

ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองของหนูเมาส์
ที่มีภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำจากการเหนี่ยวนำโดยการฉีดบีตาแอมิโลยด์25-35

นางสาวณัฐนันท์ โลสุวรรณรักษ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาสรีรวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์นี้ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่เก็บไว้ในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR) are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

**EFFECTS OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECA233
ON BRAIN MITOCHONDRIAL FUNCTION IN LEARNING-AND MEMORY-
IMPAIRED MICE INDUCED BY β -AMYLOID₂₅₋₃₅ INJECTION**

Miss Nattanan Losuwannarak

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

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของ
ไมโทคอนเดรียในสมองของหนูเมาส์ที่มีภาวะบกพร่องของ
การเรียนรู้และความจำจากการเหนี่ยวนำโดยการฉีดบีตาแอมิ-
ลอยด์25-35

โดย นางสาวณัฐนันท์ โล่สุวรรณรักษ์

สาขาวิชา สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก รองศาสตราจารย์ เกษักร ดร. บุญยงค์ ตันตีสีระ

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร. มยุรี ตันตีสีระ
อาจารย์ เกษักรหญิง ดร. รัชณี รอดศิริ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ เกษักร ดร. บุญยงค์ ตันตีสีระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร. มยุรี ตันตีสีระ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ เกษักรหญิง ดร. รัชณี รอดศิริ)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักร ดร. ปิติ จันทรวรร โชติ)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกษักร วิทยา จันทสูตร)

ณัฐนันท์ โล่สุวรรณรักษ์ : ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองของหนูเมาส์ที่มีภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำจากการเหนี่ยวนำโดยการฉีดบีตาแอมิลอยด์25-35. (EFFECTS OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECA233 ON BRAIN MITOCHONDRIAL FUNCTION IN LEARNING-AND MEMORY-IMPAIRED MICE INDUCED BY β -AMYLOID₂₅₋₃₅ INJECTION) อ.ที่ปรึกษาหลัก : รศ. ภก. ดร. บุญยงค์ ตันติสิทธิ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. ภญ. ดร. มยุรี ตันติสิทธิ์, อ. ภญ. ดร. รัชณี รอดศิริ, 90 หน้า.

การวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 (อีซีเอ233) ต่อการเรียนรู้และความจำ รวมถึงการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ถูกเหนี่ยวนำให้บกพร่องโดยการฉีดโปรตีนบีตาแอมิลอยด์25-35 ($A\beta_{25-35}$) เข้าทางโพรงสมองของสมองหนูเมาส์ หลังจากการฉีด $A\beta_{25-35}$ ให้อีซีเอ233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 7 วัน วันละ 2 ครั้งโดยการป้อนแก่หนูเมาส์ แล้วการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วย Novel object recognition model จากนั้นทำให้หนูเสียชีวิตอย่างสงบ แยกสมองหนูมาแบ่งกลุ่มเพื่อวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียและวัดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันโดยการวัดระดับ MDA ผลการทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ มีการเรียนรู้และความจำบกพร่องเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มที่ไม่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ (กลุ่ม sham) และมีระดับ MDA สูงกว่าหนูกลุ่ม sham ส่วนหนูที่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ และได้รับอีซีเอ233 ทั้ง 2 ขนาดมีการเรียนรู้และความจำดีกว่าหนูที่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ อย่างเดียว รวมทั้งช่วยลดระดับ MDA ที่เกิดขึ้นในสมอง แต่ไม่พบว่าไมโทคอนเดรียจากสมองหนูที่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ มีอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียของสมองแตกต่างจากหนูกลุ่ม sham แต่อย่างไร เมื่อทำการทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro* โดยการแยกไมโทคอนเดรียจากสมองหนูปกติมา incubate กับ KCN ซึ่งเป็นตัวยับยั้งจำเพาะของ complex IV ในไมโทคอนเดรียเพื่อยับยั้ง กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน ความเข้มข้นของ KCN ที่ใช้ในการทดลองนี้คือ IC50 ซึ่งเท่ากับ 0.3 มก./มล. ผลการทดลองพบว่า การ incubate ไมโทคอนเดรียกับอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ (10 – 100 มก./มล. ใน DMSO) ไม่สามารถช่วยเพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งโดย KCN ได้ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการที่อีซีเอ233 ช่วยฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำใน Novel object recognition และการลดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันได้นั้น ไม่ได้เป็นผลมาจากกลไกการช่วยปกป้องไมโทคอนเดรีย แต่อาจเป็นมาจากกลไกอื่นๆ ภายในเซลล์ซึ่งต้องศึกษาต่อไปในอนาคต

ภาควิชา เกษตรวิทยาและสัตววิทยา.....	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา สัตววิทยา.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....
ปีการศึกษา 2554.....	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....
	ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม.....

5176561833 : MAJOR PHYSIOLOGY

KEYWORDS : β -amyloid₂₅₋₃₅/ Novel object recognition task/ Mitochondria/ The standardized extract of *Centella asiatica*/ ECa233

NATTANAN LOSUWANNARAK: EFFECTS OF THE STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECA233 ON BRAIN MITOCHONDRIAL FUNCTION IN LEARNING-AND MEMORY-IMPAIRED MICE INDUCED BY β -AMYLOID₂₅₋₃₅ INJECTION. ADVISOR: ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., RATCHANEE RODSIRI, Ph.D., 90 pp.

This study aimed to investigate the effects of the standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 (ECa233) on brain mitochondrial function and cognitive function impairment induced by intracerebroventricular injection of β -amyloid₂₅₋₃₅ ($A\beta_{25-35}$) into mouse. ICR mice were orally treated with 10 or 30 mg/kg body weight of ECa233 twice a day for 7 days after $A\beta_{25-35}$ injection. Learning and memory was investigated using Novel object recognition model. After euthanasia, the brain was isolated and subjected to measurement of mitochondrial oxygen consumption and lipidperoxidation level determination using MDA as a marker of oxidative stress. The results demonstrated that $A\beta_{25-35}$ injected mice displayed cognitive impairment and elevation of brain MDA level when compared to sham. Both 10 and 30 mg/kg body weight ECa233 recovered learning and memory impairment accompanied by MDA level reduction when compared to $A\beta_{25-35}$ injected mice. However, no difference in mitochondrial oxygen consumption among sham, $A\beta$ -treated and $A\beta$ +Eca treated group were observed. The effect of ECa233 on mitochondrial function was further conducted *in vitro*. Brain mitochondria isolated from untreated mice was incubated with KCN (specific complex IV inhibitor). IC50 of KCN to mitochondrial function (0.3 mg/ml) was selected to investigate effects of ECa233. The results showed that incubation with different concentrations of ECa233 (10-100 mg/ml DMSO) did not recover KCN-induced mitochondrial function deficit.

The results obtained indicated that improvement of learning and memory impairment in novel object recognition and reduced oxidative stress from $A\beta_{25-35}$ elicited by ECa233 could not be accounted by its effect on mitochondrial function. Some other cellular mechanism of ECa233 should be further investigated.

Department : Pharmacology and Physiology Student's Signature

Field of Study : Physiology Advisor's Signature

Academic Year : 2011 Co-advisor's Signature

Co-advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ภก. ดร. บุญยงค์ ตันติสิระ ที่ได้กรุณาเสนอแนะแนวทางในการทำวิทยานิพนธ์นี้ รวมถึงความช่วยเหลือ คำแนะนำ กำลังใจ และทุกๆ สิ่งที่ได้ช่วยให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงได้ และข้าพเจ้าขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมอีกสองท่านคือ รศ. ภาณุ. ดร. มยุรี ตันติสิระ และ อ. ภาณุ. ดร. รัชนี รอดศิริ ที่ได้กรุณาช่วยเหลือและให้คำปรึกษาในด้านการทำทดลองต่างๆ รวมถึงการช่วยเหลือในการเตรียมตัวเพื่อนำเสนอผลงานทางวิชาการ

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่ได้กรุณาเสียสละเวลาอันมีค่าในการแนะนำและเสนอแนะแนวคิดและข้อมูลอันเป็นประโยชน์ในการทำการศึกษาวิทยานิพนธ์และช่วยให้วิทยานิพนธ์นี้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณบัณฑิตวิทยาลัยสำหรับทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งเป็นแหล่งเงินทุนในการสนับสนุนค่าใช้จ่ายในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ภาณุ. อภิญญา ฐปมงคล นิสิตปริญญาโท สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือในการทำทดลองในงานวิจัยนี้

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่าน รวมถึงเจ้าหน้าที่ในภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ สำหรับความความห่วงใยและกำลังใจแก่ข้าพเจ้าตลอดการทำวิจัย ขอขอบคุณ นิสิตปริญญาโทและปริญญาเอกในภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ที่ได้ช่วยอำนวยความสะดวก ให้คำแนะนำและให้กำลังใจแก่ข้าพเจ้ามาโดยตลอดเช่นกัน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 บทความปริทัศน์.....	5
- โรคอัลไซเมอร์.....	5
- ไมโทคอนเดรีย.....	8
- ความสัมพันธ์ของบีตาแอมิลอยด์ ไมโทคอนเดรีย และโรคอัลไซเมอร์.....	11
- บั้วบก.....	12
- สารสกัดมาตรฐานบั้วบก อีซีเอ233.....	14
- โมเดลจำลองการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในสัตว์ทดลอง.....	14
- โมเดลสำหรับทดสอบพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำ.....	16
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	21
- วัสดุอุปกรณ์.....	21
- สัตว์ทดลอง.....	21
- สารเคมี.....	21
- เครื่องมือ.....	22
- อุปกรณ์.....	23
- วิธีการทดลอง.....	24
- การเตรียมสารละลายบีตาแอมิลอยด์25-35.....	24
- การเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยการฉีด บีตาแอมิลอยด์25-35.....	24

- การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง.....	24
- การบริหารยา (อีซีเอ233).....	25
- การทดสอบพฤติกรรม (Behavioural test).....	26
- การทดสอบพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำ	
โมเดล Novel object recognition.....	26
- การทดสอบพฤติกรรมเคลื่อนไหวก้าว (Locomotor activity test).....	27
- การทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	28
- การเตรียมไมโทคอนเดรียจากสมองของหนูเมาส์.....	28
- วิธีการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย.....	28
- การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแบบ <i>in vitro</i>	33
- การหาค่า IC50 ของสารละลาย KCN.....	34
- การศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	35
- การศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรีย	
ที่ถูกยับยั้งการทำงานของ cytochrome c oxidase ด้วย KCN.....	35
- การวัดปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation assay).....	36
- การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....	37
4 ผลการวิจัย.....	38
- ผลของบีตาแอมิโลยด์25-35 และสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อ	
การทำงานของ ประสาทยนต์ (Locomotor activity) ของหนูเมาส์.....	38
- ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อความจำของหนูเมาส์	
ที่ได้รับบีตาแอมิโลยด์25-35.....	39
- ผลการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสมองหนู	
ที่ถูกฉีดบีตาแอมิโลยด์25-35.....	44
- ผลการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแบบ <i>in vitro</i>	45
- การหา IC50 ของ KCN.....	45
- ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	46
- ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN.....	47
- ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน	
ในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับบีตาแอมิโลยด์25-35.....	48
5 อภิปรายผลการวิจัย.....	50

รายการอ้างอิง.....	55
ภาคผนวก.....	66
ภาคผนวก ก.....	67
ภาคผนวก ข.....	69
ภาคผนวก ค.....	75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	77

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง.....	25
2 แสดง state ต่างๆ ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย.....	29

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 แสดงกระบวนการตัดสาย APP	7
2 แสดงกลไกภายในเซลล์ประสาทที่เกิดจากการสะสมของ A β	8
3 แสดงโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย.....	9
4 กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน และการสังเคราะห์ ATP	10
5 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Delayed non-matching to sample.....	16
6 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Morris water maze.....	17
7 แสดงอุปกรณ์การทดสอบ Radial arms maze.....	18
8 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Step through test.....	19
9 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Step down test.....	20
10 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Y-maze.....	20
11 อุปกรณ์และวิธีทดสอบ Novel object recognition.....	21
12 แผนผังแสดงแผนการดำเนินการวิจัย.....	20
13 แสดงวิธีการทดสอบ Novel object recognition (NOR).....	27
14 อุปกรณ์ Locomotor activity test.....	27
15 แสดงส่วนประกอบและการทำงานของ biological oxygen chamber.....	29
16 แสดงส่วนประกอบของ oxygen electrode.....	30
17 oxygraph tracing แสดงวิธีการหาค่าต่างๆ สำหรับการคำนวณหาค่า RCI.....	31
18 oxygraph tracing แสดงวิธีการหาค่าต่างๆ สำหรับการคำนวณ อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย.....	31
19 แผนภูมิแสดงการใส่สารต่างๆ ในการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนใน oxygen chamber ในการหาค่า IC50 ของ KCN.....	34
20 แผนภูมิแสดงการใส่สารต่างๆ ในการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนใน oxygen chamber ในการศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	35
21 แผนภูมิแสดงการใส่สารต่างๆ ในการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนใน oxygen chamber ในการศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	35
22 แสดงกลไกการเกิด Lipid peroxidation.....	36
23 แสดงผลต่อการทำงานของประสาทยนต์ (Locomotor activity).....	38

24	แสดงเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง Sample trial.....	40
25	แสดงเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง Test trial.....	41
26	แสดงค่า %PI ของหนูกลุ่มต่างๆ ในการสำรวจวัตถุใหม่ในช่วง Test trial.....	42
27	แสดงผลรวมของเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้น ในช่วง Sample trial.....	43
28	แสดงผลรวมของเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้น ในช่วง Test trial.....	43
29	แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรีย ในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ.....	44
30	แสดงผลการหาค่า KCN IC50.....	46
31	แสดงผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย.....	47
32	แสดงผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN.....	48
33	แสดงปริมาณของ MDA ในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ.....	49

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

กก.	=	กิโลกรัม
ซม.	=	เซนติเมตร
มก.	=	มิลลิกรัม
มคล.	=	ไมโครลิตร
มม.	=	มิลลิเมตร
มล.	=	มิลลิลิตร
A β	=	Beta-amyloid
AD	=	Alzheimer's disease
ADP+Pi	=	Adenosine diphosphate + inorganic phosphate
ANOVA	=	Analysis of variance
APOE	=	Apolipoprotein E
APP	=	Amyloid precursor protein
ATP	=	Adenosine Triphosphate
BSA	=	Bovine serum albumin
CMC	=	Carboxymethylcellulose
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
ECa233	=	The standardized extract of <i>Centella asiatica</i> ECa233
IC50	=	The half maximal inhibitory concentration
i.c.v.	=	intracerebroventricular
KCN	=	Potassium cyanide
MDA	=	Malondialdehyde
mtDNA	=	Mitochondrial DNA
NFT	=	Neurofibrillary tangle
NMDA	=	N-Methyl-D-aspartic acid หรือ N-Methyl-D-aspartate
NOR	=	Novel object recognition
3-NPA	=	3-Nitropropionic acid
O	=	Oxygen atom

PS	=	Presenilin
ROS	=	Reactive oxygen species
rpm	=	rounds per minute
STZ	=	Streptozotocin
2-VO	=	2-vessel occlusion

บทที่ 1

บทนำ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease, AD) เป็นโรคที่เกิดจากภาวะเสื่อมของเซลล์ประสาท (Neurodegenerative disease) อันเป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของภาวะหลงลืม (Dementia) โรคนี้เป็นโรคที่พบมากในผู้สูงอายุ จากการสำรวจในปีพ.ศ. 2554 ในประเทศสหรัฐอเมริกาพบว่าประชากรที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไป เป็นโรคอัลไซเมอร์ถึง 5.4 ล้านคน คิดเป็น 13% ของประชากรผู้สูงอายุทั้งหมด ซึ่งพบว่า 96% ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ เป็นชนิด late-onset (Alzheimer's association, 2011) จากการสำรวจของสถาบันเวชศาสตร์ผู้สูงอายุและโรงพยาบาลในจังหวัดต่างๆ ของประเทศไทย ระหว่างปี พ.ศ. 2537 - 2543 พบความชุกของกลุ่มอาการความจำเสื่อมประมาณ 3-4% จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด ซึ่งสาเหตุของอาการความจำเสื่อมส่วนใหญ่มาจากโรคอัลไซเมอร์ (กัมมันต์ พันธุมจินดา, 2536, พันัส รัชญะกิจไพศาล, 2544, วันดี โภคะกุล, ม.ป.ป.)

โรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง มีลักษณะการดำเนินโรคเป็นไปอย่างช้าๆ โดยมีการแบ่งอาการออกเป็น 3 ระยะ ระยะที่หนึ่ง ผู้ป่วยมีอาการหลงลืมที่ไม่รุนแรง เป็นการลืมที่รบกวนการดำเนินชีวิตประจำวันของผู้ป่วย ส่วนมากมักจะแยกไม่ออกระหว่างโรคอัลไซเมอร์กับภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เป็นอาการหลงลืมตามธรรมชาติที่เกิดในผู้สูงอายุ (Mild cognitive impairment) ระยะที่สอง ผู้ป่วยมีความบกพร่องของความจำและการเรียนรู้โดยเฉพาะความจำหรือความรู้ใหม่ มีอาการบกพร่องทางภาษา มีปัญหาในการเคลื่อนไหวที่ซับซ้อนและการวางแผน อารมณ์แปรปรวน ระยะสุดท้าย ผู้ป่วยมีอาการหลงลืมที่รุนแรงจนไม่สามารถทำกิจกรรมต่างๆ ในชีวิตประจำวันด้วยตัวเองได้ มีลักษณะของภาวะไร้อารมณ์และอ่อนเพลีย การเคลื่อนไหวร่างกายลดลง และเสียชีวิตเนื่องจากปัจจัยแทรกซ้อน (พันัส รัชญะกิจไพศาล, 2544)

พยาธิสภาพที่สำคัญของโรคอัลไซเมอร์ คือ โครงสร้างที่มีลักษณะเป็นคราบของ โปรีติน บีตาแอมิลอยด์ (amyloid plaque หรือ senile plaque) ร่วมกับมี neurofibrillary tangles (NFT) ที่เกิดจากการเกาะกลุ่มกันของโปรีตินเทา (tau protein) ที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) (Copstead และ Banasik, 2000) จากการศึกษากลไกการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันพบว่า ความผิดปกติของไมโทคอนเดรียเป็นกลไกสำคัญกลไกหนึ่งของการเกิดโรคอัลไซเมอร์ชนิด late-onset ซึ่งเกิดในผู้สูงอายุ เมื่ออายุมากขึ้น ความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียจะลดลง ส่งผลให้การสังเคราะห์พลังงานของไมโทคอนเดรียลดลงและเกิด reactive oxygen species (ROS) มาก

ขึ้น ส่วนโปรตีนบีตาเอมิลอยด์ (beta-amyloid, A β) ที่เกาะกันเป็น amyloid plaque ที่ผิวเซลล์จะเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยการสร้างอนุมูลอิสระ นอกจากนี้โปรตีน A β ที่อยู่ในเซลล์ยังสามารถยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย ทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่องไป และเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress มากขึ้น กระบวนการเหล่านี้นำไปสู่การเกิด apoptotic cell death ของเซลล์ประสาท (Anandatheerthavarada และคณะ, 2003, Yan และคณะ, 2004, Anandatheerthavarada และคณะ, 2007, Crouch และคณะ, 2008, Tillement และคณะ, 2011) ยารักษาโรคอัลไซเมอร์ในปัจจุบันไม่สามารถแก้ไขความผิดปกติที่เป็นสาเหตุแท้จริงของโรคอัลไซเมอร์ได้ ยารักษาโรคอัลไซเมอร์กลุ่มหนึ่ง ได้แก่ Donepezil, Galantamine และ Rivastigmine ออกฤทธิ์โดยยับยั้งเอนไซม์ cholinesterase เพิ่มการทำงานของระบบโคลิเนอร์จิกในสมอง ยารักษาโรคอัลไซเมอร์อีกกลุ่มหนึ่ง ได้แก่ Memantine ออกฤทธิ์เป็น NMDA receptor antagonist จากการศึกษาในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์พบว่ายารักษาโรคอัลไซเมอร์ที่มีใช้ยูนีช่วยทำให้ผู้ป่วยมีความจำที่ดีขึ้นชั่วคราวแต่ไม่สามารถยับยั้งการดำเนินของโรคได้ สุดท้ายผู้ป่วยอัลไซเมอร์จะกลับมามีอาการหลงลืมอีกและรุนแรงกว่าเดิม (Dipiro และคณะ, 2011, Cummings และคณะ, 2008, Ito และคณะ, 2010)

บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) เป็นพืชที่ใช้รับประทานเป็นอาหารและใช้เป็นสมุนไพรในประเทศไทยมานาน ในตำราอายุรเวทและตำราแพทย์แผนจีนโบราณมีการใช้บัวบกเป็นยาในการรักษาอาการทางระบบประสาทส่วนกลางหลายอย่าง เช่น บรรเทาอาการหลงลืม คลายกังวล เป็นต้น (Sivarajan และ Balachandran, 1994) สารออกฤทธิ์ที่พบในบัวบกเป็นสารกลุ่ม triterpenoid ทั้งในรูป sapogenin คือ asiatic acid กับ madecassic acid และรูป glycoside คือ asiaticoside กับ madecassoside มีการศึกษาหลายการศึกษาที่รายงานถึงฤทธิ์ต่างๆ ของสารสกัดบัวบกทั้งในรูปสารสกัดหยาบ และสารบริสุทธิ์ ได้แก่ ฤทธิ์ด้านการอักเสบ ฤทธิ์สมานแผล ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหารและลำไส้ ฤทธิ์รักษาความผิดปกติของหลอดเลือดดำ ฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ฤทธิ์คลายกังวล ฤทธิ์ต้านซึมเศร้า (DerMarderosian และ Beutler, 2010, Carpinella และ Rai, 2009, Brinkhaus และคณะ, 2000, Wijeweera และคณะ, 2006) จากการศึกษาของ Shinomol และ Muralidhara (2008) ซึ่งแบ่งเป็น 2 การทดลอง การทดลองแรกเป็นการศึกษาในหนูเมาส์ปกติและหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในสมองโดยการฉีด 3-NPA ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ succinate dehydrogenase หรือ complex II ของไมโทคอนเดรีย พบว่า หนูที่ถูกฉีด 3-NPA และได้รับอาหารที่ผสมผงใบบัวบก ความเข้มข้น 0.5% และ 1% มีระดับ malondialdehyde, ROS, hydrogenperoxide และ protein carbonyl ลดลง และมีระดับ glutathione เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่ถูกฉีด 3-NPA แต่ไม่ได้รับบัวบก

ในอาหาร การทดลองที่ 2 เป็นการศึกษาในไมโทคอนเดรียที่ถูกแยกมาจากสมองหนูเมาส์ปกติโดย incubate ไมโทคอนเดรียกับสารสกัดบัวบกเป็นเวลา 30 นาที จึงเติม 3-NPA ความเข้มข้น 2 มิลลิโมลาร์ แล้ว incubate ต่อเป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปวัดระดับ malondialdehyde, ROS, hydrogenperoxide พบว่าสารสกัดบัวบกสามารถยับยั้งการเกิด malondialdehyde, ROS, hydrogenperoxide ได้ในลักษณะ dose-dependent การศึกษาเกี่ยวกับการเรียนรู้ในสัตว์ทดลอง พบว่าการให้สารสกัดบัวบกขนาด 200 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วันสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูแรทปกติในการทดสอบ Shuttle box, Step through และ Step down test (Veerendra Kumar และ Gupta, 2002) และการให้สารสกัดบัวบกขนาด 200 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วันสามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำของหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหลงลืมโดยการฉีด Streptozotocin เข้าสู่โพรงสมองเมื่อทดสอบด้วย Step through test (Veerendra Kumar และ Gupta, 2003) นอกจากนี้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดบัวบกในผู้สูงอายุ สุขภาพดี พบว่าการรับประทานสารสกัดบัวบกขนาด 750 มก.ต่อวันเป็นเวลา 30 และ 60 วันมีผลเพิ่มความสามารถในการจดจำในผู้สูงอายุสุขภาพดี เมื่อทดสอบด้วยแบบทดสอบ auditory oddball paradigm และการทดสอบต่างๆ ใน CDR computerized assessment battery test ซึ่งเป็นการทดสอบความจำชนิด Working memory และ Spatial memory เทียบกับอาสาสมัครที่ได้รับยาหลอก และในการประเมินอารมณ์ของอาสาสมัครด้วยแบบประเมินของ Bond-Lader คณะผู้วิจัยพบว่าการรับประทานสารสกัดบัวบกขนาด 750 มก.ต่อวันเป็นเวลา 30 และ 60 วันมีผลเพิ่มภาวะ Alertness และ Calmness ในผู้สูงอายุเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก ซึ่งภาวะอารมณ์ทั้ง 2 อย่างนี้เป็นอารมณ์เชิงบวกที่ส่งผลต่อความจดจำในการเรียนรู้และจดจำ (Wattanathorn และคณะ, 2007)

จากผลการศึกษาดังกล่าวข้างต้นที่พบว่าบัวบกมีฤทธิ์ช่วยรักษาความผิดปกติของการเรียนรู้และความจำได้ แต่ปัญหาหนึ่งในการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพรคือความแปรปรวนของปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้ในแต่ละครั้ง คณะจารย์คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยจึงได้พัฒนาสารสกัดบัวบกได้เป็นสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 (ECa233) ซึ่งเป็นสารสกัดที่มีสีขาวนวล ปริมาณสารสำคัญคือ Triterpenoids ไม่น้อยกว่า 80% และมีอัตราส่วนระหว่าง madecassoside และ asiaticoside เป็น 1.5 ± 0.5 จากการทดสอบฤทธิ์ของอีซีเอ233 พบว่าการให้อีซีเอ233 เป็นเวลา 15 วันสามารถฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้หลงลืม โดยการทำให้ 2-vessel occlusion (2-VO) และโดยการฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าทางโพรงสมอง (intracerebroventricular injection หรือ i.c.v. injection) ในการทดสอบ Morris water maze test และ Step down test (ยุทธพร สุขวิชชัย, 2553, อัญชลี คำเอก, 2552)

อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองของหนูเมาส์ การวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองของสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ โดยการฉีด AB_{25-35} ทาง i.c.v. ซึ่งเป็นโมเดลจำลองโรคอัลไซเมอร์ในสัตว์ทดลอง

วัตถุประสงค์

1. ศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยการฉีดบีตาแอมิลลอยด์25-35 เข้าสู่โพรงสมองโดยใช้โมเดล Novel object recognition
2. ศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียจากสมองหนูเมาส์

ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย

ได้ข้อมูลสนับสนุนในการวิจัยและพัฒนาสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 เป็นยาหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารสำหรับรักษาภาวะหลงลืม

บทที่ 2

บทความปริทัศน์

โรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease หรือ AD) เป็นโรคความจำเสื่อมชนิดที่เกิดจากภาวะเสื่อมของสมองซึ่งเป็นโรคความจำเสื่อมชนิดที่พบบ่อยที่สุด มีอุบัติการณ์สูงในผู้ที่มีอายุ 65 ขึ้นไป การดำเนินโรคเป็นไปอย่างช้าๆ และไม่สามารถรักษาให้หายได้ ผู้ป่วยมักมีชีวิตอยู่ได้อีกประมาณ 4 - 8 ปีหลังได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคอัลไซเมอร์ โรคอัลไซเมอร์แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามรูปแบบการเกิดของโรค ได้แก่

1. Familial Alzheimer's Disease (FAD) หรือ Early-onset AD

เป็นโรคอัลไซเมอร์ชนิดที่พบน้อยมาก ประมาณ 5% ของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ทั้งหมด พบอุบัติการณ์ในผู้ที่อายุ 30-60 ปี มีสาเหตุมาจากการกลายพันธุ์ของยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 21, 14 หรือ 1 ซึ่งส่งผลให้โปรตีนที่สร้างจากยีนเหล่านี้อันได้แก่ amyloid precursor protein (APP), presenilin 1 และ presenilin 2 ตามลำดับ ผิดปกติไป โปรตีนเหล่านี้ โดยเฉพาะ APP ทำให้เกิดโปรตีน β -amyloid เพิ่มขึ้น รูปแบบการถ่ายทอดนี้เป็นแบบ autosomal dominant ดังนั้นผู้ที่มีพ่อหรือแม่เพียงฝ่ายใดฝ่ายหนึ่งมียีนกลายพันธุ์เหล่านี้เพียงยีนใดยีนหนึ่งจะมีโอกาสเป็นโรคอัลไซเมอร์ชนิดนี้ถึง 50%

2. Sporadic Alzheimer's Disease (SAD) หรือ Late-onset AD

เป็นโรคอัลไซเมอร์ชนิดที่เกิดในผู้ที่มีอายุ 65 ปีขึ้นไป สาเหตุเกิดจากความเสื่อมตามอายุของสมอง มีรายงานว่ายีน apolipoprotein E (APOE) ซึ่งอยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 19 มีความเกี่ยวข้องกับโรคอัลไซเมอร์ APOE มี 3 isoform ได้แก่ APOE ϵ 2, APOE ϵ 3 และ APOE ϵ 4 ผู้ที่มียีน APOE ϵ 4 จะมีความเสี่ยงเป็นโรคอัลไซเมอร์มากขึ้น โดยผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ประมาณ 40% ตรวจพบว่า มี APOE ϵ 4 allele อย่างไรก็ตามการมียีน APOE ϵ 4 ไม่ใช่ตัวบ่งชี้ว่าคนผู้นั้นจะต้องเป็นอัลไซเมอร์ และยังไม่ทราบความสัมพันธ์ระหว่าง APOE ϵ 4 กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ (Copstead และ Banasik, 2000, Higgins และคณะ, 1997)

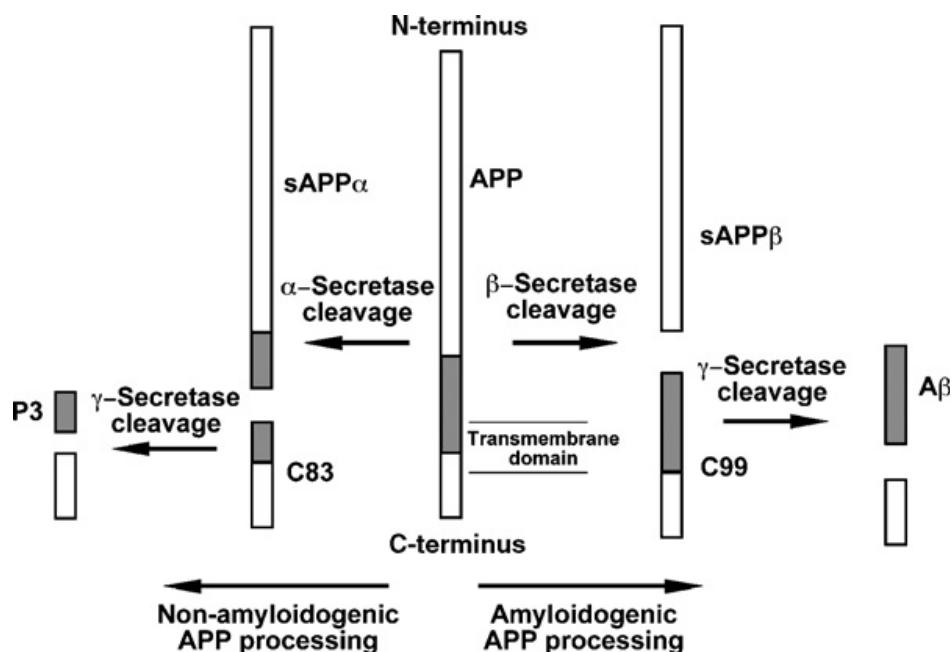
พยาธิสภาพของสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์คือ มีการฝ่อของสมองเกิดขึ้นในหลายบริเวณ เนื่องจากการตายของเซลล์ประสาทในสมองจำนวนมาก ลักษณะทางพยาธิสรีรวิทยาของสมองของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ที่สำคัญ ได้แก่ การเกิด neurofibrillary tangles และ amyloid plaques (Underwood, 2004, Smith และคณะ, 2002)

1. โปรตีนเทา และการเกิด neurofibrillary tangles (NFT)

โปรตีนเทาเป็น adhesive protein ที่เกาะอยู่บนสายไมโครทิวบูล มีหน้าที่รักษาสภาพของโครงร่างเซลล์ประสาท เช่น รักษาโครงสร้างและการทำงานของไมโครทิวบูล พบมากในแอกซอนของเซลล์ประสาท เมื่อโปรตีนเทาถูกเติมหมู่ฟอสเฟตจะทำให้ความสามารถในการเกาะบนไมโครทิวบูลเสียไป ปกติการเกิด phosphorylation และ dephosphorylation ของโปรตีนเทาถูกควบคุมโดยเอนไซม์ protein kinase และ phosphatase หากเกิดความผิดปกติที่ตำแหน่ง phosphorylate บนสายโปรตีนเทา หรือเกิดความผิดปกติของเอนไซม์ phosphatase จะทำให้โปรตีนเทาถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากเกินไป (hyperphosphorylation) โปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟต (hyperphosphorylated tau protein) เหล่านี้จะรวมตัวกันเป็น NFT มีลักษณะเป็นสายยาวของโปรตีน 2 เส้นพันกันเป็นเกลียว (Paired helical filaments) อยู่ภายในเซลล์ ขัดขวางการทำงานของออร์แกเนลล์ต่างๆ ภายในเซลล์ นอกจากนี้ เมื่อโปรตีนเทาหลุดจากไมโครทิวบูลไปมาก ไมโครทิวบูลจะสูญเสียโครงสร้างและความสามารถในการทำงาน เช่น การขนส่งสารไปตามแอกซอน เป็นต้น ส่งผลให้การสื่อสารสัญญาณประสาททางไซแนปส์บกพร่องและเซลล์สูญเสียการทำงาน จากการศึกษาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ที่เสียชีวิตพบ NFT รวมกันหนาแน่นที่บริเวณ entorhinal cortex และ hippocampus ซึ่งเป็นบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ (Avila และคณะ, 2004, Lace และคณะ, 2009)

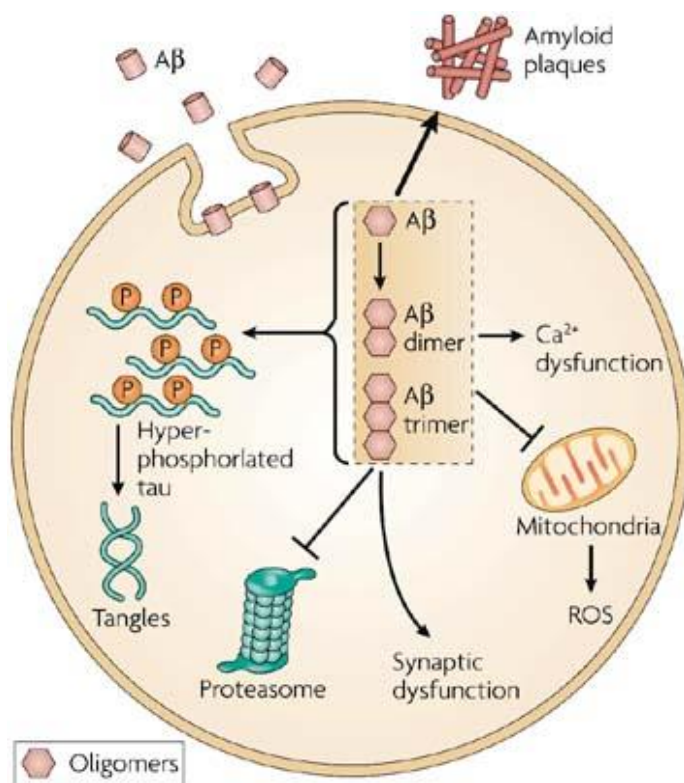
2. บีตาแอมิลอยด์ (β -amyloid) และการเกิด amyloid plaques (senile plaques)

ในเซลล์ประสาทปกติมีการสร้าง amyloid precursor protein (APP) ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารสัญญาณประสาทบริเวณไซแนปส์ (Den Heuvel และคณะ, 2007) APP ถูกตัดโดยเอนไซม์ secretase หลาย isoforms APP ที่ถูกตัดโดยเอนไซม์ α -secretase ที่ตำแหน่ง C83 จะได้ผลิตภัณฑ์สุดท้ายเป็น โปรตีน P3 ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ละลายน้ำและไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ แต่ถ้า APP ถูกตัดด้วย β -secretase ที่ตำแหน่ง C99 และสายเปปไทด์ที่ได้นั้นถูกตัดอีกครั้งด้วย γ -secretase จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น $A\beta$ ซึ่งมีอยู่ 2 แบบคือ สาย $A\beta$ ที่มี 40 amino acids ($A\beta_{1-40}$) ซึ่งกระบวนการตัดเกิดใน trans-Golgi network กับ $A\beta$ ที่มี 42 amino acids ($A\beta_{1-42}$) ซึ่งกระบวนการตัดเกิดใน endoplasmic reticulum (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 แสดงกระบวนการตัดสาย APP (Crouch และคณะ, 2008)

A β_{1-42} ละลายน้ำได้น้อยกว่าจึงจับตัวกันและตกตะกอนได้ง่ายกว่า A β_{1-40} ทั้ง A β_{1-40} และ A β_{1-42} ถูกสร้างภายในเซลล์ และถูกขนส่งออกมานอกเซลล์แล้วรวมตัวกันเป็น plaques บนผิวเซลล์ A β สร้างความเสียหายให้กับเซลล์ประสาทโดยเหนี่ยวนำให้เกิด oxidative stress ผ่านทางกลไก เช่น รวมตัวกันเป็น pore ที่ผิวเซลล์ทำให้แคลเซียมไหลเข้าเซลล์มากขึ้น เหนี่ยวนำให้เกิด excitotoxicity โดยกระตุ้นผ่าน NMDA receptor และภาวะ excitotoxicity นี้ยังเป็นการกระตุ้นให้เกิด hyperphosphorylation ของโปรตีนเทา ซึ่งส่งผลต่อเซลล์ประสาทดังกล่าวมาแล้ว โปรตีน A β ภายในเซลล์ส่วนหนึ่งเข้ายับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียสร้าง adenosine triphosphate (ATP) ได้น้อยลงและเกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น เป็นต้น นอกจากนี้ A β ยังเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ โดย prostaglandin/arachidonic acid ที่หลั่งจาก astrocyte ซึ่งกระตุ้น microglia ให้ปลดปล่อย neurotoxic factors และอนุมูลอิสระจำนวนมาก ความเสียหายทั้งจากภายในและภายนอกเซลล์เหล่านี้ส่งผลให้เซลล์ประสาทตายแบบ apoptosis ทำให้เซลล์ประสาทในสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ลดจำนวนลง (Maurice และคณะ, 1996a, 1996b, Harkany และคณะ, 1999, Findeis, 2007, Butterfield และคณะ, 2010) (รูปที่ 2)

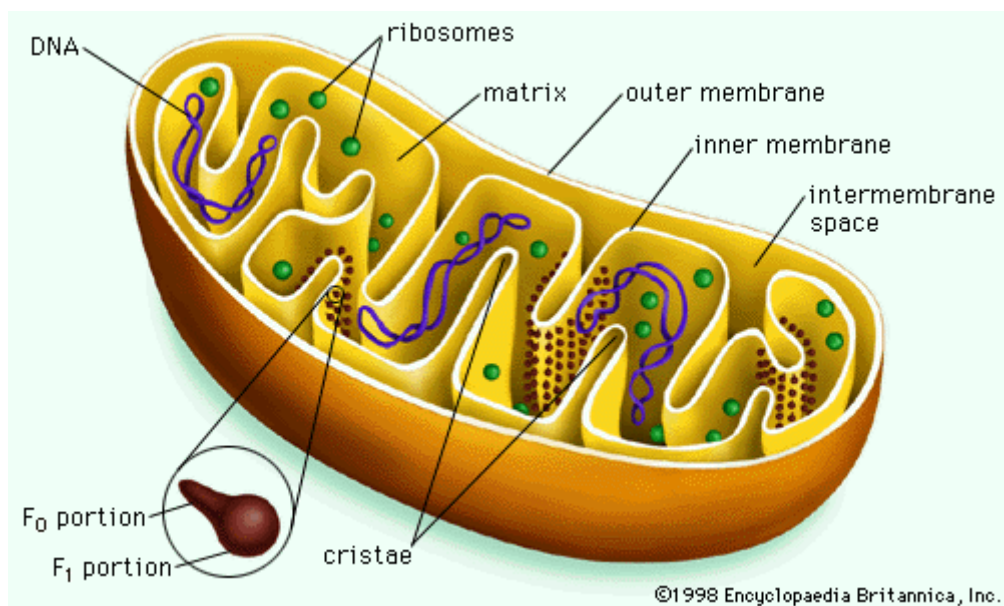


Nature Reviews | Neuroscience

รูปที่ 2 แสดงกลไกภายในเซลล์ประสาทที่เกิดจากการสะสมของ A β (LaFerla และคณะ, 2007)

ไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตและการทำงานของเซลล์ เนื่องจากเป็นแหล่งสังเคราะห์สารพลังงานสูงหรือ adenosine triphosphate (ATP) ไมโทคอนเดรียมีเยื่อหุ้ม 2 ชั้น คือ เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) และเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) ระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับเยื่อหุ้มชั้นในเป็นช่องว่างเรียกว่า intermembrane space ช่องว่างภายในเยื่อหุ้มชั้นในประกอบด้วยของเหลวเรียกว่า matrix เยื่อหุ้มชั้นในมีการพับและยื่นเข้าไปใน matrix เรียกว่า cristae เยื่อหุ้มชั้นนอกมี porin ซึ่งเป็น channel ที่ยอมให้โมเลกุลขนาดไม่เกิน 5,000 ดาลตันผ่านเข้า เช่น โมเลกุลที่ใช้ในกระบวนการสังเคราะห์ ATP ส่วนเยื่อหุ้มชั้นในเป็นชั้นที่ไม่ยอมให้มีสารใดๆ ผ่านได้ กระบวนการสังเคราะห์ ATP เกิดบนเยื่อหุ้มชั้นในบริเวณ cristae โดยโปรตีน complex I, II, III, IV และ ATP synthase (FOF1-ATPase, ATPase, complex V) (รูปที่ 3)

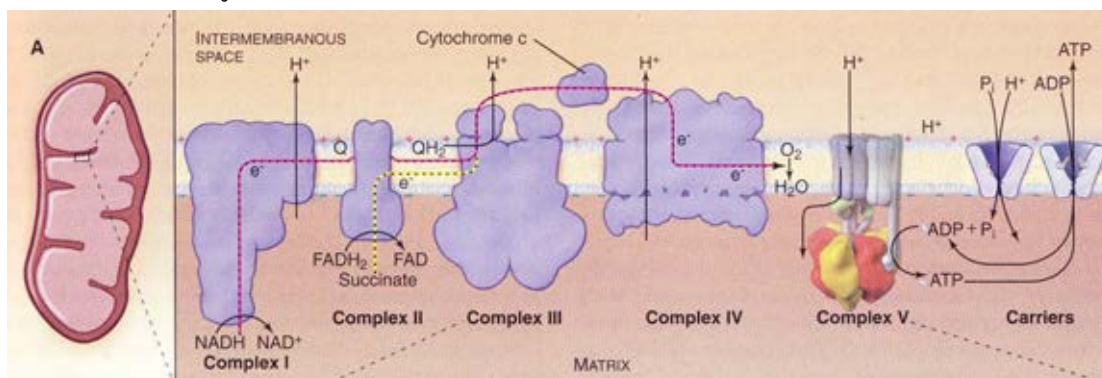


รูปที่ 3 แสดงโครงสร้างของไมโทคอนเดรีย (Encyclopaedia Britannica, 1998)

หน้าที่สำคัญของไมโทคอนเดรียคือการเปลี่ยนแปลงสารอาหารของเซลล์ เช่น กลูโคสหรือไพรูเวทเป็น ATP รักษาสมดุลแคลเซียมในเซลล์โดยการเก็บกักแคลเซียมจากไซโทซอลไว้และปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้น นอกจากนี้ไมโทคอนเดรียยังมีส่วนในกระบวนการทำงานของเซลล์หลายกระบวนการ เช่น การส่งสัญญาณประสาท การสร้างหรือเปลี่ยนแปลงโปรตีนสำหรับเซลล์ วัฏจักรเซลล์ การเปลี่ยนแปลงและเจริญเติบโตของเซลล์ กระบวนการตายของเซลล์ เป็นต้น การผลิต ATP เกิดขึ้นในกระบวนการ oxidative phosphorylation ที่เกิดขึ้นภายใน intermembrane space ของไมโทคอนเดรีย กระบวนการนี้ประกอบด้วย 2 กระบวนการคือ กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) และการสังเคราะห์ ATP (ATP synthesis) กระบวนการ electron transport chain เป็นการทำงานอย่างต่อเนื่องของโปรตีนหลายตัวได้แก่ complex I (NADH dehydrogenase), complex II (succinate dehydrogenase), complex III (cytochrome *b-c*₁ complex), complex IV (cytochrome *c* oxidase) และ complex V (ATP synthase)

กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน เริ่มจาก complex I รับอิเล็กตรอนจาก NADH และส่งต่ออิเล็กตรอนให้ ubiquinone และ ubiquinone ส่งต่อให้ complex III ส่วน complex II จะรับอิเล็กตรอนจาก FADH₂ และส่งต่ออิเล็กตรอนให้ ubiquinone แล้วส่งต่อไปให้ complex III เช่นเดียวกับ complex I หลังจากนั้น complex III จะส่งอิเล็กตรอนไปให้ cytochrome *c* ซึ่งส่งต่ออิเล็กตรอนไปให้ complex IV ที่ complex IV นี้มีการส่งอิเล็กตรอนให้ออกซิเจน (O₂) ซึ่งเป็นตัวรับอิเล็กตรอนตัวสุดท้ายได้เป็นน้ำ (H₂O) ในการส่งผ่านอิเล็กตรอนของแต่ละ complex จะมีการขับ H⁺ ออกสู่ intermembrane space ของไมโทคอนเดรีย การไหลออกของ H⁺ เหล่านี้ทำให้เกิดความแตกต่างของความเข้มข้นของ H⁺ ระหว่าง intermembrane space กับ matrix H⁺ จะแพร่กลับเข้ามา

ภายในเยื่อหุ้มชั้นในตาม concentration gradient โดยแพร่ผ่าน complex V หรือ ATP synthase การไหลกลับของ H^+ ทุกๆ 4 ตัวจะทำให้ได้พลังงานมากพอในการสร้าง ATP 1 โมเลกุล (Pollard และ Earnshaw, 2008) (รูปที่ 4)



รูปที่ 4 กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน และการสังเคราะห์ ATP (Pollard และ Earnshaw, 2008)

ในภาวะปกติเมื่อเกิดกระบวนการ oxidative phosphorylation จะมีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) เช่น superoxide จำนวนเล็กน้อยอันเกิดจากการรั่วของอิเล็กตรอนจาก complex ต่างๆ ในกระบวนการ โดยเฉพาะ complex I และ III แต่หากเกิดการยับยั้งที่ขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งของกระบวนการนี้จะทำให้การสังเคราะห์ ATP หยุดและเกิด ROS เพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งเกิดจากการที่อิเล็กตรอนจาก cytochrome *c* มา reduce โมเลกุลของออกซิเจนได้ไม่สมบูรณ์ ROS ที่เกิดขึ้นปกติจะถูกจัดการโดยสารต้านอนุมูลอิสระในไมโทคอนเดรีย เช่น superoxide dismutase (SOD) แต่หากเกิด ROS มากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นภาวะที่มีการสร้างอนุมูลอิสระมากเกินไปจนระบบต้านอนุมูลอิสระภายในไมโทคอนเดรียไม่สามารถจัดการได้ ส่งผลให้ไมโทคอนเดรียเกิดความเสียหายและกำจัดตัวเอง (autophagy) และหากภาวะ oxidative stress รุนแรงขึ้น เช่น เกิดการยับยั้งไมโทคอนเดรียจำนวนมากภายในเซลล์ เกิดการสร้างอนุมูลอิสระขึ้นจำนวนมาก จะส่งผลให้เซลล์เกิดความเสียหายเนื่องจากอนุมูลอิสระ (oxidative damage) โดยเฉพาะที่เยื่อหุ้มเซลล์และออร์แกเนลล์ที่มีเยื่อหุ้ม (Kim, 2007, Nicholls และ Ferguson, 2002, Szeto, 2006)

กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจะต้องใช้ออกซิเจน 1 โมเลกุลต่อการเกิดปฏิกิริยา 1 รอบ วิธีการตรวจวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียวิธีหนึ่งคือการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ถ้าไมโทคอนเดรียทำงานปกติ ปฏิกิริยาการส่งผ่านอิเล็กตรอนจะเกิดอย่างต่อเนื่อง และออกซิเจนจะถูกใช้ไปเรื่อยๆ จนหมด แต่หากกระบวนการนี้ถูกยับยั้งในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่ง เช่น ยับยั้งการทำงานของ cytochrome *c* oxidase จะทำให้ออกซิเจนถูกใช้ลดลง ปริมาณออกซิเจนที่วัดได้จึงไม่ลดลงมากนัก (Sompol และคณะ, 2008, Benani และคณะ, 2009)

ความสัมพันธ์ของบีตาแอมิลอยด์ ไมโทคอนเดรีย และโรคอัลไซเมอร์

ปัจจุบันพบว่าไมโทคอนเดรียมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ เมื่ออายุมากขึ้นความสามารถในการสร้างเอนไซม์ต่างๆ ใน TCA cycle และ complex ต่างๆ ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนจะลดลง ส่งผลให้การสร้างพลังงานของเซลล์ลดลงด้วย ในการสื่อสารสัญญาณทางไซแนปส์ต้องใช้ ATP จำนวนมาก ที่บริเวณไซแนปส์จึงมีไมโทคอนเดรียจำนวนมาก การเกิด amyloid plaque ในสมองบริเวณที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ ทำให้การทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่อง การสร้าง ATP ลดลง ส่งผลให้การทำงานของไซแนปส์บริเวณนั้นลดลงด้วย (Maurice และคณะ, 1996b, Santos และคณะ, 2010, Reddy, 2009) นอกจากนี้ สมองเป็นอวัยวะที่ต้องการพลังงานมาก จึงต้องการออกซิเจนมากเมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นในร่างกายและเป็นเหตุให้มีโอกาสเกิด ROS มาก แต่ระบบต้านอนุมูลอิสระภายในสมองนั้นมีน้อย นอกจากนั้นส่วนประกอบในสมองยังอุดมไปด้วยกรดไขมันไม่อิ่มตัว จึงเป็นสาเหตุให้สมองเป็นอวัยวะที่ไวต่อการเกิด oxidative damage มาก (Nicholls และ Ferguson, 2002, Candelario-Jalil และคณะ, 2001) ปกติในสมองมีการสร้างโปรตีน A β จำนวนเล็กน้อยและสะสมอยู่บนผิวสมอง (Teng และ Tang, 2005) ภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีนที่ใช้ในการสร้างโปรตีน APP มากขึ้นและเกิดการสร้าง A β มากขึ้น A β นี้ส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพด้วยกลไกต่างๆ เช่น หนึ่งย่นำให้เกิดกระบวนการอักเสบโดย astrocyte (Hull และคณะ, 2006) A β หนึ่งย่นำให้เกิด ROS ในไมโทคอนเดรียเพิ่มมากขึ้น ภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในไมโทคอนเดรีย หนึ่งย่นำให้เกิดความเสียหายต่อ mitochondrial DNA (mtDNA) ส่งผลให้การสร้าง subunit I ของ complex IV ซึ่งสร้างมาจาก mtDNA ผิดปกติไป (Santos และคณะ, 2010) ทำให้กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนถูกยับยั้งและเกิด ROS เพิ่มขึ้น กลายเป็นวัฏจักรที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress มากขึ้น ไมโทคอนเดรียที่ได้รับความเสียหายปลดปล่อย cytochrome *c* และ apoptotic factor ต่างๆ ออกมา ทำให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตายแบบ apoptosis (Cardoso และคณะ, 2002, Swerdlow และคณะ, 2011)

มีการศึกษาหลายการศึกษาสนับสนุนว่า ความผิดปกติในการทำงานของไมโทคอนเดรียที่เกิดจาก A β เป็นสาเหตุสำคัญของพยาธิสภาพต่างๆ ของโรคอัลไซเมอร์ จากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า A β ยับยั้งกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน โดยยับยั้งที่การทำงานของ cytochrome *c* oxidase ส่งผลให้เกิด ROS มากขึ้น ทำให้ไมโทคอนเดรียบวมและปลดปล่อย cytochrome *c* ออกมาในไซโทซอลซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis (Casley และคณะ, 2002, Cardoso และคณะ, 2001, 2002, Santos และคณะ, 2010) มีการศึกษาพบว่านอกจาก A β จะถูกสร้างขึ้นที่เยื่อหุ้มเซลล์แล้ว ยังพบ A β ภายในไมโทคอนเดรียด้วย โดยพบว่าสาย APP มี sequence ที่สามารถจับ

กับโปรตีนบนเยื่อหุ้มชั้นนอกของไมโทคอนเดรียได้ APP ถูก uptake เข้าภายในไมโทคอนเดรีย โดย translocase of outer membrane (TOM) และเกิดการตัดสาย APP ภายในไมโทคอนเดรียได้เป็น A β แต่กระบวนการตัดสาย APP ในไมโทคอนเดรียนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด (Wong-Riley และคณะ, 1996, Canevari และคณะ, 1999, Anandatheerthavarada และคณะ, 2003, 2007, Teng และ Tang, 2005, Reddy และคณะ, 2009) และเข้าจับที่ cytochrome *c* oxidase หรือ complex IV ของไมโทคอนเดรีย (Tillement และคณะ, 2011) ส่งผลให้การทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่อง และทำให้เกิดความเสียหายแก่เซลล์ดังกล่าวในข้างต้น

บัวบก

บัวบก หรือชื่อพ้องได้แก่ ผักแว่น, ผักหนอก, ปะหนะ, เอชาเต๊ะ, Gotu Kola และ Asiatic pennywort มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban อยู่ในวงศ์ Umbelliferae (Apiaceae) มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุก ขึ้นรวมกันเป็นกอติดดิน ลำต้นกลมและมีร่อง เลื้อยตามดิน มีรากงอกตามข้อ ใบและรากงอกตามข้อ ใบเป็นใบเดี่ยว รูปไข่หรือรูปกลม ขอบใบหยักมีรอยเว้าลึกที่ฐานใบ ผิวใบด้านบนเรียบ ด้านล่างมีขนสั้นๆ ก้านใบยาว ช่อดอกคล้ายร่ม ออกดอกครั้งละ 2-3 ช่อจากข้อ กลีบดอกสีม่วงเข้ม 5 กลีบ ผลมีเปลือกแข็งยาว 2-2.5 มิลลิเมตร สีเขียวหรือม่วง เป็นพืชสมุนไพรใช้ในประเทศไทยมานาน มีสรรพคุณบำรุงหัวใจ แก้ไข้เนื่องจากการบาดเจ็บฟกช้ำ แก้เมื่อยล้า อ่อนเพลีย แก้บิด ท้องเสีย รักษาแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ในตำรายาอายุรเวทและตำรายาแพทย์จีนแผนโบราณมีการใช้บัวบกเป็นยาในการรักษาอาการป่วยต่างๆ เช่น โรคเรื้อน สะเก็ดเงิน รักษาบาดแผลลักษณะต่างๆ บรรเทาอาการหลงลืม เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นต้น (Brinkhaus และคณะ, 2000, Howes และคณะ, 2003, Thomson และคณะ, 2001, Poonam และคณะ, 2009, Zheng และคณะ, 2007) สารสำคัญที่พบในบัวบกเป็นสารกลุ่ม triterpenoid ทั้งในรูป sapogenin คือ asiatic acid กับ madecassic acid และรูป glycoside คือ asiaticoside กับ madecassoside นอกจากนี้ยังมีสารอื่นๆ อีก ได้แก่ centellasaponin B, centellasaponin C, centellasaponin D, sceleffoleoside A, α -humulene, β -caryophyllene, bicyclogermacrene, germacrene B และ myrcene (Mauri และคณะ, 2000, Zheng และคณะ, 2007)

ในการศึกษาฤทธิ์ฟื้นฟูความจำของบัวบกในสัตว์ทดลอง จากการศึกษาในหนูแรทปกติของ Veerendra และ Gupta (2002) พบว่าการให้สารสกัดบัวบกขนาด 200 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 14 วัน ช่วยให้หนูแรทมีความจำดีขึ้นในการทดสอบ Shuttle box test, Step-through passive avoidance test และ Step-down test และยังช่วยลดภาวะ oxidative stress ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับหนูปกติที่ไม่ได้รับสารสกัดบัวบก และอีกการศึกษาหนึ่งของ

Veerendra และ Gupta (2003) พบว่าการป้อนสารสกัดบัวบกในขนาด 200 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วันให้หนูแรทที่ถูกทำให้บกพร่องไปโดยการฉีด streptozotocin (STZ) เข้าทางโพรงสมอง lateral ventricle ทั้ง 2 ข้าง สามารถช่วยฟื้นฟูความจำของหนูเมื่อทดสอบด้วย Step-through passive avoidance test เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับบัวบก และจากการประเมินระดับตัวชี้วัดภาวะ oxidative stress ได้แก่ malondialdehyde (MDA), glutathione, superoxide dismutase และ catalase พบว่าสารสกัดบัวบกสามารถลดการเกิดอนุมูลอิสระและลด oxidative damage ในเซลล์ประสาทได้

นอกจากนี้ มีรายงานว่าสารสกัดบัวบกสามารถเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้จดจำและช่วยเรื่องภาวะอารมณ์ในผู้สูงอายุสุขภาพดีได้ โดยทำการศึกษาในอาสาสมัครผู้สูงอายุสุขภาพดี 28 ราย ให้อาสาสมัครรับประทานสารสกัดบัวบกขนาด 250, 500 และ 750 มก./วัน เป็นเวลา 2 เดือน หลังจากนั้นให้ทำการทดสอบทางการเรียนรู้จดจำคือ แบบทดสอบ auditory oddball paradigm และการทดสอบต่างๆ ใน CDR computerized assessment battery test ซึ่งเป็นการทดสอบความจำชนิด working memory และ spatial memory และทดสอบอารมณ์โดยใช้ Bond-Lader visual analogue scales ซึ่งประเมินโดยคณะผู้วิจัยทั้งก่อนและหลังการให้สารสกัดครั้งแรกและ 1 เดือนหลังได้รับสารสกัด พบว่าสารสกัดบัวบกขนาด 750 มก./วันมีผลช่วยในเรื่องการเรียนรู้และความจำทั้งในการทดสอบด้วยแบบทดสอบ auditory oddball paradigm และการทดสอบด้วย CDR computerized assessment battery test เทียบกับอาสาสมัครที่ได้รับยาหลอก รวมถึงช่วยฟื้นฟูภาวะทางอารมณ์โดยมีผลเพิ่มภาวะ Alertness และ Calmness ในผู้สูงอายุเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาหลอก ซึ่งภาวะอารมณ์ทั้ง 2 อย่างนี้เป็นอารมณ์เชิงบวกที่ส่งผลต่อความจดจำในการเรียนรู้และจดจำ เนื่องจากความจดจำและรู้สึกผ่อนคลายส่งผลให้การเรียนรู้และจดจำดีขึ้น (Wattanathorn และคณะ, 2007) และจากการศึกษาของ Omar Dev และคณะ (2009) ในผู้ใหญ่วัยกลางคนที่มีสุขภาพดี 41 คนพบว่าเมื่อให้อาสาสมัครรับประทานบัวบกอัดแคปซูล 3-4 แคปซูลตามน้ำหนักตัว วันละ 1 ครั้งเป็นเวลา 2 เดือนแล้วทำการวัดความสามารถทางการเรียนรู้และจดจำด้วยแบบทดสอบ Woodcock-Johnson Cognitive Abilities Test III (WJ CAT III) โดยมีการวัดผลก่อนทำการทดลอง ในวันที่ 40, 60 และหลังได้รับสารสกัด ผลพบว่าอาสาสมัครมีผลการทดสอบที่ดีขึ้นทั้งชายและหญิง

ในการศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียพบว่า สารสกัดบัวบกสามารถปกป้องการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์ประสาทได้ โดย Shinomol และคณะ (2008) รายงานว่าการให้ผงใบบัวบก 0.5% ในหนูเมาส์โดยการผสมลงในอาหารเป็นเวลา 10 วันสามารถป้องกันการเกิดภาวะ oxidative stress ในสมองส่วนต่างๆ ที่เกิดจากการฉีด 3-NPA เข้าทางช่องท้อง (i.p.) 75 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 2 วันก่อนการทดสอบ ผลการวัดค่าของเอนไซม์ต้านอนุมูล-

อิสระบ่งชี้ว่าบัวบกช่วยป้องกันความเสียหายของสมองส่วนต่างๆ จากภาวะ oxidative stress ได้นอกจากนี้การศึกษาในสัตว์ทดลองของ Dhanasekaran และคณะ (2009) ทำการศึกษาใน PSAPP mice ซึ่งเป็นหนูเมาส์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีความผิดปกติที่ยีน 2 ยีน (Double-mutant) คือ ยีน PS1 และยีน APP ส่งผลให้หนูมีการสร้าง $A\beta$ มากกว่าปกติและมีความจำบกพร่อง หนูเมาส์ถูกแบ่งเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 2.5 และ 5.0 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 60 วันและกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 2.5 และ 5.0 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 180 วัน ผลการทดลองพบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดบัวบกเป็นเวลา 180 วันขนาด 2.5 มก./กก. น้ำหนักตัว มีปริมาณ $A\beta$ ในสมองน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับอย่างมีนัยสำคัญ

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 (อีซีเอ233)

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ได้รับการพัฒนาขึ้นโดยคณาจารย์คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เป็นสารสกัดของสมุนไพรบัวบกที่มีการกำหนดมาตรฐานของปริมาณสารสำคัญ โดยมี Triterpenoid อย่างน้อย 80% และมีสัดส่วนของ madecassoside/asiaticoside อยู่ระหว่าง 1.50 ± 0.50 เพื่อป้องกันความแปรปรวนของปริมาณสารสำคัญที่สกัดได้ในแต่ละครั้งซึ่งเป็นปัญหาสำคัญของการวิจัยและพัฒนาพืชสมุนไพร หลังจากกำหนดคุณภาพมาตรฐานของสารสกัดแล้วจึงได้นำอีซีเอ233 มาศึกษาฤทธิ์ต่างๆ

การศึกษากิจกรรมที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองพบว่าอีซีเอ233 ช่วยแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้หลงลืมโดยการปิดกั้นหลอดเลือดคอมมอนแคโรติดทั้ง 2 ข้าง (2-vessel occlusion, 2-VO) พบว่าหนูกลุ่มที่ได้อีซีเอ233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว มีการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้นเมื่อเทียบกับหนูที่ถูกทำ 2-VO แต่ไม่ได้รับอีซีเอ233 ในการทดสอบ Morris water maze test และ Step down test (ยูทพร สุขวิชัย, 2553) และในการทดสอบ Novel object recognition (จิตรลดา และสุบงกช, 2552) การฉีด $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. โดยหนูกลุ่มที่ได้อีซีเอ233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ใช้เวลาในการค้นหาแท่นพักได้น้ำลดลงเมื่อเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับอีซีเอ233 เมื่อทดสอบด้วย Morris water maze test และเพิ่มระยะเวลาในการอยู่บนแท่นพักในการทดสอบ Step down ซึ่งเป็นแบบทดสอบพฤติกรรม passive avoidance วิธีหนึ่ง (อัญชลี คำเอก และคณะ, 2552)

โมเดลจำลองการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในสัตว์ทดลอง

วิธีการจำลองพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ ในหนูเมาส์และหนูแรทมีหลายวิธี ได้แก่ การใช้หนูเมาส์ที่ถูกดัดแปลงพันธุกรรม (Transgenic mouse) ให้มีการกลายพันธุ์ของยีนที่เกี่ยวข้อง

กับการสร้าง A β เช่น ยีน APP หรือ ยีน Presenillin1 หนุ้ดัดแปลงพันธุกรรมนี้ มีการสร้างโปรตีน APP มากและมีความผิดปกติบริเวณตำแหน่งที่มีการตัดสาย APP และจะแสดงลักษณะทางกายภาพที่ผิดปกติคือ amyloid plaque เกิดขึ้น ร่วมกับการมีการเรียนรู้และความจำบกพร่อง (Strazielle และคณะ, 2003, 2004) แต่หลังจากการคิดค้นทฤษฎี mitochondrial cascade hypothesis ซึ่งสันนิษฐานว่าโรคอัลไซเมอร์ ชนิด late-onset มีสาเหตุเริ่มต้นมาจากความเสื่อมตามอายุของไมโทคอนเดรียและการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในสมองที่เพิ่มมากขึ้น ร่วมกับการมีโปรตีน A β ที่ค่อยๆ สะสมเพิ่มมากขึ้น (Cottrell และคณะ, 2001) ในขณะที่โรคอัลไซเมอร์แบบ early-onset เริ่มต้นจากการที่มีการสร้างโปรตีน A β จำนวนมากเนื่องจากความผิดปกติของยีน APP, PS1 หรือ PS2 เกิดเป็น amyloid plaques และซึ่งโมเดลนี้เป็นลักษณะการเกิดโรคอัลไซเมอร์ในหนุ้ดัดแปลงพันธุกรรม (Swerdlow และคณะ, 2004) อีกวิธีหนึ่งที่น่าสนใจคือ การฉีดโปรตีน A β_{1-40} และ A β_{1-42} ซึ่งเป็นโปรตีนที่สังเคราะห์ขึ้นเลียนแบบโปรตีน A β ในสมองที่เป็นโรคอัลไซเมอร์ เข้าไปยังโพรงสมองหรือสมองบริเวณ hippocampus ซึ่งมีทั้งการฉีดครั้งเดียวด้วยเข็ม micro-syringe และการ infusion ด้วยเครื่อง micro-pump เมื่อ A β ถูกฉีดเข้าสู่สมองแล้วจะกระจายตัวไปตาม cerebral fluid และเกาะกันเป็นคราบอยู่ที่ผิวสมองลักษณะเดียวกับ senile plaques (Harkany และคณะ, 1999, Sipos และคณะ, 2007, Chambon และคณะ, 2011) ต่อมา มีการสังเคราะห์โปรตีน A β_{25-35} ซึ่งเป็นสายโปรตีนที่ประกอบด้วยกรดอะมิโนตำแหน่งที่ 25 ถึง 35 ของโปรตีนสายเต็มของ A β (A β_{1-42}) จากการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพิษของโปรตีน A β_{25-35} พบว่า A β_{25-35} สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์คล้ายกับผลของ A β_{1-40} และ A β_{1-42} คือมีการเกาะกลุ่มเป็นคราบ amyloid plaques บนผิวเซลล์ (Maurice และคณะ, 1996b) เพิ่มระดับ oxidative stress (Cafe และคณะ, 1996, Chambon และคณะ, 2011) กระตุ้นกระบวนการ excitotoxicity โดยการกระตุ้น NMDA receptor (Maurice และคณะ, 1996b, Fernandez-Tome และคณะ, 2004) ลดการทำงานของสารสื่อประสาท (Ashenafi และคณะ, 2005) ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Harkany และคณะ, 1999, Cardoso และคณะ, 2001, Bosetti และคณะ, 2002, Yan และคณะ, 2004) และทำให้เซลล์ประสาทตายโดยกระบวนการ apoptotic cell death (Blasko และคณะ, 2000) การฉีดโปรตีน A β_{25-35} เข้าสู่สมองทำให้การเรียนรู้และความจำในหนูแรทและหนูเมาส์บกพร่องไปเช่นเดียวกับการฉีดด้วย A β_{1-40} และ A β_{1-42} (Maurice และคณะ, 1996a,b, Terranova และคณะ, 1996, Sipos และคณะ, 2007, Furukawa-Hibi และคณะ, 2011) ในการศึกษาผลของ A β แบบ *in vivo* โปรตีน A β ที่ละลายในน้ำกลั่นจะถูก incubate ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพื่อให้โปรตีนเกาะกลุ่มเป็นก้อน (aggregation) ก่อนเนื่องจากโปรตีน A β ที่เกาะกลุ่มเป็นก้อนมีผลพิษต่อเซลล์ประสาทและส่งผลต่อการเรียนรู้และความจำของสัตว์ทดลองมากกว่า A β แบบเป็นสาย (Pike และคณะ, 1993, 1995) จากการทดลองของ Delobette

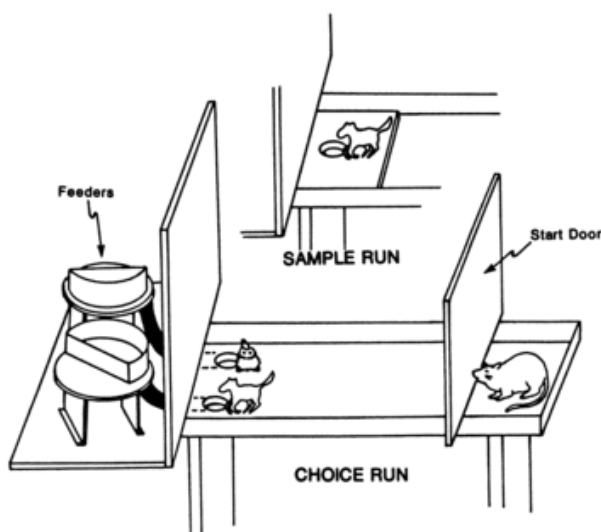
และคณะ (1997) พบว่าการฉีด i.c.v. $A\beta_{25-35}$ ที่ incubate ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วันทำให้หนูแรทเกิดภาวะหลงลืมในการทดสอบ Morris water maze เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ถูกฉีด i.c.v. ด้วย $A\beta_{25-35}$ ที่ไม่ได้ incubate จากการศึกษาความสามารถในการเกิด aggregation ของโปรตีน $A\beta$ รูปแบบต่างๆ ของ Pike และคณะ (1993) พบว่า $A\beta_{25-35}$ สามารถเกาะกลุ่มและตกตะกอนทันทีที่ละลายน้ำในขณะที่ $A\beta_{1-42}$ ต้อง incubate ในอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 7 วัน (Maurice และคณะ, 1996b, Canevari และคณะ, 1999, Casley และคณะ, 2002) อย่างไรก็ตามเพื่อให้โปรตีน $A\beta_{25-35}$ เกิดผลพิษต่อเซลล์ประสาทมากที่สุดจึงต้อง incubate $A\beta_{25-35}$ เป็นเวลา 4 วันก่อนใช้

โมเดลสำหรับทดสอบพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำ

โมเดลทดสอบการเรียนรู้และความจำที่ใช้ในสัตว์ทดลองมีหลายโมเดล ได้แก่

1. Delayed matching-non-matching to sample tasks

เป็นโมเดลสำหรับศึกษา working memory โดยอาศัยความสามารถในการแยกแยะสิ่งใหม่กับสิ่งเดิมที่เคยเผชิญ การทดสอบแบ่งออกเป็น 3 phase คือ sample phase เป็นช่วงที่ฝึกให้สัตว์ทดลองเรียนรู้ cue ที่ผู้ทดลองให้ เช่น วัตถุหรือภาพ แสงสว่าง หรือกลิ่น และเรียนรู้วิธีการเลือก cue เช่น การเคาะคานที่อยู่ใต้ภาพ หรือเคาะคานที่อยู่ใต้หลอดไฟ เป็นต้น ต่อมาเป็นช่วง delay phase สัตว์ทดลองจะถูกนำไปพักที่กรงอื่นเป็นระยะเวลาหนึ่ง หลังจากนั้นเป็นช่วง choice phase สัตว์ทดลองจะได้รับ cue ที่เคยได้ในช่วง sample phase กับ cue ใหม่ที่ต่างออกไป เช่น วัตถุหรือภาพใหม่ และจะต้องเลือก cue ที่เป็น cue ใหม่จึงจะได้รางวัล หากสัตว์ทดลองเลือก cue เก่า (cue ใน sample phase) จะไม่ได้รับรางวัล (Otto และคณะ, 1992) (รูปที่ 5)

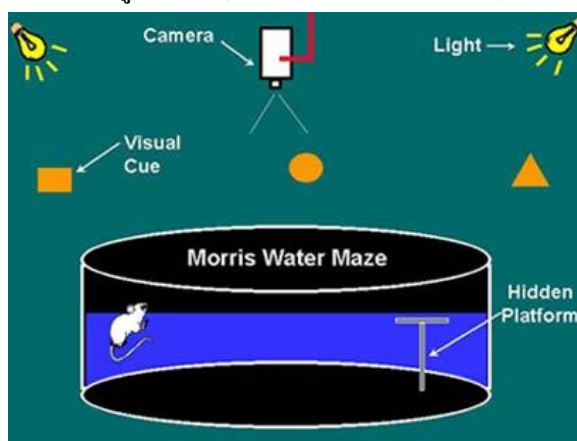


รูปที่ 5 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Delayed non-matching to sample

การทดลองนี้ถูกพัฒนาขึ้นจากการทดลองการเรียนรู้และความจำในลิง ต่อมาจึงพัฒนารูปแบบและวิธีการให้ทดลองในหนูได้ ข้อจำกัดของการทดลองนี้คือต้องมีการฝึกสัตว์ทดลองให้เกิดการเรียนรู้ โดยให้สัตว์ทดลองอดอาหารหรือน้ำเพื่อกระตุ้นให้สัตว์ทดลองมีแรงจูงใจในการเรียนรู้ซึ่งอาจทำให้สัตว์ทดลองเครียด และต้องใช้เวลาในการฝึกนาน และหากสัตว์ทดลองไม่เกิดการเรียนรู้ในช่วง sample phase จะถูกตัดออกจากการทดลองทำให้เสียสัตว์ทดลองโดยเปล่าประโยชน์ นอกจากนี้อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลองยังมีความซับซ้อนมาก เช่น กลไกในการให้รางวัลคือน้ำหรืออาหาร หรือระบบในการให้ cue แก่สัตว์ทดลองใน phase ต่างๆ เป็นต้น

2. Morris water maze task

เป็นโมเดลสำหรับศึกษา spatial memory พัฒนาขึ้นมาสำหรับการศึกษาการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับตำแหน่งและทิศทางในหนูแรทและหนูเม้าส์ การทดลองแบ่งเป็น 3 trial คือ training trial เป็นช่วงที่ฝึกให้หนูเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของแท่นพักใต้น้ำโดยอาศัยการดู cue ซึ่งเป็นภาพบนผนังทั้ง 4 ด้านรอบอ่างน้ำ ต่อมาเป็นช่วง retention trial ทำการทดสอบความจำของหนูโดยปล่อยให้หนูว่ายน้ำหาแท่นพักใต้น้ำ หนูอาจถูกทดสอบได้หลายครั้งต่อวันโดยปล่อยจากตำแหน่งที่ไม่ซ้ำเดิม ความสามารถในการเรียนรู้และจดจำของหนูวัดจากการที่หนูสามารถหาแท่นพักใต้น้ำเจอและใช้เวลาในการหาน้อยลง สุดท้ายเป็นการทดสอบช่วง probe trial หนูถูกปล่อยให้ว่ายน้ำโดยที่ไม่มีแท่นพักใต้น้ำเพื่อยืนยันว่าการที่หนูหาแท่นพักได้ในช่วง retention trial นั้นมาจากการที่หนูจำตำแหน่งของแท่นพักได้ ไม่ใช่การพบโดยบังเอิญ หากหนูจำตำแหน่งแท่นพักได้ หนูจะว่ายน้ำวนในบริเวณที่เคยมีแท่นพักวางอยู่ (Morris, 1981, Limon และคณะ, 2009a) (รูปที่ 6)



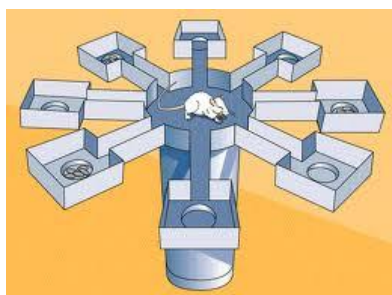
รูปที่ 6 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Morris water maze

ข้อจำกัดของการทดลองนี้คือต้องมีการฝึกสัตว์ทดลองให้เกิดการเรียนรู้ในช่วง training trial โดยอาศัยแรงจูงใจคือการออกจากอ่างน้ำ หากหนูไม่สามารถว่ายน้ำหรือไม่สามารถหาแท่นพักเจอ (เนื่องจากไม่สามารถเรียนรู้และจดจำตำแหน่งของแท่นพักหรือไม่เรียนรู้ว่ามีแท่นพักใต้น้ำอยู่) จะถูกตัดออกจากการทดลอง ทำให้เสียเวลาในการฝึก นอกจากนี้ยังเสียเวลาในการเตรียม

อุปกรณ์ เนื่องจากการทดสอบใช้เวลาหลายวัน จึงต้องมีการเปลี่ยนน้ำในอ่างเสมอและต้องควบคุมอุณหภูมิน้ำในอ่างให้เย็นคงที่ (ประมาณ 20 องศาเซลเซียส) เพื่อให้หนูรู้สึกไม่สบายตัวและต้องการออกจากอ่างน้ำให้เร็วที่สุด

3. Radial arms maze

เป็นการทดสอบ spatial working memory ในหนูแรทและหนูเมาส์ แบ่งการทดสอบเป็น 2 ช่วงคือ training trial และ testing trial อุปกรณ์ที่ใช้คือกล่องที่มีลักษณะเป็นแขน 8 แขน ช่วง training trial เป็นช่วงฝึกให้หนูเรียนรู้ว่ามีอาหารอยู่ในแขนแต่ละแขน โดยวางอาหารหนูที่ปลายสุดของทุกแขนและปล่อยหนูลงกลางกล่องระหว่างแขนทั้ง 8 ให้หนูสำรวจกล่องอย่างอิสระ ต่อมาในช่วง testing trial ผู้ทดลองจะวางอาหารหนูเพียง 3 แขนเท่านั้น หนูถูกปล่อยให้สำรวจกล่องทั้งหมด 8 รอบโดยใน 3 รอบแรก หนูสามารถเข้าสำรวจแขนได้ 8 ครั้งเพื่อให้หนูเรียนรู้ตำแหน่งแขนที่มีอาหาร ในการทดสอบ 5 รอบหลัง หนูจะมีโอกาสเลือกเข้าเพียง 3 แขน หากหนูมีการเรียนรู้และความจำปกติหนูจะเลือกเข้าแขนที่มีอาหารได้ถูกต้อง (Limon และคณะ, 2009b, Cuevas และคณะ, 2009) (รูปที่ 7)



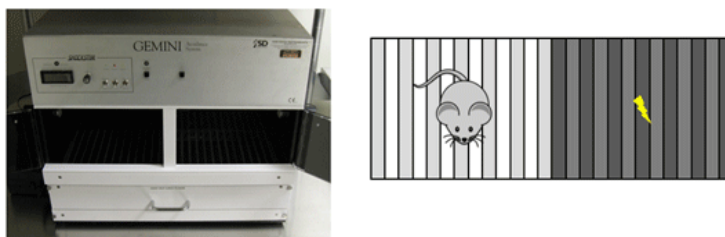
รูปที่ 7 แสดงอุปกรณ์การทดสอบ Radial arms maze

การทดลอง radial arms maze มีข้อจำกัดคือ ต้องจำกัดอาหารหนู และใช้เวลานานในการฝึก หนูให้มีการเรียนรู้และจดจำ

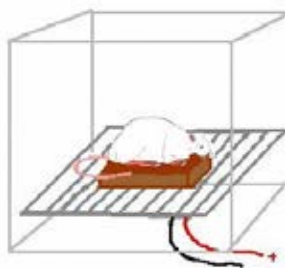
4. Step-through และ Step-down passive avoidance tests

เป็นการทดสอบความสามารถในการเรียนรู้และจดจำในหนูแรทและหนูเมาส์ โดยอาศัยสัญชาตญาณชนิด passive avoidance คือเป็นการหลีกเลี่ยงจากสิ่งที่เป็นภัยต่อตัวหนูด้วยการหลบอยู่ในที่ที่หนูเห็นว่าปลอดภัยจากสิ่งที่เป็นภัยนั้น ภัยที่ทำให้ส่วนใหญ่ในการทดลองประเภทนี้คือการช็อกไฟฟ้าบนลวดที่พื้นกรง อุปกรณ์ที่ใช้คือกล่องที่แบ่งเป็นบริเวณที่มีไฟฟ้าและไม่มีไฟฟ้า บริเวณที่ไม่มีไฟฟ้าจะเป็นบริเวณที่หนูไม่ชอบอยู่ ส่วนบริเวณที่มีไฟฟ้าจะเป็นบริเวณที่หนูชอบอยู่มากกว่า เพื่อเป็นการยืนยันว่าการที่หนูอยู่ในบริเวณที่ปลอดภัยมากกว่าไปยังบริเวณที่มีไฟฟ้า เกิดจากการที่หนูจำบริเวณที่ถูกช็อกไฟฟ้าได้ เช่น ในการทดสอบ Step-through ผนังกล่องบริเวณที่ไม่มีไฟฟ้าเป็นสีขาวในขณะที่ผนังกล่องบริเวณที่มีไฟฟ้าเป็นสีดำ หนูจะชอบอยู่ในที่มีมืดมากกว่า ส่วน

ในการทดสอบ Step-down พื้นกล่องทั้งหมดจะมีไฟฟ้าและมีแท่นเล็กๆ ที่ยกสูงขึ้นจากพื้นกล่องซึ่งไม่มีไฟฟ้า หนูไม่ชอบอยู่ที่สูงและชอบเดินสำรวจมากกว่าอยู่บนแท่น ก่อนการทดสอบหนูจะถูกปล่อยให้สำรวจกล่องอย่างอิสระเพื่อให้เกิดความคุ้นเคย (habituation) ต่อมาจึงฝึกให้เรียนรู้ถึงบริเวณที่มีและไม่มีไฟฟ้า (training trial) โดยปล่อยหนูลงในบริเวณที่ไม่มีไฟฟ้า หนูจะไปยังบริเวณที่ชอบซึ่งมีไฟฟ้าและถูกช็อก หลังจากนั้นในช่วงทดสอบ (retention trial) ปล่อยหนูลงในบริเวณที่ไม่มีไฟฟ้าอีกครั้ง หนูที่จำได้จะปีนตัวเองไม่เดินไปยังบริเวณที่มีไฟฟ้า (Miyazaki และคณะ, 1995, Kameyama และคณะ, 1986) (รูปที่ 8 และ 9)



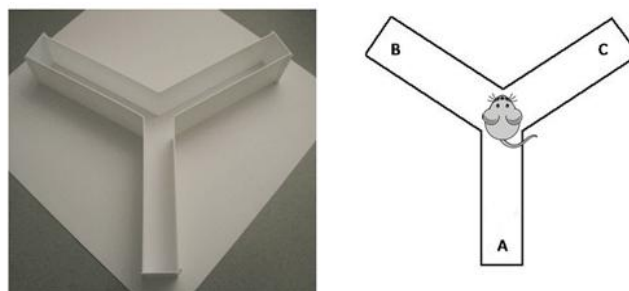
รูปที่ 8 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Step through test



รูปที่ 9 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Step down test

5. Y-maze spontaneous alteration test

เป็นการทดสอบ spatial working memory โดยใช้สัญชาตญาณของหนูที่ชอบสำรวจสิ่งใหม่และความสามารถในการจำทิศทาง อุปกรณ์ที่ใช้คือกล่องรูปตัว Y ทดสอบโดยการปล่อยหนูตรงกลางกล่องรูปตัว Y และให้หนูเดินสำรวจแขนทั้ง 3 แขนอย่างอิสระ ปกติหนูจะสำรวจแขนใหม่มากกว่ากลับเข้าไปในแขนเก่าที่เพิ่งสำรวจมา (Sarter และคณะ, 1988, Maurice และคณะ, 1996b) (รูปที่ 10)



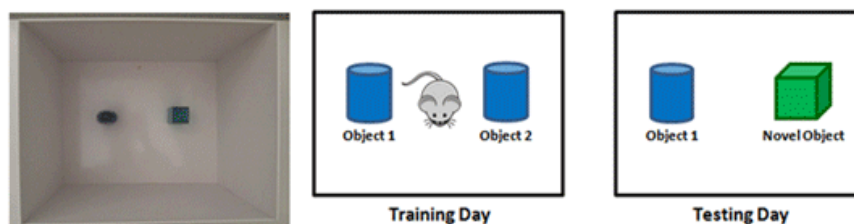
รูปที่ 10 แสดงอุปกรณ์และวิธีการทดสอบ Y-maze

การทดสอบ passive avoidance มีข้อดีคือใช้เวลาในการฝึกสั้นเนื่องจากหนูไม่ต้องเรียนรู้เงื่อนไขที่ซับซ้อน แต่ก็มีข้อจำกัดคือหนูอาจเกิดภาวะเครียดเนื่องจากการถูกช็อกไฟฟ้า และหากยาหรือสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบมีผลต่อการรับรู้สึกเจ็บปวดที่ผิวหนัง เช่น ทำให้หนูมีความไวต่อความเจ็บปวดมากขึ้น หรือกดประสาทให้การรับรู้ความเจ็บปวดลดลง ผลการทดลองอาจผิดพลาดและส่งผลต่อการวิเคราะห์ผล

6. Novel object recognition task

โมเดลที่ใช้ในงานวิจัยนี้คือ Novel object recognition เป็นการทดสอบความสามารถด้านความจำที่อาศัย working memory เป็นหลัก โดยอาศัยนิสัยตามธรรมชาติของหนูที่ชอบสำรวจ โดยเฉพาะเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมใหม่หรือได้เจอกับวัตถุชิ้นใหม่ หนูจะแสดงพฤติกรรมการสำรวจตามสัญชาตญาณ เช่น การเข้าไปแตะ ดม หรือเอาเท้าหน้าทั้งสองสัมผัส เป็นต้น (Aggleton, 1985) การทดสอบนี้จึงมีข้อดีว่าการทดสอบพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำอื่นคือ ไม่ต้องมีการฝึกสัตว์ทดลอง และทำให้สัตว์ทดลองตื่นหรือเครียดน้อยกว่าการทดสอบที่ใช้สิ่งกระตุ้นให้สัตว์ทดลองแสดงพฤติกรรม เช่น การอดอาหาร หรือการว่ายน้ำเพื่อหาแท่นพัก เป็นต้น แบบทดสอบนี้จึงเป็นการทดสอบที่มุ่งเน้นไปที่การเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองอย่างชัดเจน มีความปลอดภัย และไม่มีเรื่องความเครียด ความแตกต่างในการรับรู้เรื่องความเจ็บปวด หรือแรงจูงใจในการหลีกเลี่ยงสิ่งกระตุ้นมาเกี่ยวข้อง นอกจากนี้แบบทดสอบเกี่ยวกับการสนใจสิ่งใหม่มากกว่านี้คล้ายคลึงกับการทดสอบด้านความจำที่ทำในมนุษย์ (Ennaceur และ Delacour, 1988) (รูปที่ 11)

การทดสอบ Novel object recognition แบ่งออกเป็น 2 trial ได้แก่ sample trial คือ ช่วงที่ปล่อยให้หนูเดินสำรวจกล่องที่มีวัตถุที่ลักษณะเหมือนกัน 2 ชิ้น (familiar object) หลังจากนั้นในช่วง test trial วัตถุใหม่ (novel object) ที่มีลักษณะแตกต่างจากวัตถุเดิมแต่มีขนาดใกล้เคียงกันจะถูกนำมาแทนที่วัตถุเดิม 1 ชิ้น และปล่อยให้หนูเดินสำรวจอีกครั้ง หนูปกติควรจะสามารถจดจำวัตถุเก่าได้และใช้เวลาในการสำรวจวัตถุใหม่มากกว่า (Dix และ Aggleton, 1999, Ennaceur และ Delacour, 1988, Dere และคณะ, 2007)



รูปที่ 11 อุปกรณ์และวิธีทดสอบ Novel object recognition

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุอุปกรณ์

1. สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือหนูเมาส์เพศผู้ สายพันธุ์ ICR อายุ 4-5 สัปดาห์ น้ำหนัก 25-35 กรัม (ศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ตำบลศาลายา อำเภอพุทธมณฑล จังหวัดนครปฐม) หนูเมาส์ถูกนำไปเลี้ยงไว้ในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลองของคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิในห้องให้คงที่ที่ 25 ± 2 องศาเซลเซียส ควบคุมความชื้นในห้องที่ $60 \pm 10\%$ และควบคุมแสงสว่างโดยกำหนดช่วงเวลา เปิดปิดไฟ เป็น 12:12 ชั่วโมงต่อวัน ได้รับน้ำและอาหารอย่างเพียงพอ มีวัฏจักรนอนที่สะอาด เปลี่ยนใหม่ทุกวันเว้นวัน ได้รับอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลอง คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 11-33-001

2. สารเคมี

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 (ได้รับจาก รศ. ภก. ดร. เอกรินทร์สายฟ้าและคณะ)

Carboxymethylcellulose (CMC) (Fluka)

Amyloid β -protein fragment 25-35 ($A\beta_{25-35}$) (Sigma)

Pentobarbital sodium (Nembutal[®]) (Ceva Sante Animale)

Double distilled water

Sodium chloride (Sigma)

Malondialdehyde (MDA) ($CH_2(CHO)_2$) (Sigma)

Sodium dihydrogenphosphate (NaH_2PO_4) (Ajax Finechem)

Sodium hydrogenphosphate (Na_2HPO_4) (Ajax Finechem)

2-Thiobarbituric acid (TBA) (Sigma)

Sodium monododecyl sulfate (Sodium lauryl sulphate) ($CH_3(CH_2)_{11}OSO_3Na$) (Sigma)

Acetic acid (CH_3COOH) (Lab-scan)

Hydrochloric acid (HCl) (Sigma)

Butanol (Lab-scan)

Pyridine (Ajax Finechem)

Sucrose ($C_{11}H_{22}O_{11}$) (Ajax Finechem)
 Mannitol ($C_6H_{14}O_6$) (Ajax Finechem)
 Bovine serum albumin (BSA) (Sigma)
 Ethylenediaminetetraacetic acid (EDTA) (Merck)
 Potassium chloride (KCl) (Sigma)
 Potassium phosphate monobasic anhydrous (KH_2PO_4) (Sigma)
 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) ($C_4H_5OC_2H_5$) (Sigma)
 Adenosine 5'-diphosphate (ADP) (Sigma)
 Malic acid ($HO_2CCH_2CHOHCO_2H$) (Sigma)
 Glutamic acid ($C_5H_9NO_4$) (Sigma)
 Dimethyl sulfoxide (C_2H_6OS) (DMSO) (Sigma)
 Digitonin (Sigma)
 Potassium cyanide (KCN) (Merck)
 Absolute ethanol (C_2H_6O) (Lab-scan)
 Folin-phenol reagent (Sigma)
 Sodium hydroxide (NaOH) (Ajax Finechem)
 Sodium carbonate (Na_2CO_3) (Merck)
 Potassium tartrate ($K_2C_4H_4O_6$) (Carlo Erba)
 Copper (II) sulphate ($CuSO_4$) (Ajax Finechem)

3. เครื่องมือ

Heidolph motor drive tissue homogenizer (Type 50203RZR2)

pH-meter (Beckman, U.K.)

Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge (Himac model CR20B3) and Rotor (model PRP18-3)

Oxygraph apparatus ประกอบด้วย

- Biological Oxygen Monitor (YSI model 53)
- Clark Oxygen Electrode (YSI5331)
- Gilson Oxygen Chamber (water-jacketed chamber)
- Strip Chart Recorder (Gilson Recorder Model N2)

Oxygen Probe Service Kit (YSI5775) ประกอบด้วย

- Clark Type Membrane Booklets (Standard)
- Oxygen Probe Solution : half saturated KCl solution
- O-rings

Electromagnetic Stirrers (Oxygraph-2k, Oroboros Instruments) พร้อม Magnetic stirrer

Temperature controlled circulator water bath

UV/Visible spectrochotometer (UV-160A, Shimadzu)

Vortex mixer (Velp. Scientifica, Europe)

Vacuum Pump

Temperature controlled water bath

ตู้เย็นและตู้แช่แข็งควบคุมอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

คอมพิวเตอร์

เครื่องชั่งสาร

Novel object recognition set

Locomotor activity set (UGO Basile, Comerico, Italy)

นาฬิกาจับเวลา

กล้องถ่ายวิดีโอ

4. อุปกรณ์

Thomas glass homogenizer tube with Teflon pestle

Centrifuge tube ขนาด 15 มล.

Micropipette ขนาด 200, 1,000 และ 5,000 มล. (Pipet-Lite™, U.S.A.)

Hamilton micro-syringe ชนิดมีหัวติด ขนาด 10 มล.

Hamilton micro-syringe ชนิดแยกหัว ขนาด 10 มล.

หัวเข็มสแตนเลส เบอร์ 27 ยาวประมาณ 3 มม.

กระบอกเข็มฉีดยา ขนาด 1 มล.

หัวเข็มฉีดยา เบอร์ 27

อุปกรณ์ผ่าตัด ประกอบด้วย ถาดอะลูมิเนียม กรรไกร มีด Tissue forcep

น้ำแข็งและกล่องโฟมบรรจุน้ำแข็ง

ช้อนสแตนเลส

Gavage tube

Cylinder

แท่งแก้ว

ปิเกตอร์

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมสารละลายบีตาแอมิโลยด์ ($A\beta_{25-35}$)

นำผง $A\beta_{25-35}$ มาละลายในน้ำกลั่น (deionized double distilled water) ให้ได้ความเข้มข้น 1 มก./มล. และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 วัน หลังจากนั้นนำมาตรวจดูการจับตัวกันของโปรตีนด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) ลักษณะการเกาะกลุ่มของ $A\beta_{25-35}$ ที่ใช้ได้จะมีโครงสร้างเป็น fibril และ amorphous globular (อัญชลี คำเอก, 2553)

2. การเหนี่ยวนำให้หนูเกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยการฉีด $A\beta_{25-35}$

สลบหนูโดยการฉีด pentobarbital sodium ขนาด 60 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งใช้ 0.9% sterile normal saline เป็นตัวทำละลาย เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ทดสอบภาวะสลบด้วยวิธีการจิกเท้า เมื่อหนูสลบลึกแล้ว ทำการฉีดสารละลาย $A\beta_{25-35}$ ด้วยเข็ม micro-syringe เข้าโพรงสมอง (intracerebroventricular, i.c.v.) ขนาด 1 มล. ต่อตัว โดยเจาะเข็มผ่านกะโหลกเข้าไปยังโพรงสมอง lateral ventricle ข้างขวาของสมอง ตำแหน่งที่ฉีดวัดจากจุดกึ่งกลางระหว่างโคนหูกับหางตาซึ่งอยู่หลังจุดอ้างอิง (Bregma) ประมาณ 0.5 มม. และจาก midline มาทางขวา 1 มม. ทำมุม 90 องศากับกะโหลก และฉีดที่ความลึก 3 มม. (Tsunekawa และคณะ, 2008) สำหรับหนูกลุ่ม sham จะฉีดน้ำกลั่นแทน $A\beta_{25-35}$ หลังจากนั้นให้หนูพักอยู่ในอุณหภูมิห้องจนกว่าจะฟื้นจากสลบ จึงนำกลับเข้ากรงเลี้ยงปกติ เริ่มทำการทดสอบพฤติกรรมหลังจากฉีด $A\beta_{25-35}$ 7 วัน

3. การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

การทดลองแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 12 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่ม sham ถูกฉีดน้ำกลั่นแทน $A\beta_{25-35}$ และได้รับกระสายยา (vehicle) ขนาด 10 มล./กก. น้ำหนักตัว ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุม ถูกฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ และได้รับกระสายยา (vehicle) ขนาด 10 มล./กก. น้ำหนักตัว ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

กลุ่มที่ 3 ถูกฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ และได้รับอีซีเอ233 ขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัว ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

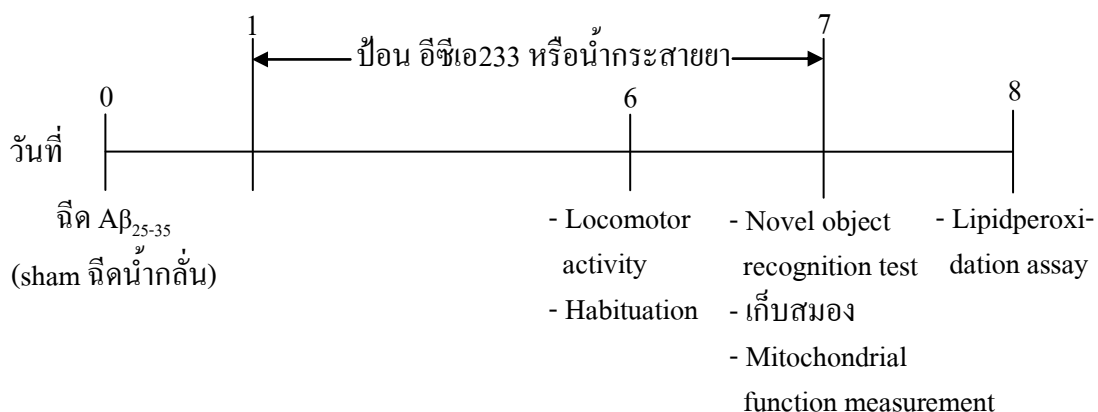
กลุ่มที่ 4 ถูกฉีดด้วยสารละลาย $A\beta_{25-35}$ และได้รับอีซีเอ233 ขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน

ตารางที่ 1 แสดงการแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

กลุ่ม	จำนวนหนู	เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะหลงลืม	สารทดสอบ (p.o., bid.)
กลุ่มที่ 1 (sham)	n = 12	ฉีดน้ำกลั่น (i.c.v.)	vehicle ขนาด 10 มล./กก. น้ำหนักตัว
กลุ่มที่ 2 ($A\beta$)	n = 12	ฉีดสารละลาย $A\beta_{25-35}$ (i.c.v.)	vehicle ขนาด 10 มล./กก. น้ำหนักตัว
กลุ่มที่ 3 ($A\beta$ +ECa10)	n = 12	ฉีดสารละลาย $A\beta_{25-35}$ (i.c.v.)	อีซีเอ233 ขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัว
กลุ่มที่ 4 ($A\beta$ +ECa30)	n = 12	ฉีดสารละลาย $A\beta_{25-35}$ (i.c.v.)	อีซีเอ233 ขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัว

4. การบริหารยา

ใช้สารละลาย 0.5% ของ carboxymethylcellulose (CMC) ในน้ำเป็นกระสายยาของอีซีเอ 233 หนูเมาส์ได้รับสารทดสอบโดยการป้อนด้วย gavage tube เข้าสู่กระเพาะอาหาร โดยให้สารทดสอบวันละ 2 ครั้ง เวลา 7.00 น. และ 17.00 น. เริ่มให้ CMC และอีซีเอ233 หลังจากฉีด $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. 1 วันและให้ทุกวันจนถึงสิ้นสุดการทดสอบพฤติกรรม รวมให้ยาเป็นเวลา 7 วัน (รูปที่ 12)



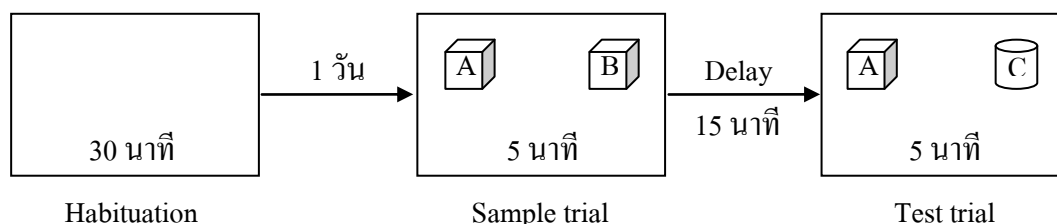
รูปที่ 12 แผนผังแสดงแผนการดำเนินการวิจัย

5. การทดสอบพฤติกรรม (Behavioral tests)

5.1 การทดสอบพฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำโมเดล Novel object recognition

อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบนี้ ได้แก่ กล่องพลาสติกขนาดกว้าง 40 ซม. ยาว 60 ซม. และสูง 50 ซม. และวัตถุ 3 ชิ้นคือ A, B และ C วัตถุ A และ B มีรูปร่างและขนาดเหมือนกัน ส่วนวัตถุ C มีขนาดใกล้เคียงกันแต่สีและรูปร่างต่างจาก A และ B วัตถุทั้ง 3 ชิ้นไม่มีกลิ่น ก่อนการทดสอบ 1 วัน ทำ habituation ซึ่งเป็นการทำให้หนูคุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมภายในกล่อง ทำโดยการปล่อยหนูให้เดินสำรวจภายในกล่องที่ไม่มีวัตถุเป็นเวลา 30 นาที วันต่อมาทำการทดสอบโดยแบ่งเป็น 2 ช่วงคือ sample trial ทำโดยวางวัตถุ A และ B ซิดผนังกล่องด้านยาว แต่ละอันห่างจากผนังกล่องทั้ง 2 ด้านเป็นระยะ 10 ซม. (รูปที่ 13) ปล่อยหนูซิดกับผนังฝั่งตรงข้ามกับวัตถุและอยู่กึ่งกลางระหว่างวัตถุ 2 ชิ้น ปล่อยให้หนูสำรวจภายในกล่องเป็นเวลา 5 นาที บันทึกเวลาที่หนูสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นโดยมีหลักการคือ หนูดมวัตถุโดยจุมูกห่างจากวัตถุไม่เกิน 2 ซม. เลี้ยว หรือสัมผัสวัตถุด้วยเท้าหน้าในขณะที่ดมวัตถุอยู่ ส่วนการเดินรอบๆ ปีน เดินข้าม นั่ง หรือยืนบนวัตถุไม่ถือว่าหนูสำรวจและสนใจวัตถุชิ้น (Sambeth และคณะ, 2007, Sutcliffe และคณะ, 2007) จากนั้นนำหนูไปเก็บในกรงเลี้ยงตามเดิม เช็ดทำความสะอาดวัตถุทั้ง 2 ชิ้นด้วยแอลกอฮอล์ 70% และน้ำสะอาด 15 นาทีถัดมา นำหนูตัวเดิมมาทดสอบในช่วง test trial โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับช่วง sample trial แต่เปลี่ยนวัตถุ A หรือ B เป็นวัตถุ C เช็ดทำความสะอาดวัตถุทั้ง 2 ชิ้นด้วยแอลกอฮอล์ 70% และน้ำสะอาดก่อนนำหนูตัวต่อไปเข้าทดสอบ บันทึกเวลาที่หนูสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น

ตัวแปรที่ทำการวัดในการทดสอบนี้คือ 1) exploratory time คือเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุ A, B หรือ C ในแต่ละ trial หน่วยเป็นวินาที 2) total exploratory time คือระยะเวลาทั้งหมดที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้นในแต่ละ trial หน่วยเป็นวินาที 3) %Preference index คำนวณจากสูตร $\%Preference\ index = (exploratory\ time \times 100) / total\ exploratory\ time$ การคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์โดยหารด้วยระยะเวลาทั้งหมดที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้นเป็นการตัดอิทธิพลของความตื่นตัวหรือความสนใจของหนูแต่ละตัวที่ไม่เท่ากัน อันส่งผลต่อเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นและทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มได้ชัดเจน หากหนูมีความสนใจในวัตถุ 2 ชิ้นไม่ต่างกัน ความน่าจะเป็นที่หนูจะสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นคิดเป็น 50% (50% chance) แต่หากหนูมีความสนใจในวัตถุชิ้นใดชิ้นหนึ่งเป็นพิเศษ ความน่าจะเป็นที่หนูจะสำรวจวัตถุนั้นจะมากกว่า 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



รูปที่ 13 แสดงวิธีการทดสอบ Novel object recognition (NOR)

5.2 การทดสอบพฤติกรรมเคลื่อนไหวนิว (Locomotor activity test)

เป็นการวัดการทำงานของระบบประสาทยนต์ เพื่อพิสูจน์ว่าการให้ $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. และ/หรือการให้อีซีเอ233 ไม่มีผลต่อระบบประสาทยนต์ เป็นการยืนยันว่าผลของการทดสอบด้านการเรียนรู้และความจำนั้นเกิดจากภาวะหลังล้มของสัตว์ทดลอง ไม่ใช่จากความผิดปกติของระบบประสาทยนต์ อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบนี้คือ Activity Cage (UGO Basile 7430) ประกอบด้วยกล่องพลาสติก ขนาดความกว้าง 23 ซม. ยาว 35 ซม. และสูง 11 ซม. พื้นกล่องเป็นแท่งสแตนเลสมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 3 มม. แต่ละแท่งห่างกันประมาณ 11 มม. กล่องนี้ต่อเข้ากับเครื่องวัดซึ่งจะทำการนับจำนวนครั้งที่หนูก้าวเดินบนแท่งสแตนเลส ให้นู้อยู่ในกล่องเป็นเวลา 5 นาทีและบันทึกจำนวนครั้งของการเคลื่อนไหวนิวในหนูกลุ่มต่างๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 14)



รูปที่ 14 อุปกรณ์ Locomotor activity test

ภายหลังการทดสอบ Novel object recognition หนูเมาส์แต่ละกลุ่มจะถูก sacrifice ด้วยวิธี cervical dislocation แล้วแยกสมองออกมา แบ่งเป็น 2 ชุดเพื่อทำการวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมอง และวัดปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน การวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองจะต้องทำทันทีหลังแยกสมองออกมา ส่วนสมองที่จะทำการวัดปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันจะถูกแช่น้ำหนักและแช่แข็งใน dry ice ทันทีหลังจากแยกสมองออกมาก่อนเก็บใส่กล่อง และเก็บไว้ในตู้แช่อุณหภูมิต่ำ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะทำการวัดในวันถัดมา

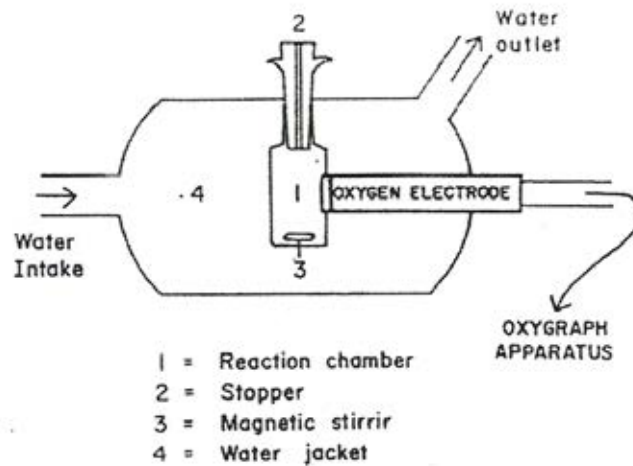
6. การทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรีย

6.1 การเตรียมไมโทคอนเดรียจากสมองของหนูเมาส์

วิธีการเตรียมไมโทคอนเดรียจากสมองของหนูเมาส์ปรับปรุงจากวิธีของ Cairns และคณะ (1998) สลับหนูโดยการฉีด pentobarbital sodium ขนาด 60 มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งใช้สารละลาย น้ำเกลือ 0.9% เป็นตัวทำละลาย เข้าทางช่องท้อง (i.p.) เมื่อสลบแล้ว sacrifice หนูด้วยวิธี cervical dislocation และ decapitation แยกสมองเฉพาะส่วน cerebrum มาชั่งน้ำหนักและใส่ centrifuge tube ขนาด 15 มล. เติม isolation medium ให้ได้อัตราส่วน 5 มล. ต่อสมอง 3 กรัม บด (homogenize) ด้วยเครื่อง homogenizer ที่ความเร็ว 70 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นนำไป centrifuge ด้วย เครื่อง refrigerated centrifuge ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 2,000g เป็นเวลา 3 นาที เก็บส่วนบนที่เป็นของเหลว (supernatant) มาเติม 0.2% digitonin ที่ละลายใน DMSO 10 มล. และ centrifuge อีกครั้งที่ 2,000g เป็นเวลา 3 นาที จากนั้นนำส่วน supernatant มา centrifuge ที่ 12,000g เป็นเวลา 10 นาที ทิ้งส่วน supernatant ล้างส่วน pellet และ resuspend ใน isolation medium นำไป centrifuge อีกครั้งที่ 12,000g 10 นาที ล้าง pellet หลายๆ ครั้งด้วย incubation medium และ resuspend pellet ใน incubation medium 1 มล. ในทุกๆ ขั้นตอนดังกล่าวทำในอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (ice-cold) ใช้สมองหนู 1 ตัวต่อ incubation medium 1 มล.

6.2 วิธีการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย

วัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียด้วยเครื่อง biological oxygen monitor (YSI model 53) ซึ่งประกอบด้วย oxygen electrode (YSI5331), reaction chamber และบันทึกผลด้วย oxygraph apparatus มีการควบคุมอุณหภูมิของน้ำไหลเวียนให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียสตลอดเวลา (รูปที่ 15) ใส่ incubation medium 1,700 มล. ลงใน reaction chamber และเติมสารแขวนลอยไมโทคอนเดรีย (mitochondrial suspension) 200 มล. ทิ้งไว้ประมาณ 1 นาทีเพื่อปรับอุณหภูมิและปรับค่าเริ่มต้นของการใช้ออกซิเจนของสารแขวนลอยไมโทคอนเดรียให้นิ่ง แล้วใส่สารตั้งต้น (substrate) คือ 1 M glutamate กับ 1 M malate (glutamate+malate) (pH 7.2) จากนั้นเติมสารละลาย 0.3 M ADP กับ 0.6 M Phosphate ion (ADP+Pi) (pH 7.2) ซึ่งจะทำให้เกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วเพื่อเปลี่ยน ADP ไปเป็น ATP เรียกช่วงการหายใจนี้เป็น state 3 respiration หรือ active respiring state หลังจากนั้นอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเนื่องจาก ADP ถูกเปลี่ยนไปเป็น ATP จนหมด เรียกการหายใจช่วงนี้เป็น state 4 หากกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียถูกยับยั้ง อัตราการหายใจใน state 3 จะลดลง ทำให้ความแตกต่างของอัตราการหายใจระหว่าง state 3 กับ state 4 ลดลง

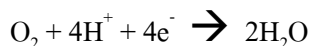


รูปที่ 15 แสดงส่วนประกอบและการทำงานของ biological oxygen chamber คือ (1) Reaction chamber (oxygen chamber) ความจุ 2 มล. มี (2) Stopper สำหรับปิด chamber เพื่อป้องกันไม่ให้ออกซิเจนเข้าไปละลายใน chamber อันเป็นการรบกวนการทดลอง รูเล็กๆตรงกลาง stopper เป็นที่ยอมให้ฟองอากาศภายใน chamber ออกได้และใช้เป็นที่เติมสารต่างๆลงไปด้วยเข็ม micro-syringe (3) magnetic stirrer ใช้สำหรับกวนสารต่างๆใน chamber ตลอดเวลาที่ทดลอง (4) water jacket มีท่อต่อเข้ากับ water bath เพื่อให้ น้ำ 37 องศาเซลเซียสไหลผ่าน ใช้ควบคุมอุณหภูมิ chamber ให้อยู่ที่ 37 องศาเซลเซียสตลอดเวลา oxygen electrode มีแผ่น Teflon membrane หุ้มกั้นระหว่าง chamber กับ electrode ระหว่าง membrane กับ electrode มีสารละลาย 2M KCl ซึ่งเป็น electrolyte ของ electrode เพื่อใช้ในการวัดปริมาณออกซิเจนของสารละลายใน chamber

ตารางที่ 2 แสดง state ต่างๆ ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย (Chance and Williams, 1955)

	State 1	State 2	State 3	State 4	State 5
รูปแบบการหายใจ	ใช้ออกซิเจน	ใช้ออกซิเจน	ใช้ออกซิเจน	ใช้ออกซิเจน	ไม่ใช้ออกซิเจน
ปริมาณ ADP	น้อย	มาก	มาก	น้อย	มาก
ปริมาณ substrate	น้อย	น้อยมาก	มาก	มาก	มาก
อัตราการหายใจ	ช้า	ช้า	เร็ว	ช้า	ไม่มี
Rate-limiting component	ADP	substrate	Respiratory chain	ADP	ออกซิเจน

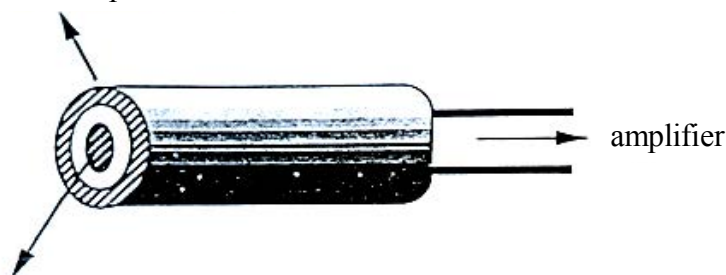
หลักการวัดปริมาณออกซิเจนใน chamber ของ oxygen electrode คือใช้กระแสไฟฟ้าขนาดต่ำประมาณ 0.8 โวลต์ต่อขั้ว silver anode (+) และขั้ว platinum cathode (-) ออกซิเจนจะแพร่ผ่านแผ่น Teflon membrane แล้วถูก reduce เป็นน้ำที่ platinum cathode (รูปที่ 16)



วงจรจะครบที่ silver anode ซึ่งจะถูกกัดกร่อนไปเรื่อยๆ โดย KCl



CATHODE : platinum electrode



ANODE : Ag/Ag/Cl electrode

รูปที่ 16 แสดงส่วนประกอบของ oxygen electrode

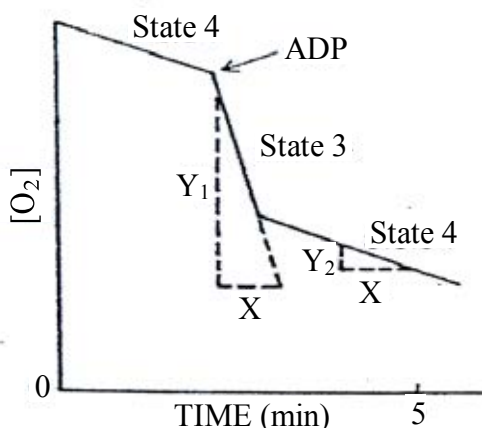
กระแสที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มข้นของออกซิเจนใน chamber กระแสไฟฟ้าที่วัดได้จะถูกแปลงค่าเป็นสัญญาณที่อ่านเป็นกราฟได้ด้วยเครื่อง strip chart recorder (Gilson Recorder Model N2) ขณะทำการวัดจึงต้องเปิด magnetic stirrer เพื่อกวนให้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในสารละลายใน chamber ไหลเวียนมายังผิวหน้า electrode อย่างทั่วถึง

