1. Abstract

There is increasing evidence suggesting that the brain plays major role in regulating lifespan as well as health status during the aging process. The nervous system contains several signaling pathways that influence and regulate lifespan in individuals. Cells in the brain die following stroke, trauma and chronic neurodegenerative disease. Many factors affect neurogenesis, such as, aging, various molecules including hormones, neurotransmitters or trophic factors. In particular, glucocorticoids (stress hormone) and drugs of abuse have been shown to exert a negative influence that may account for the marked reduction in granule cell proliferation caused by stress and addiction. Thus, studies are encouraged and needed to identify, characterize and elucidate mechanisms of certain factors that are both positive and negative, influencing the neurogenesis (brain development) throughout life-span, including aging periods and aged-related neurodegenerative diseases.

Melatonin can exert neuroprotective effects in various models of neurodegeneration as studied by our group. Firstly, our results indicate that pretreatment with melatonin markedly prevented the loss of cell viability caused by amphetamine treatment in the SK-N-SH dopamine cells. It prevented the overproduction of reactive oxygen species (ROS), lipid peroxidation, depletion of intracellular ATP levels and induction of α-synuclein (an abnormal protein shown in Parkinson's brain) expression, caused by amphetamine. Secondly, our result also shows that amphetamine induces autophagy by inhibiting the signaling pathway and thereby leads to cell death. Moreover, we demonstrated a novel role for melatonin in enhancing mammalian target of the rapamycin (mTOR) signaling. Thirstily, our studies demonstrated that amphetamine causes the induction of proinflammatory mediators (which has been demonstrated in post-mortem Alzheimer's brain), in microglia. In addition, we, the first group, demonstrated that amphetamine causes inflammatory effect directly in neuron and we also examined the anti-inflammatory effect of melatonin.

Besides the neuroprotective effect, increasing evidence suggests that melatonin might be an interesting agent in the context of neurogenesis. We have recently found that in the adult mouse, the precursor cells from subventricular zone of the lateral ventricle, the main neurogenic area of the adult brain, express melatonin receptors. In addition, precursor cells derived from this area treated with melatonin exhibited increase proliferative activity. Furthermore melatonin also induced the differentiation of precursor cells to neuronal cells without an upregulation of the number of glia cells. Furthermore, we found that pretreatment with melatonin prevented glial cell activation and βIII-tubulin reduction, caused by d-amphetamine in both the hippocampus and

prefrontal cortex. We showed that melatonin promoted the proliferation of precursor cells obtained from adult mouse subventricular zone and the differentiation of precursor cells to neurons. This further confirm the notion that melatonin enhances neurogenesis *in vivo* and modulates the survival of newborn neurons in the adult hippocampus.

Besides, amphetamine causes the detrimental effect to neuronal cells, chronic stress induces neuropathological alteration. We used the precursor cells from the adult hippocampus to determine the effect of melatonin on dexamethasone, an agonist of glucocorticoid receptor, induced the decrement of precursor cells proliferation. We found that dexamethasone decreased the proliferation as well as the level of doublecortin and βIIItubulin. Interestingly, these effects are reversed by melatonin pretreatment. We attempted to explore whether chronic DEX administration could alter the memory process and what is the mechanism of the detrimental effect of DEX. The result showed that mice treated with DEX consecutively for 21 days had significantly impaired spatial memory and reduced BDNF, NR2A/B, synaptophysin and CaMKII expressions in both hippocampus and prefrontal cortex. Pretreated with melatonin prior to DEX, mice showed shorter latencies and longer time spent in target quadrant. Melatonin significantly prevented DEX-induced reduction in NR2A/B, BDNF and CamKII expressions. Furthermore, our results showed that the number of BrdU-immunopositive cells and doublecortin were significantly reduced in DEX - treated mice. Pretreatment with melatonin was found to restore BrdU-immunoreactivity and DCX expression in the dentate gyrus. Furthermore, pretreatment with melatonin prevented DEX - induced reduction in glucocorticoid receptors and Erk 1/2 in hippocampal brain area. The data demonstrate a novel effect of melatonin on the adult hippocampal neurogenesis. The present study clearly demonstrated that cognitive impairment caused by DEX was reverted by melatonin treatment. A new role for melatonin that is associated with neurogenesis.

