



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบป้องกันตนเองของเซลล์ประสาทที่เกิดการเสื่อมสลายจากสารเสพติด: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล

Induction of cellular defense system in drug abuses-induced neuronal cell degeneration: A functional study of the molecular mechanisms

โดย รองศาสตราจารย์บัณฑิต เจตน์สว่าง

กันยายน 2554

สัญญาเลขที่ RMU5180010

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การเพิ่มประสิทธิภาพการทำงานของระบบป้องกันตนเองของเซลล์ประสาทที่เกิด
การเสื่อมสลายจากสารเสพติด: การศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโมเลกุล

Induction of cellular defense system in drug abuses-
induced neuronal cell degeneration: A functional
study of the molecular mechanisms

ผู้วิจัยสังกัด

ศูนย์วิจัยประสาทวิทยาศาสตร์

สถาบันชีววิทยาศาสตร์โมเลกุล

มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จ. นครปฐม

สนับสนุนโดยสำนักงานคณะกรรมการอุดมศึกษาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย
(ความเห็นในรายงานนี้เป็นของผู้วิจัย สกอ. และ สกว. ไม่จำเป็นต้องเห็นด้วยเสมอไป)

Abstract

Project Code: RMU5180010

Project Title: Induction of cellular defense system in drug abused-induced neuronal cell degeneration: A functional study of the molecular mechanism

Investigator: Associate Professor Banthit Chetsawang

Research Center for Neuroscience, Institute of Molecular Biosciences, Mahidol University, Salaya, Nakhonpathom 73170

E-mail Address: grbcs@mahidol.ac.th

Project Period: 3 years (15 May 2008 - 14 May 2011)

Parkinson's disease is a progressive neurodegenerative disorder, associated with the selective loss of dopaminergic neurons in the substantia nigra pars compacta. Methamphetamine (METH) is a potent psychostimulant drug that may cause neuronal cell degeneration. In this study, we investigated an important role of calpain-dependent cascades in methamphetamine-induced toxicity in human dopaminergic neuroblastoma SH-SY5Y cultured cell lines. In addition, the protective effect of melatonin against METH-induced calpain-dependent death pathway was also investigated. The results of the present study show that METH significantly decreased cell viability and tyrosine hydroxylase phosphorylation in SH-SY5Y cultured cells. Melatonin reversed the toxic effect of METH by inducing cell viability. In addition, melatonin was able to restore the reduction in mitochondrial function and phosphorylation of tyrosine hydroxylase in SH-SY5Y treated cells. An induction of calpain expression and activity but a reduction of calpain inhibitor (calpastatin) protein levels were observed in SH-SY5Y cells-treated with METH but these effects were diminished by melatonin. Taken together, increase in phosphorylation of c-Jun and Bax/Bcl-2 ratio was observed in METH-treated cells. Calpastatin can reverse the toxic effect of METH by increasing cell viability, reducing phosphorylation of c-Jun and Bax/Bcl-2 ratio in METH-treated cells. These results implicated calpain-dependent death pathways in the processes of METH-induced toxicity and also indicated that melatonin and calpastatin have the capacity to reverse this toxic effect in SH-SY5Y cultured cells.

Keywords: methamphetamine, calpain, calpastatin, melatonin, neuroprotection, dopamine cells, cell death

บทนำ

การเกิดโรคหรือกลุ่มอาการของโรคทางระบบประสาทหลายชนิดพบว่ามีสาเหตุมาจากการเกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท (Neurodegeneration) เช่น โรค Alzheimer's disease (AD), Parkinson's disease (PD), Amyotrophic lateral sclerosis (ALS) และ Neuronal Aging (Evans et al 1989, Tanner and Langston 1990) จากการศึกษาวิจัยพบว่ามีปัจจัยและสาเหตุที่เหนี่ยวนำให้เกิดโรคดังกล่าวอยู่หลายอันเช่น ภาวะชราภาพ การได้รับสารพิษต่อระบบประสาทต่อเนื่องเป็นเวลานาน และการเกิดสภาวะติดเชื้อในสมอง (Langford et al 2003, Huang et al 2005) เป็นต้น แต่อีกสาเหตุหนึ่งที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งก็คือการได้รับสารเสพติดเป็นเวลานานๆ หรือได้รับในปริมาณที่สูง เช่น สารเสพติดพวก Alcohol (Zharkovsky et al 2003) Heroin (Cunha-Oliveira et al 2007) และ Metamphetamine (Davidson et al 2001, Cunha-Oliveira et al 2006) ก็พบว่าเป็นสาเหตุหนึ่งของการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในสมองได้ และจากรายงานผลการศึกษาปัญหาการใช้สารเสพติดในประเทศแถบเอเชียตะวันออกเฉียงและแปซิฟิกเมื่อปี 2549 พบว่า 9 ใน 13 ประเทศที่ทำการศึกษารวมทั้งประเทศไทยมีอัตราการใช้สารเสพติดจำพวกสารกระตุ้นระบบประสาทและความรู้สึก (Psychostimulant) เช่นแอมเฟตามีนหรือที่รู้จักกันดีในชื่อยาบ้าเพิ่มมากขึ้น ประกอบกับผลการศึกษาวิจัยที่ทำการทดลองศึกษาในสัตว์ทดลองและในเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์พบว่าสารที่ก่อให้เกิดการเสพติดดังกล่าวมีผลทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในสมองของสัตว์ทดลองหลายส่วน (Cadet et al 2005, Zhu et al 2006) และในทำนองเดียวกันก็พบว่าการก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทที่เพาะเลี้ยงในน้ำยาเลี้ยงเซลล์อีกด้วย (Cunha-Oliveira et al 2006) ดังนั้นจึงอาจเล็งเห็นได้ว่าในอนาคตปัญหาทางด้านสุขภาพของผู้ใช้สารเสพติดแอมเฟตามีนนั้นจะเป็นปัญหาหลักไม่แพ้กันกับปัญหาด้านอื่นๆ โดยเฉพาะผลเสียของการใช้สารเสพติดประเภทนี้ที่มีต่อสมองและระบบประสาท จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจที่จะได้มีการศึกษาถึงกลไกในระดับโมเลกุลที่สารเสพติดเข้าไปมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพการทำงานของเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่มีต่อระบบป้องกันตนเองของเซลล์ (cellular defense system) จนทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทรวมทั้งทดลองศึกษาหาแนวทางในการลดผลเสียดังกล่าวที่เกิดขึ้นกับเซลล์ประสาทเพื่อทำให้เซลล์มีการทำงานตามปกติ และการที่เรามีความรู้ความเข้าใจกลไกหรือกระบวนการในระดับโมเลกุลที่สารเสพติดดังกล่าวมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพการทำงานของเซลล์ประสาทเช่นไปมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออก (expression) ของยีนหรือโปรตีนบางชนิด อาจนำความรู้ดังกล่าวมาพัฒนาเป็น โปรตีนบ่งชี้ (Marker protein) ที่จะใช้ตรวจสอบความผิดปกติหรือการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทได้ ดังนั้นโครงการวิจัยนี้จึงได้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษาถึงกลไกระดับโมเลกุลทั้งในระดับยีนและโปรตีนต่างๆที่เข้าไปเกี่ยวข้องในกระบวนการที่สารเสพติดมีผลทำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท รวมทั้งการค้นคว้าวิจัยอันจะได้มาซึ่งแนวทางในการป้องกัน

หรือด้านผลของการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท และจะเป็นแนวทางหนึ่งในการที่จะได้มาซึ่งองค์ความรู้พื้นฐานที่จะนำไปประยุกต์ใช้ในการป้องกันยับยั้งหรือการวินิจฉัยการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอีกด้วย

วิธีการทดลอง

1. อัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยแอมเฟตามีน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ซึ่งเป็น dopaminergic cell line ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่แอมเฟตามีนที่ความเข้มข้นต่างๆลงไปในเซลล์นาน 24 ชั่วโมง ในเซลล์บางกลุ่มจะไม่ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม (Control group) หลังจากนั้นทำการวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay โดยใช้สารละลาย 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) ลงในเซลล์เพาะเลี้ยงทิ้งไว้ 2 ชั่วโมง แล้วนำเซลล์ออกจากตู้อบ เทน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ทิ้งไป แล้วเติมสารละลายส่วนผสมของ isopropanol และ HCl ลงไปเพื่อทำละลาย dark blue formazan crystal แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง โดยเครื่อง Spectrophotometer ที่ 560 nm. นำผลการทดลองมาเปรียบเทียบกับระหว่างอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์กับปริมาณความเข้มข้นของแอมเฟตามีนซึ่งจะแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของแอมเฟตามีนกับอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

2. การเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในระบบป้องกันตนเองของเซลล์ประสาทที่เกิดการเสื่อมสลายจากผลของสารเสพติดแอมเฟตามีน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ซึ่งเป็น dopaminergic cell line ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่แอมเฟตามีนที่มีความเข้มข้นต่างๆกันลงไปในเซลล์ส่วนเซลล์บางกลุ่มจะไม่ได้ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุมทิ้งเซลล์ไว้ที่เวลาแตกต่างกัน ทำการ harvested cell โดยใช้ SDS sample buffer ลงไปแล้วทำให้เซลล์แตกโดยใช้เครื่อง Sonicator แล้วปั่นแยกที่ 14,000 rpm นาน 10 นาที เก็บแยกเฉพาะส่วน supernatant ไว้เพื่อนำไปแยกหาแถบโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis หลังจากนั้น Transfer แถบโปรตีนลงบน Nitrocellulose membrane แล้วนำไป incubate กับ primary antibody ที่ 4 องศาเซลเซียสนานข้ามคืน (12 ชั่วโมง) หลังจากนั้นนำมา incubate กับ HRP-conjugated secondary antibody นาน 1 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำไปทำปฏิกิริยากับ ECL plus reagent แล้วนำไปตรวจสอบหาการเรืองแสงของแถบโปรตีนที่เฉพาะเจาะจงต่อ

โปรตีนโดยนำแผ่น Nitrocellulose ไปประกบกับแผ่น Film หลังจากนั้นนำแผ่น Film ไปวัดค่าความเข้มของแถบโปรตีนโดยใช้เครื่อง Densitometer เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในแต่ละกลุ่ม