6.2.1 การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory control index หรือ RCI)

การเกิดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนร่วมกับการเกิดการสังเคราะห์ ATP เรียกว่า เกิดการ coupling ของปฏิกิริยา RCI เป็นค่าดัชนีที่บ่งชี้ว่าในกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียเกิดการ coupling ของกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนกับการสังเคราะห์ ATP ดีเพียงใด หากเกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรีย เช่น ในการแยกไมโทคอนเดรียทำไม่ได้ดี หรือเติมสารพวก detergent ที่ทำให้เกิดการ uncoupling จะทำให้การ coupling ไม่ดีทำให้ได้ค่า RCI ต่ำ โดยปกติทั่วไปค่า RCI ที่ใช้ได้จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3-10 โดยคำนวณได้จากสมการ

$$\text{RCI} = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 4}} = \frac{\text{ความชันของเส้นกราฟใน state 3}}{\text{ความชันของเส้นกราฟใน state 4}}$$

โดยความชันนั้นสามารถวัดได้จาก oxygraph tracing (รูปที่ 17) ซึ่งในการศึกษานี้กำหนดให้ไมโทคอนเดรียที่แยกออกจากสมองที่สามารถใช้ในการทดลองได้มีค่า RCI ไม่ต่ำกว่า 3



รูปที่ 17 oxygraph tracing แสดงวิธีการหาค่าต่างๆ สำหรับการคำนวณหาค่า RCI

6.3.2 วิธีการคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียสามารถคำนวณได้จากสูตร

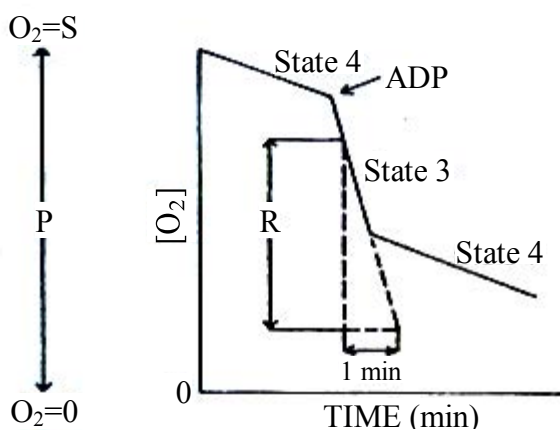
$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times S}{P} \quad \text{หน่วยเป็น natoms O/นาที}$$

โดยที่ค่า R และ P วัดจาก oxygraph tracing ดังรูปที่ 18

R = ความสูงของเส้น R

P = ความสูงของเส้น P

S = จำนวน natoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ใน reaction mixture ก่อนที่จะถูกไมโทคอนเดรียใช้ไปในการทำปฏิกิริยา



รูปที่ 18 oxygraph tracing แสดงวิธีการหาค่าต่างๆ สำหรับการคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย

หากทราบปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียแล้วนำมาหาอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณตามวิธีข้างต้นจะทำให้ได้ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียต่อนาที จากนั้นนำค่าปริมาณโปรตีนที่วัดได้มาหาร หน่วยเป็น natoms O/นาที/มก. โปรตีน ส่วนค่า S ในสูตรนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของ reaction mixture ใน chamber และอุณหภูมิขณะทำการทดลอง ถ้าปริมาณมาก ออกซิเจนจะละลายอิมตัวได้มาก และถ้าอุณหภูมิต่ำจะทำให้ ออกซิเจนละลายอิมตัวได้มากกว่า อุณหภูมิสูง การคำนวณหาค่า S จะหาได้จากสูตร

$$S = A \times \text{ปริมาณทั้งหมดของ reaction mixture ที่ทำปฏิกิริยา} \quad \text{หน่วยเป็น } n \text{ atoms O}$$

A = จำนวน natoms ออกซิเจนที่ละลายอิมตัวในน้ำ (reaction mixture) 1 มล. ซึ่งหาได้จากสูตร

$$A = \frac{s \times p \times N \times 10^9}{V \times 100} \quad \text{หน่วยเป็น } \text{natoms O/มล.}$$

โดยที่ s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมของออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำการทดลอง (ปริมาณของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ที่ 0 องศาเซลเซียส และ 760 มม.ปรอท) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

$$p = \text{สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ} = 21\%$$

$$N = \text{จำนวนอะตอมใน 1 โมเลกุลของออกซิเจน} = 2$$

V = ปริมาตรก๊าซที่ 0 องศาเซลเซียส ความดัน 1 บรรยากาศ เทียบกับ 1 กรัมโมล = 22,400 มล.

เมื่อแทนค่า s, p, N และ V ลงในสมการ จะทำให้สามารถคำนวณหาปริมาณออกซิเจนที่ละลายอิมตัวในน้ำ 1 มล. (A) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสได้เท่ากับ 444.9 natoms O/มล. นอกจากนี้ค่า A ที่คำนวณได้ยังสามารถนำไปใช้คำนวณหาอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ ได้เช่นเดียวกับค่า S โดยดูจาก oxygraph tracing (รูปที่ 18) หน่วยเป็น natoms O/มล./นาที โดยใช้สูตร

$$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times A}{P} \quad \text{หน่วยเป็น } \text{natoms O/มล./นาที}$$

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R

$$P = \text{ความสูงของเส้น P}$$

A = จำนวน natoms ออกซิเจนที่ละลายอิมตัวในน้ำ 1 มล.

ในการทดลองนี้จะคำนวณเป็นค่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ต่อปริมาณ โปรตีนของไมโทคอนเดรียที่เตรียม (natoms O/นาที่/มก. โปรตีน)

6.2.3 วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

เนื่องจากความเข้มข้นของ mitochondrial suspension ที่เตรียมแต่ละครั้งมีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนที่วัดได้จึงต้องมีการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียของทุกๆ ตัวอย่างเพื่อสามารถนำค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของแต่ละตัวอย่างมาเปรียบเทียบกันได้ ซึ่งในการศึกษานี้ใช้วิธีการหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียของ Lowry (1951)

นำสารแขวนลอยไมโทคอนเดรียมา 10 มล. เจือจางด้วยน้ำกลั่น 3 มล. จากนั้นนำสารแขวนลอยไมโทคอนเดรียที่เจือจางแล้วมา 1 มล. และเติม Alkaline-copper reagent 1 มล. เขย่าให้เข้ากัน ทิ้งไว้ 10 นาที เติม folin-phenol reagent 3 มล. แล้วอุ่นในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 50 องศาเซลเซียส 10 นาที จากนั้นทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้องแล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer โดยเทียบหาปริมาณโปรตีนกับ standard curve ที่วัดจากสารละลาย BSA ความเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 และ 0.3 มก./มล. หน่วยที่วัดได้เป็น มก./มล.

หลังจากการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนแล้ว สารแขวนลอยไมโทคอนเดรียแต่ละตัวอย่างจะถูกนำไปวัดปริมาณโปรตีน ค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนของสารแขวนลอยไมโทคอนเดรียในสมองหนูที่ถูกฉีดโพรงสมองกลุ่มต่างๆ คือ กลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. เท่ากับ 3.33, 3.38, 3.20 และ 3.34 มก./มล. ตามลำดับ ส่วนค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีนของสารแขวนลอยไมโทคอนเดรียในสมองหนูปกติที่ทำการทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro* เท่ากับ 3.8 มก./มล.

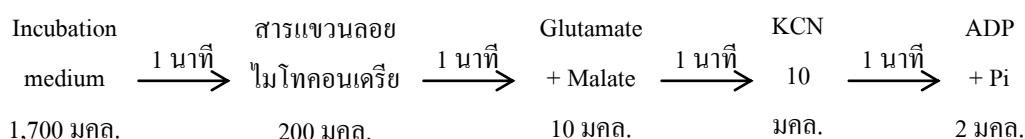
7. การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro*

เนื่องจากกลไกการยับยั้งไมโทคอนเดรียของ A β คือการยับยั้งที่เอนไซม์ cytochrome *c* oxidase ในกระบวนการกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro* เพื่อพิสูจน์ว่าอีซีเอ233 มีกลไกการออกฤทธิ์ผ่าน cytochrome *c* oxidase หรือไม่ โดยการนำหนูเมาส์ปกติที่ไม่ได้รับสารทดสอบใดๆ มาแยกไมโทคอนเดรียจากสมองด้วยวิธีการแยกไมโทคอนเดรียดังข้อ 6.1 โดยในการวัดแต่ละครั้งใช้สมองหนู 2 ตัวรวมกันต่อ incubation medium 2 มล. และใช้ตัวยับยั้งจำเพาะของ cytochrome *c* oxidase คือ potassium cyanide (KCN)

การวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro* ใช้อุปกรณ์การวัดดังอธิบายในข้อ 6.2 และทำอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 4 ในการศึกษาการทำงานของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro* นี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อย ได้แก่ การหาค่า IC50 ของ KCN ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ และผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่เสียไปเนื่องจากถูกยับยั้งโดย KCN

7.1 การหาค่า IC50 ของสารละลาย KCN

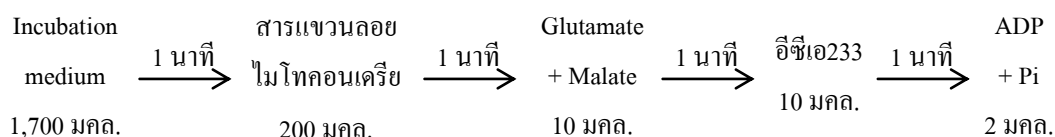
เพื่อเป็นการหาความเข้มข้นของ KCN ที่เหมาะสมในการยับยั้งไมโทคอนเดรีย ค่า IC50 คือความเข้มข้นของ KCN ที่สามารถยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียลงครึ่งหนึ่ง เนื่องจากค่า IC50 ของ KCN ที่ใช้ในการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับวิธีการทดลอง ดังนั้นจึงต้องมีการหาค่า IC50 ของ KCN เพื่อใช้ในการทดสอบผลของอีซีเอ233 ขั้นตอนการทดลองคือ ใส่สารแขวนลอยไมโทคอนเดรีย 200 มก. ลงใน reaction chamber ที่มี incubation medium อยู่ 1,700 มก. ปรับค่าเริ่มต้นของการใช้ออกซิเจนของสารแขวนลอยไมโทคอนเดรียให้หนึ่ง ใส่ substrate คือ 1 M glutamate + malate 10 มก. เติมสารละลาย KCN ความเข้มข้นต่างๆ (0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1, 10 มก./มล. ในน้ำกลั่น) 10 มก. จากนั้นเติมสารละลาย 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 2 มก. เพื่อดูผลการใช้ออกซิเจนในการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 4 เปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียปกติที่ไม่ได้รับ KCN นำอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 มาคำนวณเป็น %inhibition และ plot กราฟเพื่อหาค่าความเข้มข้นของสารละลาย KCN ที่สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนในการหายใจ state 3 ของไมโทคอนเดรียลง 50% ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของอีซีเอ 233 ในการทดลองถัดไป (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษาอัตราการใช้ออกซิเจนใน oxygen chamber ในการหาค่า IC50 ของ KCN

7.2 การศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

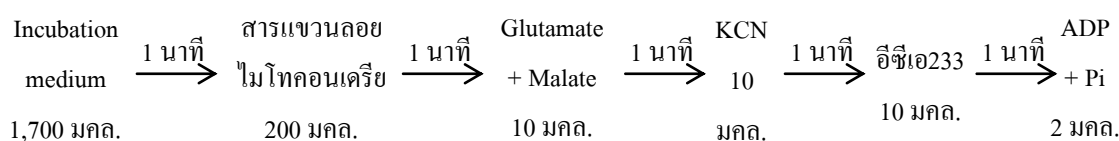
เพื่อทดสอบความเป็นพิษของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย มีขั้นตอนคือ ใส่สาร-แวนลอยไมโทคอนเดรีย 200 มก. ลงใน reaction chamber ที่มี incubation medium อยู่ 1,700 มก. ปรับค่าเริ่มต้นของการใช้ออกซิเจนของสารแวนลอยไมโทคอนเดรียให้ตั้ง substrate คือ 1 M glutamate + malate 10 มก. เติมสารละลายของอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ (1, 10, 25, 50, 75, 100 มก./มล. ใน DMSO) 10 มก. จากนั้นเติมสารละลาย 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 2 มก. เพื่อดูผลการใช้ออกซิเจนในการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 4 เปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียปกติที่ได้รับ DMSO (รูปที่ 20)



รูปที่ 20 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษ้อัตราการใช้ออกซิเจนใน oxygen chamber เพื่อศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

7.3 การศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งการทำงานของ cytochrome c oxidase ด้วย KCN

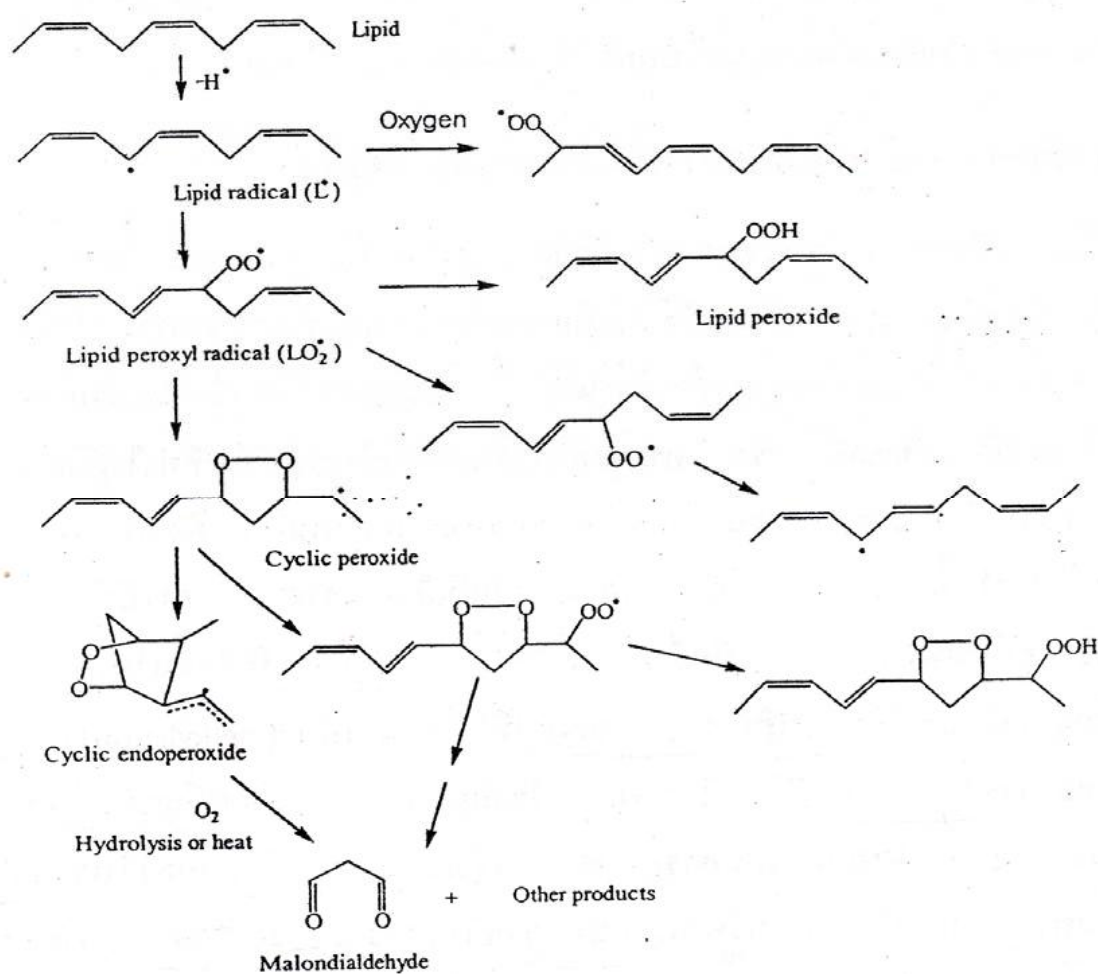
มีขั้นตอนคือ ใส่สารแวนลอยไมโทคอนเดรีย 200 มก. ลงใน reaction chamber ที่มี incubation medium อยู่ 1,700 มก. ปรับค่าเริ่มต้นของการใช้ออกซิเจนของสารแวนลอยไมโทคอนเดรียให้ตั้ง substrate คือ 1 M glutamate + malate 10 มก. เติมสารละลาย KCN ความเข้มข้นระดับ IC50 ที่หาได้ 10 มก. เติมสารละลายของอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ (0, 10, 25, 50, 75, 100 มก./มล. ใน DMSO) 10 มก. จากนั้นเติมสารละลาย 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 2 มก. เพื่อดูผลการใช้ออกซิเจนในการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 4 เปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียกลุ่มควบคุมที่ได้รับ KCN กับ DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของอีซีเอ233 ส่วนกลุ่มปกติคือกลุ่มที่ได้รับแต่ DMSO (รูปที่ 21)



รูปที่ 21 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการศึกษ้อัตราการใช้ออกซิเจนใน oxygen chamber เพื่อศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย KCN

8. การวัดปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน (Lipid peroxidation assay)

Lipid peroxidation เป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ของปฏิกิริยาออกซิเดชันที่เกิดกับเยื่อหุ้มเซลล์ ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ได้แก่ ปฏิกิริยาเริ่มต้นของการเกิดโซ่ (Initiation) ปฏิกิริยาการทวีเพิ่มขึ้น (Propagation) และการสิ้นสุดปฏิกิริยา (Termination) ปฏิกิริยาลูกโซ่เริ่มต้นด้วยการมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น และอนุมูลอิสระนี้เข้าทำปฏิกิริยากับลิพิดซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์และทำให้เกิดอนุมูลลิพิด (Lipid radical) และจับกับออกซิเจนเป็น peroxide radical จำนวนมาก (รูปที่ 22) ผลผลิตที่เกิดขึ้นมาจาก Lipid peroxidation ได้แก่ สาร hydrocarbon เช่น ethane ethene และ penthane รวมถึงสาร ketone และสาร aldehyde เป็นต้น ซึ่งสาร aldehyde ที่มีความสำคัญ คือ Malondialdehyde (MDA) เมื่อ MDA ทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid จะได้เป็น thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) ซึ่งเป็นสารมีสีและวัดปริมาณด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร (Gavino และคณะ, 1981)



รูปที่ 22 แสดงกลไกการเกิด Lipid peroxidation

การเกิดอนุมูลอิสระเป็นกลไกการเกิดพิษกลไกหนึ่งของ AB_{25-35} ซึ่งส่งผลทำลายเซลล์ประสาทและมีผลต่อการเรียนรู้และความจำ Lipid peroxidation assay เป็นการทดลองเพื่อศึกษาผลของการป้อนอีซีเอ233 เป็นเวลา 7 วันต่อปริมาณอนุมูลอิสระในสมองหนูที่ถูกฉีด AB_{25-35} เข้าสู่โพรงสมอง และเป็นการศึกษากลไกการทำงานของอีซีเอ233 ในการฟื้นฟูความจำของหนู

ขั้นตอนการแยก MDA จากสมองคือ นำสมองหนูที่ถูกแช่แข็งมาแช่ใน phosphate buffer (pH 7.4) ประมาณ 5 มล. เมื่อนิ่มแล้วจึงตัดและบดให้ละเอียดด้วยเครื่อง homogenizer นำ homogenate มา 0.1 มล. ใส่ในหลอด centrifuge เติม acetic acid (pH 3.5) 1.5 มล. thiobarbituric acid 1.5 มล. และ sodium dodecyl sulphate 0.2 มล. จากนั้นนำไปแช่ในอ่างน้ำอุ่นที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที เมื่อครบเวลาแล้วนำออกมาทิ้งให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง เติมสารละลาย butanol-pyridine ซึ่งเตรียมในอัตราส่วน 15:1 ปริมาณ 5 มล. และน้ำกลั่น 1 มล. แล้วนำไป centrifuge ที่ 5,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที เก็บเอา organic partition ที่อยู่ชั้นบนไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ในการทำ standard curve เพื่อใช้เปรียบเทียบค่าปริมาณ MDA นี้ใช้ MDA 0.1 มล. ความเข้มข้น 10 นาโนโมลาร์, 100 นาโนโมลาร์, 1 ไมโครโมลาร์, 10 ไมโครโมลาร์ และ 100 ไมโครโมลาร์ และใช้ phosphate buffer 0.1 มล. เป็น blank ค่าที่ได้มีหน่วยเป็นนาโนโมลาร์ นำค่า MDA ที่วัดได้มาเทียบกับน้ำหนักสมองที่ชั่งและบันทึกไว้ก่อนนำสมองไปแช่แข็ง หน่วยเป็น นาโนโมลาร์/กรัม น้ำหนักสมอง

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

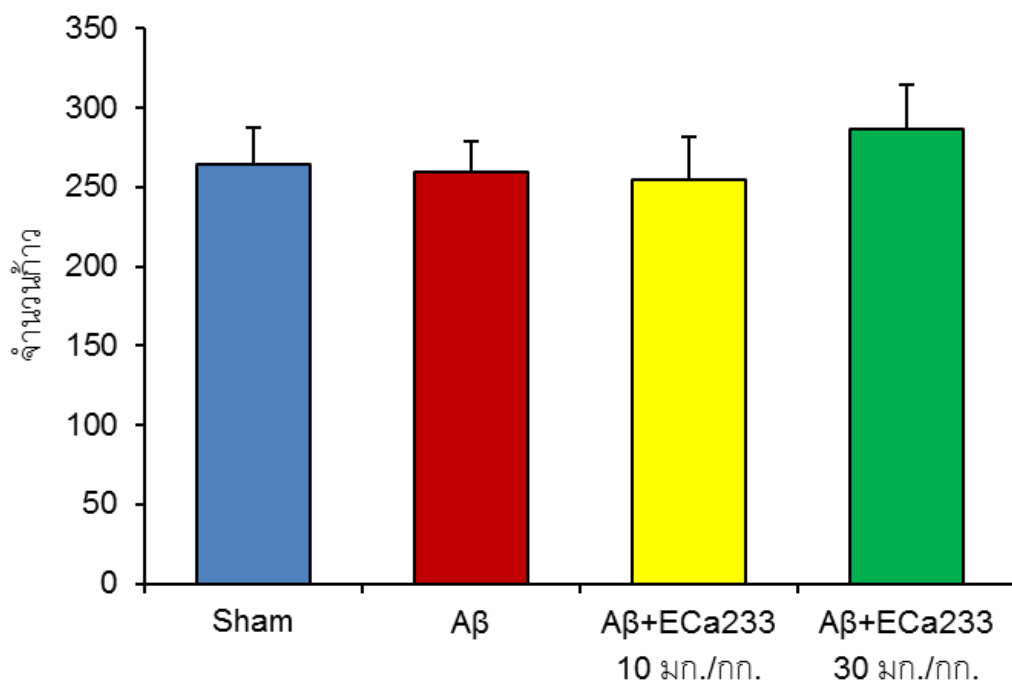
ผลการทดลองแสดงค่าเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM ในการทดสอบ Novel object recognition เปรียบเทียบเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น (exploratory time) ภายในกลุ่มด้วย paired Student's *t*-test เปรียบเทียบ %Preference index ของหนูแต่ละกลุ่มกับ 50% chance โดยใช้ One-sample *t*-test การทดลองอื่นๆ เปรียบเทียบผลการทดลองด้วย One-way ANOVA และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มด้วย Tukey's HSD *post hoc* test โดยกำหนดให้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่า $P < 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

1. ผลของบีตาแอมิโลยด์₂₅₋₃₅ และสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของประสาทยนต์ (Locomotor activity) ของหนูเมาส์

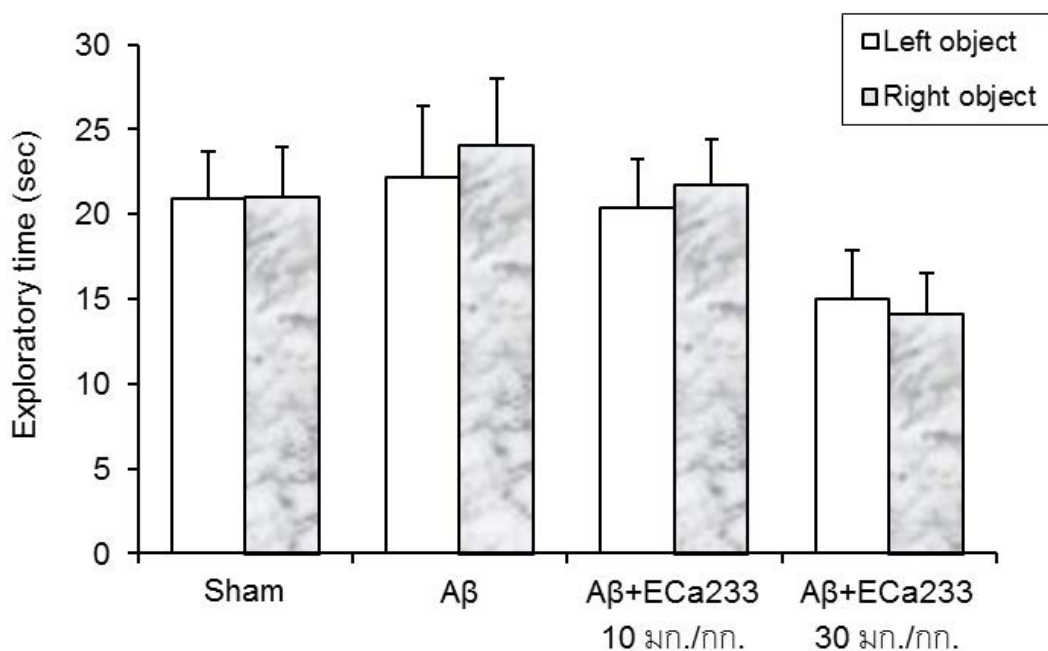
ในการวิเคราะห์ผลของ $A\beta_{25-35}$ และอีซีเอ233 ต่อการทำงานของประสาทยนต์ในวันที่ 6 หลังจากการฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าสู่โพรงสมองโดยการปล่อยให้หนูแต่ละตัวเดินอย่างอิสระใน activity cage เป็นระยะเวลา 5 นาทีพบว่า ค่าเฉลี่ยของจำนวนก้าวเดินของหนูกลุ่ม sham กลุ่ม $A\beta$ กลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 30 มก./กก. ในระยะเวลา 5 นาทีเท่ากับ 264.2 ± 23.0 , 259.6 ± 19.1 , 254.8 ± 26.5 และ 286.7 ± 27.7 ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มพบว่า จำนวนก้าวเดินของหนูทั้ง 4 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(3,44) = 0.336$, $P = 0.799$, One-way ANOVA) (รูปที่ 23)



รูปที่ 23 แสดงผลต่อการทำงานของประสาทยนต์ (Locomotor activity) ของหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ ผลแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของจำนวนก้าวที่หนูก้าวเดินใน activity cage ในระยะเวลา 5 นาที ($n = 12$, $F(3,44) = 0.336$, $P = 0.799$, One-way ANOVA)

2. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อความจำของหนูเม้าส์ที่ได้รับบีตาแอมิโลยด์ 25-35

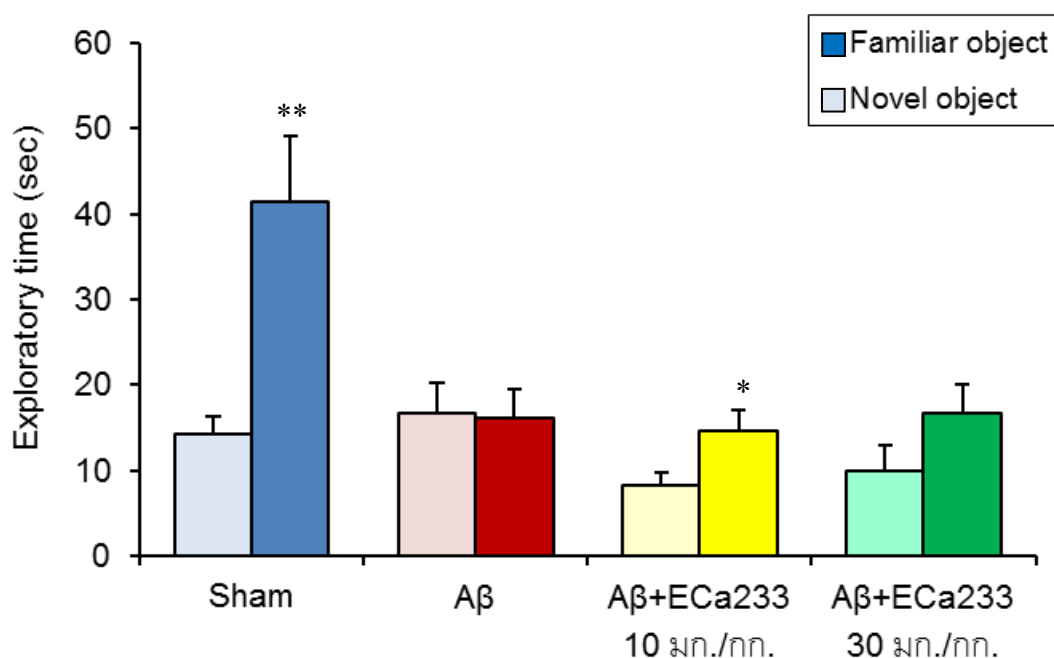
ผลของอีซีเอ233 ต่อความจำของหนูเม้าส์ที่ได้รับ $A\beta_{25-35}$ ทดสอบโดย Novel object recognition การทดสอบนี้แบ่งออกเป็น 2 trial คือ sample trial และ test trial จากการวิเคราะห์เวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุ (exploratory time) ในช่วง sample trial โดยการปล่อยให้หนูสำรวจวัตถุที่เหมือนกัน 2 ชิ้นในระยะเวลา 5 นาที พบว่าหนูกลุ่ม sham ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุที่อยู่ทางซ้ายและขวาเท่ากับ 20.9 ± 2.8 และ 21.0 ± 2.9 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม sham ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุซ้ายและขวาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.919$, paired Student's *t*-test) หนูกลุ่ม $A\beta$ ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุที่อยู่ทางซ้ายและขวาเท่ากับ 22.2 ± 4.2 และ 24.1 ± 3.9 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม $A\beta$ ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุซ้ายและขวาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.497$, paired Student's *t*-test) หนูกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 10 มก./กก. ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุที่อยู่ทางซ้ายและขวาเท่ากับ 20.4 ± 2.9 และ 21.8 ± 2.7 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 10 มก./กก. ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุซ้ายและขวาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.403$, paired Student's *t*-test) หนูกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 30 มก./กก. ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุที่อยู่ทางซ้ายและขวาเท่ากับ 15.0 ± 2.8 และ 14.1 ± 2.4 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 30 มก./กก. ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุซ้ายและขวาไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.343$, paired Student's *t*-test) จากผลการวิเคราะห์ทางสถิติพบว่าหนูทุกกลุ่มใช้เวลาในการสำรวจวัตถุซ้ายไม่แตกต่างจากวัตถุขวา ซึ่งแสดงให้เห็นว่าตำแหน่งของวัตถุทั้งสองชิ้น ไม่มีผลต่อพฤติกรรมกรรมการสำรวจของหนู (รูปที่ 24)



รูปที่ 24 แสดงเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง sample trial (n = 12)

ต่อมาในการทดสอบช่วง test trial ทำการสลับเปลี่ยนวัตถุชิ้นใดชิ้นหนึ่งเป็นวัตถุใหม่ซึ่งมีลักษณะต่างจากวัตถุเดิมและให้หนูสำรวจวัตถุอีกครั้งในระยะเวลา 5 นาทีพบว่า หนูกลุ่ม sham ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุเดิมและวัตถุใหม่เท่ากับ 14.2 ± 2.2 และ 41.4 ± 7.8 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม sham ที่ถูกฉีดน้ำกลั่นเข้าทางโพรงสมองร่วมกับการป้อน CMC เป็นเวลา 7 วัน วันละ 2 ครั้งใช้เวลาในการสำรวจวัตถุใหม่มากกว่าวัตถุเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$, paired Student's *t*-test) แสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่ม sham สามารถแยกความแตกต่างระหว่างวัตถุใหม่กับวัตถุเดิมและมีการเรียนรู้และจดจำที่ปกติ หนูกลุ่ม A β ที่ถูกฉีด A β_{25-35} เข้าสู่โพรงสมองร่วมกับการป้อน CMC เป็นเวลา 7 วัน วันละ 2 ครั้งใช้เวลาในการสำรวจวัตถุเดิมและวัตถุใหม่เท่ากับ 16.6 ± 3.6 และ 16.1 ± 3.5 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม A β ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุใหม่ไม่แตกต่างจากวัตถุเดิม ($P = 0.729$, paired Student's *t*-test) แสดงให้เห็นว่าการฉีด A β เข้าทางโพรงสมองมีผลทำให้หนูมีการเรียนรู้และความจำบกพร่องเนื่องจากหนูไม่สามารถจดจำวัตถุเดิมที่เคยสำรวจไปแล้วได้ หนูกลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. ที่ถูกฉีด A β_{25-35} เข้าสู่โพรงสมองร่วมกับการป้อนอีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัว เป็นเวลา 7 วัน วันละ 2 ครั้งใช้เวลาในการสำรวจวัตถุเดิมและวัตถุใหม่เท่ากับ 8.2 ± 1.6 และ 14.7 ± 2.4 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุใหม่มากกว่าวัตถุเดิมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, paired Student's *t*-test) หนู

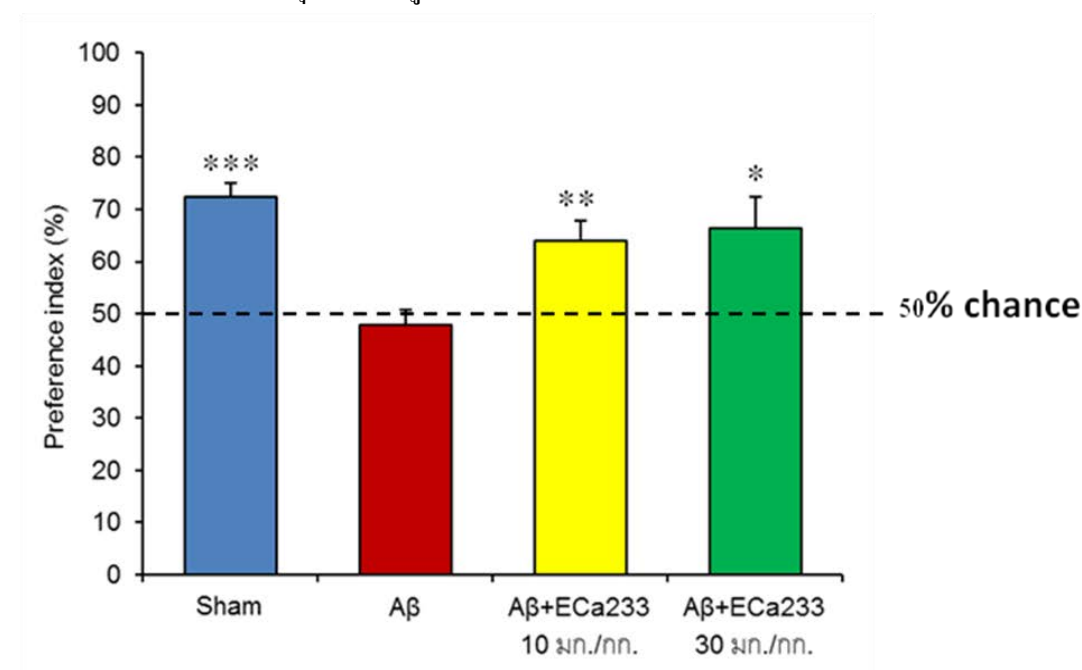
กลุ่ม $A\beta$ + อีซีเอ 30 มก./กก. ที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าสู่โพรงสมองร่วมกับการป้อนอีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. นำหนักตัว เป็นเวลา 7 วัน วันละ 2 ครั้ง ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุเดิมและวัตถุใหม่เท่ากับ 10.0 ± 2.9 และ 16.7 ± 3.3 วินาทีตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มพบว่าหนูกลุ่ม $A\beta$ + อีซีเอ 30 มก./กก. ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุใหม่มากกว่าวัตถุเดิมแต่ไม่แตกต่างกันอย่างนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.96$, paired Student's *t*-test) จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. นำหนักตัวสามารถแยกความแตกต่างระหว่างวัตถุใหม่กับวัตถุเดิม บ่งชี้ว่าอีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. นำหนักตัวทำให้การเรียนรู้และความจำของหนูที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าสู่โพรงสมอง ดีกว่าหนูที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ แต่ไม่ได้รับอีซีเอ 233 (รูปที่ 25)



รูปที่ 25 แสดงเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง test trial ($n = 12$, *,** แสดงถึงความแตกต่างภายในกลุ่มของเวลาในการสำรวจวัตถุใหม่เปรียบเทียบกับวัตถุเดิม ที่ค่า $P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ, paired Student's *t*-test)

ในการวิเคราะห์ผลการเรียนรู้และความจำด้วยแบบทดสอบ Novel object recognition นำเวลาที่หนูใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง test trial มาคำนวณเป็นค่า %Preference index (%PI) และเทียบกับค่า %Preference index ที่ 50% เพื่อเปรียบเทียบว่าหนูสามารถแยกแยะระหว่างวัตถุใหม่กับวัตถุเดิมได้ หากหนูเผชิญกับวัตถุ 2 ชิ้นเป็นครั้งแรก (sample trial) หนูจะสำรวจวัตถุสองชิ้นภายในกล่องด้วยโอกาส 50% และในการสำรวจครั้งที่สอง หากหนูสามารถแยกวัตถุใหม่ได้ หนูจะเลือกสำรวจวัตถุชิ้นใหม่มากกว่าวัตถุเดิมที่เคยสำรวจแล้วมากกว่า 50% (%PI มากกว่า 50%)

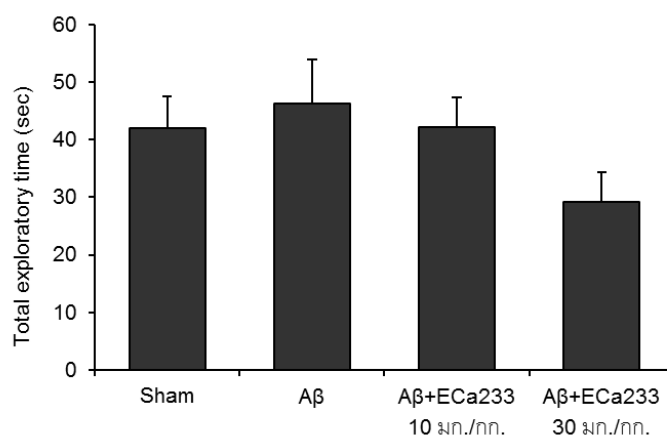
จากผลการคำนวณค่า %PI ของหนูกลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. เท่ากับ 72.4%, 47.8%, 64.0% และ 66.4% ตามลำดับ เมื่อเทียบค่า %PI ของหนูกลุ่มต่างๆ กับ 50% พบว่า ค่า %PI ของหนูกลุ่ม sham สูงกว่า 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$, One-sample *t*-test) แสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่ม sham สามารถจดจำและแยกวัตถุใหม่ได้ ค่า %PI ของหนูกลุ่ม A β ไม่แตกต่างจาก 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P = 0.481$, One-sample *t*-test) แสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่ม A β ไม่สามารถจดจำและแยกวัตถุใหม่ได้ และค่า %PI ของหนูกลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. สูงกว่า 50% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$ และ $P < 0.05$ ตามลำดับ, One-sample *t*-test) แสดงให้เห็นว่าหนูที่ได้รับอีซีเอ 233 ทั้ง 2 ขนาด สามารถจดจำและแยกวัตถุใหม่ได้ (รูปที่ 26)



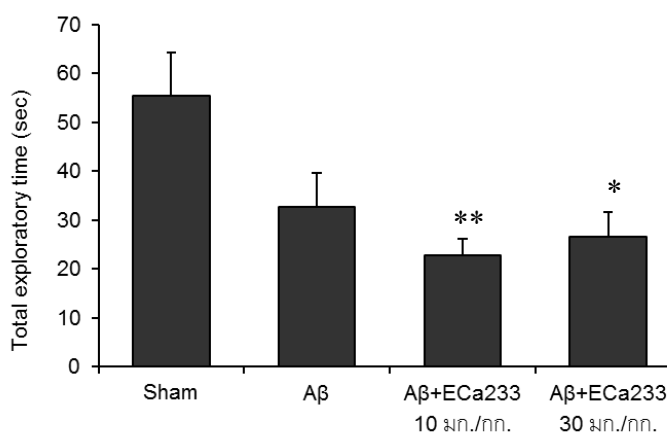
รูปที่ 26 แสดงค่า %PI ของหนูกลุ่มต่างๆ ในการสำรวจวัตถุใหม่ในช่วง test trial ($n = 12$, *, **, *** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับค่า %PI ที่ 50% โดยมีค่า $P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ, One-sample *t*-test)

ผลรวมของเวลา (total exploration time) ที่หนูกลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้น ในช่วง sample trial เท่ากับ 42.0 ± 5.6 , 46.3 ± 7.6 , 42.2 ± 5.3 และ 29.1 ± 5.2 วินาที ตามลำดับ (รูปที่ 27) จากผลการทดลอง จะเห็นได้ว่า หนูกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. มีแนวโน้มใช้เวลาในการสำรวจวัตถุในช่วง sample trial ลดลง แต่ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(3,44) = 1.545$, $P = 0.216$, One-way ANOVA) ส่วน total exploration time ในช่วง test trial ของหนูกลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. เท่ากับ 55.6 ± 8.8 , 32.7 ± 7.0 ,

22.9 ± 3.4 และ 26.7 ± 5.1 วินาทีตามลำดับ (รูปที่ 28) จากการวิเคราะห์พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ($F(3,44) = 5.288, P = 0.003, \text{One-way ANOVA}$) โดยพบว่า หนูกลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. มี total exploration time น้อยกว่าหนูกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$ และ $P < 0.05$ ตามลำดับ, Tukey's HSD *post hoc* test) ส่วน total exploration time ในช่วง test trial ของหนูกลุ่ม A β มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม sham แต่ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากผลการวิเคราะห์หึ่งชี้ว่าการได้รับอีซีเอ 233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. นำหนักตัวเป็นเวลา 7 วัน วันละ 2 ครั้งทำให้หนูใช้เวลาในการสำรวจวัตถุโดยรวมลดลง



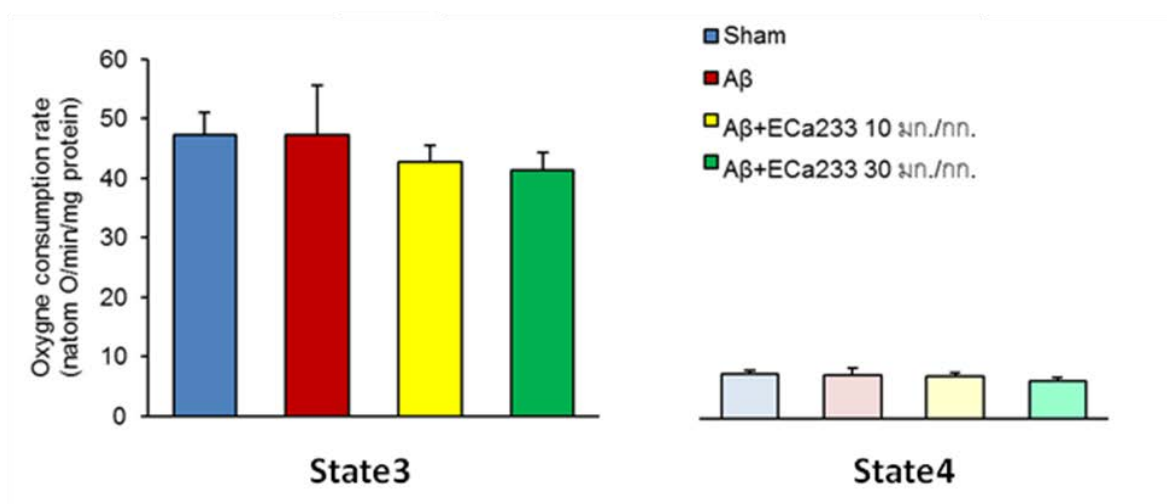
รูปที่ 27 แสดงผลรวมของเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้นในช่วง sample trial ($n = 12, F(3,44) = 1.545, P = 0.216, \text{One-way ANOVA}$)



รูปที่ 28 แสดงผลรวมของเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุเดิมและวัตถุใหม่ในช่วง test trial ($n = 12, F(3,44) = 5.288, P = 0.003, \text{One-way ANOVA}, *, **$ แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham โดยมีค่า $P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ, Tukey's HSD *post hoc* test)

3. ผลการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในสมองหนูที่ถูกฉีดบีตาแอมิลอยด์ 25-35

หลังจากการทดสอบ Novel object recognition เสร็จสิ้น หนูจะถูกแยกส่องส่วนหน้ามาวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียทันที ผลการทดลองพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียของหนูกลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. เท่ากับ 47.4 ± 3.7 , 47.4 ± 8.1 , 42.7 ± 2.8 และ 41.3 ± 3.1 natoms O/นาที่/มก. โปรตีน ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(3,23) = 0.474$, $P = 0.704$, One-way ANOVA) ส่วนอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 เท่ากับ 7.4 ± 0.7 , 7.2 ± 1.2 , 7.0 ± 0.7 และ 6.3 ± 0.6 natoms O/นาที่/มก. โปรตีน ซึ่งไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นกัน ($F(3,23) = 0.353$, $P = 0.787$, One-way ANOVA) ตามลำดับ (รูปที่ 29)



รูปที่ 29 แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ ($n = 6-7$, $F(3,23) = 0.474$ และ 0.787 ตามลำดับ, $P = 0.704$ และ $P = 0.787$, One-way ANOVA)

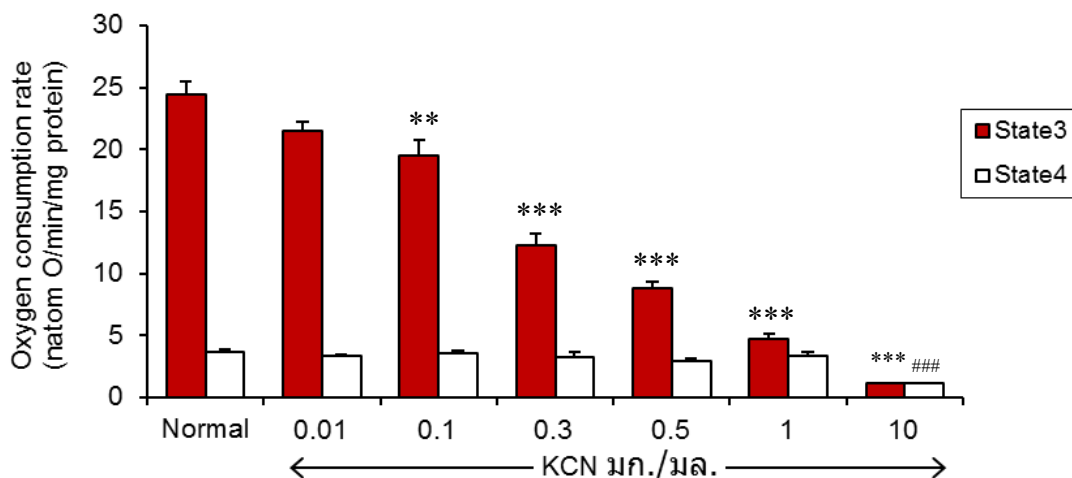
4. ผลการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro*

4.1 การหา IC50 ของ KCN

ผลการวิเคราะห์ค่า IC50 ของ KCN ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ทำโดยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียปกติ และไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ความเข้มข้นต่างๆ คือ 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1 และ 10 มก./มล. ในน้ำกลั่น ค่า IC50 คือค่าความเข้มข้นของ KCN ที่ทำให้ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียลดลง 50%

อัตราการใช้ออกซิเจน state 3 ของไมโทคอนเดรียปกติ และไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ความเข้มข้น 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1 และ 10 มก./มล. ในน้ำกลั่น เท่ากับ 24.40 ± 1.07 , 21.50 ± 0.78 , 19.47 ± 1.27 , 12.26 ± 0.92 , 8.79 ± 0.53 , 4.74 ± 0.38 และ 1.12 ± 0.06 natoms O/นาที่/มก. โปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 30) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 ของไมโทคอนเดรียปกติ พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ($F(6,48) = 79.780$, $P < 0.001$, One-way ANOVA) โดยไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ความเข้มข้น 0.1, 0.3, 0.5, 1 และ 10 มก./มล. มีอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียปกติ ($P < 0.01$, Tukey's HSD *post hoc* test) ความเข้มข้นของ KCN ที่ทำให้ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียลดลง 50% คือ 0.3 มก./มล.

เมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียปกติ ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ของไมโทคอนเดรียกลุ่มต่างๆ เท่ากับ 3.71 ± 0.13 , 3.37 ± 0.08 , 3.57 ± 0.25 , 3.28 ± 0.39 , 2.94 ± 0.24 , 3.32 ± 0.30 และ 1.12 ± 0.06 natoms O/นาที่/มก. โปรตีน ตามลำดับ พบความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ($n = 5-9$, $F(6,48) = 8.946$, $P < 0.001$, One-way ANOVA) โดยไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN 10 มก./มล. มีอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 ต่ำกว่าค่าเฉลี่ย state 4 ของไมโทคอนเดรียกลุ่มปกติ (Normal) และกลุ่มที่ได้รับ KCN 0.01, 0.1, 0.3, 0.5 และ 1 มก./มล. อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.001$, Tukey's HSD *post hoc* test) (รูปที่ 30)

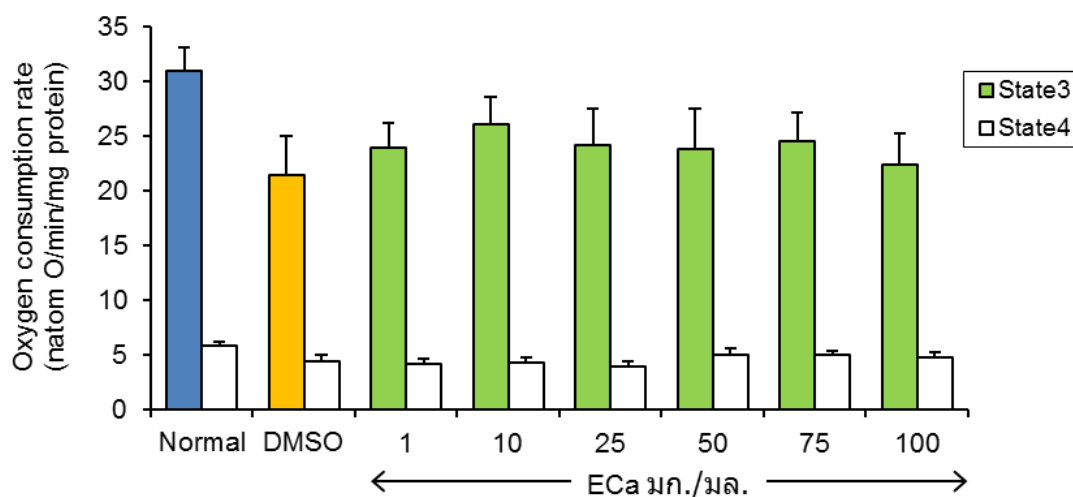


รูปที่ 30 แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียปกติ และไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.01, 0.1, 0.3, 0.5, 1 และ 10 มก./มล. (n = 5-9, **, *** แสดงถึงความแตกต่างของอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มโดยเปรียบเทียบกับ กลุ่ม Normal ค่า P < 0.01 และ P < 0.001 ตามลำดับ, ### แสดงถึงความแตกต่างของอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4 อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มโดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม Normal ค่า P < 0.001, Tukey's HSD *post hoc* test)

4.2 ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียทำโดยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียปกติ ไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO (ตัวทำละลายของอีซีเอ233) และไมโทคอนเดรียที่ได้รับอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล. ใน DMSO อัตราการใช้ออกซิเจน state 3 ของไมโทคอนเดรียปกติ ไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO และไมโทคอนเดรียที่ได้รับอีซีเอ233 ความเข้มข้น 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล. ขนาด 10 มคด. เท่ากับ 30.97 ± 2.18 , 21.38 ± 3.61 , 23.88 ± 2.36 , 26.02 ± 2.53 , 24.12 ± 3.32 , 23.80 ± 3.74 , 24.54 ± 2.63 และ 22.36 ± 2.85 natoms O/นาที/มก. โปรตีน และอัตราการใช้ออกซิเจน state 4 เท่ากับ 5.80 ± 0.35 , 4.43 ± 0.58 , 4.10 ± 0.50 , 4.24 ± 0.44 , 3.96 ± 0.37 , 4.98 ± 0.64 , 4.92 ± 0.43 และ 4.68 ± 0.49 natoms O/นาที/มก. โปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 31) เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 ของไมโทคอนเดรียปกติ (Normal) พบว่าไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO และไมโทคอนเดรียที่ได้รับอีซีเอ233 มีอัตราการใช้ออกซิเจนลดลงเล็กน้อยแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(7,34) = 1.127$, $P = 0.370$, One-way ANOVA) และไม่พบความแตกต่างของอัตราการใช้

ออกซิเจน state 4 ของไมโทคอนเดรียกลุ่มต่างๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(7,34) = 1.969$, $P = 0.090$, One-way ANOVA)

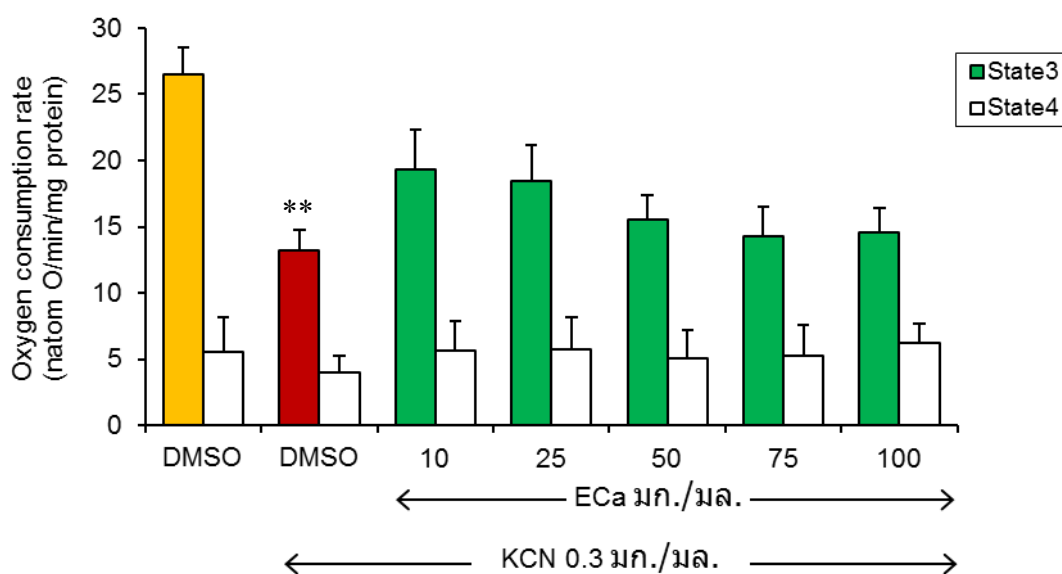


รูปที่ 31 แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียปกติ ไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO และไมโทคอนเดรียที่ได้รับอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 1, 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล. ใน DMSO ($n = 5-6$, $F(7,34) = 1.127$ และ $F(7,34) = 1.969$ ตามลำดับ, $P = 0.37$ และ $P = 0.090$ ตามลำดับ, One-way ANOVA)

4.3 ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN

การวิเคราะห์ผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ทำโดยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO (ตัวทำละลายของอีซีเอ233) ไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ความเข้มข้น 0.3 มก./มล. ร่วมกับ DMSO และไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN 0.3 มก./มล. ร่วมกับอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO ไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN 0.3 มก./มล. ร่วมกับ DMSO และไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN 0.3 มก./มล. ร่วมกับอีซีเอ233 ความเข้มข้น 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล. เท่ากับ 26.54 ± 2.02 , 13.17 ± 1.54 , 19.36 ± 3.04 , 18.42 ± 2.70 , 15.57 ± 1.79 , 14.31 ± 2.21 และ 14.53 ± 1.91 natoms O/นาที/มก. โปรตีน และอัตราการใช้ออกซิเจน state 4 เท่ากับ 5.52 ± 1.17 , 4.02 ± 0.54 , 5.64 ± 1.00 , 5.74 ± 1.07 , 5.07 ± 0.96 , 5.24 ± 1.04 และ 6.20 ± 0.45 ตามลำดับ natoms O/นาที/มก. โปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 32) เมื่อเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($F(6,28) = 4.278$, $P = 0.004$, One-way ANOVA) โดยพบว่าการให้ KCN 0.3 มก./มล. ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน

state 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$, Tukey's HSD *post hoc* test) เมื่อเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ได้รับ DMSO และเมื่อเปรียบเทียบอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ร่วมกับอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ กับไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN 0.3 มก./มล. ร่วมกับ DMSO พบว่า การให้อีซีเอ233 ร่วมกับ KCN ทำให้อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

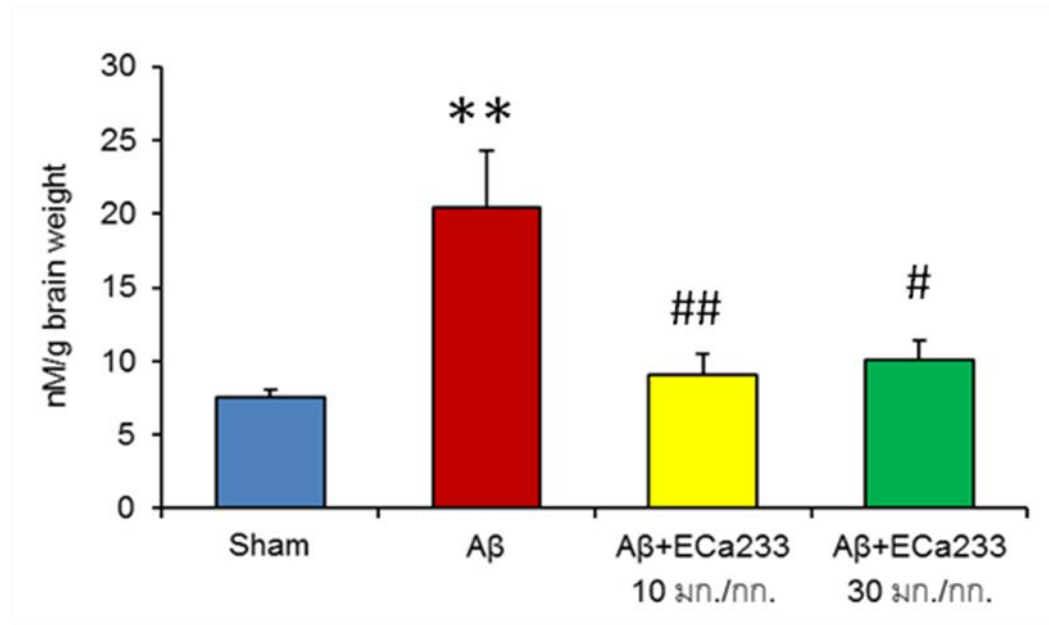


รูปที่ 32 แสดงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียปกติที่ได้รับ DMSO ไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN ความเข้มข้น 0.3 มก./มล. ร่วมกับ DMSO และไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN 0.3 มก./มล. ร่วมกับอีซีเอ233 ความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 10, 25, 50, 75 และ 100 มก./มล. ($n = 5$, ** แสดงถึงความแตกต่างของอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 อย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ DMSO อย่างเดียว (Normal (DMSO)) ที่ค่า $P < 0.01$, One-way ANOVA, Tukey's HSD *post hoc* test)

5. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับบีตาแอมิโลยด์25-35

หลังการทดสอบ Novel object recognition สมองหนูถูกแยกออกมาแช่แข็งในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) ทันทีและเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสตลอดเวลา เมื่อจะทำการวัดปริมาณลิพิดเปอร์ออกซิเดชันจึงนำมาละลายใน phosphate buffer ทำการวัดปริมาณ MDA และนำค่าที่วัดได้มาคำนวณเทียบกับน้ำหนักสมองหลังแยกออกมา น้ำหนักสมองเฉลี่ย (whole brain) ของหนูกลุ่ม

sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. เท่ากับ 0.49, 0.52, 0.52 และ 0.52 กรัม ตามลำดับ ผลการวัดความเข้มข้นของ MDA พบว่าค่าเฉลี่ยปริมาณ MDA ของหนูกลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. เท่ากับ 7.55 ± 0.55 , 20.42 ± 3.89 , 9.09 ± 1.45 และ 10.08 ± 1.35 นาโนโมลาร์/กรัม น้ำหนักสมอง ตามลำดับ (รูปที่ 33) โดยพบว่าปริมาณ MDA ของหนูแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(3,20) = 7.062$, $P = 0.002$, One-way ANOVA) โดยหนูกลุ่ม A β มีปริมาณ MDA ในสมองสูงกว่าหนูกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$, Tukey's HSD *post hoc* test) และหนูกลุ่ม A β + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + อีซีเอ 30 มก./กก. มีระดับ MDA ในสมองต่ำกว่าหนูกลุ่ม A β อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$ และ 0.05 ตามลำดับ, Tukey's HSD *post hoc* test) แสดงให้เห็นว่าอีซีเอ233 ทั้งขนาด 10 และ 30 มก./กก. มีความสามารถในการลดลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับ A β_{25-35} ได้



รูปที่ 33 แสดงปริมาณของ MDA ในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ ($n = 6$, $F(3,20) = 7.062$, $P = 0.002$, ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม sham โดยมีค่า $P < 0.01$, ## แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม A β โดยมีค่า $P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ, One-way ANOVA, Tukey's HSD *post hoc* test)

บทที่ 5

อภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อเซลล์ประสาทของหนูเมาส์ที่ถูกทำให้เกิดภาวะหลงลืมด้วยการฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าสู่โพรงสมอง โดยวัดการเรียนรู้และความจำด้วย Novel object recognition และความเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุลของสมองด้วยการวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียและการวัดระดับ MDA ในการทดสอบ Novel object recognition หนูเมาส์ถูกแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่ม sham กลุ่ม $A\beta$ กลุ่ม $A\beta$ + อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม $A\beta$ + อีซีเอ 30 มก./กก. ผลการทดลองพบว่า $A\beta_{25-35}$ ทำให้หนูเมาส์มีการเรียนรู้และความจำบกพร่อง และอีซีเอ233 ทั้งขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว สามารถฟื้นฟูความจำของหนูเมาส์ได้ ส่วนผลการเปลี่ยนแปลงในสมองพบว่า $A\beta_{25-35}$ ทำให้ระดับ MDA เพิ่มขึ้น ในขณะที่อีซีเอ233 ทั้งขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ช่วยลดระดับ MDA ในสมองแต่ไม่มีผลต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียของสมอง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อไมโทคอนเดรียในสมองแบบ *in vitro* โดยการให้ KCN ร่วมกับอีซีเอ233 พบว่าอีซีเอ233 ไม่สามารถช่วยฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากเซลล์สมองของหนูเมาส์ได้

ก่อนการทดสอบความจำ Novel object recognition หนูเมาส์ถูกนำมาทดสอบ locomotor activity จากผลของ locomotor activity แสดงให้เห็นว่า $A\beta_{25-35}$ และอีซีเอ233 ไม่มีผลต่อ motor function ในการทดสอบ locomotor activity ของหนูเมาส์ ดังที่เห็นได้จาก activity ของหนูแต่ละกลุ่มที่ไม่แตกต่างจากกลุ่ม sham ทำให้สามารถสรุปได้ว่าผลการทดลองใน Novel object recognition เป็นผลที่เกิดจาก $A\beta_{25-35}$ และอีซีเอ233 โดยไม่มีผลของการเปลี่ยนแปลง motor function เข้ามาเกี่ยวข้องด้วย

การฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าสู่โพรงสมองเป็นโมเดลที่ใช้จำลองพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ ในสัตว์ทดลอง โดยพบว่าทำให้เกิดคราบ plaque รวมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ภาวะ oxidative stress และการลดจำนวนลงของเซลล์ประสาท ซึ่งเป็นพยาธิสภาพที่พบในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ (Maurice และคณะ, 1996a, Sigurdsson และคณะ, 1996, Delobette และคณะ, 1997, Chen และคณะ, 1996) มีการศึกษาหลายการศึกษาบ่งชี้ว่า การฉีด $A\beta_{25-35}$ เข้าสู่โพรงสมองสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในโมเดล Novel object recognition ซึ่งเป็นการทดสอบความจำชนิด working memory ได้ (Alkam และคณะ, 2007, Tsunekawa และคณะ, 2008, Chambon และคณะ, 2011) ในการศึกษาพบว่า การให้น้ำกลั่นทาง

i.c.v. (กลุ่ม sham) ไม่มีผลต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ ในขณะที่การให้ $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. ทำให้หนูมีการเรียนรู้และความจำลดลงเมื่อทดสอบด้วย Novel object recognition

ในการใช้ Novel object recognition ทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อการเรียนรู้และความจำ พบว่าหนูกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 30 มก./กก. สามารถแก้ไขภาวะบกพร่องในการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นโดย $A\beta_{25-35}$ จากการศึกษาฤทธิ์ของอีซีเอ233 ที่มีการศึกษามาก่อนบ่งชี้ว่า อีซีเอ233 สามารถเพิ่มการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ที่ได้รับการผ่าตัดปิดกั้นหลอดเลือดคออมอนแคโรติด (2-VO) โดยทดสอบใน โมเดล Morris water maze ซึ่งเป็นการทดสอบความจำชนิด spatial memory (ยูทพร สุขวิชัย, 2553) และ Novel object recognition ซึ่งเป็นการทดสอบความจำชนิด working memory (จิตรลดา และสุบงกช, 2552) และอีซีเอ233 ยังสามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. ในการทดสอบโมเดล Morris water maze (อัญชลี คำเอก, 2552) เป็นการแสดงให้เห็นว่าอีซีเอ 233 น่าจะมีประสิทธิภาพในการรักษาภาวะหลงลืมใน โรคอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการศึกษาที่บ่งชี้ว่าสารสกัดของบัวบกสามารถช่วยให้หนูแรทมีความจำดีขึ้นในแบบทดสอบ passive avoidance (Veerendra Kumar และคณะ, 2002, Veerendra Kumar และคณะ, 2003, Gupta และคณะ, 2003) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของอีซีเอ233 หรือสารสกัดของบัวบกต่อ $A\beta$ โดยตรง มีเพียงบางการทดลองที่ศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อ $A\beta$ ที่เกิดขึ้นในสมองหนูตัดแปลงพันธุกรรม PSAPP mice ซึ่งพบว่าหนูเมาส์ที่ได้รับสารสกัดบัวบกมีปริมาณ $A\beta$ ในสมองลดลง (Dhanasekaran และคณะ, 2009) แต่การศึกษานี้ไม่สามารถบ่งบอกถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดบัวบกต่อ $A\beta$ ที่เกิดในโรคอัลไซเมอร์ชนิด late-onset ได้

จากผล total exploration time ในช่วง test trial พบว่าหนูกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม $A\beta +$ อีซีเอ 30 มก./กก. มี total exploration time ที่น้อยกว่ากลุ่ม sham กับกลุ่ม $A\beta$ อย่างมีนัยสำคัญ โดยหนูกลุ่ม $A\beta$ ใช้เวลาสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชิ้นในแต่ละ trial ไม่แตกต่างกันและใช้เวลารวมในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 trial ไม่แตกต่างกัน แสดงให้เห็นว่าหนูกลุ่ม $A\beta$ สำรวจวัตถุเดิมในช่วง test trial เสมือนกับเป็นวัตถุใหม่ แต่หนูกลุ่มอื่นๆ ใช้เวลาในการสำรวจวัตถุเดิมลดลงเนื่องจากหนูจดจำวัตถุเดิมในช่วง sample trial ได้จึงสนใจวัตถุน้อยลงและหันไปสนใจวัตถุใหม่แทน ซึ่งใน test trial หนูคุ้นเคยกับกล่องและวัตถุเดิมแล้วจึงมีเป้าหมายชัดเจนในการสำรวจ เมื่อสำรวจวัตถุใหม่จนคุ้นเคยแล้วก็จะเลิกสำรวจวัตถุ และกลับไปอยู่ตามมุมหรือด้านที่เป็นกำแพง (Genoux และคณะ, 2002) ปกติหนูเมาส์มีพฤติกรรมที่ชอบสำรวจสิ่งใหม่มากกว่า แต่เนื่องจากหนูเมาส์มีสัญชาตญาณระวังภัยมากกว่าหนูแรท (Dere และคณะ, 2007) ดังนั้นหนูเมาส์จะมีพฤติกรรมที่พยายามหลีกเลี่ยงการสำรวจถ้าไม่จำเป็น (Griebel และคณะ, 1993) การที่หนูกลุ่มที่ได้รับอีซีเอ233 ใช้เวลาในการ

สำรวจวัตถุใหม่น้อยกว่าหนูกลุ่ม sham อาจเป็นเพราะหนูที่ได้รับไอซีเอ233 มีการเรียนรู้ที่ดีกว่าหนูปกติ ทำให้หนูคุ้นเคยกับวัตถุใหม่ได้เร็วกว่าในขณะที่หนูปกติใช้เวลาในการเรียนรู้และแยกแยะวัตถุใหม่นานกว่า (Rao และคณะ, 2005)

หลังจากทดสอบ Novel object recognition หนูทุกกลุ่มจะถูกทำให้เสียชีวิตอย่างสงบแล้ว แยกสมองออกมาวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองด้วยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย ผลการทดลองพบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนในการหายใจ state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียในสมองหนูกลุ่ม sham กลุ่ม A β กลุ่ม A β + ไอซีเอ 10 มก./กก. และกลุ่ม A β + ไอซีเอ 30 มก./กก. ไม่แตกต่างกัน ซึ่งบ่งชี้ว่าไมโทคอนเดรียในสมองหนูทั้ง 4 กลุ่มมีการทำงานที่ปกติ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่ไวต่อการบาดเจ็บ พื้นที่ที่เกิดการบาดเจ็บไมโทคอนเดรียจะเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการกำจัดตัวเอง (autophagy) เพื่อลดความเสียหายต่อเซลล์อันเกิดจากการสร้างอนุมูลอิสระจำนวนมากในไมโทคอนเดรีย ไมโทคอนเดรียที่เสียหายมากเกินไปจะฟื้นฟูตัวเองและสลายไป (Kim และคณะ, 2007) เมื่อ A β_{25-35} ถูกฉีดเข้าสู่โพรงสมอง lateral ventricle โปรตีนจะกระจายตัวไปตาม cerebrospinal fluid และเกาะเป็นคราบบนผิวสมองบริเวณต่างๆ สร้างความเสียหายต่อเซลล์ประสาทโดยเฉพาะส่วน hippocampus และ cerebral cortex (Yamaguchi และคณะ, 2001) นอกจากการเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบจากภายนอกเซลล์แล้ว A β_{25-35} ยังเหนี่ยวนำให้ไมโทคอนเดรียทำงานบกพร่องไปโดยพบว่าการทำงานของ complex I, complex II-III และ complex IV ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรียลดลง เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้น และมีการปลดปล่อย cytochrome c มากขึ้นซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดเซลล์ประสาทตายแบบ apoptosis (Cardoso และคณะ, 2002, Cafe และคณะ, 1996, Blasko และคณะ, 2000) เป็นไปได้ว่าหนูที่ถูกฉีด A β_{25-35} มีการตายของเซลล์ประสาทเกิดขึ้น เมื่อจำนวนเซลล์ประสาทลดลง จำนวนไมโทคอนเดรียที่แยกได้ก็ลดลงด้วย ส่งผลให้ปริมาณการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียลดลงตาม เมื่อคำนวณเป็นอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียเทียบกับปริมาณ mitochondrial protein ซึ่งแปรผันตามจำนวนไมโทคอนเดรียที่แยกได้ ผลของอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ของหนูกลุ่ม A β จึงไม่ต่างจากอัตราการใช้ออกซิเจนในไมโทคอนเดรียของหนูกลุ่ม sham ดังนั้นการทดลองนี้จึงทำให้ไม่สามารถดูความสัมพันธ์ระหว่างภาวะบกพร่องของความจำที่เกิดขึ้นกับการทำงานของไมโทคอนเดรียในสมองของหนูเมาส์ที่ถูกฉีดด้วย A β_{25-35} ได้ และเมื่อให้อีซีเอ233 ร่วมกับ A β_{25-35} จึงไม่สามารถเห็นผลของอีซีเอ233 ได้

มีการศึกษาหลายการศึกษาทราบว่าในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีระดับ enzyme activity ของ cytochrome c oxidase (complex IV) ต่ำกว่าผู้ที่ไม่ได้เป็นโรคอัลไซเมอร์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ร่วมกับการมีจำนวนเซลล์ประสาทลดลงโดยเฉพาะในส่วน hippocampus และ

cerebral cortex (Wong-riley และคณะ, 1996, Maurer และคณะ, 2000, Qiu และคณะ, 2001, Dwyer และคณะ, 2009) การยับยั้งกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรียส่งผลให้การทำงานของไมโทคอนเดรียบกพร่อง การสังเคราะห์ ATP ลดลง รวมทั้งเกิด ROS เพิ่มขึ้น (Eckert และคณะ, 2003, Moreira และคณะ, 2005a, Diaz, 2010) ปัจจุบันมีเพียงบางการศึกษาที่ทำการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่ถูกแยกออกมาจากสมองหนูแรทและ incubate กับ $A\beta_{1-40}$ และ $A\beta_{25-35}$ เป็นเวลา 5 นาที ผลการทดลองพบว่า $A\beta$ ทั้ง 2 ชนิดลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียได้ (Gao และคณะ, 2009, Moreira และคณะ, 2005a,b) แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของการฉีด $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในหนูเมาส์หรือหนูแรท

การทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียแบบ *in vitro* เป็นการศึกษากลไกของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่บกพร่องไป จากการทดลองของ Canevari และคณะ (1999) บ่งชี้ว่าการ incubate ไมโทคอนเดรียจากสมองหนูแรทกับ $A\beta_{25-35}$ มีผลลดการทำงานของ complex IV โดยไม่ลดการทำงานของ complex I และ II-III และในการศึกษาของ Maurer และคณะ (2000) ซึ่งนำสมองของผู้ป่วยปกติกับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ มาวัดค่า activity ของเอนไซม์ต่างๆ ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน อันได้แก่ complex I+III, complex II+III, complex II และ complex IV ผลการทดลองพบว่าในสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีเพียง complex IV ที่มี activity ต่ำกว่าผู้ป่วยปกติ ดังนั้นเพื่อเป็นการจำลองผลพิษของ $A\beta_{25-35}$ ต่อไมโทคอนเดรีย ในการทดลองนี้จึงใช้ KCN ซึ่งเป็นตัวยับยั้งจำเพาะของ complex IV ในการทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย การทดลองนี้แบ่งออกเป็น 3 การทดลองย่อยคือ การหาค่า IC50 ของ KCN ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียจากสมองหนูเมาส์ปกติ การทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อไมโทคอนเดรียปกติ และการทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย KCN

เนื่องจากค่า IC50 ของ KCN ต่อไมโทคอนเดรียในแต่ละการศึกษามีความแตกต่างกันตามวิธีการทดลองและอุปกรณ์ที่ใช้วัด (Leavesley และคณะ, 2008, Nadanaciva และคณะ, 2007) ค่า IC50 ของ KCN ที่หาได้ในทดลองนี้คือ 0.3 มก./มล. หรือคิดเป็น 3 มก. ใน chamber ขนาด 2 มล. การทดสอบผลของอีซีเอ233 ต่อไมโทคอนเดรียปกติพบว่า อีซีเอ233 ไม่มีความเป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย และเมื่อทำการวัดผลของอีซีเอ233 ต่อไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย KCN พบว่าอีซีเอ233 ไม่สามารถฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรียที่เสียไปได้ และจากการศึกษาของอัญชลี คำเอก (2552) ซึ่งทำการวัดผลทางฮิสโทโลยีโดยการนับจำนวนเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 และ CA3 ของ hippocampus ของหนูเมาส์พบว่า หนูที่ถูกฉีด $A\beta_{25-35}$ ทาง i.c.v. มี %cell density น้อยกว่า

หนูกลุ่ม sham อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษาของอัญชลี คำเอก (2552) เป็นการยืนยันผลการวัดการทำงานของไมโทคอนเดรียในหนูเมาส์ที่ถูกฉีด i.c.v. ด้วย A β ในการทดลองก่อนหน้านี้ว่าการที่ผลการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียของหนูกลุ่ม A β เป็นปกติเนื่องจากการเป็นโรคเฉพาะไมโทคอนเดรียที่สภาพดีในเซลล์ประสาทที่เหลืออยู่ อาจสรุปได้ว่าการที่อิชีเอ233 ช่วยฟื้นฟูความจำและการเรียนรู้ของหนูเมาส์ในการศึกษาดังกล่าวไม่ได้เป็นผลมาจากการช่วยเพิ่มการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้ง complex IV แต่เป็นการออกฤทธิ์ที่ A β cascade หรือที่กลไกภายในเซลล์อื่นๆ ซึ่งต้องมีการศึกษาต่อไป

นอกจากนั้นผลทางฮิสโทโลยีในการศึกษาของอัญชลี คำเอก (2552) ยังพบว่า หนูเมาส์ที่ได้รับ A β_{25-35} ร่วมกับการได้รับอิชีเอ233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว มี %cell density มากกว่าหนูที่ได้รับแต่ A β_{25-35} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าอิชีเอ233 สามารถปกป้องเซลล์ประสาทให้ตายน้อยลง ซึ่งกลไกการปกป้องกันนี้อาจไม่เกี่ยวข้องกับไมโทคอนเดรีย อัญชลี คำเอก (2552) ระบุว่า A β_{25-35} มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในเซลล์สมอง โดยพบว่า หนูที่ได้รับ A β_{25-35} มีระดับ MDA ในสมองสูงกว่าหนูกลุ่ม sham (Cuevas และคณะ, 2009, Diaz, 2010) ซึ่งอนุมูลอิสระที่สูงขึ้นนั้นส่งผลให้เซลล์ประสาทตายแบบ apoptosis (Jhoo และคณะ, 2004) และอิชีเอ233 ทั้งขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว สามารถลดระดับ MDA ที่สูงขึ้นได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการวัดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชันในงานวิจัยนี้ เป็นการบ่งชี้ว่าการที่หนูเมาส์กลุ่ม A β เกิดภาวะหลงลืมในการทดลอง Novel object recognition เนื่องมาจากผลพิษของ A β_{25-35} ในการทำให้เกิดอนุมูลอิสระในสมองและผลของอิชีเอ233 ในการลด oxidative stress จากอนุมูลอิสระดังกล่าว น่าจะช่วยให้หนูเมาส์มีการเรียนรู้ที่ดีขึ้นในการทดลอง Novel object recognition (Alkam และคณะ, 2007, Liu และคณะ, 2010)

จากผลการทดลองทั้งหมดสรุปได้ว่าอิชีเอ233 มีฤทธิ์ช่วยฟื้นฟูการเรียนรู้และความจำที่เสียไปจากผลของ A β_{25-35} ในการทดสอบ Novel object recognition โดยกลไกหนึ่งที่ช่วยให้หนูมีการเรียนรู้และความจำดีขึ้นของอิชีเอ233 คือการลด oxidative stress แต่ไม่มีกลไกฟื้นฟูการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้ง การศึกษาในอนาคตอาจเปลี่ยนแปลงแผนการทดลองโดยมุ่งเน้นไปที่กลไกการปกป้องเซลล์กลไกอื่นของอิชีเอ233 เช่น กลไกด้านการอักเสบ และกลไกด้านอนุมูลอิสระ หรืออาจเปลี่ยนวิธีการทดลองให้มีความไวและจำเพาะต่อการศึกษการทำงานของไมโทคอนเดรียมากขึ้น เช่น การศึกษาผลของอิชีเอ233 ต่อจำนวนไมโทคอนเดรียที่เหลือรอดและสรีรวิทยาของไมโทคอนเดรีย การศึกษาผลของอิชีเอ233 ต่อการทำงานของเอนไซม์ cytochrome c oxidase การปกป้อง mtDNA การเกิด ROS ในไมโทคอนเดรีย เป็นต้น

- Anandatheerthavarada, H. K., Biswas, G., Robin, M., and Avadhani, N. G. Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. The Journal of Cell Biology 161 (2003): 41-54.
- Anandatheerthavarada, H. K. and Devi, L. Amyloid precursor protein and mitochondrial dysfunction in Alzheimer's disease. Neuroscientist 13 (2007): 626-638.
- Ashenafi, S., Fuente, A., Criado, J. M., Rioloobos, A. S., Heredia, M., and Yajeya, J. β -amyloid peptide₂₅₋₃₅ depresses excitatory synaptic transmission in the rat basolateral amygdala "in vitro" Neurobiology of Aging 26 (2005): 419-428.
- Avila, J., Lucas, J. J., Perez, M., and Hernandez, F. Role of tau protein in both physiological and pathological conditions. Physiological Reviews 84 (2004): 361-384.
- Benani, A., Barquissau, V., Carneiro, L., Salin, B., Colombani, A., Leloup, C., et al. Method for functional study of mitochondria in rat hypothalamus. Journal of Neuroscience Methods 178 (2009): 301-307.
- Blasko, I., Wagner, M., Whitaker, N., Grubeck-Loebenstein, B., and Jansen-Durr, P. The amyloid β peptide A β (25-35) induces apoptosis independent of p53. FEBS Letters 470 (2000): 221-225.
- Bosetti, F., Brizzi, F., Barogi, S., Mancuso, M., Siciliano, G., Tendi, E. A., et al. Cytochrome c oxidase and mitochondrial F1F0-ATPase (ATP synthase) activities in platelets and brain from patients with AD. Neurobiology of Aging 23 (2002): 371-376.
- Brinkhaus, B., Lindner, M., Schuppan, D., and Hahn, E. G. Chemical, pharmacological and clinical profile of the East Asian medical plant *Centella asiatica*. Phytomedicine 7 (2000): 427-448.
- Butterfield, D. A., Galvan, V., Lange, M. B., Tang, H., Sowell, R. A., Spilman, P., et al. In vivo oxidative stress in brain of Alzheimer disease transgenic mice: Requirement for methionine 35 in amyloid β -peptide of APP. Free Radical Biology & Medicine 48 (2010): 136-144.
- Cafe, C., Torri, C., Bertorelli, L., Angeretti, N., Lucca, E., Forloni, G., et al. Oxidative stress after acute and chronic application of β -amyloid fragment 25-35 in cortical cultures. Neuroscience Letters 203 (1996): 61-65.

- Candelario-Jalil, E., Al-Dalain, S. M., Castillo, R., Martínez, G., and León, O. S. Selective vulnerability to kainate-induced oxidative damage in different rat brain regions. Journal of Applied Toxicology 21(2001): 403-407.
- Canevari, L., Clark, J. B., and Bates, T. E. β -Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. FEBS Letters 457 (1999): 131-134.
- Cardoso, S. M., Santos, S., Swerdlow, R. H., and Oliveira, C. R. Functional mitochondria are required for amyloid β -mediated neurotoxicity. FASEB Journal 15 (2001): 1439-1441.
- Cardoso, S. M., Swerdlow, R. H., and Oliveira, C. R. Induction of cytochrome *c*-mediated apoptosis by amyloid β 25-35 requires functional mitochondria. Brain Research 931 (2002): 117-125.
- Cairns, C. B., Walther, J., Harken, A. H., and Banerjee, A. Mitochondria oxidative phosphorylation thermodynamic efficiencies reflect physiological organ roles. The American Journal of Physiology – Regulatory, Integrative and Comparative Physiology 274 (1998): 1376-1383.
- Carpinella, M. C. and Rai, M. eds. Novel therapeutic agents from plants. 1st ed. USA: Science Publishers, 2009.
- Casley, C. S., Land, J. M., Sharpe, M. A., Clarke, J. B., Duchon, M. R., and Canevari, L. β -amyloid fragment 25-35 causes mitochondrial dysfunction in primary cortical neurons. Neurobiology of Disease 10 (2002): 258-267.
- Chambon, C., Wegener, N., Gravius, A., and Danysz, W. Behavioural and cellular effects of exogenous amyloid- β peptides in rodents. Behavioural Brain Research 225 (2011): 623-641.
- Chance, B. and Williams, G. R. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. III. The steady state. The Journal of Biological Chemistry 217 (1955): 409-427.
- Chen, S., Wright, J. W., and Barnes, C. D. The neurochemical and behavioral effects of β -amyloid peptide(25-35). Brain Research 720 (1996): 54-60.
- Copstead, L. C., Banasik, J. L., eds. Pathophysiology: Biological and behavioral perspectives. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders, 2000.

