

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

Author Miss Thanyaluck Phitak

Degree Doctor of Philosophy (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Prachya Kongtawelert Advisor

Assoc. Prof. Dr. Siriwan Ong-chai Co-advisor

Prof. Dr. Bruce Caterson Co-advisor

ABSTRACT

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

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

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

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

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

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์	การตรวจสอบสารพฤษเคมีระดับโมเลกุลที่มีผลต่อเมแทบอลิซึมของ เซลล์คอนโคโรไซค์มนุษย์
ผู้เขียน	นางสาว ธัญญลักษณ์ พิทักษ์
ปริญญา	วิทยาศาสตร์ดุขุภินันต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

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

บทคัดย่อ

โรคข้อกระดูกอักเสบเป็น ภาวะที่พบบ่อยที่สุดในภาวะข้อต่ออักเสบและ ส่งผลกระทบต่อ ประชากรกว่าล้านคนทั่วโลก การรักษาผู้ป่วยแบบดั้งเดิมมักใช้ยาในกลุ่มยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่ สเตอริรอยด์ แต่ยาในกลุ่มนี้มีผลข้างเคียงค่อนข้างรุนแรง สารเคมีจากพืชเป็นอีกหนึ่งทางเลือก เพื่อพัฒนาไปสู่รักษาโรคข้อกระดูกอักเสบ ในการศึกษาที่พืชของไทยสองชนิดได้ถูกคัดเลือกมา เพื่อศึกษา ได้แก่ เหง้าข่า (*Alpinia galanga* rhizomes) และ เมล็ดงา (*Sesamun indicum* seeds) ฤทธิ์การป้องกันกระดูกอ่อนของสารสกัดจากพืชทั้งสองชนิดถูกศึกษาโดย การเพาะเลี้ยงผิวกระดูก อ่อนหมูโดยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วยสารอินเทอร์ลิวคิน-1-เบต้า พบว่าสารสกัดจากเหง้าข่า ในชั้นอะซีโตนมีฤทธิ์ยับยั้งการสลายของกระดูกอ่อนมากกว่าสารสกัดในชั้นตัวทำละลายอื่นๆ และ พบว่าสารพาราไฮดรอกซีชินนามอลดีไฮด์คือสารที่ออกฤทธิ์ในสารสกัดนี้ สำหรับเมล็ดงาสารที่

เป็นที่รู้จักและพบมากในงา คือ เซซามิน ได้ถูกนำมาศึกษาในครั้งนี้นี้และพบว่าสารดังกล่าวมีฤทธิ์ในการป้องกันการสลายของกระดูกอ่อนที่กระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้าเช่นกัน เมื่อเปรียบเทียบฤทธิ์ในการป้องกันการสลายของกระดูกอ่อนของสารทั้งคู่นี้ พบว่าปริมาณของสารพาราไฮดรอกซีชินนามอลดีไฮด์ที่ใช้ เพื่อทำให้ออกฤทธิ์นั้นมากกว่าปริมาณของสารเซซามินถึง 160 เท่า ดังนั้นในการศึกษาต่อไป จะเลือกเฉพาะ สารเซซามินมาทำการศึกษาเท่านั้น

ในการศึกษาที่ลึกลงไปทำในกระดูกอ่อนผิวข้อของหนู โดยใช้ระยะเวลาในการเพาะเลี้ยงที่นานขึ้นเป็นเวลา 28 วัน พบว่าสารเซซามินสามารถยับยั้งฤทธิ์ของอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า ต่อการสลายของโมเลกุลภายนอกเซลล์ได้ โดยพบว่าการสลายของซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคนและไฮดรอกซีโปรตีนถูกยับยั้งได้โดยสารเซซามิน ได้ศึกษากลไกการยับยั้งของสารเซซามิน ต่อ และพบว่าสารเซซามินสามารถลดการแสดงออกของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-1, -3 และ -13 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่สามารถสลายโปรตีโอไกลแคนและคอลลาเจนได้ทั้งในระดับยีนและโปรตีน นอกจากนี้ยังพบว่าสารเซซามินยังสามารถยับยั้งการกระตุ้นกัมมันตภาพของเอนไซม์เมทริกซ์เมทัลโลโปรทีเนส-3 ได้อีกด้วย ในเซลล์กระดูกอ่อนมนุษย์พบว่าสัญญาณภายในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดยอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า ถูกยับยั้งได้โดยสารเซซามิน โดยสามารถยับยั้งทั้งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับโปรตีน p38 และ JNK ในวิถี MAPK ได้ และนอกจากนี้ยังสามารถยับยั้งการกระตุ้นทรานสคริปชันแฟกเตอร์ชนิด NF κ B ได้อีกด้วย ฤทธิ์ของสารเซซามินถูกศึกษาต่อในหนูที่ถูกกระตุ้นให้เป็นโรคข้อกระดูกอักเสบด้วยปาเปน พบว่าการให้สารเซซามินร่วมกับฉีดปาเปนแก่หนูดังกล่าว สามารถยับยั้งพยาธิสภาพการเกิดโรคได้ โดยสามารถลดการเรียงตัวของเซลล์กระดูกอ่อนที่ผิดปกติเนื่องจากการอักเสบได้ สามารถเพิ่มความหนาของกระดูกอ่อนได้และสามารถลดการสลายของสารชีวโมเลกุลในกระดูกอ่อนที่สำคัญ คือ คอลลาเจนชนิดที่สอง และ ซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคนได้ นอกจากนี้สารเซซามินยังสามารถเพิ่มคอลลาเจนชนิดที่สองและซัลเฟตไกลโคซามิโนไกลแคน ในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนของข้อหนูปกติ

ได้อีกด้วย จากผลการศึกษาดังกล่าว ทั้งหมดสามารถบอกได้ว่าสารเซซามินมีประสิทธิภาพในการลดการพัฒนาการเกิดพยาธิสภาพของ โรคข้อกระดูกอักเสบในหนูได้

นอกจากนี้ ได้ทำการศึกษาความสามารถในการเสริมฤทธิ์ของยาที่ใช้รักษาโรคข้อเสื่อม ได้แก่ กลูโคซามีนซัลเฟต ของสารเซซามินในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหนู พบว่าสารเซซามินสามารถเสริมฤทธิ์ของกลูโคซามีนซัลเฟต

ในการป้องกันการสลายของโปรตีโอไกลแคนโอในเนื้อเยื่อกระดูกอ่อนหนูที่ถูกกระตุ้นด้วยอินเตอร์ลิวคิน-1-เบต้า

ดังนั้นสารเซซามินน่าจะสามารถพัฒนาเพื่อใช้เป็นยารักษาโรคข้อกระดูกอักเสบ หรืออย่างน้อยเป็นตัวเสริมประสิทธิภาพของยารักษาโรคนี้ได้