

**EFFECTS OF ACRYLONITRILE ON MUSCARINIC  
RECEPTORS AND THEIR SIGNALINGS**

**WANTIKA CHANTARA**

**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT  
OF THE REQUIREMENTS FOR  
THE DEGREE OF DOCTOR OF PHILOSOPHY (TOXICOLOGY)  
FACULTY OF GRADUATE STUDIES  
MAHIDOL UNIVERSITY  
2006**

**ISBN 974-04-7658-9  
COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

ผลของอะครีโลไนไตรล์ต่อระดับของตัวรับมัสคารินิกและการส่งสัญญาณผ่านตัวรับมัสคารินิก

(EFFECTS OF ACRYLONITRILE ON MUSCARINIC RECEPTORS AND THEIR SIGNALINGS)

วันทิกา จันทระ 4438089 SCTX/D

ปร.ค. (พืชวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: จุฑามาศ สัตยวิวัฒน์, Ph.D. (Pharmacology), สุขุมาล

จงธรรมคุณ, Ph.D. (Anatomy), ศันสนีย์ ไชยโรจน์, Ph.D. (Biology),

ปิยจิต วัชรศิษย์, Ph.D. (Pharmacology)

### บทคัดย่อ

อะครีโลไนไตรล์เป็นสารที่มีพิษต่อระบบประสาทและเป็นสารก่อมะเร็งในสัตว์ทดลอง ผลจากการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าอะครีโลไนไตรล์อาจทำให้มีการหลั่งของสารสื่อประสาทอะเซทิลโคลีนไปกระตุ้นตัวรับมัสคารินิกจนทำให้มีการกระตุ้นระบบประสาทโคลิเนอร์จิกมากเกินไป เนื่องจากตัวรับมัสคารินิกทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมระบบการส่งสัญญาณ การรบกวนการส่งสัญญาณของตัวรับมัสคารินิกอาจมีผลต่อระบบการส่งสัญญาณ ERK ผ่านตัวรับมัสคารินิก วัตถุประสงค์ของการวิจัยนี้เพื่อศึกษาผลของอะครีโลไนไตรล์ต่อระดับของตัวรับมัสคารินิกและการส่งสัญญาณผ่านตัวรับมัสคารินิกโดยทำการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองโดยใช้หนูขาวและในหลอดทดลอง

การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองทั้งแบบให้สารเคมีเพียงครั้งเดียวและการให้แบบซ้ำๆ 5 วันต่อสัปดาห์ เป็นเวลานาน 3 สัปดาห์ พบว่าหนูขาวที่ได้รับอะครีโลไนไตรล์เพียงครั้งเดียวโดยการฉีดเข้าชั้นใต้ผิวหนังในปริมาณ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมเป็นเวลา 15 นาทีและ 3 ชั่วโมง หรือได้รับอะครีโลไนไตรล์ร่วมกับอะโทรปีนเข้าชั้นกล้ามเนื้อ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับตัวรับมัสคารินิก ส่วนการเปลี่ยนแปลงของระบบการส่งสัญญาณนั้นผลการศึกษาวิจัยไม่สามารถสรุปได้ ในทำนองเดียวกันไม่พบการเปลี่ยนแปลงของระดับตัวรับมัสคารินิก และระบบการส่งสัญญาณในหนูขาวที่ได้รับอะครีโลไนไตรล์ในปริมาณ 1 มิลลิกรัม และ 25 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมเป็นเวลา 3 สัปดาห์

ในส่วนที่สองเป็นการศึกษาวิจัยในเซลล์ที่มีต้นกำเนิดมาจากมะเร็งสมอง ผลการวิจัยนี้พบว่าอะครีโลไนไตรล์มีผลกระตุ้นตัวส่งสัญญาณ ERK ซึ่งอาจมีผลเกี่ยวข้องกับการเกิดมะเร็งโดยเฉพาะมะเร็งสมองหลังจากได้รับสารอะครีโลไนไตรล์เป็นเวลานาน อะครีโลไนไตรล์สามารถกระตุ้นการส่งสัญญาณได้ โดยความแรงของการกระตุ้นขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลาที่สัมผัสกับสาร นอกจากนี้ยังพบว่าตัวยับยั้งของ ERK kinase (MEK) และ ตัวยับยั้งของโปรตีนไคเนสซี สามารถยับยั้งผลของอะครีโลไนไตรล์ได้ การให้อะครีโลไนไตรล์ต่อเนื่องเป็นเวลานานในเซลล์ชนิดนี้ยังพบว่าทำให้มีการลดลงของจำนวนตัวรับมัสคารินิก ดังนั้นการที่อะครีโลไนไตรล์สามารถก่อให้เกิดมะเร็งได้นั้นอาจเนื่องมาจาก อะครีโลไนไตรล์สามารถกระตุ้นระบบการส่งสัญญาณผ่านโปรตีนไคเนสซี ผลการศึกษาวิจัยชิ้นนี้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่สำคัญและรายงานเป็นครั้งแรก ซึ่งจะช่วยให้มีความเข้าใจในกลไกการออกฤทธิ์ของสารนี้เพิ่มขึ้น

**EFFECTS OF ACRYLONITRILE ON MUSCARINIC RECEPTORS AND THEIR SIGNALINGS**

WANTIKA CHANTARA 4438089 SCTX/D

Ph.D. (TOXICOLOGY)

THESIS ADVISORS: JUTAMAAD SATAYAVIVAD, Ph.D.(PHARMACOLOGY),  
SUKUMAL CHONGTHAMMAKUN, Ph.D.(ANATOMY), SANSANEE CHAIYAROJ,  
Ph.D.(BIOLOGY), PIYAJIT WATCHARASIT, Ph.D.(PHARMACOLOGY)**ABSTRACT**

Acrylonitrile (ACN) is a potent neurotoxicant and a probable carcinogen. ACN may cause cholinotoxicity via muscarinic acetylcholine receptor (mAChR) stimulation. As mAChRs are capable of modulating extracellular signal-regulated kinase (ERK) activity in the brain, the disturbances of these receptors possibly lead to modulation of mAChR-mediated ERK1/2 activation. Thus, the effects of ACN on expression of mAChRs and activation of ERK both *in vivo* and *in vitro* were investigated.

The first part of this study determined the *in vivo* effect of acute and repeated exposure to ACN on expression of mAChRs and ERK activation in male *Wistar* rat brains using immunoblotting technique. Subcutaneous injection of ACN (25 mg/kg BW) for 15 min or 3h did not alter the expression of M<sub>1</sub> and M<sub>3</sub> mAChRs, and the activation of ERK1/2 in rat brains. No significant effect of atropine and ACN cotreatment was detected. Likewise, the subcutaneous injection ACN 1 mg/kg or 25 mg/kg 5 days/week for 3 weeks did not show any significant effect of ACN on mAChRs expression and the phosphorylation of ERK.

In part II, effects of ACN on the alteration of ERK activity and the expression of M<sub>3</sub> mAChRs in SK-N-SH neuroblastoma cells were examined. This present study demonstrates a new mechanism involving ERK signaling molecules that may contribute to preferential tumorigenesis of brain tumors induced by ACN. Results of this study provide evidence for the first time that ACN causes activation of ERK1/2 through a PKC-dependent mechanism in neuroblastoma SK-N-SH cells. Treatment of these cells with ACN (400 µg/ml) greatly increased phosphorylation of ERK1/2 in dose- and time-dependent manners. This effect was inhibited by PD 98059 and U 0126, specific inhibitors of MEK, indicating that MEK, an upstream activator of ERK1/2, is directly involved in ACN-induced ERK1/2 activation. Furthermore, the activation of ERK1/2 by ACN was attenuated by inhibition of PKC with GF 109203X, rottlerin, and prolonged incubation with PMA (phorbol 12-myristate 13-acetate). The muscarinic receptor stimulation is not apparently involved in ACN-induced ERK1/2 activation, and oxidative stress does not play a role in the activation mechanism. Interestingly, long term exposure to ACN decreased total number of M<sub>3</sub> mAChRs in dose and time-dependent manners.

Taken together, the results indicate that ACN causes ERK1/2 activation through a mechanism involving PKC in SK-N-SH cells. This study provides important information for understanding the effect of ACN, which may lead to further study on the effect of ACN on mAChRs and their signal transduction pathway.

KEY WORDS: ACRYLONITRILE/ MUSCARINIC RECEPTOR/ ERK ACTIVATION/ PKC

135 pp. ISBN 974-04-7658-9