ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ในภาวะปกติ และภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว

นายยุทธพร สุขวิชัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECA 233 ON LEARNING AND MEMORY IN NORMAL AND TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA IN MICE

Mr.Yuttaporn Sukwichai

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ในภาวะปกติและภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว
โดย	นายยุทธพร สุขวิชัย
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันติสิระ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

…….. คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง เรืออากาศโทหญิง ดร.ภัสราภา โตวิวัฒน์)

…….. อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันติสิระ)

…… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ)

…… กรรมการ
(อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รัชนี รอดศิริ)

…… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.กนกวรรณ ติลกสกุลชัย)

ยุทธพร สุขวิชัย : ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ในภาวะปกติและภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว. (EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECA 233 ON LEARNING AND MEMORY IN NORMAL AND TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA IN MICE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันติสิระ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ภก.ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ, 81 หน้า

การวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 (อีซีเอ 233) ต่อความสามารถของการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ปกติและหนูเมาส์ที่มีความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำจากภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว พบว่าหนูเมาส์ปกติที่ได้รับอีซีเอ 233 อย่างต่อเนื่องทั้งในขณะก่อนและระหว่างการเรียนรู้มีผลทำให้การเรียนรู้และความจำดีขึ้นเมื่อทดสอบด้วยแบบทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้โดยวิธีมอริสวอเตอร์เมสและสะเต็บดาวรวมถึงมีระดับกลูตาไธโอนในสมองเพิ่มขึ้น การปิดกั้นหลอดเลือดคาโรติดชั่วคราว (ทูวีโอ) ทำให้สมองขาดเลือดส่งผลให้การเรียนรู้และความจำลดลง การให้อีซีเอ 233 ในขนาด 30 มก./กก. ทางปากแก่หนูจะช่วยลดความรุนแรงของภาวะดังกล่าว โดยอีซีเอ 233 สามารถลดภาวะความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้ดีที่สุดเมื่อหนูได้รับอีซีเอ 233 ทั้งในขณะก่อนและระหว่างการเรียนรู้ โดยสามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำเมื่อทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้โดยวิธีมอริสวอเตอร์เมสและสะเต็บดาวรวมถึงลดระดับเอ็มดีเอที่สูงขึ้นจากภาวะสมองขาดเลือดและเพิ่มกลูตาไธโอนในสมองอีกทั้งยังสามารถลดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสบริเวณซีเอ 1 และซีเอ 3 รองลงมาคือหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 เฉพาะหลังและก่อนทำทูวีโอ ตามลำดับ ในการทดลองนี้ไม่พบความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนไหวเมื่อทดสอบด้วยวิธีโลโคมอเตอร์แอคติวิตี้แต่อย่างใด

ผลจากการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาของอีซีเอ 233 ก่อนหน้านี้ในการแก้ไขภาวะการเรียนรู้และความจำบกพร่องจากภาวะสมองขาดเลือด นอกจากนั้นยังพบว่าอีซีเอ 233 สามารถเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูปกติได้ โดยอาจมีกลไกส่วนหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาต่อไปถึงกลไกอื่น ๆ ที่อาจเกี่ยวข้อง อีกทั้งควรมีการศึกษาเพื่อพัฒนาอีซีเอ 233 ไปเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับบำรุงสมองหรือเป็นยาเพื่อรักษาผู้ป่วยที่อยู่ในภาวะสมองเสื่อม

ภาควิชา.....เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา……

สาขาวิชา.....เภสัชวิทยา.....ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา.....2553.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก……..…

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5176581333 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : CENTELLA ASIATICA / ECA 233 / COGNITIVE FUNCTION / MORRIS WATER MAZE TEST / STEP – DOWN TEST

YUTTAPORN SUKWICHAI : EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECA 233 ON LEARNING AND MEMORY IN NORMAL AND TRANSIENT CEREBRAL ISCHEMIA IN MICE. ADVISOR : ASSOC. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., 81 pp.

The present study aimed to investigate the effects of standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on cognitive function in normal mice and mice with impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia (bilateral occlusion of common carotid arteries, 2VO). Normal mice receiving ECa233 throughout the course of experiment demonstrated improved learning and memory in behavior models of Morris Water Maze (MWM) test and step – down test as well as an increase in brain glutathione (GSH) level. The 2VO caused an impairment of learning and memory which could be ameliorated by an oral administration of ECa233 at the dose 30 mg /kg. The most effective effect was noted on mice receiving ECa233 throughout the course of experiment (before and after 2VO) which significantly resulting from ischemic injury event improved performance in Morris Water Maze (MWM) test and step – down test, decreased brain MDA level and increased brain glutathione (GSH) level. A decrease in neuronal cell death in hippocampus CA1 and CA3 regions were also observed. Administration of ECa233 during pre-treatment or post-treatment only showed less effect than that observed in mice receiving ECa233 throughout the couse of experiment . Locomotor activity was not altered by ECa233.

The results obtained are in accordance with previous study demonstrating ameliorating effects of ECa233 on memory deficit induced by global cerebral ischemia. In addition positive effect of ECa233 on memory of normal mice was also demonstrated in the present study. Antioxidant property of ECa233 could partly underlie positive modulation of learning and memory observed, however, some other mechanisms which could possibly be involved should be further investigated. Moreover, it is highly suggestive that ECa 233 should be further developed into a food supplement or a medication for patients with memory deficit.

Department : Pharmacology and Physiology

Field of Study : Pharmacology Student's Signature .....

Academic Year : 2010.....Advisor's Signature .....

Co-advisor's Signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี ล้วนเกิดจากความช่วยเหลือเกื้อกูล เอื้อเฟื้อจากกัลยาณชนผู้มีน้ำใจดีงามหลายท่าน ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณในน้ำใจอันดีงามของท่านผู้มีพระคุณ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.มยุรี ตันติสิระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ช่วยให้คำแนะนำ คำปรึกษา เทคนิคการคิดอย่างเป็นระบบในการทำงานวิจัย และรองศาสตราจารย์ ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ ที่ช่วยให้คำแนะนำทางด้านเทคนิค ให้ความดูแล และให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในระหว่างการทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช ภาควิชาเภสัชเคมีและอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิจัยทางเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือในการทดลอง

ขอขอบคุณบุคลากรภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยาทุกท่านที่อำนวยความสะดวกทั้งอุปกรณ์และสถานที่ในระว่างการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณรุ่นพี่นิสิตปริญญาเอกทุกคนที่ให้คำแนะนำที่ดีเกี่ยวกับเทคนิคต่าง ๆ และขอบคุณเพื่อนนิสิตทุกคนที่มีน้ำใจดีงามและให้ความช่วยเหลือตลอดมา

ขอบคุณภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยาที่ให้โอกาสทำวิทยานิพนธ์ในการครั้งนี้ จนบรรลุความสำเร็จ และท้ายสุดขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ – คุณแม่ที่คอยเป็นกำลังใจอยู่ตลอดมา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ
กิตติกรรมประกาศ..... ฉ
สารบัญ..... ช
สารบัญตาราง..... ญ
สารบัญภาพ..... ฎ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ..... ฐ
บทที่ 1 บทนำ..... 1
1.1 ที่มาและความสำคัญ..... 1
1.2 คำถามของการวิจัย (research questions)..... 3
1.3 สมมติฐานการวิจัย (hypothesis)..... 3
1.4 วัตถุประสงค์ในการวิจัย (objective)..... 3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4
2.1 การไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (blood brain circulation) และ ภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemia)..... 4
2.1.1 การไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (blood brain circulation)..... 4
2.1.2 ภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemia)..... 5
2.2 การเรียนรู้และความจำ (learning and memory)..... 14
2.2.1 การเรียนรู้ (learning)..... 14
2.2.2 ความจำ (memory)..... 15
2.2.3 กายวิภาคศาสตร์ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Anatomy of the Hippocampus)..... 17
2.2.4 กระบวนการของความจำ (process of memory)..... 19
2.2.5 Spatial memory..... 20
2.2.6 โรคความจำเสื่อม (amnesia)..... 21
2.3 บัวบก (Centella asiatica)..... 22
2.3.1 ข้อมูลการใช้บัวบกเป็นอาหารและสมุนไพรรักษาโรค..... 22

หน้า

2.3.2 องค์ประกอบทางเคมี (chemical components).....24
2.3.3 ข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา..... 25
2.3.4 ข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics)..... 28
2.3.5 สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233..... 28
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 30
3.1 สัตว์ทดลอง 30
3.2 เครื่องมือในการทดลอง..... 30
3.3 สารเคมี..... 31
3.4 วิธีการทดลอง..... 32
3.4.1 การเตรียมสารทดสอบและการให้สารทดสอบ..... 32
3.4.2 การทำให้หนูเมาส์มีความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำ โดยการทำ bilateral occlusion of common carotid arteries หรือ 2– vessel occlusion (2–VO)..... 32
3.4.3 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง..... 33
3.4.4 การทดสอบพฤติกรรม (behavior tests)..... 35
3.4.5 Biochemical study..... 38
3.4.6 Morphology study..... 39
3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล (data analysis) 40
บทที่ 4 ผลการทดลอง..... 41
4.1 ผลการทดสอบด้านพฤติกรรม..... 41
4.1.1 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ spatial 41
4.1.2 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ passive Avoidance..... 46
4.1.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์..... 52
4.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมี (biochemical study)..... 54
4.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาทที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้าง..... 59
บทที่ 5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ..... 66

หน้า

รายการอ้างอิง..... 70
ภาคผนวก..... 78
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 81

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4.1 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ spatial..... 45

4.2 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ passive avoidance..... 51

4.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA และ glutathione (GSH) ในสมอง..... 58

4.4 ผลของอีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus..... 65

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 2.1 การเปลี่ยนแปลงหลังเกิดภาวะสมองขาดเลือด..... 9
รูปที่ 2.2 การเกิด glutamate excitotoxicity และการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเกิดภาวะสมองขาดเลือด..... 10
รูปที่ 2.3 ผลของการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ต่อการตายของเซลล์ประสาทในภาวะสมองขาดเลือด..... 11
รูปที่ 2.4 Endogenous protective mechanism..... 14
รูปที่ 2.5 การจำแนกประเภทของความจำตามแหล่งเก็บข้อมูล..... 17
รูปที่ 2.6 การเคลื่อนที่กระแสประสาท ในสมองส่วน cortex ไปยังสมองส่วน hippocampus 18
รูปที่ 2.7 ภาพแสดงทางเดินของกระแสประสาทนำเข้าและออกของสมองส่วน hippocampus 19
รูปที่ 2.8 ลักษณะของใบบัวบก..... 24
รูปที่ 2.9 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในบัวบก 25
รูปที่ 2.10 อีซีเอ 233..... 28
รูปที่ 3.1 ตำแหน่งที่มีการปิดกั้นหลอดเลือดโดยใช้เทคนิค 2–vessel occlusion (2–VO)..... 33
รูปที่ 3.2 แผนการทดลอง..... 34
รูปที่ 3.3 Morris water maze test..... 36
รูปที่ 3.4 Step – down test..... 37
รูปที่ 3.5 Activity meter..... 38
รูปที่ 3.6 บริเวณที่ใช้ในการประเมินจำนวนเซลล์ประสาท..... 40
รูปที่ 4.1 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ ทดสอบโดยวิธี MWM test ในหนูปกติ 42
รูปที่ 4.2 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ ทดสอบโดยวิธี MWM test ในหนูกลุ่มที่ถูกทำ 2VO..... 43
รูปที่ 4.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ ทดสอบโดยวิธี MWM test (probe trial) ในหนูปกติ..... 44
รูปที่ 4.4 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ ทดสอบโดยวิธี MWM test (probe trial) ในหนู2VO..... 44

หน้า

รูปที่ 4.5 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down latency ในหนูปกติ..... 47
รูปที่ 4.6 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down latency ในหนู 2VO..... 48
รูปที่ 4.7 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down errors ในหนูปกติ..... 49
รูปที่ 4.8 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down errors ในหนู 2VO..... 50
รูปที่ 4.9 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์ในหนูปกติ..... 52
รูปที่ 4.10 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์ในหนู 2VO..... 53
รูปที่ 4.11 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA ในหนูปกติ..... 54
รูปที่ 4.12 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA ในหนู 2VO..... 55
รูปที่ 4.13 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ GSH ในหนูปกติ..... 56
รูปที่ 4.14 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ GSH ในหนู 2VO..... 57
รูปที่ 4.15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ประสาท pyramidal..... 60
รูปที่ 4.16 เซลล์ประสาทที่ CA 3 ในหนูปกติ..... 61
รูปที่ 4.17 เซลล์ประสาทที่ CA 3 ในหนู 2VO..... 62
รูปที่ 4.18 จำนวนเซลล์ประสาท pyramidal ในหนูปกติ..... 63
รูปที่ 4.19 จำนวนเซลล์ประสาท pyramidal ในหนู 2VO..... 64

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

%	=	Percent
α	=	Alpha
β	=	Beta
μm	=	Micrometer
AMPA	=	α – amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid
ANOVA	=	Analysis of variance
bcl	=	B-cell lymphoma
CA 1	=	Area 1 of Ammon's horn
CA 3	=	Area 3 of Ammon's horn
CMC	=	Carboxy methyl cellulose
DNTB	=	Dinitrothiocyanobenzene
GABA	=	Gamma aminobutyric acid
GF	=	Growth factors
HSPs	=	Heat shock proteins
i.p.	=	Intraperitoneal
IL	=	Interleukin
IP_3	=	Inositol triphosphate
Kg	=	Kilogram
M	=	Molar
MDA	=	Malondialdehyde
Mg	=	Milligram
mm^2	=	Square millimeter
MMP	=	Matrix metalloproteinase
MWM	=	Morris Water Maze
NMDA	=	N-methyl-D-aspartate
nmol/g	=	Nanomolar per gram
NO	=	Nitric oxide
NOS	=	Nitric oxide synthase

p53	=	Tumor protein p53
ROS	=	Reactive oxygen species
S.E.M	=	Standard error of the mean
Sec	=	second
SOD	=	Superoxide dismutase
TBA	=	Thiobarbituric acid
TNF – α	=	Tumor necrosis factor alpha
2VO	=	Two vessel occlusion

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญ

ภาวะสมองเสื่อมเป็นปัญหาทางสาธารณสุขและทางเศรษฐกิจสังคม พบในกลุ่มผู้สูงอายุ โดยพบได้ประมาณ 4% ในกลุ่มอายุมากกว่า 65 ปี และพบได้ถึง 20% ในกลุ่มอายุมากกว่า 85 ปี โอกาสในการเกิดภาวะสมองเสื่อมจะเพิ่มเมื่ออายุเพิ่มขึ้น จากข้อมูลทางการแพทย์พบว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อมมีหลายอย่างอาทิ ความผิดปกติและเสื่อมสภาพของเซลล์สมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคสมองเสื่อมที่เกิดจากโรคหลอดเลือดสมอง ตลอดจนภาวะสมองเสื่อมที่เกิดร่วมกับโรคทางสมองอื่นๆ เช่น โรคลมชักหรือพาร์กินสัน (กฤติ รื่นอารมณ์, 2552) ปัจจุบันพบว่าผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมส่วนหนึ่งมีสาเหตุร่วมกันระหว่างโรคอัลไซเมอร์และโรคหลอดเลือดสมอง ดังนั้นการป้องกันโรคหลอดเลือดสมองนอกจากสามารถป้องกันภาวะสมองเสื่อมที่เกิดจากโรคหลอดเลือดสมองโดยตรงแล้ว ยังมีผลในการป้องกันโรคอัลไซเมอร์ได้ (วีรศักดิ์ เมืองไพศาล, 2552)

จากการศึกษาทางพยาธิสรีรวิทยาพบว่าการเกิดภาวะความจำเสื่อมจากโรคหลอดเลือดสมอง (Ischemic stroke) เป็นผลจากการที่เซลล์สมองไม่สามารถรับเลือดและสารอาหารไปเลี้ยงเซลล์สมองได้ โดยเฉพาะเซลล์ประสาทซึ่งจะทนต่อสภาวะการขาดเลือดและออกซิเจนได้น้อย จึงทำให้เซลล์ขาด ATP ซึ่งจำเป็นต่อการคงสภาพของเซลล์ (นิพนธ์ พวงวรินทร์, 2534) พยาธิสรีรวิทยาของการเกิดโรคหลอดเลือดสมองมีความซับซ้อนซึ่งจะรวมถึงกลไก excitotoxicity กระบวนการอักเสบ การทำลายโดยสารอนุมูลอิสระ (oxidative damage) การเสียสมดุลของไอออนของเซลล์ (ionic imbalances) และการตายของเซลล์ (apoptosis) (Gupta, 2010) การตายของเซลล์ประสาทจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ cognitive function เกิดอาการทางด้านจิตใจและพฤติกรรมขึ้น มีรายงานการศึกษาที่แสดงให้เห็นถึงผลของการเหนี่ยวนำให้สมองเกิดการขาดเลือดโดยการปิดกั้นเส้นเลือดที่จะไปเลี้ยงสมอง พบว่าทำให้พฤติกรรมในการเรียนรู้บกพร่องและมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์โดยสามารถเป็นตัวบ่งชี้ถึงการดำเนินของโรคอัลไซเมอร์และการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท (Farkasa และคณะ, 2007)

บัวบก (*Centella asiatica* Linn.) เป็นพืชที่ใช้เป็นอาหารกันมานานและใช้ผสมในยาสมุนไพรพื้นบ้านหลายตำรับตั้งแต่สมัยโบราณ จึงเป็นสมุนไพรที่ค่อนข้างปลอดภัยและจากการทดสอบก็ไม่พบความเป็นพิษที่รุนแรง ในทางสาธารณสุขมูลฐานชาวบ้านนิยมใช้รักษาแผลสด แผลหลังผ่าตัดและแผลน้ำร้อนลวกหรือไฟไหม้ นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณหลายประการที่ระบุไว้ในตำรายาแผนโบราณ ปัจจุบันบัวบกจึงได้รับการบรรจุให้เป็น 1 ใน 8 ชนิดของยาที่พัฒนาจากสมุนไพรในบัญชียาจากสมุนไพร พ.ศ. 2549 (บัญชียาจากสมุนไพร, 2549) โดยมีข้อบ่งใช้ในการสมานแผล อย่างไรก็ตามเนื่องจากมีการค้นพบสารประกอบทางเคมีหลายชนิดในบัวบก (เช่น asiatic acid, madecassic acid, asiaticoside และ madecassoside เป็นต้น) จึงเชื่อกันว่าบัวบกน่าจะมีฤทธิ์อื่นๆ ตามสรรพคุณที่ระบุไว้ในตำรายาแผนโบราณด้วย แม้จะยังขาดการศึกษายืนยันทางคลินิกที่แน่ชัด สรรพคุณหนึ่งซึ่งมีรายงานคือ ฤทธิ์ในการช่วยชะลอความจำเสื่อม เพิ่มความจำและการเรียนรู้ ในตำรายาไทยใช้บัวบกเป็นยาอายุวัฒนะ โดยการคั้นน้ำใบบัวบก นำใบบัวบกมา 1 กำมือหรือ1 แก้วโดยยัดใส่แก้วพอแน่น นำมาตำหรือปั่นให้ละเอียด แล้วเติมน้ำ 1 แก้ว คนให้เข้ากัน แล้วกรองกินแต่น้ำ เติมน้ำตาลหรือเกลือ กินครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร จะช่วยบำรุงร่างกายและเจริญอาหาร(สำนักงานพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพ, 2009) นอกจากนี้การแพทย์ทางอายุรเวทของอินเดียเชื่อว่าบัวบกช่วยบำรุงร่างกายและทำให้ความจำดีขึ้น จึงได้มีการศึกษารายงานว่าบัวบกมีฤทธิ์ในการบำรุงสมองและกระตุ้นการเจริญของเดนไดรท์ (Rao และคณะ, 2005) มีฤทธิ์ป้องกันเซลล์ประสาท ความจำเสื่อม และลดการเกิดอนุมูลอิสระจากความเครียด (Veerenda และคณะ, 2003) ฤทธิ์ในการเร่งการสร้างเซลล์ประสาท (Soumyanath และคณะ, 2005) และจากผลการวิจัยสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง พบว่าช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดด้วยการปิดกั้นหลอดเลือดแดงแคโรทิดทั้งสองข้างแบบชั่วคราวได้ และผลดังกล่าวนี้อาจเกิดจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ของบัวบก (Tantisira, 2008) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากบัวบกมีฤทธิ์ในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำของอาสาสมัครสุขภาพดีในวัยกลางคนและผู้สูงอายุ (Dev และคณะ, 2009) รวมถึงผลการวิจัยความเป็นพิษของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 พบว่ามีความเป็นพิษต่ำมีความปลอดภัยสูง (Tantisira, 2008) การศึกษาในครั้งนี้จึงสนใจที่จะศึกษาถึงฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในการเพิ่มความจำและการเรียนรู้ในหนูเมาส์ปกติ รวมถึงฤทธิ์ในการป้องกันความบกพร่องของความจำและการเรียนรู้ก่อนการ

เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดในหนูเมาส์ด้วยการปิดกั้นหลอดเลือดแดงแคโรทิดทั้งสองข้างแบบชั่วคราว

1.2 **คำถามของการวิจัย** (RESEARCH QUESTIONS)

1.สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 สามารถเพิ่มความจำในหนูปกติได้หรือไม่

2.สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233.สามารถป้องกันภาวะความบกพร่องของการเรียนรู้, ความจำและลดการตายของเซลล์ประสาทในหนูเมาส์ก่อนและภายหลังถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดได้หรือไม่

1.3 **สมมติฐานการวิจัย** (HYPOTHESIS)

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 สามารถเพิ่มความจำในหนูปกติและสามารถป้องกันภาวะความบกพร่องของการเรียนรู้, ความจำและลดการตายของเซลล์ประสาทในหนูเมาส์ก่อนและภายหลังถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด

1.4 **วัตถุประสงค์ในการวิจัย** (OBJECTIVES)

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ต่อความสามารถของการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ปกติ

2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ในการป้องกันความบกพร่องของการเรียนรู้ และความจำก่อนและภายหลังถูกเหนี่ยวนำโดยภาวะสมองขาดเลือดในหนูเมาส์

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 การไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (Blood brain circulation) และ ภาวะสมองขาดเลือด (Cerebral ischemia)

2.1.1 การไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงสมอง (Blood brain circulation)

เส้นเลือดที่ไปเลี้ยงสมองจะประกอบไปด้วยเส้นเลือด Carotid artery 4 เส้นหลัก คือ Internal carotid arteries และ vertebral arteries อย่างละ 2 เส้น สมองได้รับเลือดจาก carotid artery เป็นส่วนใหญ่หรือประมาณ 2 ใน 3 ของปริมาณเลือดทั้งหมดที่สมองได้รับ และอีก 1 ใน 3 จะได้รับจาก vertebral arteries ปกติสมองจะได้รับเลือดและออกซิเจนไปเลี้ยงในปริมาณที่เพียงพออย่างสม่ำเสมอ โดยจะได้รับเลือดไปเลี้ยงในปริมาตร 750 มล./นาทีหรือประมาณ 50–55 มล./ สมอง 100 กรัม/นาที แม้ว่าสมองจะมีน้ำหนักเพียงร้อยละ 2 ของน้ำหนักร่างกายคือประมาณ 90–1,800 กรัม แต่ก็ได้รับเลือดไปเลี้ยงถึงร้อยละ 15-20 ของปริมาณเลือดทั้งหมด และมีความต้องการใช้ออกซิเจนถึงร้อยละ 20 ของปริมาณออกซิเจนที่ร่างกายใช้ทั้งหมดหรือประมาณ 50 มล./นาทีหรือ 3.7 มล./สมอง 100 กรัม/นาที หรือ 75 มก.ต่อนาที(นิพนธ์ พวงวรินทร์, 2534) เลือดแดงจะไหลผ่าน internal carotid artery ไปยังสมองและออกทาง jugular vein กระบวนการทั้งหมดใช้เวลาเพียง 7 วินาที ดังนั้นสมองจึงเก็บออกซิเจนและกลูโคสไว้ได้น้อยมาก สมองจึงมีพลังงานสำรองน้อย สมองร้อยละ 85 ได้รับพลังงานจากการเผาผลาญกลูโคสโดยผ่านกระบวนการ aerobic pathway สิ่งสำคัญของสมองคือเลือด เพราะเลือดจะนำเอาออกซิเจนและกลูโคสไปให้สมอง ทำให้สมองได้รับออกซิเจนและกลูโคสอย่างเพียงพอตลอดเวลา (Leeders และคณะ, 1990) ปริมาณของการไหลเวียนเลือดไปเลี้ยงสมองจะมีค่าคงที่อยู่เสมอเนื่องจากหลอดเลือดสมองมีการปรับตัวเพื่อรักษาปริมาณเลือดที่มาเลี้ยงสมองให้เพียงพออยู่ตลอดเวลา (autoregulation) ซึ่งความสามารถของการปรับตัวของหลอดเลือดสมองนี้จะมีประสิทธิภาพในการคงปริมาณเลือดไปเลี้ยงสมองเมื่อความดันเฉลี่ยของหลอดเลือดแดงอยู่ในช่วงระหว่าง 60-150 มม.ปรอท (Steiner และ Andrews, 2006)

2.1.2 ภาวะสมองขาดเลือด (Cerebral ischemia)

สมองที่ขาดเลือด (Cerebral ischemia) แบ่งเป็น 2 ลักษณะ คือ

1. Global ischemia หมายถึงการที่สมองทุกส่วนขาดเลือดในเวลาเดียวกัน เช่น เมื่อหัวใจหยุดเต้น ความดันเลือดต่ำ เป็นต้น

. 2. Focal ischemia หรือ regional ischemia หมายถึงสมองเพียงบางส่วนเท่านั้นที่ขาดเลือด,เช่นเมื่อเกิดการตีบหรือตันของหลอดเลือดที่เลี้ยงสมองในบางแขนง

ทั้ง global และ focal ischemia อาจรุนแรงจนทำให้เนื้อสมองตาย (infarct) infarct จึงหมายถึงการตายของเซลล์ และเนื้อเยื่อทุกชนิดที่ประกอบเป็นเนื้อสมอง อันเนื่องมาจากการขาดเลือด การเกิด infarct นั้นขึ้นกับหลายปัจจัย เช่นปริมาณเลือดที่ขาด ระยะเวลาที่ขาดเลือด หรือวงจรเสริม (collateral circulation) เป็นต้น (นิพนธ์ พวงวรินทร์, 2534)

พยาธิสรีรวิทยาของการเกิดสมองขาดเลือดเฉียบพลัน

ในขณะที่มีการเกิดภาวะสมองขาดเลือด เนื้อเยื่อสมองที่อยู่รอบหลอดเลือดจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ชั้นคือ เนื้อเยื่อชั้นใน (inner core) เนื้อสมองจะมีการขาดเลือดอย่างรุนแรง ซึ่งจะมีเลือดไหลผ่านต่ำกว่า 10 -25 % จะพบการตาย (necrosis) ของเซลล์ประสาทรวมถึงชิ้นส่วนของ glia cell ส่วนเนื้อเยื่อชั้นนอกคือ penumbra จะเป็นบริเวณที่ยังมีหลอดเลือด (collateral) มาเลี้ยงและยังพบเซลล์ประสาทได้ (Dev, 2010)

ภายหลังจากการเกิดภาวะสมองขาดเลือด ตรงกลางของส่วน core จะมีเลือดไหลผ่าน 10 -12 ml / 100 g / นาที ในขณะที่บริเวณรอบ ๆ ที่อยู่เกือบถึง penumbra เลือดจะไหลผ่านอยู่ในขั้นวิกฤติซึ่งน้อยกว่า 18 – 20 ml / 100 g / นาที และอาจจะหยุดไหลได้ภายในชั่วโมง แต่ในบริเวณ penumbra นั้นจะยังคงมีเลือดไหลผ่านน้อยกว่า 60 ml / 100 g / นาที ซึ่งมีผลทำให้เซลล์ตายได้น้อยกว่า โดยเซลล์ประสาทในบริเวณนี้อาจมีการสูญเสียโครงสร้าง แต่อาจมีการไหลเวียนของเลือด (reperfusion) มาเลี้ยงอีกครั้งในช่วงเวลาหนึ่ง (Dev, 2010) ในการเกิดภาวะสมองขาดเลือดจะมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ผ่านกลไกหลายอย่าง คือ

