ผลของ curcumin ต่อภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทในหนู

นางสาว รุ่งฟ้า ธัญธนนุกุล

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2553
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF CURCUMIN ON NERVE INJURY IN RATS

Miss RungfaTuntananukul

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 2010

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของ curcumin ต่อภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทในหนู
โดย	นางสาว รุ่งฟ้า ธัญธนนุกุล
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิพร แอกทอง

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ อดิศร ภัทรดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิพร แอกทอง)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วัชรี ลิมปนสิทธิกุล)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ กิตติคุณ ดร.ราตรี สุดทรวง)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รุ่งฟ้า ธัญธนนุกุล : ผลของ curcumin ต่อภาวการณ์บาดเจ็บของเส้นประสาทในหนู (Effect of curcumin on nerve injury in rats.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ.นพ.สิทธิพร แอกทอง, 50หน้า.

บทนำ ภายหลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บจะเกิดการงอกใหม่ได้เองแต่ยังคงจำกัดด้วยการงอกใหม่ที่ใช้เวลานานและการตายของเซลล์ประสาท จึงมีความพยายามพัฒนาวิธีรักษาแต่ก็ยังไม่ประสบผลสำเร็จในการนำมาใช้ในมนุษย์การทดลองนี้นำ curcumin ซึ่งสกัดได้จากรากขมิ้นชัน *Curcuma longa* ที่มีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านเซลล์มะเร็ง ลดการอักเสบ รวมถึงมีผลดีในการรักษาโรคทางระบบประสาท

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผล curcuminหลังจากภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บว่ามีผลดีในการลดการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและกระบวนการงอกใหม่ของเส้นประสาทหรือไม่

วิธีดำเนินการวิจัย หนีบเส้นประสาท sciatic ที่ขาข้างซ้ายและฉีด curcumin เข้าช่องท้อง ขนาด 100, 300 และ 500 mg/kg/day เป็นเวลา 2 สัปดาห์ จากนั้นประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการโดยการวัดจากรอยพิมพ์เท้าและนับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังที่ระดับ L4 ส่วนการศึกษาการงอกใหม่ของเส้นประสาทจะทำการฉีด curcumin เข้าช่องท้อง 300 mg/kg/day เป็นเวลา 10 วัน และวัดระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาท

ผลการศึกษา พบว่า curcumin ทั้ง 3 ขนาดช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$ ในกลุ่ม 100 และ 300 mg/kg/day; $P<0.05$ ในกลุ่ม 500 mg/kg/day) ส่วนในการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทและการงอกใหม่ของเส้นประสาทที่พบผลดีกว่าเล็กน้อยเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผล ผลการทดลองนี้สนับสนุนคุณประโยชน์ของ curcumin ต่อภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ โดยการลดการตายของเซลล์ประสาท แต่อาจไม่ได้ส่งผลชัดเจนต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทและการงอกใหม่ของเส้นประสาท

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต นางสาว รุ่งฟ้า ธัญธนนุกุล

ปีการศึกษา 2553 ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก แอกทอง

5174817130: MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS : CURCUMIN/SCIATIC NERVE/NERVE INJURY/NERVE REGENERATION
RUNGFA TUNTANANUKUL: EFFECT OF CURCUMIN ON NERVE INJURY IN RATS. ADVISOR: ASSOC.PROF.SITHIPORN AGTHONG, M.D., Ph.D, 50 pp.

Introduction: After nerve injury, spontaneous recovery is usually limited by slow axonal regeneration and neuronal cell death.Efforts so far have failed to ameliorate these problems in clinical situation. Curcumin extracted from *Curcuma longa* has antioxidant,antineoplastic and anti-inflammatory properties. Its benefits in neurological diseases have been shown.

Objective: This experiment was conducted to test if curcumin could reduce neuronal cell loss and enhance the nerve regeneration processes after nerve injury.

Methods: Left sciatic nerve crush with intraperitoneal injection of curcumin 100, 300 and 500 mg/kg/day for 2 weeks were done to the rats. At the end, the rats were tested for motor recovery using walking track analysis and subsequently sacrificed to remove L4 DRG for neuronal cell count.Another study of nerve regeneration distance at 10 days withintraperitoneal injection of curcumin300mg/kg/dayhas also done.

Results: All 3 doses of curcumincould significantly reduce neuronal cell loss. ($P<0.01$ at 100 and 300 mg/kg/day; $P<0.05$ at 500 mg/kg/day)However, curcumin did not significantlyenhance the motor recovery andnerve regeneration and distance.

Conclusion: These data suggest the beneficial effect of curcumin on nerve injury by decreasing neuronal cell loss but notenhancing the motor recovery andnerve regeneration distance.

Field of Study : Medical Science. Student's Signature Rungfa Tuntananukul.
Academic Year : 2010 Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ.นพ.สิทธิพร แอกทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ให้คำแนะนำและความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้สำเร็จไปด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.กิตติคุณ ดร .ราตรี สุดทรวง รศ.พญ.วิไล ชินธเนศ และ ผศ.ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล ที่ให้ข้อแนะนำข้าพเจ้าในการแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอาทิตยา แก้วเสมา ที่ให้ความช่วยเหลือข้าพเจ้าในการถ่ายทอดความรู้การใช้เครื่องมือและเทคนิคต่างๆในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุ ณคณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทความรู้ จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณบุคลากรของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่าน ที่ช่วยประสานงานและให้ความช่วยเหลือตลอดการศึกษา

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าจนสำเร็จการศึกษา

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ..... ช

สารบัญตาราง..... ..... ฌ

สารบัญภาพ..... ..... ญ

บทที่1 บทนำ..... 1

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

คำถามของการวิจัย..... 2

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 2

ขอบเขตของการวิจัย..... 2

ข้อจำกัดของการวิจัย..... 2

คำจำกัดความของการวิจัย..... 2

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ..... 2

วิธีดำเนินการวิจัย..... 3

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย..... 3

บทที่2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง..... 4

ระบบประสาทส่วนปลาย..... 4

การบาดเจ็บของเส้นประสาท..... 6

การงอกใหม่ของเส้นประสาท..... 10

การรักษาเส้นประสาทที่ได้รับบาดเจ็บ..... 12

Oxidative stress และภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ..... 14

สารสกัดจากขมิ้นชัน..... 16

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หน้า

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย..... 20
ขั้นตอนการดำเนินวิจัย..... 20
การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ curcuminต่อการลดจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและการประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic..... 20
การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ curcuminต่อระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic..... 29
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล..... 34
การทดลองที่ 1 การศึกษาผลของ curcuminต่อการลดจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและการประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic..... 34
การทดลองที่ 2 การศึกษาผลของ curcuminต่อระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic..... 38
บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย..... 39
สรุปผลการวิจัย..... 42
ข้อเสนอแนะ..... 42
รายการอ้างอิง..... 43
ภาคผนวก..... 47
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 50

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1แสดงค่า ITS และ PL ของเท้าซ้ายและเท้าขวา และค่าอัตราส่วน
เท้าซ้ายต่อเท้าขวาของค่า ITS และ PL โดยแสดงในค่าเฉลี่ย ±SEM..... 35
ตารางที่ 2แสดงจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ที่ระดับ L4..... 37

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 แสดงภาคตัดขวางเส้นประสาทเส้นใยประสาท (nerve fiber) มัดเส้นใยประสาท(fascicle) และเยื่อหุ้มเส้นประสาท..... 5

ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท..... 6

ภาพที่ 3 แสดงเซลล์ประสาทที่ถูกหนีบ(crush)และตัดเส้นประสาท (transection) และตำแหน่ง proximal stump และ distal stump ของเส้นประสาท..... 7

ภาพที่ 4 แสดงการเกิด cell body reaction พบว่า cell body บวม นิวเคลียสชิดขอบเซลล์(eccentric nucleus) retrograde degeneration เกิดการย่อยสลายแอกซอนขึ้นไป 1 ถึง 2 ปล้องเหนือต่อตำแหน่งที่บาดเจ็บและ Wallerian degeneration หลังจาก 12 ชม.ที่เส้นประสาทได้รับบาดเจ็บแอกซอนถูกย่อยสลายเป็นgranular debris หรือ granular disintegration..... 9

ภาพที่ 5 แสดงการเกิด Wallerian degeneration ที่ 24 ชม.หลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บเยื่อไมอีลินถูกย่อยสลายเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เรียกว่า myelinoviods โดยการทำงานของ macrophage..... 9

ภาพที่ 6 แสดงการเกิด Wallerian degeneration ที่ 3 สัปดาห์ ในขณะที่เยื่อไมอีลินถูกย่อยสลาย Schwann cell จะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซีส (mitosis) และเรียงตัวเป็นแถวเรียกว่า Büngner band..... 10

ภาพที่ 7 แสดงการงอกใหม่ของเส้นประสารทเปรียบเทียบระหว่างการหนีบและตัดเส้นประสาทปลายแอกซอนที่งอกใหม่ เรียก growth cone ประกอบด้วย filopodia หรือ collateral spout และ lamellipodia หรือ terminal spout..... 11

ภาพที่ 8 แสดงการงอกของเส้นประสาทที่ผิดทิศทางหลังจากตัดเส้นประสาท ส่วนของเส้นประสาทที่งอกใหม่ไม่ไปยัง distal stump เกิดเป็น neuroma..... 12

ภาพที่ 9 แสดงการสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ กลไกการกำจัดด้วย antioxidant ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) รวมถึงการสร้าง hydroxide anion (OH^-) ไปทำลายโปรตีน ไขมัน และโครงสร้างของสารพันธุกรรม..... 15

ภาพที่10 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารpolyphenol ในสารสกัดขมิ้นชัน..... 16

หน้า

ภาพที่11 แสดงตำแหน่งเริ่มต้นของเส้นประสาท sciatic ที่ได้รับแขนง sensory จาก DRG ที่ระดับL4–6 แขนงปลายของเส้นประสาท sciatic ได้แก่ เส้นประสาท common peroneal เส้นประสาท tibial และ เส้นประสาท sural……..... 22
ภาพที่12 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเท้าหนูและรอยพิมพ์เท้าหนู..... 25
ภาพที่13 แสดง DRG ที่ระดับ L4 หลังย้อม toluidine blue ที่กำลังขยาย 10x..... 28
ภาพที่14 แสดงเซลล์ประสาทภายใน DRG ที่ระดับ L4..... 36
ภาพที่15 แสดง axonที่ย้อมติด rhodamineตลอดเส้นประสาท sciatic ส่วนของ distal stump……..... 38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทนั้นมักมีสาเหตุมาจากการประสบอุบัติเหตุโดยส่วนใหญ่ ซึ่งเป็นเหตุให้เกิดภาวะทุพพลภาพไม่สามารถดำเนินกิจกรรมได้อย่างเป็นปกติ นับเป็นปัญหาสำคัญโดยเฉพาะในกลุ่มวัยทำงานทำให้ประเทศขาดบุคลากรอันเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศชาติ ในทางการแพ ทย์วิธีการรักษาผู้ป่วยที่ได้รับการบาดเจ็บของเส้นประสาทเป็นการรักษาเพื่อให้เกิดการฟื้นตัวของเส้นประสาทให้กลับสู่ภาวะปกติและทำงานได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งมีการทดลองในหนูไมซ์ (mice) ทดลองเพื่อศึกษาภาวะเส้นประสาทที่ได้รับบาดเจ็บแบบหนีบ (crush) และแบบตัดขาด (transection) และสังเกตการเกิดการซ่อมแซมตัวเองภายหลังได้รับบาดเจ็บโดยมีการงอกใหม่ของเส้นประสาท (nerve regeneration) แต่การซ่อมแซมตัวเองของเส้นประสาทยังมีข้อเสียอยู่ เช่น ใช้เวลานานและเกิดการงอกใหม่ที่ไม่สมบูรณ์ มีผลต่อการทำงานจากปัญหาข้างต้น จึงมีการพัฒนาวิธีการรักษาหรือสารเคมีที่ช่วยลดเวลาการงอกใหม่ของเส้นประสาทรวมถึงประสิทธิภาพในการงอกใหม่ แต่จากงานวิจัยที่ผ่านมายังไม่ประสบความสำเร็จที่จะนำมารักษาในมนุษย์ curcumin เป็นสารเคมีจำพวก polyphenol มีสีเหลืองสกัดได้จากรากของขมิ้นชันในประเทศแถบเอเชี ยนำมาใช้ประกอบอาหารและรักษาโรคในมนุษย์ ในงานวิจัยที่ผ่านมาก็ยอมรับคุณสมบัติพิเศษที่ลดอาการอักเสบ ต่อต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านการเกิดมะเร็ง รวมทั้งกลไกทางเคมีระดับเซลล์ป้องกันโรคที่เกิดในระบบประสาท เช่น Alzheimer disease และ Parkinson disease เป็นต้น จากประโ ยชน์ข้างต้น curcumin น่าจะมีผลดีต่อภาวะเส้นประสาทบาดเจ็บสามารถเกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาทได้ดีขึ้นอีกทั้ง curcumin เป็นสารเคมีที่มีความปลอดภัยเมื่อใช้มนุษย์ละสัตว์ทดลอง มีราคาถูก สามารถหาได้ง่ายเนื่องจากเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านของประเทศไทยและประเทศในแถบเอเชีย

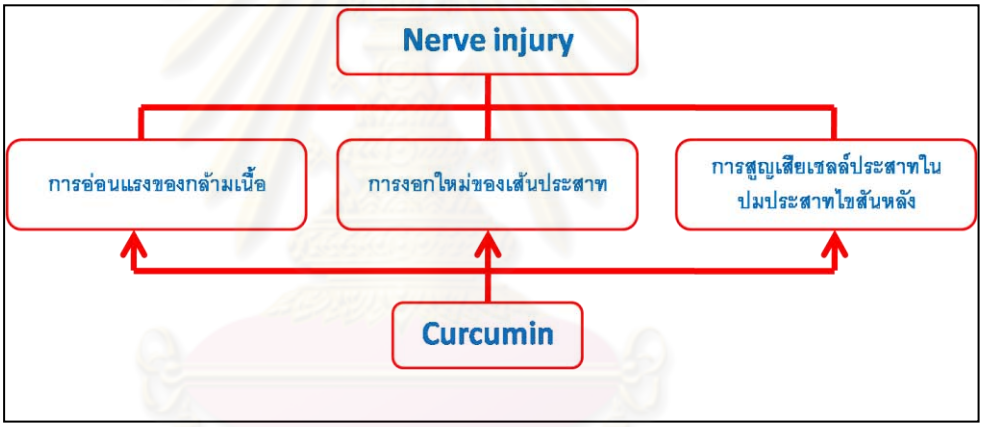
คำถามงานวิจัย

curcumin มีผลดีต่อระบบประสาทส่วนปลายภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาทหรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของ curcumin ต่อการคืนหน้าที่ของการเคลื่อนไหวหลังเส้นประสาทบาดเจ็บ
2. เพื่อศึกษาผลของ curcumin ต่อการสูญเสียเซลล์ประสาทรับความรู้สึกในปมประสาทไขสันหลังหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท
3. เพื่อศึกษาผลของ curcumin ต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาทหลังการบาดเจ็บ

ขอบเขตของการวิจัย



ข้อจำกัดของการวิจัย

เนื่องจาก curcumin เป็นสารไม่ละลายน้ำและดูดซึมในระบบทางเดินอาหารได้น้อย งานวิจัยนี้จึงเลือกสารละลาย 2% sodium carboxy methyl cellulose ใช้ในการทำละลายได้ดีขึ้น และการฉีดเข้าช่องท้องเพื่อการดูดซึมที่ดีขึ้น

คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

curcumin, sciatic nerve, nerve injury, nerve regeneration

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ถ้า curcumin มีผลดีต่อระบบประสาทส่วนปลายภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาทแล้ว ผลการทดลองนี้น่าจะนำไปทดลองในทางคลินิกต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลอง (experiment)

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ลำดับ	การปฏิบัติงาน	ระยะเวลา (เดือน)											
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
1	ทบทวนวรรณกรรม	■	■										
2	การวิจัยในสัตว์ทดลอง			■									
3	ศึกษาโครงสร้างเส้นประสาทและปมประสาทไขสันหลัง				■	■	■	■	■				
4	การบันทึกผลและวิเคราะห์ผลการทดลอง								■	■			
5	เขียนวิทยานิพนธ์										■	■	■

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system หรือ PNS)

ระบบประสาทส่วนปลายประกอบด้วย 2 ส่วนหลัก คือ 1. ปมประสาท (ganglion) และ 2. เส้นประสาท (nerve)

2.1.1 ปมประสาท (ganglion)

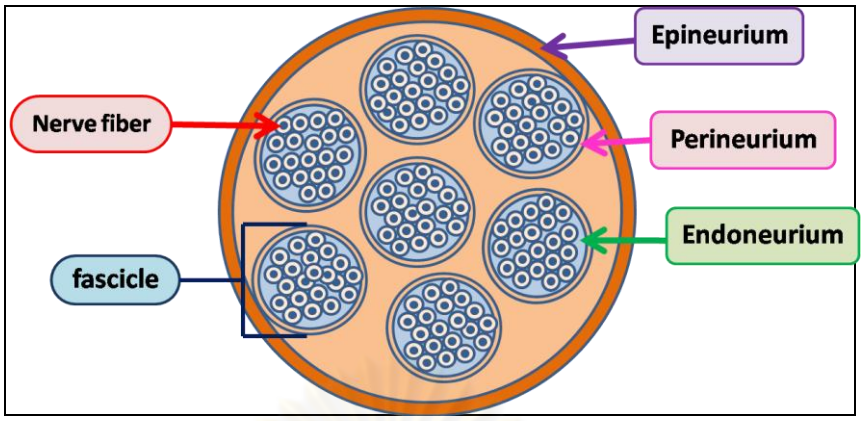
เป็นกลุ่มของตัวเซลล์ประสาท (cell body) ที่อยู่นอกระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system หรือ CNS) โดยแบ่งตามหน้าที่ได้ 2 ชนิด คือ

