

การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ pericyte และ blood-nerve barrier ในระบบประสาทส่วนปลาย  
ของหนูที่เกิดภาวะ neuropathy จาก cisplatin



นายวรพัทธ์ นพรัตน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)

เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)  
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2559

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Alteration of the pericyte and blood-nerve barrier in the peripheral nervous system  
of rats with cisplatin-induced neuropathy

Mr. Worapat Nopparat



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 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ pericyte และ blood-nerve barrier ในระบบประสาทส่วนปลายของหนูที่เกิดภาวะ neuropathy จาก cisplatin
โดย	นายวรพัทธ์ นพรัตน์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิพร แอกทอง
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์

---

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก  
(ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิพร แอกทอง)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม  
(อาจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล)

วรพัทธ์ นพรัตน์ : การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ pericyte และ blood-nerve barrier ในระบบประสาทส่วนปลายของหนูที่เกิดภาวะ neuropathy จาก cisplatin (Alteration of the pericyte and blood-nerve barrier in the peripheral nervous system of rats with cisplatin-induced neuropathy) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ศ. ดร. นพ.สิทธิพร แอภทอง, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.เดมิชา จินดาทิพย์, 67 หน้า.

Cisplatin เป็นยาที่นำมาใช้รักษาโรคมะเร็งหลายชนิดอย่างกว้างขวาง ผลข้างเคียงที่สำคัญของการใช้ยานี้คือ การเกิดความผิดปกติ ของการรับความรู้สึกของเส้นประสาท (sensory neuropathy) และยังพบว่า cisplatin ส่งผลเสียต่อ endothelial cell ทำให้การไหลเวียนเลือดที่เส้นประสาทลดลง และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อขนาดยาตามมาตรฐานได้ ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งลดลง และเกิดผลข้างเคียงที่รบกวนการดำรงชีวิตประจำวันของผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีการพยายามหา กลไกระดับโมเลกุล (molecular mechanisms) ของการเกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนปลาย แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาถึงผลของ cisplatin ต่อ pericyte และ blood-nerve barrier (BNB) โดยตรง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ pericyte และ BNB ในระบบประสาทส่วนปลายของหนูที่ได้รับ cisplatin ขนาดสะสม 20 mg/kg ในระยะเวลา 5 สัปดาห์ ผลการศึกษาพบว่า cisplatin มีผลทำให้น้ำหนักตัวหนู การรับรู้ต่อการรับความรู้สึกร้อน และความเร็วในการนำกระแสประสาท motor ที่เส้นประสาท sciatic ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และการศึกษาด้วย immunohistochemistry ของเส้นประสาท sciatic พบว่าความหนาแน่นของ pericyte ในกลุ่ม cisplatin ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม control และการศึกษาโครงสร้างของ pericyte ที่เส้นประสาท sciatic ด้วย TEM พบว่า cytoplasmic process ของ pericyte ในกลุ่ม cisplatin แยกออกจาก endothelial cell ร่วมกับ basement membrane หายไปในบางส่วน แต่ใน DRG ทั้งสองกลุ่ม pericyte ไม่มีความแตกต่างกัน การศึกษาระดับโปรตีนของ BNB ด้วยวิธี Western blot พบว่าการแสดงออกของโปรตีน ZO-2 ที่เส้นประสาท sciatic ในกลุ่มที่ได้รับ cisplatin แนวนอนที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม control ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า cisplatin ส่งผลเสียต่อ pericyte และอาจทำให้ BNB อ่อนแอลงเห็นได้จากระดับโปรตีนที่มีแวนโน้มลดลง ข้อมูลนี้มีความสำคัญต่อการศึกษาต่อไปถึงบทบาทของ pericyte และ BNB ในภาวะ neuropathy จาก cisplatin

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต .....

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก .....

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม .....

# # 5774018630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: PERICYTE / BLOOD-NERVE BARRIED / CISPLATIN / NEUROPATHY

WORAPAT NOPPARAT: Alteration of the pericyte and blood-nerve barrier in the peripheral nervous system of rats with cisplatin-induced neuropathy.  
 ADVISOR: PROF.SITHIPORN AGTHONG, Ph.D., CO-ADVISOR: DEPICHA JINDATIP, Ph.D., 67 pp.

Cisplatin is widely used as an antineoplastic agent. One of its major side effects is sensory neuropathy. Cisplatin has shown its toxic effect on endothelial cells with reduced nerve blood flow. However, it remains unclear whether cisplatin has any effect on pericytes which also play a major role in the maintenance and functions of blood-nerve barrier (BNB). This study investigated alterations of pericytes and blood-nerve barrier in the peripheral nervous system (PNS) of rats with cisplatin-induced neuropathy. Two mg/kg of cisplatin was administered intraperitoneally twice a week for five consecutive weeks. The cisplatin-treated rats had reduced body weight, decreased heat sensation of hindpaw and slower motor nerve conduction velocity (MNCV) of sciatic nerve, indicating neuropathy. Immunohistochemistry showed reduced density of pericyte in the sciatic nerves of the cisplatin compared with those of control groups. TEM study of pericytes in the sciatic nerve and dorsal root ganglia (DRG) showed that pericytes in sciatic nerve of cisplatin group sciatic nerve separated from endothelial cells with breakdown of the basement membrane. However, the pericytes in the DRG were not different between the two groups. Finally, protein components of the BNB were examined using Western blot analysis. Zonula occludens-2 (ZO-2) expression tended to decrease in the sciatic nerve of the cisplatin compared with those of the control groups. The above data suggest that cisplatin might adversely affect pericytes and BNB. Further studies should be done to see if these changes contribute to the neuropathy.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2016

Student's Signature .....

Advisor's Signature .....

Co-Advisor's Signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.นพ. สิทธิพร แอกทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก และ อ.ดร.เดมิชา จินดาทิพย์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.พญ. วิไล ชินธเนศ และ ผศ.ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ และ ผศ.ดร.อัมพร จาริยะพงศ์สกุล สำหรับการตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอาทิตย์ ร่วมวงศ์ สำหรับความช่วยเหลือด้านการทดลอง ด้านเครื่องมือและเทคนิคต่างๆในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณมาริษา รอดทยอย และคุณเพชรรินทร์ โคบุตรี สำหรับความช่วยเหลือด้านการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและช่วยดูแลระหว่างการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ ทุกคนในครอบครัวที่เป็นแรงบันดาลใจ กำลังใจ และสนับสนุนจนสำเร็จการศึกษา

## สารบัญ

หน้า

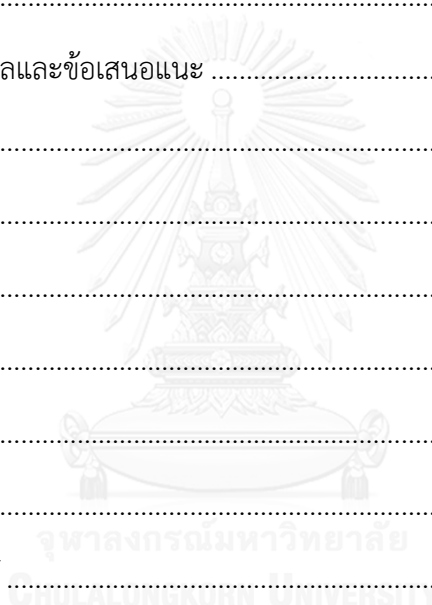
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ .....	ฉ
บทที่ 1 .....	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา .....	1
คำถามงานวิจัย .....	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย .....	1
กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework).....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	3
บทที่ 2 .....	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง .....	4
1.Pericyte .....	4
1.1 การบ่งชี้เซลล์ pericyte.....	5
1.3 ลักษณะของ pericyte ที่มีพยาธิสภาพ .....	6
2. Blood-brain barrier (BBB) และ Blood-nerve barrier (BNB) .....	6
2.1 Blood-brain barrier(BBB).....	6
2.2 บทบาท pericyte ต่อคุณสมบัติของ BBB.....	6

2.4 บทบาทของ endothelial cell ต่อคุณสมบัติของ BNB.....	7
2.5. บทบาทpericyte ต่อคุณสมบัติของ BNB.....	7
3. Cisplatin .....	8
3.1 กลไกการออกฤทธิ์ .....	8
3.2 ผลข้างเคียงของ cisplatin.....	9
Nephrotoxicity.....	9
Ototoxicity.....	9
3.3 Cisplatin-induced neuropathy .....	9
3.3.1 กลไกการเกิด.....	9
3.3.2 ลักษณะการเกิด cisplatin-induce neuropathy ในมนุษย์ .....	10
3.3.3 ลักษณะการเกิด cisplatin-induce neuropathy ในสัตว์ทดลอง.....	10
4. ผลของ cisplatin ต่อการทำงานของ endothelial cell และ pericyte ในระบบประสาท	
ส่วนปลาย.....	11
บทที่ 3 .....	12
วิธีดำเนินงานวิจัย .....	12
1.การทดลองในสัตว์ทดลอง .....	12
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา .....	12
รูปแบบการวิจัย.....	12
วิธีการวิจัย (Research methodology).....	12
2. การดูแลหนู .....	12
3. การฉีดยาหนู .....	12
3.1 วิธีการเตรียมยาและสารเคมี .....	13
4. Hot plate test.....	14



5. Motor nerve conduction velocity test .....	14
6. การ sacrifice หนู.....	16
7. การเตรียมและวิเคราะห์ชิ้นเนื้อ .....	17
7.1 Western blot analysis of DRG and sciatic nerve .....	17
7.1.1 การเตรียมตัวอย่าง .....	17
7.1.2 Bramhall protein assay .....	18
7.1.3 Gel electrophoresis .....	19
7.1.4 Immunological detection .....	19
7.1.5 Densitometric analysis .....	20
7.2 Immunohistochemistry for pericytes in DRG and sciatic nerve .....	20
7.2.1 เตรียมชิ้นเนื้อ .....	20
7.2.2 Immunohistochemistry for pericyte.....	21
7.2.3 Quantitative analysis .....	22
7.3 TEM study of pericyte and BNB.....	24
7.3.1 การฝังชิ้นเนื้อใน epoxy resin .....	24
7.3.2 การศึกษาโครงสร้างของ pericyte ใน DRG และ sciatic nerve .....	24
8. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis) .....	26
9. จริยธรรม (Ethical consideration) .....	26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
1. นำหนักตัวหนู .....	27
2. การวัดการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหนูด้วย hot plate test .....	27
3. การวัดความเร็วการนำกระแสประสาทที่เส้นประสาท sciatic .....	28
4. การหาค่าความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ในเส้นประสาท sciatic.....	28

5. การศึกษาโครงสร้างของเซลล์ pericyteในเส้นประสาท sciatic และDRG ในระดับ L4 (pericyte morphology) .....	32
6. การศึกษาปริมาณโปรตีนของ blood nerve-barrier ในเส้นประสาท sciatic และDRG.....	37
- โปรตีนของ blood nerve-barrier ในเส้นประสาท sciatic.....	37
- โปรตีนของ blood nerve-barrier ใน DRG.....	38
สรุปผลการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด.....	39
บทที่ 5 .....	40
สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ .....	40
ข้อสรุปการทดลอง.....	42
ข้อเสนอแนะ .....	42
รายการอ้างอิง .....	43
ภาคผนวก.....	48
ภาคผนวก ก .....	49
ภาคผนวก ข .....	54
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ .....	67



สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 แสดงค่า thermal threshold ที่เท้าหลังของหนู ..... 28

ตารางที่ 2 แสดงค่า sciatic motor NCV ของหนูหลังสิ้นสุดการทดลอง ..... 28

ตารางที่ 3 แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ในเส้นประสาท sciatic ..... 29



สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pericyte และ endothelial cell ..... 5

รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของ cisplatin ..... 8

รูปที่ 3 แสดงแผนการทดลอง ..... 13

รูปที่ 4 แสดงการวางตำแหน่งของ electrode ต่างๆ ..... 15

รูปที่ 5 แสดงค่า latency (L) จาก CMAP ที่ได้จากการกระตุ้นทั้งสองตำแหน่ง ..... 16

รูปที่ 6 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูเพื่อนำชิ้นเนื้อไปศึกษาด้วยเทคนิคต่างๆ ..... 17

รูปที่ 7 แสดงการแบ่งเส้นประสาท sciatic เป็นส่วน proximal และ distal ..... 20

รูปที่ 8 แสดงลำดับการเรียง section บนสไลด์ ..... 21

รูปที่ 9 รูปแสดง morphometry ของ sciatic nerve เพื่อหาความหนาแน่นของ pericyte ..... 23

รูปที่ 10 semithin section ..... 25

รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทั้งสองกลุ่มตลอดการทดลอง ..... 27

รูปที่ 12 เส้นประสาท sciatic ส่วนต้น ส่วนปลาย ที่แสดงออกต่อdesmin ..... 31

รูปที่ 13 DRG กลุ่มcontrol, DRG กลุ่ม cisplatin ..... 32

รูปที่ 14 เส้นประสาท sciatic ส่วนต้น กลุ่มควบคุม ..... 33

รูปที่ 15 เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นของกลุ่ม cisplatin ..... 34

รูปที่ 16 เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายของกลุ่มควบคุม ..... 34

รูปที่ 17 เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายของกลุ่ม cisplatin ..... 35

รูปที่ 18 DRG กลุ่มควบคุม ..... 36

รูปที่ 19 DRG กลุ่ม cisplatin ..... 36

รูปที่ 20 แสดงระดับโปรตีน occludin ของเส้นประสาท sciatic ..... 37

รูปที่ 21 แสดงระดับโปรตีน claudin-5 ของเส้นประสาท sciatic ..... 37

รูปที่ 22 แสดงระดับโปรตีน ZO-2 ของเส้นประสาท sciatic ..... 37

รูปที่ 23 แสดงระดับโปรตีน occludin ของ DRG.....	38
รูปที่ 24 แสดงระดับโปรตีน claudin-5 ของ DRG.....	38
รูปที่ 25 แสดงระดับโปรตีน ZO-2 ของ DRG .....	38
รูปที่ 26 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ของระดับโปรตีน ZO-2 ใน DRG.....	38
รูปที่ 27 แสดงระดับโปรตีน beta actin.....	38
รูปที่ 28 แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ SEM ของระดับโปรตีน beta actin .....	39



## บทที่ 1

### บทนำ

#### ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Cisplatin เป็นยาที่นำมาใช้รักษาโรคมะเร็งหลายชนิดอย่างกว้างขวาง(1) ผลข้างเคียงที่พบบ่อยของการใช้ยานี้คือการเกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนปลายที่ส่งผลต่อการรับรู้ความรู้สึก (sensory neuropathy) และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อขนาดยาตามมาตรฐานได้(2, 3) ซึ่งส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็งลดลงและเกิดผลข้างเคียงที่รบกวนการดำรงชีวิตประจำวันของผู้ป่วย ดังนั้นจึงมีการพยายามหากลไกระดับโมเลกุล (molecular mechanisms) ของการเกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนปลาย ในงานวิจัยที่ผ่านพบว่า หนูที่ได้รับยา cisplatin จะมีความไวในการรับรู้สึกร้อนน้อยลง(4-9) และพบว่ามีอาการฝ่อ (atrophy) ของ cell body, nucleus และ nucleolus ของ dorsal root ganglion (4, 5, 8-10) ส่วนโครงสร้างของ nerve พบว่ามีอาการลดลงของขนาด myelinated fiber และลดลงของจำนวนด้วยเล็กน้อย(4, 8-10) แต่ยังมีการศึกษาอยู่น้อยที่ทำการศึกษถึงผลข้างเคียงต่อระบบไหลเวียนเลือดที่เข้าเข้าไปในระบบประสาท มีการศึกษาในการรักษาผู้ป่วยด้วยเคมีบำบัดที่มี cisplatin พบมีโอกาสดเกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงในสมองเพิ่มขึ้น(11) และในหนูที่ได้รับ cisplatin ชักนำไปให้เกิด neuropathy จะมีการไหลเวียนเลือดในเส้นประสาทลดลง จำนวนหลอดเลือดในเส้นประสาทก็ลดลง(12)นอกจากนี้ การศึกษาที่มีก็ศึกษาเฉพาะ endothelial cell เท่านั้น ไม่มีการศึกษาถึงผลต่อ pericyte ในหนูที่ได้รับ cisplatin พบว่าเกิด apoptosis ต่อ endothelial cell (12) ยังพบมีความผิดปกติของ blood-nerve barrier (BNB) ในโรคของเส้นประสาทส่วนปลายที่เกิดจากการอักเสบและเบาหวาน (13-15) ซึ่ง BNB นี้เกิดจากการทำงานร่วมกันของ endothelial cell และ pericyte ดังนั้นน่าจะมีการศึกษาว่า cisplatin มีผลต่อ pericyte และ BNB ในระบบประสาทส่วนปลายของหนูที่เกิด neuropathy จาก cisplatin หรือไม่อย่างไร จึงเป็นที่มาของการศึกษานี้

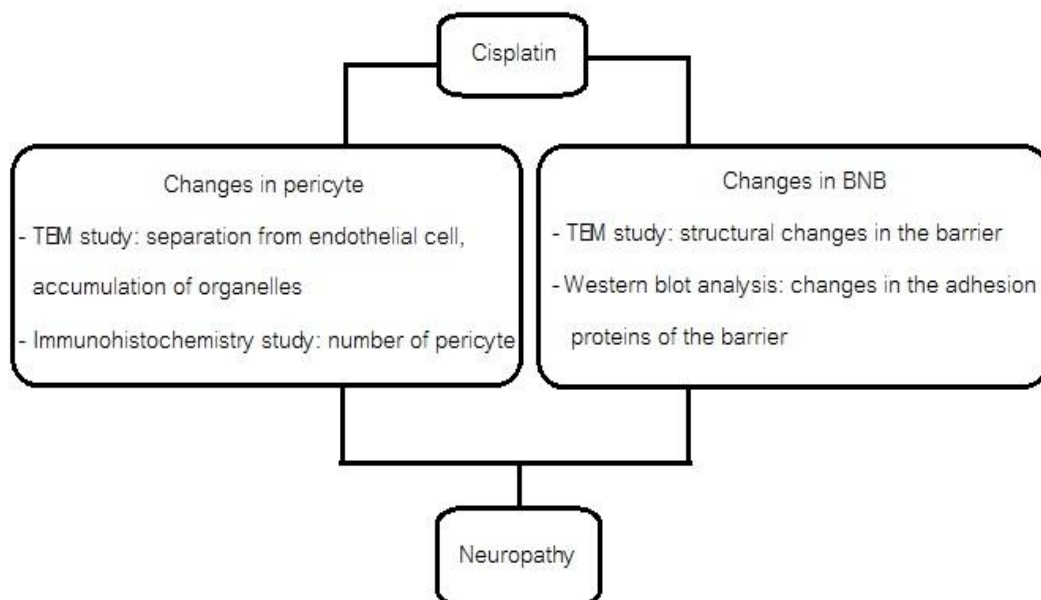
#### คำถามงานวิจัย

- 1.Pericyteในระบบประสาทส่วนปลายมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรหลังจากได้รับยา cisplatin
2. BNB มีการเปลี่ยนแปลงไปหรือไม่หลังจากได้รับยา cisplatin

#### วัตถุประสงค์งานวิจัย

- เพื่อศึกษาผลของ cisplatin ต่อเซลล์ pericyte และ blood-nerve barrier ในระบบประสาทส่วนปลายของหนูที่เกิด neuropathy จาก cisplatin

### กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ถ้าพบว่าลักษณะของ pericyte และองค์ประกอบของ BNB ในระบบประสาทส่วนปลายเปลี่ยนแปลงไปจากการได้รับยา cisplatin จะเป็นข้อมูลที่สำคัญซึ่งองค์ความรู้ที่ได้สามารถนำมาใช้ในการวิจัย การหายาที่มีผลต่อ pericyte และ BNB ที่สามารถใช้ในการรักษา neuropathy จาก cisplatin ได้ในอนาคต

## ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ตารางปฏิบัติงาน	ระยะเวลา(เดือน)				
	1-2	3-4	5-6	7-9	10-12
ค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง					
ศึกษาผลของ cisplatin ต่อpericyteใน สัตว์ทดลอง					
วิเคราะห์และสรุปผลการทดลอง					
เขียนและสอบวิทยานิพนธ์					





