

การเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์แมพไคเนสในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกและ  
เซลล์ค้ำจุนในหนูที่ได้รับยาพาคลิแทคเซล



นางสาวณัฐภาณี ถนอมศรีเดชชัย

ศูนย์วิทยทรัพยากร

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4622-9

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ALTERATION IN THE ACTIVITY OF MAPKs IN PRIMARY SENSORY  
NEURONS AND ASSOCIATED GLIAL CELLS IN PACLITAXEL-  
TREATED RATS

Miss Natthapaninee Thanomsridetchai



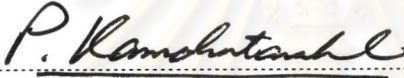
ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science  
Faculty of Medicine  
Chulalongkorn University  
Academic Year 2005  
ISBN 974-17-4622-9

Thesis Title   ALTERATION IN THE ACTIVITY OF MAPKs IN PRIMARY  
   SENSORY NEURONS AND ASSOCIATED GLIAL CELLS IN  
   PACLITAXEL-TREATED RATS  
By   Miss Natthapaninee Thanomsridetchai  
Field of Study   Medical Science  
Thesis advisor   Assistant Professor Sithiporn Agthong, M.D., Ph.D.  
Thesis Co-advisor   Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.

---


Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment  
of the Requirements for the Master's Degree

  
.....Dean of the Faculty of Medicine  
(Professor Pirom Kamolratanakul, M.D.)

#### THESIS COMMITTEE

  
.....Chairman  
(Assistant Professor Wilai Anomasiri, Ph.D.)

  
.....Thesis Advisor  
(Assistant Professor Sithiporn Agthong, M.D., Ph.D.)

  
.....Thesis Co-Advisor  
(Associate Professor Vilai Chentanez, M.D., Ph.D.)

  
.....Member  
(Assistant Professor Sompol Sanguanrungrasirikul, M.D., M.Sc.)

ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย: การเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์แมพไคเนสในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกและเซลล์ค้ำจุนในหนูที่ได้รับยาพาคลิแทคเซล (ALTERATION IN THE ACTIVITY OF MAPKs IN PRIMARY SENSORY NEURONS AND ASSOCIATED GLIAL CELLS IN PACLITAXEL-TREATED RATS) อ.ที่ปรึกษา: ผศ.นพ.สิทธิพร แอภทอง, อ. ที่ปรึกษา  
ร่วม : รศ.พญ.วิไล ชินธเนศ, 62 หน้า. ISBN 974-17-4622-9.

ยาพาคลิแทคเซล (paclitaxel) หรือชื่อทางการค้าคือแทคซอล (taxol) เป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิด แต่ผลข้างเคียงที่พบได้คือการเกิดพยาธิสภาพต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อระบบประสาทรับความรู้สึก ซึ่งกลไกการเกิดภาวะนั้นนั้นยังไม่สามารถอธิบายได้ชัดเจน Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) เป็นเอนไซม์ในกลุ่มไคเนสที่จำเพาะกับกรดอะมิโนเซอร์อินและทรีโอซีน ซึ่งประกอบด้วย ERK, JNK และ p38 ซึ่งมีหลักฐานพบการกระตุ้นเอนไซม์ MAPKs ทั้งในเซลล์ประสาทและเซลล์ชนิดอื่นๆ เมื่อให้ยาพาคลิแทคเซล ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาระดับการทำงานของเอนไซม์ MAPKs ทั้ง 3 กลุ่ม ในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกและเซลล์ค้ำจุนในสัตว์ทดลองที่เกิดพยาธิสภาพต่อระบบประสาทส่วนปลายที่เกิดจากยาพาคลิแทคเซล โดยฉีดยาพาคลิแทคเซล ขนาด 16 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมให้กับหนูวิสตาร์ เพศผู้ในกลุ่ม P และฉีดครีโมฟออร์ (cremophor) ผสมกับเอทานอล ซึ่งเป็นตัวทำละลายยา ให้กับกลุ่ม V สัปดาห์ละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 5 สัปดาห์ติดต่อกัน และทดสอบการตอบสนองต่อการรับความรู้สึกความเจ็บปวด และการนำกระแสประสาท ผลพบว่าค่าเวลาในการตอบสนองต่อการรับความรู้สึกความเจ็บปวดจากความร้อนทั้งที่ หางและที่เท้าหลังของหนูที่ได้รับยาพาคลิแทคเซลยาวนานขึ้น รวมทั้งการนำกระแสประสาทที่หางก็ลดลงด้วย ซึ่งบ่งบอกถึงภาวะการเกิดพยาธิสภาพต่อระบบประสาทส่วนปลาย จากนั้นเก็บปมประสาทรับความรู้สึกของหนูในระดับไขสันหลังส่วนเอวที่ 4 และ 5 นำมาวัดระดับโปรตีนโดยวิธีเวสเทิร์นบลอต (Western blot) ผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ ERK อย่างไม่มีนัยสำคัญ ในปมประสาทรับความรู้สึกของหนูที่ได้รับยาพาคลิแทคเซลเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม สำหรับทั้งในกลุ่ม V และกลุ่ม P มีการเพิ่มระดับการทำงานของเอนไซม์ p38 อย่างไม่มีนัยสำคัญเช่นกัน ส่วนเอนไซม์ JNK มีระดับการทำงานที่ใกล้เคียงกันใน 3 กลุ่มทดลอง ทั้งนี้ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของเอนไซม์ MAPKs ในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกและเซลล์ค้ำจุนของหนูที่ได้รับยาพาคลิแทคเซล จนกว่าจะได้ทำการศึกษาที่ระยะเวลาต่างๆหลังจากให้ยา

สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.....

ปีการศึกษา.....2548.....

ลายมือชื่อนิสิต.....ณัฐภาณินี ถนอมศรีเดชชัย.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..........

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..........

# # 467 47230 30: MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORD: PACLITAXEL / TAXOL / MAPKs / PERIPHERAL NEUROPATHY

NATTHAPANINEE THANOMSRIDETCHAI: ALTERATION IN THE ACTIVITY OF MAPKs IN PRIMARY SENSORY NEURONS AND ASSOCIATED GLIAL CELLS IN PACLITAXEL-TREATED RATS. THESIS ADVISOR: ASSIST. PROF. SITHIPORN AGTHONG, M.D., PH.D. THESIS CO-ADVISOR: ASSOC. PROF. VILAI CHENTANEZ, M.D., PH.D. 62 pp, ISBN 974-17-4622-9.

Paclitaxel (Taxol<sup>®</sup>), an effective anti-neoplastic agent in the treatment of several solid tumors, produces a peripheral neuropathy with sensory predominance as one of its toxic side effects. Little is known regarding the mechanisms underlying this complication. Mitogen-activated protein kinases (MAPKs), a family of serine-threonine specific kinase comprised of extracellular signal regulated kinase (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and p38 kinase, have been shown to be activated in neuronal and other cell types in response to paclitaxel. Therefore, this work was aimed to study the activity of all three subfamilies of MAPKs in primary sensory neurons and glial cells in the animal model of paclitaxel-induced neuropathy. Adult male Wistar rats were given a weekly intraperitoneal injection of 16 mg/kg paclitaxel (P group) or vehicle (Cremophor+ethanol, V group) for 5 consecutive weeks and were subjected to quantitative sensory tests and nerve conduction velocity (NCV) study. Prolonged reaction time to the heat at the tail and hind paw including reduced tail NCV was observed, indicating the neuropathy. Subsequently, the animals were sacrificed and L4-5 dorsal root ganglia (DRG) were removed for Western blot analysis. The immunoblots showed an insignificant increase in the phosphorylation of ERK in the DRG of paclitaxel-treated rats compared with those of the controls. Similarly, an insignificant activation of p38 was demonstrated in the V and P groups relative to the controls. For JNK, comparable levels of phosphorylation in all groups were observed. It cannot be concluded that there is no change in the activity of MAPKs in DRG in response to paclitaxel until further studies in various time points are completed.

Field of study ..... Medical Science.....

Academic year ..... 2005.....

Student's signature.....Natthapaninee Thanomsridetchai.....

Advisor's signature.....Sithiporn Agthong.....

Co-Advisor's signature.....Vilai Chentanez.....

## ACKNOWLEDGEMENTS

The work in this thesis has been completed with the help from my advisor Assistant Professor Dr. Sithiporn Agthong at Department of Anatomy, who did not only offer me the opportunity, but also guided me through the entire project. I also greatly appreciate in his constructive comments and invaluable suggestions during the preparation of this thesis.

I would like to express my sincere appreciation to my co-advisor Associate Professor Dr. Vilai Chentanez at Department of Anatomy for giving me one of the most important opportunities in my life and providing constant support and encouragement, including giving advises and guidances.

I am deeply grateful to my thesis exam committee Assistant Professor Wilai Anomasiri at Department of Biochemistry and Assistant Professor Dr. Sompol Sanguanrungririkul at Department of Physiology who gave me valuable comments, suggestions, and encouragement essential for the successful completion of this thesis.

I am highly indebted to Mrs. Attitaya Kaewsema for her invaluable technical advice and friendship for helping me promptly and efficiently. She is, therefore, regarded as one of my teachers.

Many thanks to Mr.Teerayuth, Ms.Janjira, Ms.Kannika, Mr.Terasuk, Ms.Natthara, Mr.Thanasil, Mrs.Phinidda, members of Peripheral nerve research unit, for good friendship and encouragement.

In addition, I also would to thank all students in Medical science and Biomedical science its completion especially Ms.Thivaratana, Ms.Nootchanat and Ms.Petcharat for their contribution to the completion of this thesis.

I feel a deep sense of gratitude to my aunt (my first teacher), who has given me the vision and has taught me the good things that really matter in life. In special, I would like to give my special thanks to Mr. Pattadon Sukkapan who always offers great help in difficult times and love enabling me to complete the thesis work.

I gratefully acknowledge the financial support from:

- Office of commission for higher education-CU graduate thesis grant
- The royal Bangkok sports club (RBSC) scholarship
- Graduate thesis grant from Medical science program
- Teaching assistance fellowship from Graduate School

Special thanks to

- All personnels in the animal research center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University
- Chula MRC for allowing me to use some equipment
- Graduate School, Faculty of Medicine and Graduate School, Chulalongkorn University

## TABLE OF CONTENTS

	<b>Page</b>
<b>ABSTRACT (THAI)</b> .....	iv
<b>ABSTRACT (ENGLISH)</b> .....	v
<b>ACKNOWLEDGEMENTS</b> .....	vi
<b>TABLE OF CONTENTS</b> .....	vii
<b>LIST OF FIGURES</b> .....	viii
<b>LIST OF ABBREVIATIONS</b> .....	ix
<b>CHAPTER</b>	
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	1
<b>II. LITERATURE REVIEW</b> .....	5
<b>III. MATERIALS AND METHODS</b> .....	19
<b>IV. RESULTS</b> .....	33
<b>V. DISCUSSION AND CONCLUSION</b> .....	42
<b>REFERENCES</b> .....	46
<b>APPENDICES</b> .....	57
<b>BIOGRAPHY</b> .....	62

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## LIST OF FIGURES

<b>Figure</b>		<b>Page</b>
1	Activation of MAPK cascades .....	11
2	Activation of the three main MAP kinases .....	14
3	CMAP recording after two-point nerve stimulation .....	23
4	Diagram explaining positions of stimulating and recording electrode in NCV study .....	25
5	Comparison of body weight (g) between control, vehicle and paclitaxel groups .....	33
6	Comparison of reaction times from Tail flick analgesic test between control, vehicle and paclitaxel groups .....	34
7	Comparison of reaction times from Hind paw analgesic test between control, vehicle and paclitaxel groups .....	35
8	Comparison of Nerve conduction velocity between control, vehicle and paclitaxel groups .....	36
9	Comparison of ERK phosphorylation in DRG between control, vehicle and paclitaxel groups .....	38
10	Comparison of JNK phosphorylation in DRG between control, vehicle and paclitaxel groups .....	39
11	Comparison of p38 phosphorylation in DRG between control, vehicle and paclitaxel groups .....	40

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



## LIST OF ABBREVIATIONS

ANOVA	One-way analysis of variance
APS	Ammonium persulphate
ASK1	Apoptosis signal-regulating kinase1
ATF-2	Activating transcription factor 2
BSA	Bovine serum albumin
CNS	Central nervous system
DRG	Dorsal root ganglia
ERK	Extracellular-regulated protein kinase
FDA	Food and Drug Administration
HRP	Horse-radish peroxidase
JNK	c-Jun NH <sub>2</sub> -terminal protein kinase
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MAPKKK or MEKK	MAPK kinase kinase
MEF	Myocyte enhance factor
MKK or MAPKK or MEK	MAPK kinase
MKP	MAPK phosphatase
NaCl	Normal saline
NCV	Nerve conduction velocity
NGF	Nerve growth factor
PC12 cells	Pheochromocytoma cells
PNS	Peripheral nervous system
RTK	Tyrosine kinases
SAPK	Stress-activated protein kinases
SEM	Standard error of mean
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	Signal transducer and activator of transcription
TCF	The ternary complex factor
TEMED	N, N, N', N'-tetramethylethylene diamine