1. Sensory ganglion หรือ Craniospinal ganglion เป็นที่อยู่ของเซลล์ประสาทรับความรู้สึก (sensory neurons) ของเส้นประสาทสมองและไขสันหลัง ซึ่งประกอบด้วย cranial nerve ganglion ของเส้นประสาท trigeminal (CN V) facial (CN VII) glossopharyngeal (CN IX) และ vagus (CN X) และ spinal sensory ganglion ได้แก่ dorsal root ganglion

2. Autonomic ganglion ประกอบด้วย sympathetic ganglion และ parasympathetic ganglion เซลล์ประสาทเหล่านี้จะส่งเส้นใยประสาทออกไปเพื่อไปยังอวัยวะเป้าหมาย

2.1.2 เส้นประสาท (nerve)

ในระบบประสาทส่วนปลายประกอบด้วยเส้นประสาทสมอง 12 คู่ และเส้นประสาทไขสันหลัง 31 คู่ โดยเส้นประสาทเกิดจากเส้นใยประสาท (nerve fiber) หลายๆเส้นรวมกันเป็นมัดเส้นใยประสาท (fascicle) ซึ่งในแต่ละเส้นประสาทจะมีจำนวนมัดเส้นประสาทที่แตกต่างกันออกไป โดยเส้นใยประสาทแต่ละเส้นถูกหุ้มด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบหลวมๆ (loose connective tissue) เรียกว่า endoneurium ส่วนในแต่ละมัดเส้นใยจะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันแบบหนา (dense connective tissue) หุ้ม เรียกว่า perineurium และหลายๆมัดเส้นใยประสาทจะหุ้ม เรียกว่า epineurium (ภาพที่ 1) เส้นใยประสาทในเส้นประสาทนี้จะมีทั้งที่เป็นแขนงของเซลล์ประสาทรับความรู้สึก เซลล์ประสาทสั่งการ และ เซลล์ประสาทอัตโนมัติ

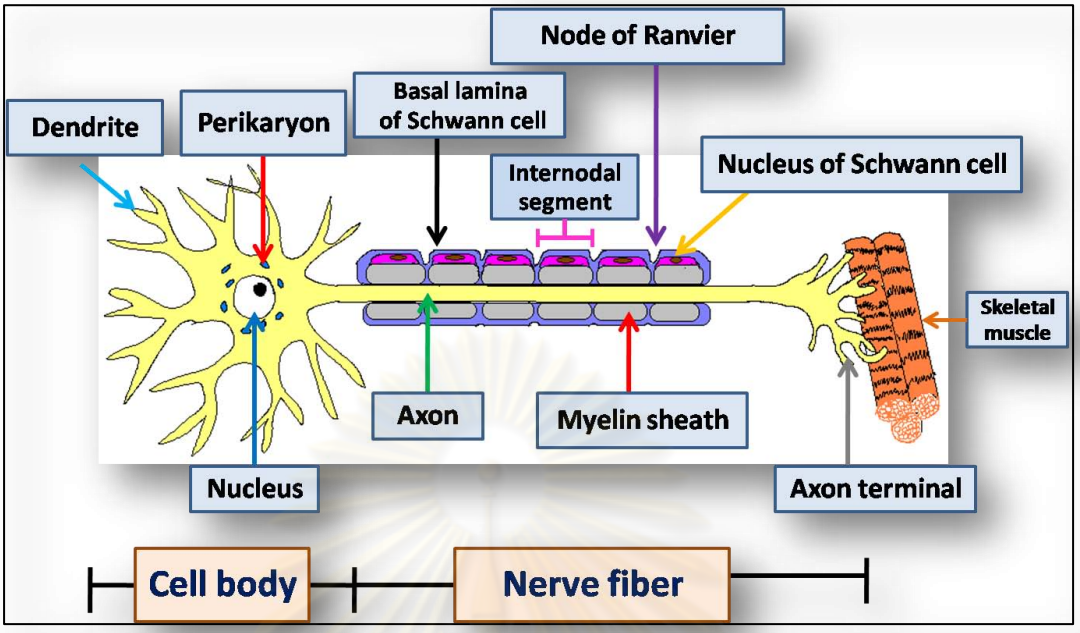


ภาพที่ 1 แสดงภาคตัดขวางเส้นประสาท เส้นใยประสาท(nerve fiber) มัดเส้นใยประสาท(fascicle) และเยื่อหุ้มเส้นประสาท

เซลล์ประสาท (neuron หรือ nerve cell) ประกอบด้วย 2 ส่วน คือ

1. ตัวเซลล์ประสาท ได้แก่ นิวเคลียส และ Perikaryon

2. แขนงของเซลล์ประสาท (cell process) คือ ส่วนที่ยื่นจากตัวเซลล์ประสาท มี 2 ชนิด คือ เดนไดร์ต (dendrite) ทำหน้าที่รับกระแสประสาทเข้าสู่ ตัวเซลล์ประสาท มีได้หลายแขนง และ แอกซอน (axon) มีหน้าที่รับกระแสประสาทจากตัวเซลล์ประสาทและส่งออกไปยังอวัยวะเป้าหมายหรือเซลล์ประสาทตัวอื่นๆ มีได้เพียงแขนงเดียวเท่านั้น ส่วน glial cell ในระบบประสาทส่วนปลาย คือ Schwann cell มีหน้าที่หลักดังต่อไปนี้ 1. สร้างและรักษาเยื่อไมอีลิน (myelin sheath) หุ้มล้อมรอบแอกซอน 2. ค้ำจุนแอกซอน 3. ทำหน้าที่เป็น phagocyte ในขณะเกิด degeneration โดยเราจะเรียกแอกซอนรวมกับ Schwann cell ว่า nerve fiber ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ 1. Unmyelinated nerve fiber เป็นแอกซอนขนาดเล็ก มี Schwann cell แต่ไม่มีการสร้างเยื่อไมลิน ซึ่ง Schwann cell 1 เซลล์ จะหุ้มได้หลายแอกซอน และ 2. Myelinated nerve fiber เป็นแอกซอนที่มีขนาดใหญ่และมี Schwann cell ทำหน้าที่สร้างเยื่อไมอีลิน โดยความหนาของเยื่ อไมอีลินจะขึ้นกับเส้นผ่านศูนย์กลางของแอกซอน ถ้าแอกซอนมีขนาดใหญ่ เยื่อไมอีลินจะมีความหนามากขึ้น ซึ่ง Schwann cell 1 เซลล์จะมีแอกซอนเพียงเส้นเดียวและสร้างเยื่อไมอีลินเพียง 1 ปล้อง เรียกว่า internode ส่วนบริเวณที่แอกซอนไม่มีเยื่อไมอีลินหุ้มหรือบริเวณระหว่าง internode 2 อัน เรียกว่า node of Ranvier บริเวณนี้มีความสำคัญในการเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสประสาท (action potential) กระแสประสาทกระโดดข้ามระหว่าง node of Ranvier ทำให้การนำกระแสประสาทจะเร็วกว่า unmyelinated nerve fiber (ภาพที่ 2)



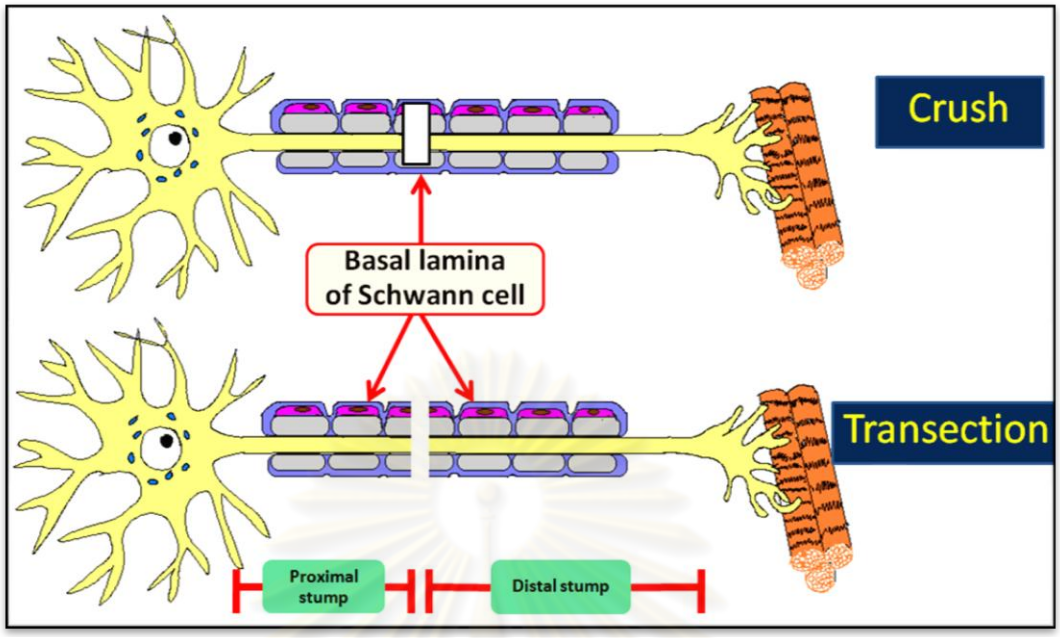
ภาพที่ 2 แสดงองค์ประกอบของเซลล์ประสาทและเส้นใยประสาท

2.2 การบาดเจ็บของเส้นประสาท (Nerve injury)

ลักษณะการบาดเจ็บของเส้นประสาทนั้นมีความสัมพันธ์กับการฟื้นคืนหน้าที่การทำงานของเส้นประสาท โดยการบาดเจ็บของเส้นประสาทเกิดจากกลไก 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ

1. การหนีบเส้นประสาทเกิดจากเส้นประสาทถูกกระแทกหรือการถูกหนีบด้วยของแข็งที่ไม่มีคม เช่น การถูกชนหรือกระแทกหรือการที่กระดูกหักแล้วกดทับเส้นประสาท จนทำให้แอกซอนและเยื่อไมอีลินที่ตำแหน่งที่ได้รับบาดเจ็บเสื่อมสลายเหลือแต่ชั้น basal lamina ของ Schwann cell

2. การตัดเส้นประสาท มักเกิดจากของมีคมบาด เช่น ถูกฟัน หรือถูกแทง ทำให้ทั้งแอกซอน เยื่อไมอีลิน และชั้น basal lamina ของ Schwann cell รวมทั้งเยื่อหุ้มเส้นประสาทที่ตำแหน่งไ ด้รับบาดเจ็บที่ตัดขาดออกจากกัน ภายหลังจากเส้นใยประสาทถูกหนีบหรือตัดขาด จะเรียกปลายเส้นประสาทที่อยู่ใกล้ตัวเซลล์ประสาทว่า proximal stump และ ปลายประสาทที่อยู่ต่ำกว่าตำแหน่งที่ได้รับบาดเจ็บว่า distal stump (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แสดงเซลล์ประสาทที่ถูกหนีบ (crush)และตัดเส้นประสาท (transection)และตำแหน่ง proximal stump และ distal stump ของเส้นประสาท

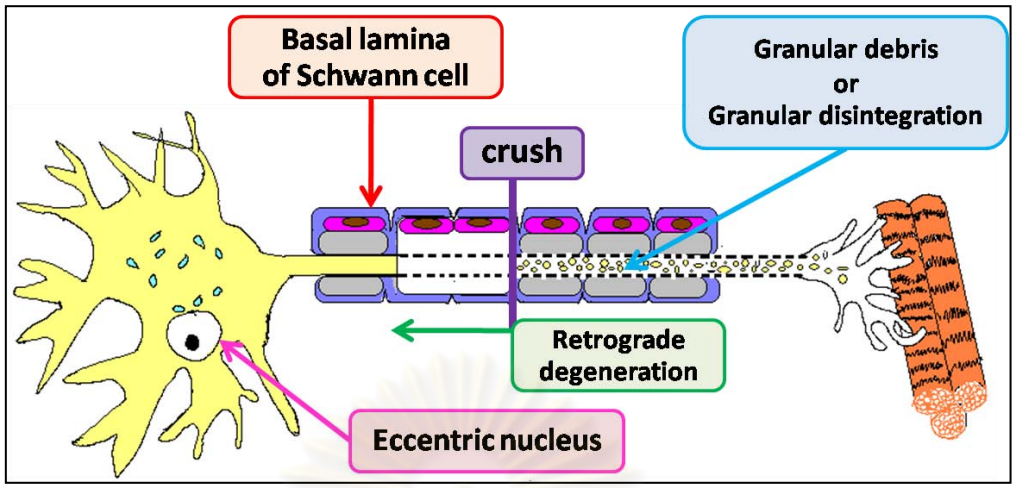
ซึ่งจะเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในตัวเซลล์ประสาทและแอกซอนหลังการบาดเจ็บ โดยการเปลี่ยนแปลงของปลาย proximal stump เรียกว่า retrograde degeneration ส่วน distal stump เรียกว่า anterograde หรือ Wallerian degeneration ซึ่งสามารถลำดับเหตุการณ์การเปลี่ยนแปลงได้ ดังนี้

1. การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในตัวเซลล์ประสาท (cell body reaction) มีดังนี้ ตัวเซลล์ประสาทจะบวม นิวเคลียสเคลื่อนที่ไปชิดขอบเซลล์ (eccentric nucleus) และเกิดกระบวนการกระจายตัวของ Nissl body ที่เรียกว่า Chromatolysis ประมาณ 24 ชั่วโมงหลังบาดเจ็บ

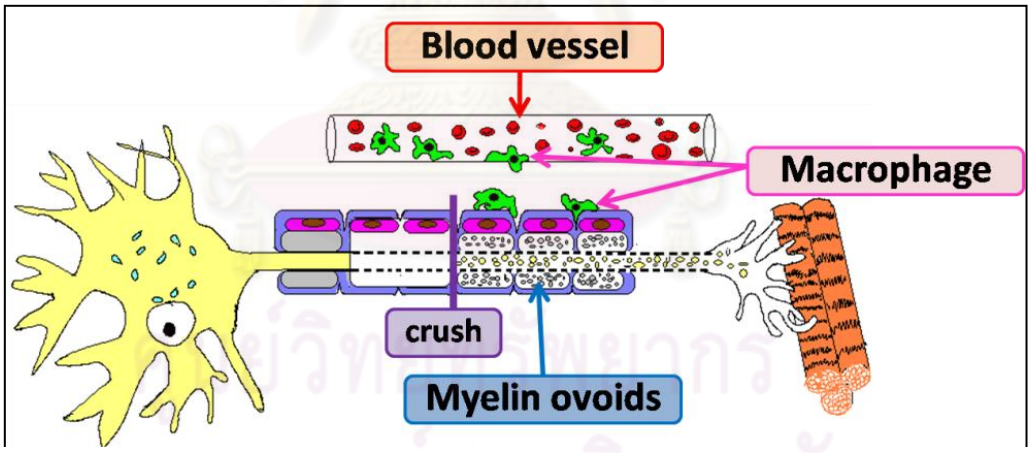
2. Retrograde degeneration การเปลี่ยนแปลงใน proximal stump จะมีการย่อยสลายของแอกซอน ขึ้นไปเหนือต่อรอยตัด 1-2 ปล้อง (internodal segment) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความรุนแรงของการบาดเจ็บที่ได้รับ แต่ยังคงเหลือชั้น basal lamina ของ Schwann cell มีลักษณะคล้ายท่อกลวงและเริ่มการสร้างแอกซอนขึ้นมาใหม่จากปลายแอกซอนที่ยังเหลืออยู่ ซึ่งจะกล่าวต่อไปในเรื่องการงอกใหม่ของเส้นประสาท

3. Anterograde หรือ Wallerian degeneration การเปลี่ยนแปลงใน distal stump ที่เกิดขึ้นทันทีใน 12 ชั่วโมงแรกหลังจากการบาดเจ็บของเส้นประสาท Schwann cell ลดการสร้างเยื่อไมอีลินแต่ก็ยังคงรูปร่างปกติอยู่ ภายหลังจาก 12 ชั่วโมง แอกซอนเริ่มถูกย่อยสลายโดยการทำงานของ Schwann cell เป็น Granular debris หรือ Granular disintegration (ภาพที่ 4) หลังจาก 24 ชั่วโมงหลังจากการบาดเจ็บของเส้นประสาท เยื่อไมอีลินเริ่มแตกสลายเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เรียกว่า Myelin ovoids (ภาพที่ 5) และการย่อยสลายเยื่อไมอีลินจนหมดจะใช้เวลานานถึง 3 สัปดาห์โดยการทำงานของ macrophage โดย macrophage แบ่งออกเป็น 2 ชนิดตามบริเวณที่พบ คือ 1.Resident macrophage ที่พบได้ทั่วไปในเส้นประสาทที่ชั้น endoneurirm 2. Hematogenous macrophage เป็น macrophage ที่เคลื่อนที่มาจากระบบหมุนเวียนโลหิต โดยเคลื่อนที่ผ่านเข้ามาทางชั้น basal lamina ของ Schwann cell โดยจำนวนของ macrophage จะเพิ่มขึ้นจำนวนมากในวันที่ 2 ถึง 3 หลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ หน้าที่ของ macrophage คือช่วย Schwann cell ย่อยสลายเยื่อไมอีลินและสร้างสารไปกระตุ้น Schwann cell เช่น IL-1 ให้ Schwann cell มีการผลิตสารจำพวก Nerve Growth Factor (NGF) เป็นสารที่เป็นปัจจัยสำคัญการงอกใหม่ของแอกซอน รวมถึงสนับสนุนให้เกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาทที่ดีขึ้น (Ide, 1996) ระหว่างนี้ Schwann cell จะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซีส (mitosis) หลังจาก Schwann cell แบ่งตัวก็จะเรียงตัวเป็นแถวเรียกว่า Büngner band (ภาพที่6) โดยมีหน้าที่ช่วยกำหนดและควบคุมทิศทางการงอกใหม่ของแอกซอนจากปลาย proximal stump ไปยัง distal stump ได้ถูกทิศทางมากขึ้น นอกจากนี้มีหน้าที่สนับสนุนและส่งเสริมการเกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาท

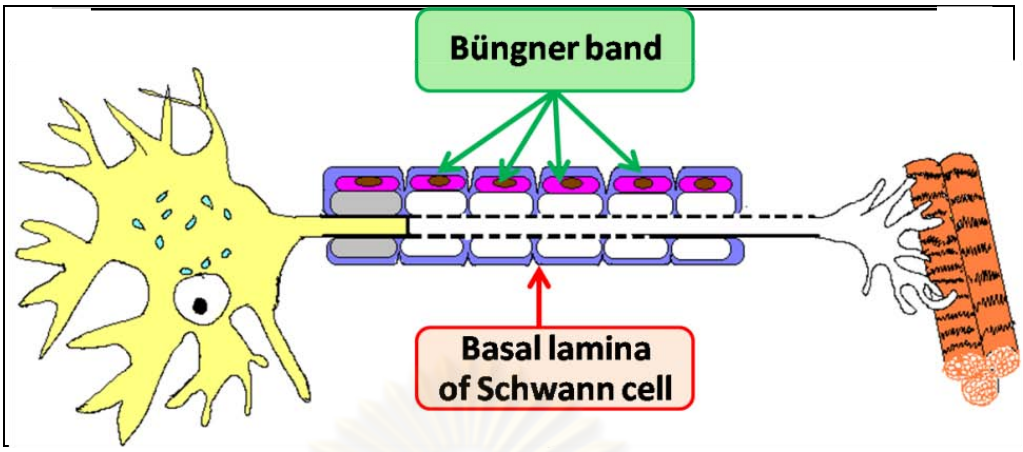
จากที่กล่าวมาข้างต้น Schwann cell มีบทบาทสำคัญอย่างยิ่งต่อเซลล์ประสาททั้งในภาวะเซลล์ประสาทที่ปกติและที่ได้รับบาดเจ็ บ นอกจากนี้ยังมีหน้าที่ผลิตสารสำคัญที่เป็นปัจจัยช่วยในกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของ Schwann cell และการงอกใหม่ของเส้นประสาทอีกด้วย เช่น NGF ในภาวะปกติมีหน้าที่กระตุ้นการสร้าง mRNA ที่สังเคราะห์โปรตีนจำพวก neuropeptide คือ Substance P และ Calcitonin gene-related peptide (CGRP) มีหน้าที่รับความเจ็บปวดใน small sensory neuron ส่วนในภาวะบาดเจ็บของเส้นประสาท Schwann cell ใน distal stump จะทำหน้าที่ผลิต NGF โดยมี Interleukin-1 (IL-1) ที่สร้างจาก macrophage เป็นตัวกระตุ้น โดย NGF จะกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประสาท (Terenghi., 1999)



ภาพที่ 4 แสดงการเกิด cell body reaction พบว่า cell body บวม นิวเคลียสชิดขอบเซลล์ (eccentric nucleus) retrograde degeneration เกิดการ ย่อยสลายแอกซอนขึ้นไป 1 ถึง 2 ปล้องเหนือต่อตำแหน่งที่บาดเจ็บและ Wallerian degeneration หลังจาก 12 ชม.ที่เส้นประสาทได้รับบาดเจ็บแอกซอนถูกย่อยสลายเป็น granular debris หรือ granular disintegration



ภาพที่ 5 Wallerian degeneration ที่ 24 ชม.หลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ เยื่อไมอีลินถูกย่อยสลายเป็นชิ้นเล็กชิ้นน้อย เรียกว่า myelin oviods โดยการทำงานของ macrophage



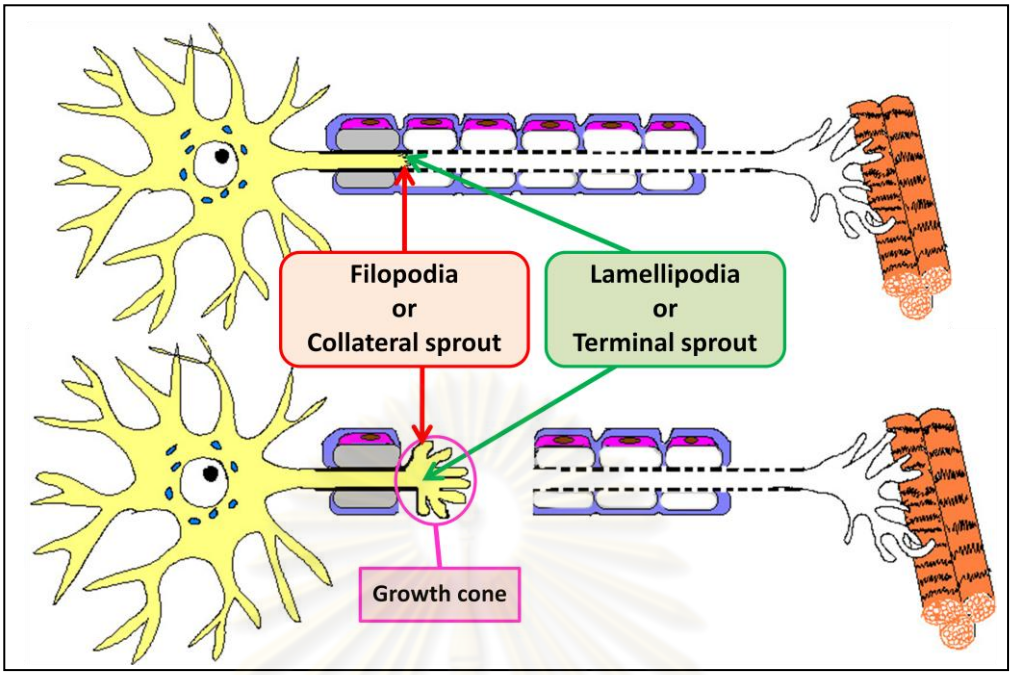
ภาพที่ 6 Wallerian degeneration ที่ 3 สัปดาห์ ในขณะที่เยื่อไมอีลินถูกย่อยสลาย Schwann cell จะมีการแบ่งนิวเคลียสแบบไมโตซีส (mitosis) และเรียงตัวเป็นแถวเรียกว่า Büngner band

2.3 การงอกใหม่ของเส้นประสาท (Nerve regeneration)

ภายหลังจาการเสื่อมสลายของเส้นใยประสาทที่ได้รับบาดเจ็บหรือถูกตัดขาด จะตามด้วยกระบวนการเจริญทดแทนหรือการงอกใหม่ของเส้นประสาท เรียก Nerve regeneration ซึ่งเหตุการณ์นี้พบได้ในระบบประสาทส่วนปลายสามารถเรียงลำดับการเปลี่ยนแปลง ได้ดังนี้

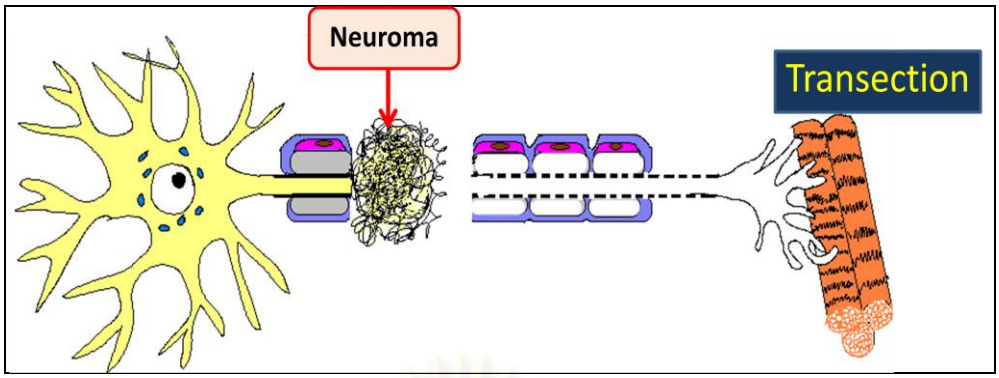
1. การเปลี่ยนแปลงภายในตัวเซลล์ โดยนิวเคลียสเริ่มเคลื่อนจากขอบเซลล์มาอยู่ในตำแหน่งกลางเซลล์เหมือนเดิม มีการสร้าง Nissl substance ซึ่งจะปรากฏตัวรอบๆนิวเคลียส ตัวเซลล์ลดอาการบวม

2. การเปลี่ยนแปลงภายใน proximal stump 2 ถึง 3 วัน หลังจากบาดเจ็บแอกซอนที่เหลือหลังจา กการเสื่อมสลาย จะเริ่มมีการสร้างแอกซอนออกมาใหม่จากปลายแอกซอนที่เหลืออยู่ เรียกว่า growth cone ซึ่งเป็นบริเวณที่ไวต่อ growth factor ที่สร้างมาจาก Schwann cell ใน distal stump ที่กล่าวไว้ในข้างต้น โดยบริเวณตรงกลางของ growth cone เรียกว่า lamellipodia หรือ terminal sprout ส่วนปลายที่งอกออกไปด้านข้างโดยรอบเรียกว่า filopodia หรือ collateral sprout ซึ่งแอกซอนเหล่านี้จะงอกออกมาจำนวนมากและยาวออกไปทาง distal stump ถ้าแอกซอนที่สร้างใหม่เส้นไหนที่งอกแล้วไปเจอ basal lamina tube ของ distal stump พอดี ก็จะงอกยาวไปเรื่อยๆ จนถึงอวัยวะเป้าหมายก็สามารถฟื้นคืนหน้าที่ได้ ส่วนแอกซอนอื่นๆที่มีการงอกใหม่แต่ไม่ตรงกับ basal lamina tube ของ distal stump ก็จะถูกย่อยสลายไปในภายหลัง (ภาพที่ 7)



ภาพที่ 7 แสดงการงอกใหม่ของเส้นประสาทเปรียบเทียบระหว่างการหนีบและตัดเส้นประสาทปลายแอกซอนที่งอกใหม่ เรียก growth cone ประกอบด้วย filopodia หรือ collateral sprout และ lamellipodia หรือ terminal sprout

มีความแตกต่างกันในการงอกใหม่ของเส้นประสาทระหว่างการหนีบและการตัดขา ดของเส้นประสาท ดังนี้ การหนีบเส้นประสาท ชั้น basal lamina ของ Schwann cell ยังไม่ขาดออกจากกันและยังคงเชื่อมส่วนของ proximal stump และ distal stump เข้าด้วยกันคล้ายท่อที่ไม่มีแอกซอน ช่วยให้การงอกใหม่ของแอกซอนที่ปลาย proximal stump ไปยังปลาย distal stump ได้ถูกทิศทางและเจริญเป็นแอกซอนที่สมบูรณ์ต่อไป ซึ่งแตกต่างจากการตัดเส้นประสาทให้ขาดออกจากกัน โดยปลาย proximal stump แยกออกจากปลาย distal stump โดยชั้น basal lamina ของ Schwann cell ไม่เชื่อมต่อกัน การงอกใหม่ของแอกซอนที่ปลาย proximal stump ไปยังปลาย distal stump เป็นไปได้ยากขึ้นหรืออาจมีเนื้อเยื่ออื่นมาขวางคั่นกลางและหากไม่ได้ทำการผ่าตัดแก้ไขหรือเย็บซ่อมจะเกิดเป็น neuroma สร้างความเจ็บปวดให้กับผู้ป่วยเป็นอย่างมาก (ภาพที่8) (Stoll and Müller., 1999)



ภาพที่ 8 แสดงการงอกของเส้นประสาทที่ผิดทิศทางหลังจากตัดเส้นประสาท ส่วนของเส้นประสาทที่งอกใหม่ไม่ไปยัง distal stump เกิดเป็น neuroma

2.4 การรักษาเส้นประสาทที่ได้รับบาดเจ็บ (Nerve repair)

ในด้านการรักษาจะเริ่มจากตรวจสภาพบาดแผลและลักษณะการขาดออกเส้นประสาท ซึ่งจะนำไปสู่การเลือกช่วงเวลาและเทคนิคในการเย็บซ่อมเส้นประสาท โดยเริ่มจากการตรวจสอบสภาพบาดแผลถ้าเป็นบาดแผลที่สะอาดปราศจากการติดเชื้อ เส้นประสาทขาดออกจากกันจะทำการเย็บซ่อมเส้นประสาทโดยทันที (immediate repair) แต่หากพบว่าบาดแผลมีการติดเชื้อหรือ มีการบาดเจ็บที่ระบบอื่นที่จำเป็นต้องรักษาก่อนก็ต้องทำเลื่อนการเย็บซ่อมเส้ นประสาทออกไป (delayed repair) โดยเทคนิคที่นิยมใช้ในการเย็บซ่อมเส้นประสาทแบ่งออกเป็น 3 วิธีหลักๆ ดังนี้

1. เทคนิคการเย็บซ่อมโดยตรง (direct repair) ลักษณะการขาดของเส้นประสาทที่เหมาะกับการเย็บซ่อมด้วยเทคนิคนี้ คือ การขาดของเส้นประสาทที่สูญเสียปลาย proximal stump หรือ distal stumpด้านใดด้านหนึ่ง เพียงเล็กน้อยหรือไม่สูญเสีย สามารถเย็บปลาย proximal stump และ distal stump เข้าด้วยกันด้วยความตึง (tension) เพียงเล็กน้อย โดยเทคนิคนี้แบ่งออกเป็น 2 วิธีย่อยๆ คือ 1. Epineurial repair เป็นวิธีมาตรฐานที่นิยมใช้ โดยการเย็บผ่าน epineurium มักใช้เย็บซ่อมเส้นประสาทที่ถูกตัดด้วยของมีคมและการจัดเรียงตัวของมัดเส้นประสาทมีความเป็นระเบียบ จำนวนรอยของการเย็บไม่มากก่อให้ เกิดแผลเป็นน้อยแต่มักมีข้อเสียคือการงอกใหม่ของเส้นประสาทอาจผิดทิศทาง 2. Fascicle repair เป็นการเย็บผ่าน perineurium ให้แต่ละมัดเส้นประสาทติดกัน มักใช้เย็บซ่อมเส้นประสาทที่ขาดความเป็นระเบียบของมัดเส้นประสาทหรือต้องการให้การงอกใหม่ของเส้นประสาทถูกทิศทางมากขึ้น แต่มีข้อเสียคือจำนวนรอยเย็บมาก ส่งผลให้เกิดรอยแผลเป็นจำนวนมากขึ้นไปรบกวนการไหลของ กระแสโลหิตภายในมัดเส้นประสาทได้

2. Nerve graft ใช้ในกรณีที่เส้นประสาทขาดออกจากกันและมีการสูญเสียเส้นประสาท ถ้าเอาเส้นประสาทดังกล่าวมาเย็บต่อกันจะเกิดแรงตึงเกิดขึ้นมาก ดังนั้นจึงนำส่วนของเส้นประสาทรับความรู้สึกจากผิวหนังตัดมาเชื่อมต่อปลายประสาทที่อยู่ห่างกันเพื่อลดแรงตึง โดยที่นิยมใช้ คือ sensory cutaneous nerve เช่น sural nerve, lateral antebrachial cutaneous nerve (LACN), anterior division of the medial antebrachial cutanous nerve (MACN), dorsal cutaneous branch of the ulnar nerve (DCBUN) และ Superficial sensory branch of the radial nerve (SSR) ซึ่ง sural nerve สามารถตัดได้ยาวถึง 30 - 50 เซนติเมตร โดยมีอาการชาที่ผิวหนังด้านข้างของเท้าและหลังตาตุ่ม ข้อเสียของการใช้ nerve graft คือ เกิดการชาที่ผิวหนังบริเวณที่เลี้ยงโดยเส้นประสาทที่เป็น donor ทั้งนี้นิยมใช้ autologous nerve graft เนื่องจากไม่มีปัญหาเรื่องการปฏิเสธเนื้อเยื่อ

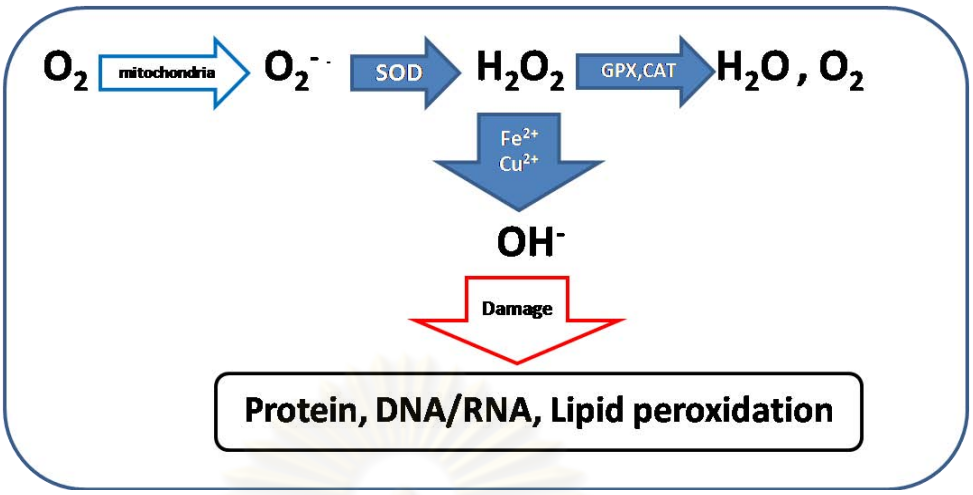
3. Entubulation repair ใช้ในกรณีเดียวกับการทำ nerve graft แต่ใช้วัสดุที่เป็นท่อ (conduit) มาเชื่อมต่อปลายเส้นประสาทที่ขาดออกจากกันและอาจเคลือบภายในท่อโดยการฉีดสารกระตุ้นต่อการอยู่รอดของเส้นประสาทหรือสารชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของเส้นประส าท (Neurotrophic factor) เป็นการเพิ่มประสิทธิภาพในการงอกใหม่ของเส้นประสาทได้ดีกว่าการทำ nerve graft โดยท่อที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อของร่างกาย เช่น เส้นเลือดดำใหญ่ (vein), mesothelial chamber, มัดของกล้ามเนื้อลาย และ epinuerium นอกจากนี้ยังใช้วัสดุที่เสื่อมสลายไ ด้ เช่น polyglycolic acid polymer (PGA), polylactide-caprolactone polymer (PLCL) เป็นต้น โดยวัสดุที่เลือกใช้นั้นมีความคงทนต่างกันและยังคงต้องพัฒนาต่อไป โดยคุณสมบัติของท่อที่ดี คือ ยอมให้มีการแพร่ของสารและก๊าซได้ดีและมีความเข้ากันได้กับเนื้อเยื่อ (Siemionow and Brzezicki., 2009

จากข้างต้นพบว่าการรักษาเส้นประสาทด้วยวิธีที่กล่าวไปยังมีข้อจำกัดอยู่บ้าง อาทิ 1. ระยะเวลาที่เส้นประสาทงอกใหม่ในธรรมชาติค่อนข้างช้า โดยแอกซอนจะมีอัตราการงอกใหม่ประมาณ 1 มิลลิเมตรต่อวันในมนุษย์ ถ้าเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บเป็นระยะทางที่ยาวจะใช้เวลานานมากในการฟื้นคืนสภาพปกติ ส่งผลให้กล้ามเนื้อบริเวณนั้นลีบ (atrophy) ไม่สามารถใช้การได้ตามปกติถึงแม้ว่าการงอกใหม่ของเส้นประสาทจะไปถึงกล้ามเนื้อแล้วก็ตาม 2. ความสามารถในการงอกใหม่อ ย่างถูกทิศทาง เป็นอีกปัญหาหนึ่งที่ส่งผลให้การคืนหน้าที่ของกล้ามเนื้อผิดปกติ (Höke., 2006) ดังนั้นจึงมีความพยายามในการศึกษาสารเคมีที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประ สาทหลังจากภาวะที่ได้รับบาดเจ็บ ซึ่งมีการนำสารที่ schwann cell สร้างขึ้นหรือ สารเคมีอื่นๆที่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นและชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาทอย่างถู ก

ทิศทางมากขึ้นและมีผลข้างเคียงที่น้อยที่สุดมาใช้ แต่ยังอยู่ในขั้นตอนการทำวิจัยในสัตว์ทดลองและมนุษย์ ซึ่งยังไม่มีวิธีใดที่ให้ผลในการรักษาที่ดีและนำมาใช้รักษาได้จริงในมนุษย์

2.5 Oxidative stress และภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ

Oxidative stress เป็นภาวะที่มีการเพิ่มปริมาณของ reactive oxygen species (ROS) กับกำจัด ROS ลดลง จึงเกิดความไม่สมดุลทำให้เกิดภาวะดังกล่าว ที่ส่งผลต่อเซลล์ต่างๆของร่างกายเสียหาย เนื่องจากเกิดการทำลายสารชีวโมเลกุ ลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ จำพวก ไขมัน น้ำตาล โปรตีน กรดนิวคลีอิก โดยปัจจัยที่ทำให้เกิด oxidative stress คือ mitochondria เป็นออแกเนล (organelle) ที่ผลิตพลังงานของเซลล์ ด้วยกระบวนการ electron transport chain เพื่อผลิต ATP จะเกิดการรั่วไหล (leak) ของ electron ซึ่ง electron ที่ออกมาจะไปจับกับ โมเลกุลของ oxygen (O_2) ได้เป็น superoxide anion redical ($O_2^{-\cdot}$) มีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent ร่างกายจะใช้ antioxidant มากำจัด โดย antioxidant แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ 1. Enzymatic antioxidant ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) 2. Non-Enzymatic antioxidant ได้แก่ ascorbic acid (vitamin C), α-tocopherol (vitamin E), glutathione (GSH), β-carotene และ vitamin A ในที่นี้จะใช้ superoxide dismutase (SOD) ไปกำจัด superoxide anion redical ($O_2^{-\cdot}$) ได้ผลิตภัณฑ์เป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และ oxygen (O_2) ซึ่ง H_2O_2 ก็ยังเป็นพิษต่อเซลล์จะถูกกำจัดด้วย CAT และ GPx ซึ่งมี GSH เป็น cofactor จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น น้ำ (H_2O) และ oxygen ส่วน H_2O_2 ที่เหลือบางส่วนจะจับกับ reduce transition metal ion เช่น Fe^{2+},Cu^{2+} จะได้ผลิตภัณฑ์เป็น hydroxide anion (OH^-) อีกทั้งการเกิด OH^- นั้นอาจเกิดจากการรวมตัวกันของ $O_2^{-\cdot}$ ได้เป็น H_2O_2 อีกด้วย ซึ่ง OH^- ที่เกิดขึ้นจะไปทำลายโครงสร้างของสารชีวโมเลกุล เช่น โปรตีน ไขมัน กรดนิวคลีอิกที่เป็นองค์ประกอบของสารพันธุกรรม ทำให้เซลล์สูญเสียหน้าที่เกิดการตายของเซลล์และก่อให้เกิดโรคต่างๆในที่สุด (Matés et al., 1999) (ภาพที่ 9)



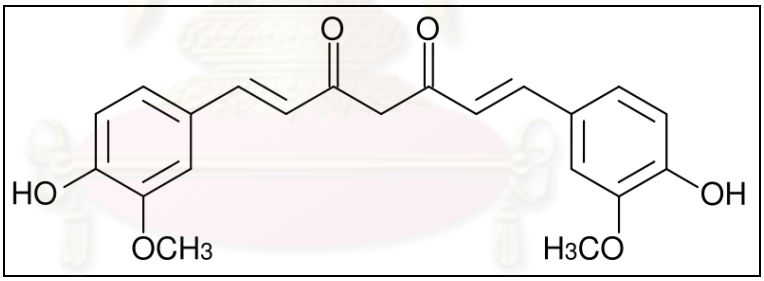
ภาพที่ 9 แสดงการสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ กลไกการกำจัดด้วย antioxidant ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) รวมถึงการสร้าง hydroxide anion (OH^-) ไปทำลายโปรตีน ไขมัน และโครงสร้างของสารพันธุกรรม

ในภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บนั้นจะมี การเพิ่มขึ้นของ oxidative stress โดยการทดลองของ Varija และคณะ (Varija et al., 2008) ศึกษาพบว่าเมื่อทำให้เส้นประสาท sciatic บาดเจ็บในหนูจะมีการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress ใน sciatic nerve, spinal cord, dorsal root ganglion, dorsal root และ ventral root เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress จากการลดลงของ SOD1 ส่งผลให้เกิดการเสื่อมสลายของ axon (Fischer and Glass., 2010) และ การตายของเซลล์ประสาทเกิดจากการเพิ่มของ ROS ทำให้เกิดตายของเซลล์โดยผ่านกระบวนการแบ่งเซลล์ (cell cycle) หรือการเพิ่มปัจจัยที่ มีผลต่อการตายของเซลล์ (pro-death factor) เช่น BAD phosphorylation (Langley and Ratan., 2004) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress ภายหลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บจะส่งผลให้เกิ ดการเสื่อมสลายของ axon และ การตายของเซลล์ประสาทได้

2.6 **สารสกัดจากขมิ้นชัน** (Curcumin)

ขมิ้นชัน (Turmeric) มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* เป็นพืชตระกูลขิงข่า (Zingiberaceae) ส่วนรากและเหง้าเมื่อนำมาบดเป็นผงจะให้สารสีเหลือง มีกลิ่นเฉพาะเป็นสมุนไพรชนิ ดหนึ่งที่พบทั่วไปในแถบเอเชีย ถูกนำมาใช้ปรุงอาหาร ทำเครื่องสำอาง และเป็นยารักษาโรคมาเป็นเวลายาวนานแล้ว จากการจดบันทึกของชาวจีนและตำรายาอายุรเวชของอินเดีย (India's Ayurvedic system of medicine) ได้กล่าวถึงสรรพคุณในการรักษาโรค ดังนี้ ใช้ในการรักษาบาดแผล โรคผิ วหนัง โรคติดเชื้อทางตา โรคทางระบบทางเดินหายใจ ไอ และโรคทางระบบเดินอาหารรวมถึงใช้ในการรักษาโรคทางทันตกรรม ส่วนในการปรุงอาหารเนื่องจากขมิ้นเป็นสารสีเหลืองสดจึงนำมาใช้เป็นสีผสมอาหาร และแต่งกลิ่นอาหาร นอกจากนี้คนไทยนิยมนำผงขมิ้นมาใช้ในการขัดผิวและพอกหน้าอีกด้วย

ในด้านการวิจัยศึกษาคุณสมบัติของ curcumin ที่เป็นสารในกลุ่มของ polyphenol (ภาพที่ 10) ที่จัดเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ชนิดหนึ่งที่พบได้ในสารสกัดจากธรรมชาติ เช่น องุ่น ผลไม้ในกลุ่มเบอร์รี่ ชาเขียว บล็อคโคลี่ รวมทั้งขมิ้นชัน โดยงานวิจัยมุ่งเน้นในการนำสาร polyphenol ที่สกัดจากขมิ้นชันมาใช้รักษาโรคต่างๆทั้งในสัตว์ทดลองและมนุษย์ ดังนี้



ภาพที่ 10 แสดงโครงสร้างโมเลกุลของสารpolyphenol ในสารสกัดขมิ้นชัน

http://www.honorintl-cn.com/uploadimg/200961115485676742.jpg

(availabled on 13-11-2008)

1. ฤทธิ์ต่อต้านอนุมูลอิสระ พบว่า curcumin มีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของ SOD และ เพิ่มระดับ glutathione รวมทั้งกำจัด metal ion ที่สำคัญ คือ Fe และ Cu เป็นต้น นอกจากนี้เมื่อนำไปทดสอบในสัตว์ทดลองและมนุษย์พบว่าสามารถลดภาวะ oxidative stress และมีผลดีต่อโรคที่เชื่อว่าเกิด oxidative stress เช่น atherosclerosis, Alzheimer's disease (Hatcher et al., 2008;

Epstein et al., 2010) นอกจากนี้ curcumin ไปลดการเกิด lipid peroxidation โดยลดการทำงานของ lipo-oxygenase โดยการจับกันของ curcumin และ lipo-oxygenase และลดการสร้าง H_2O_2 (Maheshwari et al., 2006; Gole et al., 2008)

2. ฤทธิ์ลดอาการอักเสบและต้านอาการแพ้ พบว่าอนุพันธุ์ของ curcumin มีฤทธิ์ลดอาการอักเสบ เช่นเดียวกับสาร phenylbutazone ที่ใช้เป็นยาลดอาการอักเสบ ส่วนน้ำมันหอมระเหยในรากของขมิ้นชันมีฤทธิ์ลดอาการอักเสบ โดยออกฤทธิ์ต้าน histamine ในระยะแรกของกา รอักเสบ (Srimal et al., 1973; Tripathi et al., 1973) อีกทั้ง curcumin ยับยั้งเอนไซม์ที่ก่อให้เกิดอาการอักเสบ เช่น 5-lipoxygenase, 12-lipoxygenase, transcription factor nuclear factor **K**B (NF-**K**B) และ cyclooxygenase (COX) รวมถึง curcumin ยังสามารถยับยั้งกา รผลิตสาร cytokine ต่างๆ เช่น IL1,IL6 และ TNF-α ทำให้ลด inflammation (Hatcher et al., 2008; Epstein et al., 2010) นอกจากนี้มีการนำไปใช้รักษาหนูที่ทำให้เกิดข้ออักเสบ (arthritis)(Ramadan et al., 2010) และ พบว่าสามารถลดอาการเจ็บปวดในผู้ป่วยที่เกิดภาวะ inflammation เช่น กระดูกข้ออักเสบ (Rheumatoid arthritis), psoriasis และ inflammatory bowel disease (Epstein et al., 2010)

3. ฤทธิ์สมานแผล เมื่อนำผงขมิ้นมาละลายน้ำและทาบนแผลของหนูและกระต่ายทดลอง พบว่าช่วยป้องกันการติดเชื้อของบาดแผล และเร่งให้บาดแผลที่ติดเชื้ อหายได้เร็วขึ้น (Steenkamp et al.,2004) ส่วนการรักษาโรคผิวหนัง หรือแผลที่เกิดจากการกัดของแมลงพบว่ามีฤทธิ์ในการสร้างเซลล์ผิวใหม่ รวมทั้งกระตุ้นการสร้างกล้ามเนื้อขึ้นมาใหม่หลังได้รับบาดเจ็บจากอุบัติเหตุ นอกจากนี้ curcumin มีฤทธิ์ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหารอี กด้วย (gastric ulcer) (Maheshwari et al., 2006)

4. ฤทธิ์ต่อต้านการทำงานสารก่อมะเร็ง โดยไปยับยั้งสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดมะเร็งและยับยั้งการแบ่งเซลล์มะเร็งในระดับเซลล์ โดยไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p53 ให้เพิ่มขึ้น ส่งผลให้ยุติการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งหรือทำให้เซลล์นั้นตายไป (Hatcher et al., 2008; Gole et al., 2008)

5. ฤทธิ์ทางด้านระบบประสาท เนื่องจากสมองเป็นอวัยวะที่มี oxidative สูงเพราะมีความต้องการ oxygen ถึง 20% เทียบกับร่างกาย และร่วมกับการเสื่อมสลายของเซลล์ตามวัย (aging) และการสะสมของ reduce transition metal ion จึงทำให้เกิด ROS (Aggarwal et al., 2009) พบว่า curcumin มีประสิทธิภาพใน การ ลดภาวะการอักเสบของระบบประสาท (neuroinflammation) มีคุณสมบัติเป็นสารปกป้องระบบประสาท (neuroprotection) ต่อต้านอนุมูลอิสระ โดยการลดสารตั้งต้นที่ก่อให้เกิดการอักเสบ (pro-inflammatory) และ สารตั้งต้นของอนุมูลอิสระ (pro-oxidant) นอกจากนี้มีรายงานว่าสามารถใช้ในการรักษา หรือ ลดอาการของโรคอัลไซเมอร์ (Alzhheimer's disease) โรคพาร์คินสัน (Parkinson's disease) โรคทางระบบ

ประสาทที่เกิดจากการสร้างโปรตีนผิดรูปร่าง โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) และโรคทางสมองที่พบในผู้สูงอายุ (brain aging) เป็นต้น (Cole et al., 2007)

โรคอัลไซเมอร์ เป็นโรคที่เกิดจากการตายของเซลล์ประสาทและการเพิ่มของ neurofibrillary tangles (NFTs) และ senile plaques ที่สร้างจาก β-amyloid (Aβ) peptide ที่บริเวณ hippocampus (Hardy., 1997) curcumin นอกจากไปลดสารจำพวกอนุมูลอิสระที่ไปทำลายระบบประสาทและลดการอักเสบ (Begum et al., 2008) แล้วยังคงลด Aβ peptide โดยจะไปกระตุ้น microgial ช่วย brain macrophage ทำการ phagocytosis ในการกำจัด Aβ peptide และขัดขวางไม่ให้ Aβ peptide มาสร้างพันธะซึ่งกันเนื่องจาก curcumin ไปกระตุ้นการแสดงออกของ heat shock proteins (HSPs) ทำหน้าที่ป้องกันไม่ให้เกิดการสร้างพันธะโปรตีนที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบประสาทด้วย (Lim et al., 2001, Scapagnini et al., 2006, Rossi et al., 2008)

โรคพาร์คินสันเป็นโรคที่เกิดจากสองสาเหตุหลัก คือ 1. เกิดจากการตายของเซลล์ประสาทที่สร้างสาร dopamine ใน substantia nigra เมื่อสาร dopamine แตกตัวและผ่านกระบวนการ เมทาบอลิซึม จะให้อนุมูลจำพวกซูเปอร์ออกไซด์ นั่นคือ hydrogen peroxide ที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ (Chandra et al., 2001) แต่พบว่า curcumin ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระดังกล่าว 2. โรคพาร์คินสันที่มีสาเหตุจากโรคทางพันธุกรรมจะพบการแปรผัน (mutation) ของการสร้างโปรตีน α-synuclien โดย curcumin จะไปลดการรวมตัวของโปรตีนนี้ (Duan et al., 1999)

โรคทางระบบประสาทที่เกิดจากการสร้างโปรตีน ผิดรูปร่าง เช่น Mad cow disease และ Huntington's disease ซึ่ง curcumin จะไปป้องกันการสร้างโปรตีนที่ผิดปกติดังกล่าว (Pandey et al., 2005; Zhu et al., 2006)

โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) จากรายงานวิจัยพบว่า curcumin จะไปลดระดับคลอเลสเตอรอล (cholesterol) และเพิ่มระดับ high-density lipoprotein (HDL) ในมนุษย์ อีกทั้งป้องกันการทำลายของเยื่อบุผนังหลอดเลือดจากสาร homocysteine รวมถึง curcumin ไปลดอนุมูลอิสระที่สร้างจากภาวะการอักเสบจากหลอดเลือดในสมองตีบตัน (ischemic stroke) (Wang et al., 2005)

โรคทางสมองที่พบในผู้สูงอายุ พบว่าผู้สูงอา ยุในแถบเอเชียที่รับประทานอาหารที่มีส่วนของเครื่องเทศและขมิ้นผสมอยู่เป็นประจำจะมีการทำงาน cognitive function ที่สูงกว่าผู้สูงอายุที่ไม่ค่อยรับประทานอาหารที่มีขมิ้นเป็นส่วนประกอบ (Gole et al., 2008)

ภาวะไขสันหลังได้รับบาดเจ็บ spinal cord (SCI) ในหนู พบว่าเมื่อให้สาร curcumin เทียบกับกลุ่มที่ได้รับ methyprednisolone และ กลุ่มควบคุม ผลการทดลองพบว่า curcumin ทำหน้าที่เป็น antioxidant โดยตรวจในตัวอย่างเลือดพบปริมาณ SOD ที่เพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ methyprednisolone และ กลุ่มควบคุม อีกทั้งปริมาณ malondialdehyde (MDA) ที่เป็นตัวชี้วัดการเกิด lipid peroxidation ที่ลดลง ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Kavakli et al., 2011) รวมถึงมีงานวิจัยก่อนหน้านี้ได้ศึกษาภายหลังไขสันหลังได้รับบาดเจ็บ โดย curcumin ไปยับยั้งการเกิด apoptosis ลดการตายของเซลล์ประสาท เนื่องจากไปควบคุมการทำงานของ astrocyte และ microglia เพื่อลดสร้าง Glia fibrillary acidic protein (GFAP) ที่ทำให้เกิด gial scar แต่ก็มีข้อเสียคือจะไปยับยั้งการงอกใหม่ของ axon และ ยับยั้งการซ่อมแซมตัวเองของเซลล์ประสาทที่บริเวณดังกล่าว ดังนั้น curcumin ไปลดการสร้าง GFAP และ apoptosis จึงช่วยให้เซลล์ประสาทรอดชีวิตเพิ่มขึ้น (Lin et al., 2009)

ภาวะเส้นประสาท sciatic ที่ได้รับบาดเจ็บแบบหนีบในหนู กับการให้สาร curcumin พบว่ากลุ่มที่ได้รับ curcumin มีการคืนหน้าที่ของประสาทสั่งการที่วัดจากรอยพิม พ์เท้า sciatic function index (SFI) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ ช่วยคงโครงสร้างของของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง (Noorafshan et al., 2011)

จากข้อมูลข้างต้น curcumin มีสรรพคุณในการรักษาโรคหลายชนิดเป็นระยะเวลานาน ราคาถูก แล้วไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงในมนุษย์และสัตว์ทดลอง อีกทั้งมีรายงานการวิจัยที่ยืนยันสรรพคุณของสารที่อยู่ในขมิ้นชันในการรักษาโรคหลายชนิดรวมถึงโรคทางระบบประสาท ส่วนภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บในปัจจุบันยังคงไม่มีวิธีการรักษา หรือ การนำสารเคมีชนิดใดที่จะนำมาใช้รักษาได้อย่างมีประสิทธิภาพ อีกทั้งการนำสาร curcumin มาใช้รักษาภาวะเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บนั้นมีงานวิจัยอยู่น้อยมาก ดังนั้นการทดลองนี้จึงนำสาร curcumin มาศึกษาในกรณีของเส้นประสาทที่ได้รับบาดเจ็บ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

<u>การทดลองที่ 1</u> การศึกษาผลของ curcumin ต่อการลดจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและการประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic

<u>การทดลองที่ 2</u> การศึกษาผลของ curcumin ต่อระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาทsciatic

<u>การทดลองที่ 1</u>

การศึกษาผลของ curcumin ต่อการลดจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและการประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาท ภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic

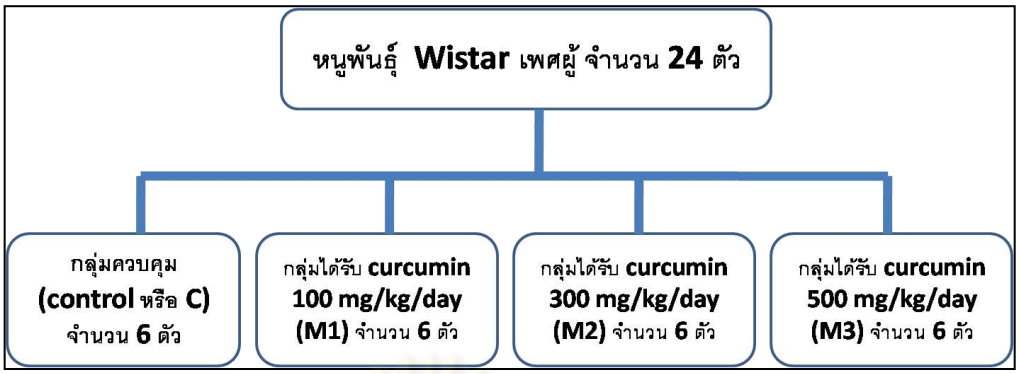
1. การเลือกกลุ่มประชากร

หนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ จำนวน 24 ตัว น้ำหนัก 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยจำนวนที่ใช้ได้จาก pilot study ก่อนหน้านี้ พบว่าจำเป็นต้องใช้หนูอย่างน้อย 5 ตัว ในการศึกษาทางด้านโครงสร้างของปมประสาทเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่น่าเชื่อถือ รวมทั้งต้องเผื่อไว้กลุ่มละ 1 ตัว ในกรณีที่มีการตายของหนูระหว่างทดลอง

1.1 การแบ่งกลุ่มประชากร

นำหนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ 24 ตัว มาแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังแผนภาพต่อไปนี้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กลุ่มที่ 1 หนูกลุ่มควบคุม (control หรือ C) จำนวน 6 ตัว

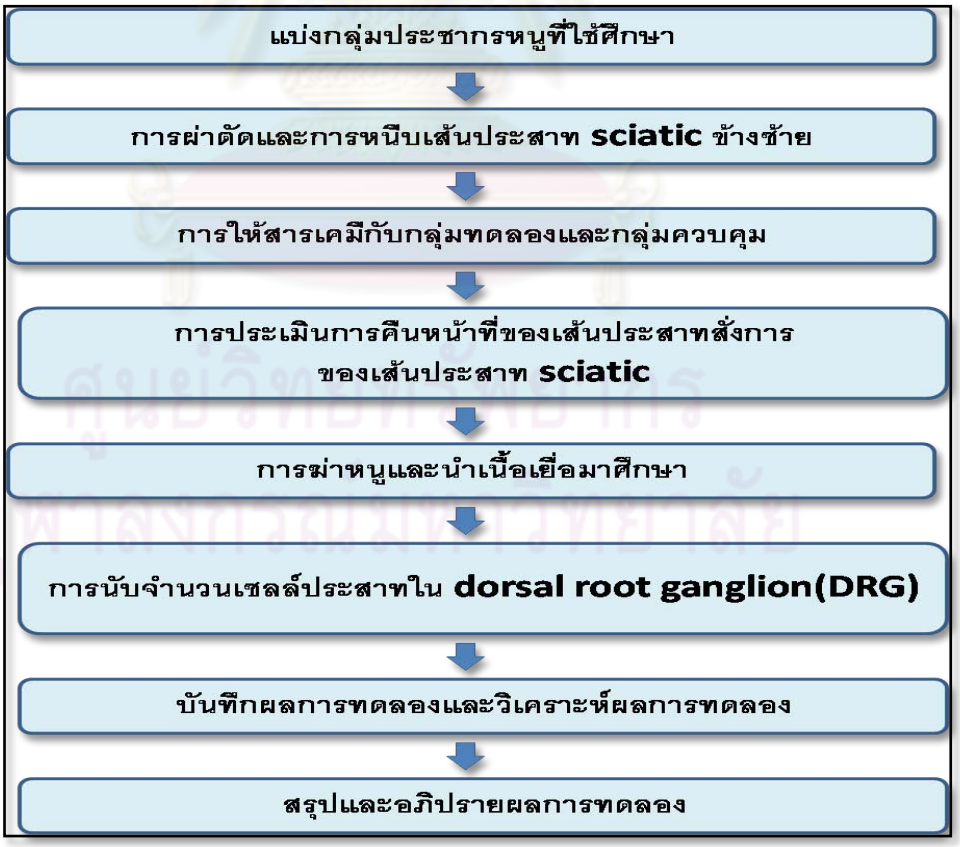
กลุ่มที่ 2 หนูกลุ่มที่ได้รับสาร curcumin 100 mg/kg/day (M1) จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 3 หนูกลุ่มที่ได้รับสาร curcumin 300 mg/kg/day (M3) จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 4 หนูกลุ่มที่ได้รับสาร curcumin 500 mg/kg/day (M5) จำนวน 6 ตัว

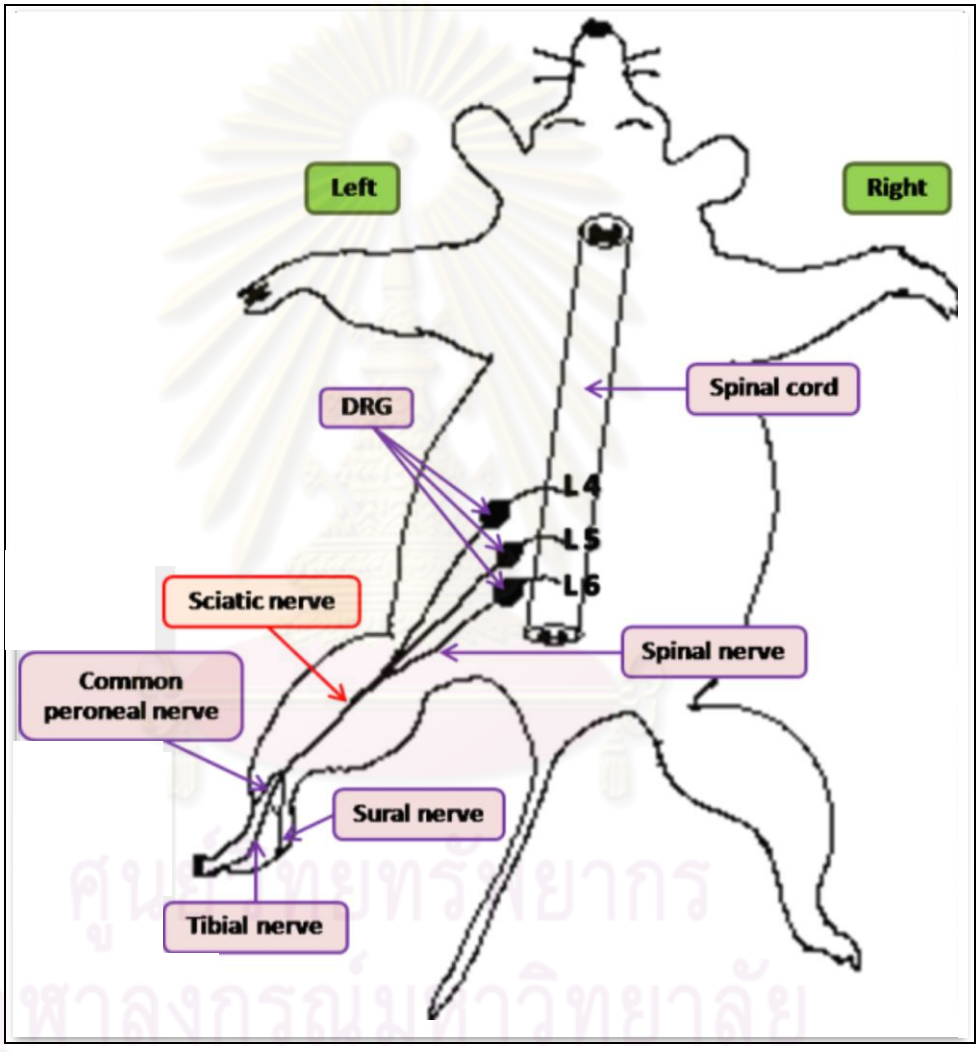
2. วิธีการวิจัย (Methods)

แผนผังขั้นตอนการวิจัย



3. การผ่าตัดและทำให้เกิดการบาดเจ็บแบบหนีบต่อเส้นประสาท sciatic

เส้นประสาท sciatic เป็นเส้นประสาทที่ได้รับแขนง sensory จาก dorsal root ganglion (DRG) ที่ระดับ L4 ถึง L6 และแขนงประสาทสั่งการ โดยส่วนปลายมีแขนงประสาทแยกออกไป คือ เส้นประสาท common peroneal เส้นประสาท tibial และ เส้นประสาท sural โดยทำหน้าที่เลี้ยงผิวหนังที่ขาหลัง กล้ามเนื้อต้นขาด้านหลัง กล้ามเนื้อขาและเท้าของขาหลัง (ภาพที่ 11)



ภาพที่ 11 แสดงตำแหน่งเริ่มต้นของเส้นประสาท sciatic ที่ได้รับแขนง sensory จาก DRG ที่ระดับ L4–6 แขนงปลายของเส้นประสาท sciatic ได้แก่ เส้นประสาท common peroneal เส้นประสาท tibial และ เส้นประสาท sural

3.1 ขั้นตอนดำเนินการ

ทำการวางยาสลบเพื่อทำการผ่าตัดหนูทุกตัว โดยใช้ isoflurane ผสมกับ oxygen ให้ดมจนหนูทดลองสลบ จากนั้นเตรียมการผ่าตัด โดยโกนขนที่ขาหลังและสะโพกข้างซ้าย และทาน้ำยา betadine ฆ่าเชื้อโรคบริเวณดังกล่าว จากนั้นผ่าตัดเปิดชั้นผิวหนังของขาหลังข้างซ้ายและแหวกกล้ามเนื้อตรงสะโพกแล้วทำการหนีบเส้นประสาท sciatic ระดับกลางต้นขาโดยใช้ arterial clamp เป็นเวลา 30 วินาที จากนั้นทำตำหนิไว้บริเวณที่หนีบเส้นประสาท โดยการเย็บด้วยไหมชนิดไม่ละลายเบอร์ 6/0 ที่ชั้น epineurium และเย็บปิดผิวหนังด้วยไหมชนิดไม่ละลายเบอร์ 4/0 หลังจากนั้นตรวจดูบาดแผลและทา betadine ที่บริเวณบาดแผลจนกว่าแผลจะหายสนิท

4. การให้ยากับหนู

4.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 ml
2. เข็มฉีดยาเบอร์ 21
3. curcumin (CAYMAN CHEMICAL, Cat.81025)
4. 2% sodium carboxy methyl cellulose ละลายใน normal saline
5. สารละลาย betadine

4.2 ขั้นตอนเตรียมยา

ละลาย curcumin ใน vehicle คือ สารละลาย 2% sodium carboxy methyl cellulose ใน normal saline

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.3 วิธีให้ยา

การให้ยาจะให้ด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection หรือ IP injection) ในขั้นตอนนี้ต้องระวังเป็นพิเศษเพราะอาจจะทำให้เกิดการบาดเจ็บต่ออวัยวะภายในรวมทั้งการติดเชื้อในช่องท้องได้ ดังนั้นต้องใช้อุปกรณ์ที่ปลอดเชื้อและตำแหน่งฉีดที่ถูกต้องด้วย โดยเริ่มจากทา betadine ที่ตำแหน่งที่ใช้ฉีดยา ซึ่งตำแหน่งฉีดยานั้นจะอยู่ที่ lower quadrant ของช่องท้องข้างซ้ายหรือข้างขวา การให้ยานั้นเริ่มภายหลังจากการผ่าตัดและรอให้หนูฟื้นดีแล้วในวันเดียวกัน โดยจะให้ยาดังต่อไปนี้

1. กลุ่ม C ให้เฉพาะสาร vehicle เพียงอย่างเดียว
2. กลุ่ม M1 ให้สารละลาย curcumin 100 mg/kg/day
3. กลุ่ม M2 ให้สารละลาย curcumin 300 mg/kg/day
4. กลุ่ม M3 ให้สารละลาย curcumin 500 mg/kg/day

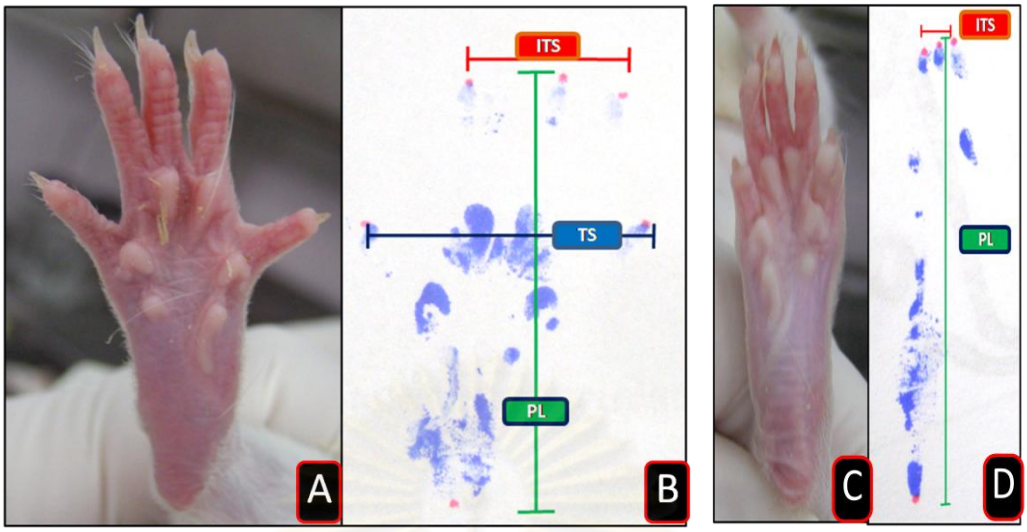
โดยจะฉีดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ณ เวลาเดียวกันคือตอนเช้า เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์

5. การประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic โดยการวัดจากรอยเท้า

เป็นการตรวจสอบการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทภายหลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ โดยวัดดูจากรอยเท้าซึ่งสะท้อนถึงการเคลื่อนไหวและการทำงานของเซลล์ประสาทสั่งการ ซึ่งในการทดลองจะสร้างทางเดิน (corridor) ให้กับสัตว์ทดลอง โดยทำทางเดินจากวัสดุทึบแสงเป็นผนังกั้นที่สูงกว่าควา มสูงของสัตว์ทดลองเพื่อป้องกันการรบกวนจากสิ่งเร้าภายนอก โดยพื้นของทางเดินจะปูด้วยกระดาษสีขาวเพื่อรองรับรอยพิมพ์เท้าของหนูทดลองเวลาเดินผ่าน

5.1 วิธีการตรวจ

ภายหลังจากให้ยาเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ ทดสอบการเดินของหนูที่ผ่านการหนีบเส้นประสาท sciatic โดยการนำฝ่ าเท้าของขาหลังทั้งสองข้างจุ่มหมึก และให้หนูเดินบนทางเดินที่สร้างขึ้น จะได้ภาพพิมพ์ของฝ่าเท้าทั้งสองข้างนำภาพของฝ่าเท้ามาวัดค่าต่างๆ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 12 แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเท้าหนูและรอยพิมพ์เท้าหนู

โดย A แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเท้าหนูข้างขวา

B แสดงรอยพิมพ์เท้าหนูข้างขวา

C แสดงลักษณะทางกายวิภาคของเท้าหนูข้างซ้าย

D แสดงรอยพิมพ์เท้าหนูข้างซ้าย

PL แสดง print length

TS แสดง toe spread

ITS แสดง intermediary toe spread

ค่าที่วัดมีดังต่อไปนี้

1. ความยาวของฝ่าเท้าจากส้นเท้าถึงปลายนิ้วเท้าที่ 3 (print length หรือ PL)
2. ความกว้างของฝ่าเท้าโดยวัดจากปลายนิ้วเท้าที่ 1 ถึงนิ้วเท้าที่ 5 (toe spread หรือ TS)
3. ความกว้างจากนิ้วเท้าที่ 2 ถึงนิ้วเท้าที่ 4 (intermediary toe spread หรือ ITS)

