

ห้องสมุดงานวิจัย สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ



E47369

MOLECULAR INVESTIGATIONS OF PHYTOCHEMICALS HAVING
EFFECTS ON HUMAN CHONDROCYTE METABOLISM

TEANYALUCK PHITAK

DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOCHEMISTRY

THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY

AUGUST 2010



**MOLECULAR INVESTIGATIONS OF PHYTOCHEMICALS HAVING
EFFECTS ON HUMAN CHONDROCYTE METABOLISM**

THANYALUCK PHITAK



**A THESIS SUBMITTED TO THE GRADUATE SCHOOL IN
PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIRMENTS
FOR THE DEGREE OF
DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOCHEMISTRY**

**THE GRADUATE SCHOOL
CHIANG MAI UNIVERSITY**

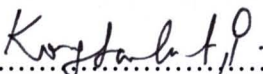
AUGUST 2010

**MOLECULAR INVESTIGATIONS OF PHYTOCHEMICALS HAVING
EFFECTS ON HUMAN CHONDROCYTE METABOLISM**

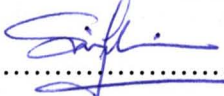
THANYALUCK PHITAK

**THIS THESIS HAS BEEN APPROVED
TO BE A PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS
FOR THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY
IN BIOCHEMISTRY**


EXAMINING COMMITTEE

.....CHAIRPERSON

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert

.....MEMBER


Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai

.....MEMBER

Assoc. Prof. Dr. Ampai Panthong


.....MEMBER

Dr. Waraporn Kasekarn


.....MEMBER

Dr. Peraphan Pothacharoen

THESIS ADVISORY COMMITTEE

.....ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert

.....CO-ADVISOR

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai

.....CO-ADVISOR

Prof. Dr. Bruce Caterson

16 August 2010

ACKNOWLEDGEMENTS

I wish to express my sincere gratitude and deep appreciation to my advisor, Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert, for his patient guidance, precious advice, and persistent encouragement during the preparation and investigation of this thesis.

I also would like to express my gracious thank to my co-advisor, Prof. Dr. Bruce Caterson, Cardiff School of Biosciences, Cardiff University, Wales, UK for his valuable and kind advice, and for providing laboratory facilities during my stay in his laboratory and I would like to thank all staffs at the Caterson's laboratory for their kindness and friendship.

I would like to thanks Assist. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai for her kindly help with best suggestions. I would like to give special thanks to Dr. Peraphan Pothacharoen, for her excellent training and advice in almost experiment in my thesis. I would like to extent my gracious thanks to Dr. Jongkolnee Settakorn, Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chiang Mai University, for giving me the favor to analyze the results of histoimmunochemistry in animal model.

I also would like to thank my dear laboratory partners; Mr. Theerawut Chanmee and Mr. Kanchanok Kodchakorn for their favor in the setting up the animal model for my thesis.

I would like to acknowledge the Royal Golden Jubilee (RGJ) scholarship and PERCH-CIC for the financial support that made this work possible.

Many thanks for my friends and colleagues in the Department of Biochemistry, Faculty of Medicine, Chiang Mai University for their kindness and friendship.

Finally, I would like to express my deepest appreciation to my family, my boy friend, Mr. Weerayuth Klaysutthi and finally my dear dog, Fender, for their love and encouragement during this study.

Thanyaluck Phitak

Thesis Title Molecular Investigations of Phytochemicals Having Effects on Human Chondrocyte Metabolism

Author Miss Thanyaluck Phitak

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

| | |
|---------------------------------------|------------|
| Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert | Advisor |
| Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai | Co-advisor |
| Prof. Dr. Bruce Caterson | Co-advisor |