การสูญเสียพลังงานของเซลล์ : เนื้อเยื่อสมองมีความต้องการใช้ออกซิเจนและกลูโคสสูง การผลิตพลังงานในสมองเกือบทั้งหมดต้องใช้กระบวนการ oxidative phosphorylation ในการผลิตสารที่มีพลังงานสูงคือ adenosine triphosphate (ATP) เมื่อกระบวนการนี้ไม่สามารถทำงานตามปกติได้จะส่งผลต่อการแลกเปลี่ยนไอออน และเกิด depolarization ของเซลล์ประสาท (รูปที่

2.1) (Gupta, 2010) นอกจากนี้การลดลงของออกซิเจนยังเป็นผลให้เกิดกระบวนการ anaerobic glycolysis และมีการสะสมของ lactate (Dohmen, 2007)

Excitotoxicity : คือกลไกการกระตุ้นที่ส่งผลให้มีความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยพบว่ามีการหลั่งของ glutamate และ aspartate ซึ่งทำให้เกิดการกระตุ้น *N*-methyl *D*-aspartate (NMDA) และ α-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazolepropionic acid (AMPA) receptors ทำให้เกิดการไหลเข้า ของ calcium ion, sodium ion และน้ำเข้าไปในเซลล์ ซึ่งทำให้เกิดการบวมของเซลล์ (cytotoxic edema) ส่งผลให้เกิดการรบกวนสมดุลและการใช้พลังงานของเซลล์ การเพิ่มขึ้นของ calcium ยังส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งจะทำให้เซลล์ถูกทำลาย นอกจากนี้การเพิ่มขึ้นของ calcium ยังสามารถกระตุ้น enzyme หลายชนิด เช่น lipases, protease และ endonucleases ซึ่งอาจทำให้ DNA ,cell, proteins และ lipids ถูกทำลาย ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ ดังรูปที่ 2.2 (Oulu University Library, 2002 : online)

Oxidative stress : การเกิด oxidative stress ดังแสดงในรูปที่ 2.4 จะมีขึ้นเมื่อ free radical ในเซลล์มีมากเกินกว่า antioxidant จะทำลายให้หมดได้ reactive oxygen และโมเลกุลของไนโตรเจนมีความสำคัญต่อการทำลายของเนื้อเยื่อในสภาวะที่สมองขาดเลือดเฉียบพลัน (acute ischemic stroke) ในสภาวะที่สมองมีการขาดเลือด จะมีการผลิต superoxide (O_2^-) (รูปที่ 2.3) โดยโมเลกุลนี้สามารถหลุดออกผ่านขบวนการ mitochondrial electron transport chain superoxide เป็น primary radical ที่จะมารวมตัวกันเกิดเป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) ซึ่ง hydrogen peroxide ยังสามารถแปรรูปกลับไปเป็น hydroxyl radical ได้ (OH^-)

โมเลกุลของ nitric oxide ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น water-and lipid- soluble free radical มีค่าครึ่งชีวิตสั้นซึ่งจะถูกสร้างมาจากกรดอะมิโน L-arginine โดยเอนไซม์ nitric oxide synthases (NOS) (รูปที่ 2.3) ที่ประกอบไปด้วย 3 subtype คือ NOS I, NOS II และ NOS III สำหรับ NOS I และ NOS III ทำงานโดยอาศัยการกระตุ้นผ่าน Ca^{2+} เอนไซม์เหล่านี้จะพบได้ที่เนื้อเยื่อของเซลล์ประสาทและหลอดเลือด ส่วน NOS II (inducible enzyme) ต้องอาศัยการทำงานผ่าน cytokine ชนิดต่าง ๆ เมื่อเกิดภาวะสมองขาดเลือดจะมีการกระตุ้น NOS I และ NOS III ที่เซลล์ประสาทและเซลล์ของผนังหลอดเลือด ขั้นตอนต่อมาจะมีการรกระตุ้น NOS II ที่ glia cell และ neutrophils NOS I และ NOS II จะมีอิทธิพลมากต่อการเกิดภาวะสมองขาดเลือด แต่การผลิต nitric oxide โดย NOS III จะเพิ่มการไหลเวียนของเลือดไปเลี้ยงยังบริเวณ ischemic penumbra ผ่านกลไกการ

ขยายหลอดเลือด (vasodilation) และยับยั้งการรวมตัวของเกล็ดเลือด (platelet adhesion) nitric oxide ที่ได้จาก NOS III ยังสามารถต้านการเกิด oxygen radical และต้านกระบวนการอักเสบ โดยยับยั้งการรวมตัวของ leukocyte บริเวณเซลล์ผนังหลอดเลือด การยับยั้ง NOS โดย asymmetrical dimethylarginine อาจจะมีผลทำให้ bioavailability ของ nitric oxide ลดลง ซึ่งจะทำให้เกิด vasoconstriction และ free radical เพิ่มขึ้น เกิด platelet aggregation และ leukocyte adhesion ที่ผิวผนังหลอดเลือด

การเกิดปฏิกิริยาระหว่าง oxygen radical และส่วนอื่น ๆ ของเนื้อเยื่อยังสามารถทำให้เกิดอนุมูลอิสระได้อีกหลายชนิด โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเกิด peroxynitrite ซึ่งเกิดจากการรวมตัวของ superoxide และ nitric oxide โดย peroxynitrite สามารถผลิต hydroxyl radical ซึ่ง hydroxyl radical มีคุณสมบัติเป็น lipid soluble จึงสามารถซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี รวมทั้ง hydroxyl radical มีฤทธิ์ค่อนข้างแรงจึงสามารถทำลายเนื้อเยื่อได้มาก อนุมูลอิสระที่เกิดภายในเซลล์ก็ยังส่งผลให้ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์หลายชนิด, การปลดปล่อย Ca^{2+}จากแหล่งเก็บภายในเซลล์, โปรตีนสูญเสียโครงสร้างการทำงาน (denature), เกิด lipid peroxidation, การทำลายโครงสร้างของ DNA และการเหนี่ยวนำให้เกิดการรวมตัวของ mediator ต่าง ๆ (chemotaxis) นอกจากนี้ free radical ยังรบกวนการทำงานของการผลิตพลังงาน (ATP) ในไมโทคอนเดรียโดยรบกวนโมเลกุลของโปรตีนในขบวนการขนถ่ายอิเล็กตรอน และยังสามารถทำให้มีการหลั่ง cytochrome C ออกจากไมโทคอนเดรียซึ่งจะนำไปสู่การตายของเซลล์ (apoptosis)

Reperfusion injury : คือการไหลของเลือดเข้าไปในบริเวณที่มีการถูกทำลาย ภายหลังจากที่สมองขาดเลือด ในการเกิดภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว (transient cerebral ischemia) กระบวนการไหลเวียนของเลือดจะเกิดการปรับตัว (reperfusion) การเปลี่ยนแปลงการไหลเวียนของเลือดทำให้เกิด endothelial dysfunction (Cooper และคณะ, 2003) การเกิด reperfusion ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ intracranial pressure (ICP) ซึ่งจะทำให้เกิด vascular compression และการลดลงของ tissue perfusion ทำให้เกิด vasoconstriction ที่ผิดปกติไป กระบวนการดังกล่าวจะส่งผลต่อการใช้ออกซิเจนของสมอง เมื่อมีการเกิด reperfusion ก็จะมีการเกิด leukocyte infiltration ตามมา กระบวนการนี้จะมี leucocyte หลายชนิด โดยเฉพาะ neutrophil เข้ามารวมอยู่ที่ผนังของ cerebral blood vessel ซึ่งจะเกิดการกระตุ้นผ่าน cytokines ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็น tumor necrosis factor alpha (TNF-α) และ Interleukin (IL-1) จากนั้นก็จะเกิดการ

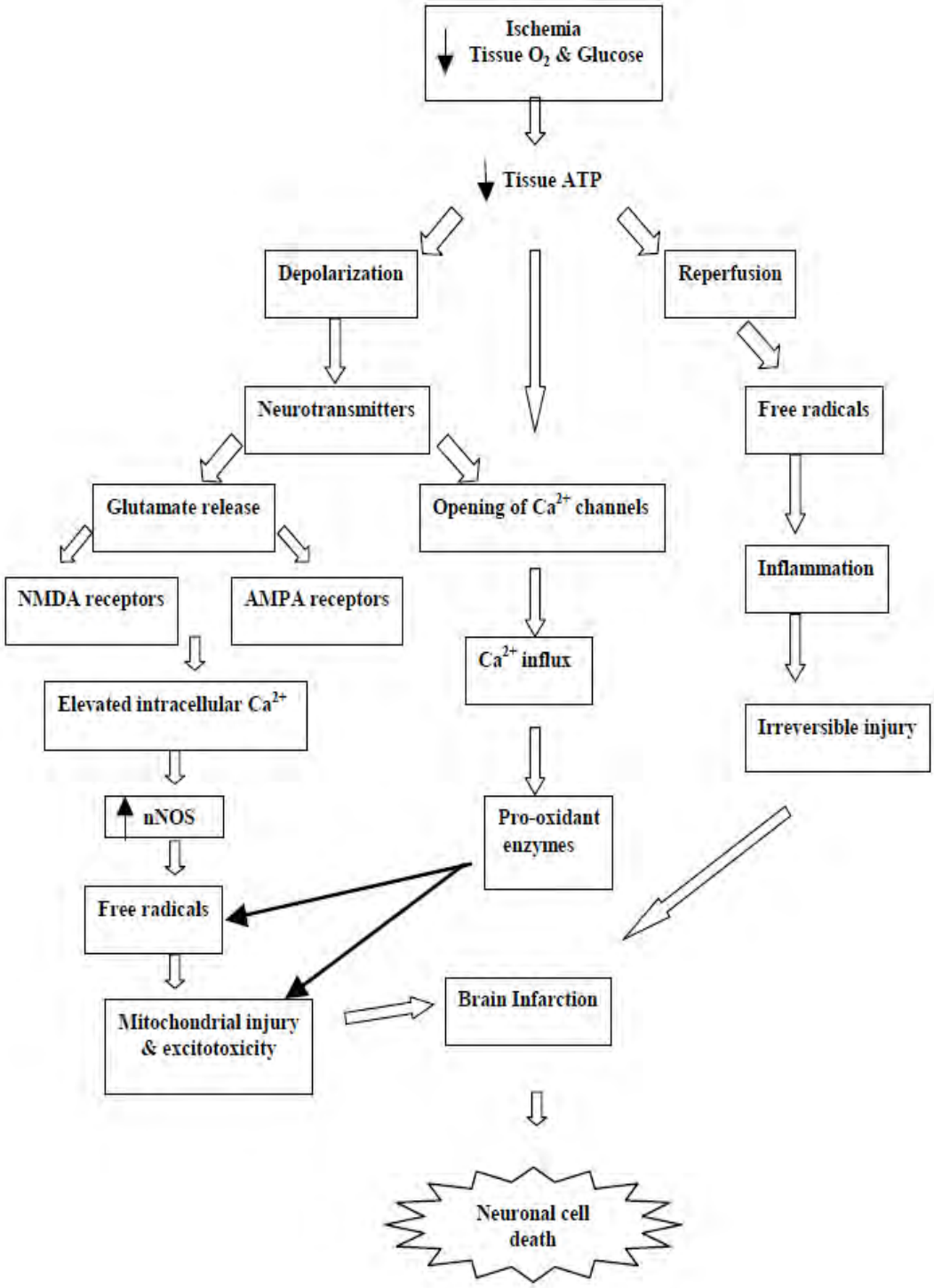
กระตุ้น inflammatory reaction เป็นผลให้มีการปลดปล่อย oxygen free radical และเกิด tissue injury ตามมา (Feuerstein และคณะ, 1996)

ขบวนการอักเสบของเซลล์ (inflammation) ภายหลังจากการเกิดภาวะ ischemic ประมาณ 1 ชั่วโมงจะเกิดการหลั่ง inflamatory cytokine เช่น TNF-α ซึ่งเป็น cytokine ชนิดหนึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน, interleukin-1(IL-1) และIL-6 ซึ่งจะทำให้เกิดขบวนการอักเสบ (Arvin และคณะ, 1996) มีการหลั่งสารโปรตีนโมเลกุลเล็กคือ Anaphylatoxin C5a ซึ่งมีฤทธิ์ทำให้เกิดการอักเสบได้สูง (Ember และ Hugli, 1997)

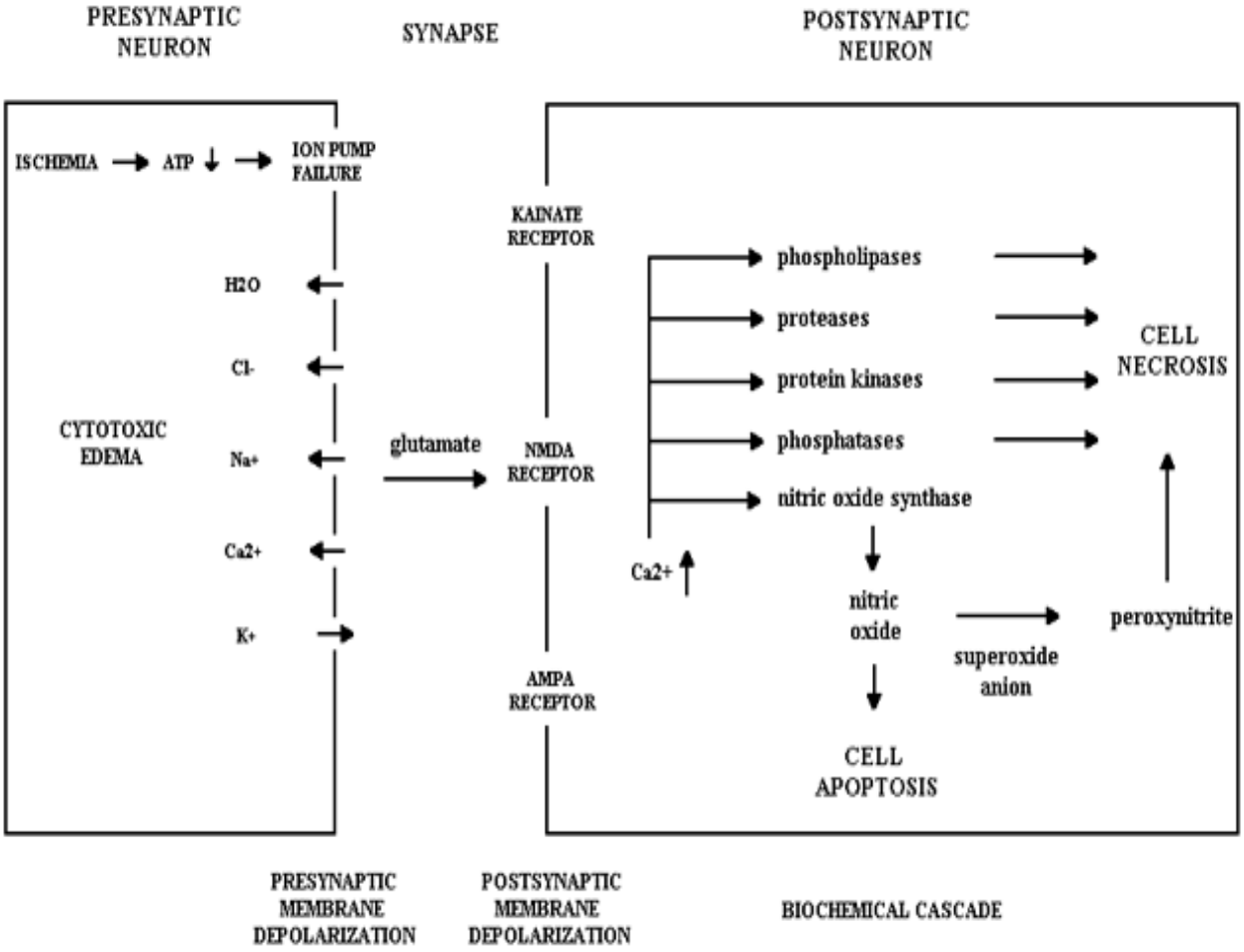
การเกิด Apoptosis คือการตายของเซลล์ที่เซลล์จะค่อย ๆ ตายไปโดยจะเกิดผ่านทั้ง pathway ของ intracellular signal ซึ่งกระตุ้นโดยการเกิด mitochondria dysfunction และเกิดผ่าน extracellular signal รวมถึงการกระตุ้นผ่านทาง TNF superfamily receptor (Eldadah และ Faden, 2000) NFkB (nuclear factor kB) P53 dependent pathway และผ่าน proapoptotic bcl family (Matsushita และคณะ, 1998)

การสูญเสียการทำงานของ Blood – brain barrier (BBB)

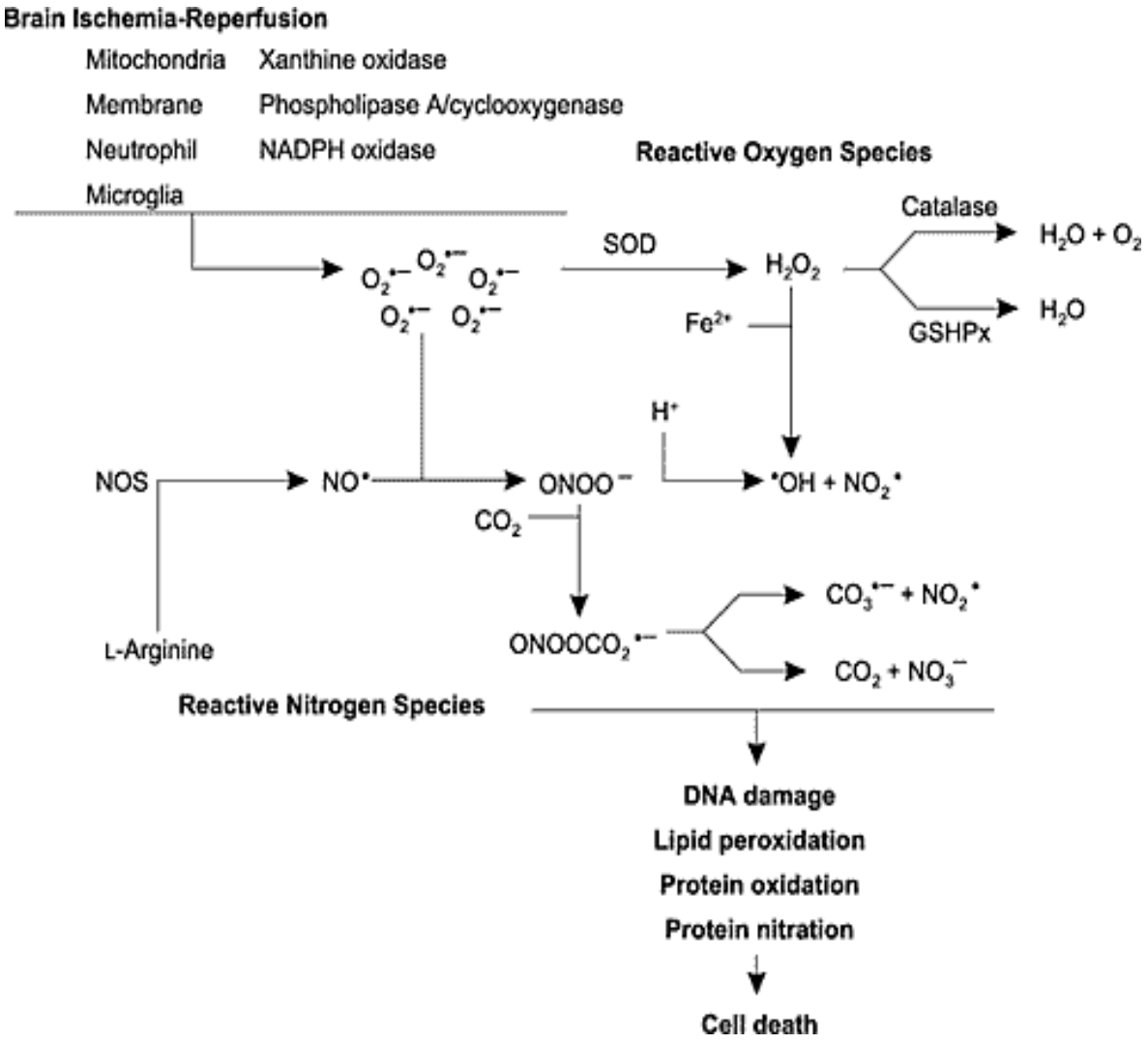
Blood – brain barrier (BBB) มีหน้าที่ปกป้องเซลล์ประสาทจากสารโมเลกุลใหญ่ไม่ให้เข้าสู่เซลล์สมองได้ BBB จะสูญเสียไปมากน้อยเพียงใดขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการเกิดภาวะสมองขาดเลือด โดยทั่วไปจะมีกลไกการเกิดอยู่ 2 ช่วง คือ ภายหลังการเกิด reperfusion จะเริ่มสังเกตุเห็น endothelial basal laminar มีการแตกสลาย ภายใน 2 ชั่วโมงหลังจากเริ่มเกิดภาวะสมองขาดเลือด และหลังจากนั้นทันทีทันใดก็จะมี BBB permeability เพิ่มขึ้น BBB ถูกทำลายเป็นผลมาจากการรวมตัวของ bradykinin, vascular endothelial growth factor , thrombin, active matrix metalloproteinases (MMP) และการทำงานของ protease อื่น ๆ ซึ่งเอนไซม์เหล่านี้จะมีการย่อยสลาย endothelial basal laminar ภายหลังจากการขาดเลือดไปเลี้ยงสมอง (infarct) ประมาณ 24 – 72 ชั่วโมง จะเข้าสู่ช่วงที่สองซึ่งมีกระบวนการที่ซับซ้อนโดยมีการรวมตัวของ mediator หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบจึงทำให้เนื้อเยื่อถูกทำลายอย่างชัดเจนมากขึ้น การรบกวน BBB ส่งผลให้มีการรั่วไหลของสารต่าง ๆ ที่อยู่ในเลือดเข้าไปสู่เนื้อเยื่อสมอง (brain parenchyma) จึงทำให้เซลล์สมองบวม เกิดภาวะความดันสูงของน้ำในสมอง (intracranial hypertension) (Brouns, 2009)



รูปที่ 2.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงหลังเกิดภาวะสมองขาดเลือด (Gupta, 2010)



รูปที่ 2.2 การเกิด glutamate excitotoxicity และการเปลี่ยนแปลงภายหลังการเกิดภาวะสมองขาดเลือด (Oulu University Library, 2002 : online)



รูปที่ 2.3 ผลของการเกิดอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ ต่อการตายของเซลล์ประสาทในภาวะสมองขาดเลือด (Brouns, 2009)

ในขณะที่เกิดกระบวนการ reperfusion ก็สามารถพบกระบวนการเกิด endogenous antioxidative defense เพื่อต้านการเกิด oxygen free radical ที่มากเกินไปได้บ้าง (Chan,2001)

Endogenous protective mechanism

Endogenous protective mediator จะช่วยลดผลจากการทำลายของ Endogenous mediator ต่าง ๆ ที่หลั่งออกมาในขบวนการ ischemic หรือ traumatic damage และช่วยในการเพิ่มประสิทธิภาพของกระบวนการ neuronal repair ต่างๆ (รูปที่ 2.4) เช่น

Heat shock protein (HSP) : เป็นโปรตีนกลุ่มหนึ่งซึ่งจะมีการปลดปล่อยออกมามากขึ้นเมื่อร่างกายอยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นจากอุณหภูมิหรือสภาวะเครียด โดยจะหลั่งออกมาภายหลังการเกิดภาวะสมองขาดเลือด เช่น HSP90 จะไปจับกับที่อยู่จำเพาะ (heat shock element) แล้วเคลื่อนเข้าไปยัง nucleus และจับกับ specific DNA site แล้วทำให้เกิดการสร้าง HSP70, HSP72 และ HSP27 การกระตุ้น HSP จะสามารถป้องกันการเกิด ischemic damage ได้โดยป้องกันการเกิดการทำลายโครงสร้างของโปรตีน (protein denaturation) (Abe และคณะ, 1998)

Anti –inflammatory cytokines : เป็นสารที่มีฤทธิ์ในการต้านกระบวนการอักเสบ เช่น IL-10 มีฤทธิ์ในการป้องกันการเกิดการทำลายจากภาวะสมองขาดเลือดได้โดยการยับยั้งการการผลิต inflammatory cytokine (Barone และ Feuerstein, 1999) นอกจากนี้ยังมี binding protein บางชนิด เช่น IL-1, TNF binding protein และ IL-18 binding protein ซึ่งจะมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ pro-inflammatory cytokines (Novick และคณะ, 1999)

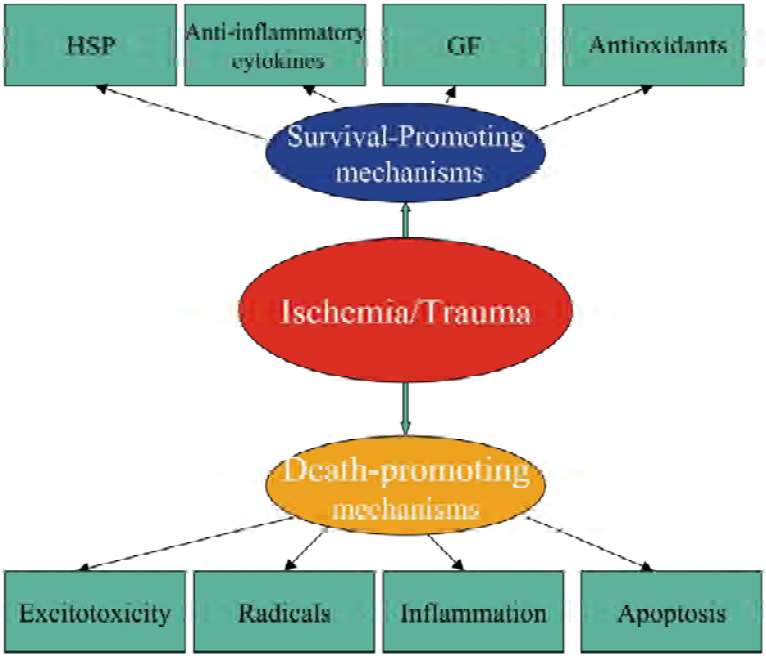
Growth factors (GF) : เป็นสารที่ช่วยกระตุ้นการเจริญเติบโตของเซลล์และมีความสำคัญในการควบคุมกระบวนการของเซลล์ พบว่ามี growth factors หลายชนิดที่ถูกกระตุ้นภายหลังการเกิดรอยโรคในภาวะ ischemic damage เช่น nerve growth factor (NGF), brain derived neurotrophic factor (BDNF), glial derived growth factor (GDNF), basic and acidic fibroblastic growth factors (FGF) และ members of the transforming growth factor super family (TGF) (Cuevas และ Gimenez, 1997) growth factors เหล่านี้จะรบกวน pathway ของการเกิด apoptosis และป้องกันการเกิด apoptotic death (Finklestein, 1996)

Endogenous antioxidant mechanisms : เกิดจากสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ภายในร่างกายอยู่แล้ว พบว่ามี antioxidant enzymes และlow-molecular-weight antioxidants ถูกกระตุ้นภายหลังการเกิด ischemic trauma ตัวอย่างเช่น manganese superoxide dismutase (Mn-SOD), extracellular SOD, Cu–Zn-SOD รวมถึง gluthatione สามารถป้องกัน blood brain barrier ไม่ให้ถูกทำลาย ภายหลังการเกิด cerebral ischemia และ reperfusion (Kim และคณะ., 2001) และการเพิ่มขึ้นของ enzymes มีผลเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ประสาทได้ (Chen และคณะ, 2001)

Endocannabinoids : เป็น mediator จำพวกไขมันทำหน้าที่ควบคุมกระบวนการที่เกี่ยวกับความอยากอาหาร (appetite) ความรู้สึกเจ็บปวด (pain sensation), อารมณ์ (mood) และความจำ (memory) endocannabinoids ที่พบได้แก่ 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) และ anandamide ซึ่งพบได้ทั้งในส่วน peripheral และสมอง โดยจะออกฤทธิ์ที่ CB1 receptor มีการศึกษาทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* พบว่ามีฤทธิ์ต่อต้านการเกิดภาวะสมองขาดเลือด (Nagayama และคณะ, 1999)

