



รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เมลาโทนินและปัจจัยต่าง ๆ
ที่สามารถลดการชราภาพของสมอง
และโรคสมองเสื่อมและสามารถเพิ่ม
การสร้างเซลล์ประสาทใหม่

ศ.ดร.ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงศ์
มหาวิทยาลัยมหิดล

มีนาคม 2560

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานฉบับสมบูรณ์

โครงการ: เมลาโทนินและปัจจัยต่าง ๆ
ที่สามารถลดการชราภาพของสมอง
และโรคสมองเสื่อมและสามารถเพิ่ม
การสร้างเซลล์ประสาทใหม่

ศ.ดร.ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงศ์

มหาวิทยาลัยมหิดล

มีนาคม 2560

สนับสนุนโดยสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย

รายงานฉบับนี้ยังไม่ใช่ฉบับสมบูรณ์ไม่สามารถนำไปอ้างอิงได้

สารบัญ

หน้า

1. Abstract	1
บทคัดย่อ.....	4
2. Executive Summary	7
3. เนื้อหาผลงานวิจัย	11
4. Output:.....	39
4.1. Book chapter	39
4.2. Full manuscripts (International).....	39
4.2. National Proceedings.....	44
4.3. Abstracts.....	46
5. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะ.....	54
6. รางวัลที่ได้รับระหว่างรับทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย.....	55
7. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ กับต่างประเทศ.....	56
8. กิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้อง.....	58

ภาคผนวก

เอกสารแนบ

1. Abstract

The risk for developing several types of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's, stroke, increases with increasing age. The rising number of elderly people around the world necessitates the understanding of normal aging mechanisms to prevent normal age-induced disabilities and improve age-related brain diseases. Understanding the mechanisms underlying aging-related alterations in brain structure and function has become critical for the identification of new therapeutic targets and the development of multimodal health-care strategies that meet the needs of an aging population. The main objective of this study was to investigate how melatonin, a pineal hormone, and other factors affecting brain aging process related to neurodegeneration and neurogenesis. The study was divided into six subprojects.

Firstly, the anti-oxidative effects of melatonin were confirmed by our studies. Melatonin promoted dopaminergic neuroblastoma cell viability by decreasing ROS and lipid peroxidation, which attenuated methamphetamine (METH)-induced oxidative damage. Melatonin has been shown to inhibit pro-apoptotic proteins and to promote anti-apoptotic proteins. METH also mediates neuronal apoptosis through calpain, which has been implicated in clinical pathologies including Alzheimer's disease and Parkinson disease. Interestingly, our result showed that melatonin downregulated calpain but upregulated calpastatin. Overexpression of calpastatin was found to modulate METH-induced calpain activation and neuronal cell death. In addition, mitochondrial function and morphology, which have been found to be disturbed in pathological conditions, are also restored by melatonin in our study. Furthermore, melatonin also modulated METH-mediated disturbances to mitochondrial dynamics. Melatonin has been shown to modulate a number of inflammatory mediators. Our study demonstrated that melatonin was able to attenuate the generation of nitric oxide. The induction of several pro-inflammatory cytokines was inhibited by melatonin treatment. We demonstrated that melatonin inhibited the activity of nuclear factor kappa B (NF κ B). We also found that melatonin promoted the activity of nuclear factor-erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), a transcription factor of antioxidant enzyme genes. Thus, a negative relationship between NF κ B and Nrf2 has been observed in neurodegenerative diseases that are associated with oxidative stress and neuroinflammation.

Secondly, the free radical theory of aging proposes that the accumulation of oxidized macromolecules can decrease cell function and shorten life-span. These results demonstrated that melatonin reduced a number of beta-galactosidase (SA- β gal)-positive cells, a senescent marker. Melatonin increased the protein levels of SIRT1, Beclin1, and LC3-II, a hallmark protein of autophagy, and reduced the levels of acetylated-Lys310 in the p65 subunit of NF- κ B in SH-SY5Y cells treated with H₂O₂. In the presence of SIRT1 inhibitor, melatonin failed to increase autophagic markers. Our recent data indicated that melatonin enhanced autophagic activity via the SIRT1 signaling pathway. We propose that in modulating autophagy, melatonin may provide a therapeutically beneficial role in the anti-aging processes.

Thirdly, dynamic circadian rhythms contribute to memory formation, and the hormonal and neurochemical changes that follow circadian patterns are frequently deregulated with aging. The present study attempted to examine the daily profiles of several clock genes, Period (Per) 1 and Per2 and brain and muscle ARNT-like protein-1 (Bmal1), as well as the clock-controlled cognition-related gene brain-derived neurotrophic factor (BDNF), in rat hippocampus during development and aging as well as the effect of melatonin on the expression of these genes during aging. In the 24-month-old groups, all studied genes showed significant differences from 2- and 12-month-old rats, with both periods showing loss of rhythmicity and lower expression than in the younger groups. Melatonin administered was able to rescue these changes and to increase the expression of melatonin receptor. This study indicated that melatonin may have restored age-induced resynchronization in the expression of circadian genes in the hippocampus by acting through its receptors. The potential for chronobiological approaches to the treatment and prevention of Alzheimer's disease merits further exploration from a pharmacotherapeutic perspective.

Fourthly, high calorie diets have been associated with the risk of Alzheimer's disease; therefore, it has been proposed that a low calorie diet might afford protection against neurodegenerative diseases. Our study aimed to compare the effects of melatonin and caloric restriction (CR) on the expression of Sirt1, FoxO1, FoxO3a and FoxOs target genes in the aging mouse hippocampus. We found that both caloric restriction and melatonin were able to regulate Sirt1 and FoxOs expression in the hippocampus

of aging mice, possibly via Wisp1. In addition, our data also showed that Npy was required for melatonin, in addition to CR, to mediate the effects on life extension. Our study also aimed to investigate the hyperglycemic condition and to examine the effect of melatonin on adult hippocampal functions. Hyperglycemic rats significantly impaired memory, reduced neurogenesis in the hippocampus, reduced axon terminal markers, reduced dendritic marker and the glutamate receptor. Treatment of melatonin, rats restored the memory impairment, attenuated the reduction of neurogenesis, synaptogenesis and the induction of astrogliosis. Thus, melatonin might be a therapeutic option for treating patients caused by diabetes.

Fifthly, we showed that the proliferation and differentiation of precursor cells from the adult mouse subventricular zone (SVZ) and the rat sub-granular zone can be modulated by melatonin via the MT1 melatonin receptor. We found that significant increase in proliferation was observed when two growth factors (EGF+bFGF) and melatonin were used simultaneously compared with EGF + bFGF or compared with melatonin alone. In addition, we found that melatonin minimized the inhibitory effects of dexamethasone, a stress hormone, on adult hippocampal progenitor cell proliferation. Melatonin is beneficial for preventing the reduction of hippocampal progenitor cell proliferation that may lead to impairment of learning and memory resulting from stress exposure. Moreover, we found that METH induced a reduction in the proliferation of cultured adult rat hippocampal progenitor cells, increases in the protein expression of p53, p21, GFAP, decreases in the expression of the neuronal phenotype markers and the post-synaptic proteins. All of these alterations were attenuated by pretreatment with melatonin. The discovery of the mechanism by which melatonin modulates neural precursor cell proliferation and differentiation may be used to improve innovative strategies for the therapeutics of neurodegenerative diseases.

Sixthly, the Alzheimer-related amyloid β -peptide ($A\beta$) triggers oxidative stress through hydroxyl-radical-induced cell death, suggests that melatonin could reduce Alzheimer's pathology. In the present study, we found that melatonin was able to inhibit BACE1 and PS1 and to activate ADAM10 mRNA level and protein expression. We further investigated the molecular mechanisms underlying this regulation under pathological conditions by using a model of $A\beta$ 42 treated SH-SY5Y cell cultures which mimic Alzheimer's disease (AD) neurotoxicity. Our data suggested that melatonin attenuated $A\beta$ 42 induced up regulation of BACE1 and PS1 possibly via Pin1/NF- κ B/GSK3 β pathway. Deregulated glucose metabolism is a risk factor for developing Alzheimer's disease. Our results showed that melatonin significantly ameliorated the spatial learning and memory impairment in hyperglycemic rats. Hyperglycemic rats increased enzyme (BACE1), presenilin 1 and C99) in hippocampus and these were reversed by melatonin. Chronic METH administration is associated with neurodegeneration leading to impairments in episodic memory, executive function, and motor function. Our study revealed that rats received METH showed impairment of learning and memory, increased the levels of BACE1 and PSEN1 proteins while decreased level of ADAM10, and melatonin was able to reverse all these effects. Furthermore, we also showed that the long-term administration of melatonin, improved learning and memory and attenuated the reduction of α -secretase and inhibited the increase of β - and γ -secretases in aged mice. These results suggested that melatonin protected against $A\beta$ peptide production in aged mice. Hence, melatonin loss in aging could be recompensed through dietary supplementation as a beneficial therapeutic strategy for AD prevention and progression. In addition, we also studied in AD patients, and found that PSEN1, BACE1 gene expressions significantly increased while ADAM10 decreased in AD patients. Thus, gene expression of amyloidogenic related enzymes and the alteration of $A\beta$ levels and its ratio in peripheral blood may further use as a biomarker for diagnosis of Alzheimer's disease. Altogether our findings suggest that melatonin may be a potential therapeutic agent for reducing the risk and attenuating the progression of AD in humans.

Therefore, therapeutic development in this particular area should emphasize on addressing the underlying cause, drug safety, efficacy, cost effectiveness and since the brain cells are rarely replaced in such disorders, priority should be given to interventions which along with preventing the degeneration of neurons also have the ability to stimulate neurogenesis with least toxic effects. Melatonin the pineal neurohormone is one such therapeutic agent which not only has proved to halt or reverse the progression of most neurodegenerative diseases but its physiology (synthesis, secretion and endogenous levels) provides information about the development and progression of the disease which aids in identifying successful drug targets thus offering assurance in breakthrough treatment strategies.

Key words: melatonin, neurogenesis, neural stem cell, neurodegeneration, amphetamime, stress, neuroprotective, hippocampus, oxidative stress, autophagy, apoptosis, Alzheimer, Parkinson

บทคัดย่อ

จากการสำรวจขององค์การอนามัยโลกรายงานว่า ผู้สูงอายุเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ 30% ของผู้สูงอายุจะเป็นโรคสมองเสื่อม และ 10% ของโรคสมองเสื่อมจะเป็นโรคสมองเสื่อมแบบอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease; AD) ดังนั้นการศึกษาเพื่อเข้าใจกระบวนการของความชราภาพโดยเฉพาะทางสมอง จึงเป็นเรื่องที่ต้องทำการอย่างเร่งด่วน การศึกษาวิเคราะห์ที่เป็นปัจจัยบวก (เมลาโท닌ซึ่งเป็นฮอร์โมนสร้างจากต่อมไพเนียล) และปัจจัยลบ (เช่น การเสพติดยาเสพติด ความเครียด การได้รับอาหารไขมันสูง) ต่อการพัฒนาของสมองและการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ ผลงานวิจัยแบ่งเป็นโครงการย่อย 6 โครงการ ดังนี้ คือ

1. ทฤษฎี "The free radical theory of aging" กล่าวว่า การที่มีการสะสมของ oxidized macromolecule ภายในเซลล์จะทำให้การทำงานของเซลล์ทำให้เซลล์มีอายุสั้นลง ปัจจัยที่ก่อให้เกิดสมองเสื่อม เกิดอนุมูลอิสระ เช่น สารเสพติด methamphetamine (METH) คณะวิจัย ได้ศึกษาพบว่า METH ทำลาย neuron นอกจาก oxidative stress และ Ca^{2+} homeostasis ทำลาย mitochondria ยังทำให้เกิด ER stress นั้น melatonin สามารถยับยั้งการเกิด ER stress จากการได้รับ METH และ METH ยังทำให้เกิด neuroinflammation เร็วๆ นี้ คณะวิจัย พบว่า METH ไปทำลาย blood brain barrier ด้วย ทำลาย tight junction แล้ว melatonin สามารถยับยั้งป้องกันได้ ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจมากกว่าถ้า blood brain barrier ของคนหรือสัตว์ถูกสารพิษอื่นๆ ทำลายไป ซึ่งจะทำอันตรายต่อสมองมาก

2. Autophagy เป็นกลไกหนึ่งที่ได้รับ ความสนใจมาก เกิดขึ้นในเซลล์ในขณะที่เซลล์ขาดแคลนอาหาร หรือขณะที่เซลล์ต่างๆ มีอายุมากขึ้นจะเกิดการสะสมของ damage macromolecule ขบวนการเหล่านี้เกิดใน aging process คณะวิจัย ได้ใช้ H_2O_2 induce ให้ neuronal cell line SH-SY5Y เกิด senescent ทำให้ลด Sirt1 เพิ่ม ac-RelA/p65 และลด LC3-II และทั้งหมดนี้ melatonin สามารถปรับให้อยู่ในระดับปกติได้ แสดงให้เห็นว่า melatonin มีคุณสมบัติต้าน senescent process (ชราภาพ) คณะวิจัย ได้ศึกษาต่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง neuroinflammation และ autophagy

3. ผู้สูงอายุนั้น clock gene ต่างๆ ไม่แสดง circadian rhythm แล้ว BDNF และ neuroinflammatory marker ที่ปกติจะแสดง rhythm แต่เมื่อสูงอายุ โดยเฉพาะผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ rhythm เหล่านี้จะเสียและแสดงผิดปกติไป คณะวิจัย ได้ทดลอง ให้สัตว์ทดลองที่แก่ได้รับ melatonin เป็นเวลานาน 6 เดือน rhythm ต่างๆ ที่เสียเมื่ออายุมากจะกลับสู่เหมือนในช่วงที่มีอายุน้อย แสดงว่า melatonin สามารถเปลี่ยน circadian rhythm ต่างๆ ให้เป็นปกติได้ในผู้สูงอายุ และเป็นที่น่าสนใจมากกว่าสามารถปรับให้ผู้ป่วยสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ ที่มี circadian rhythm ผิดปกติกลับสู่ปกติได้หรือไม่

4. งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของเมลาโท닌ต่อการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแก่โดยศึกษาผลของเมลาโท닌ต่อ FOXO1 pathway ซึ่งเป็น pathway ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการทำลายเซลล์สมอง พบว่าเมื่อให้เมลาโท닌แก่หนูแก่ เมลาโท닌มีผลเพิ่มการแสดงออกของตัวแปรที่ป้องกันการทำลายของเซลล์สมอง ได้แก่ Sirtuin1, FOXO1, และ Beclin1 และลดตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์สมอง ได้แก่ p53, MDM2 และ DKK1 ซึ่งเป็น marker มีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ นอกจากนี้ คณะวิจัย ยังพบว่า การที่ได้รับอาหารที่มี calorie ต่ำ คือ caloric restriction (CR) จะลดการเกิดสมองเสื่อม หนูแก่ที่ได้ CR หรือได้รับเมลาโท닌จะไปควบคุมโดยผ่าน SIRT1/FOXO1 และคณะวิจัย ยังพบว่า การทำงานของเมลาโท닌เกิดผ่าน neuropeptide Y (NPY) ในกรณีของ high-fat +STZ ซึ่งเหนี่ยวนำให้เป็นโรคเบาหวาน โดยสมองส่วน hippocampus จะถูกทำลาย ลดการสร้างเซลล์ใหม่ หนูที่เป็นเบาหวานสูญเสียการเรียนรู้และความจำ ลดการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ ลดการสร้าง synapse ทั้งหมดนี้ถ้าหนูได้รับเมลาโท닌จะกลับเหมือนหนูที่ไม่เป็นโรคเบาหวาน นอกจากนี้ คณะวิจัย ได้ศึกษาต่อเกี่ยวกับโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์

5. หลังจากคณะวิจัย ได้ พบว่า melatonin สามารถไปกระตุ้นการสร้าง neural stem cell บริเวณ hippocampus และ subventricular zone คณะวิจัย ได้ศึกษาเพิ่มเติมว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นนี้มีความเกี่ยวข้องกับ signaling molecule เทียบ melatonin กับ growth factor อื่น EGF และ bFGF ปรากฏว่า melatonin สามารถเพิ่ม

จำนวน neurosphere ได้มากกว่า EGF และ EGF+ bFGF แสดงว่า melatonin สามารถนำมาช่วยการสร้าง neuron ในกรณีที่ neuron เสียไปในโรคสมองเสื่อมอัลไซเมอร์ได้ คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาในกรณีของความเครียดและสารเสพติด METH ยังเป็นสาเหตุที่สำคัญทำให้ neural stem cell จาก hippocampus หยุดการสร้างเซลล์ใหม่ซึ่งเป็นการทำลายการทำงานของ hippocampus และศึกษาต่อถึงความสัมพันธ์กับโรคอัลไซเมอร์

6. จากผลงานวิจัยของคณะวิจัยฯ พบเป็นครั้งแรกว่า melatonin มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงต่อ enzyme ที่สร้าง $A\beta$ ซึ่งได้รับความสนใจมากมาย เนื่องจากการยับยั้งการสร้าง $A\beta$ จะเป็น target ที่สำคัญในการยับยั้งการเกิดโรค AD คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาต่ออีกว่า ถ้าเซลล์ได้รับ $A\beta_{42}$ นั้น ซึ่งจะมีสภาพเหมือนเป็นโรคอัลไซเมอร์ $A\beta_{42}$ ยังสามารถไปเพิ่ม β -secretase ได้อีกเป็นการเพิ่มความเป็นพิษต่อเซลล์ ทำให้ AD รุนแรงมากขึ้นเป็น vicious cycle แต่เมื่อ treat ด้วย melatonin สามารถไปยับยั้ง β -secretase ที่เพิ่มขึ้น และไปเพิ่ม α -secretase ที่ลดลงในกรณีที่ได้รับ $A\beta_{42}$ ดังนั้นจึงเป็นที่คาดหวังว่าผู้ที่มียา $A\beta_{42}$ ในกรณีของผู้ป่วย AD อยู่แล้วถ้ามี melatonin สามารถไปลด β -secretase ได้ ซึ่งจะเป็นการลดความรุนแรงของ AD นอกจากนี้ยังมีโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับโรค AD คือ Pin1 ที่มีความสัมพันธ์กับทั้ง β APP, NF- κ B stabilization และ Tau pathology ดังนั้น คณะวิจัยฯ ศึกษาต่อและพบว่า melatonin เป็น modulator ที่สำคัญในการควบคุม Pin1 ที่จะนำไปสู่การควบคุมการสร้างโปรตีน $A\beta$ จนในที่สุดจึงได้ดำเนินการศึกษาเพื่อป้องกันการเกิดโรคใน AD ตั้งแต่ต้นทางก่อนการเกิดโรค และสูญเสียเซลล์ประสาท คณะวิจัยฯ พบว่าหนูแก่มีความจำแย่ (impair memory) ส่วน หนูแก่ที่ให้ melatonin จะคืนความจำเท่าหนู young หนูแก่นั้นมี β -secretase (BACE1) และ γ -secretase (PS1) เพิ่มขึ้น ส่วน α -secretase จะลดลงในสมองบริเวณ hippocampus เมื่อหนูกลุ่มที่ได้รับเมลานินเป็นเวลา 6 เดือน ปรากฏว่าระดับ α , β , γ -secretase มีระดับ mRNA และ protein เปลี่ยนกลับเหมือนในกลุ่ม young ข้อมูลบ่งชี้ให้เห็นว่าเมลานินสามารถช่วยป้องกันและ/หรือลดความเสี่ยงของการเกิด $A\beta$ ในบริเวณ hippocampus ซึ่งจะเป็นผลทำให้บุคคลนั้นๆ เป็นโรค AD ผู้สูงอายุเป็นวัยที่เสี่ยงที่สุดยิ่งอายุมากขึ้นยิ่งเสี่ยงมาก จากงานวิจัยข้างต้นเกี่ยวกับโรคเบาหวาน คณะวิจัยฯ ได้สร้าง model สัตว์ทดลองของโรคเบาหวาน นำหนูทดลองมาทดสอบความจำพบว่าสูญเสียความจำ ส่วน melatonin ช่วยความจำนั้นยังคงอยู่นอกจากนี้ โรคเบาหวานจะเพิ่ม β - และ γ -secretase แต่ลด α -secretase ผลลัพธ์คือทำให้เกิด $A\beta$ มากขึ้นที่สมองบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex ทั้งหมดนี้ melatonin สามารถช่วยยับยั้งได้ คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาในผู้เสพติดยา METH พบว่าผู้เสพติดนี้มี cognitive function เสียไปมาก คณะวิจัยฯ จึงได้ศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยให้ METH แก่หนู ผลการทดลองพบว่าหนูที่รับ METH สูญเสีย memory ไป ส่วนหนูที่ pretreat ด้วย melatonin ก่อนรับ METH นั้น melatonin สามารถป้องกันมิให้สูญเสียความจำนี้ได้ คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาต่อพบว่า METH ทำให้สมองบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex เพิ่มเอ็นไซม์ β - และ γ -secretase แต่ลด α -secretase ผลลัพธ์ทำให้เพิ่ม $A\beta$ ได้ ส่วนหนูที่ pretreat ด้วย melatonin เอ็นไซม์เหล่านี้อยู่ในระดับปกติ แสดงว่า melatonin สามารถยับยั้งป้องกันการเกิด AD ได้ในกรณีที่ได้รับสารพิษดังเช่น METH คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาในผู้ป่วย AD ข้อมูลเบื้องต้นพบว่า mRNA ของ β -secretase และ γ -secretase ในผู้ป่วย AD สูงกว่าคนปกติ ส่วน mRNA ของ ADAM 10 และ ADAM 17 มีแนวโน้ม ต่ำกว่าคนปกติ ส่วนจากเลือดของคนไข้ AD ขณะนี้กำลังวัดระดับ marker ของ AD ค่าอื่นๆ อีก ขณะนี้ยาที่ใช้ชะลออาการของผู้ป่วยโรค AD ล้วนแล้วแต่ไม่ใช่ target ที่เจาะจง และไม่สามารถชะลออาการของ AD ได้ ส่วน melatonin สามารถชะลอการเกิด $A\beta$ จะเป็นตัวยาที่สำคัญที่จะชะลอการเกิดโรค AD ได้ ข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับ mechanism ของ melatonin ต่อโรค AD นั้น คณะวิจัยฯ ได้รับเชิญให้เขียนเป็นบทความตีพิมพ์ให้ชาวโลกเข้าใจซึ่งได้ตีพิมพ์ลงในวารสารนานาชาติเรื่อง Mechanisms of melatonin in alleviating Alzheimer's disease ผลงานวิจัยนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปพัฒนาช่วยเหลือ ป้องกัน และยับยั้งปัญหาของโรคสมองเสื่อม เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคชราภาพทางสมอง และโรคอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับสุขภาพของสมอง

คำหลัก

เมลาโทนิน แอมเฟตามีน เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท การสร้างเซลล์ประสาทใหม่ อนุมูลอิสระ โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ ความเครียด การเรียนการจำ โรคสมองเสื่อม ยาเสพติด

2. Executive Summary

Back ground and significance

The risk for developing several types of neurodegenerative diseases such as Alzheimer's or Parkinson's diseases, and stroke, increases with increasing age. Understanding the mechanisms underlying brain aging-related alterations in brain structure and function has become critical for the identification of new therapeutic targets and the development of multimodal health-care strategies that meet the needs of an aging population. There is increasing evidence suggesting that the brain plays major role in regulating lifespan as well as health status during the aging process. Thus, studies are encouraged and needed to identify, characterize and elucidate mechanisms of certain factors that are both positive and negative, influencing the brain development throughout life-span, including aging and neurodegenerative periods. Melatonin, a hormone mainly synthesized in pineal gland, is multifunctioning molecule that could theoretically intervene at any of a number of sites to abate the changes associated with the development of AD. Based on a multitude of experimental results, melatonin benefits may influence on neurogenesis and neurodegeneration processes that makes it as an anti-aging agent.

