สำนักหอสมุด

อภินันทนาการ สัญญาเลขที่ MS-AR048/2552

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาพิษแบบกึ่งเรื้อรังของสารสกัดชาเขียว และกากชาเขียวและผลต่อระดับของเอนไซม์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในหนูโตเต็มวัย หนูแก่

โดย

1. ดร. พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์ ภาควิชาสรีรวิทยา
2. ผ.ศ. ดร. นิวัติ เทพาวราพฤกษ์ ภาควิชาสรีรวิทยา
3. ดร. สุธิรา เลิศตระกูล ภาควิชาชีวเคมี
4. อาจารย์เทวรัตน์ คุ้มจันทึก ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
5. อาจารย์พงษ์พิทักษ์ ภูติวัตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์

คณะวิทยาศาสตรการแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยนเรศวร
วันลงทะเบียน - 5 JUL 2011
เลขทะเบียน 1566430
เลขเรียกหนังสือ ว ๒๓ ๒๕๑ พ๒๕๕ ๒๕๑๒

ได้รับทุนอุดหนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2552
มหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอไว้อาลัยแด่ อาจารย์ ดร. สุธิรา เลิศตระกูล ผู้ร่วมโครงการวิจัย ซึ่งอาจารย์ได้เสียชีวิตลงด้วยโรคมะเร็งก่อนที่โครงการนี้จะเสร็จสิ้นลง

ขอขอบคุณ ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประภัศร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์ สารสกัดชาและกากชาเขียวที่ใช้งานวิจัยนี้

ทางคณะผู้วิจัยได้รับความอนุเคราะห์ด้านสถานที่และสาธารณูปโภคในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง การทำวิจัยทางชีวเคมี และด้านเนื้อเยื่อวิทยา จากภาควิชาสรีรวิทยา ภาควิชาชีวเคมีและศูนย์นิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

งานวิจัยนี้ได้รับความช่วยเหลือจาก นางสาวรัตติยา สมบัติทวีกุล นิสิตปริญญาโทสาขาสรีรวิทยา และนางสาว ปวีณา แก้วมั่น นิสิตปริญญาตรี สาขาคู่ขนานนิติศาสตร์

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนโครงการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดินปี 2552 มหาวิทยาลัยนเรศวร

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้ดำเนินการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรังของสารสกัดชาเขียวและสารสกัดกากชาเขียว ในหนูโตเต็มวัยและหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดเป็นเวลานาน 90 วัน โดยจะศึกษาค่าทางชีวเคมี ค่าโลหิตวิทยา จุลกายวิภาคของอวัยวะภายในที่สำคัญ เช่น สมอง หัวใจ ปอด ตับ และไต ฯลฯ เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถใช้ในการยืนยันความปลอดภัยของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว นอกจากนี้ ยังได้ทำการตรวจระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระคือ กลูตาไธโอน เปอร์ออกซิเดส และ คาตาเลส ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของสัตว์ทดลองกลุ่มดังกล่าวด้วย เพื่อให้ได้ข้อมูลที่สามารถใช้ในการยืนยันว่าผลของสารสกัดชาเขียวต่อระบบความจำเกี่ยวข้องกับการต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่น

จากผลการวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ไม่พบความผิดปกติหรือความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลอง แต่จากผลการวิเคราะห์ค่าทางชีวเคมีของเลือดพบว่า กลุ่มหนูแก่มีการทำงานของตับที่ไม่ดีเท่ากับหนูหนุ่มและการให้สารสกัดจากชาเขียวขนาด 300 มก/กกน้ำหนักตัวแก่หนูแก่เป็นเวลานาน 90 วันไม่แสดงผลเสียอย่างเห็นได้ชัดต่อการทำงานของตับในหนูแก่ แต่การให้สารสกัดกากชาเขียวขนาดสูงคือ 300 มก/กกน้ำหนักตัว อาจส่งผลเสียต่อการทำงานของตับได้ ในขณะที่การให้สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก/กกน้ำหนักตัวเป็นเวลานาน 90 วันในหนูหนุ่มเป็นพิษและไม่ส่งผลเสียต่อการทำงานของตับ ส่วนผลทางจุลกายวิภาคของอวัยวะภายในที่สำคัญของหนูหนุ่มกลุ่มต่างๆ ไม่พบความผิดปกติใดๆอย่างเด่นชัด

ผลการวิเคราะห์ระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระพบว่าหนูหนุ่มปกติมีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์มากกว่าหนูแก่อย่างมีนัยสำคัญ ในกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว มีระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งผลที่ได้นี้คล้ายคลึงกับผลในหนูหนุ่ม กล่าวคือหนูหนุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว มีระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระมากกว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม นอกจากนี้การให้สารสกัดทั้งสองเป็นเวลานาน ยังมีผลป้องกันการลดจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของทั้งหนูแก่และหนูหนุ่ม

สรุปได้ว่ากลไกการทำงานของชาเขียวและกากชาเขียว ในการเพิ่มความสามารถการเรียนรู้และความจำในสัตว์ทดลองที่มีอายุมากหรือหนูปกติ อาจเกี่ยวข้องกับการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ และการป้องกันการลดจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และการให้สารสกัดเป็นเวลานาน 90 วัน ไม่เป็นพิษหรือส่งผลเสียต่อหนูหนุ่ม แต่อาจทำให้การทำงานของตับแย่ลงในหนูแก่ได้

Abstracts

The present study investigated the sub-chronic toxicology effects of green tea (GT) or its byproduct (GTB) when given to the young and old rats for 90 days. Biochemical analysis, blood test and histological study of important organ such as brain heart lung liver and kidney etc were conducted in order to confirm the safety of GT and GTB. In addition, the activity of antioxidant enzymes ie., glutathione peroxidase and catalase in the hippocampus of those rats were measured in order to confirm that cognitive enhancement effects of GT and GTB involved with antioxidant enzymes

From blood test, there was neither abnormal sign nor difference among the testing groups. However, biochemical analysis of blood revealed that the old rats had poorer liver function than the young rats. The administration of GT for 90 days to the old rats did not cause any obvious abnormal liver function but the administration of GTB for 90 days might affect liver function. In contrast, the administration of GT or GTB at the doses of 30 and 300 mg/Kg to the young rats did not cause any toxicity or interferences their liver function. Histological analysis of important organ revealed no obvious abnormal signs.

The level of antioxidant enzyme activities in the young rats was found to be significantly higher than the old rats. The group of old rats that received GT or GTB had higher level of antioxidant enzymes activities than the control old rats. Similarly, the young rats that received GT or GTB had higher level of antioxidant enzymes activities than the control young rats. Additionally, long term administration of GT or GTB could reduce the number of damage neurons in the hippocampus of both young and old rats.

In conclusion, the mechanism of GT or GTB underlying the improvement of cognitive functions in old or young rats may involve the enhancement of antioxidant enzyme activity in the hippocampus. Long term administration of these extracts for 90 days do not cause any toxic signs in the young rats but may cause the abnormal liver function in the old rats.

สารบัญเรื่อง

เรื่อง	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อภาษาไทย	3
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	4
สารบัญรูป	6
สารบัญตาราง	7
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
วิธีดำเนินการวิจัย	16
ผลการทดลอง	25
สรุปและวิจารณ์ผล	48
บรรณานุกรม	50
เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลอง	54

สารบัญรูป

	หน้า
รูปที่ 1 แสดงภาพของต้นชา (พืชในกลุ่ม *Camelliea sinensis*)	9
รูปที่ 2 แสดงลักษณะของใบชาเขียว	9
รูปที่ 3 แสดงสารประกอบหลักโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่พบในใบชาเขียว	10
รูปที่ 3 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูทดลอง	16
รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนหลักการย้อมสี Hematoxylin & Eosin	20
รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูแก่แต่ละกลุ่ม	25
รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่ม	26
รูปที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบจำนวน undamaged neuron บริเวณ CA1 และ CA3 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่ธรรมชาติและหนูหนุ่มแต่ละกลุ่ม	40
รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบใน CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่ธรรมชาติในแต่ละกลุ่ม	41
รูปที่ 10 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบใน CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus ของหนูหนุ่มในแต่ละกลุ่ม	42
รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบในอวัยวะของหนูกลุ่มต่างๆ	43
รูปที่12 กราฟมาตรฐาน ของการทำงานของ Glutathione Peroxidase (GPx)	44
รูปที่ 13 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม	45
รูปที่ 14 กราฟมาตรฐานของการทำงานของเอนไซม์ catalase	46
รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase ในสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่ และหนูหนุ่ม	46

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 แสดงกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อ	19
ตาราง 2 แสดงกระบวนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin	21
ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูแก่ป้อนน้ำ	28
ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูแก่ป้อนชาเขียว 300 มก/กก	29
ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูแก่ป้อนกากชาเขียว 300 มก/กก	30
ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนน้ำ	31
ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนชาเขียว 30 มก/กก	32
ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนชาเขียว 300 มก/กก	34
ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนกากชาเขียว 30 มก/กก	35
ตารางที่10 ผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนกากชาเขียว 300 มก/กก	36

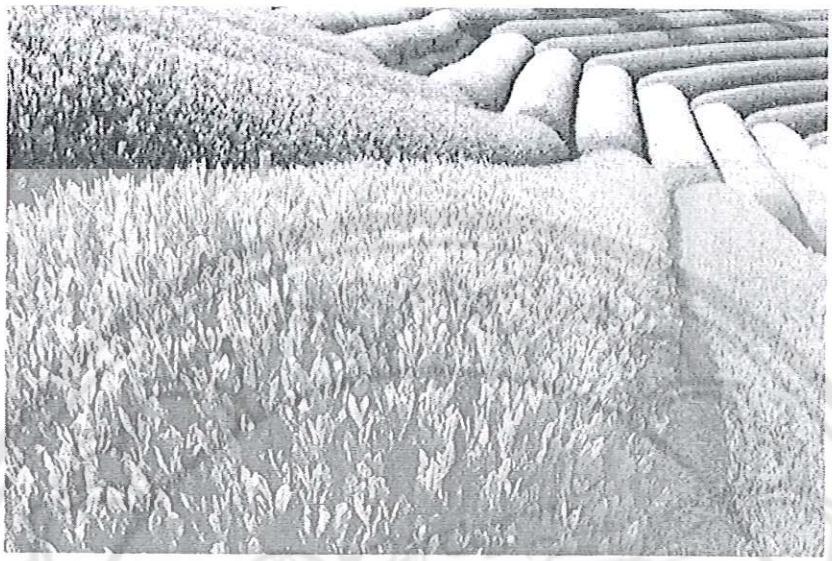
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ชาเขียว

ชาเป็นเครื่องดื่มชนิดหนึ่งซึ่งเป็นที่นิยมที่มีผู้บริโภคทั่วโลก โดยในแต่ละปีมีการนำใบชามาผลิตเป็นเครื่องดื่มเพื่อการบริโภคประมาณ 3 พันล้านกิโลกรัม ซึ่งมีการบริโภคแตกต่างกันในพื้นที่ต่างๆ ของโลก เช่น ชาเขียว ชาอูหลง หรือชาดำ (Khan and Mukhtar, 2007) ซึ่งการแบ่งประเภทของชาตามแบบจีนสามารถแบ่งชาออกได้เป็น 7 ประเภทคือ ชาขาว (white tea) ชาเขียว (green tea) ชาอูหลง (oolong tea) ชาดำ (black tea) ชาผูเอ่อ (pu-er tea) ชาเป่าจง (pouching) และชาแต่งกลิ่นรส (scented/flavored tea) โดยชาเขียวมีการบริโภคกันมากในจีน ญี่ปุ่นและเอเชียตะวันออก ขณะที่ชาดำมีการบริโภคมากในประเทศแถบยุโรป และอินเดีย (Koo and Chi, 2004) ในปัจจุบันชาที่นิยมดื่มโดยทั่วไปมีอยู่ 3 ประเภทคือ ชาเขียว ชาอูหลง และ ชาดำ โดยชาทั้ง 3 ประเภทนี้มีกระบวนการการผลิตที่แตกต่างกันคือ 1) ชาดำ มีการบริโภคประมาณ 78% ของชาทั้งหมด เป็นชาที่ผ่านการหมัก 100 % (full- fermented tea) มีสารที่สำคัญน้อยมากหรือแทบไม่มีเลย แต่มีลักษณะพิเศษคือ มีกลิ่นหอม 2) ชาอูหลง มีการบริโภคประมาณ 2% ของชาทั้งหมด เป็นชากึ่งหมัก (semi-fermented tea) คือผ่านการหมัก 10-80% ชาอูหลงที่ผ่านการหมักไม่เกิน 20 % มีสารสำคัญที่เป็นประโยชน์ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับชาเขียว คุณลักษณะพิเศษของชาอูหลงคือ มีกลิ่นหอมและชุ่มคอ และ 3) ชาเขียว มีการบริโภคประมาณ 20% ของชาทั้งหมด เป็นชาที่ไม่ผ่านการหมัก (unfermented tea) ผลิตโดยทำใบชาให้แห้งด้วยกรรมวิธีการอบไอน้ำหรืออบที่อุณหภูมิสูงอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ต่อสารกลุ่มโพลีฟีนอล (polyphenols) และฟลาโวนอล (flavonols) ทำให้สารสำคัญเหล่านี้ในใบชายังคงเหลืออยู่ และมีคุณภาพเช่นเดียวกับในใบชาสด สีของน้ำชาเป็นสีเขียวอ่อน มีกลิ่นเขียวตามธรรมชาติ (สมพร ภูติยานันต์, 2546)

ชามาจากพืชตระกูลคาเมลเลีย (Camelliea) มีชื่อทางพฤกษศาสตร์ว่า *Camelliea sinensis* (รูปที่ 4) ถิ่นกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในประเทศจีน เจริญเติบโตในแถบที่มีสภาพภูมิประเทศเป็นพื้นที่สูง อากาศเย็น ต้นชาให้ใบขนาดยาวประมาณ 3 นิ้ว กว้างประมาณ 1 นิ้ว มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม ใบแหลมสีเขียว (รูปที่ 5) ดอกสีขาว มีกลิ่นหอม เมื่อดอกชาโตเต็มที่จะให้ผลชาที่ภายในมีเมล็ดเล็กๆ ตั้งแต่หนึ่งถึงสามเมล็ด ในการแพร่พันธุ์ ต้นชาจะต้องได้รับการผสมละอองเกสรกับต้นชาต้นอื่นๆเพื่อให้มีการแลกเปลี่ยนยีนและโครโมโซมซึ่งกันและกัน เมื่อปล่อยให้โตตามธรรมชาติสามารถสูงได้ถึง 20 เมตร แต่ในการทำไร่ชามักจะเลี้ยงไว้ที่ความสูง 3-5 เมตร เพื่อความสะดวกในการเก็บเกี่ยวใบชาอ่อน และตัดแต่งกิ่งให้ส่วนบนเป็นพื้นราบ ส่วนของต้นชา

ที่นำมาเป็นเครื่องดื่มจะอยู่ส่วนบนสุดของต้น ซึ่งเป็นตำแหน่งของการผลิใบอ่อน และการแตกหน่อ จัดเป็นส่วนที่มีคุณภาพที่ดีที่สุด

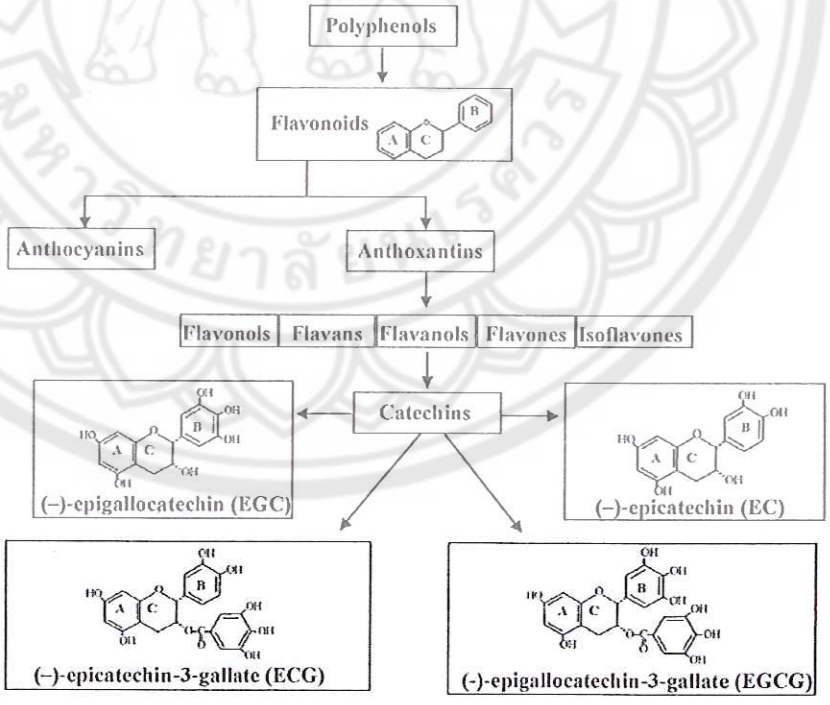


รูปที่ 4 แสดงภาพของต้นชา (พืชในกลุ่ม *Camelliea sinensis*)
สืบค้นเมื่อ 25 สิงหาคม 2551
ที่มา: http://www.orienthall.co.uk/images/green%20tea.jpg

รูปที่ 5 แสดงลักษณะของใบชาเขียว
สืบค้นเมื่อ 25 สิงหาคม 2551
ที่มา: http://img.alibaba.com/photo/10105131/Green_Tea_Extract.jpg