Erythropoietin : เป็นฮอร์โมนชนิดหนึ่งที่นอกจากทำหน้าที่ในการควบคุมขบวนการสร้างฮีโมโกลบิน (hematopoiesis) แล้วยังมีการศึกษาที่พบว่า Erythropoietin สามารถควบคุม growth factor และยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ (Braun และคณะ, 1996)

Sex hormone : มีการทดลองพบว่า estrogen มีฤทธิ์ในการปกป้องสมองจากภาวะ cerebral ischemia โดยผ่านกลไกทั้งทางด้านหลอดเลือดและเซลล์ประสาท (Watanabe และคณะ, 2001) มีการศึกษาทั้ง estrogen และ progesterone ถึงฤทธิ์ในการเป็น neuroprotective และ neuroregenerative ในภาวะ stroke และ traumatic brain injuries ซึ่งคาดว่าเกิดจากกลไกในการเป็น antioxidant ลดการเกิด excitotoxicity มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงผ่าน glutamate receptor ลดการเกิด immune inflamation กระตุ้นการเกิด axonal remyelimination และเพิ่มการเกิดกระบวนการ synaptogenesis รวมถึงเกิดการแตกแขนงของเซลล์ประสาทส่วนเดนไดรต์ (dendritic arborization) (Stein, 2001)



รูปที่ 2.4 Endogenous protective mechanism (Farkas, 2007)

2.2 การเรียนรู้และความจำ (Learning and Memory)

2.2.1. การเรียนรู้ (Learning)

การเรียนรู้คือกระบวนการที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลงของประสบการณ์ของระบบประสาทและพฤติกรรมในช่วงเวลานั้น ซึ่งทำให้มีการเกิดความจำ (memory) ขึ้น การเรียนรู้จะแบ่งออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ nonassociative learning และ associative learning

2.2.1.1 Nonassociative learning

เป็นการเรียนรู้ที่เกิดจากกการตอบสนองจากสิ่งกระตุ้นชนิดเดียว ซึ่งจะแบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ ความเคยชิน (habituation) ซึ่งเกิดเมื่อมีการตอบสนองลดลงจากการได้รับสิ่งที่ถูกกระตุ้นอย่างซ้ำ ๆ เป็นการเพิ่มการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นหลายอย่างภายหลังจากได้รับสิ่งกระตุ้นที่รุนแรงหรือที่เป็นอันตราย

2.2.1.2 . Associative learning

คือการเรียนรู้แบบมีเงื่อนไข จำแนกออกเป็น 2 ประเภท คือ classical conditioning และ instrumental conditioning

classical conditioning เกิดจากการกระตุ้นที่มีความสัมพันธ์กันของสิ่งกระตุ้นหลายสิ่งจนทำให้เกิดการเรียนรู้ สิ่งกระตุ้นชนิดแรกคือสิ่งกระตุ้นที่ไม่มีเงื่อนไข (uncondition stimulus : US) ทำให้เกิดการตอบสนองแบบปกติทั่วไปโดยไม่ได้ผ่านการฝึก (training) มาก่อน สิ่งกระตุ้นชนิดที่ 2 คือสิ่งกระตุ้นแบบมีเงื่อนไข (condition stimulus : CS) เป็นสิ่งกระตุ้นที่ไม่ได้ทำให้เกิดการตอบสนองแบบปกติ ต้องอาศัยการฝึก เช่น การหลั่งน้ำลายของสุนัขหลังจากได้ยินเสียงระฆัง (condition stimulus) โดยปกติสุนัขจะเกิดการหลั่งน้ำลายเมื่อมีชิ้นเนื้อ (uncondition stimulus) และมีเสียงระฆัง สุนัขเกิดการเรียนรู้แบบมีเงื่อนไข เมื่อสุนัขได้ยินเสียงระฆังเพียงอย่างเดียวก็จะเกิดการหลั่งน้ำลายขึ้น ซึ่งถือว่าเป็นการตอบสนองต่อการเรียนรู้แบบมีเงื่อนไข (Bear และคณะ, 2007)

instrumental conditioning คือการเรียนรู้ในแต่ละบุคคลซึ่งจะมีความสัมพันธ์กับการเคลื่อนไหวท่าทาง เมื่อได้รับสิ่งกระตุ้นแบบการได้รับรางวัล เช่น อาหาร ยกตัวอย่างเช่น พฤติกรรมการดีใจของหนูทดลองที่อยู่ในกล่อง หนูจะกดปุ่ม ซึ่งจะทำให้ทราบถึงระดับของการจ่ายอาหาร ซึ่งหนูก็จะเรียนรู้ว่าต้องกดปุ่มระดับไหนอาหารจึงจะลงมาโดยทำการสำรวจดูก่อน เมื่อหนูได้ทำการสำรวจ ก็จะมีการกดปุ่มเพื่อให้จ่ายอาหาร ซึ่งหนูก็จะเกิดการเรียนรู้จากอาหารด้วยซึ่งถือว่าเป็นรางวัล (Mark, 2001)

2.2.2. ความจำ (memory)

ความจำเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของการส่งสัญญาณกระแสประสาท (synaptic transmission) ระหว่างเซลล์ประสาท (neuron) ซึ่งเกิดขึ้นเป็นวงจรของกระแสประสาทที่อยู่ภายในสมอง และมีการพัฒนาการเกิดเป็นเส้นทางกระแสประสาท เรียกว่า memory trace โดยทั่วไปจะจำแนกความจำเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ ตามแหล่งเก็บของข้อมูล แบ่งเป็น declarative memory และ non declarative memory ดังรูปที่ 2.5 (Lynch, 2004)

2.2.2.1 Declarative (explicit memory)

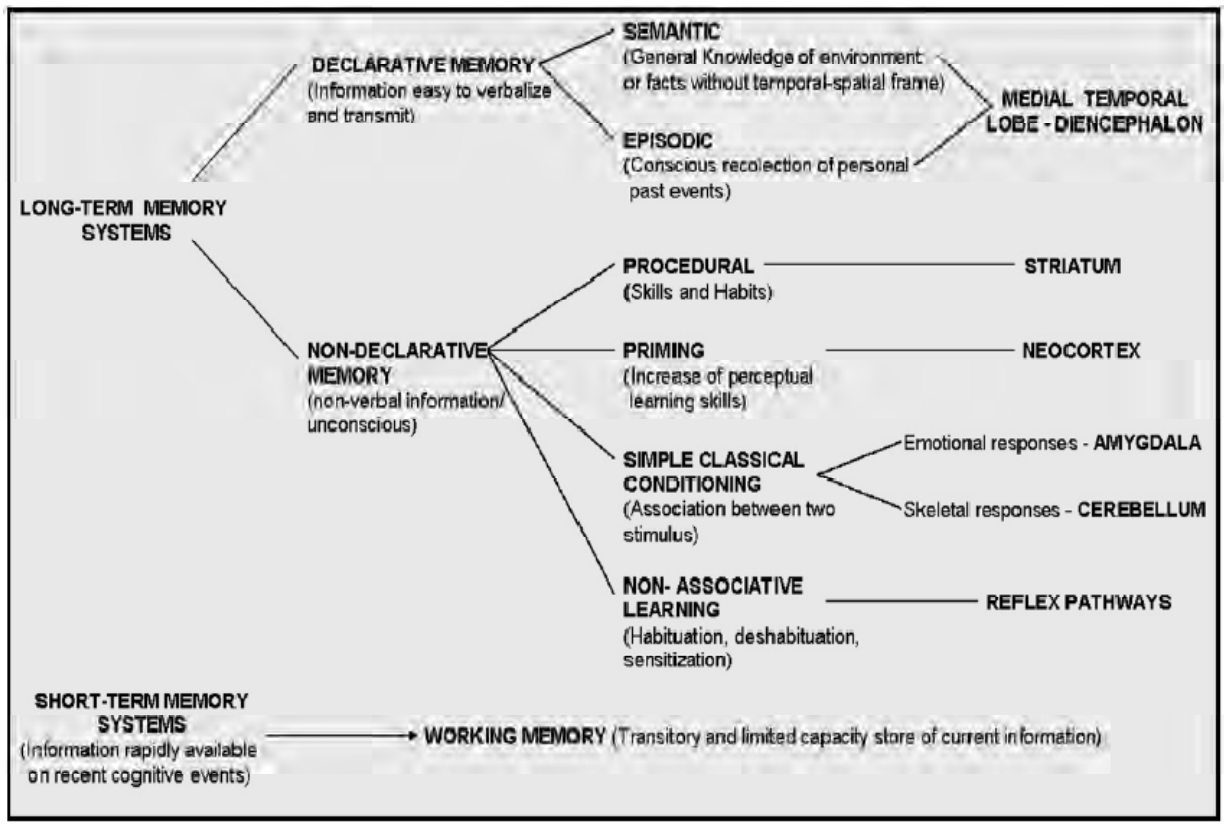
เป็นการเรียนรู้ที่เกิดจากข้อเท็จจริง (Fact), ประสบการณ์ (Experience) และข้อมูลข่าวสารเกี่ยวกับเหตุการณ์ เกิดจากความมีสติตื่นตัว มีความรวดเร็ว ยืดหยุ่น โดยส่วนใหญ่ข้อมูลมักเป็นข้อเท็จจริง เช่น ความสามารถในการจดจำจำนวนตัวเลข declarative memory ยังสามารถแบ่งเป็นประเภทย่อย ๆ ออกได้เป็น semantic memory และ episodic memory (Widmaier และคณะ, 2004)

Semantic memory คือความรู้ทั่วไปในโลกที่เป็นข้อเท็จจริงโดยที่ข้อมูลไม่ถูกเก็บใน spatial-temporal frame เป็นการนึกถึงความหมายของคำ สัญลักษณ์ นามธรรม ความสัมพันธ์ของความหมายคำพูด ข้อมูลของความจำจะเก็บสะสมผ่านช่วงเวลาของชีวิต semantic memory จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้เมื่อมีการหลงลืม (amnesia)

Episodic memory คือการเรียนรู้เกี่ยวกับสถานที่ และระยะเวลา เป็นตอน ๆ เป็นกรณี เป็นครั้งคราวในช่วงหนึ่งของชีวิต เช่น ความจำเกี่ยวกับอาหารที่ได้ทานไปเมื่อตอนเช้า หรือ คำที่เคยได้ยินไปก่อนหน้านี้ การจดจำข้อมูลมีความถูกต้องแม่นยำทั้งเวลา สถานที่ของเหตุการณ์ (Delis และคณะ, 1999)

2.2.2.2 Non declarative (implicit memory /procedural)

เป็นรูปแบบของความจำซึ่งไม่เกิดผ่านการเรียนรู้อย่างมีสติโดยตรง ความจำจะเกิดผ่านกระบวนการทางทักษะเช่น ทักษะการเล่นดนตรี ที่ต้องมีการจดจำโน๊ตเพลง จังหวะในการสีไวโอลิน ความจำการเรียนรู้อย่างเคยชินและรวมถึงการตอบสนองทางอารมณ์ต่อสถานการณ์ เช่น การเจองูเห่า ซึ่งเป็นสัตว์ที่มีพิษในขณะนั้นจะมีอารมณ์ตกใจ เกิดเป็นความจำที่มาจากอารมณ์ในช่วงเวลานั้น (Mark, 2001)

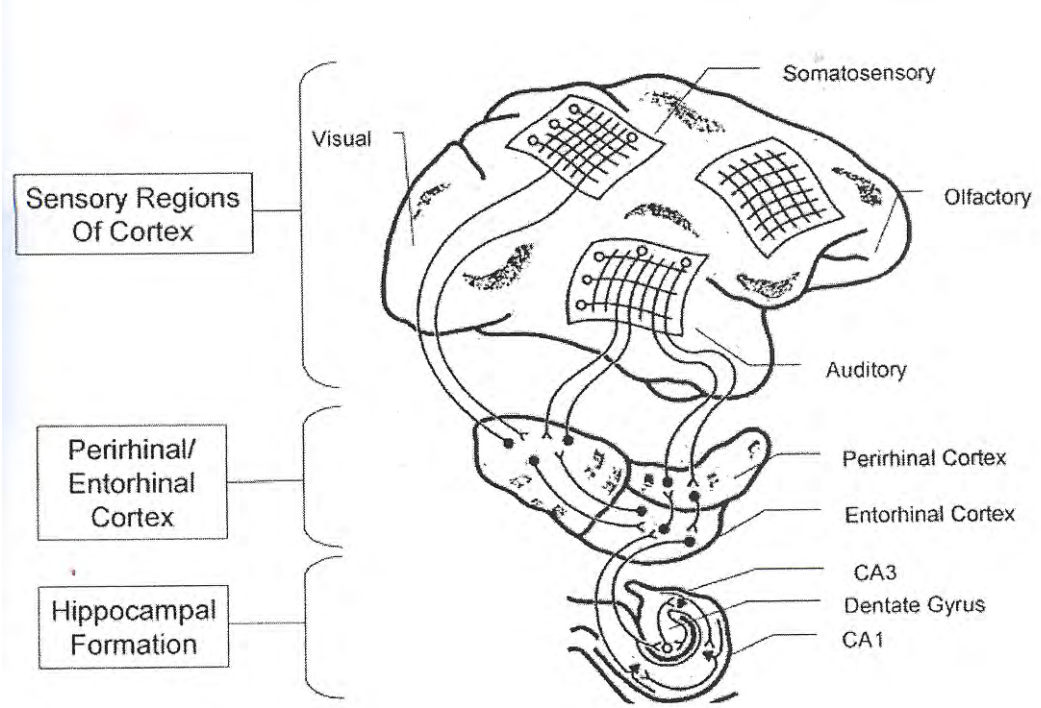


รูปที่ 2.5 การจำแนกประเภทของความจำตามแหล่งเก็บข้อมูล (Paul, 2009)

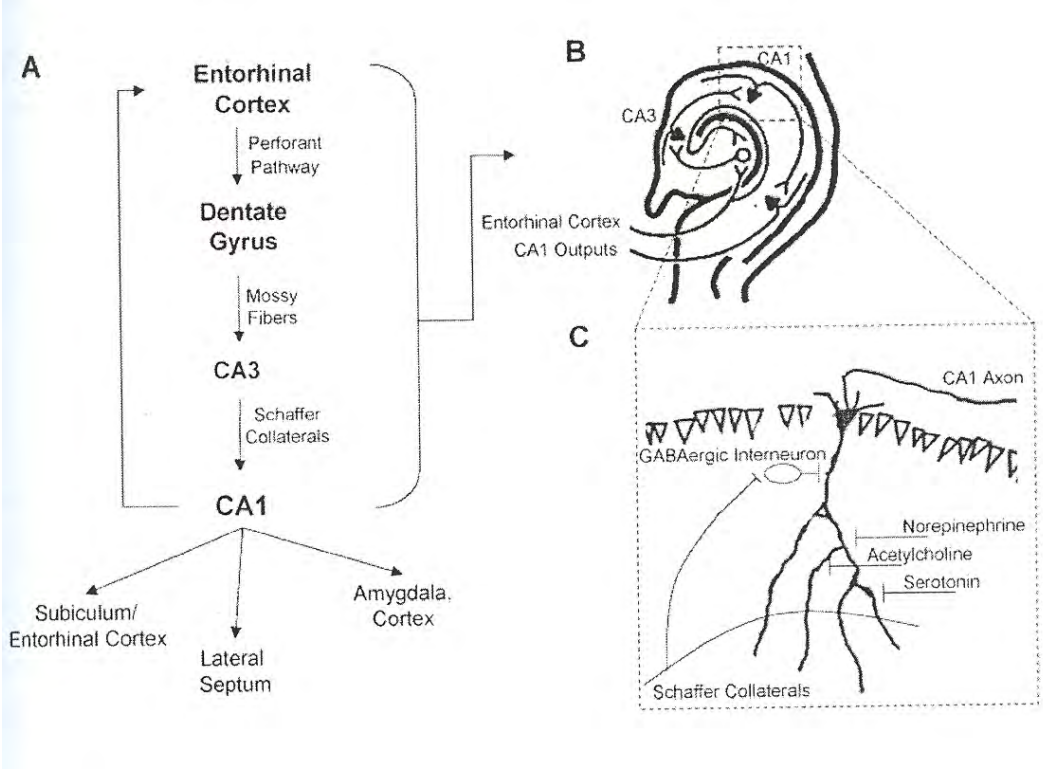
2.2.3 กายวิภาคศาสตร์ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (Anatomy of the hippocampus)

โครงสร้างพื้นฐานของสมองส่วน hippocampus การนำส่งข้อมูลแสดงไว้ดังรูปที่ 2.6 hippocampus จะได้รับข้อมูลทั้งทางตรงและทางอ้อมจากบริเวณ sensory area และส่วนอื่น ๆ ของสมองส่วน cortex เช่น visual information processing, auditory cortex, somatosensory cortex สมองส่วน hippocampus จะได้รับข้อมูลทางระบบ olfactory ผ่านทาง olfactory bulb ข้อมูลการรับรู้จากหลาย ๆ ที่จะถูกส่งลงไปที่ hippocampus โดยผ่าน perirhinal และ entorhinal cortices และถูกเชื่อมต่อไปยัง dentate gyrus ของสมองส่วน hippocampus ในสมองส่วน hippocampus จะประกอบไปด้วย CA1, CA2, CA3 และ CA4 โดย CA1 และ CA3 เป็นบริเวณส่วนใหญ่ที่พบได้มากที่สุดและเรียกเซลล์ที่อยู่ในบริเวณ CA นี้ว่า pyramidal cell ข้อมูลส่งออกจะมาทาง axon ของ CA1 ซึ่งเป็น glutamategic axon หลังจากนั้นจะออกจากสมองส่วน hippocampus ไปที่ entorhinal cortex ต่อไป ดังรูปที่ 2.6 (Sweatt, 2003)

สมองส่วนบริเวณ hippocampus ครอบคลุมบริเวณกว้างในบริเวณก้านสมอง และพบปลายประสาท axon ที่หลั่งสารสื่อประสาท norepinephrine (NE), acetylcholine (Ach), และ serotonin (5HT) ดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.6 ภาพแสดงทางของการเคลื่อนที่กระแสประสาทจาก sensory region ในสมองส่วน cortex ผ่าน perirhinal และ entorrhinal cortices ไปยังสมองส่วน hippocampus (Sweatt, 2003)



รูปที่ 2.7 ภาพแสดงทางเดินของกระแสประสาทนำเข้าและออกของสมองส่วน hippocampus (A) แสดงวงจรการนำกระแสประสาทของสมองส่วน hippocampus (B) โครงสร้าง hipocampus (C) กระบวนการ signaling ที่ปรากฏบริเวณ CA1 ของสมองส่วน hippocampus โดยชี้ให้เห็นถึงบริเวณที่มีการเชื่อมต่อของเซลล์ (Sweatt, 2003)

2.2.4. **กระบวนการของความจำ** (Process of memory)

กระบวนการของการจำประกอบไปด้วย 4 ขั้นตอนคือ encoding, consolidation, stored และ retrieval

Encoding : เป็นการเรียนรู้ข้อมูลใหม่ที่สนใจ ในขั้นตอนนี้มีความสำคัญว่าจะจำข้อมูลไว้อย่างไร ข้อมูลที่ได้รับเข้ามามีความละเอียดและลึก กระบวนการจะสมบูรณ์ได้นั้นผู้รับจะต้องมีความสนใจในข้อมูลและความสัมพันธ์ของความหมายของข้อมูล ในสภาวะที่มีการตื่นตัวจะทำให้การเก็บข้อมูลดีขึ้น (Deli และคณะ, 1999)

Consolidation : เป็นกระบวนการที่มีการจัดเรียบเรียงข้อมูลใหม่ให้เป็นระเบียบขึ้น แต่ยังคงเค้าความเดิม เพื่อให้ข้อมูลนั้นถูกเก็บไว้ได้นานขึ้น ในกระบวนการนี้จะเกิด expression ของ gene และสังเคราะห์โปรตีนใหม่ ทำให้มีการปรับโครงสร้างของเซลล์ ส่งผลให้เก็บข้อมูลได้อยู่ตัวเป็นระยะเวลานานขึ้น (Kandel และคณะ, 2000)

Storage เกี่ยวกับกลไกและแหล่งที่เก็บของข้อมูล ในสมองส่วน temporal lope บริเวณ diencephalon ซึ่งจะมีความจุได้ไม่จำกัด (Mark, 2001)

Retrieval เป็นกระบวนการที่เรียกข้อมูลกลับคืน และใช้ประโยชน์จากข้อมูลที่ได้ถูกจัดเก็บไว้ โดยการนำข้อมูลออกมาจากเหล่งเก็บแล้วนำมาแยกแยะ ในขั้นตอนนี้การรับรู้ (perception) จะมีความสำคัญอย่างมาก กระบวนการเรียกกลับข้อมูลคืนจะมีประสิทธิภาพมากเมื่อสภาพแวดล้อมที่เกี่ยวกับเนื้อความนั้นมีความใกล้เคียงกัน (Anderson, 1995)

2.2.5.Spatial memory

ความจำแบบ spatial เป็นความจำประเภทหนึ่งที่เกิดจากพฤติกรรมการสำรวจที่มีอยู่ในสัตว์ทั่วไปทุกเผ่าพันธุ์รวมถึงมนุษย์ พฤติกรรมเหล่านี้รวมถึงความอยากรู้อยากเห็นตามธรรมชาติของมนุษย์หรืออาจจะหมายถึงความต้องการที่จะเรียนรู้ข้อมูลใหม่ ๆ สิ่งแวดล้อมใหม่ ๆ และสิ่งกระตุ้นใหม่ ๆ ดังนั้น ความจำแบบ spatial จะมีความสัมพันธ์กับหน้าที่ของสมองในการจดจำ (recognizing) การแปลรหัสข้อมูล (codifyding) การจัดเก็บข้อมูล (storage) และการเรียกกลับข้อมูลออกมาใช้ (recovering) ของข้อมูลข่าวสารที่เป็นวัตถุหรือสถานที่ ถึงแม้ว่าความจำแบบ spatial จะมีอยู่ในสัตว์ทั่วไปทุกเผ่าพันธุ์ แต่ในมนุษย์ก็จะมีความแตกต่างจากสัตว์โดยทั่วไปเพราะมนุษย์มีการใช้สัญลักษณ์ในการสื่อสาร แผนที่ รูปภาพ ภาษาพูด และภาษาเขียน ความจำแบบ spatial จึงไม่เกี่ยวกับประสบการณ์โดยตรง

สาระสำคัญของกระบวนการเรียนรู้จะต้องมีสิ่งสำคัญอย่างน้อย 2 สิ่ง การที่บุคคลสามารถจดจำสถานที่ สิ่งกระตุ้นหรือตำแหน่ง (personal-coporal space) และสามารถใช้ข้อมูลจากแหล่งนั้นได้ (external space) โดยจะมีอยู่ 2 กระบวนการ คือ การเอาตัวเองเป็นศูนย์กลาง (egocentric) เป็นกระบวนการของความจำที่ยึดเอาตัวผู้จำเป็นจุดศูนย์กลางในการเปรียบเทียบกับสิ่งที่สังเกตุรอบ ๆ ข้าง เช่น การที่เรามองเห็นกรอบรูปอยู่ด้านหน้าของตัวเรา อีกกระบวนการหนึ่งคือการเอาสิ่งอื่นเป็นศูนย์กลาง (allocentric) เป็นกระบวนการของความจำที่ยึดเอาตัววัตถุที่เราเห็นเป็นจุดศูนย์กลางในการเปรียบเทียบกับสิ่งที่สังเกตุรอบ ๆ ข้าง เช่น เรามองเห็นกรอบรูปอยู่ด้านข้างแจกัน (Paul, 2009)

ความจำแบบ spatial สามารถพบได้ในหลายรูปแบบ เช่น

- Spatial working memory เป็นระบบความจำอย่างหนึ่งโดยที่สมองส่วน temporal จะสามารถเก็บกักข้อมูล (spatial information) ได้ในจำนวนจำกัดเพื่อให้ง่ายต่อการ

ดึงข้อมูลออกมาใช้ได้ทันที ข้อมูลข่าวสารนี้อาจจะผ่านกระบวนการรับรู้อื่น ๆ เครือข่ายของ spatial working memory อยู่ที่ cortical-occipital, parietal-dorsal และ frontal area (Paul, 2009)

- Spatial short-term memory เป็นระบบความจำอย่างหนึ่งที่ใช้จัดเก็บและบริหารข้อมูลชั่วคราว ซึ่งมีความจำเป็นต่อการเรียนรู้ที่มีความยากและซับซ้อน เช่น การเรียนการหาเหตุผล เรื่องที่ต้องอาศัยความเข้าใจ (Morris, 2004)
- Spatial long-term memory เป็นระบบความจำอย่างหนึ่งที่มีความคงทนในสมองมากกว่า Spatial working memory หรือ Spatial short-term memory การจัดเก็บข้อมูลในเรื่องที่ยากจะเกิดเมื่อเรามีความเชื่อเป็นพื้นฐานในเรื่องนั้น ทำให้สามารถเรียนรู้และนำข้อมูลที่หลากหลายออกมาใช้ตามชนิดของข้อมูลและจุดมุ่งหมายที่แตกต่างกัน (Morris,2004)

2.2.6 โรคความจำเสื่อม (ammesia)

โรคความจำเสื่อม คือ ภาวะที่ความจำสูญเสียการทำงานอย่างรุนแรงโดยไม่เกี่ยวข้องกับความพร่องของไหวพริบ (intelligence), ความสนใจ (attention) และการรับรู้ (perception) ภาวะความจำเสื่อมอาจเกิดได้ภายหลังจากการถูกกระทบกระเทือนทางสมอง (trauma) เช่น ภาวะ chronic alcoholism, encephalitis, brain tumor และ stroke ซึ่งสภาวะเหล่านี้สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสมอง ภาวะความจำเสื่อมสามารถจำแนกออกเป็น 2 รูปแบบคือ anterograde amnesia และ retrograde amnesia

2.2.6.1. Anterograde amnesia

มีสาเหตุมาจากการเกิดการกระทบกระเทือนทางสมอง ซึ่งก่อนเกิดเหตุการณ์ memory จะยังคงมีปกติอยู่ แต่ภายหลังการเกิดการกระทบกระเทือนทางสมอง จะมีผลทำให้เกิดการสูญเสียความจำ จึงมีผลทำให้ไม่สามารถเปลี่ยนข้อมูลที่เป็นความจำระยะสั้น (short – term memory) ให้เป็นความจำระยะยาว (long – term memory) ได้ ยกตัวอย่างเช่น คนไข้ไม่สามารถจดจำชื่อของแพทย์ที่รักษาได้ ทั้งที่เป็นแพทย์ประจำตัวและรักษาเขามาหลายปี ต้องพูดซ้ำอยู่ทุกครั้ง ในทางคลินิกพบผู้ป่วยที่มีความจำในวัยเยาว์จะยังคงปกติอยู่ แต่ภายหลังจากการเกิดการกระทบกระเทือนทางสมองจะมีความจำที่ลดลงในแต่ละปี และพบการถูกทำลายของสมองอย่างน้อย 3 ส่วน หากเกิดการทำลายในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นทางผ่านของ

ข้อมูลข่าวสาร รวมถึงเป็นแหล่งเก็บของข้อมูล จะทำให้ข้อมูลไม่สามารถเชื่อมต่อในกระบวนการที่เกี่ยวกับความจำได้ (Joseph, 1996)

2.2.6.2.Retrograde amnesia

เป็นผลมาจากการเกิดการกระทบกระเทือนทางสมองเช่นกันกับ anterograde amnesia แต่การสูญเสียความจำจะเกิดก่อนการเกิดการกระทบกระเทือนทางสมอง ช่วงระยะเวลาในการเกิดอาจเกิดตั้งแต่ไม่กี่นาทีจนถึงหลายปี ความจำเสื่อมประเภทนี้เกิดจากความบกพร่องของสมองส่วนที่ดึงข้อมูลจาก ความจำระยะยาว (long term memory) ไปเป็นความจำระยะสั้น(short – term memory) โดยที่ความสามารถในการเรียนรู้ยังดีอยู่ แต่ความสามารถในการแยกแยะจะสูญเสียไป ยกตัวอย่างเช่น คนไข้ยังรู้วิธีการจับปากกา เขาก็ชูปากกาให้ดู แล้วบอกว่าเอาไว้ทำแบบนี้ เอาไว้เขียน ซึ่งอาจจะลืมว่านี่เรียกว่า ปากกา (Bear และคณะ, 2007)

2.3 บัวบก (*Centella asiatica*)

บัวบก (รูปที่ 2.9) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* Urban ซึ่งจัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นไม้ล้มลุก ลำต้นเลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน แตกรากฝอยตามข้อ มักขึ้นตามที่ชื้นแฉะ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว รูปไต กลม ขอบใบหยัก เรียงสลับหรือออกเป็นกระจุก กระจุกละ 3-5 ใบ ก้านใบยาวชูขึ้น ดอกมีสีม่วง ออกเป็นช่อ ก้านช่อดอกสั้น ผลมีสีเขียวหรือขาว ขนาดเล็ก ค่อนข้างกลม (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2541) บัวบกเป็นพืชสมุนไพรที่มีประวัติการใช้ประโยชน์ในทางยามานาน ในทางการแพทย์อายุรเวทดั้งเดิมเป็นที่รู้จักกันดีว่าสามารถนำบัวบกมาใช้ในด้านการฟื้นฟูความอ่อนเยาว์ ความจำและช่วยให้อายุยืนยาว นอกจากนั้นยังถูกนำมาใช้บำบัดอาการที่เกี่ยวข้องกับสมองมาเป็นเวลานาน ช่วยลดความเครียดจากการทำงานหนัก ควบคุมระดับแรงดันเลือดให้เป็นปกติ แก้ช้ำใน บำรุงกำลัง บำรุงหัวใจ ขับปัสสาวะ แก้ท้องร่วง แก้อ่อนเพลีย แก้น้ำร้อนลวก ใช้รักษาโรคผิวหนัง แก้เจ็บคอ ร้อนในและกระหายน้ำ เป็นต้น (วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์, 2544)

2.3.1 ข้อมูลการใช้บัวบกเป็นอาหารและสมุนไพรรักษาโรค

บัวบกเป็นพืชที่พบได้มากในอินเดียและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ โดยแต่ละประเทศมีการนำบัวบกมาใช้ประกอบอาหาร ในศรีลังกามักเรียกบัวบกว่า Gotu Kola

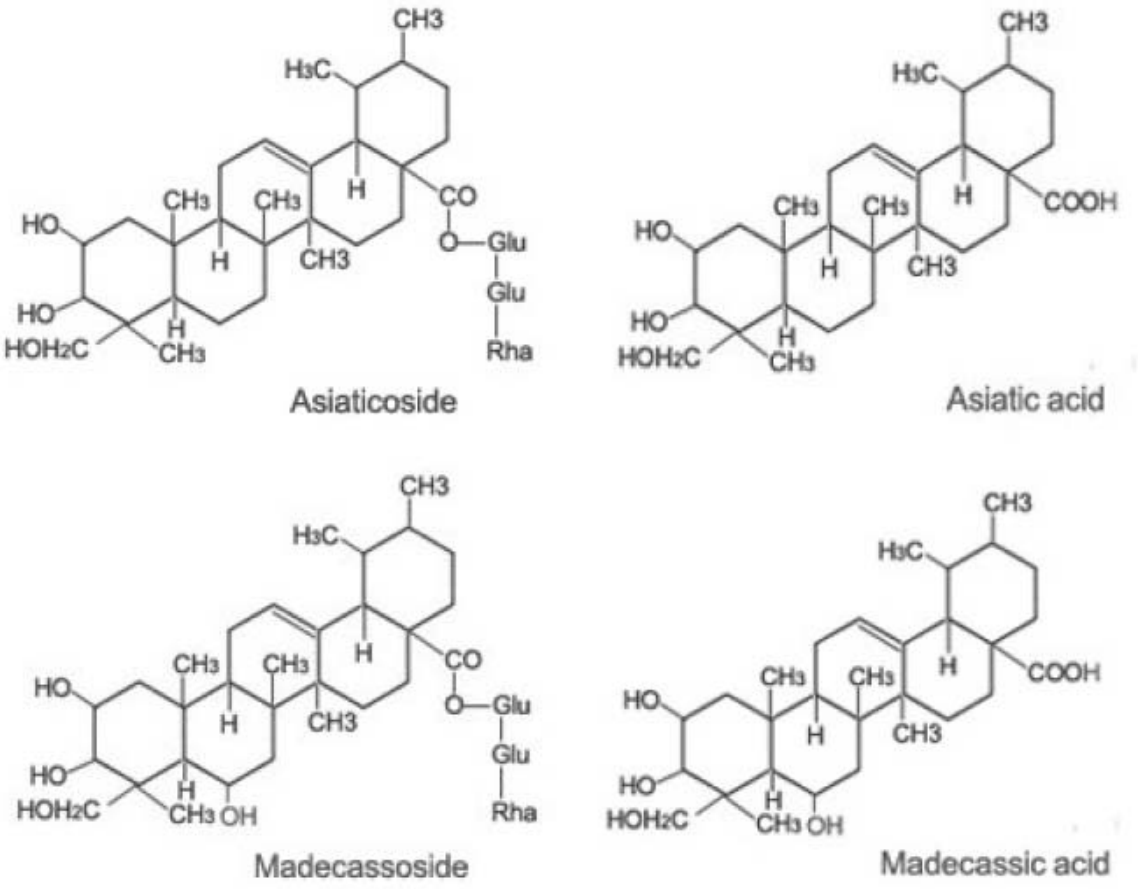
ในคัมภีร์อายุรเวทของอินเดียซึ่งเป็นศาสตร์บำบัดที่เก่าแก่ที่สุด มีวิธีการแบบองค์รวมช่วยให้ผู้คนมีอายุยืนยาวและคงความสมดุลของชีวิต มีชีวิตชีวาเชื่อมต่อระหว่างร่างกาย อารมณ์ จิตใจ และจิตวิญญาณ มีบันทึกว่า บัวบกมีชื่อที่นิยมเรียกในทางการแพทย์อายุรเวท คือ Brahmi มีลักษณะกลิ่นฉุน มีรสขมอมหวานย่อยได้ง่าย เป็นยาเย็น ยาระบาย ยาบำรุง ช่วยฟื้นฟูสภาพ บำรุงเสียง ช่วยให้ความจำดีขึ้น เป็นยาเจริญอาหาร แก้ไข้ แก้อักเสบ ผิวหนังเป็นด่างขาว โลหิตจาง มีหนองออกจากปัสสาวะ หลอดลมอักเสบ น้ำดีในร่างกายมากเกินไป ม้ามโต หืด กระหายน้ำ แก้คนเป็นบ้า โรคเกี่ยวกับเลือดและโรคที่สมุฏฐานเกี่ยวกับเสมหะ ในอินเดียบอกว่าถ้ากินบัวบกวันละ 1-2 ใบ เป็นประจำทุกวัน จะช่วยทำให้จิตใจสดชื่นแจ่มใส ช่วยทำให้ความจำดีขึ้น บำรุงประสาทและโลหิต คนในอินเดียบางแคว้นกินใบบัวบกกับนม ถือว่าเป็นยาช่วยให้ความจำดีและช่วยบำรุงร่างกาย และปัจจุบันมีผลิตภัณฑ์บัวบกที่ระบุสรรพคุณช่วยเพิ่มความจำนำเข้ามาจำหน่ายในประเทศไทย(สำนักงานพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพ, 2009 : ออนไลน์)

ในตำรายาไทยกล่าวว่า บัวบกมีรสเฝื่อนขมเย็น แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า บำรุงธาตุ บำรุงหัวใจ ขับปัสสาวะ ขับโลหิตเสีย ในไทยใช้บัวบกเป็นยาอายุวัฒนะ โดยการคั้นน้ำใบบัวบก โดยนำใบบัวบก 1 มากำมือหรือ1 แก้วนำมายัดใส่แก้วพอแน่น หลังจากนั้นนำมาตำหรือปั่นให้ละเอียด แล้วเติมน้ำ 1 แก้วคนให้เข้ากัน แล้วกรองกินแต่น้ำ เติมน้ำตาลหรือเกลือ กินครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3 ครั้งก่อนอาหาร แต่อย่ากินติดต่อกันในปริมาณมากเป็นเวลานานๆ เพราะบัวบกมีรสเย็นจัดอาจทำให้ร่างกายเสียสมดุลได้ และต้องแก้ปัญหาเรื่องมีฤทธิ์เย็นของบัวบกด้วย การผสมพริกไทยลงไปโดยใช้ผงใบบัวบก 2 ส่วนผสมกับผงพริกไทย 1 ส่วน ละลายน้ำร้อนกินก่อนนอน ครั้งละครึ่งช้อนชา กล่าวกันว่า "กินบัวบก 1 เดือน โรคร้ายหายสิ้นมีปัญญา กิน 2 เดือน บริบูรณ์น่ารักมีเสน่ห์ กิน 3 เดือนริดสีดวงสิบจำพวกหายสิ้น กิน 4 เดือนลมสิบจำพวกหายหมด กิน 5 เดือนโรคร้ายในกายทุเลา กิน 6 เดือน ไม่รู้จักเมื่อยขบ กิน 7 เดือนผิวกายจะสวยงาม กิน 8 เดือน ร่างกายสมบูรณ์เสียงเพราะ"(สำนักงานพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพ, 2009 : ออนไลน์)

รูปที่ 2.8 ลักษณะของใบบัวบก

2.3.2 **องค์ประกอบทางเคมี** (Chemical components)

บัวบกประกอบไปด้วยสารสำคัญกลุ่ม saponin ที่ประกอบไปด้วย triterpene acid และ sugar ester คือ asiaticoside, asiatic acid, madicassoside และ madecassic acid ดังรูปที่ 2.9 ใบบัวบกประกอบไปด้วยน้ำ 90%, คาร์โบไฮเดรต 7%, และสารอินทรีย์อื่น ๆ อีก 2% (Randriamampionama และคณะ, 2007)



รูปที่ 2.9 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ asiaticoside, asiatic acid, madicassoside และ madecassic acid (Randriamampionama และคณะ, 2007)

2.3.3 ข้อมูลการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

ได้มีผู้ทำการศึกษาค้นคว้าเกี่ยวกับบัวบกจำนวนมาก ทำให้มีข้อมูลทางคลินิกและทางเภสัชวิทยาอยู่มากมาย ดังต่อไปนี้

2.3.3.1. ฤทธิ์สมานแผล (Wound healing effects)

จากการศึกษาของ Maquart และคณะ (1999) พบว่าสารสกัดจากบัวบก (titrated extract) ที่ประกอบด้วยสาร triterpines 3 ชนิด คือ asiatic acid, madecassic acid

และ asiaticoside นั้นมีฤทธิ์สมานแผล โดยจะเพิ่มการสร้างเนื้อเยื่อประสาน และเพิ่มปริมาณคอลลาเจนในหนูแรท นอกจากนั้นยังสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีนในเซลล์ human fibroblast ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดและเนื้อเยื่อประสานในบริเวณที่เนื้อเยื่อถูกทำลาย (Coldren และคณะ, 2003) จากการศึกษาสารสกัดน้ำจากบัวบก ในรูปของครีม ขี้ผึ้งและเจล โดยใช้ทาที่แผลของหนูแรท 3 ครั้งต่อวัน นาน 24 วัน พบว่าสารสกัดน้ำจากบัวบก ในรูปของเจลมีผลเพิ่มการเจริญเติบโตของเยื่อบุผิว เพิ่มการสร้างคอลลาเจนและเพิ่ม tensile strength ได้มากขึ้นซึ่งให้ผลดีกว่าขี้ผึ้งและครีม (Sunilkumar และคณะ, 1998)

2.3.3.2. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

จากการศึกษาของ Ahmad และคณะ (1998) พบว่าสารสกัดอัลกอฮอล์จากบัวบกนั้นมีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย *Staphylococcus aureus Escherichia coli* และ *Pseudomonas aeruginosa* ได้เป็นอย่างดี

2.3.3.3. ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (Antifungal activity)

จากการศึกษาของ Minija และ Thoppil (2003) พบว่าสารสกัดเอทานอลจากทั้งต้น มีผลยับยั้งการเจริญของเชื้อรา *Trichophyton mentagrophytes* และ *Trichophyton rubrum* ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดโรคกลากได้

2.3.3.4. ฤทธิ์แก้ปวด (Antinociceptive effects)

จากการศึกษาของ Sakina และ Dandiya (1990) พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบในขนาด 20 มก./กก. น้ำหนักตัว มีฤทธิ์แก้ปวดในหนูแรทได้

2.3.3.5. ฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนัง (Antiproliferant effects)

จากการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่าสารสกัดน้ำจากบัวบกให้ผลอย่างอ่อนในการต้านการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังชั้น keratin (Sampson และคณะ, 2001)

2.3.3.6. ฤทธิ์ลดการอักเสบ (Antiinflammatory activity)

การศึกษาของ Dunstan และคณะ (1997) พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบมีฤทธิ์ลดการอักเสบอย่างอ่อนในหนูแรท ต่อมา Lee และคณะ (2005) ได้ทำการศึกษาในทางคลินิกโดยทดลองกับผู้ป่วยที่มีอาการผิวหนังอักเสบเรื้อรัง พบว่าสามารถลดการอักเสบของผิวหนังได้

2.3.3.7. ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร (Antiulcer activity)

Cheng และ Koo (2000) พบว่าเมื่อป้อนสารสกัดบัวบก ขนาด 0.05, 0.1 และ.25 ก./กก. น้ำหนักตัว แก่หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยกรดอะซีติก พบว่าสามารถลดขนาดของแผล และเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดขนาดเล็กในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังลดการทำงานของเอนไซม์ myeloperoxidase จึงมีฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหารได้

2.3.3.8. ฤทธิ์ต้านมะเร็ง (Cytotoxic activity)

จากการศึกษาทั้งในหลอดทดลองและสัตว์ทดลองของ Babu และคณะ (1995) พบว่าสารสกัดบัวบกทั้งกึ่งบริสุทธิ์และแบบหยาบนั้นสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

2.3.3.9. ฤทธิ์ต่อระบบประสาท (Neurological effects)

จากการศึกษาสารสกัดบัวบกด้วยเอธานอลนั้น พบว่ามีฤทธิ์กดระบบประสาทอย่างอ่อน (Adesina, 1982) และนอกจากนั้นยังพบว่าสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกมีผลต่อกระบวนการเรียนรู้ของหนู พบว่าหนูที่ได้รับสาร pentylenetetrazole (PTZ) ซึ่งมีผลรบกวนการเรียนรู้ของหนูนั้น เมื่อได้รับสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกขนาด 300 มก./กก.น้ำหนักตัว ทางปากสามารถลดอาการชัก และช่วยทำให้การเรียนรู้ของหนูที่ได้รับ PTZ ดีขึ้น ต่อมานักวิจัยกลุ่มนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดด้วยน้ำของบัวบกต่อการเรียนรู้ของหนูที่ได้รับสาร streptozotocin (STZ) เข้าทาง intracerebroventricular เพื่อให้มีความผิดปกติของการเรียนรู้ พบว่าทำให้ระดับ MDA (malondialdehyde) ในสมองลดลงขณะที่ระดับของ glutathione และเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (Gupta และคณะ, 2003) นอกจากนั้นยังมีรายงานผลการวิจัยสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในสัตว์ทดลอง ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดโดยการผูกหลอดเลือดแดงแคโรทิดทั้งสองข้างแบบชั่วคราวเพื่อให้เกิดความบกพร่องในการเรียนรู้ พบว่าช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำ อีกทั้งยังทำให้ระดับ malondialdehyde (MDA) ในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Tantisira, 2008)

2.3.4.ข้อมูลด้านเภสัชจลนศาสตร์ (Pharmacokinetics)

มีการศึกษาทั้งแบบ single และ repeated dose โดยการให้สารสกัด *C. asiatica* ทางปาก (30 หรือ 60 มก) ในอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 12 คน พบค่า elimination half life 2-3 ชม โดยไม่คำนึงถึงขนาดที่ให้ ค่า peak plasma concentration ของ asiaticoside, asiatic acid และ madecassic acid สูงอยู่ที่ 2-4 ชม. และ area under the curve (0-24 ชม) เมื่อให้สารสกัดของ *C.asiatica* พบว่ามีค่า plasma half life เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สาร triterpine จะขับออกทางไตได้น้อย ส่วนใหญ่ขับออกทางอุจจาระในช่วง 24-76 ชม.(Grimaldi และคณะ., 1990).

2.3.5 สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

รูปที่ 2.10 อีซีเอ 233

สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 ซึ่งนำมาใช้ในการทดลองลักษณะเป็นผงสีขาวนวล (white to off-white) ดังรูปที่ 2.10 ประกอบไปด้วยสารสำคัญกลุ่ม triterpenoids ไม่น้อยกว่าร้อยละ 80 และมีสัดส่วนของ madecassocide ต่อ asiaticoside คือ 1.5 ± 0.5 (Tantisira, 2009)

2.3.4.1 ผลการศึกษาทางด้านเภสัชวิทยาและพิษวิทยาของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

มีการศึกษาฤทธิ์ของอีซีเอ 233 ต่อภาวะความจำบกพร่องจากการปิดกั้นหลอดเลือดไปเลี้ยงสมองชั่วคราว พบว่าอีซีเอ 233สามารถลดการเกิดภาวะความจำบกพร่องในหนูถีบจักรที่ได้รับอีซีเอ 233 ทางปากในขนาด 10 และ 30 มก./ กก.น้ำหนักตัว โดยใช้ Morris water

maze test และ Step-down test และพบการลดลงของระดับ MDA ในขณะที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ locomotor activity (Tantisira, 2008) รวมถึงมีการศึกษาผลของอีซีเอ 233ในขนาด 10 และ 30 มก./กก.น้ำหนักตัว ต่อการลดภาวะความจำบกพร่องจากกการเหนี่ยวนำด้วย β - amyloid โดยอีซีเอ 233 ในขนาด 30 มก./ กก.น้ำหนักตัว จะให้ผลลดความจำบกพร่องได้ดีกว่า 10 มก./กก.น้ำหนักตัว (Kam-eg, 2009) นอกจากนี้อีซีเอ 233 ยังมีความปลอดภัยสูงโดยไม่พบอาการเกิดพิษเมื่อทดสอบพิษเฉียบพลัน (acute toxicity) และพิษกึ่งเรื้อรัง (sub – chronic toxicity) (Tantisira, 2008)จึงได้มีความสนใจศึกษาผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำในหนูปกติและการป้องกันความจำบกพร่องจากภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูเมาส์ (mice) สายพันธุ์ ICR เพศผู้ น้ำหนัก 20-25 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา จังหวัดนครปฐม โดยนำมาพักไว้ในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ก่อนนำมาทดลองเพื่อเป็นการปรับสภาพหนู โดยเลี้ยงไว้ในห้องที่ทำการควบคุมอุณหภูมิห้องที่ 25± 2 องศาเซลเซียส, ควบคุมแสงสว่าง : มืด 12 : 12 ชั่วโมงต่อวัน มีระบบระบายอากาศและเลี้ยงสัตว์ทดลองในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด การทดลองทั้งหมดดำเนินการระหว่างเวลา 6.00-17.00 น. สัตว์ทดลองทุกตัวได้รับน้ำและอาหารตามปกติและจะถูกนำมาใช้ในการทดลองเพียงครั้งเดียว

การดำเนินการในสัตว์ทดลองได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลองเพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเมื่อวันที่ 17 พฤษภาคม 2553 ใบอนุมัติเลขที่ 10 -33 -016

3.2 เครื่องมือในการทดลอง

1. Rotary Evaporator (Rotavapor R-114)
2. pH meter (Sevenmulti, Switzerland)
3. Stop watch (Seiko)
4. Morris water maze test set
5. Step down test set
6. Locomotor activity test set (UGO Basile, Comerico, Italy)
7. Automatic micropipette (Pipet – Lite ^{TM}, U.S.A.)
8. Automatic mixer (Vertex, U.S.A.)
9. Homogenizer (Glas-Col, Terre Haute, U.S.A.)
10. Centrifugeter (Sorvoll, GLC-2B,U.S.A.)
11. Spectrophotometer (Shimadzu, UV1201, Japan)
12. Conical centrifuge tube (Nunc, Denmark)

13.Cryostat (Leica, Germany)

14.Slide and cover glass (Sail, China)

3.3 สารเคมี

1. สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233

ได้รับความอนุเคราะห์จาก ผศ.ดร.ชำนาญ ภัตรพานิช (ภาควิชาเภสัชเคมีและอาหารเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย)

2. Carboxy methyl cellulose sodium salt (Fluka, Finland)

3. Ethanol 95 % (GPO, Thailand)

4. Chloroform (Lab-scan LTD, Ireland)

5. Methanol (Lab-scan LTD, Ireland)

6. Normal saline solution (Thai Nakorn Patana Co., Ltd., Thailand)

7. Pentobarbital sodium (Nacalai texque, Japan)

8. Sodium hydrogen phosphate – 2- hydrate (Ajex Finecham, Australia)

9. Sodium dihydrogen phosphate -2-hydrate (Ajex Finecham, Australia)

10. Acetic acid (Sigma, USA)

11. Sodium dodecyl sulfate (Sigma, USA)

12. Thiobarbituric acid (Sigma, USA)

13. N-Butanol (Sigma, USA)

14. Pyridine (Sigma, USA)

15.1,1,3,3-Tetraethoxy-propane (Malondialdehyde) (Sigma, USA)

16.Cresyl violet (Sigma, U.S.A)

17. Xylene (TJ Baker, U.S.A)

18.Permount (Sigma, USA)

19.Ethanol absolute (Merck,Germany)

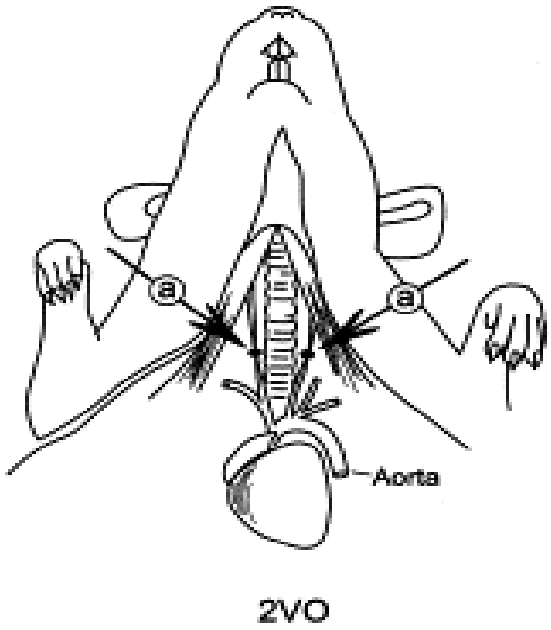
3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารทดสอบและการให้สารทดสอบ

ใช้สารละลาย 0.5 % carboxymetylcellulose (CMC) ในน้ำเป็นสารแขวนตะกอนของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ 233 และหนูทดลองจะได้รับยาสลบ Pentobarbital ในขนาด 60 มก./กก. น้ำหนักตัว โดยการฉีดทางช่องท้อง (i.p.) หนูทดลองจะได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ผ่านทาง gavage tube เข้าสู่กระเพาะอาหาร

3.4.2 การทำให้หนูเมาส์มีความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำโดยการทำ bilateral occlusion of common carotid arteries หรือ 2–vessel occlusion (2–VO)

การผ่าตัดจะทำในวันที่ 8 ของการทดลอง โดยทำให้หนูหมดความรู้สึกโดยฉีด Pentobarbital ขนาด 60 มก./กก. น้ำหนักตัว เข้าทางช่องท้อง เปิดผิวหนังและเนื้อเยื่อบริเวณคอด้านหน้า (ventral mid line) ดังรูปที่ 3.1 แยก common carotid arteries เส้นประสาทเวกัส (vagus nerve) และเนื้อเยื่อรอบ ๆออกจากกัน นำด้ายเย็บผ้าเบอร์ 60 ขนาดยาว 8 เซนติเมตร คล้องใต้หลอดเลือดทั้ง 2 เส้น หมุนด้ายรัดหลอดเลือดและนำคลิปมาหนีบเส้นด้ายเป็นเวลา 20 นาที หลังจากนั้นตัดปลายหางหนูแล้วบีบเลือดออกจากหางปริมาณ 0.3 มิลลิลิตร เพื่อสร้างภาวะความดันเลือดต่ำ เมื่อปิดกั้นหลอดเลือดครบเวลา 20 นาทีแล้วจึงคลายเส้นด้ายออก (ทุกขั้นตอนผ่าตัดด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ) ปิดบาดแผลด้วยกาวชนิดแห้งเร็ว (extra superglue) (Xu และคณะ, 2000) ให้หนูพักอยู่ภายในห้องจนกว่ายาสลบจะหมดฤทธิ์ สำหรับหนูกลุ่ม Sham จะดำเนินการผ่าตัดด้วยวิธีเดียวกับที่กล่าวข้างต้นทุกประการ ยกเว้นแต่ไม่มีการปิดกั้นการไหลของเลือดและเส้นเลือด



รูปที่ 3.1. บริเวณตำแหน่งที่มีการปิดกั้นหลอดเลือดโดยใช้เทคนิค 2–vessel occlusion (2–VO) (ตำแหน่ง a =carotid artery)

3.4.3.การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

แบ่งหนูเมาส์ออกเป็น 9 กลุ่ม กลุ่มละ10 ตัว หนูเมาส์จะได้รับสารทดสอบโดยการป้อนวันละ 2 ครั้ง เช้า (8.00 น.) และ เย็น (17.00 น) โดยสัตว์ทดลองจะได้รับสารทดสอบคือ สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. หนูที่ทำการทดสอบจะจัดเป็น 3 กลุ่มใหญ่คือ หนูปกติ, หนูที่ได้รับการปิดกั้นหลอดเลือดชั่วคราว (2 –VO) และหนูกลุ่ม sham

3.4.3.1 หนูปกติ แบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ

กลุ่มที่ 1.เป็นกลุ่มควบคุมจะได้รับสารละลาย CMC อย่างเดียวตลอดการทดลองจนครบ 17 วัน

กลุ่มที่ 2.ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 เป็นเวลา 7 วันและในวันที่ 8 ตอนเช้า หลังจากนั้นจะได้รับสารละลาย CMC ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มที่ 3.ได้รับสารละลาย CMC เป็นเวลา 7 วันและในวันที่ 8 ตอนเช้า หลังจากนั้นจะได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ไปจนสิ้นสุดการทดลอง

กลุ่มที่ 4.ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ตลอดการทดลองจนครบ 17 วัน

3.4.3.2 หนูที่ได้รับการปิดกั้นหลอดเลือดชั่วคราว (2 –VO)

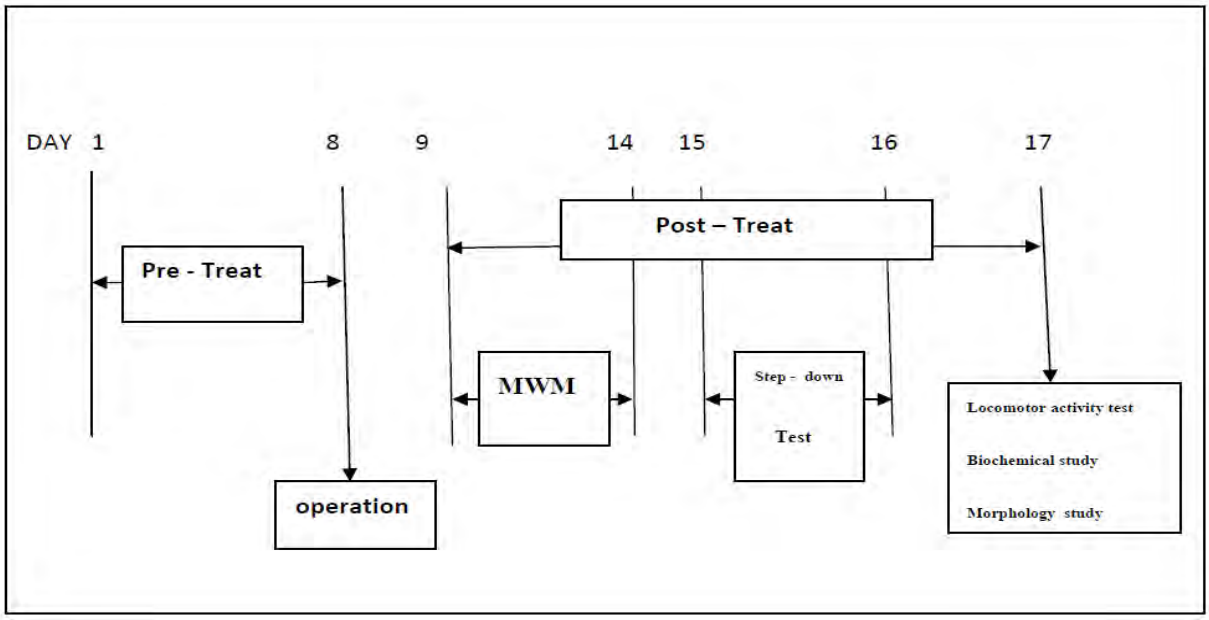
ทำ 2VO ในวันที่ 8 ของการทดลองภายหลังจากที่หนูได้รับสารทดสอบในตอนเช้า หนูกลุ่มนี้ ถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มโดยนับเป็นกลุ่มหมายเลข 5 , 6 , 7 และ 8 ซึ่งได้รับสารทดสอบเช่นเดียวกับหนูปกติกลุ่มที่ 1 , 2 , 3 และ 4 ตามลำดับ

3.4.3.3 หนูกลุ่ม Sham operated control

หนูกลุ่มที่ 9 เป็นหนูกลุ่ม sham หนูกลุ่มนี้จะถูกผ่าตัดเช่นเดียวกับหนูกลุ่มที่ทำ 2VO แต่จะไม่ถูกปิดกั้นหลอดเลือด

หลังจากที่ทำ 2–VO แล้ว วันต่อมาจะนำสัตว์ทดลองทุกกลุ่มมาทดสอบพฤติกรรมเป็นเวลา 9 วัน โดยการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้คือ

1. Morris water maze test 6 วัน
2. Step–down passive avoidance test 2 วัน
3. Locomotor activity test 1 วัน

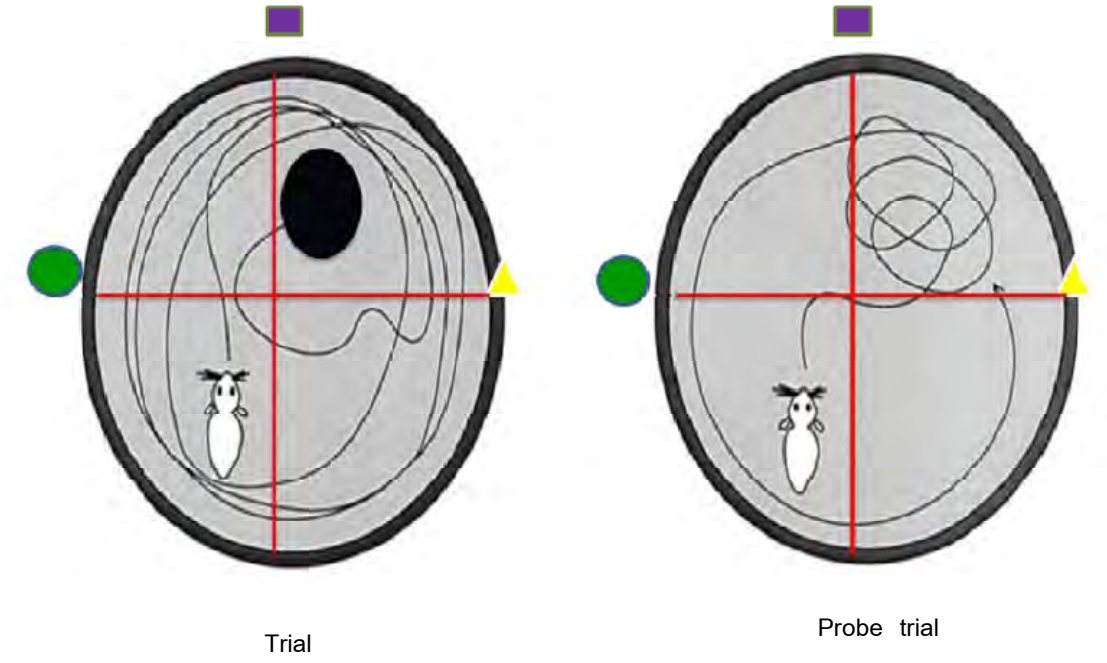


รูปที่ 3.2 แผนการทดลอง

3.4.4 การทดสอบพฤติกรรม (Behavior tests)

3.4.4.1 Morris water maze test

เป็นการวัด spatial memory (D'Hooge และ De Dey, 2001) การทดลองนี้ใช้อ่างน้ำวงกลม สีดำ ดังรูปที่ 3.3 ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 70 เซนติเมตรในอ่างบรรจุน้ำความลึก 13 เซนติเมตร ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายในอ่างมีแท่นพัก (hidden platform) สีดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 เซนติเมตร อยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 เซนติเมตร แบ่งอ่างน้ำออกเป็นสี่ส่วนเท่าๆกัน วางแท่นพักบริเวณกึ่งกลางส่วนใดส่วนหนึ่ง (อยู่คงที่ตลอดการทดลอง) อ่างดังกล่าวตั้งอยู่ในห้องและบริเวณรอบๆอ่างทั้งสามด้านมีฉากที่มีรูปภาพติดอยู่ ซึ่งรูปภาพนั้นจะอยู่ตำแหน่งเดิมตลอดการทดลอง หนูจะอาศัยตำแหน่งของภาพในการจดจำตำแหน่งของแท่นพักซึ่งอยู่ใต้น้ำ การทดสอบแบ่งออกเป็น 2 ช่วง คือ trials และ probe trials ทดสอบการเรียนรู้และความจำเป็นเวลา 5 วันติดต่อกันโดยปล่อยหนูลงที่จุดกึ่งกลางขอบอ่างน้ำซึ่งถูกแบ่งออกเป็นสี่ส่วน จับเวลาที่หนูใช้ในการว่ายน้ำจนกระทั่งขึ้นไปอยู่บนแท่นพัก บันทึกเวลาและให้หนูอยู่บนแท่นพักนาน 10 วินาที ให้หนูใช้เวลาในการหาแท่นพักเป็นเวลา 60 วินาที ถ้าครบเวลา 60 วินาที แล้วหนูยังไม่สามารถอยู่บนแท่นพักได้ให้จับหนูไปอยู่บนแท่นพักเป็นเวลา 10 วินาที หลังจากนั้นนำหนูมาพักเป็นเวลา 30 วินาที ทำการทดลองซ้ำจนครบทั้งสี่ส่วน และในวันที่ 6 จะนำแท่นพักออกปล่อยหนูลงที่จุดกึ่งกลางขอบอ่างน้ำซึ่งถูกแบ่งออกเป็นสี่ส่วน จับเวลาที่หนูว่ายน้ำอยู่บริเวณที่เคยวางแท่นพักเป็นเวลา 60 วินาที ถ้าหนูที่มีการเรียนรู้และความจำดีจะว่ายน้ำอยู่บริเวณที่เคยวางแท่นพักนานกว่าบริเวณอื่น (Xu และคณะ, 2000)

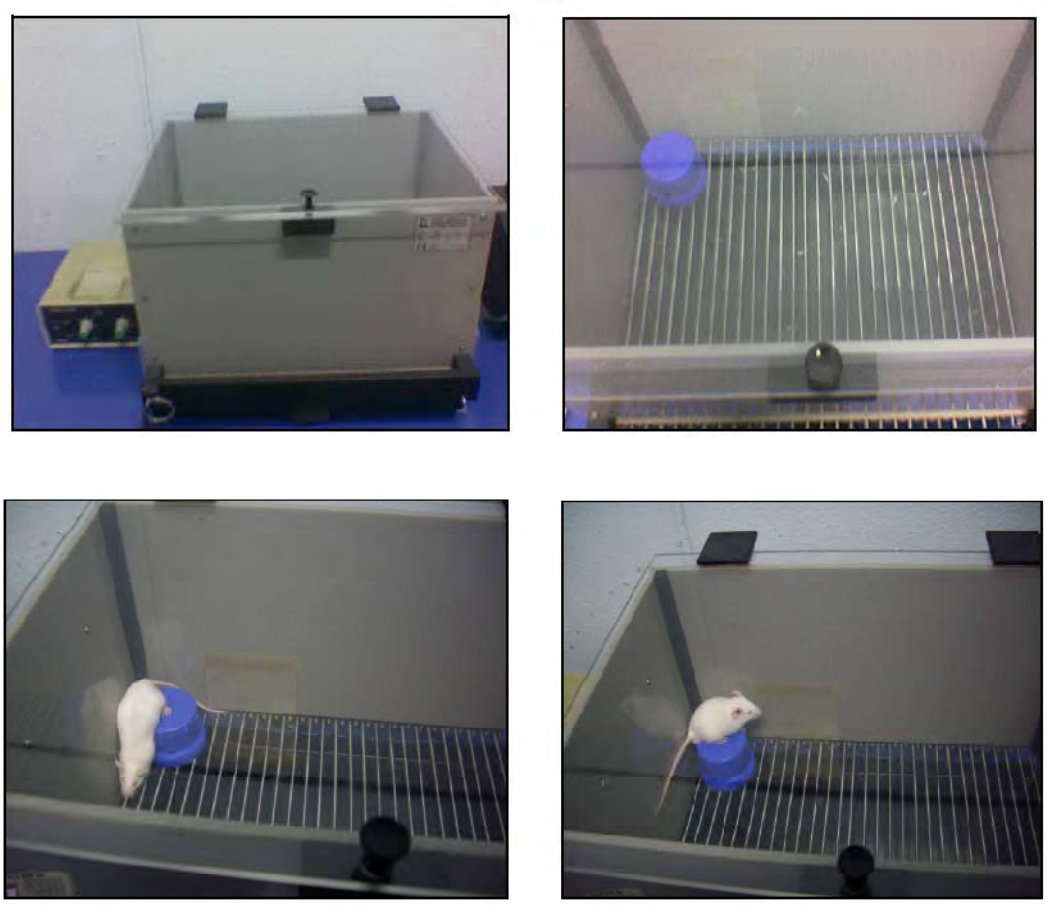


รูปที่ 3.3 Morris water maze test (Xu และคณะ, 2000)

3.4.4.2. Step-down test

เป็นการทดสอบเพื่อยืนยันความสามารถในด้านความจำและการเรียนรู้ชนิด passive avoidance ทดสอบโดยวิธี Step-down test การทดลองนี้ใช้อุปกรณ์ที่ประกอบด้วยกล่องซึ่งมีขนาดความกว้าง 23 เซนติเมตร ยาว 35 เซนติเมตร และสูง 20 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.4 พื้นของกล่องเป็นแท่งสเตนเลสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร วางในแนวนอนแต่ละแท่งห่างกันประมาณ 11 มิลลิเมตร ภายในกล่องมีแท่นพักซึ่งมีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 4 เซนติเมตรและสูงประมาณ 4 เซนติเมตร วางที่มุมใดมุมหนึ่งของกล่อง (อยู่คงที่ตลอดการทดลอง) การทดลองแบ่งออกเป็น acquisition trial และ retention trial ในช่วง acquisition trial จะวางหนูบนแท่นพักปล่อยให้เดินอิสระเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำหนูลงบนแท่นพักพร้อมกับปล่อยกระแสไฟฟ้าขนาด 0.4 มิลลิแอมแปร์ เป็นเวลา 300 วินาที จับเวลาตั้งแต่เริ่มวางหนูบนแท่นพักจนหนูก้าวลงจากแท่นพักครบทั้ง 4 เท้า บันทึกเวลา (step-down latency) ถ้าหนูอยู่บนแท่นพักเป็น

เวลา 300 วินาที ให้นำหนูออกจากการทดลองบันทึกเวลาเป็น 300 วินาที (5 นาที) และนับจำนวนครั้งที่หนูก้าวลงจากแท่นพัก ภายในเวลา 300 วินาที (step-down errors) หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง จึงทำการทดสอบ retention trial บันทึก step-down latency และ step-down errors ซึ่งหนูที่มีการเรียนรู้และความจำดีจะหลบหลีกจากการถูกช็อคด้วยไฟฟ้าจากการนั่งอยู่บนแท่นพักนานขึ้น (Xu และคณะ, 2000)

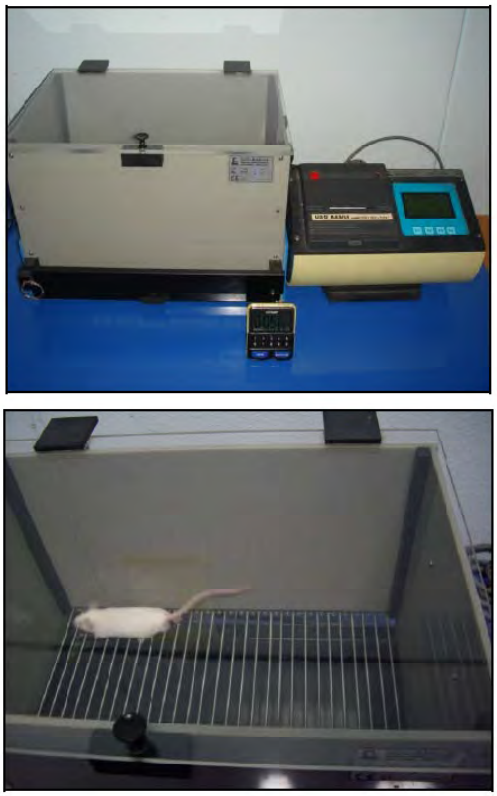


รูปที่ 3.4 Step – down test

3.4.4.3 Locomotor activity test

เป็นการวัดการทำงานของระบบประสาทยนต์ เพื่อพิสูจน์ว่าผลจากการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze และ Step-down test นั้นมิได้เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทยนต์ โดยดูผลการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองที่ได้รับสารทดสอบ การทดลองนี้ ใช้เครื่อง Activity Cage (UGO Basile 7430) ดังรูปที่ 3.5 ประกอบด้วยกล่องพลาสติกซึ่งมีขนาดความกว้าง 23 เซนติเมตร ยาว 35 เซนติเมตร และสูง 20 เซนติเมตร พื้นของกล่องเป็นแท่งสเตนเลสมีเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตร แต่ละแท่งห่างกันประมาณ 11 มิลลิเมตร อุปกรณ์นี้จะทำการนับ

จำนวนครั้งการเคลื่อนไหวของหนูภายในเวลา 5 นาที โดยใช้จำนวนครั้งของการเคลื่อนไหวในหนูกลุ่มควบคุม เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ๆ (Gupta และคณะ, 2003)



รูปที่ 3.5 Activity meter

3.4.5 Biochemical study

Lipid peroxidation assay

เป็นการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตผลจากปฏิกิริยา lipid peroxidation โดยการ sacrificed หนูด้วยวิธี cervical dislocation และ decapitation ผ่าตัดแยกสมองออกมาแล้ว ล้างทำความสะอาดโดยใช้ ice-cold saline เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำสมองหนูใส่ลงใน ice-cold phosphate buffer (pH 7.4) 0.1 โมลาร์ ในปริมาณ 10 เท่าของสมองหนู (น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วทำให้เป็นส่วนประกอบเดียวกัน (homogenized) นำมาวัด lipid peroxide โดยการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) วิธีการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ทำโดยการนำสารละลายที่ประกอบด้วย acetic acid 1.5 มิลลิลิตร (20%) pH 3.5, thiobarbituric acid 1.5 มิลลิลิตร (0.8%) และ sodium

dodecyl sulphate 0.2 มิลลิลิตร (8.1%) มาผสมกับเนื้อเยื่อของสมองหนูปริมาตร 0.1 มิลลิลิตร ทำให้ร้อนที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็น แล้วนำมาผสมลงใน n-butanol/ pyridine 5 มิลลิลิตร (15:1) และน้ำกลั่น 1 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 5000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำสารชั้นบน (supernatant) มาวัดค่า absorbance ที่ 532 นาโนเมตรโดยใช้ spectrophotometer (Gupta และคณะ, 2003)

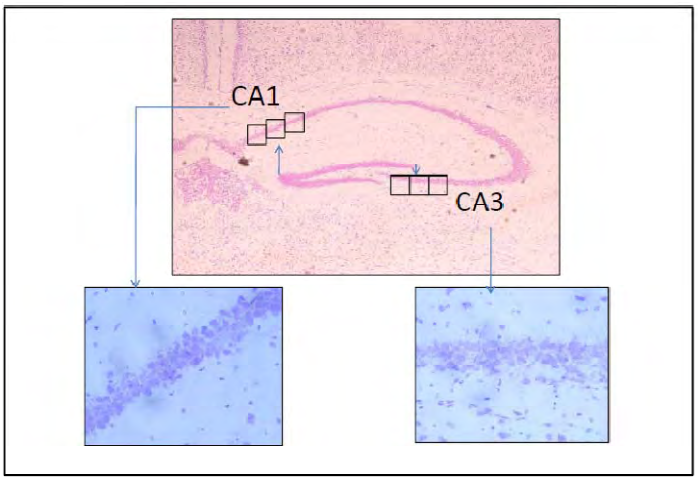
Determination of brain glutathione (GSH)

เป็นการประเมินระดับ GSH ในสมองซึ่งเป็นสารที่ต้านการเกิดภาวะ oxidative stress โดยการ sacrificed หนูด้วยวิธี cervical dislocation และ decapitation ผ่าตัดแยกเอาสมองออกและนำไปแช่ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส บดเนื้อเยื่อสมองจนได้ homogenate นำ homogenate 0.5 มล. ไปตกตะกอนโดยเติม 4% sulfosalicylic acid ลงไป 0.5 มล.นำไป centrifuge ด้วยความเร็ว 1,200 g เป็นเวลา 15 นาที นำสารชั้นบน (supernatant) 0.5 มล. ไปเติม dinitrothiocyanobenzene (DNTB) 0.1 mM (ใน 0.1 M phosphate buffer solution pH 7.4) ปริมาณ 0.5 มล. ที่เตรียมขึ้นมาใหม่ๆ (freshly prepared) นำไปวัดด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 412 นาโนเมตร นำค่าที่ได้ไปคำนวณเทียบเป็นปริมาณ GSH (หน่วยนาโนโมล/น้ำหนักของเนื้อเยื่อสมองเป็นกรัม) (Shivakumar และคณะ, 1992)

3.4.6.Morphology study

เป็นการประเมินจำนวนเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส (hippocampus) ในบริเวณ CA 1 และ CA 3 โดยการตัดชิ้นเนื้อสมองเป็นแผ่นบางแล้วย้อมดูเซลล์ประสาท โดยใช้ cresyl violet staning technique สลบสัตว์ทดลองโดยการฉีด pentobarbital ขนาด 60 mg/kg เข้าทางช่องท้อง (i.p.) decapitation แล้วแยกสมองออกอย่างรวดเร็วแล้วทำให้แข็งโดยใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice) หลังจากนั้นตัดสมองตามแนวขวาง (coronal section) ความหนา 10 μm ที่ระดับของฮิปโปแคมปัส (hippocampus) โดยใช้ cryostat จากนั้นย้อมสีด้วย 1% cresyl violet นำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic observation) เพื่อดูเซลล์ที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus)โดยใช้บริเวณส่วนหัวและส่วนท้ายของสมองส่วนเดนเตทไจรัส (dentate gyrus) ตามลำดับเป็นตัวกำหนดพื้นที่ในการศึกษาเซลล์ไพรามิดอล

(pyramidal) ของสมองหนูทุกตัวให้ตรงกัน (รูปที่ 3.6) จากนั้นนำมาถ่ายรูป (400X) และนับจำนวนเซลล์ประสาทต่อพื้นที่ของเซลล์ 0.068mm^2 (Ni และคณะ, 1995)



รูปที่ 3.6 แสดงบริเวณที่คัดเลือกเพื่อนำมาใช้ในการประเมินจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิต (survival neurons) ในสมองฮิปโปแคมปัส (Hippocampus) บริเวณ CA 1 และ CA 3

3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

แสดงผลการศึกษาข้อมูลการทดสอบพฤติกรรม การศึกษาทางพยาธิวิทยา จากค่า mean±SEM เปรียบเทียบข้อมูลระหว่างกลุ่มด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) ตามด้วย post hoc test และตามด้วย Fisher's least significant difference (LSD) และจะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหากค่า P น้อยกว่า 0.05

บทที่ 4

ผลการทดลอง

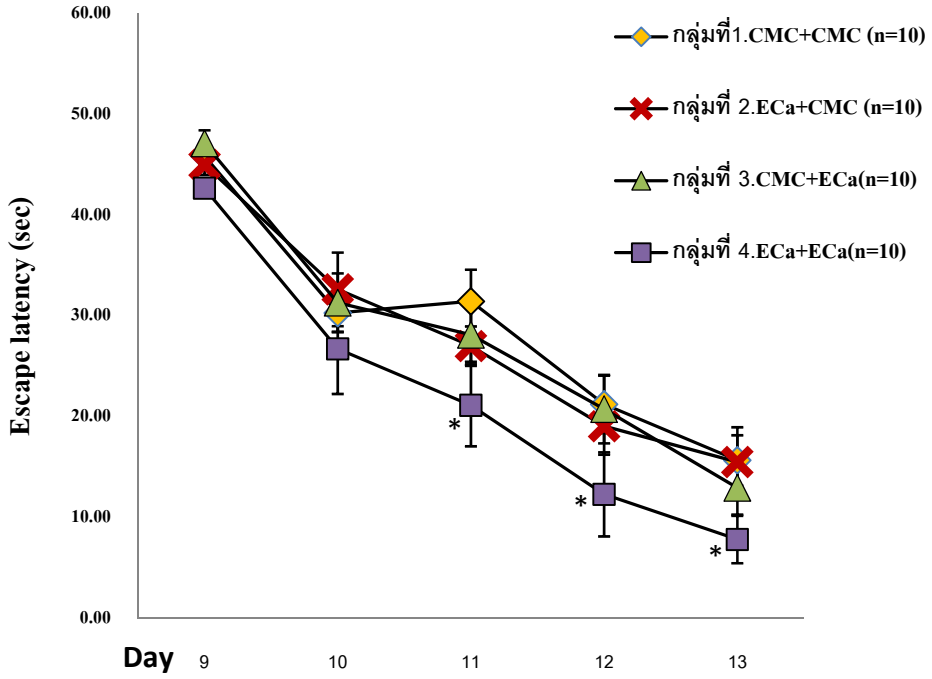
4.1 ผลการทดสอบด้านพฤติกรรม

4.1.1 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ spatial

รูปที่ 4.1 และ 4.2 และตารางที่ 4.1 แสดงการเปรียบเทียบผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำโดยวิธี morris water maze test (MWM) ในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) รูปที่ 4.1 และตารางที่ 4.1 พบว่าหนูกลุ่มที่ 4 มีค่า escape latency ในวันที่ 11,12 และ 13 ลดลงแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า escape latency ของวันที่ 11,12 และ 13 ในหนูกลุ่มที่1(กลุ่มควบคุม) คือ 31.42±3.15, 21.22±2 .85 และ15.67±2.49 กลุ่มที่ 2 คือ 27.00±1.95, 19.05±2.81 และ 15.50±3.45 กลุ่มที่ 3 คือ 28.12±2.68, 20.75±3.39 และ 12.95±2.66 กลุ่มที่ 4 คือ 21.12±4.06, 12.30±4.17 และ 7.82±2.35 วินาที ตามลำดับ

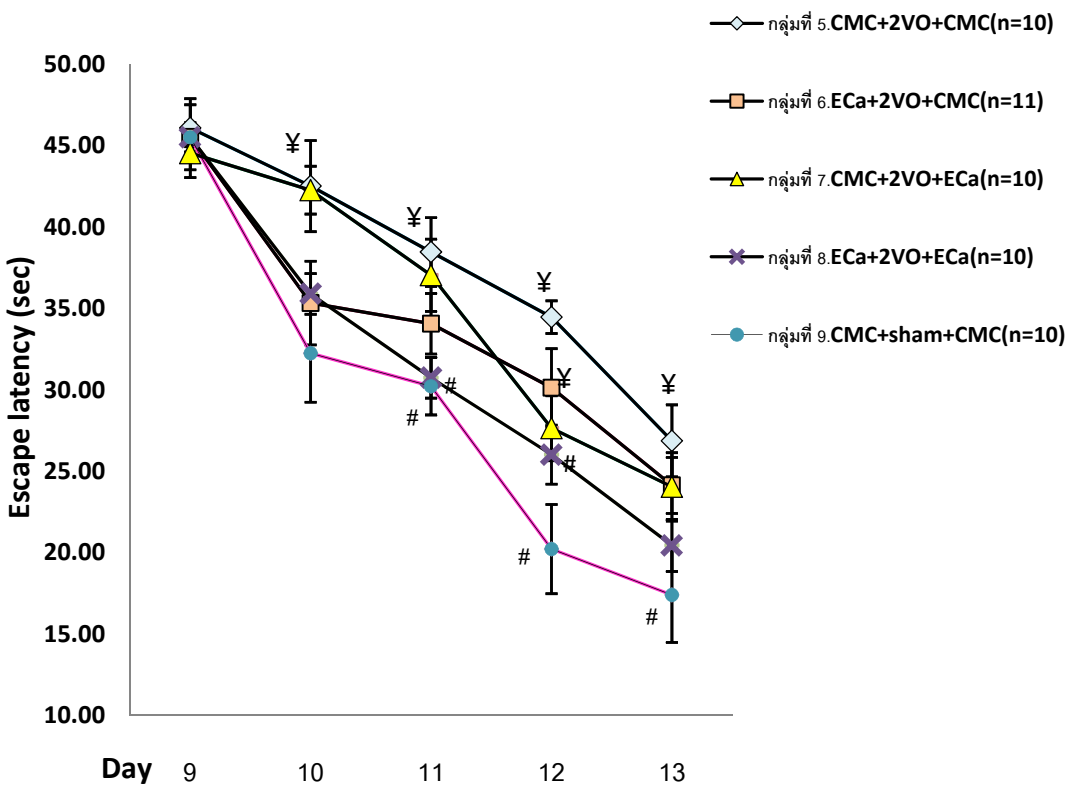
สำหรับหนูที่ได้ทำการปิดกั้นหลอดเลือดแคโรติด (2VO) (กลุ่มที่ 5 – 8) รูปที่ 4.2 และตารางที่ 4.1 จะมีความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยหนูกลุ่มที่ 5 จะมีค่า escape latency แตกต่างจากกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) อย่างมีนัยสำคัญ อีซีเอ 233 สามารถลดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้ โดยพบว่าหนูกลุ่มที่ 8 ซึ่งได้รับอีซีเอ 233 ตลอดการทดลองจะมีค่า escape latency ในวันที่ 11 และ 12 แตกต่างไปจากหนูกลุ่มที่ 5 (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดย escape latency ในวันที่ 11 และ 12 ของหนูกลุ่มที่ 5 คือ 38.47±2.11 และ 34.47±1.59 กลุ่มที่ 6 คือ 34.06±1.86 และ 30.13±2.31 กลุ่มที่ 7 คือ 37.05±2.22 และ 27.65±1.99 กลุ่มที่ 8 คือ 30.75±1.25 และ 26.02±1.81 วินาที ตามลำดับ

สำหรับการทำ probe trial ซึ่งเป็นการพิสูจน์ว่าการที่หนูว่ายน้ำไปพักบนแท่นได้นั้นมิได้เกิดจากการที่หนูเห็นแท่นพัก แต่เกิดเนื่องจากการที่หนูสามารถจดจำตำแหน่งของแท่นพักได้ ดำเนินการโดยใช้หนูที่ผ่านการทดสอบ MWM แล้ววางลงในอ่างเดิมแต่เอาแท่นพักออกไป ผลการทดสอบพบว่าหนูสามารถจดจำตำแหน่งที่เคยวางแท่นพักอยู่ได้โดยหนูจะว่ายน้ำอยู่ในบริเวณที่เคยวางแท่นพักนานกว่าบริเวณอื่น (รูปที่ 4.3 , 4.4 และตารางที่ 4.1)



รูปที่ 4.1 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี MWM test ในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) หนูทุกกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 7 วัน โดยในวันที่ 8 จะได้รับสารทดสอบเฉพาะตอนเช้า และเริ่มการทดสอบโดยการวัดค่า escape latency ในหนูกลุ่มต่าง ๆ ติดต่อกัน 5 วัน

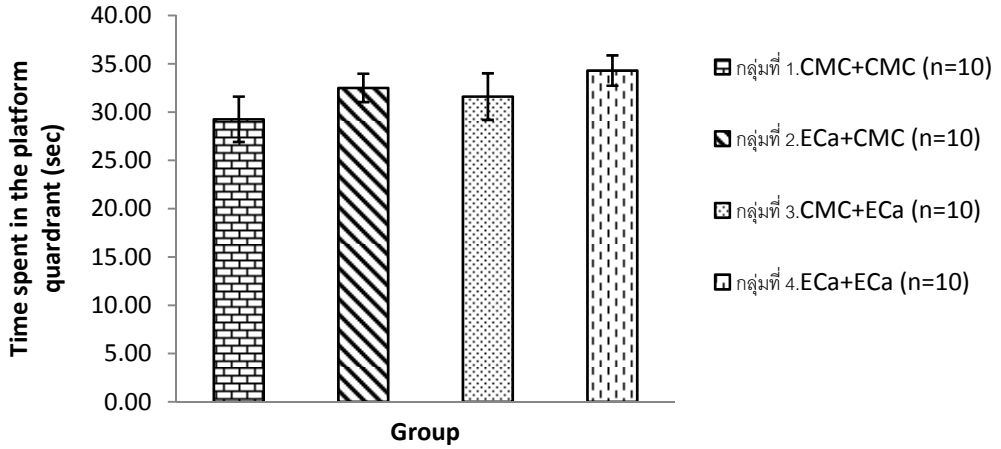
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)



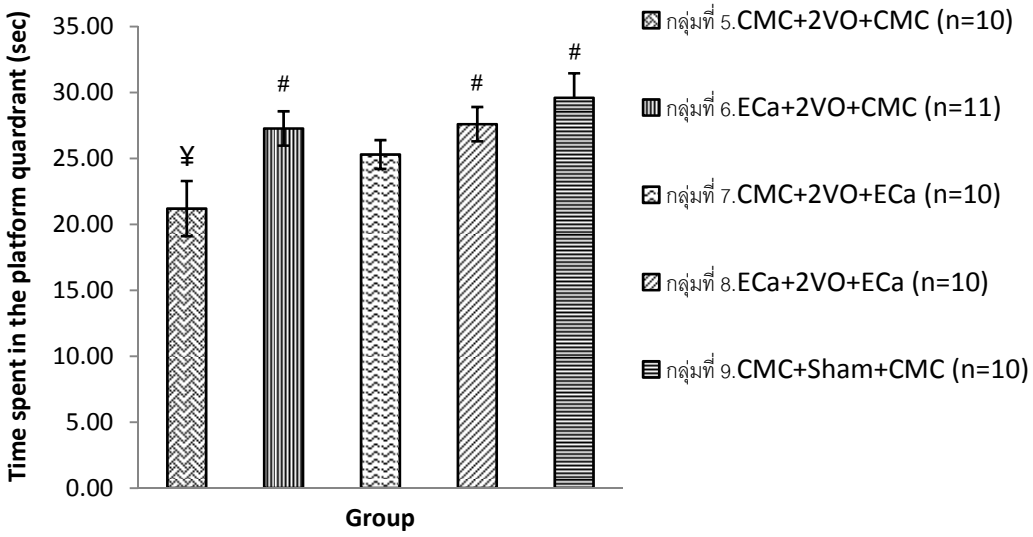
รูปที่ 4.2 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี MWM test ในหนูกลุ่มที่ถูกทำ 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และกลุ่ม sham หนูทุกกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน ในวันที่ 8 จะได้รับสารทดสอบเฉพาะตอนเช้าก่อนทำ 2VO และเริ่มการทดสอบโดยการวัดค่า escape latency ในหนูกลุ่มต่าง ๆ ติดต่อกัน 5 วัน สำหรับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) จะดำเนินการผ่าตัดเหมือนการผ่าตัดหนูกลุ่มอื่นแต่ไม่มีการทำ 2VO

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)



รูปที่ 4.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี MWM test (probe trial) ในหนูปกติ ทดสอบในวันที่ 14 ของการทดลอง



รูปที่ 4.4 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี MWM test (probe trial) ในหนู 2VO ทดสอบในวันที่ 14 ของการทดลอง

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

Group name	Escape latency in the MWM (sec)						Time spent in the platform quadrant (sec) Day 14
	n	Day9	Day10	Day11	Day12	Day13	
1.CMC+CMC	10	45.82±0.67	30.27±1.86	31.42±3.15	21.22±2.85	15.67±2.49	29.25±2.35
2.ECa+CMC	10	44.97±0.95	32.62±3.65	27.00±1.95	19.05±2.81	15.50±3.45	32.50±1.47
3.CMC+ECa	10	47.10±1.29	31.30±2.91	28.12±2.68	20.75±3.39	12.95±2.66	31.60±2.41
4.ECa+ECa	10	42.65±0.64	26.72±4.46	21.12±4.06*	12.30±4.17*	7.82±2.35*	34.30±1.57
5.CMC+2VO+CMC	10	46.10±1.73	42.52±2.74¥	38.47±2.11¥	34.47±1.59¥	26.87±2.21¥	21.20±2.09¥
6.ECa+2VO+CMC	11	45.54±0.56	35.34±2.57	34.06±1.86	30.13±2.31¥	24.13±1.72	27.27±1.30#
7.CMC+2VO+ECa	10	44.55±1.41	42.27±1.47	37.05±2.22	27.65±1.99	24.05±2.10	25.30±1.90
8.ECa+2VO+ECa	10	45.52±0.81	35.90±1.24	30.75±1.25#	26.02±1.81#	20.45±1.60	27.60±1.30#
9.CMC+sham+CMC	10	45.52±1.97	32.25±3.01	30.22±1.76#	20.22±2.74#	17.40±2.91#	29.60±1.86#

ตารางที่ 4.1 ผลของอีซีเอ 233 แสดงค่าเป็น escape latency และ Time spent in the platform quadrant ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ spatial ในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) และหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยการทำ 2VO (กลุ่มที่ 5-8) โดยวิธี MWM test หนูทุกกลุ่มจะเริ่มถูกทดสอบภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 8 วัน โดยให้ทางปากวันละ 2 ครั้ง ยกเว้นวันที่ 8 จะให้สารทดสอบตอนเช้าเพียงครั้งเดียว และเริ่มทำการทดสอบในวันที่ 9 ติดต่อกัน 6 วัน

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)

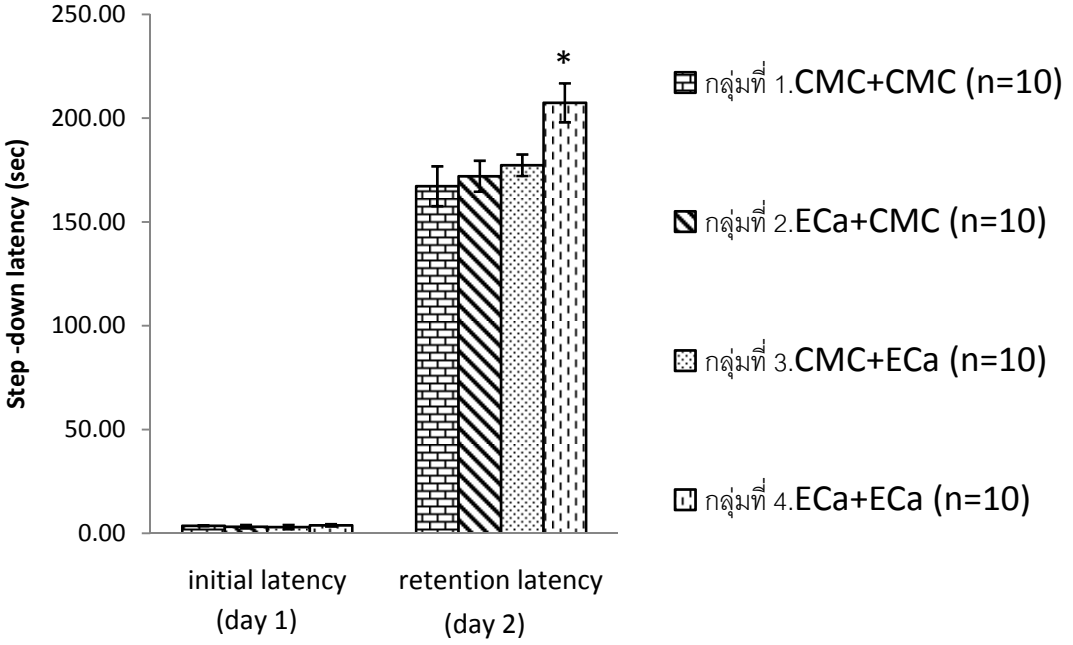
\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

4.1.2 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ passive avoidance

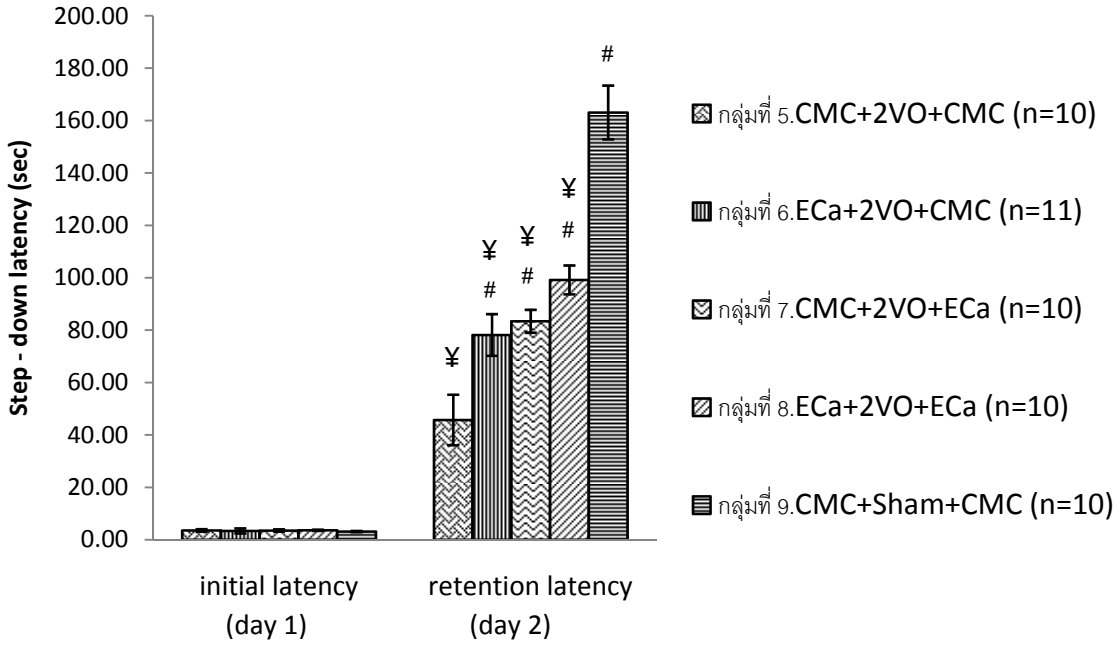
รูปที่ 4.5 - 4.8 และตารางที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูกลุ่มต่าง ๆ โดยวิธี step – down test พบว่าในวันแรกของการทดสอบค่า step – down latency (รูปที่ 4.5,4.6 และตารางที่ 4.2) และ number of error (รูปที่ 4.7,4.8 และตารางที่ 4.2) ของหนูทุกกลุ่มจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่วันที่ 2 หนูปกติในกลุ่มที่ 4 จะมีค่า step – down latency แตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า step – down latency ของหนูปกติกลุ่มที่ 1 คือ 167.2±9.6 กลุ่มที่2 คือ 172.0±7.4 กลุ่มที่ 3 คือ 177.3±5.1 และกลุ่มที่ 4 คือ 207.4±9.3 วินาที ตามลำดับ ในขณะที่ number of error ของหนูปกติทุกกลุ่มจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยค่า number of error ของหนูปกติกลุ่มที่ 1 คือ 4.1±0.2 กลุ่มที่ 2 คือ 3.9±0.3 กลุ่มที่ 3 คือ 4.1 ±0.5 และกลุ่มที่ 4 คือ 3.4±0.7 ครั้ง ตามลำดับ

หนูที่ถูกทำ 2VO (กลุ่มที่ 5-8) จะมีความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยหนูกลุ่มที่ 5 จะมีค่า step – down latency และ number of error ในวันที่ 2 แตกต่างจากหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) อย่างมีนัยสำคัญ อีซีเอ 233 สามารถลดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้ โดยพบว่าหนูในกลุ่มที่ 6, 7 และ 8 จะมีค่า step – down latency และ number of error ในวันที่ 2 แตกต่างไปจากหนูกลุ่มที่ 5 (กลุ่มควบคุม) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า step – down latency ของหนูกลุ่มที่ 5 คือ 45.7±9.6 กลุ่มที่ 6 คือ 78.1±7.9 กลุ่มที่ 7 คือ 83.4±4.3 กลุ่มที่ 8 คือ 99.2±5.5 วินาที และค่า number of error กลุ่มที่ 5 คือ 7.7±0.8 กลุ่มที่ 6 คือ 6.1±0.6 กลุ่มที่ 7 คือ 6.0±0.5 และกลุ่มที่ 8 คือ 5.1±0.2 ครั้งตามลำดับ



รูปที่ 4.5 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down latency ในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1 – 4) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน การทดสอบดำเนินการในวันที่ 15 (day1, acquisition trial) และวันที่ 16 (day2, retention trial)

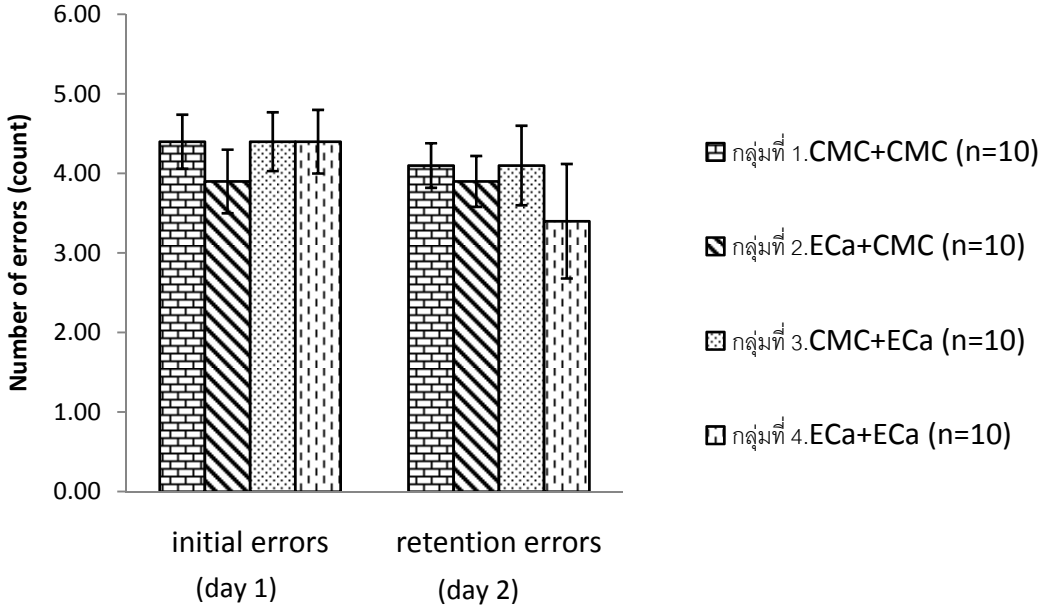
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)



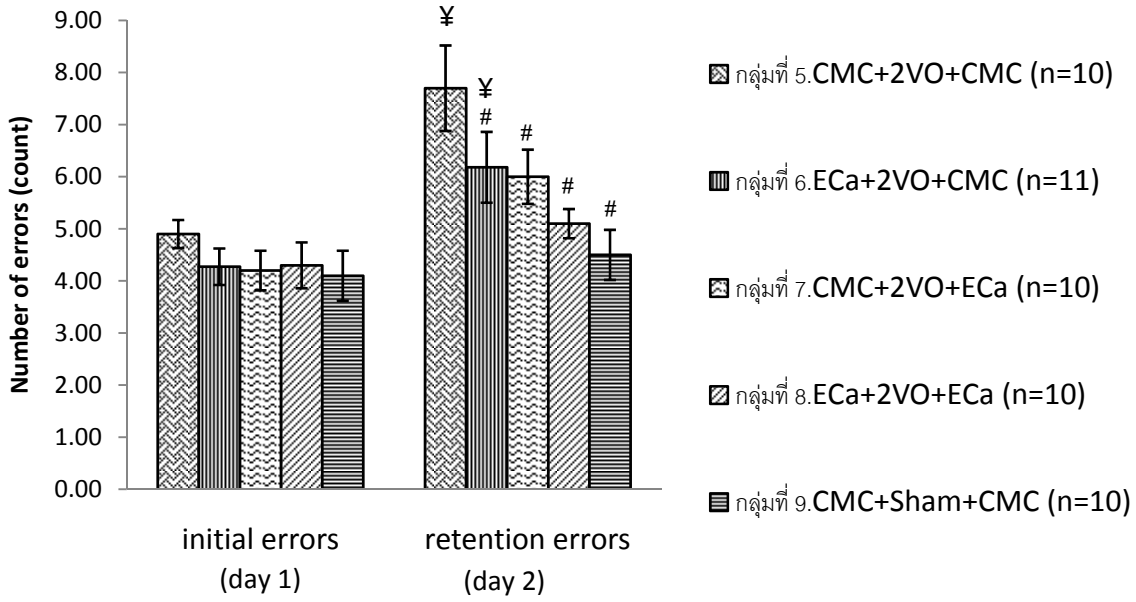
รูปที่ 4.6 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down latency ในกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5- 8) โดยมีหนูกลุ่มที่ 9 เป็นหนูกลุ่ม sham หนูทุกลุ่มได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน การทดสอบดำเนินการในวันที่ 15 (day1, acquisition trial) และวันที่ 16 (day2, retention trial)

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)



รูปที่ 4.7 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down errors ในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1 – 4) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน การทดสอบดำเนินการในวันที่ 15 (day1, acquisition trial) และวันที่ 16 (day 2, retention trial)



รูปที่ 4.8 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำ เมื่อทดสอบโดยวิธี step – down test แสดงค่าเป็น step – down errors ในหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5- 8) โดยมีหนูกลุ่มที่ 9 เป็นหนูกลุ่ม sham หนูทุกลุ่มได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน การทดสอบดำเนินการในวันที่ 15 (day1, acquisition trial) และวันที่ 16 (day2, retention trial)

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

Group name	N	Step-down latency (sec)		Number of errors	
		Day 1	Day 2	Day 1	Day 2
1.CMC+CMC	10	3.6±0.1	167.2±9.6	4.4±0.3	4.1±0.2
2.ECa+CMC	10	3.1±0.2	172.0±7.4	3.9±0.4	3.9±0.3
3.CMC+ECa	10	3.0±0.3	177.3±5.1	4.4±0.3	4.1±0.5
4.ECa+ECa	10	3.8±0.1	207.4±9.3*	4.4±0.4	3.4±0.7
5.CMC+2VO+CMC	10	3.5±0.1	45.7±9.6¥	4.9±0.2	7.7±0.8¥
6.ECa+2VO+CMC	11	3.3±0.2	78.1±7.9#,¥	4.2±0.3	6.1±0.6#,¥
7.CMC+2VO+ECa	10	3.5±0.4	83.4±4.3#,¥	4.2±0.3	6.0±0.5#
8.ECa+2VO+ECa	10	3.4±0.2	99.2±5.5#,¥	4.3±0.4	5.1±0.2#
9.CMC+ sham +CMC	10	3.1±0.2	163.1±10.2#	4.1±0.4	4.5±0.4#

ตารางที่ 4.2 ผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำแบบ passive avoidance แสดงค่าเป็น step – down latency และ number of errors ในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1 – 4) และหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยการทำ 2VO (กลุ่มที่ 5- 8) โดยมีหนูกลุ่มที่ 9 เป็นหนูกลุ่ม sham หนูทุกกลุ่มจะได้รับสารทดสอบทางปากวันละ 2 ครั้งเป็นเวลา 14 วัน การทดสอบดำเนินการในวันที่ 15 (day1, acquisition trial) และวันที่ 16 (day2, retention trial)

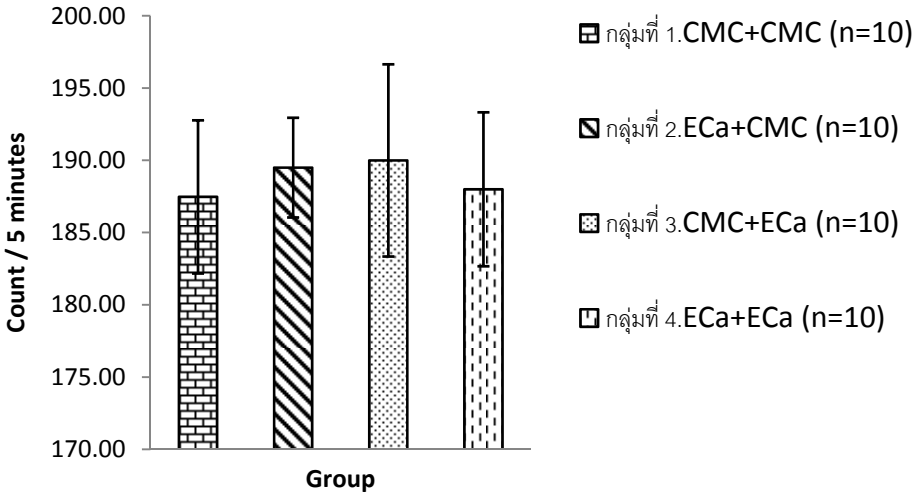
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

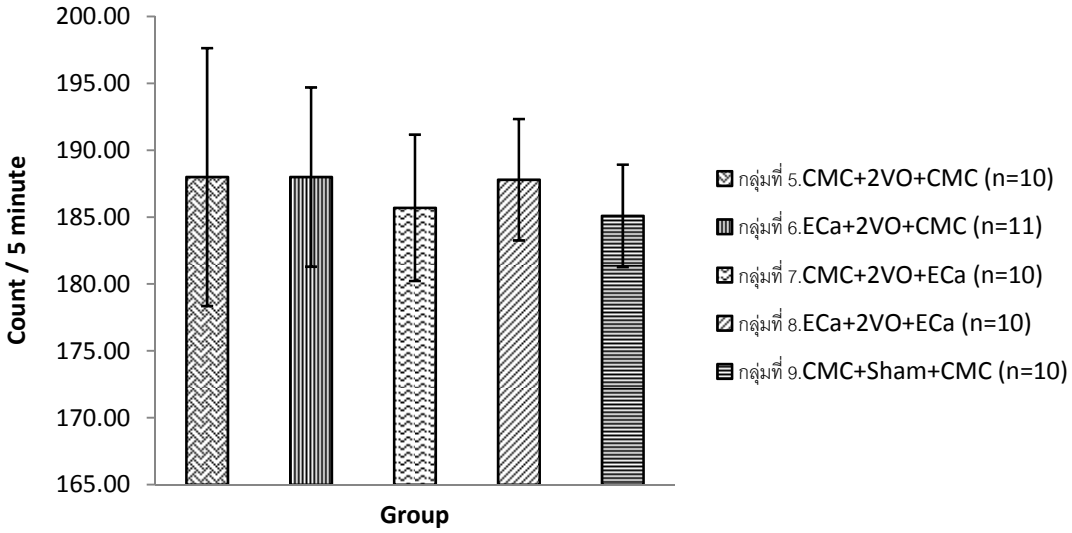
¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

4.1.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์

รูปที่ 4.9 แสดงผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์ โดยวิธี locomotor activity test การทดสอบดังกล่าวดำเนินการเพื่อยืนยันว่าผลของอีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำที่ได้ดำเนินการไปแล้วมิได้เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทยนต์แต่อย่างใด ผลการทดสอบไม่พบความแตกต่างของอัตราการเคลื่อนไหว (counts / 5 minutes) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 4.9 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์ เมื่อทดสอบโดยวิธีการวัดอัตราการเคลื่อนไหว (locomotor activity, counts / 5 minutes) ของหนูกลุ่มปกติ (กลุ่มที่ 1-4)

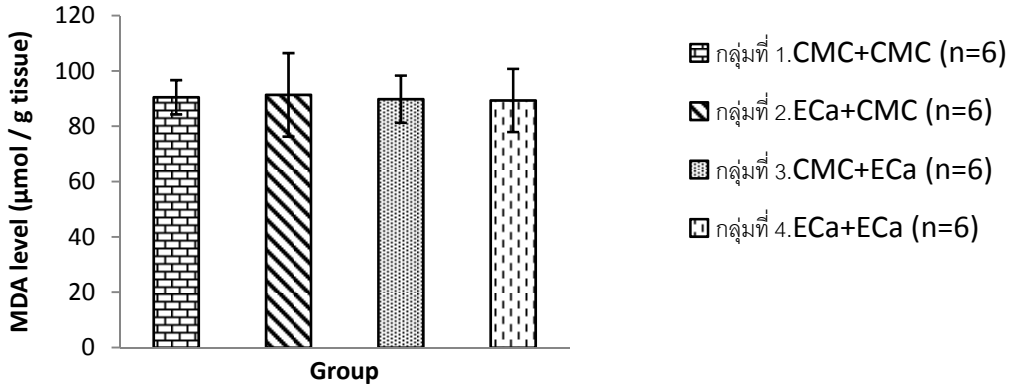


รูปที่ 4.10 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระบบประสาทยนต์ เมื่อทดสอบโดยวิธีการวัดอัตราการเคลื่อนไหว (locomotor activity, counts / 5 minutes) ของหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5 – 8) และหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

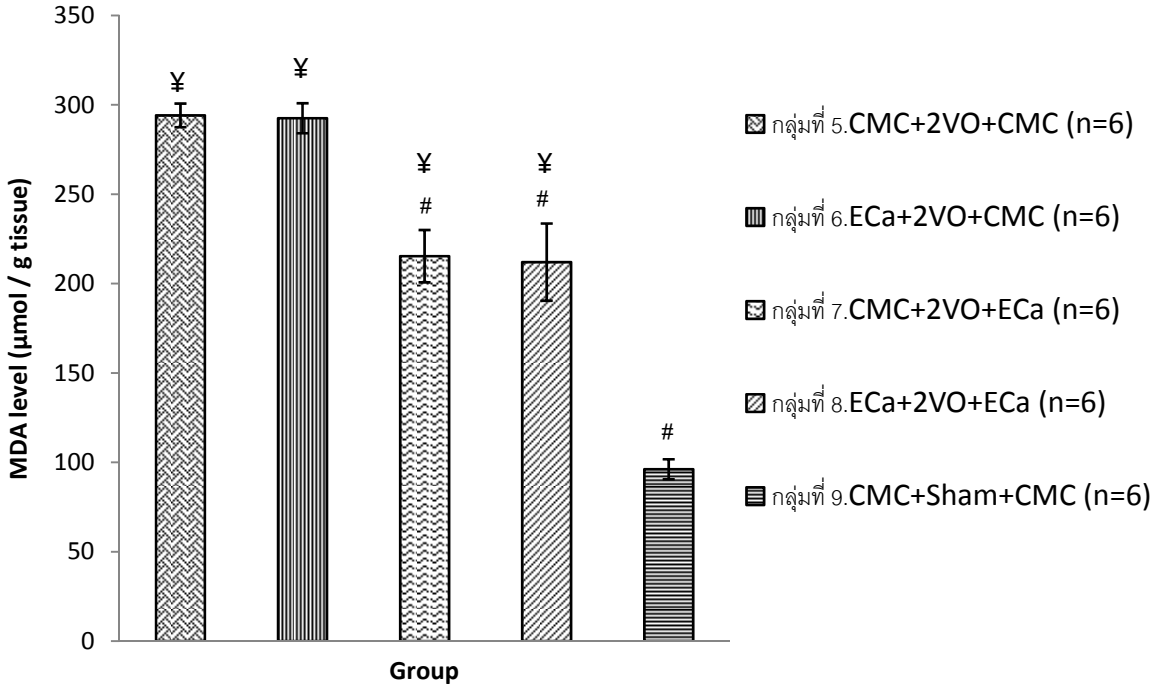
4.2 ผลการทดสอบทางชีวเคมี (Biochemical study)

