กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบคุณ Professor Muayyad Al-ubaidi จาก University of Oklahoma, OK ประเทศสหรัฐอเมริกาที่ได้กรุณาเตรียมและจัดส่งเซลล์ 611W photoreceptor มาให้ ขอขอบคุณ ดร.สุกัญญา วิริยโกศล ที่ได้กรุณาช่วยรับและเลี้ยงเซลล์ 661W ระหว่างขั้นตอนการเตรียมขนส่งเซลล์จากเมืองซานดิเอโก้ ประเทศสหรัฐอเมริกามายังประเทศไทย ขอขอบคุณอาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลโดยเฉพาะอย่างยิ่ง ผศ.ดร.กนกพรรณ วงศ์ประเสริฐ ที่กรุณาให้ข้อเสนอแนะพร้อมทั้งอนุญาตให้ใช้ห้องวิจัยเลี้ยงเซลล์ อุปกรณ์ และเครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย โดยการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2533

บทคัดย่อภาษาไทย

Retinitis Pigmentosa (RP) เป็นโรคกลุ่มที่เกิดจากความผิดปกติทางพันธุกรรมซึ่งทำให้เกิดการสูญเสียเซลล์รับแสงชนิดแท่งก่อนที่จะตามมาด้วยการสูญเสียเซลล์รับแสงชนิดกรวยอย่างช้าๆ จากการทำลายโดยอนุมูลอิสระ (oxidative damage) ในท้ายที่สุดจะทำให้สูญเสียการมองเห็นอย่างถาวร เบอร์เบอร์รีน (berberine) เป็นสาร isoquinoline alkaloid และเป็นหนึ่งในองค์ประกอบหลักของหวงเหลียน (*Coptidis rhizome*) และสมุนไพรชนิดอื่นๆ โดยมีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสามารถป้องกันการทำลายจากอนุมูลอิสระได้ในเซลล์หลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อตรวจสอบคุณสมบัติของเบอร์เบอร์รีนในการต้านการทำลายจากอนุมูลอิสระและป้องการตายของเซลล์รับแสง 661W ที่ถูกชักนำด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide; H_2O_2) เซลล์ 661W ได้รับสารเลี้ยงใน medium, DMSO (dimethy sulfoxide) ซึ่งเป็นตัวพา หรือเบอร์เบอร์รีน (25-200 μM) อย่างใดอย่างหนึ่งเป็นเวลาสองชั่วโมงก่อนการได้รับสารเลี้ยงเซลล์หรือ H_2O_2 100-1000 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ร้อยละของเซลล์ที่รอดชีวิต (% cell viability) จะถูกตรวจสอบโดยใช้เทคนิค trypan blue dye exclusion การอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียสซึ่งเป็นลักษณะเด่นที่พบของการตายแบบเอพอพโตซิส (apoptosis) จะถูกตรวจสอบโดยใช้การย้อมนิวเคลียสด้วย Hoechst 33342 และส่องดูและถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซน ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ได้รับเบอร์เบอร์รีนที่ขนาด 25-100 μM เป็นเวลา 2 ชั่วโมงและตามด้วยการเลี้ยงด้วยmedium เป็นเวลา 24 ชั่วโมงสามารถคงไว้ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตในระดับเดียวกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามหากเพิ่มความเข้มข้นของเบอร์เบอร์รีนเป็น 200 μM ที่เวลา 2 ชั่วโมงจะทำให้ร้อยละของเซลล์ที่อยู่รอดลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) โดยเหลือเพียง 83% ของกลุ่มควบคุม การทดลองโดยการให้ H_2O_2 แก่เซลล์ 661W อย่างเดียวที่ขนาด 100-1000 μM จะพบว่าการตายของเซลล์ขึ้นอยู่กับขนาดของ H_2O_2 (dose-dependent cell death) การให้เบอร์เบอร์รีนที่ความเข้มข้น 100 μM แก่เซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมงก่อนการให้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น100-300 μM พบว่าสามารถลดการตายของเซลล์และลดจำนวนของเซลล์ที่บรรจุนิวเคลียสทีมีโครมาตินอัดแน่นได้อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารเลี้ยงเซลล์หรือ DMSO อย่างใดอย่างหนึ่งแทนเบอร์เบอร์รีนและตามด้วยขนาดที่เท่ากันของ H_2O_2 ส่วนการได้รับเบอร์เบอร์รีนที่ขนาด 50 μM ให้ผลน้อยลงในการลดการตายของเซลล์และนำไปสู่การลดลงของจำนวนนิวเคลียสที่มีการอัดแน่นของโครโมโซม ผลการทดลองในครั้งนี้สรุปได้ว่าเบอร์เบอร์รีนสามารถป้องกันการตายของเซลล์ 661W photoreceptor และการเกิดการอัดแน่นของโครมาตินในนิวเคลียสได้ ดังนั้นเบอร์เบอร์รีนอาจเป็นประโยชน์และมีศักยภาพในการนำมาใช้ป้องกันการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการถูกชักนำโดยอนุมูลอิสระ เช่นที่พบใน retinitis pigmentosa และโรคที่เกิดจากการเสื่อมสภาพของจอประสาทตาชนิดอื่นๆ

Abstract

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

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	3
ขอบเขตของการวิจัย	3
ประโยชน์ที่ได้รับจากการวิจัย	4
บทที่ 2 วิธีดำเนินการวิจัย.....	6
บทที่ 3 ผลการวิจัยและอภิปรายผลการทดลอง.....	9
บทที่ 4 บทสรุป	
สรุปผลการวิจัย	27
ข้อเสนอแนะ	27
บรรณานุกรม	28
ประวัติผู้วิจัย	32

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ……9

ตารางที่ 2 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ ……12

ตารางที่ 3 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ขนาดความเข้มข้นต่างๆ ……16

ตารางที่ 4 แสดงร้อยละของเซลล์ที่ภายใน nucleus มีการอัดแน่นของโครมาติน (nuclear chromatin condensation) เทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ ……..20

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงค่าร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine ที่ความเข้มข้นต่างๆ ……10
รูปที่ 2 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังจากได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ……13
รูปที่ 3 ภาพ phase contrast micrographs แสดงลักษณะของเซลล์ 661W ภายหลังการได้รับ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ …….. 14
รูปที่ 4 แสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตรอดเทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ…….. 17
รูปที่ 5 ภาพ phase contrast micrograph แสดงลักษณะของเซลล์ 661W ภายหลังการได้รับ berberine 100 μM และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้น 100-200 μM …….. 18
รูปที่ 6 แสดงร้อยละของเซลล์ที่ภายใน nucleus มีการอัดแน่นของโครมาติน (nuclear chromatin condensation) เทียบกับกลุ่มควบคุมหลังได้รับ berberine และ hydrogen peroxide ที่ความเข้มข้นต่างๆ …….. 21
รูปที่ 7 แสดงภาพถ่ายของนิวเคลียสของเซลล์ 661W หลังได้รับ berberine 100 μM และ hydrogen peroxide ที่ 100-200 μM ด้วยกล้อง fluorescent microscope ……. 22