



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของแอนาล็อกของเคอร์คิวมินอยด์ต่อกระบวนการอักเสบ
ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน

Effects of curcuminoid analogs on inflammatory
in vitro model of Parkinson's disease

โดย ดร.วัชรีย์ เทียงอยู่ และคณะ

ธันวาคม 2557

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

ผลของแอนาล็อกของเคอร์คิวมินอยด์ต่อกระบวนการอักเสบ

ในแบบจำลองโรคพาร์กินสัน

Effects of curcuminoid analogs on inflammatory

in vitro model of Parkinson's disease

โดย

ดร.วัชร เที่ยงอยู่

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา

สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

และ มหาวิทยาลัยนเรศวร

(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ผู้สนับสนุนทุนการทำงานวิจัยสำหรับโครงการนี้ ได้แก่ สำนักงานคณะกรรมการการอุดมศึกษา สำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัยในส่วนทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่ และกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ นักวิจัยที่ปรึกษา ที่ได้ให้ข้อคิดเห็นต่างๆ ที่มีประโยชน์อย่างมากต่อการศึกษาวิจัย

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ จากภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง และ อ.ดร.ชัชวาลย์ ช่างทำ จากคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยหัวเฉียว ที่ได้ให้ความอนุเคราะห์และช่วยเหลือเรื่องสารสกัดเคอร์คิวมินอยด์และเคอร์คิวมินอยด์แอนาลอกที่ใช้ตลอดโครงการวิจัย รวมทั้งขอขอบคุณมหาวิทยาลัยนเรศวรที่ได้ให้โอกาสและให้การสนับสนุนโครงการวิจัยทางด้านทรัพยากรต่างๆ

สุดท้ายนี้คณะผู้วิจัยขอขอบคุณผู้มีส่วนร่วมในการช่วยดำเนินงานวิจัยและเจ้าหน้าที่ฝ่ายต่าง ๆ ของกองทุนวิจัยทุกท่านที่ได้อำนวยความสะดวกตลอดการศึกษาวิจัย ซึ่งทำให้สามารถดำเนินการสำเร็จลุล่วงไปได้เป็นอย่างดี

ดร.วัชรีย์ เทียงอยู่
(หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน)

บทคัดย่อ

รหัสโครงการ: MRG 5480023

ชื่อโครงการ: ผลของแอนาล็อกของเคอร์คิวมินอยด์ต่อกระบวนการอักเสบในแบบจำลองโรคพาร์คินสัน

ชื่อนักวิจัย และสถาบัน

ดร. วชิร เทียงอยู่
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์
คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

อีเมล: watchareet@nu.ac.th

ระยะเวลาโครงการ:

2 ปี (15 มิถุนายน 2554-15 มิถุนายน 2556)

บทคัดย่อ:

เคอร์คิวมินและเคอร์คิวมินอยด์เป็นสารที่มีคุณสมบัติมากมายที่พบได้ในเหง้าของขมิ้นชัน แต่สารเคอร์คิวมินอยด์ก็มีข้อจำกัด จึงได้มีการพัฒนาแอนาล็อกของเคอร์คิวมินอยด์ขึ้นมาเพื่อให้มีประสิทธิภาพที่เหมาะสมในการนำมาวิจัยคุณสมบัติในด้านต่าง ๆ รวมทั้งประโยชน์ในด้านการต้านความเสื่อมในระบบประสาทด้วย กระบวนการอักเสบในระบบประสาทก็เป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคระบบประสาทเสื่อม โดยในโรคพาร์คินสัน มีการศึกษาพบว่าสารที่มีพิษต่อเซลล์ประสาท MPP^+ สามารถกระตุ้นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบได้ด้วย ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลของเคอร์คิวมินอยด์และแอนาล็อกที่มีฤทธิ์ต้านการตายของเซลล์โดยออกฤทธิ์ยับยั้งกระบวนการอักเสบของเซลล์ในระบบประสาทเพาะเลี้ยง neuroblastoma (SK-N-SH) และ glioblastoma (T98G) ผลการศึกษาพบว่า เซลล์ประสาท SK-N-SH ที่ได้รับเคอร์คิวมิน เตตระไฮโดรเคอร์คิวมิน และเตตระไฮโดรดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน ที่ความเข้มข้น 5 μ M ช่วยลดการตายของเซลล์ที่ได้รับ MPP^+ และ H_2O_2 ที่ทำให้เกิดออกซิเดทีฟสเตรสและการตายของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ทั้งสองประเภทไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงระดับ nitric oxide (NO) เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) หรือ MPP^+ ซึ่งเป็นตัวกลางที่จะกระตุ้นกระบวนการอักเสบให้เกิดขึ้นตามมา อย่างไรก็ตามการศึกษาระดับโปรตีน inflammatory enzyme COX-2 พบว่า MPP^+ ทำให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของ COX-2 ($p<0.001$) ส่วนเคอร์คิวมิน และเตตระไฮโดรดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน สามารถช่วยลด COX-2 ($p<0.001$) จากผลของ MPP^+ ได้ เมื่อศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายโดยมีวิธีการตายผ่านไมโทคอนเดรีย

ได้แก่ Bax และ Bcl-2 พบว่า MPP^+ และ H_2O_2 จะกระตุ้นให้โปรตีน Bax ซึ่งเป็น pro-apoptotic protein เพิ่มขึ้น ($p < 0.001$) ซึ่งจะทำให้เกิดการรั่วของ cytochrome c ออกจากไมโทคอนเดรียและทำให้เกิดกระบวนการอะพอพโทซิสตามมา เมื่อเซลล์ได้รับ เคอร์คูมิน และ เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน พบว่าปริมาณ Bax ในไซโทซอลและไมโทคอนเดรีย ลดลง ($p < 0.001$) และมี Bcl-2 ในไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น ($p < 0.001$) ซึ่งเป็นการแสดงออกที่สอดคล้องกับการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ ทำให้สรุปได้ว่ากลไกการทำงานของเคอร์คูมิน เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน และเตตระไฮโดรดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน ในการช่วยต้านการตายนั้นเป็นกลไกที่ช่วยปกป้องการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย และช่วยลด inflammatory enzyme COX-2 ของเซลล์ประสาทโดยตรง โดยไม่ได้มีผลยับยั้งการสร้าง nitric oxide ของ glia cells ร่วมด้วย การศึกษาครั้งนี้เป็นการช่วยเพิ่มพูนองค์ความรู้เกี่ยวกับกลไกการทำงานของสารสกัดสำคัญที่อยู่ในสมุนไพรขมิ้นชัน และส่งเสริมการนำสารสกัดเคอร์คูมิน และแอนาลอก เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน เตตระไฮโดรดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน มาพัฒนาให้เกิดประโยชน์ในการช่วยลดหรือชะลอความเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งจะเป็นการป้องกันการเกิดโรคความเสื่อมในระบบประสาท เช่น โรคพาร์กินสัน หรือโรคอื่น ๆ ที่ไม่มียารักษาให้หายขาดได้

คำหลัก : เคอร์คูมิน เคอร์คูมินอยด์ เตตระไฮโดรเคอร์คูมิน เตตระไฮโดรดีเมทอกซีเคอร์คิวมิน
อะพอพโทซิส กระบวนการอักเสบ โรคพาร์กินสัน

Abstract

Project Code : MRG 5480023**Project Title :** Effects of curcuminoid analogs on inflammatory *in vitro* model of Parkinson's disease**Investigator :** Watcharee Tiangyou

Department of Anatomy, Faculty of Medical Science, Naresuan University

E-mail Address : watchareet@nu.ac.th**Project Period :** 2 Years (15 June 2011 – 15 June 2013)**Abstract:**

Curcumin and curcuminoid analogs have been revealed the neuroprotective benefits. However, it is water insoluble and unstable in light. Curcuminoid analogs are structurally modified curcuminoids and curcuminoid metabolites which have more stability and efficacy equal to or better than that of curcumin. The promising results of curcuminoid analogs may be a candidate for developing strategies in prevention or treatment of neurodegenerative diseases. Parkinson's disease (PD) is a neurodegenerative disorder characterized by a loss of midbrain dopaminergic neurons which has been demonstrated neurotoxicity and microglial activation by the neurotoxin MPP⁺ (1-methyl-4-phenylpyridinium). Thus we aimed to study the protective effects of curcuminoids and curcuminoid analogs on apoptosis and inflammatory-induced neuroblastoma (SK-N-SH) and glioblastoma (T98G) cell line cultures. Cytotoxicity of curcumin, curcuminoid analogs, MPP⁺, H₂O₂ and lipopolysaccharide (LPS) were tested by MTT assay. The production of nitric oxide (NO) from glia cell line was measured by Griess assay. Apoptosis and inflammatory factors; Bcl-2, Bax and COX-2 were quantified using Western blot analysis. The results showed that MPP⁺ and H₂O₂ induced apoptosis in neuronal cell line SK-N-SH. Cells pretreated two hours with 5uM of curcumin, tetrahydrocurcumin (THC) or tetrahydrodemethoxycurcumin (THDC) showed the most increasingly the cell viability. Although all treatments did not significantly change the NO production. The MPP⁺ treatment raised the COX-2 level in neuronal cell line ($p < 0.001$), moreover, curcumin and THDC helped reduce this inflammatory enzyme ($p < 0.001$). The level of proteins involved with mitochondria-mediated apoptotic mechanism; Bcl-2 and Bax protein were also changed by

means of anti-apoptotic effect of curcumin, THC and THDC toward MPP^+ and H_2O_2 -induced apoptosis. The pro-apoptotic Bax protein was increased when treated with MPP^+ or H_2O_2 ($p < 0.001$), which illustrated the following apoptosis pathway and led to cell death. Curcumin, THC and THDC alleviated the cell death by reducing this Bax protein ($p < 0.001$), curcumin and THC also increased the level of Bcl-2 in mitochondria ($p < 0.001$). In conclusion, the present study has found that curcumin and its analog; the tetrahydrocurcumin and the tetrahydrodemethoxycurcumin have shown anti-apoptotic effect by inhibiting the mitochondria-mediated apoptotic pathway and reducing the inflammatory COX-2 protein in neurons which did not significantly involve with the inflammatory process in glia cells. This study may support and help to elucidate the benefits of curcumin and curcuminoid analogs for help people in risk of PD and other neurodegenerative diseases of aging such as Alzheimer's disease.

Keywords: curcumin, tetrahydrocurcumin, tetrahydrodemethoxycurcumin, inflammation, apoptosis, Parkinson's disease

Executive summary

ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

Parkinson's disease (PD) เป็นโรคที่อยู่ในกลุ่ม progressive neurodegenerative disorders โดยส่วนใหญ่พบในผู้สูงอายุตั้งแต่ 50 ปีขึ้นไป และความเสี่ยงในการเกิดโรคจะเพิ่มสูงขึ้นตามอายุที่มากขึ้น สาเหตุการเกิดโรคไม่ทราบแน่นอน โดยพบว่ามีปัจจัยส่งเสริมเป็นได้ทั้งจากสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรม พยาธิสภาพของโรค PD เกิดจากการตายของเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ที่อยู่ใน substantia nigra par compacta ของก้านสมองส่วน midbrain ทำให้ขาดสารสื่อประสาทโดพามีน (dopamine) ผู้ป่วยจะมีความผิดปกติเกี่ยวกับการเคลื่อนไหว ได้แก่ อาการสั่นขณะพัก (resting tremor) เคลื่อนไหวร่างกายเชื่องช้า (bradykinesia) แขนขาแข็งเกร็ง (rigidity) ทรงตัวไม่ได้ (postural instability) เป็นต้น เนื่องจากสมองไม่สามารถประสานงานการสั่งการไปยังอวัยวะเป้าหมายให้ทำงานได้อย่างปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยอาจมีอาการหลงลืมจากสมองเสื่อม (dementia) มีอาการซึมเศร้า (depression) นอนไม่หลับ (insomnia) และมีความผิดปกติของระบบอัตโนมัติร่วมด้วย (autonomic disturbance) เช่น มีปัญหาในระบบการขับถ่ายอุจจาระ ปัสสาวะ ซึ่งอาการผิดปกติเหล่านี้เป็นสาเหตุให้เกิดความทุกข์ทรมานกับผู้ป่วยหลายล้านคนจากทั่วทุกมุมโลก นอกจากนี้ในระยะท้ายของโรค ผู้ป่วยมักจะมีอาการแทรกซ้อน เช่น ปอดบวม ติดเชื้อในกระแสเลือด ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและแผลกดทับ การรักษาโรคนี้โดยทั่วไปทำได้โดยให้ยา levodopa และยาในกลุ่มต่าง ๆ ร่วมกัน ซึ่งช่วยบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงและทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากผลของยา ผู้ป่วยต้องการการดูแลอย่างใกล้ชิด ซึ่งส่งผลต่อ สภาพร่างกาย จิตใจ เศรษฐกิจ และสังคม ของผู้ป่วย และญาติผู้ให้การดูแล

สาเหตุและกลไกการตายของ dopaminergic neurons นั้นมีสมมติฐานการตายหลายประการ อาทิเช่น การทำงานที่บกพร่องของ mitochondria จากภาวะ oxidative stress ของเซลล์ การมี misfolded proteins สะสมอยู่ภายในเซลล์ประสาท และการที่มีภาวะอักเสบ (inflammation) ซึ่งการศึกษากลไกการเกิดโรคนี้จะนำไปสู่กลยุทธ์ในการจัดการกับโรค เช่น มีการศึกษาพบว่า การให้ยาประเภท anti-inflammatory ช่วยลดความเสี่ยงของการเกิดโรค หรือบรรเทาอาการของผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามยาในกลุ่มเหล่านี้ ก็มีผลข้างเคียงและไม่สามารถใช้ได้ต่อเนื่อง ดังนั้นสารที่ได้จากธรรมชาติ สมุนไพรต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติสอดคล้องกับกลไกการเกิดโรค ก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาช่วยในการป้องกัน ลดอัตราการตายของเซลล์ประสาท หรือช่วยบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยได้ และเป็นการยกระดับคุณค่าของพืชสมุนไพรโดยมีผลงานวิจัยรองรับ ซึ่งขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) ที่เป็นพืชสมุนไพรและเป็นส่วนประกอบของอาหารในชีวิตประจำวันนั้น ได้มีการศึกษาพบว่ามีคุณสมบัติมากมาย สำหรับโรคพาร์กินสันนั้น Rajeswari ได้รายงานไว้ว่า curcumin มีคุณสมบัติ neuroprotection ต่อต้านภาวะ oxidative stress จากสารเหนี่ยวนำให้เกิด parkinsonism ในสัตว์ทดลองได้ (Rajeswari, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม curcumin ก็มีคุณสมบัติที่จำกัด แอนาโลก

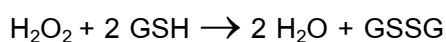
ของขมิ้นชัน (curcuminoid analogs) ส่วนใหญ่มีความเสถียรกว่าสาร curcumin ต้นแบบ และมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป เช่น anti-oxidant, anti-cancer และ anti-inflammation เป็นต้น ดังนั้นจุดประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ก็เพื่อจะศึกษาผลของแอนาล็อกของขมิ้นชันต่อกลไกกระบวนการอักเสบและการตายของเซลล์ประสาทพาร์กินสัน ซึ่งกระบวนการอักเสบก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่เกี่ยวข้อง กับโรค Parkinson's disease รวมถึงโรคความเสื่อมที่เกิดจากความชราภาพของระบบประสาทอื่นๆ ด้วย เช่น Alzheimer's disease

บทนำ

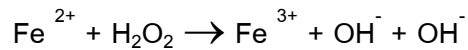
สมมติฐานการตายของ dopaminergic neurons ในโรค Parkinson

สืบเนื่องมาจากการค้นพบ MPP^+ (1-methyl-4-phenylpyridinium) ที่ได้จากกระบวนการ metabolite ของ methylphenyltetrahydropyridine (MPTP) ซึ่งทำให้เกิด acute parkinsonism ในคนที่ใช้ยาเสพติดฉีดเข้าเส้นนั้น (Langston et al., 1983) MPP^+ ได้ถูกนำมาใช้เป็น model ในการศึกษาโรค Parkinson อย่างแพร่หลาย โดยพบว่ามีผลยับยั้ง mitochondrial complex I (NADH, ubiquinone reductase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่เกิดขึ้นในกระบวนการ respiratory electron transport chain ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในสมองของคนตายที่ป่วยเป็นโรค Parkinson (postmortem PD brain) อันแสดงถึงภาวะ mitochondrial dysfunction ของ dopaminergic neurons นอกจากนี้ MPP^+ ยังทำให้เกิดการสะสม alpha synuclein และ Lewy bodies ในสัตว์ทดลองได้เหมือนที่พบในสมองของผู้ป่วยโรค Parkinson อีกด้วย ภายหลังจากการค้นพบเกี่ยวกับ MPP^+ ก็ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับสารต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม (Bove et al., 2005; Langston, 1996) ตัวอย่างเช่น rotenone ในยาฆ่าแมลง ที่มีคุณสมบัติเป็น mitochondrial complex I inhibitors กับความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค PD อันเป็นที่มาของข้อสรุปที่ว่าสาเหตุการเกิดโรค Parkinson เป็นกระบวนการความเสื่อมที่เกิดจากหลายปัจจัยร่วมกัน ทั้งสิ่งแวดล้อมทั้งภายใน และภายนอก รวมถึงพันธุกรรมด้วย (Dawson and Dawson, 2003; Le Couteur et al., 2002; Moore et al., 2005)

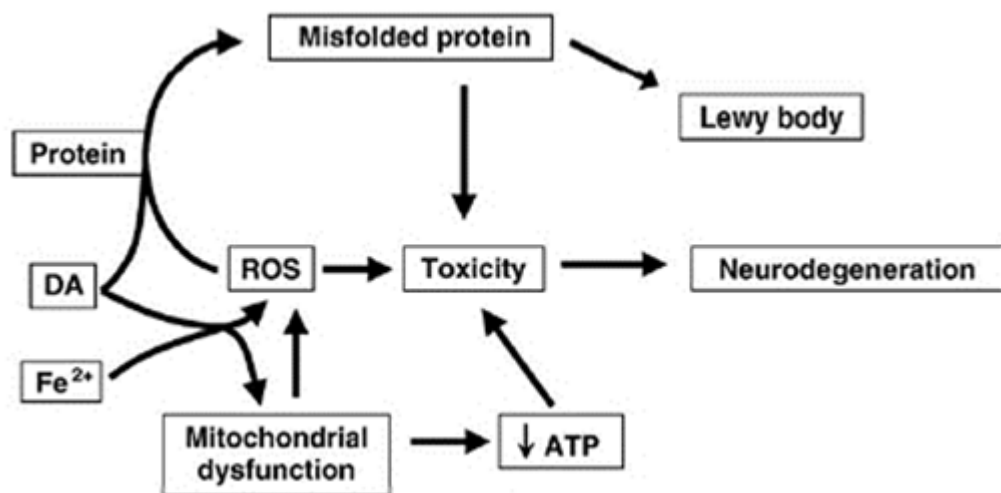
MPTP เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูก oxidize โดย monoamine oxidase B (MAOB) ให้เป็น MPP^+ (Fritz et al., 1985) ซึ่งมีความจำเพาะเจาะจงในการนำเข้าสู่เซลล์ dopaminergic neurons โดยอาศัย dopamine transporter และกระบวนการ actively transport เข้าไปยังการทำงานของ mitochondrial complex I ใน mitochondria ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เกิดอนุมูลอิสระ O_2^- ขึ้นมากมาย O_2^- นั้นอันที่จริงแล้วมีพิษน้อย แต่ถ้าได้รวมกับ nitric oxide (NO) จะได้ peroxynitrite ($ONOO^-$) ซึ่งจะแตกตัวให้เป็น hydroxyl radical ($OH^\cdot$) ที่มีพิษสูงมาก (Beckman et al., 1990) นอกจากสารเคมีจากภายนอกที่จำเพาะเจาะจงในการทำลาย dopaminergic neurons แล้ว ขบวนการ oxidize สาร dopamine เองโดย MAO ก็ทำให้เกิด H_2O_2 ซึ่งจะถูกทำให้ไม่มีพิษโดย glutathione (GSH) ได้เป็น glutathione disulfide (GSSG) ดังนี้



แต่ถ้า H_2O_2 ไปทำปฏิกิริยากับ iron ก็จะทำให้เกิด $\text{OH}^\cdot$ ซึ่งมีความเป็นพิษสูงได้ ดังนี้



