ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำในหนูเมาส์

นายสิทธิพงษ์ กนกวรรณจำรัส

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (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 STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 ON LEARNING AND MEMORY DEFICIT INDUCED BY LOW DOSE CHLORPYRIFOS IN MICE

Mr. Sitthipong Kanokewanjumrus

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology
Department of Pharmacology and Physiology
Faculty of Pharmaceutical Sciences
Chulalongkorn University
Academic Year 2011
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำในหนูเมาส์
โดย	นายสิทธิพงษ์ กนกวรรณจำรัส
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.มยุรี ตันติสิระ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รัชนี รอดศิริ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

……...ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง พ.ต.ท.หญิง. ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

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

……...อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(รองศาสตราจารย์ เภสัชกร ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ)

……...อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ เภสัชกรหญิง ดร.รัชนี รอดศิริ)

……...กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เภสัชกรหญิง ร.ท.หญิง ดร.ภัสราภา โตวิวัฒน์)

……...กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(อาจารย์ ดร. นายแพทย์สมพล เทพชุม)

สิทธิพงษ์ กนกวรรณจำรัส : ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำในหนูเมาส์. (EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 ON LEARNING AND MEMORY DEFICIT INDUCED BY LOW DOSE CHLORPYRIFOS IN MICE) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.ภญ.ดร.มยุรี ตันติสิระ, อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รศ.ภก.ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ, อ.ภญ.ดร.รัชนี รอดศิริ, 81 หน้า.

คลอร์ไพริฟอส เป็นยาฆ่าแมลงที่มีความเป็นพิษต่อระบบประสาทที่อาจรุนแรงถึงแก่ชีวิตหากได้รับในขนาดสูง มีรายงานว่าการได้รับคลอร์ไพริฟอสในขนาดต่ำอย่างต่อเนื่อง จะก่อให้เกิดอนุมูลอิสระในสมอง และยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท ซึ่งอาจส่งผลต่อการทำงานของระบบประสาท งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำ โดยใช้หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ จากการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลัน ในหนูเมาส์จำนวน 5 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสทางปาก ในขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 150-230 มก./กก. พบว่ามีค่า LD_{50} เท่ากับ 175.65 (163.19-188.11) มก./กก. และเมื่อให้คลอร์ไพริฟอส 30 มก./กก. (1 ใน 6 ของค่า LD_{50}) ทางปาก วันละ 1 ครั้งแก่หนูเมาส์ เป็นระยะเวลา 20 วัน พบว่า ทำให้เกิดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ระดับของ MDA ในสมองสูงขึ้นและเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกทำลาย โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาด 10 และ 30 มก./กก. ที่ให้โดยการป้อนทางปากสามารถช่วยลดความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ในการทดสอบด้วยวิธี Morris water maze และ Object recognition อีกทั้งยังสามารถช่วยลดระดับ MDA ในสมอง และลดการตายของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส โดยที่ขนาดของคลอร์ไพริฟอสและสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่หนูเมาส์ได้รับนั้น ไม่มีฤทธิ์กระตุ้นหรือยับยั้งระบบประสาทส่วนกลางที่ควบคุมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ เมื่อทดสอบด้วยวิธี locomotor activity ในขณะที่การได้รับวิตามินอี (75 มก./กก.) ร่วมกับวิตามินซี (100 มก./กก.) ไม่สามารถแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ แต่จะช่วยลดปริมาณ MDA และลดการตายของเซลล์ประสาทในสมองที่เกิดจากการได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำได้

ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ให้โดยการป้อนทางปากสามารถช่วยแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำได้ โดยอย่างน้อยที่สุดจะมีกลไกส่วนหนึ่งในการป้องกันเซลล์ประสาทบริเวณฮิปโปแคมปัสจากฤทธิ์ของอนุมูลอิสระ ร่วมกับกลไกอื่น ๆ นอกเหนือจากฤทธิ์ต้านออกซิเดชันดังกล่าว ควรจะมีการศึกษาต่อไปในระดับเซลล์ เพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่สมบูรณ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

ภาควิชา เภสัชวิทยาและสรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต .....

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

ปีการศึกษา 2554 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม .....

5276600733 : MAJOR Pharmacology

KEYWORDS : *CENTELLA ASIATICA* / ECa 233 / CHLORPYRIFOS

SITTHIPONG KANOKEWANJUMRUS : EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa 233 ON LEARNING AND MEMORY DEFICIT INDUCED BY LOW DOSE CHLORPYRIFOS IN MICE. ADVISOR : ASSOC. PROF. MAYUREE TANTISIRA, Ph.D., CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. BOONYONG TANTISIRA, Ph.D., RATCHANEE RODSIRI, Ph.D., 81 pp.

Chlorpyrifos is an organophosphate insecticide with neurotoxicity. If exposure level is high enough, chlorpyrifos can cause death. It has been reported that persistent low dose exposure to chlorpyrifos generated reactive oxygen species and inhibited proliferation of neuronal cells which could attribute to neuronal dysfunction. Therefore, the present study aimed to investigate the effects of standardized *Centella asiatica* extract ECa 233 (ECa 233) on learning and memory deficit induced by low dose chlorpyrifos in male, 4- weeks old ICR mice. Acute toxicity test was carried out in 5 groups of 10 mice each. Chlorpyrifos at the doses between 150-230 mg/kg was orally administered and the LD_{50} of chlorpyrifos was found to be 175.65 (163.19-188.11) mg/kg. When chlorpyrifos 30 mg/kg (1/6 of LD_{50}) was orally given once daily for 20 consecutive days, impairment of learning and memory, increased of MDA levels and neuronal cells death in CA1 and CA3 regions of hippocampus were observed. Apparently, they are significantly differ from control group. ECa 233 at the doses of 10 and 30 mg/kg could significantly improve chlorpyrifos-induced learning and memory deficit observed in both Morris water maze and Object recognition tests. Moreover, ECa 233 could significantly reduce cerebral MDA levels and decreased cells death in CA1 and CA3 regions of hippocampus in mice receiving chlorpyrifos, while neither ECa 233 nor chlorpyrifos could stimulate or depress locomotor activity in mice. In contrast administration of vitamin E (75 mg/kg) in combination with vitamin C (100 mg/kg) could not ameliorate learning and memory deficit whereas the increase of brain MDA as well as neuronal cells loss, caused by low dose chlorpyrifos, were significantly reduced.

The results obtained demonstrated that orally given ECa 233 could improve learning and memory deficit induced by low dose chlorypyrifos at least, partly through attenuation of free radicals subsequently protected hippocampus cells death. Some other mechanisms independent of antioxidative activity do exist and should be further investigate to establish complete profiles of underlying mechanisms of action of standardized extract ECa 233.

Department : Pharmacology and Physiology	Student's Signature .....
Field of Study : Pharmacology	Advisor's Signature .....
Academic Year : 2011	Co-advisor's Signature .....
	Co-advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ. ภญ. ดร.มยุรี ตันติสิระ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ. ภก. ดร.บุญยงค์ ตันติสิระ และ อ. ภญ. ดร.รัชนี รอดศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาประสาทวิชาความรู้ พร้อมทั้งให้คำปรึกษา ชี้แนะแนวทาง เพื่อให้การทำวิทยานิพนธ์ในครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รศ. ภญ. พ.ต.ท.หญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอำนวยความสะดวกและช่วยเหลือเรื่องการใช้สถานที่ เครื่องมือ และอุปกรณ์ต่างๆในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ ผศ. ภญ. ร.ท.หญิง ดร.ภัสราภา โตวิวัฒน์ และ อ. ดร. นพ.สมพล เทพชุม กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม เพื่อทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณคณะแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช ที่ได้มอบทุนการศึกษาระดับปริญญาโทในครั้งนี้

ขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโททุกท่าน ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และแนะนำความรู้ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณบิดาและมารดาของข้าพเจ้าที่ท่านได้ให้กำลังใจและสนับสนุนการศึกษาในครั้งนี้ให้กับข้าพเจ้า และขอขอบคุณทุกท่านที่ได้มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญภาพ……... ญ

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ…… ฏ

บทที่

1 บทนำ……. 1

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

สมมติฐานงานวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 2

กรอบแนวคิดการวิจัย……..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……..... 4

คลอร์ไพริฟอส…… 4

ลักษณะทางเคมีและกายภาพ……. 5

เมแทบอลิซึม…… 5

กลไกการเกิดพิษ……... 6

อาการพิษ……..... 7

Cholinesterase enzyme……. 9

ความจำ……. 9

ความจำจากการรับรู้..... 9

ความจำระยะสั้น…… 10

ความจำระยะยาว…… 10

กระบวนการของความจำ……... 12

การลงรหัสข้อมูล…… 13

บทที่ หน้า

การจัดการข้อมูล..... 13
การเก็บรักษาข้อมูล..... 13
การเรียกข้อมูลกลับ..... 13
ภาวะความจำเสื่อม..... 14
Retrogarde amnesia..... 14
Anterograde amnesia..... 14
บัวบก..... 15
ลักษณะทางพฤกษศาสตร์..... 15
องค์ประกอบทางเคมี..... 16
ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา..... 16
สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 18
การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233..... 19
การศึกษาทางพิษวิทยา..... 20

3 วิธีดำเนินงานวิจัย..... 21
สัตว์ทดลอง และสารเคมี..... 21
วัสดุอุปกรณ์..... 22
เครื่องมือ..... 23
วิธีการวิจัย..... 23
การเตรียมสารทดสอบ..... 23
การหา Median lethal dose (LD_{50}) ของคลอร์ไพริฟอส..... 23
การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง..... 24
การออกแบบการทดลอง..... 24
การทดสอบทางด้านพฤติกรรม (Behavioral test)..... 26
การทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ (Locomotor activity). 26
การทดสอบความจำและการเรียนรู้ด้วยวิธี Object Recognition..... 27
การทดสอบความจำและการเรียนรู้ด้วยวิธี Morris Water Maze..... 28
การตรวจวิเคราะห์ทางชีวเคมี (Biochemical analysis)..... 29
การตรวจวัดระดับเอนไซม์ cholinesterase..... 29

บทที่ หน้า

การวัด lipid peroxidation…….…… 31
การศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์…..... 32
การวิเคราะห์ข้อมูล…… 33

4 ผลการทดลอง……..... 34
ผลการหาค่า Median lethal dose (LD_{50}) ของคลอร์ไพริฟอส…….. 34
ผลการทดสอบด้านพฤติกรรม…… 35
ผลการทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ (Locomotor activity).. 35
ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี Object Recognition……..... 38
ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี Morris Water Maze..... 42
ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมี……... 46
ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อปริมาณ MDA.. 46
ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของ Cholinesterase activity ในเลือด…… 48
ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของ Cholinesterase activity ในสมอง…… 51
ผลการศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์…… 54

5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง…… 60

รายการอ้างอิง..... 66
ภาคผนวก..... 75
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 81

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	สูตรโครงสร้างทางเคมีของคลอร์ไพริฟอส……	4
2	กระบวนการเมแทบอลิซึมของคลอร์ไพริฟอส……	6
3	กลไกการเกิดพิษของคลอร์ไพริฟอส……	7
4	อาการแสดงภายหลังการได้รับคลอร์ไพริฟอส……..	8
5	การแบ่งประเภทของความจำระยะยาว……	11
6	ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนของสมองและความจำประเภทต่าง ๆ.....	12
7	กระบวนการของความจำ……	13
8	บัวบก (*Centella asiatica* (Linn.) Urban) ……	15
9	โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ asiaticoside, asiatic acid, madicassoside และ madecassic acid…….....	16
10	สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233……..	19
11	แผนผังการทดสอบ.....	25
12	อุปกรณ์ Locomotor activity cage……..	26
13	วิธีการทดสอบ Object Recognition……...	28
14	แบบจำลองโมเดล Morris Water Maze……...	29
15	การเกิดสารประกอบของ malondialdehyde จากปฏิกิริยา lipid peroxidation.	32
16	บริเวณ CA 1 และ CA 3 ของสมองส่วน hippocampus ที่ใช้ในการประเมินจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิต (survival neurons)……...	33
17	ความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตาย (Mortality) กับขนาด (log) ของคลอร์ไพริฟอสเป็นมก./กก. น้ำหนักตัว……	34
18	จำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยต่อ 5 นาที ของหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ.....	36
19	ผลรวมจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยของหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 นาที..... ……..	37
20	ค่า Discrimination index ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ภายหลังการได้รับสารทดสอบทางปากเป็นเวลา 14 วัน.....	39
21	ค่า Discrimination index ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ภายหลังการได้รับสารทดสอบทางปากเป็นเวลา 20 วัน.....	41

ภาพที่ หน้า

22 Escape latency ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ก่อนเริ่มให้สารทดสอบ 1 วัน..... 43

23 ระยะเวลาเฉลี่ยของ escape latency ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 15-19 วัน โดยการทดสอบด้วย Morris Water Maze. 44

24 ระยะเวลาที่หนูเมาส์ใช้ในการว่ายใน quadrant ที่ 1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีแท่นพักใต้น้ำเดิมอยู่ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 20 วัน…….…… 45

25 ผลของสารสกัดมาตรฐาน อีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA ในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ.. 47

26 ผลของคลอร์ไพริฟอส ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ในพลาสมาของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ..... 49

27 ผลของคลอร์ไพริฟอส ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเม็ดเลือดแดงของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ..... 50

28 ผลของคลอร์ไพริฟอส ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองส่วน hippocampus ของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ..... 52

29 ผลของคลอร์ไพริฟอส ต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองส่วน prefrontal cortex ของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ……. 53

30 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampusในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน……. 55

31 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท บริเวณ CA1 และ CA3 ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampusในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา14 วัน…….. 56

32 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampusในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 20 วัน……. 58

33 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท บริเวณ CA1 และ CA3 ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampusในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 20 วัน……. 59

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ก.	กรัม
กก.	กิโลกรัม
ซม.	เซ็นติเมตร
ซม^3	ลูกบาศ์กเซ็นติเมตร
มก.	มิลลิกรัม
มม.	มิลลิเมตร
มล.	มิลลิลิตร
ล.	ลิตร
พ.ศ.	พุทธศักราช
ACh	acetylcholine
AChE	acetylcholinesterase
$AChE_m$	muscarinic acetylcholine receptor
$AChE_n$	nicotinic acetylcholine receptor
ANOVA	one-way analysis of variance
ATCI	acetylthiocholine iodide
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Disease Registry
BTCI	butyrylthiocholine iodide
CMC	carboxymethylcellulose
CNS	Central Nervous System
CPF	chlorpyrifos
CPF-oxon	chlorpyfos oxon
DI	discrimination index
DTNB	5,5'-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid)
ECa 233	standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233
i.p.	intraperitoneal
IUPAC	International Union of Pure and Applied Chemistry
LD_{50}	median lethal dose
LSD	Fisher's Least Significant Difference

kg	kilogram
M	Molar
MDA	malondialdehyde
mg	milligram
min	minute
MWM	Morris Water Maze
$Na_2HPO_4.2H_2O$	di-sodium hydrogen orthophosphate dihydrate
$NaH_2PO_4.2H_2O$	sodium dihydrogen orthophosphate
No.	Number
NRA	National Registration Authority
o.d.	once daily
OP	organophosphate
ORT	Object Recognition Test
pH	potential of Hydrogen ion
p.o.	per os (oral administration)
rpm	revolutions per minute
sec	second
S.E.M.	standard error of the means
SDS	sodium dodecyl sulfate
TCP	3,5,6-trichloro-2-pyrinol
µl	microlitre
µm	micrometers
µmol	micromolar
vit C	vitamin C
vit E	vitamin E
WHO	World Health Organization

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทย เป็นเมืองเกษตรกรรม ที่มีการใช้ยาฆ่าแมลงเป็นจำนวนมาก แต่มีเพียงส่วนน้อยเท่านั้น ที่มีความเข้าใจในการใช้ยาฆ่าแมลงอย่างถูกวิธี ทำให้เกษตรกรได้รับยาฆ่าแมลงโดยไม่รู้ตัวอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้เกิดปัญหาด้านสาธารณสุข และสิ่งแวดล้อม อันเนื่องมาจากสารตกค้างในผลผลิตทางการเกษตร และอุตสาหกรรม โดยเฉพาะสารพิษจากยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphate ที่มีรายงานถึงผลกระทบที่สูงในการก่ออันตรายต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อม (พาลาภ สิงหเสนี, 2537) โดยอาการพิษที่เกิดจากการได้รับยาฆ่าแมลงเกินขนาด จะยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase อาการที่พบส่วนใหญ่มักเกิดขึ้นที่ตาและระบบทางเดินหายใจเป็นลำดับแรก จากการกระตุ้นตัวรับ muscarinic ของระบบประสาท parasympathetic ทำให้มีสิ่งคัดหลั่งเพิ่มมากขึ้น ม่านตาหรี่ คลื่นไส้ อาเจียน ท้องร่วง หลอดลมและลำไส้หดเกร็ง จากนั้นตามมาด้วยการกระตุ้นตัวรับ nicotinic ที่ปมประสาท sympathetic และ parasympathetic ของระบบประสาทอัตโนมัติ รวมทั้งที่บริเวณจุดเชื่อมระหว่างปลายประสาทและกล้ามเนื้อ ส่งผลทำให้ผู้ป่วยมีอาการกล้ามเนื้อกระตุก อ่อนล้าและเป็นอัมพาตได้ (สมิง เก่าเจริญ และ ยุพา ลีลาพฤทธิ์, 2537) นอกจากการเกิดพิษจากการได้รับยาฆ่าแมลงในขนาดสูงดังกล่าวแล้ว จากการศึกษาในปัจจุบัน พบว่า อาการพิษที่เกิดจากการได้รับยาฆ่าแมลงนั้น อาจเกิดจากการได้รับในปริมาณน้อยๆ อย่างต่อเนื่อง ซึ่งสามารถส่งผลต่อสุขภาพได้เช่นกัน โดยยาฆ่าแมลงจะไปมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ประสาทในสมอง ยับยั้งขบวนการ axonogenesis และเพิ่มระดับของอนุมูลอิสระภายในสมอง จนอาจเกิดภาวะบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำ อันเป็นสาเหตุให้เกิดโรคสมองเสื่อม (Dementia)ได้ (Jett และคณะ, 2001; Schuh และคณะ, 2002; Fernando และคณะ, 2005; Garcia และคณะ, 2005; Yang และคณะ, 2008; El-Hossary และคณะ, 2009)

บัวบก (*Centella asiatica* (L.) Urban) เป็นพืชสมุนไพรชนิดหนึ่งที่รู้จักและนิยมนำมาใช้อย่างแพร่หลาย โดยในปัจจุบันมีการนำบัวบกมาแปรรูปเป็นน้ำใบบัวบกเครื่องดื่มสมุนไพร ที่มีสรรพคุณ แก้เจ็บคอ ร้อนใน กระหายน้ำ ทำให้ชุ่มคอ นอกจากการแปรรูปเป็นเครื่องดื่มสมุนไพรแล้ว ยังพบว่ามีการนำมาผลิตเป็นเจลเพื่อรักษาอาการแผลในช่องปาก แผลเรื้อรัง เช่น แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก แผลกดทับ แต่สำหรับสรรพคุณในการช่วยแก้ไขสภาวะการบกพร่องทางความจำและการเรียนรู้นั้น พบว่ายังมีการศึกษาวิจัยค่อนข้างน้อย โดยการรักษาส่วนใหญ่จะยังคงเน้นไปในการ

ใช้ยาแผนปัจจุบันมากกว่า ทั้งนี้ อาจมีสาเหตุมาจากการที่สมุนไพรมีความแปรปรวนของสารสำคัญที่เป็นสารออกฤทธิ์ค่อนข้างสูงหรือมีวิธีการใช้ที่ยุ่งยากและซับซ้อนมากกว่าการใช้ยาแผนปัจจุบัน อีกทั้ง ผู้ที่ทำการรักษา อาจยังมีทัศนคติต่อการใช้สมุนไพรว่าเป็นการรักษาที่ด้อยคุณภาพ (malpractice) ผู้ทำการรักษาอาจไม่มีความมั่นใจที่จะนำไปใช้ เพื่อแก้ปัญหานี้ คณะผู้วิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้มีแนวคิดในการเตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่มีคุณลักษณะอันพึงประสงค์ คือ เป็นสารสกัดปราศจากสีที่ประกอบด้วย madecassoside ต่อ asiaticoside ซึ่งเป็นสารสำคัญในสัดส่วน 1.5±0.5:1 และมีปริมาณ triterpenoids ไม่ต่ำกว่า 80% มีความคงตัวในการเก็บอย่างน้อย 2 ปี (เอกรินทร์ สายฟ้า และคณะ, 2549) จากการศึกษาและวิจัย พบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีคุณสมบัติในการช่วยแก้ไขสภาวะการบกพร่องทางด้านการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ (Kam-eg และคณะ, 2009) จึงเป็นที่น่าสนใจที่จะศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในการรักษาสภาวะการบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจากการได้รับยาฆ่าแมลง

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำในหนูเมาส์

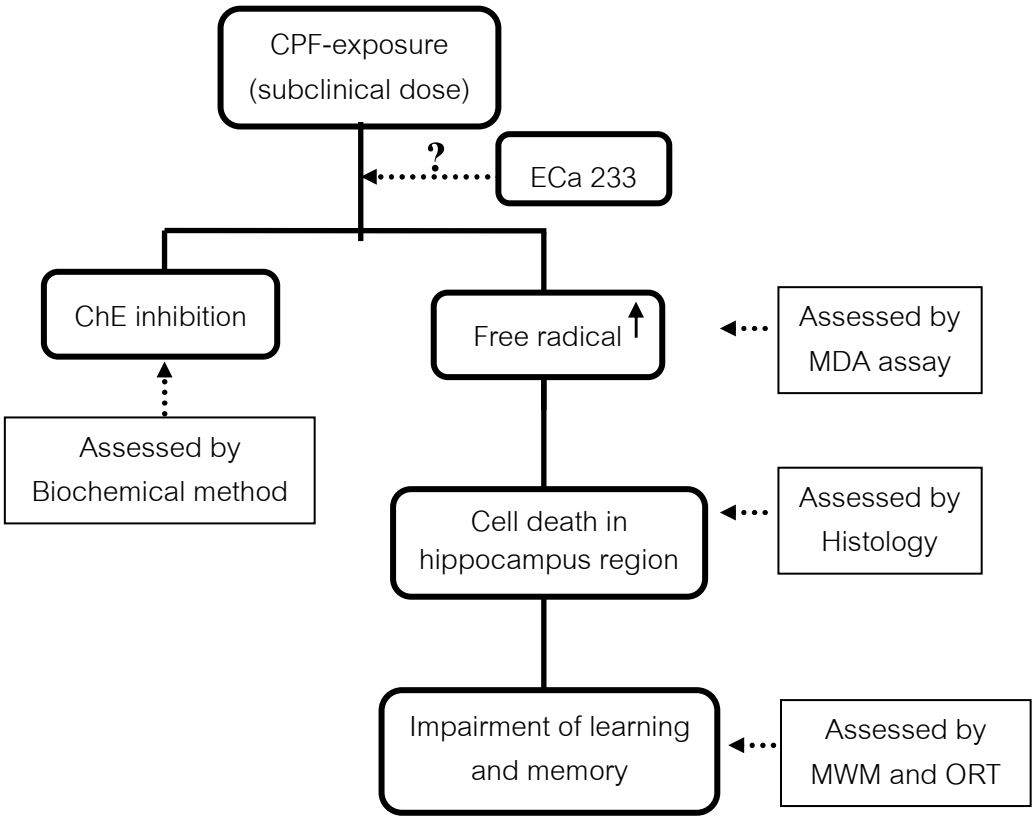
สมมติฐานการวิจัย

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ป้องกันหรือลดความรุนแรงของภาวะสมองเสื่อมที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นจากการได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำอย่างต่อเนื่องในหนูเมาส์

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

ได้ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์ที่จะแสดงให้เห็นผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะสมองเสื่อมที่เกิดจากการได้รับยาฆ่าแมลงในขนาดต่ำอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในมนุษย์

กรอบแนวคิดการวิจัย (Conceptual Framework)



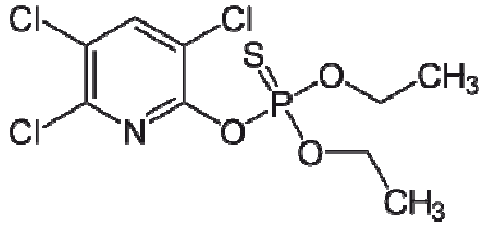
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 **คลอร์ไพริฟอส** (Chlorpyrifos)

คลอร์ไพริฟอสเป็นยาฆ่าแมลงอินทรีย์สังเคราะห์ (synthetic organic insecticides) ในกลุ่ม organophosphate ที่ไม่สามารถถูกดูดซึมเข้าสู่เนื้อเยื่อพืช (non-systemic insecticides) ซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากมีประสิทธิภาพสูงในการกำจัดแมลงศัตรูพืชที่เข้ามารบกวนผลผลิตทางการเกษตร โดยเฉพาะแมลงศัตรูพืชจำพวกที่ใช้ปากดูดหรือกัด เช่น หนอน แมลงปีกแข็ง หรือเพลี้ยอ่อน เป็นต้น (World Health Organization [WHO], 2009) คลอร์ไพริฟอส มีความเป็นพิษต่อทั้งระบบประสาทอัตโนมัติ และระบบประสาทส่วนกลาง อันเป็นผลสืบเนื่องจากฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งมีหน้าที่ในการทำลายสารสื่อประสาท acetylcholine ทำให้เกิดการคั่งของ acetylcholine บริเวณปลายประสาทอัตโนมัติและสมอง การได้รับคลอร์ไพริฟอสในปริมาณมาก จะทำให้เกิดอาการพิษจากการกระตุ้นของ acetylcholine มากเกิน (Cholinergic symptoms) ได้แก่ คลื่นไส้ อาเจียน น้ำตาไหล น้ำลายฟูมปาก เหงื่อแตก ความดันโลหิตต่ำ ท้องเสีย หายใจลำบาก กล้ามเนื้ออ่อนแรงและเป็นอัมพาตได้ในที่สุด (Garcia และคณะ, 2005) โดยพิษที่เกิดขึ้นนั้น สามารถเข้าสู่ร่างกายได้ทางการหายใจ สัมผัส การปนเปื้อนในอาหารและพืชผักทางการเกษตร หรือเกิดจากการตกค้างของสารเคมีในดิน น้ำ และอากาศได้ จากการแบ่งประเภทของสารเคมีกำจัดแมลงในกลุ่ม organophosphate ตามระดับอันตรายของการเกิดพิษ โดยองค์การอนามัยโลก (WHO, 2009) คลอร์ไพริฟอสถูกจัดให้อยู่ในระดับ II หรือมีความเป็นพิษปานกลาง

คลอร์ไพริฟอสมีชื่อทางเคมีตามระบบ International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) ว่า *O,O-diethyl-O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate และสูตรโมเลกุล $C_9H_{11}Cl_3NO_3PS$ จัดอยู่ในกลุ่มอนุพันธ์ของกรด phosphorothioic ที่มีมวลโมเลกุล 350.6 (Agency for Toxic Substances and Disease Registry [ATSDR], 1997; The National Registration Authority [NRA], 2000; WHO, 2009) โดยมีสูตรโครงสร้าง แสดงดังภาพที่ 1



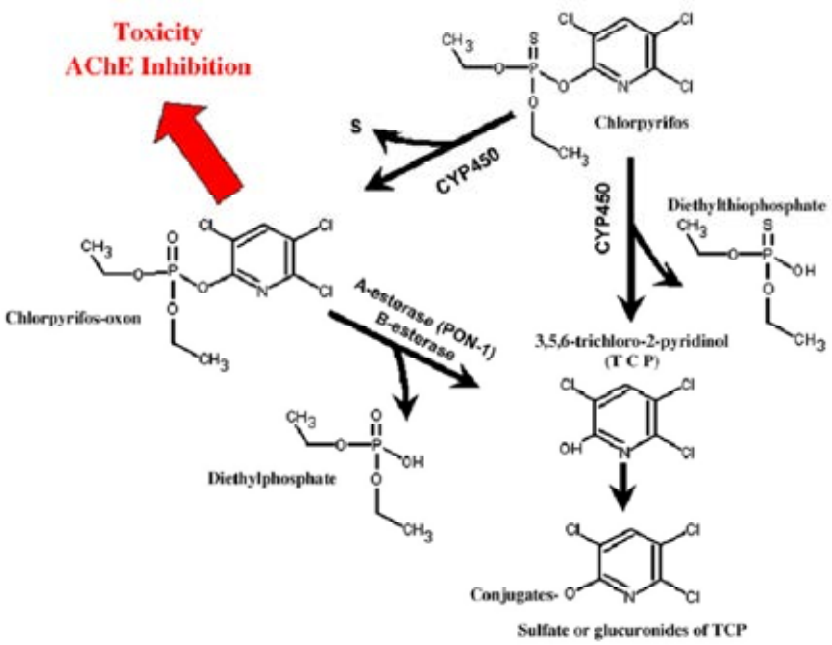
ภาพที่ 1 สูตรโครงสร้างทางเคมีของคลอร์ไพริฟอส (NRA, 2000)

2.1.1 **ลักษณะเคมีและทางกายภาพ** (Chemical and physical properties)

คลอร์ไพริฟอสเป็นผลึกของแข็งที่ไม่มีสี ไม่มีกลิ่น มีจุดหลอมเหลวที่ 41 – 43.5 องศาเซลเซียส ความหนาแน่น 1.38 ก./ซม^3 โดยมีค่าการละลายในน้ำต่ำอยู่ที่ 2 มก./ล. ที่ 23 องศาเซลเซียส และ 1.39 มก./ล. ที่ 25 องศาเซลเซียส คลอร์ไพริฟอสเป็นสารที่มีความคงตัวในอากาศ และไม่มีความไวต่อรังสีอุลตร้าไวโอเลต โดยคงตัวได้ในสภาวะที่เป็นกลางและกรดอ่อน แต่ถูกไฮโดรไลซ์ได้ในสภาวะที่เป็นด่างแก่ อีกทั้งยังสามารถถูกไฮโดรไลซ์ได้มากขึ้นเมื่อ pH และอุณหภูมิเพิ่มขึ้น (NRA, 2000)

2.1.2 **เมแทบอลิซึม**

คลอร์ไพริฟอสมีกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่ค่อนข้างซับซ้อน มีเมแทบอไลท์ได้หลากหลายชนิด แต่ส่วนใหญ่เมแทบอลิซึมที่เกิดขึ้น จะเกิดผ่านปฏิกิริยาออกซิเดชันที่ตับ โดยอาศัยเอนไซม์ cytochrome P450 เกิดเป็น chlorpyrifos-oxon (CPF-oxon) ซึ่งเป็นเมแทบอไลท์หลัก (ATSDR, 1997) ที่มีความเป็นพิษมากกว่าคลอร์ไพริฟอสถึง 400 เท่า (Nolan และคณะ, 1984; Garcia และคณะ, 2005) โดยหลังจากเกิดการเมแทบอลิซึมแล้ว ทั้งคลอร์ไพริฟอส และ CPF-oxon จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และเข้าไปสะสมบริเวณเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของร่างกาย จนเป็นสาเหตุหนึ่งที่อาจทำให้เกิดพิษตามมาได้ (Mattsson และคณะ, 1996) แต่ถึงอย่างไรก็ตาม สารทั้งสองจะถูกกำจัดพิษให้ลดน้อยลงโดยเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีส ที่มีเอนไซม์ carboxylesterase และ paraoxonase เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา ได้เมแทบอไลท์ 3 ชนิด คือ 3,5,6-trichloro-2-pyrinol (TCP), diethylphosphate และ diethylthiophosphate ซึ่งเป็นเมแทบอไลท์ที่มีความเป็นพิษน้อย และถูกกำจัดออกจากร่างกายโดยการจับกับ glucuronide และ sulfate เพื่อขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ (Nolan และคณะ, 1984; Drevenkar และคณะ, 1993; Mattsson และคณะ, 1996; Cometa และคณะ, 2007; Eaton และคณะ, 2008; Jiang และคณะ, 2010) แสดงดังภาพที่ 2



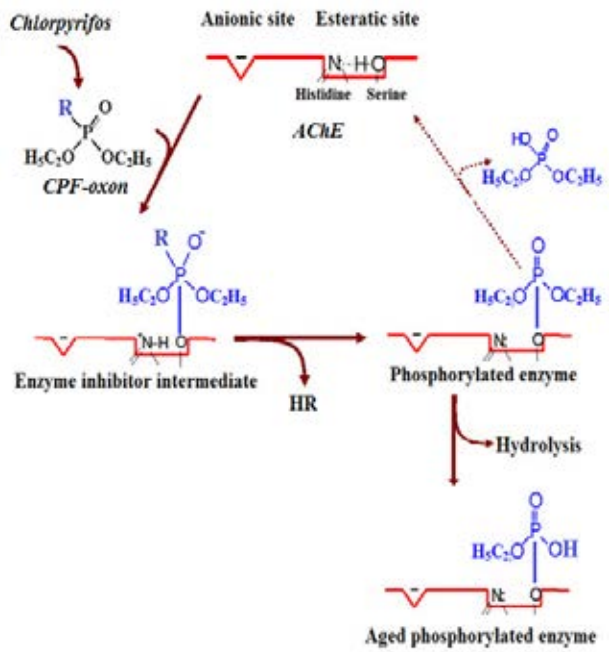
ภาพที่ 2 กระบวนเมแทบอลิซึมของคลอร์ไพริฟอส (Iyer และคณะ 2008)

นอกจากกระบวนการเมแทบอลิซึมดังกล่าวแล้ว ยังมีรายงานการวิจัยถึงความเป็นพิษของ CPF-oxon ที่ไปมีผลลดระดับของกลูตาไธโอน ทำให้ระดับอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น แต่กลไกดังกล่าวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด (Garcia และคณะ, 2005; Cometa และคณะ, 2007) นอกจากความเป็นพิษของคลอร์ไพริฟอส และ CPF-oxon แล้ว ยังมีรายงานการวิจัยถึงความเป็นพิษของ TCP อันเป็นผลมาจากการตกค้างของคลอร์ไพริฟอสในน้ำ ดินและอากาศ ที่สามารถสลายในสิ่งแวดล้อมได้เป็น TCP ซึ่งมีความเป็นพิษมากกว่าคลอร์ไพริฟอสประมาณ 2-3 เท่า (Caroline และคณะ, 1994b)

2.1.3 **กลไกการเกิดพิษ** (Mechanism of Toxic action)

คลอร์ไพริฟอสมีกลไลการเกิดพิษที่คล้ายกับสารในกลุ่ม organophosphate ตัวอื่น ๆ คือ จะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase โดยจับที่ serine hydroxyl group บริเวณ esteratic site ของเอนไซม์ เกิดเป็น phosphorylated enzyme ที่มีความคงตัวและถูกสลายกลับไปเป็น free enzyme ได้ช้ามาก อีกทั้ง การสร้างเอนไซม์ acetylcholinesterase ขึ้นมาใหม่นั้น จะต้องใช้ระยะเวลานานประมาณ 2-3 สัปดาห์ ดังนั้น หากไม่ได้รับการแก้ไขพิษ จะทำให้เอนไซม์ acetylcholinesterase ถูกยับยั้งการทำงานแบบถาวร (irreversible process) กระบวนการดังกล่าวนี้เรียกว่า “aging” กล่าวคือ เมื่อคลอร์ไพริฟอสจับกับเอนไซม์จนเกิดเป็น phosphorylated enzyme แล้ว เมื่อทิ้งไว้นาน ๆ สารประกอบนี้จะค่อยๆละลายน้ำและถูกไฮโดรไลซ์

โดยเกิดปฏิกิริยา dealkylation ของ phosphorylated enzyme เกิดเป็นสารประกอบที่มีความคงตัวเพิ่มสูงขึ้นและไม่สามารถกลับมาเป็น free enzyme ได้อีกต่อไป แสดงดังภาพที่ 3



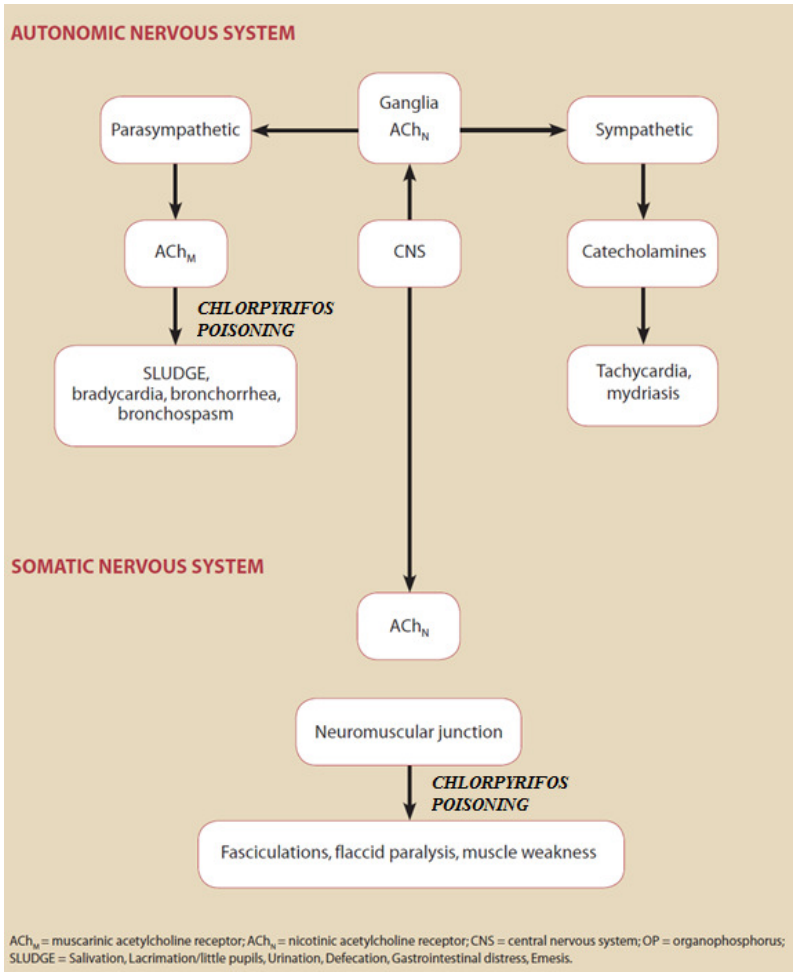
ภาพที่ 3 กลไกการเกิดพิษของคลอร์ไพริฟอส (ณัฐิยา ไกรวพันธุ์, 2553)

นอกจากกลไกหลักในการเกิดพิษจากการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ปัจจุบันได้มีสมมติฐานถึงกลไกการเกิดพิษของคลอร์ไพริฟอสในสัตว์ทดลอง จากการได้รับในปริมาณต่ำ ๆ อย่างต่อเนื่องว่า สามารถทำให้เกิดพิษได้ โดยผ่านกลไกการยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ, การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ประสาทในสมอง (cell differentiation and proliferation), รบกวนขบวนการ axonogenesis ทำให้ระบบการขนส่งโปรตีนภายในเซลล์เกิดความผิดปกติ และเพิ่มระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Jett และคณะ, 2001; Schuh และคณะ, 2002; Garcia และคณะ, 2005) ส่งผลทำให้เกิดความบกพร่องต่อความจำและการเรียนรู้ของสัตว์ทดลอง ก่อให้เกิดภาวะความจำเสื่อม ซึ่งเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคอัลไซเมอร์ได้ โดยกลไกดังกล่าวนี้ อาจไม่ได้ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase (Jiang และคณะ, 2010)

2.1.4 อาการพิษ

อาการแสดงของการเกิดพิษ อันเป็นผลมาจากการคั่งของ acetylcholine ในระบบประสาทอัตโนมัติและสมอง อาจทำให้เกิดกลุ่มอาการได้ต่าง ๆ กัน ทั้งนี้ขึ้นกับความเร็ว และวิถีทางของการได้รับพิษ ซึ่งคลอร์ไพริฟอสสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายทั้งการกิน สัมผัส และการ

หายใจ เนื่องจากคุณสมบัติของมันสามารถละลายได้ดีในไขมัน โดยอาการแรกที่พบมักเกิดจากการกระตุ้นตัวรับ muscarinic ในระบบประสาท parasympathetic ทำให้มีสิ่งคัดหลั่งเพิ่มมากขึ้น ม่านตาหรี่ หลอดลมหดเกร็ง ท้องร่วง และหัวใจเต้นช้า และตามมาด้วยการกระตุ้นตัวรับ nicotinic ที่ปมประสาท parasympathetic และ sympathetic และที่กล้ามเนื้อลาย ทำให้เกิดอาการหัวใจเต้นเร็ว ความดันโลหิตสูง กล้ามเนื้อกระตุก อ่อนล้า และเป็นอัมพาตได้ ส่วนผลต่อระบบประสาทส่วนกลางจะทำให้มีอาการกระวนกระวาย ความจำเสื่อม กดศูนย์หายใจ และศูนย์ควบคุมระบบการไหลเวียนโลหิต (Garcia และคณะ, 2005) แสดงดังภาพที่ 4



ภาพที่ 4 อาการแสดงของการได้รับคลอร์ไพริฟอส (Klein, และคณะ 2008)

นอกจากนี้ยังพบรายงานว่าการได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ประสาทในสมอง ยับยั้งขบวนการ axonogenesis และเพิ่มระดับของอนุมูลอิสระภายในสมอง จนเกิดภาวะบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำ อันเป็นสาเหตุให้เกิดภาวะสมองเสื่อม (Dementia) ได้ (Saulsbury และคณะ 2009)

2.2 Cholinesterase enzyme

Cholinesterase เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในร่างกาย โดยมีหน้าที่หลักในการไฮโดรไลซ์ acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ โดยในร่างกายจะพบเอนไซม์นี้อยู่ 2 ชนิด คือ

1. Erythrocyte (true) cholinesterase หรือ acetylcholinesterase โดยพบมากในเม็ดเลือดแดงและเนื้อเยื่อระบบประสาท มีหน้าที่หลักในการไฮโดรไลซ์ acetylcholine
2. Butyrylcholinesterase หรือ plasma pseudocholinesterase พบมากในพลาสมาและเนื้อเยื่อนอกระบบประสาท มีบทบาทในการไฮโดรไลซ์ succinylcholine แต่ยังไม่ทราบหน้าที่ที่ชัดเจนในร่างกาย

การได้รับคลอร์ไพริฟอสพบว่า สามารถออกฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ทั้ง acetylcholinesterase และ butyrylcholinesterase แต่เมื่อได้รับสารพิษ butyrylcholinesterase จะเป็นดัชนีที่มีความไวต่อการได้รับสารพิษ กล่าวคือ ระดับของเอนไซม์นี้จะลดลงเร็วกว่า acetylcholinesterase โดยที่ระดับของ acetylcholinesterase จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะทางคลินิกมากกว่า (NRA, 2000; Askar และคณะ, 2010)

2.3 ความจำ (Memory)

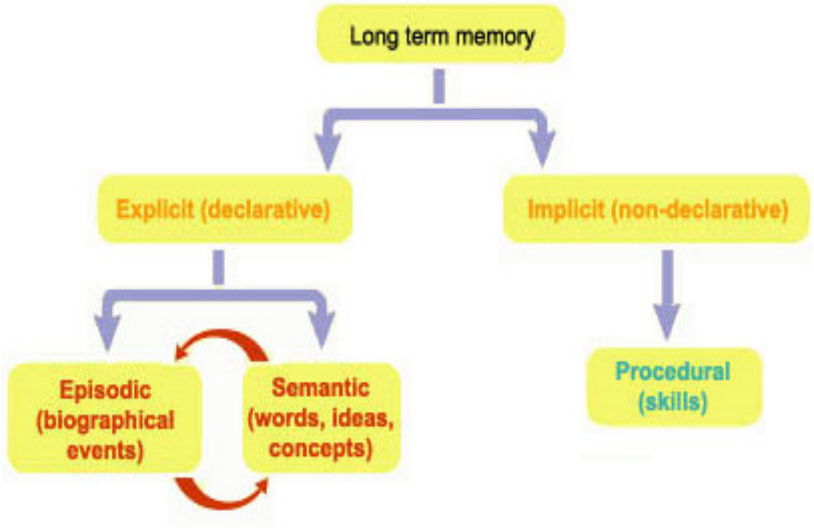
ความจำ เป็นความสามารถของสมองที่จะจดจำข้อมูลต่างๆ และสามารถเรียกกลับมาได้ โดยกระบวนการดังกล่าวจะต้องอาศัยข้อมูลผ่านเข้ามาที่สมอง จากตัวรับความรู้สึกต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น รับภาพจากจอตา รับเสียงจากหูชั้นใน หรือรับความรู้สึกต่าง ๆ จากร่างกาย เช่น แขน ขา เป็นต้น ดังนั้น การเก็บความจำได้มากหรือน้อยนั้น ขึ้นกับการทำงานร่วมกันของสมองหลายบริเวณ จึงจะทำให้สามารถเก็บความจำได้ดี โดยทั่วไปแล้วความจำสามารถแบ่งได้ 3 ประเภทใหญ่ ๆ ตามแหล่งการเก็บข้อมูล (Baddeley และคณะ, 2004) ดังนี้

2.3.1 **ความจำจากการรับรู้** (Sensory memory) เป็นความสามารถในการจำข้อมูลที่ส่งผ่านเข้ามาในสมองระยะเวลาสั้น ๆ เช่น การมองวัตถุแล้วเบนสายตาไปบริเวณอื่น ซึ่งภาพนั้นจะคงอยู่ประมาณ 250 มิลลิวินาที และจางหายไปภายในระยะเวลาไม่ถึง 1 วินาที โดยจะมีสัญญาณภาพใหม่เข้ามาแทนที่ หรือการได้ยินเสียงจากการพูดของคนรอบข้าง จะจำได้เพียง 2 วินาที เป็นต้น โดย sensory memory นี้จะเป็นระบบความจำขั้นแรกที่จะมีการเก็บข้อมูลไว้ในระยะสั้น ๆ ก่อนจะถ่ายทอดข้อมูลเข้าสู่ความจำระยะสั้นต่อไป แต่อย่างไรก็ตามร่างกายจะไม่

ส่งผ่านข้อมูลทุกอย่างเข้าสู่ความจำระยะสั้น จะคัดเลือกเฉพาะข้อมูลที่มีความสนใจและสำคัญเท่านั้น กระบวนการดังกล่าวเรียกว่า “selective attention”

2.3.2 **ความจำระยะสั้น (short-term memory)** หรืออาจเรียกว่า ความจำส่วนปฏิบัติงาน (Working memory) เป็นความจำที่รับมาจาก sensory memory โดยทำหน้าที่เป็นคลังข้อมูลชั่วคราวที่สามารถเก็บข้อมูลได้ในปริมาณที่จำกัด เช่น การจำหมายเลขโทรศัพท์ ถ้าไม่มีการจดบันทึกเก็บไว้ อาจทำให้เกิดการลืมได้ในระยะเวลาไม่นาน อีกทั้ง ความจำแบบ short-term memory ยังสามารถถูกรบกวนหรือถูกแทรกแซงได้ง่าย อาจทำให้เกิดการลืมได้อย่างรวดเร็ว ปกติข้อมูลที่อยู่ในระยะนี้จะจางหายไปภายในระยะเวลาประมาณ 18 วินาที แต่ถ้ามีการอ่านซ้ำ หรือทบทวนข้อมูลบ่อย ๆ (rehearsal process) ข้อมูลนั้นมีโอกาสที่จะถูกบันทึกในความจำระยะยาวได้ ความจำแบบ short-term memory มีความเกี่ยวข้องกับบริเวณสมองส่วนหลัง คือ visual association area และสมองส่วนหน้าบริเวณ prefrontal cortex ทั้ง 2 ข้าง

2.3.3 **ความจำระยะยาว (Long-term memory)** การเรียนรู้ และสติปัญญา จะเกิดขึ้นได้นั้นต้องมี long-term memory เพราะเป็นความจำที่ค่อนข้างถาวร และไม่จางหายไปแม้ว่าจะอยู่ในสถานการณ์ที่ไม่ได้นึกถึงสิ่งนั้นแล้วก็ตาม เราสามารถคงประสบการณ์ในอดีตไว้และสามารถเรียกข้อมูลเหล่านั้นกลับมาได้ ความจำระยะนี้สามารถเก็บข้อมูลได้ในปริมาณที่ไม่จำกัด เนื่องจากว่า long-term memory จะเก็บข้อมูลไว้บนพื้นฐานของความหมายและความสำคัญของข้อมูล ซึ่งต่างจาก short-term memory ที่เก็บข้อมูลในรูปแบบเสียงเป็นส่วนใหญ่ เช่น การที่สามารถจำชื่อ วันเดือนปีเกิด ของตนเองได้ หรือจำประสบการณ์ต่าง ๆ ในอดีตที่เกี่ยวกับตนเองได้อย่างแม่นยำ เป็นต้น โดย long-term memory ที่เกิดขึ้นเชื่อว่าเกิดจากการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์บริเวณ synapse ซึ่งพบ terminal fibrils ที่บริเวณ synapse ของเซลล์สมองเพิ่มมากขึ้น หรือมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางชีวเคมี ทำให้มีการสร้างโปรตีน, RNA และสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องกับความจำเพิ่มมากขึ้นได้ โดยทั่วไปสามารถแบ่ง Long-term memory ได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้ (แสดงดังภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 การแบ่งประเภทของความจำระยะยาว (Head's blog@NHGS, 2010)

2.3.3.1 Declarative memory (Explicit)

ความจำประเภทนี้ เป็นความจำที่เกิดขึ้นขณะมีสติ (conscious) เอาใจใส่ หรือมีความตั้งใจ เพื่อเรียกข้อมูลเหล่านั้นกลับมาอธิบายเป็นคำพูด หรือการเขียนบรรยาย และแปลผลได้ สามารถแบ่งได้ 2 ประเภทย่อย (Purves และคณะ, 2008) ได้แก่

Semantic memory

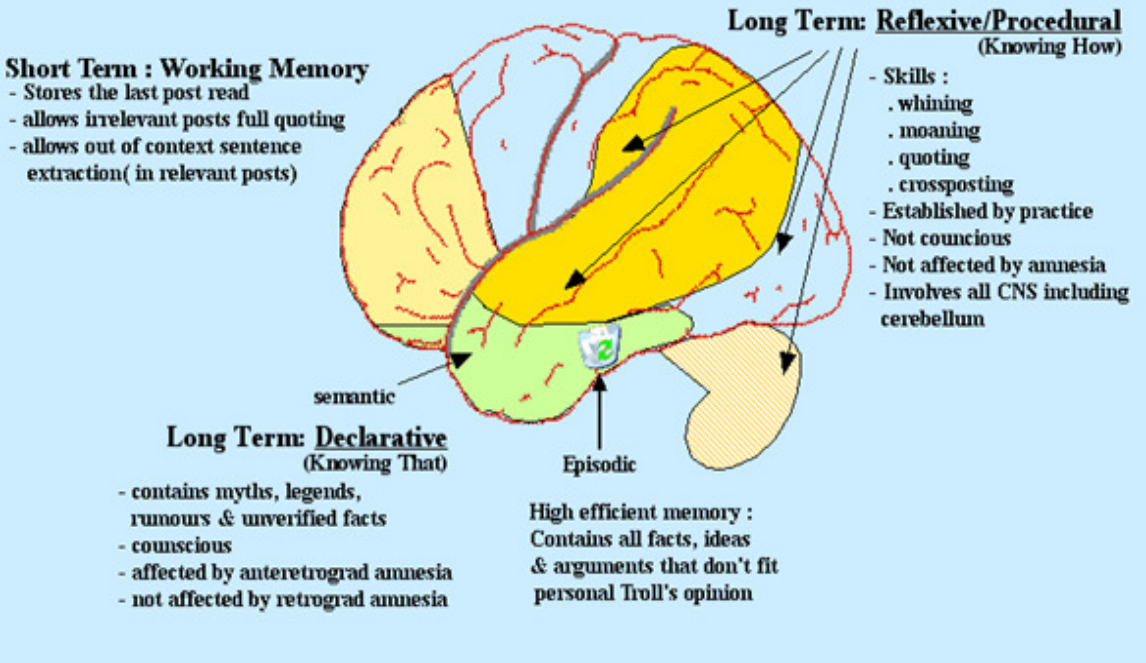
เป็นความจำเกี่ยวกับความรู้พื้นฐานทั่วไป หรือเป็นข้อเท็จจริงเกี่ยวกับสถานการณ์ปัจจุบัน หรือการจำความหมายของคำ สัญลักษณ์ ต่าง ๆ เหตุการณ์เหล่านี้จะถูกบันทึกเก็บไว้เป็น long-term memory เรียบร้อยแล้วและจะไม่มีการลืมเลย เช่น ชื่อเมืองหลวงของประเทศไทย, ทักษะการคำนวณง่าย ๆ หรือ ชื่อวันในสัปดาห์ เป็นต้น โดยความจำประเภทนี้อาศัยสมองส่วน medial temporal lobes แต่อย่างไรก็ตาม semantic memory จะเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ถ้ามีการหลงลืม (amnesia)

Episodic memory

เป็นความจำที่เกี่ยวกับการระลึกถึงเรื่องราวต่าง ๆ ที่เกี่ยวกับชีวิตของตนเอง, ประสบการณ์ย้อนหลังในช่วงวัยเด็ก (experience) โดยมักมีความสัมพันธ์กับสถานที่และเวลา เช่น งานฉลองวันรับปริญญาเมื่อปีที่แล้ว หรือ อุบัติเหตุที่เกิดขึ้นเมื่อ 2 ปีที่แล้ว เป็นต้น โดยความจำประเภทนี้อาศัยสมองส่วน medial temporal lobes รวมถึง hippocampus และ parahippocampus

2.3.3.2 Non-declarative memory (Implicit)

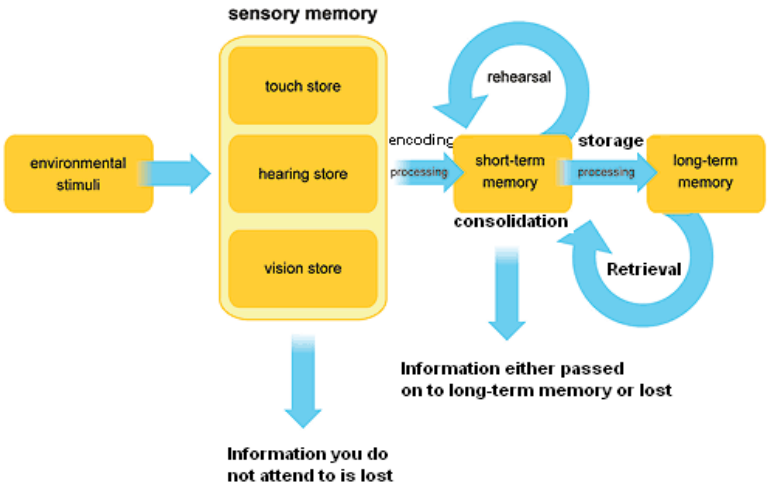
เป็นความจำที่มีความสัมพันธ์กันระหว่างสิ่งเร้า (stimuli) กับการตอบสนอง (response) ที่เกิดจากการเรียนรู้ สามารถเกิดขึ้นได้อย่างอัตโนมัติ โดยที่ร่างกายไม่จำเป็นต้องคิด (unconscious) ความจำชนิดนี้มักเกิดจากการฝึกฝน หรือทำซ้ำบ่อยๆ และเกิดขึ้นอย่างช้า ๆ มักจะเกี่ยวข้องกับทักษะการดำเนินชีวิต หรือการทำงานของร่างกาย เพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้ารอบตัวด้วยวิธีที่เหมาะสม เช่น การเล่นเทนนิส, การเล่นดนตรี หรือ การเหยียบเบรคเมื่อเห็นไฟแดง เป็นต้น บางครั้งจึงเรียกความจำประเภทนี้ว่า procedural หรือ muscle memory ความจำประเภทนี้อาศัยสมองส่วน striatum, cerebellum และ basal ganglia (Krupa, 2009)



ภาพ 6 ความสัมพันธ์ระหว่างส่วนของสมองและความจำประเภทต่าง ๆ (TL's Journey of Life)

2.4 กระบวนการของความจำ (process of memory)

กระบวนการของความจำ เริ่มตั้งแต่การรับข้อมูล จนกระทั่งถึงการจัดเก็บข้อมูล จะประกอบด้วย 4 ขั้นตอน คือ encoding, consolidation, storage และ retrieval โดยในการจัดเก็บข้อมูลใด ๆ จะต้องผ่านความจำทั้ง 3 ประเภท คือ sensory memory, short-term memory และ long-term memory (Kandel และคณะ, 2000) แสดงดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 กระบวนการของความจำ (Head's blog@NHGS, 2010)

2.4.1 **การลงรหัสข้อมูล** (Encoding)

เป็นการเรียนรู้ข้อมูลใหม่ที่รับจาก sensory stimuli แล้วทำการคัดเลือกข้อมูลที่สนใจ เพื่อบันทึกและเก็บไว้ในความทรงจำ โดยใช้ข้อมูลเก่ามาร่วมในการวิเคราะห์หรือจัดเก็บข้อมูลนั้น กระบวนการนี้เรียกว่า "encoding strategies"

2.4.2 **การจัดการข้อมูล** (Consolidation)

เป็นกระบวนการที่ทำหน้าที่ในการจัดการและเปลี่ยนแปลงข้อมูลหลังจากที่ encoded แล้ว เพื่อให้ข้อมูลมีความเป็นระเบียบและสามารถเก็บได้ยาวนานขึ้น แต่ยังคงเค้าความเดิม โดยเชื่อว่าสมองส่วน hippocampus และบริเวณโดยรอบมีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้

2.4.3 **การเก็บรักษาข้อมูล** (Storage)

ทำหน้าที่เป็นแหล่งเก็บข้อมูลได้ในปริมาณไม่จำกัด เพื่อให้ข้อมูลนั้นสามารถเก็บไว้ได้นาน และพร้อมที่จะเรียกกลับมาใช้ได้อีกครั้ง โดยข้อมูลจะเก็บได้ดีเพียงใด ขึ้นกับระยะเวลาของการ rehearsal ยิ่งนานข้อมูลยิ่งเก็บได้ดี สมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการนี้ คือ temporal lobes บริเวณ diencephalon

2.4.4 **การเรียกข้อมูลกลับ** (Retrieval)

เป็นกระบวนการเรียกข้อมูลกลับคืน เพื่อนำข้อมูลเหล่านั้นมาใช้ให้เกิดประโยชน์ โดยกระบวนการเรียกข้อมูลกลับคืนจะมีประสิทธิภาพอย่างมาก เมื่อสภาพแวดล้อมกับข้อมูลเนื้อหาที่เรียกกลับนั้นมีความใกล้เคียงกัน

2.5 ภาวะความจำเสื่อม (amnesia)

ภาวะความจำเสื่อม เป็นภาวะผิดปกติทางด้านความจำ โดยที่การทำงานของสมองส่วนอื่นยังเป็นปกติ เช่น ไม่มีความผิดปกติทางด้านการใช้ภาษา (aphasia) ไม่สูญเสียทักษะในการทำกิจวัตรประจำวัน (apraxia) และ ไม่มีความผิดปกติในการบริหารจัดการ (executive dysfunction) สาเหตุส่วนใหญ่มาจากการเกิดอุบัติเหตุทางรถยนต์ ที่ทำให้เกิดการกระทบกระเทือนอย่างรุนแรงบริเวณศีรษะ, เกิดการติดเชื้อไวรัส herpes ในสมอง, ภาวะ chronic alcoholism หรือมีความผิดปกติทางด้านอารมณ์ เป็นต้น โดยเชื่อว่าเกิดจากความผิดปกติของสมองส่วน medial temporal lobes บริเวณ hippocampus ปัจจุบันได้มีการแบ่งภาวะความจำเสื่อมออกเป็น 2 ประเภทใหญ่ ๆ คือ

2.5.1 Retrograde amnesia

เป็นภาวะความจำเสื่อมที่เกิดจากการได้รับการกระทบกระเทือนหรือการได้รับบาดเจ็บบริเวณสมอง ทำให้เกิดการสูญเสียความทรงจำ โดยช่วงระยะเวลาของเหตุการณ์ที่สูญเสียไปนั้น อาจเป็นเหตุการณ์ก่อนเกิดเหตุไม่กี่นาทีไปจนถึงก่อนเกิดเหตุหลาย ๆ ปี ความจำเสื่อมประเภทนี้จะมีความบกพร่องของกระบวนการ retrieval กล่าวคือ ไม่สามารถดึงข้อมูลส่วนที่เก็บไว้ใน long-term memory มาใช้ได้ โดยที่กระบวนการเรียนรู้สิ่งใหม่ ๆ ยังดีอยู่ เช่น ผู้ที่เกิดอุบัติเหตุจากการขับขี่จักรยานยนต์ ศีรษะได้รับการกระทบกระเทือนอย่างรุนแรง เขาจะไม่สามารถจำเหตุการณ์ขณะเกิดเหตุได้เลย ไม่ว่าจะใช้ความพยายามเพียงใด โดยเชื่อว่าการทำลายสมองส่วน hippocampus จะมีผลต่อการเกิด retrograde amnesia (Sutherland และคณะ, 2001)

2.5.2 Anterograde amnesia

เป็นภาวะความจำเสื่อมที่มีลักษณะตรงข้ามกับ retrograde amnesia กล่าวคือ ความจำในช่วงก่อนเกิดเหตุจะยังคงปกติดีอยู่ แต่จะมีความบกพร่องของกระบวนการ consolidation ของข้อมูลใหม่ ๆ ที่ได้รับ เนื่องจากไม่สามารถเปลี่ยน short-term memory ให้กลายเป็น long-term memory ได้ ยกตัวอย่างเช่น ผู้ป่วยไม่สามารถจำชื่อแพทย์ประจำตัวได้เลย แม้ว่าจะรักษากับแพทย์คนเดิมมาเป็นระยะเวลาหลายปี เปรียบเสมือนว่าได้รักษากับแพทย์คนใหม่ตลอดเวลา ความจำเสื่อมลักษณะนี้ มักจะมีปัญหาในการสร้าง semantic และ episodic memory ใหม่ ในขณะที่การเรียนรู้ทักษะใหม่ ๆ (procedural memory) ไม่เสียไป (Race และ Verfaellie, 2011)

2.6 บัวบก (*Centella asiatica*)

2.6.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

บัวบกมีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Centella asiatica* (Linn.) Urban อยู่ในวงศ์ Umbelliferae มีชื่อเรียกในภาษาอังกฤษว่า Asiatic Pennywort, Indian Pennywort, Tiger Herbal, Hydrocotyle นอกจากนี้ยังมีชื่อท้องถิ่น เนื่องจากว่าแต่ละพื้นที่มีชื่อเรียกบัวบกที่ไม่เหมือนกัน เช่น ผักแว่น (ภาคใต้), ผักหนอก (ภาคเหนือ), เอขาเด๊าะ (กระเหรี่ยงแม่ฮ่องสอน), กะบังนอก (ลำปาง), แว่นโคก (ฉะเชิงเทรา) และ แจ๊ะเซาะเช่า (ประเทศจีน) (สมพร ภูติยานันต์, 2546) จัดเป็นไม้ล้มลุกจำพวกผัก ลักษณะใบเป็นใบเดี่ยวแตกเป็นกระจุกติดกับราก ใบมีลักษณะเป็นรูปกลมหรือรูปไต เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-4 ซม. ดอกออกเป็นช่อคล้ายร่ม ก้านดอกแตกออกจากโคนใบ แต่ละช่อมีดอกย่อย 3-6 ดอก กลีบดอกรูปไข่สีม่วงเข้ม ผลขนาดเล็กสีขาวหรือเขียวเป็น 2 พู (มัฑนา กานต์ไกรศรี, 2548) แสดงดังภาพที่ 8

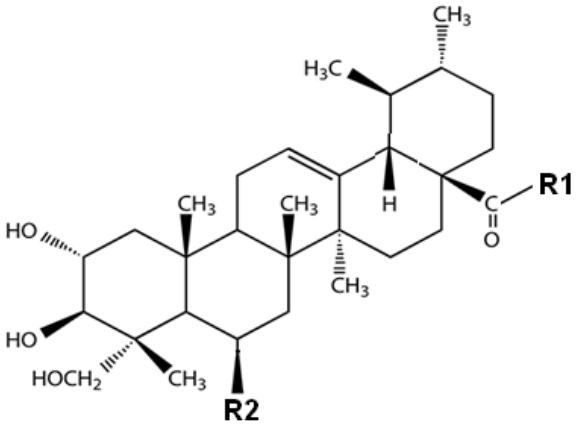
ภาพที่ 8 บัวบก (*Centella asiatica*) (Trance plants natural products and incenses, 2009)

สารสกัดจากใบบัวบกมีสรรพคุณกระตุ้นการสังเคราะห์ collagen สมานแผล รักษาแผลในกระเพาะอาหาร และต่อต้านอนุมูลอิสระ (ไชยยง รุจจนเวท และ ดวงตา กาญจนโพธิ์, 2552) นอกจากนี้ ยังพบสรรพคุณของใบบัวบกอีกมากมาย ตามตำราสมุนไพรพื้นบ้าน เช่น แก้ปากเปื่อย ร้อนใน กระหายน้ำ ลดไข้ แก้ท้องเสีย บำรุงความจำ บำรุงสุขภาพ บำรุงหัวใจ แก้อ่อนเพลีย เมื่อยล้า ขับเลือดเสีย ลดการเกิดหนองและอักเสบ ฆ่าเชื้อราอันเป็นสาเหตุของโรคกลากได้ (สุภัค ภิรมย์, 2550)

สำหรับวิธีขยายพันธุ์นั้น เนื่องจากบัวบกเป็นพืชเขตร้อน พบขึ้นทั่วไปตามที่ลุ่ม แฉะ ตามคันนา และริมหนองน้ำ (เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ, 2542) ขยายพันธุ์โดยใช้เมล็ด และใช้ลำต้นหรือที่เรียกว่า “ไหล” ปักชำ ตัดแยกไหลที่มีต้นอ่อนและรากออก นำไปปลูกในพื้นที่แฉะ แต่ได้รับแสงมากพอสมควร เป็นพืชที่ขึ้นง่าย ปลูกได้ตลอดปี (สมพร ภูติยานันต์, 2546)

2.6.2 **องค์ประกอบทางเคมี** (Chemical components)

บัวบกประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดที่สำคัญ คือ มีสาร terpene acids ได้แก่ asiatic acid, madecassic acid และ glycosides เช่น asiaticoside, madecassoside และสารประกอบ phenolic แสดงดังภาพที่ 9 นอกจากนี้ยังประกอบไปด้วยน้ำ 90%, คาร์โบไฮเดรต 7%, และสารอินทรีย์อื่น ๆ อีก 2%



R1=OH, R2=H : Asiatic acid
R1=OH, R2=OH : Madecassic acid
R1=O-Glu-Glu-Rha, R2=H : Asiaticoside
R1=O-Glu-Glu-Rha, R2=OH : Madecassoside

ภาพที่ 9 โครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญ asiaticoside, asiatic acid, madicassoside และ madecassic acid (Amazing nature, 1995)

2.6.3 **ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา**

2.6.3.1 **ฤทธิ์รักษาแผลในกระเพาะอาหาร**

Cheng และ Koo (2000) เมื่อให้สารสกัดบัวบกขนาด 0.05, 0.1 และ 0.25 ก./กก. ทางปากแก่หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดแผลในกระเพาะอาหารด้วยกรดอะซีติก พบว่าแผลมีขนาดเล็กลง และช่วยเพิ่มจำนวนของหลอดเลือดในเนื้อเยื่อของหนูแรท นอกจากนี้ยังพบว่าบัวบกยังช่วยลดการทำงานของเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) อีกด้วย

2.6.3.2 ฤทธิ์ลดการอักเสบ

Yun และคณะ (2008) พบว่า ผลของ asiatic acid และ asiaticoside ที่แยกได้จากใบบัวบกในขนาด 30, 60 และ 120 ไมโครโมลาร์ต่อเซลล์ RAW 264.7 macrophages ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) จะมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ โดยจะยับยั้งทำให้ปริมาณของ inducible nitric oxide synthase (iNOS), COX-2, TNF-α, IL-1β และ IL-6 ลดลงได้ ทำให้การผลิต nitric oxide (NO) และ PG E_2 ลดลง

2.6.3.3 ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Gnanapragasam และคณะ (2004) พบว่า เมื่อให้สารสกัดบัวบกขนาด 200 มก./กก. ทางปากแก่หนูแรท จะมีฤทธิ์ช่วยต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถช่วยป้องกันการถูกทำลายของเนื้อเยื่อหัวใจ โดยมีผลไปลดระดับของ Creatine phosphokinase (CPK), Myocardial lipid peroxidases (LPO) และ superoxide dismutase (SOD)

2.6.3.4 ฤทธิ์สมานแผล

Shukla และคณะ (1999) พบว่าเมื่อให้สาร asiaticoside ที่สกัดจากใบบัวบก ขนาด 0.5, 1.0 และ 10 มก./กก. ทางปาก และ 0.2% asiaticoside ทาบนผิวหนังในหนูแรท และให้ 0.4% asiaticoside ทาบนผิวหนังในหนูแรทที่เป็นเบาหวาน พบว่า ช่วยทำให้แผลมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ยังพบว่ายังมีฤทธิ์ช่วยเพิ่มคอลลาเจนและความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ ทั้งหนูปกติและหนูที่เป็นเบาหวาน

2.6.3.5 ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (Antibacterial activity)

Oyedeji และ Afolayan (2005) ศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของน้ำมันหอมระเหยจากบัวบก ผลการศึกษาพบว่า น้ำมันหอมระเหยจากบัวบกนี้มีฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งแกรมบวก (*Bacillus subtilis, Staphylococcus aureus.*) และแกรมลบ (*Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Shigella sonnei.*)

2.6.3.6 ฤทธิ์ต้านการแบ่งตัวของเซลล์ (Antiproliferant effects)

Sampson และคณะ (2001) ศึกษาผลของสารสกัดบัวบกต่อโรคสะเก็ดเงิน ซึ่งเป็นโรคที่เกิดจากการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังผิดปกติ พบว่าสารสกัดบัวบกสามารถลดการแบ่งตัวของเซลล์ผิวหนังชั้น keratin ได้ในหลอดทดลอง

2.6.3.7 ฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท และผลต่อการเรียนรู้และความจำ

Gupta และคณะ (2003) พบว่า สารสกัดบัวบกช่วยให้กระบวนการเรียนรู้และความจำดีขึ้นในหนูแรทที่ได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 200 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ทางปาก เป็นเวลา 14 วัน และพบว่าช่วยลดระดับของ malondialdehyde (MDA) ในสมองของหนูแรทอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่า หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการชักและมีการเรียนรู้บกพร่องด้วยการฉีด pentylenetetrazole (PTZ) จะมีอาการชักลดลงและมีการเรียนรู้ที่ดีขึ้น เมื่อหนูแรทได้รับสารสกัดบัวบกขนาด 300 มก./กก. ทางปาก

Rao และคณะ (2007) พบว่า หนูแรทที่ได้รับสารสกัดบัวบกด้วยน้ำขนาด 200 มก./กก. เป็นระยะเวลา 15 วัน ช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำ นอกจากนี้ยังช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองหนูบริเวณ hippocampus

Wattanathorn และคณะ (2008) ศึกษาผลของสารสกัดบัวบกในอาสาสมัครสุขภาพดีที่มีอายุมากกว่า 60 ปีขึ้นไป จำนวน 24 คน โดยได้รับสารสกัดบัวบก ขนาด 250, 500 และ 750 มก./วัน เป็นระยะเวลา 2 เดือน จะมีความกระตือรือร้นในการทำกิจกรรมมากขึ้น รวมทั้งมีการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น

สำหรับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ได้มีการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือดโดยการผูกหลอดเลือดแดงแคโรทิดทั้งสองข้างแบบชั่วคราว (T2VO) พบว่าช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำ อีกทั้งยังช่วยลดระดับ malondialdehyde ในสมองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (มยุรี ตันติสิระ และคณะ, 2551ข)

2.7 สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

เนื่องจากปัญหาทางด้านความแปรปรวนของสารออกฤทธิ์ในสมุนไพร ทำให้การรักษาที่ได้เกิดความไม่แน่นอน เพื่อขจัดปัญหานี้ คณะผู้วิจัย คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้มีแนวคิดในการเตรียมสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่มีคุณลักษณะอันพึงประสงค์ คือ เป็นสารสกัดปราศจากสีที่ประกอบด้วย madecassoside ต่อ asiaticoside ซึ่งเป็นสารสำคัญในสัดส่วน 1.5±0.5:1 และมีปริมาณ triterpenoids ไม่ต่ำกว่า 80% มีความคงตัวในการเก็บอย่างน้อย 2 ปี (เอกรินทร์ สายฟ้า และคณะ, 2549) แสดงดังภาพที่ 10

ภาพที่ 10 สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

2.7.1 การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233

Tanintaraard และคณะ (2009) ได้ทำการศึกษาโดยการทาสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ความแรง 0.05% แก่หนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นแผลกรีดที่บริเวณหลังของหนู พบว่า ลักษณะแผลกรีดของหนูแรทจะมีความแข็งแรงมากขึ้น อีกทั้ง เมื่อประเมินความหนาของชั้นหนังกำพร้า พบว่า ชั้นของหนังกำพร้ามีความหนามากกว่ากลุ่มควบคุมได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์เร่งการสมานของแผลได้

Wannarat และคณะ (2009) พบว่า เมื่อทาสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ความแรง 0.05% บริเวณหลังของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นแผลไหม้ด้วยความร้อน จะช่วยเร่งการสมานแผลไหม้ได้เร็วขึ้น

Kam-eg และคณะ (2009) พบว่า การให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาด 10 มก./กก. ทางปากวันละสองครั้งเป็นเวลา 7 วัน สามารถป้องกันการหลงลืมในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการเรียนรู้ช้าและหลงลืมจากการฉีด β-amyloid เข้าทาง intracerebroventricular ได้

Ruengprasertkit และคณะ (2010) พบว่า อาสาสมัครสุขภาพดี ที่มีอายุ 18-65 ปีและมีแผลร้อนในชนิดที่ไม่รุนแรง เมื่อได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่มีความแรง 0.05%, 0.10% และ 0.20% จะมีการสมานและการหายของแผลได้ภายใน 10 วัน หลังการทาสารสกัดดังกล่าว รวมทั้งยังมีฤทธิ์ในการลดอาการปวด และขนาดของแผลร้อนในได้อย่างมีประสิทธิภาพ

2.7.2 การศึกษาทางพิษวิทยา

ผลการวิจัยความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน เมื่อป้อนสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ทางปากเพียงครั้งเดียวแก่หนูเมาส์ ในขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม พบว่า ไม่ทำให้หนูเมาส์ตาย และเมื่อทดสอบความเป็นพิษกึ่งเรื้อรัง โดยให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาด 100 - 1,000 มก./กก. แก่หนูแรทติดต่อกันทุกวัน เป็นเวลา 3 เดือน ก็ไม่พบความผิดปกติของ blood chemistry หรือความเป็นพิษอื่น ๆ ที่ทำให้สัตว์ทดลองตายได้เช่นกัน แสดงให้เห็นว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีความเป็นพิษต่ำมาก (มยุรี ตันติสิระ และ คณะ, 2551ก)

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

หนูเมาส์ สายพันธุ์ ICR เพศผู้ อายุ 4 สัปดาห์ จำนวน 278 ตัว จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม นำมาเลี้ยงที่คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อทำการปรับสภาพ ก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ ภายในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองมีการควบคุมอุณหภูมิที่ 25±1 องศาเซลเซียส ควบคุมแสงสว่างและมืด 12:12 ชั่วโมงต่อวัน มีระบบระบายอากาศที่เหมาะสมและเลี้ยงในกรงพลาสติกที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยที่สะอาด โดยได้รับอาหารสำเร็จรูปและน้ำสะอาดตามปกติ และหัวข้อวิจัยได้ผ่านการอนุมัติของคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 11-33-013

3.2 สารเคมี

- Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233
- Olive oil (Sabroso®, Spain)
- Triton X-100 (Sigma, USA)
- Acetic acid (BHD, England)
- Butanal (Ajax Finechem, Australia)
- Pyridine (Ajax Finechem, Australia)
- Pentobarbital (Nacalai tesque, Japan)
- Normal saline solution (GHP, Thailand)
- Sodium hydroxide pellets (BDH, England)
- Thiobarbituric acid (TBAR) (Sigma, USA)
- Chlorpyrifos Pestanal (CPF) (Sigma, USA)
- Acetylthiocholine iodide (ATCI) (Sigma, USA)
- Sodium dodecyl sulfate (SDS) (Sigma, USA)
- Carboxymethylcellulose (CMC) (Sigma, USA)
- 1, 1, 3, 3-Tetraethoxy-propane (Malondialdehyde) (MDA) (Sigma, USA)

- Butyrylthiocholine iodide crystalline (BTCI) (Sigma, USA)
- 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) (Sigma, USA)
- Sodium dihydrogen orthophosphate ($NaH_2PO_4.2H_2O$) (Ajax Finechem, Australia)
- Di-sodium hydrogen orthophosphate dihydrate ($Na_2HPO_4.2H_2O$) (Asia Pacific, Australia)
- Diethyl ether (Fisher sciencetific, England)
- L-Ascorbic acid (Sigma, USA)
- α-Tocopherol (Sigma, USA)
- Cresyl violet (Sigma, USA)

3.3 วัสดุและอุปกรณ์

- Tips
- Tubes
- Stop watches (Seiko)
- Beaker
- Glass cylinder
- Automatic pipettes
- Feeding tubes
- Needles
- Forceps
- Scissors
- Syringes
- Digital camera
- Multichannel pipette
- Microplate 96 wells plate
- Stainless steel spoon
- Eppendorf plastic tubes
- Volumetric flask

3.4 เครื่องมือ

- Automatic mixer (Vortex, USA)
- Homogenizer (Glas-Col, Terre Haute, USA)
- Centrifugater (Sorvll, GLC-2B, USA)
- Spectrophotometer (Shimadzu, UV1201, Japan)
- Microplate reader
- Locomotor activity set (UGO Basile, Comerico, Italy)
- pH meter (Beckman, UK)
- Water bath
- Cryostat (Leica, Germany)
- Refrigerators
- Morris water maze set

3.5 วิธีการวิจัย

3.5.1 การเตรียมสารทดสอบ

สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีลักษณะเป็นผงละเอียดปราศจากสี ประกอบด้วย madecassoside ต่อ asiaticoside ซึ่งเป็นสารสำคัญในสัดส่วน 1.5±0.5:1 และมีปริมาณ triterpenoids ไม่ต่ำกว่า 80% เตรียมเป็นสารละลายให้ทางปาก โดยใช้สารละลาย 0.5% carboxymethycellulose (CMC) เป็นน้ำกระสายยา ซึ่งหนูเมาส์จะได้รับสารสกัดในปริมาตร 5 มล./กก. ส่วนคลอร์ไพริฟอสเตรียมเป็นสารละลายให้ทางปาก โดยใช้น้ำมันมะกอกเป็นตัวทำละลาย และให้ในปริมาตร 2 มล./กก. สำหรับวิตามินซี และ อี ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ antioxidant ใช้เป็น positive control จะเตรียมเป็นสารละลายให้ทางปาก โดยใช้สารละลาย 0.5% CMC เป็นน้ำกระสายยาและให้ในปริมาตร 5 มล./กก.

3.5.2 การหา Median lethal dose (LD_{50}) ของคลอร์ไพริฟอส

การหาค่า LD_{50} ใช้หนูเมาส์จำนวน 50 ตัว แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ๆ ละ 10 ตัว กำหนดขนาดที่ทำให้หนูเมาส์ตาย จำนวน 5 ขนาด โดยให้ทางปากแก่หนูเมาส์เพียงครั้งเดียว ติดตามอาการพิษและจำนวนหนูที่ตายในระยะเวลา 14 วัน คำนวณค่า LD_{50} โดยวิธีของ Miller และ Tainter (1944) จากจำนวนการตายของหนูเมาส์ในแต่ละกลุ่ม

3.5.3 การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองจะถูกแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆ ละ 38 ตัว แต่ละกลุ่มจะได้รับสารทดสอบโดยการป้อนวันละ 2 ครั้ง เช้า (8.00 น.) และ เย็น (16.00 น.) เป็นระยะเวลา 20 วัน ดังนี้

กลุ่มที่ 1 : หนูเมาส์ที่ได้รับน้ำ 2 มล./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง และ 0.5% CMC 5 มล./กก. ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น

กลุ่มที่ 2 : หนูเมาส์ที่ได้รับน้ำมันมะกอก 2 มล./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง และ 0.5% CMC 5 มล./กก. ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น

กลุ่มที่ 3 : หนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาด 30 มก./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง และ 0.5% CMC 5 มล./กก. ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น

กลุ่มที่ 4 : หนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาด 30 มก./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง และสารสกัดมาตรฐานบัวบัก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น

กลุ่มที่ 5 : หนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาด 30 มก./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง และสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. ทางปาก วันละ 2 ครั้ง เช้า เย็น

กลุ่มที่ 6 : หนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาด 30 มก./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง, วิตามินอี ขนาด 75 มก./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง ตอนเช้า และวิตามินซี ขนาด 100 มก./กก. ทางปาก วันละ 1 ครั้ง ตอนเย็น (Ambali และคณะ 2010)

3.5.4 การออกแบบการทดลอง (experimental design)

3.5.4.1 การทดสอบ Locomotor activity และ Morris Water Maze

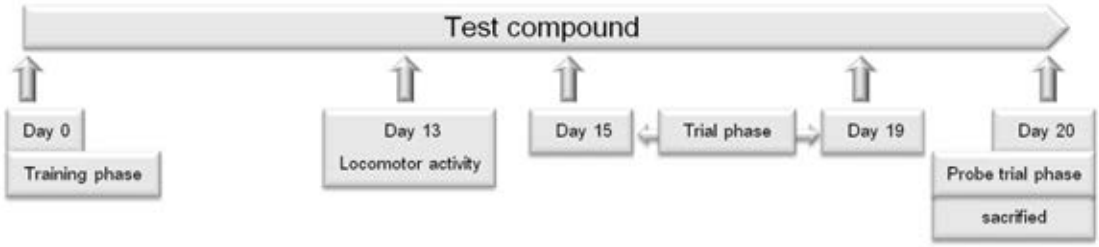
หนูเมาส์แต่ละกลุ่มจะได้รับสารทดสอบตามที่ได้กำหนดไว้ เป็นระยะเวลา 20 วัน โดยก่อนประเมินพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ นำหนูเมาส์มาทดสอบ locomotor activity เพื่อศึกษาผลของสารทดสอบต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ โดยจะดำเนินการในวันที่ 13 ภายหลังการได้รับสารทดสอบ จากนั้นจึงนำมาทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ โดยวิธี Morris water maze ในวันที่ 15 ถึง 20 ภายหลังการได้รับสารทดสอบ เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบด้านพฤติกรรม หนูเมาส์จะถูกฉีดด้วย pentobarbital sodium ขนาด 60 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (i.p.) เพื่อเก็บเลือดจากหัวใจด้วยวิธี cardiac puncture และนำไปตรวจวิเคราะห์ทางด้านชีวเคมี (Biochemical analysis) โดยการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase จากนั้นทำการ sacrificed และเก็บเนื้อเยื่อสมอง 3 ส่วน คือ hippocampus, prefrontal cortex และ cerebral cortex โดยบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex

นำไปตรวจหาระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ส่วน cerebral cortex นำไปทดสอบ lipid peroxidation แสดงดังภาพที่ 11

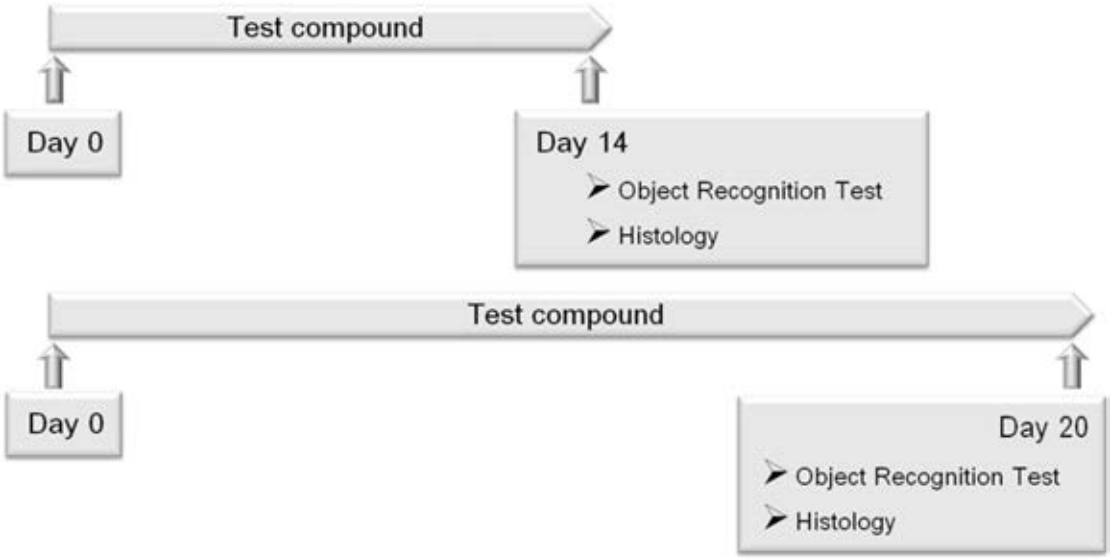
3.5.4.2 **การทดสอบ** Object recognition test **และจุลกายวิภาคศาสตร์**

การทดสอบนี้แบ่งออกเป็น 2 ขั้นตอน คือ ภายหลังการได้รับสารทดสอบวันที่ 14 และ 20 เมื่อหนูเมาส์ได้รับสารทดสอบตามระยะเวลาที่ได้กำหนดไว้ นำหนูเมาส์มาทดสอบ Object recognition test เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบทางด้านพฤติกรรม ทำการ decapitate และเก็บสมอง เพื่อดูการตายของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus แสดงดังภาพที่ 11

