

สารบัญ

เรื่อง	หน้า
บทคัดย่อ	1
1. บทนำ	
ที่มาและความสำคัญ	3
Oxidative Stress และการเกิดโรคความเสื่อมทางระบบประสาท	4
บทบาทของ mitochondria และการตายของเซลล์แบบ apoptosis	6
ขมิ้นชัน (curcumin)	8
ผลของ curcumin ต่อการเกิด apoptosis และ mitochondria	10
วัตถุประสงค์การวิจัย	11
ขอบเขตการวิจัย	11
สมมติฐานการวิจัย	11
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	12
2. วิธีดำเนินการวิจัย	
รูปแบบการวิจัย	13
ประชากรและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ในการวิจัย	13
วิธีการศึกษาวิจัย	14
วัสดุและเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย	19
3. ผลการวิจัย	
ผลความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SK-N-SH)	22
ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง	29
ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์หลังได้รับ H_2O_2	30
ผลของ H_2O_2 , curcumin และ analogs ต่อระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย- แบบอะพอพโทซิสในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง	31
4. อภิปรายและสรุปผลการวิจัย	36
5. เอกสารอ้างอิง	45
กิตติกรรมประกาศ	47
Output ที่ได้จากโครงการ	47
ภาคผนวก	48

บทคัดย่อ

ภาษาไทย

ภาวะ oxidative stress และ mitochondrial dysfunction เป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคกลุ่มระบบประสาทเสื่อม เช่น โรคพาร์กินสัน ดังนั้นจึงศึกษาผลของสารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่ดีอย่าง ขมิ้นชันและแอนาโลกต่อไมโทคอนเดรียของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ผลการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ได้รับ curcumin และ แอนาโลก tetrahydrocurcumin ที่ความเข้มข้น 5uM ช่วยลดการตายของเซลล์ที่ได้รับสารที่ทำให้เกิด oxidative stress H_2O_2 ที่ 50uM ได้ถึง 31% ($p<0.001$) โดยที่สารความเข้มข้นดังกล่าวไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียด้วยการย้อม JC-1 พบว่า H_2O_2 ทำให้มีการสูญเสีย membrane potential ซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ในวิถีการตายที่ผ่านไมโทคอนเดรีย การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายโดยผ่านไมโทคอนเดรีย ได้แก่ Bax และ Bcl-2 พบว่ามีโปรตีนในไซโตพลาสซึมและโปรตีนในไมโทคอนเดรียมีการเปลี่ยนแปลงโดยที่ H_2O_2 จะกระตุ้นให้โปรตีน Bax ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein เพิ่มขึ้นทั้งใน ไซโตซอลและไมโทคอนเดรีย ($p<0.001$) ซึ่งจะทำให้เกิดรูรั่วของ cytochrome c ที่เป็นตัวทำให้เกิดอะพอพโทซิสตามมา เมื่อเซลล์ได้รับ curcumin และ tetrahydrocurcumin จะมีปริมาณ Bax ในไซโตซอลและไมโทคอนเดรียลดลง ($p<0.001$) และมี Bcl-2 ในไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น ($p<0.001$) เป็นการแสดงออกที่สอดคล้องกับการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ทำให้สรุปได้ว่ากลไกการทำงานของ curcumin และแอนาโลก tetrahydrocurcumin เป็นกลไกที่ส่งผลต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงโดยช่วยป้องกันการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย การศึกษาครั้งนี้เป็นการช่วยเพิ่มองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการทำงานของสารสกัดสำคัญที่อยู่ในสมุนไพรขมิ้นชัน และส่งเสริมการนำสารสกัด curcumin และ tetrahydrocurcumin จากธรรมชาติมาช่วยในการลดหรือชะลอความเสื่อมของเซลล์ประสาทอันนำไปสู่โรคความเสื่อมที่ไม่มียารักษาให้หายขาดได้

คำสำคัญ: เคอร์คูมิน เทตราไฮโดรเคอร์คูมิน ออกซิเดทีฟสเตรส อะพอพโทซิส โรคพาร์กินสัน

Abstract

Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are well demonstrated as leading cause of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Thus we aimed to study the effects of curcuminoids and their analogs on the mitochondria of the apoptosis-induced in cultured neuronal cell line (SK-N-SH). Cells pretreated two hours with 5 μ M of curcumin and its analog, the tetrahydrocurcumin (THC), showed the highest numbers of cell survival of 31% ($p<0.001$) by MTT assay, when induced apoptosis with 50 μ M of H₂O₂. Apoptotic cells showed the mitochondrial membrane disruption when stained with mitochondrial membrane potential sensitive dye; JC-1. Western blot analysis of proteins involved with mitochondria-mediated apoptotic mechanism; Bcl-2 and Bax, were also changed by means of anti-apoptotic effect of curcumin and THC against H₂O₂-induced apoptosis. While H₂O₂ induced the expression of pro-apoptotic protein Bax in both cytosol and mitochondria ($p<0.001$) causing cytochrome C released and activation of apoptosis respectively. Curcumin and THC helped to increase the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in mitochondria ($p<0.001$), and reduced the expression of pro-apoptotic protein Bax in both cytosol and mitochondria when treated with 50 μ M of H₂O₂ ($p<0.001$). Thus the results can imply that Bcl-2 protects the mitochondrial membrane from Bax. In conclusion, both curcumin and its major metabolite, the tetrahydrocurcumin, have shown anti-apoptotic effect and this effect was suggested a part of anti-apoptotic mechanism via mitochondrial pathway. This study also supported that curcumin and tetrahydrocurcumin may be used as natural prevention for neurodegenerative diseases.

Keywords: curcumin, tetrahydrocurcumin, oxidative stress, apoptosis, Parkinson's disease

บทนำ

(Introduction)

ที่มาและความสำคัญ

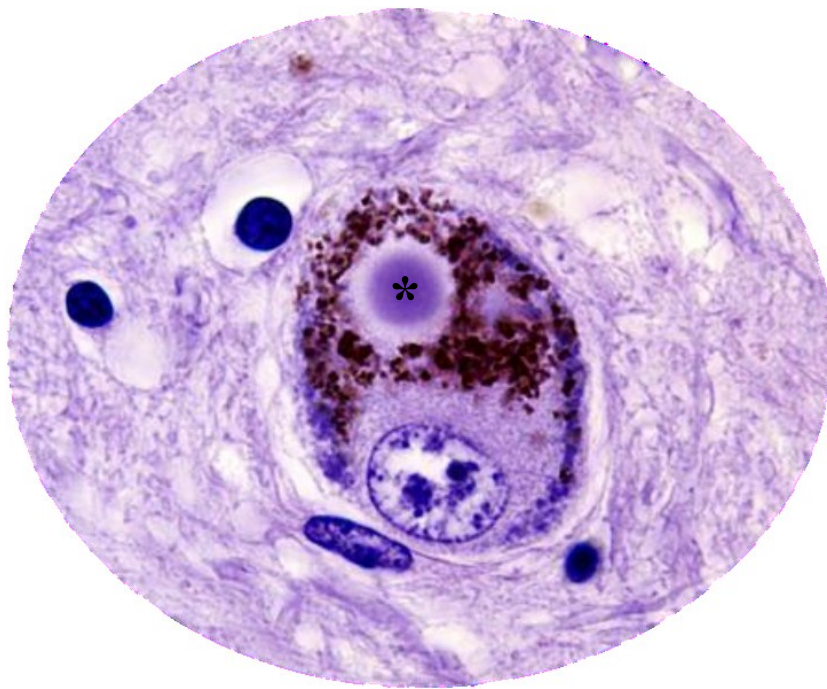
Oxidative Stress และการเกิดโรคความเสื่อมทางระบบประสาท

Parkinson's disease (PD) เป็นโรคที่อยู่ในกลุ่ม progressive neurodegenerative disorders พบได้ประมาณ 0.3-1% ของประชากร ส่วนใหญ่พบในผู้สูงอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไป และความเสี่ยงในการเกิดโรคจะเพิ่มสูงมากขึ้นตามอายุที่มากขึ้น สาเหตุการเกิดโรคไม่ทราบแน่นอน มีปัจจัยส่งเสริมที่เป็นได้ทั้งสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม ส่วน familial PD นั้นพบได้น้อยและมักพบเริ่มมีอาการในผู้ป่วยที่มีอายุน้อยกว่า 40 ปี พยาธิสภาพของโรค PD เกิดจากการตายของ dopaminergic neurons ที่อยู่ในส่วนที่เรียกว่า substantia nigra pars compacta ของก้านสมองส่วน midbrain ซึ่งสาเหตุการตายของ dopaminergic neurons นั้นยังไม่เป็นที่ทราบแน่นอน มีการศึกษาพบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับการทำงานที่บกพร่องของ mitochondria เป็นส่วนสำคัญ ส่วนอาการของโรคจะปรากฏขึ้นเมื่อมีการตายของเซลล์ประสาทมากกว่า 60-70% ขึ้นไป กลุ่มอาการหลักของ parkinsonism ได้แก่ rigidity, bradykinesia, resting tremor และ postural instability นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยอาจมีอาการ dementia, depression, insomnia และ autonomic disturbance ร่วมด้วย ในระยะท้ายของโรคผู้ป่วยจะมีอาการแทรกซ้อน เช่น ปอดบวม ติดเชื้อในกระแสเลือด ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและแผลกดทับ การรักษาโดยทั่วไปทำได้โดยให้ยา levodopa และยาในกลุ่มต่าง ๆ ร่วมกัน ซึ่งช่วยบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงและทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อน ผู้ป่วยต้องการการดูแลอย่างใกล้ชิดซึ่งส่งผลต่อ สภาพร่างกาย จิตใจ เศรษฐกิจและสังคม ของผู้ป่วยและญาติผู้ให้การดูแล การผ่าตัดรวมทั้งการทำ neurotransplantation สามารถช่วยบรรเทาอาการได้ แต่ก็ เป็นวิธีการที่มีความซับซ้อนและต้องการผู้ที่มีความชำนาญ ดังนั้นการศึกษากลไกการเกิดโรครวมทั้ง อนุพันธ์ของสารที่ได้จากธรรมชาติต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติสอดคล้องกับกลไกการเกิดโรค ก็เป็นอีกช่องทางหนึ่งที่จะช่วยทำให้สามารถป้องกัน ลดอัตราการตายของเซลล์ประสาท และช่วยบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยได้ ซึ่งขมิ้นชัน (curcumin) ที่เป็นพืชสมุนไพรและเป็นส่วนประกอบของอาหารในชีวิตประจำวันนั้น ได้มีการศึกษาพบว่ามีคุณสมบัติมากมาย โดยที่แต่ละอนุพันธ์ของขมิ้นชันก็มีคุณสมบัติแตกต่างกันไป การศึกษานี้จึงมุ่งเป้าไปที่กลไกที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทเนื่องมาจากภาวะ oxidative stress อันส่งผลทำให้เกิด mitochondrial dysfunction และการปกป้อง mitochondria โดยอนุพันธ์ของขมิ้นชัน

Oxidative Stress และการเกิดโรคความเสื่อมทางระบบประสาท

พยาธิสภาพของ PD

การตรวจเนื้อเยื่อประสาทใน postmortem PD brain พบว่ามี intracytoplasmic inclusion ที่เรียกว่า Lewy bodies ใน dopaminergic neurons ซึ่งเป็นลักษณะเฉพาะที่สำคัญของ PD โดย Lewy bodies เป็นการรวมตัวกันอย่างผิดปกติของโปรตีน ประกอบด้วย alpha synuclein, ubiquitin และ neurofilament อย่างไรก็ตาม Lewy bodies ก็ยังพบได้ในภาวะอื่นได้ เช่น Alzheimer's disease (AD) และ dementia with Lewy bodies (DLB) แต่จะพบกระจุกกระจายไปในส่วนต่าง ๆ ของสมอง (Cornford et al., 1995) หน้าที่ของ Lewy bodies ที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาทนี้ยังไม่ทราบชัดเจนแน่นอน อาจเป็นกลไกการปกป้องเซลล์ อันเนื่องมาจากขบวนการ protein degradation อันได้แก่ ubiquitin-proteasome system ได้มีการสูญเสียหน้าที่ไป (Tanaka et al., 2004) หรือเป็นเพียงสิ่งที่แสดงถึงการตายของเซลล์



ภาพ 1 แสดง intracytoplasmic inclusion (*) ในเซลล์ประสาทที่เรียกว่า Lewy bodies

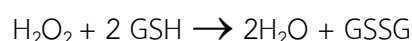
ที่มา <http://neuropathology.neoucom.edu/chapter9/images9/9-lb2.jpg>

สมมติฐานการตายของ dopaminergic neurons ใน PD

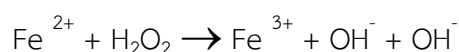
Mitochondria เป็น cytoplasmic organelle ที่สำคัญ โดยเป็นแหล่งสร้างพลังงานให้กับเซลล์ในขบวนการ oxidative phosphorylation (OXPHOS) นอกจากนี้ยังเป็นเป้าหมายหลักในการศึกษาสาเหตุที่ทำให้เกิดการตายของ dopaminergic neurons ใน PD โดยสืบเนื่องมาจากการค้นพบ MPP⁺ ที่ได้จากการ metabolite ของสาร MPTP (methylphenyltetrahydropyridine) ทำให้เกิด acute parkinsonism ในคนที่ใช้ยาเสพติดฉีดเข้าเส้นนั้น (Langston et al., 1983) ได้ถูกนำมาใช้เป็น model ในการศึกษา PD อย่างแพร่หลาย ซึ่งพบว่ามีผลยับยั้ง mitochondrial complex I (NADH, ubiquinone reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกในขบวนการ respiratory electron transport chain เกิดขึ้นด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาใน postmortem PD brain อันแสดงถึงภาวะ mitochondrial dysfunction ของ dopaminergic neurons นอกจากนี้ MPP⁺ ยังทำให้เกิดการสะสม alpha synuclein และ Lewy bodies ในสัตว์ทดลองได้เหมือนที่พบใน PD ด้วย

หลังจากการค้นพบเกี่ยวกับ MPP⁺ ก็ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม (Bove et al., 2005; Langston, 1996) ตัวอย่างเช่น rotenone ในยาฆ่าแมลง ที่มีคุณสมบัติเป็น mitochondrial complex I inhibitors กับความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค PD อันเป็นที่มาของข้อสรุปที่ว่า การเกิด PD เป็นขบวนการความเสื่อมที่เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน ทั้งสิ่งแวดล้อมทั้งภายใน และภายนอก รวมถึงพันธุกรรมด้วย (Dawson and Dawson, 2003; Le Couteur et al., 2002; Moore et al., 2005)

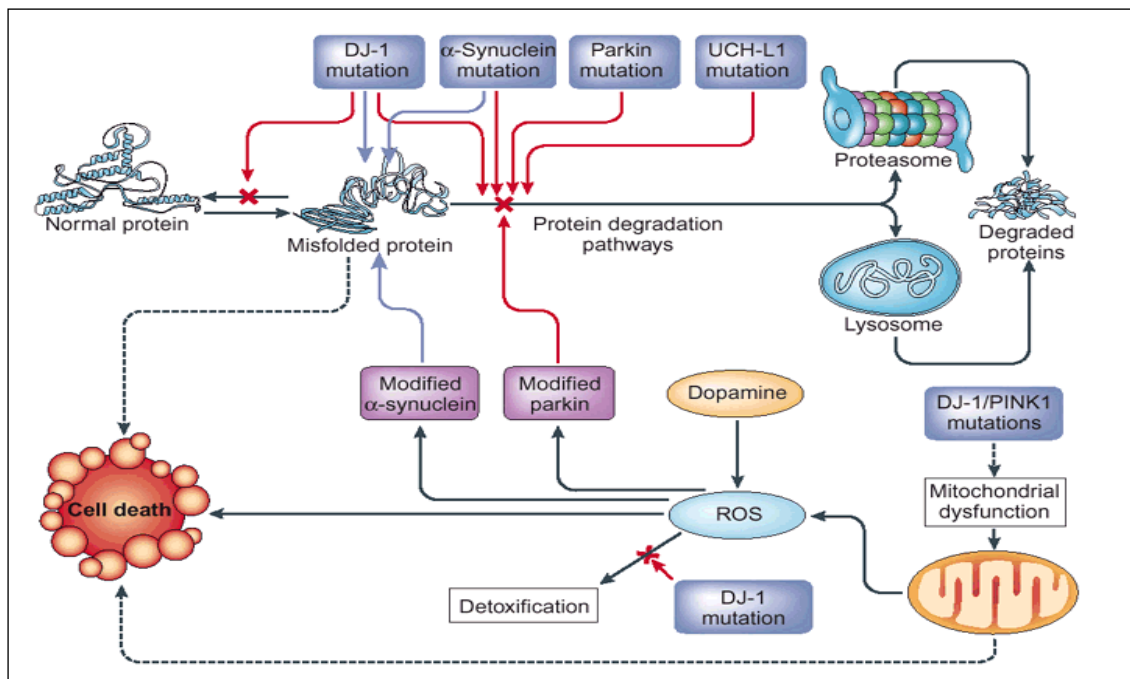
จากการศึกษาเกี่ยวกับ MPTP พบว่าเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูก oxidize โดย monoamine oxidase B (MAOB) ให้เป็น MPP⁺ (Fritz et al., 1985) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงในการนำเข้าสู่ dopaminergic neurons โดย dopamine transporter และ actively transport เข้าไปยับยั้งการทำงานของ mitochondrial complex ใน mitochondria ทำให้เกิด oxidative stress เกิดอนุมูลอิสระ O₂⁻ ขึ้นมากมาย O₂⁻ นั้นมีพิษน้อย แต่ถ้าได้รวมกับ nitric oxide (NO) จะได้ peroxynitrite (ONOO⁻) ซึ่งจะแตกตัวให้เป็น -OH ที่มีพิษสูงมาก (Beckman et al., 1990) นอกจากสารเคมีจากภายนอกที่จำเพาะเจาะจงในการทำลาย dopaminergic neurons แล้ว ขบวนการ oxidize สาร dopamine เองโดย MAO ก็ทำให้เกิด H₂O₂ ซึ่งจะถูกทำให้ไม่มีพิษโดย glutathione (GSH) ได้เป็น glutathione disulfide (GSSG) ดังนี้



แต่ถ้าไปทำปฏิกิริยากับ iron ก็จะทำให้เกิด -OH ซึ่งมีความเป็นพิษสูงได้ดังนี้



จากการศึกษาพยาธิสภาพและการตายของ dopaminergic neurons ในผู้ป่วย familial PD ซึ่งพบได้น้อยนั้น ยีนที่มีความผิดปกติส่วนใหญ่เกี่ยวข้องกับขบวนการ protein degradation ได้แก่ *DJ1*, *SNCA* (α -synuclein gene), *PARKIN* และ *ubiquitin carboxyl-terminal esterase L1* (*UCHL1*) ซึ่งเมื่อไม่สามารถกำจัด misfolded proteins ได้ก็เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตาย (Vila and Przedborski, 2004) นอกจากนี้ยีนบางส่วนยังเกี่ยวข้องกับ oxidative stress และ mitochondrial dysfunction ได้แก่ *DJ-1* และ *PTEN induced putative kinase 1* (*PINK1*) ดังแสดงในภาพที่ 2



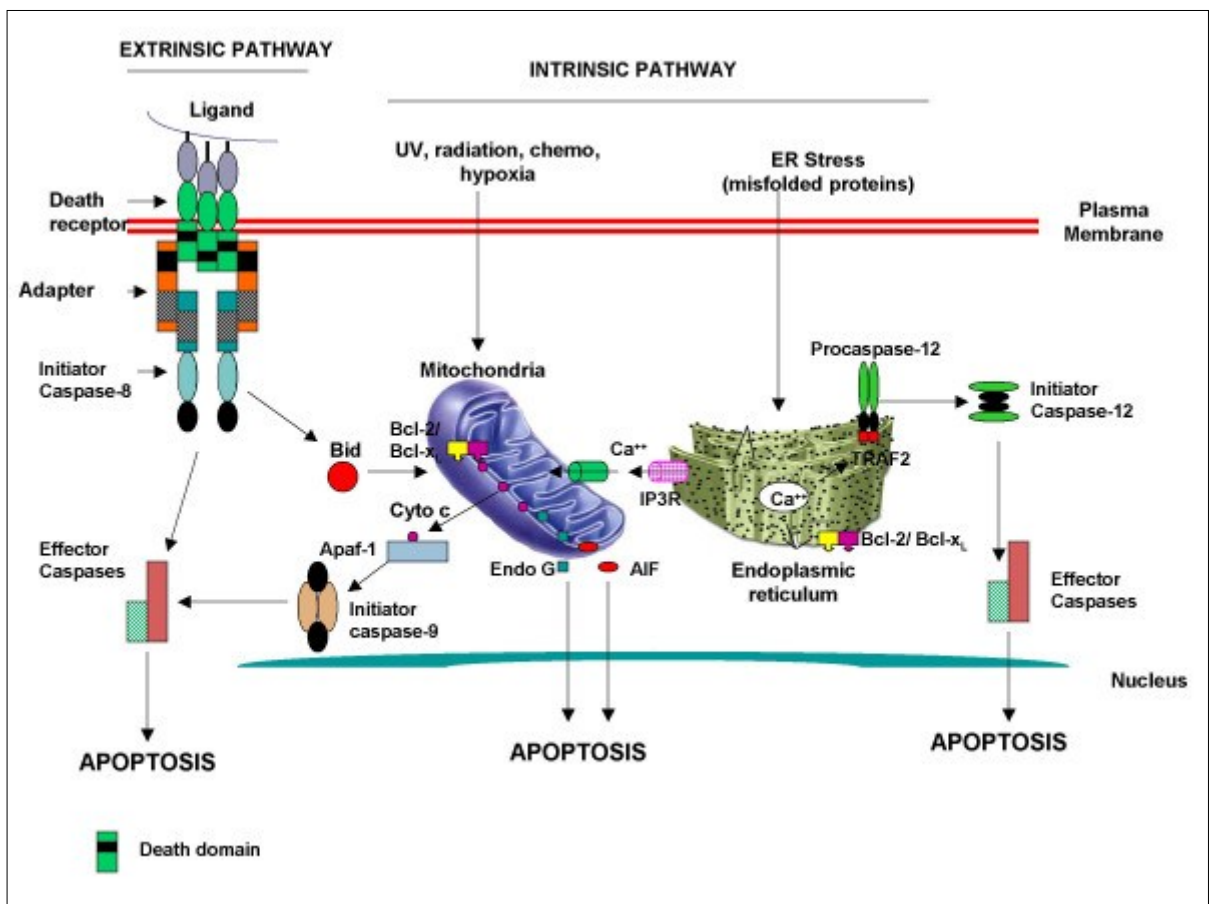
ภาพ 2 Genetic mutations และกลไกการตายของเซลล์ใน PD (Vila and Przedborski, 2004)

แม้ว่าภาวะ oxidative / nitrative stress และ mitochondrial dysfunction จะเป็นสมมติฐานหลักในสาเหตุการตายของ dopaminergic neurons ทั้งในรูปแบบ acute และ familial PD แต่กลไกและปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ใน sporadic PD ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนแน่นอน PD ที่พบในผู้สูงอายุส่วนใหญ่จึงเป็น complex disease ที่เกิดจากปัจจัยหลาย ๆ อย่างร่วมกัน เป้าหมายแนวทางการจัดการกับโรค จึงมุ่งเน้นในเรื่องของการศึกษากลไกของปัจจัยเสี่ยงต่าง ๆ ในการทำให้เกิดโรค เพื่อหาทางป้องกัน ตัดทอน บำบัดพิษ ฟันฟู ลดหรือชะลอการตายของเซลล์

บทบาทของ mitochondria และการตายของเซลล์แบบ apoptosis

Mitochondria มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการตายของเซลล์ โดยภายใน mitochondria จะมีสารที่จะเหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis (pro-apoptotic proteins) เช่น apoptosis inducing

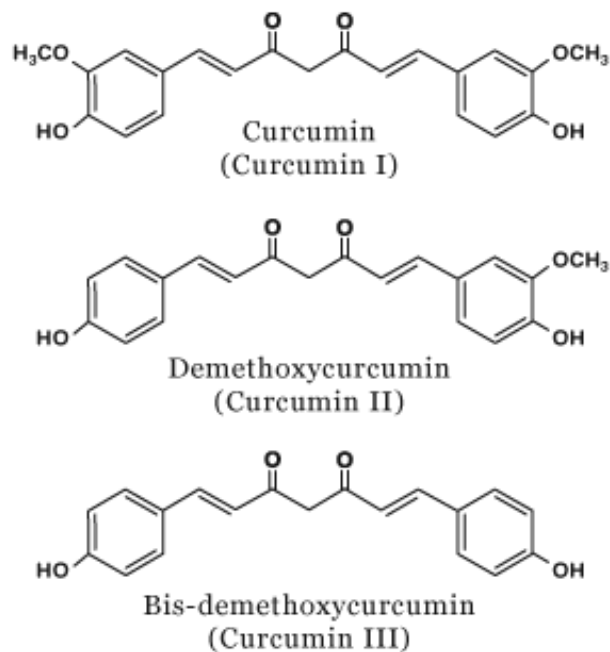
factor (AIF), Smac/DIABLO, EndoG และ cytochrome C ซึ่งสารเหล่านี้จะสามารถออกมาจาก mitochondria สู่ cytosol ได้ทาง permeability transition pore (PTP) ที่อยู่บน mitochondrial outer membrane ได้ อย่างไรก็ดีตามในสภาวะปกติ pores นี้จะถูกควบคุมโดยโปรตีน Bcl-2 family ไม่ให้สารเหล่านี้ออกมา เมื่อมีสิ่งกระตุ้นในสภาวะต่าง ๆ เช่น สารเคมี เคมีบำบัด รังสี ultraviolet และ free radicals ก็จะทำให้สมดุลของ Ca^{++} เสียไป เกิดการรั่วของ PTP ดังนั้น pro-apoptotic protein จึงสามารถออกไปสู่ cytosol ได้ โดย AIF และ EndoG จะเข้าไปใน nucleus เหนี่ยวนำให้เกิด chromatin condensation และ DNA fragmentation ส่วน cytochrome C จะไปจับกับ apoptosis protein-activating factor 1 (Apaf-1) เหนี่ยวนำให้ pro-caspase-9 มารวมตัวกันด้วย เป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่า apoptosome การเกิด apoptosome จะกระตุ้นให้ pro-caspase-9 สามารถย่อยตัวเองเป็น caspase-9 และเหนี่ยวนำให้ effector caspases ทำงาน (ภาพที่ 3) ซึ่งทำให้ เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ตามมา (Karp, 2008)



ภาพ 3 แสดงขบวนการเกิด apoptosis โดย mitochondria เป็นตัวกลางที่สำคัญของ intrinsic pathway (Gupta et al., 2006)

ขมิ้นชัน (curcumin หรือ turmeric)

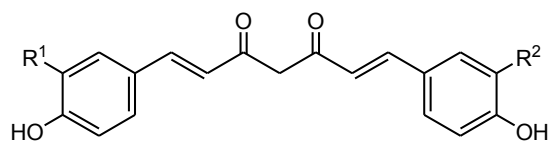
ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) เป็นพืชตระกูลขิง เหง้าตากแห้งและบดใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่น รส และสีในอาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นยารักษาโรคประจำบ้านกันอย่างแพร่หลายมาเป็นระยะเวลายาวนานแล้ว เช่น ช่วยลดกรด ขับลม แก้ปวดท้อง นอกจากเป็นยาแล้วยังใช้เป็นสีย้อม และเครื่องสำอางได้อีกด้วย สารสำคัญจะอยู่ในเหง้าของขมิ้น ประกอบด้วยสาร curcumin หรือ diferuloylmethane ประมาณ 77% ที่เหลือ 20-25% เป็น desmethoxycurcumin และ bisdesmethoxycurcumin (Jayaprakasha et al., 2002)



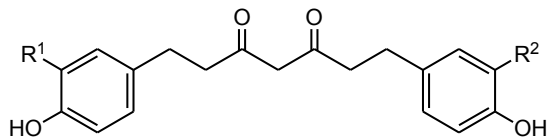
ภาพ 4 แสดงลักษณะของพืชสมุนไพรขมิ้นชันและโครงสร้างของสารหลักที่พบในสารสกัด curcumin
ที่มา <http://curcumin-turmeric.net/>

Curcumin เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดที่ทำให้ขมิ้นชันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งมีผลการวิจัยมากมาย ที่เกี่ยวข้องกับคุณสมบัติ antioxidant ตัวอย่างเช่น curcumin กระตุ้นการแสดงออกของ human glutathione S- transferase P1 (GSTP1) ใน HepG2 cells ซึ่ง glutathione นี้เป็น detoxifying enzyme ที่สำคัญ (Nishinaka et al., 2007) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าผลของการกระตุ้น Nrf2/antioxidant response element (ARE) signaling pathway โดย curcumin นั้นมี protein kinase C เป็นตัวควบคุมร่วมด้วย (Rushworth et al., 2006)

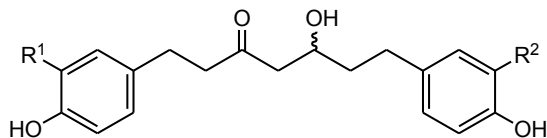
Curcumin หรือ diferuloylmethane เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน ethanol, alkalis, ketone, acetic acid และ chloroform อย่างไรก็ตามสารละลาย curcumin จะไม่เสถียร แต่จะคงตัวใน cell culture medium ที่มี 10% fetal calf serum และในเลือดซึ่งพบว่าหลังจากที่ผ่านการ incubate เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะยังคงเหลือ curcumin อยู่ประมาณ 50% (Wang et al., 1997) ดังนั้นจึงมีการปรับโครงสร้างสังเคราะห์อนุพันธ์ของ curcuminoid ขึ้นมาใช้ เพื่อลดข้อจำกัดและทำให้สามารถศึกษาผลของ curcumin ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่งสาร curcuminoid analogs ที่นำมาศึกษาในโครงการนี้จะเป็นผลมาจากการคิดค้นวิจัย ปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เหมาะสมกับการทดลอง นักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร curcuminoid ไปเป็น analog จำนวนทั้งสิ้น 13 ชนิดของ curcuminoids ดังแสดงในภาพที่ 5 (Suksamran et al., unpublished result.) ที่เป็น metabolites ของ curcuminoids และมีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และต้านสารอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ที่ดีกว่า curcumin จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้ไปใช้ในการศึกษาวิจัยนี้



- 1, $R^1 = R^2 = \text{OMe}$ (Curcumin)
- 2, $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OMe}$ (Demethoxycurcumin)
- 3, $R^1 = R^2 = \text{H}$ (Bisdemethoxycurcumin)
- 4, $R^1 = \text{OH}, R^2 = \text{OMe}$ (Mono-O-demethylcurcumin)
- 5, $R^1 = R^2 = \text{OH}$ (Di-O-demethylcurcumin)
- 6, $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OH}$ (O-Demethyldemethoxycurcumin)



- 7, $R^1 = R^2 = \text{OMe}$ (Tetrahydrocurcumin)
- 8, $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OMe}$ (Tetrahydrodemethoxycurcumin)
- 9, $R^1 = R^2 = \text{H}$ (Tetrahydrobisdemethoxycurcumin)



- 10, $R^1 = R^2 = \text{OMe}$ (Hexahydrocurcumin)
- 11a, $R^1 = \text{H}, R^2 = \text{OMe}$ (Hexahydrodemethoxycurcumin, isomer 1)
- 11b, $R^1 = \text{OMe}, R^2 = \text{H}$ (Hexahydrodemethoxycurcumin, isomer 2)
- 12, $R^1 = R^2 = \text{H}$ (Hexahydrobisdemethoxycurcumin)

ภาพ 5 แสดงสูตรโครงสร้างของ curcuminoid analogs 13 ชนิด

ผลของ curcumin ต่อการเกิด apoptosis และ mitochondria

Chan และคณะ (2003) พบว่า curcumin สามารถช่วยลดการเกิด reactive oxygen species (ROS) จากแสง ultraviolet ใน *in vitro* ได้ ซึ่งแสง ultraviolet นี้จะไปกระตุ้น c-Jun N-terminal kinase (JNK), mitochondrial membrane potential (MMP) เพิ่มขึ้น พร้อมทั้งมีการหลั่ง cytochrome C ออกมา กระตุ้น caspases และทำให้เซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด ส่วน Chen และคณะ (Chan et al., 2003) พบว่า curcumin สามารถป้องกัน PC12 cells จาก MPP^+ ได้ โดยพบว่ามี overexpression ของ Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein และลดการสูญเสีย mitochondrial membrane potential (MMP) โดยระดับของ ROS และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับ MPP^+ จึงมีความเป็นไปได้ว่ากลไกการปกป้องเซลล์จาก ROS และ iNOS ของ curcumin นั้นดำเนินการผ่านทาง Bcl-2 และ mitochondria (Chen et al., 2006)

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษากลไกที่ทำให้เกิดการตายแบบที่มี mitochondria เป็นเป้าหมายและศูนย์กลาง ของเซลล์ประสาทพาร์กินสัน SK-N-SH ที่มีคุณสมบัติใกล้เคียงกับ dopaminergic neurons
2. เพื่อศึกษาผลกระทบต่อ mitochondria ของสารเหนี่ยวนำการตายโดยทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นปัจจัยหลักที่ก่อให้เกิด neurodegenerative diseases ได้
3. เพื่อศึกษาผลของ curcuminoid analogs ในการช่วยปกป้อง mitochondria จากสภาวะกลไกการเหนี่ยวนำต่าง ๆ ที่จะนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทพาร์กินสัน

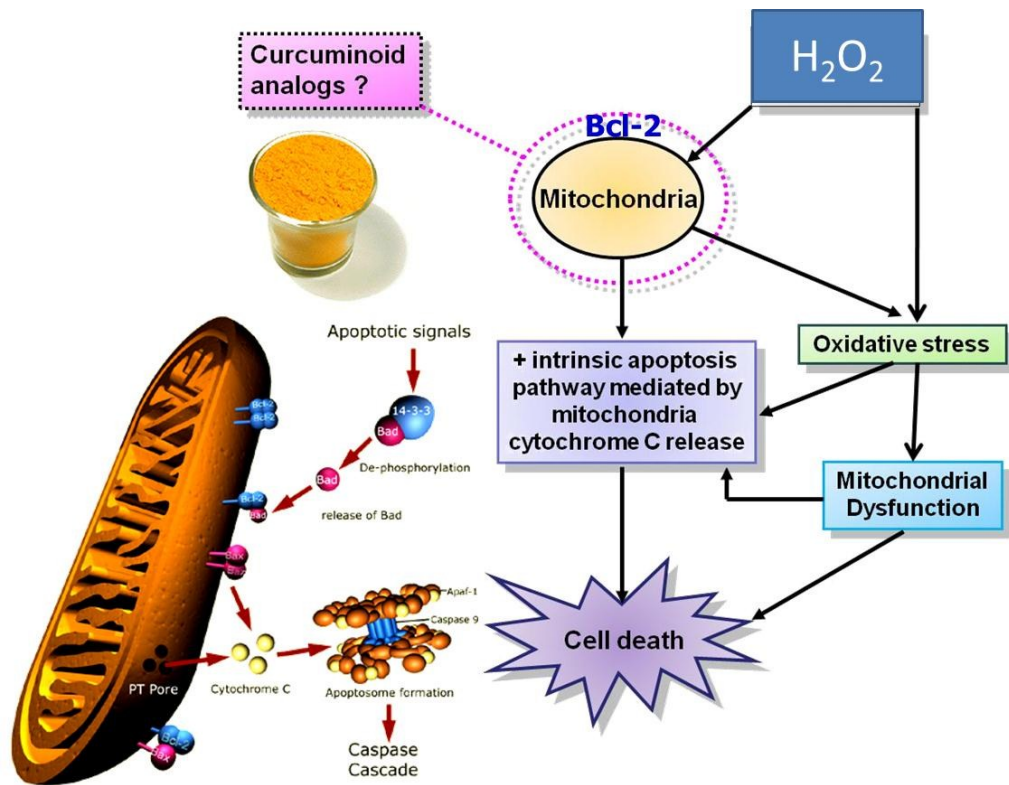
ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลในด้าน neuroprotection ของ curcuminoid analogs ต่อการตายของเซลล์ประสาทพาร์กินสันในหลอดทดลอง ซึ่งได้รับสารที่เหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตาย ที่มีกลไกผ่าน mitochondria เป็นหลัก โดยมีแนวคิดที่ว่า mitochondrial dysfunction เป็นสาเหตุการตายของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยที่เป็นโรค neurodegenerative disease อย่างเช่นโรค Parkinson หาก curcuminoid analogs สามารถคงสภาพหรือฟื้นฟูการทำหน้าที่ของ mitochondria ได้ ก็จะช่วยป้องกัน พิ้นฟู ลด หรือ ชะลอ อาการของผู้ป่วยที่เป็นโรคได้

สมมติฐานของการวิจัย

ทฤษฎี	การตายของ dopaminergic neurons เป็นสาเหตุที่ทำให้เกิด parkinsonism
สมมติฐาน	Mitochondria เป็นเป้าหมายและศูนย์กลางของสาเหตุกลไกการตายของเซลล์ ดังนั้นการปกป้อง mitochondria ไว้ จากปัจจัยต่าง ๆ จะช่วยป้องกัน และ/หรือ ลดการตายของเซลล์ประสาทได้

