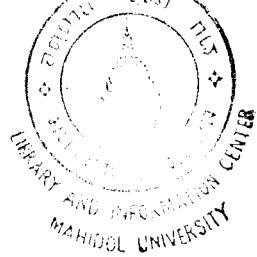
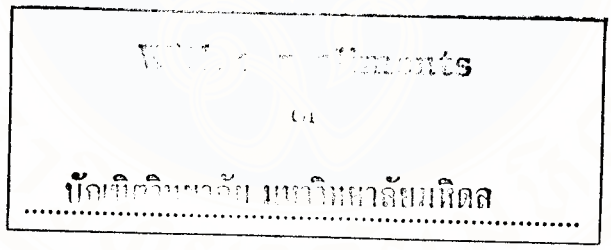
27 JUN 2003




# THE EFFECTS OF G-PROTEIN ACTIVATORS, MASTOPARAN AND COMPOUND 48/80, ON SEROTONIN SECRETION AND PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY IN HUMAN PLATELETS

**SUPACHOKE MANGMOOL**




**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT**
**OF THE REQUIREMENTS FOR**
**THE DEGREE OF MASTER OF SCIENCE**
**(PHARMACOLOGY)**
**FACULTY OF GRADUATE STUDIES**
**MAHIDOL UNIVERSITY**
**2003**

TH
S 959e
2003
c. 2

**ISBN 974-04-2993-9**
**COPYRIGHT OF MAHIDOL UNIVERSITY**

Copyright by Mahidol University

THE EFFECTS OF G-PROTEIN ACTIVATORS, MASTOPARAN AND COMPOUND 48/80, ON SEROTONIN SECRETION AND PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY IN HUMAN PLATELETS

SUPACHOKE MANGMOOL 4436325 SCPM/M

M.Sc. (PHARMACOLOGY)

THESIS ADVISOR : DARAWAN PINTHONG, Ph.D., YUPIN SANVARINDA, Ph.D., SUPEENUN UNCHERN, Ph.D.

ABSTRACT

Mastoparan (MP) and compound 48/80 have been found to accelerate guanine nucleotide exchange and GTPase activity of purified G-proteins. These compounds can directly activate secretory processes of mast cells and pancreatic islets by penetrating through plasma membranes and directly stimulating membrane GTPase activity without mediating via receptor binding. Phospholipase D (PLD) activities were reported to be involved in vesicular transport such as exocytosis and endocytosis. Therefore, this study aims to examine whether these compounds affect secretion of human platelets, and examine the subtype of G-protein signaling and the effect of MP and compound 48/80 on PLD activities.

MP was found to produce a dose-dependent increase in serotonin release from intact platelets. The maximal secretion was obtained at the concentration of 88 μg/ml (60 μM). Similarly, compound 48/80 caused a dose-dependent increase in 5-HT release with maximal secretion obtained at the concentration of 400 μg/ml. Permeabilized platelets with SLO significantly ($p \leq 0.05$) increased serotonin secretion.

To investigate whether the observed stimulation of serotonin secretion is mediated through the $G_i$ subtype of G-protein, the G-protein blocking agents (e.g. pertussis toxin, benzalkonium chloride and daunomycin) were used. MP- and compound 48/80-induced secretion was significantly ($p \leq 0.05$) inhibited by preincubation with pertussis toxin and 5 μg/ml of benzalkonium chloride only in SLO-permeabilized platelets whereas daunomycin did not affect MP- and compound 48/80-induced secretion in both intact and SLO-permeabilized platelets. The results from this study suggested that MP and compound 48/80 promoted secretion by mechanisms involving the stimulation of $G_i$ but not the lipid bilayer disruption of the membranes. The consequence after $G_i$ activation to platelet secretion remains to be clarified.

MP and compound 48/80 stimulated PLD activity with maximal response observed at 14.67 μg/ml (10 μM) of MP and 50 μg/ml of compound 48/80. G-protein blocking agents did not affect this stimulatory effect. These results suggest that the mechanism does not involve the G-protein linked pathways. Whether the stimulation of PLD activity by MP and compound 48/80 in human platelets is due to their effects on membrane perturbation or on small GTPase stimulation remains to be elucidated.

KEY WORDS : G-PROTEIN ACTIVATORS / SEROTONIN SECRETION / PLD ACTIVITY / SIGNALING PATHWAY / HUMAN PLATELETS

125 P. ISBN 974-04-2993-9

Copyright by Mahidol University

การศึกษาฤทธิ์ของสารกระตุ้นโปรตีน-จี (มาสโตพารานและสารประกอบ 48/80) ต่อการหลั่งซีโรโทนินและการกระตุ้นเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส ดี ในเกล็ดเลือดมนุษย์ (THE EFFECTS OF G-PROTEIN ACTIVATORS, MASTOPARAN AND COMPOUND 48/80, ON SEROTONIN SECRETION AND PHOSPHOLIPASE D ACTIVITY IN HUMAN PLATELETS)

ศุภโชค มั่งมูล 4436325 SCPM/M

วท.ม. (เภสัชวิทยา)

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ : ดาราวรรณ ปิ่นทอง, Ph.D., ยุพิน สังวรินทะ, Ph.D., สุภีนันท์ อัญเชิญ, Ph.D.

บทคัดย่อ

มาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการแลกเปลี่ยนguanine nucleotide และกระตุ้น GTPase activity ของโปรตีน-จีบริสุทธิ์ สารประกอบทั้งสองนี้ยังสามารถกระตุ้นโดยตรงต่อขบวนการหลั่งสารของเซลล์ต่างๆ เช่น mast cells และ pancreatic islets โดยการแทรกผ่านผนังเซลล์เข้าไปกระตุ้นโดยตรงต่อ GTPase activity ซึ่งการกระตุ้นนี้ไม่ผ่านตัวรับ การทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส ดี มีรายงานว่าเกี่ยวข้องกับ vesicular transport เช่น exocytosis และ endocytosis ดังนั้นงานวิจัยนี้มีจุดประสงค์ในการทดสอบฤทธิ์ของมาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 ต่อการหลั่งสารในเกล็ดเลือดและทดสอบหาชนิดของโปรตีน-จีที่เกี่ยวข้องกับขบวนการหลั่งสาร และทดสอบฤทธิ์ของมาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 ต่อการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส ดี

จากการทดลองพบว่ามาสโตพารานกระตุ้นการหลั่งซีโรโทนินจากเกล็ดเลือดปกติในลักษณะที่ขึ้นกับความเข้มข้น การหลั่งซีโรโทนินพบได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 88 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (20 ไมโครโมลาร์) สารประกอบ 48/80 ก็สามารถกระตุ้นการหลั่งซีโรโทนินได้เช่นเดียวกันและขึ้นกับความเข้มข้น การหลั่งซีโรโทนินพบได้สูงสุดที่ความเข้มข้น 400ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร การเพิ่มความสามารถของเกล็ดเลือดในการซึมผ่านโดยใช้ streptolysin O พบว่าทำให้สารทั้งสองตัวกระตุ้นการหลั่งซีโรโทนินเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการศึกษาชนิดของโปรตีน-จีที่มีบทบาทต่อกลไกกระตุ้นการหลั่งซีโรโทนิน โดยใช้สารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน-จี เช่น pertussis toxin, benzalkonium chloride และ daunomycin พบว่า pertussis toxin และ benzalkonium 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรยับยั้งการหลั่งซีโรโทนินที่ถูกกระตุ้นด้วยมาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)ในSLO-permeabilized platelets เท่านั้น ขณะที่ daunomycin ไม่มีผลยับยั้งการหลั่งสารที่ถูกกระตุ้นด้วยมาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 ทั้งใน intact and SLO-permeabilized platelets จากผลการทดลองนี้สรุปได้ว่ามาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 สามารถกระตุ้นการหลั่งสารโดยผ่านทางการกระตุ้นโปรตีน-จีชนิด $G_i$ และไม่เกี่ยวข้องกับการรบกวนโครงสร้างของผนังเซลล์

มาสโตพารานและสารประกอบ 48/80 กระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส ดีซึ่งการกระตุ้นพบได้สูงสุด ที่ความเข้มข้น 14.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (10 ไมโครโมลาร์) ของมาสโตพารานและที่ความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรของสารประกอบ 48/80 สารที่ยับยั้งการทำงานของโปรตีน-จีไม่มีผลต่อการกระตุ้นนี้ จากผลการทดลองสรุปได้ว่าสารทั้งสองการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส ดี โดยไม่ผ่านทางการกระตุ้นโปรตีน-จี การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ฟอสโฟไลเปส ดีจะเกี่ยวข้องกับการรบกวนหน้าที่ของผนังเซลล์หรือผ่านทางการกระตุ้น small GTPase ยังคงต้องศึกษาต่อไป

125 หน้า . ISBN 974-04-2993-9

©Copyright by Mahidol University