การทดสอบ Morris Water Maze **และ** Locomotor activity



การทดสอบ Object recognition test **และจุลกายวิภาคศาสตร์**

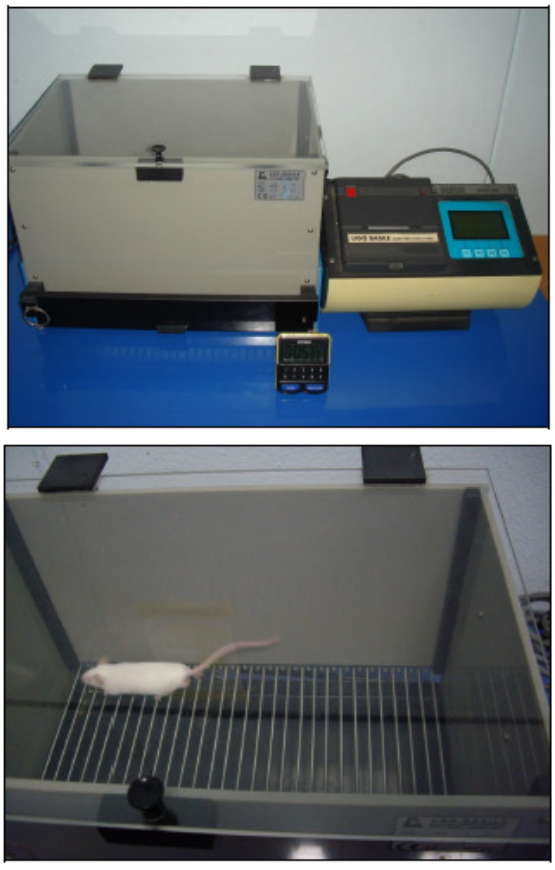


ภาพที่ 11 แผนผังการทดสอบ

3.5.5 **การทดสอบทางพฤติกรรม** (Behavioral test)

3.5.5.1 **การทดสอบ** Locomotor activity

Locomotor activity test เป็นการศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ เพื่อประเมินผลของสารทดสอบต่อระบบประสาทส่วนกลางที่ควบคุมการเคลื่อนไหว ก่อนที่จะนำสัตว์ทดลองไปทดสอบพฤติกรรมอื่นต่อไป โดยใช้อุปกรณ์ที่เรียกว่า locomotor activity cage (UGO Basile 7430, Comerico, Italy) ซึ่งมีลักษณะเป็นกล่องขนาดยาว 35 ซม. กว้าง 23 ซม. และสูง 20 ซม. พื้นกล่องมีแท่งสแตนเลสขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มม. วางในแนวนอน โดยแต่ละแท่งห่างกัน 11 มม. แสดงดังภาพที่ 12 ทำการทดสอบภายในห้องที่ควบคุมแสง และไม่มีเสียงรบกวน โดยให้สารทดสอบ 15 นาที ก่อนที่จะนำไปใส่ไว้ใน locomotor activity cage สังเกตการเปลี่ยนแปลง และนับจำนวนครั้งของการเดินของหนูเมาส์เป็นเวลา 30 นาที โดยใช้จำนวนครั้งของการเดินกลุ่มควบคุมเป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้สารทดสอบ (Gupta และคณะ, 2003) แสดงดังภาพที่ 12



ภาพที่ 12 อุปกรณ์ Locomotor activity cage

3.5.5.2 **การทดสอบความจำและการเรียนรู้ด้วยวิธี** Object Recognition

Object recognition test เป็นการทดสอบความจำเกี่ยวกับการปฏิบัติงาน (working memory) ของหนูเมาส์ ในการศึกษานี้จะทดสอบความจำภายหลังการได้รับสารทดสอบครบ 14 และ 20 วัน โดยแบ่งการทดสอบออกเป็น 4 ระยะ แสดงดังภาพที่ 13 (Dere และคณะ, 2007; Jorge, 2006) ดังนี้

1. Habituation phase ก่อนทำ Object recognition test 1 วัน (Day 13 หรือ Day 19) นำหนูเมาส์มาปรับสภาพให้เกิดความเคยชินกับอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบ เพื่อลดความเครียด โดยให้สำรวจวัตถุภายในกล่องสี่เหลี่ยมสีดำขนาด 60x40x50 ซม. ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที โดยปราศจากวัตถุ

2. Sample phase ภายหลังการได้รับสารทดสอบครบ 14 หรือ 20 วัน นำหนูเมาส์มาทดสอบ Object Recognition Test โดยให้หนูเมาส์สำรวจวัตถุสองสิ่งที่เหมือนกัน (A/A) เป็นเวลา 5 นาที บันทึกเวลาที่หนูเมาส์ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น เมื่อเสร็จสิ้นการทดสอบ ให้ทำความสะอาดอุปกรณ์ด้วยแอลกอฮอล์

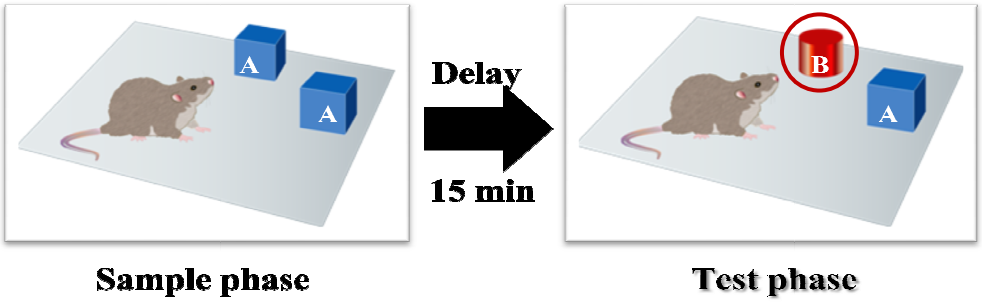
3. Delay phase พักหนูเป็นระยะเวลา 15 นาที

4. Test phase ระยะนี้นำหนูเมาส์มาสำรวจวัตถุสองสิ่งที่แตกต่างกัน (A/B) เป็นระยะเวลา 5 นาที สังเกตพฤติกรรมของหนูและบันทึกเวลาที่หนูเมาส์ใช้ในการสำรวจวัตถุแต่ละชิ้น เพื่อนำมาคำนวณหาค่า Discrimination index (DI)

$$\text{Discrimination index (DI)} = \frac{\text{Time}_B - \text{Time}_A}{(\text{Time}_B + \text{Time}_A)}$$

หมายเหตุ

1. การสำรวจวัตถุ หมายถึง การที่หนูเมาส์ใช้จมูกดมวัตถุในระยะห่างจากวัตถุไม่เกิน 2 ซม.
2. วัตถุที่นำมาใช้ควรมีลักษณะสมมาตร และขนาดใกล้เคียงกัน ไม่มีกลิ่น
3. ลักษณะของวัตถุต้องไม่มัน เงา หรือวัตถุที่หนูเมาส์สามารถกัดแทะได้
4. การเดินวนรอบ หรือนั่งบนวัตถุ ไม่นับเป็นเวลาที่ใช้ในการสำรวจวัตถุ
5. ในช่วง Sample phase สัตว์ทดลองต้องใช้ระยะเวลาในการสำรวจแต่ละวัตถุไม่น้อยกว่า 3 วินาที และช่วง Test phase ไม่น้อยกว่า 1 วินาที จึงจะนำเวลานั้นไปคำนวณค่า Discrimination index (Rosa และคณะ, 2005)



ภาพที่ 13 วิธีการทดสอบ Object Recognition

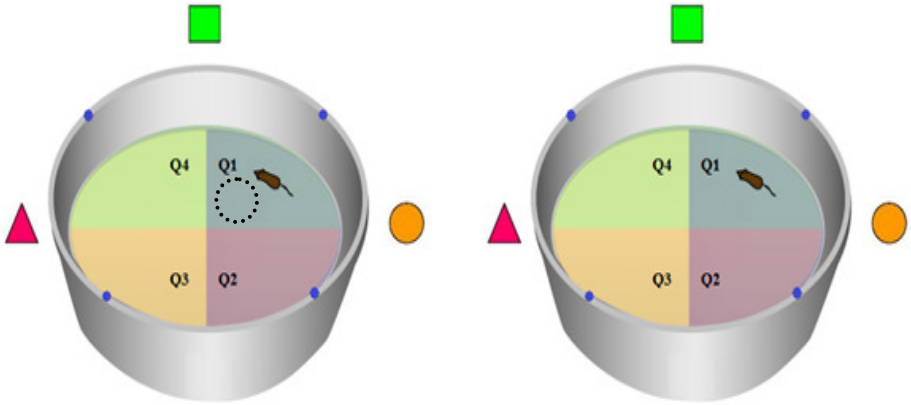
3.5.5.3 **การทดสอบความจำและการเรียนรู้ด้วยวิธี** Morris Water Maze

Morris Water Maze เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบความจำและการเรียนรู้แบบ spatial memory (D'Hooge และ De Dey, 2001) โดยใช้อ่างบรรจุน้ำที่มีเส้นผ่าศูนย์กลาง 120 ซม. บรรจุน้ำที่ระดับความลึก 13 ซม. ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายในมีแท่นพักใต้น้ำ (hidden platform) สีดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 ซม. อยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 ซม. แบ่งอ่างน้ำออกเป็นสี่ส่วนเท่าๆกัน วางแท่นพักบริเวณกึ่งกลางส่วนใดส่วนหนึ่ง (อยู่คงที่ตลอดการทดลอง) อ่างดังกล่าวตั้งอยู่ในห้องและบริเวณรอบๆอ่างทั้งสามด้านมีรูปภาพติดอยู่ ซึ่งรูปภาพนั้นจะอยู่ตำแหน่งเดิมตลอดการทดลอง หนูจะอาศัยตำแหน่งของภาพในการจดจำตำแหน่งของแท่นพักซึ่งอยู่ใต้น้ำ (Jorge, 2006) แสดงดังภาพที่ 14 สำหรับการทดสอบนี้จะประกอบด้วยการทดสอบ 3 ระยะ ดังนี้

1. **Training phase** ก่อนเริ่มให้สารทดสอบ 1 วัน นำหนูเมาส์มาฝึกให้หาแท่นพักที่อยู่ภายในอ่างบรรจุน้ำ เพื่อทำให้แน่ใจว่าหนูเมาส์ไม่มีปัญหาในการว่ายน้ำ และการมองเห็น ที่เป็นอุปสรรคต่อการศึกษาพฤติกรรมด้านความจำและการเรียนรู้ โดยการปล่อยหนูเมาส์ลงในอ่างบรรจุน้ำ และจับเวลาที่หนูเมาส์ใช้เวลาจนเจอแท่นพักใต้น้ำ โดยกำหนดเวลาไม่เกิน 1 นาทีต่อรอบ และทำการทดลอง 4 ครั้ง ตามจุดที่ได้กำหนดไว้ แต่ละครั้งห่างกันเป็นเวลา 30 วินาที ถ้าหนูสามารถยืนอยู่บนแท่นพักได้เป็นเวลา 10 วินาที อย่างน้อย 1 ครั้งใน 4 ครั้ง จึงนำหนูตัวนั้นมาใช้ในการทดลองต่อไป แต่ถ้าทำครบทั้ง 4 ครั้งแล้ว หนูไม่สามารถหาแท่นพักได้ ให้คัดหนูตัวนั้นออกจากการทดลอง

2. **Trial phase** เมื่อให้สารทดสอบแก่หนูเมาส์ตามที่ได้กำหนดไว้ในแต่ละกลุ่มครบ 15 วัน (Day 15) นำหนูเมาส์มาว่ายน้ำในอ่างบรรจุน้ำ จับเวลาที่หนูเมาส์ใช้เวลาในการหาแท่นพัก (Escape latency) จากการปล่อยทั้ง 4 มุม โดยให้เวลามุมละไม่เกิน 1 นาที โดยดำเนินการทดสอบเป็นระยะเวลา 5 วัน (Day 15-19)

3. **Probe trial phase** ภายหลังการให้สารแก่หนูเมาส์ครบ 20 วัน (Day 20) นำหนูเมาส์มาว่ายน้ำในอ่างบรรจุน้ำ ที่ไม่มีแท่นพัก โดยเลือกปล่อยมุมใดมุมหนึ่ง เพียงมุมเดียว จับเวลาที่หนูเมาส์ใช้เวลาว่ายน้ำใน Quadrant ที่ 1 ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีแท่นพักเดิมอยู่



Trial phase Probe trial phase

ภาพที่ 14 แบบจำลองโมเดล Morris Water Maze

3.5.6 การตรวจวิเคราห์ทางชีวเคมี (Biochemical analysis)

3.5.6.1 การตรวจวัดระดับเอนไซม์โคลีนเอสเทอร์เรส (Ellman, 1961)

1. **สารเคมี**

- 0.1M phosphate buffer pH 7.4 : เตรียมโดยชั่ง Na_2HPO_4 9.6114 ก. และ NaH_2PO_4 7.1764 ก. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.
- 0.1 mM DTNB : เตรียมโดยชั่ง DTNB 39.63 มก. ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ให้ครบ 100 มล.
- 3 mM ATCI : เตรียมโดยชั่ง ATCI 86.77 มก. ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ให้ครบ 100 มล.
- 3 mM BTCI : เตรียมโดยชั่ง BTCI 96.50 มก. ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ให้ครบ 100 มล.
- 1% triton-X : เตรียมโดยเติม triron-X ปริมาตร 1.5 มล. ลงใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ปริมาตร 148.5 มล.

2. หลักการ

เป็นการศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase โดยอาศัยเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) และ butyrylcholinesterase (BChE) เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซีสของ acetylthiocholine iodide (ATCI) และ butyrylthiocholine iodide (BTCI) ซึ่งเป็น substrate ต่อเอนไซม์ดังกล่าว ตามลำดับ แล้วเกิดสาร thiocholine ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยากับ 5,5′-dithiobis-(2-nitrobenzoic acid) (DTNB) จะเกิดเป็นสารประกอบสีเหลืองของ 5-thio-2-nitro-benzoic acid ที่สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร โดยแบ่งการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ออกเป็น 3 การทดลอง ดังนี้

$$ATCI + H_2O \xrightarrow{AChE} \text{Thiocholine iodide} + \text{Acetic acid}$$

$$\text{Thiocholine iodide} + DTNB \longrightarrow \text{5-Thio-2-nitrobenzoate}$$

$$BTCI + H_2O \xrightarrow{BChE} \text{Thiocholine iodide} + \text{Acetic acid}$$

$$\text{Thiocholine iodide} + DTNB \longrightarrow \text{5-Thio-2-nitrobenzoate}$$

- **ตรวจวัดระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมอง**

โดยการนำเนื้อสมองส่วน hippocampus และ prefrontal cortex มาทำให้เป็นเนื้อเดียวกัน (homogenized) ด้วย 1% Triton-X 100 ที่ละลายใน 0.1M phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:50 นำไป centrifuge ที่ 17000 rpm เป็นเวลา 6 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส นำส่วน supernatant มาเจือจางด้วย 0.1M phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:10 จากนั้นนำไปวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ โดยนำชั้น supernatant ปริมาตร 20 μl ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติม 1mM DTNB 100 μl/well และ 3mM ATCI 50 μl/well นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วัดทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อนาที เพื่อนำไปหาอัตราการทำงานของเอนไซม์

$$\text{อัตราการทำงานของเอนไซม์} = \frac{\text{ค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสง/นาที}}{\text{ปริมาณโปรตีน (มิลลิกรัม)} \times 13{,}600}$$

- **ตรวจวัดระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเม็ดเลือดแดง**

หลังจากเก็บเลือดบริเวณหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) ให้นำไป centrifuge ที่ 17,000 rpm เป็นเวลา 6 นาที ที่ 25 องศาเซลเซียส จะทำให้เกิดการแยกชั้นของเม็ดเลือดแดงและพลาสมา นำส่วนของเม็ดเลือดแดงมาล้างด้วย 0.9% normal saline 3 ครั้ง และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้เท่ากับปริมาตรเดิมเพื่อทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จากนั้นนำมาเจือจางด้วย 0.1M phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:50 และนำไปวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ โดยดูดสารละลายที่เตรียมได้ปริมาตร 20 μl ใส่ลงใน 96 well plate แล้วเติม 1mM DTNB 100 μl/well และ 3mM ATCl 50 μl/well จากนั้นจึงนำไปวัดการเปลี่ยนแปลงค่าการดูดกลืนแสงในเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 405 นาโนเมตร วัดทุก 30 วินาที เป็นเวลา 10 นาที บันทึกค่าการเปลี่ยนแปลงการดูดกลืนแสงต่อนาที เพื่อนำไปหาอัตราการทำงานของเอนไซม์

- **ตรวจวัดระดับเอนไซม์ butyrylcholinesterase ในพลาสมา**

นำพลาสมามาเจือจางด้วย 0.1M phosphate buffer pH 7.4 ในอัตราส่วน 1:50 และนำไปวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ซึ่งมีวิธีการทดลองเช่นเดียวกับข้อ 3.10.1.2 แต่ใช้พลาสมาแทนการใช้เม็ดเลือดแดง และ BTCl แทนการใช้ ATCl

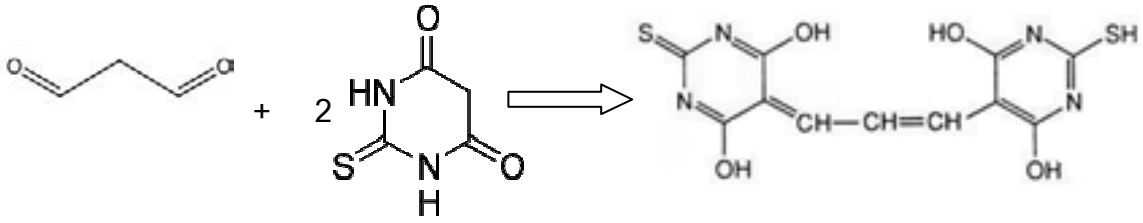
3.5.6.2 **การวัด lipid peroxidation**

1. **สารเคมี**

- 0.1M phosphate buffer pH 7.4 : เตรียมโดยชั่ง Na_2HPO_4 9.6114 ก. และ NaH_2PO_4 7.1764 ก. ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 1000 มล.
- 0.81% TBAR : เตรียมโดยชั่ง TBAR 405 มก. ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ให้ครบ 50 มล.
- 8.1% SDS : เตรียมโดยชั่ง SDS 4.05 กรัม ปรับปริมาตรด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4 ให้ครบ 50 มล.
- 20% acetic acid : นำ 100% acetic acid ปริมาตร 10 มล. เติมลงในน้ำกลั่นปริมาตร 40 มล. ปรับ pH ให้เป็น 3.5 ด้วย HCl หรือ NaOH
- 15 : 1 butenaol : pyridine : นำ butanal ปริมาตร 300 มล. เติมลงใน pyridine ปริมาตร 20 มล.

2. วิธีการทดลอง

การทดลองนี้อาศัยหลักการวัดปริมาณ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นผลิตผลจากปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ในสภาวะที่เป็นกรด ได้สารประกอบที่มีสีแดง (แสดงดังภาพที่ 15) สำหรับวิธีการทดลอง นำสมองหนูส่วน cerebral cortex ที่เก็บไว้ในตู้ -80 องศาเซลเซียส มาใส่ลงใน ice-cold phosphate buffer (pH 7.4) 0.1 M ในปริมาณ 10 เท่าของสมองหนู (1:10 น้ำหนักต่อปริมาตร) แล้วนำมา homogenized จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ให้เกิดการแยกชั้น วัดปริมาณ MDA โดยนำชั้น supernatant ปริมาตร 0.1 มล. มาเติมสารละลายต่าง ๆ ซึ่งประกอบด้วย 20% acetic acid 1.5 มล. pH 3.5, 0.8% thiobarbituric acid 1.5 มล. และ 8.1% sodium dodecyl sulphate 0.2 มล. จากนั้นนำไปต้มที่อุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 60 นาที ทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง แล้วนำมาผสมลงใน n-butanol/pyridine ในอัตราส่วน 15:1 ปริมาตร 5 มล. และน้ำกลั่น 1 มล. เขย่าให้เข้ากันโดยใช้เครื่อง vortex จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 4000 rpm เป็นเวลา 10 นาที นำชั้น supernatant มาวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 532 นาโนเมตรโดยใช้เครื่อง spectrophotometer (Gupta และคณะ, 2003)



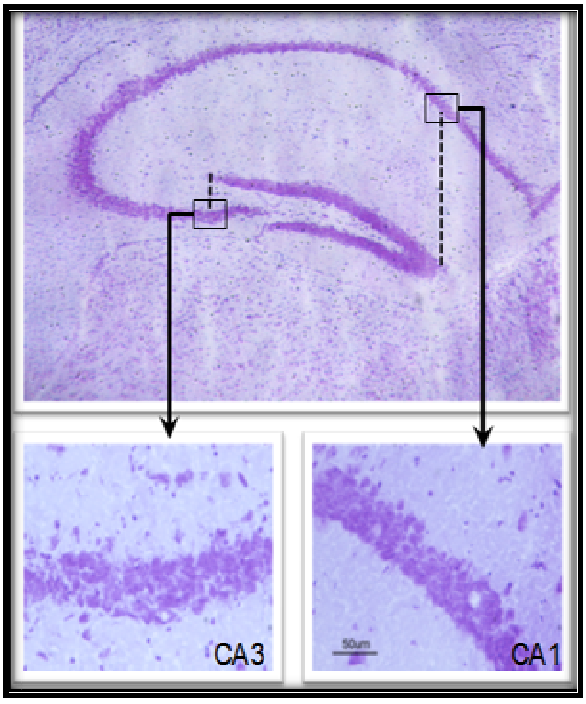
Malondialdehyde Thiobarbituric acid MDA-TBA Adduct

ภาพที่ 15 การเกิดสารประกอบของ malondialdehyde จากปฏิกิริยา lipid peroxidation

3.5.7 การศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์

เป็นการประเมินจำนวนเซลล์ประสาทในสมองบริเวณ hippocampus โดยการตัดชิ้นเนื้อสมองเป็นแผ่นบางแล้วย้อมดูเซลล์ประสาทที่มีชีวิต โดยใช้ cresyl violet staining technique หลังเสร็จสิ้นการทดสอบทางด้านพฤติกรรม สลบหนูเมาส์โดยการฉีด pentobarbital ขนาด 60 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (i.p.) ทำการ decapitate เพื่อแยกสมองแล้วทำให้แข็งโดยใช้น้ำแข็งแห้ง (dry ice) จากนั้นตัดสมองตามแนวขวาง (coronal section) ความหนา 10 μm ที่ระดับของ hippocampus โดยเริ่มต้นตัดตามแนวขวางห่าง

จากจุด bregma 3.14 มม. จากนั้นย้อมสีด้วย 1% cresyl violet นำไปส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์ (microscopic observation) เพื่อดูเซลล์ที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus โดยกำหนดพื้นที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองหนูให้ตรงกัน โดยใช้ส่วนหัวและส่วนท้ายของสมองส่วน dentate gyrus ตามลำดับ เป็นตัวกำหนดพื้นที่ในการนับเซลล์ประสาท จากนั้นนำมาถ่ายรูป (x400) และนับจำนวนเซลล์ต่อพื้นที่ 0.084 มม^2 (Farkas และคณะ, 2006; He และคณะ, 2008) แสดงดังภาพที่ 16



ภาพที่ 16 บริเวณ CA 1 และ CA 3 ของสมองส่วน hippocampus ที่ใช้ในการประเมินจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิต (survival neurons)

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

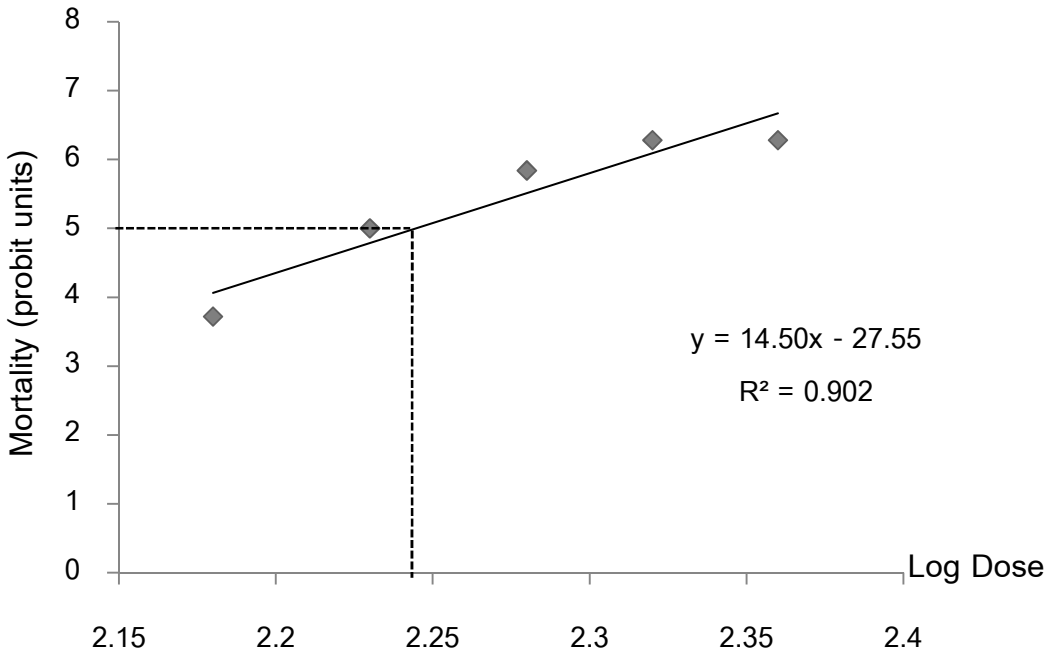
การเก็บบันทึกและรวบรวมข้อมูล โดยแสดงผลการศึกษาเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้ unpaired student's t-test เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับน้ำและกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก และใช้ One-way analysis of variance (One-way ANOVA) เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม โดยใช้ Fisher's least significant difference (LSD) พิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 ค่า Median lethal dose (LD_{50}) ของคลอร์ไพริฟอส

การหาค่า Median lethal dose (LD_{50}) เป็นการหาปริมาณของสารพิษที่ให้เข้าไปเพียงครั้งเดียวแล้วทำให้สัตว์ทดลองตายไปครึ่งหนึ่ง (50%) ของสัตว์ทดลองที่ใช้ทั้งหมด โดยกำหนดขนาดของคลอร์ไพริฟอสที่ใช้ในการทดลอง คือ 150 - 230 มก./กก. น้ำหนักตัว จากผลการทดลองพบว่า เมื่อให้คลอร์ไพริฟอส โดยการป้อนทางปากแก่หนูเมาส์ (n = 10) วันละ 1 ครั้ง และเฝ้าติดตามอาการเป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่า คลอร์ไพริฟอสทำให้หนูเมาส์ น้ำตาไหล น้ำลายฟูมปาก กลั้นปัสสาวะไม่อยู่ และกล้ามเนื้ออ่อนแรง ซึ่งเป็นอาการที่แสดงถึงการได้รับคลอร์ไพริฟอสเกินขนาด โดยมีค่า LD_{50} เท่ากับ 175.65 (163.19-188.11) มก./กก. น้ำหนักตัว ด้วยวิธีของ Miller และ Tainter (1944) แสดงดังภาพที่ 17



LD_{50} (95% confidence limits) = 176.65 (163.19 – 188.11) mg/kg body weight

ภาพที่ 17 กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการตาย (Mortality) กับขนาด (log) ของคลอร์ไพริฟอสเป็นมก./กก. น้ำหนักตัว

4.2 ผลการทดสอบทางด้านพฤติกรรม

4.2.1 การทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ (Locomotor activity)

Locomotor activity เป็นการทดสอบเพื่อศึกษาว่าสารทดสอบที่หนูเมาส์ได้รับนั้นมีผลต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางที่ควบคุมการเคลื่อนไหวหรือไม่ โดยทำการทดลองภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 13 วัน ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังนี้

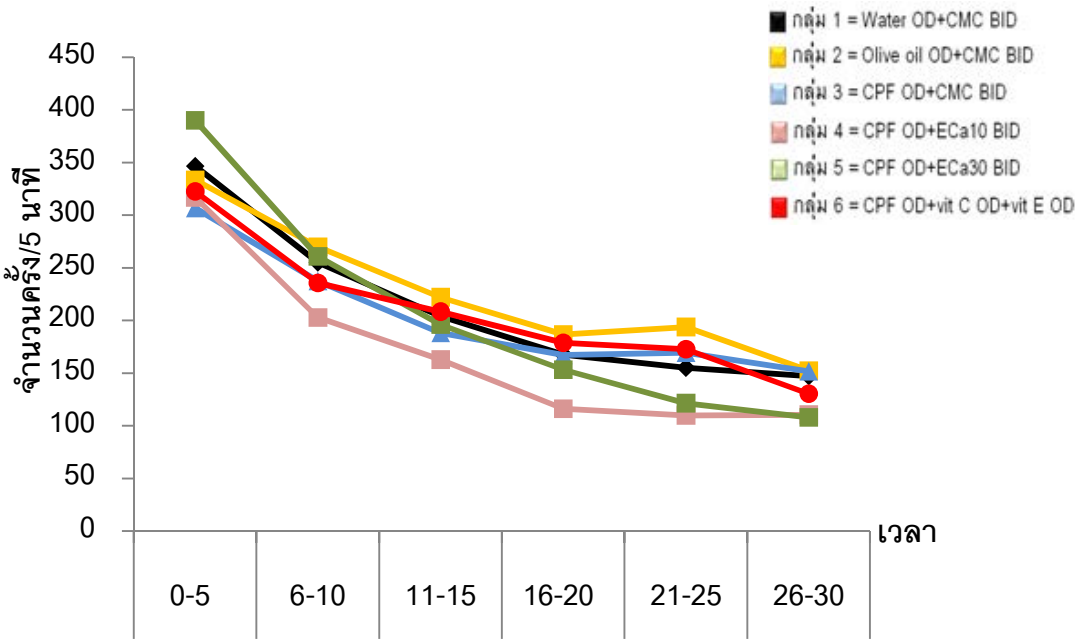
4.2.1.1 ผลของน้ำมันมะกอกต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์

จากผลการทดลอง หนูกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25 และ 26-30 นาที มีค่าเท่ากับ 347 ± 5.53, 255 ± 6.60, 204 ± 6.82, 168 ± 7.00, 155 ± 4.84, 147 ± 14.62 ครั้ง และ 334 ± 20.70, 270 ± 12.19, 222 ± 18.56, 187 ± 25.73, 194 ± 21.51, 152 ± 15.58 ครั้ง ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบทั้งสอง ในทุกช่วงเวลาของการทดสอบ ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) แสดงดังภาพที่ 17 และเมื่อดูผลรวมของจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยของกลุ่มที่ 1 และกลุ่มที่ 2 ในระยะเวลา 30 นาที พบว่า มีค่าเท่ากับ 1276 ± 14.91 และ 1358 ± 14.35 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบทั้งสองเช่นกัน ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) แสดงดังภาพที่ 18

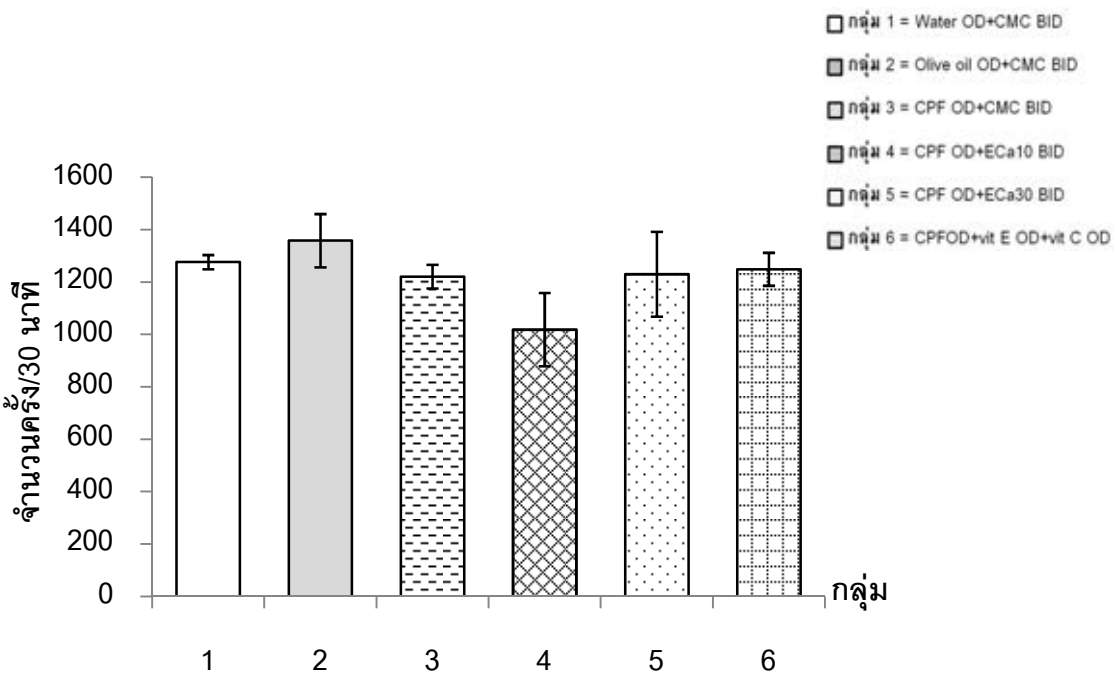
4.2.1.2 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 และคลอร์ไพริฟอสต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์

หนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) และร่วมกับวิตามินซี+วิตามินอี (กลุ่มที่ 6) มีจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยในช่วงเวลา 0-5, 6-10, 11-15, 16-20, 21-25 และ 26-30 นาที โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลาของการทดสอบเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 18 และเมื่อดูผลรวมของจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยเป็นระยะเวลา 30 นาที ในกลุ่มที่ 3-6 พบว่า มีค่าเท่ากับ 1221 ± 11.96, 1019 ± 17.99, 1230 ± 22.90 และ 1249 ± 14.48 ครั้ง ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมเช่นกัน ($P > 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 19

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า ขนาดของคลอร์ไพริฟอส และสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ ไม่มีผลต่อระบบประสาทส่วนกลางที่มีผลต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ โดยเฉพาะสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ที่แม้จะเพิ่มขนาด แต่ไม่ทำให้พฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์เปลี่ยนแปลงไป จึงเป็นการยืนยันผลเพื่อแสดงให้เห็นว่า สารทั้งสองที่นำมาใช้ในการทดลองนั้น ไม่มีผลกระทบต่อการทดสอบทางด้านการเรียนรู้และความจำ



ภาพที่ 18 จำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยต่อ 5 นาที ของหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ โดยข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 4) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA



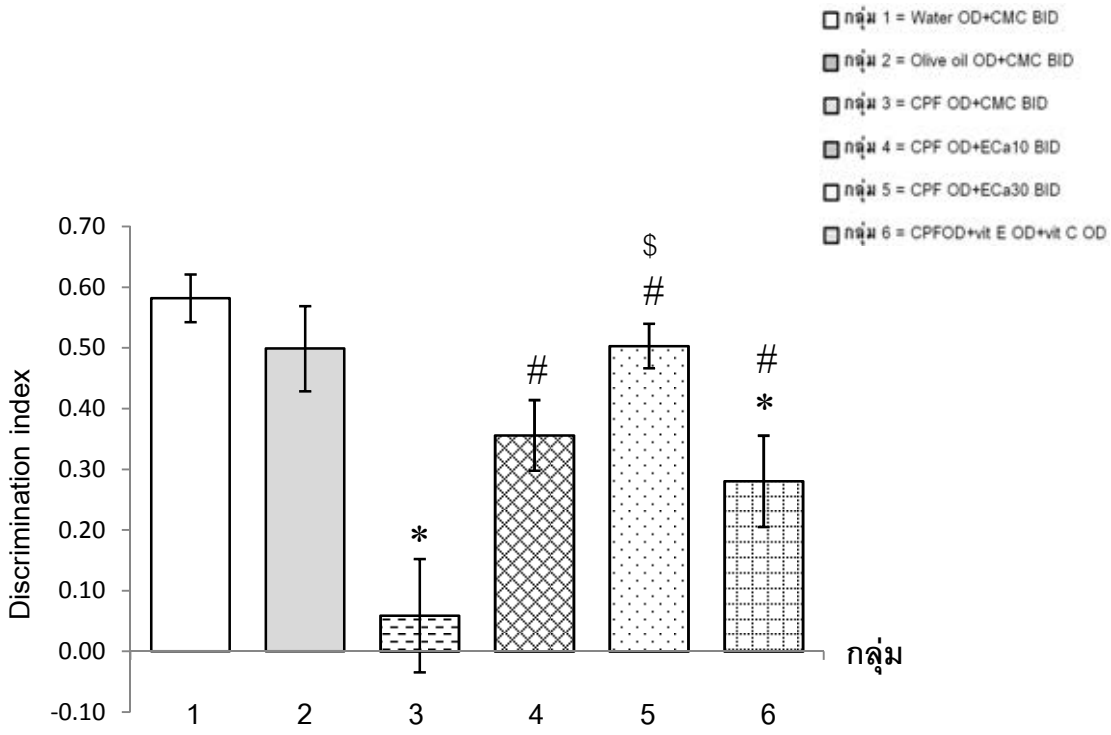
ภาพที่ 19 ผลรวมจำนวนครั้งการเคลื่อนไหวเฉลี่ยของหนูเมาส์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบชนิดต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 30 นาที โดยข้อมูลแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 4) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA

4.2.2 ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี Object Recognition

Object recognition test เป็นการทดสอบความจำระยะสั้น (short-term memory) หรือความจำเกี่ยวกับการปฏิบัติงาน (working memory) ของหนูเมาส์ ในการศึกษานี้จะทดสอบความจำภายหลังการได้รับสารครบ 14 และ 20 วัน ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังนี้

4.2.2.1 ผลการทดลองเมื่อได้รับสารทดสอบครบ 14 วัน

จากผลการทดลอง พบว่า หนูทุกกลุ่มจะให้ความสนใจและใช้เวลาในการสำรวจวัตถุใหม่มากกว่าวัตถุเก่า โดยหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำด้วยคลอร์ไพริฟอส มีค่า Discrimination index (DI) เท่ากับ 0.58 ± 0.04 และ 0.50 ± 0.07 ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดสอบทั้งสอง ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) แต่เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ 3 ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเพียงอย่างเดียว ซึ่งมีค่า DI เท่ากับ 0.06 ± 0.09 พบว่า หนูกลุ่มที่ 3 มีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำวัตถุใหม่ลดลง โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) และวิตามินอีและซี (กลุ่มที่ 6) สามารถช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำให้กับหนูเมาส์ได้ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) นอกจากนี้ยังพบกว่าการได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. ให้ผลที่ดีกว่ากลุ่มที่ 6 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) สำหรับค่า DI ของหนูกลุ่มที่ 4 คือ 0.36 ± 0.06 กลุ่มที่ 5 คือ 0.50 ± 0.04 และกลุ่มที่ 6 คือ 0.28 ± 0.08 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 20



ภาพที่ 20 ค่า Discrimination index ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ภายหลังการได้รับสารทดสอบทางปากเป็นเวลา 14 วัน โดยข้อมูลแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 4) และกำหนดระดับความสำคัญที่

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

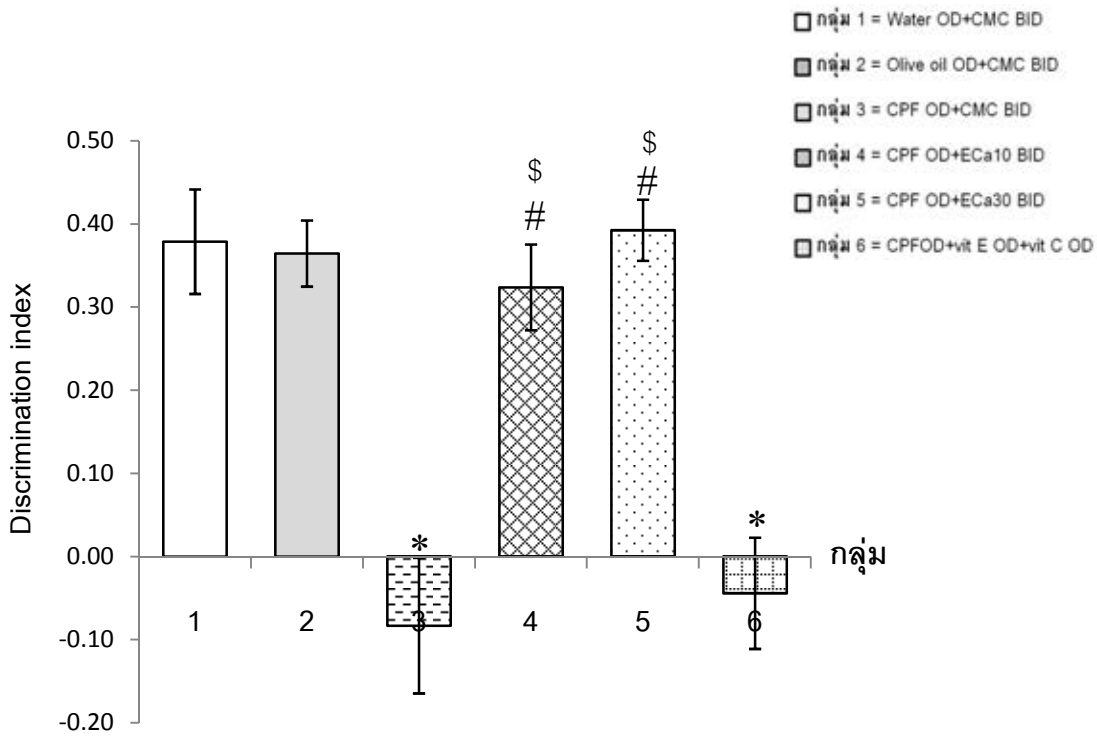
\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส+วิตามินอี+วิตามินซี (กลุ่มที่ 6)

4.2.2.2 ผลการทดลองเมื่อได้รับสารทดสอบครบ 20 วัน

จากผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มควบคุมคือ กลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่1) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่2) มีค่า DI เท่ากับ 0.38 ± 0.06 และ 0.36 ± 0.04 ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) และกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับวิตามินอีและซี (กลุ่มที่ 6) มีแนวโน้มของค่า DI ลดต่ำลงจากวันที่ 14 ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) และ 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) พบว่า มีค่า DI ไม่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม และเมื่อนำมาเปรียบเทียบ พบว่า ให้ผลที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 และ 6 ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) สำหรับค่า DI กลุ่มที่ 3 คือ -0.08 ± 0.08 กลุ่มที่ 4 คือ 0.32 ± 0.05 กลุ่มที่ 5 คือ 0.39 ± 0.04 และกลุ่มที่ 6 คือ -0.04 ± 0.07 ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 21

จากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า การได้รับคลอร์ไพริฟอส สามารถทำให้หนูเมาส์เกิดภาวะบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำ จนไม่สามารถจำวัตถุเดิมที่เคยสำรวจได้ และเมื่อเวลายิ่งผ่านไป ยิ่งทำให้การเรียนรู้บกพร่องมากขึ้น แม้ว่าจะได้รับในปริมาณ ๆ น้อยก็ตาม ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 สามารถช่วยชะลอหรือลดความรุนแรงของภาวะบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำได้



ภาพที่ 21 ค่า Discrimination index ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ภายหลังการได้รับสารทดสอบทางปากเป็นเวลา 20 วัน โดยข้อมูลแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 4) โดยกำหนดระดับความสำคัญที่

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส+วิตามินอี+วิตามินซี (กลุ่มที่ 6)

4.2.3 ผลการทดสอบการเรียนรู้และความจำด้วยวิธี Morris Water Maze

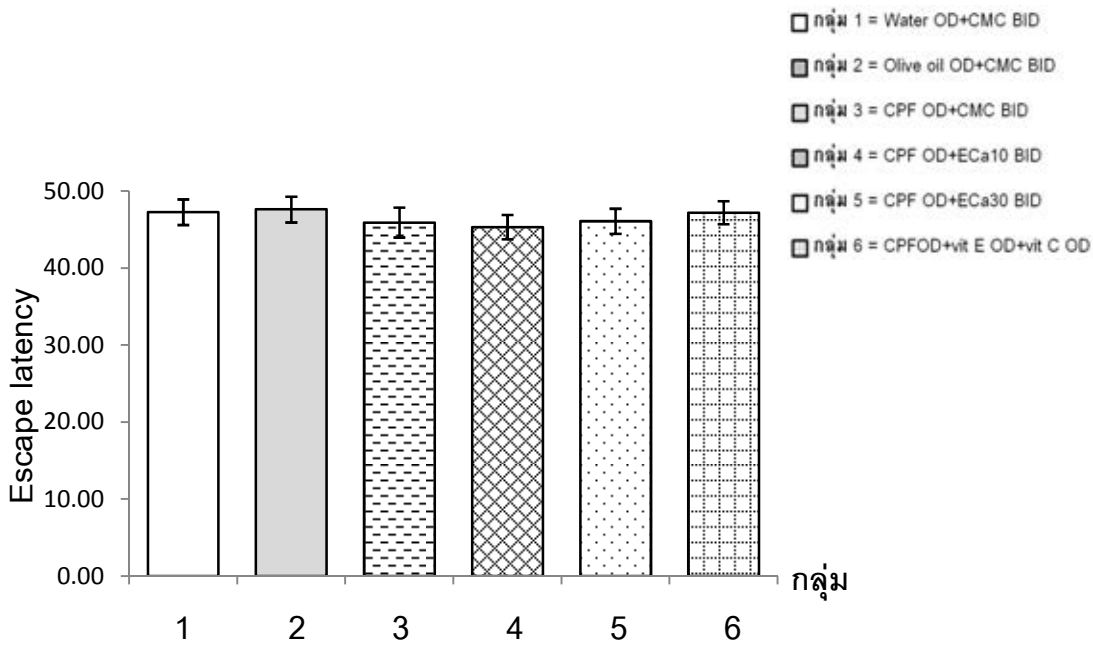
ก่อนเริ่มให้สารทดสอบ 1 วัน นำหนูเมาส์มาฝึกการเรียนรู้และความจำ โดยให้ว่ายน้ำภายในอ่างบรรจุน้ำที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 120 ซม. บรรจุน้ำที่ระดับความลึก 13 ซม. ควบคุมอุณหภูมิที่ 25 ± 1 องศาเซลเซียส ภายในมีแท่นพักใต้น้ำ (hidden platform) สีดำ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 8 ซม. อยู่ต่ำกว่าระดับผิวน้ำ 1 ซม. เป็นระยะเวลา 1 วัน โดยทำทั้งหมด 4 จุด ตามที่ได้กำหนดไว้ เพื่อฝึกให้หนูเมาส์เกิดการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งที่ตั้งของแท่นพักใต้น้ำ จากผลการทดลอง พบว่า หนูกลุ่มที่ 1-6 มีระยะเวลาเฉลี่ยในการค้นหาแท่นพักใต้น้ำ (escape latency) เท่ากับ 47.25 ± 1.66, 47.60 ± 1.68, 45.91 ± 1.94, 45.31 ± 1.58, 46.09 ± 1.63 และ 47.19 ± 1.51 วินาที ตามลำดับ โดยไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P > 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 22 แสดงให้เห็นว่า ก่อนเริ่มให้สารทดสอบหนูเมาส์แต่ละตัวมีความสามารถในการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งในการค้นหาแท่นพักใต้น้ำได้ไม่แตกต่างกัน

สำหรับการทดสอบ Morris Water Maze ในวันที่ 15-19 ภายหลังการได้รับสารทดสอบ (Day15-19) พบว่า เมื่อเวลาผ่านไป หนูทุกกลุ่มมีระยะเวลาเฉลี่ยในการค้นหาแท่นพักใต้น้ำ (escape latency) ลดลง โดยหนูกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีค่า escape latency ในวันที่ 15-19 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในทุกช่วงเวลา สำหรับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) และกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับวิตามินอีและซี มีค่า escape latency แตกต่างจากกลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัว มีค่า escape latency แตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ได้รับร่วมกับวิตามินซีกับวิตามินอี (กลุ่มที่ 6) ตั้งแต่วันที่ 16 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัว มีค่า escape latency ที่แตกต่างจากกลุ่มที่ 3 และ 6 ในวันที่ 19 เท่านั้น ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 23

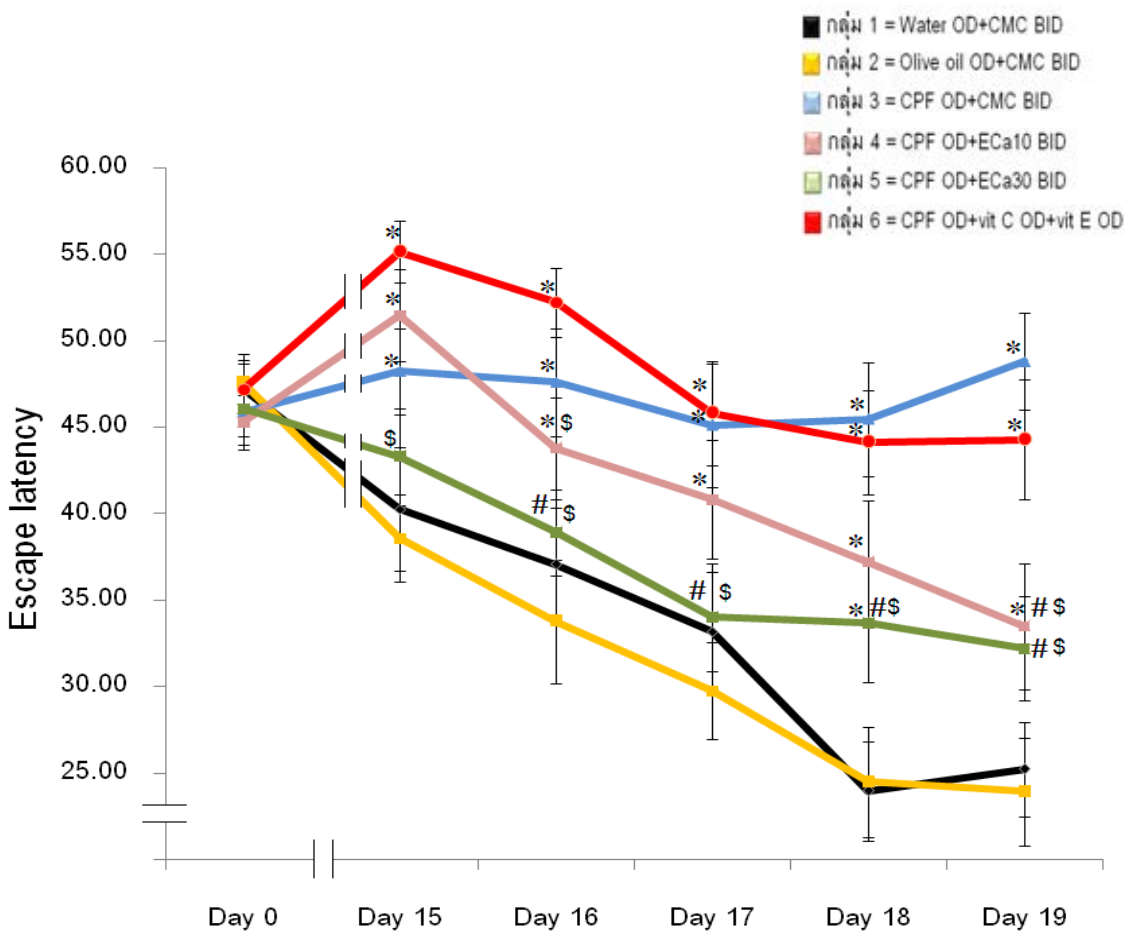
จากการทดลองนี้ ชี้ให้เห็นว่าการได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ตลอดการทดลองนั้น สามารถช่วยลดภาวะบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำได้ โดยการให้ในขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัวให้ผลการทดลองที่ดีกว่าขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัว แสดงว่า การได้รับสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ในขนาดที่เพิ่มมากขึ้น จะทำให้การเรียนรู้และความจำดีขึ้น

สำหรับการทดสอบ Morris Water Maze ช่วง probe trial phase ในวันที่ 20 ภายหลังการได้รับสารทดสอบ เพื่อเป็นการยืนยันผลว่า การเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ เกิดจากความสามารถในการจดจำตำแหน่งได้ ไม่ได้เกิดจากการมองเห็นแท่นพักใต้น้ำ จะทำการทดลอง โดยปล่อยหนูเมาส์ลงในอ่างบรรจุน้ำ ซึ่งเอาแท่นพักใต้น้ำออก และจับเวลาที่หนูเมาส์ใช้เวลาในการว่าย

อยู่ในบริเวณ quadrant ที่ 1 (Time spent in quadrant 1) ซึ่งเป็นบริเวณที่มีแท่นพักใต้น้ำอยู่เดิม จากผลการทดลอง พบว่า หนูกลุ่มที่ 1 (19.10 ± 1.54 วินาที) และกลุ่มที่ 2 (22.80 ± 1.44 วินาที) ใช้เวลาในการว่ายใน quadrant 1 ได้ไม่แตกต่างกัน สถิติ ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) สำหรับกลุ่มที่ 3 (12.55 ± 1.49 วินาที) ใช้เวลาในการว่ายในบริเวณดังกล่าวแตกต่างจากกลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) (22.55 ± 1.72 วินาที) ใช้เวลาในการว่ายบริเวณดังกล่าวมากกว่ากลุ่มที่ 3 และกลุ่มที่ 6 (16.70 ± 1.35 วินาที) โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) สำหรับกลุ่มที่ 4 ใช้เวลาในการว่ายบริเวณที่มีแท่นพักใต้น้ำอยู่เดิม 20.85 ± 2.13 วินาที โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3 แต่ไม่พบความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 6 ($P > 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 24



ภาพที่ 22 ค่าเฉลี่ยของ escape latency ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ก่อนเริ่มให้สารทดสอบ 1 วัน เพื่อฝึกให้หนูเมาส์เกิดการเรียนรู้และจดจำตำแหน่งที่ตั้งของแท่นพักใต้น้ำ โดยข้อมูลแสดงอยู่ในรูปของค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 20) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA

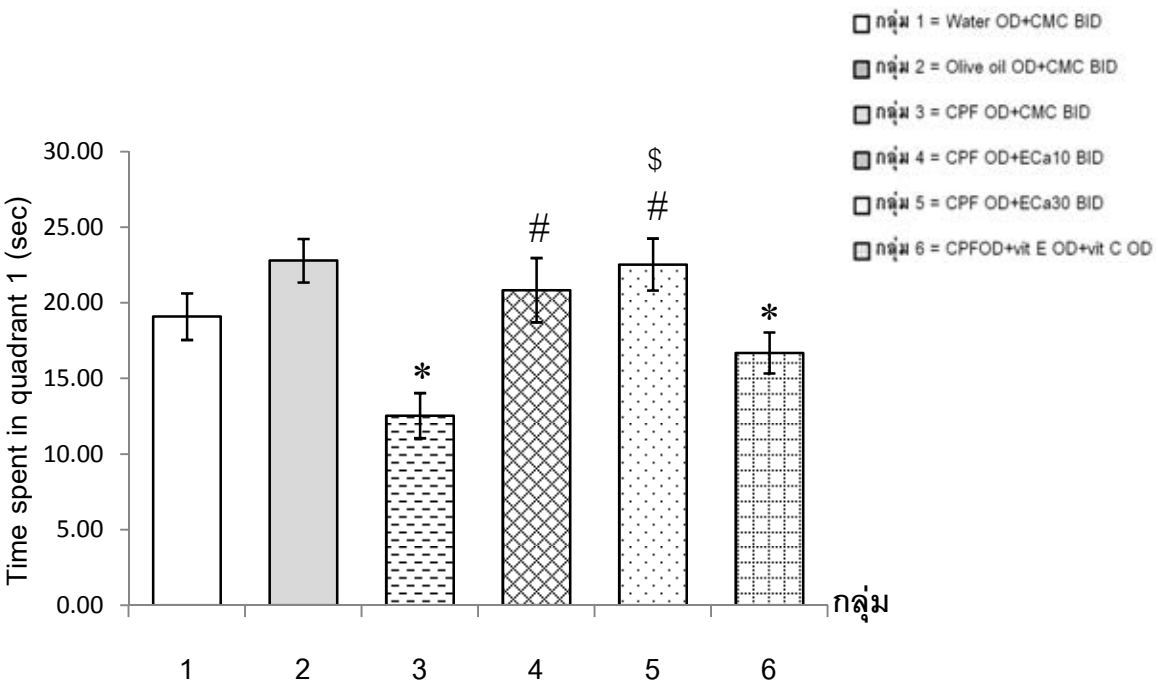


ภาพที่ 23 กราฟแสดงระยะเวลาเฉลี่ยของ escape latency ของหนูเมาส์แต่ละกลุ่ม ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 15-19 วัน โดยการทดสอบด้วย Morris Water Maze ผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 20) โดยกำหนดระดับความสำคัญที่

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส+วิตามินอี+วิตามินซี (กลุ่มที่ 6)



ภาพที่ 24 ระยะเวลาที่หนูเมาส์ใช้ในการว่ายใน quadrant ที่ 1 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีแท่นพักใต้น้ำเดิมอยู่ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 20 วัน โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 20) โดยกำหนดระดับความสำคัญที่

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

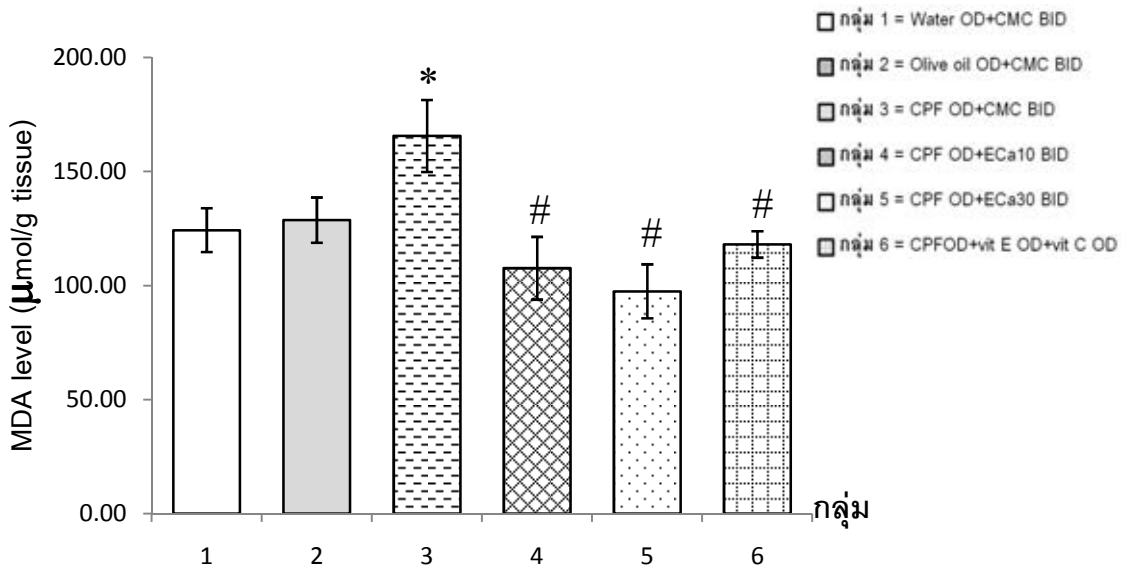
\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

$ มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส+วิตามินอี+วิตามินซี (กลุ่มที่ 6)

4.3 ผลการทดสอบทางด้านชีวเคมี (Biochemistry)

4.3.1 ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อปริมาณ MDA

การทดลองนี้อาศัยหลักการวัดปริมาณ MDA ซึ่งเป็นผลิตผลจากปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ thiobarbituric acid ในสภาวะที่เป็นกรด ได้สารประกอบที่มีสีแดง จากผลการทดลอง หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีระดับของ MDA ในสมองเท่ากับ 124.29 ± 9.58 และ 128.65 ± 9.95 μmol/g tissue ตามลำดับ ซึ่งไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของกลุ่มทดสอบทั้งสอง ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) พบว่า กลุ่มที่ 3 จะมีระดับ MDA สูงขึ้นแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) และ วิตามินซีและอี (กลุ่มที่ 6) สามารถลดระดับ MDA ในสมอง ได้แตกต่างจากกลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) โดยระดับ MDA ของกลุ่มที่ 3 คือ 165.61 ± 15.79 กลุ่มที่ 4 คือ 107.59 ± 13.74 กลุ่มที่ 5 คือ 97.43 ± 11.83 และ กลุ่มที่ 6 คือ 118.01 ± 5.79 μmol/g tissue ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 25



ภาพที่ 25 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อระดับ MDA ในสมองหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 10) โดยกำหนดระดับความสำคัญที่

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.001$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

4.3.2 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของ Cholinesterase activity ในเลือด

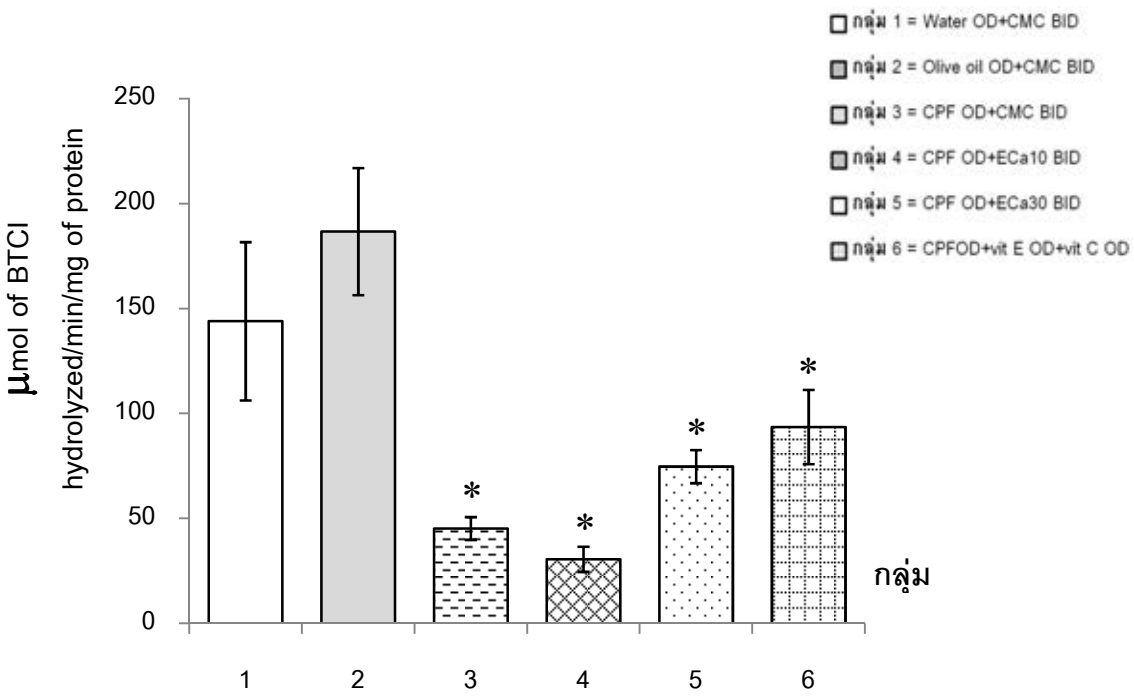
ภายหลังจากที่หนูเมาส์ได้รับสารทดสอบครบ 20 วัน จะทำการเก็บเลือดบริเวณหัวใจห้องล่างซ้ายของหนูเมาส์ และนำไป centrifuge ที่ 17000rpm นาน 6 นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เพื่อแยกส่วนพลาสมาและเม็ดเลือดแดงออกจากกัน โดยนำชั้นพลาสมาและเม็ดเลือดแดงไปตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase และ acetylcholinesterase ตามลำดับ ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังนี้

4.3.2.1 ผลการทำงานของ Cholinesterase activity ในพลาสมา

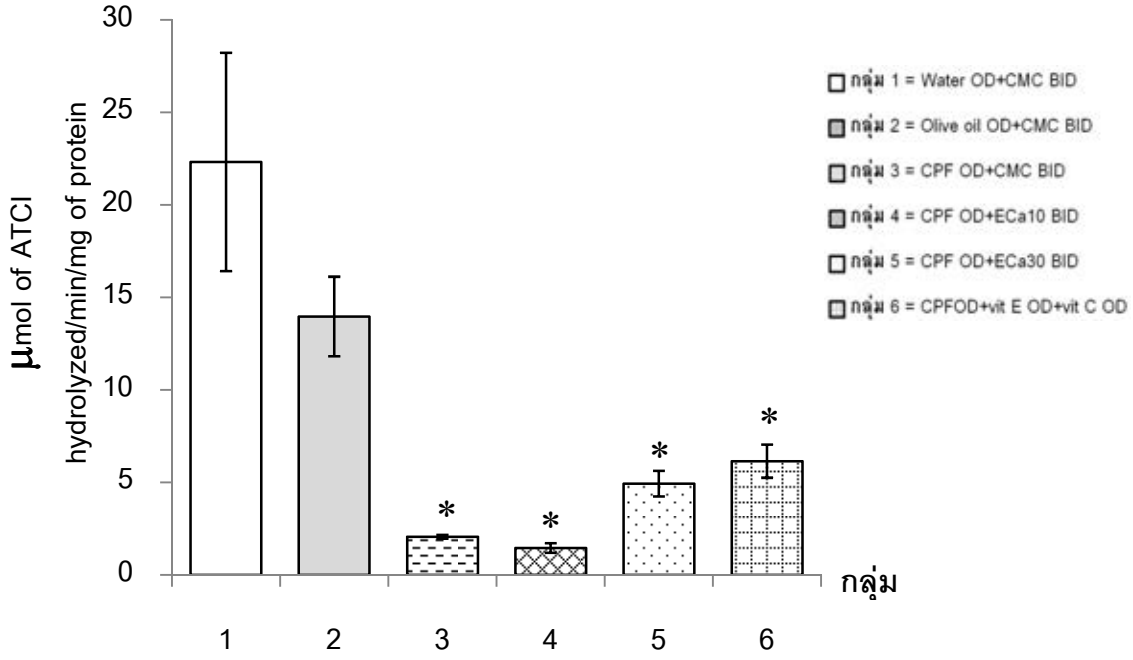
จากผลการทดลอง พบว่า กลุ่มควบคุม คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase เท่ากับ 144.01 ± 37.71 และ 186.74 ± 30.27 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มทดสอบทั้งสอง ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) สำหรับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) และร่วมกับวิตามินซี+วิตามินอี (กลุ่มที่ 6) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase เท่ากับ 45.31 ± 5.42, 30.67 ± 5.98, 74.82 ± 7.89 และ 93.66 ± 17.71 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ โดยทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ 2 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 26

4.3.2.2 ผลการทำงานของ Cholinesterase activity ในเม็ดเลือดแดง

จากผลการทดลอง พบว่า กลุ่มควบคุม คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 22.31 ± 5.90 และ 13.96 ± 2.15 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มทดสอบทั้งสอง ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) สำหรับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) และร่วมกับวิตามินซี+วิตามินอี (กลุ่มที่ 6) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 2.06 ± 0.10, 1.45 ± 0.26, 4.93 ± 0.69 และ 6.14 ± 0.90 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ โดยทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ 2 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 27



ภาพที่ 26 ผลของคลอร์ไพริฟอสต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ในพลาสมาของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 5) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)



ภาพที่ 27 ผลของคลอร์ไพริฟอสต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในเม็ดเลือดแดงของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 5) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

4.3.3 ผลการตรวจวัดระดับการทำงานของ Cholinesterase activity ในสมอง

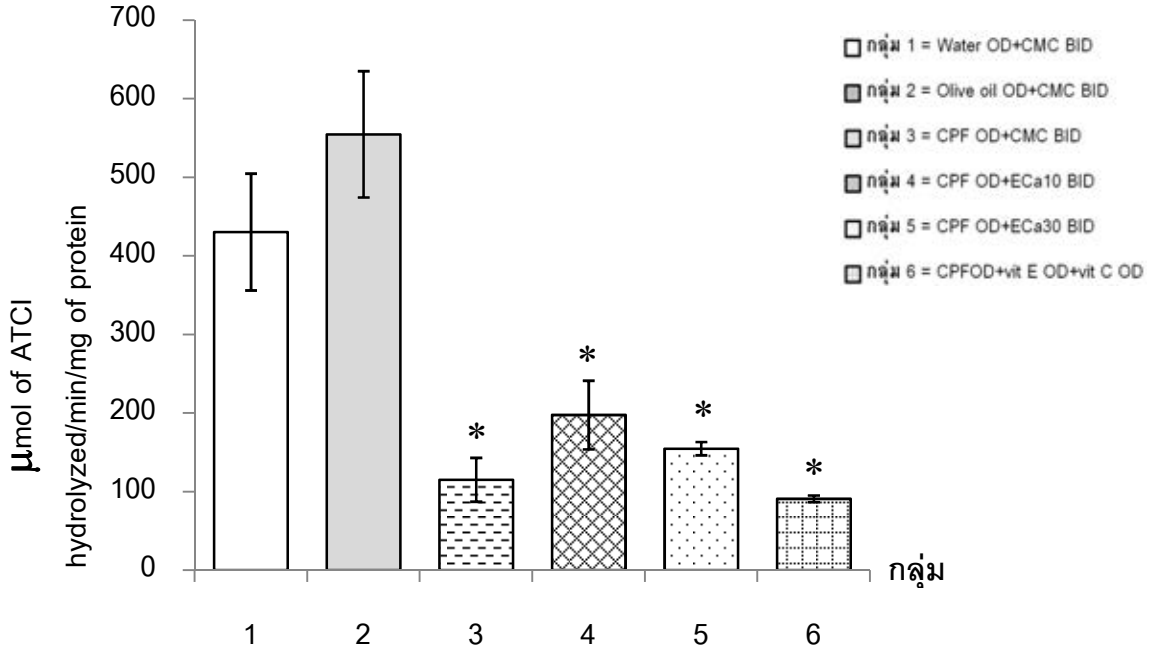
เมื่อเสร็จสิ้นการทดลองหนูเมาส์แต่ละกลุ่มจะถูก sacrificed และเก็บเนื้อเยื่อสมองส่วน hippocampus และ prefrontal cortex เพื่อนำไปตรวจหาระดับเอนไซม์ acetylcholinesterase ซึ่งได้ผลการทดลอง ดังนี้

4.3.3.1 ผลการทำงานของ Cholinesterase activity ใน hippocampus

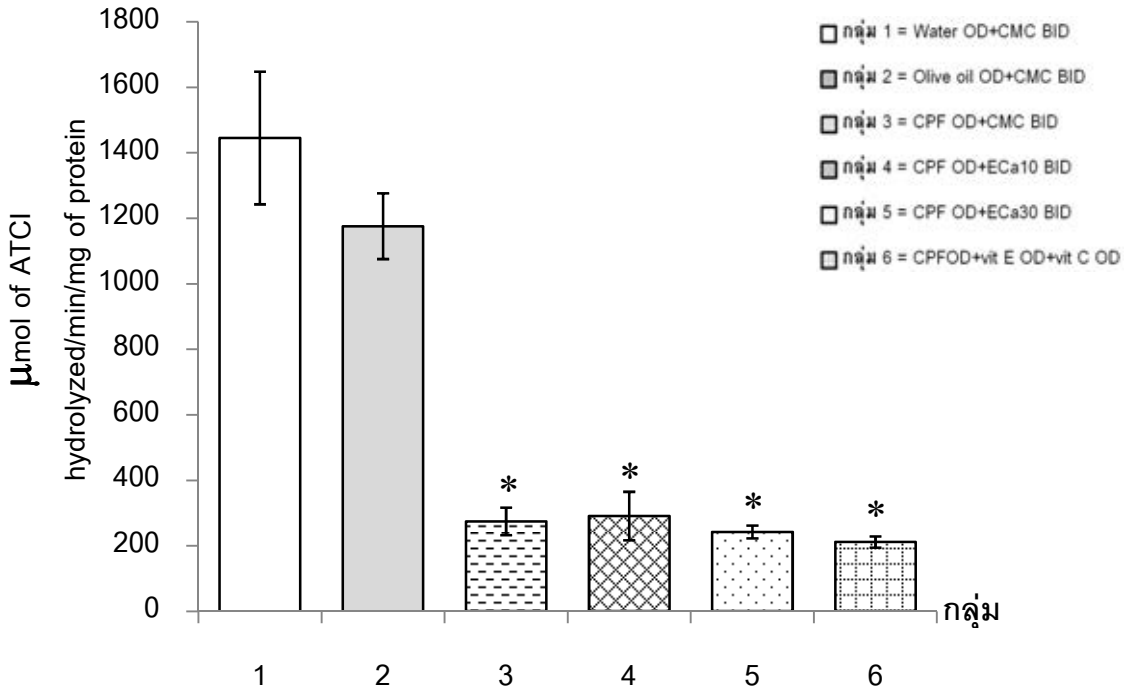
จากผลการทดลอง พบว่า กลุ่มควบคุม คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 430.24 ± 74.38 และ 554.59 ± 80.32 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มทดสอบทั้งสอง ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) สำหรับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. (กลุ่มที่ 4) 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 5) และร่วมกับวิตามินซี+วิตามินอี (กลุ่มที่ 6) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 114.99 ± 27.88, 197.44 ± 43.68, 154.57 ± 8.43 และ 90.74 ± 4.35 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ โดยทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ 2 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 28

4.3.3.2 ผลการทำงานของ Cholinesterase activity ใน prefrontal cortex

จากผลการทดลอง พบว่า กลุ่มควบคุม คือ หนูกลุ่มที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) และน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 1444.81 ± 202.57 และ 75.41 ± 100.33 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มทดสอบทั้งสอง ($P > 0.05$, unpaired student's t-test) สำหรับกลุ่มที่ได้รับ CPF (กลุ่มที่ 3) CPF+ECa10 (กลุ่มที่ 4) CPF+ECa30 (กลุ่มที่ 5) และ CPF+vit C+vit E (กลุ่มที่ 6) มีค่าการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase เท่ากับ 274.20 ± 41.99, 290.64 ± 73.90, 242.10 ± 19.56 และ 211.42 ± 17.08 μmole hydrolyzed/min/mg of protein ตามลำดับ โดยทุกกลุ่มมีค่าต่ำกว่ากลุ่มที่ 2 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test) แสดงดังภาพที่ 29



ภาพที่ 28 ผลของคลอร์ไพริฟอสต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองส่วน hippocampus ของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 5) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)



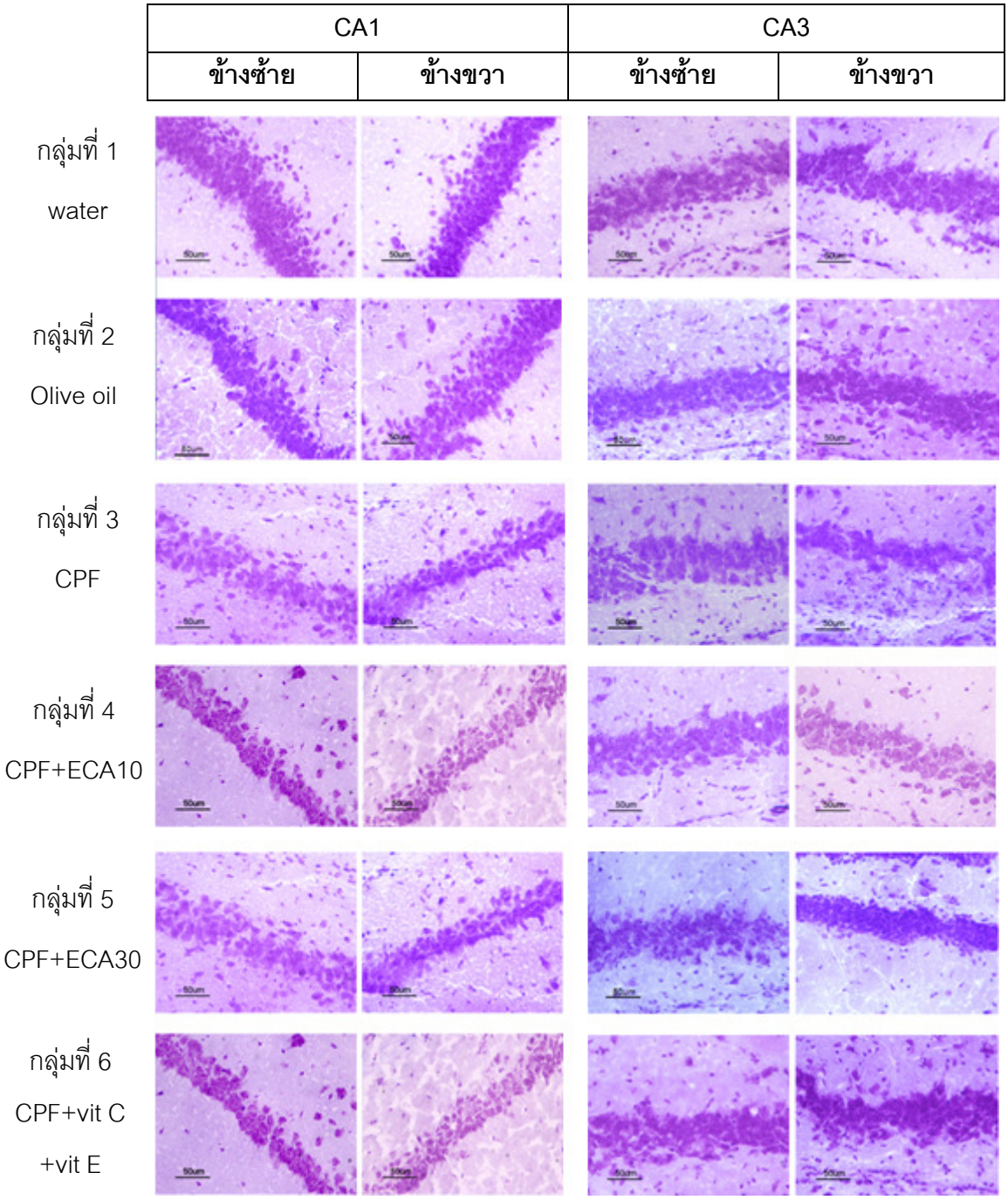
ภาพที่ 29 ผลของคลอร์ไพริฟอสต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ในสมองส่วน prefrontal cortex ของหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 5) และกำหนดระดับความสำคัญที่ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

4.4 ผลการศึกษาทางด้านจุลกายวิภาคศาสตร์

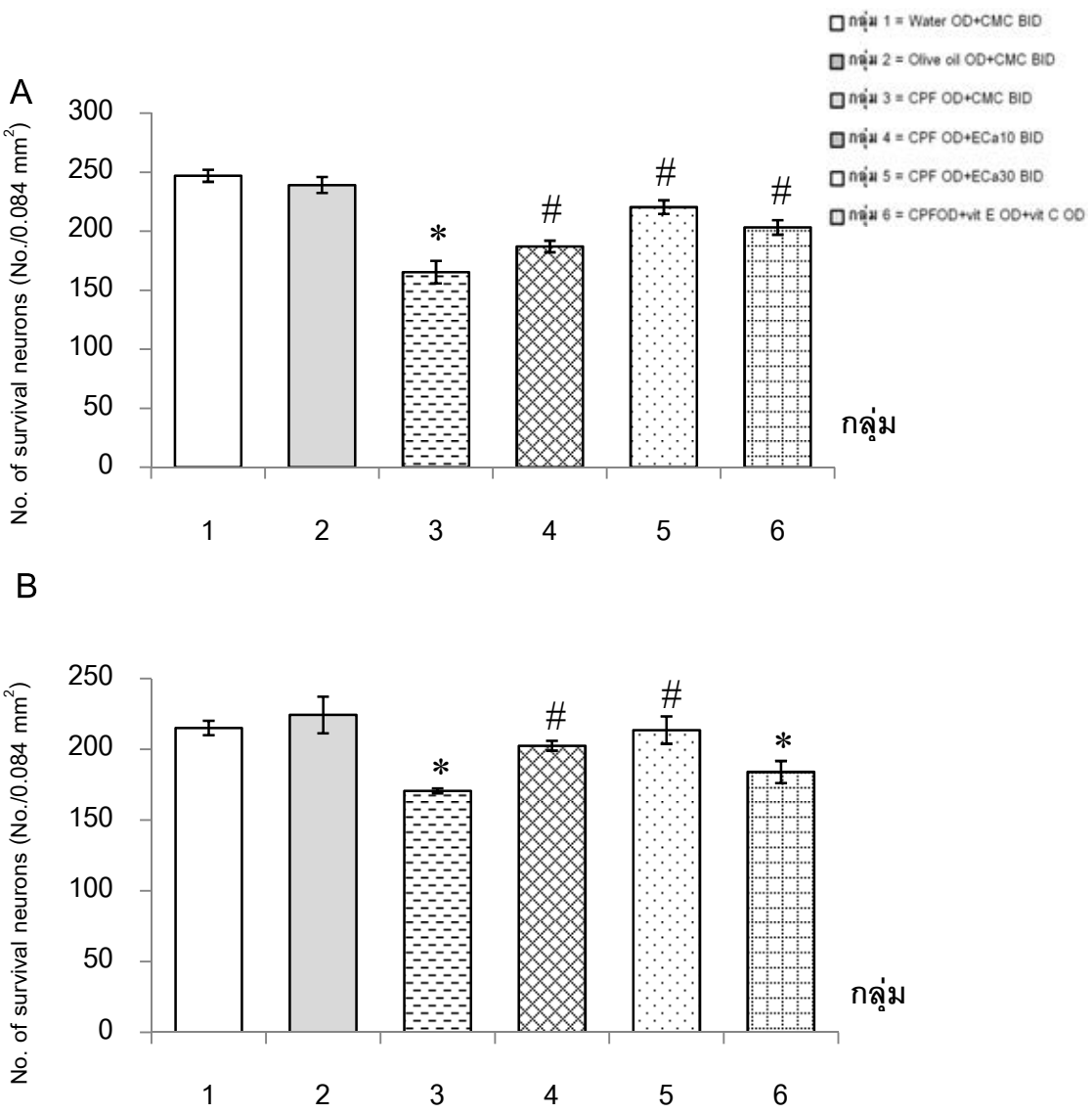
4.4.1 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาทในหนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 14 วัน

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) มีจำนวนเซลล์ประสาทที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้าง เท่ากับ 247.00 ± 5.11 และ 215.13 ± 5.11 เซลล์ ตามลำดับ ในขณะที่จำนวนเซลล์ประสาทดังกล่าวที่พบในหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) เท่ากับ 239.20 ± 6.78 และ 224.40 ± 12.93 เซลล์ ตามลำดับ โดยจำนวนเซลล์ที่นับได้ทั้ง 4 บริเวณ ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด

สำหรับการศึกษาผลของสารทดสอบต่ออัตราการตายของเซลล์ประสาทที่บริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างในหนูเมาส์ พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) มีจำนวนเซลล์ประสาทในบริเวณ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้างลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 2 โดยจำนวนเซลล์ประสาทในหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสที่บริเวณ CA1 และ CA3 เหลือเพียง 165.27 ± 9.56 และ 170.73 ± 1.69 เซลล์ ตามลำดับ เมื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 มก./กก. น้ำหนักตัว (กลุ่มที่4) และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว (กลุ่มที่ 5) และกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับวิตามินซีขนาด 100 มก./กก. น้ำหนักตัว และวิตามินอีขนาด 75 มก./กก. น้ำหนักตัว (กลุ่มที่ 6) พบว่า หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ทั้งสองขนาด และกลุ่มที่ได้รับวิตามินอีและซี มีจำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 มากกว่าที่พบในกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเพียงอย่างเดียว อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในขณะที่เมื่อศึกษาในบริเวณ CA3 กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 นั้น จะมีจำนวนเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเพียงอย่างเดียว แต่หนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับวิตามินอีและซี ไม่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์ประสาทแต่อย่างใด สำหรับจำนวนของเซลล์ประสาทที่บริเวณ CA1 ในหนูกลุ่มที่ 4 คือ 187.07 ± 4.93 กลุ่มที่ 5 คือ 220.40 ± 5.78 และกลุ่มที่ 6 คือ 203.20 ± 6.23 เซลล์ ตามลำดับ สำหรับจำนวนของเซลล์ประสาทใน CA3 กลุ่มที่ 4 คือ 202.60 ± 3.45 กลุ่มที่ 5 คือ 213.67 ± 9.67 และกลุ่มที่ 6 คือ 184.07 ± 7.79 เซลล์ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 30-31



ภาพที่ 30 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampus ในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน bar = 50 μm



ภาพที่ 31 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท บริเวณ CA1 (A) และ CA3 (B) ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampusในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 14 วัน โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 5) โดยกำหนดระดับความสำคัญที่

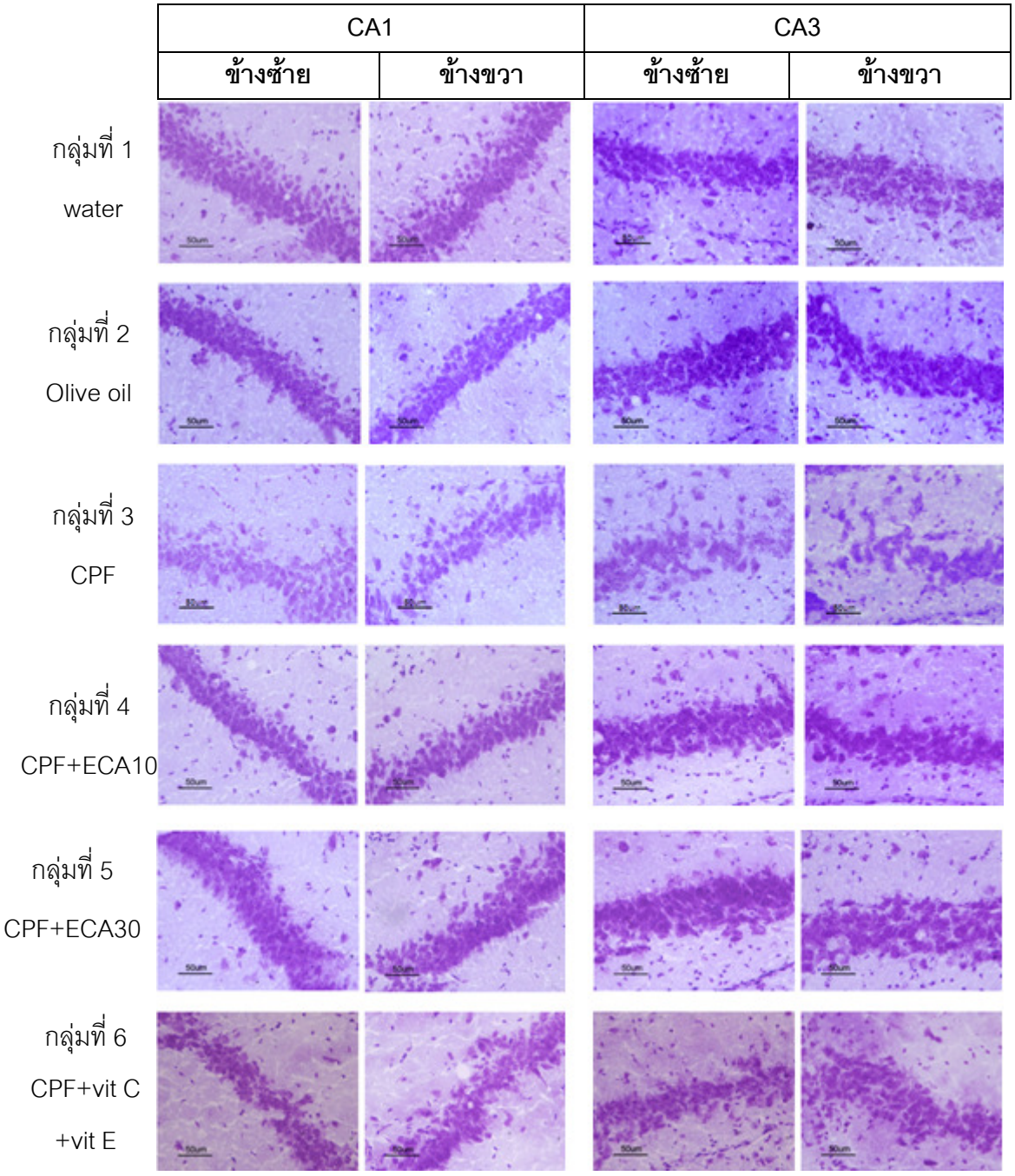
* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

