

ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย
ที่แยกจากสมองของหนูแรท

นางสาวอภิญญา ฐูปมงคล

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเภสัชวิทยา ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา
คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the Graduate School.

EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa233 ON
THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT BRAIN

Miss Apinya Thoopmongkhol

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy Program in Pharmacology

Department of Pharmacology and Physiology

Faculty of Pharmaceutical Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการ
ทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนู
แรท

โดย

นางสาวอภิญญา ชูปมงคล

สาขาวิชา

เภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

อาจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. รัชณี รอดศิริ

คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยรับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาเภสัชศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะเภสัชศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. พิณทิพย์ พงษ์เพ็ชร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง พันตำรวจโทหญิง ดร.สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(อาจารย์ เกสัชกรหญิง ดร. รัชณี รอดศิริ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกรหญิง เรืออากาศโทหญิง ดร. ภัศราภา ไตวิวัฒน์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสัชกร วิทยา จันทสูตร)

อภิญา ฐปมกค : ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนูแรท. (EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa233 ON THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT BRAIN) อ.ที่ปริภษาวิทธานิพนธ์หลัก : อ. เกศักรหญิง ดร. รัชนี รอดศิริ, 84 หน้า.

สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 เป็นสารที่สกัดมาจาก *Centella asiatica* (Linn.) Urban. จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae นิยมใช้ในการแพทย์อายุรเวท ซึ่งถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและโรคทางสมอง เช่น โรคพาร์กินสัน และโรคอัลไซเมอร์ เป็นต้น ซึ่งพบว่าโรคเหล่านี้อาจมีสาเหตุมาจากการทำงานที่ผิดปกติของไมโทคอนเดรีย การศึกษานี้จึงมุ่งศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรีย

การศึกษาผลของอีซีเอ233 ต่อไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนูแรท อีซีเอ233 5 ปริมาณได้แก่ 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 ไมโครแกรม จะถูกใส่ลงในปฏิกิริยาของไมโทคอนเดรีย ผลปรากฏว่าไม่มีปริมาณใดที่ลดอัตราการหายใจ state 3 และ state 4 ลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อใช้กลูตาเมตร่วมกับมาเลตเป็นสับสเตรท และเมื่อใช้ซัคซินเนตเป็นสับสเตรท ตามลำดับ สรุปได้ว่า อีซีเอ233 ไม่มีผลรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย

การศึกษาฤทธิ์ของอีซีเอ233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากการยับยั้งการหายใจด้วย rotenone ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน complex I อีซีเอ233 5 ปริมาณ ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครแกรมจะถูกใส่ลงในปฏิกิริยาของไมโทคอนเดรียก่อนที่จะใส่ rotenone พบว่าไม่มีปริมาณใดของอีซีเอ233 ที่ทำให้การหายใจของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่า อีซีเอ233 ไม่มีผลในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากการยับยั้งการหายใจด้วย rotenone

การศึกษาฤทธิ์ของอีซีเอ233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากการยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide ซึ่งเป็นสารที่ออกฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน complex IV อีซีเอ233 5 ปริมาณ ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 ไมโครแกรมจะถูกใส่ลงในปฏิกิริยาของไมโทคอนเดรียก่อนที่จะใส่ sodium azide พบว่าไม่มีปริมาณใดของอีซีเอ233 ที่ทำให้การหายใจของไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม สรุปได้ว่า อีซีเอ233 ไม่มีผลในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากการยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide

งานวิจัยนี้พบว่าอีซีเอ233 ไม่มีผลรบกวนการทำงานของไมโทคอนเดรีย และไม่พบผลปกป้องไมโทคอนเดรียจากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone และ sodium azide ในการศึกษาภายนอก

ภาควิชา..... เกศักรหญิงและศิริวิทยา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา..... เกศักรหญิง..... ลายมือชื่อ อ.ที่ปริภษาวิทธานิพนธ์หลัก.....

ปีการศึกษา..... 2554.....

5272418123 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEYWORDS : STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa233 / BRAIN MITOCHONDRIA / OXYGEN CONSUMPTION / RESPIRATORY CONTROL INDEX

APINYA THOOPMONGKHOL : EFFECTS OF STANDARDIZED EXTRACT OF *CENTELLA ASIATICA* ECa233 ON THE FUNCTION OF MITOCHONDRIA ISOLATED FROM RAT BRAIN. ADVISOR : RATCHANEE RODSIRI, Ph.D., 84 pp.

ECa233 is the standardized extract of *Centella asiatica* (Linn.) Urban. in the family of Umbelliferae that uses widely in ayurvedic medicine especially in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease and Alzheimer's disease. The main cause of these diseases is mitochondria dysfunction. The aim of this study is to find out the effects of ECa233 to the mitochondria.

The effects of ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain were studied. The rat brain mitochondria were incubated with ECa233 0.1, 1, 10, 100, and 1000 µg. However there was no significant difference in the rate of oxygen consumption of the brain mitochondria incubated with all ECa233 concentrations compared with the control while using glutamate plus malate and succinate as substrate. The finding suggested no toxic effect of ECa233 on mitochondria. The data supported further investigation on the protective effects of ECa233 on brain mitochondria.

The protective effects of ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain against rotenone, complex I inhibitor, were studied. The rat brain mitochondria were incubated with Eca233 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg then incubated with rotenone. There was no significant difference in the rate of oxygen consumption of the brain mitochondria incubated with all ECa233 concentrations compared with the control. The finding suggested no protective effect of ECa233 against complex I inhibition of rotenone.

Also the protective effects of ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain against sodium azide, complex IV inhibitor, were studied. The rat brain mitochondria were incubated with Eca233 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 µg then incubated with sodium azide. There was no significant difference in the rate of oxygen consumption of the brain mitochondria incubated with all ECa233 concentrations compared with the control. The finding suggested no protective effect of ECa233 against complex IV inhibition of sodium azide.

In the summary, ECa233 does not have any effects to mitochondria, even protect mitochondria against rotenone and sodium azide in *in vitro* study.

Department : Pharmacology and Physiology Student's Signature

Field of Study : Pharmacology Advisor's Signature

Academic Year : 2011

กิตติกรรมประกาศ

การที่วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ เกศัชกรหญิง ดร. รัชณี รอดศิริ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความช่วยเหลือในทุกด้านและให้คำปรึกษาที่ดียิ่ง ตลอดจนคำแนะนำความรู้และข้อคิดเห็นต่างๆ ตลอดการทำวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ เกศัชกรหญิง พ.ต.ท. หญิง ดร. สมทรง ลาวัณย์ประเสริฐ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศัชกรหญิง ร.ท.หญิง ดร. ภัศราภา โตวิวัฒน์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกศัชกร วิทยา จันทบุตร ที่กรุณาให้คำแนะนำ

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ เกศัชกรหญิง ดร. มยุรี ตันตสิระ ที่กรุณาให้ความอนุเคราะห์สารทศสอบ

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาเกษตรวิทยาและสัตววิทยาทุกท่านที่กรุณาให้ความรู้ และคำปรึกษาตลอดการศึกษาระดับมหาบัณฑิต

และสุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดามารดาที่เป็นกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัย และขอบคุณบุคลากรคณะเกษตรศาสตร์ รวมทั้งเพื่อนๆ พี่ๆ น้องๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือในความสำเร็จของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญรูป.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
สมมติฐานการวิจัย.....	4
ขอบเขตของงานวิจัย.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ไมโตคอนเดรีย.....	5
โรคอัลไซเมอร์.....	11
โรคพาร์กินสัน.....	13
บัวบก.....	16
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีวิจัย.....	18
3.1 วัสดุอุปกรณ์.....	18
3.2 วิธีการวิจัย.....	20
3.2.1 การเตรียมไมโตคอนเดรียจากสมองของหนูแรท.....	20
3.2.2 การหาปริมาณโปรตีนของไมโตคอนเดรีย.....	21
3.2.3 การวัดอัตราการหายใจของไมโตคอนเดรีย.....	22
3.2.4 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของ ไมโตคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนูแรท เมื่อใช้ substrate ต่างๆ กัน.....	26
3.2.5 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก Eca233 ต่อการหายใจของ	

	หน้า
ไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนูแรท ในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ การ electron transport chain ด้วย rotenone ซึ่งเป็น complex I inhibitor.....	27
3.2.6 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของ ไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนูแรทในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ การ electron transport chain ด้วย sodium azide ซึ่งเป็น complex IV inhibitor..	29
3.3 การรวบรวมและการวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	32
4.1 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ substrate เป็น NAD ⁺ -linked (glutamate + malate)	32
4.2 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อ ใช้ substrate เป็น FAD-linked (succinate).....	35
4.3 ผลของ rotenone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ rotenone ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหา %inhibition.....	38
4.4 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะ ที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone 0.10 µg.....	42
4.5 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะ ที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone 0.04 µg.....	45
4.6 ผลของ sodium azide ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ sodium azide ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหา %inhibition.....	48
4.7 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะ ที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย sodium azide 200 µg.....	51
4.8 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะ ที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย sodium azide 120 µg.....	54
บทที่ 5 สรุปและอภิปรายผลการวิจัย.....	57
รายการอ้างอิง.....	60
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	84

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. การแบ่งภาวะ (state) ต่างๆ ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย.....	22
2. แสดงอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อทดสอบผลของ ECa233 ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate	69
3. แสดงอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อทดสอบผลของ ECa233 ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate	70
4. % inhibition ของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone ปริมาณต่างๆ.....	71
5. แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้อง ไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการยับยั้งการหายใจ ด้วย rotenone 0.10 µg.....	72
6. แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้อง ไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการยับยั้งการหายใจ ด้วย rotenone 0.04 µg.....	73
7. % inhibition ของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide ปริมาณต่างๆ.....	74
8. แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้อง ไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการยับยั้งการหายใจ ด้วย sodium azide 200 µg.....	75
9. แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้อง ไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการยับยั้งการหายใจ ด้วย sodium azide 120 µg.....	76

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1. ลักษณะของไมโทคอนเดรีย.....	6
2. แสดงขั้นตอนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจและการสร้าง ATP.....	7
3. สารยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียในขั้นตอนต่างๆ	9
4. ภาพระนาบด้านข้างของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์.....	13
5. บัวบก.....	16
6. ส่วนประกอบและการทำงานของ biological oxygen monitor	23
7. ตัวอย่าง oxygraph tracing ในการนำมาคำนวณค่า RCI.....	24
8. ตัวอย่าง oxygraph tracing ในการนำมาใช้คำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย.....	25
9. oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย ในการทดลองหาผลของ ECa233 ในปริมาณต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 และ state 4 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate	33
10. เปรียบเทียบผลของ ECa233 ในปริมาณต่างๆ ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 4 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate	34
11. oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย ในการทดลองหาผลของ ECa233 ในปริมาณต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 และ state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate	36
12. เปรียบเทียบผลของ ECa233 ในปริมาณต่างๆ ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 และ state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate	37
13. oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ rotenone ในปริมาณต่างๆ ต่อการยับยั้งการหายใจ.....	39
14. แสดงค่าอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรีย ที่ถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone ในปริมาณต่างๆ.....	40
15. แสดงผลการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เป็น % inhibition เมื่อใช้ rotenone ในปริมาณต่างๆ เป็นสารยับยั้งการหายใจ.....	41
16. oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 เมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.10 μ g.....	43

17. เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆเมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.10 μg	44
18. oxygraph tracing กลุ่มควบคุม ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 เมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.04 μg	46
19. เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆเมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.04 μg	47
20. oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ sodium azide ในปริมาณต่างๆ ต่อการยับยั้งการหายใจ.....	49
21. แสดงผลการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เป็น % inhibition เมื่อใช้ sodium azide ในปริมาณต่างๆ เป็นสารยับยั้งการหายใจ.....	50
22. oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ปริมาณต่างๆ เมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 200 μg	52
23. เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 200 μg	53
24. oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 เมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 120 μg	55
25. เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 120 μg	56

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

A β	=	beta amyloid
ADP	=	adenosine 5'- diphosphate
ATP	=	adenosine 5'- triphosphate
ATPase	=	adenosinetriphosphatase
BSA	=	bovine serum albumin
CoQ	=	coenzyme Q, ubiquinone
$^{\circ}\text{C}$	=	degree celcius
EDTA	=	ethylenediaminetetraacetic acid
ETC	=	electron transport chain
FAD	=	flavin adenine dinucleotide
FADH ₂	=	reduced flavin adenine dinucleotide
g	=	gram
<i>g</i>	=	centrifugal force unit (gravity)
H ⁺	=	proton
IC ₅₀	=	median inhibitory concentration
IC ₁₀₀	=	maximum inhibitory concentration
kg	=	kilogram
M	=	molar
MAO	=	monoamine oxidase
mg	=	milligram
min	=	minute
ml	=	milliliter
mm	=	millimeter
mM	=	millimolar
μg	=	microgram
μl	=	microliter
N	=	normality
NAD ⁺	=	nicotinamide adenine dinucleotide

NADH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
n atoms	=	nanoatoms
O	=	oxygen
Pi	=	inorganic phosphate
RCI	=	respiratory control index
rpm	=	revolution per minute
v/v	=	volume by volume
w/v	=	weight by volume
/	=	per
%	=	percent
<	=	less than

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ไมโทคอนเดรียพบในเซลล์สิ่งมีชีวิตชั้นสูงทุกชนิด มีหน้าที่สำคัญในการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ และมีหน้าที่ในการควบคุมกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ เช่นการแบ่งตัวของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ การสื่อสารระหว่างเซลล์ การทำหน้าที่ปกติของเซลล์ และการตายของเซลล์ เป็นต้น [1-3] กระบวนการหายใจระดับเซลล์เพื่อสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรียจะต้องผ่านเอนไซม์ต่างๆ ที่อยู่บนเยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) ของไมโทคอนเดรียคือ ไมโทคอนเดรียเอนไซม์ complex I ถึง complex V ประกอบด้วยสองกระบวนการที่เกิดขึ้นพร้อมกันคือ กระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนใน electron transport chain (ETC) หรือ respiratory chain ด้วย complex I ถึง IV โดยมีออกซิเจนเป็นตัวรับอิเล็กตรอนในขั้นตอนสุดท้าย และกระบวนการ oxidative phosphorylation ด้วย complex V โดยที่พลังงานที่เกิดขึ้นจากการขนส่งอิเล็กตรอนใน ETC จะถูกนำไปใช้ในกระบวนการ oxidative phosphorylation เพื่อเปลี่ยนแปลง adenosine diphosphate (ADP) เป็น adenosine triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นโมเลกุลพลังงานสูงที่เซลล์จะนำไปใช้ หากมีการขัดขวางการทำงานของ complex III (ubiquinol:cytochrome *c* reductase) และ complex IV (cytochrome *c* oxidase) การสร้าง ATP จะเกิดขึ้นไม่ได้เลย ส่วนการขัดขวางการทำงานของ complex I (NADH-ubiquinone oxidoreductase) การสร้าง ATP จะสูญเสียไปเกือบทั้งหมด [4-9]

โรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative diseases) คือกลุ่มโรคที่มีการดำเนินโรคแบบค่อยเป็นค่อยไป มีอาการผิดปกติทั้งทางกายและจิตใจสัมพันธ์กับความผิดปกติของระบบประสาทส่วนต่างๆ อย่างจำเพาะ โรคที่พบบ่อยคือ โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease หรือ AD) และโรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease หรือ PD) นอกจากนั้นยังได้แก่ โรค amyotrophic lateral disease และ Huntington's disease เป็นต้น โดยพบว่าพยาธิสภาพของโรคเหล่านี้มีลักษณะการตายของเซลล์ประสาทและความผิดปกติของไมโทคอนเดรียในสมองส่วนที่แตกต่างกัน [10]

โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease หรือ PD) เป็นโรคที่เกิดจากความผิดปกติประสาทสั่งการ (motor system) ผู้ป่วยจะมีอาการสั่นขณะพัก กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง การเคลื่อนไหวช้าลงหรือสูญเสียการ

เคลื่อนไหว และสูญเสียการทรงตัวหรือทรงตัวไม่ได้ขณะลุกขึ้น [20-21] พยาธิสภาพพบว่ามี การตายของเซลล์ประสาทโดปามีนใน substantia nigra pars compacta ร่วมกับการสะสมของโปรตีนที่เรียกว่า Lewy bodies ใน cytoplasm ของเซลล์ประสาท การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างโรคพาร์กินสันกับไมโทคอนเดรียพบว่า พยาธิกำเนิดของโรคพาร์กินสันเกี่ยวข้องกับการสูญเสียหน้าที่และลดการทำงานของ complex I ของห่วงโซ่การหายใจ เช่นการศึกษาไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากสมองส่วน striata ของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคพาร์กินสัน พบว่า 4 จาก 5 ตัวอย่างมีการลดการทำงานของ complex I แต่ complex III และ IV ไม่เปลี่ยนแปลง [22], การศึกษาไมโทคอนเดรียของกล้ามเนื้อและ tissues อื่นๆ ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสันที่ไม่ทราบสาเหตุพบว่า complex I และ complex IV มีการทำงานลดลง [23] จากการศึกษาทางระบาดวิทยาพบว่าสารพิษสำคัญที่อาจเป็นสาเหตุโรคพาร์กินสันได้แก่ ยาเบื่อปลา rotenone และสารอนุพันธ์ MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ซึ่งต่อมาสารทั้ง 2 ชนิดนี้ก็ถูกนำมาใช้สร้างแบบจำลองโรคพาร์กินสันในสัตว์ทดลองอย่างกว้างขวาง [24] ในการทดลองให้ rotenone ความเข้มข้นต่ำในระยะยาวแก่หนูแรท ปรากฏผลยับยั้งการทำงานของ complex I ในสมอง ซึ่งการยับยั้งนี้เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนใน nigrostriatal pathway และทำให้สัตว์ทดลองมีอาการคล้ายพาร์กินสัน [25]

โรคอัลไซเมอร์เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทที่พบมากที่สุด [11-12] พยาธิสภาพพบว่ามีสมองส่วน cerebral cortex ฝ่อ (atrophy) อย่างรุนแรง และพบการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทใน neocortex, hippocampus, basal forebrain และ brain stem พบรอยโรคในสมองที่เรียกว่า senile plaque ซึ่งเกิดจากการสะสมของโปรตีนเบต้าอะไมลอยด์ (β -amyloid หรือ A β) และโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตมากผิดปกติ (hyperphosphorylated tau) พยาธิกำเนิดที่อาจเกี่ยวข้องได้แก่ ความผิดปกติของเมตาโบลิซึมของ amyloid precursor protein (APP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ประสาท การเจริญเติบโตและการซ่อมแซมเซลล์ประสาท และ cytoskeletal protein tau ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำงานของ microtubule ทำให้เกิดการสะสมของ A β และ neurofibrillary tangle (NFT) ทำให้ microtubule สลายตัวและทำลายการขนส่งในเซลล์ นำไปสู่การตายของเซลล์ในที่สุด และยังคงพบพยาธิสภาพของสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์นอกจากมีการสะสมของ senile plaque แล้วยังมีความผิดปกติของไมโทคอนเดรียร่วมด้วย โดยการศึกษาของ Ito และคณะ (1999) ได้นำเอาไมโทคอนเดรียที่แยกจากเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มาศึกษา พบว่ามี การลดการทำงานของ complex IV ลงมากกว่า 50% ในผู้ป่วย 5 จาก 6 ราย [13] ส่วนไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองผู้ป่วยก็พบการลดลงของการทำงานของ complex IV อย่างมีนัยสำคัญ [14] นอกจากนั้นยังมีการศึกษาที่แยกเอา

ไมโทคอนเดรียจากสมองหนูแรทมา incubate ด้วย $\text{A}\beta$ พบว่าการทำงานของ complex IV ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน [15] เหล่านี้จึงเป็นหลักฐานสำคัญที่ชี้ว่าพยาธิกำเนิดของโรคอัลไซเมอร์เกี่ยวข้องกับ ความบกพร่องในการทำงานของไมโทคอนเดรียเอนไซม์ complex IV ซึ่งไมโทคอนเดรียที่ทำงานผิดปกติจะทำให้เกิดการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ขึ้น และการนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาท [16-19]

โรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสันเป็นโรคที่รักษาไม่หายและปัจจุบันยังไม่มีวิธีป้องกันการเกิดโรคอย่างได้ผล แนวทางการรักษาจึงทำได้เพียงระงับอาการและชะลอการดำเนินโรคเท่านั้น จึงมีการวิจัยเพื่อนำเอาสมุนไพรต่างๆ ที่เชื่อว่ามีฤทธิ์ในการบรรเทาและชะลอการดำเนินโรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสันมาใช้เป็นประโยชน์ต่อผู้ป่วย ซึ่งสมุนไพรที่น่าสนใจชนิดหนึ่งคือบัวบก (*Centella asiatica*) บัวบกเป็นสมุนไพรที่ใช้ในการแพทย์อายุรเวท ถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น เจ็บคอ ร้อนใน กระจายน้ำ ลดไข้ ขับปัสสาวะ แก้ท้องเสีย [26] โดยเฉพาะการนำมาใช้สมานแผลและเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ รวมถึงการใช้กระตุ้นระบบความจำและระบบประสาท [27] สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์เพิ่มพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำในหนูแรทที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีอาการคล้ายโรคอัลไซเมอร์ด้วยกลไกการยับยั้ง oxidative stress [28] มีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทของหนูแรท วยแก่ที่ถูกเหนี่ยวนำให้มีอาการคล้ายพาร์กินสันด้วย MPTP โดยเกี่ยวข้องกับการลดภาวะ oxidative stress [29] เช่นกัน สารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 (standardized extract of *Centella asiatica* ECa233) ซึ่งพัฒนาการสกัดและการควบคุมมาตรฐานโดยคณะนักวิจัยจากคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้มีส่วนประกอบของ triterpenoids ไม่น้อยกว่า 80% และมีสัดส่วนของ madecassoside และ asiaticoside เป็น 1.50 ± 0.50 มีฤทธิ์ช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำ และลดระดับ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็น oxidative stress marker ในสมองอย่างมีนัยสำคัญในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด นอกจากนี้สารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียความจำด้วย β -amyloid [30] ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 จะมีฤทธิ์ปกป้องไมโทคอนเดรียที่ถูกทำให้สูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียเอนไซม์ด้วยกลไกเดียวกันกับพยาธิกำเนิดโรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสันหรือไม่ การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ *in vitro* โดยใช้ไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองหนูแรท

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองหนูแรท
2. เพื่อศึกษาฤทธิ์ปกป้องไมโทคอนเดรียจากภาวะที่มีการยับยั้งห่วงโซ่การหายใจของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 โดยศึกษาในไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองหนูแรท

สมมุติฐานการวิจัย (Hypothesis)

สารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 สามารถปกป้องไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองหนูแรท จากภาวะที่มีการยับยั้งห่วงโซ่การหายใจ และไม่มีพิษต่อไมโทคอนเดรีย

ขอบเขตของงานวิจัย

1. ศึกษาผลของ ECa233 ต่อกระบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย
2. ศึกษาผลของ ECa233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากภาวะที่มีการยับยั้งไมโทคอนเดรียเอนไซม์ Complex I ของห่วงโซ่การหายใจ
3. ศึกษาผลของ ECa233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากภาวะที่มีการยับยั้งไมโทคอนเดรียเอนไซม์ Complex IV ของห่วงโซ่การหายใจ

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ได้ข้อมูลฤทธิ์ของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของหนูแรท และข้อมูลพิษต่อไมโทคอนเดรียของ ECa233 ซึ่งจะเป็นประโยชน์นำไปสู่การศึกษาเพื่อพัฒนาเป็นยาชะลอการดำเนินโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ไมโทคอนเดรีย

ไมโทคอนเดรียเป็นออร์แกเนลล์ที่พบใน eukaryotic cells ทุกชนิด [1] มีความสำคัญในการสร้าง adenosine 5'-triphosphate (ATP) ซึ่งเป็นโมเลกุลที่ทำหน้าที่เก็บสะสมพลังงานอิสระของเซลล์ นอกจากนั้นไมโทคอนเดรียยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการต่างๆ ที่เกิดขึ้นกับเซลล์ เช่น การสื่อสารระหว่างเซลล์ (cell signaling), การเจริญเติบโต, การเปลี่ยนแปลงหน้าที่ (cell differentiation), การควบคุม cell cycle และการตายของเซลล์ เป็นต้น [2]

ไมโทคอนเดรียมีส่วนประกอบ 5 ส่วน (รูปที่ 1) ได้แก่

1) เยื่อหุ้มชั้นนอก (outer membrane) มีลักษณะเป็นผิวเรียบ มี integral protein ที่มีลักษณะเป็นช่องเรียกว่า porin จัดเรียงตัวอยู่จำนวนมาก porin นี้ยอมให้สารโมเลกุลเล็ก (น้อยกว่า 5,000 dalton) เช่น ADP, ATP, sucrose และ ion ต่างๆ ผ่านเข้าออกได้อย่างอิสระ มีบริเวณเชื่อมต่อระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและเยื่อหุ้มชั้นในเรียกว่า contact site ซึ่งจะมีโครงสร้างคล้ายท่อที่เรียกว่า mitochondrial permeability transition pore (PTP) วางอยู่ ซึ่งจะเปิดให้สารโมเลกุลเล็ก (น้อยกว่า 1,500 dalton) ผ่านเข้าออก โดยปัจจัยที่ทำให้ PTP เปิดได้แก่ภาวะที่มีปริมาณแคลเซียมที่เพิ่มมากขึ้นในไมโทคอนเดรีย, ภาวะที่มี trans-membrane potential ต่ำ [4-5] และถ้ามีการฉีกขาดของเยื่อหุ้มชั้นนอก โปรตีนที่อยู่ในช่องระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับเยื่อหุ้มชั้นในจะรั่วออกไปสู่ cytosol ทำให้เซลล์ตาย [6]

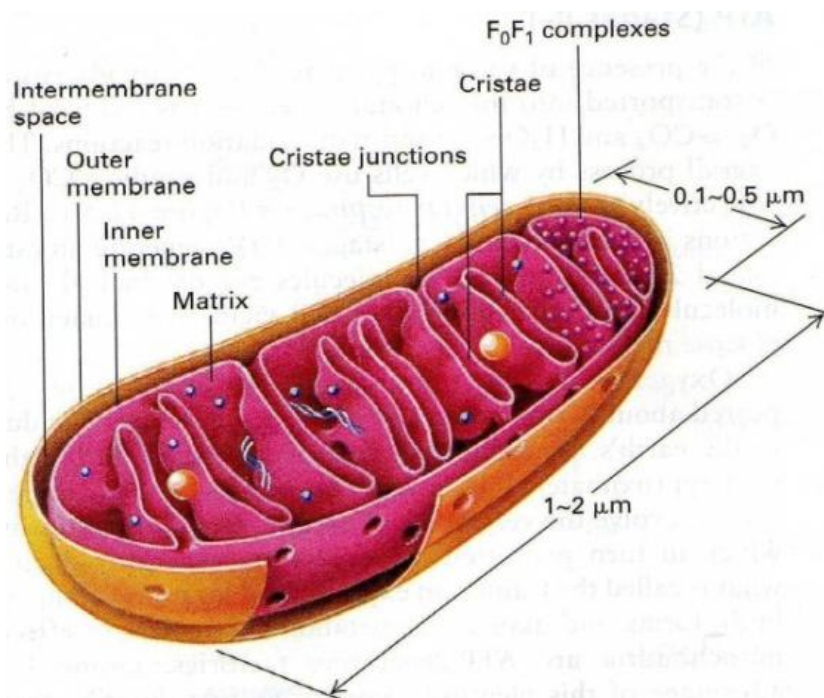
2) ช่องระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับเยื่อหุ้มชั้นใน (inter-membrane space) เป็นที่อยู่ของ cytochrome c และเนื่องจากเยื่อหุ้มชั้นนอกยอมให้สารโมเลกุลเล็กบางอย่างเช่น sucrose, ion ต่างๆ ผ่านเข้าออกอย่างอิสระ ดังนั้นความเข้มข้นของสารดังกล่าวในบริเวณ inter-membrane space จึงเท่ากับความเข้มข้นใน cytosol [6]

3) เยื่อหุ้มชั้นใน (inner membrane) มีความยืดหยุ่นสูง มีลักษณะพับไปมา ไม่มี porin มีคุณสมบัติไม่ยอมให้สารผ่านเข้าออกอย่างอิสระ (impermeability) สารที่มีคุณสมบัติ hydrophilic และ inorganic ions จะผ่านเข้าออกได้ด้วยการใช้ช่องทาง (channel) และโปรตีนตัวพา (carrier) ที่จำเพาะเจาะจง อย่างไรก็ตามที่เยื่อหุ้มชั้นในนี้ยอมให้ O_2 , CO_2 , H_2O และ NH_3 ผ่านเข้าออกอิสระ นอกจากนี้เยื่อหุ้มชั้นในเป็นบริเวณที่เกิดการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจ (electron transport chain)

ดังนั้นจะมีเอนไซม์สำคัญในกระบวนการถ่ายทออิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจ รวมทั้งเอนไซม์ที่ใช้ในการสังเคราะห์ ATP (ATP synthase) อยู่ [4]

4) Cristae เป็นส่วนของเยื่อหุ้มชั้นในที่พับซ้อนกันเพื่อเพิ่มพื้นที่ผิวของเยื่อหุ้มชั้นในซึ่งจะเป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการสร้าง ATP [7]

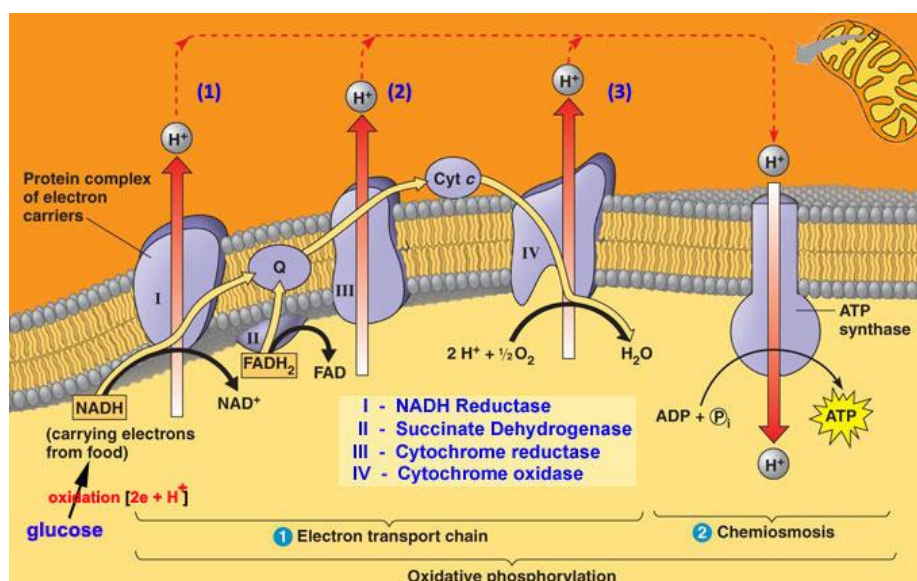
5) Matrix เป็นส่วนประกอบที่ถูกปิดอยู่ภายในเยื่อหุ้มชั้นใน มีลักษณะเป็นของเหลวคล้ายวุ้น เป็นที่อยู่ของเอนไซม์ต่างๆของปฏิกิริยาในวัฏจักรเครบส์ (Kreb's cycle หรือ Tricarboxylic acid cycle) (ยกเว้น succinate dehydrogenase ซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มชั้นใน) และเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยา lipid oxidation และเป็นที่อยู่ของ mitochondria DNA (mtDNA) [4, 6]



รูปที่ 1 ลักษณะของไมโทคอนเดรีย ซึ่งมีส่วนประกอบ 5 ส่วนคือ เยื่อหุ้มชั้นนอก, ช่องระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกและชั้นใน, เยื่อหุ้มชั้นใน (ซึ่งเป็นที่อยู่ของ respiratory enzymes และ ATP synthase), คริสตี และ แมทริกซ์ [31]

กระบวนการสร้างพลังงานโดยไมโทคอนเดรียนั้นเริ่มจากการออกซิไดส์สารที่ให้พลังงาน ซึ่งได้แก่คาร์โบไฮเดรต ไขมัน และ โปรตีน พลังงานที่ได้มาจะอยู่ในรูป reducing equivalent (proton และ

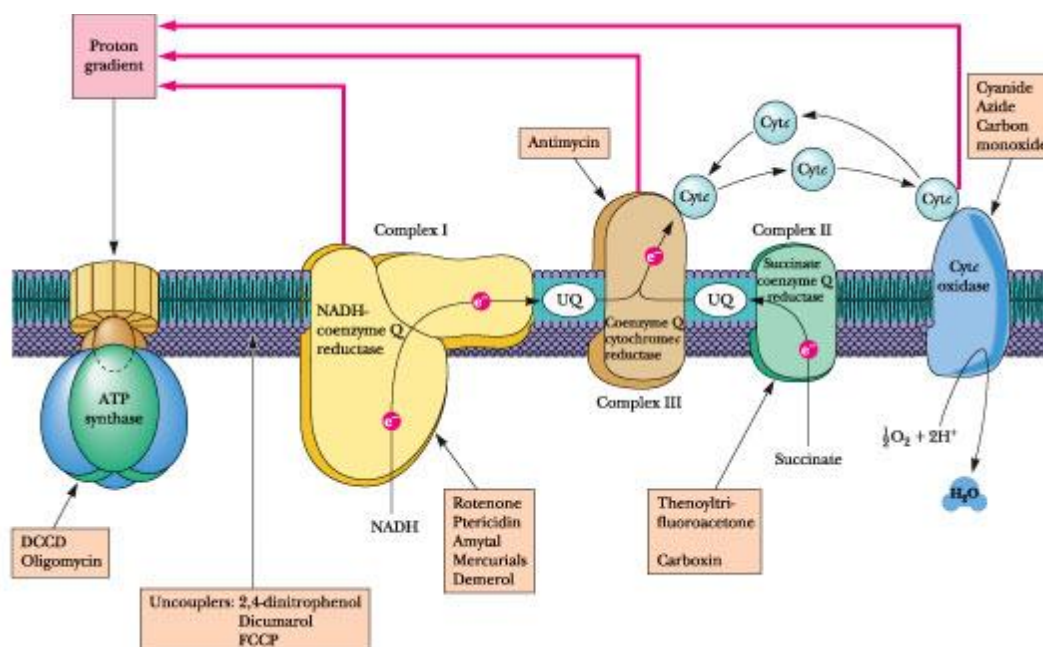
electron) ซึ่งจะมี NAD^+ และ FAD มารับ กลายเป็น NADH และ FADH_2 ตามลำดับ เมื่อ NADH และ FADH_2 ถ่ายทอด reducing equivalent ไปให้ O_2 โดยผ่านห่วงโซ่การหายใจ (respiratory chain หรือ electron transport chain) ที่อยู่ในเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย และจะมีพลังงานปล่อยออกมา พลังงานนี้จะถูก ATP synthase นำไปสร้าง ATP จาก ADP และ phosphate (P_i) วิธีการสร้าง ATP โดยใช้พลังงานที่ได้จากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนนี้ เรียกว่า “oxidative phosphorylation” [32] (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 แสดงขั้นตอนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจและการสร้าง ATP (oxidative phosphorylation) ที่เกิดขึ้นที่เยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรีย โดยเริ่มจาก NADH ที่ได้จากวัฏจักรเครบส์ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ complex I แล้วถ่ายทอดต่อไปยัง CoQ ขณะเดียวกัน FADH_2 ก็ถ่ายทอดอิเล็กตรอนให้แก่ complex II แล้วถ่ายทอดต่อไปยัง CoQ เช่นเดียวกัน จากนั้น CoQ จึงถ่ายทอดอิเล็กตรอนต่อไปยัง complex III ต่อมา cytochrome c จึงมารับอิเล็กตรอนเพื่อถ่ายทอดไปยัง complex IV สุดท้ายจึงถ่ายทอดอิเล็กตรอนไปที่ O_2 พลังงานที่ปลดปล่อยออกมาตลอดกระบวนการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะถูกนำไปใช้ปั๊มโปรตอน (H^+) ออกจากเมทริกซ์ไปสู่ช่องว่างระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับชั้นใน จึงมีความต่างศักย์ไฟฟ้าเคมีเกิดขึ้น ซึ่งจะถูก ATP synthase (หรือ complex V) นำไปใช้สร้าง ATP จาก ADP และ P_i [32]

การถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจแบ่งขั้นตอนออกเป็น 5 complex ได้แก่ Complex I (NADH dehydrogenase หรือ NADH-ubiquinone oxidoreductase หรือ NADH-coenzyme Q reductase) รับผิดชอบอิเล็กตรอนจาก NADH ที่อยู่ในเมทริกซ์แล้วถ่ายทอดไปยัง coenzyme Q (CoQ) ในขณะเดียวกันใน complex II (succinate dehydrogenase หรือ succinate-ubiquinone oxidoreductase หรือ succinate-coenzyme Q reductase) มีการรับอิเล็กตรอนจาก $FADH_2$ แล้วถ่ายทอดไปยัง CoQ โดยตรงไม่ผ่าน complex I เมื่อ CoQ รับผิดชอบอิเล็กตรอนจาก complex I และ complex II แล้วก็จะถ่ายทอดต่อไปยัง complex III (cytochrome b-c₁ complex หรือ cytochrome c reductase หรือ CoQ-cyt c reductase) จากนั้น cytochrome c ก็จะถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก complex III ไปยัง complex IV (cytochrome c oxidase) แล้วถ่ายทอดต่อไปยัง O_2 โดย oxygen 1 อะตอมของ O_2 ($\frac{1}{2}O_2$) จะรับ 2 อิเล็กตรอนเป็น H_2O ดังนั้น O_2 รับ 4 อิเล็กตรอนได้เป็น 2 H_2O พลังงานที่ปลดปล่อยออกมาจากการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจจนถึง O_2 ซึ่งเป็นตัวรับสุดท้ายนั้น จะนำไปใช้ปั๊มโปรตอน (H^+) จากเมทริกซ์ไปยังช่องระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับชั้นใน (inter-membrane space) ทำให้เกิด electrochemical gradient ซึ่งพลังงานจากความต่างศักย์ที่เกิดขึ้นจะถูกนำไปสังเคราะห์ ATP โดย ATP synthase (F_1F_0 ATPase หรือ complex V) จาก ADP และ phosphate (Pi) [8] (รูปที่ 2) ในภาวะปกติการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจะถูกกระตุ้นเมื่อมีการใช้ ATP มาก โดยการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจจะต้องเกิดพร้อมกับการสร้าง ATP เสมอซึ่งเรียกกระบวนการที่เกิดขึ้นพร้อมกันนี้ว่า coupling [9]

ไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งชีวพลังงานของเซลล์มีสารหลายชนิดที่เป็นพิษต่อไมโทคอนเดรีย โดยรบกวนห่วงโซ่การหายใจหรือรบกวน oxidative phosphorylation จะทำให้เกิดอาการเหมือนกับขาดออกซิเจน (cytotoxic hypoxia) เช่น กล้ามเนื้ออ่อนแรง อ่อนเพลียง่าย ความดันต่ำ ปวดศีรษะ วิงเวียน มึนงง เจ็บคื่นหน้าอก เป็นต้น



รูปที่ 3 สารยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียในขั้นตอนต่างๆ

(<http://web.virginia.edu/Heidi/chapter21/chp21.htm>)

สารที่เป็นพิษต่อไมโทคอนเดรียสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท ดังนี้

1. สารยับยั้งห่วงโซ่การหายใจ ได้แก่

1.1) สารยับยั้ง complex I ซึ่งการยับยั้งอาจเกิดจากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้คือ การยับยั้งแบบไม่เฉพาะเจาะจงต่อ complex I โดยยับยั้งตรงตำแหน่งของ NADH-flavin ที่จะเข้าทำปฏิกิริยา, การมีคุณสมบัติเป็น quinole antagonists ซึ่งสามารถยับยั้งได้ทั้ง complex I และ III หรือการยับยั้งโดยแรงและจำเพาะเจาะจง (potent and specific) ต่อ complex I ด้วยการจับกับ Fe-S clusters ของ complex I ทำให้เกิดการขัดขวางการออกซิเดชัน [3] สารยับยั้งที่ออกฤทธิ์ด้วยกลไกสุดท้ายนี้และที่เด่นในกลุ่มนี้ได้แก่ rotenone ซึ่งเป็นสารกลุ่ม isoflavonoids ที่ได้จากพืชตระกูล Leguminosae [21] นอกจากนี้ได้แก่ MPTP, demerol และ amytal [34]

1.2) สารยับยั้ง complex II มีฤทธิ์ยับยั้งการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก succinate ไปยัง coenzyme Q ได้แก่ malonate, 2-Thenyltrifluoroacetone, carboxin ซึ่งเป็นการยับยั้งแบบแข่งขัน (competitive inhibitor) ต่อ succinate ในการจับกับเอนไซม์ succinate dehydrogenase [3, 35]

1.3) สารยับยั้ง complex III ซึ่งการยับยั้งอาจเกิดจากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้คือ การมีคุณสมบัติเป็น quinole antagonists โดยมีกลุ่ม β -methoxyacrylate เป็นส่วนประกอบอยู่ในโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างของ ubiquinone (CoQ) จึงมีการขัดขวางทำให้ CoQ ไม่สามารถเข้าทำปฏิกิริยาออกซิเดชันได้ หรือการมี 6-hydroxyquinone fragment เป็นส่วนประกอบอยู่ในโครงสร้างคล้ายกับโครงสร้างของ CoQ ทำให้เกิดการขัดขวางการถ่ายทอดอิเล็กตรอนจาก Fe-S center ไปยัง cytochrome c_1 ร่วมกับการขัดขวางปฏิกิริยารีดักชันของ cytochrome b โดยสารยับยั้งที่เด่นในกลุ่มนี้ได้แก่ ยาปฏิชีวนะ antimycin ซึ่งมี affinity สูงในการจับกับ complex III มากกว่าสารยับยั้งอื่นๆ ในกลุ่ม [3]

1.4) สารยับยั้ง complex IV ซึ่งการยับยั้งอาจเกิดได้จากกลไกอย่างใดอย่างหนึ่งดังต่อไปนี้คือ การยับยั้งแบบไม่แข่งขันทั้งต่อ O_2 และต่อ cytochrome c โดยเข้าจับกับ heme (ซึ่งเป็นส่วนประกอบของ cytochrome a_3) ในภาวะ ferric state (Fe^{3+}) เช่น cyanide และ azide, การยับยั้งแบบแข่งขันกับ O_2 โดยเข้าจับกับ heme ในสถานะ ferrous state (Fe^{2+}) เช่น carbon monoxide (CO) หรือการยับยั้งแบบแข่งขันกับ cytochrome c เช่น polycations [3]

1.5) สารยับยั้ง ATP synthase กลไกการยับยั้งอาจเกิดโดยการเข้าจับกับ F_1 หรือ F_0 subunit ของ ATP synthase ทำให้ไม่สามารถปั๊มโปรตอนเพื่อนำมาสร้าง ATP ได้ ตัวอย่างสารยับยั้งที่เด่นในกลุ่มนี้ได้แก่ oligomycins A-D ที่แยกได้จาก *Streptomyces diastatochromogenes* [3]

2. สารที่ทำให้ไมโทคอนเดรียเกิดภาวะ uncoupling

ภาวะ uncoupling คือภาวะที่ไมโทคอนเดรียมีการถ่ายทอดอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจแต่ไม่เกิดการสร้าง ATP เนื่องจากสารที่เป็น uncoupler ทำให้โปรตอน (H^+) ที่ถูกปั๊มออกไปที่ inter-membrane space ระหว่างกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนกลับเข้ามาสู่เมทริกซ์โดยไม่ผ่าน ATP synthase การเกิดภาวะ uncoupling นี้จะทำให้เพิ่มการใช้ออกซิเจนและเพิ่มการสร้างความร้อนโดยไมโทคอนเดรียเนื่องจากเกิดกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนอย่างต่อเนื่องเพื่อรักษา electrochemical gradient

2.1) สารที่ออกฤทธิ์เป็น structural uncoupling มีคุณสมบัติในการทำให้ความแข็งแรงของเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียสูญเสียไป ซึ่งทำให้ประสิทธิภาพของ oxidative phosphorylation ลดลงและเพิ่มการทำงานของ ATPase เช่น detergent และ phospholipase

2.2) สารพวก ionophores มีกลไกทำให้คุณสมบัติ impermeable ของเยื่อหุ้มชั้นในของไมโทคอนเดรียเปลี่ยนแปลงไปโดยยอมให้สารต่างๆ รวมทั้งโปรตอนและโพแทสเซียมไอออนผ่านเข้าออกได้

ง่าย จนสูญเสีย electrochemical gradient ที่จำเป็นในการสร้าง ATP เช่น gramicidin, valinomycin, nigericin

2.3) สารพวก phenols และ anionic compounds อื่นๆ มีคุณสมบัติเป็น lipophilic weak acid ทำให้สามารถจับกับ H^+ ในช่องระหว่างเยื่อหุ้มชั้นนอกกับชั้นในแล้วเคลื่อนเข้าไปในเมทริกซ์โดยไม่ได้ผ่านทาง F_0 subunit ของ ATP synthase เมื่ออยู่ในเมทริกซ์ซึ่งเป็นด่าง (มี H^+ น้อย) มันก็จะแตกตัวเป็น ionized form พร้อมกับให้ H^+ ทำให้ด้านเมทริกซ์มีความเข้มข้นของ H^+ ไม่ต่างจากด้านนอกของเยื่อหุ้มชั้นใน จึงขาด electrochemical gradient ที่จะนำไปใช้สร้าง ATP ตัวอย่างเช่น 2, 4-dinitrophenol (DNP), carbonyl cyanide *m*-chlorophenylhydrazone (CCCP) และ carbonyl cyanide *p*-(trifluoromethoxy) phenylhydrazone (FCCP) [3]

เมื่อไมโทคอนเดรียสูญเสียหน้าที่จะนำไปสู่การลดการสร้าง ATP มีการสูญเสียสมดุลแคลเซียม และมีการสร้าง reactive oxygen species (ROS) เกิดขึ้นซึ่งเป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการแก่และการเสื่อมของระบบประสาท (aging and neurodegenerative disease) [36]

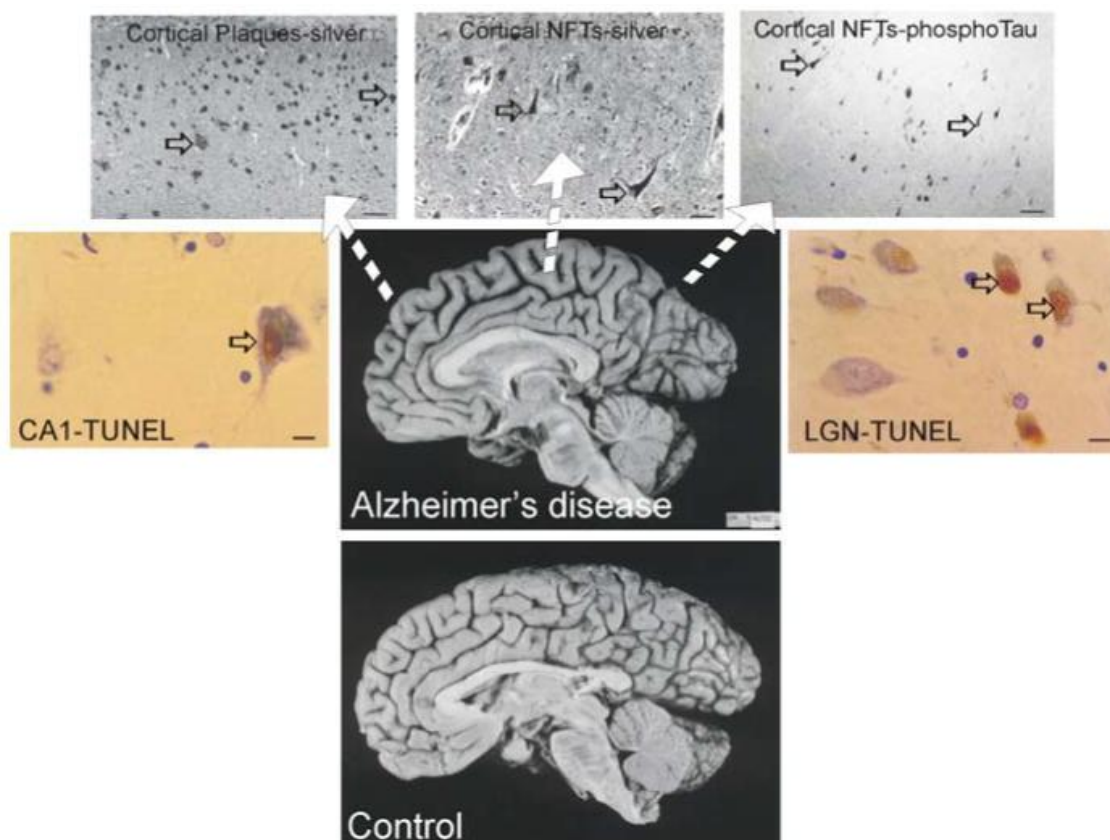
โรคอัลไซเมอร์

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease หรือ AD) ค้นพบเป็นครั้งแรกโดยจิตแพทย์ชาวเยอรมันชื่อ Alois Alzheimer เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาทที่พบมากที่สุด มักเกิดขึ้นในผู้สูงอายุ โดยพบว่า 7-10% เกิดขึ้นกับผู้ป่วยอายุมากกว่า 65 ปี และ 50-60% เกิดขึ้นกับผู้ป่วยอายุมากกว่า 85 ปี [11] มีอุบัติการณ์ 2% ของประชากร พบผู้ป่วยประมาณ 35 ล้านคนทั่วโลก มีการพยากรณ์ว่าจะมีผู้ป่วยราว 107 ล้านคนในปี ค.ศ. 2050 [12] ผู้ป่วยเกือบทั้งหมดเกิดโรคแบบไม่ทราบสาเหตุ (sporadic cases) อย่างไรก็ตามมีบางรายที่มีประวัติครอบครัวเป็นโรคและมีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมของยีนส์ที่ encode APP ที่กลายพันธุ์ [37-38] ซึ่งผู้ป่วยจะเกิดอาการตั้งแต่อายุน้อยกว่า 60 ปี [39-40] อาการของโรคในระยะเริ่มแรกคือการสูญเสียความจำ คือจำสิ่งที่เรียนรู้มาไม่นานไม่ได้ ระยะต่อมาผู้ป่วยมีอาการสับสน อารมณ์แปรปรวน หงุดหงิดง่าย ก้าวร้าว สูญเสียความทรงจำระยะยาว และเฉยเมยต่อสิ่งรอบข้าง ระยะสุดท้ายคือสูญเสียความรับรู้ ร่างกายสูญเสียหน้าที่และเสียชีวิตในที่สุด [41-42]

อาการความจำเสื่อมของผู้ป่วยอัลไซเมอร์เกิดจากการที่สมองส่วน cerebral cortex ฝ่ออย่างรุนแรง โดยจะพบว่าสมองส่วน sulci กว้างขึ้นและ gyri แคบลง ในขณะที่สมองคนปกติจะมีส่วนของ sulci แคบและ gyri กว้าง (รูปที่ 3) มีการขาดเก็บเซลล์ประสาทในสมองส่วน neocortex, hippocampus,

basal forebrain และ brain stem พบรอยโรคเรียกว่า senile plaque ซึ่งประกอบด้วย $A\beta$ ที่สะสมอยู่ภายนอกเซลล์ประสาทมากผิดปกติ และ NFT ที่ประกอบด้วยโปรตีนเทาที่ถูกเติมหมู่ฟอสเฟตสะสมอยู่ในเซลล์ประสาทมากผิดปกติ นอกจากนี้พบเซลล์ประสาทที่กลายในสมองส่วน cortical และ subcortical พบสาย DNA แตกหักในเซลล์ประสาทของ neocortex, hippocampus และ thalamus [16-19] โดยการตายของเซลล์ประสาทเกิดจากสาเหตุ ได้แก่ ความผิดปกติของ protein metabolism, สารพิษจากสิ่งแวดล้อม, oxidative stress, ความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย และ inflammation [43-52] โดยมีการศึกษาที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง $A\beta$ และไมโทคอนเดรีย เช่น พบการสูญเสียการทำงานของ complex IV ในสมองของผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคอัลไซเมอร์ [47] เมื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงมีการแสดงออกของ APP มากผิดปกติ APP ดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับไมโทคอนเดรีย ทำให้ไมโทคอนเดรียสร้างพลังงานไม่ได้ [52] และเมื่อนำ $A\beta$ มา incubate กับเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงพบว่า $A\beta$ เหนี่ยวนำให้เกิดการตายทั้งแบบ apoptosis และ necrosis [53] เกิดการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย [54] สูญเสียภาวะสมดุลแคลเซียม เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ เกิด DNA damage และทำให้เกิดการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียซึ่งนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทในที่สุด [55-56]

ยาที่รักษาโรคอัลไซเมอร์โดยหลักได้แก่ ยากลุ่ม Cholinesterase Inhibitors (ChEIs) เช่น donepezil, galantamine, rivastigmine เนื่องจากพบว่าในสมองส่วนที่พบการสะสม $A\beta$ จะมีระดับ acetylcholine ลดลง ยากลุ่มนี้จะช่วยเพิ่มระดับ acetylcholine ด้วยการยับยั้งเอนไซม์ acetylcholinesterase จึงช่วยเพิ่มการทำงานของระบบประสาท cholinergic [41]



รูปที่ 4 ภาพในระนาบด้านข้างของสมองผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์อายุ 85 ปี จะเห็น sulci แคบ gyri กว้าง เมื่อเปรียบเทียบกับสมองของคนปกติอายุ 86 ปี และเมื่อดูภาพขยายจากกล้องจุลทรรศน์จะเห็น senile plaque, neurofibrillary tangles และ neuronal cell death ในสมองส่วน hippocampus CA-1 และบริเวณ subcortical เช่น thalamic, lateral geniculate nucleus (LGN) [57]

โรคพาร์กินสัน

โรคพาร์กินสัน (Parkinson's disease) ค้นพบโดยนายแพทย์ชาวอังกฤษชื่อ James Parkinson ในปี ค.ศ. 1817 เป็นโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท (neurodegenerative disease) มีอุบัติการณ์ประมาณ 2% ของประชากร เป็นโรคที่มีอุบัติการณ์มากเป็นอันดับสองของโรคทางความเสื่อมของระบบประสาทรองจากโรคอัลไซเมอร์ [58] ผู้ป่วยโรคพาร์กินสันส่วนน้อย (<10% ของจำนวนผู้ป่วยทั้งหมด) มีประวัติครอบครัวเป็นโรคพาร์กินสัน (familial Parkinson's disease) [21] ผู้ป่วย

โรคพาร์กินสันส่วนมากเกิดโดยไม่ทราบสาเหตุ (idiopathic Parkinson's disease) โรคพาร์กินสันมีการดำเนินโรคแบบค่อยเป็นค่อยไป ลักษณะเฉพาะที่สำคัญซึ่งใช้ในการวินิจฉัยโรคเป็นอาการทางระบบประสาทสั่งการ (motor system) 4 อาการหลัก ได้แก่ อาการสั่นขณะพัก (resting tremor), กล้ามเนื้อแข็งเกร็ง (rigidity) ซึ่งประกอบด้วยข้อแข็งเกร็งและกล้ามเนื้อตึงตัว อาการเคลื่อนไหวช้าลงหรือภาวะเสียการเคลื่อนไหว (bradykinesia หรือ akinesia) สูญเสียการทรงตัวหรือทรงตัวไม่ได้ขณะลุกขึ้น (postural instability) [20] อาการทางระบบประสาทสั่งการที่เกิดในโรคพาร์กินสัน เป็นผลมาจากการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนใน substantia nigra pars compacta ร่วมกับมีการสะสมของโปรตีนที่เรียกว่า Lewy bodies ใน cytoplasm ของเซลล์ประสาท [59] นอกจากนี้พยาธิกำเนิดของโรคพาร์กินสันยังเกี่ยวข้องกับ oxidative stress และความผิดปกติของการทำงานของไมโทคอนเดรีย [60-61]

จากการศึกษาพบว่าผู้ที่สัมผัสกับยาปราบศัตรูพืชเป็นประจำมีอุบัติการณ์ของโรคพาร์กินสันมากกว่าประชากรปกติถึง 70% [62] ซึ่งสารพิษจากเกษตรกรรมที่อาจเป็นสาเหตุโรคพาร์กินสันได้แก่ ยาฆ่าหญ้าในกลุ่ม polychlorinated biphenyls, paraquat [63] ยาฆ่าแมลงกลุ่ม organochlorine เช่น dieldrin [64], lindane [65] rotenone [24] โลหะในหนูทรานส์เจน เช่น แมงกานีสหรือเหล็ก [66-67] พิษจากสาร MPTP (N-methyl-4-phenyl-1,2,3,6-tetrahydropyridine) ซึ่งเป็นอนุพันธ์สังเคราะห์จากฝิ่นเป็นสาเหตุที่เฉพาะเจาะจงกับการเกิดอาการของโรคพาร์กินสัน ทั้ง rotenone และ MPTP นี้ต่อมาได้นำมาใช้เป็นแบบจำลองโรคพาร์กินสันในสัตว์ทดลอง [68] ในการทดลองให้ rotenone ความเข้มข้นต่ำในระยะยาว แก่หนูแรท ปรากฏผลยับยั้งการทำงานของ complex I ในสมอง [25] เป็นสาเหตุให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีนใน nigrostriatal pathway เกิด striatal oxidative damage และพบการสร้าง α -synuclein-ubiquitin inclusions ใน nigral cells เช่นเดียวกับการพบ Lewy bodies ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน [21] ด้านการศึกษาทางพฤติกรรมของสัตว์ทดลองพบว่าหนูที่ได้รับ rotenone มีอาการเคลื่อนไหวเชื่องช้า (hypokinesia) ด้วยท่าทางหงิกงอ (flexed posture) คล้ายกับอาการตัวโค้งงอ (stooped posture) ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน นอกจากนั้นสัตว์ทดลองยังมีอาการแข็งเกร็งอย่างรุนแรง (severe rigidity) และอาการเท้าสั่น (shaking paw) คล้ายกับอาการสั่นขณะพัก (resting tremor) ในผู้ป่วยโรคพาร์กินสัน [25] ต่อมาจึงสามารถยืนยันกลไกว่า rotenone ยับยั้ง complex I อย่างจำเพาะเจาะจง โดยการศึกษาใน SK-N-MC cells ที่ transduce ด้วย single-subunit NADH dehydrogenase ของ *Saccharomyces cerevisiae* (NDI1) เข้าไปแทน complex I พบว่า rotenone ไม่ลดอัตราหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ปกติซึ่ง rotenone ยับยั้งการหายใจ [69] หลักฐานเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าพยาธิกำเนิดของโรคพาร์กินสันเกิดจากการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I ซึ่งจะทำให้เกิด oxidative stress

ขึ้น โดยเฉพาะการสร้าง O_2^- ทำให้ไมโทคอนเดรียลดประสิทธิภาพการทำงานรวมทั้งลดการสร้าง ATP [70]

การรักษาโรคพาร์กินสันในปัจจุบันจะรักษาด้วยยาซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อลดอาการทางระบบประสาทสั่งการ โดยการเพิ่มความสามารถของระบบประสาทโดปามีน ทั้งโดยเพิ่มการสังเคราะห์โดปามีน ลดการทำลายโดปามีน และกระตุ้นตัวรับโดปามีนโดยตรง ยาโรคพาร์กินสัน ได้แก่ L-DOPA (L-3,4-dihydroxyphenylalanine) ซึ่งเป็นสาร intermediate ในการสังเคราะห์โดปามีน L-DOPA จะเปลี่ยนรูปเป็นโดปามีนในเซลล์ประสาทโดปามีนด้วยเอนไซม์ L-aromatic amino acid decarboxylase อย่างไรก็ตาม L-DOPA สามารถเข้าสู่ระบบประสาทส่วนกลางได้เพียง 1-5% เท่านั้น นอกนั้นถูก metabolized ไปเป็นโดปามีนภายนอกสมอง จึงได้มีการใช้ dopa decarboxylase inhibitors ได้แก่ carbidopa benserazide ร่วมกับ L-DOPA ป้องกันไม่ให้ L-DOPA ถูก metabolized ภายนอกสมอง ยากลุ่ม COMT Inhibitors ซึ่งมีฤทธิ์ลดการทำลายโดปามีนที่ synapse โดยยับยั้งเอนไซม์ catechol-*o*-methyltransferase ยากลุ่ม dopamine agonists เช่น bromocriptine, pergolide, pramipexole, ropinirole, piribedil, cabergoline, apomorphine, lisuride ซึ่งออกฤทธิ์โดยกระตุ้น dopamine receptors และยากลุ่ม MAO-B inhibitors เช่น selegiline rasagiline ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ monoamine oxidase-B (MAO-B) ซึ่งทำลายโดปามีนที่หลังจากเซลล์ประสาทโดปามีน [71] แนวทางการพัฒนาการรักษาโรคพาร์กินสันมุ่งเน้นที่จะชะลอการเสื่อมของเซลล์ประสาท และปกป้องเซลล์ประสาท

บัวบก (*Centella asiatica*)



ชื่อวิทยาศาสตร์ *Centella asiatica* (Linn.) Urban.

ชื่อวงศ์ Umbelliferae

ชื่ออังกฤษ Asiatic pennywort

ชื่อท้องถิ่น ผักแว่น, ผักหนอก, ปะหนะ, เอชาเด้าะ

รูปที่ 5 บัวบก (<http://medplant.mahidol.ac.th/pubhealth/index.asp>)

บัวบกมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ คือ *Centella asiatica* (Linn.) Urban. จัดอยู่ในวงศ์ Umbelliferae เป็นพืชที่ขึ้นในเขตร้อนชื้น มีลักษณะเป็นไม้ล้มลุกเลื้อยแผ่ไปตามพื้นดิน ชอบที่ชื้นแฉะ แตรากฝอยตามข้อ โหลที่แผ่ไปจะงอกใบจากข้อชูขึ้น 3-5 ใบ ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยวเรียงสลับรูปไต เส้นผ่าศูนย์กลาง 2-5 ซม. ขอบใบหยัก ก้านใบยาว ดอกเป็นช่อสีม่วงขนาดเล็กออกที่ซอกใบ 2-3 ดอก ผลมีสีเขียวหรือขาวขนาดเล็ก เป็นผลแห้งแตกได้ [72] สารสกัดจากบัวบกประกอบด้วยสารสำคัญหลายตัว เช่น asiatic acid, asiaticoside, oxyasiaticoside, madecassic acid, madecassoside และ madecassol [73] บัวบกเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้ในการแพทย์อายุรเวท ถูกนำมาใช้ในการรักษาอาการต่างๆ เช่น เจ็บคอ ร้อนใน ระบายน้ำ ลดไข้ ขับปัสสาวะ แก้ท้องเสีย เป็นต้น [26] โดยเฉพาะการนำมาใช้สมานแผลและเร่งการสร้างเนื้อเยื่อ รวมถึงการใช้กระตุ้นระบบความจำและระบบประสาท [27] การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดจากบัวบกที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและโรคทางสมอง มีดังต่อไปนี้

1. การศึกษาที่แสดงว่าสารสกัดบัวบกมีฤทธิ์เพิ่มพฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ ในหนูแรทที่ถูกทำให้สูญเสียความสามารถในการเรียนรู้และความจำด้วยการฉีด streptozotocin เข้าทาง intracerebroventricular โดยพบว่าเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง oxidative stress ด้วยการลดระดับ malondialdehyde (MDA) เพิ่มระดับ glutathione และ catalase [28]

2. สารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทของหนูเมาส์วัยก่อนเจริญพันธุ์ ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ด้วย nitropropionic acid (3-NP) ซึ่งเป็น neurotoxicant ที่จำเพาะเจาะจงในการเกิดพยาธิสภาพต่อสมองส่วน striatum เช่นเดียวกับโรค Huntington's disease โดยเกี่ยวข้องกับการยับยั้ง oxidative stress ลดการสูญเสียหน้าที่ของ succinate dehydrogenase ซึ่งเป็นเอนไซม์ในห่วงโซ่หายใจของไมโทคอนเดรีย และลดการตายของไมโทคอนเดรีย [74]

3. การศึกษาที่แสดงว่า asiatic acid อนุพันธ์ triterpenoid ที่สกัดได้จากบัวบก มีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทของหนูเมาส์ที่ถูกทำให้เกิดภาวะสมองซีรีบรัมขาดเลือดซึ่งพบว่าสามารถลด mitochondrial injury โดยเมื่อแยกไมโทคอนเดรียมาวิเคราะห์พบว่าการยับยั้งการหลั่ง cytochrome c [75]

4. การศึกษาที่แสดงว่าสารสกัดบัวบกมีฤทธิ์ปกป้องระบบประสาทของหนูแรทวัยแก่ที่ถูกทำให้เป็นโรคพาร์กินสันด้วย MPTP โดยสารสกัดบัวบกลดระดับ lipid hydroperoxide (LPO), xanthine oxidase (XO) และเพิ่มระดับ total antioxidants (TA), superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx) และ catalase ในสมองส่วน corpus striatum และ hippocampus [29]

5. การศึกษาที่แสดงว่า asiatic acid ที่สกัดจากบัวบก ที่ให้แบบ pre-treatment มีฤทธิ์ปกป้องเซลล์ชนิด SH-SY5Y ต่อพิษของ rotenone และ H_2O_2 โดยพบว่าสามารถลดการตายของเซลล์, ลดอัตราการเกิด cells damage นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถลด expression ของ voltage-dependent anion channel (VDAC) ซึ่งเกี่ยวข้องในการเกิด mitochondrial damage อีกด้วย [76]

สารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 (standardized extract of *Centella asiatica* ECa233) ในการศึกษาที่มีลักษณะเป็นผงละเอียดสีขาวนวล มีปริมาณ triterpenoid glycosides ไม่น้อยกว่า 80% มีอัตราส่วนของ masdecosside ต่อ asiaticoside อยู่ในช่วง 1.5 ± 0.50 โดยมีการศึกษาที่แสดงว่าสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ช่วยเพิ่มการเรียนรู้และความจำ รวมทั้งช่วยลดระดับ malondialdehyde (MDA) ในสมองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในสัตว์ทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด โดยการผูกหลอดเลือดแดงแคโรทิดทั้งสองข้างแบบชั่วคราว นอกจากนี้สารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ยังช่วยเพิ่มความสามารถในการเรียนรู้และความจำในหนูเมาส์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการสูญเสียความจำด้วย β -amyloid [30]

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีวิจัย

3.1 วัสดุอุปกรณ์

สัตว์ทดลอง

หนูแรทพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนัก 200 – 250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา นครปฐม เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดและน้ำปริมาณไม่จำกัด ในโรงเลี้ยงสัตว์ทดลองคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ควบคุมอุณหภูมิห้องให้อยู่ระหว่าง $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ให้แสงสว่างและมีช่วงละ 12 ชั่วโมงสลับกัน และปฏิบัติตามหลักจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2542 โดยผ่านการอนุมัติระเบียบวิธีวิจัยในสัตว์ทดลองจากคณะกรรมการจริยธรรมสัตว์ทดลองคณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเลขที่ 11 – 33 - 007

สารเคมี

adenosine 5'-diphosphate (ADP), bovine serum albumin (BSA), malic acid ($\text{HO}_2\text{CCH}_2\text{CHOHCO}_2\text{H}$), glutamic acid ($\text{C}_5\text{H}_9\text{NO}_4$), potassium chloride (KCl), potassium phosphate monobasic anhydrous (KH_2PO_4), rotenone ($\text{C}_{23}\text{H}_{22}\text{O}_6$), hydrochloric acid (HCl), 2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris) ($\text{C}_4\text{H}_{11}\text{NO}_3$), sucrose ($\text{C}_{12}\text{H}_{22}\text{O}_{11}$), mannitol, potassium hydroxide (KOH), digitonin, absolute ethanol ($\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$), Dimethyl sulfoxide ($\text{C}_2\text{H}_6\text{OS}$) (DMSO), copper sulfate (CuSO_4), sodium potassium tartrate ($\text{NaKC}_4\text{H}_4\text{O}_6$), sodium carbonate (Na_2CO_3), Folin-Ciocalteu's phenol reagent, tyramine HCl, 5-hydroxytryptamine (5-HT), benzylamine HCl, sodium azide (NaN_3)

สารทดสอบ ECa233 ซึ่งได้รับความอนุเคราะห์จาก รองศาสตราจารย์ เกษักรหญิง ดร. มยุรี ตันติศิริระ

เครื่องมือและอุปกรณ์

Automatic pipettes 200, 1,000, 5,000 μl and pipette tips

Centrifuge tubes 15 ml

Hamilton micro-syringes 10.25 μ l

Hitachi automatic high speed refrigerated centrifuge (Himac model CR20B3) with rotor (model PRP18-3)

Homogenizer (Glass-Col[®])

Ice and ice box

Magnetic stirrer and magnetic bars

Oxygraph apparatus

- Biological Oxygen Monitor (YSI model 53)
- Clark Oxygen Electrode (YSI5331)
- Gilson Oxygen Chamber
- Strip Chart Recorder (Gilson Recorder Model N2)

Oxygen Probe Service Kit (YSI5775)

- Clark Type Membrane Booklets (Std)
- O₂ Probe Solution : half saturated KCl solution
- O-rings

Personal computer

pH-meter

Refrigerator and -20 °C controlled refrigerator

Surgical instruments : scissors, tissue forcep, tray, petri dish, beaker

Syringes 1 ml and needles 27 G

Temperature controlled circulator water bath

Temperature controlled water bath

Thomas glass homogenizer tube with Teflon pestle

Vacuum pump

Vortex mixer (Velp. Scientifica, Europe)

UV/Visible spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)

3.2 วิธีการวิจัย

3.2.1 การเตรียมไมโทคอนเดรียจากสมองของหนูแรท

เตรียมไมโทคอนเดรียจากสมองของหนูแรทด้วยวิธี differential centrifugation ซึ่งปรับปรุงจากวิธีของ Zhan และคณะ (2002) [77]

1. นำสลบหนูแรท 1 ตัว ด้วย chloral hydrate 400 mg/kg i.p. ทำ cervical dislocation แล้วผ่าตัดแยกสมองออกมาใส่ petri dish ที่มี isolation buffer 30 ml ตัดแยกเอาเฉพาะสมองส่วน cerebrum นำไปแช่ใน beaker ที่มี isolation buffer 30 ml

2. ตัดสมองให้เป็นชิ้นเล็กๆ แล้วเท isolation buffer ทิ้งเพื่อล้างเลือด แล้วเติม isolation buffer ให้ได้ปริมาตรประมาณ 15 ml

3. เทชิ้นเนื้อสมองใส่ homogenizing tube ขนาด 15 ml ทำการ homogenize ด้วยเครื่อง homogenizer

4. เท homogenate ใส่น้ำหลอด centrifuge 2 หลอด แบ่งเท่าๆ กัน เติม isolation buffer ให้ได้ปริมาตรหลอดละ 10 ml แล้วนำไป centrifuge ด้วยเครื่อง refrigerated centrifuge ที่ควบคุมอุณหภูมิ 4 °C

5. centrifuge ด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 3 นาที

6. เทส่วนใส (supernatant) ใส่น้ำหลอด centrifuge ที่ใส่ 0.02% digitonin ไว้แล้ว 2 หลอด หลอดละ 10 µl เติม isolation buffer ให้ได้ปริมาตร 10 ml แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 2,000 g เป็นเวลา 3 นาที

7. เทส่วนใสใส่น้ำหลอด centrifuge 2 หลอด เติม isolation buffer ให้ได้ปริมาตร 10 ml แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที

8. ทิ้งส่วนใสเก็บตะกอนทั้ง 2 หลอดรวมกันในหลอด homogenize แล้ว homogenize ด้วยมือเทใส่น้ำหลอด centrifuge 1 หลอด เติม isolation buffer ให้ได้ปริมาตร 10 ml แล้ว centrifuge ด้วยความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 10 นาที

9. ล้างผิวตะกอนด้วย incubation buffer ปริมาณเล็กน้อย 2-3 ครั้ง

10. เติม incubation buffer ให้ได้ปริมาตร 2 ml ใช้ auto-pipette คูดถ่ายตะกอนใส่น้ำหลอดกั้นกม แล้ว homogenize ด้วยมืออีกครั้ง จะได้ mitochondria พร้อมใช้

โดย Isolation buffer ประกอบด้วย 250 mM sucrose, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, 1 mg/ml BSA ปรับปรุงจาก Cormier (2003) [78]

Incubation buffer ประกอบด้วย 75 mM sucrose, 300 mM mannitol, 10 mM Tris, 5 mM KCl, 5 mM KH_2PO_4 ปรับปรุงจาก Zhan และคณะ (2002) [77]

หมายเหตุ : สารละลายและขั้นตอนทั้งหมดต้องอยู่ในสภาวะอุณหภูมิ 4 °C

3.2.2 การหาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย

หาปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียโดยใช้วิธีของ Lowry และคณะ (1951) ซึ่งดัดแปลงเพิ่มเติมโดย Miller (1959) โดยมีวิธีทำดังนี้ [79]

1. เจือจาง mitochondrial suspension ปริมาณ 10 μl ด้วยน้ำกลั่น 3 ml (1:300) จะได้สารละลาย A
2. คูณสารละลาย A ปริมาณ 1 ml ใส่ในหลอดทดลอง เติม alkaline copper reducing agent 1 ml เขย่าให้เข้ากัน ปล่อยให้ทำปฏิกิริยา 10 นาที (กรณีเป็น blank ใช้น้ำกลั่น 1 ml และกรณีที่ทำ standard curve จะใช้ 1 ml ของ bovine serum albumin ในความเข้มข้น 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25, 0.30 mg/ml แทนสารละลาย A)
3. เติม Folin-Ciocalteu's phenol reagent (dilution 1:10) 3 ml เขย่าให้เข้ากัน
4. นำไปแช่ใน water bath ที่มีอุณหภูมิ 50 °C เป็นเวลา 10 นาที
5. ตั้งทิ้งไว้ให้เย็นที่อุณหภูมิห้อง
6. นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm
7. นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปเปรียบเทียบกับปริมาณโปรตีนจาก standard curve แล้วคูณด้วย dilution factor (ในที่นี้คือ 3 x 100) จะได้ค่าความเข้มข้นและปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรีย มีหน่วยเป็น mg/ml

หมายเหตุ : การเตรียมสารละลายที่ใช้ในการหาปริมาณโปรตีน

- alkaline copper reagent เป็นสารละลายที่ประกอบด้วย 1 ส่วนของ 0.5% CuSO_4 ที่ละลายอยู่ใน 1% (w/v) ของ potassium tartrate และ 10 ส่วนของ 10% (w/v) Na_2CO_3 ที่ละลายอยู่ใน 0.5 M NaOH

- Folin-Ciocalteu's phenol reagent (dilution 1:10) เตรียมได้จากการเจือจาง concentrated Folin-Ciocalteu's phenol reagent ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:10 (v/v) และเตรียมใช้ทันที

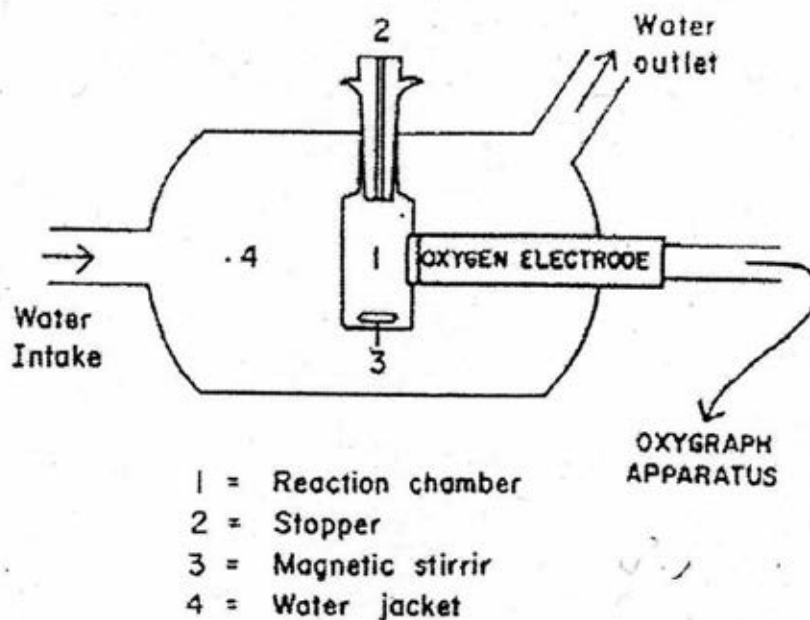
3.2.3 การวัดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย

องค์ประกอบสำคัญของการหายใจของไมโทคอนเดรียมีหลายประการ เช่น ออกซิเจน, สับสเตรท, ADP + Pi หรือ uncoupler เป็นต้น ซึ่ง Chance และ William (1956) ได้จัดแบ่งภาวะการหายใจของไมโทคอนเดรียตามองค์ประกอบสำคัญในปฏิกิริยาออกเป็น 6 ภาวะ ดังตารางที่ 1

ตารางที่ 1 การแบ่งภาวะ (state) ต่างๆ ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย

State	Condition
1	มีเพียง O ₂
2	มี O ₂ และ substrate
3 (active state)	มี O ₂ , substrate และ ADP
3u	มี uncoupler
4	มี O ₂ และ substrate
5	มีเพียง substrate
6	การหายใจถูกยับยั้งด้วย excess calcium

อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียวัดด้วย biological oxygen monitor (YSI model 53) ประกอบด้วย Clark oxygen electrode (YSI5331) water-jacketed chamber (Gilson Oxygen Chamber) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 °C (รูปที่ 6) โดยวิธีนำไมโทคอนเดรียไป incubate ด้วย standard respiration medium ใน oxygen chamber (หรือเรียกว่า reaction chamber) ที่มีสารละลาย substrate อยู่ จากนั้นเติมสารละลาย ADP + Pi ซึ่งจะทำให้เกิดการใช้ออกซิเจนอย่างรวดเร็วเพื่อเปลี่ยน ADP ไปเป็น ATP ซึ่งเรียกว่า active respiring state หรือ state 3 respiration หลังจากนั้นอัตราการใช้ออกซิเจนจะลดลงเนื่องจาก ADP ถูก phosphorylate ไปเป็น ATP จนหมดไปซึ่งเรียกว่า state 4



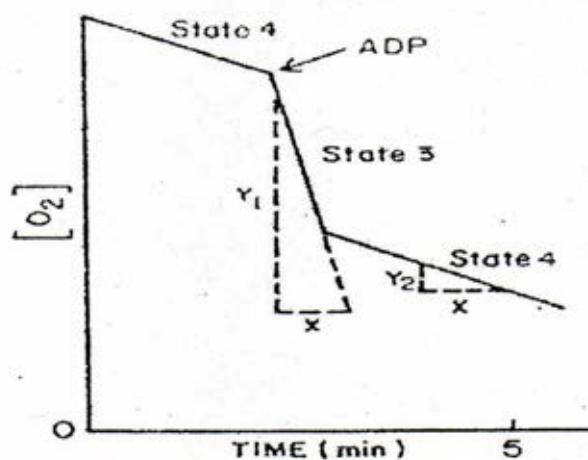
รูปที่ 6 ส่วนประกอบและการทำงานของ Biological oxygen monitor คือ (1) reaction chamber ความจุ 2 ml, (2) stopper ใช้ปิด chamber เพื่อป้องกันไม่ให้อากาศเข้าไปละลายใน chamber ซึ่งจะรบกวนการทดลอง, (3) magnetic stirrer, (4) water jacket ใช้ควบคุมอุณหภูมิให้แก่ chamber โดยมีน้ำ 37 °C ไหลผ่านตลอดเวลา, oxygen electrode ใช้วัดปริมาณออกซิเจนใน chamber

การคำนวณค่าดัชนีควบคุมการหายใจ (Respiratory control index หรือ RCI)

RCI เป็นค่าบ่งชี้ว่าการถ่ายเทอิเล็กตรอนในห่วงโซ่การหายใจกับ oxidative phosphorylation มี coupling กันดีเพียงใด ถ้าเตรียมไมโทคอนเดรียไม่ดีซึ่งอาจเกิดจาก mechanical damage หรือเกิดจากสภาวะไม่เหมาะสมในขณะที่แยกเอาไมโทคอนเดรียจะทำให้ได้การ coupling ที่ไม่ดี ซึ่งโดยทั่วไปแล้ว RCI จะมีค่าอยู่ระหว่าง 3 – 10 โดยสามารถคำนวณ RCI จากตัวอย่าง oxygraph tracing ดังรูปที่ 7 ได้ดังนี้

$$\text{RCI} = \frac{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 3}}{\text{อัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียใน state 4}}$$

$$\text{RCI} = \frac{\text{ความชันของเส้นกราฟใน state 3}}{\text{ความชันของเส้นกราฟใน state 4}}$$

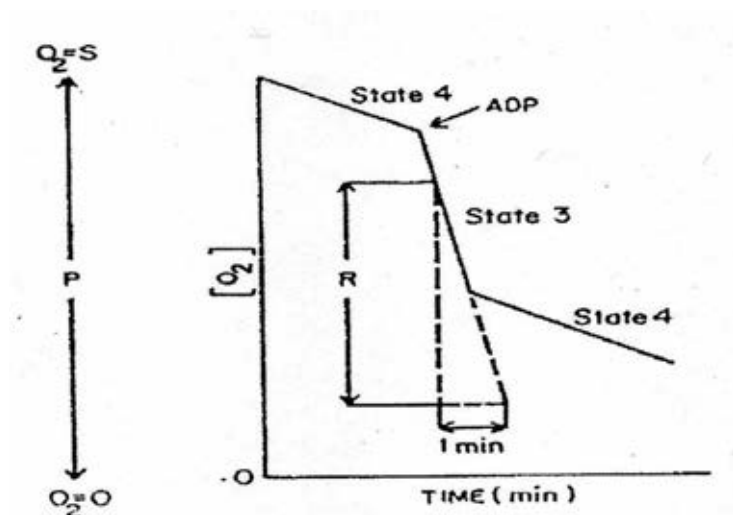


รูปที่ 7 ตัวอย่าง oxygraph tracing ในการนำมาใช้คำนวณค่า RCI โดยคำนวณได้จาก

$$\text{RCI} = \frac{Y_1/X}{Y_2/X} = \frac{Y_1}{Y_2}$$

ในการศึกษานี้หลังจากเตรียมไมโทคอนเดรียได้ จะทำการวัดค่า RCI โดยเติมสารต่างๆ ใน chamber ดังนี้ incubation buffer ไมโทคอนเดรีย substrate ซึ่งได้แก่ glutamate + malate และ ADP + Pi ตามลำดับ และวัดค่าอัตราการหายใจ state 3 และ state 4 กำหนดให้ไมโทคอนเดรียที่มีค่า RCI ตั้งแต่ 4 ขึ้นไปจึงจะนำมาใช้ในการทดลอง [80]

การคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียในระยะต่างๆ



รูปที่ 8 ตัวอย่าง oxygraph tracing ในการนำมาใช้คำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย จากตัวอย่าง oxygraph tracing ในรูปที่ 8 สามารถคำนวณอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียได้ ดังนี้

$\text{อัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3} = \frac{R \times A}{P} \quad \text{n atoms O/min}$
--

โดยที่ R = ความสูงของเส้น R ในรูป

P = ความสูงของเส้น P ในรูป

A = จำนวน n atoms ของออกซิเจนที่ละลายอิมตัวอยู่ในน้ำ 1 ml

A สามารถหาได้จากสมการ

$A = \frac{s \times p \times N \times 10^9}{V \times 100} \quad \text{n atoms O/ml}$
--

เมื่อ A = จำนวน n atoms ออกซิเจนที่ละลายอิมตัวในน้ำ 1 ml

s = ค่าสัมประสิทธิ์การดูดซึมของออกซิเจน (absorption coefficient) ที่อุณหภูมิที่ทำให้การทดลอง (ปริมาตรของออกซิเจนเมื่อถูกเปลี่ยนแปลงไปอยู่ที่ 0 °C และ 760 mmHg) โดยมีค่าเท่ากับ 0.02373 ที่อุณหภูมิ 37 °C

$p =$ สัดส่วนของออกซิเจนในบรรยากาศ = 21 %

$N =$ จำนวน atom ใน 1 molecule ของออกซิเจน = 2

$V =$ ปริมาตรก๊าซที่ 0 °C ความดัน 1 บรรยากาศ เทียบกับ 1 กรัมโมล มีค่าเท่ากับ 22,400 ml

ในการวิจัยจะควบคุมอุณหภูมิให้คงที่ที่ 37 °C ดังนั้นค่า A ในที่นี้จึงเท่ากับ 444.9 n atoms O/ml ถ้าทราบปริมาณโปรตีนของไมโทคอนเดรียแล้วนำมาหาอัตราการใช้ออกซิเจนที่คำนวณได้ตามวิธีข้างต้น จะทำให้ได้ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียที่มีหน่วยเป็น n atoms O/ml/min/mg protein

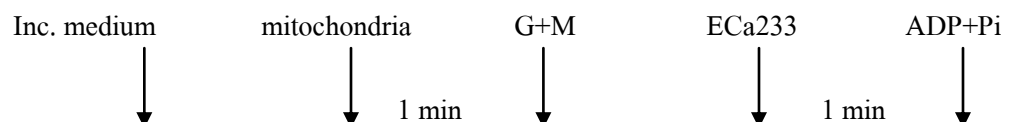
3.2.4 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองหนูแรทเมื่อใช้ substrate ต่างๆ กัน

3.2.4.1 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ substrate เป็น NAD⁺-linked (glutamate + malate) ซึ่งเป็น substrate ของ complex I (n = 5)

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l

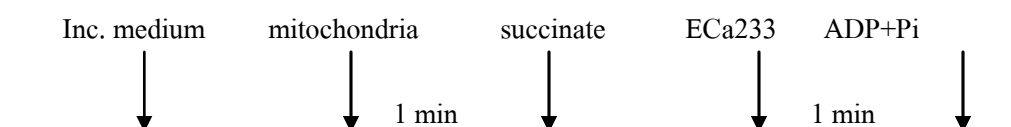
2) เติม ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml ปริมาณ 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 μ g ตามลำดับ กลุ่มควบคุมเติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ ECa233

3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3



3.2.4.2 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัควัก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ substrate เป็น FAD-linked (succinate) ซึ่งเป็น substrate ของ complex II (n = 5)

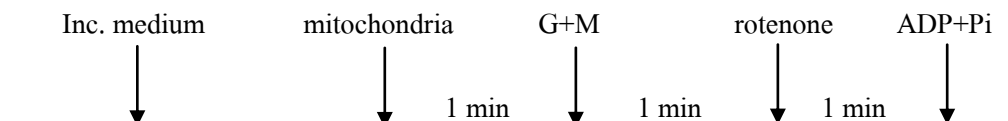
- 1) เติม substrate คือ 1 M succinate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l
- 2) เติม ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml ปริมาณ 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 μ g ตามลำดับ กลุ่มควบคุมเติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ ECa233
- 3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3



3.2.5 การศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัควัก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองหนูแรทในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone ซึ่งเป็น complex I inhibitor

3.2.5.1 ผลของ rotenone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ rotenone ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหา % inhibition (n = 5)

- 1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l
- 2) เติม rotenone ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.005, 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/ml ปริมาณ 2 μ l กลุ่มควบคุมเติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ rotenone
- 3) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 และ state 4



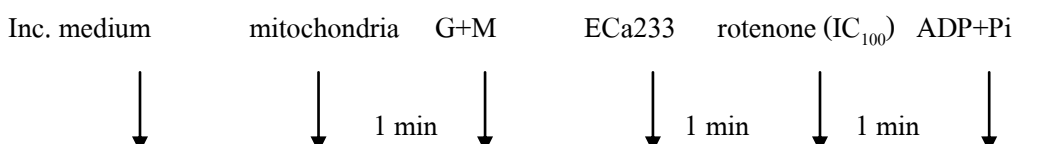
3.2.5.2 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone ในความเข้มข้น maximum inhibitory concentration (n = 5)

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l

2) เติม ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g ตามลำดับ กลุ่มควบคุม เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ ECa233

3) เติม rotenone ความเข้มข้น maximum inhibitory concentration ปริมาณ 2 μ l ลงใน oxygen chamber

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3



3.2.5.3 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone ในความเข้มข้น IC₂₅ (n = 5)

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l

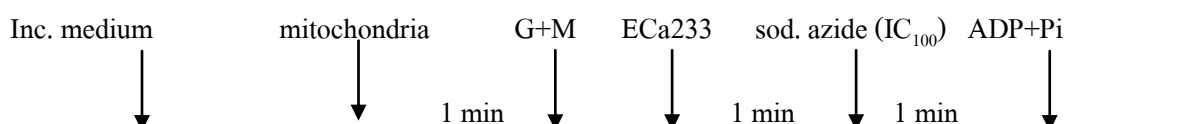
2) เติม ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g ตามลำดับ กลุ่มควบคุม เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ ECa233

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l

2) เติม ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μ g ตามลำดับ กลุ่มควบคุม เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ ECa233

3) เติม sodium azide ความเข้มข้น maximum inhibitory concentration ปริมาณ 2 μ l

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3



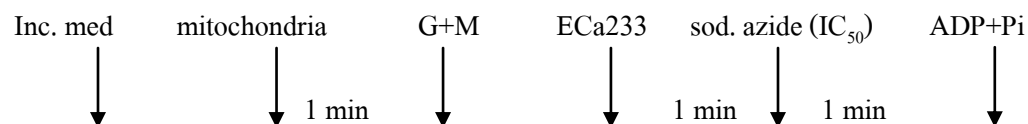
3.2.6.3 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย sodium azide ในความเข้มข้น median inhibitory concentration (n = 5)

1) เติม substrate คือ 1 M glutamate + 1 M malate ปริมาณ 10 μ l ลงใน reaction chamber ที่มี incubation buffer 1,700 μ l และไมโทคอนเดรีย 200 μ l

2) เติม ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.001, 0.1, 1, 10, 100 μ g ตามลำดับ กลุ่มควบคุม เติม DMSO ซึ่งเป็นตัวทำละลายของ ECa233

3) เติม sodium azide ความเข้มข้น median inhibitory concentration ปริมาณ 2 μ l

4) เติม 0.3 M ADP + 0.6 M Pi ปริมาณ 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3



3.3 การรวบรวมและการวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ค่าอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียแสดงผลเป็น $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ และเปรียบเทียบผลระหว่างกลุ่มด้วย One-way analysis of variance (ANOVA) และใช้ *post-hoc* test วิธีของ Tukey

บทที่ 4

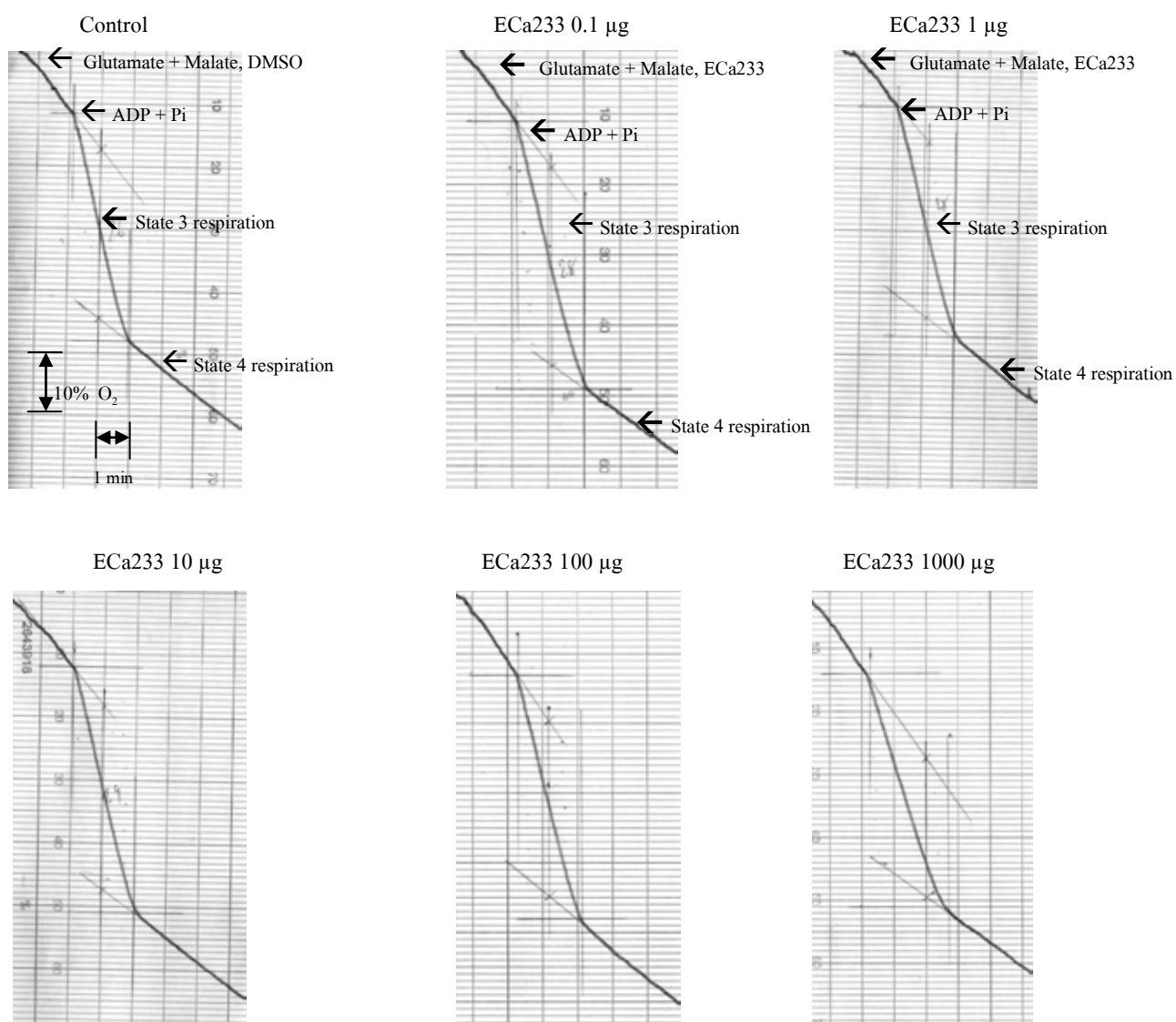
ผลการวิจัย

4.1 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ substrate เป็น NAD^+ -linked (glutamate + malate)

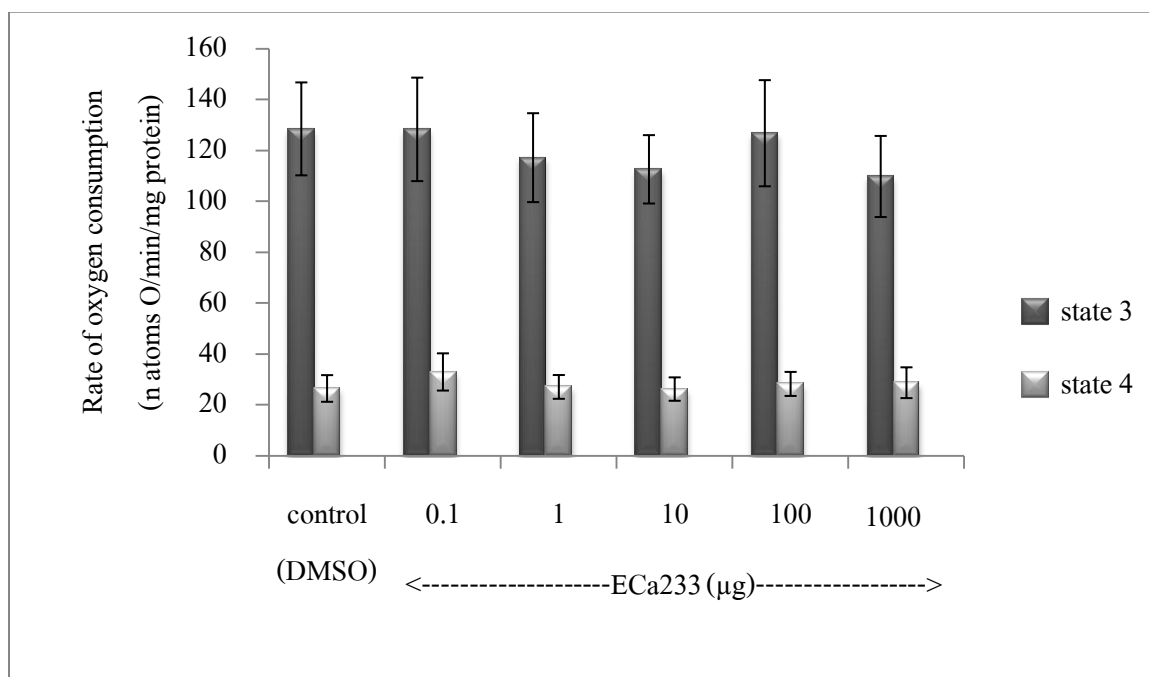
ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 4.89 ± 0.15 ($n = 5$) ECa233 ปริมาณ 0.1, 1, 10, 100, 1000 μg ใน chamber มีแนวโน้มที่จะลดอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (128.16 ± 20.34 , 117.04 ± 17.48 , 112.46 ± 13.44 , 126.65 ± 20.87 , 109.64 ± 15.94 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 128.36 ± 18.27 ของกลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(5,24) = 0.22$, $P = 0.95$, one-way ANOVA) และไม่มีผลต่อการหายใจใน state 4 ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (32.78 ± 7.32 , 26.90 ± 4.68 , 26.05 ± 4.60 , 28.07 ± 4.73 , 28.55 ± 6.05 n atom O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 26.29 ± 5.2 ของกลุ่มควบคุม) ($F(5,24) = 0.20$, $P = 0.95$, one-way ANOVA) ดังรูปที่ 10

รูปที่ 9 แสดง oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย ในการทดลองหาผลของ ECa233 ในปริมาณต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 และ state 4 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา 1 M glutamate + 1 M malate 10 μ l, incubation buffer 1,700 μ l, ไมโทคอนเดรีย 200 μ l, ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 μ g ตามลำดับ หรือ DMSO 10 μ l ในกลุ่มควบคุม (control), และ 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μ l คูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 respiration โดยแกน x คือ เวลา แกน y คือ ปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 10 เปรียบเทียบผลของ ECa233 ปริมาณต่างๆ ต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ($F(5,24) = 0.22, P = 0.95$, one-way ANOVA) และ state 4 ($F(5,24) = 0.20, P = 0.95$, one-way ANOVA) เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate แต่ละจุดแสดงเป็น mean \pm S.E.M. จาก 5 การทดลอง ($n = 5$)

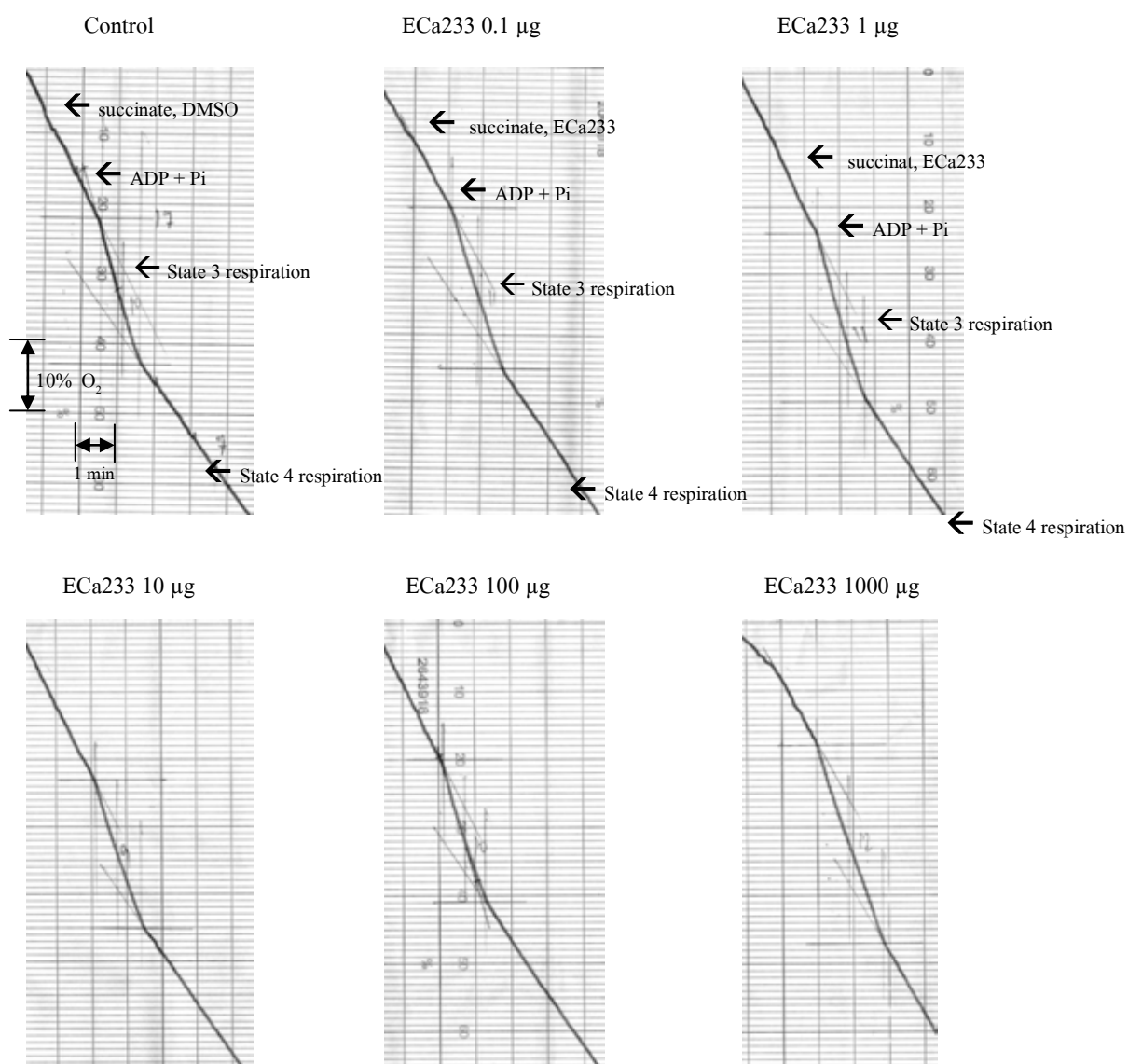


4.2 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียเมื่อใช้ substrate เป็น FAD-linked (succinate)

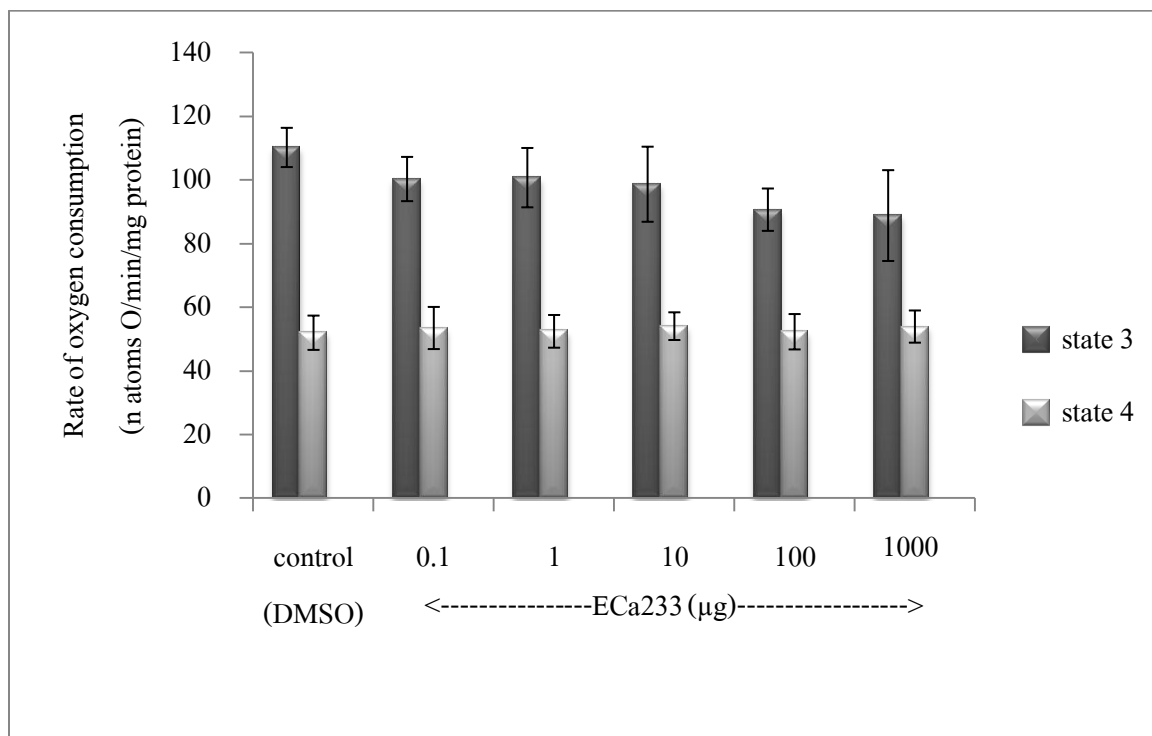
ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 5.48 ± 0.48 ($n = 5$) ECa233 ปริมาณ 0.1, 1, 10, 100, 1000 μg ใน chamber มีแนวโน้มที่จะลดอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (100.34 ± 6.95 , 100.77 ± 9.33 , 98.70 ± 11.80 , 90.70 ± 6.66 , 88.85 ± 14.27 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 110.26 ± 6.16 ของกลุ่มควบคุม) อย่างไรก็ตามไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(5,24) = 0.64$, $P = 0.67$, one-way ANOVA) และไม่มีผลต่อการหายใจใน state 4 ของไมโทคอนเดรีย เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (53.52 ± 6.62 , 52.47 ± 5.14 , 54.10 ± 4.35 , 52.34 ± 5.56 , 53.97 ± 5.06 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 52.03 ± 5.39 ของกลุ่มควบคุม) ($F(5,24) = 0.28$, $P = 1.0$, one-way ANOVA) ดังรูปที่ 12

รูปที่ 11 oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย ในการทดลองหาผลของ ECa233 ในปริมาณต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 และ state 4 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา คือ 1 M succinate ปริมาณ 10 μ l, incubation buffer 1,700 μ l, ไมโทคอนเดรีย 200 μ l, ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 mg/ml 10 μ l ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.1, 1, 10, 100, 1,000 μ g ตามลำดับ หรือ DMSO 10 μ l, 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μ l ผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือ เวลา แกน y คือ ปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 12 เปรียบเทียบผลของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ ต่ออัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ($F(5,24) = 0.64, P = 0.67$, one-way ANOVA) และ state 4 ($F(5,24) = 0.28, P = 1.0$, one-way ANOVA) เมื่อใช้ succinate เป็น substrate แต่ละจุดแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M จาก 5 การทดลอง (n = 5)



4.3 ผลของ rotenone ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ rotenone ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหา % inhibition

ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 6.39 ± 0.96 ($n = 3$) rotenone ปริมาณ 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08, 0.10 μg ใน chamber สามารถลดอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรียมากขึ้นแปลตามความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (74.95 ± 7.92 , 61.15 ± 0.46 , 49.96 ± 0.38 , 35.55 ± 7.01 , 26.33 ± 2.86 , 19.61 ± 1.79 n atoms O/min/mg protein ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 74.95 ± 7.92 ของกลุ่มควบคุม) มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(6,14) = 19.14$, $P < 0.001$, one-way ANOVA) โดยอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 μg มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$, $P < 0.001$, $P < 0.001$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ Tukey's *post-hoc* test) ดังรูปที่ 14

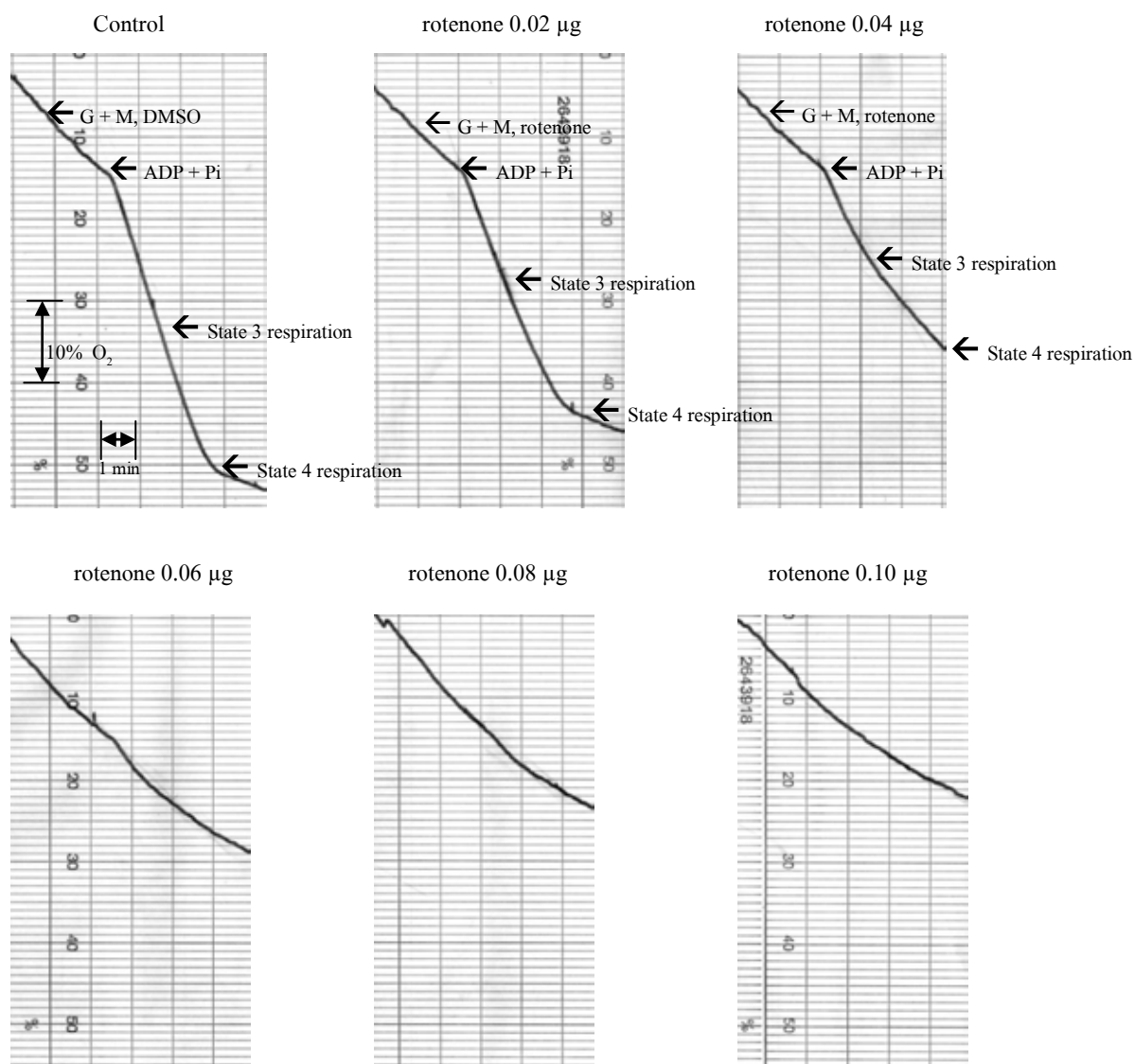
เมื่อคำนวณค่าเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียใน state 3 (% inhibition) พบว่า rotenone ปริมาณ 0.01, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 และ 0.10 μg ใน chamber มี % inhibition เท่ากับ 0.00 ± 0.00 , 16.73 ± 8.02 , 31.98 ± 6.47 , 51.35 ± 11.49 , 63.01 ± 6.89 , 73.11 ± 4.43 % ตามลำดับ ดังรูปที่ 15

โดยที่ rotenone ปริมาณ 0.10 μg ในปฏิกิริยาสามารถลดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียจนมีอัตราการหายใจใน state 3 ใกล้เคียงกับ state 4 แสดงว่าเกิดการยับยั้งกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรียจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ได้ เมื่อใส่ ADP ลงในปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณค่า RCI ได้เท่ากับ 1.08 ± 0.08 จึงถือว่า rotenone 0.10 μg เป็นปริมาณที่ทำให้เกิด maximum inhibition ส่วนปริมาณที่ทำให้เกิด median inhibition นั้นเลือก 0.04 μg ซึ่งไม่เท่ากับ IC_{50} โดยจากสมการ probit คือ $y = 38.671x - 1.501$ จะได้ ความเข้มข้นของ rotenone ที่ 50% inhibition เท่ากับ 0.039 mg/ml หรือเป็นปริมาณที่ใส่ในปฏิกิริยาเท่ากับ 0.078 μg

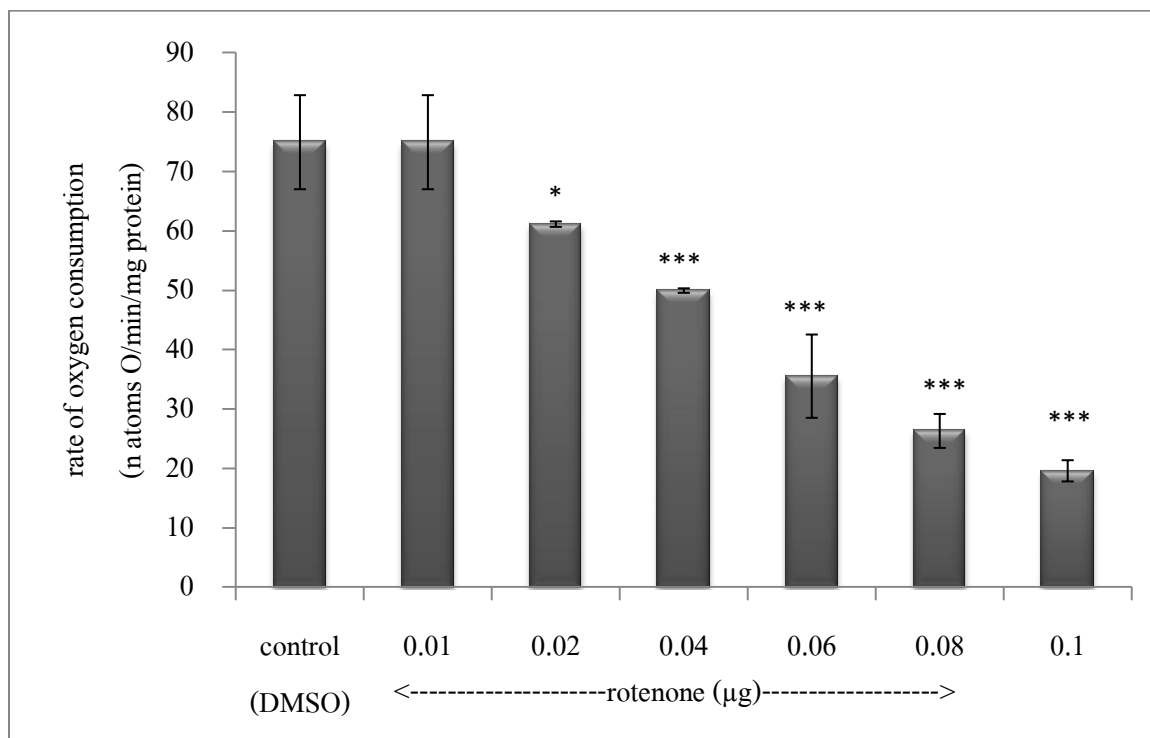
จากการทดลองนี้จะใช้ rotenone ที่ maximum inhibition (0.01 μg ใน chamber) และ IC_{25} (0.04 μg ใน chamber)

รูปที่ 13 oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ rotenone ในปริมาณต่างๆ กัน ยับยั้งการหายใจ

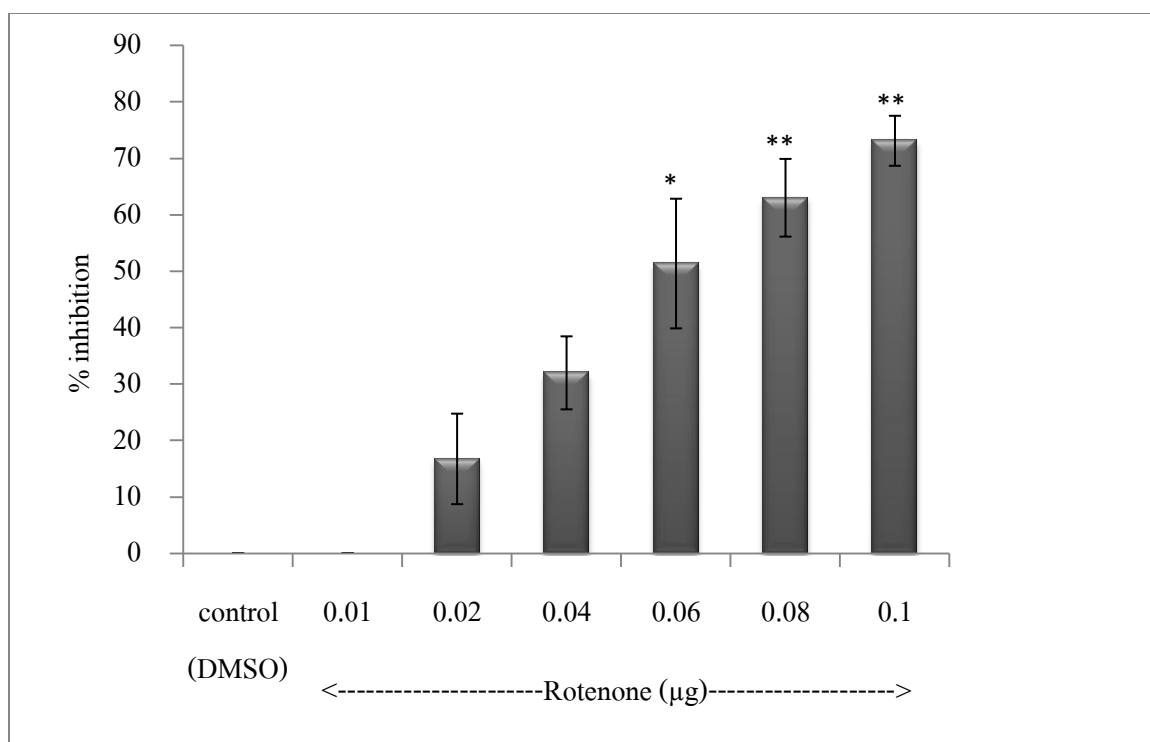
ส่วนประกอบของปฏิกิริยา คือ 1 M glutamate + 1 M malate 10 μ l, incubation buffer 1,700 μ l, ไมโทคอนเดรีย 200 μ l, rotenone ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.03, 0.04, 0.05 mg/ml หรือ DMSO ปริมาณ 2 μ l, 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μ l ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือเวลา แกน y คือปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 14 แสดงค่าอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรีย ที่ถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone ปริมาณต่างๆ ($F(6,14) = 19.14, P < 0.001$, one-way ANOVA) โดย *, *** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่า $P < 0.05$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ Tukey's *post-hoc* test แต่ละจุดแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. (n = 3)



รูปที่ 15 แสดงผลการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเป็น % inhibition เมื่อใช้ rotenone ปริมาณต่างๆ เป็นสารยับยั้งการหายใจ โดย * และ ** แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ($F(6,14) = 19.60, P < 0.001$, one-way ANOVA) โดยมีค่า $P = 0.001, < 0.001$ ตามลำดับ, Tukey's *post-hoc* test แต่ละจุดแสดงเป็นค่า $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ($n = 3$)

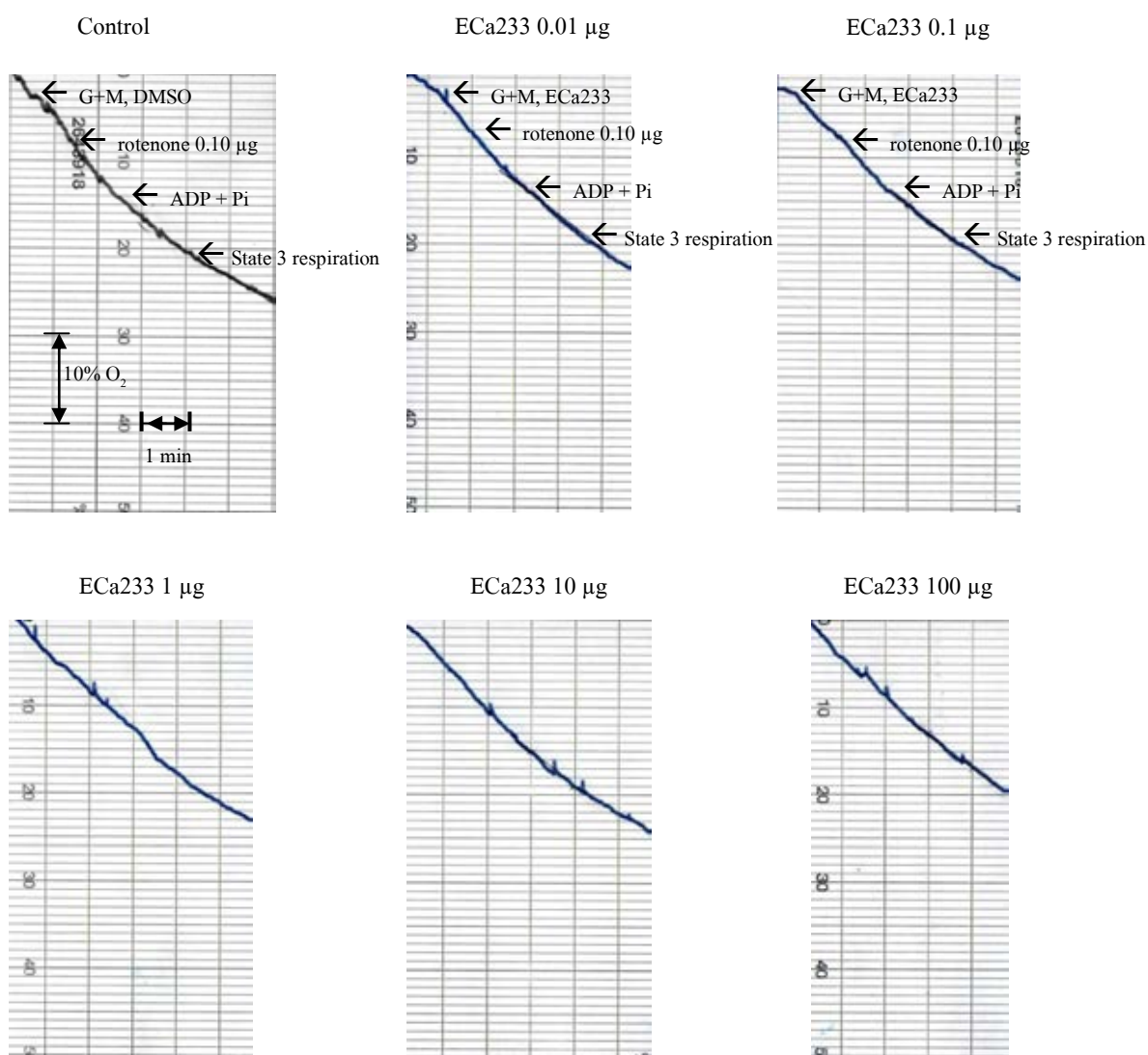


4.4 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone 0.10 μg

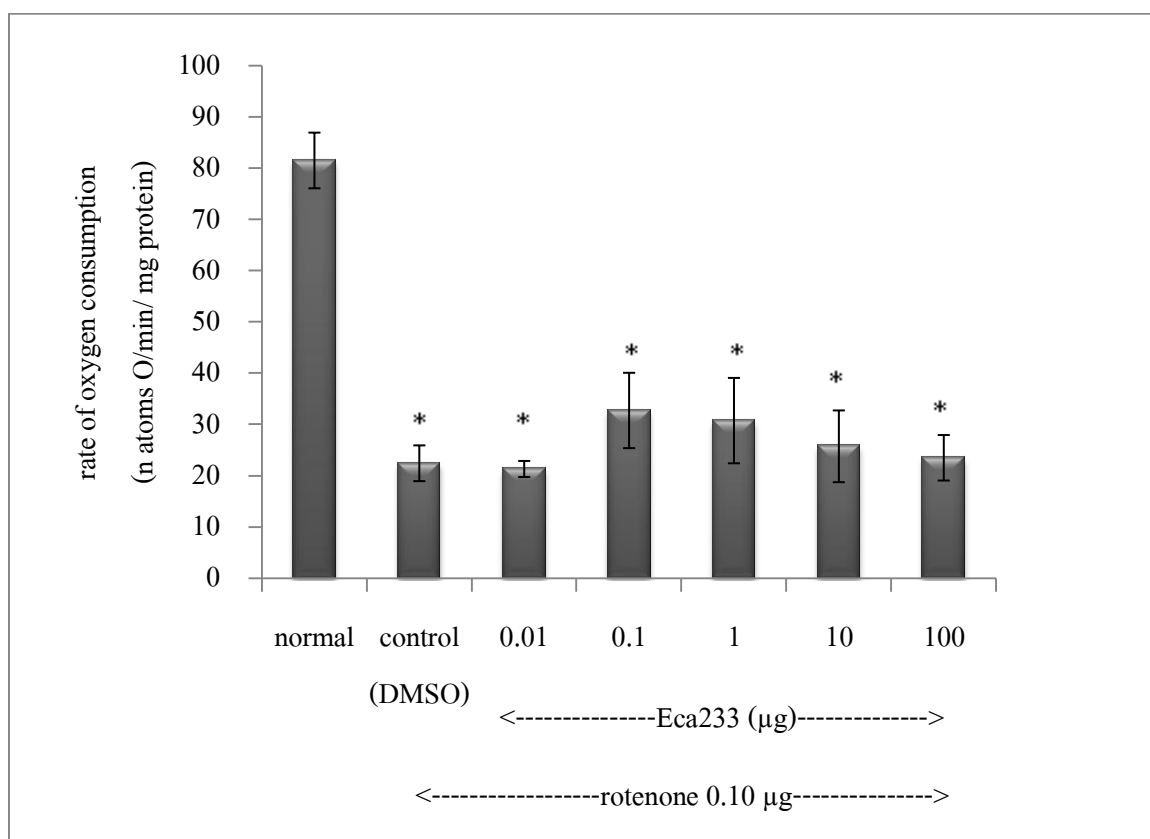
ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 4.86 ± 0.48 ($n = 5$) rotenone ในปริมาณที่ทำให้เกิด maximum inhibition ($0.10 \mu\text{g}$ ใน chamber) ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ (22.45 ± 3.49 เปรียบเทียบกับ 81.53 ± 5.43 n atoms O/min/mg protein ของกลุ่มปกติ $P < 0.001$, Tukey's post hoc test) ECa233 ปริมาณ $0.01 \mu\text{g}$ มีแนวโน้มลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone ในขณะที่ ECa233 0.1 และ $1.0 \mu\text{g}$ มีแนวโน้มจะเพิ่มอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone อย่างไรก็ตาม ECa233 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถเพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone อย่างเดียว ดังรูปที่ 17

รูปที่ 16 oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.10 μg ใน chamber ซึ่งเป็น maximum inhibition

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา คือ 1 M glutamate + 1 M malate 10 μl , incubation buffer 1,700 μl , ไมโทคอนเดรีย 200 μl , ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml 10 μl ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg ตามลำดับหรือ DMSO 10 μl , rotenone 0.05 mg/ml 2 μl (1.0 μg), 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μl ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือเวลา แกน y คือปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 17 เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.10 μg พบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลอง ($F(5,18) = 0.57, P = 0.72$, one-way ANOVA) โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มปกติกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ($F(6,28) = 13.55, P < 0.001$, One-way ANOVA) โดยมีค่า $P < 0.001$, Tukey's *post-hoc* test แต่ละจุดแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. (n = 5)

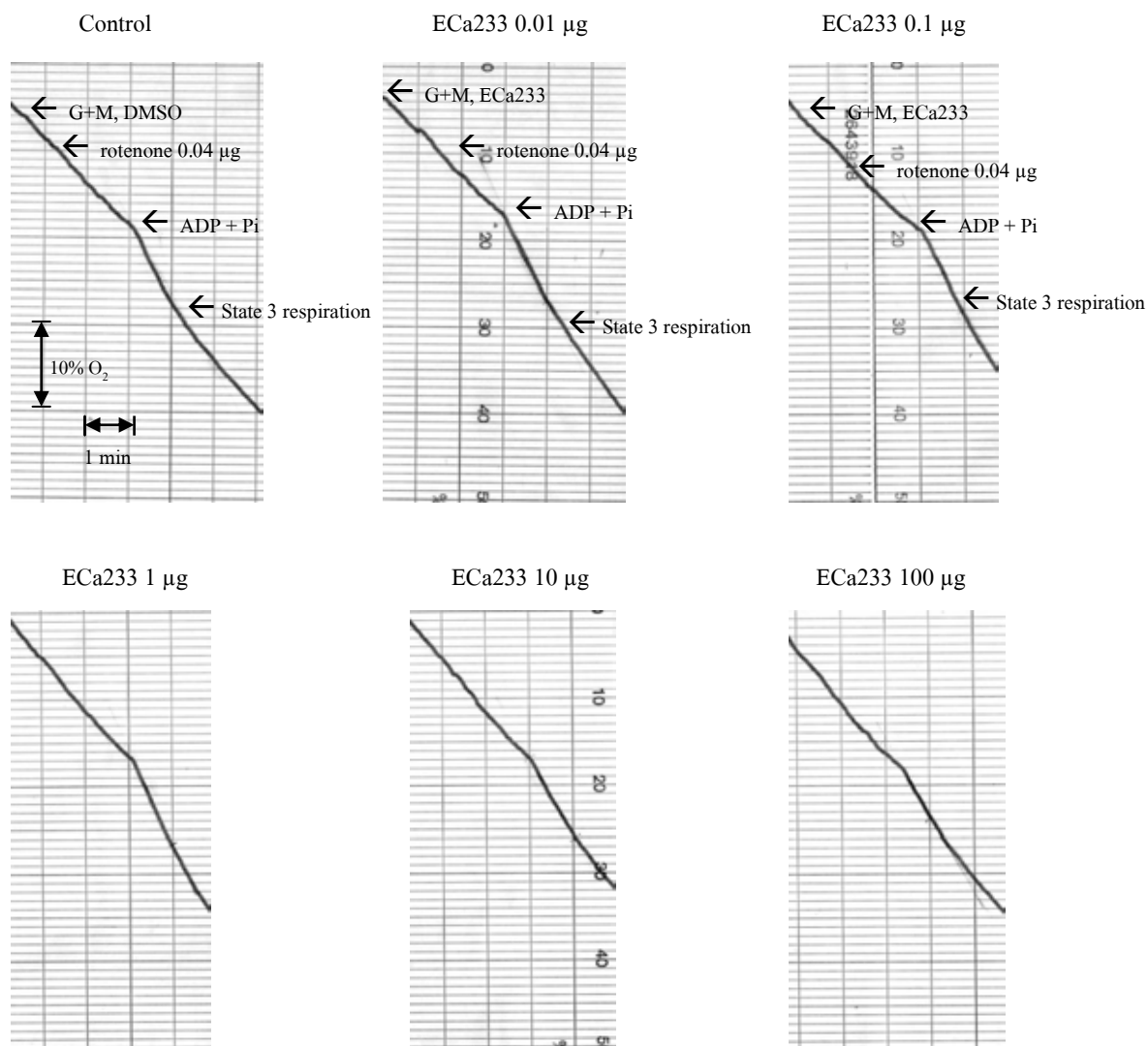


4.5 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย rotenone 0.04 μg

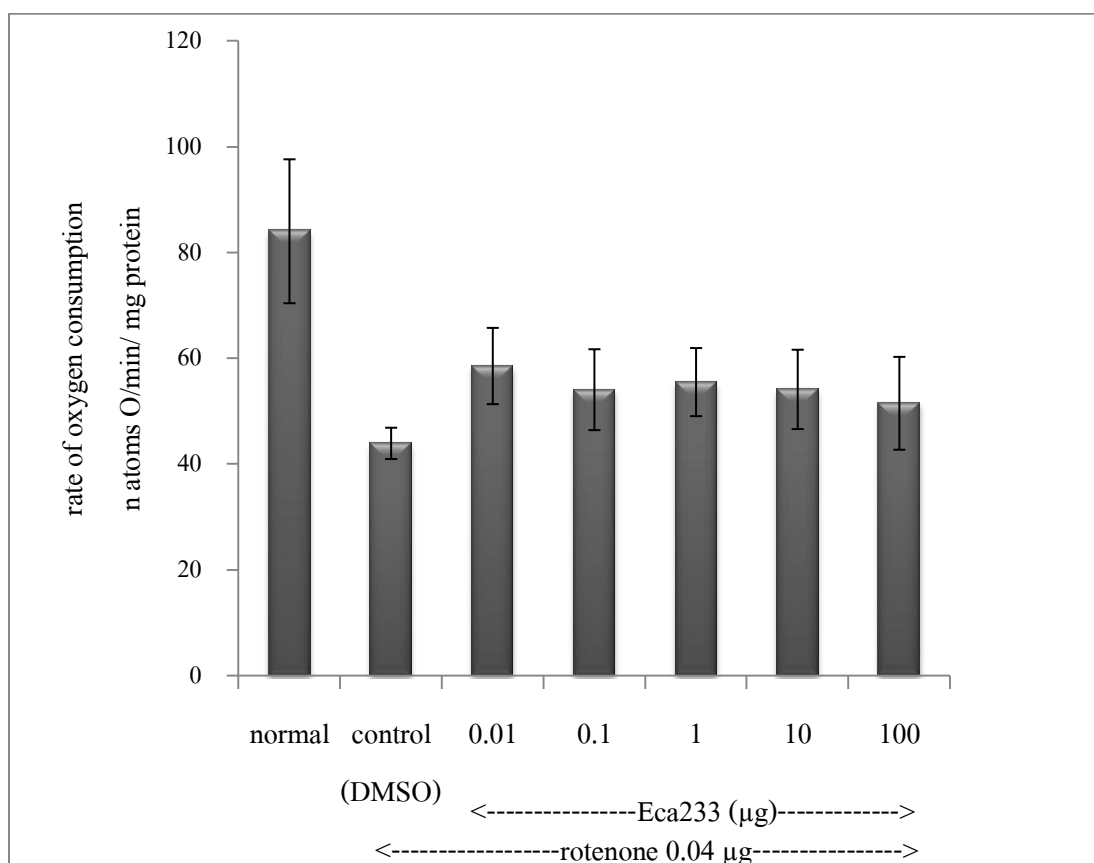
ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 6.21 ± 0.16 ($n = 5$) rotenone ในปริมาณที่ทำให้เกิด 25% inhibition หรือ IC_{25} ($0.04 \mu\text{g}$ ใน chamber) ไม่สามารถลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ (43.93 ± 2.96 เปรียบเทียบกับ 84.08 ± 13.61 n atoms/min/ mg protein ของกลุ่มปกติ, $P = 0.06$, Tukey's *post-hoc* test) ECa233 ทุกปริมาณที่ใส่ใน chamber ได้แก่ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg มีแนวโน้มที่เพิ่มอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone อย่างไรก็ตาม ECa233 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถเพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ได้รับ rotenone อย่างเดียว ดังรูปที่ 19

รูปที่ 18 oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.04 μg

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา 1 M glutamate + 1 M malate 10 μl , incubation buffer 1,700 μl , ไมโทคอนเดรีย 200 μl , ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μl ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg ตามลำดับหรือ DMSO 10 μl , rotenone 0.02 mg/ml 2 μl (0.04 μg), 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μl แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือเวลา แกน y คือปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 19 เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.04 μg พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ($F(5,18) = 0.55, P = 0.73$, one-way ANOVA) และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มปกติกับควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ($F(6,28) = 2.32, P = 0.60$, one-way ANOVA) แต่ละจุดแสดงเป็นค่า $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ($n = 5$)



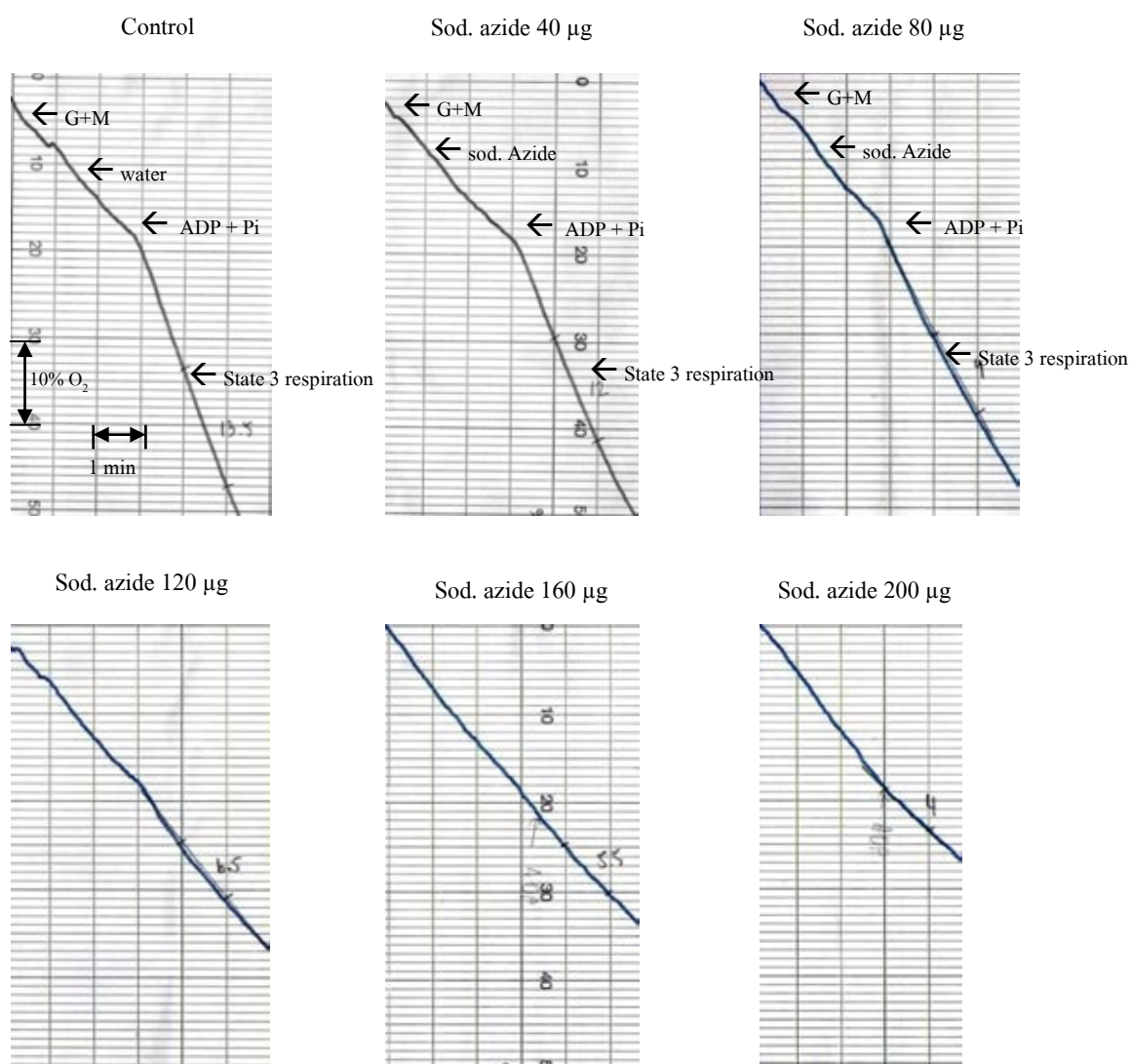
4.6 ผลของ sodium azide ในการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ sodium azide ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหา % inhibition

ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 5.21 ± 0.44 ($n = 5$) sodium azide ปริมาณ 20, 40, 80, 120, 160, 200 μg ใน chamber สามารถลดการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรียมากขึ้นแปลตามความเข้มข้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (5.05 ± 5.72 , 6.02 ± 6.71 , 29.64 ± 6.03 , 50.21 ± 3.67 , 54.56 ± 3.31 , 69.29 ± 2.71 % ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ 0.00 ± 0.00 ของกลุ่มควบคุม) มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($F(6,28) = 37.18$, $P < 0.001$, one-way ANOVA) โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับ sodium azide 80, 120, 160, 200 μg โดยมีค่า $P = 0.001$, < 0.001 , < 0.001 , < 0.001 ตามลำดับ, Tukey's *post-hoc* test ดังรูปที่ 21

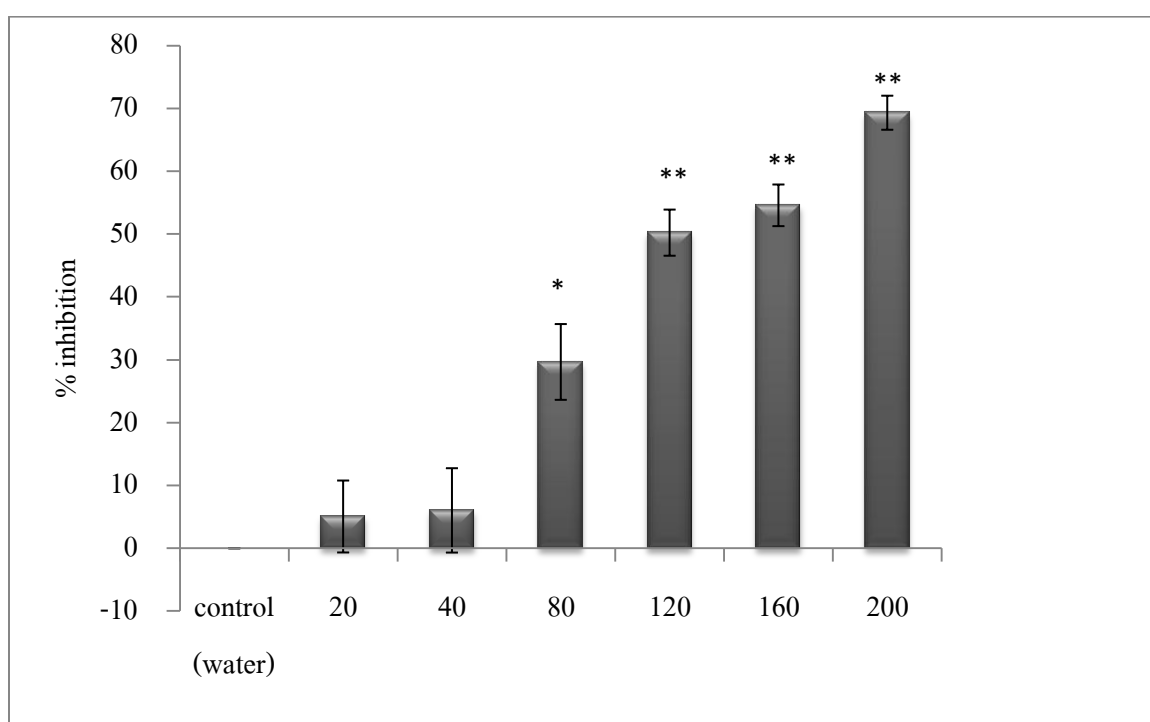
โดยที่ sodium azide 200 μg ในปฏิกิริยาสามารถลดอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียจนมีอัตราการหายใจใน state 3 เท่ากับ state 4 แสดงว่าเกิดการยับยั้งการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรียจนไม่สามารถเกิดปฏิกิริยา oxidative phosphorylation ได้ เมื่อใส่ ADP ลงในปฏิกิริยา ซึ่งคำนวณค่า RCI ได้เท่ากับ 1.00 ± 0.00 จึงถือว่า sodium azide 200 μg เป็นปริมาณที่ทำให้เกิด maximum inhibition ส่วนปริมาณที่ทำให้เกิด median inhibition นั้นเลือก 120 μg ซึ่งไม่เท่ากับ IC_{50} โดยจากสมการ probit คือ $y = 0.025x - 1.600$ จะได้ ความเข้มข้นของ sodium azide ที่ 50% inhibition เท่ากับ 63.71 mg/ml หรือเป็นปริมาณที่ใส่ในปฏิกิริยาเท่ากับ 127.42 μg ในการทดลองนี้ใช้ sodium azide 200 μg ซึ่งเป็น maximum inhibition และ sodium azide 120 μg ซึ่งเป็นค่าใกล้เคียงกับ IC_{50}

รูปที่ 20 oxygraph tracing ของการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อใช้ sodium azide ในปริมาณต่างๆ กัน
 ยับยั้งการหายใจ

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา 1 M glutamate + 1 M malate, 10 μ l, incubation buffer 1,700 μ l, ไมโทคอนเดรีย 200 μ l, sodium azide ความเข้มข้นต่างๆ 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 10, 20, 40, 60, 80, 100 mg/ml ปริมาณ 2 μ l หรือ pure water (ตัวทำละลายของ sodium azide) 2 μ l, 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μ l แล้วดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือเวลา แกน y คือปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 21 แสดงผลการยับยั้งการหายใจของไมโทคอนเดรียเป็น % inhibition เมื่อใช้ sodium azide ความเข้มข้นต่างๆ เป็นสารยับยั้งการหายใจ พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ($F(6,28) = 37.18, P < 0.001$, one-way ANOVA) โดย * และ ** แสดงค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า $P = 0.001$ และ < 0.001 ตามลำดับ, Tukey's *post-hoc* test แต่ละจุดแสดงเป็นค่า $\text{mean} \pm \text{S.E.M.}$ ($n = 5$)

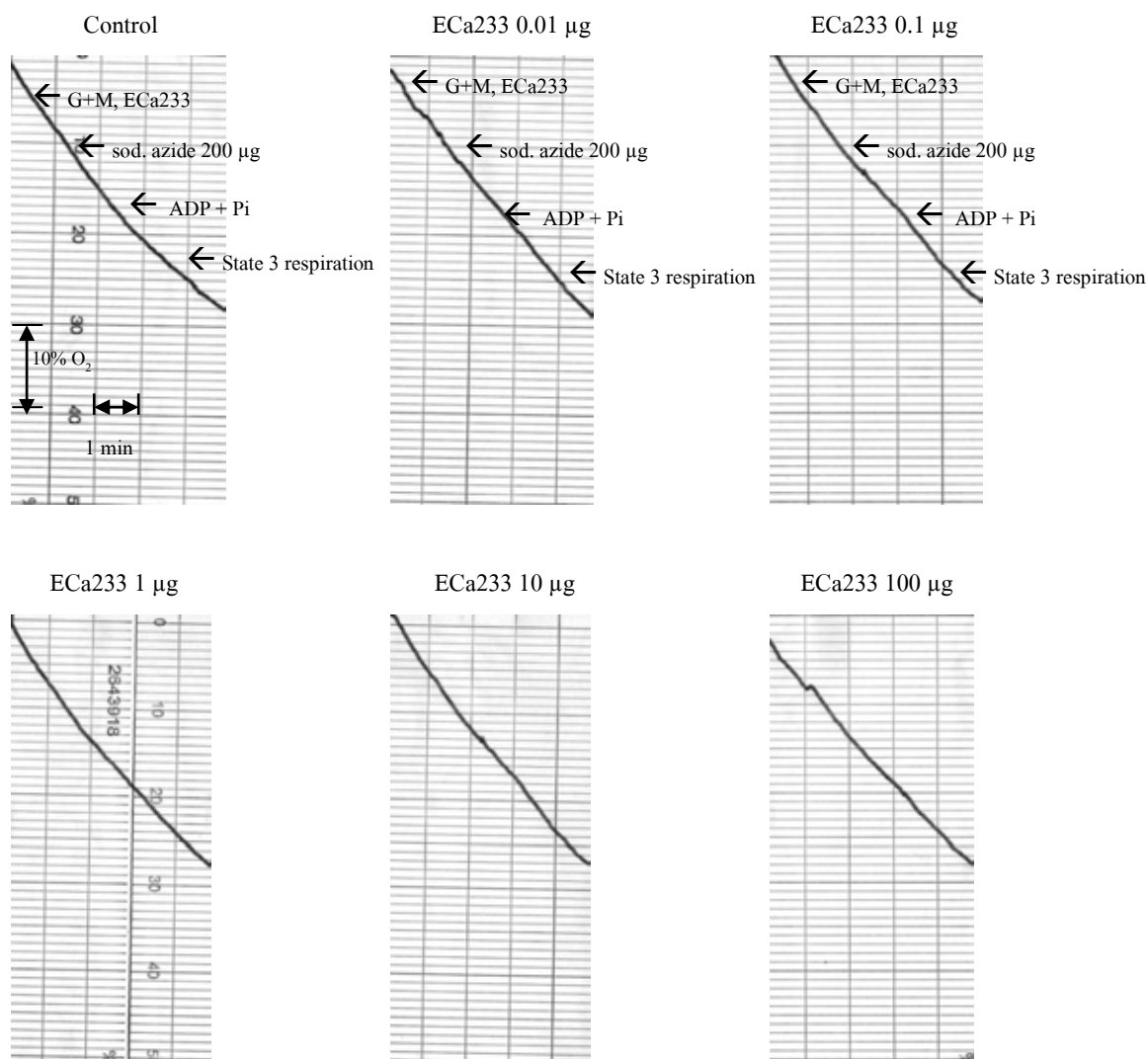


4.7 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย sodium azide 200 μg

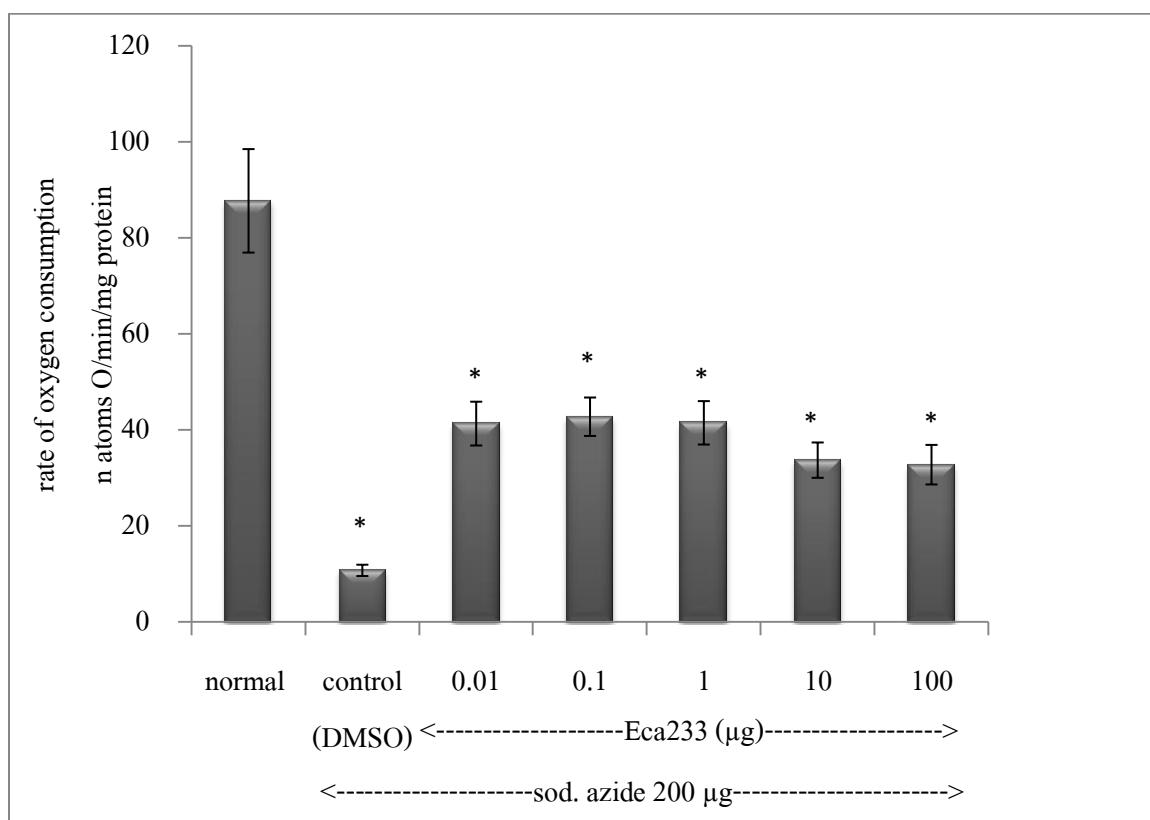
ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 7.42 ± 1.19 ($n = 5$) sodium azide ในปริมาณที่ทำให้เกิด maximum inhibition (200 μg ใน chamber) ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ (30.48 ± 1.18 เปรียบเทียบกับ 87.74 ± 10.78 n atoms/min/mg protein ของกลุ่มปกติ $P < 0.001$, Tukey's *post-hoc* test) ECa233 ทุกปริมาณคือ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg มีแนวโน้มจะเพิ่มอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ sodium azide อย่างไรก็ตาม ECa233 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถเพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ sodium azide ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ได้รับ sodium azide อย่างเดียว ดังรูปที่ 23

รูปที่ 22 oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 200 μg ซึ่งเป็น maximum inhibition

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา คือ 1 M glutamate + 1 M malate 10 μl , incubation buffer 1,700 μl , ไมโทคอนเดรีย 200 μl , ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μl ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.01, 0.1, 1, 10, 100 μg ตามลำดับหรือ DMSO 10 μl , sodium azide 200 μg 2 μl , 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μl ผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือเวลา แกน y คือปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 23 เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 200 μg พบไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง ($F(5,18) = 0.86$, $P = 0.53$, one-way ANOVA) โดย * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มปกติกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ($F(6,28) = 13.30$, $P < 0.001$, One-way ANOVA) โดยมีค่า $P < 0.001$, Tukey's post hoc test แต่ละจุดแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. (n = 5)

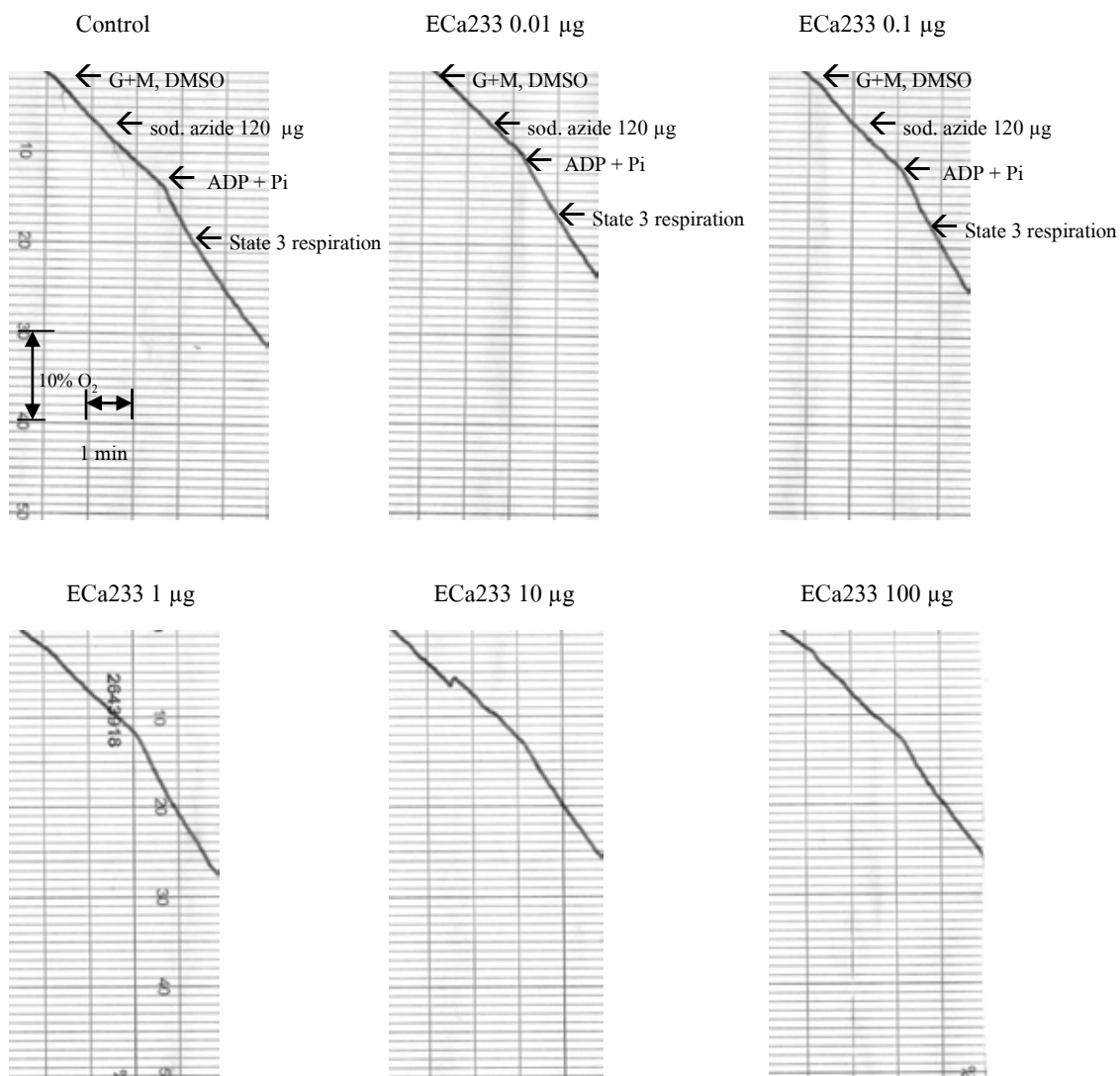


4.8 ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก ECa233 ต่อการหายใจของไมโทคอนเดรียในภาวะที่มีการยับยั้งกระบวนการ electron transport chain ด้วย sodium azide 120 μg

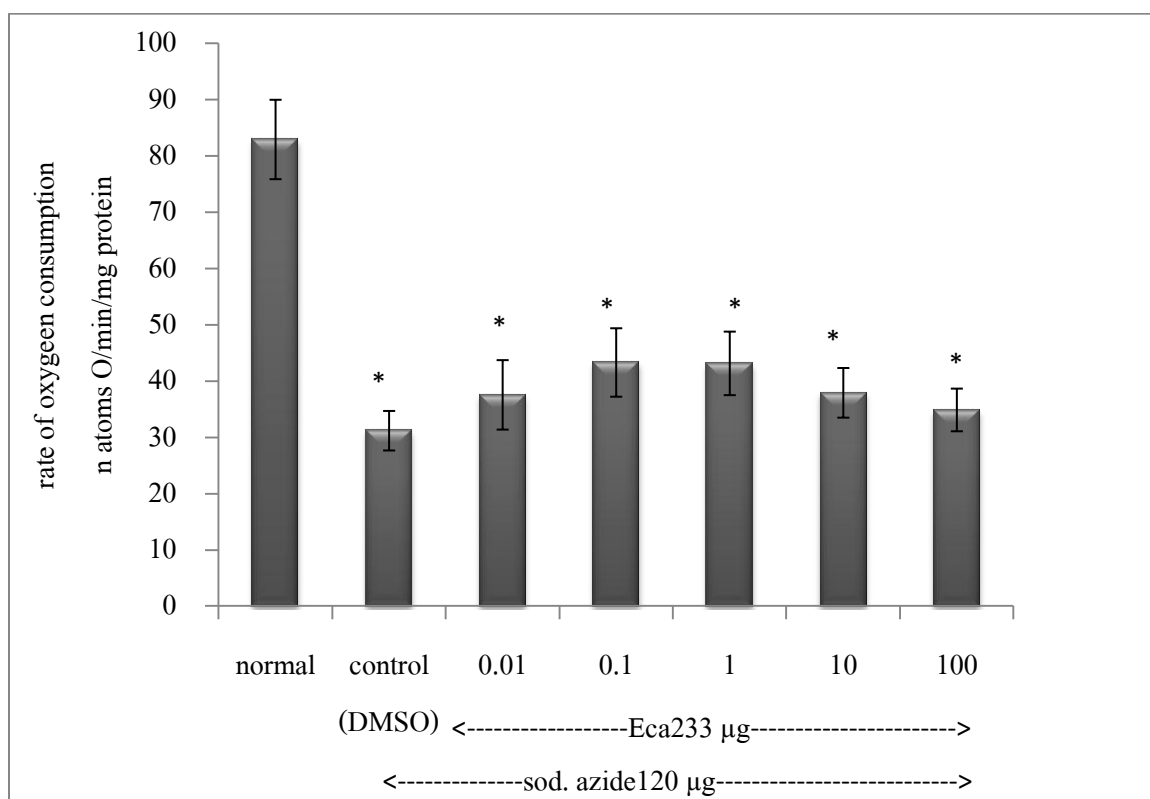
ก่อนทำการทดลองทดสอบค่า RCI ของไมโทคอนเดรียที่เตรียมได้มีค่าเท่ากับ 7.07 ± 0.57 ($n = 5$) sodium azide ในปริมาณที่ทำให้เกิด median inhibition (120 μg ใน chamber) ลดอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มปกติ (31.19 ± 3.51 เปรียบเทียบกับ 82.92 ± 7.05 n atoms /min/mg protein ของกลุ่มปกติ $P < 0.001$, Tukey's *post-hoc* test) ECa233 0.1 และ 1 μg ใน chamber มีแนวโน้มจะเพิ่มอัตราการหายใจใน state 3 ของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ sodium azide อย่างไรก็ตาม ECa233 ทุกความเข้มข้นไม่สามารถเพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ได้รับ sodium azide ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับไมโทคอนเดรียที่ได้รับ sodium azide อย่างเดียว ดังรูปที่ 25

รูปที่ 24 oxygraph tracing ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 120 μg

ส่วนประกอบของปฏิกิริยา คือ 1 M glutamate + 1 M malate 10 μl , incubation buffer 1,700 μl , ไมโทคอนเดรีย 200 μl , ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ 5 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 mg/ml ปริมาณ 10 μl ซึ่งจะได้ปริมาณที่ทำปฏิกิริยาใน chamber เท่ากับ 0.001, 0.1, 1, 10, 100 μg ตามลำดับ หรือ DMSO 10 μl , sodium azide 120 μg 2 μl , 0.3 M ADP + 0.6 M Pi 4 μl ดูผลการเปลี่ยนแปลงอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 โดยแกน x คือเวลา แกน y คือปริมาณ O_2 ใน reaction chamber



รูปที่ 25 เปรียบเทียบอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 120 μg พบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ($F(5,18) = 0.78$, $P = 0.57$, one-way ANOVA) โดย * แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มปกติกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองทุกกลุ่ม ($F(6,28) = 10.60$, $P < 0.001$, One-way ANOVA) โดยมีค่า $P < 0.001$, Tukey's post hoc test แต่ละจุดแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M. (n = 5)



บทที่ 5

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 (ECa233) ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในภาวะปกติ ในภาวะที่ถูกยับยั้งการทำงานของ complex I และภาวะที่ถูกยับยั้งการทำงานของ complex IV ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนของไมโทคอนเดรีย ซึ่งเป็นการเลียนแบบพยาธิกำเนิดของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative diseases) ได้แก่ โรคพาร์กินสันและโรคอัลไซเมอร์ ตามลำดับ การวิจัยนี้เป็นการศึกษาแบบนอกกาย (*in vitro* study) โดยทำการแยกไมโทคอนเดรียจากสมองของหนูแรท แล้วศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในภาวะต่างๆ ด้วยการวัดอัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรีย

จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 ในช่วงปริมาณ 0.1-1000 μg ไม่มีผลต่ออัตราการใช้ออกซิเจนของไมโทคอนเดรียทั้งในภาวะที่ใช้ NAD^+ -linked ซึ่งแสดงกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนโดยเริ่มจาก complex I ของไมโทคอนเดรียและ FAD-linked substrate ซึ่งแสดงกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนโดยเริ่มจาก complex II ของไมโทคอนเดรีย การวิจัยนี้เป็นการวิจัยแรกที่แสดงให้เห็นว่า สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 มีความปลอดภัยสูงต่อไมโทคอนเดรีย แม้ทดสอบในช่วงปริมาณที่ต่างกันถึง 10,000 เท่า ก็ไม่พบผลรบกวนกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอนและกระบวนการสร้าง ATP งานวิจัยนี้จึงสนับสนุนการใช้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 ในทางคลินิกต่อไป

จากนั้นการวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากภาวะที่มีการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I ในกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้าพบว่า พยาธิกำเนิดของโรคพาร์กินสันเกิดจากการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I เช่น การศึกษาไมโทคอนเดรียที่เตรียมจากสมองส่วน striata ของ

ผู้ป่วยที่เสียชีวิตด้วยโรคพาร์กินสัน พบการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I ลดลง [22] นอกจากนี้ มีการใช้สารที่ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I ได้แก่ MPTP และ rotenone เพื่อจำลองอาการคล้ายพาร์กินสันในสัตว์ทดลอง [25] และจากการทดลองของ Haleagrahara และคณะ [29] โดยให้สารสกัดบัวบกแก่หนูแรทที่ได้รับสารที่ยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I (MPTP) พบว่าสามารถลดการเกิด oxidative stress ในสมองส่วน striatum และ hippocampus ของหนูแรทได้ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลของสารสกัดบัวบกนี้ต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียโดยตรง [29] การทดลองครั้งนี้ได้ใช้ rotenone เพื่อยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex I แบบนอกกาย โดยเลือก rotenone ในปริมาณที่ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียได้สูงสุด และในปริมาณที่ IC_{25} พบว่า สารสกัดบัวบกอีซีเอ233 ที่ปริมาณต่ำ (0.01 และ 0.1 μg) มีแนวโน้มที่จะเพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย rotenone ได้ อย่างไรก็ตาม การเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งผลเพิ่มการทำงานของไมโทคอนเดรียนี้อาจเป็นผลบางส่วนจากฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระของอีซีเอ233 มากกว่าฤทธิ์การปกป้องไมโทคอนเดรีย complex I โดยตรง

เนื่องจากการศึกษาก่อนหน้าพบความเกี่ยวข้องของความบกพร่องของการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex IV กับการเกิดโรคอัลไซเมอร์ โดยพบการลดลงของการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex IV ในเกล็ดเลือดของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ [13] และในไมโทคอนเดรียที่แยกจากสมองของผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ [14] นอกจากนี้พบว่า การให้สารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 สามารถแก้ไขภาวะบกพร่องทางการเรียนรู้และความจำในหนูที่ได้รับ $A\beta$ ทางโพรงสมอง ซึ่งเลียนแบบพยาธิสภาพของโรคอัลไซเมอร์ได้ [82] การวิจัยนี้จึงศึกษาผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีซีเอ233 ในการปกป้องไมโทคอนเดรียจากภาวะที่มีการยับยั้งการทำงานของไมโทคอนเดรีย complex IV ของกระบวนการขนส่งอิเล็กตรอน โดยใช้ sodium azide ซึ่งเป็นสารที่ยับยั้งอย่างจำเพาะเจาะจงที่ไมโทคอนเดรีย complex IV ใช้ Sodium azide ในปริมาณที่ยับยั้งอัตราการใช้ออกซิเจนใน state 3 ของไมโทคอนเดรียได้สูงสุด และในปริมาณที่ IC_{50} พบว่า สารสกัดบัวบกอีซีเอ233 ที่ปริมาณต่ำ (0.01, 0.1 และ 1 μg) มีแนวโน้มที่จะเพิ่มอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งด้วย sodium azide อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

มีการศึกษาก่อนหน้า ได้กล่าวถึงกลไกการปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีชีเอ233 ในโมเดลของสัตว์ทดลองที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทด้วยการปิดกั้นหลอดเลือด (2-vessel occlusion) [83 และ 84] และการฉีด A β ทางโพรงสมอง [82] แสดงผลในการลดภาวะ oxidative stress ของสารสกัดบัวบกอีชีเอ233 [84] การวิจัยนี้จึงต้องการศึกษากลไกอื่นๆในการปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีชีเอ233 อย่างไรก็ตาม การวิจัยนี้ไม่พบผลปกป้องไมโทคอนเดรียทั้ง complex I และ complex IV จึงสรุปได้ว่า การปกป้องเซลล์ประสาทของสารสกัดมาตรฐานบัวบกอีชีเอ233 ไม่ผ่านกระบวนการปกป้องไมโทคอนเดรีย

การปกป้องไมโทคอนเดรียเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์หนึ่งที่น่าสนใจในการพัฒนาสารที่ปกป้องเซลล์ประสาทและชะลอการดำเนินของโรคที่เกิดจากความเสื่อมของเซลล์ประสาท[85] ปัจจุบันมีสารที่ใช้ในการรักษาโรคอัลไซเมอร์ที่ได้รับการรับรองแล้ว แม้จะไม่ได้ออกฤทธิ์ปกป้องไมโทคอนเดรียโดยตรง แต่มีกลไกที่พบว่าน่าจะเกี่ยวข้องกับการปกป้องไมโทคอนเดรีย เช่น ยากลุ่ม cholinesterase inhibitors โดยมีกลไกลดการสร้าง nitric oxide เป็นผลทำให้ลดการสร้าง reactive nitrogen species (RNS) และ reactive oxygen species (ROS) ลงได้ หรือ ยากลุ่ม N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor antagonists โดยมีกลไกในการลดการสร้าง ROS ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้มีแคลเซียมในเซลล์มากเกินไป เป็นต้น ส่วนยาที่ใช้รักษาโรคพาร์กินสัน แม้ไม่ได้ออกฤทธิ์โดยตรงต่อไมโทคอนเดรีย แต่ก็มีกลไกที่เกี่ยวข้องกับการปกป้องไมโทคอนเดรียเช่นกัน เช่น ยา levodopa และ dopamine agonists โดยมีกลไกช่วยการทำงานของไมโทคอนเดรียในการส่งสัญญาณประสาทภายในสมองส่วน nigrostriatal และยาในกลุ่ม MAO-B inhibitors ที่มีกลไกช่วยเพิ่มโดปามีน และลด ROS ที่สร้างโดยไมโทคอนเดรียลงได้ เป็นต้น [86]

รายการอ้างอิง

- [1] Henze, K. and W. Martin, Evolutionary biology: Essence of mitochondria. *Nature*, 2003. 426(6963): p. 127-128.
- [2] McBride, H.M., M. Neuspiel, and S. Wasiak, Mitochondria: More Than Just a Powerhouse. *Current biology : CB*, 2006. 16(14): p. R551-R560.
- [3] Wallace, K.B. and A.A. Starkov, Mitochondrial Targets of Drug Toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 2000. 40(1): p. 353-388.
- [4] Alberts, B.A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of the Cell*. Vol. 5. 1994, New York: Garland Publishing Inc. 1275.
- [5] Herrmann, J.M. and W. Neupert, Protein transport into mitochondria. *Current Opinion in Microbiology*, 2000. 3(2): p. 210-214.
- [6] Chipuk, J.E., L. Bouchier-Hayes, and D.R. Green, Mitochondrial outer membrane permeabilization during apoptosis: the innocent bystander scenario. *Cell Death Differ*, 2006. 13(8): p. 1396-1402.
- [7] Mannella, C.A., Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 2006. 1763(5-6): p. 542-548.
- [8] Mitchell, P. and J. Moyle, Chemiosmotic Hypothesis of Oxidative Phosphorylation. *Nature*, 1967. 213(5072): p. 137-139.
- [9] Padan, E. and H. Rottenberg, Respiratory Control and the Proton Electrochemical Gradient in Mitochondria. *European Journal of Biochemistry*, 1973. 40(2): p. 431-437.
- [10] Lin, M.T. and M.F. Beal, Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature*, 2006. 443(7113): p. 787-795.
- [11] McKhann, G., et al., Clinical diagnosis of Alzheimer's disease. *Neurology*, 1984. 34(7): p. 939.
- [12] Minati, L., et al., Reviews: Current Concepts in Alzheimer's Disease: A Multidisciplinary

- Review. *American Journal of Alzheimer's Disease and Other Dementias*, 2009. 24(2): p. 95-121.
- [13] Ito, S., et al., Functional Integrity of Mitochondrial Genomes in Human Platelets and Autopsied Brain Tissues from Elderly Patients with Alzheimer's Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1999. 96(5): p. 2099-2103.
- [14] Parker, W.D., et al., Electron transport chain defects in Alzheimer's disease brain. *Neurology*, 1994. 44(6): p. 1090.
- [15] Canevari, L., J.B. Clark, and T.E. Bates, [beta]-Amyloid fragment 25-35 selectively decreases complex IV activity in isolated mitochondria. *FEBS Letters*, 1999. 457(1): p. 131-134.
- [16] Gomez-Isla, T., et al., Profound Loss of Layer II Entorhinal Cortex Neurons Occurs in Very Mild Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.*, 1996. 16(14): p. 4491-4500.
- [17] Mouton, P.R., et al., Cognitive decline strongly correlates with cortical atrophy in Alzheimer's dementia. *Neurobiology of Aging*, 1998. 19(5): p. 371-377.
- [18] West, M.J., et al., The CA1 Region of the Human Hippocampus Is a Hot Spot in Alzheimer's Disease. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2000. 908(1): p. 255-259.
- [19] Pelvig, D.P., et al., Neocortical Glial Cell Numbers in Alzheimer's Disease. *Dementia and Geriatric Cognitive Disorders*, 2003. 16(4): p. 212-219.
- [20] Jankovic, J., Parkinson's disease: clinical features and diagnosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 2008. 79(4): p. 368-376.
- [21] Senard, J.M., et al., Prevalence of orthostatic hypotension in Parkinson's disease. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 1997. 63(5): p. 584-589.
- [22] Mizuno, Y., et al., Deficiencies in Complex I subunits of the respiratory chain in Parkinson's disease. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 1989. 163(3): p. 1450-1455.
- [23] Cardellach, F., et al., Mitochondrial respiratory chain activity in skeletal muscle from patients with Parkinson's disease. *Neurology*, 1993. 43(11): p. 2258-

- [24] Betarbet, R., et al., Chronic systemic pesticide exposure reproduces features of Parkinson's disease. *Nat Neurosci*, 2000. 3(12): p. 1301-1306.
- [25] Betarbet, R., T.B. Sherer, and J.T. Greenamyre, Animal models of Parkinson's disease. *BioEssays*, 2002. 24(4): p. 308-318.
- [26] Gnanapragasam, A., et al., Protective effect of Centella asiatica on antioxidant tissue defense system against adriamycin induced cardiomyopathy in rats. *Life Sciences*, 2004. 76(5): p. 585-597.
- [27] Hussin, M., et al., Protective effect of Centella asiatica extract and powder on oxidative stress in rats. *Food Chemistry*, 2007. 100(2): p. 535-541.
- [28] Veerendra Kumar, M.H. and Y.K. Gupta, Effect of Centella asiatica on cognition and oxidative stress in an intracerebroventricular streptozotocin model of Alzheimer's disease in rats. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 2003. 30(5-6): p. 336-342.
- [29] Haleagrahara, N. and K. Ponnusamy, Neuroprotective effect of Centella asiatica extract (CAE) on experimentally induced parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2010. 35(1): p. 41-47.
- [30] Tantisira, M.H., Bioactive standardized extract of Centella asiatica ECa233. *Proceeding of the 8th NRCT-JSPS Joint Seminar*, 2009(2-3 February): p. 25.
- [31] Harvey Lodish, A.B., Chris A. Kaiser, Monty Krieger, Matthew P. Scott, Anthony Bretscher, Hidde Ploegh, Paul Matsudaira, *Molecular Cell Biology*. 6 ed. 2008, New York: Sara Tenney.
- [32] Mitchell, P., Proton Current Flow in Mitochondrial Systems. *Nature*, 1967. 214(5095): p. 1327-1328.
- [33] Bruce Alberts, A.J., Julian Lewis, Martin Raff, Keith Roberts, Peter Walter, *Molecular Biology of The Cell*. 5 ed. 2008, New York: Garland Science.
- [34] Degli Esposti, M., Inhibitors of NADH-ubiquinone reductase: an overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1998. 1364(2): p. 222-235.
- [35] Horsefield, R., et al., Structural and Computational Analysis of the Quinone-binding Site of

- Complex II (Succinate-Ubiquinone Oxidoreductase). *Journal of Biological Chemistry*, 2006. 281(11): p. 7309-7316.
- [36] Beal, M.F., Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology*, 2005. 58(4): p. 495-505.
- [37] Chartier-Harlin, M.-C., et al., Early-onset Alzheimer's disease caused by mutations at codon 717 of the [beta]-amyloid precursor protein gene. *Nature*, 1991. **353**(6347): p. 844-846.
- [38] Goate, A., et al., Segregation of a missense mutation in the amyloid precursor protein gene with familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1991. 349(6311): p. 704-706.
- [39] Campion, D., et al., Mutations of the presenilin I gene in families with early-onset Alzheimer's disease. *Human Molecular Genetics*, 1995. 4(12): p. 2373-2377.
- [40] Sherrington, R., et al., Cloning of a gene bearing missense mutations in early-onset familial Alzheimer's disease. *Nature*, 1995. 375(6534): p. 754-760.
- [41] Waldemar, G., et al., Recommendations for the diagnosis and management of Alzheimer's disease and other disorders associated with dementia: EFNS guideline. *European Journal of Neurology*, 2007. 14(1): p. e1-e26.
- [42] Mölsä, P.K., R.J. Marttila, and U.K. Rinne, Survival and cause of death in Alzheimer's disease and multi-infarct dementia. *Acta Neurologica Scandinavica*, 1986. 74(2): p. 103-107.
- [43] Yankner, B., et al., Neurotoxicity of a fragment of the amyloid precursor associated with Alzheimer's disease. *Science*, 1989. 245(4916): p. 417-420.
- [44] Hardy, J. and D.J. Selkoe, The Amyloid Hypothesis of Alzheimer's Disease: Progress and Problems on the Road to Therapeutics. *Science*, 2002. 297(5580): p. 353-356.
- [45] Kosik, K.S., C.L. Joachim, and D.J. Selkoe, Microtubule-associated protein tau (tau) is a major antigenic component of paired helical filaments in Alzheimer disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1986. 83(11): p. 4044-4048.
- [46] Mattson, M., et al., beta-Amyloid peptides destabilize calcium homeostasis and render

- human cortical neurons vulnerable to excitotoxicity. *J. Neurosci.*, 1992. 12(2): p. 376-389.
- [47] Reddy, P.H. and M.F. Beal, Amyloid beta, mitochondrial dysfunction and synaptic damage: implications for cognitive decline in aging and Alzheimer's disease. *Trends in Molecular Medicine*, 2008. 14(2): p. 45-53.
- [48] DeKosky, S.T. and S.W. Scheff, Synapse loss in frontal cortex biopsies in Alzheimer's disease: Correlation with cognitive severity. *Annals of Neurology*, 1990. 27(5): p. 457-464.
- [49] Fath, T., J. Eidenmuller, and R. Brandt, Tau-Mediated Cytotoxicity in a Pseudohyperphosphorylation Model of Alzheimer's Disease. *J. Neurosci.*, 2002. 22(22): p. 9733-9741.
- [50] Rapoport, M., et al., Tau is essential to β -amyloid-induced neurotoxicity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002. 99(9): p. 6364-6369.
- [51] Anandatheerthavarada, H.K., et al., Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *The Journal of Cell Biology*, 2003. 161(1): p. 41-54.
- [52] Manczak, M., et al., Mitochondria are a direct site of A β accumulation in Alzheimer's disease neurons: implications for free radical generation and oxidative damage in disease progression. *Human Molecular Genetics*, 2006. 15(9): p. 1437-1449.
- [53] Behl, C., et al., Amyloid [beta] peptide induces necrosis rather than apoptosis. *Brain Research*, 1994. 645(1-2): p. 253-264.
- [54] Casley, C.S., et al., [beta]-Amyloid Fragment 25-35 Causes Mitochondrial Dysfunction in Primary Cortical Neurons. *Neurobiology of Disease*, 2002. 10(3): p. 258-267.
- [55] Duker, N.J., et al., β -amyloid protein induces the formation of purine dimers in cellular DNA. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2001. 81(3): p. 393-400.
- [56] Kuperstein, F. and E. Yavin, ERK activation and nuclear translocation in amyloid- β peptide-

- and iron-stressed neuronal cell cultures. *European Journal of Neuroscience*, 2002. 16(1): p. 44-54.
- [57] Martin, L.J., Mitochondrial and Cell Death Mechanisms in Neurodegenerative Diseases. *Pharmaceuticals*, 2010. 3(4): p. 839-915.
- [58] Van Den Eeden, S.K., et al., Incidence of Parkinson's Disease: Variation by Age, Gender, and Race/Ethnicity. *American Journal of Epidemiology*, 2003. 157(11): p. 1015-1022.
- [59] Brundin, P., et al., Research in motion: the enigma of Parkinson's disease pathology spread. *Nat Rev Neurosci*, 2008. 9(10): p. 741-745.
- [60] Hashimoto, M., et al., Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *NeuroMolecular Medicine*, 2003. 4(1): p. 21-35.
- [61] Schapira, A.H.V., Mitochondria in the aetiology and pathogenesis of Parkinson's disease. *The Lancet Neurology*, 2008. 7(1): p. 97-109.
- [62] Ascherio, A., et al., Pesticide exposure and risk for Parkinson's disease. *Annals of Neurology*, 2006. 60(2): p. 197-203.
- [63] Manning-Bog, A.B., et al., The Herbicide Paraquat Causes Up-regulation and Aggregation of alpha-Synuclein in Mice. *Journal of Biological Chemistry*, 2002. 277(3): p. 1641-1644.
- [64] Kitazawa, M., V. Anantharam, and A.G. Kanthasamy, Dieldrin-induced oxidative stress and neurochemical changes contribute to apoptotic cell death in dopaminergic cells. *Free Radical Biology and Medicine*, 2001. 31(11): p. 1473-1485.
- [65] Corrigan, F.M., et al., ORGANOCHLORINE INSECTICIDES IN SUBSTANTIA NIGRA IN PARKINSON'S DISEASE. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A: Current Issues*, 2000. 59(4): p. 229 - 234.
- [66] Di Monte, D.A., M. Lavasani, and A.B. Manning-Bog, Environmental Factors in Parkinson's Disease. *NeuroToxicology*, 2002. 23(4-5): p. 487-502.
- [67] Chiueh, C., et al., Neuroprotective strategies in parkinson's disease: protection against

- progressive nigral damage induced by free radicals. *Neurotoxicity Research*, 2000. 2(2): p. 293-310.
- [68] CHIUEH, C.C., et al., *In Vivo* Generation of Hydroxyl Radicals and MPTP-Induced Dopaminergic Toxicity in the Basal Ganglia. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1994. 738(The Neurobiology of NO* and *OH): p. 25-36.
- [69] Sherer, T.B., et al., Mechanism of Toxicity in Rotenone Models of Parkinson's Disease. *J. Neurosci.*, 2003. 23(34): p. 10756-10764.
- [70] Andersen, J., Oxidative stress in neurodegeneration: cause or consequence? *Nature Reviews Neuroscience*, 2004. 5: p. S18-S25.
- [71] Goldenberg, M.M., Medical Management of Parkinson's Disease P T, 2008. 33(10): p. 590-594, 599-606.
- [72] บุญยะประสงค์, น., *สมุนไพรไม้พื้นบ้าน*. 1 ed. 2541, กรุงเทพฯ: บริษัทประชาชน จำกัด
- [73] วงศ์รัตนสถิตย์, ถ., *เอกลักษณ์สมุนไพร*. 2538, นครปฐม: ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล.
- [74] Shinomol, G.K. and Muralidhara, Prophylactic neuroprotective property of Centella asiatica against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in brain regions of prepubertal mice. *NeuroToxicology*, 2008. 29(6): p. 948-957.
- [75] Krishnamurthy, R.G., et al., Asiatic acid, a pentacyclic triterpene from Centella asiatica, is neuroprotective in a mouse model of focal cerebral ischemia. *Journal of Neuroscience Research*, 2009. 87(11): p. 2541-2550.
- [76] Xiong, Y., et al., Protective Effects of Asiatic Acid on Rotenone- or H₂O₂-Induced Injury in SH-SY5Y Cells. *Neurochemical Research*, 2009. 34(4): p. 746-754.
- [77] Zhan, R.-Z., et al., Ischemic Preconditioning Is Capable of Inducing Mitochondrial Tolerance in the Rat Brain. *Anesthesiology*, 2002. 97(4): p. 896-901.
- [78] Cormier, A., et al., Nicotine protects rat brain mitochondria against experimental injuries. *Neuropharmacology*, 2003. 44(5): p. 642-652.

- [79] Miller, G.L., Protein Determination of Large Numbers of Samples. *Analytical Chemistry*, 1959. 31(5): p. 964-964.
- [80] Sugiyama, Y. and T. Fujita, Stimulation of the respiratory and phosphorylating activities in rat brain mitochondria by idebenone (CV-2619), a new agent improving cerebral metabolism. *FEBS Letters*, 1985. 184(1): p. 48-51.
- [81] Youdim, M.B.H., D. Edmondson, and K.F. Tipton, The therapeutic potential of monoamine oxidase inhibitors. *Nat Rev Neurosci*, 2006. 7(4): p. 295-309.
- [82] อัญชลี คำเอก. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อความบกพร่องของการเรียนรู้และความจำที่ถูกเหนี่ยวนำโดยเปปไทด์บีตาแอมิลอยด์ 25-35 ในหนูเมาส์. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาวิชาเภสัชวิทยา, ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.
- [83] จิตรลดา จิระวงศ์อร่าม และสุบงกช สุทธิจิตโต. โครงการผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก (ECa233) ต่อความบกพร่องในการเรียนรู้และความจำทดสอบโดยวิธี Two Object Discrimination หลังการอุดตันหลอดเลือดแดงคอมมอนแคโรติดทั้งสองข้างในหนูถีบจักร. โครงการปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาเภสัชกรรมผลิตภัณฑ์, แผนกการค้นพบยา, ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.
- [84] ยุทธพร สุขวิชัย. ผลของสารสกัดมาตรฐานบัวบก อีซีเอ 233 ต่อการเรียนรู้และความจำของหนูเมาส์ในภาวะปกติและภาวะสมองขาดเลือดชั่วคราว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ, สาขาวิชาเภสัชวิทยา, ภาควิชาเภสัชวิทยาและสรีรวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2553.
- [85] Paul I. Moreira., et al., Mitochondria : a therapeutic target in neurodegeneration. *Biochimica et Biophysica Acta* 1802, 2010. p. 212-220.
- [86] Jake G Hoekstra, et al., Mitochondrial therapeutics in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Alzheimer's Research & Therapy*, 2011. 3(21): p. 1-7.

ภาคผนวก

ตารางที่ 2 แสดงอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อทดสอบผลของ ECa233 ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 เมื่อใช้ glutamate + malate เป็น substrate โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

ปริมาณ ECa233 (μ g)	อัตราการหายใจ state 3 (n atoms O/min/mg protein)	อัตราการหายใจ state 4 (n atoms O/min/mg protein)
0 (control)	128.36 \pm 18.24	26.29 \pm 5.20
0.1	128.16 \pm 20.34	32.78 \pm 7.32
1	117.04 \pm 17.48	26.90 \pm 4.68
10	112.46 \pm 13.44	26.05 \pm 4.60
100	126.65 \pm 20.87	28.07 \pm 4.73
1000	109.64 \pm 15.94	28.55 \pm 6.05

ตารางที่ 3 แสดงอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย เมื่อทดสอบผลของ ECa233 ในความเข้มข้นต่างๆ ต่อการหายใจใน state 3 เมื่อใช้ succinate เป็น substrate โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

ปริมาณ ECa233 (μ g)	อัตราการหายใจ state 3 (n atoms O/min/mg protein)	อัตราการหายใจ state 4 (n atoms O/min/mg protein)
0 (control)	110.26 \pm 6.16	52.03 \pm 5.39
0.1	100.34 \pm 6.95	53.52 \pm 6.62
1	100.77 \pm 9.33	52.47 \pm 5.14
10	98.70 \pm 11.80	54.10 \pm 4.35
100	90.70 \pm 6.66	52.34 \pm 5.56
1000	88.85 \pm 14.27	53.97 \pm 5.06

ตารางที่ 4 % inhibition ของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone ปริมาณต่างๆ โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

rotenone (μ g)	% inhibition
0.00 (control)	0.00 \pm 0.00
0.01	0.00 \pm 0.00
0.02	16.73 \pm 8.02
0.04	31.98 \pm 6.47
0.06	51.35 \pm 11.49
0.08	63.01 \pm 6.89
0.10	73.11 \pm 4.43

ตารางที่ 5 แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.10 μg โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

ECa233 (μg)	อัตราการหายใจ state 3 (n atoms O/min/mg protein)
0 (control)	22.45 \pm 3.49
0.01	21.33 \pm 1.57
0.1	32.75 \pm 7.35
1	30.77 \pm 8.33
10	25.76 \pm 7.00
100	23.52 \pm 4.44

ตารางที่ 6 แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดสอบหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย rotenone 0.04 μg โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

ECa233 (μg)	อัตราการหายใจ state 3 (n atoms O/min/mg protein)
0 (control)	43.93 \pm 2.96
0.01	58.56 \pm 7.21
0.1	54.08 \pm 7.65
1	55.52 \pm 6.44
10	54.14 \pm 7.50
100	51.15 \pm 8.78

ตารางที่ 7 % inhibition ของไมโทคอนเดรียที่ถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide ปริมาณต่างๆ โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

Sodium azide (μg)	% inhibition
0 (control)	0.00 \pm 0.00
20	5.05 \pm 5.72
40	6.02 \pm 6.71
80	29.64 \pm 6.03
120	50.21 \pm 3.67
160	54.56 \pm 3.31
200	69.29 \pm 2.71

ตารางที่ 8 แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 200 μg โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M



ECa233 (μg)	อัตราการหายใจ state 3 (n atoms O/min/mg protein)
0 (control)	30.48 \pm 1.18
0.01	41.35 \pm 4.56
0.1	42.78 \pm 4.00
1	41.51 \pm 4.52
10	33.74 \pm 3.68
100	32.79 \pm 4.12

ตารางที่ 9 แสดงค่าอัตราการหายใจของไมโทคอนเดรีย state 3 ในการทดลองหาฤทธิ์ในการปกป้องไมโทคอนเดรียของ ECa233 ความเข้มข้นต่างๆ จากการถูกยับยั้งการหายใจด้วย sodium azide 120 μg โดยแสดงเป็นค่า mean \pm S.E.M

ECa233 (μg)	อัตราการหายใจ state 3 (n atoms O/min/mg protein)
0 (control)	31.19 \pm 3.51
0.01	37.56 \pm 6.17
0.1	43.31 \pm 6.08
1	43.15 \pm 5.64
10	37.92 \pm 4.41
100	34.88 \pm 3.79



Chulalongkorn University Animal Care and Use Committee

Certificate of Project Approval	<input type="checkbox"/> Original <input type="checkbox"/> Renew
Animal Use Protocol No. 11-33-007	Approval No. 11-33-007
Protocol Title Effect of the standardized extract of <i>Centella asiatica</i> ECa233 on the function of mitochondria isolated from rat brain	
Principal Investigator Ratchanee Rodsiri, Ph.D.	
Certification of Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC) This project has been reviewed and approved by the IACUC in accordance with university regulations and policies governing the care and use of laboratory animals. The review has followed guidelines documented in Ethical Principles and Guidelines for the Use of Animals for Scientific Purposes edited by the National Research Council of Thailand.	
Date of Approval March 11, 2011	Date of Expiration March 11, 2012
Applicant Faculty/Institution Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Phyathai Rd., Pathumwan BKK-THAILAND. 10330	
Signature of Chairperson 	Signature of Authorized Official 
Name and Title THONGCHAI SOOKSAWATE, Ph.D. Chairman	Name and Title PARKPOOM TENGAMNUAY, Ph.D. Associate Dean (Research and Academic Service)
<p style="text-align: center;"><i>The official signing above certifies that the information provided on this form is correct. The institution assumes that investigators will take responsibility, and follow university regulations and policies for the care and use of animals.</i></p> <p style="text-align: center;"><i>This approval is subjected to assurance given in the animal use protocol and may be required for future investigations and reviews.</i></p>	



Thai Journal of Pharmacology

www.thaipharmacol.org

Official Publication of
Pharmacological and Therapeutic Society of Thailand

Proceeding of
33rd Pharmacological and
Therapeutic Society of
Thailand Meeting

17-19 March 2011

Vol.33, Suppl. 1, 2011

ISSN 0125-3832

P52

Effects of the standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain

Apinya Thoopmongkon*, Ratchanee Rodsiri

Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand

* Presenting Author

The effects of standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain were studied. The rat brain mitochondria were incubated with ECa233 5 concentrations (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg/ml). High concentration of ECa233 (100 mg/ml) decreased the rate of oxygen consumption by 26 and 30% while using glutamate plus malate and succinate as substrate, respectively. However there was no significant difference in the rate of oxygen consumption of the brain mitochondria incubated with all ECa233 concentrations compared with the control. The finding suggested no toxic effect of ECa233 on mitochondria. The data supported further investigation on the protective effects of ECa233 on brain mitochondria.

Keywords: standardized extract of *Centella asiatica* ECa233, brain mitochondria, oxygen consumption, respiratory control index

RESEARCH ARTICLE**Effects of the Standardized Extract of *Centella asiatica* ECa233 on the Respiration of Mitochondria Isolated from Rat Brain****Apinya Thoopmongkon, Ratchanee Rodsiri***Department of Pharmacology and Physiology, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Thailand***Abstract**

The effects of standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 on the respiration of mitochondria isolated from rat brain were studied. The rat brain mitochondria were incubated with ECa233 5 concentrations (0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg/ml). High concentration of ECa233 (100 mg/ml) decreased the rate of oxygen consumption by 26 and 30% while using glutamate plus malate and succinate as substrate, respectively. However there was no significant difference in the rate of oxygen consumption of the brain mitochondria incubated with all ECa233 concentrations compared with the control. The finding suggested no toxic effect of ECa233 on mitochondria. The data supported further investigation on the protective effects of ECa233 on brain mitochondria.

Keywords standardized extract of *Centella asiatica* ECa233, brain mitochondria, oxygen consumption, respiratory control index

Introduction

Mitochondria play the important roles in energy production, cell signalling and regulation of cell morphology, mobility, multiplication, and apoptosis. Dysfunction of mitochondria leads to decreased of ATP production, disrupted calcium buffering and promoted the generation of reactive oxygen species (ROS) (1). Neurons are susceptible to the alterations of mitochondria functions, thus mitochondrial dysfunction has been hypothesized to be involved in aging and neurodegenerative diseases (2).

Centella asiatica (Linn.) has been traditionally used to improve cognitive function (3). Clinical studies showed the benefits of *Centella asiatica* extract in age-related decline in cognitive function (4), elderly with mild cognitive impairment (5), generalized anxiety disorder and depression (6). *In vivo* studies revealed that *Centella asiatica* extract improved cognitive behavior in pentylentetrazole-induced kindled seizure rats (7), protected against 3-nitropropionic acid-induced mitochondrial dysfunction in mice brain (8) and attenuated MPTP-induced oxidative stress in aged rats (9). The standardized extract of *Centella asiatica* ECa233 is established by researchers from the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. The extract contained not less than 80% triterpenoids and the ratio between madecassoside and asiaticoside should be within 1.50 ± 0.50 . Oral administration (10-30 mg/kg) exhibited ameliorating effects on memory deficits induced by either transient bilateral occlusion of common carotid arteries or i.c.v. injection of β -amyloid mice suggesting a promising neuroprotective effect of the extract in stroke and Alzheimer's disease (10). The aim of the present study was to investigate the effect of ECa233 on the mitochondria isolated from rat brain.

Materials and Methods

Male Wistar rats weighing 200–250 g (National Laboratory Animal Center, Mahidol University, Nakornpathom) were housed at a constant ambient temperature (25 ± 2 °C) and humidity (45–65%) on a 12-h light/dark cycle with free access to food and water. The standardized extract of *Centella*

asiatica ECa233 were provided by Associate Professor Chamnan Patarapanich and co-workers, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University. ECa233 used in this experiment was dissolved in DMSO to 5 concentrations; 0.01, 0.1, 1, 10, and 100 mg/ml.

Method for isolation of rat brain mitochondria was modified from Zhan *et al.* (11). Briefly, rat was sacrificed using chloral hydrate (400 mg/kg i.p.) and decapitated. The brain was quickly removed and placed in ice-cold isolation buffer containing 250 mM sucrose, 10 mM Tris, 2 mM EDTA, and 1 mg/ml of BSA (pH 7.4). The cerebellum was removed and the cerebrum was homogenized in 20 ml of the isolation buffer. Rat brain homogenate was centrifuged at 2000 g for 3 min. The supernatant was collected and added 20 μ l of 0.02% digitonin then centrifuged twice at 2000 g for 3 min and 12000 g for 10 min. The pellet was resuspended in the isolation buffer and centrifuged at 12000 g for 10 min. The synaptosome layer was washed with ice-cold incubation buffer containing 300 mM mannitol, 75 mM sucrose, 5 mM KCl, 10 mM Tris, and 5 mM KH_2PO_4 (pH 7.4). Finally, the mitochondria pellets were collected and resuspended in 2 ml incubation buffer. Protein concentrations were determined using Lowry method.

Effects of ECa233 on the respiration of rat brain mitochondria were investigated using Gilson oxygraph apparatus. Mitochondrial suspension was incubated with the incubation buffer in a Gilson reaction chamber at the controlled temperature of 37 °C. Either 10 μ l of 1 M glutamate plus 1 M malate or 10 μ l of 1 M succinate, the substrates for mitochondrial electron transport chain complex I and complex II respectively, was added (state 4 respiration) and then added 10 μ l of ECa233 to the reaction chamber for 1 min. Four μ l of 0.3 M ADP plus 0.6 M phosphate were then added to initiate mitochondrial oxidative phosphorylation reaction (state 3 respiration). The oxygen concentration in the reaction chamber was measured using Clark oxygen electrode and calculated as nanomoles oxygen/minute/mg protein. The respiratory control index (RCI) was used to evaluate mitochondria function and only the mitochondria suspension which RCI = 4

were used. Data were presented as mean \pm SEM ($n = 4/\text{group}$). One-way ANOVA was performed for statistical comparisons between each concentration of ECa233 and control. $P \leq 0.05$ was considered as significant difference.

Results

The mean respiratory control index (RCI) of mitochondria suspension (\pm SEM) used in the present study was 5.64 ± 0.28 ($n = 8$) when using glutamate plus malate as mitochondria respiratory chain substrates indicating a good condition of mitochondria before incubating with ECa233. The range of ECa233 concentration used in this

experiment was 0.01-100 mg/ml to examine the toxic effect of ECa233 from low to high concentrations. It was demonstrated that ECa233 tended to reduce rate of oxygen consumption of mitochondrial state 3 respiration when using either glutamate plus malate (figure 1A) or succinate (figure 1B) as substrates. ECa233 100 mg/ml (1,000 μg in chamber) decreased rate of oxygen consumption of mitochondrial state 3 respiration by 26.11 and 29.88% when using glutamate plus malate and succinate as substrates, respectively, but these changes were not significantly different from control. In addition ECa233 had no effect on rate of oxygen consumption of mitochondrial state 4 respiration.

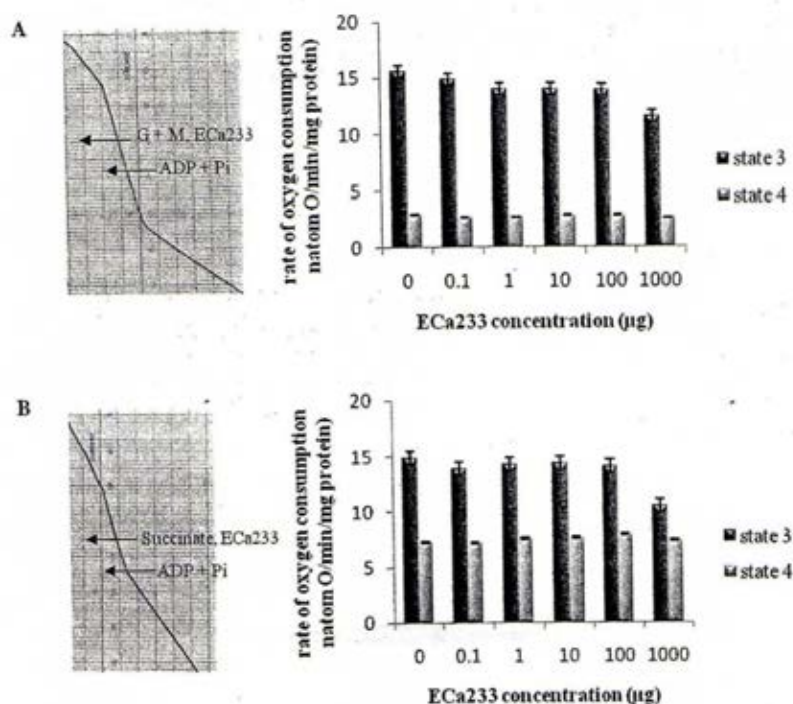


Figure 1 The examples of oxygen monitor tracing and rate of mitochondrial oxygen consumption of rat brain mitochondria in incubated medium containing glutamate plus malate, ADP + Pi and ECa233 (A) and succinate, ADP + Pi and ECa233 (B)

Discussion and Conclusion

The present study showed no toxic effect of the standardized extract of ECa233 on the respiration of rat brain mitochondria, even though brain mitochondria were incubated with very high concentration of ECa233 (1000 µg). This finding is in agreement with earlier *in vivo* studies showing that pre-treatment of ECa233 (10 and 30 mg/kg) significantly decreased cerebral lipid peroxidation indicating an antioxidant property of ECa233 [10]. As the pathogenesis of Parkinson's disease (PD) and Alzheimer's disease (AD) related to the

inhibition of complex I and complex IV in mitochondrial electron transport chain, respectively, it is worth to investigate the neuroprotective effect of ECa233 on brain mitochondria models implicated PD and AD *in vitro*.

Acknowledgment

Authors would like to thank undergraduate students in the Faculty of Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn University, Miss Krittita Wornisrakul, Miss Pailin Uaruksakul and Mr. Witoon Attanyou for kindly assistants.

References

- Wallace KB, Starkov AA. Mitochondrial targets of drug toxicity. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology* 2000; 40(1): 353-388.
- Beal MF. Mitochondria take center stage in aging and neurodegeneration. *Annals of Neurology*. 2005; 58(4): 495-505.
- Manyam BV. Dementia in Ayurveda. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*. 1999; 5(1): 81-88.
- Dev RDO, Mohamed S, Hambali Z, Samah BA. Comparison on cognitive effects of *Centella Asiatica* in healthy middle age female and male volunteers. *European Journal of Scientific Research*. 2009; 4: 553-565.
- Tiwari S, Singh S, Patwardhan K, Gehlot S, Gambhir. Effect of *Centella asiatica* on mild cognitive impairment (MCI) and other common age-related clinical problems. *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*. 2008; 3(4): 215-220.
- Jana U, Sur TK, Maity LN, Debnath PK, Bhattacharyya D. A clinical study on the management of generalized anxiety disorder with *Centella asiatica*. *Nepal Med Coll J*. 2010; 12(1): 8-11.
- Gupta YK, Veerendra Kumar MH, Srivastava AK. Effect of *Centella asiatica* on pentylentetrazole-induced kindling, cognition and oxidative stress in rats. *Pharmacology Biochemistry and Behavior*. 2003; 74(3): 579-585.
- Shinomol GK, Muralidhara. Prophylactic neuroprotective property of *Centella asiatica* against 3-nitropropionic acid induced oxidative stress and mitochondrial dysfunctions in brain regions of prepubertal mice. *NeuroToxicology*. 2008; 29(6): 948-957.
- Haleagrahara N, Ponnusamy K. Neuroprotective effect of *Centella asiatica* extract (CAE) on experimentally induced parkinsonism in aged Sprague-Dawley rats. *J Toxicol Sci*. 2010; 35(1): 41-7.
- Tantisira MH. Bioactive standardized extract of *Centella asiatica* ECa233. *Proceeding of the 8th NRCT-JSPS Joint Seminar, 2009 (2-3 February)*: 25.
- Zhan RZ, Fujihara H, Baba H, Yamakura T, Shimoji K. Ischemic preconditioning is capable of inducing mitochondrial tolerance in the rat brain. *Anesthesiology*, 2002. 97(4): 896-901.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ภูมิถำเนาอยู่ท่จังหวัดเพชรรบูรณ บิดาชื่อ นายวีระ ฐปมกค มารดาชื่อ นางปวีณา ฐปมกค มีพี่น้องรวมตัวเอง 3 คน สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมปลายจากโรงเรียนวิทยานุกูลนารี ระดับปริญญาตรี เกษศาสตร์บัณฑิตจากมหาวิทยาลัยขอนแก่น นิติศาสตร์บัณฑิตจากมหาวิทยาลัยสุโขทัยธรรมมาธิราช ปัจจุบันปฏิบัติงานเป็นเภสักร ดำรงตำแหน่งเภสักรชำนาญการ ประจำที่โรงพยาบาลจังหวัดเพชรรบูรณ