ส่วนประกอบสำคัญที่พบในชาเขียว

โพลีฟีนอล (polyphenols) เป็นสารประกอบชีวภาพที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติ ซึ่งสามารถพบได้ประมาณ 30-42% ในใบชาแห้ง มีสรรพคุณเป็นสารแอนติออกซิเดนซ์ ที่ทรงพลัง สารในกลุ่มโพลีฟีนอลมีอยู่มากมายหลายประเภท ซึ่งครอบคลุมถึงสารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ที่พบในชาเขียว สำหรับสารคาเทชิน (catechin) เป็นสารฟลาโวนอยด์ ชนิดพิเศษที่พบในชา โดยเฉพาะในชาเขียวซึ่งสามารถพบได้ประมาณ 10-18% ในใบชาแห้ง สารคาเทชินที่เป็นสารประกอบหลักในชาเขียวมี 5 ชนิดคือ เอปิคาเทชิน (epicatechin: EC) เอปิแกลโลคาเทชิน (epigallocatechin: EGC) เอปิคาเทชิน แกลเลต (epicatechin gallate: ECG) และ เอปิแกลโลคาเทชิน แกลเลต (epigallocatechin gallate: EGCG) โดยสาร EGCG พบปริมาณมากที่สุดคือ 40 % ของสารโพลีฟีนอลทั้งหมด ดังรูปที่ 3 นอกจากนี้ยังมีสารอื่นที่สามารถพบได้ในชาเขียวคือ กรดแกลโลแทนนิก (gellotannic acids), แอลคาลอยด์ (alkaloid) กลุ่ม พิวรีน (purine) ที่เป็นอนุพันธ์ของ methylxanthins ที่สำคัญคือ คาเฟอีน (caffeine), ธีโอโบรมีน (theobromine), ธีโอฟิลลิน (theophylline), แซนทีน (xanthine), เบต้าแคโรทีน (β-carotene), สารคลอโรฟิลล์ สารอาหารประเภท โปรตีน น้ำตาล กรดอะมิโนไธมีน (thiamine), วิตามิน อี ซี และ บีรวม ฟลูออไรด์ และแทนนิน เป็นต้น (Khan and Mukhtar, 2007; Weinreb et al., 2004)



รูปที่ 3 แสดงสารประกอบหลักโพลีฟีนอล (polyphenols) ที่พบในใบชาเขียว

ที่มา: Weinreb et al., 2004

ประโยชน์ของชาเขียว

ในปัจจุบันได้มีการศึกษาวิจัยถึงประโยชน์ของชาเขียวอย่างมาก อาจสืบเนื่องมาจากส่วนประกอบที่พบได้มากในชาเขียว คือ สารโพลีฟีนอลนั้น มีความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant capacity) ได้เป็นอย่างดี ดังเช่นมีการศึกษาถึงผลของการดื่มชาเขียว 1 ลิตรต่อวัน เป็นเวลา 3 สัปดาห์ในมนุษย์พบว่า ทำให้มีการลดลงของ malonyldialdehyde (MDA) และ malonyldialdehyde+4-hydroxy-2(E)-nonenal (MDA*4-HNE) ในเลือด ซึ่ง MDA และ MDA*4-HNE นี้เป็นผลิตผลที่เกิดจากกระบวนการ lipid peroxidation (Coimbra et al., 2006) และสามารถกำจัดอนุมูลอิสระ (radical scavenging) เช่น superoxide anion, hydroxyl radical, 1,1-diphenyl-2picrylhydrazyl radical (Nanjo, 1999) และ nitric oxide (Nakagawa and Yokozawa, 2002) มีการศึกษาผลของการให้ชาเขียว 0.2% เป็นเวลา 30 วันในหนูถีบจักรพบว่า สารโพลีฟีนอลในชาเขียวสามารถเสริมฤทธิ์การทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระคือ glutathione peroxidase, catalase และ quinine reductase ในลำไส้เล็ก ตับ และปอด (Khan et al., 1992) นอกจากนี้มีการทดลองถึงผลของสารโพลีฟีนอลในชาเขียวต่อการเรียนรู้และความจำ พบว่าหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารโพลีฟีนอล 0.1% และ 0.5% ติดต่อกันเป็นเวลานาน 26 สัปดาห์ พบว่ามีการเรียนรู้และความจำด้านสถานที่ (spatial cognition learning memory) เมื่อทดสอบด้วย radial arm maze test ดีกว่าหนูกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ (Haque et al., 2006) นอกจากนั้นจากการศึกษาของ Kaur และคณะ ทำการศึกษาผลของการให้สารสกัดชาเขียว 0.5% เป็นเวลา 8 สัปดาห์ต่อความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่เปรียบเทียบกับหนูหนุ่มพบว่าการให้สารสกัดชาเขียวช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูแก่โดยการเพิ่ม retention latency ของการทดสอบโดยใช้วิธี passive avoidance (Kaur et al., 2008) มีการรายงานผลการศึกษาวิจัยโดยการให้สาร EGCG 50 มก./กก.น้ำหนักตัว/วัน เป็นเวลา 6 เดือน พบว่าส่งผลให้มีการลดลงของ Amyloid β peptide และ plaque ในหนูถีบจักรที่ตัดแต่งยีนให้เป็นโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer transgenic mice) และมีความสามารถในการจำเพิ่มขึ้นเมื่อทดสอบด้วย RAM test (Rezai-Zadeh et al., 2008) นอกจากชาเขียวและสารประกอบที่อยู่ในชาเขียวจะมีประโยชน์ในการรักษาหรือป้องกันโรคต่างๆ แล้วยังมีคุณสมบัติในการควบคุม และลดน้ำหนัก โดยจากการศึกษาผลการให้ชาเขียว 3% เป็นเวลา 25 วันพบว่า มีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) ที่เกี่ยวข้องกับการสลายคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate metabolism) (Khan et al., 2007)

กากชาเขียว (Green tea byproduct)

กากชาเขียวเป็นส่วนที่เหลือใช้ภายหลังจากการผลิตเครื่องดื่มชาเขียว ซึ่งโดยปกติกากชาเขียวจะถูกจำกัดทิ้งโดยการเผาหรือการฝังกลบซึ่งก่อให้เกิดผลเสียกระทบผลต่อสิ่งแวดล้อม (Kondo, Kita, and Yokota, 2004) จากข้อมูลการวิจัยของ Yamamoto และคณะในปี 1997 พบว่ากากชาเขียวยังคงมีองค์ประกอบของโปรตีนหลงเหลืออยู่ภายหลังจากกระบวนการผลิตเป็นเครื่องดื่มชาเขียว จึงน่าจะนำประโยชน์ดังกล่าวมาพัฒนาเป็นอาหารสัตว์ แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณค่าทางสารอาหารที่ได้จากกากชาเขียว

จากการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยโดย ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประภัศร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล พบว่า กากชาเขียวมีปริมาณสารแอนติออกซิแดนซ์ที่สำคัญได้แก่ สารcatechin, สาร(-)-epigallocatechingallate (EGCG), สาร(-) – epigallocatechin (EGC) และสาร (-) – epicatechin (EC) ในปริมาณที่ใกล้เคียงกับปริมาณสารแอนติออกซิเดนซ์ที่พบในชาเขียว โดยมี catechin 0.022% EGCG 5.814% EGC 4.136% และ EC 6.634% อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับผลของกากชาเขียวในด้านต่างๆ มากมายนัก

อนุมูลอิสระ (Free Radical)

อนุมูลอิสระ คือ อะตอม โมเลกุล หรือสารประกอบที่มีอิเลคตรอนเดี่ยวอยู่ในออร์บิทัลวงนอกสุด รวมถึงอะตอมของไฮโดรเจนและอิออนของโลหะทรานซิชันส่วนใหญ่ อนุมูลอิสระมีทั้งที่อยู่ในสภาวะเป็นกลางทางไฟฟ้า และอนุมูลในสภาวะที่มีประจุไฟฟ้า โดยมีทั้งประจุบวกและประจุลบ อนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำจะไวต่อการเกิดปฏิกิริยามากกว่าอนุมูลที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงเนื่องจากอิเลคตรอนเดี่ยวจะไม่เสถียรและพยายามจับคู่กับอิเลคตรอนเดี่ยวอื่น ดังนั้นอนุมูลอิสระจึงมีคุณสมบัติเฉพาะ คือ มีความไวสูงในการเกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ โดยอนุมูลอิสระที่มีความเสถียรน้อยมาก ได้แก่ อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน (O_2^-) อนุมูลไฮดรอกซี (OH) อนุมูล อัลคอกซี (RO) และอนุมูลเปอร์ไฮดรอกซี (HO_2) ซึ่งอนุมูลอิสระเหล่านี้จัดเป็นอนุมูลที่ไวในการเกิดปฏิกิริยาสูงมาก อนุมูลอิสระและสารที่เกี่ยวข้องในทางชีววิทยา แบ่งได้เป็น 3 กลุ่มดังนี้ กลุ่มที่มีออกซิเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive oxygen species, ROS) กลุ่มที่มีไนโตรเจนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive nitrogen species, RNS) และกลุ่มที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบสำคัญ (reactive chlorine species, RCS) (Roberfroid and Colderon, 1995) อนุมูลอิสระในระบบของสิ่งมีชีวิตเป็นผลิตผลจากการเผาผลาญของเซลล์โดยการใช้ออกซิเจน อนุมูลซุปเปอร์ออกไซด์แอนอิออน (O_2^-) อนุมูลไฮดรอกซี (OH^-) เป็นอนุมูลที่พบในเซลล์มากกว่าอนุมูลอื่นๆ ส่วนไฮโดรเจนเปอร์ไซด์และเปอร์ออกซีไนไตรท

($ONOO^-$) แม้ไม่เป็นอนุมูลอิสระแต่จัดเป็นสารเกี่ยวข้องที่ความไวสูง (reactive species, RS) มีบทบาทในปฏิกิริยารีด็อกซ์ที่เกิดขึ้นในเซลล์เป็นอย่างมาก (โอภา วัชระคุปต์, 2549)

บทบาทของอนุมูลอิสระต่อการกระบวนการเกิดโรค

อนุมูลอิสระมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเกิดโรค ทั้งเป็นต้นเหตุของการเกิดโรค และเป็นปัจจัยทำให้โรคมีพัฒนาการอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงมากขึ้น โดยเฉพาะโรคที่เกี่ยวกับความเสื่อมและความบกพร่องของเซลล์ประสาทและระบบสื่อประสาทในสมอง และภาวะขาดเลือดของอวัยวะที่สำคัญต่อการดำรงชีวิต คือ หัวใจ และสมอง นอกจากนี้อนุมูลอิสระยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบอนุมูลอิสระมีความไวสูงไม่คงตัวเนื่องจากมีอิเลคตรอนเดี่ยวไร้คู่ ดังนั้นจึงพยายามหาอิเล็คตรอนมาจับคู่ทำให้มีความคงตัวขึ้น เป้าหมายแรกที่อนุมูลอิสระทำให้เกิดความเสียหายและเป็นสาเหตุของการเกิดโรค คือ ชีวโมเลกุลที่สำคัญในร่างกายที่ไวต่อการถูกออกซิไดซ์ ได้แก่ ลิพิดที่เป็นองค์ประกอบของเมมเบรน โปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของเอนไซม์ รีเซพเตอร์ และสารสื่อประสาท และ ดีเอ็นเอ ชีวโมเลกุลเหล่านี้มีอิเลคตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนที่หลุดออกโดยง่าย ทำให้อนุมูลอิสระเข้าไปทำปฏิกิริยาโดยเข้าจับคู่กับอิเล็คตรอนของชีวโมลกุล หรือดึงอิเลคตรอน หรืออะตอมไฮโดรเจนออกจากชีวโมเลกุลนั้น ๆ กล่าวคือชีวโมเลกุลคือ ลิพิด โปรตีน และ ดีเอ็นเอ ถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระ อุบัติการณ์เหล่านี้ทำให้คุณสมบัติ และการทำงานของชีวโมเลกุลเปลี่ยนไป เกิดความบกพร่อง หรือถูกทำลาย อันเป็นต้นเหตุของการเกิดโรค (Halliwell and Gutteridge, 1999; Kehre, 1993)

ความไม่สมดุลของการเกิดอนุมูลอิสระทำให้มีอนุมูลมากเกินสมดุล และ เกิดภาวะที่เซลล์และร่างกายถูกออกซิไดซ์ (oxidative stress) ภาวะดังกล่าวมีบทบาทในโรคต่าง ๆ มากกว่า 100 โรค เช่น ภาวะผนังเส้นเลือดแดงหนาและมีความยืดหยุ่นน้อยลงเนื่องจากการสะสมไขมันที่ผนังหลอดเลือด ทำให้หลอดเลือดตีบตันเกิดภาวะขาดเลือดชั่วขณะที่สมอง และหัวใจ โรคซึ่งเกี่ยวกับการเสื่อมของประสาท โรคภูมิแพ้และโรคมะเร็ง เป็นต้น นอกจากนี้การมีปริมาณอนุมูลอิสระที่ไม่สมดุลยังสัมพันธ์กับลักษณะโรคหรืออาการผิดปกติอื่น ๆ ดังนี้ โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน อาการสมองและไขสันหลังอักเสบอันเนื่องมาจากโรคภูมิแพ้ โรคเนื้องอกเรื้อรัง โรคตับอักเสบ โรคข้ออักเสบ และกลุ่มอาการ Down's syndrome (Lunec, 1992)

การป้องกันอันตรายและความเสียหายที่เกิดจากอนุมูลอิสระ

โดยธรรมชาติแล้วจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้นในเซลล์และร่างกายหลายชนิด มีทั้งที่เป็นประโยชน์และให้โทษอันประกอบด้วย อนุมูลอิสระที่หลุดรอดออกมาจากการเผาผลาญออกซิเจนเป็นพลังงาน อนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่เป็นตัวส่งสัญญาณต่อเซลล์ และอนุมูลอิสระที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของเซลล์หรืออวัยวะ เซลล์และร่างกายจะเป็นอันตรายและเสียหายหากมี

อนุมูลอิสระในปริมาณมากเกินสมดุล ดังนั้นเซลล์และร่างกายจึงมีกลไกเพื่อควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระไม่ให้สูงจนเกิดอันตราย กลไกสำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระมีกลไกหลักอยู่สามกลไก คือ เอนไซม์ สารตัวจับโลหะและสารต้านอนุมูลอิสระ ทำหน้าที่ลดผลกระทบที่เป็นอันตรายของอนุมูลต่อเซลล์ ในสภาวะปกติกลไกเหล่านี้ถือว่าเพียงพอต่อการรักษาปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุลได้ กล่าวคือสามารถควบคุมได้แม้ว่าจะมีอนุมูลอิสระเกิดขึ้น อย่างไรก็ตามหากเกิดภาวะผิดปกติที่ทำให้กลไกการป้องกันเหล่านี้บกพร่องไม่สามารถที่จะควบคุมภาวะสมดุลได้ จะนำไปสู่การเกิดภาวะที่อนุมูลและสารออกซิแดนท์มีมากเกินสมดุล (oxidative stress) และเกิดโรคต่าง ๆ ขึ้นในร่างกายได้ กลไกที่สำคัญที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล (โอภา วัชระคุปต์, 2549) ได้แก่

1. เอนไซม์

ในระดับเซลล์ เอนไซม์เป็นกลไกสำคัญขั้นแรกที่ทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล เอนไซม์ที่สำคัญ ได้แก่ เอนไซม์ catalase (CAT) เอมไซม์ CAT เป็นเอนไซม์ซึ่งมีฮีม คือ ferriprotoporphyrin เป็นองค์ประกอบ โครงสร้างเอนไซม์ CAT จะประกอบด้วยหน่วยย่อยของโปรตีนฮีม 4 หน่วยย่อยที่เหมือนกัน แต่ละหน่วยมีขนาด 60 กิโลดาลตัน เอนไซม์ CAT ทำหน้าที่เปลี่ยน H_2O_2 ไปเป็นโมเลกุลของน้ำและออกซิเจน (Satoh and Lindahl, 1994) ดังแสดงในสมการ

$$H_2O_2 + 2H^+ \xrightarrow{CAT} H_2O + O_2$$

2. สารตัวจับโลหะ (Metal chelators)

สารทำหน้าที่ตัวจับโลหะ เป็นอีกกลไกหนึ่งในการทำหน้าที่ควบคุมปริมาณอนุมูลอิสระให้อยู่ในสมดุล ทั้งนี้เพราะโลหะทรานซิชั่น เช่น ธาตุเหล็ก และ ทองแดง มีส่วนสำคัญในการเกิดอนุมูลอิสระ สารทำหน้าที่ตัวจับโลหะในร่างกายส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่จับและแยกโลหะที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนการเกิด OH เข้ามารวมไว้ในโครงสร้างให้อยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อน โลหะจึงไม่สามารถทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดอนุมูลอิสระได้ (Stadtman and Oliver, 1991)

3. สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระเป็นสารที่สามารถทำปฏิกิริยากับอนุมูลอิสระโดยตรง เพื่อกำจัดอนุมูลให้หมดไป หรือหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ไม่ให้ดำเนินต่อ สารกำจัดอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติเช่น กรดยูริค บิลิรูบิน จะกำจัดอนุมูลอิสระ ส่วนวิตามินซี วิตามินอี กลูตาไทโอน เบตาแคโรทีน และยูบิควิโนน จะหยุดปฏิกิริยาลูกโซ่ของการเกิดอนุมูล สารต้านอนุมูลอิสระประเภทหลังมีบทบาทสำคัญในการทำให้กระบวนการลิพิดเปอร์ออกซิเดชันสิ้นสุดลง (Noguchi and Niki, 1999) นอกจากนี้ในอาหาร เช่น ผลไม้ ผัก และสมุนไพร ที่มีสารโพลีฟีนอลเป็นองค์ประกอบสำคัญจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ได้แก่ caffeic acid ในกาแฟ, สาร resveratrol ในไวน์แดง, สาร curcuminในขมิ้น สารฟลาโวนอยด์ (flavonoid) ที่พบในพืชต่าง ๆ มากกว่า 5,000 ชนิด ซึ่งสารฟลาโวนอยด์ ที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวาง ได้แก่ เคอร์ซิติน (quercetin) และ คาเทชิน (catechin) ซึ่งพบได้ในใบชา เป็นต้น (Galati et al., 2002; Harborne and Williams, 2000; Noguchi and Niki, 1999)

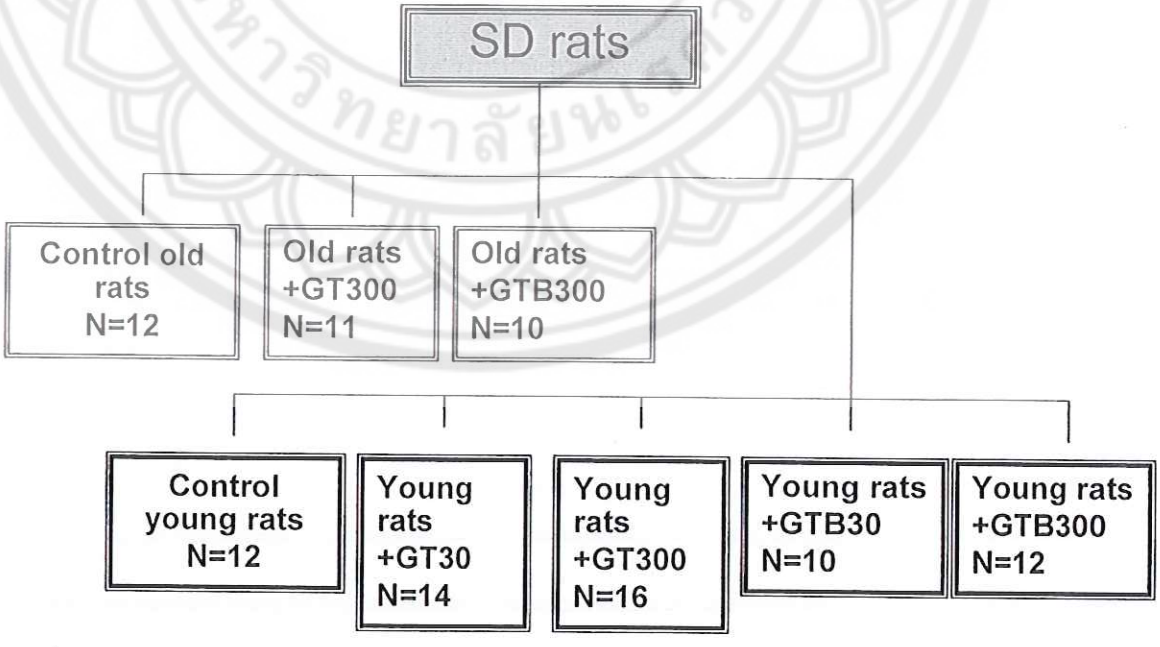
วิธีดำเนินงานวิจัย

สัตว์ทดลอง

สัตว์ทดลองที่นำมาใช้ในการศึกษาในครั้งนี้เป็นหนูขาวเพศผู้สายพันธุ์ Sprague-Dawley โดยสั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ต.ศาลายา อ.พุทธมณฑล จ.นครปฐม อายุ 8 สัปดาห์ในกลุ่มหนูหนุ่ม และอายุ 32 สัปดาห์ในกลุ่มหนูแก่ โดยหนูแก่ถูกเลี้ยงจนกระทั่งอายุประมาณ 72-80 สัปดาห์จึงนำมาใช้ในการศึกษา หนูทดลองทุกตัวถูกนำไปเลี้ยงไว้ในห้องเลี้ยงหนูทดลองของคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ภายใต้สภาพแวดล้อมที่มีการควบคุมอุณหภูมิของห้องประมาณ 25 ± 2 องศาเซลเซียส มีระบบการควบคุมแสงสว่างอย่างเหมาะสม ในแต่ละวันกำหนดช่วงเวลาที่เปิดไฟตั้งแต่ 6.00 - 18.00 น. หนูทดลองทุกตัวได้รับอาหารเม็ดจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติและน้ำสะอาดอย่างบริบูรณ์ มีวัสดุรองนอนที่สะอาดและเปลี่ยนใหม่วันเว้นวัน หรือเมื่อตรวจพบว่าชื้นแฉะหรือสกปรก หนูทดลองทุกตัวได้พักฟื้นและปรับตัวให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมใหม่ก่อนทำการทดลองเป็นเวลาอย่างน้อย 1 สัปดาห์หลังจากได้รับจากสำนักสัตว์ทดลอง

การแบ่งกลุ่มหนูทดลอง

หนูทดลองที่นำมาใช้ในการทดลองครั้งนี้แบ่งเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ หนูแก่ (old rats) อายุประมาณ 72 สัปดาห์ จำนวน 33 ตัว และหนูหนุ่ม (adult rats) อายุประมาณ 8 สัปดาห์ จำนวน 64 ตัว โดยในแต่ละกลุ่มจะมีการแบ่งเป็นกลุ่มย่อยดังรูปที่ 4 ดังนี้



รูปที่ 6 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูทดลอง

<u>หนูแก่</u> (old rats) แบ่งเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ ตัวทำละลายคือ น้ำบริสุทธิ์ จำนวน 12 ตัว

2. กลุ่มชาเขียว (green tea : GT group) ได้รับสารสกัดชาเขียว 300 มก./กก.น้ำหนักตัว จำนวน 11 ตัว

3. กลุ่มกากชาเขียว (green tea byproduct : GTB group) ได้รับสารสกัดกากชาเขียว 300 มก./กก.น้ำหนักตัว จำนวน 10 ตัว

<u>หนูหนุ่ม</u> (adult rats) แบ่งเป็น 5 กลุ่มย่อย คือ

1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ ตัวทำละลายคือ น้ำบริสุทธิ์ จำนวน 12 ตัว

2. กลุ่มชาเขียว (GT group) ได้รับชาเขียว 30 มก./กก.น้ำหนักตัว จำนวน 14 ตัว

3. กลุ่มชาเขียว (GT group) ได้รับชาเขียว 300 มก./กก.น้ำหนักตัว จำนวน 16 ตัว

4. กลุ่มกากชาเขียว (GTB group) ได้รับกากชาเขียว 30 มก./กก.น้ำหนักตัว จำนวน 10 ตัว

5. กลุ่มกากชาเขียว (GTB group) ได้รับกากชาเขียว 300 มก./กก.น้ำหนักตัว จำนวน 12 ตัว

การขออนุมัติทำวิจัยในสัตว์

การศึกษาวิจัยในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ตามแนวทางของสภาวิจัยแห่งชาติ และได้ผ่านการอนุมัติการทำวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ภาคผนวก ก)

การเตรียมสารสกัดชาเขียว และกากชาเขียว

สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวที่ใช้ในการทดลองได้รับความอนุเคราะห์จาก ศ.ดร.นันทวัน บุญยะประภัศร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล สารสกัดดังกล่าวจะผ่านการควบคุมมาตรฐานและการวิเคราะห์หาค่า และตรวจวัดปริมาณของสารสำคัญต่างๆ ได้แก่ catechin(-)–epigallocatechingallate (EGCG), (-) –epigallocatechin (EGC), และ (-) – epicatechin (EC)

สารสกัดเหล่านี้ถูกนำมาละลายในน้ำบริสุทธิ์ เพื่อเตรียมให้มีความเข้มข้นขนาด 30 หรือ 300 มก./กก. น้ำหนักตัวหนู ซึ่งความเข้มข้นนี้อ้างอิงจากผลเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยที่พบว่ามีฤทธิ์ในการกระตุ้นประสาทและพฤติกรรมการเคลื่อนไหวได้ โดยการให้สารละลายทำโดยป้อนให้หนูโดยตรงทางปาก ด้วยหลอดฉีดยาขนาด 1 มล. ที่ต่อกับเข็มป้อนสารที่มีปลายมนความยาว 10 เซนติเมตร (สั่งซื้อจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ) ทำการป้อนสารทุกวัน วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลานาน 12 สัปดาห์สำหรับหนูหนุ่ม และหนูแก่ โดยกลุ่ม Control group ได้รับน้ำ

บริสุทธิ์ หรือกลุ่ม Green tea group หรือ GT ได้รับสารละลายชาเขียว กลุ่ม Green tea byproduct group หรือ GTB ได้รับสารละลายกากชาเขียว

การทดสอบ sub-chronic toxicity ของสารสกัดจากชาเขียวและกากชาเขียว

เป็นการทดสอบความเป็นพิษแบบกึ่งเรื้อรัง หลังจากป้อนสารวันละครั้ง ทุกวันติดต่อกันเป็นเวลานาน 3 เดือน ก่อนทำการฆ่าเพื่อเก็บเลือดและอวัยวะภายใน จะทำการอดอาหารประมาณ 12 ชั่วโมง จากนั้นทำหนูสลบลึกด้วยการฉีดยาสลบ urethane แบบ overdose ขนาด 3 ก/กกน้ำหนักตัว หลังจากเช็ครีเฟล็กซ์ต่างๆเพื่อให้มั่นใจว่าหนูสลบลึกดีแล้ว ทำการผ่าช่องท้องเพื่อตรวจสอบลักษณะของอวัยวะภายใน และทำการเก็บอวัยวะ เช่น ปอด หัวใจ สมอง ตับ และไต ฯลฯ ชั่งน้ำหนักอวัยวะและนำไปแช่ใน 10% ฟอร์มาลิน จากนั้นผ่านขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา general morphology และตรวจหาพยาธิสภาพของอวัยวะ นอกจากนี้จะทำการเก็บเลือดหนูแต่ละตัวส่งตรวจที่ รพ.มหาวิทยาลัยนเรศวร เพื่อหาค่าโลหิตวิทยา (ได้แก่ white blood cell, neutrophil, lymphocyte, monocyte, eosinophil, basophil, red blood cell, platelet, hemoglobin, hematocrit) ค่าทางชีวเคมีในเลือด (ได้แก่ creatinine, total protein, albumin, globulin) และวัดค่าทางชีวเคมี (ได้แก่ aspartate aminotransferase (AST), serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanine aminotransferase (ALT), serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, urea nitrogen (BUN) เป็นต้น) หากมีหนูตายระหว่างการทดลอง ผู้วิจัยทำการผ่าช่องท้อง เพื่อตรวจสอบลักษณะอวัยวะภายในและเก็บอวัยวะต่างๆ เพื่อศึกษาทางพยาธิวิทยา

การศึกษาเนื้อเยื่อของอวัยวะต่าง ๆ (Morphology)

ในการศึกษานี้เลือกใช้ Paraffin technique ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษา Histology, Histopathology หรือการ Diagnosis ด้วยกล้องจุลทรรศน์ ซึ่งประกอบด้วยขั้นตอนต่างๆ ดังนี้

1. นำสมองที่ใช้สำหรับการศึกษา morphology มา fix ใน fixative คือ formalin 10% ทันทีเพื่อป้องกันการเน่าเปื่อยของเนื้อเยื่อ (tissue autolysis) ซึ่งเป็นขั้นตอนการคงสภาพเนื้อเยื่อเพื่อป้องกันการเกิด tissue autolysis ทำให้เนื้อเยื่อที่เป็น semi- fluid เป็น semi-solid ซึ่งง่ายต่อขั้นตอนการตัด (trim) ชิ้นเนื้อ และทำให้เห็นส่วนต่างๆ ภายในเนื้อเยื่อได้ดี โดยในการศึกษานี้จะเลือกใช้ fixative คือ formalin 10%
2. หลังจาก fixation นำเนื้อเยื่อมาผ่านขั้นตอน ดังนี้

2.1 Washing ล้าง fixative ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่นธรรมดาซึ่งเป็นการใช้น้ำเปล่าล้าง fixative ออกจากเนื้อเยื่อโดยทำการล้างด้วยน้ำสะอาดที่ไหลตลอดเวลา

2.2 Dehydration เป็นขบวนการทำให้ชิ้นเนื้อแห้งน้ำ โดยใช้ขบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์ โดยการใช้ dehydrant เช่น acetone, ethanol, isopropyl alcohol แต่โดยมากนิยมใช้ ethanol ทั้งนี้เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปหาสูง เช่น ใช้ 70%, 80%, 95% และ 100% ethanol ตามลำดับ

2.3 Clearing เป็นการนำชิ้นเนื้อที่แห้งน้ำไปแช่ใน xylene เพื่อเป็นการนำ dehydrant ออกจากเนื้อเยื่อโดยให้ clearing agent เข้าไปแทนที่

2.4 Infiltration เป็นขั้นตอนที่นำสาร embedding media (paraffin) เข้าสู่เนื้อเยื่อ

โดยในขั้นตอนในหัวข้อ 2.2 ถึง 2.4 เป็นขั้นตอนที่ใช้ในเตรียมเนื้อเยื่อซึ่งใช้การทำงานของเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (Leica TP 1020, Germany) ในการเตรียมเนื้อเยื่อโดยผู้วิจัยจะเตรียมสารเคมี และตั้งค่าเวลาในการแช่เนื้อเยื่อไว้ในสารเคมีแต่ละโถดังตารางที่ 1

ตาราง 1 แสดงกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อสำหรับการศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อ

ตำแหน่งโถ	สารเคมี	ระยะเวลา (นาที)
โถที่ 1	เอทานอล 70%	30
โถที่ 2	เอทานอล 70%	30
โถที่ 3	เอทานอล 85%	30
โถที่ 4	เอทานอล 90%	30
โถที่ 5	เอทานอล 95%	30
โถที่ 6	เอทานอล 95%	30
โถที่ 7	เอทานอล 100%	30
โถที่ 8	เอทานอล 100%	30
โถที่ 9	Xylene	60
โถที่ 10	Xylene	120
โถที่ 10	Paraplast	120
โถที่ 12	Paraplast	120

เมื่อครบกำหนดเวลาผู้วิจัยนำเนื้อเยื่อมาเข้าสู่กระบวนการ Embedding

2.5 Embedding โดยใช้เครื่องทำพาราฟินบล็อก (Leica EG 1160, Germany) ทำโดยวางเนื้อเยื่อใน mold ซึ่งประกอบด้วย molten paraffin wax (embedded) จากนั้นจึงปล่อยให้เย็นและแข็งตัว

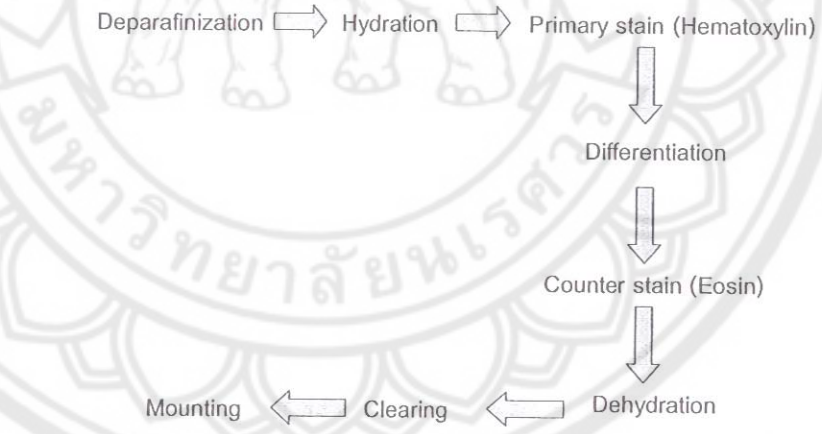
ทำการตัดเนื้อเยื่อโดยใช้เครื่องตัดชิ้นเนื้ออัตโนมัติ (Leica RM 2235, Germany) โดยตัดเนื้อเยื่อ บริเวณหลังต่อ bregma ประมาณ3-4 มิลลิเมตร โดยบาง 5 ไมครอนและวางส่วนที่ตัดได้บน slide ทิ้งไว้ให้แห้ง 3-4 วัน จากนั้นจึงเริ่มทำการย้อมสี Hematoxylin & Eosin

สำหรับการย้อมสีเนื้อเยื่อทำได้โดยมีหลักการดังนี้

1 Deparaffinized โดยการดึง paraffin ออก ด้วย xylene, alcohol และน้ำกลั่นตามลำดับ

2 ย้อมเนื้อเยื่อโดยใช้สี Hematoxylin & Eosin (H&E) ซึ่งเป็นการย้อมติดสีที่นิยมใช้ในกระบวนการศึกษาทาง histology โดยกระบวนการย้อมสีดังกล่าวมีการประยุกต์ใช้ basic dye hematoxylin ซึ่งสีที่ใช้ดูรูปร่างลักษณะของเซลล์หรือเนื้อเยื่อโดยจะติดสีฟ้าม่วงร่วมกับมีการประยุกต์ใช้ eosin ซึ่งมีการย้อมติดสีชมพู ซึ่งเป็นการย้อมสีเพื่อให้เห็น contrast ใน tissue มากขึ้น โดยสีที่นิยมใช้ได้แก่สี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin โดยสรุปดังรูปที่ 5



รูปที่ 5 แสดงขั้นตอนหลักการย้อมสี Hematoxylin & Eosin

ผู้วิจัยนำหลักการดังกล่าวมาประยุกต์ใช้ในการศึกษาครั้งนี้โดยมีกระบวนการในการย้อมสี Hematoxylin & Eosin ดังตาราง 2

