

Retinitis Pigmentosa (RP) เป็นโรคกลุ่มที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์รับแสงชนิดแท่งก่อนที่จะตามมาด้วยการสูญเสียเซลล์รับแสงชนิดกรวยอย่างช้าๆ จากการทำลายโดยอนุมูลอิสระ (oxidative damage) ในท้ายที่สุดจะทำให้สูญเสียการมองเห็นอย่างถาวร เบอร์เบอร์รีน (berberine) เป็นสาร isoquinoline alkaloid และเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของหวงเหลียน (*Coptidis rhizome*) และสมุนไพรชนิดอื่นๆ โดยมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระได้ในเซลล์หลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเบอร์เบอร์รีนในการต้านการทำลายจากอนุมูลอิสระและป้องกันการตายของเซลล์รับแสง 661W ที่ถูกชักนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide;  $H_2O_2$ ) เซลล์ 661W ได้รับสารเลี้ยงใน medium, DMSO (dimethyl sulfoxide) ซึ่งเป็นตัวพา หรือเบอร์เบอร์รีน (25-200  $\mu M$ ) อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลาสองชั่วโมงก่อนการได้รับสารเลี้ยงเซลล์หรือ  $H_2O_2$  100-1000  $\mu M$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) จะถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิค trypan blue dye exclusion การอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียสซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่พบของการตายแบบเอพอพโตซิส (apoptosis) จะถูกตรวจสอบโดยใช้การย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 และส่องดูและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับเบอร์เบอร์รีนที่ขนาด 25-100  $\mu M$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและตามด้วยการเลี้ยงด้วย medium เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสามารถคงไว้ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตในระดับเดียวกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามหากเพิ่มความเข้มข้นของเบอร์เบอร์รีนเป็น 200  $\mu M$  ที่เวลา 2 ชั่วโมงจะทำให้ร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) โดยเหลือเพียง 83% ของกลุ่มควบคุม การทดลองโดยการให้  $H_2O_2$  แก่เซลล์ 661W อย่างเดียวที่ขนาด 100-1000  $\mu M$  จะพบว่า การตายของเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของ  $H_2O_2$  (dose-dependent cell death) การให้เบอร์เบอร์รีนที่ความเข้มข้น 100  $\mu M$  แก่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการให้  $H_2O_2$  ที่ความเข้มข้น 100-300  $\mu M$  พบว่าสามารถลดการตายของเซลล์และลดจำนวนของเซลล์ที่บรรจุนิวเคลียสที่มีโครมาตินอัดแน่นได้อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารเลี้ยงเซลล์หรือ DMSO อย่างใดอย่างหนึ่งแทนเบอร์เบอร์รีนและตามด้วยขนาดที่เท่ากันของ  $H_2O_2$  ส่วนการได้รับเบอร์เบอร์รีนที่ขนาด 50  $\mu M$  ให้ผลน้อยลงในการลดการตายของเซลล์และนำไปสู่การลดลงของจำนวนนิวเคลียสที่มีการอัดแน่นของโครโมโซม ผลการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าเบอร์เบอร์รีนสามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W photoreceptor และการเกิดการอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียสได้ ดังนั้นเบอร์เบอร์รีนอาจเป็นประโยชน์และมีศักยภาพในการนำมาใช้ป้องกันการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการถูกชักนำโดยอนุมูลอิสระ เช่นที่พบใน retinitis pigmentosa และโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของจอประสาทตาชนิดอื่นๆ

Retinitis Pigmentosa (RP) is a group of diseases caused by a large number of mutations which result in loss of rod photoreceptor cells followed by gradual death of cones predominantly from oxidative damage and subsequent irreversible loss of vision. Berberine, an isoquinoline alkaloid and one of the main constituents of *Coptidis rhizoma* and other herbs, has been shown to be a potent antioxidant and can prevent oxidative injury in many kinds of cells. The present study is aimed to validate their antioxidant properties against oxidative damage and cell death induced by  $H_2O_2$  in 661W. Cultured 661W photoreceptor cells were pretreated with either fresh medium, DMSO (dimethyl sulfoxide) vehicle or berberine (25-200  $\mu M$ ) for two hours before incubating with either media or  $H_2O_2$  100-1000  $\mu M$  for 24 h. The percentage of viable cells was determined using trypan blue dye exclusion technique. Nuclear chromatin condensation, a hallmark of apoptosis, was determined using Hoechst 33342 staining and then visualized by fluorescence microscopy. The results demonstrated that cells treated with 25-100  $\mu M$  berberine for 2 hours followed by culturing in fresh media for 24 hours retained viability similar to that of the control cells. However, at concentration of 200  $\mu M$ , berberine significantly decreased cell viability to 83% of the control. Treatment of 661W cells with 100-1000  $\mu M$  of  $H_2O_2$  alone resulted in dose-dependent cell death. Pre-treatment of 661W cells with 100  $\mu M$  berberine for 2 hours prior exposure to  $H_2O_2$  100-300  $\mu M$  could significantly attenuate cell death and decreased the percentage of cells containing condensed nuclei compared to those pre-treated with either fresh media or DMSO followed by the same doses of  $H_2O_2$ . Pre-treatment with berberine 50  $\mu M$  had reduced effect on cell death protection and lead to a decrease in the percentage of cells with nuclear chromatin condensation. The result demonstrated that berberine provides substantial protection against  $H_2O_2$ -induced cell death and nuclear chromatin condensation in 661W cells. Berberine may therefore be useful as a potential agent to protect against disorders associated with oxidative stress-induced cell damage such as retinitis pigmentosa and other retinal degeneration diseases.