

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การศึกษาผลของสารบาราคอลต่อการดูดกลับของ
5-HT จากเนื้อเยื่อสมองของหนูขาวส่วนฮิปโปแคมปัสในหลอดทดลอง

คณะผู้ดำเนินการวิจัย

ผศ.ดร. วัชรวิรรณ ทองสะอาด

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

Professor Charles A. Marsden

School of Biomedical Sciences, University of Nottingham, UK

หน่วยงานที่รับผิดชอบ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

แหล่งทุนสนับสนุนงานวิจัย

มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ ประจำปีงบประมาณ 2542

บทคัดย่อ

ข้าเหล็กเป็นพืชสมุนไพรที่รู้จักกันแพร่หลายทั้งนำมาใช้เป็นอาหารและยาในการช่วยในการนอนหลับ มีการสกัดสารบริสุทธิ์สำคัญจากใบและดอกข้าเหล็กและให้ชื่อว่าสารบาราคอล และมีการศึกษาพบว่าสารดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์สงบระงับได้ในสัตว์ทดลองหากใช้ในปริมาณที่เหมาะสม ในปีค.ศ. 1996 คณะผู้วิจัยได้รายงานผลของสารสกัดบาราคอลในการคลายเครียดในสัตว์ทดลองหากใช้ในปริมาณที่ต่ำกว่าขนาดที่ออกฤทธิ์สงบระงับ โดยพบว่าสารบาราคอลออกฤทธิ์ผ่านระบบประสาทโดปามีน โดยไปลดการหลั่งโดปามีนจากสมองโดยไม่มีผลต่อการดูดกลับของโดปามีนเข้าสู่เซลล์สมอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานว่าการลดการหลั่งโดปามีนในระบบประสาทมีผลช่วยในการคลายเครียด จากรายงานการศึกษาวิจัยผลของสารบาราคอลต่อระบบประสาทเซโรโตนินหรือ 5-HT ซึ่งเป็นระบบประสาทสำคัญที่เกี่ยวข้องกับภาวะทางจิตใจ พบว่าสารบาราคอลมีผลในการเพิ่มการหลั่งสาร 5-HT คล้ายกับผลของยา Fluoxetine ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคเครียดในปัจจุบันในกลุ่มของ Serotonin reuptake inhibitor ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารบาราคอลต่อการดูดกลับของ 5-HT เปรียบเทียบกับสาร Fluoxetine จากการศึกษาพบว่าสารบาราคอลไม่มีผลต่อการเพิ่มหรือยับยั้งการดูดกลับของ 5-HT ยกเว้นที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลา สารบาราคอลจะมีผลลดการดูดกลับของ [³H]5-HT เช่นเดียวกับ Fluoxetine (100 ไมโครโมลา) จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าการที่สารบาราคอลมีผลในการเพิ่มการหลั่งสาร 5-HT นั้น มาจากผลของสารบาราคอลในการยับยั้งการดูดกลับของ 5-HT แต่ทั้งนี้คำอธิบายดังกล่าวสามารถอธิบายได้เฉพาะกรณีที่ใช้ความเข้มข้นของสารบาราคอลที่สูงมากเท่านั้น เนื่องจากที่ความเข้มข้นต่ำลงสารบาราคอลไม่มีผลในการเพิ่มการดูดกลับของ 5-HT ทั้งที่ความเข้มข้นดังกล่าวสามารถเพิ่มการหลั่งสาร 5-HT ได้ ทั้งนี้ผลการศึกษาดังกล่าวเป็นผลจากการศึกษาในหลอดทดลอง ยังต้องมีการศึกษาต่อไปว่าสารบาราคอลจะให้ผลเช่นเดียวกันหากศึกษาในตัวสัตว์ทดลองหรือไม่ และต้องศึกษาต่อไปเพื่อหากลไกการออกฤทธิ์ของสารบาราคอลต่อระบบประสาทเซโรโตนินเพื่อนำความรู้ไปพัฒนาใช้ต่อไป

บทนำ

ขี้เหล็ก (*Cassia siamea*) เป็นพืชพื้นบ้านที่ปลูกมากในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ทั้งในประเทศไทย พม่า อินเดีย และมาเลเซีย ส่วนต่าง ๆ ของต้นขี้เหล็กได้ถูกนำมาใช้เป็นยาพื้นบ้าน เพื่อรักษาโรคและอาการต่าง ๆ เช่น ราก นำมาใช้ลดไข้ เปลือกนำมาใช้รักษาโรคผิวหนังบางชนิด เมล็ดใช้รักษาโรคเบาหวาน ผลใช้รักษาโรคเบาหวานและใช้เป็นยาระบาย ส่วนใบอ่อนและดอก นำมาใช้เป็น ยา รักษาโรคเบาหวาน ยาระบายรักษาโรคความดันโลหิตสูง และที่ใช้กันแพร่หลายที่สุด คือใช้เป็น ยา แก้อาการนอนไม่หลับ ในประเทศไทยยังใช้ใบอ่อนและดอกมาปรุงอาหารด้วย การศึกษาผลทางเภสัชวิทยา ของใบและดอกขี้เหล็กเริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1949 โดย ศ.พญ. อุไร อรุณลักษณะนา ได้นำใบขี้เหล็ก มาสกัดด้วยเอธานอล และป้อนแก่สัตว์ทดลอง พบว่าสารสกัดเอธานอลจากใบขี้เหล็กมีผลลดการทำงานของ ระบบประสาท ลดความรุนแรงของการชักที่กระตุ้นโดยยาstrychnine และเพิ่มแรงตึงตัวของกล้ามเนื้อลำไส้ และหัวใจ

ในปลายปี ค.ศ. 1969 ได้มีรายงานการพบสารออกฤทธิ์สำคัญที่สกัดได้จากใบและดอกขี้เหล็ก (Hassanali - walji et al., 1996) โดยได้ตั้งชื่อสารสำคัญนี้ว่า “บาราคอล (barakol)” และในปี ค.ศ. 1970 ก็ได้มีการเสนอโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของบาราคอล (Bycroft et al., 1970) โดยมีชื่อทางเคมีว่า 3a,4-dihydro-3a,8-dihydroxy-2,5-dimethyl-1,4-dioxaphenalene ($C_{13}H_{12}O_4$) ดังรูปที่ 1 คุณสมบัติทางเคมีและคุณสมบัติทางสรีรวิทยาและเภสัชวิทยาของสารบาราคอลได้สรุปไว้ใน Thongsard, et al., 1999 จากนั้นมาได้มีรายงานการวิจัยถึงผลของบาราคอลต่อระบบต่าง ๆ อย่างต่อเนื่อง ดังนี้

1. ผลต่อต้านแบคทีเรีย (Anti-microbial effects)

บาราคอลมีผลด้านการเจริญของแบคทีเรียทั้งกรัมบวกและกรัมลบเพียงเล็กน้อย (Gritsanapan et al. 1989)

2. ผลต่อระบบไหลเวียนโลหิต (Effect on cardiovascular system)

2.1 บาราคอล (0.5 - 15 mg/kg, i.v.) มีผลในการลดความดันโลหิตในหนูและกระต่าย (Suwan et al, 1992)

2.2 บาราคอล (10 mg/kg) สามารถลดอัตราการเต้นของหัวใจและลดความดันเลือดในสัตว์ทดลองที่ทำให้สลบได้ (Momose et al., 1996)

3. ผลต่อเนื้อเยื่อต่าง ๆ (Effects on isolated tissue preparations)

3.1 บาราคอล (1-32 μ g/ml และ 0.5 - 16 mg/ml) ไม่มีผลต่อการหดตัวของลำไส้เล็กส่วนอเล็กซ์ของหนูกึ่งนิพิต (Gritsanapan et al. 1989)

3.2 บาราคอล (10 μM - 1mM) มีผลลดการหดตัวของเส้นเลือดทอแรคซิกที่ถูกกระตุ้นโดยสารเพนนิลเอพฟรีน (Suwan et al, 1992)

3.3 บาราคอล (1 - 300 μM) ไม่มีผลต่อการหดตัวของเส้นเลือดหางหมู (porcine tail artery) วาส เดเฟเรน (vas deferens) ของหนู และลำไส้เล็กส่วนอิลีียมของหนูกินีพิก (guinea pig ileum) ที่ถูกกระตุ้นโดยกระแสไฟฟ้า (Thongsaard et al, 1997a)

4. ผลทางพิษวิทยา (Toxicity of barakol)

ความเข้มข้นของบาราคอลที่ทำให้หนูถีบจักรตายไปครึ่งหนึ่งของจำนวนทั้งหมด (LD_{50}) เท่ากับ 302-347 mg/kg (Jantarayota, 1987)

5. ผลต่อระบบประสาท (Effects on the central nervous system)

4.1 บาราคอล (10-100 mg/kg, i.p) มีผลในการลดพฤติกรรมเคลื่อนไหว ในหนูถีบจักร (Jantarayota, 1987 ; Kaokeaw, 1992) แต่เมื่อให้บาราคอลในปริมาณสูงชันกลับมีผล กระตุ้นการทำงานของระบบประสาท และทำให้ชักตายในที่สุด

4.2 บาราคอล (100-200 mg/kg,i.p) มีผลในการลดความเจ็บปวดในหนูถีบจักรโดยใช้การทดสอบบนแผ่นความร้อน (hot-plate test) (Jantarayota, 1987, Tongroach et al, 1992)

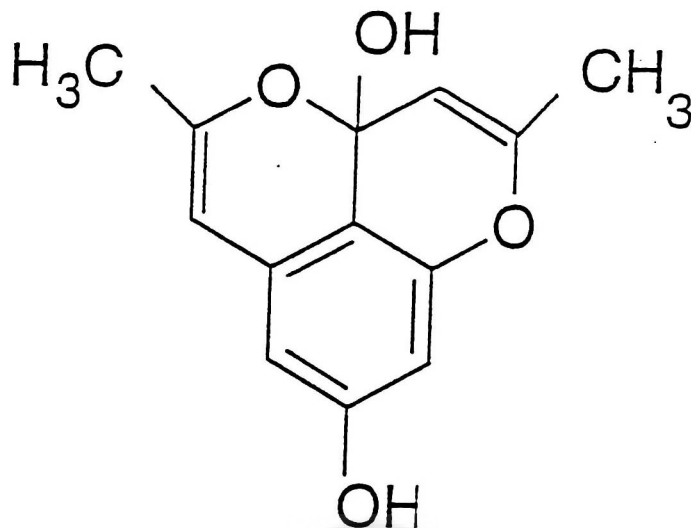
4.3 บาราคอล (75-150 mg/kg, i.p) มีผลเพิ่มพฤติกรรมหมุนตัว (rotation behaviour) ที่กระตุ้นโดยสารอะโปมอร์ฟิน ในหนูที่ถูกทำลายสมองในส่วนสไตรอาตัม (striatal lesion) (Jantarayota, 1987 ; Tongroach et al, 1992)

4.4 บาราคอล (25-100 mg/kg, i.p.) มีผลลดการทำงานของสาร 5-hydroxytryptophan ที่กระตุ้นให้เกิดพฤติกรรมสบัดหัว (head shake behaviour) (Jantarayota, 1987 ; Tongroach et al, 1992)

4.5 บาราคอล (10 mg/kg, i.p) มีผลลดความเครียดในหนูเมื่อทดสอบด้วย elevated plus maze คล้ายกับยาไดอะซีแพม (diazepam) แต่ไม่ทำให้เกิดอาการง่วงซึม กลับมีผลเพิ่มพฤติกรรมเคลื่อนไหวที่และตื่นตัว (Thongsaard et al, 1996a)

4.6 บาราคอล (1 - 100 μM) มีผลลดการหลั่งโดปามีนจากเนื้อเยื่อสมองในส่วน สไตรอาตัม (striatum) ในหลอดทดลอง โดยไม่ได้มีการเพิ่มการดูดกลับของโดปามีนจากปลายประสาท (Thongsaard et. al. 1997b)

4.7 บาราคอล (10 และ 100 μM /kg, i.p.) มีผลลดระดับโดปามีนในสารละลายภายนอกเซลล์ (extracellular dopamine) ในหนูเมื่อวัดโดยใช้เทคนิคไมโครไดอะไลซิส (microdialysis technique) (Thongsaard et al, 1996b)



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของสารบาราคอล

งานวิจัยนี้ต่อเนื่องจากงานวิจัยที่ผู้วิจัยได้เริ่มดำเนินการมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 1992 หลังจากค้นพบว่าสารสกัดจากใบขี้เหล็กที่เรียกว่าบาราคอล นอกจากจะมีผลเป็นยานอนหลับแล้ว หากใช้ในปริมาณที่น้อยลง กลับมีผลในการลดความเครียด โดยมีข้อดีกว่ายาลดความเครียดในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน (Benzodiazepines) ที่ว่าในปริมาณที่ออกฤทธิ์ลดความเครียดนั้นไม่ทำให้เกิดอาการง่วงซึม ซึ่งเป็นผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ที่พบในผู้ป่วยที่ได้รับยาในกลุ่มนี้ ซึ่งจากผลงานวิจัยดังกล่าวทำให้มีการตื่นตัวในหมู่นักวิจัยที่ พยายามค้นหายาที่ใช้รักษาโรคเครียดที่จะมีผลข้างเคียงน้อยที่สุด และจากการศึกษาต่อไปถึงกลไกการออกฤทธิ์ของบาราคอลในแง่ การลดความเครียด ก็พบว่าบาราคอลมีผลต่อการลดการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีน (dopamine) จากเนื้อเยื่อสมอง (Thongsaard, et al., 1996b, Thongsaard, 1997, Thongsaard et al., 1997b) นอกจากนี้บาราคอลยังอาจมีผลต่อระดับกรด แกมมา อมิโนบิวทาริก (GABA) และ เซโรโทนิน (5-HT)

ในการทดลองนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารบาราคอลต่อการดูดกลับของเซโรโทนินในเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส เนื่องจากเป็นที่ทราบโดยทั่วไปแล้วว่าการที่มีเซโรโทนินมากในสมองจะทำให้ระดับความเครียดลดลง (Marsden, 1990, Graeff, et al., 1996) ในปัจจุบันมียาในกลุ่มที่ยับยั้งการดูดกลับของเซโรโทนิน (serotonin selective reuptake inhibitors) ทำให้มีเซโรโทนินมากในสมอง ถูกนำมาใช้อย่างได้ผลในการรักษาผู้ป่วยโรคเครียดมาก อาทิเช่นยา Prozac® ซึ่งมีตัวยา Fluoxetine และยาในกลุ่มนี้ยังมีผลข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์อยู่น้อยเมื่อเทียบกับยาในกลุ่มเบนโซไดอะซีพีน (Benzodiazepines)

วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาผลของบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการดูดกลับของสารสื่อประสาท 5-HT จากเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส
2. เลือกความเข้มข้นของบาราคอลที่ให้ผลสูงสุด มาศึกษาเปรียบเทียบการดูดกลับสาร 5-HT กับยาในกลุ่ม SSRI

วัสดุอุปกรณ์

1. หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 200-250 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ
2. หลอดพลาสติกกันแบนเพื่อบดเลี้ยงเนื้อเยื่อกับสาร [^3H]5-HT
3. กระดาษกรองขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 25 มม.
4. ชุดกรองชนิดที่ใช้ปั๊มสุญญากาศ
5. Shaking water bath
6. เครื่องวัดรังสีเบต้า
7. เครื่องคอมพิวเตอร์บันทึกและวิเคราะห์ผล
8. สารบาราคอล และ ยา Fluoxetine
9. สารละลายบัฟเฟอร์ (Krebs-Henseleit buffer; KHB)
10. เครื่องบดย่อยเนื้อเยื่อ
11. สารรังสี [^3H]5-HT

วิธีการศึกษา

1. การเตรียมเนื้อเยื่อ

นำสัตว์ทดลองมาทำให้หมดความรู้สึกโดยวิธีตัดคอ จากนั้นตัดเอาเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสออกมาวางบนเครื่องบดย่อยเนื้อเยื่อเพื่อตัดเนื้อเยื่อออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 35 x 35 มิลลิเมตร ตักเนื้อเยื่อใส่ขวดรูปชมพู่ที่มีสารละลาย KHB ที่ไม่มีแคลเซียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร เพื่อล้างเนื้อเยื่อ ทำซ้ำ 3 ครั้ง จากนั้นเติมสารละลาย KHB ที่ไม่มีแคลเซียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร เติมหอกซิเจนปิดจุกแล้วนำไปแช่ในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่สั่นได้ (Shaking water bath) ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ที่ 37 °C ทิ้งไว้ 60 นาที จากนั้นล้างเนื้อเยื่ออีกครั้งด้วยสารละลาย KHB ที่ไม่มีแคลเซียมปริมาตร 10 มิลลิลิตร ดูดสารละลาย KHB ออกให้เหลือเป็นเนื้อเยื่อเข้มข้น ใช้เครื่องดูดสารละลายที่จำกัดปริมาตรดูดเนื้อเยื่อขึ้นมาใส่ในหลอดพลาสติกกันแบนในปริมาตรหลอดละ 25 ไมโครลิตร

2. การทดลอง

แบ่งเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1 การเปรียบเทียบการให้สารบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการดูดกลับ 5-HT

ตอนที่ 2 เลือกความเข้มข้นที่ให้ผลในการดูดกลับสูงสุดมาเปรียบเทียบกับ Fluoxetine

ตอนที่ 1 การเปรียบเทียบการให้สารบาราคอลที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อการดูดกลับ 5-HT

แบ่งหลอดพลาสติกกันแบนออกเป็น 8 กลุ่ม ๆ ละ 10 หลอดเพื่อทำการศึกษาการดูดกลับสาร 5-HT โดยเตรียมสารละลาย KHB ดังนี้

กลุ่มที่ 1 KHB ปกติ เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 0.1 นาโนโมลา

กลุ่มที่ 3 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 1 นาโนโมลา

กลุ่มที่ 4 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 10 นาโนโมลา

กลุ่มที่ 5 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลา

กลุ่มที่ 6 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 1 ไมโครโมลา

กลุ่มที่ 7 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 10 ไมโครโมลา

กลุ่มที่ 8 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 100 ไมโครโมลา

ใส่สารดังกล่าวในปริมาตร 450 ไมโครลิตร incubate นาน 10 นาที จากนั้นเติมสาร [³H]5-HT ปริมาณ 1.25 μ Ci ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้ว incubate ต่ออีก 30 นาที

หยุดการ incubate ด้วย การกรองแบบสุญญากาศ แล้วล้างด้วย KHB ที่เย็นจัด (2 °C)

นำกระดาษกรองที่มีเนื้อเยื่ออยู่ในขวด Scintillation เติมกรด 1 M HCl ปริมาตร 2 ml และ Scintillation cocktail 8 ml เตรียมนำไปวัดปริมาณรังสีเบต้า

ตอนที่ 2 เลือกความเข้มข้นที่ให้ผลในการดูดกลับสูงสุดมาเปรียบเทียบกับ Fluoxetine

แบ่งหลอดพลาสติกกันแบนออกเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 10 หลอดเพื่อทำการศึกษาการดูดกลับสาร 5-HT โดยเตรียมสารละลาย KHB ดังนี้

กลุ่มที่ 1 KHB ปกติ เป็นกลุ่มควบคุม

กลุ่มที่ 2 KHB + Fluoxetine ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลา

กลุ่มที่ 3 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 100 ไมโครโมลา

กลุ่มที่ 4 KHB + สารบาราคอลความเข้มข้น 100 ไมโครโมลา + Fluoxetine ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลา

ใส่สารดังกล่าวในปริมาตร 450 ไมโครลิตร incubate นาน 10 นาที จากนั้นเติมสาร [³H]5-HT ปริมาณ 1.25 μ Ci ปริมาตร 25 ไมโครลิตร แล้ว incubate ต่อมา 30 นาที

หยุดการ incubate ด้วย การกรองแบบสุญญากาศ แล้วล้างด้วย KHB ที่เย็นจัด (2 °C)

นำกระดาษกรองที่มีเนื้อเยื่ออยู่ในขวด Scintillation เติมกรด 1 M HCl ปริมาตร 2 ml และ Scintillation cocktail 8 ml เตรียมนำไปวัดปริมาณรังสีเบต้า

3. การแปลผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

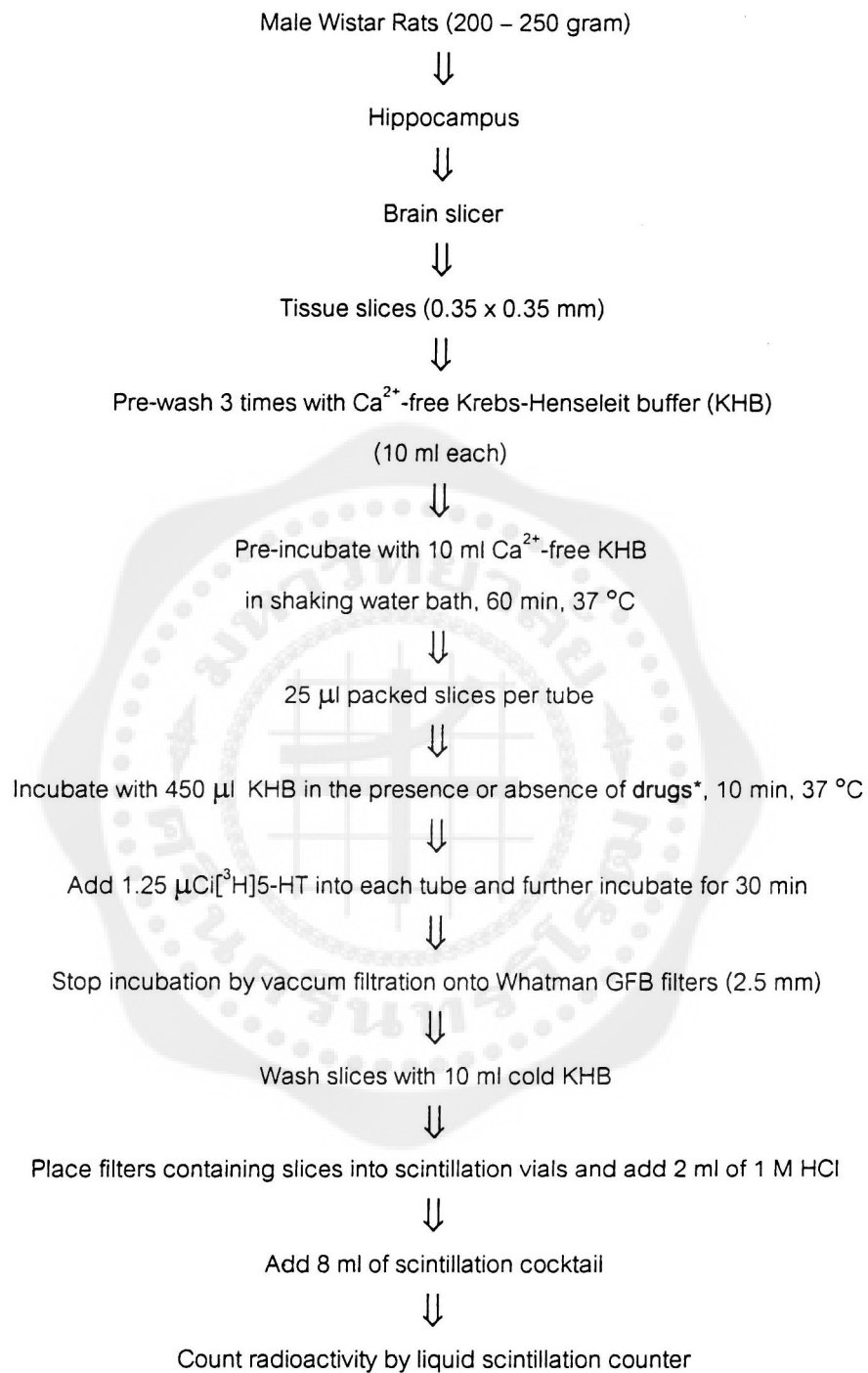
ค่า DPM 1 ที่ได้จากการวัด เป็นค่าแสดงปริมาณ [³H]5-HT ที่ปรากฏอยู่ในเนื้อเยื่อ นำค่า ปริมาณ [³H]5-HT มาคำนวณหาค่าเฉลี่ย และ SEM (Standard error of mean) โดยแสดงค่าเป็น mean $\pm$ SEM โดยคิดค่า ปริมาณ [³H]5-HT ของกลุ่มควบคุมเป็น 100 % แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณ [³H]5-HT ในสภาวะที่เนื้อเยื่อถูก incubate ในสารต่างๆ กัน เป็นหน่วย % Control โดยใช้สถิติแบบ Non-parametric test (Mann-Whitney U-test) โดยค่า $P < 0.05$ ถือว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

ผลการทดลอง

จากผลการทดลองพบว่า ปริมาณของ [³H]5-HT ที่วัดได้จากเนื้อเยื่อในกลุ่มควบคุมมีค่า DPM1 เฉลี่ยเท่ากับ 39589 เมื่อเทียบให้ค่าดังกล่าวเป็น 100 % พบว่า เมื่อเนื้อเยื่อถูกเลี้ยงในสารละลาย KHB ที่มี Fluoxetine 100 μ M และ Fluoxetine 1 μ M ปริมาณของ [³H]5-HT ที่วัดได้มีค่า % Control เท่ากับ 76.4 ± 2.16 และ 96.96 ± 2.24 ตามลำดับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย Fluoxetine 100 μ M มีผลในการยับยั้งการดูดกลับของ [³H]5-HT เข้าสู่เนื้อเยื่ออย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังแสดงในกราฟรูปที่ 3

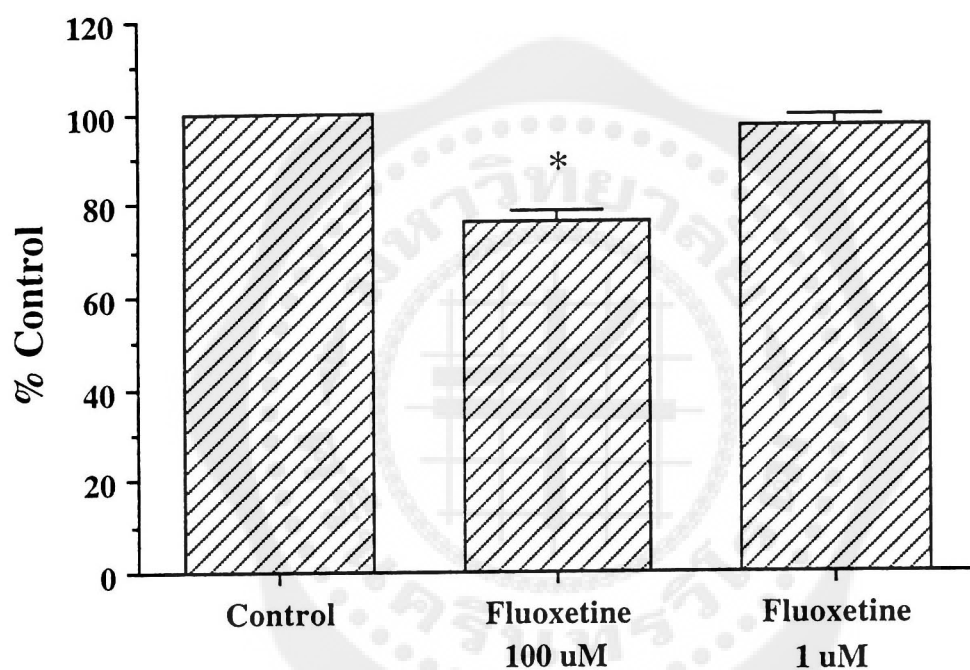
เมื่อเนื้อเยื่อถูกเลี้ยงในสารละลาย KHB ที่มี สารละลาย Barakol ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 nM, 1 nM, 10 nM, 0.1 μ M, 1 μ M, 10 μ M, และ 100 μ M พบว่า ค่า % Control ที่ได้มีค่าเท่ากับ 98.39 ± 2.00 , 97.44 ± 1.87 , 96.96 ± 3.24 , 101.13 ± 1.91 , 92.55 ± 2.82 , 93.77 ± 2.59 , และ 86.87 ± 5.37 ตามลำดับ เฉพาะที่ความเข้มข้น 100 μ M สารบาราคอลมีฤทธิ์ในการยับยั้งการดูดกลับของ [³H]5-HT อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ดังกราฟรูปที่ 4 และเมื่อเนื้อเยื่อถูกเลี้ยงในสารละลาย KHB ที่มี ยา Fluoxetine (100 μ M) ร่วมกับสารละลาย Barakol (100 μ M) พบว่าค่าการดูดกลับของ [³H]5-HT ลดลง เป็น 79.05 ± 2.60 % Control ที่นัยสำคัญ 0.05 ดังกราฟรูปที่ 5

รูปที่ 2 แผนภูมิแสดงขั้นตอนการทดลอง

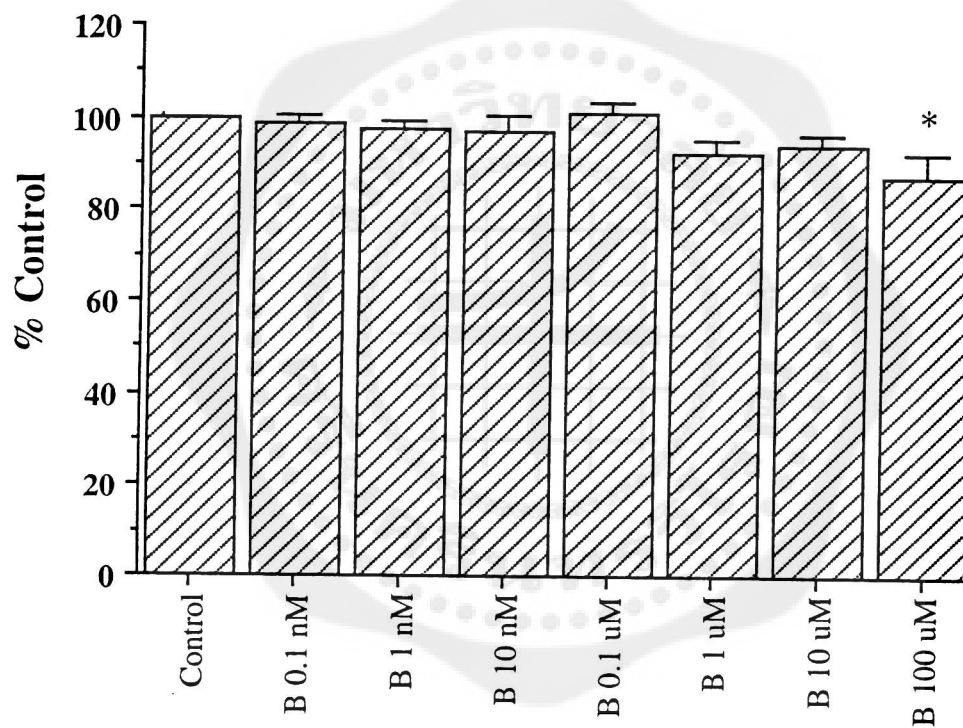


* Drugs : บาราคอล, Fluoxetine และ บาราคอลร่วมกับ Fluoxetine

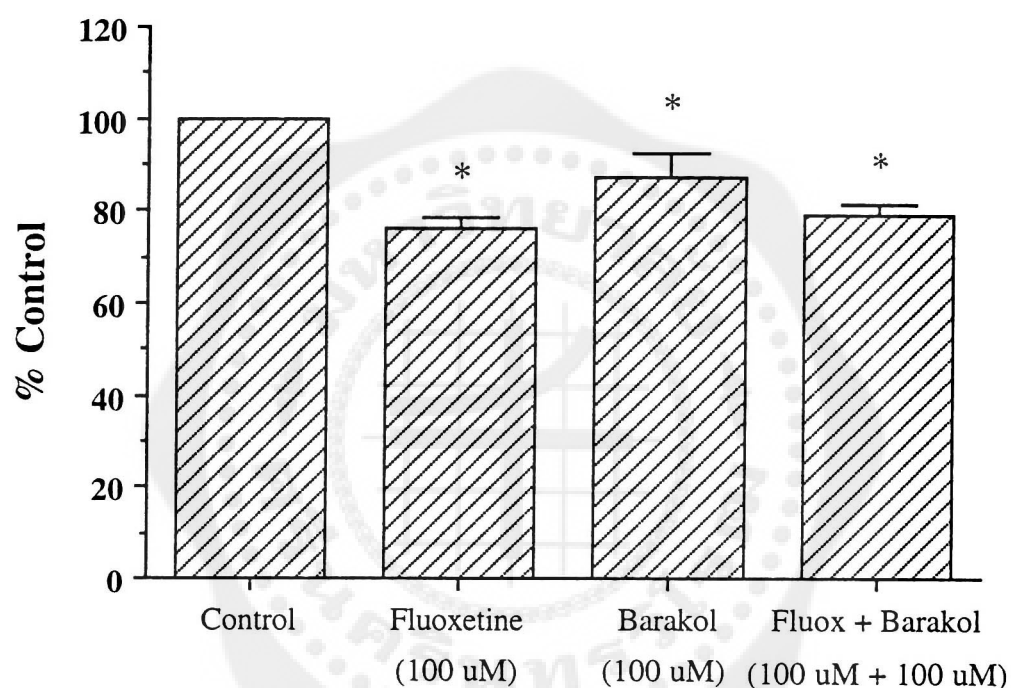
รูปที่ 3 แสดงผลของ Fluoxetine ที่ความเข้มข้น 100 และ 1 ไมโครโมลา ต่อการดูดกลับของ [³H]5-HT
สู่เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ค่าของการดูดกลับ แสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SEM *แสดงถึง $P < 0.05$
เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 4 แสดงผลของบาราคอล (B) ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10 นาโนโมลา, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครโมลา ต่อการดูดกลับของ [³H]5-HT สู่เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหลอดทดลอง ค่าของการหลังสารแสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SEM * แสดงถึง $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 5 แสดงผลของ Fluoxetine (100 ไมโครโมลา) บาราคอล (100 ไมโครโมลา) และ Fluoxetine (100 ไมโครโมลา) ร่วมกับบาราคอล (100 ไมโครโมลา) ต่อการดูดกลับของ [³H]5-HT สู่เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหลอดทดลอง ค่าของการหลังสารแสดงเป็นค่า Mean $\pm$ SEM * แสดงถึง $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



อภิปรายผล

ในการศึกษานี้ใช้เทคนิคการวัดการดูดกลับของสารเข้าสู่เนื้อเยื่อโดยใช้สารกัมมันตรังสีเป็นตัวบ่งชี้ (Marker) โดยบ่มเลี้ยงเนื้อเยื่อในสารละลายที่มีสารกัมมันตรังสีปนอยู่ในเวลาที่จำกัด จากนั้นนำเนื้อเยื่อดังกล่าวไปกรองเพื่อเอาสารละลายภายนอกออกโดยใช้การกรองระบบสุญญากาศเพื่อดึงเอาสารละลายออกให้มากที่สุด จากนั้นทำการย่อยสลายเนื้อเยื่อโดยใช้กรดไฮโดรคลอริก แล้วนำไปวัดสารกัมมันตรังสีที่อยู่ในเนื้อเยื่อนั้น ในการทดลองนี้ใช้เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งมีสารสื่อประสาทเซโรโตนินหรือ 5-HT อยู่มาก ใช้สารกัมมันตภาพรังสี [^3H]5-HT เป็นตัวบ่งชี้การดูดกลับ และวัดปริมาณรังสีเบต้าโดยเครื่อง Beta counter

คณะผู้วิจัยได้เคยใช้เทคนิคดังกล่าวในการวัดการดูดกลับของสารสื่อประสาทโดปามีนจากเนื้อเยื่อสมองส่วนสเตรอาตัม เพื่อศึกษาผลของสารสกัดบาราคอลต่อการดูดกลับของสารดังกล่าว ผลการศึกษาพบว่าในขณะที่สารบาราคอลมีผลยับยั้งการหลั่งสารโดปามีนจากเนื้อเยื่อสมอง สารบาราคอลกลับไม่มีผลต่อการเพิ่มการดูดกลับของโดปามีนแต่อย่างใด (Thongsaard, 1997) ซึ่งจากผลการศึกษาดังกล่าวแสดงว่ากลไกการออกฤทธิ์ของบาราคอลในการยับยั้งการหลั่งสารนั้นไม่ได้เป็นเพราะบาราคอลไปเพิ่มการดูดกลับสารเข้าสู่เนื้อเยื่อ

ในการทดลองครั้งนี้ก็เช่นกัน สารบาราคอลซึ่งคณะผู้วิจัยพบว่ามีผลในการเพิ่มการหลั่งสารสื่อประสาท 5-HT จากเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสเมื่อใช้ที่ความเข้มข้น 1, 10 และ 100 ไมโครโมลา (Thongsaard, et al., 2000) กลับไม่มีผลในการยับยั้งการดูดกลับของ 5-HT เข้าสู่เนื้อเยื่อ ยกเว้นที่ความเข้มข้นของบาราคอลที่สูงมากคือ 100 ไมโครโมลา จากผลการทดลองสามารถอธิบายได้ว่าการที่สารบาราคอลไปเพิ่มการหลั่งของสาร 5-HT จากเนื้อเยื่อสมองทำให้มีปริมาณ 5-HT ในสมองมาก มีรายงานว่าสารสื่อประสาท 5-HT หลั่งออกมามากในสมองจะทำให้บุคคลนั้นคลายความเครียดลง (Marsden 1990; Graeff et al., 1996) ซึ่งผลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการทดลองที่เคยรายงานว่าบาราคอลที่ความเข้มข้น 1 - 100 ไมโครโมลา สามารถยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีน โดยใช้เทคนิคเดียวกันในการทดลอง ในขณะที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่านั้นไม่แสดงผล (Thongsaard et al., 1997b) และมีรายงานว่า การยับยั้งการหลั่งสารสื่อประสาทโดปามีนในระบบ Mesolimbic จะมีผลในการคลายเครียดเช่นกัน (Di Chiara and North, 1992 ; Henry and White, 1995) จากผลนี้เป็นจุดที่น่าสนใจว่าการจะพัฒนานำสารสกัดสมุนไพรไปใช้ในการรักษาผู้ป่วยนั้นจำเป็นต้องศึกษาให้ถี่ถ้วนถึงขนาดที่เหมาะสมที่สามารถออกฤทธิ์ในการรักษาบำบัดเพราะหากใช้ไม่ถูกขนาดนอกจากจะไม่ได้ผลแล้วยังอาจก่อให้เกิดผลเสียข้างเคียงตามมาอีกด้วย ในอนาคตคณะผู้วิจัยจะดำเนินการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารบาราคอลที่ความเข้มข้นต่างๆ ในช่วงที่กว้างขึ้น และจะศึกษาควบคู่กับผลต่อระดับสารสื่อประสาทโดปามีนด้วย เนื่องจากการที่บาราคอลมีผลต่อระบบประสาททั้งสองในทางตรงกันข้ามกัน และระบบประสาททั้งสองก็เกี่ยวข้องกับการควบคุมสภาวะทางจิตใจของคน ดังนั้นควรศึกษาโดยละเอียดเพื่อหาขนาดของบาราคอลที่เหมาะสมที่จะไป

เพิ่มการหลั่ง 5-HT ในขณะเดียวกันก็สามารถลดการหลั่งโดปามีน เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ส่งผลในการออกฤทธิ์สูงสุด

ในการศึกษานี้ได้ทดสอบคุณสมบัติของบาราคอลเปรียบเทียบกับยา Fluoxetine ซึ่งเป็นตัวยาลำคัญที่ใช้อย่างแพร่หลายในปัจจุบันในการรักษาผู้ป่วยโรคเครียด อาทิเช่น ยา Prozac® ซึ่งเป็นยาในกลุ่ม Selective serotonin reuptake inhibitor; SSRI ซึ่งยาดังกล่าวจะมีผลในการยับยั้งการดูดกลับของ 5-HT ในสมองทำให้มี 5-HT ที่ถูกหลั่งออกมามีเหลืออยู่ในปริมาณมากซึ่งเชื่อว่าจากผลดังกล่าวจะทำให้ผู้ป่วยที่มีอาการเครียดสามารถคลายเครียดลงไปได้ ซึ่งยาดังกล่าวมีข้อดีกว่ายาในกลุ่มของ Benzodiazepines ตรงที่มีผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์น้อยกว่า จากการศึกษาโดยใช้เทคนิคนี้พบว่า Fluoxetine สามารถยับยั้งการดูดกลับของสาร 5-HT ในหลอดทดลองได้ และบาราคอลในขนาด 100 ไมโครโมลาก็ให้ผลเช่นเดียวกันจึงเป็นที่น่าสังเกตว่าภายใต้สภาวะของการทดลองเดียวกันบาราคอลสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายกับผลจากยา Fluoxetine ที่ใช้ในปัจจุบัน จึงเป็นจุดที่น่าสนใจทำการศึกษาต่อไปว่าหากใช้สารบาราคอลในสัตว์ทดลองจริงๆ เปรียบเทียบกับยา Fluoxetine หรือยาอื่นๆที่ใกล้เคียงกันแล้วจะมีผลเช่นไร ซึ่งคณะผู้วิจัยจะได้ทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป การที่ให้สารบาราคอลร่วมกับยา Fluoxetine แล้วมีผลยับยั้งการดูดกลับของ 5-HT ไม่แตกต่างจากการให้ยาตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียวนั้นอาจเนื่องมาจากการดูดกลับของ 5-HT สู่เนื้อเยื่อในปริมาณที่ใช้นั้นถึงจุดสูงสุดแล้วจึงไม่เห็นผลในการเสริมฤทธิ์แต่อย่างใด ในอนาคตผู้วิจัยจะทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยทำการศึกษากับตัวสัตว์ทดลองที่มีชีวิตจะทำให้ทราบผลของยาได้แน่ชัดกว่าเพื่อประโยชน์ในการพัฒนายาเพื่อใช้ในทางการแพทย์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัยนี้

เอกสารอ้างอิง

- Arunlakshana, O. (1949). Pharmacological study of the leaves of *cassia siamea*. *Siriraj. Hosp. Gaz.*, 1, 434-444.
- Bycroft, B.W., Hassanali - walji, A., Johnson, A.W., & King, T.J. (1970). The structure and synthesis of barakol : a novel dioxaphenylene derivative from *Cassia siamea*. *J. Chem. Soc.*, 12, 1686-1689.
- de Duve C, Pressman BC, Gianetto R, Wattianx R, Appelman F. (1995) Tissue fractionation studies 6. Intracellular distribution patterns of enzymes in rat liver tissue. *J Biol Chem*;60:604-617.

- Di Chiara, G. and North, R.A. (1992) Neurobiology of opiate abuse. *Trends Pharmacol. Sci.*, 13, 185-193.
- Graeff, F.G., Guimaraes, F.S., De Andrade, T.G.C.S. & Deakin, J.F.W. (1996) Role of 5-HT in stress, anxiety and depression. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, 54, 129-141.
- Gritsanapan, W., Mekmanee, R. & Chulasiri, M. (1989). Antimicrobial activity and effect on isolated guinea pig ileum of barakol. *J. Pharm. Sci.*, 16, 27-31.
- Hassanali - Walji, A., King, T.J. & Wallwork, S. C. (1969) Barakol, a novel dioxzphenalene derivative from *Cassia siamea*. *J. Chem. Soc. Chem. commun.*, 12, 678.
- Henry, D.J. and White, F.J. (1995) The persistence of behavioural sensitization to cocaine parallels enhanced inhibition of nucleus accumbens neurones. *J. Neurosci.*, 15, 6287-6299.
- Jantarayota, P. (1987). Effects of barakol extractedd from leaves of *Cassia siamea* on the rat central nervous system. Thesis submitted for the degree of Master of Science in Pharmacy, Chulalongkorn University, Bangkok., Thailand
- Kaokeaw, K. (1992). Iodination reaction and evaluation of sedative actie of barakol, the main ingredient extracted from the young leaves of *Cassia siamea* Lamk. A thesis submitted for the degre of Master of Science in Biological Chemistry, srinakharinwirot University, Bangkok, Thailand.
- Momose, Y., Chaichantipyuth, C., Leelasangakul, V. & Tongroach, P. (1996) Effects of barakol on aconitine-induced arrhythmias in heart. In *Proceeding of the Third NRCT-JSPS Joint Seminar on Current Advance in Natural Product Research, Bangkok, Thailand*, 153 – 156.
- Marsden, C.A. (1990) The pharmacology of new anxiolytic acting on 5-HT neurones. *Postgrad. Med. J.*, 66 (Suppl 2), S2-S6.
- Suwan, G., Sudsuang, R., Ghumma - Upakorn, D. & Werawong, C. (1992) Hypertensive effects of barakol estracted from leaves of *Cassia siamea* Lam. in rats and cats. *Thai J. Physiol. Sci.*, 5, 53-65.
- Thongsaard, W. (1998) Physiological and pharmacological properties of *Cassia siamea* and its active constituent, barakol. *Thai J. Physiol. Sci*, 11(1), 1-26. (Review)
- Thongsaard, W., Chainakul, S. and Marsden, C.A. (2000) Barakol extracted from *Cassia siamea* and 5-HT release. (In preparation).

- Thongsaard, W., Deachapunga, C., Pongsakoorn, S. Boyd, E.A., Bennett, C.W. & Marsden, C.A. (1996a) Barakol : a potential anxiolytic extracted from. *Cassia siamea* *Pharmacol. Biochem.Behav.*, 53, 753-758.
- Thongsaard, W., Pongsakorn, S., Sudsuang, R., Bennett, G.W. & Marsden, C.A. (1996b) Effect of barakol on extracellular dopamine and its metabolites in rat striatum in vivo. In Proceeding of the 7th International Conference on *in vivo* Methods. Santa Cruz de Tenerife, Spain, pp. 127-128.
- Thongsaard, W. (1997) Behavioural and pharmacological properties of barakol : a natural anxiolytic. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy in Physiology and Pharmacology, University of Nottingham, Nottingham, UK.
- Thongsaard, W., Ting, K.N., Marsden, C.A. and Wilson, V.G. (1997a) The effect of barakol against electrically-evoked contraction of the isolated porcine tail artery and guinea pig ileum. *Br. J. Pharmacol*, 122, 141P.
- Thongsaard, W., Pongsakorn, S., Sudsuang, R., Bennett, G.W. & Marsden, C.A (1997b) Barakol, a natural anxiolytic, inhibits striatal dopamine release but not uptake *in vitro* *Eur. J. Pharmacol.* 319, 157-164.
- Thongsaard, W., Kendall, D.A., Bennett, G.W. and Marsden, C.A. (1997c) A simple method for measuring dopamine release from rat brain slices. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods.* 37 (3) 143 – 148.
- Tongroach, P., Jantarayota, P., Tantisira, B., Kunluan, P., Tongroach, C. & Chaichantipyuth, C. (1992). Barakol, a neuroactive compound. from *Cassia siamea*. In *Proceeding of the First JSPS - NRCT Joint Seminar in Pharmaceutical Sciences ; Advance in Research on Pharmacologically Active Substances from Natural Sources, Chiangmai, Thailand*, OP21.
-