## บทที่ 2

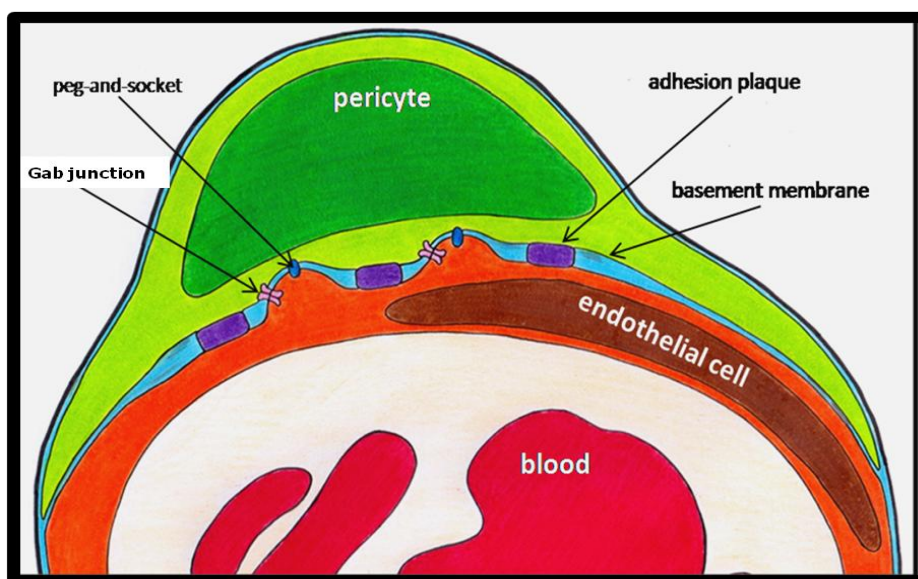
### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1.Pericyte

pericyte เป็นเซลล์ที่วางตัวชิดกับผนังด้านนอกของหลอดเลือดขนาดเล็ก เซลล์มีแขนงแตกออกมาจากตัวเซลล์ ซึ่งแขนงเหล่านี้เป็นส่วนที่ทำหน้าที่โอบล้อมหลอดเลือดไว้ พบได้ที่ผนังหลอดเลือดชนิด capillary และ postcapillary venule pericyte ฝังตัวอยู่ภายใน basement membrane ที่สร้างขึ้นร่วมกับ endothelial cell ซึ่งทั้งสองเซลล์นี้จะมีการใช้ basement membrane ร่วมกันในบางอวัยวะ basement membrane บางบริเวณหายไป เกิดเป็น junctional complex ระหว่างเซลล์ (รูปที่ 1) ซึ่งส่วนประกอบของ junctional complex มีดังนี้ (16, 17)

- gap junction เป็นบริเวณที่ยึดติดกันระหว่าง endothelial cell ที่อยู่ข้างเคียงและเป็นบริเวณที่มีการแลกเปลี่ยนของไอออนและโมเลกุลขนาดเล็ก
- adhesion plaque ช่วยส่งเสริมการส่งผ่านแรงในการหดตัวของ pericyte ไปยังเซลล์อื่น
- peg-and-socket เป็นส่วนที่ยึด pericyte ไว้กับ endothelial cell โดย peg คือส่วนของ pericyte cytoplasm ที่ยื่นลงมาสวมอยู่ใน socket เล็กๆซึ่งเป็นส่วนของ endothelial cell

ความครอบคลุมพื้นที่รอบหลอดเลือดของ pericyte ในแต่ละอวัยวะมีความแตกต่างกันซึ่งมีความสัมพันธ์กับความยากง่ายในการผ่านเข้าออกของสาร โดยจะมีความหนาแน่นมากที่สุดที่จอประสาทตา และ สมอง ซึ่งสอดคล้องกับการมี blood-retinal และ blood-brain barriers นอกจากนั้นลักษณะของ pericyte จะมีความแตกต่างกันไปขึ้นอยู่กับแต่ละอวัยวะ โดยในระบบประสาทส่วนกลาง pericyte ให้แขนง cytoplasmic process จำนวนมากล้อมรอบ capillary จึงทำให้เซลล์มีรูปร่างคล้ายดาว นิวเคลียสของ pericyte จะค่อนข้างกลมเมื่อเทียบกับ endothelial cell ที่ยาวรี (16, 17)



รูปที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง pericyte และ endothelial cell ในหลอดเลือดขนาดเล็ก โดย pericyte และ endothelial cell จะมีการใช้ basement membrane ร่วมกัน ซึ่งทั้ง 2 เซลล์มีการเชื่อมกันผ่านทาง junctional complex ซึ่งเป็นบริเวณที่ส่วนของ basement membrane หายไป (ดัดแปลงจาก (17))

### 1.1 การบ่งชี้เซลล์ pericyte

ในการบ่งชี้ pericyte สามารถใช้วิธีการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน (transmission electron microscope) และส่องกราด (scanning electron microscope) ซึ่งเป็นการศึกษาที่บ่งชี้ pericyte ได้อย่างชัดเจน (18) นอกจากนี้ยังสามารถใช้ marker ในการบ่งชี้ แต่เนื่องจากลักษณะและองค์ประกอบของ pericyte มีความแตกต่างกันอยู่บ้างในแต่ละอวัยวะ ทำให้ยังไม่มี marker ใดที่เป็น pan marker จึงมีความจำเป็นในการเลือกใช้ marker ให้เหมาะสมในแต่ละเนื้อเยื่อ ยกตัวอย่างดังต่อไปนี้ (16, 17)

1. Contractile protein เช่น  $\alpha$ -smooth muscle actin ( $\alpha$ -SMA) ซึ่งจะพบที่ pericyte ของระบบประสาทส่วนกลาง แต่ไม่พบการแสดงออกใน endothelial cell (16)

2. Cytoskeletal protein เช่น desmin, vimentin และ nestin (16)

3. Marker อื่นๆ เช่น platelet-derived growth factor  $\beta$  receptor (PDGF- $\beta$  receptor), chondroitin sulfate proteoglycan (CSPG), neuron-gial antigen 2 (NG2), regulator of G-protein signaling5 (RGS5) (16)

4. Cultured pericyte จะมีการแสดงออกซึ่ง marker ของ mesenchymal stem cell เช่น CD44, CD73, CD90 และ CD105 (16)

## 1.2 หน้าที่ของ pericyte

Pericyte ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis), การควบคุมการไหลเวียนของหลอดเลือดฝอยจากความสามารถในการหดตัวได้ (local blood flow regulation), ความคงสภาพของหลอดเลือด (vessel stabilization), การซึมผ่านของหลอดเลือด (microvascular permeability), นอกจากนี้ pericyte ยังเป็นองค์ประกอบหนึ่งใน blood-brain และ blood-nerve barriers ด้วย (16)

### 1.3 ลักษณะของ pericyte ที่มีพยาธิสภาพ

pericyte ในแต่ละอวัยวะจะมีความแตกต่างกัน (19) ซึ่งมีหลายการศึกษาพบว่าโครงสร้างภายในของ pericyte ที่มีพยาธิสภาพมีลักษณะดังนี้

- pericyte ของสมองที่เสื่อมสภาพ จะพบ lysosome จำนวนมากและพบการหนาตัวของ basement membrane (20)

- pericyte ของหลอดเลือดที่จอประสาทตาในภาวะไขมันในเลือดสูง จะพบว่า cytoplasm ฟูอืด (20)

- pericyte บริเวณสมองที่ได้รับการบาดเจ็บพบว่า จะอยู่กับ endothelial cell อย่างหลวมๆ และเห็น cytoplasmic process ของ pericyte แยกออกมาจากหลอดเลือด (21)

- pericyte บริเวณหลอดเลือดของจอประสาทตาย้ายจาก endothelial cell ไปยัง perivascular space ในหนูที่เกิดภาวะ retinoneuropathy (22)

## 2. Blood-brain barrier (BBB) และ Blood-nerve barrier (BNB)

### 2.1 Blood-brain barrier(BBB)

Blood-brain barrier มีความสำคัญต่อเนื้อเยื่อประสาท โดยทำหน้าที่คัดกรองสารจากเลือดที่จะเข้าสู่เนื้อเยื่อประสาท เพื่อรักษาสภาพที่เหมาะสมสำหรับการทำงานของระบบประสาท และป้องกันอันตรายจากสารพิษในเลือด โครงสร้างของ BBB ประกอบด้วย endothelial cell basement membrane และ pericyte และด้านนอกสุดจะถูกล้อมรอบด้วย end feet ของ astrocyte (16)

### 2.2 บทบาท pericyte ต่อคุณสมบัติของ BBB

Pericyte มีความสำคัญต่อ BBB ผ่านหลายกลไก กลไกแรกคือ เสริมความแข็งแรงของ intercellular junction ระหว่าง endothelial cell โดยอาศัย cell-to-cell contact กลไกอื่นคือ ผลิตสารที่มีผลต่อคุณสมบัติของ BBB เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF) ที่เพิ่ม permeability ของ barrier, basic fibroblast growth factor (bFGF) ที่เพิ่มความหนาแน่นของ intercellular junction ซึ่งสารนี้ยังผลิตจาก astrocyte ได้อีกด้วย (16) การศึกษาก่อนหน้านี้แสดง

ความเกี่ยวข้องระหว่างความหนาแน่นของ pericyte รอบหลอดเลือดกับการทำงานของ BBB โดยพบว่าหากจำนวน pericyte ลดลง จะส่งผลให้ permeability ของ BBB เพิ่มขึ้น (22, 23) นอกจากนี้ยังพบความเสียหายของ BBB ในโรคทางระบบประสาทต่างๆ เช่น โรคหลอดเลือดสมอง, multiple sclerosis, Parkinson disease, Alzheimer disease และ เนื้องอก ซึ่งการทำงานที่ผิดปกติของ BBB นั้น อาจเกิดจากการเปิดของ tight junction เพียงชั่วคราวจนถึงการถูกทำลายของ barrier อย่างเรื้อรัง (16)

ในโรค Alzheimer พบว่า  $\beta$ -amyloid เป็นพิษต่อ pericyte และ endothelial cell ในโรคหลอดเลือดสมองตีบ pericyte จะทำให้ capillary หดตัวและส่งผลให้ลดการไหลของเลือดในบริเวณนั้น ในการบาดเจ็บของสมองพบว่า pericyte มีการเคลื่อนที่จากรอบหลอดเลือดไปอยู่ที่บริเวณเนื้อสมอง ซึ่งจะเกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) (16)

### 2.3 Blood-nerve barrier (BNB)

Blood nerve barrier คือผนังหลอดเลือดในชั้น endoneurium ของเส้นประสาท หลอดเลือดบริเวณนี้มี endothelial cell แนบชิดกับ pericyte อย่างต่อเนื่อง ซึ่งบริเวณนี้จะพบ intercellular junction ระหว่าง endothelial cell และ pericyte โดย BNB จะทำหน้าที่เป็น barrier ที่ทำให้เกิดการลำเลียงสารแบบใช้พลังงานและแบบเลือกผ่าน (active and selective transport) ระหว่าง endoneurium และภายในหลอดเลือด (24) และจะแยก endoneurium จากระบบไหลเวียนเลือดเพื่อป้องกันการรั่วไหลของสารที่ไม่สามารถควบคุมได้ จะเข้าไปที่เส้นประสาทส่วนปลาย จะเห็นได้ว่า BNB มีความสำคัญต่อการทำงานของเส้นประสาทคล้ายกับที่ BBB มีต่อสมอง (25)

### 2.4 บทบาทของ endothelial cell ต่อคุณสมบัติของ BNB

endothelial cell สร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ barrier ประกอบด้วย occludin, zonula occluden 1&2 (ZO-1&2), junctional adhesion protein (JAM) และ claudin 5&12 endothelial cell สามารถบ่งชี้ได้โดยใช้ marker ที่มีความจำเพาะคือ von-Willebrand factor (vWF) และ platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) ซึ่งมีการศึกษาที่พบว่า การลดลงของ claudin-5 และ ZO-1 เกี่ยวข้องกับการเกิดโรค chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy (CIDP) ที่มีการทำงานของ BNB บกพร่อง (13, 25)

### 2.5. บทบาท pericyte ต่อคุณสมบัติของ BNB

pericyte มีความสำคัญต่อการทำงานของ BNB ซึ่ง pericyte จะสร้างโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ barrier ประกอบด้วย occludin, ZO-1&2, JAM และ claudin-12 ยกเว้น claudin-5 ซึ่งสร้างจาก endothelial cell เท่านั้น โปรตีนเหล่านี้มีความสำคัญต่อความสามารถในการซึมผ่านของ barrier (6) pericyte ยังสามารถหลั่ง growth factor เช่น bFGF, VEGF, Ang1, TGF

ซึ่งสารเหล่านี้มีผลต่อปริมาณ claudin-5 ใน endothelial cell และส่งผลต่อคุณสมบัติของ BNB (14)

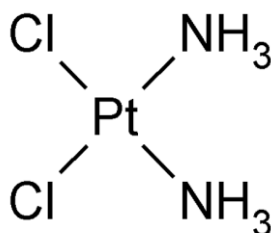
หลักฐานข้างต้นนี้แสดงถึงการทำงานร่วมกันระหว่าง pericyte กับ endothelial cell ต่อคุณสมบัติของ BNB โดยความผิดปกติในการทำงานของ endothelial cell และ pericyte ทำให้เกิดโรคของเส้นประสาทได้ โดยพบว่าโรคเส้นประสาทเสื่อมจากเบาหวาน (diabetic neuropathy) มีการลดลงหรือหายไปของ pericyte ร่วมกับ basement membrane ที่หนาตัวขึ้น (15) พบว่า pericyte ในหลอดเลือดของเส้นประสาท ที่มีการลดการแสดงออกของ claudin5 ใน endothelial cell ส่งผลให้ BNB อ่อนแอลง และสามารถนำไปสู่การเกิด demyelinating polyradiculoneuropathy ได้ด้วย (13, 14) นอกจากนั้น pericyte สามารถหลั่ง glia cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) ซึ่งส่งผลให้การแสดงออกของ claudin-5 มากขึ้นทั้งในระดับโปรตีนและ mRNA ทำให้ BNB แข็งแรงขึ้น ซึ่งเห็นได้จากค่า transendothelial electrical resistance ที่เพิ่มขึ้น (26)

### 3. Cisplatin

Cisplatin (*cis* – diamminodichloroplatinum หรือ CDDP) ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี 1845 โดย Peyrone หลังจากนั้นในปี 1965 Rosenberg ได้พบว่า cisplatin มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของ *Eschericia coli* ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยจากขั้วกระตุ้นไฟฟ้าของแพลทินัม (platinum) ผ่านอาหารเหลว ต่อมาได้มีการใช้ cisplatin รักษาโรคมะเร็งหลายชนิดและมีการใช้อย่างกว้างขวาง เช่น มะเร็งปอด มะเร็งศีรษะและคอ มะเร็งอวัยวะ มะเร็งรังไข่ และมะเร็งเต้านม เป็นต้น (1) ผลข้างเคียงทางคลินิกที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เกิดจากการใช้ยา cisplatin ที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อขนาดยาตามมาตรฐานได้คือการเกิดความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral neuropathy) (2, 3)

#### 3.1 กลไกการออกฤทธิ์

Cisplatin เป็นยาที่เป็นอนุพันธ์ของแพลทินัมโดยมีส่วนประกอบของ  $\text{NH}_3$  และกลุ่มคลอไรด์ ( $\text{Cl}^-$ )



รูปที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของ cisplatin

โดย cisplatin สามารถเข้าเซลล์โดยกระบวนการ passive diffusion ซึ่งเกิดจากการที่ภายนอกเซลล์ มีปริมาณคลอไรด์ไอออนมากกว่าภายในเซลล์ ทำให้เกิดการแพร่ผ่านเข้าไปได้ นอกจากนี้ยังอาจผ่านเข้าไปโดยอาศัย copper transporter อีกด้วย (27) เมื่อ cisplatin เข้าสู่เซลล์ จะมีการเปลี่ยนรูปเป็น aqueous จากการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยเกิดการแลกเปลี่ยนโมเลกุลระหว่างคลอไรด์ไอออนกับน้ำ (28, 29) หลังจากนั้น aqueous form ของ cisplatin จะเข้าไปมีผลโดยตรงต่อ DNA ในนิวเคลียสโดยจะเข้าไปสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้เกิด intra-strand และ inter-strand cross-links ที่บริเวณตำแหน่ง N-7 ของ guanines และ adenine ทำให้เกิด DNA damage และเกิดการตายของเซลล์มะเร็งแบบ apoptosis (30, 31)

### 3.2 ผลข้างเคียงของ cisplatin

หลังจากที่ให้เข้าทางหลอดเลือดแล้ว cisplatin จะมีการกระจายไปตามอวัยวะต่างๆในร่างกายโดยจะพบเป็นปริมาณมากที่บริเวณไต, ตับ, รังไข่, อัณฑะ, ผิวหนัง, กระดูก รวมทั้ง dorsal root ganglion (DRG) (30) ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดผลข้างเคียงในหลายอวัยวะ เช่น nephrotoxicity (32) ototoxicity (33) และ peripheral neuropathy (1)

#### Nephrotoxicity

จากการที่มี cisplatin สะสมมากที่บริเวณไตก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของไตจนอาจถึงขั้นไตวาย (renal failure) จากการศึกษา morphology ของไตในผู้ป่วยที่ได้รับ cisplatin พบว่าเกิด necrosis ที่บริเวณ terminal portion ของ proximal tubule และเกิด apoptosis ที่ distal nephron (32) ปัจจุบันสามารถลดผลข้างเคียงของ cisplatin ที่ส่งผลต่อไตได้โดยการ hydration ร่วมกับการใช้ยากลุ่ม diuretics และ serotonin receptor antagonist (34)

#### Ototoxicity

ผลข้างเคียงของ cisplatin ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่สำคัญต่อเส้นประสาทที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการได้ยิน โดยทำให้เกิดการสูญเสียการได้ยินในช่วงความถี่สูงและส่งผลกระทบต่อช่วงความถี่ในระดับเดียวกับการพูด (35) และยังสามารถส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ tinnitus ทั้งแบบชั่วคราวและถาวร (36)

### 3.3 Cisplatin-induced neuropathy

#### 3.3.1 กลไกการเกิด

จากการศึกษาพบว่า cisplatin สะสมใน DRG มากกว่าใน nerve, spinal cord และ brain (31, 37) โดยกลไกที่ทำให้เกิด cisplatin-induced neuropathy เป็นผลจาก DNA damage และจากโครงสร้างของ DNA ที่ผิดปกติทำให้ cell cycle มีความผิดปกติและทำให้เกิด apoptosis ของ DRG neuron โดยผ่านกลไก re-entry ของ cell cycle (38, 39) โดยมีการกระตุ้นการแสดงออกของ

p53 ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cell cycle แล้วไปทำให้เกิดการย้ายของ Bax ไปที่ mitochondria ทำให้มีการปล่อย Cytochrome C ออกมาจาก mitochondria มากระตุ้น caspase ต่างๆ แล้วนำไปสู่ apoptosis (40) นอกจากนี้มีผลต่อ nuclear DNA ของ neuron ชำงต้นแล้ว cisplatin ยังมีผลต่อ mitochondrial DNA เช่นเดียวกัน โดย mitochondrial DNA damage ทำให้การสร้างพลังงานจาก mitochondria ลดลง neuron ซึ่งเป็นเซลล์ที่ต้องการพลังงานในการขนส่งสารผ่าน axon รวมทั้งการสื่อสารผ่าน synapse โดยใช้ neurotransmitter ก็จะถูกพร่องและจากการศึกษาพบว่า cisplatin-induced neuropathy ทำให้การขนส่งสารต่างๆ ภายใน axon (axonal transport) ลดลงทั้งในทิศทาง anterograde และ retrograde (41) นอกจากนี้การที่ transcription ของ nuclear DNA เสียไปจากที่ cisplatin ไปจับก็ยังทำให้การสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ ที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์เสียไป (42) นอกจากนี้กลไกข้างต้น cisplatin ยังเพิ่มภาวะ oxidative stress ทั้งนี้เนื่องจากการศึกษาผลของ vitamin E ซึ่งเป็น antioxidant พบว่ามีผลดีต่อภาวะ cisplatin neuropathy ทั้งในคนและสัตว์ทดลอง (43, 44)

### 3.3.2 ลักษณะการเกิด cisplatin- induce neuropathy ในมนุษย์

ลักษณะของ cisplatin neuropathy ในคนที่พบบ่อยที่สุดคือ distal symmetrical polyneuropathy คือเป็นมากที่ปลายมือปลายเท้า เป็นทั้งสองข้างใกล้เคียงกันและเป็นกับเส้นประสาทหลายเส้นพร้อมๆ กัน (45, 46) ความผิดปกติมักเกิดขึ้นกับการรับรู้ความรู้สึก มีอาการชาปลายมือปลายเท้าเป็นลักษณะคล้ายใส่ถุงมือถุงเท้า (glove-stocking pattern) อาจจะมีอาการขาเริ่มการรักษามาได้ระยะหนึ่งและจะมีอาการมากขึ้นเมื่อ ผู้ป่วยได้รับการรักษามาได้หลายเดือนหรือหลังสิ้นสุดการรักษา นอกจากนี้ความผิดปกติทาง sensory อื่นๆ ที่พบได้ คือ paresthesia, รับรู้ vibration ได้ลดลง, รับรู้ joint position ได้ลดลงและการลดลงหรือหายไปของ deep tendon reflexes (45) นอกจากนี้ยังพบการลดลงของ sensory nerve conduction amplitude และ velocity แต่ไม่มีอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ (47) เมื่อตรวจร่างกายทางพยาธิวิทยาของเส้นประสาท sural พบว่ามีการหายไปของ myelinated fiber ขนาดใหญ่ (46) ดังนั้นการเกิด neuropathy เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถรับยา cisplatin ในการรักษาโรคมะเร็งอย่างต่อเนื่อง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งลดลง

### 3.3.3 ลักษณะการเกิด cisplatin- induce neuropathy ในสัตว์ทดลอง

การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าหนูที่ได้รับยา cisplatin จะมีความไวในการรับรู้ต่อความร้อนน้อยลง แต่เกิดความเจ็บปวดต่อ mechanical stimuli (mechanical allodynia) ได้ (4-6, 8, 9, 48) และจากการศึกษา motor และ proprioceptive function โดยใช้ rota-rod test ก็พบว่ามีความ

ผิดปกติด้วย (6, 49) Motor nerve conduction velocity อาจลดลงได้ในกรณีได้ขนาดยา cisplatin ที่สูง (8, 9, 49) แต่เมื่อเทียบกับขนาดยาที่ต่ำกว่าอาจไม่พบการลดลงของ Motor nerve conduction velocity (48) ในส่วนของโครงสร้าง DRG พบว่ามี atrophy ของ cell body, nucleus และ nucleolus (6, 8-10, 13) แต่การลดลงของจำนวน DRG neuron นั้นยังไม่ชัดเจน โดยมีรายงานว่าพบการลดลงหลังได้รับยา cisplatin แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ (8, 10) ส่วนโครงสร้างของ nerve พบมีการลดขนาดของ myelinated fiber และมีการลดลงเล็กน้อยของจำนวน myelinated fiber (4, 8-10)

สรุปได้ว่า cisplatin มีผลต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยเฉพาะ ต่อ DRG neuron ซึ่งเป็น sensory neuron เป็นหลัก ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ sensory neuropathy จนส่งผลเสียต่อการรักษา มะเร็ง ดังนั้นการรักษา cisplatin-induced neuropathy จึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับ molecular mechanism ของการเกิดภาวะนี้

#### 4. ผลของ cisplatin ต่อการทำงานของ endothelial cell และ pericyte ในระบบประสาทส่วนปลาย

จากข้อมูลในหัวข้อก่อนหน้านี้ที่แสดงว่า cisplatin มีผลเสียต่อ sensory neuron ใน DRG และ endothelial cell กับ pericyte รวมทั้งมีความผิดปกติของ blood-nerve barrier ในโรคของเส้นประสาทหลายโรค ดังนั้นจึงน่าจะมีการศึกษาว่า cisplatin มีผลต่อ endothelial cell และ pericyte ในระบบประสาทส่วนปลายหรือไม่ อย่างไร

ในปัจจุบันมีการศึกษาไม่มากเกี่ยวกับผลของ cisplatin ต่อเซลล์ pericyte ในระบบประสาทส่วนปลาย มีการสังเกตว่าการรักษาผู้ป่วยด้วยเคมีบำบัดที่มี cisplatin รวมอยู่ด้วยมีโอกาสเสี่ยงต่อการเกิดการอุดตันของหลอดเลือดแดงในสมองเพิ่มขึ้น (11) นอกจากนี้ยังพบว่าการรักษาเนื้องอก germ cell ด้วยเคมีบำบัดที่มี cisplatin ประกอบอยู่ จะทำให้เกิดความเสียหายต่อ endothelial cell (12) และในหนูทดลองซึ่งได้รับการฉีด cisplatin ขนาด 2mg/kg 1 ครั้งต่อสัปดาห์เป็นเวลา 9 สัปดาห์ส่งผลให้มีการลดลงของการไหลเวียนเลือดในเส้นประสาท และมีการลดลงของจำนวนหลอดเลือดในเส้นประสาท รวมทั้งเกิด apoptosis ของ endothelial cell (50)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่า cisplatin น่าจะมีผลเสียต่อ endothelial cell และส่งผลกระทบต่อความผิดปกติในการไหลเวียนเลือดภายในเส้นประสาท ซึ่งอาจจะเกี่ยวข้องกับภาวะ neuropathy ที่เป็นผลข้างเคียงสำคัญของ cisplatin ได้ อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาถึงผลของ cisplatin ต่อ pericyte ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อ BNB และการทำงานของระบบประสาทส่วนปลายเช่นเดียวกับ endothelial cell จึงเป็นที่มาของโครงการศึกษา



### บทที่ 3 วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 1. การทดลองในสัตว์ทดลอง

##### กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

หนูเพศเมียพันธุ์ Wistar จำนวน 25 ตัว น้ำหนัก 200-220 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

##### รูปแบบการวิจัย

การทดลองในสัตว์

#### วิธีการวิจัย (Research methodology)

##### 1. การแบ่งกลุ่มหนู

แบ่งกลุ่มหนู 25 ตัวโดยสุ่มเลือกแบ่งออกเป็น 2กลุ่ม กลุ่มละ 12-13 ตัว คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control หรือ C) ได้รับการฉีด normal saline ที่เป็น vehicle สำหรับ cisplatin จำนวน 12 ตัว

กลุ่มที่ 2 (cisplatin หรือ P) ได้รับการฉีด cisplatin จำนวน 13 ตัว ที่มีจำนวนมากกว่ากลุ่ม C 1 ตัวเนื่องจากเพื่อเสียชีวิตระหว่างการทดลอง

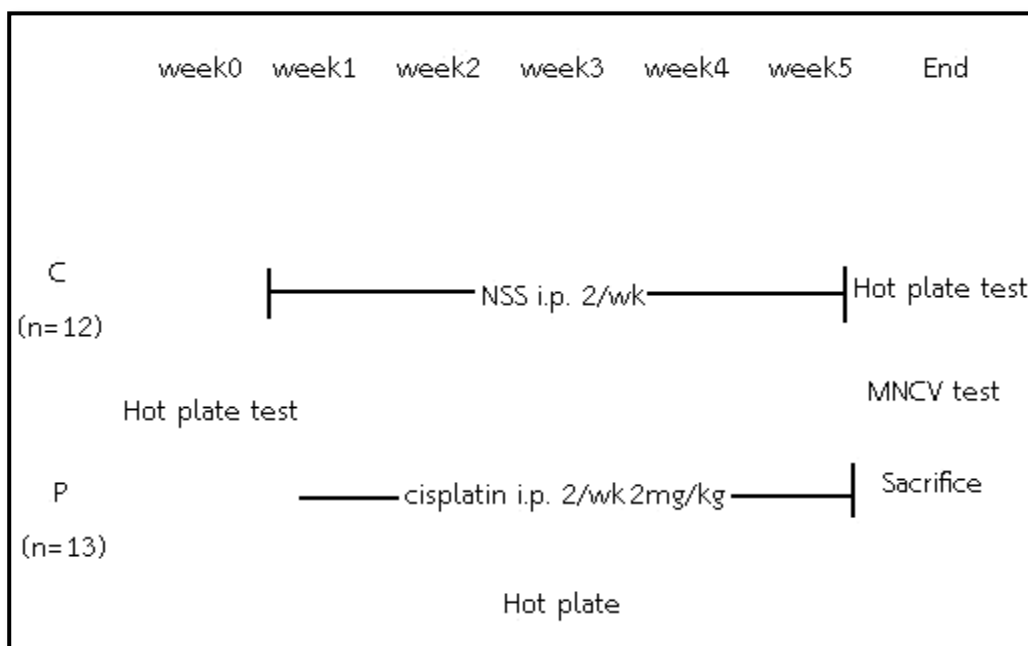
##### 2. การดูแลหนู

ซังน้ำหนักแรกจับและทุกสัปดาห์จนสิ้นสุดการทดลอง ให้หนูได้รับน้ำและอาหารเม็ดสำเร็จรูป ในปริมาณที่เพียงพอ ที่อุณหภูมิห้อง 25°C ช่วงเวลากลางคืนกลางวัน 12/12 ชั่วโมง ทั้งนี้ก่อนเริ่มการวิจัย โครงการได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรียบร้อยแล้ว (เลขที่โครงการวิจัย 19/58) และผู้วิจัยได้ทำตามหลักเกณฑ์/คำแนะนำ ในการใช้สัตว์ทดลองที่ออกโดยสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

##### 3. การฉีดยาหนู

กลุ่ม C ได้รับการฉีด normal saline เข้าช่องท้องโดยปริมาตรคำนวณตามน้ำหนักตัว เทียบเท่ากับกลุ่ม P

กลุ่ม P ได้รับการฉีด cisplatin ผสมใน normal saline เข้าช่องท้อง 2mg/kg/ครั้ง สัปดาห์ละ 2 ครั้ง ทั้งหมด 5 สัปดาห์ติดต่อกัน รวม dose ที่ได้ทั้งหมด 20 mg/kg ขนาดที่ให้นี้ได้ทดลองแล้วว่าทำให้เกิดภาวะ neuropathy ในหนูจริง (9)



รูปที่ 3 แสดงแผนการทดลอง

NSS = normal saline solution

MNCV = motor nerve conduction velocity

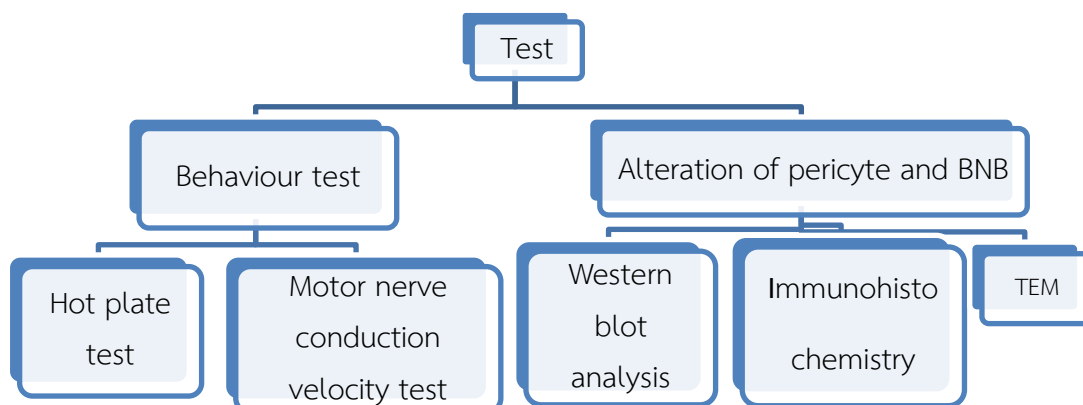
### 3.1 วิธีการเตรียมยาและสารเคมี

ยาและสารเคมีที่ใช้ (8, 9)

1. Sterile normal saline สำหรับฉีด
2. cisplatin (Korea united pharm, สำหรับฉีดขนาด 50 mg in 50 ml)

การผสมยา

- cisplatin เจือจางด้วย normal saline ให้ได้ความเข้มข้น 0.5 mg/ml เพื่อฉีดเข้าช่องท้อง ปริมาตร 4ml/kg
- ปริมาณ normal saline ที่ให้กลุ่ม C จะเท่ากับกลุ่ม P ที่น้ำหนักตัวเท่ากัน แต่ไม่มี cisplatin อยู่



#### 4. Hot plate test

Hot plate test ใช้วัดการรับรู้ความร้อนที่เท้าของหนู ใช้อุปกรณ์คือ hot plate meter โดยวางหนูปบนแผ่นความร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิและจับเวลาตั้งแต่เท้าของหนูสัมผัสบนแผ่นความร้อน และจะหยุดจับเวลาเมื่อหนูเลียอุ้งเท้าหลัง ระยะเวลาที่ได้คือ withdrawal latency หน่วยเป็นวินาที **วิธีทดลอง** หนูทุกตัว ในแต่ละกลุ่มจะถูกวางลงบนแผ่นความร้อนที่มีอุณหภูมิ  $60 \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  นำหนูแต่ละตัวมาทำการทดลอง 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันประมาณ 10 นาที โดยที่ cut-off time เท่ากับ 35 วินาทีเพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเท้า สังเกตพฤติกรรมการเลียอุ้งเท้าของหนู บันทึกเวลาตั้งแต่วางหนูลงบนแผ่นความร้อนจนกระทั่งหนูแสดงพฤติกรรมดังกล่าว จากนั้นนำเวลา 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยของหนูตัวนั้นๆ โดยจะทำก่อนให้ยา สัปดาห์ที่ 3 และสัปดาห์ที่ 5 ก่อนสิ้นสุดการทดลอง 1 วัน เปรียบเทียบค่าของหนูกลุ่มต่างๆ ในแต่ละครั้งวิธีการนี้ได้ใช้ในการศึกษาก่อนหน้านี้แล้ว (8, 9)

#### 5. Motor nerve conduction velocity test

Motor nerve conduction velocity (MNCV) test เป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถในการนำกระแสประสาทของ motor nerve fiber โดยการทดลองนี้จะทำการวัดค่า MNCV ในเส้นประสาท sciatic สัปดาห์ที่ 5 ก่อนสิ้นสุดการทดลองเหตุผลที่ไม่ได้ทำในช่วงก่อนเริ่มการทดลองเนื่องจากผลที่เท้าจากการแทงขั้วไฟฟ้าอาจทำให้รับกวนการทำ hot plate test ได้ จึงทำเมื่อได้ผล hot plate test ครั้งสุดท้ายแล้วครั้งเดียว

**วิธีทดลอง** หนูถูกทำให้สลบโดยเริ่มด้วย 4% isoflurane ผ่าน oxygen 1000 ml/min โดยใช้เครื่องดมยาสำหรับสัตว์ทดลองหลังจากนั้นลดความเข้มข้นของ isoflurane เป็น 2.5% ผ่าน oxygen 500 ml/min เพื่อคงภาวะสลบของหนูและรักษาอุณหภูมิร่างกายของหนูที่  $37^{\circ}\text{C}$  ระหว่างการทดสอบหนูอยู่ในลักษณะนอนคว่ำบนแผ่นร้อนที่คลุมด้วยผ้า ใช้ 70% alcohol เช็ดที่ผิวหนัง จากนั้นทำการเสียบ stimulating electrode ที่บริเวณ sciatic notch ด้านซ้าย (point 1, รูปที่ 4) ซึ่งอยู่บริเวณสะโพกใกล้ sciatic nerve และเสียบ recording electrodes ที่บริเวณ interosseous

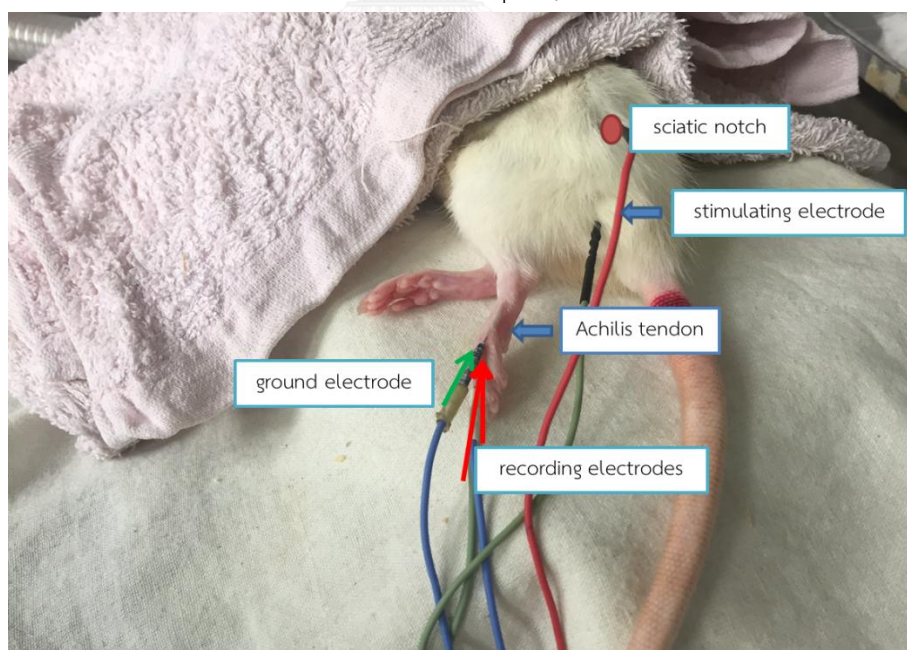
space ที่ 2 และ 3 ของเท้าด้านเดียวกัน ground electrode ถูกเสียบที่ผิวหนังด้านข้างของเท้าที่อยู่ระหว่าง stimulating และ recording electrodes โดย electrodes ทุกตัวถูกเชื่อมต่อกับเครื่อง electromyography (EMG) แล้วทำการกระตุ้นระดับ supramaximal stimulus ที่บริเวณ point 1 และ หลังจากกระตุ้น motor fiber ใน sciatic nerve แล้วกล้ามเนื้อที่ขาจะมีการกระตุกซึ่งจะบันทึกการตอบสนองได้เป็น compound muscle action potential (CMAP) ทำการกระตุ้นซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง ในหนูแต่ละตัวในเครื่อง EMG วัดระยะเวลาตั้งแต่ถูกกระตุ้นจนถึง M wave peak ของ CMAP ที่ point 1 ที่เรียกว่า latency1 (L1, รูปที่ 5) แล้วจึงย้าย stimulating electrode จากบริเวณ sciatic notch (point 1) ไปเสียบข้าง Achilles tendon (point 2, รูปที่ 4) ซึ่งอยู่ใกล้กับแขนง tibial ของ sciatic nerve ทำการทดสอบซ้ำเหมือนกับ point 1 ข้างต้นซึ่งจะได้ค่า latency2 (L2, รูปที่ 5) จากนั้นคำนวณ MNCV โดยนำระยะทางระหว่าง point 1 และ point 2หารด้วยผลต่างของ L1 กับ L2 ตามสูตรดังต่อไปนี้ (8, 9)

$$\text{MNCV (m/s)} = \frac{\text{ระยะทางระหว่าง point 1 และ point 2 (mm)}}{\text{L1 - L2 (ms)}}$$

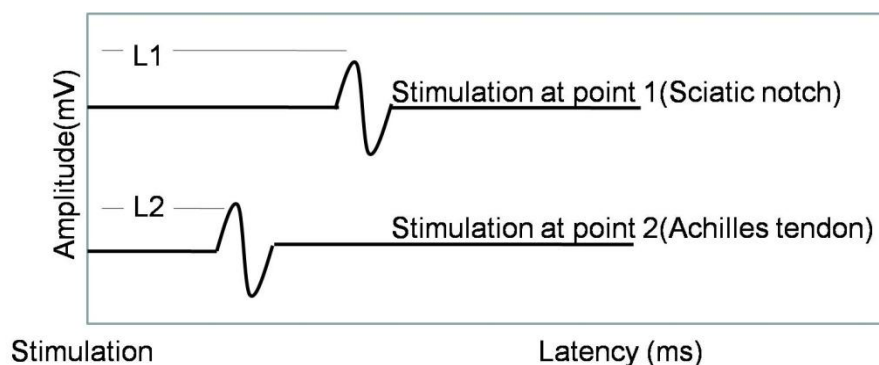
MNCV = Motor nerve conduction velocity (หน่วยเป็น m/s)

L1 = ระยะเวลาที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ point 1 (L1) (หน่วยเป็น ms)

L2 = ระยะเวลาที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นที่ point 2 (L2) (หน่วยเป็น ms)



รูปที่ 4 แสดงการวางตำแหน่งของ electrode ต่างๆ



รูปที่ 5 แสดงค่า latency (L) จาก CMAP ที่ได้จากการกระตุ้นทั้งสองตำแหน่ง

## 6. การ sacrifice หนู

โดยทำเมื่อหนูได้รับยาครบ 5 สัปดาห์แล้ว

6.1 นำหนูทุกตัวมาดม isoflurane จนหนูสลบ

6.2 แบ่งหนูกลุ่ม C และ P เป็น 3 กลุ่มย่อย (รูปที่ 5)