Objectives

1. To investigate the effects of the aging process and neurodegeneration on brain functions
2. To develop new methods of prevention and slow down the age-related brain diseases, Alzheimer's disease
3. To obtain a greater understanding of the molecular and epigenetic aging of the brain and anti-aging mechanisms to increase the life span under healthy conditions
4. To develop new strategies to promote successful brain aging
5. To develop new research strategies to extend the life span
6. To explore new discoveries, technologies and agents which have the potential to reduce the suffering and cost associated with diseases and injuries of the brain

Subproject 1. Oxidative stress in brain aging and neurodegeneration: free radical, Neuroinflammation, mitochondrial function, cytosolic calcium overload

In vivo study: Animals will include as the following groups:

1. Control rat: adult rat
2. Normal aged rat
3. Drug-induced neurodegeneration rat
4. Melatonin-treated normal aged rat
5. Melatonin-treated drug-induced neurodegeneration rat

In vitro study

SH-SY5Y dopaminergic cells/glia cells will be divided into different groups including

1. SH-SY5Y dopaminergic cells
2. SH-SY5Y dopaminergic cells treated with drugs-induced neurodegeneration
3. SH-SY5Y dopaminergic cells treated with drugs-induced neurodegeneration +melatonin

Experimental plan

1. To measure different signaling molecules related to oxidative stress:
2. To measure mitochondria functions: ATP, complex I
3. To detect the AD markers: GSK, APP enzymes
4. To investigate the anti-inflammatory cytokines, pro-inflammatory cytokines,
5. To investigate the effect of melatonin on the anti-inflammatory cytokines, pro-inflammatory cytokines, chemokines and cell adhesion molecules protein level on A β 1-42 treated dopamine cells
6. The alteration in calcium receptors, calcium uptake sites and calcium buffering proteins in the brain of adult and aged rats
7. Determination of intracellular calcium levels, calcium receptors, calcium uptake sites and calcium buffering proteins in short- and long-term neuron cell cultures

8. The role of melatonin on calcium homeostasis and calcium buffering process in short- and long-term neuron cell cultures using cell-permeable calcium-sensitive fluorescent dye, Fluo-3/AM, western blot analysis and immunofluorescence staining

Subproject 2. Autophagy controlling brain aging and neurodegeneration

In vitro study and in vivo study will be as described in subproject 1.1

Experimental plan

1. To determine whether starvation stage via the insulin/IGF-1 nutrient-sensing alter the mTOR signaling pathway and to determine whether this can be modified by melatonin
2. To determine the mechanism of SIRT1 and FoxOs signaling against aging process on autophagy pathway by melatonin treatment
3. To study the mechanism of IKK complexes and NF- κ B signaling against aging process on autophagy pathway by melatonin treatment

Subproject 3. Circadian clock regulating brain aging process and neurodegeneration

In vivo study: Animal used as described in subproject 1.1

Experimental plan

1. To identify the genes that display rhythmicity in its expression in hippocampus in adult aged rats and neurodegenerative animals
2. To determine whether circadian clock can modulate expression of the genes involved in memory formation through SIRT1
3. To determine whether treatment with melatonin/SIRT1 activator (resveratro) can restore the hippocampal-dependent behavior
4. To determine whether treatment with melatonin/SIRT1 activator (resveratrol) can restore the expression of genes involved in memory formation, compare both in adult and aged animals with or without SIRT1 activator, normal with neurodegenerative animals

Subproject 4. Caloric restriction, high-fat diet and aging brain and neurodegeneration

Experimental plan

In vivo study

At 12 weeks of age, the wild type (WT) and Npy knockout (Npy-KO) mice will be divided into the ad libitum (AL) and caloric restriction (CR) groups. At 6 months, mice will be decapitated, serum, hypothalamus and hippocampal brain area will be collected for analyze mRNA expression level of theses parameters:

1. To determine Sirtuin1 and FoxO1 protein and mRNA by real time PCR and western blot analysis.
2. To test whether melatonin alone can increase the sirtuin1 and FoxOs levels in hypothalamus and hippocampus, melatonin 10 mg/kg, i.p. will be treated for 7 days in WT/CR and Npy-KO/CR groups. Sirtuin1 and FoxO1 will be determined
3. To determine the mRNA of FoxOs target genes that regulate cell cycle (eg. p21, p27) and apoptosis (Bim, Nrf2).

Subproject 4.2. High fat diet and brain aging and neurodegeneration

In vivo study

1. Normal adult rat
2. Normal adult rat feed with high fat diet for 12 week
3. Normal adult rat feed with high fat diet for 12 week + melatonin (at 8 week + 3 mg/kg melatonin, daily)

Experimental plan

1. Behavior test on learning and memory function
2. Brain area: hippocampus, prefrontal cortex, striatum will be dissected
 - 1) To determine the neuronal marker and neurogenesis
 - 2) To determine the marker for synaptogenesis
 - 3) To determine the AD markers
 - 4) To study how clock gene and SIRT1 regulate the neuronal plasticity as the clock-controlled gene
 - 5) To study the profile of clock gene and related clock controlled gene

Subproject 5. Neural stem cell

Subproject 5.1. Effect of melatonin (positive factor) in neuronal stem cell proliferation/differentiation

Experimental plan

1. Isolate, identify and characterize neural precursor cells obtained from adult hippocampus on proliferation and differentiation
2. Determine whether melatonin is able to promote neural precursor cell from adult SGZ on proliferation and differentiation
3. Determine the mechanisms of how melatonin is modulating different neural precursors from SVZ, SGZ
4. Compare the neurogenic activity of SGZ in different ages

Subproject 5.2. Effect of A β 1-42 in neuronal stem cell proliferation/differentiation

Experimental plan

1. To determine whether A β 1-42 can inhibit proliferation/differentiation of neural precursor cells from adult rat SGZ
2. To determine whether melatonin is able to protect A β 1-42 –induced alteration of neural stem cell proliferation/differentiation

Subproject 5.3. Effect of amphetamine (negative factor) in neuronal stem cell proliferation/differentiation

Experimental plan

1. To determine whether amphetamine can inhibit proliferation/differentiation of neural precursor cells from adult rat SGZ
2. To determine whether melatonin is able to protect amphetamine-induced alteration of neural stem cell proliferation/differentiation

Subproject 5.4. Effect of dexamethasone (negative factor) in neuronal stem cell proliferation/differentiation

Experimental plan

1. To determine whether dexamethasone can inhibit proliferation/differentiation of neural precursor cells from adult rat SGZ
2. To determine whether melatonin is able to protect dexamethasone-induced alteration of neural stem cell proliferation/differentiation

Subproject 6. Alzheimer's Disease

Subproject 6.1. Modulation of α , β and γ -secretases by melatonin- a possible therapeutic approach targeting towards Alzheimer's disease

Experimental plan

1. To develop a therapeutic approach for learning and memory impairments, Alzheimer's and dementia and impaired neurogenesis.
2. To determine the effects of melatonin as a therapeutic agent.
3. To measure α , β -secretase activities, proteins and mRNAs in SH-SY5Y cell.
4. To determine the effects of melatonin pre-treatments on the specific α , β -secretase activities, proteins and mRNAs in SH-SY5Y cell cultures
5. To determine the effect of melatonin on the gamma secretase in SH-SY5Y cell cultures
6. To determine the effect of melatonin on notch signaling in SH-SY5Y cell cultures

Subproject 6.2. PIN 1- A strategic target for melatonin implicating a novel therapeutic approach towards Alzheimer's & brain aging

Experimental plan

1. To determine the levels of PIN 1 in both young and aging mice
2. To determine the levels of isomerase activity of PIN1 in both young and aging mice
3. To determine the effect of melatonin on PIN 1 expression and mRNA level in aging mice
4. To determine the levels of PIN 1, APP, sAPP α and ADAM10 in melatonin pretreatment
5. To determine the localization of PIN 1 before and after melatonin treatment

Subproject 6.3. In AD patients study

Transcriptional and epigenetic regulation of APP processing enzymes α secretase (ADAM10, ADAM17), β -secretase (BACE1) and γ -secretases and sirtuin1

Human subjects:- Human peripheral blood mononuclear cells from the following subjects:

1. Aged-matched control subjects
2. AD patients

Experimental plan

To determine mRNAs of all groups by real time PCR.

β -secrease (BACE1), α - secrease (ADAM10, ADAM17), and γ -secretase and sirtuin1

3.เนื้อหาผลงานวิจัย

เนื้อหาผลงานวิจัยแบ่งเป็น 6 subprojects คือ

Subproject 1. Oxidative stress in brain aging and neurodegeneration

Subproject 1.1. Free radical and mitochondrial functions and Ca homeostasis in aging brain and neurodegeneration

ทฤษฎี “The free radical theory of aging” ได้กล่าวไว้ว่า การที่มีการสะสม oxidized macromolecule ภายในเซลล์จะทำให้การทำงานของเซลล์และทำให้เซลล์มีอายุสั้นลง ถ้าเกิดในเซลล์ประสาทจะทำให้สมองเสื่อม คณะวิจัย ได้รวบรวมงานวิจัยต่างๆ เกี่ยวกับทฤษฎีของความชราภาพของสมองตีพิมพ์ในวารสาร Jenwitheesuk et al. ใน Int J Mol Sci, 2014,15(9):16848-16884. (เอกสารแนบ 4.2.1) ได้ ำจจัยที่ทำให้ก่อให้สมองเสื่อม เกิดอนุมูลอิสระ เช่น สารเสพติด amphetamine และความเครียด (หรือ treat ด้วย stress hormone คือ สาร dexamethasone)

ผลการทดลองครั้งก่อนๆ ของคณะวิจัยพบว่าสาร amphetamine ทำให้ dopamine cell line ตาย และกลไกการตายเกิดผ่าน oxidative stress เกิด ROS ลด ATP, เพิ่ม lipid peroxidation เพิ่มการสร้าง abnormal protein, α -synuclein ซึ่งเป็น hall mark ของโรค Parkinson เป็นต้น ซึ่งเป็นกลไกเหมือนใน Parkinson และ Parkinson model

สาร melatonin hormone หลังจากต่อมไพเนียล สามารถป้องกันและยับยั้งการเกิด oxidative stress นี้ได้ และยับยั้งการเกิด α -synuclein ได้ ผลงานชิ้นนี้มีความสำคัญมากที่พบคุณสมบัติของ melatonin จากคุณสมบัติของ Melatonin ที่มีต่อการเกิด neurodegeneration นั้น ทำให้มีแนวโน้มว่าสามารถใช้เป็นยาต้านความชราภาพหรือไม่ นอกจากนี้กลุ่มผู้วิจัยยังพบว่า amphetamine ทำให้ลดปริมาณของ phosphorylated tyrosine hydroxylase ซึ่ง melatonin สามารถยับยั้งได้ ยิ่งกว่านี้ melatonin ยังสามารถเพิ่มปริมาณ p-tyrosine hydroxylase ดังนั้นกลุ่มวิจัยได้หากลไกอธิบายการยับยั้งการเกิด α -synuclein จาก amphetamine

Oxidative stress จากการเกิด free radical ทำให้เซลล์ต่างๆ ถูกทำลายและทำให้เซลล์แก่ ส่งผลทำให้สัตว์ต่างๆ ตลอดจนมนุษย์เกิดชราภาพ ำจจัยสิ่งแวดล้อม สารพิษต่างๆ ก่อให้เกิดชราภาพได้ เช่น สารเสพติดที่ก่อให้สมองเสื่อมเหมือนโรคสมองเสื่อม เช่น Parkinson ได้ คณะวิจัย ได้ศึกษาพิษของสารเสพติด amphetamine ก่อให้เกิดสมองเสื่อมโดยผ่านกลไกของ oxidative stress ในเซลล์ประสาทโดยใช้ dopamine cell line และเกิดในเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองบริเวณ striatum มีข้อมูลจากรายงานว่า methamphetamine ทำลายเซลล์ประสาท (apoptosis) บริเวณ striatum โดยผ่าน endoplasmic reticulum (ER) ซึ่งก่อให้เกิด ER stress ขึ้น คณะวิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์ของ methamphetamineในการทำลายเซลล์ประสาท ก่อให้เซลล์ชราภาพและ/หรือตายได้โดยใช้ glia cell (C6) ผลการทดลองพบว่า methamphetamine ทำให้ glia cell ตายได้โดย induce เกิด ER stress โดยการกระตุ้น unfold protein response (UPR) ส่งผลไปกระตุ้น ER stress inducer คือ activating transcription factor (ATF6) และ inositol-requiring enzyme 1 (IRE1) phosphorylation เพิ่ม mRNA

expression ของ binding immunoglobulin protein (Bip), CCAAT/enhancer-binding protein (CHOP), caspase 12, eukaryotic translation initiation factor2-alpha (eIF2 α) และ x-box-binding protein 1 (xBP1) สิ่ง queเปลี่ยนแปลงนั้น melatonin สามารถยับยั้งได้ melatonin สามารถยับยั้งการเกิด ER stress จากการได้รับ methamphetamine ได้ผลงานนี้ได้ดีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Tungkum et al., J Toxicol Sci, 2017: 42; 63-71) (เอกสาร แนบ 4.2.26)

Methamphetamine ทำลายเซลล์จากการเกิดใน glia cell แล้ว คณะวิจัยฯ ได้ทดลองพิสูจน์ว่า methamphetamine ทำให้เกิด ER stress ได้ในเซลล์ประสาท SH-SY5Y โดย methamphetamine ทำให้เกิด overexpression ของ ER stress gene เช่น CHOP, XBP1 และ activate caspase-12 และ caspase-3 ซึ่งนำไปสู่การเกิด apoptosis ถ้า treat เซลล์ประสาทด้วย melatonin จะป้องกันการเกิด apoptosis ได้ ผลงานวิจัยนี้ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ Wongprayoon and Govitrapong, Neurotoxicology Res 2017 (31): 1-10 (เอกสารแนบ 4.2.25)

Methamphetamine ทำให้เกิดการเสื่อมของสมองและประสาท melatonin สามารถป้องกันยับยั้งได้ด้วยการผ่านกลไก mechanism หลายทาง ดังที่กล่าวมาแล้ว คือ oxidative stress, ทำลาย mitochondria, เกิด inflammation, autophagy และ ทำลาย neural stem cell คณะวิจัยฯ ได้รับเชิญจากวารสารนานาชาติเขียน review นี้ ซึ่งได้ตีพิมพ์ใน Wongprayoon and Govitrapong, Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(8):1022-1032 (เอกสารแนบ 4.2.15) นอกจาก amphetamine ที่จะทำให้สมองเสื่อม คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาสมองเสื่อมแล้ว การติดเหล้าแอลกอฮอล์จะมีผลทำให้กระทบกระเทือนสมอง คณะวิจัยฯ ได้ส่งนักศึกษาปริญญาเอกทุน ควบ. ไปศึกษาที่ lab ของ Prof. Andrew Lawrence ได้ค้นหายาที่จับที่ nicotinic receptor สามารถลดการติดเหล้าได้ ผลงานวิจัยที่ได้ตีพิมพ์ใน Srisontiyakul et al., Neurochem Res. 2016:41(12):3206-3214 (เอกสารแนบ 4.2.22)

กลไกผ่าน Ca²⁺-homeostasis-mitochondria

คณะวิจัยฯ ได้ศึกษา toxic effect ของ amphetamine ต่อ และพบว่า methamphetamine (METH) ทำลาย dopamine cell โดยผ่านกลไกของ calpain โดย METH เพิ่มปริมาณ calpain และ spectrin break down product (SBDP) เมลาโทนินที่ความเข้มข้น 0.25 mM สามารถยับยั้งการเพิ่มของ calpain และ calpain SBDP ได้ METH ยังไปลดปริมาณของ calpastatin เมลาโทนินสามารถป้องกันการลดลงของ enzyme นี้ได้ ผลการวิจัยนี้ทำให้เชื่อว่าระดับของ Ca²⁺ มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตายของ dopamine cell จากผลการทดลองของกลุ่มวิจัย พบว่า METH จะเพิ่มปริมาณ Ca²⁺ ภายในเซลล์ทั้ง *in vivo* และ *in vitro* Ca²⁺ ที่เพิ่มขึ้นจะไปกระตุ้นการทำลายของ calpain Ca²⁺-dependent cysteine protease calpastatin ซึ่งเป็น calpain inhibitor ยังเป็นตัวที่ควบคุมการทำงานของ calpain การเกิด ROS จะไปเพิ่ม intracellular Ca²⁺ และ Ca²⁺ จะไปเพิ่ม Bax/Bcl-2 ซึ่งเป็น signaling molecule นำไปสู่การตายของ dopamine cell เมลาโทนินและ metabolite ของเมลาโทนินยับยั้งป้องกันการเกิด oxidative stress ซึ่งยังผลให้ยับยั้งผลของ METH ที่ไปเพิ่ม calpain นำไปสู่การตายของเซลล์ได้

นอกจากนี้กลุ่มวิจัยยังพบว่า amphetamine ทำให้เซลล์ dopamine ตาย อาจผ่านกลไกการทำลาย mitochondria ผลการวิจัยพบว่า amphetamine ไปเพิ่มปริมาณ mitochondria fission machinery protein (Fis1) melatonin ช่วยทำให้เซลล์ไม่ตายจาก toxic effect ของ amphetamine โดย melatonin ไปลดปริมาณ Fis1 (Parameyong et al., Mitochondrion. 2015, 24:1-8.) (เอกสารแนบ 4.2.9)

calpain เป็น protease enzyme ที่เกี่ยวข้องกับโรคสมองเสื่อม calpastatin เป็น endogenous specific calpain inhibitor สามารถป้องกันการเกิด pathogenesis จาก calpain แต่ mechanism ยังไม่เป็นที่เข้าใจ คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาเพื่อเข้าใจกลไกนี้โดยศึกษาใน neuronal cell line SH-SY5Y เมื่อนำเซลล์นี้ มา treat ด้วย H_2O_2 ทำให้เซลล์ตาย ลด mitochondrial membrane potential และ mitochondrial fusion protein (Opal1) ใน mitochondrial fraction ทำให้เพิ่ม calpain, เพิ่ม calcineurin และเพิ่ม mitochondrial fission protein (Fis1 และ Drp1) toxic effect ที่เกิดขึ้นนี้ จะไม่เกิดในเซลล์ที่ stably overexpress calpastatin เมื่อ treat ด้วย H_2O_2 ผลงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า calpain และ calcineurin จะก่อให้เกิดความเสียหายต่อ mitochondria ในเซลล์ประสาทนั้น calpastatin สามารถยับยั้ง toxic effect นี้ได้ ผลงานวิจัยนี้ได้ส่งเพื่อ ตีพิมพ์ใน Tangmanusakulchai et al., Mitochondrion (2016, 30:151-61) (เอกสารแนบ 4.2.21)

ดังนั้นคณะวิจัยฯ ได้ศึกษา calpastatin ป้องกัน toxicity ที่เกิดจาก methamphetamine ใน neuronal cell line SH-SY5Y ผลการทดลองพบว่าเซลล์ที่ overexpress calpastatin จะป้องกัน toxicity จากการได้รับ methamphetamine ที่ทำลาย mitochondria ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ใน Abubekar et al., Proceeding The 19th TNS Conference 2015. P. 54-58. (เอกสารแนบ 4.3.7)

นอกจาก amphetamine แล้ว เร็วๆ นี้คณะวิจัยฯ ยังพบว่า stress (dexamethasone, glucocorticoid) มีผลกระทบต่อสุขภาพของสมอง มีผลต่อการเรียนการจำของสัตว์ทดลอง กลไกที่สำคัญอันหนึ่งที่ dexamethasone คือการเกิด oxidative stress ทำลาย mitochondria จากการศึกษาโดยใช้เซลล์ประสาท SH-SY5Y เลี้ยงใน cultured medium พบว่า dexamethasone ลดปริมาณของ glutathione เพิ่ม ROS, lipid peroxidation และเพิ่มการตายของเซลล์ dexamethasone เพิ่ม cytosolic Ca และเพิ่ม mitochondria fusion protein เมื่อ SH-SY5Y เซลล์ได้รับ melatonin ก่อน melatonin สามารถป้องกันการเกิด oxidative stress ป้องกันการเกิด cytosolic Ca overload ป้องกันการทำลาย mitochondria ซึ่งจะเป็นการชะลอการตายของเซลล์ประสาท ผลงานนี้ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสาร นานานชาติ (Suwanjang et al., Neurochem Int, 2016;97:34-41) (เอกสารแนบ 4.2.17)

Subproject 1.2. Neuroinflammation and immune responses in the aging brain and neurodegeneration

มีข้อมูลรายงานว่า อายุมากขึ้นจะเพิ่มระดับของ inflammation และลดความสามารถในการทำงานของ immune ในบริเวณต่างๆ ของร่างกายและในสมอง ผลจาก inflammation ทั้ง acute และ chronic จะลดความสามารถเกี่ยวกับความจำและการเรียนรู้ ตลอดจนก่อให้เกิดโรคสมองเสื่อมแบบ

Alzheimer ปัจจัยที่ทำให้ร่างกายเกิด inflammation เช่น การติดเชื้อ การสูบบุหรี่ โรคเบาหวาน โรคความดันสูง เป็นต้น สิ่งเหล่านี้จะก่อให้เกิดเซลล์ประสาทที่มีชีวิตสั้นลง ทำให้เกิดสมองเสื่อม คณะวิจัยศึกษากลไกของ inflammation ที่ก่อให้เกิดเซลล์ตายอย่างไร สมองแก่อย่างไร melatonin สามารถป้องกันกลไกนี้หรือไม่ คณะวิจัยได้ศึกษาวิจัยโดยใช้เซลล์ประสาท SH-SY5Y dopamine cell line โดย induce ให้เกิด senescence โดย H_2O_2 ทดสอบความชราภาพของเซลล์โดย β -galactosidase จากการทดลองพบว่า melatonin สามารถลดปริมาณเซลล์ที่มีความชราภาพ (SA- β gal) melatonin สามารถลด mRNA expression ของ pro-inflammatory cytokines เช่น IL-1 β , IL-6, TNF- α ข้อมูลเบื้องต้นนี้แสดงว่า melatonin สามารถลด inflammation ที่เกี่ยวข้องกับความชราภาพของเซลล์ประสาท วัดระดับ chemokine และ inflammation เหนียวุ่นทำให้เกิด A β ชนิดต่างๆ จาก APP processing ที่เกิดในโรค Alzheimer และ melatonin จะยับยั้งป้องกันได้หรือไม่ การเกิด neuroinflammation จะเป็นกลไกหนึ่งที่จะนำไปสู่เซลล์แก่และเซลล์ตาย และทำให้สมองเสื่อมอย่างเช่นโรค Parkinson, Alzheimer คณะวิจัยได้ตั้งสมมติฐานไว้ว่ากลไกของการเกิด inflammation เกิดจากกระตุ้น NF-KB signaling ซึ่งเป็น key mediator ของ inflammation และยับยั้ง nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2) signaling การทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า dopamine cell ที่ทำให้แก่ จะเกิด neuroinflammation (IL-1 β , IL-6, TNF- α) และเมลาโท닌สามารถยับยั้งได้ดี กลไกนี้เกิดผ่าน NF-KB และ Nrf2 ซึ่งทั้งคู่เป็น transcription factor จะไปควบคุมที่ promoter region ของการสร้าง cytokine งานเบื้องต้นได้นำไปเสนอและตีพิมพ์เป็น proceeding ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (Chantadul et al., 18th TNS Conference 2014, page 30-36) (เอกสารแนบ 4.3.2) และเพิ่มเติมตีพิมพ์เสนอในงานประชุม The 19th TNS Conference 2015. P. 68 และผลงานฉบับสมบูรณ์ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ (Nopparat et al., Mechanism Aging Dev, 2017 accepted) (เอกสารแนบ 4.2.31)

งานนี้ยังได้พิสูจน์ในสัตว์ทดลอง โดยแบ่งหนู (mice) เป็น 3 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 หนู young adult (2 เดือน)

กลุ่มที่ 2 หนูแก่ old (16 เดือน) + น้ำดื่มปกติ → เลี้ยงต่ออีก 6 เดือน รวมอายุเป็น 22 เดือน

กลุ่มที่ 3 หนูแก่ old (16 เดือน) + น้ำดื่มใส่ melatonin 10 mg/kg → เลี้ยงต่ออีก 6 เดือน รวมอายุเป็น 22 เดือน

ผลการวิจัยปรากฏว่าหนูแก่เพิ่มระดับ cytokine (IL-1 β , IL-6, TNF- α) หนูกลุ่มที่ได้รับเมลาโท닌 ระดับโปรตีน และ mRNA ของ cytokine เปลี่ยนกลับเหมือนกลุ่ม young และลดระดับ NF-KB ที่เพิ่มในหนูแก่ เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าหนูแก่นั้น หน้าที่ต่างๆ ของสมองส่วน hippocampus ที่เสื่อมโทรมด้วยโดยเฉพาะอย่างยิ่ง learning & memory ดังนั้นกลุ่มวิจัยจึงได้วัด functional test ที่เกี่ยวกับการเรียนรู้จากการทดลอง พบว่า หนูแก่มีการเรียนรู้ที่ลดลงเมื่อเทียบกับหนู young หนูแก่ที่ได้รับเมลาโท닌เป็นเวลา 6 เดือน การเรียนรู้และการจำเหมือนในหนูกลุ่ม young แสดงว่าเมลาโท닌สามารถป้องกันการเสื่อมของการเรียนรู้เมื่อเข้าสู่วัยชราภาพ นอกจากนี้การวิจัยยังได้วัดระดับ คือ NMDA receptor subunit NR_{2A}, NR_{2B}, CamKII ในสมองส่วนบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex ซึ่งเป็นตัวที่บ่งบอกกลไกการเรียนรู้ ก็พบว่าหนูแก่ปริมาณ NR_{2A}, NR_{2B} และ CamKII ลดลง เมื่อได้รับเมลาโท닌โปรตีน

เหล่านี้จะมีระดับเพิ่มขึ้นจนมีระดับเท่าหนู young และเตรียมเขียนผลงานเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Permpoonpattana et al., Exp. Gerontol 2017 submitted) (เอกสารแนบ 4.2.35) และตีพิมพ์เป็น proceeding ใน Tangweerasing et al., (2016) ในงานประชุมนานาชาติ IBRO-APRC School of Neuroscience ระหว่าง July 4-8, 2016, p114-119. (เอกสารแนบ 4.3.8) ผลงานวิจัยบางส่วนนี้ อ.ปิยะรัตน์ ได้นำไปบรรยายที่งานประชุมนานาชาติ International Association of Gerontology Geriatrics (IAGG) และได้ตีพิมพ์ abstract ใน Govitrapong (2015) IAGG, Plenary Lecture 2 page 2 (เอกสารแนบ 4.4.22)

นอกจาก H_2O_2 จะ induce ให้เกิด neuroinflammation ใน neuron แล้ว amphetamine ยังสามารถ induce ให้เกิด neuroinflammation ใน glia cell ซึ่งนำไปสู่การเกิด neurodegeneration ได้เช่นกัน การทดลองนี้ใช้ glia cell line (C6) และ methamphetamine ที่ induce การเกิด reactive nitrogen species โดยการผลิต nitric oxide เพิ่ม inducible nitric oxide synthase (iNOS) methamphetamine ไปลด Nrf₂ และลด heme oxygenase-1 (HO-1), NADPH: quinone oxidoreductase-1 (NQO-1) และ glutamate-cysteine ligase catalytic (γ -GCLC) ซึ่งส่งผลทำให้ลด superoxide dismutase (SOD) activity melatonin จะเพิ่มการสร้าง Nrf₂ ทำให้เพิ่ม HO-1, NQO-1, γ -GCLC ทำให้เพิ่ม activity ของ SOD (Jumnongprakhon et al., Neurotoxicity Res, 2014, 25:286-294.) (เอกสารแนบ 4.2.3)

melatonin ไปยับยั้งการสลายตัวของ IKB α ลดการ translocate ของ p65 subunit ลดการสร้าง iNOS ทำให้ลดปริมาณ NO ทั้งหมดเป็นการลด neuroinflammation ที่เกิดจาก methamphetamine แสดงว่า melatonin สามารถลดการเกิด neuroinflammation ได้ (Jumnongprakhon et al., Neurochem Res. 2015, 40:1445-1456) (เอกสารแนบ 4.2.7)

นอกจากนี้ คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาผลของ amphetamine ต่อ inflammation โดยใช้ dopamine cell line พบว่าในเซลล์ประสาท SH-SY5Y dopamine cell line เกิด neuroinflammatory cytokine โดย amphetamine ไปเพิ่ม iNOS, NF-KB phosphorylation, pERK และลด Nrf₂ และยับยั้งได้โดยเมลาโท닌 คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาพบว่าเมลาโท닌สามารถยับยั้งการเกิด neuro-inflammation ที่เกิดขึ้นในเซลล์ประสาท dopamine ได้ ข้อมูลเป็นข้อมูลใหม่ เนื่องจากเป็นที่เข้าใจกันว่าการเกิด neuroinflammation เกิดขึ้นที่ glia cell ไม่ได้เกิดที่ neuron ดังนั้นข้อมูลของคณะวิจัยฯ นี้จึงเป็นเรื่องใหม่ นอกจากได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติแล้ว เร็วๆ นี้ คณะวิจัยฯ ได้ข้อมูลต่ออีกว่า เมลาโท닌 ยับยั้ง neurotoxicity ของ methamphetamine ใน dopamine cell นั้น เกิดผ่าน melatonin receptor โดยที่ methamphetamine ทำให้เกิด TNF- α เกิด NF-KB translocate เข้าไปใน nucleus ไปจับกับ promoter region ของ cytokine gene และทำให้ลด Nrf₂ ซึ่งไป link กับ กลุ่ม anti-oxidative enzyme และกลไกเหล่านี้ยับยั้งได้ด้วยเมลาโท닌 โดยผ่าน melatonin receptor ข้อมูลเป็นเรื่องใหม่ ผลงานนี้ได้ตีพิมพ์และเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ) Wongprayoon and Govitrapong, 18th TNS Conference 2014, page 64) (เอกสารแนบ 4.4.8) และนำไปเสนอที่ ISN-APSN ที่ Australia (Wongprayoon and Govitrapong. 2015 J Neurochem (suppl 1) p. 226) (เอกสารแนบ 4.4.18) และเสนอผลงานที่งานประชุมระดับชาติ

(Wongprayoon and Govitrapong, The 19th TNS Conference 2015. P. 61 (เอกสารแนบ 4.5.7) และส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Wongprayoon and Govitrapong, Neurotoxicology, 2015, 50:122-130) (เอกสารแนบ 4.2.8)

เร็วๆ นี้ มีข้อมูลเกี่ยวกับ methamphetamine ที่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์และทำให้เกิด neuroinflammation และ apoptosis โดยการทำลาย blood brain barrier (BBB) อย่างไรก็ดีตามขณะนี้ยังไม่มีหลักฐานทางวิจัยที่แสดงให้เห็นชัดเจน ดังนั้นคณะวิจัยฯ จึงได้สร้าง model ของ blood brain barrier โดยการ culture primary rat brain microvascular endothelium cell (BMVEC) ซึ่ง isolate จากหนู neonatal rat แล้วเลี้ยง BMVEC กับ methamphetamine และ melatonin ผลวิจัยปรากฏว่า methamphetamine ทำให้เกิด ROS, RNS, apoptosis โดยผ่านทาง NADPH oxidase (NOX)2 ทำให้การ transport ต่อ BBB เสีย โดยการวัด transendothelial electric resistance ทำลาย tight junction proteins (ZO-1, occludin, claudin 5) ทำลาย beta-gp transporter ถ้า treat BMVEC ด้วย melatonin ซึ่งป้องกัน methamphetamine ทำลาย BBB ได้โดยผ่านทาง NOX-2 activity และการทำงานของ melatonin นี้เกิดผ่าน melatonin receptor MT_{1/2} ผลงานวิจัยนี้ได้ submit ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Jumnongprakhon et. al Toxicol In vitro 2017 (เอกสารแนบ 4.2.28) และ Jumnongprakhon et. al Brain Res 2016; 1646:182-192 (เอกสารแนบ 4.2.18) และ Jumnongprakhon et. al Brain Res 2016; 1659: 84-92. (เอกสารแนบ 4.2.19)

จากผลการวิจัยข้างต้นทำให้ทราบว่า methamphetamine จะทำลาย BBB ดังนั้นคณะวิจัยฯ ได้วิจัยต่อเพื่อพิสูจน์ต่อว่าการทำลาย BBB ทำให้เกิด neuroinflammation หรือไม่ และ melatonin จะช่วยได้หรือไม่ อย่างไร โดยใช้ BMVEC model ของ BBB พบว่า methamphetamine ทำให้เกิด inflammation mediator เพิ่ม intracellular adhesion molecule (ICAM-1) vascular cell adhesion molecule (VCAM-1) และ matrix metalloproteinase (MMP-1), เกิด iNOS, NO และทั้งหมดดังกล่าวนี้ melatonin สามารถป้องกันได้โดยผ่าน NF- κ B และ Nrf₂ transcriptional molecules และผ่าน melatonin receptor MT_{1/2} ผลงานวิจัยนี้ได้ส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Jumnongprakhon et. al Brain Res 2016; 1646: 393-401. (เอกสารแนบ 4.2.20)

นอกจากได้ศึกษาพิสูจน์ใน cell line และใน blood brain barrier (BBB) แล้ว คณะวิจัยฯ ได้พิสูจน์กลไกเหล่านี้เกิดขึ้นใน systemic ด้วย ดังนั้นจึงทำการพิสูจน์ในสัตว์ทดลอง แล้ว treat หนู rat ด้วย methamphetamine และ melatonin เพื่อพิสูจน์ว่า methamphetamine ก่อให้เกิด neuroinflammation ทำลาย BBB และ melatonin สามารถช่วยป้องกันได้ จากผลการทดลองปรากฏว่า methamphetamine ทำให้เกิด neuroinflammation บริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex โดยการวัดการเพิ่มขึ้นของ cytokine ต่างๆ เช่น IL-1 β , IL-6, TNF- α เมื่อ treat ด้วย melatonin ระดับ cytokine กลับสู่ปกติ ผลงานเบื้องต้นได้เสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (Namyen et al., 18th TNS Conference 2014, p. 57, (เอกสารแนบ 4.4.3) และ Namyen et al., 19th TNS Conference 2015, p. 67 (เอกสารแนบ 4.5.3)

คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาต่อบริเวณ hippocampus พบว่า methamphetamine ยังไปทำลาย BBB โดยการทำลาย intracellular adhesion molecule (ICAM-1, VCAM-1) หนูกุ่มที่ treat ด้วย melatonin และ methamphetamine นั้น melatonin สามารถป้องกันและแก้ไขการถูกทำลายของ BBB และป้องกันการเกิด cytokine ต่างๆ ที่เพิ่มขึ้นได้ และศึกษาว่ากลไก amphetamine ทำลาย BBB อย่างไร เมลาโทนินป้องกัน แก้ไข โดยกลไกทาง cellular อย่างไร งานวิจัยนี้กำลังเตรียมรวบรวมเพื่อเขียนตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Namyen et al., 2017) (เอกสารแนบ 4.2.38)

จากผลงานข้างต้นที่ amphetamine ทำลาย BBB เกิด neuroinflammation นั้นบริเวณ hippocampus ของสมองซึ่งเป็นสมองที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้ การจำ (learning memory) และ (cognitive function) ถ้าสมองบริเวณนี้เสียไปจากการใช้สารเสพติด amphetamine หรือเด็กอ่อนที่เกิดจากการใช้สารเสพติดของแม่ในระหว่างตั้งครรภ์จะเป็นการทำลายสมอง hippocampus ดังนั้นคณะวิจัยฯ จึงได้ศึกษาในหนู rat ในช่วง postnatal หลังคลอด P₄-P₁₀ ซึ่งตรงกับ trimester ของคน โดยนำหนู postnatal นี้ มาให้ methamphetamine 5-10 mg/kg และกลุ่มที่ให้ amphetamine และ melatonin (10 mg/kg) เป็นเวลา 7 วัน จากนั้นนำหนูทั้ง 4 กลุ่มมา sacrificed และแบ่งเป็นการศึกษา immunocytochemistry และ Western blot ศึกษาบริเวณ hippocampus วัดปริมาณ tyrosine hydroxylase (TH, marker ของ dopamine) และ dopamine transporter (DAT) วัด α -synuclein (marker ของ Parkinson), synaptophysin (marker ของ presynaptic), PSD₉₅ (marker ของ postsynaptic), NMDA receptor subunit (NR_{2A}, NR_{2B}) โปรตีนที่กล่าวข้างต้นนี้ลดลงในกลุ่มที่ได้รับ methamphetamine และ reverse ปริมาณทั้งหมดในกลุ่มหนูที่ได้รับ methamphetamine และ melatonin แสดงว่า melatonin สามารถป้องกันการสูญเสียโปรตีนที่สำคัญในบริเวณ hippocampus ผลงานวิจัยนี้ได้นำไปเสนอที่งานประชุมวิชาการนานาชาติ Leeboonngam et al., 2014, 18th TNS Conference, page 58 (เอกสารแนบ 4.4.4) Leeboonngam et al., 2015 J Neurochem (suppl 1) page 352 (เอกสารแนบ 4.4.20) และเตรียมส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Leeboonngam et al., J Pineal Res (2017 in preparation) (เอกสารแนบ 4.2.42)

ผลงานวิจัยเกี่ยวกับ toxic effect ของ amphetamine ต่อ ระบบประสาท ทำให้เกิดสมองเสื่อม สมองแก่ โดยผ่านทฤษฎีต่างๆ คณะวิจัยฯ ได้ถูกเชิญให้เรียบเรียงตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Wongprayoon and Govitrapong, Current Pharmaceutical Design, 2016, 22(8):1022-1032 revised) (เอกสารแนบ 4.2.15)

นอกจาก neuron และ microglia และสัตว์ทดลองแล้ว คณะวิจัยฯ ยังได้ค้นพบการเกิด neuroinflammation ใน schwann cell ซึ่งเป็น supporting cell ของ peripheral nervous system โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ trigeminal nerve และพบว่า CGRP เป็น neuropeptide ที่ก่อให้เกิด cytokine IL-1 β ใน schwann cell โดยผ่าน ERK pathway ดังนั้นจึงทำให้สามารถศึกษาต่ออีกว่า neuroinflammation ที่เกิดขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับ pain และ neurodegeneration อย่างไร งานนี้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Permpoonputtana et al., Life Sci, 2016, 144:19-25) (เอกสารแนบ 4.2.14)

การเกิด spinal cord injury ก่อให้เกิดปัญหาต่อทั้ง CNS และ PNS คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาพบว่า spinal cord injury ก่อให้เกิด neuroinflammation และถ้า treat ด้วยเมลาโทนินก็สามารถยับยั้งได้ (Sompub et al., 18th TNS Conference 2014, page 70 (เอกสารแนบ 4.4.14) และ Sompub et al., The 14th APSN Conference 2016 p. 80 (เอกสารแนบ 4.4.29) และ IBRO-APRC School of Neuroscience 2016 and 20th Thai Neuroscience society International Conference, Naresuan University Phitsanulok, Thailand, July 4-8, 2016, p. 87 (เอกสารแนบ 4.4.25) คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาพบว่า agomelatine, melatonin agonist สามารถยับยั้ง cerebral ischemia injury งานนี้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Chumboatong et al., 2017 Neurochem Int 2017 (102):114-122. (เอกสารแนบ 4.2.27)

Subproject 2. Autophagy controlling brain aging and neurodegeneration

Autophagy เป็นกลไกหนึ่งที่เกิดขึ้นในเซลล์ในขณะที่เซลล์ขาดแคลนอาหาร หรือขณะที่เซลล์ต่างๆ มีอายุมากขึ้นจะเกิดการสะสมของ damage macromolecule เซลล์จำเป็นจะต้องกำจัด macromolecule เหล่านี้ โดยขบวนการ ubiquitin-proteasome และขบวนการ lysosome mediated autophagy ขบวนการเหล่านี้เกิดใน aging process และเป็นขบวนการที่กำหนดอายุของเซลล์ต่างๆ ว่ามี life span ยืนยาวแค่ไหน คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาในเซลล์ SH-SY5Y dopamine cell line พบว่า amphetamine ทำให้เกิด autophagy โดยการเกิด mammalian target of rapamycin (mTOR) signaling protein, mTOR เป็น signaling protein ที่มีหน้าที่ควบคุม growth และ proliferation, mTOR เปลี่ยนแปลงได้โดย growth factor ต่างๆ เช่น amino acid หรือ stress ถูก suppress โดย rapamycin mTOR ถูก activate ไปเป็น p-mTOR ซึ่งจะไป phosphorylate protein อีก 2 ชนิด คือ p70S6K และ 4EBP1 ซึ่งจะทำให้เกิด growth และ proliferation จากผลการทดลองพบว่า amphetamine ไปลด p-mTOR ส่วน melatonin ช่วยป้องกันการลดลงของ p-mTOR จาก amphetamine ป้องกันการ reduction of p-4EB1-induced by amphetamine และ melatonin ป้องกันการเกิด autophagy

นอกจากนี้ กลุ่มวิจัยยังได้ศึกษาต่ออีกว่าการที่ amphetamine ทำให้เซลล์ประสาทตายโดยผ่าน pathway ของ mTOR นั้น จำเป็นต้องเกิดผ่านการเกิด reactive oxygen species และขบวนการนี้ยับยั้งได้ด้วย melatonin

คณะวิจัยได้ศึกษาต่อจาก mammalian target of rapamycin (mTOR) pathway Atg1, Beclin1 (Atg6), LC3 (Atg8) และ Atg18 ซึ่งเป็น downstream signaling ของ mTOR โดยที่ pathway นี้จะถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแวดลอม เช่น การขาดอาหาร ขาด amino acid การเกิด oxidative stress ส่วน upstream pathway เช่น JNK1 activation จากผลการทดลองเร็วๆ นี้ โดยคณะวิจัยพบว่าเมื่อใส่ METH 1 mM ใน dopamine cell line แล้ว incubate 4, 8, 24 ชั่วโมง พบว่า METH เพิ่มปริมาณ microtubule-associated protein light chain 3 (LC3-II) ซึ่งเป็น indicator ของ autophagy เป็น 264% เมื่อ preincubate เมลาโทนิน 1 mM เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ปริมาณ LC3-II ลดเหลือ 197% การทดลองโดยใช้

immunofluorescence confocal microscopy ก็เห็นเซลล์ติด LC3-II immunostaining ชัดเจน เพื่อจะพิสูจน์ว่า METH ทำให้เกิด autophagy โดยผ่านขบวนการ Bcl-2/Beclin1 การเปลี่ยนแปลงโปรตีน 2 ตัวนี้ยับยั้งได้ด้วยเมลานโทนิน การเพิ่ม p-Bcl-2 ทำให้เกิดการ dissociation ของ Bcl-2/Beclin1 complex และก่อให้เกิด autophagy เพื่อที่จะพิสูจน์ต่อว่า Bcl-2/Beclin1 complex นี้ถูกควบคุมโดย c-Jun-N-terminal protein kinase 1 (JNK 1) หรือไม่ จากผลการทดลองพบว่า incubate dopamine cell ด้วย METH 24 ชั่วโมง ระดับของ p-JNK เพิ่มขึ้นเป็น 160% และลดลงเป็นระดับกลุ่ม control เมื่อ pretreat ด้วยเมลานโทนิน แสดงว่าการ phosphorylate JNK มีบทบาทสำคัญต่อการ dissociation ของ Bcl-2/Beclin1 complex แล้วนำไปสู่การเกิด autophagy ผลงานวิจัยเหล่านี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ และขณะนี้คณะวิจัยฯ ศึกษากลไกในระดับลึกซึ่งต่อไปอีก พบว่า เกี่ยวข้องโปรตีน นอกจาก ubiquitin-proteasome system (UPS) แล้วยังมี chaperone-mediated autophagy (CMA) ซึ่งเป็น selective target ของโปรตีนต่อ lysosome จากที่คณะวิจัยพบว่า amphetamine ทำให้เกิด abnormal protein aggregation คือ α -synuclein ซึ่งเป็น hall mark สำคัญที่พบในสมองของผู้ป่วย Parkinson α -synuclein จะจับกับ lysosomal protein ชนิดที่เรียก Lamp 2A ซึ่งมี sequence "KFERQ motif" เหมือน sequence ของ α -synuclein ขณะที่ α -synuclein กลายเป็น oligomer form จะไม่สามารถจับกับ Lamp 2A จากการทดลองทำให้เชื่อว่าการที่ amphetamine ก่อให้เกิด α -synuclein aggregation เนื่องจากป้องกันการย่อยสลาย α -synuclein โดยขบวนการ CMA โดยที่เมลานโทนินสามารถยับยั้งขบวนการนี้ ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ไปแล้ว

ข้อมูลเบื้องต้นเหล่านี้จะนำไปสู่การวิจัยเกี่ยวกับขบวนการ ดังนี้

ศึกษาความสัมพันธ์ของ melatonin ต่อ SIRT1 และ FoxO3 pathway ต่อ aging process โดยผ่าน autophagy pathway

SIRT₁ เป็น NAD-dependent histone acetylase โดย Sirt₁ ทำงานร่วมกับ autophagy ในการควบคุม longevity (การมีอายุยืนยาว) ในงานวิจัยศึกษา dopamine cell SH-SY5Y โดยทำให้เกิด senescence ด้วย H₂O₂ (หรือสารพิษอื่นๆ) จากการทดลองพบว่า dopamine cell ถูก induce ให้แก่ โดยใช้ marker ของ SA- β gal เซลล์เหล่านี้ลดปริมาณโปรตีน LC3-II ซึ่งเป็น marker ของ autophagy ถ้า treat ด้วยเมลานโทนินทำให้เพิ่ม LC3-II protein และลดปริมาณ SA- β gal (เซลล์แก่) แสดงว่าเมลานโทนินไปยับยั้งความชราภาพของเซลล์โดยผ่าน autophagy pathway งานเบื้องต้นนี้ได้เสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (Sinjanakhim et al., 18th TNS Conference 2014, page 12) (เอกสารแนบ 4.4.7)

คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาต่อพบว่าเมลานโทนินสามารถกระตุ้นเพิ่มโปรตีนของ SIRT1, Beclin1 และ LC3-II (ซึ่งเป็น hallmark protein ของ autophagy) และสามารถลดระดับ acetylated Lys310 ใน p65 ซึ่งเป็น subunit หนึ่งของ NF- κ B ในเซลล์ที่ทำให้เกิด senescence ผลงานวิจัยนี้ได้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ณ ประเทศออสเตรเลีย ตีพิมพ์ใน Sinjanakhom et al., 2015 J Neurochem (suppl 1) p. 225 (เอกสารแนบ 4.4.17)

กลไก IKK complex และ NF-KB signaling ต่อ aging process โดยผ่าน autophagy

คณะวิจัยฯ ยังพบว่าเมลาโท닌ไปเพิ่ม Sirt₁ และ FoxO₁ ซึ่งเป็น target ของ SIRT₁ และเพิ่ม autophagy งานวิจัยนี้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (Nopparat and Govitrappong, 18th TNS Conference 2014, page 19) (เอกสารแนบ 4.4.10)

คณะวิจัยฯ ได้ใช้ H₂O₂ induce ให้ neuronal cell line SH-SY5Y เกิด senescent ทำให้ลด SIRT1 เพิ่ม ac-RelA/p65 และลด LC3-II และทั้งหมดนี้ melatonin สามารถปรับให้อยู่ในระดับปกติได้ แสดงให้เห็นว่า melatonin มีคุณสมบัติต้าน senescent process (ชราภาพ) ได้ข้อมูลเบื้องต้นเสนอและตีพิมพ์เป็น proceeding ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ Sinjanakhom et al., The 19th TNS Conference 2015. P. 46-52 (เอกสารแนบ 4.3.6) คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาต่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง neuroinflammation และ autophagic ผลงานนี้จะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor 9.3 (Nopparat et al., (2017, accepted, J Pineal Res) (เอกสารแนบ 4.2.32)

Subproject 3: Circadian clock regulating brain aging process and neurodegeneration

clock genes เป็นกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการกำหนดเวลาในรอบวันโดยเฉพาะเวลากลางวัน กลางคืนที่เรียกว่า circadian rhythm ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งการกำหนดเวลาดังกล่าวนั้นเกิดจากการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีนควบคุมเวลาหลายชนิด และโปรตีนเหล่านี้จะมีปริมาณขึ้นลงเป็นจังหวะตามระยะเวลา 24 ชั่วโมง และจะไปมีผลต่อกลไกการควบคุมการทำงานต่างๆ ของร่างกาย เช่น การนอน การตื่น อุณหภูมิของร่างกาย การเต้นของหัวใจ การสร้างฮอร์โมน ความดันโลหิต เป็นต้น กระบวนการต่างๆ ที่มีลักษณะเป็น circadian rhythm พบได้ตั้งแต่สิ่งมีชีวิตเซลล์เดียว ซึ่งมีไว้เพื่อป้องกัน replicating DNA จาก high ultraviolet radiation ในช่วงเวลากลางวัน สำหรับในสัตว์ชั้นสูง เช่น พวกสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม circadian rhythm ถูกควบคุมด้วย suprachiasmatic nuclei (SCN) ของสมองส่วน hypothalamus ซึ่งถือเป็น circadian pace maker โดยจะถูกฝึกให้รู้ถึงสัญญาณจากสิ่งแวดล้อมภายนอกนั้นก็คือความมืดและความสว่าง จากนั้นจะส่งสัญญาณไปบอกยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกายโดยผ่านทางสัญญาณประสาทหรือฮอร์โมนที่สร้างจากต่อมไพเนียลที่ชื่อว่าเมลาโท닌อีกทีหนึ่ง ดังนั้นในปัจจุบันเชื่อว่าทั้ง SCN และต่อมไพเนียลร่วมกันควบคุม circadian rhythm ซึ่งบทบาทของยีน *Per1* ต่อการทำหน้าที่ของต่อมไพเนียลยังคงต้องมีการศึกษาต่อไป ดังนั้นคณะวิจัยฯ ได้ศึกษาการแสดงออกของยีนควบคุมเวลาในต่อมไพเนียลของหนูที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะหลอดทดลองพบว่า ยีนควบคุมเวลา *Per2*, *Bmal1* และ *Rev-erb alpha* ยังคงมีจังหวะในการแสดงออกของยีนหลังจากเพาะเลี้ยงเป็นเวลา มากกว่า 24 ชั่วโมง ซึ่งแตกต่างไปจากยีน *Per1* และ *Aa-nat* ที่จังหวะการแสดงออกในรอบวันนั้นล้มเลิกลงเมื่ออยู่ในสภาวะหลอดทดลอง ดังนั้นการควบคุมจังหวะการแสดงออกของ *Per2*, *Bmal1* และ *Rev-erb alpha* ในต่อมไพเนียลไม่ได้ขึ้นอยู่กับกลไกการควบคุมของสารสื่อประสาท norepinephrin (NE) เช่นเดียวกับยีน *Per1* และ *Aa-nat* ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารแล้ว

สิ่งที่เกิดแก่วัยชราคือ การสูญเสียการเรียนรู้และการจำ ซึ่งเป็นสิ่งที่เกิดขึ้นในโรคสมองเสื่อม อย่าง Alzheimer การเรียนรู้ การจำ ควบคุมโดย circadian คณะวิจัยฯ ได้ตั้งสมมติฐานไว้ คือ functional clock จะอยู่ในสมองบริเวณต่างๆ โดยเฉพาะ hippocampus, hippocampus มี clock gene และทำหน้าที่สัมพันธ์กับ aging process สัมพันธ์กับ การเรียนรู้ การจำ ดังนั้นการศึกษาจึงสามารถ ศึกษาโดยใช้ model ของ neurodegeneration เช่น AD model, neurodegeneration model เช่น ในกรณีที่ได้รับ amphetamine ก่อให้เป็น neurodegeneration และกรณีของ aging model

amphetamine (AMPH) มีผลต่อการแสดงออกของยีน *Per1*, *Per2* และ *Aa-nat* ในต่อมไพเนียล ของหนูหลังคลอดอายุ 9, 16 และ 60 วัน ในสภาวะที่มีแสง 12 ชั่วโมง และไม่มีแสง 12 ชั่วโมง ฉีด saline หรือ AMPH ให้สัตว์ทดลองติดต่อกันเป็นระยะเวลา 7 วัน และเก็บต่อมไพเนียลที่เวลา ZT 3 และ ZT 15 ของการทดลอง Real-time PCR แสดงให้เห็นว่า AMPH มีผลต่อการแสดงออกของแต่ละยีนในต่อมไพเนียลแตกต่างกันไป โดยไม่มีผลต่อระดับ mRNA ของ *Aa-nat* ในหนูทุกอายุทั้งในเวลาที่มีแสง และไม่มีแสง พบผลการลดระดับ mRNA ของ *Per1* ในเวลากลางคืนในต่อมไพเนียลของหนูอายุ 60 วัน และพบว่า AMPH มีผลทำให้เกิดการลดระดับการแสดงออกของยีน *Per2* ในต่อมไพเนียลของหนูหลังคลอดอายุต่างๆ

จากรายงานที่ผ่านมาพบว่ายาในกลุ่มสารเสพติดซึ่งมีผลต่อจังหวะของพฤติกรรมต่างๆ อาทิ sleep/wake cycle แล้วยังสามารถควบคุมจังหวะการแสดงออกของยีนหลายชนิดใน striatum โดยปราศจากการควบคุมเวลาของ master clock หรือ SCN ดังนั้นจึงทำการทดสอบดูผลการเสพติด amphetamine ต่อการแสดงออกของ clock gene ทุก 6 ชั่วโมงตลอดวัน ใน striatum ของหนูโตเต็มวัย พบว่ามีผลทำให้มีการเปลี่ยนแปลงปริมาณ mRNA ของยีน *Per1* โดยที่ amphetamine ทำให้ peak ของ *Per1* มีการเลื่อนช้าออกไป (phase delay) อย่างน้อย 6 ชั่วโมงเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ ยังมีผลทำให้ปริมาณการแสดงออก (amplitude) เพิ่มขึ้นอีกด้วย สำหรับยีน *Bmal1* ซึ่งมีการแสดงออกสูงในเวลากลางวันในหนูปกติ นั้น เมื่อหนูฉีด amphetamine พบว่ารูปแบบการแสดงออกเปลี่ยนไป เช่นเดียวกับ *Per1* โดยในหนูกลุ่มควบคุมซึ่ง peak เกิดในตอนเช้า หรือเวลา 10.00 น. เปลี่ยนไปเป็น เวลา 22.00 น. นั่นคือมีการเลื่อนช้าออกไปอย่างน้อย 12 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อ amplitude ของการแสดงออก อย่างไรก็ตาม amphetamine ไม่มีผลต่อจังหวะการแสดงออกของยีน *Rev-erb alpha* ทั้งรูปแบบและปริมาณ โดย *Rev-erb alpha* จะมีการแสดงออกสูงในช่วงเวลาก่อนการเปลี่ยนจากเวลามีแสง เป็นเวลามืด ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า amphetamine มีผลควบคุมจังหวะการแสดงออกอย่างเฉพาะเจาะจงต่อ clock gene แต่ละตัว โดยอาจเป็นผลให้มีตอบสนองและแสดงออกทางด้านพฤติกรรมที่แตกต่างออกไป

สำหรับบริเวณ hippocampus นั้น *Per1* mRNA มี peak สูงตอนเวลากลางวัน ในขณะที่ *Bmal1* mRNA จะมี peak สูงในเวลากลางคืน เมื่อหนูได้รับ amphetamine 5 mg/kg ติดต่อกัน 7 วัน พบว่า amphetamine ทำให้ *Bmal1* mRNA เกิด phase shift เปลี่ยนจาก diurnal เป็น nocturnal pattern ส่วน *Per1* mRNA คงที่ไม่เปลี่ยน แต่ลดปริมาณโปรตีนลง จากการทดลองแสดงให้เห็นว่า amphetamine ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง clock gene ในบริเวณ hippocampus ซึ่งเป็นสิ่งที่น่าสนใจคือ จะเกี่ยวข้องกับ

การทำให้เปลี่ยนแปลงการเรียนรู้ การจำ เนื่องจากการใช้ amphetamine งานวิจัยนี้ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Pramong et al., Neurosci Lett., 2017 submitted) (เอกสารแนบ 4.2.41)

คณะวิจัยฯ ได้ศึกษา clock gene ควบคุม brain aging process ได้อย่างไร โดยศึกษา clock gene 4 ตัว คือ *Per1*, *Per2*, *Bmal1* และ *Rev-erba* ในหนู rat ที่มีอายุ 8 สัปดาห์, 1 ปี และ 2 ปี (ซึ่งเป็นอายุที่ชราภาพเมื่อเทียบกับมนุษย์) และ treat melatonin หนูอายุ 1 ปี และ 2 ปี จากนั้นวัด mRNA ของ clock gene 4 ชนิด บริเวณ hippocampus ของหนูทั้งกลางวันและกลางคืน ผลปรากฏว่า กลุ่มที่ treat ด้วย melatonin และที่ไม่ได้ treat ผลการวิจัยปรากฏว่า การแสดงออกของยีน *Per1*, *Per2* และ *Rev-erba* ตอนกลางวันสูงกว่าตอนกลางคืน ในขณะที่การแสดงออกของยีน *Bmal1* สูงตอนกลางคืน หนูอายุ 1 ปี *Per2*, *Bmal1* และ *Rev-erba* ยังคงมี rhythm ส่วน *Per1* ไม่แสดง rhythm เปลี่ยน เมื่ออายุ 2 ปี นั้น *Per1*, *Per2* และ *Bmal1* สูญเสีย rhythm ขณะที่ *Rev-erba* มี rhythm น้อยลง หนูได้รับ melatonin เป็นเวลา 2 เดือนตอนกลางคืน ปรากฏว่าหนู 1 ปี และ 2 ปี ที่ได้รับ melatonin การแสดงออกของ clock gene ทั้ง 2 ชนิด มี rhythm กลับคืนมาเหมือนตอนอายุ 8 สัปดาห์ ข้อมูลนี้เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่แสดงให้เห็นว่า การที่อายุมาก circadian rhythm จะสูญเสียไป ซึ่งเป็น mechanism หนึ่งในกระบวนการทำงานต่างๆ ของสมองโดยเฉพาะอย่างยิ่งการเรียนรู้ การจำ เมื่อ circadian rhythm ผิดปกติไปจะทำให้สมองทำงานผิดปกติ melatonin สามารถทำให้ circadian rhythm นั้น คงเหมือนช่วงอายุน้อย คณะวิจัยฯ ศึกษาต่อเพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไก clock gene ควบคุมการทำงานของสมองอย่างไร ทำไมอายุมากจึงสูญเสีย rhythm นั้นๆ melatonin ช่วยทำให้ rhythm ของ clock gene ของชราภาพกลับคืนสู่เหมือนตอนอายุน้อยได้หรือไม่อย่างไร ผลงานวิจัยนี้ได้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (Pramong et al., 18th TNS Conference 2014, page 59) (เอกสารแนบ 4.4.5) คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาต่อพบว่า melatonin receptor repression จะเปลี่ยนเป็นจังหวะ rhythm เวลากลางวันและกลางคืน ตอนอายุมาก rhythm นั้นก็จะหายไป การให้ melatonin สามารถปรับให้ rhythm ที่เสียไปเวลาแก่นั้นกลับคืนมาได้ งานนี้ได้นำไปเสนอที่งานประชุมวิชาการนานาชาติที่ประเทศออสเตรเลียและตีพิมพ์ Pramong et al., 2015, J Neurochem (suppl 1) page 205. (เอกสารแนบ 4.4.16) และตีพิมพ์ในวารสาร Pramong et al., 2015, J Med Assoc Thai 98 (Suppl. 9): s123-129. (เอกสารแนบ 4.2.12) นอกจากนี้คณะวิจัยฯ ยังพบว่า melatonin ยังสามารถปรับ circadian rhythm ของหนูแก่ที่ผิดปกติ เช่น *Per2* และ brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ให้กลับสู่ปกติได้ในสมองบริเวณ hippocampus ผลงานวิจัยนี้ได้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ Pramong et al., The 19th TNS Conference 2015. P. 81 (เอกสารแนบ 4.5.14) นอกจาก clock gene ต่างๆ ในผู้สูงอายุจะไม่แสดง circadian rhythm แล้ว BDNF และ neuroinflammatory marker ที่ปกติจะแสดง rhythm แต่เมื่อสูงอายุ rhythm เหล่านี้จะเสียและแสดงผิดปกติไป แต่กับหนูที่ได้รับ melatonin เป็นเวลานาน rhythm ต่างๆ เหล่านี้จะกลับสู่เหมือนในช่วงที่มีอายุน้อย ผลงานนี้ได้นำไปเสนอที่งานประชุมนานาชาติประเทศเดนมาร์ก Pramong et al., The 10th Federation of European Neuroscience Societies (FENS), July 2-6, 2016 page 3706 (เอกสารแนบ 4.4.32) ผลงานวิจัยเบื้องต้นนี้ได้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการ

ระดับชาติ Panmak et al., The 19th TNS Conference 2015. p 75 (เอกสารแนบ 4.5.10) และผลงานทั้งหมดจะเตรียมส่งตีพิมพ์ใน (Pramong et al., J Pineal Res, 2017) (เอกสารแนบ 4.2.40)

ผู้ป่วย depression จะมี pattern ของ clock gene ผิดปกติ ผู้ป่วย depression จะเป็นกลไกเหนี่ยวนำไปสู่โรค Alzheimer ได้ ดังนั้นคณะวิจัยฯ จึงได้ศึกษา *Per2* polymorphism ของผู้ป่วยซึมเศร้าเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ ซึ่งตีพิมพ์เป็น proceeding (Usama et al., 18th TNS Conference 2014, page 42-45) (เอกสารแนบ 4.3.4)

melatonin มีบทบาทสำคัญในการควบคุมขบวนการ aging โดยเฉพาะ brain aging อย่างยิ่งต่อ circadian system อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญไปบรรยายเรื่อง "Melatonin in the brain aging process" ที่งานประชุมวิชาการนานาชาติเกี่ยวกับเรื่องราวของผู้สูงอายุ บทสรุปอยู่ใน Govitrapong (2015) IAGG Meeting p. 3 (เอกสารแนบ 4.4.22)

Subproject 4. Caloric restriction, high-fat diet, aging brain and neurodegeneration

Subproject 4.1: Caloric restriction, brain aging and neurodegeneration

การได้รับอาหารที่มี calorie ต่ำ (**Caloric restriction: CR**) จะทำให้ยืดอายุขัยทั้งในพืชและในสัตว์หลายชนิดเป็นเรื่องที่รู้กันมานาน แต่กลไกเกิดขึ้นได้อย่างไร ยังไม่เป็นที่ทราบกัน melatonin เป็นฮอร์โมนที่สร้างขึ้นเองในร่างกายก็เป็นสารที่สนใจกันว่าทำให้ยืดอายุขัยเช่นกันทั้ง melatonin และการได้รับอาหารที่มี calorie ต่ำ เป็นกลไกที่เกี่ยวข้องกับ energy mechanism, sirtuins (โดยเฉพาะ Sirtuin 1 = Sirt₁) เป็นเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ epigenetic FoXO₁ และ FoXO_{3a} ซึ่งเป็น Sirt₁ target gene ทำหน้าที่ควบคุม neuronal homeostasis โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ hippocampus เกี่ยวข้องกับ apoptosis และ survival ซึ่ง Sirt₁ ควบคุม aging และ neurodegenerative process คณะวิจัยฯ ได้รวบรวมข้อมูลต่างๆ เหล่านี้และได้ตีพิมพ์ใน Jenwitheesuk et al., Int J Mol Sci, 22 (2014): 16848-84 (เอกสารแนบ 4.2.1) และงานวิจัยนี้ได้ทำร่วมกับ Professor Shimokawa ที่ Nagasaki University ประเทศญี่ปุ่น โดย น.ส.อโนรัตน์ เจนวิทีสุข นักศึกษาปริญญาเอกหลักสูตร Neuroscience ได้รับทุน Goho Life Science International Fund ไปทำวิจัยส่วนหนึ่งที่ประเทศญี่ปุ่น ได้ผลงานวิจัยดังนี้

กลุ่มที่ 1 หนู mice young (6 เดือน)

กลุ่มที่ 2 หนู mice old (19 เดือน) – treat ด้วย vehicle

กลุ่มที่ 3 หนู mice old (19 เดือน) – treat ด้วย melatonin 10 mg/kg เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มที่ 4 หนู mice (CR) ได้รับอาหาร calories ต่ำ (Charles River LPF diet) – treat ด้วย vehicle

กลุ่มที่ 5 หนู mice (CR) ได้รับอาหาร calories ต่ำ (Charles River LPF diet) – treat ด้วย melatonin 10 mg/kg ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน

กลุ่มที่ 6 หนู mice (NPY) ที่ knockout NPY treat ด้วย vehicle

กลุ่มที่ 7 หนู mice (NPY) ที่ knockout NPY treat ด้วย melatonin 10 mg/kg ทุกวัน เป็นเวลา 10 วัน

หนูถูก sacrifice และ dissect hippocampus จากนั้น hippocampus จากสมองหนู วัดระดับ mRNA ของ Sirt₁, FoXO₁ และ FoXO_{3a} วัด cell cycle gene (p21, p27) วัด gene เกี่ยวกับ apoptosis (Nrf₂) modulator ของ FoXO_{3a} (Wisp₁) ได้ผลสรุปดังนี้

หนูแก่ มี mRNA Sirt₁ ต่ำกว่าหนู young และ หนู young ไม่ว่าจะเป็น CR หรือ treat ด้วย melatonin ไม่มี Sirt₁ ที่แตกต่างกัน ส่วนหนูแก่ที่ treat ด้วย melatonin หรือให้อาหาร CR จะเพิ่มระดับ Sirt₁

ส่วนหนูแก่ มีระดับ FoXO₁ mRNA ลดลง เมื่อหนูแก่ treat ด้วย melatonin หรือ CR จะเพิ่มระดับ FoXO₁ mRNA

FoXO_{3a} ก็เช่นเดียวกันกับ FoXO₁

หนูแก่ได้รับ melatonin หรือ CR จะเพิ่ม p27

Nrf₂: หนู young และ หนูแก่ มี Nrf₂ เท่ากัน

หนู young ที่ได้รับ melatonin (high dose) หรือ CR + melatonin (low dose) จะเพิ่ม Nrf₂

หนูแก่ถ้าได้รับ melatonin (low dose) หรือ CR, CR + melatonin (high dose) จะเพิ่ม Nrf₂

Wisp₁: หนู young และ หนูแก่ ไม่แตกต่างกัน

หนูแก่ได้รับ melatonin หรือ CR, CR + melatonin จะเพิ่มปริมาณ Wisp₁ mRNA

สรุป หนูแก่เมื่อได้รับอาหารที่มี calorie ต่ำ หรือได้รับ melatonin จะปรับเปลี่ยน Sirt₁, FoXO, Nrf₂, p21, p27, Wisp₁ แสดงว่ากลไกการเปลี่ยนของ CR และ melatonin นั้นจะ share ด้วยกลไกที่เหมือนกัน ดังนั้นทั้ง CR หรือ melatonin จะช่วยทำให้อายุขัยยืนยาวขึ้นโดยผ่าน Sirt₁, FoXO เหมือนกันและไม่มี synergistic effect ส่วนหนูที่ Knockout NPY จะมีระดับของ Sirt₁, FoXO₁, FoXO₃, p27 และ wisp1 ลดลงต่ำกว่ากลุ่มหนูแก่ treat หนูด้วย 10 mg/kg melatonin ไม่สามารถช่วยเพิ่มระดับโปรตีนเหล่านี้ได้ แสดงว่า NPY มีบทบาทสำคัญต่อขบวนการนี้ ผลงานวิจัยนี้ได้เตรียมส่งตีพิมพ์ใน (Jenwitheesuk et al., Neurochem Res, 2017) (เอกสารแนบ 4.2.34)

คณะวิจัยฯ ศึกษาวิจัยเรื่องนี้ต่ออีก

ผลของเมลาโทนินในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูแก่ผ่าน การทำงานของ FoxO1 (The effects of melatonin in aging mouse hippocampus : involvement with FoxO1 pathway)

ฮิปโปแคมปัสเป็นสมองที่พบการเสื่อมตามอายุและเป็นส่วนสำคัญในเกิดภาวะหลงลืมในผู้สูงอายุ งานวิจัยนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาผลของเมลาโทนินต่อการทำงานของสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในหนูแก่โดยศึกษาผลของเมลาโทนินต่อ FoxO1 pathway ซึ่งเป็น pathway ที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันการทำลายเซลล์สมอง พบว่าเมื่อให้เมลาโทนินแก่หนูแก่ เมลาโทนินมีผลเพิ่มการแสดงออกของตัวแปรที่ป้องกันการทำลายของเซลล์สมอง ได้แก่ Sirtuin1, FoxO1, และ Beclin1 และลดตัวแปรที่เกี่ยวข้องกับกลไกการตายของเซลล์สมอง ได้แก่ p53, mdm2 และ Dkk1 ผลงานวิจัยนี้เสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ Jenwitheesuk et al., The 19th TNS Conference 2015. P. 76 (เอกสารแนบ

4.5.11) และได้ส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Jenwitheesuk et al., 2017, EXCLI J, accepted) (เอกสารแนบ 4.2.29)

Subproject 4.2 : High fat diet and brain aging and neurodegeneration

การได้อาหารที่มีปริมาณไขมันสูงจะทำให้สัตว์ทดลองเกิด insulin resistance ซึ่งจะพัฒนาเป็นโรคเบาหวาน type 2 และทำให้เกิดสมองเสื่อมลดการเรียนรู้ การจำ คณะวิจัยฯ ได้รวบรวมข้อมูลจากแหล่งต่างๆ ดังในเอกสาร Jenwitheesuk et al., Int J Mol Sci, 22 (2014): 16848-16884 (เอกสารแนบ 4.2.1) คณะวิจัยฯ ได้ตั้งสมมติฐานดังนี้ 1.สมองบริเวณ hippocampus จะมีเซลล์ตายและไม่สร้างเซลล์ใหม่ 2.สมองบริเวณ hippocampus จะเกิดความผิดปกติของ circadian rhythm ทั้งนี้ป้องกันแก้ไขได้ด้วยการได้รับ melatonin โดยมีโครงการวิจัย ดังนี้

4.2.1 Melatonin prevents decrease in hippocampal neurogenesis in high fat diet and streptozotocin-treated rats

ใช้หนู rat อายุ 8 สัปดาห์ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 control (ให้อาหารปกติ)

กลุ่มที่ 2 high fat + STZ (ให้อาหารไขมันสูง + STZ single dose หลัง 1 สัปดาห์, treat ด้วย vehicle เป็นเวลา 6 สัปดาห์)

กลุ่มที่ 3 high fat + STZ + melatonin (ให้อาหารไขมันสูง + STZ single dose หลัง 1 สัปดาห์ treat ด้วย 10 mg/kg melatonin ทุกวัน เป็นเวลา 6 สัปดาห์)

กลุ่มหนึ่งให้อาหารปกติ อีกกลุ่มให้อาหารที่มีปริมาณไขมันสูง เป็นเวลา 6 สัปดาห์ ตรวจระดับ glucose ในเลือด พบว่าหนูมีระดับ glucose สูงขึ้นมาก เป็นกลุ่ม hyperglycemia หนูกลุ่มหนึ่งฉีด melatonin 10 mg/kg ทุกวันจนครบ 6 สัปดาห์ เมื่อเวลา 4 สัปดาห์ ฉีด 40 mg/kg STZ เมื่อครบ 6 สัปดาห์ นำหนูมาทดสอบ learning memory โดยวิธี Morris Water Maze ปรากฏว่าหนูกลุ่มที่ได้รับ high fat + STZ การเรียนรู้และการจำจะลดลง impair spatial memory ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับ melatonin การเรียนรู้ของหนูจะกลับคืนเท่ากับหนูที่ไม่ได้รับอาหาร high fat + STZ จากนั้นคณะวิจัยฯ ได้ศึกษาต่อโดยนำหนูถูกฆ่าแล้ว dissect hippocampus วัดระดับ double cortin (immature neuron) nestin (marker ของ neuron) พบว่า neurogenesis marker ของหนูกลุ่มที่ได้อาหาร high fat + STZ ลดลง melatonin ป้องกันการลดลงกลับสู่ระดับปกติ synaptophysin (pre-synaptic marker) PSD95 (post-synaptic marker) ลดลง melatonin ช่วยป้องกันกลับสู่ระดับปกติ IR- β (insulin receptor β subunit) IR- α (insulin receptor α subunit) ลดลง p-ERK, MT₁, MT₂ receptor ลดลง melatonin ช่วยป้องกันยับยั้งการลดลง melatonin ช่วยป้องกันการลดลงของ neurogenesis ป้องกันการลดลงของ synaptogenesis ทั้งนี้ผ่าน insulin receptor ส่วน melatonin ออกฤทธิ์ผ่าน melatonin receptor ผลงานวิจัยนี้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติเป็น proceeding (Lansubsakul et al, 18th TNS Conference 2014, page 37-41) (เอกสารแนบ 4.3.3) และเสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ Lansubsakul et al., The 19th

TNS Conference 2015. page 72 (เอกสารแนบ 4.5.8) เพื่อที่จะศึกษา function ได้ศึกษา NMDA receptor subunit ซึ่งเป็น functional unit ของ hippocampus จากผลการวิจัยพบว่า หนู (high fat + STZ) ลดระดับของ NR2A ส่วน NR2B เพิ่มขึ้น และลดระดับ CamKII ดังนั้นโปรตีนที่เปลี่ยนไปนั้น เมื่อ treat ด้วย melatonin ระดับโปรตีนจะเปลี่ยนกลับเหมือนกลุ่ม control ผลงานนี้ได้รับตีพิมพ์ใน Wongchitrat et al., Neurochem Int 2016,100:97-109 (เอกสารแนบ 4.2.23) model นี้คณะวิจัยกำลังจะศึกษาต่อว่ามีผลที่ทำให้พัฒนาเป็น Alzheimer's disease และ brain aging หรือไม่ อย่างไร เมลาโทนิныับยั้งได้อย่างไร

เนื่องจากโรคเบาหวานมักจะถูกพัฒนาเกิดอีกโรคคือโรคสมองเสื่อม Alzheimer's disease จากข้อมูลข้างต้นพบว่า high fat + STZ ทำให้เกิด hyperglycemia เกิดการสูญเสียความจำ melatonin สามารถป้องกันยับยั้งได้ คณะวิจัย ได้นำ model นี้มาศึกษาต่อโดย treat หนู rat ด้วย STZ และ STZ + melatonin และทดสอบ memory test จากนั้น dissect สมองหนูบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex แล้วศึกษาเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ APP cleaving enzyme ที่ทำให้เกิด amyloid beta ($A\beta$) ซึ่งเป็น hall mark ของโรค Alzheimer (รายละเอียดจะได้กล่าวในบทที่ศึกษา Alzheimer ใน Subproject 6) ผลงานวิจัยเบื้องต้นพบว่า หนูกลุ่ม hyperglycemia มีเอ็นไซม์ β -secretase เพิ่มขึ้น ส่วน α -secretase ลดลง ซึ่งจะทำให้เกิด $A\beta$ ซึ่งเป็น marker ของ AD ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับ melatonin นั้น melatonin สามารถทำให้เอ็นไซม์กลับสู่ปกติได้ นี่เป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สำคัญมากเพื่อพิสูจน์ว่าโรคเบาหวานอาจพัฒนาไปเป็นโรค Alzheimer ได้อย่างไร ขณะนี้นักศึกษาปริญญาเอกกำลังวิจัยอยู่ ข้อมูลเบื้องต้นแสดงให้เห็นว่า หนูที่เป็น hyperglycemia การเรียนรู้ การจำ จะแย่ลง เมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม control ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับ melatonin ความสามารถในการเรียนรู้จะดีเท่ากับหนูกลุ่ม control แสดงให้เห็นว่า hyperglycemia มีผลกระทบต่อการเรียนรู้ เมื่อนำสมองส่วน hippocampus ของหนูในกลุ่มต่างๆ มาทดสอบ อยู่ใน manuscript ของ Kamsrijai et al. (2017, in preparation) (เอกสารแนบ 4.2.37)

4.2.2 Effect of melatonin on clock gene and metabolic gene expression in hippocampal of high fat-diet and STZ-treated rats

เพื่อจะพิสูจน์ว่าสมองที่ได้รับอาหารที่มีไขมันสูงจนพัฒนาเป็นโรคเบาหวานนั้นและทำให้เกิดโรคสมองเสื่อม และอาการอื่นๆ นั้น เนื่องจากเกิดการเปลี่ยนแปลงกระทบต่อ circadian rhythm melatonin สามารถป้องกันการเปลี่ยนแปลงนี้ ดังนั้นคณะวิจัย จึงได้ทดสอบระดับ mRNA ของ *Per1*, *Per2*, *Bmal1*, *Rev-erba* และ *Sirt*, ปรากฏว่ากลุ่ม high fat สมองบริเวณ hippocampus จะเพิ่มระดับ *Per2* และ *Bmal1* melatonin สามารถช่วยป้องกันให้ *Per2* ลดลงเป็นระดับปกติ ส่วน *Rev-erba* ลดลงในกลุ่ม high fat ที่น่าสนใจคือ *Sirt*, ในกลุ่ม high fat เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ melatonin สามารถป้องกันการเพิ่มขึ้นนี้ไปสู่เท่าระดับ control ผลงานนี้แสดงให้เห็นว่า high fat-STZ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับ clock gene และ *Sirt*, ซึ่งอาจเป็นกลไกที่สำคัญอันหนึ่งที่สมองเกิดการพัฒนาไปเป็นโรคสมองเสื่อมใน high fat-STZ หรือผู้ป่วยโรคเบาหวานได้ ผลงานวิจัยนี้เสนอผลงานในงานประชุมวิชาการระดับชาติ

Chanakamchokcharoen et al., The 19th TNS Conference 2015. page 65 (เอกสารแนบ 4.5.1) และ Tangyen et al., The 19th TNS Conference 2015. page 70 (เอกสารแนบ 4.5.6) และตีพิมพ์ใน Wongchitrat et al., Neurochem Int 2016,100:97-109 (เอกสารแนบ 4.2.23)

4.2.3 Melatonin prevents calcium-induced calpain activation in high glucose toxicity in SH-SY5Y cells

เพื่อที่จะพิสูจน์ต่อว่าในขณะปริมาณที่มี glucose สูง นั้นจะทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ประสาท)ดังเช่นในโรคเบาหวาน (คณะวิจัยฯ ได้ใช้ neuroblastoma SH-SY5Y cell line โดยเฉพาะเลี้ยงในอาหารที่มี high glucose พบว่า high glucose ทำเซลล์ประสาทตายได้ melatonin สามารถป้องกันการตายของเซลล์ high glucose ทำให้เพิ่ม calpain ขึ้น melatonin ป้องกันการตายของเซลล์ประสาท โดยผ่านการยับยั้งการเพิ่มขึ้นของ calpain แสดงว่า Ca-binding protein มีบทบาทเกี่ยวกับ high fat ทำให้เซลล์ประสาทเสื่อม ข้อมูลเบื้องต้นนี้สามารถนำไปพิสูจน์และพัฒนาไปสู่ความเข้าใจ high fat, high glucose และโรคเบาหวาน ทำให้เกิดสมองเสื่อมเกิดโรคสมองเสื่อม เช่น Alzheimer ได้ ข้อมูลเบื้องต้นได้นำไปเสนอและตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Sirisuwat et al., 18th TNS-CU-NIPS Symposium 2014, p. 60) (เอกสารแนบ 4.4.12) และ (Burushnareerat et al., 18th TNS-CU-NIPS Symposium 2014, p. 61) (เอกสารแนบ 4.4.13)

4.2.4 เปรียบเทียบ effect ของ melatonin ต่อ autophagy ใน high glucose ของ SH-SY5Y cell line กับกลุ่ม hyperglycemia บริเวณ hypothalamus

ผลของเมลาโทนินต่อยีน Sirt1 ที่กระตุ้นกระบวนการ autophagy ผ่านการยับยั้งของ RelA/p65 ในกระบวนการอักเสบของเซลล์ SH-SY5Y

ความชราทำให้ฟังก์ชันทางสรีรวิทยาที่นำไปสู่การตายของเซลล์ โดยกระบวนการ autophagy เป็นเส้นทางที่สำคัญสำหรับการย่อยสลายโมเลกุลกลุ่มของ cytosolic ผิดปกติอย่างหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความชรา ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ Sirtuin1 (SIRT1) ในการเพิ่มอัตราการอยู่รอดของเซลล์ผ่านการ deacetylation ใน relA/ p65 ซึ่งเป็นหน่วยย่อยของ NF-KB นอกจากนี้เมลาโทนินซึ่งเป็นฮอร์โมนที่หลั่งจากต่อมไพเนียลและสามารถช่วยในการอยู่รอดของเซลล์ อาจผ่านการควบคุมของ SIRT1 อีกด้วย เพราะฉะนั้นการศึกษาครั้งนี้จึงต้องการศึกษาผลของเมลาโทนินต่อ autophagy ผ่านทางเดินสัญญาณ Sirtuin1 ซึ่งถูกกระตุ้นให้อยู่ในภาวะความชรา (aging) ด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ใน SH-SY5Y เซลล์ ผลการทดลองของเราแสดงให้เห็นว่าในเซลล์ SH-SY5Y ที่ให้ H₂O₂ นั้น เมลาโทนินสามารถเพิ่มระดับโปรตีน SIRT1, Beclin1 และ LC3-II ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญของกระบวนการ autophagy ในขณะที่ระดับของ acetylated-Lys310 ที่ p65 ก็ลดลงอีกด้วย นอกจากนี้เมลาโทนินสามารถลดจำนวนเซลล์แก่ที่ย้อมติดสีฟ้าของ เบต้า galactosidase (SA-βgal) ซึ่งเป็นเครื่องหมายเซลล์ senescent อย่างหนึ่ง นอกจากนี้ผลการทดลองได้รับการแสดงให้เห็นว่าเมื่อยับยั้งการทำงานของ

Sirtuin1 ผลจะเป็นไปในทางตรงกันข้าม ซึ่งแสดงให้เห็นว่า เมลาโท닌สามารถเพิ่มการทำงานของกระบวนการ autophagy ผ่าน SIRT1 ในการที่ช่วยชลอความแก่ของเซลล์ได้อีกด้วย) ผลงานวิจัยนี้ได้นำไปเสนอและตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติ (Nopparat et al., 19th TNS Conference 2015, p. 74) (เอกสารแนบ 4.5.9) ได้ส่งตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติที่มี impact factor สูง 9.3 (Nopparat et al., 2017, J Pineal Res, in press) (เอกสารแนบ 4.2.32)

นอกจากนี้ คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษา effect ของ melatonin ต่อ high glucose ใน neural cell (SH-SY5Y) พบว่า high glucose ทำให้เซลล์ประสาทตายได้ โดยที่ high glucose ไปลด LC3-II เพิ่ม p-mTOR และลด AMPK γ 3 ซึ่งเป็น metabolic regulator ที่สำคัญ ถ้า treat ด้วย melatonin แล้ว melatonin สามารถยับยั้งและป้องกันการเปลี่ยนที่เกิดขึ้นนี้ effect เหล่านี้ คณะวิจัยฯ ยังนำมาศึกษาในหนูที่ได้รับ high fat + STZ จนทำให้เกิด hyperglycemia ก็เกิดปรากฏการณ์เหมือนใน cell line ดังนั้นจากผลงานวิจัยนี้ทำให้ทราบว่า melatonin มีความสัมพันธ์กับเรื่อง autophagy และ effect ของ melatonin ในการป้องกันการเกิด neurotoxicity จาก high glucose อาจเนื่องจากโรคเบาหวาน melatonin จะมีส่วนในการยับยั้ง toxicity ที่เกิดที่สมองได้ ภาวะอ้วนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนในหลายส่วนของร่างกายซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งของการเกิดโรคเรื้อรังหลายชนิด จากการทดลองให้อาหารที่มีปริมาณไขมันสูงแก่หนู พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีนในเลือด ซึ่งโปรตีนที่พบทั้งหมดเป็นโปรตีนที่สร้างจากตับและเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพต่อตับ เมื่อให้สารเมลาโท닌ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีประสิทธิภาพ เป็นระยะเวลาต่อเนื่อง 6 สัปดาห์ พบว่าเมลาโท닌สามารถช่วยปรับระดับโปรตีนที่ผิดปกติไปในเลือดให้กลับมาสู่ปริมาณปกติเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังนั้นเมลาโท닌อาจเป็นทางเลือกในการลดความรุนแรงหรือความผิดปกติที่อาจเกิดจากภาวะอ้วนจากการได้รับอาหารไขมันสูงก็เป็นได้ ผลงานวิจัยนี้จะตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Wongchitrat et al., Proteomics (2017, accepted) (เอกสารแนบ 4.2.33)

Subproject 5: Neural stem cell

Subproject 5.1. Effect of melatonin (positive factor) in neuronal stem cell proliferation/differentiation

เซลล์ประสาทในบริเวณ subventricular zone และ subgranular ของ dentate gyrus บริเวณหนึ่งของ hippocampus มีการสร้างเซลล์ประสาทขึ้นใหม่ เซลล์ประสาทนี้สามารถ differentiate ไปเป็น neuron หรือ glial cell ได้ neurogenesis จะเกิดขึ้นเรื่อยๆ ในสมองของผู้ใหญ่ แต่จะลดลงเมื่ออายุมากขึ้น ยังไม่มีใครทราบว่า มีปัจจัยอะไรมาควบคุม neurogenesis สิ่งที่น่าสนใจตั้งสมมติฐาน คือ ปัจจัยที่มาจากสิ่งแวดล้อม สิ่งกระตุ้น และประสบการณ์ต่างๆ growth factor ต่างๆ เช่น BDNF IGF-I และการลด oxidative stress ดังนั้นกลุ่มวิจัยจึงได้ศึกษาโดย dissociate สมองของหนู mice บริเวณ subventricular zone และได้ neural stem cell มา culture ซึ่งเซลล์นี้ตรวจสอบว่าเป็น neural stem cell สามารถเลี้ยงต่อเป็น passage ต่างๆ ได้ เมื่อใส่ melatonin ความเข้มข้นต่างๆ พบว่า melatonin สามารถเพิ่มปริมาณของ neurosphere ได้อย่างมีนัยสำคัญ ทางสถิติ และตาม

concentration dependence ขนาดของ neurosphere เพิ่มขึ้นด้วย เพื่อที่จะพิสูจน์ว่า effect ของเมลาโทนินที่เพิ่มการสร้างปริมาณ precursor cell นั้นขึ้นกับ melatonin receptor หรือไม่ ดังนั้นจึงใส่ luzindole ซึ่งเป็น melatonin receptor antagonist พบว่า luzindole ยับยั้งฤทธิ์ของเมลาโทนินและ effect ของเมลาโทนินยังยับยั้งได้ด้วย PTX สารที่จะทำให้ G-protein uncouple กับ receptor ผลแสดงว่า effect ของเมลาโทนินนี้เกิดผ่าน melatonin receptor MT₁ ซึ่ง couple G-protein และ MT₁ receptor นี้จะ co-localized กับ proliferative marker Ki67 เมลาโทนินเพิ่มปริมาณ neurosphere มากที่สุดที่ passage 2 และเมลาโทนินจะเพิ่มปริมาณ MT₁ receptor ที่ passage 1,2,3 ส่วนที่ passage 4, MT₁ receptor จะมีปริมาณเท่ากับกลุ่ม control เมื่อนำ neurosphere นี้มา differentiate ปกติแล้ว neural stem cell จะ differentiate เป็น neuron และ glia เมื่อนำ neurosphere มา incubate กับเมลาโทนิน 1 μ M พบว่า เพิ่ม neurosphere จะเพิ่มการ differentiate ไปเป็น neuron (β III-tubulin เป็น marker) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ไม่เพิ่มปริมาณ glia (GFAP เป็น marker) ยิ่งกว่านั้น MT₁ receptor จะ co-express ด้วยกันกับ β III-tubulin เมลาโทนินเพิ่ม β III-tubulin immunopositive cell ในขณะที่ปริมาณ immunopositive GFAP cell คงที่ แสดงว่าเมลาโทนินจะ differentiate neurosphere ไปเป็น neuron เพิ่มขึ้น ขณะที่ differentiate ไปเป็น glia cell เท่าเดิม และเมลาโทนินยังเพิ่มปริมาณของ MT₁ receptor ข้อมูลเหล่านี้มีความสำคัญมาก กลุ่มวิจัยกำลังพิสูจน์และศึกษา mechanism ให้ลึกซึ้ง เพื่อจะเป็นข้อมูลสำคัญในการนำ neural stem cell นี้มาศึกษาพิสูจน์เพื่อนำไป transplant เข้าไปในสมองที่มีปัญหาเซลล์ประสาทเสียไป เช่น กรณีของ Parkinson กรณีของ Alzheimer ผลงานนี้นับว่าสำคัญกลุ่มวิจัยจะวิจัยต่อกันอีก คณะผู้วิจัยได้ศึกษาเพิ่มเติมว่ากระบวนการที่เกิดขึ้นนี้มีความเกี่ยวข้องกับ signaling molecule ตัวใดเพื่อเป็นการต่อยอดและทำให้การศึกษานี้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น เปรียบเทียบความสามารถในการเพิ่มจำนวนเซลล์โดยนับจำนวน neurosphere เทียบ melatonin เป็น growth factor อื่น EGF และ bFGF ปรากฏว่า melatonin สามารถเพิ่มจำนวน neurosphere ได้มากกว่า EGF และ EGF + bFGF และถ้าให้ melatonin + EGF + bFGF จะเพิ่มจำนวน neurosphere มากขึ้น แสดงว่า melatonin ไป synergistic effect ต่อ EGF + bFGF ศึกษาต่อพบว่า melatonin ไปเพิ่ม pERK1/2 และ p-c-Myc การทดลองนี้คณะวิจัย ได้ทำการทดลองใน *in vivo* ก็พบว่า melatonin สามารถกระตุ้นและเพิ่มการแสดงออกของ pERK1/2 และ p-c-Myc นอกจากนี้คณะวิจัย ยังได้ทดสอบโดยใช้ inhibitor ของ MEK1/2 (U0126) และ inhibitor ของ melatonin receptor (luzindole) เพื่อพิสูจน์ว่า effect ของ melatonin ต่อการเพิ่มปริมาณ neural stem cell เกิดผ่าน melatonin receptor ซึ่งส่งผลต่อ ERK/MAPK signaling ทำให้กระตุ้น G1 และ S phase progress ของ cell cycle ผลงานนี้ชี้ให้เห็นว่า melatonin มีความสามารถในการกระตุ้นการสร้าง neuron ใหม่ กลไกมีความคล้ายคลึงกับ growth factor ดังนั้นจึงสามารถนำมาพัฒนาต่อเพื่อเพิ่มการสร้างเซลล์ในกรณีของเสื่อมและ neuron ชราภาพได้ ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Sotthibundhu et al., . EXCLI J. 2016, 15:829-841 (เอกสารแนบ 4.2.24)

กลุ่มวิจัยยังได้ศึกษา stem cell บริเวณ hippocampus ซึ่งเป็นบริเวณของสมองที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวกับ learning & memory โดยเฉพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดประสาทและเซลล์ตั้งต้นประสาท

neural stem cell / progenitor cell จากสมองส่วน hippocampus ของหนู rat พบว่าเมลาโท닌สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและก่อตัวเป็น neurosphere ได้มาก นอกจากนี้การวิจัยนี้พบว่า melatonin เพิ่ม phospho-ERK ในขณะที่ amphetamine นั้น ลด p-ERK และลด neurogenesis p-ERK ซึ่งเป็น kinase ที่เกี่ยวข้องโดยไป couple กับ melatonin receptor เป็นกลไกหนึ่งนำไปสู่การกระตุ้น cellular proliferation การเพิ่มขึ้นของ neurogenesis โดยเมลาโท닌บริเวณ hippocampus นั้นยังผ่าน signaling pathway ของ phospho-c-Raf, phospho-c-myc อีก ผลงานนี้ได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Tocharus et al., Neuroscience, 2014, 275:314-321 (เอกสารแนบ 4.2.2) ผลงานวิจัยนี้ได้รับความสนใจมากภายในเวลาไม่กี่เดือนที่ตีพิมพ์มีคน download อ่านมากมาย

Subproject 5.2. Effect of $A\beta_{1-42}$ in neuronal stem cell proliferation/differentiation

$A\beta_{1-42}$ เป็น amyloid protein ที่เกิดขึ้นในสมองของผู้ป่วย Alzheimer เป็นที่เข้าใจกันว่า protein เป็นสาร toxic ทำลายเซลล์ประสาทโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ hippocampus ซึ่งเป็นสมองส่วนที่ควบคุมการเรียนรู้ การจำ และเป็นสมองส่วนที่มีการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ คณะวิจัยฯ จึงตั้งสมมติฐานว่า $A\beta_{1-42}$ จะทำลายยับยั้งการสร้าง neural stem cell ส่วน melatonin สามารถยับยั้งการ inhibition นี้ จากการทดสอบเบื้องต้นโดย isolate neural stem cell จากบริเวณ SVZ และ SGZ แล้วใส่ $A\beta_{1-42}$ ใน neural stem cell culture พบว่า $A\beta_{1-42}$ ลดจำนวน neurosphere อย่างมีนัยสำคัญ ส่วน stem cell กลุ่มที่ใส่ melatonin ก่อนตามด้วย $A\beta_{1-42}$ พบว่าจำนวน neurosphere เท่ากลุ่ม control แสดงว่า melatonin สามารถช่วยยับยั้ง $A\beta_{1-42}$ ในการทำลาย neural stem cell ขณะนี้โครงการวิจัยนี้กำลังดำเนินการต่ออยู่ ข้อมูลเบื้องต้นได้นำไปเสนอและตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Boontem et al., 18th TNS-CU-NIPS Conference 2014, page 56) (เอกสารแนบ 4.4.2) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจเฉพาะอย่างยิ่งว่า $A\beta_{1-42}$ ไปลดการสร้าง neural stem cell ได้อย่างไร

Subproject 5.3. Effect of amphetamine (negative factor) on neuronal stem cell proliferation/differentiation

1. To determine whether amphetamine can inhibit proliferation/differentiation of neural precursor cells from adult rat SGZ
2. To determine whether melatonin is able to protect amphetamine –induced alteration of neural stem cell proliferation/differentiation

จากผลงานวิจัยก่อนหน้านี้คณะวิจัยฯ ได้ศึกษาเกี่ยวกับ amphetamine พบว่า amphetamine ทำลายเซลล์ประสาทโดยเฉพาะ dopamine cell โดยผ่านกลไกต่างๆ การทำลาย dopamine cell บริเวณ nigrostriatum จะเหมือนกับโรคสมองเสื่อมแบบ Parkinson คณะวิจัยฯ ได้ตั้งสมมติฐานจากข้อมูลเบื้องต้นพบว่า amphetamine จะทำลายเซลล์ประสาทบริเวณ hippocampus ด้วย ซึ่งเป็นบริเวณสมองควบคุมการเรียนรู้ การจำ และเป็นบริเวณที่มีการสร้าง neural stem cell ดังนั้นการทดลองใน subproject นี้ จึงได้ให้นักศึกษาปริญญาเอกที่ isolate stem cell บริเวณ hippocampus ซึ่งตีพิมพ์แล้ว

ใน Neuroscience ทดสอบฤทธิ์ของ methamphetamine ต่อ neural stem cell ใน culture ข้อมูลงานวิจัยนี้พบว่า methamphetamine ไปลดการ proliferation ของ neural stem cell ที่เตรียมจาก hippocampus ของ rat การลดการแบ่งตัวของ neural stem cell นี้ขึ้นกับ dose ของ methamphetamine ถ้าให้เมลาโทนิน 1 μ M สามารถจะยับยั้งฤทธิ์ของ methamphetamine ได้ การทดลองนี้ได้พิสูจน์อีกโดยใช้ marker ของ proliferation คือ Ki 67 และ nestin (สำหรับ neuron) ก็ได้ผลชัดเจนว่า methamphetamine ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ stem cell เมลาโทนินยับยั้งได้ การที่ methamphetamine ลดการแบ่งตัวของ neural stem cell เพราะ methamphetamine ไปยับยั้ง cell cycle inhibitor ต่างๆ เช่น p53 p21 และเมลาโทนินยับยั้งได้ดี จากการยับยั้งการแบ่งตัวของ stem cell ทำให้ methamphetamine ไปลด neurogenesis โดยใช้ marker ต่างๆ ดังนี้ nestin, β III-tubulin, double cortin เมลาโทนินสามารถยับยั้งผลเหล่านี้ได้ นอกจากนี้ methamphetamine ยังไปเพิ่มการสร้าง astrocyte โดยมี marker ที่สำคัญคือ GFAP แสดงว่าให้เห็นว่า methamphetamine จะนำไปสู่การเกิด astrocytosis ได้ เมลาโทนินสามารถยับยั้งได้ดี

ผลจากการ inhibit neurogenesis สมองบริเวณ hippocampus นี้ ซึ่งเป็นสมองที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเรียนรู้ การจำ และ target ที่สำคัญคือ glutamate receptor NR2A แต่เพิ่ม NR2B ปกติแล้ว NR2A และ NR2B ซึ่งเป็น subunit ของ glutamate receptor นี้จะทำงานตรงกันข้าม methamphetamine ยังไปลด CamKII ซึ่งเป็น signaling molecule ที่ couple กับ glutamate receptor ส่งผลไปทำให้เกิดการเรียนรู้ เช่น LTP นอกจากนี้ methamphetamine ยังไปลด melatonin receptor MT₁/MT₂ เมลาโทนินป้องกันการทำลายของ methamphetamine ต่อ hippocampus นั้นโดยผ่าน melatonin receptor ผลการวิจัยชิ้นนี้มีความสำคัญมาก ทำให้แน่ใจว่าถ้าเสพสารเสพติด methamphetamine จะทำลาย hippocampus ผลงานวิจัยนี้ส่วนหนึ่งนำไปเสนอและตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ (Ekthuwapranee et al., 18th TNS-CU-NIPS Symposium 2014, page 55) (เอกสารแนบ 4.4.1) และนำไปเสนอและตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับนานาชาติ ณ ประเทศออสเตรเลีย ตีพิมพ์ใน Ekthuwapranee and Govitrapong, 2015, J Neurochem (suppl 1) page 178 (เอกสารแนบ 4.4.15) และผลงานฉบับเต็มได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Ekthuwapranee et al., J Pineal Res 2015, 58:418-428. IF = 9.6) (เอกสารแนบ 4.2.6) นอกจากพิสูจน์ผลของ methamphetamine (METH) ในหลอดทดลอง (*in vitro*) โดยการเพาะเลี้ยง neural stem cell แล้ว คณะวิจัย ยังได้ศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ก็พบว่าหนู mice ที่ treat ด้วย METH เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ทำให้เกิดการลดลงของ neurogenesis บริเวณ hippocampus เช่นมีการลดลงของ nestin, β -III tubulin, doublecortin เพิ่มระดับ GFAP และมีการลดลงของ signaling molecule เช่น p-c-Raf, p-ERK1/2 และ p-c-Myc มีการลดลงของ glutamate receptor NR2A, CamKII และเพิ่ม NR2B เมื่อ treat หนูด้วย melatonin 10 mg/kg พบว่าความผิดปกติ เช่น neurogenesis และ glutamate receptor กลับสู่ค่าปกติ งานชิ้นนี้ศึกษาโดยนักศึกษาปริญญาเอก คปก. และได้ตีพิมพ์ใน Singhakumar et al. Neurosci.Lett. 2015, 606:209-214 (เอกสารแนบ 4.2.10) คณะวิจัย ได้สรุปผลงานวิจัยเกี่ยวกับ effect ของเมลาโทนินต่อ neurogenesis และ neurodegeneration ซึ่งตีพิมพ์เป็น review article ใน

หนังสือเป็น book chapter โดย Singhakumar et al., Chapter 4 (2015, Nova Science Publishers, New York, page 143-164) (เอกสารแนบ 4.1.1) ขณะนี้นักศึกษาปริญญาเอกอีกคน คือนางสาว ปัทมาได้พิสูจน์อีกว่าหนูที่ได้รับ METH จะสูญเสียความจำ (memory impairment) แต่เมื่อ pretreat ด้วย melatonin ทำให้หนูมีความทรงจำกลับคืนมาได้ ขณะนี้กำลังศึกษาต่ออีกว่าบริเวณ hippocampus เปลี่ยนแปลงอย่างไร ข้อมูลเบื้องต้นอยู่ใน Panmak et al., 2017 (เอกสารแนบ 4.2.39)

Subproject 5.4. Effect of dexamethasone (negative factor) on neuronal stem cell proliferation/differentiation

Experimental plan

1. To determine whether dexamethasone (**stress hormone**) can inhibit proliferation/differentiation of neural precursor cells from adult rat SGZ
2. To determine whether melatonin is able to protect dexamethasone –induced alteration of neural stem cell proliferation/differentiation

จากงานวิจัยก่อนหน้านี้โดยคณะวิจัยฯ ที่พิมพ์แล้วในวารสาร Tongjaroenbuangam et al., J Neurochem Int (2013) และ Ruksee et al., 18th TNS-CU-NIPS Symposium 2014, page 72 (เอกสารแนบ 4.4.11), Ruksee et al., J Steroid Mol Biosci (2014) 143:72-80 (เอกสารแนบ 4.2.4) พบว่า stress โดยใช้ glucocorticoid hormone: dexamethasone) ในสัตว์ทดลองหนู rat พบว่าหนู สูญเสียการเรียนรู้ หนูเกิดความเครียดจนเกิด depression บริเวณ hippocampus สูญเสีย synapse, neurogenesis ดังนั้นคณะวิจัยจึงได้ตั้งสมมติฐานเพื่อพิสูจน์ว่า dexamethasone สามารถทำลาย neural stem cell โดยตรง จากการทดลองพบว่า dexamethasone ลดปริมาณ neurosphere ถ้า pretreat ด้วย melatonin จะช่วยยับยั้งป้องกันการ inhibition นั้น พิสูจน์ได้ด้วย stain Ki67 และ nestin ลดปริมาณ เซลล์เหล่านี้ กลไกผ่าน pERK1/2, G1-S phase cell cycle regulator เช่น cyclin E, CDK2 การออกฤทธิ์ของ dexamethasone ผ่าน GR receptor ส่วน melatonin ออกฤทธิ์ผ่าน MT₁ receptor จากการทดลองนี้คณะวิจัยฯ ยังพบว่าการทำงานของ GR และ MT₁ receptor จะเกิดควบคุมซึ่งกันและกันเป็น crosstalk, cross regulation ผลงานนี้ได้ส่งเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ Ekthuwapranee et al., J Steroid Mol Biosci, 2014 145:38-48 (เอกสารแนบ 4.2.5) แสดงว่าความเครียดจะทำลาย hippocampus ซึ่งอาจทำให้สูญเสียความจำจนเกิดสมองเสื่อม Alzheimer ได้

ผลงานวิจัยของคณะวิจัยฯ ที่ศึกษาเกี่ยวกับ neural stem cell และ neurogenesis นั้นได้พบทั้ง negative และ positive factor เช่น melatonin, amphetamine, stress จาก dexamethasone ซึ่งส่งผล ทำให้สมองบริเวณ hippocampus ทำงานผิดปกติหรือดีขึ้น ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับ cognitive function จะไปเชื่อมโยงกับโรคชราภาพ โรคสมองเสื่อมแบบ Alzheimer ได้ ส่วนคุณสมบัติของ melatonin สามารถนำไปส่งเสริมให้สมองบริเวณ hippocampus เสื่อม และ/หรือสามารถนำไปพัฒนาเกี่ยวกับปัญหาสมองเสื่อมที่ต้องการ neural stem cell สร้างเซลล์ประสาทมากขึ้นได้ อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญไปบรรยายเรื่อง "Melatonin regulating neurogenesis and neurodegeneration" ที่งานประชุมวิชาการนานาชาติ 8th

FAOPS Congress บทความได้ดีพิมพ์ Govitrapong (2015) 8th FAOPS Congress (เอกสารแนบ 4.4.21) และได้รับเชิญให้เขียน Book chapter, Govitrapong et al., 2016; Chapter 8, page 101-115 (เอกสารแนบ 4.1.2)

Subproject 6: Alzheimer's Disease

Subproject 6.1: Modulation of α , β and γ - secretases by melatonin- a possible therapeutic approach targeting towards Alzheimer's disease

1. To develop a therapeutic approach for learning and memory impairments, Alzheimer's and dementia and impaired neurogenesis.
2. To determine the effects of melatonin as a therapeutic agent.
3. To measure α , β -secretase activities, proteins and mRNAs in SH-SY5Y cell.
4. To determine the effects of melatonin pre-treatments on the specific α , β -secretase activities, proteins and mRNAs in SH-SY5Y cell cultures
5. To determine the effect of melatonin on the gamma secretase in SH-SY5Y cell cultures

โรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease)

อัลไซเมอร์เป็นโรคสมองเสื่อมชนิดหนึ่ง ส่วนใหญ่จะพบผู้ป่วยมีอาการหลงลืมเป็นอาการนำ และเมื่ออาการเสื่อมของสมองเพิ่มขึ้น จะมีผลทำให้บุคลิกภาพ อารมณ์ ตลอดจนพฤติกรรมของผู้ป่วยเปลี่ยนไป มีสาเหตุมาจากการตายของเซลล์ประสาท อัตราการพบของโรคนี้จะเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เพราะอัตราการเพิ่มจำนวนของประชากรผู้สูงอายุมากขึ้นตามลำดับ ทำให้นักวิจัยให้ความสนใจทำการวิจัยเกี่ยวกับสมองมากขึ้น

พยาธิสภาพของสมองที่เกิดขึ้นกับผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์มีสองชนิดคือ amyloid plaques และ neurofibrillary tangle (NFT) ซึ่ง amyloid plaques ประกอบไปด้วย beta amyloid ($A\beta$) โดย $A\beta$ เป็นโปรตีนที่เป็นพิษต่อเซลล์ประสาท $A\beta$ มาจากการ hydrolyse จาก β -amyloid precursor protein (APP) โดย β -secretase และ γ -secretase enzyme นี้ ประกอบด้วย presenilin 1, 2 ถ้า APP ถูก hydrolyse โดย α -secretase ซึ่งจะทำให้ลดการสร้าง $A\beta$ ได้ดี

คณะวิจัย ได้ทดลองและพิสูจน์แล้วว่า melatonin สามารถ inhibit β และ γ -secretase ในการ hydrolyse APP นอกจากนี้ melatonin ยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ α -secretase ซึ่งเป็นการค้นพบเป็นครั้งแรกถึงความสามารถของ melatonin ต่อ APP metabolism จากการศึกษาทดลองโดยใช้ SH-SY5Y neuroblastoma cell line คณะวิจัย ได้พิสูจน์ว่ากลไกที่ melatonin มีต่อ α , β และ γ -secretase โดยผ่าน melatonin receptor เพื่อที่จะพิสูจน์ที่จะให้กลไกของ melatonin ในการควบคุมการสร้าง $A\beta$ คณะวิจัย ได้พิสูจน์ต่ออีกว่าการ hydrolyse APP ไม่ได้เนื่องจากการสังเคราะห์ APP และได้พิสูจน์อีกว่านอกจาก α , β และ γ -secretase แล้ว melatonin ยัง inhibit C_{99} โดยผ่าน melatonin receptor และเป็น receptor ที่ couple กับ G-protein แสดงว่าเป็น membrane-bound receptor

เนื่องจากใส่ PTX ทำให้การทำงานของ melatonin receptor หดหายไป ขณะนี้โครงการวิจัยนี้ยังทำต่อเนื่องอยู่เพื่อหาระดับโปรตีนและศึกษาผลของ melatonin ต่อ notch signaling ผลงานเบื้องต้นได้นำไปเสนอและตีพิมพ์ในงานประชุมวิชาการระดับชาติเป็น proceeding (Panmanee et al., 18th TNS-CU-NIPS Symposium 2014, page 23-29) (เอกสารแนบ 4.3.1) และตีพิมพ์ใน Panmanee et al., 2015, J Neurochem (suppl 1) p. 327-328 (เอกสารแนบ 4.4.19) ในงานประชุมวิชาการนานาชาติและฉบับสมบูรณ์ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Panmanee et al., J Pineal Res, 2015 J Pineal Res 59:308-320, IF=9.6) (เอกสารแนบ 4.2.11) ผลงานวิจัยนี้เป็นครั้งแรกที่พบว่า melatonin มีคุณสมบัติเฉพาะเจาะจงต่อ enzyme ที่สร้าง A β ซึ่งได้รับความสนใจมากมาย เนื่องจากการยับยั้งการสร้าง A β จะเป็น target ที่สำคัญในการยับยั้งการเกิดโรค AD ก่อนหน้านั้นก็มีข้อมูลเกี่ยวกับบทบาทของ melatonin ในการยับยั้งโรค AD นั้น และขณะนี้ยาที่ใช้ชะลออาการของผู้ป่วยโรค AD ล้วนแล้วแต่ไม่ใช่ target ที่เจาะจง และไม่สามารถชะลออาการของ AD ได้ ส่วน melatonin สามารถชะลอการเกิด A β จะเป็นตัวยาที่สำคัญที่จะชะลอยับยั้งโรค AD ได้ ข้อมูลต่างๆ เกี่ยวกับ mechanism ของ melatonin ต่อโรค AD นั้น คณะวิจัยฯ ได้เขียนเป็นบทความที่จะตีพิมพ์ให้ชาวโลกเข้าใจคือ Shukla et al., Curr Neuropharmacol 2017 (accepted) (เอกสารแนบ 4.2.30)

นอกจากการศึกษความสัมพันธ์ระหว่าง melatonin กับ secretase enzymes ที่ระดับ baseline ใน SH-SY5Y neuroblastoma cell line แล้ว คณะวิจัยฯ ยังได้ทำการศึกษาต่อด้วยการเหนี่ยวนำเซลล์ด้วย A β ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงสมดุลของการสร้าง secretase enzymes เป็นแบบที่พบในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ คือเพิ่ม activity ของเอนไซม์ใน amyloidogenic pathway คือ β -secretase และ γ -secretase ทำงานมากขึ้น รวมไปถึงลด activity ของ α -secretase ลง ซึ่งเป็นเอนไซม์ใน non-amyloidogenic pathway จากนั้นทำการวิจัยว่า pretreatment ของ melatonin ใน AD cellular model นี้สามารถช่วยปรับการเสียสมดุลของ secretase enzymes ได้หรือไม่ เพื่อยืนยันถึงคุณสมบัติของ melatonin ในการชะลอการสร้าง A β ผ่านการควบคุม activity ของ secretase enzymes ด้วย melatonin จากการทดลองพบว่า melatonin pretreatment สามารถช่วยลดการทำงานของ β -secretase และ γ -secretase ใน AD cellular model ได้จริง อีกทั้งพบว่า melatonin ยังสามารถช่วยเพิ่ม α -secretase ได้อีกด้วย รวมไปถึงทำการทดสอบต่อด้วย Luzindole (melatonin receptor blocker) พบว่ากระบวนการควบคุม secretase enzymes นี้เกิดขึ้นผ่าน melatonin receptor คณะวิจัยฯ จึงทำการศึกษาต่อเกี่ยวกับกลไกการทำงานของ melatonin ที่สามารถปรับ activity ของ secretase enzymes และพบว่า NF-KB ซึ่งเป็น mediator ของ inflammation มีส่วนเข้ามาเกี่ยวข้องด้วยอย่างมาก เนื่องจากมีคุณสมบัติที่สามารถจับกับ promotor ของ β -secretase นำไปสู่การควบคุมการเพิ่มขึ้นของ amyloidogenic pathway นอกจาก enzyme ที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการ cleave APP แล้ว ยังมีโปรตีนที่ทำหน้าที่สำคัญเกี่ยวข้องกับโรค AD คือ Pin1 ที่มีความสัมพันธ์กับทั้ง β APP, NF-KB stabilization และ Tau pathology ดังนั้น คณะวิจัยฯ จึงจะทำการศึกษาต่อไปว่า melatonin จะเป็น modulator ที่สำคัญในการควบคุม Pin1 ที่จะนำไปสู่การควบคุมการสร้างโปรตีน A β จนในที่สุดจัดเป็นการศึกษาเพื่อป้องกันโรคใน AD ตั้งแต่ต้นทางก่อนการเกิดโรค และสูญเสียเซลล์ประสาท นี่มีความสำคัญในกรณีที่เป็น Alzheimer แล้ว ควรจะ

แก้ไขรักษาได้อย่างไร ข้อมูลนี้ได้รวบรวมเพื่อตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติอยู่ในเอกสาร Chinchalongporn et al., J Pineal Res 2017 (เอกสารแนบ 4.2.36) และให้นักศึกษาปริญญาเอกไปเสนอในงานประชุมวิชาการนานาชาติ ISN (International Society for Neurochemistry) ที่ประเทศฝรั่งเศส ปี 2017

Subproject 6.2. เปรียบเทียบเอ็นไซม์ที่สร้าง A β ในโรค Alzheimer (β APP enzymes, α , β และ γ -secretase) ใน aging brain

A β เป็น peptide ที่ปรากฏในสมองของโรคสมองเสื่อม Alzheimer โดย peptide นี้จะปรากฏในสมองของผู้สูงอายุ เช่นกัน แต่ไม่มากเท่าสมองของผู้ที่เป็นโรค AD ซึ่ง A β นี้จะไปทำลาย neuron ทำให้เซลล์ประสาทตายโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณ hippocampus เมลาโทนินเป็นฮอร์โมนที่สร้างที่ต่อมไพเนียลทำหน้าที่หลายอย่าง เช่น ทำลาย free radical เป็น neuroprotective agent และช่วยยับยั้งการเกิด neuroinflammation ซึ่งเป็นกลไกหนึ่งที่ทำให้เกิดสมองเสื่อม ระดับของเมลาโทนินจะลดลงตามอายุที่มากขึ้น เมื่อถึงวัยชราร่างกายจะมีเมลาโทนินน้อยมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมองของผู้ที่เป็นโรค Alzheimer จะมีเมลาโทนินน้อยกว่าผู้สูงอายุที่อยู่ในวัยเดียวกัน จากผลการวิจัยดังข้างต้นใน dopamine cell line เมลาโทนินจะยับยั้งระดับ β -secretase และ γ -secretase (เป็นเอ็นไซม์ที่เพิ่มปริมาณ A β) และเมลาโทนินจะกระตุ้น α -secretase ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ที่ก่อให้เกิด non-amyloidogenic (ไม่สร้าง A β) ดังนั้นในโครงการวิจัยนี้ คณะวิจัยฯ จึงทำการพิสูจน์ว่าสมองหนูแก่จะมีระดับ α , β , γ -secretase มากน้อยแค่ไหน ถ้าให้เมลาโทนินสามารถจะเปลี่ยนแปลงได้หรือไม่ จึงแบ่งหนู 3 กลุ่ม

กลุ่มที่ 1 หนู young (2 เดือน)

กลุ่มที่ 2 หนูแก่ (16 เดือน) + น้ำปกติ $\rightarrow$ 22 เดือน

กลุ่มที่ 3 หนูแก่ (16 เดือน) + ให้เมลาโทนิน 10 mg/kg ในน้ำดื่มเป็นเวลา 6 เดือน $\rightarrow$ 22 เดือน

ผลการวิจัยปรากฏว่าในหนูแก่นั้นมี β -secretase (BACE₁) และ γ -secretase (PS₁) เพิ่มขึ้นมากทั้งระดับ mRNA และ protein เมื่อเปรียบเทียบกับหนู (young) ส่วน α -secretase จะลดลงทั้ง mRNA และ protein เมื่อหนูกลุ่มที่ได้รับเมลาโทนินเป็นเวลา 6 เดือน ปรากฏว่าระดับ α , β , γ -secretase มีระดับ mRNA และ protein เปลี่ยนกลับเหมือนในกลุ่ม young ข้อมูลบ่งชี้ให้เห็นว่าเมลาโทนินสามารถช่วยป้องกันและ/หรือลดความเสี่ยงของการเกิด A β ในบริเวณ hippocampus ซึ่งจะเป็นผลทำให้บุคคลนั้นๆ เป็นโรค Alzheimer ได้ ผลงานวิจัยนี้จึงเป็นผลงานวิจัยที่สำคัญมากได้ตีพิมพ์ในวารสารนานาชาติ (Mukda et al., Neurosci Lett, 2016; 16:39-46) (เอกสารแนบ 4.2.16) ซึ่งได้รับความสนใจมากทั้งโลก และจากข้อมูลเบื้องต้นที่ใช้ dopamine SH-SY5Y cell induce ให้เกิด senescence โดย H₂O₂ เกิด neuroinflammation ซึ่ง neuroinflammation เป็นกลไกหนึ่งนำไปสู่การเกิดสมองเสื่อมแบบ Alzheimer ดังนั้นคณะวิจัยฯ จึงใช้ model ศึกษาต่อโดยการวัด secretase (BACE₁) ก็พบว่า H₂O₂ induce senescence ก่อให้เพิ่ม BACE₁ ซึ่งเป็นเอ็นไซม์ทำให้การสร้าง A β peptide

เพิ่มขึ้น เมลาโท닌สามารถยับยั้งได้ ดีพิมพ์เป็น proceeding ใน Permpoonputtana et al., 18th TNS-CU-NIPS Symposium 2014, page 46-51) (เอกสารแนบ 4.3.5)

การศึกษากลไกการเกิดโรค Alzheimer นั้น นอกจากเปรียบเทียบในสภาวะสมองเกิดซาร์ภาพแล้วยังสามารถศึกษาได้โดยใช้ A β เพื่อ induce ให้เกิด neurotoxicity ใน dopamine cell คณะวิจัยฯ ยังได้ใช้ A β_{25-35} ซึ่งเป็น peptide ที่สังเคราะห์ขึ้นโดยที่มี amino acid sequence ที่ก่อให้เกิด toxic เหมือน A β_{1-42} จากผลการวิจัยพบว่า A β_{25-35} ก่อให้เกิด reactive oxygen species (ROS) และ RNS ใน dopamine SK-N-SH cell โดยการวัด iNOS และ nitric oxide ซึ่งก่อให้เกิด neuroinflammation ผ่านกลไก NF- κ B และ Nrf2 ซึ่ง Nrf2-ARF pathway นี้จะไปเกี่ยวข้องกับ antioxidant enzyme หลายชนิดคือ heme-oxygenase (HO-1), NAD(P)H: quinone oxidoreductase (NQO-1) และ glutamate-cysteine ligase catalytic subunit (γ -GCLC) ในการทดลองนี้ได้ใช้สารที่ modify จาก curcumin คือ di-o-dimethyl curcumin ซึ่งสามารถยับยั้งการเกิด neuroinflammation จากการเหนี่ยวนำโดย A β_{25-35} ผลงานวิจัยนี้ได้ตีพิมพ์ Pinkaew et al., Neurotox Res. 2016,29:80-91) (เอกสารแนบ 4.2.13) การวิจัยต่อไปจะนำไปศึกษาเปรียบเทียบกับเมลาโท닌ว่า เมลาโท닌สามารถยับยั้งฤทธิ์ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำโดย A β peptide หรือไม่อย่างไร การวิจัยนี้คณะวิจัยฯ ยังนำ A β_{1-42} ไปพิสูจน์ว่ามีผลต่อการสร้างเซลล์ประสาทใหม่หรือไม่ โดยนำไปเลี้ยงกับ neural progenitor cell จาก SVZ ของหนู พบว่า A β_{1-42} ไปลด proliferation ผลงานวิจัยเบื้องต้นนี้ได้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ Boontem et al., The 19th TNS Conference 2015. page 66 (เอกสารแนบ 4.5.2)

คณะวิจัยฯ ได้พยายามค้นหาสาเหตุหรือ factor อะไรบ้างที่ทำให้คนเป็นโรค AD ผู้สูงอายุเป็นวัยที่เสี่ยงที่สุด ยิ่งอายุมากยิ่งเสี่ยงมาก จากงานวิจัยข้างต้นเกี่ยวกับโรคเบาหวาน คณะวิจัยฯ ได้สร้าง model สัตว์ทดลองของโรคเบาหวาน โดยการ treat หนูทดลองด้วย STZ และ/หรือ high fat + STZ จากนั้นนำหนูทดลองมาทดสอบความจำพบว่าสูญเสียความจำ melatonin ช่วยความจำนั้นยังคงอยู่นอกจากนี้ STZ ทำให้ APP cleaving enzyme เปลี่ยนแปลงไปโดยเพิ่ม β - และ γ -secretase แต่ลด α -secretase ผลลัพธ์คือทำให้เกิด A β มากขึ้นที่สมองบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex ทั้งหมดนี้ melatonin สามารถช่วยยับยั้งได้ ข้อมูลเบื้องต้นรวบรวมอยู่ใน Kamsrijai et al. 2017 (เอกสารแนบ 4.2.37) นอกจากโรคเบาหวาน คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาในผู้เสพติดยา METH พบว่าผู้เสพติดนี้มี cognitive function เสียไปมาก คณะวิจัยฯ กำลังศึกษาต่อและเพื่อที่จะเข้าใจ mechanism ต่างๆ คณะวิจัยฯ จึงได้ศึกษาในสัตว์ทดลอง โดยให้หนู rat เสพ METH เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำมาทดสอบ memory โดย Morris Water Maze ผลการทดลองพบว่าหนูที่รับ METH เป็นเวลา 10 วันสูญเสีย spatial memory ไป ส่วนหนูที่ pretreat ด้วย melatonin ก่อนรับ METH นั้น melatonin สามารถป้องกันมิให้สูญเสียความจำนี้ได้ นอกจากนี้คณะวิจัยฯ ยังได้ศึกษาต่อโดยนำสมองหนูบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex แล้วนำมาตรวจสอบ APP cleaving enzyme พบว่า METH ทำให้สมองบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex เพิ่มขึ้นเอนไซม์ β - และ γ -secretase แต่ลด α -secretase ผลลัพธ์ทำให้เพิ่ม A β ได้ ซึ่งเป็น hall mark ของ AD ส่วนหนูที่ pretreat ด้วย melatonin เอนไซม์เหล่านี้อยู่ในระดับปกติ แสดงว่า melatonin สามารถยับยั้งป้องกันการเกิด AD ที่เกิดจากการ

seph amphetamine ได้ คณะวิจัยฯ กำลังศึกษาต่อเพื่อให้เข้าใจลึกซึ้งขึ้น ข้อมูลเบื้องต้น อยู่ใน Panmak et al. 2017 (เอกสารแนบ 4.2.39)

Subproject 6.3. In AD patients study

Transcriptional and epigenetic regulation of APP processing enzymes a secrease (ADAM10, ADAM17), β -secrease (BACE1) and γ -secretases and sirtuin1

Human subjects:- Human peripheral blood mononuclear cells from the following subjects:

1. Aged-matched control subjects
2. AD patient
3. Control group (young normal)

β -secrease (BACE1), α - secrease (ADAM10, ADAM17), and γ -secretase and sirtuin1 จากความร่วมมือกับ โรงพยาบาลธรรมศาสตร์ ได้ตัวอย่างเลือดจากคนไข้ที่เป็นโรค Alzheimer และ control ที่อายุใกล้เคียง และกลุ่ม control ที่อายุหนุ่มสาว ข้อมูลเบื้องต้นพบว่า mRNA ของ β -secretase ในผู้ป่วย AD สูงกว่าคนปกติ และ SIRT₁ ของผู้ป่วย AD ต่ำกว่าคนปกติ และตรวจวัด PS1 ซึ่งเป็น subunit ที่สำคัญของ γ -secretase จากการทดลองตรวจวัดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง amyloid beta ($A\beta$) จากการย่อยสลาย amyloid precursor protein (APP) ในตัวอย่างเลือดของผู้ป่วยอัลไซเมอร์ พบระดับ mRNA ของยีนที่มีบทบาทในการเกิด $A\beta$ (BACE1, PSEN1) จากการย่อยสลาย APP เพิ่มขึ้น ในขณะที่ยีนระดับ mRNA ของยีนที่มีบทบาทในกระบวนการที่ไม่ก่อให้เกิด $A\beta$ จากการย่อยสลาย APP (ADAM10, ADAM17) นั้นลดลง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับอาสาสมัครสุขภาพดี ดังนั้นการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีนเหล่านี้ในเลือดอาจสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในการตรวจคัดกรองหรือวินิจฉัยโรคอัลไซเมอร์ได้ในอนาคต ผลวิจัยนี้มีความสำคัญมาก ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน คณะวิจัยฯ กำลังศึกษา ข้อมูลเบื้องต้นอยู่ใน (Pakpian et al., 2016) (เอกสารแนบ 4.2.43) และเสนองานวิจัยเบื้องต้นในงานประชุมนานาชาติ IBRO-APRC School of Neuroscience ระหว่าง July 4-8, ใน Pakpian et al. (2016) 2016, p.87 (เอกสารแนบ 4.4.26) และในงานประชุมนานาชาติ Pakpian et al. (2016) Front Cell Neuroscience Conference doi: 10.3389/conf.fncel.2016.36.00156 (เอกสารแนบ 4.4.30) คณะวิจัยฯ ยังได้นำตัวอย่างเลือดคนไข้ AD มาตรวจ gene ที่ควบคุมการทำงานของ mitochondria ผลงานเบื้องต้นนี้ได้นำไปเสนอในงานประชุมวิชาการระดับชาติ Niyomphol et al., The 19th TNS Conference 2015. page 86 (เอกสารแนบ 4.4.24) ขณะนี้กำลังศึกษาและวัด mRNA ของ α -secretase และ Sirt₂, Sirt₃ และรวบรวมตัวอย่างให้มากขึ้นโดยเฉพาะตัวอย่างเลือดของผู้ป่วย mild cognitive impairment (MCI) เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม AD และผู้สูงอายุที่ไม่ได้เป็นโรคเกี่ยวกับสมองต่อไป

จากผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับ AD นั้น อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเป็น Plenary Lecture 2 ของ The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting เรื่อง "Role of

melatonin in controlling Alzheimer's disease" วันที่ 2-3 กุมภาพันธ์ 2016 ณ The Berkeley Hotel, Bangkok, Thailand APFP (เอกสารแนบ 4.4.23) และงานประชุมนานาชาติ IBRO-APRC School of Neuroscience ระหว่าง July 4-8, 2016, p.62 (เอกสารแนบ 4.4.24) และ อ.ปิยะรัตน์ถูกทาบทามให้เขียน review article ฉบับสมบูรณ์จากวารสารนานาชาติเรื่อง Mechanisms of melatonin in regulating Alzheimer' s disease ซึ่งตีพิมพ์ใน Shukla et al., Curr Neuropharmacol. 2017 (accepted) (เอกสารแนบ 4.2.30)

4. Output:

ผลงานวิจัยที่นำไปเผยแพร่และผลิตนักศึกษา

ผลงานวิจัยที่นำไปเผยแพร่

4.1. Book chapter: 2

4.2. Full paper: published or accepted =33

Submitted or in preparation =10

4.3. Proceeding: 8

4.4. Abstract (International): 32

4.5. Abstract (National): 15

4.6. ผลิตนักศึกษาระดับปริญญาโท-เอก (9, 13)

4.1. BOOK CHAPTERS

- 4.1.1. Rachen Singhakumar, Kasima Ekthuwapranee, Parichart Boontem, Utcharaporn Kamsrijai and Piyarat Govitrapong (2015). Role of melatonin in regulating neurogenesis and neurodegeneration. In: Neurogenesis: Cell Biology, Regulation and Role in Disease. Eds, Alicia Moreno, Nova Sci. Publisher, Chapter 4, p. 143-164.
- 4.1.2. Piyarat Govitrapong , Kasima Ekthuwapranee ,Nootchanart Ruksee , and Parichart Boontem (2016). Melatonin, a Neuroprotective Agent: Relevance for Stress-Induced Neuropsychiatric Disorders). In: Melatonin, Neuroprotective Agents and Antidepressant Therapy. F. López-Muñoz et al. (eds), Springer India 2016, Chapter 8, pp. 101-115.

4.2. FULL PAPERS

2014

- 4.2.1. Jenwitheesuk A, Nopparat C, Mukda S, Wongchitrat P, Govitrapong P. (2014). Melatonin regulates aging and neurodegeneration through energy metabolism, epigenetics, autophagy and circadian rhythm pathways. Int J Mol Sci.22;15(9):16848-84. (IF=3.257)
- 4.2.2. Tocharus C Tocharus J, Junmanee T, Puriboriboon Y and Govitrapong P (2014). Melatonin enhances adult rat hippocampal progenitor cell proliferation by ERK signaling pathway through melatonin receptor. Neuroscience 275:314-321. (IF=3.231)
- 4.2.3. Pichaya Jumnongprakhon, Piyarat Govitrapong, ChainarongTocharus, WanidaTungkum, JirapornTocharus (2014). Protective effect of melatonin on

methamphetamine-induced apoptosis in gliomacell line. *Neurotoxicity Res.* 25:286-294. (IF=3.140)

- 4.2.4. Nootchanart Ruksee, Walaiporn Tongjaroenbuangam, Thanutchaporn Mahanam, Piyarat Govitrapong (2014). Melatonin restored dexamethasone-induced depressive-like behavior and dexamethasone-induced impaired hippocampal neurogenesis in the mouse brain. *J Steroid Biochem Mol Biol* 143:72-80. (IF=3.985)

2015

- 4.2.5. Kasima Ekthuwapranee, Areechun Sotthibundhu, Chainarong Tocharus, Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin ameliorates the inhibitory effects of dexamethasone on adult hippocampal progenitor cells proliferation via upregulation of Erk1/2 phosphorylation. *J Steroid Biochem Mol Biol* 145:38-48. (IF=3.985)
- 4.2.6. Kasima Ekthuwapranee, Areechun Sotthibundhu, Piyarat Govitrapong. (2015). Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of proliferation of adult rat hippocampal progenitor cells in vitro. *J Pineal Res.* 58:418-428. (IF=9.314)
- 4.2.7. Pichaya Jumnongprakhon, Piyarat Govitrapong, Chainarong Tocharus, Decha Pinkaew, Jiraporn Tocharus. (2015). Melatonin protects methamphetamine induced-neuroinflammation through NF- κ B and Nrf2 pathways in glioma cell line. *Neurochem Res.* 40:1445-1456. (IF = 2.472)
- 4.2.8. Pawaris Wongprayoon and Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin attenuates methamphetamine-induced neuroinflammation through melatonin receptor in SH-SY5Y cell line. *Neurotoxicology* 50:122-130. (IF = 2.738)
- 4.2.9. Arisa Parameyong, Piyarat Govitrapong and Banthit Chetsawang (2015). Melatonin attenuates the mitochondrial translocation of mitochondrial fission proteins and Bax, cytosolic calcium overload and cell death in methamphetamine-induced toxicity in neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Mitochondrion.* 24:1-8. (IF = 3.647)
- 4.2.10. Rachen Singhakumar, Parichart oontem, Kasima Ekthuwapranee Areechun Sotthibundhu, Sujira Mukda, Banthit Chetsawang, Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin attenuates methamphetamine-induced inhibition of neurogenesis in the adult mouse hippocampus: an in vivo study. *Neurosci. Lett.* 606:209-214. (IF = 2.107)
- 4.2.11. Jiraporn Panmanee, Chutikorn Nopparat, Napapit Chawanich, Mayuri Shukla, Sujira Mukda, Jean-Francois Hernandez, Weihong Song, Bruno Vincent and Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin regulates the transcription of β APP-cleaving

secretases via a melatonin receptor in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *J Pineal Res*, 59:308-320. (IF=9.314)

- 4.2.12. Ratchadaporn Pramong, Prapimpun Wongchitrat, Piyarat Govitrapong, Pansiri Phansuwan-Pujito (2015). Development of Clock Genes Expression in Rat Hippocampus *J Med Assoc Thai* 98 (Suppl. 9): s123-129.

2016.

- 4.2.13. Decha Pinkaew, Chatchawan Changtam, Chainarong Tocharus, Piyarat Govitrapong, Pichaya Jumnongprakhon, Apichart Suksamrarn, Jiraporn Tocharus (2016). Association of neuroprotective effect of Di-O-demethylcurcumin on A β ₂₅₋₃₅ –induced neurotoxicity with suppression of NF- κ B and activation of Nrf2. *Neurotox Res*.29:80-91. (IF = 3.140)
- 4.2.14. Kannika Permpoonputtana, James E. Porter, Piyarat Govitrapong.(2016). Calcitonin gene-related peptide mediates an inflammatory response in Schwann cells via a cAMP-dependent ERK signaling cascade. *Life Sci* 144:19-25. (IF = 2.685)
- 4.2.15. Pawaris Wongprayoon and Piyarat Govitrapong (2016). Melatonin attenuates methamphetamine-induced neurotoxicity. *Current Pharmaceutical Design*. 22(8):1022-1032. (IF = 3.052)
- 4.2.16. Mukda S, Panmanee J, Boontem P, Govitrapong P (2016). Melatonin administration reverses the alteration of amyloid precursor protein-cleaving secretases expression in aged mouse hippocampus. *Neurosci Lett*. 16;621:39-46. (IF = 2.107)
- 4.2.17. Wilasinee Suwanjang, Andrey Y. Abramov, Komgrid Charngkaew, Piyarat Govitrapong, Banthit Chetsawang (2016). Melatonin prevents cytosolic calcium overload, mitochondrial damage and cell death due to toxically high doses of dexamethasone-induced oxidative stress in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. *Neurochem Int*. 97: 34-41. (IF = 3.385)
- 4.2.18. Pichaya Jumnongprakhon, Chainarong Tocharus, Piyarat Govitrapong and Jiraporn Tocharus (2016). Melatonin promotes BBB integrity in methamphetamine –induced inflammation in BMVECs. *Brain Res* 1646: 182-192. (IF = 2.561)
- 4.2.19. Jumnongprakhon P, Govitrapong P, Tocharus C, Tocharus J. (2016). Inhibitory effect of melatonin on cerebral endothelial cells dysfunction induced by methamphetamine via NADPH oxidase-2. *Brain Res*. 2016, 1659: 84-92. (IF = 2.561)
- 4.2.20. Jumnongprakhon P, Govitrapong P, Tocharus C, Tocharus J. (2016). Melatonin improves methamphetamine-induced blood brain barrier impairment through NADPH

oxidase-2 in primary rat brain microvascular endothelium cells. *Brain Res.* 2016 Sep 1;1646: 393-401. (IF = 2.561)

- 4.2.21. Kulvadee Tangmansakulchai, Zuroida Abubakar, Narisorn Kittyanant, Piyaat Govitrapong, Banthit Chetsawang (2016). Calpastatin overexpression reduces oxidative stress-induced mitochondrial impairment and cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells by decreasing calpain and calcineurin activation, induction of mitochondrial fission and destruction of mitochondrial fusion. *Mitochondrion.* 30:151-61. (IF = 3.647)
- 4.2.22. Jirawoot Srisontiyakul, Hanna E. Kastman, Elena V. Krstew, Piyaat Govitrapong & Andrew J. Lawrence. (2016). The nicotinic $\alpha 6$ -subunit selective antagonist bPiDI reduces alcohol self-administration in alcohol-preferring rats. *Neurochem Res.* 2016;41(12):3206-3214. (IF = 2.472)
- 4.2.23. Prapimpun Wongchitrat, Niyada Lansubsakul, Utcharaporn Kamsrijai, Kwankanit Sae-Ung, Sujira Mukda, and Piyaat Govitrapong (2016). Melatonin attenuates the high-fat diet and streptozotocin-induced reduction in rat hippocampal neurogenesis. *Neurochem Int.* 2016;100:97-109. (IF = 3.385)
- 4.2.24. Areechun Sotthibundhu, Kasima Ekthuwapranee, Piyaat Govitrapong (2016). Compare melatonin with growth factors in promoting precursor cells proliferation in adult mouse subventricular zone. *EXCLI J.* 15:829-841. (IF = 1.292)

2017

- 4.2.25. Pawaris Wongprayoon and Piyaat Govitrapong (2017). Melatonin protects SH-SY5Y neuronal cells against methamphetamine-induced endoplasmic reticulum stress and apoptotic cell death. *Neurotoxicity Res* 31(1): 1-10. (IF = 3.140)
- 4.2.26. Wanida Tungkum, Chainarong Tocharus, Pichaya Jumnongprakhon, Piyaat Govitrapong, Jiraporn Tocharus (2017). Melatonin suppresses methamphetamine-triggered endoplasmic reticulum stress in glioma cells. *J Toxicol Sci* 2017;42(1):63-71. (IF = 1.292)
- 4.2.27. Chumboatong W, Thummayot S, Govitrapong P, Tocharus C, Jittiwat J, Tocharus J (2017). Neuroprotection of agomelatine against cerebral ischemia/reperfusion injury through an antiapoptotic pathway in rat. *Neurochem Int.* 2017 ;102:114-122. (IF = 3.385)
- 4.2.28. Jumnongprakhon P, Sivasinprasasn S, Govitrapong P, Tocharus C, Tocharus J. (2017). Activation of melatonin receptor (MT1/2) promotes P-gp transporter in

- methamphetamine-induced toxicity on primary rat brain microvascular endothelial cells. *Toxicol In Vitro*. 41:42-48. (IF = 3.338)
- 4.2.29. Anorut Jenwitheesuk, Parichart Boontem, Sujira Mukda, Piyaarat Govitrapong (2017). Melatonin regulates the aging mouse hippocampal homeostasis via the sirtuin1-FoxO1 pathway. *EXCLI J*.16:340-353. (IF = 1.292)
 - 4.2.30. Mayuri Shukla, Parichart Boontem, Russel J Reiter, Jutamaad Satayavivad, Piyaarat Govitrapong (2017) Mechanism of melatonin in regulating Alzheimer's disease. *Curr Neuropharmacol* (2017 in press). (IF = 3.753)
 - 4.2.31. Chutikorn Nopparat, Varunya Chantadol, Kannika Permpoonputtana and Piyaarat Govitrapong (2017). The Anti-inflammaging Effect of Melatonin on Senescence-Like Phenotypes in SH-SY5Y Neuroblastoma Cells. *Mechanisms Ageing & Devel* (2017, in press) (IF = 2.892)
 - 4.2.32. Chutikorn Nopparat, Puritat Sinjanakhom, and Piyaarat Govitrapong (2017). Melatonin reverses H₂O₂-induced senescence in SH-SY5Y cell by enhancing autophagy via sirtuin 1 deacetylation on RelA-p65 of NF κ B. *J Pineal Res*. (2017, in press). (IF=9.314)
 - 4.2.33. Prapimpun Wongchitrata, Paul Klosen, Supitcha Pannengpetcha, Kuntida Kitidee, Piyaarat Govitrapong, Chartchalerm Isarankura-Na-Ayudhya High-fat diet induced plasma protein and liver changes in obese rats can be attenuated by melatonin supplementation. *Nutrition Res*. (2017, in press.)
 - 4.2.34. Anorut Jenwitheesuk, Seongjoon Park, Prapimpun Wongchitrat, Jiraporn Tocharus, Sujira Mukda, Isao Shimokawa, Piyaarat Govitrapong. Comparing the effects of melatonin with caloric restriction in the hippocampus of aging mice: involvement of sirtuin1 and the FOXOs pathways. *Neurochem Res*. (2017, submitted).
 - 4.2.35. Kannika Permpoonpattana, Patlada, Sujira Mukda, Piyaarat Govitrapong Long-term consumption of melatonin attenuates neuroinflammation in the hippocampus and medial prefrontal cortex of aged mice. (*Neurochem Res*. 2017 in preparation).
 - 4.2.36. Vorapin Chinchalongporn, Mayuri Shukla, Piyaarat Govitrapong (2017). Melatonin prevents the amyloidogenic processing of β APP via Pin1/NF- κ B pathway in A β -induced cellular model of AD. (2017, in preparation).
 - 4.2.37. Utchalaporn Kamsrijai, Prapimpun Wongchitrat, Mayuri Shukla, Piyaarat Govitrapong. Melatonin ameliorates memory deficits in streptozotocin-induced hyperglycemia via altering amyloid precursor protein processing in rat hippocampus. (2017 in preparation).

- 4.2.38 Jatuporn Namyen, Kannika Permpoonpattana, Chainarong Tocharus, Jiraporn Tocharus, Piyarat Govitrapong (2017). Effects of melatonin on methamphetamine-induced neuroinflammation and disruption of blood brain barrier (BBB) integrity in rat hippocampus Brain Res (2017 in preparation).
- 4.2.39. Pattama Panmak, Kannika Permpoonpattana, Piyarat Govitrapong (2017). The effect of melatonin on spatial learning performance and Alzheimer's marker in chronic methamphetamine rats. (2017, in preparation).
- 4.2.40. Ratchadaporn Pramong, Prapimpun Wongchitrat, Piyarat Govitrapong, Pansiri Phansuwan-Pujito (2017). Melatonin rescues the age-induced alteration in rhythmic clock gene expression in rat hippocampus. J Pineal Res. (Submitted 2017).
- 4.2.41 Ratchadaporn Pramong, Piyarat Govitrapong and Pansiri Phansuwan-Pujito. Effect of amphetamine on clock gene expression in rat hippocampus. NeuroSci Lett (2017, submitted).
- 4.2.42. Tanawan Leeboonngam., Piyarat Govitrapong, and Pansiri Phansuwan-Pujito. Protective effect of melatonin on methamphetamine-induced hippocampal degeneration in postnatal rats. J Pineal Res. (2017 in preparation).
- 4.2.43. Nattaporn Pakpian, Prapimpun Wongchitrat, Kamonrat Kamonrat Phopin, Piyarat Govitrapong. Alteration of beta amyloid precursor protein cleaving enzymes mRNA expression in Alzheimer's patient blood samples (2017, in preparation).

4.3. PROCEEDINGS

2014:

- 4.3.1. Jiraporn Panmanee, Chutikorn Nopparat, Sujira Mukda and Piyarat Govitrapong. Melatonin suppresses the presenilin subunit of γ -secretase complex in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 23-29.
- 4.3.2. Varunya Chantadol, Kannika Permpoonpattana, Chutikorn Nopparat, Sujira Mukda, and Piyarat Govitrapong. Melatonin prevents senescence-like state induced by hydrogen peroxide in SH-SY5Y neuroblastoma cells. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 30-36.

- 4.3.3. Niyada Lansubsakul, Prapimpun Wongchitrat, Sujira Mukda, and Piyarat Govitrapong. Effects of high-fat diet and low-dose streptozotocin injection-induced changes in rat hippocampal synaptic proteins. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p37-41.
- 4.3.4. Rusana Usama, Prapimpun Wongchitrat, Doungjai Buntup, Verayuth Praphanphoj, Piyarat Govitrapong. Distribution of PER2 rs2304672 polymorphism in Thai major depressive disorder patients. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p.42-45.
- 4.3.5. Kannika Permpoonpattana, Chutikorn Nopparat, and Piyarat Govitrapong. Effect of melatonin against premature senescence-induced BACE1 expression: implication for Alzheimer's disease. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 46-51.

2015

- 4.3.6. Puritat Sinjanakhom, Chutikorn Nopparat, Sujira Mukda, and Piyarat Govitrapong. Melatonin enhances NF- κ B deacetylation to induce autophagy in senescence-like SH-SY5Y cells via Sirtuin 1 activation. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand p.46-52.
- 4.3.7. Zuroida Abubakar, Narisorn Kitiyanant, Wilasinee Suwanjang, Chaniya Leepiyasakulchai, Piyarat Govitrapong and Bantit Chetsawang. Roles of Calpastatin overexpression on oxidative stress and methamphetamine toxicity-induced mitochondrial dysfunction and cell death in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand p. 54-58.

2016

- 4.3.8. Patlada Tangweerasing, Kannika Permpoonputtana, Sujira Mukda, Chutikorn Nopparat, and Piyarat Govitrapong. Changes in astrocyte and cytokine expressions in aged mouse hippocampus. IBRO-APRC School of Neuroscience 2016 and 20th Thai

Neuroscience society International Conference, Naresuan University Phitsanulok, Thailand, July 4-8, 2016, p. 114-119.

4.4. ABSTRACT (International)

2014 (International)

- 4.4.1. Kasima Ekthuwapranee, Areechun Sothibundhu, Chainarong Tocharus and Piyarat Govitrapong. Melatonin attenuates methamphetamine-induced decrease in the adult hippocampal progenitor cells proliferation. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p.55.
- 4.4.2. Parichart Boontem, Kasima Ekthuwapranee and Piyarat Govitrapong. Melatonin attenuates beta-amyloid-induced decrease in proliferation of cultured neural progenitor cells obtained from adult rat subventricular zone. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p.56.
- 4.4.3. Jatuporn Namyen, Kannika Permpoonpattana, Sujira Mukda, Piyarat Govitrapong. Melatonin prevents methamphetamine-induced neuroinflammation by attenuating the increased mRNA expression of pro inflammatory cytokine, IL-1 β , in vivo study 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p.57.
- 4.4.4. Tanawan Leeboonngam, Piyarat Govitrapong, Pansiri Phansuwan-Pujito. Protective effect of melatonin on amphetamine-induced NMDA receptors alteration in hippocampus of postnatal rats. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p.58.
- 4.4.5. Ratchadaporn Pramong, Piyarat Govitrapong and Pansiri Phansuwan-Pujito. Role of melatonin in restoration of age-induced alteration in rhythmic clock gene expression in rat hippocampus. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p.59.
- 4.4.6. Nattawadee Yokyongsakul, Virapong Prachayasittikul, Pansiri Phansuwan-Pujito, Piyarat Govitrapong, Prapimpun Wongchitrat. Age-related change in rat retina sirtuin expression. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium

December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 62.

- 4.4.7. Puritat Sinjanakhom, Chutikorn Nopparat, Sujira Mukda, and Piyaat Govitrapong. Melatonin attenuates hydrogen peroxide-induced senescence-like state in SH-SY5Y neuroblastoma cells via autophagy pathway. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 63.
- 4.4.8. Pawaris Wongprayoon and Piyaat Govitrapong. Melatonin attenuates methamphetamine-induced NF κ B activation in human neuroblastoma SH-SY5Y cell lines through melatonin MT1/MT2 receptor. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 64.
- 4.4.9. Anirut Jenwitheesuk, Seongjoon Park, Isao Shimokawa, Piyaat Govitrapong. The effects of melatonin and caloric restriction on mouse aging brain: involvement with sirtuin and FoxOs pathway. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 67.
- 4.4.10. Chutikorn Nopparat, and Piyaat Govitrapong. The effect of melatonin-attenuated aging phenomenon in SH-SY5Y cells via sirtuin-activated autophagy pathway. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 19.
- 4.4.11. Nootchanart Ruksee, Walaiporn Tongjaroenbuangam, Piyaat Govitrapong. The effects of melatonin on dexamethasone exposure-induced changes in melatonin receptor of adult mouse hippocampus. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 72.
- 4.4.12. Chayanit Sirisuwat, Supalak Prachayasittikul, Virapong Prachayasittikul, Banthit Chetsawang, Piyaat Govitrapong, Wilasinee Suwanjang. Effect of 8-hydroxyquinoline and its derivatives on cultured human neuroblastoma cells under high glucose toxicity: an involvement of calcium-dependent pathway. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 60.
- 4.4.13. Siriporn Burusnareerat, Supalak Prachayasittikul, Virapong Prachayasittikul, Banthit Chetsawang, Piyaat Govitrapong, Wilasinee Suwanjang. Protective effect of 8-

hydroxyquinoline and its derivatives against high glucose-induced toxicity and mitochondrial fission in human neuroblastoma SH-SY5Y cells. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 61.

- 4.4.14. Sompub K, Krityakiarana W, Jongkamonwiwat N, Mukda S, Phansuwan-Pujito P, Govitrapong P. Effect of melatonin on glial scar formation after severe crush spinal cord injury in mice. 18th TNS Conference 2014 and 2nd Joint CU-NIPS Symposium December 21-23, 2014. Fac. Pharmaceutical Sciences, Chulalongkorn Univ., Bangkok, Thailand, p. 70.

2015: (International)

- 4.4.15. Kasima. Ekthuwapranee, Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin attenuates methamphetamine-induced decrease in adult hippocampal progenitor cell proliferation via cell cycle inhibition. J Neurochem (suppl 1) p. 178.
- 4.4.16. Ratchadaporn Pramong, Prapimpun. Wongchitrat, Piyarat Govitrapong, Pansiri. Phansuwan-Pujito. (2015). The effect of melatonin on the alteration of clock gene and melatonin receptor expression in hippocampus of the aging rats. J Neurochem (suppl 1) p. 205.
- 4.4.17. Puritat. Sinjanakhom, Chutikorn Nopparat, Sujira. Mukda, Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin enhances autophagic activity via represses P65 deacetylation activity by sirtuin 1 in senescence-like state in SH-SY5Y cells. J Neurochem (suppl 1) p. 226.
- 4.4.18. Pawaris. Wongprayoon, Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin modulates methamphetamine-induced NF- κ B activation and TNF- α overexpression through the MT1/MT2 receptor. J Neurochem (suppl 1) p. 227-228.
- 4.4.19. Jiraporn. Panmanee, Sujira. Mukda, Chutikorn. Nopparat, Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin regulates the expression of amyloid precursor protein (APP) secretases in human neuroblastoma SH-SY5Y cell line. J Neurochem (suppl 1) p. 327.
- 4.4.20. Tanawan. Leeboonngam, Piyarat Govitrapong, Pansiri Phansuwan-Pujito (2015). Effect of melatonin on NMDA receptor subunit 2A and 2B expression in hippocampus of methamphetamine-treated postnatal rats. J Neurochem (suppl 1) p. 352.

2015- Abstract (International)

- 4.4.21. Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin regulating neurogenesis and neurodegeneration. Plenary Lecture at The 8th FAOPS congress Nov 22-25, 2015 Centara Grand & Bangkok Convention Centre at Central World.
- 4.4.22. Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin regulating aging and neurodegeneration. Plenary Lecture at The International Association of Gerontology and Geriatrics – Asia/Oceania 2015 Congress (IAGG Asia/Oceania 2015) will be held between 19th – 22nd October 2015 at the International Convention and Exhibition Center Commemorating His Majesty's 7th Cycle Birthday Anniversary, Chiang Mai, Thailand, p.3.
- 4.4.23. Piyarat Govitrapong (2016). Roles of melatonin in controlling Alzheimer's disease. At the 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist Meeting (APFP) in Bangkok, p.17.

2016-Abstract (International)

- 4.4.24. Piyarat Govitrapong. How does melatonin regulate Alzheimer's disease? IBRO-APRC School of Neuroscience 2016 and 20th Thai Neuroscience society International Conference, Naresuan UniversityPhitsanulok, Thailand, July 4-8, 2016, p.62.
- 4.4.25. Kamonrapat Sompub, Warin krityakiarana, Nopporn Jongkamonwiwat, Sujira Mukda, Pansiri PhansuwanPujito, Piyarat Govitrapong. Effect of melatonin on myelin-associated inhibitors expression after severe crush spinal cord injury. IBRO-APRC School of Neuroscience 2016 and 20th Thai Neuroscience society International Conference, Naresuan UniversityPhitsanulok, Thailand, July 4-8, 2016, p. 87.
- 4.4.26. Nattaporn Pakpian Prapimpun Wongchirat, Kamonrat Phopin, Piyarat Govitrapong. The expression of beta site APP-cleaving enzyme 1 and presenilin 1 in Alzheimer's disease. IBRO-APRC School of Neuroscience 2016 and 20th Thai Neuroscience society International Conference, Naresuan UniversityPhitsanulok, Thailand, July 4-8, 2016, p. 94.
- 4.4.27. Wongprayoon and PiyaratGovitrapong (2016). Melatonin inhibits methamphetamine-mediated ER stress and cell death in SH-SY5Y cell line. Propagation in Neurodegenerative Disease Conference, 8th – 11th August 2016, Grand Hotel Malahide, County Dublin, Ireland, page 76.
- 4.4.28. Tanawan Leeboongam, Piyarat Govitrapong and Pansiri Phansuwan-Pujito (2016)

- Protective effect of melatonin on methamphetamine-induced synaptic degeneration in postnatal hippocampus. *Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: 14th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry*. doi: 10.3389/conf.fncel.2016.36.0018
- 4.4.29. Kamonrapat Sompub, Warin Krityakiarana, Nopporn Jongkamonwiwat, Sujira Mukda, Pansiri Phansuwan-Pujito and Piyarat Govitrapong (2016). Effects of melatonin on myelin-associated inhibitors after severe crush spinal cord injury in a mouse model. . *Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: 14th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry*. doi: 10.3389/conf.fncel.2016.36.00156
- 4.4.30. Nattaporn Pakpian, Prapimpun Wongchitrat, Kamonrat Phopin and Piyarat Govitrapong (2016). The expression of Presenilin-1, A Disintegrin and Metalloproteinase 17 in Alzheimer's disease. *Front. Cell. Neurosci. Conference Abstract: 14th Meeting of the Asian-Pacific Society for Neurochemistry*. doi: 10.3389/conf.fncel.2016.36.00188
- 4.4.31. Jirawoot Srisontiyakul, Elena V. Krstew, Hanna E. Kastman, Piyarat Govitrapong and Andrew J. Lawrent. Antagonism of alpha 6 nicotinic acetylcholine receptor by bPiDI can inhibit alcohol self-administration in alcohol-preferring rats. RGJ-PhD congress 17, June 8-11, 2016, Jomtien Palm Beach Hotel and Resort, Pattaya, Chonburi.
- 4.4.32. R. Pramong, P. Govitrapong, P. Phansuwan-Pujito, Spatial memory and clock genes expression in the hippocampus after melatonin administration. The 10th Federation of European Neuroscience Societies (FENS), July 2-6, 2016 | Copenhagen, Denmark Organised by the Danish Society for Neuroscience P. 3706,

4.5. ABSTRACTS (National)

2015-(National)

- 4.5.1. Piyatida Chanakamchokcharoen, Piyarat Govitrapong, Prapimpun Wongchitrat The effect of high-fat diet and streptozotocin-induced hyperglycemia on metabolic genes expression in the rat hippocampus. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand p.65.
- 4.5.2. Parichart Boontem, Kasima Ekthuwapranee and Piyarat Govitrapong. The effect of melatonin on β -secretase expression in cultured neural progenitor cells obtained from adult rat subventricular zone The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p.66.

- 4.5.3. Jatuporn Namyen, Kannika Permpoonpattana, Sujira Mukda, Piyarat Govitrapong. Melatonin attenuates methamphetamine-induced neuroinflammation in the rat brain The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand p. 67.
- 4.5.4. Varunya Chantadul, Kannika Permpoonputtana, Chutikorn Nopparat, Sujira Mukda, and Piyarat Govitrapong Melatonin mitigates inflammation in hydrogen peroxide-induced senescence-like SH-SY5Y neuroblastoma cells. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p.68
- 4.5.5. Patlada Tangweerasing, Kannika Permpoonputtana, Chutikorn Nopparat, Sujira Mukda, and Piyarat Govitrapong. Melatonin prevents Neuroinflammation in the hippocampus of aged mice. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p. 63.
- 4.5.6. Anawat Tangyen, Piyarat Govitrapong, Prapimpun Wongchitrat. The effect of aging on metabolic genes expression in rat hippocampus. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p. 70
- 4.5.7. Pawaris Wongprayoon and Piyarat Govitrapong (2015). Melatonin attenuates methamphetamine-induced overexpression of ER stress-related genes in SH-SY5Y cell line. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p. 61
- 4.5.8. Niyada Lansubsakul, Prapimpun Wongchitrat, Sujira Mukda, and Piyarat Govitrapong Melatonin modulates hippocampal neurogenesis alteration in high-fat diet-fed and streptozotocin-treated rats The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p. 72.
- 4.5.9. Chutikorn Nopparat, Puritat Sinjanakhom and Piyarat Govitrapong. Melatonin attenuates hyperglycemia state in SH-SY5Y cells via mTOR signaling pathway. The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p. 74.
- 4.5.10. Pattama Panmak, Ratchadaporn Pramong, Pansiri Phansuwan-Pujit, Piyarat Govitrapong. Effect of melatonin on the alteration of inflammatory maker in hippocampus of aging rats The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015

(TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p. 75.

- 4.5.11. Anorut Jenwitheesuk, Sujira Mukda, Piyaarat Govitrapongp. Effects of melatonin in aging hippocampus: involvement with FoxO1 pathway The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand. P. 76.
- 4.5.12. Kritchamon Thanaterakamon, Piyaarat Govitrapong, Banthit Chetsawang, Wilasinee Suwanjang. Neuroprotective effect of melatonin against ethanol-induced calpain activation and cell death in human dopaminergic cell lines The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand p. 78.
- 4.5.13. Kamonrapat Sompub, Warin Krityakiarana, Nopporn Jongkamonwiwat, Sujira Mukda, Pansiri Phansuwan-Pujito, Piyaarat Govitrapong Effect of melatonin on Nogo and oligodendrocyte myelin glycoprotein expression after severe crush spinal cord injury The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand p. 80.
- 4.5.14. Ratchadaporn Pramong, Piyaarat Govitrapong, Pansiri Phansuwan-Pujito. Effect of melatonin on the expression of Period2 and brain-derived neurotrophic factor in rat hippocampus The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p.81.
- 4.5.15. Tummapon Niyomphol, Waralee Ruankham, Wilasinee Suwanjang, Prapimpun Wongchitrat, Piyaarat Govitrapong, Kamonrat Phopin. Study of Drp1 mRNA expression in patients with Alzheimer's disease The 19th Thai Neuroscience Society Conference 2015 (TNS 2015), October 16, 2015, Mahidol University, Salaya, Nakornpathom, Thailand, p.86.

4.6. ผลิตนักศึกษาาระดับปริญญาโท-เอก

4.6.1. มีนักศึกษาปริญญาโท 11 คน (สำเร็จการศึกษา 9 คน) ดังนี้

- | | |
|---------------------------------|---------------------------|
| 1. นางสาว จิราพร ปานมณี | สำเร็จการศึกษา (ทุน พสวท) |
| 2. นางสาว วรัญญา จันตะดุลย์ | สำเร็จการศึกษา |
| 3. นางสาว นียดา ลั่นทรัพย์สกุล | สำเร็จการศึกษา |
| 4. นางสาว รุสนา อุสุม | สำเร็จการศึกษา |
| 5. นางสาว ภัทรรดา ตั้งวีระสิงห์ | สำเร็จการศึกษา |
| 6. นาย ภูริทัตต์ สิญจนาคม | สำเร็จการศึกษา |

7. นางสาว Zuroida Abubakar	สำเร็จการศึกษา
8. นางสาว วนิดา ทองคำ	สำเร็จการศึกษา
9. นางสาว วิจิตรา ชุมบัวทอง	สำเร็จการศึกษา
10. นาย กมลภัทร สัมพัฑ	กำลังศึกษา
11. นางสาว ณิชพร พากเพียร	กำลังศึกษา

4.6.2. มีนักศึกษาปริญญาเอก 17 คน (สำเร็จการศึกษา 13 คน) (ทุน คปก 7 คน) ดังนี้

1. นาง นุชนาฏ รักษ์	สำเร็จการศึกษา
2. นางสาว กสิมา เอกฐะปราณี	สำเร็จการศึกษา
3. นาย เดชา ปิ่นแก้ว	สำเร็จการศึกษา
4. นางสาว กุลวดี ตั้งมั่นสกุลชัย	สำเร็จการศึกษา
5. นางสาว อริสา ปาระมียอง	สำเร็จการศึกษา (ทุน คปก)
6. นาย ปวริศ วงษ์ประยูร	สำเร็จการศึกษา (ทุน คปก)
7. นาย ราเชนทร์ สิงหกุมาร	สำเร็จการศึกษา (ทุน คปก)
8. นางสาว รัชฎาภรณ์ ประมงค์	สำเร็จการศึกษา (ทุน คปก)
9. นางสาว ธนวรรณ ลีบุญงาม	สำเร็จการศึกษา (ทุน คปก)
10. นาย พิชัย จำนงค์ประโคน	สำเร็จการศึกษา
11. นางสาว กนกวรรณ วงศ์แก้ว	สำเร็จการศึกษา
12. นางสาว อโนรตร เจนวิถีสุข	สำเร็จการศึกษา
13. Mayuri Shukla	สำเร็จการศึกษา
14. นาย จิราวุฒิ ศรีสนธิยากุล	(ทุน คปก)
15. นางสาว วรพินท์ ชินฉลองพร	(ทุน คปก)
16. นางสาว จตุพร นามเย็น	กำลังศึกษา
17. นางสาว ปัทมา ปานมาก	กำลังศึกษา
18. นางสาว อัจฉราภรณ์ คำศรีใจ	กำลังศึกษา

4.6.3. มีนักวิจัยหลังปริญญาเอก 2 คน ดังนี้

1. ดร. ลัดดาวัลย์ การะโชติ
2. Dr. Mayuri Shukla

5. การนำผลงานไปใช้ประโยชน์ในเชิงสาธารณะ

1. เป็นการสร้างองค์ความรู้ใหม่แก่สาขาประสาทวิทยาศาสตร์ในการพิสูจน์ว่าสารเสพติดดังเช่น methamphetamine เป็นพิษต่อระบบประสาทอาจทำให้พัฒนาไปเป็นโรคสมองเสื่อมได้
2. ทำให้เข้าใจกลไกของการเกิดโรคสมองเสื่อม เช่น โรค Alzheimer
3. เป็นประโยชน์ต่อประชาชน เยาวชนที่เสพติดอยู่ หรือกำลังคิดอยากจะเสพติด ได้ตระหนักถึงโทษอันตรายจากการใช้สารเหล่านี้ โดยเฉพาะเยาวชนผู้ซึ่งจะใช้อनुพันธ์สารกระตุ้นในการลดน้ำหนัก
4. เป็นข้อมูลพื้นฐานเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนาด้านการแพทย์ทางคลินิกต่อไป
5. เป็นแนวทางในการพัฒนายาที่สามารถป้องกันรักษาสมองเสื่อมและพัฒนายาที่ช่วยให้สมองเจริญแก่เด็กเยาว์วัยให้เจริญพัฒนาสมบูรณ์
6. เป็นข้อมูลและแนวทางด้านการแพทย์ในการปลูกถ่าย neural stem cell สำหรับโรคที่เกี่ยวข้องกับ neurodegeneration เช่น โรค Parkinson โรค Alzheimer โรค dementia เป็นต้น
7. เป็นข้อมูลและแนวทางด้านการแพทย์เพื่อใช้รักษา/ป้องกันความเสี่ยงที่เป็นโรค Alzheimer สำหรับผู้สูงอายุ เมลาโท닌สามารถไปลดการสร้าง $A\beta$ ในสมองของสัตว์ทดลองที่มีอายุมากให้กลับไปเหมือนอายุน้อยวัย นี่เป็นข้อมูลใหม่ที่สำคัญอีกชิ้นหนึ่ง เพื่อนำไปพัฒนา ป้องกันการเกิด $A\beta$ ซึ่งเป็นการป้องกันการเกิดโรค AD ด้วย
8. เมลาโท닌สามารถยับยั้ง β -secretase และ γ -secretase แต่กระตุ้น α -secretase ซึ่งจะช่วยให้ลดการสร้าง $A\beta$ ที่เกิดในสมองของโรค Alzheimer ข้อมูลนี้ทำให้คณะแพทย์จากโรงพยาบาลเอกชนนำไปทดลองใช้กับผู้ป่วย Alzheimer

6. รางวัลที่ได้รับระหว่างรับทุนส่งเสริมกลุ่มวิจัย

มีนักศึกษาและนักวิจัยไปเสนอผลงานประชุมวิชาการต่างประเทศ ดังนี้

- มีนักศึกษา/นักวิจัยได้รับทุน APSN ไปเสนอผลงานวิจัยที่ไต้หวัน จำนวน 4 คน คือ
 1. ผศ.ดร. สุจิตรา มุกดา
 2. อ.ดร. ประพิมพรรณ วงศ์จิตรัตน์
 3. อ.ดร. นุชนาฏ รักษ์
 4. อ.ดร. วิลาสินี สุวรรณจำง ได้รับรางวัล outstanding oral presentation
- มีนักศึกษาได้รับทุนจาก ISN ไปเสนอผลงานวิจัยที่ออสเตรเลีย จำนวน 6 คน คือ
 1. นางสาว กสิมา เอกฐะปราณี
 2. นาย ปวริศ วงษ์ประยูร
 3. นางสาว รัชฎาภรณ์ ประมงค์
 4. นาย ภูริทัตต์ สิญญานาคม
 5. นางสาว ธนวรรณ ลีบุญงาม
 6. นางสาว จิราพร ปานมณี
- อาจารย์ในกลุ่มได้รับทุนจาก ISN ไปร่วมทำวิจัยที่ประเทศไต้หวัน เป็นเวลา 3 เดือน (สิงหาคม-ตุลาคม 2558)
ผศ.ดร. สุจิตรา มุกดา
- อาจารย์ในกลุ่มได้รับทุนจาก ISN ไปร่วมทำวิจัยที่ประเทศฝรั่งเศส เป็นเวลา 3 เดือน
อ.ดร. ประพิมพรรณ วงศ์จิตรัตน์
- มีนักศึกษาได้รับทุนจาก IBRO ไปเสนอผลงานวิจัยที่มหาวิทยาลัยนเรศวร จำนวน 3 คน คือ
 1. นางสาว ภัทรรดา ดังวีระสิงห์
 2. นาย กมลภัทร สัมพั
 3. นางสาว ณัฐพร พากเพียร
- มีนักศึกษาได้รับทุนจาก APSN ไปเสนอผลงานวิจัยที่ประเทศมาเลเซีย วันที่ 27-30 สิงหาคม 2559 คือ
 1. นางสาว ธนวรรณ ลีบุญงาม
 2. นาย กมลภัทร สัมพั
 3. นางสาวณัฐพร พากเพียร

7. การเชื่อมโยงทางวิชาการกับนักวิชาการอื่น ๆ กับต่างประเทศ

มีผู้เชี่ยวชาญจากต่างประเทศมาให้คำปรึกษาแนะนำคือ

1. Professor Isao Shimokawa, MD, PhD. Department of Investigative Pathology, Unit of Basic Medical Science, Graduate School of Biomedical Sciences, Nagasaki University, Sakamoto, Nagasaki, Japan จะมาบรรยายให้กับ มหาวิทยาลัยมหิดล ทำให้มีผลงานวิจัยร่วมกัน และต่อเนื่อง
อ.ปิยะรัตน์ได้เชิญ Professor Shimokawa มาบรรยายเรื่อง “A key role neuropeptide Y in regulation of aging and cancer by dietary restriction” ที่มหาวิทยาลัยมหิดล
2. Associate Professor Paul Klosen จาก Institute of Cellular and Integrative Neuroscience, University of Strasbourg, France มาร่วมงานวิจัยเกี่ยวกับ Diabetes, hippocampal plasticity and melatonin ทำให้ร่วมงานวิจัยต่อ
3. Dr. Tamao Endo (Vice director ของ Metropolitan Institute of Gerontology) ผู้เชี่ยวชาญ Research Team for Mechanism of Aging, Molecular Neurobiology of Aging เป็นที่ปรึกษา และจะเดินทางมาบรรยายให้กับงานประชุมวิชาการ The IAGG Asia/Oceania Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG Asia/Oceania 2015 Congress) โดยที่ประเทศไทยเป็นเจ้าภาพ อ.ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงศ์ เป็น chair ใน Session Biological Sciences
4. Dr. Aki Ishigami จะเดินทางมาบรรยายให้กับงานประชุมวิชาการ The IAGG Asia/Oceania Congress of Gerontology and Geriatrics (IAGG Asia/Oceania 2015 Congress) โดยที่ประเทศไทยเป็นเจ้าภาพ อ.ปิยะรัตน์ โกวิทตรพงศ์ เป็น chair ใน Session Biological Sciences
อ.ปิยะรัตน์ได้เชิญ Dr. Ishigami มาบรรยายเรื่อง “Abnormal accumulation of citrullinated proteins in Alzheimer’s disease” ที่มหาวิทยาลัยมหิดล
5. Dr Jean Lud Cadet, M.D., Chief, Molecular Neuropsychiatry Research Branch
Associate Director for Diversity and Outreach
Co-Director, Fellowship in Addiction and Aging
National Institutes of Health
National Institute on Drug Abuse
ผู้เชี่ยวชาญปัญหาเสพติดโดยเฉพาะอย่างยิ่งเรื่อง amphetamine ได้รับนักศึกษา นายปวิศ วงษ์ประยูร นักศึกษาทุน คปก ได้ไปศึกษาวิจัยที่ NIH เป็นเวลา 6 เดือน และได้รับคำปรึกษาด้านยาเสพติด Dr. Cadet ตั้งใจจะร่วมวิจัยปัญหาเสพติดและจะเดินทางมาประเทศไทยเมื่อ นายปวิศจะสอบ และ Dr. Cadet เป็นผู้เชี่ยวชาญปัญหาเสพติดก่อให้เกิดมองเสมออย่างไร
6. Professor Andrew J Lawrence, FBPharmacolS
NHMRC Principal Research Fellow

Associate Director, Florey Institute of Neuroscience & Mental Health

Head, Division of Behavioural Neuroscience

ผู้เชี่ยวชาญวิจัยปัญหาเสพติดโดยเน้นศึกษาด้าน behavior อ.ปิยะรัตน์ รู้จักกับ Professor Lawrence เป็นอย่างดี และได้ส่งนายจิราวุฒิ ศรีสนธิยากุล ไปศึกษาวิจัยปัญหาของการติด alcohol ศึกษาพฤติกรรมเสพติด alcohol และได้พัฒนาตัวใหม่ในการรักษาและให้เลิกเสพติด alcohol ซึ่ง Professor Lawrence ยินดีที่จะเดินทางมาให้คำแนะนำงานวิจัยด้านนี้และยินดีช่วย set เครื่องมือต่างๆ ในการศึกษาพฤติกรรมเสพติดยาชนิดต่างๆ และเดือนกันยายนนี้ อ.ปิยะรัตน์ และ อ.ปานสิริ ร่วมกับนักศึกษา 2 คน น.ส. รัชฎาภรณ์ และ น.ส.ธนวรรณ ไปเยี่ยมชมห้องปฏิบัติการและปรึกษาโครงการวิจัย และได้ส่ง น.ส.ธนวรรณ นักศึกษา คปก อยู่ทำวิจัยภายใต้คำแนะนำของ Prof. A. Lawrence

7. Russel J. Reiter, Ph.D., Dr.h.c.mult.

Professor of Cell Biology

Editor-in-Chief, Journal of Pineal Research

Thomson Reuters list of The World's Most Influential Scientific Minds

Department of Cellular and Structural Biology

UT Health Science Center

San Antonio, Texas 78229, USA

Professor Russel Reiter ผู้ทำวิจัยเรื่องเมลาโทนินเป็นเวลามากกว่า 50 ปีเป็นผู้เขียนหนังสือ Pocket book เรื่อง “Melatonin” เป็นหนังสือขายดีอันดับต้นๆ ของอเมริกา ทำให้ชาวอเมริกันยอมรับทานเป็นอาหารเสริมกันอย่างแพร่หลาย Professor Reiter เป็นผู้บุกเบิกสร้างองค์ความรู้ใหม่ เป็น editor ของ Journal of Pineal Research เป็นวารสารที่มี impact factor สูง คือ 9.6 อ.ปิยะรัตน์ มีการติดต่อทางวิชาการกับ Prof. Reiter เป็นประจำและเป็นเวลานานมาก ได้รับข้อคิด แง่คิดใหม่ๆ ด้านวิชาการของเมลาโทนิน Prof. Reiter ได้เดินทางมาประเทศไทย 2-3 ครั้ง ในปี 2561 อ.ปิยะรัตน์ จะเชิญท่านมาประเทศไทยเพื่อบรรยายและให้ความกระจ่างแก่ชาวไทย ให้ประชาชนชาวไทยมีโอกาสเข้าใจและเห็นคุณค่าของเมลาโทนิน

8. กิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้อง

8.1. เป็นวิทยากรบรรยายเผยแพร่ผลงานวิจัย

1. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Melatonin and aging process" ให้กับงานประชุมวิชาการเรื่อง Brain and mild ระหว่างสถาบันจิตเวชศาสตร์สมเด็จพระยา กรมสุภาพจิต และศูนย์วิจัยประสาทวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ณ โรงแรม Royal River กรุงเทพฯ วันที่ 5 มิถุนายน 2557
2. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Melatonin: antioxidant reducing oxidative stress, neuronal degeneration and death, implication in Parkinson's disease, neurotoxicity of amphetamine and antiaging" ในงานประชุมวิชาการเรื่อง "การพัฒนายุทธศาสตร์งานวิจัยเกี่ยวกับสมองจิตใจและพฤติกรรม" จัดโดยสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช) ร่วมกับสถาบันวิจัยระบบสาธารณสุข (สวรส) ณ โรงแรมมิราเคิลแกรนด์ คอนเวนชั่น หลักสี่ กรุงเทพฯ วันที่ 21-23 กรกฎาคม 2557
3. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญเป็นวิทยากรบรรยายเรื่อง "Melatonin in neurodegenerative disease" ในงานประชุมวิชาการ Melatonin Research Forum ครั้งที่ 2 เรื่อง "Therapeutic use of melatonin from basic research to clinical use" ณ ห้องมงกุฎเงิน โรงแรมโสมพะมิตร ขอนแก่น จัดโดยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น วันที่ 21-22 สิงหาคม 2557
4. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเป็น Plenary Lecture เรื่อง "Melatonin in the brain aging process" ที่งานประชุมวิชาการนานาชาติ International Association of Gerontology and Geriatrics IAGG Asia/Oceania 2015 ระหว่างวันที่ 19-22 ตุลาคม 2558 ที่ The International Convention and Exhibition Center จังหวัดเชียงใหม่
5. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเรื่อง "Melatonin regulating neurogenesis and neurodegeneration" ที่งานประชุมวิชาการนานาชาติ 8th FAOPS Congress ระหว่างวันที่ 22-25 พฤศจิกายน 2558 ณ Centara Grand and Bangkok Convention Center at Central World
6. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญให้ไปบรรยายเป็น Plenary Lecture 2 เรื่อง "Role of melatonin in controlling Alzheimer's disease" ที่ The 13th Asia Pacific Federation of Pharmacologist (APFP) Meeting วันที่ 2-3 กุมภาพันธ์ 2559 ณ The Berkeley Hotel, Bangkok, Thailand
7. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญจาก สกว. ไปบรรยายในงานประชุมนักวิจัยรุ่นใหม่พบเมธีวิจัยอาวุโส สกว. ครั้งที่ 15 เมื่อวันที่ 6-8 มกราคม 2559 ณ โรงแรมเดอะรีเจนท์ ซะอ์ฮาร์ต จังหวัดเพชรบุรี
8. อ.ปิยะรัตน์ได้รับเชิญให้ไปบรรยายจากสถาบันจิตเวชศาสตร์สมเด็จพระยา บรรยายวิชาการ The Neuroscience Symposium ครั้งที่ 2 เรื่อง Addicted Brain ในวันพฤหัสบดีที่ 16 มีนาคม 2560 เวลา 8.30 – 16.30 น. บรรยายเรื่อง The effect of methamphetamine on the brain ที่สถาบันจิตเวชศาสตร์สมเด็จพระยา

8.2. ตำแหน่งอื่นๆ ในวารสารต่างประเทศ

1. อ.ปิยะรัตน์ได้รับแต่งตั้งให้เป็น Associate Editor ของวารสาร Journal of Pharmacological Science เป็นปีที่ 5
2. อ.ปิยะรัตน์ได้รับแต่งตั้งให้เป็น Associate Editor ของวารสาร Journal of Pineal Research (IF = 9.6) ตั้งแต่เดือน กุมภาพันธ์ 2559
3. อ.ปิยะรัตน์ได้รับแต่งตั้งให้เป็น Associate Editor ของวารสาร Neurochem. Research
4. อ.ปิยะรัตน์ได้รับแต่งตั้งให้เป็น Associate Editor ของวารสาร Applied Clinical Research, Clinical trials and regulatory affairs Journal (ACCTRA)
5. อ.ปิยะรัตน์ได้รับแต่งตั้งให้เป็น Associate Editor ของวารสาร Global Drugs and Therapeutics (GDT)

8.3. จัดงานประชุมวิชาการ

1. จัดงานประชุมวิชาการ TRF ประจำปีที่ 1 (Distinguished Research Professor Grant สาขา Neuroscience) เรื่อง Melatonin and other factors as the potentially useful agents in attenuating brain aging and neurodegeneration and enhancing neurogenesis ในวันที่ 29 เมษายน พ.ศ. 2558 เวลา 8.30 - 17.30 น. ณ ห้องประชุม A107 สถาบันชีววิทยาศาสตร์ โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
2. จัดงานประชุมวิชาการ TRF ประจำปี 2 (Distinguished Research Professor Grant สาขา Neuroscience) เรื่อง Melatonin and other factors as the potentially useful agents in attenuating brain aging and neurodegeneration and enhancing neurogenesis ในวันที่ 22 เมษายน พ.ศ. 2559 เวลา 8.30 - 17.30 น. ณ ห้องประชุม A107 สถาบันชีววิทยาศาสตร์ โมเลกุล มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา
3. จัดงานประชุมวิชาการ TRF ประจำปี 3 (Distinguished Research Professor Grant สาขา Neuroscience) เรื่อง Melatonin and other factors as the potentially useful agents in attenuating brain aging and neurodegeneration and enhancing neurogenesis ในวันที่ 15-16 พฤษภาคม 2560 ณ ห้องประชุมใหญ่ ชั้น 2 ราชวิทยาลัยจุฬาภรณ์ อาคารสถาบัน บัณฑิตศึกษาจุฬาภรณ์

8.4. อื่นๆ

1. ผลงานวิจัยตีพิมพ์เรื่อง "Melatonin restored dexamethasone-induced depressive-like behavior and dexamethasone-induced impaired hippocampal neurogenesis in the mouse brain" ได้รับความสนใจมากจนมีผู้ download และผู้เข้ามาอ่าน 814 ครั้ง (ภายในประมาณ 1 ปี)
2. ผลงานวิจัยตีพิมพ์เรื่อง "Melatonin enhances adult rat hippocampal progenitor cell proliferation by ERK signaling pathway through melatonin receptor" ได้รับความสนใจมากจนมีผู้ download และผู้เข้ามาอ่าน 590 ครั้ง (ภายในประมาณครึ่งปี)

3. ผลงานวิจัยตีพิมพ์เรื่อง “Melatonin ameliorates the inhibitory effects of dexamethasone on adult hippocampal progenitor cells proliferation via upregulation of Erk1/2 phosphorylation” ได้รับความสนใจมากจนมีผู้ download และผู้เข้ามาอ่าน 324 ครั้ง (ภายในประมาณครึ่งปี)
4. ผู้ประเมินข้อเสนอโครงการวิจัยงานวิจัยมหิตล ปีละ 10 เรื่อง
5. ผู้ประเมินข้อเสนอโครงการวิจัยงานวิจัย สกว ปีละ 10 เรื่อง
6. ประเมิน paper ใน journal ต่างๆ ปีละ 10 เรื่อง เช่น J Pineal Res (10 เรื่อง)
7. เป็น Associate Editor ของ J. Pharmacological Science ประเมิน paper ต่างๆ ในวารสารนี้ปีละ 10 paper
8. มีการประชุมประจำปีทุกปี และประชุมกลุ่มย่อยทุก 2 เดือน