- Cottrell, D. A., Blakely, E. L., Johnson, M. A., Ince, P. G., Borthwick, G. M., and Turnbull, D. M. Cytochrome c oxidase deficient cells accumulate in the hippocampus and choroid plexus with age. Neurobiology of Aging 22 (2001): 265–272.
- Crouch, P. J., Harding, S. E., White, A. R., Camakaris, J., Bush, A. I., and Masters C. L. Mechanisms of A β mediated neurodegeneration in Alzheimer's disease. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 40 (2008): 181–198.
- Cuevas, E., Limon, D., Perez-Severiano, F., Diaz, A., Ortega, L., Zenteno, E., et al. Antioxidant effects of Epicatechin on the hippocampal toxicity caused by amyloid-beta 25-35 in rats. European Journal of Pharmacology 616 (2009): 122–127.
- Cummings, J. L., Mackell, J., and Kaufer, D. Behavioral effects of current Alzheimer's disease treatments: A descriptive review. Alzheimer's & Dementia 4 (2008): 49–60.
- Delobette, S., Privat, A., and Maurice, T. In vitro aggregation facilitates β -amyloid peptide-(25–35)-induced amnesia in the rat. European Journal of Pharmacology 319 (1997): 1–4.
- Den Heuvel, C. V., Thornton, E., and Vink, R. Traumatic brain injury and Alzheimer's disease: a review. Progress in Brain Research 161 (2007): 303-316.
- Dere, E., Huston, J. P., De Souza Silva, M. A. The pharmacology, neuroanatomy and neurogenetics of one-trial object recognition in rodents. Neuroscience and Biobehavioral Reviews 31 (2007): 673–704.
- DerMarderosian, A. and Beutler, J. A. The review of natural products: The most complete source of natural product information. 6th ed. Missouri: Wolters Kluwer Health, 2010.
- Dhanasekaran, M., Holcomb, L. A., Hitt, A. R., Tharakan, B., Porter, J. W., Young, K. A., et al. *Centella asiatica* extract selectively decreases amyloid β levels in hippocampus of Alzheimer's disease animal model. Phytotherapy Research 23 (2009): 14–19.
- Diaz, F. Cytochrome c oxidase deficiency: Patients and animal models. Biochimica et Biophysica Acta 1802 (2010): 100–110.
- Dipiro, J. T., Talbert, R. L., Yee, G. C., Matzke, G. R., Wells, B. G., Posey, L. M., eds. Pharmacotherapy: a pathophysiological approach. 8th ed. New York: McGraw-Hill, 2011.
- Dix, S. L. and Aggleton, J. Extending the spontaneous preference test of recognition: evidence of object-location and object-context recognition. Behavioural Brain Research 99 (1999): 191-200.

- Dwyer, B. E., Stone, M. L., Gorman, N., Sinclair, P. R., Perry, G., Smith, M. A., et al. Heme-a, the heme prosthetic group of cytochrome *c* oxidase, is increased in Alzheimer's disease. Neuroscience Letters 461 (2009): 302–305.
- Eckert, A., Keil, U., Marques, C. A., Bonert, A., Frey, C., Schussel, K., et al. Mitochondrial dysfunction, apoptotic cell death, and Alzheimer's disease. Biochemical Pharmacology 66 (2003): 1627–1634.
- Ennaceur, A., Delacour, J. A new one-trial test for neurobiological studies of memory in rats. 1: Behavioral data. Behavioural Brain Research 31 (1988): 47–59.
- Fernandez-Tome, P., Brera, B., Arevalo, M., and de Ceballos, M. L. β -amyloid₂₅₋₃₅ inhibits glutamate uptake in cultured neurons and astrocytes: modulation of uptake as a survival mechanism. Neurobiology of Disease 15 (2004): 580-589.
- Findeis, M. A. The role of amyloid β peptide 42 in Alzheimer's disease. Pharmacology & Therapeutics 116 (2007): 266–286.
- Furukawa-Hibi, Y., Alkam, T., Nitta, A., Matsuyama, A., Mizoguchi, H., Suzuki, K. Butyrylcholinesterase inhibitors ameliorate cognitive dysfunction induced by amyloid- β peptide in mice. Behavioural Brain Research 225 (2011): 222– 229.
- Gao, X., Zhang, C. Y., Yang, L., Tang, X. C., and Zhang, H. Y. Huperzine A protects isolated rat brain mitochondria against β -amyloid peptide. Free Radical Biology & Medicine 46 (2009): 1454–1462.
- Gavino, V. C., Miller, J. S., Ikharebha, S. O., Milo, G. E., and Cornwell, D.G. Effect of polyunsaturated fatty acids and antioxidants on lipid peroxidation in tissue cultures. The Journal of Lipid Research 22 (1981): 763-769.
- Genoux, D., Haditsch, U., Knobloch, M., Michalon, A., Storm, D., and Mansuy, I. M. Protein phosphatase 1 is a molecular constraint on learning and memory. Nature 418 (2002): 970-975.
- Griebel, G., Belzung, C., Misslin, R., and Vogel, E. The free-exploratory paradigm: an effective method for measuring neophobic behaviour in mice and testing potential neophobia-reducing drug. Behavioural Pharmacology 4 (1993): 637-644.
- Harkany, T., Hortobagyi, T., Sasvari, M., Konya, C., Penke, B., Luiten, P. G. M., et al. Neuroprotective approaches in experimental models of β -amyloid neurotoxicity:

- relevance to Alzheimer's disease. Progress in Neuro-Psychopharmacology and Biological Psychiatry 23 (1999) 963-1008.
- Higgins, G. A., Large, C. H., Rupniak, H. T., and Barnes, J. C. Apolipoprotein E and Alzheimer's disease: a review of recent studies. Pharmacology Biochemistry and Behavior 56 (1997): 675–685.
- Howes, R. M. and Houghton, P. J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 75 (2003): 513–527.
- Hull, M., Muksch, B., Akundi, R. S., Waschbisch, A., Hoozemans, J. J., Veerhuis, R., et al. Amyloid beta peptide (25-35) activates protein kinase C leading to cyclooxygenase-2 induction and prostaglandin E2 release in primary midbrain astrocytes. Neurochemistry International 48 (2006): 663-672.
- Ito, K., Ahadiéh, S., Corrigan, B., French, J., Fullerton, T., Tensfeldt, T., et al. Disease progression meta-analysis model in Alzheimer's disease. Alzheimer's & Dementia 6 (2010): 39–53.
- Jhoo, J. H., Kim, H., Nabeshima, T., Yamada, K., Shin, E., Jhoo, W., et al. β -Amyloid (1–42)-induced learning and memory deficits in mice: involvement of oxidative burdens in the hippocampus and cerebral cortex. Behavioural Brain Research 155 (2004): 185–196.
- Kameyama, T., Nabeshima, T., and Kozawa, T. Step-down-type passive avoidance- and escape-learning method: Suitability for experimental amnesia models. Journal of Pharmacological Methods 16 (1986): 39–52.
- Kim, I., Rodriguez-Enriquez, S., and Lemasters, J. J. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. Archives of Biochemistry and Biophysics 462 (2007): 245–253.
- Lace, G., Savva, G. M., Forster, G., Silva, R., Brayne, C., Matthews, F. E., et al. Hippocampal tau pathology is related to neuroanatomical connections: an ageing population-based study. Brain 132 (2009): 1324–1334.
- LaFerla, F. M., Green, K. N., and Oddo, S. Intracellular amyloid- β in Alzheimer's disease. Nature Reviews Neuroscience 8 (2007): 499-509.

- Leavesley, H. B., Li, L., Prabhakaran, K., Borowitz, J. L., and Isom, G. E. Interaction of cyanide and nitric oxide with cytochrome c oxidase: implications for acute cyanide toxicity. Toxicological Sciences 101 (2008): 101–111.
- Limon, I. D., Diaz, A., Mendieta, L., Chamorro, G., Espinosa, B., Zenteno, E., et al. Amyloid- β_{25-35} impairs memory and increases NO in the temporal cortex of rats. Neuroscience Research 63 (2009a): 129–137.
- Limon, I. D., Diaz, A., Mendieta, L., Chamorro, G., Espinosa, B., Zenteno, E., et al. Neuroprotective effect of alpha-asarone on spatial memory and nitric oxide levels in rats injected with amyloid- $\beta_{(25-35)}$. Neuroscience Letters 453 (2009b): 98–103.
- Liu, R., Zou, L., Fu, J., and Lu, Q. Effects of liquiritigenin treatment on the learning and memory deficits induced by amyloid β -peptide (25–35) in rats. Behavioural Brain Research 210 (2010): 24–31.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. Protein measurement with the folin phenol reagent. The Journal of Biological Chemistry 193 (1951): 265–275.
- Maurer, I., Zierz, S., and Moller, H. A selective defect of cytochrome c oxidase is present in brain of Alzheimer disease patients. Neurobiology of Aging 21 (2000): 455–462.
- Mauri, P. and Pietta, P. Electrospray characterization of selected medicinal plant extracts. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 23 (2000): 61–68.
- Maurice, T., Lockhart, B. P., Su, T., and Privat, A. Reversion of β_{25-35} -amyloid peptide-induced amnesia by NMDA receptor-associated glycine site agonists. Brain Research 731 (1996a): 249–253.
- Maurice, T., Lockhart, B. P., and Privat, A. Amnesia induced in mice by centrally administered β -amyloid peptides involves cholinergic dysfunction. Brain Research 706 (1996b): 181–193.
- Mitochondrion. Encyclopaedia Britannica. [Online]. 1998. Available from : <http://www.britannica.com/EBchecked/topic/386130/mitochondrion> [2012, May 18]
- Miyazaki, S., Imaizumi, M., and Onodera, K. Effects of thioperamide on the cholinergic system and the step-through passive avoidance test in mice. Methods and findings in experimental and clinical pharmacology 17 (1995): 653–658.

- Moreira, P. I., Santos, M. S., Sena, C., Seica, R., and Oliveira, C. R. Insulin protects against amyloid β -peptide toxicity in brain mitochondria of diabetic rats. Neurobiology of Disease 18 (2005a): 628– 637.
- Moreira, P. I., Santos, M. S., Sena, Nunes, E., C., Seica, R., and Oliveira, C. R. CoQ10 therapy attenuates amyloid β -peptide toxicity in brain mitochondria isolated from aged diabetic rats. Experimental Neurology 196 (2005b): 112–119.
- Morris, R. G. M. Spatial localization does not require the presence of local cues. Learning and Motivation 12 (1981): 239-260.
- Nadanaciva, S., Bernal, A., Aggeler, R., Capaldi, R., and Will, Y. Target identification of drug induced mitochondrial toxicity using immunocapture based OXPHOS activity assays. Toxicology In Vitro 21 (2007): 902-911.
- Nicholls, D. G. and Ferguson, S.J. eds. Bioenergetics 3. 5th ed. Amsterdam: Academic Press, 2002.
- Omar Dev, R. D., Mohamed, S., Hambali, Z., and Samah, B. A. Comparison on cognitive effects of Centella Asiatica in healthy middle age female and male volunteers. European Journal of Scientific Research 31 (2009): 553-565.
- Otto, T. and Eichenbaum, H. Neuronal activity in the hippocampus during delayed non-match to sample performance in rats: evidence for hippocampal processing in recognition memory. Hippocampus 2 (1992): 323-334.
- Pike, C. J., Burdick, D., Walencewicz, A. J., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. Neurodegeneration induced by β -amyloid peptides *in vitro*: the role of peptide assembly state. The Journal of Neuroscience 13 (1993): 1676-1687.
- Pike, C. J., Walencewicz-Wasserman, A. J., Kosmoski, J., Cribbs, D. H., Glabe, C. G., and Cotman, C. W. Structure-activity analyses of β -amyloid peptides: contributions of the β 25–35 region to aggregation and neurotoxicity. Journal of Neurochemistry 64 (1995): 253–265.
- Pollard, T. D., Earnshaw, W. C., Lippincott-Schwartz, J., eds. Cell Biology. Philadelphia: Saunders, 2008.

- Poonam, K. and Singh, G. S. Ethnobotanical study of medicinal plants used by the Taungya community in Terai Arc Landscape, India. Journal of Ethnopharmacology 123 (2009): 167–176.
- Qiu, X., Chen, Y., and Zhou, M. Two point mutations in mitochondrial DNA of cytochrome *c* oxidase coexist with normal mtDNA in a patient with Alzheimer's disease. Brain Research 893 (2001): 261–263.
- Rao, S. B., Chetana, M., and Devi, P. U. *Centella asiatica* treatment during postnatal period enhances learning and memory in mice. Physiology & Behavior 86 (2005): 449–457.
- Reddy, P. H. Amyloid beta, mitochondrial structural and functional dynamics in Alzheimer's disease. Experimental Neurology 218 (2009): 286–292.
- Sambeth, A., Riedel, W. J., Smits, L. Th., and Blokland, A. Cholinergic drugs affect novel object recognition in rats: relation with hippocampal EEG? European Journal of Pharmacology 572 (2007): 151–159.
- Santos, R. X., Correia, S. C., Wang, X., Perry, G., Smith, M. A., Moreira, P. I., et al. Alzheimer's disease: diverse aspects of mitochondrial malfunctioning. International Journal of Clinical and Experimental Pathology 3 (2010): 570-581.
- Sarter, M., Bodewitz, G., and Stephens, D. N. Attenuation of scopolamine-induced impairment of spontaneous alternation behaviour by antagonist but not inverse agonist and agonist β -carbolines. Psychopharmacology 94 (1988): 491-495.
- Shinomol, G. K. Effect of *Centella asiatica* leaf powder on oxidative markers in brain regions of prepubertal mice *in vivo* and its *in vitro* efficacy to ameliorate 3-NPA-induced oxidative stress in mitochondria. Phytomedicine 15 (2008): 971–984.
- Sigurdsson, E. M., Lorens, S. A., Hejna, M. J., Dong, X., and Lee, J. M. Local and distant histopathological effects of unilateral amyloid- β 25-35 injections into the amygdala of young F344 rats. Neurobiology of Aging 17 (1996): 893-901.
- Sivarajan, V. V., Balachandran, I., eds. Ayurvedic drugs and their plant sources. USA: Oxford and IBH, 1994.
- Sipos, E., Kurunczi, A., Kasza, A., Horvath, J., Felszeghy, K., Laroche, S., et al. β -amyloid pathology in the entorhinal cortex of rats induces memory deficits: implications for Alzheimer's disease. Neuroscience 147 (2007): 28–36.

- Smith, M. A., Drew, K. L., Nunomura, A., Takeda, A., Hirai, K., Zhu, X., et al. Amyloid- β , tau alterations and mitochondrial dysfunction in Alzheimer disease: the chickens or the eggs?. Neurochemistry International 40 (2002): 527–531.
- Sompol, P., Ittarat, W., Tangpong, J., Chen, Y., Doubinskala, I., Batinic-Haberle, I., et al. A neuronal model of Alzheimer's disease: an insight into the mechanisms of oxidative stress-mediated mitochondrial injury. Neuroscience 153 (2008): 120–130.
- Strazielle, C., Dumont, M., Fukuchi, K., and Laronde, R. Transgenic mice expressing the human C99 terminal fragment of β APP - effects on cytochrome oxidase activity in skeletal muscle and brain. Journal of Chemical Neuroanatomy 27 (2004): 237–246.
- Strazielle, C., Sturchler-Pierrat, C., Staufenbiel, M., and Lalonde, R. Regional brain cytochrome oxidase activity in β -amyloid precursor protein transgenic mice with the swedish mutation. Neuroscience 118 (2003): 1151–1163.
- Sutcliffe, J. S., Marshall, K. M., and Neill, J. C. Influence of gender on working and spatial memory in the novel object recognition task in the rat. Behavioural Brain Research 177 (2007): 117–125.
- Swerdlow, R. H. Brain aging, Alzheimer's disease, and mitochondria. Biochimica et Biophysica Acta 1812 (2011): 1630–1639.
- Swerdlow, R. H. and Khan, S. M. A “mitochondrial cascade hypothesis” for sporadic Alzheimer's disease. Medical Hypotheses 63 (2004): 8–20.
- Szeto, H. H. Mitochondria-targeted peptide antioxidants: novel neuroprotective agents. The AAPS Journal 8 (2006): E521-E531.
- Teng, F. Y. H. and Tang, B. L. Widespread c-secretase activity in the cell, but do we need it at the mitochondria?. Biochemical and Biophysical Research Communications 328 (2005): 1–5.
- Terranova, J., Kan, J., Storme, J., Perreaut, P., Fur, F. L., and Soubrie, P. Administration of amyloid β -peptides in the rat medial septum causes memory deficits: reversal by SR 57746A, a non-peptide neurotrophic compound. Neuroscience Letters 213 (1996): 79-82.
- Thomson, C. and Lutz, R. B. Nutrition in the Prevention and Treatment of Disease. Arizona: Academic Press, 2001.
- Tillement, L., Lecanu, L., and Papadopoulos, V. Alzheimer's disease: effects of β -amyloid on mitochondria. Mitochondrion 11 (2011): 13–21.

- Tsunekawa, H., Noda, Y., Mouri, A., Yoneda, F., and Nabeshima, T. Synergistic effects of selegiline and donepezil on cognitive impairment induced by amyloid beta (25–35). Behavioural Brain Research 190 (2008): 224–232.
- Underwood, J. C. E. ed. *General and Systematic Pathology*. 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2004.
- Veerendra Kumar, M. H. and Gupta, Y. K. Effect of different extracts of *Centella asiatica* on cognition and markers of oxidative stress in rats. Journal of Ethnopharmacology 79 (2002): 253–260.
- Veerendra Kumar, M. H. and Gupta, Y. K. Effect of *Centella asiatica* on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology 30 (2003): 336–342.
- Wattanathorn, J., Mator, L., Muchimapura, S., Tongun, T., Pasuriwong, O., Piyawatkul, N., et al. Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*. Journal of Ethnopharmacology 116 (2007): 325–332.
- Wijeweera, P., Arnason, J. T., Koszycki, D., and Merali, Z. Evaluation of anxiolytic properties of Gotukola – (*Centella asiatica*) extracts and asiaticoside in rat behavioral models. Phytomedicine 13 (2006): 668–676.
- Wong-Riley, M., Antuono, P., Ho, K., Egan, R., Hevner, R., Liebl, W., et al. Cytochrome oxidase in Alzheimer's disease: biochemical, histochemical, and immunohistochemical analyses of the visual and other systems. Vision Research 37 (1997): 3593–3608.
- Yamaguchi, Y. and Kawashima, S. Effects of amyloid- β -(25–35) on passive avoidance, radial-arm maze learning and choline acetyltransferase activity in the rat. European Journal of Pharmacology 412 (2001): 265–272.
- Yan, S. D., Caspersen, C., Yao, J., Wang, N., Susonov, A., Lue, L., et al. P1-170 Amyloid-beta peptide accumulation in mitochondria from human Alzheimer brain and transgenic mutant APP mice potentially leading to neuronal dysfunction. Neurobiology of Aging 25 (2004): S144.
- Zheng, C. and Qin, L. Chemical components of *Centella asiatica* and their bioactivities. Journal of Chinese Integrative Medicine 5 (2007): 348–351.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

วิธีการเตรียม isolation medium และ incubation medium ในการแยกไมโทคอนเดรียจากสมอง

1. Isolation medium (pH 7.4)

ประกอบด้วย sucrose 250 มิลลิโมลาร์ EDTA 2 มิลลิโมลาร์ Tris 10 มิลลิโมลาร์ bovine serum albumin 1 มก./มล. ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย potassium hydroxide

2. Incubation medium (pH 7.4)

ประกอบด้วย mannitol 300 มิลลิโมลาร์ sucrose 75 มิลลิโมลาร์ KCl 5 มิลลิโมลาร์ Tris 10 มิลลิโมลาร์ และ potassium phosphate 5 มิลลิโมลาร์ ละลายส่วนผสมทั้งหมดในน้ำกลั่น ปรับ pH ให้เป็น 7.4 ด้วย hydrochloric acid

วิธีการเตรียม reagent ในการวัดปริมาณโปรตีน

1. Alkaline-copper reagent

1.1 ละลาย copper(II)sulfate 0.005 กรัม และ potassium tartrate 0.01 กรัมในน้ำกลั่น โดยละลายแยกกัน เมื่อละลายดีแล้วเทสารละลาย copper(II)sulfate ลงในสารละลาย potassium tartrate ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 10 มล.

1.2 ละลาย sodium hydroxide 2 กรัม และ sodium carbonate 10 กรัมในน้ำกลั่น โดยละลายแยกกัน เมื่อละลายดีแล้วเทสารละลาย sodium hydroxide ลงในสารละลาย sodium carbonate ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนได้ 100 มล.

1.3 เทสารละลายในข้อ 1.1 ลงในสารละลายข้อ 1.2 ด้วยอัตราส่วน 1:10 v/v ควรใช้ทันที หลังเตรียมเสร็จ (freshly prepare)

2. Folin-phenol reagent

ผสม folin-phenol reagent ลงในน้ำกลั่น ด้วยอัตราส่วน 1:10 v/v ควรใช้ทันทีหลังเตรียมเสร็จ (freshly prepare)

ภาคผนวก ข

ตารางแสดงผล Locomotor ของหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย (จำนวนก้าว)	SD	SEM
Sham	12	264.17	79.67	23.00
A β	12	259.58	66.25	19.13
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	254.83	91.79	26.50
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	286.67	95.90	27.68

ตารางแสดงผลของอีซีเอ233 ต่อเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น (exploratory time) ในช่วง sample trial

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย exploratory time ของวัตถุซ้าย (วินาที)	SD	SEM	ค่าเฉลี่ย exploratory time ของวัตถุขวา (วินาที)	SD	SEM
Sham	12	20.93	9.60	2.77	21.04	10.10	2.92
A β	12	22.18	14.49	4.18	24.11	13.55	3.91
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	20.39	9.87	2.85	21.80	9.17	2.65
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	15.00	9.82	2.83	14.12	8.32	2.40

ตารางแสดงผลของอีซีเอ233 ต่อเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น (Exploratory time) ในช่วง test trial

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย exploratory time ของวัตถุเก่า (วินาที)	SD	SEM	ค่าเฉลี่ย exploratory time ของวัตถุใหม่ (วินาที)	SD	SEM
Sham	12	14.21	7.46	2.15	41.35	26.93	7.77
A β	12	16.60	12.58	3.63	16.07	12.12	3.50
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	8.20	5.63	1.63	14.70	8.25	2.38
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	9.99	10.10	2.91	16.68	11.51	3.32

ตารางแสดงค่า %Preference index ของหนูกลุ่มต่างๆ ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง sample trial

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย %Preference index ของวัตถุซ้าย	SD	SEM	ค่าเฉลี่ย %Preference index ของวัตถุขวา	SD	SEM
Sham	12	50.02	4.74	1.37	49.98	4.74	1.37
A β	12	46.94	10.94	3.16	53.06	10.94	3.16
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	48.06	6.48	1.87	51.94	6.48	1.87
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	48.60	6.08	1.76	50.59	6.08	1.76

ตารางแสดงค่า %Preference index ของหนูกลุ่มต่างๆ ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้นในช่วง test trial

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย %Preference index ของวัตถุซ้าย	SD	SEM	ค่าเฉลี่ย %Preference index ของวัตถุขวา	SD	SEM
Sham	12	27.62	9.37	2.70	72.38	9.37	2.70
A β	12	52.21	10.51	3.03	47.79	10.51	3.03
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	36.03	13.50	3.90	63.97	13.50	3.90
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	33.58	20.90	6.03	66.42	20.90	6.03

ตารางแสดงผลรวมของเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชั้น (total exploratory time) ในช่วง sample trial

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย total exploratory time (วินาที)	SD	SEM
Sham	12	41.97	19.38	5.59
A β	12	46.29	26.39	7.62
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	42.18	18.20	5.25
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	29.12	17.94	5.18

ตารางแสดงผลรวมของเวลาที่หนูกลุ่มต่างๆ ใช้ในการสำรวจวัตถุทั้ง 2 ชั้น (total exploratory time) ในช่วง sample trial

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย total exploratory time (วินาที)	SD	SEM
Sham	12	55.57	30.30	8.75
A β	12	32.67	24.15	6.97
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	12	22.90	11.74	3.39
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	12	26.66	17.52	5.06

ตารางแสดงผลของอีซีเอ233 ต่ออัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรีย ในสมองหนูเมาส์ที่ได้รับ A β ₂₅₋₃₅

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3	SD	SEM	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4	SD	SEM
Sham	7	47.36	9.76	3.69	7.38	1.75	0.66
A β	6	47.37	19.93	8.14	7.19	2.97	1.21
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	7	42.65	7.38	2.79	7.02	1.82	0.69
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	7	41.29	8.16	3.08	6.31	1.63	0.61

ตารางแสดงผลอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียในการหาค่า IC50 ของ KCN

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3	SD	SEM	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4	SD	SEM
Normal	9	24.40	3.20	1.07	3.71	0.38	0.13
KCN 0.01 มก./มล.	9	21.50	2.33	0.78	3.37	0.24	0.08
KCN 0.1 มก./มล.	9	19.47	3.81	1.27	3.57	0.75	0.25
KCN 0.3 มก./มล.	9	12.26	2.76	0.92	3.28	1.17	0.39
KCN 0.5 มก./มล.	9	8.89	1.60	0.53	2.94	0.73	0.24
KCN 1 มก./มล.	5	4.74	0.86	0.38	3.32	0.67	0.30
KCN 10 มก./มล.	5	1.12	0.13	0.06	1.12	0.13	0.06

ตารางแสดงผลอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียในการศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3	SD	SEM	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4	SD	SEM
Normal	5	31.65	3.22	1.44	6.29	1.42	0.64
DMSO	6	21.38	8.85	3.61	4.43	1.42	0.58
ECa 1 มก./มล.	5	23.88	5.27	2.36	4.10	1.12	0.50
ECa 10 มก./มล.	5	26.02	5.66	2.53	4.24	0.98	0.44
ECa 25 มก./มล.	5	24.12	7.43	3.32	3.96	0.82	0.37
ECa 50 มก./มล.	5	23.80	8.37	3.74	4.98	1.43	0.64
ECa 75 มก./มล.	5	24.54	5.89	2.63	4.92	0.95	0.43
ECa 100 มก./มล.	5	22.36	6.38	2.85	4.68	1.08	0.49

ตารางแสดงผลอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4 ของไมโทคอนเดรียในการศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ KCN (0.3 มก./มล.)

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3	SD	SEM	ค่าเฉลี่ยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 4	SD	SEM
DMSO	5	26.54	4.53	2.02	5.52	2.62	1.17
KCN + DMSO	5	13.17	3.45	1.54	4.02	1.21	0.54
KCN + ECa 10 มก./มล.	5	19.34	6.79	3.04	5.64	2.25	1.00
KCN + ECa 25 มก./มล.	5	18.42	6.04	2.70	5.74	2.39	1.07
KCN + ECa 50 มก./มล.	5	15.57	4.01	1.79	5.07	2.14	0.96
KCN + ECa 75 มก./มล.	5	14.31	4.94	2.21	5.24	2.32	1.04
KCN + ECa 100 มก./มล.	5	14.53	4.28	1.91	6.20	1.45	0.65

ตารางแสดงผลของอีซีเอ233 ต่อปริมาณ MDA ในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่างๆ จากการวัดระดับลิพิดเปอร์ออกซิเดชัน

กลุ่ม	N	ค่าเฉลี่ย MDA (นาโนโมลาร์)	SD	SEM
Sham	6	7.55	1.34	0.55
A β	6	20.42	9.54	3.89
A β + อีซีเอ 10 มก./กก.	6	9.09	3.55	1.45
A β + อีซีเอ 30 มก./กก.	6	10.08	3.31	1.35

ภาคผนวก ค



Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval	<input type="checkbox"/> Original	<input type="checkbox"/> Renew
Animal Use Protocol No. 11-33-001	Approval No. 11-33-001	
Protocol Title Effects of the standardized extract of <i>Centella asiatica</i> ECa 233 on brain mitochondria function in learning- and memory-impaired mice induced by β -amyloid ₂₅₋₃₅ injection		
Principal Investigator Boonyong 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 March 11, 2011	Date of Expiration March 11, 2012	
Applicant Faculty/Institution Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Rd., Pathumwan BKK-THAILAND. 10330		
Signature of Chairperson 	Signature of Authorized Official 	
Name and Title THONGCHAI SOOKSAWATE, Ph.D. Chairman	Name and Title PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D. Associate Dean (Research and Academic Service)	
<p><i>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.</i></p> <p><i>This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.</i></p>		

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวณัฐนันท์ โล่สุวรรณรักษ์ เกิดวันที่ 26 เมษายน พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดอุบลราชธานี สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2550 และเข้าศึกษาต่อระดับปริญญาโทที่ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษาล่าสุด

ผลงานทางวิชาการที่ตีพิมพ์มี 1 เรื่อง ได้แก่ Effects of longan seed extract on scopolamine-induced learning and memory deficit in mice. The Thai Journal of Pharmaceutical Science 33 (2009): 33-38.