ABSTRACT

E47369

Osteoarthritis (OA) is the most common form of arthritis and affects millions of people worldwide. Patients have traditionally been treated with non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs), but these are associated with significant side effects. The phytochemicals from plants are the choice for developing drug for OA treatment. The two type of Thai plants were selected, *Alpinia galanga* rhizomes and seeds of *Sesamum indicum*. The chondroprotective effect was studied in short-term porcine cartilage explant induced inflammation using interleukin-1beta (IL-1 β). The acetone extract of *A. galanga* had the highest chondroprotective effect above other

non-polar extracts. An active compound, para-hydroxycinnamaldehyde, was isolated from this fraction. For *S. indicum*, the well-known active phytochemical, sesamin, was focused for this study. It showed the chondroprotective effect in porcine cartilage explant model. When compare the chondroprotective effect of these two phytochemicals, the effective doses of *p*-hydroxycinnamaldehyde was higher than sesamin about 160 times. Thus, sesamin was chosen to further investigate.

In long-term porcine cartilage explant, sesamin had ability to revert IL-1 β effects on the degradations of extracellular matrix (ECM) molecules. IL-1 β -induced the releases of sulfated-glycosaminoglycan (s-GAG) and hydroxyproline from the explants were significantly inhibited by sesamin. The molecular mechanism of this ability of sesamin was studied, it was found that sesamin could decrease the expressions of MMP-1, -3 and -13, which play a role on both PGs and type II collagen degradation, both on mRNA and protein levels. Interestingly, the activation of MMP-3 might be inhibited by sesamin. Moreover, in human articular chondrocytes (HACs), IL-1 β signal transductions were inhibited by sesamin: p38 and JNK phosphorylations in MAPK pathway and NF κ B activation. The effect of sesamin was further studied in papain-induced OA rats. Sesamin treatment reversed pathological changes in OA cartilage, which were reduction of the disorganization of chondrocytes in cartilage, increase of the cartilage thickness, decreasing of type II collagen and s-GAG losses. Sesamin alone might increase type II collagen and s-GAG in cartilage tissue of normal rats. The results demonstrate that sesamin efficiently suppressed pathological processes in an OA model.

In addition, the additive effect of sesamin with drug used for OA treatment, glucosamine-sulfate (GlcN-S) was also studied in short-term porcine cartilage explant model. Sesamin showed the additive effect with GlcN-S to protect proteoglycans degradation in IL-1 β -induced-porcine cartilage explant.

Taken all results, sesamin could be a potential therapeutic agent for the treatment of OA or at least as the complementary medicine.

| | |
|-----------------------|--|
| ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ | การตรวจสอบสารพฤกษเคมีระดับโมเลกุลที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์คอนโครไชต์มนุษย์ |
| ผู้เขียน | นางสาว รัชฎาภรณ์ พัทธกัญ |
| ปริญญา | วิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต (ชีวเคมี) |

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

| | |
|--------------------------|----------------------|
| รศ. ดร. ปรัชญา คงทวีเลิศ | อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก |
| รศ. ดร. ศิริวรรณ องค์ไชย | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |
| Prof. Dr. Bruce Caterson | อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม |

บทคัดย่อ

E47369

โรคข้อกระดูกอักเสบเป็น ภาวะที่พบบ่อยที่สุดในภาวะข้อต่ออักเสบและ ส่งผลกระทบต่อประชากรกว่าล้านคนทั่วโลก การรักษาผู้ป่วยแบบดั้งเดิมมักใช้ยาในกลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ แต่ยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง สารเคมีจากพืชเป็นอีกหนึ่งทางเลือกเพื่อพัฒนาไปสู่การรักษาโรคข้อกระดูกอักเสบ ในการศึกษาพืชของไทยสองชนิดได้ถูกคัดเลือกมาเพื่อศึกษา ได้แก่ เหง้าข่า (*Alpinia galanga rhizomes*) และ เมล็ดงา (*Sesamun indicum seeds*)ฤทธิ์การป้องกันกระดูกอ่อนของสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดถูกศึกษาโดย การเพาะเลี้ยงผิวกระดูกอ่อนหนูโดยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสารอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า พบว่าสารสกัดจากเหง้าข่าในชั้นอะซีไตนามีฤทธิ์ยับยั้งการสลายของกระดูกอ่อนมากกว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายอื่นๆ และพบว่าสารพาราไฮดรอกซีซินนามอลไซด์คือสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนี้ สำหรับเมล็ดงาสารที่

เป็นที่รู้จักและพบมากในงา คือ เซซามิน ได้ถูกนำมาศึกษาในครั้งนี้และพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการป้องกันการสลายของกระดูกอ่อนที่กระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้าเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการป้องกันการสลายของกระดูกอ่อนของสารทั้งคู่นี้ พบว่าปริมาณของสารพาราไฮดรอกซีซินนามอลดีไฮด์ที่ใช้ เพื่อทำให้ออกฤทธิ์นั้นมากกว่าปริมาณของสารเซซามินถึง 160 เท่า ดังนั้นในการศึกษาต่อไป จะเลือกเฉพาะ สารเซซามินมาทำการศึกษาเท่านั้น

ในการศึกษาที่ลึกลงไปทำในกระดูกอ่อนผิวข้อของหนู โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นเป็นเวลา 28 วัน พบว่าสารเซซามินสามารถยับยั้งฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า ต่อการสลายของโมเลกุลภายนอกเซลล์ได้ โดยพบว่าการสลายของซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคนและไฮดรอกซีโปรตีนถูกยับยั้งได้โดยสารเซซามิน ได้ศึกษากลไกการยับยั้งของสารเซซามินต่อ และพบว่าสารเซซามินสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-1, -3 และ -13 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายโปรตีโอไกลแคนและคอลลาเจนได้ทั้งในระดับยีนและโปรตีน นอกจากนั้นยังพบว่าสารเซซามินยังสามารถยับยั้งการกระตุ้นกัมมันตภาพของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-3 ได้อีกด้วย ในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์พบว่าสัญญาณภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า ถูกยับยั้งได้โดยสารเซซามิน โดยสามารถยับยั้งทั้งการเพิ่มหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน p38 และ JNK ในวิถี MAPK ได้ และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด NFκB ได้อีกด้วย ฤทธิ์ของสารเซซามินถูกศึกษาต่อในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคข้อกระดูกอักเสบด้วยปาเปน พบว่าการให้สารเซซามินร่วมกับฉีดปาเปนแก่หนูดังกล่าว สามารถยับยั้งพยาธิสภาพการเกิดโรคได้ โดยสามารถลดการเรียงตัวของเซลล์กระดูกอ่อนที่ผิดปกติเนื่องจากการอักเสบได้ สามารถเพิ่มความหนาของกระดูกอ่อนได้และสามารถลดการสลายของสารชีวโมเลกุลในกระดูกอ่อนที่สำคัญ คือ คอลลาเจนชนิดที่สอง และ ซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคนได้ นอกจากนั้นสารเซซามินยังสามารถเพิ่มคอลลาเจนชนิดที่สองและซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคน ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อหนูปกติ

ได้อีกด้วย จากผลการศึกษาดังกล่าว ทั้งหมดสามารถบอกได้ว่าสารเซซามินมีประสิทธิภาพในการลดการพัฒนารูปการเกิดพยาธิสภาพของ โรคข้อกระดูกอักเสบในหนูได้

นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเสริมฤทธิ์ของยาที่ใช้รักษาโรคข้อเสื่อม ได้แก่ กลูโคซามีนซัลเฟต ของสารเซซามินในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหนู พบว่าสารเซซามินสามารถเสริมฤทธิ์ของกลูโคซามีนซัลเฟต ในการป้องกันการสลายของโปรตีโอไกลแคนโอในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า

ดังนั้นสารเซซามินน่าจะสามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคข้อกระดูกอักเสบ หรืออย่างน้อยเป็นตัวเสริมประสิทธิภาพของยารักษาโรคนี้ได้

