รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศักยภาพการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรท้องถิ่นภาคตะวันออกของประเทศไทยต่อการปกป้องเซลล์ประสาทในโรคความเสื่อมจากระบบประสาทกลาง

(The Potential Effect of Indigenous Medicinal Plant in The Eastern Region Part of Thailand on Neuroprotection in Neurodegenerative Diseases)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร.ปรัชญา แก้วแก่น

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560

รหัสโครงการ .....

สัญญาเลขที่ 32/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ ศักยภาพการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรท้องถิ่นภาคตะวันออกของประเทศไทยต่อการปกป้องเซลล์ประสาทในโรคความเสื่อมจากระบบประสาทกลาง

(The Potential Effect of Indigenous Medicinal Plant in The Eastern Region Part of Thailand on Neuroprotection in Neurodegenerative Diseases)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร.ปรัชญา แก้วแก่น

วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 32/2560

บทคัดย่อ (Abstract)

โรคความเสื่อมจากระบบประสาทกลางเป็นภาวะหนึ่งที่มีอุบัติการณ์เกิดโรคสูงและส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาการไทย โรคความเสื่อมจากระบบประสาทกลางที่สำคัญ คือ โรคพาร์กินสัน จากการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานกลไกของอนุมูลอิสระต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคพาร์กินสัน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักกูด ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดผักกูดสามารถมีฤทธิ์ต่อการปกป้องเซลล์ประสาท ตลอดจนการผลต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำ ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงได้นำสารสกัดแอลกอฮอล์ของสารสกัดผักกูด ขนาดต่างๆได้แก่ 10, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมาป้อนหนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้น้ำหนักประมาณ 280-320 กรัม จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะจำลองโรคพาร์กินสัน ด้วยการฉีดสาร 6-OHDA แล้วนำมาประเมินการเปลี่ยนแปลงของอนุมูลอิสระที่พบในเนื้อเยื่อสมองหนูแรท โดยการประเมินการเปลี่ยนแปลง oxidative stress markers ได้แก่ ปริมาณ Malondialdehyde (MDA) การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ Superoxide dismutase (SD), Catalase (CAT) และ Glutathione peroxidase (GPx) ในสมองส่วน Cerebral cortex, Striatum และ Hippocampus พบว่าหนูแรท กลุ่มที่ได้รับสารสกัดผักกูด มีการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวข้างต้นเพิ่มขึ้น และพบการเปลี่ยนแปลงของการลดลงของ MDA ลดลงทุกขนาดของสารสกัด และเมื่อประเมินผลการให้สารสกัดผักกูด ในการปกป้องสมองพบว่า หนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดผักกูด ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทที่รอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น ความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น และความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Caspase-3 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดผักกูด ดังนั้นการวิจัยนี้แสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดในวิถีอะพอพโทซิสได้ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์หลักของสารสกัดผักกูดนั้นยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Abstract

Neurodegeneration of the Central Nervous system is a condition that has a high incidence of disease and affects the quality of life of Thai people. Central nervous system depressive disorder is Parkinson's disease. Based on a recent study that reported the mechanism of free radicals to pathogenesis of Parkinson's disease, and the antioxidant activity of plant extracts. Researchers have hypothesized that *Dipalzium esculatum* extract (DEE) can increase antioxidant activity. It also affects learning and memory. Therefore, this study focus on alcohols extracted from DEE. Various sizes of 10, 50 and 200 mg / kg body weight were fed to male rats of Wistar, weighing 280-320 grams, and then induced by Parkinson's disease. With 6-OHDA injection, the free radicals found in brain tissue. Antioxidant activities include superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPx) in the brain. Cerebral cortex, striatum, and hippocampus are found in rat. The group received the DEE. The activity of the antioxidant enzyme mentioned above increased. MDA decreased in all doses of DEE. When evaluating the effect of DEE on protecting the brain. Grouped rats with 200 mg / kg body weight gain. Increased neuronal density Bcl-2 neuronal density increased and Caspase-3 neurons was decreased compared to untreated group. Therefore, this study demonstrates the mechanism of biological action of DEE in apoptosis pathway. However, the main mechanism of DEE is still to study further mechanism.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

กิตติกรรมประกาศ..... ก
บทคัดย่อ..... ข
สารบัญเรื่อง..... ง
สารบัญภาพ..... จ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย..... ฉ
บทนำ..... 1
วิธีดำเนินการวิจัย..... 10
ผลการการวิจัย..... 16
สรุปผลการวิจัย.....21
บรรณานุกรม.....22
ภาคผนวก.....24
ประวัติผู้วิจัย 39

สารบัญภาพ (List of illustrations)

ภาพที่ 1: กรอบแนวคิดการวิจัย..... 3
ภาพที่ 2: ส่วนของสมองที่เกิดพยาธิสภาพในโรคพาร์กินสัน.....6
ภาพที่ 3: แนวทางการรักษาโรคพาร์กินสันผ่านการเพิ่มสารสื่อประสาทโดปามีน.....7
ภาพที่ 4: ผักกูด..... 8
ภาพที่ 5: กลไกการกระตุ้นและยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีอะพอพโทซิส.....9
ภาพที่ 6: การเตรียมสารสกัดผักกูดในห้องปฏิบัติการ.....11
ภาพที่ 7: หนูแรทเพศผู้ชนิดวิสตาร์ (Wistar Rat) ในห้องปฏิบัติการวิจัย.....12
ภาพที่ 8: ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทที่รอดชีวิต (Survival Neuron).....17
ภาพที่ 9: ความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Caspases-3 18
ภาพที่ 10: ความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Bcl-2 18

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

Ab	Antibodies
ACh	Acetylcholine
ANOVA	Analysis of variance
AChE	Acetylcholinesterase
ACA	Anterior cerebral artery
ATP	Adenosine triphosphate
Bcl-2	B-cell Lymphoma
BH	Bcl-2 homology
°C	Celsius degree
CA1	Cornu ammonis area 1
CA2	Cornu ammonis area 2
CA3	Cornu ammonis area 3
Ca2+	Calcium ion
CAT	Catalase
CBF	Cerebral blood flow
CE	Corn Extract
ChAT	Choline acetyl transferas
Da	Dalton (atomic mass unit)
DAB	3,3'diaminobenzedine
DISC	Death-inducing signaling complex
DG	Dentate gyrus
DTNB	Dithiobisnitrobenzoate
DNA	Deoxyribonucleic Acid
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
eNOS	Endothelial nitric oxide synthase
GABA	Gamma-aminobutyric acid
g	Gram
GPx	Glutathione peroxidase
HDL	High density lipoprotein
HRP	Horse radish peroxide
IgG	Goat antimouse antibody
K+	Potassium ion
KCL	Potassium chloride
kg	Kilogram
KPBS	Krebs phosphate buffer saline

KPBS-BT	Krebs phosphate buffer saline
L	Liter
LDL	Low density lipoprotein
Linn.	Linnaeus
M	Molar
MDA	Malondialdehyde
mg	Milligram
mg/kg BW	Milligram per kilogram body weight
MCA	Middle cerebral artery
min.	Minutes
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
Mw	Molecular weight
N	Number
Na+	Sodium ion
NADP+	Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADPH	The reduced form of NADP+
nM	Nanomolar
NMDA	N-methyl-D-aspatate
pH	Percent of Hydrogen ion
RNA	Ribonucleic acid
ROS	Reactive oxygen species
s.	second
SEM	Standard error of mean
SOD	Superoxide dismutase
T1	First trial
T2	Second trial
TBARS	Thiobarbituric reactive substances
TIAs.	Transient ischemic attacks
µg	Microgram
µl	Microlitre
µm	Micrometer
µM	Micromolar
VLDL	Very density lipoprotein

บทนำ (Introduction)

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ระบบประสาทเป็นระบบที่ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของร่างกายทั้งหมด ดังนั้นจึงมีความสำคัญที่คนเราต้องมีการดูแลการทำงานให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม ทั้งนี้เมื่ออายุมากขึ้นมักพบอุบัติการณ์การเกิดโรคความเสื่อมของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative disease) ที่สำคัญเป็นลำดับต้น คือ โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease: PD) เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของความเสื่อมโครงสร้าง (Morphology) และหน้าที่ (Function) ของเซลล์ประสาท (Neuron) โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ ซับสแตนเซีย ไนกรา (Substatia Nigra) เมื่อเกิดพยิสภาพ จะพบอาการทางคลินิกที่สำคัญ (Clinical Menifestation) ได้แก่ อาการเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกายที่ผิดปกติไปไม่สามารถควบคุมได้ ที่พบบ่อย คือ อาการสั่น (Tremor) บริเวณปลายนิ้วมือ มือ เท้า และส่วนอื่นของร่างกายที่เกิดขึ้นขณะผู้ป่วยอยู่นิ่งๆ และเป็นอาการสำคัญที่เกิดก่อนอาการอื่นๆ ส่วนมากจะเป็นที่มือด้านใดด้านหนึ่งก่อน ต่อมาจะเป็นที่เท้าข้างเดียวกัน พออาการเป็นมากขึ้น จึงจะมาสั่นที่มือและเท้าด้านตรงข้าม ส่วนอาการสั่นศีรษะจะพบในรายที่มีอาการมากแล้ว ถ้ามีการเคลื่อนไหว อาการสั่นจะลดน้อยลง แต่หากมีอาการตื่นเต้นหรือเคลื่อนไหวของแขนขาด้านตรงข้าม อาการสั่นของแขนขาอีกด้านหนึ่งจะสั่นมากขึ้น โดยความถี่ของการสั่นประมาณ 4 - 8 ครั้งต่อนาที เวลาหลับอาการสั่นจะหายไป อาการแข็งเกร็ง (Rigidity) ทำให้การเคลื่อนไหวของอวัยวะรยางค์ไม่คล่องตัว โดยมักจะเป็นบริเวณข้อมือก่อน ต่อมาจะเป็นบริเวณข้อศอก แล้วจึงเป็นที่กล้ามเนื้อของลำตัว ถ้าหากมีอาการเคลื่อนไหวของแขนขาด้านตรงข้ามกับข้างที่ rigidity อาการ rigidity ของแขนขาข้างนั้นจะมีมากขึ้น อาการเคลื่อนไหวช้า (Bradykinesia) เคลื่อนไหวน้อยน้อย (Hypokinesia) ผู้ป่วยจะมีเคลื่อนไหวของแขนขาโดยความตั้งใจ ช้ากว่าปกติ โดยเฉพาะการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อเล็กๆ ของมือจะมีความผิดปกติอย่างมาก เช่น ผู้ป่วยไม่สามารถติดกระดุมเสื้อหรือสนเข็มได้ การเขียนหนังสือจะลำบาก ตัวหนังสือที่ผู้ป่วยเขียนจะเล็กลงเรื่อย (Micrographia) พูดช้า พูดลำบาก เสียงเบา ไม่มีเสียงต่ำและเสียงสูง(slurred, quiet และ monotonous) ในรายที่เป็นมากๆ ผู้ป่วยจะไม่สามารถช่วยเหลือตัวเองได้ และไม่สามารถลุกจากเตียงและเคลื่อนไหวได้เอง ใบหน้ามีลักษณะคล้ายกับคนสวมหน้ากาก(masked face หรือ Parkinsonian face) คือมีลักษณะเฉยเมย ไร้อารมณ์ ตาจ้องไม่กระพริบ น้ำลายไหล ส่วนลำตัวและแขนขาอยู่ในลักษณะงอ (flexion) อาการทรงตัวไม่มั่นคง (Postural instability) ล้มง่าย และการเริ่มเดินในตอนแรกจะค่อนข้างช้าและลำบาก พอออกเดินได้แล้วก็จะเดินได้เร็วขึ้น ลักษณะเวลาเดินคือ หลังงอ ศีรษะไปก่อน แขนขางอ แขนสองข้างไม่แกว่ง เดินก้าวสั้นๆ(shuffling gait) และช้า นอกจากนี้ยังมีอาการอื่นๆ เช่น กลืนอาหารลำบาก ท้องผูก เป็นตะคริวที่ขา 2 ข้าง ปวดหลัง ปวดเมื่อยตามลำตัวเนื่องจากกล้ามเนื้อแข็งเกร็ง ร้อนตามผิวหนัง เหงื่อออกมาก และน้ำลายมากกว่าปกติ

ผลจากอาการทางคลินิกดังที่กล่าวมา ทำให้นักวิทยาศาสตร์ปัจจุบันพยายามศึกษากลไกการเกิดพยาธิสภาพดังกล่าวเกิดจากสารสื่อประสาทที่สำคัญ คือ โดปามีน (Dopamine) ในสมองลดลง จึงแสดงอาการผิดปกติทางการเคลื่อนไหว เช่น อาการสั่น การเคลื่อนไหวช้า เดินลำบากและเสียการทรงตัว โดยพบ

อุบัติการณ์มากในผู้สูงอายุ มีการประมาณการว่า ในปัจจุบันมีผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน มากกว่า 5 ล้านคนทั่วโลก ความชุกของโรคพาร์กินสันในประเทศไทยเท่ากับ 242.57 ต่อประชากร 100,000 คนดังนั้นการป้องกันภาวะนี้จึงจัดเป็นเรื่องสำคัญเร่งด่วนทางการแพทย์และสาธารณสุข ด้วยอุบัติการณ์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและข้อจำกัดในการรักษาภาวะของโรคดังกล่าวทำให้มีการพยายามที่จะใช้สารป้องกันระบบประสาท (Neuroprotective agent) เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่ ให้ฟื้นคืนสภาพกลับมาทำงานของเนื้อเยื่อประสาท สารป้องกันระบบประสาทที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของเนื้อเยื่อสมอง อาทิ การเพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณ Substantia Nigra การยับยั้งการทำงานของกรดอะมิโนชนิดกระตุ้น(Excitatory amino acid) ผ่านตัวรับ NMDA การบาดเจ็บของเซลล์ประสาทที่มีความจำเพาะ ผลการเปลี่ยนแปลงตามวัยที่เพิ่มขึ้นของผู้ป่วยพาร์กินสันมักพบความบกพร่องที่เกี่ยวข้องกับแมตาบอลิซึมของพลังงาน เช่น การลดลงของฟังก์ชันคอมเพล็กซ์ I ในห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโตคอนเดรีย(Arnold, 2012) รวมทั้งการยับยั้งจากเกิดแมตาบอลิซึมแบบออกซิเดชันของไมโตคอนเดรียก็เป็นกลไกหนึ่งที่สำคัญ ดังนั้นการหาสารที่มีศักยภาพต้านการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชั่นจึงเป็นปัจจัยสำคัญ

ผักกูด ชื่อวิทยาศาสตร์ *Diplazium esculentum* Retz. ลักษณะของผักกูดเป็นเฟินชนิดหนึ่งที่สามารถรบประทานได้ พบได้ทั่วไปในเขตร้อนโดยเฉพาะภาคตะวันออกของประเทศไทย นำมารับประทานเป็นผักได้ เป็นพืชที่มีลำต้นเป็นเหง้าแบบตั้งตรง สูงมากกว่า 1 เมตร ส่วนที่นำมาปรุงเป็นอาหารคือก้านใบใหม่ที่โผล่ขึ้นมาจากลำต้น ส่วนปลายม้วนงอซึ่งจะพัฒนาไปเป็นใบอ่อนและใบแก่ ผักกูด มีรสจืดอมหวาน และกรอบ ยอดอ่อนและใบอ่อนนิยมนำมาบริโภค แต่บางชนิดยอดใบจะมีรสขมมาก นำมาปรุงเป็นอาหารทั้งยำ ผัด แกง จืด แกงเลียง แกงส้ม แกงแค บางครั้งก็นิยมลวกหรือนำมาราดน้ำกะทิ รับประทานร่วมกับน้ำพริก มีแคลเซียม ธาตุเหล็ก ธาตุฟอสฟอรัส วิตามินเอ วิตามินบี1 วิตามินบี2 และวิตามินบี 3 ช่วยต้านอนุมูลอิสระ (Diswadeep, 2013) ลดระดับคอเลสเตอรอล บำรุงโลหิต แก้โรคโลหิตจาง บำรุงสายตา ลดระดับน้ำตาลในเลือดของภาวะเบาหวาน(Hui,2012) รวมถึงมีการศึกษาถึงฤทธ์ antibacterial acitivity ด้วย (Semwal, 2011) เนื่องจากมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ(antioxidant)โดยจะปกป้องเยื่อหุ้มเซลล์รวมถึงการต้านการเกิดลิปิดเพอรอกซิเดชั่น(lipids peroxidation)

ด้วยบทบาทของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการออกฤทธิ์ปกป้องสมองจากภาวะที่สมองมีการเกิดอนุมูลอิสระถูกทำลายจากการขาดเลือด สารที่นำมาใช้ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ เรียกว่า สารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่ต่อต้านหรือยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ที่มีกลไกยับยั้งอนุมูลอิสระไม่ให้ทำลายองค์ประกอบของเซลล์ ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าผักกูดสกัดซึ่งมีฤทธิ์ทางชีวภาพดังกล่าว สามารถปกป้องสมองจากภาวะความเสื่อมของเซลล์ประสาทได้โดยศึกษาในแบบจำลองการเกิดโรคพาร์กินสันในสัตว์ทดลอง เพื่อเป็นองค์ความรู้พื้นฐานก่อนที่ศึกษาในมนุษย์

2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อสนองพระราชดำริโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี

2.2 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดในการป้องกันและ/หรือลดการทำลายเซลล์ประสาทในหนูแรทเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวให้เกิดโรคพาร์กินสัน

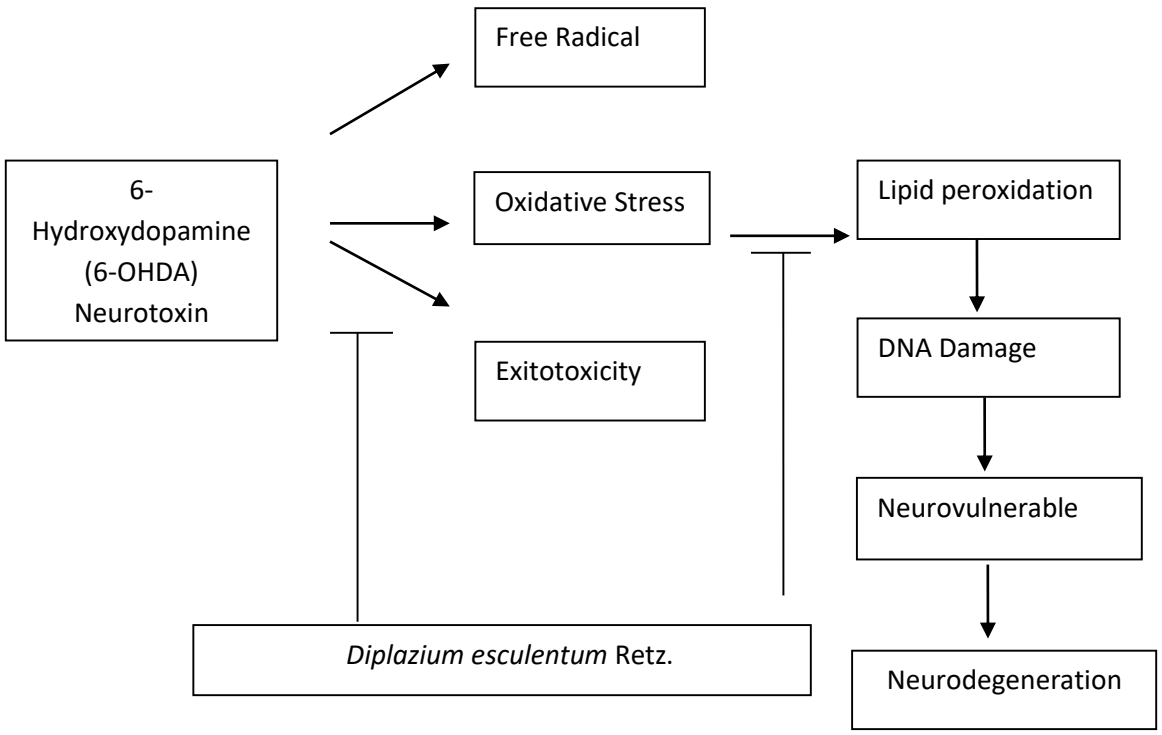
2.3 เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และ ความจำในหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสันด้วย 6-OHDA

2.4 เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดผักกูด ต่อ oxidative stress markers

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

สัตว์ทดลองที่ใช้จะเป็นหนูแรทเพศผู้เพื่อลดผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนเพศ (Estrous cycle) โดยการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองจะต้องทำเป็นการศึกษาคู่ขนานกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเพื่อป้องกันผลกระทบด้านฤดูกาล ส่วนการให้สารสกัดผักกูดจะต้องทำในช่วงเดียวกันตลอดการทดลองเพื่อหลีกเลี่ยงจากผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของวงรอบทางชีวภาพสัตว์ทดลองการวิจัยนี้ คือ หนูแรท (Biological rhythm)

