



ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมาตรฐานเมล็ดกระทงลายและเศษส่วนต่อการชักนำ
การตายแบบอะพอพโตซิสจาก MPP⁺ ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y

ณัฐนรี พงษ์เฉลิม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมาตรฐานเมล็ดกระทงลายและเศษส่วนต่อการชักนำ
การตายแบบอะพอพโตซิสจาก MPP⁺ ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y



ณัฐนรี พงษ์เฉลิม

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

2564

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

Neuroprotective effect of *Celastrus paniculatus* standardized extract and its fractions on MPP⁺-
induced neuronal apoptotic cell death in SH-SY5Y cells



NATNAREE PONGCHALERM

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR THE MASTER DEGREE OF SCIENCE
IN MEDICAL SCIENCE
FACULTY OF ALLIED HEALTH SCIENCES
BURAPHA UNIVERSITY

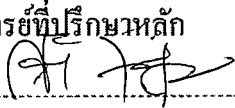
2021

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณา
วิทยานิพนธ์ของ ฉันทน์รี พงษ์เฉลิม ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม
หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

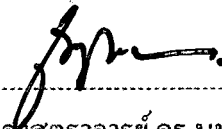
คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก



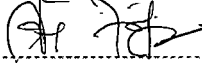
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



ประธาน

(รองศาสตราจารย์ ดร.นพ.เพิ่มพินธุ์ ธรรมสโรช)



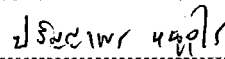
กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์)



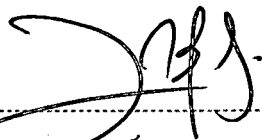
กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอุ่น)



กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปริญญาพร หนูอุไร)



คณบดีคณะสหเวชศาสตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มาร์ต ตั้งวัฒนาชุติพร)

วันที่ 15 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2564

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยบูรพา อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการ
การศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ของมหาวิทยาลัย
บูรพา



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ ดร.นุจรี ไชยมงคล)

วันที่ 27 เดือน ตุลาคม พ.ศ. 2564

61910123: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์การแพทย์; วท.ม. (วิทยาศาสตร์การแพทย์)
 คำสำคัญ: อะพอพโตซิส, เมล็ดกระถางลาย, โรควาร์กินสัน, เซลล์ประสาท SH-SY5Y, บีซีแอลทู

ณัฐรี พงษ์เฉลิม : ฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมาตรฐานเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการชักนำการตายแบบอะพอพโตซิสจาก MPP⁺ ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y. (Neuroprotective effect of *Celastrus paniculatus* standardized extract and its fractions on MPP⁺-induced neuronal apoptotic cell death in SH-SY5Y cells) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์ ปี พ.ศ. 2564.

โรควาร์กินสันเป็นโรคที่พบมากในผู้สูงอายุ เกิดจากความเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาทที่สร้างสารสื่อประสาทโดปามีนในสมองส่วนซับสแตนเชียในกรา มีรายงานว่าเซลล์ประสาทที่เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสมีความสัมพันธ์กับโปรตีนในกลุ่ม Bcl-2 ซึ่งในปัจจุบันโรควาร์กินสันยังไม่มีการรักษาให้หายขาดได้ งานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์ทางระบบประสาท สามารถเพิ่มความจำและการเรียนรู้ ลดสารอนุมูลอิสระในเนื้อเยื่อสมองหนูไมส์และในเซลล์เพาะเลี้ยง แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่อการตายของเซลล์ประสาทในโรควาร์กินสัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่มีขั้วต่างกัน 3 ชนิด ได้แก่สารสกัดที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตต (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ต่อการปกป้องเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ โดยใช้วิธี MTT วิธี LDH cytotoxicity และวิธี Western blot ผ่านการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าการให้ CPSE ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าการให้สารสกัด CPSE CPSE-E/H และ CPSE-E/EA แบบ pre-treatment และ post-treatment สามารถลดการตายของเซลล์และเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 จากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างในกลุ่ม CPSE-E/W แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบหยาบและเศษส่วน CPSE-E/H สามารถปกป้องเซลล์ประสาทในแบบจำลองโรควาร์กินสันผ่านการควบคุมของ Bcl-2

61910123: MAJOR: MEDICAL SCIENCE; M.Sc. (MEDICAL SCIENCE)

KEYWORDS: Apoptosis, *Celastrus paniculatus* seed, Parkinson's disease, SH-SY5Y cells, Bcl-2

NATNAREE PONGCHALERM : NEUROPROTECTIVE EFFECT OF
CELASTRUS PANICULATUS STANDARDIZED EXTRACT AND ITS FRACTIONS ON
MPP⁺-INDUCED NEURONAL APOPTOTIC CELL DEATH IN SH-SY5Y CELLS.
ADVISORY COMMITTEE: SIRIPORNC CHAMNIANSAWAT, Ph.D. 2021.

Parkinson's disease (PD), a neurodegenerative disorder in older is characterized by degenerated or loss the dopaminergic neurons in substantia nigra of striatum. There is previously study reported that apoptosis is a mechanism of dopaminergic neuron death in Parkinson's disease, involved Bcl-2, anti-apoptotic protein dysregulation. Currently, there's no cure or inhibition of the progressive disorder. Several studies reported that *Celastrus paniculatus* seed extract (CPSE) has neurological effects by improvement to learning and memory, reduction of free radicals in mice brain tissue and cell cultures. However, the effects of CPSE on neurons of Parkinson's disease model were not evaluated. Thus, we aimed to examine the neuroprotective effect and inhibiting effect of CPSE and its fraction that partition by hexane (CPSE-E/H), ethyl acetate (CPSE-E/EA) and water (CPSE-E/W) on MPP⁺ induced apoptotic SH-SY5Y cells. We also studied by using MTT assay, LDH cytotoxicity assay and Western blot on Bcl-2 expression. The results showed that SH-SY5Y cells treatment with 10 µg/ml CPSE for 24 hours are significantly increased cell viability compared to control. We found that pre-treatment and post-treatment with 10 µg/ml CPSE, CPSE -E/H and CPSE-E/EA could significantly decreased cell death in MPP⁺-induced apoptotic SH-SY5Y cells compared to untreated control. Furthermore, Bcl-2 expression showed the similar result. In contrast, both treatment with CPSE-E/W did not showed significant differences. The results indicated that CPSE and CPSE-E/H protects SH-SY5Y cells against MPP⁺-induced apoptotic via Bcl-2 regulator pathway in model of Parkinson's diseases.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยฉบับนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยระดับบัณฑิตศึกษาประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๒ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริพร จำเนียรสวัสดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่สละเวลาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือและแก้ปัญหาตลอดกระบวนการวิจัย และทำให้งานวิจัยฉบับนี้เสร็จสมบูรณ์ ขอขอบคุณศาสตราจารย์ ดร.สุชมาล จงธรรมคุณ หัวหน้าหน่วยวิจัยประสาทวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ที่ให้ความอนุเคราะห์เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อนันต์ อธิพรชัย อาจารย์ภาควิชาเคมีอินทรีย์ ที่ให้ผู้วิจัยเข้าใช้ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ภายในภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือและเทคนิคการสกัดสาร ขอขอบคุณรองศาสตราจารย์ ดร.ณรงค์ฤทธิ์ ทองอ่อนและผู้ช่วยศาสตราจารย์ปริญญาพร หนูอุไร คณะกรรมการสอบเค้าโครงร่างวิทยานิพนธ์

และขอขอบคุณเพื่อนนิสิตปริญญาโทและปริญญาเอก คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาทุกท่านที่ให้คำแนะนำการใช้เครื่องมือต่างๆในส่วนขั้นตอนการทำงานวิจัยและส่งเสริมกำลังใจตลอดมา นอกจากนี้ยังมีผู้ที่มีความร่วมมือช่วยเหลืออีกหลายท่าน ซึ่งผู้วิจัยไม่สามารถกล่าวนามในที่นี้ได้หมด จึงขอขอบคุณทุกท่านเหล่านั้นไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

ณัฐนรี พงษ์เฉลิม

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฉุ
บทที่ 1 บทนำ (Introduction)	1
ที่มาและความสำคัญ	1
วัตถุประสงค์การวิจัย	4
สมมติฐานของการวิจัย	5
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	5
ขอบเขตของการวิจัย	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม (Literature review)	6
1. โรคพาร์กินสัน (Parkinson’s disease)	6
2. อะพอพโตซิส (Apoptosis)	15
3. อะพอพโตซิสและโรคพาร์กินสัน	18
4. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)	19
5. Bcl-2 และโรคพาร์กินสัน	22
6. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP ⁺)	23
7. กระจงลาย (<i>Celastrus paniculatus</i>)	25
บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)	33

1. การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลาย	33
2. เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture).....	36
3. MTT assay.....	37
4. LDH Cytotoxicity assay	38
5. การเก็บโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง.....	39
6. Bradford protein assay	40
7. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)	40
8. Western Blot analysis.....	41
9. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ	41
10. Experimental Designs	42
บทที่ 4 ผลการวิจัย (Results).....	46
1. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT..	46
2. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายและเศษส่วนต่อการป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP ⁺	47
3. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายและเศษส่วนต่อการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP ⁺	53
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย (Discussion and conclusions)	59
บรรณานุกรม	63
ประวัติย่อของผู้วิจัย	77

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางที่ 1 ยาที่ใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสัน.....	14
ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย.....	29
ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ	31



สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 โครงสร้าง substantia nigra ภายใน midbrain	6
ภาพที่ 2 แผนผังแสดง nigrostriatal dopaminergic pathway	7
ภาพที่ 3 แสดงการสะสม α -syn ที่ผิดปกติ	10
ภาพที่ 4 แสดงการเกิดอะพอพโตซิสแบบ intrinsic pathway	17
ภาพที่ 5 แสดงการเกิดอะพอพโตซิสแบบ extrinsic pathway	18
ภาพที่ 6 โครงสร้างสามมิติของ Bcl-2	20
ภาพที่ 7 ภาพแสดงการทำงานของ Bcl-2	21
ภาพที่ 8 แสดงการเมทาบอลิซึมสาร MPTP ไปเป็น MPP^+	23
ภาพที่ 9 กระบวนการ	26
ภาพที่ 10 โครงสร้างของ celastrol (A) และ paniculatin (B)	27
ภาพที่ 11 โครงสร้างของ pristimerin	27
ภาพที่ 12 เครื่อง rotary evaporator (EYELA-N-100s) และ water bath (EYELA- SB-1000)	33
ภาพที่ 13 แสดงสมบัติการมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่างๆ	35
ภาพที่ 14 โครงสร้าง MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)	38
ภาพที่ 15 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ lactate dehydrogenase	39
ภาพที่ 16 แผนภาพแสดงการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT	43
ภาพที่ 17 แผนภาพแสดงกลุ่มการทดลองการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางและเศษส่วนกับเซลล์ SH-SY5Y แบบ pre-treatment	44
ภาพที่ 18 แผนภาพแสดงกลุ่มการทดลองการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางและเศษส่วนกับเซลล์ SH-SY5Y แบบ post-treatment	45

ภาพที่ 19 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y เมื่อได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ	46
ภาพที่ 20 แสดงเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	48
ภาพที่ 21 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment	49
ภาพที่ 22 แสดงร้อยละการรั่วของเอนไซม์ LDH ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment.....	50
ภาพที่ 23 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment	52
ภาพที่ 24 แสดงเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ	54
ภาพที่ 25 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment ..	55
ภาพที่ 26 แสดงร้อยละการรั่วของเอนไซม์ LDH ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment.....	56
ภาพที่ 27 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment.....	58
ภาพที่ 28 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในการควบคุมการเกิดอะพอพโทซิส	61

บทที่ 1

บทนำ (Introduction)

ที่มาและความสำคัญ

โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมของเซลล์ในระบบประสาท ซึ่งพบมากเป็นอันดับสองรองจากโรคอัลไซเมอร์ พบได้ในผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไปโดยอัตราการเกิดสัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มขึ้น (Kouli, Torsney, & Kuan, 2018; Massano & Bhatia, 2012) และจากข้อมูลทางสถิติแสดงให้เห็นว่าจำนวนของประชากรสูงอายุเพิ่มขึ้นในปัจจุบัน ส่งผลให้มีอุบัติการณ์การเกิดโรคพาร์กินสันเพิ่มมากขึ้นกว่าร้อยละ 30 ในปี พ.ศ. 2563 (Chen, Chang, et al., 2001; Kouli et al., 2018) รวมถึงมีอุบัติการณ์การเกิดเพิ่มมากขึ้นในประชากรวัยกลางคน (Kaewwilai, 2020) โรคพาร์กินสันเกิดจากการเสื่อมของเซลล์ประสาทที่สร้างสารสื่อประสาทโดปามีน (dopaminergic neuron) ในสมองส่วนซับสแตนเชียไนกรา (substantia nigra) ส่วน par compacta ก่อให้เกิดการทำงานที่ไม่สมดุลระหว่าง direct และ indirect motor pathway ซึ่งผู้ป่วยจะมีความผิดปกติของการเคลื่อนไหวในรูปแบบต่างๆ (motor symptoms) ได้แก่ การเสียการทรงตัวและการเคลื่อนไหวร่างกายช้าลง มีการแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อขณะเดิน ลูกนั่งลำบาก เกิดอาการสั่น มีการแสดงทางใบหน้า เช่น สีหน้านิ่งเรียบ ไร้อารมณ์ กระพริบตาลดลง และกลืนอาหารลำบาก อาจมีอาการอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทสั่งการ (nonmotor symptoms) ร่วมด้วย เช่น อาการทางจิตเวช อาการทางระบบประสาทอัตโนมัติ และอาการทางประสาทสัมผัส เป็นต้น (Beitz, 2014; DeMaagd & Philip, 2015; Greenland & Barker, 2018; Massano & Bhatia, 2012)

มีการรายงานว่าเซลล์ประสาทโดปามีนในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่เกิดจากการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) โดยเมื่อการแสดงออกของ Bcl-2 ลดลง จำนวนเซลล์ประสาทโดปามีนก็ลดลงด้วย (Khwanraj, Phruksaniyom, Madlah, & Dharmasaroja, 2015; Yu et al., 2011) Bcl-2 เป็นโปรตีนในกลุ่ม anti-apoptosis ที่ช่วยป้องกันและยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทจาก neurotoxin (Liu, Liu, & Yang, 2019) การขาด Bcl-2 ส่งผลให้สูญเสีย motor neuron และ sensory neuron ใน dorsal root ganglia รวมถึงสูญเสีย sympathetic neurons ใน superior cervical ganglia (Opferman & Kothari, 2018) จากรายงานพบว่าหนูไมส์ที่ตัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ human Bcl-2 มีอัตราการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน striatum ลดลงหลังจากได้รับ neurotoxin

เมื่อเทียบกับหนูโมสส์ปกติ (Offen et al., 1998) และเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 พบว่ามีการแสดงออกของ apoptotic cytokines ในเซลล์เพาะเลี้ยง N2a และเซลล์ประสาทโดปามีน MN9D เพิ่มขึ้น (Robinson et al., 2018) นอกจากนี้ยังพบว่าในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีการแสดงออกของ Bcl-2 ลดลงอย่างชัดเจน โดยมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาและความรุนแรงของโรค (Blandini et al., 2004; Hartmann et al., 2001; Tatton, 2000)

1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) เป็นสาร neurotoxin ที่เกิดจากกระบวนการ metabolism ของ MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) โดยเอนไซม์ monoamine oxidase-B (MAO-B) มีฤทธิ์จำเพาะในการทำลายเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน substantia nigra โดย MPP⁺ สามารถเข้าสู่ไมโทคอนเดรียได้หลายวิธี เช่น ห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) หรืออยู่ในรูป vesicle แล้วแทรกผ่านกรขนส่ง monoamine เมื่อผ่านเข้าสู่เซลล์จะส่งผลให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เชื่อมเซลล์ (electrical gradient) เปลี่ยนแปลงไป เกิดการยับยั้ง oxidase nicotinamide adenine dinucleotide (NAD) oxidase ใน complex I ส่งผลให้การสร้าง ATP ลดลง และมีปริมาณ superoxide และ oxidative stress เพิ่มขึ้น นำไปสู่การตายของเซลล์ (Singer, Ramsay, McKeown, Trevor, & Castagnoli, 1988; Smeyne & Jackson-Lewis, 2005) จากรายงานพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ที่ได้รับ MPP⁺ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่คล้ายกับในโรคพาร์กินสัน โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ที่เชื่อมเซลล์ของไมโทคอนเดรีย มีปริมาณ reactive oxygen species (ROS) เพิ่มขึ้น เกิด glutathione depletion และมีการทำงานของ caspase-3 เพิ่มขึ้น ในขณะที่การทำงานและแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ลดลง (Guan, Jiang, Bao, & An, 2006) และยังพบว่าเซลล์ประสาท MN9D และเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วย MPP⁺ ทำให้เกิดลักษณะของ necrosis โดยมีลักษณะการบวมของไมโทคอนเดรีย และ heterochromatid นอกจากนี้ยังพบว่าไรโบโซมกระจายอยู่ทั่วบริเวณที่เซลล์เกิดการตาย เซลล์เมมเบรนแตกออก ความหนาแน่นในไซโทซอลเปลี่ยนแปลงไป เกิดการรวมตัวของเศษนิวเคลียสเป็นแควิวโอลอย่างเห็นได้ชัด กอลจิคอมเพล็กซ์สลาย รวมถึงมีปริมาณ ROS เพิ่มขึ้น (Choi et al., 1999; Sheehan, Palmer, Helm, & Tuttle, 1997) นอกจากนี้ในหนูโมสส์ หนูแรท และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ได้รับ MPP⁺ พบว่ามีความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทสั่งการ เช่น การเคลื่อนไหวกล้ามเนื้อลดลง (hypokinesia) กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง (rigidity) มีอาการสั่น (tremor) และสูญเสียการทรงตัว ซึ่งคล้ายกับโรคพาร์กินสันที่พบในมนุษย์ จากข้อมูลดังกล่าวงานวิจัยจำนวนมากในปัจจุบันจึงนิยมใช้ MPP⁺ เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะของโรคพาร์กินสัน (Sedelis, Schwarting, & Huston, 2001; Zeng, Geng, & Jia, 2018)

กระทงลาย (*Celastrus paniulatus*) เป็นพืชพื้นบ้านเป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่ เมล็ดมีรูปร่างรีเป็นรูปไข่ มีเนื้อสีน้ำตาลแดงหุ้มโดยรอบ มีน้ำมันหอมระเหย พบได้ในประเทศไทยและประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองน้ำตาล นิยมนำมาใช้เป็นยานวดคลายกล้ามเนื้อ บรรเทาอาการเหน็บชา เคล็ดขัดยอก ในประเทศอินเดียนิยมนำมาใช้เป็นยาป้องกันและรักษาโรคต่างๆ สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมี (phytochemical constituents) ที่หลากหลาย อาทิ สารประกอบเทอร์พีน เอสเทอร์ กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว เป็นต้น โดยมีสารออกฤทธิ์ (bio-active compound) ได้แก่ กลุ่ม alkaloids เช่น celastrine และ paniculatin กลุ่ม terpenoids เช่น phytol และ linalool กลุ่มกรดไขมัน เช่น palmitic acid, tetracosanol, กรดอะซิติก (acetic acids), กรดเบนโซอิก (benzoic acids) และ สเตอรอล (sterol) (Arora & Pandey-Rai, 2014; Avinash & Waman, 2014)

การศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์หลากหลาย ได้แก่ การต้านการเจ็บปวดและการอักเสบในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดด้วยการจุ่มหางในน้ำร้อน (tail immersion) การใช้แผ่นให้ความร้อน (hot plate) และ การใช้กรดอะซิติก (acetic-acid-induced writhing) โดยหนูแรทที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย มีขนาดบาดแผลและพฤติกรรมตอบสนองความเจ็บปวดลดลง (Kulkarni, Agarwal, & Garud, 2015) สามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะอาหารของหนูแรทที่เป็น pyloric ligation สามารถลด pro-inflammatory cytokines เช่น TNF- α และ IL-6 และเพิ่ม anti-inflammatory cytokine เช่น IL-10 ได้ รวมถึงลดความเป็นกรดและลดการหลั่งน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Lekha, Mohan, & Samy, 2010; Palle, Kanakalatha, & Kavitha, 2018) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยังสามารถลดระดับไขมันชนิด low-density lipoprotein (LDL) ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในเลือดรวมถึงลดการสะสมไขมันในชั้น tunica intima และ tunica medium ของหลอดเลือดแดงใหญ่ในหนูแรทที่มีไขมันสูง (hypercholesteremic rats) โดยกระตุ้นการหลั่งน้ำดีส่งผลให้มีการกำจัดไขมัน ในขณะที่ปริมาณไขมัน high-density lipoprotein (HDL) เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ lipoprotein lipase และ plasma LCAT (Patil, Prakash, & Maheshwari, 2010)

สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบประสาท โดยสามารถเพิ่มประสิทธิภาพความจำและการเรียนรู้ โดยไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase ส่งผลให้ acetylcholine (ACh) ในสมองของหนูแรทเพิ่มมากขึ้น (Bhanumathy, Harish, Shivaprasad, & Sushma, 2010) นอกจากนี้ยังลด norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT) และสารอนุมูลอิสระ เช่น malondialdehyde อีกทั้งกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ glutathione และ catalase ในสมองของหนูแรทจึงส่งผลให้มีพฤติกรรมความจำและการเรียนรู้ที่ดีขึ้นจากการทดสอบ

ด้วยวิธี avoidance และ spatial (Kumar & Gupta, 2002; Nalini, Karanth, Rao, & Aroor, 1995) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของสารสื่อประสาทกลูตาเมตใน primary neuronal cell โดยรบกวนการทำงานของ glutamate receptor ชนิด NMDA (Godkar, Gordon, Ravindran, & Doctor, 2004) และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* โดยลดปริมาณ oxidative stress และ free radicals ในหนูไมส์ที่มีความเครียดแบบ immobilization stress ทั้งแบบจับปล้นและแบบเรื้อรัง รวมถึงเพิ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) และ glutathione reductase (GR) ในเนื้อเยื่อสมองหนูไมส์และในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง (Godkar, Gordon, Ravindran, & Doctor, 2003; Godkar, Gordon, Ravindran, & Doctor, 2006; Kumar & Gupta, 2002; Lekha et al., 2010; Russo, Izzo, Cardile, Borrelli, & Vanella, 2001) และจากงานวิจัยของ Kumar และคณะพบว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายยับยั้งการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง C2C12 murine muscle cells ที่เหนี่ยวนำด้วย tertiary butyl hydroperoxide (t-BHP) โดยมีปริมาณ cytochrome C และอัตราการตายของเซลล์ลดลง รวมทั้งมีปริมาณของ SOD และ CAT เพิ่มขึ้น (Kumar et al., 2015) จากงานวิจัยข้างต้นสามารถกล่าวได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทและเซลล์อื่นๆ โดยมีฤทธิ์เป็น anti-oxidant และ anti-apoptosis แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายต่อการตายของเซลล์ประสาทในโรคพาร์กินสัน ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษด้วย MPP⁺ เพื่อใช้เป็นแบบจำลองของโรคพาร์กินสัน โดยงานวิจัยนี้จะทำการสกัดสารจากเมล็ดกระถางหลายด้วย 95% เอทานอล และแยกสารสกัดออกเป็นเศษส่วนตามลักษณะความมีขี้ของสาร โดยใช้เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำเป็นตัวทำละลาย แล้วจึงทำการศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายและเศษส่วนต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y ทั้งแบบการป้องกัน (pre-treatment) และแบบการรักษา (post-treatment) ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษด้วย MPP⁺

วัตถุประสงค์การวิจัย

- 1) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายและเศษส่วนต่อการป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺
- 2) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายและเศษส่วนต่อการยับยั้งการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺

- 3) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺

สมมติฐานของการวิจัย

คาดว่าสารสกัดมาตรฐานเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนจะสามารถป้องกันการตายของเซลล์ประสาทโดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 และยับยั้งการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำการตายด้วย MPP⁺

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

คาดว่าจะได้รู้ประเภทของสารออกฤทธิ์ในสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย ที่สามารถนำไปศึกษาต่อยอคหาสารออกฤทธิ์และส่วนประกอบด้วยวิธีการอื่นๆต่อไป รวมทั้งคาดว่าจะสามารถนำสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมาพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคพาร์กินสัน

ขอบเขตของการวิจัย

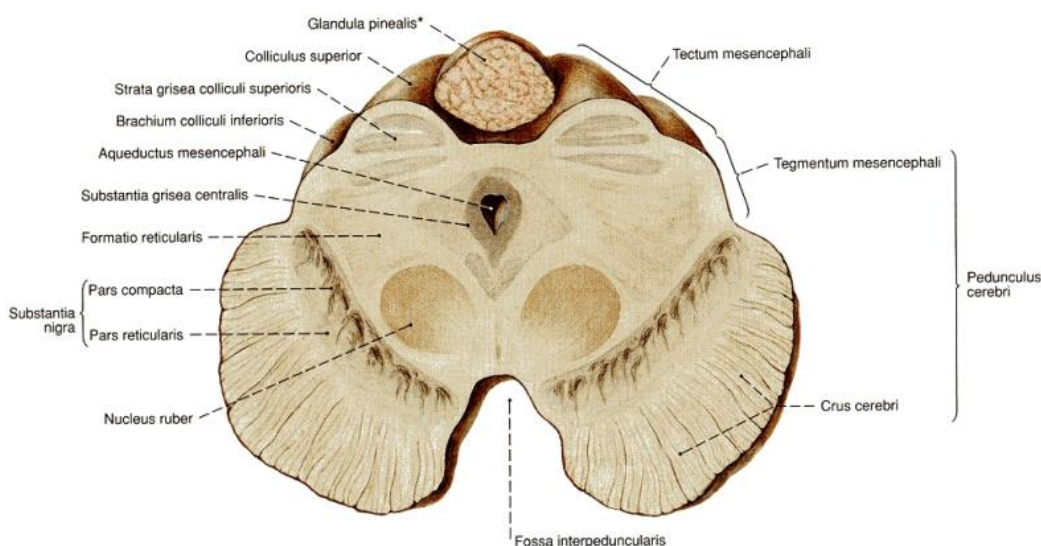
ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y passage ที่ 19-24

บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม (Literature review)

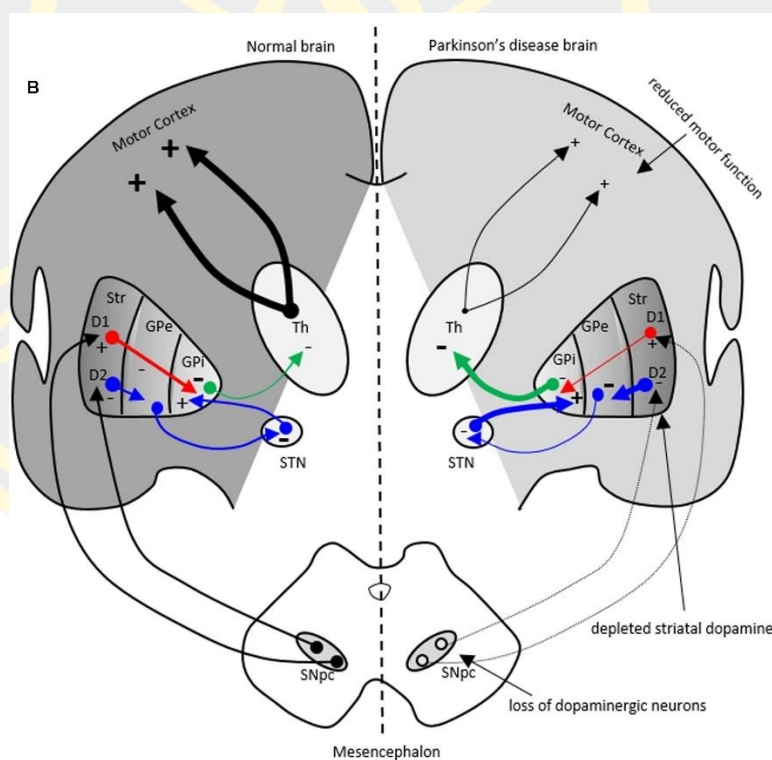
1. โรควาร์กินสัน (Parkinson's disease)

โรควาร์กินสัน เป็นโรคที่เกิดจากการเสื่อมของระบบประสาทซึ่งพบมากได้เป็นอันดับสองรองจากโรคอัลไซเมอร์ มักเกิดในผู้ที่มีอายุ 60 ปีขึ้นไป มีอัตราการเกิดร้อยละ 1-2 และเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละ 3 ในกลุ่มผู้ที่มีอายุ 80 ปีขึ้นไป (Kouli et al., 2018; Massano & Bhatia, 2012) ซึ่งแสดงถึงแนวโน้มการเกิดโรคเพิ่มขึ้นเมื่อมีอายุเพิ่มมากขึ้น โดยในปี พ.ศ. 2558 มีประชากรทั่วโลกเป็นโรควาร์กินสัน 6.1 ล้านคน ซึ่งมากกว่าปีพ.ศ. 2533 ประมาณ 3.5 ล้านคน (GBD 2016 Parkinson's Disease Collaborators, 2018) จากการศึกษาของรื่องโรจน์ พิทยศิริและคณะ (2553) พบว่าในประเทศไทยมีความชุกการเกิดโรคประมาณ 95.34 คน ต่อประชากร 100,000 คน และในประชากรทั่วไปอายุ 40 ปีขึ้นไปประมาณ 424.57 ต่อประชากร 100,000 คน (Bhidayasiri et al., 2011) และเนื่องจากจำนวนของประชากรสูงอายุที่เพิ่มขึ้นในปัจจุบันคาดว่าจะมีอุบัติการณ์การเกิดโรควาร์กินสันเพิ่มมากขึ้นกว่า 30% ในปี พ.ศ.2563 (Chen, Chang, et al., 2001; Massano & Bhatia, 2012) โรควาร์กินสันเกิดจากการสูญเสียหรือเสื่อมสภาพของเซลล์ประสาทประเภทโดปามีน (dopaminergic neuron) ในสมองส่วนซับสแตนเชียไนกรา (substantia nigra) ของสมองส่วนกลาง (midbrain) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้าง substantia nigra ภายใน midbrain (Kier et al., 2009)

ส่งผลต่อการขนส่งสารสื่อประสาทโดปามีนที่ผ่านทาง nigrostriatal pathway (ภาพที่ 2) ทำให้มีปริมาณสารโดปามีนในสมองส่วน striatum ลดลง และกระทบต่อระบบประสาทสั่งการ (motor neuron) ทำให้เกิดอาการความผิดปกติทาง motor ได้แก่ มีการเคลื่อนไหวที่ลดลง (hypokinesia) เคลื่อนไหวร่างกายช้าลง (bradykinesia) มีการแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อ (rigidity) มักเกิดที่แขน ขา คอและหลัง ซึ่งทำให้ผู้ป่วยมีลำตัวเอนมาด้านหน้า มีการลุกนั่งลำบาก เกิดอาการสั่น (tremor) ที่ปลายนิ้วมือและขา อาจรวมถึงที่กรามและริมฝีปากจึงทำให้เกิดการพูดเปลี่ยนแปลงไป พบการสูญเสียการทรงตัวและการเขียน นอกจากนี้ยังมีอาการที่ไม่เกี่ยวข้องกับ motor เช่น อาการทางจิตเวช ได้แก่ วิตกกังวล ซึมเศร้า ความจำลดลง อาการทางระบบประสาทอัตโนมัติ ได้แก่ ขับปัสสาวะผิดปกติ เหงื่อออกมาก อาการทางประสาทสัมผัส ได้แก่ การชา การรับกลิ่นผิดปกติ และอาการที่เกี่ยวกับการนอน ได้แก่ อาการนอนไม่หลับ (Beitz, 2014; Kouli et al., 2018; Massano & Bhatia, 2012)



ภาพที่ 2 แผนผังแสดง nigrostriatal dopaminergic pathway ในสมองปกติและสมองโรคพาร์กินสัน

(Subramaniam & Federoff, 2017)

จากแผนผังใน nigrostrial pathway สมองส่วน striatum (Str) ที่เกี่ยวข้องประกอบด้วย caudate nucleus และ putamen ทำหน้าที่รับสารสื่อประสาทโดปามีนที่ส่งมาจาก substantia nigra pars compacta (SNpc) ใน midbrain โดยสมองปกติเซลล์ประสาท GABAergic ที่อยู่ภายใน Str จะรับสารโดปามีนด้วย D1 หรือ D2 dopaminergic receptors และส่งต่อไปยัง globus pallidus interna (GPi) ทั้งแบบ direct pathway (ลูกศรสีแดง) เป็นการส่งสัญญาณยับยั้งทาลามัสเพื่อให้กระตุ้นการทำงานของ motor และแบบ indirect pathway (ลูกศรสีน้ำเงิน) เป็นการส่งสัญญาณกระตุ้นทาลามัสเพื่อให้ยับยั้งการทำงานของ motor โดยผ่าน globus pallidus externa (Wang, Wei, et al.) และ subthalamic nucleus ก่อนไปยัง GPi จากนั้นสัญญาณจะถูกส่งออกไปยังสมองส่วนทาลามัส (ลูกศรสีเขียว) เพื่อยับยั้งและส่งสัญญาณควบคุมการทำงานของ motor cortex ต่อไป โดยที่ในสมองปกติการทำงานของ direct และ indirect pathway จะมีความสมดุลกัน ซึ่งมีความต่างจากในสมองโรคพาร์กินสันที่มีการสูญเสียเซลล์ประสาทโดปามีนใน SNpc ทำให้สารสื่อประสาทโดปามีนถูกส่งไปยัง striatal ลดลง นำไปสู่การส่งสัญญาณยับยั้งจาก GPi ไปยังทาลามัสผ่าน indirect pathway เพิ่มมากขึ้น การทำงานของ motor ลดลงส่งผลให้เกิดความผิดปกติทางการเคลื่อนไหวและทรงตัว (สัญญาณยับยั้งและสัญญาณกระตุ้นแสดงด้วยเครื่องหมาย (-) และ (+) ตามลำดับ)

1.1 สาเหตุการเกิดโรคพาร์กินสัน

โรคพาร์กินสันเกิดได้จากหลายสาเหตุทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม ซึ่งอายุเป็นปัจจัยเสี่ยงที่เกี่ยวข้องและสำคัญที่สุด โดยพบได้ในผู้ที่มีอายุ 60 ปีและจะมีความเสี่ยงเพิ่มสูงขึ้นจำนวนของผู้ป่วยอายุ 70 ปี จากการศึกษาพบว่า การเกิดโรคพาร์กินสันมีความสัมพันธ์แบบผกผันกับการสูบบุหรี่ ซึ่งเหตุผลยังไม่ชัดเจนอาจเนื่องมาจากสารนิโคตินในบุหรี่สามารถกระตุ้น nicotinic acetylcholine receptors บนเซลล์ประสาทโดปามีนและส่งผลให้เกิดการหลั่งสารโดปามีนออกมา (Bordia et al., 2015; Srinivasan et al., 2016) ในงานวิจัยหลายงานศึกษาความสัมพันธ์ของสารคาเฟอีนกับความเสี่ยงการเกิดโรคพาร์กินสัน พบว่าในคนที่ได้รับคาเฟอีนอย่างสม่ำเสมอมีความเสี่ยงการเกิดโรคน้อยกว่าผู้ที่ไม่ได้รับคาเฟอีน ซึ่งคาเฟอีนเป็น adenosine A2A receptor antagonist มีฤทธิ์ในการปกป้องระบบประสาทในหนูแรทที่เป็นโรคพาร์กินสัน (Chen, Xu, et al., 2001; Noyce et al., 2012; Ross et al., 2000) ปัจจัยหนึ่งที่สำคัญมากได้แก่ สารกำจัดศัตรูพืชและวัชพืช ที่มีโครงสร้างคล้ายสาร MPTP ซึ่งเป็นสาเหตุของการเสื่อมของเซลล์ประสาทของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน จากรายงานพบว่า การเกิดโรคมีความสัมพันธ์กับการได้รับสารกำจัดวัชพืช (Di Monte, Sandy, Ekstrom, & Smith, 1986) โดยสาร MPTP สามารถยับยั้ง complex I ที่ไมโทคอนเดรียและทำลายเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน substantia nigra ของสัตว์ทดลอง (Betarbet et al.,

2000) นอกจากนี้ยังเกิดจากสาเหตุความผิดปกติของยีนแบบ autosomal dominant หรือ autosomal recessive ในปัจจุบันพบว่ามีความผิดปกติของยีน α -synuclein, PARK, GBA1, PINK และ LRRK2 เป็นต้น (Nichols et al., 2009; Pickrell & Youle, 2015; Polymeropoulos et al., 1997; Schulte & Gasser, 2011)

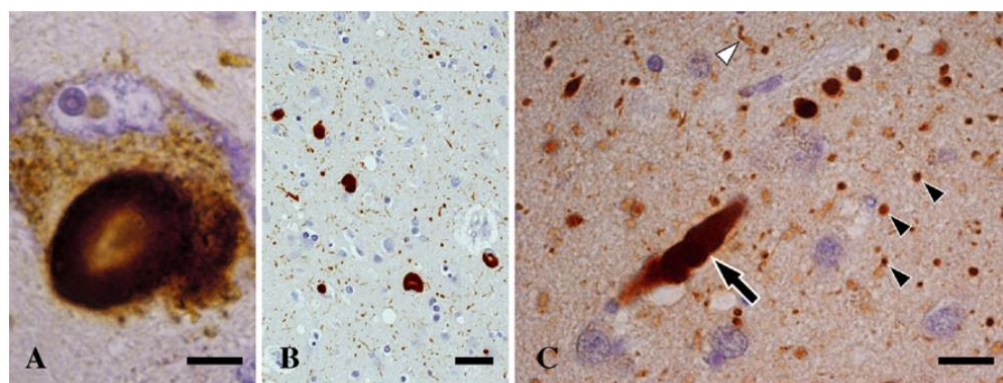
1.2 ลักษณะทางพยาธิสภาพ

ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันก้านสมองมีลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่พบได้ชัด โดยพบการสูญเสียเซลล์ประสาทโดปามีนในส่วน SNpc และ locus coeruleus ในสมองส่วนกลาง โดยเกิดจากการเสื่อมสภาพและการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนและเซลล์ประสาท noradrenergic ในสมองส่วน locus coeruleus สามารถพบ neuromelanin หรือ A9 neuron ที่มีลักษณะเป็นเซลล์สีน้ำตาลดำ และเกลียเซลล์ประเภทอื่นๆ กระจายอยู่ด้วย จากงานวิจัยพบว่าการสูญเสียเซลล์ประสาทโดปามีนไปกว่า 38% เมื่อเทียบกับคนปกติ นอกจากนี้ยังพบการสูญเสียเซลล์ประสาทในสมองส่วน subcortical รวมถึง nucleus basalis of Meynert, dorsal motor nucleus ของเส้นประสาท vagus, pedunculopontine nucleus, raphe nuclei (Giguere, Burke Nanni, & Trudeau, 2018) นอกจากนี้ยังพบเซลล์อื่นๆที่ได้รับผลกระทบ ซึ่งส่งผลให้เกิดอาการที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทสั่งการ เช่น cholinergic, adenosinergic, glutamatergic, GABAergic, noradrenergic, serotonergic และ histaminergic (Chaudhuri, Healy, Schapira, & National Institute for Clinical, 2006; Kalia, Brotchie, & Fox, 2013) ซึ่งลักษณะการเปลี่ยนแปลงที่พบได้บ่อย สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ลักษณะ ได้แก่

(1) การสะสมของ alpha-synuclein (α -syn) misfolding

Alpha-synuclein (α -syn) เป็น โปรตีนที่สร้างโดยยีน SNCA พบมากที่สมอง หัวใจ กล้ามเนื้อและเนื้อเยื่ออื่นๆ โดย α -syn ที่พบในสมองมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการสื่อสารระหว่างเซลล์ (neural plasticity) มักอยู่ใน presynaptic cells คอยควบคุม synaptic vesicle trafficking และการขนส่งสารสื่อประสาทระหว่างเซลล์ประสาท ซึ่งปกติแล้ว α -syn ในสมองส่วนใหญ่เมื่อเกิดการคลายตัว (unfold) จะไม่เหลือโครงสร้างตติยภูมิไว้ แต่เมื่อเกิดความผิดปกติของการคลายตัวมักจะเหลือโครงสร้าง tetramer และเกิดการสะสมโครงสร้าง α -syn ซึ่งในสมองส่วน substantia nigra ของผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะเกิดการสะสม α -syn ที่มีโครงสร้างผิดปกติ ซึ่งไม่สามารถละลายหรือถูกกำจัดออกได้หมด จนพัฒนาเป็นรูปร่าง β -sheet และสานกันเป็นร่างแห มีโครงสร้างคล้าย β -amyloid เป็นรูปร่างที่เรียกว่า Lewy body ซึ่งสามารถเห็นเป็น pigment สีน้ำตาลอย่างชัดเจน (ภาพที่

3) ในผู้ป่วยระยะแรกพบการสะสม lewy bodies ได้ที่สมองส่วน vagal nerve และ olfactory bulb จากนั้นในระยะที่ 2 จะแพร่กระจายไปสู่ก้านสมองและสมองส่วน pons และเข้าสู่สมองส่วนกลาง (midbrain) และสมองส่วน substantia nigra ในระยะที่ 3 และเมื่ออาการมากขึ้นจะลามไปสู่ limbic lobe ในระยะที่ 4 และไปสู่ neocortex ในระยะที่ 5 (Hernandez, Tikhonova, & Karamyshev, 2020) ส่งผลให้เซลล์ประสาทโดปามีนเสีย homeostasis เกิดการสะสม ROS และทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนในที่สุด (Daubner, Le, & Wang, 2011; Stefanis, 2012)



ภาพที่ 3 แสดงการสะสม α -syn ที่ผิดปกติ (A) แสดง lewy body ในสมองส่วน substantia nigra (B) แสดง cortical lewy body ที่สมองส่วน temporal lobe และ (C) แสดง lewy threads (หัวลูกศรสีขาว), lewy dots (หัวลูกศรสีดำ) และ lewy axons (ลูกศร) ภายใน temporal cortex (Wakabayashi et al., 2013)

การสะสม α -syn มีหลายรูปแบบ ได้แก่ โครงร่างโอลิโกเมอร์ที่ละลายน้ำได้ โมโนเมอร์ที่ไม่ละลายน้ำ โปโรโตไฟบริล และร่างแหขนาดใหญ่ที่ไม่ละลายน้ำ จากรายงานพบว่า α -syn สามารถยับยั้งการเกิด phosphorylation ของเอนไซม์ tyrosine hydroxylase ที่ทำหน้าที่สร้างสารสื่อประสาทโดปามีน ส่งผลให้การสังเคราะห์สารสื่อประสาทและการสื่อสารระหว่างเซลล์ลดลง ทำให้ไม่สามารถกำจัดสารสื่อประสาทส่วนเกิน จึงไม่เกิดการคลายตัวของโปโรโตไฟบริลและโครงร่างโอลิโกเมอร์ชนิดต่างๆ และเกิดการสะสมโอลิโกเมอร์และเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาททั้งใน *in vivo* และ *in vitro* (Kouli et al., 2018; Stefanis, 2012)

(2) ความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย

จากการศึกษาพบว่าในสมองส่วน SNpc ของผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีปริมาณของไมโทคอนเดรียลดลง รวมทั้งในกล้ามเนื้อและเกล็ดเลือดเมื่อเทียบกับสมองของคนปกติ (Bindoff, Birch-Machin, Cartlidge, Parker, & Turnbull, 1991) โดย complex I เป็นองค์ประกอบหลักที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งอิเล็กตรอนภายในไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีการทำงานของเอนไซม์ NADH ubiquinone oxidoreductase และ Type I NADH dehydrogenase อิเล็กตรอนจาก NADH จะถูกขนส่งไปยัง ubiquinone (UQ) และเกิดการรีดิวซ์ได้เป็น ubiquinol (UQH₂) ที่สามารถผ่านเมมเบรนและทำให้ complex I ขนส่งโปรตอนจากไมโทคอนเดรียมาสู่ intermembrane space และเกิดความต่างศักย์เพื่อขนส่งอิเล็กตรอนในกระบวนการต่อไป การที่ไมโทคอนเดรียผิดปกติ ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนจากการที่เซลล์ขาดพลังงาน และการเพิ่มขึ้นของ ROS ภายในเซลล์ และเกิดการเปลี่ยนแปลง mitochondria outer membrane permeability (MOMP) ทำให้เกิด mitochondria transition pore (MTP) และเกิดการหลั่งสารที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรียออกมา ได้แก่ cytochrome C, apoptosis-inducing factors (AIF), secondary mitochondria-derived activator of caspase ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสและทำลาย DNA มีการค้นพบว่าการใช้ MPTP สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดอาการของพาร์กินสันอย่างถาวร (Elbaz et al., 2009; Schapira et al., 1990) โดยเมื่อ MPTP ถูกออกซิไดซ์นำไปสู่การยับยั้ง complex I ในไมโทคอนเดรียของเซลล์ประสาทโดปามีน สาร MPTP สามารถพบได้ในสารพิษและสารกำจัดแมลงและวัชพืช (Zeng et al., 2018) นอกจากนี้การกลายพันธุ์ของยีน PINK1 และ parkin (PARK2 และ PARK6 ตามลำดับ) ที่มีหน้าที่ควบคุมกระบวนการ mitophagy หรือกระบวนการกำจัดไมโทคอนเดรียที่ผิดปกติ ทำให้สูญเสียหน้าที่ในการควบคุมไมโทคอนเดรียที่บกพร่องและส่งผลให้เกิดโรคพาร์กินสันที่ถ่ายทอดทางพันธุกรรมแบบยีนด้อย (recessive autosomal PD) (Kitada et al., 1998; Pickrell & Youle, 2015)

(3) ความผิดปกติของกระบวนการกำจัดโปรตีน

กระบวนการกำจัดโปรตีนที่สำคัญมีอยู่ 2 กระบวนการ ได้แก่ ubiquitin-proteasome system (UPS) และ autophagy-lysosome โดยกระบวนการ UPS จะมี ubiquitin ligases (E3s) ทำหน้าที่ตอบสนองต่อโปรตีนที่ผิดปกติ และจะทำการติดแท็กโปรตีนนั้นด้วย ubiquitin หลายชนิดซึ่งจะถูกขนส่งไปยัง proteasome เพื่อทำการย่อยสลาย โดยจะถูกปรับแต่งด้วยเอนไซม์ deubiquitinating (DUBs) หรืออาจจะเกิดการตัดแต่งบริเวณที่ ubiquitin จับกับโปรตีนยับยั้ง (Nakamura, 2018) ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันพบว่ามีการทำงานของ UPS และมีการแสดงออกของ proteosomal ในสมองส่วน SNpc ลดลงเมื่อเทียบกับสมองที่ปกติ ส่งผลให้เกิดการสะสมโปรตีนที่

ผิดปกติ (Ullrich, Mlekusch, Kuschnig, Marksteiner, & Humpel, 2010) และจากรายงานพบว่าหากยับยั้งการทำงานของ proteasome ส่งผลให้เกิดการสะสม Lewy bodies ในสมองส่วน SNpc และเกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองของหนูปกติ (Bedford et al., 2008; Zeng, Bukhatwa, Hikima, Rose, & Jenner, 2006) และในกระบวนการ autophagy-lysosome มีองค์ประกอบได้แก่ macroautophagy, microautophagy และ chaperone-mediated autophagy (CMA) ซึ่งจะทำการรวมโปรตีนที่ผิดปกติไว้ในรูปของ vesicle และไปรวมตัวกับ lysosome เพื่อทำการย่อยสลาย ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่เกิดความผิดปกติของการกำจัดโปรตีน ทำให้เกิดการสะสมของ α -syn จำนวนมาก ส่งผลให้กระบวนการกำจัดโปรตีนดังกล่าวไม่สามารถทำงานได้อย่างเพียงพอต่อจำนวนการสะสมโปรตีนที่ผิดปกติ ซึ่งอาจเพิ่มให้เกิดความรุนแรงของโรค (Ebrahimi-Fakhari, Wahlster, & McLean, 2012; Lee, Khoshaghideh, Patel, & Lee, 2004; Pan, Kondo, Le, & Jankovic, 2008; Xilouri, Brekk, & Stefanis, 2013)

(4) เซลล์ประสาทอักเสบ

ในสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีการทำงานของ microglia มีการสะสม T-cell lymphocyte และการเพิ่มขึ้นของ pro-inflammatory cytokine ในสมองส่วน SNpc (Loeffler, Camp, & Conant, 2006) โดยการสะสมของ α -syn สามารถกระตุ้นการทำงานของ microglia และทำให้เกิดการอักเสบ (Su et al., 2008) จากการศึกษาในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสัน พบว่าการหลั่ง pro-inflammatory cytokine เพิ่มมากขึ้น และเมื่อทำการยับยั้งการทำงานของ microglia พบว่ามีอัตราการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนลดน้อยลง (Wu et al., 2002) และจากการศึกษาด้านพันธุกรรมพบว่าเมื่อกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกัน จะส่งผลให้การทำงานของ human leucocyte antigen (HLA) class II เพิ่มมากขึ้นเป็นผลให้เกิดการพัฒนาของโรคพาร์กินสัน (McGeer, Itagaki, Boyes, & McGeer, 1988) สามารถบ่งชี้ได้ว่าการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของเซลล์และกระบวนการอักเสบสามารถกระตุ้นการเสื่อมของเซลล์ประสาท และส่งผลให้มีอาการทางระบบประสาทสั่งการและการแสดงออกของโรคพาร์กินสัน

1.3 อาการของโรคพาร์กินสัน

(1) อาการทางระบบประสาทสั่งการ (motor symptoms)

อาการที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของระบบประสาทสั่งการ (motor neuron) ที่สามารถสังเกตได้ง่าย โดยผู้ป่วยจะมีการทรงตัวและเคลื่อนไหวร่างกายที่ผิดปกติ มีอาการ Bradykinesia คือ เคลื่อนไหวร่างกายได้ช้าลงและขาดการเคลื่อนไหวอย่างเป็นธรรมชาติ ไม่สามารถเคลื่อนไหวแขน

ขาเร็วๆ ขณะเดินจะแกว่งแขนลดลง ก้าวสั้นและมีลักษณะหลังก้มและงอ สามารถตรวจสอบได้จาก การทำ rapid alternate movement เช่น การคว่ำและหงายฝ่ามือเร็วๆ หรือสังเกตจากการทำ finger/heel tapping โดยสังเกตความเร็วและลักษณะการเคลื่อนไหว และการทำ pull test เพื่อทดสอบการทรงตัวของผู้ป่วย นอกจากนี้อาการ bradykinesia ยังเกิดร่วมกับภาวะ hypophonia คือการพูดด้วยเสียงที่เบาและน้ำเสียงราบเรียบ มีอาการกลืนลำบากอาจจะส่งผลให้มีปริมาณน้ำลายเพิ่มมากขึ้น ในผู้ที่มิระยะรุนแรงขึ้นจะเกิดภาวะ hypomimia คือสูญเสียการแสดงออกทางสีหน้าและมีการกระพริบตาลดลง ทำให้ใบหน้าดูมีลักษณะนิ่งหรือเรียกว่า poker face อาจมีการแสดงอาการ micrographia คือลายมือของผู้ป่วยจะมีขนาดแคบและเล็กลงเรื่อยๆ มีอาการ tremor ซึ่งเกิดได้ทั้งขณะพักมักเรียกว่า “pill-rolling” มีลักษณะนิ้วหัวแม่มือถูกับนิ้วชี้ มีความถี่ในการสั่น 4-6 Hz ซึ่งเป็นอาการที่เกิดขึ้น โดยไม่ตั้งใจและหากเคลื่อนไหวอาการก็จะหายไป แต่ก็เกิดขึ้นอีกในไม่กี่นาทีต่อมา (Jankovic, Schwartz, & Ondo, 1999) ยังสามารถเกิดการสั่นที่ค้างหรือขากรรไกรต่างรวมถึงลิ้นได้ด้วย ยังพบอาการ Rigidity หรือร่างกายแข็งเกร็งสังเกตเห็นได้ขณะเคลื่อนไหวแขน ขา หรือ คอ ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับกล้ามเนื้ออและกล้ามเนื้อยึด โดยจะรู้สึกถึงแรงต้านเมื่อมีการเคลื่อนไหวร่างกายและมีอาการสั่นร่วมอยู่ด้วย เกิดลักษณะ cogwheel rigidity ในขณะเคลื่อนไหวแขน ขา และ โดยเฉพาะข้อมือ (Ali & Morris, 2015; Greenland & Barker, 2018; Jankovic, 2008; Massano & Bhatia, 2012)

(2) อาการที่ไม่ใช่ระบบประสาทสั่งการ (nonmotor symptoms)

ในผู้ป่วยพาร์กินสันมักมีอาการอื่นๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทสั่งการร่วมด้วย ซึ่งเป็นอาการที่ไม่เฉพาะเจาะจงและบางอาการสามารถพบได้ทั่วไปในผู้สูงอายุ ได้แก่ อาการทางจิตเวช เช่น วิตกกังวล ซึมเศร้า อารมณ์แปรปรวน ความจำลดลง (Shiba et al., 2000) อาการที่เกิดจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลาง เช่น การขับปัสสาวะผิดปกติ อาจปัสสาวะบ่อยหรือกลั้นปัสสาวะไม่อยู่ มีเหงื่อออกมากผิดปกติ มีอาการท้องผูก ความดันเลือดต่ำ หรืออาจหย่อนสมรรถภาพทางเพศ (Goldstein, Sewell, & Sharabi, 2011; Greenland & Barker, 2018) อาการทางประสาทสัมผัส เช่น การชา การรับกลิ่นผิดปกติ (Ross et al., 2008) และอาการที่เกี่ยวข้องกับการนอน เช่น นอนไม่หลับ ง่วงนอนตอนกลางวัน และอ่อนเพลีย ผู้ป่วยบางรายอาจมีอาการปวดบ่าไหล่หรือเกิดข้อกระดูกเสื่อมซึ่งเป็นผลกระทบจากอาการทางระบบประสาทสั่งการ (Ali & Morris, 2015; Jankovic, 2008; Massano & Bhatia, 2012; O'Sullivan et al., 2008)

1.4 การรักษาโรคพาร์กินสัน

ในปัจจุบันมุ่งเน้นไปที่การรักษาตามอาการ โดยการใช้ยาที่มีผลต่อระบบประสาทสั่งการ ซึ่งสามารถออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทโดปามีน เช่น dopamine agonists และ monoamine oxidase-B (MAO-B) inhibitors (ตารางที่ 1) (Beitz, 2014) ร่วมกับการทำกายภาพบำบัดหรือการออกกำลังกาย เพื่อลดอาการทางคลินิก เช่น ลดอาการแข็งเกร็งของร่างกายและเพิ่มความยืดหยุ่นของกล้ามเนื้อ หรือรักษาโดยการผ่าตัดเพื่อกระตุ้นการทำงานของสมองในผู้ป่วยที่รักษาด้วยยาไม่เห็นผล ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันระยะรุนแรงอาจได้รับยาทางช่องปากเสริมกับการให้ยาทางอื่น เช่น การฉีดยาใต้ผิวหนังหรือการให้ยาทาง intrajejunal (Beitz, 2014; Kouli et al., 2018) intrajejunal gels หรือ levodopa intrajejunal คือการฉีดยาเข้าไปที่ลำไส้โดยตรงซึ่งสามารถลดการทำลายตัวจากกระบวนการย่อยอาหารภายในกระเพาะอาหาร มีประสิทธิภาพการออกฤทธิ์ที่สูง แต่ราคาค่อนข้างสูงและเหมาะกับผู้ป่วยบางรายที่สามารถทนกับการใช้อุปกรณ์ (Eggert et al., 2008)

ตารางที่ 1 ยาที่ใช้ในการรักษาโรคพาร์กินสัน (Beitz, 2014)

ประเภทของยา	ชื่อยา	กลไกการออกฤทธิ์ยา
โดปามีน	Carbidopa/Levodopa (Sinemet)	สารตั้งต้น โดปามีนที่สามารถผ่าน Blood brain barrier และเปลี่ยนเป็น โดปามีน ได้ที่ เซลล์ประสาทโดปามีนด้วยเอนไซม์ dopa-decarboxilase
Dopamine Agonists Non-Ergot	Pramipexole (Mirapex) Ropinorole (Requip)	ตัวกระตุ้น D2, D3, D4 receptor และกระตุ้น 5-HT2 และ Alpha 2 – adrenergic receptors ได้
Dopamine Agonists Ergot	Bromocriptine (Parlodel) Pergolide	ตัวกระตุ้น D2 receptor ตัวกระตุ้น 5HT1, 5HT2 และ NA Receptors ยับยั้ง D1 receptor
Injectable Dopamine Agonists	Apomorphine (Apokyn)	กระตุ้น D2-D5 receptor Antagonizes 5HT1 และ 5HT2 receptors Antagonizes Alpha-1 และ Alpha-2 adrenergic receptors

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ประเภทของยา	ชื่อยา	กลไกการออกฤทธิ์
Monoamine Oxidase-B Inhibitors	Selegiline (Eldepryl) Rasagiline (Azilect)	ยับยั้ง MAO-B, ยับยั้ง presynaptic dopamine receptor และ dopamine uptake
Catechol O-Methyltransferase (COMT) Inhibitors	Entacapone (Comtan) Tolcapone (Tasmar)	ยับยั้งการย้อนกลับของ COMT
N-Methy-D-Aspartate (NMDA) Receptor Inhibitor	Amantadine	เพิ่มการสังเคราะห์และการหลั่งสาร โดปามีน, ยับยั้ง NMDA Glutamatergic receptors
Anticholinergics	Benztropine Trihexyphenidyl	การปิดกั้นตัวรับ cholinergic ของ muscarinic และเซลล์ประสาท cholinergic ภายใน striatal interneurons

2. อะพอพโตซิส (Apoptosis)

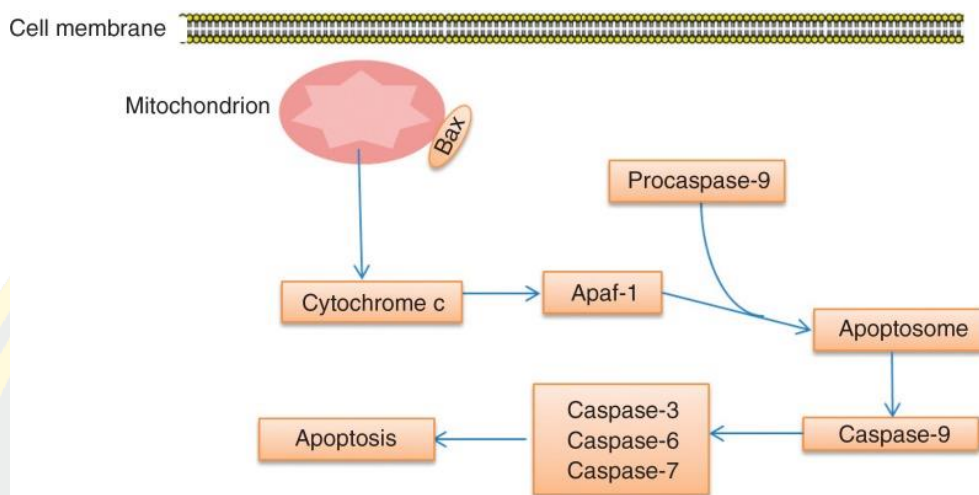
อะพอพโตซิส (Apoptosis) เป็นกระบวนการตายของเซลล์ที่ถูกตั้งโปรแกรมไว้ (programmed cell death) พบได้ในทุกเซลล์ของสัตว์เลื้อยคลานด้วยนม ซึ่งจะเกิดขึ้นระหว่างกระบวนการพัฒนาเซลล์และในเซลล์ที่มีการแก่ตัว โดยมีการตายที่เป็นระบบและเฉพาะเจาะจงต่างกันไปในเซลล์แต่ละชนิด เพื่อรักษาสมดุล (homeostasis) และจำนวนของเซลล์ในเนื้อเยื่อนั้นๆ และยังพบได้ในปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของเซลล์เมื่อได้รับสารพิษ ปัจจัยในการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสนั้นมีหลากหลาย ได้แก่ ทางสรีรวิทยาและทางพยาธิวิทยา จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสีหรือยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็ง มักเกี่ยวข้องกับเซลล์ที่มีการแสดงออกของตัวรับ p53 นอกจากนี้เซลล์บางชนิดที่มีการแสดงออกของตัวรับ Fas และ TNF ก็สามารถนำไปสู่การตายของเซลล์โดยอาศัยการจับกันของ ligand และโปรตีน crosslink อื่นๆ หรือเซลล์บางชนิดที่อาจถูกกระตุ้นได้ด้วยฮอร์โมน เช่น corticosteroids ในขณะที่บางเซลล์อาจถูกยับยั้งการเกิดอะพอพโตซิสด้วยฮอร์โมนหรือ growth factor บางชนิด ในบางครั้งการตายของเซลล์อาจถูกกระตุ้นด้วยปริมาณของสิ่งกระตุ้นต่างกัน เช่น ความร้อน การฉายรังสี การขาดออกซิเจน และยาต้านมะเร็งที่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นในปริมาณน้อยจะส่งผลให้เกิดการตาย

ของเซลล์แบบอะพอพโตซิส แต่เมื่อได้รับการกระตุ้นในปริมาณมากอาจส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์แบบเนื้อร้ายหรือ necrosis กระบวนการอะพอพโตซิสทำงานโดยอาศัย cysteine proteases หรือที่เรียกว่า caspases ซึ่งเป็น protein cascade กระตุ้นกันเป็นทอดๆ เพื่อให้เกิดการตายของเซลล์ ลักษณะการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสที่ศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า เซลล์มีการหดตัว (shrinking) มีรูปร่างรีเล็กอาจอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวหรืออยู่รวมกันเป็นกลุ่มเล็กๆ และติดสีย้อมของ hematoxylin และ eosine เข้มอย่างเห็นได้ชัด ภายในเซลล์ cytoplasm หนาแน่น พบลักษณะการรวมตัวกันของโครมาติน เรียกว่า karyopyknosis และพบ fragment ของ DNA และนิวเคลียสอยู่ภายในเซลล์ และตามมาด้วยการเกิด phagocytosis โดยไม่มีการอักเสบเกิดขึ้นกับเซลล์ใกล้เคียง (Elmore, 2007)

ในกระบวนการอะพอพโตซิสมีกลุ่มโปรตีนที่เป็น biochemical component เกี่ยวข้อง 3 ชนิด ได้แก่โปรตีนตระกูล B-cell lymphoma (Bcl-2) โปรตีนกลุ่ม apoptotic peptidase activating factor (Apaf-1) และโปรตีน caspases (Chinnaiyan, 1999) ซึ่งโปรตีน caspase เป็นโปรตีนที่สำคัญและมีบทบาทในกระบวนการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส ประกอบด้วยโปรตีน protease 14 ชนิดเพื่อควบคุมการตายของเซลล์ โดยในเซลล์ปกติจะอยู่ในรูป zymogens ที่เป็น inactive และจะตอบสนองต่อสิ่งเร้าที่กระตุ้นให้เซลล์ตาย โดยกระตุ้นกันเป็นทอดๆ caspase แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่ 1) caspase ที่ตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อจุลินทรีย์ก่อโรคและ inflammatory cytokine ได้แก่ caspase -1, -4, -5, -11, -12, -13, และ -14 2) caspase ที่เป็น initiator apoptotic ได้แก่ caspases-2, -8, -9, and -10 พบได้เมื่อเกิดการเริ่มต้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส มีลักษณะโดเมนที่ยาวสามารถเกิด auto-cleavage และสามารถกระตุ้น executioner caspases ใน downstream และ 3) executioner caspases-3, -6, -7 เป็นตัวที่ตอบสนองต่อ initiator caspase จึงทำให้เกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส การเกิดอะพอพโตซิสแบ่งออกได้เป็น 2 pathways ได้แก่ intrinsic pathway และ extrinsic pathway

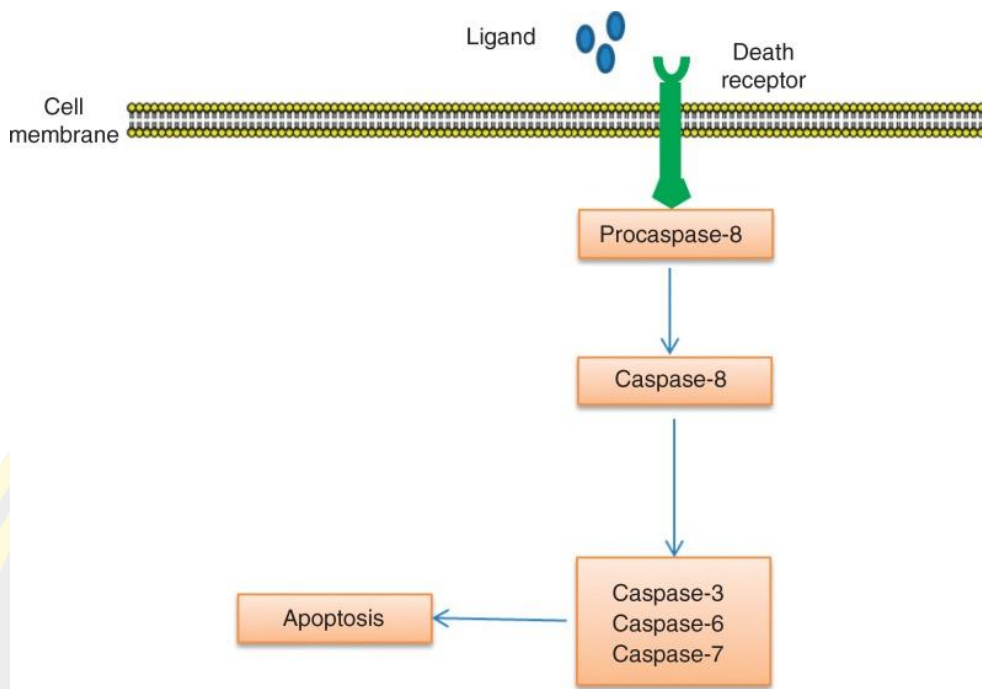
(1) intrinsic pathway คือการกระตุ้นการตายจากภายในเซลล์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนในตระกูล B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) และการเปลี่ยนแปลง permeability transition pore ของไมโทคอนเดรีย โดยจะเกิดการกระตุ้นจากโปรตีน pro-apoptotic เช่น Bax และโปรตีน anti-apoptotic เช่น Bcl-2 ที่อยู่บนผิวไซโตพลาสมิกของไมโทคอนเดรียและออร์แกเนลล์อื่นๆ และทำหน้าที่เป็นตัวควบคุม permeability transition pore ของไมโทคอนเดรีย ทำให้เกิด depolarized และไมโทคอนเดรียแตกตัวจากการที่ไม่สมดุลของ osmolarity โดย pro-apoptotic ทำให้เกิดการหลั่ง cytochrome C ออกสู่ cytosol ของเซลล์ ซึ่ง cytochrome C เป็น apoptogenic factor ที่สามารถจับกับ apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) และไปรวมตัวกับ procaspase-9 เป็นโครงสร้าง

ที่เรียกว่า apoptosome ซึ่ง procaspase-9 จะเปลี่ยนรูปไปเป็น caspase-9 และกระตุ้น caspases downstream ต่อไปและเกิดการอะพอพโตซิสในที่สุด (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 4 แสดงการเกิดอะพอพโตซิสแบบ intrinsic pathway (Erekat, 2018)

(2) extrinsic pathway คือการกระตุ้นจากตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์ ประกอบไปด้วย trans membrane protein ได้แก่ tumor necrosis factor (TNF) หรือ nerve growth factor (NGF) receptor ที่แสดงอยู่บนเซลล์เมมเบรน ซึ่งจะทำให้ ligand เช่น FAS มาจับและสามารถกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสได้โดยผ่านการกระตุ้น pro-caspase 8 และเปลี่ยนรูปเป็น caspase 8 ซึ่งจะสามารถกระตุ้น caspases downstream และทำให้เกิดอะพอพโตซิสต่อไปได้ (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 5 แสดงการเกิดอะพอพโตซิสแบบ extrinsic pathway (Erekat, 2018)

3. อะพอพโตซิสและโรคพาร์กินสัน

โรคพาร์กินสันเป็นโรคที่เกิดจากการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน SNpc ซึ่งมีปัจจัยหลากหลายที่ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ จากการศึกษาจากลักษณะสัญญาณ การศึกษา ระดับโมเลกุล การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง การศึกษาในสัตว์ทดลองที่เป็นแบบจำลองของโรคพาร์กินสัน รวมถึงในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน พบว่าอะพอพโตซิสเป็นกลไกหนึ่งที่ส่งผลให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน (Lev, Melamed, & Offen, 2003) โดยสังเกตได้จาก ปริมาณการแสดงออกและการทำงานของ caspase ที่เพิ่มขึ้นในสมองส่วน SNpc (Estornell et al., 2001; Mogi et al., 2000) และยังพบว่า anti-apoptotic protein เช่น Bcl-2 ในแบบจำลองของโรคพาร์กินสันมีปริมาณเพิ่มขึ้นเพื่อปกป้องเซลล์ประสาทจากการตายหรือชะลอการเสื่อมของเซลล์ (Akao et al., 2002) นอกจากนี้ยังสามารถสังเกตได้จากปริมาณ pro-apoptotic protein เช่น Bax ที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน (Tatton, 2000) ซึ่งกลไกอะพอพโตซิสที่เกี่ยวข้องอย่างเห็นได้ชัดคือ intrinsic pathway ที่ส่งผลให้เกิดลักษณะการเปลี่ยนแปลงของ mitochondria ในเซลล์ โดยมีการทำงานของ complex I ลดลง มีการเพิ่มขึ้นของ ROS การหลั่ง Cytochrome C การขาดพลังงานของเซลล์และตามมาด้วยการการทำงานของ caspase-9 และ caspase-3 นอกจากนี้ยังพบว่าไมโทคอนเดรียที่เกิด mutation อาจเกี่ยวข้องกับการสะสม α -syn และนำมาสู่การตายของเซลล์เช่นกัน

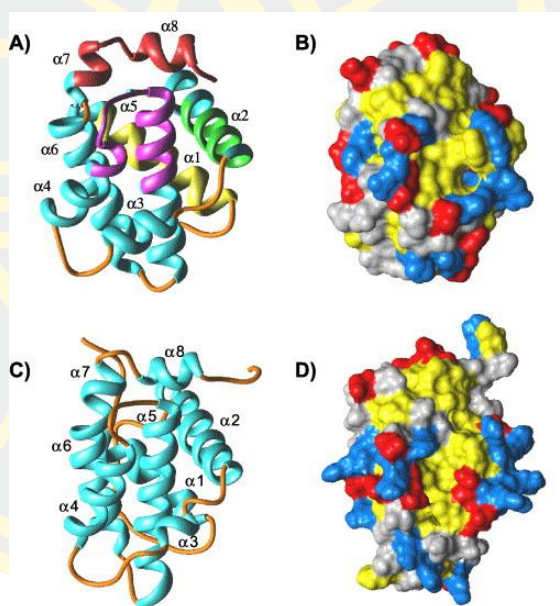
จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าหากให้สารเหนี่ยวนำที่เป็นพิษกับไมโทคอนเดรียส่งผลให้เกิดการสะสม α -syn และ lewy bodies ในสมองของ rodents และเซลล์เพาะเลี้ยง มากไปกว่านั้นการสะสม α -syn ยังส่งผลให้การทำงานของไมโทคอนเดรียผิดปกติ โดยยับยั้งการทำงานของ complex I ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ ROS ซึ่งลักษณะดังกล่าวสามารถพบได้ในสมองส่วน sub stantia nigra ของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน งานวิจัยจำนวนมากจึงนิยมใช้ลักษณะความผิดปกติของไมโทคอนเดรียเป็นตัวลักษณะที่บ่งชี้โรคพาร์กินสันทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลองหรือแบบจำลองของโรคพาร์กินสัน (Erekat, 2018)

จากรายงานพบว่าโรคพาร์กินสันมีความสัมพันธ์กับการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนแบบอะพอพโตซิส ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีน pro-apoptosis เพิ่มขึ้น โดยใน *in vivo* พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน pro-apoptosis ได้แก่ Bax และ caspase 3 รวมถึง apoptotic cell จำนวนมากในเซลล์ประสาทโดปามีนและสมองส่วน substantia nigra ในสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน post mortem (Anglade, Vyas, Hirsch, & Agid, 1997; Hartmann et al., 2001; Tatton, 2000) เช่นเดียวกับในสมองของหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 6-OHDA (Ma et al., 2016) และยังพบว่าในการศึกษาแบบ *in vitro* มีการแสดงออกของ Bax ในเซลล์เพาะเลี้ยง mesencephalon ของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพาร์กินสันด้วย MPP⁺ (Tatton, 2000) และในเซลล์เพาะเลี้ยง PC12 ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย 6-OHDA ซึ่งพบว่าจำนวนของเซลล์ประสาทโดปามีนลดลงด้วย (Mei & Niu, 2014) Bax มีความเกี่ยวข้องกับลักษณะพยาธิสภาพของโรค พบว่ามีการแสดงออกของ Bax ในเซลล์ประสาทโดปามีนและ lewy bodies ในสมองส่วน SNpc (Jia Liu, 2018) จากงานวิจัยของ Tatton W.G. และคณะที่ทำการศึกษาแบบ *in situ* และการศึกษาลักษณะนิเวศของเซลล์ก่อนเกิดการตาย และ identify apoptotic factor พบว่ามีการทำงานของ cytochrome c pro-caspase 9 และ caspase 3 ในสมองส่วน nigral ของผู้ป่วย และยังพบการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bax ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความสามารถในการซึมผ่านของไมโทคอนเดรียซึ่งส่งผลให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทในสมองส่วน nigral และจากการศึกษา immunocytochemistry ในสมองของผู้ป่วยพบว่าไมโทคอนเดรียมีการตายที่เกี่ยวข้องกับ p53-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)-BAX pathway และ FAS receptor-FADD-caspase 8-BAX pathway (Tatton, Chalmers-Redman, Brown, & Tatton, 2003)

4. B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)

B-cell lymphoma 2 (Bcl-2) เป็นโปรตีน anti-apoptosis ในตระกูล Bcl-2 เดิมถูกระบุว่ามีความเกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งต่อมน้ำเหลืองที่มีต้นกำเนิดจาก B-cell ต่อมาจึงถูกค้นพบว่าเป็น anti-

apoptosis protein จากการลดปริมาณของ IL-3 และถูกพบว่ามียับยั้งการป้องกันการตายของ เซลล์ในกระบวนการอะพอพโทซิสปกติ และในเซลล์ที่มีการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายแบบอะพอพโทซิสด้วยสารเคมีต่างๆ (Tsujiimoto, 1998) Bcl-2 สังกะหรห้จากยีน BCL2 มีน้ำหนักโมเลกุลประมาณ 26 kDa มี 2 ไอโซฟอร์มซึ่งมีลักษณะการม้วนพับคล้ายกัน ได้แก่ Bcl-2 และ Bcl-xL ประกอบด้วยโดเมน Bcl-2 homology (BH) 4 โดเมน ได้แก่ BH1, BH2, BH3 และ BH4 จากการศึกษาคด้วย Nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) พบว่า Bcl-2 มีโครงสร้างที่ประกอบไปด้วย α -helices 8 อัน เชื่อมต่อดด้วยลูปที่มีความยาวต่างกัน ซึ่ง $\alpha 5$ และ $\alpha 6$ เป็นแกนกลางที่ถูกหุ้มด้วย hydrophobic helices และมี groove ขนาดใหญ่อยู่ที่บริเวณ $\alpha 3$ (ภาพที่ 6) ทั้ง Bcl-2 และ Bcl-xL นั้นมี arginine residue อยู่ในตำแหน่งที่แตกต่างกันซึ่งสามารถจับกับ โปรตีน pro-apoptosis และ โปรตีนอื่นๆ ซึ่งความแตกต่างของ binding groove อาจส่งผลต่อการจับ โปรตีน เนื่องจากลักษณะโครงสร้างที่ไม่เอื้ออำนวย (Petros, Olejniczak, & Fesik, 2004)

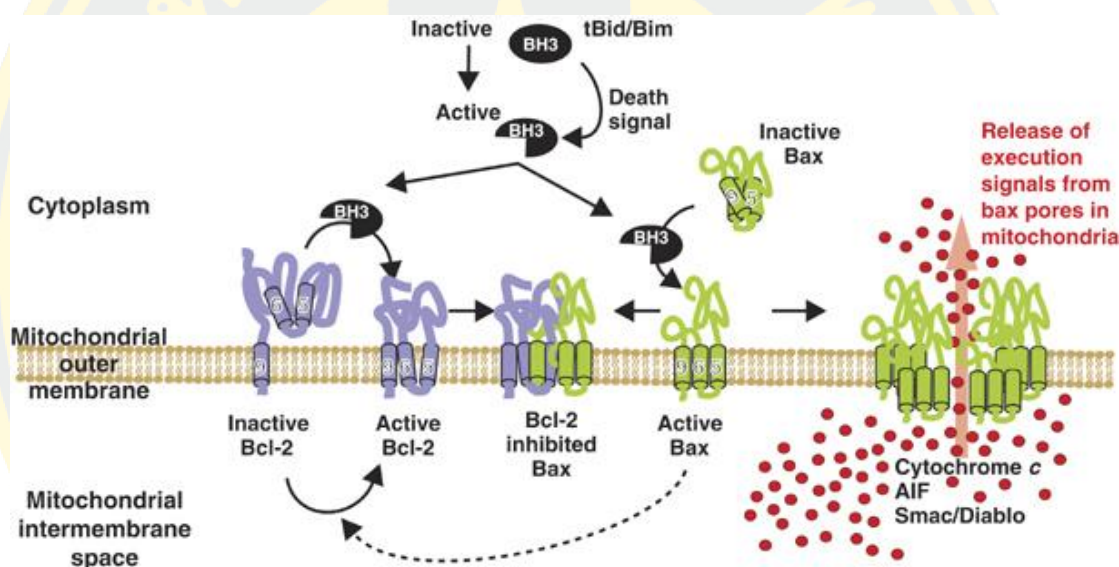


ภาพที่ 6 โครงสร้างสามมิติของ Bcl-2 แสดง Bcl-xL (A, B) และ Bcl-2 (C, D) (Petros et al., 2004)

การทำงานของ Bcl-2

Bcl-2 มีหน้าที่ยับยั้งการเกิดอะพอพโทซิส โดยยับยั้งการหลั่ง apoptogenic factors ได้แก่ cytochrome c และ apoptosis-inducing factor (AIF) ออกสู่ cytosol ของเซลล์ (Kharbanda et al.,

1997) โดย Bcl-2 จะยับยั้งการเปลี่ยนแปลง MOMP ที่เกิดจากการกระตุ้นของ pro-apoptotic proteins ด้วยกลไกการยับยั้งการจับกันของโปรตีน Bax กับ BH3-only protein (ภาพที่ 7) ซึ่งเมื่อเกิดสัญญาณกระตุ้นการตายของเซลล์ โปรตีน BH3-only protein ได้แก่ tBid/Bim จะสามารถจับกับ Bcl-2 และเกิดเป็น active Bcl-2 ที่สามารถจับกับ โปรตีน Bax เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการ Oligomerization หรือการรวมตัวกันของโปรตีน Bax บริเวณ outer membrane ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งโครงสร้างดังกล่าวสามารถพัฒนาไปเป็น transition pore ได้ ในขณะเดียวกันโปรตีน BH3-only protein จะจับกับโปรตีน Bax ได้และเกิดการ active เช่นเดียวกัน ซึ่งกระบวนการดังกล่าวจะเกิดขึ้นพร้อมกัน ทำให้ยับยั้งการรวมตัวกันของโปรตีน Bax (Dlugosz et al., 2006)



ภาพที่ 7 ภาพแสดงการทำงานของ Bcl-2 แสดงการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโปรตีน Bcl-2 เพื่อยับยั้งโปรตีน Bax ที่บริเวณ outer membrane ของไมโทคอนเดรีย (Dlugosz et al., 2006)

นอกจากนี้ยังพบว่า Bcl-2 ช่วยเพิ่มการจับโปรตอนออกจากไมโทคอนเดรียเพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านและการเปลี่ยนแปลง membrane potential โดยการทำงานของ Bcl-2 จะถูกกระตุ้นด้วย pro-apoptotic proteins หรือการแตกตัวของโปรตีนที่เกิดจาก caspase cascade และเกิดการ phosphorylation ที่ตำแหน่ง serine/threonine ของโปรตีน Bcl-2 ได้หลากหลาย เช่น Ser-70 เป็นต้น นอกจากนี้ Bcl-2 ยังถูกกระตุ้นได้ด้วยโปรตีนอื่นๆ ได้แก่ Bag-1 (Takayama et al., 1995), Raf-1 (Wang, Rapp, & Reed, 1996) และ Smn (Iwahashi et al., 1997) โดย Bag-1 และ Raf-

1 จะจับกับ N-terminal ของ Bcl-2 ที่มีโดเมน BH4 (Petros et al., 2004; Tsujimoto, 1998) ทำให้เกิดการ activate และสามารถทำงานได้

5. Bcl-2 และโรคพาร์กินสัน

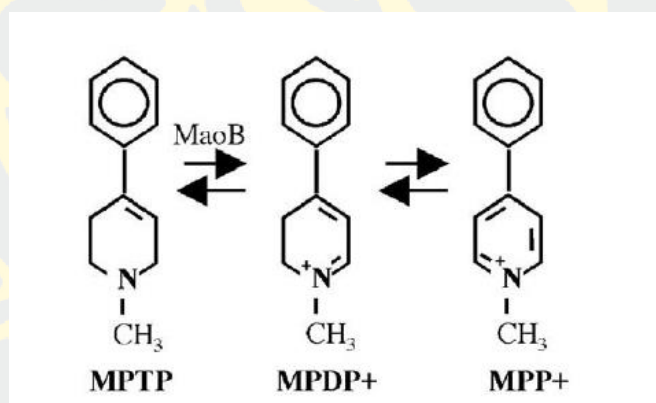
จากรายงานก่อนหน้านี้นี้พบว่าในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันมีโปรตีนกลุ่ม anti-apoptosis เช่น Mcl-1, Bcl-2, หรือ Bcl-xL จำนวนลดลง (Xu et al., 2015) โดยที่โปรตีน Bcl-2 ลดลงอย่างเห็นได้ชัดในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันซึ่งมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาและความรุนแรงของโรค (Blandini et al., 2003) มีการรายงานว่าการขาด Bcl-2 ส่งผลให้สูญเสีย motor neuron, sensory neuron และ sympathetic neurons (Opferman & Kothari, 2018) และเมื่อจำนวนเซลล์ประสาทโดปามีนลดลงเมื่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ลดลง (Khwanraj et al., 2015; Yu et al., 2011) งานวิจัยที่ผ่านมาระบุว่า Bcl-2 และ Bcl-xL สามารถยับยั้งการเกิด apoptosis ที่เกิดจากสารโดปามีนในเซลล์ประสาทโดปามีน ในสมองส่วน nigrostriatal ของหนูแรทที่เหนี่ยวนำให้เป็นโรคพาร์กินสันด้วย 6-OHDA (Hartmann et al., 2002; Ye et al., 2016) หากยับยั้งการแสดงออกของ Bcl-2 พบว่ามีการแสดงออกของ apoptotic protein ในเซลล์เพาะเลี้ยง N2a และเซลล์ประสาทโดปามีน MN9D เพิ่มขึ้น (Robinson et al., 2018) และหากยับยั้งการแสดงออกของโปรตีน anti-apoptotic ชนิด Mcl-1 ส่งผลให้เกิดการจับกันระหว่าง ubiquitin ผ่าน Parkin- และ PTEN-induced kinase 1 (PINK1) และเกิดการย่อยโปรตีนใน proteasome ใน HeLa cells (Carroll, Hollville, & Martin, 2014) และเมื่อเพิ่มการแสดงออกของ Bax ส่งผลให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสของเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองของหนูแรท (Robinson et al., 2018) นอกจากนี้มีงานวิจัยพบว่า การตายของเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน striatum ลดลงหลังจากได้รับ neurotoxin ในหนูไมส์ที่ดัดแปลงพันธุกรรมให้มีการแสดงออกของ human Bcl-2 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและยังพบว่าอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ประสาทขึ้นอยู่กับปริมาณการแสดงออกของ Bcl-2 (Offen et al., 1998) มากไปกว่านั้นการที่ปริมาณ Bcl-2 เพิ่มขึ้นสามารถทำให้การเกิดความสมดุลของ apoptosis และ autophagy ในหนูไมส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีการแสดงอาการโรคพาร์กินสันด้วย rotenone (Liu et al., 2018)

จากรายงานข้างต้นการสูญเสียเซลล์ประสาทโดปามีนแบบอะพอพโตซิสในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน ถูกควบคุมผ่านวิถี Bax/Bcl-2 โดยเมื่อมีการแสดงออกของ Bcl-2 จำนวนมากส่งผลขัดขวางการทำงานของ Bax ซึ่งเป็นโปรตีน pro-apoptotic และยับยั้ง caspase cascade ส่งผลให้เซลล์มีการรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนของ Bcl-2 มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ TH ที่เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในการสังเคราะห์ catecholamine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทโดปามีนในสมอง โดยในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันจะมีเอนไซม์ TH ลดลงเนื่องจากเซลล์ประสาทโดปามีนถูก

ทำลาย จึงพบการแสดงออกของ Bcl-2 ลดลงและการแสดงออกของ Bax เพิ่มขึ้น (Blandini et al., 2004; Khwanraj et al., 2015; Liu et al., 2019)

6. 1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺)

1-Methyl-4-phenylpyridinium (MPP⁺) เป็น สาร neurotoxin ที่ใช้เหี้ยวนำให้เกิดลักษณะของโรคพาร์กินสันที่ได้จากกระบวนการ metabolism MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ซึ่งถูกค้นพบเป็นครั้งแรกโดย Barry Kidson ในปี ค.ศ. 1976 โดยพบว่า MPTP ทำให้มนุษย์มีอาการแสดงอาการ bradykinesia ที่รุนแรงและออกฤทธิ์ต่อระบบประสาท รวมถึงเกิดการทำลายเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน substantia nigra และรบกวนระบบประสาทโดปามีน MPTP จึงถูกใช้เหี้ยวนำให้เกิดโรคพาร์กินสัน มีการรายงานว่า MPTP มีโครงสร้างคล้ายกับสารกำจัดวัชพืช ได้แก่ paraquat และยากำจัดแมลง ได้แก่ rotenone ซึ่งการเกิดโรคพาร์กินสันมีความสัมพันธ์กับปริมาณการได้รับสารกำจัดวัชพืช (Bhidayasiri et al., 2011; Di Monte et al., 1986)



ภาพที่ 8 แสดงการเมตาบอลิซึมสาร MPTP ไปเป็น MPP⁺ ด้วยเอนไซม์ MAO-B (Jackson-Lewis & Smeyne, 2005)

MPP⁺ เป็น สาร neurotoxin ที่ได้จากกระบวนการ metabolism MPTP (1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ด้วยเอนไซม์ monoamine oxidase-B (MAO-B) ที่อยู่ภายในเกลียเซลล์ (ภาพที่ 8) โดย MPTP สามารถผ่าน blood brain barrier (BBB) และจะถูกขนส่งไปยังเกลียเซลล์และเปลี่ยนเป็น MPP⁺ ซึ่งในเกลียเซลล์ประกอบไปด้วย MAO จำนวนมาก จากนั้น MPP⁺ จึงสามารถออกฤทธิ์เป็น neurotoxin ซึ่งเซลล์ astrocyte เป็นเซลล์แรกที่จะได้รับผลกระทบจากสารพิษ

นี้ พบว่าสามารถกระตุ้นให้มีการเพิ่มขึ้นของ TNF-alpha, interleukin-1-beta (IL- 1b) และ interleukin-6 (IL-6) มีการสังเคราะห์ nitric oxide (NO) เพิ่มมากขึ้น ซึ่งการสังเคราะห์ NO มี 3 ไอโซฟอร์ม ได้แก่ endothelial NOS (eNOS) พบได้ที่หลอดเลือดสมอง ซึ่งไม่เกี่ยวข้องกับ MPTP, neuronal NOS (nNOS) พบได้ทั่วไปในสมองมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท ซึ่งพบว่าเมื่อให้ MPTP กับหนูที่ทำการ knock out ยีน nNOS สมองส่วน SNpc จะถูกทำลาย และไอโซฟอร์ม Inducible nitric oxide synthase (iNOS) พบมากที่สุดในส่วน SNpc ที่เกิดพยาธิสภาพทั้งในสมองของผู้ป่วยโรคพาร์กินสันและในหนูเมาส์ที่ได้รับ MPTP โดย iNOS สามารถทำให้เกิดการสร้าง NO จำนวนมากซึ่งสามารถแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเป็นพิษต่อเซลล์ (Jackson-Lewis & Smeyne, 2005)

โดย MPP^+ สามารถผ่านเข้าเซลล์ประสาทโดปามีนได้ทาง dopamine transporter (DAT) และสามารถเข้าสู่ไมโทคอนเดรียได้หลายวิธี ได้แก่ ทางห่วงโซ่การขนส่งอิเล็กตรอน (electron transport chain) หรืออยู่ในรูป vesicle แล้วแทรกผ่านการขนส่ง monoamine เมื่อผ่านเข้าไปแล้วส่งผลให้ความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ (electrical gradient) เปลี่ยนแปลงไป เกิดการยับยั้งการขนส่งเอนไซม์ NADH (complex I) ส่งผลให้การสร้าง ATP ลดลง และมีปริมาณ superoxide (SOD), oxidative stress และ Reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้น นำไปสู่การตายของเซลล์ (Singer et al., 1988; Smeyne & Jackson-Lewis, 2005) จากรายงานพบว่าเซลล์ PC12 ที่ได้รับ MPP^+ ทำให้เกิดการตายของเซลล์ที่คล้ายกับในโรคพาร์กินสัน โดยเกิดการเปลี่ยนแปลง membrane potential ของไมโทคอนเดรีย มีปริมาณ reactive oxygen species (ROS) เพิ่มมากขึ้น เกิด GSH depletion และมีการทำงานของ caspase-3 เพิ่มมากขึ้นในขณะที่การทำงานของ Bcl-2 ลดลง (Guan et al., 2006) เซลล์ประสาท MN9D และเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำความเป็นพิษด้วย MPP^+ ทำให้เกิดลักษณะของ necrosis โดยมีลักษณะการบวมของไมโทคอนเดรียและมี heterochromatid และโรโบโซมกระจายอยู่ทั่วบริเวณที่เซลล์เกิดการตาย เซลล์เมมเบรนแตกออก ความหนาแน่นในไซโทซอลเปลี่ยนแปลงไป เกิดการรวมตัวของเศษนิวเคลียสเป็นแควิวโอลอย่างเห็นได้ชัด กอลจิคอมเพล็กซ์สลายไป รวมถึงมีปริมาณ ROS เพิ่มมากขึ้น (Choi et al., 1999; Sheehan et al., 1997) และจากการศึกษาของ Ito และคณะปี ค.ศ. 2017 พบว่า Necrostatin-1 (Nec-1) ซึ่งเป็นตัวยับยั้งการเกิด necroptotic หรือการตายอย่างหนึ่งที่มีลักษณะคล้ายกับการเกิด necrosis สามารถยับยั้งการตายของเซลล์ได้ SH-SY5Y ที่ได้รับสารพิษ MPP^+ และ rotenone ได้ โดยรักษาปริมาณ ATP ภายในเซลล์ในคงที่และลดการเปลี่ยนแปลง membrane potential ของไมโทคอนเดรีย โดยยังคงเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไมโทคอนเดรีย (Ito et al., 2017) นอกจากนี้ในหนูเมาส์หนูแรทและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (primate) ที่ได้รับ MPP^+ มีการแสดงความผิดปกติของพฤติกรรม

ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทสั่งการ เช่น การเคลื่อนไหวกล้ามเนื้อลดลง (hypokinesia) กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง (rigidity) การสูญเสียการทรงตัว และอาการสั่น (tremor) ซึ่งคล้ายกับโรคพาร์กินสันที่พบได้ในมนุษย์ ส่งผลให้งานวิจัยจำนวนมากในปัจจุบันจึงนิยมใช้ MPP⁺ เป็นสารเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะของโรคพาร์กินสัน (Sedelis et al., 2001; Zeng et al., 2018)

นอกจากนี้ยังมีสารพิษอื่นๆที่ทำให้เกิดอาการของโรคพาร์กินสันและการสูญเสียเซลล์โดปามีน ได้แก่ rotenone, 6-OHDA และ paraquat (Zeng et al., 2018) rotenone เป็นยากำจัดแมลงที่ใช้กันอย่างแพร่หลาย มีคุณสมบัติในการผ่าน bbb เข้าสู่สมองและเซลล์ต่างๆได้โดยไม่อาศัยกลไกขนส่งที่จำเพาะ ซึ่งจากรายงานพบว่า rotenone สามารถยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรียที่บริเวณ complex I และรบกวนการขนส่งสารโดปามีนใน nigrostriatal pathway รวมถึงทำให้เกิดการสะสม lewy body ภายในสมอง แต่เนื่องจากคุณสมบัติความคงตัวของสารและการออกฤทธิ์ไม่จำเพาะเจาะจงในสัตว์ทดลอง จึงยังไม่เป็นที่นิยมสำหรับนำมาใช้ในการเหนี่ยวนำโรคพาร์กินสัน 6-OHDA เป็นสารเคมีที่สามารถเข้าสู่ของเซลล์ประสาทโดปามีนและเซลล์ในปมประสาทซิมพาเทติก ได้แก่ เซลล์ประสาทที่สร้างสารสื่อประสาทนอร์อะดรีนาลีน (noradrenaline) เมื่อเข้าสู่เซลล์และจะกระตุ้นการสร้าง ROS และ free radicals ส่งผลให้เกิดการเสื่อมของเซลล์ประสาทในบริเวณ locus coeruleus และ nigrostriatal นำมาใช้ในสัตว์ทดลองโดยการฉีดเข้าไปในบริเวณที่สนใจศึกษา โดยเฉพาะ paraquat หรือยากำจัดศัตรูพืชมีโครงสร้างคล้ายกับ MPP⁺ สามารถเข้าสู่เซลล์ประสาทได้เช่นเดียวกันแต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด เมื่อเข้าเซลล์แล้วกระตุ้นให้มีการสร้าง ROS และ SO นำไปสู่การตายของเซลล์ จากรายงานระบุว่า paraquat ไม่มีฤทธิ์ยับยั้งที่ complex I แต่จะกระตุ้นการตายของเซลล์ประสาทในสมองส่วนต่างๆจากการผลิตสารอนุมูลอิสระ (Tieu, 2011)

7. กระถงลาย (*Celastrus paniculatus*)

กระถงลาย (*Celastrus paniulatus*) หรือกระทุงลาย หรือมะแตก เป็นพืชในวงศ์ CELASTRACEAE เป็นไม้เถาเนื้อแข็งขนาดใหญ่ ลำต้นสูงประมาณ 10 เมตร ใบเดี่ยวเรียงสลับ มีลักษณะรีเป็นรูปไข่ หรือไข่กลับ ปลายใบแหลม โคนใบมน ขอบใบจักเป็นคลื่นถี่ๆ ออกดอกตามปลายกิ่ง ช่อดอกแบบช่อแยกแขนง ดอกมีลักษณะเล็ก สีขาวอมเหลือง มีจำนวนมาก ผลลักษณะกลมมีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 7 มิลลิเมตร ผลแก่เป็นสีส้มปนเหลืองและแตกตามผนังออกเป็น 3 กลีบ เมล็ดมีลักษณะรีเป็นรูปไข่ มีเมล็ดจำนวน 3-6 เมล็ด มีเนื้อสีแดงอมน้ำตาลหุ้ม โดยรอบ กระถงลายเป็นพืชพื้นบ้านในประเทศอินเดียและพบได้มากในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้

ได้แก่ จีน อินเดีย เอเชีย มาเลเซีย เมียนมาร์ เนปาล ศรีลังกา ไทย เวียดนาม และเกาะแปซิฟิก รวมถึง
ในออสเตรเลีย (Deodhar & Shinde, 2015b) (ภาพที่ 9)



ภาพที่ 9 กระทงลาย

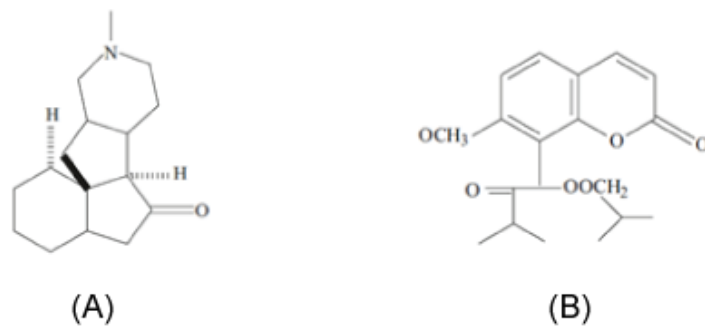
ในประเทศไทยนิยมนำน้ำมันจากเมล็ดกระทงลายมาใช้เป็นยารักษาโรคต่าง ๆ แก่
โรคเหน็บชา ในอดีตใช้เป็นน้ำมันเชื้อเพลิง น้ำมันตามไฟหรือนำมาเคลือบกระดาษกันน้ำซึมและใช้
เป็นยาขับเหงื่อ จากการศึกษาพบว่าเมล็ดใช้ทำยาได้ โดยในประเทศอินเดียมีการนำเมล็ดกระทงลาย
มาใช้ป้องกันรักษาโรคอย่างแพร่หลาย ซึ่งเมล็ดกระทงลายมีองค์ประกอบทางพฤกษเคมี
(phytochemical constituents) ที่หลากหลาย โดยแบ่งออกเป็นกลุ่มดังนี้

(1) Fixed oil (Sengupta & Bhargava, 1970)

(2) Alkaloids

ได้แก่ paniculatine A, paniculatine B, celsastrine, celapanine, celapanigine, celapagine
และ

wiformine F (Basu & Pabrai, 1946; Lu et al., 2006) (ภาพที่ 10)



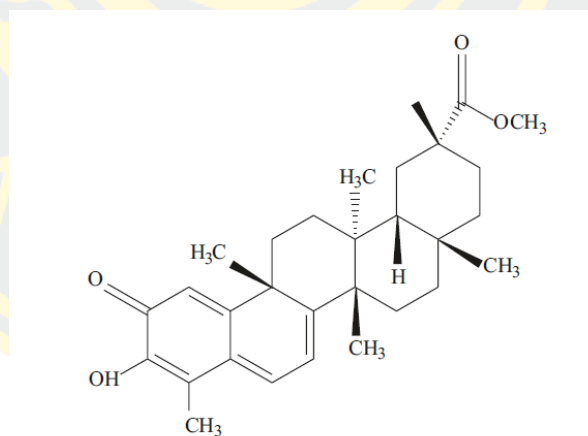
ภาพที่ 10 โครงสร้างของ celastrol (A) และ paniculatin (B)

(3) Polyalcohols

ได้แก่ malangunin, malkanginnol, malkanguniol และ paniculatadiol (Shashank, Rajendra, & Mistry, 2017)

(4) Triterpenoid

ได้แก่ pristimerin ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างเป็น β -dihydroagarofuran sesquiterpene polyesters (Sang, Wang, Tu, & Chen, 1991) (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 โครงสร้างของ pristimerin

โดยในสารสกัดจากเมล็ดกระทงหลายมียังประกอบทางพฤษเคมีที่หลากหลาย อาทิ สารประกอบเทอร์พีน เอสเทอร์ กรดไขมันอิ่มตัวและไม่อิ่มตัว เป็นต้น โดยมีสารออกฤทธิ์ (bio-active compound) ได้แก่ กลุ่ม alkaloids เช่น celastrol และ paniculatin กลุ่ม terpenoids เช่น phytol และ linalool กลุ่มกรดไขมัน เช่น palmitic acid, tetracosanol, กรดอะซิติก (acetic acids),

กรดเบนโซอิก (benzoic acids) และ สเตอรอล (sterol) (Arora & Pandey-Rai, 2014; Avinash & Waman, 2014; Shashank et al., 2017)

โดยสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีลักษณะเป็นน้ำมันสีเหลืองน้ำตาล ในการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีฤทธิ์หลากหลาย ดังสรุปในตารางที่ 2 จากรายงานระบุว่าสามารถต้านการเจ็บปวดและการอักเสบในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเจ็บปวดด้วย tail immersion, hot plate และ acetic acid-induced writhing โดยหนูแรทที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย มีขนาดบาดแผลและพฤติกรรมตอบสนองของความเจ็บปวดลดลง (Kulkarni et al., 2015) สามารถป้องกันการเกิดแผลในกระเพาะของอาหารหนูแรทที่เป็น pyloric ligation โดยลดการอักเสบจากการลด inflammatory cytokine ได้แก่ TNF- α , IL-6 และเพิ่ม IL-10 ซึ่งเป็น anti-inflammatory cytokine รวมถึงลดความเป็นกรดและการหลั่งน้ำย่อยในกระเพาะอาหาร (Lekha et al., 2010; Palle et al., 2018) นอกจากนี้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายยังสามารถลดระดับไขมัน LDL ไตรกลีเซอไรด์ และคอเลสเตอรอลในเลือดรวมถึงลดการสะสมไขมันในชั้น tunica intima และ tunica medium ของหลอดเลือดแดงใหญ่ (Aorta) ของหนูแรทที่มีไขมันสูง (Hypercholesteremic rats) โดยกระตุ้นการหลั่งน้ำดีส่งผลให้มีการกำจัดไขมัน ในขณะที่ปริมาณไขมัน HDL เพิ่มขึ้น โดยการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ lipoprotein lipase และ lecithin-cholesterol acyltransferase (LCAT) (Patil et al., 2010) ป้องกันการลุกลามของพยาธิสภาพ โดยลด inflammatory cytokines และ oxidant stress ในหนูแรทที่เป็น โรคข้อต่ออักเสบ (Kothavade, Bulani, Deshpande, Chowdhury, & Juvekar, 2015) และยับยั้งการเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง C2C12 murine muscle cells ที่เหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ โดยปริมาณ cytochrome C และอัตราการตายของเซลล์ลดลงรวมทั้งมีปริมาณของ SOD และ CAT เพิ่มขึ้น (Kumar et al., 2015)

ตารางที่ 2 แสดงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย

การออกฤทธิ์	ในแบบจำลอง	กลไกการออกฤทธิ์	อ้างอิง
ต้านการเจ็บปวด	pain and inflammatory rat	ยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin และการหลั่ง IL-1 β	Kulkarni et al., 2015
ต้านการอักเสบ	arthritis rat, pyloric ligation rat	ลด inflammatory cytokines เช่น TNF- α และ IL-6, เพิ่ม anti-inflammatory cytokine เช่น IL-10	Kothavade et al., 2015; Lekha et al., 2010; Palle et al., 2018
เพิ่มความจำและการเรียนรู้	Rat	ยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase, กระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ glutathione และ catalase	Bhanumathy et al., 2010; Kumar & Gupta, 2002; Nalini et al., 1995
ปกป้องระบบประสาท	primary neuronal cell	รบกวนการทำงานของ glutamate receptor ชนิด NMDA	Godkar et al., 2004
ต้านอนุมูลอิสระ	acute and chronic immobilization stress mouse	ลด oxidative stress และ free radicals, เพิ่ม SOD, CAT และ GR	Godkar et al., 2003; 2006 Lekha et al., 2010; Russo et al., 2001
ต้านการเกิดอะพอพโทซิส	t-BHP induced apoptosis C2C12 murine muscle cells	ลดการหลั่ง cytochrome C	Kumar et al., 2015

สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายมีฤทธิ์ต่อระบบประสาทและสมอง ดังสรุปในตารางที่ 3 พบว่ามีฤทธิ์ในการกดประสาทและต่อต้านการชักในหนูแรท (Saini, Chaudhary, & Sharma, 2012) สามารถเพิ่มประสิทธิภาพความจำและการเรียนรู้ (cognitive function) โดยลดเอนไซม์ acetylcholinesterase ส่งผลให้ acetylcholine (ACh) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในสมองของหนูแรท เพิ่มมากขึ้น (Alama & Haqu, 2011; Bhanumathy et al., 2010) ลด norepinephrine (NE), dopamine (DA), serotonin (5-HT) และสารลดอนุมูลอิสระ เช่น malondialdehyde อีกทั้งกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของ glutathione และ catalase ในสมองของหนูแรทจึงส่งผลให้มีพฤติกรรมความจำและการเรียนรู้ที่ดีขึ้น จากการทดสอบ avoidance task และ spatial test (Kumar & Gupta, 2002; Nalini et al., 1995) ปกป้องเซลล์ประสาทจากความเป็นพิษของสารสื่อประสาทกลูตาเมตใน embryonic brain neuronal cells โดยรบกวนการทำงานของ glutamate receptor เพื่อยับยั้งไม่ให้ Ca^{2+} ไหลเข้าเซลล์มากเกินไป (Godkar et al., 2004) และสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* โดยลดปริมาณ oxidative stress และ free radicals ในหนูไมส์ที่มีความเครียดแบบ acute และ chronic immobilization stress ได้ รวมถึงเพิ่มเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น SOD, CAT และ GR ในเนื้อเยื่อสมองหนูไมค์และในเซลล์เพาะเลี้ยง brain neuronal cells (FBNC) (Godkar et al., 2003; Godkar et al., 2006; Kumar & Gupta, 2002; Lekha et al., 2010; Russo et al., 2001)

ตารางที่ 3 แสดงฤทธิ์และกลไกการออกฤทธิ์ต่อระบบประสาทของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่สกัดด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ

ชนิดของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย	ฤทธิ์ต่อระบบประสาท	อ้างอิง
น้ำมันจากเมล็ดกระทงลาย	<ul style="list-style-type: none"> - เพิ่มความจำและการเรียนรู้โดยลด NE, DA, 5-HT และเมทาบอลิต์ในสมองหนูแรท - เพิ่มกระบวนการทางความจำในหนูแรทเมื่อเทียบกับหนูแรทที่ได้รับ vasopressin - ปรับปรุงกระบวนการความจำแบบ cognitive ในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความจำลดลง - เพิ่มความจำและการเรียนรู้ในหนูแรทที่มีความเครียดเรื้อรัง 	Bhanumathy et al., 2010; Karanth et al., 1981; Gattu et al., 1997 Bhagya et al., 2016
สารสกัดที่สกัดด้วยเอทานอลและเมทานอล	<ul style="list-style-type: none"> - ปกป้องเซลล์ประสาทจาก hydrogen peroxides ในสมองหนูแรท - ปรับปรุงความเครียดและลด oxidative stress ในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์ประสาทด้วย 3-nitropropionic acid 	Malik et al., 2016 Godkar et al., 2006
สารสกัดที่สกัดด้วยปิโตรเลียมอีเทอร์	<ul style="list-style-type: none"> - ลดพฤติกรรมความวิตกกังวลในหนูแรท 	Jadhav et al., 2013
สารสกัดที่สกัดด้วยน้ำ	<ul style="list-style-type: none"> - ลดการตายของเซลล์ประสาทที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดพิษด้วยกลูตามเมทโดยควบคุมที่ตัวรับกลูตามเมทในเซลล์เพาะเลี้ยง FBNC - เพิ่มความจำและการเรียนรู้ในหนูแรทโดยลดสารอนุมูลอิสระภายในสมองหนู - เพิ่มกระบวนการความจำโดยเพิ่มสาร acetylcholine ในสมองของหนูแรท 	Godkar et al., 2003; Kumar et al., 2010; Bhanumathy et al., 2010

นอกจากนี้ยังสามารถต้านการเจริญเติบโตของแบคทีเรียหลายชนิด ได้แก่ *Micrococcus pyogenes*, *Bacillus cereus*, *Salmonella typhosa*, *Bacillus subtilis*, *Salmonella dysenterica*, *Salmonella paratyphi*, *Salmonella marcescens*, *Escherichia coli*, *Proteus vulgaris*, *Pseudomonas pyocyana*, *Pseudomonas morgani*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus lutea*, *Staphylococcus aureus* และ *Klebsiella pneumonia* (Deodhar & Shinde, 2015a) และต้านการเจริญเติบโตของเชื้อรา ได้แก่ *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum*, *Trichophyton soudanense*, *Candida albicans*, *Torulopsis glabrata* และ *Candida krusei* (Deodhar & Shinde, 2015b)



บทที่ 3

ระเบียบวิธีวิจัย (Research Methodology)

1. การเตรียมสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย

เมล็ดกระทงลาย (*Celastrus paniculatus* seed) ตากแห้ง ได้รับความอนุเคราะห์จากเทศบาลตำบลทุ่งข้าวพวง จังหวัดเชียงใหม่ นำมาบดอย่างหยาบด้วยเครื่องปั่นหรือโถรงบดยา แล้วแช่กับตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว 95% เอทานอล อัตราส่วน 1:3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองผ่านกระดาษกรอง Whatman No.4 โดยระวังไม่ให้มีตะกอนของเมล็ดกระทงลายตกออกมา นำสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลายไประเหยให้แห้งด้วยเครื่อง rotary evaporator ซึ่งเป็นเครื่องมือที่อาศัยหลักการกลั่นด้วยสูญญากาศ คือการกลั่นที่ดำเนินการภายใต้ความดันความดันที่ลดลง เพื่อแยกตัวทำละลายออกจากสารสกัดและทำให้สารสกัดเข้มข้นขึ้น ซึ่งเป็นวิธีการทั่วไปที่นิยมใช้ในขั้นตอนการสกัดสารจากพืชเนื่องจากใช้เวลาการระเหยสั้น โดยตัวทำละลายจะถูกทำให้ระเหยออกจากสารสกัดและกลายเป็นไอด้วยระบบสูญญากาศ จากนั้นไอจะถูกปั๊มให้เคลื่อนมาพบกับความเย็นในระบบ เกิดการควบแน่นและเกิดการคืนสภาพของสารละลาย ซึ่งสามารถนำกลับมาใช้ใหม่ได้

ภาพที่ 12 เครื่อง rotary evaporator (EYELA-N-100s) และ water bath (EYELA- SB-1000)

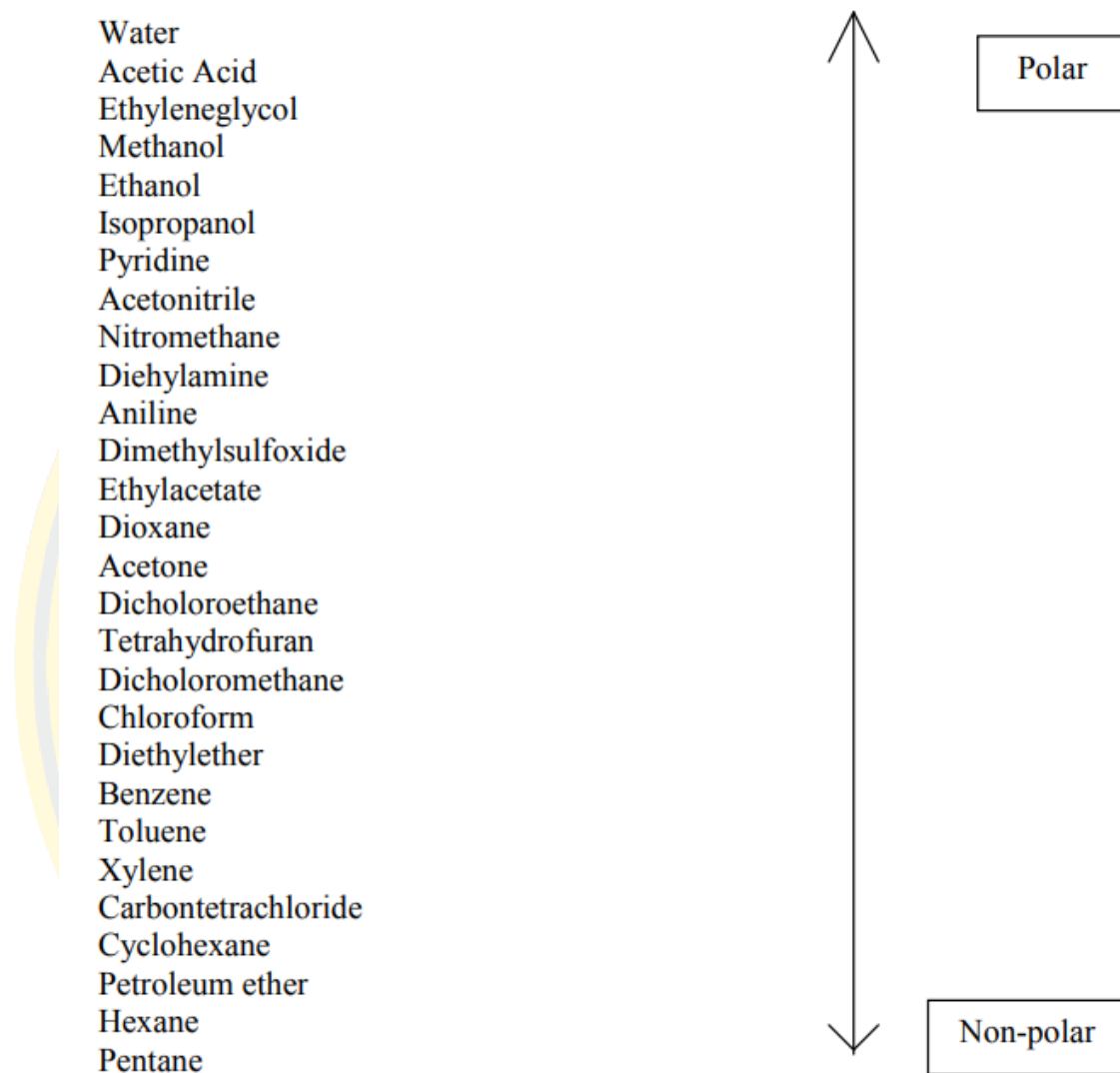
นำสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบ่งใส่ evaporating flask ครั้งละประมาณ 20 ml แล้วนำไปต่อเข้ากับเครื่อง rotary evaporator (EYELA-N-100s) (ภาพที่ 10) โดยจัดตำแหน่งให้ส่วนกันขวดแตะกับผิวน้ำใน water bath ที่ตั้งอุณหภูมิไว้ 50-51°C และเปิดเครื่อง ระบบปั๊มสูญญากาศจะเริ่มทำงานเพื่อทำการระเหย โดยปกติเอทานอลจะมีจุดเดือดอยู่ที่ 78.5 °C เมื่ออยู่ในระบบที่ลดความดันจะส่งผลให้สามารถระเหยได้ในจุดเดือดที่ต่ำลง เมื่อระเหยไปสักพักจะสังเกตเห็นเอทานอลระเหยจาก evaporating flask เข้าสู่ condenser ที่ทำหน้าที่ควบแน่นไอระเหยของเอทานอลอยู่ในสถานะของเหลวและไหลลงสู่ collecting flask ที่รองอยู่ที่ condenser ในขณะเดียวกันสารสกัดที่อยู่ใน evaporating flask จะมีลักษณะหนืดข้นมากขึ้น เมื่อเอทานอลระเหยหมดให้ทำการเติมสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลายลงไปเพิ่มและทำขั้นตอนนี้ซ้ำจนสารสกัดหมด จะได้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลาย (CPSE) ที่มีลักษณะเป็นน้ำสีน้ำตาลเหลืองลักษณะหนืดข้นคล้ายน้ำมันเหลืออยู่ใน evaporating flask เสร็จแล้วทำการถ่ายสารสกัดกระทงลายลงในภาชนะหรือบีกเกอร์ แล้วตั้งทิ้งไว้ที่

อุณหภูมิห้องเพื่อให้ระเหยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เก็บในภาชนะมีฝาปิด ที่อุณหภูมิห้อง แล้วแบ่งสารสกัดบางส่วนมาทำการแยกสารสกัดตามคุณสมบัติการมีขี้ของสาร

การแยกสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายตามสมบัติการมีขี้ (Partition) เป็นวิธีการแยกสารสกัดตามสมบัติการมีขี้ โดยตัวถูกละลายจะสามารถละลายได้ในตัวทำละลายที่มีสมบัติเหมือนกัน กล่าวคือตัวถูกละลายที่มีขี้จะละลายในตัวทำละลายที่มีขี้ และตัวถูกละลายที่ไม่มีขี้จะละลายในตัวทำละลายที่ไม่มีขี้ เนื่องจากแรงดึงดูดระหว่างขี้ของสารทั้งสองชนิด ในกรณีที่สารหนึ่งมีขี้น้อยกว่าอีกสารหนึ่งความสามารถในการละลายจะลดลง ซึ่งในการแยกสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลายจะใช้ตัวทำละลายที่มีขี้ต่างกัน ได้แก่ เฮกเซน เอทิลอะซิเตท และน้ำ (ภาพที่ 13)



Polarity of Solvents



ภาพที่ 13 แสดงสมบัติการมีขั้วของตัวทำละลายชนิดต่างๆ (Biochemistry, 2017)

โดยจะนำสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงละลายมาละลายใน 100% เฮกเซน อัตราส่วน 1:5 แล้วเทใส่ separating funnel เขย่าให้เข้ากัน ตั้งพักไว้ 10 นาทีเพื่อให้สารแยกชั้น จะสังเกตเห็นสารสกัดแยกออกเป็น 2 ชั้น ซึ่งสารสกัดที่มีขั้วมากกว่าจะอยู่ด้านล่างและสารสกัดที่มีขั้วน้อยกว่าจะอยู่ด้านบน ทำการไขก๊อกเพื่อให้สารสกัดที่มีขั้วไหลมากออกมาสู่ภาชนะที่รองไว้โดยระวังไม่ใช้สารสกัดทั้ง 2 ชั้น ไหลลงมารวมกัน จากนั้นเทสารสกัดที่มีขั้วน้อยกว่า (ส่วนที่ละลายในเฮกเซน) ออก

ทางด้านบนของ separating funnel ใส่งในอีกภาชนะหนึ่ง แล้วนำไประเหยเฮกเซนออกด้วยเครื่อง rotary evaporator เมื่อระเหยแล้วจะได้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่มีขี้วัวต่ำ ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องและเก็บในภาชนะมีฝาปิด ที่อุณหภูมิห้อง ในการแยกสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายด้วยตัวทำละลายที่มีขี้วัวกลางและขี้วัวสูง ทำเช่นเดียวกับขั้นตอนข้างต้น โดยการนำสารสกัดชั้นล่างที่ถูกไขออกมาก่อนมาผสมกับตัวทำละลายชนิดอื่นต่อไป ในขั้นตอนนี้จะทำให้ได้เศษส่วนของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย 3 ชนิด ได้แก่

- (1) เศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน มีขี้วัวต่ำ (CPSE-E/H)
- (2) เศษส่วนที่แยกด้วยเอทิลอะซิเตท มีขี้วัวปานกลาง (CPSE-E/EA)
- (3) เศษส่วนที่แยกด้วยน้ำ มีขี้วัวสูง (CPSE-E//W)

2. เซลล์เพาะเลี้ยง (Cell culture)

2.1 เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y

เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y (ATCC®CRL-2266™) ได้รับความอนุเคราะห์จากหน่วยวิจัยประสาทวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล เป็นเซลล์ neuroblastoma ของมนุษย์ที่นิยมนำมาศึกษาโรคเกี่ยวกับระบบประสาทแบบ *in vitro* มีงานวิจัยจำนวนมากนำมาใช้เพื่อศึกษากระบวนการเมตาบอลิซึมของเซลล์ประสาท การทำงานและกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการเสื่อมของระบบประสาท ความเป็นพิษและการปกป้องเซลล์ประสาท ซึ่งเซลล์ SH-SY5Y มีคุณสมบัติในการสร้างสารสื่อประสาทโดปามีนได้เช่นเดียวกับเซลล์ประสาทโดปามีนในสมองส่วน substantia nigra (Xie et al., 2010) ในการศึกษาที่ใช้เซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y passage ที่ 19-24 เลี้ยงใน 25 cm³ cell culture flask โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ Eagle's Minimum Essential Medium Mixture (MEM) ผสมกับ Ham's F12 Nutrient mixture ในอัตราส่วน 1:1 และ 10% fetal bovine serum (FBS) (Gibco), 0.5% sodium pyruvate (Sigma), 0.005% non-essential amino acid (Gibco) และ 2% sodium bicarbonate (Sigma) และ 1% antibiotics (Gibco) เลี้ยงภายในตู้ incubator ภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂

2.2 การซับกัลเจอร์ (subculture)

เมื่อเซลล์ SH-SY5Y มีจำนวนมากกว่า 80% มีลักษณะเซลล์เรียวยาวคล้ายกระสวย มีการยื่นของโพรเซสแผ่ออกจากตัวเซลล์และเรียงตัวไม่ซ้อนทับกัน ทำการดูดอาหารออกแล้วล้างด้วย 0.1 M sterile PBS ปริมาณ 3-5 ml จากนั้นเติม 0.25% trypsin 1 ml แล้วนำเข้าตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 3 นาที เมื่อครบเวลานำมาส่องภายใต้กล้อง inverted light microscope จนสังเกตเห็นเซลล์หลุด

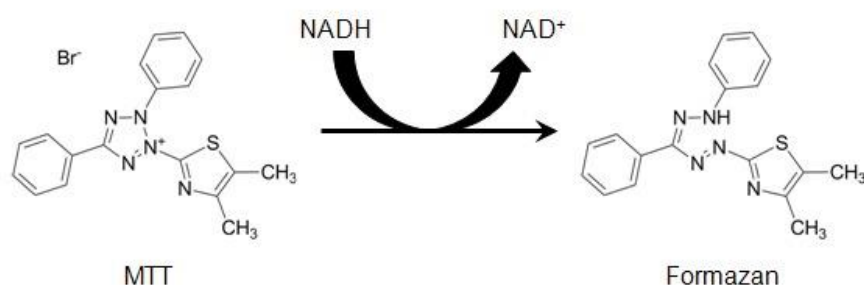
ออกจากพื้น flask ซึ่งเซลล์จะมีลักษณะกลมลอยตัว และแยกเป็นเซลล์เดี่ยว จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ลงไป 1 ml เพื่อหยุดปฏิกิริยาของ trypsin ใช้ pipette boy ดูอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใน flask ขึ้นลงอย่างรวดเร็วประมาณ 30 ครั้งเพื่อชะให้เซลล์เป็นเซลล์เดี่ยวและหลุดออกจากพื้น flask จากนั้นดูดใส่ conical tube 15 ml แล้วนำไปปั่นที่ 1000 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเทอาหารทิ้งโดยระวังไม่ให้เซลล์ที่เกาะอยู่ที่ก้น conical tube หลุดออกมา เติมน้ำใหม่ลงไป 4 ml ใช้ pipette boy ดูขึ้นลง จากนั้นดูดแบ่งใส่ cell culture flask ปริมาณ flask ละ 2 ml แล้วเติมน้ำเลี้ยงเซลล์ลงใน flask ให้ครบ 5 ml แล้วนำเข้าตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เพื่อทำการเลี้ยงเซลล์ต่อ

ในการเพลาเซลล์จะทำการนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตด้วย vital dye คือ trypan blue โดยดูเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ผ่านการ trypsinize ใน conical tube ออกมา 10 µl ใส่ลงใน centrifuge tube จากนั้นเติม trypan blue 10 µl (ค่า dilution factor =2) ผสมให้เข้ากัน จากนั้นดูดออกมา 10 µl ใส่ลงใน counting chamber แล้วปิดด้วย cover slip นำไปส่องภายใต้กล้อง inverted light microscope โดยนับเฉพาะเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งมีลักษณะกลมและใส ไม่ติดสี trypan blue เมื่อได้จำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตแล้ว นำเซลล์ลง 96-well plate หรือ 6-well plate โดยคำนวณความหนาแน่นของเซลล์ให้ได้จำนวนที่ต้องการตามสูตร

$$\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (cells/ml)} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทั้งหมด}}{\text{จำนวนช่องที่นับ}} \times \text{dilution factor} \times 10^4$$

3. MTT assay

ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางและเศษส่วนต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT ซึ่งเป็นการวัด metabolic activity ภายในเซลล์ ที่สามารถบ่งบอกถึงการมีชีวิตของเซลล์ อาศัยหลักการเปลี่ยนสีของ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) ที่มีสีเหลืองไปเป็นผลึก formazan ที่สีม่วง ด้วยเอนไซม์ dehydrogenase ที่อยู่ภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต (Mosmann, 1983) (ภาพที่ 14) ซึ่งความเข้มของสีแปรผันตรงกับอัตราการมีชีวิตของเซลล์



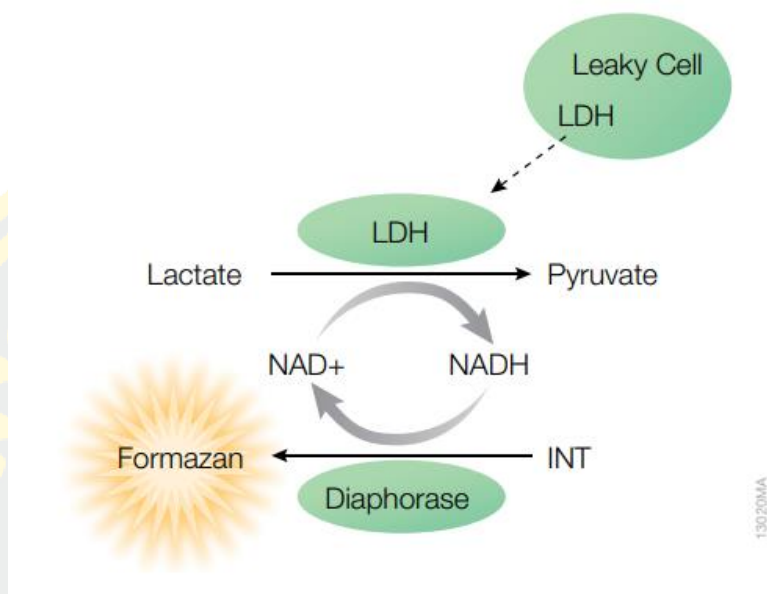
ภาพที่ 14 โครงสร้าง MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) (Riss et al., 2004)

โดยเมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงหลายครบบเวลาตามที่กำหนดใน experiment designs ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใน 96-well plate โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่หลุมละ 100 μ l เติม สาร MTT solution (BiotiumTM) จำนวน 10 μ l ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ และทำการดูดขึ้นลงเบาๆ ให้ เข้ากันแล้วนำเข้าตู้บ่มในที่มืดภายใต้อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 2-4 ชั่วโมง หลังจากนั้นเติม DMSO 200 μ l เพื่อให้ผลึกแตกตัว ดูดขึ้นลงเบาๆระวังไม่ให้เกิดฟองอากาศ และนำไปวัดค่าดูดกลืน แสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร บันทึกค่าและทำการกราฟอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ด้วย โปรแกรม GraphPad Prism 8

4. LDH Cytotoxicity assay

ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงหลายและเศษส่วนต่ออัตราการรั่วของ เอนไซม์ Lactate dehydrogenase (LDH) ของเซลล์ SH-SY5Y เพื่อยืนยันการเกิดพิษจากการ เหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี LDH Cytotoxicity ซึ่งเป็นวิธีการวัดการทำงานของเอนไซม์ LDH ใน อาหารเลี้ยงเซลล์ LDH เป็นเอนไซม์เป็นที่ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาการสร้างพลังงานภายในเซลล์ของ เนื้อเยื่อเกือบทุกอวัยวะ เมื่อเซลล์ตายโดยที่พลาสมาเมมเบรนแตกออก LDH จะรั่วออกสู่ภายนอก เซลล์และผสมอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เมื่อได้ reaction mixture ที่มีส่วนผสมของ lactate, NAD⁺, diaphrose และ INT ลงไป LDH จะรีดิวซ์ NAD⁺ ให้เป็น NADH ทำให้ lactate เปลี่ยนเป็นพลังงาน ในขณะที่เดียวกันเกิดปฏิกิริยาคาบคู่โดย NADH จะเปลี่ยน tetrazolium salt INT ที่มีสีเหลือง ให้เป็น

ผลิตภัณฑ์ formazan ที่มีสีม่วงแดง โดยที่ความเข้มของสีขึ้นกับจำนวน LDH ที่รั่วออกมาจากเซลล์ (Kumar, Nagarajan, & Uchil, 2018) (ภาพที่ 15)



ภาพที่ 15 ปฏิกิริยาของเอนไซม์ lactate dehydrogenase (CytoTox®)

เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายครั้งตามเวลาที่กำหนดใน experiment designs คุณเอาเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาตร 50 μ l ใส่ใน 96-well plate เปล่าโดยไม่ให้มีซากเซลล์ติดมาด้วย แล้วเติม reaction mixture ปริมาณ 50 μ l (CyQUANT™) ลงในแต่ละ well แล้วนำไปบ่มในที่มืดที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นเติม stop reaction จำนวน 50 μ l เพื่อหยุดปฏิกิริยา คุณขึ้นลงเบาๆ และนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 และ 680 นาโนเมตร บันทึกค่าและทำการกราฟอัตราการตายของเซลล์ด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8

5. การเก็บโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง

เป็นขั้นตอนการเก็บโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y เพื่อนำไปศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางหลายครั้งต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ภายในเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี Western blot ซึ่งการสกัดโปรตีนจากเซลล์จะควบคุมอุณหภูมิที่ 4°C ตลอดการปฏิบัติงาน เมื่อครบเวลาการให้สารสกัดกระถางตามเวลาที่กำหนดใน experiment designs ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจาก 6-well plates จนหมดและล้างด้วย 0.01 M cold-PBS 3 ครั้ง ครั้งละ 1000 μ l/well เติม RIPA buffer ที่มีส่วนผสมของ 1% protease inhibitor cocktail ลงใน 6 well-plate 100 μ l/well

และนำไปเขย่าเบาๆเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นใช้ scraper ขูดที่ผิวด้านล่างของ well อย่างเร็วและแรง และนำไปเขย่าเบาๆเป็นเวลา 10 นาที ดูดเก็บสารใน 6 well-plate จนหมด ใส่ microcentrifuge tube แล้วนำเข้าเครื่องปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 12,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ภายใต้อุณหภูมิ 4°C เมื่อครบเวลาดูดเก็บ supernatant ที่มีโปรตีนละลายอยู่ ระวังอย่าให้ตะกอนหรือกากเซลล์ติดขึ้นมา ก่อนนำไปวัดความเข้มข้นของโปรตีน ด้วยวิธี Bradford protein assay และแยกโปรตีนตามน้ำหนักด้วย กระแสไฟฟ้า (SDS PAGE)

6. Bradford protein assay

เป็นวิธีการวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วยปฏิกิริยาของสี Coomassie G-250 dye ซึ่งมีสีน้ำตาลแดง (reddish/brown) ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดที่ 465 นาโนเมตร ทำปฏิกิริยากับโปรตีน จนกลายเป็นสีฟ้า (blue) และเมื่อเกิดปฏิกิริยานำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อวัดปริมาณของโปรตีน โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน เมื่อเก็บโปรตีนจากเซลล์ได้แล้วนำโปรตีนที่ได้ใส่ cuvette 5 μ l แล้วเติม Bradford reagent (ที่เจือจางในอัตราส่วน 1:4) บ่มในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นผสมให้เข้ากันก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 595 นาโนเมตร เพื่อนำไปหาค่าความเข้มข้นของโปรตีนเทียบกับกราฟมาตรฐาน

กราฟมาตรฐานสร้างจากการเตรียมสารละลายโปรตีน bovine serum albumin (BSA) (Sigma) โดยชั่งผงโปรตีน BSA ทำละลายกับ RIPA buffer ให้ได้ความเข้มข้น 1500 μ g/ml, 1000 μ g/ml, 750 μ g/ml, 500 μ g/ml, 250 μ g/ml และ 100 μ g/ml จากนั้นเติมสารละลาย BSA ทั้ง 6 ความเข้มข้น ลงใน cuvette ที่มี Bradford reagent 5 μ l ตามลำดับ และใช้ Bradford reagent เป็นกลุ่มที่มีความเข้มข้น 0 μ g/ml เป็นกลุ่มควบคุม นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยวิธี Bradford และปฏิบัติเช่นเดียวกับการวัดปริมาณโปรตีนข้างต้นและนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปสร้างกราฟเส้นตรง

7. Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)

นำโปรตีนที่สกัดจากเซลล์ SH-SY5Y มาแยกตามน้ำหนักโมเลกุลด้วยกระแสไฟฟ้า ในขั้นตอนการแยกโปรตีนนี้สามารถ load โปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ลงใน well ของ SDS-PAGE ปริมาตรรวม 40-50 μ l/well โดยแบ่งเป็น 6x-loading dye (0.5M Tris HCL pH 6.8 700 μ l, 10% SDS 0.1 g, Glycerol 300 μ l, DTT 0.093 g, Bromophenol blue 0.0012g, ddH₂O to 1 μ l) 8 μ l ที่เหลือเป็นส่วนผสมของโปรตีน โดยทำการคำนวณให้โปรตีนแต่ละ well มีความเข้มข้นเท่ากับ 10 μ g/well และปรับปริมาตรด้วย RIPA buffer จนได้ปริมาตร 40 μ l โดยทำการผสมโปรตีนตาม

ปริมาตรตามที่คำนวณได้กับส่วนผสมของ RIPA buffer และ 6x-loading dye ตามสัดส่วน นำโปรตีนต้มใน water bath เพื่อให้เกิด denaturation ของโปรตีนที่อุณหภูมิ 95°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำโปรตีนที่ต้มแล้วไหลลง well ของ 10% SDS-PAGE ตั้งค่าไฟฟ้า 100 โวลต์ เป็นเวลา 90 นาที เมื่อครบเวลา นำแผ่นเจลประกบลงบนแผ่น nitrocellulose membrane และทำขั้นตอน Western Blot ต่อไป

8. Western Blot analysis

ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ โดยทำการแยกโปรตีนตามขนาดด้วย SDS PAGE แล้วถ่ายโปรตีนลงบนแผ่น nitrocellulose membrane ด้วยเครื่อง wet blot transfer set (Bio-Rad) ตั้งค่าไฟฟ้า 100 โวลต์ ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 105 นาที จากนั้น block โปรตีน non-specific binding ด้วย 5% skim milk เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วแช่แผ่น nitrocellulose membrane ใน Bcl-2 primary antibody (Sigma-Aldrich) ซึ่งเจือจางด้วย TBS-T ในอัตราส่วน 1:1000 ที่อุณหภูมิ 4°C overnight จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที นำแผ่น nitrocellulose membrane มาแช่ใน secondary antibody ได้แก่ goat anti mouse หรือ goat anti rabbit ตามชนิดของ primary antibody โดยเจือจางด้วย TBS-T ในอัตราส่วน 1:5000 ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และนำแผ่น nitro cellulose membrane ที่ติดฉลากด้วย secondary antibody เรียบร้อยแล้ว นำเข้าที่มีดแล้วเติม enhance chemiluminescent detection substrate (ECL) (Bio-helix) 500 μ l ลงบนแผ่น membrane แล้วสังเกตการเรืองแสงของแถบโปรตีนและถ่ายภาพภายใต้เครื่อง Gel documentary นำไปวัดความเข้มของแถบโปรตีนโดยใช้โปรแกรม Image J และ GraphPad Prism 8 ในการวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อต้องการเปลี่ยน primary antibody ให้นำแผ่น nitrocellulose membrane ล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง แล้วนำมาแช่ใน stripping buffer เป็นเวลา 45 นาทีที่อุณหภูมิ 50°C แล้วล้างด้วย TBS-T 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที จากนั้นทำตามขั้นตอนเดิมตั้งแต่การ block โปรตีน non-specific binding ด้วย 5% skim milk จนถึงการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม GraphPad Prism 8

9. วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

แสดงความแตกต่างของข้อมูลในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y และการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่ออัตราการมีชีวิตและอัตราการการรั่วของเอนไซม์ LDH และการแสดงออกของโปรตีน

Bcl-2 ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ โดยใช้โปรแกรม Graphpad Prism 8 แสดงผลเป็นค่า mean \pm standard error of man (S.E.M.) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มด้วย Analysis of Variance (one-way ANOVA) โดยใช้ค่านัยสำคัญ $P < 0.05$ และเปรียบเทียบผลต่างข้อมูลของกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุมแบบเป็นคู่ด้วย Tukey's multiple comparison test โดยใช้ค่านัยสำคัญ $P < 0.05$

10. Experimental Designs

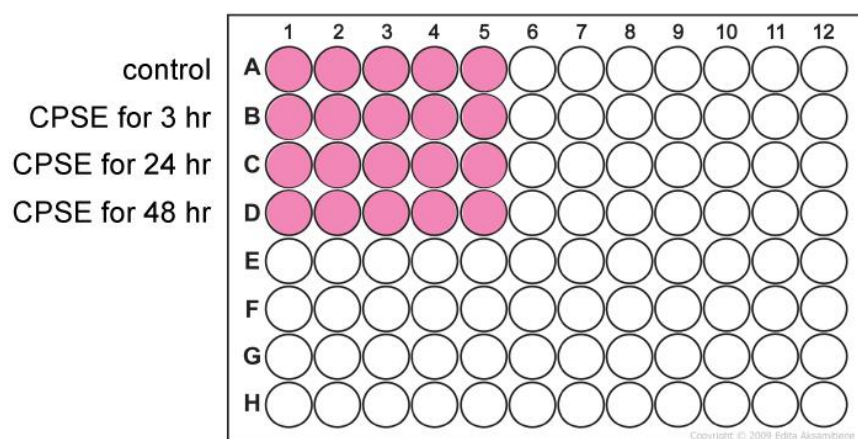
ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้ 50 mM MPP⁺ ในการเหนี่ยวนำเซลล์ SH-SY5Y เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ให้เกิดความเป็นพิษ ซึ่งอ้างอิงการศึกษาก่อนหน้านี้ พบว่าระยะเวลาการให้สาร 50 mM MPP⁺ ที่มากกว่า 3 ชั่วโมงจะเกิดความเป็นพิษซึ่งทำให้เซลล์ตายเป็นจำนวนมาก เช่นเดียวกับการให้สาร MPP⁺ ที่ความเข้มข้นสูงกว่า 50 mM เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ทำให้ไม่สามารถนำเซลล์มาทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่อได้ (Chamniansawat, Proyhkunthod, & Thongon, 2020) และในการศึกษานี้จะใช้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายและเศษส่วนที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์มีชีวิตรอดมากที่สุด โดยจะแบ่งการทดลองออกเป็น 3 การทดลองดังนี้

1) Experiment 1

ทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT โดยจะให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ กับเซลล์ SH-SY5Y ที่เวลาต่างกัน ได้แก่ 3 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อหาระยะเวลาที่เหมาะสมที่จะทำให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตสูงสุด ทำการ plate cell SH-SY5Y ลงใน 96-well plate โดยคำนวณให้มีความหนาแน่น 5-10 $\times 10^3$ cells/well แบ่งกลุ่มการให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็น 4 กลุ่ม (ภาพที่ 16) ได้แก่

- A. กลุ่มควบคุม (เซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์)
- B. กลุ่ม treatment 1 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE เป็นเวลา 3 ชั่วโมง
- C. กลุ่ม treatment 2 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
- D. กลุ่ม treatment 3 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ให้สารสกัดกับเซลล์แล้วนำเข้าตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เมื่อครบเวลาการให้สารสกัดทำการวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม Graphpad prism 8



ภาพที่ 16 แผนภาพแสดงการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT

2) Experiment 2: pre-treatment

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายและเศษส่วนต่อการป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี MTT และ LDH cytotoxicity และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายและเศษส่วนต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ แบบ pre-treatment ด้วยวิธี Western blot

ทำการ plate cell SH-SY5Y ลงใน 96-well plate โดยคำนวณให้มีความหนาแน่น 5-10x10⁶ cells/well โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 17) ได้แก่

- กลุ่มควบคุม (เซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์)
- กลุ่ม MPP⁺ คือกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ เพียงอย่างเดียว
- กลุ่ม pre-treatment 1 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE และ MPP⁺
- กลุ่ม pre-treatment 2 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE-E/H และ MPP⁺
- กลุ่ม pre-treatment 3 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE-E/EA และ MPP⁺
- กลุ่ม pre-treatment 4 คือกลุ่มที่ได้รับสารสกัด CPSE-E/W และ MPP⁺

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
control	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
MPP ⁺	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
CPSE + MPP ⁺	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
CPSE-E/H + MPP ⁺	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
CPSE-E/EA + MPP ⁺	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
CPSE-E/W + MPP ⁺	●	●	●	●	●	○	○	○	○	○	○	○
G	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
H	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

ภาพที่ 17 แผนภาพแสดงกลุ่มการทดลองการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนกับเซลล์ SH-SY5Y แบบ pre-treatment

ให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ นำเซลล์เข้าตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อ้างอิงเวลาการให้สารสกัดจากผลการทดลองใน experiment 1) เมื่อครบเวลาทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง แล้วเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดอะพอพโตซิสโดยเปลี่ยนเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 50 mM MPP⁺ บ่มต่อในตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาการให้สารสกัดทำการวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และวัดอัตราการรั่วของเอนไซม์ LDH ด้วยวิธี LDH cytotoxicity รวมถึงทำการเก็บโปรตีนไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ด้วยวิธี Western blot

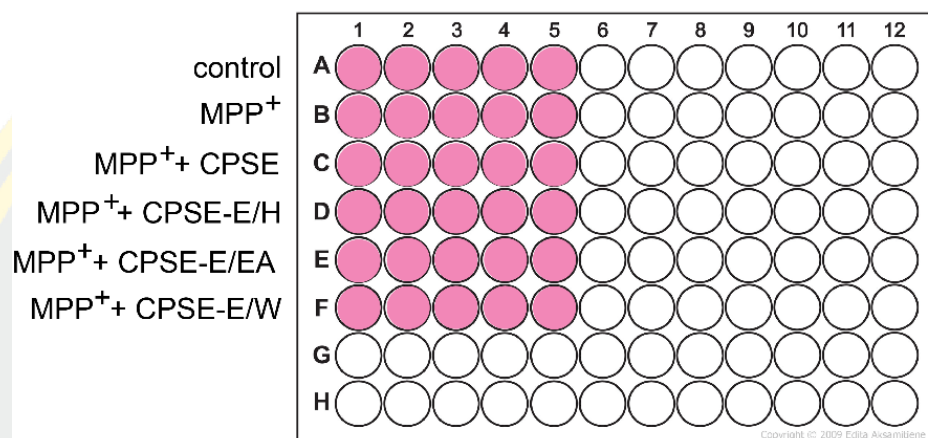
3) Experiment 3: post-treatment

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการยับยั้งการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี MTT และ LDH cytotoxicity และศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิส MPP⁺ แบบ post-treatment ด้วยวิธี Western blot

ทำการ plate cell SH-SY5Y ลงใน 96-well plate โดยคำนวณให้มีความหนาแน่น 5-10x10⁶ cells/well โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม (ภาพที่ 18) ได้แก่

- กลุ่มควบคุม (เซลล์และอาหารเลี้ยงเซลล์)
- กลุ่ม MPP⁺ คือกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ เพียงอย่างเดียว

- C. กลุ่ม post-treatment 1 คือกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ และสารสกัด CPSE
- D. กลุ่ม post-treatment 2 คือกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ และสารสกัด CPSE-E/H
- E. กลุ่ม post-treatment 3 คือกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ และสารสกัด CPSE-E/EA
- F. กลุ่ม post-treatment 4 คือกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ และสารสกัด CPSE-E/W



ภาพที่ 18 แผนภาพแสดงกลุ่มการทดลองการให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนกับเซลล์ SH-SY5Y แบบ post-treatment

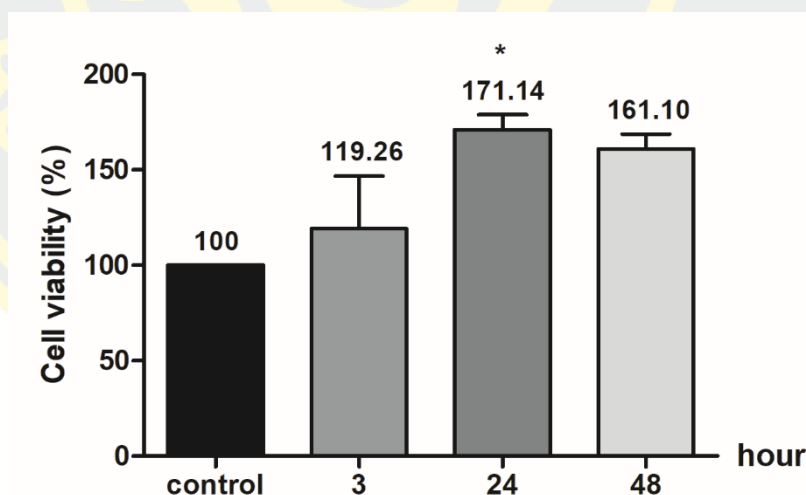
ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ SH-SY5Y ให้เกิดอะพอพโตซิส โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีส่วนผสมของ 50 mM MPP⁺ แล้วนำเข้าตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนชนิดต่างๆ ความเข้มข้น 10 µg/ml นำไปบ่มต่อในตู้บ่ม 37°C, 5% CO เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (อ้างอิงเวลาการให้สารสกัดจากผลการทดลองใน experiment 1) เมื่อครบเวลาการให้สารสกัดทำการวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT และวัดอัตราการรั่วของเอนไซม์ LDH ด้วยวิธี LDH cytotoxicity รวมถึงทำการเก็บโปรตีน ไปศึกษาการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ด้วยวิธี Western blot

บทที่ 4

ผลการวิจัย (Results)

1. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายต่ออัตราการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ด้วยวิธี MTT

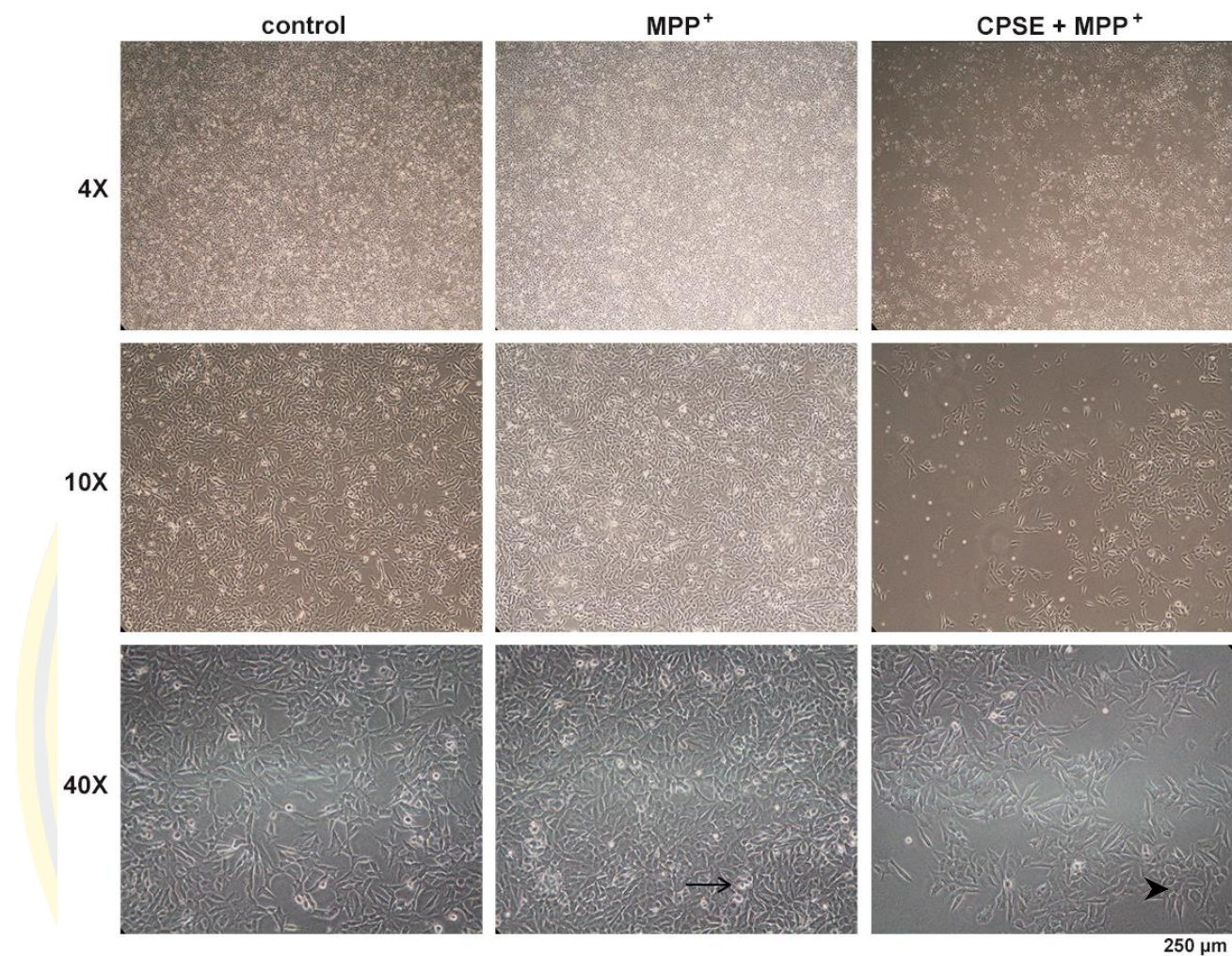
หลังจากให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลาย (CPSE) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ กับเซลล์ SH-SY5Y เป็นเวลา 3 24 และ 48 ชั่วโมง และวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ CPSE ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์เป็นร้อยละ 171.13 ซึ่งมีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่การให้ CPSE ที่ 3 และ 48 ชั่วโมงไม่มีความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระทงลาย 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็น 24 ชั่วโมง เป็นความเข้มข้นและเวลาที่เหมาะสมในการศึกษาต่อไปและมีค่าสูงที่สุดเมื่อเทียบกับเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 3 ชั่วโมงและ 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 19)



ภาพที่ 19 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y เมื่อได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบสกัดหยาบ ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 3 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี MTT เทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด ($n=12$, $*p < 0.01$ เทียบกับกลุ่มควบคุม)

2. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺

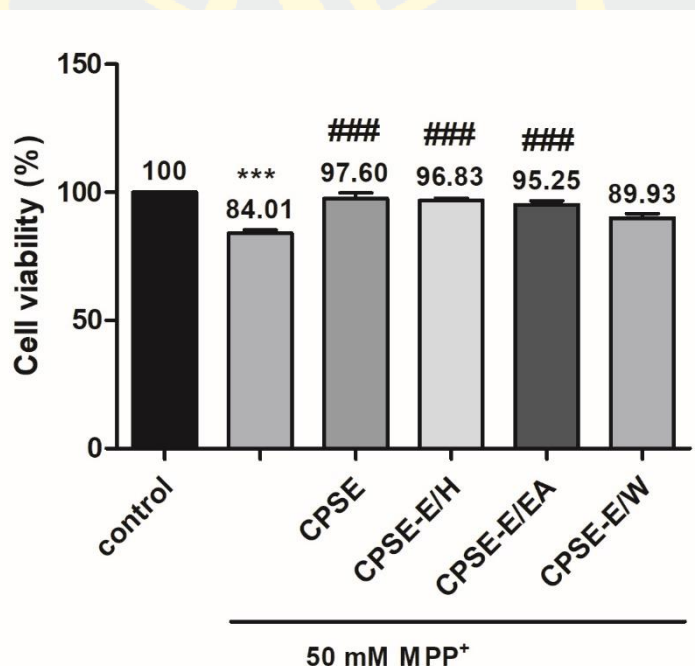
เมื่อให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลาย (CPSE) เป็นเวลา 24 ชั่วโมงกับเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted light microscope) พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่ตายน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ แต่ไม่ได้รับสารสกัด นอกจากนี้เซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมงเพียงอย่างเดียว เกิดการตายของเซลล์ พบลักษณะการจับกลุ่มของโปรตีนและ DNA fragment อยู่ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์ พบการหดตัวของเซลล์ (shrinking) และพบเซลล์ตายที่หลุดลอยจากพื้น ซึ่งสามารถสังเกตได้จากลักษณะการเรืองแสงภายใต้กล้อง (ภาพที่ 20) อย่างไรก็ตามความหนาแน่นของเซลล์ SH-SY5Y ในแต่ละกลุ่มไม่เท่ากัน จึงไม่สามารถบ่งบอกและเปรียบเทียบจำนวนของเซลล์ที่มีชีวิตระหว่างกลุ่มได้ในการทดลองนี้



ภาพที่ 20 แสดงเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 4 10 และ 40 เท่า โดยแสดงเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CPSE) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ และ 50 mM MPP^+ เทียบกับเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ 50 mM MPP^+ เพียงอย่างเดียวและเซลล์กลุ่มควบคุม (ลูกศรแสดงเซลล์ตาย, หัวลูกศรแสดงรูปร่างเซลล์หดตัว)

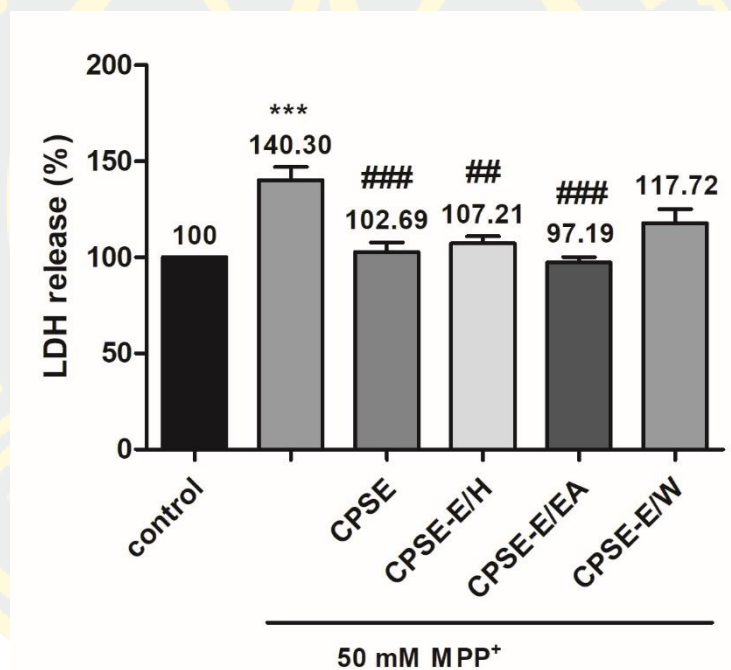
2.1 ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี MTT และ LDH cytotoxicity (pre-treatment)

จากการให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลาย (CPSE) และเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าเซลล์ที่ได้รับ CPSE มีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 97.60 เซลล์ที่ได้รับ CPSE-E/H มีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 96.84 และเซลล์ที่ได้รับ CPSE-E/EA มีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 95.25 ซึ่งเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 mM MPP⁺ เพียงอย่างเดียว (ร้อยละ 84.01) อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับ CPSE-E/W (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ด้วยวิธี MTT (n=5, *** p<0.01 เทียบกับกลุ่มควบคุม, ### p<0.01 เทียบกับกลุ่ม MPP⁺)

ทำการศึกษารวบรวมของเอนไซม์ LDH ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ เพิ่มเติมด้วยวิธี LDH cytotoxicity โดยหลังจากให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลาย (CPSE) และเศษส่วนทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัด CPSE, CPSE-E/H และ CPSE-E/EA มีระดับของเอนไซม์ LDH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ร้อยละ 102.69, 107.21 และ 97.19 ตามลำดับซึ่งน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ เพียงอย่างเดียว เช่นเดียวกับผลจากวิธี MTT ที่ไม่พบความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับ CPSE-E/W (ภาพที่ 22)

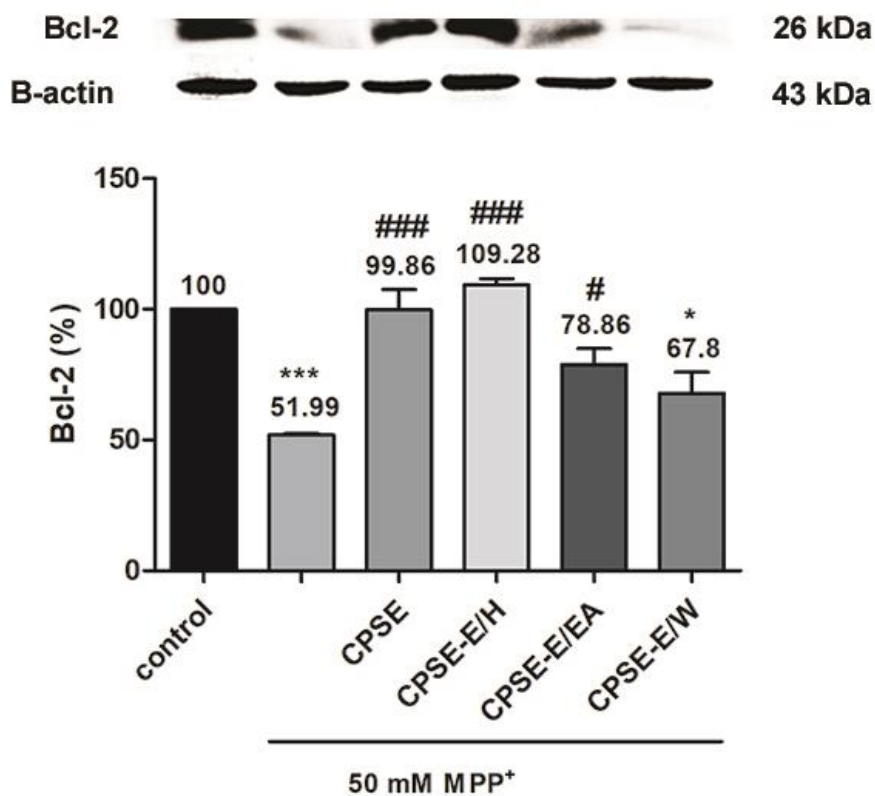


ภาพที่ 22 แสดงร้อยละการรั่วของเอนไซม์ LDH ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment เซลล์ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังจากให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ด้วยวิธี LDH cytotoxicity (n=5, *** p<0.01 เทียบกับกลุ่มควบคุม; ## p<0.05, ### p<0.01 เทียบกับกลุ่ม MPP⁺)

2.2 ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี Western blot (pre-treatment)

เมื่อให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนความเข้มข้น 10 µg/ml กับเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และทดสอบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ด้วยวิธี Western blot พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนมีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ MPP⁺ เพียงอย่างเดียว โดยเซลล์ที่ได้รับ CPSE มีการแสดงออกของโปรตีนร้อยละ 99.86 เซลล์ที่ได้รับ CPSE-E/H มีการแสดงออกของโปรตีนมากถึงร้อยละ 109.28 และ CPSE-E/EA มีการแสดงออกของโปรตีนร้อยละ 78.8 โดยในเซลล์ที่ได้รับ MPP⁺ แต่ไม่ได้รับสารสกัดมีการแสดงออกของโปรตีนเพียงร้อยละ 51.99 ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับ CPSE-E/W (ภาพที่ 23)

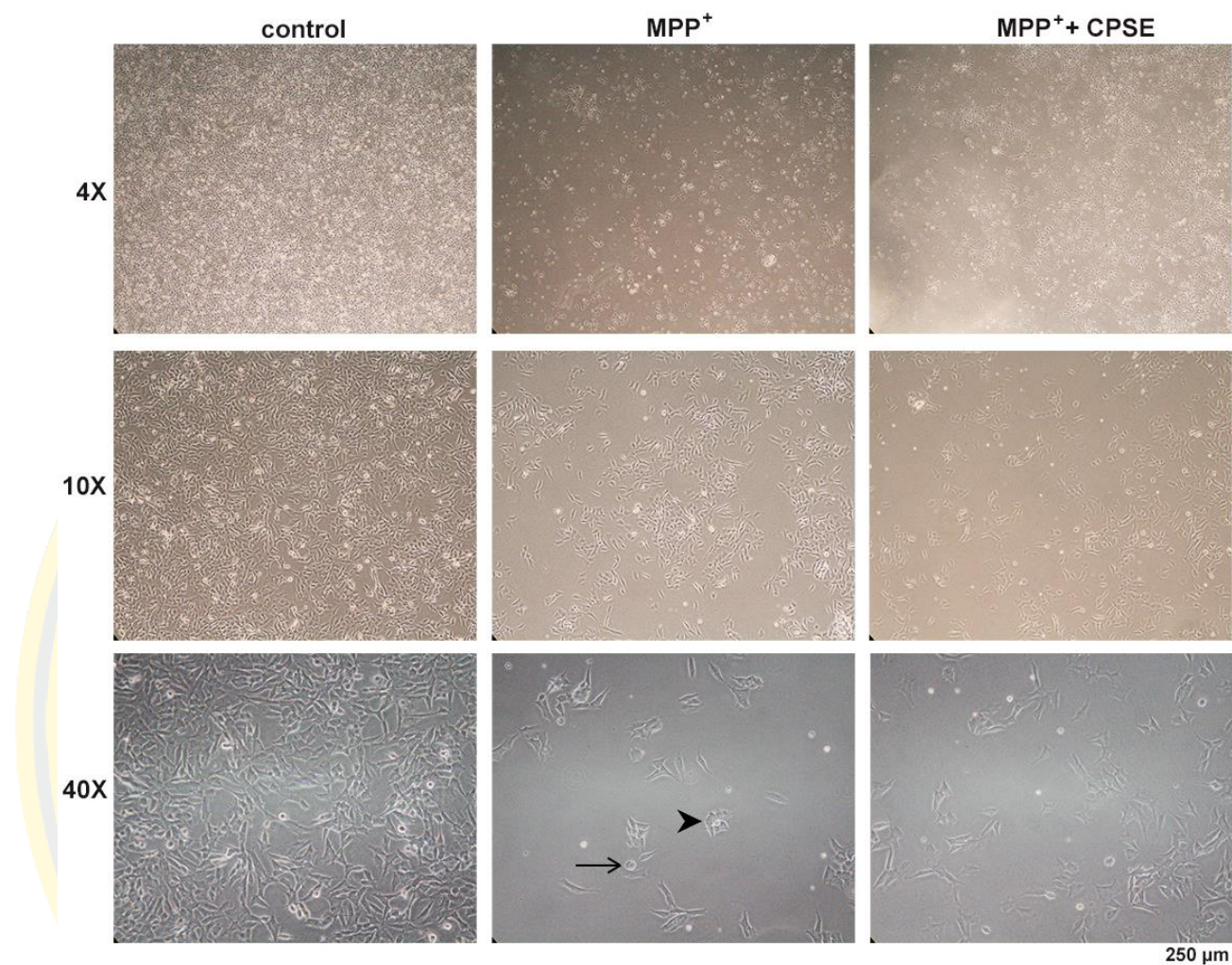
จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าการให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วน CPSE-E/H และ CPSE-E/EA แบบ pre-treatment กับเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ส่งผลให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y เพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกลุ่มที่ให้ CPSE-E/W จึงสรุปได้ว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วน CPSE-E/H และ CPSE-E/EA มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์จากการเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y



ภาพที่ 23 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ pre-treatment ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโตซิสด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงหลังให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ด้วยวิธี Western blot เทียบกับ Beta-actin (n=5, *** p<0.01 เทียบกับกลุ่มควบคุม; # p<0.05, ### p<0.01 เทียบกับกลุ่ม MPP⁺)

3. ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการยับยั้งการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺

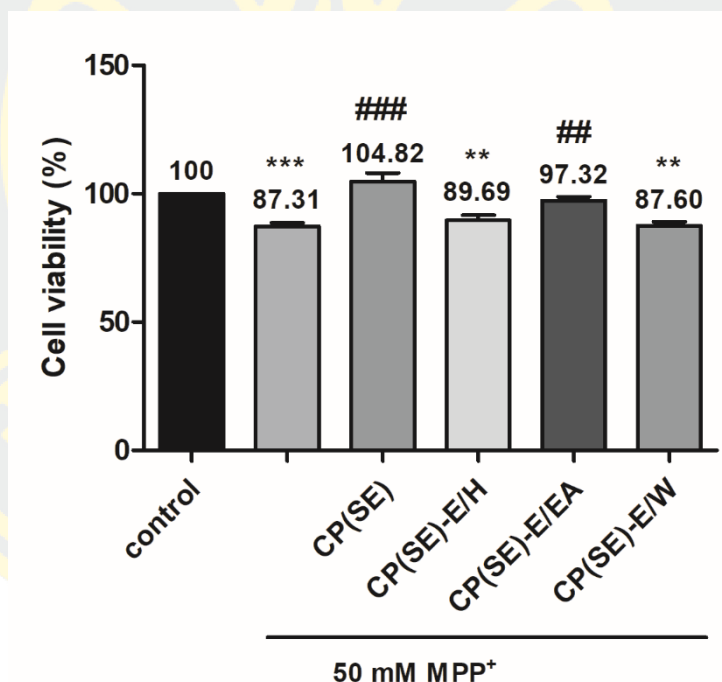
ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ SH-SY5Y ให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลาย (CPSE) ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ พบว่าเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีจำนวนเซลล์ลดลงและเกิดการตายของเซลล์โดยจะเห็นลักษณะการจับกลุ่มของโปรตีนและชิ้นส่วนของชิ้น DNA ภายในเซลล์ พบรูปร่างเซลล์หดตัวและไม่เกาะพื้นตั้งเกิดได้จากลักษณะการลอยและเรืองแสงของเซลล์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ภายใต้กล้อง และเมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์มีการตายลดลงและมีจำนวนของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ เพียงอย่างเดียว (ภาพที่ 24)



ภาพที่ 24 แสดงเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ ที่กำลังขยาย 4 10 และ 40 เท่า โดยแสดงเซลล์ที่ได้รับ 50 mM MPP⁺ และเซลล์ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CPSE) ที่ความเข้มข้น 10 μg/ml หลังจากได้รับ 50 mM MPP⁺ เทียบกับเซลล์กลุ่ม control (ลูกศรแสดงเซลล์ตาย, หัวลูกศรแสดงรูปร่างเซลล์หดตัว)

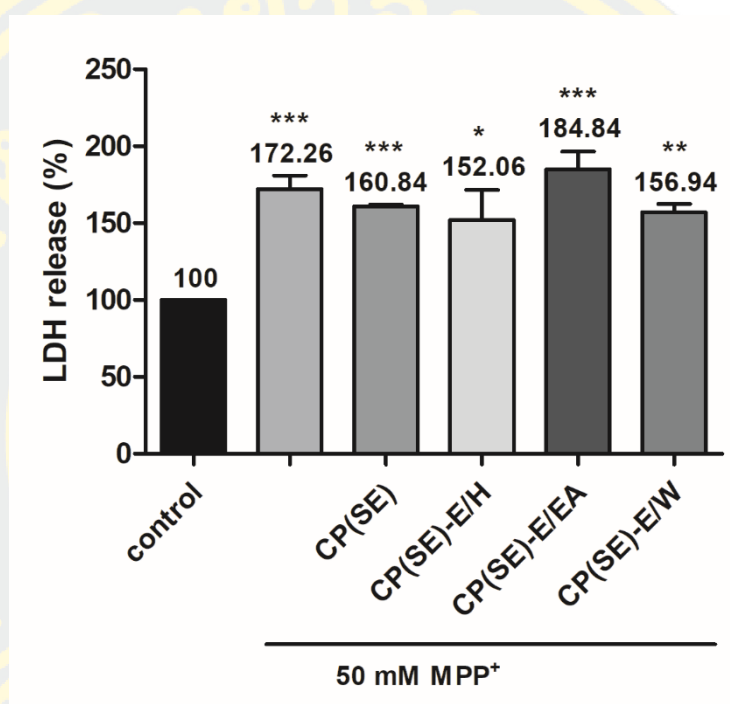
3.1 ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการยับยั้งการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอโทซิสด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี MTT และ LDH cytotoxicity (post-treatment)

เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลาย (CPSE) และเศษส่วนที่ผ่านการแยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง กับเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอโทซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้ววัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าเซลล์ที่ได้รับ CPSE มีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 104.82 และเซลล์ที่ได้รับเศษส่วน CPSE-E/EA มีอัตราการมีชีวิตของเซลล์ร้อยละ 97.32 ซึ่งมีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ 50 mM MPP⁺ แต่ไม่ได้รับสารสกัด ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับ CPSE-E/H และ CPE-E/W (ภาพที่ 25)



ภาพที่ 25 แสดงร้อยละของการมีชีวิตของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอโทซิสด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมงก่อนให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ด้วยวิธี MTT (n=5, *** p<0.001 เทียบกับกลุ่มควบคุม; ## p<0.025, ### p<0.001 เทียบกับกลุ่ม MPP⁺)

และเมื่อวัดอัตราการรั่วของเอนไซม์ LDH ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนทั้ง 3 ชนิด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธี LDH cytotoxicity พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนทุกชนิดมีระดับของเอนไซม์ LDH ในอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ แต่ไม่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 26)

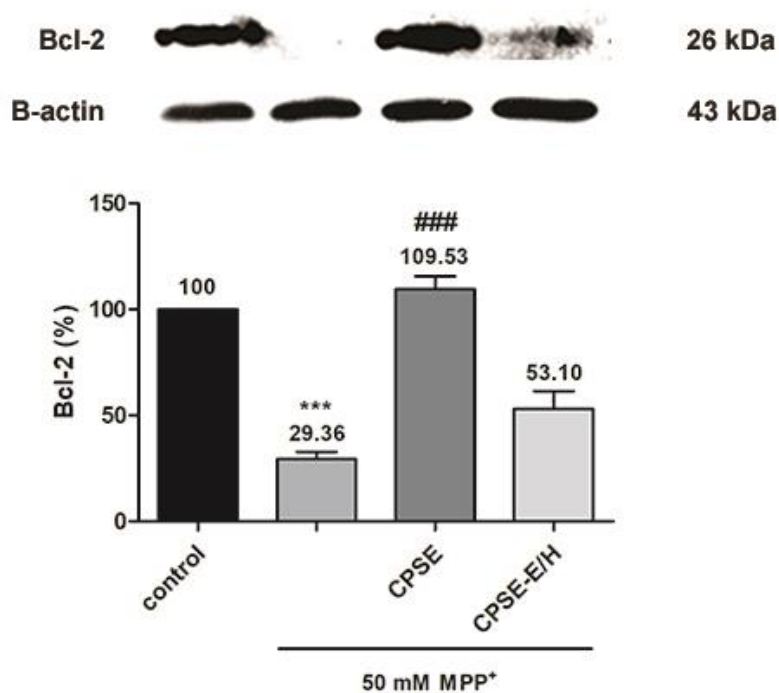


ภาพที่ 26 แสดงร้อยละการรั่วของเอนไซม์ LDH ของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) เอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) และน้ำ (CPSE-E/W) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ด้วยวิธี LDH cytotoxicity (n=5, * p<0.05; ** p<0.025; *** p<0.01 เทียบกับกลุ่มควบคุม)

3.2 ผลของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนต่อการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺ ด้วยวิธี Western blot (post-treatment)

ทำการเหนี่ยวนำเซลล์ SH-SY5Y ให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย 50 mM MPP⁺ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนทั้ง 3 ชนิด ความเข้มข้น 10 µg/ml กับเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทดสอบการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ด้วยวิธี Western blot พบว่าเซลล์ที่ได้รับ CPSE มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับเซลล์ที่ได้รับ MPP⁺ เพียงอย่างเดียว โดยเซลล์ที่ได้รับ CPSE มีการแสดงออกของโปรตีนมากถึงร้อยละ 107.53 ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้รับสารสกัดมีการแสดงออกของโปรตีนเพียงร้อยละ 29.36 แต่ไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับ CPSE-E/H (ภาพที่ 27) เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับ CPSE-E/EA และ CPSE-E/W ซึ่งมีการแสดงออกของโปรตีนไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับ MPP⁺ แต่ไม่ได้รับสารสกัด (ไม่ได้แสดงไว้ในภาพ)

จากผลการทดสอบสรุปได้ว่าการให้สารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนแบบ post-treatment กับเซลล์ SH-SY5Y ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสด้วย MPP⁺ ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการมีชีวิตเพิ่มมากขึ้นและมีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 โดยพบว่าเซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดอะพอพโทซิสแล้วได้รับสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลายเกิดการยับยั้งการตายของเซลล์ได้ แต่ในกลุ่มที่ได้รับเศษส่วน CPSE-E/H และ CPSE-E/EA ให้ผลการทดสอบที่ยังไม่แน่ชัดและไม่มีความแตกต่างทางสถิติในกลุ่มที่ได้รับเศษส่วน CPSE-E/W



ภาพที่ 27 การแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ในเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับสารสกัดแบบ post-treatment ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดความเป็นพิษด้วย MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ก่อนให้สารสกัดจากเมล็ดกระถางลายแบบสกัดหยาบ (CPSE) และแบบเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ด้วยวิธี Western blot เทียบกับ beta-actin (n=5, *** p<0.001 เทียบกับกลุ่มควบคุม; ### p<0.001 เทียบกับกลุ่ม MPP⁺)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย (Discussion and conclusions)

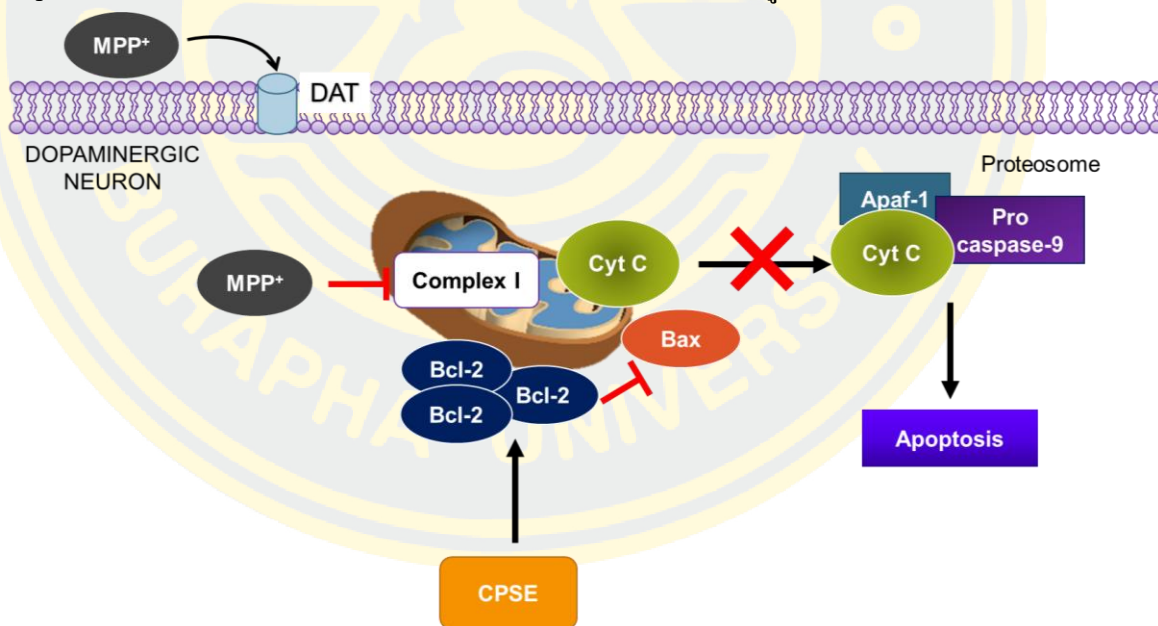
ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายและเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ประสาทและยับยั้งการเกิดอะพอพโตซิส โดยเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ส่งผลให้เพิ่มการมีชีวิตของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง SH-SY5Y จากการเหนี่ยวนำด้วย MPP⁺ มีการศึกษาจำนวนมากทำการศึกษารื่องความเป็นพิษของสารในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด SH-SY5Y รวมถึงใช้เป็นแบบจำลองของโรคทางระบบประสาทต่างๆ ได้แก่ โรคอัลไซเมอร์ โรคสมองขาดเลือด โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง รวมถึงโรคพาร์กินสัน เช่นเดียวกันกับการศึกษานี้ที่ใช้เซลล์ SH-SY5Y เป็นแบบจำลองของโรคพาร์กินสัน โดยใช้ MPP⁺ ในการเหนี่ยวนำให้ไมโทคอนเดรียทำงานผิดปกติส่งผลให้เกิดการตายแบบอะพอพโตซิสแบบ intrinsic pathway ซึ่ง MPP⁺ จะมีความจำเพาะต่อเซลล์ประสาทโดปามีนเนื่องจากผ่านเข้าสู่เซลล์ประสาทได้ทาง DAT (Jackson-Lewis & Smeyne, 2005) ก่อเป็นสารพิษที่มีความจำเพาะต่อเซลล์ประสาทที่สร้างสารสื่อประสาทโดปามีน และเข้าสู่ไมโทคอนเดรียได้หลายวิธี ได้แก่ electron transport chain หรือ monoamine transport เมื่อ MPP⁺ เข้าสู่ไมโทคอนเดรียแล้วจะยับยั้ง complex I ในกระบวนการ electron transport chain ส่งผลให้การสร้าง ATP ลดลง และมีปริมาณ superoxide และ oxidative stress เพิ่มขึ้น จึงเกิดการเปลี่ยนแปลงความต่างศักย์ไฟฟ้าที่เยื่อหุ้มเซลล์ที่ทำให้เกิด permeability transition pore และเกิดการหลั่ง cytochrome C ออกสู่ cytosol ของเซลล์ ซึ่ง cytochrome C เป็น apoptogenic factor สามารถจับกับ apoptotic protease-activating factor-1 (Apaf-1) และไปรวมตัวกับ procaspase-9 เป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome ซึ่ง procaspase-9 จะเปลี่ยนรูปไปเป็น caspase-9 และกระตุ้น caspase-3 นำไปสู่การตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิส (Wu & Bratton, 2013; Zeng et al., 2018) นอกจากนี้ยังมีโปรตีน apoptosis-inducing factor อื่นๆที่หลั่งออกจากไมโทคอนเดรีย รวมถึงปริมาณ ROS ที่เพิ่มขึ้นภายในเซลล์เหนี่ยวนำให้เกิดการหดตัวของโครมาตินและเกิดการแตกตัวของ DNA ซึ่งสามารถกระตุ้นกระบวนการเกิดอะพอพโตซิสผ่านโปรตีน Cellular tumor antigen p53 (p53) โดยไปยับยั้งการทำงานของโปรตีน Bcl-2 เป็นที่ทราบกันดีว่า โปรตีน Bcl-2 เป็นโปรตีนในกลุ่ม anti-apoptosis ที่ช่วยป้องกันการตายของเซลล์ ซึ่งมีความสำคัญในกระบวนการเกิดอะพอพโตซิสแบบ intrinsic pathway โดยมีหน้าที่ยับยั้งการเปลี่ยนแปลงของ permeability ของไมโทคอนเดรียเพื่อยับยั้งการหลั่ง cytochrome C และช่วยเพิ่มการขับโปรตอนออกจากไมโทคอนเดรียเพื่อไม่ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการซึมผ่านและการเปลี่ยนแปลง membrane potential การทำงานของ Bcl-2 จะถูก

กระตุ้นได้ด้วยโปรตีน pro-apoptosis และโปรตีนที่เกิดจาก caspase cascade ในกระบวนการอะพอพโตซิส ซึ่งเมื่อมีการแสดงออกของ Bcl-2 จำนวนมากทำให้เซลล์มีการตายลดลง (Xu et al., 2015)

เมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายกับเซลล์ SH-SY5Y ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลาต่างกัน พบว่าอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นหลังจากได้รับสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และเมื่อได้รับเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงกลับพบว่าอัตราการมีชีวิตของเซลล์ของเซลล์ลดน้อยลง ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดกระทงลายมีประสิทธิภาพที่ดีที่สุดในเวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งจากผลการทดลองส่งผลให้เซลล์มีจำนวนมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจึงอาจต้องทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยดูจาก ปริมาณของ growth factor ที่เกี่ยวข้อง และเมื่อให้สารสกัดจากเมล็ดกระทงลายทั้งแบบสกัดหยาบ CPSE และเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซน (CPSE-E/H) และเอทิลอะซิเตท (CPSE-E/EA) ที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทั้งแบบ pre-treatment และ post-treatment แก่เซลล์ SH-SY5Y พบว่าเซลล์มีอัตราการตายแบบอะพอพโตซิสที่ลดลง ในขณะเดียวกันเมื่อให้สารสกัดเศษส่วนที่แยกด้วยน้ำ ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงทั้งแบบ pre-treatment และ post-treatment แก่เซลล์ SH-SY5Y ให้ผลไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด และจากรายงานของ Ito K. และคณะก่อนหน้านี้พบว่า MPP⁺ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดลักษณะการรวมของไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นข้อบ่งชี้การเกิด necrosis ร่วมด้วย (Ito et al., 2017) จึงทำการศึกษาดังวิธี LDH cytotoxicity เพิ่มเติม พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ MPP⁺ ที่ความเข้มข้น 50 mM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง อัตราการรั่วของเอนไซม์ LDH ในอาหารเลี้ยงเซลล์เพิ่มมากขึ้นแสดงถึงอัตราการตายของเซลล์ที่เพิ่มมากขึ้น และเมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลาย CPSE และเศษส่วน CPSE-E/H และ CPSE-E/EA แบบ pre-treatment อัตราการรั่วของเอนไซม์ LDH ลดลง จึงสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระทงลายและเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซนและเอทิลอะซิเตทสามารถป้องกันการตายของเซลล์ SH-SY5Y ที่ได้รับ MPP⁺ ได้ ซึ่งแตกต่างจากการให้สารสกัดแบบ post-treatment เนื่องจากเซลล์ถูกทำให้เกิดอะพอพโตซิสก่อนและเกิดการหลั่งของเอนไซม์ LDH ออกมาผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ทำให้อัตราการทำงาน LDH ในแต่ละกลุ่มไม่แตกต่างกัน ดังนั้นการให้สารสกัดแบบ pre-treatment จึงเหมาะสมและมีประสิทธิภาพในศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์ประสาทมากกว่าแบบ post-treatment แต่อย่างไรก็ตามมีการศึกษาในสารสกัดจากกระทงลายทั้งต้นที่สกัดด้วยเมทานอลและแยกความเข้มข้นด้วยเฮกเซนพบว่ามียูบิกวิตินในการกระตุ้นการเกิดอะพอพโตซิสและ autophagy ในเซลล์เพาะเลี้ยง MCF-7 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเต้านม โดยลดการแสดงออกของ p-Akt และ NF-KB ความคุมการเกิดอะพอพโตซิส (Weng, Yen, & Lin, 2013) ซึ่งขัดแย้งกับผลการทดลองนี้ ดังนั้นจึงควรมี

การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายต่อการเกิดอะพอพโตซิสในเซลล์เพาะเลี้ยงที่เป็นเซลล์ปกติเพิ่มเติม

จากผลการทดลองอัตราการมีชีวิตของเซลล์มีความสัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ซึ่งเป็น โปรตีน anti-apoptosis เมื่อเซลล์ได้รับสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลาย CPSE และเศษส่วน CPSE-E/H และ CPSE-E/EA ทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มมากขึ้นส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้นเช่นกันเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารสกัด (ภาพที่ 28) มีความสอดคล้องกับงานวิจัยของ K.H. Kumar และคณะ (2015) ที่ระบุว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายสามารถยับยั้งการเกิดการตายของเซลล์แบบอะพอพโตซิสในเซลล์เพาะเลี้ยง C2C12 murine muscle cells โดยมีการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งยังมีปริมาณ cytochrome C ลดลง (Kumar et al., 2015) ซึ่งในงานวิจัยวิจัยนี้ยังขาดการศึกษาและดูการแสดงออกของโปรตีนอื่นๆที่เป็น marker สำคัญในกระบวนการเกิดอะพอพโตซิสแบบ intrinsic pathway เพิ่มเติมเช่น cytochrome C ที่บ่งชี้ถึงระยะก่อนเกิดอะพอพโตซิส และ โปรตีน caspase-9 และ caspase-3 ที่บ่งชี้ถึงระยะหลังเกิดอะพอพโตซิสเพื่อให้ผลการวิจัยสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น



ภาพที่ 28 แสดงฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายในการควบคุมการเกิดอะพอพโตซิส โดยสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายจะเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่บริเวณ outer-membrane ของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำหน้าที่ยับยั้งโปรตีน Bax ซึ่งเป็น pro-apoptosis และส่งผลให้ยับยั้งการหลั่ง Cytochrome C จากไมโทคอนเดรียจึงไม่เกิดกระบวนการอะพอพโตซิส

จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายเป็นสารที่มีขั้วต่ำ มีคุณสมบัติละลายได้ไม่ดีในน้ำ จึงทำให้ผลการศึกษาของสารสกัดเศษส่วนที่มีขั้วต่ำ ได้แก่ CPSE-E/H และขั้วกลาง ได้แก่ CPSE-E/EA มีฤทธิ์ป้องกันและยับยั้งการตายของเซลล์ได้มากกว่าเศษส่วนที่มีขั้วสูง ได้แก่ CPSE-E/W ซึ่งให้ผลไปในทางเดียวกับการศึกษาของ Alama และ Haque ในปี 2011 ที่รายงานว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายที่แยกเศษส่วนด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในขณะที่เศษส่วนที่แยกด้วยน้ำไม่มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ในการทดสอบด้วยวิธี DPPH (Alama & Haque, 2011) และต่อมาได้มีการศึกษาสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายด้วยเทคนิค Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) พบว่าในสารสกัดเมล็ดกระถางลายมีสารประเภท phenolic ประกอบมากถึง 99.2% ได้แก่ กรดปาล์มิติก ไฟทอล และไลนาลูล ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่พบได้ทั่วไปในพืช ซึ่งมีบทบาทในการต้านอนุมูลอิสระและลดการสร้าง ROS นอกจากนี้เมล็ดกระถางลายที่สกัดด้วยคลอโรฟอร์มมีส่วนประกอบของสาร phenolic เป็นหลัก และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (Arora & Pandey-Rai, 2014) และมีการศึกษาบ่งชี้ว่าสารออกฤทธิ์ของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายน่าจะเป็นสารที่อยู่ในกลุ่มแอลคาลอยด์ ได้แก่ Celastrol และ Paniculatin กลุ่มเทอร์ปีนอยด์ ได้แก่ phytol และ linalool กรดไขมัน กรดอะซิติก กรดเบนโซอิก สเตอรอล และเตตระโทซานอล ตามลักษณะทางชีวภาพของสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายซึ่งมีลักษณะเป็นน้ำมันหอมระเหย (Dwivedi & Maurya, 2018; Shashank et al., 2017) อย่างไรก็ตามมีการศึกษาในเมล็ดกระถางลายที่สกัดด้วยน้ำ โดยพบว่าสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายที่สกัดด้วยน้ำมีสารต้านอนุมูลอิสระ จากการทดสอบด้วยวิธี DPPH scavenging activity (Arora & Pandey-Rai, 2014) และสามารถเพิ่มพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำได้ในหนูแรทโดยลดการทำงานของเอนไซม์ acetylcholinesterase (AChE) ส่งผลให้มีสารสื่อประสาทประเภท acetylcholine (ACh) เพิ่มขึ้นในสมองหนู (Bhanumathy et al., 2010) และสามารถลดสารอนุมูลอิสระทั้งในสมองของหนูแรทและในเซลล์เพาะเลี้ยง FBNC (Godkar et al., 2003)

จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นแนวโน้มที่ชัดเจนว่าสารสกัดหยาบจากเมล็ดกระถางลาย และเศษส่วนที่แยกด้วยเฮกเซนมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ประสาท โดยสามารถเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ภายในเซลล์ประสาท SH-SY5Y นำไปสู่การยับยั้งการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย MPP^+ ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการมีชีวิตเพิ่มมากขึ้น ดังนั้นสารสกัดจากเมล็ดกระถางลายจึงสามารถนำมาพัฒนาเป็นยาทางเลือกในการรักษาและบรรเทาอาการของโรคทางระบบประสาท จึงน่าจะนำเศษส่วนของสารสกัดที่แยกด้วยเฮกเซน ไปศึกษาหาสารประกอบและสารออกฤทธิ์ด้วยวิธี Gas chromatography และนำไปทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ และในสัตว์ทดลองก่อนนำไปใช้รักษาผู้ป่วยโรคพาร์กินสันต่อไป

บรรณานุกรม

- Akao, Y., Maruyama, W., Yi, H., Shamoto-Nagai, M., Youdim, M. B., & Naoi, M. (2002). An anti-Parkinson's disease drug, N-propargyl-1(R)-aminoindan (rasagiline), enhances expression of anti-apoptotic bcl-2 in human dopaminergic SH-SY5Y cells. *Neurosci Lett*, 326(2), 105-108. doi:10.1016/s0304-3940(02)00332-4
- Alama, B., & Haqu, E. (2011). Anti-Alzheimer and Antioxidant Activity of *Celastrus paniculatus* Seed. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 8.
- Alama, B., & Haque, E. (2011). Anti-Alzheimer and Antioxidant Activity of *Celastrus paniculatus* Seed. *Iranian Journal of Pharmaceutical Sciences Winter*, 7(1), 8.
- Ali, K., & Morris, H. R. (2015). Parkinson's disease: chameleons and mimics. *Pract Neurol*, 15(1), 14-25. doi:10.1136/practneurol-2014-000849
- Anglade, P., Vyas, S., Hirsch, E. C., & Agid, Y. (1997). Apoptosis in dopaminergic neurons of the human substantia nigra during normal aging. *Histol Histopathol*, 12(3), 603-610.
- Arora, N., & Pandey-Rai, S. (2014). GC-MS analysis of the essential oil of *Celastrus paniculatus* Willd. seeds and antioxidant, anti-inflammatory study of its various solventextracts. *Industrial Crops and Products*, 61, 7.
- Avinash, D. K., & Waman, S. N. (2014). Phytochemical Constituents of Leaves of *Celastrus Paniculatus* Willd: Endangered Medicinal Plant. *International Journal of Pharmacognosy and Phytochemical Research*, 6(4), 3.
- Basu, N. K., & Pabrai, P. R. (1946). A chemical investigation of *Celastrus paniculata* Willd. *J Am Pharm Assoc Am Pharm Assoc*, 35(9), 272. doi:10.1002/jps.3030350906
- Bedford, L., Hay, D., Devoy, A., Paine, S., Powe, D. G., Seth, R., . . . Mayer, R. J. (2008). Depletion of 26S proteasomes in mouse brain neurons causes neurodegeneration and Lewy-like inclusions resembling human pale bodies. *J Neurosci*, 28(33), 8189-8198. doi:10.1523/JNEUROSCI.2218-08.2008
- Beitz, J. M. (2014). Parkinson's disease: a review. *Front Biosci (Schol Ed)*, 6, 65-74. doi:10.2741/s415
- Betarbet, R., Sherer, T. B., MacKenzie, G., Garcia-Osuna, M., Panov, A. V., & Greenamyre, J. T. (2000). Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat*

Neurosci, 3(12), 1301-1306. doi:10.1038/81834

- Bhanumathy, M., Harish, M. S., Shivaprasad, H. N., & Sushma, G. (2010). Nootropic activity of *Celastrus paniculatus* seed. *Pharm Biol*, 48(3), 324-327. doi:10.3109/13880200903127391
- Bhidayasiri, R., Wannachai, N., Limpabandhu, S., Choeytim, S., Suchonwanich, Y., Tananyakul, S., . . . Asawavichienjinda, T. (2011). A national registry to determine the distribution and prevalence of Parkinson's disease in Thailand: implications of urbanization and pesticides as risk factors for Parkinson's disease. *Neuroepidemiology*, 37(3-4), 222-230. doi:10.1159/000334440
- Bindoff, L. A., Birch-Machin, M. A., Cartlidge, N. E., Parker, W. D., Jr., & Turnbull, D. M. (1991). Respiratory chain abnormalities in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *J Neurol Sci*, 104(2), 203-208. doi:10.1016/0022-510x(91)90311-t
- Biochemistry, D. o. C. a. (2017). Polarity of Solvents. Retrieved from <https://research.cbc.osu.edu/turro.1/wp-content/uploads/2017/02/PolarityofSolvents.pdf>
- Blandini, F., Cosentino, M., Mangiagalli, A., Marino, F., Samuele, A., Rasini, E., . . . Nappi, G. (2004). Modifications of apoptosis-related protein levels in lymphocytes of patients with Parkinson's disease. The effect of dopaminergic treatment. *J Neural Transm (Vienna)*, 111(8), 1017-1030. doi:10.1007/s00702-004-0123-1
- Blandini, F., Mangiagalli, A., Cosentino, M., Marino, F., Samuele, A., Rasini, E., . . . Nappi, G. (2003). Peripheral markers of apoptosis in Parkinson's disease: the effect of dopaminergic drugs. *Ann NY Acad Sci*, 1010, 675-678. doi:10.1196/annals.1299.123
- Bordia, T., McGregor, M., Papke, R. L., Decker, M. W., McIntosh, J. M., & Quik, M. (2015). The alpha7 nicotinic receptor agonist ABT-107 protects against nigrostriatal damage in rats with unilateral 6-hydroxydopamine lesions. *Exp Neurol*, 263, 277-284. doi:10.1016/j.expneurol.2014.09.015
- Carroll, R. G., Hollville, E., & Martin, S. J. (2014). Parkin sensitizes toward apoptosis induced by mitochondrial depolarization through promoting degradation of Mcl-1. *Cell Rep*, 9(4), 1538-1553. doi:10.1016/j.celrep.2014.10.046
- Chamniansawat, s., Proyhkunthod, P., & Thongon, N. (2020). *Celastrus Paniculatus* Seed Extract Protects Neuron Against MPP+-Induced Toxicity in Parkinson's Disease Model. *Journal of Community Development and Life Quality*, 8(2), 14.

- Chaudhuri, K. R., Healy, D. G., Schapira, A. H., & National Institute for Clinical, E. (2006). Non-motor symptoms of Parkinson's disease: diagnosis and management. *Lancet Neurol*, *5*(3), 235-245. doi:10.1016/S1474-4422(06)70373-8
- Chen, J. F., Xu, K., Petzer, J. P., Staal, R., Xu, Y. H., Beilstein, M., . . . Schwarzschild, M. A. (2001). Neuroprotection by caffeine and A(2A) adenosine receptor inactivation in a model of Parkinson's disease. *J Neurosci*, *21*(10), RC143.
- Chen, R. C., Chang, S. F., Su, C. L., Chen, T. H., Yen, M. F., Wu, H. M., . . . Liou, H. H. (2001). Prevalence, incidence, and mortality of PD: a door-to-door survey in Ilan county, Taiwan. *Neurology*, *57*(9), 1679-1686. doi:10.1212/wnl.57.9.1679
- Chinnaiyan, A. M. (1999). The apoptosome: heart and soul of the cell death machine. *Neoplasia*, *1*(1), 5-15. doi:10.1038/sj.neo.7900003
- Choi, W. S., Yoon, S. Y., Oh, T. H., Choi, E. J., O'Malley, K. L., & Oh, Y. J. (1999). Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP+-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspases, ROS, and JNK. *J Neurosci Res*, *57*(1), 86-94. doi:10.1002/(SICI)1097-4547(19990701)57:1<86::AID-JNR9>3.0.CO;2-E
- Daubner, S. C., Le, T., & Wang, S. (2011). Tyrosine hydroxylase and regulation of dopamine synthesis. *Arch Biochem Biophys*, *508*(1), 1-12. doi:10.1016/j.abb.2010.12.017
- DeMaagd, G., & Philip, A. (2015). Parkinson's Disease and Its Management: Part 1: Disease Entity, Risk Factors, Pathophysiology, Clinical Presentation, and Diagnosis. *P T*, *40*(8), 504-532.
- Deodhar, K. A., & Shinde, N. W. (2015a). *Celastrus paniculatus*: Traditional uses and Ethnobotanical study. *Indian Journal of Advances in Plant Research (IJAPR)*, *2*(1), 4.
- Deodhar, K. A., & Shinde, N. W. (2015b). CELASTRUS PANICULATUS; MEDICINAL AND PHARMACOLOGICAL PROPERTIES: A REVIEW. *International Journal of Development Research*, *5*(9), 6.
- Di Monte, D., Sandy, M. S., Ekstrom, G., & Smith, M. T. (1986). Comparative studies on the mechanisms of paraquat and 1-methyl-4-phenylpyridine (MPP+) cytotoxicity. *Biochem Biophys Res Commun*, *137*(1), 303-309. doi:10.1016/0006-291x(86)91210-6
- Dlugosz, P. J., Billen, L. P., Annis, M. G., Zhu, W., Zhang, Z., Lin, J., . . . Andrews, D. W. (2006). Bcl-2 changes conformation to inhibit Bax oligomerization. *EMBO J*, *25*(11), 2287-2296. doi:10.1038/sj.emboj.7601126

- Ebrahimi-Fakhari, D., Wahlster, L., & McLean, P. J. (2012). Protein degradation pathways in Parkinson's disease: curse or blessing. *Acta Neuropathol*, 124(2), 153-172. doi:10.1007/s00401-012-1004-6
- Eggert, K., Schrader, C., Hahn, M., Stamelou, M., Russmann, A., Dengler, R., . . . Odin, P. (2008). Continuous jejunal levodopa infusion in patients with advanced parkinson disease: practical aspects and outcome of motor and non-motor complications. *Clin Neuropharmacol*, 31(3), 151-166. doi:10.1097/wnf.0b013e31814b113e
- Elbaz, A., Clavel, J., Rathouz, P. J., Moisan, F., Galanaud, J. P., Delemotte, B., . . . Tzourio, C. (2009). Professional exposure to pesticides and Parkinson disease. *Ann Neurol*, 66(4), 494-504. doi:10.1002/ana.21717
- Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol*, 35(4), 495-516. doi:10.1080/01926230701320337
- Erekat, N. S. (2018). Apoptosis and its Role in Parkinson's Disease. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Brisbane (AU).
- Estornell, J., Echanove, I., Paya, R., J. L. P., J. V. V., & Montero, B. (2001). [Endomyocardial fibrosis. Presentation as a right ventricular tumor]. *Rev Esp Cardiol*, 54(5), 655-657. doi:10.1016/s0300-8932(01)76371-3
- Giguere, N., Burke Nanni, S., & Trudeau, L. E. (2018). On Cell Loss and Selective Vulnerability of Neuronal Populations in Parkinson's Disease. *Front Neurol*, 9, 455. doi:10.3389/fneur.2018.00455
- Godkar, P., Gordon, R. K., Ravindran, A., & Doctor, B. P. (2003). Celastrus paniculatus seed water soluble extracts protect cultured rat forebrain neuronal cells from hydrogen peroxide-induced oxidative injury. *Fitoterapia*, 74(7-8), 658-669. doi:10.1016/s0367-326x(03)00190-4
- Godkar, P. B., Gordon, R. K., Ravindran, A., & Doctor, B. P. (2004). Celastrus paniculatus seed water soluble extracts protect against glutamate toxicity in neuronal cultures from rat forebrain. *J Ethnopharmacol*, 93(2-3), 213-219. doi:10.1016/j.jep.2004.03.051
- Godkar, P. B., Gordon, R. K., Ravindran, A., & Doctor, B. P. (2006). Celastrus paniculatus seed oil and organic extracts attenuate hydrogen peroxide- and glutamate-induced injury in embryonic rat forebrain neuronal cells. *Phytomedicine*, 13(1-2), 29-36.

doi:10.1016/j.phymed.2003.11.011

- Goldstein, D. S., Sewell, L., & Sharabi, Y. (2011). Autonomic dysfunction in PD: a window to early detection? *J Neurol Sci*, *310*(1-2), 118-122. doi:10.1016/j.jns.2011.04.011
- Greenland, J. C., & Barker, R. A. (2018). The Differential Diagnosis of Parkinson's Disease. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Brisbane (AU).
- Guan, S., Jiang, B., Bao, Y. M., & An, L. J. (2006). Protocatechuic acid suppresses MPP⁺-induced mitochondrial dysfunction and apoptotic cell death in PC12 cells. *Food Chem Toxicol*, *44*(10), 1659-1666. doi:10.1016/j.fct.2006.05.004
- Hartmann, A., Michel, P. P., Troadec, J. D., Mouatt-Prigent, A., Faucheux, B. A., Ruberg, M., . . . Hirsch, E. C. (2001). Is Bax a mitochondrial mediator in apoptotic death of dopaminergic neurons in Parkinson's disease? *J Neurochem*, *76*(6), 1785-1793. doi:10.1046/j.1471-4159.2001.00160.x
- Hartmann, A., Mouatt-Prigent, A., Vila, M., Abbas, N., Perier, C., Faucheux, B. A., . . . Hirsch, E. C. (2002). Increased expression and redistribution of the antiapoptotic molecule Bcl-xL in Parkinson's disease. *Neurobiol Dis*, *10*(1), 28-32. doi:10.1006/nbdi.2002.0494
- Hernandez, S. M., Tikhonova, E. B., & Karamyshev, A. L. (2020). Protein-Protein Interactions in Alpha-Synuclein Biogenesis: New Potential Targets in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, *12*, 72. doi:10.3389/fnagi.2020.00072
- Ito, K., Eguchi, Y., Imagawa, Y., Akai, S., Mochizuki, H., & Tsujimoto, Y. (2017). MPP⁺ induces necrostatin-1- and ferrostatin-1-sensitive necrotic death of neuronal SH-SY5Y cells. *Cell Death Discov*, *3*, 17013. doi:10.1038/cddiscovery.2017.13
- Iwahashi, H., Eguchi, Y., Yasuhara, N., Hanafusa, T., Matsuzawa, Y., & Tsujimoto, Y. (1997). Synergistic anti-apoptotic activity between Bcl-2 and SMN implicated in spinal muscular atrophy. *Nature*, *390*(6658), 413-417. doi:10.1038/37144
- Jackson-Lewis, V., & Smeyne, R. J. (2005). From Man to Mouse: The MPTP Model of Parkinson Disease. In E. L. Lane & S. B. Dunnett (Eds.), *Animal Models of Movement Disorders* (pp. 149-160): Humana Press.
- Jankovic, J. (2008). Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, *79*(4), 368-376. doi:10.1136/jnnp.2007.131045

- Jankovic, J., Schwartz, K. S., & Ondo, W. (1999). Re-emergent tremor of Parkinson's disease. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, 67(5), 646-650. doi:10.1136/jnnp.67.5.646
- Kaewwilai, L. (2020). How Community Nurse Practitioners Screen for Parkinson's Disease in the Community. *Journal of Public Health Nursing*, 34(2), 130-142.
- Kalia, L. V., Brotchie, J. M., & Fox, S. H. (2013). Novel nondopaminergic targets for motor features of Parkinson's disease: review of recent trials. *Mov Disord*, 28(2), 131-144. doi:10.1002/mds.25273
- Kharbanda, S., Pandey, P., Schofield, L., Israels, S., Roncinske, R., Yoshida, K., . . . Kufe, D. (1997). Role for Bcl-xL as an inhibitor of cytosolic cytochrome C accumulation in DNA damage-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(13), 6939-6942. doi:10.1073/pnas.94.13.6939
- Khwanraj, K., Phruksaniyom, C., Madlah, S., & Dharmasaroja, P. (2015). Differential Expression of Tyrosine Hydroxylase Protein and Apoptosis-Related Genes in Differentiated and Undifferentiated SH-SY5Y Neuroblastoma Cells Treated with MPP(.). *Neurol Res Int*, 2015, 734703. doi:10.1155/2015/734703
- Kier, C., Seidel, G., Brüggemann, N., Hagenah, J., Klein, C., Aach, T., & Mertins, A. (2009). *Transcranial sonography as early indicator for genetic Parkinson's disease*. Paper presented at the 4th European Conference of the International Federation for Medical and Biological Engineering.
- Kitada, T., Asakawa, S., Hattori, N., Matsumine, H., Yamamura, Y., Minoshima, S., . . . Shimizu, N. (1998). Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*, 392(6676), 605-608. doi:10.1038/33416
- Kothavade, P. S., Bulani, V. D., Deshpande, P. S., Chowdhury, A. S., & Juvekar, A. R. (2015). The petroleum ether fraction of *Celastrus paniculatus* Willd. seeds demonstrates anti-arthritic effect in adjuvant-induced arthritis in rats. *Journal of Traditional Chinese Medical Sciences*, 2(3), 11.
- Kouli, A., Torsney, K. M., & Kuan, W. L. (2018). Parkinson's Disease: Etiology, Neuropathology, and Pathogenesis. In T. B. Stoker & J. C. Greenland (Eds.), *Parkinson's Disease: Pathogenesis and Clinical Aspects*. Brisbane (AU).
- Kulkarni, Y. A., Agarwal, S., & Garud, M. S. (2015). Effect of Jyotishmati (*Celastrus paniculatus*)

- seeds in animal models of pain and inflammation. *J Ayurveda Integr Med*, 6(2), 82-88. doi:10.4103/0975-9476.146540
- Kumar, K. H., Venuprasad, M. P., Jayashree, G. V., Rachitha, P., Krupashree, K., Pal, A., & Khanum, F. (2015). *Celastrus paniculatus* Willd. mitigates t-BHP induced oxidative and apoptotic damage in C2C12 murine muscle cells. *Cytotechnology*, 67(6), 955-967. doi:10.1007/s10616-014-9733-0
- Kumar, M. H., & Gupta, Y. K. (2002). Antioxidant property of *Celastrus paniculatus* willd.: a possible mechanism in enhancing cognition. *Phytomedicine*, 9(4), 302-311. doi:10.1078/0944-7113-00136
- Kumar, P., Nagarajan, A., & Uchil, P. D. (2018). Analysis of Cell Viability by the Lactate Dehydrogenase Assay. *Cold Spring Harb Protoc*, 2018(6). doi:10.1101/pdb.prot095497
- Lee, H. J., Khoshaghideh, F., Patel, S., & Lee, S. J. (2004). Clearance of alpha-synuclein oligomeric intermediates via the lysosomal degradation pathway. *J Neurosci*, 24(8), 1888-1896. doi:10.1523/JNEUROSCI.3809-03.2004
- Lekha, G., Mohan, K., & Samy, I. A. (2010). Effect of *Celastrus paniculatus* seed oil (Jyothismati oil) on acute and chronic immobilization stress induced in swiss albino mice. *Pharmacognosy Res*, 2(3), 169-174. doi:10.4103/0974-8490.65512
- Lev, N., Melamed, E., & Offen, D. (2003). Apoptosis and Parkinson's disease. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*, 27(2), 245-250. doi:10.1016/S0278-5846(03)00019-8
- Liu, J., Liu, W., Lu, Y., Tian, H., Duan, C., Lu, L., . . . Yang, H. (2018). Piperlongumine restores the balance of autophagy and apoptosis by increasing BCL2 phosphorylation in rotenone-induced Parkinson disease models. *Autophagy*, 14(5), 845-861. doi:10.1080/15548627.2017.1390636
- Liu, J., Liu, W., & Yang, H. (2019). Balancing Apoptosis and Autophagy for Parkinson's Disease Therapy: Targeting BCL-2. *ACS Chem Neurosci*, 10(2), 792-802. doi:10.1021/acchemneuro.8b00356
- Loeffler, D. A., Camp, D. M., & Conant, S. B. (2006). Complement activation in the Parkinson's disease substantia nigra: an immunocytochemical study. *J Neuroinflammation*, 3, 29. doi:10.1186/1742-2094-3-29

- Lu, Y., Yang, S., Zou, Z., Luo, X., Chen, H., & Xu, L. (2006). Evonoinoate Sesquiterpene Alkaloids from the Stem of *Celastrus paniculatus*. *ChemInform*, 37(42).
- Ma, C., Pan, Y., Yang, Z., Meng, Z., Sun, R., Wang, T., . . . Fan, W. (2016). Pre-administration of BAX-inhibiting peptides decrease the loss of the nigral dopaminergic neurons in rats. *Life Sci*, 144, 113-120. doi:10.1016/j.lfs.2015.11.019
- Massano, J., & Bhatia, K. P. (2012). Clinical approach to Parkinson's disease: features, diagnosis, and principles of management. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(6), a008870. doi:10.1101/cshperspect.a008870
- McGeer, P. L., Itagaki, S., Boyes, B. E., & 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(8), 1285-1291. doi:10.1212/wnl.38.8.1285
- Mei, J. M., & Niu, C. S. (2014). Effects of CDNF on 6-OHDA-induced apoptosis in PC12 cells via modulation of Bcl-2/Bax and caspase-3 activation. *Neurol Sci*, 35(8), 1275-1280. doi:10.1007/s10072-014-1700-1
- Mogi, M., Togari, A., Kondo, T., Mizuno, Y., Komure, O., Kuno, S., . . . Nagatsu, T. (2000). Caspase activities and tumor necrosis factor receptor R1 (p55) level are elevated in the substantia nigra from parkinsonian brain. *J Neural Transm (Vienna)*, 107(3), 335-341. doi:10.1007/s007020050028
- Mosmann, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65(1-2), 55-63. doi:10.1016/0022-1759(83)90303-4
- Nakamura, N. (2018). Ubiquitin System. *Int J Mol Sci*, 19(4). doi:10.3390/ijms19041080
- Nalini, K., Karanth, K. S., Rao, A., & Aroor, A. R. (1995). Effects of *Celastrus paniculatus* on passive avoidance performance and biogenic amine turnover in albino rats. *J Ethnopharmacol*, 47(2), 101-108. doi:10.1016/0378-8741(95)01264-e
- Nichols, W. C., Pankratz, N., Marek, D. K., Pauciulo, M. W., Elsaesser, V. E., Halter, C. A., . . . Parkinson Study Group, P. I. (2009). Mutations in GBA are associated with familial Parkinson disease susceptibility and age at onset. *Neurology*, 72(4), 310-316. doi:10.1212/01.wnl.0000327823.81237.d1
- Noyce, A. J., Bestwick, J. P., Silveira-Moriyama, L., Hawkes, C. H., Giovannoni, G., Lees, A. J., &

- Schrag, A. (2012). Meta-analysis of early nonmotor features and risk factors for Parkinson disease. *Ann Neurol*, 72(6), 893-901. doi:10.1002/ana.23687
- O'Sullivan, S. S., Williams, D. R., Gallagher, D. A., Massey, L. A., Silveira-Moriyama, L., & Lees, A. J. (2008). Nonmotor symptoms as presenting complaints in Parkinson's disease: a clinicopathological study. *Mov Disord*, 23(1), 101-106. doi:10.1002/mds.21813
- Offen, D., Beart, P. M., Cheung, N. S., Pascoe, C. J., Hochman, A., Gorodin, S., . . . Bernard, O. (1998). Transgenic mice expressing human Bcl-2 in their neurons are resistant to 6-hydroxydopamine and 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine neurotoxicity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(10), 5789-5794. doi:10.1073/pnas.95.10.5789
- Opferman, J. T., & Kothari, A. (2018). Anti-apoptotic BCL-2 family members in development. *Cell Death Differ*, 25(1), 37-45. doi:10.1038/cdd.2017.170
- Palle, S., Kanakalatha, A., & Kavitha, C. N. (2018). Gastroprotective and Antiulcer Effects of *Celastrus paniculatus* Seed Oil Against Several Gastric Ulcer Models in Rats. *J Diet Suppl*, 15(4), 373-385. doi:10.1080/19390211.2017.1349231
- Pan, T., Kondo, S., Le, W., & Jankovic, J. (2008). The role of autophagy-lysosome pathway in neurodegeneration associated with Parkinson's disease. *Brain*, 131(Pt 8), 1969-1978. doi:10.1093/brain/awm318
- Patil, R. H., Prakash, K., & Maheshwari, V. L. (2010). Hypolipidemic Effect of *Celastrus paniculatus* in Experimentally Induced Hypercholesterolemic Wistar Rats. *Indian J Clin Biochem*, 25(4), 405-410. doi:10.1007/s12291-010-0050-x
- Petros, A. M., Olejniczak, E. T., & Fesik, S. W. (2004). Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1644(2-3), 83-94. doi:10.1016/j.bbamcr.2003.08.012
- Pickrell, A. M., & Youle, R. J. (2015). The roles of PINK1, parkin, and mitochondrial fidelity in Parkinson's disease. *Neuron*, 85(2), 257-273. doi:10.1016/j.neuron.2014.12.007
- Polymeropoulos, M. H., Lavedan, C., Leroy, E., Ide, S. E., Dehejia, A., Dutra, A., . . . Nussbaum, R. L. (1997). Mutation in the alpha-synuclein gene identified in families with Parkinson's disease. *Science*, 276(5321), 2045-2047. doi:10.1126/science.276.5321.2045
- Riss, T. L., Moravec, R. A., Niles, A. L., Duellman, S., Benink, H. A., Worzella, T. J., & Minor, L. (2004). Cell Viability Assays. In G. S. Sittampalam, A. Grossman, K. Brimacombe, M. Arkin, D. Auld, C. P. Austin, J. Baell, B. Bejcek, J. M. M. Caaveiro, T. D. Y. Chung, N. P.

- Coussens, J. L. Dahlin, V. Devanaryan, T. L. Foley, M. Glicksman, M. D. Hall, J. V. Haas, S. R. J. Hoare, J. Inglese, P. W. Iversen, S. D. Kahl, S. C. Kales, S. Kirshner, M. Lal-Nag, Z. Li, J. McGee, O. McManus, T. Riss, P. Saradjian, O. J. Trask, Jr., J. R. Weidner, M. J. Wildey, M. Xia, & X. Xu (Eds.), *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD).
- Robinson, E. J., Aguiar, S. P., Kouwenhoven, W. M., Starmans, D. S., von Oerthel, L., Smidt, M. P., & van der Heide, L. P. (2018). Survival of midbrain dopamine neurons depends on the Bcl2 factor Mc11. *Cell Death Discov*, 4, 107. doi:10.1038/s41420-018-0125-7
- Ross, G. W., Abbott, R. D., Petrovitch, H., Morens, D. M., Grandinetti, A., Tung, K. H., . . . White, L. R. (2000). Association of coffee and caffeine intake with the risk of Parkinson disease. *JAMA*, 283(20), 2674-2679. doi:10.1001/jama.283.20.2674
- Ross, G. W., Petrovitch, H., Abbott, R. D., Tanner, C. M., Popper, J., Masaki, K., . . . White, L. R. (2008). Association of olfactory dysfunction with risk for future Parkinson's disease. *Ann Neurol*, 63(2), 167-173. doi:10.1002/ana.21291
- Russo, A., Izzo, A. A., Cardile, V., Borrelli, F., & Vanella, A. (2001). Indian medicinal plants as antiradicals and DNA cleavage protectors. *Phytomedicine*, 8(2), 125-132. doi:10.1078/0944-7113-00021
- Saini, K., Chaudhary, A., & Sharma, R. K. (2012). Effect of *Celastrus paniculatus* on trace elements of cerebellum in ageing albino rats. *Ann Neurosci*, 19(1), 21-24. doi:10.5214/ans.0972.7531.180405
- Sang, H., Wang, H., Tu, Y., & Chen, Y. (1991). New β -dihydroagarofuran sesquiterpenoids from *Celastrus paniculatus*. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 29, 6.
- Schapira, A. H., Cooper, J. M., Dexter, D., Clark, J. B., Jenner, P., & Marsden, C. D. (1990). Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *J Neurochem*, 54(3), 823-827. doi:10.1111/j.1471-4159.1990.tb02325.x
- Schulte, C., & Gasser, T. (2011). Genetic basis of Parkinson's disease: inheritance, penetrance, and expression. *Appl Clin Genet*, 4, 67-80. doi:10.2147/TACG.S11639
- Sedelis, M., Schwarting, R. K., & Huston, J. P. (2001). Behavioral phenotyping of the MPTP mouse model of Parkinson's disease. *Behav Brain Res*, 125(1-2), 109-125. doi:10.1016/s0166-4328(01)00309-6
- Sengupta, A., & Bhargava, H. N. (1970). Chemical investigation of the seed fat of *Celastrus*

- paniculatus. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 21(12), 4.
- Shashank, D., Rajendra, S., & Mistry, A. (2017). An Overview of Phytoconstituents and Pharmacological Activities of *Celastrus Paniculatus* Wild *Journal of Pharmaceutical Research*, 16(4).
- Sheehan, J. P., Palmer, P. E., Helm, G. A., & Tuttle, J. B. (1997). MPP+ induced apoptotic cell death in SH-SY5Y neuroblastoma cells: an electron microscope study. *J Neurosci Res*, 48(3), 226-237. doi:10.1002/(sici)1097-4547(19970501)48:3<226::aid-jnr5>3.0.co;2-h
- Shiba, M., Bower, J. H., Maraganore, D. M., McDonnell, S. K., Peterson, B. J., Ahlskog, J. E., . . . Rocca, W. A. (2000). Anxiety disorders and depressive disorders preceding Parkinson's disease: a case-control study. *Mov Disord*, 15(4), 669-677. doi:10.1002/1531-8257(200007)15:4<669::aid-mds1011>3.0.co;2-5
- Singer, T. P., Ramsay, R. R., McKeown, K., Trevor, A., & Castagnoli, N. E., Jr. (1988). Mechanism of the neurotoxicity of 1-methyl-4-phenylpyridinium (MPP+), the toxic bioactivation product of 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine (MPTP). *Toxicology*, 49(1), 17-23. doi:10.1016/0300-483x(88)90169-2
- Smeyne, R. J., & Jackson-Lewis, V. (2005). The MPTP model of Parkinson's disease. *Brain Res Mol Brain Res*, 134(1), 57-66. doi:10.1016/j.molbrainres.2004.09.017
- Srinivasan, R., Henley, B. M., Henderson, B. J., Indersmitten, T., Cohen, B. N., Kim, C. H., . . . Lester, H. A. (2016). Smoking-Relevant Nicotine Concentration Attenuates the Unfolded Protein Response in Dopaminergic Neurons. *J Neurosci*, 36(1), 65-79. doi:10.1523/JNEUROSCI.2126-15.2016
- Stefanis, L. (2012). alpha-Synuclein in Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 2(2), a009399. doi:10.1101/cshperspect.a009399
- Su, X., Maguire-Zeiss, K. A., Giuliano, R., Prifti, L., Venkatesh, K., & Federoff, H. J. (2008). Synuclein activates microglia in a model of Parkinson's disease. *Neurobiol Aging*, 29(11), 1690-1701. doi:10.1016/j.neurobiolaging.2007.04.006
- Subramaniam, S. R., & Federoff, H. J. (2017). Targeting Microglial Activation States as a Therapeutic Avenue in Parkinson's Disease. *Front Aging Neurosci*, 9, 176. doi:10.3389/fnagi.2017.00176
- Takayama, S., Sato, T., Krajewski, S., Kochel, K., Irie, S., Millan, J. A., & Reed, J. C. (1995).

- Cloning and functional analysis of BAG-1: a novel Bcl-2-binding protein with anti-cell death activity. *Cell*, 80(2), 279-284. doi:10.1016/0092-8674(95)90410-7
- Tatton, N. (2000). Increased caspase 3 and Bax immunoreactivity accompany nuclear GAPDH translocation and neuronal apoptosis in Parkinson's disease. *Exp Neurol*, 166(1), 29-43. doi:10.1006/exnr.2000.7489
- Tatton, W. G., Chalmers-Redman, R., Brown, D., & Tatton, N. (2003). Apoptosis in Parkinson's disease: signals for neuronal degradation. *Ann Neurol*, 53 Suppl 3, S61-70; discussion S70-62. doi:10.1002/ana.10489
- Tieu, K. (2011). A guide to neurotoxic animal models of Parkinson's disease. *Cold Spring Harb Perspect Med*, 1(1), a009316. doi:10.1101/cshperspect.a009316
- Tsujimoto, Y. (1998). Role of Bcl-2 family proteins in apoptosis: apoptosomes or mitochondria? *Genes Cells*, 3(11), 697-707. doi:10.1046/j.1365-2443.1998.00223.x
- Ullrich, C., Mlekusch, R., Kuschnig, A., Marksteiner, J., & Humpel, C. (2010). Ubiquitin enzymes, ubiquitin and proteasome activity in blood mononuclear cells of MCI, Alzheimer and Parkinson patients. *Curr Alzheimer Res*, 7(6), 549-555. doi:10.2174/156720510792231766
- Wakabayashi, K., Tanji, K., Odagiri, S., Miki, Y., Mori, F., & Takahashi, H. (2013). The Lewy body in Parkinson's disease and related neurodegenerative disorders. *Mol Neurobiol*, 47(2), 495-508. doi:10.1007/s12035-012-8280-y
- Wang, H. G., Rapp, U. R., & Reed, J. C. (1996). Bcl-2 targets the protein kinase Raf-1 to mitochondria. *Cell*, 87(4), 629-638. doi:10.1016/s0092-8674(00)81383-5
- Wang, J., Wei, S., Yang, W., Lin, W., Yang, D., Whangpeng, J., & Ting, C. (1996). In vitro and in vivo correlation of the effect of granulocytemacrophage colony-stimulating factor gene transfer on the tumorigenicity and immunogenicity of B16 melanoma. *Int J Oncol*, 9(6), 1267-1276. doi:10.3892/ijo.9.6.1267
- Weng, J. R., Yen, M. H., & Lin, W. Y. (2013). Cytotoxic constituents from *Celastrus paniculatus* induce apoptosis and autophagy in breast cancer cells. *Phytochemistry*, 94, 211-219. doi:10.1016/j.phytochem.2013.05.022
- Wu, C. C., & Bratton, S. B. (2013). Regulation of the intrinsic apoptosis pathway by reactive oxygen species. *Antioxid Redox Signal*, 19(6), 546-558. doi:10.1089/ars.2012.4905
- Wu, D. C., Jackson-Lewis, V., Vila, M., Tieu, K., Teismann, P., Vadseth, C., . . . Przedborski, S.

- (2002). Blockade of microglial activation is neuroprotective in the 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine mouse model of Parkinson disease. *J Neurosci*, *22*(5), 1763-1771.
- Xilouri, M., Brekk, O. R., & Stefanis, L. (2013). alpha-Synuclein and protein degradation systems: a reciprocal relationship. *Mol Neurobiol*, *47*(2), 537-551. doi:10.1007/s12035-012-8341-2
- Xu, H., An, D., Yin, S. M., Chen, W., Zhao, D., Meng, X., . . . Zhang, W. Q. (2015). [The alterations of apoptosis factor Bcl-2/Bax in the early Parkinson's disease rats and the protective effect of scorpion venom derived activity peptide]. *Zhongguo Ying Yong Sheng Li Xue Za Zhi*, *31*(3), 225-229.
- Ye, Q., Yuan, X. L., He, J., Zhou, J., Yuan, C. X., & Yang, X. M. (2016). Anti-apoptotic effect of Shudipingchan granule in the substantia nigra of rat models of Parkinson's disease. *Neural Regen Res*, *11*(10), 1625-1632. doi:10.4103/1673-5374.193242
- Yu, Z. Q., Liu, M. Y., Ren, Q. X., Xiong, Y., Xu, J. H., Xiao, C. H., & Gao, D. S. (2011). Dopamine content in the striatum and expression changes of Bad and Bcl-2 in elderly rats with abnormal behavior. *Neurochem Res*, *36*(12), 2333-2338. doi:10.1007/s11064-011-0558-3
- Zeng, B. Y., Bukhatwa, S., Hikima, A., Rose, S., & Jenner, P. (2006). Reproducible nigral cell loss after systemic proteasomal inhibitor administration to rats. *Ann Neurol*, *60*(2), 248-252. doi:10.1002/ana.20932
- Zeng, X. S., Geng, W. S., & Jia, J. J. (2018). Neurotoxin-Induced Animal Models of Parkinson Disease: Pathogenic Mechanism and Assessment. *ASN Neuro*, *10*, 1759091418777438. doi:10.1177/1759091418777438