These works demonstrate a novel role for melatonin as a neuroprotective and a neurogenic agent. The discovery of the mechanism by which melatonin modulates neural precursor cell proliferation and differentiation may be used to develop novel strategies for the treatment of neurodegenerative diseases.

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

บทคัดย่อ

สมองมีบทบาทสำคัญในการควบคุมสุขภาพร่างกายตลอดชีวิตขัยของเรา โดยระบบประสาทจะส่งสัญญาณต่างๆ ไปควบคุมร่างกาย เซลล์ประสาทจะตายเมื่อร่างกายประสบกับปัญหาเกี่ยวกับ stroke trauma และปัญหาโรคสมองเสื่อม มีปัจจัยต่างๆ มากมายที่มีผลกระทบต่อการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ เช่น วัยชราภาพ ฮอร์โมนต่างๆ สารสื่อประสาท สาร trophic factor ต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเมื่ออยู่ในสภาวะเครียด การเสพยาเสพติดเหล่านี้ จะส่งผลกระทบในทางลบต่อเซลล์ประสาท ดังนั้นการศึกษาวิเคราะห์ปัจจัยที่เป็นทั้งบวกและลบต่อการพัฒนาของสมอง การสร้างเซลล์ประสาทใหม่ตลอดชีวิตของมนุษย์นั้นจึงจำเป็นและสำคัญมาก เพื่อนำไปสู่ความเข้าใจกลไกขบวนการของชราภาพและโรคสมองเสื่อมต่างๆ

เมลาโทนินสามารถป้องกันการเสื่อมของประสาทใน model ต่าง ๆ ของโรคสมองเสื่อม ในการวิจัยนี้คณะวิจัยได้ใช้หลาย model ที่จะรายงานนี้โดยใช้สารแอมเฟตามีนเป็น model ของสมองเสื่อม จากงานวิจัยนี้ค้นพบว่า 1. แอมเฟตามีนทำลายเซลล์ประสาทโดยผ่านขบวนการ oxidative stress จากการเลี้ยงเซลล์ประสาทโดปามีน SK-N-SH ทำให้เกิดอนุมูลอิสระ (ROS) เกิด lipid peroxidation ทำลายการสร้างพลังงาน ATP นอกจากนี้ยังพบว่าสารแอมเฟตามีนยังเพิ่มปริมาณการรวมกลุ่มกันของโปรตีน α-synuclein (ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกิดในสมองของผู้เป็นโรคพาร์กินสัน) จากผลที่กล่าวมาพบว่า oxidative stress เป็นสาเหตุที่สำคัญอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาทโดปามีน จากการทดลองศึกษาผลของเมลาโทนินต่อการเป็นพิษของเซลล์ประสาทโดปามีนจากสารแอมเฟตามีน พบว่าเมลาโทนินสามารถป้องกันการตายของเซลล์ ลดอนุมูลอิสระ และลดการสร้าง α-synuclein 2. จากผลการทดลองพบว่าแอมเฟตามีนทำให้เซลล์ประสาทตายโดยขบวนการของ autophagy และพบว่าเมลาโทนินสามารถป้องกันการเกิด autophagy ได้โดยผ่านขบวนการเพิ่มปริมาณของ mammalian target of rapamycin (mTOR) 3. จากการทดลองพบว่าแอมเฟตามีนทำให้เกิดปริมาณ proinflammatory mediator ซึ่งจะพบมากในสมองของผู้เสียชีวิตด้วยโรคสมองเสื่อม Alzheimer แอมเฟตามีนทำให้เกิด cytokine ภายใน microglia และยังเป็นการค้นพบครั้งแรกว่า ทำให้เกิด cytokine ภายในเซลล์ประสาทโดยตรงได้ ซึ่งทั้งใน glia หรือในเซลล์ประสาทจะส่งผลให้เซลล์ตายได้ เมลาโทนินสามารถยับยั้งการเกิด proinflammation ได้

นอกจากขบวนการป้องกัน ยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทแล้วนั้น เมลาโทนินยังสามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ได้ (neurogenesis) จากผลการทดลองโดยสกัด precursor cell จากบริเวณ subventricular zone ซึ่งเป็นบริเวณที่มี neural stem cell มากและมี melatonin receptor เมื่อนำมาเลี้ยงในน้ำเพาะเลี้ยงพบว่าเมื่อใส่เมลาโทนินๆ จะเพิ่มการ proliferation เพิ่มจำนวน neurosphere และเมลาโทนินยังกระตุ้นการ differentiation ทำให้ precursor cell นั้น differentiate ไปเป็นเซลล์ประสาทโดยไม่ได้เพิ่มปริมาณ glia cell จากการทดลองในสัตว์ทดลองที่ได้รับแอมเฟตามีน พบว่าแอมเฟตามีนเพิ่ม glia cell activation และลดปริมาณ β-III tuberlin (marker ของเซลล์ประสาท) บริเวณ

hippocampus และ prefrontal cortex ทั้ง 2 อย่างนี้ถูกยับยั้งได้ด้วยการฉีดเมลาโทนิน แสดงว่าเมลาโทนินสามารถกระตุ้นการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ได้บริเวณ hippocampus

นอกจากแอมเฟตามีนแล้ว ความเครียดจะทำลายเซลล์ประสาทด้วย จากการทดลองโดยการให้ dexamethasone (DEX) (stress hormone) แก่หนูพบว่า DEX ลดทั้ง proliferation และลดปริมาณของ doublecortin และ β-III tuberlin เมลาโทนินสามารถลดผลการทดลองข้างต้นนี้ เพื่อพิสูจน์ว่าถ้าได้รับ DEX เป็นเวลานานมีผลต่อพฤติกรรมอย่างไร และผ่านกลไกอะไรบ้าง ดังนั้นคณะวิจัย จึงได้ฉีด DEX แก่หนูเป็นเวลา 21 วันแล้วทดสอบการเรียน การจำ ปรากฏว่าหนูลดความสามารถในการเรียน การจำ ลดปริมาณ BDNF, $NR_{2A/B}$ glutamate receptor, synaptophysin, CAMKII ในสมองบริเวณ hippocampus และ prefrontal cortex ทั้งหมดนี้จะยับยั้งได้ด้วยการฉีดเมลาโทนิน และหนูมีความสามารถในการเรียน การจำดีขึ้น ดีกว่ากลุ่ม control เพื่อพิสูจน์ว่า DEX มีผลต่อการสร้างเซลล์ประสาทใหม่หรือไม่ จึงพิสูจน์โดยการใช้ BrdU และ doublecortin พบว่าลดลงบริเวณ dentate gyrus เมื่อหนูได้รับ DEX ยิ่งกว่านั้นเมื่อฉีดเมลาโทนินก่อนฉีด DEX จะสามารถยับยั้งการลดปริมาณเซลล์ประสาทใหม่ได้ และขบวนการเกิดผ่านขบวนการ $Erk_{1/2}$ signaling ดังนั้นจากการทดลองทำให้ทราบว่าความเครียดหรือฮอร์โมนความเครียดจะลดปริมาณของเซลล์ประสาทใหม่ เมลาโทนินสามารถป้องกันการลดปริมาณนี้ นอกจากนี้เมลาโทนินเองสามารถเพิ่มการสร้างปริมาณเซลล์ประสาทนี้

ดังนั้นจากงานวิจัยที่คณะวิจัย กลุ่มนี้ทำ ทำให้ได้ข้อมูลที่เกี่ยวกับการสร้างเซลล์ประสาทใหม่ การเสื่อมของสมอง ทราบปัจจัยที่เป็นผลบวก (เช่น เมลาโทนิน) และผลลบ (เช่น สารเสพติดแอมเฟตามีน ความเครียด) กลไกและผลการวิจัยนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นในการพัฒนาเพื่อนำไปใช้ในทางคลินิกในการช่วยปัญหาของโรคสมองเสื่อม เช่น Alzheimer, Parkinson หรือโรคชราต่างๆ

คำหลัก

เมลาโทนิน แอมเฟตามีน เซลล์ต้นกำเนิดระบบประสาท การสร้างเซลล์ประสาทใหม่ อนุมูลอิสระ โรคพาร์กินสัน โรคอัลไซเมอร์ ความเครียด การเรียนการจำ โรคสมองเสื่อม ยาเสพติด