

# CONTENTS

	Page
Acknowledgement	c
Abstract in Thai	d
Abstract in English	f
List of Tables	j
List of Figures	k
List of Abbreviations	m
List of Symbols	o
Statement of Originality in Thai	p
Statement of Originality in English	q
Chapter 1 Introduction	1
1.1 Rationale	1
1.2 Literature Review	2
1.2.1 Protein folding and misfolding	2
1.2.2 Alzheimer's disease: a neurodegenerative disease-causing protein misfolding and aggregation	5
1.2.3 Therapeutic approaches against protein aggregation in Alzheimer's disease	8
1.2.4 An approach for investigating amyloid protein fibrillation	11
1.3 Objectives	14
Chapter 2 Materials and Methods	15
2.1 Phytochemicals and chemical reagents	15
2.2 Cell lines and cell culture	16

	Page
2.3 Spectroscopic analysis of Phytochemical-protein interaction	16
2.3.1 Interaction between insulin and phytochemicals	16
2.3.2 The study of insulin fibrillation	16
2.3.3 Kinetic analysis of amyloid fibrillation	18
2.3.4 Effect of phytochemicals on amyloid beta fibrillation	18
2.4 Effect of phytochemicals on cell viability of human neuroblastoma cell lines	19
2.5 Protective effect of phytochemicals against the neurotoxicity-induced by amyloid protein aggregation	20
Chapter 3 Results	21
3.1 Spectroscopic analysis of phytochemical-protein interaction	21
3.1.1 Fluorescence spectra of phytochemicals	21
3.1.2 Interaction of human insulin with phytochemicals	22
3.2 Effect of Phytochemicals on the amyloid fibrillation of human recombinant insulin	24
3.2.1 Kinetics of insulin fibrillation monitoring via intrinsic Tyr fluorescence and Thioflavin T	24
3.2.2 Effect of phytochemicals on kinetic of insulin fibrillation	25
3.3 Effect of phytochemicals on the amyloid beta fibrillation	30
3.4 Effect of phytochemicals on the cell viability of human neuroblastoma cell lines	32
3.5 Neuroprotective effects of phytochemical against amyloid beta induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells	35
3.5.1 Toxicity of amyloid beta peptide, A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 and A $\beta$ 40:A $\beta$ 42 on SH-SY5Y cell line	35
3.5.2 Effect of phytochemical against A $\beta$ induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cells	36
Chapter 4 Discussion and Conclusion	38

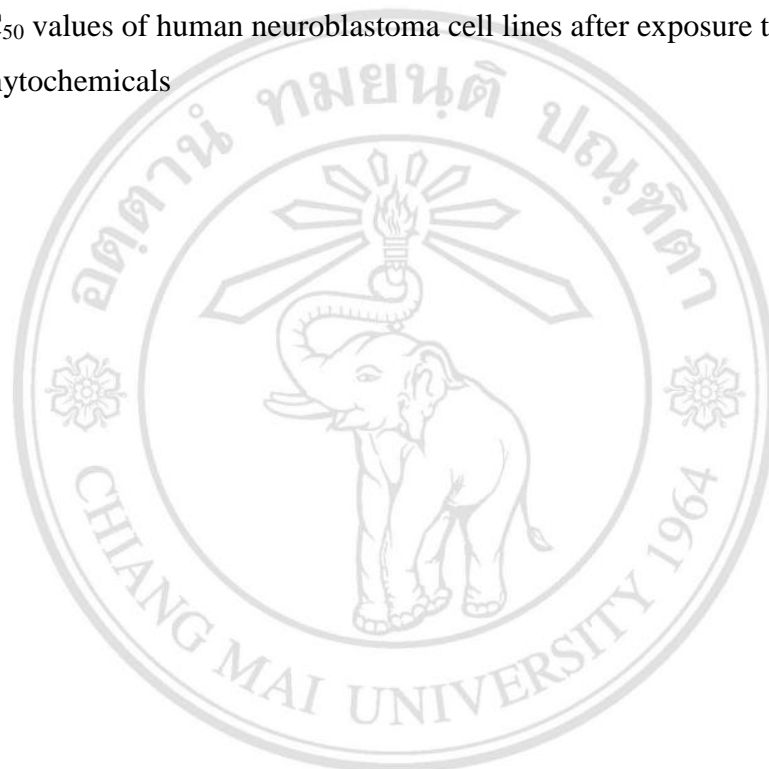
	Page
References	42
Curriculum Vitae	54



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright© by Chiang Mai University  
 All rights reserved

## LIST OF TABLES

	Page
Table 3.1 Effect of phytochemicals on insulin fibrillation detected by Tyr fluorescence and Thioflavin T	27
Table 3.2 IC <sub>50</sub> values of human neuroblastoma cell lines after exposure to phytochemicals	35



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
 Copyright© by Chiang Mai University  
 All rights reserved

## LIST OF FIGURES

	Page
Figure 1.1 A schematic representation of the amyloid forming pathway	4
Figure 1.2 Characteristics of A $\beta$ <sub>40</sub> and A $\beta$ <sub>42</sub> protein	6
Figure 1.3 The relationship between the size of A $\beta$ and their toxic effects	8
Figure 1.4 A typical kinetic graph of the insulin aggregation model	12
Figure 2.1 The model of kinetic of insulin fibrillation monitoring by the fluorescence intensity of Tyrosine	17
Figure 2.2 The model of kinetic of amyloid beta fibrillation monitoring by the fluorescence intensity of Thioflavin T	19
Figure 3.1 Chemical structures and fluorescence excitation and emission spectra of four Alkaloids derived from <i>Stephania venosa</i> (Blume)	21
Figure 3.2 Fluorescence emission spectra of human insulin	22
Figure 3.3 Fluorescence emission spectra of insulin in the presence of different concentrations of A1, A2, A3 and A4	23
Figure 3.4 Fluorescence emission spectra of insulin in the presence of different concentrations of IronQ, quercetin, and curcumin	24
Figure 3.5 Insulin fibrillation detected by Tyr fluorescence and Thioflavin T	25
Figure 3.6 Effect of alkaloids compounds on insulin fibrillation detected by Tyrosine autofluorescence and Thioflavin T	26
Figure 3.7 Effect of polyphenol compound on insulin fibrillation detected by Tyrosine autofluorescence and Thioflavin T	28
Figure 3.8 Effect of alkaloid compound on insulin fibrillation detected by Thioflavin T	29
Figure 3.9 Effect of polyphenol compound on insulin fibrillation detected by Thioflavin T	30

	Page
Figure 3.10 Kinetic of amyloid- $\beta$ fibrillation detected by Thioflavin T	31
Figure 3.11 Effect of phytochemicals on A $\beta$ fibrillation detected by Thioflavin T	32
Figure 3.12 Effect of alkaloids on the cell viability of human neuroblastoma cell lines, SK-N-SH and SH-SY5Y	33
Figure 3.13 Effect of polyphenols on the cell viability of human neuroblastoma cell lines, SK-N-SH and SH-SY5Y	34
Figure 3.14 Effect of A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ and ratio of A $\beta_{40}$ , A $\beta_{42}$ on the cell growth of SH-SY5Y	36
Figure 3.15 Effect of phytochemicals at different concentrations on Amyloid $\beta$ -induced cytotoxicity in SH-SY5Y cells	37

## LIST OF ABBREVIATIONS

A $\beta$	Amyloid beta
A $\beta$ 42	Amyloid beta 42 residues long
A $\beta$ 40	Amyloid beta 40 residues long
A1	Crebanine
A2	O-methylbulbocapnine
A3	Tetrahydropalmatine
A4	N-methyltetrahydropalmatine
ADDL	A $\beta$ -derived diffusible ligands
CNS	Central nervous system
Cur	Curcumin
DMSO	Dimethyl sulfoxide
DMEM	Dulbecco's Modification of Eagle's Medium
ELND005	Scyllo-inositol
F <sub>tyr</sub>	Fluorescence intensity of tyrosine residue
HAM/F12	Ham's F12 Nutrient Mixture
HFIP	1,1,1,3,3,3 hexafluoro-2-propanol
IDE	Insulin-degrading enzyme
LRP1	Low-density-lipoprotein-receptor-related protein 1
MEM	Minimum Essential Media
PS1	Presenilin 1
PS2	Presenilin 2
Phe	Phenylalanine
Qct	Quercetin
ROS	Reactive oxygen species
RFU	Relative fluorescent units
SH-SY5Y	Human neuroblastoma cell lines
SK-N-SH	Human neuroblastoma cell lines
SDS	Sodium dodecyl sulfate

ThT	Thioflavin T
Tyr	Tyrosine
Trp	Tryptophan
8-HQ	8-hydroxiquinolines

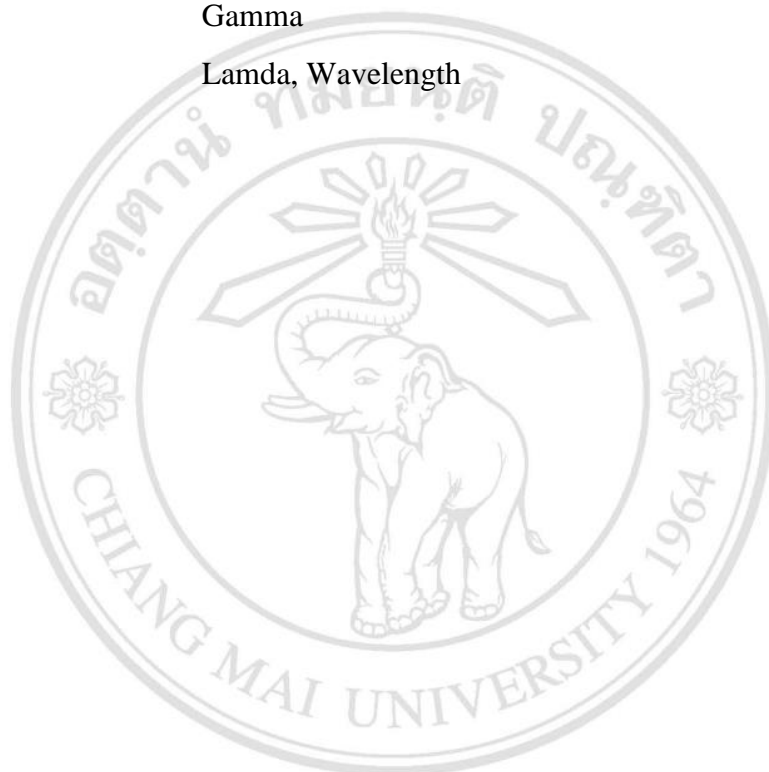


ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved



## LIST OF SYMBOLS

$h$	hour
$M$	$\text{mol.L}^{-1}$
$\beta$	Beta
$\gamma$	Gamma
$\lambda$	Lamda, Wavelength



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## ข้อความแห่งการริเริ่ม

วิทยานิพนธ์นี้ได้นำเสนอการศึกษาฤทธิ์ทางด้านเภสัชจลนศาสตร์ในระดับหลอดทดลอง ระหว่างสารพฤษเคมีกับอะไมลอยด์เบตาเปปไทด์ในการออกฤทธิ์ป้องกันเซลล์ประสาทในโรคอัลไซเมอร์ โดยอาศัยเทคนิคทางด้านฟลูออเรสเซนซ์สเปกโตรสโกปีในการศึกษาฤทธิ์ของสารพฤษเคมีต่อการยับยั้งการตกตะกอนของโปรตีนอะไมลอยด์ รวมถึงการศึกษาประสิทธิภาพในการเป็นสารป้องกันความเป็นพิษที่เกิดจากการตกตะกอนของโปรตีนอะไมลอยด์ เบต้าที่ได้ทำการศึกษาในระดับเซลล์ทดลอง

การศึกษานี้ได้ทำการทดสอบประสิทธิภาพของสารพฤษเคมีสองกลุ่ม ได้แก่ สารพฤษเคมีกลุ่มอัลคาลอยด์และสารพฤษเคมีกลุ่มโพลีฟีนอลและสารประกอบเชิงซ้อนระหว่างโลหะหนักกับเคอร์ซีติน องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาสามารถนำไปใช้เป็นแบบแผนในการพัฒนาต้นแบบที่ได้จากสารธรรมชาติเพื่อใช้ในการป้องกันการตกตะกอนของโปรตีนอะไมลอยด์ ซึ่งจะนำไปสู่การลดโอกาสเสี่ยงและป้องกันการเกิดโรคอัลไซเมอร์ต่อไป

ข้าพเจ้าขอรับรองว่าเนื้อหาในวิทยานิพนธ์นี้เป็นของข้าพเจ้าซึ่งไม่เคยถูกนำเสนอเพื่อปริญาใด ๆ มาก่อน และข้าพเจ้าขอประกาศว่าวิทยานิพนธ์นี้ไม่มีการขัดแย้งทางผลประโยชน์ใด ๆ ทั้งสิ้น

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved

## STATEMENTS OF ORIGINALITY

This thesis proposed to study the in vitro pharmacokinetic between phytochemicals and amyloid beta peptide towards neuroprotective effect in Alzheimer's disease. We performed the experiments by using the fluorescence spectroscopy for studying the interaction of phytochemicals as the inhibitory mechanism on amyloid protein aggregation. We also studied the efficiency of phytochemicals as the protective agent from the toxicity induced by amyloid protein aggregation at the cellular level.

This study determined the efficiency of two phytochemicals group, alkaloids and polyphenol, and a paramagnetic agent of complexation between ferric iron and quercetin. The knowledge gained from this study can be used as a basis for the development of drug prototype derived from the natural substance for preventing the aggregation of amyloid protein, leading to prevent and reduce the risk of Alzheimer's disease.

I can affirm that the content of this thesis is my own work and has never been proposed for any degree. I also declare that this thesis has no conflict of interest.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่  
Copyright© by Chiang Mai University  
All rights reserved