

การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในระบบประสาทส่วนปลายเมื่อเกิดการบาดเจ็บของ
เส้นประสาทในหนูแรท

นางสาวมารีชา รอดทะยอย

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

Alterations in autophagy in the peripheral nervous system after nerve injury in rats

Miss Marisa Rodtayoy



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	การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในระบบประสาทส่วนปลายเมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทในหนูแรท
โดย	นางสาวมารีษา รอดทะยอย
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์สิทธิพร แอกทอง

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงศ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. นายแพทย์อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ กิตติคุณ ดร. เกสัชกรหญิงรัตวี สุดทรง)

มาริษา รอดทะยอย : การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในระบบประสาทส่วนปลายเมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทในหนูแรท (Alterations in autophagy in the peripheral nervous system after nerve injury in rats) อ.ที่ปริกษาวิทยานิพนธ์
 หลัก: ศ. ดร. นพ.สิทธิพร แยกทอง, 35 หน้า.

กระบวนการ autophagy เป็นกระบวนการย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพเพื่อนำสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ กระบวนการนี้มีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ประสาทเนื่องจากพบว่าในโรคกลุ่ม neurodegeneration เซลล์ประสาทมีการทำงานของ autophagy ลดลง เมื่อเกิดการบาดเจ็บของสมองและเส้นประสาทพบว่าการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในเซลล์ประสาท ซึ่งข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของเซลล์และระยะเวลายังมีอยู่น้อยและไม่เพียงพอ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกระบวนการ autophagy ได้แก่ Beclin-1, LC3 และ p62 ในระบบประสาทส่วนปลายเมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทไขสันหลัง โดยผ่าตัดหนีบเส้นประสาท sciatic ข้างซ้ายในหนู 28 ตัว แล้วแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มๆ ละ 7 ตัว โดยจะถูก sacrifice หลังจากหนีบเส้นประสาทแล้ว 1, 3, 7 และ 14 วันตามลำดับ เมื่อครบกำหนดแล้วทำการเก็บปมประสาทไขสันหลัง (DRG) ระดับ L4-L6 ทั้งสองข้างรวมถึง เส้นประสาท sciatic ทั้ง proximal และ distal stump เพื่อนำมาเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนด้วยวิธี Western blot พบว่าใน DRG ปริมาณของ Beclin-1 และ p62 พบว่าไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างข้างซ้ายและข้างขวาในระยะเวลาเดียวกันและระหว่างค่าสัดส่วนข้างซ้ายต่อขวาในหนูตัวเดียวกันระหว่างช่วงเวลาต่างๆ หลังเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท นอกจากนี้ไม่สามารถตรวจพบแถบของ LC3 ได้ และจากการศึกษาในเส้นประสาท sciatic ปริมาณของ Beclin-1 และ p62 ในเส้นประสาท sciatic พบว่ามีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงในเส้นประสาทข้างที่บาดเจ็บทั้งทางด้าน proximal (LP) รวมถึงด้าน distal (LP) ตั้งแต่ วันที่ 3 หลังจากเกิดการบาดเจ็บ จนถึงวันที่ 14 หลังจากเกิดการบาดเจ็บ และไม่สามารถตรวจพบแถบของ LC3 ได้น่าจะเกิดจากการมีปริมาณโปรตีนอยู่น้อย ผลการศึกษาเบื้องต้นนี้บ่งชี้ว่า autophagy อาจจะมีการเปลี่ยนแปลงหลังเส้นประสาทบาดเจ็บ อย่างไรก็ตามคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความชัดเจนมากขึ้น

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ อ.ที่ปริกษาหลัก

5774069630 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: AUTOPHAGY, DRG. NERVE INJURY

MARISA RODTAYOY: Alterations in autophagy in the peripheral nervous system after nerve injury in rats. ADVISOR: PROF.SITHIPORN AGTHONG, Ph.D., 35 pp.

Autophagy is the degradation system for recycling of structural proteins and organelles. It has a crucial role in neurons as impaired function has been associated with neurodegenerative diseases. Induction of autophagy has been observed in CNS and PNS injuries. However, spacial and temporal changes in the autophagy process after nerve injury remain unclear. This study was conducted to investigate alterations in autophagy proteins: beclin-1, LC3 and p62 in the dorsal root ganglion (DRG) and proximal & distal stumps of sciatic nerve after sciatic nerve injury. Rats were subjected to sciatic nerve crush and then divided into 4 groups (n = 7/group). Each group was sacrificed 1, 3, 7 and 14 days after nerve crush, respectively. For each protein, the amount on the injury side (left) was normalized to the intact side (right). The levels of Beclin-1 and p62 in DRG were not significantly different among time points after injury. However, the levels of Beclin-1 and p62 in sciatic nerves were tend to increase in 3 days after nerve crush both proximal and distal stump. In contrast, the LC3 could not be detected in the DRG and sciatic nerve. These preliminary data suggest that autophagy might alter after nerve injury. However, more investigations are needed to clarify this issue.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2016

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ ศ.ดร.นพ. สิทธิพร แอภทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้
ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศ. กิตติคุณ ดร.ราตรี สุตทรวง ศ.ดร.พญ. วิไล ชินธเนศ และ ผศ.
ดร.นพ. อมรพันธุ์ เสรีมาศพันธุ์ สำหรับการตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์
อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอาทิตย์ ร่วมวงศ์ สำหรับความช่วยเหลือด้านการทดลอง
ด้านเครื่องมือและเทคนิคต่างๆในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณวรพัทธ์ นพรัตน์ และคุณเพชรรินทร์ โคบุตรี สำหรับความ
ช่วยเหลือด้านการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและช่วยดูแลระหว่างการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทย์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่
ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ ทุกคนในครอบครัวที่เป็นแรงบัลดาลใจ
กำลังใจ และสนับสนุนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญภาพ	1
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
คำถามงานวิจัย	2
วัตถุประสงค์ของงานวิจัย.....	2
กรอบแนวคิดงานวิจัย	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย	3
บทที่ 2	4
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
Autophagy	4
กลไกของ macroautophagy	5
ระบบประสาท	6
การบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย.....	8
การเปลี่ยนแปลงหลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท	8
Autophagy กับระบบประสาท	9
Autophagy กับการบาดเจ็บของระบบประสาท.....	10

บทที่ 3	13
วิธีดำเนินการวิจัย	13
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา.....	13
รูปแบบการวิจัย	13
วิธีการทำวิจัย.....	13
บทที่ 4	19
ผลการวิเคราะห์ข้อมูล	19
1. การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ใน DRG.....	19
2. การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในเส้นประสาท sciatic.....	22
บทที่ 5	21
สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ	21
รายการอ้างอิง	23
ภาคผนวก.....	26
ภาคผนวก ก	27
ภาคผนวก ข	30
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	35

สารบัญภาพ

หน้า

รูปที่ 1	แสดงประเภทของกระบวนการ autophagy.....	5
รูปที่ 2	แสดงกระบวนการการเกิด macroautophagy.....	6
รูปที่ 3	แสดงภาคตัดขวางของเส้นประสาทและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน.....	7
รูปที่ 4	แสดงการเตรียมเส้นประสาท sciatic ที่แยกเป็น proximal และ distal stumps.....	15
รูปที่ 5	แสดงการวัดแถบความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image pro plus.....	17
รูปที่ 6	แถบโปรตีน Beclin-1 ใน DRG.....	19
รูปที่ 7	ค่าสัดส่วนของระดับ Beclin-1 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวา.....	20
รูปที่ 8	ค่าเฉลี่ยของระดับ Beclin-1 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในช่วงเวลาต่างๆ.....	20
รูปที่ 9	แถบโปรตีน p62 ใน DRG ข้างซ้าย (L) และข้างขวา (R).....	21
รูปที่ 10	ค่าสัดส่วนของระดับ p62 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในหนูตัวเดียวกันในช่วงเวลาต่างๆ.....	21
รูปที่ 11	ค่าเฉลี่ยของระดับ p62 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในช่วงเวลา.....	22
รูปที่ 12	แถบโปรตีน LC3 ใน DRG จากการศึกษาด้วยวิธี Western blot.....	22
รูปที่ 13	แถบโปรตีน p62 ในเส้นประสาท sciatic ข้างขวา (R) และข้างซ้าย.....	19
รูปที่ 14	แถบโปรตีน Beclin-1 ในเส้นประสาท sciatic ข้างขวา (R) และข้างซ้ายที่บาดเจ็บ.....	19
รูปที่ 15	ผลการตรวจแถบโปรตีน Beta-actin ในปมประสาทไขสันหลังด้วยวิธี western blot.....	19
รูปที่ 16	แสดงค่าเฉลี่ย±SD ของระดับโปรตีน Beta-actin ในปมประสาทไขสันหลังในแต่ละช่วงเวลา.....	20

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนใหญ่มักมีสาเหตุมาจากอุบัติเหตุ ซึ่งนำไปสู่ภาวะทุพพลภาพไม่สามารถดำเนินกิจกรรมในชีวิตประจำวันได้อย่างปกติ โดยเฉพาะในกลุ่มคนวัยทำงานทำให้ประเทศขาดบุคลากรอันเป็นกำลังสำคัญในการพัฒนาประเทศชาติ ซึ่งการบาดเจ็บของเส้นประสาททำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในเซลล์ประสาท โดยในเส้นประสาทจะมีการเสื่อมสลายของ axon เรียกว่า anterograde axonal degeneration หรือ Wallerian degeneration ซึ่งเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมงตามด้วยการงอกใหม่ของ axon ในเส้นประสาท (nerve regeneration) การบาดเจ็บของเส้นประสาทนี้อาจรุนแรงจนนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทได้ (1,2) นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในเซลล์ประสาทเมื่อเกิดการบาดเจ็บของระบบประสาท (3-5) โดยกระบวนการ autophagy เป็นกระบวนการที่เซลล์ย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพเพื่อนำสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ (6) ในระบบประสาท กระบวนการ autophagy มีความสำคัญมากเนื่องจากเซลล์ประสาทไม่มีการแบ่งเซลล์มาทดแทนเซลล์เดิมที่อายุมากขึ้น จึงมีโครงสร้างของเซลล์ที่เสียหายมากขึ้นประกอบกับประสิทธิภาพของ autophagy ที่ลดลงตามอายุ ทำให้เกิดการสะสมโปรตีนที่ผิดปกติมากขึ้นเรื่อยๆ และเกิดการตายของเซลล์ประสาท ซึ่งมีข้อมูลสนับสนุนว่ามีการทำงานของ autophagy ลดลงในโรคของระบบประสาทในกลุ่ม neurodegeneration เช่น โรค Alzheimer โรค Parkinson ที่มีการตายของเซลล์ประสาทเป็นลักษณะเด่นและพบในคนสูงอายุ (7)

ในกรณีการบาดเจ็บของสมองและไขสันหลัง พบมีการกระตุ้น autophagy เพิ่มขึ้นในเซลล์ประสาท (3-5) ในการบาดเจ็บของเส้นประสาท autophagy ก็ถูกกระตุ้นเช่นเดียวกัน (8, 9) อย่างไรก็ตามข้อมูลที่มีอยู่นั้นยังไม่ครบถ้วนในเรื่องระยะเวลาที่มีการกระตุ้นและตำแหน่งในระบบประสาทส่วนปลายที่มีการกระตุ้น ในงานวิจัยนี้จึงสนใจศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในระบบประสาทส่วนปลาย ทั้งเส้นประสาทที่อยู่เหนือต่อการบาดเจ็บ (proximal nerve stump) เส้นประสาทที่อยู่ต่ำกว่าการบาดเจ็บ (distal nerve stump) และเซลล์ประสาทใน dorsal root ganglion (DRG) หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic ของหนูในระยะเวลาที่ต่างกัน เมื่อทราบการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy อย่างแน่ชัดแล้ว สามารถใช้เป็นข้อมูลในการศึกษาเพิ่มเติมในเรื่องบทบาทของ autophagy และการให้ยาเกี่ยวกับกระบวนการนี้ ซึ่งอาจจะเป็นผลดีต่อการรักษาการบาดเจ็บของเส้นประสาทได้ในอนาคต

คำถามงานวิจัย

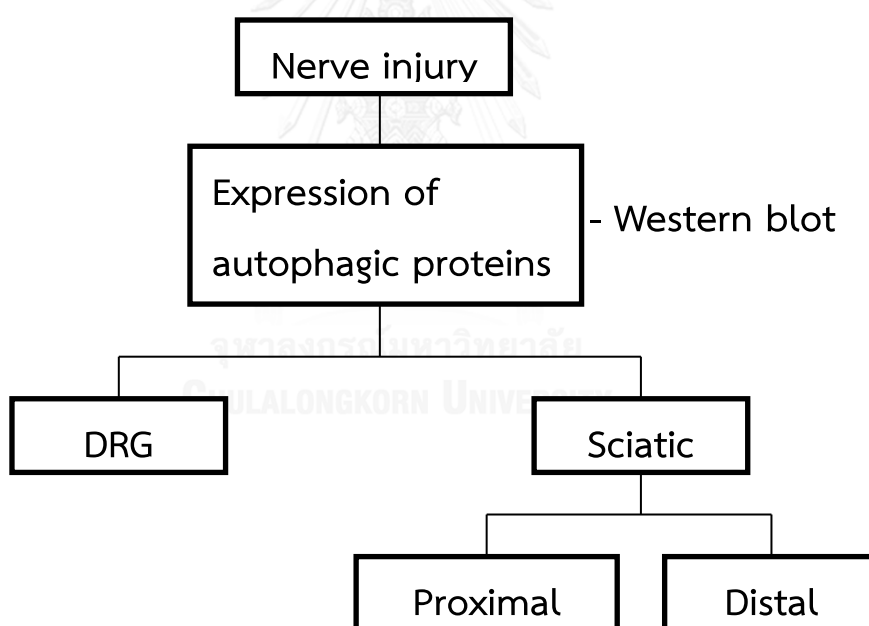
กระบวนการ autophagy มีการเปลี่ยนแปลงในระบบประสาทส่วนปลายหลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทไขสันหลังหรือไม่ อย่างไร

วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบของกระบวนการ autophagy ในระบบประสาทส่วนปลายคือ ปมประสาทและเส้นประสาทไขสันหลังเมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทไขสันหลัง

การศึกษานี้เป็นการศึกษาเบื้องต้นโดยจะศึกษาการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนในกระบวนการ autophagy ในปมประสาทและเส้นประสาทไขสันหลังตามระยะเวลาหลังเส้นประสาทไขสันหลังบาดเจ็บ

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ถ้ากระบวนการ autophagy มีการเปลี่ยนแปลงในระบบประสาทส่วนปลายหลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทแล้ว ผลจากการทดลองนี้น่าจะเป็นข้อมูลพื้นฐานในการทดลองในขั้นต่อไปว่าการเปลี่ยนแปลงนี้มีผลดีหรือผลเสียต่อระบบประสาทอย่างไร ซึ่งอาจจะนำไปสู่การพัฒนาวิธีการรักษาเส้นประสาทบาดเจ็บในอนาคตได้

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองในสัตว์ทดลอง

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

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

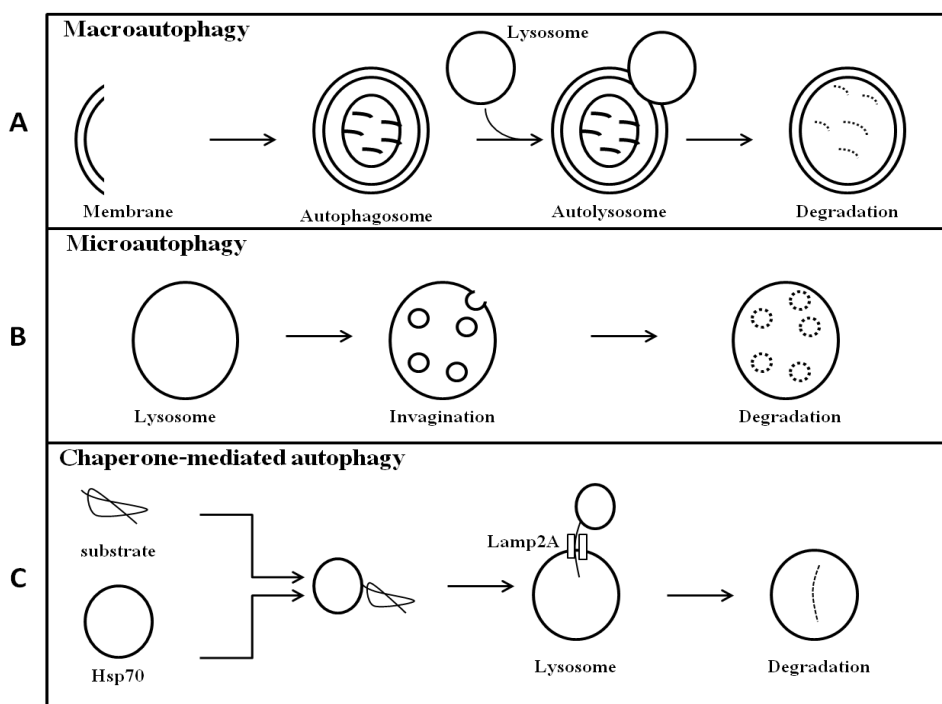
บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Autophagy

เซลล์มีกระบวนการย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพเพื่อนำสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ เกิดขึ้นทั้งในภาวะปกติและผิดปกติ เช่น การขาดสารอาหาร กระบวนการย่อยสลายนี้มีอยู่ 2 กระบวนการด้วยกัน (6, 7) คือ

1. Ubiquitin-proteasome system (UPS) เป็นกระบวนการที่ย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่มีความจำเพาะต่อ ubiquitin คือโครงสร้างภายในเซลล์นั้นถูก ubiquitin จับไว้ก่อนที่จะถูกย่อยสลายโดย proteasome สิ่งที่ย่อยสลายด้วยวิธีนี้คือ short-lived proteins
2. Autophagy-lysosome pathway (ALP) หรือ autophagy เป็นกระบวนการที่ย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ต่างๆ ที่เป็น organelle หรือ membrane โดยอาศัย lysosome ย่อยในขั้นตอนสุดท้าย ทั้งนี้กระบวนการ autophagy ยังสามารถแบ่งออกได้อีก 3 ประเภทย่อยๆ ดังนี้ (รูปที่ 1)
 - 2.1 Macroautophagy หรือโดยทั่วไปจะเรียกว่า autophagy โดยโครงสร้างภายในเซลล์จะถูกล้อมรอบด้วย membrane กลายเป็น autophagosome และส่งต่อไปรวมกับ lysosome เพื่อย่อยสลายโครงสร้างเหล่านั้น
 - 2.2 Microautophagy เป็นกระบวนการย่อยสลายโดยการเกิด invagination ของ lysosome โดยตรง
 - 2.3 Chaperone-mediated autophagy (CMA) เป็นกระบวนการที่จำเพาะกับ pentapeptide (LysPheGluArgGln) ที่อยู่ในโปรตีนที่จะย่อยสลายนั้นๆ โดยจะมี Heat shock protein 70 (Hsp70) เข้ามาจับบน pentapeptide นี้โปรตีนที่จับกับ Hsp70 นี้จะไปจับกับ Lamp2A ซึ่งเป็น receptor บน lysosome จากนั้นโปรตีนก็จะถูกส่งผ่าน lumen ของ lysosome เข้าไปภายในเพื่อย่อยสลาย

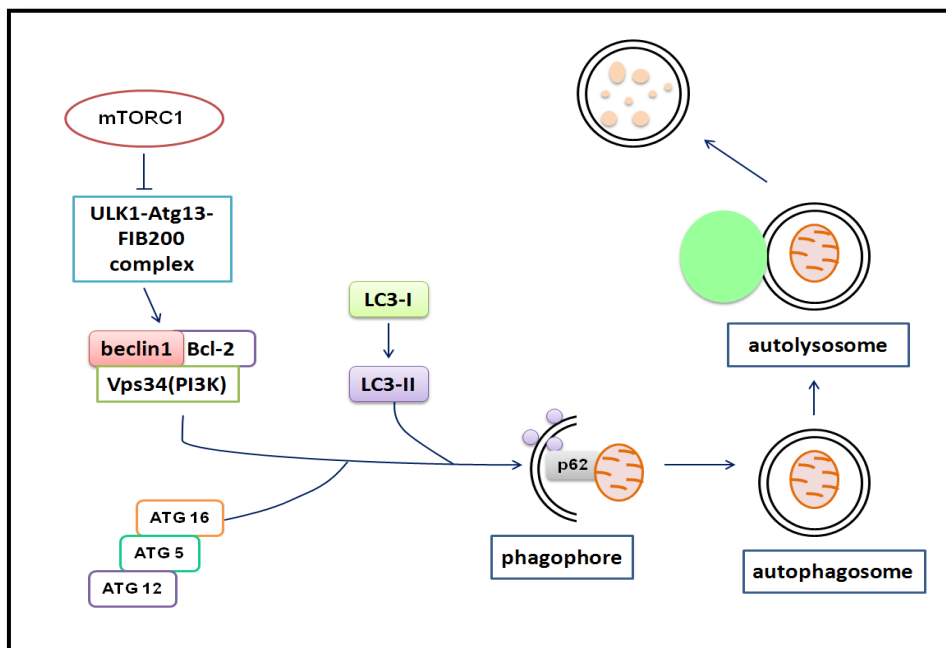


รูปที่ 1 แสดงประเภทของกระบวนการ autophagy A: macroautophagy: โครงสร้างภายในเซลล์ ถูกล้อมรอบด้วย membrane เกิดเป็น autophagosome และรวมกับ lysosome เรียกว่า autolysosome B: microautophagy เกิดการ invagination เข้าไปใน lysosome โดยตรง C: chaperone-mediated autophagy โปรตีน substrate จะมีลำดับ pentapeptide ที่จะจับกับ Hsp70 และเคลื่อนไปที่ lysosome โดยจับกับ Lamp2A ที่เป็น receptor บน lysosome โปรตีน substrate ก็จะถูกส่งเข้าไปใน lysosome เพื่อย่อยสลาย (ดัดแปลงรูปจาก Mizushima & Komatsu., 2011)

กลไกของ macroautophagy

เริ่มจากเมื่อมีการชักนำให้เกิดกระบวนการ autophagy โปรตีน Beclin-1 หลุดออกจาก Bcl-2 จากนั้น ubiquitin-like kinase (ULK) complex จะควบคุมให้ Beclin-1 จับกับ class III phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) complex ซึ่งจะชักนำโปรตีนกลุ่ม autophagy related gene (ATG) ต่างๆมารวมตัวเพื่อเริ่มสร้าง membrane initiation complex ล้อมรอบโครงสร้างที่จะย่อยสลาย จากนั้น LC3-II ซึ่งเปลี่ยนแปลงมาจาก LC3-I (ATG8) จะเข้ามาจับบริเวณ membrane ดังกล่าวด้วยเพื่อให้เกิด elongation จนล้อมรอบสมบูรณ์ พบว่ามีการชักนำ membrane จาก endoplasmic reticulum และ mitochondria ด้วย เมื่อเกิดเป็น autophagosome ที่สมบูรณ์ LC3-II จะหลุดออกจากบริเวณผิวของ autophagosome จากนั้น autophagosome ก็จะถูกส่งไป

ย่อยสลายโดยรวมกับ lysosome เป็น autophagolysosome หรือ autolysosome ต่อไป (รูปที่ 2) (6, 7)



รูปที่ 2 แสดงกระบวนการการเกิด macroautophagy (ดัดแปลงรูปจาก Rubinsztein et al., 2015) (10)

นอกจากนี้โปรตีนที่ชื่อ p62 ซึ่ง p62 จะเกาะอยู่กับ LC3 บริเวณที่ membrane ที่กำลังขยายตัว เมื่อเกิดเป็น autophagosome สมบูรณ์ p62 ก็ถูกล้อมรอบไว้ภายในและถูกย่อยสลายโดย lysosome (6, 7)

จากกลไกการเกิด autophagy ข้างต้นนี้ จึงได้มีการใช้ปริมาณของ Beclin-1, LC3-II และ p62 ในการบ่งบอกระดับการเกิด autophagy โดยหากมีการเกิด autophagy เพิ่มขึ้น จะทำให้ระดับของ Beclin-1, LC3-II เพิ่มขึ้นแต่ระดับของ p62 จะลดลงเนื่องจากถูกย่อยสลายมากขึ้น

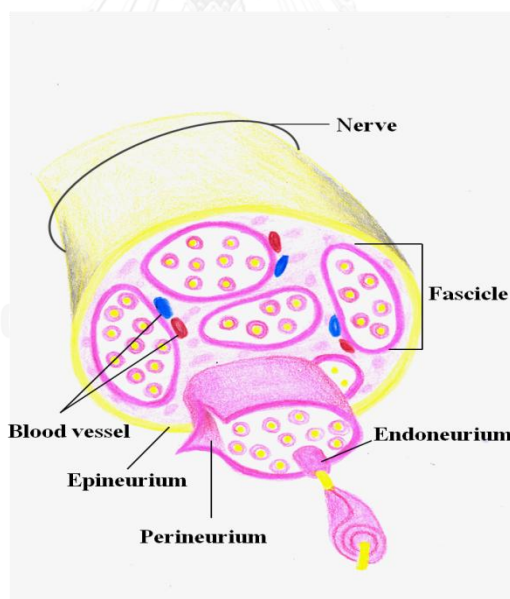
ระบบประสาท

ระบบประสาทประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

1. ระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system) หรือ CNS คือสมองและไขสันหลัง
2. ระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system) หรือ PNS เป็นส่วนที่ติดต่อระหว่างระบบประสาทส่วนกลางกับร่างกายส่วนต่างๆ ประกอบไปด้วย ปมประสาท (ganglion) และเส้นประสาท (nerve)

2.1 ปมประสาท (ganglion) เป็นที่อยู่ของ cell body ของเซลล์ประสาทที่อยู่นอก CNS โดยปมประสาทรับความรู้สึกของเส้นประสาทไขสันหลังเรียกว่า Dorsal root ganglion (DRG) ซึ่งเซลล์ประสาทรับความรู้สึกใน DRG จะรับความรู้สึกจากร่างกายที่ผ่านมากับเส้นประสาทไขสันหลังแต่ละระดับ นอกจากปมประสาทเป็นที่อยู่ของ cell body แล้วยังมีเซลล์ค้ำจุนที่อยู่ล้อมรอบ cell body เรียกว่า satellite glia cell (SGC) ทำหน้าที่เป็น incomplete physical barrier เพื่อควบคุมการผ่านเข้าออกของสาร โดยจะเรียงตัวล้อมรอบ cell body (11)

2.2 เส้นประสาท (nerve) มีส่วนประกอบที่สำคัญคือ axon และ Schwann cell โดยเส้นประสาทเกิดจากการรวมกลุ่มกันของเส้นใยประสาทที่รวมกันเป็นมัด (fascicle) อาจมีได้ตั้งแต่ ถึงหลายๆ fascicle โดยมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เรียกว่า endoneurium อยู่ระหว่างเส้นใยประสาทใน fascicle แต่ละ fascicle จะมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน perineurium หุ้มอยู่โดยรอบ และมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน epineurium หุ้มอยู่นอกสุดของเส้นประสาท (รูปที่ 3) เส้นใยประสาทในเส้นประสาทนี้จะมีทั้งที่เป็นของเซลล์ประสาทรับความรู้สึก เซลล์ประสาทสั่งการ และ เซลล์ประสาทอัตโนมัติ



รูปที่ 3 แสดงภาคตัดขวางของเส้นประสาทและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ดัดแปลงจาก (Atlas of histology with function correlation. 11th edition. P 156)

การบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย

การบาดเจ็บของเส้นประสาทอาจเกิดขึ้นได้จากหลายกลไก คือการหนีบหรือถูกแรงกด (crush/entrapment) และการถูกตัดขาด (transection) ซึ่งในทางคลินิกสามารถจำแนกความรุนแรงของการบาดเจ็บได้ 3 ระดับ (12) คือ

1. Neurapraxia เกิดการเสียหายที่ของเส้นประสาทชั่วคราว ไม่เกิด axon degeneration
2. Axonotmesis เกิดการกระแทกหรือกดทับรุนแรง axon degeneration เกิดต่ำกว่าตำแหน่งที่บาดเจ็บ แต่ connective tissue ยังคงสภาพดี การทดลองในสัตว์ทดลองจะเลียนแบบการบาดเจ็บในระดับนี้ด้วยการหนีบ (crush)
3. Neurotmesis มีการขาดออกจากกันของ connective tissue ร่วมกับการเกิด axon degeneration ทำให้ปลายเส้นประสาททั้งสองข้างแยกออกจากกัน ซึ่งการทดลองในสัตว์จะเลียนแบบการบาดเจ็บระดับนี้ด้วยการตัดเส้นประสาทให้ขาด (transection)

การเปลี่ยนแปลงหลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท

ใน cell body ของเซลล์ประสาท พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงที่ cell body เรียกว่า cell body reaction (CRB) ซึ่งประกอบด้วยการบวมของเซลล์ นิวเคลียสมีการเคลื่อนที่จากตรงกลางไปทางด้านข้าง (nuclear eccentricity) Nissl body มีการสลายตัวเรียกว่า Chromatolysis โดย CRB พบได้ตั้งแต่ 8 ชั่วโมงหลังจากเกิดการบาดเจ็บ (13) ซึ่ง CRB นี้อาจรุนแรงจนเกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ พบว่าในปมประสาทไขสันหลังมีการตายของเซลล์ประสาทประมาณ 10-30% หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic (2) โดยการตายของเซลล์แบบ apoptosis นี้จะพบได้ตั้งแต่วันแรกหลังจากเกิดการบาดเจ็บและเกิดขึ้นภายใน 2 เดือน (1)

ในเส้นประสาทที่เหนือต่อบริเวณที่บาดเจ็บ (proximal stump) เกิดการย่อยสลาย axon ขึ้นไป 1-2 internode เรียกว่า retrograde degeneration โดยปลาย axon ที่ยังเหลืออยู่จะมีโครงสร้างที่เรียกว่า growth cone อกไปยัง distal stump ภายใต้อัน basal lamina ของ Schwann cell ที่มีลักษณะเป็นโพรงสำหรับนำทางการงอกของเส้นประสาท และในเส้นประสาทที่อยู่ใต้ต่อบริเวณที่บาดเจ็บ (distal stump) จะเกิดการเสื่อมสลายของ axon ไปยังอวัยวะเป้าหมาย เรียกว่า anterograde degeneration โดยหลังจาก 24 ชั่วโมงจะพบการย่อยสลายของ myelin sheath เกิด myelin voids จากนั้น myelin จะถูก Schwann cell กำจัดไปและจะมี macrophage เข้ามา ซึ่งนอกจากจะเข้ามาช่วยกำจัดแล้วยังช่วยกระตุ้น Schwann cell ให้มีการผลิตสาร nerve growth factor (NGF) ซึ่งเป็นสารที่ช่วยการงอกใหม่ของเส้นประสาท (14)

Autophagy กับระบบประสาท

เนื่องจาก autophagy เป็นกระบวนการย่อยสลาย organelle ที่ผิดปกติไม่ให้สะสมในเซลล์ ดังนั้นจึงมีความสำคัญต่อการทำงานของปกติของเซลล์ และโดยเฉพาะอย่างยิ่งต่อเซลล์ประสาทที่ไม่มีการแบ่งเซลล์ในผู้ใหญ่ ทำให้เซลล์ประสาทมีอายุยืนและจำเป็นต้องพึ่งพากระบวนการ autophagy อย่างมาก นอกจากนี้กระบวนการ autophagy ก็ยังมีความสำคัญในการจัดเรียงตัวใหม่ของ dendrite และ axon ซึ่งเกี่ยวข้องกับ plasticity ของระบบประสาทอีกด้วย (7, 15)

ความสำคัญของกระบวนการ autophagy ต่อเซลล์ประสาทจะเห็นได้จากการทดลอง gene deletion ของ ATG ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของ autophagy พบว่ามีการสะสมของโปรตีนและโครงสร้างผิดปกติในเซลล์ประสาท ทำให้เซลล์สูญเสียการทำงานและตายในที่สุด สอดคล้องกับการทดลองนี้คือ การพบว่ากระบวนการ autophagy มีการทำงานผิดปกติในโรคของระบบประสาท โดยเฉพาะกลุ่ม neurodegeneration เช่น Alzheimer's disease ที่เกิดจากการสะสมของโปรตีน beta-amyloid ภายในเซลล์ Parkinson's disease ที่มีการสะสมของโปรตีน alpha-synuclein ในบริเวณ substantia nigra เป็นต้น ซึ่งความผิดปกติของกระบวนการ autophagy มีความเกี่ยวข้องกับโรคกลุ่ม neurodegeneration (7) เนื่องจาก

1. การแก่ของเซลล์ประสาท การแก่ของเซลล์จะปลดประสิทธิภาพของกระบวนการ autophagy อีกทั้งพบการรวมกลุ่มของโปรตีนหรือโครงสร้างภายในเซลล์ที่ผิดปกติมากขึ้น แล้วชักนำให้เกิดการตายของเซลล์และก่อให้เกิดโรคกลุ่มนี้
2. โปรตีนที่ผิดปกติในโรคเหล่านี้ไม่สามารถละลายตัว เพราะโดยปกติในการย่อยสลายโปรตีนที่มีโครงสร้างผิดปกติผ่าน proteasome นั้นต้องเป็นโปรตีนที่ละลายตัวแล้วเพื่อที่จะส่งผ่านรูของ proteasome เข้าไปย่อยสลาย ดังนั้นจึงเป็นหน้าที่ของกระบวนการ autophagy เข้ามาจัดการกับโปรตีนที่ไม่มีการละลายตัวเหล่านั้น ทำให้ภาระของ autophagy มากขึ้น

การที่ประสิทธิภาพของ autophagy ลดลงร่วมกับมีภาระต้องย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์เพิ่มขึ้นทำให้มีการสะสมของโครงสร้างและโปรตีนที่ผิดปกติมากขึ้น ส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์ โดยเฉพาะการขนส่งสารต่างๆ ผ่าน axon (10)

จากทั้งหมดสามารถสรุปได้ว่ากระบวนการ autophagy เป็นกระบวนการที่สำคัญในการอยู่รอดของเซลล์ประสาท อีกทั้งระดับของ autophagy ที่ต่ำนั้นส่งผลให้เกิดความผิดปกติในเซลล์และนำไปสู่การตายของเซลล์ประสาทอย่างกว้างขวางในโรคกลุ่ม neurodegeneration

อย่างไรก็ตามมีข้อโต้แย้งว่า autophagy เป็นกลไกที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ประสาทด้วยเช่นกัน โดยพบว่าเมื่อกำจัด autophagy gene บางตัวออกไปก็ส่งผลทำให้มีการตายของเซลล์ประสาทลดลงในโรคของระบบประสาทบางโรคเช่น พบว่าในสมองที่เกิดการบาดเจ็บจากสภาวะ

hypoxia-ischemia เซลล์ประสาทใน hippocampal มีการตายลดลงเมื่อยับยั้งการแสดงออกของ ATG-7 (16)

ดังนั้นกระบวนการ autophagy มีผลดีหรือผลเสียต่อระบบประสาทนั้น ยังไม่มีข้อสรุปอย่างแน่ชัด แต่อาจเป็นไปได้ว่าการทำงานของ autophagy จะเป็นผลดีต่อเซลล์ประสาทเพื่อย่อยสลายโปรตีนและโครงสร้างที่ผิดปกติ แต่หากการทำงานลดลงเช่นที่พบในโรคกลุ่ม neurodegeneration หรือเพิ่มขึ้นในกรณี hypoxia-ischemia อาจจะเป็นผลเสียต่อเซลล์ ทั้งนี้คงต้องรอการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

Autophagy กับการบาดเจ็บของระบบประสาท

เมื่อเกิดการบาดเจ็บของระบบประสาทส่วนกลาง พบว่าระดับของการเกิดกระบวนการ autophagy เพิ่มขึ้น (17) โดยสังเกตจากโปรตีน Beclin-1 ซึ่งเป็น autophagy regulator protein จะมีปริมาณสูงขึ้นหลังจากการบาดเจ็บของสมอง (18) รวมถึงระดับของ LC3-II ก็มีปริมาณสูงขึ้น (3, 4) เช่นเดียวกันเมื่อเกิดการบาดเจ็บของไขสันหลัง พบว่าโปรตีน Beclin-1 มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้น ในเซลล์ประสาท astrocyte และ oligodendrocyte (5) นอกจากนี้พบว่าในสัตว์ทดลองที่เป็น subarachnoid hemorrhage ก็ยังมีระดับของ Beclin-1 และอัตราส่วนของ LC3-II : LC3-I สูงขึ้นด้วยเช่นกัน (19) กระบวนการ autophagy ที่เพิ่มสูงขึ้นหลังจากการบาดเจ็บของระบบประสาทส่วนกลางนั้น ยังมีข้อโต้แย้งอยู่ว่ามีผลดีหรือผลเสียต่อระบบประสาท เพราะหลักฐานยังขัดแย้งกันอยู่ (17) ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

ในกรณีการบาดเจ็บของเส้นประสาทมีการทดลองรัดเส้นประสาทไขสันหลังระดับ L4-L5 พบว่าปริมาณของ LC3-II สูงขึ้นมาก แต่ระดับของ Beclin-1 สูงขึ้นเล็กน้อยในไขสันหลังข้างเดียวกับที่ทำการรัดเส้นประสาท (8) นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน p62 ซึ่งเป็น autophagy substrate ที่จะไปจับกับ LC3 โดยตรงแล้วเข้าไปอยู่ภายใน autophagosome เพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ากระบวนการ autophagy ลดประสิทธิภาพในการทำงานลง แต่ในขณะที่การเพิ่มขึ้นของ LC3-II จะเกี่ยวข้องกับ การสะสมของ autophagosome ซึ่งการรัดเส้นประสาทไขสันหลังจะส่งผลไปลดการทำงานของกระบวนการ autophagy นำไปสู่การสะสมของ autophagosome นั้นเอง อีกการศึกษาหนึ่งพบการเพิ่มขึ้นของ Beclin-1 และ LC3 เมื่อไขสันหลังบาดเจ็บ และพบว่าการเพิ่มขึ้นนี้อยู่ในเซลล์ประสาทมากกว่า astrocyte (9)

นอกจากนี้พบว่าการบาดเจ็บของเส้นประสาทสมองก็มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ autophagy จากการทดลองตัดเส้นประสาท hypoglossal เมื่อทำ RT-PCR และ In situ hybridization (ISH) พบว่าในนิวเคลียสของเส้นประสาท hypoglossal ที่ถูกตัดนี้มีการสังเคราะห์ mRNA ของ LC3 และ LC3-II มากขึ้น (20) อย่างไรก็ตามสำหรับการบาดเจ็บของเส้นประสาท optic

พบว่า ในการเพาะเลี้ยง retinal ganglion cell (RGCs) เมื่อให้สาร paraquat ซึ่งเป็นสารที่ชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ขึ้นส่งผลให้ mitochondria membrane potential เสียไป และทำให้มีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น (21) แต่เมื่อให้สาร rapamycin ซึ่งเป็นสารที่ไปกระตุ้นกระบวนการ autophagy ผลที่ได้คือ mitochondria membrane potential ดีขึ้น ปริมาณของ ROS และการตายของเซลล์ลดลง นอกจากนี้การทดลองให้สาร 3-methyladenine (3-MA) ซึ่งเป็นสารยับยั้งการเกิดกระบวนการ autophagy พบว่าให้ผลเหมือนกับสาร paraquat สามารถสรุปได้ว่ากระบวนการ autophagy มีบทบาทในการป้องกันการตายของ RGC ที่ถูกกระตุ้นจากสภาวะ oxidative stress นอกจากการทดลองใน cell culture การตัดเส้นประสาท optic ในสัตว์ทดลองพบว่าจำนวนของ RGCs เริ่มลดลงจากกระบวนการ apoptosis ในวันที่ 5 หลังจากทำการตัดเส้นประสาท ส่วนโปรตีน LC3-II Beclin-1 และ mRNA ของ Atg5 ที่ได้จากการสกัดจอตาของสัตว์ทดลองพบว่ามีปริมาณสูงขึ้น และเมื่อศึกษาพยาธิสภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า mitochondria ถูกกลืนอยู่ภายใน autophagosome แสดงให้เห็นถึงระดับของ autophagy ที่เพิ่มขึ้น เมื่อให้สาร rapamycin ในหนูที่ทำการตัดเส้นประสาท optic พบว่าการตายของ RGC ลดลง และเมื่อทำ gene deletion ของ Atg4b ออกจากระบบประสาทของสัตว์ทดลอง พบว่ากระบวนการ autophagy ลดลง และมีการตายของเซลล์มากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้ทำ gene deletion การทดลองในสัตว์นี้จึงสรุปได้ว่าการบาดเจ็บของเส้นประสาท optic ทำให้เกิดการตายของ RGC โดยมีกระบวนการ autophagy เพิ่มขึ้น ซึ่งหากกระตุ้น autophagy มากขึ้นด้วย rapamycin จะสามารถลดการตายของ RGC ได้ สอดคล้องกับการขัดขวาง autophagy จาก gene deletion ที่ทำให้เซลล์ตายมากขึ้น ดังนั้น autophagy จึงน่าจะมีผลดีต่อ RGC หลังการบาดเจ็บ

งานวิจัยของ Huang และคณะในปี 2016 (22) ได้ศึกษาบทบาทของ autophagy ต่อการบาดเจ็บของเส้นประสาท โดยทำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic แบบหนีบแล้วแบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มแรกเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการบาดเจ็บของเส้นประสาท กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทและได้สาร vehicle กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่มีการบาดเจ็บของเส้นประสาทและได้สาร rapamycin ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้น autophagy และกลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่มีการบาดเจ็บของเส้นประสาทและได้สารยับยั้งกระบวนการ autophagy คือ 3-methyladenine (3-MA) ในสัปดาห์ที่ 1 ที่บริเวณที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทแบบหนีบ พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของอัตราส่วนของโปรตีน LC3-II : LC3-I และปริมาณของ autophagosome ที่เพิ่มขึ้นจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับการบาดเจ็บของเส้นประสาทและกลุ่มที่ให้สาร 3-MA ซึ่งแสดงว่ามีการกระตุ้น autophagy ในเส้นประสาทที่บาดเจ็บ นอกจากนี้ในด้านการศึกษาหน้าที่ motor ของเส้นประสาท sciatic พบว่าในกลุ่มที่ให้สาร rapamycin มีการคืนหน้าที่ทาง motor ดีกว่าในกลุ่มที่ได้ vehicle อย่างเดียว ในสัปดาห์ที่ 1 และ 2 สวนทางกับเมื่อให้สาร 3-MA

พบว่ามีการคืนหน้าที่ทาง motor ลดลง จึงสามารถสรุปได้ว่า กระบวนการ autophagy น่าจะมีผลดีต่อการคืนหน้าที่ทาง motor ของเส้นประสาท sciatic หลังการบาดเจ็บ

งานวิจัยนี้ยังได้ศึกษาการงอกใหม่ของ axon รวมถึงการสร้าง myelin sheath พบว่ามีการแสดงออกของปริมาณ myelin basic protein (MBP) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สำคัญใน myelin sheath และปริมาณ neurofilament-200 (NF-200) ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม cytoskeleton ของ axon มีปริมาณสูงขึ้นใน 1 สัปดาห์หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทในกลุ่มที่ให้สาร rapamycin เมื่อเทียบกับกลุ่ม vehicle และกลุ่มที่ให้สาร 3-MA ในสัปดาห์ที่ 6 หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท จากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนพบว่า มีจำนวน axon ขนาดใหญ่ ($> 4 \mu\text{m}$) เพิ่มมากขึ้นในกลุ่มที่ให้สาร rapamycin เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้ vehicle และกลุ่มที่ให้สาร 3-MA จึงสามารถสรุปได้ว่าการกระตุ้นกระบวนการ autophagy ด้วย rapamycin น่าจะมีผลดีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic นอกจากนี้เมื่อตรวจสอบการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ด้วย TUNEL พบปริมาณนิวเคลียสของเซลล์ที่เกิด apoptosis ในสัปดาห์ที่ 1 หลังจากเกิดการบาดเจ็บลดลงในกลุ่มที่ให้สาร rapamycin เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้ vehicle อย่างเดียวและกลุ่มที่ให้สาร 3-MA จากส่วนนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าการกระตุ้น autophagy จะมีบทบาทในการป้องกันการตายของเซลล์ ซึ่งน่าจะเป็นเซลล์ Schwann หลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic ได้

แต่อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ไม่มีการศึกษาถึงระยะเวลาในการเพิ่มขึ้นของกระบวนการ autophagy ว่าเพิ่มขึ้นในช่วงใดบ้าง อีกทั้งวิธีการที่ใช้ประเมินการงอกใหม่ของเส้นประสาทนั้นไม่ละเอียดเพียงพอ นอกจากนี้ยังไม่ได้ศึกษาถึงเนื้อเยื่อส่วนอื่นของระบบประสาทส่วนปลายที่เกี่ยวข้องด้วย ได้แก่ เส้นประสาทด้านที่อยู่เหนือต่อบริเวณที่บาดเจ็บ (proximal stump) และด้านที่อยู่ใต้ต่อบริเวณที่บาดเจ็บ (distal stump) รวมทั้ง dorsal root ganglion

ข้อมูลข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่าการบาดเจ็บของระบบประสาทน่าจะกระตุ้นกระบวนการ autophagy และน่าจะมีผลดีต่อเส้นประสาทที่ได้รับการบาดเจ็บแต่ยังมีข้อมูลอยู่น้อย ดังนั้นจำเป็นต้องศึกษาเพิ่มเติมต่อไป โดยเฉพาะการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ autophagy ในปมประสาทไขสันหลังและเส้นประสาทส่วนอื่นๆ หลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic ทั้ง proximal & distal nerve stumps ในแต่ละช่วงเวลาจึงเป็นที่มาของการศึกษาในครั้งนี้

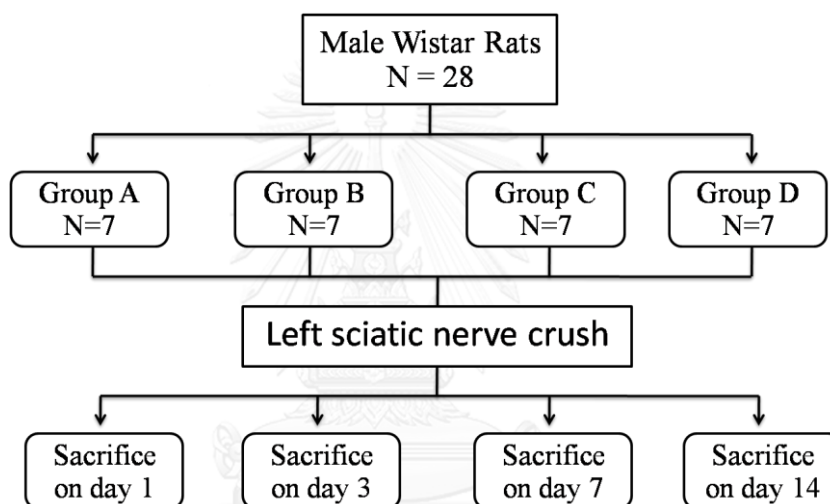
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

หนูเพศผู้พันธุ์ Wistar จำนวน 28 ตัว น้ำหนัก 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

รูปแบบการวิจัย

การทดลองในสัตว์



วิธีการทำวิจัย

1. การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

หนูทั้งหมด 28 ตัว โดยสุ่มเลือกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 7 ตัว ดังนี้

กลุ่ม A ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 1 วัน

กลุ่ม B ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 3 วัน

กลุ่ม C ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 7 วัน

กลุ่ม D ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 14 วัน

2. สภาพแวดล้อมในการดูแลหนู

ทำการชั่งน้ำหนักแรกจับ ให้หนูได้รับน้ำและอาหารเม็ดสำเร็จรูปในปริมาณที่เพียงพอ ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ช่วงเวลากลางคืน/กลางวัน 12/12 ชั่วโมง ทั้งนี้ก่อนเริ่มการวิจัย โครงการได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ ของคณะ

แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่โครงการ 18/58 และผู้วิจัยได้ทำตามหลักเกณฑ์/ คำแนะนำ ในการใช้สัตว์ทดลองที่ออกโดยสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

3. การทำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทแบบหนีบ

เส้นประสาท sciatic รับแขนง sensory และ motor จาก L4-L6 nerve root โดยส่วน ปลายแยกเป็นเส้นประสาท common peroneal, tibial และ sural โดยมีขั้นตอนการหนีบ เส้นประสาท sciatic ซึ่งจะหนีบบริเวณระดับกึ่งกลางต้นขาก่อนที่จะแยกเป็น 3 แขนงข้างต้นดังนี้

- 3.1 วางยาสลบหนูทดลองเพื่อทำการผ่าตัดหนูทุกตัว โดยใช้ isoflurane ผสมกับ oxygen ให้หนูทดลองดมจนสลบโดยใช้เครื่องดมยาสลบสำหรับสัตว์ทดลองจากนั้นเตรียมการผ่าตัด โดยโกนขนที่ขาหลังและสะโพกข้างซ้ายและท่ายา betadine ที่ผิวหนังเพื่อฆ่าเชื้อโรค
- 3.2 จากนั้นผ่าตัดเปิดชั้นผิวหนังของต้นขาหลังข้างซ้ายและแหวกกล้ามเนื้อเพื่อให้เห็นเส้นประสาท sciatic แล้วทำการหนีบเส้นประสาท sciatic ระดับกลางต้นขา โดยใช้ arterial clamp หนีบเป็นเวลา 30 วินาที
- 3.3 ทำดำหนีบบริเวณที่ทำการหนีบเส้นประสาทโดยใช้ไหมชนิดไม่ละลายเบอร์ 8/0 ผูกที่ชั้น epineurium จากนั้นทำการเย็บปิดแผลด้วยไหมไม่ละลายเบอร์ 5/0 แล้วรอให้หนูฟื้น
- 3.4 เมื่อหนูรู้สึกตัวดีแล้ว นำกลับเข้าห้องสัตว์เลี้ยง โดยหลังจากนี้คอยตรวจดูบาดแผลและทา betadine ที่บริเวณบาดแผลจนกว่าแผลจะหายสนิททุกวันและคอยสังเกตบริเวณแผลผ่าตัดว่าแผลเย็บหลุดหรือไม่ เพื่อจะได้เย็บปิดบาดแผลได้ทันทุกวันจะกว่าแผลจะปิดสนิท

4. การเก็บชิ้นเนื้อเส้นประสาทและปมประสาทไขสันหลัง

เมื่อครบกำหนด 1, 3, 7, และ 14 วันหลังจากการผ่าตัด ทำการ sacrifice มีขั้นตอนต่อไปนี้

- 4.1 นำหนูทุกตัวมาดม isoflurane เกินขนาด
- 4.2 ผ่าตัดเปิดช่องอกแล้วใช้เข็มดูดเลือดออกจากหัวใจห้องล่างขวาให้ได้มากที่สุด จากนั้นใช้กรรไกรตัดผนังหัวใจห้องบนขวา เพื่อให้แน่ใจว่าหนูเสียชีวิตแล้วแน่นอน
- 4.3 จากนั้นผ่าตัดเปิดชั้นผิวหนังของขาหลังเพื่อเก็บเส้นประสาท sciatic ทั้ง 2 ข้าง โดยเก็บส่วนตั้งแต่รอยหนีบที่มีไหมเย็บอยู่ลงไป (distal stump) และตั้งแต่รอยหนีบขึ้นไป (proximal stump) จนถึงก่อนที่เส้นประสาทจะแยกเป็น L4-L6 nerve root ทั้งนี้จะใช้เส้นประสาท sciatic ข้างขวาเทียบกับข้างซ้าย
- 4.4 จากนั้นนำเส้นประสาท sciatic แยกใส่ Eppendorf tube นำไปแช่ใน dry ice แล้วจึงย้ายไปเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -70°C

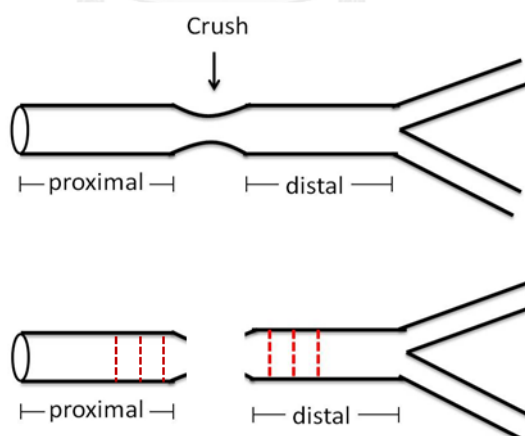
5. การหาระดับโปรตีน beclin1, LC3 และ p62 ด้วยวิธี Western blot

5.1 การเตรียมตัวอย่าง

5.1.1 Dorsal root ganglion (DRG) ในระดับ L4-L6 ใส่ใน Eppendorf tube รวมกันแต่ แยกข้างซ้ายและข้างขวา

5.1.2 Sciatic nerve ที่แยกเป็น proximal และ distal stumps ข้างซ้ายและขวา (รูปที่ 4) โดยตัดแบ่ง sciatic nerve ออกมาเป็นท่อนๆละ 3 mm จำนวน 3 ท่อน

นำ DRG และ sciatic nerve ที่แบ่งแล้วมา homogenize ใน homogenization solution [0.1 mmol/l PIPES Ph 6.9, 5 mmol/l magnesium chloride, 5 mmol/l EGTA, 0.5% Triton X-100, 20% glycerol, 10 mmol/l sodium fluoride plus 1 mmol/l PMSF, 2 mmol/l sodium orthovanadate and protease inhibitor cocktail (1µg/ml pepstatin A, 1 µg/ml leupeptin, 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 aprotinin)] ด้วยเครื่อง microhomogenizer ปิเปตตัวอย่าง 100 µl หลังจากนั้นเติม sample buffer 25 µl (Trizma HCl pH 6.8, bromphenol blue sodium salt, glycerol, 99% DL-Dithiothreitol, SDS and B-mercapo) ลงในแต่ละ sample แล้วนำไปต้มเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อทำให้โปรตีนเสียสภาพ



รูปที่ 4 แสดงการเตรียมเส้นประสาท sciatic ที่แยกเป็น proximal และ distal stumps

5.2 Bramhall protein assay (23)

เป็นวิธีการที่ทำให้ทราบความเข้มข้นของโปรตีนในตัวอย่าง โดยเทียบกับค่าโปรตีนมาตรฐาน หลักการคือใช้ Coomassie blue เข้าไปจับกับโปรตีนใน acidic medium ความเข้มของสีจะแปรตามปริมาณโปรตีน โดยขั้นตอนเริ่มจากใช้กระดาษ Whatman เบอร์ 1 ใช้ดินสอกาแบ่งเป็นช่องสี่เหลี่ยมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ใช้ Bovine serum albumin (BSA) เป็น standard ปริมาตร 0.5 - 8 μ l homogenization solution ปริมาตร 3 μ l เป็น blank และตัวอย่างที่ได้จากการเตรียมในขั้นตอนแรกปริมาตร 3 μ l หยดลงบนกระดาษ 3 ช่อง ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วนำมาล้างด้วย methanol เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่อาจจะไปรบกวนการจับของสี Coomassie blue จากนั้นนำกระดาษมาข้อมด้วย 0.5% Coomassie blue เป็นเวลา 30 นาที และล้างด้วย 7% acetic acid เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้แห้งแล้วตัดกระดาษออกตามแต่ละตารางใส่ใน 1.4 ml elute solution (66% methanol, 33% distilled water and 1% ammonium hydroxide) แล้ว vortex เพื่อ elute สีที่จับอยู่กับโปรตีนออก ปิเปตต์สารละลายไปใส่ใน 96-well plate และนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm โดยใช้เครื่อง plate reader ค่า OD ของตัวอย่างจะนำมาเปรียบเทียบกับค่า OD ของ BSA ที่ plot เป็น standard curve เพื่อใช้หาความเข้มข้นของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง

5.3 Gel electrophoresis

เป็นกระบวนการแยกโปรตีนโดยอาศัยมวลโมเลกุลและประจุไฟฟ้า โดยใช้เทคนิค SDS-PAGE (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis) โดย SDS จะไปทำให้โปรตีนเสียสภาพอีกทั้งยังไปเพิ่มประจุลบให้กับโปรตีน ทำให้โปรตีนสามารถวิ่งในสนามไฟฟ้าได้ โดย load โปรตีนที่สนใจลงใน stacking gel ในปริมาณที่คำนวณให้ได้โปรตีน 15 μ g จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า 100 โวลต์ เพื่อให้โปรตีนเรียงตัวที่แถบเดียวกันก่อนจะเข้าสู่ separating gel ปล่อยกระแสไฟฟ้าไหลผ่าน 150 โวลต์ โดยโปรตีนที่มีขนาดเล็กจะสามารถเคลื่อนที่ผ่านไปไกลกว่าโปรตีนขนาดใหญ่ จากนั้นโปรตีนที่ถูกแยกแล้วจะถูกย้ายไปยังแผ่น nitrocellulose (GE Life Sciences) โดยใช้เครื่อง semi-dry electroblotter

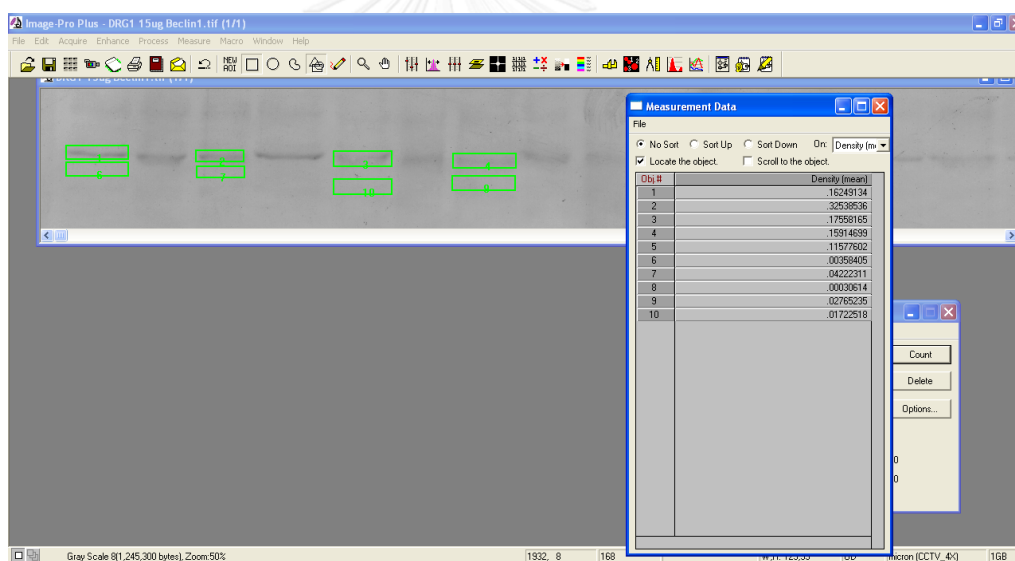
5.4 Immunological detection

เมื่อโปรตีนถูกย้ายมาอยู่บนแผ่น nitrocellulose แล้วนำแผ่น nitrocellulose มาแช่ใน 0.5% casein solution buffer (Vector) เป็นเวลา 5 นาที เพื่อลดการเกิด non-specific binding ของ primary antibody จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ไปบ่มกับ primary antibody ต่อโปรตีนที่สนใจที่จะศึกษา คือ Beclin-1, LC3 และ p62 (1:1000, Santa Cruz) ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 1 คืน ในวันถัดมานำแผ่น nitrocellulose มาล้าง

ด้วย wash buffer เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปบ่มต่อกับ biotinylated secondary antibody (Vector) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง นำแผ่น nitrocellulose ไปล้างอีกครั้งด้วย wash buffer เป็นเวลา 5 นาทีแล้วนำไปบ่มกับ Avidin-biotin complex (Vectastain ABC kit standard 1:100 Vector) เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นนำแผ่น nitrocellulose ไปใส่ใน DAB substrate (DAB peroxidase substrate kit, Vector) เพื่อให้แถบโปรตีนที่สนใจติดเป็นสีน้ำตาลเข้ม สุดท้ายนำแผ่น nitrocellulose ไปล้างด้วยน้ำประปาแล้วทิ้งไว้ให้แห้ง

5.5 Densitometric analysis

แผ่น Nitrocellulose ที่ได้จะนำไปสแกนด้วยเครื่องสแกนเนอร์ ออกมาเป็นไฟล์ภาพ TIFF แถบความเข้มของแถบโปรตีนที่ปรากฏจะถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Image pro plus (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 แสดงการวัดแถบความเข้มของแถบโปรตีนด้วยโปรแกรม Image pro plus

6. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

เปรียบเทียบค่าปริมาณโปรตีน Beclin-1, LC3 และ p62 ที่ตรวจสอบได้ในเส้นประสาท sciatic proximal, distal stump และ DRG ระดับ L4-6 ระหว่างข้างซ้ายที่บาดเจ็บกับข้างขวาที่ปกติในแต่ละระยะเวลาด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA ใช้โปรแกรม SPSS version 16 โดยความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < .05$

7. จริยธรรม (Ethical consideration)

โครงการนี้ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่ 18/58 ก่อนเริ่มดำเนินการวิจัยในสัตว์และผู้วิจัยได้ทำตามจริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

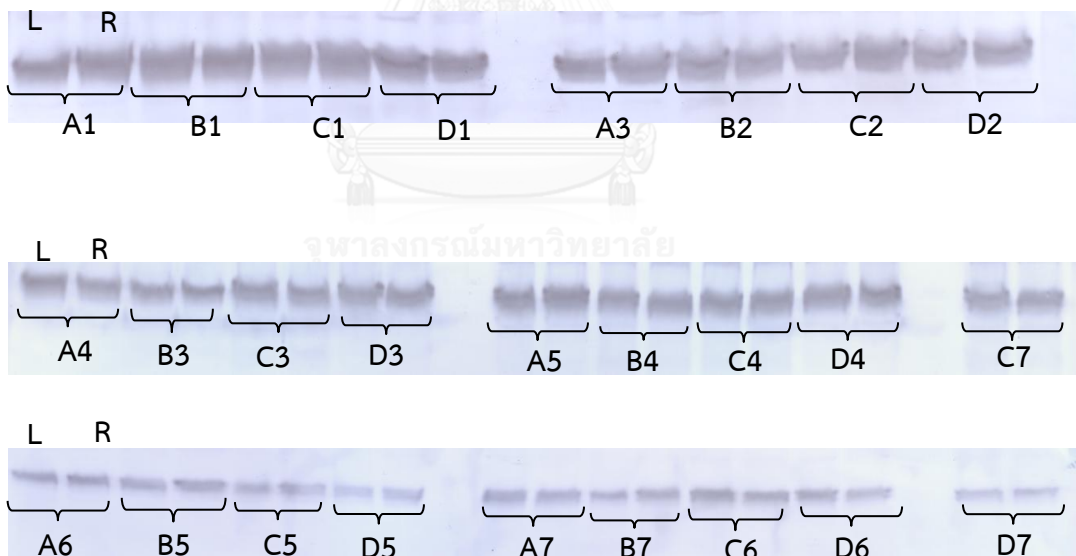


บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

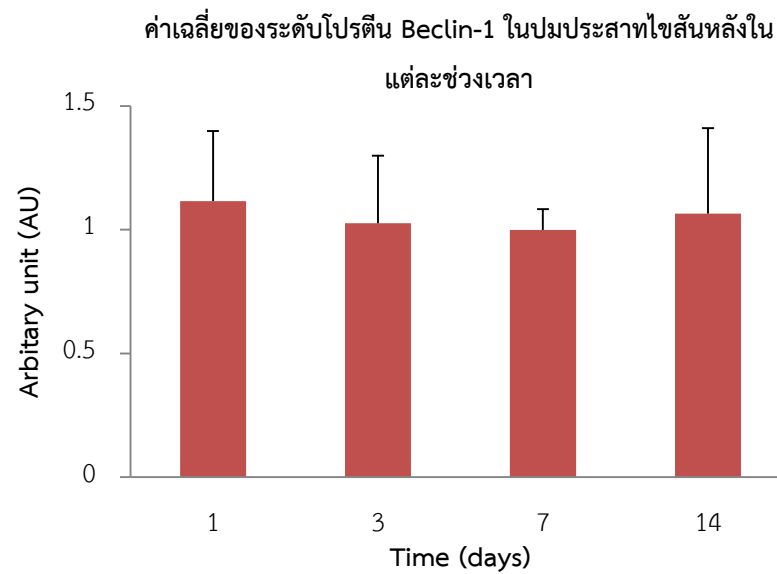
การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในปมประสาทไขสันหลัง (DRG) และในเส้นประสาท sciatic ของหนูทั้งทางด้าน proximal และ distal stump หลังจากทำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท

1. การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ใน DRG

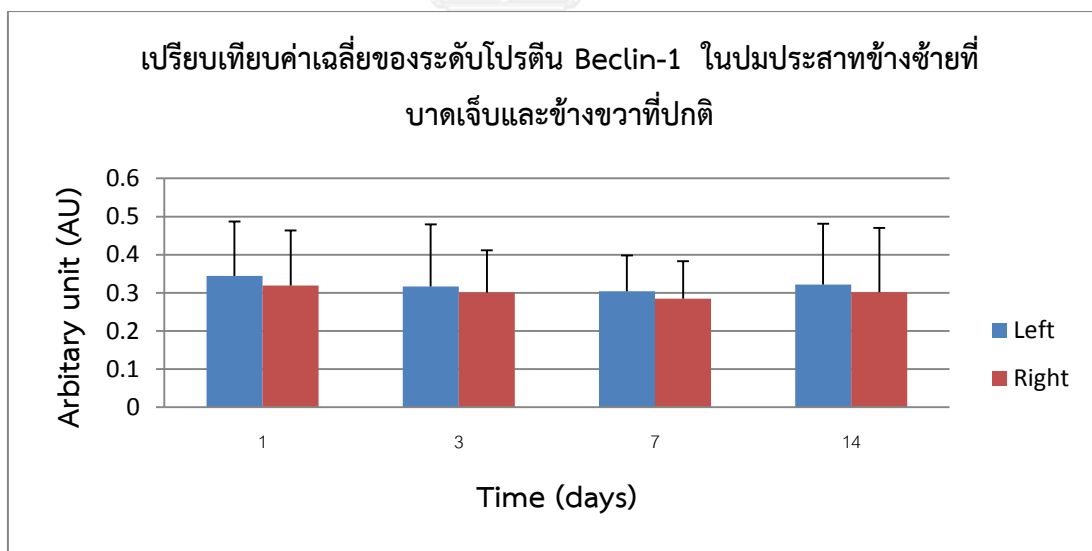
การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนในกระบวนการ autophagy ซึ่งประกอบด้วย Beclin-1, LC3 และ p62 โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Western blot ที่เวลาต่างกันคือ 1, 3, 7 และ 14 วันหลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทแบบหนีบ (รูปที่ 6) พบว่าใน DRG ปริมาณของ Beclin-1 ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างข้างซ้ายและข้างขวาในระยะเวลาเดียวกันและระหว่างค่าสัดส่วนข้างซ้ายต่อขวาในหนูตัวเดียวกันระหว่างช่วงเวลาต่างๆ หลังเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท (รูปที่ 7 และ 8)



รูปที่ 6 แถบโปรตีน Beclin-1 ใน DRG ข้างซ้าย (L) และข้างขวา (R) ด้วยวิธี Western blot โดยกลุ่ม A, B, C และ D ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 1, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ เลข 1-7 คือ เลขของหนูทดลอง

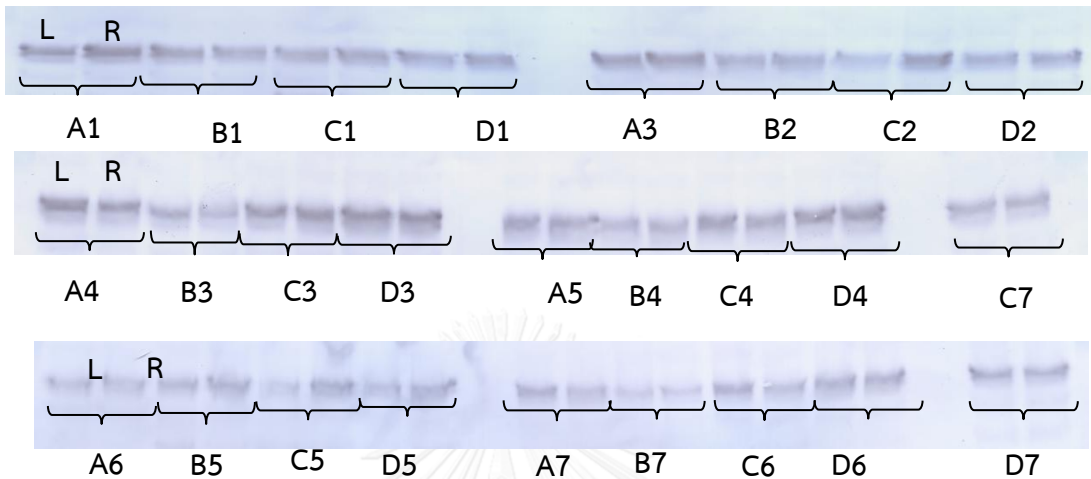


รูปที่ 7 ค่าสัดส่วนของระดับ Beclin-1 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในหนูตัวเดียวกันในช่วงเวลาต่างๆ กันหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย และ error bar เป็นค่า SD



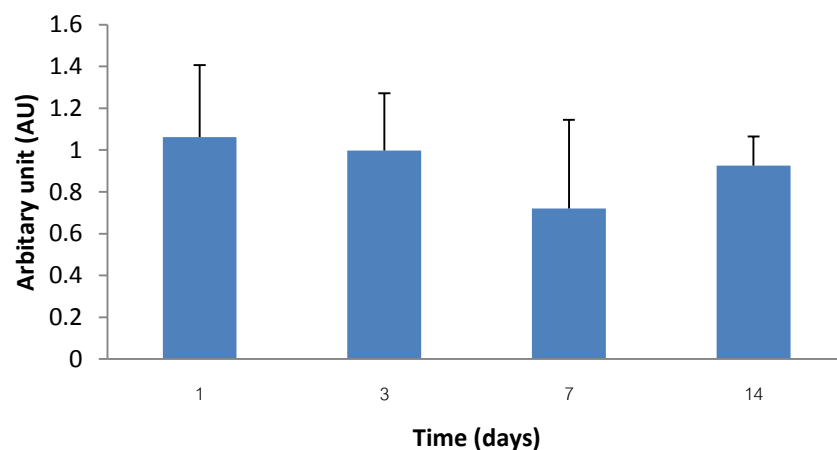
รูปที่ 8 ค่าเฉลี่ยของระดับ Beclin-1 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในช่วงเวลาต่างๆ กันหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic

สำหรับปริมาณโปรตีน p62 ใน DRG พบว่าไม่แตกต่างกันมีนัยสำคัญระหว่างข้างซ้ายและข้างขวาในระยะเวลาเดียวกันและระหว่างค่าสัดส่วนข้างซ้ายต่อขวาในหนูตัวเดียวกันระหว่างช่วงเวลาต่างๆ หลังเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท (รูปที่ 9, 10 และ 11)

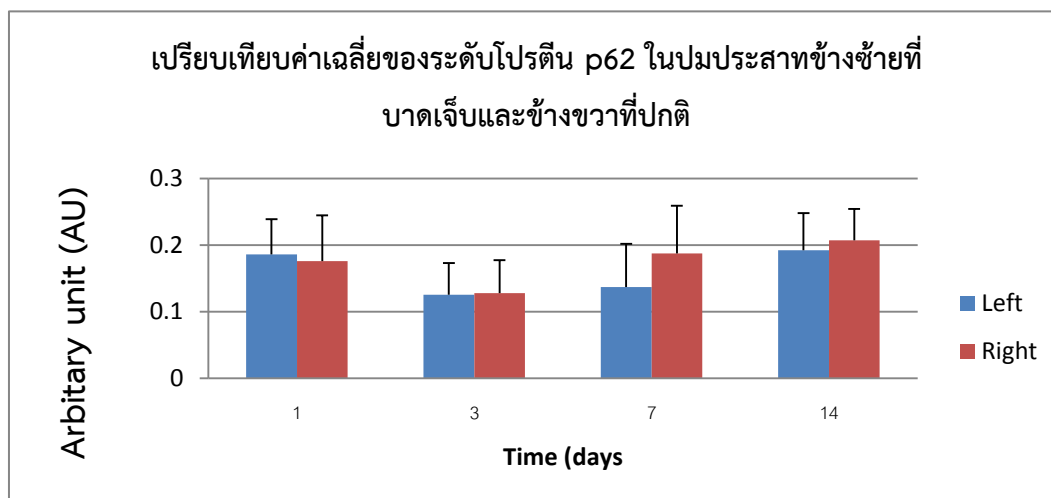


รูปที่ 9 แถบโปรตีน p62 ใน DRG ข้างซ้าย (L) และข้างขวา (R) ด้วยวิธี Western blot โดยกลุ่ม A, B, C และ D ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 1, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ และเลข 1-7 คือ เลขของหนูทดลอง

ค่าเฉลี่ยของระดับโปรตีน p62 ในปมประสาทไขสันหลังใน แต่ละช่วงเวลา



รูปที่ 10 ค่าสัดส่วนของระดับ p62 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในหนูตัวเดียวกันในช่วงเวลาต่างๆ กันหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยและ error bar เป็นค่า SD



รูปที่ 11 ค่าเฉลี่ยของระดับ p62 ใน DRG ข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาในช่วงเวลาต่างๆ กันหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic

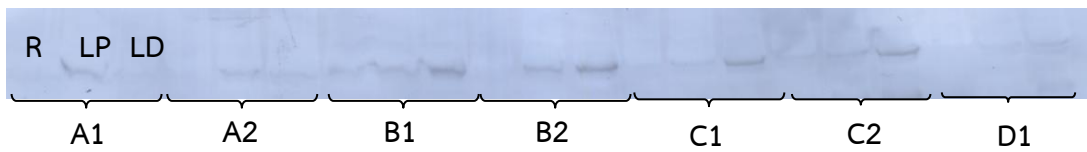
นอกจากนี้ยังพบว่าการศึกษาปริมาณของ LC3 ด้วยวิธี Western blot พบแถบของ LC3 จางจนไม่สามารถวิเคราะห์เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ ถึงแม้จะได้มีการเปลี่ยน/เพิ่มความเข้มข้น primary antibody รวมทั้งเพิ่มปริมาณ sample แล้วก็ตาม (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แถบโปรตีน LC3 ใน DRG จากการศึกษาด้วยวิธี Western blot

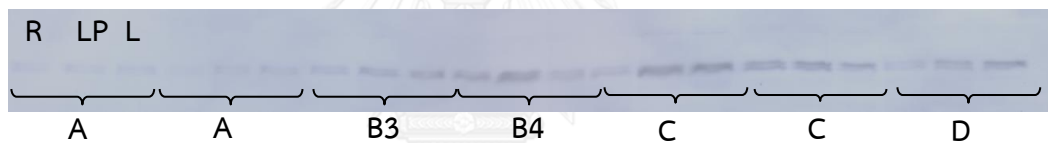
2. การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในเส้นประสาท sciatic

การเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในเส้นประสาท sciatic ในเส้นประสาททางด้าน proximal และ distal stump พบว่าในหนูที่บาดเจ็บหลังจากหนีบเส้นประสาทแล้ว 1 วัน (กลุ่ม A) แถบโปรตีนของโปรตีน p62 เพิ่มสูงขึ้นในข้างที่ได้รับบาดเจ็บทางด้าน proximal (LP) เมื่อเทียบกับข้างขวาและ LD (รูป 11) นอกจากนี้พบแถบโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นในข้างที่ได้รับบาดเจ็บทางด้าน distal (LD) ในกลุ่มที่ได้รับบาดเจ็บหลังจากหนีบเส้นประสาทแล้วในวันที่ 3, 7 และ 14 วันหลังจากเกิดการบาดเจ็บ (กลุ่ม B, C และ D) ตามลำดับ เมื่อเทียบกับข้างขวาและ LP (รูป 13)



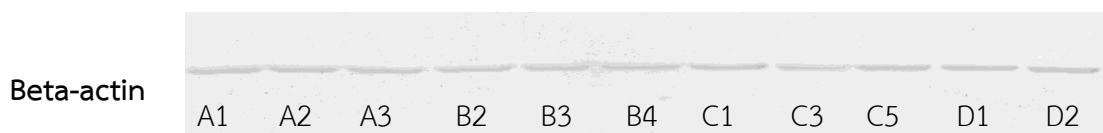
รูปที่ 13 แลบบโพรตีน p62 ในเส้นประสาท sciatic ข้างขวา (R) และข้างซ้าย ที่แบ่งเป็น proximal (LP) และ distal (LD) ด้วยวิธี Western blot โดยกลุ่ม A, B, C และ D ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 1, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ และเลข 1 และ 2 คือเลขของหนูทดลอง

การเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีน Beclin-1 ในเส้นประสาท sciatic พบว่ามีแนวโน้มเปลี่ยนแปลงในเส้นประสาทข้างที่บาดเจ็บทั้งทางด้าน proximal (LP) รวมถึงด้าน distal (LP) ตั้งแต่วันที่ 3 หลังจากเกิดการบาดเจ็บ (กลุ่ม B) จนถึงวันที่ 14 หลังจากเกิดการบาดเจ็บ (กลุ่ม D) และมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นมากที่สุดในวันที่ 7 หลังจากเกิดการบาดเจ็บ (กลุ่ม C) (รูปที่ 14)



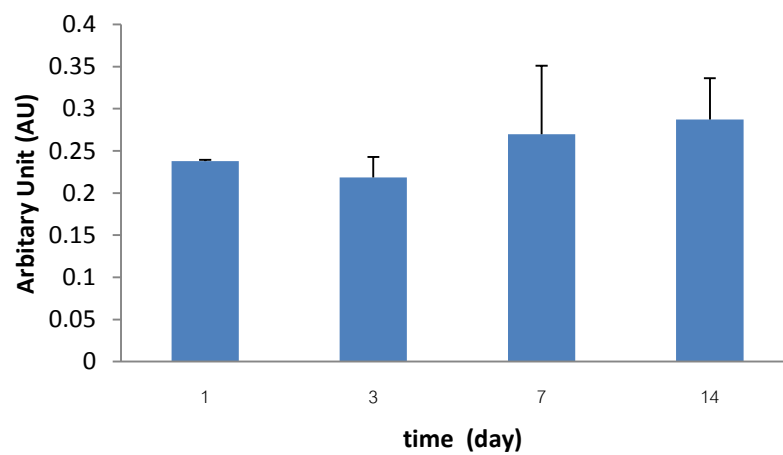
รูปที่ 14 แลบบโพรตีน Beclin-1 ในเส้นประสาท sciatic ข้างขวา (R) และข้างซ้ายที่บาดเจ็บ ที่แบ่งเป็น proximal (LP) และ distal (LD) ด้วยวิธี Western blot โดยกลุ่ม A, B, C และ D ถูก sacrifice หลังจากการหนีบเส้นประสาทแล้ว 1, 3, 7 และ 14 วัน ตามลำดับ และเลข 2-4 คือเลขของหนูทดลอง

ส่วนการหาปริมาณของโปรตีน LC3 ไม่พบแถบของโปรตีนนี้ นอกจากนี้ยังได้มีการทดลองเพื่อยืนยันปริมาณโปรตีนทั้งหมดของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง Western blot ว่าไม่แตกต่างกันด้วย Beta-actin (รูปที่ 15 และ 16) พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มต่างๆ



รูปที่ 15 ผลการตรวจแถบโปรตีน Beta-actin ในปมประสาทไขสันหลังด้วยวิธี western blot และเลข 1-5 คือเลขของหนู

ค่าเฉลี่ยของระดับโปรตีน **Beta-actin** ในปมประสาทไข
สันหลังในแต่ละช่วงเวลา



รูปที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ย \pm SD ของระดับโปรตีน Beta-actin ในปมประสาทไขสันหลังในแต่ละช่วงเวลา



บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปราย และข้อเสนอแนะ

กระบวนการ autophagy เป็นกระบวนการย่อยสลายโครงสร้างภายในเซลล์ที่เสื่อมสภาพแล้วนำสารต่างๆ กลับมาใช้ใหม่ ซึ่งสามารถเกิดขึ้นได้ในสภาวะปกติหรือชักนำได้โดยสภาวะต่างๆ เช่น การอดอาหาร (6, 7) ซึ่งในการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย (peripheral nerve injury) มีกระบวนการหลายอย่างเกิดขึ้นตั้งแต่การเสื่อมสลายของ distal nerve stump, cell body reaction และการตายของเซลล์ประสาทใน DRG จากกระบวนการ apoptosis (1, 2, 24) การศึกษานี้จึงต้องการศึกษาว่ามีการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในเซลล์ประสาทหลังเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทหรือไม่ โดยศึกษาการเปลี่ยนแปลงระดับโปรตีนได้แก่ Beclin-1, LC3 และ p62 ที่เป็นองค์ประกอบสำคัญในกระบวนการ autophagy ในเส้นประสาท sciatic ทั้งใน proximal และ distal stump รวมทั้งใน DRG ในระยะเวลาที่ต่างกัน

จากการศึกษาระดับโปรตีนใน DRG พบว่าระดับ Beclin-1 และ p62 ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในระยะเวลาต่างๆ จาก 1 วันถึง 14 วันหลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท แต่แถบโปรตีนของ LC3 มีลักษณะจางจนไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลเพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มได้ ถึงแม้จะมีการ ปรับปรุงแก้ไขทางเทคนิคแล้วก็ตาม อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่าง DRG ที่นำมาใช้ศึกษามีปริมาณโปรตีน LC3 อยู่่น้อย

ผลของ Beclin-1 ใน DRG ที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงระหว่างช่วงที่บาดเจ็บและช่วงที่ปกติในแต่ละระยะเวลารวมทั้งไม่มีความแตกต่างระหว่างระยะเวลาต่างๆ ตั้งแต่ 1 วันถึง 14 วัน นั้นแตกต่างจากผลการศึกษาก่อนหน้านี้ในระบบประสาทส่วนกลาง ในสภาวะที่เกิดการบาดเจ็บของสมอง (3, 4, 18) subarachnoid hemorrhage (19) รวมถึงการบาดเจ็บของไขสันหลัง (5) พบว่าระดับ Beclin-1 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การศึกษาของ Rodriguez-Muela และคณะในปี 2012 (21) ที่ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ใน retinal ganglion cell หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท optic ก็พบว่า Beclin-1 เพิ่มขึ้นเช่นกัน นอกจากนี้ผลการศึกษาโปรตีน p62 พบว่าไม่เปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญระหว่างช่วงและระหว่างช่วงเวลาเช่นเดียวกัน มีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทไขสันหลังในหนูพบว่ามีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน p62 อย่างมีนัยสำคัญในไขสันหลังช่วงที่ได้รับบาดเจ็บ (8) อย่างไรก็ตามการศึกษาเหล่านี้ไม่ได้เป็นการศึกษาการบาดเจ็บในระบบประสาทส่วนปลายซึ่ง autophagy อาจเปลี่ยนแปลงแตกต่างไป อย่างไรก็ตามแถบโปรตีนของ LC3 นั้นจางจนไม่สามารถนำมาวิเคราะห์ผลได้ บ่งชี้ว่าปริมาณ LC3 ใน DRG ค่อนข้างต่ำ อาจจำเป็นต้องใช้วิธีการอื่น เช่น ศึกษาปริมาณ mRNA ด้วยวิธี RT-PCR ซึ่งบ่งบอกได้ถึงระดับ expression ของ LC3 แทน

สำหรับการศึกษาโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในกระบวนการ autophagy ในเส้นประสาท sciatic ที่ศึกษาทางด้าน proximal และ distal พบว่าการแสดงออกของโปรตีน beclin-1 และ p62 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในข้างซ้ายที่บาดเจ็บเมื่อเทียบกับข้างขวาที่ปกติ ซึ่งแสดงว่ามีการกระตุ้น autophagy ในเส้นประสาทที่บาดเจ็บ แต่การแสดงออกของ LC3 จากการทดสอบยังไม่ชัดเจนพอที่จะสรุปการเปลี่ยนแปลงอย่างแน่ชัดของ LC3 ได้ ในอนาคต น่าจะมีการปรับเปลี่ยนทางเทคนิค เพื่อให้เห็นโปรตีน LC3 ดีขึ้น

โปรตีน Beclin-1 พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นในข้างซ้ายที่บาดเจ็บตั้งแต่วันที่ 3 จนถึงวันที่ 14 หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ศึกษาการบาดเจ็บของเส้นประสาทไขสันหลังที่ทำให้เกิดอาการปวด (8, 9) ซึ่งพบการเพิ่มขึ้นของ Beclin-1 ที่ไขสันหลังที่ 7 วันหลังจากเกิดการบาดเจ็บ เช่นเดียวกับการพบโปรตีน p62 มีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นในข้างที่บาดเจ็บทางด้าน distal เมื่อเทียบกับ left proximal และข้างขวาในวันที่ 3 ถึง 7 การเพิ่มขึ้นของ p62 แสดงว่ามีการสะสมของ autophagosome เพิ่มมากขึ้นจนไม่สามารถย่อยสลายผ่าน lysosome ได้ ทั้งหมดในวันที่ 3 และ 7 หลังจากเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท แต่ในวันที่ 14 พบว่า p62 มีการลดลงกลับสู่ระดับเดียวกับวันที่ 1 อาจจะเป็นไปได้ว่ากระบวนการ autophagy ในช่วงเวลาดังกล่าว การย่อยสลายผ่าน lysosome มีการทำงานดีขึ้น จึงทำให้มีการสะสมของ p62 และ autophagosome ลดลง ซึ่งต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อยืนยันว่ามีการเปลี่ยนแปลงจำนวนของ autophagosome ตามสมมุติฐาน โดยการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope) และนับจำนวน autophagosome ในระยะเวลาต่างๆ หลังเส้นประสาทบาดเจ็บ

สำหรับโปรตีน LC3 งานวิจัยของ Huang พบว่ามีระดับเพิ่มขึ้น 7 วันหลังเส้นประสาท sciatic บาดเจ็บ (22) แต่การศึกษาของ Huang นี้ยังไม่ได้ศึกษาในแต่ละช่วงเวลาต่างๆของการบาดเจ็บ อีกทั้งยังเป็นการศึกษาระดับโปรตีนที่บริเวณที่หนีบเส้นประสาทเพียงตำแหน่งเดียว ดังนั้น จำเป็นต้องมีการศึกษาระดับ LC3 ในเส้นประสาทที่บาดเจ็บส่วนต่างๆ ในช่วงเวลาที่ต่างกันต่อไป

ในอนาคตคงต้องมีการศึกษายืนยันการเปลี่ยนแปลงของกระบวนการ autophagy ในระบบประสาทส่วนปลายที่บาดเจ็บนี้ โดยอาจจะใช้เทคนิคอื่นมาช่วยในการศึกษา เช่น การศึกษาในระดับ mRNA หรือการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (Electron microscope) เพื่อให้เห็นถึงจำนวน autophagosome ที่เกิดขึ้นในกระบวนการ autophagy (25)

รายการอ้างอิง

1. McKay Hart A, Brannstrom T, Wiberg M, Terenghi G. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat: timecourse of cell death and elimination. *Exp brain res.* 2002;142:308-18.
2. Jutamrd D, Sithiporn A, Tanyawee S. Vitamin E reduces sensory neuronal loss and improves nerve regeneration after sciatic nerve injury. *AJBR.* 2013;7:649-55.
3. Lai Y, Hickey RW, Chen Y, Bayir H, Sullivan ML, Chu CT, et al. Autophagy is increased after traumatic brain injury in mice and is partially inhibited by the antioxidant gamma-glutamylcysteinyl ethyl ester. *JCBFM.* 2008;28:540-50.
4. Liu CL, Chen S, Dietrich D, Hu BR. Changes in autophagy after traumatic brain injury. *JCBFM.* 2008;28(4):674-83.
5. Kanno H, Ozawa H, Sekiguchi A, Itoi E. Spinal cord injury induces upregulation of Beclin 1 and promotes autophagic cell death. *Neurobiol dis.* 2009;33:143-8.
6. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues. *Cell.* 2011;147:728-41.
7. Ghavami S, Shojaei S, Yeganeh B, Ande SR, Jangamreddy JR, Mehrpour M, et al. Autophagy and apoptosis dysfunction in neurodegenerative disorders. *Prog neurobiol.* 2014;112:24-49.
8. Berliocchi L, Russo R, Maiaru M, Levato A, Bagetta G, Corasaniti MT. Autophagy impairment in a mouse model of neuropathic pain. *Mol. pain.* 2011;7:83.
9. Zhang E, Yi MH, Ko Y, Kim HW, Seo JH, Lee YH, et al. Expression of LC3 and Beclin 1 in the spinal dorsal horn following spinal nerve ligation-induced neuropathic pain. *Brain. res.* 2013;1519:31-9.
10. Rubinsztein DC, Bento CF, Deretic V. Therapeutic targeting of autophagy in neurodegenerative and infectious diseases. *JEM.* 2015;212:979-90.

11. Pannese E. The structure of the perineuronal sheath of satellite glial cells (SGCs) in sensory ganglia. *Neuron. glia. biol.* 2010;6(1):3-10.
12. Seddon H. Three types of nerve injury. *Brain.* 1943;66:237-88.
13. Guntinas-Lichius O, Neiss WF, Schulte E, Stennert E. Quantitative image analysis of the chromatolysis in rat facial and hypoglossal motoneurons following axotomy with and without reinnervation. *Cell. tissue. Res.* 1996;286:537-41.
14. Chen ZL, Yu WM, Strickland S. Peripheral regeneration. *Annu. Rev. Neurosci.* 2007;30:209-33.
15. Marino G, Madeo F, Kroemer G. Autophagy for tissue homeostasis and neuroprotection. *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2011;23:198-206.
16. Koike M, Shibata M, Tadakoshi M, Gotoh K, Komatsu M, Waguri S, et al. Inhibition of autophagy prevents hippocampal pyramidal neuron death after hypoxic-ischemic injury. *AJP.* 2008;172:454-69.
17. Smith CM, Chen Y, Sullivan ML, Kochanek PM, Clark RS. Autophagy in acute brain injury: feast, famine, or folly. *Neurobiol. Dis.* 2011;43:52-9.
18. Diskin T, Tal-Or P, Erlich S, Mizrachy L, Alexandrovich A, Shohami E, et al. Closed head injury induces upregulation of Beclin 1 at the cortical site of injury. *J. Neurotrauma.* 2005;22:750-62.
19. Lee JY, He Y, Sagher O, Keep R, Hua Y, Xi G. Activated autophagy pathway in experimental subarachnoid hemorrhage. *Brain. Res.* 2009;1287:126-35.
20. Egami Y, Kiryu-Seo S, Yoshimori T, Kiyama H. Induced expressions of Rab24 GTPase and LC3 in nerve-injured motor neurons. *BBRC.* 2005;337:1206-13.
21. Rodriguez-Muela N, Germain F, Marino G, Fitze PS, Boya P. Autophagy promotes survival of retinal ganglion cells after optic nerve axotomy in mice. *Cell. Death. Differ.* 2012;19:162-9.

22. Huang HC, Chen L, Zhang HX, Li SF, Liu P, Zhao TY. Autophagy Promotes Peripheral Nerve Regeneration and Motor Recovery Following Sciatic Nerve Crush Injury in Rats. *J. Mol. Neurosci.* 2016;58:416–23.
23. Bramhall S, Nock N, Wu M, Loewenberg JR. A simple colorimetric method for determination of protein. *Anal. Biochem.* 1969;31:146-8.
24. แอกทอง ส. การเปลี่ยนแปลงของ PNS ใน nerve injury. In: 1 พ, editor. ระบบประสาทส่วนปลาย: บทบาทของ oxidative stress และ MAPKs ต่อโครงสร้างและการทำงาน. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย;2556. p. 27-55.
25. Klionsky DJ, Cuervo AM, Seglen PO. Methods for monitoring autophagy from yeast to human. *Autophagy.* 2007;3(3):181-06.





ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



การเตรียมการ homogenize ตัวอย่างสำหรับการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Western

blot

Homogenization solution

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
total	500 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 μ l	300 μ l	50 μ l	150 μ l
10 % APS	100 μ l	300 μ l	37.5 μ l	112.5 μ l
TEMED	10 μ l	30 μ l	5 μ l	15 μ 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

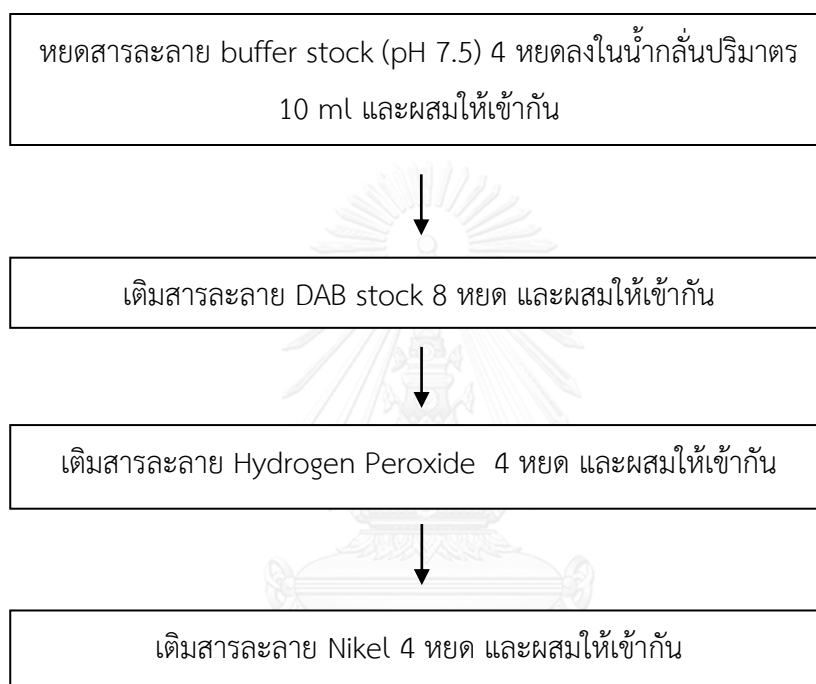
Stacking gel buffer: 1M Tris-base, pH 6.8

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





ค่าแสดงความเข้มแถบของโปรตีน Beclin-1 ใน DRG ได้จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม image pro plus

Sample	Band	Background	Band-background	L/R Ratio
A2DL	0.286	0.104	0.182	
A1DL	0.536	0.074	0.463	
A1DR	0.428	0.157	0.272	1.70
B1DL	0.467	0.079	0.388	
B1DR	0.323	0.141	0.182	2.13
C1DL	0.556	0.096	0.461	
C1DR	0.298	0.150	0.148	3.12
D1DL	0.427	0.024	0.404	
D1DR	0.286	0.223	0.063	6.36
A3DL	0.175	0.075	0.099	
A3DR	0.124	0.002	0.123	0.81
B2DL	0.118	0.072	0.046	
B2DR	0.059	0.002	0.057	0.81
C2DL	0.126	0.062	0.064	
C2DR	0.016	0.000	0.016	4.00
D2DL	0.052	0.010	0.043	
D2DR	0.012	0.001	0.011	3.92
A4DL	0.252	0.164	0.088	
A4DR	0.240	0.162	0.078	1.13
B3DL	0.205	0.146	0.059	
B3DR	0.170	0.135	0.035	1.70
C3DL	0.196	0.129	0.066	
C3DR	0.141	0.110	0.031	2.15
Sample	Band	Background	Band-background	L/R Ratio

A5DL	0.102	0.090	0.012	
A5DR	0.084	0.072	0.012	1.01
B4DL	0.152	0.144	0.008	
B4DR	0.126	0.100	0.026	0.30
C4DL	0.113	0.097	0.016	
C4DR	0.149	0.117	0.031	0.51
D4DL	0.108	0.086	0.021	
D4DR	0.108	0.097	0.011	1.93
D7DL	0.063	0.054	0.009	
D7DR	0.076	0.061	0.015	0.60
C7DL	0.151	0.064	0.086	
A6DL	0.196	0.067	0.129	
A6DR	0.179	0.043	0.136	0.95
B5DL	0.288	0.149	0.139	
B5DR	0.365	0.171	0.194	0.72
C5DL	0.378	0.162	0.216	
C5DR	0.267	0.024	0.243	0.89
D5DL	0.142	0.022	0.120	
D5DR	0.151	0.049	0.102	1.18
B7DL	0.087	0.046	0.041	
B7DR	0.093	0.039	0.054	0.75
C6DL	0.139	0.026	0.113	
C6DR	0.064	0.014	0.050	2.27
D6DL	0.034	0.003	0.032	
D6DR	0.020	0.000	0.020	1.62

ค่าแสดงอัตราส่วนของโปรตีน Beclin-1 ใน DRG ของข้างซ้ายที่บาดเจ็บเทียบกับข้างขวาในแต่ละกลุ่ม

กลุ่ม A

กลุ่ม	L/R Ratio	Mean	SD
A1	1.70	1.12	0.35
A3	0.81		
A4	1.13		
A5	1.01		
A6	0.95		

กลุ่ม B

กลุ่ม	L/R Ratio	Mean	SD
B1	2.13	1.07	0.69
B2	0.81		
B3	1.70		
B4	0.30		
B5	0.72		
B7	0.75		

กลุ่ม C

กลุ่ม	L/R Ratio	Mean	SD
C1	3.12	2.16	1.32
C2	4.00		
C3	2.15		
C4	0.51		
C5	0.89		
C6	2.27		

กลุ่ม D

กลุ่ม	L/R Ratio	Mean	SD
D1	6.36	1.85	1.26
D2	3.92		
D4	1.93		
D5	1.18		
D6	1.62		
D7	0.60		

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ - สกุล	นางสาวมารีชา รอดทะยอย
วัน เดือน ปีเกิด	วันอังคารที่ 16 มิถุนายน 2535
ที่อยู่ตามภูมิลำเนา	31/1 หมู่ 3 ต.โคกขาม อ.เมือง จ.สมุทรสาคร 74000
หมายเลขติดต่อ	098-014-4349
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ จบการศึกษาในปี 2552