กรอบแนวความคิดและความเชื่อมโยงของปัญหา แสดงความสัมพันธ์ไว้ในไดอะแกรมข้างล่างนี้



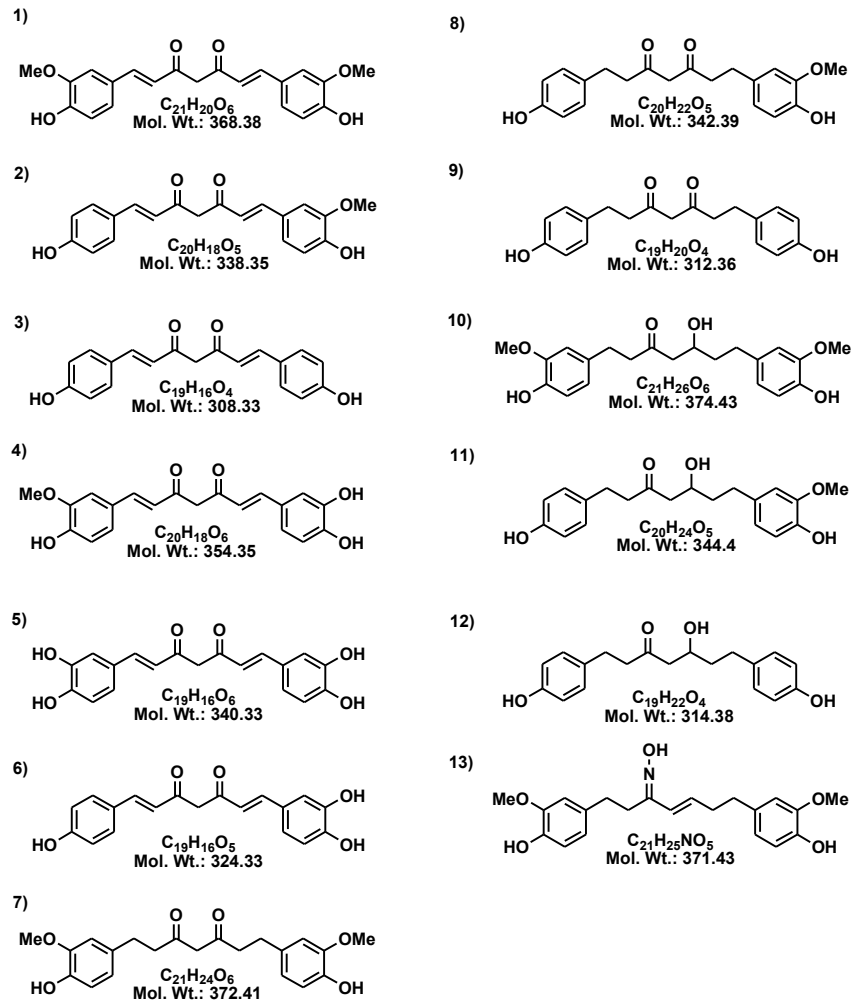
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. สามารถเชื่อมโยงความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับสาเหตุและกลไกที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ไปสู่การพัฒนาการป้องกัน รักษา หรือบรรเทาอาการให้กับผู้ป่วยในกลุ่มอาการ parkinsonism ได้
2. สามารถนำผลการศึกษาไปพัฒนาองค์ความรู้ทางวิทยาศาสตร์ให้สมบูรณ์ เพื่อรองรับและยกระดับ คุณประโยชน์จากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ซึ่งสามารถช่วยป้องกันการเกิด พิ้นฟู หรือบรรเทาอาการของ โรคที่เกิดจากความเสื่อมในระบบประสาท ที่เมื่อเป็นแล้วจะไม่มีทางรักษาให้หายขาดได้
3. มีการตีพิมพ์ผลงานวิจัย ในวารสารวิชาการในระดับชาติหรือนานาชาติ อย่างน้อย 1 ฉบับ

บทที่2 วิธีดำเนินการวิจัย

1. สารสกัดที่ใช้ในงานวิจัย

Curcuminoids และ analogs เป็นสารสกัดที่ได้รับความนิยมจากนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ซึ่งการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบสารสกัด curcuminoids สารโครงสร้างที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็น natural curcuminoids คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ตามลำดับ และ analogs สารโครงสร้างที่ 4, 5 ซึ่งเป็น demethylation products ของสารที่ 1 และ analog สารโครงสร้างที่ 6 เป็น demethylation product ของสารที่ 2 ดังแสดงในภาพ 6



ภาพ 6 แสดงโครงสร้าง และน้ำหนักโมเลกุลของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs

2. ตัวอย่างที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง Human neuroblastoma (SK-N-SH) จาก American Type Culture Collection (ATCC)

3. รูปแบบการวิจัย

การศึกษาผลของ curcuminoid analogs ต่อการต้านการตายแบบ apoptosis ในเซลล์ประสาทพะละเลี้ยง (SK-N-SH) ที่ถูกเหนี่ยวนำโดยสารที่ก่อให้เกิด oxidative stress คือ H_2O_2 ในระดับความรุนแรงที่แตกต่างกัน มีรูปแบบการวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experiment study design)

4. วิธีการดำเนินงานวิจัย

4.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์พะละเลี้ยง Human Neuroblastoma (SK-N-SH) เพาะเลี้ยงด้วยอาหารสูตร modified essential medium (MEM) และ fetal bovine serum (FBS) ในสภาวะปลอดเชื้อที่ควบคุมอุณหภูมิ $37^{\circ}C$ และ $5\%CO_2$

4.2 การนำเซลล์จากการแช่แข็งในถังไนโตรเจนเหลวที่อุณหภูมิ $-196^{\circ}C$ มาเพาะเลี้ยง (Thaw cells)

1. นำหลอดที่บรรจุเซลล์แช่แข็งอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$ ทันที หลังจากเซลล์ละลาย ทำการถ่ายเซลล์ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์
2. นำเข้าตู้เพาะเลี้ยง (incubator $37^{\circ}C$, $5\%CO_2$) เป็นเวลา 24 ชม.

4.3 การถ่ายเลี้ยงเซลล์ (Subculture) ด้วยการใช้เอนไซม์ trypsin

1. อุ่นอาหารเลี้ยงเซลล์และสารละลาย PBS ให้ได้อุณหภูมิใกล้เคียงกับอุณหภูมิของเซลล์เพาะเลี้ยง ส่วน trypsin นำมาไว้ในอุณหภูมิห้อง
2. ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกให้หมด และทำการล้างผิวเซลล์ด้วยสารละลาย PBS แล้วทำการดูดสารละลาย PBS ที่ทิ้ง
3. ใส่ trypsin ลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ เอียงภาชนะเพื่อให้ trypsin คลุมทั่วผิวเซลล์ประมาณ 10-20 วินาที แล้วทำการดูด trypsin ออก
4. นำไปบ่มในตู้บ่มที่อุณหภูมิ $37^{\circ}C$, $5\%CO_2$ ประมาณ 5 นาที แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์บนพื้นผิวภาชนะ ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อกระจายให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ
5. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไป

4.4 การนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่อง hemacytometer โดยวิธี trypan blue exclusion assay

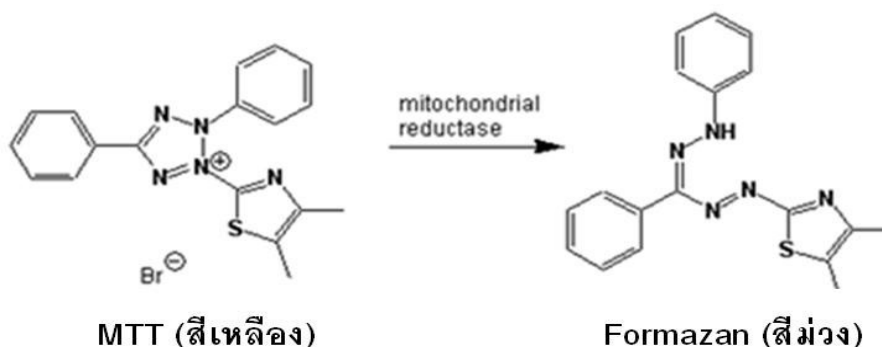
1. หลังจากทำการ trypsinize ได้เซลล์ suspension ทำการแบ่งเซลล์ใส่ tube
2. นำเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 rpm เวลา 5 นาที ดูดสาร supernatant ออกให้หมด แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์
3. ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อกระจายให้ได้เซลล์เดี่ยวๆ
4. นำเซลล์มาผสมกับ trypan blue แล้วทำการนับด้วยเครื่อง hemacytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

4.5 การเตรียมสารสกัด curcuminoids และ analogs

สารสกัด curcuminoids และ analogs ถูกทำละลายด้วยตัวทำละลาย dimethylsulfoxide (DMSO) ซึ่งการเตรียมชุดสกัด curcuminoids และ analogs ที่ความเข้มข้นต่างกัน ทำโดยการเจือจางความเข้มข้นด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (Dulbecco's Modified Essential Medium) ที่ไม่มีส่วนผสมของ serum และจะถูกนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ $-80^{\circ}C$ อนาคตเซลล์

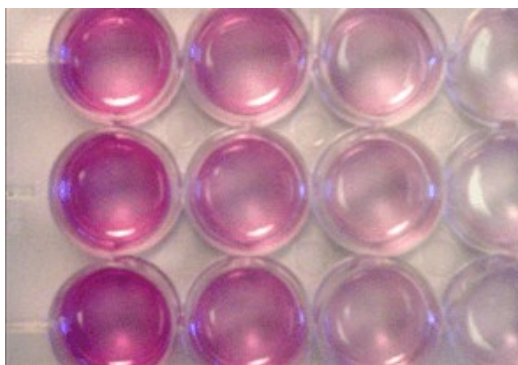
4.6 ศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ (Cell viability)

การศึกษาการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จะทำการทดสอบด้วยเทคนิค MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ซึ่งเป็นการศึกษาการทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ (enzyme) ที่พบใน mitochondria ของเซลล์ที่มีชีวิต โดยเอนไซม์ใน mitochondria จะทำปฏิกิริยากับสีของ MTT จากเดิมสีของ MTT เป็นสีเหลืองถูกเปลี่ยนกลายเป็นผลึกสีม่วงที่เรียกว่า Formazan crystal



ภาพ 7 แสดงการเปลี่ยนโครงสร้างของ MTT เป็น formazan โดย mitochondrial reductase

ที่มา : American Type Culture Collection ATCC Product, 2002



ภาพ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสี MTT ตามการมีชีวิตของเซลล์ หลังทำการละลายผลึกสีม่วง (Formazan crystal) พบว่า การมีชีวิตของเซลล์แสดงออกโดยการเกิดสี ซึ่ง สีม่วงเข้ม แสดงการมีชีวิตของเซลล์มาก ส่วนสีม่วงอ่อน แสดงการมีชีวิตของเซลล์น้อย

ที่มา : <http://www.markergene.com/ProductDetails.php/M1475>

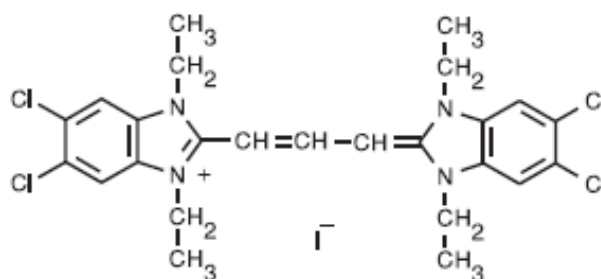
ในการศึกษาสารที่นำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ จะทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของแคดเมียม (CdCl_2) และสารสกัด curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SK-N-SH) ในการทดสอบจะทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ลงใน 96 well-plate ที่ความเข้มข้นของเซลล์ 3×10^4 cells/well ที่สภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ

ทำการเติมสารที่ต้องการทดสอบนำมาใช้ในการศึกษาเลี้ยงต่อไปอีก 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และเติมสาร MTT ที่ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ในอัตราส่วน 1:9 ตามลำดับ จากนั้นนำเซลล์ไปเลี้ยงให้อยู่ในสภาวะควบคุมอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ 5% CO₂ เป็นเวลา 1.30 ชั่วโมง จะเกิดผลึกสีม่วง (Formazan crystal) และทำการละลายด้วยตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วนำไปวิเคราะห์หาค่า % cell viability ด้วยเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น (Optical density; OD) 540 นาโนเมตร (Bio-Tek, Instruments, Winooski, VT, USA) สำหรับกลุ่มเซลล์ control จะทำการเพาะเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ในสภาวะเดียวกัน โดยค่า OD ที่ได้นำไปคำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) โดยเทียบให้กลุ่มควบคุมเป็น 100% ดังนี้

$$\% \text{ Cell Viability} = \frac{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ที่ทดสอบ}}{\text{ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของเซลล์ควบคุม}} \times 100$$

4.7 ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Mitochondrial membrane potential (MMP)

Mitochondria เป็นศูนย์กลางที่สำคัญที่เกี่ยวข้องในกระบวนการตายของเซลล์แบบ อะพอพโทซิส ภายในเยื่อหุ้มชั้นของ mitochondria มีการทำงานแลกเปลี่ยนอิเล็กตรอน (e⁻) เกิดเป็นศักย์ไฟฟ้าอยู่ในเยื่อหุ้มชั้นของ mitochondria ที่เรียกว่า mitochondrial membrane potential (MMP) หากเมื่อการทำหน้าที่ของ mitochondria ผิดปกติไป ทำให้เกิดการสูญเสียของ mitochondrial membrane potential นำไปสู่การปล่อยกลุ่มสาร apoptogenic factors ที่ภายใน mitochondria เช่น cytochrome C ออกสู่ cytosol ซึ่งจะทำให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสตามมา

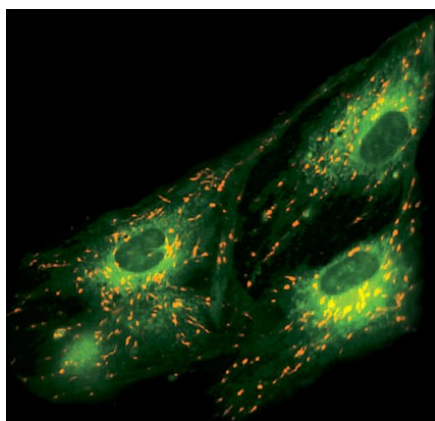


ภาพ 9 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสี JC-1

ที่มา : <http://probes.invitrogen.com/media/pis/mp34152.pdf>

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้สีย้อม JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น lipophilic cationic dye ในภาวะเซลล์ปกติ จะมีระดับ MMP สูง เมื่อนำเซลล์ย้อมด้วยสี JC-1 สีสามารถแทรกซึมเข้าสู่ mitochondria และจะพบการ

แสดงของสี JC-1 ติดสีส้มแดง อยู่ภายใน mitochondria โดยการทำงานของสี JC-1 จะผ่านเข้าไปสะสมใน mitochondrial matrix เกิดการเกาะกลุ่ม (aggregates) เปลี่ยนจากสีเขียว กลายเป็นสีส้มแดง ดังแสดงในภาพ 10 แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้น หรือ เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส การทำงานของ mitochondria ผิดปกติ เกิดการสูญเสีย MMP ส่งผลทำให้สี JC-1 ไม่สามารถผ่านเข้าไปใน mitochondrial matrix สี JC-1 จึงแสดงการติดเป็นสีเขียว คั่งอยู่ใน cytoplasm ของเซลล์ ผลที่ได้สามารถวิเคราะห์ผลได้ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ ซึ่งสีแดงมีความยาวคลื่น (Optical density) 585/590 นาโนเมตร ส่วนสีเขียวมีความยาวคลื่น (Optical density) 510/527 นาโนเมตร ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงของสี JC-1 บ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential และสามารถบ่งบอกถึงสุขภาพของเซลล์ได้



ภาพ 10 แสดงการติดของสี JC-1 ภายใน mitochondria ของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ที่มา : <http://www.med.unipg.it/imagelab/mitoch.html>

4.8 การสกัดโปรตีนและการวัดปริมาณโปรตีน

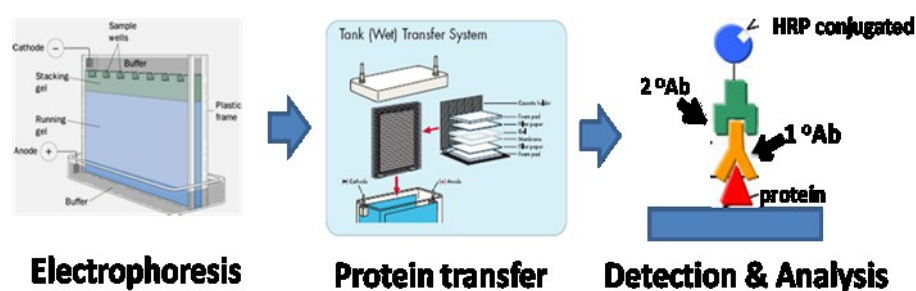
การศึกษาตรวจวัดปริมาณโปรตีน โดยการสกัดแยกโปรตีน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ศึกษาโปรตีนทั้งใน cytosol และ mitochondria โดยใช้ชุดสกัด cytosol และ mitochondria buffer Kit (cytosol and Mitochondria Protein Extraction Kit) จากบริษัท Bio basic (Cat.no.BSP051) ในขั้นตอนการสกัด หลังจากเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบ เก็บเซลล์ และล้างเซลล์ด้วยสารละลาย 1X PBS ที่แช่เย็น นำไปปั่น (vortex) เพื่อให้ละลาย PBS ชะล้างทั่วเซลล์ จากนั้นทำการปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที (ทำการล้างเซลล์ซ้ำ 2 รอบ) หลังจากปั่นตกครบรอบ จะได้เซลล์เกาะกลุ่ม (cell pack) ตกอยู่ที่ก้นหลอด เติมสารละลาย cytosol buffer ที่มีส่วนผสมของ proteinase และ DTT (อัตราส่วน 1ml:1μl:1μl) และปั่น (vortex) เพื่อให้เซลล์แตก ซึ่งขั้นตอนการทำให้เซลล์แตกเพื่อให้ได้โปรตีนใน cytosol ทำโดยปั่นเซลล์ (vortex) เป็นเวลา 5 นาที และทิ้งไว้เพื่อให้สารละลายทำการย่อย (lysis) เพื่อให้ได้โปรตีน เป็นเวลา 10 นาที (ทำซ้ำ 3 รอบ) หลังจากครบรอบทำการปั่นตกด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 3000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 นาที ซึ่งจะได้สารละลายด้านบน (supernatant) ย้าย supernatant ที่ได้ นำไปใส่ในหลอดที่แช่เย็นไว้ (pre-cold tube) อันใหม่ และทำการปั่นเหวี่ยงที่

ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที จะได้สาร (supernatant) นำสาร (supernatant) ที่ได้ประมาณ 80% จากปริมาณทั้งหมด (คงเหลือไว้ที่หลอดประมาณ 20%) นำไปใส่ในหลอดที่แช่เย็นไว้ (pre-cold tube) อันใหม่ สิ่งที่ได้คือ cytosol proteins จากนั้นส่วนที่เหลือ 20% เติมสารละลาย mitochondria buffer ที่มีส่วนผสมของ proteinase และ DTT (อัตราส่วน 500 μ l:0.5 μ l:0.5 μ l) และทำการปั่น (vortex) เพื่อให้ได้ organelles หรือ mitochondria โดยปั่นเป็นเวลา 5 นาที และทิ้งไว้ 10 นาที (ทำซ้ำ 3 รอบ) หลังจากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 13,000 rpm ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที สิ่งที่ได้คือ mitochondria proteins และเก็บโปรตีนที่ -80 องศาเซลเซียส

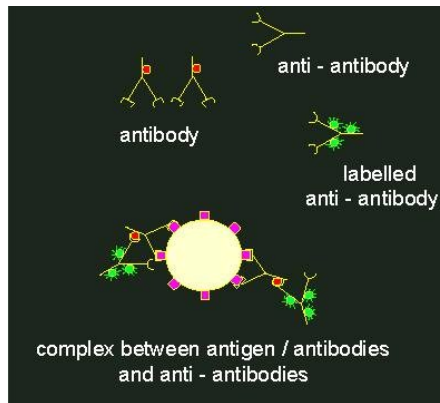
ในส่วนการวัดปริมาณโปรตีนใช้ Bradford protein assay เทียบกับ BSA (Bovine serum albumin) standard โดยนำโปรตีนมาเจือจาง (dilute) 20x (โปรตีนจาก stock 1 μ l + DW 19 μ l) เติม Bradford reagent ซึ่งวัดปริมาณโปรตีนด้วยเครื่อง Microtiter plate reader ที่ความยาวคลื่น 620 นาโนเมตร

4.9 Western blot analysis

หลังจากได้โปรตีน และวัดปริมาณโปรตีน นำโปรตีนที่ได้มาทำการแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis โดยใช้กระแสไฟฟ้า 180 Volts เป็นเวลา 50 นาที จากนั้นทำการย้ายโปรตีนบนเจลไปยังแผ่น membrane polyvinylidene fluoride (PVDF) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 200 mA เป็นเวลา 30 นาที ทำการ block แผ่น membrane ด้วยหางนม 5% (5 % skimmed milk) ทิ้งไว้ overnight ที่สภาวะอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วทำการ blotting ต่อโปรตีนที่ต้องการสำหรับโปรตีน Bcl-2 ใช้ mouse anti-Bcl-2 เป็น primary antibody ความเข้มข้น 1:1000 ใน TBST บ่มไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สำหรับโปรตีน Bax ใช้ mouse anti-Bax เป็น primary antibody ความเข้มข้น 1:1000 ใน TBST บ่มไว้เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และใช้ Actin ใช้ mouse anti-actin เป็น loading control บ่มไว้เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการล้าง primary antibody ด้วย TBST แล้วจึงเติม secondary antibody ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ peroxidase (horseradish peroxidase anti-mouse IgG) ความเข้มข้น 1:40,000 และทำการวิเคราะห์ผลโปรตีนโดย chemiluminescent detection



ภาพ 11A แสดงหลักการ western blot analysis



ภาพ 11B แสดงหลักการเกิดปฏิกิริยาระหว่างแอนติเจน และแอนติบอดี

ที่มา : <http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e17/17j.htm>

4.10 การวิเคราะห์ข้อมูล

ผลการทดลองเชิงปริมาณได้จากค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากการทดลองหรือการตรวจวัดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และรายงานค่าเป็น Mean $\pm$ SD การวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย one-way analysis of variance (ANOVA) และใช้ Bonferri test ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$, $p < 0.01$, $p < 0.001$ ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดคำนวณโดยใช้ SPSS v.11.5 บริษัท SPSS Inc.

5. เครื่องมือ, อุปกรณ์ และสารเคมีที่ใช้ในการวิจัย

5.1 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ (Culture medium preparation)

- 1) Aluminium foil (Aro, Thailand)
- 2) Beaker (Pyrex, Germany)
- 3) Bottle (Duran, Germany)
- 4) Cellulose acetate filter (pore size 0.45 μ m) (Satorius, Germany)
- 5) Cylinder (Pyrex, Germany)
- 6) Distilled water 18 m Ω
- 7) Dulbecco's Modified Essential Medium (DMEM) (GIBCO™, New Zeland)
- 8) Fetal bovine serum (GIBCO™, New Zeland)
- 9) Penicillin/Streptomycin (GIBCO™, New Zeland)
- 10) Polycarbonate filter holder (Satorius, Germany)
- 11) Sodium bicarbonate (Sigma, ST Louis, MO, USA)
- 12) Sterile filter (Variomag®, Germany)
- 13) Vacuum pump (TODAY'S, Rocker400, Taiwan)

5.2 การเลี้ยงเซลล์ (Cell culture)

- 1) Autoclave (Astell, england)
- 2) Bunsen burner (Integra Biosciences, Switzerland)

- 3) Biosafety cabinet (Affinitech, Thailand)
- 4) Cell culture incubator (Sanyo, Japan)
- 5) Centrifuge (Labofuge 400R, Heraeus, Germany)
- 6) Centrifuged tube (Corning[®], Mexico)
- 7) Culture plate (Flacon[®], U.S.A.)
- 8) Cryogenic vial (Cryos[™], Japan)
- 9) Ethanol (Merk, Germany)
- 10) Grass pipette (precicolor HBG, Germany)
- 11) Light inverted microscope (Leica, Germany)
- 12) Pipette aid (Bio-Rad, USA)
- 13) Phosphate buffer saline (Ameresco[®], USA)
- 14) Trypsin (GIBCO[®], Canada)
- 15) Water bath (Heto, Lab Equipment, Denmark)

5.3 การทดสอบความเป็นพิษ และการประเมินการมีชีวิตของเซลล์ (Toxicity test and cell viability evaluation)

- 1) Bunsen burner (Integra Bioscience, Switzerland)
- 2) Cadmium Chloride (CdCl₂) (Sigma cat. no.C3141)
- 3) Centrifuged tube (Corning[®], Mexico)
- 4) Curcumin compound (provided by Prof. Dr. Apichart Suksamran)
- 5) Curcuminoid analog (provided by Prof. Dr. Apichart Suksamran)
- 6) Dimethyl sulfoxide (Sigma, ST Louis, MO, USA)
- 7) Ethanol (Merk, Germany)
- 8) Micropipette (Bio-Rad, USA)
- 9) Microplate shaker (National Labnet, USA)
- 10) Microtiter plate reader (Bio-Tek, Instruments, Winooski, VT, USA)
- 11) Neubauer hemocytometer (Fischer Scientific, Germany)
- 12) Glass pipette (Calbiochem, Germany)
- 13) Pipette Tip (Trefflab, Switzerland)
- 14) Trypan blue (Sigma, St Louis, MO, USA)
- 15) 3-(4,5-dimethylthiazole-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
- 16) (Sigma, St Louis, MO, USA)
- 17) 96-well plate (Nunc[™], Denmark)

5.4 การสกัดโปรตีน

- 1) Bottle (Duran, Germany)
- 2) Cytosol and Mitochondrial protein extraction Kit (Biobasic Inc,
- 3) Canada)
- 4) Distilled water 15 mΩ
- 5) Eppendorf (Trefflab, Switzerland)

- 6) Groves (Semperguard, Thailand)
- 7) Micropipette (Bio-Rad, USA)
- 8) Phosphate buffer saline (Amersco[®], USA)
- 9) Pipette tips (Trefflab, Switzerland)
- 10) Refrigerated centrifuge (D3750 Osterode, Kendro, Germany)
- 11) Vortex (Paramix D-77960, Julabo, Germany)

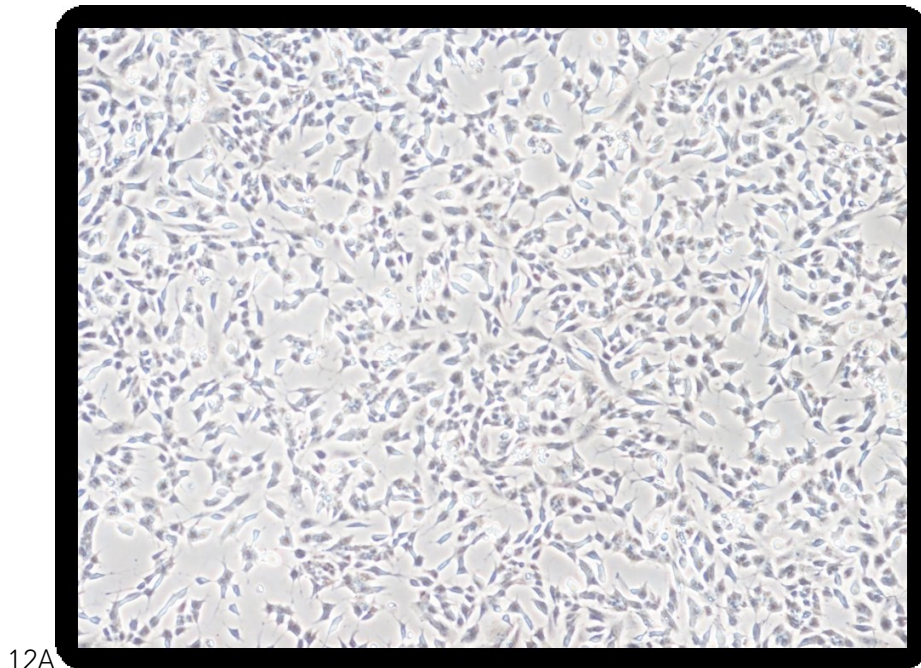
5.5 Western blot analysis

- 1) Acrylamide (Amersham Bioscience, Sweden)
- 2) Ammonium persulfate (Amersham Bioscience, Sweden)
- 3) Acetic acid (Merk, Germany)
- 4) Bromophenol blue (Sigma, ST Louis, MO, USA)
- 5) Casting stand with clamp (Miniprotein[®] System, Biorad, China)
- 6) Chemiluminescent HRP substrate (Immobilon[™] Western, Milipore, USA)
- 7) Chromatography paper (Whatman[®], England)
- 8) Heat block (Wealtec, USA)
- 9) Methanol (AnalaR[®], England)
- 10) Polyvinylidene Difluoride (Amersham Hypond[™]-P, UK)
- 11) Skimmed milk (Morinagamilk, Japan)
- 12) Sodium chloride (Merk, Germany)
- 13) Sodium dodecyl sulfate (Bio basic inc., Canada)
- 14) TEMED (Bio basic inc., Canada)
- 15) Tris-base (Amersco[®], USA)
- 16) Tween 20 (USB, USA)
- 17) Vortex (Paramix D-77960, Julabo, Germany)

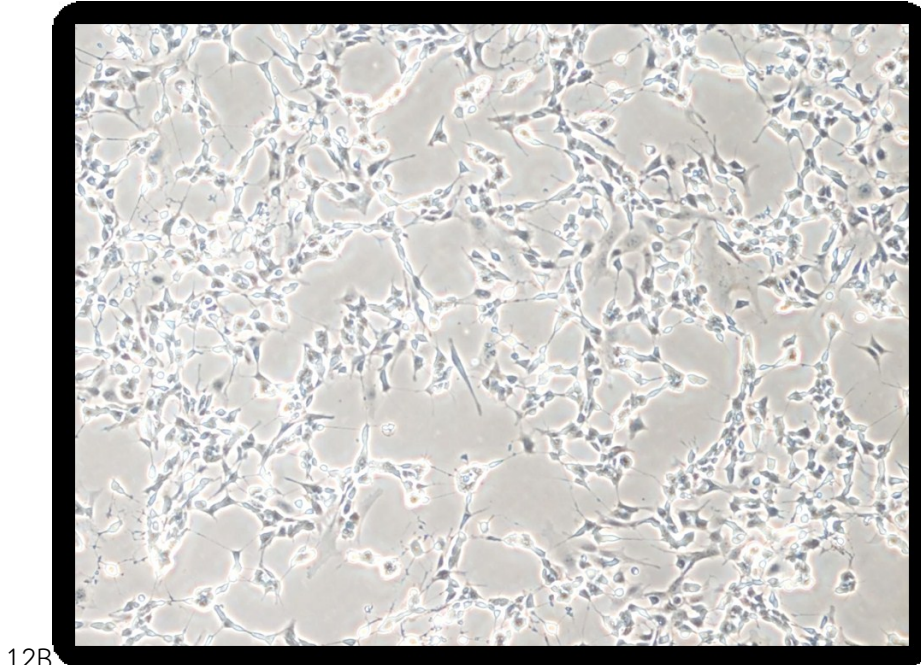
บทที่ 3 ผลการวิจัย

1. ผลความเป็นพิษของ H_2O_2 ต่อเซลล์ประสาท (SK-N-SH)

จากการศึกษาพบว่า H_2O_2 เป็นสารที่มีพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง โดยเมื่อทดลองเลี้ยงเซลล์และให้สาร ความเข้มข้นที่ 50uM เมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง จะเห็นการตายของเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 12 โดยเซลล์จะมีลักษณะหดเล็กลงและมารวมกันเป็นก้อนกลม และหลุดลอยออกมาในที่สุด



12A



12B

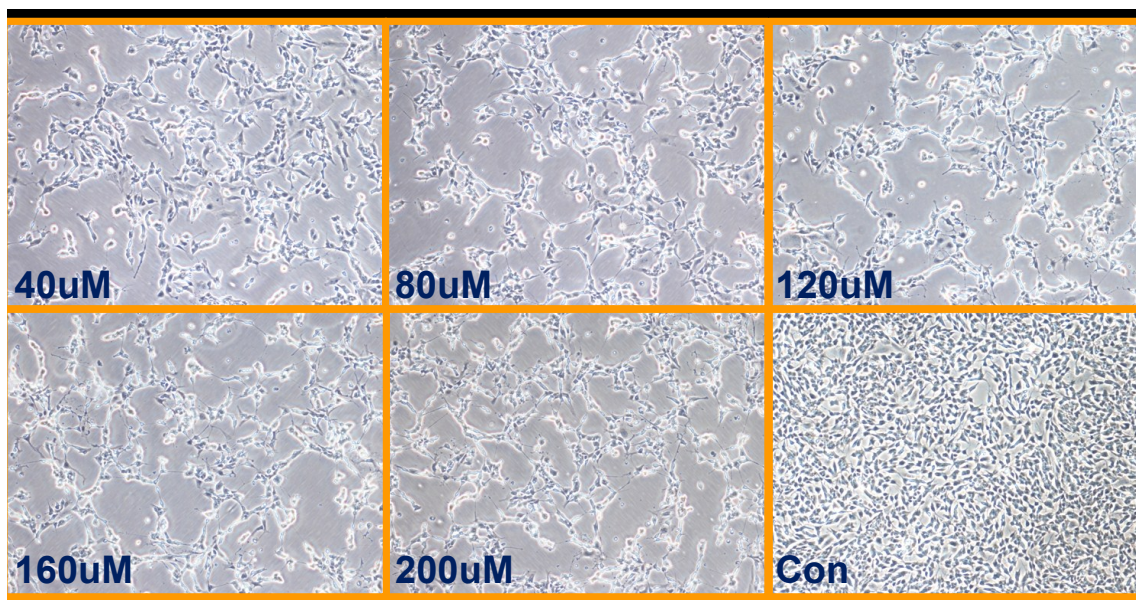
ภาพ 12 แสดงลักษณะของเซลล์ SK-N-SH ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์

12A แสดงลักษณะของเซลล์ที่ไม่ได้รับ H_2O_2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

12B แสดงลักษณะของเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ที่เวลา 24 ชั่วโมง

Dose- dependent

จากการทดสอบความสัมพันธ์ของปริมาณการได้รับ H_2O_2 ต่อการตายของเซลล์ (Dose-dependent) พบว่าเมื่อให้ H_2O_2 ที่มีปริมาณที่สูงขึ้น ในเวลา 24 ชั่วโมงจะพบการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 13

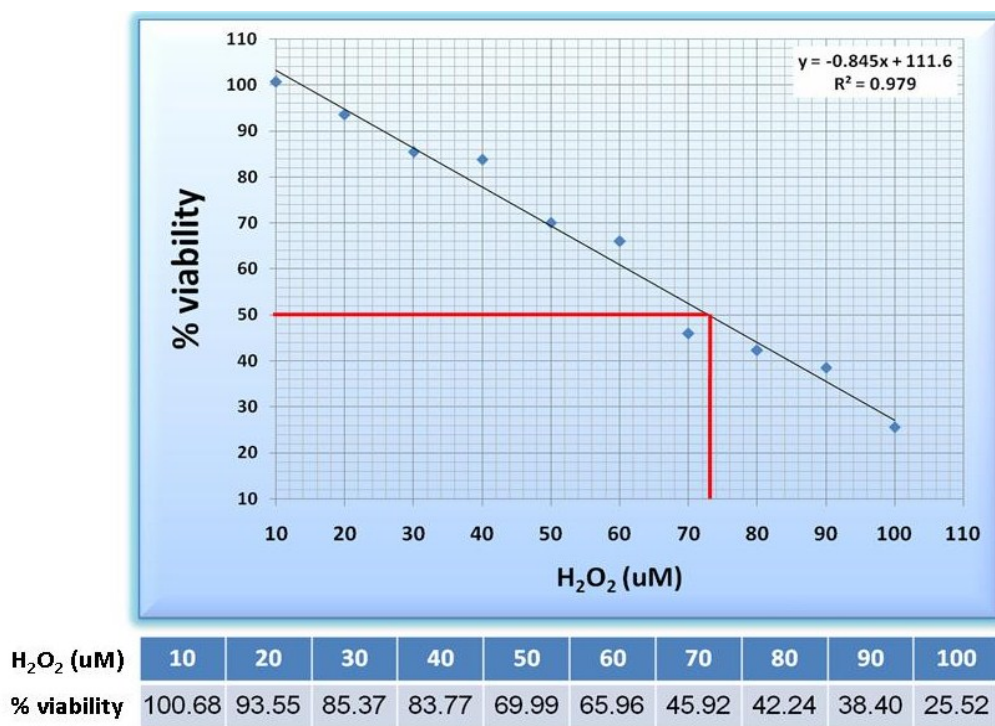


ภาพ 13 แสดงลักษณะของเซลล์ SK-N-SH ที่ได้รับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างกัน (40, 80, 120, 160, 200uM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

สำหรับการทดสอบผลของ H_2O_2 ต่อเซลล์ประสาทพะเลียง มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาหาความเข้มข้น (concentration) ของ H_2O_2 ในการนำไปใช้ทดสอบต่อการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิส โดยทำการทดสอบให้เซลล์ประสาทพะเลียงได้รับ H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10-100uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากการวิเคราะห์การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ด้วยเทคนิค MTT assay พบว่า ในแต่ละความเข้มข้น H_2O_2 (10-100uM) มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ประสาทพะเลียงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยพบว่า ที่ระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 70uM มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงถึง 50% (IC_{50} = inhibitory concentration of 50% growth) ดังแสดงในภาพ 14

จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า ในแต่ละความเข้มข้นของ H_2O_2 มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทพะเลียง เมื่อเซลล์ได้รับ H_2O_2 ที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ส่งผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงมากขึ้นด้วย ซึ่งค่า IC_{50} ที่ได้ทำให้สามารถเลือกใช้ความเข้มข้นของ H_2O_2 ต่อการเหนี่ยวนำการตายในเซลล์ประสาทพะเลียง เนื่องจากที่ระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 70uM มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ถึง 50 % ในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งเป็นระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่มีความเป็นพิษสูง อาจส่งผลให้เซลล์ประสาทพะเลียงเกิดการตายแบบเนโครซิสมากกว่าการตายแบบอะพอพโทซิส ด้วยวัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้เป็นการศึกษาลักษณะการตายแบบอะพอพ

โทซิส โดยจะทำการศึกษาเลียนแบบการได้รับภาวะ oxidative stress อย่างน้อย ๆ แล้วค่อยๆสะสมจนทำให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเกิดการตายแบบอะพอพโทซิส ดังนั้นในการศึกษาค้างนี้จึงได้เลือกใช้ระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่ต่ำกว่า 70uM ซึ่งในการทดลองผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงหลังได้รับการเหนี่ยวนำการตายด้วย H_2O_2 พบว่า สาร curcuminoids และ analogs สามารถช่วยเพิ่มการมีชีวิตของเซลล์มากขึ้น ที่ระดับความเข้มข้นของ H_2O_2 50uM



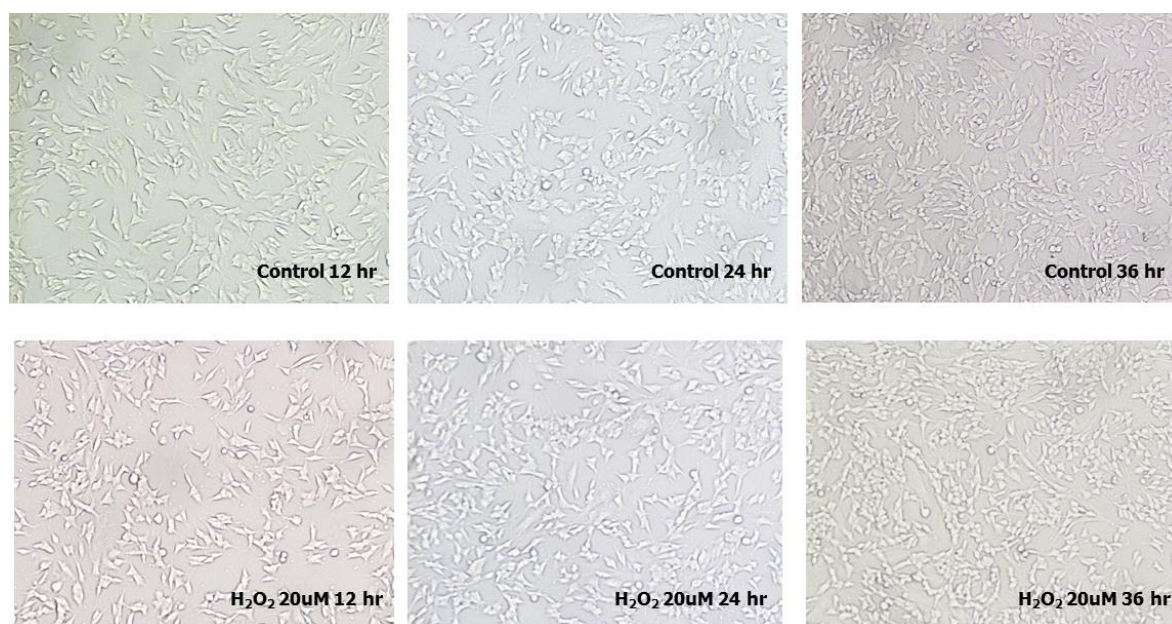
ภาพ 14 กราฟแสดงความสัมพันธ์ของปริมาณ H_2O_2 กับ % viability ของเซลล์ โดย MTT assay

Time- dependent

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของระยะเวลาการได้รับ H_2O_2 ต่อการตายของเซลล์ (Time-dependent) พบว่าเมื่อให้ H_2O_2 ในปริมาณที่ต่ำ เป็นเวลา 12, 24 และ 36 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไปมากขึ้นการตายของเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 จะมีมากขึ้น แม้ว่าปริมาณที่ได้จะน้อยก็ตาม ดังแสดงในตารางที่ 1 และ รูปที่ 15

ตารางที่ 1 แสดงผลการคำนวณ % การตายของเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 20uM ที่เวลาต่างกัน (Time-dependent)

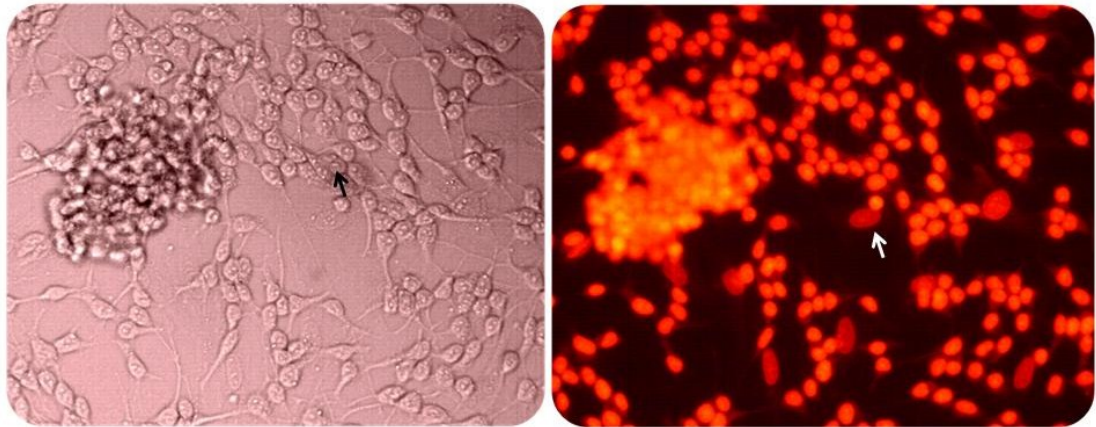
กลุ่ม	เวลา (ชั่วโมง)	เซลล์ทั้งหมด	เซลล์ที่มีชีวิต	เซลล์ที่ตาย	% เซลล์ตาย
Control	12	262	255	7	2.68
H_2O_2 20uM	12	322	302	20	6.21
Control	24	353	323	30	8.50
H_2O_2 20uM	24	405	352	53	13.08
Control	36	430	380	50	11.62
H_2O_2 20uM	36	402	328	74	18.40



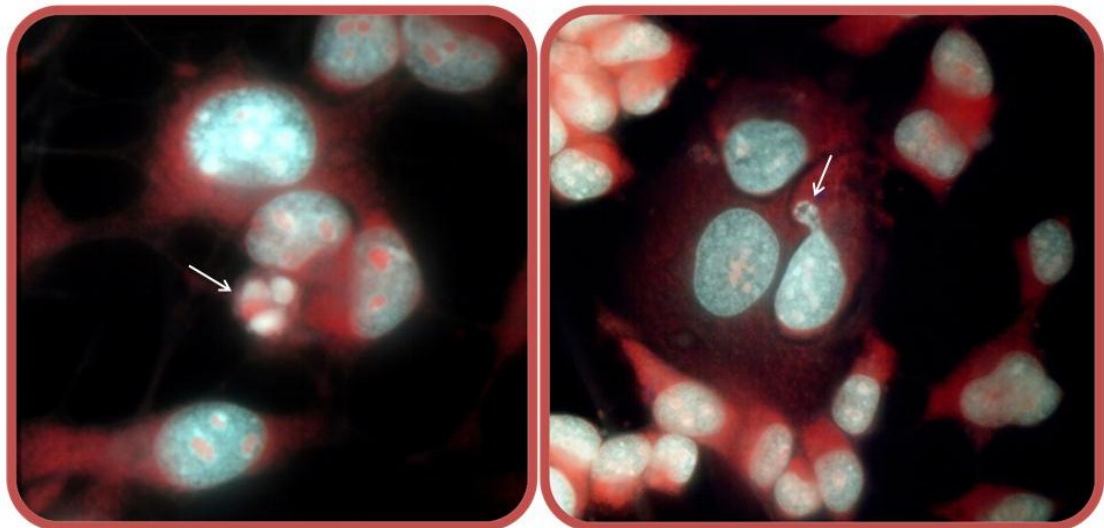
ภาพ 15 แสดงลักษณะของเซลล์ SK-N-SH ที่ได้รับ H_2O_2 ที่เวลาต่างกัน (Time-dependent)

2. ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทพาะเลี้ยง (SK-N-SH) เมื่อได้รับ H_2O_2

สำหรับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางด้าน morphology เพื่อทดสอบลักษณะการตายของเซลล์ประสาทพาะเลี้ยงแบบอะพอพโทซิส โดยการย้อมสีลงในเซลล์ประสาทพาะเลี้ยงด้วย propidium iodide และ acridine orange ซึ่ง propidium iodide เป็นสีที่สามารถเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ที่ไม่มีชีวิต ดังนั้นเมื่อย้อมด้วย propidium iodide จึงเกิดการติดสีที่นิวเคลียส ส่วน acridine orange เป็นสีที่สามารถย้อมติดที่นิวเคลียสของเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นเมื่อเซลล์ถูกย้อมด้วย propidium iodide และ acridine orange พบเซลล์มีรูปร่างกลมติดสีฟลูออเรสเซนต์สองสีซ้อนทับกันอย่างเด่นชัด ซึ่งเป็นการแสดงลักษณะของการเกิด nuclear condensation ของเซลล์ประสาทพาะเลี้ยงหลังถูกเหนี่ยวนำการตายด้วย H_2O_2 และหากเมื่อนำเซลล์ที่ย้อมไปส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า ตำแหน่งที่เกิดลักษณะ nuclear condensation เซลล์มีลักษณะหดตัวเล็กลง และกลม ดังแสดงในภาพ 16-17 จึงสรุปได้ว่า H_2O_2 มีผลทำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส



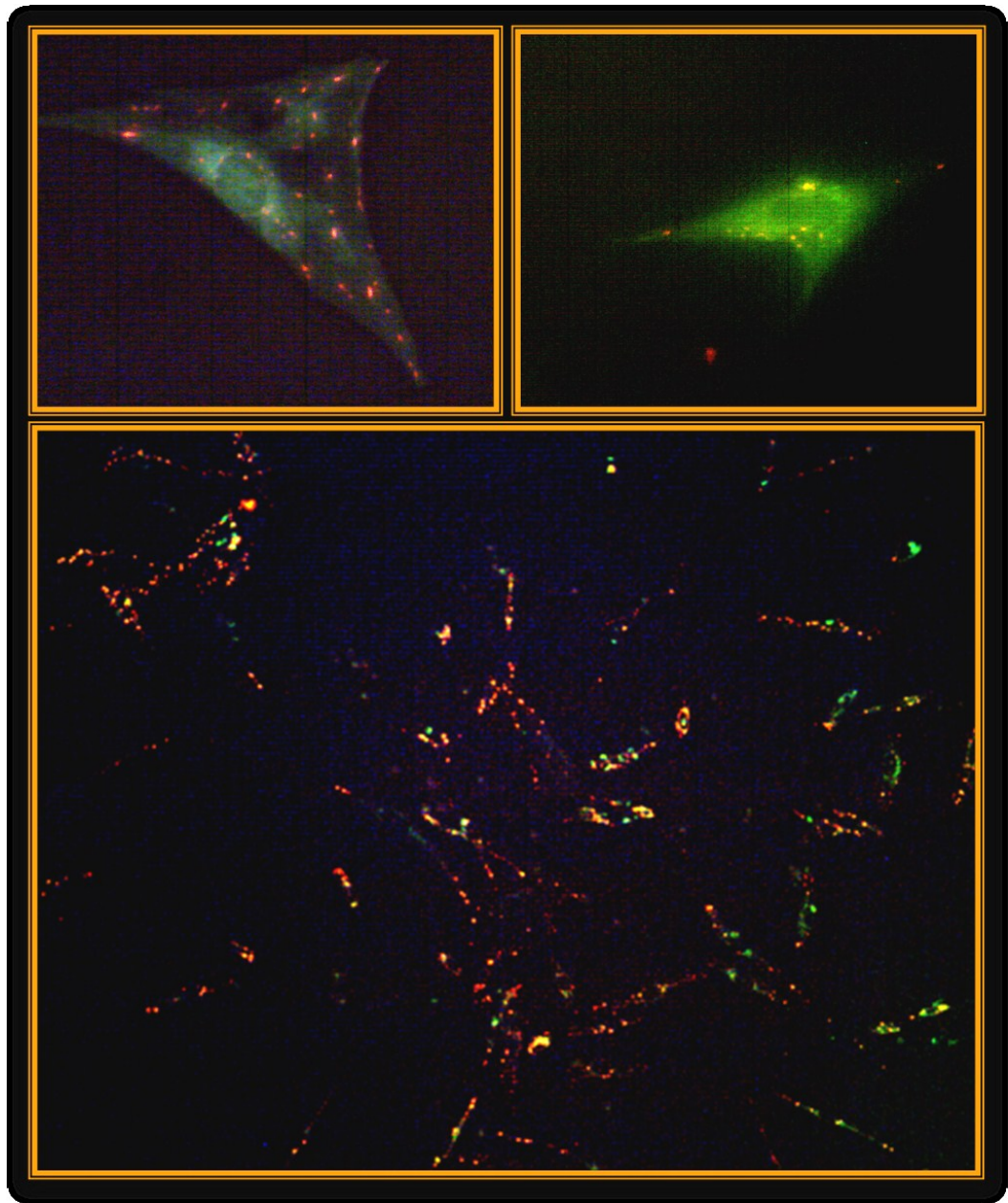
ภาพ 16 แสดงลักษณะการตายของเซลล์ SK-N-SH ที่ได้รับ H_2O_2 แล้วย้อมด้วย acridine orange และ propidium iodide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescent และ phase contrast



ภาพ 17 แสดงลักษณะการตายของเซลล์ SK-N-SH ที่ได้รับ H_2O_2 แล้วย้อมด้วย acridine orange และ propidium iodide ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescent แสดง nuclear fragmentation (ลูกศรชี้)

3. ผลของ H_2O_2 ต่อการเปลี่ยนแปลง mitochondrial membrane potential (MMP) ของเซลล์ประสาทพะเลียง

ในการศึกษาผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลง mitochondrial membrane potential ของเซลล์ประสาทพะเลียง เพื่อทดสอบลักษณะการตายแบบอะพอพโทซิสโดยมี mitochondria เป็นศูนย์กลางสำคัญ ทำการทดลองโดยนำกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับ H_2O_2 20uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ไปย้อมด้วยสี JC-1 Assay Kit โดยคุณสมบัติของสี JC-1 (5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanineiodide) สามารถเข้าไปใน mitochondrial matrix ของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งมีค่าต่างศักย์ระหว่างชั้นเยื่อหุ้มของ mitochondria (mitochondrial membrane potential; MMP) ที่สูงทำให้สี JC-1 ที่อยู่ใน mitochondrial matrix เกิดการเกาะกลุ่มเปลี่ยนสีเป็นสีแดงส้ม ดังนั้นเมื่อนำเซลล์ประสาทพะเลียงกลุ่มควบคุมไปย้อมสี JC-1 จึงพบสี JC-1 เป็นสีแดงส้มสะสมอยู่ใน mitochondrial matrix ดังแสดงในภาพ 18 ในการทดลองได้ทดสอบกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียง (positive control) ที่ได้รับสาร CCCP (carbonyl cyanide 3-chlorophenylhydrazone) เป็นสารที่ไปรบกวนต่อค่าต่างศักย์ (MMP) โดยตรง จากผลการทดลองในกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับสาร CCCP พบว่า สี JC-1 ติดอยู่บนผิวของ mitochondria และคงอยู่ใน cytoplasm แสดงสีเป็นสีเขียว เนื่องจากเป็นกลุ่มเซลล์ที่มีการรบกวนของค่าต่างศักย์ (MMP) สี JC-1 จึงไม่สามารถเข้าสู่ mitochondrial matrix ได้ ส่วนในกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับ H_2O_2 20uM พบว่า สี JC-1 ติดอยู่บนผิวของ mitochondria และคงอยู่ใน cytoplasm แสดงสีเป็นสีเขียว และพบเป็นสีแดงส้มที่สะสมอยู่ใน mitochondrial matrix ปะปนเล็กน้อย จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่า H_2O_2 มีผลทำให้เซลล์ประสาทพะเลียงเกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยมี mitochondria เป็นศูนย์กลางสำคัญ



ภาพ 18 แสดงการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential (MMP) ในเซลล์ประสาทพวงเลี้ยวหลังได้รับ H_2O_2 20uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยการย้อมสี JC-1 ภายใต้กล้องฟลูออเรสเซนส์

ภาพบนขวา เซลล์ประสาทพวงเลี้ยว control (ภาพกำลังขยายสูง)

ภาพบนซ้าย เซลล์ประสาทพวงเลี้ยว ที่ได้รับ CCCP (ภาพกำลังขยายสูง)

ภาพล่าง เซลล์ประสาทพวงเลี้ยวที่ได้รับ H_2O_2 20uM (ภาพกำลังขยายต่ำ)

4. ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SK-N-SH)

ผลการหาความเป็นพิษของสาร curcuminoid analogs จำนวน 20 analogs ด้วยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน 2.5, 5, 10, 20, 40uM แสดงผลตาม dose dependent โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้นจะทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ ดังแสดงในตารางที่ 2 และภาพที่ 19 จะเห็นได้ว่าสารชุดนี้บาง analog มี limit toxicity จึงได้ตัดสารนั้นออกไป และเริ่มทำการทดสอบผลการด้านการตาย โดยการเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 โดยที่จำกัดความเข้มข้นของสาร curcuminoids และ analogs ที่ไม่เกิน 5uM

ตารางที่ 2 แสดงผลการหาความเป็นพิษของสาร curcuminoid และ curcuminoid analogs

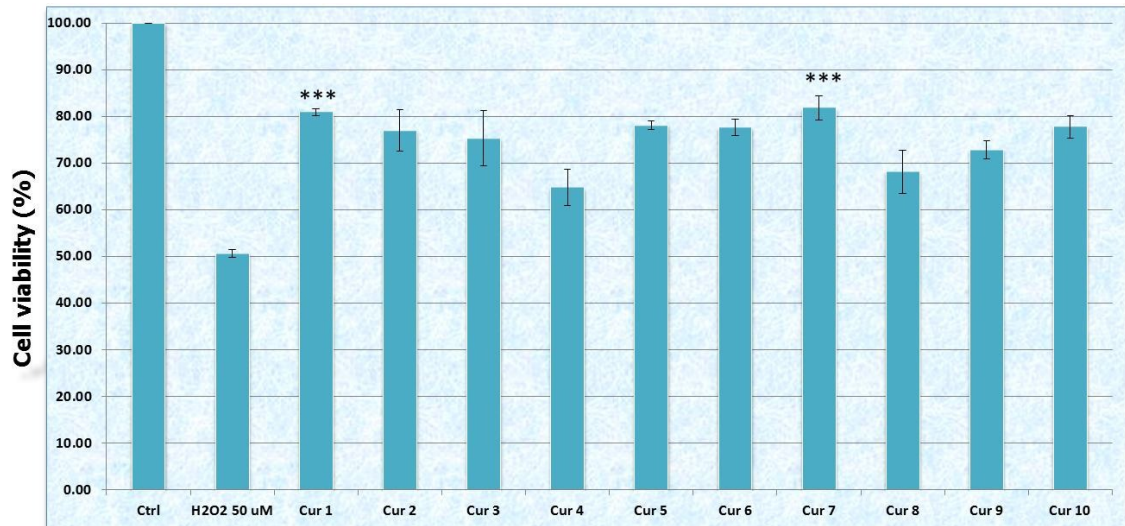
analog	dose ที่เริ่มพบ toxicity	ลักษณะเซลล์	analog	dose ที่เริ่มพบ toxicity	ลักษณะเซลล์
1	no	ปกติ	11	no	ปกติ
2	no	ปกติ	12	no	ปกติ
3	20uM	พบ apoptosis	13	no	ปกติ
4	5uM	พบ apoptosis	14	no	ปกติ
5	5uM	พบ apoptosis	15	5uM	พบ apoptosis
6	5uM	พบ apoptosis	16	5uM	พบ apoptosis
7	no	ปกติ	17	2uM	จำนวนเซลล์ลดลง + apoptosis เมื่อ dose สูง
8	no	ปกติ	18	2uM	จำนวนเซลล์ลดลง + apoptosis เมื่อ dose สูง
9	no	ปกติ	19	2uM	จำนวนเซลล์ลดลง + เปลี่ยนรูปร่าง
10	no	ปกติ	20	2uM	จำนวนเซลล์ลดลง + เปลี่ยนรูปร่าง



ภาพ 19 แสดงลักษณะ morphological changes ของเซลล์ ที่ treat ด้วย curcuminoid analog 16 และ 20 ที่ความเข้มข้น 2uM นาน 44 ชั่วโมง ซึ่งพบจำนวนเซลล์ลดลง เกิด apoptosis และรูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์เปลี่ยนไปตามลำดับ

5. ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง หลังได้รับ H₂O₂

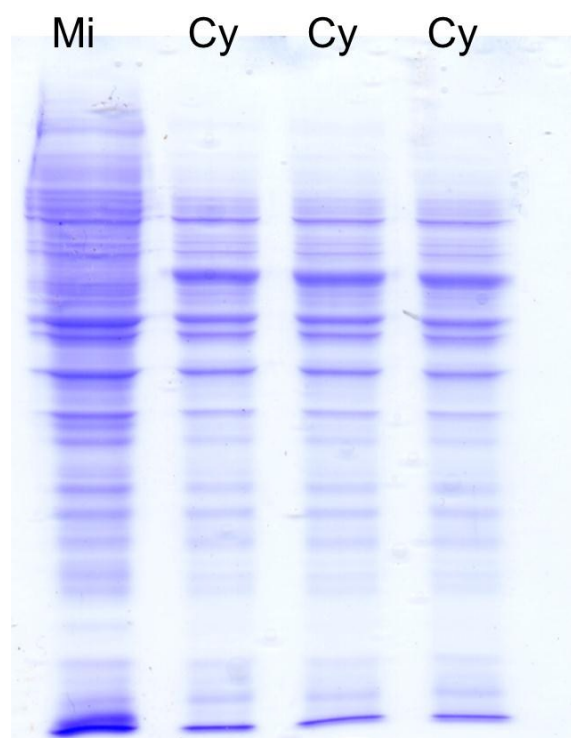
การศึกษาผลของสาร curcuminoids และ analogs ในระดับความเข้มข้นที่ 5 uM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนการได้รับสารการเหนี่ยวนำการตายด้วย H₂O₂ ความเข้มข้นที่ 50uM จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับสารที่ 1 (curcumin) และ สารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H₂O₂ 50uM เพียงอย่างเดียว ดังแสดงในภาพที่ 20 โดยในการทดสอบครั้งนี้ค่า IC₅₀ ของสาร H₂O₂ จะอยู่ที่ความเข้มข้น 50uM



ภาพ 20 ผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงหลังได้รับ curcuminoids และ analogs ในความเข้มข้น 5 uM ต่อระดับความเข้มข้นของ H₂O₂ 50uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลในการช่วยต้านการตายได้ดีกว่า สารอื่น (กราฟแต่ละแท่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย Mean $\pm$ S.D., *** $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H₂O₂ 50uM)

6. ผลของ H_2O_2 , curcumin และ analogs ต่อระดับโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

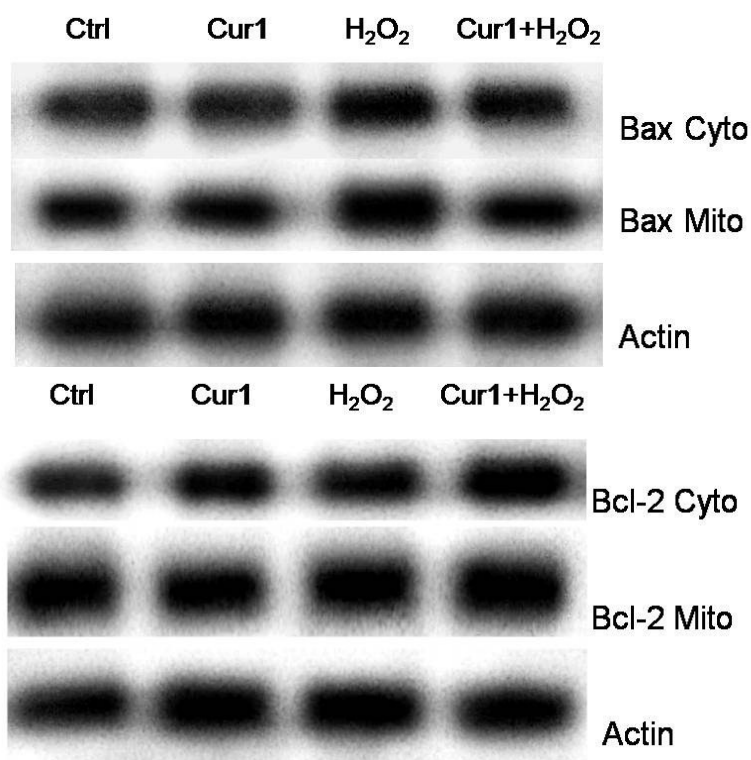
สำหรับการศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ซึ่งทำการทดสอบผลของสาร curcuminoids ได้แก่ สารที่ 1 (curcumin) สารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) โดยในการศึกษาครั้งนี้จะทำการตรวจหาปริมาณโปรตีน Bax, Bcl-2 ทั้งใน cytosol และ mitochondria ในการทดลองจะทำการแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม คือ กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ไม่ได้รับสารใดๆ (กลุ่มควบคุม) กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 50 μM กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับสาร curcuminoids ได้แก่ สารที่ 1 (curcumin) สารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) ตามลำดับ และกลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoids ได้แก่ สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) 4 ร่วมกับ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 50 μM ซึ่งการทดสอบนี้ใช้เทคนิค western blot analysis เพื่อตรวจหาปริมาณโปรตีนที่ต้องการศึกษา ซึ่งจากผลการทดลองได้แสดงผลจากการสกัดแยกโปรตีนใน cytosol และ mitochondria ดังแสดงในภาพที่ 21 โดยผลการทดลองทั้งหมดจะทดลองผล 3 ซ้ำ ซึ่งได้นำไปวิเคราะห์ผลหาค่าเฉลี่ย และหาค่าความแตกต่างทางสถิติ



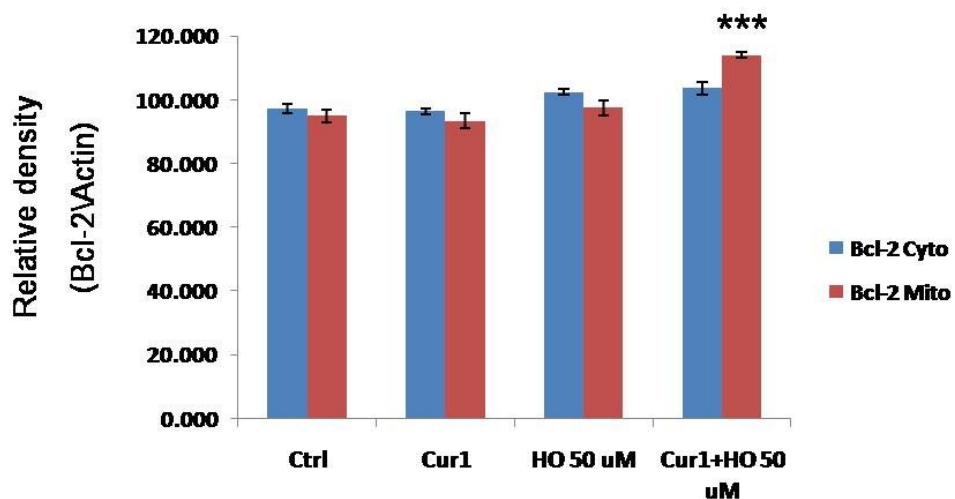
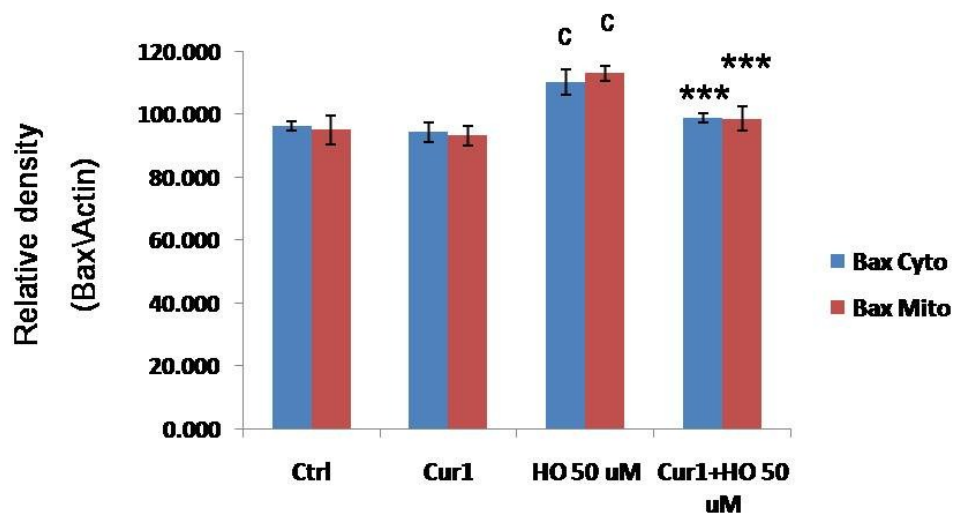
ภาพ 21 แสดงโปรตีนใน cytosol และ mitochondria บน SDS-PAGE Gels ที่ได้จากการสกัดในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

สำหรับการวิเคราะห์ผลของ H_2O_2 ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งในการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 50uM ของแต่ละการทดสอบทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bax ในกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 ของแต่ละการทดสอบ พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ทั้งใน cytosol และ mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในภาพ 22-25 จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าความเป็นพิษของ H_2O_2 มีผลต่อการทำงานของโปรตีน Bax ทั้งใน cytosol และ mitochondria เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสตามมาในที่สุด

กลุ่มที่ได้รับสารที่ 1 (curcumin) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และใน mitochondria ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated curcumin ก่อนได้รับ H_2O_2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในภาพ 22-23 สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bcl-2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในภาพ 22-23



ภาพ 22 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Bax, Bcl-2 ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลุ่ม control, curcumin 5uM, H_2O_2 50uM และกลุ่ม curcumin 5uM + H_2O_2 50uM
 ภาพบน การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria
 ภาพล่าง การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria



ภาพ 23 แสดงกราฟการวิเคราะห์ผลของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลุ่ม control, curcumin 5uM, H₂O₂ 50uM และกลุ่ม curcumin 5uM + H₂O₂ 50uM

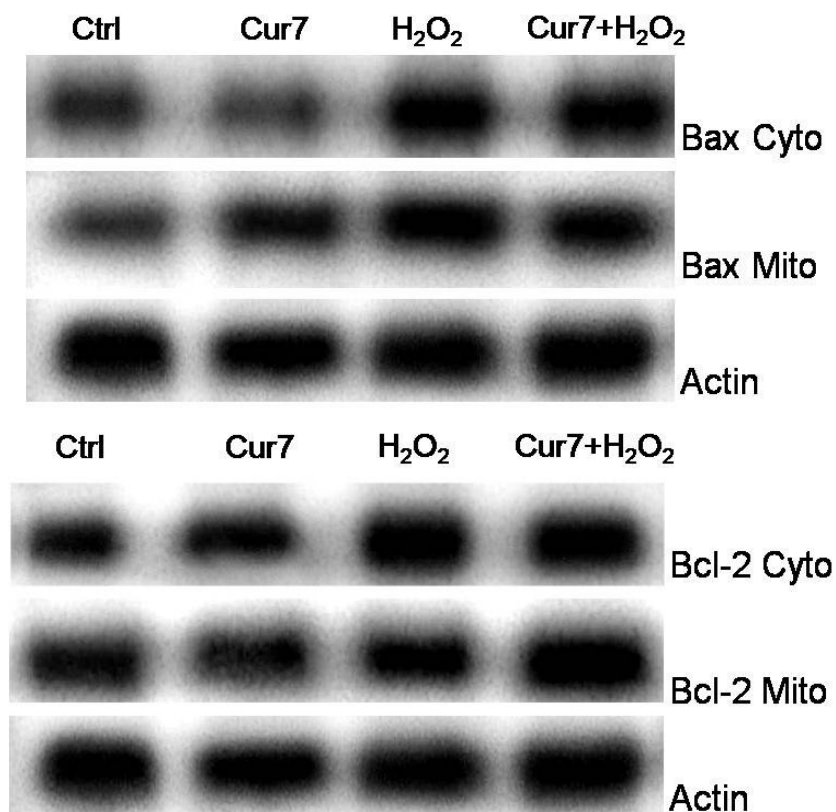
ภาพบน การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria

ภาพล่าง การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria

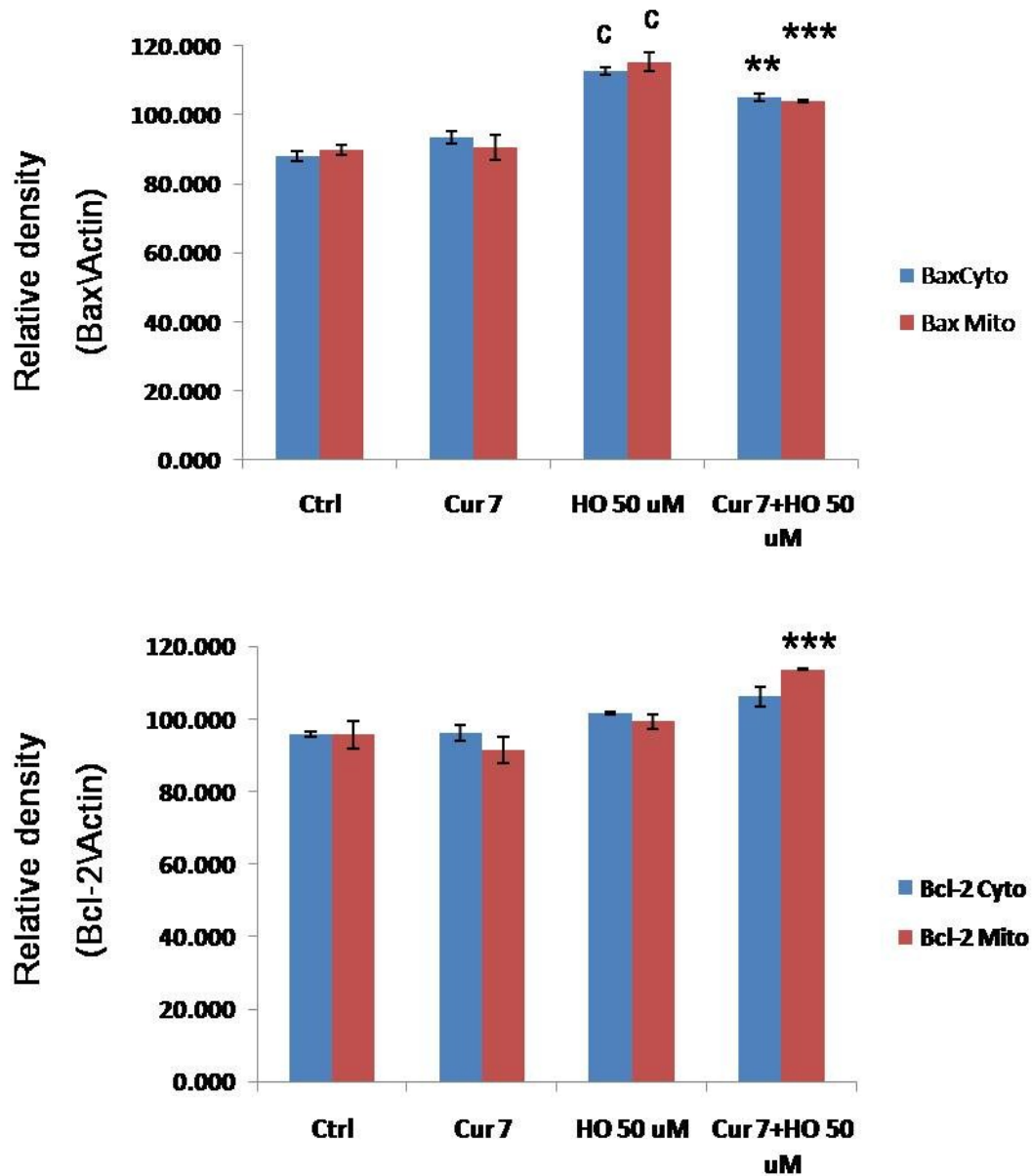
(^{***} $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H₂O₂ 50uM)

(กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean $\pm$ S.D.)

กลุ่มที่ได้รับสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ ใน mitochondria ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated ด้วย tetrahydrocurcumin เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 50uM พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในภาพ 24-25 สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bcl-2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในภาพ 13-14



ภาพ 24 แสดงการแสดงออกของโปรตีน Bax, Bcl-2 ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลุ่ม control, curcumin 5uM, H_2O_2 50uM และกลุ่ม tetrahydrocurcumin 5uM + H_2O_2 50uM
 ภาพบน การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria
 ภาพล่าง การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria



ภาพ 25 แสดงกราฟการวิเคราะห์ผลของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลุ่ม control, tetrahydrocurcumin 5uM, H₂O₂ 50uM และ tetrahydrocurcumin 5uM + H₂O₂ 50uM ภาพบน การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria ภาพล่าง การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria
^{**} $p < 0.01$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H₂O₂ 50uM
^{***} $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H₂O₂ 50uM
^c $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่ม control
(กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean $\pm$ S.D.)

บทที่ 4 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

เคอร์คิวมินอยด์ (Curcuminoids) เป็นสารสกัดที่ได้จากผงของเหง้าขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) ซึ่งมีสารประกอบ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารประกอบ curcumin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยในทางการแพทย์ได้มีการนำสารสกัด curcumin มาใช้ประโยชน์ในกระบวนการรักษาโรคต่างๆ มากมาย แต่อย่างไรก็ตาม curcumin ก็มีคุณสมบัติเฉพาะตัว ไม่ละลายน้ำ (insoluble water) แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายบางตัว มีข้อจำกัดในด้านการคงตัว (unstable) และไวต่อแสง ดังนั้นจึงได้มีการปรับโครงสร้างของสาร curcuminoids ขึ้นมาใช้เรียกว่า curcuminoid analogs โดยนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร curcuminoid ไปเป็น สารสังเคราะห์ (analog) ที่มีคุณสมบัติเป็น metabolite ของ curcuminoids ที่มีความคงตัวที่ดีกว่า ซึ่งในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการได้ทำการทดสอบคุณสมบัติของ curcuminoid analogs ต่อการต้านการเกิดมะเร็งต่อเซลล์มะเร็งในตับของหนู พบว่า curcuminoid analog สารโครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin) สามารถยับยั้งเซลล์มะเร็งในตับของหนูได้ (Yoysungnoen, et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้มาทำการศึกษาดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาคุณสมบัติของสาร curcuminoids และ analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม โดยศึกษาผลของสาร curcuminoids (analog 1, 2, 3) และสาร analogs ของสารต้นแบบทั้ง 3

ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ในการศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของ curcumin พบว่า การให้ผงขมิ้นชันในขนาด 2.5 และ 5.0 กรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน มีผลต่อการเจริญเติบโต และการกินอาหารของหนูเพศผู้เพียงเล็กน้อย แต่ไม่มีผลต่อหนูเพศเมีย รวมทั้งไม่พบความผิดปกติของค่าทางโลหิตวิทยา หรือ ชีวเคมี และไม่ทำให้เกิดพยาธิสภาพภายในอวัยวะของหนูทั้งเพศผู้ และเพศเมีย (Sittisomwong, et al., 1990)

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของสาร curcuminoids (สารโครงสร้างที่ 1, 2, 3) และ analogs ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง พบว่า สารแต่ละสารของ curcuminoids และ analogs ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกัน มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกันออกไป จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้เลือกสารที่ไม่มีผลต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับในความเข้มข้น 5 μ M แต่เมื่อเซลล์ในความเข้มข้นสูงขึ้น (30-40 μ M) มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้เห็นช่วงความปลอดภัยของสาร curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในแต่ละสาร และแต่ละความเข้มข้น ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกสารที่จะนำไปศึกษาจะต้องเลือก สาร และความเข้มข้นที่ไม่ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ลดลงต่ำกว่า 95% (สารที่นำมาใช้ไม่ควรมีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงเกิน 5% เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม)

ภาวะ oxidative stress จากการเหนี่ยวนำโดย H₂O₂ กกับการเกิด apoptosis

H₂O₂ สามารถทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้หลายๆ ชนิด และเซลล์ที่เป็นเซลล์เป้าหมายหลักของภาวะ oxidative stress ที่สำคัญก็คือเซลล์ประสาท โดย H₂O₂ จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทได้ทั้ง apoptosis และแบบ necrosis ในการศึกษานี้จะเหนี่ยวนำให้เป็นการตายแบบ

apoptosis โดยการใช้ H_2O_2 ในปริมาณที่ต่ำและระยะเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับการศึกษา dose-dependent และ 36 ชั่วโมง สำหรับการศึกษา time-dependent โดยการตายของเซลล์จะเริ่มเกิดขึ้นภายหลังได้รับ H_2O_2 แล้วนาน 12 ชั่วโมง dose ที่ใช้ในการศึกษาจะใช้ต่ำกว่า LD_{50} เนื่องจากการให้ H_2O_2 ความเข้มข้นที่สูงจะทำให้เกิดการตายแบบ necrosis ซึ่งเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว และไม่สามารถช่วยต้านการตายได้

การตายแบบ apoptosis เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายแบบที่มีการตั้งโปรแกรมการตายไว้แล้ว (Programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งเกี่ยวข้องกับชุดของปฏิกิริยาทางเคมี ที่ทำให้เซลล์มีสัญญาณวิทยาเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ เช่น การพอง (blebbing) ของเยื่อหุ้มเซลล์ การเหี่ยวของเซลล์ (shrink) โครมาตินหนาตัวขึ้น (pyknotic nucleus) และนิวเคลียสของเซลล์แตกเป็นชิ้นส่วน (fragmented nucleus) เป็นต้น โดยการตายของเซลล์อาจเกิดได้จากหลาย pathway ไม่ว่าจะเป็น Mitochondria-mediated apoptotic pathway, Receptor-mediated apoptotic pathway และจาก pathway อื่นๆได้ ซึ่งจากการศึกษาผลของ H_2O_2 ที่มีต่อการตายของเซลล์ พบว่าเมื่อให้สาร H_2O_2 เข้าไปในเซลล์เพาะเลี้ยง จะทำให้รูปร่างของเซลล์มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไป โดยจากการที่มีการแพร่กระจายของเซลล์และการเชื่อมกันระหว่างเซลล์นั้น จะพบว่าเซลล์จะมีลักษณะหดตัวลงเป็นลักษณะกลมๆ และมีการหลุดลอยออกมาจากพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นลักษณะของการตายแบบ apoptosis อย่างหนึ่ง

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของการได้รับ H_2O_2 กับการตายของเซลล์ (dose-dependent) พบว่าที่ปริมาณความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เพิ่มมากขึ้นทำให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย เมื่อนำมาสร้างกราฟจะได้กราฟที่มีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ ($R^2 = 0.962$) ดังนั้นความเข้มข้นของการได้รับ H_2O_2 ที่เพิ่มมากขึ้นกับการตายของเซลล์มีความสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญ จากการทดลองพบว่าการศึกษาโดยดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สามารถที่จะบอกความแตกต่างของแต่ละความเข้มข้นได้อย่างชัดเจนมากกว่าการนับการตายของเซลล์โดยตรงโดยการนับด้วย hemacytometer เพราะการนับโดยวิธีการดังกล่าวจะทำให้เกิดการหายไปของเซลล์ที่ตายและหลุดลอยออกมาได้ในหลายๆขั้นตอนการนับเซลล์

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของเวลาการได้รับ H_2O_2 กับการตายของเซลล์ (time-dependent) พบว่าเมื่อเวลาที่เพิ่มมากขึ้นจะมีการตายที่เพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

จากการศึกษาหาค่า IC_{50} ของ H_2O_2 ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่จำนวนเซลล์ 4×10^4 เซลล์ ซึ่งค่า IC_{50} (IC_{50} = inhibitory concentration of 50% growth) เป็นค่าความเข้มข้นของสารเคมีที่ทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงถูกยับยั้งการเจริญเติบโตหรือตายไปครึ่งหนึ่ง ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองโดยใช้วิธี MTT assay ซึ่งเป็นวิธีตรวจวัดความมีชีวิตโดยไม่ต้องใช้การนับด้วย hemacytometer โดยเซลล์มีชีวิตจะมี mitochondrial dehydrogenase ที่จะเปลี่ยน MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารสีเหลืองให้เป็น formazan ที่มีสีฟ้าและไม่ละลายน้ำ เมื่อละลายตะกอน formazan ด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม (DMSO) จะสามารถวัดค่าความเข้มข้นสีที่ OD 540 nm ได้ ปริมาณ dehydrogenase ในเซลล์หนึ่ง ๆ จะคงที่ ดังนั้นปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต จึงสามารถใช้เป็นวิธีวัดความมีชีวิตของเซลล์ได้ จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าที่ความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่สูงมากขึ้นทำให้มีการตายเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วยอย่างมีนัยสำคัญ โดยมีค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ ($R^2 = 0.963$) และพบว่าที่ความเข้มข้น 70 μM ทำให้

เซลล์เพาะเลี้ยงมีการเจริญลดลง 50% (IC_{50} = inhibitory concentration of 50% growth) ดังนั้นค่า IC_{50} ของ H_2O_2 ที่มีต่อเซลล์เพาะเลี้ยงที่จำนวนเซลล์ 4×10^4 เซลล์ เท่ากับ 70uM อย่างไรก็ตามค่า IC_{50} นี้เป็นค่าที่สูงเกินไปสำหรับนำมาใช้ศึกษาการต้านการตายโดยเซลล์จะตายลงอย่างรวดเร็วและไม่สามารถต้านการตายได้ นอกจากนี้เซลล์ที่ตายไปเหล่านี้จะหลุดลอยและหายไปในช่วงตอนต่าง ๆ ค่าที่ได้จึงคลาดเคลื่อน ดังนั้นความเข้มข้นของ H_2O_2 ที่เลือกนำมาใช้เหนี่ยวนำการตายแบบ apoptosis จึงมีความเข้มข้นต่ำ (20-50uM) โดยเฉพาะในการศึกษารูปแบบ time-dependent ถือว่าเป็นการเลียนแบบการสะสมภาวะ oxidative stress แบบสะสมในเนื้อเยื่อประสาท ตามสภาพความเป็นจริงซึ่งเซลล์ประสาทจะได้รับพิษจาก H_2O_2 ในปริมาณน้อย ๆ แต่ใช้เวลานานจึงเกิดการตาย และระบบประสาทเสียหายที่ตามมาในที่สุด

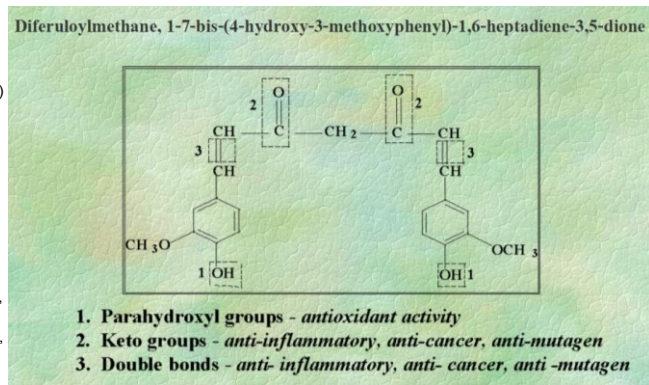
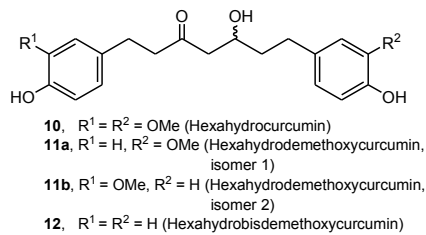
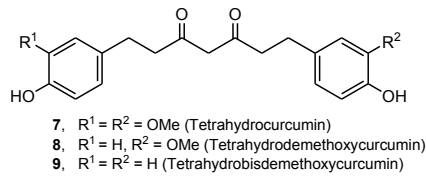
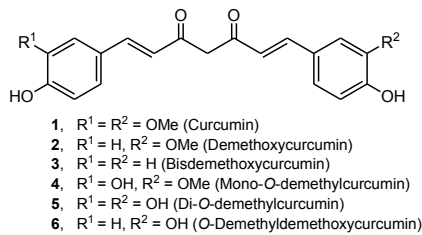
จากการศึกษาลักษณะการตายของเซลล์โดยการย้อมด้วย acridine orange และ propidium iodide ซึ่งสารสีทั้ง 2 ชนิดนี้จะมีการติดสีที่แตกต่างกัน โดย acridine orange จะเป็นการย้อม nucleic acid โดย acridine Orange จะทำปฏิกิริยากับ DNA และ RNA ของเซลล์ปกติ เมื่อนำไปส่องผ่านกล้อง fluorescence ที่ 525 nm จะเห็นเป็นสีเขียว การย้อม acridine orange นิยมนำไปใช้ในการวัดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ส่วน propidium iodide เป็นการย้อม nucleic acid เช่นเดียวกัน โดยสีจะผ่านเข้าไปติดนิวเคลียสเซลล์ที่ตายเท่านั้น เมื่อนำไปส่องผ่านกล้อง fluorescence จะเห็นเป็นสีแดง การย้อม propidium iodide มักถูกนำไปใช้ในการระบุการตายของเซลล์และใช้เป็นสีที่สองในเทคนิคการย้อม fluorescence หลายสี จากผลการศึกษา ผู้วิจัยได้ทำการย้อมสีเซลล์เพาะเลี้ยงโดยการย้อม 2 สี (multicolor) คือ ย้อมด้วย acridine orange เป็นสีแรก และ propidium iodide เป็นสีที่สอง เมื่อนำไปส่องผ่านกล้อง fluorescence ปรากฏว่ากล้องไม่สามารถแยกสีของเซลล์ได้ซึ่งเป็นไปได้ว่ากล้องที่ใช้ไม่สามารถที่จะดูโดยใช้ค่าแสงพร้อมกันได้ทั้ง 2 ค่า ดังนั้นผู้ศึกษาจึงได้ดูโดยแยกดูทีละค่าสีเปรียบเทียบกับการดูโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่ตำแหน่งเดียวกัน ซึ่งจะเห็นความแตกต่างของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย โดยเซลล์ที่ตายลักษณะของสีทั้งสองที่แสดงออกมาจะมีความสว่างของสีมากกว่าเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ และนอกจากนี้ยังดูลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ และลักษณะของนิวเคลียสประกอบเพื่อแยกรูปแบบการตายของเซลล์ที่พบ ซึ่งส่วนใหญ่เป็นการตายแบบ apoptosis

ดังนั้น จากผลการศึกษาจะเห็นได้ว่า H_2O_2 ทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้แบบ apoptosis ซึ่งความเข้มข้นและระยะเวลาของการได้รับ H_2O_2 จะส่งผลให้เกิดความเป็นพิษ และเป็นอันตรายต่อเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย

H_2O_2 มีผลทำให้เซลล์ได้รับ reactive oxygen species (ROS) ส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียของระดับ mitochondria membrane potential (MMP) ใน mitochondria ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบในครั้งนี้จากการวิเคราะห์ด้วยการย้อมสี JC-1 assay Kit พบว่า H_2O_2 มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง mitochondria membrane potential (MMP) ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงลดลง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการปล่อย apoptotic factors ออกมาสู่ cytosol ส่งผลให้เกิดการเหนี่ยวนำกระบวนการอะพอพโทซิสตามมา (Desagher and Martinou, 2000) ดังนั้นอาจสรุปได้ว่า H_2O_2 มีผลทำให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสโดยมีกลไกการทำงานผ่าน mitochondria เป็นสำคัญ

ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับการเหนี่ยวนำการตายจากภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2

สำหรับการศึกษาผลของ curcuminoids และ analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาทพะเลียงจากการเหนี่ยวนำการตายด้วย H_2O_2 จากผลการทดลองพบว่าสาร curcuminoids ได้แก่ สารโครงสร้างที่ 1 ที่เป็นสารต้นแบบ และสารโครงสร้างที่ 7 ที่เป็น analog มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ประสาทพะเลียงเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับ H_2O_2 จากการวิเคราะห์โครงสร้างของสาร curcuminoids สารแต่ละสารมีคุณสมบัติแตกต่างกันไปตามโครงสร้าง ดังแสดงในภาพที่ 26 ซึ่งโครงสร้างของสาร curcumin (สารที่ 1) และ analogs (สารที่ 7) เป็นโครงสร้างที่มี parahydroxyl group เป็นส่วนประกอบ ทำให้สารมีคุณสมบัติเป็น anti-oxidant อาจมีผลต่อการลด หรือ ต้านการเกิดสารอนุมูลอิสระ (free radicals) ที่ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress จากการกระตุ้นด้วย H_2O_2 ซึ่งสารเหล่านี้อาจมีประสิทธิภาพดีกว่าสาร curcuminoids ที่เป็น mixture ในสภาพธรรมชาติ เนื่องจากอาจเป็นไปได้ว่าสาร curcuminoids ที่เป็น mixture ในสภาพธรรมชาติ หรือ crude extract เป็นสารที่มีโครงสร้างแต่ละสารต่างกันมารวมตัวกัน อาจจะทำให้เกิดความไม่สมดุล และไม่ส่งเสริมกัน ทำให้คุณสมบัติที่เป็น anti-oxidant เปลี่ยนแปลงไป



ภาพ 26 แสดงโครงสร้างและคุณสมบัติของ curcumin

ผลของ H_2O_2 ต่อการทำงานของโปรตีน Bax และ Bcl-2

ในกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสที่ดำเนินผ่านทาง mitochondria จะมีการทำงานของกลุ่มโปรตีน Bcl-2 family ที่คอยควบคุมในการปล่อยสาร apoptogenic factors ที่อยู่ภายในชั้น inner membranous space ซึ่งการทำงานของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic เช่น Bax, Bak ในสภาวะเซลล์ปกติ โปรตีน Bax จะอยู่ในสภาพที่ยังไม่พร้อมทำงาน (inactive) และอยู่ภายใน cytosol (Hsu, et al., 1997) แต่หากเมื่อเซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิส โปรตีน Bax จะเปลี่ยนให้อยู่ในสภาพพร้อมที่จะทำงาน (active) และจะเคลื่อนไปจับที่เยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria จากการทำงานของโปรตีน Bax ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นนอกของ mitochondria (Gross, et al., 1999) ทำให้เกิดรอยร้าวบนเยื่อหุ้มของ mitochondria และในขณะเดียวกัน โปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic เช่น Bcl-2 มีบทบาทในการควบคุมระดับ mitochondrial membrane potential (MMP) (Vander Heiden, 1999) โดยจะยับยั้งการทำงานของโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic ซึ่งเป็นการปกป้อง mitochondria และป้องกันการตายของเซลล์ แต่หากเมื่อโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic มีการทำงานที่มากกว่า ส่งผลให้เกิด permeability transition pore (PT pore) บนเยื่อหุ้มของ mitochondria เกิดการสูญเสียการควบคุมการผ่านเข้า-ออกของสารระหว่าง cytosol และ mitochondria ทำให้กลุ่มสาร apoptogenic factors เช่น cytochrome C ถูกปล่อยออกมาสู่ cytosol เกิดการรวมตัวกับ apoptosis-activating factor-1 (Apaf-1) กลายเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome โดยโครงสร้าง apoptosome จะไปกระตุ้น procaspase-9 (inactive) ให้เป็น caspase-9 (active) แล้วจึงไปกระตุ้น caspase-3 ซึ่งเป็น caspase ตัวสุดท้ายในการเหนี่ยวนำการตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ (Sudhir, 2001)

ผลการทดลองการเหนี่ยวนำการตายด้วย H_2O_2 ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 พบว่าภาวะ oxidative stress จาก H_2O_2 มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax, Bcl-2 ทั้งใน

cytosol และ mitochondria ให้เพิ่มมากขึ้น จากการวิเคราะห์ผลจากกล่าวได้ว่า ภาวะ oxidative stress จาก H_2O_2 มีผลต่อการทำงานของโปรตีน Bax ทั้งใน cytosol และ mitochondria เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิส เนื่องจากโปรตีน Bax เป็นโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic ที่มีบทบาทในการเหนี่ยวนำการตายในกระบวนการเกิดอะพอพโทซิส และในทางเดียวกัน H_2O_2 ก็มีผลต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ทั้งใน cytosol และ mitochondria เนื่องจากโปรตีน Bcl-2 เป็นโปรตีนกลุ่ม anti-apoptotic มีบทบาทในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax เพื่อป้องกันการตายของเซลล์จากการเหนี่ยวนำการตายด้วย แคลเซียม โดยโปรตีนทั้ง 2 กลุ่มนี้จะมีการทำงานเป็น antagonist ซึ่งกันและกัน

ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อการทำงานของโปรตีน Bax และ Bcl-2

สำหรับการวิเคราะห์ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งในการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับสารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 tetrahydrocurcumin อภิปรายผลได้ดังนี้

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria พบว่า

สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bax ใน cytosol เพิ่มขึ้น เนื่องจากเซลล์ได้รับสารแปลกปลอมเข้าไปทำให้เซลล์ได้รับการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bax แต่การทำงานของโปรตีน Bax ในบทบาทการเหนี่ยวนำการตายไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ เมื่อพิจารณาจากการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน mitochondria เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งพบว่าปริมาณการแสดงออกไม่แตกต่างกัน จากผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่าโปรตีน Bax เพิ่มขึ้นจากผลการทดลองของสารที่ 1 (curcumin) ซึ่งไม่มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria พบว่า

สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bcl-2 เพิ่มขึ้นทั้งใน cytosol และ mitochondria โดยบทบาทการทำงานของโปรตีน Bcl-2 จะทำหน้าที่คอยควบคุมสมดุลของ mitochondria หรือ ทำหน้าที่คอยยับยั้งการทำงานของกลุ่มโปรตีน Bax เพื่อป้องกันการตายของเซลล์ (Vander Heiden, 1999) จากผลการวิเคราะห์อาจสมมติฐานได้ว่า สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีความสามารถในการเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bcl-2 ให้เพิ่มขึ้น ซึ่งเหมือนเป็นการเพิ่มกลไกการป้องกันตัวเองของเซลล์จากการเหนี่ยวนำการตาย นอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ได้อีกด้วย

ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อกลไกการทำงานของโปรตีน Bax และ Bcl-2 จากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2

สำหรับการวิเคราะห์ผลของ curcuminoids และ analogs ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับสารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) ร่วมกับ H_2O_2 อภิปรายผลได้ดังนี้

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria พบว่า

สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria ลดลงอย่างชัดเจน ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 เพียงอย่างเดียว จะเห็นได้ว่า สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7

(tetrahydrocurcumin) มีความสามารถช่วยด้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยมีคุณสมบัติในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax จากการกระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress โดย H_2O_2

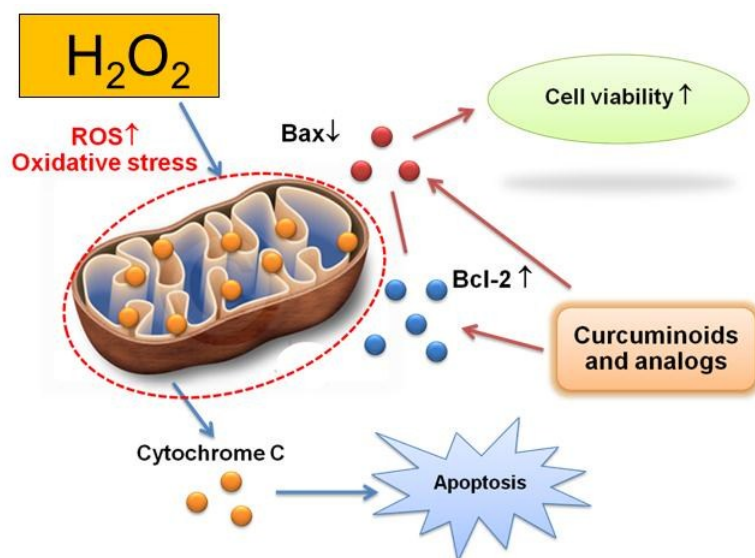
สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลกระตุ้นให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงเหนี่ยวนำการสร้างโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ($p < 0.001$) ซึ่งบทบาทการทำงานของโปรตีน Bcl-2 ในการป้องกันการตายของเซลล์จะมีบทบาทต่อ mitochondria เป็นสำคัญ โดยจะทำหน้าที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax จากการวิเคราะห์อาจสรุปได้ว่า สารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีคุณสมบัติช่วยด้านการตายจากการเหนี่ยวนำด้วยแคดเมียม โดยการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น ซึ่งในงานวิจัยของ Chen และคณะ (2006) พบว่าสาร curcumin สามารถป้องกันการตายของเซลล์ได้ โดยทำให้เกิดการ overexpression ของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งช่วยลดการสูญเสียของ mitochondrial membrane potential (MMP) จากภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นภาวะที่มีกลุ่มสาร ROS เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำจากสารพิษ โดยกลไกการป้องกันสาร ROS ของสาร curcumin พบว่าดำเนินการผ่านทางโปรตีน Bcl-2 และ mitochondria ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นเช่นเดียวกัน

ดังนั้นจากการวิเคราะห์ผลการทดลองของสาร curcuminoids และ analogs ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 จากการเหนี่ยวนำการตายด้วยแคดเมียม พบว่าสารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีความสามารถช่วยด้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยมีผลต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม pro-apoptotic และมีความสามารถช่วยด้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง โดยมีผลในการกระตุ้นการทำงานของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น เพื่อทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bax ซึ่งจากการวิเคราะห์อาจบอกได้ว่าผลของสาร curcuminoids และ analogs มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการกระตุ้นของแคดเมียม โดยทำงานผ่านโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งมี mitochondria เป็นศูนย์กลาง ดังนั้นจึงสมมติฐานได้ว่า ถ้าหากนำสารบริสุทธิ์แต่ละสารที่มีโครงสร้างที่มีคุณสมบัติช่วยด้านการตายที่โดดเด่น และมีลักษณะการทำงานที่ส่งเสริมกันมารวมกัน ก็อาจทำให้ได้สารที่ช่วยยับยั้งการตายของแคดเมียมที่มีประสิทธิภาพที่ดีมากยิ่งขึ้นได้หรือไม่ จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจในการศึกษาครั้งต่อไป ดังนั้นจากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่าสาร curcuminoids และ analogs สามารถช่วยลด หรือ ป้องกันการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำด้วยแคดเมียม โดยมีการทำงานผ่านบทบาทของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งมี mitochondria เป็นศูนย์กลาง ดังแสดงในภาพที่ 27

Curcuminoid analogs ต่อการด้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

จากการทดสอบ พบว่า curcumin และ tetrahydrocurcumin รวมทั้ง curcuminoid analogs บางชนิด สามารถช่วยลดการตายได้ดีดังได้แสดงผลไว้ดังกล่าวแล้ว และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential ของเซลล์ที่ได้รับ H_2O_2 จะพบว่าลดลงซึ่งการสูญเสีย mitochondrial membrane potential โดยมีการกระตุ้น intrinsic pathway (mitochondria-mediated pathway) pro-apoptotic protein กลุ่ม Bax ซึ่งในภาวะปกติจะอยู่ในไซโตซอล จะเคลื่อนไปจับที่ outer membrane ของไมโทคอนเดรียเมื่อเซลล์ได้รับการชักนำให้ตายแบบอะพอพโทซิส ทำให้ permeability transition pore เสียการควบคุมการเข้าออกของไอออน มีการปล่อยไอออนจากไซโตซอลเข้ามาภายในไมโทคอนเดรีย ทำให้ inner membrane potential ของไมโทคอนเดรียถูกรบกวน เป็นสาเหตุให้มีการหลั่ง cytochrome C ออกมาในไซโตซอล เมื่อ cytochrome

C ออกมาสู่ไซโตซอลจะรวมตัวกับ Apaf-1 และ procaspase -9 เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome โดยใช้พลังงานในรูป ATP ในการรักษาโครงสร้างให้เสถียร ซึ่ง caspase-9 จะกระตุ้นการทำงานของ effector caspase เช่น procaspase-3 ต่อไป และทำให้เซลล์เกิด apoptosis ในที่สุด แต่เซลล์ที่ได้รับการ treat ด้วย curcumin และ tetrahydrocurcumin จะแสดงผลของการสูญเสีย mitochondrial membrane potential ลดลง จึงอาจกล่าวได้ว่า curcumin และ tetrahydrocurcumin สามารถป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จากผลของภาวะ oxidative stress ได้ และมีความเป็นไปได้ว่ากลไกการปกป้องเซลล์จาก นั้นดำเนินการผ่านทาง mitochondria ดังแสดงในภาพที่ 27 ด้านล่างนี้



ภาพ 27 แสดงกลไกการเกิด apoptosis และการออกฤทธิ์ของ curcuminoids และ analogs

Curcuminoids ซึ่งสกัดจากขมิ้นชัน ประกอบด้วย สารหลัก 3 ตัว คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin เป็นที่ทราบกันดีว่า curcuminoids มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ดี จึงนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านยา อาหาร และเครื่องสำอาง ได้ มีการวิจัยทั้งในคนและสัตว์ทดลอง แต่อย่างไรก็ตาม curcuminoids ก็ยังมีข้อจำกัดคือ เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน ethanol, alkalis, ketone, acetic acid และ chloroform อย่างไรก็ตาม สารละลาย curcumin จะไม่เสถียร ดังนั้นการปรับปรุงสูตรโครงสร้างเพื่อลดข้อจำกัดนี้ ทำให้ได้ curcuminoid analogs ที่มีคุณสมบัติทัดเทียมกับสารต้นแบบ ซึ่งเมื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติโครงสร้างของ curcumin ต้นแบบ กับ curcuminoid analogs ทำให้สามารถประเมินได้ว่าสาร curcuminoid analogs นั้นมีคุณสมบัติ antioxidant activity ที่ดี

สรุปผลการวิจัย

ภาวะ oxidative stress ทำให้เกิดความเป็นพิษสะสมและส่งผลกระทบต่อการสูญเสียหน้าที่ของเซลล์ประสาททำให้เกิดโรคระบบประสาทเสื่อม (neurodegenerative disease) ตามมาโรคที่พบได้บ่อยในผู้สูงอายุ ได้แก่ โรคพาร์กินสัน และโรคอัลไซเมอร์ จากการประเมินผลของภาวะ oxidative stress ด้วยการเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2 ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (SK-N-SH; human neuroblastoma) ที่มีคุณสมบัติคล้าย dopaminergic neuron ซึ่งเป็นเซลล์ที่พบพยาธิสภาพในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน ด้วยวิธี MTT assay และการศึกษา morphological change ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง พบว่า เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสได้ด้วย H_2O_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยพบว่าค่า IC_{50} อยู่ที่ 70 μM นอกจากนี้พิษของ H_2O_2 ยังมีผลต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงทั้งในรูปแบบ dose และ time dependent

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ mitochondrial membrane potential โดยการใช้ JC-1 พบว่า H_2O_2 ทำให้การทำหน้าที่ของ mitochondria เสียไป ถึงแม้ว่าการเกิด apoptosis จะมีได้หลายวิธีและหลายปัจจัย แต่จากลักษณะดังกล่าวทำให้สมมติฐานได้ว่า สารใดที่จะช่วยลด oxidative stress และลดการตายของเซลล์น่าจะมีกลไกที่ผ่าน mitochondria หรือ intrinsic pathway เป็นกลไกหลักนั่นเอง

จากการศึกษาผลของสาร curcuminoids สารโครงสร้างที่ 1, 2 และ 3 ซึ่งเป็น natural curcuminoids คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin ตามลำดับ และสาร curcuminoid analogs (สารโครงสร้างที่ 4-13) พบว่า สารโครงสร้างที่ 1 (curcumin) และโครงสร้างแอนาล็อกที่ 7 (tetrahydrocurcumin) ช่วยยับยั้งการตายของเซลล์ได้ดีที่สุด นอกจากนี้การศึกษานี้เปรียบเทียบปริมาณการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับวิถีการเกิดอะพอพโทซิสทั้งใน cytosol และ mitochondria ได้แก่ Bax และ Bcl-2 ก็มีการเปลี่ยนแปลงที่สอดคล้องกับการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ และสมมติฐานการตายของเซลล์ที่มี mitochondria เป็นศูนย์กลางสำคัญ ดังนั้นจึงสามารถช่วยอธิบายกลไกการออกฤทธิ์ของสาร curcuminoids และ analogs ได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น ซึ่งสารเหล่านี้มีคุณสมบัติที่ดี และอาจมีผลในการป้องกัน บรรเทา ชะลอการตายของเซลล์ อันมีสาเหตุมาจากการสะสมภาวะ oxidative stress โดยธรรมชาติของสิ่งมีชีวิตเอง และจากการได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม ซึ่งอาจเป็นทางเลือกหนึ่งที่จะนำไปช่วยเหลือ พันธุ์ ป้องกันบรรเทาการตายของเซลล์ประสาทในผู้สูงอายุที่มีความเสี่ยงต่อการเกิดโรคระบบประสาทเสื่อมต่อไปได้

เอกสารอ้างอิง (References)

1. Beckman JS, Beckman TW, Chen J, Marshall PA, Freeman BA. Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1990; 87: 1620-4.
2. Bove J, Prou D, Perier C, Przedborski S. Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx* 2005; 2: 484-94.
3. Chan WH, Wu CC, Yu JS. Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of Cellular Biochemistry* 2003; 90: 327-38.
4. Chen J, Tang XQ, Zhi JL, Cui Y, Yu HM, Tang EH, et al. Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. *Apoptosis* 2006; 11: 943-53.
5. Cole GM, Teter B, Frautschy SA. Neuroprotective effects of curcumin. *Advances in Experimental Medicine & Biology* 2007; 595: 197-212.
6. Cornford ME, Chang L, Miller BL. The neuropathology of parkinsonism: an overview. *Brain Cogn* 1995; 28: 321-41.
7. Dawson TM, Dawson VL. Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 2003; 302: 819-22.
8. Fritz RR, Abell CW, Patel NT, Gessner W, Brossi A. Metabolism of the neurotoxin in MPTP by human liver monoamine oxidase B. *FEBS Letters* 1985; 186: 224-8.
9. Gupta S, Agrawal A, Agrawal S, Su H, Gollapudi S. A paradox of immunodeficiency and inflammation in human aging: lessons learned from apoptosis. *Immun Ageing* 2006; 3: 1183-1185.
10. Jayaprakash GK, Jagan Mohan Rao L, Sakariah KK. Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *Journal of Agricultural & Food Chemistry* 2002; 50: 3668-72.
11. Karp G. *Cell and Molecular Biology: Concepts and Experiments*. Asia: John Wiley & Sons, Inc, 2008.
12. Langston JW. The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 1996; 47: S153-60.
13. Langston JW, Ballard P, Tetrud JW, Irwin I. Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 1983; 219: 979-80.

14. Le Couteur DG, Muller M, Yang MC, Mellick GD, McLean AJ. Age-environment and gene-environment interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Rev Environ Health* 2002; 17: 51-64.
15. Moore DJ, West AB, Dawson VL, Dawson TM. Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annu Rev Neurosci* 2005; 28: 57-87.
16. Tanaka M, Takeyasu T, Fuku N, Li-Jun G, Kurata M. Mitochondrial genome single nucleotide polymorphisms and their phenotypes in the Japanese. *Ann N Y Acad Sci* 2004; 1011: 7-20.
17. Vila M, Przedborski S. Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nat Med* 2004; 10 Suppl: S58-62.
18. Wang YJ, Pan MH, Cheng AL, Lin LI, Ho YS, Hsieh CY, et al. Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of Pharmaceutical & Biomedical Analysis* 1997; 15: 1867-76.

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณกองทุนวิจัยคณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ที่ให้การสนับสนุนโครงการวิจัยนี้จนเสร็จสิ้นสมบูรณ์ ขอขอบคุณ รศ. ดร.สุขกิจ ยะโสธรศรีกุล คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์มหาวิทยาลัยนเรศวร และ ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ที่ปรึกษาโครงการวิจัย ที่ได้ให้ความแนะนำตลอดการทำวิจัย รวมทั้งสารสังเคราะห์ curcuminoid และ curcuminoid analogs ที่นำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ สุดท้ายนี้ขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการช่วยวิจัยและอำนวยความสะดวกตลอดการศึกษาวิจัย ซึ่งทำให้ดำเนินการสำเร็จลุล่วงเป็นอย่างดี

Output ที่ได้จากโครงการ

1. เข้าร่วมนำเสนอผลงาน ในงานประชุมวิชาการ

The 38th Congress on Science and Technology of Thailand, Chiang Mai: Oct 16-19, 2012

2. เข้าร่วมนำเสนอผลงาน ในงานประชุมวิชาการ

The 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology, Bangkok: Nov 25-29, 2012

3. ดำเนินการผลิตบัณฑิตระดับปริญญาโท เอก ได้

ภาคผนวก (Appendix)

บทคัดย่อในการไปเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการ The 38th Congress on Science and Technology of Thailand, Chiang Mai: Oct 16-19, 2012.

MITOCHONDRIA PROTECTIVE EFFECTS OF CURCUMINOID ANALOGS ON OXIDATIVE STRESS INDUCED-APOPTOSIS IN NEURONAL CELL LINE CULTURE

Watcharee Tiangyou,^{1*} Nawaphat Jangphattananont,¹ Damratsamon Surangkul,² Apichart Suksamrarn³

¹Department of Anatomy, Faculty of Medical science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical science, Naresuan University, Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok 10240, Thailand

*e-mail: watchareet@nu.ac.th

Abstract: Mitochondria are involved in molecular target of oxidative stress and apoptotic pathway which resulting in neurodegenerative disorders such as Parkinson's disease. Thus we aimed to study the protective effects of curcuminoids and curcuminoid analogs on the mitochondria of the apoptosis-induced neuronal cell line culture (SK-N-SH). Twenty compounds including pure curcumin, demethoxycurcumin, bisdemethoxycurcumin and their analogs were tested. Cells pretreated two hours with 5 μ M of curcumin and its analog, the tetrahydrocurcumin, showed the most increasing the cell viability by 30-31% ($p < 0.05$) when induced apoptosis with 50 μ M of H₂O₂. They also did not have cytotoxicity at concentration below 40 μ M. Apoptotic cells were also shown the mitochondrial membrane disruption when stained with mitochondrial membrane potential sensitive dye; JC-1. Proteins involved with mitochondria-mediated apoptotic mechanism; Bcl-2 and Bax, were also changed by means of anti-apoptotic effect of curcumin and tetrahydrocurcumin toward H₂O₂- induced apoptosis. They increased the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2, and reduced the expression of pro-apoptotic protein Bax in mitochondria when treated with 50 μ M of H₂O₂ ($p < 0.05$). While H₂O₂ increased pro-apoptotic protein Bax in both cytosol and mitochondria, and decreased Bcl-2 in mitochondria. Curcuminoids are major active compounds of turmeric (*Curcuma Longa* Linn.) which have a variety of advantages, such as anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-cancer. However, they are water insoluble and unstable in light. Curcuminoid analogs are curcuminoid metabolites which have more stability and efficacy equal to or better than those of parent compounds. Tetrahydrocurcumin is the derivative of curcumin, which has shown more powerful of anti-oxidative effect than curcumin. Moreover, tetrahydrocurcumin can be found as curcumin metabolite in animal body, thus this study could provide some of its protective efficacy. In conclusion, both curcumin and its analog, the tetrahydrocurcumin, have shown anti-apoptotic effect and this effect was suggested a part of anti-apoptotic mechanism via mitochondrial pathway. This study also suggested that pure curcumin and tetrahydrocurcumin may be used as natural anti-oxidants which help to prevent neuronal cell deaths leading cause of neurodegenerative diseases.

Acknowledgements: National Research Council of Thailand (NRCT), Naresuan University and Prof.Dr. Apichart Suksamrarn

Keywords: curcuminoids, mitochondria, oxidative stress, apoptosis, Parkinson's disease

The 13th FAOBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology,
Bangkok: Nov 25-29, 2012

**EFFECTS OF CURCUMIN AND TETRAHYDROCUCUMIN (THC) ON THE
EXPRESSION OF BCL-2 AND BAX PROTEINS IN OXIDATIVE STRESS-
INDUCED APOPTOSIS NEURONAL CELL LINE**

Tiangyou W^{1*}, Jangphattananont N¹, Surangkul D², Suksamrarn A³

¹Department of Anatomy, Faculty of Medical science, Naresuan University,
Phitsanulok 65000, Thailand

²Department of Biochemistry, Faculty of Medical science, Naresuan University,
Phitsanulok 65000, Thailand

³Department of Chemistry, Faculty of Science, Ramkhamhaeng University, Bangkok
10240, Thailand

*e-mail: watchareet@nu.ac.th

Abstract: Oxidative stress and mitochondrial dysfunction are well demonstrated as leading cause of neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease. Thus we aimed to study the effects of curcuminoids and their analogs on the mitochondria of the apoptosis-induced in cultured neuronal cell line (SK-N-SH). Cells pretreated two hours with 5 μ M of curcumin and its analog, the tetrahydrocurcumin (THC), showed the highest numbers of cell survival of 31% ($p < 0.001$) by MTT assay, when induced apoptosis with 50 μ M of H₂O₂. Apoptotic cells showed the mitochondrial membrane disruption when stained with mitochondrial membrane potential sensitive dye; JC-1. Western blot analysis of proteins involved with mitochondria-mediated apoptotic mechanism; Bcl-2 and Bax, were also changed by means of anti-apoptotic effect of curcumin and THC against H₂O₂-induced apoptosis. While H₂O₂ induced the expression of pro-apoptotic protein Bax in both cytosol and mitochondria ($p < 0.001$) causing cytochrome C released and activation of apoptosis respectively. Curcumin and THC helped to increase the expression of anti-apoptotic protein Bcl-2 in mitochondria ($p < 0.001$), and reduced the expression of pro-apoptotic protein Bax in both cytosol and mitochondria when treated with 50 μ M of H₂O₂ ($p < 0.001$). Thus the results can imply that Bcl-2 protects the mitochondrial membrane from Bax. In conclusion, both curcumin and its major metabolite, the tetrahydrocurcumin, have shown anti-apoptotic effect and this effect was suggested a part of anti-apoptotic mechanism via mitochondrial pathway. This study also supported that curcumin and tetrahydrocurcumin may be used as natural prevention for neurodegenerative diseases.

Keywords: curcumin, tetrahydrocurcumin, oxidative stress, apoptosis, Parkinson's disease