

ชื่อวิทยานิพนธ์ ผลของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์เป็นสารกระตุ้นต่อดีเอ็นเอใน
จอประสาทตาของไก่

ชื่อผู้ทำวิทยานิพนธ์ นางสาวอุมพร วิบูลย์อุทัย

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

 ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.จินตนา สัตยาภัย)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.นิสันต์ สัตยาภัย)

 กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.กมลทิพย์ บราน)

บทคัดย่อ

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้น (excitatory amino acids, EAAs) ได้แก่ glutamic acid (GLU), kainic acid (KA) และ N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) รวมทั้ง H_2O_2 ที่มีต่อ DNA ของจอประสาทตาไก่ โดยกระทำทั้งใน *in vitro* และ *in vivo*

การทดลอง *in vitro* ทำโดยใช้ eye cup preparations จากลูกตาไก่ และ incubate ใน choline-Kreb's solution โดยมีกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้น ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน หรือ H_2O_2 เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแยกจอประสาทมาสกัด DNA ด้วยวิธี phenol-chloroform และตรวจสอบลักษณะ DNA ของจอประสาทตา ด้วย 1% agarose gel electrophoresis ผลการทดลองพบว่า มีการสลายของ DNA ของจอประสาทตาที่สัมผัสกับ GLU ทุกความเข้มข้นที่ทำการทดลอง (0.1, 1 หรือ 10 mM) โดยพบลักษณะ smear band ของ DNA การสลายของ DNA ดังกล่าวจะเพิ่มมากขึ้น เมื่อความเข้มข้น

ของ GLU สูงขึ้น ทั้งนี้โซเดียมไอออนไม่มีผลเปลี่ยนแปลงลักษณะการสลายของ DNA ที่เกิดจาก GLU ในการศึกษาเปรียบเทียบผลของกรดอะมิโนที่มีฤทธิ์กระตุ้นระหว่าง GLU, KA และ NMDA พบว่า GLU ที่ความเข้มข้น 1 mM ก่อเกิดการสลายของ DNA ชัดเจนกว่า KA ความเข้มข้น 0.1 mM หรือ NMDA ความเข้มข้น 0.1 mM จากการทดลองครั้งนี้ H_2O_2 สามารถทำให้เกิดการสลายของ DNA ของจอประสาทตาไก่ได้เช่นกัน โดยพบว่า ที่ความเข้มข้น 3 mM สามารถทำให้เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band

การศึกษากฎวิธีในการป้องกันการสลายของ DNA พบว่า folic acid ความเข้มข้น 10 mM สามารถป้องกันการสลายของ DNA ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย 3 mM H_2O_2 ได้ แต่ไม่สามารถป้องกันการสลายของ DNA ที่เกิดจาก GLU ความเข้มข้น 10 mM ในขณะที่ $ZnSO_4$ ความเข้มข้น 0.1 mM สามารถป้องกันการสลายของ DNA จากทั้ง 3 mM H_2O_2 หรือ 10 mM GLU ได้อย่างสมบูรณ์

การศึกษา *in vivo* ทำโดยการฉีด GLU ในขนาด 10 μ moles/eye หรือ H_2O_2 ในขนาด 3 μ moles/eye เข้าสู่วุ้นตา (intravitreal injection) เมื่อตรวจสอบลักษณะของ DNA หลังจากฉีด 30 นาที พบว่า เกิดการสลายของ DNA ในลักษณะ smear band เช่นเดียวกับผลที่พบใน *in vitro* ขณะที่ $ZnSO_4$ ในขนาด 0.1 μ moles/eye สามารถป้องกันการสลายของ DNA ที่เกิดจากการฉีด H_2O_2 ในขนาด 3 μ moles/eye หรือ GLU ในขนาด 10 μ moles/eye ได้อย่างสมบูรณ์ ส่วน folic acid ในขนาด 10 μ moles/eye ไม่สามารถป้องกันการสลายของ DNA ที่เกิดจากการฉีด H_2O_2 ในขนาด 3 μ moles/eye ได้

THESIS TITLE : EFFECT OF EAAs ON RETINAL DNA IN CHICKEN

AUTHOR : MISS UMAPORN WIBULOUTAI

THESIS ADVISORY COMMITTEE :

 Chairman

(Associate Professor Dr. Jintana Sattayasai)

 Member

(Associate Professor Dr. Nison Sattayasai)

 Member

(Associate Professor Dr. Kamoltip Brown)

ABSTRACT

The damaging effects of certain excitatory amino acids (EAAs) namely glutamic acid (GLU), kainic acid (KA) and N-methyl-D-aspartic acid (NMDA) and H_2O_2 on chick retinal DNA were investigated by using both *in vitro* and *in vivo* experiments and the effect of Na^+ on EAAs- induced neuronal cell death was also examined.

In *in vitro* study, eye cup preparations were used by incubating in medium containing either EAAs, at various concentrations, or H_2O_2 for 30 minutes. Retinas were then isolated from eye cups and retinal DNA was extracted by using phenol-chloroform method. Retinal DNA patterns were investigated using 1% agarose gel electrophoresis. Damaging effects of GLU on retinal DNA, appeared as smear band, were observed with all concentrations tested (0.1, 1 or 10 mM), in a dose - dependent manner. The effects of GLU on retinal DNA seemed to be not depend on Na^+ , since

the smear band of DNA appeared similarly either in the presence or absence of Na^+ . The DNA damaging effects caused by either GLU, KA or NMDA were compared. Incubation with 1 mM GLU resulted in a higher degree of DNA damage than incubation with either 0.1 mM KA or 0.1 mM NMDA.

Although many studies reported that H_2O_2 produced DNA damage in a ladder fashion, in our study, the smear band of DNA was observed in most retinas which incubated with 3 mM H_2O_2 . The protective effect of folic acid against DNA damaging effect of 3 mM H_2O_2 was observed at concentration 10 mM, however, no effect against 1 mM GLU could be observed. In addition zinc sulfate (ZnSO_4), at concentration 0.1 mM, was found to completely protect retinal DNA from the effects of either 3 mM H_2O_2 or 1 mM GLU.

The *in vivo* experiments were done by injected either toxic substances (GLU or H_2O_2), with or without antagonists (folic acid or ZnSO_4) intravitreally and retinal DNA were examined at 30 minutes after injections. Injection of either 10 $\mu\text{moles/eye}$ GLU or 3 $\mu\text{moles/eye}$ H_2O_2 resulted in the smear band pattern of retinal DNA, as observed in the *in vitro* experiments. In contrast to *in vitro* experiments, folic acid, at concentration 10 $\mu\text{moles/eye}$, had no protective effect against H_2O_2 . Whereas, ZnSO_4 (0.1 $\mu\text{moles/eye}$) completely protected the retinal DNA from the effect of either GLU or H_2O_2 , consistent with results observed in the *in vitro* experiments.