ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ของเมลาโทนินต่อการสร้างเซลล์ประสาทสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวที่เจริญเต็มที่ในหลอดทดลอง

ผู้เขียน นายธีระ จันทร์มณี

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ผศ.ดร. ชัยณรงค์ โตจรัส	อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
รศ.ดร. อำนาจ มีเวที	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. กนกกาญจน์ บำรุงกิจ	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
ผศ.ดร. รณิดา ควิกกิ้นส์	อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

เมลาโทนินเป็น neurohormone ที่หลั่งจากต่อมไพเนียล มีบทบาทสำคัญต่อระบบประสาทส่วนกลาง ทำหน้าที่เป็น neuroprotectant ป้องกันภาวะ oxidative stress ปัจจุบันพบว่าเมลาโทนินยังสามารถกระตุ้นกระบวนการสร้างเซลล์ประสาทในช่วงที่เป็นเอ็มบริโอ การศึกษาในครั้งนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของเมลาโทนินต่อการพฤติกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดประสาทและเซลล์ตั้งต้นประสาท (neuronal stem/progenitor cell) จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวที่เจริญเติบโตเต็มที่ โดยทดสอบความสามารถของการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท เซลล์ต้นกำเนิดประสาทและเซลล์ตั้งต้นประสาทจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูขาวถูกนำมาเลี้ยงในห้องทดลองโดยวิธี Medium switch method พบว่าเซลล์ดังกล่าวมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเกิดเป็น neurosphere จากการทดสอบโปรตีนในกลุ่มเซลล์โดยวิธี immunofluorescense พบโปรตีน nestin ที่พบเฉพาะในเซลล์ต้นกำเนิดประสาทและเซลล์ตั้งต้นประสาท หลังจากนั้นทำการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ที่ได้เมลาโทนินความเข้มข้น 0.001 nM, 0.1 nM, 10 nM, 1μM และ 100 μM โดยวิธี MTT reduction assay พบว่า กลุ่มเซลล์ที่ได้รับเมลาโทนิน 1μM แสดงค่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เมื่อทดสอบความสามารถการแบ่งตัวของ

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 50 nM, 1μM และ 50 μM โดยวิธี neurosphere forming assay แล้วนับจำนวน neurosphere ที่เกิดขึ้น พบว่ากลุ่มเซลล์ที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 1μM กระตุ้นการสร้างจำนวน neurosphere ได้มากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม หลังจากนั้นทำการทดสอบว่าเมลาโทนินกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนผ่านททาง melatonin receptor โดยใช้ luzindole ซึ่งเป็น melatonin receptor antagonist มาร่วมทดสอบใน neurosphere forming assay ในกลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 1 μM กลุ่มที่ได้รับพบว่ากลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 1 μM ร่วมกับ luzindole ความเข้มข้น 1 μM และกลุ่มที่ได้รับ luzindole ความเข้มข้น 1 μM อย่างเดียว พบว่ากลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 1 μM สามารถกระตุ้นการเกิดจำนวน neurosphere ได้มากที่สุด และผลดังกล่าวถูกยับยั้งเมื่อมีการผสมเมลาโทนินร่วมกับ luzindole ในกลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 1 μM ร่วมกับ luzindole ความเข้มข้น 1 μM เมื่อวัดขนาด แล้วจัดกลุ่มขนาดของ neurosphere ก็พบว่า กลุ่มที่ได้รับพบว่ากลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินความเข้มข้น 1 μM จะมี neurosphere ขนาดใหญ่มากกว่ากลุ่มควบคุม การทดสอบความสามารถในการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาทที่กระตุ้นในสภาพมีอาหารเลี้ยงเซลล์มีการเติม fetal bovine serum พบว่าเมลาโทนินความเข้มข้น 1 μM ทำให้จำนวนเซลล์ที่แสดง Tuj1 โดยวิธี immunofluorescense มีมากกว่ากลุ่มควบคุม ดังนั้นเมลาโทนินมีผลกระตุ้นพฤติกรรมของเซลล์ต้นกำเนิดประสาทและเซลล์ตั้งต้นประสาท ทั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนโดยผ่าน melatonin receptor และกระตุ้นการเจริญเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ประสาท

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Thesis Title Effect of Melatonin on Adult Rat Hippocampal Neurogenesis *In vitro*

Author Mr. Teera Junmanee

Degree Master of Science (Anatomy)

Thesis Advisory Committee

Asst. Prof. Dr. Chainarong Tocharus	Advisor
Assoc. Prof. Dr. Umnat Mevatee	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Ranida Quiggins	Co-advisor
Asst. Prof. Dr. Kanokkan Bumroongkit	Co-advisor

Abstract

Melatonin, the neurohormone secreted from pineal gland plays the important role on central nervous system including neuroprotection and oxidative stress inhibition. Recently, researchers find that it can stimulate embryonic neurogenesis. This study attempted to determine the effect of melatonin on neural stem/progenitor cells (NS/PCs) derived from hippocampus of adult rats. NS/PC proliferation and neuronal differentiation abilities were examined. Adult hippocampal NS/PCs were cultured by medium switch method. Afterward, these cells were divided into neurospheres. Immunofluorescense method result revealed nestin positive cells in the neurosphere. This specific protein find in NS/PCs. Then NS/PCs were tested for effect of different concentration of melatonin (0.001 nM, 0.1 nM, 10 nM, 1μM and 100 μM) on cytotoxicity by MTT reduction assay. The result demonstrated that 1 μM melatonin significantly increased percentage of cell viability when compared with control. Fifty nM, 1μM and 50 μM melatonin concentrations were used for proliferation testing by neurosphere forming assay. Neurosphere numbers were counted directly. The result showed that NS/PC group that received 1 μM melatonin

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

could significantly increase neurosphere numbers (compared with control). In order to determine wether melatonin stimulates NS/PC proliferation via melatonin (MT) receptor. Luzindole (MT receptor antagonist) and melatonin were applied in neurosphere forming assay. Four study groups were divided into NS/PCs exposed to 1 μM melatonin, combinations of 1 μM melatonin and 1 μM luzindole, and 1 μM luzindole. NS/PCs exposed to 1 μM melatonin could significantly increased neurosphere numbers (compared with control) and NS/PCs exposed to the combination of 1 μM melatonin and 1 μM luzindole patially reversed the effect of melatonin in increase numbers of neurosphere. Furthermore 1 μM melatonin increased the size of neurospheres. Neuronal differentiation ability of NS/PCs in differentiation medium (serum medium) maintenance were underwent immunofluorescense method for Tuj1 positive neuron counting. The result showed that 1 μM melatonin significantly increased Tuj1 positive neuron numbers when compared with control. Therefore, melatonin stimulates adult hippocampal NS/PC behavior including NS/PC proliferation via MT receptor and neuronal differentiation.

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved