

รายงานการวิจัย

โครงการสนับสนุนทุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2556

โครงการวิจัย

รหัส ร -ม 7.56

หัวข้อการวิจัย

ผลการป้องกันความเสียหายต่อเซลล์ประสาทของสารสกัดจากย่านางเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวในหนูไมซ์

Neuroprotective effect of *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels extract against transient cerebral ischemia in mice

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากย่านางว่าจะสามารถช่วยป้องกันความเสียหายของเนื้อสมองเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวได้หรือไม่
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากย่านางว่าจะสามารถช่วยป้องกันความเสียหายของเนื้อสมองจากสาเหตุของการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวได้หรือไม่

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ดร.วชิรญาณ ฐงอาสา

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

โทรศัพท์ 02-562-5555 ต่อ 3273 หรือ 087-082-0028

ทุนวิจัย

ทุนวิจัยเพื่อพัฒนานักวิจัยรุ่นใหม่ ประจำปี 2556

บทที่ 1

บทนำ

ภาวะสมองขาดเลือด (Cerebral ischemia) มีความเกี่ยวข้องกับภาวะที่ความสามารถทางด้านสติปัญญา ถดถอย (Cognitive decline) (de la Torre et al., 1992; Farkas and Luiten, 2001) ผลที่เกิดขึ้นจะขึ้นอยู่กับบริเวณของสมองที่ถูกกระทบ ความรุนแรงและระยะเวลาของการขาดเลือด สาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะเลือดไปเลี้ยงสมองลดลงหรือภาวะสมองขาดเลือด ได้แก่ โรคที่เกิดจากความผิดปกติของเม็ดเลือดแดง เช่น โรคโลหิตจางแบบซิกเกิลเซลล์ (Sickle cell anemia) ภาวะหัวใจเต้นผิดจังหวะ ภาวะหัวใจล้มเหลว การผ่าตัดหัวใจ การตีบหรือแข็งของหลอดเลือดที่นำเลือดไปเลี้ยงสมอง (Atherosclerosis, arteriosclerosis) หลอดเลือดอุดตันจากสาเหตุการถูกกดทับ (Compress) การมีลิ่มเลือด (Embolism) หรือมีแผ่นตะกอน (Plaque) กั้นขวางหรืออุดตันหลอดเลือดที่นำเลือดไปเลี้ยงสมองหรือหลอดเลือดที่อยู่ภายในสมอง ภาวะที่สมองขาดเลือดเกิดขึ้นทั่วทั้งสมอง (Global cerebral ischemia) ผลกระทบจะเกิดกับสมองบริเวณที่มีความอ่อนแอหรือเสียหายได้ง่ายก่อน (Vulnerable area) เช่น สมองส่วน Hippocampus ซึ่งเป็นสมองที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ สมองส่วน Cerebral cortex ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการรับรู้สัมผัสต่างๆ การสั่งการการเคลื่อนไหว การคิดวิเคราะห์ และสมองส่วน Basal ganglia ซึ่งทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมการเคลื่อนไหว ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับส่วนของสมองที่กล่าวมาข้างต้นจะมากหรือน้อยแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการขาดเลือด หากการขาดเลือดนั้นเกิดขึ้นอย่างเฉียบพลันและเกิดขึ้นชั่วคราวจะส่งผลต่อเซลล์สมอง คือ ในระยะแรกที่เกิดภาวะขาดเลือดทันทีจะทำให้เซลล์สมองขาดสารอินทรีย์พลังงานสูงในทันที เช่น Adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งจะส่งผลให้กระบวนการต่างๆ ระดับเซลล์ที่อาศัยพลังงานหยุดชะงักและทำให้เซลล์สมองบริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือดตายอย่างรวดเร็วโดยกระบวนการที่ เรียกว่า Excitotoxicity ซึ่งกลไกการทำลายเซลล์นั้นเกิดจากการมีสารอนุมูลอิสระถูกสร้างและหลั่งออกมามากเกินไปจนส่งผลไปทำลายองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมันที่ไม่อิ่มตัวที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Lipid peroxidation) รวมทั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่มากเกินไป เช่น เอนไซม์ Phospholipase ซึ่งทำให้เกิดการสลายขององค์ประกอบของเซลล์ที่เป็นไขมันมากขึ้น นอกจากนี้ผลจากการขาดพลังงานและการมีอนุมูลอิสระมากเกินไปยังส่งผลไปยับยั้งการสร้างโปรตีนของเซลล์ เช่น เอนไซม์ที่ทำหน้าที่กำจัดอนุมูลอิสระต่างๆ (White et al., 2000) ในระยะต่อมาเมื่อเลือดกลับมาเลี้ยงสมองบริเวณที่ขาดเลือด (Reperfusion) ในช่วงแรกระดับเลือดที่มาเลี้ยงจะต่ำกว่าปกติ (Hypoperfusion) ซึ่งในระยะนี้กระบวนการสร้างโปรตีนของเซลล์ยังคงถูกยับยั้งอย่างต่อเนื่องและมีการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ซึ่งเป็นกระบวนการทำลายตัวเองของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของ Pro-inflammatory cytokines เช่น Tumor necrosis factor (TNF)- α , Interleukin (IL)-1 β และ IL-6 ซึ่งกระตุ้นการอักเสบ (Inflammation) และส่งเสริมกระบวนการอื่นๆ ที่นำไปสู่การตายของเซลล์ที่เกิดตามมาภายหลัง (White et al., 2000; Zhu et al., 2006) จะเห็นได้ว่าการตายของเซลล์เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องแม้ว่าจะมีเลือดกลับมาเลี้ยงสมองแล้วก็ตาม ภาวะสมองขาดเลือดทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทอย่างชัดเจนซึ่งสัมพันธ์กับภาวะที่ความสามารถทางด้านสติปัญญาเสื่อมถอย

(de la Torre et al., 1992; Farkas and Luiten, 2001) ดังนั้น หากสามารถชะลอหรือยับยั้งกระบวนการต่างๆ ที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สมองหลังจากการขาดเลือดได้ก็น่าจะเป็นการช่วยชะลอหรือยับยั้งไม่ให้อาการของความเสื่อมทางด้านสติปัญญาเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกัน

การพัฒนาการรักษาโรคทางสมองมักจะมุ่งเน้นไปในทางการป้องกันหรือชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาทและการทำงานของเซลล์ประสาทสมอง สารสังเคราะห์ต่างๆ ที่ใช้ในปัจจุบันมักจะพบผลข้างเคียงไม่มากนักน้อย หรือยาที่ใช้รักษาโดยเฉพาะกับโรคที่เกิดจากสมองขาดเลือดมักจะต้องใช้ในรูปแบบของการใช้ยาหลายตัวร่วมกัน (Multi-drug therapy) เนื่องจากกลไกพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นหลังภาวะสมองขาดเลือดที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทยังมีหลายกลไกด้วยกัน ดังที่ได้กล่าวไปแล้วในเบื้องต้น ปัจจุบันมีการให้ความสนใจเป็นอย่างมากต่อสารที่ได้จากธรรมชาติ สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายตัวที่มีการศึกษาแล้วพบว่า เป็นประโยชน์ต่อการทำงานของสมอง เช่น สารสกัดจากใบแป๊ะก๊วย โสม ใบบัวบก และพรมมิ คุณสมบัติหลายประการที่มีผลด้านความเสื่อมของเซลล์ประสาทที่ทำให้พืชสมุนไพรเหล่านี้มีความน่าสนใจ เช่นฤทธิ์การต้านสารอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) ฤทธิ์การต้านภาวะการอักเสบ (Anti-inflammation) ฤทธิ์การต้านการทำงานของเอนไซม์ที่ย่อยสลายสารสื่อประสาท Acetylcholine (ACh) เช่น Acetylcholine esterase (AChE) inhibitor โดยสารสื่อประสาทดังกล่าวมีความสำคัญในเรื่องความสามารถทางด้านสติปัญญาและสามารถเห็นได้ชัดเจนในผู้ป่วยโรคสมองเสื่อม เช่น Alzheimer's disease (AD) ซึ่งพบว่ามีความเกี่ยวข้องกันระหว่างความสามารถทางด้านสติปัญญาที่ถดถอยกับระบบของสารสื่อประสาท ACh ที่เสื่อมลง (Auld et al., 2002; Jope et al., 1997; Pinto et al., ; Van Beek and Claassen) ผักพื้นบ้านและเป็นพืชสมุนไพรที่ผู้วิจัยสนใจในโครงการวิจัยนี้ คือ ย่านาง หรือ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels ซึ่งตำรายาสมุนไพรไทยใช้พืชดังกล่าวในการถอนพิษไข้และพิษชนิดต่างๆ รวมทั้งใช้มาลาเรีย คุณสมบัติที่น่าสนใจของย่านางที่ผู้วิจัยสนใจและน่าจะเป็นประโยชน์กับงานวิจัยครั้งนี้ ได้แก่ ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์การต้านการอักเสบ และฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ AChE (Anjaneyulu et al., 1969; Ingkaninan et al., 2003; Nanasombat and Teckchuen, 2009; Saiin and Markmee, 2003; Sureram et al.) ซึ่งทำให้สารสกัดจากย่านางมีความน่าสนใจและอาจนำมาใช้ในการยับยั้งหรือชะลอการตายของเซลล์ประสาทสมองหลังเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวได้ สำหรับสารสำคัญที่พบในย่านาง เช่น สาร Bisbenzylisoquinoline alkaloids (Tiliacorinine, Tiliacorine, Nortiliacorinine) สารกลุ่ม Polyphenols เช่น p-hydroxybenzoic acid, Minecoside, flavones glycoside cinnamic acids derivative, Monoepoxy-beta-carotene และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมและธาตุเหล็ก (Boonsong et al., 2009; Singthong et al., 2009)

ด้วยคุณสมบัติดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นจึงทำให้ย่านางมีความน่าสนใจอย่างยิ่งที่จะนำมาทำการวิจัยถึงผลที่อาจจะช่วยป้องกันหรือยับยั้งไม่ให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทสมองเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราว และอาจมีส่วนช่วยลดการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระที่เป็นสาเหตุหนึ่งของการตายของเซลล์สมองเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดอีกด้วย

บทที่ 2

เอกสารอ้างอิงและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวะสมองขาดเลือดเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดความเสื่อมถอยของสติปัญญา รวมทั้งความผิดปกติของการเคลื่อนไหวซึ่งส่งผลกระทบต่อชีวิตประจำวันของผู้ป่วยเองและคนรอบข้าง ภาวะสมองขาดเลือดแบบเฉียบพลันและเกิดขึ้นชั่วขณะมักจะส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ประสาทสมองและทำให้เกิดการตายของเซลล์ในทันที และส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อความสามารถของสมองทางด้านใดนั้นจะขึ้นอยู่กับสมองบริเวณที่ได้รับผลกระทบ ภาวะสมองขาดเลือดที่เกิดขึ้นทั่วทั้งสมองเช่นที่เกิดขึ้นในผู้ป่วยหัวใจล้มเหลวหรือการตีบของหลอดเลือดหลักที่ลำคอ เช่น หลอดเลือดแดง Common carotid ทำให้เกิดการตายของเซลล์สมองบริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือดก่อน เช่น สมองส่วน Hippocampus, Cerebral cortex และ Basal ganglia กลไกที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์สมองเมื่อสมองขาดเลือดเกิดจากการที่สารอนุมูลอิสระถูกสร้างขึ้นอย่างมาก โดยหลักแล้วสารอนุมูลอิสระที่ถูกสร้างขึ้นมี 2 ประเภท คือ สารอนุมูลอิสระที่เป็นออกซิเจน (Reactive oxygen species; ROSs) และสารอนุมูลอิสระที่เป็นไนโตรเจน (Nitrogen species; RNSs) สาร ROSs ได้แก่ Hydrogen peroxide (H_2O_2), Hydroxyl radical, Singlet oxygen สาร RNSs ได้แก่ Nitric oxide (NO) และ Peroxynitrite (ONOO⁻) (Ozerol et al., 2009) สารอนุมูลอิสระเหล่านี้จะทำลายเยื่อหุ้มเซลล์โดยตรงโดยกระบวนการ Lipid peroxidation และเกิดการยับยั้งการสร้างโปรตีนของเซลล์ประสาทในบริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือด เช่น โปรตีนที่เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการต้านสารอนุมูลอิสระและ Growth factors ต่างๆ ที่เป็นโปรตีนสัญญาณสำคัญที่กระตุ้นให้เซลล์อยู่รอด นอกจากนี้ยังพบว่ามี การเพิ่มขึ้นของ Pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α , IL-1 β และ IL-6 ในช่วงที่มีเลือดกลับมาเลี้ยงสมองอีกครั้งหลังจากการขาดเลือดด้วย (White et al., 2000; Zhu et al., 2006) ในช่วงแรกๆ ที่มีเลือดกลับมาเลี้ยงสมองในระดับที่ต่ำกว่าปกติอยู่ชั่วขณะนั้นจะมีการกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์แบบ Apoptosis โดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นระดับแคลเซียมภายในเซลล์ที่เพิ่มขึ้นและการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์กลุ่ม Proteolysis และ Endoneucleases เมื่อรวมผลของกลไกต่างๆ ที่ถูกกระตุ้นหรือยับยั้งขณะที่สมองขาดเลือดและเมื่อขณะที่มีเลือดกลับมาเลี้ยงสมองแล้วนั้นจะส่งผลทำให้เซลล์สมองบริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือดไม่สามารถที่จะตอบสนองต่อภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นได้และไม่สามารถยับยั้งกระบวนการสลายโปรตีนของเซลล์ได้ ซึ่งจะส่งผลทำให้ประสิทธิภาพการทำงานของเซลล์ประสาทค่อยๆ เสื่อมลงและเกิดการตายของเซลล์ประสาทในที่สุด การตายของเซลล์สมองจะส่งผลต่อการสูญเสียความสามารถของร่างกายทางด้านใดนั้นก็ขึ้นอยู่กับสมองบริเวณที่ถูกกระทบ เช่น ถ้าเกิดการตายของเซลล์สมองบริเวณ Hippocampus จำนวนมากจะทำให้เกิดการสูญเสียความสามารถทางด้านสติปัญญา เช่น ความสามารถในการเรียนรู้และความสามารถในการจดจำ (Broadbent et al., 2004; Burgess et al., 2002; Scoville and Milner, 2000)

การพัฒนาการรักษาโรคทางสมองมักจะมุ่งเน้นไปในทางการป้องกันหรือชะลอความเสื่อมของเซลล์สมองหลังเกิดภาวะสมองขาดเลือดหากแต่ไม่สามารถที่จะใช้ยาเพียงตัวใดตัวหนึ่งมายับยั้งการตายของเซลล์ได้