รูปที่ 4.11 - 4.14 และ ตารางที่ 4.3 แสดงการเปรียบเทียบผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA และ glutathione (GSH) ในสมอง ผลการทดลองในหนูปกติพบว่าระดับ MDA ของหนูทุกกลุ่มจะไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับของ MDA ในหนูกลุ่มที่ 1 คือ 90.48 ±6.19 กลุ่มที่ 2 คือ 91.36±15.09 กลุ่มที่ 3 คือ 89.79±8.53 และ กลุ่มที่ 4 คือ 89.34±11.42 µmol / g tissue ในขณะที่ระดับ GSH ของหนูปกติกลุ่มที่ 4 จะมีความแตกต่างจากหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับ GSH ของหนูกลุ่มที่ 1 คือ 289.98±7.95 กลุ่มที่ 2 คือ 269.27±34.38 กลุ่มที่ 3 คือ 293.8±31.46 และกลุ่มที่ 4 คือ 361.14±6.43 nmol / g tissue ตามลำดับ

สำหรับหนูที่ได้ทำ 2VO จะพบว่ามีระดับ MDA สูงขึ้น และ GSH ลดลง โดยหนูกลุ่มที่ 5 จะมีระดับ MDA และ GSH แตกต่างจากกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) อย่างมีนัยสำคัญ สำหรับหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 ในกลุ่มที่ 7 และ 8 จะมีระดับ MDA และ GSH แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยระดับ MDA ของหนูกลุ่มที่ 5 คือ 294.165±6.62 กลุ่มที่ 6 คือ 292.55±8.41 กลุ่มที่ 7 คือ 215.37±14.63 และกลุ่มที่ 8 คือ 212.04±21.60 µmol / g tissue และระดับ GSH ของหนูกลุ่มที่ 5 คือ 63.06±10.31 กลุ่มที่ 6 คือ 71.69±10.25 กลุ่มที่ 7 คือ 117.49±5.82 และกลุ่มที่ 8 คือ 166.74±9.43 nmol / g tissue ตามลำดับ สำหรับหนูกลุ่ม sham จะมีระดับ MDA ใกล้เคียงกับหนูปกติ



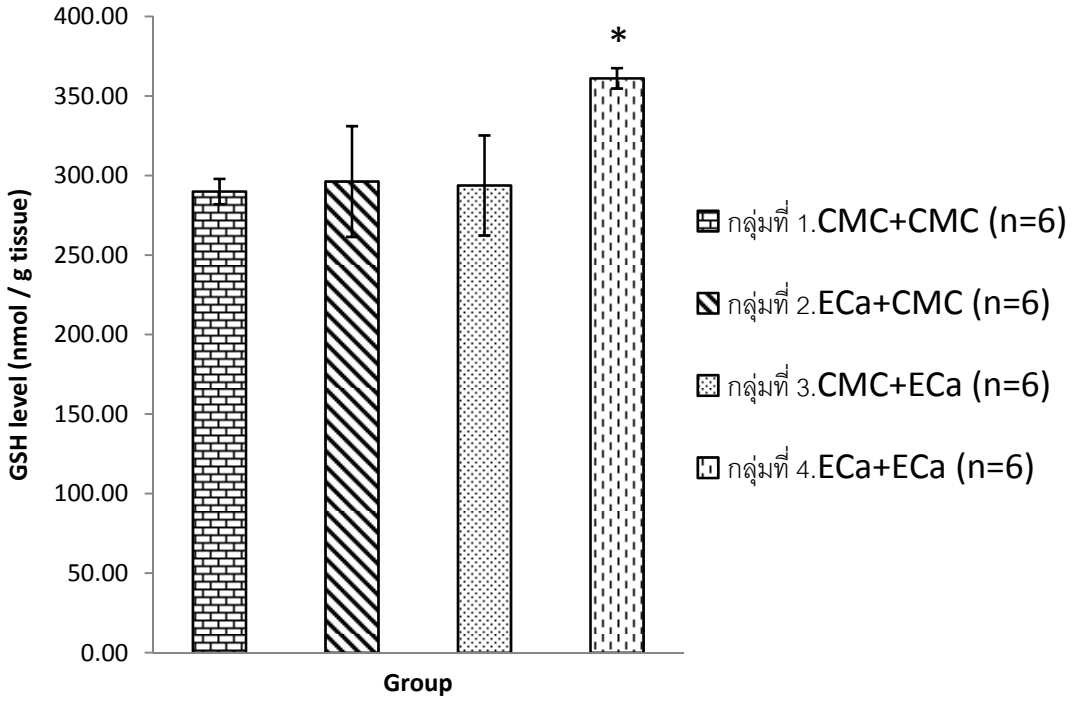
รูปที่ 4.11 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA ในสมองของหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 16 วัน วันละ 2 ครั้งทางปาก ก่อนดำเนินการวัดระดับ MDA ในสมองหนูในวันที่ 17



รูปที่ 4.12 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA ในสมองของหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 16 วัน วันละ 2 ครั้งทางปากก่อนดำเนินการวัดระดับ MDA ในสมองหนูในวันที่ 17

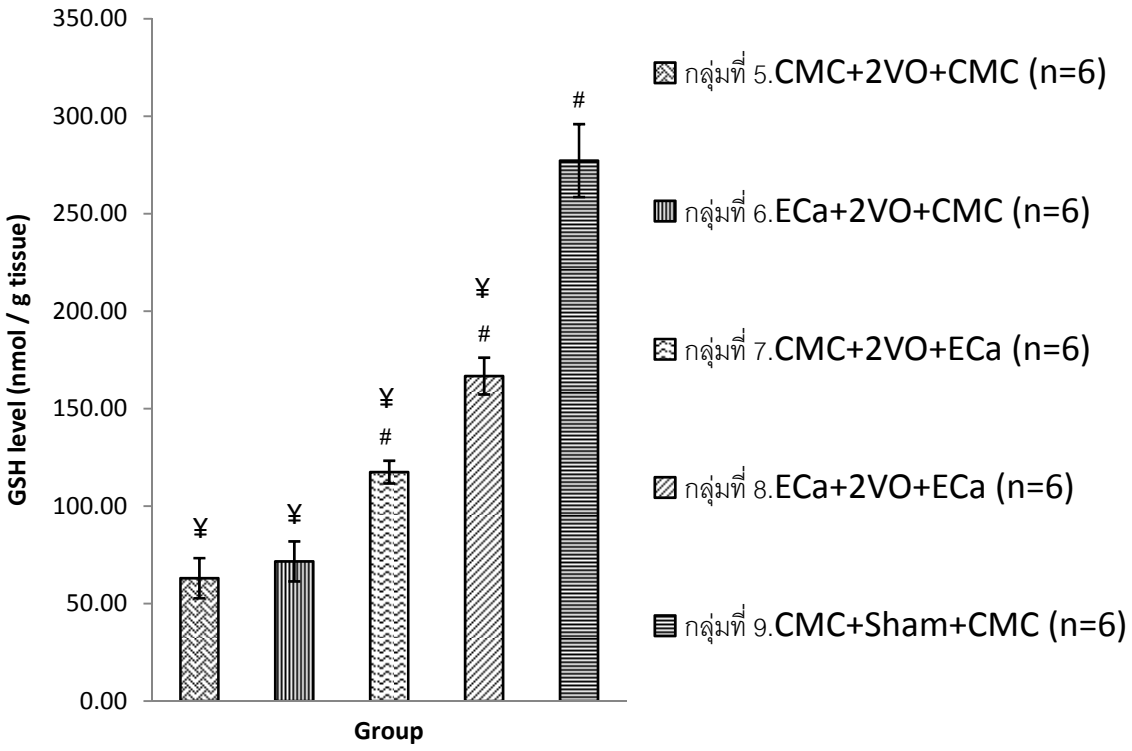
\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)



รูปที่ 4.13 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ GSH ในสมองหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 16 วัน วันละ 2 ครั้งทางปาก ก่อนดำเนินการวัดระดับ GSH ในสมองหนูในวันที่ 17

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)



รูปที่ 4.14 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ GSH ในสมองหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 16 วัน วันละ 2 ครั้งทางปากก่อนดำเนินการวัดระดับ GSH ในสมองหนูในวันที่ 17

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

Group	N	MDA (μmol / g tissue)	GSH (nmol / g tissue)
1.CMC+CMC	10	90.48±6.19	289.98±7.95
2.ECa+CMC	10	91.36±15.09	296.27±34.38
3.CMC+ECa	10	89.79±8.53	293.8±31.46
4.ECa+ECa	10	89.34±11.42	361.14±6.43 *
5.CMC+2VO+CMC	10	294.165±6.62 ¥	63.06±10.31 ¥
6.ECa+2VO+CMC	11	292.55±8.41 ¥	71.69±10.25 ¥
7.CMC+2VO+ECa	10	215.37±14.63 #, ¥	117.49±5.82 #, ¥
8.ECa+2VO+ECa	10	212.04±21.6 #, ¥	166.74±9.43 #, ¥
9.CMC+ sham +CMC	10	96.16±5.6 #	277.24±18.69 #

ตารางที่ 4.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA และ glutathione ในสมองหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4), หนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) หนูทุกกลุ่มได้รับสารทดสอบติดต่อกัน 16 วัน วันละ 2 ครั้งทางปาก ก่อนดำเนินการวัดระดับ MDA และ GSH จากสมองหนูในวันที่ 17

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1)

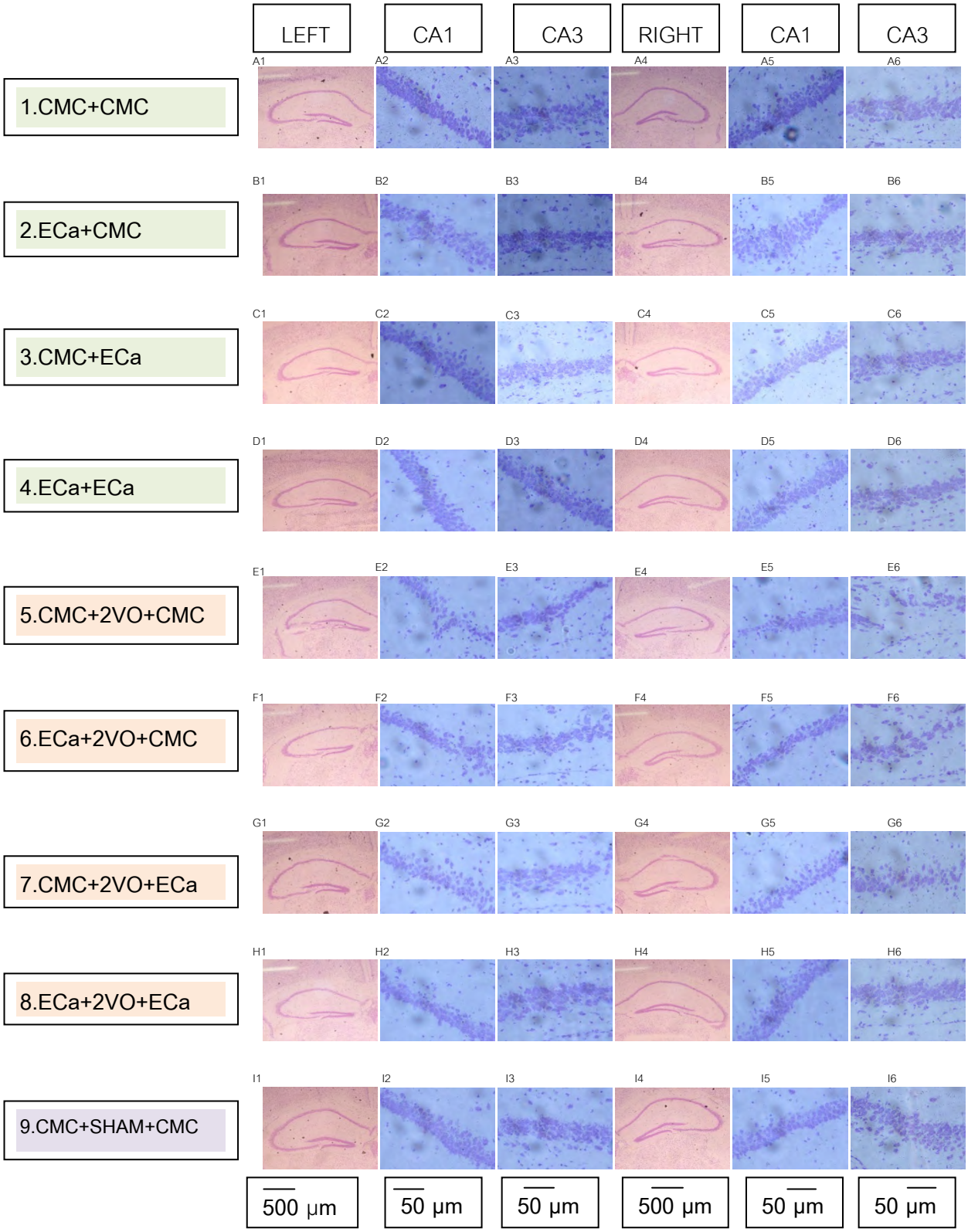
มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

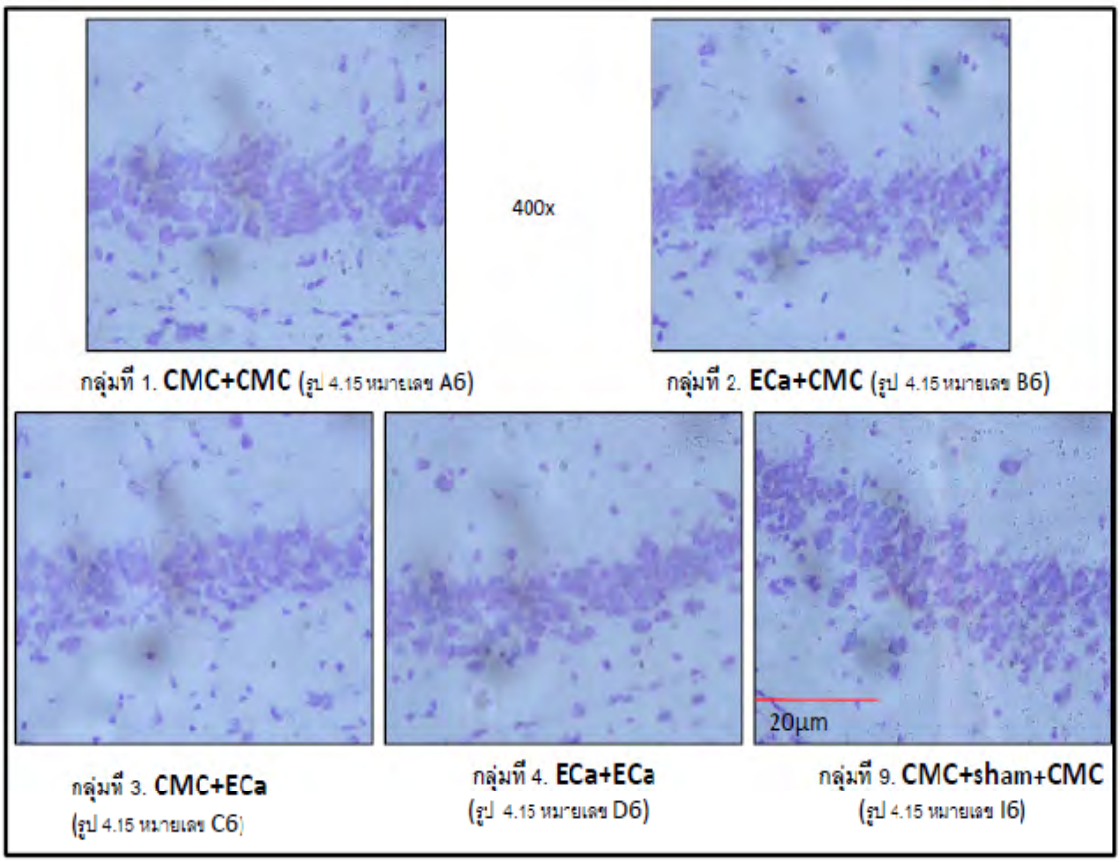
4.3 ผลของอีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาทที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้าง

รูปที่ 4.15 - 4.19 และตารางที่ 4.4 แสดงผลของอีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างผลการทดลองในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1- 4) พบว่าจำนวนเซลล์ประสาทที่นับได้ในหนูแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าจำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 ในหนูกลุ่มที่ 1- 4 คือ 60.4±0.76, 60.5±0.31, 59.86±0.48 และ 60.33±0.62 เซลล์ ตามลำดับ จำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA3 ในหนูกลุ่มที่ 1-4 คือ 60.33±0.83, 60.04±0.24, 60.83±0.50 และ 59.25±0.83 เซลล์ ตามลำดับ

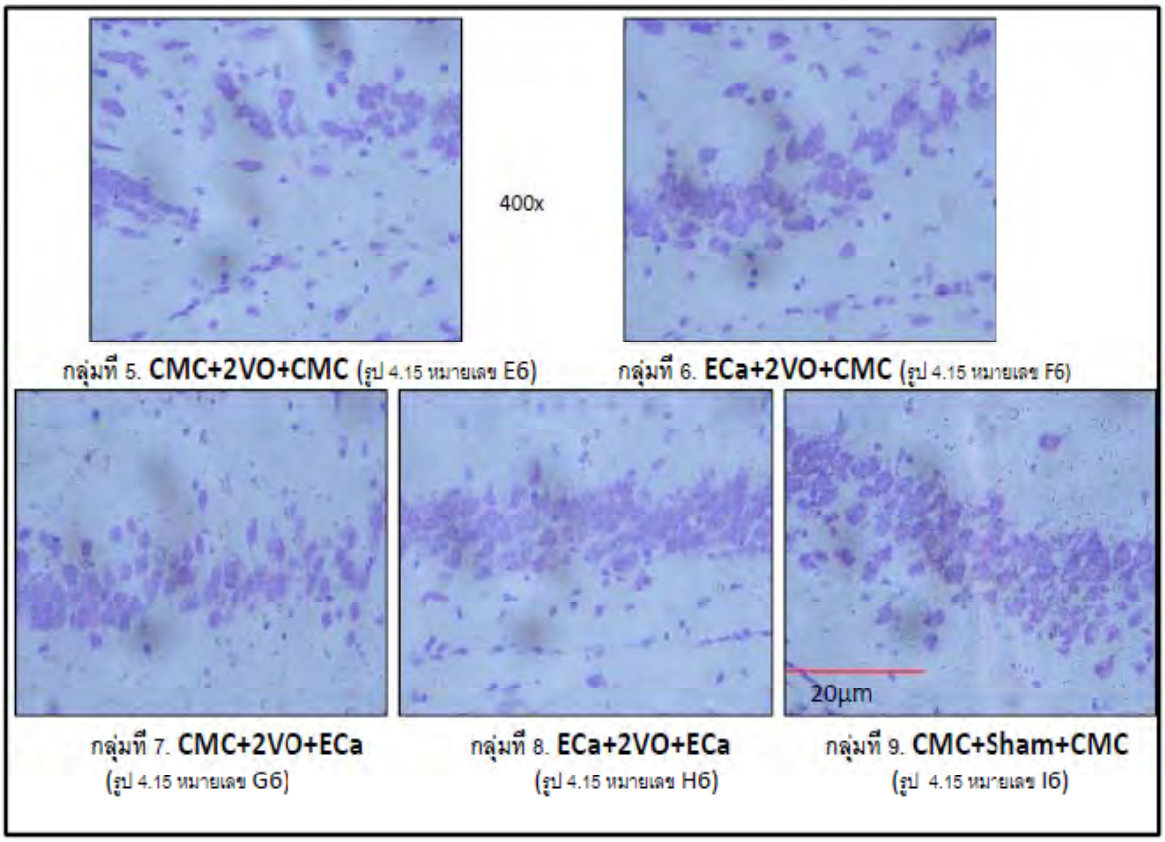
สำหรับหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) ผลจากการทำ 2VO ทำให้จำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองทั้งด้านซ้ายและด้านขวาตายไปทำให้จำนวนเซลล์ประสาทของสมองที่ได้กล่าวมาแล้วลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มปกติ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ประสาทในหนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 กับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5) พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ 233 มีเซลล์ประสาทที่ยังมีชีวิตมากกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าบริเวณ CA1 ของสมองด้านซ้ายจำนวนเซลล์ประสาทที่คงเหลือในกลุ่มที่ 5- 8 เท่ากับ 32.03±0.50, 32.21±0.84, 39.86±0.32, 42.65±0.66 ตามลำดับ



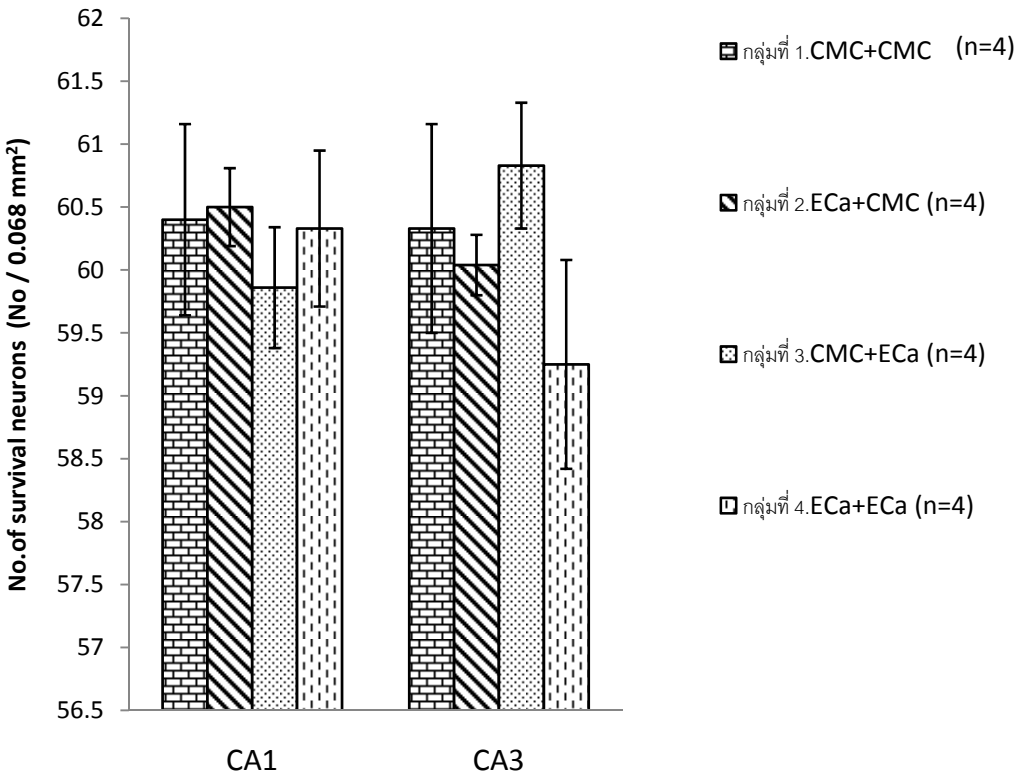
รูปที่ 4.15 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสดงลักษณะของเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองซีกซ้ายและขวาของหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4), หนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) ภายหลังจากการได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 16 วัน ๆ วันละ 2 ครั้ง ทางปาก โดยในวันที่ 17 จะดำเนินการแยกสมองหนูเพื่อทำสไลด์ และย้อมสีด้วยสีย้อม cresyl violet bar ของ columm A_1-I_1 และ A_4-I_4 เท่ากับ 500 µM และ columm ที่ A_3 - I_{-3} , A_5 - I_5 และ A_6 – I_6 เท่ากับ 50 µm



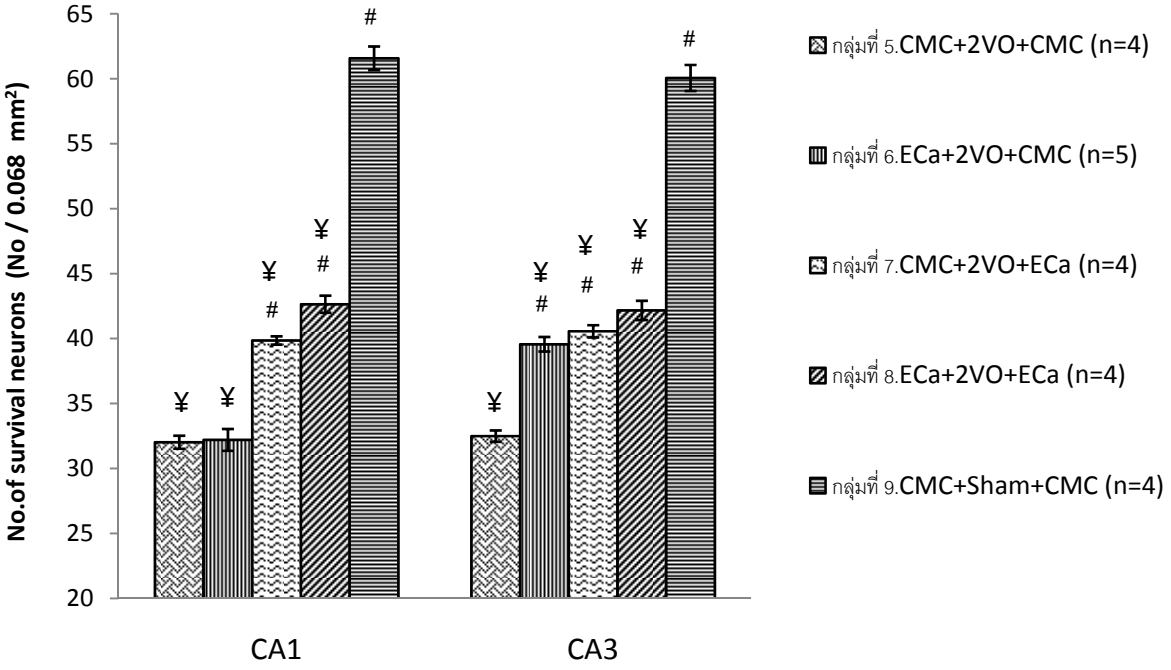
รูปที่ 4.16 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA3 ของหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) และกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) bar = 20 µm



รูปที่ 4.17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA3 ของหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) bar = 20 µm



รูปที่ 4.18 กราฟแสดงผลของอีซีเอ 233จำนวนเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างในหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) ภายหลังจากการได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 16 วัน ๆ วันละ 2 ครั้ง ทางปาก



รูปที่ 4.19 กราฟแสดงผลของอีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างในหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) ภายหลังจากการได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 16 วัน ๆ วันละ 2 ครั้ง ทางปาก

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

Group	N	Number of survival cell	
		CA 1	CA 3
1.CMC+CMC	4	60.4±0.76	60.33±0.83
2.ECa+CMC	4	60.5±0.31	60.04±0.24
3.CMC+ECa	4	59.86±0.48	60.83±0.50
4.ECa+ECa	4	60.33±0.62	59.25±0.83
5.CMC+2VO+CMC	4	32.03±0.50 ¥	32.5±0.44 ¥
6.ECa+2VO+CMC	5	32.21±0.84 ¥	39.57±0.56 #, ¥
7.CMC+2VO+ECa	4	39.86±0.32 #, ¥	40.57±0.47 #, ¥
8.ECa+2VO+ECa	4	42.65±0.66 #, ¥	42.18±0.74 #, ¥
9.CMC+sham+CMC	4	61.58±0.91 #	60.07±1.0 #

ตารางที่ 4.4 แสดงผลของอีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท pyramidal บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างของหนูปกติ (กลุ่มที่ 1-4) และหนูกลุ่ม 2VO (กลุ่มที่ 5-8) และกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9) ภายหลังจากการได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นเวลา 16 วัน ๆ วันละ 2 ครั้ง ทางปาก โดยในวันที่ 17 จะดำเนินการแยกสมองหนูเพื่อทำสไลด์ และย้อมสีด้วยสีย้อม cresyl violet

มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 5)

¥ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม sham (กลุ่มที่ 9)

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การศึกษาผลของการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองนิยมใช้การทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้ (behavior model) ในการประเมินประสิทธิภาพของยา ซึ่งมีอยู่หลายลักษณะ (Xu และคณะ, 2000) การศึกษานี้ทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้ด้วยวิธี Morris water maze test ซึ่งเป็นการทดสอบการเรียนรู้แบบ spatial memory ที่ได้รับความนิยมในปัจจุบัน โดยจะมีความสัมพันธ์กับการทำงานของสมองส่วน hippocampus โดยหนูสามารถจดจำตำแหน่งของ platform ได้โดยการสังเกตสัญลักษณ์และสิ่งแวดล้อมที่อยู่ในบริเวณนั้น (environmental visual cues) (Paul, 2009) ดังที่กล่าวว่าการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze (MWM) test จะต้องอาศัยการมองเห็น ดังนั้นหลังจากวันสุดท้ายของการทดสอบจึงจำเป็นต้องทดสอบโดยการนำแท่นออก (probe trial) และบันทึกความสามารถของความจำจากระยะเวลาที่หนูว่ายน้ำใน quadrant ที่เคยมีแท่นพักอยู่ เพื่อเป็นการยืนยันว่าผลการทดสอบไม่ได้เกิดจากความผิดปกติของการเคลื่อนไหวจึงจำเป็นต้องประเมินความสามารถในการเคลื่อนไหวด้วยวิธี locomotor activity test ส่วนการทดสอบโดยวิธี step – down passive avoidance เป็นวิธีการทดสอบการเรียนรู้และความจำในการหลีกเลี่ยงจากสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย (noxious stimuli) โดยมีการลำดับเหตุการณ์เป็นขั้นตอน จึงใช้สมองหลายส่วนประสานการทำงานร่วมกัน คือ hippocampus, cortex และ amygdala (Rossato และคณะ, 2006) เมื่อทำการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูปกติพบว่าหนูทดลองในกลุ่มที่ 4 ซึ่งได้รับอีซีเอ 233 ทั้งในขณะก่อนและตลอดเวลาที่มีการเรียนรู้จะมีการเรียนรู้และความจำดีขึ้นโดยหนูสามารถจดจำตำแหน่งจากสิ่งแวดล้อมและใช้เวลาหาแท่นพัก (platform) ได้ดีขึ้น และยังสามารถจดจำหลีกเลี่ยงจากสิ่งกระตุ้นที่เป็นอันตราย โดยใช้ระยะเวลาอยู่บนแท่นที่ไม่มีกระแสไฟฟ้า (step – down latency) ได้นานขึ้น รวมถึงมีระดับ glutathione (GSH) เพิ่มขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ซึ่งศึกษาผลของสารสกัดบัวบกด้วยตัวทำละลายที่แตกต่างกันต่อการเรียนรู้และการเกิดภาวะ oxidative stress ในหนูแรท (wistar rat) พบว่าหนูแรทที่ได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 200 มก./ กก / วัน เป็นเวลา 7 วันจะสามารถเรียนรู้ในแบบทดสอบพฤติกรรมได้ดีขึ้น รวมถึงมีระดับ GSH ในสมองเพิ่มมากขึ้นเมื่อหนูได้รับสารสกัดบัวบกเป็นเวลา14 วัน (Kumar, 2002) และยังพบว่าหนูที่ได้รับบัวบก 12 มก. / กก.น้ำหนักตัว เป็นเวลา 10 วัน จะสามารถเรียนรู้ในแบบทดสอบพฤติกรรมโดยใช้โมเดล operant conditioning technique ได้ดีขึ้นเช่นกัน (Jared, 2010) การศึกษาในหนูปกติที่ได้รับ อีซีเอ 233 ในครั้งนี้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของจำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ซึ่งการศึกษาก่อนหน้านี้ (Rao, 2005) พบการแตกแขนงของเซลล์ประสาทในหนูแรกเกิดที่บริเวณ CA3 เพิ่มขึ้นเมื่อประเมินโดยเทคนิค golgi

staining ซึ่งทำให้ทราบถึงโครงสร้างที่ละเอียดของเซลล์ประสาท เช่น axon, dendrite และการเชื่อมต่อระหว่างเซลล์ (interconnection) ซึ่งเซลล์ประสาทมักเกาะกลุ่มกันอย่างหนาแน่น (Pannese, 1999) ส่วนการศึกษานี้ใช้วิธี cresyl violet staining ซึ่งเป็นการประเมินลักษณะของเซลล์เท่านั้นไม่สามารถทราบถึงโครงสร้างโดยละเอียด ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจในการนำเทคนิค golgi staining มาทำการศึกษาผลของอีซีเอ 233 ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในครั้งต่อไป

ผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาผลของบัวบกในการเพิ่มการเรียนรู้และความจำในอาสาสมัครสุขภาพดีวัยกลางคนเมื่อทดสอบด้วยแบบทดสอบความสามารถในการจดจำของ Woodcock-Johnson Cognitive Abilities Test III (WJ CAT III) โดยอาสาสมัครได้รับสารสกัดบัวบกแคปซูลในขนาด 500 มก. / 10 กก.นน.ตัว วันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 2 เดือน (Dev และคณะ, 2009) บัวบกยังเพิ่มผลต่อการเรียนรู้ (cognition) และอารมณ์ (mood) ในผู้สูงอายุสุขภาพดีที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบกในขนาด 250, 500, 750 มก. วันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 2 เดือนต่อเนื่องกัน จากแบบประเมินการเรียนรู้ computerized test battery และ event-related potential รวมถึงแบบประเมินพฤติกรรมทางอารมณ์ (mood) (Wattanathorn, 2008)

เมื่อพิจารณาผลการทดลองในหนูปกติจะพบว่าหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 อย่างต่อเนื่องตลอดการทดลองเท่านั้นที่สามารถเพิ่มพฤติกรรมการเรียนรู้และมี GSH เพิ่มขึ้นในสมอง ส่วนหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 เฉพาะก่อนหรือในระหว่างทดสอบพฤติกรรมจะไม่มีการเปลี่ยนแปลง อาจกล่าวได้ว่าบัวบกจะสามารถกระตุ้นการเรียนรู้และความจำในหนูปกติได้ หากได้รับติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน แสดงว่าระยะเวลาที่ได้รับสารสกัดอาจเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการออกฤทธิ์ สอดคล้องกับการศึกษาในอาสาสมัครสุขภาพดีที่ได้รับสารสกัดบัวบกมาก่อนการทดสอบเป็นเวลา 2 เดือน (Wattanathorn, 2008)

การปิดกั้นหลอดเลือดโดยวิธี 2VO ส่งผลให้เกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำจากการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้ ทำให้ระดับ MDA ในสมองเพิ่มขึ้น และทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ทั้งบริเวณ CA1 และ CA3 (Wanakhachornkrai, 2006) จากผลการทดลองพบว่าการให้อีซีเอ 233 มีผลลดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำจากการทดสอบพฤติกรรม และลดการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ทั้งบริเวณ CA1 และ CA3 สำหรับในการทดลอง MWM test มีหนูกลุ่มที่ 8 (ได้รับอีซีเอ 233 ก่อนและหลังทำ 2VO) เท่านั้นที่สามารถลดความบกพร่องของความจำและการเรียนรู้

ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนการได้รับอีซีเอ 233 ก่อนหรือหลังเพียงอย่างเดียวไม่สามารถลดความบกพร่องจาก MWM test ได้ ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่าการให้อีซีเอ 233 หลังทำ 2VO จะสามารถลดความบกพร่องจาก MWM test ได้ (Tantisira, 2008) แต่ในการทดลองดังกล่าวไม่มีการให้ CMC แก่หนูก่อนการทำ 2VO จึงคาดว่าในการทดลองนี้ สัตว์ทดลองอาจเกิดภาวะ stress จากการได้รับ CMC ก่อนการทำ 2VO ทำให้มีการหลั่งฮอร์โมนคอร์ติซอล ซึ่งจะมีผลลดความสามารถในการเรียนรู้และความจำ(Louis, 1999) จึงทำให้ผลของ MWM test ของหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 หลังทำ 2VO ซึ่งถึงแม้มีแนวโน้มที่ดีกว่าหนูกลุ่มที่ 5 แต่ก็ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามหนูกลุ่มนี้ยังให้ผลในการเพิ่มการเรียนรู้โดยวิธี passive avoidance test และมีระดับ MDA ลดลง และระดับ GSH เพิ่มขึ้นรวมถึงลดการตายของเซลล์ประสาทได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากผลการทดลองในหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 ก่อนการทำ 2VO พบการเปลี่ยนแปลงในการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้ด้วยวิธี step – down passive avoidance test และลดการตายของเซลล์ประสาทบริเวณ CA3 แต่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ MDA และ GSH ดังนั้นมีความเป็นไปได้ว่านอกจากอีซีเอ 233 จะสามารถป้องกันเซลล์ประสาทจากการถูกทำลายด้วยกลไก antioxidant และลดการตายของเซลล์ประสาทแล้วน่าจะมีกลไกอื่นซึ่งเป็นที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งต่อไป

จากข้อมูลในระหว่างการทดลอง (ภาคผนวก) หนูที่ได้รับการทำ 2VO อาจมีการตายในระหว่างการทดลอง ซึ่งหนูปกติที่ได้รับเพียงกระสายยา (กลุ่มที่ 5 และ7) ก่อนทำ 2VO จะมีอัตรารอดชีวิตประมาณ 45 % แต่ในหนูที่ได้รับ อีซีเอ 233 มาก่อนทำ 2VO (กลุ่มที่ 6 และ 8) จะมีอัตรารอดชีวิตประมาณ 70 % ดังนั้นการที่หนูได้รับอีซีเอ 233 มาก่อนอาจสามารถช่วยลดผลกระทบจากการเกิดภาวะสมองขาดเลือดได้

หนูที่ได้รับอีซีเอ 233 หลังการทำ 2VO และตลอดการทดลองสามารถช่วยลดภาวะความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำซึ่งเกิดจากภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราวได้ สอดคล้องกับผลการศึกษาที่ผ่านมาซึ่งพบว่าอีซีเอ 233 ในขนาด 10 และ 30 มก / กก.น้ำหนักตัว ที่ให้แก่หนูเมาส์ในลักษณะเดียวกันสามารถลดภาวะความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เกิดจาการฉีด β-amyloid เข้าโพรงสมองได้ (Kam-eg, 2009)

จากผลการศึกษานี้อาจกล่าวได้ว่าอีซีเอ 233 สามารถลดภาวะความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้มากที่สุดเมื่อหนูได้อีซีเอ 233 อย่างต่อเนื่อง รองลงมาคือการให้เฉพาะหลังการทำ 2VO และเฉพาะก่อนทำ 2VO ตามลำดับ และยังสามารถช่วยเพิ่มความจำในหนูปกติได้

หากได้รับในระยะเวลานานพอโดยอาจมีฤทธิ์ antioxidant เป็นกลไกส่วนหนึ่ง แต่ก็ยังอาจมีกลไกอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องอีกจึงเป็นที่น่าสนใจที่จะมีการศึกษาเพื่อพัฒนาอีซีเอ 233 ไปเป็นอาหารบำรุงสมอง (nootropic drugs) ผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพ (health supplements) รวมถึงพัฒนาไปเป็นยาในผู้ที่ภาวะสมองเสื่อม

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กฤติ รื่นอารมณ์. สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ.ภาวะสมองเสื่อม. [ออนไลน์].2552. แหล่งที่มา : http://www.thaihealth.or.th/node/8443. [27 มิถุนายน 2552].

คณะกรรมการแห่งชาติด้านยา. บัญชียาจากสมุนไพร. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี.กระทรวงสาธารณสุข ,2549.

ถนอมศรี วงศ์รัตนาสถิตย์. เอกลักษณ์สมุนไพร. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2538. หน้า 48-52.

นิพนธ์ พวงวรินทร์. โรคหลอดเลือดสมอง. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล.2534.หน้า 73-78.

นันทวัน บุณยะประภัศร. สมุนไพรไม้พื้นบ้าน. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ : บริษัทประชาชน จำกัด , 2541.

วีรพล คู่คงวิริยพันธุ์. ข้อมูลการศึกษาประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพรบัวบก. ในรายงานผลการศึกษาโครงการประเมินประสิทธิภาพและความปลอดภัยของยาสมุนไพร, หน้า 127-136.นนทบุรี :เอส อาร์ พริ้นติ้ง แมสโปรดักส์. 2544.

วีรศักดิ์ เมืองไพศาล ภาควิชาเวชศาสตร์ป้องกันและสังคม คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล. ปัจจัยเสี่ยงของภาวะสมองเสื่อมและการป้องกัน.[ออนไลน์]. 2552 .แหล่งที่มา : http : www.si.mahidol.ac.th. [27 มิถุนายน 2552].

สำนักงานพัฒนาระบบข้อมูลข่าวสารสุขภาพ. บัวบก : สมุนไพรมหัศจรรย์ บำรุงความจำ บำรุงสุขภาพ. [ออนไลน์]. แหล่งที่มา. http://www.hiso.or.th/. [17 เมษายน 2554].

ภาษาอังกฤษ

Abe, K., Kawagoe, J., Aoki, M., Kogure, K., and Itoyama, Y. Stress protein inductions after brain ischemia. Cellular and Molecular Neurobiology. 18 (1998) : 709–719.

Adesina, S. K. Studies on some plants use as anticonvulsants in America and African traditional medicine. Fitoterapia. 53(1982) : 147-162.

Ahmad, I., Mehmood, Z., and Mohammad, F. Screening of some Indian medicinal plants for their antimicrobial properties. Journal of Ethnopharmacology. 62(1998) : 183-193.

Anderson, J.R. Retrieval of memories. In, Learning and memory, an integrated approach. 1st edition. Pp. 273-313.Canada : John wiley and sons, Inc., 1995.

Arvin, B., Neville, L.F., Barone , F.C., and Feuerstein, G.Z. The role of inflammation and cytokines in brain injury. Neurosciences Biobehavior Review. (1996) : 445–452.

Babu, T. D., Juttan, G., and Padikkala, J. Cytotoxic and anti-tumor properties of certain taxa of Umbelliferae with special reference to Centella asiatica (L.) Urban. Journal of Ethnopharmacology. 48(1995) : 53-57.

Barone, F.C.and Feuerstein, G.Z. Inflammatory mediators and stroke: new opportunities for novel therapeutics, Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism.19 D (1999) : 819–834.

Bear, M.F., Connor, B.W., and Paradiso, M.A. Memory system. In, Neuroscience Exploring the brain. 3rd edition.USA . Lippincott Williama and Wilkins, 2007 : 725-760.

Braun, J.S., Jander, S., Schroeter, M., Witte, O.W. and Stoll, G. Spatiotem poral relationship of apoptotic cell death to lymphomonocytic infiltration in photochemically induced focal ischemia of the rat cerebral cortex. Acta Neuropathologica . 1996 : 255–263.

Brouns, R., Deyn, P.P. D., The complexity of neurobiological processes in acute ischemic stroke, Clinical Neurology Neurosurgery : 2009.

Chen, Y., Chan, P.H.and Swanson, R.A. Astrocytes overexpressing Cu, Zn superoxide dismutase have increased resistance to oxidative injury, Glia 33 .2001 :343–347.

Cheng, C. L., and Koo, M. W. Effect of *Centella asiatica* on ethanol induced gastric mucosal lesion in rats. Life Sciences. 67(21)(2000) : 2647-2653.

Choi, D. Antagonizing excitotoxicity : a therapeutic strategy for stroke?. Mt. Sinai Journal of Medicine. 65 1998 :133–138.

Coldren, C.D.,et al. Gene expression changes in the human fibroblast induced by *Centella asiatica* triterpenoinds. Planta Medica. 69(8)(2003) : 725-732.

Cooper, W.A., et al. Hypothermic circulatory arrest causes multisystem vascular endothelial dysfunction and apoptosis. Forty-Fifth Annual Meeting of the Southern Thoracic Surgical Association 1998. Carlyle Fraser Heart Center of Crawford Long Hospital, and Emory University School of Medicine, Atlanta, Georgia, USA.

Cuevas, P.and Gimenez-Gallego, G,. Role of fibroblast growth factors in neural trauma, Neurology. 19.1997: 254–256.

Delis, D.C., Lucas, J.A., Kopelman, M.D. Memory. In.Fogel, B.S., Schiffer, R.B.and Rao, S.M. Synopsis of Neuropsychiatry. USA : Lippincott Williams and Wilkins .1999: 169-191.

Dev, RD., Mohamed, S., Hambali, Z., and Samah, BA.Comparison on Cognitive Effect of *Centella asiatica* in Healthy Middle Age Female and Male Volunteers. European Journal of Scientific Reserch. 2009 : 553-565.

Dohmen, C., Bosche, B., Graf, R., Reithmeier, T., Ernestus, RI. and Brinker G.Identification and clinical impact of impaired cerebrovascular autoregulation in patients with malignant middle cerebral artery infarction. Stroke . 2007 : 56–61.

Dunstan, C. A., et al. Evaluation of some Samoan and Peruvian medicinal plants by prostaglandin biosynthesis and rat ear edema assays. Journal of Ethnopharmacology. 57(1997) : 35-56.

Eldadah, B.A.,and Faden, A.I.Caspase pathways, neuronal apoptosis, and CNS injury. Journal of Neurotrauma. 2000 : 811–829.

Ember, J.A., and Hugli, T.E.Complement factors and their receptors. Immunopharmacology .1997 : 3 –15.

Evans, P.H. Free radical in brain metabolism and pathology , British Medical Bulletin.49 . 1993 :577 –587.

Fakasa, E., Paul G.M., and Bari F. Permanent, bilateral common carotid artery occlusion in the rat : A model for chronic cerebral hypoperfusion – related neurogernerative disedses. Brain Reserch Review 2007 :162-180.

Finklestein, S.P.The potential use of neurotrophic growth factors in the treatment of cerebral Ischemia. Advance Neurology. 1996: 413– 417.

Grimaldi, R., et al. Pharmacokinetics of the total triterpenic fraction of *Centella asiatica* after single and multiple administration to healthy volunteers. A new assay for asiatic acid. Journal of Ethnopharmacology .1990 : 235-241.

Gupta, Y. K., Veerendra Kumar, M. H., and Srivastava, A. K. Effect of *Centella asiatica* on pentylentetrazole - induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior. 2003 : 579-585.

Gupta, Y.K., Briyal, S., and Gulati, A. Therapeutic potential of herbal drugs in cerebral ischemia. Indian Journal of Physiology and Pharmacology. 2010 : 99-122.

Hamony, D Nitric oxide in acute ischaemic stroke: a target for neuroprotection. Journal of Neurology Neurosurgery and Psychiatry 1999 : 1–3.

Heuschmann, et.al. Frequency of thrombolytic therapy in patients with acute ischemic stroke and the risk of in-hospital mortality : the German Stroke Registers Study Group, Stroke 2003 : 1106–1113.

Jared, S.R. Enhancement of memory in rats with *Centella asiatica*. Biomedical Research. 2010 : 429-432.

Joy, J., Krishnan, C. and Nair, K. Protection of DNA and membranes from gamma-radiation induced damages by *centella asiatica*. Journal of pharmacy and pharmacology. 2009 : 941–947.

Kam-eg, A., Effects of the Standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on cognitive deficits induced by β-amyloid peptide (25-35) in mouse. Master's thesis, Department of Pharmacology (Interdisciplinary program), Graduate School, Chulalongkorn University, 2009.

Kandel, E.R., Schwaetz, J.H.., and Jessell, T.M. Learning and memory, In, Principle of Neuroscience, 4th edition, pp. 1227-1246. Newyork : McGraw-Hill, 2000.

Kim, K.W., et al.The cytosolic antioxidant, copper/ zinc superoxide dismutase, attenuates blood- brain barrier disruption and oxidative cellular injury after photothrombotic cortical ischemia in mice, Neuroscience 105. 2001:1007–1018.

Lee, J., et.al. Evaluation of the anti-inflammatory and atopic dermatitis-mitigating effects of BSASM, a multicompound preparation. Journal of Ethnopharmacology. 2005 : 211-219.

Leenders, K.L., et al. Cerebral blood flow, blood volume and oxygen utilisation. Normal values and effect of age. Brain.1990 : 27.

Louis, ST. High Stress Hormone Levels Impair Memory. Science Daily. 1999 .

Lynch, M.A. Long-term potentiation and memory. Physiology Review. 84(2004) : 87-136.

Macquart, F.X., et al. Triterpenes from *Centella asiatica* stimulate extracellular matrix accumulation in rat experimental wounds. European Journal of Dermatology. 1999 : 289-296.

Madhyastha, S., Somayaji, SN., Bairy, KL., and Madhyastha, P. Neuroprotective Effect of Centella asiatica Leaf Extract Treatment on Cognition and Hippocampal Morphology Against Prenatal Stress. Thai Journal of Physiological Sciences Vol. 20 No. 2 : 2007

Martin, R.L., Lloyd H.G. and Cowan A.I. The early events of oxygen and glucose deprivation: setting the scene for neuronal death? Trends Neuroscience 1994 : 251–257.

Matsushita., et al. Alterations of Bcl-2 family proteins precede cytoskeletal proteolysis in the penumbra, but not in infarct centres following focal cerebral ischemia in mice. Neuroscience.1998 : 439–448.

Minija, J.and Thoppil, J. E. Antimicrobial activity of *Centella asia*tica (L.) Urb. essential oil. Indian Perfumer. 2003 : 179-181.

Morris, R.G. and Mayes, A.R. Long-term spatial memory: introduction and guide to the special section. Neuropsychology. 2004 : 403-404.

Nagayama, T.,et al. Cannabinoids and neuroprotection in global and focal cerebral ischemia and in neuronal cultures, Journal of Neuroscience.1999 : 2987–2995.

Ni, J-W., Matsumoto, K., Li, H.B., Murakami, Y., and Watanabe, H. Neuronal damage and decrease of central acetylcholine level following permanent occlusion of bilateral commom carotid arteries in rats. Brain Research. 1995 : 290-296.

Novick, D., et al. Interleukin -18 binding protein : a novel modulator. of the Th1 cytokine response, Immunity.1999 :127–136.

Oulu University Library. HCA and pathophysiology of ischemic cerebral injury. [online]. Avialable from : http://herkules.oulu.fi/isbn9514269217/html/x234.html. [19 April 2011].

Pannese, E. The Golgi Stain: Invention, Diffusion and Impact on Neurosciences', Journal of the History of the Neurosciences .1999 : 132 — 140.

Paul, C.-M., Magda G. and Abel S. Spatial memory : Theoretical basis and comparative review on experimental methods in rodents . Behavior Brain Research 2009 : 151-164.

Powers, WJ. Cerebral hemodynamics in ischemic cerebrovascular disease. Annal Neurology. 1991 : 231.

Raghavendra, M.et al. Role of *Centella asiatica* on cerebral post-ischemic reperfusion and long-term hypoperfusion in rats. Green Pharmacy .2009 : 88-96.

Rajanikant, G., et al. Asiatic Acid, a Pentacyclic TriterpeneFrom Centella asiatica, Is Neuroprotectivein a Mouse Model of Focal Cerebral Ischemia. Journal of Neuroscience Research. 2009 : 2541–2550.

Rao, SB, Chetana, M. and Uma Devi P. Centella asiatica treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. Physiology and Behavior. 2005 : 449-57.

Rossato, J.I., et al. and Izquierdo,I. A link between the hippocampal and the striatal memory systems of the brain. Annals of the Brazillian Academy of Sciences. 2006 : 515-523.

Sakina, M. R., and Dandiya, P.C.A. psycho-neuropharmacological profile of *Centella asiatica* extract. Fitoterapia.1990 : 291-296.

Sampson, J.H., et al. In vitro keratinocytes antiproliferant effect of *Centella asiatica* extract and triterpenooids saponin. Phytomedicine.2001 : 230-235.

Shivakumar, B.R., Kolluri, S.V.R., and Ravindranath, V. Glutathione homeostasis in brain during reperfusion following bilateral carotid artery occlusion in the rat. Molecular and cellular Biochemistry.1992 : 125-129.

Siesjo BK. Cell damage in the brain : A speculative synthesis . Journal of Cerebral blood flow metabolism.1981 : 155-185.

Soumyanath A, et al. Evaluation of topical formulations of aqueous extract of *Centella asiatica* on open wound in rats. Indian Journal of Experimental Biology. 1998 : 569-572.

Soumyanath, A., et al. Centella asiatica accelerates nerve regeneration upon oral administration and contains multiple active fractions increasing neurite elongation in-vitro Journal of Pharmacy and Pharmacology (JPP). 2005 : 1221–1229.

Stein, D.G. Brain damage, sex hormones and recovery: a new role for progesterone and estrogen?,Trends Neuroscience. 2001: 386– 391.

Steiner, LA. and Andrews P.J. Monitoring the injured brain: ICP and CBF. British Journal of Anaesthesia. 2006 : 26–38.

Sweatt D. Mechanisms of memory, USA. Academic Press, 2003, 61-64.

Tantisira, M.H. Bioactive Standardized Extract of Centella asiatica (ECa 233). Proceeding of the Eighth NRCT–JSPS Joint Seminar:Innovative Research in Natural Products for Sustainable Development.Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, Bangkok. 2008.

Veerendra, M. H., and Gupta, Y. K. Effect of *Centella asiatica* on cognitive and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. Clinical & Experimental Pharmacology & Physiology. 2003 : 336-342.

Wanakhachornkrai, O., Effect of N-(2-propylpentanoyl) urea on impairment of learning memory and neuronal cell death after bilateral common carotid arteries occlusion in mice. Master's thesis, Department of Physiology (Interdisciplinary program), Graduate School, Chulalongkorn University, 2006.

Watanabe, Y.,et al. Estrogen restores postischemic pial microvascular dilation. Physiology. 2001 : 155–160.

Wattanathorn, J.,et al. Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*.Journal of Ethnopharmacology. 2008 : 325 – 332.

Widmaier, E.P., Raff, H. and Strang, K.T. Conciousness, the brain, and behavior. In,Vander, Sherman, Lucino's(eds.). Human Physiology : The mechanism of body function. 9th edition. New York :McGraw-Hill, 2004: 259-261.

Xu, J., et al.Protective effect of Oren-geoku-to (Huang-Lian-Jie-Du-Tang) against impairment of learning and memory induced by transient cerebral ischemia in mice. Journal of Ethanopharmacology.2000 : 405-413.

ภาคผนวก

ผลข้อมูลดิบ (RAW DATA)

จำนวนหนูที่รอดชีวิตจากเทคนิคการผ่าตัดด้วยเทคนิค 2VO ในแต่ละกลุ่ม

Survival data of 2VO				
Group	No.Initial mice	No.survival mice	No.death	% survied
5.CMC+2VO+CMC	17	10	7	58
6.ECa+2VO+CMC	15	11	4	73
7.CMC+2V0+ECa	27	10	17	37
8.ECa+2VO+ECa	14	10	4	71

Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval	☐ Original ☐ Renew
Animal Use Protocol No. 10-33-016	**Approval No. 10-33-016**

Protocol Title
Preventive effect of standardize extract of *Centella asiatica* ECa 233 on cognitive deficits induced by cerebral ischemia in mice

Principal Investigator
Mayuree Tantisira, Ph.D.

Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC)
This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.

Date of Approval	**Date of Expiration**
May 17, 2010	May 17, 2011

Applicant Faculty/Institution
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Rd., Pathumwan BKK-THAILAND. 10330

Signature of Chairperson	**Signature of Authorized Official**
	Parkpoom Tengamnuay
Name and Title	**Name and Title**
THONGCHAI SOOKSAWATE, Ph.D. Chairman	PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D. Associate Dean (Research and Academic Service)

The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.

This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายยุทธพร สุขวิชัย

เกิดวันที่ 28 กันยายน พ.ศ.2526

ภูมิลำเนา จังหวัดมหาสารคาม

จบการศึกษา เภสัชศาสตรบัณฑิต มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ ปีการศึกษา 2550

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

Sukwichai, Y., Patarapanich, C., Tantisira, B., and Tantisira, M.H. Positive modulation of cognitive function by standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 in normal mice. Proceeding of the Nine NRCT–JSPS Joint Seminar : Natural Medicine Research for the Next Decade : New Challenges and Future Collaboration. Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, Bangkok. 2010.