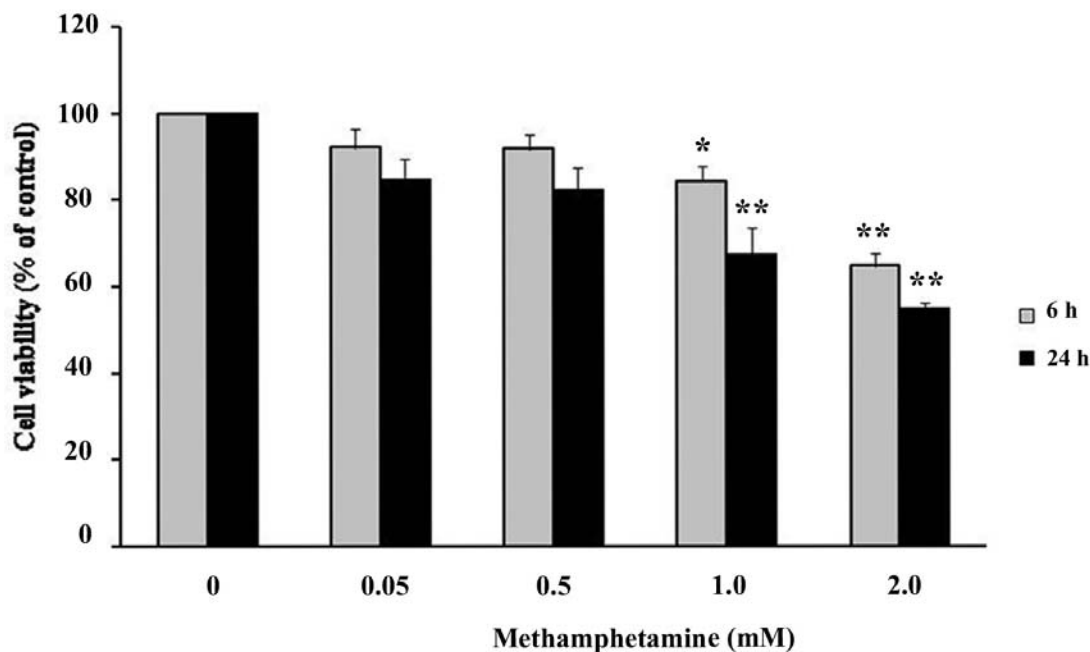
3. ผลของเมลาโท닌ในการยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทจากแอมเฟตามีน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y ซึ่งเป็น dopaminergic cell line ในน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์บน culture dish ในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะ 5% CO₂ และ 95% air หลังจากนั้นใส่แอมเฟตามีนหรือเมลาโทนิกลงไปในเซลล์ ส่วนเซลล์บางกลุ่มจะใส่สารละลายเมลาโทนิกลงไป 1 ชั่วโมงก่อนที่จะใส่แอมเฟตามีนลงไปและเซลล์ที่ไม่ได้ใส่สารเคมีใดๆลงไปเรียกเซลล์ในกลุ่มนี้ว่ากลุ่มควบคุม (Control group) ทิ้งเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการวัดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay นำข้อมูลที่ได้มาเปรียบเทียบอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ใส่แอมเฟตามีนหรือเมลาโทนิอย่างเดียวกันและกลุ่มที่ใส่แอมเฟตามีนร่วมกับเมลาโทนิ นอกจากนี้ยังทำการศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ประสาทและนับหาปริมาณจำนวนเซลล์ที่เสื่อมสลายในเซลล์แต่ละกลุ่มโดยการย้อมเซลล์ด้วยเทคนิค Immunocytochemistry staining โดยทำการ fix cell ด้วย 4% paraformaldehyde แล้วล้างออกด้วย PBS หลังจากนั้นนำมาแช่ใน PBS ที่เติม 1% hydrogen peroxide เป็นเวลา 10 นาทีที่อุณหภูมิห้องเพื่อลด endogenous peroxidase จากนั้นนำเซลล์มา incubate ใน 5% normal rabbit serum ใน PBS-A (PBS + 1% BSA + 0.3% Triton X-100) เป็นเวลา 30 นาทีเพื่อลด non-specific binding แล้วจึงนำชิ้นเนื้อมา incubate กับ specific primary antibody ที่ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน (12 ชั่วโมง) เพื่อให้เซลล์ทำปฏิกิริยากับ antibody จากนั้นนำเซลล์ที่ทำปฏิกิริยาขึ้นต้นแล้วมาล้างด้วย PBS-B (PBS + 0.25% BSA + 0.1% Triton X-100) 3 ครั้งๆ ละ 10 นาที แล้วนำไปทำปฏิกิริยาขั้นที่สองกับ FITC-conjugated anti-Rabbit IgG ใน PBS-B เป็นเวลา 2 ชั่วโมงที่ 4 องศาเซลเซียสแล้วล้างด้วย PBS นำเซลล์ไปปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาดูโดยใช้ confocal laser scanning microscopy เซลล์ที่มี positive immunostaining จะเรืองแสงสีเขียวเมื่อสังเกตเซลล์ภายใต้กล้อง confocal

ผลการทดลอง

1. ศึกษาอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดย methamphetamine

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ methamphetamine ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 mM นาน 6 และ 24 ชั่วโมงมีการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control, 0 mM) ที่ไม่ได้รับ methamphetamine (รูปที่ 1)

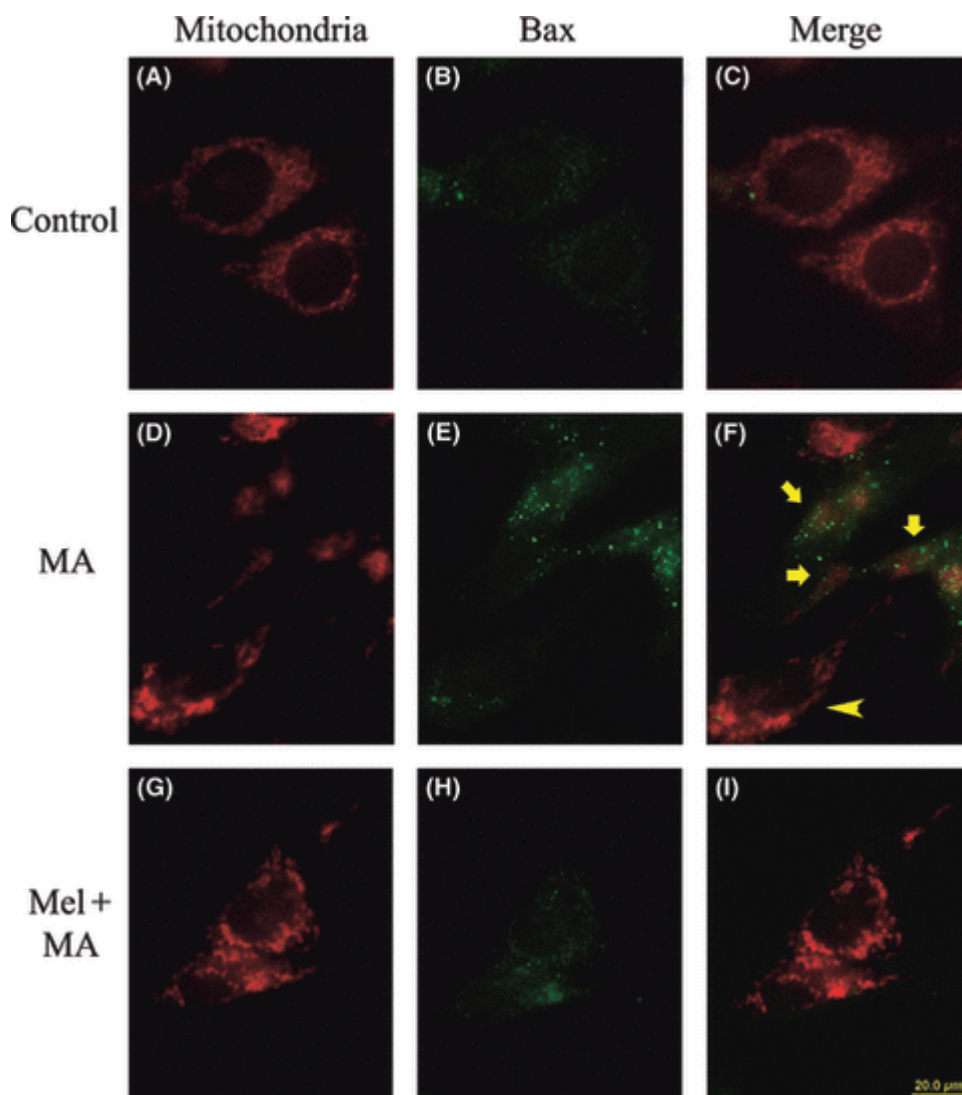


รูปที่ 1. อัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดย methamphetamine

* $p < 0.05$ และ ** $p < 0.001$ เทียบกับกลุ่มควบคุม

2. ศึกษาผลของ methamphetamine ที่มีต่อการทำงานของไมโทคอนเดรียในเซลล์ประสาท

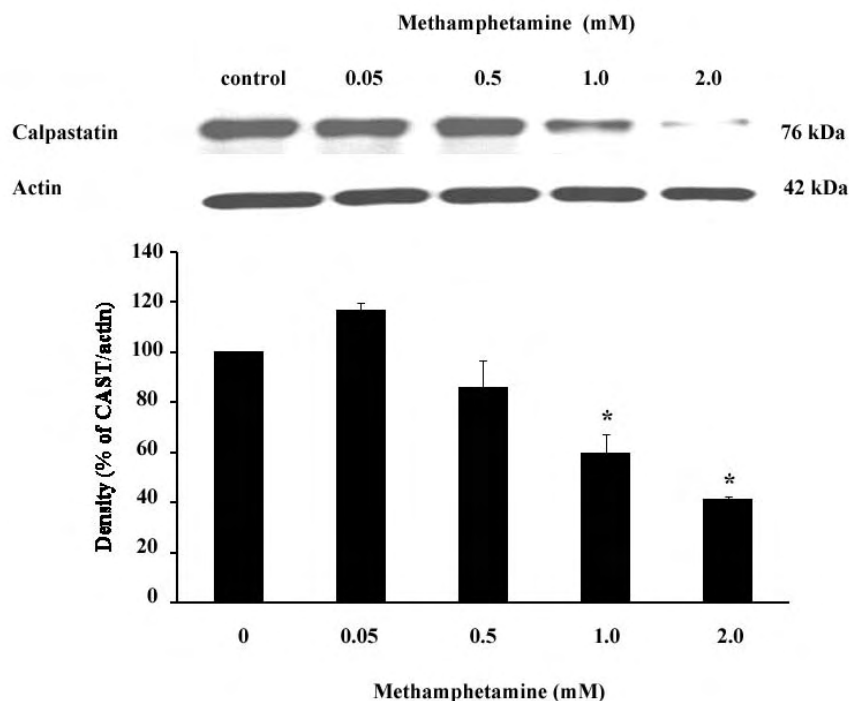
เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ methamphetamine (MA) ที่ความเข้มข้น 2.0 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการทำงานของไมโทคอนเดรียลดลงและมีการหดตัวของเซลล์หรือ shrinkage-like cells แต่มีปริมาณของ apoptotic protein หรือ โปรตีน Bax เพิ่มมากขึ้น (รูปที่ 2F, ลูกศร) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียเป็นปกติ (รูปที่ 2F, หัวลูกศร) หรือเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ methamphetamine (รูปที่ 2C) และผลเสียดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยเมลานิน (Mel) (รูปที่ 2I)



รูปที่ 2. Fluorescence images ของ SH-SY5Y cells แสดงตำแหน่งของไมโทคอนเดรีย (สีแดง) และโปรตีน Bax (สีเขียว)

3. ศึกษาผลของ methamphetamine ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ endogenous calpain inhibitor protein ในเซลล์ประสาท

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ methamphetamine ที่ความเข้มข้น 1.0 และ 2.0 mM นาน 24 ชั่วโมงมีระดับปริมาณของโปรตีน calpastatin (calpain inhibitor protein) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ methamphetamine (รูปที่ 3)

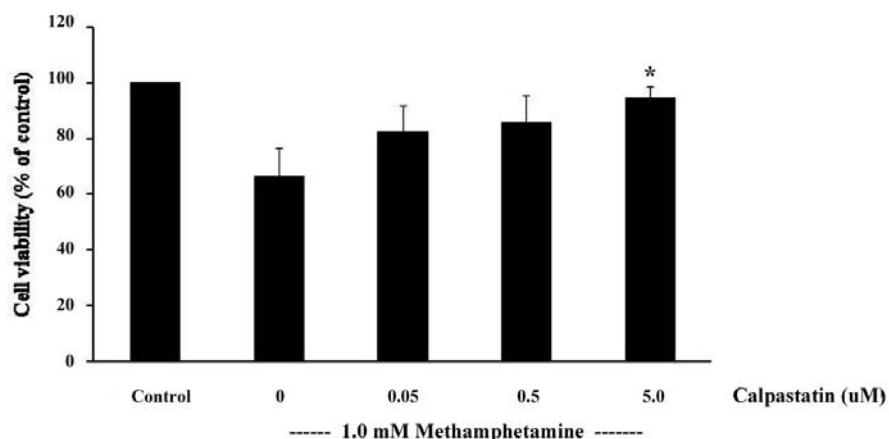


รูปที่ 3. Western blot analysis ของโปรตีน calpastatin ใน SH-SY5Y cells

*p < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม (0 mM)

4. ศึกษาผลของ calpain inhibitor ที่มีต่ออัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทที่ได้รับ methamphetamine

เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ calpain inhibitor (calpastatin) ที่ความเข้มข้น 0.05, 0.5 และ 5.0 μM นาน 6 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ methamphetamine ที่ความเข้มข้น 1.0 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมง พบว่า calpain inhibitor ที่ความเข้มข้น 5.0 μM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก methamphetamine ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 4)

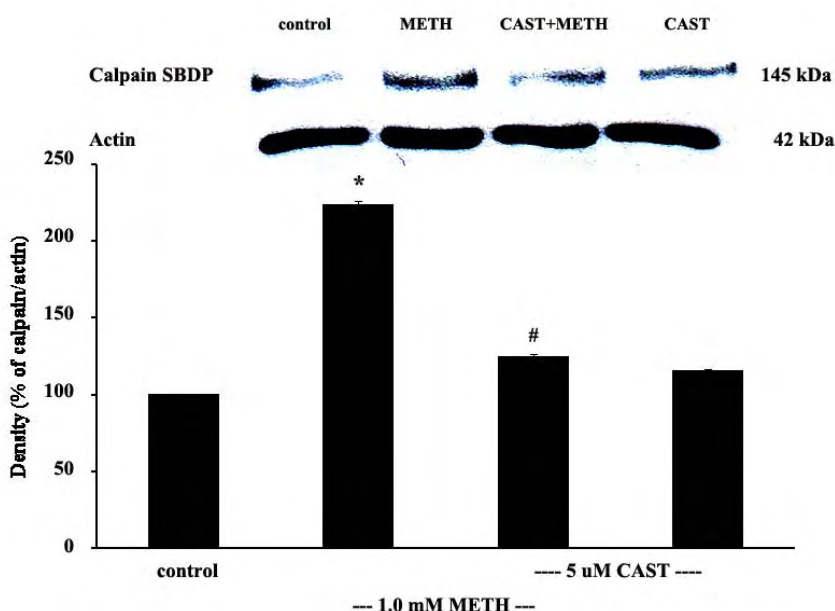


รูปที่ 4. อัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท SH-SY5Y

* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม (0 μM)

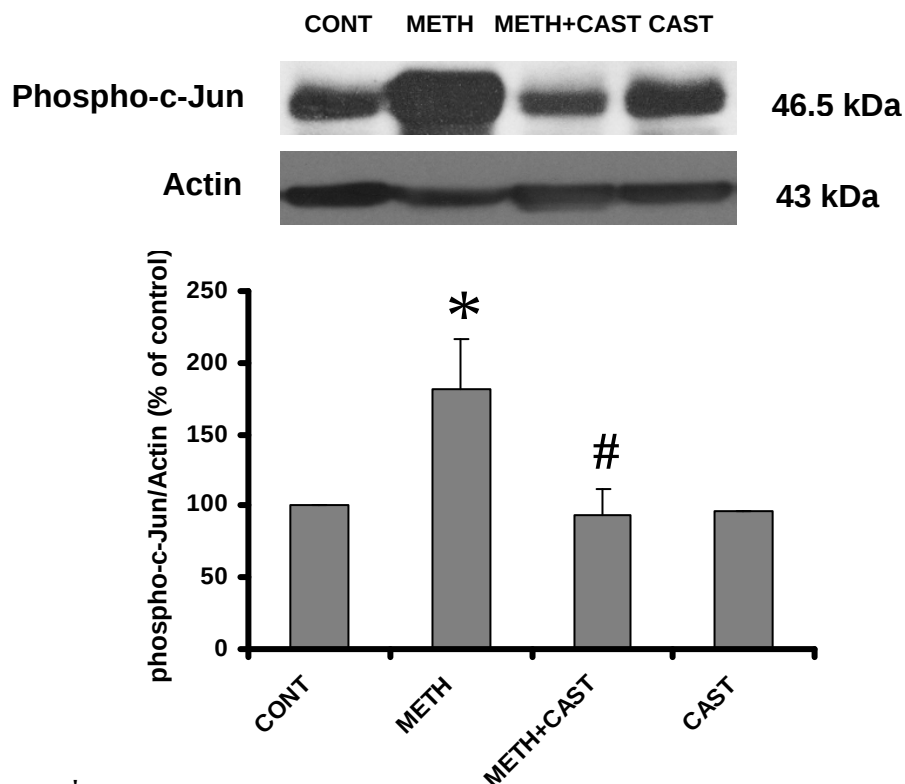
5. ศึกษาผลของ calpain inhibitor ที่มีต่ออัตราการทำงานของ calpain enzyme, c-Jun phosphorylation และปริมาณของโปรตีน Bax/Bcl-2 ในเซลล์ประสาทที่ได้รับ methamphetamine

เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ calpain inhibitor ที่ความเข้มข้น 5.0 μM นาน 6 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ methamphetamine ที่ความเข้มข้น 1.0 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมง พบว่า calpain inhibitor สามารถลดการเพิ่มขึ้นของการทำงานของ calpain enzyme (รูปที่ 5), c-Jun phosphorylation (รูปที่ 6) และปริมาณของโปรตีน Bax/Bcl-2 (รูปที่ 7) ในเซลล์ประสาทที่ได้รับ methamphetamine ได้อย่างมีนัยสำคัญ

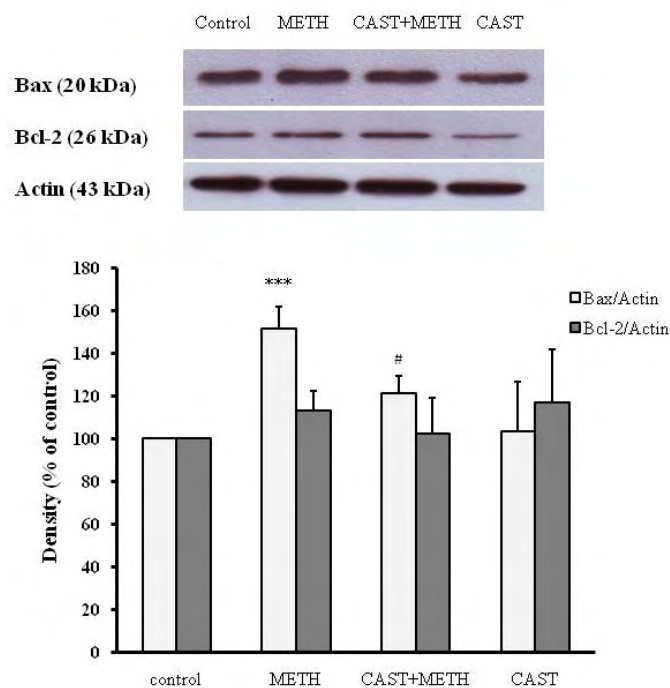


รูปที่ 5. Western blot analysis ของ calpain spectrin breakdown products (SBDP) ใน SH-SY5Y cells

* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม 1.0 mM METH



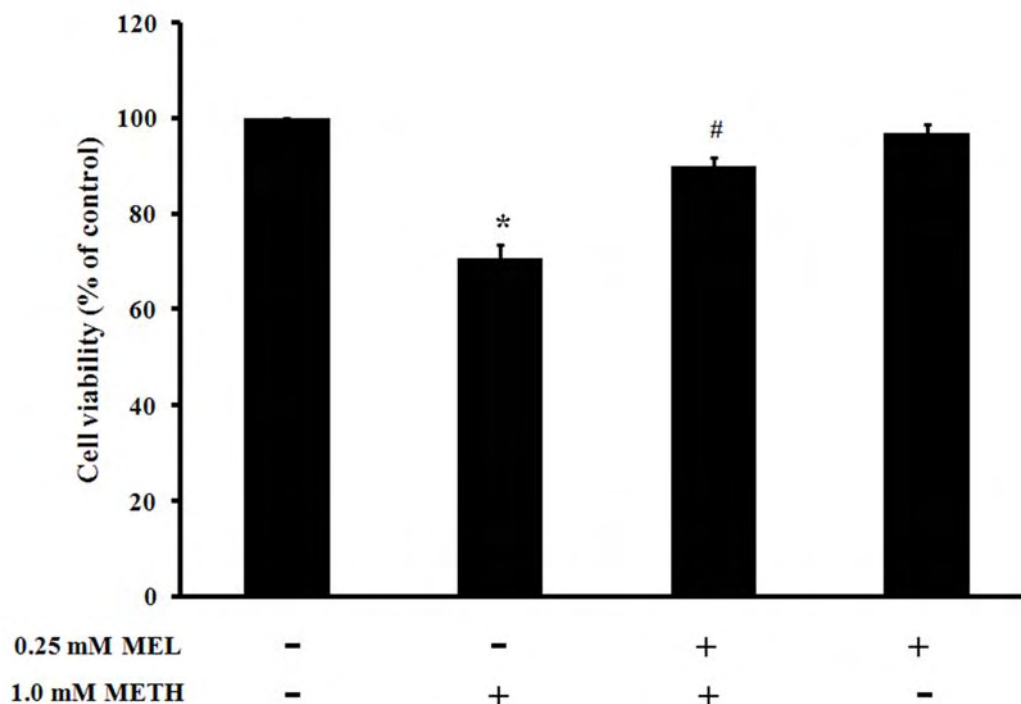
รูปที่ 6. Western blot analysis ของ c-Jun phosphorylation (Phospho-c-Jun) ใน SH-SY5Y cells
 $*p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ $\#p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม 1.0 mM METH



รูปที่ 7. Western blot analysis ของโปรตีน Bax และ Bcl-2 ใน SH-SY5Y cells
 $***p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ $\#p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม 1.0 mM METH

6. ศึกษาผลของเมลานินที่มีต่ออัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทชนิด SH-SY5Y cells ที่เกิดจากเมทแอมเฟตามีน

เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับเมลานิน (MEL) ที่ความเข้มข้น 0.25 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ methamphetamine (METH) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมง พบว่าเมลานินที่ความเข้มข้น 0.25 mM สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ SH-SY5Y จาก methamphetamine ได้อย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 8)



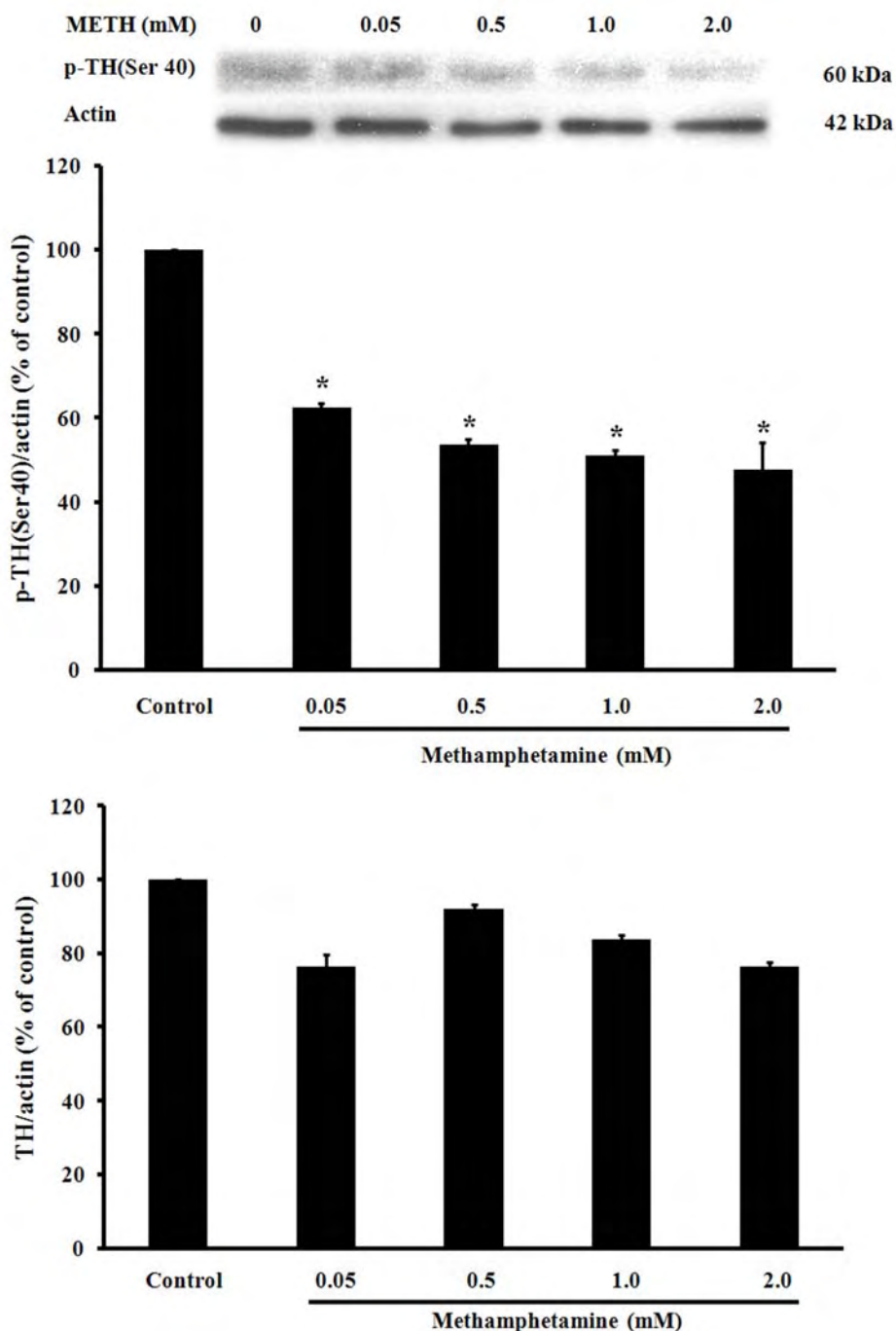
รูปที่ 8. อัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท

* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ # $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม 1.0 mM METH

7. ศึกษาผลของเมลานินที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ tyrosine hydroxylase phosphorylation และ mitochondrial function ใน SH-SY5Y cells ที่ได้รับเมทแอมเฟตามีน

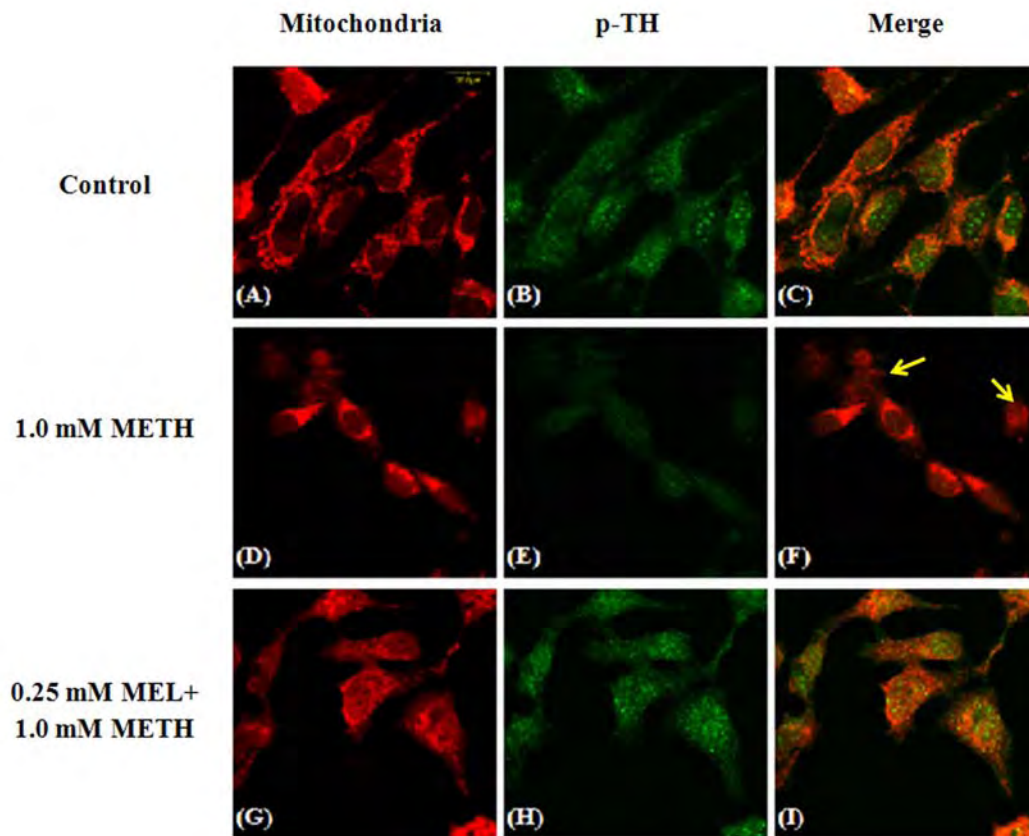
เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ methamphetamine (METH) ที่ความเข้มข้น 0.05-2.0 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการลดลงของปริมาณ tyrosine hydroxylase phosphorylation (รูปที่ 9) ซึ่งเป็น rate limiting enzyme ของการสร้างโดปามีน เมื่อทำการทดสอบการทำงานของไมโทคอนเดรียก็พบว่าเซลล์ที่ได้รับ methamphetamine (METH) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการทำงานของไมโทคอนเดรียลดลง การสังเกตลักษณะรูปร่างของเซลล์พบว่าการหดตัวของเซลล์หรือ shrinkage-like cells และมีปริมาณของ tyrosine hydroxylase

phosphorylation ซึ่งเป็น rate limiting enzyme ของการสร้างโดปามีน ลดลงอย่างเห็นได้ชัด (รูปที่ 10F) เมื่อเทียบกับเซลล์ที่มึการทำงานของไมโทคอนเดรียเป็นปกติ หรือเซลล์ในกลุ่มควบคุม (Control) ที่ไม่ได้รับ methamphetamine (รูปที่ 10C) และผลเสียดังกล่าวสามารถยับยั้งได้ด้วยเมลาทอนิน (MEL) (รูปที่ 10I)



รูปที่ 9. Western blot analysis ของ tyrosine hydroxylase phosphorylation (p-TH)

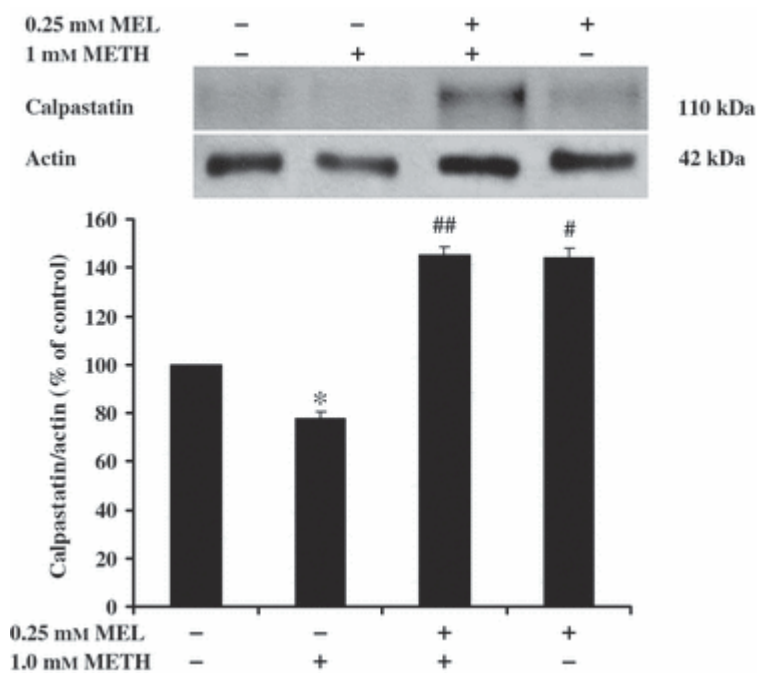
*p < 0.05 เทียบกับกลุ่มควบคุม



รูปที่ 10. Fluorescence images ของ SH-SY5Y cells แสดงตำแหน่งของไมโทคอนเดรีย (สีแดง) และ tyrosine hydroxylase phosphorylation (สีเขียว)

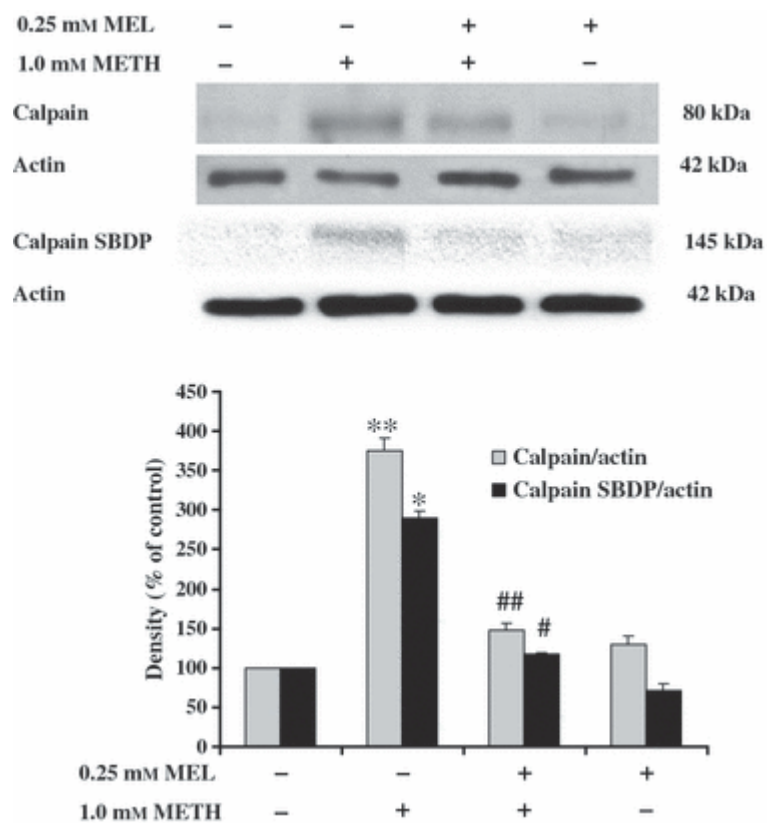
8. ทำการศึกษาผลของเมลาโท닌ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ calpain, calpain SBDP และ calpastatin ใน SH-SY5Y cells ที่ได้รับเมทแอมเฟตามีน

เซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับ methamphetamine (METH) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM นาน 24 ชั่วโมงมีการลดลงของปริมาณโปรตีน calpastatin (รูปที่ 11) แต่มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ calpain enzyme และ calpain spectrin breakdown product ที่ขนาด 145 kDa (รูปที่ 12) แต่เซลล์ประสาทโดปามีน SH-SY5Y ที่ได้รับเมลาโท닌 (MEL) ที่ความเข้มข้น 0.25 mM นาน 1 ชั่วโมงก่อนที่จะได้รับ methamphetamine (METH) ที่ความเข้มข้น 1.0 mM นานต่อไปอีก 24 ชั่วโมง พบว่าเมลาโท닌ที่ความเข้มข้น 0.25 mM สามารถยับยั้งการลดลงของปริมาณโปรตีน calpastatin (รูปที่ 11) และการเพิ่มขึ้นของปริมาณ calpain enzyme และ calpain spectrin breakdown product ที่ขนาด 145 kDa (รูปที่ 12)



รูปที่ 11. Western blot analysis ของโปรตีน calpastatin

* $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ ## $p < 0.05$ เทียบกับกลุ่ม 1.0 mM METH



รูปที่ 12. Western blot analysis ของโปรตีน calpain และ calpain spectrin breakdown product (SBDP)

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ เทียบกับกลุ่มควบคุม และ # $p < 0.05$, ## $p < 0.01$ เทียบกับกลุ่ม 1.0 mM METH

บทวิจารณ์

จากผลการศึกษาวิจัยพอจะสรุปได้ว่าการเสื่อมสลายของไมโทคอนเดรียรวมทั้งการลดลงของปริมาณ calpain inhibitor ส่งผลให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpain ซึ่งอาจจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดย methamphetamine แสดงให้เห็นว่าสาเหตุของการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทดังกล่าวน่าที่จะถูกเหนี่ยวนำมาจากการเสียสภาวะสมดุลของระบบที่ช่วยยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpain ประกอบกับมีการกระตุ้นการทำงานของระบบทำลายเซลล์เช่นการสูญเสียการทำงานของไมโทคอนเดรียและการเพิ่มขึ้นของ apoptotic proteins เช่น โปรตีน Bax ซึ่งจะมีผลต่อเนื่องในการกระตุ้นการทำงานของ death signaling อื่นๆต่อไป

มีการศึกษาสภาวะการทำงานของสมองของผู้ใช้แอมเฟตามีนด้วยเทคนิค Brain imaging เช่น PET (Positron emission tomography) และพบว่าในสมองของผู้ใช้แอมเฟตามีนมีการทำงานของระบบ Dopamine ลดลง (Iyo 1992) และเมื่อศึกษายืนยันในสมองของผู้เสียชีวิตที่เคยใช้แอมเฟตามีนก็ให้ผลที่สอดคล้องกัน จึงได้มีการทดลองศึกษาเพิ่มเติมมากขึ้น โดยใช้สัตว์ทดลองซึ่งก็ให้ผลที่สอดคล้องกันคือเมื่อให้ Methamphetamine แบบ acute toxic dose (4X5mg/kg) พบว่าสมองของสัตว์ทดลองมีการเสื่อมสลายของปลายประสาท (nerve terminal) ชนิด Dopamine และ Serotonin (Iyo et al 1993, Cubells et al 1994, Albers et al 1995) และได้มีการศึกษายืนยันถึงผลเสียของแอมเฟตามีนที่มีต่อระบบประสาทโดยทำการศึกษาความเป็นพิษของแอมเฟตามีนที่มีต่อเซลล์ประสาทเฉพาะเลี้ยงที่ได้จาก cortical neurons ของหนูพบว่าแอมเฟตามีนที่ความเข้มข้น 500 uM และโคเคน (cocaine) ที่ความเข้มข้น 1 mM นาน 24 ชั่วโมงมีผลทำให้มีการตายของเซลล์ประสาทประมาณ 50% และพบว่าทั้งแอมเฟตามีนและโคเคนมีผลทำให้เกิดการเสียชีวิตของไมโทคอนเดรียส่งผลต่อเนื่องให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำให้มีการย่อยสลาย DNA (Cunha-Oliveira et al 2006) และส่งผลให้มีการเสียสภาวะสมดุลของเซลล์ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด

ขบวนการที่แอมเฟตามีนทำให้เกิดการเสียชีวิตของไมโทคอนเดรียนั้นน่าจะมาจากการที่แอมเฟตามีนซึ่งมีคุณสมบัติเป็น cationic lipophilic molecule จะ diffuse ผ่านเข้าไปสะสมอยู่ภายในไมโทคอนเดรีย การสะสมของโมเลกุลที่มีประจุบวกมากมายใน cristae ของไมโทคอนเดรีย จะทำให้มีการสูญเสียของ electrochemical gradient ที่ได้มาจากขบวนการ electron transport chain (ETC) เนื่องจาก electrochemical gradient มีความสำคัญต่อการทำงานของเอนไซม์ adenosine triphosphate (ATP) synthase และการคงสภาพของ mitochondrial membrane ดังนั้นผลเสียที่ตามมาจากความผิดปกติของการทำงานของทั้งสองส่วนของไมโทคอนเดรียสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเสื่อมสลายของเซลล์ได้ (Davidson C et al 2001) เนื่องจากไมโทคอนเดรียเป็นแหล่งที่สำคัญของเซลล์ที่มีการสร้างพลังงานให้กับเซลล์ในรูป ATP (adenosine triphosphate) ในสภาวะปกติ

เอนไซม์ calcium ATPase ในไมโทคอนเดรียจะช่วยในการดึง calcium เข้ามาเก็บสะสมไว้ภายในไมโทคอนเดรียเมื่อมีการสูญเสียของ electrochemical gradient ร่วมกับการเสื่อมสภาพของ mitochondrial membrane ก็จะทำให้มีการรั่วไหลของ calcium และ cytochrome c จากภายในไมโทคอนเดรียผ่าน permeability transition pore (PTP) ออกมาสู่ภายนอกไมโทคอนเดรีย การเพิ่มมากขึ้นของปริมาณ calcium และ cytochrome c ใน cytoplasm จะไปกระตุ้นการทำงานของ caspase-dependent cell death signaling โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ caspase-3 ที่สามารถเหนี่ยวนำให้มีการย่อยสลาย DNA (Cunha-Oliveira et al 2006) ทำให้เกิดความผิดปกติในการสร้างโปรตีนที่สำคัญที่ต้องใช้ในการทำงานของเซลล์และผลสุดท้ายก็จะเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ และผลเสียที่ตามมาอีกอันหนึ่งเมื่อมีการสูญเสียของเอนไซม์ ATP-synthase ร่วมกับการเสื่อมสภาพของ mitochondrial membrane ก็คือในขบวนการสร้าง ATP โดยขบวนการหายใจของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial respiration) จะมีการส่งผ่านอิเล็กตรอน (electron transport chain) ผ่านไปตามกลุ่มของโปรตีน 4 กลุ่ม (protein complex I, II, III และ IV) ที่อยู่บนผนังเซลล์ชั้นในของไมโทคอนเดรียซึ่งจะมีผลพลอยได้คือ oxidizing agents ทั้งในรูป (form) free radicals (อนุมูลอิสระ) เช่น superoxide anion ($O_2^{\cdot -}$) และ non-radicals เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2) ที่มักเรียกรวมกันในกลุ่มนี้รวมกันว่า reactive oxygen species หรือ ROS เมื่อมีการเสื่อมสภาพของ mitochondrial membrane ก็อาจจะมี การรั่วซึม (leakage) ของสารเหล่านี้ออกมาจากไมโทคอนเดรียมากกว่าปกติโดยทั่วไป superoxide สองโมเลกุลจะถูกกำจัดโดยเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ได้เป็น H_2O_2 หลังจากนั้น H_2O_2 จะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ catalase (CAT) และ glutathion peroxidase (GSH-Px) ไปเป็นน้ำ (H_2O) และ diatomic oxygen ในสภาวะปกติจะมีสมดุลระหว่างการสร้างและทำลายของ H_2O_2 แต่เมื่อใดก็ตามที่สภาวะสมดุลของเซลล์เสียไปเช่นมีการสร้างหรือรั่วไหลออกมาจากไมโทคอนเดรียมากขึ้น หรือมีการกำจัดลดลงก็จะทำให้เกิดการสะสมของ H_2O_2 และโดยขบวนการ reduction ซึ่งจะเกิดปฏิกิริยารวมตัวกันระหว่าง H_2O_2 กับ Ferrous iron (Fe^{2+}) ได้เป็น hydroxyl radical ($OH^{\cdot}$) ซึ่งจะมีความเป็นพิษสูงกว่า H_2O_2 และมีผลในการทำลายไขมันและ DNA โดยเฉพาะไขมันที่เป็น ส่วนประกอบของผนังเซลล์ที่อยู่ในรูปฟอสโฟลิปิด (phospholipid) เกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation ส่วนการทำลาย DNA นั้นก็จะทำลายทั้ง DNA ของไมโทคอนเดรีย (mitochondrial DNA, mtDNA) และ DNA ในนิวเคลียส (nuclear DNA, nDNA) (Robb-Gaspers and Connor 1997, Cassarino and Bennett Jr. 1999a, Kannan and jain 2000) การที่โมเลกุลที่สำคัญต่างๆภายในเซลล์ถูกทำลายเรามักเรียกว่าเซลล์ตกอยู่ในสภาวะ “Oxidative stress” (Kannan and Jain 2000) โดยผลของ oxidative stress จะก่อให้เกิดการสูญเสียพลังงานของเซลล์ที่อยู่ในรูป ATP มีการลดลงของระดับ NADH (reduced form ของ nicotinamide adenine dinucleotide, NAD^+) และมีการสูญเสียภาวะสมดุลของแคลเซียม (calcium, Ca^{2+}) และทำให้เกิดการตายของเซลล์ในที่สุด

เนื่องจากการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทนั้นขบวนการหนึ่งที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ก็คือขบวนการที่โมเลกุลที่สำคัญในการทำงานของเซลล์เช่น โปรตีนหรือ DNA ถูกย่อยสลายด้วย เอนไซม์ protease โดยเฉพาะเอนไซม์ protease class ในกลุ่ม cysteine protease สองชนิดคือ caspase และ calpain โดยเฉพาะอย่างยิ่งเอนไซม์ calpain ที่การทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ในสภาวะปกติจะถูกควบคุมด้วย endogenous protein inhibitor ที่ชื่อ calpastatin นอกจากนี้ยังมีปัจจัยอื่นที่สำคัญที่สามารถเปลี่ยนแปลงสภาวะการทำงานของเอนไซม์ชนิดนี้ได้คือปริมาณ calcium ภายในเซลล์ (Wang 2000) พบว่าในสภาวะที่ภายในเซลล์มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ calcium อย่างมากเช่นการที่เซลล์ประสาทได้รับสารสื่อประสาท glutamate ในปริมาณมากหรือการที่เซลล์ได้รับสารพิษ marine toxin (Nath et al 1996) ซึ่งเป็นสารพิษที่กระตุ้นการเปิดของ voltage และ ligand-gated channels ก็จะสามารถที่จะกระตุ้นและเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ calpain ได้ เนื่องจาก substrate ที่สำคัญของเอนไซม์ calpain ก็คือ cytoskeletal proteins, plasma-membrane-associated proteins, transcription factors, calmodulin dependent proteins และ signal transduction proteins ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการตายหรือการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในหลายกรณีมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของการทำงานของเอนไซม์ calpain (Wang et al 1989, Yuen and Wang 1998, Carafoli and Molinari 1998) ข้อมูลจากการศึกษาวิจัยหลายอันบ่งชี้ว่าการเพิ่มปริมาณหรือประสิทธิภาพการทำงานของ endogenous calpain inhibitor ที่เรียกว่า calpastatin สามารถป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์จากสภาวะ oxidative stress ได้เช่นการ overexpression ของ calpastatin ในเซลล์เฉพาะเลี้ยงชนิด cerebellar granule neurons สามารถป้องกันการเกิดสภาวะ calcium overload การกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ calpain และการตายของเซลล์ประสาทจาก glutamate-induced excitotoxicity ได้ (Bano et al 2005) ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ก็ได้ผลการทดลองที่สอดคล้องกับข้อมูลข้างต้นคือ exogenous calpastatin สามารถลดอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนชนิด SH-SY5Y จากความเป็นพิษของเมทแอมเฟตามีนได้รวมทั้งยังสามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นของปริมาณ c-Jun phosphorylation ซึ่งเป็น transcription factors ที่สำคัญของ death signaling cascades และป้องกันการเพิ่มขึ้นของโปรตีน Bax (apoptotic protein) จากการกระตุ้นด้วยเมทแอมเฟตามีนได้อีกด้วย

ผลจากการการศึกษาดังกล่าวได้ชี้ให้เห็นถึงกลไกในระดับโมเลกุลบางส่วนที่น่าจะเกี่ยวข้องในการเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะที่นำมาซึ่งการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดยเมทแอมเฟตามีน ดังนั้นการทำให้เซลล์กลับมาอยู่ในสภาวะสมดุล (Homeostasis) โดยการทำให้ไมโทคอนเดรียกลับมาทำงานได้ตามปกติ ซึ่งจะส่งผลให้มีการลดการกระตุ้นการทำงานของ death signaling ต่างๆ และทำให้ปริมาณของ calpain inhibitor เพิ่มขึ้นสู่ระดับปกติทำให้สามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ calpain ได้ ผลจากการทดลองพบว่าฮอร์โมนเมลาโทนินมีคุณสมบัติในการยับยั้งความเป็นพิษของเมทแอมเฟตามีนที่มีต่อเซลล์ประสาท SH-SY5Y ได้โดยเมลาโทนินสามารถลดการเพิ่มขึ้นของอัตราการเสื่อมสลายของเซลล์ที่ได้รับเมทแอมเฟตามีน มีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ

โปรตีน calpastatin ทำให้ไมโทคอนเดรียมีทำงานอย่างเป็นปกติและการทำงานโดยทั่วไปของเซลล์กลับคืนสู่ภาวะใกล้เคียงกับภาวะปกติ ซึ่งดูได้จากมีการทำงานของเอนไซม์ tyrosine hydroxylase ที่ใกล้เคียงกับเซลล์ปกติ

ฮอร์โมนเมลาโทนิน (Melatonin) สร้างมาจากต่อมไพเนียล (Pineal gland) ที่อยู่ในสมอง ปัจจุบันมีข้อบ่งชี้จากการศึกษาพบว่าเมลาโทนินมีคุณสมบัติในการป้องกันการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาท (Reiter et al 2002, Reiter et al 2003, Tan et al 2003, Chetsawang et al 2006, Chetsawang et al 2007) มีการศึกษาในหลอดทดลองโดยใส่เมลาโทนินเข้าไปในส่วนผสมของไมโทคอนเดรียที่ได้จากเซลล์สมองและเซลล์ตับของหนู พบว่ามีการสร้าง ATP เพิ่มขึ้น อาจเป็นไปได้ว่าเมลาโทนินช่วยลดภาวะการทำลายเซลล์จากอนุมูลอิสระโดยไปมีผลทำให้ขบวนการสร้างพลังงาน (ในรูป ATP) ของเซลล์จากไมโทคอนเดรียสมบูรณ์มากขึ้นจนมีพลังงานพอเพียงที่จะใช้ในขบวนการซ่อมแซม (repairing process) ของเซลล์ (Martin et al 2002) มีการศึกษาเพื่อยืนยันคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของเมลาโทนินและพบว่าเมลาโทนินช่วยคงสภาพความยืดหยุ่น (fluidity) และลดความแข็งกระด้าง (rigidity) ของผนังเซลล์ได้โดยไปมีผลลดการเกิดปฏิกิริยา peroxidation ของกรดไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ที่เกิดจากพิษของอนุมูลอิสระ เป็นที่ทราบกันดีว่าปอดและสมองเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อการรับรู้ (sensitive) ต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณ O_2 ได้มีการทดลองโดยให้หนูทดลองได้รับ 100% O_2 เป็นเวลา 90 นาที จนเกิดสภาวะ hyperoxia และเหนี่ยวนำให้มีการสร้าง ROS เพิ่มขึ้น (Shaikh et al 1997) พบว่าหนูที่ได้รับเมลาโทนินจะมีปริมาณการถูกทำลายของ PUFA เกิดขึ้นน้อยกว่าหนูที่ไม่ได้รับเมลาโทนิน (Garcia et al 1997, Garcia et al 1998)

การเพิ่มขึ้นของปริมาณ Homocysteine (Hcy) ในร่างกายเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดอาการผิดปกติของหลอดเลือดหัวใจ (Cardiovascular disease) เนื่องจากเกิดการบาดเจ็บของ endothelial cells เกิดขึ้นอันเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของขบวนการ Oxidative damage ได้มีการศึกษา โดยฉีด Hcy เข้าไปใน Ventricle ของสมอง (Intracerebro ventricular, ICV) แล้วทำการศึกษาวิเคราะห์ต่างๆ ของสมองพบว่าสมองบริเวณ Hippocampus, Cortex และ Cerebellar มีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ malondialdehyde ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ว่าเกิด Oxidative damage โดยขบวนการ lipid peroxidation ในสมอง แต่ในสมองของหนูที่ได้รับ melatonin ผ่านเข้าทางช่องท้อง (Intraperitoneal, IP) เป็นเวลานาน 3 วัน ก่อนได้รับ Hcy ในปริมาณสูง กลับพบว่าสมองหนูมีระดับของ malondialdehyde ที่ต่ำ แสดงว่าขบวนการ lipid peroxidation เกิดขึ้นน้อย รวมทั้งพบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับ glutathione และ glutathion activity ซึ่งเป็น antioxidant ในสมองอีกด้วย (Baydas 2003) Kaptanoglun และคณะ (2003) ได้ทดลองศึกษาฤทธิ์ในการเป็นสาร antioxidant ของเมลาโทนินในหลอดทดลอง โดยใช้ชิ้นส่วนของเนื้อสมอง, ไขสันหลัง และเส้นประสาทตา (optic nerve) นำเนื้อเยื่อดังกล่าวมาทำให้อยู่ในสภาพที่เกิด oxidative damage โดยใช้ ferrous ion (Fe^{2+}) และ H_2O_2

พบว่าเกิดขบวนการ lipid peroxidation เพิ่มขึ้น แต่ผลดังกล่าวสามารถยับยั้งได้โดยเมลาโทนิน Beni และคณะ (2003) ก็ได้ศึกษาพบว่าเมลาโทนินสามารถลดการ translocation ของ redox-sensitive transcription factors เช่น NF- κ B หรือ AP-1 ซึ่งเป็น transcription factors ของยีนในกลุ่ม pro-apoptotic proteins (BAD, BID, BAX, etc.) จาก cytoplasm เข้าสู่ nucleus ของเซลล์ประสาทในสมอง และเพิ่มปริมาณของ low molecular weight antioxidants (LMWA) ในสมองของหนูที่เหนี่ยวนำให้เกิด Closed head injury แม้ว่าจากการศึกษาดังกล่าวจะพบว่าเมลาโทนินสามารถลดการเกิด Oxidative damage ได้ในเซลล์ประสาทแต่ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าผ่านมาทางขบวนการใด มีข้อมูลแสดงให้เห็นว่าผลการลด Oxidative damage โดยเมลาโทนินอาจจะเข้าไปเกี่ยวข้องกับขบวนการส่งผ่านอิเล็กตรอนในไมโทคอนเดรีย ได้มีการศึกษาพบว่า 6-OHDA ซึ่งเป็น neurotoxin (Woodgate et al 1999) ที่มีผลโดยตรงในการยับยั้งการส่งผ่านอิเล็กตรอนที่โปรตีน Complex I ของไมโทคอนเดรีย (Park et al 2002) มีผลทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทเนื่องจากการเพิ่มขึ้นของ Oxidative stress นั้นสามารถที่จะป้องกันได้โดยเมลาโทนิน (Mayo et al 1998)

ได้มีการศึกษาผลของเมลาโทนินที่มีต่อการทำงานของ transcription factor และการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตายหรือการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทในเซลล์ประสาทโดปามีนพบว่าเมลาโทนินสามารถยับยั้งการเสื่อมสลายของเซลล์ประสาทโดปามีนที่เกิดจาก hydrogen peroxide ได้ โดยเมลาโทนินสามารถที่จะลดการเพิ่มขึ้นของการ phosphorylation ของ transcription factor อันหนึ่งคือ nuclear factor kappa B (NF- κ B) และยังสามารถยับยั้งการ translocation ของ phosphoNF- κ B ผ่านเข้าไปในนิวเคลียสของเซลล์ได้ด้วย นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาพบว่าเมลาโทนินมีผลในการลดการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของ Bax/Bcl-2 โดย hydrogen peroxide ได้อีกด้วย (Chetsawang et al 2006)

เอกสารอ้างอิง

- Albers DS, Sonasalla PK. Methamphetamine-induced hyperthermia and dopaminergic neurotoxicity in mice: pharmacological profile of protective and nonprotective agents. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1995; 275: 1104-1114.
- Antolin I, Mayo JC, Sainz RM, et al. Protective effect of melatonin in a chronic experimental model of parkinson's disease. *Brain Res.* 2002; 943: 163-173.
- Bano D, Young K, Guerin C et al., Cleavage of the plasma membrane Na⁺/Ca²⁺ exchanger in excitotoxicity, *Cell* 2005; 120:275-285.
- Baydas G, Kutlu S, Naziroglu M, et al. Inhibitory effects of melatonin on neural lipid peroxidation induced by intracerebroventricularly administered homocysteine. *J. Pineal Res.* 2003; 34: 36-39.

- Beni SM, Kohen R, Reiter RJ, et al. Melatonin-induced neuroprotection after closed head injury is associated with increased brain antioxidants and attenuated late-phase activation of NF- κ B and AP-1. *FASEB J.* 2003; 3: express article 10.1096/fj.03-0323fje.
- Berg D, Riess O, Bornemann A. Specification of 14-3-3 proteins in Lewy bodies. *Am. Neurol. Assoc.* 2003; 10621: 135.
- Cadet JL, Jayanthi S, Deng X. Methamphetamine-induced neuronal apoptosis involves the activation of multiple death pathway. *Neurotox. Res.* 2005; 8: 199-206.
- Cassarino DS, Bennett Jr. JP. An evaluation of the role of mitochondria in neurodegenerative disease: mitochondrial mutations and oxidative pathology, protective nuclear response, and cell death in neurodegeneration. *Brain Res. Rev.* 1999; 29: 1-25.
- Chetsawang B, Putthaprasart C, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Melatonin protects against hydrogen peroxide-induced cell death signaling in SH-SY5Y cultured cells: involvement of nuclear factor kappa B, Bax and Bcl-2. *J. Pineal Res.* 2006; 41: 116-123.
- Chetsawang J, Govitrapong P, Chetsawang B. Melatonin inhibits MPP⁺-induced caspase-mediated death pathway and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cultured cells. *J. Pineal Res.* 2007; 43: 115-120.
- Choi WS, Yoon SY, Oh TH, et al. Two distinct mechanisms are involved in 6-hydroxydopamine- and MPP⁺-induced dopaminergic neuronal cell death: role of caspase, ROS and JNK. *J. Neurosci. Res.* 1999; 57: 86-94.
- Clerk A, Sugden PH. Ras: The stress and the strain. *J. Mol. Cell Cardiol.* 2006; 41: 595-600.
- Cubells JF, Rayport S, Rajendran G, et al. Methamphetamine neurotoxicity involves vacuolation of endocytic organelles and dopamine-dependent intracellular oxidative stress. *J. Neurosci.* 1994; 14: 2260.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Cardoso SM, Borges F, Swerdlow RH, Macedo T, Oliveira CR. Mitochondrial dysfunction and caspase activation in rat cortical neurons treated with cocaine or amphetamine. *Brain Res.* 2006; 1089: 44-54.
- Cunha-Oliveira T, Rego AC, Garrido J, Borges F, Macedo T, Oliveira CR. Street heroin induces mitochondrial dysfunction and apoptosis in rat cortical neurons. *J. Neurochem.* 2007; 101: 543-554.
- Davidson C, Gow AJ, Lee TH, et al. Metamphetamine neurotoxicity: necrotic and apoptotic mechanisms and relevance to human abuse and treatment. *Brain Res. Rev.* 2001; 36: 1-22.

- Dev KK, Hofele K, Barbieri S, et al. Part II: alphasynuclein and its molecular pathophysiological role in neurodegenerative disease. *Neuropharmacology*. 2003;45: 14-44.
- Evans DA, Funkenstein HH, Albert MS, et al. Prevalence of Alzheimer's disease in a community population of older persons. Higher than previously reported. *JAMA* 1989; 262: 2551-2556.
- Ganguly S, Weller JL, Ho A, Chemineau P, Malpoux B, David K. Melatonin synthesis: 14-3-3-dependent activation and inhibition of arylalkylamine N-acetyltransferase mediated by phosphoserine-205. *PNAS* 2005; 102: 1222-1227.
- Garcia JJ, Reiter RJ, Guerrero JM, et al. Melatonin prevents changes in microsomal membrane fluidity during lipid peroxidation. *FEBS Lett.* 1997; 408: 297-300.
- Garcia JJ, Reiter RJ, Ortiz GG, et al. Melatonin enhances tamoxifen's ability to prevent the reduction in microsomal membrane fluidity induced by lipid peroxidation. *J. Membr. Biol.* 1998; 162: 56-65.
- Grima G, Benz B, Parpura V, Cuenod M, Do KQ. Dopamine-induced oxidative stress in neurons with glutathione deficit: implication for schizophrenia. *Schizophr. Res.* 2003; 62: 213-224.
- Higgins CMJ, Jung C, Ding H, Xu Zuoshang. Mutant Cu, Zn superoxide dismutase that causes motorneuron degeneration is present in mitochondria in the CNS. *J. Neurosci.* 2002; 22: 1-6.
- Huang Y, Erdmann N, Zhao J, Zheng J. The signaling and apoptotic effects of TNF-related apoptosis-inducing ligand in HIV-1 associated dementia. *Neurotox. Res.* 2005; 8: 135-148.
- Iyo M. PET dopamine D2 receptors and susceptibility to methamphetamine psychosis. *Clin. Neuropharmacol.* 1992; 15 Suppl. 1: 652A-653A.
- Iyo M, Nishio M, Itoh T, et al. Dopamine D2 and serotonin S2 receptors in susceptibility to methamphetamine psychosis detected by positron emission tomography. *Psychiatry Res.* 1993; 50: 217-231.
- Kannan K, Jain SK. Oxidative stress and apoptosis. *Pathophys.* 2000; 7: 153-163.
- Kaptanoglu E, Palaoglu S, Demirpence E, et al. Different responsiveness of central nervous system tissues to oxidative conditions and to the antioxidant effect of melatonin. *J. Pineal Res.* 2003; 34: 32-35.
- Kawamoto Y, Akiguchi I, Nakamura S, et al. 14-3-3 proteins in Lewy bodies in Parkinson disease and diffuse lewy body disease brains. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2002; 61: 245-253.

- Kleppe R, Toska K, Haavik J. interaction of phosphorylated tyrosine hydroxylase with 14-3-3 proteins: evidence for a phosphoserine40-dependent association. *J. Neurochem.* 2001; 77: 1097-1107.
- Kunikowska G, Jenner P. 6-Hydroxydopamine-lesioning of the nigrostriatal pathway in rats alters basal ganglia mRNA for copper, zinc- and manganese-superoxide dismutase, but not glutathione peroxidase. *Brain Res.* 2001; 922: 51-64.
- Langford D, Adame A, Grigorian A, Grant I, McCutchan JA, Ellis RJ, Marcotte TD, Masliah E. Patterns of selective neuronal damage in methamphetamine-user AIDS patients. *J. Acquir. Immune Defic. Syndr.* 2003; 34: 467-474.
- Lansbury PT Jr., Brice A. Genetics of Parkinson's disease and biochemical studies of implicated gene products. *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002; 14: 653-660.
- Lin CL, Wang FS, Kuo YR, et al. Ras modulation of superoxide activates ERK-dependent fibronectin expression in diabetes-induced renal injuries. *Kidney Int.* 2006; 69: 1593-1600.
- Martin M, Macias M, Leon J, Escames G, Khaldy H, Acuna-Castroviejo D. Melatonin increase the activity of the oxidative phosphorylation enzymes and the production of ATP in rat brain and liver mitochondria. *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2002; 34: 348-357.
- Mayo JC, Sainz RM, Uria H, et al. Melatonin prevents apoptosis induced by 6-hydroxydopamine in neuronal cells: implications for parkinson's disease. *J. Pineal Res.* 1998; 24: 179-192.
- Murphy DD, Reuter SM, Trojanowski JQ, Lee VM. Synucleins are developmentally expressed, and alpha-synuclein regulates the size of the presynaptic vesicular pool in primary hippocampal neurons. *J. neurosci.* 2000; 20: 3214-3220.
- Nath R, et al. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1b-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells, contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. *Biochem. J.* 1996; 319: 683-690.
- Nguyen MD, Julien JP, Rivest S. Innate immunity: The missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat. Rev. Neurosci.* 2002; 3: 216-227.
- Park JW, Youn YC, Kwon OS, et al. Protective effect of serotonin on 6-hydroxydopamine- and dopamine-induced oxidative damage of brain mitochondria and synaptosome and PC12 cells. *Neurochem. Int.* 2002; 40: 223-233.
- Perez RG, Waymire JC, Lin E, et al. A role for alpha-synuclein in the regulation of dopamine biosynthesis. *J. Neurosci.* 2002; 22: 3090-3099.

- Reiter RJ, Tan D, Sainz RM, et al. Melatonin: reducing the toxicity and increasing the efficacy of drugs. *JPP*. 2002; 54: 1299-1321.
- Reiter RJ, Sainz RM, Lopez-Burillo S, et al. Melatonin ameliorates neurologic damage and neurophysiologic deficits in experimental model of stroke. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2003; 993: 35-47.
- Rio MJD, Velez-Pardo C. Monoamine neurotoxins-induced apoptosis in lymphocytes by a common oxidative stress mechanism: involvement of hydrogen peroxide (H₂O₂), caspase-3, and nuclear factor kappa-B (NF- κ B), p53, c-Jun transcription factors. *Biochem. Pharmacol.* 2002; 63: 677-688.
- Robb-Gaspers SJ, Connor JR. Oxidative stress-induced cell damage in the CNS. In: Connor JR, ed. *Metals and oxidative damage in neurological disorders*. New York. Plenum Press 1997: 341-351.
- Rosenquist M. 14-3-3 proteins in apoptosis. *Braz. J. Med. Res.* 2003; 36: 403-408.
- Tan DX, Hardeland R, Manchester LC, et al. Mechanistic and comparative studies of melatonin and classic antioxidants in terms of their interactions with the ABTS cation radical. *J. Pineal Res.* 2003; 34: 249-259.
- Tanner CM, Langston JW. Do environmental toxins cause Parkins's disease? A critical review. *Neurology* 1990; 40: 17-30.
- Vaudano E, Rosenblad C, Bjorklund A. Injury induced c-Jun expression and phosphorylation in the dopaminergic nigral neurons of the rats: correlation with neuronal death and modulation by glial-cell-line-derived neurotrophic factor. *Eur. J. Neurosci.* 2001; 13: 1-14.
- Wang KK et al. Calmodulin-binding proteins as calpain substrates. *Biochem. J.* 1989; 262: 693-706.
- Wang KKW. Calpain and caspase: can you tell the difference? *TINS* 2000; 23: 20-26.
- Weinreb O, Mandel S, Youdim MBH. CDNA gene expression profile homology of antioxidants and their antiapoptotic and proapoptotic activities in human neuroblastoma cells. *FASEB J.* 2003; 17: 935-937.
- Woodgate A, MacGibbon G, Walton M, et al. The toxicity of 6-hydroxydopamine on PC12 and PC19 cells. *Mol. Brain Res.* 1999; 69: 84-92.
- Xia XG, Harding T, Weller M, et al. Gene transfer of the JNK interacting protein-1 protects dopaminergic neurons in the MPTP model of Parkinson's disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001; 98: 10433-10438.

- Xu J, Kao SY, Lee FJS, et al. Dopamine-dependent neurotoxicity of α -synuclein: A mechanism for selective neurodegeneration in parkinson disease. *Nature Med.* 2002; 8: 600-606.
- Yuen PW, Wang KKW. Calpain inhibitors, novel neuroprotectants and potential anticataractic agents. *Drugs Future* 1998; 23: 741-749.
- Zharkovsky T, Kaasik A, Jaako K, et al. Neurodegeneration and production of the new cells in the dentate gyeus of juvenile rat hippocampus after a single administration of ethanol. *Brain Res.* 2003; 978: 115-123.
- Zhu JPQ, Xu W, Angulo JA. Methamphetamine-induced cell death: Selective vulnerability in neuronal subpopulations of the striatum in mice. *Neurosci.* 2006; 140: 607-622.

ผลงานและประโยชน์ที่ได้รับจากโครงการวิจัย

1. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการนานาชาติ
 - 1.1 **Chetsawang B**, Kooncumchoo P, Govitrapong P, Ebadi M. 1-methyl-4-phenyl-pyridinium ion-induced oxidative stress, c-Jun phosphorylation and DNA fragmentation factor-45 cleavage in SK-N-SH cells are averted by selegiline. *Neurochem Int.* 2008; 53: 283-288. (impact factor = 3.541)
 - 1.2 Wisessmith W, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, **Chetsawang B**. Melatonin reduces induction of Bax, caspase and cell death in methamphetamine-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J. Pineal Res.* 2009; 46:433-440. (impact factor = 5.209)
 - 1.3 Suwanjang W, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P, **Chetsawang B**. The protective effect of melatonin on methamphetamine-induced calpain-dependent death pathway in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *J. Pineal Res.* 2010; 48:94-101. (impact factor = 5.209)
 - 1.4 Chetsawang J, Govitrapong P, **Chetsawang B**. Hydrogen peroxide toxicity induces Ras signaling in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells. *J. Biomed. Biotech.* 2010, doi10.1155/2010/803815. (impact factor = 1.750)
 - 1.5 Chetsawang J, Suwanjang W, Pirompul N, Govitrapong P, **Chetsawang B**. Calpastatin reduces methamphetamine-induced induction in c-Jun N-terminal kinase cascades, Bax and cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurosci. Lett.* (Revision).
 - 1.6 กำลังจัดทำต้นฉบับ (Manuscript) ของผลงานวิจัยเรื่อง “Calpasatain reduces methamphetamine-induced toxicity with calpain and caspase activation in human

neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells” ซึ่งคาดว่าจะตีพิมพ์ในวารสาร Neurotoxicity Research หรือ Neuroscience Letters

2. การนำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์เชิงวิชาการ

2.1 ผลิตภัณฑ์ปริญญาโทสาขาประสาทวิทยาศาสตร์ 2 คน

2.1.1 นางสาววิไลวรรณ วิเศษสมิต

2.1.2 นางสาววิลาสิณี สุวรรณจำง

3. การเสนอผลงานในที่ประชุมวิชาการ

3.1 เสนอผลงานแบบบรรยายโดยนักศึกษาปริญญาโทสาขาประสาทวิทยาศาสตร์ (นานาชาติ) เรื่อง “Melatonin attenuates methamphetamine-induced calpain-dependent death pathway in SH-SY5Y cells” ในการประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์แห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32 วันที่ 29 เมษายน-1 พฤษภาคม 2552

3.2 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์โดยนักศึกษาปริญญาโทสาขาประสาทวิทยาศาสตร์ (นานาชาติ) เรื่อง “Melatonin reduces induction of Bax, caspase and cell death in methamphetamine-treated human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells” ในการประชุม The 32nd Annual Meeting of the Japan Neuroscience Society (Neuroscience 2009), Nagoya, Japan, September 16-18, 2009.

3.3 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “Contribution of Ras signaling in hydrogen peroxide-induced toxicity in human neuroblastoma SH-SY5Y cultured cells” ในการประชุม The 22nd Biennial Meeting of the ISN/APS N 2009, Busan, Korea, August 23-28, 2009.

3.4 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “Calpastatin reduces methamphetamine-induced induction in c-Jun Phosphorylation, Bax and Cell death in neuroblastoma SH-SY5Y cells” ในการประชุม The 23rd Biennial Meeting of the ISN/ESN 2011, Athens, Greece, August 28-September1, 2011.

3.5 เสนอผลงานแบบโปสเตอร์เรื่อง “Calpastatin attenuates calpain and caspase activation in methamphetamine-induced degeneration in human neuroblastoma SH-SY5Y cells” ในการประชุม The 23rd Biennial Meeting of the ISN/ESN 2011, Athens, Greece, August 28-September1, 2011.