ตาราง 2 แสดงกระบวนการย้อมสี Hematoxylin & Eosin

ลำดับของอ่างย้อมสี	สารเคมี	ระยะเวลาแช่ (นาที) หรือจำนวน dip (ครั้ง)
1	Xylene	2 นาที
2	Xylene	10 ครั้ง
3	เอทานอล 100%	10 ครั้ง
4	เอทานอล 100%	10 ครั้ง
5	เอทานอล 95%	10 ครั้ง
6	เอทานอล 95%	10 ครั้ง
7	น้ำกลั่น	1 นาที
8	สี Hematoxylin	5 นาที
9	น้ำกลั่น	0.5 นาที
10	1% Lithium Carbonate	10 ครั้ง
11	น้ำกลั่น	0.5 นาที
12	สี Eosin	0.25 นาที
13	น้ำกลั่น	0.5 นาที
14	เอทานอล 95%	10 ครั้ง
15	เอทานอล 95%	10 ครั้ง
16	เอทานอล 100%	10 ครั้ง
17	เอทานอล 100%	10 ครั้ง
18	Xylene	10 ครั้ง
19	Xylene	10 ครั้ง

ทำการปิด slide โดยหยด mounting medium แล้วปิดด้วย coverslip เพื่อป้องกันการขีดข่วน เพิ่มความชัดเจนในการส่องกล้องและสามารถเก็บไว้ได้นาน

ศึกษาความแตกต่างทาง morphology ของเนื้อเยื่อในหนูทดลองแต่ละกลุ่มโดยใช้ light microscope (Olympus BX51, Japan) และถ่ายรูปโดยใช้กล้องถ่ายรูปจุลทรรศน์ระบบดิจิตอล (Olympus DP12, Japan) ด้วยกำลังขยาย 40 เท่า

การตรวจระดับของ enzyme activities ของ antioxidant enzymes ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

1. การตรวจวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ glutathione peoxidase (GPx)

การวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx ใช้ชุดวิเคราะห์ค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx โดยมีหลักการคือ เอนไซม์ GPx ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยารีดักชั่นของ สารประกอบ hydrogen peroxide ได้แก่ lipid peroxide (ROOH) และ H_2O_2 โดยมี glutathione (GSH) ร่วมในปฏิกิริยา เกิดเป็น oxidized glutathione (GSSG) และ H_2O จากนั้นเอนไซม์ glutathione reductase (GR) จะเร่งปฏิกิริยารีดักชั่นของ GSSG โดยมี nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (NADPH) ร่วมในปฏิกิริยา เกิดเป็น GSH และ $NADP^+$ และวัดค่าการดูดกลืนแสงของ $NADP^+$ ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร โดยมีวิธีทดสอบและคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx ดังนี้

วิธีทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx การทดสอบค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx จะใช้ถาดที่มี 96 หลุม และทำซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) โดยเริ่มจาก

1) เติม buffer ปริมาตร 200 µL ลงในหลุม blank ปริมาตร 160 µL ลงในหลุมควบคุม control (ซึ่งถือเป็น background) ปริมาตร 140 µL ลงในหลุม standard และหลุม sample

2) เติม reaction mix ที่มีส่วนประกอบของ GR, GSH และ NADPH ปริมาตร 20 µL ลงในหลุม control, standard และ sample

3) เติมเอนไซม์ GPx ปริมาตร 20 µL ลงในหลุม standard

4) เติม sample ปริมาตร 20 µL ลงในหลุม sample

5) เติม cumene hydroperoxide ปริมาตร 20 µL ลงในหลุม control, standard และ sample รวมปริมาตรแต่ละหลุมเท่ากับ 200 µL นำไปเขย่า 10 วินาที และอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร (ΔA_{340}) ทุกๆ 1 นาที เป็นเวลาทั้งหมด 10 นาที ด้วยเครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง

วิธีคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx คือนำ ΔA_{340} ที่ได้ไปคำนวณหาค่าการดูดกลืนแสงต่อนาที (หรือเรียกว่า ΔA_{340}/min.) จากสูตร

$$\Delta A_{340}/\text{min.} = \frac{\Delta A_{340}\ (\text{Time 2}) - \Delta A_{340}\ (\text{Time 1})}{\text{Time 2 min. -- Time 1 min.}}$$

จากนั้นนำค่า ΔA_{340}/min. (ที่ได้จากสูตรข้างต้น) ของ sample และ standard ลบออกด้วยค่า ΔA_{340}/min. ของ background นำผลลัพธ์ ΔA_{340}/min. ของ sample มาคำนวณหาค่าการทำงานของเอนไซม์ GPx ดังสูตรต่อไปนี้

$$\text{GPx activity} = \frac{\Delta A_{340}/\text{min.}}{0.00379\ \mu M^{-1}} \times \frac{0.2\ \text{ml}}{0.02\ \text{ml}} \times \text{sample dilution} = \text{nmol/min/ml} = \text{Units/ml}$$

2. การตรวจวัดระดับ enzyme activities ของเอนไซม์ catalase

หลังจากที่ terminate หนูทดลองแต่ละตัวแล้ว สมองส่วนฮิปโปแคมปัสได้ถูกแยกออกมาเพื่อดำเนินการหาระดับการทำงานของเอ็นไซม์ catalase ด้วยขั้นตอนต่อไปนี้

1. ล้างชิ้นเนื้อสมอง (20mg-1g) ของหนูทั้งจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบใน phosphate buffered saline (PBS) ที่ pH 7.4
2. ปั่นชิ้นเนื้อสมอง (homogenize) บนน้ำแข็งใน 5-10 ml ของสารละลายที่เย็นของ 50mM potassium phosphate ที่มี 1mM EDTA เป็นส่วนประกอบและที่ pH 7.0 จากนั้น centrifuge homogenate ที่ 10,000 xg และที่อุณหภูมิ 4 °C นาน 15 นาที
3. แยกเก็บเฉพาะชั้นของเหลวใสในหลอดที่สะอาดที่อุณหภูมิ 0-4 °C หรือที่ -80 °C ได้นาน 1 เดือน
4. เตรียม formaldehyde standards ที่ความเข้มข้น 0, 5, 15, 30, 45, 60 และ 75 μM และใส่ 20 μL standards พร้อมทั้ง 100 μL assay buffer และ 30 μL methanol ลงในแต่ละ well ของ microplate สำหรับ standards
5. ใส่ 20 μL CAT control พร้อมทั้ง 100 μL assay buffer และ 30 μL methanol ลงใน well ของ microplate สำหรับ positive controls
6. ใส่ 20 μL สารละลายสกัดจากสมองและตับพร้อมทั้ง 100 μL assay buffer และ 30 μL methanol ลงใน well ของ microplate สำหรับตัวอย่าง
7. เติม 20 μL hydrogen peroxide ลงในแต่ละ well ของ microplate และวาง microplate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องนาน 20 นาที
8. เติม 30 μL potassium peroxide ลงในแต่ละ well ของ microplate และตามด้วย 30 μL Purpald และวาง microplate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องนาน 10 นาที
9. เติม 10 μL potassium periodate ลงในแต่ละ well ของ microplate และวาง microplate บน shaker ที่อุณหภูมิห้องนาน 5 นาที
10. วัดค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 540 nm
11. จากนั้นคำนวณ CAT activities ในสารสกัดจากสมองได้จากการใช้กราฟมาตรฐาน

การกำจัดซากสัตว์ทดลอง หลังจากสิ้นสุดการทดลองทั้งหมดแล้ว ซากของสัตว์ทดลองจะนำไปเก็บรวบรวมในตู้เย็น -20 °C แล้วจึงนำไปฝังกลบในที่ที่เหมาะสมต่อไป

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลที่ได้จากทุกการทดลองแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M. (standard error of the mean) และค่าร้อยละของการเปลี่ยนแปลง (% change) และนำมาทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย one-way ANOVA เมื่อผลของ ANOVA แสดงให้เห็นว่ามีข้อมูลบางชุดมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และทำการทดสอบต่อด้วย Dunnett's *post hoc* test (ในการศึกษาทางด้านพฤติกรรมและชีวเคมี) และใช้ Tukey *post hoc* test (ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคศาสตร์) โดยถ้า $P < 0.05$ จะถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

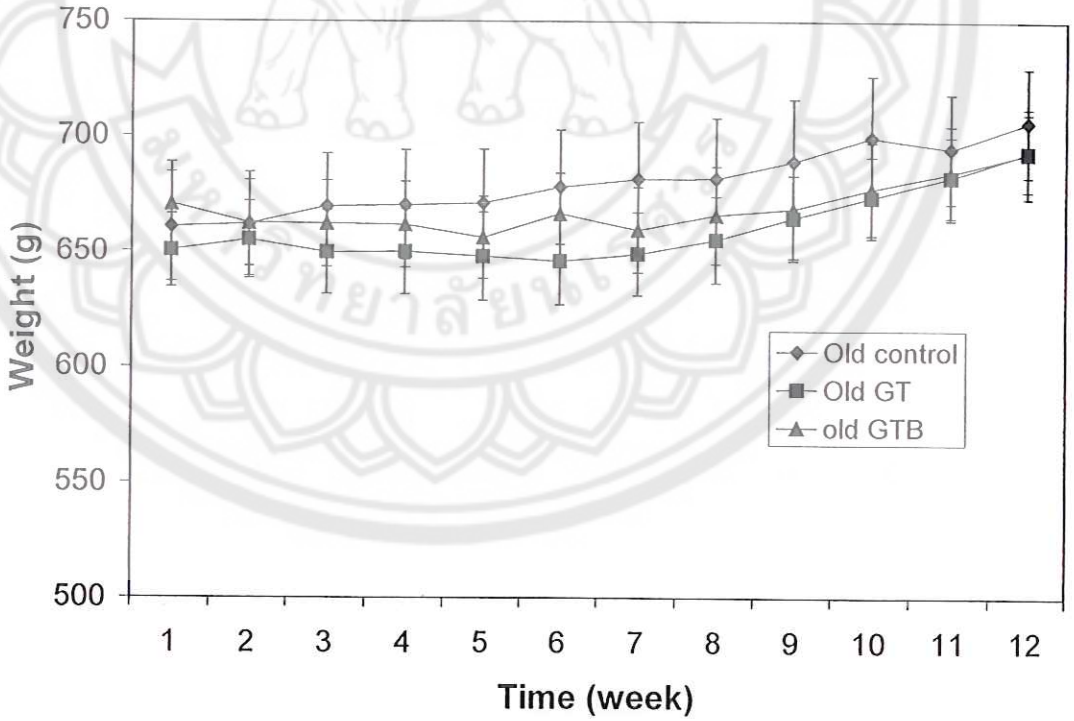
ว RM
251
พ2455
2552

สำนักหอสมุด
5 JUL 2011

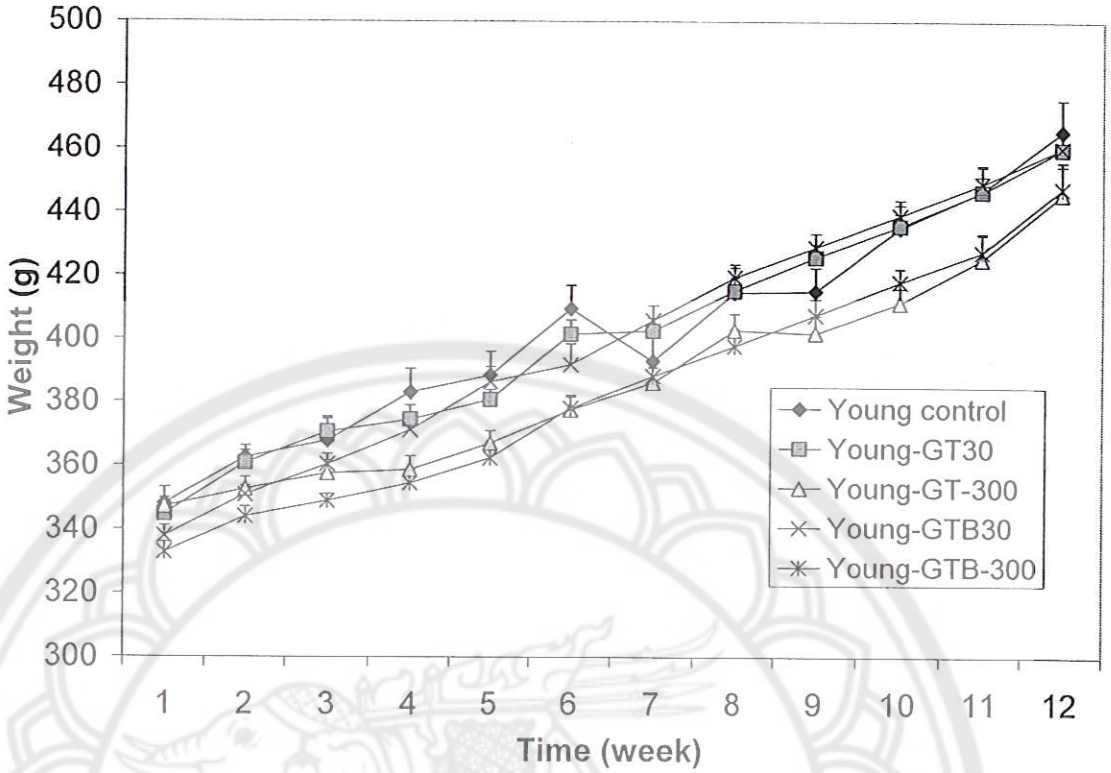
ผลการวิจัย

น้ำหนักหนูทดลอง

หนูแก่ตามธรรมชาติในแต่ละกลุ่ม มีน้ำหนักตัวเริ่มต้นไม่ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หนูแก่กลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวตอนเริ่มต้นเท่ากับ 660.7 ± 23.65 กรัม หนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวมีน้ำหนักตัวเฉลี่ยเท่ากับ 650.4 ± 15.78 กรัมและหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 670.55±18.10 กรัม ในการทดลองนี้ได้ทำการกรอกสารสกัดชาเขียว หรือสารสกัดกากชาเขียวหรือน้ำเป็นเวลาติดต่อกันนาน 12 สัปดาห์ และได้ทำการชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวทุกสัปดาห์ น้ำหนักในสัปดาห์ที่ 12 มีค่าดังนี้คือ หนูแก่กลุ่มควบคุม เท่ากับ 706.08 ± 23.50 กรัม หนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวมีค่าเท่ากับ 693.10 ± 16.72 กรัมและหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวมีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 692.82±19.44 กรัม ทั้งนี้น้ำหนักตัวของหนูแก่ตามธรรมชาติในแต่ละกลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P>0.05$) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way ANOVA ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 12 ของการกรอกสารสกัด (รูปที่ 6)



รูปที่ 6 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูแก่แต่ละกลุ่มตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์



รูปที่ 7 แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูหนุ่มแต่ละกลุ่ม ตลอดระยะเวลา 12 สัปดาห์

ในขณะที่หนูหนุ่มในแต่ละกลุ่ม มีน้ำหนักตัวเริ่มต้นแตกต่างกันเล็กน้อยซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ หนูทดลองกลุ่มควบคุม (Young control) มีค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตัวตอนเริ่มต้นเท่ากับ 348.00 $\pm$ 5.18 กรัม และหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและสารสกัดจากกากชาเขียวขนาด 30 มก/กก (Young-GT 30 และ Young-GTB 30) มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวเริ่มต้นเท่ากับ 344.67 $\pm$ 2.75 กรัม 337.83 $\pm$ 3.20 ตามลำดับ หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและสารสกัดจากกากชาเขียวขนาด 300 มก/กก (Young-GT 300 และ Young-GTB 300) มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 347.06 $\pm$ 4.4 กรัม และ 332.75 $\pm$ 3.19 กรัม ตามลำดับ ในการทดลองนี้ได้ทำการกรอกสารสกัดชาเขียว หรือสารสกัดกากชาเขียวหรือน้ำเป็นเวลา 12 สัปดาห์ และได้ทำการชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวทุกสัปดาห์ดังแสดงในกราฟรูปที่ 7 เท่ากับ 465.67 $\pm$ 9.96 กรัม และหนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและสารสกัดจากกากชาเขียวขนาด 30 มก/กก มีค่าเฉลี่ยน้ำหนักตัวเท่ากับ 460.08 $\pm$ 5.63 กรัม และ460.42 $\pm$ 4.84 ตามลำดับ หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและสารสกัดจากกากชาเขียวขนาด 300 มก/กก มีน้ำหนักเฉลี่ยเท่ากับ 445.94 $\pm$ 10.12 กรัม และ 447.75 $\pm$ 7.03 กรัม ตามลำดับ ทั้งนี้น้ำหนักตัวของหนูแในกลุ่มที่ได้รับชาเขียวและกากชาเขียวมีแนวโน้มของน้ำหนักตัวที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P>0.05) จากการวิเคราะห์ทางสถิติด้วย One way ANOVA ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 จนถึงสัปดาห์ที่ 12 ของการกรอกสารสกัด

ผลการตรวจวัดค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือด

สำหรับผลการตรวจวัดค่าต่างๆของหนูแต่ละกลุ่มหลังป้อนน้ำในกลุ่ม control หรือป้อนสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวเป็นเวลานาน 3 เดือน ค่าต่างๆแสดงในตารางโดยมีรายละเอียดของตารางที่ 3 ถึง ตารางที่ 5 เป็นผลจากการวิเคราะห์เลือดหนูแก่กลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 300 มก/กกน้ำหนักตัว ตามลำดับ ตารางที่ 6 ถึง ตารางที่ 10 เป็นผลจากการวิเคราะห์เลือดหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 30 มก/กก และ 300 มก/กก กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวขนาด 30 มก/กก และ 300 มก/กกตามลำดับ โดยทุกตารางจะแสดงค่าต่างๆดังนี้

<u>ตารางบน</u> แสดงค่าที่วัดทางโลหิตวิทยา (Hematological parameters) ได้แก่ white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC) , hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), platelet count (PLT), absolute leukocyte count ซึ่งได้แก่ค่า neutrophil (NEUT), lymphocyte (LYMPH), monocyte (MONO), eosinophil (EO), และ basophil (BASO)

<u>ตารางล่าง</u> แสดงค่าชีวเคมีในเลือด (Serum chemistry parameters) ได้แก่ creatinine, total protein, albumin, globulin, aspartate aminotransferase (AST) หรือ serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT), alanine aminotransferase (ALT) หรือ serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT), alkaline phosphatase (ALP), total bilirubin, urea nitrogen (BUN)

ตารางที่ 3 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูแก่ป้อนน้ำ

rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO
1	4.40	9.4	17.4	52.7	744	0.79	2.78	0.27	0.07	0
2	5.47	9.73	18.1	55.2	838	2.12	3.04	0.24	0.06	0.01
3	4.38	10.07	18.4	55.6	834	0.76	2.55	0.29	0.05	0
4	3.94	9.41	17.9	55.4	829	0.86	2.79	0.23	0.06	0
5	4.25	9.86	18.4	55.3	595	0.95	3.03	0.24	0.03	0
6	3.01	9.16	16.9	51.7	972	0.47	2.4	0.08	0.06	0
7	1.91	9.94	18.1	53.9	695	0.56	1.27	0.06	0.02	0
8	3.37	10.23	19.3	56.0	864	0.65	2.52	0.15	0.05	0
9	3.50	9.37	17.9	53.7	875	0.76	2.44	0.19	0.09	0.02
10	3.68	10.24	17.8	51.0	854	0.79	2.75	0.11	0.03	0
11	2.29	10.47	19.0	55.4	835	0.73	1.42	0.11	0.03	0
12	2.97	9.23	17.2	51.1	1006	0.57	2.18	0.06	0.07	0.09
Mean	3.60	9.76	18.03	53.92	828.42	0.85	2.43	0.17	0.05	0.01
SEM	0.30	0.13	0.21	0.56	33.50	0.14	0.17	0.03	0.01	0.01

rat	Creatinine	T protien	Albumin	Globulin	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	ALP	BUN
1	0.3	5.2	3.04	2.3	178	176	112	20
2	0.7	5.3	3.4	2.5	167	131	88	21
3	0.6	5.6	3.2	2.4	190	333	69	19
4	0.6	5.9	3.3	2.6	176	58	32	17
5	0.6	5.8	3.4	2.4	294	123	39	20
6	1.2	5.0	2.3	2.7	189	72	28	43
7	0.7	5.6	3.4	2.2	306	186	39	20
8	0.8	5.3	3.0	2.4	298	104	28	25
9	0.5	5.2	2.9	2.3	271	126	38	19
10	0.9	5.6	3.4	2.2	236	158	44	21
11	1.0	5.3	3.4	1.9	299	182	37	23
12	0.7	5.3	2.7	2.6	169	55	50	21
Mean	0.72	5.43	3.12	2.38	231.08	142.00	50.33	22.42
SEM	0.07	0.08	0.11	0.07	17.62	22.84	7.89	2.05

ตารางที่ 4 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูแก่ป้อนซาเขียว 300 มก/กก

rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MO NO	EO	BASO
1	1.69	9.76	17.3	52.2	899	0.49	1.11	0.06	0.03	0
2	1.75	9.27	16.2	50.5	947	0.43	1.18	0.1	0.04	0
3	4.62	10.23	18.8	57.4	806	0.84	3.5	0.23	0.05	0
4	3.20	9.50	17.7	54.4	658	0.85	2.14	0.3	0.005	0
5	3.21	9.00	16.5	52.8	909	1.03	1.72	0.43	0.03	0
6	3.51	10.51	19.0	57.3	857	0.6	2.68	0.19	0.04	0
7	2.11	10.76	19.0	58.0	754	0.39	1.62	0.08	0.02	0
8	5.79	10.96	19.9	59.1	1032	2.2	2.99	0.52	0.08	0
9	4.39	9.19	17.6	54.9	733	1.24	2.28	0.76	0.11	0
10	4.50	10.00	18.0	55.4	925	0.9	2.27	0.6	0.08	0
Mean	3.48	9.92	18.00	55.20	852.0	0.90	2.15	0.33	0.05	0.00
SEM	0.45	0.23	0.39	0.93	37.80	0.19	0.26	0.08	0.01	0.00

SUBJECT	Creatinine	Total protien	Albumin	Globulin	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	ALP	BUN
1	0.4	6.1	3	2.8	133	49	42	21
2	0.4	5.5	2.8	2.7	121	58	49	19
3	0.6	6.7	3.5	3.2	231	68	86	20
4	0.6	5.8	2.9	2.9	671	246	38	20
5	0.5	6.2	3.1	3.1	161	75	59	20
6	0.6	5.9	2.9	3.0	145	59	44	19
7	0.7	6.3	3.5	2.8	214	98	43	18
8	0.4	5.5	2.8	2.9	303	380	134	23
9	0.4	5.8	2.9	3.0	251	438	215	17
10	0.5	6.1	3.05	2.9	163	184	108	22
Mean	0.51	5.99	3.05	2.93	239.30	165.50	81.80	19.90
SEM	0.04	0.12	0.09	0.05	54.14	47.90	18.99	0.60

ตารางที่ 5 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูแก่ป้อนกากชาเขียว 300 มก/กก

rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO
1	1.95	9.77	17.8	57.2	890	0.83	1.03	0.08	0.01	0
2	3.69	10.22	18.8	58.8	677	0.95	2.61	0.12	0.01	0
3	6.06	10.23	19.0	59.7	859	1.45	4.39	0.14	0.08	0
4	3.16	9.71	17.9	56.3	829	0.84	2.08	0.19	0.05	0
5	2.68	9.27	17.3	55.2	753	0.77	1.61	0.27	0.03	0
6	3.97	10.21	18.6	55.6	790	0.9	2.34	0.27	0.04	0
7	4.17	8.70	17.0	53.3	695	1.34	2.59	0.21	0.03	0
8	2.48	9.49	17.1	53.2	952	0.95	1.35	0.14	0.04	0
9	3.16	10.12	18.3	56.7	951	0.59	2.41	0.13	0.03	0
10	6.88	11.08	19.2	56.4	776	0.8	3.97	0.59	0.06	0
11	3.16	10.96	19.4	58.6	688	0.84	2.13	0.19	0	0
Mean	3.76	9.98	18.22	56.45	805.45	0.93	2.41	0.21	0.03	0.00
SEM	0.47	0.22	0.27	0.66	31.56	0.08	0.32	0.04	0.01	0.00

Rat	Creatinine	AST(SGOT)	ALT(SGPT)	ALP	BUN
1	0.6	479	401	90	36
2	0.9	294	142	44	38
3	0.9	380	119	60	30
4	0.5	342	285	53	27
5	0.6	430	230	67	33
6	0.5	217	91	63	26
7	0.8	212	71	27	30
8	0.6	239	111	63	26
9	0.7	269	82	66	30
10	0.8	351	424	248	22
11	0.7	388	274	96	23
Mean	0.69	327.36	202.73	79.73	29.18
SEM	0.05	28.03	40.54	18.64	1.60

ตารางที่ 6 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนน้ำ

Rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO
1	3.73	7.79	14.0	45.7	707	0.83	2.62	0.22	0.06	0
2	1.53	8.61	15.6	50.6	829	0.49	0.96	0.07	0.01	0
3	2.43	8.34	14.6	48.4	853	0.37	1.92	0.12	0.02	0
4	3.29	8.09	14.4	47.4	746	0.50	2.63	0.13	0.03	0
5	3.18	7.61	14.0	46.2	857	0.51	2.46	0.14	0.07	0
6	3.71	8.42	14.8	48.4	837	0.55	2.87	0.24	0.05	0
7	2.31	8.29	14.7	46.8	612	0.36	1.78	0.12	0.05	0
8	2.57	8.20	14.9	48.1	696	0.29	2.11	0.12	0.05	0
9	0.71	7.83	14.2	46.9	726	0.08	0.57	0.03	0.01	0.02
10	3.36	8.21	14.7	47.9	751	0.50	2.92	0.18	0.03	0
11	2.41	8.58	15.0	48.7	761	0.33	1.91	0.12	0.05	0
12	2.16	8.09	14.9	46.9	733	0.38	1.63	0.1	0.05	0
Mean	2.62	8.17	14.65	47.67	759.00	0.43	2.03	0.13	0.04	0.00
SEM	0.27	0.09	0.14	0.40	22.21	0.05	0.22	0.02	0.01	0.00

Rat	Creatinine	T protien	Albumin	Globulin	AST(SGOT)	ALT(SGPT)	ALP	BUN
1	0.4	6.4	3.9	2.5	136	62	142	33
2	0.4	6.3	4.0	2.3	149	77	76	28
3	0.4	6.1	3.9	2.2	104	63	109	29
4	0.4	5.6	3.6	2.0	179	82	148	31
5	0.4	5.8	3.7	2.1	129	47	112	28
6	0.4	6.2	3.8	2.4	156	58	134	34
7	0.4	6.0	3.8	2.2	206	102	150	33
8	0.4	5.6	3.5	2.1	123	58	107	27
9	0.3	5.8	3.8	2.0	117	66	104	23
10	0.3	6.4	4.1	2.3	123	77	133	35
11	0.5	5.9	3.8	2.1	228	152	139	32
12	0.4	6.3	3.9	2.4	102	49	83	27
Mean	0.39	6.03	3.82	2.22	146.00	74.42	119.75	30.00
SEM	0.02	0.09	0.05	0.05	12.03	8.69	7.50	1.08

ตารางที่ 7 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนชาเขียว 30 มก/กก

Rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MONO	EO	BASO
1	6.09	9.23	15.8	49.5	656	1.53	2.98	1.09	0.49	0
2	4.18	9.41	16.5	49.4	805	0.82	2.50	0.61	0.09	0.16
3	4.06	9.65	16.2	47.9	776	0.40	3.24	0.22	0.05	0.05
4	3.59	10.02	17.0	48.2	805	0.48	2.87	0.16	0.05	0.03
5	1.27	9.62	16.9	50	888	0.32	0.85	0.05	0.02	0.03
6	1.74	9.55	16.4	49.9	746	0.20	1.34	0.11	0.01	0.08
7	1.61	9.92	17.2	49.7	806	0.19	1.26	0.08	0.01	0.07
8	1.70	9.80	16.6	51	591	0.23	1.17	0.05	0.24	0.01
9	2.82	9.22	16.3	48.5	803	0.32	1.96	0.31	0.06	0.17
10	2.39	10.13	18.0	54	869	0.35	1.83	0.06	0.05	0.1
11	1.15	9.75	17.1	50.1	791	0.12	0.90	0.05	0.01	0.07
12	4.08	8.99	15.8	46.9	974	0.74	2.81	0.43	0.08	0.02
Mean	2.89	9.61	16.65	49.59	792.50	0.48	1.98	0.27	0.10	0.07
SEM	0.46	0.10	0.19	0.54	30.18	0.12	0.26	0.09	0.04	0.02

Rat	Creatinine	AST(SGOT)	ALT(SGPT)	ALP	BUN
1	0.7	185	117	80	35
2	0.4	295	128	58	24
3	0.4	111	52	45	21
4	0.4	91	44	57	20
5	0.4	95	47	47	19
6	0.5	110	50	45	20
7	0.4	166	85	61	22
8	0.6	108	62	55	22
9	0.5	150	82	51	23
10	0.5	119	47	37	23
11	0.5	83	60	49	24
12	0.4	173	55	45	20
Mean	0.48	140.50	69.08	52.50	22.75
SEM	0.03	15.87	7.55	2.95	1.12

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนซาเขียว 300 มก/กก

Rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MO NO	EO	BASO
1	3.2	8.13	14.8	46.6	739	0.52	2.49	0.15	0.04	0
2	1.93	7.05	13.5	44.3	688	0.66	1.13	0.1	0.04	0
3	5.09	7.63	13.5	44.7	732	1.07	3.64	0.31	0.07	0
4	4.58	8.29	15.1	48.8	722	0.87	3.41	0.24	0.06	0
5	5.83	8.9	15.9	53.3	993	0.9	4.11	0.73	0.09	0
6	4.64	8.59	15.3	49.8	849	1.47	2.76	0.29	0.12	0
7	4.4	7.84	14.7	48.5	799	1.32	2.77	0.25	0.06	0
8	3.11	8.19	14.2	47.2	814	0.78	2.1	0.13	0.1	0
9	4.84	8.73	15.5	48.8	799	0.56	3.97	0.25	0.06	0
10	2.74	8.67	15.3	47.5	763	0.39	2.2	0.11	0.04	0
11	4.21	8.69	15.0	47.5	872	0.49	3.49	0.15	0.08	0
12	1.01	3.31	5.8	19.3	93	0.47	0.45	0.04	0.05	0
13	2.46	8.67	15.0	47.9	718	0.7	1.55	0.15	0.06	0
14	2.88	8.69	14.9	47.6	611	0.36	2.08	0.11	0.28	0.05
15	3.54	8.88	15.1	47.6	762	1.01	2.44	0.03	0.06	0
16	4.11	8.31	14.3	44.6	773	0.62	3.18	0.22	0.09	0
Mean	3.66	8.04	14.24	45.88	732.94	0.76	2.61	0.20	0.08	0.00
SEM	0.33	0.35	0.61	1.91	49.26	0.08	0.26	0.04	0.01	0.00

ตารางที่ 8 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนชาเขียว 300 มก/กก (ต่อ)

SUB JECT	Creati nine	Total protien	Albumin	Globulin	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	ALP	BUN
1	0.4	6.5	4.1	2.4	136	49	71	29
2	0.3	5.9	3.8	2.1	141	55	144	31
3	0.4	5.7	3.6	2.1	139	56	145	36
4	0.5	6.1	4.0	2.1	131	57	117	30
5	0.7	6.0	3.9	2.1	123	114	142	31
6	0.5	6.4	3.8	2.6	155	61	113	30
7	0.3	6.0	3.7	2.3	132	54	107	25
8	0.4	6.1	4.0	2.1	212	62	73	28
9	0.4	6.3	3.9	2.4	175	90	76	22
10	0.4	6.5	4.0	2.5	158	73	99	21
11	0.5	6.3	3.9	2.4	209	83	87	27
12	0.4	7.1	4.1	3	197	54	93	23
13	0.3	6.7	4.1	2.6	159	56	99	23
14	0.4	6.3	4.0	2.3	136	71	89	26
15	0.4	6.5	3.8	2.7	133	46	89	28
16	0.4	5.8	3.7	2.1	136	66	81	23
Mean	0.42	6.26	3.90	2.36	154.50	65.44	101.56	27.06
SEM	0.03	0.09	0.04	0.07	7.45	4.55	6.38	1.06

ตารางที่ 9 แสดงผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนกากซาเขียว 30 มก/กก

Rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MO NO	EO	BASO
1	1.88	10.53	18.3	55.2	914	0.31	1.43	0.07	0.01	0
2	4.06	9.98	17.6	52.8	921	0.35	3.22	0.19	0.1	0
3	5.35	10.4	18.1	54.6	967	0.34	4.16	0.24	0.06	0
4	1.75	10.14	17.8	53.4	726	0.19	1.38	0.05	0.04	0.09
5	1.86	10.52	17.9	54.4	803	0.31	1.37	0.11	0.06	0.01
6	3.69	9.94	16.9	51.3	881	0.56	2.39	0.68	0.06	0
7	2.94	11.01	19.4	57.4	871	0.49	2.31	0.1	0.04	0
8	2.87	9.88	17.5	52.2	847	0.36	2.33	0.12	0.02	0.04
9	2.8	11.05	19.3	57.3	757	0.46	2.1	0.14	0.07	0.03
10	3.06	10.6	18.4	56.3	808	0.31	2.45	0.2	0.04	0.06
Mean	3.03	10.41	18.12	54.49	849.50	0.37	2.31	0.19	0.05	0.02
SEM	0.35	0.13	0.25	0.66	24.09	0.03	0.28	0.06	0.01	0.01

Rat	Creatinine	AST(SGOT)	ALT(SGPT)	ALP	BUN
1	0.5	181	75	92	23
2	0.5	100	33	57	24
3	0.8	165	65	67	26
4	0.9	150	56	63	26
5	0.6	160	90	75	28
6	0.6	158	53	84	25
7	0.8	212	186	75	29
8	0.6	125	52	82	25
9	0.8	123	45	62	26
10	0.6	249	151	71	26
Mean	0.67	162.30	80.60	72.80	25.80
SEM	0.04	13.88	15.69	3.48	0.55

ตารางที่10 ผลการวิเคราะห์เลือดกลุ่มหนูหนุ่มป้อนกากชาเขียว 300 มก/กก

Rat	WBC	RBC	HGB	HCT	PLT	NEUT	LYMPH	MO NO	EO	BASO
1	3.00	7.66	13.9	46.2	704	0.76	1.94	0.22	0.08	0
2	2.58	7.79	14.2	46.9	728	0.52	1.88	0.16	0.02	0
3	2.91	8.19	14.4	47.2	716	0.58	2.1	0.17	0.06	0
4	5.34	7.9	14.4	46.9	838	1.68	3.28	0.3	0.08	0
5	3.58	8.12	14.7	46.3	743	0.39	2.93	0.21	0.05	0
6	2.84	7.82	14.5	45.1	631	0.52	2.18	0.11	0.03	0
7	3.14	8.16	14.8	45.9	718	0.42	2.56	0.12	0.04	0
8	2.43	8.44	14.8	46.8	741	0.6	1.63	0.16	0.04	0
9	1.66	8.66	14.8	46.5	853	0.34	1.19	0.11	0.02	0
10	2.56	8.64	15.0	48.0	963	1.4	1.01	0.1	0.05	0
11	1.51	7.83	13.8	42.8	906	0.33	1.08	0.03	0.06	0.01
12	1.43	8.13	14.1	44.2	756	0.70	0.64	0.05	0.05	0.36
Mean	2.75	8.11	14.45	46.07	724.75	0.69	1.87	0.15	0.05	0.03
SEM	0.32	0.10	0.12	0.43	62.34	0.13	0.24	0.02	0.01	0.03

Rat	Crea tinine	T protien	Albumin	Globulin	AST (SGOT)	ALT (SGPT)	ALP	BUN
1	0.4	5.6	3.6	2	116	81	136	30
2	0.4	5.8	4.0	1.8	94	61	113	26
3	0.3	5.7	3.7	2	73	40	109	30
4	0.3	5.9	3.8	2.1	171	100	122	28
5	0.4	5.9	3.8	2.1	87	52	66	25
6	0.3	6.3	4.0	2.3	133	54	83	30
7	0.4	6.3	4.1	2.2	166	77	83	28
8	0.4	6.7	3.6	3.1	145	47	63	26
9	0.4	6.9	3.8	3.1	87	33	73	22
10	0.5	6.2	3.3	2.9	101	46	82	27
11	0.4	6.3	3.5	2.8	98	42	65	23
12	0.5	6.3	3.5	2.8	124	46	76	26
Mean	0.39	6.16	3.73	2.43	116.25	56.58	89.25	26.75
SEM	0.02	0.12	0.07	0.14	9.66	5.96	7.39	0.79

จากผลการวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา จะเห็นว่าค่าต่างๆไม่ว่าจะเป็น white blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC) , hemoglobin (HGB), hematocrit (HCT), platelet count (PLT), absolute leukocyte count ซึ่งได้แก่ค่า neutrophil (NEUT), lymphocyte (LYMPH), monocyte (MONO), eosinophil (EO), และ basophil (BASO) พบว่ามีค่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างหนูแก่ 3 กลุ่มคือหนูแก่กลุ่มควบคุมและหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว หรือหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว หรือระหว่างหนูหนุ่มกลุ่มต่างๆกัน 5 กลุ่ม คือหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมและหนูหนุ่มกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก/กก หรือหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว ขนาด 30 และ 300 มก/กก แต่เมื่อพิจารณาผลค่าชีวเคมีในเลือดคือค่า aspartate aminotransferase (AST) หรือ serum glutamic oxaloacetic transaminase (SGOT) ซึ่งค่า AST จะเป็นเอ็นไซม์ที่อาจตรวจพบได้ในกระแสเลือด สร้างขึ้นมาจากความเสียหายของตับ เม็ดเลือดแดง หัวใจ กล้ามเนื้อ ตับอ่อน หรือไต โดยที่ตับมักมีบทบาทในการแสดงผลต่อการเพิ่ม/ลด ค่าของ AST มากกว่าอวัยวะอื่น ส่วนค่า alanine aminotransferase (ALT) หรือ serum glutamic pyruvic transaminase (SGPT) เป็นค่าเอ็นไซม์อีกตัวหนึ่งที่เกิดขึ้นจากความเสียหายของตับ หรืออาจเกิดจากความเสียหายของอวัยวะใดๆเช่น ไต หัวใจหรือกล้ามเนื้อ ฯลฯ ก็ได้ และค่า alkaline phosphatase (ALP) จัดเป็นกลุ่มของเอ็นไซม์ชนิด phosphatase ที่จะทำงานได้ดีในสภาวะที่เป็นด่าง ถูกสร้างขึ้นจากหลายแหล่ง ส่วนใหญ่ผลิตจากตับ รองลงมาคือกระดูกและลำไส้เล็ก ไต และรกของสตรีมีครรภ์ ซึ่งทั้ง 3 ค่าดังกล่าวจัดเป็นค่าที่นิยมวัดในการศึกษาการทำงานของตับ (liver function test) ผลการวิเคราะห์พบว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยของ AST ค่าเฉลี่ยของ ALT และค่าเฉลี่ยของ ALP คือ 231.08 $\pm$ 17.62, 142.00 $\pm$ 22.84, 50.33 $\pm$ 7.89 ตามลำดับ ซึ่งในหนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 300 มก/กกมีแนวโน้มของค่าเฉลี่ยของ AST ALT และ ALP ที่สูงกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมคือเท่ากับ 239.30 $\pm$ 54.14, 165.50 $\pm$ 47.90 และ 81.80 $\pm$ 18.99 ตามลำดับ เช่นเดียวกับหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวขนาด 300 มก/กก มีแนวโน้มของค่าเฉลี่ยของ AST ALT และ ALP ที่สูงกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมคือเท่ากับ 327.36 $\pm$ 28.03, 202.73 $\pm$ 40.54 และ 79.73 $\pm$ 18.64 ตามลำดับ (ดูข้อมูลจากตารางที่ 3 ถึง ตารางที่ 5)

เมื่อพิจารณาจากผลจากการวิเคราะห์เลือดหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมพบว่าค่าเฉลี่ยของ AST ALT และ ALP มีค่าต่ำกว่าหนูแก่กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญคือ 146.00 $\pm$ 12.03, 74.42 $\pm$ 8.69 และ 119.75 $\pm$ 7.50 ตามลำดับ (ตารางที่ 6) หนูหนุ่มกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 30 มก/กกพบว่าค่าเฉลี่ยของ AST และ ALT มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมคือ 140.50 $\pm$ 15.87 และ 69.08 $\pm$ 7.55 ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยของ ALP ต่ำกว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญคือ 52.50 $\pm$ 2.95 (ตารางที่ 7) ส่วนหนูหนุ่มกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวขนาด 300 มก/กกพบว่า ค่าเฉลี่ยของ AST ALT และ ALP มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมคือ 154.50 $\pm$ 7.45, 65.44 $\pm$ 4.55 และ 101.56 $\pm$ 6.38

ตามลำดับ (ตารางที่ 8) ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวขนาด 30 มก/กก มีค่าเฉลี่ยของ AST ALT และ ALP มีค่าใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมคือ 162.30 ± 13.88 , 80.60 ± 15.69 และ 72.80 ± 3.48 ตามลำดับ (ตารางที่ 9) และ หนูกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียวขนาด 300 มก/กก มีค่าเฉลี่ยของ AST ALT และ ALP มีค่าต่ำกว่ากลุ่มควบคุมคือ 116.25 ± 9.66 , 56.58 ± 5.96 และ 89.25 ± 7.39 ตามลำดับ (ตารางที่ 10)

จากผลที่กล่าวมาข้างต้นแสดงว่าในหนูแก่มีการทำงานของตับที่ไม่ดีเท่ากับหนูหนุ่มและการให้สารสกัดจากชาเขียวขนาด 300 มก/กกน้ำหนักตัวแก่หนูแก่เป็นเวลานานไ 90 วันไม่แสดงผลเสียต่อการทำงานของตับในหนูแก่ แต่การให้สารสกัดกากชาเขียวขนาดสูงคือ 300 มก/กกน้ำหนักตัว อาจส่งผลเสียต่อการทำงานของตับได้ ในขณะที่ ส่วนการให้สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก/กกน้ำหนักตัวเป็นเวลานาน 90 วันในหนูหนุ่มไม่ส่งผลเสียต่อการทำงานของตับและมีแนวโน้มที่จะส่งผลทำให้ทำให้ค่า ALT และ ค่า ALP ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด

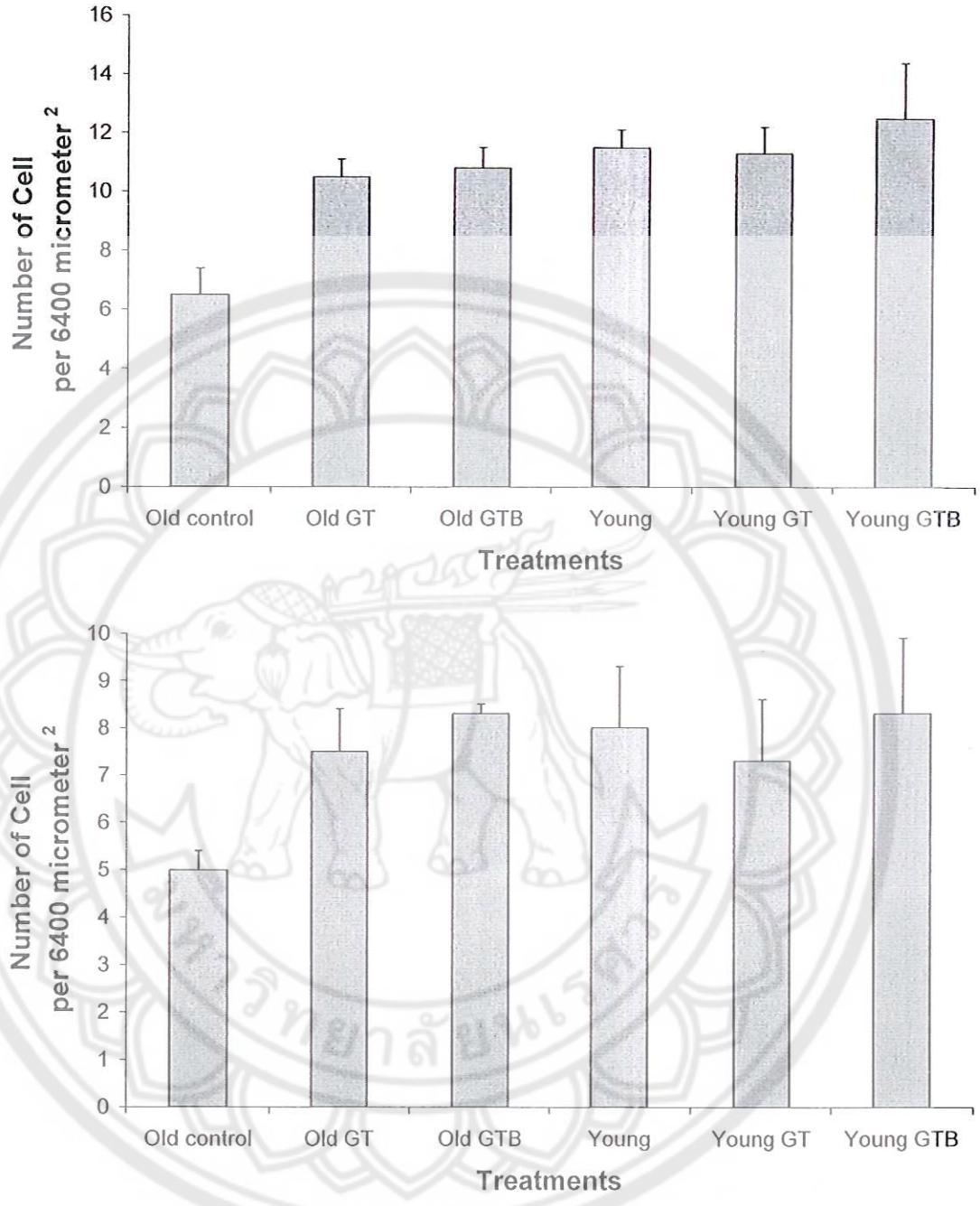
การเปลี่ยนแปลงลักษณะทางกายวิภาคของสมอง

ผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อจำนวนเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

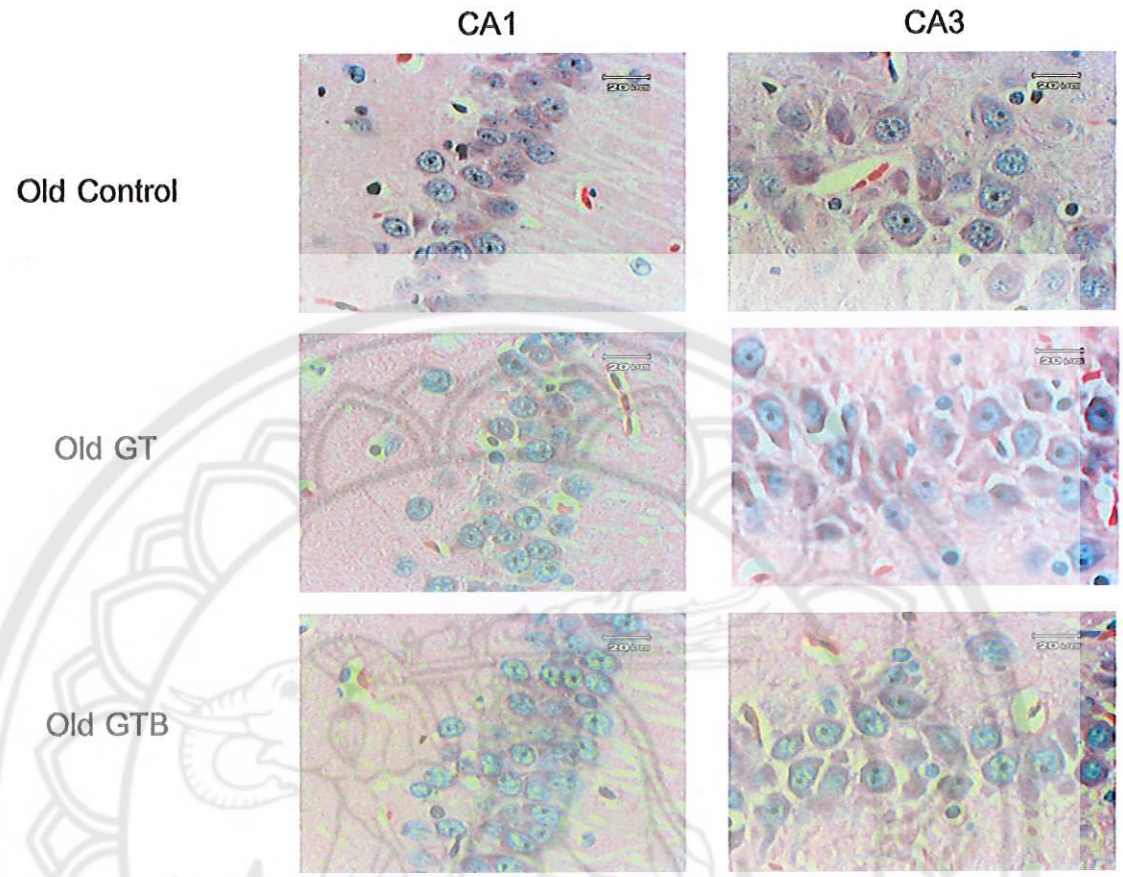
ความสามารถในการทำงานของระบบประสาทที่ลดลงเมื่อเข้าสู่วัยสูงอายุนอกจากการเปลี่ยนแปลงที่สังเกตได้จากพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ การศึกษาถึงระดับการทำงานของเอนไซม์ที่มีบทบาทในการป้องกันภาวะ oxidative stress และเอนไซม์ที่มีผลต่อประสิทธิภาพในการส่งผ่านสารสื่อประสาทที่มีความสำคัญต่อการเรียนรู้และความจำแล้วการเปลี่ยนแปลงที่สำคัญและพบในผู้สูงอายุ คือ การลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทโดยเฉพาะในสมองส่วน hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการเรียนรู้และความจำ โดยมีการศึกษาพบว่าในบริเวณ CA1 ของสมองส่วน hippocampus เป็นบริเวณหนึ่งที่พบว่าเกิดพยาธิสภาพและมีการลดจำนวนของเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ (West et al., 2004) โดยการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการให้สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวในหนูแก่ธรรมชาติ มีผลป้องกันการลดจำนวนเซลล์ประสาทในสมองบริเวณ CA1 ในขณะเดียวกันการให้สารสกัดกากชาเขียวยังมีผลป้องกันการลดจำนวนเซลล์ประสาท ในสมองบริเวณ CA3 อีกด้วย หนูแก่ธรรมชาติ และหนูแก่กลุ่มที่ได้รับชาเขียว และหนูแก่กลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีจำนวน undamaged neurons ในบริเวณ CA1 ของสมองส่วน hippocampus เป็น 6.5 ± 0.9 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน, 10.5 ± 0.6 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน และ 10.8 ± 0.7 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน ตามลำดับ ส่วนจำนวน undamaged neurons ในบริเวณ CA3 ของสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับชาเขียว และกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว เป็น 5.0 ± 0.4 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน, 7.5 ± 0.9 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอนและ 8.3 ± 0.2 เซลล์ต่อ

6400 ตารางไมครอน ตามลำดับ จำนวนเซลล์ประสาท ในสมองบริเวณ CA1 และCA3 ของหนูแต่ละกลุ่มแสดงดังรูปที่ 8

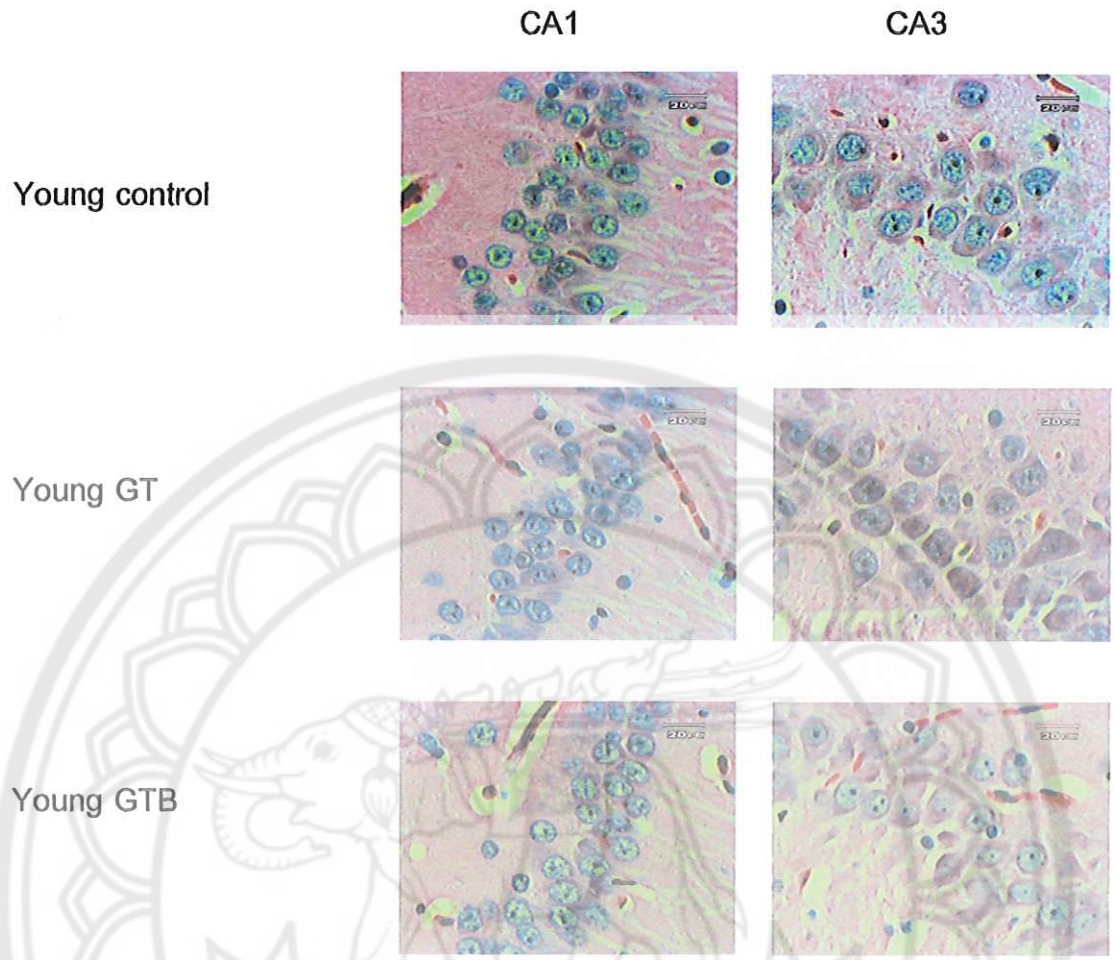
สำหรับผลการทดลองในหนูหนุ่ม พบว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม หนูหนุ่มกลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว และหนูหนุ่มกลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว มีจำนวน undamaged neurons ในบริเวณ CA1 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เป็น 11.5 ± 0.6 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน, 11.3 ± 0.9 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน และ 12.5 ± 1.9 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน ในสมองส่วน CA3 ของสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เป็น 8.0 ± 1.3 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน, 7.3 ± 1.3 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน และ 8.3 ± 1.6 เซลล์ต่อ 6400 ตารางไมครอน โดยลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบใน CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแก่ในแต่ละกลุ่มแสดงในรูปที่ 9 และหนูหนุ่มแสดงในรูปที่ 10



รูปที่ 8 แสดงการเปรียบเทียบจำนวน undamaged neuron บริเวณ CA1 (กราฟรูปบน) CA3 (กราฟรูปล่าง) ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (Old control) หนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว (Old GT) หนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว (Old GTB) และหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (Young) สารสกัดชาเขียว (Young GT) และสารสกัดกากชาเขียว (Young GTB)



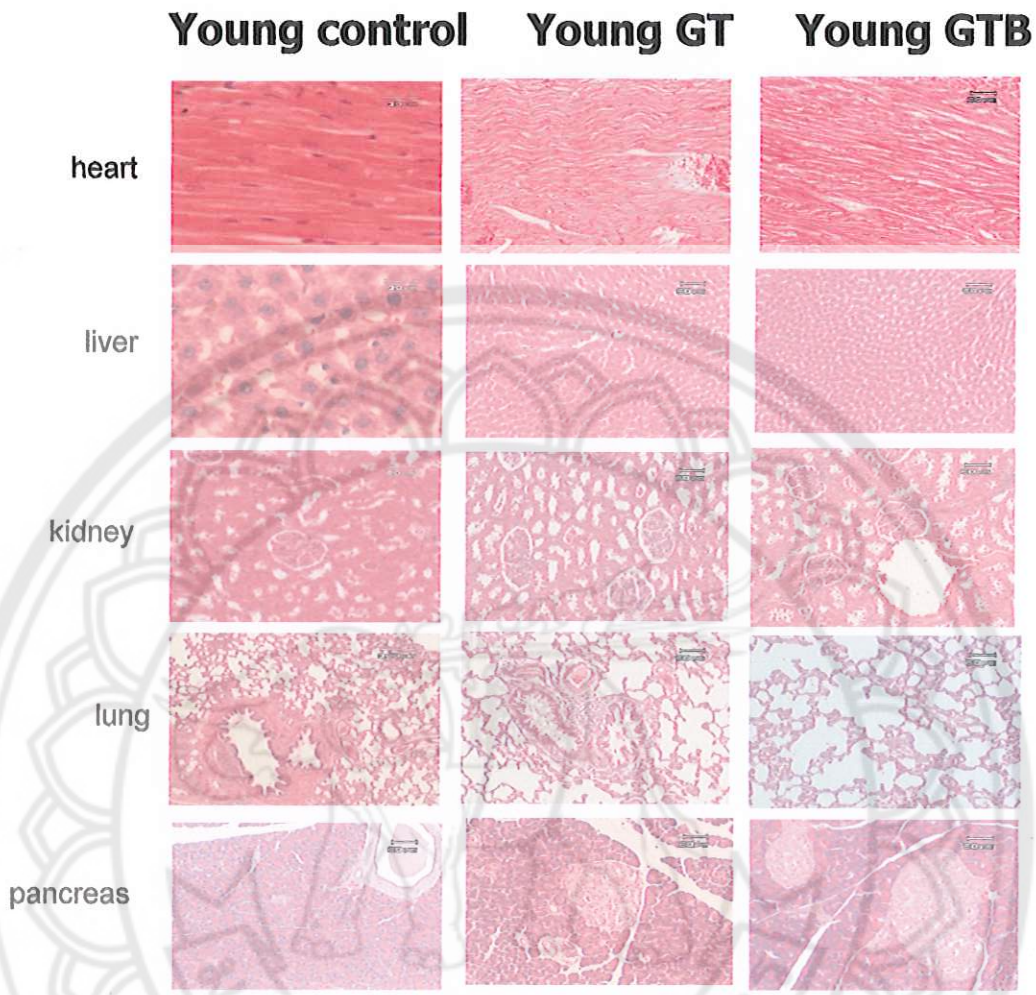
รูปที่ 9 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบใน CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus ของหนูหนูแก่กลุ่มควบคุมที่ด้รับน้ำ (Old control) หนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียว (Old GT) หนูแก่กลุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชาเขียว (Old GTB)



รูปที่ 10 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบใน CA1 และ CA3 ในสมองส่วน hippocampus ของหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมที่ได้รับน้ำ (Young control) สารสกัดชาเขียว (Young GT) และสารสกัดกากชาเขียว (Young GTB)

ผลของสารสกัดต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะหนูทดลอง

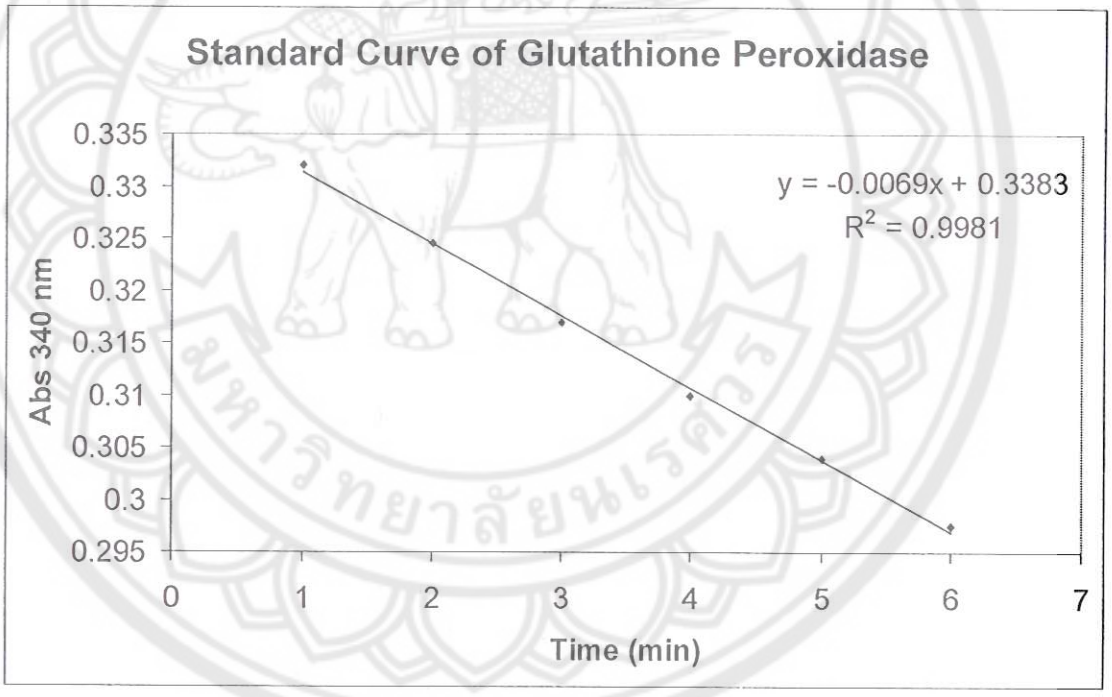
เมื่อทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ในแต่ละอวัยวะของหนูหนุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 300 มก/กกน้ำหนักตัว เป็นเวลานาน 3 เดือนเปรียบเทียบกับที่ได้รับน้ำซึ่งเป็นตัวทำละลาย พบว่าไม่ทำให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ผิดปกติ ผลการผ่าซากชันสูตรของหนูทั้งหมดพบว่าไม่มีความผิดปกติใดๆที่มองเห็นด้วยตาเปล่าปรากฏในหนูกลุ่มต่างๆ การศึกษาลักษณะทางพยาธิกายวิภาคและจุลพยาธิวิทยาของอวัยวะของหนูทั้งหมด ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม แสดงดังรูปภาพที่ 11 ดังต่อไปนี้



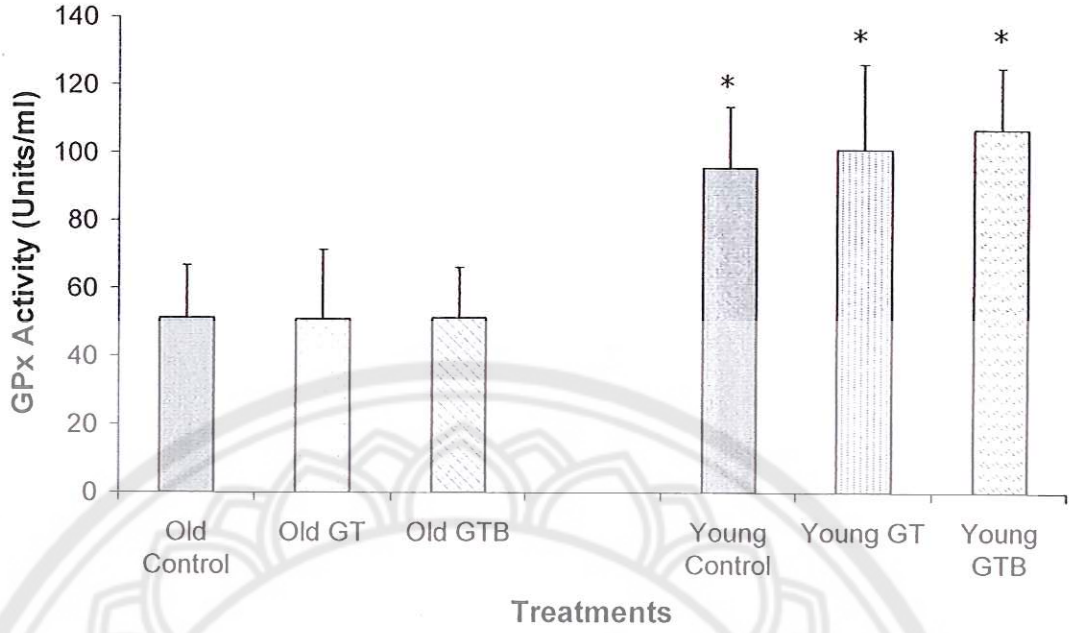
รูปที่ 11 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเซลล์ที่พบในอวัยวะต่างๆคือ spleen, intestine, stomach, seminal vesicle, testis, prostate gland, heart, liver, kidney, lung, pancreas ของหนูหนุ่มที่ได้รับน้ำกลั่น สารสกัดชาเขียวและสารสกัดกากชาเขียวขนาด 300 มก/กก น้ำหนักตัวนาน 3 เดือน

ผลของสารสกัดชาเขียว และกากชาเขียวและผลต่อระดับของเอนไซม์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในหนูโตเต็มวัย หนูแก่

ในการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ glutathione peoxidase (GPx) ได้ผลการทำกราฟมาตราฐานแสดงดังกราฟรูปที่ 12 จากผลการทดลองพบว่าหนูแก่กลุ่มควบคุม หนูแก่ที่ได้รับชาเขียวและหนูแก่กลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 51.30 ± 15.55, 50.89 ± 20.49 และ 51.30 ± 14.83 ยูนิท/มล. ตามลำดับ ซึ่งน้อยกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับชาเขียวและกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียวที่ขนาดเท่ากัน ซึ่งมีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 95.65 ±18.03, 101.14 ± 25.12 และ 107.01 ± 18.13 ยูนิท/มล. ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.05$ แสดงดังรูปที่ 13

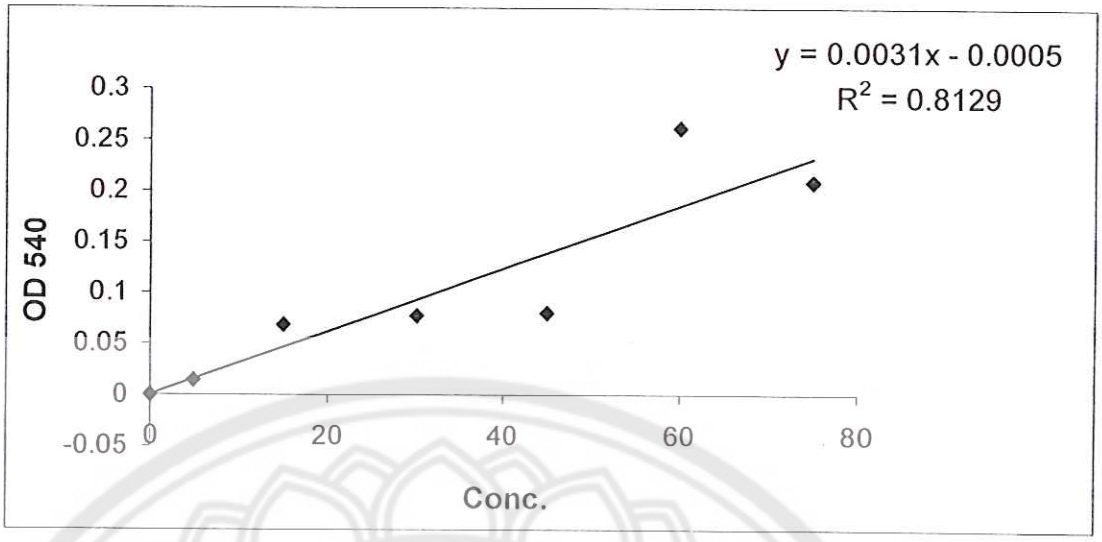


รูปที่ 12 แสดง กราฟมาตรฐาน (standard curve)ของการทำงานของ Glutathione Peroxidase ที่เวลา 1-6 นาที เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร

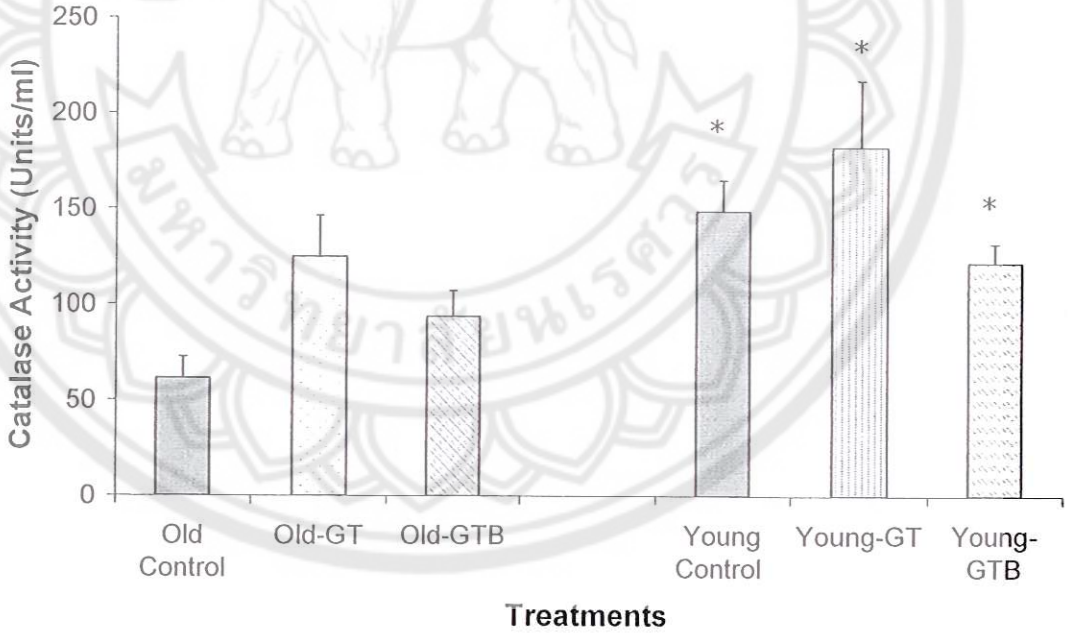


รูปที่ 13 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus ของหนูทดลองแต่ละกลุ่ม * p< 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับน้ำหรืออสารสกัดชา และกากชาขนาดเท่ากัน