หน่วยที่ใช้วัดคือ เซนติเมตร เมื่อวัดค่าต่างๆของทั้งสองเท้าเสร็จก็นำมาเปรียบเทียบกันระหว่างเท้าซ้ายและเท้าขวาและเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองต่างๆ จดบันทึกค่าที่ได้แล้วนำค่าต่างๆไปคำนวณทางสถิติซึ่งจะกล่าวต่อไป

6. การนับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง

เนื่องจากภายหลังจากเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บจะพบการตายของเซลล์ในปมประสาทไขสันหลัง (Stoll and Müller, 1999) โดยจะเริ่มเห็นได้ชัดที่ระยะเวลา 2 สัปดาห์ ดังนั้นการทดลองนี้จึงได้ศึกษาจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังภายหลังได้รับบาดเจ็บเป็นเวลา 2 สัปดาห์เทียบ กับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังด้านที่ปกติในสัตว์ตัวเดียวกัน รวมถึงการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ได้รับปริมาณสาร curcumin ที่แตกต่างกัน

6.1 การเก็บปมประสาทไขสันหลัง

หลังจากวัดรอยเท้าแล้ว นำหนูทดลองทุกตัวมาดม isoflurane จนหนูสลบ จากนั้นผ่าเปิดช่องอกจนเห็นหัวใจอย่างชัดเจนเพื่อทำ cardiac perfusion โดยใช้เข็มที่ต่อกับสายยางจากปั๊มเจาะเข้าหัวใจห้องล่างซ้าย (left ventricle) และผ่าเปิดที่หัวใจห้องบนขวา (right atrium) จากนั้นปั๊ม normal saline เย็นผ่านหัวใจห้องล่างซ้ายเพื่อไล่เ ลือด 200 ml ตามด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) 400 ml จากนั้นผ่าเลาะเพื่อเก็บ DRG ที่ระดับ L4 และ L5 ทั้งสองข้าง

6.2 การรักษาสภาพปมประสาทไขสันหลัง

DRG ที่ระดับ L4 และL5 นำไปแช่ใน 3% glutaraldehyde ที่ 4°c เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นเปลี่ยนเป็น 0.2 M phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4 จำนวน 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. เพื่อล้าง 3% glutaraldehyde ออก จากนั้นเก็บไว้จนกว่าจะเริ่มกระบวนการฝังใน epoxy resin และการตัดชิ้นเนื้อตามลำดับ

6.3 การเตรียมปมประสาทไขสันหลังที่ใช้ในการศึกษา

6.3.1. การฝังชิ้นเนื้อใน epoxy resin

นำ DRG ระดับ L4 และ L5 ที่ผ่านกระบวนการรักษาสภาพชิ้นเนื้อด้วย 3% glutaraldehyde และเปลี่ยนเป็นมา 0.2 M PBS pH 7.4 เข้าสู่กระบวนการฝังใน epoxy resin (embedding) ด้วยขั้นตอนต่อไปนี้ ล้างด้วย 0.1 M Cacodylate buffer (pH7.4) 3 ครั้งครั้งล่ะ 10 นาที แล้วเปลี่ยนเป็น OsO_4 ทิ้งไว้เป็นเวลา 2 ชม. จากนั้นจะเข้าสู่การฝังใน epoxy resin โดยการทำให้ชิ้นเนื้อปราศจากน้ำ (dehydration) ด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้น 70% และเปลี่ยนแปลงความเข้มข้นเป็น 80%, 95% และ 100%

ตามลำดับ จากนั้นแทนที่แอลกอฮอล์ภายในเซลล์ด้วย propylene oxide จำนวน 2 ครั้ง โดย propylene oxide เป็นตัวทำละลาย epoxy resin ตามมาด้วยการเติม epoxy resin เข้าสู่เซลล์ด้วยอัตราส่วน epoxy resin : propylene oxide 1:1 และ 2:1 ตามลำดับ ในขั้นตอนสุดท้ายจะทำการเติม (infiltration) epoxy resin เข้าชิ้นเนื้อ ด้วย epoxy resin 100 % และฝังในแม่พิมพ์ (mold) ที่มี epoxy resin 100 % นำเข้าตู้อบรักษาอุณหภูมิที่ 60ºC เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำออกจากแม่พิมพ์ ซึ่งเราจะเรียกว่า plastic block พร้อมที่จะนำมาตัดชิ้นเนื้อต่อไป

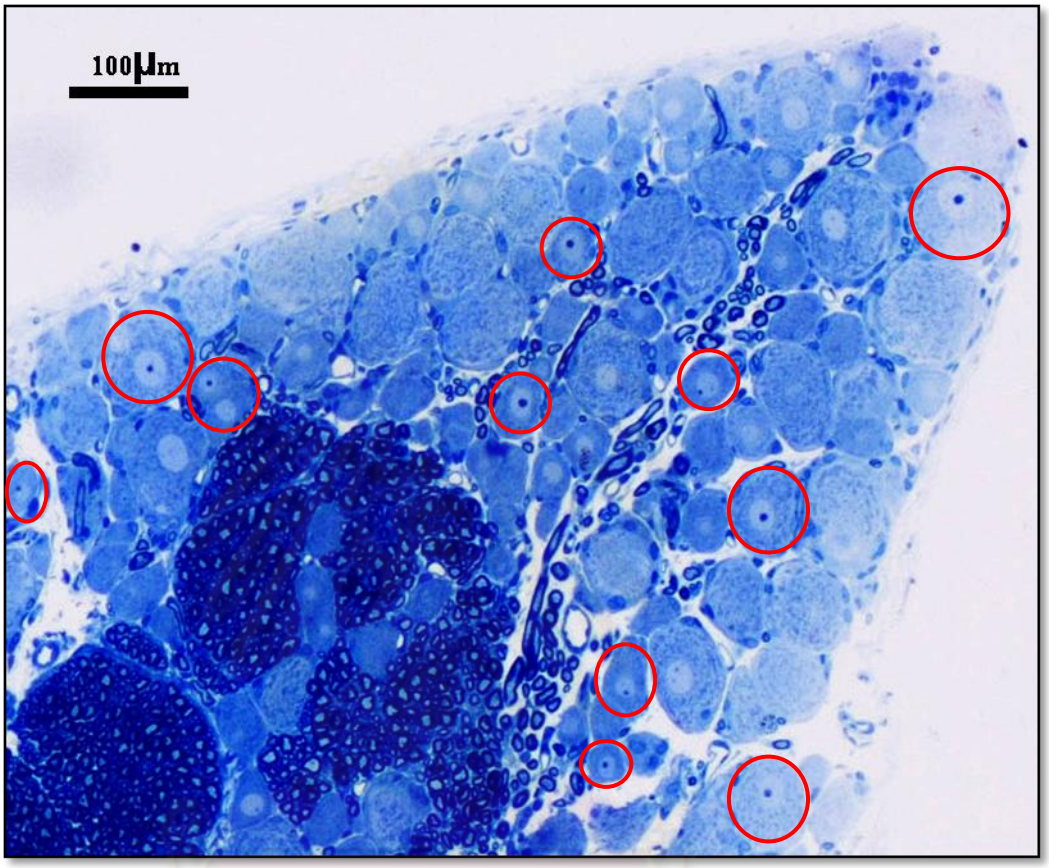
6.3.2. การตัดชิ้นเนื้อ

ในขั้นตอนการตัดชิ้นเนื้อ เริ่มจากนำ plastic block ที่มี DRG ฝังอยู่มาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome เป็น semithin section ที่ความหนา 2 µm โดยตัดต่อเนื่องเก็บทุก section ในขั้นตอนนี้ต้องดูผ่านกล้องจุลทรรศน์เพื่อหา section แรกและสุดท้ายที่มีตัวเซลล์ประสาท (cell body)อยู่ เมื่อตัด section และวางบนกระจกสไลด์เสร็จแล้ว จะนำกระจกสไลด์มาวางบน hot plate ที่อุณหภูมิ 60^0c เพื่อให้ section แห้งและเกาะกับกระจกสไลด์

6.3.3. การย้อมสีชิ้นเนื้อ

ภายหลังชิ้นเนื้อแห้งสนิทและยึดติดกับกระจกสไลด์แน่นแล้ว จะทำการย้อมด้วยสารละลาย toluidine blue ซึ่งจะติดสีฟ้าที่ cytoplasm และสีน้ำเงินเข้มที่ nucleolus ของตัวเซลล์ประสาทใน DRG (ภาพที่13) จากนั้นสุ่มเลือกสไลด์ที่จะใช้นับจำนวนเซลล์ประสาท โดยสุ่มเลือกหมายเลขชิ้นเนื้อจากสไลด์แรก หมายเลขตั้งแต่ 1 - 10 จากนั้นเลือกในตำแหน่งถัดไปห่างจากตำแหน่งที่ได้จากการสุ่มเลือกครั้งแรก 20 ชิ้นเนื้อ (เทียบเป็นระยะห่างประมาณ 40 µm) เช่น การสุ่มที่ 4, 24, 44, 64,... เป็นต้น เพื่อป้องกันการนับเซลล์ประสาทซ้ำในเซลล์เดียวกัน 2 ครั้ง จากนั้นดูภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ที่กำลังขยาย 10x แล้วถ่ายภาพจากกล้องถ่ายรูปที่ติดกับกล้องจุลทรรศน์ จากนั้นนำภาพเข้าสู่คอมพิวเตอร์และนับเซลล์โดยใช้โปรแกรม photoshop นับจำนวนเซลล์ประสาทจากสไลด์ที่สุ่มเลือกทั้งหมด โดยเราจะทำเครื่องหมาย O ล้อมรอบเซลล์ประสาทที่มีขอบเขตนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสที่ชัดเจน จากนั้นนำค่าที่นับได้ไปแทนค่าในสูตรดังต่อไปนี้เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG ที่ระดับนั้นๆ โดยสูตรนี้มีที่มาจากวิธีการนับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง ในงานของ Tredici et al., 1999 และ Schenker et al.,2003

$$\text{จำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ประสาทในแต่ละ section} \times \text{จำนวน section ทั้งหมด}}{\text{จำนวน section ที่ได้รับการสุ่มเลือก}}$$



ภาพที่ 13 แสดง DRG ที่ระดับ L4 หลังย้อม toluidine blue ที่กำลังขยาย 10x และ แสดงเครื่องหมาย O ล้อมรอบเซลล์ประสาทที่ใช้นับจำนวนเซลล์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การทดลองที่ 2</u>

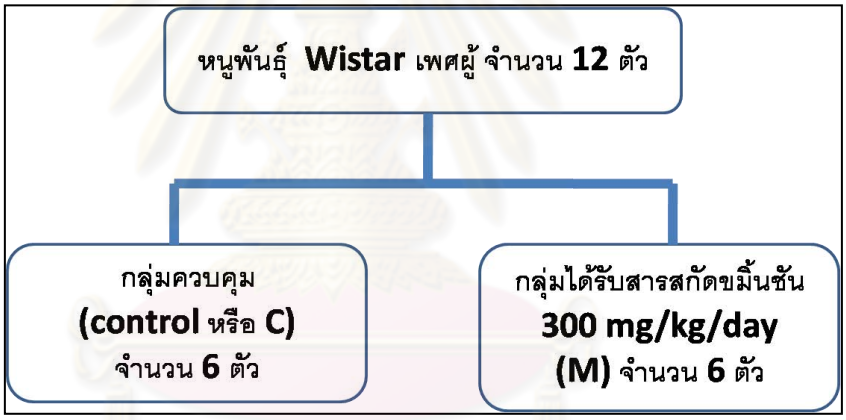
การศึกษาผลของ curcumin ต่อระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาท ภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic

1. การเลือกกลุ่มประชากร

จาก pilot study ก่อนหน้านี้ และจำเป็นต้องใช้หนูอย่างน้อย 5 ตัว ในการศึกษาทางด้านโครงสร้างของเส้นประสาทและปมประสาทเพื่อให้ได้ข้อสรุปที่น่าเชื่อถือ รวมทั้งต้องเผื่อไว้กลุ่มละ 1 ตัว ในกรณีที่มีการตายของหนูระหว่างทดลอง

2. การแบ่งกลุ่มประชากร

นำหนูพันธุ์ Wistar เพศผู้ 12 ตัว แบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มละ 6 ตัว ดังแผนภาพต่อไปนี้



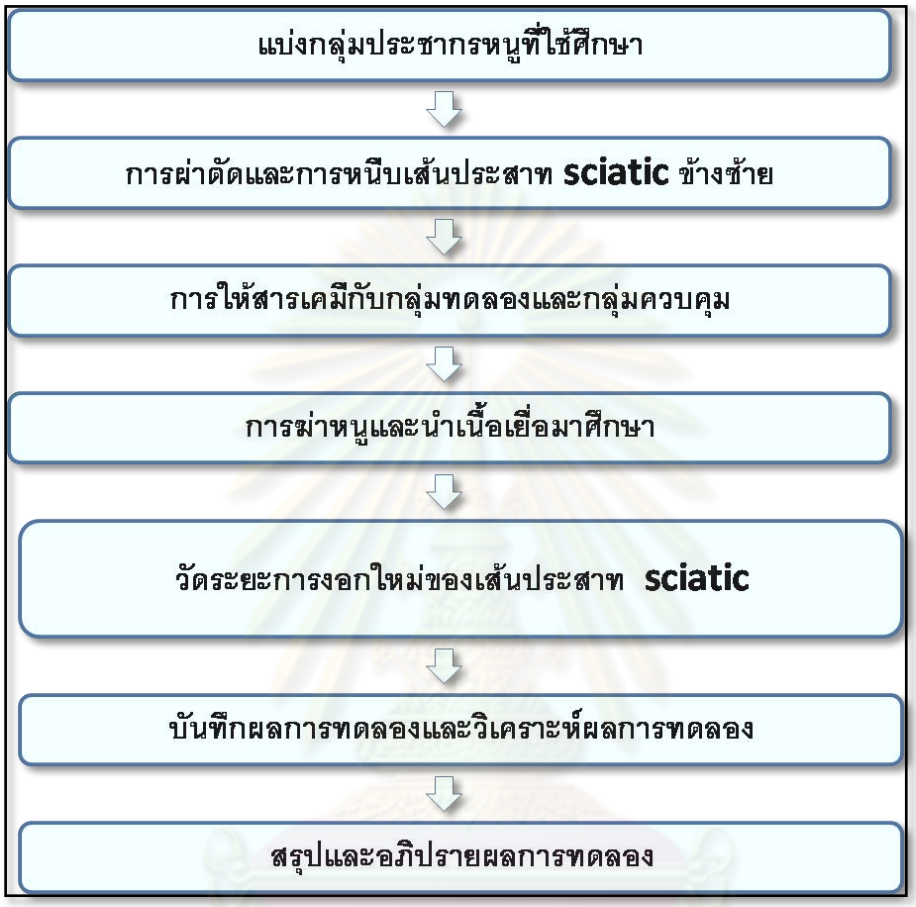
กลุ่มที่ 1 หนูกลุ่มควบคุม (control หรือ C) จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 หนูกลุ่มที่ได้รับสาร curcumin 300 mg/kg/day (M) จำนวน 6 ตัว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4. **วิธีการวิจัย** (Methods)

แผนผังขั้นตอนการวิจัย



5. **การผ่าตัดและทำให้เกิดการบาดเจ็บแบบหนีบต่อเส้นประสาท** sciatic

ขั้นตอนการดำเนินการเหมือนกับการทดลองที่1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การให้ยากับหนู

6.1 อุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้

1. กระบอกฉีดยา ขนาด 1 ml
2. เข็มฉีดยาเบอร์ 21
3. curcumin (CAYMAN CHEMICAL, Cat.81025)
4. 2% sodium carboxy methyl cellulose ละลายใน normal saline
5. สารละลาย betadine

6.2 ขั้นตอนเตรียมยา

ละลาย curcumin ใน vehicle คือ สารละลาย 2% sodium carboxy methyl cellulose ใน normal saline

6.3 วิธีให้ยา

จากผลการทดลองที่ 1 พบว่าการให้ curcumin ทั้ง 3 ขนาด คือ 100, 300 และ 500 mg/kg/day มีผลต่อจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ภายหลังเส้นประสาท sciaticได้รับบาดเจ็บ โดยเฉพาะปริมาณ curcumin ที่ 300 mg/kg/day ลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทได้ดีที่สุด ดังนั้นการทดลองนี้จึงเลือก 300 mg/kg/day มาศึกษาการงอกใหม่ของเส้นประสาท โดยให้ยาด้วยวิธีการฉีดเข้าช่องท้องเช่นเดียวกับการทดลองที่ 1 ซึ่งการให้ยานั้นเริ่มภายหลังจากการผ่าตัดและรอให้หนูฟื้นดีแล้วในวันเดียวกัน โดยจะให้ยาดังต่อไปนี้

1. กลุ่ม C ให้เฉพาะสาร vehicle เพียงอย่างเดียว
2. กลุ่ม M ให้สารละลาย curcumin 300 mg/kg/day

โดยจะฉีดทุกวัน วันละ 1 ครั้ง ณ เวลาเดียวกันคือตอนเช้า เป็นระยะเวลา 10 วัน

7. การศึกษาระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic

จาก pilot study พบว่าการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ที่ 2 สัปดาห์ ไม่สามารถหาระยะทางที่เส้นประสาทงอกใหม่ได้เนื่องจากระยะทางที่เส้นประสาทงอกใหม่นั้นยาวเกินกว่าความยาวของเส้นประสาทที่สามารถตัดชิ้นเนื้อได้ ดังนั้นจึงไม่สามารถใช้เส้นประสาทจากการทดลองที่1 ได้และการทดลองนี้จึงศึกษาการงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังได้รับบาดเจ็บเป็นเวลา 10 วัน และเลือกปริมาณ curcumin ที่ 300 mg/kg/day มาใช้ในการศึกษา โดยเทียบกับกลุ่มควบคุม

7.1 การเก็บเส้นประสาท sciatic

ทำเช่นเดียวกับข้อ 6.1 ของการทดลองที่ 1 โดยเก็บเส้นประสาท sciatic ทั้งสองข้าง

7.2 การเก็บรักษาสภาพเส้นประสาท sciatic

เส้นประสาท sciatic nerve เมื่อนำออกมาแล้วจะนำตุ้มน้ำหนักมาถ่วงที่ปลายด้าน distal เพื่อให้เส้นประสาทเหยียดตรงในขณะที่แช่ใน 4% PFA เป็นเวลา 6 ชม.ที่อุณหภูมิ 4°c แล้วเปลี่ยนเป็น 30% sucrose เป็นเวลา 2 ครั้ง ห่างกัน 24 ชม. จากนั้นเก็บไว้จนกว่าจะเริ่มกระบวนการฝัง (embedding) และตัดชิ้นเนื้อ โดยในขั้นตอนนี้ต้องเก็บไว้ที่ 4°c

7.3 การเตรียมเส้นประสาท sciatic ที่ใช้ในการศึกษา

นำเส้นประสาท sciatic ที่ผ่านการเก็บรักษาข้างต้น ตัดเฉพาะส่วน distal stump มาแบ่งเป็นท่อนสั้นๆ ท่อนละ 5 mm กำหนดให้เป็นชิ้น D1, D2, D3 และ D4 ตามลำดับ จากนั้นนำมาฝังใน optimal cutting temperature (OCT) medium แล้วทำ cryostat section ตามยาว หนา 12 µm ติดบนกระจกสไลด์ จากนั้นทำขั้นตอน blocking โดยแช่ section ใน 10% serum เป็นเวลา 20 นาที ตามด้วยการใส่ primary antibody ต่อ neurofilament light chain subunit (NF-L) ทิ้งไว้ที่ 4°c เป็นเวลา 24 ชม. จากนั้นล้างสไลด์แล้วใส่ secondary antibody ที่ติดกับ biotin 40 นาที ล้างสไลด์แล้วตามด้วย avidin-rhodamine 30 นาที ล้างสไลด์ แล้วทำการ mount และปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ จากนั้นดูภาพจากกล้องจุลทรรศน์ fluorescence แล้วถ่ายภาพ จากกล้อง ถ่ายรูปที่ติดกับกล้องจุลทรรศน์ นำภาพถ่ายเข้าสู่คอมพิวเตอร์เข้าโปรแกรมวิเคราะห์เพื่อวัดระยะทางที่งอกใหม่ของเส้นประสาท คือ ระยะทางของ axon ที่ย้อมติด rhodamine ที่จับกับ NF-L นั่นเอง

8. บันทึกผลการทดลองและการวิเคราะห์ผลการทดลองที่ 1 และ 2

เปรียบเทียบค่า PL และ ITS ระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาทและจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระหว่างกลุ่มต่างๆด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA ในกรณีที่ข้อมูลที่มีการกระจายตัวแบบปกติ หากข้อมูลมีการกระจายตัวไม่เป็นแบบปกติใช้การทดสอบ nonparametricแทน ด้วยโปรแกรม SPSS15.0 for windows โดยถือความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ $p<0.05$

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

<u>การทดลองที่ 1</u>

1. การประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic โดย การวัดจากรอยเท้า

1.1 ลักษณะทางกายวิภาคของเท้าหนู

พบว่าเท้าซ้าย (ข้างที่ถูกหนีบเส้นประสาท) มีลักษณะเท้าที่ลีบ ลักษณะฝ่าเท้าแบนและเหยียดตรงทำให้ความยาวฝ่าเท้า (PL) มากกว่าเท้าขวา เท้าข้างซ้ายนิ้วเท้าทั้ง 5 นิ้วชิดกัน ต่างจากเท้าข้างขวาที่กางออกจากกัน ส่งผลให้ค่า ITS ของเท้าซ้ายน้อยกว่าเท้าขวา

1.2 การวัดขนาดเท้า

จากการวัดค่า print length (PL), toe spread (TS) และ intermediary toe spread (ITS) พบว่าค่า PLและ ITS สามารถวัดค่าได้ แต่ TS ข้างซ้ายไม่สามารถวัดค่าได้เนื่องจากนิ้วที่ 1และ 5 หุบเข้าหากันและไม่เห็นรอยชัดเจนบนกระดาษ จากการวัดค่า PL ของเท้าซ้ายมีค่ามากกว่าเท้าขวาเมื่อเทียบเป็นอัตราส่วนเท้าซ้ายต่อเท้าขวาได้ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม (ตารางที่ 1)กลุ่ม C คือ 1.22± 0.013 cm, M1 คือ 1.21 ± 0.001cm, M2 คือ 1.18 ± 0.023 cm และ M3 คือ 1.17 ± 0.022 cm โดยค่าเข้าใกล้ 1 cm คือ สามารถใช้เท้าได้อย่างปกติ จากค่า PL พบว่า กลุ่ม M2 และ M3 ใกล้เคียงกันและใกล้เคียงค่าปกติมากที่สุด ส่วนค่า ITS ของเท้าซ้ายมีค่าน้อยกว่าเท้าขวาเมื่อเทียบเป็นอัตราส่วนเท้าซ้ายต่อเท้าขวาได้ค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่ม ดังนี้ กลุ่ม C คือ 0.47 ± 0.044 cm, M1 คือ 0.50 ± 0.044 cm, M2 คือ 0.55 ± 0.030 cm และ M3 คือ 0.48 ± 0.026 cm โดยค่าเข้าใกล้ 1 cm คือ สามารถใช้เท้าได้อย่างปกติ จากค่า ITS พบว่า กลุ่ม M2 ใกล้เคียงค่าปกติมากที่สุด จากผลการทดลอง วัดค่า PL และ ITS พบว่า กลุ่มที่ได้รับ curcumin มีค่าประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการที่ดี กว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับ curcumin เล็กน้อย และกลุ่ม M2 ให้ค่าประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการดีที่สุดแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง

ตารางที่ 1 แสดงค่า ITS และ PL ของเท้าซ้ายและเท้าขวา และค่าอัตราส่วนเท้าซ้ายต่อเท้าขวาของค่า ITS และ PL โดยแสดงในค่าเฉลี่ย ± SEM

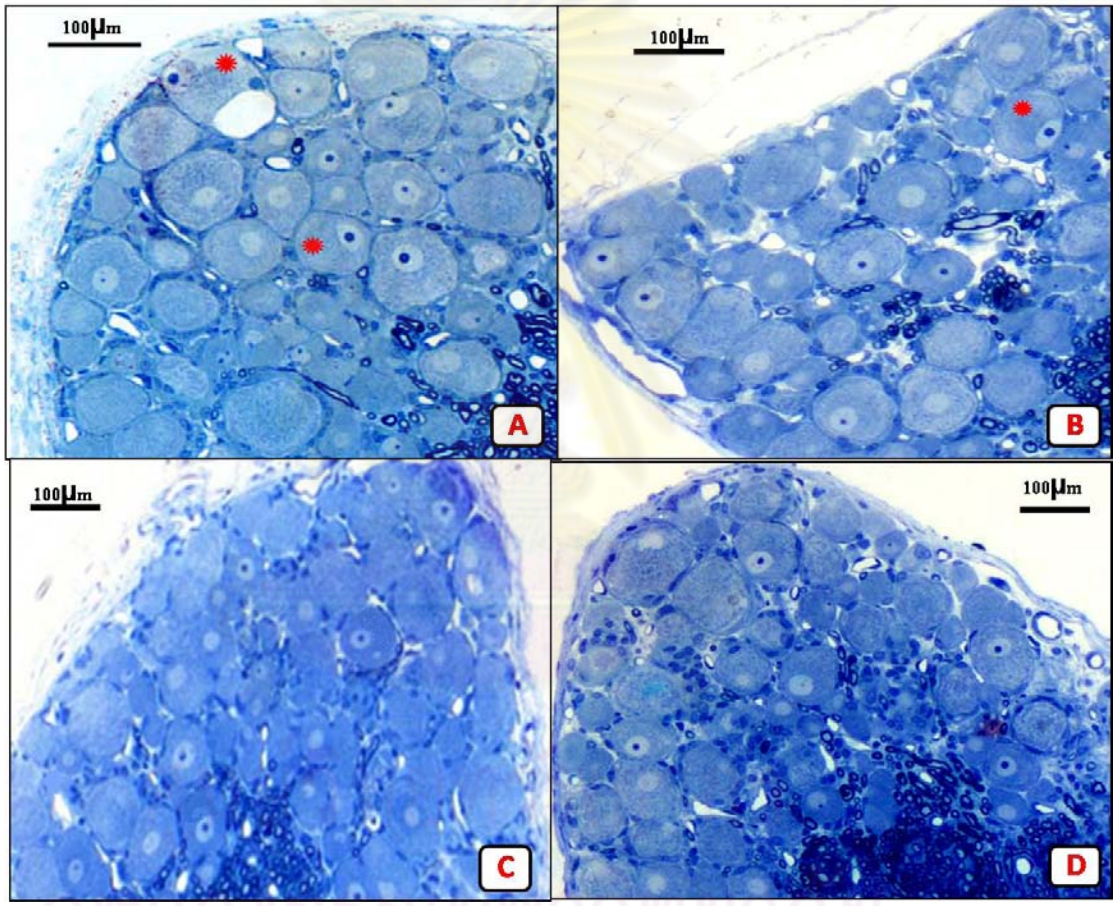
Group	ITS (cm)		ITS	PL(cm)		PL	Sig.
	Left	Right	Lt/Rt	Left	Right	Lt/Rt	
Control	0.45±0.03	0.98±0.04	0.47±0.04	3.77±0.04	3.06±0.04	1.22±0.01	Non-sig.
M1	0.48±0.04	0.99±0.04	0.50±0.04	3.54±0.10	3.09±0.06	1.21±0.00	Non-sig.
M2	0.51±0.02	0.94±0.03	0.55±0.03	3.67±0.04	3.11±0.06	1.18±0.02	Non-sig.
M3	0.51±0.03	1.03±0.03	0.48±0.03	3.46±0.02	3.05±0.05	1.17±0.02	Non-sig.

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. การนับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง

2.1 จุลกายวิภาคศาสตร์ของเซลล์ประสาทใน DRG

จากการศึกษา DRG ข้างซ้าย กลุ่ม C ที่ไม่ได้รับ curcumin นั้นจะมีภาวะ cell body reaction โดยนิวเคลียสเคลื่อนที่ไปชิดขอบเซลล์ (eccentric nucleus) ในเซลล์ประสาทจำนวนมากแต่จำนวนเซลล์ประสาทที่มีภาวะนี้ลดลงในกลุ่ม M1, M2 และ M3 แต่ไม่ได้นับจำนวนเป็นตัวเลข (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 14 แสดงเซลล์ประสาทภายใน DRG ที่ระดับ L4 ข้างซ้ายของหนูกลุ่มต่างๆ

โดย A กลุ่มควบคุม (C)

B กลุ่มที่ได้รับ curcumin 100 mg (M1)

C กลุ่มที่ได้รับ curcumin 300 mg (M2)

D กลุ่มที่ได้รับ curcumin 500 mg (M3)

* เซลล์ที่มี eccentric nucleus

2.2 นับจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG

จากการนับจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระดับ L4 ข้างซ้าย ในกลุ่ม C, M1, M2 และ M3 มีจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดประมาณ 21,041.0 ± 722.3, 24,454.2 ± 1,190.9, 26,629.2 ± 1,307.1 และ 22,012.0 ± 1520.7 ตามลำดับ พบว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ข้างซ้ายเมื่อเทียบกับข้างขวาในทุกกลุ่ม สำหรับกลุ่มที่ได้รับ curcumin ทั้งสามกลุ่มการลดลงนี้น้อยกว่ากลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยในกลุ่ม M2 มีการลดลงของเซลล์ประสาทน้อยที่สุด คือ 2.5% และแตกต่างจากกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ที่ระดับ L4

กลุ่ม	Left	Right	% Left/Right	% Decrease
C	21,041.0±722.3	27,682.6±384.6	76.0	24.0
M1	24,454.2±1,190.9	26,993.1±1,295.5	90.6	9.4 [a]
M2	26,629.2±1,307.1	27,320.2±1,352.0	97.5	2.5 [a]
M3	22,012.0±1520.7	25,952.9±1,122.2	84.8	15.4 [b]

โดยค่า a คือ $p < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

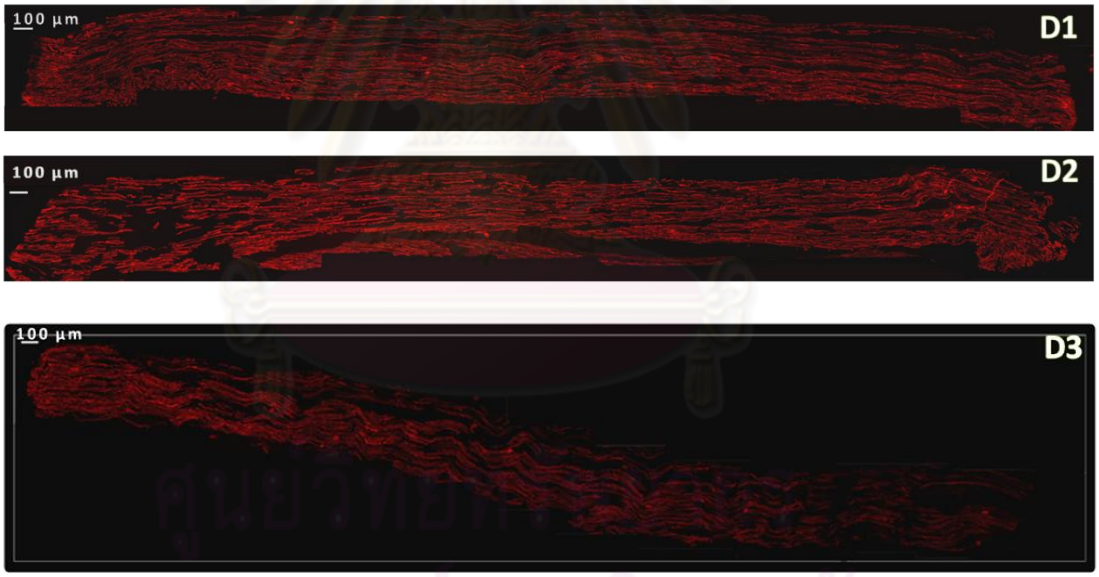
b คือ $p < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่ม C

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

<u>การทดลองที่ 2</u>

1. การศึกษาระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic

เมื่อนำ axon ที่ย้อมติด rhodamine ที่จับกับ neurofilament light chain subunit (NF-L) ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ fluorescence แล้วถ่ายภาพ axon จะเรืองแสงเป็นสีแดง โดยเราจะเก็บภาพทีละส่วนของความยาวเส้นประสาททั้งหมด จากนั้นนำภาพที่ถ่ายได้มาต่อกันด้วยโปรแกรม Adobe photoshop CS 2 ดังภาพ (ภาพที่ 15) ซึ่งค่าที่ได้จากการวัด ในกลุ่ม control (c) และกลุ่มที่ได้รับ curcumin 300 mg/kg/day (M) พบว่ามีการงอกใหม่ของเส้นประสาทเป็นระยะทางเฉลี่ย ดังนี้ กลุ่ม control (c) วัดระยะทางได้ 14.45±1.37 mm และ กลุ่มที่ได้รับ curcumin วัดระยะทางได้ 15.18±0.67 mm ซึ่งค่าที่วัดได้ในกลุ่มที่ได้รับ curcumin มีค่าการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ



ภาพที่ 15 แสดง axon ที่ย้อมติด rhodamine ตลอดเส้นประสาท sciatic ส่วนของ distal stump ในท่อน D1, D2 และ D3 พบว่าในท่อน D1 และ D2 ติดสีตลอดความยาวเส้นประสาทจะมีค่าการงอกใหม่ คือ 5 mm ส่วนท่อน D3 มีการงอกไม่ถึงปลายที่ตัดได้เมื่อวัดความยาวจากโปรแกรม Adobe photoshop CS 2 พบว่ามีค่า 4.95 mm

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

อภิปรายผลการวิจัย

1. การประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic โดย การวัดจากรอยเท้าและการศึกษาระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic

จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับสาร curcumin มีการคืนหน้าที่ทาง motor เล็กน้อย ของเส้นประสาท sciatic ภายหลังจากการหนีบเส้นประสาทได้ดีกว่ากลุ่มควบคุม โดยทำการวัดค่า print length (PL), toe spread (TS) และ intermediary toe spread (ITS) และเมื่อคำนวณด้วย สมการคณิตศาสตร์จะได้ค่า sciatic function index (SFI) (Varejão., 2001; Varejão., 2004) แต่ จากการทดลองนี้ ไม่สามารถคำนวณค่า SFI ได้ภายหลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ ที่ 14 วัน เนื่องจากค่า TS ไม่สามารถวัดค่าได้ แต่เมื่อเทียบอัตราส่วนของรอยพิมพ์เท้าข้างซ้ายต่อรอยพิมพ์ เท้าข้างขวาของค่า PL และ ITS พบว่ากลุ่มที่ได้ curcumin ให้ค่าที่เข้าใกล้ค่าปกติมากกว่ากลุ่ม ควบคุมเล็กน้อย โดยกลุ่ม M2 คือ กลุ่มที่ได้รับสาร curcumin 300 mg/kg/day ได้ค่า ITS เท่ากับ 0.55±0.03 cm และ ค่า PL เท่ากับ1.18±0.02 cm ที่ดีกว่ากลุ่ม M1 ที่ได้รับสาร curcumin 100 mg/kg/day ได้ค่า ITS เท่ากับ 0.50±0.04 cm และ ค่า PL เท่ากับ1.21±0.00 cm และ กลุ่ม M3 ซึ่งได้รับสาร curcumin 500 mg/kg/day ได้ค่า ITS เท่ากับ 0.48±0.03 cm และ ค่า PL เท่ากับ 1.17±0.02 cm ส่วนในกลุ่มควบคุม ได้ค่า ITS เท่ากับ 0.47±0.04 cm และ ค่า PL เท่ากับ 1.22±0.01 cm แต่ก็ไม่ แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามงานวิจัยก่อนหน้านี้ (Noorafshan et al., 2011) ได้ยืนยันประสิทธิภาพของ curcumin ในเรื่องการคืนหน้าที่ของ เส้นประสาท sciatic ภายหลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บแบบหนีบในหนู โดยค่าในกลุ่มที่ได้รับ curcumin 200 mg/kg/day โดยการกินมีการคืนหน้าที่ที่ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับ curcumin แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$) โดยวันที่ 14 เริ่มมีการคืนหน้าที่ของเส้นประสาท และ ในวันที่ 21 พบว่าเส้นประสาท sciatic มีการทำงานเต็มประสิทธิภาพ ทั้งนี้ที่การศึกษานี้ไม่เห็นผลดี ของ curcumin ชัดเจนในเรื่อง walking track analysis อาจเป็นเพราะวัดผลเร็วเกินไปอาจต้องไป วัดผลที่ 21 วัน เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Noorafshan และคณะ (Noorafshan et al., 2011) ทั้งนี้เนื่องจากการงอกของเส้นประสาทและการคืนหน้าที่จะเกิดมากขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป ทำให้ สามารถวัดค่า TS และคำนวณค่า SFI ได้

ในการศึกษาระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาทนั้นพบว่า curcumin ไม่มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประสาท โดยในการศึกษาครั้งแรกที่ระยะเวลา 14 วัน แต่ไม่สามารถวัดได้เนื่องจากระยะทางที่เส้นประสาทงอกใหม่นั้นยาวเกินกว่าความยาวของเส้นประสาทที่สามารถตัดชิ้นเนื้อได้ จึงได้ทำการศึกษาใหม่ที่ 10 วัน และเลือกกลุ่มที่ให้สาร curcumin ที่ 300 mg/kg/day (m) เนื่องจากให้ผลดีที่สุดในการศึกษา walking track analysis ของการศึกษาแรก ซึ่งจากผลการทดลองวัดระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาทนั้นพบว่าในกลุ่ม M ได้ค่าการงอกใหม่ที่แตกต่างกลุ่ม C ที่ไม่ได้รับ curcumin โดยกลุ่ม M ได้ค่าระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาทเท่ากับ 15.18±0.67 mm และ กลุ่ม C ได้ค่า เท่ากับ 14.95±1.37 mm พบว่าแตกต่างกันเพียงเล็กน้อยและไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น curcumin อาจไม่มีผลในด้านการกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังได้รับบาดเจ็บที่ส่งผลต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทที่ไม่ดีขึ้นชัดเจนไปด้วย ดังนั้นกลไกที่น่าจะอธิบายถึงผลดังกล่าวได้ คือ ภายหลังจากการหนีบเส้น ประสาทจะเริ่มกระบวนการเสื่อมสลายของเส้นประสาท (nerve degeneration) และ การงอกใหม่ของเส้นประสาท (nerve regeneration) ซึ่ง 2 กระบวนการจะเกิดขึ้นพร้อมๆกัน โดย curcumin น่าจะมีผลดีต่อภาวะเส้นประสาทภายหลังได้รับบาดเจ็บในแง่การต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจาก oxidative stress ภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท (Varija et al., 2008) โดยมีรายงานว่า curcumin มีฤทธิ์เป็นสาร antioxidant ไปลดการเกิด lipid peroxidation โดยลดการทำงานของ lipo-oxygenase รวมถึงลดการไปสร้าง H_2O_2 (Maheshwari et al., 2006; Hatcher et al., 2008; Gole et al., 2008) อีกทั้งมีฤทธิ์เหนี่ยวนำ antioxidative enzyme ตัวอื่นๆอีก เช่น glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) และ NADPH:quinine reductase ใช้ในการกำจัด H_2O_2 ภายในเซลล์ และไปลด reduced transition metal ion เช่น Fe^{2+},Cu^{2+} (Hatcher et al., 2008) เพราะฉะนั้นเซลล์ประสาทจึงน่าจะเสียหายน้อยลงและเข้าสู่กระบวนการ nerve regeneration ได้ดีขึ้น แต่ในขณะเดียวกันพบว่า curcumin ยังสามารถยับยั้งการผลิตสาร cytokine ต่างๆ ทำให้ลด inflammation (Hatcher et al., 2008) แต่ inflammation นี้น่าจะมีผลดีต่อการงอกใหม่เส้นประสาท โดยภายหลังจากเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บจะมีการหลั่ง cytokine ได้แก่ membrane attack complex (MAC) ทำให้เกิดการย่อยสลายของ axon และทำหน้าที่เป็น chemotaxis activation ให้ hematogenous macrophage เป็น macrophage ที่เคลื่อนที่มาจา กระบบหมุนเวียนโลหิต ช่วย Schwann cell ย่อยสลาย myelin และกระตุ้นให้ Schwann cell สร้าง cytokine อื่นๆ เช่น IL-1β, IL-6, IL-10, Leukemia inhibitory factor (LIF) (Ide, 1996) IL-1β จะไปกระตุ้นให้ Schwann cell สร้าง nerve growth factor (NGF) เร่งการงอกใหม่ของเส้นประสาท IL-6 จะกระตุ้นการงอกใหม่ของเส้นประสาทโดยเฉพาะเกี่ยวกับการงอกใหม่ของเส้นประสาทรับ

ความรู้สึก ส่วน LIF จะเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขนาดและจำนวนของ myelinated fibers ช่วยเสริมการทำงานระหว่างเส้นประสาทและกล้ามเนื้อได้ดีขึ้น นอกจากนี้สาร pro-inflammation ดังกล่าวจะไปกระตุ้นการรวมตัวของ macrophages บริเวณที่เส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ ในการกำจัด myelin ovoid ที่ distal stump (Stoll et al., 2002; Cámara-Lemarroy et al., 2010) จากข้างต้นเมื่อพิจารณาแล้วจะพบว่า inflammation ที่เกิดภายหลังเส้นประสา ทได้รับบาดเจ็บนับมีประโยชน์อย่างยิ่งในการช่วยการงอกใหม่ของเส้นประสาท ซึ่ง curcumin ถึงแม้นว่าจะไปลดภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นหลังเส้นประสาทบาดเจ็บแต่ขณะเดียวกันก็มีฤทธิ์ anti-inflammation ดังนั้นกลไกที่ให้ผลค้านกันทั้งสองนี้จึงอาจจะอธิบายว่าเหตุใดจึ งไม่เห็นการคืนหน้าที่และระยะการงอกใหม่ของเส้นประสาทที่ดีกว่าอย่างชัดเจน ในกลุ่มที่ได้รับสาร curcumin เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในการศึกษานี้

2. การนับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง

ผลการศึกษาพบว่า curcumin ช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสัน หลังภายหลังเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ โดยในกลุ่ม C ที่ไม่ได้รับ curcumin มีการลดลงของเซลล์ประสาท คือ 24% มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ curcumin ในกลุ่ม M1, M2 และ M3 ซึ่งมีค่าการลดลงเท่ากับ 9.4%, 2.5% และ 15.4% ตามลำดับ โดยลดลงน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ น่าจะสรุปได้ว่ากลุ่ม M2 ที่ได้รับปริมาณ curcumin 300 mg/kg/day เป็นปริมาณที่เหมาะสมที่ช่วยลดอัตราการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังได้ดีที่สุด ซึ่งผลการทดลองก็สอดคล้องกับการทดลองของ Noorafshan และคณะ (Noorafshan et al., 2011) โดยวัดจากโครงสร้างของเซลล์ประสาท ได้แก่ ปริมาตร พื้นที่ผิวทั้งหมด และ จำนวนของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง ก็สนับสนุนว่า curcumin มีประสิทธิภาพลดการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะ curcumin มีบทบาทเป็นสาร antioxidant ทำให้ภาวะ lipid peroxidation ลดลง โดยลดการทำงานของ lipo-oxygenase รวมถึงลดการไปสร้าง H_2O_2 (Maheshwari et al., 2006; Hatcher et al., 2008; Gole et al., 2008) อีกทั้งมีฤทธิ์เหนี่ยวนำ antioxidative enzyme ตัวอื่นๆอีก เช่น glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) และ NADPH:quinine reductase ใช้ในการกำจัด H_2O_2 ภายในเซลล์ และไปลด reduce transition metal ion เช่น Fe^{2+},Cu^{2+} (Hatcher et al., 2008) ทำให้เซลล์ประสาทถูกทำลายน้อยลงดังนั้นการตายของเซลล์ประสาทจึงลดลง ทั้งนี้มีหลักฐานว่า oxidative stress ทำให้เกิดการตายของเซลล์ประสาท (Langley and Ratan., 2004; Fischer and Glass., 2010)

นอกจากนี้ผลการทดลองนี้ยังสอดคล้องกับงานวิจัยของ Zhao และคณะ (Zhao et al., 2009) ที่พบว่า curcumin ที่ 300 mg/kg/day โดยการฉีดเข้าช่องท้อง ช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทจากภาวะสมองขาดเลือด โดย curcumin จะไปเพิ่ม antiapoptotic Bcl-2 protein พร้อมกับไปยับยั้งการปลดปล่อย cytochrome c และ ยับยั้งการทำงานของ caspase 3 จึงน่าจะคาดการณ์ได้ว่าการลดลงของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังจากผลของ curcumin น่าจะเกี่ยวข้องกับ anti-apoptosis ซึ่งต้องการการศึกษามายืนยันต่อไป

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สรุปผลการวิจัย

Curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งการลดจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทภายหลังจากการบาดเจ็บของเส้นประสาท ส่วนการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการและระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาทไม่พบผลดีอย่างชัดเจน

ข้อเสนอแนะ

1. ศึกษากลไกที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพของ curcumin ในการลดการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาทโดยเฉพาะในด้าน oxidative stress และภาวะ apoptosis

2. ศึกษาผลของ curcumin ต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทในระยะเวลาที่นานขึ้นกว่า 10 วัน ในการศึกษานี้ ซึ่งอาจจะเห็นผลที่ชัดเจนขึ้น โดยเฉพาะเมื่อสามารถ วัดค่า TS และ คำนวณค่า SFI ได้

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

Aggarwal, B.B., and Harikumar, B.K. Potential therapeutic effects of curcumin,the anti-inflammatory agent,against neurodegenerative,cardiovascular,pulmonary, metabolic,autoimmune and neoplastic diseases. J Biochem Cell Biol.2009;41(1):40-59.

Begum, A.N., et al. Curcumin structure-Function, bioavailability, and efficacy in models of neuroinflammation and Alzheimer's disease. J Pharmacol Exp Therapeut. 2008;326(1):196-208.

Cámara-Lemarroy, R.C., and Guzmán-de la Garza, J.F. Molecular Inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. J Neuro Immuno Mod. 2010;17:314-324.

Chandra, V., et al. Incidence of Alzheimer's disease in a rural community in India. J Neurobiol.2001;57:985-9.

Cole, G.M., Teter, B.,and Frautschy, S.A. Neuroprotective effects of curcumin. J Adv Exp Med Biol.2007;595:197-212.

Duan, W., and Mattson, M.P. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson's disease. J Neurosci Res.1999;57(2):195-206.

Epstein, J., Sanderson, R.I., and Macdonald, T.T. Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in ,vitro, animal and human studies. J Nutrit.2010;103:1545-57.

Fischer, R.L., and Glass, D.J. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG cultures. J Acta Neuropathol.2010;119:249-59.

Gole, A., Kunnumakkara, A.B., and Aggarwal, B.B. curcumin as "curecumin": from kitchen to clinic. J Biochem Pharmacol.2008;75:787-809.

Hardy, J. Amyloid,the presenilins and Alzheimer's disease. J Trends Neurosci. 1997;20:154-9.

Hatcher, H., Planalp, R., Cho, J., Torti, F.M., and Torti, S.V. Curcumin: from ancient medicine to current clinical trials. J Cell Mol Life Sci.2008;65:1631-52.

Hoke, A. Machanisms of Disease: what factors limit the success of peripheral nerve regeneration in human. J Nat Neurobiol.2006;2(8):448-54.

Ide, C. Peripheral nerve regeneration. J Neurosci Res.1996;25:101-21.

Kavakli, S.H., Koca, C., and Alici, O. Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats. J Trauma and Emerg Surg.2011;17(1):14-18.

Langley, B., and Ratan, R.R. Oxidative stress-induced death in the nervous system: cell cycle dependent or independent?. J Neuro Res.2004; 77:621-9.

Lim, G.P., et al. The curry spice curcumin reduces oxidative damage and amyloid pathology in an Alzheimer transgenic mouse. J Neurosci.2001;21(21):8370-7.

Lin, M.S., Lee, Y.H., Chiu, W.T., and Hung, K.S. Curcumin provides Neuroprotection after spinal cord injury. J Surg Res.2009;0022-4804:1-10.

Maheshwari, R.K., Singh, A.K., Gaddipati, J., and Srimal, R.C. multiple biological activities of curcumin:a short review. J Life Sci.2006;78:2081-7.

Matés, M.J., Pérez-Gómez, C., and Núñez, de castro. Antioxidant enzymes and human diseases. J Clinic Biochem.1999;32:595-603.

Noorafshan, A., et al. Effects of curcumin on the dorsal root ganglion structure and functional recovery after sciatic nerve crush in rat. J Micron.2011;10:1-7.

Pandey, N., Strider, J., Nolan, W.C., Yan, S.X., and Galvin, J.E. Curcumin inhibits aggregation of α-synuclein. J Acta Neuropathol.2008;115:479-89.

Ramadan, G., Al-Kahtani, A.M., and El-Sayed, M.W. Anti-inflamatory and Anti-oxidant properties of *Curcuma longa* (turmeric) *Versus Zingiber officinale* (ginger)Rhizomes in rat adjuvant-induced Arthristis. J Inflam.2010;0360-3997:1-11.

Rossi, L., Mazzitelli, S., and Arciello, M. Benefits from dietary polyphenols for brain aging and Alzheimer'disease. J Neurochem Res.2008;33:2390-400.

Schenker,M., et al. Thyroid hormone reduces the loss of axotomized sensory neurons in dorsal root ganglia after sciatic nerve transection in adult rat. J Exp Neuro.2003;184:225-36.

Scapagnini, G., et al. Curcumin Activates Defensive Genes and Protects Neurons Against Oxidative Stress. Antioxidants & Redox Signaling. J Neurochem Res.2006;8 (3-4):395-403.

Siemionow, M., and Brzezicki, G. Current techniques and concepts in peripheral nerve repair. J Neurobiol.2009;87:141-72.

Srimal, R.C., and Dhawan, B.N. Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory analogs in rats. J Pharm Pharmacol.1973;25(6):447-52.

Steenkamp, V., Mathivha, E., Gouws, M.C., and Van Rensburg, J.E.C. Studies on antibacteria antioxidant and fibroblast growth stimulation of wound healing remedies from south Africa. J Ethno.2004;95:353-7.

Stoll, G., and Muller, H.W. Nerve injury,axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. J Brain pathology.1999;9:313-25.

Stoll, G., Jander, S., and Myers, R.R. Degeneration and regeneration of periferal nervous system : From Augustus Waller's observations to neuroinflammation. J Peripheral Sys. 2002;7:13-27.

Terenghi, G. Peripheral nerve regeneration and neurotrophic factors. J Anat. 1999;194:1-14.

Tredici,G.,et al.Effect of recombinant human nerve growth factor on cisplatin Neurotoxicity in rats. J Exp Neuro.1999;159:551-8

Tripathi, R.M, Gupta, S.S., and Chandra, D.Anti-trypsin and antihyalunidase activity of volatile oil of *Curcuma longa*. J Pharmacol.1973;5:260-1.

Varejão, A.S.P., Meek, M.F., Ferreira, A.J.A., Patríciod, J.A.B., and Cabritae, A.M.S. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat: walking track analysis J Neurosci Met.2001;108:1-9.

Varejão, A.S.P., Pinto, M.P., Meek, F.M., Filipe, M.V., and Bulas-Cruz, J. Methods for the experiment function assessment of rat sciatic nerve regeneration. J Neuro Res.2004; 26:186-194.

Varija, D., Kumar, P.K., Reddy, P.K., and Reddy, P.K. Prolonged constriction of scitaic nerve affecting oxidative stressors and antioxidant enzymes in rat. J Med Res.2009; 129:587-92.

Wang, Q., et al. Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits. J Neurosc Res.2005;82(1):138-48.

Zhao, J., et al. Curcumin Improves outcome and attenuates focal cerebral ischemic injury via antiapoptotic mechanisms in rats. J Neurochem Res.2009;10:1-6

Zhu, C., Gallant, K., and Chesselet, M.S. Differential effects of curcumin and coenzyme Q 10 treatment on Huntington aggregate in CAG 140 knock-in mouse modal of Huntington's disease. J Soc Neurosci.2006;32:Abs 472.8

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

ตารางที่ 1 แสดงจำนวนเซลล์ประสาท

Group	Number	Left	Right	%Decrease	Std.Deviation	Sig.
control	4	21,041.0	27,682.6	24.0	5.3	-
M1	5	24,454.2	26,993.1	9.4	2.3	0.00
M2	5	26,629.2	27,320.1	2.5	2.2	0.00
M3	3	22,012.0	25,952.9	15.4	4.7	0.03

ตารางที่ 2 แสดงค่าเฉลี่ยของค่า PL และ ITS ของเท้าซ้ายและเท้าขวา

ลำดับ	ซ้าย PL	ขวา PL
C	3.77	3.06
M1	3.67	3.09
M3	3.67	3.11
M5	3.61	3.09

ลำดับ	ซ้าย ITS	ขวา ITS
C	0.45	0.98
M1	0.48	1.06
M3	0.52	0.94
M5	0.49	1.03

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 3 แสดงค่าการวัดระยะทางการงอกใหม่ของเส้นประสาท

Group		Distance=mm
Control (c)	Mean	14.95
	SD	3.35
	SEM	1.37
Curcumin (m) 300 mg/kg/day	Mean	15.18
	SD	1.65
	SEM	0.67

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – สกุล นางสาวรุ่งฟ้า ธัญธนนุกุล

วัน เดือน ปีเกิด 28 กรกฎาคม 2528

ที่อยู่ตามภูมิลำเนา 1144 ถ.กรุงเทพ – นนท์ แขวงบางซื่อ เขตบางซื่อ กทม. 10800

หมายเลขติดต่อ 086-576-9474

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	**สถาบันการศึกษา**	**สำเร็จการศึกษา**
วิทยาศาสตร์บัณฑิต (วท.บ.)	คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	พ.ศ.2550

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย