



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ

ผลของสารสกัดหน้าดอกข้าวที่มีต่อปริมาณของ
dopamine receptors และ NMDA receptors ใน
สมองของหนูขาวเล็ก

โดย

ดร.ธนศักดิ์ เทียกทอง¹

ผศ.ดร.สกลวรรณ ประพฤติบัติ¹

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร

วันลงทะเบียน...1.4.สิ.ศ. 2555

เลขทะเบียน...1.6161028

เลขเรียกหนังสือ 0 88

01.4

0157

2555

¹ภาควิชาเภสัชกรรมปฏิบัติ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้บริหาร คณาจารย์ เจ้าหน้าที่ และผู้ช่วยวิจัยทุกท่าน ทั้งจากคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และจากสถาบันวิจัยทางวิทยาศาสตร์สุขภาพ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่มีส่วนช่วยให้โครงการวิจัยนี้ดำเนินไปอย่างราบรื่นและสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินของมหาวิทยาลัยนเรศวร ประจำปีงบประมาณ พุทธศักราช 2553 จึงขอขอบคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย



บทคัดย่อ

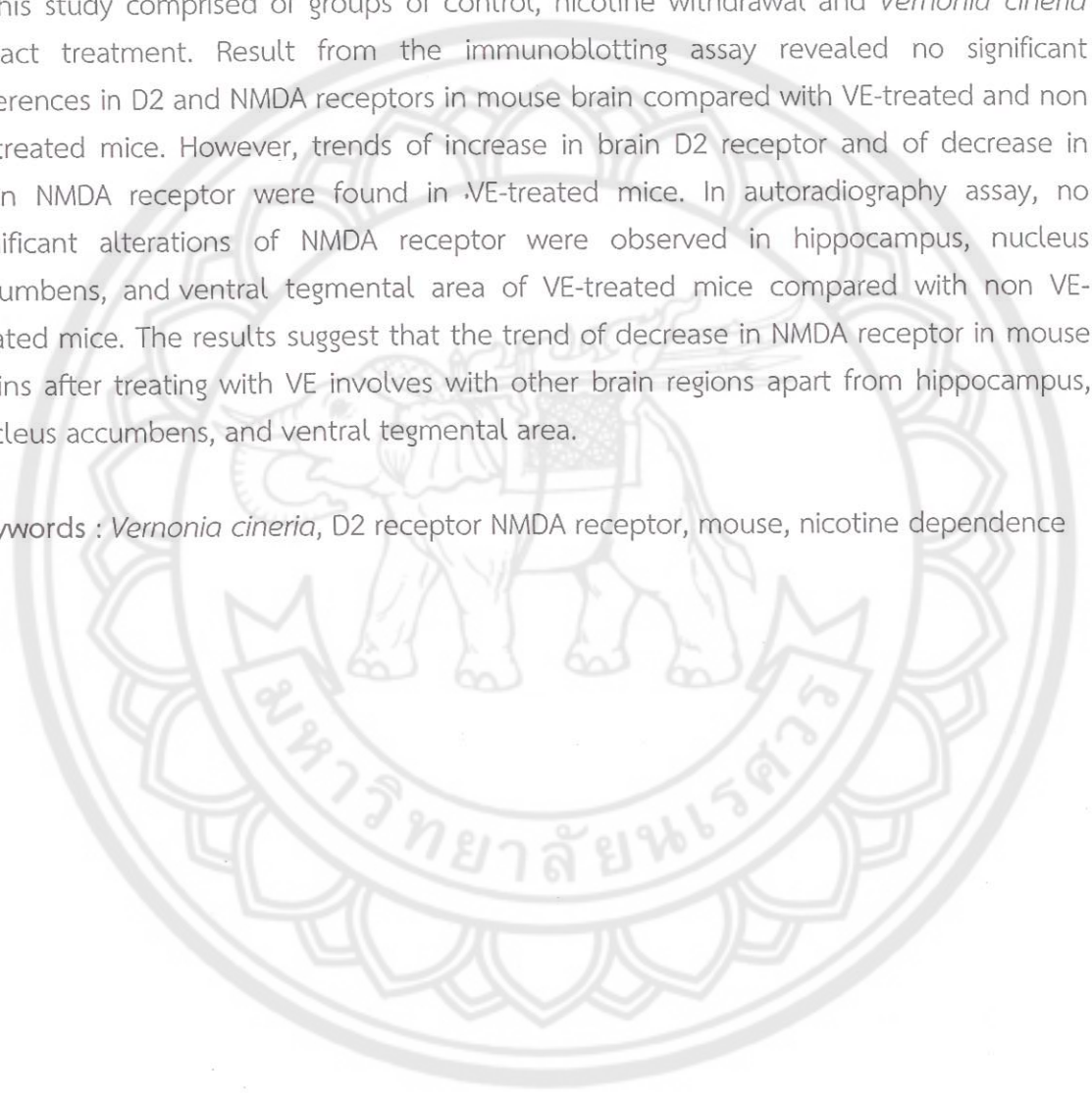
หญ้าดอกขาวเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้รักษาอาการผิดปกติต่างๆ รวมทั้งการลดอาการอยากสูบบุหรี่ ซึ่งกลไกในการลดอาการอยากสูบบุหรี่ยังไม่ทราบแน่ชัด และเนื่องจากการศึกษาที่ผ่านมามีการรายงานถึงบทบาทของ dopamine 2 (D2) receptor และ NMDA receptor ในการติดยาโคเคน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็ก เปรียบเทียบระหว่างหนูขาวเล็กกลุ่มควบคุม หนูขาวเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน และหนูขาวเล็กที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดต่างๆหลังจากเกิดภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน ผลการศึกษาโดยวิธี immunoblotting แสดงให้เห็นว่าแม้ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างหนูขาวเล็กแต่ละกลุ่ม แต่มีแนวโน้มของการเพิ่มขึ้นของระดับ D2 receptor และการลดลงของระดับ NMDA receptor ในหนูขาวเล็กที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวเล็กกลุ่มควบคุมและหนูขาวเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของระดับ NMDA receptor ในสมองที่เกี่ยวข้องกับการติดยาโคเคน ได้แก่ hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area โดยวิธี autoradiography พบว่าระดับ NMDA receptor ในสมองส่วนดังกล่าวไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างหนูแต่ละกลุ่ม จึงอาจเป็นไปได้ว่าแนวโน้มที่ลดลงของระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว เกิดขึ้นในสมองส่วนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการติดยาโคเคนนอกเหนือไปจากสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area

คำสำคัญ : หญ้าดอกขาว D2 receptor NMDA receptor หนูขาวเล็ก การติดยาโคเคน

Abstract

Vernonia cineria Less. is a Thai traditional plant which is used for treatment many diseases including smoking cessation. Although efficacy in treatment of nicotine dependence is acceptable, mechanism of action of *Vernonia cineria* in this aspect is still unclear. Several studies have been reported role of dopamine 2 (D2) and NMDA receptors in nicotine dependence. Therefore, this research aimed to study the effects of *Vernonia cinerea* Less. extract (VE) on D2 and NMDA receptors in mouse brains. The mice in this study comprised of groups of control, nicotine withdrawal and *Vernonia cineria* extract treatment. Result from the immunoblotting assay revealed no significant differences in D2 and NMDA receptors in mouse brain compared with VE-treated and non VE-treated mice. However, trends of increase in brain D2 receptor and of decrease in brain NMDA receptor were found in VE-treated mice. In autoradiography assay, no significant alterations of NMDA receptor were observed in hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area of VE-treated mice compared with non VE-treated mice. The results suggest that the trend of decrease in NMDA receptor in mouse brains after treating with VE involves with other brain regions apart from hippocampus, nucleus accumbens, and ventral tegmental area.

Keywords : *Vernonia cineria*, D2 receptor NMDA receptor, mouse, nicotine dependence



Executive Summary

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัญหาการติดบุหรี่ถือว่าเป็นปัญหาที่สำคัญปัญหาหนึ่งที่ประเทศไทยกำลังเผชิญอยู่ ดังจะเห็นได้จากการณรงค์ให้เห็นถึงผลเสียที่เกิดขึ้นจากการสูบบุหรี่และผลดีจากการเลิกสูบบุหรี่ตามสื่อต่างๆ ทั้งนี้เนื่องจากการติดบุหรี่ทำให้เกิดผลกระทบในหลายด้าน ไม่ว่าจะเป็นปัญหาด้านครอบครัว เศรษฐกิจ วัฒนธรรม และสังคม รวมทั้งผลกระทบด้านสุขภาพ โดยการติดบุหรี่มีความพันธุโดยตรงและเป็นสาเหตุสำคัญต่อการเกิดโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบทางเดินหายใจ โรคมะเร็งหัวใจและหลอดเลือด และมะเร็งที่อวัยวะต่างๆในทางเดินหายใจ หากมีการสูบบุหรี่อย่างต่อเนื่องจากการติดบุหรี่ยังจะทำให้เกิดการสะสมของสารพิษต่างๆจากควันบุหรี่มากขึ้นเรื่อยๆ เป็นเหตุให้เกิดอาการของโรคที่รุนแรงและเสียชีวิตในที่สุด

ในปี 2547 พบว่าจำนวนผู้ป่วยด้วยโรคร้ายแรงต่างๆที่มีสาเหตุมาจากการสูบบุหรี่มีจำนวน 4.9 ล้านคนทั่วโลก จากผลการสำรวจพฤติกรรมการสูบบุหรี่ในประเทศไทย พ.ศ. 2547 ของสำนักงานสถิติแห่งชาติ พบว่าประชากรไทยตั้งแต่อายุ 15 ปีขึ้นไปสูบบุหรี่มีจำนวน 11.3 ล้านคน และในจำนวนนั้นมีผู้สูบบุหรี่ประจำจำนวนถึง 9.6 ล้านคน โดยในเพศชายมีอัตราการสูบบุหรี่มากกว่าเพศหญิงประมาณ 18 เท่า ในกลุ่มคนที่สูบบุหรี่เป็นประจำและสูบบุหรี่เป็นเวลานานจะมีความเสี่ยงต่อการเสียชีวิตจากโรคที่มีสาเหตุมาจากบุหรี่มากกว่าคนที่ไม่สูบบุหรี่ถึง 3 เท่า เมื่อพิจารณาค่าใช้จ่ายทางด้านสุขภาพของโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ในประเทศไทยพบว่ามีค่าใช้จ่ายสูงมากและส่วนใหญ่เป็นค่าใช้จ่ายในส่วนของรัฐบาลต้องรับผิดชอบ อาทิ ค่าใช้จ่ายของผู้ป่วยโรคถุงลมโป่งพองที่เกิดจากการสูบบุหรี่ทั้งหมดในปี พ.ศ. 2546 ประมาณ 18,000 ล้านบาท เป็น ค่าใช้จ่ายของรัฐบาลประมาณ 10,000 ล้านบาท และค่าใช้จ่ายส่วนตัวของผู้ป่วยประมาณ 8,000 ล้านบาท โรคมะเร็งปอดมีค่าใช้จ่ายทางด้านสุขภาพทั้งหมดประมาณ 8,000 ล้านบาท เช่นเดียวกับโรคหัวใจในเลือดอุดตัน ค่าใช้จ่ายเท่ากับ 19,000 ล้านบาท แนวทางในการลดค่าใช้จ่ายด้านสุขภาพของประเทศจากโรคที่เกิดจากการสูบบุหรี่ทำได้โดยทำให้มีจำนวนผู้สูบบุหรี่น้อยลง

การรักษาการติดบุหรี่ทำให้อัตราการเกิดโรคต่างๆที่เกิดขึ้นจากการสูบบุหรี่ลดลงและเป็นการฟื้นฟูสภาพกายและสภาพจิตของผู้ที่ติดบุหรี่ให้ดีขึ้น แนวทางในการรักษาการติดบุหรี่ในปัจจุบัน ได้แก่ การให้แนะนำในการปรับเปลี่ยนความคิดและพฤติกรรมโดยการให้คำปรึกษา (counseling) เพื่อให้เลิกสูบบุหรี่และการใช้ยาในการรักษาเพื่อลดอาการลงแดงหรืออาการถอนยา (withdrawal syndromes) จากการใช้ยาชนิดนิโคติน ซึ่งมียาหลายชนิดถูกนำมาใช้เพื่อรักษาการติดบุหรี่ รวมทั้ง การให้นิโคตินทดแทน (nicotine replacement therapy) และ bupropion แต่การรักษาด้วยวิธีใดวิธีหนึ่งเพียงวิธีเดียว มักจะไม่ให้ประสิทธิภาพในการรักษาที่น่าพอใจ การรักษาที่นิยมจึงเป็นการรักษาทั้ง 2 วิธีพร้อมๆกัน อย่างไรก็ตาม การรักษาการติดบุหรี่ด้วยวิธีดังกล่าวมักใช้ระยะเวลานานและเสียค่าใช้จ่ายค่อนข้างมาก อีกทั้งการใช้ยาในการรักษาทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้มาก การใช้การรักษาวิธีอื่นๆที่สามารถให้ประสิทธิภาพที่ดีและทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์น้อยที่สุด รวมทั้งสามารถลดค่าใช้จ่ายลงได้ จึงน่าจะเป็นแนวทางที่ดีในการเลือกใช้เพื่อรักษาการติดบุหรี่

การใช้สมุนไพรในการรักษาโรคต่างๆในประเทศไทยเป็นภูมิปัญญาพื้นบ้านที่สืบทอดกันมาเป็นระยะเวลานาน เนื่องจากสมุนไพรเป็นสิ่งที่หาได้ง่ายในท้องถิ่น การใช้สมุนไพรในการรักษาการติดบุหรี่ยังเป็นทางเลือกที่น่าสนใจอีกทางเลือกหนึ่ง และเป็นการนำทรัพยากรที่มีอยู่ตามธรรมชาติมาใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างคุ้มค่า สมุนไพรหลายชนิดถูกนำมาศึกษาเกี่ยวกับประสิทธิภาพในการรักษาการติดบุหรี่ ซึ่งการศึกษาดังกล่าวยังไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่าการออกฤทธิ์ในการรักษาการติดบุหรี่ของสมุนไพรเหล่านั้นเกิดขึ้นได้อย่างไร แต่พบว่าสามารถลดการติดบุหรี่หรือนิโคตินซึ่งเป็นสารสำคัญที่อยู่ในบุหรี่โดยเฉพาะในสัตว์ทดลอง

หญ่าดอกขาวเป็นสมุนไพรพื้นบ้านอีกชนิดหนึ่งที่มีการนำมาใช้ในการลดการติดยุหรีในผู้ที่สูบบุหรีได้ดี โดยมีการใช้ในรูปแบบของชาชง แม้ว่าหญ่าดอกขาวจะให้ประสิทธิภพในการรักษาการติดยุหรี แต่กลไกที่หญ่าดอกขาวไปออกฤทธิ์ในการรักษานั้นยังไม่มีการศึกษาที่แน่ชัด

จากการศึกษาเบื้องต้นโดยคณะผู้วิจัยในการศึกษาผลของสารสกัดหญ่าดอกขาวที่มีต่อ nicotinic และ muscarinic receptor พบว่าสารสกัดหญ่าดอกขาวอาจมีฤทธิ์ลดอาการขาดนิโคตินในสัตว์ทดลองผ่านการจับกับ α_7 nicotinic receptor และ M5 muscarinic receptor ในสมองของสัตว์ทดลอง อย่างไรก็ตามผลดังกล่าวยังไม่สามารถบอกได้อย่างชัดเจนว่ามีเพียง 2 receptor เท่านั้นที่อาจมีส่วนเกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ลดการขาดนิโคตินในสัตว์ทดลอง เนื่องจากการศึกษาเป็นจำนวนมาพบว่าการติดยุหรีหรือนิโคตินยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการทำงานและการเปลี่ยนแปลงของทั้ง dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมองร่วมด้วย ดังนั้นการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหญ่าดอกขาวที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมอง อาจจะช่วยให้เกิดความเข้าใจกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดหญ่าดอกขาวในการรักษาการติดยุหรีในระดับโมเลกุล และนำไปสู่การพัฒนาายเพื่อใช้ในการรักษาการติดยุหรีที่มีประสิทธิภพดี

งานวิจัยนี้ต้องการศึกษาถึงผลของสารสกัดของหญ่าดอกขาวที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ dopamine receptor และ NMDA glutamate receptor ในสมองของสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดภาวะติดนิโคติน เพื่อใช้เป็นแนวทางประยุกต์ในการอธิบายถึงกลไกและประสิทธิภพของหญ่าดอกขาวในการรักษาการติดยุหรีในคนต่อไป

วัตถุประสงค์หลักของแผนงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหญ่าดอกขาวที่มีต่อปริมาณ dopamine receptor ในสมองสัตว์ทดลองทั้งในภาวะที่ติดและไม่ติดนิโคติน
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหญ่าดอกขาวที่มีต่อปริมาณ NMDA receptor ในสมองสัตว์ทดลองทั้งในภาวะที่ติดและไม่ติดนิโคติน
3. เพื่อศึกษากลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของหญ่าดอกขาวในการรักษาการติดยุหรี

ทฤษฎี กรอบแนวคิด และแนวทางในการดำเนินการของแผนงานวิจัย

การติดยุหรีเป็นปัญหาเรื้อรังที่ส่งผลกระทบต่อประเทศไทยในหลายๆด้าน รวมทั้งด้านสุขภาพซึ่งส่งผลอย่างมากต่อทั้งคุณภาพชีวิต และการพัฒนาประเทศ การรณรงค์ส่งเสริมการลดการติดยุหรีที่เกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องเป็นการทำให้คุณภาพชีวิตของผู้สูบบุหรีดีขึ้น อีกทั้งทำให้ประชาชนทั่วไปตระหนักถึงโทษและพิษภัยของการสูบบุหรี นอกจากการรณรงค์ลดการติดยุหรีแล้ววิธีที่ใช้ในการลดการติดยุหรียังมีการปรับเปลี่ยนความคิดและพฤติกรรมในการสูบบุหรีและการใช้ยาในการรักษาการติดยุหรี ซึ่งออกฤทธิ์เลียนแบบนิโคตินในการกระตุ้น nicotinic receptors การใช้ยาในผู้ที่ติดยุหรีพบว่าประสิทธิภพในการรักษาไม่ดีขึ้น สาเหตุอาจเนื่องมาจากการติดยุหรีเกิดผ่านหลากหลายกลไกซึ่งการออกฤทธิ์ของยาไม่สามารถครอบคลุมได้ทั้งหมด และแม้ว่าจะมีการพยายามค้นหากลไกใหม่ๆที่เกี่ยวข้องกับการติดยุหรีรวมทั้งศึกษาประสิทธิภพในการรักษาการติดยุหรีของยาที่ออกฤทธิ์ผ่านกลไกเหล่านั้น แต่การศึกษาดังกล่าวยังไม่สามารถหาข้อสรุปได้อย่างแน่ชัด นอกจากนี้การใช้ยามักทำให้เกิดอาการไม่พึงประสงค์ได้มากและทำให้เสียค่าใช้จ่ายในการรักษาค่อนข้างสูง ดังนั้นการใช้สมุนไพรในการรักษาการติดยุหรีจึงเป็นทางเลือกอีกทางหนึ่งที่น่าสนใจเนื่องจากเป็นทรัพยากรที่มีอยู่มากมายในประเทศไทยและเป็นการสนับสนุนภูมิปัญญาไทยที่มีอยู่แต่โบราณให้เกิดประโยชน์ที่คุ้มค่า

หญ้าดอกขาวเป็นสมุนไพรที่ใช้กันมานานในประเทศไทยในการรักษาโรคต่างๆ รวมทั้งมีสรรพคุณในการช่วยลดความอยากบุหรี่ จากการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาพบว่าสารสกัดจากหญ้าดอกขาวสามารถลดอาการปวดและอักเสบในในสัตว์ทดลองได้ ซึ่งอาจจะส่งผลในการลดการสูบบุหรี่ในผู้ที่สูบบุหรี่เพื่อลดอาการเจ็บปวดจากการเป็นโรคบางชนิด ส่วนการศึกษาทางคลินิกซึ่งมีอยู่จำนวนไม่มากนักในประเทศไทย พบว่าการรักษาการติดบุหรี่ด้วยหญ้าดอกขาวในรูปแบบชาขงสามารถลดปริมาณการสูบบุหรี่และความอยากสูบบุหรี่ได้ดี แต่อย่างไรก็ตามกลไกการออกฤทธิ์ในการรักษาการติดบุหรี่ยังไม่เป็นที่แน่ชัดและยังไม่มีรายงานการศึกษาในปัจจุบัน ด้วยเหตุที่การติดบุหรี่ยังเกี่ยวข้องกับการทำงานของสมองส่วน limbic system ซึ่งพบว่ามีการทำงานร่วมกันทั้ง dopamine receptor และ NMDA receptor รวมทั้งยาที่รักษาอาการติดบุหรี่ในปัจจุบัน ได้แก่ bupropion ออกฤทธิ์เพิ่มปริมาณ dopamine ทำให้กระตุ้น dopamine receptor ในสมองได้มากขึ้น ดังนั้นการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของหญ้าดอกขาวที่มีต่อการทำงานและปริมาณของ dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมองของสัตว์ทดลอง จึงน่าจะช่วยให้สามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ในการรักษาการติดบุหรี่ในคนได้ในระดับหนึ่ง

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมองสัตว์ทดลองที่ได้รับนิโคตินเป็นระยะเวลานาน
2. กลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ของหญ้าดอกขาวในการรักษาการติดนิโคตินในสัตว์ทดลองและสามารถประยุกต์ใช้ในการอธิบายผลของยาในการรักษาการติดบุหรี่ในคน
3. ส่งเสริมนโยบายในการเลิกบุหรี่และการส่งเสริมสุขภาพกายและสุขภาพจิตของประเทศ
4. การเผยแพร่ผลงานวิจัยต่อประชาชน หน่วยงานทางด้านวิทยาศาสตร์การแพทย์และสาธารณสุข
5. การนำสมุนไพรพื้นบ้านซึ่งเป็นทรัพยากรที่มีอยู่ตามธรรมชาติและภูมิปัญญาไทยที่มีอยู่นำมาใช้ในเกิดประโยชน์ต่อประชาชนและช่วยลดค่าใช้จ่ายทางยาและค่าใช้จ่ายด้านสุขภาพโดยรวมของประเทศ

บทนำ

การติดบุหรี่ก่อให้เกิดอุปสรรคในการพัฒนาประเทศและสูญเสียค่าใช้จ่ายเป็นจำนวนมากในการรักษาและฟื้นฟูสุขภาพของผู้ที่ติดบุหรี่ สาเหตุของการติดบุหรี่เกิดจากการที่ร่างกายคุ้นเคยกับการได้รับนิโคตินที่อยู่ในบุหรี่ มีหลายทฤษฎีที่นำมาใช้ในการอธิบายถึงการติดบุหรี่ที่เกิดจากนิโคติน (Pidoplichko et al., 2004) แต่กลไกที่ใช้อธิบายการติดบุหรี่เนื่องจากนิโคติน คือ การเกิดผลที่ทำให้เกิดความพึงพอใจได้แก่ ความรู้สึกกระปรี้กระเปร่า มีสมาธิมากขึ้น สมองปลอดโปร่ง กระฉับกระเฉง และรู้สึกมีความสุขหลังจากสูบบุหรี่ ทำให้เกิดความต้องการที่จะสูบบุหรี่ต่อไปเรื่อยๆเพื่อให้เกิดผลดังกล่าว ในที่สุดจะเกิดการพึ่งพาหรือติดบุหรี่ทางจิตใจ (psychological dependence) (Mansvelter and McGehee, 2002) และเมื่อหยุดสูบบุหรี่จะเกิดอาการไม่สบายต่างๆ เกิดขึ้น เช่น ง่วงนอน ไม่สบายใจ เชื่องซึม ไม่มีชีวิตชีวาในการทำงาน และขาดสมาธิ ซึ่งอาการเหล่านี้เรียกรวมกันว่าอาการขาดบุหรี่หรืออาการลงแดง (withdrawal symptoms) (Kenny and Markou, 2001) ผู้สูบบุหรี่ต้องหันกลับไปสูบบุหรี่เพื่อลดอาการไม่สบายดังกล่าว จึงเป็นการส่งเสริมให้เกิดการติดบุหรี่ยิ่งขึ้น

กลไกในการทำให้เกิดการติดบุหรี่ทางจิตใจเกิดจากการที่นิโคตินในบุหรี่เมื่อผ่านเข้าสู่สมองจะไปจับกับ nicotinic receptors ที่อยู่บริเวณปลายประสาท dopaminergic neurons ในสมองบริเวณที่ควบคุมอารมณ์และความรู้สึกเป็นสุข (limbic system) (Morgane et al., 2005) ซึ่ง nicotinic receptors ดังกล่าวเมื่อถูกกระตุ้นด้วยนิโคตินจะทำให้ dopamine ในสมองส่วนดังกล่าวหลั่งออกมา แล้วไปจับกับ dopamine receptor ในสมองบริเวณต่างๆ มีผลทำให้เกิดความรู้สึกสบายใจ มีความสุข และมีชีวิตชีวา (Balfour et al., 2000; Wonnacott et al., 2005) นอกจากนี้การที่ dopamine หลั่งเพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นด้วย nicotine เป็นผลส่วนหนึ่งมาจากการลดการทำงานของ NMDA receptor ในสมองส่วน nucleus accumbens (Cano-Cebrián et al., 2003; Kosowski and Liljequist, 2004)

ในปัจจุบันการรักษาการติดบุหรี่ยังมุ่งเน้นไปที่การกระตุ้น nicotinic receptors โดยอาจจะกระตุ้น receptor ดังกล่าวโดยตรงหรือเพิ่มปริมาณสารที่จะไปกระตุ้น ได้แก่ nicotine ทำให้เกิดความสบายใจและความพึงพอใจโดยไม่ต้องสูบบุหรี่และเป็นการลดปริมาณสารพิษในบุหรี่ที่จะสะสมในร่างกาย ยาที่มีการใช้ในการรักษาการติดบุหรี่ยังแพร่หลาย ได้แก่ การให้นิโคตินทดแทน (nicotine replacement therapy) ในประเทศไทยการให้นิโคตินทดแทนเป็นการให้นิโคตินเข้าไปในร่างกายในรูปแบบของการเคี้ยวหมากฝรั่งหรือการแปะที่ผิวหนัง ซึ่งนิโคตินที่ได้รับสามารถกระตุ้น nicotinic receptor ได้โดยตรง (Molyneux, 2004) ดังนั้นผลที่เกิดขึ้นจากการให้นิโคตินทดแทน จะทำให้เกิดผลที่ทำให้เกิดความสบายใจและความพึงพอใจจากกลไกดังกล่าวข้างต้น

อย่างไรก็ตามแม้ว่าจะมีการให้นิโคตินทดแทนในการรักษาการติดบุหรี่ยังแพร่หลาย แต่ปัญหาที่พบคือประสิทธิภาพในการรักษาไม่ดีนัก อีกทั้งค่าใช้จ่ายในการรักษาด้วยยาค่อนข้างสูง รวมทั้งการเกิดอาการไม่พึงประสงค์มีค่อนข้างมาก จึงมีการค้นหาแนวทางใหม่ๆในการรักษาการติดบุหรี่ยที่มีประสิทธิภาพและราคาถูก ในประเทศไทยซึ่งถือว่าเป็นประเทศที่อุดมไปด้วยทรัพยากรธรรมชาติ และมีการนำสมุนไพรชนิดต่างๆมาใช้ในการป้องกันและรักษาโรคต่างๆเป็นเวลานาน รวมถึงการนำสมุนไพรมาใช้ในการรักษาการติดบุหรี่ ซึ่งสมุนไพรที่มีการศึกษาและนำมาใช้จริงได้แก่ หน้ำดอกขาวซึ่งมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Vernonia cinerea* Less. จากการศึกษาถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของหน้ำดอกขาว พบว่าสารสกัดหน้ำดอกขาวมีฤทธิ์ต่างๆ ได้แก่ ฤทธิ์ในการลดอุณหภูมิร่างกาย (Gupta et al., 2003; Iwalewa et al., 2003) ฤทธิ์ลดอาการ

ปวดและอักเสบ (Latha et al., 1998; Iwalewa et al., 2003; Mazumder et al., 2003) และมีฤทธิ์ระงับการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (Gupta et al., 2003) และเซลล์มะเร็ง (Kuo et al., 2003) ซึ่งฤทธิ์ดังกล่าวเป็นผลจากการศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง โดยกลไกการออกฤทธิ์ที่จะนำมาใช้อธิบายผลดังกล่าวยังไม่ทราบแน่ชัด สำหรับการศึกษาฤทธิ์ในการรักษาการติดยุติในคนพบการศึกษาไม่มากนัก ซึ่งจากการศึกษาประสิทธิภาพในการรักษาติดยุติในประชากรที่ติดยุติจำนวนหนึ่งในประเทศไทยในจังหวัดสุพรรณบุรี (นริศรา แยมทรัพย์, 2541) และเชียงราย (ศักดิ์วิชา ไซสวัสดิ์ และมนัชยา มรรคอนันตโชติ, 2539) พบว่าชาวชนเผ่าดอกขาวสามารถลดอัตราการสูบบุหรี่ โดยทำให้เกิดการชาลิ้น ทำให้ไม่อยากสูบบุหรี่เหมือนกลิ่นบุหรี่ สูบแล้วเกิดความรู้สึกอยากอาเจียน และเนื่องจากหญ้าดอกขาวเป็นพืชที่พบเห็นโดยทั่วไป จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะนำหญ้าดอกขาวมาศึกษากลไกในการออกฤทธิ์โดยเฉพาะกลไกที่เกี่ยวข้องกับการทำงานและปริมาณของ NMDA receptor และด้วยเหตุที่การติดยุติเกี่ยวข้องกับการทำงานร่วมกันของ dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมอง (Cano-Cebrián et al., 2003; Kosowski and Liljequist, 2004) ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาถึงผลของสารสกัดของหญ้าดอกขาวที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณของ dopamine receptor และ NMDA receptor ในสมองของสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดภาวะติดยุติโคติน เพื่อใช้เป็นแนวทางประยุกต์ในการอธิบายถึงกลไกและประสิทธิภาพของหญ้าดอกขาวในการรักษาการติดยุติในคนต่อไป

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหญ้าดอกขาว

นำส่วนใบและต้นของหญ้าดอกขาวแห้งมาทำการลดขนาดลง อบให้แห้งที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 °C จากนั้นนำพืชแห้งของหญ้าดอกขาวมาทำการสกัดสารโดยใช้ซอกเลท (soxhlet apparatus) และมีเมธานอลเป็นตัวทำละลาย ใช้ระยะเวลาในการสกัดเป็นเวลา 8 ชม สารละลายที่ได้จะถูกทำให้แห้งในสภาวะลดความดันเพื่อเอาตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดออก สารสกัด (crude extract) ในขั้นตอนนี้พร้อมที่จะนำไปทำการทดลองในขั้นต่อไป สารในความเข้มข้นต่างๆสำหรับการทดลองในขั้นถัดไปสามารถเตรียมได้โดยชั่งสารสกัดในปริมาณที่เหมาะสมมาละลายในน้ำเกลือให้ได้ความเข้มข้นตามที่ต้องการ

2. การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูขาวเล็ก (mice) เพศผู้อายุ 1 เดือน ถูกเลี้ยงในห้องเลี้ยงสัตว์ทดลอง โดยให้สัมผัสกับแสงสว่างและความมืดสลับกัน ทุก 12 ชั่วโมง ซึ่งหนูขาวเล็กจะได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด การทำให้หนูขาวเล็กติดยุติโคตินจะทำโดยฉีดสารละลายนิโคตินขนาด 2 มิลลิกรัม/กิโลกรัม เข้าใต้ผิวหนังวันละ 4 ครั้งห่างกัน 4 ชั่วโมง เริ่มตั้งแต่ 8.00 น. เป็นเวลา 14 วัน ในการทดลองหนูขาวจะถูกแบ่งออกเป็น 8 กลุ่ม ได้แก่

- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือ 0.9% เป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มควบคุม
- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับน้ำเกลือ 0.9% โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน
- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 125 กิโลกรัม/มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ทดลองกลุ่ม 1

- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 250 กิโลกรัม/มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ทดลองกลุ่ม 2

- หนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับนิโคตินเป็นเวลา 14 วัน แล้วได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 500 กิโลกรัม/มิลลิกรัม โดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังต่ออีกเป็นเวลา 14 วัน จำนวน 7 ตัว เป็นกลุ่มที่ทดลองกลุ่ม 3

3. การเตรียมสมองของสัตว์ทดลอง

หลังจากเสร็จสิ้นการเตรียมสัตว์ทดลอง สมองหนูขาวเล็กทั้งหมดในแต่ละกลุ่มจะถูกแบ่งออกเป็น 2 ส่วน โดยสมองหนูขาวเล็ก 4 ตัวถูกนำไปปั่น (homogenize) ร่วมกับ phosphate buffer โดยใช้ homogenizer แล้วจึงนำสิ่งที่ได้จากการปั่นหรือ homogenate ไปเก็บที่อุณหภูมิ -20°C เพื่อนำไปใช้ในการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting ส่วนสมองหนูขาวเล็ก 3 ตัวที่เหลือ จะถูกนำมาตัดเป็นแผ่นบาง (sectioned) ให้มีความหนา $10\ \mu\text{m}$ โดยใช้ cryostat microtome ที่อุณหภูมิประมาณ -20°C และแผ่นเนื้อเยื่อสมองที่ได้ซึ่งประกอบด้วยสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area ถูกทำให้แห้งบนแผ่น slide แล้วเพื่อใช้ในการศึกษาระดับของ NMDA receptor ด้วยวิธี autoradiography

4. การศึกษาระดับของ dopamine 2 (D2) receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็ก ด้วยวิธี immunoblotting (Western blot)

ขั้นตอนที่ 1 การหาปริมาณโปรตีนด้วยวิธีของเบรดฟอร์ด (Bradford assay)

นำ homogenate ที่ได้จากข้อ 3 มาทำให้เจือจางในอัตราส่วน 1: 20 แล้วเติม Bradford reagents ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง 10 นาทีเพื่อให้ปฏิกิริยาสมบูรณ์ ได้สารละลายมีสี แล้วนำสารละลายไปอ่านค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (microplate spectrophotometer) และทำการคำนวณหาปริมาณโปรตีนใช้ standard curve จากโปรตีนมาตรฐานอัลบูมิน

ขั้นตอนที่ 2 การแยกโปรตีนด้วย SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และ immunoblotting ด้วยแอนติบอดีที่เฉพาะเจาะจงกับ receptors

Homogenate ถูกนำมาผสมกับ Tris buffers สำหรับเตรียมทำการแยกโปรตีน โดย Tris buffers ประกอบด้วย 50 mM Tris HCl, pH 8, 150 mM NaCl, 1% v/v Tween 20, 0.1% sodium dodecyl sulphate (SDS) และ 10% protease inhibitor cocktail แล้วนำไปแช่ในน้ำแข็ง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นแยก (centrifugation) ที่ 10,000 g เป็นเวลา 10 นาที และเก็บสารส่วนด้านบนซึ่งเป็น membraned proteins ไปผสมกับ electrophoresis marker และนำตัวอย่างไปต้มให้เดือดเพื่อสลายโครงสร้างโปรตีน จากนั้นนำตัวอย่างไปทำการแยกโปรตีนโมเลกุลด้วย SDS-PAGE โปรตีนที่ถูกแยกตามน้ำหนักโมเลกุลจะถูกนำไปไว้ใน polyvinylidene fluoride membrane (PVDF) และนำ PVDF blot ที่ได้ไปแช่ในสารละลาย 5% albumin เพื่อป้องกัน non-specific binding จากนั้นแช่ PVDF blot ในสารละลาย buffer ที่มี primary monoclonal antibody ต่อ dopamine 2 receptor หรือ NMDA glutamate receptor อัตราส่วน 1:1000 ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมง แล้วจึงนำ PVDF blot ไปล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์สำหรับล้าง 3 ครั้ง แล้วนำไปแช่ใน secondary antibody ซึ่งจับกับสารสำหรับการวัดผลด้วย chemiluminescent reagent (ECL) บนแผ่นฟิล์ม

ขั้นตอนที่ 3 การนำผลที่ได้จาก immunoblotting ไปประเมินระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor

นำแถบที่ปรากฏบนแผ่นฟิล์มไปวิเคราะห์หาระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Quantity One[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)

5. การศึกษาระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กด้วยวิธี autoradiography

เนื้อเยื่อสมองซึ่งประกอบด้วยสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area ถูก incubate กับ [³H]dizocilpine maleate ([³H]MK-801) เป็นเวลา นาที โดยใช้ 60 MK-801 ในการวัดระดับของ non-specific NMDA receptor binding จากนั้นจึงนำเนื้อเยื่อทั้งหมดไปวางเทียบกับแถบ tritium มาตราฐานบน Hyperfilm เป็นเวลา 4 สัปดาห์ เมื่อครบตามจำนวนเวลา autoradiographs จะถูกนำไปวิเคราะห์หาระดับของ NMDA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Quantity One[®] (Bio-Rad Laboratories, Inc. California, USA)

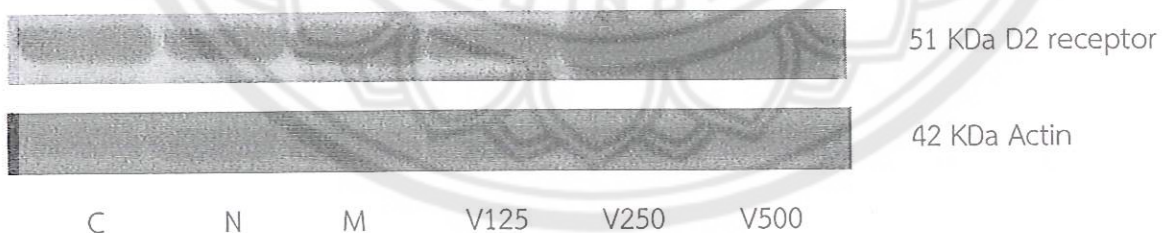
13.2.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มต่างๆที่ได้จากการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting และ autoradiography ถูกนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่ม โดยใช้สถิติ ANOVA ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05 ($P < 0.05$)

ผลการศึกษา

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ D2 receptor ในสมองหนูขาว

ระดับของ D2 receptor ที่แสดงออกในเนื้อสมองของหนูขาวเล็ก จะแสดงเป็นแถบที่มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 51 กิโลดาลตัน (kDa) (รูปที่ 1) จากผลการศึกษาพบว่าระดับของ D2 receptor ในเนื้อสมองหนูขาวเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคตินมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับนิโคติน และเมื่อหนูที่อยู่ในภาวะเลียนแบบการขาดนิโคตินได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดต่างๆ (125, 250 และ 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม) ระดับของ D2 receptor กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นกลับมาใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1) อย่างไรก็ตามผลการเปลี่ยนแปลงของระดับ D2 receptor นี้ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)



รูปที่ 1 แถบโปรตีนระดับ D2 receptor ที่น้ำหนักโมเลกุล 51 kDa จากสมองหนูขาวเล็กโดยวิธี immunoblotting. C คือ หนูขาวเล็กกลุ่มควบคุม, N คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยน้ำเกลือ, M คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่กลุ่มได้รับ nicotine ตามด้วย macamylamine, V125 คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, V250 คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, V500 คือหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

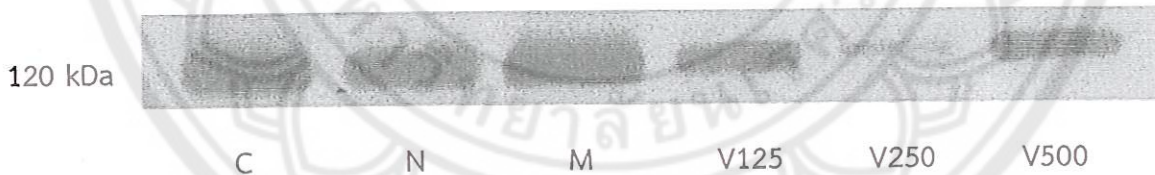
ตารางที่ 1 ระดับของ D2 receptor ในสมองหนูขนาดเล็ก จากการศึกษาโดยวิธี immunoblotting

หนูขนาดเล็ก	ปริมาณความเข้มของแถบ โปรตีน (N = 3)
กลุ่มควบคุม	213.99 ± 17.17
กลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน	201.13 ± 17.18
กลุ่มที่ได้รับ mecamylamine	205.45 ± 16.32
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	208.38 ± 9.03
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	218.69 ± 1.34
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	223.81 ± 7.24

หมายเหตุ ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

ผลของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็ก

เนื้อสมองหนูขนาดเล็กเฉพาะส่วน membrane fraction ถูกนำมาหาระดับ NMDA receptor ซึ่งแสดงเป็นแถบบนแผ่นฟิล์มโดยมีน้ำหนักโมเลกุลโปรตีนประมาณ 120 กิโลดัลตัน (kDa) (รูปที่ 2) จากผลการศึกษาพบว่าระดับของ NMDA receptor ในสมองจากหนูขนาดเล็กในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) อย่างไรก็ตามมีแนวโน้มของการลดลงในสมองหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวหลังจากเกิดภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว แต่การลดลงของระดับ NMDA receptor ไม่ขึ้นกับขนาดของสารสกัดหญ้าดอกขาวที่หนูขนาดเล็กได้รับ (ตารางที่ 2)



รูปที่ 2 แถบโปรตีนระดับ NMDA receptor ที่น้ำหนักโมเลกุล 120 kDa จากสมองหนูขนาดเล็กโดยวิธี immunoblotting. C คือ หนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุม, N คือหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยน้ำเกลือ, M คือหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วย mecamylamine, V125 คือหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, V250 คือหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม, V500 คือหนูขนาดเล็กกลุ่มที่ได้รับ nicotine ตามด้วยสารสกัดหญ้าดอกขาว 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

จากการพิจารณาในระดับ NMDA receptor ในสมองส่วนที่เกี่ยวข้องกับการติดนิโคติน ได้แก่ hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p > 0.05$) ของระดับ NMDA receptor ในสมองทั้ง 3 ส่วนระหว่างหนูขาวเล็กที่ได้รับและไม่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว และขนาดของสารสกัดหญ้าดอกขาวไม่มีผลต่อระดับของ NMDA receptor ในสมองทั้ง 3 ส่วน (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็ก จากการศึกษาโดยวิธี autoradiography

หนูขาวเล็ก	ระดับของ NMDA receptor (fmol/mg) (N = 3)		
	Hippocampus	Nucleus accumbens	Ventral tegmental area
กลุ่มควบคุม	5.13 ± 2.29	5.41 ± 2.44	0.76 ± 4.54
กลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน	4.81 ± 2.09	5.59 ± 1.88	2.04 ± 1.96
กลุ่มที่ได้รับ mecamylamine	1.87 ± 0.89	1.45 ± 0.33	1.27 ± 1.71
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 125 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	3.53 ± 4.05	4.37 ± 3.79	0.20 ± 1.82
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 250 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	2.81 ± 2.54	2.49 ± 2.73	2.76 ± 1.18
กลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวขนาด 500 มิลลิกรัม/กิโลกรัม	5.10 ± 1.33	4.11 ± 0.91	4.02 ± 1.73

หมายเหตุ ผลการศึกษาแสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน

วิจารณ์และสรุปผลการศึกษา

การศึกษานี้เป็นการศึกษาแรกที่แสดงให้เห็นถึงผลของการเปลี่ยนแปลงของระดับ D2 receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคตินหลังจากได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวในขนาดต่างๆ ซึ่งจากผลการศึกษาโดยใช้วิธี immunoblotting พบว่าระดับของ D2 receptor และ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาว ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขาวเล็กกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ขาดนิโคติน อย่างไรก็ตามระดับของ D2 receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ในขณะที่ระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขาวเล็กกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญ้าดอกขาวมีแนวโน้มลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ขาดนิโคติน ซึ่งงานวิจัยที่ผ่านมามีรายงานการลดลงของระดับ D2 receptor (Novak et al., 2010) และมีการเพิ่มขึ้นของระดับ NMDA receptor ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับนิโคตินติดต่อกัน (Hsieh et al., 2002; Kovacs et al., 2010) รวมทั้งมีความสัมพันธ์ระหว่างอาการติดบุหรี่กับ D2 receptor (Fehr et al., 2008) และ NMDA receptor (Ma et al., 2010) ในผู้ที่สูบบุหรี่ นอกจากนี้มีหลักฐานว่าการขาดยาในภาวะติดสารเสพติดหลายๆชนิดสัมพันธ์กับการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระดับของ D2 receptor (Conrad et al., 2010; Zijlstra et al., 2008) และ NMDA receptor (Ary and Szumlinski, 2007;

Obara et al., 2009; Pian et al., 2010) ในสมอง แต่สำหรับการศึกษานี้ D2 receptor และ NMDA receptor ในสมองของหนูขนาดเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดโดปามีนมีระดับที่ไม่แตกต่างจากหนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเกิดจากการที่จำนวนของหนูขนาดเล็กที่ใช้ในการศึกษามีจำนวนน้อยเกินไป จึงไม่พบความแตกต่างเช่นการศึกษาอื่น สำหรับผลของสารสกัดหญาดอกขาวที่ทำให้มีแนวโน้มเพิ่มระดับ D2 receptor และลดระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็กนั้น อธิบายถึงกลไกของสารสกัดหญาดอกขาวในการลดอาการขาดโดปามีนที่เกี่ยวข้องกับระดับ NMDA receptor โดยยาหรือสารที่ใช้ในการลดการติดบูหรี่หรือลดอาการขาดโดปามีนบางชนิดออกฤทธิ์ผ่านการทำงานของ D2 receptor (Berrettini and Lerman, 2005) หรือ NMDA receptor (Bisaga et al., 2000; Jain et al., 2008) และจากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบการลดลงของผลในการทำให้โดปามีนในสัตว์ทดลองที่ได้รับสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการทำงานของ NMDA receptor (Kosowski et al., 2004; Papp et al., 2002) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารสกัดหญาดอกขาวอาจมีผลเพิ่มระดับของ D2 receptor และลดระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็ก ซึ่งอาจส่งผลต่อการลดอาการขาดโดปามีน

การติดสารเสพติดรวมทั้งนิโคตินเป็นผลจากการทำงานของสมองหลายๆส่วน โดยเฉพาะ hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area (Davis and Gould, 2008; Govind et al., 2009) ซึ่งมีรายงานการเพิ่มขึ้นของการทำงานของ NMDA receptor ในสมองส่วนดังกล่าวในสัตว์ทดลองที่มีภาวะเลียนแบบการติดสารเสพติด (Bajo et al., 2006; Murray et al., 2007) และในผู้ที่ได้รับสารเสพติด (Pian et al., 2010) จากผลการศึกษาด้วยวิธี immunoblotting ซึ่งพบแนวโน้มการลดระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็ก เมื่อทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงระดับ NMDA receptor ในสมองเฉพาะส่วน ได้แก่ hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area โดยวิธี autoradiography พบว่าระดับ NMDA receptor ในสมองทั้ง 3 ส่วนดังกล่าวของหนูขนาดเล็กไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบระหว่างหนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุม กลุ่มที่มีภาวะเลียนแบบการขาดโดปามีน และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหญาดอกขาว จึงเป็นไปได้ว่าแนวโน้มที่ลดลงของระดับ NMDA receptor ในสมองของหนูขนาดเล็กที่พบในการศึกษานี้ เกิดขึ้นในสมองส่วนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการติดนิโคตินนอกเหนือไปจากสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area มีหลายการศึกษาที่สนับสนุนการพบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของ NMDA receptor ในสมองส่วน limbic forebrain (Narita et al., 2000), locus coeruleus, hypothalamic paraventricular nucleus frontal cortex (Zhu et al., 1999) และ striatum (Kerdsan et al., 2009) ในภาวะที่ได้รับสารเสพติด จึงเป็นไปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็กภายหลังจากการได้รับสารสกัดหญาดอกขาว เกิดขึ้นในสมองส่วนอื่นนอกเหนือจาก hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจนำไปสู่การลดอาการขาดโดปามีนในสัตว์ทดลอง

เอกสารอ้างอิง

- นริศรา แยมทรัพย์. (2541). หน้าดอกขาว อีกทางเลือกหนึ่งของผู้ต้องการเลิกบุหรี่. *จุลสารบุหรีและสุขภาพ*, 8, 15-16.
- ศักดิ์วิชา ไชสวัสดิ์, มนัชยา มรรคอนันตโชติ. (2539). การศึกษารูปแบบการบำบัดผู้ติดบุหรีด้วยการใช้หน้าดอกขาวและธรรมชาติบำบัดของโรงพยาบาลเทิง จังหวัดเชียงรย. สถาบันควบคุมการบริโภคนยาสูบ กระทรวงสาธารณสุข: นนทบุรี.
- Ary, A. W., & Szumlinski, K. K. (2007). Regional differences in the effects of withdrawal from repeated cocaine upon Homer and glutamate receptor expression: a two-species comparison. *Brain Research*, 1184, 295-305.
- Bisaga, A., Popik, P., Bepalov, A. Y., & Danysz, W. (2000). Therapeutic potential of NMDA receptor antagonists in the treatment of alcohol and substance use disorders. *Expert Opinion on Investigational Drugs*, 9(10), 2233-2248.
- Bajo, M., Crawford, E. F., Roberto, M., Madamba, S. G., & Siggins, G. R. (2006). Chronic morphine treatment alters expression of N-methyl-D-aspartate receptor subunits in the extended amygdala. *Journal of Neuroscience Research*, 83(4), 532-537.
- Balfour, D. J., Wright, A. E., Benwell, M. E., & Birrell, C. E. (2000). The putative role of extra-synaptic mesolimbic dopamine in the neurobiology of nicotine dependence. *Behavioural Brain Research*, 113, 73-83.
- Berrettini, W. H., & Lerman, C. E. (2005). Pharmacotherapy and pharmacogenetics of nicotine dependence. *American Journal of Psychiatry*, 162(8), 1441-1451.
- Cano-Cebrián, M. J., Zornoza-Sabina, T., Guerri, C., Polache, A., & Granero, L. (2003). Local acamprostate modulates dopamine release in the rat nucleus accumbens through NMDA receptors: an in vivo microdialysis study. *Naunyn-schmiedeberg's Archives of Pharmacology*, 367, 119-125.
- Conrad, K. L., Ford, K., Marinelli, M., & Wolf, M. E. (2010). Dopamine receptor expression and distribution dynamically change in the rat nucleus accumbens after withdrawal from cocaine self-administration. *Neuroscience*, 169(1), 182-194.
- Davis, J. A., & Gould, T. J. (2008). Associative learning, the hippocampus, and nicotine addiction. *Current Drug Abuse Reviews*, 1(1), 9-19.
- Fehr, C., Yakushev, I., Hohmann, N., Buchholz, H. G., Landvogt, C., Deckers, H., Eberhardt, A., Kläger, M., Smolka, M. N., Scheurich, A., Dielentheis, T., Schmidt, L. G., Rösch, F., Bartenstein, P., Gründer, G., & Schreckenberger, M. (2008). Association of low striatal dopamine d2 receptor availability with nicotine dependence similar to that seen with other drugs of abuse. *American Journal of Psychiatry*, 165(4), 507-514.
- Govind, A. P., Vezina, P., & Green, W. N. (2009). Nicotine-induced upregulation of nicotinic receptors: underlying mechanisms and relevance to nicotine addiction. *Biochemical Pharmacology*, 78(7), 756-765.

- Gupta, M., Mazumder, U. K., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P. K., & Roy, S. (2003). Evaluation of antipyretic potential of *Vernonia cinerea* extract in rats. *Phytotherapy Research*, 17, 804-806.
- Gupta, M., Mazumder, U. K., Manikandan, L., Haldar, P. K., Bhattacharya, S., & Kandar, C. C. (2003). *Antibacterial activity of Vernonia cinerea*. *Fitoterapia*, 74, 148-150.
- Hsieh, C. Y., Leslie, F. M., & Metherate, R. (2002). Nicotine exposure during a postnatal critical period alters NR2A and NR2B mRNA expression in rat auditory forebrain. *Developmental Brain Research*, 133(1), 19-25.
- Iwalewa, E. O., Iwalewa, O. J., & Adeboye, J. O. (2003). Analgesic, antipyretic, anti-inflammatory effects of methanol, chloroform and ether extracts of *Vernonia cinerea* less leaf. *Journal of Ethnopharmacology*, 86, 229-234.
- Jain, R., Mukherjee, K., & Balhara, Y. P. (2008). The role of NMDA receptor antagonists in nicotine tolerance, sensitization, and physical dependence: a preclinical review. *Yonsei Medical Journal*, 49(2), 175-188.
- Kenny, P. J., & Markou, A. (2001). Neurobiology of the nicotine withdrawal syndrome. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*, 70, 531-549.
- Kerdsan, W., Thanoi, S., & Nudmamud-Thanoi, S. (2009). Changes in glutamate/NMDA receptor subunit 1 expression in rat brain after acute and subacute exposure to methamphetamine. *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2009, 329631.
- Kosowski, A. R., Cebers, G., Cebere, A., Swanhagen, A. C., & Liljequist, S. (2004). Nicotine-induced dopamine release in the nucleus accumbens is inhibited by the novel AMPA antagonist ZK200775 and the NMDA antagonist CGP39551. *Psychopharmacology*, 175(1), 114-123.
- Kosowski, A. R., & Liljequist, S. (2004). The NR2B-selective N-methyl-D-aspartate receptor antagonist Ro 25-6981 [(+/-)-(R*,S*)-alpha-(4-hydroxyphenyl)-beta-methyl-4-(phenylmethyl)-1-piperidine propanol] potentiates the effect of nicotine on locomotor activity and dopamine release in the nucleus accumbens. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 311(2):560-567.
- Kovacs, K., Lajtha, A., & Sershen, H. (2010). Effect of nicotine and cocaine on neurofilaments and receptors in whole brain tissue and synaptoneurosome preparations. *Brain Research Bulletin*, 82(1-2), 109-117.
- Kuo, Y. H., Kuo, Y. J., Yu, A. S., Wu, M. D., Ong, C. W., Yang Kuo, L. M., Huang, J. T., Chen, C. F., & Li, S. Y. (2003). Two novel sesquiterpene lactones, cytotoxic vernolide-A and -B, from *Vernonia cinerea*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 51, 425-426.
- Latha, R. M., Geetha, T., & Varalakshmi, P. (1998). Effect of *Vernonia cinerea* Less flower extract in adjuvant-induced arthritis. *General Pharmacology*, 31, 601-606.
- Ma, J. Z., Payne, T. J., Nussbaum, J., & Li, M. D. (2010). Significant association of glutamate receptor, ionotropic N-methyl-D-aspartate 3A (GRIN3A), with nicotine dependence in European- and African-American smokers. *Human Genetics*, 127(5), 503-512.
- Mansvelder, H. D., & McGehee, D. S. (2002). Cellular and synaptic mechanisms of nicotine addiction. *Journal of Neurobiology*, 53, 606-617.

- Mazumder, U. K., Gupta, M., Manikandan, L., Bhattacharya, S., Haldar, P. K., & Roy, S. (2003). Evaluation of anti-inflammatory activity of *Vernonia cinerea* Less. extract in rats. *Phytomedicine*, *10*, 185-188.
- Molyneux, A. (2004). Nicotine replacement therapy. *British Medical Journal*, *328*, 454-456.
- Morgane, P. J., Galler, J. R., & Mokler, D. J. (2005). A review of systems and networks of the limbic forebrain/limbic midbrain. *Progress in Neurobiology*, *75*, 143-160.
- Murray, F., Harrison, N. J., Grimwood, S., Bristow, L. J., & Hutson, P. H. (2007). Nucleus accumbens NMDA receptor subunit expression and function is enhanced in morphine-dependent rats. *European Journal of Pharmacology*, *562*(3), 191-197.
- Narita, M., Soma, M., Mizoguchi, H., Tseng, L. F., & Suzuki, T. (2000). Implications of the NR2B subunit-containing NMDA receptor localized in mouse limbic forebrain in ethanol dependence. *European Journal of Pharmacology*, *401*(2), 191-195.
- Novak, G., Seeman, P., & Le Foll, B. (2010). Exposure to nicotine produces an increase in dopamine D2(High) receptors: a possible mechanism for dopamine hypersensitivity. *The International Journal of Neuroscience*, *120*(11), 691-697.
- Obara, I., Bell, R. L., Goulding, S. P., Reyes, C. M., Larson, L. A., Ary, A. W., Truitt, W. A., & Szumlanski, K. K. (2009). Differential effects of chronic ethanol consumption and withdrawal on homer/glutamate receptor expression in subregions of the accumbens and amygdala of P rats. *Alcoholism, Clinical and Experimental Research*, *33*(11), 1924-1934.
- Papp, M., Gruca, P., & Willner, P. (2002). Selective blockade of drug-induced place preference conditioning by ACPC, a functional NMDA-receptor antagonist. *Neuropsychopharmacology*, *27*(5), 727-743.
- Pian, J. P., Criado, J. R., Milner, R., & Ehlers, C. L. (2010). N-methyl-D-aspartate receptor subunit expression in adult and adolescent brain following chronic ethanol exposure. *Neuroscience*, *170*(2), 645-654.
- Pidoplichko, V. I., Noguchi, J., Areola, O. O., Liang, Y., Peterson, J., Zhang, T., & Dani, J. A. (2004). Nicotinic cholinergic synaptic mechanisms in the ventral tegmental area contribute to nicotine addiction. *Learning & Memory*, *11*, 60-69.
- Wonnacott, S., Sidhpura, N., & Balfour, D. J. (2005). Nicotine: from molecular mechanisms to behaviour. *Current Opinion in Pharmacology*, *5*, 53-59.
- Zhu, H., Jang, C. G., Ma, T., Oh, S., Rockhold, R. W., & Ho, I. K. (1999). Region specific expression of NMDA receptor NR1 subunit mRNA in hypothalamus and pons following chronic morphine treatment. *European Journal of Pharmacology*, *365*(1), 47-54.
- Zijlstra, F., Booij, J., van den Brink, W., & Franken, I. H., (2008). Striatal dopamine D2 receptor binding and dopamine release during cue-elicited craving in recently abstinent opiate-dependent males. *European Neuropsychopharmacology*, *18*(4), 262-270.

ภาคผนวก

ตัวชี้วัดเพื่อการประเมินผลสำเร็จ
ของโครงการ

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผลของสารสกัดหน้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ NMDA receptor ในสมองของหนูขนาดเล็ก
Effects of *Vernonia cinerea* Less. extract on levels of NMDA receptors in mouse brains

บทคัดย่อ

หน้าดอกขาวเป็นพืชสมุนไพรที่นำมาใช้รักษาอาการผิดปกติต่างๆ รวมทั้งการลดอาการอยากสูบบุหรี่ซึ่งกลไกในการลดอาการอยากสูบบุหรี่ยังไม่ทราบแน่ชัด และจากการศึกษาที่ผ่านมามีการรายงานถึงบทบาทของ NMDA receptor ในการติดนิโคติน งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหน้าดอกขาวที่มีต่อระดับของ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็ก เปรียบเทียบระหว่างหนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุม หนูขนาดเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน และหนูขนาดเล็กที่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวในขนาดต่างๆหลังจากเกิดภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน ผลการศึกษาโดยวิธี immunoblotting แสดงให้เห็นว่าแม้พบความแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญระหว่างหนูขนาดเล็กแต่ละกลุ่ม แต่มีแนวโน้มของการลดลงของระดับ NMDA receptor ในหนูขนาดเล็กที่ได้รับสารสกัดหน้าดอกขาวเมื่อเปรียบเทียบกับหนูขนาดเล็กกลุ่มควบคุมและหนูขนาดเล็กที่มีภาวะเลียนแบบการขาดนิโคติน อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาการเปลี่ยนแปลงของระดับ NMDA receptor ในสมองที่เกี่ยวข้องกับการติดนิโคติน ได้แก่ hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area โดยวิธี autoradiography พบว่าระดับ NMDA receptor ในสมองส่วนดังกล่าวมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกันระหว่างหนูแต่ละกลุ่ม จึงอาจเป็นไปได้ว่าแนวโน้มที่ลดลงของระดับ NMDA receptor ในสมองหนูขนาดเล็กหลังจากได้รับสารสกัดหน้าดอกขาว เกิดขึ้นในสมองส่วนอื่นที่เกี่ยวข้องกับการติดนิโคติน นอกเหนือไปจากสมองส่วน hippocampus, nucleus accumbens และ ventral tegmental area

คำสำคัญ : หน้าดอกขาว NMDA receptor หนูขนาดเล็ก การติดนิโคติน