เนื่องด้วยกลไกที่ถูกกระตุ้นและส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์สมองนั้นมีมากกว่าหนึ่งกลไก การใช้ยาที่เป็นสารสังเคราะห์ในปัจจุบันก็ไม่สามารถออกฤทธิ์ครอบคลุมได้หมดรวมทั้งผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นและจำเป็นต้องใช้การรักษาโดยวิธีใช้ยาหลายตัวร่วมกัน ซึ่งผลของยานั้นต้องครอบคลุมในหลายส่วน เช่น การรักษาระดับ Growth factors ให้เพียงพอที่จะกระตุ้นให้เซลล์อยู่รอดได้ การยับยั้งสารที่จะไปยับยั้งกระบวนการสร้างโปรตีนต่างๆ การยับยั้งการเพิ่มปริมาณสารอนุมูลอิสระและการยับยั้งไม่ให้สารอนุมูลอิสระไปทำลายเซลล์ การยับยั้งภาวะการอักเสบและการยับยั้งเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการตายของเซลล์ (Mehta et al., 2007; White et al., 2000) งานวิจัยในปัจจุบันที่มุ่งเน้นหาการรักษาให้ความสนใจในสารจากธรรมชาติมากขึ้น สารสกัดจากพืชสมุนไพรหลายชนิดที่มีฤทธิ์ในการเสริมการทำงานของเซลล์สมอง ตัวอย่าง เช่น โสม แป๊ะก๊วย บัวบกและพรมมิ ที่ถูกนำมาใช้กันอย่างแพร่หลาย สำหรับงานวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยให้ความสนใจพืชสมุนไพรไทย คือ ย่านาง หรือ *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels ซึ่งเป็นพืชที่อยู่ในวงศ์ Menispermaceae ลักษณะเป็นเถาไม้เลื้อยขนาดเล็ก ใบรูปรีสีเขียวเข้ม เถาและใบย่านางนำมาใช้ประกอบอาหารได้หลายชนิด นอกจากนี้ยังสามารถใช้ย่านางเป็นยาถอนพิษไข้ได้เกือบทุกชนิดและสารสกัดจากย่านางยังสามารถนำมาต้านเชื้อมาลาเรียและเชื้อแบคทีเรียได้อีกด้วย (Nanasombat and Teckchuen, 2009; Saiin and Markmee, 2003; Sureram et al.) ย่านางมีคุณสมบัติที่สำคัญหลายประการและน่าสนใจที่จะนำมาใช้ในการชะลอการตายของเซลล์ประสาทเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือด คุณสมบัติดังกล่าว เช่น ฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต้านภาวะการอักเสบและฤทธิ์การต้านการทำงานของเอนไซม์ AChE ซึ่งนอกจากจะชะลอการตายของเซลล์ได้แล้วยังอาจช่วยส่งเสริมความสามารถทางด้านสติปัญญาได้อีกด้วย (Ingkaninan et al., 2003; Nanasombat and Teckchuen, 2009; Phadungkit et al., 2012) สารสำคัญที่เป็นองค์ประกอบในย่านาง ได้แก่ Triterpenes, Flavonoids, Saponins, Tannins (Phadungkit et al., 2012) นอกจากนี้ยังมีสาร Alkaloids โดยเฉพาะสารกลุ่ม Bisbenzylisoquinoline alkaloids เช่น Tiliacorinine, Tiliacorine และ Nortiliacorinine สารกลุ่ม Polyphenols เช่น p-hydroxybenzoic acid, Minecoside, Flavones glycoside cinnamic acids derivative, Monoepoxy-beta-carotene และแร่ธาตุ เช่น แคลเซียมและธาตุเหล็ก (Boonsong et al., 2009; Saiin and Markmee, 2003; Singthong et al., 2009) การทดลองเพื่อหาขนาดความเป็นพิษของสารสกัดจากย่านางพบว่าสามารถให้โดยการกินได้อย่างต่อเนื่องถึง 90 วันในปริมาณถึง 1,200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวโดยไม่เกิดผลข้างเคียงหรือมีความเป็นพิษแต่อย่างใด นอกจากนี้ยังพบว่าการให้ย่านางสกัดครั้งเดียวในปริมาณ 5,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมก็ไม่ทำให้เกิดพิษเช่นเดียวกัน (Sireeratawong et al., 2008) ดังนั้น การวิจัยในครั้งนี้จึงมุ่งเน้นที่จะศึกษาผลที่เป็นประโยชน์จากผักพื้นบ้านที่เป็นพืชสมุนไพร โดยเฉพาะผลในการป้องกันการตายของเซลล์สมอง เพื่อใช้เป็นข้อมูลและแนวทางในการอนุรักษ์ การพัฒนาและการส่งเสริมการใช้สมุนไพรไทยและการต่อยอดการใช้สารสกัดจากสมุนไพรไทยเพื่อเป็นอาหารเสริมสำหรับป้องกันความเสื่อมของเซลล์สมองหรือการวิจัยค้นคว้าหาตัวยาสำคัญในการใช้ป้องกันหรือรักษาโรคสมองเสื่อมต่อไป

การวิจัยในครั้งนี้เป็นการทดสอบผลการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท และการป้องกันการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระที่นำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทเมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราว ซึ่งใช้สาร

สกัดจากย่านางลักษณะสารสกัดหยาบ ทั้งนี้เพื่อให้สอดคล้องกับการบริโภคพืชสมุนไพรที่เป็นผักพื้นบ้านของ
ประชากรโดยทั่วไป และง่ายต่อการรณรงค์หรือส่งเสริมการบริโภค อย่างไรก็ตามโครงการวิจัยนี้ถือเป็น
โครงการวิจัยนำร่องที่จะนำไปสู่การศึกษาขั้นต่อไปที่มีเป้าหมายที่จะหาสารออกฤทธิ์ที่บริสุทธิ์จากย่านาง เพื่อ
การวิจัยต่อยอดหรือการพัฒนาตัวยาต่อไปด้วย สารกลุ่มที่คณะผู้วิจัยสนใจในขั้นตอนนี้เป็นสารในกลุ่มที่มี
คุณสมบัติการต้านสารอนุมูลอิสระ เช่น สารในกลุ่ม Polyphenols และ Flavonoids รวมทั้งสารในกลุ่มอื่นๆ ที่
น่าสนใจซึ่งคณะผู้วิจัยได้วางแผนจะทำการศึกษาในส่วนของโครงการวิจัยที่มีอย่างต่อเนื่องต่อไป

บทที่ 3

วิธีวิจัย

1. สัตว์ทดลอง

หนูไมซ์ (*Mus musculus*) สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 12 สัปดาห์ น้ำหนัก 30 – 50 กรัม จำนวนทั้งหมด 40 ตัว เลี้ยงในห้องควบคุมอุณหภูมิ (22 ± 2 องศาเซลเซียส) และความชื้น (55 ± 5 %) สัตว์ทดลองได้รับอาหารเม็ดมาตรฐานและน้ำที่ผ่านการกรองตามความต้องการ จะงดให้อาหารสัตว์ทดลองเฉพาะก่อนทำการผ่าตัด สำหรับสัตว์ทดลองทั้งหมดสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล (National Laboratory Animal Center, Mahidol University) จังหวัดนครปฐม วิธีดำเนินการวิจัยรวมทั้งการเลี้ยงและใช้สัตว์ทดลองได้ผ่านการอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ฯ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (ID # ACKU 02756)

2. พืชทดลอง

2.1 การสกัดสารจากใบย่านาง

ใบย่านางแห้งบดเป็นผงละเอียดถูกนำมาสกัดโดยผสมกับ 95% Ethanol (EtOH) ต้มที่อุณหภูมิ 60-80 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 28 ชั่วโมงโดยใช้ซอกซ์เลต (Soxhlet extractor) หลังจากนั้นทำการกรองสารสกัดที่ได้แล้วกำจัด EtOH โดยการนำไประเหยและทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้นโดยใช้ Rotary vacuum (BUCHI) สารสกัดที่ได้จะถูกเก็บในขวดบรรจุที่มีฝาปิดสนิท โดยจะเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ สำหรับสารสกัดที่จะใช้ป้อนสัตว์ทดลองจะถูกละลายด้วย 10 % Tween 80 ในปริมาณ 300 mg/ml เตรียมไว้ก่อนนำไปใช้

2.2 การตรวจวัดระดับสาร Polyphenols เบื้องต้นในสารสกัดจากใบย่านาง

นำสารสกัดจากใบย่านางปริมาตร 20 ไมโครลิตร ผสมกับน้ำกลั่นปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร และสาร Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 100 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันและบ่มเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นเติม 20% Sodium carbonate solution เขย่าให้เข้ากัน บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 765 นาโนเมตร โดยจะทำทั้งหมด 3 ซ้ำ การคำนวณหาระดับสาร Polyphenols จะทำโดยการเทียบกับกราฟมาตรฐานของ Gallic acid ที่เตรียมจากความเข้มข้น 0, 2.5, 5.0, 7.5, 10, 20 และ 30 mg/ml โดยระดับสารประกอบ Polyphenols ที่ได้จะเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Gallic acid ต่อกรัมของย่านาง (mg GAE/gm.)

2.3 การตรวจวัดระดับสาร Flavonoids เบื้องต้นในสารสกัดจากไບย่านาง

นำสารสกัดจากไບย่านางปริมาตร 0.5 มิลลิลิตร (100 mg/ml ใน 95% EtOH) ผสมด้วย 95% EtOH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร 10% Aluminum chloride ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร 1M Potassium acetate ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร และน้ำกลั่นปริมาตร 2.8 มิลลิลิตร บ่มส่วนผสมที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 415 นาโนเมตร (Chang et al., 2002) ระดับสารประกอบ Flavonoid จะทำการคำนวณจากกราฟมาตรฐานที่เตรียมโดยใช้สาร Quercetin ความเข้มข้น 0, 25, 50 และ 100 mg/ml โดยระดับสารประกอบ Flavonoid ที่ได้จะเป็นค่ามิลลิกรัมสมมูลของ Quercetin ต่อกรัมของย่านาง (mg QE/gm.)

3. การแบ่งกลุ่มการทดลอง

แบ่งหนูไมซ์ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว ให้สารทดสอบแก่หนูไมซ์โดยใช้ไซริงค์และเข็มป้อนผ่านทางปากวันละครั้งติดต่อกันเป็นเวลาทั้งหมด 15 วัน หลังจากนั้นทำการผ่าตัดเพื่อผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างแบบชั่วคราว โดยรายละเอียดของแต่ละกลุ่มทดลองมี ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Sham ได้รับสาร 10 % Tween 80 เพียงอย่างเดียว และทำการผ่าตัดโดยไม่ได้ผูกหลอดเลือดแดง Common carotid (Sham + 10% Tween 80)

กลุ่มที่ 2 BCCAO ได้รับสาร 10 % Tween 80 เพียงอย่างเดียว และทำการผ่าตัดผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างแบบชั่วคราว (BCCAO + 10% Tween 80)

กลุ่มที่ 3 BCCAO ได้รับสารสกัดย่านางปริมาณ 300 mg/kg ละลายใน 10 % Tween 80 และทำการผ่าตัดผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างแบบชั่วคราว (BCCAO + *T.triandra* 300 mg/kg)

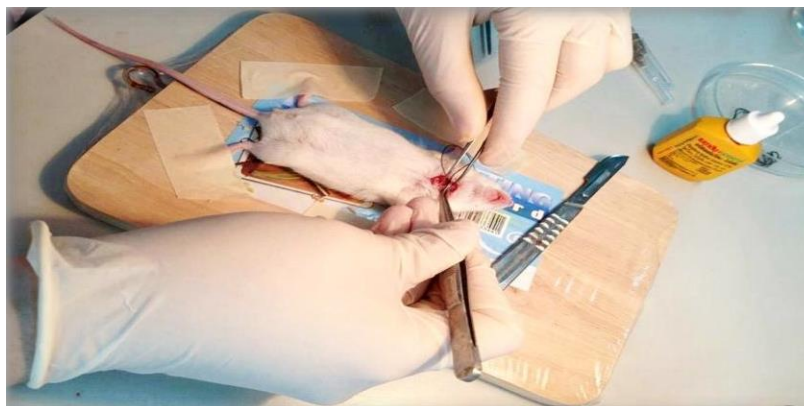
กลุ่มที่ 4 BCCAO ได้รับสารสกัดย่านางปริมาณ 600 mg/kg ละลายใน 10 % Tween 80 และทำการผ่าตัดผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างแบบชั่วคราว (BCCAO + *T.triandra* 600 mg/kg)

กลุ่มที่ 5 BCCAO ได้รับสาร Quercetin ปริมาณ 10 mg/kg ละลายใน 10 % Tween 80 และทำการผ่าตัดผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างแบบชั่วคราว (BCCAO + Quercetin 10 mg/kg)

กลุ่ม BCCAO หลังจากการผ่าตัดผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาที ทำการปล่อยให้เลือดไหลกลับมาเลี้ยงสมองตามปกติ (Reperfusion) เป็นเวลา 45 นาที ก่อนที่จะทำการผ่าตัดตัวทดลองเพื่อนำสมองไปทำการศึกษาต่อไป

4. วิธีการผ่าตัด

หนูไม่ซุกทำให้สลบโดยการฉีด โซเดียม Sodium pentobarbital ปริมาณ 45 mg/kg และ Atropine sulfate ปริมาณ 0.05 มิลลิลิตร (0.60 mg/ml) เข้าที่บริเวณช่องท้อง (Intraperitoneal) เมื่อหนูไม่ซุกจะเริ่มทำการผ่าตัด โดยใช้มีดผ่าตัดผ่าเปิดบริเวณกลางลำคอ เพื่อหาหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติดทั้งสองข้าง และทำการผูกหลอดเลือดทั้งสองไว้เป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นปล่อยให้เลือดไหลตามปกติเป็นเวลา 45 นาที (M et al., 2009; Y et al., 1989)



ภาพที่ 3.1 การผ่าตัดผูกหลอดเลือดแดง Common carotid

5. การหาขนาดพื้นที่ของเนื้อเยื่อสมองที่เสียหาย (Infarction area) หลังเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราว

ทำการฆ่าสัตว์ทดลองโดยวิธีตัดหัว (Decapitation) อย่างรวดเร็วและนำสมองออกมาล้างอย่างรวดเร็วในน้ำเกลือเย็น (0.9 % Normal saline solution; NSS) และตัดแบ่งสมองตามแนวขวางโดยแต่ละชั้นให้มีความหนา 2 มิลลิเมตร และนำไปย้อมใน 2 % 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที แล้วเก็บชิ้นสมองไว้ในสารละลาย Neutral buffered formalin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการถ่ายภาพชิ้นสมองและตรวจสอบพื้นที่ของเนื้อเยื่อสมองที่เสียหายโดยใช้โปรแกรม UTHSCSA Image Tool 3.0

6. การวัดระดับ Lipid peroxidation (Malondialdehyde; MDA)

สัตว์ทดลองจะถูกฆ่าโดยการตัดคออย่างรวดเร็วและทำการผ่าเปิดกะโหลกเพื่อเก็บสมอง ทำการล้างสมองใน 0.9 % NSS ที่เย็นและเก็บรักษาโดยแช่ในน้ำแข็ง หลังจากนั้นทำการชั่งน้ำหนักและบด (Homogenized) ด้วยส่วนผสม 10% w/v ใน Phosphate buffer (0.05 M, pH 7.4) หลังจากนั้นนำ Homogenate ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตรผสมกับ 4% Sodium dodecyl sulphate 0.2 มิลลิลิตรและเติม 20% Acetic acid 1.5 มิลลิลิตรและ 0.5% Thiobarbituric acid 1.5 มิลลิลิตร ต้มส่วนผสมที่กล่าวมาที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสใน Water bath เป็นเวลา 60 นาทีจนได้สีชมพู หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 3,500 rpm เป็นเวลา 10 นาทีแล้วนำ Supernatant ไป

อ่านค่าการดูดกลืนแสงในช่วงคลื่น 532 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะแสดงออกมาเป็นความเข้มข้นของ MDA ในหน่วย $\mu\text{moles/mg of protein}$

7. การวัดระดับเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD)

นำ Supernatant ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตรผสมกับ EDTA ปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร (1×10^{-4} M) Carbonate buffer (pH 7.9) ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรและ Epinephrine (3×10^{-3} M) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการอ่านค่า Optical density ของ Adrenochrome ที่ 480 นาโนเมตรเป็นเวลา 3 นาทีโดยห่างกันช่วงละ 30 วินาที ค่ากิจกรรมของ เอนไซม์ (Enzyme activity) จะแสดงออกมาในหน่วย U/min/mg of protein โดยหนึ่งหน่วยของการทำงานของ เอนไซม์จะเทียบเป็นความเข้มข้นที่ใช้ในการยับยั้งการเกิด Chromogen ได้ 50% ในหนึ่งนาทีโดยการเทียบจาก กราฟมาตรฐานของ SOD ความเข้มข้น 0, 0.0058, 0.0294, 0.117 และ 0.294 $\mu\text{g/ml}$ (โดยค่า Enzyme activity ของ SOD ที่นำมาเตรียมค่ามาตรฐานมีค่าเท่ากับ 6150 U/mg, Merck, Germany)

8. การวัดระดับเอนไซม์ Catalase (CAT)

นำ Supernatant ปริมาตร 50 ไมโครลิตรผสมกับ 50 mM phosphate buffer, pH 7 ที่มี 10 mM H_2O_2 และ ทำการปรับปริมาตรให้เป็น 3 มิลลิลิตร อ่านค่าการลดลงของค่าการดูดกลืนแสงที่ 240 นาโนเมตรเป็นเวลา 3 นาทีโดยแต่ละช่วงห่างกัน 30 วินาที ทำการคำนวณโดยใช้ Extinction co-efficient ของ H_2O_2 0.041/ $\mu\text{moles/cm}^2$ ผลที่ได้จะออกมาเป็น μmoles ของ H_2O_2 utilized/min/mg of protein (U/mg of protein)

9. การวัดระดับเอนไซม์ Reduced Glutathione (GSH)

นำ Homogenate ปริมาตร 1 มิลลิลิตรผสมด้วย 10% TCA ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ทำการเหวี่ยงและนำ Supernatant ปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรมาเติมด้วย 5, 5' - dithios (2- nitro benzoic acid; DTNB) ปริมาตร 2 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรให้ได้ 3 มิลลิลิตร โดยการเติม Phosphate buffer ทำการอ่านค่าสีที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร ทำ การเตรียมกราฟมาตรฐาน โดยใช้ Glutathione (Merck, Germany) ความเข้มข้น 0, 0.065, 0.163, 0.326, 0.490 และ 0.653 mM ค่าที่ได้แสดงผลออกมาเป็น mmoles ของ GSH/mg of protein

10. การวัดระดับ Calcium

ทำการติดฉลากหลอดทดลอง 3 หลอดให้เป็น Blank, standard และ Test ทำการเตรียมตัวอย่าง ผสมและ บ่มไว้ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที ทำการอ่านค่าการดูดกลืนแสงของมาตรฐานและตัวอย่าง ทดสอบที่ 490 นาโนเมตร ต่อค่า Blank ภายใน 10 นาที ค่าที่แสดงออกมาเป็น mEq/L (Spare, 1964)

เตรียม Stock standard calcium โดยละลาย CaCO_3 บริสุทธิ์น้ำหนัก 2.497 กรัมใน HCl เข้มข้นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 1 ลิตร จะได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1 mg/ml นำ Stock standard

calcium ผสมกับน้ำกลั่นในอัตรา 1 ส่วนในน้ำกลั่น 9 ส่วน จะได้ Working standard calcium ความเข้มข้นเท่ากับ 0.1 mg/ml

เตรียม Stock color reagent โดยละลาย Murexide (Merck, Germany) น้ำหนัก 40 mg ในน้ำกลั่นปริมาตร 5 มิลลิลิตร แล้วผสมด้วย Propylene glycol ให้ได้ปริมาตร 500 มิลลิลิตร ในทันที นำ Stock color reagent ปริมาตร 50 มิลลิลิตร ผสมกับ 3.75 N NaOH ปริมาตร 1.5 มิลลิลิตร จะได้ Working color reagent

ตารางที่ 3.1 วิธีการตรวจวัดระดับ Calcium

Reagents	Test	Standard	Blank
	ml		
น้ำกลั่น	2.5	2.5	2.55
Sample	0.05	-	-
Working standard calcium	-	0.05	-
Working color reagent	1.5	1.5	1.5

11. Total protein level

นำ Supernatant ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับ Solution D ปริมาตร 2 มิลลิลิตร (2% w/v Na_2CO_3 in 0.1N NaOH; 0.5% w/v $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ในน้ำกลั่น: 1% w/v $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O} = 48:1:1$) บ่มส่วนผสมเป็นเวลา 10 นาที แล้วเติม 1N Folin-Ciocalteu Reagent (1:1) ปริมาตร 0.2 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้ 30 นาที นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 นาโนเมตร ทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนโดยเทียบจากกราฟมาตรฐานที่ได้จาก Bovine serum albumin (BSA) ความเข้มข้น 0, 0.083, 0.153, 0.214 และ 0.266 mg/ml ตามลำดับ (Lowry et al., 1951)

12. Histological analysis

การศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับเซลล์ประสาทสมองโดยการย้อมด้วย 0.1% Luxol fast blue และ 0.1% Cresyl violet นำสมองที่คงสภาพไว้ใน 10 % Neutral buffer formalin มาผ่านขั้นตอนการฝังชิ้นเนื้อลงในพาราฟินและนำไปตัดโดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้อ Freezing microtome ความหนา 5 ไมโครเมตร โดยทำการเก็บชิ้นเนื้อสมองตั้งแต่มุม Bregma - 1.98 เป็นต้นไปซึ่งเป็นตำแหน่งที่พบสมองส่วน Dorsal hippocampus (Paxinos and Franklin, 2008) ทำการคัดเลือกสไลด์กระจกทั้งหมด 3 แผ่นจากหนูแต่ละตัวโดยสไลด์กระจกแต่ละแผ่นมีชิ้นเนื้อสมองที่ระยะการเก็บห่างกันไม่ต่ำกว่า 125 ไมโครเมตร นำสไลด์กระจกทั้งหมดไปย้อมสีโดยมี

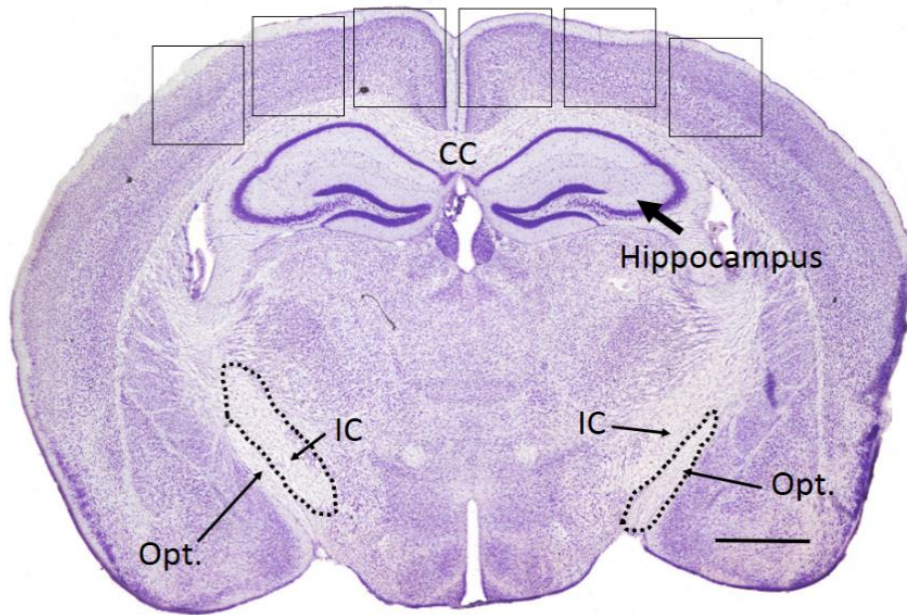
ขั้นตอน ดังนี้ ทำการอบสไลด์กระจกข้ามคืนใน Hot air oven อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส หลังจากนั้นนำสไลด์กระจกจุ่มในสารละลายดังนี้ Xylene, 100% EtOH, 95%EtOH, 0.1% Luxol fast blue (ละลายใน 95%EtOH) นำถาดย้อมที่มีกระจกสไลด์แช่อยู่ใน 0.1% Luxol fast blue นี้ไปอบเป็นเวลา 1 คืนใน Hot air oven อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการล้างสีส่วนเกินใน 95% EtOH ตามด้วยน้ำกลั่นและจุ่มใน 0.05% Lithium carbonate เป็นเวลา 30 วินาที ตามด้วยน้ำกลั่นและย้อมต่อด้วย 0.1% Cresyl violet ประมาณ 30 – 40 วินาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น และจุ่มใน 95% EtOH, 100% EtOH, Xylene และปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ตามลำดับ

เซลล์ประสาทจะถูกนับแยกเซลล์มีชีวิต (Viable cell) และเซลล์ตาย (Dead cell) ในบริเวณสมองที่สนใจ ได้แก่ สมองส่วน Cerebral cortex, Cerebellum บริเวณชั้นเซลล์ Purkinje (PC) บริเวณย่อยของสมองส่วน Dorsal hippocampus ได้แก่ Cornus ammonis(CA) 1, 3 และ Dentate gyrus (DG) โดยทำการถ่ายภาพบริเวณที่สนใจในส่วนของ Cerebral cortex (ภาพที่ 3.2) ที่กำลังขยาย 100 เท่า (Olympus Tg300) จำนวนทั้งหมด 6 ภาพ (Left hemisphere 3 ภาพ และ Right hemisphere 3 ภาพ) แต่ละภาพมีขนาด 886.26x668.01 ไมโครเมตร การนับจำนวนเซลล์จะนับในทุกชั้นของสมองส่วน Cerebral cortex ขนาดตั้งแต่ 5-30 ไมโครเมตร (นับทั้ง Granular และ Pyramidal cell) โดยแยกเป็นเซลล์ที่มีชีวิตที่ส่วนของ Cytoplasm คติสีม่วงจางและสังเกตเห็น Nucleolus ได้ชัดเจน ส่วนเซลล์ตายจะมีลักษณะเซลล์เหี่ยวลีบ คติสีม่วงทึบ ไม่เห็น Nucleolus และมีช่องว่างเกิดขึ้นรอบๆ เซลล์ โดยการนับเซลล์จะใช้โปรแกรม UTHSCSA Image Tool 3.0

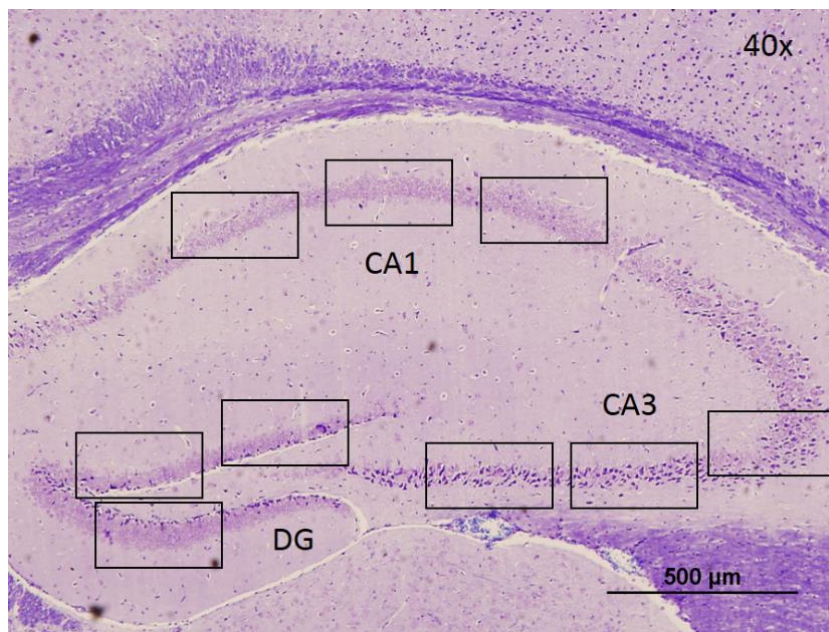
สมองส่วน Hippocampus ในแต่ละบริเวณย่อย เช่น CA1, CA3 และ DG จะทำการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 400 เท่า บริเวณละ 6 ภาพ (Left hemisphere 3 ภาพ และ Right hemisphere 3 ภาพ) แต่ละภาพมีขนาด 166.67x166.34 ไมโครเมตร โดยจะนับเซลล์ขนาด 15 – 35 ไมโครเมตรในสมองบริเวณ CA1 และ CA3 และขนาด 9 – 25 ไมโครเมตรในสมองบริเวณ DG โดยแยกเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายเช่นเดียวกับสมองส่วน Cerebral cortex (ภาพที่ 3.2 และ 3.3)

สมองบริเวณ Cerebellum จะทำการนับเซลล์เฉพาะชั้นเซลล์ Purkinje โดยทำการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 400 เท่า ทั้งหมด 6 ภาพ แต่ละภาพมีขนาด 166.67x166.34 ไมโครเมตร โดยแยกเป็นเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตายเช่นเดียวกับสมองส่วน Cerebral cortex และ Hippocampus (ภาพที่ 3.4)

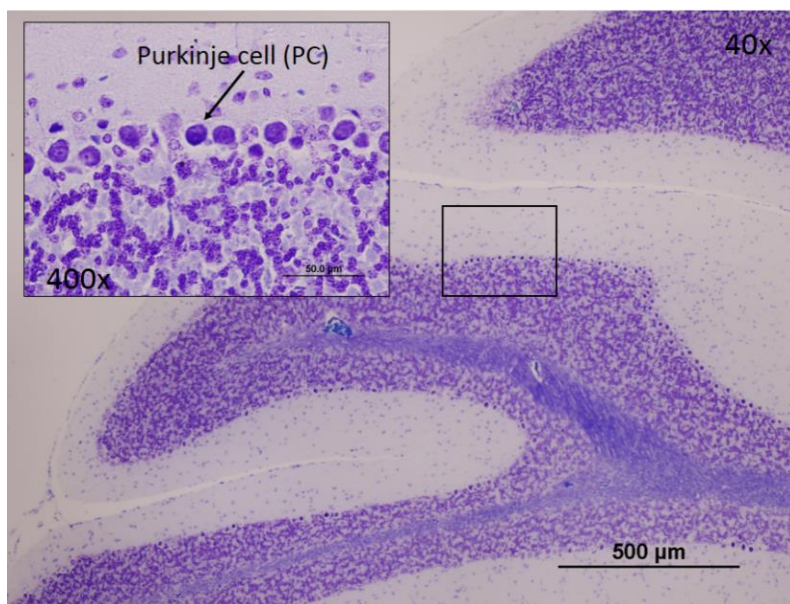
สำหรับใยประสาทสมอง (White matter) บริเวณที่สนใจได้แก่ Corpus callosum (CC), Internal capsule (IC) และ Optic tract (Opt.) (ภาพที่ 3.2) โดยวัดค่าออกมาเป็นความหนาแน่นของใยประสาท (% area) จากการถ่ายภาพที่กำลังขยาย 400 เท่า ใช้ทั้งหมดบริเวณละ 6 ภาพ (Left hemisphere 3 ภาพ และ Right hemisphere 3 ภาพ) โดยความหนาแน่นหาได้โดยการใช้โปรแกรม NIH Image Analysis (Image J) (Farkas et al., 2004; Wakita et al., 2002)



ภาพที่ 3.2 ภาพแสดงตำแหน่งของสมองและใยประสาทบริเวณที่สนใจศึกษา ได้แก่ Cerebral cortex, Hippocampus, Corpus callosum (CC), Internal capsule (IC) และ Optic tract (Opt.) เส้นขีดขาวที่มุมล่างขวาของภาพแสดงความยาว 1 มิลลิเมตร



ภาพที่ 3.3 ภาพแสดงตำแหน่งของสมองส่วน Dorsal hippocampus บริเวณย่อยที่สนใจศึกษา ได้แก่ CA1, CA3 และ DG



ภาพที่ 3.4 ภาพแสดงตำแหน่งของสมองบริเวณ Cerebellum บริเวณชั้นเซลล์ Purkinje (PC)

13. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าน้ำหนักตัวและน้ำหนักแต่ละอวัยวะ, Infarction area, CAT, GSH, SOD, MDA, Calcium, Total protein, Viable cell, Dead cell และค่าร้อยละของเซลล์ตายต่อพื้นที่ (% dead) จะนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างโดยใช้สถิติ One-way Analysis of variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Fisher's PLSD post hoc test โดยยอมรับความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับ p-value น้อยกว่า 0.05

สำหรับค่าแสดงพยาธิสภาพของเซลล์สมองและใยประสาทของบริเวณที่สนใจจะทำการเปรียบเทียบโดยแยกเป็น Left hemisphere และ Right hemisphere โดยใช้ค่าเฉลี่ยจาก 3 สไลด์ในหนูแต่ละตัว ถ้าเปรียบเทียบระหว่าง Hemisphere แล้วไม่แตกต่างกันจะทำการเปรียบเทียบต่อไปโดยใช้ค่าเฉลี่ยจากสมองทั้งสอง Hemisphere โดยเปรียบเทียบทั้งค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ตายต่อพื้นที่ที่ทำการนับเซลล์ และเปรียบเทียบเป็นร้อยละของเซลล์ตายโดยใช้สูตรคำนวณ คือ $\% \text{ dead} = \left(\frac{\text{dead cell}}{\text{dead cell} + \text{viable cell}} \right) \times 100$ โดยข้อมูลที่ทำกรวิเคราะห์แล้วจะแสดงออกมาเป็นค่า Mean \pm Standard error of mean (SEM)

14. สถานที่ทำการทดลอง

ห้องวิจัยสัตว์ทดลอง 114/2 ห้องปฏิบัติการกลาง 306 และห้องปฏิบัติการสรีรวิทยา 304 ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

15. ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

เดือนกันยายน พ.ศ. 2556 – เดือนสิงหาคม พ.ศ. 2557

บทที่ 4

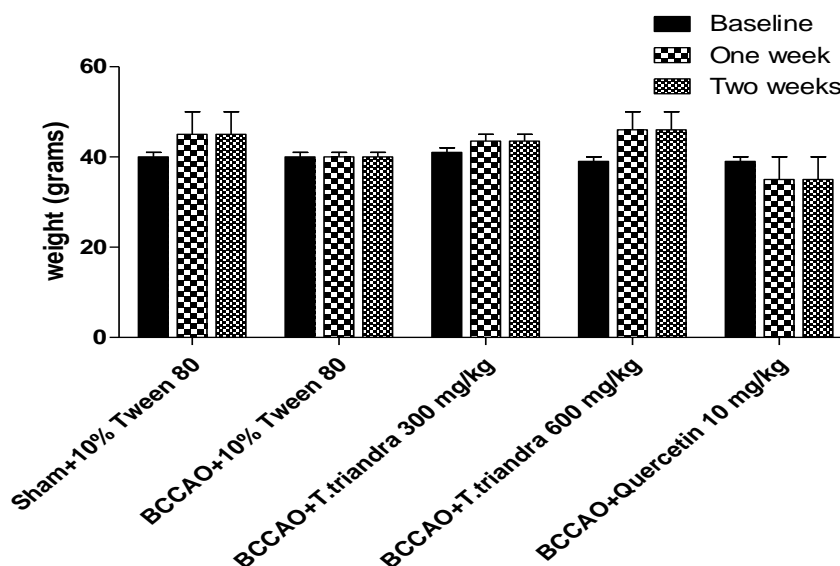
ผลการวิจัย

1. สารสกัดจากไบบานาง

ผงไบบานางแห้งบดละเอียดน้ำหนักรวมทั้งหมด 2 กิโลกรัม เมื่อผ่านการสกัดแล้วทำให้ได้สารสกัดหยابน้ำหนัก 329.30 กรัม คิดเป็น % yield เท่ากับ 16.46 % เมื่อนำมาทำการวัดค่า สาร Polyphenols ทั้งหมดได้เท่ากับ 340.21 ± 5.76 mg GAE/gm. และสารประกอบ Flavonoids ทั้งหมดได้เท่ากับ 231.29 ± 1.72 mg QE/gm.

ผลของการให้สารต่อสภาพร่างกายและการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง

ผลการศึกษาเบื้องต้นพบว่า การให้สาร 10% Tween 80 และสารสกัดจากไบบานางหรือสาร Quercetin ไม่ส่งผลต่ออัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวตลอดการทดลองเป็นเวลา 2 สัปดาห์ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญแต่อย่างใด (ภาพที่ 4.1) นอกจากนี้ผลของการป้อนสารต่อน้ำหนักอวัยวะต่างๆ เช่น สมอง ตับ ปอด กระเพาะอาหาร ไต อัณฑะ ม้าม และหัวใจ ก็ไม่มีความแตกต่างกันในแต่ละกลุ่มการทดลอง (ตารางที่ 4.1)



ภาพที่ 4.1 อัตราการเจริญเติบโตของสัตว์ทดลอง แสดงเป็นค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัว (Mean \pm SEM) ในช่วงก่อนทำการทดลอง (Baseline) ช่วงให้สารสัปดาห์ที่ 1 และ 2 (One, Two weeks) ตามลำดับ

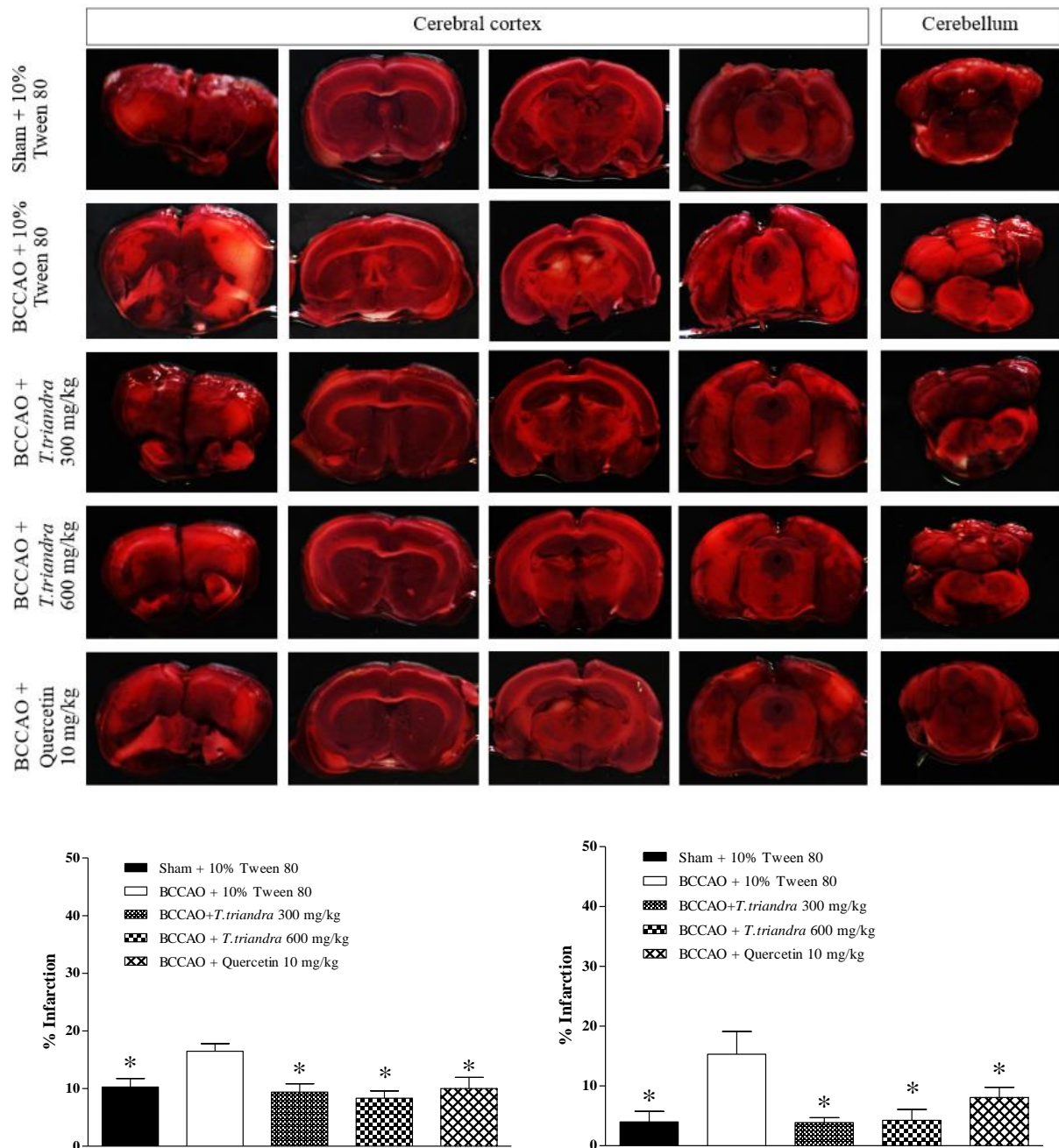
ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงน้ำหนักตัวและน้ำหนักของแต่ละอวัยวะในแต่ละกลุ่มการทดลองเป็นค่า Mean \pm SEM

กลุ่ม	น้ำหนัก (กรัม)								
	น้ำหนักตัว	สมอง	ตับ	ปอด	กระเพาะอาหาร	ไต	อวัยวะ	ม้าม	หัวใจ
Sham + 10% Tween 80	42.85 \pm 1.84	0.62 \pm 0.01	2.30 \pm 0.11	0.26 \pm 0.01	0.33 \pm 0.01	0.69 \pm 0.04	0.33 \pm 0.03	0.11 \pm 0.01	0.26 \pm 0.01
BCCAO +10% Tween 80	38.00 \pm 2.00	0.61 \pm 0.02	2.01 \pm 0.15	0.31 \pm 0.03	0.27 \pm 0.01	0.60 \pm 0.03	0.33 \pm 0.01	0.09 \pm 0.01	0.23 \pm 0.02
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	42.33 \pm 1.45	0.64 \pm 0.03	2.07 \pm 0.21	0.29 \pm 0.06	0.26 \pm 0.01	0.57 \pm 0.02	0.37 \pm 0.01	0.07 \pm 0.007	0.21 \pm 0.02
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	46.00 \pm 4.00	0.59 \pm 0.02	2.23 \pm 0.58	0.32 \pm 0.05	0.27 \pm 0.03	0.64 \pm 0.06	0.36 \pm 0.05	0.07 \pm 0.01	0.23 \pm 0.005
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	38.00 \pm 2.70	0.63 \pm 0.01	1.97 \pm 0.09	0.28 \pm 0.01	0.31 \pm 0.003	0.61 \pm 0.009	0.33 \pm 0.02	0.07 \pm 0.009	0.20 \pm 0.01

2. การหาขนาดพื้นที่ของเนื้อเยื่อสมองที่เสียหายจากภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราว

เมื่อทำการเปรียบเทียบพื้นที่ของสมองที่ขาดเลือดโดยการย้อมด้วย TTC พบว่ามีบริเวณของสมองที่เสียหายจากการขาดเลือดในทุกกลุ่มการทดลอง เมื่อทำการเปรียบเทียบเป็นร้อยละของพื้นที่สมองที่ขาดเลือดต่อพื้นที่สมองทั้งหมด (% Infarction) โดยทำการแบ่งออกเป็น 2 บริเวณหลัก ได้แก่ Cerebral cortex และ Cerebellum พบว่า ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับการผูกหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติดและได้รับสารสกัดจากใบย่านางหรือ Quercetin จะมีบริเวณของสมองเสียหายจากการขาดเลือดน้อยกว่าในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดแดงและได้รับเพียง 10% Tween 80 พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80 กับทุกกลุ่ม (ภาพที่ 4.2) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับ 10% Tween 80 และไม่ได้ผูกหลอดเลือดกับกลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือด พบว่า กลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือดมีพื้นที่ของสมองส่วน Cerebral cortex และ Cerebellum ที่เสียหายสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.008$ และ $p = 0.004$ ตามลำดับ) เมื่อ

เปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับสารสกัดจากใบย่านางปริมาณ 300 และ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับ Quercetin 10 mg/kg พบว่าบริเวณของสมองที่เสียหายจากการขาดเลือดต่ำกว่ากลุ่มที่ได้ 10% Tween 80 อย่างมีนัยสำคัญ (Cerebral cortex, $p = 0.001$, $p = 0.008$ และ $p = 0.003$, ภาพที่ 4.2 ล่างซ้าย; Cerebellum, $p = 0.001$, $p = 0.005$ และ $p = 0.041$ ตามลำดับ, ภาพที่ 4.2 ล่างขวา)



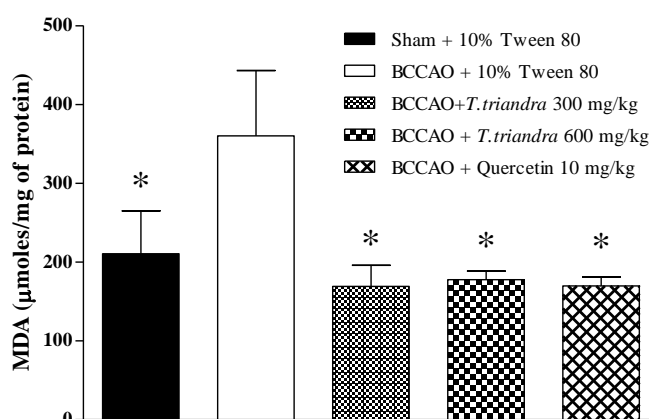
ภาพที่ 4.2 แสดงบริเวณพื้นที่สมองที่เสียหาย (Infarction area) จากภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราว ภาพบนแสดงเนื้อสมองที่ย้อมด้วย TTC บริเวณ Cerebral cortex และ Cerebellum ภาพล่างแสดงค่าร้อยละของพื้นที่สมองที่เสียหายจากภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวในสมองส่วน Cerebral cortex (ภาพล่างซ้าย) และ Cerebellum (ภาพล่างขวา), * p -value < 0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

กล่าวได้ว่ากลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไບยานางปริมาณ 300 และ 600 mg/kg สามารถช่วยป้องกันพื้นที่ของสมองที่เสียหายจากภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวได้ทั้งในส่วนสมอง Cerebral cortex และ Cerebellum ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin ปริมาณ 10 mg/kg

3. การวัดระดับ Lipid peroxidation

การเปรียบเทียบระดับ Lipid peroxidation พบว่ากลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80 มีระดับเพิ่มสูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Sham + 10% Tween 80 กับ BCCAO + 10% Tween 80 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับเพียง 10% Tween 80 และได้รับการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาที จะกระตุ้นให้มีการสลายของคอเปอร์ของเยื่อหุ้มเซลล์ที่เป็นกรดไขมันไม่อิ่มตัวและเกิดสารผลิตภัณฑ์ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ 10% Tween 80 และไม่ได้ทำการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ($p = 0.0332$)

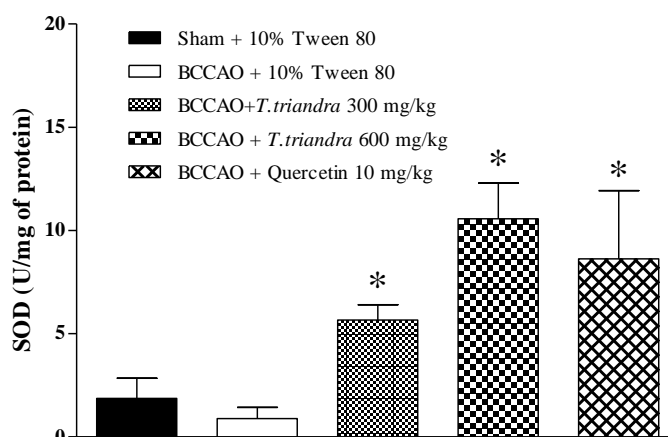
เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid และได้รับสารสกัดจากไບยานาง พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไບยานางปริมาณ 300 mg/kg และ 600 mg/kg มีระดับของ MDA ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเพียง 10% Tween 80 อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0065$ และ 0.0085 ตามลำดับ) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับ 10% Tween 80 และได้รับการผูกหลอดเลือดแดงกับกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานมีระดับ MDA ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0098$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไບยานางกับกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน พบว่าระดับ MDA ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.3)



ภาพที่ 4.3 ระดับสาร Malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ Lipid peroxidation, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

4. การวัดระดับเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD)

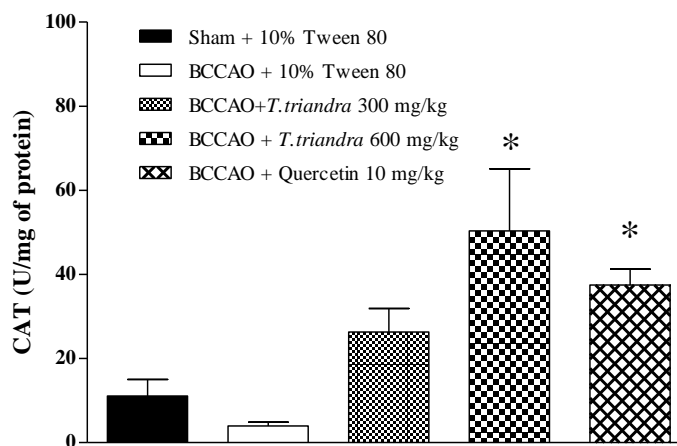
การวัดระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ SOD พบว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาทีไม่ทำให้ระดับ SOD ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.677$) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Sham + 10% Tween 80 และกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80) อย่างไรก็ตามเมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับสารสกัดจากไบยานางปริมาณ 300 mg/kg และ 600 mg/kg รวมถึงกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่าระดับเอนไซม์ SOD มีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเพียง 10% Tween 80 อย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.042, 0.0005$ และ 0.005 ตามลำดับ, **ภาพที่ 4.4**)



ภาพที่ 4.4 ระดับเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

5. การวัดระดับเอนไซม์ Catalase (CAT)

การวัดระดับเอนไซม์ CAT พบว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาทีไม่ทำให้ระดับเอนไซม์ CAT ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.600$, เปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม Sham + 10% Tween 80 และกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80) การเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับสารสกัดจากไบยานางปริมาณ 300 mg/kg ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ($p = 0.097$) เมื่อทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบยานางปริมาณ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg กับกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ 10% Tween 80 พบว่าระดับเอนไซม์ CAT มีค่าสูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.002$ และ 0.026 ตามลำดับ, **ภาพที่ 4.5**)

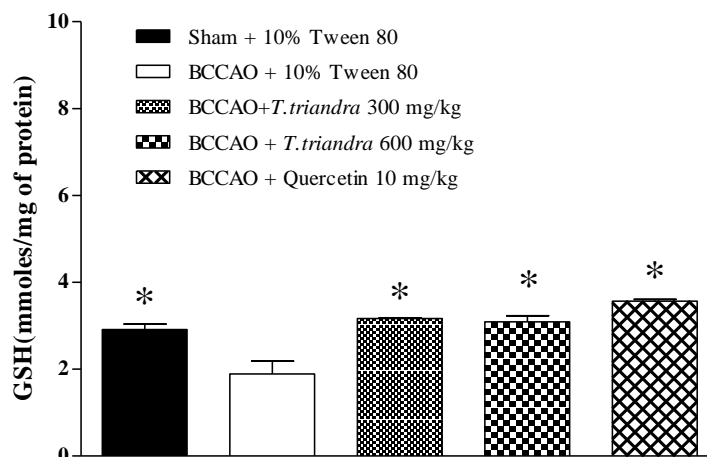


ภาพที่ 4.5 ระดับเอนไซม์ Catalase (CAT), * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

6. การวัดระดับเอนไซม์ Glutathione (GSH)

การเปรียบเทียบค่าเอนไซม์ GSH พบว่ากลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80 มีระดับต่ำกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบระหว่าง Sham + 10% Tween 80 กับ BCCAO + 10% Tween 80 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาทีทำให้ระดับเอนไซม์ GSH ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.001$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid

เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับสารสกัดจากไบยานาง พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบยานางปริมาณ 300 mg/kg และ 600 mg/kg มีระดับของเอนไซม์ GSH สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0002$ และ 0.0002 ตามลำดับ) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับ 10% Tween 80 และได้รับการผูกหลอดเลือดกับกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานมีระดับเอนไซม์ GSH สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0001$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบยานางกับกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานพบว่าระดับของเอนไซม์ GSH ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.6)

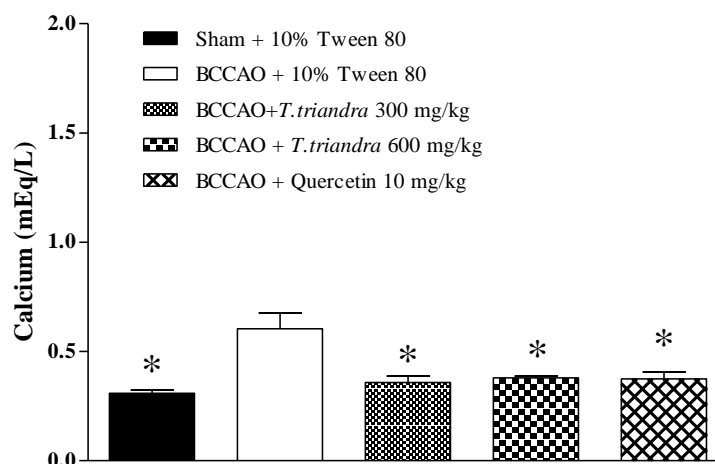


ภาพที่ 4.6 ระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ Glutathione (GSH), * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

7. การวัดระดับ Calcium

การเปรียบเทียบระดับของ Calcium พบว่ากลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80 มีระดับสูงกว่าทุกกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เปรียบเทียบระหว่าง Sham + 10% Tween 80 กับ BCCAO + 10% Tween 80 แสดงให้เห็นว่ากลุ่มที่การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาที ทำให้ระดับ Calcium เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0003$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการผูกหลอดเลือดแดงคอมมอนคาโรติค

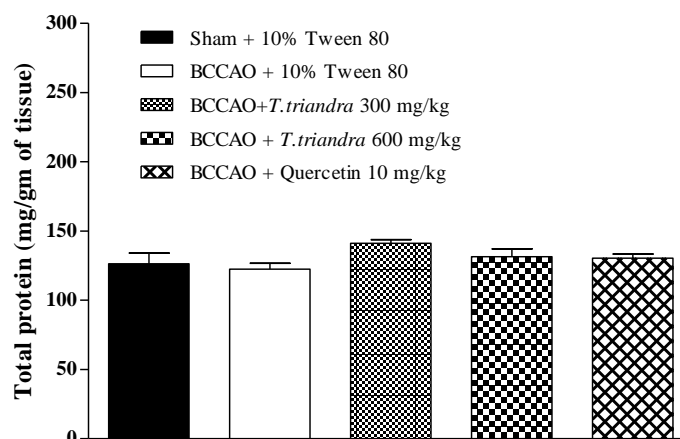
เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับสารสกัดจากไบยานาง พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบยานางปริมาณ 300 mg/kg และ 600 mg/kg มีระดับของ Calcium ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับยาหลอกอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0007$ และ 0.0015 ตามลำดับ) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับยาหลอกและได้รับการผูกหลอดเลือดกับกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐานมีระดับ Calcium ต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.0022$) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบยานางกับกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน พบว่าระดับของ Calcium ไม่มี ความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.7)



ภาพที่ 4.7 ระดับ Calcium, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

8. Total protein level

ระดับของโปรตีนทั้งหมดที่วัดได้และเทียบกับน้ำหนักของเนื้อเยื่อสมองที่นำมาทำการศึกษา พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติในทุกกลุ่มการทดลอง แม้ว่าในกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80 จะมีระดับค่อนข้างต่ำกว่าทุกกลุ่มการทดลองก็ตาม (ภาพที่ 4.8)



ภาพที่ 4.8 ระดับของโปรตีนทั้งหมดเทียบกับน้ำหนักของเนื้อเยื่อสมองที่นำมาทำการศึกษา

10. Histological analysis

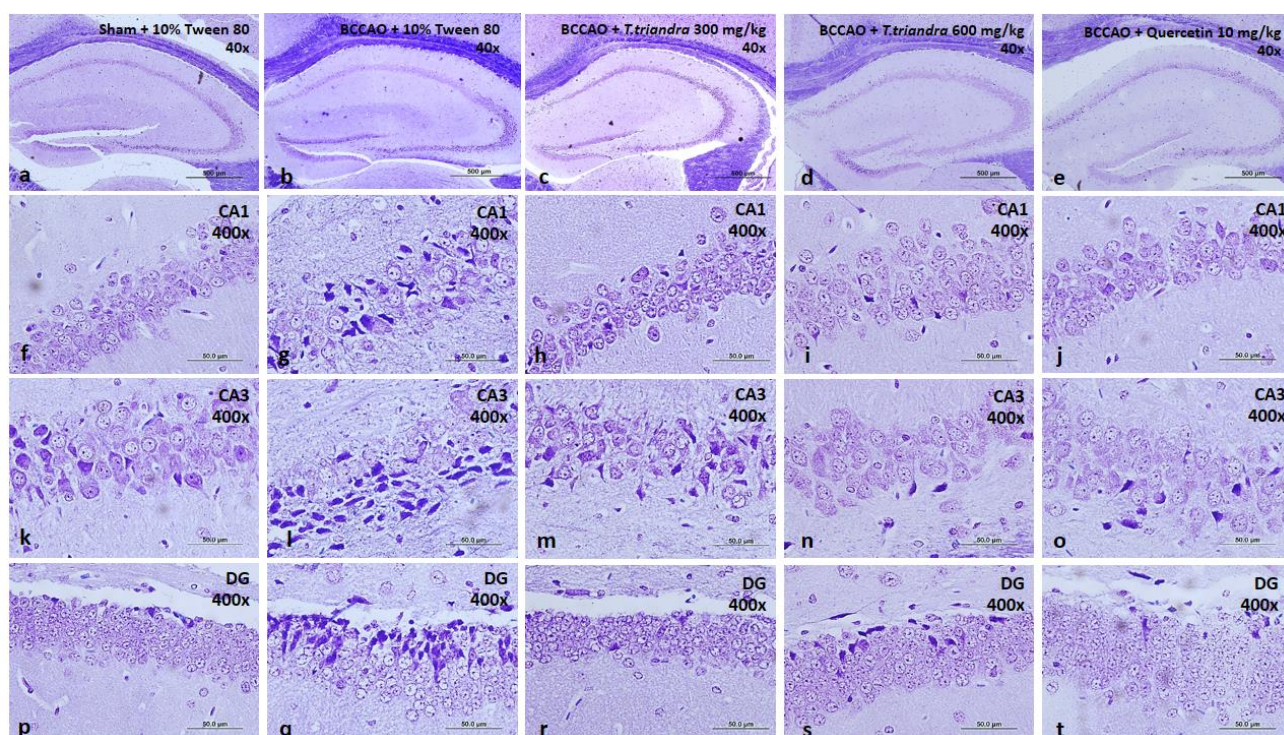
การตรวจสอบพยาธิสภาพของเซลล์สมองโดยการย้อมด้วย 0.1% Luxol fast blue และ 0.1% Cresyl violet พบว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาทีทำให้เกิดการตายของเซลล์สมองบริเวณ Cerebral cortex, Hippocampus และ Cerebellum อย่างชัดเจนและมีความสำคัญทางสถิติ เมื่อทำการเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์ตายในสมองบริเวณ Cerebral cortex พบว่า ในกลุ่มที่

ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 มีเซลล์ตายมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการผูกหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0002$) และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 กับกลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือดและได้รับสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า เซลล์ประสาทของกลุ่มการทดลองสามกลุ่มหลังลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p = 0.0018, 0.0048$ และ 0.0022 ตามลำดับ) ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Cerebral cortex ได้ไม่แตกต่างกับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg (ภาพที่ 4.11 และ 4.12)

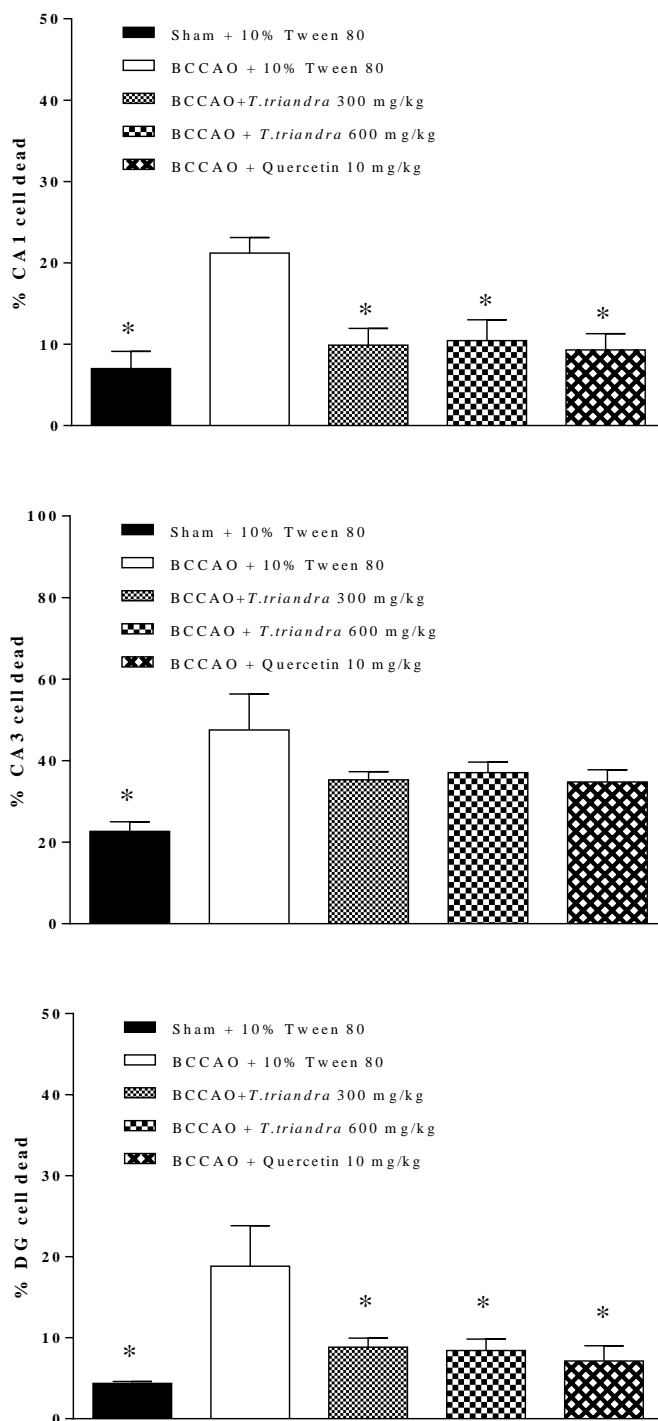
เมื่อทำการเปรียบเทียบร้อยละของเซลล์ตายในสมองส่วน Hippocampus ในแต่ละบริเวณย่อย พบว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาที ทำให้เซลล์ประสาทตายมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับการผูกหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญในทุกบริเวณย่อย (CA1; $p = 0.0012$, CA3; $p = 0.0027$ และ DG; $p = 0.0023$) เมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า บริเวณย่อย CA1 เซลล์ตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสามกลุ่มการทดลองหลัง ($p = 0.0052, 0.0033$ และ 0.0038 ตามลำดับ) ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณย่อย CA1 ของ Hippocampus ได้ไม่แตกต่างจากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg (ภาพที่ 4.6 และ 4.10 ภาพบน) เมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า บริเวณย่อย CA3 ไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.0627, 0.0583$ และ 0.0698 ตามลำดับ) ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg และ สารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg ไม่สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณย่อย CA3 ของ Hippocampus ได้ (ภาพที่ 4.9 และ 4.10 ภาพกลาง) เมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg พบว่า บริเวณย่อย DG เซลล์ตายลดลงอย่างมีนัยสำคัญในสามกลุ่มการทดลองหลัง ($p = 0.0187, 0.0155$ และ 0.0083 ตามลำดับ) ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบย่านางขนาด 300 และ 600 mg/kg สามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณย่อย DG ของ Hippocampus ได้ไม่แตกต่างจากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg (ภาพที่ 4.9 และ 4.10 ภาพล่าง)

สำหรับการเปรียบเทียบความหนาแน่นของใยประสาทในบริเวณ Corpus callosum, Internal capsule และ Optic tract พบว่าไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มซึ่งสรุปได้ว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid เป็นเวลา 30 นาที และมี Reperfusion 45 นาทีไม่ได้ทำให้ใยประสาทถูกทำลายและทำให้ความหนาแน่นของใยประสาทลดลงแต่อย่างใด (ภาพที่ 4.11 และ 4.13)

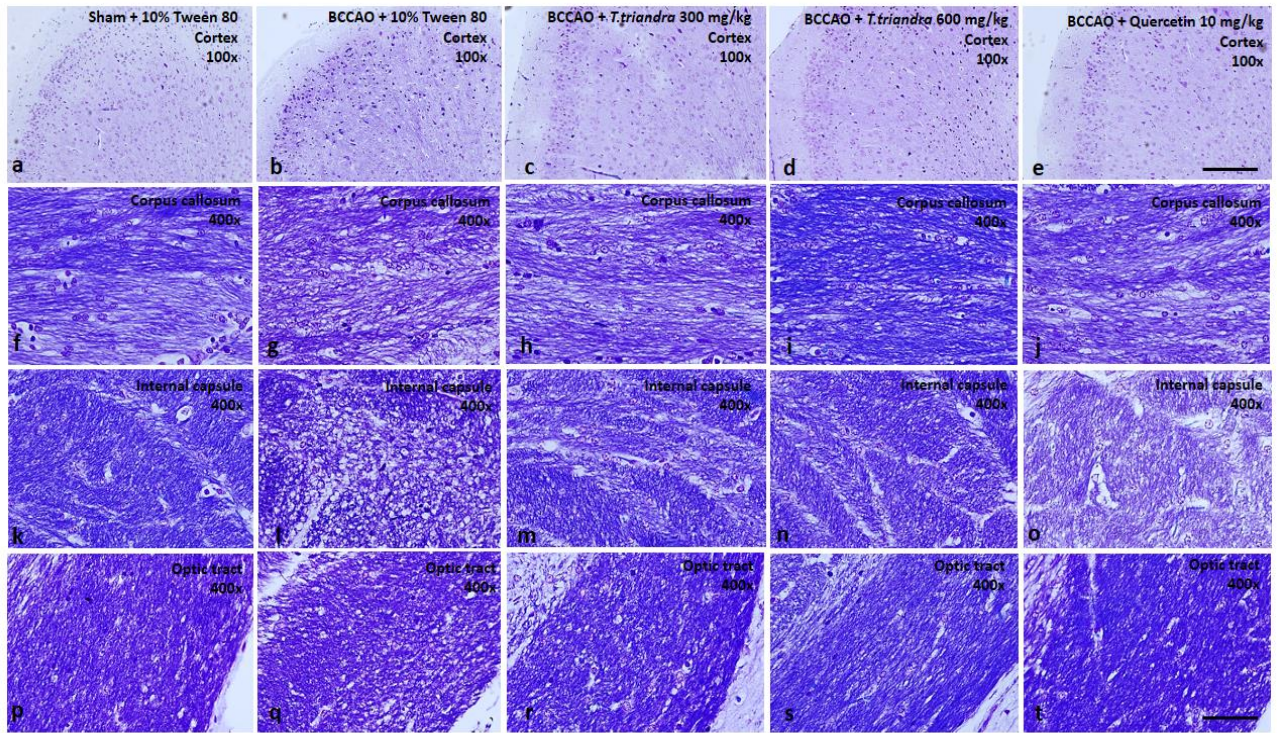
เมื่อทำการเปรียบเทียบกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 กับกลุ่มที่ไม่ได้ทำการผูกหลอดเลือด พบว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาที และมี Reperfusion 45 นาทีทำให้เซลล์ Purkinje ของ Cerebellum ตายมากขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.090$) เมื่อทำการเปรียบเทียบในกลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดและได้รับ 10% Tween 80 และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบบานาง ขนาด 300 และ 600 mg/kg และกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg ของชั้นเซลล์ Purkinje ของ Cerebellum พบว่า ไม่มีความแตกต่างกัน ($p = 0.117, 0.160$ และ 0.152 ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.14 และ 4.15)



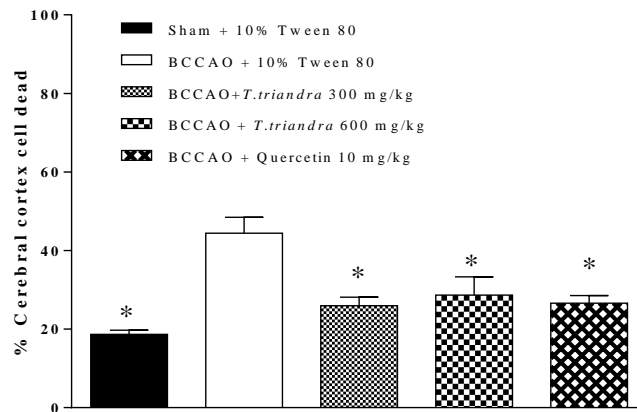
ภาพที่ 4.9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงสมองบริเวณ Hippocampus โดยภาพ a – e มีกำลังขยาย 40 เท่า เส้นขีดขาวในภาพมีความยาวเท่ากับ 500 ไมโครเมตร; ภาพ f – j แสดงบริเวณย่อย Cornus ammonis 1 (CA1); ภาพ k – o แสดงบริเวณย่อย Cornus ammonis 3 (CA3) และภาพ p – t แสดงบริเวณย่อย Dentate gyrus (DG) โดยภาพ f – t มีกำลังขยาย 400 เท่า เส้นขีดขาวในภาพมีความยาวเท่ากับ 50 ไมโครเมตร



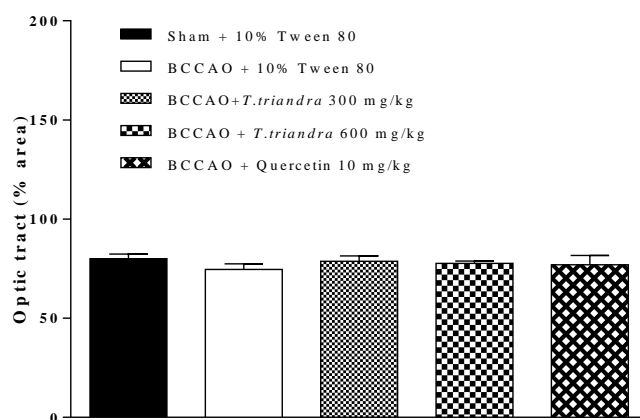
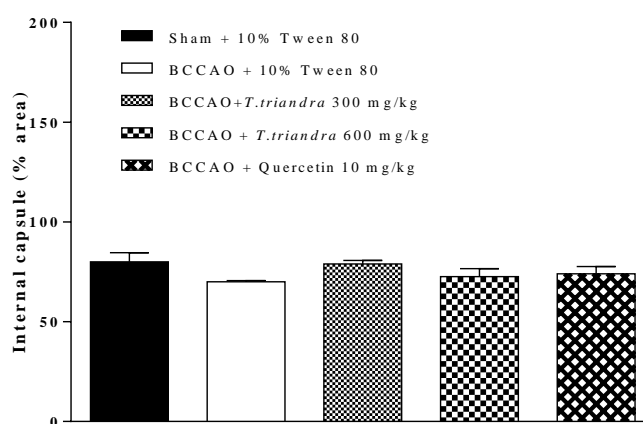
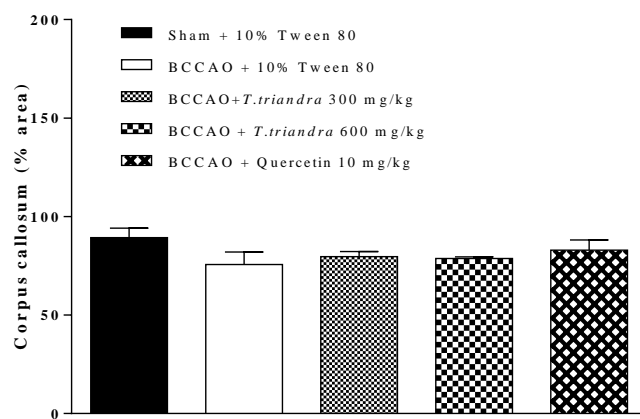
ภาพที่ 4.10 แสดงร้อยละของเซลล์ตายในสมองส่วน Hippocampus บริเวณย่อย CA1, CA3 และ DG, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80



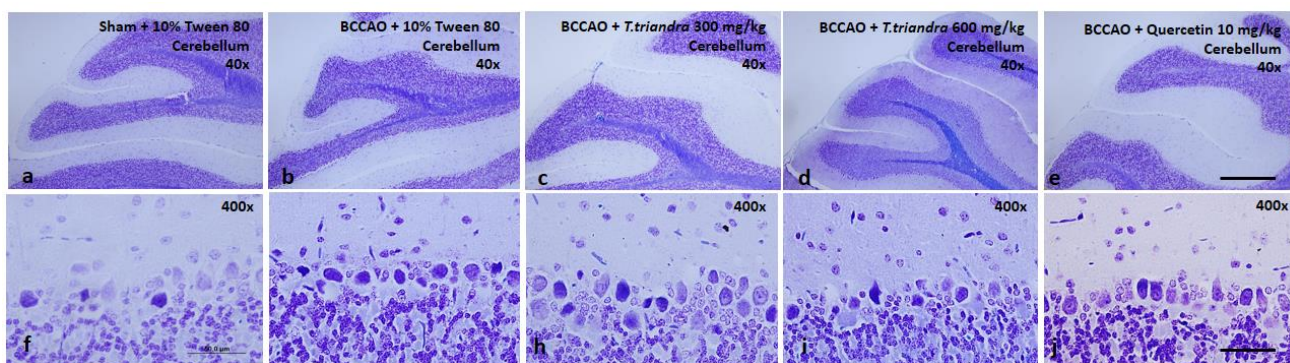
ภาพที่ 4.11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงสมองส่วน Cerebral cortex (ภาพ a – e กำลังขยาย 100 เท่า เส้นขีดขาวในภาพมีความยาวเท่ากับ 200 ไมโครเมตร); ภาพ f–j แสดงสมองส่วนเนื้อขาวบริเวณ Corpus callosum; ภาพ k – o แสดงสมองส่วนเนื้อขาวบริเวณ Internal capsule และภาพ p – t แสดงสมองส่วนเนื้อขาวบริเวณ Optic tract โดยภาพ f–t มีกำลังขยาย 400 เท่า เส้นขีดขาวในภาพมีความยาวเท่ากับ 50 ไมโครเมตร



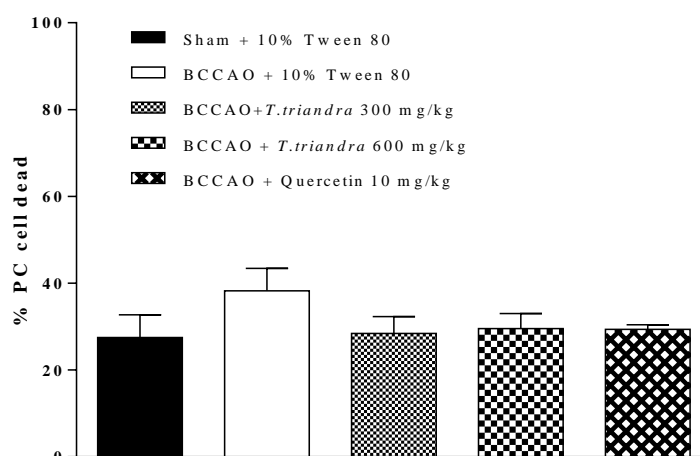
ภาพที่ 4.12 แสดงร้อยละของเซลล์ตายในสมองส่วน Cerebral cortex, * $p < 0.05$ เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80



ภาพที่ 4.13 แสดงความหนาแน่นของใยประสาทบริเวณ Corpus callosum, Internal capsule และ Optic tract



ภาพที่ 4.14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงสมองบริเวณ Cerebellum (ภาพ a – e กำลังขยาย 40 เท่า เส้นขีดขาวในภาพมีความยาวเท่ากับ 500 ไมโครเมตร); ภาพ f–j แสดงชั้นเซลล์ Purkinje ของ Cerebellum โดยภาพถ่ายมีกำลังขยาย 400 เท่า เส้นขีดขาวในภาพมีความยาวเท่ากับ 50 ไมโครเมตร



ภาพที่ 4.15 แสดงร้อยละของเซลล์ตายในชั้นเซลล์ Purkinje (PC) ของ Cerebellum

บทที่ 5

สรุป วิจารณ์ และข้อเสนอแนะ

ผลการทดลองสรุปได้ว่า การให้สารสกัดจากใบย่านางในปริมาณ 300 และ 600 mg/kg รวมทั้งสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin ไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อสัตว์ทดลอง โดยการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวและน้ำหนักอวัยวะต่างๆ เช่น สมอง ตับ ปอด กระเพาะอาหาร ไต อัมชะ ม้าม และหัวใจ เมื่อพิจารณาผลของการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid เป็นเวลา 30 นาที และมี Reperfusion 45 นาที ไม่ทำให้ปริมาณโปรตีนโดยรวมของสมองมีความแตกต่างกันแต่อย่างใด แต่พบว่าทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งระดับแคลเซียมที่เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์จะกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์หลังเกิดภาวะสมองขาดเลือดได้ เช่น กระตุ้นการตายของเซลล์แบบ Necrosis ผ่านกลไก Excytotoxicity การกระตุ้นการทำงานของ Proteolytic enzymes การกระตุ้นการอักเสบ หรือแม้แต่การกระตุ้นการตายของเซลล์แบบ Apoptosis (Leker and Shohami, 2002; White et al., 2000) นอกจากนี้ยังพบว่าการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid เป็นเวลา 30 นาที และมี Reperfusion 45 นาที กระตุ้นให้เกิด Lipid peroxidation มากขึ้น โดยพบว่าระดับสาร MDA ซึ่งเป็นสารผลิตภัณฑ์จากกระบวนการ Lipid peroxidation มีระดับเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น GSH มีระดับลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน อย่างไรก็ตามแม้การทดลองในครั้งนี้จะพบว่าระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น CAT และ SOD ไม่ได้ลดลงอย่างมีนัยสำคัญแต่ก็มีแนวโน้มลดลงหลังการผูกหลอดเลือด เมื่อพิจารณาพื้นที่ของสมองที่เสียหายจากการขาดเลือดโดยการย้อมด้วย TTC ซึ่งสารดังกล่าวจะถูกเปลี่ยนให้เป็นสีแดงเข้ม โดย Nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) และ Dehydrogenases ที่พบในเซลล์ที่มีชีวิต ส่วนเซลล์ที่ไม่มีชีวิตหรือไม่มีเอนไซม์นี้ก็จะมิสีขาวหรือเหลืองหม่นเมื่อย้อมด้วย TTC ซึ่งทำให้สามารถเปรียบเทียบเป็นพื้นที่ของสมองที่เสียหายจากการขาดเลือดได้โดยเปรียบเทียบระหว่างบริเวณของสมองที่เป็นสีแดงกับบริเวณที่มีสีจางหรือขาว ซึ่งในการทดลองนี้พบว่า บริเวณพื้นที่ของสมองที่เสียหายจากการขาดเลือดทั้งในส่วน of Cerebral cortex และ Cerebellum ในกลุ่มที่ถูกผูกหลอดเลือดสูงกว่าในกลุ่มที่ไม่ได้รับการผูกหลอดเลือดอย่างมีนัยสำคัญ ประกอบกับพยาธิสภาพของเซลล์ที่ตรวจวัดโดยการย้อมด้วย 0.1% Luxol fast blue และ 0.1% Cresyl violet ที่แสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่า มีการตายของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือด เช่น Cerebral cortex และ Hippocampus เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ หลังการผูกหลอดเลือด ยกเว้นสมองส่วน Cerebellum ที่พบว่า การตายของเซลล์ Purkinje ไม่แตกต่างกันในทุกกลุ่ม เมื่อทำการตรวจสอบในส่วนของใยประสาท เช่น บริเวณ Corpus callosum, Internal capsule และ Optic tract ก็ไม่มีความแตกต่างกันในทุกกลุ่มเช่นเดียวกัน ในส่วนแรกจึงสามารถสรุปได้ว่า การผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาที ทำให้ระดับแคลเซียมภายในเซลล์และระดับ Lipid peroxidation เพิ่มมากขึ้น และทำให้ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระลดลง รวมทั้งทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทสมองอย่างชัดเจนในสมองบริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือด เช่น Cerebral cortex และ Hippocampus

เมื่อพิจารณากลุ่มที่ได้รับการผูกหลอดเลือดแดง Common carotid ทั้งสองข้างเป็นเวลา 30 นาทีและมี Reperfusion 45 นาที และได้รับสารสกัดจากไบบานางขนาด 300 และ 600 mg/kg พบว่า สารสกัดจากไบบานางสามารถช่วยป้องกันการเพิ่มขึ้นของแคลเซียมภายในเซลล์และการเพิ่มขึ้นของสาร MDA ได้อย่างมีนัยสำคัญไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg และเมื่อพิจารณาพร้อมกับระดับของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น SOD, GSH พบว่าสารสกัดจากไบบานางขนาด 300 และ 600 mg/kg สามารถกระตุ้นให้ระดับของเอนไซม์เหล่านี้เพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มที่ได้รับเพียง 10% Tween 80 อย่างมีนัยสำคัญและไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin 10 mg/kg แม้ว่าในส่วนของการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ CAT อย่างมีนัยสำคัญจะพบเฉพาะกลุ่มที่ได้รับสารสกัดจากไบบานางขนาด 600 mg/kg เท่านั้น จากผลการทดลองที่กล่าวมาสามารถสรุปได้ว่าการให้สารสกัดจากไบบานางก่อนที่จะเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวนั้น สามารถช่วยป้องกันการเกิด Lipid peroxidation และกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระได้ไม่แตกต่างจากสารต้านอนุมูลอิสระมาตรฐาน Quercetin ซึ่งสอดคล้องกับพื้นที่ของสมองที่เสียหายหลังการผูกหลอดเลือดที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มการทดลองที่ได้รับสารสกัดจากไบบานาง และ Quercetin เมื่อพิจารณาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ประสาทสมองบริเวณต่างๆ ก็พบว่า สารสกัดจากไบบานางสามารถช่วยป้องกันการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Cerebral cortex และสมองส่วน Hippocampus บริเวณย่อย CA1 และ DG ได้ไม่แตกต่างกับ Quercetin แต่สำหรับเซลล์สมองในบริเวณย่อย CA3 ของ Hippocampus และเซลล์ Purkinje ของสมองส่วน Cerebellum นั้นไม่มีความแตกต่างกันแต่อย่างใด

ผลโดยรวมจากการทดลองนี้ทำให้สรุปได้ว่า สารสกัดจากไบบานางสามารถช่วยป้องกันการตายของเซลล์ประสาทสมองบริเวณ Cerebral cortex และ บริเวณย่อย CA1, DG ของสมองส่วน Dorsal hippocampus ได้ โดยกลไกที่น่าจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมภายในเซลล์และป้องกันการเกิดกระบวนการ Lipid peroxidation พร้อมทั้งการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น ซึ่งส่งผลให้จำนวนเซลล์ประสาทในบริเวณดังกล่าวตายน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญ สำหรับกลไกระดับเซลล์ที่ช่วยป้องกันไม่ให้เซลล์ประสาทตายหลังเกิดภาวะสมองขาดเลือดของสารสกัดจากไบบานางอาจเป็นผลมาจากการทำงานของสารในกลุ่ม Polyphenols และ Flavonoids ที่พบในไบบานางซึ่งซึ่งสารสกัดที่ใช้ในการทดลองนี้มีสารกลุ่มดังกล่าว เช่น สาร Polyphenols ทั้งหมดได้เท่ากับ 340.21 ± 5.76 mg GAE/gm. และสารประกอบ Flavonoids ทั้งหมดได้เท่ากับ 231.29 ± 1.72 mg QE/gm. ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าสารในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระและกระบวนการอักเสบ (Anjaneyulu et al., 1969; Ingkaninan et al., 2003; Nanasombat and Teckchuen, 2009; Saiin and Markmee, 2003; Sureram et al.) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวสามารถยับยั้งหรือชะลอการตายของเซลล์ประสาทสมองหลังเกิดภาวะสมองขาดเลือดแบบชั่วคราวได้ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสกัดจากไบบานางสามารถยับยั้งระดับแคลเซียมไม่ให้เพิ่มขึ้น และป้องกันไม่ให้เกิดภาวะ Lipid peroxidation ได้อย่างมีนัยสำคัญ

และยังสามารถกระตุ้นให้ระดับเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น CAT, SOD และ GSH ให้มีระดับสูงขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับผลการป้องกันพื้นที่ของสมองที่เสียหายจากการขาดเลือดและทำให้ร้อยละของเซลล์ตายในสมอง บริเวณที่อ่อนแอต่อการขาดเลือด เช่น Cerebral cortex และ Hippocampus ลดลงได้ สำหรับสารกลุ่ม Polyphenols ที่พบในสารสกัดจากใบย่านาง ได้แก่ p-hydroxybenzoic acid, Minecoside, Flavones glycoside cinnamic acids derivative, Monoepoxy-betacarotene (Boonsong et al., 2009; Singthong et al., 2009)

ข้อเสนอแนะและชี้แจง

ทำการทดลองต่อๆ ไปในการหาสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในสารสกัดจากใบย่านาง โดยใช้เทคนิค เช่น High performance liquid chromatography (HPLC) และอื่นๆ เพื่อหาสารออกฤทธิ์บริสุทธิ์และทำการทดลอง หรือพัฒนาเป็นตัวยาต่อไป

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

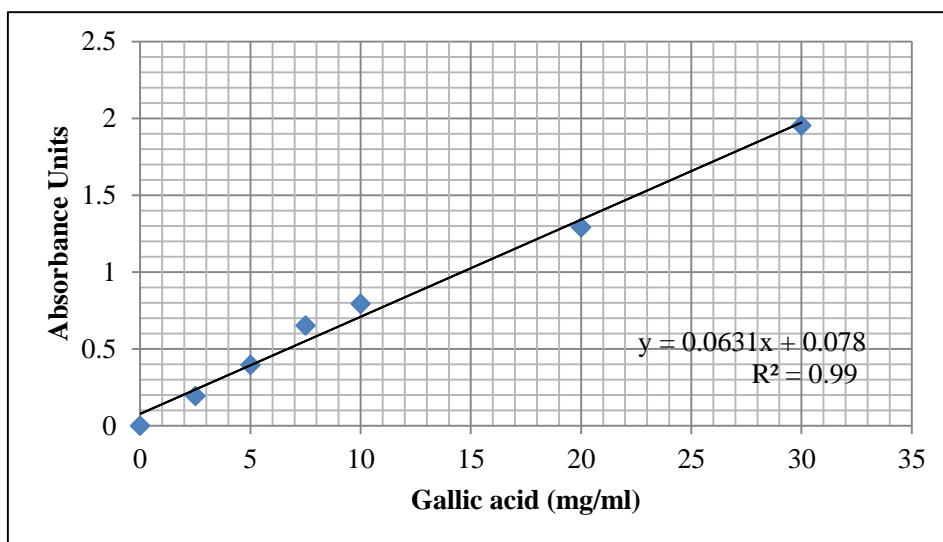
- Anjaneyulu, B., Govindachari, T.R., Sathe, S.S., Viswanathan, N., Gopinath, K.W., Pai, B.R., 1969. Alkaloids of *Tiliacora racemosa* Colebr. *Tetrahedron*. 25, 3091-3105.
- Auld, D.S., Kornecook, T.J., Bastianetto, S., Quirion, R., 2002. Alzheimer's disease and the basal forebrain cholinergic system: relations to β -amyloid peptides, cognition, and treatment strategies. *Progress in Neurobiology*. 68, 209-245.
- Boonsong, P., Laohakunjit, N., Kerdchoechuen, O., 2009. Identification of polyphenolic compounds and colorants from *Tiliacora triandra* (Diels) Leaves. *Agricultural Sci. J.* 40, 13-16.
- Broadbent, N.J., Squire, L.R., Clark, R.E., 2004. Spatial memory, recognition memory, and the hippocampus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101, 14515-20.
- Burgess, N., Maguire, E.A., O'Keefe, J., 2002. The human hippocampus and spatial and episodic memory. *Neuron*. 35, 625-41.
- Chang, C.-C., Yang, M.-H., Wen, H.-M., Chern, J.-C., 2002. Estimation of total flavonoid content in propolis by two complementary colorimetric methods. *Journal of Food and Drug Analysis*. 10, 178-182.
- de la Torre, J.C., Fortin, T., Park, G.A., Butler, K.S., Kozlowski, P., Pappas, B.A., de Socarraz, H., Saunders, J.K., Richard, M.T., 1992. Chronic cerebrovascular insufficiency induces dementia-like deficits in aged rats. *Brain Res.* 582, 186-95.
- Farkas, E., Luiten, P.G.M., 2001. Cerebral microvascular pathology in aging and Alzheimer's disease. *Progress in Neurobiology*. 64, 575-611.
- Farkas, E., Donka, G., de Vos, R.A., Mihaly, A., Bari, F., Luiten, P.G., 2004. Experimental cerebral hypoperfusion induces white matter injury and microglial activation in the rat brain. *Acta Neuropathol.* 108, 57-64.
- Ingkaninan, K., Temkitthawon, P., Chuenchom, K., Yuyaem, T., Thongnoi, W., 2003. Screening for acetylcholinesterase inhibitory activity in plants used in Thai traditional rejuvenating and neurotonic remedies. *Journal of Ethnopharmacology*. 89, 261-264.

- Jope, R.S., Song, L., Powers, R.E., 1997. Cholinergic activation of phosphoinositide signaling is impaired in Alzheimer's disease brain. *Neurobiology of Aging*. 18, 111-120.
- Leker, R.R., Shohami, E., 2002. Cerebral ischemia and trauma different etiologies yet similar mechanisms: neuroprotective opportunities. *Brain Research Reviews*. 39, 55-73.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J., 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem*. 193, 265-275.
- M, R., Rituparna, M., Shafalika, K., Anshuman, T., Sumit, M., S, A., 2009. Role of *Centella asiatica* on cerebral post-ischemic reperfusion and long-term hypoperfusion in rats. *Int J Green Pharm*. 3, 88-96.
- Mehta, S.L., Manhas, N., Raghubir, R., 2007. Molecular targets in cerebral ischemia for developing novel therapeutics. *Brain Research Reviews*. 54, 34-66.
- Nanasombat, S., Teckchuen, N., 2009. Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*. 3 443-449.
- Ozerol, E., Bilgic, S., Iraz, M., Cigli, A., Ilhan, A., Akyol, O., 2009. The protective effect of erdosteine on short-term global brain ischemia/reperfusion injury in rats. *Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry*. 33, 20-24.
- Paxinos, G., Franklin, K., 2008. *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. Vol., Academic Press.
- Phadungkit, M., Somdee, T., Kangsadalampai, K., 2012. Phytochemical screening, antioxidant and antimutagenic activities of selected Thai edible plant extracts. *Journal of Medicinal Plants Research*. 6, 662-666.
- Pinto, T., Lanctôt, K.L., Herrmann, N., 2011. Revisiting the cholinergic hypothesis of behavioral and psychological symptoms in dementia of the Alzheimer's type. *Ageing Research Reviews*. 10, 404-412.
- Saiin, C., Markmee, S., 2003. Isolation of anti-malarial active compound from Yanang (*Tiliacora triandra* Diels). *Kasetsart Journal (Natural Science)*. 37, 47-51.

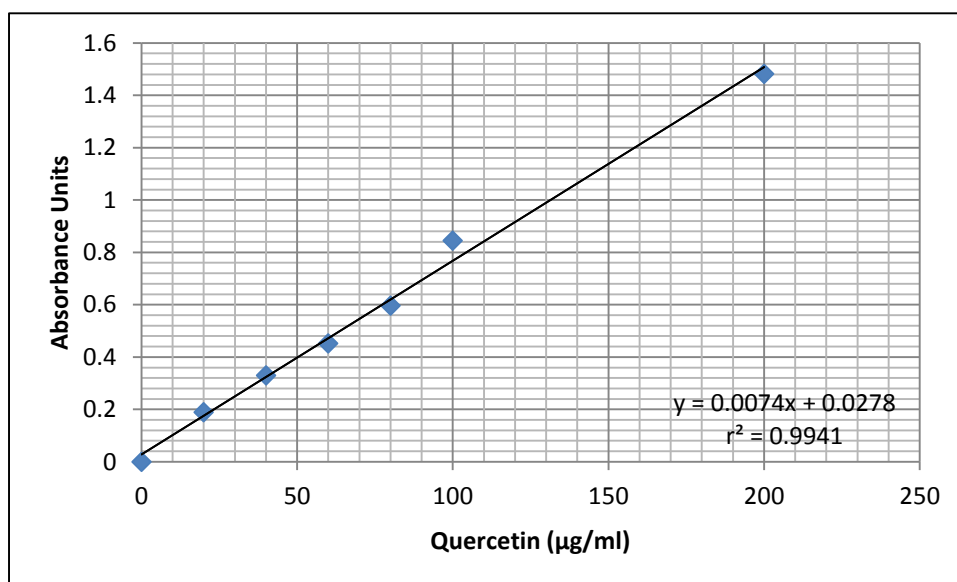
- Scoville, W.B., Milner, B., 2000. Loss of recent memory after bilateral hippocampal lesions. 1957. *J Neuropsychiatry Clin Neurosci.* 12, 103-113.
- Singthong, J., Ningsanond, S., Cui, S.W., 2009. Extraction and physicochemical characterisation of polysaccharide gum from Yanang (*Tiliacora triandra*) leaves. *Food Chemistry.* 114, 1301-1307.
- Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A., Suwanlikhid, N., Jaijoy, K., 2008. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from *Tiliacora triandra* (Colebr.) Diels in rats. *Songklanakarin J. Sci. Technol.* 30, 611-619.
- Spare, P.D., 1964 A Stabel murexide reagent for the estimation of calcium in micro quantities of serum *Clinical Chemistry.* 10, 726-729.
- Sureram, S., Senadeera, S.P.D., Hongmanee, P., Mahidol, C., Ruchirawat, S., Kittakoop, P., 2012. Antimycobacterial activity of bisbenzylisoquinoline alkaloids from *Tiliacora triandra* against multidrug-resistant isolates of *Mycobacterium tuberculosis*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters.* 22, 2902-2905.
- Van Beek, A.H.E.A., Claassen, J.A.H.R., 2009. The cerebrovascular role of the cholinergic neural system in Alzheimer's disease. *Behavioural Brain Research.* 221, 537-542.
- Wakita, H., Tomimoto, H., Akiguchi, I., Matsuo, A., Lin, J.X., Ihara, M., McGeer, P.L., 2002. Axonal damage and demyelination in the white matter after chronic cerebral hypoperfusion in the rat. *Brain Res.* 924, 63-70.
- White, B.C., Sullivan, J.M., DeGracia, D.J., O'Neil, B.J., Neumar, R.W., Grossman, L.I., Rafols, J.A., Krause, G.S., 2000. Brain ischemia and reperfusion: molecular mechanisms of neuronal injury. *Journal of the Neurological Sciences.* 179, 1-33.
- Y, I., S, I., M, S., T, N., T, Y., H, K., 1989. Forebrain ischemia induced by temporary bilateral common carotid occlusion in normotensive rats. *J Neurol Sci.* 90, 155-65.
- Zhu, Y., Saito, K., Murakami, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Seishima, M., 2006. Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neuroscience Letters.* 393, 122-126.

ภาคผนวก

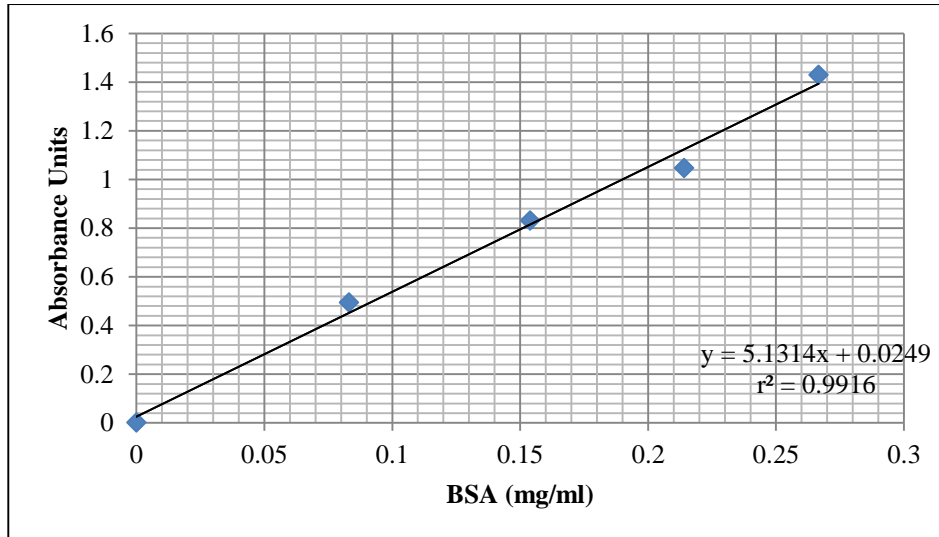
ภาคผนวก ก



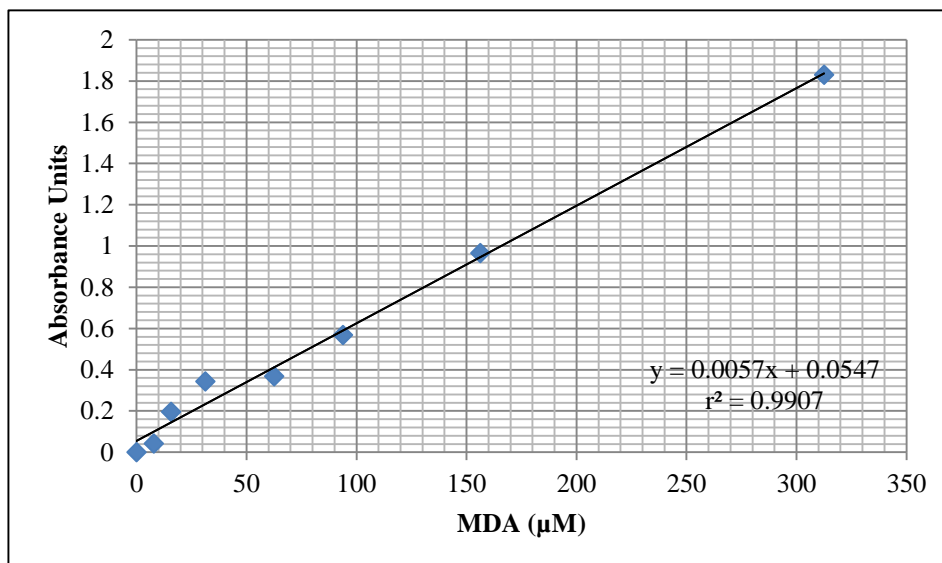
ภาพที่ 1ก กราฟมาตรฐานสำหรับการเทียบค่าสารประกอบ Polyphenols โดยเตรียมจาก Gallic acid



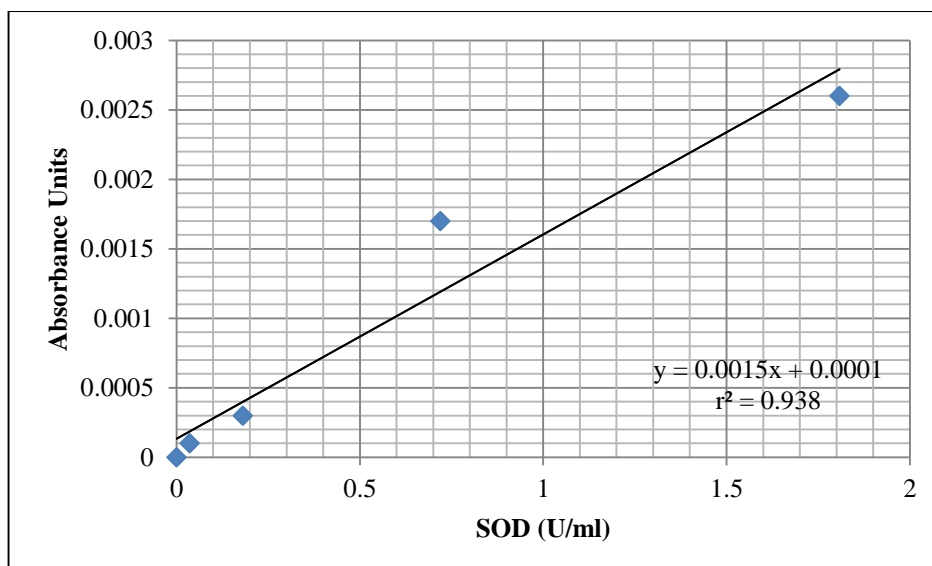
ภาพที่ 2ก กราฟมาตรฐานสำหรับการเทียบค่าสารประกอบ Flavonoids โดยเตรียมจาก Quercetin



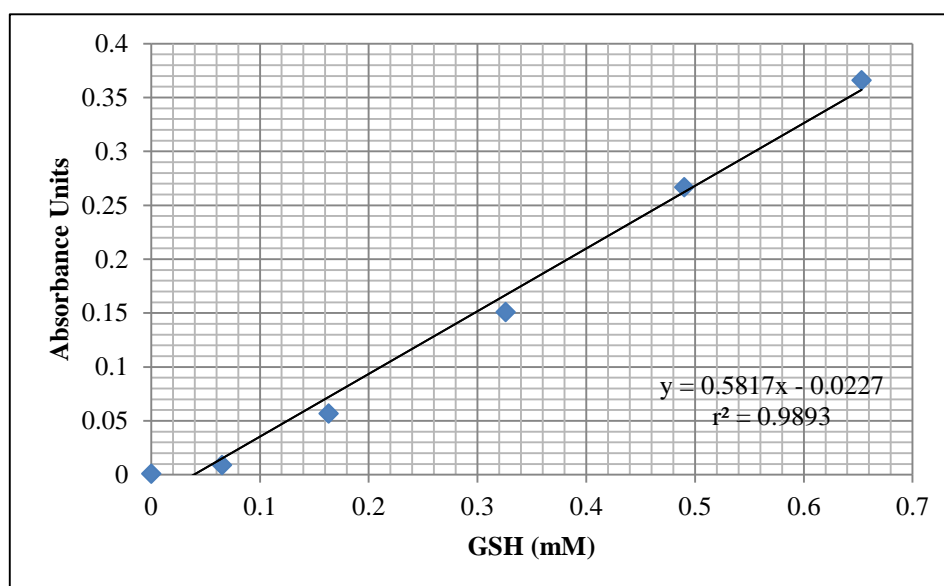
ภาพที่ 3ก กราฟมาตรฐานสำหรับการเทียบค่าของโปรตีน โดยเตรียมจาก Bovine serum albumin (BSA)



ภาพที่ 4ก กราฟมาตรฐานสำหรับการเทียบระดับ Malondialdehyde (MDA)



ภาพที่ 5ก กราฟมาตรฐานสำหรับการเทียบค่ากิจกรรมของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD)



ภาพที่ 6ก กราฟมาตรฐานสำหรับการเทียบระดับ Glutathione (GSH)

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 1ข ค่าตรวจสอบทางสถิติของบริเวณสมอง Cerebral cortex ที่เสียหายจากการขาดเลือด (% Infraction)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	10.26	3.62	1.47	0.0080
BCCAO + 10% Tween 80	16.47	4.14	1.31	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	9.39	4.09	1.44	0.0013
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	8.31	3.11	1.27	0.0008
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	10.01	5.49	1.94	0.0030

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 2ข ค่าตรวจสอบทางสถิติของบริเวณสมอง Cerebellum ที่เสียหายจากการขาดเลือด (% Infraction)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	3.97	4.32	1.76	0.0043
BCCAO + 10% Tween 80	15.29	12.01	3.80	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	3.87	2.27	0.80	0.0019
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	4.25	4.42	1.80	0.0053
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	8.08	4.80	1.70	0.0410

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 3x ค่าตรวจสอบทางสถิติของระดับ Malondialdehyde ($\mu\text{M}/\text{mg}$ of protein)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	210.68	93.90	54.21	0.0332
BCCAO + 10% Tween 80	360.27	143.27	82.72	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	169.13	53.59	26.79	0.0056
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	177.56	22.21	11.10	0.0085
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	169.62	20.04	11.57	0.0098

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 4x ค่าตรวจสอบทางสถิติของระดับ Glutathione (mM/mg of protein)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	2.91	0.21	0.12	0.0010
BCCAO + 10% Tween 80	1.89	0.51	0.29	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	3.16	0.03	0.21	0.0002
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	3.08	0.28	0.14	0.0002
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	3.56	0.07	0.04	< 0.0001

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 5x ค่าตรวจสอบทางสถิติของระดับกิจกรรมของเอนไซม์ Catalase (U/mg of protein)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	11.08	6.79	3.92	0.600
BCCAO + 10% Tween 80	3.94	1.58	0.91	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	26.31	11.13	5.56	0.0970
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	50.34	29.54	14.77	0.0029
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	37.45	6.79	3.92	0.0268

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 6x ค่าตรวจสอบทางสถิติของระดับกิจกรรมของเอนไซม์ Superoxide dismutase (U/mg of protein)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	1.86	1.69	0.97	0.6771
BCCAO + 10% Tween 80	0.89	1.08	0.54	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	5.66	1.48	0.74	0.0424
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	10.57	3.44	1.72	0.0005
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	8.62	5.73	3.31	0.0050

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 7ข ค่าตรวจสอบทางสถิติของระดับ Calcium (mEq/L)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	0.30	0.02	0.01	0.0003
BCCAO + 10% Tween 80	0.60	0.14	0.07	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	0.35	0.05	0.02	0.0007
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	0.37	0.01	0.008	0.0015
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	0.37	0.05	0.03	0.0022

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 8ข ค่าตรวจสอบทางสถิติของระดับ โปรตีน (mg/gm. of tissue)

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	126.37	13.43	7.75	0.5943
BCCAO + 10% Tween 80	122.53	8.51	4.25	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	141.11	5.51	2.75	0.0756
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	131.49	11.27	5.63	0.1925
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	130.42	5.19	3.00	0.2825

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 9x ค่าตรวจสอบทางสถิติของร้อยละการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Cerebral cortex

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	18.66	1.80	1.04	0.0002
BCCAO + 10% Tween 80	44.41	7.08	4.08	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	25.98	3.71	2.14	0.0018
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	28.67	8.03	4.63	0.0048
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	26.61	3.31	1.91	0.0022

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 10x ค่าตรวจสอบทางสถิติของร้อยละการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ
ย่อย CA1

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	7.00	3.67	2.12	0.0009
BCCAO + 10% Tween 80	21.22	3.28	1.89	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	9.88	3.59	2.07	0.0039
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	10.45	4.44	2.56	0.0053
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	9.30	3.48	2.01	0.0028

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 11x ค่าตรวจสอบทางสถิติของร้อยละการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ
ย่อย CA3

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	22.64	4.09	2.36	0.003
BCCAO + 10% Tween 80	47.56	15.21	8.78	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	35.30	3.45	1.99	0.084
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	37.09	4.49	2.59	0.132
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	34.77	5.20	3.00	0.073

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 12x ค่าตรวจสอบทางสถิติของร้อยละการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน Hippocampus บริเวณ
ย่อย DG

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	4.35	0.43	0.25	0.0023
BCCAO + 10% Tween 80	18.82	8.65	4.99	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	8.83	1.95	1.12	0.0187
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	8.43	2.42	1.39	0.0155
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	7.13	3.24	1.87	0.0083

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80

ตารางที่ 13x ค่าตรวจสอบทางสถิติของร้อยละการตายของเซลล์ Purkinje ในสมองส่วน Cerebellum

กลุ่ม	Mean	Std. Dev.	Std. Err.	Fisher's PLSD (p-value)
Sham + 10% Tween 80	27.50	9.01	5.20	0.090
BCCAO + 10% Tween 80	38.24	8.92	5.15	
BCCAO + <i>T.triandra</i> 300 mg/kg	28.40	6.81	3.93	0.120
BCCAO + <i>T.triandra</i> 600 mg/kg	29.54	6.01	3.47	0.164
BCCAO + Quercetin 10 mg/kg	29.34	1.83	1.06	0.155

ค่า p-value เปรียบเทียบกับกลุ่ม BCCAO + 10% Tween 80