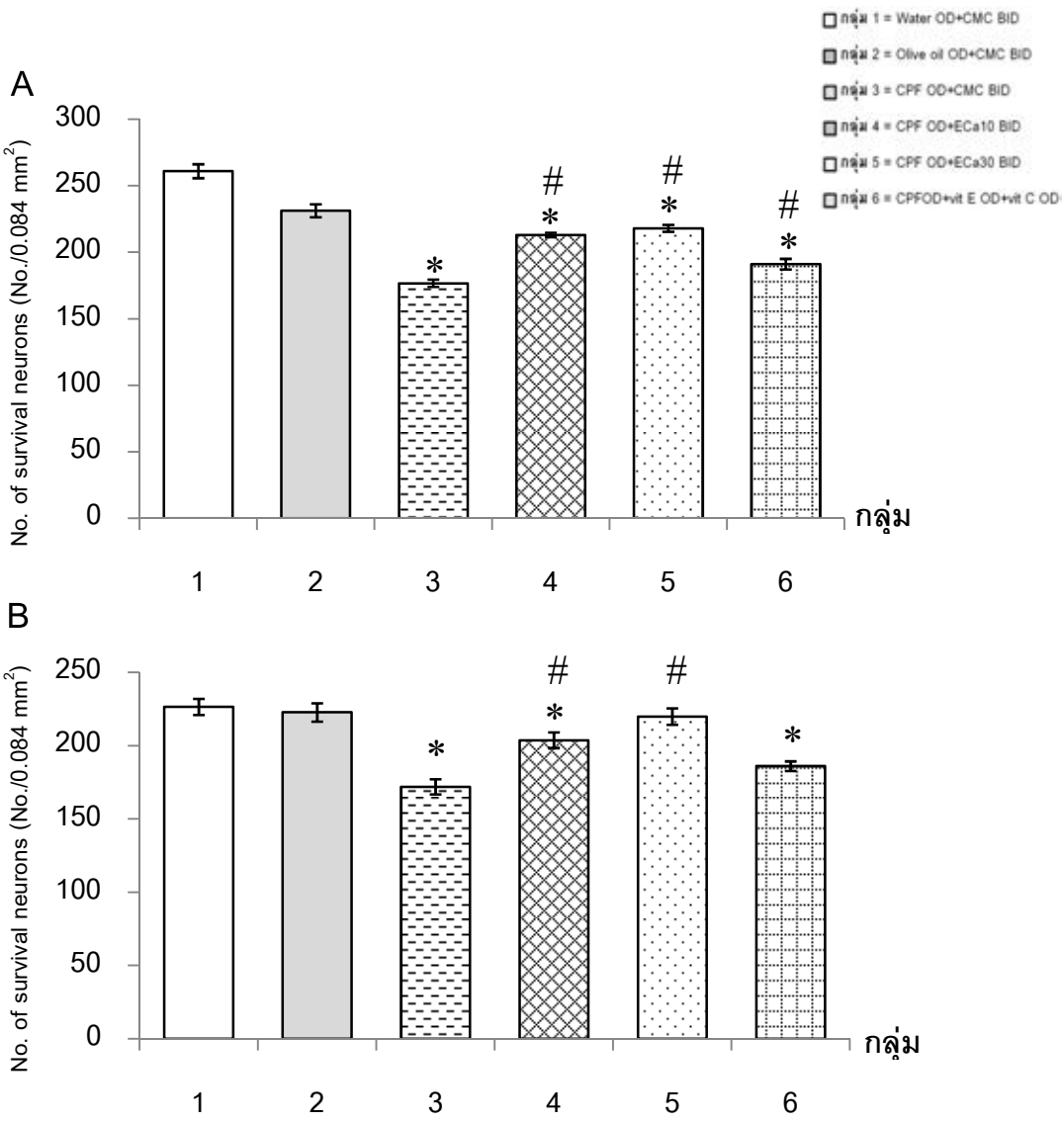
4.4.2 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาทในหนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 20 วัน

ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาทในหนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส เป็นเวลา 20 วัน จะสอดคล้องกับผลจากการได้รับคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 14 วัน ดังที่ได้กล่าวมาแล้ว กล่าวคือ จำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus ทั้งสองข้าง ในหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (กลุ่มที่ 1) เท่ากับ 260.93 ± 5.23 และ 226.53 ± 5.51 เซลล์ กลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2) เท่ากับ 231.27 ± 4.89 และ 222.73 ± 6.26 เซลล์ ตามลำดับ โดยผลดังกล่าวนี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด เมื่อศึกษาผลของคลอร์ไพริฟอสต่อจำนวนเซลล์ประสาทที่บริเวณนี้ พบว่า คลอร์ไพริฟอสมีผลทำให้จำนวนเซลล์ประสาทลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ประสาทในสมองหนูกลุ่มที่ 2ทั้ง 4 บริเวณดังกล่าวข้างต้น โดยจำนวนเซลล์ประสาทในสมองบริเวณ CA1 และ CA3 ในกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส มีค่าเท่ากับ 176.66 ± 2.73 และ 171.93 ± 5.15 เซลล์ ตามลำดับ

สำหรับผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อหนูเมาส์ที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสเป็นเวลา 20 วันนั้น พบว่า การให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ทั้งขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ทำให้จำนวนเซลล์ประสาทในสมองบริเวณ CA1 และ CA3 ของ hippocampus เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) โดยจำนวนเซลล์ประสาทในหนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ที่ CA1 และ CA3 ของสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 213.07 ± 1.58, 203.73 ± 5.34 และ 218.00 ± 2.56, 219.87 ± 5.59 เซลล์ ตามลำดับ อย่างไรก็ตาม เมื่อเปรียบเทียบผลของวิตามินซีกับวิตามินอีที่ให้ร่วมกับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 6) ที่บริเวณ CA1 และ CA3 กับหนูเมาส์กลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) พบว่า กลุ่มที่ 6 มีเซลล์ประสาทที่ CA1 เท่านั้นที่มีจำนวนมากกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยจำนวนเซลล์ประสาทในหนูเมาส์กลุ่มที่ 6 บริเวณ CA1 มีค่าเท่ากับ 191.06 ± 4.01 ในขณะที่จำนวนเซลล์ประสาทที่บริเวณ CA3 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 186.07 ± 3.28 เซลล์ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่อย่างใด สำหรับผลการทดลองแสดงไว้ในภาพที่ 32-33



ภาพที่ 32 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ (กำลังขยาย 400 เท่า) แสดงลักษณะของเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 และ CA3 ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampus ข้างขวา ในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 20 วัน bar = 50 μm



ภาพที่ 33 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อจำนวนเซลล์ประสาท บริเวณ CA1 (A) และ CA3 (B) ทั้งสองข้างของสมองส่วน hippocampusในหนูเมาส์กลุ่มต่าง ๆ ภายหลังการได้รับสารทดสอบเป็นระยะเวลา 20 วัน โดยผลการทดลองแสดงอยู่ในรูปค่าเฉลี่ย±ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) (n = 5) โดยกำหนดระดับความสำคัญที่

* มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอก (กลุ่มที่ 2)

\# มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $P < 0.05$, One-way ANOVA ตามด้วย LSD post hoc test เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

การวิจัยนี้ เป็นการศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยคลอร์ไพริฟอสในขนาดต่ำ เนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมา พบว่า การได้รับคลอร์ไพริฟอสปริมาณต่ำเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ โดยเฉพาะ superoxide anion (O^{2-}) ซึ่งส่งผลทำให้มีการทำงานของเซลล์ผิดปกติ โดยจะมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ, การเจริญเติบโตและการแบ่งตัวของเซลล์ประสาทในสมอง (cell differentiation and proliferation), รบกวนกระบวนการ axonogenesis ทำให้ระบบการขนส่งโปรตีนภายในเซลล์เกิดความผิดปกติ และเพิ่มระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Jett และคณะ, 2001; Schuh และคณะ, 2002; Garcia และคณะ, 2005) ทำให้เซลล์ประสาทเกิดการตายแบบ apoptosis (Abou-Donia M., 2005) ซึ่งอาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ โดยมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง เชื่อว่าน่าจะเกิดผ่านกลไกในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวกับกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนของเซลล์ (Caroline และคณะ, 1994a; Mehta และคณะ, 2009)

ในการศึกษานี้มีการประเมินพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลอง (behavioral model) ด้วยวิธี Morris Water Maze test และ Object Recognition Test สำหรับการทดสอบ Morris Water Maze เป็นการทดสอบพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำเกี่ยวกับสถานที่ (spatial memory) ของสัตว์ฟันแทะ (rodent) และมีความสัมพันธ์กับการทำงานของเซลล์สมองส่วน hippocampus (Buccafusco, 2009; Sharma, 2009) และสามารถนำไปประยุกต์ใช้กับการทดสอบการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับระบบประสาท เช่น หนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดโรค Alzheimer หรือหนูที่ทำให้เกิดภาวะสมองเสื่อมจากการถูกอุดกั้นเส้นโลหิตที่ไปเลี้ยงสมอง (stroke) เป็นต้น (D'Hooge และ Deyn, 2001) สำหรับการทดสอบ Object Recognition เป็นการทดสอบความจำระยะสั้น (short-term memory) หรือความจำเกี่ยวกับการปฏิบัติงาน (working memory) (Buccafusco, 2009) โดยอาศัยความสามารถในการจดจำวัตถุสิ่งของระหว่างวัตถุเก่า (familiar object) และวัตถุใหม่ (novel object) ซึ่งโดยปกติลักษณะนิสัยตามธรรมชาติของหนูเมาส์ จะให้ความสนใจและสำรวจวัตถุใหม่มากกว่าวัตถุเก่า (Raber และ Benice, 2006; Gaskin และคณะ, 2003) นอกจากนี้มีการทดสอบ locomotor activity test เป็นการศึกษาพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ เพื่อประเมินผลของสารทดสอบต่อระบบประสาทส่วนกลางที่ควบคุมการเคลื่อนไหว ซึ่งขนาดของคลอร์ไพริฟอสที่ใช้ในการทดลอง

ควรมีขนาดที่ต่ำเพียงพอที่จะเหนี่ยวนำให้หนูเมาส์เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้ และไม่มีผลกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง จนมีผลต่อการศึกษาพฤติกรรมของสัตว์ทดลอง อีกทั้งต้องไม่มีผลเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์ cholinesterase หรือไม่เกิดอาการ cholinergic symptom

การวิจัยนี้ สัตว์ทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยใช้คลอร์ไพริฟอสในขนาดต่ำ โดยเลือกหนูเมาส์มาใช้ในการทดสอบ เนื่องจากมีความไวต่อการเกิดพิษมากกว่าหนูแรทประมาณ 4.5 เท่า (Cometa และคณะ, 2007) จากผลการทดสอบความเป็นพิษของคลอร์ไพริฟอสพบว่า มีค่า LD_{50} เท่ากับ 175.65 (163.19-188.11) มก./กก. น้ำหนักตัว ซึ่งใกล้เคียงกับที่ WHO ได้รายงานไว้ก่อนหน้านี้ คือ 100 – 150 มก./กก. น้ำหนักตัว ดังนั้น จึงกำหนดขนาดของคลอร์ไพริฟอสที่จะนำมาใช้ในการทดสอบผลต่อการเรียนรู้และความจำเป็น 30 มก./กก. น้ำหนักตัว หรือ 1/6 ของค่า LD_{50} เพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการตายจากการได้รับคลอร์ไพริฟอสในขนาดสูง และมีรายงานมาก่อนหน้านี้ว่าคลอร์ไพริฟอส ในขนาดดังกล่าว เป็นขนาดที่ทำให้เกิดการบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้โดยไม่ทำให้สัตว์ทดลองตาย (sublethal dose) และไม่เกิดอาการ cholinergic symptom (Terry และคณะ 2002)

สำหรับการศึกษาผลของคลอร์ไพริฟอสต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำโดยการให้สารดังกล่าวในขนาด 30 มก./กก.น้ำหนักตัว ทางปากวันละครั้ง เป็นระยะเวลา 20 วัน (กลุ่มที่ 3) พบว่า หนูเมาส์มีการเรียนรู้และความจำลดลง สูญเสียความสามารถทั้งความจำแบบ non-spatial และ spatial โดยการทดสอบด้วยวิธี Object Recognition และ Morris Water Maze ตามลำดับ โดยความบกพร่องดังกล่าวสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ได้รับสาร ซึ่งจะเห็นได้จากการทดสอบ Object Recognition Test เปรียบเทียบระหว่างวันที่ 14 และ 20 ภายหลังการได้รับคลอร์ไพริฟอส จะเห็นได้ว่าค่า discrimination index มีแนวโน้มที่ลดลง ซึ่งให้ผลไปในทิศทางเดียวกับการทดสอบด้วยวิธี Morris Water Maze ที่ในช่วง 3 วันแรกของการทดสอบ คือ วันที่ 15-17 ภายหลังการได้รับสารทดสอบ ค่า escape latency มีแนวโน้มที่ลดลง แต่หลังจากนั้นกลับมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้น และเมื่อทำ probe trial ภายหลังการได้รับสารทดสอบ 20 วัน พบว่า หนูเมาส์ใช้เวลาในการว่ายน้ำใน quadrant ที่มีแท่นพักใต้น้ำอยู่เดิมเพียง 12.55 วินาที ซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1 และ 2) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (แสดงดังภาพที่ 24) แสดงให้เห็นว่าการได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำ ๆ อย่างต่อเนื่องสามารถทำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำได้ ซึ่งมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่หนูเมาส์ได้รับสาร

สำหรับผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำนั้น พบว่า เมื่อให้สารสกัดดังกล่าวในขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว (กลุ่มที่ 4 และ 5) พบว่า สามารถทำให้หนูเมาส์มีการเรียนรู้และความจำที่ดีขึ้น โดยดูจากค่า discrimination index ที่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทั้งในวันที่ 14 และ 20 ภายหลังการได้รับสารทดสอบ โดยการทดสอบด้วยวิธี Object Recognition นอกจากนี้ยังมีค่า escape latency ที่น้อยกว่ากลุ่มที่ 3 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่วันที่ 15 โดยการทดสอบด้วยวิธี Morris Water Maze แสดงให้เห็นว่า การได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 สามารถช่วยป้องกันภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดยคลอร์ไพริฟอสได้ การทดสอบดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา โดยเมื่อให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 แก่หนูเมาส์ ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ก่อนและหลังจากที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ โดยการฉีด β-amyloid peptide 25-35 ($A\beta_{25-35}$) เข้าสู่ช่องว่างในสมองของหนูเมาส์ (Kam-eg และคณะ, 2009) เป็นระยะเวลา 22 วัน หรือการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัว หลังจากทำการปิดกั้นหลอดเลือดคาโรติดชั่วคราวในหนูเมาส์ (T2VO) เป็นระยะเวลา 17 วัน (ยุทธพร สุขวิชัย, 2553) พบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 สามารถช่วยแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม โดยวิธีการทดสอบ Morris Water Maze

สำหรับการศึกษาผลของอนุมูลอิสระภายในสมอง จะใช้เนื้อเยื่อสมองส่วน cerebral cortex ของหนูเมาส์ โดยอาศัยหลักการวัดปริมาณ MDA ซึ่งเป็นผลผลิตสุดท้ายจากปฏิกิริยา lipid peroxidation ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาระหว่างอนุมูลอิสระกับผนังเซลล์ จากผลการทดลองพบว่า การได้รับคลอร์ไพริฟอสขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ทางปาก วันละ 1 ครั้ง เป็นระยะเวลา 20 วัน จะทำให้มีภาวะ oxidative stress เพิ่มสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 25) ผลดังกล่าวคาดว่าน่าจะเกิดจากการที่คลอร์ไพริฟอสมีฤทธิ์ลดระดับของ superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase และ glutathione-S-transferase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดอนุมูลอิสระ ทำให้มีปริมาณของอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ เป็นเหตุให้เกิดการทำลายของไขมัน โปรตีน และ ดีเอ็นเอ ซึ่งเป็นองค์ประกอบของเซลล์ ส่งผลให้เกิดการยับยั้งการทำงานและการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาทปกติ (Bas และ Kalender, 2011) นอกจากนี้ยังพบฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ATPase ต่าง ๆ ได้อีก เช่น Na/K-, Ca-, และ Mg-ATPase ส่งผลให้การแลกเปลี่ยนอิออนต่างๆ ภายในเซลล์เกิดความผิดปกติ ทำให้เกิดการหลั่งของสารสื่อประสาทที่ผิดปกติไป โดยมีผลกับสมองได้ทั้ง 3 บริเวณ คือ fore-brain, mid-brain และ hind-brain (Mehta และคณะ, 2005) ซึ่ง

สอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมาว่า การให้คลอร์ไพริฟอส โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อ (intramuscular) เป็นระยะเวลา 1 เดือน สามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของอนุมูลอิสระชนิดต่าง ๆ คือ hydrogen peroxide (H_2O_2) nitrate (NO_3^-) และ nitrite (NO_2^-) เป็นต้น และเกิดการสะสมอนุมูลอิสระภายในสมองได้ทั้ง 3 บริเวณเช่นเดียวกัน นอกจากนี้ยังสามารถพบการสะสมของอนุมูลอิสระที่บริเวณตับ และเนื้อเยื่ออื่น ๆ ได้ จนทำให้เกิดความเป็นพิษ และรบกวนการทำงานต่อเซลล์ปกติได้ (Mehta และคณะ, 2009) ซึ่งการให้สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. (กลุ่มที่ 4 และ 5) พบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ลดระดับอนุมูลอิสระภายในสมอง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) โดยอาจเกิดจากการที่สารสกัดบัวบกนั้นมีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ caspase 9 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทในการกระตุ้นให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ผ่านทางการยับยั้งการทำงานของ proapoptotic proteins เช่น p53, Bax และ Bad เป็นต้น (Omar และคณะ 2011) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ยังสามารถลดระดับอนุมูลอิสระได้ดีกว่ากลุ่มที่ได้รับร่วมกับวิตามินซีและวิตามินอี (กลุ่มที่ 6) ซึ่งอาจเกิดจากการที่วิตามินซี มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดี ทำให้การลดอนุมูลอิสระภายในสมองเกิดขึ้นได้น้อย เนื่องจากไม่สามารถผ่าน Blood Brain Barrier (BBB) ได้ ทำให้ประสิทธิภาพในการลดอนุมูลอิสระไม่ดีเท่าที่ควรจะเป็น ผลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาทางด้านพยาธิจุลกายวิภาคศาสตร์ของเนื้อเยื่อสมองส่วน hippocampus บริเวณ CA1 และ CA3 ซึ่งเป็นบริเวณที่มีความเกี่ยวข้องกับความจำ โดยการย้อมสีเนื้อเยื่อสมองด้วย 1% cresyl violet จะพบการตายของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับสารสกัดมาตรฐานบักบก อีซีเอ 233 (กลุ่มที่ 4 และ 5) น้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และช่วยปกป้องการตายของเซลล์ประสาทส่วน hippocampus ได้ ซึ่งจากการศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการทำงานของเซลล์ประสาทนั้น พบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 มีฤทธิ์เพิ่ม neurite outgrowth ของเซลล์ nuroblastoma ผ่านทาง AKT และ MEK pathway ซึ่งเป็น survival pathway ที่ช่วยเพิ่มความยาวและการแตกแขนงของ dendrite ให้กับเซลล์ประสาท(อรพรรณ วนขจรไกร, 2554) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Gadahad และคณะ (2008) เมื่อให้สารสกัดบัวบก 6 มล./กก. เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์แก่หนูแรท สามารถช่วยเพิ่มความยาวและการแตกแขนงของ dendrite ให้กับเซลล์ประสาทบริเวณ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ได้

สำหรับการทดสอบพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ (locomotor activity) จากการทดลอง เมื่อให้คลอร์ไพริฟอส 30 มก./กก. น้ำหนักตัว (กลุ่มที่ 3) พบว่า พฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์ ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 19) สำหรับความเป็น

พิษของคลอร์ไพริฟอส พบว่าอาการพิษที่เกิดขึ้นจะมีอาการทาง nicotinic เด่นกว่า muscarinic กล่าวคือ จะพบอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรงหรือเป็นอัมพาต (สมิง เก่าเจริญ และ ยุพา ลีลาพฤทธิ์, 2537) และทำให้มีพฤติกรรมการเคลื่อนไหวที่ลดลง ส่วนใหญ่จะพบอาการดังกล่าวภายหลังการได้รับคลอร์ไพริฟอสประมาณ 2-3 วัน แสดงให้เห็นว่าคลอร์ไพริฟอสมีฤทธิ์ในการยับยั้งระบบประสาทส่วนกลาง ทำให้พฤติกรรมการเคลื่อนไหวของสัตว์ทดลองลดลง ขณะที่การศึกษาในครั้งนี้ไม่พบผลดังกล่าว ทั้งนี้อาจเนื่องจากขนาดที่ใช้ในการทดลองคือ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว หรือ 1/6 LD_{50} อาจมีขนาดต่ำ ไม่ถึงระดับที่จะมีฤทธิ์ในการยับยั้งระบบประสาทส่วนกลาง และเมื่อให้ร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ขนาด 10 และ 30 มก./กก. น้ำหนักตัว ก็ไม่พบความเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์เช่นกัน (Kam-eg และคณะ, 2009; ยุทธพร สุขวิชัย, 2553) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลของสารสกัดบัวบกด้วยน้ำ (aqueous extract of *Centella asiatica*) ต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหว โดยให้ในขนาด 150 และ 300 มก./กก. น้ำหนักตัว ทางปากวันละครั้ง ภายหลังการเหนี่ยวนำให้เกิดการบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ โดยการฉีด colchicine เข้าช่องว่างในสมองของหนูตะเภา พบว่า สารสกัดบัวบกด้วยน้ำไม่ทำให้เกิดความผิดปกติต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูตะเภา (Kumar, 2009) แสดงให้เห็นว่า การได้รับคลอร์ไพริฟอสเดี่ยว ๆ ในการทดลองครั้งนี้ เป็นขนาดที่ทำให้เกิดการบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ โดยไม่ส่งผลต่อพฤติกรรมการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์แต่อย่างใด อีกทั้งการได้รับร่วมกับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ก็ไม่พบความผิดปกติของการเคลื่อนไหวของหนูเมาส์เช่นกัน

การตรวจวัดระดับเอนไซม์ cholinesterase เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าคลอร์ไพริฟอสเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphate ที่มีกลไกการเกิดพิษในการยับยั้งทั้งเอนไซม์ butyrylcholinesterase และ acetylcholinesterase โดยเฉพาะ butyrylcholinesterase ที่พบในพลาสมานั้น เป็นดัชนีที่มีความไวต่อการได้รับสารพิษในกลุ่ม organophosphate เป็นอย่างมาก กล่าวคือ จะมีระดับของเอนไซม์ลดต่ำลงอย่างรวดเร็ว เมื่อได้รับสารพิษ โดยเฉพาะการได้รับแบบเฉียบพลัน ส่วน acetylcholinesterase ที่พบในสมองและเม็ดเลือดแดง จะมีความสัมพันธ์กับลักษณะอาการทางคลินิกและการได้รับแบบเรื้อรังมากกว่า (สมิง เก่าเจริญ และ ยุพา ลีลาพฤทธิ์, 2537; Turabi และคณะ, 2007) ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ butyrylcholinesterase ในพลาสมา และ acetylcholinesterase ในสมองและเม็ดเลือดแดง ในกลุ่มที่ได้รับคลอร์ไพริฟอส (กลุ่มที่ 3-6) พบว่า ระดับการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดลดลง โดยให้ผลที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ 1 และ 2) ซึ่งผลการทดลองไม่เป็นไปอย่างที่ผู้วิจัย

คาดหวังไว้ ว่าการให้คลอร์ไพริฟอสขนาด 30 มก./กก. น้ำหนักตัว จะไม่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์ ที่เป็นเช่นนี้ อาจเนื่องมาจากช่วงพิสัยค่าปกติของเอนไซม์ทั้งสองชนิดทั้งในพลาสมาและเม็ดเลือดแดงนั้นกว้างมาก ถึงแม้ว่าจะมีระดับการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวลดลงจากค่าปกติ 50% แต่อาจไม่ทำให้เกิดอาการผิดปกติแต่อย่างใด (สมิง เก่าเจริญ และ ยุพา ลีลาพฤทธิ์, 2537) อีกทั้งจากการเฝ้าดูอาการตลอดระยะเวลาที่ได้รับคลอร์ไพริฟอสก็ไม่พบอาการ cholinergic symptom ของหนูเมาส์ เช่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง น้ำลายมาก กลั้นอุจจาระไม่ได้ หรือมีความผิดปกติของระบบทางเดินหายใจ เป็นต้น ซึ่งเป็นอาการแสดงที่บ่งบอกถึงการได้รับคลอร์ไพริฟอสเกินขนาดและส่งผลต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cholinesterase

จากการศึกษาวิจัยนี้ แสดงให้เห็นว่า การได้รับคลอร์ไพริฟอสในปริมาณต่ำ ๆ อย่างต่อเนื่อง จะทำให้มีระดับของ malondialdehyde ภายในสมอง เพิ่มขึ้น ที่อาจเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำ ซึ่งการได้รับสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ควบคู่ไปกับการได้รับคลอร์ไพริฟอสนั้น สามารถช่วยแก้ไขภาวะบกพร่องของการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ได้ โดยคาดว่ากลไกส่วนหนึ่งอาจจะเกิดผ่านการลดระดับอนุมูลอิสระ ที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดการตายของเซลล์สมองส่วน hippocampus ร่วมกับกลไกอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับการต้านออกซิเดชัน ดังนั้น ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมและหากลไกการออกฤทธิ์อื่นที่เกี่ยวข้องในระดับโมเลกุล เพื่อให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่สมบูรณ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 เพื่อพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์เสริมอาหารให้กับผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมต่อไป

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของกลุ่มที่ได้รับวิตามินซีและอี (กลุ่มที่ 6) ควรมีการศึกษาแบบแยกกลุ่มระหว่างกลุ่มที่ได้รับวิตามินซี และ อี เนื่องจากว่าวิตามินทั้งสองชนิดมีคุณสมบัติทางกายภาพที่แตกต่างกัน กล่าวคือ วิตามินอีละลายในไขมันได้ดี ขณะที่วิตามินซีละลายน้ำได้ดี ซึ่งวิตามินอี น่าจะผ่าน blood brain barrier เข้าไปมีฤทธิ์ลดอนุมูลอิสระภายในสมองได้ดีกว่า
2. นอกจากศึกษาการวัดระดับอนุมูลอิสระในสมองด้วยปฏิกิริยา lipid peroxidation แล้ว อาจศึกษาการออกฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และ glutathione peroxidase (GPx) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดอนุมูลอิสระ เพื่อทำให้ทราบว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 นั้นมีฤทธิ์ในการเพิ่มปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวในสมองหรือไม่

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

ไชยยง รุจจนเวท และ ดวงตา กาญจนโพธิ์. ๒๐ ปี สวนสมุนไพรสมเด็จพระเทพรัตนราชสุดาฯ สยามบรมราชกุมารี. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: เลิฟเอิร์ธ, 2552

ณัฐิยา ไกรวพันธุ์. Cholinergic drugs [ออนไลน์]. 2553. แหล่งที่มา: http://www.med.cmu.ac.th/dept/pharmaco/Pharmacology/Lession02/aboutus.htm[2554, ตุลาคม 16]

พาลาภ สิงหเสนี. พิษของยาฆ่าแมลงต่อผู้ใช้และสิ่งแวดล้อม. พิมพ์ครั้งที่ 4. กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2537.

เพ็ญนภา ทรัพย์เจริญ. ไม้ริมรั้ว สมุนไพรกับวัฒนธรรมไทย. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร: สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข, 2542.

มัฑนา กานต์ไกรศรี. ผลของบัวบกต่อการสมานแผลในหนูขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2548.

มยุรี ตันติสิระ, บุญยงค์ ตันติสิระ และ ทรงพล ชีวะพัฒน์. รายงาน " การศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันและความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบก" ในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องความเป็นพิษเฉียบพลันและความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังของสารสกัดมาตรฐานบัวบก คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและสถาบันวิจัยสมุนไพร กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์, 2551.

มยุรี ตันติสิระ, บุญยงค์ ตันติสิระ และ จุไรพร สมบุญวงศ์. รายงาน " การศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลและผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบกในโมเดลของสัตว์ทดลอง" ในรายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์เรื่องการศึกษาฤทธิ์ในการสมานแผลและผลต่อการเรียนรู้และความจำของสารสกัดมาตรฐานบัวบก คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2551

ยุทธพร สุขวิชัย. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ในภาวะปกติและภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 2553.

สุภัคภิรมย์. 97 สมุนไพรใกล้ตัว เสริมสุขภาพและความงาม. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: สำนักพิมพ์เครือเถา, 2550.

สมพร ภูติยานันต์. ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย ว่าด้วย สมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย. พิมพ์ครั้งที่ 4. เชียงใหม่: คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, 2546.

สมิง เก่าเจริญ และ ยุพา ลีลาพฤทธิ์. เกณฑ์มาตรฐานในการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับพิษจากสารเคมีกำจัดแมลง กลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมท ฉบับที่ 2. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา, 2537.

เอกรินทร์ สายฟ้า, สุวรรณา เหลืองชลธาร, ชำนาญ ภัตรพานิช และ รุทธ สุทธิศรี. การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางที่มีมาตรฐานจากสมุนไพรบัวบกสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม. ใน รายงานการวิจัยโครงการเรื่อง การวิจัยและพัฒนาผลิตภัณฑ์ยาและเครื่องสำอางที่มีมาตรฐานจากสมุนไพรบัวบกสู่การผลิตระดับอุตสาหกรรม, คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2549.

ภาษาอังกฤษ

Abou-Donia, M. Organophosphorus ester-induced chronic neurotoxicity. J Occup Health Safety-Aust NZ 21 (2005): 408-432.

Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Toxicological profile for chlorpyrifos [Online]. 1997. Available from : www.atsdr.cdc.gov/toxprofiles/tp84.

Pdf[2010, October 23]

Ambali, S. F., Akanbi, D. O., Shittu, M., Giwa, A., Oladipo, O. O., and Ayo, J. O. Chlorpyrifos-Induced Clinical, Hematological and Biochemical Changes in Swiss Albino Mice- Mitigating effect by co-administration of vitamins C and E. Life Science Journal 7 (2010): 37-44.

Amazing nature. Plants of the gods *Centella asiatica* [Online]. 1995. Available from : http://www.amazing-nature.com/-i-54.html[2011, October 13]

Askar, K. A., Kudi, A. C., and Moody, A. J. Comparison of Two StorageMethods for the Analysis of Cholinesterase Activities in Food Animals. Enzyme Research 10 (2010): 1-11.

Baddeley, A. D., Kopelman, M. D., and Wilson, B. A. The Essential Handbook of Memory Disorders for Clinicians. United Kingdom: John Wiley & Sons, 2004.

Bas, H., and Kalender, Y. Chlorpyrifos Induced Cardiotoxicity in Rats and the Protective Role of Quercetin and Catechin. Gazi University Journal of Science 24 (2011): 387-395.

Buccafusco, J. J. Methods of behavior analysis in neuroscience second edition. The United States of America: Tayler & Francis, 2009.

Caroline, C. Chlorpyrifos, part 1: Toxicology. Journal of pesticide reform 14 (1994): 15-20.

Caroline, C. Chlorpyrifos, part 2: Human exposure. Journal of pesticide reform 14 (1994): 14-20.

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

Cometa, M. F., Buratti, F. M., Fortuna, S., Lorenzini, P., Volpe, M. T., Parisi, L., Testai, E., and Meneguz, A. Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic metabolism by oral acute and repeated chlorpyrifos administration to mice. Toxicology 234 (2007): 90–102.

Dere, E., Huston, J. P., and 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.

D'Hooge, R. D., and Deyn, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and Memory. Brain Research Reviews 36 (2001): 60–90.

Drevenkar, V., Vasili, Z., Stengl, B., Frobe, Z., and Rumenjak, V. Chlorpyrifos metabolites in serum and urine of poisoned persons. Chem.-Biol. Interactions 87 (1993): 315-322.

Eaton, D. L., et al. Review of the Toxicology of Chlorpyrifos with an Emphasis on Human Exposure and Neurodevelopment. Critical Reviews in Toxicology 2 (2008): 1–125.

El-Hossary, G. G., Mansour, S. M., and Mohamed, A. S. Neurotoxic Effects of Chlorpyrifos and the Possible Protective Role of Antioxidant Supplements: an Experimental Study. Journal of Applied Sciences Research 5 (2009): 1218-1222.

Ellman, G. L., Courtney, K. D., Andres, V. J. R., and Feather-Stone, R. M. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochemical Pharmacology 7 (1961): 88–95.

Farkas, E., Institoris, A., Domoki, F., Mihaly, A., and Bari, F. The effect of pre-and post-treatment with diazoxide on the early phase of chronic cerebral hypoperfusion in the rat. Brain Research 1087 (2006): 168-174.

Fernando, C., Diana, C., Eva D., and Sa´nchez-Santed, F. Long-Term Neurotoxicity of Chlorpyrifos: Spatial Learning Impairment on Repeated Acquisition in a Water Maze. Toxicological sciences 85 (2005): 944–951.

Gadahad, M. R., Muddanna Rao, M., Rao, G. Enhancement of Hippocampal CA3 Neuronal Dendritic Arborization by *Centella asiatica* (Linn) Fresh Leaf Extract Treatment in Adult Rats. J Chin Med Assoc 71 (2008): 6-13.

Garcia, S. J., Seidler, F. J., and Slotkin, T. A. Developmental neurotoxicity of chlorpyrifos: targeting glial cells. Environmental Toxicology and Pharmacology 19 (2005): 455–461.

Gaskin, S., Tremblay, A., and Mumby, D. G.Retrograde and Anterograde Object Recognition in Rats With Hippocampal Lesions. Behav Neurosci 13 (2003): 1-8.

Gnanapragasama A., Ebenezara K. K., Sathisha, V., Govindarajub, P., and Devakia, T. Protective effect of *Centella asiatica* on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. Life Sciences 76 (2004): 585–597.

Gupta, Y.K., Veerendra, M.H., and Srivastava, A.K. Effect of *Centella asiatica* on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. Pharmacology, Biochemistry and Behavior 74 (2003): 579–585.

He, Z., Huang, L., Wu, Y., Wang, J., Wang, H., and Guo, L. DDPH: Improving cognitive deficits beyond its_1-adrenoceptor antagonism in chronic cerebral hypoperfused rats. European Journal of Pharmacology 588 (2008): 178-188.

Head's blog@NHGS. Forgetting! Techniques to improve your memory [Online]. 2010. Available from : http://www.nhgs.co.uk/blogs/headsblog/blog/default.aspx?id=97&t=FORGETTINGTECHNIQUES-TO-IMPROVE-YOUR-ME[2011,October 13]

Iyer, P., and Kaufman, F. Evidence on the developmental and reproductive toxicity of chlorpyrifos. Chlorpyrifos Hazard Identification Document (2008): 1-180.

Jett, D. A., Navoa, R. V., Beckles, R. A., and McLemore, G. L. Cognitive Function and Cholinergic Neurochemistry in Weanling Rats Exposed to Chlorpyrifos. Toxicology and Applied Pharmacology 174 (2001): 89–98.

Jiang, W., Duysen, E. G., Hansen, H., Shlyakhtenko, L., Schopfer, L. M., and Lockridge, O. Mice Treated with Chlorpyrifos or Chlorpyrifos Oxon Have Organophosphorylated Tubulin in the Brain and Disrupted Microtubule Structures, Suggesting a Role for Tubulin in Neurotoxicity Associated with Exposure to Organophosphorus Agents. Toxicological sciences 115 (2010): 183–193.

Jorge A. Quillfeldt. Behavioral Methods to Study Learning and Memory in Rats [Online]. 2006. Available from : http://ufrgs.br/ppgneuro/artigos/1 QuillfeldtjA BehavMethodsLearn& Memory2006.pdf[2010, December 9]

TL's Journey of Life. Part 4 : improving human memory [Online]. 2009. Available from : http://tlhung.blogspot.com/2010/03/part-4-improving-human-memory.html[2011, October 13].

Kam-eg, A., Tantisira, B., and Tantisira, M. H. Preliminary study on effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica*, ECa 233, on Deficit of Learning and Memory induced by an Intracerebroventricular Injection of β-Amyloid Peptide in Mice. Thai Journal of Pharmacology 31 (2009): 79-82.

Kandel, E. R., Kupfermann, I., and Iversen, S. Learning and memory. Principles of neuroscience, Newyork: McGraw-Hill, 2000.

Klein G. M., Rao R. B., and Nelsson, L.S. Emergency to organophosphorus poisoning. Disaster preparedness 7 (2008): 1-18.

Krupa, A. K. The Competitive Nature of Declarative and Nondeclarative Memory Systems: Converging Evidence from Animal and Human Brain Studies. The UCLA USJ 22 (2009): 39-46.

Kumar, A., Dogra, S., and Prakash, A. Neuroprotective Effects of *Centella asiatica* against Intracerebroventricular Colchicine-Induced Cognitive Impairment and Oxidative Stress. SAGE-Hindawi Access to Research International Journal of Alzheimer's Disease 8 (2009): 1-8.

Mattsson J. L., Wilmer, J. W., Shankar, M. R., Berdasco, N. M., Crissman, J. W., Maurissen, J. P., and Bond, D. M. Single-dose and 13-Week Repeated-Dose Neurotoxicity Screening Studies of Chlorpyrifos Insecticide. Food and Chemical Toxicology 34 (1996): 393-405.

Mehta, A., Verma, R. S., and Srivastava, N. Chlorpyrifos-induced alterations in rat brain acetylcholinesterase, lipid peroxidation and ATPase. Indian Journal of Biochemistry & Biophysics 42 (2005): 54–58.

Mehta, A, Verma, R. S., and Srivastava, N. Chlorpyrifos induced alterations in the levels of hydrogen peroxide, nitrate and nitrite in rat brain and liver. Pesticide Biochemistry and Physiology 94 (2009): 55–59.

Miller, L.C., and Tainter, M.L. Estimation of the LD_{50} and its error by means of logarithmic probit graph paper. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.) 57 (1944): 261-264.

Nolan, R. J., Rick, D. L., Freshour, N. L., and Saunders, J. H. Chlorpyrifos: Pharmacokinetics in Human Volunteers. Toxicology and applied pharmacology 73 (1984): 8- 15.

Omar, N.S., Zakaria1, Z. A., Then Sue Mian, T. S., Ngah, W. z, and Mazlan, M. C*entella asiatica* modulates neuron cell survival by altering caspase-9 pathway. Journal of Medicinal Plants Research 5 (2011): 2201-2109.

Oyedeji, O.A., and Afolayan, A.J. Comparative study of the essential oil composition and antimicrobial activity of *Leonotis leonurus* and L. ocymifolia in the Eastern Cape, South Africa. South African Journal of Botany 71 (2005): 114-116.

Purves, D., Brannon, E. M., Cabeza, R., Huettel, S. A., LaBar, K. S., Platt, M. L., and Woldorff, M. Declarative memory. Principles of Cognitive Neuroscience (2008): 353-378.

Raber, J., and Benice, T. Using EthoVision XT for studying object recognition in mice. Noldus information technology News 13 (2006): 1-2.

Race, E., and Verfaellie, M. Amnesia and the Brain. The United States of America: Elsevier, 2011.

Rao, K. S., Patil, P. A., and Malur, P. R. Promotion of cutaneous wound healing by famotidine in Wistar rats. Indian J Med Res 125 (2007): 149-154.

Rosa, R. D., *et al*. Intranasal administration of nerve growth factor (NGF) rescues recognition memory deficits in AD11 anti-NGF transgenic mice. Neuroscience 8 (2005): 3811-3816.

Ruengprasertkit, C., Hongprasong, N., Tantisira, B., and Tantisira, M. H. Preliminary study of effects of a standardized extract of *Centella asiatica* ECa 233 on minor aphthous ulcers. CU Dent J. 33 (2010): 131-142.

Sampson, J. H., Raman, A., Karlsen, G., Navsaria, H., and Leigh, I. M. In vitro keratinocyte antiproliferant effect of *Centella asiatica* extract and triterpenoid saponins. Phytomedicine 8 (2001): 230–235.

Saulsbury, M. D., Heyliger, S. O., Wang, K., and Johnson, D. J. Chlorpyrifos induces oxidative stress in oligodendrocyte progenitor cells. Toxicology 259 (2009) 1–9.

Schuh, R. A., Lein, P. J., Beckles, R. A., and Jett, D. A. Noncholinesterase Mechanisms of Chlorpyrifos Neurotoxicity: Altered Phosphorylation of Ca^{2+}/cAMP Response Element Binding Protein in Cultured Neurons. Toxicology and Applied Pharmacology 182 (2002): 176–185.

Sharma, V. K. Morris Water Maze – a versatile cognitive tool. J Biosci Tech 1 (2009): 15-19.

Shukla, A., Rasik, A.M., Jain, G. K., Shankar, R., Kulshrestha, D. K., and Dhawan, B. N. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolated from *Centella asiatica.* Journal of Ethnopharmacology 65 (1999): 1–11.

Slotkin, T. A., MacKillop, E. A., Ryde, I. T., and Seidler, F. J. Ameliorating the Developmental Neurotoxicity of Chlorpyrifos: A Mechanisms-Based Approach in PC12 Cells. Environ Health Perspect 115 (2007): 1306-1313.

Sutherland, R. J., *et al*. Retrograde Amnesia After Hippocampal Damage: Recent vs. Remote Memories in Two Tasks. HIPPOCAMPUS 11 (2001): 27–42.

Tanintaraard, H., Tantisira, M., and Tantisira, B. Preliminary study of healing effects of ECa 233, standardized extract of *Centella asiatica* , on incision wound in rats. The 35th Congress on Scirnce and Technology of Thailand (2009): 15-17.

Terry, A. V., Stone, J. D., Buccafusco, J. J., Sickles, D. W., Sood, A., and Prendergast, M. A. Repeated Exposures to Subthreshold Doses of Chlorpyrifos in Rats: Hippocampal Damage, Impaired Axonal Transport, and Deficits in Spatial Learning. The Journal OF Phamacology and Experimental Therapeutics 305 (2002): 375-384.

The National Registration Authority (NRA). The NRA Review of Chlorpyrifos. National Registration Authority for Agricultural and Veterinary Chemicals (2000): 1-98.

Trance plants natural products and incenses. Medicinal Herbs. [Online]. 2009. Available from : http://www.tranceplants.net/product-info.php?pid181.html[2011, October13]

Turabi, A., *et al.* Evaluation of suspected chronic pesticide poisoning among residents near agriculture fields. Biomedica 23 (2007): 76-82.

Wannarat, K., Tantisira M. H., and Tantisira B. Wound Healing Effects of a Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa 233 on Burn Wound in Rats. Thai J Pharmacol 31 (2009): 120-123.

Wattanathorn, J., Mator, L., Muchimapura, S., Tongun, T., Pasuriwong, O., Piyawatkul, N., Yimtae, K., Sripanidkulchai, B., and Singkhoraard, J. Positive modulation of cognition and mood in the healthy elderly volunteer following the administration of *Centella asiatica*. Journal of Ethnopharmacology 116 (2008): 325–332.

World Health Organization. Chlorpyrifos in Drinking-water. Background document for development of WHO Guidelines for Drinking-water Quality (2004): 1-6.

World Health Organization. CHLORPYRIFOS (*O,O*-diethyl *O*-3,5,6-trichloro-2-pyridyl phosphorothioate). WHO Specifications and evaluations for public health pesticides chlorpyrifos (2009): 1-47.

Yang, D., Howard, A., Bruun, D., Ajua-Alemanj, M., Pickart, C., and Lein, P. J. Chlorpyrifos and chlorpyrifos-oxon inhibit axonal growth by interfering with the morphogenic activity of acetylcholinesterase. Toxicology and Applied Pharmacology 228 (2008): 32–41.

Yun, K. J., *et al.* Inhibition of LPS-induced NO and PGE2 production by asiatic acid via NF-kappa B inactivation in RAW 264.7 macrophages: possible involvement of the IKK and MAPK pathways. International Immunopharmacology 8 (2008): 431–441.

ภาคผนวก

Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval	☐ Original ☐ Renew
Animal Use Protocol No. 11-33-013	**Approval No. 11-33-013**
Protocol Title Effects of standardized *Centella asiatica* extract ECa233 on learning and memory deficit induced by low dose chlorpyrifos in mice	
Principal Investigator Mayuree Tantisira, Ph.D.	
Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.	
Date of Approval 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)
The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals. *This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.*	

ที่ ศธ ๐๕๑๓.๑๑๕๐๓/๒๗๑๓

บัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ตู้ ปณ.๑๑๐๕ ปทฝ. เกษตรศาสตร์
จตุจักร กรุงเทพฯ ๑๐๙๐๓

๒๗ กันยายน ๒๕๕๔

เรื่อง ขอเชิญเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒๒

เรียน นายสิทธิพงษ์ กนกวรรณจำรัส

สิ่งที่ส่งมาด้วย ข้อปฏิบัติสำหรับผู้ที่ผ่านการพิจารณาการนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒๒

ตามที่ท่านได้ให้ความสนใจเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒๒ ในระหว่างวันที่ ๖-๗ ตุลาคม ๒๕๕๔ ณ อาคารวชิรานุสรณ์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ นั้น

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ มีความยินดีที่จะแจ้งให้ท่านทราบว่า ผลงานของท่านผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิเรียบร้อยแล้ว จึงขอเชิญท่านเข้าร่วมเสนอผลงานภาคโปสเตอร์ในเรื่อง **"ผลของคลอร์ไพริฟอสขนาดต่ำต่อความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์"** ตามวัน เวลาและสถานที่ดังกล่าว และขอให้ท่านดำเนินการตามข้อปฏิบัติที่แนบมาพร้อมนี้

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

ขอแสดงความนับถือ

(รองศาสตราจารย์ ดร.กัญจนา ธีระกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
โทร. ๐-๒๙๔๒-๘๔๔๕ ต่อ ๒๐๗-๒๐๘
โทรสาร ๐-๒๙๔๒-๘๔๔๕ ต่อ ๒๓๖

Abstracts
The 2nd National Graduate Research Conference
6-7 Oct 2011
Kasetsart University
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทร.0-2942-8445-50
E-mail: fgra@ku.ac.th / website: www.grad.ku.ac.th

ที่ประชุมคณะผู้บริหารบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยของรัฐ และ มหาวิทยาลัยในกำกับของรัฐ (ทคบร.) และ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ขอมอบเกียรติบัตรฉบับนี้ไว้เพื่อแสดงว่า

นายสิทธิพงษ์ กนกวรรณจำรัส

ได้นำเสนอผลงานวิจัย แบบโปสเตอร์

ในการประชุมนำเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ ๒๒

ให้ไว้ ณ วันที่ ๖-๗ ตุลาคม ๒๕๕๔

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.คนึงนิจ ภู่พัฒน์วิบูลย์)
ประธานที่ประชุมคณะผู้บริหารบัณฑิตศึกษามหาวิทยาลัยของรัฐ
และมหาวิทยาลัยในกำกับของรัฐ (ทคบร.)

(รองศาสตราจารย์ ดร.กัญจนา ธีระกุล)
คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

Effects of low dose chlorpyrifos on learning and memory ability in mice

Sitthipong Kanokewanjumrus [1*], Mayuree H. Tantisira [2], Boonyong Tantisira [2]

1) Student in Master degree program in pharmacology, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

2)Advisor, Lecturer, Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand 10330

* Presenting Author

Introduction

Thailand is an agricultural country in which pesticides are extensively and wildly used while a large proportion of people involved are unaware of its toxicity especially those caused by low dose exposure (1). Chlorpyrifos (CPF) is one of organophosphate insecticides used for crop protection and pest control. CPF inhibits acetylcholinesterase (AchE) that breaks down acetylcholine (Ach) resulting in an accumulation of Ach at synaptic clef which could fatal in large dose exposure. Sign of overcholinergic over stimulation such as nausea, vomiting, miosis, diarrhea, bronchoconstriction, lacrimation, muscle fasciculation and respiratory paralysis could be easily recognized whereas health deterioration due to low dose and persistent exposure is mostly overlooked (2). Persistent low level exposure to CPF has been reported to inhibit axonogenesis and proliferation of neuronal cells causing neuronal dysfunction (3-4). Thus, the present study aimed to investigate the effect of low dose exposure of chlorpyrifos on ability to learn and memorize in experimental animals.

Objective

To investigate the effects of low dose chlorpyrifos on learning and memory ability in mice.

Materials and Methods

Animals

Male ICR mice, 4-weeks old were purchased from National Laboratory Animal Center, Salaya, Nakornpathom Province, Thailand. After acclimatization, the animals were randomly divided into three groups as followed ; group I : mice receiving water, group II : mice receiving olive oil and group III : mice receiving CPF 30 mg/kg B.W.

Morris water maze (MWM)

MWM is the most common behavioral task used to determine spatial learning and memory deficit because it is specific with hippocampus damage (5). The test consisted of 120 cm. diameter circular pool which is filled with 15 cm depth of the water. The pool was divided into four equal quadrants with the hidden platform, was placed 1 cm below the water surface, located in the centre of quadrant 1 (Figure 1). In trial phase, mice of each group were placed in a pool from four different startitime 60 sec). This was tested for 5 consecutive days on day 15-19 following administration of CPF 30 mg/kg once daily via oral gavazed. The escape latency was recorded. For probe trial on day 20, the hidden platform was removed from the pool and each mice were allowed to swim ng quadrant points in order to find the platform (maximum for 60 sec. Time spent in quadrant 1 was recorded.

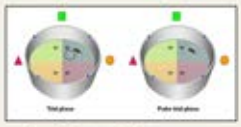


Figure 1 Equipment for Morris water maze test

Locomotor activity

Locomotor activity was monitored to evaluate motor dysfunction. Each mice were placed in a locomotor cage and behavioral change was observed on day 13 following administration of CPF 30 mg/kg once daily. The number of movements were recorded for 10 minutes and expressed as counts per 10 minutes (6).

Experimental protocol

Acute toxicity test was carried out in 5 groups of mice with 10 mice in each. CPF at the doses between 150-230 mg/kg was orally administered. The mortality rate of mice was observed for 14 days and the LD_{50} was then calculated . Then CPF 30 mg/kg (1/6 of LD_{50}) which is dissolved in olive oil (2 ml/kg gavage volume), was orally given once daily for 20 consecutive days. Learning and memory was assessed by Locomotor activity and Morris water maze (MWM) test during day 15-19 (Figure 2).

Figure 2 Experimental design

Statistical analysis

All data was expressed as mean ± S.E.M (n = 8-10). Statistical comparisons were analyzed using ANOVA followed by LSD for *post hoc* test. The significance of differences was considered $p < 0.05$.

Results

In acute toxicity test, sign of cholinergic symptoms such as salivation, lacrimation, urination and defecation was noted in mice receiving CPF at the dose between 150-230 mg/kg. LD_{50} of CPF in mice was found to be 175.65 (163.19-188.11) mg/kg (Figure 3).

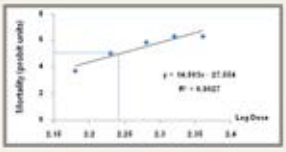


Figure 3 Log dose-response curves of CPF on acute toxicity (lethality) in mice

As shown in Figure 4, CPF-treated group had demonstrated significantly higher escape latency (50.00 ± 3.35 sec) than those of water- (22.00 ± 3.04 sec) and olive oil-treated group (20.59 ± 5.24 sec) in day 20.

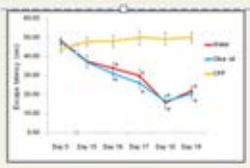


Figure 4 Effects of CPF on learning and memory in trial phase of MWM

Accordingly in probe trial on day 20, CPE-treated group significantly spent shorter time (11.38 ± 1.94 sec) in the quadrant where the platform was removed than those exhibited by water- (21.25 ± 2.55 sec) and olive oil-treated group (22.00 ± 1.59 sec) (Figure 5).

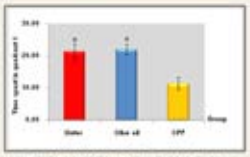


Figure 5 Effects of CPF on learning and memory in probe trial phase of MWM

In locomotor activity test, the mean total counts per 10 minute of locomotor activity of each group showed no statistical significance among different groups (Figure 6).

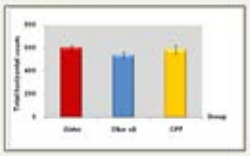


Figure 6 The effects of CPF on total horizontal counts of locomotor activity in mice

Discussion and conclusion

Based on the results obtained, the LD_{50} of CPF was found to be 176.97 (163.19-188.11) mg/kg which is consistent with the information from World Health Organization 2004. Therefore, the dose of CPF 30 mg/kg (1/6 of LD50) which has been reported not to exert significant inhibition of AChE (2),was used to examine learning and memory.

In MWM test, CPF-treated group demonstrated significantly higher escape latency than those of control group in trial phase. Accordingly in probe trial, they spent shorter in the quadrant formerly equipped with platform, than those exhibited by control group and these effects were not affected by locomotor activity indicating that low dose of CPF (30 mg/kg) could lead to impairment of spatial learning and memory. It has been reported that persistent low-level exposure to chlorpyrifos generated reactive oxygen species (ROS) through a reduction of glutathione peroxidase and glutathione-S-transferase which are the enzyme that helps to eliminate reactive oxygen species (7) resulting in inhibition of differentiation and proliferation of neuronal cells and destroy lipid, protein, DNA attributed to neuronal dysfunction (2-3).

The present study suggested that persistent exposure of low dose CPF could lead to deficit of spatial learning and memory in mice probably through an increment of reactive oxygen species in the brain. Studies on mechanism of learning and memory deficit and its treatment should be further carried out.

References

1. Costa, M. F., Barreti, F. M., Fortuna, S., Lorenzini, P., Volpe, M. T., Parisi, L., Terzo, E., and Mosconi, A. Cholinesterase inhibition and alterations of hepatic xenobiotic-metabolizing enzymes after chlorpyrifos administration to adult rats. Toxicology 234 (2007): 95–102.
2. Jett, D. A., Navoa, R. V., Buckley, B. A., and McLemore, G. L. Cognitive Function and Cholinergic Neurochemistry in Weanling Rats Exposed to Chlorpyrifos. Toxicology and Applied Pharmacology 174 (2001): 39–50.
3. Schuh, R. A., Lein, P. J., Beckles, R. A., and Jett D. A. Noncholinesterase Mechanisms of Chlorpyrifos Neurotoxicity: Altered Phosphorylation of Ca2+/cAMP-Response Element Binding Protein in Cultured Neurons. Toxicology and Applied Pharmacology 182 (2002): 176–185.
4. El-Hossary, G. G., Ahmadour, S. M., and Mohamed, A. S. Neurotoxic Effects of Chlorpyrifos and the Possible Protective Role of Antioxidant Supplements. Experimental Toxicologic Pathology 57 (2006): 1213–1222.
5. D' Hooge, R., and Deyn, P. P. Applications of the Morris water maze in the study of learning and memory. Brain Research Review 36 (2001): 60–90.
6. Gupta, Y.K., Veerendra Kumar, M.H., and Srivastava, A.K. Effect of Centella asiatica on pentylenetetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. Pharmacology Biochemistry and Behavior 74 (2003): 579–585.
7. Ince, H., and Kismeter, V. Chlorpyrifos Induced Cardiotoxicity in Rats and the Protective Role of Quercetin and Catechin. Gazi University Journal of Science 24 (2011): 387-395.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นายสิทธิพงษ์ กนกวรรณจำรัส เกิดเมื่อวันที่ 18 มกราคม พ.ศ.2522 จังหวัดกรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เมื่อปีการศึกษา 2543 และได้ศึกษาต่อในระดับปริญญาโทหลักสูตรเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2552

ประวัติการทำงาน

2544-2546 ฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลแหลมงอบ อำเภอแหลมงอบ จังหวัดตราด

2546-ปัจจุบัน กลุ่มงานเภสัชกรรม คณะแพทยศาสตร์กรุงเทพมหานครและวชิรพยาบาล มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช

ผลงานเผยแพร่ทางวิชาการ

นำเสนอผลงานวิจัย เรื่อง “Effects of low dose chlorpyrifos on learning and memory ability in mice” ในการประชุมเสนอผลงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาแห่งชาติ ครั้งที่ 22 (The 22nd National Graduate Research Conference) ระหว่างวันที่ 6-7 ตุลาคม พ.ศ.2554 ณ อาคารวชิรานุสรณ์ คณะเกษตร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน