



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์



โครงการ

ผลของข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนเบรนต์ไรว์นิวโรโทรฟิกแฟคเตอร์ เซลล์ประสาทใน
สมองส่วนฮิปโปแคมปัสและเซลล์ตับของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง

Effects of pre-germinated brown rice diet on hippocampal brain-derived neurotrophic
factor, neuronal cell and liver cell in amnesic rats

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนครสวรรค์
โครงการวิจัย 0.5 ส.ค. 2564
เลขหนังสือ 1034/ก 5
เลขเรียกหนังสือ จ 70
425

.133
03/96
2561

โดย ผศ.ดร.อรรณี คงสมบัติ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนครสวรรค์

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ ในการอนุเคราะห์การใช้เครื่องมือ สถานที่ในการทำการทดลอง นอกจากนี้ขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรในการให้ทุนในการทำวิจัยสำหรับการศึกษาในครั้งนี้

ผศ.ดร. อรรระวี คงสมบัติ
หัวหน้าโครงการวิจัย



สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	3
ความสำคัญและที่มาของปัญหา	3
วัตถุประสงค์	4
ขอบเขตของการวิจัย	4
ทฤษฎี สมมติฐาน	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
<hr/>	
บททวนเอกสาร	5
ข้าวกล้องอก	5
Amyloid β -peptide	5
Brain-derived neurotrophic factor	6
ระเบียบวิธีวิจัย	7
สัตว์ทดลอง	7
ชิ้นเนื้อ	7
การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus ด้วยวิธี western blotting	8
การตรวจชิ้นเนื้อสมองทาง histological examination	9
สรุปวิเคราะห์ผล	9
ผลการวิจัย	
การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีนBDNF ในสมองส่วน hippocampus	10
การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของสมองบริเวณ Hippocampus	11
การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย	12
บรรณานุกรม	13

บทคัดย่อ

บทนำ ข้าวกล้องงอกคือ ข้าวกล้องที่ผ่านการแช่น้ำเพื่อกระตุ้นให้เกิดการงอก โดยข้าวกล้องงอกมีสารสำคัญ เช่น กรดอะมิโนบิวทริกหรือกาบา สารแกมมาออริซานอล และไขมันที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพอื่น ๆ ข้าวกล้องงอกมีสารกาบา มากกว่าข้าวที่ไม่ผ่านการเพาะงอก 15 เท่า มีรายงานการศึกษาว่าข้าวกล้องงอกสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วยสารตะกั่วและป้องกันการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทรวมถึงการเรียนรู้และความจำบกพร่องจากการเหนี่ยวนำด้วยสารอะไมลอยด์บีตาในหนูแรทที่กำลังเจริญเติบโต

วัตถุประสงค์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของข้าวกล้องงอกต่อการเรียนรู้และความจำ ในหนูกลุ่มดังกล่าว โดยวัดระดับโปรตีน BDNF และการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท

วิธีการทดลอง

หนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Wistar rats แบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม ในการศึกษาหนูทดลองจะได้รับอาหารควบคุม ข้าวกล้องและข้าวกล้องงอก 4 สัปดาห์ และได้รับการฉีดอะไมลอยด์บีตา 25-35 เปปไทด์ 15 ไมโครลิตรเข้าไปในโพรงสมองในวันที่ 22 หลังจากนั้นจะทำให้ตายอย่างสงบและนำชิ้นเนื้อสมองไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และนับจำนวนเซลล์ประสาทที่ยังมีชีวิตด้วยวิธีจุลกายวิภาคศาสตร์ เนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผลการวิจัย

พบว่าหนูกลุ่มที่ถูกชักนำด้วยสารอะไมลอยด์บีตา 25-35 เปปไทด์ มีการลดลงของโปรตีน BDNF และจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ในขณะที่ข้าวกล้องงอกไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus และข้าวกล้องงอกยังช่วยรักษาจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิตให้เทียบเท่ากับในหนูแรทปกติอีกด้วย

สรุปผลการทดลอง

ข้าวกล้องงอกมีประสิทธิภาพในการป้องกันภาวะความจำบกพร่อง โดยช่วยรักษาจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิตในสมองส่วน hippocampus ให้เทียบเท่ากับในหนูแรทปกติ

คำสำคัญ: อะไมลอยด์ บีตา 25-35 เปปไทด์ การเรียนรู้และความจำ ข้าวกล้องงอก

Abstract

Introduction: Pre-germinated brown rice (PGR) is a brown rice that has been soaked in water to initiate pre-germination. Important nutrients in GBGR are γ -aminobutyric acid (GABA), γ -oryzanol, and other bioactive lipids. GABA concentrations in GBGR are more than 15 times greater than in non-germinated rice. PGR has been reported to have neuroprotective effects in developing rats against the accumulation of lead and protects against neuronal cell loss and memory deficits.

Objectives: We therefore investigated the effects and protective mechanisms of PGR against $A\beta_{25-35}$ peptide induced neurotoxicity in rats.

Methods: Adult female Wistar rats were divided into five groups and were fed with control, BGR, and GBGR diets 4 weeks. They were injected intraventricularly with 15 μ l of aggregate $A\beta_{25-35}$ peptides on day 22. The alterations of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) protein and the neuronal viability were counted by histological techniques.

Results: The results obtained from western blot analysis revealed that a significant decrease in BDNF was observed in hippocampus in $A\beta_{25-35}$ peptides induced toxicity. PGR could improve hippocampal neuronal viability to control group whereas had not affect on BDNF level.

Conclusion: It can be concluded that PGR has a potential role to protect against memory deficits by restore neuronal damage induced by $A\beta_{25-35}$ peptides.

Keywords: $A\beta_{25-35}$ peptide; learning and memory; GABA; pre-germinated brown rice

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ปี ค.ศ. 2010 ที่ผ่านมา ยอดผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมทั่วโลกมีประมาณ 35.6 ล้านคน โดยพบผู้ป่วยรายใหม่ 7.7 ล้านคนต่อปี และคาดการณ์ว่าภายในปี ค.ศ. 2030 จะมีผู้ป่วยที่มีภาวะสมองเสื่อมทั่วโลกประมาณ 67.5 ล้านคน (World Alzheimer Report 2011) ส่วนในประเทศไทยในปี ค.ศ. 2050 กระทรวงสาธารณสุขได้เคยคาดการณ์จำนวนผู้ป่วยภาวะสมองเสื่อมในประเทศไทยไว้ว่า มีจำนวนประมาณ 1,200,000 คน ตามลำดับ และได้ประมาณการจำนวนผู้ป่วยรายใหม่จะเพิ่มสูงขึ้นเป็น 377,000 คนต่อปี ในปี ค.ศ. 2050 (อรพิชญา และสิริธร 2548) จะเห็นได้ว่าในสังคมปัจจุบันจะมีผู้สูงอายุมีจำนวนที่เพิ่มขึ้น และมีสุขภาพที่ดีขึ้นจากการดูแลตนเองทั้งทางร่างกายและจิตใจ อาหารเสริมนับเป็นผลิตภัณฑ์ที่มีอัตราการเติบโตในตลาดเพิ่มขึ้นทุกวัน ข้าวกล้องงอกอาจเป็นอีกทางเลือกหนึ่งของผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพของผู้สูงอายุหรือบุคคลทั่วไป

จากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มพบว่าข้าวกล้องงอกสามารถที่จะช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย beta-amyloid peptides ข้าวกล้องงอก (pre-germinated brown rice หรือ “GABA-rice”) คือข้าวกล้องที่ถูกนำมาผ่านการงอก โดยอาศัยส่วนของจมูกข้าวที่ยังคงมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการงอก (Shoichi, 2004) โดยปกติแล้วในตัวข้าวกล้องเองประกอบด้วยสารอาหารที่มีคุณค่าจำนวนมาก เช่น โยอาหารกรดไฟติก (Phytic acid) วิตามินซี วิตามินอี สารกาบา (gammaaminobutyric acid , GABA) (Champagne et al., 2004) ซึ่งช่วยป้องกันโรคต่างๆ เช่น โรคมะเร็ง โรคเบาหวาน และช่วยในการควบคุมน้ำหนักเป็นต้น และจากการศึกษาองค์ประกอบของข้าวกล้องงอกพบว่าเมื่อนำข้าวกล้องมาแช่น้ำเพื่อทำให้งอก จะทำให้ข้าวกล้องมีสารอาหารต่างๆ เพิ่มมากขึ้น เช่น GABA, dietary fiber, ferulic acid, tocotrienols, magnesium, potassium, zinc, c-oryzanol and prolylendopeptidase inhibitor (Kayahara, Tsukahara, & Tатаi, 2000) และสารที่เป็น antioxidants เช่น ascorbic acid, tocopherols, tocotrienols และ phenolic compounds (Frias, Miranda, Doblado, & Vidal-Valverde, 2005) มีรายงานการวิจัยในหนูถีบจักร พบว่าการบริโภคข้าวกล้องงอกที่มีสาร GABA มากกว่าข้าวกล้องปกติ 15 เท่า จะสามารถป้องกันการทำลายสมองที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสาร beta-amyloid peptide ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Alzheimer (Mamiya และคณะ 2004) ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนที่มีชื่อว่า Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) กระจายตัวอยู่ในสมอง โดยเฉพาะสมองส่วน Hippocampus และ cerebral cortex (Hofer et al., 1990) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท (neuronal growth), การมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท (neuronal survival) รวมไปถึงจนถึงการปรับเปลี่ยนวงจรเชื่อมโยงใหม่ของเซลล์ประสาท (neuroplasticity) ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทรอบนอก (Chao, 2003) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีน BDNF มีส่วนสำคัญที่ช่วยให้เกิด

การเรียนรู้และความจำ (Patterson et al., 1996; Ma et al., 2002) ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มพบว่า ข้าวกล้องงอกสามารถที่จะช่วยป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย amyloid β -peptide₂₅₋₃₅ (amnesic rat) ดังนั้นผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของการออกฤทธิ์ของข้าวกล้องงอกต่อการเรียนรู้และความจำในหนูกลุ่มดังกล่าว โดยวัดระดับโปรตีน BDNF และการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาผลของข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus ของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง
- 2) เพื่อศึกษาผลของข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง

1.3 ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาถึงผลกระทบของข้าวกล้องงอกต่อการป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำจาก amyloid β -peptide₂₅₋₃₅ โดยตรวจวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus

1.4 ทฤษฎี สมมุติฐาน (ถ้ามี) และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ฤทธิ์ในการป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย amyloid β -peptide₂₅₋₃₅ ของข้าวกล้องงอก น่าจะเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus และทำให้เซลล์ประสาทมีชีวิตรอดมากขึ้น

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- 1) ทำให้ทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของข้าวกล้องงอกต่อการป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำจาก beta-amyloid peptide สามารถสร้างมูลค่าเพิ่มให้กับข้าวกล้องงอก และสามารถพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ต่อไป รวมทั้งเสริมความเชื่อมั่นในการใช้ผลิตภัณฑ์เมื่อทราบถึงกลไกการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์ และหน่วยงานที่จะนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์คือมหาวิทยาลัยนเรศวร และผู้ผลิตผลิตภัณฑ์สมุนไพร
- 2) ผลการศึกษาที่ได้จะนำไปเผยแพร่โดยการนำเสนอผลงาน และ/หรือ ตีพิมพ์ลงในวารสารวิชาการระดับชาติหรือระดับนานาชาติ
- 3) เปิดโอกาสให้นิสิตได้เข้ามามีส่วนร่วมในการวิจัย

บทที่ 2

ทบทวนเอกสาร

2.1 ข้าวกล้องงอก

ข้าวกล้องงอกคือ ข้าวกล้องที่ผ่านการงอกจากส่วนของจมูกข้าวที่ยังคงมีสารอาหารที่จำเป็นต่อการงอก (Shoichi, 2004) โดยอาศัยปัจจัยต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการงอกของเมล็ดข้าว ได้แก่ น้ำ ความชื้น ออกซิเจนและอุณหภูมิที่เหมาะสม เมื่อข้าวกล้องงอกมีการงอกแล้วจะมีสารต้านอนุมูลอิสระที่สำคัญ เช่น วิตามินอี และฟีนอลิก นอกจากนี้เมื่อมีการงอกของข้าวกล้องจะมีปริมาณ GABA เพิ่มขึ้น GABA เป็นสารสื่อประสาทชนิดยับยั้ง (inhibitory neurotransmitter) โดยจะทำหน้าที่รักษาสมดุลในสมองที่ได้รับการกระตุ้น ซึ่งช่วยทำให้สมองเกิดการผ่อนคลายและนอนหลับสบาย อีกทั้งยังทำหน้าที่ช่วยกระตุ้นต่อมไร้ท่อ (anterior pituitary) ซึ่งทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่ช่วยในการเจริญเติบโต (GH) ทำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ ทำให้กล้ามเนื้อเกิดความกระชับ และเกิดสาร lipotropic ป้องกันการสะสมไขมัน จากการศึกษาในหนูพบว่าการบริโภคข้าวกล้องงอกที่มีสาร GABA มากกว่าข้าวกล้องปกติ 15 เท่า จะสามารถป้องกันการทำลายสมองเนื่องจากสาร Beta-amyloid peptide ซึ่งเป็นสาเหตุของโรค Alzheimer (Mamiya และคณะ 2004) และมีฤทธิ์คล้าย anti-depressant (Mamiya และคณะ 2007) ในเมล็ดข้าวที่กำลังงอกยังมีการเพิ่มขึ้นของสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ได้แก่ ascorbic acid, tocopherols, tocotrienols และ phenolic compounds (Fernandez-Orozco et al., 2008; Frias Miranda, Doblado, & Vidal-Valverde, 2005) สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารหรือเอนไซม์ที่มีความเข้มข้นต่ำๆ ช่วยชะลอหรือป้องกันปฏิกิริยาออกซิเดชันของสาร (substrate) ที่ไวต่อการเกิดปฏิกิริยา ชนิดของ substrate ในร่างกาย เช่น โปรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต ดีเอ็นเอ และจากการศึกษาของ Zhang และคณะ (2010) พบว่าหนูขาวที่มีความผิดปกติในด้านการเรียนรู้และความจำจากการได้รับพิษจากสารตะกั่ว เมื่อได้รับข้าวกล้องงอกเป็นเวลาประมาณ 1 สัปดาห์ พบว่าระดับของสารตะกั่วในซีรัมและสมองส่วน hippocampus ลดลง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารตะกั่วอย่างเดียวก่อนและหนูกลุ่มที่ได้รับสารตะกั่วและข้าวขาว นอกจากนี้หนูที่ได้รับข้าวกล้องงอกจะมีความสามารถในการเรียนรู้และมีความจำดีขึ้น

2.2 Amyloid β -peptide

จากการศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์และสัตว์ทดลองที่ถูกชักนำให้สูญเสียความจำด้วย amyloid β -peptide จะมีการสะสมของ A β Protein ที่เป็นสาเหตุทำให้มีการตายของเซลล์และมีความสัมพันธ์กับการสูญเสียหน้าที่และการทำลายของเซลล์ประสาท cholinergic และการลดของ acetylcholine ในสมองเป็นสัดส่วน โดยตรงกับระดับความรุนแรงของความเสื่อมในสมอง ตลอดจนการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิประสาทวิทยาในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ (Atack et al., 1983; Perry, 1986) จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า กลูตาเมต (glutamate) และ

amyloid β -peptide มีบทบาทสำคัญต่อการเกิดของโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) โดยทำให้เกิดการเสื่อม หรือการถูกทำลายของเซลล์ประสาท (Khan, Krishnakumar and Paulose, 2008; Singh and Dhawan, 1997) นอกจากนั้นกลไกที่ทำให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่เกิดจาก amyloid β -peptide สัมพันธ์กับภาวะ Oxidative stress (Anbarasi et al., 2006; Aucoin et al., 2005; Butterfield et al., 2007; Jellinger, 2007) ซึ่งเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทตามมา (Butterfield, et al., 2001; Chauhan and Chauhan, 2006; Moreira et al., 2007)

2.3 Brain-derived neurotrophic factor

โปรตีนที่มีชื่อว่า Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) กระจายตัวอยู่ในสมองโดยเฉพาะสมองส่วน Hippocampus และ cerebral cortex (Hofer et al., 1990) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท (neuronal growth), การมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท (neuronal survival) รวมไปถึงจนถึงการปรับเปลี่ยนวงจรเชื่อมโยงใหม่ของเซลล์ประสาท (neuroplasticity) ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาททรอบนอก (Chao, 2003) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีน BDNF มีส่วนสำคัญที่ช่วยให้เกิดการเรียนรู้และความจำ (Lindsay et al., 1991; Nomomura et al., 1995; Patterson et al., 1996; Ma et al., 2002)

จากการศึกษาของ Fahnestock และคณะ ในปี 2012 พบว่าการให้สารอาหารที่มีฤทธิ์ antioxidant ในสุนัขแก่จะมีการคงระดับของโปรตีน BDNF ซึ่งอาจจะส่งผลช่วยเพิ่มสมรรถนะของสมอง และจากการศึกษาที่ผ่านมาของกลุ่มพบว่าข้าวกล้องงอกสามารถป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำ และลดภาวะ oxidative stress ในสมองและในพลาสมาของหนูที่เกิดจากการเหนี่ยวนำของอะมัยลอยด์เบตาเปปไทด์

ดังนั้นในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะทำการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของข้าวกล้องงอกต่อการป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอะมัยลอยด์เบตาเปปไทด์โดยวัดระดับการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน BDNF การมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาทบริเวณสมองส่วนฮิปโปแคมปัส



บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

การทดลองในโครงการนี้จะใช้เนื้อเยื่อที่เก็บจากสัตว์ทดลองในโครงการผลของข้าวกล้องงอกต่อการเรียนรู้และความจำในหนูขาวแก่และหนูขาวที่เหนียวทำให้เกิดความจำบกพร่อง รหัส โครงการ NU-AE540424 และได้รับการรับรองด้านจรรยาบรรณการใช้สัตว์เลขที่ 56 04 0044 จากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์มหาวิทยาลัยนเรศวร

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของข้าวกล้องงอกต่อการป้องกันการสูญเสียการเรียนรู้และความจำของหนูที่ถูกเหนียวมาจาก beta-amyloid peptide โดยใช้เนื้อเยื่อสมองที่เก็บจากสัตว์ทดลองในโครงการผลของข้าวกล้องงอกต่อการเรียนรู้และความจำ เอนไซม์ที่มีฤทธิ์ต้านออกซิเดชันในหนูขาวแก่และหนูขาวที่เหนียวทำให้เกิดความจำบกพร่อง ซึ่งจากผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าการให้ข้าวกล้องงอก 4 สัปดาห์ ข้าวกล้องงอกสามารถป้องกันความจำบกพร่องที่เกิดจากการเหนียวมาด้วยของ beta-amyloid peptide โดยเนื้อเยื่อจะมาจากหนูขาวเพศผู้พันธุ์ Sprague-Dawley อายุ 8 สัปดาห์ ที่ถูกเหนียวทำให้เกิดความจำเสื่อม ซึ่งแบ่งเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ได้แก่

1. กลุ่มควบคุม (control) ให้ Normal saline
2. กลุ่มที่ได้รับตัวทำละลายทางปากก่อนการให้ Normal saline ทางโพรงสมอง
3. กลุ่มที่ได้รับตัวทำละลายก่อนการถูกกระตุ้นให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย beta-amyloid peptide ($A\beta$) ทางโพรงสมอง
4. กลุ่มที่ได้รับข้าวกล้องงอกก่อนการถูกกระตุ้นให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย $A\beta$ ทางโพรงสมอง
5. กลุ่มที่ได้รับข้าวกล้องงอกก่อนการถูกกระตุ้นให้มีการเสื่อมของเซลล์ประสาทด้วย ($A\beta$) ทางโพรงสมอง

3.2 ชิ้นเนื้อ

การทดลองในโครงการนี้จะใช้เนื้อเยื่อสมองที่เก็บจากสัตว์ทดลองในโครงการผลของข้าวกล้องงอกต่อการเรียนรู้และความจำ ซึ่งเมื่อสิ้นสุดการทดลองแล้วนั้นสัตว์ทดลองจะถูกทำให้ตายอย่างสงบด้วย pentobarbital sodium (50 mg/kg) และทำการตัดหัวสัตว์ทดลอง (decapitate) และเอาสมองออกมาทำความสะอาดโดยใช้ ice-cold saline แยกสมองส่วนต่างๆ เช่น hippocampus, frontal cortex และ cerebellum เป็นต้น ใส่ใน microcentrifuge tube ขนาด 1.5 มล. และเก็บไว้ในตู้แช่ -80°C จนกว่าจะนำชิ้นเนื้อส่วนต่างๆ มาใช้วิเคราะห์

ซึ่งจาก literature review ขึ้นเนื้อสมองที่เก็บไว้นาน 39 เดือน เมื่อนำมาใช้ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน muscarinic receptors ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญต่อการลดลงของการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าว (Rodriguez-Puertas, 1996) ซึ่งขึ้นเนื้อของโครงการ NU- NU-AE540424 ที่จะใช้ในการวิจัยในครั้งนี้เก็บเมื่อเดือน ธันวาคม 2555 รวมเป็นระยะเวลา 20 เดือน ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ที่ศึกษาทาง histopathology นำสมองที่เก็บและแช่ใน Fixative 10% formalin buffer ที่เก็บไว้มานานผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ

3.3 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน

hippocampus ด้วยวิธี western blotting

สมองส่วน hippocampus จะถูกนำมาสกัดโปรตีนโดยทำการบดเนื้อเยื่อพร้อมกับ lysis buffer และทำการปั่นแยกที่ 10,000 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นทำการแยก supernatant ออกมาเพื่อทำการวัดระดับโปรตีนโดยใช้ Bicinchoninic acid protein assay reagent kit นำโปรตีนที่ได้มาต้มรวมกับ 2x loading buffer เป็นเวลา 5 นาที และนำมาผ่านกระบวนการแยกโปรตีนโดยวิธีเจลอิเล็กโตรโฟรีซิส จากนั้นทำการถ่ายโปรตีนลงบนเมมเบรน (blotting) โดยกระแสไฟฟ้า เมมเบรนที่ได้จะถูกนำมาตรวจระดับของโปรตีน โดยทำการ block เมมเบรนด้วย blocking solution ซึ่งประกอบด้วย 5% non-fat dry milk ละลายใน Tris-buffer saline, 0.1% Tween-20 (TBS/T) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการบ่ม (incubate) เมมเบรนด้วย rabbit anti-BDNF IgG (1:200) ซึ่งละลายใน blocking solution เป็นเวลา 3 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเมมเบรนจะถูกล้างด้วย TBS/T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที และทำการบ่มต่อด้วย biotinylated anti-rabbit IgG ละลายใน blocking solution เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้างด้วย TBS/T จำนวน 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที ทำการบ่มเมมเบรนต่อด้วย avidin-biotin complex solution เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วล้างออกด้วย TBS/T จำนวน 3 ครั้งๆ 10 นาที แล้วใส่ 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) substrate เพื่อนำไปตรวจหาระดับโปรตีน ระดับของโปรตีนจะถูกคำนวณเป็นอัตราส่วนระหว่างโปรตีนที่สนใจกับโปรตีนเบต้าแอกติน (β -actin) ซึ่งเมมเบรนจะถูกตรวจสอบระดับโปรตีนเบต้าแอกตินโดยทำการบ่มด้วย goat anti- β -actin IgG (1:1000) ละลายใน blocking solution เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการล้างและบ่มต่อด้วย chicken anti-goat IgG (1:1000) เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ทำการตรวจสอบระดับโปรตีนโดยการใส่ DAB substrate

แถบโปรตีนที่ได้ทั้งหมดถูกบันทึกภาพด้วยเครื่อง scanner ซึ่งภาพที่ได้จะถูกนำมาวิเคราะห์หาความเข้ม (Density) ของแบนโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Image J

3.4 การตรวจชิ้นเนื้อสมองทาง histological examination

ส่วนการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในสมองส่วน hippocampus ที่ศึกษาทาง histopathology นำสมองที่เก็บและแช่ใน Fixative 10% formalin buffer ที่เก็บไว้มาผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ จนได้ชิ้นเนื้อซึ่งฝังในพาราฟิน จากนั้นนำชิ้นเนื้อมาตัดที่ความหนา 5 ไมโครเมตร และนำมาย้อมด้วย hematoxylin and eosin (H&E) เพื่อดูรูปร่างและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาท

3.5 สรุปวิเคราะห์ผล

ข้อมูลที่ได้จากการวิจัยจะเป็นข้อมูลเชิงปริมาณซึ่งจะถูกนำมาวิเคราะห์ทางสถิติโดยการหาค่าเฉลี่ย (mean) และความน่าเชื่อถือของค่า mean แสดงโดยใช้ค่า standard error of the mean (S.E.M) การเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า mean ระหว่างกลุ่มการทดลองจะทำการวิเคราะห์ด้วย one-way ANOVA ตามด้วย post hoc LSD test และตั้งค่านัยสำคัญเท่ากับ 0.05 ($P < 0.05$)

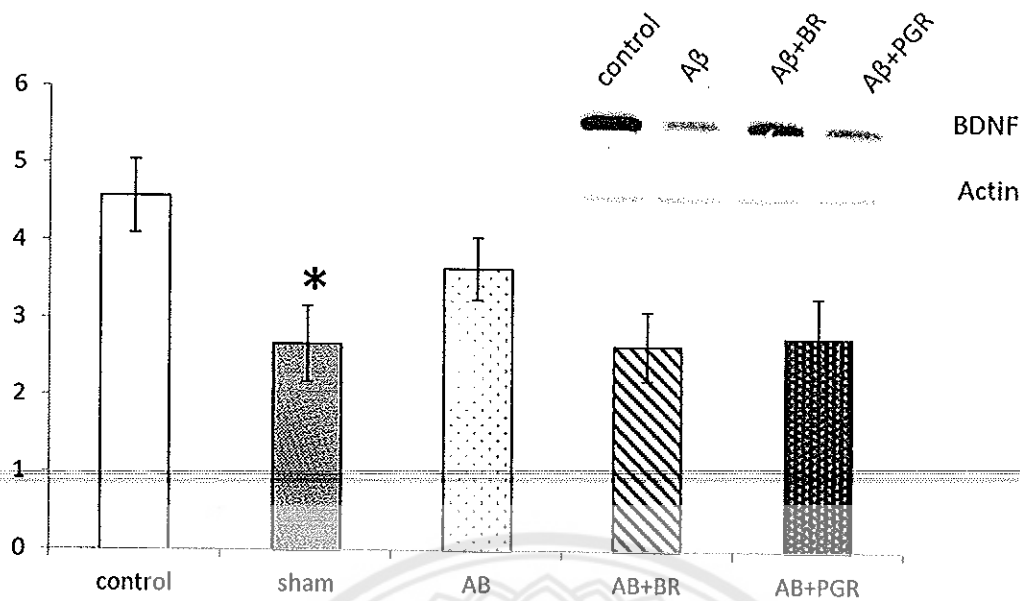


บทที่ 4 ผลการวิจัย

จากการศึกษาผลของข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนเบรนต์โรวินิวโรโทรฟิกแฟคเตอร์โปรตีน BDNF ในสมองส่วน hippocampus ด้วยวิธี western blotting และเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่อง มีผลดังต่อไปนี้

4.1 ผลของการได้รับข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของโปรตีน Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำบกพร่องด้วยสาร β -amyloid peptide

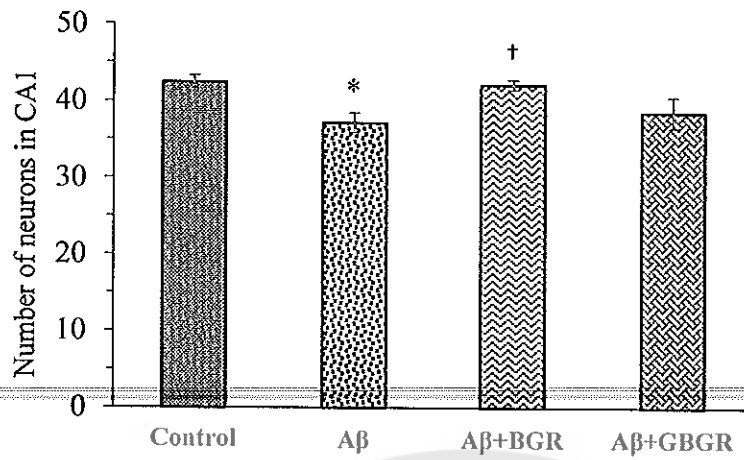
ผลจากการศึกษาด้วยเทคนิค Western blot analysis พบว่า การเหนี่ยวนำให้สัตว์ทดลองมีภาวะความจำบกพร่องด้วยสาร β -amyloid peptide ส่งผลให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ในสมองส่วน Hippocampus ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ขณะที่สัตว์ทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะความจำบกพร่องด้วยสาร β -amyloid peptide และได้รับข้าวกล้อง ($A\beta$ +BR) หรือข้าวกล้องงอก ($A\beta$ +PGR) ร่วมด้วย เป็นระยะเวลา 30 วัน มีระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองส่วน Hippocampus แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสาร β -amyloid peptide เพียงอย่างเดียว แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 ผลของข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ในสมองส่วน Hippocampus ของหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีความจำบกพร่องด้วยสาร β -amyloid peptide (A β), * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (One-Way ANOVA และ LSD test)

4.2 การเปลี่ยนแปลงทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของสมองบริเวณ Hippocampus

ได้ทำการตรวจวัดทำการศึกษาทาง histological studies สมองบริเวณ Hippocampus พบว่า กลุ่มควบคุมและกลุ่ม sham ไม่มีความแตกต่างกัน สำหรับกลุ่มที่ถูกเหนี่ยวนำจาก A β_{25-35} peptides มีการตายของเซลล์ประสาทเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนกลุ่มที่ให้ข้าวกล้องงอกและเหนี่ยวนำด้วย A β_{25-35} peptides พบว่าจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิตเทียบเท่ากับหนูกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าข้าวกล้องงอกที่ให้ไปสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทได้



รูปที่ 2 ผลของข้าวกล้องและข้าวกล้องงอกต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วน CA1 ของ hippocampus * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม † $P < 0.05$ compared with A β (One-Way ANOVA และ LSD test)



บทที่ 5

การอภิปรายและสรุปผลการวิจัย

ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าโปรตีนที่มีชื่อว่า Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) กระจายตัวอยู่ในสมองโดยเฉพาะสมองส่วน Hippocampus และ cerebral cortex (Hofer et al., 1990) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท (neuronal growth), การมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาท (neuronal survival) รวมไปถึงจนถึงการปรับเปลี่ยนวงจรเชื่อมโยงใหม่ของเซลล์ประสาท (neuroplasticity) ทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและระบบประสาทรอบนอก (Chao, 2003) ซึ่งเชื่อว่าโปรตีน BDNF มีส่วนสำคัญที่ช่วยให้เกิดการเรียนรู้และความจำ (Patterson et al., 1996; Ma et al., 2002) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าหนูขาวที่ถูกชักนำให้มีความจำบกพร่องด้วยโปรตีน amyloid- β -peptide₂₅₋₃₅ มีการลดลงของ BDNF และมีจำนวนเซลล์ประสาทใน CA1 ของสมองส่วน hippocampus ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Díaz และคณะ (2010) และ Stepanichev และคณะ (2004) ที่พบว่า amyloid- β -peptide₂₅₋₃₅ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ในสมองส่วน hippocampus สำหรับการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การให้ BDNF สามารถป้องกันการสูญเสีย long term potentiation ที่ถูกชักนำด้วย amyloid- β -peptide₂₅₋₃₅ ซึ่งการที่มีกระบวนการ up regulation ของ BDNF จะช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำในผู้ป่วยอัลไซเมอร์ได้ (Li et al., 2012)

สำหรับหนูที่ได้รับข้าวกล้องงอกพบว่ามีจำนวนเซลล์ประสาทบริเวณ CA1 ของสมองส่วน hippocampus เท่ากับกลุ่มควบคุม แต่ไม่เปลี่ยนแปลงระดับของ BDNF ดังนั้นฤทธิ์ในการปกป้องการสูญเสียการเรียนรู้และความจำในหนูขาวที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย amyloid β -peptide₂₅₋₃₅ ของข้าวกล้องงอก น่าจะเป็นผลจากการกลไกอื่นเช่น ฤทธิ์ antioxidant ของข้าวกล้องงอกและส่งผลให้จำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิตเท่ากับกลุ่มควบคุม

ข้าวกล้องงอกมีประสิทธิภาพในการป้องกันภาวะความจำบกพร่อง โดยช่วยรักษาจำนวนเซลล์ประสาทที่มีชีวิตในสมองส่วน hippocampus ให้เทียบเท่ากับในหนูแรทปกติ

บรรณานุกรม

- Anbarasi, K., Vani, G., Balakrishna, K. and Devi, C. S. S. (2006). Effect of bacoside A on brain antioxidant status in cigarette smoke exposed rats. *Life Sciences*, 78(12), 1378-1384.
- Atack JR., Perry EK., Bonham JR., Perry RH., Tomlinson BE., Blessed G., and Fairbairn A. (1983) Molecular forms of acetylcholinesterase in senile dementia of Alzheimer type: selective loss of the intermediate (10S) form, *Neuroscience Letters*, 40 199-204.
- Aucoin, J. S. Jiang, P. Aznavour, N. Tong, X. K. Buttini, M. Descarries, L., et al. (2005). Selective cholinergic denervation, independent from oxidative stress, in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neuroscience*, 132(1), 73-86.
- Butterfield, D. A., Drake, J., Pocernich, C. and Castegna, A. (2001). Evidence of oxidative damage in Alzheimer's disease brain: central role for amyloid [beta]-peptide. *Trends in Molecular Medicine*, 7(12), 548-554.
- Butterfield, D. A., Reed, T., Newman, S. F. and Sultana, R. (2007). Roles of amyloid [beta]-peptide-associated oxidative stress and brain protein modifications in the pathogenesis of Alzheimer's disease and mild cognitive impairment. *Free Radical Biology and Medicine*, 43(5), 658-677.
- Chao MV (2003) Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neuroscience*, 4:299-309.
- Chauhan, V. and Chauhan, A. (2006). Oxidative stress in Alzheimer's disease. *Pathophysiology*, 13(3), 195-208.
- Díaz A, De Jesús L, Mendieta L, Calvillo M, Espinosa B, Zenteno E, et al. The amyloid- β 25-35 injection into the CA1 region of the neonatal rat hippocampus impairs the long-term memory because of an increase of nitric oxide. *Neuroscience Letters*. 2010;468(2):151-5.
- Fahnestock M., Fahnestock M., Marchese M., Head E., Pop V, Michalski B., Milgram WN., Cotman CW. (2012) BDNF increases with behavioral enrichment and an antioxidant diet in the aged dog. *Neurobiology of Aging*, 33, 546-554
- Fernandez-Orozco, R., Frias, J., Zielinski, H., Piskula, MK., Kozłowska, H., and Vidal-Valverde, C.

- (2008) Kinetic study of the antioxidant compounds and antioxidant capacity during germination of *Vigna radiata* cv. emmerald, *Glycine max* cv. jutro and *Glycine max* cv. merit. *Food Chemistry*, 111(3): 622–630.
- Frias, J., Miranda, M. L., Doblado, R., & Vidal-Valverde, C. (2005) Effect of germination and fermentation on the antioxidant vitamin content and antioxidant capacity of *Lupinus albus* L. var. Multolupa. *Food Chemistry*, 92(2): 211–220.
- Hofer M, Pagliusi SR, Hohn A, Leibrock J, Barde YA (1990) Regional distribution of brain-derived neurotrophic factor mRNA in the adult mouse brain. *EMBO J* 9:2459-2464.
- Jellinger, K. A. (2007). *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders*. Elsevier B.V., 1-58.
- Kayahara, H., Tsukahara, K., & Tatai, T. (2000). Flavor, health and nutritional quality of pre-germinated brown rice. In 10th international flavor conference (pp. 546–551). Paros, Greece.
- Khan, R., Krishnakumar, A. and Paulose, C. S. (2008). Decreased glutamate receptor binding and NMDA R1 gene expression in hippocampus of pilocarpine-induced epileptic rats: Neuroprotective role of *Bacopa monnieri* extract. *Epilepsy & Behavior*, 12(1), 54-60.
- Li QS, Yang W, Pan YF, Min J, Zhang Z, Gao HZ, Qi JS. Brain-derived neurotrophic factor prevents against amyloid beta protein-induced impairment of hippocampal in vivo long-term potentiation in rats. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*. 2012;28(5):425-9.
- Ma L, Harada T, Harada C, Romero M, Hebert JM, McConnell SK, Parada LF (2002) Neurotrophin-3 is required for appropriate establishment of thalamocortical connections. *Neuron* 36:623-634.
- Mamiya, T., Asanuma, T., Kise, M., Ito, Y., Mizukuchi, A., Aoto, H., Ukai, M. (2004) Effects of Pre-Germinated Brown Rice on B-Amyloid Protein-Induced Learning and Memory Deficits in Mice. *Biol Pharm Bull* 27(7): 1041-1045.
- Mamiya, T., Kise, M., Morikawa, K., Aoto, H., Ukai, M., Noda, Y. Effects of pre-germinated brown rice on depression-like behavior in mice. *Pharmacol Biochem Behav* 86v (2007): 62-67.
- Moreira, P. I. Nunomura, A. Honda, K. Aliev, G. Casadesus, G. Zhu, X., et al. (2007). The key role of oxidative stress in alzheimer's disease. In G. A. Qureshi et.alS. H. Parvez (Eds.), *Oxidative Stress and Neurodegenerative Disorders* (pp. 267-281). Amsterdam: Elsevier Science B.V.

Patterson SL, Abel T, Deuel TA, Martin KC, Rose JC, Kandel ER (1996) Recombinant BDNF rescues deficits in basal synaptic transmission and hippocampal LTP in BDNF knockout mice. *Neuron* 16:1137-1145.

Perry, EK. (1986) The cholinergic hypothesis--ten years on. *Br Med Bull* 42: 63-69.

Rodriguez-Puertas, R, Pascual J, Pazos A. Effects of freezing storage time on the density of muscarinic receptors in the human postmortem brain: an autoradiographic study in control and Alzheimer's disease brain tissues. *Brain research* 728 (1996); 65-71.

Shoichi, I., and Yukihito, I. Marketing of valued-added rice production in Japan:

Germinated brown rice and rice bread. Proc. FAO rice conference 2004, Rome.

Singh, H. K. and Dhawan, B. N. (1997). Neuropsychopharmacological effects of the Ayurvedic nootropic bacopa monniera Linn(Brahmi) *Indian Journal of Pharmacology*, 29(5), S359-365

Stepanichev MY, Zdobnova IM, Zarubenko, II, Moiseeva YV, Lazareva NA, Onufriev MV, et al. Amyloid-beta(25-35)-induced memory impairments correlate with cell loss in rat hippocampus. *Physiol Behav.* 2004;80(5):647-55.

World Alzheimer Report 2011. The benefits of early diagnosis and intervention.

Alzheimer's Disease International (ADI). September 2011, United Kingdom.

Zhang, J., Wang, X.F., Lu, Z.B., Liu, N.Q., Zhao, B.L. (2004) The effects of meso-2,3-dimercaptosuccinic acid and oligomeric procyanidins on acute lead neurotoxicity in rat hippocampus. *Free Radic. Biol. Med.* 37(7): 1037-1050.

อรพิชญา ไกรฤทธิ, สิริรินทร์ ฉันทศิริกาญจน. ภาวะสมองเสื่อม มหันตภัยใกล้ตัว. การสาธารณสุขไทย 2548-