TABLE OF CONTENT

| | Page |
|---|-------------|
| ACKNOWLEDGEMENT | iii |
| ENGLISH ABSTRACT | v |
| THAI ABSTRACT | viii |
| LIST OF TABLES | xix |
| LIST OF FIGURES | xx |
| ABBREVIATIONS | xxvi |
| CHAPTER I: INTRODUCTION | |
| 1.1 Statement and significance of the problem | 1 |
| 1.2 Literature reviews | 5 |
| 1.2.1 Articular cartilage | 5 |
| 1.2.2 Composition of articular cartilage matrix | 12 |
| 1.2.2.1 Collagens | 12 |
| 1.2.2.1.1 Cartilage collagen | 14 |
| - Type II collagen | 14 |
| - Type XI collagen | 16 |
| - Type IX collagen | 17 |
| - Other collagens | 18 |
| 1.2.2.1.2 Collagen biosynthesis | 19 |
| - Step of collagen biosynthesis | 19 |
| 1.2.2.2 Proteoglycan | 23 |

| | | |
|-----------|---|----|
| 1.2.2.2.1 | Structure of proteoglycan | 23 |
| 1.2.2.2.2 | Cartilage proteoglycan | 29 |
| - | Aggrecan | 29 |
| - | Other hyaluronan-binding proteoglycans | 31 |
| - | Small leucine-rich proteoglycans (SLRs) | 31 |
| 1.2.2.2.1 | Proteoglycan biosynthesis | 33 |
| 1.2.3 | Cartilage extracellular matrix | 43 |
| 1.2.3.1 | Aggrecan | 45 |
| 1.2.3.2 | The collagen network | 45 |
| 1.2.3.3 | Collagen associated molecules | 46 |
| 1.2.3.4 | Other cartilage extracellular matrix constituents | 46 |
| 1.2.3.5 | Other proteins in cartilage | 48 |
| 1.2.4 | Cartilage matrix metabolism | 48 |
| 1.2.5 | Osteoarthritis | 51 |
| 1.2.5.1 | Pathobiology of osteoarthritis | 51 |
| 1.2.5.2 | Degeneration of articular cartilage in osteoarthritis | 54 |
| 1.2.5.2.1 | Cartilage degradation | 54 |
| - | Aggrecanase | 54 |
| - | Matrix metalloproteinases (MMPs) | 61 |
| 1.2.5.2.2 | Cartilage synthesis | 69 |
| 1.2.5.2.3 | Inflammation | 69 |

| | | |
|--|--|----|
| 1.2.5.3 | Symptoms and signs | 75 |
| 1.2.5.4 | Treatment of osteoarthritis | 76 |
| 1.2.5.4.1 | Pharmacologic treatment | 76 |
| 1.2.5.4.2 | Non-pharmacologic treatment | 78 |
| 1.2.5.4.3 | Alternative treatments | 78 |
| 1.2.5.4.4 | Surgical treatment | 79 |
| 1.2.6 | <i>Sesamum indicum</i> and <i>Alpinia galanga</i> | 79 |
| 1.2.6.1 | <i>Sesamum indicum</i> and sesamin | 79 |
| 1.2.6.2 | <i>Alpinia galanga</i> | 80 |
| 1.3 | Objectives | 82 |
| CHAPTER II: MATERIALS AND METHODS | | |
| 2.1 | Chemicals | 83 |
| 2.2 | Preparations of extracts | 83 |
| 2.2.1 | Preparation of <i>Alpinia galanga</i> extracts | 83 |
| 2.2.2 | Isolation of active compound of acetone fraction of <i>A. galanga</i> | 86 |
| 2.2.3 | Preparation of sesamin from <i>Sesamum indicum</i> Linn. | 88 |
| 2.3 | Tissue/cell cultures and treatments | 89 |
| 2.3.1 | Porcine cartilage explant preparation and treatment | 89 |
| 2.3.2 | Human articular chondrocyte (HAC) culture and treatment | 89 |

| | | |
|---------------------------------|--|-----|
| 2.4 | <i>In vivo</i> experiment | 90 |
| 2.5 | Analytical methods | 91 |
| 2.5.1 | Cytotoxicity detections | 91 |
| 2.5.2 | Measurement of s-GAG levels | 92 |
| 2.5.3 | Measurement of HA levels | 92 |
| 2.5.4 | Gelatin zymography | 93 |
| 2.5.5 | Quantitation of uronic acid remaining in cartilage tissue | 93 |
| 2.5.6 | Measurement of hydroxyproline release and remaining | 94 |
| 2.5.7 | Gene expression analysis | 94 |
| 2.5.8 | Measurement of protein level | 97 |
| 2.5.9 | Protein extraction and western blot analysis | 97 |
| 2.5.10 | Western blots for aggrecanase activities | 98 |
| 2.5.11 | Immunohistochemistry analysis | 99 |
| CHAPTER III: RESULTS | | |
| 3.1 | Investigation of chondroprotective effect of <i>Alpinia galanga</i> extracts and screening for active phytochemical | 100 |
| 3.1.1 | Chondroprotective effect of hexane, acetone, ethylacetate, and methanol extracts of <i>Alpinia galanga</i> in porcine cartilage explant induced inflammation using IL-1 β | 100 |
| 3.1.2 | The isolation of active compound in acetone extract of <i>A. galanga</i> | 105 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 3.1.3 | The effect of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde on porcine cartilage explant | 108 |
| 3.2 | Investigation of chondroprotective effect of sesamin isolated from <i>Sesamum indicum</i> Linn. | 110 |
| 3.2.1 | Chondroprotective effect of sesamin in porcine cartilage explant induced inflammation using IL-1 β | 110 |
| 3.3 | Investigation of molecular mechanisms of chondroprotective effect of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde and sesamin in human articular chondrocytes (HACs) | 114 |
| 3.3.1 | Cytotoxicities of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde and sesamin in HACs | 114 |
| 3.3.2 | The effects of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde and sesamin on human articular chondrocytes | 116 |
| 3.3.3 | The effects of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde and sesamin on catabolic and anabolic gene expressions in HACs | 119 |
| 3.4 | Investigation of chondroprotective effect of sesamin in long-term porcine cartilage explant culture induced inflammation using IL-1 β | 125 |
| 3.4.1 | The effect of sesamin on proteoglycans (PGs) degradation | 125 |
| 3.4.2 | The effect of sesamin on collagen degradation | 128 |
| 3.5 | Investigation of molecular mechanism of chondroprotective effect of sesamin | 131 |
| 3.5.1 | The effect of sesamin on ADAMTS activities | 131 |
| 3.5.2 | The effect of sesamin on MMP-1, MMP-3 and MMP-13 expressions | 133 |

| | | |
|---------|--|-----|
| 3.6 | Investigation of sesamin effect on IL-1 β signal transduction in HACs | 136 |
| 3.6.1 | The effect of sesamin on IL-1 β induces MAPK signaling pathway in HAC | 136 |
| 3.6.2 | The effect of sesamin IL-1 β induces NF- κ B transcription factor in HAC | 140 |
| 3.7 | Investigation of sesamin effect on osteoarthritis pathological progression in papain-induced osteoarthritis (OA) rat model | 144 |
| 3.7.1 | The effect of sesamin on the cartilage and chondrocyte morphology in papain-induced osteoarthritis (OA) rat model | 144 |
| 3.7.2 | The effect of sesamin on the degradation of extracellular matrix (ECM) molecules in papain-induced osteoarthritis (OA) rat model | 146 |
| 3.8 | Investigation of the chondroprotective effect of the combination between sesamin and glucosamin-sulfate | 150 |
| 3.8.1 | Comparison of glucose derivatives effects on cartilage degradation | 150 |
| 3.8.1.1 | Chondroprotective effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl in porcine cartilage explants | 151 |
| 3.8.1.2 | Cytotoxic effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl in HAC | 154 |
| 3.8.1.3 | Effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on HA release and MMP-2 activity in IL-1 β -treated-HAC | 156 |

| | |
|---|-----|
| 3.8.1.4 Effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on catabolic (MMPs) gene expression in HAC | 158 |
| 3.8.1.5 Effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on anabolic gene expressions in HAC | 160 |
| 3.8.2 The additive chondroprotective effect of sesamin and GlcN-S on porcine cartilage explant | 162 |

CHAPTER IV: DISCUSSION AND CONCLUSION

| | |
|---|-----|
| 4.1 The chondroprotective effect of <i>Alpinia galanga</i> extracts and its active phytochemical | 172 |
| 4.2 The chondroprotective effect of sesamin | 172 |
| 4.3 The comparison of chondroprotective effect between <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde and sesamin | 172 |
| 4.4 Chondroprotective effect of sesamin, its molecular mechanism and its effect in animal model | 173 |
| 4.5 Chondroprotective effects of glucose derivatives and the additive effect of sesamin | 175 |
| SUMMARY | 178 |
| FURTHER STUDY | 179 |
| REFERENCES | 180 |

| | |
|--------------------------------|-----|
| APPENDICES | 216 |
| APPENDIX A | 217 |
| APPENDIX B | 222 |
| APPENDIX C | 224 |
| PUBLICATIONS FOR THESIS | 229 |
| CURRICULUM VITA | 230 |

LIST OF TABLES

| Table | Page |
|--|-------------|
| 1.1 Classification of matrix metalloproteinases | 62 |
| 2.1 Primers used for semi-quantitative RT-PCR and quantitative real time PCR | 96 |
| 3.1 The effect of GlcN-S and/or sesamin on the reduction of HA release from cartilage explant induced with IL-1 β into media | 165 |
| 3.2 The effect of GlcN-S and/or sesamin on the reduction of s-GAG release from cartilage explant induced with IL-1 β into media | 167 |
| 3.3 The effect of GlcN-S and/or sesamin on the reduction of uronic acid loss from cartilage explant induced with IL-1 β | 169 |

LIST OF FIGURES

| Figure | Page |
|---|------|
| 1.1 Articular cartilage or hyaline cartilage covers the joint surfaces | 7 |
| 1.2 Section of bovine articular cartilage stained with Hematoxylin & Eosin (H&E) | 9 |
| 1.3 Type I procollagen as a prototype of fibril-forming collagens | 13 |
| 1.4 Structure of proteoglycan | 25 |
| 1.5 Repeating disaccharide units in proteoglycans | 26 |
| 1.6 Structure of the different glycosaminoglycan chains | 27 |
| 1.7 Structure of aggrecan monomer | 30 |
| 1.8 Schematic overview of synthesis and secretion of aggrecan, link protein and hyaluronan by a chondrocyte | 34 |
| 1.9 Synthesis pathway for the formation of UDP-sugars and PAPS | 36 |
| 1.10 The different steps in the synthesis of CS, DS, HS and heparin glycosaminoglycan chains of the GlcA-Gal-Xyl-linker region | 38 |
| 1.11 Heparan sulfate proteoglycans turn over | 42 |
| 1.12 Illustration of components in the cartilage extracellular matrix | 44 |
| 1.13 The control of degradation of cartilage extracellular matrix | 50 |
| 1.14 Molecular and cellular mechanisms that perpetuate osteoarthritis | 53 |
| 1.15 Aggrecanase cleavage sites in the aggrecan core protein | 55 |
| 1.16 The structure of ADAMTS-4 and ADAMTS-5 | 57 |

| | | |
|------|---|-----|
| 1.17 | Schematic representation of the two main aggrecanase-generated aggrecan cleavage fragments | 60 |
| 1.18 | Major signaling pathways for IL-1 beta in chondrocytes and synovial cells | 73 |
| 2.1 | Diagram represents the method of <i>A. galanga</i> extraction and the dried weight of each crude extract | 85 |
| 2.2 | Diagram represents the method of crude acetone extract isolation for finding out of the active compound | 87 |
| 3.1 | Characteristic of <i>Alpinia galanga</i> and it's rhizome | 101 |
| 3.2 | <i>A. galanga</i> extracts affect on the releases of s-GAG, HA from porcine cartilage tissue to the media and uronic acid remaining in the cartilage tissue | 102 |
| 3.3 | Effects of <i>A. galanga</i> extracts on MMP-2 activity | 104 |
| 3.4 | Para-hydroxycinnamaldehyde the active compound of the acetone fraction of <i>A. galanga</i> | 107 |
| 3.5 | Para-hydroxycinnamaldehyde affect on the releases of s-GAG, HA from porcine cartilage explant to the media and the uronic acid remaining in the cartilage tissue and the production of MMP-2 activity | 109 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.6 | Characteristic of <i>Sesamum indicum</i> and it's seed | 111 |
| 3.7 | Sesamin: the phytochemical of the <i>Sesamum indicum</i> | 112 |
| 3.8 | Sesamin affect on the releases of s-GAG, HA from porcine cartilage explant to the media and the uronic acid remaining in the cartilage tissue and the production of MMP-2 activity | 113 |
| 3.9 | Cytotoxicities of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde and sesamin on human articular chondrocytes | 115 |
| 3.10 | Effects of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde on releases of HA, s-GAG and MMP-2 from chondrocytes | 117 |
| 3.11 | Effects of sesamin on releases of HA, s-GAG and MMP-2 from chondrocytes | 118 |
| 3.12 | Effect of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde on mRNA expression of proteinases | 120 |
| 3.13 | Effect of sesamin on mRNA expression of proteinases | 121 |
| 3.14 | Effects of <i>p</i> -hydroxycinnamaldehyde on mRNA expression of cartilage genes (AGG, COL2 and SOX9) | 123 |
| 3.15 | Effects of sesamin on mRNA expression of cartilage genes (AGG, COL2 and SOX9) | 124 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.16 | Sulfated GAG release and uronic acid remaining in porcine cartilage tissue explant co-treated with IL-1 β and sesamin | 127 |
| 3.17 | The hydroxyproline release and remaining in porcine cartilage explant co-treated with IL-1 β and sesamin | 129 |
| 3.18 | The hydroxyproline release and remaining in porcine cartilage explant explant co-treated with IL-1 β /OSM and sesamin | 130 |
| 3.19 | Aggrecanase activities in conditioned media of cartilage explant treated with IL-1 β and sesamin | 132 |
| 3.20 | MMP-1, -3 and -13 mRNA expressions in HAC treated with IL-1 β and sesamin | 134 |
| 3.21 | MMP-1, -3 and -13 protein expressions in HAC treated with IL-1 β and sesamin | 135 |
| 3.22 | The effect of IL-1 β on the phosphorylation of MAPK protein families | 137 |
| 3.23 | The effects of sesamin on the phosphorylation of MAPK protein families induced by IL-1 β | 139 |
| 3.24 | The effect of IL-1 β on the phosphorylations of IKK α / β , I κ B α and p65 subunit of NF κ B transcription factor | 141 |

| | | |
|------|---|-----|
| 3.25 | The effects of sesamin on the phosphorylations of IKK α/β , IkB α and p65 subunit of NF κ B transcription factor induced by IL-1 β | 143 |
| 3.26 | H&E staining in cartilage of normal rats, mornal rats+10 μ M sesamin, papain-induced OA rats, OA rats+1 μ M sesamin and OA rats+10 μ M sesamin | 145 |
| 3.27 | Safranin O staining in cartilage of normal rats, mornal rats+10 μ M sesamin, papain-induced OA rats, OA rats+1 μ M sesamin and OA rats+10 μ M sesamin | 147 |
| 3.28 | Type II collagen immunohistochemical staining in cartilage of normal rats, mornal rats+10 μ M sesamin, papain-induced OA rats, OA rats+1 μ M sesamin and OA rats+10 μ M sesamin | 149 |
| 3.29 | The effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl: release of s-GAG, HA from porcine cartilage tissues to the media, the uronic acid remaining in the cartilage tissue | 152 |
| 3.30 | Effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on the production of MMP-2 | 153 |
| 3.31 | The cytotoxic effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl | 155 |

| | | |
|------|--|-----|
| 3.32 | Effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on the release of HA, s-GAG and MMP-2 from chondrocytes | 157 |
| 3.33 | Effect of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on the mRNA expression of proteinases [MMP-3 and MMP-13] | 159 |
| 3.34 | Effects of Glc, GlcN-S, GlcA and GlcN-HCl on the mRNA expression of cartilage genes [AGG and SOX9] | 161 |
| 3.35 | Effects of GlcN-S or sesamin or GlcN-S and sesamin on the release of HA from cartilage explant | 164 |
| 3.36 | Effects of GlcN-S or sesamin or GlcN-S and sesamin on the release of s-GAG from cartilage explant | 166 |
| 3.37 | Effects of GlcN-S or sesamin or GlcN-S and sesamin on the uronic remaining in cartilage explant | 168 |

ABBREVIATIONS

| | |
|----------|-----------------------------------|
| Au | absorbance unit |
| BSA | bovine serum albumin |
| CS | chondroitin sulfate |
| CsCl | cesium chloride |
| CV | coefficient of variation |
| DS | dermatan sulfate |
| ELISA | enzyme-linked immunosorbent assay |
| GAG | glycosaminoglycan |
| Gal | galactose |
| Glc | glucose |
| GlcN | glucosamine |
| GalNAc | <i>N</i> -acetylgalactosamine |
| GlcA | glucuronic acid |
| GlcNAc | <i>N</i> -acetylglucosamine |
| GlcN-HCl | glucosamine hydrochloride |

| | |
|--------------------------------|--|
| GlcN-S | glucpsamine sulfate |
| gm | gram |
| GuHCl | guanidine hydrochloride |
| h | hour |
| HA | hyaluronan |
| HAC | human articular chondrocyte |
| HABP | hyaluronan binding protein |
| HPLC | high performance liquid chromatography |
| HS | heparan sulfate |
| H ₂ SO ₄ | sulfuric acid |
| IdoA | iduronic acid |
| IgG | immunoglobulin G |
| IgM | immunoglobulin M |
| k_a | association rate constants |
| k_d | dissociation rate constants |
| K_d | dissociation equilibrium constants |
| kDa | kilodaltons |
| KS | keratan sulfate |

| | |
|--------------------|-------------------------------------|
| L | liter |
| M | molar |
| mAb | monoclonal antibody |
| pAb | polyclonal antibody |
| min | minute |
| ml | milliliter |
| mg | milligram |
| MW | molecular weight |
| NaCl | sodium chloride |
| NaHCO ₃ | sodium bicarbonate |
| μg | microgram |
| μl | microliter |
| ng | nanogram |
| nm | nanometer |
| nmol | nanomole |
| NSAIDs | non-steroid anti-inflammatory drugs |
| OA | osteoarthritis |
| PAGE | polyacrylamide gel electrophoresis |

| | |
|----------------|-------------------------|
| PBS | phosphate buffer saline |
| PG | proteoglycan |
| pmol | picomole |
| RA | rheumatoid arthritis |
| RU | resonance unit |
| rpm | revolution per minute |
| s | second |
| SD | standard deviation |
| U | unit |
| w/v | weight by volume |
| w/w | weight by weight |
| °C | degree Celsius |
| V _t | total volume |
| Xyl | xylose |
| U | unit |
| UV | ultraviolet |
| V | volting |