ผลของสารสกัดมะละกอต่อการต้านอนุมูลอิสระในแบบจำลองภาวะสมองขาดเลือดเฉพาะที่ในหนูทดลอง

Effect of *Carica papaya* L. Extract Protect Against Oxidative Stress in Rat Model of Focal Cerebral Ischemia

ปรัชญา แก้วแก่น*

Pratchaya Kaewkaen*

หน่วยวิจัยวิทยาการปัญญาและนวัตกรรม วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา

Cognitive Science and Innovation Research Unit (CSIRU), Burapha University

Received : 18 June 2018

Revised : 20 August 2018

Accepted : 7 January 2019

บทคัดย่อ

โรคหลอดเลือดสมองเป็นสาเหตุการตายอันดับต้นทั้งในประเทศไทยและประเทศอื่นๆทั่วโลก และทำให้เกิดภาวะทุพพลภาพจากความผิดปกติของระบบประสาทของพยาธิสภาพการอุดกั้นหลอดเลือดสมอง ปัจจุบันวิธีการป้องกันและรักษาภาวะผิดปกติโรคดังกล่าวมีข้อจำกัด ดังนั้นการศึกษานี้จึงมุ่งเน้นที่จะตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดมะละกอสุกในการป้องกันการตายของเซลล์ประสาท การต้านอนุมูลอิสระและการเพิ่มความจำ ในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำโดยภาวะสมองขาดเลือด หนูแรทสายพันธุ์วิสตาร์ น้ำหนัก 300-350 กรัมได้รับการป้อนสารสกัดมะละกอสุกขนาด 50, 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 14 วันก่อนทำการอุดกั้นหลอดเลือดแดงมิดเดิล (Middle cerebral artery) แล้วนำสมองสัตว์ทดลองมาวัดเอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ และปริมาตรการตายของเซลล์ประสาท รวมทั้งพฤติกรรมด้านความจำ ผลการทดลองพบว่าสารสกัดมะละกอขนาดต่างๆ ตั้งแต่ 50, 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว สามารถลดปริมาตรสมองที่ขาดเลือดในบริเวณ คอร์เท็กซ์ สไตรตรัม และฮิปโปแคมปัส ลดผลิตผลของลิพิดดเพอรอกซิเดชั่น (Lipid peroxidation product) เพิ่มกิจกรรมของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ลดอนุมูลอิสระ ได้แก่ glutathione peroxidase (GSH.px) superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) ในคอร์เท็กซ์ นอกจากนั้นยังเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้ตำแหน่งทิศทางในการทดสอบมอริสซึ่งเป็นการเรียนรู้ตำแหน่งทิศทางในช่วงก่อนการเหนี่ยวนำ ดังนั้นสารสกัดมะละกอสุกจึงเป็นสารสกัดธรรมชาติที่มีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาสารตัวใหม่ที่สามารถป้องกันและรักษาภาวะสมองขาดเลือดรวมทั้งการเพิ่มความจำ อย่างไรก็ตามยังต้องวิจัยถึงกลไกการออกฤทธิ์ในตำแหน่งที่แน่ชัดต่อไป

คำสำคัญ : หลอดเลือดสมองอุดกั้น, สารสกัดมะละกอ, แบบจำลองสมองขาดเลือด, เอนไซม์กำจัดอนุมูลอิสระ

***Corresponding author. E-mail:** pratchaya@buu.ac.th

Abstract

Stroke has been recognized as one of the most dangerous killer diseases in Thailand and worldwide. It has been reported that stroke is the common cause of neurological problems that mainly found leads to mortality or disability problems. However, the effective protective and therapeutic strategies had not effective. Therefore, this study is carried out to screening the neuroprotective effect of *Carica papaya* L. extract against cerebral ischemia. Rats were fed with 50, 150 and 450 mg / kg ripe papaya extract for 14 days prior to induce middle cerebral artery. Then, the rats were measure the brain infarction volume and oxidative markers. The results demonstrated that all doses of *Carica papaya* L. extract reduced brain infarction volume in the cortex striatum and hippocampus. In addition, the lipid peroxidation product was decreased, increased the activity of glutathione peroxidase (GSH.px) superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in cortex. The spatial memory had been increase according to reduce the escape latency time at dose 150 and 450 mg/kg BW in Healthy Condition. Therefore, in conclusion, *Carica papaya* L. extract has potential to be developed as a novel effective therapeutic agent against ischemic stroke. However, further study on the other pathways in cerebral ischemia has to be conducted for elucidating the precise mechanism of action.

Keywords: cerebral artery occlusion, papaya extract, animal model of stroke, scavenging enzyme

บทนำ

โรคหลอดเลือดสมอง (Stroke) จัดเป็นภาวะคุกคามที่สำคัญของประชากรในปัจจุบัน ในประเทศไทย พบว่าอัตราตายด้วยโรคหลอดเลือดสมองต่อประชากรแสนคน ในภาพรวมของประเทศในปี 2556-2558 เท่ากับ 36.13, 38.66 และ 42.62 ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าอัตราการตายด้วยโรคหลอดเลือดสมองซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นทุกปี นอกจากนี้อัตราผู้ป่วยในด้วยโรคหลอดเลือดสมองต่อประชากรแสนคน ในภาพรวมของประเทศ ในปี 2557 เท่ากับ 352.30 ข้อมูลจากรายงานของสำนักนโยบายและยุทธศาสตร์ สำนักงานปลัดกระทรวงสาธารณสุข ในปี พ.ศ.2556 รายงานภาระโรคและการบาดเจ็บของประชากรไทย พ.ศ. 2556 พบว่าโรคหลอดเลือดสมอง เป็นสาเหตุการตายของประชาชนไทยในเพศชายเป็นอันดับที่ 1 ร้อยละ 11.1 เพศหญิงอันดับที่ 1 ร้อยละ 14.5 และการสูญเสียปีสุขภาวะของประชากรไทยในเพศชายเป็นอันดับที่ 3 คิดเป็นร้อยละ 6.9 เพศหญิงอันดับที่ 1 ร้อยละ 8.2 คนไทยเสียปีสุขภาวะจากโรคหลอดเลือดสมองประมาณปีละ 792,000 โรคหลอดเลือดสมองมีสาเหตุสำคัญ 2 ประการ คือ 1.หลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตันพบประมาณร้อยละ 70 2.เลือดออกในสมอง พบประมาณร้อยละ 30 สำหรับในประเทศไทย จากสถิติของพบว่า ผู้ป่วยโรคหลอดเลือดในสมองตีบ หรืออุดตันแบบเฉียบพลัน ได้รับการรักษาได้ทันเวลามีเพียงร้อยละ 1.96 เท่านั้น ทำให้อัตราการเสียชีวิตและพิการสูงมาก (WHO, 2014) ดังนั้นการป้องกันการเกิดภาวะนี้จึงจัดเป็นเรื่องสำคัญทางการแพทย์และสาธารณสุขของประเทศ

องค์การอนามัยโลกได้ให้คำจำกัดความของโรคหลอดเลือดสมองว่า เป็นกลุ่มอาการทางคลินิกประกอบด้วยลักษณะอาการทางระบบประสาทบกพร่องที่เกิดขึ้นทันทีทันใด และมีอาการแสดงนานกว่า 24 ชั่วโมง โดยอาการที่เกิดขึ้นมีสาเหตุมาจากการแตก ตีบหรืออุดตันของหลอดเลือดภายในสมอง ซึ่งการรักษาโรคหลอดเลือดสมองมีเป้าหมายที่สำคัญคือ ผู้ป่วยต้องได้รับการรักษาโดยเร็วที่สุด พยาธิสภาพของโรคหลอดเลือดสมองที่เกิดจากการขาดเลือด (Ischemic stroke) ที่พบมากคือมีพยาธิสภาพจากเกิดการตีบตันของหลอดเลือดขนาดใหญ่และหลอดเลือดขนาดเล็กในสมอง และเกิดจากการอุดตันของลิ่มเลือดที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสเลือด โดยการตีบตันของหลอดเลือดในสมองส่วนใหญ่ มักจะมีความสัมพันธ์กับโรคหลอดเลือดแดงแข็ง (Atherosclerosis) และความดันโลหิตสูง (Hypertension) เป็นเวลานาน โดยโรคหลอดเลือดแดงแข็งจะทำ ให้ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของหลอดเลือดแดงในสมองมีขนาดเล็กลง จนเลือดไม่สามารถไหลเวียนไปเลี้ยงสมองได้อย่างเพียงพอ จากการศึกษาในผู้ป่วยพบการตีบตันหลอดเลือดสามารถเกิดขึ้นได้ทุกแห่งของหลอดเลือดสมองโดยจะพบมากที่บริเวณหลอดเลือดแดงส่วนกลาง (Middle Cerebral Arteries: MCA) ด้วยอุบัติการณ์ที่มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและข้อจำกัดในการรักษาภาวะของโรคดังกล่าวทำให้มีการพยายามที่จะใช้สารป้องกันระบบประสาท (Neuroprotective agent) เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่ที่อยู่ขอบบริเวณที่ขาดเลือด (Penumbra area) นอกเหนือจากส่วนที่ขาดเลือด(Core infarction area) ให้ฟื้นคืนสภาพกลับมาทำงานของเนื้อเยื่อประสาท (Nervous tissue) สารป้องกันระบบประสาทที่พัฒนาขึ้นมาใช้ในปัจจุบันส่วนใหญ่แล้วจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะสมองขาดเลือด อาทิ การเพิ่มการไหลเวียนเลือดไปยังบริเวณที่ขาดเลือด (Increase blood flow) มุ่งเน้นการยับยั้งการทำงานของกรดอะมิโนชนิดกระตุ้น (Excitatory amino acid) ผ่านตัวรับ NMDA รวมทั้งยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ที่เกิดขึ้นจากการอุดกั้นของหลอดเลือด (Binthaisong ,2014). ทั้งนี้การวิจัยระดับพรีคลินิก (Pre-clinical Phase) ใช้แบบจำลองการเกิดโรคหลอดเลือดสมองโดยการอุดกั้นหลอดเลือดแดงมิดเดิลด้านขวาในสัตว์ทดลองเนื่องจากเป็นด้านที่พบอุบัติการณ์มากในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง

การส่งเสริมสุขภาพด้วยโภชนาการที่ดีรวมถึงการแพทย์ทางเลือก (Alternative medicine) ตรงตามหลักการ อาหารเป็นยา คือแนวทางการบริโภคพืชที่มีสารประกอบสำคัญจากสารพฤกษเคมี (Phytonutrient compound) ซึ่งเป็นวิธีการที่สามารถป้องกันการเกิดโรคทางระบบประสาท (Liu *et al*., 2017) ทั้งนี้ประเทศไทยเป็นประเทศเขตร้อนที่มีการเพาะปลูกและบริโภคมะละกอในปริมาณที่สูงประกอบกับมะละกอมีปริมาณแคโรทีนซึ่งเป็นสารที่ช่วยในการป้องกันการทำลายของอนุมูลอิสระมากกว่าผลไม้ชนิดอื่นๆ เช่น แอปเปิ้ล ฝรั่ง เป็นต้น นอกจากนั้นมะละกอ ชื่อวิทยาศาสตร์ *Carica papaya* L.อยู่ในวงศ์ *Caricaceae* มะละกออุดมไปด้วยวิตามิน เอ บี1 บี2 และ ซี มีโปรตีนเป็นองค์ประกอบร้อยละ 5 ทั้งนี้จะแตกต่างกันไปในแต่ละสายพันธุ์ (Sankat & Maharaj,1997) ทั้งนี้ซูโครส (Sucrose) ฟรุกโตส (Fructose) และกลูโคส (Glucose) จะพบได้ในปริมาณสูงเมื่อเป็นมะละกอสุก โดยมีน้ำตาลร้อยละ 10-13 (Zhou & Paull, 2001) รงควัตถุ (Pigments) ในมะละกอเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ละลายในน้ำ พบในแวคิวโอล ได้แก่ สารแอนโทไซยานิน (Anthocyanin) และ กลุ่มที่ละลายในไขมันพบในพลาสติด (Plastid) มีหลายชนิด เช่น สารสีเขียวในคลอโรฟิลล์เอ และบี สารสีเหลืองในแคโรทีน และสารสีแดงในไลโคปีน พบได้ในพืช เช่น ข้าวโพด ฟักทอง กลีบดาวเรือง พริก มะละกอแตงโม เป็นต้น (สารแคโรทีนอยด์ (Carotenoid) ที่พบในมะละกอ ส่วนใหญ่ คือ ไลโคปีน (Lycopene) และเบต้าแคโรทีน (Beta-carotene) รายงานปรากฏว่า มะละกอแต่ละสายพันธุ์มีปริมาณแคโรทีนอยด์รวมแตกต่างกัน โดยผลสุกของมะละกอมีค่าปริมาณแคโรทีนอยด์ ระหว่าง 0.005-0.676 มิลลิกรัมเบต้าแคโรทีนต่อ 100 กรัมน้ำหนักสด (Parmeshwar *et al*., 2015)

มีรายงานวิจัยเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของมะละกอหลายการศึกษา อาทิ สารสกัดจากมะละกอสามารถที่จะยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง และมีคุณสมบัติช่วยเสริมภูมิคุ้มกัน (Otsuki *et al*., 2010) สามารถป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลายโดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของลิพิด (Lipid peroxidation) และเพิ่มระดับกลูต้าไธโอน (Glutathione) ซึ่งเป็นสารที่สำคัญในการต้านอนุมูลอิสระและสามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารได้ (Sadek , 2012) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำมันที่สกัดจากเมล็ดมะละกอมีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และลดปริมาณโคเลสเตอรอลในสมอง ในการศึกษาผลมะละกอสุกต่อทางพฤติกรรมสัตว์ทดลองผลการวิจัย ปรากฏว่า หลังได้รับมะละกอสุกติดต่อกันเป็นระยะเวลา 21 วัน ก่อนกับหลังการเหนี่ยวนำความจำเสื่อมด้วยสโคโพลามีน ปรากฏว่ามีฤทธิ์เพิ่มการเรียนรู้และความจำในหนูไมส์ได้ (Sawatdiyapanon & Kaewkaen, 2015)

ด้วยบทบาทสำคัญของสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในการออกฤทธิ์ปกป้องสมองจากภาวะที่สมองถูกทำลายจากการขาดเลือด ผู้วิจัยจึงตั้งสมมติฐานว่าสารสกัดมะละกอซึ่งมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจะสามารถใช้ปกป้องสมองจากภาวะสมองจากภาวะสมองขาดเลือดได้ และใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาต่อยอดเพิ่มมูลค่าผลิตภัณฑ์สุขภาพ (Food Supplement) จากสารสกัดมะละกอสุกต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด

เตรียมและคุมมาตรฐานของสารสกัดหาวิธีและตัวทำละลายที่เหมาะสม เพื่อทำการสกัดมะละกอ โดยคัดแยกมะละกอสุก (Ripen Papaya) เก็บผลที่เปลือกมีสีแดงหรือสีเหลืองร้อยละ 80-100 ของพื้นที่ผิวทั้งหมดบนเปลือก เนื้อมีสีแดงหรือสีเหลือง มะละกอทั้งหมดที่ใช้ในการวิจัยเก็บจากต้นมะละกอ สายพันธุ์ศรีสุภา (Srisupa Species) จาก ต.ห้วยใหญ่ อ.บางละมุง จ.ชลบุรี น้ำหนัก 20 กิโลกรัม เก็บที่อุณหภูมิตู้เย็น (8 °C) หลังจากนั้นนำผลมะละกอมาปอกล้างทำความสะอาดด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง และนำไปอบแห้ง (60±2°C, 12 ชั่วโมง) บดมะละกอให้ละเอียดเป็นผง บรรจุผงมะละกอที่ได้ใส่ถุงสุญญากาศและเก็บที่อุณหภูมิ ห้อง หลังจากนั้นเตรียมสารสกัดจากผงมะละกอ (Powder) กับเอทานอล ร้อยละ 95 ซึ่งเป็นตัวทำละลายในอัตราส่วน 1:10 น้ำหนักต่อ ปริมาตรวางขวดบนเครื่องเขย่า (200 รอบต่อนาที) สกัดเป็นเวลา 24 ชม. ที่อุณหภูมิห้อง (25 ±2 °C) เมื่อครบเวลากรองแยกของเหลวและของแข็ง ก่อนนำของแข็งมาสกัดซ้ำอีกครั้งที่สภาวะเดิม จากนั้นรวมกันของเหลวที่สกัดได้ทั้ง 2 ครั้ง ก่อนใช้เครื่องระเหยตัวทำละลายชนิด rotary vacuum เพื่อทำการแยกตัวทำละลายออกโดยใช้อุณหภูมิการระเหย 45 องศาเซลเซียส จะได้สารในรูปแบบของสารสกัดหยาบ เมื่อสารสกัดแห้งดีแล้วจึงชั่งน้ำหนักหาร้อยละของสารสกัด (Yield)

2. การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้หนูทดลอง คือหนูแรทเพศผู้ชนิดวิสตาร์ (Wistar)จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ อ.ศาลายา จ. นครปฐม วัยเจริญพันธุ์ น้ำหนักประมาณ 300-350 กรัม เลี้ยงไว้ในกรง กรงละ 4 ตัว สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงไว้ภายใต้ช่วงสว่างต่อช่วงมืด (Light –dark cycle) 12:12 ชั่วโมง ภายใต้อุณหภูมิ 22± 2°C โดยหนูทดลองได้รับอาหารและน้ำอย่างสมบูรณ์ (ad libitum) ทั้งนี้โครงการวิจัยได้ผ่านการพิจารณาของคณะกรรมการจรรยาบรรณและมาตรฐานการเลี้ยงและการใช้

สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาแล้ว (72/2559) โดยยึดหลักเกณฑ์จรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลอง สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ โดยหนูทดลองแบ่งออกเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 8 ตัว มีรายละเอียดดังนี้

2.1 Control vehicle group คือ กลุ่มที่ได้รับเฉพาะสารตัวทำละลาย/ ตัวพา Propylene glycol (PG) ได้รับปริมาตร 0.5 มิลลิลิตรเท่ากันทุกตัว วันละครั้ง และใช้เป็นข้อมูลเปรียบเทียบดูผลของสารตัวทำละลาย/ ตัวพา ต่อการต้านการเสื่อมของเซลล์ประสาท

2.2 *Carica papaya* L. extract treated group คือ กลุ่มที่ได้รับตามความเข้มข้น 50, 150 และ 450 mg/ kg BW ตามลำดับ ดังนี้

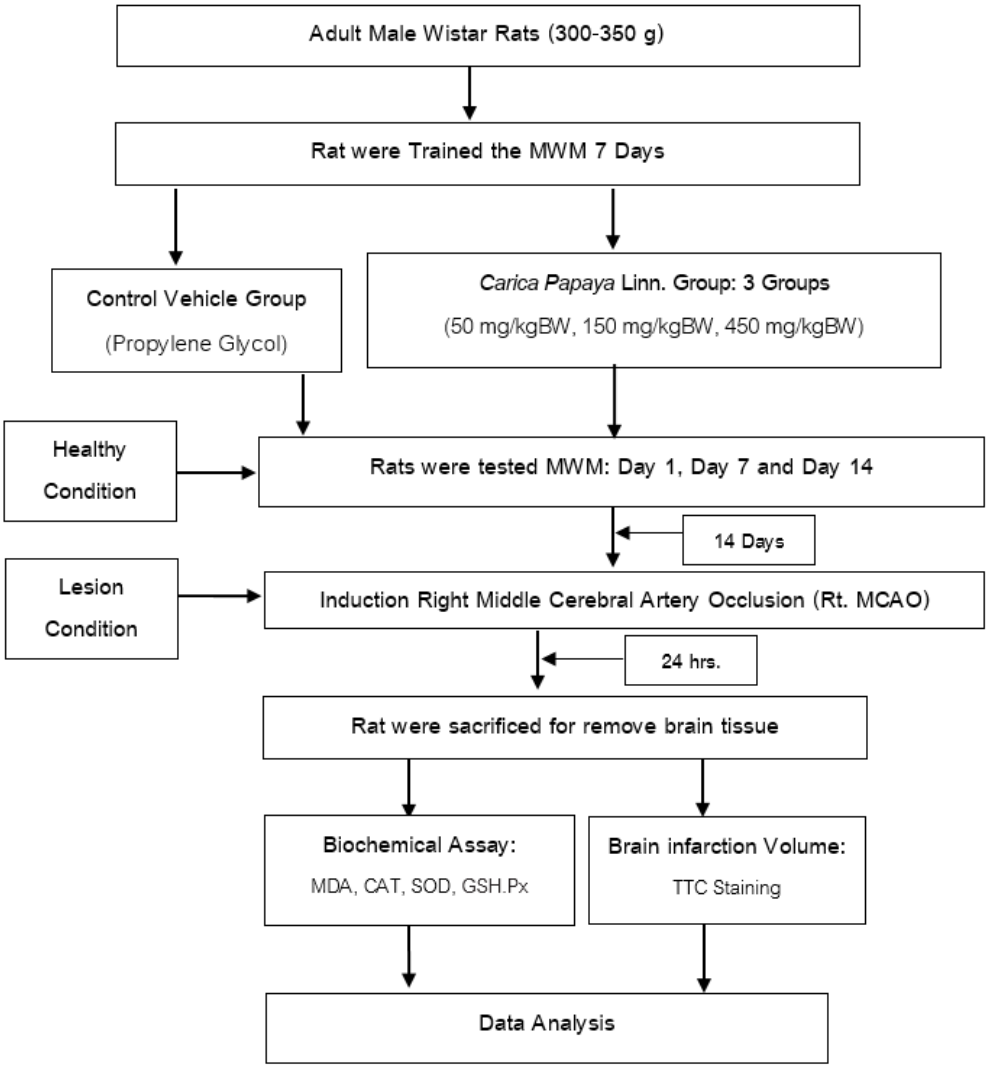
a. 50 mg/ kg BW of *Carica papaya* L. extract treated group

b. 150 mg/ kg BW of *Carica papaya* L. extract treated group

c. 450 mg/ kg BW of *Carica papaya* L. extract treated group

ให้สารโดยการป้อนวันละครั้งต่อเนื่องกันเป็นเวลา 14 วัน และทำการผ่าตัดเหนี่ยวนำทำให้สมองขาดเลือดหนูทุกกลุ่มในวันที่ 14 โดยการอุดกั้นหลอดเลือดแดงมิดเดิลเซรีบรัลข้างขวา

2.3 Positive control group คือ กลุ่มที่ได้รับยา Donepezil (Acetylcholine esterase inhibitor) ขนาด 1 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ใช้เป็นข้อมูลในการเปรียบเทียบผลต่อความจำและการเรียนรู้ วันละ 1 ครั้ง ใช้สัตว์ทดลอง 8 ตัว



ภาพที่ 1 ลำดับขั้นตอนการทดลอง

3. **วิธีการผ่าตัดเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือด** Middle Cerebral Artery

ในขั้นตอนของการเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงมิดเดิล นั้นหนูทดลองจะถูกวางยาสลบด้วย Thiopental Sodium 50 mg/kgBW และ Atropine 5 mg/100 g/BW โดยการฉีดทางช่องท้องเพื่อลดเสมหะ หลังจากนั้นหนูทดลองถูกจับให้นอนหงายและตรึง (Fix) ไว้กับโต๊ะผ่าตัด ขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงมิดเดิล เริ่มจาก right common carotid artery (CCA) bifurcation ถูกเปิดออก จากนั้น internal carotid artery (ICA) และ external carotid artery (ECA) จะถูกยกออกจากเนื้อเยื่ออื่นๆที่อยู่รอบๆและผูกหลอดเลือดไว้ นำไนลอนชนิด silicone-coated monofilament เบอร์ 4 ถูกสอดเข้าไปทาง common carotid artery (CCA) หลังจากนั้นก็ผ่านไปตามช่องของ internal carotid artery (ICA) 17 mm จาก carotid bifurcation สอดผ่านไปจนถึงฐานหลอดเลือดสมอง Circle of Willis เพื่อที่ไปอุดจุดเริ่มต้นของ middle cerebral artery ข้างขวา (Longa *et al*., 1982) หลังจากการผ่าตัดเสร็จสิ้นเย็บปิดแผลที่คอของหนูและทำการ

ดูแลจนกว่าหนูจะฟื้น หลังจากนั้น 24 ชั่วโมงสัตว์ทดลองจะถูกนำไปศึกษา เพื่อวัด lipid peroxidation และ activity ของเอนไซม์ superoxide dismutase, catalase และ glutathione peroxidase รวมทั้งวัดปริมาตรของสมองที่ขาดเลือดด้วยปฏิกิริยากับสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) โดยปฏิกิริยาของเอนไซม์ดีไฮโดรจีเนสจะมีการปลดปล่อยไฮโดรเจนอิออนออกมา ทำปฏิกิริยากับสารละลาย TTC ที่เป็นสารละลายใสไม่มีสีและแพร่กระจายได้ (Diffusible) เปลี่ยนรูปเป็น 2,3,5-triphenyl tetrazolium formazan ซึ่งมีสีแดงและไม่แพร่กระจาย (Non-diffusible) มีผลให้เซลล์ประสาทที่มีชีวิตติดสีแดงของสารละลายโดยการวิเคราะห์ปริมาตรใช้ซอฟต์แวร์สำเร็จในการวิเคราะห์ปริมาตรของสมอง

4. วิธีการตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA) และ การตรวจวัดทางชีวเคมี (Biochemical Assay) ประกอบด้วย

4.1 Lipid peroxidation content: นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ lipid peroxidation content หลักการนี้จะใช้หาปริมาณ MDA ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน TMP (1, 1, 3, 3- tetramethoxy propane) ที่ความเข้มข้น 2, 4, 6, 8, และ 10 นาโนโมลต่อมิลลิลิตร โดยการเติมกรดไทโอบาร์บิทูริก (Thiobarbituric acid; TBA) ลงในสารตัวอย่าง แล้ว MDA จะทำปฏิกิริยากับกรดไทโอบาร์บิทูริก ในสภาวะเป็นกรด ได้เพอรอกซิเดชั่นโปรดักส์ แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Ohkawa (Ohkawa *et al*., 1979)

4.2 Superoxide dismutase (SOD): นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ superoxide dismutase (SOD) ด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 550 นาโนเมตร ตามวิธีการของ McCord (McCord *et al*., 1969) โดยการวัด SOD activity โดยใช้ SOD assay kit โดยแซนทีนออกซิเดส (Xanthine oxidase) และไฮโปแซนทีน (Hypoxanthine) เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการสร้างซุปเปอร์ออกไซด์ แอนไอออน (Superoxide anion) ซึ่งเป็นอนุมูลอิสระที่จะทำปฏิกิริยากับเตตราโซเลียมซอล์ท (Tetrazolium salt) ได้เป็นฟอร์มาซานดราย (Formazan dye) ซึ่งมีสีเหลืองดังนั้น SOD จะเป็นตัวยับยั้งปฏิกิริยานี้โดยเปลี่ยนซุปเปอร์ออกไซด์แรดิคอล (Superoxide radical) ให้เป็นออกซิเจน

4.3 Catalase (CAT): นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ catalase (CAT) หลักการนี้จะใช้หาปริมาณ CAT ในสารตัวอย่างเทียบกับกราฟมาตรฐานที่ได้จากการวัดสารละลายมาตรฐาน CAT ความเข้มข้น 20, 40, 60, 80, และ 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร โดยเติมสารตัวอย่าง หรือสารละลายมาตรฐาน และเติมไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์(Hydrogen peroxide; H_2O_2) 50 ไมโครลิตร ทิ้งไว้ 1 นาที ใส่กรดซัลฟูริก 25 ไมโครลิตร ใส่โพแทสเซียมเปอร์แมงกาเนต (Potassium permanganate; $KMnO_4$) 100 ไมโครลิตรด้วยการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 นาโนเมตร ตามวิธีการของ Goldblith (Goldblith *et al*., 1950)

4.4 Glutathione peroxidase (GSH-Px): นำสมองส่วน hippocampus, cerebral cortex ที่แยกมา homogenate ด้วย KCl หลังจากนั้นนำมาวัดปริมาณของ Glutathione peroxidase (GPx) ตามวิธีการของ Wendel (Wendel, 1981) หลักการวัดคือ เป็นการวัดความสามารถในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระทำปฏิกิริยากับตัวอย่าง ที่ความยาวคลื่น 314 นาโนเมตร เพื่อวัดว่า NADPH ที่ลดลงในระยะเวลา 0-10 นาที นำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่ามาตรฐาน ของเอนไซม์ GSH-Px แล้วคำนวณความสามารถในการทำงานของเอ็นไซม์กลูตาไทโอนเพอร์อกซิเดส แสดงในรูป U/mg.protein

5. การวัดความจำสัตว์ทดลองด้วยการทดสอบ Morris Water Maze

Morris Water Maze Test (MWM) เป็นการทดสอบการเรียนรู้ตำแหน่งทิศทาง โดยการว่ายหาแท่นใต้น้ำในอ่างทรงกลมขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 170 เซนติเมตร ความสูงอ่าง 58 เซนติเมตร ความลึกของน้ำ 40 เซนติเมตร แบ่งอ่างทรงกลมเป็น 4 โซนและมีสัญลักษณ์ (Visual Cue) ที่ขอบอ่างแตกต่างกัน 3 จุด ยกเว้น จุดที่มีแท่นใต้น้ำ (Platform) แท่นใต้น้ำมีความสูง 38 เซนติเมตร ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแท่น 12 เซนติเมตรน้ำมีอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง บนผิวน้ำมีผงแป้งไม่เป็นพิษ (Nontoxic Powder) สีขาวโรยบนผิวน้ำเพื่อปิดแท่นใต้น้ำระหว่างการทดลอง (Dinesh & Varun, 2012) เริ่มทดลองโดยวางให้หนูอยู่บนแท่นใต้น้ำ 30 วินาทีในครั้งแรก แล้วค่อยปล่อยหนูทดลองให้ว่ายน้ำอย่างอิสระจนหนูทดลองสามารถหาแท่นใต้น้ำเจอ แล้วไปอยู่บนแท่นใต้น้ำ บันทึกเวลาที่ได้ การทดสอบนี้ทำในวันที่ 1, 7 และ 14 หลังจากที่หนูทดลองได้รับการป้อนสารสกัด 30 นาที ในระยะหนูทดลองสุขภาพดี (Healthy Condition)

6. สถิติวิเคราะห์ ข้อมูลทั้งหมดจะถูกนำมาเสนอในรูปค่าเฉลี่ย ± ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน การทดสอบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจะทำโดย One-way Analysis of Variance (ANOVA) สถิติทดสอบโดยวิธีของดันเนท (Dunnett's test) และค่า p-value< .05 จะถือว่ามีความต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ผลการวิจัยและวิจารณ์ผล

ฤทธิ์ของสารสกัดมะละกอของต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ malondialdehyde (MDA) และ การเปลี่ยนแปลงการทำงานของ scavenging enzymes

จากข้อมูลพื้นฐานที่พบว่าสารสกัดมะละกอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นผู้วิจัยจึงทำการศึกษาบทบาทของในการออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระเพื่อปกป้องสมองจากภาวะที่สมองถูกทำลายจากการขาดเลือด ด้วยการวัดผลของสารสกัดต่อสมดุลอนุมูลอิสระโดยวัด lipid peroxidation product, MDA พบว่าสารสกัดขนาด 150 และ 450 mg/kg BW มีระดับ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน cortex ดังแสดงในตารางที่ 1

เมื่อทำการประเมินฤทธิ์ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ CAT ใน cortex จะพบว่าหนูที่ได้รับสารสกัดมะละกอทุกขนาดมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ CAT สัตว์ทดลองที่ได้รับทั้งสารสกัดมะละกอ 3 ขนาด (50, 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) มีการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ใน cortex เพิ่มขึ้น จากการศึกษาจะเห็นว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับสารสกัดขนาด 50,150 และขนาด 450 mg/kg BW มีระดับ GSH-Px เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน cortex ดังแสดงในตารางที่ 1

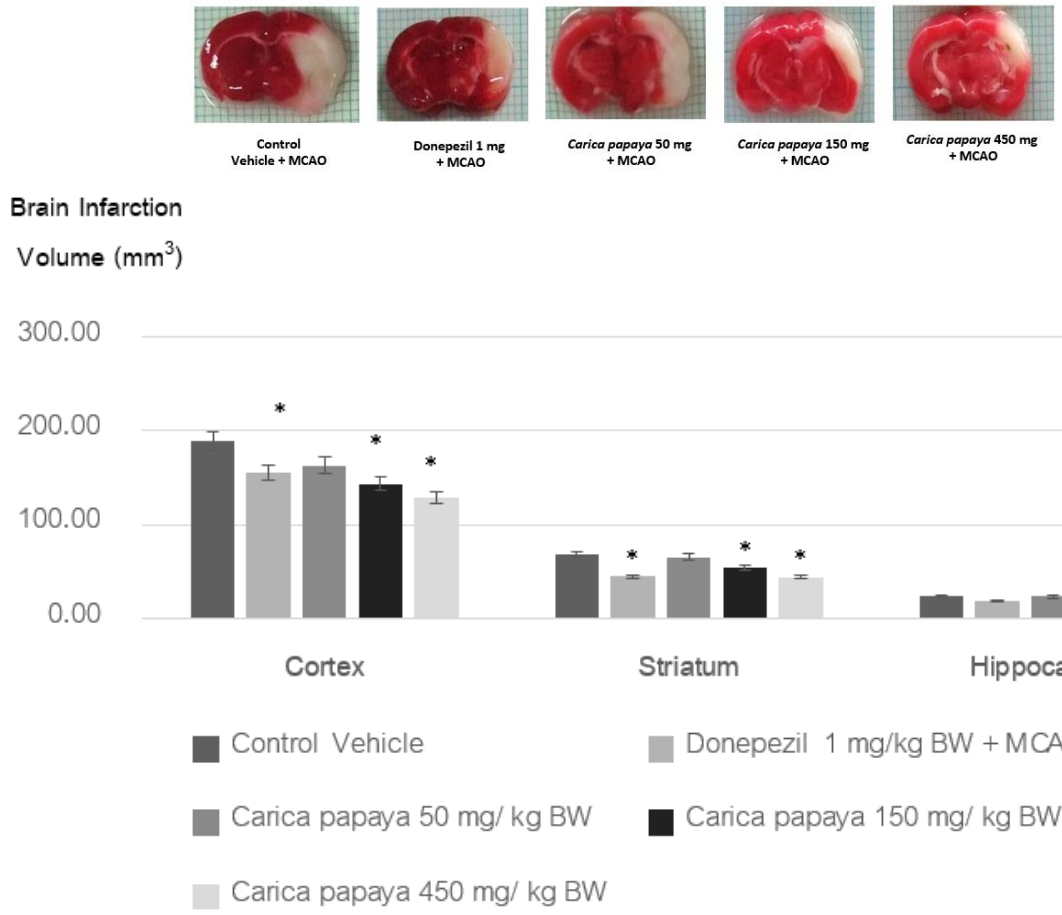
ตารางที่ 1 ฤทธิ์ของสารสกัดมะละกอของต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ MDA และ การเปลี่ยนแปลงการทำงานของ scavenging enzymes ใน cortex

Group	MDA (U/mg.protein)	CAT (U/mg.protein)	SOD (U/mg.protein)	GSH-Px (U/mg.protein)
Control Vehicle + MCAO	3.45±0.50	11.84±2.94	1.45±0.11	0.52±0.10
Donepezil 1 mg/ kgBW + MCAO	1.25±0.12*	16.32±3.05*	2.65±0.52*	0.85±0.15*
Carica papaya 50 mg/ kgBW + MCAO	2.68±0.68	15.46±7.11*	1.82±0.33	0.94±0.21*
Carica papaya 150 mg/ kgBW + MCAO	1.35±0.17*	16.14±2.16*	3.35±0.12*	0.91±0.52*
Carica papaya 450 mg/ kgBW + MCAO	1.26±0.53*	19.34±4.53*	2.82±0.45*	0.95±0.25*

หมายเหตุ : * คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$)
เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control Vehicle + MCAO

การย้อมเซลล์ประสาททำปฏิกิริยากับสารละลาย 2, 3, 5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC)

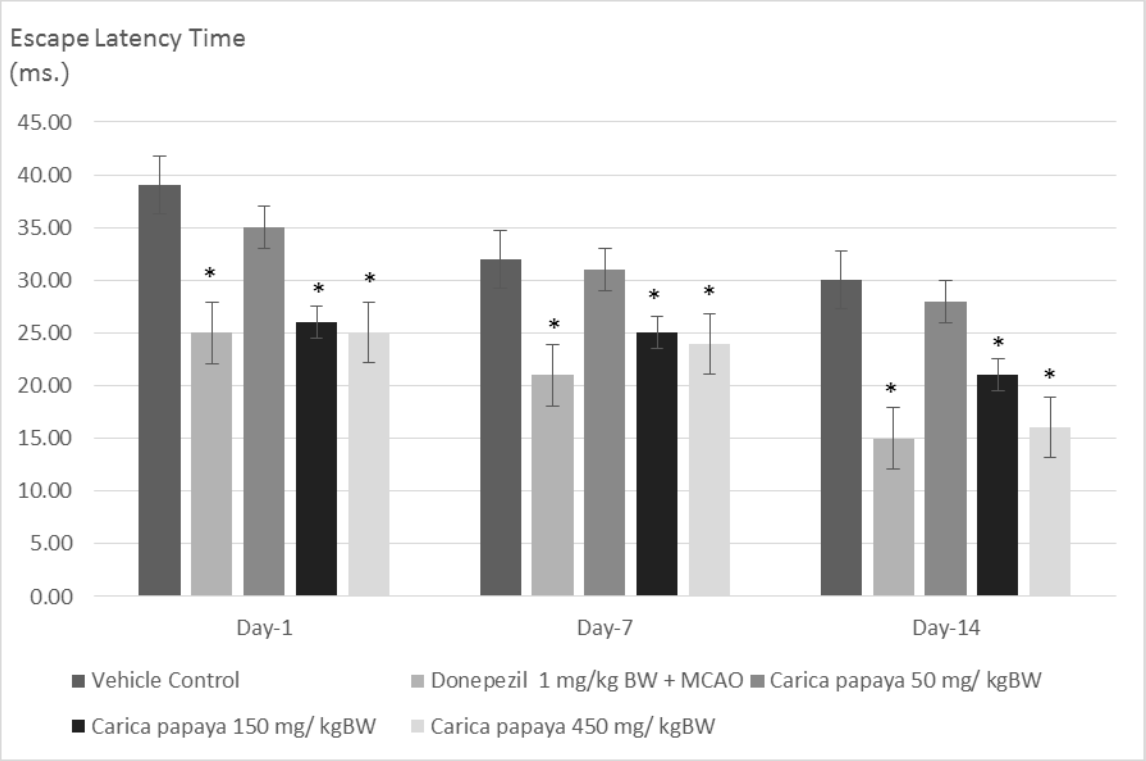
ปริมาตรการตายของเซลล์ประสาทของสมองส่วนคอร์เท็กซ์ สไตรตรัม และฮิปโปแคมปัส เมื่อย้อมเซลล์ประสาทำปฏิกิริยากับสารละลาย TTC ปรากฏว่ากลุ่มที่ให้สารสกัดมะละกอขนาด 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีปริมาตรการตายของเซลล์ประสาท (Infarction volume) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน cortex แต่ใน striatum ลดลงเฉพาะขนาด 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 กราฟแสดงปริมาตรการตายของเซลล์ประสาทของสมองส่วนคอร์เท็กซ์ สไตรตรัม และฮิปโปแคมปัส เมื่อย้อมเซลล์ประสาททำปฏิกิริยากับสารละลาย 2,3,5-triphenyl tetrazolium chloride (TTC) : * คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control Vehicle + MCAO

การว่ายน้ำของสัตว์ทดลองกลุ่มต่าง ๆ ในภาวะสุขภาพดี (Healthy Condition) **ก่อนการเหนี่ยวนำการอุดกั้นของหลอดเลือดสมอง**

หลังจากป้อนสารสกัดมะละกอเป็นเวลา 30 นาที สัตว์ทดลองได้ทดสอบการว่ายน้ำ (Morris Water Maze) ในทุกๆ 7 วัน ประกอบด้วยวันที่ 1, 7 และ 14 ซึ่งหนูจะต้องจดจำตำแหน่งของแท่นพักกลางอ่างน้ำขุ่นวัดผลจากระยะเวลาที่หนูใช้หาแท่นพักกลางอ่างน้ำ ปรากฏว่ากลุ่มที่ให้สารสกัดมะละกอ 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีเวลาของการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำ (Platform) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 3 กราฟแสดงเวลาการว่ายน้ำของสัตว์ทดลองกลุ่มต่างๆ ในภาวะสุขภาพดี (Healthy Condition) ก่อนการเหนี่ยวนำการอุดกั้นของหลอดเลือดสมอง * คือ แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม Control Vehicle

โรคหลอดเลือดสมอง (Stroke) จัดเป็นภาวะคุกคามทางสุขภาพที่สำคัญ ในปัจจุบัน การศึกษาถึงกลไกในห้องปฏิบัติการจะใช้สัตว์ทดลอง โดยเฉพาะอย่างยิ่งใช้แบบจำลองภาวะสมองขาดเลือดบางส่วนแบบจำลองนี้ถูกใช้อย่างแพร่หลายเนื่องจากใช้เลียนแบบการเกิด thromboembolic stroke ในมนุษย์ ซึ่งเกิดจากการอุดตันของหลอดเลือดหลักที่ไปเลี้ยงบางส่วนของสมอง เช่น middle cerebral artery ซึ่งเป็นแขนงหลอดเลือดสมองที่สำคัญมากกับการเลี้ยงอวัยวะที่สำคัญของร่างกาย การอุดกั้นหลอดเลือดสมองก่อให้เกิดปริมาณของเลือดที่ไปเลี้ยงสมองส่วน striatum และ cortex ลดลง ส่วนความรุนแรงของโรคขึ้นอยู่กับ ระยะเวลาของการขาดเลือด ตำแหน่งที่มีการอุดตันของหลอดเลือดและ ปริมาณเลือดจากหลอดเลือด ใกล้เคียงในบริเวณที่ถูกเลี้ยงด้วยหลอดเลือดนั้นๆ ลักษณะเฉพาะของภาวะการขาดเลือดของสมองบางส่วนคือ มีความแตกต่างของบริเวณที่ขาดเลือด (Heterogeneous pathology) โดยมีแกนกลาง (Necrotic core) เป็นส่วนที่ขาดเลือดอย่างสมบูรณ์และส่วนรอบๆที่สามารถกู้กลับมาได้ (Salvageable penumbra) ถ้ามีการกู้ที่เหมาะสมเซลล์ประสาทเหล่านี้สามารถกลับมาเป็นปกติได้ ดังนั้นบริเวณ penumbra จึงสำคัญต่อการศึกษาในการพัฒนายาที่ใช้ในการรักษาโรคสมองขาดเลือด (Pongmayteegul, 2010) ด้วยข้อจำกัดในการรักษาภาวะของโรคดังกล่าวทำให้มีการพยายามที่จะใช้ neuroprotective agent เข้ามาช่วยเพื่อให้เซลล์ประสาทในบริเวณที่ที่อยู่ริมของส่วนที่ขาดเลือดโดยเฉพาะ penumbra area ฟื้นคืนสภาพกลับมา

ทำงาน neuroprotective agent ในปัจจุบันมักจะมุ่งไปยับยั้งกลไกต่างๆที่เกี่ยวข้องกับพยาธิสรีรวิทยาของภาวะสมองขาดเลือด เช่น เพิ่มการไหลของเลือดไปเลี้ยงบริเวณดังกล่าว ยับยั้งการทำงานของ excitatory amino acid ผ่าน NMDA receptor, Endothelial nitric oxide synthase รวมทั้งยับยั้งการทำงานของอนุมูลอิสระ (Moskowitz *et al*., 2010)

ภาวะที่มีอนุมูลอิสระมากเกิน แต่ปริมาณสารต้านอนุมูลอิสระไม่เพียงพอ และส่งผลให้เกิดการทำลายดีเอ็นเอ โปรตีน ไขมัน และโมเลกุลอื่น ๆจัดเป็นการทำลายแบบออกซิเดชัน (Oxidative damage) โมเลกุลเป้าหมายที่เกิด oxidative damage ได้แก่ ดีเอ็นเอ โปรตีน และไขมัน (Li *et al*., 2013) จากผลการศึกษาสารสกัดมะละกอมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ด้วยการวัดผลของสารสกัดต่อสมดุลอนุมูลอิสระโดยวัด lipid peroxidation product, MDA พบว่าขนาด 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวมีระดับ MDA ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติใน cortexขนาด (50, 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว) มีการทำงานของเอนไซม์ GSH-Px ใน cortex และ hippocampus เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ กลไกดังกล่าวจึงเป็นการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจากสารธรรมชาติ โดย SOD เป็นเอนไซม์ที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ superoxide ให้เปลี่ยนเป็น H_2O_2 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะพบในเซลล์ทุกเซลล์ CATเป็นเอนไซม์ที่ใช้เร่งปฏิกิริยาการสลายตัวของ H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O และ O_2 สำหรับ GSH-Px ซึ่งจะเร่งปฏิกิริยา reduction ของ H_2O_2 ให้กลายเป็น H_2O (Nimse & Pal, 2015) การศึกษานี้มุ่งไปยังสมองส่วนคอร์เท็กซ์ สไตรตรัม และฮิปโปแคมปัส ซึ่งเป็นสมองที่ได้รับผลกระทบจากการเหนี่ยวนำการขาดเลือดที่สมอง (Cerebral ischemia) (Kokaia *et al*., 2006) และสารสกัดมะละกอซึ่งมีองค์ประกอบของสารประกอบฟีโนลิกที่สำคัญสามารถลดการเกิดความเครียดจากออกซิเดชั่นได้ (Barbagallo *et al.,* 2015) จะรวมอยู่ในโมเลกุลของน้ำตาลในรูปของสารประกอบไกลโคไซด์ (Glycoside) น้ำตาลชนิดที่พบมากที่สุดในโมเลกุลของสารประกอบฟีนอล คือ น้ำตาลกลูโคส และพบว่าอาจมีการรวมตัวกันระหว่างสารประกอบฟีนอลด้วยกันเอง หรือสารประกอบฟีนอลกับสารประกอบอื่นๆ นอกจากนี้มีการศึกษาการต้านอนุมูลอิสระด้วยตัวทำาละลายน้ำ โดยการเหนี่ยวนำด้วยอะครายลาไมด์ (Acrylamide) ให้เกิดจากความเครียดออกซิเดชัน และการพัฒนาการท้างานของระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับผลกระทบจากอนุมูลอิสระที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอะครายลาไมด์ ในหนูแรทผลการทดลอง ปรากฏว่าสามารถลดออกซิเดชั่นที่เกิดขึ้นได้หลังจากที่ป้อนด้วยมะละกอ Kadry (2012)

กลุ่มที่ให้สารสกัดมะละกอขนาด 150 และ 450 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว มีเวลาของการว่ายน้ำหาแท่นใต้น้ำ (Platform) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) สอดคล้องกับการศึกษาของ Wang *et al.,* (2015) และ Bahonar *et al*., (2017). ที่ศึกษาผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ประสาทส่งผลต่อการลดภาวะความจำบกพร่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งแคโรทีนอยส์ (Carotenoids) ซึ่งพบมากในมะละกอสุก เป็นพฤกษเคมี เป็นสารประกอบฟีโนลิกทั้งนี้การศึกษาของ Cocate *et al*., (2015) ได้ระบุว่า การบริโภคแคโรทีนอยส์มีความสัมพันธ์กับการลดการเกิดลิพิดเพอรอกซิเดชั่น (Lower lipid oxidation) รวมถึงการทำลายดีเอ็นเอ (DNA damage) ในเซลล์ได้ ส่งผลต่อการคงสภาพของเซลล์ประสาทไม่ให้ถูกทำลาย

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดมะละกอมีศักยภาพที่จะนำไปพัฒนาสารตัวใหม่ที่ป้องกันและรักษาภาวะสมองขาดเลือด ผ่านกลไกตัวชี้วัดออกซิเดชั่น (Oxidative markers) อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษาวิจัยทั้งในด้านปรีคลินิก (Pre-clinical phase) และคลินิก (Clinical phase) ต่อไปเพื่อความมีประสิทธิภาพและความปลอดภัยของการใช้ประโยชน์สูงสุดของสารสกัดมะละกอต่อการปกป้องระบบประสาท (Neuroprotection) ของมนุษย์

กิตติกรรมประกาศ

โครงการนี้เป็นโครงการที่ได้รับงบประมาณวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนส่วนงาน วิทยาลัยวิทยาการวิจัยและวิทยาการปัญญา มหาวิทยาลัยบูรพา ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2559

เอกสารอ้างอิง

Bahonar, A., Saadatnia, M., Khorvash, F., Maracy, M., & Khosravi, A. (2017). Carotenoids as potential antioxidant agents in stroke prevention: A systematic review. *International Journal of Preventive Medicine*, *8*, 70. 6-12.

Barbagallo, M., Marotta F., & Dominguez, L.J. (2015). Oxidative stress in patients with Alzheimer's disease: Effect of extracts of fermented papaya powder. *Mediators Inflammation*, 624801. 1-6.

Binthaisong, T. (2014). Arrival time in patients with acute stroke. *Journal of the Police Nurse*, *6* (2), 275-282. (in Thai)

Cocate, P.G., Natali, A.J., Alfenas, R.C, de Oliveira, A., dos Santos, E.C., & Hermsdorff H.H. (2015). Carotenoid consumption is related to lower lipid oxidation and DNA damage in middle-aged men. *British Journal of Nutrition*, *114,* 257–264.

Dhingra, D. & Kumar, V. (2012). Memory-Enhancing Activity of Palmatine in Mice Using Elevated Plus Maze and Morris Water Maze. *Advances in Pharmacological Sciences*, 2012, Article ID 357368, 1-7.

Goldblith, S. A., & Proctor, B. E. (1950). Photometric determination of catalase activity. *Journal of Biological Chemistry, 187*, 705-709.

Hara, H., Fink, K., Endres, M., Friedlander, R.M., Gagliardini, V., Yuan, J., & Moskowitz, M.A. (1997). Attenuation of transient focal cerebral ischemic injury in transgenic mice expressing a mutant ICE inhibitory protein. *Journal of Cerebral Blood Flow Metabolism*, *17*, 370-375.

Kadry, M.S. (2012). Antioxidant and immunostimulant effect of *Carica papaya* Linn. aqueous extract in acrylamide intoxicated rats. *Acta Informatica Medica, 20* (3), 180-185.

Kokaia, Z., Thored, P., Arvidsson A., & Lindvall, O. (2006). Regulation of stroke-induced neurogenesis in adult brain—recent scientific progress. *Cerebral Cortex*, *16*(Suppl 1), i162-i167.

Li, H., Horke, S., & Förstermann, U. (2013). Oxidative stress in vascular disease and its pharmacological prevention. *Trends in Pharmacological Sciences*, *34*(6), 313-319.

Liu, J-Q., Dai, S-X., Zheng, J-J., Guo, Y-C., Li, W-X., Li, G-H., & Huang, J-F. (2017). The identification and molecular mechanism of anti-stroke traditional Chinese medicinal compounds. *Scientific Reports*, *7*, 14106. 1-11.

Lo, E.H., Moskowitz, M.A., & Jacobs, T.P. (2005). Exciting, radical, suicidal: how brain cells die after stroke. *Stroke*, *36*(2), 189-192.

Longa, E.Z., Weinstein, P.R., Carlson, S., & Cummins, R. (1989).Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats. *Stroke*, *20*(1), 84-91.

McCord, J.M. & Fridovich, I. (1969).Superoxide dismutase: an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). *Journal of Biological Chemistry*, *244*, 6049–6055.

Ministry of public health. (2002). Burden of disease and injuries in Thailand Priority setting for policy, A14-16, 58.

Moskowitz, M.A., Lo, E.H., & Iadecola, C. (2010). The Science of stroke: Mechanisms in search of treatments. *Neuron*, *67*(2), 181-198.

Nimse, S.B., Pal, D. (2015). Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*, *5*(35), 27986-28006.

Ohkawa, H., Ohishi, N., & Yagi, K. (1979). Assay for lipid peroxidation in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Annals of Biochemistry*, *95*, 351–358.

Otsuki, N., Dang, N. H., Kumagai, E., Kondo A., Iwata, S., & Morimoto, C. (2010). Aqueous extract of *Carica papaya* leaves exhibits anti-tumor activity and immunomodulatory effects. *Journal of Ethnopharmacology*, *127*(3), 760-767.

Pongmayteegul, S. (2010). Experimental models of global and focal cerebral ischemia. *Journal of Medicine and Health Sciences, 17* (3), 149 -159. (in Thai)

Parmeshwar L.S., Ishwar S.S., & Ravish, C. (2015*). Papaya: Biology, cultivation, production and uses*. (pp. 169 -188). New York: CRC Press.

Sadek, K.M. (2012). Antioxidant and immunostimulant effect of *Carica papaya* Linn. aqueous extract in acrylamide intoxicated rats. *Acta Informatica Medica*, *20*(3), 180-185.

Sankat, C.K., & Maharaj, R.P. (1997). In: Mitra SK. (Ed.), *Postharvest physiology and storage of tropical and subtropical foods.* (pp. 167-189). New York: Cab International.

Sawatdiyapanon, C., & Kaewkaen, P. (2015). Behavioral effect of *Carica papaya* L. fruits juice in animal model of mild cognitive impairment. In *Proceedings of the Burapha University International Conference 2015*. (pp. 423-429). Chon Buri: Thailand.

Wang, S., Cu, Y., Wang, C., Xie, W., Ma, L., Zhu, J. (2015). Protective effects of dietary supplementation with a combination of nutrients in a transgenic mouse Mmodel of Alzheimer's disease. *PLoS ONE, 10*(11), e0143135.

Wendel, A. (1981). Glutathione peroxidase. *Methods in Enzymology*, *77*, 325-333.

World Health Organization. (2014).Global status report on non-communicable diseases. Geneva: World Health Organization.

Zhou, L., Paull, R.E. (2001). Sucrose metabolism during papaya (*Carica papaya* L.) fruit growth and ripening. *Journal of the American Society for Horticultural Science, 126*, 351-357.