LIBRARY AND INFORMATION CENTER
MAHIDOL UNIVERSITY

EFFECTS OF NITRIC OXIDE SYNTHASE INHIBITORS IN N18 NEUROBLASTOMA CELLS

PANIDA CHUTSRINOPKUN

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE (PHARMACOLOGY)

With compliments
of
.....

IN

FACULTY OF GRADUATE STUDIES

MAHIDOL UNIVERSITY

1997

Copyright© by Mahidol University

TH
P192e
1997

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของยายับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตสในเซลล์เพาะเลี้ยงนิวโรบลาสโตม่าชนิดเอ็นสิบแปด

ผู้วิจัย พนิดา ฉัตรครีนพคุณ

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ พรทิพย์ ศุภวิไล, Ph.D.
มลวิภา วงษ์สกุล, Ph.D.
กิตติมา ศรีวัฒนกุล, Ph.D.

วันที่สำเร็จการศึกษา 21 สิงหาคม พ.ศ. 2540

บทคัดย่อ

ในการทดลองนี้ใช้เซลล์เพาะเลี้ยงนิวโรบลาสโตม่าชนิดเอ็นสิบแปด (เซลล์เอ็นสิบแปด) เพื่อศึกษาถึงผลในการสร้างไนตริกออกไซด์เมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีรั่มและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของผลนั้นเมื่อให้ยายับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตส ไนตริกออกไซด์สามารถสร้างขึ้นภายในร่างกายจากแอล-อาจินินและออกซิเจนโมเลกุลโดยเอ็นไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตส ไนตริกออกไซด์มีบทบาททั้งในสภาวะปกติของร่างกายและในสภาวะที่มีพยาธิสภาพ ทั้งนี้รวมถึงการควบคุมการหดตัวของเส้นเลือด การทำหน้าที่เป็นสารสื่อประสาทและการตอบสนองด้านภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไนตริกออกไซด์ยังมีบทบาทในแง่การทำลายเซลล์ต่างๆอีกด้วย การศึกษาเมื่อเร็วๆนี้พบว่าไนตริกออกไซด์มีความเกี่ยวข้องอย่างมากกับโรคต่างๆที่เกี่ยวกับการเสื่อมของเซลล์ประสาท การวัดปริมาณไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นทำโดยทางอ้อมด้วยวิธีของกรีสส์ซึ่งวัดสีบานเย็นที่เกิดจากไนไตรท์ (ซึ่งเป็นสารที่เกิดจากการทำปฏิกริยาของไนตริกออกไซด์กับออกซิเจน) ทำปฏิกริยากับซัลฟานิลาไมด์และแนปทีลีนไดเอมีนไดไฮโดรคลอไรด์ในสภาวะกรด

เซลล์เอ็นสิบแปดเมื่อเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีซีรั่มจะผลิตไนไตรท์เพิ่มขึ้นตามเวลาที่ผ่านไป โดยพบว่าในชั่วโมงที่ 48 มีไนไตรท์เกิดขึ้นมากถึง 10 เท่า ผลของการให้ยายับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตส 6 ตัว ได้แก่ เอ็น-ไนโตร-แอล-อาจินิน เมธิล เอสเทอร์ (แอล-เอ็น

เอเอ็มอีแอล), เอ็น-ไนโตร-ดี-อาจินิน เมธิล เอสเทอร์ (ดี-เอ็นเอเอ็มอี), เอ็น-เมธิล-แอล-อาจินิน (แอล-เอ็นเอ็มเอ), เอ็น-เมธิล-ดี-อาจินิน (ดี-เอ็นเอ็มเอ), อะมิโนกัวนิดีน (เอจี) และเอ็น-ไนโตร-แอล-อาจินิน (แอล-เอ็นเอ็นเอ) แก่เซลล์เอ็นสิบแปดในความเข้มข้น 0 1, 1, 10, 100, และ 1000 ไมโครโมล่า ต่อปริมาณไนไตรท์ที่ผลิตขึ้นทันทีและในชั่วโมงที่ 2, 8, 24, และ 48 พบว่าที่ความเข้มข้นของยาต่ำๆ (0 1 1 และ 10 ไมโครโมลา) ยาส่วนใหญ่ไม่ลดการผลิตไนไตรท์ถึงระดับที่มีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่ความเข้มข้นของยาสูงขึ้น (100 และ 1000 ไมโครโมล่า) ยายับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตส (ยกเว้นแอล-เอ็นเอ็นเอ) สามารถลดการสร้างไนไตรท์ได้ ในขณะที่สารชนิดเดียวกันแต่เป็นดี-อีแนนทิโอเมอร์ไม่มีผลใดๆ

จากผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์เอ็นสิบแปดในอาหารที่ไม่มีซีรั่ม เซลล์เอ็นสิบแปดจะถูกเหนี่ยวนำให้ผลิตไนไตรท์ และปริมาณไนไตรท์ที่ผลิตนี้จะลดลงเมื่อให้ยายับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ไนตริกออกไซด์ซินเตส แอล-เอ็นเอเอ็มอี, แอล-เอ็นเอ็มเอ, และเอจี ในขณะที่แอล-เอ็นเอ็นเอ, ดี-เอ็นเอเอ็มอี และ ดี-เอ็นเอ็มเอจะไม่มีผลใดๆ

Copyright by Mahidol University

Thesis Title Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors in N18 Neuroblastoma Cells

Name Panida Chutsrinopkun

Degree Master of Science (Pharmacology)

Thesis Supervisory Committee
Porntip Supavilai, Ph.D.
Molvibha Vongsakul, Ph.D.
Kittima Sriwatanakul, Ph.D.

Date of Graduation 21 August B.E. 2540 (1997)

Abstract

Experiments were performed to verify whether N18 neuroblastoma cells (N18 cells) in culture medium without serum produced nitric oxide (NO) and whether they were sensitive to the nitric oxide synthase (NOS) inhibitors. NO is synthesized *in vivo* from L-arginine and oxygen by enzyme NOS and plays a major role in several diverse physiological and pathological functions including regulation of vascular tone, neurotransmission and mediation of immune response. Recent studies have shown that excessive NO plays a key role in the etiology of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's disease and stroke. In this study, NO formation was determined from the NO breakdown product, nitrite, by measuring spectrometrically the purple colour developed after it had been reacted with sulfanilamide and N-1-

Copyright© by Mahidol University

napthylenediamine dihydrochloride under acidic condition (Griess method).

N18 cells when cultured in medium without serum exhibited time-dependent production of nitrite. The induction of NO in N18 cells was found to be increased more than 10-fold at 48 hr after serum withdrawal.

NOS inhibitors including N^{ω}-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME), N^{ω}-nitro-D-arginine methyl ester (D-NAME), N^{ω}-methyl-L-arginine (L-NMA), N^{ω}-methyl-D-arginine (D-NMA), aminoguanidine (AG), and N^{ω}-nitro-L-arginine (L-NNA) at the concentrations of 0.1, 1, 10, 100, and 1000 μM were used to evaluate for their inhibitory effects on nitrite production. It was found that low concentrations (0.1-10 μM) of these NOS inhibitors did not produce significant inhibition on the nitrite production, whereas at higher concentrations (100 and 1000 μM) of optically active L-NAME and L-NMA but not L-NNA significantly inhibited the nitrite production ($P<0.05$). However, racemic AG at higher concentrations (100 and 1000 μM) were found to significantly inhibit the nitrite production ($P<0.05$). On the other hand, the inactive enantiomer of NOS inhibitors, D-NAME and D-NMA, did not inhibit nitrite productions.

These data thus demonstrated that deprivation of serum in culture medium of N18 cells resulted in the induction of nitrite production which was attenuated by L-NAME and iNOS inhibitors such as L-NMA and AG, but not by cNOS inhibitor (L-NNA) and the inactive enantiomers (D-NAME and D-NMA).

Copyright by Mahidol University