4. ทฤษฎี สมมุติฐานและกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวความคิดของการวิจัย

5. สมมติฐานของงานวิจัย

5.2.1 ถ้าสารสกัดผักกูดมีฤทธิ์ป้องกัน (Neuroprotection)และลดการตายของเซลล์ประสาทในโรคพาร์กินสัน สัตว์ทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสัน และได้รับสารสกัดผักกูดจะมีการตายของเซลล์ประสาทน้อยกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสันและไม่ได้รับสารสกัดผักกูด

5.2.2 ถ้าสารสกัดผักกูดมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้ในโรคพาร์กินสันได้ สัตว์ทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสันและได้รับสารสกัดผักกูดจะมีพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำดีกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสันและไม่ได้รับสารสกัดผักกูด

5.2.3 ถ้าสารสกัดผักกูดมีฤทธิ์ป้องกันและลดการตายของเซลล์ประสาทและเพิ่มการเรียนรู้โดยผ่านกลไกการลดอนุมูลอิสระ สัตว์ทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสันและได้รับสารสกัดผักกูดจะมีระดับ lipid peroxidation, protein carbonyl และ superoxide anion น้อยกว่า แต่มีสมรรถนะของเอนไซม์ superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase สูงกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสัน และไม่ได้รับสารสกัดผักกูด

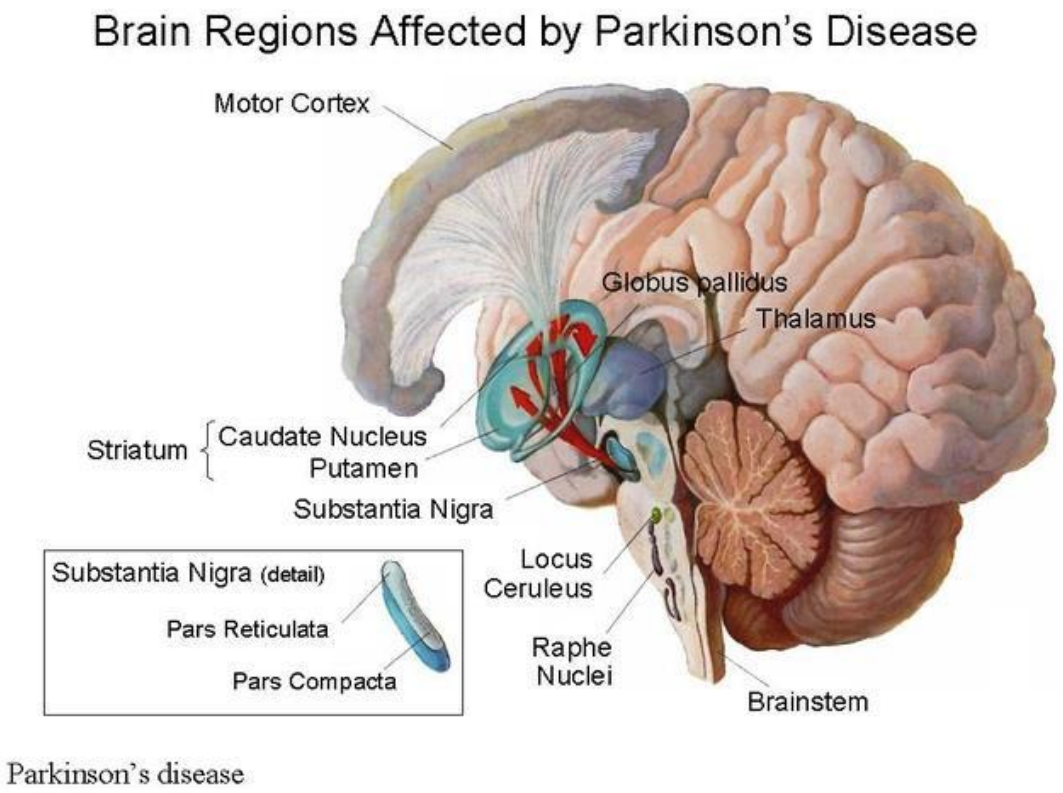
6. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

โรคพาร์กินสัน (Parkinson disease: PD) เป็นโรคในกลุ่มโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท (Neurodegenerative Disease) จึงไม่ค่อยพบในบุคคลอายุต่ำกว่า 40 ปี ทั้งนี้แม้ยังไม่ทราบพยาธิกำเนิดของโรคที่แน่ชัด แต่เบื้องต้นทราบว่าอาการของโรคเกิดจาก มีการลดลงของ dopamine จาก basal ganglia ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทสำคัญที่เชื่อมโยงระหว่าง thalamus และ motor cortex เมื่อมีการขาดเลือดทำให้เกิดการเสียหายของเซลล์ เป็นผลจากการไม่มีการไหลเวียนของเลือด ทำให้เกิดการขาดเลือดที่รุนแรง เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทและสมอง ทำให้โครงสร้างของเซลล์ประสาทเสื่อมสภาพไป โรคพาร์กินสัน (Parkinson’s disease) เป็นโรคความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative disorders) ที่มักพบในผู้สูงอายุ (1,2) ในปัจจุบันโรคพาร์กินสันยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ เป็นโรคเรื้อรังที่ต้องการการรักษาและดูแลอย่างต่อเนื่อง การรักษาผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะให้ความสำคัญกับการใช้ยาเป็นหลัก และอาการของโรคจะเพิ่มมากขึ้นตามการดำเนินของโรคพาร์กินสัน การใช้ยาต้านพาร์กินสันตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบันนิยมใช้ยากลุ่ม levodopa เป็นหลัก (3) โดยผู้ป่วยโรคพาร์กินสันในระยะกลางและปลายจะพบปัญหาเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อยาไม่สม่ำเสมอ (motor fluctuation) โดยเฉพาะการเกิดอาการที่เหมือนยาหมดฤทธิ์ (off time) ซึ่งเป็นปัญหาที่แพทย์ให้ความสำคัญ เพราะมักเป็นปัญหาเกี่ยวเนื่องโดยตรงกับการบริหารยา ซึ่งการรักษาคือการใช้ยากลุ่ม sustained-release levodopa หรือเพิ่ม dopamine agonist หรือ COMT inhibitors และ

ลดขนาดยา levodopa ลง (4) อย่างไรก็ตามการเกิดอาการดังกล่าวอาจจะเกิดจากหลายสาเหตุร่วมกัน จึงมีความหลากหลายในการเลือกวิธีการดูแลด้วยยาที่เหมาะสม

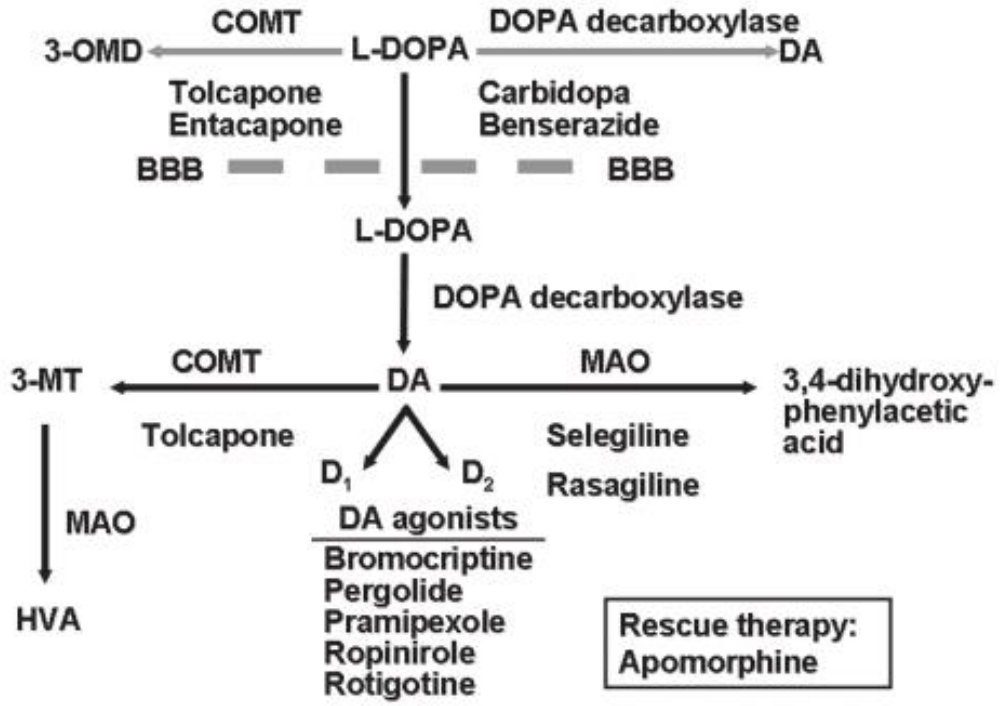
ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันต้องได้รับการดูแลอย่างใกล้ชิด รักษาอย่างต่อเนื่องตลอดชีวิต ค่าใช้จ่ายในการรักษาที่สูง ทำให้เป็นภาระแก่ญาติหรือผู้ใกล้ชิดและแก่สังคมโดยรวม ความชุกของโรคนี้ประมาณ 0.5-1% ของประชากรทั้งโลกและเพิ่มขึ้นเป็น 4% ของผู้ที่อายุมากกว่า 65 ปีขึ้นไปโรคนี้มักเกิดกับผู้ที่มีอายุเกิน 55 ปี เกิดกับผู้ชายมากกว่าผู้หญิง และความชราเป็นปัจจัยเสี่ยงที่สำคัญที่สุดของโรคนี้ ดังนั้น จึงคาดว่าในอนาคตจะมีผู้เป็นโรคนี้สูงขึ้น เนื่องจากขณะนี้ประเทศต่าง ๆในโลกอยู่ในสังคมของผู้สูงอายุและมีจำนวนของผู้สูงอายุเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ขณะนี้ยังไม่ทราบสาเหตุที่แท้จริงของโรคนี้ แต่ทราบว่าปัจจัยเสี่ยงต่อโรคนี้นอกเหนือจากความชราแล้ว ยังมีปัจจัยเสี่ยงอื่น ๆ ได้แก่ การสัมผัสกับยากำจัดศัตรูพืช การอาศัยอยู่ในชนบท การดื่มน้ำบาดาล การได้รับโลหะหนัก (เช่น แมงกานีส) เป็นต้น

พยาธิสภาพในสมองผู้ป่วยที่เด่นชัดคือ มีการตายของเซลล์ประสาทโดพามีน (dopamine) อย่างต่อเนื่องใน substantia nigra par compacta ทำให้สารสื่อประสาทโดพามีนใน striatum ลดลงอย่างมากการรักษาโรคนี้มักจะให้ยาที่เพิ่มการสังเคราะห์โดพามีน (เช่น L-dopa + carbidopa, L-dopa + benserazide, entacapone) ยาที่ลดการกำจัดโดพามีน (selegiline) ยาที่กระตุ้นตัวรับโดพามีน (pramiplexole, ropinirole) ซึ่งบางครั้งอาจเรียกว่าเป็นการรักษาโดยให้ยาทดแทนโดพามีนที่พร่องไป (dopamine replacement therapy) แม้ว่าการรักษาด้วยยาดังกล่าวจะให้ประสิทธิผลที่ดีในระยะแรกของโรคและเมื่อเริ่มใช้ยา แต่ประสิทธิผลของการรักษาจะค่อยๆ ลดลงจนในที่สุดการรักษาจะล้มเหลวและอาการของผู้ป่วยจะทรุดลงอย่างรวดเร็ว เช่นเดียวกับโรคสมองเสื่อมฝ่ออื่น ๆ การรักษาด้วยยาที่มีใช้ในปัจจุบันเป็นการรักษาตามอาการโดยที่ไม่ได้กำจัดต้นเหตุของการเกิดโรคหรือการเกิดสมองเสื่อมฝ่อแต่อย่างใด นอกเหนือจากข้อจำกัดที่การรักษาที่ได้ผลระยะสั้นมักไม่เกิน 5 ปีแล้ว การรักษาโดยการเพิ่มการทำงานของระบบประสาทโดพามีนในระยะยาวไม่สามารถลดอาการนอกเหนือจากความผิดปกติของการเคลื่อนไหว และยังทำให้เกิดผลไม่พึงประสงค์ที่เป็นอุปสรรคในการรักษาผู้ป่วยอีกหลายประการ เช่น การเคลื่อนไหวผิดปกติโดยไม่ได้ตั้งใจ (abnormal involuntary movements หรือบางครั้งเรียกว่า dyskinesia



ภาพที่ 2 ส่วนของสมองที่เกิดพยาธิสภาพในโรคพาร์กินสัน

การเสื่อมของเซลล์ในส่วน SNc ซึ่งมีหน้าที่ในการผลิต Dopamine ส่งผลให้ปริมาณของโดปามีนในสมองมีน้อยลง โดยปกติแล้ว Dopamine ถูกเปลี่ยนมาจาก amino acid tyrosine โดยใช้เอนไซม์ที่มีชื่อว่า Tyrosine hydroxylase (TH) TH นี้ก็มีปริมาณน้อยลงในผู้ป่วยพาร์กินสันเช่นเดียวกัน หลังจากโดปามีนถูกผลิตขึ้นมาก็จะถูกเปลี่ยนต่อไป โดยเอนไซม์ที่เรียกว่า Monoamine oxidase (MAO) และ Cathechol-O-methyl transferase (COMT) จนเป็นสารสุดท้ายที่เรียกว่า Homovanillic acid (HVA) ก่อนที่จะถูกกำจัดออกไปจากร่างกาย เอนไซม์ MAO และ COMT นี้มีความสำคัญ เพราะเป็นตำแหน่งของยาที่ใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสัน ในปัจจุบันออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ดังกล่าวถึงแม้ว่าพยาธิสภาพในโรคพาร์กินสันในส่วนใหญ่อยู่ที่ SNc ส่งผลให้ผู้ป่วยมีความผิดปกติในการเคลื่อนไหวดังที่ได้กล่าวไว้ข้างต้นใน ปัจจุบัน พบว่าการเสื่อมของระบบประสาทในโรคพาร์กินสันเริ่มที่ในส่วนของ Dorsal motor nucleus of vagus nerve และมีการเสื่อมในลักษณะที่เริ่มจากส่วนล่างของ Brainstem ใน Medulla ก่อนที่การเสื่อมจะค่อยๆ เพิ่มขึ้นในลักษณะ Caudal-Rostral extension ดังนั้นหากมีวิธีการที่ทำให้เซลล์ประสาทสามารถที่จะกู้ให้กลับมาทำงานได้ถือเป็นโอกาสในการหาแนวทางการหรือกลยุทธ์การรักษาภาวะดังกล่าว



ภาพที่ 3 แนวทางการรักษาโรคพาร์กินสันผ่านการเพิ่มสารสื่อประสาทโดปามีน

การเกิดการตายของเซลล์ประสาทตามลำดับขั้นแบบ apoptosis (Tatton, 2003) มีรายงานว่ามีความเกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดโรคพาร์กินสัน จากการทำงานของโปรตีนที่อยู่ใน Bcl-2 family, Bax (Hartmann, 2001) และ caspase นั้นจะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเกิด apoptosis หนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Bcl-2 จะป้องกันการบาดเจ็บของเซลล์จากการขาดเลือดได้อย่างไรก็ตาม นอกจาก Bcl-2 แล้วยังมีรายงานว่า caspase ซึ่งเป็น cysteine protease enzyme เองก็มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ โดยเฉพาะ caspase-3 นอกจากกลไกผ่าน apoptosis แล้วยังพบว่าการตายของเซลล์ประสาทนี้ยังเกิดขึ้นผ่านอีกหลายกลไก รวมทั้ง การทำงานของ excitatory amino acid มากเกินไป และการเกิดอนุมูลอิสระ(Lo et al.,2005; Siesjö et al.,1995) ได้ทำมีความพยายามที่จะใช้สารปกป้องระบบประสาท (Neuroprotective agent) เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทฟื้นคืนสภาพกลับมาทำงาน สารปกป้องระบบประสาทที่มีการพัฒนาขึ้นมาใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะพาร์กินสัน เช่นเพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณดังกล่าว รวมทั้งมีรายงานการวิจัยว่าสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant) มีศักยภาพเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในภาวะโรคทางสมอง (Kaewkaen et al.,2012) สารต้านอนุมูลอิสระ เช่น vitamin A, C, E, carotenoid, flavonoids และ polyphenols ล้วนมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระภายในระบบประสาทส่วนกลางและส่งเสริมระบบโคลิเนอร์จิกที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ (Bhutada., 2011) โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ ในกรณีหลังจะมีประโยชน์แต่ออกฤทธิ์ในปริมาณที่ต่ำมากไม่

เกิดอันตรายต่อเซลล์ เซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหาย หากมีอนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไก ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอ ต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือสามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนท์มีมากเกินสมดุล(Oxidative stress) และเกิดโรคความเสื่อมจากระบบประสาทกลางได้การหาวิธีการการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระและความเสื่อมของสารชีวโมเลกุลด้วยพฤกษเคมีจึงมีความสำคัญ

ภาพที่ 4 ผักกูด

ชื่อวิทยาศาสตร์ : *Diplazium esculentum* (Tetzius) Swartz

ชื่อเรียกอื่น : หมิ้น ขี่หมิ้น ขมิ้นหัว

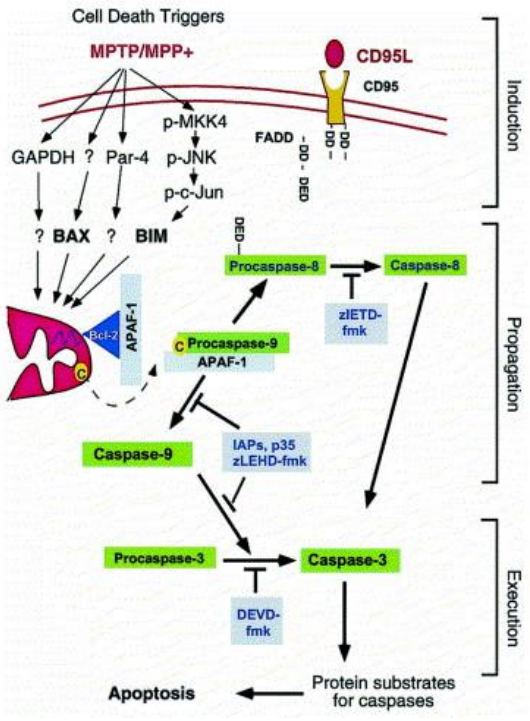
ชื่อวงศ์ : Athyriaceae

ลักษณะ : พืชจำพวกเฟิน มีเหง้าใต้ดิน อายุหลายปี ใบประกอบแบบขนนกสองชั้น ก้านใบยาวสีน้ำตาล มีเกล็ดปกคลุม สร้างกลุ่มอับสปอร์ด้านล่างของใบเพื่อใช้ในการขยายพันธุ์ ขยายพันธุ์โดยสปอร์หรือแยกเหง้าใต้ดิน ผักกูด จัดเป็นเฟิร์นขนาดใหญ่ที่มีเหง้าตั้งตรง และมีความสูงมากกว่า 1 เมตรขึ้นไป เหง้าปกคลุมไปด้วยใบเกล็ด เกล็ดมีขนาดกว้างประมาณ 1 มิลลิเมตรและยาวประมาณ 1 เซนติเมตร เกล็ดมีสีน้ำตาลเข้มถึงสีดำ ขอบใบเกล็ดหยักเป็นซี่

โดยเฟิร์นชนิดนี้มักจะขึ้นหนาแน่นตามชายป่าที่มีแดดส่องถึง ในบริเวณที่ลุ่มชุ่มน้ำ ตามริมลำธาร บริเวณต้นน้ำ หนองบึง ชายคลอง ในที่ที่มีน้ำขังแฉะและมีอากาศเย็น รวมไปถึงในพื้นที่เปิดโล่ง หรือในที่ที่มีร่มเงาบ้าง และจะเจริญเติบโตได้ดีบริเวณที่ชื้นแฉะ มีความชื้นสูง เติบโตในช่วงฤดูฝน ขยายพันธุ์ด้วยวิธีการใช้

เหง้า ใช้สปอร์ หรือไหล มีเขตการกระจายพันธุ์อยู่ในเขตร้อนทั่วไปของเอเชีย ไล่ตั้งแต่ภาคกลางของประเทศจีน ภาคใต้ของญี่ปุ่น ไปจนถึงหมู่เกาะแปซิฟิก ส่วนในประเทศไทยบ้านเราจะพบผักกูดได้ทั่วไปแทบทุกภูมิภาค ในที่มีสภาพดินไม่แห้งแล้ง

ผักกูดขึ้นอยู่บริเวณดินแฉะๆ หรือริมลำธารในบริเวณที่ได้รับแสงเต็มที่ บนพื้นที่ระดับต่ำถึงที่สูงจากระดับน้ำทะเลประมาณ 800 เมตร เป็นพืชที่ปรากฏอุดมสมบูรณ์ในพื้นที่พื้นถิ่นภาคตะวันออกของประเทศไทย ผักกูด (*Diplazium esculentum* (Koenig ex Retz.) อยู่ในวงศ์ Athyriaceae เป็นพืชตระกูลเฟิร์น(Fern) ที่พบได้ในเขตร้อนเอเชียและโอเชียเนีย มีการศึกษาพบค่าการต้านอนุมูลอิสระรวม(total antioxidant) ที่ร้อยละ 70 จากการสกัดผักกูดด้วยเมทานอล สามารถยับยั้งการเกิดภาวะเพอรอกซิเดชั่น(Lipid peroxidation) นอกจากนั้นยังพบค่าสารประกอบฟีโนลิก(phenolic) และฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ปริมาณสูง(Roy, 2013) สรรพคุณของผักกูด ช่วยเสริมสร้างร่างกายให้แข็งแรง ช่วยเพิ่มภูมิคุ้มกันและช่วยต่อต้านอนุมูลอิสระ (ใบ) ผักกูดอุดมไปด้วยธาตุเหล็กและเบตาแคโรทีน การรับประทานผักกูดร่วมกับเนื้อสัตว์จะช่วยทำให้ร่างกายดูดซึมแร่ธาตุต่าง ๆ ได้ดีขึ้น และยังช่วยบำรุงร่างกายอีกด้วย (ใบ) ใบผักกูดนำมาต้มเป็นน้ำดื่มช่วยแก้ไข้ตัวร้อน (ใบ) ผักกูดเป็นผักที่มีคุณสมบัติช่วยดับร้อน ทำให้ร่างกายปรับสภาพอุณหภูมิให้เข้ากับฤดูได้ ช่วยลดระดับคอเลสเตอรอลในเม็ดเลือด (ใบ) ช่วยบำรุงโลหิต เนื่องจากผักกูดเป็นผักที่มีธาตุเหล็กมากที่สุดเป็นอันดับ 1 (ใบ) ช่วยแก้โรคโลหิตจาง (ใบ) ช่วยบำรุงสายตา (ใบ) ช่วยลดความดันโลหิตสูง (ใบ) ช่วยป้องกันโรคเลือดออกตามไรฟันได้ (ใบ) ผักกูดเป็นผักที่มีเส้นใยอาหารสูงมาก จึงช่วยให้ระบบขับถ่ายทำงานได้อย่างดี (ใบ) ช่วยขับปัสสาวะ (ใบ) ช่วยแก้พิษอักเสบ (ใบ)



ภาพที่ 5 กลไกการกระตุ้นและยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีอะพอพโทซิส (Apoptosis Pathway)

จากข้อมูลที่ได้กล่าวมาทั้งหมดการใช้กลไกต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้ชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาท จึงเป็นกลไกสำคัญ สารสกัดผักกูดจะเป็นสารที่มีความเป็นไปได้ในการพัฒนาต่อยอดองค์ความรู้เรื่องสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ เนื่องจากประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางทรัพยากรธรรมชาติ ดังนั้นการคัดเลือกสารสกัดซีผักกูดจึงมีความเป็นไปได้สูง นอกจากนั้นยังสามารถต่อยอดเชิงพาณิชย์ในรูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพที่มีประสิทธิภาพสูงต่อการป้องกันโรคพาร์กินสันซึ่งเป็นปัญหาสุขภาพที่สำคัญต่อประเทศที่ส่งผลต่อคุณภาพของประชากรไทย

7. วิธีดำเนินการวิจัย (Materials & Method)

7.1 อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์ (Material)

1. สารเคมีในการตรวจวัด Survival neurons
2. สารเคมีใช้ศึกษา Immunohistochemistry Bcl-2 และ Caspase -3
3. สารเคมีในการตรวจวัดเอนไซม์ Acetylcholinesterase
4. สารเคมีสำหรับตรวจวัดเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), Catalase (CAT) และ Glutathione peroxidase (GSH-Px; GPx)
5. วัสดุรองนอนและอาหารสัตว์ทดลอง
6. สารสกัดผักกูด

7.2 วิธีการ (Procedure)

7.2.1 การเตรียมสารสกัด

ขั้นตอนการสกัดสารจากผักกูดหั่นให้เป็นชิ้นเล็กๆแล้วนำไปอบให้แห้งเพื่อป้องกันการเกิดเชื้อราเมื่อพืชแห้งสนิทแล้วจึงนำมาปั่นบดให้เป็นผง นำผงดังกล่าวไปเข้ากระบวนการสกัดด้วยเครื่อง Soxhlet Extractor โดยใช้เอทธานอล 95% เป็นตัวทำละลาย ใช้เวลาในการสกัดประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปเข้ากระบวนการกลั่นแบบ reflux เพื่อแยกตัวทำละลายที่ผสมอยู่ออกให้หมดด้วยเครื่อง Rotary Evaporator กระบวนการสุดท้ายคือการทำให้สารสกัดแห้งเพื่อที่จะสามารถเก็บรักษาสารสกัดให้นานยิ่งขึ้นและเป็นการเพิ่มความเข้มข้นให้สารสกัดด้วยเครื่อง Lyophilizer สามารถเก็บรักษาสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

ภาพที่ 6 การเตรียมสารสกัดผักกูดในห้องปฏิบัติการ

7.2.3 สัตว์ทดลองในการวิจัย

ในการศึกษานี้ใช้หนูแรทเพศผู้ชนิดวิสตาร์ (Wistar Rat) จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ อ.ศาลายา จ.นครปฐม เป็นสัตว์ทดลอง หนูวัยเจริญพันธุ์จะใช้หนูอายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 280-320 กรัม นำมาเลี้ยงไว้ในกรงๆละ 5 ตัว สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงไว้ภายใต้สภาวะสว่าง-มืด (light –dark cycle) 12:12 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 22 $\pm$ 2° ซ. สัตว์ทดลองได้รับอาหารและน้ำอย่างสมบูรณ์ (*ad libitum*)

ภาพที่ 7 หนูแรทเพศผู้ชนิดวิสตาร์ (Wistar Rat) ในห้องปฏิบัติการวิจัย

8. ผลการวิเคราะห์สารสกัดผักกูด

(1.) การเตรียมสารสกัดสารสกัดผักกูดและสารละลายของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและ ไมละลายในน้ำ สารสกัดผักกูดมา 200 กรัม หมักดวยเอทธานอล 95% และนำไประเหยแหงจะได้น้ำหนักสารสกัดและ % yield ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดผักกูดและ % yield ของสารสกัดผักกูด

ชนิดพืช	น้ำหนักผักกูดสด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดผักกูด(กรัม)	% yield
ผักกูด	500	58.45	8.55

8.1 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น (Phytochemical Screening) เปนการตรวจสอบองคประกอบทางเคมีเบื้องตนของสารสกัดผักกูดมีองคประกอบทางเคมีเปนกลุมใด โดยในการวิจัยนี้จะตรวจสอบสาร กลุม Flavonoids และ Phenolic compounds and Tannins โดยองคประกอบเคมีเหลานี้สามารถแสดงฤทธิ์ตานอนุมูลอิสระได การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้น ของ สารสกัดส่วนเอทิลแอซีเตตและเอทานอล 7 กลุ่ม ได้แก่ แอนทราควิโนน เทอร์พีนอยด์ ฟลาโวนอยด์ ซาโปนิน แทนนิน แอลคาลอยด์ และคาร์ดิแอกไกลโคไซด์ จะใช้ ปฏิกิริยาการเกิดสีหรือตะกอน (Trease and Evans, 2002; Harborne, 1998) ดังนี้

ตารางที่ 2 การตรวจสอบสารพฤกษเคมีเบื้องต้นของสารสกัดเอทานอลผักกูด

สารพฤกษเคมี	สารสกัดเอทานอล
แอนทราควิโนน	Negative
เทอร์พีนอยด์	Negative
ฟลาโวนอยด์	Positive
ซาโปนิน	Negative
แทนนิน	Negative
แอลคาลอยด์	Positive
คาร์ดิแอกไกลโคไซด์	Negative

9. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดต่อการเปลี่ยนแปลงทางพฤติกรรม

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดในสัตว์ทดลอง โดยแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลองเป็นกลุ่มต่างๆ กลุ่มละ 10 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Sham operation group คือ กลุ่มที่ได้รับอาหารและน้ำตามปกติ และในวันที่ 14 ของการทดลองได้รับการผ่าตัดหลอก

กลุ่มที่ 2 Vehicle group คือ กลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารตัวทำละลาย/ ตัวพา ได้รับขนาด 0.5 มิลลิลิตร เท่ากันทุกตัว วันละครั้ง และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบดูผลของสารตัวทำละลาย/ ตัวพา

กลุ่มที่ 3-5 กลุ่มที่เหนี่ยวนำให้เกิดพาร์กินสันด้วย 6-OHDA Neurotoxin ด้วย intraventricular injection และได้รับสารสกัดผักกูดในขนาดต่างๆ 3 ขนาด (dose) คือ ระดับ ต่ำ กลาง และสูง วันละครั้ง

กลุ่มที่ 6 Positive control group คือ กลุ่มที่ได้รับยาที่มีเพิ่มการเรียนรู้และความจำ วันละครั้ง และยามาตรฐานที่ใช้รักษาโรคพาร์กินสันใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ย่อยได้ดังนี้

a. Donepezil treated group สัตว์ทดลองได้รับ Donepezil (Acetylcholine esterase inhibitor) ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

b. Levodopa (L-dopa) treated group สัตว์ทดลองได้รับ L-dopa ขนาด 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ภายหลังการแบ่งกลุ่มการทดลองเสร็จสิ้น สัตว์ทดลองในกลุ่ม Vehicle, สารสกัดผักกูด และ Positive control treated group จะถูกฉีด 6-OHDA ทำให้เกิด โรคพาร์กินสัน ในวันที่ 14 ของการทดลอง หลังจากนั้นสัตว์ทดลองจะได้รับการป้อนสารทดสอบต่อไปอีก 21 วัน โดยจะประเมินการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test และ object recognition test ทุก 7 วันจนสิ้นสุดการทดลอง

10. การตรวจวัดปริมาณ Malondialdehyde (MDA) และการทำงานของ scavenger enzymes

สมองของสัตว์ทดลองในส่วน cerebral cortex และ hippocampus จะถูกแยกและนำมาเตรียมเป็น brain homogenate ดังกล่าวข้างต้นแล้วนำมาประเมินระดับ MDA ด้วน Thiobarbituric reaction (TBAR) ตรวจวัด activity ของ scavenger enzymes ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GSH-Px; GPx) ด้วยวิธี coloretic method

11. การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ oxidative stress damage markers

สัตว์ทดลองมาแบ่งเป็นกลุ่มต่างๆดังที่กล่าวไว้ใน 3 นำสมองส่วน cerebral cortex , striatum และ hippocampus ไปตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของ oxidative stress damage markers ประกอบด้วย

malondialdehyde (MDA) และการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระได้แก่ superoxide dismutase , catalase และ glutathione peroxidase ภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรค

12. การวิเคราะห์ข้อมูล

การเปรียบเทียบผลของสารสกัดข้าวโพดระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองใช้ ANOVA การเปลี่ยนแปลงที่ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติคือตั้งแต่ p-value < 0.05

ผลการวิจัย (Results)

1. การเตรียมสารสกัดผักกูด

ได้ทำการเตรียม alcoholic extract ของสารสกัดผักกูดด้วย 95 % alcohol โดย Soxhlet extraction technique มีเปอร์เซ็นต์ yield 8.55

2. การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดผักกูด

หนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดผักกูดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ (Scavenger enzymes) พบว่าในการศึกษาครั้งนี้ จะมีการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในสมองหนูแรท ($p\text{-value} < .05$ ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle และเหนี่ยวนำให้เกิดโรคหรือ vehicle+6-OHDA) ดังแสดงใน**ตารางที่ 3**

ตารางที่ 3 ฤทธิ์ของสารสกัดผักกูดต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA) และ การเปลี่ยนแปลงการทำงานของ scavenging enzymes ในสมองหนูแรท

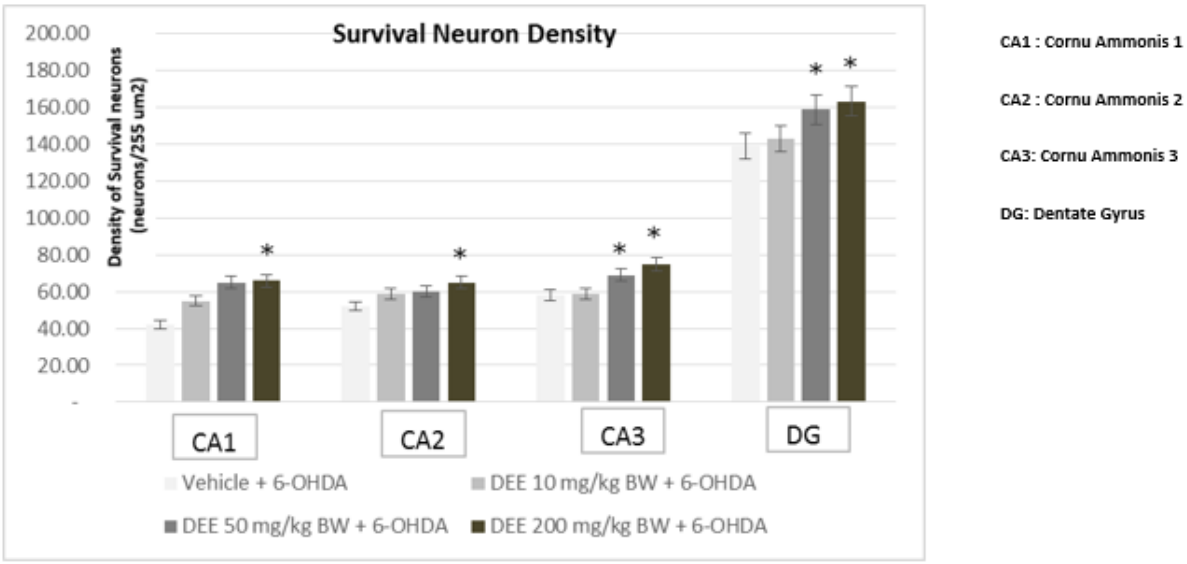
Group	*MDA (u/mg.protein)*	*CAT (u/mg.protein)*	*SOD (u/mg.protein)*	*GSH-Px (u/mg.protein)*
Control Vehicle +6-OHDA	9.45±0.50	8.84±2.94	6.45±0.11	5.52±0.10
Donepezil 1 mg/ kgBW +6-OHDA	5.15±0.12*	15.32±3.05*	8.65±0.52*	9.85±0.15*
DEE 10 mg/ kgBW + MCAO	3.38±0.39	19.56±7.11*	9.82±0.33	9.94±0.21*
DEE 50 mg/ kgBW +6-OHDA	2.25±0.17*	12.94±2.16*	1235±0.12*	15.91±0.52*
DEE 200 mg/ kgBW +6-OHDA	1.66±0.53*	11.34±4.53*	16.82±0.45*	18.95±0.25*

หมายเหตุ : * คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม +MCAO

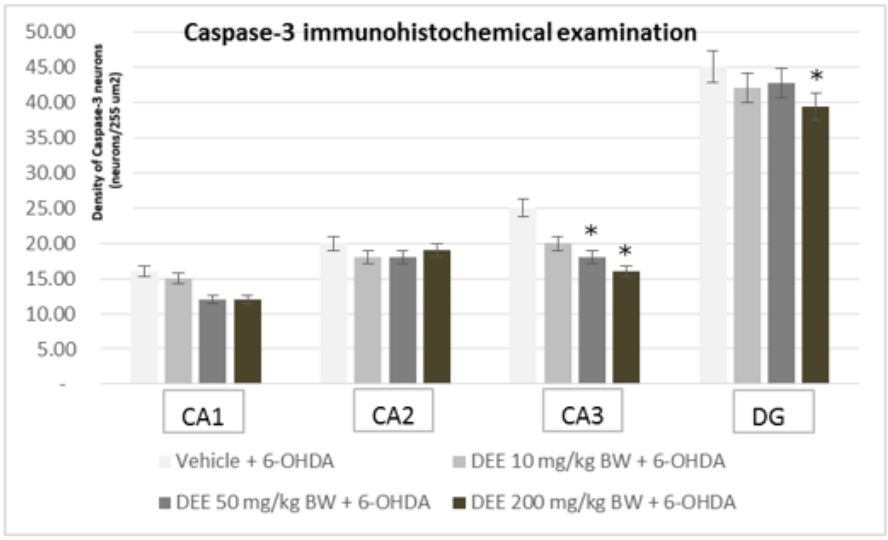
ผลการศึกษาปรากฏหนูแรทที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่มีการทำงานของเอนไซม์ catalase ในสมอง เพิ่มขึ้น ผลการศึกษาปรากฏหนูแรทที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวที่มีการทำงานของเอนไซม์ เอนไซม์ glutathione peroxidase ในสมองเพิ่มขึ้น (p-value<.05 ทั้งหมดเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ vehicle+6-OHDA)

เมื่อทำการประเมินฤทธิ์สารทดสอบต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ malondialdehyde(MDA) ซึ่งเป็นดัชนีแสดงการทำลายของเซลล์จากความเครียดออกซิเดชัน (oxidative damage) หนูแรทที่ได้รับสารสกัดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีปริมาณ MDA ในสมองลดลง (p-value<.05 ทั้งหมด เทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ vehicle+6-OHDA)

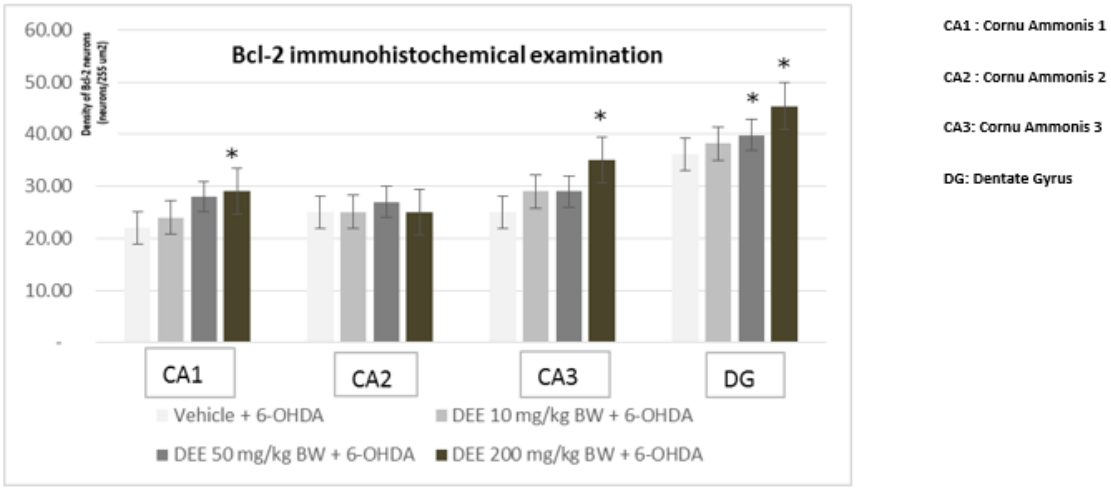
เมื่อทำการป้อนสารสกัดให้หนูแ เพศผู้ขนาด 10, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดให้เกิดโรค จะพบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดผักกูดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาทที่รอดชีวิต (Survival Neuron) (p-value<.05 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ vehicle และเหนี่ยวนำโรค) ดังแสดงในภาพที่ 8



ภาพที่ 8 ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทที่รอดชีวิต (Survival Neuron)



ภาพที่ 9 ความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Caspases-3



ภาพที่ 10 ความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Bcl-2

ทำการป้อนสารสกัดให้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ขนาด 10, 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดให้เกิดโรค จะพบว่าหนูขาวที่ได้รับสารสกัดผักกูดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Bcl-2 เพิ่มขึ้นและ Caspases- 3 ลดลง (p-value$<.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับ vehicle และเหนี่ยวนำโรค) ดังแสดงในภาพที่ 8

ตารางที่ 4 การตรวจสอบการเรียนรู้และความจำด้วยมอริสวอเตอร์ (Morris Water) ของ Escape Latency Time (ms.) ในสัตว์ทดลองชนิดวิสตาร์

กลุ่ม	ก่อนเหนี่ยวนำ			หลังเหนี่ยวนำ	
	Single Dose	ay-7	Day-14	Day-7	Day-14
Sham operation group	4.54	5.56	5.89	5.56	4.56
Vehicle group	5.23	6.56	4.65	12.34	13.31
***Diplazium esculentum Retz* 10 mg**	5.43	4.56	5.22	9.68	8.23
***Diplazium esculentum Retz* 50 mg**	6.43	3.23	4.58	11.39	8.95
***Diplazium esculentum Retz* 200 mg**	6.98	5.31	5.36	12.56	8.65
Donepezil treated group 1 mg	5.34	6.31	6.39	8.32	8.54
Levodopa (L-dopa) treated group 5 mg	4.56	5.67	5.38	9.51	8.48

การทดสอบประสิทธิภาพการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดผักกูดขนาด 50 และ 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 6-OHDA

ปัจจุบันประสิทธิภาพการรักษาโรคพาร์กินสันนั้นยังค่อนข้างจำกัด ข้อมูลจากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าโรคพาร์กินสันนั้นจะมีผลทำให้สมองขาดเลือดและมีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นทำให้มีผลทำลายเนื้อเยื่อของสมองเนื่องจากสมองเป็นอวัยวะที่มีการผลิตอนุมูลอิสระ และมีองค์ประกอบไขมันซึ่งเป็นเป้าหมายของอนุมูลอิสระสูงในขณะที่มีเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระน้อยเมื่อเทียบกับเนื้อเยื่ออื่น (Markesbery, 1997) เมื่ออนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับไขมันซึ่งเป็นองค์ประกอบที่สำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ผ่านปฏิกิริยาที่เรียกว่า lipid peroxidation จะทำให้เกิด carbonyl fragment และสารตัวที่มีสภาพเสถียรและค่อนข้างมีบทบาทสำคัญต่อการทำลายเซลล์ประสาทและทำให้เซลล์ประสาทตายได้แก่ malondialdehyde (MDA) ดังนั้นระดับของ MDA จึงถูกนำมาใช้เป็นดัชนีตัวหนึ่งที่แสดงถึงปริมาณการทำลายเนื้อเยื่อสมองจากอนุมูลอิสระในภาวะสมองขาดเลือด (Warner *et al*., 2004)

อย่างไรก็ตามการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระนั้นไม่ใช่ปัจจัยเดียวที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในภาวะดังกล่าว ในภาวะที่สมองขาดเลือดนั้นจะส่งผลกระทบถึงกระบวนการผลิตพลังงานหรือสาร ATP (adenosine triphosphate) ใน mitochondria ทำให้เซลล์มีพลังงานที่จะนำมาใช้ในการรักษาสมดุลของสารมีประจุต่างๆโดยเฉพาะ sodium ion, chloride ion และ calcium ion ได้ลดลง ทำให้ปริมาณสารมีประจุเหล่านั้นในเซลล์เพิ่มขึ้นมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆจำนวนมาก เช่น การกระตุ้นการทำงานของ phospholipase ทำให้ leukotrienes และ prostaglandin เพิ่มขึ้นเกิดการบาดเจ็บของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เซลล์ประสาทตายได้ การเพิ่มของสารมีประจุเหล่านี้ยังสามารถทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ protease, nitric oxide synthase (NOS) และเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทได้เช่นกัน (Raystman, 2003)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดผักกูดจะมีการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นโดยสารสกัดผักกูดขนาดต่ำคือ 2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะทำให้เอนไซม์ SOD ใน cerebral cortex และ striatum สูงขึ้นแต่มีผลให้ glutathione peroxidase (GPx) ใน striatum เพิ่มขึ้นเท่านั้น ในขณะที่สารสกัดผักกูดขนาดกลางหรือ 10 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นทั้งใน cerebral cortex และ striatum ทำให้การทำงานของเอนไซม์ catalase (CAT) เพิ่มขึ้นใน striatum และทำให้การทำงานของ GPx เพิ่มขึ้นในทุกบริเวณคือ cerebral cortex, hippocampus และ striatum และสารสกัดขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวทำให้การทำงานของเอนไซม์ SOD เพิ่มขึ้นทุกบริเวณที่กล่าวข้างต้น การทำงานของ CAT เพิ่มขึ้นใน striatum และเอนไซม์ GPx เพิ่มขึ้นใน cerebral cortex และ hippocampus ถึงแม้ในภาพรวมจะเห็นว่าหนูที่ได้รับสารสกัดผักกูดมีการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระดีขึ้นน่าจะมีปริมาณของสาร MDA ลดลง เนื่องจากสารสกัดผักกูดมีสาร polyphenol อยู่ สารดังกล่าวจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ สามารถทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระเป็น polyphenol radical ซึ่งมีสภาพเสถียรกว่า สามารถทำอันตรายต่อเซลล์ได้น้อยลง จากนั้นสารดังกล่าวจะถูก

เปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการเมแทบอลิซึม โดยกระบวนการ methylation, sulfation และ glucuronidation และขับออกจากร่างกาย แต่กลับไม่พบว่ามีปริมาณ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญแม้จะพบว่ามีปริมาตรสมองที่ขาดเลือดลดลง แต่เนื่องจากสาร polyphenol เองสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์และ signal transduction ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ อีกหลายประการได้แก่ lipoxygenase, cyclo-oxygenase, xanthine oxidase, phospholipase A2, ATPases,aldose reductase, phoshodiesterases, topoisomeraseI and II, protein kinase C, phosphoinositide3-kinase, Akt/PKB, (protein kinase B) and mitogen-activated protein (MAPKs)kinases (MAPs) (Korkina and Afanas, 1997; Nijveldt *et al*., 2001; Esposito *et al*., 2002)

ดังนั้นข้อมูลจากการศึกษาครั้งนี้จึงช่วยสนับสนุนบทบาทของสารสกัดผักกูดในการป้องกันและลดความรุนแรงของโรคพาร์กินสัน สารที่มีบทบาทสำคัญในการปกป้องการทำลายของสมองในภาวะดังกล่าวน่าจะเป็นสารกลุ่ม polyphenol อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์หลักที่แท้จริงนั้นยังคงต้องการการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปเพื่ออธิบายในรายละเอียดกลไกทางชีวภาพต่อไป

สรุปผลการทดลอง

สารสกัดผักกูดมีศักยภาพในการป้องกันโรคพาร์กินสันได้ สารที่มีบทบาทในการออกฤทธิ์นั้นน่าจะเป็นสารกลุ่ม polyphenol ถึงแม้สารดังกล่าวจะมีบทบาทสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระซึ่งเป็นปัจจัยที่สำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพโรคพาร์กินสัน

บรรณานุกรม

Ministry of public health. Burden of disease and injuries in Thailand Priority setting for policy.2002; A14-16,58.

Rengachary, S.S. and Ellenbogen, R.G., editors, Principles of Neurosurgery, Edinburgh: Elsevier Mosby, 2005

Midori A Y., Rona G., Robert M S., and Gary K S., The neuroprotective potential of heat shock protein 70 (HSP70) Trends in Molecular Medicine, Vol(5), Issue 12,1999; pp 525-531, 1

De Virgilio A, Greco A, Fabbrini G, et al. Parkinson's disease: autoimmunity and neuroinflammation. Autoimmun Rev. 2016 15(10) 1005–1011.

Birben E, Sahiner UM, Sackesen C, Erzurum S, Kalayci O. Oxidative Stress and Antioxidant Defense. The World Allergy Organization journal. 2012;5(1):9-19. doi:10.1097/WOX.0b013e3182439613.

Mitra A, Choudhury M D, Paul , Nath D, Choudhury P R and Talukdar A D Phytopharmacological reviews on Diplazium esculentum (Retz.) Sw. (Athyriaceae): A commonly consumed Pteridophyte. ECOBIOS, Vol. 8. (1&2), 2015; 24-40

Roy, Subhrajyoti, Somit Dutta and Tapas Kumar Chaudhuri. "In vitro assessment of anticholinesterase and NADH oxidase inhibitory activities of an edible fern, *Diplazium esculentum*" J Basic Clin Physiol Pharmacol, 2015 (26): 395-401.

Magalingam KB, Radhakrishnan AK, Haleagrahara N. Protective Mechanisms of Flavonoids in Parkinson’s disease. Oxidative Medicine and Cellular Longevity. 2015:314560.

Harborne JB. Phytochemical methods to modern techniques of plant analysis. 1984 Chapman & Hall, London

Ye Q, Yuan X, He J, Zhou J, Yuan C, Yang X. Anti-apoptotic effect of Shudipingchan granule in the substantia nigra of rat models of Parkinson’s disease. Neural Regen Res. 2016 (11):1625-1632.

Roy S, Dutta S, Chaudhuri TK. In vitro assessment of anticholinesterase and NADH oxidase inhibitory activities of an edible fern, Diplazium esculentum. J Basic Clin Physiol Pharmacol. 2015 (26) 395-401.

Kujawska M., Jodynis-Liebert J. Polyphenols in Parkinson's Disease: A Systematic Review of In Vivo Studies. Nutrients. 2018 10(5). pii: E642.

ภาคผนวก

Preparation of Tissue Sections

Procedures:

1. The brains of the animals were perfused transcardially with 9% normal saline
2. Following the perfusion, the brain were removed and post fixed with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer over night at 4°C.
3. Tissues were rinse with phosphate buffer and infiltrate with 30% sucrose solution in order to provide cryoprotection.
4. The specimens were frozen rapidly with deep freeze at -25°C in cryostat (model JUNG FRIGOCUT 2800E)
5. After freezing, 25 µm thick of specimens are cut on cryostat.
6. Sections there were stored in phosphate buffer and they were picked up on slides coated with a 0.01% aqueous solution of a high molecular weight poly-L-lysine.

References

Krill JJ, Halliday GM, Svoboda MD, Carwright H. The cerebral cortex is damaged in chronic alcohol. ***Neuroscience.*** 1997; 79(7): 983-998.

Cresyl Violet Staining For Nissl Substance

Cresyl violet can be used to demonstrate Nissl substance. The rationale of the technique is a simple acid-base reaction, where the cationic dyes bond with the anionic RNA of the Nissl substance, plus the DNA and RNA of cell nuclei.

Staning solution:

- 0.5% g/ml aqueous cresy fast violet solution 100 ml
- 10% acetic acid 7 ml

Add 10% acetic 7 ml in 0.5% g/ml aqueous cresyl fast violet solution 100 ml and adjust pH 3.5-3.8. Stand the solution at room temperature for 24-48 hours. The solution should be heated gently and filtered before used.

Procedures:

1. Immerse slides into xylene solution for 2 times, approximate 2-3 minutes each.
2. Hydrate the sections in serial concentration of alcohol; absolute 95% and 70% alcohol approximate 3 minutes per each process.
3. Wash the section in distilled water.
4. Stain the sections in cresyl violet solution for 3-5 minutes. Nissl body should be violet.
5. Immerse the sections in a serial concentration of alcohol; 70%, 95% and absolute alcohol for 1 minute or longer per each process until the background is relatively clear.
6. Clear the sections in xylene solution for 2-3 minutes.

ɔunt the slides and cover slipped with DPX per mount

ıody: violet

Paxions G, Chorles W. Cresyl Violet. In: Paxinos G, Chorles W, editors. ***The rat br***

coordinates. London: Academic Press; 1981. p.9-17.

Immunohistochemical Study of Bcl-2 Immunopositive Neurons

Reagents:

1. KPBS-BT (Krebs phosphate buffer saline containing bovine serum albumin and triton x-100)
2. 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6.
3. 0.5% H_2O_2 in methanol.
4. Primary antibody against Bcl-2 dilution 1:400.
5. DAKO Strept ABC Complex/HRP duet kit. This kit consist of reagent A: Streptavidin, B: biotinylated horseradish and reagent C: biotinylated goat antibody to mouse immunoglobulin.

Working solution of biotinylated goat antibody to mouse. Add reagent C 10 µl in 1 ml of KPBS-BT. .

Working solution of Strept AB Complex/HRP. Add 10 µl of reagent A and B into 1ml of KPBS-BT.

6. 0.4% H_2O_2 and diaminobenzedine in 0.05 M Tris-HCl.
7. 5% normal horse serum in KPBS-BT.

Procedures:

1. Inhibit endogenous peroxidase activity by incubating in 0.5% H_2O_2 in methanol for 30 minutes.
2. Wash slides in running tap water for 1 minute then wash slides again in distilled water for 1 minute.
3. Wash slides in KPBS and KPBS-BT foe 5 minutes per each process.

4. Remove excess buffer, then apply the 5% normal goat serum in KPBS-BT to the sections and incubate in moist chamber for 30 minutes in order to minimize background staining.
5. Drain off excess normal goat serum.
6. Incubate sections in mouse primary antibody against Bcl-2 diluted 1:400 in KPBS-BT at room temperature for 2 hours and then incubate at 4°C for 48 hours. (This strep is omitted in control slide)
7. Wash off excess antiserum and wash slides in KPBS-BT for two 7 minutes changes.
8. Drain off excess buffer and incubate slides with 100 µl of working solution of biotinylated goat antibody to mouse for 4 hours at room temperature.
9. Wash slides in KPBS-BT for two 7 minutes changes.
10. Drain off excess buffer and incubate slides with 100 µl of working solution of strep AB Complex/HRP for 4 hours at room temperature.
11. Wash slides in KPBS-BT for 1 minute, then wash slides again with KPBS for 10 minutes two times.
12. React for peroxidase activity in KPBS-BT containing 0.025% DAB and 0.01% H_2O_2 for 24 hours at room temperature.
13. Wash in running tap water, let dry and mount sections in DPX per mount.

Reference:

Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. **J Histochem Cytochem** 1981; 29: 1196-1204.

Immunohistochemical Study of Caspase-3 Immunopositive Neurons

Reagents:

1. KPBS-BT (Krebs phosphate buffer saline containing bovine serum albumin and triton x-100)
2. 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.6.
3. 0.5% H_2O_2 in methanol.
4. Primary antibody against Casspase-3 dilution 1:400.
5. DAKO Strept ABC Complex/HRP duet kit. This kit consist of reagent A: Streptavidin, B: biotinylated horseradish and reagent C: biotinylated goat antibody to mouse immunoglobulin.

Working solution of biotinylated goat antibody to mouse. Add reagent C 10 µl in 1 ml of KPBS-BT. .

Working solution of Strept AB Complex/HRP. Add 10 µl of reagent A and B into 1ml of KPBS-BT.

6. 0.4% H_2O_2 and diaminobenzedine in 0.05 M Tris-HCl.
7. 5% normal horse serum in KPBS-BT.

Procedures:

1. Inhibit endogenous peroxidase activity by incubating in 0.5% H_2O_2 in methanol for 30 minutes.
2. Wash slides in running tap water for 1 minute then wash slides again in distilled water for 1 minute.
3. Wash slides in KPBS and KPBS-BT foe 5 minutes per each process.

4. Remove excess buffer, then apply the 5% normal goat serum in KPBS-BT to the sections and incubate in moist chamber for 30 minutes in order to minimize background staining.
5. Drain off excess normal goat serum.
6. Incubate sections in mouse primary antibody against Casspase-3 diluted 1:400 in KPBS-BT at room temperature for 2 hours and then incubate at 4°C for 48 hours. (This strep is omitted in control slide)
7. Wash off excess antiserum and wash slides in KPBS-BT for two 7 minutes changes.
8. Drain off excess buffer and incubate slides with 100 µl of working solution of biotinylated goat antibody to mouse for 4 hours at room temperature.
9. Wash slides in KPBS-BT for two 7 minutes changes.
10. Drain off excess buffer and incubate slides with 100 µl of working solution of strep AB Complex/HRP for 4 hours at room temperature.
11. Wash slides in KPBS-BT for 1 minute, then wash slides again with KPBS for 10 minutes two times.
12. React for peroxidase activity in KPBS-BT containing 0.025% DAB and 0.01% H_2O_2 for 24 hours at room temperature.
13. Wash in running tap water, let dry and mount sections in DPX per mount.

Reference:

Wood GS, Warnke R. Suppression of endogenous avidin-binding activity in tissues and its relevance to biotin-avidin detection systems. **J Histochem Cytochem** 1981; 29: 1196-1204.

Preparation of Tissue Homogenates

After the last administration of substances, all animals were anesthetized with intraperitoneal injection of pentobarbital sodium (Nembutal®) at dose of 50 mg/kg BW. Brains were isolated and kept cool in ice buckets. Then these tissues were homogenized in 4 volume of 1.15 % KCl with glass Potter-Elvehjim homogenizer.

Reference:

Marzel P. General principle and procedure for drug metabolism in vitro. In: La Du BN, Mandel HG, Way EL. editors. **Fundamentals of drug metabolism and drug disposition** Newyork: Krieger Publishing Company; 1979. p. 527-52.

Determination of Lipid Peroxidation

Reagents:

1. 8.1% SDS (sodium dodecyl sulfate).
2. 20% acetic acid solution adjusts to pH 3.5 with NaOH.
3. 0.8% TBA (thiobarbituric acid).
4. TMP (1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane) or malondialdehyde bis (dimethyl acetal) solution was used as an external standard, and the level of lipid peroxide was expressed as nmol of MDA (malondialdehyde).

Procedures:

1. Add the following substances in the table into the series of glass tubes with screw capped.

	Blank (ml)	Standard (ml)	Unknown (ml)
Sample (1:30)	-	-	0.2
8.1% SDS	0.2	0.2	0.2
20% Acetic acid (pH 3.5)	1.5	1.5	1.5
0.8% TBA	1.5	1.5	1.5
TMP stock standard	-	0.2	-
Distilled water	0.8	0.6	0.6

2. Heated the tubes in the water-bath at 95 °C for 60 min.
3. After cooling with tap water, 1.0 ml of distilled water and 5.0 ml of the mixture of n-butanol and pyridine (15:1, v/v) are added and shaken vigorously.
4. After centrifugation at 4,000 rpm for 10 minutes, the organic layer is taken and its absorbance at 532 nm is measured.

5. The content of lipid peroxide is expressed in terms of nmol MDA/100 mg protein.

Calibration Curve

1. Prepare a series of tubes containing TMP stock standard in water in the following concentrations: 2.0 nmol/0.2 ml, 4.0 nmol/0.2 ml, 6.0 nmol/0.2 ml, 8.0 nmol/0.2 ml, 1.0 nmol/ 0.2 ml.
2. Perform the procedure as in step2.
3. Determine the absorbance at 532 nm. The O.D. was plotted against concentration of MDA which expressed as nmol MDA/100 mg protein.

Reference:

Ohkawa H, Ohishi N, Yagi K. Assay for lipid peroxide in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**. 1979; 95: 351-358.

Determination of Protein

Reagents:

1. Solution A: Alkaline tartate reagent.

   - Na_2CO_3 (Sodium carbonate) 10.0 g

   - $Na_2\ C_4H_4O_6.2H_2O$ (Sodium tartate) 0.1 g

   - NaOH (Sodium hydroxide) 1.2 g

   Dissolve these chemicals in distilled water to make 500 ml solution.

2. Solution B: 0.5% copper sulfate

   Dissolve 0.5 g of copper sulfate ($CuSO_4.5H_20$) in distilled water and make up a final volume to 100 ml

3. Solution C: Freshly mixed 50 ml of solution A with 1 ml of solution B.

4. Solution D: 1 N Folin phenol reagent. Dilute commercial 2.0 N Folin Ciocalteu Phenol reagent 1:1 with distilled water and used immediately.

5. Standard protein solution. Dissolved bovine serum albumin (BSA) 60mg to 100 mg with distilled water.

Procedures:

1. Pipette solution into each tube as follows:

	Blank (ml)	Standard (ml)	Unknown (ml)
Distilled water	0.2	0.1	0.1
Standard protein (BSA)	-	0.1	-
* Sample	-	-	0.1
Solution C	5.0	5.0	5.0
Solution D	0.5	0.5	0.5

*Sample dilution 1:30 for brain

2. Mix and let stand at room temperature for 10 minutes.
3. Mix and let stand at room temperature for 1 hour.
4. Read optical density (O.D) at 650 nm by UV/vis spectrophotometer (model spectronic 20) against reagent blank.

Calculation

Protein concentration (g %)

$$= \frac{O.D.\ unknown \times concentration\ of\ standard}{O.D.\ standard}$$

Reference:

Lowry OH, Roseburgh NJ, Farr AL, Randall RJ. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem** 1951; 193: 265-275.

การเผยแพร่ผลงานวิจัย

การประชุมวิชาการโครงการอนุรักษ์พันธุกรรมพืชอันเนื่องมาจากพระราชดำริฯ อพ.สธ. ครั้งที่ 8 “ทรัพยากรไทย:ศักยภาพมากล้นมีให้เห็น” ณ ศูนย์เครือข่ายการเรียนรู้เพื่อภูมิภาค จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จังหวัดสระบุรี ระหว่างวันที่ 29 พฤศจิกายน – 1 ธันวาคม พ.ศ. 2560

การประชุมวิชาการนานาชาติ

The International Conference of Pharmaceutical Sciences and Medicines 2018 (ICPAM 2018) “Health Innovation for Aging Society” 3rd August 2018

การประชุมวิชาการนานาชาติ

15th Asian-Pacific Society for Neurochemistry 2018, Macao, China