

**PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AGAINST
EXOGENOUS REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCING CELL
DEATH SIGNALING IN SH-SY5Y CULTURED CELLS**

CHORKAEW PUTTHAPRASART

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR
THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE
(NEUROSCIENCE)
FACULTY OF GRADUATE STUDIES
MAHIDOL UNIVERSITY
2005**

**ISBN 974-04-6669-9
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ผลของเมลาโทนินในการป้องกันการเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์โดย exogenous reactive oxygen species ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y (PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AGAINST EXOGENOUS REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCING CELL DEATH SIGNALING IN SH-SY5Y CULTURED CELLS)

ชื่อแก้ว พุทธประสาท 4536624 STNS/M

วท.ม. (ประสาทวิทยาศาสตร์)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : บัณฑิต เจตนัสว่าง, ปร.ด., ปิยะรัตน์ โกวิททรงพงศ์, Ph.D.,
นัยพินิจ คชภักดี, Ph.D.

บทคัดย่อ

สภาวะที่เซลล์มีการเสียสมดุลระหว่างอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระและส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์นั้น เรียกว่า เซลล์อยู่ในสภาวะ oxidative stress สารอนุมูลอิสระโดยเฉพาะสารในกลุ่มที่รวมเรียกว่า reactive oxygen species เช่น superoxide radical, hydroxyl radical และ hydrogen peroxide พบว่า มีหน้าที่เป็นตัวกลางสำคัญภายในเซลล์ที่จะเหนี่ยวนำให้มีการกระตุ้นขบวนการที่จะก่อให้เกิดการตายของเซลล์ จุดประสงค์การทําวิจัยครั้งนี้ต้องการที่จะทําการศึกษาเพื่อให้ความเข้าใจถึงกลไกภายในเซลล์ซึ่งถูกเหนี่ยวนำจากสภาวะ oxidative stress และก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท รวมทั้งการศึกษาเพื่อให้เกิดความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับผลของเมลาโทนิน (melatonin) ในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบผลของเมลาโทนินในการป้องกันการเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในเซลล์เพาะเลี้ยงโดปามีนชนิด SH-SY5Y ผลการศึกษาพบว่า hydrogen peroxide มีผลทำให้เซลล์เกิดการเสื่อมสลายเกิดขึ้นได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยใช้วิธีการวัดสภาพของเซลล์ที่เรียกว่า MTT assay และเมลาโทนินสามารถลดผลของ hydrogen peroxide ได้ ส่วนการใช้ Desipramine ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น monoamine uptake blocker นั้นพบว่าสามารถที่จะลดผลของการทำลายเซลล์จาก 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺) ได้แต่ไม่สามารถลดผลการทำลายเซลล์ของ hydrogen peroxide ได้และเมื่อทําการศึกษาถึงผลของการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ caspase โดยใช้สาร Ac-DEVD-CHO ซึ่งเป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ caspase-3 พบว่าสารดังกล่าว มีผลในการลดการทำลายเซลล์โดย hydrogen peroxide และในการวิจัยครั้งนี้ยังพบอีกว่า hydrogen peroxide มีผลเพิ่มการ phosphorylation ของ transcription factor ชนิด nuclear factor kappa B (NF- κ B) ขึ้นภายในเซลล์และผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยเมลาโทนิน และเมื่อทําการศึกษาด้วย immunofluorescence พบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับผลจาก hydrogen peroxide มีการเคลื่อนที่ของ phosphorylated NF- κ B เข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์มากกว่ากลุ่มควบคุมและผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยเมลาโทนิน นอกจากนี้ hydrogen peroxide ยังส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Bcl-2 และ Bax ในเซลล์เพาะเลี้ยง SH-SY5Y โดยที่เมลาโทนิน สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Bax แต่ไม่สามารถยับยั้งการเพิ่มขึ้นของปริมาณโปรตีน Bcl-2

77 หน้า ISBN 974-04-6669-9

PROTECTIVE EFFECT OF MELATONIN AGAINST EXOGENOUS REACTIVE OXYGEN SPECIES INDUCING CELL DEATH SIGNALING IN SH-SY5Y CULTURED CELLS

CHORKAEW PUTTHAPRASART 4536624 STNS/M

M.Sc. (NEUROSCIENCE)

THESIS ADVISORS: BANTHIT CHETSAWANG, Ph.D., PIYARAT GOVITRAPONG, Ph.D., NAIPHINICH KOTCHABHAKDI, Ph.D.

ABSTRACT

Oxidative stress is defined as a disturbance in the prooxidant-antioxidant balance, leading to potential cell damage. Reactive oxygen species such as superoxide radicals, hydroxyl radicals and hydrogen peroxide may act also as a second intermediate in intracellular signaling leading to cell death. The objective of this research, therefore, was to better understand the cellular mechanisms of neuronal cell degeneration induced via oxidative stress and the protective roles of melatonin on this cell death. In the present study, the effects of melatonin on hydrogen peroxide-induced neuronal cell degeneration in a human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells were investigated. The results showed that hydrogen peroxide significantly decreased cell viability as determined by 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT) assay, and melatonin was able to reverse the toxic effects of hydrogen peroxide. Desipramine, a monoamine uptake blocker was able to abolish the toxic effects of 1-methyl-4-phenylpyridinium iodide (MPP⁺) but not hydrogen peroxide on cell viability reduction. An inhibition of caspase enzyme activity by Ac-DEVD-CHO, a caspase-3 inhibitor significantly increased cell viability in hydrogen peroxide treated cells. The phosphorylation of transcription factors, nuclear factor kappa B (NF- κ B) was increased in hydrogen peroxide treated cells and this effect was abolished by melatonin. Translocation of phosphorylated NF- κ B to nuclear site using immunofluorescence was more observed in hydrogen peroxide treated cells than control-untreated cultured cells and the said effect was abolished by melatonin. In addition, induction of Bcl-2 and Bax proteins was demonstrated in SH-SY5Y cultured cells treated with hydrogen peroxide, whereas the induction of Bax but not Bcl-2 was diminished by melatonin.

KEY WORDS: MELATONIN/ OXIDATIVE STRESS/ HYDROGEN PEROXIDE/
CELL DEATH/ SH-SY5Y CELLS

77 P. ISBN 974-04-6669-9