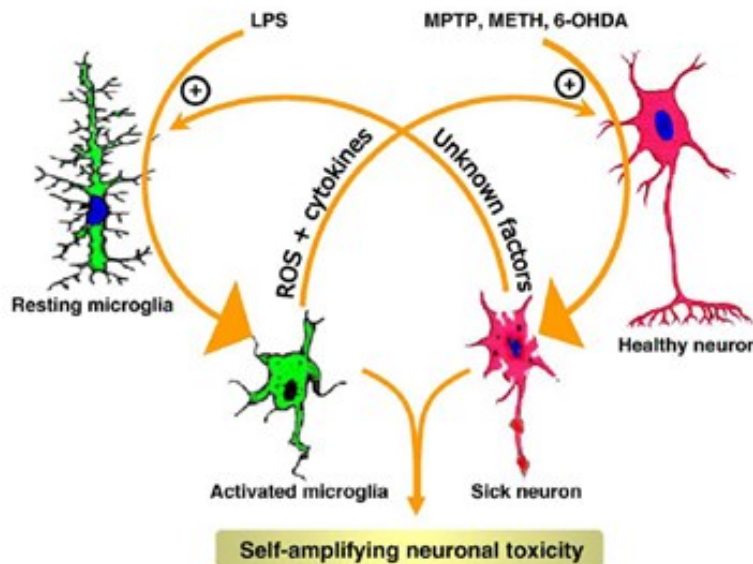
จากการศึกษาพยาธิสภาพและการตายของ dopaminergic neurons ในผู้ป่วยโรค Parkinson ที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรม (familial Parkinson's disease) ซึ่งพบได้น้อยนั้น ยีนที่มีความผิดปกติส่วนใหญ่จะมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ protein degradation ได้แก่ *DJ1*, *SNCA* (α -synuclein gene), *PARKIN* และ *UCHL1* ซึ่งเมื่อไม่สามารถกำจัด misfolded proteins ได้ก็ทำให้เกิดเป็นพิษต่อเซลล์ทำให้เซลล์ตาย นอกจากนี้ยีนบางส่วนยังเกี่ยวข้องกับ oxidative stress และ mitochondrial dysfunction ได้แก่ *DJ-1* และ *PINK1* (Vila and Przedborski, 2004)



รูปที่ 1 แสดงสมมติฐานกลไกที่ทำให้เกิด neurodegeneration ของ dopaminergic (DA) neurons (Hald and Lotharius, 2005)

Inflammatory process และ brain inflammation ในโรค Parkinson

แม้ว่าภาวะ oxidative / nitrative stress, misfolded protein และ mitochondrial dysfunction จะเป็นสมมติฐานหลักในสาเหตุการตายของ dopaminergic neurons (รูปที่ 1) ทั้งในรูปแบบ acute และ familial PD แต่กลไกและปัจจัยที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ใน sporadic PD ยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจนแน่นอน Parkinson ที่พบในผู้สูงอายุส่วนใหญ่จึงเป็น complex disease ที่เกิดจากปัจจัยหลาย ๆ อย่างร่วมกัน ซึ่งกระบวนการอักเสบในระบบประสาทก็พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องทำให้เกิดโรคความเสื่อมในระบบประสาท เช่น Alzheimer รวมถึง Parkinson ด้วย



รูปที่ 2 แสดงปฏิกิริยาการตอบสนองระหว่าง neuron และ microglia ทำให้เกิด neuronal toxicity และ neurodegeneration เพิ่มขึ้น (Hald and Lotharius, 2005)

โดยภายหลังจากที่ McGeer และคณะ (1988) เปิดเผยการค้นพบ activated microglia และ T-lymphocytes ใน substantia nigra ของผู้ป่วย Parkinson (McGeer et al., 1988) ต่อมาก็มีการศึกษามากมายที่สนับสนุนเกี่ยวกับ neuroinflammatory processes ในโรค Parkinson ซึ่งนอกเหนือจากจะพบ activated microglia และ microgliosis แล้ว ยังพบ pro-inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IFN- γ); enzymes ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ inflammation (iNOS, COX-2); สารจำพวก T-cell activation-associated cytokine (IL-2); สารจำพวก anti-inflammatory cytokine (IL-4) รวมทั้งพวก growth factors ต่าง ๆ ซึ่งสารต่าง ๆ เหล่านี้ส่งผลความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาท (neurotoxicity) ทั้งทางตรงและทางอ้อม ดังเช่น nitric oxide ที่ปล่อยออกมาจาก activated microglia จะเกิดปฏิกิริยา เปลี่ยนเป็น peroxynitrite (ONOO $^-$) ซึ่งจะแตกตัวให้เป็น OH $^-$ ที่มีพิษสูงมาก (reviewed in Hald and Lotharius, 2005) กระบวนการอักเสบในระบบประสาท (neuroinflammation) นี้อาจจะเกิดมาจากการติดเชื้อในร่างกายที่กระตุ้นให้เกิด activated microglia ในสมองได้ (Perry, 2004) อย่างไรก็ตาม activated microglia ยังพบได้ในกลุ่มประชากรผู้สูงอายุทั่วไป (Beach et al., 2007) จึงมีความเป็นไปได้ว่า กระบวนการ aging ปกติทั่วไปก็เป็นปัจจัยส่วนหนึ่งในการส่งเสริมให้เกิดโรคความเสื่อมทางระบบประสาทซึ่งรวมถึงโรค Parkinson ด้วย และโดยทั่วไปแล้วเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ที่ได้รับอันตรายหรืออยู่ในภาวะ stress ก็กระตุ้น microglia ให้หลั่งสารจำพวก neurotoxic factors ออกมาอยู่แล้ว จึงเป็นวงจร vicious cycle ดังแสดงในรูปที่ 2 ที่ทำให้เกิดภาวะเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative) เพิ่มขึ้น (Block and Hong, 2007) ส่วนสารที่เกิดขึ้นจาก dopaminergic neurons ที่ใกล้จะตายและมีผลไปกระตุ้น microglia ได้แก่ พวก alpha synuclein, ATP, MMP-3 และ neuromelanin (Long-Smith et al., 2009) นอกจากนี้ยังพบว่า microgliosis ไปที่บริเวณอื่น

ของสมองนอกเหนือจากที่พบในบริเวณ substantia nigra จึงเป็นสมมติฐานการเกิดพยาธิสภาพที่เป็น non-motor system ที่พบได้ในโรค Parkinson อีกด้วย

จากการศึกษาเกี่ยวกับ neuroinflammation ที่เกี่ยวข้องกับโรค Parkinson นำมาสู่การใช้ยาจำพวก anti-inflammatory ในผู้ป่วย โดยยาจำพวก steroids ไม่สามารถใช้ต่อเนื่องได้ เพราะมีผลข้างเคียงมากและส่วนใหญ่เป็นผลที่รุนแรงต่อร่างกาย เช่น แผลในกระเพาะอาหาร กระดูกพรุน หรือก่อกวนการทำงานของระบบการควบคุมการหลั่งฮอร์โมน ส่วนยาจำพวก non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) พบว่าช่วยลดการตายของ dopaminergic neurons ได้ในสัตว์ทดลอง และยังพบว่า NSAIDs บางชนิด เช่น ibuprofen ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ดีในเพศหญิง (Chen et al., 2005; Esposito et al., 2007) ซึ่งเป็นผลที่ยืนยันว่าสารจำพวก anti-inflammation มีผล neuroprotection ในผู้ป่วย Parkinson อย่างไรก็ตามการใช้ยาเหล่านี้ก็มีข้อจำกัด และก็ยังไม่เป็นที่แน่ชัดว่าควรใช้ในจำนวนเท่าใด เป็นระยะเวลาานานเท่าใดจึงจะให้ผลดี ยาบางชนิดก็ยังไม่ปลอดภัย เช่น celecoxib ซึ่งเป็นยาต้านอักเสบในกลุ่ม COX-2 inhibitors ที่พบว่าเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดและโรคของหลอดเลือดสมองได้ (Solomon et al., 2005) ดังนั้นจึงน่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่า หากเลือกที่จะใช้สมุนไพรที่มีคุณสมบัติหลายประการและไม่มีโทษต่อร่างกาย อย่างเช่น ขมิ้นชัน รวมทั้งสารที่ได้มาจากสมุนไพร เช่น สาร curcuminoids จากขมิ้นชัน ในการนำมาศึกษาถึงฤทธิ์ anti-inflammation และ neuroprotection ในโรค Parkinson เพื่อพัฒนามาใช้ประโยชน์ได้อย่างมีมาตรฐานและมีผลงานวิจัยรองรับ

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L. หรือ turmeric)

ขมิ้นชัน (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชตระกูลขิง (Zingiberaceae) ส่วนเหง้านำมาตากแห้งและบดใช้เป็นเครื่องเทศ แต่งกลิ่น รส และสีในอาหาร นอกจากนี้ยังใช้เป็นยารักษาโรคประจำบ้านกันอย่างแพร่หลายมาเป็นระยะเวลายาวนานแล้ว เช่น ช่วยลดกรด ขับลม แก้ปวดท้อง นอกจากเป็นยาแล้ว ยังใช้เป็นสีย้อมและเครื่องสำอางได้อีกด้วย สารสำคัญจะอยู่ในเหง้าของขมิ้น ประกอบไปด้วยสาร curcumin หรือ diferuloylmethane ประมาณ 77% ที่เหลือ 20-25% เป็น demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin (Jayaprakasha et al., 2002)

Curcumin เป็นส่วนประกอบที่สำคัญที่สุดที่ทำให้ขมิ้นชันมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ซึ่งมีผลการวิจัยมากมาย ที่เกี่ยวข้องกับ neuroprotective effects ตัวอย่างเช่น curcumin ยับยั้งการเกิด preformed ของ beta amyloid ใน *in vitro* study และยับยั้งไม่ให้เกิด amyloid plaque เพิ่มขึ้นใน *in vivo* study ซึ่ง amyloid plaque เป็นพยาธิสภาพที่พบในโรค Alzheimer's disease (AD) โดยที่ผลของ curcumin ต่อ amyloid plaque นี้มีคุณสมบัติเด่นที่แตกต่างจาก antioxidant หรือการรักษาอื่น ๆ ที่ไม่สามารถลดการสะสม amyloid plaque ได้ ในการทดลองเปรียบเทียบในหนูที่เริ่มให้การรักษาระดับการดำเนินของโรคระยะท้าย ๆ เหมือนกัน (Cole et al., 2007)

Curcumin เป็นสารที่มีคุณสมบัติ ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน ethanol, alkalis, ketone, acetic acid และ chloroform อย่างไรก็ตามสารละลาย curcumin จะไม่เสถียร โดยจะคงตัวใน cell culture medium ที่มี 10% fetal calf serum และในเลือดซึ่งพบว่าหลังจากที่ผ่านการ incubate เป็นเวลา 8 ชั่วโมง จะยังคงเหลือ curcumin อยู่ประมาณ 50% (Wang et al., 1997) ดังนั้นจึงมีการปรับโครงสร้างสังเคราะห์แอนาล็อกของ curcuminoid ขึ้นมาใช้ เพื่อลดข้อจำกัดและทำให้สามารถศึกษาผลของ curcumin ได้อย่างมีประสิทธิภาพ ซึ่ง Harish G (2010) ได้รายงานว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างได้แก่ curcumin D1 (di-piperoyl), D2 (di-valinoyl) และ D3 (diglutamoyl) มีความสามารถในการละลาย การดูดซึม และมีความเสถียรมากขึ้น รวมทั้งมีคุณสมบัติช่วยลด oxidative stress ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงได้ด้วยเช่นเดียวกับ curcumin (Harish et al., 2010)

สาร curcuminoid analogs ที่นำมาศึกษาในโครงการนี้จะเป็นผลมาจากการคิดค้นวิจัยปรับเปลี่ยนโครงสร้างให้เหมาะสมกับการทดลอง โดยนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร curcuminoids ไปเป็นแอนาล็อกต่าง ๆ (Changtam et al., 2010a; Changtam et al., 2010b) ซึ่งแอนาล็อกบางชนิดเป็นสารประกอบ metabolite ของ curcuminoids ซึ่งได้มีรายงานมาแล้วว่า curcumin ถูก metabolized ไปเป็น tetrahydrocurcumin และ hexahydrocurcumin ในทางเดินอาหารส่วนลำไส้และตับ และ metabolism ในลำไส้ของคนจะเกิดมากกว่าในลำไส้หนูขาว (Ireson et al., 2002) ซึ่งแอนาล็อกของ curcuminoid จะมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Anti-inflammatory) และต้านสารอนุมูลอิสระ (Anti-oxidant) ที่ดีกว่า curcumin จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำแอนาล็อก เหล่านี้ไปใช้ในการศึกษาวิจัยนี้

ฤทธิ์ anti-inflammation ของ curcumin และ neuroprotection

Curcumin เป็นสมุนไพรในครัวเรือนและพบว่ามีสรรพคุณทางยา ซึ่งถูกนำมาใช้รักษาอาการต่าง ๆ มาช้านานแล้ว โดย Bengmark (2006) ได้รายงานผลการทบทวนวรรณกรรมที่ตีพิมพ์จากฐานข้อมูล Pubmed ที่เกี่ยวข้องกับ curcumin พบว่ามีรายงานถึงคุณสมบัติต่าง ๆ เป็นจำนวนมาก และไม่พบว่า curcumin มีสารที่เป็นพิษต่อร่างกาย ในฤทธิ์ที่ต่อต้านการอักเสบนั้นพบว่า curcumin ออกฤทธิ์โดยการยับยั้ง enzymes ที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ ได้แก่ cyclooxygenase-2 (COX-2), lipoxygenase (LOX) และ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ NF- κ B เป็นต้น (Bengmark, 2006)

จากการศึกษาของ Wang T และคณะ (2005) พบว่าในการกระตุ้นเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ด้วย MPP⁺ เพื่อให้มีกระบวนการอักเสบและมีการหลั่ง prostaglandin E2 (PGE2) และ COX-2 ออกมานั้นจำเป็นต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงร่วมกับ microglia ซึ่งเมื่อให้สาร COX-2 inhibitor เข้าไปก็ทำให้ปริมาณของ PGE2 ลดลงได้ ซึ่งแสดงถึงผลของสารที่มีคุณสมบัติ COX-2 inhibitor จะสามารถลดขบวนการอักเสบได้ (Wang et al., 2005) นอกจากนี้ Wang MS ยังรายงานว่าการช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากความเสียหายของ

alpha-synuclein ได้ด้วย ซึ่ง alpha synuclein นี้เป็นโปรตีนที่พบสะสมในเซลล์ประสาทของผู้ป่วย Parkinson (Wang et al., 2010)

จากการศึกษาของ Yang และคณะ (2008) พบว่า curcumin สามารถช่วยปกป้องเซลล์ประสาท primary dopaminergic neurons culture จาก pro-inflammatory factors เมื่อกระตุ้น microglia cells ด้วย inflammagen lipopolysaccharide (LPS) โดยพบว่า curcumin ทำให้ปริมาณ nitric oxide (NO), PGE2 และการแสดงออกของยีน pro-inflammatory เช่น TNF- α , iNOS, COX-2, IL-1 β ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่า curcumin ช่วยทำให้ transcription factors NF- κ B และ activator protein 1 (AP-1) ลดลง ซึ่ง NF- κ B และ AP-1 นี้จะไวต่อภาวะ oxidative stress และส่งสัญญาณไปกระตุ้นการสร้าง pro-inflammatory factors ของ microglia ซึ่งทำให้เกิด neurotoxicity ตามมาได้ (Yang et al., 2008)

ฤทธิ์ anti-apoptosis ของ curcumin และ neuroprotection

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)

วัตถุประสงค์

1. ทราบกระบวนการตายและกระบวนการอักเสบของเซลล์ neurons และ glia cells เพาะเลี้ยง เมื่อถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการตายในแบบจำลองของโรค Parkinson
2. ทราบประสิทธิผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อกระบวนการตายและอักเสบของ เซลล์ neurons และ glia cells เพาะเลี้ยง

ขอบเขตของการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็น *in vitro* study โดยจะทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงซึ่งเป็น cell line 2 ชนิด คือ human neuroblastoma SK-N-SH และ human glioblastoma cell line T98G จาก American Type Culture Collection (ATCC) ซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่า glioblastoma multiforme สามารถแสดงคุณสมบัติของ activated microglia และสร้าง pro-inflammatory factors ได้เมื่อถูกกระตุ้น ในการศึกษาครั้งนี้จะนำเซลล์ทั้งสองชนิดมาทดลองเพาะเลี้ยงสองรูปแบบคือเลี้ยงแยกภาชนะกัน (mono-culture) แล้วเก็บ media จากจานเพาะเลี้ยง glial cells ไปผสมในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท การเลี้ยงร่วมกัน (co-culture) ซึ่งการเลี้ยงเปรียบเทียบผลกันจะช่วยลดปัญหาตัวแปรแทรกซ้อนอันอาจเกิดจากความไม่สมบูรณ์ของสภาวะแวดล้อม สัดส่วนจำนวนเซลล์ที่จะส่งผลให้เซลล์สองชนิดมีชีวิตร่วมและมีปฏิสัมพันธ์กันในการเพาะเลี้ยงและทำการทดลองแต่เพียงรูปแบบเดียว นอกจากนี้ยังเป็นการเลียนแบบการอยู่ร่วมกันของเนื้อเยื่อประสาท

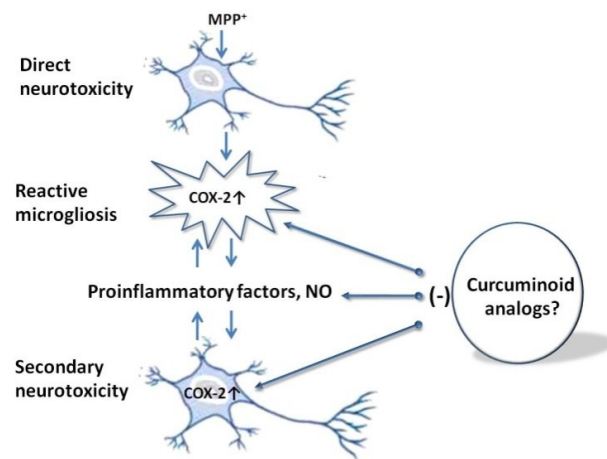
โครงการวิจัยนี้จะเหนี่ยวนำการตาย/อักเสบของเซลล์โดยใช้ neurotoxin MPP^+ ซึ่งเป็นการจำลองรูปแบบการตายของโรคพาร์กินสัน แล้วศึกษาการตายของเซลล์รวมทั้งการหลั่ง pro-inflammatory factors ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของเซลล์ทั้งสอง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร MPP^+ นอกจากนี้ยังใช้ lipopolysaccharide (LPS) เป็น positive control ในการศึกษากระบวนการอักเสบ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MPP^+ และกลุ่มควบคุมอีกด้วย

ในส่วนของการศึกษาผล anti-inflammation ของ curcuminoid analogs ในแต่ละการทดลองก็จะใส่ curcuminoid analog แต่ละโครงสร้างที่ต้องการทดสอบลงไปในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ก่อนการเติมสาร MPP^+ หรือ LPS ลงไป ก่อนนำไปศึกษาติดตามผลการเปลี่ยนแปลง เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analog และกลุ่มควบคุม

ในเบื้องต้นจะมีการทดสอบสาร curcuminoid analogs ก่อนซึ่ง curcuminoid analogs เหล่านี้ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ และคณะ ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างมาจาก curcuminoids คาดว่าจะใช้จำนวนทั้งสิ้นไม่น้อยกว่า 20 แอนาล็อก (Suksamrarn et al., unpublished result.) โดยจะเป็น reduced analogues เช่น tetrahydro และ hexahydro analogues ของ curcuminoids ทั้ง 3 ชนิด demethylated analogues และ แอนาล็อกที่มีการปรับเปลี่ยนโครงสร้างและหมู่ฟังก์ชันที่ heptyl chain และทดสอบแล้วว่า มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory) และต้านสารอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) ที่ดีกว่า curcumin โดยโครงการนี้จะทดสอบสารไม่น้อยกว่า 20 ชนิด แล้วคัดเลือกสารชนิดที่มีฤทธิ์ช่วยลดการตายของเซลล์ประสาท

จากการเหนี่ยวนำด้วย MPP^+ ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด นำมาทดสอบประสิทธิภาพการลดการตายโดยการลดการทำลายเซลล์ประสาทด้วยกระบวนการอักเสบดังกล่าวข้างต้น ซึ่งประสิทธิผลด้านการต้านทานกระบวนการอักเสบ จะประเมินจากระดับ nitric oxide ที่ลดลง การแสดงออกของยีนและปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analogs อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เมื่อเซลล์ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP^+ และ LPS

โครงการวิจัยนี้เป็นการศึกษาผลในด้าน anti-inflammatory ของ curcuminoid analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ที่ได้รับสารเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายในรูปแบบจำลองโรค Parkinson โดยภาวะ brain inflammation พบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการตายของเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ในผู้ป่วยที่เป็นโรค Parkinson และโดยที่ curcuminoid analogs บางกลุ่มมีฤทธิ์ anti-inflammation ที่ดีกว่าและมีความเสถียรกว่าสาร curcumin ต้นแบบ จึงน่าจะช่วยลดปฏิกิริยาการอักเสบและลดการตายของเซลล์ประสาทได้ ดังแสดงในภาพข้างล่างนี้



นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังศึกษาผลในด้าน neuroprotection ของ curcuminoid analogs ซึ่งเป็นที่ทราบดีว่ามีคุณสมบัติ anti-oxidative stress ที่ดี ต่อการตายของเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงในหลอดทดลอง ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตาย ด้วย MPP^+ เปรียบเทียบกับสารที่กระตุ้นให้เกิดภาวะ oxidative stress คือ hydrogen peroxide (H_2O_2) โดยมีวิถีการตายผ่าน mitochondria เป็นหลัก โดยมีแนวคิดที่ว่า oxidative stress และ mitochondrial dysfunction เป็นสาเหตุการตายของเซลล์ประสาทในผู้ป่วยที่เป็นโรค Parkinson หาก curcuminoid analogs สามารถป้องกันการเสียหายที่ของ mitochondria ได้ ก็จะช่วยป้องกัน ฟันฟู ลด หรือ ชะลอ การตายของเซลล์ประสาทอันทำให้เกิดเป็นโรคตามมาได้

โครงการวิจัยนี้จะจัดทำขึ้นในห้องปฏิบัติการของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร โดยความร่วมมือช่วยเหลือในด้านการสังเคราะห์สารทดสอบ curcuminoid analogs จากห้องปฏิบัติการของ ศ.ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง

วิธีการศึกษาวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็น *in vitro* study โดยจะทำการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงซึ่งเป็น cell line 2 ชนิด คือ human neuroblastoma SK-N-SH และ human glioblastoma cell line T98G จาก American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) ซึ่งได้มีการทดสอบแล้วว่า glioblastoma multiforme สามารถแสดงคุณสมบัติของ activated microglia และสร้าง pro-inflammatory factors ได้เมื่อถูกกระตุ้น ในการศึกษาครั้งนี้จะนำเซลล์ทั้งสองชนิดมาทดลองเพาะเลี้ยงสองรูปแบบคือ เลี้ยงแยกภาชนะกัน (mono-culture) และการเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดร่วมกัน (co-culture) ในภาชนะเพาะเลี้ยงเดียวกัน

ในเบื้องต้นจะมีการทดสอบสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs ก่อนซึ่ง curcuminoid analogs เหล่านี้ ศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ และคณะ ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างมาจาก curcuminoids จำนวนทั้งสิ้น 20 analogs (Suksamran et al., unpublished result.) โดยโครงการนี้จะทดสอบสารทั้ง 20 ชนิด แล้วคัดเลือกสารชนิดที่มีฤทธิ์ช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทจากการเหนี่ยวนำด้วย neurotoxin MPP^+ และสารเหนี่ยวนำ oxidative stress hydrogen peroxide (H_2O_2) ได้ดีที่สุด ที่ความเข้มข้นที่ต่ำที่สุด นำมาทดสอบประสิทธิภาพการลดการตายโดยการลดการทำลายเซลล์ประสาทด้วยกระบวนการอักเสบ โดยจะทดลองชักนำกระบวนการอักเสบด้วย Lipopolysaccharide (LPS) เปรียบเทียบกับ ซึ่งประสิทธิผลด้านการต้านทานกระบวนการอักเสบ จะประเมินจากระดับ nitric oxide (NO) ที่ลดลง ด้วยการหาปริมาณ nitrite (NO_2^-) การแสดงออกของปริมาณโปรตีน COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบที่น่าจะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analogs นอกจากนี้ยังทดสอบปริมาณโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ได้แก่ pro-apoptotic protein Bax และ anti-apoptotic protein Bcl2 ด้วย

ในส่วนของการศึกษาผล anti-apoptotic effect ของ curcuminoid และ curcuminoid analogs ในแต่ละการทดลองก็จะใส่สาร curcuminoid analog แต่ละโครงสร้างที่ต้องการทดสอบลงไป ในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ก่อนการเติมสาร MPP^+ หรือ H_2O_2 ลงไป ก่อนนำไปศึกษาติดตามผลการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analog และกลุ่มควบคุม

ในส่วนของการศึกษาผล anti-inflammation ของ curcuminoid และ curcuminoid analogs ในแต่ละการทดลองก็จะใส่ curcuminoid analog แต่ละโครงสร้างที่ต้องการทดสอบลงไป ในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ก่อนการเติมสาร MPP^+ หรือ LPS ลงไป แล้วนำไปศึกษาติดตามผลการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analog และกลุ่มควบคุม โดยการศึกษาผลของกระบวนการอักเสบต่อการตายของเซลล์นี้ จะทดสอบในรูปแบบ mono-culture โดยเลี้ยงแยกกันแล้วใส่สารกระตุ้นกระบวนการอักเสบ LPS ลงในจานเพาะเลี้ยง glia cells แล้วเก็บ media จากจานเพาะเลี้ยง glial cells ไปผสมในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท และการเลี้ยงแบบ co-culture คือเลี้ยงร่วมกัน และทดสอบเซลล์ทั้งสองชนิดในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน เป็นการเลียนแบบการดำรงชีวิตของเซลล์ในเนื้อเยื่อประสาทที่เซลล์ต่าง ๆ อาศัยอยู่ร่วมกัน

การดำเนินการวิจัยประกอบด้วยขั้นตอนต่าง ๆ ดังนี้

1. การเตรียมสารละลายของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs
2. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (mono-culture)
 - 2.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบ mono-culture
 - 2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ neurons ร่วมกับ glial cells (co-culture)
3. การทดสอบปริมาณความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดลองต่อเซลล์เพาะเลี้ยง
4. แบบแผนการทดลองเหนี่ยวนำการตาย/อักเสบ ด้วย LPS, MPP⁺ และ H₂O₂ และการให้สาร curcuminoid analogs
5. การศึกษาผลของการต้านการตาย/การอักเสบ ของสาร curcuminoid analogs ที่มีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย LPS, MPP⁺ และ H₂O₂
 - 5.1 ตรวจสอบ cell viability ด้วยวิธี MTT assay
 - 5.2 ศึกษา morphological changes
 - 5.3 ตรวจสอบปริมาณ nitric oxide
 - 5.4 ตรวจสอบ protein expression ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายและการอักเสบของเซลล์เพาะเลี้ยง
6. การวิเคราะห์ข้อมูล

วิธีทดลอง

1. การเตรียมสารละลายของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs

สาร curcuminoids และ curcuminoid analogs ที่ได้รับมาจะอยู่ในรูปผงละเอียด ดังนั้นจึงต้องมีการเตรียมสารละลายของสารสกัด curcuminoids และ curcuminoid analogs ด้วยตัวทำละลาย ultrapure dimethylsulfoxide (DMSO; Amresco®, OH, USA) หลังจากนั้นทำการเจือจางที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ต้องการตามแบบแผนการทดลองด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Modified Essential Medium (MEM, Gibco®, NY, USA) ที่ไม่มีส่วนผสมของ fetal bovine serum ส่วนสารละลายความเข้มข้นสูงที่เป็น stock solutions จะถูกนำไปจัดเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C

2. การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์

2.1 การทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แบบ mono-culture

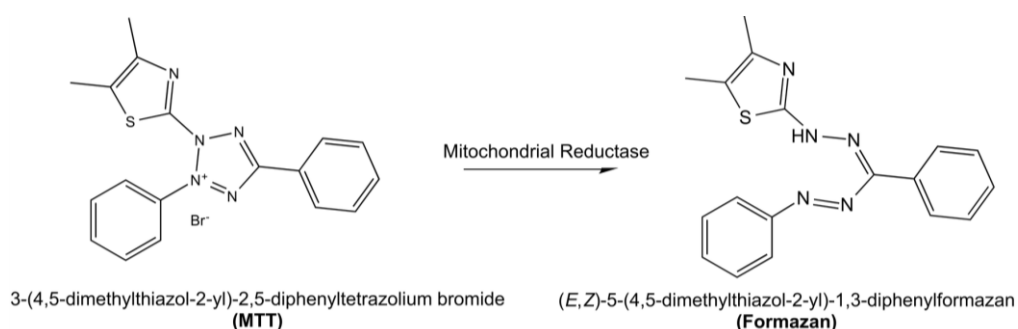
นำ cell line ของระบบประสาทชนิด human neuroblastoma (SK-N-SH) และ human glioblastoma (T98G) ที่ได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC, VA, USA) มาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Modified Essential Medium (MEM, Gibco®, NY, USA) ที่มีส่วนผสมของ 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco®, NY, USA), 1% Penicillin streptomycin (Pen strep; Gibco®, NY, USA) ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ ซึ่งปรับสภาพจนได้สภาวะที่เหมาะสมโดยเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

2.2 การหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ neurons ร่วมกับ glial cells (co-culture)

นำเซลล์ SK-N-SH จำนวน 5×10^4 cells/ml มาผสมร่วมกับ glial cells 1.25×10^5 cells/ml แล้วเพาะเลี้ยงบน 96 well plate (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) จำนวน 100ul/well นำไปใส่ตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C และ $5\%\text{CO}_2$ นาน 24 ชั่วโมงเพื่อให้เซลล์ลงเกาะ plate ก่อนนำไปทำการทดลอง

3. การทดสอบปริมาณความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดลองต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

ทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ด้วยความหนาแน่น 1×10^4 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ Lipopolysaccharide (LPS; Sigma-Aldrich, MO, USA), hydrogen peroxide (H_2O_2 ; Sigma-Aldrich, MO, USA), MPP^+ (Sigma-Aldrich, MO, USA) และ curcuminoid analogs ที่ความเข้มข้นต่างกันบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide; Amresco®, OH, USA) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงอีก 1.30-2 ชั่วโมง นำมาดูดอาหารเพาะเลี้ยงออก แล้วเติมสาร dimethyl sulfoxide (DMSO; Bio Basic Inc., ON, Canada) หลุมละ 100ul เพื่อละลาย formazan crystal แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540nm ด้วย microplate reader เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของ MTT reduction กับ control cells โดยให้การดูดกลืนของ control cells เป็น 100% การศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองแต่ละครั้งจะทำ 3 wells และทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแต่ละครั้งไปวิเคราะห์ผล



รูปที่ 3 แสดงหลักการของ MTT assay โดยสาร MTT ซึ่งมีสีเหลือง จะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ mitochondrial reductase ที่ได้จากเซลล์ที่มีชีวิตปล่อยออกมา แล้วทำให้สาร MTT เปลี่ยนเป็น formazan ซึ่งเป็นผลึกสีม่วง เมื่อละลายในตัวทำละลายแล้วจะสามารถนำไปวัดปริมาณได้ด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 500-600nm

ที่มา http://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

4. แบบแผนการทดลองเหนี่ยวนำการตาย/อักเสบ และการให้สาร curcuminoid analogs

ในแต่ละการทดลอง เซลล์เพาะเลี้ยงได้กำหนดการเพาะเลี้ยงไว้ 2 รูปแบบคือ mono-culture และ co-culture จะถูก treat ด้วยสารทดลองแต่ละสาร ได้แก่ MPP^+ , LPS, H_2O_2 , และ curcuminoid analogs ในความเข้มข้นต่าง ๆ ในส่วนของการศึกษาผลของการให้สารเหนี่ยวนำร่วมกับ curcuminoids นั้นจะให้สาร curcuminoids ก่อนเป็นเวลา 2 ชั่วโมงและตามด้วยการเติมสารเหนี่ยวนำการตาย/การอักเสบที่ต้องการศึกษา ได้แก่ MPP^+ , LPS, H_2O_2 ลงไป เพาะเลี้ยงต่ออีก 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปศึกษาติดตามผลต่อไป โดยเปรียบเทียบการศึกษากับกลุ่ม control

ในส่วนของการศึกษาผลการต้านการตายแบบ apoptosis ของ curcuminoid analogs ในแต่ละการทดลองก็จะใส่ curcuminoid analog แต่ละโครงสร้างที่ต้องการทดสอบลงในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ก่อนการเติมสาร MPP^+ หรือ H_2O_2 ลงไป แล้วนำไปศึกษาติดตามผลการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analog และกลุ่มควบคุม

ในส่วนของการศึกษาผล anti-inflammation ของ curcuminoid analogs ในแต่ละการทดลองก็จะใส่ curcuminoid analog แต่ละโครงสร้างที่ต้องการทดสอบลงในเซลล์เพาะเลี้ยง 2 ชั่วโมง ก่อนการเติมสาร MPP^+ หรือ LPS ลงไป แล้วนำไปศึกษาติดตามผลการเปลี่ยนแปลงเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ curcuminoid analog และกลุ่มควบคุม โดยการเพาะเซลล์สองชนิดเพื่อทดสอบกระบวนการอักเสบต่อการตายของเซลล์นั้นจะทดลองเลี้ยงสองรูปแบบ แบบ mono-culture จะเลี้ยงแยกกันแล้วใส่สารกระตุ้นกระบวนการอักเสบ LPS ลงในจานเพาะเลี้ยง glia cells แล้วเก็บ media จากจานเพาะเลี้ยง glial cells ไปผสมในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท และการเลี้ยงแบบ co-culture คือเลี้ยงร่วมกัน และทดสอบเซลล์ทั้งสองชนิดในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน เป็นการเลียนแบบการดำรงชีวิตของเซลล์ในเนื้อเยื่อประสาทที่เซลล์ต่าง ๆ อาศัยอยู่ร่วมกัน

5. การศึกษาผลของการต้านการตาย/การอักเสบ ของสาร curcuminoid analogs ที่มีผลต่อ neurons และ glial cells หลังจากการเหนี่ยวนำด้วย LPS, MPP^+ และ H_2O_2

5.1 ตรวจสอบ cell viability ด้วยวิธี MTT assay

ทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยนำเซลล์มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ด้วยความหนาแน่น 1×10^4 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายที่ต้องการทดสอบ ได้แก่ LPS, H_2O_2 , MPP^+ และ curcuminoid analogs ตามแบบแผนที่ต้องการทดสอบ ที่ความเข้มข้นต่างกันบ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงอีก 2 ชั่วโมง นำมาดูดอาหารเพาะเลี้ยงออก แล้วเติมสาร dimethyl sulfoxide (DMSO) หลุมละ 100ul เพื่อละลาย formazan crystal แล้วนำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540nm ด้วย microplate reader เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของ MTT reduction กับ control cells โดยให้การดูดกลืนของ control cells เป็น 100% การศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองแต่ละครั้งจะทำ 3 wells และทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแต่ละครั้งไปวิเคราะห์ผล

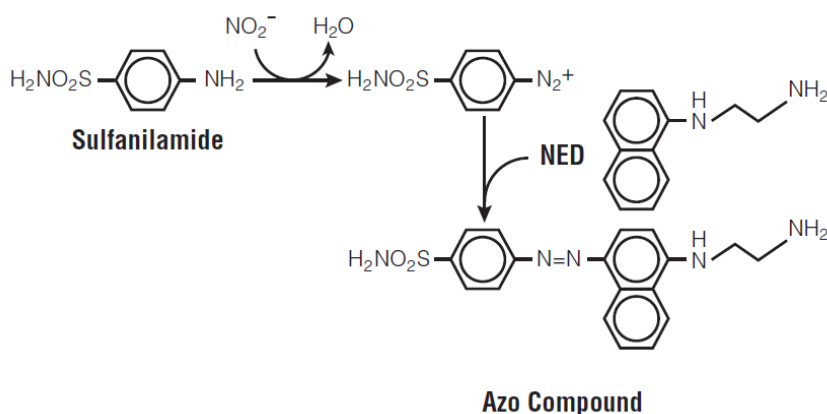
5.2 ศึกษา morphological changes

ตรวจสอบบันทึกลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ inverted phase contrast microscope (Olympus IX71) และชุดถ่ายภาพ (DP20) โดยถ่ายภาพกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละการทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกเหนี่ยวนำการตาย/การอักเสบด้วยสารทดลองแต่ละสารที่ความเข้มข้นที่น้อยที่สุดที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ โดยเลี้ยงใน cell culture slide (SPL, Gyeonggi-do, Korea) มาล้างด้วย phosphate buffer solution (PBS) และตรึงสภาพด้วย 70% ethyl alcohol ก่อนย้อมนิวเคลียสด้วย propidium iodide (PI; (Sigma-Aldrich, MO, USA) และ Hoechst 33342 (Sigma-Aldrich, MO, USA) จากนั้นนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescent (Nikon Eclipse 80i) ถ่ายภาพเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

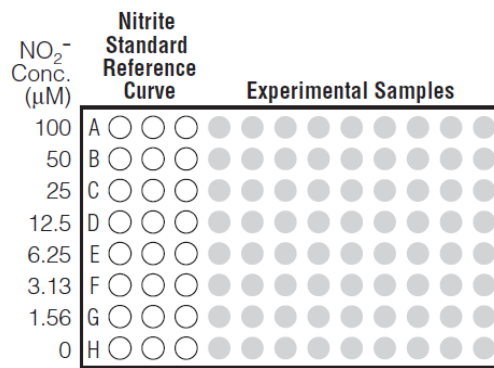
5.3 ตรวจสอบปริมาณ nitric oxide

นำ supernatant ที่ได้จากการทดลองมาหาปริมาณ nitrite (NO_2^-) ซึ่งเกิดจากกระบวนการเปลี่ยนรูปของ nitric oxide (NO) โดยเซลล์เพาะเลี้ยง T98G และ SK-N-SH จะถูก treat ด้วย LPS เพื่อทดลองเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการอักเสบ ในการวัดปริมาณ nitrite นั้นจะใช้วิธี Griess assay (รูปที่ 4) โดยใช้ Griess reagent system (Promega, WI, USA) โดยเติมสาร sulfanilamide เป็นเวลา 5-10 นาที แล้วตามด้วย สาร N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) และ นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 520-550nm ด้วย microplate reader เปรียบเทียบกับ standard curve ของ nitrite standard ดังตัวอย่างแสดงในรูปที่ 5 การศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองแต่ละครั้งจะทำ 3 wells และทำการทดลองซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อหาค่าเฉลี่ยของแต่ละครั้งไปทำการวิเคราะห์ผล



รูปที่ 4 แสดงหลักการของ Griess assay โดยสาร sulfanilamide จะทำปฏิกิริยากับ nitrite (NO_2^-) และเปลี่ยนเป็น diazonium salt ซึ่ง diazonium salt นี้จะจับกับ N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride (NED) เป็นสารประกอบ Azo compound และสามารถนำไปวัดปริมาณได้ด้วย spectrophotometer

ที่มา: Greiss reagent technical bulletin (Promega, WI, USA)



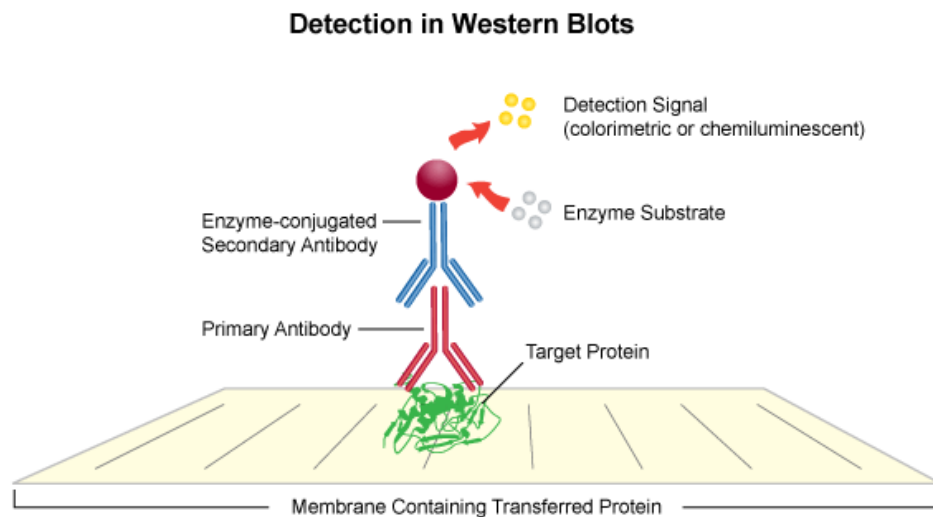
รูปที่ 5 แสดง plate ตัวอย่าง experimental samples และ nitrite standard curve
ที่มา: Greiss reagent technical bulletin (Promega, WI, USA)

5.4 ตรวจสอบ protein expression ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ inflammation

สมมติฐานกลไกการต้านกระบวนการตายและการอักเสบของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ในโครงการวิจัยนี้คือการชักนำให้มีการสร้างโปรตีน pro-inflammatory มากขึ้น ดังนั้นโปรตีนที่เกี่ยวข้องที่จะทดสอบในเบื้องต้นเพื่อเป็นการสนับสนุนฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ได้แก่ COX-2 ในส่วนของกระบวนการตายแบบ apoptosis จะทดสอบโปรตีน pro-apoptotic Bax และ anti-apoptotic Bcl2 ด้วยวิธี Western blots analysis โดยมีหลักการตรวจสอบปริมาณโปรตีน ดังแสดงในรูปที่ 6

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ใน cell culture dish ขนาด 35mm (Corning, NY, USA) นำเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับสารที่ความเข้มข้นต่าง ๆ บ่มเพาะเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มาล้างด้วย phosphate buffer solution (PBS) และทำการสกัดแยกโปรตีนด้วย RIPA buffer (25mM Tris HCl pH 7.6, 150mM NaCl, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 0.1% SDS) และ Cytosol mitochondria protein extraction kit (BioBasic Inc., ON, Canada) โดยเติม protease inhibitor ลงไปในโปรตีนที่สกัดได้ด้วยเพื่อป้องกันเป็นการป้องกันโปรตีนถูกย่อยสลายด้วยเอนไซม์ protease ที่มีอยู่ในเซลล์ จากนั้นนำมาหาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Bradford นำโปรตีนที่ได้มาทำการแยกโดยใช้ sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel (SDS-PAGE) electrophoresis และย้ายแผ่นเจลไปยัง polyvinylidene fluoride (PDVF) membrane (Merck Millipore, MA, USA) ทำการ blocking ด้วย 5% skimmed milk แล้วจึงบ่มกับ primary antibody ที่ต้องการศึกษา ได้แก่ monoclonal antibody Anti-Bax (MAB4601), anti Bcl2 (Cat.No.05-826), Anti-Cyclooxygenase-2 (MAB3462) และใช้ Anti-Actin (MAB1501) เป็น loading control โดย antibody ทั้งหมดจากบริษัท Merck Millipore, (MA, USA) หลังจากนั้นจะล้าง primary antibody และตามด้วยการบ่มใน Horseradish Peroxidase (HRP) conjugated secondary antibody ที่จำเพาะต่อ primary antibody โดยในการทดลองนี้ใช้ goat anti-mouse IgG (Invitrogen; Thermo Fisher Scientific Inc., MA, USA) หลังจากนั้นล้าง antibody ออกจะเติม Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate (Merck Millipore, MA, USA) และบันทึกสัญญาณบนแผ่นฟิล์ม x-ray จากนั้น

ถ่ายรูปเพื่อนำไปวิเคราะห์ปริมาณผลของโปรตีนแต่ละกลุ่มโดยใช้โปรแกรม ImageJ analysis software version 1.48 (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>)



รูปที่ 6 แสดง Detection in Western blots โดย primary antibody จะจับกับ target protein ที่จำเพาะกัน แล้วให้ secondary antibody ที่ติด enzyme ไว้ด้วย มาจับกับ primary antibody อีกที หลังจากนั้นใส่สารที่เป็น substrate กับ enzyme นั้น เพื่อให้เกิดปฏิกิริยากัน ทำให้เกิดสีหรือเรืองแสง ซึ่งสามารถเก็บบันทึกผลไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนได้

ที่มา: http://www.leinco.com/general_wb

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

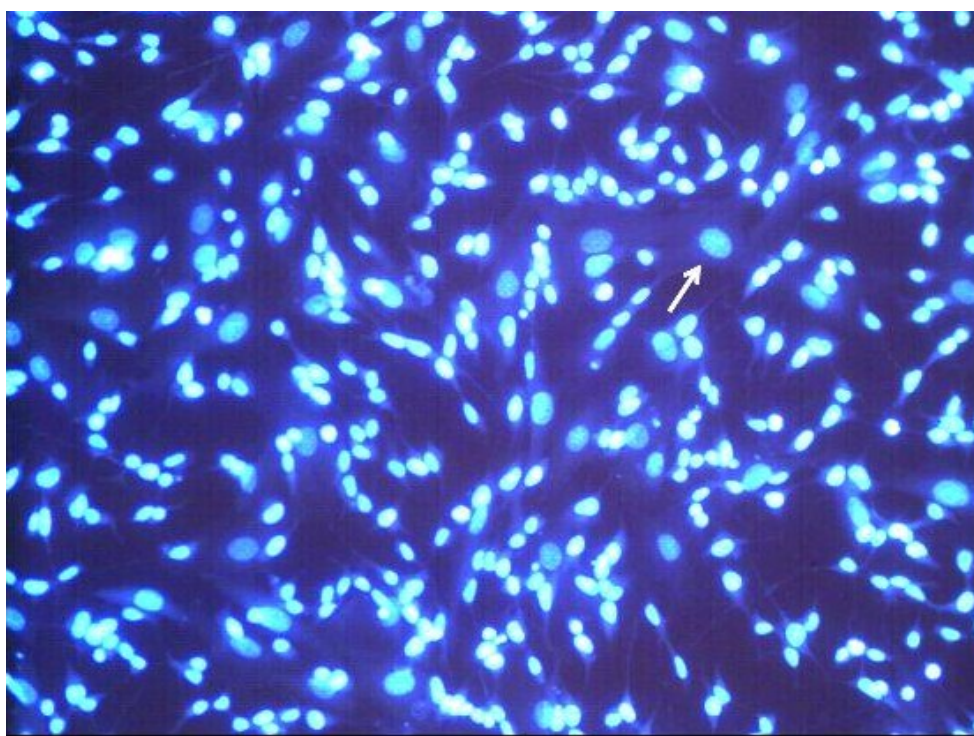
ผลการทดลองเชิงปริมาณได้จากค่าเฉลี่ยของข้อมูลที่ได้จากการทดลองหรือการตรวจวัดซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง และรายงานค่าเป็น $\text{mean} \pm \text{SD}$ การวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างของค่าเฉลี่ยโดย one-way analysis of variance (ANOVA) และใช้ Duncan test ทดสอบความแตกต่างทางสถิติ โดยกำหนดระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับ $p < 0.05$ ข้อมูลทางสถิติทั้งหมดคำนวณโดยใช้ SPSS v.15 (IBM, NY, USA)

ผลการทดลอง

1. การทดลองปรับสภาวะที่เหมาะสมในการเพาะเลี้ยงเซลล์

นำ cell line ของระบบประสาทชนิด human neuroblastoma (SK-N-SH) และ human glioblastoma (T98G) ที่ได้มาจาก American Type Culture Collection (ATCC; VA, USA) มาทดลองเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Modified Essential Medium ที่มีส่วนผสมของ 10% heat inactivated fetal bovine serum, 1% Penicillin streptomycin ในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5%CO₂ ซึ่งปรับสภาพจนได้สภาวะที่เหมาะสมโดยเซลล์สามารถเจริญเติบโตได้ดี

ผลการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ SK-N-SH ดำเนินการไปได้ด้วยดี ลักษณะของเซลล์ประกอบด้วย non neuronal และ neuronal phenotype อยู่ปะปนกัน ดังแสดงในรูปที่ 7



รูปที่ 7 แสดงลักษณะ morphological ของ neuronal และ non-neuronal cells ในเซลล์เพาะเลี้ยง SK-N-SH โดยเซลล์ประสาท (ตัวอย่างที่ถูกชี้) จะมีขนาดใหญ่ เห็น nucleus กลมรีขนาดใหญ่ cytoplasm มาก มี processes แผ่ยื่นออกไป ส่วน non-neuronal จะมีขนาดเล็ก nucleus กลมหรือยาวรี

2. การทดสอบปริมาณความเข้มข้นที่เป็นพิษของสารที่ใช้ในการทดลองต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

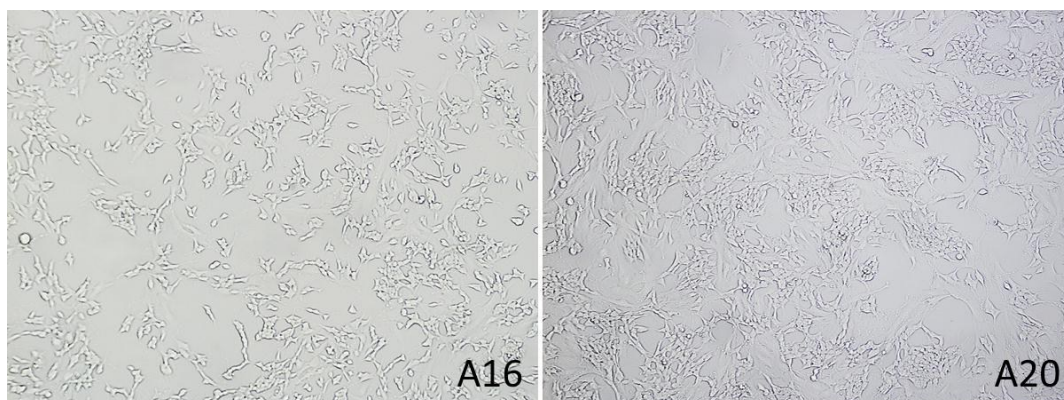
2.1 ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

ผลการหาความเป็นพิษของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs จำนวน 20 analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ด้วยวิธี MTT assay ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน ดังนี้ 2.5, 5, 10, 20, 30 และ 40uM แสดงผลตาม dose dependent โดยความเข้มข้นที่สูงขึ้น 20-30uM จะทำให้ cell availability เริ่มลดลงต่ำกว่า 95% จากการตายของเซลล์ได้ จากผล MTT

assay และลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อศึกษาด้วยกล้อง จะเห็นได้ว่าสารชุดนี้บางแอนาลอกมี limit toxicity ดังแสดงผลตามตารางข้างล่างนี้ และบางแอนาลอกก็ส่งผลต่อจำนวนเซลล์รวมทั้งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง morphological change ด้วยดังแสดงในรูปที่ 8 ซึ่งการทดลองนี้ก็จะทำให้เห็นการออกฤทธิ์ของสารแต่ละโครงสร้างต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และอาจช่วยแยกแยะกลไกการออกฤทธิ์ของสารตามคุณสมบัติของโครงสร้างทางเคมีได้

ตาราง แสดงผลของ curcuminoids (Analog 1-3) และ curcuminoid analogs (Analog 4-20) ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10, 20 และ 40uM ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SK-N-SH

Analog	dose ที่เริ่มพบ toxicity	ลักษณะเซลล์	Analog	dose ที่เริ่มพบ toxicity	ลักษณะเซลล์
1	30uM	เริ่ม apoptosis	11	30uM	เริ่ม apoptosis
2	30uM	เริ่ม apoptosis	12	30uM	เริ่ม apoptosis
3	30uM	เริ่ม apoptosis	13	30uM	เริ่ม apoptosis
4	30uM	เริ่ม apoptosis	14	30uM	เริ่ม apoptosis
5	20uM	เริ่ม apoptosis	15	5uM	apoptosis
6	20uM	เริ่ม apoptosis	16	5uM	apoptosis
7	30uM	เริ่ม apoptosis	17	2.5uM	จำนวนเซลล์ลดลง + apoptosis เมื่อ dose สูง
8	30uM	เริ่ม apoptosis	18	2.5uM	จำนวนเซลล์ลดลง + apoptosis เมื่อ dose สูง
9	30uM	เริ่ม apoptosis	19	2.5uM	จำนวนเซลล์ลดลง + เปลี่ยนรูปร่าง
10	30uM	เริ่ม apoptosis	20	2.5uM	จำนวนเซลล์ลดลง + เปลี่ยนรูปร่าง



รูปที่ 8 แสดงลักษณะของเซลล์ ที่ treat ด้วย Analog ที่ 16 (A16) และ 20 (A20) ที่ความเข้มข้น 2.5uM นาน 24 ชั่วโมง ซึ่งพบจำนวนเซลล์ลดลง เกิด apoptosis และรูปร่างการจัดเรียงตัวของเซลล์เปลี่ยนไปตามลำดับ

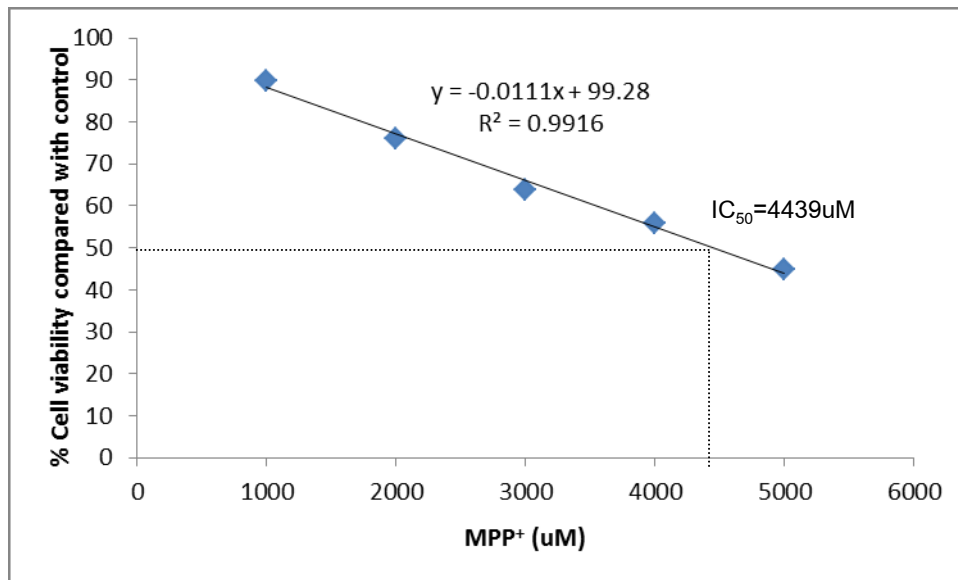
จากผลการทดสอบความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสาร curcuminoids (สารโครงสร้างแอนาล็อกที่ 1, 2, 3) และ curcuminoids analogs (โครงสร้างแอนาล็อกที่ 4-20) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ครั้งนี้ พบว่า สารแต่ละสารของ curcuminoids และ curcuminoids analogs ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกันออกไป จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้เลือกสารที่ไม่มีผลต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงสำหรับใช้ในการศึกษาทดลองขั้นต่อไป โดยเลือกความเข้มข้นที่เซลล์ได้รับแล้วไม่ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ลดลงต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในการศึกษาทดลองขั้นต่อไปจากนี้ผู้วิจัยได้เลือกความเข้มข้นที่ 5-10uM เนื่องจากในความเข้มข้นของสารที่สูงขึ้น (30-40 uM) จะเริ่มมีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้เห็นช่วงความปลอดภัยของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในแต่ละสาร และแต่ละความเข้มข้น และผู้วิจัยเลือกที่จะทดสอบสารกลุ่มโครงสร้างที่ 1-10 เนื่องจากมีโครงสร้างทางเคมีที่ใกล้เคียงกันและใกล้เคียงกับกลุ่มสารต้นแบบ

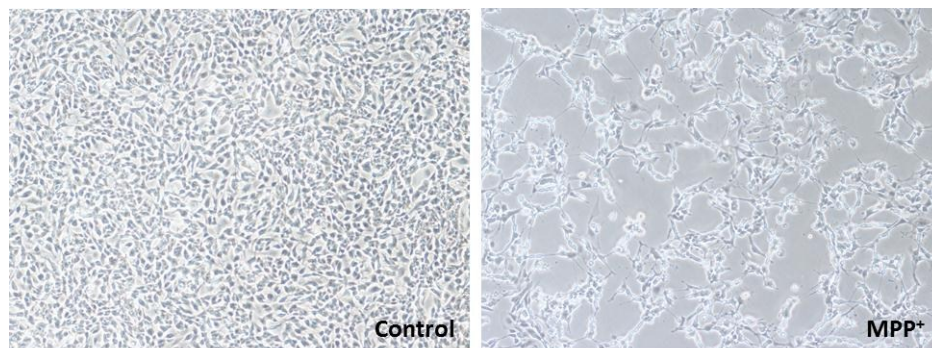
2.2 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ MPP^+ ที่เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยนำเซลล์ SK-N-SH มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ด้วยความหนาแน่น 3×10^4 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายที่ต้องการทดสอบได้แก่ MPP^+ ที่ความเข้มข้นต่างกัน 1000-5000uM บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงอีก 1.30 ชั่วโมง นำมาดูดอาหารเพาะเลี้ยงออก แล้วเติมสาร DMSO หลุมละ 100ul เพื่อละลาย formazan crystal นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540nm ด้วย microplate reader เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของ MTT reduction กับ control cells โดยให้การดูดกลืนของ control cells เป็น 100%

ผลการหาปริมาณความเข้มข้นของ MPP^+ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ โดยวิธี MTT assay ซึ่งจะได้ค่า $IC_{50}=4439uM$ ต่อจำนวนเซลล์ 3×10^4 /well (รูปที่ 9) นอกจากนี้ยังศึกษา morphological change ด้วยกล้อง phase contrast (รูปที่ 10) ซึ่งก็พบลักษณะของการตายแบบ apoptosis



รูปที่ 9 แสดง % cell viability ของเซลล์ ที่ treated ด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 0-5000uM เปรียบเทียบกับ control ผล IC₅₀=4439uM



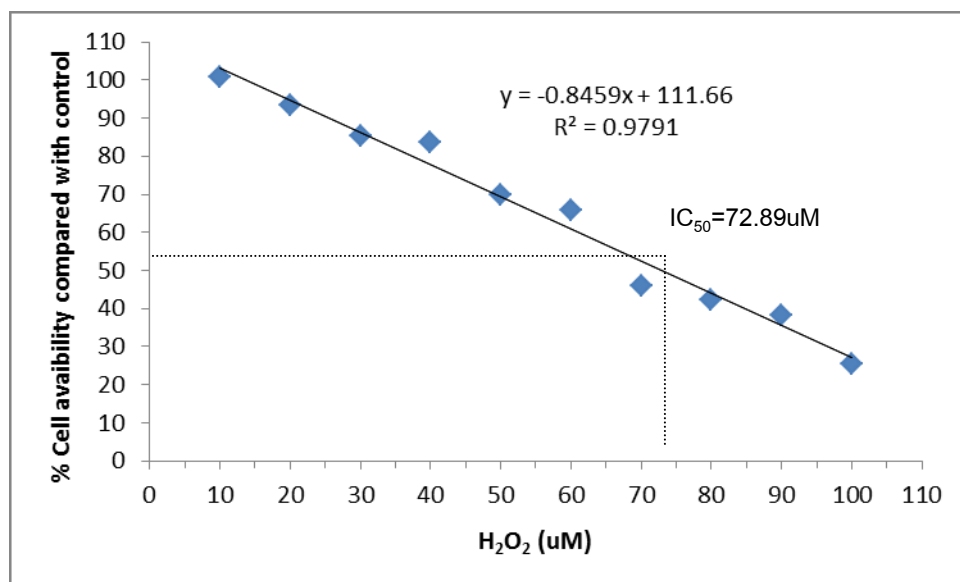
รูปที่ 10 แสดงลักษณะ morphological change ของเซลล์ ที่ treated ด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 4000uM เปรียบเทียบกับ control

2.3 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ H₂O₂ ที่เหนี่ยวนำให้เกิด apoptosis ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

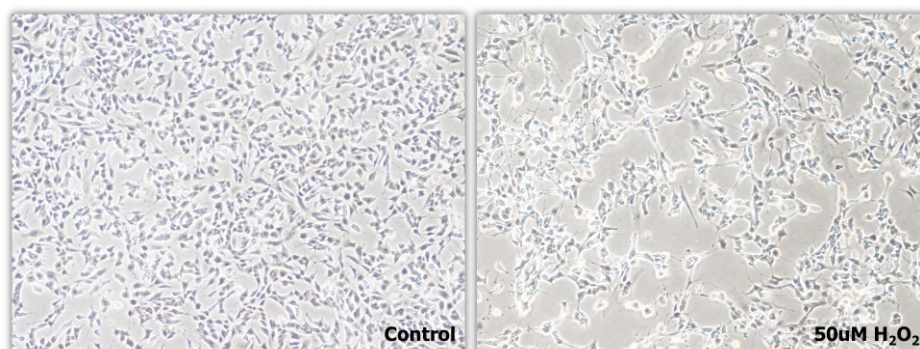
ทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยนำเซลล์ SK-N-SH มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ด้วยความหนาแน่น 3×10^4 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายที่ต้องการทดสอบได้แก่ H₂O₂ ที่ความเข้มข้นต่างกัน 0-100uM บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนเปลี่ยนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีส่วนผสมของ MTT ที่ความเข้มข้น 0.5 mg/ml ทิ้งไว้ในตู้เพาะเลี้ยงอีก 1.30 ชั่วโมง นำมาดูดอาหารเพาะเลี้ยงออก แล้วเติมสาร DMSO หลุมละ 100ul เพื่อละลาย formazan crystal นำไปวัดการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540nm ด้วย microplate reader เปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์ของ MTT reduction กับ control cells โดยให้การดูดกลืนของ control cells เป็น 100%

ผลการหาปริมาณความเข้มข้นของ H₂O₂ ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ โดยวิธี MTT assay ซึ่งจะได้ค่า IC₅₀=72.89uM ต่อจำนวนเซลล์ 3×10^4 /well (รูปที่ 11) นอกจากนี้ยัง

ศึกษา morphological change ด้วยกล้อง phase contrast (รูปที่ 12) ซึ่งก็พบลักษณะของการตายแบบ apoptosis



รูปที่ 11 แสดง % cell viability ของเซลล์ ที่ treated ด้วย H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 0-100uM เปรียบเทียบกับ control ผล IC₅₀=72.89uM



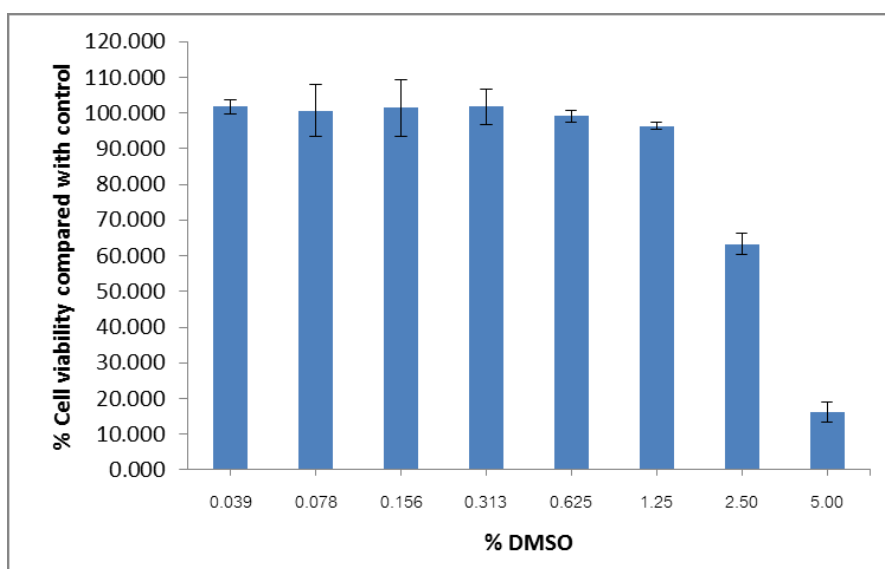
รูปที่ 12 แสดงลักษณะ morphological change ของเซลล์ ที่ treated ด้วย H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 50uM เปรียบเทียบกับ control

2.4 ผลการทดสอบหาปริมาณที่เหมาะสมของ LPS ที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อเซลล์เพาะเลี้ยง ด้วย MTT assay และปริมาณของ nitric oxide ด้วยวิธี Griess assay

ทดสอบด้วยวิธี MTT assay โดยนำเซลล์ T98G มาเพาะเลี้ยงใน 96 well plate ด้วยความหนาแน่น 3×10^4 cells/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเติมสารละลายที่ต้องการทดสอบได้แก่ LPS ที่ความเข้มข้นต่างกัน 100-100,000uM บ่มไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการหาปริมาณความเข้มข้นของ LPS ไม่พบการตายหรือการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยง หลังจากนั้นทดลองหาปริมาณ nitric oxide ด้วยวิธี Griess assay ก็ไม่พบว่ามีปริมาณของ nitric oxide เปลี่ยนแปลงไปจากกลุ่มควบคุมแต่อย่างใด

2.5 ผลการทดสอบหาความเป็นพิษของสารตัวทำละลาย DMSO ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง

เนื่องจากสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs เป็นสารที่ละลายได้ไม่ดีในน้ำ การเตรียมสารละลายจึงต้องใช้ตัวทำละลาย dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อช่วยให้มีการละลายที่ดีขึ้นในเบื้องต้น ซึ่งสาร DMSO อาจส่งผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงได้ จึงได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร ด้วยวิธี MTT assay และดูการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เมื่อได้รับ DMSO ที่จะได้รับจากการนำมาใช้เป็นตัวทำละลาย ผลการศึกษาพบว่าปริมาณ DMSO ที่ใช้ผสมในสารละลายให้มีความเข้มข้น 2.5-40uM ซึ่งจะเท่ากับ DMSO 0.031-0.250% นั้นไม่มีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยง สาร DMSO จะเริ่มมีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงโดยทำให้มี % viability ที่ลดต่ำลงน้อยกว่า 100% ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.313% ขึ้นไป ดังแสดงในกราฟข้างล่างนี้

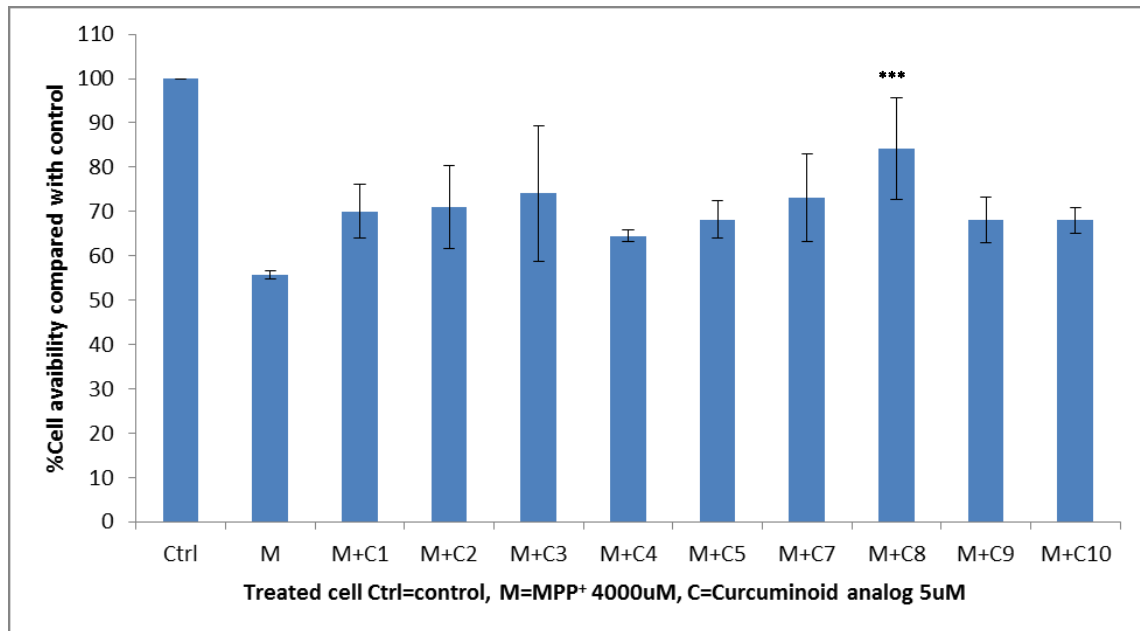


รูปที่ 13 แสดงกราฟผลของ DMSO ที่ความเข้มข้น 0.039-5.00% ที่มีต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ประเมินด้วยวิธี MTT assay (กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean $\pm$ SD)

3. ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อการทดลองเหนี่ยวนำการตาย/ อักเสบ ด้วย MPP^+ , H_2O และ LPS

3.1 ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อการเหนี่ยวนำด้วย MPP^+

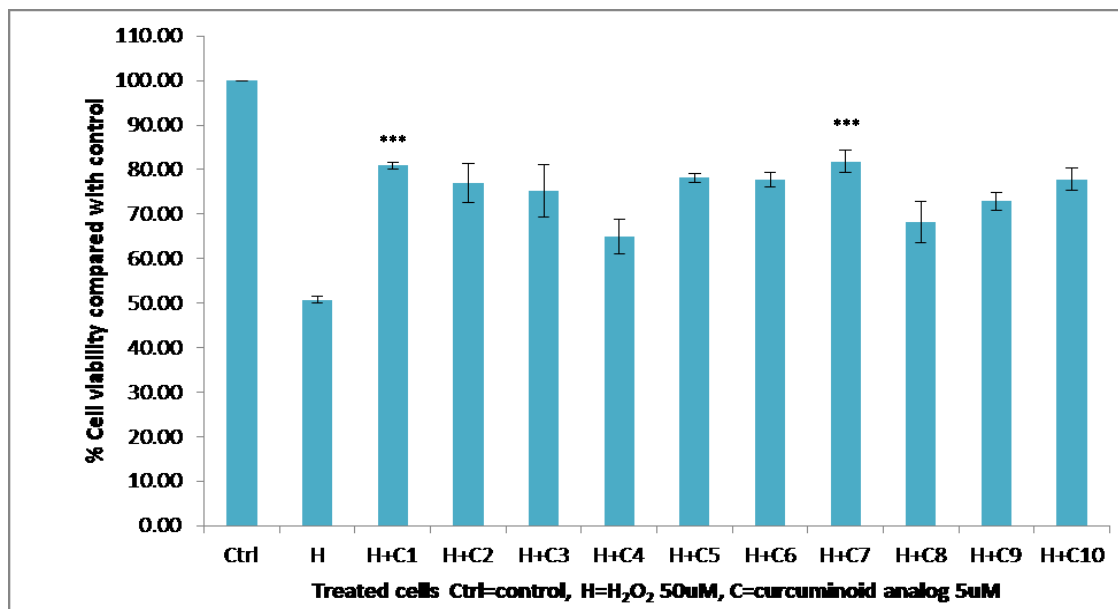
จากผลของการทดสอบความเป็นพิษของ curcuminoids และ analogs คณะผู้วิจัยได้เลือกที่จะศึกษาสารในกลุ่มโครงสร้างที่ 1-10 คือสาร curcuminoids (C1-C3) และ curcuminoid analogs (C4-C5, C7-C10) ในระดับความเข้มข้นที่ 5uM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการได้รับสารการเหนี่ยวนำการตายด้วย MPP^+ ที่ความเข้มข้น 4000uM แล้วเพาะเลี้ยงต่อจนครบเวลา 24 ชั่วโมง จากผลการทดลอง ด้วยวิธี MTT assay พบว่า กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ที่ได้รับสาร curcuminoid analog โครงสร้างที่ 8 (tetrahydrodemethoxycurcumin; THDC) มีผลช่วยทำให้การมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ MPP^+ 4000uM เพียงอย่างเดียว ดังแสดงใน รูปที่ 14



รูปที่ 14 กราฟแสดงผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงหลังได้รับ curcuminoids และ analogs ในความเข้มข้น 5uM ต่อระดับความเข้มข้นของ MPP⁺ 4000uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารที่ 8 (tetrahydrodemethoxycurcumin; THDC) มีผลในการช่วยด้านการตายได้ดีกว่าสารอื่น (กราฟแต่ละแท่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย Mean±SD, ****p*< 0.001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ 4000uM)

3.2 ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อการเหนี่ยวนำด้วย H₂O₂

การศึกษาผลของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs โครงสร้างที่ C1-C10 (สาร curcuminoids C1-C3 และ curcuminoid analogs (C4-C10) ในระดับความเข้มข้นที่ 5uM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการได้รับสารการเหนี่ยวนำการตายด้วย H₂O₂ ซึ่งเป็นการจำลองให้สารที่เพิ่มภาวะ oxidative stress ให้กับสภาวะแวดล้อมของเซลล์ โดยเลือกใช้ที่ความเข้มข้น 50uM ซึ่งต่ำกว่า IC₅₀ เพื่อไม่ให้เซลล์มีการตายที่มากเกินไป ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการตายแบบ necrosis ได้มากกว่าที่จะเกิดแบบ apoptosis และเมื่อเซลล์ตายอย่างรวดเร็วจะหลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง ทำให้ทำการทดลองได้ยากมากขึ้น จากผลการทดลองพบว่า กลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับสารโครงสร้างที่ 1 (curcumin) และสารโครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin; THC) มีผลทำให้การมีชีวิตรอดของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (*p*<0.001) เมื่อเทียบกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H₂O₂ 50uM เพียงอย่างเดียว ดังแสดงใน รูปที่ 15



รูปที่ 15 กราฟแสดงผลการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ด้วยเทคนิค MTT assay ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงหลังได้รับ curcuminoids และ analogs ในความเข้มข้น 5uM ต่อระดับความเข้มข้นของ H₂O₂ 50uM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าสารที่ 1 (curcumin) และสารที่ 7 (tetrahydrocurcumin) มีผลในการช่วยต้านการตายได้ดีกว่า สารอื่น (กราฟแต่ละแท่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ย Mean±SD, ****p*< 0.001 เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ H₂O₂ 50uM)

3.3 ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อการเหนี่ยวนำด้วย LPS

เนื่องจากในการวิจัยครั้งนี้ การใช้สาร LPS กระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงทั้ง SK-N-SH และ T98G ในรูปแบบ mono-culture และ co-culture นั้นไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งในด้าน cell viability, ปริมาณ nitric oxide และรูปสัณฐานของเซลล์ ดังนั้นจึงไม่มีความจำเป็นที่จะต้องทำการศึกษาผลของสาร curcuminoids และ analogs ต่อสาร LPS นี้

อย่างไรก็ตามในการศึกษาผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs เกี่ยวกับกระบวนการอักเสบในระดับโปรตีน คณะผู้วิจัยยังคงจะศึกษาต่อไป

4. ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตาย/อักเสบ เมื่อเหนี่ยวนำด้วย MPP^+ และ H_2O_2

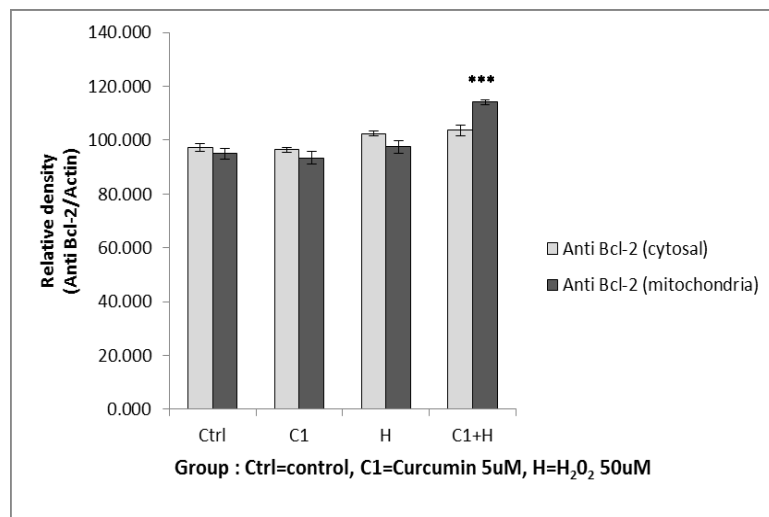
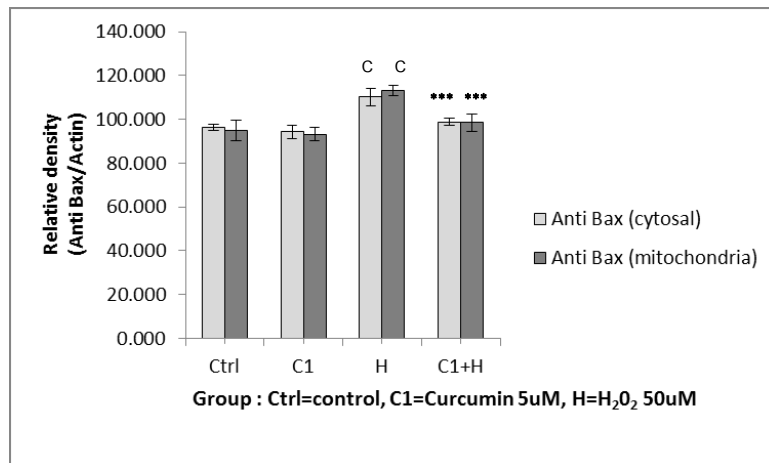
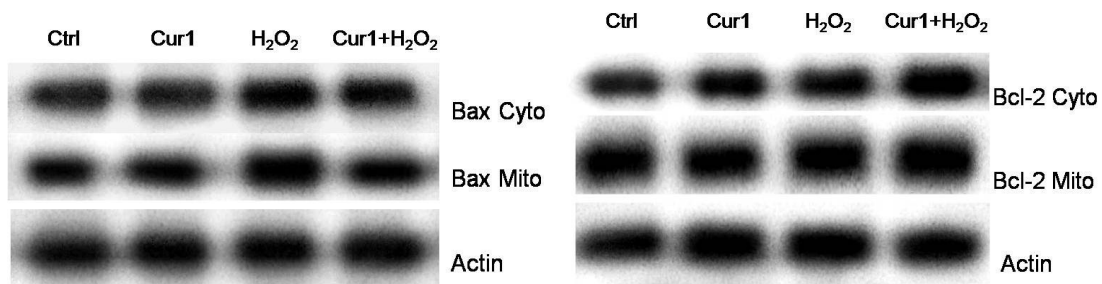
4.1 ผลของ curcumin และ tetrahydrocurcumin ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย H_2O_2

สำหรับการวิเคราะห์ผลของ H_2O_2 ต่อค่าเฉลี่ยการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งในการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H_2O_2 ความเข้มข้น 50uM ของแต่ละการทดสอบทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ โดยในแต่ละชุดของโปรตีนจะเป็นการวิเคราะห์ผลโปรตีนที่ได้มาจากการแยกโปรตีนใน cytosol และ mitochondria

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bax ในกลุ่มที่ได้รับ H_2O_2 ของแต่ละการทดสอบพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ทั้งใน cytosol และ mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 16-17 จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ของ H_2O_2 มีผลทำให้เซลล์เกิดการตายโดยมีผลต่อการเพิ่มการทำงานของโปรตีน pro-apoptotic Bax ทั้งใน cytosol และ mitochondria เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสตามมาในที่สุด

กลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoids โครงสร้างที่ 1 (curcumin) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ ใน mitochondria ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated curcumin ก่อนได้รับ H_2O_2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในรูปที่ 16 สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bcl-2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในรูปที่ 16

กลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoid analog โครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin; THC) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ ใน mitochondria ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated ด้วย tetrahydrocurcumin เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนได้รับ H_2O_2 50uM พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในรูปที่ 17 สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bcl-2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน mitochondria เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม H_2O_2 ดังแสดงในรูปที่ 17

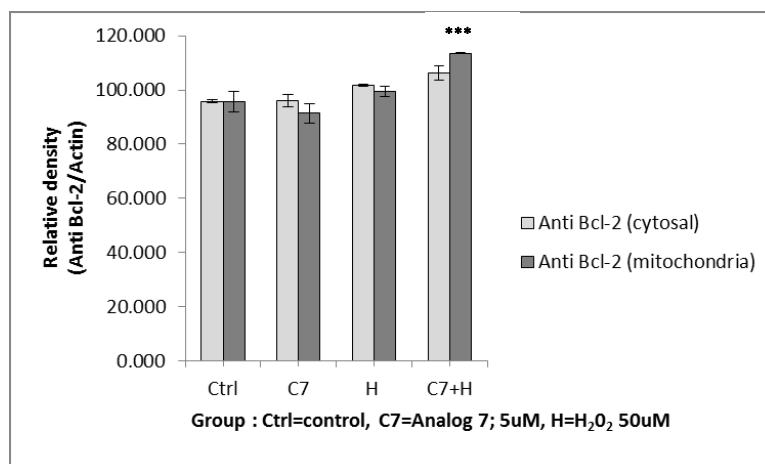
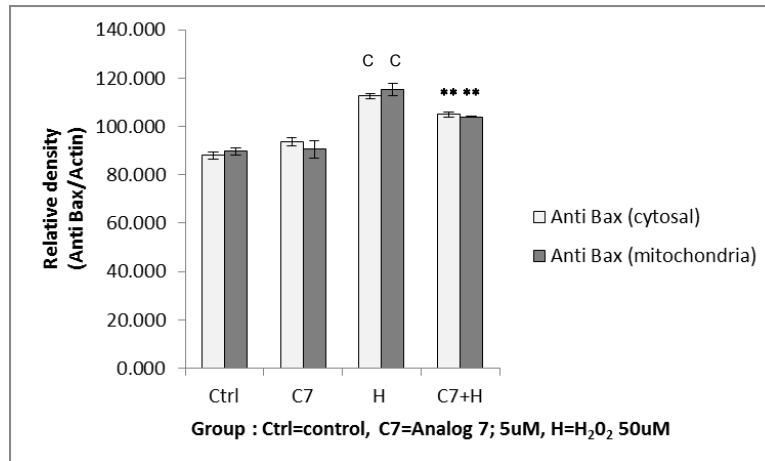
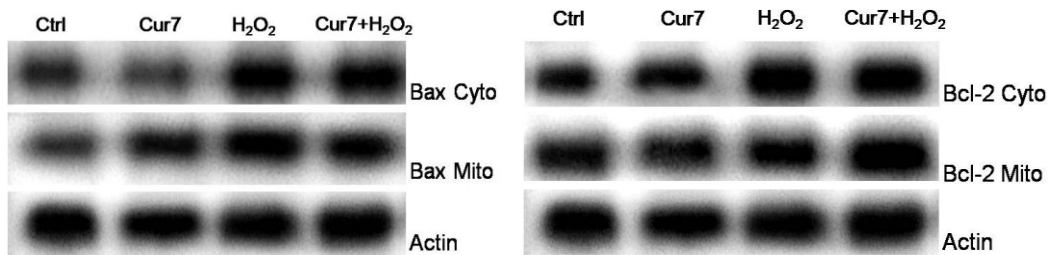


รูปที่ 16 แสดงกราฟการวิเคราะห์ผลโปรตีน Bax และ Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง กลุ่ม control, กลุ่ม curcumin 5uM, กลุ่ม H₂O₂ 50uM และกลุ่ม curcumin 5uM + H₂O₂ 50uM

ภาพบน การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria
 ภาพล่าง การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria
 (กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean±SD)

^c $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลุ่ม control

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



รูปที่ 17 แสดงกราฟการวิเคราะห์ผลโปรตีนของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง กลุ่ม control, กลุ่ม curcuminoid analog ที่ 7; 5uM, กลุ่ม H₂O₂ 50uM และกลุ่ม curcuminoid analog analog ที่ 7; 5uM + H₂O₂ 50uM (กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean±SD)

ภาพบน การแสดงออกของโปรตีน Bax ใน cytosol และ mitochondria

ภาพล่าง การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ใน cytosol และ mitochondria

^C $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงกลุ่ม control

^{**} $p < 0.01$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ H₂O₂ 50uM

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

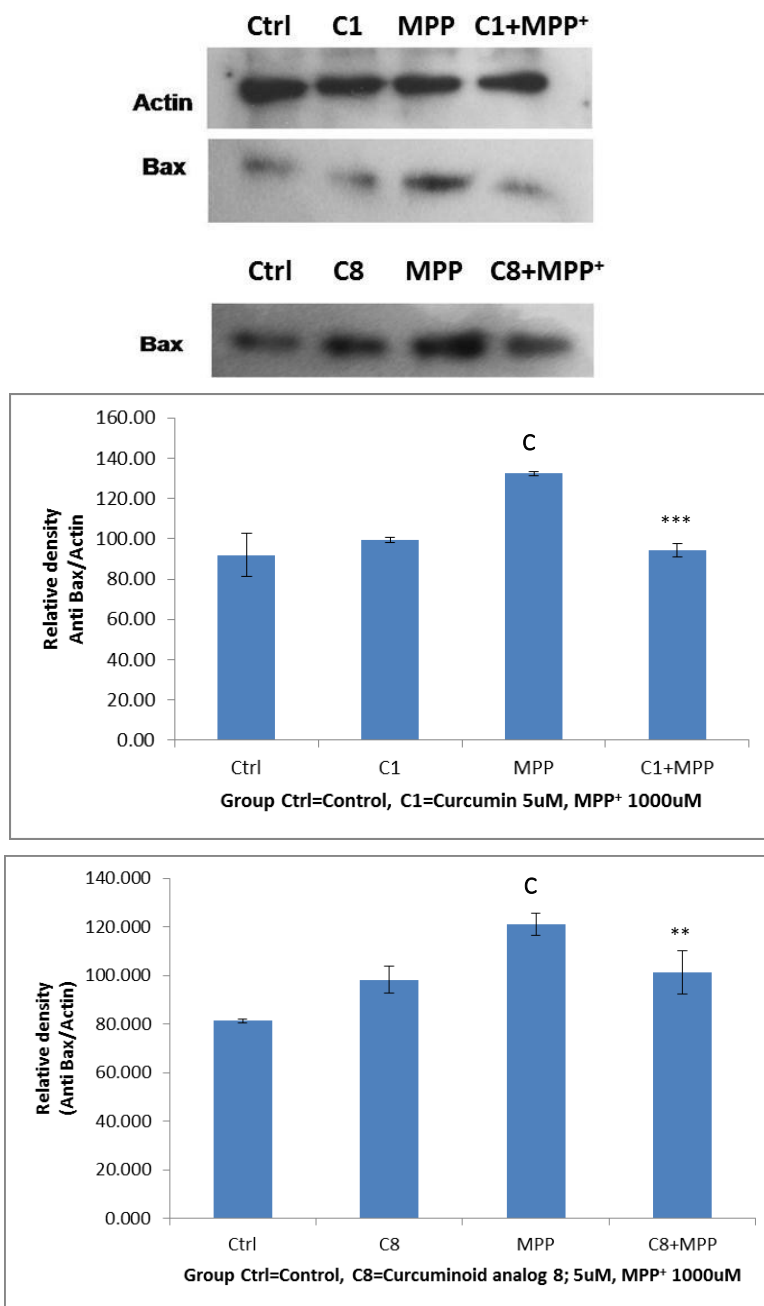
4.2 ผลของ curcumin และ tetrahydrodemethoxycurcumin ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺

การวิเคราะห์ผลของ neurotoxin MPP⁺ ที่มีผลต่อการตายของเซลล์ประสาทและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพาร์กินสันนั้น จะทดสอบการแสดงออกของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ซึ่งในการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ที่ได้รับ MPP⁺ ความเข้มข้น 1000uM ของแต่ละการทดสอบทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ โดยในแต่ละชุดของโปรตีนจะเป็นการวิเคราะห์ผลโปรตีนที่สกัดมาจาก whole proteins เพียงอย่างเดียว การใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า IC₅₀ นั้นก็เพื่อไม่ต้องการให้เซลล์ตายมากเพราะจะหลุดลอยทำให้การทดลองประเมินค่าต่าง ๆ ไม่แน่นอน

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bax ในกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ ของแต่ละการทดสอบพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 18 จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย MPP⁺ มีผลทำให้เซลล์เกิดวิธีการตายโดยมีผลต่อการเพิ่มการทำงานของโปรตีน pro-apoptotic Bax เพื่อกระตุ้นให้เกิดการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงให้เกิดกระบวนการตายแบบอะพอพโทซิสตามมาในที่สุด

กลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoids โครงสร้างที่ 1 (curcumin) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated curcumin ก่อนได้รับ MPP⁺ 1000uM พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม MPP⁺ ดังแสดงในรูปที่ 18 สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bcl-2 พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม MPP⁺ (ไม่ได้แสดงผล)

กลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoid analog โครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin; THC) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax เพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated ด้วย tetrahydrocurcumin ก่อนได้รับ MPP⁺ 1000uM พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bax ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม MPP⁺ ดังแสดงในรูปที่ 18 สำหรับผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน Bcl-2 พบว่า พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม MPP⁺ (ไม่ได้แสดงผล)



รูปที่ 18 แสดงกราฟการวิเคราะห์ผลโปรตีน Bax ของเซลล์ประสาทพะเลียง กลุ่ม control, กลุ่ม curcuminoid analog 5uM, กลุ่ม MPP⁺ 1000uM และกลุ่ม curcuminoid analog 5uM + MPP⁺ 1000uM (กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean±SD)

ภาพบน แสดงผลของ curcumin ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax

ภาพล่าง แสดงผลของ curcuminoid analog ที่ 8 ต่อการแสดงออกของโปรตีน Bax

^C $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงกลุ่ม control

^{**} $p < 0.01$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับ MPP⁺ 1000uM

^{***} $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับ MPP⁺ 1000uM

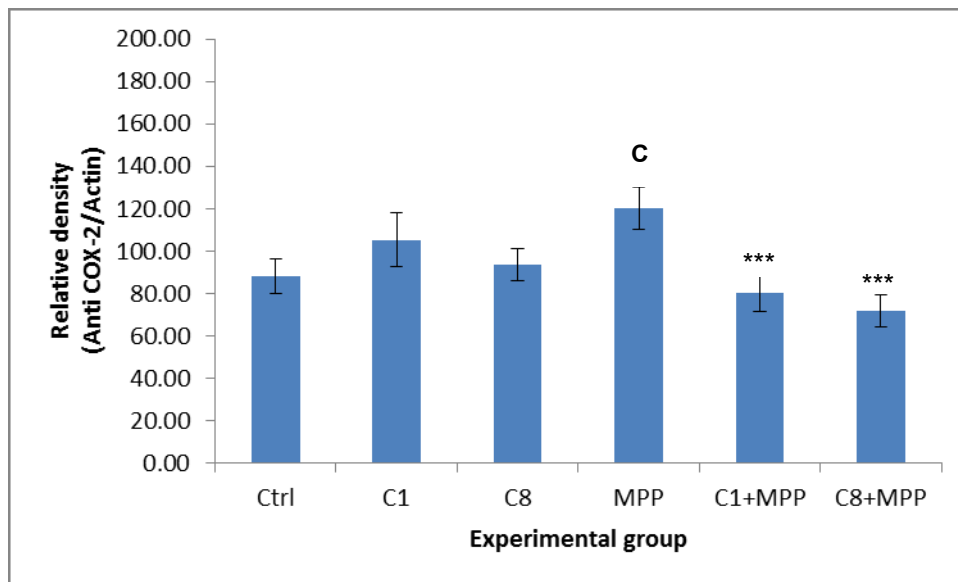
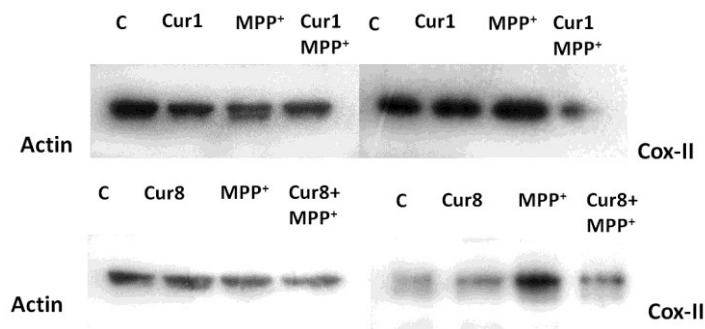
4.3 ผลของ curcumin และ tetrahydrodemethoxycurcumin ต่อการแสดงออกของโปรตีน COX-2 เมื่อเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺

การวิเคราะห์ผลของ neurotoxin MPP⁺ ที่มีผลต่อการตายของเซลล์ประสาทและเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคพาร์กินสันนั้น ในกลไกที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ แม้ว่าการประเมินระดับของ nitric oxide จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงของ nitric oxide ที่จะส่งผลให้เซลล์เกิดการกระบวนการอักเสบตามมาและส่งผลให้เซลล์เข้าสู่กระบวนการตาย อย่างไรก็ตามในการวิจัยครั้งนี้ได้ทดสอบการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบด้วย คือ pro-inflammatory protein COX-2 ซึ่งในการทดสอบจะมีกลุ่มเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ที่ได้รับ MPP⁺ ความเข้มข้น 1000uM ของแต่ละการทดสอบทั้งหมด 3 ชุดการทดสอบ โดยในแต่ละชุดของโปรตีนจะเป็นการวิเคราะห์ผลโปรตีนที่สกัดมาจาก whole proteins เพียงอย่างเดียว การใช้ความเข้มข้นที่ต่ำกว่า IC₅₀ นั้นก็เพื่อไม่ต้องการให้เซลล์ตายมากเพราะจะหลุดลอยทำให้การทดลองประเมินค่าต่าง ๆ ไม่แน่นอน

ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของโปรตีน COX-2 ในกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ ของแต่ละการทดสอบพบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 19 จากผลการทดลองอาจสรุปได้ว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วย MPP⁺ มีผลทำให้เซลล์เพิ่มการทำงานของโปรตีน pro-inflammatory protein COX-2 ด้วย

เมื่อวิเคราะห์กลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoids โครงสร้างที่ 1 (curcumin) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 เพิ่มขึ้น แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated curcumin 5uM ก่อนได้รับ MPP⁺ 1000uM พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม MPP⁺ ดังแสดงในรูปที่ 19

เมื่อวิเคราะห์กลุ่มที่ได้รับสาร curcuminoid analog โครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin; THC) พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ไม่เปลี่ยนแปลงอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่ม control ส่วนกลุ่มที่ได้รับ pretreated ด้วย tetrahydrodemethoxycurcumin 5uM ก่อนได้รับ MPP⁺ 1000uM พบว่า มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ลดลง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.001$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม MPP⁺ ดังแสดงในรูปที่ 19



รูปที่ 19 แสดงกราฟการวิเคราะห์ผลโปรตีน COX-2 ของเซลล์ประสาทพะเลียง กลุ่ม control, กลุ่ม curcumin 5uM, กลุ่ม Curcuminoid analog 8; 5uM กลุ่ม MPP⁺ 1000uM กลุ่ม curcumin 5uM + MPP⁺ 1000uM และกลุ่ม curcuminoid analog 8; 5uM + MPP⁺ 1000uM (กราฟแต่ละแท่งแสดงค่าเฉลี่ย Mean±SD)

^C $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงกลุ่ม control

*** $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มเซลล์ประสาทพะเลียงที่ได้รับ MPP⁺ 1000uM

บทวิจารณ์

เคอร์คิวมินอยด์ (curcuminoids)

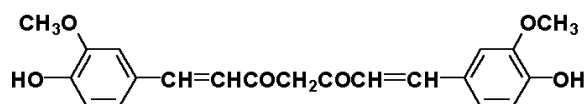
Curcuminoids เป็นสารประกอบสีเหลืองที่ได้จากการสกัดเหง้าของสมุนไพรขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn., ดังแสดงในรูปที่ 20) โดยมีสารประกอบหลัก คือ curcumin, demethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin (ดังแสดงในรูปที่ 21) ซึ่งมีอยู่เป็นส่วนผสมใน curcuminoids เป็นสัดส่วน 76.0%, 20.2% และ 3.8% ตามลำดับ การศึกษาวิจัยผลของ 'curcumin' ในบางครั้งผู้วิจัยไม่ได้ระบุว่าเป็น pure curcumin หรือ curcuminoids mixture ซึ่งประกอบไปด้วยสารทั้งสามดังกล่าวเบื้องต้น ซึ่งการที่จะศึกษาติดตามผลของสารแต่ละชนิดจริง ๆ จึงต้องเข้าไปดูที่มาของสาร curcumin รวมทั้งองค์ประกอบของสาร curcumin ที่ใช้ในงานวิจัยครั้งนั้น ๆ แต่อย่างไรก็ตามในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของสารแต่ละโครงสร้างที่แยกแยะมาโดยนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร.อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง รวมทั้ง แอนาลอกของเคอร์คิวมินอยด์ด้วย รวมทั้งหมด 20 โครงสร้าง ดังนั้นการแสดงผลของสารในการวิจัยครั้งนี้จึงเป็นกลไกการออกฤทธิ์เฉพาะสารโครงสร้างนั้น ๆ อย่างแท้จริง



รูปที่ 20 แสดงผงสีเหลืองที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชันที่มีสารประกอบ curcuminoids

ที่มา: <http://cell-nutrition.net/wp/curcuminoids-absorption/>

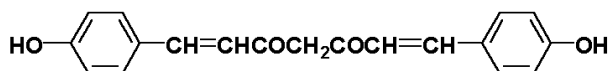
CHEMICAL STRUCTURES OF CURCUMINOIDS



CURCUMIN *Diferuloyl methane*



DEMETHOXY CURCUMIN *p-Hydroxy-cinnamoyl-feruloyl-methane*



BISDEMETHOXY CURCUMIN *pp'-Dihydroxy-dicinnamoyl-methane*

รูปที่ 21 แสดงโครงสร้างทางเคมีของสารที่เป็นองค์ประกอบของ curcuminoids

ที่มา: http://www.sabinsa.com/newsroom/paper_curcumin.html

ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้มีการรายงานถึงคุณสมบัติของสารประกอบ curcuminoids โดยแยกแยะคุณสมบัติของสารประกอบแต่ละโครงสร้าง ซึ่งแต่ละโครงสร้างก็จะมีกลไกการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกัน อาทิเช่น การศึกษาของ Liu และคณะ (2010) พบว่า curcumin ลดปริมาณการสร้าง beta-amyloid protein ที่เป็นสาเหตุของโรค Alzheimer ในเซลล์เพาะเลี้ยง โดยการยับยั้ง beta-amyloid precursor protein ส่วน bisdemethoxycurcumin จะส่งผลในการลดเอนไซม์ BACE1 ในกระบวนการสร้าง amyloid ในขณะที่ demethoxycurcumin มีผลเพียงยับยั้ง BACE1 mRNA expression เท่านั้น (Liu et al., 2010) การศึกษานี้แสดงให้เห็นถึงความสำคัญของการศึกษาผลของสารแต่ละโครงสร้างในกลไกการออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสาร curcuminoids เพื่อให้มีการนำไปใช้ได้อย่างมีประสิทธิภาพสูงสุด

จากรายงานการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา พบว่าสารประกอบ curcumin มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็ง และฤทธิ์ต้านสารอนุมูลอิสระ (antioxidant activity) โดยในทางการแพทย์ได้มีการนำสารสกัด curcumin มาใช้ประโยชน์ในกระบวนการรักษาโรคต่างๆ มากมาย (Jurenka, 2009; Prasad et al., 2014) แต่อย่างไรก็ตาม curcumin ก็มีคุณสมบัติเฉพาะตัว ที่ไม่ค่อยละลายในน้ำ (insoluble water) แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายบางตัว เช่น alcohol มีข้อจำกัดในด้านการคงตัว (unstable) และมีความไวต่อแสง ดังนั้นจึงได้มีการปรับโครงสร้างของสาร curcuminoids ขึ้นมาใช้เรียกว่า curcuminoid analogs โดยนักวิจัยกลุ่มของศาสตราจารย์ ดร. อภิชาติ สุขสำราญ ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรามคำแหง ได้ปรับเปลี่ยนโครงสร้างของสาร curcuminoid ไปเป็น สารสังเคราะห์ (analog) ที่มีคุณสมบัติเป็น metabolite ของ curcuminoids ที่มีความคงตัวที่ดีกว่า

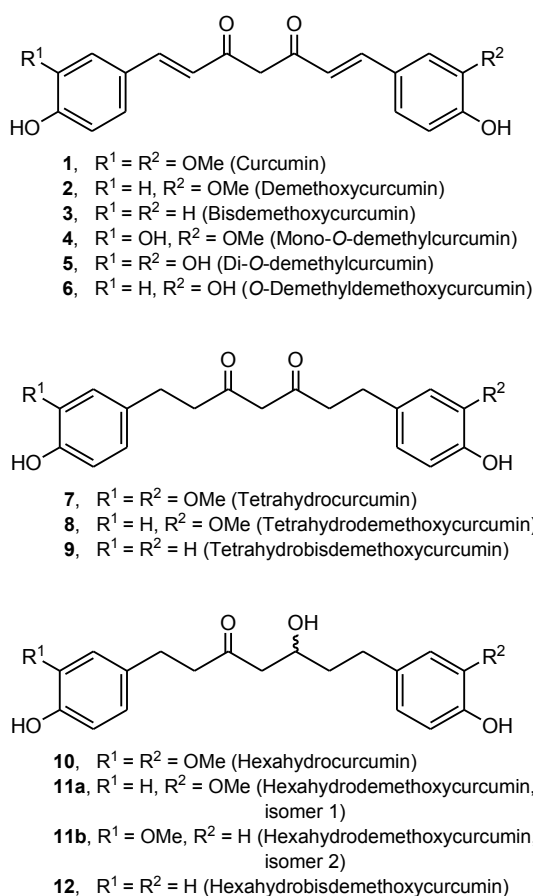
จากการศึกษาวิจัยถึงคุณสมบัติของสารประกอบ curcuminoid analogs มีรายงานพบว่ามีผลในด้านต่าง ๆ ไม่น้อยไปกว่าสารต้นแบบเลย อาทิเช่น ในด้านการต้านมะเร็ง มีรายงานว่า curcuminoid analog สารโครงสร้างที่ 7 (tetrahydrocurcumin) สามารถยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (angiogenesis) ของมะเร็งตับในหนูทดลองได้ (Yoysungnoen et al., 2008) ด้วยเหตุนี้จึงเป็นสิ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งที่จะนำ analogs เหล่านี้มาทำการศึกษา ถึงผลการต้านการตายและการอักเสบของเซลล์ประสาท ซึ่งจะเป็นคุณสมบัติต่อผู้ป่วยหรือผู้สูงอายุที่มีปัญหาความเสื่อมในระบบประสาท ทั้งในด้านการป้องกันและรักษาโรค ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงต้องการศึกษาคุณสมบัติของสาร curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงจากการเหนี่ยวนำการตายด้วยสาร neurotoxin MPP^+ เปรียบเทียบกับการชักนำภาวะ oxidative stress H_2O_2 และการอักเสบด้วย endotoxin lipopolysaccharide (LPS)

ผลของ curcuminoids และ curcuminoid analogs ต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

ในการที่จะศึกษาคุณสมบัติของสารแต่ละชนิดนั้น คณะผู้วิจัยได้เริ่มศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) ของสารต่อเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงก่อนเป็นลำดับแรก ถึงแม้ว่าสาร curcumin จะมีความปลอดภัยสูงที่ใช้ทดลองในสัตว์ทดลองแล้วปลอดภัยก็ตาม ซึ่งก็พบว่า สาร curcuminoids (สารโครงสร้างที่ 1-3) และ curcuminoid analogs มีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง ในระดับความเข้มข้นที่แตกต่างกันไป จากผลการทดลองดังกล่าวทำให้เลือกสารที่ไม่มีผลต่อเซลล์

ประสาทพะเลียงที่ได้รับในความเข้มข้น 5-10uM แต่เมื่อเซลล์ในความเข้มข้นสูงขึ้น (30-40 μ M) มีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลง ดังนั้นจากผลการทดลองทำให้เห็นช่วงความปลอดภัยของสาร curcuminoids และ analogs ต่อเซลล์ประสาทพะเลียงในแต่ละสาร และแต่ละความเข้มข้น ซึ่งเกณฑ์ที่ใช้ในการคัดเลือกสารที่จะนำไปศึกษาจะต้องเลือก สาร และความเข้มข้นที่ไม่ทำให้การมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) ลดลงต่ำกว่า 95% (สารที่นำมาใช้ไม่ควรมีผลทำให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงเกิน 5% เมื่อเทียบกับกลุ่มเซลล์ควบคุม)

จากผลการทดสอบ toxicity ดังกล่าว ทำให้ผู้วิจัยเลือกกลุ่มสารที่ 1-10 จากทั้งหมด 20 โครงสร้างที่ได้รับมา โดยพิจารณาจากช่วงความปลอดภัยและลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ไม่แตกต่างจากสารต้นแบบคือสาร curcuminoids (โครงสร้างที่ 1-3) มาก ดังแสดงในรูปที่ 22

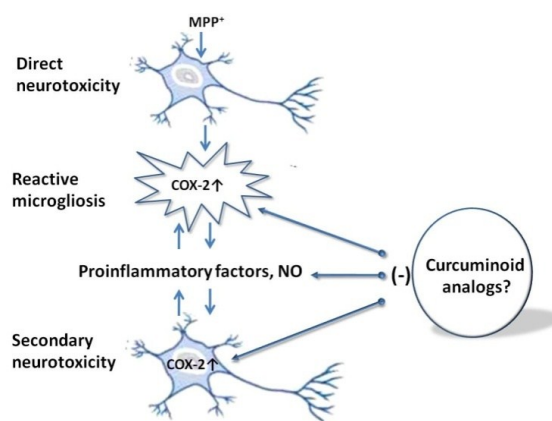


รูปที่ 22 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ curcuminoids (โครงสร้างที่ 1-3) และ curcuminoid analogs

Curcumin และ Curcuminoid analogs ต่อการต้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

กระบวนการอักเสบกับการตายของเซลล์

กระบวนการอักเสบเป็นสมมติฐานหลักของโครงการวิจัยนี้ ที่จะนำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์ประสาท ในการศึกษากระบวนการอักเสบนั้นจำเป็นต้องอาศัยเซลล์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ เซลล์ macrophage ซึ่งที่พบในระบบประสาท ได้แก่พวก microglia หรือ glia cells ดังนั้นจึงจำเป็นต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งสองชนิดซึ่งจะต้องมีการหลังสาร interaction ต่อกัน เพื่อเลียนแบบเสมือนจริงในเนื้อเยื่อของระบบประสาท เมื่อมีการกระตุ้นด้วยสารที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบ ซึ่งในแบบจำลองโรคพาร์กินสันนี้จึงได้ใช้ MPP⁺ และใช้ LPS ที่เป็น endotoxin ที่จะกระตุ้นการอักเสบเป็นตัวช่วยควบคุมด้วย เมื่อมีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น glia cells จะมารวมกันมากขึ้น (microgliosis) และสร้าง proinflammatory factors ต่าง ๆ รวมทั้ง nitric oxide ที่หลั่งออกมาแล้วไปมีผลต่อเซลล์ประสาท หรือแม้แต่ตัวเซลล์ microglia เองให้มีการหลัง cyclo-oxygenase 2 (COX-2) ให้เพิ่มมากขึ้น ดังแสดงในรูป 23 มีรายงานการวิจัยพบว่าการกระตุ้นเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ด้วย MPP⁺ เพื่อให้มีกระบวนการอักเสบและมีการหลั่ง prostaglandin E2 (PGE2) และ COX-2 ออกมานั้นจำเป็นต้องอาศัยการเพาะเลี้ยงร่วมกับ microglia ซึ่งเมื่อให้สาร COX-2 inhibitor เข้าไปก็ทำให้ปริมาณของ PGE2 ลดลงได้ ซึ่งแสดงถึงผลของสารที่มีคุณสมบัติ COX-2 inhibitor จะสามารถลดกระบวนการอักเสบได้ (Wang et al., 2005) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ของคณะผู้วิจัยไม่สามารถแสดงให้เห็นว่าการเพาะเลี้ยงร่วมกันหรือแยกกันเลี้ยงจะกระตุ้นให้มีการสร้าง nitric oxide เพิ่มมากขึ้น สันนิษฐานได้ว่าระบบการทดลองใน *in vitro* ครั้งนี้ไม่เหมาะสมกับการจำลองสถานการณ์การอักเสบได้ แต่อย่างไรก็ตามเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ได้รับ MPP⁺ โดยตรง ก็มีการแสดงออกของโปรตีน COX-2 ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งเป็นไปได้ว่า COX-2 ที่เพิ่มขึ้นนั้นเป็นผลจาก MPP⁺ ที่มีต่อเซลล์ประสาทโดยตรงนั่นเอง นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่า COX-2 ที่เพิ่มขึ้นนั้นจะสามารถสร้าง reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะยิ่งเพิ่มภาวะ oxidative stress ให้กับเซลล์และทำให้เซลล์เข้าสู่การตายแบบ apoptosis ได้ พิสูจน์ด้วยการให้สารพวก COX-2 inhibitors ลงไป พบว่าเซลล์ตายลดลงและ ROS ก็ลดลงด้วย (Hsieh et al., 2011)



รูปที่ 23 จำลองกระบวนการอักเสบและเป้าหมายการออกฤทธิ์ของสาร curcuminoid analogs

ในการศึกษาครั้งนี้เมื่อ treated เซลล์ประสาทด้วย MPP⁺ ร่วมกับ curcumin หรือร่วมกับ tetrahydrodemethoxycurcumin (THDC; analog ที่ 8) จะสามารถช่วยลดระดับการแสดงออกของ COX-2 ได้ ซึ่งทั้ง curcumin และ THDC น่าจะมีคุณสมบัติเป็น COX-2 inhibitor ในการช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทดังกล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตามหากจะยืนยันความเป็นไปได้ตามสันนิษฐานควรที่จะมีการศึกษาเปรียบเทียบกับสารที่เป็น COX-2 inhibitor ด้วย เช่น ibuprofen สืบเนื่องจากการศึกษาเกี่ยวกับ neuroinflammation ที่เกี่ยวข้องกับโรค Parkinson นำมาสู่การใช้ยาจำพวก anti-inflammatory ในผู้ป่วย โดยยาจำพวก steroids ไม่สามารถใช้ต่อเนื่องได้ เพราะมีผลข้างเคียงมากและส่วนใหญ่เป็นผลที่รุนแรงต่อร่างกาย ส่วนยาจำพวก non-steroidal anti-inflammatory drugs (NSAIDs) พบว่าช่วยลดการตายของ dopaminergic neurons ได้ในสัตว์ทดลอง และยังพบว่า NSAIDs บางชนิด เช่น ibuprofen ช่วยลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคได้ดีในเพศหญิง (Chen et al., 2005; Esposito et al., 2007) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจศึกษาสาร curcumin และ THDC ในคุณสมบัติของการเป็น COX-2 inhibitor ที่ดี

ภาวะ oxidative stress

ในโครงการวิจัยครั้งนี้พบว่าสาร cucuminoids และ curcuminoid analogs มีผลต้านการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SK-N-SH ได้ดี จากการชักนำการตายด้วย H₂O₂ และ MPP⁺ โดยเฉพาะ curcumin, tetrahydrocurcumin (THC) และ tetrahydrodemethoxycurcumin (THDC) และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลง morphology ของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปในลักษณะของการเกิด apoptosis รวมทั้งมีการสูญเสีย mitochondrial membrane potential (ไม่ได้แสดงผลในงานวิจัยครั้งนี้) ทำให้สมมติฐานได้ว่าจะมีการกระตุ้นวิถีการตายในแบบ intrinsic pathway (mitochondria-mediated pathway) ซึ่งทำให้ pro-apoptotic protein กลุ่ม Bax ซึ่งในภาวะปกติจะอยู่ใน cytosol จะเคลื่อนไปจับที่ outer membrane ของ mitochondria ทำให้ permeability transition pore เสียการควบคุมการเข้าออก มีการหลั่ง cytochrome C ออกมาใน cytosol เมื่อ cytochrome C ออกมาจะรวมตัวกับ Apaf-1 และ procaspase-9 เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome ซึ่งโครงสร้าง apoptosome จะไปกระตุ้น procaspase-9 (inactive) ให้เป็น caspase-9 (active) และ caspase-9 จะกระตุ้นการทำงานของ effector caspase เช่น procaspase-3 ต่อไปตามลำดับและทำให้เซลล์เกิดการตายแบบ apoptosis ในที่สุด (Gupta, 2001)

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าเซลล์ที่ได้รับ curcumin, THC และ THDC จะแสดงผลของการช่วยลดการแสดงออกของ pro-apoptotic protein Bax และบางแอนะล็อกช่วยเพิ่มการแสดงออกของ anti-apoptotic protein Bcl-2 ในไมโทคอนเดรียได้ จึงสรุปได้ว่า curcumin, THC และ THDC สามารถป้องกันเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง จากผลของการชักนำให้เกิด apoptosis ด้วย H₂O₂ และ MPP⁺ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Chen และคณะ (2006) ที่พบว่าสาร curcumin สามารถป้องกันการตายของเซลล์ PC12 ได้ โดยทำให้เกิดการ overexpression ของโปรตีน Bcl-2 ที่ช่วยลดการสูญเสีย mitochondrial membrane potential จากภาวะ oxidative stress ซึ่งเป็นภาวะที่มีกลุ่มสาร ROS เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสาร MPP⁺ กลไกการป้องกัน

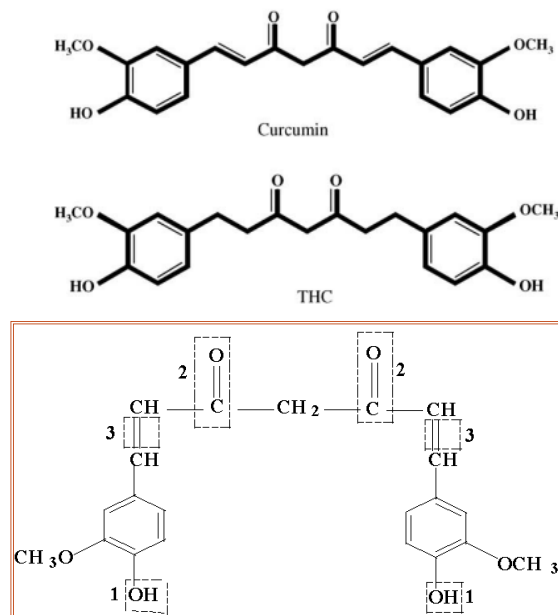
การตายของสาร curcumin พบว่าดำเนินการผ่านทางโปรตีน Bcl-2 และ mitochondria (Chen et al., 2006) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่พบการแสดงออกเกี่ยวข้องกับโปรตีน Bax และโปรตีน Bcl-2 ด้วยเช่นเดียวกัน

Curcumin

Curcumin (1,7-bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1,6-heptadiene-3,5-dione) เป็นสารหลักของสารประกอบ curcuminoids ที่พบในเหง้าของขมิ้นชัน มีงานวิจัยมากมายที่รองรับคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่ดี จึงนำมาใช้ประโยชน์ทั้งทางด้านการแพทย์ อาหาร และเครื่องสำอาง ในโรคที่เกี่ยวข้องทางระบบประสาทก็มีรายงานพบว่า สาร curcumin สามารถช่วยลดภาวะ oxidative stress จากผลของ aggregated alpha-synuclein ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคพาร์กินสันใน cell model ได้ (Wang et al., 2010) นอกจากนี้มีรายงานมากมายถึงคุณสมบัติที่ดีของ curcumin ในการที่จะพัฒนาไปใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสัน (Mythri and Bharath, 2012) แต่อย่างไรก็ตาม สาร curcumin ก็ยังมีข้อจำกัดคือ เป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ และสารละลาย curcumin ก็มักจะไม่เสถียร ในปัจจุบันมีงานวิจัยถึงการพยายามใช้ nanoparticle เพื่อช่วยนำสาร curcumin เข้าสู่เป้าหมายเพื่อการรักษาโรคทางระบบประสาท (Mourtas et al., 2014; Siddique et al., 2013) ดังนั้นการปรับปรุงสูตรโครงสร้างเพื่อลดข้อจำกัดนี้ ทำให้ได้ curcuminoid analogs ที่มีคุณสมบัติทัดเทียมกับสารต้นแบบ ซึ่งเมื่อศึกษาเปรียบเทียบคุณสมบัติกลไกการออกฤทธิ์ของโครงสร้าง curcumin ต้นแบบ กับ curcuminoid analogs ทำให้สามารถประเมินได้ว่าสาร curcuminoid analogs นั้นน่าจะมีคุณสมบัติที่ดีกว่าสารต้นแบบและน่าจะนำไปพัฒนาให้มีคุณสมบัติอย่างแท้จริง

Tetrahydrocurcumin (THC)

THC (1,7-Bis(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-3,5-Heptanedione) เป็นสารประกอบที่ไม่มีสี ได้มาจาก hydrogenated form ของ curcumin มีการศึกษาวิจัยพบว่ามีประสิทธิภาพสูงในการต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งสารอนุมูลอิสระเหล่านี้เป็นปัจจัยที่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ อวัยวะ และทำให้เกิดโรคต่าง ๆ ตามมา (Naito et al., 2002; Nakmareong et al., 2011; Wu et al., 2014) โดยลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่ทำให้สาร THC มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่ดี คือ phenolic hydroxyl group และ diketone moiety ดังแสดงในรูปที่ 24 นอกจากนี้สาร tetrahydrocurcumin ยังพบได้ใน *in vivo* โดยเป็นผลที่ได้จากกระบวนการ metabolites ของสารประกอบ curcuminoids ในลำไส้ของหนู (Ireson et al., 2002; Pan et al., 1999) ดังนั้นถึงแม้ว่า curcuminoids จะมีความสามารถในการละลายและมีความคงตัวอยู่ในกระแสเลือดได้ค่อนข้างต่ำ แต่หากเมื่อเข้าสู่ร่างกายไปแล้วสามารถแตกตัวเป็นสารที่มีประสิทธิภาพสูงได้ในร่างกายย่อมเป็นคุณสมบัติที่มีประโยชน์อย่างยิ่งของ curcuminoids ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า THC ช่วยลดการตายแบบ apoptosis เนื่องจากการกระตุ้นภาวะ oxidative stress ด้วย H_2O_2 ได้ดีในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงได้ดีเทียบเท่ากับสาร curcumin จึงเป็นสารที่มีศักยภาพสูงในการที่จะพัฒนามาใช้ป้องกันและรักษาโรคที่เกิดจากความเสื่อมในระบบประสาทอย่างโรค Parkinson หรือ Alzheimer



1. Parahydroxyl groups - *antioxidant activity*
2. Keto groups - *anti-inflammatory, anti-cancer, anti-mutagen*
3. Double bonds - *anti-inflammatory, anti-cancer, anti-mutagen*

รูปที่ 24 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ curcumin และ THC (บน) และคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของตำแหน่งโครงสร้างทางเคมี

ที่มา: http://www.sabinsa.com/newsroom/paper_curcumin.html

Tetrahydrodemethoxycurcumin (THDC)

THDC (1-(3-methoxy-4-hydroxyphenyl)-7-(4'-hydroxyphenyl) heptane-3,5-dione) เป็นสาร hydrogenated form ของ curcumin มีคุณสมบัติ antioxidant สูงเช่นเดียวกับ THC จากลักษณะโครงสร้างทางเคมีที่มี parahydroxyl group เช่นเดียวกัน ดังแสดงในรูปที่ .. THC และ THDC มักใช้เป็นส่วนผสมในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอาง ช่วยยับยั้งกระบวนการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีที่ผิวหน้าได้ดี เนื่องจาก THDC มีคุณสมบัติ antioxidant และมีข้อจำกัดน้อยกว่า curcumin จึงเป็นสารที่น่าสนใจศึกษาเช่นเดียวกับ THC

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ พบว่า THDC ช่วยต้านการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ประสาท SK-N-SH ได้ดี ในด้านกลไกการออกฤทธิ์พบว่าช่วยลดการแสดงออกของโปรตีน pro-apoptotic Bax ที่เกี่ยวข้องกับวิถีการตายแบบ mitochondrial pathway นอกจากนี้ยังช่วยลดเอนไซม์ COX-2 ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบด้วย

สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะสำหรับงานวิจัยในอนาคต

โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) จัดอยู่ในกลุ่มโรค progressive neurodegenerative disorders ที่พบได้ส่วนใหญ่ในผู้สูงอายุ โดยความเสี่ยงในการเกิดโรคจะเพิ่มสูงมากขึ้นตามอายุที่มากขึ้น สาเหตุการเกิดโรคไม่เป็นที่ทราบแน่นอน แต่พบว่ามีปัจจัยส่งเสริมเป็นได้ทั้งจากสิ่งแวดล้อมและพันธุกรรมที่ทำให้เกิดพยาธิสภาพอันเกิดจากการตายของเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ทำให้ขาดสารสื่อประสาทโดพามีน (dopamine) ผู้ป่วยจะมีความผิดปกติเกี่ยวกับการเคลื่อนไหวทำให้มีความยากลำบากในการทำกิจวัตรประจำวัน เนื่องจากสมองไม่สามารถประสานงานการสั่งการไปยังอวัยวะเป้าหมายให้ทำงานได้อย่างปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยอาจมีอาการหลงลืมจากภาวะสมองเสื่อม (dementia) มีอาการซึมเศร้า (depression) นอนไม่หลับ (insomnia) และมีความผิดปกติของระบบอัตโนมัติร่วมด้วย (autonomic disturbance) อาการผิดปกติเหล่านี้เป็นสาเหตุให้เกิดความทุกข์ทรมานกับผู้ป่วยหลายล้านคนจากทั่วทุกมุมโลก นอกจากนี้ในระยะท้ายของโรค ผู้ป่วยมักจะมีอาการแทรกซ้อน เช่น ปอดบวม ติดเชื้อในกระแสเลือด ติดเชื้อในระบบทางเดินปัสสาวะและแผลกดทับ ผู้ป่วยต้องการรักษาและการดูแลอย่างใกล้ชิด ซึ่งส่งผลต่อ สภาพร่างกาย จิตใจ เศรษฐกิจ และสังคม ของผู้ป่วยและญาติผู้ให้การดูแล การรักษาโรคนี้โดยทั่วไปทำได้โดยให้ยา levodopa และยาในกลุ่มต่าง ๆ ร่วมกัน ซึ่งช่วยบรรเทาอาการให้ผู้ป่วยได้ อย่างไรก็ตามยาเหล่านี้มักมีผลข้างเคียงและทำให้เกิดภาวะแทรกซ้อนจากผลของยา นอกจากนี้กลุ่มประชากรวัยผู้สูงอายุในประเทศไทยของเราก็เพิ่มจำนวนสูงขึ้น ปัญหาด้านสุขภาพเหล่านี้ก็จะเพิ่มมากขึ้นเรื่อย ๆ ดังนั้นในการรักษาหรือป้องกันโรคที่เกิดจากความเสื่อมตามวัยโดยใช้สารที่ได้จากธรรมชาติ สมุนไพรต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติสอดคล้องกับกลไกการเกิดโรคก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่จะนำมาใช้ช่วยในการป้องกัน บรรเทา ลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทโดยสาเหตุและกลไกการตายของเซลล์ประสาท dopaminergic neurons นั้นมีสมมติฐานการตายหลายประการ อาทิเช่น จากภาวะ oxidative stress ของเซลล์ การมี misfolded proteins สะสมอยู่ภายในเซลล์ และการที่มีการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ (inflammation) ซึ่งการศึกษากลไกการเกิดโรคนี้จะนำไปสู่กลยุทธ์ในการจัดการกับโรค งานวิจัยเกี่ยวกับสารสกัดจากสมุนไพรต่าง ๆ ที่มีคุณสมบัติสอดคล้องกับกลไกการเกิดโรคนี้ก็จะมีความประโยชน์ต่อผู้ป่วย และเป็นการยกระดับคุณค่าของพืชสมุนไพรโดยมีผลงานวิจัยรองรับ

ขมิ้นชัน หรือ turmeric (*Curcuma longa* L.) เป็นพืชสมุนไพรและเป็นส่วนประกอบของอาหารในชีวิตประจำวันนั้น ได้มีการศึกษาวิจัยพบว่ามีคุณสมบัติมากมาย สำหรับโรคพาร์กินสัน นั้น Rajeswari ได้รายงานว่า curcumin มีคุณสมบัติ neuroprotection ต่อต้านภาวะ oxidative stress จากสารเหนียวทำให้เกิด parkinsonism ในสัตว์ทดลองได้ (Rajeswari, 2006) แต่อย่างไรก็ตาม curcumin ก็มีคุณสมบัติที่จำกัด แอนาล็อกของ curcumin (curcuminoid analogs) ส่วนใหญ่มีความเสถียรกว่าสาร curcumin ต้นแบบ และมีคุณสมบัติแตกต่างกันไป เช่น anti-oxidant, anti-cancer และ anti-inflammation เป็นต้น ดังนั้นจุดประสงค์ของโครงการวิจัยนี้ก็เพื่อจะศึกษาผลของแอนาล็อกของขมิ้นชันต่อกลไกกระบวนการอักเสบและการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง

การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษ (toxicity) ของสาร curcuminoids (สารโครงสร้างที่ 1, 2, 3) และ curcuminoids analogs (สารโครงสร้างที่ 4-20) ต่อการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง พบว่า สารแต่ละสารของ curcuminoids และ curcuminoids analogs ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน มีผลต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแตกต่างกันออกไป นอกจากนี้ในการศึกษาลักษณะรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปหลังได้รับสารทำให้ประสิทธิผลของสารแต่ละตัวต่อเซลล์เพาะเลี้ยงได้เบื้องต้น โดยสารแอนาลอกบางสารทำให้เซลล์เกิดการตายก็น่าจะมีผลในด้านการ induced apoptosis จึงอาจนำแอนาลอกเหล่านี้ไปศึกษาต่อในเรื่องฤทธิ์ของการต้านมะเร็ง (anti-cancer) หรือสารบางสารทำให้เซลล์มีจำนวนลดลงโดยการไม่แบ่งตัวเพิ่มจำนวนก็น่าจะมีฤทธิ์ในด้านการยับยั้งกระบวนการแบ่งตัว (anti-proliferation) ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจที่จะศึกษาค้นคว้าพัฒนางานวิจัยต่อไป ส่วนแอนาลอกที่ช่วยให้เซลล์มีชีวิตรอดเมื่อถูกเหนี่ยวนำการตายด้วยสาร neurotoxin MPP⁺ และ H₂O₂ ก็ได้นำมาศึกษากลไกเพิ่มเติมแล้วในโครงการวิจัยนี้

การศึกษาผลของ curcuminoids และ curcuminoids analogs ต่อกระบวนการอักเสบในการศึกษาครั้งนี้ พบว่า สารที่ช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่เลือกมาทดลอง ได้แก่ curcumin, tetrahydrodemthoxycurcumin ไม่ได้แสดงฤทธิ์ในด้านการต้านกระบวนการอักเสบโดยการช่วยลด nitric oxide ซึ่งเป็นสารตัวกลางในการกระตุ้นกระบวนการอักเสบอย่างที่ได้ตั้งสมมติฐานไว้ ถึงแม้ว่าในการเพาะเลี้ยงเซลล์ครั้งนี้จะควบคุมออกแบบการทดลองให้เลียนแบบกระบวนการอักเสบในระบบประสาท โดยเลี้ยงเซลล์สองชนิดคือ neuron และ glia cells ในรูปแบบ mono-culture และ co-culture แล้วก็ตาม แต่เซลล์ทั้งสองก็ยังไม่แสดงผลตอบสนองในเชิงกระบวนการอักเสบต่อสาร neurotoxin MPP⁺ หรือแม้แต่สาร endotoxin lipopolysaccharide ที่ใช้กระตุ้นการอักเสบเองก็ตาม อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้ก็ไม่สามารถยืนยันได้ว่าการตายของเซลล์ประสาทไม่ได้เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากกระบวนการอักเสบ เนื่องจากการศึกษาผลของ curcumin ใน mouse model พบว่าช่วยลด glial reaction ในสมองส่วน striatum ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้สัตว์เกิดอาการ parkinsonism ด้วย oxidopamine (6-OHDA) ซึ่งเป็น neurotoxin ที่มีผลต่อดopaminergic และ noradrenergic neurons (Tripanichkul and Jaroensuppaperch, 2013) ดังนั้นการศึกษาจำลองกระบวนการอักเสบใน *in vitro* เป็นเรื่องที่ยังต้องพัฒนาให้เหมาะสมแม่นยำขึ้นกว่านี้อีก เพื่อที่จะได้นำมาเป็นวิธีการศึกษาคัดกรองเบื้องต้นในการศึกษาผลของสารสกัดสมุนไพรต่าง ๆ ที่มีต่อกระบวนการอักเสบ อย่างไรก็ตามการศึกษาผลของโปรตีน inflammatory enzyme COX-2 พบว่า curcumin และ tetrahydrodemethoxycurcumin ช่วยลดการแสดงออกของโปรตีน COX-2 จากการ treated เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงด้วย MPP⁺ ได้ ซึ่งก็อาจเป็นกลไกการออกฤทธิ์ส่วนหนึ่งที่ช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทได้โดยตรง

การศึกษาผลการต้านการตายของ curcuminoids และ curcuminoids analogs เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสาร neurotoxin MPP⁺ เปรียบเทียบกับสาร H₂O₂ ที่กระตุ้นภาวะ oxidative stress ให้กับเซลล์เพาะเลี้ยง พบว่า curcumin, tetrahydrocurcumin และ tetrahydrodemthoxycurcumin สามารถช่วยต้านการตายได้ดี โดยมีสมมติฐานกลไกในการ anti-apoptosis ผ่านทางวิถีการตายแบบ mitochondrial pathway ซึ่งทำให้โปรตีนที่เกี่ยวข้องคือ pro-apoptotic protein Bax ลดลง

ส่วน anti-apoptotic protein Bcl2 เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า ทั้ง MPP^+ และ H_2O_2 มีผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเซลล์ประสาทเกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าสาร curcuminoids นั้นสามารถช่วยต้านการตายได้โดยมีการออกฤทธิ์ผ่าน mitochondria

จากผลการศึกษานี้สามารถนำไปพัฒนาต่อยอดเพื่อให้เป็นประโยชน์ในทางการแพทย์ การเกิดโรคได้ จากการชะลอการตายและความเสื่อมของเซลล์ประสาท นอกจากนี้สารแอนาล็อก tetrahydrocurcumin เองก็เป็น major natural metabolite ของ curcumin ซึ่งเป็นสารที่มีปริมาณมากที่สุดในสารประกอบ curcuminoids โดยมีรายงานการพบสารนี้ในคนและสัตว์ที่ได้รับ curcuminoids (Ireson et al., 2002; Pan et al., 1999)

ในส่วนของแอนาล็อก tetrahydrodemethoxycurcumin ที่ช่วยลดการตายของเซลล์จากสาร neurotoxin MPP^+ ได้ดีที่สุดนั้น ก็เป็นสารที่พบได้ทั้งในธรรมชาติถึงแม้จะมีอยู่เป็นปริมาณน้อย แต่ก็สามารถสังเคราะห์ได้จากสารต้นแบบ curcumin จากโครงสร้างทางเคมีของสารก็ทำให้มีคุณสมบัติเป็นสารที่มี antioxidant ที่ดี จากผลการทดลองในงานวิจัยนี้ก็ยังพบว่าเป็นสารที่มี cytotoxicity ต่ำ ช่วงความเข้มข้นที่เป็นพิษค่อนข้างที่จะปลอดภัย ช่วยลดโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการกระบวนการอักเสบ การที่สารนี้ช่วยต้านการตายที่จำเพาะต่อสารที่เจาะจงทำลายเซลล์ประสาท dopaminergic neurons ได้ดี จึงเหมาะสมที่จะนำไปวิจัยพัฒนาต่อเนื่องให้เกิดประโยชน์ต่อการรักษาและป้องกันโรคพาร์กินสันหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับความเสื่อมของระบบประสาทต่อไป

ภาคผนวก

Output จากโครงการวิจัยที่ได้รับทุนจาก สกว.

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ (ระบุชื่อผู้แต่ง ชื่อเรื่อง ชื่อวารสาร ปี เล่มที่ เลขที่ และหน้า) หรือผลงานตามที่คาดไว้ในสัญญาโครงการ
 - ยังไม่มีการตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์
 - เชิงวิชาการ (มีการพัฒนาการเรียนการสอน/สร้างนักวิจัยใหม่)
 - นำความรู้ไปพัฒนาการเรียนการสอนสำหรับนิสิตบัณฑิต
3. อื่นๆ (เช่น ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการในประเทศ การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ หนังสือ การจดสิทธิบัตร)
 - นำเสนอผลงานในรูปแบบ Poster ในงานประชุมวิชาการ “นักวิจัยรุ่นใหม่...พบ...เมธีวิจัยอาวุโส สกว.” ครั้งที่ 13 วันที่ 16-18 ตุลาคม พ.ศ. 2556 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอำบีช รีสอร์ท หัวหิน ชะอำ จังหวัดเพชรบุรี
 - นำเสนอผลงานส่วนหนึ่งในรูปแบบ oral presentation โดยนิสิตบัณฑิตศึกษา ในงานประชุมวิชาการการประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 37 วันที่ 7-9 พฤษภาคม พ.ศ. 2557 ณ ศูนย์วัฒนธรรม ภาคเหนือตอนล่าง วังจันทน์ ริเวอร์วิว จังหวัดพิษณุโลก

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Beach, T.G., Sue, L.I., Walker, D.G., Lue, L.F., Connor, D.J., Caviness, J.N., Sabbagh, M.N., and Adler, C.H. (2007). Marked microglial reaction in normal aging human substantia nigra: correlation with extraneuronal neuromelanin pigment deposits. *Acta neuropathologica* 114, 419-424.
2. Beckman, J.S., Beckman, T.W., Chen, J., Marshall, P.A., and Freeman, B.A. (1990). 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* 87, 1620-1624.
3. Bengmark, S. (2006). Curcumin, an atoxic antioxidant and natural NFkappaB, cyclooxygenase-2, lipooxygenase, and inducible nitric oxide synthase inhibitor: a shield against acute and chronic diseases. *JPEN Journal of parenteral and enteral nutrition* 30, 45-51.
4. Block, M.L., and Hong, J.S. (2007). Chronic microglial activation and progressive dopaminergic neurotoxicity. *Biochemical Society transactions* 35, 1127-1132.
5. Bove, J., Prou, D., Perier, C., and Przedborski, S. (2005). Toxin-induced models of Parkinson's disease. *NeuroRx : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics* 2, 484-494.
6. Chan, W.H., Wu, C.C., and Yu, J.S. (2003). Curcumin inhibits UV irradiation-induced oxidative stress and apoptotic biochemical changes in human epidermoid carcinoma A431 cells. *Journal of cellular biochemistry* 90, 327-338.
7. Changtam, C., de Koning, H.P., Ibrahim, H., Sajid, M.S., Gould, M.K., and Suksamrarn, A. (2010a). Curcuminoid analogs with potent activity against Trypanosoma and Leishmania species. *European journal of medicinal chemistry* 45, 941-956.
8. Changtam, C., Hongmanee, P., and Suksamrarn, A. (2010b). Isoxazole analogs of curcuminoids with highly potent multidrug-resistant antimycobacterial activity. *European journal of medicinal chemistry* 45, 4446-4457.
9. Chen, H., Jacobs, E., Schwarzschild, M.A., McCullough, M.L., Calle, E.E., Thun, M.J., and Ascherio, A. (2005). Nonsteroidal antiinflammatory drug use and the risk for Parkinson's disease. *Annals of neurology* 58, 963-967.
10. Chen, J., Tang, X.Q., Zhi, J.L., Cui, Y., Yu, H.M., Tang, E.H., Sun, S.N., Feng, J.Q., and Chen, P.X. (2006). Curcumin protects PC12 cells against 1-methyl-4-phenylpyridinium ion-induced apoptosis by bcl-2-mitochondria-ROS-iNOS pathway. *Apoptosis : an international journal on programmed cell death* 11, 943-953.
11. Cole, G.M., Teter, B., and Frautschy, S.A. (2007). Neuroprotective effects of curcumin. *Advances in experimental medicine and biology* 595, 197-212.
12. Dawson, T.M., and Dawson, V.L. (2003). Molecular pathways of neurodegeneration in Parkinson's disease. *Science* 302, 819-822.

13. Esposito, E., Di Matteo, V., Benigno, A., Pierucci, M., Crescimanno, G., and Di Giovanni, G. (2007). Non-steroidal anti-inflammatory drugs in Parkinson's disease. *Experimental neurology* 205, 295-312.
14. Fritz, R.R., Abell, C.W., Patel, N.T., Gessner, W., and Brossi, A. (1985). Metabolism of the neurotoxin in MPTP by human liver monoamine oxidase B. *FEBS letters* 186, 224-228.
15. Gupta, S. (2001). Molecular steps of death receptor and mitochondrial pathways of apoptosis. *Life sciences* 69, 2957-2964.
16. Hald, A., and Lotharius, J. (2005). Oxidative stress and inflammation in Parkinson's disease: is there a causal link? *Experimental neurology* 193, 279-290.
17. Harish, G., Venkateshappa, C., Mythri, R.B., Dubey, S.K., Mishra, K., Singh, N., Vali, S., and Bharath, M.M. (2010). Bioconjugates of curcumin display improved protection against glutathione depletion mediated oxidative stress in a dopaminergic neuronal cell line: Implications for Parkinson's disease. *Bioorganic & medicinal chemistry* 18, 2631-2638.
18. Hsieh, Y.C., Mounsey, R.B., and Teismann, P. (2011). MPP(+)-induced toxicity in the presence of dopamine is mediated by COX-2 through oxidative stress. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 384, 157-167.
19. Ireson, C.R., Jones, D.J., Orr, S., Coughtrie, M.W., Boocock, D.J., Williams, M.L., Farmer, P.B., Steward, W.P., and Gescher, A.J. (2002). Metabolism of the cancer chemopreventive agent curcumin in human and rat intestine. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology* 11, 105-111.
20. Jayaprakasha, G.K., Jagan Mohan Rao, L., and Sakariah, K.K. (2002). Improved HPLC method for the determination of curcumin, demethoxycurcumin, and bisdemethoxycurcumin. *Journal of agricultural and food chemistry* 50, 3668-3672.
21. Jurenka, J.S. (2009). Anti-inflammatory properties of curcumin, a major constituent of *Curcuma longa*: a review of preclinical and clinical research. *Alternative medicine review : a journal of clinical therapeutic* 14, 141-153.
22. Langston, J.W. (1996). The etiology of Parkinson's disease with emphasis on the MPTP story. *Neurology* 47, S153-160.
23. Langston, J.W., Ballard, P., Tetrud, J.W., and Irwin, I. (1983). Chronic Parkinsonism in humans due to a product of meperidine-analog synthesis. *Science* 219, 979-980.
24. Le Couteur, D.G., Muller, M., Yang, M.C., Mellick, G.D., and McLean, A.J. (2002). Age-environment and gene-environment interactions in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Reviews on environmental health* 17, 51-64.

25. Liu, H., Li, Z., Qiu, D., Gu, Q., Lei, Q., and Mao, L. (2010). The inhibitory effects of different curcuminoids on beta-amyloid protein, beta-amyloid precursor protein and beta-site amyloid precursor protein cleaving enzyme 1 in swAPP HEK293 cells. *Neuroscience letters* 485, 83-88.
26. Long-Smith, C.M., Sullivan, A.M., and Nolan, Y.M. (2009). The influence of microglia on the pathogenesis of Parkinson's disease. *Progress in neurobiology* 89, 277-287.
27. McGeer, P.L., Itagaki, S., Boyes, B.E., and McGeer, E.G. (1988). Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology* 38, 1285-1291.
28. Moore, D.J., West, A.B., Dawson, V.L., and Dawson, T.M. (2005). Molecular pathophysiology of Parkinson's disease. *Annual review of neuroscience* 28, 57-87.
29. Mourtas, S., Lazar, A.N., Markoutsas, E., Duyckaerts, C., and Antimisiaris, S.G. (2014). Multifunctional nanoliposomes with curcumin-lipid derivative and brain targeting functionality with potential applications for Alzheimer disease. *European journal of medicinal chemistry* 80, 175-183.
30. Mythri, R.B., and Bharath, M.M. (2012). Curcumin: a potential neuroprotective agent in Parkinson's disease. *Current pharmaceutical design* 18, 91-99.
31. Naito, M., Wu, X., Nomura, H., Kodama, M., Kato, Y., Kato, Y., and Osawa, T. (2002). The protective effects of tetrahydrocurcumin on oxidative stress in cholesterol-fed rabbits. *Journal of atherosclerosis and thrombosis* 9, 243-250.
32. Nakmareong, S., Kukongviriyapan, U., Pakdeechote, P., Donpunha, W., Kukongviriyapan, V., Kongyingyoes, B., Sompamit, K., and Phisalaphong, C. (2011). Antioxidant and vascular protective effects of curcumin and tetrahydrocurcumin in rats with L-NAME-induced hypertension. *Naunyn-Schmiedeberg's archives of pharmacology* 383, 519-529.
33. Pan, M.H., Huang, T.M., and Lin, J.K. (1999). Biotransformation of curcumin through reduction and glucuronidation in mice. *Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals* 27, 486-494.
34. Perry, V.H. (2004). The influence of systemic inflammation on inflammation in the brain: implications for chronic neurodegenerative disease. *Brain, behavior, and immunity* 18, 407-413.
35. Prasad, S., Gupta, S.C., Tyagi, A.K., and Aggarwal, B.B. (2014). Curcumin, a component of golden spice: from bedside to bench and back. *Biotechnology advances* 32, 1053-1064.
36. Rajeswari, A. (2006). Curcumin protects mouse brain from oxidative stress caused by 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine. *European review for medical and pharmacological sciences* 10, 157-161.
37. Siddique, Y.H., Khan, W., Singh, B.R., and Naqvi, A.H. (2013). Synthesis of alginate-curcumin nanocomposite and its protective role in transgenic *Drosophila* model of Parkinson's disease. *ISRN pharmacology* 2013, 794582.

38. Solomon, S.D., McMurray, J.J., Pfeffer, M.A., Wittes, J., Fowler, R., Finn, P., Anderson, W.F., Zauber, A., Hawk, E., Bertagnolli, M., *et al.* (2005). Cardiovascular risk associated with celecoxib in a clinical trial for colorectal adenoma prevention. *The New England journal of medicine* 352, 1071-1080.
39. Tripanichkul, W., and Jaroensuppaperch, E.O. (2013). Ameliorating effects of curcumin on 6-OHDA-induced dopaminergic denervation, glial response, and SOD1 reduction in the striatum of hemiparkinsonian mice. *European review for medical and pharmacological sciences* 17, 1360-1368.
40. Vila, M., and Przedborski, S. (2004). Genetic clues to the pathogenesis of Parkinson's disease. *Nature medicine* 10 *Suppl*, S58-62.
41. Wang, M.S., Boddapati, S., Emadi, S., and Sierks, M.R. (2010). Curcumin reduces alpha-synuclein induced cytotoxicity in Parkinson's disease cell model. *BMC neuroscience* 11, 57.
42. Wang, T., Pei, Z., Zhang, W., Liu, B., Langenbach, R., Lee, C., Wilson, B., Reece, J.M., Miller, D.S., and Hong, J.S. (2005). MPP+-induced COX-2 activation and subsequent dopaminergic neurodegeneration. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 19, 1134-1136.
43. Wang, Y.J., Pan, M.H., Cheng, A.L., Lin, L.L., Ho, Y.S., Hsieh, C.Y., and Lin, J.K. (1997). Stability of curcumin in buffer solutions and characterization of its degradation products. *Journal of pharmaceutical and biomedical analysis* 15, 1867-1876.
44. Wu, J.C., Tsai, M.L., Lai, C.S., Wang, Y.J., Ho, C.T., and Pan, M.H. (2014). Chemopreventative effects of tetrahydrocurcumin on human diseases. *Food & function* 5, 12-17.
45. Yang, S., Zhang, D., Yang, Z., Hu, X., Qian, S., Liu, J., Wilson, B., Block, M., and Hong, J.S. (2008). Curcumin protects dopaminergic neuron against LPS induced neurotoxicity in primary rat neuron/glia culture. *Neurochemical research* 33, 2044-2053.
46. Yoysungnoen, P., Wirachwong, P., Changtam, C., Suksamrarn, A., and Patumraj, S. (2008). Anti-cancer and anti-angiogenic effects of curcumin and tetrahydrocurcumin on implanted hepatocellular carcinoma in nude mice. *World journal of gastroenterology : WJG* 14, 2003-2009.