

Thesis Title	Effects of <i>Tabernaemontana divaricata</i> Extract on Inhibition of Acetylcholinesterase (AChE) Activity in the Rats' Hippocampus	
Author	Mr. Anucha Pongpanparadorn	
Degree	Master of Science (Physiology)	
Thesis Advisory Committee	Asst. Prof. Dr. Anchalee Pongchaidecha	Chairperson
	Dr. Nipon Chattipakorn	Member
	Assoc. Prof. Dr. Siriporn Chattipakorn	Member

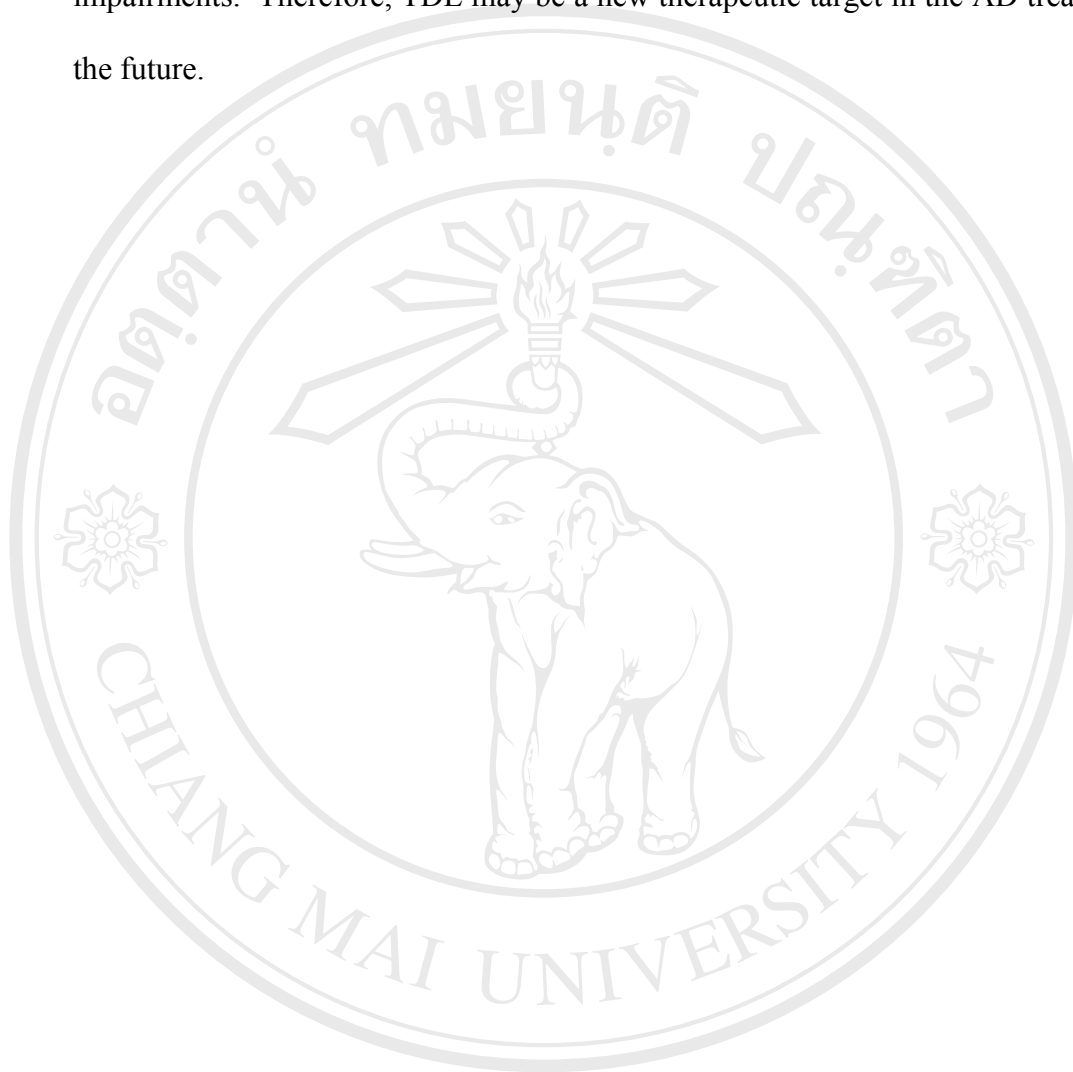
ABSTRACT

The current strategy for the treatment of Alzheimer's disease (AD), a progressive neurodegenerative disorder of cholinergic system, is the use of acetylcholinesterase inhibitors (AChEIs). Currently, uses of AChEIs in humans still have many side effects. The search for new AChEIs is of interest for many investigators, particularly AChEIs from the natural products. The recent *in vitro* study showed that *Tabernaemontana divaricata*, the tropical herbal plants, extracts (TDE) at 0.1 mg/mL inhibited more than 90% of AChE activity. According to that finding, this study aimed to determine whether the TDE can inhibit cholinesterase (ChE) activity in normal healthy animals (*in vivo*) compared to the previous *in vitro* data and to further investigate the effect of TDE on neuronal activity in the brain. Male Wistar rats were acutely administered intraperitoneally with TDE at various

doses (250, 500 and 1000 mg/kg) while control received TDE 0 mg/kg (n=9 per group). Following 2-hrs administration, acetylcholinesterase (AChE) and butyrylcholinesterase (BuChE) activity in blood and homogenized isolated cerebral cortex and hippocampus, were examined using Ellman's colorimetric method. In the study of the effect of TDE on the neuronal activity, the expression of Fos protein was used to be a marker of neuronal activity in hippocampus and cerebral cortex after 2-hrs administration of TDE into the animals by using immunohistochemistry methods.

At 2 hrs, TDE at a concentration of 500 mg/kg significantly inhibited BuChE activity in the hippocampus ($p<0.05$) when compared to the control group, but not AChE. In the cerebral cortex, only 500 mg/kg TDE significantly decreased BuChE activity ($p<0.05$), while all doses of TDE significantly decreased AChE activity ($p<0.05$). However, the effect of TDE on circulating ChE activity was not observed. In addition, the administration of TDE increased neuronal activity in brains of both normal and alcohol-induced amnesia rats. In normal rats, the expression of Fos protein was significantly increased in the hippocampus by TDE at a dose of 500 mg/kg ($p<0.01$) and significantly increased in the cerebral cortex following 2-hrs administration of all doses of TDE ($p<0.01$). The administration of all doses of TDE significantly enhanced neuronal activity in both hippocampus and cerebral cortex ($p<0.05$) in alcohol-induced amnesia rats. These findings indicated that TDE can inhibit neuronal ChE activity in rats' brain but does not affect the circulating ChE activity at 2 hrs-time course. Furthermore, the ChE inhibitory effect of TDE possibly leads to an increase of neuronal activity in normal animals and animals with memory

impairments. Therefore, TDE may be a new therapeutic target in the AD treatment in the future.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright © by Chiang Mai University
All rights reserved

VIII

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดจากต้นพุศพิทยา (ทาเบอร์นามอนทานา ไคววริคาทา) ต่อการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรสในสมองหนูส่วนฮิปโปแคมพัส	
ชื่อผู้เขียน	นาย อนุชา พงศ์พันธ์ภราดร	
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (สรีรวิทยา)	
คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์	ผศ. ดร. อัญชลี พงศ์ชัยเดชา	ประธานกรรมการ
	อ. นพ. ดร. นิพนธ์ ฉัตรทิพากร	กรรมการ
	รศ. ทพญ. ดร. สิริพร ฉัตรทิพากร	กรรมการ

บทคัดย่อ

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) เป็นโรคที่มีสาเหตุมาจากการตายของเซลล์ประสาทในกลุ่ม cholinergic system อย่างต่อเนื่อง สำหรับวิธีการรักษาโรคนี้นั้นในปัจจุบันได้มุ่งเน้นไปที่การให้ยาหรือสารที่มีฤทธิ์เป็นตัวยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรส สำหรับในผู้ป่วย การให้ยาประเภทนี้ทำให้เกิดอาการข้างเคียงต่างๆขึ้นได้มากมาย ดังนั้น การศึกษาวิจัยหาสารหรือยาตัวใหม่สำหรับรักษาโรคนี้นี้จึงยังคงเป็นที่น่าสนใจ โดยเฉพาะการศึกษาวิจัยหาสารเหล่านี้จากพืชสมุนไพรในธรรมชาติ เมื่อไม่นานมานี้ จากการศึกษาในสถานะ *in vitro* แสดงให้เห็นว่า สารสกัดเอทานอลจาก ต้นพุศพิทยาหรือพุศซ้อน (*Tabernaemontana divaricata* extract, TDE) ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/mL มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรสได้มากกว่า 90% จากผลการศึกษาดังกล่าว ในการศึกษาครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อที่จะศึกษาว่า สารสกัด TDE สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรสในสัตว์ทดลองได้หรือไม่เปรียบเทียบกับการศึกษาใน *in vitro* และศึกษาถึงผลสารสกัดจากพืชชนิดนี้ต่อการทำงานของเซลล์ประสาทในสมอง ในการศึกษาครั้งนี้ หนูขาว เพศผู้ สายพันธุ์ Wistar จะได้รับสารสกัด TDE ที่ความเข้มข้น 250, 500 และ 1,000 mg/kg โดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ในขณะที่กลุ่มควบคุมจะได้รับสารสกัด TDE ที่ความเข้มข้น 0 mg/kg (n=9 ต่อกลุ่ม) ภายหลังจากการให้สารสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จะทำการวัดการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรสและบิวทิลโคลิเนสเทอเรสในเลือดและในสมองส่วนซีรีบรัม คอร์เท็กซ์และฮิปโปแคมพัส ในการศึกษาผลของสารสกัดจากพืชสมุนไพรต่อการ

ทำงานของเซลล์ประสาท จะใช้โปรตีน Fos เป็นตัวบ่งชี้ถึงการทำงานของเซลล์ประสาทในสมองทั้งสองส่วนภายหลังจากการให้สารดังกล่าวในสัตว์ทดลองโดยใช้วิธีการทาง Immunohistochemistry

ภายหลังจากการให้สารเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สารสกัด TDE ที่ความเข้มข้น 500 mg/kg มีผลยับยั้งการทำงานของเอนไซม์บีวทิริล โคลิเนสเทอเรสในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรส ในสมองส่วนซีรีบรัล คอร์เท็กซ์นั้น มีเพียงกลุ่มที่ได้รับสารสกัดความเข้มข้น 500 mg/kg เท่านั้นที่มีการทำงานของเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ในขณะที่สารสกัด TDE ทุกความเข้มข้นสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์อะเซทิลโคลิเนสเทอเรสได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) อย่างไรก็ตาม พบว่าสารสกัดชนิดนี้ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์โคลิเนสเทอเรสทั้งสองชนิดในกระแสเลือด นอกจากนี้ การให้สารสกัด TDE ยังมีผลไปเพิ่มการทำงานของเซลล์ประสาทในสมองได้ทั้งในกลุ่มหนูขาวปกติและหนูขาวที่เหนียวทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมในหนูขาวปกตินั้น ภายหลังจากการให้สารสกัดเป็นเวลา 2 ชั่วโมง สารสกัด TDE ที่ความเข้มข้น 500 mg/kg มีผลเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Fos ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) และทุกความเข้มข้นของสารสกัด TDE สามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Fos ในสมองส่วนคอร์เท็กซ์ได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.01$) สำหรับในหนูกลุ่มที่เหนียวทำให้เกิดภาวะความจำเสื่อมนั้น ทุกความเข้มข้นของสารสกัดดังกล่าวมีผลเพิ่มการทำงานของเซลล์ประสาทได้ทั้งในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและซีรีบรัล คอร์เท็กซ์ ($p < 0.05$) จากผลการทดลองที่ได้เหล่านี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัด TDE สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลิเนสเทอเรสทั้งสองชนิดได้ในสมองของหนูขาวแต่ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์โคลิเนสเทอเรสทั้งสองชนิดในกระแสเลือด ณ เวลา 2 ชั่วโมงภายหลังจากการให้สารสกัด ยิ่งไปกว่านั้น มีความเป็นไปได้ว่าผลของสารสกัด TDE ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โคลิเนสเทอเรสอาจชักนำให้มีการทำงานของเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้นทั้งในหนูขาวปกติและหนูขาวกลุ่มที่เกิดภาวะความจำเสื่อม ดังนั้น สารสกัด TDE อาจจะเป็นเป้าหมายอันใหม่สำหรับการรักษาโรคอัลไซเมอร์ในอนาคต