

รายงานการวิจัย

การศึกษาผลการยับยั้งเอนไซม์ MAPK ERK ต่อภาวะการเสื่อม  
ของเส้นประสาทส่วนปลายในโรคเบาหวาน

The study of the effects of MAPK ERK inhibition on diabetic  
neuropathy

คณะผู้วิจัย

อาจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิพร แอกทอง  
อาจารย์นายแพทย์ธนศิลป์ หวลมานพ  
นางอติตยา แก้วเสมา

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนจากเงินงบประมาณแผ่นดิน ประจำปีงบประมาณ 2549

บทคัดย่อ

เส้นประสาทเสื่อมเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยในโรคเบาหวานและเป็นสาเหตุสำคัญของความพิการ อย่างไรก็ตามยังไม่มีวิธีการรักษาที่ได้ผลดี มีหลักฐานว่าพบการกระตุ้นกลุ่มเอนไซม์ mitogen-activated protein kinases (MAPKs) ซึ่งประกอบไปด้วย ERK, JNK และ p38 ในระบบประสาทส่วนปลายของสัตว์ทดลองและผู้ป่วยเบาหวาน นอกจากนี้มีการทดลองยับยั้ง p38 แล้วพบว่าลดความผิดปกติในการนำกระแสประสาทที่พบในหนูเบาหวานได้ หากแต่ยังไม่มีความเกี่ยวข้องกับบทบาทของ ERK ที่ถูกกระตุ้นในเวลาเดียวกับ p38 ดังนั้นโครงการนี้จึงมีจุดประสงค์เพื่อศึกษาบทบาทของ ERK ต่อภาวะเส้นประสาทเสื่อมในหนูเบาหวานโดยใช้ยา u0126 เพื่อยับยั้งการทำงานของ ERK และวัดการทำงานรวมทั้งลักษณะทางโครงสร้างของเส้นประสาท ใช้หนูทดลอง 3 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม กลุ่มเบาหวานที่ไม่ได้รับยา และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับ u0126 ในขนาด 200 µg/kg/day เข้าช่องท้อง วัดความเร็วการนำกระแสประสาทที่ขาหลังทุกสัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลองเมื่อหนูเป็นเบาหวานได้ 8 สัปดาห์ พบว่าความรุนแรงของเบาหวานไม่มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มเบาหวานทั้งสอง ส่วนความเร็วการนำกระแสประสาทที่ลดลงของ sensory แต่ไม่ใช่ motor มีแนวโน้มดีขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยา ส่วนความผิดปกติเชิงโครงสร้างของเส้นประสาทและปมประสาทไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มเบาหวาน ทั้งนี้ผล Western blot ยืนยันประสิทธิภาพการยับยั้งการทำงานของ ERK โดย u0126 จากข้อมูลข้างต้นยังไม่เห็นผลชัดเจนของการยับยั้ง ERK ต่อความผิดปกติต่างๆ ในภาวะเส้นประสาทเสื่อมจากเบาหวาน จำเป็นต้องมีการปรับเปลี่ยนการทดลองเพื่อให้สามารถตอบปัญหาได้แน่ชัดยิ่งขึ้นต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เลขหมู่  
เลขทะเบียน 013896  
วัน, เดือน, ปี 28 พ.ค. 51

### Abstract

Neuropathy is a common complication of diabetes leading to disability. However, no effective treatment is currently available. Evidence shows an activation of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) which comprise of ERK, JNK and p38 in the peripheral nervous system of diabetic animals and patients. Furthermore, inhibition of p38 has been associated with an improved nerve conduction defect in rats. However, there are no data regarding the role of ERK simultaneously activated with p38. This project was aimed to study the role of ERK in rodent diabetic neuropathy by inhibiting ERK using u0126 and functional and structural abnormalities were then evaluated. Rats were divided into 3 groups: control, diabetic and diabetic + u0126 (200 µg/kg/day i.p.). Nerve conduction velocity was measured weekly until the end of study (8<sup>th</sup> week of diabetes). Results showed the similar severity of diabetes between the diabetic groups. Sensory, but not motor; nerve conduction velocity deficit was likely improved by u0126. The structural defects were similar between the two diabetic groups. Western blot results indicated significant inhibition of ERK by u0126. In conclusion, due to inconclusive results observed in this study, protocol modifications should be done to provide more consistent data.

ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

nerve conduction velocity

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย	5
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย	6
ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย	6
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	7
วิธีการดำเนินงานวิจัย	7
ผลการวิจัย	9
อภิปรายและวิจารณ์	13
สรุปและข้อเสนอแนะ	14
บรรณานุกรม	15
ประวัตินักวิจัยและคณะ	16

## สารบัญตาราง (List of Tables)

ตารางที่ 1 น้ำหนักและระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลอง	9
ตารางที่ 2 ค่าต่างๆ จากการทำ nerve morphometry	12
ตารางที่ 3 ค่าต่างๆ จากการทำ DRG morphometry	13

## สารบัญภาพ (List of Illustration)

รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยของ motor nerve conduction velocity	10
รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ sensory nerve conduction velocity	10
รูปที่ 3 ระดับของ ERK-P และ ERK-T โดยเทคนิค Western blot ใน DRG	11
รูปที่ 4 ตำแหน่งของ ERK-P โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry ใน DRG	12
รูปที่ 5 จำนวนของ nerve fiber เป็น %	13

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

ANOVA	One way analysis of variance
DMSO	Dimethylsulfoxide
DRG	Dorsal root ganglion
ERK	Extracellular signal-regulated kinase
FITC	Fluorescein isothiocyanate
HRP	Horse radish peroxidase
JNK	c-Jun amino-terminal protein kinase
MAPKs	Mitogen-activated protein kinases
MNCV	Motor nerve conduction velocity
STZ	Streptozotocin
SNCV	Sensory nerve conduction velocity



ศูนย์วิทยทรัพยากร  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ในปัจจุบันโรคเบาหวานเป็นปัญหาทางด้านสาธารณสุขที่สำคัญปัญหาหนึ่งของทั้งประเทศที่พัฒนาแล้วและประเทศกำลังพัฒนารวมทั้งประเทศไทย ผู้ป่วยเบาหวานในประเทศไทยมักมาพบแพทย์หลังจากเริ่มเป็นเบาหวานเป็นระยะเวลาอันยาวนานเนื่องด้วยโรคนี้นักไม่มีอาการในระยะแรกรวมทั้งผู้ป่วยขาดความใส่ใจในการตรวจสุขภาพ ทำให้มาพบแพทย์ด้วยภาวะแทรกซ้อนต่างๆ ของเบาหวาน เช่น ไตเสื่อม จอประสาทตาเสื่อม เส้นประสาทเสื่อม

เส้นประสาทส่วนปลายเสื่อมเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยของโรคเบาหวานและเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยเบาหวานต้องพิการ เนื่องจากภาวะนี้ก่อให้เกิดการเสื่อมของเส้นประสาทรับความรู้สึกเป็นหลัก ซึ่งทำให้เกิดอาการชาที่มือและเท้า อาการชานี้ทำให้ผู้ป่วยรับรู้ต่อการเกิดแผลน้อยลงโดยเฉพาะที่เท้าร่วมกับการไหลเวียนเลือดและระบบภูมิคุ้มกันที่แยกลงในเบาหวาน ทำให้แผลนี้หายยากและมีโอกาสติดเชื้อรุนแรงมากขึ้นจนในบางครั้งจำเป็นต้องตัดเท้าหรือปลายขาเพื่อป้องกันการลุกลามของเชื้อ เส้นประสาทเสื่อมจึงเป็นสาเหตุที่สำคัญอันดับหนึ่งของการตัดขาที่ไม่ได้เกิดจากอุบัติเหตุ ด้วยเหตุนี้การศึกษาเพื่อหาวิธีการป้องกันหรือรักษาภาวะเส้นประสาทเสื่อมในโรคเบาหวานจึงมีความสำคัญเป็นอย่างยิ่ง

ในภาวะเส้นประสาทเสื่อมนี้มีความผิดปกติทั้งทางด้านโครงสร้างและการนำกระแสประสาท (nerve conduction) ของเส้นประสาทหลายอย่าง ความผิดปกติทางโครงสร้างที่สำคัญประกอบไปด้วย การเสื่อมสลายของเยื่อหุ้ม myelin (demyelination) ที่หุ้มอยู่รอบ axon ของเส้นประสาท รวมทั้งการเสื่อมสลายของ axon (axonal degeneration) ด้วย ซึ่งทำให้ความเร็วในการนำกระแสประสาทลดลงเป็นผลตามมา ดังนั้นจึงใช้ความผิดปกติเหล่านี้เป็นเครื่องวัดถึงความรุนแรงของเส้นประสาทเสื่อมรวมทั้งประเมินผลการรักษาในการศึกษาต่างๆ มีความพยายามในการหายาเพื่อใช้รักษาภาวะนี้มาเป็นเวลานาน หากแต่ยังไม่มีการศึกษาใดที่พบวิธีการรักษาที่ให้ผลเป็นที่น่าพอใจในปัจจุบัน

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่ถูกกระตุ้นโดยสิ่งเร้าต่างๆ จากภายนอกเซลล์ เช่น oxidative stress, growth factor แล้วนำไปสู่การปรับตัวต่อสิ่งเร้าเหล่านั้น ซึ่งอาจจะเป็นการเพิ่มจำนวนหรือการตายของเซลล์ MAPKs นี้แบ่งออกได้เป็น 3 กลุ่มคือ ERK (extracellular signal-regulated kinase) JNK (c-Jun amino-terminal kinase) และ p38 บทบาทของ MAPKs นี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์และสิ่งเร้า พบว่าสิ่งเร้าบางอย่างที่เพิ่มขึ้นในโรคเบาหวาน เช่น oxidative stress, hyperosmotic stress สามารถกระตุ้น MAPKs ในเซลล์ชนิดต่างๆ รวมทั้งเซลล์ประสาทและเซลล์ค้ำจุน (glia) ได้ (1-8) ยิ่งกว่านั้นได้มีการศึกษาพบว่า ERK และ p38 ถูกกระตุ้นในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกของปมประสาทไขสันหลัง (dorsal root ganglion neuron) ของหนูที่ได้รับการกระตุ้นให้เป็นเบาหวาน (8-9) ซึ่งเป็นการยืนยันว่ามีการกระตุ้นการ

ทำงานของ MAPK ในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกซึ่งน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับการรับความรู้สึกที่ผิดปกติในภาวะเบาหวานจริง นอกจากนี้การศึกษาของ Price และคณะ (9) ทำให้ทราบว่าการกระตุ้นของ p38 มีส่วนสำคัญต่อการเกิดความผิดปกติของการนำกระแสประสาท เนื่องจากเมื่อให้ยาไปยับยั้งการทำงานของ p38 พบว่าความเร็วในการนำกระแสประสาทกลับมาใกล้เคียงกับปกติสำหรับกรณีของ ERK นั้นยังไม่ทราบบทบาทที่แน่ชัดของการกระตุ้นที่พบในช่วงเวลาเดียวกันกับ p38

### วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษากลไกการยับยั้งการทำงานของ ERK ต่อความผิดปกติทางด้านโครงสร้างของปมประสาทไขสันหลังและเส้นประสาทส่วนปลาย รวมทั้งการลดลงของความเร็วในการนำกระแสประสาท ที่พบในหนูที่ทำให้เป็นเบาหวาน

### ทฤษฎี สมมุติฐานหรือกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

มีข้อมูลการศึกษาในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงที่ช่วยบ่งชี้ถึงบทบาทของ ERK โดยมีทั้งที่พบว่าการกระตุ้นของ ERK นั้นเป็นคุณ (protective) (10-11) และเป็นโทษทำให้เกิดการตายของเซลล์ (5, 7, 12-14) แต่ถ้าหากพิจารณาถึงสิ่งกระตุ้นที่พบในภาวะเบาหวาน คือ oxidative stress พบว่าจะกระตุ้น ERK ในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกแล้วทำให้เกิดการตายของเซลล์ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย ERK inhibitor (8) ด้วยข้อมูลดังกล่าวนี้ทำให้ตั้งสมมุติฐานได้ว่า ERK ที่ถูกกระตุ้นในเซลล์ประสาทรับความรู้สึกของหนูเบาหวานมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเสื่อมของเส้นประสาท ดังนั้นเพื่อพิสูจน์สมมุติฐานนี้จึงจำเป็นต้องมีการศึกษาโดยใช้ยาไปยับยั้งการกระตุ้นของ ERK แล้วตรวจสอบว่าสามารถรักษาภาวะเส้นประสาทเสื่อมทั้งในแง่ความผิดปกติของการนำกระแสประสาทและความผิดปกติทางโครงสร้างได้หรือไม่

อนึ่งในการศึกษานี้จำเป็นต้องใช้หนูทดลองที่ทำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีด streptozotocin (STZ) เข้าช่องท้อง ซึ่ง STZ นี้จะเข้าไปทำลาย beta cell ที่ผลิต insulin ในตับอ่อน (15) ทำให้เกิดภาวะเบาหวานประเภทที่ 1 (Type 1 diabetes mellitus หรือ insulin-dependent diabetes mellitus) ได้มีการใช้ animal model นี้อย่างกว้างขวางในการศึกษาเกี่ยวกับกลไกและวิธีการรักษาของเบาหวาน เพื่อนำข้อมูลมาประยุกต์ใช้ในคน ทั้งนี้เนื่องจากพบความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทและการนำกระแสประสาทใกล้เคียงกับที่พบในผู้ป่วยเบาหวาน (16-19) และที่สำคัญคือ สามารถควบคุมระยะเวลาและความรุนแรงของเบาหวานในสัตว์ทดลองเหล่านี้ได้ดีกว่าในผู้ป่วย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากพบว่าการยับยั้ง ERK ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงไปในทางที่ดีขึ้นในแง่ความผิดปกติในการนำกระแสประสาทหรือโครงสร้างเส้นประสาท ข้อมูลจากการศึกษานี้จะเป็นพื้นฐานที่สำคัญในการพัฒนายากลุ่มนี้เพื่อนำไปทดลองใช้รักษาภาวะเส้นประสาทเสื่อมในผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

### วิธีการดำเนินงานวิจัย (Materials & Methods)

รูปแบบการวิจัยเป็นการทดลอง (experiment)

สัตว์ทดลอง

หนูพันธุ์ Wistar ตัวผู้ น้ำหนักตัวเมื่อเริ่มการทดลองประมาณ 250 กรัม ทั้งหมด 40 ตัว

วิธีการวิจัย

1. แบ่งหนู 45 ตัวออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 15 ตัว ดังต่อไปนี้
  - กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (Control group หรือ C)
  - กลุ่มที่ 2 กลุ่มเบาหวานที่ฉีดสารละลายที่ใช้ผสมยา U0126 คือ Dimethylsulfoxide (DMSO) (Diabetic group + vehicle หรือ DV)
  - กลุ่มที่ 3 กลุ่มเบาหวานที่ให้ยา U0126 เข้าช่องท้อง 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ทุกวัน (Diabetic group + inhibitor หรือ DI)
2. ทำให้หนู 30 ตัวในกลุ่ม DV และ DI เป็นเบาหวานโดยการฉีด STZ 55 mg/kg เข้าช่องท้อง
3. ตรวจสอบว่าหนูในกลุ่ม DV และ DI เป็นเบาหวานในระดับที่ต้องการทุกตัวหรือไม่ที่ 2 วันหลังฉีด STZ โดยน้ำตาลในเลือดต้องสูงเกิน 15 mmol/l จากการหยดเลือดตรวจบน glucose strip หากระดับน้ำตาลต่ำกว่าเกณฑ์นี้จะถูกคัดออกจากการทดลอง
4. เลี้ยงหนูต่อไปจนกระทั่งครบ 6 สัปดาห์ จากนั้นเริ่มฉีด DMSO ให้หนูกลุ่ม DV หรือ U0126 ที่ละลายใน DMSO เข้าช่องท้องวันละครั้งทุกวันติดต่อกันเป็นเวลา 2 สัปดาห์
5. ศึกษา nerve conduction velocity ของเส้นประสาท sciatic เพื่อใช้บอกสภาพการทำงานของเส้นประสาท โดยวัดในหนูทุกตัวที่ 6 สัปดาห์ก่อนการให้ยาและหลังให้ยาทุกสัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลอง จากนั้นเปรียบเทียบค่าของหนูทั้ง 3 กลุ่มในแต่ละครั้งที่วัด
6. เมื่อสิ้นสุดการทดลอง ฉีดยาสลบเข้าช่องท้องโดยใช้ pentobarbital overdose ในหนู 9 ตัวจากแต่ละกลุ่ม จากนั้นผ่าเปิดช่องอกแล้วดูดเลือดอย่างน้อย 5 ml จากการเจาะเข้าหัวใจเพื่อส่งเลือดตรวจระดับน้ำตาลในห้องปฏิบัติการภาควิทยาศาสตร์ชั้นสูง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อยืนยันระดับความรุนแรงของเบาหวาน
7. หลังเจาะเลือด จะผ่าตัดเพื่อเอาปมประสาทไซสันหลังระดับเอวที่ 4 และ 5 (DRG L4/5) พร้อมกับเส้นประสาท sciatic ที่ขา ออกมาแช่ไว้ที่อุณหภูมิ  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้ตรวจวัดระดับการทำงานของ ERK โดยเทคนิค Western blot



8. สำหรับหนูอีก 6 ตัวในแต่ละกลุ่มที่เหลือจะถูกผ่าเปิดช่องอกหลังจากฉีดยาสดับเช่นเดียวกัน จากนั้นทำ transcadiac perfusion ด้วย 4% paraformaldehyde เสร็จแล้วจะผ่าตัดเลาะเอา ปมประสาทไขสันหลังและเส้นประสาท sciatic ออกมา
9. นำชิ้นเนื้อในข้อ 8 ที่จะศึกษาโครงสร้างของปมประสาทและเส้นประสาทโดยเทคนิค morphometry เตรียมเพื่อฝังใน resin ทำ semi-thin section
10. นำชิ้นเนื้อที่เหลือจากข้อ 8 และ 9 มาศึกษาโดยเทคนิค immunohistochemistry โดย embed ใน OCT medium รวจนแข็งตัวที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จากนั้นเก็บไว้ที่  $-80^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้

#### Western blot analysis

เนื้อเยื่อจะถูกนำไปปั่น (homogenization) เพื่อวิเคราะห์ระดับโปรตีนที่สนใจโดยเทคนิค sodium docecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งเป็นการแยกโปรตีน ออกตามขนาด จากนั้นทำการย้ายโปรตีนจาก gel ไปที่ nitrocellulose membrane แล้วใส่ primary antibody ที่จำเพาะต่อรูป active ของ ERK (phosphorylated ERK หรือ ERK-P) หรือต่อทั้งรูป active และ inactive (total ERK หรือ ERK-T) จากนั้นใส่ secondary antibody ที่ติดฉลากกับ horse radish peroxidase (HRP) และจำเพาะกับ primary antibody แล้วตรวจสอบระดับของ ERK-P หรือ ERK-T ใน membrane โดยวิธี enhanced chemiluminescence คือ ใส่ substrate ของ HRP เพื่อทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ก่อแสงขึ้น จากนั้นนำฟิล์มที่ไวต่อแสง (hyperfilm) ไปทาบบ แถบที่เกิดจากแสงไปกระทบกับฟิล์มจะมีความเข้มแปรผันตามปริมาณของโปรตีนที่ต้องการศึกษา

จากนั้นสแกนแถบบน hyperfilm เป็นไฟล์ภาพแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม image analysis ด้วยวิธีอ่านค่าความเข้มของแถบ (densitometric analysis) จากนั้นเทียบระดับ ERK-P กับ ERK-T ซึ่งเป็นดัชนีบ่งชี้ถึงระดับการทำงานของ ERK คือถ้าค่านี้สูง ก็แสดงว่ามีระดับการทำงานของ ERK ที่สูงหรือมีการกระตุ้น ERK นั้นเอง ขั้นตอนสุดท้ายคือเปรียบเทียบค่าสัดส่วนนี้ระหว่าง กลุ่มทดลองว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่ด้วย ANOVA

#### Immunohistochemistry

นำชิ้นเนื้อที่ embed ใน OCT medium จนแข็งมาตัดโดยวิธี cryostat หนา 8-10  $\mu\text{m}$  ติด section บน slide ป้องกัน nonspecific binding ของ primary antibody แล้วใส่ primary antibody ต่อ ERK-P บน slide จากนั้นล้าง slide แล้วใส่ secondary antibody ที่ติดฉลากกับ สารเรืองแสง Fluorescein isothiocyanate (FITC) จากนั้นทำการ mount แล้วดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence

### Nerve morphometry

Semi-thin section ของเส้นประสาทจากข้อ 9 ถูกย้อมด้วย phenylenediamine จากนั้น mount แล้วนำไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาที่ต่ออยู่กับคอมพิวเตอร์ เพื่อวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม ImagePro โปรแกรมนี้จะสามารถอ่านค่า จำนวน axon เส้นผ่านศูนย์กลางของ axon ความหนาของชั้น myelin ซึ่งเป็นข้อมูลทางด้านโครงสร้างที่สำคัญของเส้นประสาท สุดท้ายเปรียบเทียบค่าต่างๆ ระหว่างกลุ่มทดลองทางสถิติ

### DRG morphometry

นำ semi-thin section ของ L4 DRG มาย้อมด้วย toluidine blue จากนั้นเลือกหมายเลข section อย่างสุ่ม โดยแต่ละ section ต้องห่างกันอย่างน้อย 40  $\mu\text{m}$  เพื่อป้องกันการนับซ้ำ.เซลล์เดียวกัน จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ประสาทที่เห็น nucleus และ nucleolus ชัดเจน รวมทั้งวัดขนาดพื้นที่ของ nucleus และ nucleolus ของแต่ละเซลล์โดยโปรแกรม ImagePro ในคอมพิวเตอร์ สุดท้ายคำนวณจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG และค่าเฉลี่ยของขนาด nucleus และ nucleolus ของหนูแต่ละตัว แล้วคำนวณค่าเฉลี่ยของทั้งกลุ่มเพื่อเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง

### ผลการวิจัย

#### 1. ความรุนแรงของเบาหวาน

มีหนูเบาหวานตายไประหว่างการทดลอง 5 ตัวเนื่องจากภาวะร่างกายที่อ่อนแอที่เกี่ยวข้องกับเบาหวาน ซึ่งพบว่าในแง่ความรุนแรงของเบาหวานนั้น หนูในกลุ่ม DV และ DI เป็นเบาหวานอย่างชัดเจนโดยดูจากน้ำหนักที่แทบไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเมื่อเริ่มต้นการทดลองและต่ำกว่าเมื่อเทียบกับหนูกลุ่ม C ที่ไม่ได้เป็นเบาหวาน รวมทั้งระดับน้ำตาลในเลือดเมื่อสิ้นสุดการทดลองซึ่งมากกว่าของ กลุ่ม C มาก ดังตารางที่ 1 นอกจากนี้ยังไม่พบความแตกต่างในแง่ น้ำหนักหรือระดับน้ำตาลในเลือดระหว่างกลุ่ม DV และ DI ซึ่งแสดงว่ายา U0126 นี้ไม่มีผลต่อความรุนแรงของเบาหวาน หรือ ผลของยาที่อาจพบต่อไปในการศึกษา ไม่น่าจะเกิดจากการเปลี่ยนแปลงความรุนแรงของเบาหวานนั่นเอง

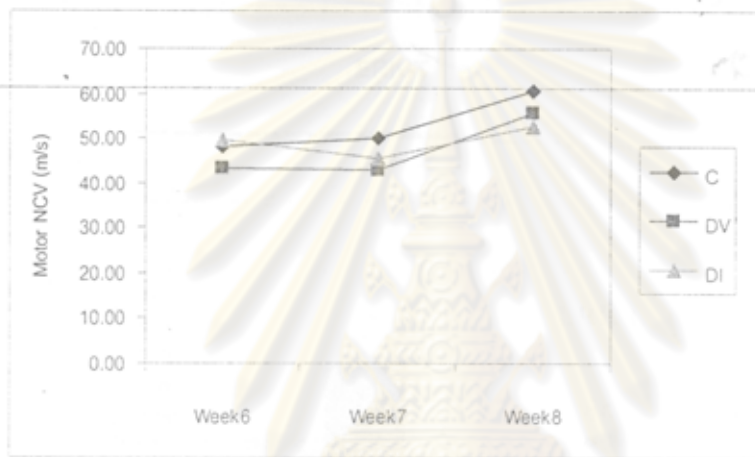
ตารางที่ 1 แสดงน้ำหนักและระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลอง

กลุ่มทดลอง	น้ำหนัก (g)		ระดับน้ำตาลในเลือด (mg/dl)
	เริ่ม	สิ้นสุด	
Control (C)	264.0 $\pm$ 3.1	448.3 $\pm$ 11.2	169.8 $\pm$ 4.6
Diabetic+vehicle (DV)	263.3 $\pm$ 2.3	264.6 $\pm$ 7.8	595.8 $\pm$ 25.3
Diabetic+inhibitor (DI)	261.5 $\pm$ 2.9	266.1 $\pm$ 10.3	541.3 $\pm$ 27.7

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่า SEM

## 2. Nerve conduction velocity (NCV)

พบว่าในกรณีของ motor NCV (MNCV) ค่าในกลุ่ม DV มีแนวโน้มน้อยกว่าค่าในกลุ่ม C ตั้งแต่ก่อนเริ่มการให้ยาในสัปดาห์ที่ 6 แต่น่าสังเกตว่าค่าของกลุ่ม DI ที่เป็นเบาหวานเช่นเดียวกันกับไม่แตกต่างจากกลุ่ม C ซึ่งยังไม่ทราบสาเหตุ จากนั้นในสัปดาห์ที่ 7 และ 8 คือหลังให้ยาไป 1 และ 2 สัปดาห์ตามลำดับ ปรากฏว่าค่า MNCV ของกลุ่ม DI ไม่แตกต่างจากของกลุ่ม DV และมีแนวโน้มต่ำกว่าของกลุ่ม C ถึงแม้จะไม่มีนัยสำคัญทางสถิติก็ตาม (รูปที่ 1) ส่วนค่า sensory NCV (SNCV) นั้น แทบจะไม่มีมีความแตกต่างกันเลยระหว่างกลุ่มในสัปดาห์ที่ 6 แต่หลังจากเริ่มการรักษาแล้ว ค่าของกลุ่ม DI ใกล้เคียงกับกลุ่ม C ไปอีก 2 สัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ในขณะที่ค่าของกลุ่ม DV แสดงความแตกต่างคือ น้อยกว่ากลุ่ม C และ DI มากขึ้น (รูปที่ 2)



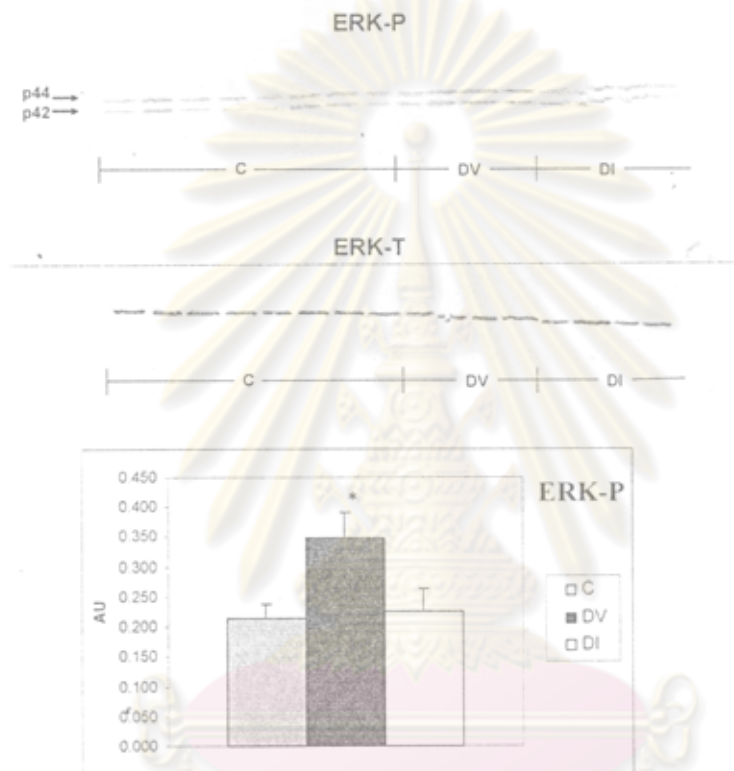
รูปที่ 1 ค่าเฉลี่ยของ motor nerve conduction velocity ของหนูกุ่มต่างๆ ตั้งแต่ก่อนเริ่มให้ยาในสัปดาห์ที่ 6 หลังเริ่มเป็นเบาหวานจนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 8 สัปดาห์หลังเป็นเบาหวาน



รูปที่ 2 ค่าเฉลี่ยของ sensory nerve conduction velocity ของหนูกุ่มต่างๆ ตั้งแต่ก่อนเริ่มให้ยาในสัปดาห์ที่ 6 หลังเริ่มเป็นเบาหวานจนถึงสิ้นสุดการทดลองที่ 8 สัปดาห์หลังเป็นเบาหวาน

### 3. Western blot analysis (รูปที่ 3)

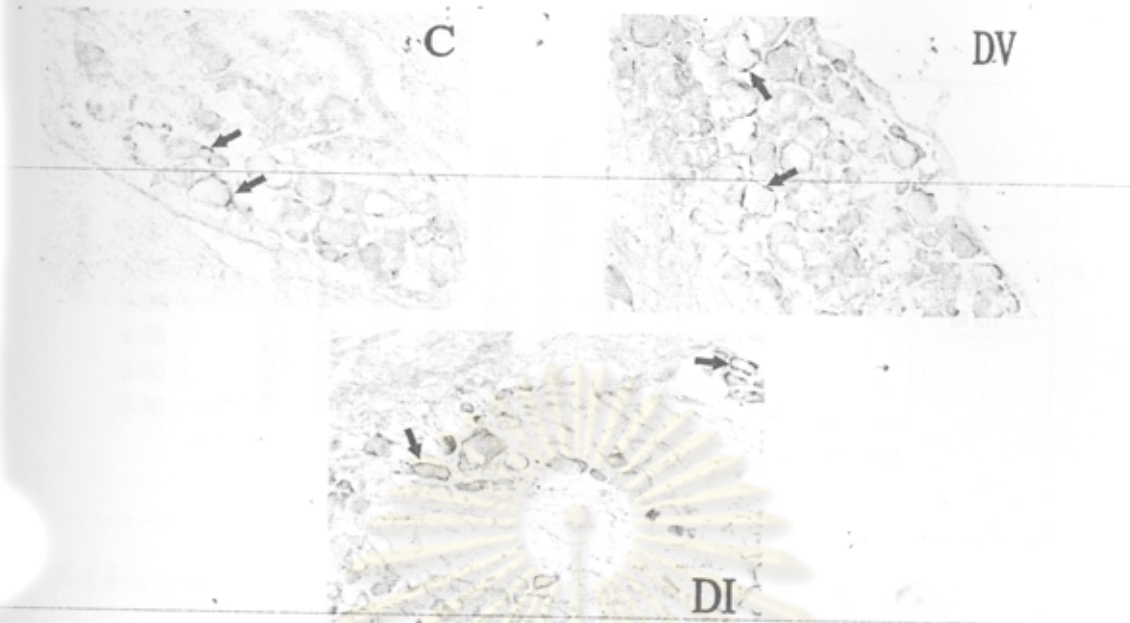
พบว่าระดับของ ERK-P มีการเพิ่มขึ้นในกลุ่ม DV เมื่อเทียบกับกลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ส่วนระดับของ ERK-P ในกลุ่ม DI ต่ำกว่ากลุ่ม DV และไม่แตกต่างจากกลุ่ม C ทั้งนี้ไม่มีความแตกต่างของระดับ ERK-T ระหว่างกลุ่มต่างๆ ทำให้สรุปได้ว่าน่าจะมีระดับการทำงานของ ERK ที่สูงขึ้นใน DRG ของหนูเบาหวาน (DV) และการให้ inhibitor สามารถยับยั้งการกระตุ้นการทำงานของ ERK นี้ (DI)



รูปที่ 3 ระดับของ ERK-P และ ERK-T โดยเทคนิค Western blot ใน DRG จากหนูกลุ่ม C, DV และ DI สองรูปบนแสดง blot ที่ใช้ antibody ต่อ ERK-P และ ERK-T ตามลำดับ โดย ERK-P จะมีสองแถบคือที่ 44 (p44) และ 42 (p42) kDa กราฟข้างล่างแสดงค่า density ของ ERK-P, \*  $p < 0.05$

### 4. Immunohistochemistry

ได้ตัดชิ้นเนื้อ DRG แบบ cryostat ไปแล้วและได้ใช้ antibody ตรวจหาตำแหน่งของ active ERK (ERK-P) โดยใช้ commercial kit ซึ่งใช้หลักการของ avidin-biotin complex และใช้ DAB เป็น substrate ของเอนไซม์ peroxidase ทำให้ตำแหน่งที่มี ERK-P จะเป็นสีน้ำตาลเข้ม ผลการศึกษาพบว่า ERK-P ส่วนใหญ่อยู่ที่ supporting cell ของ DRG คือ satellite cell ที่อยู่รอบๆ cell body ของ DRG neuron (รูปที่ 4) แต่ไม่พบความแตกต่างในแง่ตำแหน่งที่พบหรือ intensity ของ signal ระหว่างหนูทั้ง 3 กลุ่ม



รูปที่ 4 ตำแหน่งของ ERK-P โดยใช้เทคนิค immunohistochemistry ใน DRG จากหนูกลุ่ม C, DV และ DI ลูกศรแสดงตำแหน่งของ ERK-P ซึ่งจะเป็นสีน้ำตาลเข้ม กำลังขยายของรูปทั้งหมดเป็น 10X

#### 5. Nerve morphometry

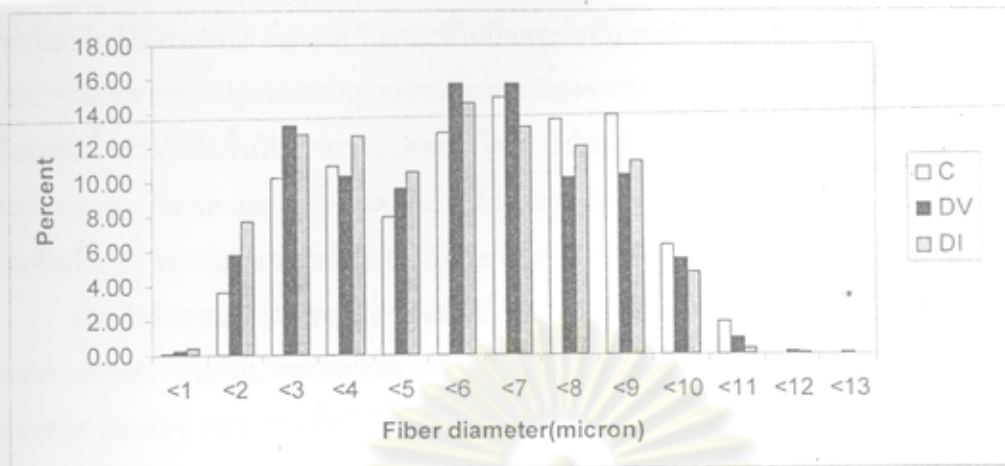
ค่าที่ได้แสดงในตารางที่ 2 ซึ่งพบว่าจำนวน fiber ทั้งหมดและความหนาแน่นของ fiber เพิ่มขึ้นในกลุ่มเบาหวานทั้งสองกลุ่มเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะกลุ่ม DV นอกจากนี้ยังพบการลดขนาดของ axon และความหนาของ myelin sheath ซึ่งทำให้ค่า g ratio ยังคงเดิมทั้งในกลุ่ม DV และ DI เมื่อเทียบกับกลุ่ม C โดยค่าในกลุ่ม DI ลดลงมากกว่าจนมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้เมื่อดูการกระจายตามขนาดของ nerve fiber ดังกราฟในรูปที่ 5 แล้วพบว่าจำนวนของ fiber ขนาดใหญ่ โดยเฉพาะประมาณ 8-9  $\mu\text{m}$  ลดลงในกลุ่ม DV และ DI เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

ตารางที่ 2 ค่าต่างๆ จากการทำ nerve morphometry

	No. of fiber	Fiber density (/mm <sup>2</sup> )	Fiber diameter ( $\mu\text{m}$ )	Axon diameter ( $\mu\text{m}$ )	Myelin thickness ( $\mu\text{m}$ )	g ratio
C	7,422 $\pm$ 300	13,300.0 $\pm$ 782.9	7.11 $\pm$ 0.19	4.11 $\pm$ 0.16	1.50 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.01
DV	9,536 $\pm$ 116 <sup>#</sup>	16,500.1 $\pm$ 985.5 <sup>#</sup>	6.60 $\pm$ 0.24	3.83 $\pm$ 0.17	1.38 $\pm$ 0.03	0.57 $\pm$ 0.01
DI	8,507 $\pm$ 468	15,394.4 $\pm$ 362.3	6.47 $\pm$ 0.14 <sup>@</sup>	3.61 $\pm$ 0.13 <sup>@</sup>	1.36 $\pm$ 0.03 <sup>@</sup>	0.56 $\pm$ 0.01 <sup>@</sup>

Mean  $\pm$  SEM

# C vs. DV p < 0.01, \* C vs. DV p < 0.05, @ C vs. DI p < 0.05



รูปที่ 5 จำนวนของ nerve fiber เป็น % แยกตาม diameter ของหนูกกลุ่ม C, DV และ DI

#### 6. DRG morphometry

พบว่าจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังของหนูกกลุ่ม DV และ DI มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม C แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 3) สำหรับขนาดของ nucleus และ nucleolus ซึ่งดูจาก area ไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่ม

ตารางที่ 3 ค่าต่างๆ จากการทำ DRG morphometry

	No. of DRG neuron	Nuclear area ( $\mu\text{m}^2$ )	Nucleolar area ( $\mu\text{m}^2$ )
C	15,385 $\pm$ 1,065	228.2 $\pm$ 37.6	18.7 $\pm$ 1.6
DV	11,956 $\pm$ 836	228.3 $\pm$ 15.0	17.9 $\pm$ 1.6
DI	10,863 $\pm$ 935	219.4 $\pm$ 29.3	17.9 $\pm$ 1.8

Mean  $\pm$  SD

#### อภิปรายและวิจารณ์ (Discussion)

ผลจาก Western blot ในการศึกษาที่สอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (8) ว่ามีการกระตุ้นของ MAPK ERK ในระบบประสาทส่วนปลายของหนูเบาหวาน โดยพบการกระตุ้นนี้ใน satellite cell รอบๆ cell body ของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังเป็นหลัก เมื่อให้ยา u0126 ที่เป็น ERK inhibitor ในขนาด 200  $\mu\text{g}/\text{kg}$  ต่อวัน สามารถลดระดับการทำงานของ ERK ในปมประสาทไขสันหลังซึ่งถูกกระตุ้นในภาวะเบาหวานได้ ซึ่งขนาดของ u0126 ที่ใช้ในการทดลองนี้มีการรายงานว่าสามารถลดระดับการกระตุ้นของ ERK ในสมองของหนูได้ (16)

การยับยั้ง ERK ด้วย u0126 ในกลุ่ม DI+ ดูเหมือนจะช่วยยับยั้งการลดลงของ sensory NCV ที่พบในกลุ่มที่ได้รับเฉพาะ vehicle ในขณะที่ไม่มีผลอะไรกับ motor NCV โดยผลต่อ sensory NCV นี้ไม่น่าจะเกิดจากความรุนแรงของเบาหวานที่ลดลงเนื่องจากยา u0126 ไม่มีผลต่อน้ำหนักที่ลดลงหรือระดับน้ำตาลที่เพิ่มขึ้นในเบาหวานแต่อย่างใด ยังไม่มีคำอธิบายแน่ชัดสำหรับผลที่แตกต่างกันระหว่าง motor กับ sensory NCV แต่เป็นไปได้ว่าความผิดปกติของ sensory NCV อาจจะถูกชดเชยได้กลับคืนเร็วกว่า อย่างไรก็ตามคงต้องรอการศึกษาในอนาคตเพื่อหาคำตอบที่แน่ชัดต่อไป

สำหรับลักษณะทางโครงสร้างของเส้นประสาท พบว่ามีมือของ axon และการบางตัวของ myelin sheath ในหนูเบาหวานทั้งสองกลุ่มเมื่อเทียบกับหนูปกติ ซึ่งน่าจะสอดคล้องกับภาวะการลดลงของ sensory NCV รวมทั้งทำให้ค่า fiber density เพิ่มขึ้นในหนูเบาหวานด้วยจากการอัดกันแน่นของ axon ขนาดเล็กที่มากขึ้นสังเกตเห็นได้จากกราฟการกระจายของ axon ตามขนาด ทั้งนี้ลักษณะทางโครงสร้างข้างต้นมีความแตกต่างเพียงเล็กน้อย ระหว่างหนูเบาหวานที่ได้รับและไม่ได้รับการยับยั้ง ERK ถึงแม้ว่าจะพบนัยสำคัญของความแตกต่างเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับยาเทียบกับกลุ่มควบคุมก็ตาม ซึ่งน่าจะเป็นนัยสำคัญทางตัวเลขเท่านั้น นอกจากนี้ยังพบการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทของหนูเบาหวานทั้งสองกลุ่มอีกด้วย โดยที่ไม่พบการมือของ nucleus และ nucleolus ของเซลล์ประสาท การศึกษาก่อนหน้านี้ได้รายงานการหายไปของเซลล์ประสาทรวมทั้งการมือของ nucleus และ nucleolus (17) ในการศึกษาที่ไม่พบการมือของ organelle ดังกล่าวซึ่งน่าจะเกิดจากระยะเวลาของเบาหวานที่สั้นเมื่อเทียบกับระยะเวลาที่นานกว่าในการศึกษานั้น อย่างไรก็ตามไม่พบผลของการยับยั้ง ERK ต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาท สอดคล้องกับข้อมูลโครงสร้างของเส้นประสาทข้างต้น

#### สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุปได้ว่าการยับยั้ง ERK นาน 2 สัปดาห์หลังหนูเป็นเบาหวานได้ 6 สัปดาห์ มีผลที่ค่อนข้างจำกัด คือ พบผลดีต่อ sensory NCV โดยที่ไม่มีผลต่อ motor NCV รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของปมประสาทไขสันหลังและเส้นประสาท ซึ่งอาจเป็นเพราะระยะเวลาการรักษาสั้นหรือวิธีการให้ยาโดยการฉีดเข้าช่องท้องทำให้ระดับยาในเลือดไม่คงที่ ทั้งสองปัจจัยนี้มีผลทำให้ประสิทธิภาพการรักษาอาจไม่ดีพอ ดังนั้นในอนาคตควรจะต้องเพิ่มระยะเวลาการรักษารวมทั้งพิจารณาใช้ pump เพื่อปลดปล่อยยาให้คงที่มากขึ้นเพื่อศึกษาให้ได้คำตอบที่แน่ชัดเกี่ยวกับบทบาทของการกระตุ้น MAPK ERK ในการเสื่อมของระบบประสาทจากเบาหวาน

## บรรณานุกรม (Bibliography)

1. Bogoyevitch MA, Ketterman AJ, Sugden PH (1995) Cellular stresses differentially activate c-Jun N-terminal protein kinases and extracellular signal-regulated protein kinases in cultured ventricular myocytes. *J.Biol.Chem.* 270:29710-29717.
2. Guyton KZ, Liu Y, Gorospe M, Xu Q, Holbrook NJ (1996) Activation of mitogen-activated protein kinase by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Role in cell survival following oxidant injury. *J.Biol.Chem.* 271:4138-4142.
3. Luo Y, Umegaki H, Wang X, Abe R, Roth GS (1998) Dopamine induces apoptosis through an oxidation-involved SAPK/JNK activation pathway. *J.Biol.Chem.* 273:3756-3764.
4. Alessandrini A, Namura S, Moskowitz MA, Bonventre JV (1999) MEK1 protein kinase inhibition protects against damage resulting from focal cerebral ischemia. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96:12866-12869.
5. Bhat NR, Zhang P (1999) Hydrogen peroxide activation of multiple mitogen-activated protein kinases in an oligodendrocyte cell line: role of extracellular signal-regulated kinase in hydrogen peroxide-induced cell death. *J.Neurochem.* 72:112-119.
6. Kung MJ, Wu X, Ly H, Thai K, Scholey JW (1999) Effect of glucose on stress-activated protein kinase activity in mesangial cells and diabetic glomeruli. *Kidney Int.* 55:2203-2214.
7. Stanciu M, Wang Y, Kentor R, Burke N, Watkins S, Kress G, Reynolds I, Klann E, Angiolieri MR, Johnson JW, DeFranco DB (2000) Persistent activation of ERK contributes to glutamate-induced oxidative toxicity in a neuronal cell line and primary cortical neuron cultures. *J.Biol.Chem.* 275:12200-12206.
8. Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton A, Fernyhough P, Tomlinson DR (2001) A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J.* 15:2508-14.
9. Price SA, Agthong S, Middlemas A, Tomlinson DR (2004) Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy: interactions with aldose reductase. *Diabetes.* 53:1851-1856.
10. Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME (1995) Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science* 270:1326-1331.
11. Anderson CN, Tolkovsky AM (1999) A role for MAPK/ERK in sympathetic neuron survival: protection against a p53-dependent, JNK-independent induction of apoptosis by cytosine arabinoside. *J.Neurosci.* 19:664-673.
12. Blazquez C, Gaive-Roperh I, Guzman M (2000) De novo-synthesized ceramide signals apoptosis in astrocytes via extracellular signal-regulated kinase. *FASEB J.* 14:2315-2322.



13. Aihara K, Kuroda S, Kanayama N, Matsuyama S, Taniizawa K, Horie M. (2003) A neuron-specific EGF family protein, NELL2, promotes survival of neurons through mitogen-activated protein kinases. Brain Res Mol Brain Res. 116:86-93.
14. Subramaniam S, Strelau J, Unsicker K (2003) Growth differentiation factor-15 prevents low potassium-induced cell death of cerebellar granule neurons by differential regulation of Akt and ERK pathways. J Biol Chem. 278:8904-8912.
15. Rakieten N, Rakieten ML, Moreshwar VN (1963) Studies on the diabetogenic action of streptozotocin (NSC-37917). Cancer Chemother.Rep. 29:91-98.
16. Namura S, Iihara K, Takami S, Nagata I, Kikuchi H, Matsushita K, Moskowitz MA, Bonventre JV, Alessandrini A (2001) Intravenous administration of MEK inhibitor U0126 affords brain protection against forebrain ischemia and focal cerebral ischemia. Proc Natl Acad Sci U S A. 98:11569-11574.
17. Kishi M, Tanabe J, Schmelzer JD, Low PA (2002) Morphometry of dorsal root ganglion in chronic experimental diabetic neuropathy. Diabetes. 51:819-824.

### ประวัตินักวิจัยและคณะ

#### หัวหน้าโครงการวิจัย

1. นายสิทธิพร แอกทอง Mr. Sithiporn Agthong
2. เลขประจำตัวประชาชน 3 1005 02981 61 3
3. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ระดับ 6
4. หน่วยงาน

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2564281 โทรสาร 02-2524963 หรือ 02-2527028

Email: fmedsat@md.chula.ac.th

#### 5. ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิตเกียรตินิยม จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2541

Ph.D. Neuroscience จาก University of Manchester สหราชอาณาจักร พ.ศ. 2546

#### 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ประสาทศาสตร์ของระบบประสาทส่วนปลาย

Neuroscience (peripheral nervous system)

#### 7. ประสบการณ์ในการบริหารงานวิจัย

### 7.1 หัวหน้าโครงการวิจัย

1. โครงการวิจัยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ MAPKs ในเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและเซลล์คำจุนในภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย  
ทุนรัชดาภิเษกสมโภช พ.ศ. 2547
2. โครงการวิจัยบทบาทของ p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) ในความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทในโรคเบาหวาน  
ทุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โครงการวิจัย พัฒนาและวิศวกรรม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พ.ศ. 2547
3. การศึกษาการป้องกันการเกิดภาวะเส้นประสาทเสื่อมในหนูเบาหวานโดยสาร Quercetin  
ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ พ.ศ. 2548

### 7.2 งานวิจัยที่สำเร็จแล้ว

1. โครงการวิจัยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ ERK ในเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและเซลล์คำจุนในภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย
2. โครงการวิจัยบทบาทของ p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) ในความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทในโรคเบาหวาน

### 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ

การศึกษาการป้องกันการเกิดภาวะเส้นประสาทเสื่อมในหนูเบาหวานโดยสาร Quercetin

### ผลงานตีพิมพ์

1. Chentanez V, Chittmitrapap S, Cheepsoonthorn P, Agthong S (2000) New classification of histochemical staining patterns of acetylcholinesterase activity in rectal suction biopsy in Hirschsprung's disease. J Med Assoc Thai. 83(10):1196-1201.
2. Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton AJ, Fernyhough P, Tomlinson DR (2001) A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. FASEB J. 15(13):2508-2514.
3. Agthong S, Tomlinson DR (2002) Inhibition of p38 MAP kinase corrects biochemical and neurological deficits in experimental diabetic neuropathy. Ann N Y Acad Sci. 973:359-362.
4. Price SA, Agthong S, Middlemas A, Tomlinson DR (2004) Mitogen-activated protein kinase p38 mediates reduced nerve conduction velocity in experimental diabetic neuropathy: interactions with aldose reductase. Diabetes. Jul;53(7):1851-1856.

## ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 1

- |                       |                         |
|-----------------------|-------------------------|
| 1. นายธนศิลป์ หวลมานพ | Mr. Thanasilp Huanmanop |
| 2. เลขประจำตัวประชาชน | 3 1017 01880 55 9       |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน    | อาจารย์ระดับ 5          |
| 4. หน่วยงาน           |                         |

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2564281 โทรสาร 02-2524963 หรือ 02-2527028

Email: kaewmdcu@hotmail.com

## 5. ประวัติการศึกษา

แพทยศาสตรบัณฑิตเกียรตินิยม จากจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2543

## 6. สาขาวิชาการที่มีความชำนาญพิเศษ

ประสาทกายวิภาคศาสตร์ (Neuroanatomy)

## 7. ประสบการณ์ในการบริหารงานวิจัย

## 7.1 ผู้ร่วมวิจัย

1. โครงการวิจัยการประเมินเชิงปริมาณของเส้นประสาททูลของมนุษย์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช pilot project พ.ศ. 2546
2. โครงการวิจัยผลของจีเอ็ม1 ต่อพยาธิสภาพของเส้นประสาทที่เกิดจากยาพาคลิแทคเซล ในหนู: การศึกษาทางโครงสร้าง ทุนรัชดาภิเษกสมโภช พ.ศ. 2547

## 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว

1. โครงการวิจัยการประเมินเชิงปริมาณของเส้นประสาททูลของมนุษย์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ
2. โครงการวิจัยผลของจีเอ็ม1 ต่อพยาธิสภาพของเส้นประสาทที่เกิดจากยาพาคลิแทคเซลในหนู: การศึกษาทางโครงสร้าง

## ผู้ร่วมวิจัยคนที่ 2

- |                       |                        |
|-----------------------|------------------------|
| 1. นายอติทยา แก้วเสมา | Mrs. Atithaya Kaewsema |
| 2. เลขประจำตัวประชาชน | 3 1019 00586 72 3      |
| 3. ตำแหน่งปัจจุบัน    | นักวิทยาศาสตร์ระดับ 5  |
| 4. หน่วยงาน           |                        |

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ถนนพระราม 4 เขตปทุมวัน กรุงเทพฯ 10330

โทรศัพท์ 02-2564281 - โทรสาร 02-2524963 หรือ 02-2527028

Email: atkaewsema@yahoo.com

## 5. ประวัติการศึกษา

วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา จากมหาวิทยาลัยรามคำแหง พ.ศ. 2538

## 6. ความชำนาญพิเศษ

เทคนิคเกี่ยวกับ microscopic analysis ของเส้นประสาททั้ง paraffin และ plastic section รวมถึงการใช้สัตว์ทดลอง

## 7. ประสบการณ์ในการบริหารงานวิจัย

### 7.1 ผู้ร่วมวิจัย

1. โครงการวิจัยการประเมินเชิงปริมาณของเส้นประสาทชิวรีลของมนุษย์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ ทุนรัชดาภิเษกสมโภช pilot project พ.ศ. 2546
  2. โครงการวิจัยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ MAPKs ในเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและเซลล์ค้ำจุนในภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย ทุนรัชดาภิเษกสมโภช พ.ศ. 2547
  3. โครงการวิจัยบทบาทของ p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) ในความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทในโรคเบาหวาน ทุนจากสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ โครงการวิจัย พัฒนาและนวัตกรรม ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ พ.ศ. 2547
  4. การศึกษาการป้องกันการเกิดภาวะเส้นประสาทเสื่อมในหนูเบาหวานโดยสาร Quercetin ทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ พ.ศ. 2548
- ### 7.2 งานวิจัยที่ทำเสร็จแล้ว
1. โครงการวิจัยการประเมินเชิงปริมาณของเส้นประสาทชิวรีลของมนุษย์โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพ
  2. โครงการวิจัยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับการทำงานของ MAPKs ในเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและเซลล์ค้ำจุนในภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย
  3. โครงการวิจัยบทบาทของ p38 mitogen-activated protein kinase (MAPK) ในความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทในโรคเบาหวาน
- ### 7.3 งานวิจัยที่กำลังทำ
- การศึกษาการป้องกันการเกิดภาวะเส้นประสาทเสื่อมในหนูเบาหวานโดยสาร Quercetin

## บทความเรื่อง Effect of ERK inhibition on diabetic neuropathy.

Supawadee Sukseree

Sithiporn Agthong

Peripheral nerve research unit, Department of Anatomy, Faculty of Medicine,  
Chulalongkorn University

### Introduction

Neuropathy is one of the major complications of diabetes which is characterized by predominantly sensory dysfunctions. Several underlying mechanisms have been identified but modifications of these pathways have been proved ineffective against diabetic neuropathy.

Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) are a group of enzymes that play a pivotal role in transducing extracellular stimuli to diverse cellular events ranging from proliferation, differentiation to apoptosis. So far, three subfamilies of MAPKs have been identified: extracellular signal-regulated kinase (ERK), c-Jun NH<sub>2</sub>-terminal kinase (JNK) and p38 kinase (p38).

Accumulating evidence suggests the participation of MAPKs in the diabetic neuropathy. p38 is activated in primary sensory neurons cultured in high glucose condition and diabetic rats. Treatment with the p38 inhibitor can prevent neuronal dysfunction (1). Activation of ERK is observed at the same period with p38 and its inhibition in vitro leads to decreased neuronal death (2). Moreover, the recent study has reported that activation of ERK was associated with mechanical hyperalgesia (3). Taken together, inhibition of ERK might have the beneficial effect on diabetic neuropathy but this hypothesis remains unproved. Therefore, the main objective of this study was to examine the effect of ERK inhibition on neurophysiologic abnormalities of peripheral nerve in diabetic rats.

### Material and Methods

#### **Animal experiment**

Fifty-five male Wistar rats (from the National Laboratory Animal Centre, Mahidol University, Thailand) weighing 250 g were divided into 3 groups: control group (C group), diabetic-vehicle group (DV group) and diabetic-inhibitor

group (DI group). The animals were housed in the laboratory animal center, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University with 12 hr light-dark cycle and food/water ad libitum throughout the experiment. This project was approved by the institutional ethical committee and all procedures were done in accordance with the guideline for the use of laboratory animals from the Research Council of Thailand.

#### **Induction of diabetes**

Diabetes was induced by a single intraperitoneal injection of 55 mg/kg of streptozotocin (STZ) in the DV and DI groups. Blood glucose level was measured from tail vein blood using glucose test strips 48 hours after STZ injection. Only animals with blood glucose > 250mg/dl were included in the experiment as diabetics.

#### **Drug administration**

ERK inhibitor (u0126) 200µg/kg was diluted in dimethylsulfoxide (DMSO) and administered intraperitoneally once daily after 5 weeks of diabetes in the DI group. The vehicle (DMSO) was injected intraperitoneally once daily in the DV group with the same dose and schedule as in the DI group. The C group received no injection.

#### **Sciatic nerve conduction velocity**

Measurement of nerve conduction velocity (NCV) was done prior to any treatment at week 6 and at the end of experiment (week 8). Briefly, the rats were anesthetized by inhaling 4% halothane. The stimulating and recording needle electrodes were placed at sciatic notch and hind paw, respectively. Supramaximal stimuli were applied at least 4 times per rat. Compound muscle action potential (CMAP) was recorded and average latency from the start of stimulation to the peak of M-wave was determined. Then, the stimulating electrode was moved to the Achilles' tendon and the above procedure was repeated. Motor NCV was calculated by dividing the distance between the sciatic notch and the Achilles' tendon by the latency difference between the two stimulation points.

#### **Blood collection**

All animals were sacrificed at week 8 with overdose pentobarbital. Blood was collected and plasma glucose level was determined using the glucose oxidase method.

#### **Statistical analysis**

ANOVA was used to compare means of different experimental groups. Statistically significant differences were considered when  $p < 0.05$ .

### **Results**

#### **Severity of diabetes**

The body weight was significantly decreased in the DV and DI groups when compared to the C group from the 2<sup>nd</sup> week to the end of the study (Fig.1). The marked increase in plasma glucose was confirmed in the DV and DI groups (Fig.2). There were no significant differences between the DV and DI groups in any of these parameters.

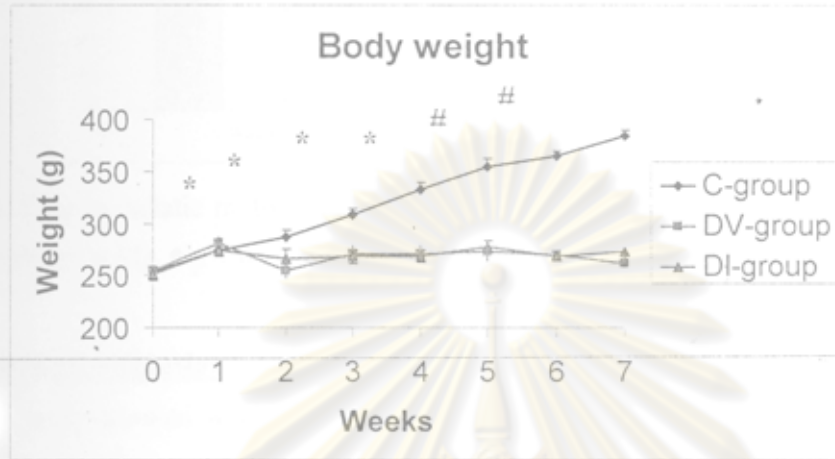


Figure 1 Changes in the body weight of C, DV and DI rats. Data are means  $\pm$  SD. (\*  $p < 0.05$ , #  $p < 0.01$ )

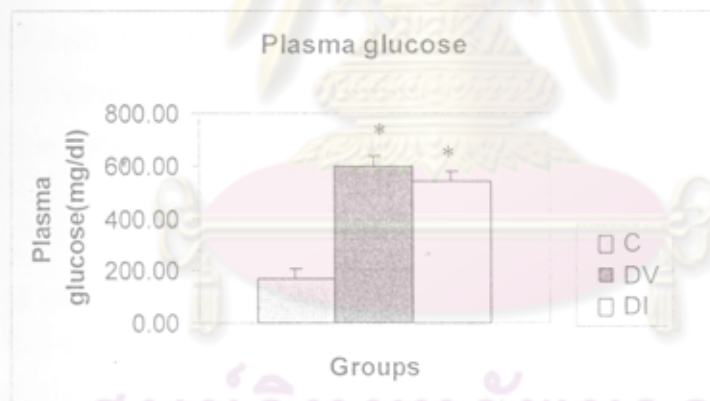
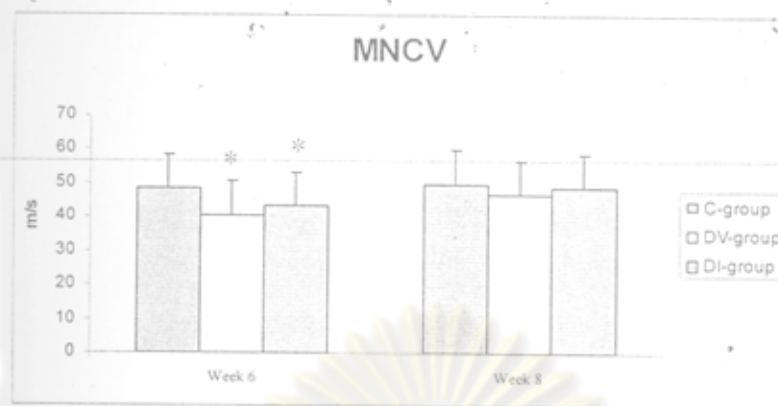


Figure 2. Average plasma glucose of rats in the C, DV and DI groups at week 8 after the onset of diabetes. Data are means  $\pm$  SD. \*  $p < 0.001$

#### Sciatic nerve conduction velocity

Sciatic motor NCV of the DV and DI groups were significantly lower than that of the C group before the start of treatment at week 6 (Fig. 3). However, the decrease was not significant at week 8. There were no differences between the diabetic groups.



**Figure 3** Average sciatic motor NCV in the C, DV and DI groups at week 6 and 8. Data are means  $\pm$  SD. \*  $p < 0.01$

### Discussion and conclusion

This study showed weight loss, hyperglycemia and reduction of motor NCV in the DV and DI when compared to the C groups. However, there were no significant differences between the diabetic groups in any of these parameters. Therefore, it appears that the ERK inhibition did not affect the severity of diabetes and neurophysiologic abnormalities. Despite this conclusion, short duration and late start of treatment in this study might account for the ineffectiveness. As a result, further studies with correction of these drawbacks should be done to give more accurate data regarding the role of ERK in diabetic neuropathy.

### References

1. Agthong S, Tomlinson DR (2002) Inhibition of p38 MAP kinase corrects biochemical and neurological deficits in experimental diabetic neuropathy. *ANN N Y Acad Sci.* 973:359-62.
2. Purves T, Middlemas A, Agthong S, Jude EB, Boulton A, Fernyhough P, Tomlinson DR (2001) A role for mitogen-activated protein kinases in the etiology of diabetic neuropathy. *FASEB J.* 15:2508-14.
3. Laurence D, Christophe M, Christine C, Joseph F (2006) Diabetes-induced mechanical hyperalgesia involves spinal MAPKs activation in neurons and microglia via NMDA dependent mechanisms. *Molecular pharmacology.* 70: 1246-54.