- **กลุ่มที่ 1** (7 ตัว) ทำ fresh removal ผ่าตัดเปิดช่องอกดูหลอดเลือดออกจากหัวใจห้องล่างขวาเพื่อให้หนูตาย กลุ่มนี้จะใช้ชิ้นเนื้อไปศึกษาาระดับโปรตีนด้วยวิธี Western blot (8)

- **กลุ่มที่ 2** (2 ตัว) ผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อทำ cardiac perfusion โดยแทงเข็มที่ต่อมาจากเครื่อง peristaltic pump เข้าที่หัวใจห้องล่างซ้ายเพื่อปั๊ม normal saline 200 ml เข้าไปในหัวใจหนูแล้วกระจายไปตามส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย และตัดหัวใจห้องบนขวาเพื่อให้เลือดไหลออกมาจากหนูหมด ตามด้วยการปั๊ม 3% glutaraldehyde ใน 2 M Cacodylate buffer pH 7.4 400 ml เข้าไป เช่นเดียวกับ normal saline กลุ่มนี้จะใช้ชิ้นเนื้อไปศึกษา เซลล์ pericyte บริเวณ DRG และ sciatic nerve ด้วย Transmission EM (TEM) (18)

- **กลุ่มที่ 3** (3 ตัว) ผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อทำ cardiac perfusion เช่นเดียวกับกลุ่มที่ 2 โดยใช้ normal saline 200 ml ตามด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) 400 ml กลุ่มนี้จะใช้ชิ้นเนื้อไปศึกษา pericyte บริเวณ DRG และ sciatic nerve ด้วยเทคนิค immunohistochemistry (8, 18)

6.3 จากนั้นผ่าเลาะเพื่อเก็บ DRG และ sciatic nerve ทั้งสองข้าง

- **กลุ่มที่1** เลาะ DRG ระดับ L4, 5 และ sciatic nerve ทันทีหลังจากหนุตาย และใส่ Eppendorf tube 2 ml แช่ในน้ำแข็งแห้ง แล้วนำไปเก็บไว้ที่ตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  (8)

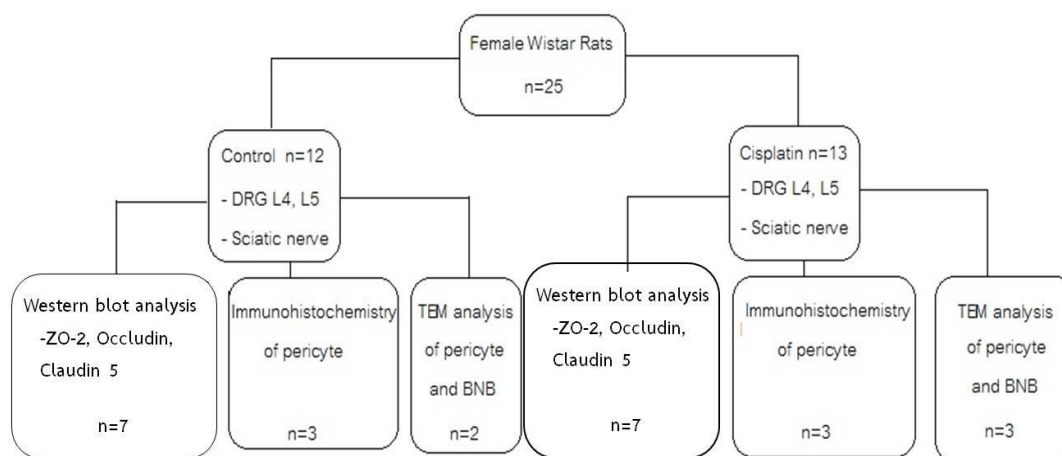
- **กลุ่มที่2** เลาะ DRG ระดับ L4, 5 และ sciatic nerve นำมาแช่ใน 3% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  1 คืน (18)

- **กลุ่มที่3** เลาะ DRG ระดับ L4,5 และ sciatic nerve นำมาแช่ใน 4% paraformaldehyde ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 1 คืน (8, 18)

6.4 กลุ่มที่2 เปลี่ยนน้ำยาแช่เป็น 0.2 M PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ซึ่งเก็บไว้จนกว่าจะเข้าสู่กระบวนการฝังใน epoxy resin (18)

6.5 กลุ่มที่3 เปลี่ยนมาแช่ใน 20% sucrose in 0.2 M PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  ซึ่งเก็บไว้จนกว่าจะเข้าสู่กระบวนการฝังใน OCT (optimal cutting temperature) medium (8, 18)

## 7. การเตรียมและวิเคราะห์ชิ้นเนื้อ



รูปที่ 6 แสดงการแบ่งกลุ่มหนูเพื่อนำชิ้นเนื้อไปศึกษาด้วยเทคนิคต่างๆ

### 7.1 Western blot analysis of DRG and sciatic nerve

#### 7.1.1 การเตรียมตัวอย่าง

-specimen ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิ  $-70^{\circ}\text{C}$  นำมา homogenize ใน homogenization solution

[0.1mmol/l PIPES Ph 6.9, 5 mmol/l sodium fluoride plus 1 mmol/l PMSF, 2 mmol/l sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail (1 µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml leuprptin, 10 µg/ml benzoyl-L-arginine methyl ester, 10 µg/ml p-tosyl-L-arginine methyl ester, 10 µg/ml L-1-tosylamide-2-phenylethylchloromethyl ketone, 10 µg/ml trypsin inhibitor and 10 µg/ml aprotin)] ด้วยเครื่อง microhomogenizer

- หลังจากนั้นเติม sample buffer (TrizmaHCl pH 6.8, bromphenol blue sodium salt, glycerol, 99% DL-Dithiothreitol, SDS and B-mercapo) ลงในแต่ละ sample
- นำไปต้มเป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้โปรตีนเกิด denaturation

### 7.1.2 Bramhall protein assay

เทคนิคนี้ใช้หลักการของ Coomassie blue ที่ไปจับกับโปรตีนใน acidic medium ซึ่งความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่างสามารถบ่งชี้ได้จากความเข้มข้นของสีและเปรียบเทียบกับโปรตีนมาตรฐาน

โดยมีขั้นตอนดังนี้

- แบ่งกระดาษกรองเป็นรูปสี่เหลี่ยม (1.5 x 1.5 cm) โดยใช้ดินสอ
- หยด Bovine serum albumin (BSA) 0.5-8 µl ซึ่งเป็นโปรตีนมาตรฐาน ลงบนกระดาษความเข้มข้นละ 3 ช่อง
- จากนั้นใส่ homogenization solution 3 µl ลงบนกระดาษ 3 ช่อง และ ใส่ตัวอย่างขนาด 3 µl ของแต่ละตัวอย่างลงบนกระดาษ 3 ช่อง
- รอให้กระดาษแห้งและนำไปจุ่มใน methanol เพื่อขจัดสารต่างๆออกจากกระดาษที่อาจจะไปขัดขวางการเกิดปฏิกิริยาการจับกับสี
- รอให้กระดาษแห้งอีกครั้ง นำมาย้อมด้วยสารละลาย Coomassie Blue 0.5% 30 นาที
- จากนั้นนำมาล้างด้วย acetic acid 7% เพื่อขจัดสีที่ไม่ได้จับกับโปรตีน แล้วปล่อยให้แห้ง
- ตัดกระดาษกรองแต่ละช่องและใส่ลงใน Eppendorf tube ขนาด 2 ml
- จากนั้นชะล้างสีที่จับกับโปรตีนโดยใส่ elute solution 1.4 ml (66% methanol, 33% distilled water and 1% ammonium hydroxide) ลงไปในแต่ละ tube
- นำแต่ละ tube ไป vortex เป็นเวลา 15 นาที ที่อุณหภูมิห้อง 2 ครั้ง
- pipette สารละลายหลังจาก vortex ใส่ใน 96-well plate 200 µl ในแต่ละช่องและใช้ plate reader อ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm จะได้ค่า optical density (OD)

- หาค่าเฉลี่ยของ OD ในแต่ละความเข้มข้นของ standard, sample และ blank จาก 3 ค่า จากนั้นหาค่า OD ของ blank ออกจากค่า OD ของทุก standard และ sample
- นำค่าของ standard ความเข้มข้นโปรตีนต่างๆมาทำเป็น standard curve
- จากนั้นคำนวณความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่างโดยการเปรียบเทียบกับ standard curve

### 7.1.3 Gel electrophoresis

เป็นกระบวนการแยกโปรตีนโดยอาศัยมวลโมเลกุลและประจุไฟฟ้า โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis) โดย pipette denature sample ลงบน stacking gel และปล่อยกระแสไฟฟ้าผ่าน 100 โวลต์ ซึ่ง stacking gel ในปริมาตรที่มีปริมาณโปรตีน 20  $\mu$  จะทำให้โปรตีนรวมเป็นแถบที่ชัดเจน ก่อนที่จะเข้าสู่ separating gel เมื่อโปรตีนเข้าสู่ separating gel จะเปลี่ยนกระแสไฟฟ้าผ่าน 150 โวลต์ จากนั้นโปรตีนที่มีประจุลบจะวิ่งจากขั้วลบไปขั้วบวก และสามารถแยกโปรตีนได้จากการเคลื่อนที่โดยขึ้นอยู่กับขนาดของ โปรตีน จากนั้นโปรตีนที่แยกได้จะถูกย้ายไปที่ nitrocellulose membrane โดยใช้ semi-dry electroblotter

### 7.1.4 Immunological detection

- นำ nitrocellulose membrane มาแช่ใน casein solution (Vector) 30 นาที เพื่อลด non-specific binding ของ primary antibody
- จากนั้นนำ nitrocellulose membrane ไป incubate ใน primary antibody [antibody ต่อ claudin-5 (1.5:1000), occludin (1.5:1000), ZO-2 (1.5:1000) และ Beta actin (1:1000) เพื่อยืนยันปริมาณโปรตีนแต่ละกลุ่ม] ที่อุณหภูมิ 4 °C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง
- นำ nitrocellulose membrane มาล้างด้วย wash buffer (Vector) 5 นาที 2 ครั้ง จากนั้นนำไป incubate ต่อใน Biotinylated secondary antibody (Vector) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
- นำ nitrocellulose membrane ไปล้างอีกครั้งด้วย wash buffer 5 นาที 2 ครั้ง
- นำไป incubate ต่อใน Avidin-biotin complex ที่มีเอนไซม์ peroxidase ติดอยู่ (Vectastain ABC kit standard, Vector) 30 นาที จากนั้นล้างด้วย wash buffer 5 นาที 2 ครั้ง
- ใส่ peroxidase substrate คือ diaminobenzidine (DAB peroxidase substrate kit, Vector) บน nitrocellulose membrane เพื่อให้แถบโปรตีนที่จำเพาะติดเป็นสีน้ำตาลเข้ม



- ล้าง nitrocellulose membrane ด้วยน้ำประปา 5 นาทีและปล่อยให้แห้ง จะได้ แลบบีน้ำตาลเข้มของโปรตีนที่สนใจบนพื้นกระดาษสีขาของ nitrocellulose membrane

### 7.1.5 Densitometric analysis

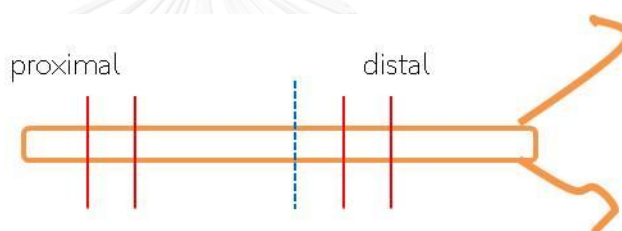
- นำ nitrocellulose membrane เข้าเครื่องสแกนและได้ภาพออกมาเป็นไฟล์ภาพและส่ง ข้อมูลเข้าไปในคอมพิวเตอร์

- วิเคราะห์ความเข้มของแถบโปรตีนที่ปรากฏด้วยโปรแกรม Image proplus

## 7.2 Immunohistochemistry for pericytes in DRG and sciatic nerve

### 7.2.1 เตรียมชิ้นเนื้อ

- นำ sciatic nerve ใน 20% sucrose มาแบ่งเป็นส่วน proximal และ distal แล้วแบ่ง ออกเป็นส่วนๆ ยาวส่วนละ 5 mm .ดังรูป



รูปที่ 7 แสดงการแบ่งเส้นประสาท sciatic เป็นส่วน proximal และ distal ตรงตำแหน่งเส้นประคือ ปริมาณกึ่งกลางความยาวของเส้นประสาท

- นำ DRG และ sciatic nerve ที่แบ่งแล้ว embed ใน OCT medium (Tissue-Tek)  
 - ตัด section DRG และ sciatic nerve แบบตามขวางด้วยความหนา 8  $\mu\text{m}$  ด้วยเครื่อง cryostat โดยเริ่มเก็บ section แรกที่เห็น axon เต็มวง fascicle จำนวน 200 section วาง บนแผ่นสไลด์ 8 section ต่อ 1 สไลด์ โดยเรียงลำดับดังนี้ สไลด์ที่เป็น section ที่ 1 11 21 31 41 51 61 71 81 สไลด์ที่ 2 เป็น section ที่ 2 22 32 42 52 62 72 82 ทำเช่นนี้จนครบ 200 section ดังรูป

SN Lt Prox	1	11	21	31
	41	51	61	71

รูปที่ 8 แสดงลำดับการเรียง section บนสไลด์

### 7.2.2 Immunohistochemistry for pericyte

นำ section มาข้อม desmin เพื่อบ่งชี้ pericyte ด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

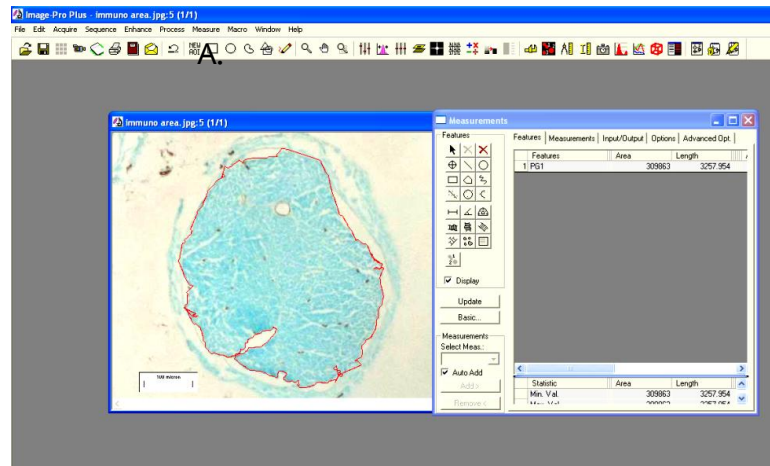
- นำสไลด์มาเป่าแห้ง 5 นาที
- ล้างด้วย phosphate-buffered saline (PBS) 5 นาที 3 ครั้ง
- นำสไลด์ที่ได้มา incubate ด้วย 2% normal goat serum (1:50) ใน PBS เป็นเวลา 20 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C
- หลังจากนั้นทำการล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้งและใส่ primary antibody ซึ่งเป็น marker สำหรับ pericyte คือ anti-human desmin rabbit polyclonal antibody (1:1000 Abcam) ที่งัว 1 คืน ที่อุณหภูมิห้อง
- ล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง
- จากนั้นนำไป incubate ต่อใน Biotinylated anti rabbit IgG (goat) secondary antibody [1:150 (Vector)] เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 30°C
- ล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง
- นำไป incubate ต่อใน Avidin-biotin complex ที่มีเอนไซม์ peroxidase ติดอยู่ (Vectastain ABC kit standard, Vector) 30 นาที จากนั้นล้างด้วย PBS 5 นาที 3 ครั้ง
- นำไป incubate ใน peroxidase substrate คือ diaminobenzidine (DAB peroxidase substrate) จนเห็นสัญญาณการติดสี DAB ของเซลล์ pericyte และหยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น
- counterstain เยื่อ myelin ด้วย luxol fast blue จากนั้น mount slide ด้วย aqua mount และปิดด้วย coverslip แล้วนำไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์

### 7.2.3 Quantitative analysis

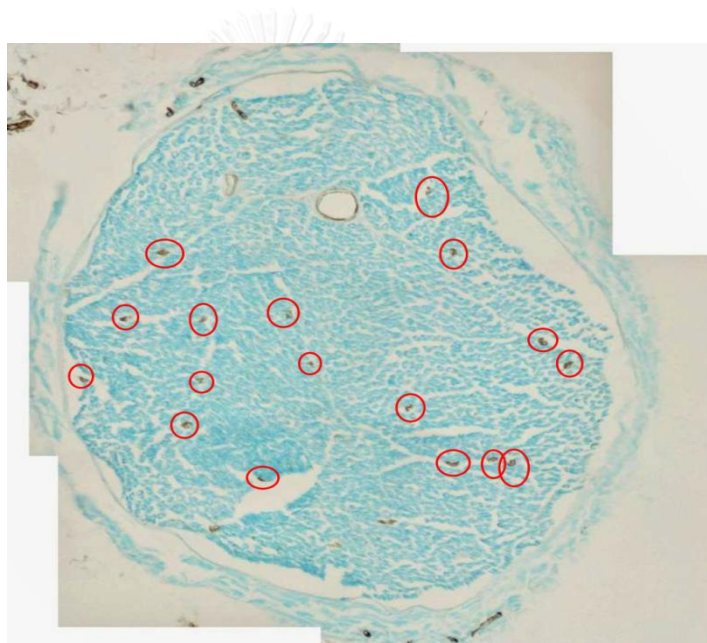
- สุ่มเลือก section ที่จะหาความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ที่ย้อมติด desmin โดยเลือกจากสไลด์ในช่วงอันดับเลขคณิตเดียวกันเช่น 5, 15, 25, 105,... เป็นต้น จำนวน 20 section ซึ่งแต่ละ section จะห่างกัน 10 section เพื่อป้องกันการนับเซลล์ pericyte ซ้ำเซลล์เดียวกัน
- เก็บภาพจากกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X เพื่อคำนวณพื้นที่ของ axon ทั้งหมดในแต่ละ fascicle ด้วยโปรแกรม Image pro plus และเก็บภาพที่กำลังขยาย 20x เพื่อนับจำนวนเซลล์ pericyte ที่ย้อมติด desmin นำภาพที่เก็บได้ทั้ง 2 กลุ่มมานับจำนวน pericyte ที่ย้อมติด desmin ด้วยโปรแกรม Photoshop โดยจะนับลักษณะที่ positive ต่อ desmin และเห็นเป็นสีน้ำตาล มีลักษณะเป็นหลอดเลือดขนาดเล็กที่มีผนังบาง จาก section ที่สุ่มเลือกทั้งหมด โดยจะทำเครื่องหมาย O ล้อมรอบเซลล์ pericyte ที่นับ จากนั้นนำค่าที่นับได้ไปหาความหนาแน่นตามสูตรดังนี้

$$\text{ความหนาแน่นเซลล์ pericyte} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ pericyte (เซลล์)}}{\text{พื้นที่ axon (ตารางไมครอน)}}$$

A.



B.



รูปที่ 9 รูปแสดง morphometry ของ sciatic nerve เพื่อหาความหนาแน่นของ pericyte

A: รูปแสดงการลากเส้นเพื่อคำนวณพื้นที่ axon ของ sciatic nerve จากโปรแกรม Image Pro Plus

B: รูปแสดงการนับเซลล์ pericyte บน sciatic nerve ด้วยโปรแกรม Photoshop

### 7.3 TEM study of pericyte and BNB

#### 7.3.1 การฝังชิ้นเนื้อใน epoxy resin

นำ sciatic nerve ที่แบ่งเป็นส่วน proximal และ distal มาตัดแบ่งเป็นท่อนสั้นๆ ยาวท่อนละ 1 มิลลิเมตร ส่วน DRG นำมาแบ่งครึ่งและเข้าสู่กระบวนการฝังใน epoxy resin ด้วยขั้นตอนดังนี้

- แช่ใน 3% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง แล้วล้างด้วยล้างด้วย 0.1 M Cacodylate buffer pH 7.4 บนเครื่องเขย่า 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

- จากนั้นทำ post-fixation ด้วย 1% Osmium tetra oxide บนเครื่องเขย่าเป็นเวลา 2 ชั่วโมง

- ล้างออกด้วยน้ำกลั่นเย็นที่ใส่น้ำแข็ง

- ต่อด้วยการทำ dehydration ด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูง (50%-100% ethanol)

- ตามด้วยการ clearing ใน propylene oxide 5 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

- จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ infiltration ด้วย Propylene oxide: Epon mixture และแช่ไว้

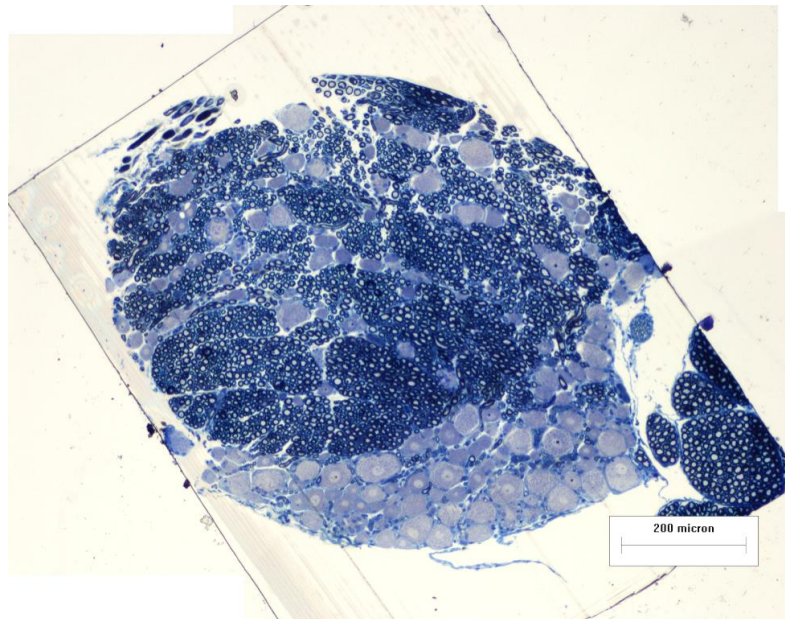
1 คืน

- หลังจากนั้นทำ infiltration ต่อด้วย epon mixture 100% อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงฝังชิ้นเนื้อลงในแม่พิมพ์ที่มี epon mixture 100% บรรจุอยู่ นำไปเข้าตูอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วจึงนำ epon resin block ออกมาจากแม่พิมพ์ เพื่อเตรียมนำมาตัดชิ้นเนื้อต่อไป

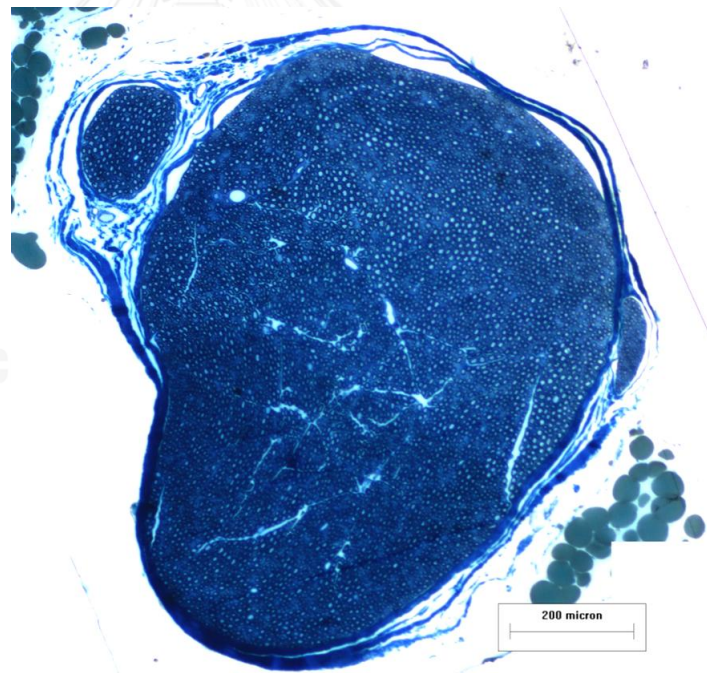
#### 7.3.2 การศึกษาโครงสร้างของ pericyte ใน DRG และ sciatic nerve

นำชิ้นเนื้อ sciatic nerve และ DRG ที่ฝังใน epon resin block มาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome โดยใช้มีดแก้วตัดแบบ semithin หนา 2  $\mu\text{m}$  แล้วทำการย้อมด้วย toluidine blue ซึ่งจะติดสีฟ้าที่ cytoplasm และสีน้ำเงินเข้มที่ nucleolus ของเซลล์ประสาทใน DRG และติดสีน้ำเงินที่เยื่อหุ้ม myelin ในเส้นประสาท sciatic เพื่อตรวจสอบดูลักษณะและคุณภาพของ section เบื้องต้น (รูปที่ 9) จากนั้นเปลี่ยนมาใช้มีดเพชรตัดให้มีความหนา 70 nm

A.



B



รูปที่ 10 semithin section ก่อนตัดด้วยมีดเพชร A: DRG B: sciatic nerve

- จากนั้นทำการย้อมด้วย 2% uranyl acetate เป็นเวลา 30 นาที
- ล้างออกด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้ง ใช้กระดาษกรองซับน้ำให้แห้ง
- นำมาย้อมต่อด้วย lead citrate เป็นเวลา 30 นาที
- ล้างออกด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง 3 ครั้ง ใช้กระดาษกรองซับน้ำให้แห้ง
- นำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน(TEM) (JEM-1400 plus, JEOL USA) เพื่อศึกษาโครงสร้างของ pericyte และ BNB ใน DRG และ sciatic nerve

### 8. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของน้ำหนักหนู ,latency จาก hot plate test, ค่า MNCV , ค่าความเข้มของแถบโปรตีนclaudin-5, occluding และ ZO-2ความหนาแน่นของ pericyte ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม cisplatin ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ student's *t* - test ในกรณีที่ข้อมูลมีการกระจายตัวปกติ หรือใช้ Mann-Whitney U test กรณีที่ข้อมูลมีการกระจายตัวแบบไม่ปกติโดยถือความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p \leq 0.05$  โดยทำการวิเคราะห์สถิติด้วยโปรแกรม SPSS version 20 ส่วนข้อมูล ลักษณะของ pericyte รวมทั้ง basement membrane ทั้งใน DRG และ sciatic nerve ใน TEM จะทำการเปรียบเทียบเชิงคุณภาพระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่ม cisplatin

### 9. จริยธรรม (Ethical consideration)

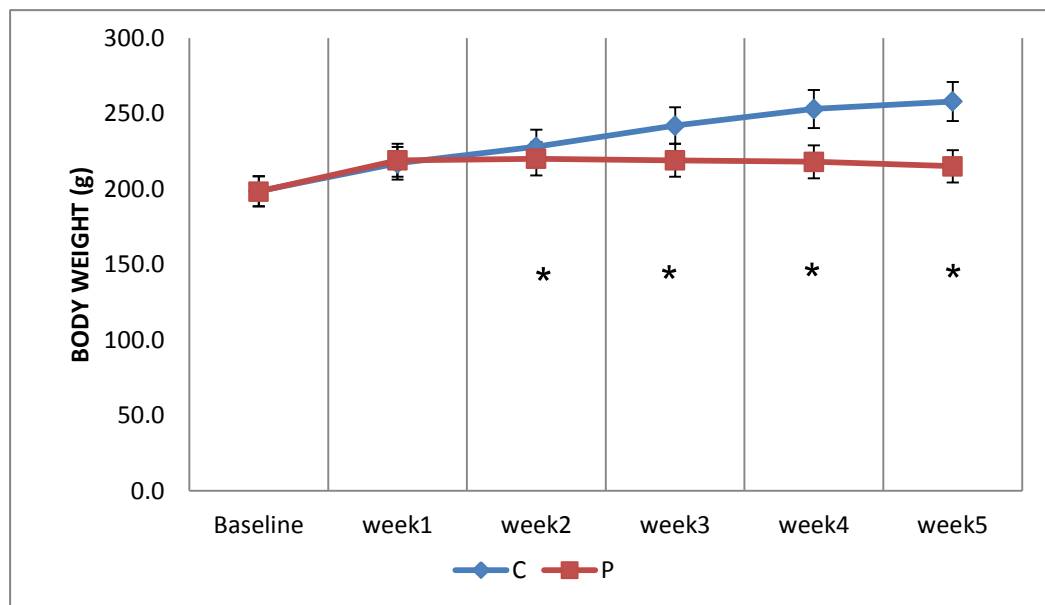
โครงการนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนเริ่มดำเนินการวิจัยในสัตว์ เลขที่โครงการ 19/58 และผู้วิจัยได้ทำตามจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

## บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

### การทดลอง

#### 1. น้ำหนักตัวหนู

น้ำหนักตัวหนูตลอดระยะเวลาการทดลอง ในกลุ่มควบคุมและ กลุ่ม cisplatin แสดงในรูปที่ 11 ซึ่ง baseline น้ำหนักตัวหนูทั้งสองกลุ่มไม่ต่างกัน จนสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 5 จะเห็นว่าน้ำหนักของหนูกลุ่มควบคุมมีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่กลุ่ม cisplatin มีค่าลดลงซึ่งน้อยกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า cisplatin มีผลทำให้น้ำหนักตัวหนูลดลง



รูปที่ 11 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทั้งสองกลุ่มตลอดการทดลอง  
ค่าที่แสดงเป็น mean  $\pm$  SEM, \*  $p < 0.05$  C vs. P

#### 2. การวัดการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหนูด้วย hot plate test

ผลการทดสอบได้ค่า thermal threshold ของหนูตลอดการทดลอง ในกลุ่มควบคุมและ cisplatin แสดงในตารางที่ 1 พบว่าการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหลังของหนูในช่วง baseline ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในช่วงระหว่างการทดลองในสัปดาห์ที่ 3 พบว่าค่า thermal threshold ของกลุ่ม cisplatin มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อสิ้นสุดการ



ทดลองพบว่าค่า thermal threshold ของกลุ่ม cisplatin มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า cisplatin มีผลทำให้เกิดการสูญเสียต่อการรับรู้สึกร้อนที่เท้าหลังของหนู

**ตารางที่ 1** แสดงค่า thermal threshold ที่เท้าหลังของหนู

Group	Thermal latency (Sec.)		
	Baseline	Week 3	Week 5
Control (C)	19.0 ± 1.2	17.3 ± 1.0	15.0 ± 1.1
Cisplatin(P)	16.5 ± 1.2	20.8 ± 1.0 <sup>*</sup>	18.5 ± 1.0 <sup>*</sup>

โดย<sup>\*</sup> คือ  $p < 0.05$  ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

### 3. การวัดความเร็วการนำกระแสประสาทที่เส้นประสาท sciatic

ค่า sciatic motor NCV ของหนูสองกลุ่ม แสดงในตารางที่ 2 พบว่าในช่วงสิ้นสุดการทดลอง MNCV ของกลุ่ม cisplatin มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติสรุปได้ว่า cisplatin มีผลทำให้ค่า motor NCV ของเส้นประสาท sciatic ลดลง

**ตารางที่ 2** แสดงค่า sciatic motor NCV ของหนูหลังสิ้นสุดการทดลอง

Group	Sciatic motor NCV(m/s)
Control (C)	77.4 ± 3.8
Cisplatin(P)	52.3 ± 2.9 <sup>๑</sup>

โดย<sup>๑</sup> คือ  $p < 0.01$ ค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

### 4. การหาค่าความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ในเส้นประสาท sciatic

จากการนับจำนวน pericyte ที่ติดสีน้ำตาลเข้มจากการทำ immunohistochemistry ต่อ desmin โดยนับเฉพาะ object ที่เข้าได้กับรูปร่างของ pericyte เท่านั้นซึ่งระบุได้จากตำแหน่งที่อยู่รอบ capillary และเห็นลักษณะเป็นผนังบางขนาดเล็ก ทั้งนี้ไม่นับสีน้ำตาลที่อยู่รอบ arteriole/venule เนื่องจากบริเวณนั้นเซลล์ที่ positive ต่อ desmin เป็น smooth muscle (รูปที่ 13) และเมื่อนำจำนวนที่นับได้ไปหารด้วยพื้นที่หน้าตัดของเส้นประสาทจะได้ค่าความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ของหนูทั้งสองกลุ่ม ในส่วนต้นและส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic แสดงในตาราง

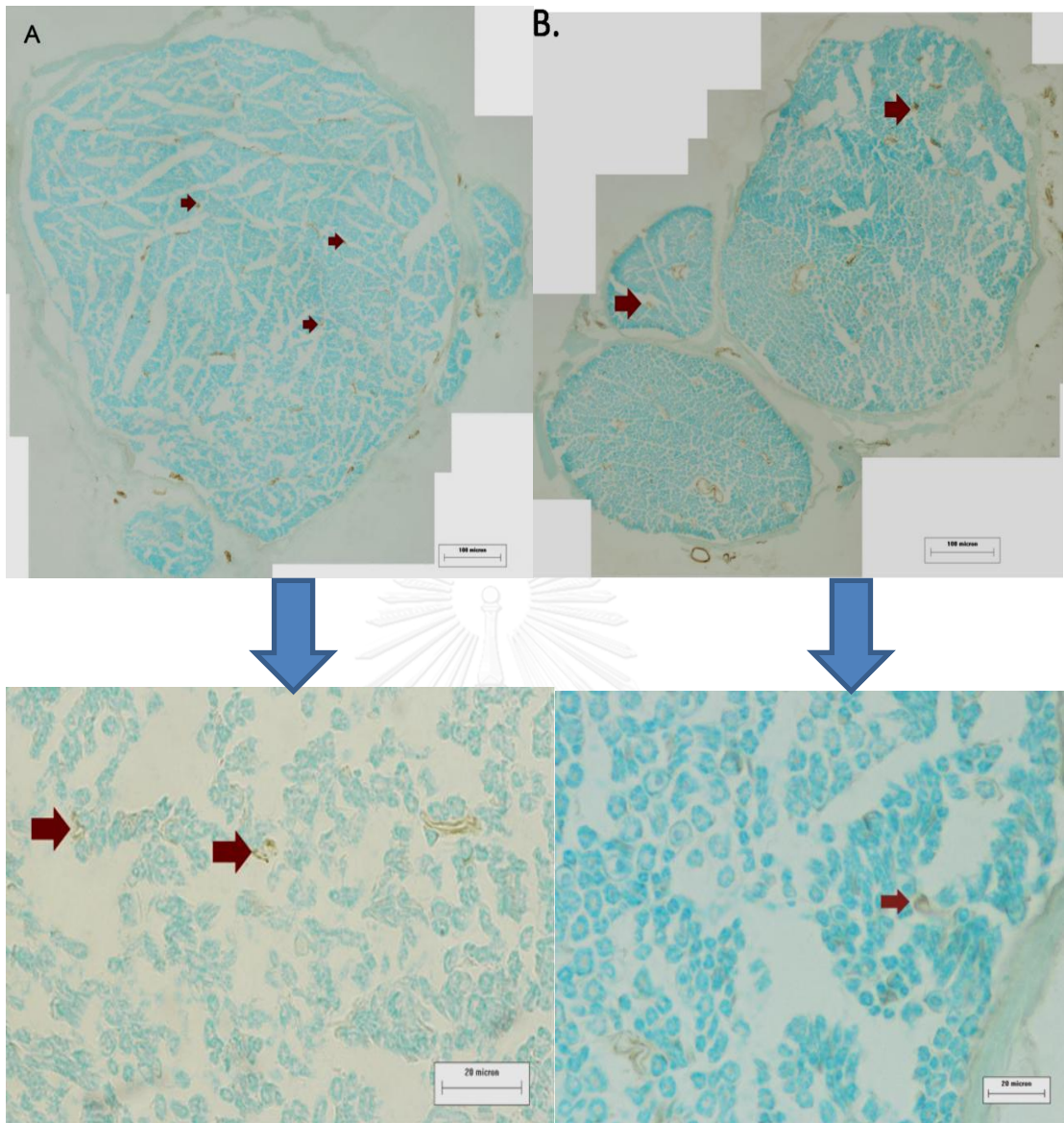
ที่ 3 พบว่า ความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ที่ส่วนต้นของเส้นประสาท sciatic ในกลุ่มควบคุม มีค่ามากกว่ากลุ่ม cisplatin เล็กน้อยและในส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic ความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ในกลุ่มควบคุมมีค่ามากกว่ากลุ่ม cisplatin อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

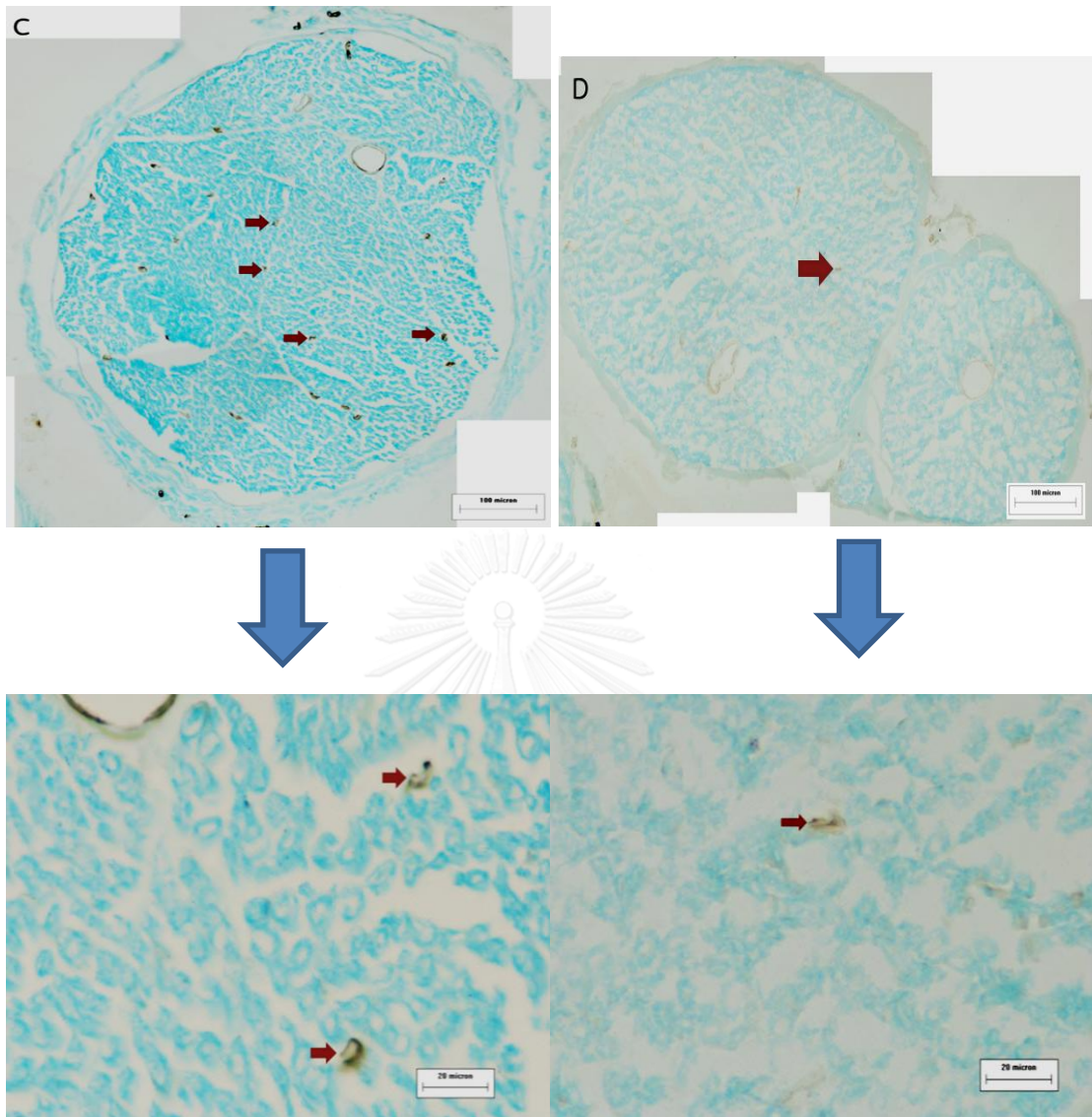
ทั้งนี้ไม่สามารถหาความหนาแน่นของ pericyte ในบริเวณ DRG ได้เนื่องจากพบแต่สีน้ำตาลรอบ arteriole/venule ซึ่งเซลล์เหล่านั้นเป็น smooth muscle ไม่ใช่ pericyte จึงไม่ได้ทำการนับเพื่อหาความหนาแน่น (รูปที่ 13)

ตารางที่ 3 แสดงค่าความหนาแน่นของเซลล์ pericyte ในเส้นประสาท sciatic

Part of sciatic nerve	Density of pericyte (number/mm <sup>2</sup> )	
	Control (C)	Cisplatin(P)
Proximal	41.41 ± 1.56	33.37 ± 3.79
Distal	64.54 ± 5.59	32.86 ± 4.53 <sup>a</sup>

โดย <sup>a</sup> คือ  $p < 0.05$  vs. distal control ค่าที่แสดงเป็น mean ± SEM

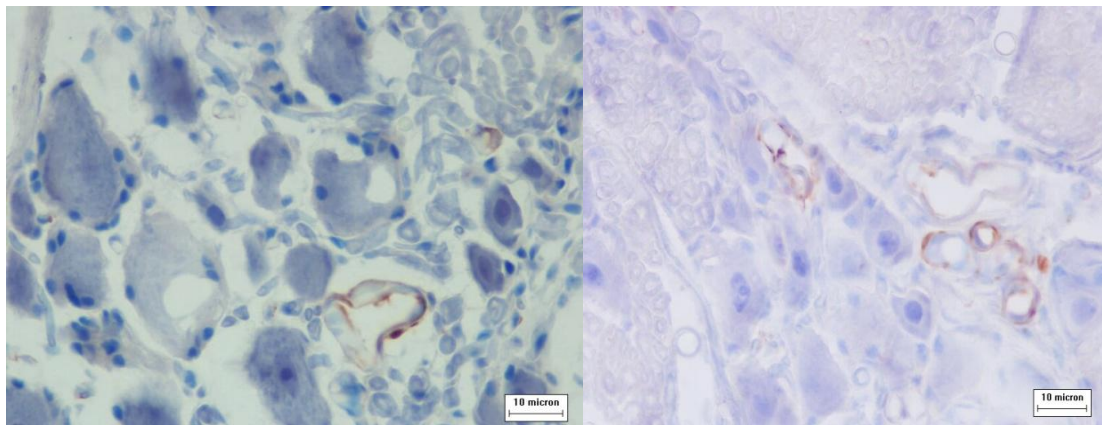




รูปที่ 12 A เส้นประสาท sciatic ส่วนต้น กลุ่ม control ลูกศรแสดง pericyte ที่แสดงออก desmin  
 B เส้นประสาท sciatic ส่วนต้น กลุ่ม cisplatin ลูกศรแสดง pericyte ที่แสดงออก desmin  
 C เส้นประสาท sciatic ส่วนปลาย กลุ่ม control ลูกศรแสดง pericyte ที่แสดงออก desmin  
 D เส้นประสาท sciatic ส่วนปลาย กลุ่ม cisplatin ลูกศรแสดง pericyte ที่แสดงออก desmin (ลูกศรสีแดงแสดง pericyte ที่ติดสีน้ำตาลเข้ม)

A.

B.

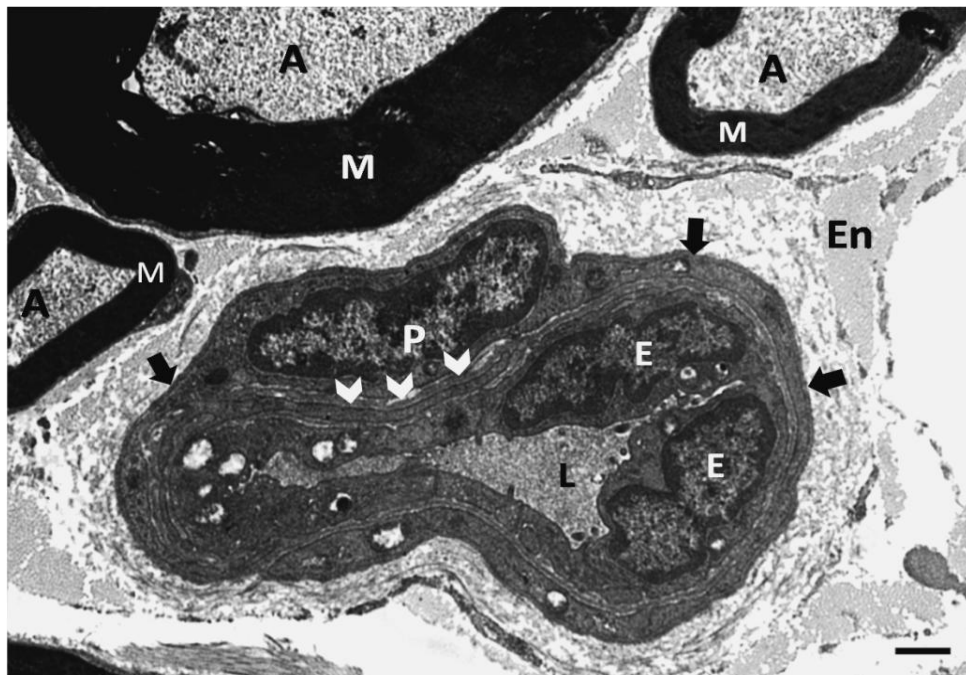


รูปที่ 13 A DRG กลุ่ม control, B DRG กลุ่ม cisplatin เซลล์ที่ positive ต่อ desmin ติดสีน้ำตาล แต่แยกได้ไม่ชัดเจนระหว่าง smooth muscle cell และ pericyte

#### 5. การศึกษาโครงสร้างของเซลล์ pericyte ในเส้นประสาท sciatic และ DRG ในระดับ L4 (pericyte morphology)

การศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์ pericyte บริเวณเส้นประสาท sciatic ส่วนต้น ส่วนปลาย และ DRG ด้วยกล้อง TEM โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่ม cisplatin พบว่า เซลล์ pericyte จะอยู่บริเวณใกล้กับผนังหลอดเลือด capillary ซึ่งเซลล์ pericyte บริเวณเส้นประสาท sciatic มีลักษณะดังนี้

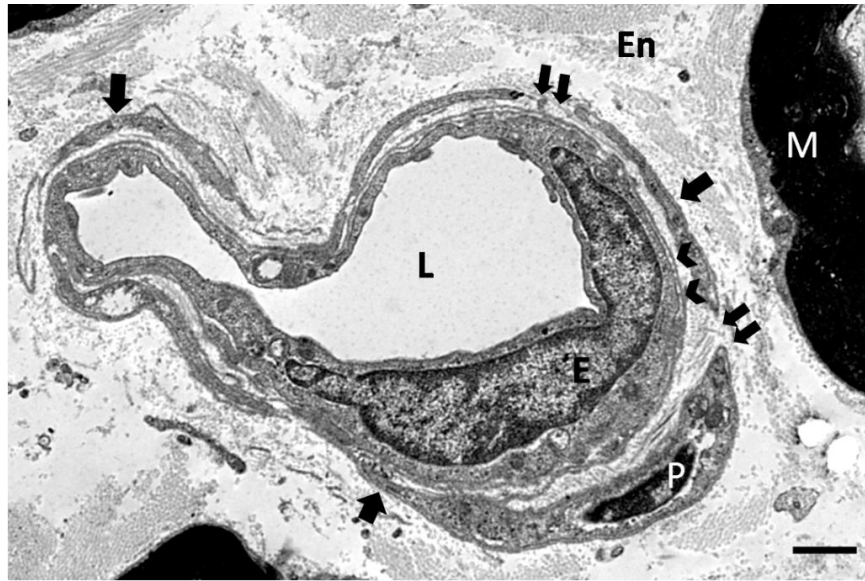
- กลุ่ม control บริเวณเส้นประสาท sciatic ส่วนต้น cytoplasmic process ของ เซลล์ pericyte โอบแนบติดกับหลอดเลือดชัดเจน และเซลล์ pericyte มี basement membrane ร่วมกับ endothelial cell (รูปที่ 14)



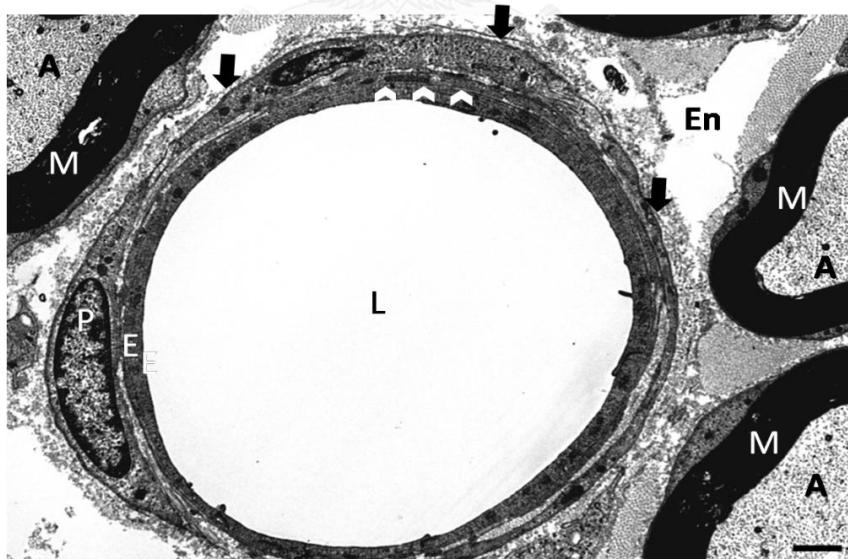
รูปที่ 14 เส้นประสาท sciatic ส่วนต้น กลุ่มควบคุม (P=pericyte, E=endothelial cell, L=lumen, A=axon, M=myelin sheath, En=endoneurium, หัวลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte ที่ร่วมกับ endothelial cell, ลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte (scale bar= 1  $\mu$ m))

-กลุ่ม cisplatin บริเวณเส้นประสาท sciatic ส่วนต้น (รูปที่ 15) cytoplasmic process ของ เซลล์ pericyte ไม่แนบติดกับ endothelial cell เห็นเป็นช่องว่างระหว่าง เซลล์ pericyte และ Endothelial cell และพบว่า basement membrane ของ pericyte ไม่ต่อเนื่องเสียหายไปในบางส่วน

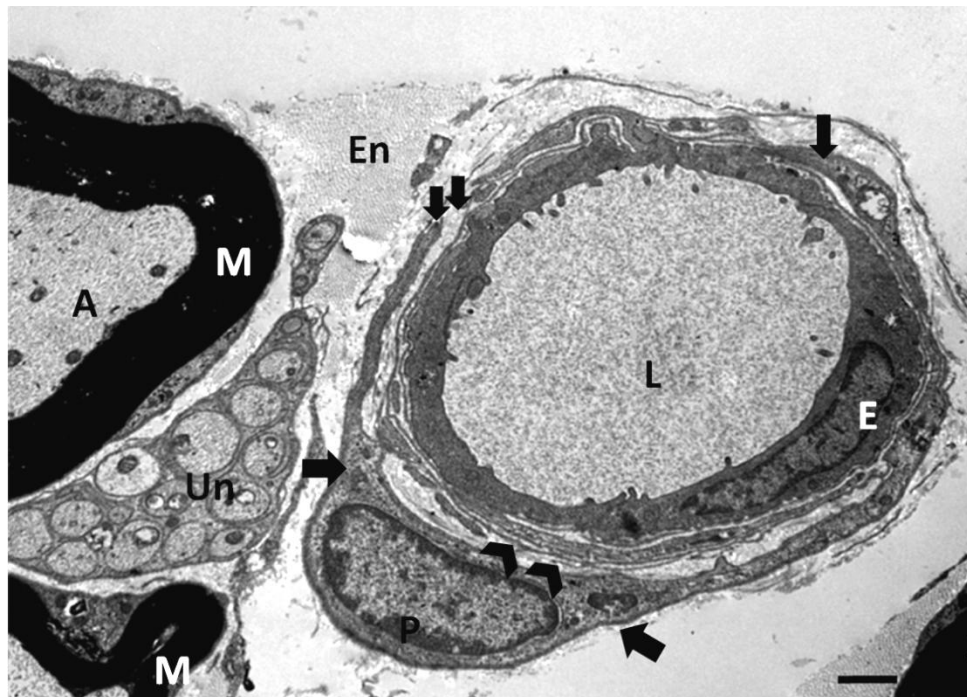
ส่วนบริเวณเส้นประสาท sciatic ส่วนปลาย พบความแตกต่างของทั้งสองกลุ่ม เช่นเดียวกับส่วนต้น (รูปที่ 16,17)



รูปที่ 15 เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นของกลุ่ม cisplatin (P=pericyte, E=endothelial cell, L=lumen, M=myelin sheath, En=endoneurium, หัวลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte ที่แยกจาก endothelial cell, ลูกศรหนึ่งดอกแสดง basement membrane ของ pericyte, ลูกศรสองดอกแสดง basement membrane ของ pericyte ที่หายไป (scale bar 1  $\mu\text{m}$ .)



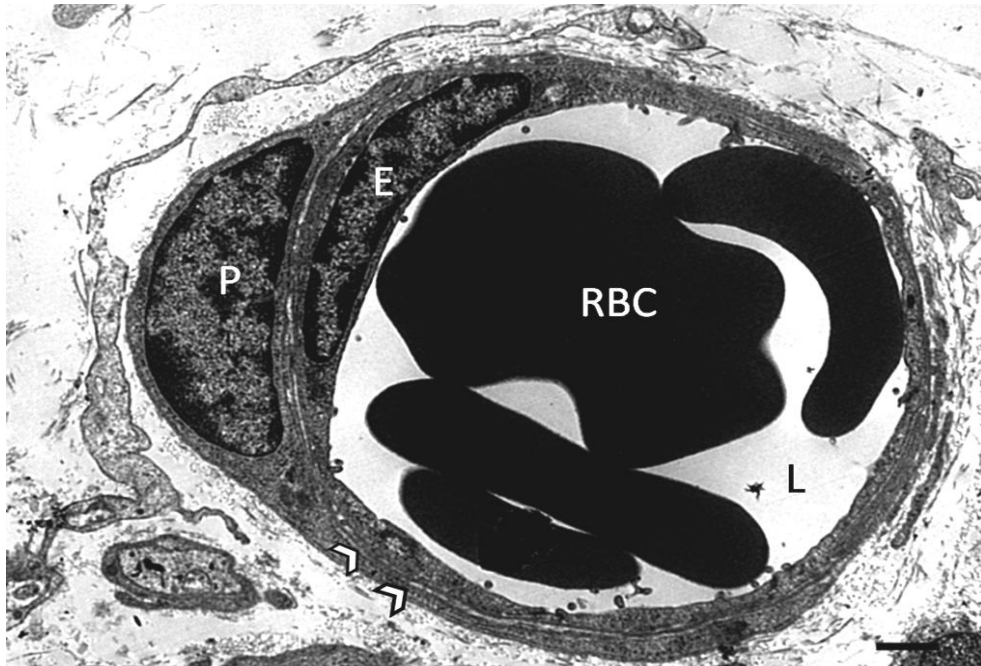
รูปที่ 16 เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายของกลุ่มควบคุม (P=pericyte, E=endothelial cell, L=lumen, A=axon, M=myelin sheath, En=endoneurium, หัวลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte ที่ร่วมกับ endothelial cell, ลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte (scale bar 1  $\mu\text{m}$ .)



รูปที่ 17 เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายของกลุ่ม cisplatin (P=pericyte, E=endothelial cell, L=lumen, A=axon, M=myelin sheath, En=endoneurium, Un= group of unmyelinated fibers, หัวลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte ที่แยกจาก endothelial cell, ลูกศรหนึ่งดอกแสดง basement membrane ของ pericyte, ลูกศรสองดอกแสดง basement membrane ของ pericyte ที่หายไป (scale bar 1  $\mu$ m.))

ส่วนบริเวณ DRG พบว่า ในกลุ่มควบคุม pericyte มี basement membrane ร่วมกับ endothelial cell โดย basement membrane แนบติดกับ Endothelial cell (รูปที่ 18) ส่วนในกลุ่ม cisplatin cytoplasmic process ของเซลล์ pericyte แนบติดกับ Endothelial cell ไม่เห็นเป็น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 19)





รูปที่ 18 DRG กลุ่มควบคุม (P=pericyte, E=endothelial cell, L=lumen, RBC=red blood cell, หัวลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte ที่ร่วมกับ endothelial cell (scale bar 1  $\mu$ m) )

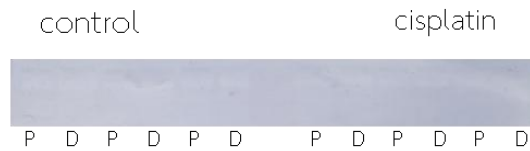


รูปที่ 19 DRG กลุ่ม cisplatin (P=pericyte, E=endothelial cell, L=lumen, A=axon, M=myelin sheath, หัวลูกศรแสดง basement membrane ของ pericyte ที่ร่วมกับ endothelial cell (scale bar 1  $\mu$ m) )

## 6. การศึกษาปริมาณโปรตีนของ blood nerve-barrier ในเส้นประสาท sciatic และDRG

- โปรตีนของ blood nerve-barrier ในเส้นประสาท sciatic

ผลการศึกษาไม่พบแถบของโปรตีน occludin และ claudin-5 ในทั้ง 2 กลุ่ม

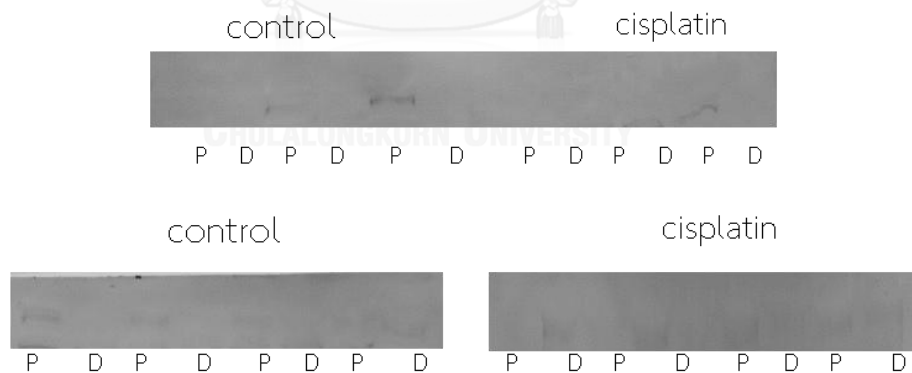


รูปที่ 20 แสดงระดับโปรตีน occludin ของเส้นประสาท sciatic (P=proximal sciatic nerve, D=distal sciatic nerve)



รูปที่ 21 แสดงระดับโปรตีน claudin-5 ของเส้นประสาท sciatic (P=proximal sciatic nerve, D=distal sciatic nerve)

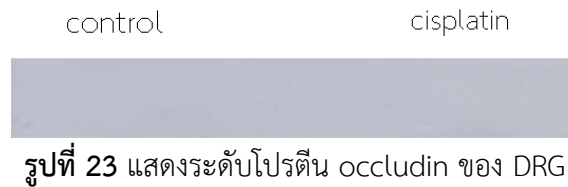
ส่วนโปรตีน ZO-2 พบแถบจางๆ ในกลุ่มควบคุมในส่วนต้นของเส้นประสาท sciatic แต่แทบไม่เห็นเลยในกลุ่ม cisplatin ดังนั้นปริมาณโปรตีนในกลุ่ม cisplatin มีแนวโน้มที่จะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ทั้งนี้แถบจางจนไม่สามารถวิเคราะห์ภาพเป็นตัวเลขได้



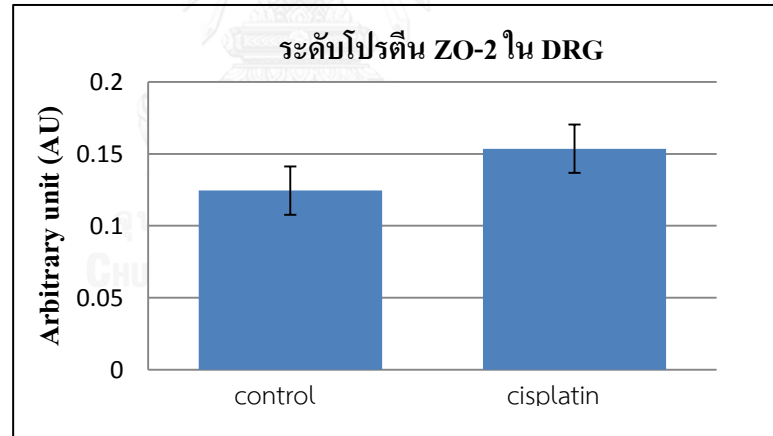
รูปที่ 22 แสดงระดับโปรตีน ZO-2 ของเส้นประสาท sciatic (P=proximal sciatic nerve, D=distal sciatic nerve)

- โปรตีนของ blood nerve-barrier ใน DRG

ผลการศึกษาไม่พบแถบของโปรตีน occludin และ claudin-5 ใน DRG ในทั้ง 2 กลุ่ม

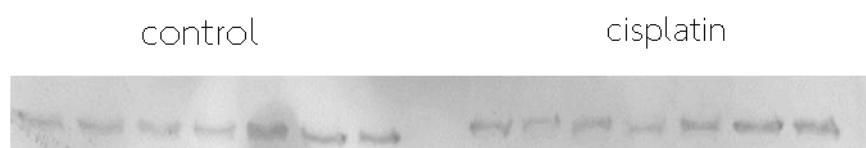


ส่วนการแสดงออกของโปรตีน ZO-2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ระหว่าง 2 กลุ่ม

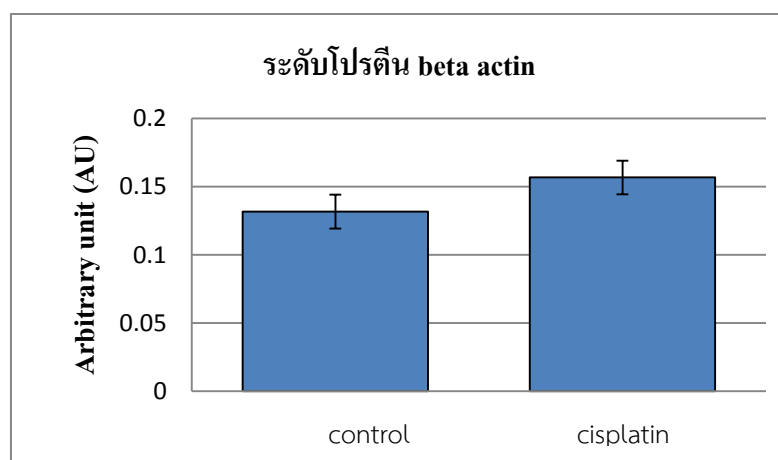


**รูปที่ 26** แสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$ SEM ของระดับโปรตีน ZO-2 ใน DRG

นอกจากนี้ได้ทดสอบว่าปริมาณโปรตีนของแต่ละ sample ที่ใช้นั้นมีปริมาณไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ โดยดูปริมาณโปรตีน beta actin (รูปที่ 23 และ 24) ซึ่งพบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างสองกลุ่มจริง



**รูปที่ 27** แสดงระดับโปรตีน beta actin



รูปที่ 28 แสดงค่าเฉลี่ย  $\pm$ SEM ของระดับโปรตีน beta actin

### สรุปผลการเปลี่ยนแปลงทั้งหมด

ผลการศึกษาพบว่า cisplatin ทำให้น้ำหนักตัวหนูการรับรู้ต่อการรับความรู้สึกร้อน และความเร็วในการนำกระแสประสาท motor ของเส้นประสาท sciatic ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงถึงภาวะ neuropathy จาก cisplatin

การศึกษาด้วย immunohistochemistry ของเส้นประสาท sciatic พบว่าความหนาแน่นของ pericyte บริเวณส่วนปลายของของเส้นประสาท sciatic ในกลุ่ม cisplatin ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุม

การศึกษาโครงสร้างของ pericyte ด้วย TEM พบว่า cytoplasmic process ของ pericyte บริเวณเส้นประสาท sciatic ในกลุ่ม cisplatin แยกออกมาจาก endothelial cell ร่วมกับ basement membrane หายไปในบางส่วน แต่ใน DRG ลักษณะของ pericyte ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม

การศึกษาระดับโปรตีนของ BNB บริเวณเส้นประสาท sciatic ด้วยวิธี Western blot พบว่าการแสดงออกของโปรตีน ZO-2 ในเส้นประสาทของกลุ่มที่ได้รับ cisplatin มีแนวโน้มที่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม ควบคุม และพบว่าในส่วนต้นของเส้นประสาท sciatic พบแทบโปรตีนที่ชัดเจนกว่าส่วนปลายในกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างกันใน DRG ส่วนโปรตีนของ BNB อื่นๆ คือ occludin และ claudin-5 ไม่พบแถบโปรตีนทั้งในเส้นประสาทและ DRG

## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัยอภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

ยา cisplatin ที่ใช้รักษามะเร็งทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนปลายการศึกษานี้ต้องการดูผลของ cisplatin ขนาดสะสม 20 mg/kg ในระยะเวลา 5 สัปดาห์ต่อการเปลี่ยนแปลงของ pericyte และ BNB ของระบบประสาทส่วนปลายของหนู

จากผลการทดลองแสดงว่าน้ำหนักของหนูที่ได้รับ cisplatin ลดลงเมื่อเทียบกับหนูควบคุมซึ่งแสดงถึงภาวะ general toxicity ทำให้หนูที่ได้รับ cisplatin กินอาหารได้น้อยลงน้ำหนักจึงลดลงและสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ (4-9, 49) สำหรับการรับความรู้สึกร้อนที่ฝ่าเท้าหลังของหนูพบว่า cisplatin ทำให้การรับความรู้สึกร้อนช้าลงจากการที่ค่า Thermal latency เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยเห็นได้ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 3 หลังจากที่ได้รับ cisplatin ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า (4-9, 49) ในการทดลองวัดความเร็วการนำกระแสประสาท motor (MNCV) ที่เส้นประสาท sciatic พบว่า cisplatin มีผลทำให้ค่า MNCV ลดลงซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า cisplatin ทำให้ค่า MNCV ลดลงในกรณีที่ใช้ปริมาณยา cisplatin ที่สูงเช่นเดียวกับการศึกษานี้ (8, 9, 49) สรุปได้ว่า cisplatin ทำให้เกิด neuropathy ขึ้นจริง

จากการทำ immunohistochemistry ต่อ desmin เพื่อหาค่าความหนาแน่นของ pericyte ของหนูทั้งสองกลุ่มในส่วนต้นและส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic พบว่าความหนาแน่นของ pericyte ที่ส่วนต้นของเส้นประสาท sciatic ในกลุ่ม cisplatin น้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย และในส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic ความหนาแน่นของ pericyte ในกลุ่ม cisplatin มีค่าน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติการลดลงของ pericyte นี้จะแสดงถึงผลเสียของ cisplatin ต่อ pericyte ซึ่งมีแนวโน้มคล้ายกับการศึกษาของ Giannini และคณะปี 1995 (15) พบว่าในผู้ป่วยที่เป็นโรคเส้นประสาทเสื่อมจากเบาหวาน (diabetic neuropathy) พบว่า pericyte บริเวณเส้นประสาท sural ลดลงหรือหายไป นอกจากนี้การที่ความหนาแน่นของ pericyte ส่วนปลายของเส้นประสาทน้อยกว่าส่วนต้นสอดคล้องกับการเกิดภาวะ neuropathy ที่จะเกิดกับส่วนปลายเร็วกว่าส่วนต้น (51) และจากการหายไปของ pericyte น่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ BNB เนื่องจากโครงสร้างนี้เกิดขึ้นจากการทำงานร่วมกันของ pericyte และ endothelial cell หากมีความผิดปกติ เช่น การหายไปของเซลล์ใดเซลล์หนึ่ง ซึ่งในกรณีนี้คือ pericyte ย่อมส่งผลต่อการทำงานของ BNB ดังนั้นผลการศึกษาค่าความหนาแน่นของ pericyte บ่งชี้ว่าน่าจะมีการผิดปกติกับ BNB ซึ่งเกิดจากการลดลงของจำนวน pericyte รอบหลอดเลือดขนาดเล็ก โดยเฉพาะในส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic ของหนูที่ได้รับ cisplatin ส่วนในบริเวณ DRG ไม่สามารถหาค่าความหนาแน่นของ

pericyte ได้เนื่องจากพบเซลล์ที่ positive รอบ arteriole/venule ซึ่งเซลล์บริเวณนั้นอาจเป็น smooth muscle ทั้งสองกลุ่มจึงไม่ได้ทำการหาความหนาแน่นของบริเวณนี้ต่อ

การศึกษาลักษณะโครงสร้างของ pericyte บริเวณเส้นประสาท sciatic ส่วนต้น ส่วนปลาย และ DRG ด้วยกล้อง TEM โดยทำการเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และ กลุ่ม cisplatin พบว่า เซลล์ pericyte ของกลุ่มควบคุมจะอยู่บริเวณใกล้กับผนังหลอดเลือด capillary ส่วนเซลล์ pericyte บริเวณเส้นประสาท sciatic ทั้งส่วนต้นและส่วนปลายของกลุ่ม cisplatin cytoplasmic process ของ pericyte ไม่แนบติดกับ endothelial cell เห็นเป็นช่องว่างระหว่าง pericyte และ endothelial cell และพบว่า basement membrane ของ pericyte เสียหายไปในบางส่วน ซึ่งภาวะปกติ pericyte จะวางตัวชิดกับผนังด้านนอกของหลอดเลือด เซลล์มีแขนงแตกออกมาจากตัว เซลล์ และแขนงเหล่านี้เป็นส่วนที่ทำหน้าที่โอบล้อมหลอดเลือดไว้ (17) เหมือนกับลักษณะที่พบในกลุ่มควบคุม ส่วนลักษณะที่สังเกตได้ในกลุ่ม cisplatin แสดงถึงการเกิดพยาธิสภาพกับเซลล์ pericyte และเหมือนกับการศึกษาของ Shi ปี 2009(21) ที่พบว่า pericyte ที่มีลักษณะผิดปกติจะอยู่อย่างหลวมๆ กับ endothelial cell และเกิดเป็นช่องว่างระหว่าง 2 เซลล์ในบางส่วน นอกจากนั้น การศึกษาก่อนที่ได้ศึกษาผลเสียของการใช้ยา cisplatin พบว่า cisplatin เป็นพิษต่อ endothelial cell ซึ่งเป็นอีกเซลล์ที่เป็นส่วนประกอบในหลอดเลือด capillary(12, 50) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่า cisplatin ทำให้เกิดความเสียหายต่อทั้ง endothelial cell และ pericyte นำไปสู่ความเสียหายต่อ BNB นอกจากนี้ไม่พบความผิดปกติภายใน cytoplasm ของ pericyte เช่นจำนวน vacuole ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่ม cisplatin ผลการศึกษา TEM นี้เข้าได้กับการลดความหนาแน่นของ pericyte ในเส้นประสาทของหนูที่ได้ cisplatin ซึ่งบ่งชี้ถึงความผิดปกติของ pericyte และ basement membrane จาก cisplatin ทั้งนี้กลับไม่พบความผิดปกติใน TEM ของ pericyte ใน DRG

การศึกษาปริมาณโปรตีนของ BNB ในเส้นประสาท sciatic และ DRG ผลการศึกษาไม่พบแถบโปรตีนของ occluding และ claudin-5 ในเส้นประสาท sciatic เป็นไปได้ว่าโปรตีนเหล่านี้มีระดับต่ำมากเนื่องจากเนื้อเยื่อประสาทมีส่วนประกอบของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันจำนวนมาก และในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเหล่านี้จะมี fibroblast อยู่อีกจำนวนมากด้วย (51) จึงน่าจะมีส่วนทำให้ตรวจพบโปรตีนได้ยาก ส่วนโปรตีน ZO-2 พบแถบจางๆ ในเส้นประสาท sciatic ของกลุ่มควบคุม แต่แทบไม่เห็นเลยในกลุ่ม cisplatin ซึ่งแสดงให้เห็นว่าระดับโปรตีนในเส้นประสาทเหมือนจะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม อาจเป็นตัวบ่งชี้ถึงโครงสร้างของ BNB ในเส้นประสาท sciatic ที่เสียหายในหนูที่ได้รับ cisplatin เนื่องจากโปรตีนดังกล่าวเป็นส่วนประกอบของ BNB ตามรายงานของ Shimizu และคณะ ปี 2008 (52) ที่ว่า ZO-2 เป็นโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบใน BNB นอกจากนั้นยังพบว่าในหนูกลุ่มควบคุมส่วนต้นของเส้นประสาท sciatic พบแถบโปรตีนเข้มกว่าส่วนปลาย ซึ่งอาจแสดงว่าในภาวะปกติส่วนปลายของเส้นประสาทมี BNB ที่ไม่แข็งแรงเท่ากับส่วนต้นจึงถูกทำลายได้ง่ายกว่า และยัง

สอดคล้องกับการเกิด neuropathy ที่จะเกิดกับส่วนปลายก่อนส่วน อย่างไรก็ตามระดับ ZO-2 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มใน DRG ซึ่งแสดงว่าความผิดปกติของ BNB น่าจะเกิดที่เส้นประสาทมากกว่าที่ DRG ผลการศึกษาในระดับโปรตีนนี้สอดคล้องไปกับผล TEM ที่ไม่พบความผิดปกติของ pericyte และ basement membrane ใน DRG ทั้งนี้การศึกษาของ McDonald และคณะปี 2005 รวมทั้งการศึกษาของ Dzagnidze และคณะปี 2007 พบว่า cisplatin สะสมอยู่ใน DRG อยู่มาก (32, 37) นอกจากนี้การศึกษาก่อนหน้านี้ในหนูทดลองแสดงให้เห็นพยาธิสภาพของเซลล์ประสาทใน DRG (4, 5, 8-10) ดังนั้นควรต้องศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่าพยาธิสภาพของ pericyte และ BNB เกิดขึ้นหรือไม่ใน DRG

ข้อมูลข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่าการใช้ยา cisplatin นอกจากจะทำให้เกิดความผิดปกติของเซลล์ประสาทแล้ว ยังไปทำลาย pericyte ที่ เส้นประสาทด้วย ส่งผลให้ BNB ที่มี pericyte เป็นส่วนประกอบและมีโปรตีนที่ pericyte สร้างขึ้นเสียหาย ซึ่งอาจทำให้เกิดการรั่วไหลของสารต่างๆในหลอดเลือดเข้าสู่ endoneurium และส่งผลให้เกิด neuropathy การศึกษาในอนาคตควรจะยืนยันการเปลี่ยนแปลงของ BNB ให้ชัดเจนขึ้น

#### **ข้อสรุปการทดลอง**

ผลการศึกษาพบว่า cisplatin มีผลทำให้เกิดภาวะ neuropathy และพบว่าจำนวน pericyte บริเวณส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic ในกลุ่ม cisplatin ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ cytoplasmic process ของ pericyte แยกออกจาก endothelial cell และ basement membrane ขาดตอนในกลุ่ม cisplatin เป็นไปได้ว่าความผิดปกตินี้ส่งผลให้เกิดความเสียหายของ BNB นอกจากนั้นการศึกษาระดับโปรตีนที่เป็นส่วนประกอบของ BNB คือ ZO-2 ในเส้นประสาท sciatic มีแนวโน้มลดลงในกลุ่มที่ได้รับ cisplatin โดยเฉพาะในส่วนปลาย แต่กลับไม่มีการเปลี่ยนแปลงใน DRG ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า cisplatin ส่งผลเสียต่อ pericyte และอาจทำให้ BNB เสียหาย โดยเฉพาะในส่วนปลายของเส้นประสาท sciatic

#### **ข้อเสนอแนะ**

ศึกษาผลของ cisplatin ต่อการครุเปลี่ยนแปลงของ BNB ในแง่การทำงาน โดยอาจดูปริมาณสารที่รั่วไหลจากภายในหลอดเลือดเข้ามาใน endoneurium ของเส้นประสาท รวมทั้งใน DRG ด้วย

## รายการอ้างอิง

1. Mollman JE. Cisplatin Neurotoxicity. *NEJM*. 1990;322:126-7.
2. Windebank AJ, Grisold W. Chemotherapy-induced neuropathy. *JPNS*. 2008;13:27-46.
3. Cavaletti G, Marmiroli P. Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity. *Nat Rev Neurol*. 2010;6:657-66.
4. Barajon I, Bersani M, Quartu M, Del Fiacco M, Cavaletti G, Holst JJ, et al. Neuropeptides and Morphological Changes in Cisplatin-Induced Dorsal Root Ganglion Neuronopathy. *Exp Neurol*. 1996;138:93-104.
5. Tredici G, Tredici S, Fabbrica D, Minoia C, Cavaletti G. Experimental cisplatin neuronopathy in rats and the effect of retinoic acid administration. *JNO*. 1998;36:31-40.
6. Boyle FM, Wheeler HR, Shenfield GM. Amelioration of experimental cisplatin and paclitaxel neuropathy with glutamate. *JNO*. 1999;41:107-16.
7. Öztürk G, Erdoğan E, Anlar Ö, Kösem M, Taşpınar M. Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice. *Cytokine*. 2005;29:31-41.
8. Wongtawatchai T AS, Kaewsema A, Chentanez V. Altered phosphorylation of mitogen-activated protein kinases in dorsal root ganglia and sciatic nerve of rats with cisplatin-induced neuropathy. *Asian Biomed (Res Rev News)*. 2012;6:397-411.
9. Agthong S, Kaewsema A, Charoensub T. Curcumin Ameliorates Functional and Structural Abnormalities in Cisplatin-induced Neuropathy. *Exp Neurobiol*. 2015;24:139-45.
10. Tredici G, Braga M, Nicolini G, Miloso M, Marmiroli P, Schenone A, et al. Effect of Recombinant Human Nerve Growth Factor on Cisplatin Neurotoxicity in Rats. *Exp Neurol*. 1999;159:551-8.
11. Ito Y, Arahata Y, Goto Y, Hirayama M, Nagamutsu M, Yasuda T, et al. Cisplatin neurotoxicity presenting as reversible posterior leukoencephalopathy syndrome. *AJNR*. 1998;19:415-7.



12. Dieckman K-P, Struss WJ, Budde U. Evidence for Acute Vascular Toxicity of Cisplatin-based Chemotherapy in Patients with Germ Cell Tumour. *IJAR*. 2011;31:4501-5.
13. Kanda T, Numata Y, Mizusawa H. Chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy: decreased claudin-5 and relocated ZO-1. *JNNP*. 2004;75:765-9.
14. Shimizu F, Sano Y, Abe M-a, Maeda T, Ohtsuki S, Terasaki T, et al. Peripheral nerve pericytes modify the blood-nerve barrier function and tight junctional molecules through the secretion of various soluble factors. *J Cell Physiol*. 2011;226:255-66.
15. Giannini C, Dyck PJ. Basement membrane reduplication and pericyte degeneration precede development of diabetic polyneuropathy and are associated with its severity. *ANA*. 1995;37:498-504.
16. Sá-Pereira I, Brites D, Brito MA. Neurovascular Unit: a Focus on Pericytes. *Mol Neurobiol*. 2012;45:327-47.
17. Armulik A, Abramsson A, Betsholtz C. Endothelial/Pericyte Interactions. *Circ Res*. 2005;97:512-23.
18. Jindatip D, Fujiwara K, Kouki T, Yashiro T. Transmission and scanning electron microscopy study of the characteristics and morphology of pericytes and novel desmin-immunopositive perivascular cells before and after castration in rat anterior pituitary gland. *ASI*. 2012;87:165-73.
19. Tilton RG. Capillary pericytes: Perspectives and future trends. *J Electron Microscop Tech*. 1991;19:327-44.
20. Alba C, Vidal L, Díaz F, Villena A, Vargas IPd. Ultrastructural and quantitative age-related changes in capillaries of the dorsal lateral geniculate nucleus. *BRB*. 2004;64:145-53.
21. Shi X. Cochlear Pericyte Responses to Acoustic Trauma and the Involvement of Hypoxia-Inducible Factor-1 $\alpha$  and Vascular Endothelial Growth Factor. *AJP*. 2009;174:1692-704.
22. Pfister F, Feng Y, vom Hagen F, Hoffmann S, Molema G, Hillebrands J-L, et al. Pericyte Migration. A Novel Mechanism of Pericyte Loss in Experimental Diabetic Retinopathy. *DIABETES*. 2008;57:2495-502.

23. Armulik A, Genove G, Mae M, Nisancioglu MH, Wallgard E, Niaudet C, et al. Pericytes regulate the blood-brain barrier. *Nature*. 2010;468:557-61.
24. Kanda T. Biology of the blood-nerve barrier and its alteration in immune mediated neuropathies. *JNNP, Neurosurgery & Psychiatry*. 2013;84:208-12.
25. Peltonen S, Alanne M, Peltonen J. Barriers of the peripheral nerve. *Tissue Barriers*. 2013;1:e24956.
26. Shimizu F, Sano Y, Saito K, Abe M-a, Maeda T, Haruki H, et al. Pericyte-derived Glial Cell Line-derived Neurotrophic Factor Increase the Expression of Claudin-5 in the Blood-brain Barrier and the Blood-nerve Barrier. *Neurochem Res*. 2012;37:401-9.
27. Ishida S, Lee J, Thiele DJ, Herskowitz I. Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002;99:14298-302.
28. EL-Khateeb M, Appleton TG, Gahan LR, Charles BG, Berners-Price SJ, Bolton A-M. Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques. *J Inorg Biochem*. 1999;77:13-21.
29. Rosenberg B, Van Camp L, Grimley EB, Thomson AJ. The Inhibition of Growth or Cell Division in *Escherichia coli* by Different Ionic Species of Platinum(IV) Complexes. *J Biol Chem*. 1967;242:1347-52.
30. Ta LE, Espeset L, Podratz J, Windebank AJ. Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding. *Neuro Toxicology*. 2006;27:992-1002.
31. McDonald ES, Randon KR, Knight A, Windebank AJ. Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: a potential mechanism for neurotoxicity. *Neurobiol Dis*. 2005;18:305-13.
32. Arany I, Safirstein RL. Cisplatin nephrotoxicity. *Seminars in Nephrology*. 2003;23:460-4.
33. Brock PR, Bellman SC, Yeomans EC, Pinkerton CR, Pritchard J. Cisplatin ototoxicity in children: A practical grading system. *Med Pediatr Oncol*. 1991;19:295-300.

34. Wong E, Giandomenico CM. Current Status of Platinum-Based Antitumor Drugs. *Chem Rev.* 1999;99:2451-66.
35. Simon T, Hero B, Dupuis W, Selle B, Berthold F. The incidence of hearing impairment after successful treatment of neuroblastoma. *Klin Padiatr.* 2002;214:149-52.
36. Dzagnidze A, Katsarava Z, Makhalova J, Liedert B, Yoon M-S, Kaube H, et al. Repair Capacity for Platinum-DNA Adducts Determines the Severity of Cisplatin-Induced Peripheral Neuropathy. *Journal Neurosci.* 2007;27:9451-7.
37. Gill JS, Windebank AJ. Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle. *JCI.* 1998;101:2842-50.
38. Fischer SJ, McDonald ES, Gross L, Windebank AJ. Alterations in Cell Cycle Regulation Underlie Cisplatin Induced Apoptosis of Dorsal Root Ganglion Neurons in Vivo. *Neurobiol Dis.* 2001;8:1027-35.
39. McDonald ES, Windebank AJ. Cisplatin-Induced Apoptosis of DRG Neurons Involves Bax Redistribution and Cytochrome c Release But Not fas Receptor Signaling. *Neurobiol Dis.* 2002;9:220-33.
40. Russell JW, Windebank AJ, McNiven MA, Brat DJ, Brimijoin WS. Effect of cisplatin and ACTH4-9 on neural transport in cisplatin induced neurotoxicity. *Brain Res.* 1995;676:258-67.
41. Podratz JL, Knight AM, Ta LE, Staff NP, Gass JM, Genelin K, et al. Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons. *Neurobiol Dis.* 2011;41:661-8.
42. Leonetti C, Biroccio A, Gabellini C, Scarsella M, Maresca V, Flori E, et al.  $\alpha$ -tocopherol protects against cisplatin-induced toxicity without interfering with antitumor efficacy. *IJC.* 2003;104:243-50.
43. Pace A GD, Galiè E, Savarese A, Carpano S, Della Giulia M, Pozzi A, Silvani A, Gaviani P, Scaioli V, Jandolo B, Bove L, Cognetti F. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy: A randomized, placebo-controlled trial. *Neurology.* 2010;74:762-6.

44. Cavaletti G, Marzorati L, Bogliun G, Colombo N, Marzola M, Pittelli MR, et al. Cisplatin-Induced peripheral neurotoxicity is dependent on total-dose intensity and single-dose intensity. *Cancer*. 1992;69:203-7.
45. Krarup-Hansen A, Fugleholm K, Helweg-Larsen S, Hauge EN, Schmalbruch H, Trojaborg W, et al. Examination of distal involvement in cisplatin-induced neuropathy in man: An electrophysiological and histological study with particular reference to touch receptor function. *Brain*. 1993;116:1017-41.
46. Krarup-Hansen A, Helweg-Larsen S, Schmalbruch H, Rørth M, Krarup C. Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: prospective clinical and neurophysiological studies. *Brain*. 2007;130:1076-88.
47. Müller LJ, van der Hoop RG, Moorer-van Delft CM, Gispen WH, Roubos EW. Morphological and Electrophysiological Study of the Effects of Cisplatin and ORG 2766 on Rat Spinal Ganglion Neurons. *Cancer Res*. 1990;50:2437-42.
48. Verdú E, Vilches JJ, Rodríguez FJ, Ceballos D, Valero A, Navarro X. Physiological and immunohistochemical characterization of cisplatin-induced neuropathy in mice. *Muscle Nerve*. 1999;22:329-40.
49. Dore-Duffy P, Owen C, Balabanov R, Murphy S, Beaumont T, Rafols JA. Pericyte Migration from the Vascular Wall in Response to Traumatic Brain Injury. *Microvasc Res*. 2000;60:55-69.
50. Kirchmair R, Walter DH, Li M, Rittig K, Tietz AB, Murayama T, et al. Antiangiogenesis Mediates Cisplatin-Induced Peripheral Neuropathy. Attenuation or Reversal by Local Vascular Endothelial Growth Factor Gene Therapy Without Augmenting Tumor Growth. 2005;111:2662-70.
51. แอกทอง ส. ระบบประสาทส่วนปลาย: บทบาทของ oxidative stress และ MAPKs ต่อโครงสร้างและการทำงาน: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย; 2556.p.5-6, 66-69
52. Shimizu F, Sano Y, Maeda T, Abe M-a, Nakayama H, Takahashi R-i, et al. Peripheral Nerve pericytes originating from the blood-nerve barrier expresses tight junctional molecules and transporters as barrier-forming cells. *J. Cell. Physiol*. 2008;217:388-99.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย  
CHULALONGKORN UNIVERSITY



### Tissue process

- sciatic nerve และ DRG ที่แช่อยู่ใน 3% glutaraldehyde ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ล้างด้วย 0.1 M Cacodylate buffer pH 7.4 บนเครื่องเขย่า 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
- Post-fix ด้วย 1% OsO<sub>4</sub> เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
- ล้างออกด้วย 0.1 M Cacodylate buffer pH 7.4 บนเครื่องเขย่า 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที
- Dehydration ด้วย
  - 70 % alcohol 10 นาทีหรือทิ้งไว้ค้างคืนบนเครื่องเขย่า
  - 80 % alcohol 10 นาทีบนเครื่องเขย่า
  - 95 % alcohol 10 นาทีจำนวน 2 ครั้งบนเครื่องเขย่า
  - 100 % alcohol 10 นาทีจำนวน 2 ครั้งบนเครื่องเขย่า
- แช่ใน propylene oxide 15 นาทีจำนวน 2 ครั้งบนเครื่องเขย่า
- Infiltrate ด้วย resin : propylene อัตราส่วน 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมงและอัตราส่วน 2:1 ที่ทิ้งไว้ค้างคืนบนเครื่องเขย่า
- Infiltrate ต่อด้วย Epon 100 % เป็นเวลา 1 ชั่วโมงบนเครื่องเขย่า
- Embedding Epon 100 %
- เมื่อ embedding เสร็จแล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 60 ° องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 วันจึงนำออกมาจาก block

## การเตรียมสารละลายสำหรับ tissue processing

### 1. การเตรียม 0.1 M CaCo Buffer (pH 7.4)

#### 1.1 Stock solution A :0.2 M sodium phosphate monobasic

0.2 M sodium phosphate monobasic	27.80 g.
Distilled water	1000 ml.

#### 1.2 Stock solution B :0.2 M sodium phosphate dibasic

Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	28.40 g.
Distilled water	1000 ml.

นำ stock solution A ผสมกับ stock solution B ในปริมาณ 19 ml. และ 81 ml.  
ตามลำดับแล้วปรับให้ได้ pH 7.4

### 2. การเตรียม 3 % glutaraldehyde in phosphate buffer pH 7.4

30 % glutaraldehyde	10 ml.
0.1 M CaCo buffer pH 7.4	30 ml.

### 3. การเตรียม 1 % osmium tetroxide

Osmium tetroxide	1 g.
0.1 M CaCo buffer pH 7.4	100 ml.

### 4. การเตรียม Epoxy resin

ปริมาตรรวม (ml.)	50 ml.	100 ml.	150 ml.	200 ml.
1. Epon 812	25 ml.	50 ml.	75 ml.	100 ml.
2. DDSA (Dodecenyl succinic anhydride)	20 ml.	40 ml.	60 ml.	80 ml.
3. NMA (Nadic methyl anhydride)	10 ml.	20 ml.	30 ml.	40 ml.
4. DMP-30	1 ml.	2 ml.	3 ml.	4 ml.



### การเตรียมการ homogenize ตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Western blot

#### Homogenization solution (500 ml)

- 0.1 M PIPES, pH 6.9	12.1 g
- 5 mM $MgCl_2$ (magnesium chloride)	5 ml
- 5 mM EGTA (ethylene glycol tetraacetic acid)	5 ml
- 0.5 % Triton X-100	2.5 ml
- 20 % glycerol	100 ml
- 10 mM NaF (sodium fluoride)	0.21 g
- Deionized water	387.5 ml

ทำการผสม Homogenization solution ปริมาตร 5 ml กับ 1 mmol/l PMSF (phenylmethylsulfonyl fluoride), 0.2 M sodium orthovanadate และ 0.5 ml Protease inhibitor cocktail หลังจากนั้นใส่ลงไปในตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

### การเตรียม stacking gel และ running gel สำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Western blot

ส่วนประกอบ	Stacking gel		10 % Running gel	
	1 plate	2 plate	1 plate	2 plate
30 % Acrylamide mix	3.3 ml	9.9 ml	0.65 ml	1.95 ml
1 M running gel buffer	3.75 ml	11.25 ml	-	-
1 M stacking gel buffer	-	-	0.625 ml	1.875 ml
Distilled water	2.75 ml	8.25 ml	3.28 ml	9.84 ml
10 % SDS	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l	50 $\mu$ l	150 $\mu$ l
10 % APS	100 $\mu$ l	300 $\mu$ l	37.5 $\mu$ l	112.5 $\mu$ l
TEMED	10 $\mu$ l	30 $\mu$ l	5 $\mu$ l	15 $\mu$ l
Total volume	10 ml	30 ml	4.6 ml	13.9 ml

30% Acrylamide/Bis solution 37.5:1 solution (Sigma, UK)

Running gel buffer: 1M Trizma per-set crystal, pH 8.8

Stacking gel buffer: 1M Tris-base, pH 6.8

10% SDS (Sodium dodecyl sulfate, minimum 9.85% GC) (Sigma, UK)

10% APS (Ammonium Persulfate) (Sigma, UK)  
TEMED (N,N,N',N'-tetramethylethane-1,2-diamine)

**การเตรียม substrate solution สำหรับ immunological detection**

- หยดสารละลาย buffer stock (pH 7.5) 4 หยดลงต่อน้ำกลั่นปริมาตร 10 ml
- หยดสารละลาย DAB stock 8 หยด
- หยดสารละลาย Hydrogen Peroxide 4 หยด
- หยดสารละลาย Nickel 4 หยด และผสมให้เข้ากัน





ความหนาแน่นของ pericyte

เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นกลุ่มความคุม (C10)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.387	21	54.26357
2	0.255	11	43.13725
3	0.348	13	37.35632
4	0.121	7	57.85124
5	0.378	10	26.45503
6	0.312	7	22.4359
7	0.366	9	24.59016
8	0.371	12	32.34501
9	0.365	15	41.09589
10	0.297	17	57.23906
11	0.357	13	36.41457
12	0.317	21	66.24606
13	0.407	20	49.14005
14	0.392	16	40.81633
15	0.261	13	49.80843
16	0.374	12	32.08556
17	0.317	11	34.70032
18	0.436	14	32.11009
19	0.338	13	38.46154
20	0.415	13	31.3253
average			40.39388

## เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นกลุ่มความคุม (C11)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.573	22	38.39442
2	0.569	28	49.20914
3	0.588	25	42.51701
4	0.522	21	40.22989
5	0.571	25	43.78284
6	0.547	15	27.4223
7	0.586	31	52.90102
8	0.588	24	40.81633
9	0.536	18	33.58209
10	0.319	21	65.83072
11	0.542	20	36.90037
12	0.609	16	26.27258
13	0.498	20	40.16064
14	0.489	21	42.94479
15	0.436	20	45.87156
16	0.278	19	68.34532
17	0.245	13	53.06122
18	0.398	15	37.68844
19	0.503	33	65.60636
20	0.513	35	68.22612
average			45.98816

## เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นกลุ่มความคุม (C12)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.533	19	35.64728
2	0.49	26	53.06122
3	0.5	18	36
4	0.535	20	37.38318
5	0.477	18	37.73585
6	0.521	25	47.98464
7	0.396	18	45.45455
8	0.424	21	49.5283
9	0.425	18	42.35294
10	0.512	21	41.01563
11	0.463	22	47.5162
12	0.544	20	36.76471
13	0.524	21	40.07634
14	0.577	22	38.12825
15	0.575	20	34.78261
16	0.504	18	35.71429
17	0.487	15	30.80082
18	0.393	19	48.34606
19	0.509	21	41.25737
20	0.475	20	42.10526
average			41.08277

## เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นกลุ่ม cisplatin (P11)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.373	11	29.49062
2	0.232	7	30.17241
3	0.359	12	33.42618
4	0.335	6	17.91045
5	0.267	11	41.1985
6	0.358	14	39.10615
7	0.363	10	27.54821
8	0.321	14	43.61371
9	0.308	18	58.44156
10	0.279	14	50.17921
11	0.242	7	28.92562
12	0.347	18	51.8732
13	0.229	14	61.13537
14	0.351	17	48.43305
15	0.365	17	46.57534
16	0.338	15	44.3787
17	0.365	13	35.61644
18	0.387	13	33.59173
19	0.368	14	38.04348
20	0.284	10	35.21127
average			39.74356

## เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นกลุ่ม cisplatin (P12)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.32	9	28.125
2	0.364	13	35.71429
3	0.396	10	25.25253
4	0.435	15	34.48276
5	0.453	14	30.90508
6	0.392	12	30.61224
7	0.4	11	27.5
8	0.468	10	21.36752
9	0.459	12	26.14379
10	0.402	13	32.33831
11	0.271	8	29.5203
12	0.404	15	37.12871
13	0.343	6	17.49271
14	0.4	10	25
15	0.464	9	19.39655
16	0.407	7	17.19902
17	0.464	9	19.39655
18	0.484	12	24.79339
19	0.443	10	22.57336
20	0.41	15	36.58537
average			27.07637



## เส้นประสาท sciatic ส่วนต้นกลุ่ม cisplatin (P13)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.537	8	14.89758
2	0.475	6	12.63158
3	0.489	13	26.58487
4	0.485	5	10.30928
5	0.501	6	11.97605
6	0.41	5	12.19512
7	0.455	12	26.37363
8	0.435	9	20.68966
9	0.441	12	27.21088
10	0.415	13	31.3253
11	0.446	11	24.66368
12	0.414	14	33.81643
13	0.508	18	35.43307
14	0.408	12	29.41176
15	0.421	11	26.12827
16	0.49	16	32.65306
17	0.49	22	44.89796
18	0.537	18	33.51955
19	0.413	17	41.16223
20	0.498	17	34.13655
average			26.50082

## เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายกลุ่มความคุม (C10)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.405	24	59.259
2	0.4	24	60
3	0.412	24	58.252
4	0.394	23	58.376
5	0.335	18	53.731
6	0.388	21	54.124
7	0.381	31	81.365
8	0.338	34	100.592
9	0.316	27	85.443
10	0.365	34	93.151
11	0.394	24	60.914
12	0.395	35	88.608
13	0.382	31	81.152
14	0.392	34	86.735
15	0.381	33	86.614
16	0.392	30	76.53
17	0.371	29	78.167
18	0.393	33	83.969
19	0.349	32	91.691
20	0.405	24	59.259
average			75.72

## เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายกลุ่มความคุม (C11)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.305	18	59.01639
2	0.361	27	74.79224
3	0.365	22	60.27397
4	0.35	20	57.14286
5	0.345	24	69.56522
6	0.327	23	70.33639
7	0.368	24	65.21739
8	0.286	16	55.94406
9	0.42	22	52.38095
10	0.351	23	65.52707
11	0.241	15	62.24066
12	0.262	20	76.33588
13	0.131	11	83.96947
14	0.307	20	65.14658
15	0.244	16	65.57377
16	0.186	9	48.3871
17	0.175	12	68.57143
18	0.15	13	86.66667
19	0.307	19	61.88925
20	0.169	14	82.84024
average			66.59088

## เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายกลุ่มความคุม (C12)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.419	21	50.11933
2	0.349	24	68.76791
3	0.364	20	54.94505
4	0.391	19	48.59335
5	0.383	19	49.60836
6	0.38	21	55.26316
7	0.366	21	57.37705
8	0.392	22	56.12245
9	0.395	21	53.16456
10	0.434	19	43.7788
11	0.408	17	41.66667
12	0.376	11	29.25532
13	0.317	15	47.31861
14	0.335	23	68.65672
15	0.328	19	57.92683
16	0.387	23	59.43152
17	0.409	23	56.23472
18	0.321	19	59.19003
19	0.424	24	56.60377
20	0.347	24	69.16427
average			54.15942

## เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายกลุ่มความคุม (P11)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.666	21	31.532
2	0.632	27	42.722
3	0.403	9	22.333
4	0.411	14	34.063
5	0.584	15	25.685
6	0.651	19	29.186
7	0.604	22	36.424
8	0.637	21	32.967
9	0.632	24	37.975
10	0.532	23	43.233
11	0.579	16	27.634
12	0.569	26	45.694
13	0.586	23	39.249
14	0.305	9	29.508
15	0.579	20	34.542
16	0.514	11	21.401
17	0.384	21	54.688
18	0.353	15	42.493
19	0.424	19	44.811
20	0.666	21	31.532
average			35.59

## เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายกลุ่มความคุม (P12)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.368	12	32.6087
2	0.319	15	47.02194
3	0.388	20	51.54639
4	0.36	10	27.77778
5	0.397	12	30.2267
6	0.416	16	38.46154
7	0.379	12	31.66227
8	0.385	21	54.54545
9	0.372	22	59.13978
10	0.396	20	50.50505
11	0.4	14	35
12	0.219	14	63.92694
13	0.418	16	38.27751
14	0.41	12	29.26829
15	0.434	14	32.25806
16	0.407	15	36.85504
17	0.411	14	34.06326
18	0.432	16	37.03704
19	0.304	13	42.76316
20	0.42	17	40.47619
average			40.67105

## เส้นประสาท sciatic ส่วนปลายกลุ่มความคุม (P13)

section	area(mm <sup>2</sup> )	number	Density(No./mm <sup>2</sup> )
1	0.385	9	23.37662
2	0.349	4	11.46132
3	0.316	6	18.98734
4	0.363	11	30.30303
5	0.362	8	22.09945
6	0.351	6	17.09402
7	0.311	6	19.2926
8	0.304	6	19.73684
9	0.27	9	33.33333
10	0.291	7	24.05498
11	0.306	9	29.41176
12	0.297	8	26.93603
13	0.28	7	25
14	0.322	9	27.95031
15	0.297	10	33.67003
16	0.304	7	23.02632
17	0.317	5	15.77287
18	0.291	7	24.05498
19	0.301	8	26.57807
20	0.293	7	23.89078
average			23.80154

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ-สกุล	นายวรพจน์ นพรัตน์
วัน เดือน ปีเกิด	พุธที่ 29 เมษายน 2535
ที่อยู่ตามภูมิลำเนา	22 หมู่ 4 ต.กุฎโง้ง อ.พนัสนิคม จ.ชลบุรี 20140
เบอร์โทรศัพท์	084-6466418
e-mail	bankworapath@gmail.com
วุฒิการศึกษา	วิทยาศาสตรบัณฑิต(กายภาพบำบัด)
สถาบันการศึกษา	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
สำเร็จการศึกษา	2556