รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปกป้องระบบประสาทของสารสกัดขมิ้นชันสายพันธุ์ภาคตะวันออกของประเทศไทยในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมจากหลอดเลือดสมองสัตว์ทดลอง

(Neuroprotection of Thai-Eastern Indigenous Curcuma longa L. Extract in Animal Models of Vascular Dementia)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร.ปรัชญา แก้วแก่น

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561

รหัสโครงการ .....

สัญญาเลขที่ 32/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

การปกป้องระบบประสาทของสารสกัดขมิ้นชันสายพันธุ์ภาคตะวันออกของประเทศไทยในแบบจำลองโรคสมองเสื่อมจากหลอดเลือดสมองสัตว์ทดลอง

(Neuroprotection of Thai-Eastern Indigenous Curcuma longa L. Extract in Animal Models of Vascular Dementia)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร.ปรัชญา แก้วแก่น

วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา

มหาวิทยาลัยบูรพา

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 32/2561

บทคัดย่อ (Abstract)

โรคสมองเสื่อมจากหลอดเลือดสมองเป็นภาวะหนึ่งที่มีอุบัติการณ์เกิดโรคสูงและส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของประชาการไทย โรคสมองเสื่อมจากหลอดเลือดสมองสัตว์ทดลองจากการศึกษาที่ผ่านมาที่รายงานกลไกของอนุมูลอิสระต่อการเกิดพยาธิสภาพของโรคพาร์กินสัน และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดขมิ้นชัน ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดขมิ้นชันสายพันธุ์ภาคตะวันออกสามารถมีฤทธิ์ต่อการปกป้องเซล์ประสาท ตลอดจนการผลต่อการเพิ่มการเรียนรู้และความจำ ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงได้นำสารสกัดแอลกอฮอล์ของสารสกัดขมิ้นชัน ขนาดต่างๆได้แก่ 100, 200 และ 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมาป้อนหนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้น้ำหนักประมาณ 280-320 กรัม จากนั้นนำมาเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะจำลองโรคพาร์กินสันด้วยการฉีดสาร 6-OHDA แล้วนำมาประเมินการเปลี่ยนแปลงของอนุมูลอิสระที่พบในเนื้อเยื่อสมองหนูแรทโดยการประเมินการเปลี่ยนแปลง 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 กลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชัน มีการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระที่กล่าวข้างต้นเพิ่มขึ้น และพบการเปลี่ยนแปลงของการลดลงของ MDA ลดลงทุกขนาดของสารสกัด และเมื่อประเมินผลการให้สารสกัดขมิ้นชันในการปกป้องสมองพบว่า หนูแรทกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชัน ขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ความหนาแน่นของเซลล์ประสาทที่รอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น ความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น และความหนาแน่นของเซลล์ประสาท Caspase-3 ลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดขมิ้นชัน ดังนั้นการวิจัยนี้แสดงถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในวิถีอะพอพโทซิสได้ อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์หลักของสารสกัดขมิ้นชันนั้นยังต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Abstract

Vascular Dementia (VaD) 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 Curcumin extract can increase antioxidant activity. It also affects learning and memory. Therefore, this study focus on alcohols extracted from curcumin. Various doses of 100, 200 and 400 mg / kg body weight were fed to male rats of Wistar, weighing 280-320 grams, and then induced by Middle Cerebral Artery Occlusion (MCAO), 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 Curcumin. The activity of the antioxidant enzyme mentioned above increased. MDA decreased in all doses of DEE. When evaluating the effect of Curcumin 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 Curcumin in apoptosis pathway. However, the main mechanism of Curcumin s 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: แนวทางการรักษาโรคหลอดเลือดสมอง..... 7
ภาพที่ 4: ขมิ้นชัน..... 8
ภาพที่ 5: กลไกการกระตุ้นและยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทผ่านวิถีอะพอพโทซิส.....9
ภาพที่ 6: การเตรียมสารสกัดขมิ้นชันในห้องปฏิบัติการ.....
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

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

การเจริญทางด้านการแพทย์และเทคโนโลยีในปัจจุบันทำให้ประชากรมีค่าเฉลี่ยของอายุขัยยาวขึ้น จากข้อมูลของ International Programs Center (IPC), Population Division, Census Bureau ของสหรัฐอเมริการายงานว่าปี 2015 จะมีประชากรผู้สูงอายุ (65 ปีขึ้นไป) คิดเป็นร้อยละ 15 ของประชากรทั้งหมดในสหรัฐอเมริกา ส่วนทวีปยุโรปจะมีผู้สูงอายุคิดเป็นร้อยละ 20 ของประชากรทั้งทวีป และทวีปเอเชียประมาณร้อยละ 10 ของประชากรทั้งทวีปตามลำดับ และสอดคล้องกับข้อมูลขององค์การสหประชาชาติที่คาดการณ์ว่าผู้สูงอายุของประชากรโลกจะเพิ่มขึ้นจาก ร้อยละ 5.7 เป็นร้อยละ 9.5 ภายในปี พ.ศ. 2568 นอกจากนี้วิทยาลัยประชากรศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ได้รายงานว่า ในปี พ.ศ.2553 ประเทศไทยมีผู้สูงอายุ (60 ปีขึ้นไป) ถึง 7.6 ล้านคนหรือร้อยละ 11.36 ของประชากรทั้งหมดในประเทศไทย ซึ่งการเพิ่มปริมาณดังกล่าวจะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างเศรษฐกิจ สังคม และแบบแผนปัญหาสาธารณสุขโดยรวมของประเทศปัญหาหนึ่งที่พบมากในผู้สูงอายุคือกลุ่มโรคสมองเสื่อม ในช่วงเวลา 20 ปีที่ผ่านมา ได้มีการศึกษากันอย่างมากเกี่ยวกับระบาดวิทยาของกลุ่มโรคสมองเสื่อม ทุกการศึกษาให้ผลตรงกันว่า ความชุกของกลุ่มโรคสมองเสื่อมมีจำนวนสูงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อมีอายุมากกว่า 65 ปีและจำ นวนความชุกจะเพิ่มขึ้นเท่าตัว ในทุกๆ ช่วงอายุ 5 ปีที่เพิ่มขึ้น หากพิจารณาจากสถิติทางระบาดวิทยาทั้งในต่างประเทศและข้อมูลจากสถาบันผู้สูงอายุ พ.ศ. 2553 จะได้ว่า ผู้ป่วยกลุ่มโรคสมองเสื่อมมีประมาณ 836,000 คน และประมาณครึ่งหนึ่งป่วยเป็นโรคอัลไซเมอร์และความจำเสื่อมจากหลอดเลือด ประมาณอย่างน้อย 418,000 คน ดังนั้นปัญหานี้จึงนับเป็นปัญหาที่สำคัญของประเทศ ในภาวะดังกล่าวจะพบว่ามีความบกพร่องเรื่องของความจำเป็นหลัก โดยมีสาเหตุใหญ่จากการเสื่อมและตายของเซลล์ประสาท ดังนั้นหากสามารถป้องกันสาเหตุดังกล่าวได้ จะช่วยลดปัญหาที่เกี่ยวข้องกับภาวะนี้ได้อย่างมาก ทั้งในด้านสุขภาพ สังคม และค่าใช้จ่ายที่ต้องเสียไปในการจัดการกับปัญหานี้ นอกจากนี้อาจสร้างรายได้จาก อุตสาหกรรมผลิตภัณฑ์อาหารเสริมที่มีส่วนในการพัฒนาสมองและส่งเสริมการเรียนรู้และความจำได้เป็นอย่างมาก เนื่องจากมูลค่าตลาดด้านผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมีมูลค่ามหาศาล และประเทศไทยมีโอกาสที่จะสร้างส่วนแบ่งด้านการตลาดจากผลิตภัณฑ์ดังกล่าวได้

โรคหลอดเลือดสมอง (Cerebrovascular Disease) จัดเป็นภาวะคุกคามที่สำคัญในปัจจุบัน โดยพบว่าเป็นสาเหตุการป่วยอันดับที่ 3 ในไทย รองจากโรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน เมื่อเร็วๆนี้ ข้อมูลจากสำนักงานประกันสุขภาพแห่งชาติ (สปสช) ได้รายงานว่าในปีพศ 2548 นั้นคนไทยป่วยเป็นโรคนี้กว่า 2.4 แสนราย และเสี่ยงที่จะเป็นกว่า 10 ล้านคน นอกจากนั้นสถิติขององค์การอนามัยโลกรายงานล่าสุดเมื่อ พ.ศ.2548 ประชาชนทั่วโลกเสียชีวิตจากโรคนี้ปีละเกือบ 6 ล้านราย หรือประมาณ 10 % ของผู้เสียชีวิตทุกสาเหตุ เฉลี่ยตายนาทีละ 11 ราย โรคนี้ถ้าเป็นแล้วแม้รอดชีวิตก็มักจะมีความพิการหลงเหลืออยู่[1] ในประเทศไทยนั้นข้อมูลจากสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ กระทรวงสาธารณสุข ปี 2550 พบว่าในประชากรแสนคนเป็นโรคหลอดเลือดสมองในอัตรา 206 คน และพบว่าโรคดังกล่าวมีอัตราการพักรักษาตัวที่โรงพยาบาลเพิ่มสูงขึ้นจากปี2540 เพิ่มขึ้นถึง 2.75 เท่า โดยการเสียชีวิตจากโรคดังกล่าวจะมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นถึง 17% ในปี 2558 และพบว่าโรคหลอดเลือดสมองนี้ยังเป็นสาเหตุการเสียชีวิตอันดับ 3 รองจากโรคเอดส์ และการบาดเจ็บ[2] โรคหลอดเลือดสมอง มีสาเหตุสำคัญ 2 ประการ คือ 1.หลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตัน (พบประมาณ 70%) 2.เลือดออกในสมอง(พบประมาณ 30%) สำหรับในประเทศไทย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตันแบบเฉียบพลัน ได้รับการรักษาได้ทันเวลามี

เพียงร้อยละ 1.96เท่านั้น ทำให้อัตราการเสียชีวิตและพิการสูงมาก[2] ดังนั้นการป้องกันภาวะนี้จึงจัดเป็นเรื่องสำคัญ

ด้วยอุบัติการณ์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและข้อจำกัดในการรักษาภาวะของโรคดังกล่าวทำให้มีการพยายามที่จะใช้สารป้องกันระบบประสาท(Neuroprotective agent) เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่ที่อยู่ขอบ(Penumbra area) นอกเหนือจากส่วนที่ขาดเลือด(Core area)ให้ฟื้นคืนสภาพกลับมาทำงานของเนื้อเยื่อประสาท(Nervous tissue) สารป้องกันระบบประสาทที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะสมองขาดเลือด อาทิ การเพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณขาดเลือด การยับยั้งการทำงานของกรดอะมิโนชนิดกระตุ้น(Excitatory amino acid) ผ่านตัวรับ NMDA รวมทั้งยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ(Antioxidant) จากการบริโภคพืชที่มีสารประกอบสำคัญจากสารพฤกษเคมี(Phytonutrient Compound) จึงเป็นวิธีการที่สามารถป้องกันการเกิดโรคได้

ปัจจุบันพบว่าอนุมูลอิสระนั้นมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดพยาธิสภาพหลายด้าน รวมทั้งในโรคเรื้อรัง เช่น แผลเรื้อรังจากภาวะเบาหวาน โรคหลอดเลือดสมอง โรคสมองเสื่อม และพิษแอลกอฮอล์ ดังนั้นจึงมีการนำเอาสารต้านอนุมูลอิสระมาใช้ในปกป้องภาวะดังกล่าวจำนวนมาก มีรายงานว่าสารเคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids) ที่พบมากในขมิ้นชัน สามารถลดความบกพร่องในเรื่องการเรียนรู้และความจำในภาวะเบาหวานได้ โดยมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ acetylcholinesterase ทำให้ปริมาณ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญต่อการเรียนรู้และความจำเพิ่มขึ้น และลด oxidative stress ในสมอง สืบเนื่องจากบทบาทของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการออกฤทธิ์ปกป้องสมองจากภาวะที่สมองถูกทำลายจากการขาดเลือด ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดขมิ้นชันซึ่งมีฤทธิ์ดังกล่าว อีกทั้งยังสามารถลดการอักเสบน่าจะสามารถใช้ปกป้องสมองจากภาวะสมองจากภาวะสมองขาดเลือดได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังมีรายงานทางวิทยาศาสตร์สนับสนุนการใช้เพื่อประโยชน์ดังกล่าวน้อยมาก ผู้วิจัยจึงมุ่งที่จะหาข้อมูลในประเด็นดังกล่าวเพื่อใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาต่อยอดเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์สุขภาพจากสารสกัดขมิ้นชัน

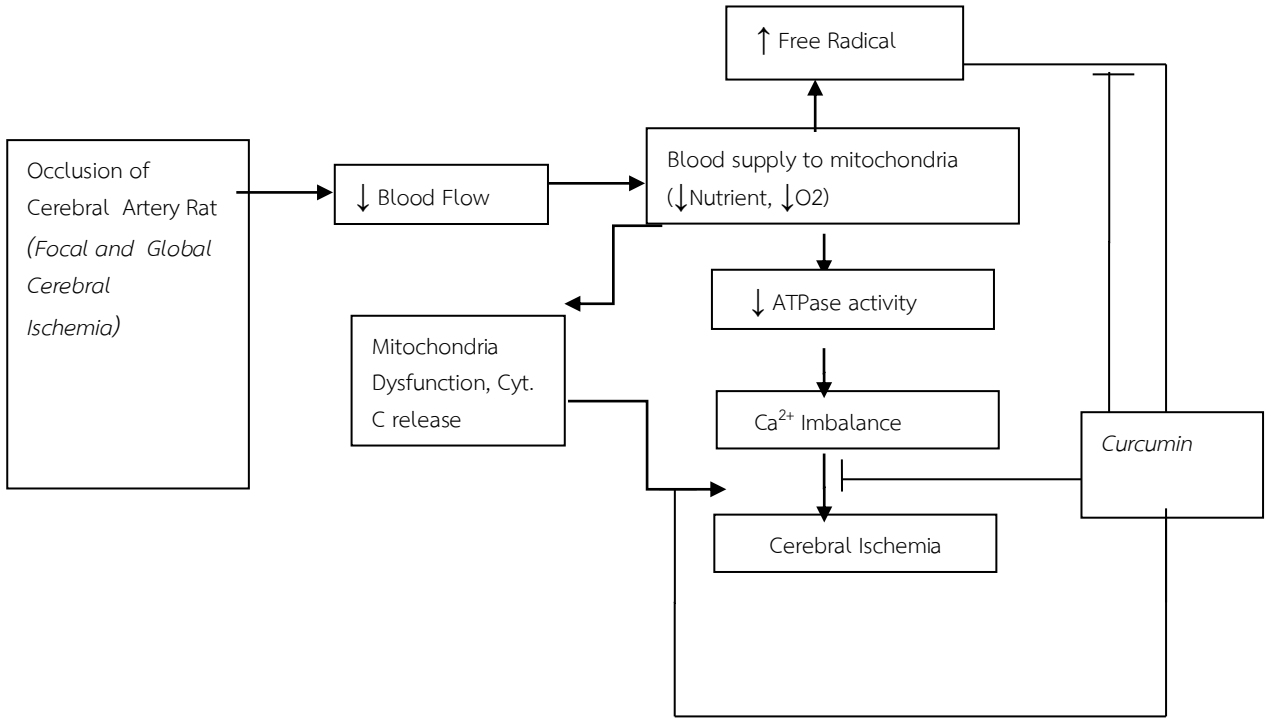
วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการป้องกันและ/หรือลดการทำลายเซลล์ประสาทในหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยวิธีอุดกั้นหลอดเลือดแดงมิดเดิ้ล
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของขมิ้นชันต่อพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูขาวเพศผู้ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยด้วยวิธีอุดกั้นหลอดเลือดแดงมิดเดิ้ล (Middle Cereal Artery Occlusion: MCAO)
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์สารสกัดขมิ้นชัน ดังต่อไปนี้
    3.1 ศึกษาฤทธิ์ของขมิ้นชัน ต่อ oxidative stress markers
    3.2 ศึกษาฤทธิ์ของขมิ้นชัน ต่อ calcium binding protein
    3.3 ศึกษาฤทธิ์ของขมิ้นชัน ต่อ neurotrophic factor

ทฤษฎี สมมติฐานหรือกรอบแนวความคิด (Conceptual Framework) ของโครงการวิจัย

1.3.1 กรอบแนวคิด

สารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระต้านการอักเสบระดับเซลล์ และมีการยับยั้งกลไกที่เกิดจากความไม่สมดุลของไมโตคอนเดีย ดังนั้นน้ำสารสกัดขมิ้นชันน่าจะป้องกันและลดอันตรายต่อเซลล์ประสาทในโรคสมองเสื่อมจากหลอดเลือดสมองสัตว์ทดลองได้



1.4 สมมติฐาน

1.4.1ถ้าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ป้องกันและลดการตายของเซลล์ประสาทในโรคหลอดเลือดสมองได้สัตว์ทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคหลอดเลือดสมองและได้รับน้ำสารสารสกัดขมิ้นชันจะมีการตายของเซลล์ประสาทใน cerebral cortex และ hippocampus น้อยกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคหลอดเลือดสมองและไม่ได้รับสารสกัดขมิ้นชัน

1.4.2 ถ้าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้ในโรคหลอดเลือดสมองได้สัตว์ทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคหลอดเลือดสมองและได้รับสารสกัดขมิ้นชันจะมีการเรียนรู้และความจำดีกว่ากลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคหลอดเลือดสมองและไม่ได้รับน้ำมะละกอสกัด

1.4.2 ถ้าสารสกัดขมิ้นชันมีฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพ สัตว์ทดลองกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคหลอดเลือดสมองและได้รับสารสกัดขมิ้นชันจะมีการเปลี่ยนแปลงใน oxidative stress markers calcium binding protein และ neurotrophic factor

1.5

☑ เป็นองค์ความรู้ในการวิจัยต่อไป

กลุ่มเป้าหมาย กระทรวงอุตสาหกรรม ภาคธุรกิจ องค์การอาหารและยา

☑ บริการความรู้แก่ประชาชน

กลุ่มเป้าหมาย ประชาชนผู้สนใจทั่วไป

☑ บริการความรู้แก่ภาคธุรกิจ

กลุ่มเป้าหมาย ผู้ผลิตด้านอุตสาหกรรมอาหาร

☑ นำไปสู่การผลิตเชิงพาณิชย์

กลุ่มเป้าหมาย ผู้ผลิตด้านอุตสาหกรรมอาหาร กระทรวงอุตสาหกรรม องค์การอาหารและยา

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ภาวะสมองเสื่อม (dementia) เป็นภาวะที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยสูงอายุ ผู้ป่วยมีความบกพร่องด้านสมรรถภาพทางสมอง ทั้งในด้านความจำและการรู้คิด (cognition) เช่นการใช้ภาษา ทักษะในการใช้ชีวิตประจำวันการรับรู้สิ่งแวดล้อม การตัดสินใจวางแผนโดยความผิดปรกติที่เกิดขึ้นมี ซึ่งอาการเหล่านี้มักเกิดขึ้นช้าๆ ค่อยเป็นค่อยไป โรคสมองเสื่อมเหตุหลอดเลือด (vascular dementia, VaD) โรคนี้พบเป็นอันดับสอง รองจากโรคอัลไซเมอร์ และพบร่วมกับโรคอัลไซเมอร์ (mixed dementia) ได้บ่อย โดยผู้ป่วยมักมีอาการตามหลังการเกิดโรคหลอดเลือดสมองไม่ว่าจะเป็นชนิดขาดเลือด (cerebral infarction) หรือหลอดเลือดสมองแตกทำให้มีเลือดออกในสมอง (intracerebral hemorrhage) อาการส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว หรือทรุดลงเป็นลำดับขั้นมีอาการเปลี่ยนแปลงขึ้นลง ผู้ป่วยมักมีปัจจัยเสี่ยงด้านโรคหัวใจและหลอดเลือดอยู่เดิม ตรวจร่างกายพบความผิดปรกติของสมองเฉพาะที่ (focal neurological deficit)

ภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด (Vascular Dementia) เป็นปัญหาสาธารณสุขที่สำคัญของโลก เนื่องจากเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตและความพิการทางด้านร่างกาย และต้องการพึ่งพาครอบครัวและสังคมในการดำรงชีวิตส่งผลกระทบต่อผู้ป่วยทั้งทางด้านร่างกายและจิตใจ และทำให้เกิดความสูญเสียทางด้านเศรษฐกิจเป็นจำนวนมาก ในระยะแรกของการเกิดภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือดจะเกิด ภาวะที่สมองขาดเลือด อาการเกิดขึ้นเพียงชั่วคราว (Transient ischemic attack: TIA) ภาวะ TIA เป็นการเริ่มต้นของภาวะสมองขาดเลือด (Ischemic stroke) เมื่อมีการขาดเลือดทำให้เกิดการเสียหายของเซลล์ เป็นผลจากการไม่มีการไหลเวียนของเลือด ทำให้เกิดการขาดเลือดที่รุนแรง เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทและสมองที่เรียกว่า สมองขาดเลือด โดยพบว่าบริเวณที่ล้อมรอบใจกลางที่มีการตายของเนื้อเยื่อ (Ischemic Core Area) ซึ่งพบว่า ค่าปกติของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (Cerebral Blood Flow, CBF) จะอยู่ในช่วง 50-55 ml/ 100g/ min (Rengachary et al., 2005) ส่วนค่าต่ำสุดที่ทำให้เกิดการล้มเหลวของเยื่อหุ้มระบบประสาทในส่วนของรอบนอกบริเวณขาดเลือด(Penumbra area) อยู่ในช่วง 6-10 ml/ 100g/ min โดยพบว่าแม้เซลล์ในระบบประสาทของ Penumbra จะไม่สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ระหว่างมีการลดลงของการได้รับเลือดไปเลี้ยง แต่เนื้อสมองส่วนนี้สามารถกลับมาทำงานได้อีกตามปกติถ้าสามารถช่วยให้เลือดกลับไปเลี้ยงสมองส่วนนี้ได้เร็วพอซึ่งต่างจากเซลล์ในบริเวณที่ตายไปแล้ว ที่ถึงแม้จะมีการผ่านของการไหลเวียนและการกำซาบ (Perfusion)ของเลือดก็ไม่สามารถกลับคืนได้ดังเดิม และยังสูญเสียการทำงานอย่างถาวร Penumbra จึงเป็นเป้าหมายสำคัญ(Midori et al.,1999) ให้การกำซาบและไหลผ่านของเลือดอย่างเหมาะสม เพื่อการกลับมาทำงานเป็นปกติอีกครั้งของสมอง

ภาวะที่หลอดเลือดสมองอุดกั้นในภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือดจะทำให้เกิดการตายของเนื้อสมอง บริเวณที่ขาดเลือดไปเลี้ยงบริเวณนี้จะพบว่าเซลล์ประสาทจะมีการตาย(Neuronal damage) เกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว อย่างไรก็ตามเซลล์ประสาทในบริเวณ penumbra area นี้ยังคงสามารถที่จะกู้ให้กลับมาทำงานได้ถือเป็นโอกาสในการหาแนวทางการหรือกลยุทธ์การรักษาภาวะสมองเสื่อมจากหลอดเลือด(Window of opportunity to treatment vascular dementia) มีรายงานว่าภาวะสมองขาดเลือดนั้นสามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทใน penumbra area ได้จากหลายกลไก เช่น การเกิด apoptosis มีรายงานว่าการทำงานของโปรตีนที่อยู่ใน Bcl-2 family และ caspase นั้นจะมีอิทธิพลอย่างมากต่อการเกิด apoptosis หนูถีบจักรที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงออกของ Bcl-2 จะป้องกันภาวการณ์บาดเจ็บของเซลล์จากการขาดเลือด

ได้อย่างไรก็ตามนอกจาก Bcl-2 แล้วยังมีรายงานว่า caspase ซึ่งเป็น cysteine protease enzyme เองก็มีบทบาทสำคัญในกระบวนการนี้ โดยเฉพาะ caspase-3 นอกจากกลไกผ่าน apoptosis แล้วยังพบว่าการตายของเซลล์ประสาทในบริเวณ penumbra area นี้ยังเกิดขึ้นผ่านอีกหลายกลไก รวมทั้ง การทำงานของ excitatory amino acid มากเกินไป และการเกิดอนุมูลอิสระ(Lo et al.,2005; Siesjö et al.,1995) ได้ทำมีความพยายามที่จะใช้สารปกป้องระบบประสาท(Neuroprotective agent)เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่ที่อยู่รอบของส่วนที่ขาดเลือด(penumbra area) ฟื้นคืนสภาพกลับมาทำงาน สารปกป้องระบบประสาทที่มีการพัฒนาขึ้นมาใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะสมองขาดเลือด เช่นเพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณดังกล่าว

ขมิ้นชันเป็นสมุนไพรที่มีการนำมาใช้ประโยชน์อย่างหลากหลาย ทั้งเป็นอาหารในลักษณะเครื่องเทศ เพิ่มสีสัน กลิ่น และรสชาติ ใช้ผสมในเครื่องสำอาง และที่สำคัญคือ ใช้รักษาโรคต่าง ๆ ตามแพทย์แผนโบราณมาอย่างยาวนานจนเป็นที่ยอมรับและจัดอยู่นตำรายาของหลายประเทศ เช่น อินเดีย จีน ญี่ปุ่น เกาหลี และเยอรมัน ซึ่งสรรพคุณทางยาของขมิ้นชันในแต่ละประเทศอาจมีความแตกต่างกัน เช่น ในประเทศอินเดียใช้ผงขมิ้นผสมกับน้ำมะนาวพอกเพื่อรักษาอาการบาดเจ็บ บวม เคล็ด ขัดยอกรักษาความผิดปกติของระบบน้ำดี แก้ไอ แก้หวัด แผลจากโรคเบาหวาน โรคข้อรูมาติซึม และไซนัสอักเสบ เป็นต้น ในประเทศจีนใช้รักษาอาการปวดท้อง ท้องมาน และดีซ่าน ในประเทศไทยใช้รักษาอาการผอมเหลือง แก้โรคผิวหนัง แก้ท้องร่วง สมานแผล ขับลม รักษาอาการท้องอืด ท้องเฟ้อ และรักษาแผลในกระเพาะอาหาร ใช้เป็นยาภายในแก้ท้องอืด ท้องร่วง แก้โรคกระเพาะ และใช้เป็นยาภายนอก เช่น ทาแก้ผื่นคัน โรคผิวหนัง พุพอง ยารักษาชันนะตุ และหนังศีรษะเป็นเม็ดผื่นคัน [5] มีสรรพคุณอย่างหนึ่งของขมิ้นชันที่คล้ายคลึงกันเกือบทุกประเทศคือช่วยบรรเทาอาการอาหารไม่ย่อย ซึ่งมีผลงานวิจัยยืนยันสรรพคุณนี้โดย Thamlikitkul และคณะ ดังนั้นคณะกรรมการแห่งชาติด้านยาจึงได้คัดเลือกขมิ้นชันเข้าในบัญชียา หลักแห่งชาติเพื่อรักษาอาการแน่น จุกเสียดเนื่องจากอาหารไม่ย่อย โดยมีการพัฒนารูปแบบการบริโภคทั้งชนิดผงลูกกลอน แคปซูล และทั้งชนิดที่เป็นสมุนไพรเดี่ยวและผสมซึ่งคณะกรรมการแห่งชาติด้านยา ได้คัดเลือกนำมาขึ้นทะเบียนอยู่ในบัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2547 (ฉบับที่ 4) อีกครั้ง โดยจัดอยู่ในกลุ่มที่ 1 บัญชียาจากสมุนไพรที่มีการใชตามองคความรูดั้งเดิม เป็นยารักษากลุมอาการทางระบบทางเดินอาหาร เช่น ยาเหลืองปิดสมุทร ประกอบด้วยขมิ้นชันหนัก 6 สวน และสมุนไพรอื่น ๆ แห้วหมู ขมิ้นออยเปลือกเพกา รากกลวยตีบ กระเทียมคั่ว ดีปลี ชันยอย ครั่งสีเสียดเทศ สีเสียดไทย ใบเทียน ใบทับทิม อย่างละ 1 สวนสรรพคุณใช้บรรเทาอาการท่องเสียชนิดที่ไมเกิดจากการติดเชื้อ เช่น อุจจาระไมเป็นมูกหรือมีเลือดปนและทองเสียชนิดที่ไมมีไข กลุมที่ 2 บัญชียาพัฒนาจากสมุนไพร ยารักษากลุjมอาการของระบบทางเดินอาหาร เช่น ยาขมิ้นชัน แคปซูล โดยมีผงเหง้าขมิ้นชันแห้งหนัก 250 มิลลิกรัมต่อแคปซูล และในผงเหง้าขมิ้นชันแห้งต้องมีปริมาณน้ำมันหอมระเหยไม่น้อยกว่า 6 เปอร์เซ็นต์ สารเคอร์คิวมินอยด์ไม่น้อยกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนัก ใช้บรรเทาอาการแน่นจุกเสียดฤทธิ์ทางชีวภาพของขมิ้นชัน (biological activity of *C. longa* L.) การค้นคว้าวิจัยเกี่ยวกับฤทธิ์ทางชีวภาพหรือทางเภสัชวิทยาของขมิ้นชันในช่วง 20 ปี ที่ผ่านมามีผลงานวิจัยที่ตีพิมพ์เผยแพร่มากกว่า 6,000 เรื่อง ทั้งที่เป็นการศึกษาวิจัยในระดับพื้นฐาน เช่น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบขมิ้นชัน สารบริสุทธิ์เคอร์คิวมินอยด์ การปรับเปลี่ยนโครงสร้างสารเคอร์คิวมินอยด์ กับฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) ฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์ (antimicrobial activity) ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-cancer activity) ฤทธิ์ต้านโปรโตซัว (anti-protozoan activity) และฤทธิ์ต้านเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ (anti-Alzheimer activity) นอกจากนี้ยังมีผลงานวิจัยใน ระดับคลินิก (clinical trial) อีกมากกว่า 65 เรื่อง

ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidation Stress)

ภาวะที่ร่างกายมีอนุมูลอิสระมากเกินแต่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ และส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลอื่นๆ จัดเป็นการทำลายแบบออกซิเดชัน (Oxidative Damage) โมเลกุลเป้าหมายที่เกิด Oxidative Damage ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ผลเสียหายต่อโมเลกุลเป้าหมาย และเซลล์จะขึ้นกับลักษณะของโครงสร้างโมเลกุล ชนิดเซลล์ ชนิดอวัยวะ และความรุนแรงของภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น หากเกิดประจำต่อเนื่อง ก็จะทำให้เสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง โรคหัวใจขาดเลือด โรคเบาหวาน โรคทางระบบประสาท ภาวะเสื่อมสภาพ และ แก่ก่อนวัย

งานวิจัยรายงานว่า โรคหลายชนิดมาจากการทำลายโดยออกซิเดชันของดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidation Stress) อาจเป็นผลสืบเนื่องมาจากกระบวนการเกิดโรค และส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อ เช่น การติดเชื้อ การบาดเจ็บ การได้รับสารพิษ และ ภาวะอื่นๆ อาจเป็นต้นเหตุของการสร้าง และสะสมของอนุมูลอิสระ ทำให้เกิดพยาธิสภาพของโรคต่อไป โดยภาวะที่ไม่สมดุลระหว่าง อนุมูลอิสระกับสารต้านอนุมูลอิสระ อาจเสี่ยงต่อการโรค และภาวะต่างๆ ดังนี้คือ

1. โรคทางระบบหัวใจและหลอดเลือด (Cardiovascular Diseases)
2. โรคมะเร็ง (Cancer)
3. โรคเบาหวาน (Diabetes) ชนิดที่ 2
4. โรคทางระบบประสาท (Neurological Diseases) เช่น ความจำเสื่อม (Alzheimer's Disease)
5. โรคทางระบบภูมิคุ้มกัน (Immune Diseases) เช่น โรคภูมิเพี้ยน (Lupus , LSD)
6. โรคตา (Eye Diseases) เช่น ต้อกระจก
7. ภาวะชราภาพ (Aging Process)

การลดหรือการป้องกันภาวะเครียดออกซิเดชัน โดยการลดสารหรือสิ่งที่จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และโดยการเพิ่มสารต่อต้านอนุมูลอิสระเป็นประจำจะป้องกันการเกิดโรคได้

สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidants) และแหล่งกำเนิดสารต้านอนุมูลอิสระ (Sources of Antioxidant)

สารต้านอนุมูลอิสระ คือ สารที่สามารถป้องกัน หรือทำลายการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของอนุมูลอิสระที่ก่อตัวขึ้น โดยการยับยั้งปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ หยุดการก่อตัวใหม่ของอนุมูลอิสระ และช่วยซ่อมแซมความเสียหายที่เกิดจากตัวอนุมูลอิสระที่ไปทำลายเซลล์ต่างๆ ในร่างกาย รวมทั้งแทนที่โมเลกุลที่ถูกทำลาย (Halliwell, 2009, pp. 531-542) แหล่งที่มาของสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญคือ สารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากผักผลไม้ได้รับความสนใจ และศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจากกระแสเรื่องความปลอดภัยของสารต้านอนุมูลอิสระที่สกัดจากธรรมชาติ (Natural Antioxidants) ที่มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น สารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้พบได้ทั้งในจุลชีพสัตว์ และพืชซึ่งมีทั้งที่เป็นวิตามิน เช่น วิตามินซี วิตามินอี เบต้าแคโรทีน และสารที่ไม่ให้คุณค่าทางโภชนาการ
(Non-Nutrient) ซึ่งมีโครงสร้างเป็นสารประกอบฟีนอลิค (Phenolic Compounds) โดยเฉพาะกลุ่มสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenols Compounds) และสารประกอบกลุ่มแคโรทีนอยด์(Carotenoids Compounds) สารเหล่านี้มีบทบาทสำคัญในการดักจับอนุมูลอิสระไม่ให้ไปกระตุ้นหรือก่อให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยการให้อนุมูลไฮโดรเจน ($H^{\bullet}$) แก่อนุมูลอิสระเหล่านั้น
(Sanchez-Moreno, Jimenez-Escria, & Saura-Calixto, 2000, pp. 941-953)

กลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ

จากรายงานวิจัยมีกลไกการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระคือดักจับอนุมูลอิสระ (Radical Scavenging) สารต้านอนุมูลอิสระสามารถยับยั้งอนุมูลอิสระได้โดยการทำให้โมเลกุลของอนุมูลอิสระมีความเสถียรขึ้นซึ่งกลไกของปฏิกิริยาเกิดโดยการให้ไฮโดรเจนหรืออิเล็กตรอนแก่ อนุมูลอิสระ (Valacchi et al., 2004, pp. 673-681) ดังสมการ

$R^{\bullet}$ + AH ----------> RH + $A^{\bullet}$

$RO^{\bullet}$ + AH ----------> ROH + $A^{\bullet}$

$R^{\bullet}$ + $A^{\bullet}$ ----------> RA

$RO^{\bullet}$ + $A^{\bullet}$ ----------> ROA

ยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจน (Singlet Oxygen Quenching: $^1O_2^*$)
สารกลุ่มแคโรทีนอยด์ (Carotenoids) สามารถยับยั้งการทำงานของซิงเกล็ทออกซิเจนโดยการเปลี่ยน ($^1O_2^*$) ให้อยู่ในรูปทริปเปร็ท (Triplet Oxygen: $^3O_2^*$) และปล่อยพลังงานที่ได้รับออกไปในรูปความร้อนโดยที่แคโรทีนอยด์ (Car) จำนวน 1 โมเลกุลสามารถทำปฏิกิริยากับซิงเกล็ทออกซิเจนได้ถึง 1,000 โมเลกุล (Sies, Stahl, & Sundquist, 1992, pp.7-19)

$^1O^{\bullet}_2$ + ^{1}Car ----------> $3O_2$ + $^3Car^{\bullet}$

$^3Car^{\bullet}$ ----------> ^{1}Car + thermal energy

อนุมูลอิสระ (Free Radicals หรือ Oxidants) และแหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ (Sources of Free Radicals Antioxidants)

อนุมูลอิสระ (Free Radicals หรือ Oxidants) คือ โมเลกุล (Molecule) หรืออะตอม (Atom) ที่มีอิเล็กตรอนที่ไม่มีคู่ หรืออิเล็กตรอนคู่โดดเดียว (Unpaired Electron) มีความไม่เสถียร(Unstable) ว่องไวมาก (Reactive) (Halliwell, 2009, pp. 531-542) สามารถเกิดปฏิกิริยากับอะตอม หรือโมเลกุลอื่นได้ง่าย เป็นสาเหตุของการทำลาย หรือภาวะบาดเจ็บในเซลล์ร่างกาย
ในลักษณะปฏิกิริยาลูกโซ่สามารถเข้าทำกับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ที่อยู่รอบข้างในทันทีที่ถูกสร้างขึ้น ก่อเกิดความเสียหายแก่เซลล์ต่างๆ ในร่างกาย เช่น การทำลายโครงสร้างดีเอ็นเอ (Destruction of DNA Structure) การเปลี่ยนสภาพโปรตีน (Protein Denature) และเกิดการเสียหายที่โมเลกุลไขมัน (Lipid Peroxidation) เป็นต้น

แหล่งกำเนิดอนุมูลอิสระ (Sources of Free Radical)

พบได้ทุกแห่งทั้งในสิ่งแวดล้อมในสิ่งมีชีวิต โดยทั่วไปร่างกายของสิ่งมีชีวิตสามารถเปลี่ยนออกซิเจนไปเป็นสารอนุมูลออกซิล (Oxyl Radicals) และออกซิเจนสปีชีส์ (Reactive Oxygen Species: ROS) ที่เป็นอันตรายต่อร่างกายมากกว่าออกซิเจน ในเซลล์ร่างกายจะมีอนุมูลอิสระของออกซิเจนเกิดขึ้นอยู่ตลอดเวลา การเกิดอนุมูลอิสระเหล่านี้มีสาเหตุมาจากปัจจัยทั้งภายในภายนอกร่างกายดังนี้

ปัจจัยภายในร่างกาย

การผลิตพลังงานจากไมโตคอนเดรีย (Mitochondria) ซึ่งเป็นศูนย์กลางการผลิตสารต่างๆ ให้แก่เซลล์ในร่างกาย โดยปกติในไมโตคอนเดรียมีสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำลายอนุมูลอิสระซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) แต่ก็จะมีบางตัวหลุดจากการทำลาย และเป็นอันตรายต่อเซลล์ ความเร็วของการเกิดภาวะชราภาพจะแปลผันตามการเกิดขบวนการเมแทบอลิซึมของร่างกาย เมื่อเราใช้ออกซิเจนในการเผาผลาญกลูโคสมากเท่าใด ยิ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และ ROS ที่เป็นสารพิษมากเท่านั้น

การผลิตอนุมูลอิสระในระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อจุลชีพ (Microbes) เช่น แบคทีเรียหรือไวรัสเข้าสู่ร่างกายเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันจะเข้าทำหน้าที่ สร้างอนุมูลอิสระ และ ROS ทำให้สามารถทำลายจุลชีพเหล่านี้ได้

ภาวะเครียด และภาวะเครียดออกซิเดชัน (Stress and Oxidative Stress) เป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของอนุมูลอิสระ และสารต้านอนุมูลอิสระ โดยเมื่อร่างกายสร้างอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระ จะส่งผลเสียต่อสารชีวโมเลกุลในร่างกาย กล่าวคือมีผลต่อโปรตีน ทำให้เกิดครอสลิงค์ของกรดอะมิโนซิสเตอีน สร้างเป็นพันธะไดซัลไฟด์ มีผลต่อไขมันทำให้เกิดเปอร์ออกไซด์ของไขมัน และมีผลต่อดีเอ็นเอ ทำให้เกิดกรดนิวคลีอิคแอดดักส์ขึ้น ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ สารพันธุกรรมมีการเปลี่ยนแปลง เหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกเป็นโรงมะเร็งได้ ภูมิต้านทานลดลง เกิดโรคเสื่อม (Degenerative Disease) เกิดขบวนการชราภาพ (Aging) และจนพัฒนาจนเกิดการตายของเซลล์ (Neuronal Death) ในที่สุด (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2555, หน้า 17-39)

ปัจจัยภายนอกร่างกาย

ยารักษาโรคยาบางชนิดที่รับประทานเข้าไปร่างกายสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระได้โดยเฉพาะอย่างยิ่งยาในกลุ่มต้านจุลชีพ และต้านมะเร็ง เช่น บลีโอไมซิน (Bleomycin) แอนทราไซลินส์ (Antracyclines) (Voest, Vreugdenhil, & Marx, 1994, pp. 490-499) และเมโธทรีเสต (Methotrexate) (Gressier, Lebegue, & Brunet, 1994, pp. 679-681)

รังสี เช่น รังสีแม่เหล็กไฟฟ้า (Electromagnetic Radiation) แสงจากอัลตราไวโอเลตจากแสงอาทิตย์ (Ultraviolet) รังสีเอ็กซเรย์ และรังสีรักษา (ใช้รักษาโรคมะเร็ง) เป็นสาเหตุทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในร่างกายทำให้เป็นพิษต่อเซลล์ในร่างกาย (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2555, หน้า 17-39)

อาหารที่ผ่านขบวนการต่างๆ (Processed Food) เช่น เนื้อและเนยที่หมดอายุมีไขมันเปอร์ออกไซด์เมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระ และ ROS นำไปสู่การเกิดหลอดเลือดแข็งตัว (Atherosclerosis) (ไมตรี สุทธจิตต์ และคณะ, 2555, หน้า 17-39)

ควันบุหรี่มีส่วนประกอบของไนตริกออกไซด์ (NO) ไนโตรเจนออกไซด์ (NO_2) และเพอรอกซีไนไตรท์ ($ONOO^-$) รวมทั้งสารมลพิษได้แก่ ซัลเฟอร์ไดออกไซด์ (SO_2) และคาร์บอนเตรตตะคลอไรด์ (CCl_4) ซึ่งจะถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการทำงานของเอ็นไซม์ไซโทโครม P-450 ไฮดรอกซีเจส (Cytochrome P-450 Hydroxylase) ที่มีอยู่มากในเซลล์ตับและพบได้บ้างในเซลล์ปอด และลำไส้เล็กทำให้เป็นสาเหตุของการสร้างอนุมูลซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ดังกล่าว (Bast, Haeren, & Doelmen, 1991, pp. 2-13)

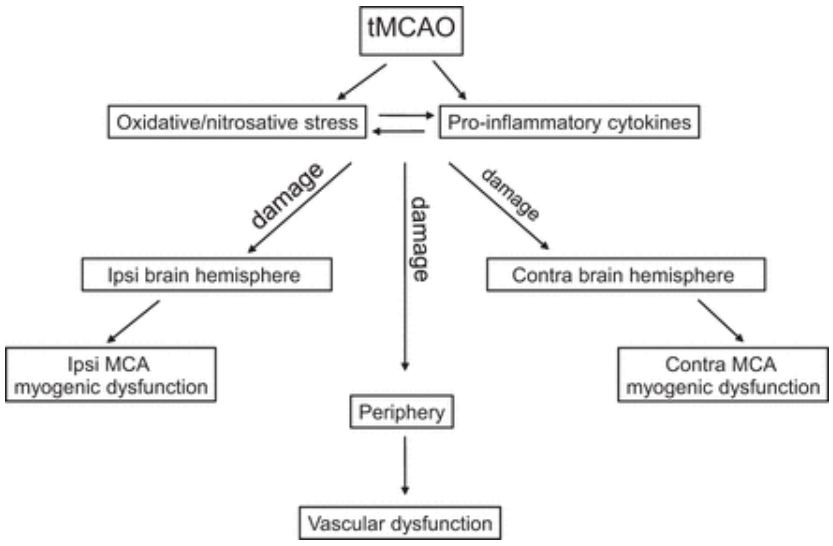
โอโซน โอโซนไม่ได้เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารออกซิไดส์แรงสูงซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปเป็นอนุมูลไฮดรอกซิลได้จากการกระตุ้นของคลื่นแสง (Valacchi et al., 2004, pp. 673-681)

งานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระ

นันทิยา สมภาร, จริญญาพร เนาวบุตร, ศุภเกต แสนทวีสุข และ อัจฉราพร

แถวหมอ (2556) ได้ทำการศึกษา ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพวในหลอดทดลองและในร่างกายของหนูแรท จากผลการศึกษา พบว่า ผักแพวมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดี และมีสารต้านอนุมูลอิสระมากมายเป็นส่วนประกอบ การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระและผลต่อระดับสารต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดผักแพว (Polygonum odoratum L.) ซึ่งเป็นผักสมุนไพรพื้นบ้านที่พบในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ผลการศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH พบว่า สารสกัดผักแพวมีค่า EC50 เท่ากับ ๕๐.๒๕ ± ๐.๖๑ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในขณะที่ vitamin E และ Butylatedhydroxytoluene (BHT) มีค่า EC50 เท่ากับ ๑๔.๗๙ ± ๐.๗๘ และ ๑๙.๗๑ ± ๐.๗๙ มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ทั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของตับและไต และการวัดระดับเอนไซม์ AST, ALT และ Cr ในซีรัมของสัตว์ทดลองไม่เปลี่ยนแปลง แสดงให้เห็นว่า สารสกัดผักแพวไม่เป็นพิษต่อตับและไตของสัตว์ทดลอง นอกจากนี้พบว่าสารสกัดผักแพวขนาดสูง (๘๐๐ มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว/วัน) สามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีน และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญในร่างกายคือ heme oxygenase (HO-1) และ **γ**-glutamylcysteine ligase (**γ**-GCL) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปผลการศึกษา: สารสกัดผักแพวสามารถกระตุ้นการแสดงออกของจีน และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายได้ การได้รับสารสกัดผักแพวน่าจะมีประโยชน์ในการเพิ่มระดับสารต้านอนุมูลอิสระในร่างกายอย่างไรก็ตามจำเป็นต้องมีการศึกษาถึงผลของการได้รับสารสกัดในระยะยาว และการศึกษาด้านพิษวิทยาเพิ่มเติม

มงคล คงเสน, อัจฉรา นิยมเดชา, วาฟาอ์ หาญณรงค์ และพนม สุขจันทร์ (2556) ได้ทำการศึกษา การรวบรวมคุณสมบัติและประโยชน์ของต้นลูกใต้ใบ ผลการศึกษาพบว่า ต้นลูกใต้ใบเป็นวัชพืชสมุนไพรที่มีคุณค่าอย่างยิ่ง มีสารที่เป็นประโยชน์ เช่น ไกลโคไซด์ ซาโพนิน ฟลาโวนอยด์ อัลคาลอยด์ แทนนิน และลิกแนน เป็นต้น มีฤทธิ์ต้านไวรัสตับอักเสบ ยับยั้งเชื้อเอดส์ ต้านเชื้อไวรัส ลดการอักเสบ ยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระ ลดการเกิดแผลในกระเพาะอาหาร แก้อาการท้องเสีย ต้านเนื้องอก มะเร็งและการก่อกลายพันธุ์ คุมกำเนิดและป้องกันพิษจากพาราเซทตามอนได้ ต้นลูกใต้ใบเป็นสมุนไพรที่มีสารสกัดที่มีคุณค่าและประโยชน์ต่อร่างกายในด้านการป้องกันโรค และสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในสัตว์ได้



ภาพที่ 2-3 พยาธิสภาพของการเกิดการอุดกั้นของหลอดเลือดสมอง

บทที่ 3

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

1.การเตรียม

จะเตรียมและคุมมาตรฐานของสารสกัดหาวิธีและตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการสกัดขมิ้นชัน รวมทั้งศึกษาความคงตัว การประเมินคุณภาพด้วยคุณสมบัติทางเคมี กายภาพ และอาศัย เทคนิคทางโครมาโทกราฟี เช่น TLC

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชัน

การเตรียมสารสกัดขมิ้นชัน

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

ผลการวิเคราะห์สารสกัดขมิ้นชัน

(1.) การเตรียมสารสกัดสารสกัดผักกูดและสารละลายของสารสกัดแยกที่ละลายในน้ำและไมละลายในน้ำ สารสกัดผักกูดมา 200 กรัม หมักดวยเอทธานอล 95% และนำไประเหยแห้งจะไดน้ำหนักสารสกัดและ % yield ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 ปริมาณสารสกัดขมิ้นชันและ % yield ของสารสกัดขมิ้นชัน

ชนิดพืช	น้ำหนักสด (กรัม)	น้ำหนักสารสกัด (กรัม)	% yield
ขมิ้นชัน *Curcuma longa* L.	500	129.75	25.95

การเลือกกลุ่มตัวอย่าง

การศึกษาครั้งนี้ใช้หนูแรทเพศผู้ สายพันธุ์ Wistar อายุประมาณ 8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 200 - 250 กรัม เป็นสัตว์ทดลองเลี้ยงในสภาวะที่มี light / dark cycle คงที่ประมาณ 12 : 12 ชั่วโมง การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชัน โดยศึกษาฤทธิ์ของสารดังกล่าวต่อเซลล์ประสาทบริเวณ cerebral cortex และ hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันต่อสมองบริเวณต่าง ๆ

การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดซีโรโทนินธรรมชาติสกัดในสัตว์ทดลอง 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 สารสกัดขมิ้นชันในขนาดต่างๆ 3 ขนาด (สูง กลาง ต่ำ) วันละครั้ง

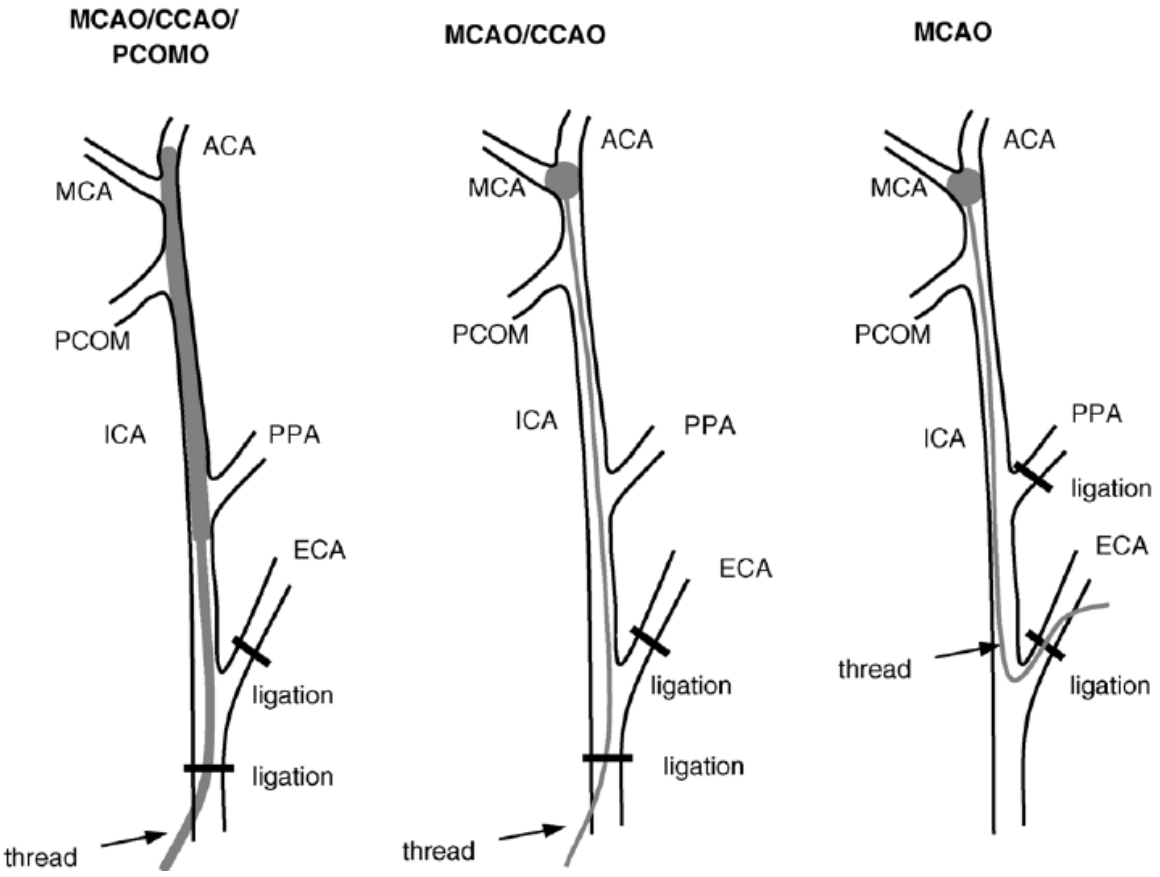
กลุ่มที่ 6 Positive control group คือ กลุ่มที่ได้รับยาที่มีเพิ่มการเรียนรู้และ ความจำ วันละครั้ง ใช้สัตว์ทดลองกลุ่มละ 6 ตัว สามารถแบ่งเป็น 2 กลุ่ม ย่อยได้ดังนี้

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

b. Piracetam treated group สัตว์ทดลองได้รับ Piracetam ขนาด 250 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว

ภายหลังการแบ่งกลุ่มการทดลองเสร็จสิ้น สัตว์ทดลองในกลุ่ม Vehicle, สารสกัดซีโรโทนินธรรมชาติสกัด และ Positive control treated group จะถูกผ่าตัดเพื่อทำ right middle cerebral artery occlusion ทำให้เกิด cerebral ischemia ในวันที่ 14 ของการทดลอง การเหนี่ยวนำทำให้เกิดการขาดเลือด (Induction of focal cerebral ischemia) ใช้แบบจำลองการขาดเลือดของ Koizumi et al., 1986 และ Zea Longa et al., 1989 ในสัตว์ทดลองใช้การผ่าตัดโดยการสอดไนลอนเคลือบซิลิโคนขนาด 4-0 เริ่มต้นเปิดแผลผ่าตัดคอด้านขวาแล้วสอดผ่านหลอดเลือดแดงคอมมอนแคโรติด (common carotid artery, CCA) และไปสิ้นสุดที่จุดเริ่มต้นของหลอดเลือดแดงมิดเดิ้ล (middle cerebral artery) วัดจากความยาวของการผ่านของไนลอนเข้าสู่หลอดเลือด 17 มิลลิเมตร แล้วใช้ด้ายเย็บมัดหลอดเลือดเพื่อกันการเลื่อนของไนลอน

หลังจากนั้นสัตว์ทดลองจะได้รับการป้อนสารทดสอบต่อไปอีก 21 วัน โดยจะประเมินการเรียนรู้และความจำด้วย Morris water maze test , object recognition test, tail suspension และ force swimming test ทุก 7 วันจนสิ้นสุดการทดลอง เมื่อสิ้นสุดการทดลองจะนำสมองมาประเมินความหนาแน่นของเซลล์ประสาทใน frontal และ parietal cortex และ hippocampus และประเมินกลไกการออกฤทธิ์ โดยหลังสิ้นสุดการทดลองนำมาตรวจวัดการยับยั้งการทำงานของ AChE และ Oxidative stress markers ได้แก่ ระดับ malondialdehyde (MDA) ใน cerebral cortex และ hippocampus ด้วย Thiobarbituric reaction (TBAR) ตรวจวัด activity ของ scavenger enzymes ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione peroxidase (GSH-Px; GPx) Calcium binding protein และ neurotrophic factor ในสมองส่วนที่กล่าวข้างต้นด้วยวิธีการวัดการดูดกลืนแสง (Coloric method)



ภาพที่ 3-1 การผ่าตัดเพื่อเหนี่ยวนำการอุดกั้นหลอดเลือดสมอง

5. วิธีการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA) และ การเปลี่ยนแปลงการทำงานของ scavenging enzymes ประกอบด้วย

Lipid peroxidation content: นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ lipid peroxidation content หลักการนี้จะใช้หาปริมาณ MDA ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน TMP (1, 1, 3, 3-tetramethoxy propane) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, และ 10 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร โดยการเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก (Thiobarbituric acid; TBA) ลงในสารตัวอย่าง แล้ว MDA จะทำ
ปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ในสภาวะเป็นกรด ได้เพอรอกซิเดชั่นโปรดักส์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Ohkawa (Ohkawa et al., 1979)

Superoxide dismutase (SOD): นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ superoxide dismutase (SOD) ด้วยการวัดค่า

ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ตามวิธีการของ McCord (McCord et al., 1969) โดยการวัด SOD activity โดยใช้ SOD assay kit โดยแซนทีน ออกซิเดส (Xanthine oxidase) และไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Superoxide anion) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่จะทำปฏิกิริยากับเตตราโซเลียมซอล์ท (Tetrazolium salt) ได้เป็นฟอร์มาซานดราย (Formazan dye) ซึ่งมีสีเหลืองดังนั้น SOD จะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยานี้โดยเปลี่ยนซุปเปอร์ออกไซด์แรดิคอล (Superoxide radical) ให้เป็นออกซิเจน

Catalase (CAT): นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ catalase (CAT) หลักการนี้จะใช้หาปริมาณ CAT ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน CAT ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, และ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเติมสารตัวอย่าง หรือ สารละลายมาตรฐาน และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(Hydrogen peroxide; H_2O_2) 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที ใส่ กรดซัลฟูริก 25 ไมโครลิตร ใส่โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate; $KMnO_4$) 100 ไมโครลิตรด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Goldblith (Goldblith et al., 1950)

Glutathione peroxidase (GSH-Px): นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ Glutathione peroxidase (GPx) ตามวิธีการของ Wendel (Wendel, 1981) หลักการวัดคือ เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร เพื่อวัดว่า NADPH ที่ลดลงในระยะเวลา 0-10 นาที นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ของเอนไซม์กลูตาไทโอนเพอร์อกซิเดส แล้วคำนวณความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์กลูตาไทโอนเพอร์อกซิเดส แสดงในรูป u/mg.protein

6. สถิติวิเคราะห์

ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาเสนอในรูปค่าเฉลี่ย (mean) ± ส่วนเบี่ยงเบนของค่าเฉลี่ย (S.E.M) การทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะทำโดย One-way analysis of variance (ANOVA) และ ค่า p-value$<$ .05 จะถือว่ามีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4
ผลการวิจัย

ฤทธิ์ของต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA) และ การเปลี่ยนแปลงการทำงานของ scavenging enzymes

จากข้อมูลพื้นฐานที่พบว่าที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาบทบาทของในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อปกป้องสมองจากภาวะที่สมองถูกทำลายจากการขาดเลือด ด้วยการวัดผลของสารสกัดต่อสมดุลอนุมูลอิสระโดยวัด lipid peroxidation product, MDA พบว่าขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีระดับ malondialdehyde (MDA) ลดลงใน cortex ในขณะที่ขนาด 400 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว จะมีระดับ malondialdehyde (MDA) ลดลงทั้งใน cortex และ hippocampus ดังแสดงในรูป 4-1

เมื่อทำการประเมินฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ Catalase (CAT) ใน cortex, hippocampus และ striatum จะพบว่าหนูที่ได้รับทุกขนาดไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ Catalase (CAT) ทั้งใน cortex, hippocampus และ striatum นอกจากนั้นยังพบว่าหนูที่ได้รับทั้ง 3 ขนาด (50, 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) มีการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase ใน cortex และ hippocampus เพิ่มขึ้น ดังแสดงในรูปที่ 4-10

จากรูป 4-1 จะเห็นว่าหนูที่ได้รับ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีการทำงานของเอนไซม์ Superoxide dismutase ใน striatum เพิ่มขึ้น

ตาราง 4-1: Effect of Scavenging Enzymes Activity, Data were expressed as mean ± SD for 8 rats in each group. (*p < 0.05 compared to the Control vehicle + MCAO group)

Group	**MDA** *(u/mg.protein)*	**CAT** *(u/mg.protein)*	**SOD** *(u/mg.protein)*	**GSH-Px** *(u/mg.protein)*
Control Vehicle + MCAO	3.58±0.51	9.32±1.93	1.25±0.81	0.52±0.10
Curcuma longa 100 mg + MCAO	2.88±0.19	11.44±0.18*	1.92±0.21	0.94±0.21*
Curcuma longa 200 mg + MCAO	1.48±0.12*	15.14±0.16*	2.35±0.12*	0.91±0.52*
Curcuma longa 400 mg + MCAO	1.35±0.25*	18.31±2.51*	2.91±0.25*	0.95±0.25*

บทที่ 5
สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

โรคหลอดเลือดสมอง หรือที่นิยมเรียกกันว่า stroke จัดเป็นภาวะคุกคามที่สำคัญในปัจจุบัน โดยพบว่าเป็นสาเหตุการป่วยอันดับที่ 3 ในไทย รองจากโรคความดันโลหิตสูง และโรคเบาหวาน โรคหลอดเลือดสมอง หรือโรคอัมพฤกษ์ หรืออัมพาต มีสาเหตุสำคัญ 2 ประการ คือ 1.หลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตัน (พบประมาณ 70%) 2.เลือดออกในสมอง(พบประมาณ 30%) สำหรับในประเทศไทย จากสถิติของกระทรวงสาธารณสุขพบว่า ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตันแบบเฉียบพลัน ได้รับการรักษาได้ทันเวลามีเพียงร้อยละ 1.96 เท่านั้น ทำให้อัตราการเสียชีวิตและพิการสูงมาก ดังนั้นการป้องกันภาวะนี้จึงจัดเป็นเรื่องสำคัญ

สืบเนื่องจากอุบัติการณ์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและข้อจำกัดในการรักษาภาวะของโรคดังกล่าวทำให้มีการพยายามที่จะใช้ neuroprotective agent เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่ที่อยู่ริมๆของส่วนที่ขาดเลือดโดยเฉพาะบริเวณที่เรียกว่า penumbra area ฟื้นคืนสภาพกลับมาทำงาน neuroprotective agent ที่มีการพัฒนาขึ้นมาใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะสมองขาดเลือด เช่นเพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณดังกล่าว ยับยั้งการทำงานของ excitatory amino acid ผ่าน NMDA receptor, Endothelial nitric oxide synthase รวมทั้งยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ จากการศึกษาต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase (eNOS) ของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด Middle cerebral artery พบว่าเมื่อนำสมองส่วน cerebral cortex ในกลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารตัวทำละลาย และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดขมิ้นชันขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ที่มีผลต่อการต้านการเสื่อมของเซลล์ประสาท ที่แยกมา homogenate ด้วย lysis buffer หลังจากนั้นนำมาวัด eNOS expression ด้วยวิธี Western blot analysis ผลการทดลองพบว่า สามารถเพิ่มการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาการสำรวจฤทธิ์ของสารสกัดขมิ้นชันในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาทที่เหนี่ยวนำโดยภาวะสมองขาดเลือด พบว่ามีศักยภาพในการป้องกันและลดความรุนแรงของสมองขาดเลือดได้ โดยขนาดที่น่าจะนำไปพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์คือขนาด 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว เนื่องจากสามารถลดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน CA1 และ CA2 อีกทั้งยังสามารถลดปริมาตรสมองที่ขาดเลือดในบริเวณ cortex และ subcortex อีกด้วย โดยกลไกของฤทธิ์ปกป้องและต้านภาวะสมองขาดเลือดบางส่วนของสารดังกล่าวที่น่าจะเป็นไปได้อาจจะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มการทำงานของ endothelial nitric oxide synthase และการลด lipid peroxidation product ในคอร์เทกซ์ อีกทั้งยังเพิ่ม activity ของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ลดอนุมูลอิสระได้แก่ superoxide dismutase (SOD) ใน striatum และ glutathione peroxidase (GSH-px) ในคอร์เทกซ์และฮิปโปแคมปัส

อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้จัดเป็นการสำรวจศักยภาพเบื้องต้นและความเป็นไปได้ในการพัฒนาเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์สารสกัดขมิ้นชัน ยังคงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่นอน สารสำคัญที่น่าจะเป็นตัวการออกฤทธิ์ ตลอดจน pharmacokinetic ของสารสกัดอีกก่อนจะนำไปสู่ขั้นตอนการทดสอบในอาสาสมัครต่อไป

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 ***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 ɛar.

   ear the sections in xylene solution for 2-3 minutes.

   ɔunt the slides and cover slipped with DPX per mount

   l body: violet

Paxions G, Chorles W. Cresyl Violet. In: Paxinos G, Chorles W, editors. ***T*** ***stereotaxic 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.

บรรณานุกรม

สถาบันประสาทวิทยา, กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข. (2544). แนวทางการรักษาโรคหลอดเลือดสมองตีบหรืออุดตัน สำหรับแพทย์. กรุงเทพมหานคร.

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

Hara H, Fink K, Endres M , Friedlander RM, Gagliardini V, Yuan J, Moskowitz MA. Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. J Cereb Blood Flow Metab 1997; 17:370–375.

Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP.Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. Stroke. 2005; 36(2):189-192.

Siesjö BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjö P, Katsura K, Folbergrová J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. Ann Thorac Surg. 1995 ; 59(5):1316-1320.

Dyker AG, Lees KR. Stroke. Duration of neuroprotective treatment for ischemic stroke. 1998 ; 29(2):535-42.

Kaur C, Ling EA. Antioxidants and neuroprotection in the adult and developing central nervous system. Curr Med Chem. 2008; 15(29):3068-80.

Longa, E. Z., Weinstein, P. R., Carlson, S., & Cummins, R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke.,* 1989; 20(1): 84-91.

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

McCord JM and Fridovich I. Superoxide dismutase. An enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem*. 1969; 244: 6049-6055.

Goldblith SA and Proctor BE. Photometric determination of catalase activity. *J Biol Chem*. 1950; 187(2): 705-709.

A. Wendel. Glutathione Peroxidase, in: W.B. Jakoby (Ed.), Enzymatic Basis of Detoxication, Vol.2, *Academic Press, New York*. 1980; pp. 333–353.

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

Chan PH (1996) Role of oxidants in ischemic brain damage. Stroke 27:1124 –1129.

Hideaki I., David I G., Hiroyuki M., I Mhairi M., Antioxidant ebselen reduces oxidative damage in focal cerebral ischemia. Free radical biology & medicine 2003;34(1):56-63.

Lo EH, Moskowitz MA, Jacobs TP.Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. Stroke. 2005; 36(2):189-192.

Siesjö BK, Zhao Q, Pahlmark K, Siesjö P, Katsura K, Folbergrová J. Glutamate, calcium, and free radicals as mediators of ischemic brain damage. Ann Thorac Surg. 1995 ; 59(5):1316-1320.

Bhutada P, Mundhada Y, Bansod K, Tawari S, Patil S, Dixit P, et al. Protection of cholinergic and antioxidant system contributes to the effect of berberine ameliorating memory dysfunction in rat model of streptozotocin-induced diabetes. Behav Brain Res 2011;220:30–41.

Koizumi J, Yoshida Y, Nakazawa T, Ooneda G. Experimental studies of ischemic brain edema, I: a new experimental model of cerebral embolism in rats in which recirculation can be introduced in the ischemic area. Jpn J Stroke. 1986;8:1-8.

Zea Longa EL, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke. 1989;20:84-91.

Murch SJ, Alan AR, Cao J, Saxena PK. Melatonin and serotonin in flowers and fruits of Datura metel L. J Pineal Res 2009; 47:277-83.

Esposito E., Rotilio D. and Di Matteo V., et al. 2002 A Review of Specific Dietary Antioxidants and the Effects on Biochemical Mechanisms Related to Neurodegenerative Processes. Neurobiol. Aging 23, 719–735.

Korkina L.G. and Afanas'ev I.B. 1997 Antioxidantand Chelating Properties of Flavonoids. Adv. Pharmacol. 38, 151–163.

Liu D., Cheng T., Guo H., Fernandez J.A., Griffin J. H., Song X. and Zlokovic B. V. 2004. Tissue Plasminogen Activator Neurovascular Toxicity is Controlled by Activated Protein C. Nat. Med. 12004; 0, 1379–1383.

Lo E. H. 2004. Combination Stroke Therapy: Easy as APC? Nat. Med. 10, 1295–1296.

Longa EZ, Weinstein PR, Carlson S, Cummins R. Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. Stroke 1989; 20: 84-91.

Markesbery W. R., 1979. Free Radic. Biol. Med., 23, 134—147.

Nijveldt R.J., Van Nood E. and Van Hoorn D.E., et.al. 2001 Flavonoids: A Review of Probable Mechanisms of Action and Potential Applications. Am. J. Clin. Nutr. 74, 418–425.

Popovich M, Fox G, Bandagi. Coping with stroke: psychological and social dimensions in U.S. patients. The International Journal of Psychiatric Nursing Research 2007; 12: 1474-87.

Ricci S., Celani M.G., Cantisani A.T.and Righetti E. 2006. Piracetam for Acute Ischaemic Stroke. Cochrane Database Syst Rev.(2):CD000419.

Raystman R.J. 2003. Animal Models of Focal and Global Cerebral Ischemia. ILAR J.;44(2): 85-95.

Warner D. S., Sheng H. X., Batini-Haberle I. 2004. J. Exp. Biol., 207, 3221-3231.

Wattanathorn J., Jittiwat J., Tongun T., Muchimapura S., Ingkaninan K. 2011. Zingiber Officinale Mitigates Brain Damage and Improves Memory Impairment in Focal Cerebral Ischemic Rat.