นอกจากนี้ในการวัดระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase ได้ผลการทำกราฟมาตราฐานแสดงดังกราฟรูปที่ 14 และจากผลการทดลองพบว่าหนูแก่กลุ่มควบคุม หนูแก่ที่ได้รับชาเขียวและหนูแก่กลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase ในสมองส่วน hippocampus เท่ากับ 61.50 ± 11.17, 124.99 ± 21.41 และ 93.81 ± 13.35 ยูนิท/มล. ตามลำดับ ส่วนในหนูหนุ่มกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ได้รับชาเขียวและกลุ่มที่ได้รับกากชาเขียว มีค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase ในสมองส่วน hippocampus สูงกว่าหนูแก่อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับน้ำหรือสารสกัดชนิดเดียวกันคือเท่ากับ 148.84 ±16.01, 182.30 ± 34.87 และ 122.23 ± 9.82 ยูนิท/มล. ตามลำดับ แสดงดังภาพที่ 15 นอกจากนี้จะสังเกตได้หนูแก่ที่ได้รับสารสกัดชา มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase สูงกว่ากลุ่มควบคุม ตามด้วยหนูแก่ที่ได้รับสารสกัดกากชา ซึ่งเมื่อทำการทดสอบทางสถิติพบว่า **แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มหนูแก่ควบคุม** ($p< 0.05$) **ส่วนในหนูหนุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวพบว่าระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่หนูหนุ่มที่ได้รับสารสกัดกากชามีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase ต่ำกว่าหนูหนุ่มกลุ่มควบคุมเล็กน้อย แต่ม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ**



รูปที่ 14 แสดง กราฟมาตรฐาน (standard curve) ของการทำงานของเอนไซม์ catalase ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร



รูปที่ 15 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยของระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase ในสมองส่วน hippocampus ของหนูแก่ และหนูหนุ่มที่ได้รับน้ำ และสารสกัดชาและกากชาขนาด 300 มก/กก น้ำหนักตัว * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มหนูแก่ที่ได้รับน้ำหรือสารสกัดชาและกากชาขนาดดเท่ากัน

สรุปและวิจารณ์ผล

การศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นการต่อยอดจากการศึกษาที่ผ่านมาที่พบว่า การให้สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวติดต่อกันเป็นเวลา 90 วันมีผลฟื้นฟูความจำเกี่ยวกับสถานที่โดยการทดสอบด้วย Morris's Water Maze test และฟื้นฟูความสามารถในการจำสิ่งที่เคยพบมาก่อนโดยการทดสอบด้วย Novel Object Recognition test ในหนูแก่ธรรมชาติได้ (พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์และคณะ 2552) ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการตรวจวัดค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีในเลือดหนูแก่และหนูหนุ่มที่ได้รับสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวเป็นเวลานาน 90 วัน โดยพบว่าในหนูแก่มีการทำงานของตับที่ไม่ดีเท่ากับหนูหนุ่มและการให้สารสกัดจากชาเขียวขนาด 300 มก/กกน้ำหนักตัวแก่หนูแก่ ไม่แสดงผลเสียต่อการทำงานของตับในหนูแก่ แต่การให้สารสกัดกากชาเขียวขนาดสูง คือ 300 มก/กกน้ำหนักตัว อาจส่งผลเสียต่อการทำงานของตับได้ ส่วนผลการทดสอบในหนูหนุ่มพบว่าการให้สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวขนาด 30 และ 300 มก/กกน้ำหนักตัว เป็นเวลานาน 90 วันในหนูหนุ่ม ไม่ส่งผลเสียต่อการทำงานของตับและมีแนวโน้มที่จะส่งผลทำให้ค่า alanine aminotransferase และ ค่า alkaline phosphatase ลดลงซึ่งเป็นค่าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของตับ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด

ถึงแม้ว่าผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา ที่พบว่ามีการเกิดภาวะ lipid peroxidation เพิ่มขึ้นในสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์หลังจากเสียชีวิต (Mizuno and Ohta, 1986 ; Richardson, 1993) แสดงให้เห็นว่าภาวะ oxidative stress มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยจากรายงานของ Mizuno และ Ohta ในปี 1986 พบว่าสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์หลังจากเสียชีวิต มีการเพิ่มขึ้นของค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน temporal lobe อีกทั้ง การศึกษาของ Lovell และคณะในปี 1995 พบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ GPx ในสมองส่วน hippocampus และเอนไซม์ catalase ในสมองส่วน hippocampus, superior และ middle temporal gyri ซึ่งค้านกับผลการศึกษาที่รายงานว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงของค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD (Gsell, et al., 1995), GPx และ catalase ในทุกส่วนของสมอง (Kish, Morito and Hornykiewiez, 1986; Richardson, 1993; Chen, et al., 1994) นอกจากนี้ยังมีรายงานว่ามีการลดลงของค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD ในสมองส่วน hippocampus และ frontal lobe (Richardson, 1993) และเอนไซม์ catalase ในสมองส่วน temporal lobe

รายงานของ Komatsu และ Hiramatsu (2000) พบว่าหนูแก่ที่ได้รับสาร catechin เป็นเวลานาน 1 เดือน มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD เพิ่มมากขึ้นใน mitrochondria fraction ของสมองส่วน striatum และ midbrain และรายงานของ Levites และคณะ (2001) พบว่าหนูถีบจักรที่ได้รับสาร EGCG มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ catalase เพิ่มขึ้นในสมอง

ส่วน striatum ในขณะที่รายงานของ Skrzydlewska และคณะ (2002) พบว่าสมองของหนูทดลองที่ดื่มชาเขียวขนาด 3 กรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 5 สัปดาห์ มีการลดลงของระดับ 4HNE และ MDA ซึ่งเป็นสารที่ถูกสร้างจากกระบวนการ lipid peroxidation และ มีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ GPx ลดลง รวมทั้งมีค่าระดับการทำงานของเอนไซม์ catalase เพิ่มขึ้น และในการศึกษาของ Haque และคณะในปี 2006 พบว่าหนูทดลองที่ได้รับสาร catechin ขนาด 0.5 และ 0.1 % ในน้ำดื่มติดต่อกันเป็นเวลานาน 26 สัปดาห์ มีระดับ ROS และ MDA ในสมองส่วน hippocampus น้อยกว่าหนูทดลองกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาผลของสารสกัดชาเขียวและกากชาเขียวต่อระดับการทำงานของเอนไซม์ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสอีกสองตัวคือ glutathione peroxidase และ catalase ซึ่งพบว่า โดยระดับ enzyme activity ของเอนไซม์ทั้งสองมีแนวโน้มที่จะลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อหนูทดลองมีอายุเพิ่มขึ้น การให้สารสกัดชาเขียวและกากชาเขียว ส่งผลให้เพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) และ catalase มากกว่าหนูแก่ธรรมชาติที่ได้รับตัวทำละลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Stiridiya และคณะในปี 2009 ซึ่งในการศึกษาดังกล่าวยังพบว่าหนูแก่ธรรมชาติที่ได้รับสาร EGCG ในชาเขียวมีผลเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ในหนูแก่ธรรมชาติ (Srividhya et al., 2009)

ผลดังกล่าวเมื่อเทียบกับมนุษย์เราก็มีความสอดคล้องกันตรงที่ว่า การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในผู้สูงอายุส่งผลต่ออวัยวะหลายส่วนในร่างกายรวมถึงการเปลี่ยนแปลงความสามารถในการทำงานของสมอง โดยพยาธิสภาพต่างๆ ที่เกิดขึ้นเช่นภาวการณ์ถูกออกซิไดซ์เกินสมดุล (oxidative stress) ที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของการปล่อยสารอนุมูลอิสระซึ่งเป็นผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระจากการสลายไขมัน โปรตีนและกรดนิวคลิอิก รวมถึงการเปลี่ยนแปลงกระบวนการตายของเซลล์ซึ่งส่งผลให้เกิดการลดความสามารถในการทำงานของสมอง (Schmitt et al., 2005) จากการลดประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของสมอง เช่นมีกระบวนการส่งผ่านข้อมูลที่ช้าลงในผู้สูงอายุที่เกิดขึ้นในสมองบริเวณต่างๆ ทำให้มีการพยายามอธิบายกระบวนการที่เกิดขึ้นโดยทฤษฎีหนึ่งที่ใช้อธิบายกระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในผู้สูงอายุคือ ทฤษฎีที่เกี่ยวข้องกับอนุมูลอิสระ (Harman, 1968) โดยสมองจะมีการสะสมของภาวะ oxidative stress ซึ่งจะมีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการขัดขวางการทำงานของไมโตคอนเดรียซึ่งเป็นออร์แกนัลในการสร้างพลังงาน และการลดลงของพลังงานดังกล่าวในเซลล์ประสาท ส่งผลให้เกิดการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทและการทำหน้าที่ของสมอง ทำให้เกิดการบกพร่องของความสามารถในการเรียนรู้และความจำในที่สุด (Schmitt et al., 2005)

บรรณานุกรม

พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์ นิวัติ เทพาวราพฤกษ์ และ สุธิรา เลิศตระกูล (2552) รายงานฉบับสมบูรณ์เรื่อง **การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากกากชาเขียวต่อการเรียนรู้และความจำ** สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (สกว.)

สมพร ภูติยานันต์. (2546). **ความรู้เบื้องต้นเกี่ยวกับการแพทย์แผนไทย ว่าด้วยสมุนไพรกับการแพทย์แผนไทย**. เชียงใหม่: ดุลย์การพิมพ์.

โอภา วัชระคุปต์. (2549). **อนุมูลอิสระในระบบของสิ่งมีชีวิต**. กรุงเทพฯ: พี.เอส.พริ้นท์

Chen, L., Richardson, J. S., Caldwell, J. E. and Ang, L. C. (1994). Reginol brain activity of free radical defense enzymes in autophy samples from patients with Alzheimer' disease and from nondemented controls. **International Journal of Neuroscience**, 75, 83-90.

Coimbra, S., Castro, E., Pereira, P. R., Rebelo, I., Rocha, S., and Silva, A. (2006). The effect of green tea in oxidative stress. **Clinical Nutrition**, 25(5), 790-796.

Galati, G., Sabzevari, O., Wilson, J. X., and O'Brien, P. J. (2002). Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, 177(1), 91-104.

Halliwell, B., and Gutteridge, J. (1999). Free radicals, other reactive species and disease. New York: Oxford University Press.

Haque, A. M., Hashimoto, M., Katakura, M., Hara, Y., and Shido, O. (2008). Green tea catechins prevent cognitive deficits caused by $A\beta_{1-40}$ in rats. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 19(1), 619-626.

Haque, A. M., Hashimoto, M., Katakura, M., Tanabe, Y., Hara, Y., and Shido, O. (2006). Long-term administration of green tea catechins improves spatial cognition learning ability in rats. **The Journal of Nutrition**, 136(4), 1043-1047.

Harborne, J. B., and Williams, C. A. (2000). Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, 55(1), 482-504.

Harman, D. (1968). Free radical theory of aging: effect of free radical reaction inhibitors on the mortality rate of male LAF mice. **Journal of Gerontology**, 23(1), 476-482.

Kaur, T., Pathak, C.M., Pandhi, P., and Khanduja, K.L. (2008). Effects of green tea extract on learning, memory, behavior and acetylcholinesterase activity in young and old male rats. **Brain and Cognition**, 67(1), 25-30.

Kehre, J. (1993). Free radicals as mediators of tissue and disease. **Critical reviews in toxicology**, 23(1), 21-48.

Khan, N., and Mukhtar, H. (2007). Tea polyphenols for health promotion. **Life Sciences**, 81(7), 519-533.

Khan, S. A., Priyamvada, S., Arivarasu, N. A., Khan, S., and Yusufi, A. N. (2007). Influence of green tea on enzymes of carbohydrate metabolism, antioxidant defense, and plasma membrane in rat tissues. Nutrition, 23(1), 687-695.

Khan, S. G., Katiyar, S. K., Rajesh, A., and Hasan., M. (1992). Enhancement of antioxidant and phase II enzymes by oral feeding of green tea polyphenols in drinking water to SKH-1 hairless mice: possible role in cancer chemoprevention. Cancer Research, 52(4), 4050-4052.

Kish, S. J., Morito, C. L. and Hornykiewiez, O. (1986). Brain Glutathione peroxidase in neurodegenerative disorders. **Neurochemical Pathology**, 4, 23-28.

Komatsu, M. and Hiramatsu, M. (2000). The efficacy of an antioxidant cocktail on lipid peroxide level and superoxide dismutase activity in aged rat brain and DNA damage in iron-induced epileptogenic foci. Toxicology, 143-148.

Kondo, M., Kita, K., and Yokota, H. (2004). Feeding value to goats whole-crop oat ensiled with green tea waste. **Animal Feed Science and Technology**, 113, 71-81.

Koo, M. W.., and Chi, H. C. (2004). Pharmacological effects of green tea on the gastrointestinal system **European Journal of Pharmacology**, 500(1), 177-185.

Levites, Y., Weinreb, O., Maor, G., Youdim, M. B. H. and Mandel, S. (2001). Green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate prevent *N*-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine-induced dopaminergic neurodegeneration. **Journal of Neurochemistry**, 78, 1073-1082.

Lunec, J. (1992). Oxygen radicals: their measurement and role in major disease. **Journal of the International Federation of Clinical Chemistry**, 4(1), 58-63.

Mizuno, Y. and Ohta, K. (1986). Increased lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in adult and aged brain. **Journal of Neorochemistry**, 46, 1344-1352.

Nakagawa, T., and Yokozawa, T. (2002). Direct scavenging of nitric oxide and superoxide by green tea. **Food and Chemical Toxicology**, 40(12), 1745-1750.

Nanjo, F. (1999). The antioxidative property of green tea against iron-induced oxidative stress in rat brain. **Bioscience, Biotechnology Biochemistry**, 63(9), 1621-1623.

Noguchi, N., and Niki, E. (1999). **Chemistry of active oxygen species and antioxidants**. Washington DC: CRC Press.

Rezai-Zadeh, K., Arendash, G. W., Hou, H., Fernandez, F., Jensen, M., Runfeldt, M., et al. (2008). Green tea epigallocatechin-3-gallate (EGCG) reduces beta-amyloid mediated cognitive impairment and modulates tau pathology in Alzheimer transgenic mice. **Brain Research**, 1214(1), 177-187.

Richardson, J. S. (1993). Free Radical in The genesis of Alzheimer's disease. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, 695, 73-76.

Satoh, M., and Lindahl, T. (1994). Enzymatic repair of oxidative DNA damage. **Cancer Research**, 54, 1899-1901.

Schmitt, S., Schaffer, S., Weber, C., Eckert, G.P., and Mukller, W.E. (2005). Flavonoids and the aging brain. **Journal of Physiology and Pharmacology**, 56(1), 23-36.

Skrzydlewska, E., Ostrowska, J., Farbiszewski, R. and Michalak, K. (2002). Protective effect of green tea against lipid peroxidation in the rat liver, blood serum and the brain. **Phytomedicine**, 9, 232-238.

Srividhya, R., Zarkvoic, K., STroser, M., Waeg, G., Zarkovic, N., and Kalaiselvi, P. (2009). Mitochondrial alterations in aging rat brain: effective role of (-)-epigallocatechin gallate. **International. Journal of Developmental Neuroscience**, 27(1), 223-231.

Stadtman, E. R., and Oliver, C. N. (1991). Metal-catalyzed oxidation of proteins. **The Journal of Biological Chemistry**, 266(1), 2005-2008.

Takami, S., Imai, T., Hasumura, M., Cho, Y., Onose, J., and Hirose, M. (2008). Evaluation of toxicity of green tea catechins with 90-day dietary administration to F344 rats. **Food and Chemical Toxicology**, 46(1), 2224-2229.

Unno, K., Takabayashi, F., and Oku, N. (2003). Improvement in brain function and oxidative damage of aged senescence-accelerted mice by green tea catechins. **International Congress Series**, 1260(1), 409-412.

Weinreb, O., Mandel, S., Amit, T., and Moussa, B. (2004). Neurological mechanisms of green tea polyphenols in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Journal of Nutritional Biochemistry**, 15(9), 506-516.

West, M. J., Kawas, C. H., Stewart, W. F., Rudow, G. L., and Troncoso, J. C. (2004). Hippocampal neurons in pre-clinical Alzheimer's disease. **Neurobiology of Aging**, 25(1), 1205-1212.

เอกสารรับรองโครงการวิจัยในสัตว์ทดลอง
คณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยนเรศวร

ชื่อโครงการ	การศึกษาพิษแบบกึ่งเรื้อรังของสารสกัดจากใบชาเขียว และกากชาเขียวและผลต่อระดับของเอนไซม์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชั่นในหนูโตเต็มวัย หนูแก่ Sub-chronic toxicity studies of extracts from green tea and green tea byproduct and an effect on levels of antioxidant enzymes in young adult and aged rats.
ชื่อหัวหน้าโครงการ	ผศ.ดร.พรนรินทร์ เทพาวราพฤกษ์
เลขที่โครงการ/รหัส	50 04 0033
สังกัดหน่วยงาน/คณะ	วิทยาศาสตร์การแพทย์
การรับรอง	ขอรับรองโครงการวิจัยดังกล่าวข้างบนนี้ ได้ผ่านการพิจารณาและรับรองจากคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร วันที่ 24 ตุลาคม 2550

ลงนาม วิบูลย์ วัฒนาธร

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิบูลย์ วัฒนาธร)

ประธานคณะกรรมการจรรยาบรรณการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร