

ผลของวิตามินอีต่อการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและ
การงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บในหนูแรท

นางสาวจุฑามาศ ดอกแก้ว

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2554
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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 Graduate School.

Effect of vitamin E on dorsal root ganglion neuronal death and
nerve regeneration after nerve injury in rats

Miss Jutamard Dokkaew

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 2011

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์

ผลของวิตามินอีต่อการตายของเซลล์ประสาทในปม
ประสาทไขสันหลังและการงอกใหม่ของเส้นประสาท
ภายหลังการบาดเจ็บในหนูแรท

โดย

นางสาวจุฑามาศ ดอกแก้ว

สาขาวิชา

วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิพร แอกทอง

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ ไศภณ นภาธร)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก)

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

จุฑามาศ ดอกแก้ว : ผลของวิตามินอีต่อการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังและการงอกใหม่ของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บในหนูแรท. (Effect of vitamin E on dorsal root ganglion neuronal death and nerve regeneration after nerve injury in rats) อ. ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : รศ. นพ. สิทธิพร แอกทอง, 61 หน้า.

เมื่อเส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ จะเกิดกระบวนการเสื่อมสลายของเส้นประสาท เรียกว่า Wallerian degeneration และจะเกิดการงอกใหม่ของเส้นประสาทได้เอง (nerve regeneration) แต่มักใช้เวลานาน และมีการตายของเซลล์ประสาทเกิดขึ้น จึงมีการพัฒนาวิธีการรักษา เพื่อให้การงอกใหม่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น วิตามินอีมีคุณสมบัติที่ช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress ในงานวิจัยที่ผ่านมา มีการพบผลดีของวิตามินอีในการรักษาโรคทางระบบประสาทที่เป็นผลจาก oxidative stress นอกจากนี้ภาวะเส้นประสาทบาดเจ็บก็มีการพบภาวะ oxidative stress ด้วย วิตามินอีจึงน่าจะส่งผลดีต่อภาวะเส้นประสาทบาดเจ็บ ดังนั้น วัตถุประสงค์ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อการสูญเสียเซลล์ประสาทรับความรู้สึกในปมประสาทไขสันหลัง (DRG) และการงอกใหม่ของ axon (axonal regeneration) หลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท โดยทำการหนีบเส้นประสาท sciatic ที่ขาข้างซ้ายของหนู และป้อนวิตามินอีเข้าทางปาก ขนาด 100, 500 และ 1,000 mg/kg/day เป็นระยะเวลา 10 วัน แล้วทำการนับจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง ที่ระดับ L4 พบว่า วิตามินอีขนาด 500 และ 1,000 mg/kg/day ช่วยบรรเทาการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม 100 mg/kg/day และกลุ่มควบคุม จึงเลือกวิตามินอีขนาด 500 mg/kg/day มาศึกษาต่อในการทดลองที่ 2 โดยหนีบเส้นประสาท sciatic เหมือนการทดลองแรก แต่ใช้เวลานานกว่าที่ 3 สัปดาห์ แล้วทดสอบการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทด้วยการของเส้นประสาท sciatic โดยวัดจากรอยพิมพ์เท้าหนูเพื่อคำนวณค่า sciatic functional index (SFI) พบว่า วิตามินอีขนาด 500 mg/kg/day ไม่มีผลต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทด้วยการของเส้นประสาท sciatic แต่ในลักษณะทางจุลกายวิภาค พบว่า สามารถช่วยเพิ่ม fiber density ใน segment ที่ 2 และ 3 และเพิ่มจำนวน myelinated nerve fiber ใน segment ที่ 3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นผลการทดลองที่กล่าวมาข้างต้น แสดงให้เห็นถึงคุณประโยชน์ของวิตามินอีต่อภาวะเส้นประสาทบาดเจ็บ โดยช่วยบรรเทาการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG และให้ผลดีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์.....ลายมือชื่อนิสิต.....
ปีการศึกษา 2554.....ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก.....

5274761730 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS : VITAMIN E / α -TOCOPHEROL / NERVE INJURY / OXIDATIVE STRESS

JUTAMARD DOKKAEW : EFFECT OF VITAMIN E ON DORSAL ROOT
GANGLION NEURONAL DEATH AND NERVE REGENERATION AFTER NERVE
INJURY IN RATS. ADVISOR : ASSOC.PROF.SITHIPORN AGTHONG, 61 pp.

After nerve injury, there is degeneration of nerve fibers called Wallerian degeneration followed by nerve regeneration. However, the recovery is limited by slow axonal regeneration and neuronal cell death. To improve the regeneration, many drugs have been testing. Vitamin E has antioxidant property which can reduce oxidative stress. In the past, several studies have shown the benefits of vitamin E in nervous system disorders in which oxidative stress plays a causal role. Oxidative stress is also found after nerve injury. Therefore, vitamin E may be beneficial to nerve injury. The aim of this study was to test the effect of vitamin E on dorsal root ganglion neuronal death and nerve regeneration after nerve injury in rats. After crushing the left sciatic nerve, vitamin E was gavaged 100, 500 and 1,000 mg/kg/day for 10 days. L4 DRG neurons was counted and vitamin E 500 and 1,000 mg/kg/day significantly reduced neuronal cell loss in DRG ($p < 0.01$) compared with 100 mg/kg/day and control group. The next study used the same nerve injury model with vitamin E 500 mg/kg/day treatment for 3 weeks. Then, the functional recovery of sciatic nerve was tested by measuring foot prints for calculating the sciatic functional index (SFI). The results showed that vitamin E 500 mg/kg/day did not significantly improve the functional recovery. However, in the nerve morphometry study, fiber density and myelinated nerve fiber were significantly increased in the distal nerve segments in the vitamin E ($p < 0.05$) compared with the control group. These data show the benefits of vitamin E on nerve injury by reducing neuronal cell loss and enhancing nerve fiber regeneration.

Field of Study : Medical Science

Student's Signature

Academic Year : 2011.....

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. นพ. สิทธิพร แอกทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไป
ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศ. กิตติคุณ ดร.ราตรี สุตทรวง รศ. พญ. วิไล ชินธเนศ
และ รศ. นพ. สิทธิศักดิ์ หรรษาเวก สำหรับการตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์
อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอาทิตยา แก้วเสมา สำหรับความช่วยเหลือด้าน
เครื่องมือและเทคนิคต่างๆในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและช่วยดูแลระหว่างการทำทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัว ที่เป็นกำลังใจและ
สนับสนุนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
คำสำคัญ.....	2
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
ระบบประสาทส่วนปลาย.....	3
การบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย.....	5
การรักษาเส้นประสาทหลังการบาดเจ็บ.....	7
Oxidative stress.....	8
Oxidative stress และระบบประสาท.....	10
วิตามินอี.....	11
หน้าที่ของวิตามินอี.....	11
การได้รับวิตามินอีเข้าสู่ร่างกาย.....	12
วิตามินอีและระบบประสาท.....	12

	หน้า
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	15
การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน ปมประสาทไขสันหลัง.....	15
การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่ การคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาค.....	23
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	31
การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน ปมประสาทไขสันหลัง.....	31
การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่ การคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาค.....	34
สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	38
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผลการวิจัย.....	39
การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน ปมประสาทไขสันหลัง.....	39
การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่ การคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาค.....	41
สรุปผลการทดลอง.....	43
ข้อเสนอแนะ.....	43
รายการอ้างอิง.....	44
ภาคผนวก.....	51
ภาคผนวก ก.....	52
ภาคผนวก ข.....	56
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	61

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 4.1	แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของหนู.....	31
ตารางที่ 4.2	แสดงจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระดับ L4 ในแต่ละข้าง รวมทั้ง ร้อยละการลดลงของข้างซ้ายเมื่อเทียบกับข้างขวา.....	33
ตารางที่ 4.3	แสดงน้ำหนักเฉลี่ยตลอดการทดลองของหนูทั้งสองกลุ่ม.....	34
ตารางที่ 4.4	แสดงค่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ในข้างซ้าย และข้างขวาและคำนวณเป็นร้อยละของข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาใน segment ที่ 1, ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM *P<0.05.....	37
ตารางที่ 4.5	แสดงค่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ในข้างซ้าย และข้างขวาและคำนวณเป็นร้อยละของข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาใน segment ที่ 2, ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM *P<0.05.....	37
ตารางที่ 4.6	แสดงค่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ในข้างซ้าย และข้างขวาและคำนวณเป็นร้อยละของข้างซ้ายเทียบกับข้างขวาใน segment ที่ 3, ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM *P<0.05.....	37

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 2.1	แสดง axon และ Schwann cell..... 4
ภาพที่ 2.2	แสดงภาคตัดขวางของเส้นประสาทและเนื้อเยื่อประสาน..... 4
ภาพที่ 2.3	1. โยประสาทปกติ, 2. โยประสาทถูกหนีบหรือตัด, 3. เกิด Wallerian degeneration, 4. ตำแหน่ง growth cone และ Schwann cell เพิ่มจำนวนขึ้น เรียงตัวเป็น Bungner's band, 5. เกิด regeneration สมบูรณ์. 7
ภาพที่ 2.4	กลไกการเกิดและการจัดการกับ oxidative stress (SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase, GPx = glutathione peroxidase, GSH = glutathione, GSSG = glutathione disulphide, GR = glutathione reductase)..... 9
ภาพที่ 3.1	แสดงแผนการทดลองที่ 1..... 15
ภาพที่ 3.2	แสดงตำแหน่ง crush ที่เส้นประสาท sciatic ข้างซ้าย..... 16
ภาพที่ 3.3	แสดงการวางเรียงลำดับของ Section ที่ตัดได้..... 19
ภาพที่ 3.4	แสดงการสุ่มเลือก section ที่จะนำไปนับจำนวนเซลล์ใน DRG..... 20
ภาพที่ 3.5	แสดงตัวอย่างภาพของ section DRG หนา 2 μm กำลังขยาย 10X ที่นำมาทำการนับจำนวนเซลล์ประสาท A แสดงภาพของทั้ง section B แสดงตัวอย่างการนับจำนวนเซลล์ประสาทใน A..... 21
ภาพที่ 3.6	แสดงแผนการทดลองที่ 2..... 23
ภาพที่ 3.7	แสดงการเดินของหนูในกล่องจำกัดทางเดิน..... 24
ภาพที่ 3.8	แสดงการวัดค่าต่างๆ บนรอยเท้าหนูเพื่อหาค่า Sciatic functional index PL= Print length , TS= Toe spread และ ITS= Intermediate toe spread..... 25
ภาพที่ 3.9	แสดงวิธีการเก็บรักษาเส้นประสาท sciatic..... 26

ภาพที่ 3.10	แสดงตำแหน่ง . ที่ใช้เป็น landmark ในการเทียบระดับ Lt. และ Rt. Sciatic n. เพื่อแบ่งเป็น segment ล้วนๆขนาด 3 mm.....	26
ภาพที่ 3.11	แสดงการวัดพื้นที่ภาคตัดขวางของเส้นประสาทขนาด 4X.....	27
ภาพที่ 3.12	แสดงการเลือกวาง 3 window ในแนวทแยงเดียวกัน.....	28
ภาพที่ 3.13	แสดงการแปลงภาพให้เป็นขาว-ดำ เพื่อนำไปแก้ไขในโปรแกรม photoshop.....	28
ภาพที่ 3.14	แสดงการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Image – Pro Plus.....	29
ภาพที่ 4.1	แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทุกกลุ่มตลอดการทดลอง.....	32
ภาพที่ 4.2	แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูตลอดการทดลองทั้งสองกลุ่ม.....	35

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เส้นประสาทบาดเจ็บ (nerve injury) เป็นสาเหตุที่สำคัญอันหนึ่งของภาวะทุพพลภาพ ส่งผลกระทบให้ผู้ป่วยไม่สามารถใช้ชีวิตประจำวันได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทำให้ผู้ป่วยมีคุณภาพชีวิตลดลง ส่งผลให้ประเทศชาติขาดบุคลากรที่จะไปพัฒนาประเทศให้เจริญก้าวหน้า โดยปกติแล้วเมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท กระบวนการที่เกิดขึ้นตามมาก็คือ กระบวนการเสื่อมสลายของเส้นประสาท เรียกว่า anterograde degeneration หรือ Wallerian degeneration ซึ่งจะเกิดขึ้นภายใน 24 ชั่วโมง ควบคู่ไปกับกระบวนการงอกใหม่ของเส้นประสาท (nerve regeneration) ซึ่งการงอกใหม่ของเส้นประสาทนั้น เป็นการซ่อมแซมตัวเองของเส้นประสาทภายหลังการบาดเจ็บ มักใช้เวลานานและการคืนหน้าที่มักไม่สมบูรณ์ จึงมีการพัฒนาวิธีการรักษา โดยการใช้สารเคมีหรือยาต่างๆ รวมทั้งสารกลุ่ม antioxidant เพื่อช่วยลดระยะเวลาการงอกใหม่ของเส้นประสาท และทำให้การงอกใหม่มีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น วิตามินอีเป็นสารที่ละลายในไขมัน มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ที่ช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งภาวะนี้จะส่งผลให้เกิดการทำลายโมเลกุลของเซลล์ ในงานวิจัยที่ผ่านมาได้มีการพบผลดีของวิตามินอีในการรักษาโรคของสมอง เช่น โรคอัลไซเมอร์และโรคพาร์กินสัน สำหรับระบบประสาทส่วนปลาย วิตามินอีสามารถรักษาผลข้างเคียงของยารักษาเมเร็งต่อเส้นประสาทได้เป็นอย่างดี ซึ่งโรคเหล่านี้พบ oxidative stress มีบทบาทสำคัญอยู่ จากประโยชน์ข้างต้น วิตามินอี จึงน่าจะมีผลดีต่อภาวะเส้นประสาทบาดเจ็บ

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อการสูญเสียเซลล์ประสาทรับความรู้สึกในปมประสาทไขสันหลัง (Dorsal root ganglion, DRG) ภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท
2. เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของ axon (axonal regeneration) ภายหลังการบาดเจ็บของเส้นประสาท

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ระบบประสาท (Nervous System)

ระบบประสาทแบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่

1. ระบบประสาทส่วนกลาง (Central nervous system หรือ CNS) ประกอบด้วย

1.1 สมอง (Brain)

1.2 ไขสันหลัง (Spinal cord)

2. ระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system หรือ PNS) ประกอบด้วย

2.1 เส้นประสาทสมอง (Cranial nerve) 12 คู่

2.2 เส้นประสาทไขสันหลัง (Spinal nerve) 31 คู่

2.3 เส้นประสาทในระบบประสาทอัตโนมัติ (Autonomic nerve)

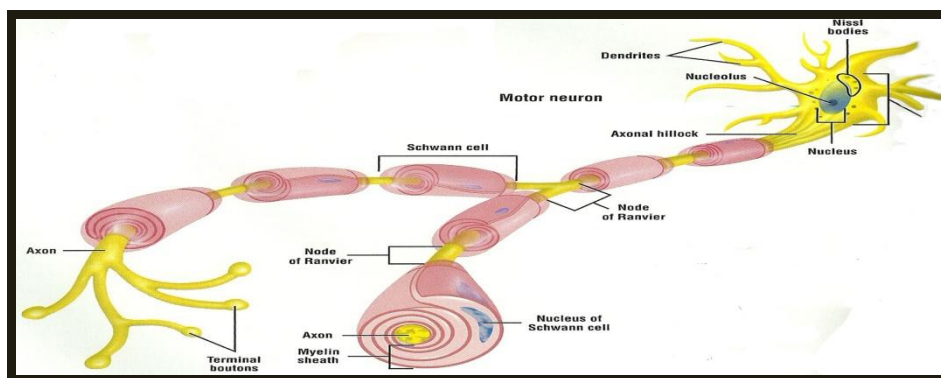
ระบบประสาทส่วนปลาย (Peripheral nervous system)

เป็นส่วนที่ติดต่อกันระหว่างระบบประสาทส่วนกลางกับส่วนอื่นๆของร่างกาย มีส่วนประกอบที่สำคัญ ดังนี้ 1. Ganglion เป็นกลุ่มของ cell body ของ neuron เช่น spinal (dorsal root) ganglion, sympathetic ganglion 2. เส้นประสาท (nerve) ประกอบด้วย เส้นใยประสาท (nerve fiber) และเนื้อเยื่อประสานที่หุ้มโดยรอบ

เส้นใยประสาท ประกอบด้วย axon ร่วมกับ Schwann cell และจากความแตกต่างของการที่ Schwann cell ห่อหุ้มเส้นใยประสาทนี้ ทำให้สามารถแบ่งชนิดของ เส้นใยประสาทออกเป็น

1. Myelinated nerve fiber เป็นใยประสาทที่ Schwann cell สร้าง myelin sheath ห่อหุ้ม axon โดยในแต่ละช่วงของ axon จะมี Schwann cell เพียงเซลล์เดียวมาสัมผัสอยู่ และ myelin sheath ที่เกิดจาก membrane ของ Schwann cell จะหุ้มรอบ axon ในลักษณะที่ม้วนซ้อนกันเป็นชั้นๆ เรียกแต่ละช่วงว่า internode ส่วนบริเวณระหว่าง internode 2 อัน เรียกว่า node of Ranvier ซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มี myelin sheath หุ้มและมีความสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณประสาท ทำให้นำกระแสประสาทได้เร็ว

2. Unmyelinated nerve fiber เป็นใยประสาทชนิดที่มี Schwann cell แต่ไม่มีการสร้าง myelin sheath ห่อหุ้ม axon ซึ่ง Schwann cell 1 เซลล์ สามารถหุ้มได้หลาย axon โดยทั่วไปใยประสาทชนิดนี้มีขนาดเล็กและนำกระแสประสาทได้ช้า

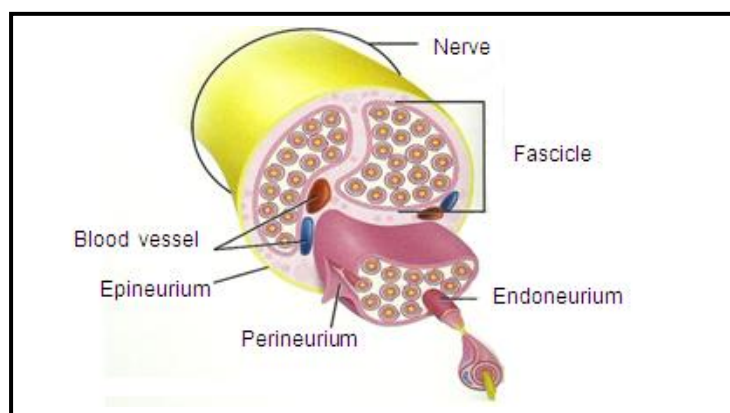


ภาพที่ 2.1 แสดง axon และ Schwann cell

(ดัดแปลงจาก Atlas of histology with function correlation. 11th edition.P 155)

เนื้อเยื่อประสาน (Connective tissue)

เส้นใยประสาท จะอยู่รวมกันเป็นมัดๆ เรียกว่า fascicle โดยที่จะมีหลายๆ fascicle มาอยู่ด้วยกันและถูกหุ้มด้วย epineurium ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อประสานชั้นนอกสุด ส่วนเนื้อเยื่อประสานที่หุ้มอยู่โดยรอบ fascicle เรียกว่า perineurium และเนื้อเยื่อประสานที่อยู่ภายใน fascicle เรียกว่า endoneurium



ภาพที่ 2.2 แสดงภาคตัดขวางของเส้นประสาทและเนื้อเยื่อประสาน

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

การบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย (Peripheral nerve injury)

การบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลายเกิดได้จากหลายกลไก คือ ถูกกระแทกหรือถูกแรงกด (crush/entrapment) ถูกของมีคมตัดขาด (transection)

ในทางคลินิกสามารถจำแนกความรุนแรงของการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลายได้ 3 ระดับ คือ

1. Neurapraxia เกิดการเสียหายที่ของเส้นประสาทชั่วคราวไม่เกิด axon degeneration
2. Axonotmesis เกิดจากการกดทับหรือกระแทกที่รุนแรง เกิด axon degeneration ต่ำกว่าตำแหน่งที่บาดเจ็บไปทางอวัยวะเป้าหมาย แต่ connective tissue ยังคงสภาพดี อยู่ในสัตว์ทดลองการเลียนแบบการบาดเจ็บชนิดนี้ใช้วิธีหนีบ (crush)
3. Neurotmesis เกิด axon degeneration ร่วมกับการขาดออกจากกันของ connective tissue ทำให้ปลายทั้งสองข้างของเส้นประสาทแยกออกจากกัน ในสัตว์ทดลองการเลียนแบบการบาดเจ็บชนิดนี้ใช้วิธีการตัดเส้นประสาทให้ขาด (transection)

การเปลี่ยนแปลงของเส้นประสาทหลังการบาดเจ็บ

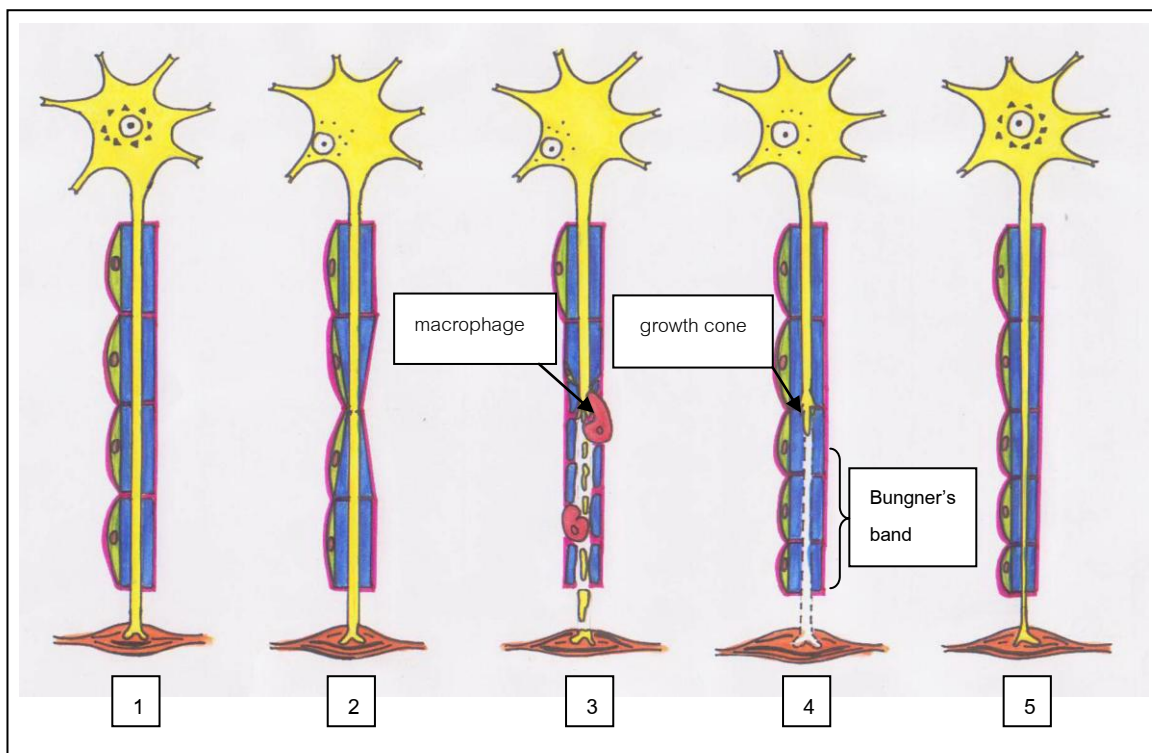
ในกรณี neurapraxia เป็นการบาดเจ็บที่ไม่รุนแรง มีการสลายตัวของ myelin sheath ในบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ ทำให้มีบริเวณของใยประสาทที่ axon ไม่มีสิ่งห่อหุ้ม ทำให้การนำสัญญาณประสาทช้าลงหรือสูญเสียความสามารถในการนำสัญญาณประสาทในบริเวณนั้นชั่วคราว ซึ่งจะสามารถกลับมาเป็นปกติเมื่อมีการสร้าง myelin ใหม่ขึ้นมาทดแทน

ในกรณี axonotmesis และ neurotmesis เป็นการบาดเจ็บที่รุนแรง มีผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทุกส่วนของเซลล์ประสาท ดังต่อไปนี้

1. Cell body พบว่ามีการบวมของเซลล์ มีการเคลื่อนที่ของ nucleus จากตรงกลางไปอยู่ด้านข้าง และพบการสลายตัวของ Nissl body เรียก chromatolysis นอกจากนี้ยังมีการสูญเสียเซลล์ประสาทไปในบางกรณีด้วย เช่น มีการศึกษาพบว่ามีการสูญเสียเซลล์ประสาทใน spinal ganglion ไป หลังเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท (Hart et al., 2002)
2. เส้นใยประสาทส่วนต้นต่อบริเวณที่บาดเจ็บ (proximal stump) จะมีการย่อยสลาย axon ย้อนขึ้นไป 1-2 internode เรียกว่า retrograde degeneration ขึ้นอยู่กับ

ความรุนแรงของการบาดเจ็บ ทำให้เหลือโครงสร้าง connective tissue ร่วมกับ basal lamina ของ Schwann cell มีลักษณะเป็นอุโมงค์สำหรับนำทางการงอกของเส้นประสาท เมื่อถึงระยะ regeneration จะพบว่า axon ส่วนที่ยังเหลืออยู่จะมีการงอกใหม่เรียกว่า sprouts ซึ่งจะมีหลายอัน sprouts จะงอกไปยัง distal stump ภายใต้อัน basal lamina และจะมี sprouts เพียงอันเดียวที่เจริญไปเป็น axon เมื่อมีการติดต่อกับ peripheral target ส่วน sprouts อื่นๆจะฝ่อไป ส่วนปลายสุดของ axon sprouts จะมีลักษณะที่เรียกว่า growth cone ซึ่งจะมีแขนงเล็กๆ เรียก filopodia เป็นส่วนที่เคลื่อนไหวได้ เพื่อออกไปยัง distal stump อีกกรณีหนึ่ง ถ้า axon ที่งอกใหม่ถูกเนื้อเยื่ออื่นมาขัดขวางไม่ให้ไปถึง distal stump จะเกิดเป็น neuroma

3. **เส้นใยประสาทส่วนปลายต่อบริเวณที่บาดเจ็บ (distal stump)** จะเกิดการเสื่อมสลายของ axon ไปยังอวัยวะเป้าหมาย เรียกว่า anterograde degeneration หรือ Wallerian degeneration (WD) หลังจาก 24 ชั่วโมงแล้วจะพบการแตกออกของ myelin sheath เป็นชิ้นๆ เรียกว่า myelin avoids จากนั้น myelin จะถูก Schwann cell กำจัดด้วยวิธี phagocytosis และสุดท้ายจะมี macrophage เข้ามาเก็บกิน ซึ่ง macrophage นอกจากจะช่วย Schwann cell ย่อยสลาย myelin แล้ว ยังช่วยกระตุ้น Schwann cell ให้มีการผลิตสารจำพวก nerve growth factor (NGF) สนับสนุนให้มีการงอกใหม่ของเส้นประสาท เมื่อถึงระยะ regeneration จะพบการเพิ่มจำนวนของ Schwann cell และเรียงตัวเป็นแถวเรียกว่า Bungner's band ทำหน้าที่นำทาง axon sprouts ไปยัง target ได้ถูกต้อง



ภาพที่ 2.3 1. ไยประสาทปกติ, 2. ไยประสาทถูกหนีบหรือตัด, 3. เกิด Wallerian degeneration,
4. ตำแหน่ง growth cone และ Schwann cell เพิ่มจำนวนขึ้น เรียงตัวเป็น Bungner's band,
5. เกิด regeneration สมบูรณ์

การรักษา Nerve injury

การรักษาภาวะ nerve injury ในปัจจุบัน ในกรณี axonotmesis ไม่ต้องมีการเย็บซ่อม เพียงแต่รอให้มีการงอกใหม่ของเส้นประสาทไปถึง target ส่วนกรณี neurotmesis นั้น จะใช้วิธีการทาง microsurgery เป็นหลัก นั่นคือ การเย็บซ่อมเส้นประสาท แบ่งได้ 3 วิธี

1. การเย็บซ่อมโดยตรง (direct repair) เป็นการเย็บปลายทั้งสองข้างต่อกันได้เลย แบ่งการเย็บเป็น 2 แบบ แบบแรก คือ epineurial repair เป็นการเย็บผ่านชั้น epineurium และอีกแบบคือ fascicle repair เป็นการเย็บผ่านชั้น perineurium ซึ่งในการเย็บโดยตรงต้องระวังไม่ให้เกิดความตึงมากเกินไป

2. การใช้ nerve graft เป็นการนำเส้นประสาทส่วนอื่นของร่างกายมาเชื่อมปลายทั้งสองข้างของเส้นประสาทที่ขาดออกจากกัน ใช้ในกรณีที่การเย็บซ่อมโดยตรงจะทำให้เกิดแรงตึงมากเกินไป ซึ่งนิยมใช้ sural nerve ของผู้ป่วยเอง

3. Entubulation repair เป็นการใช้วัสดุที่เป็นท่อ มาเชื่อมต่อปลายเส้นประสาทที่ขาดออกจากกัน โดยท่อที่ใช้เป็นเนื้อเยื่อของร่างกาย เช่น หลอดเลือดดำ (vein) กล้ามเนื้อ

การรักษาด้วยวิธีการทั้งหมดนั้น ยังมีข้อจำกัดบางอย่าง เช่น ระยะเวลาที่เส้นประสาทใช้ในการงอกใหม่และระยะห่างของเส้นประสาทที่ขาดจาก target เส้นประสาทมีอัตราการงอกที่ช้า และหากมีการงอกไปเป็นระยะทางที่ยาว จะทำให้การฟื้นคืนสภาพปกติเป็นไปได้ยาก ส่งผลให้กล้ามเนื้อ ฝ่อลีบ(atrophy)ไม่เป็นปกติ ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการหาวิธีการอื่นๆ ที่ดีขึ้นมารักษาภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาท

3.4 Oxidative stress

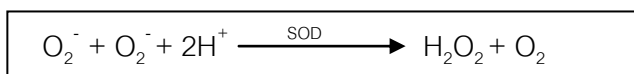
Oxidative stress คือ ภาวะที่แสดงถึงความไม่สมดุลระหว่างกระบวนการทางเคมีที่ชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) กับขั้นตอนการตอบสนองที่กำจัด ROS

ROS คือ ผลิตภัณฑ์ของกระบวนการ metabolism ในร่างกาย ซึ่งเป็นตัวการที่ทำให้โครงสร้างต่างๆ ภายในร่างกายเสียหาย เนื่องจากมีการทำลายชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ในเซลล์ ได้แก่ ไขมัน น้ำตาล โปรตีน โพลีนิวคลีโอไทด์ ทำให้เซลล์ตายได้

แหล่งผลิต ROS มักเกิดขึ้นที่ mitochondria เพราะมีการขนส่ง electron เพื่อผลิต ATP ทำให้มีการ leak ไปจับกับโมเลกุลของ oxygen (O_2) กลายเป็น superoxide anion radical (O_2^-) เป็น ROS ตัวแรก มีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent

เมื่อมี free radical เกิดขึ้น ร่างกายจะตอบสนองโดยการใช้ antioxidant เพื่อความอยู่รอดของเซลล์ สามารถแบ่ง antioxidant ออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1. Enzymatic antioxidant ได้แก่ superoxide dismutase (SOD), Glutathione peroxidase (GPx), Catalase (CAT) 2. Non-enzymatic antioxidant ได้แก่ วิตามินซี, วิตามินอี, วิตามินเอ, Glutathione (GSH) และ Flavonoids

โดยที่ SOD จะเป็น antioxidant ภายในเซลล์ตัวแรก ที่ทำหน้าที่จัดการ O_2^- ไปเป็น oxygen (O_2) และ hydrogen peroxide (H_2O_2) ดังสมการ

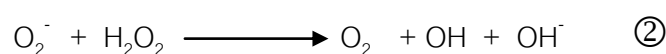


ต่อมา H_2O_2 จะถูก antioxidant CAT และ GPx สลายเปลี่ยนไปเป็น น้ำ (H_2O) และ O_2 ดังสมการ

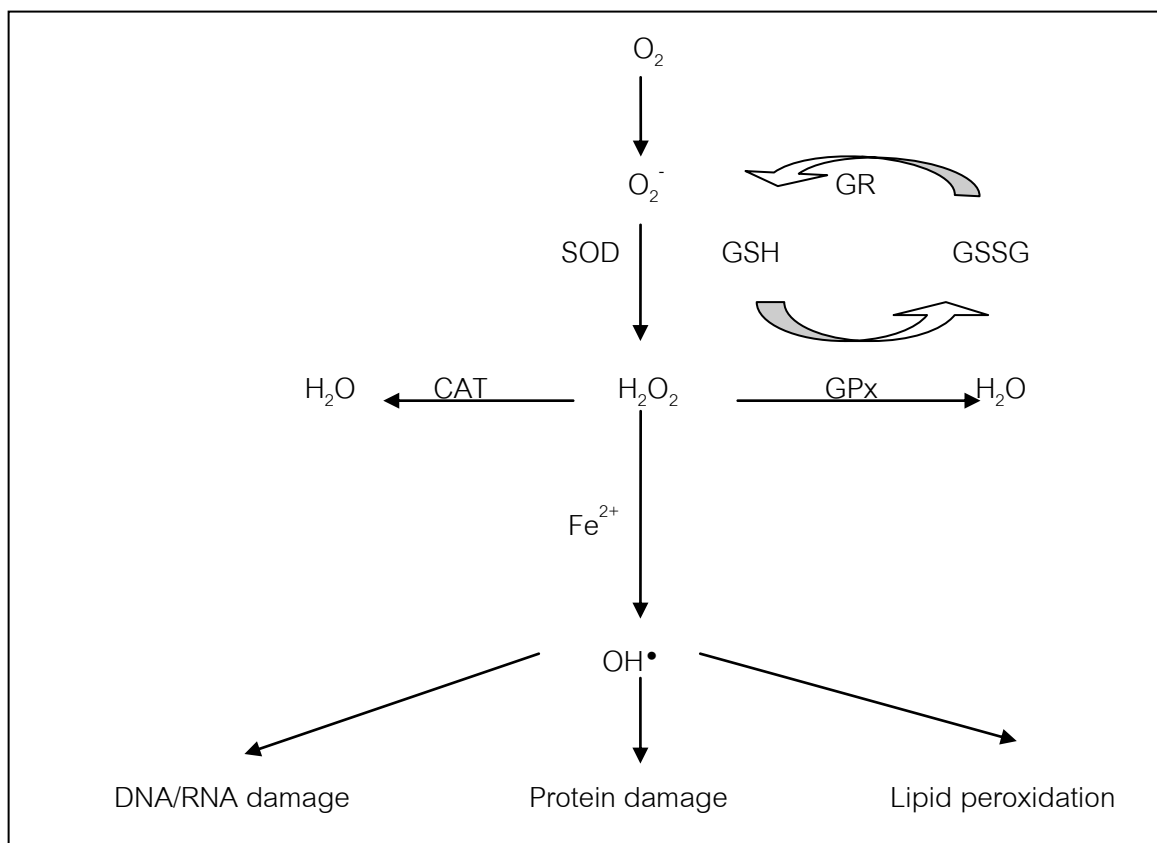


GPx จำเป็นต้องใช้ GSH ซึ่งมีบทบาทในการเป็น cofactor ไปเป็น GSSG (Glutathione disulphide) และอัตราส่วนของ GSH/GSSG จะเป็นตัววัด Oxidative stress ของร่างกาย

หากมีการ reduce transition metal ion เช่น Fe^{2+} , CU^{2+} เรียกว่า Fenton reaction (สมการ 1) หรือ มีการรวมตัวกันของ O_2^- กับ H_2O_2 (สมการ 2) จะทำให้ H_2O_2 เปลี่ยนไปเป็น Hydroxyl radical (OH^\cdot) เรียกว่า Haber-Weiss reaction



OH^\cdot ที่เกิดจากทั้งสองปฏิกิริยาข้างบน ทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของไขมัน (lipid peroxidation), โปรตีน และ DNA, RNA สามารถชักนำให้เซลล์ตายได้ สรุปกระบวนการ oxidative stress ในเซลล์ ดังภาพที่ 2.4



ภาพที่ 2.4 กลไกการเกิดและการจัดการกับ oxidative stress (SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase, GPx = glutathione peroxidase, GSH = glutathione, GSSG = glutathione disulphide, GR = glutathione reductase)

สำหรับ nonenzymatic antioxidant วิตามินซีและวิตามินอี ช่วยกำจัด free radical โดยที่ วิตามินอีจะถูกเปลี่ยนไปอยู่ในรูป tocopherolquinone และ tocopherylquinone ตามลำดับ จากนั้นวิตามินซีจะเข้ามาช่วยคืนรูปให้วิตามินอี ทำให้วิตามินซีเปลี่ยนไปอยู่ในรูป ascorbyl radical คือ semidehydroascorbate และ dehydroascorbate ตามลำดับ สุดท้าย GSH จะเป็นตัวช่วยให้วิตามินซีกลับมาอยู่ในรูป active form ได้อีกครั้ง

Oxidative stress และระบบประสาท

ในระบบประสาทส่วนกลาง oxidative stress มีบทบาทในการดำเนินโรคต่างๆของสมอง โดยในโรค Alzheimer's disease พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ enzymatic antioxidant ของสมองส่วน hippocampus และ amygdala บ่งชี้ว่ามีการสร้าง free radical เพิ่มมากขึ้น (Zemlan et al., 1989; Pappella et al., 1992) และพบ lipid peroxidation สูงขึ้นในบางบริเวณของสมองอย่างชัดเจน (Lovell et al., 1995) ในโรค Parkinson's disease พบว่ากระบวนการ metabolism ของ dopamine จะผลิต ROS ที่ชักนำให้เกิดการทำลาย DNA ขึ้น (Jenner and Olanow, 1996; Yoitaka et al., 1996) และพบว่าสมองส่วน substantia nigra pars compacta (SNpc) มีระดับ GSH ลดลง, ระดับ GSSG เพิ่มขึ้น ซึ่งน่าจะเกี่ยวข้องกับการเกิดโรค (Sian et al., 1994; Damier et al., 1993)

ในภาวะการบาดเจ็บของระบบประสาทส่วนปลาย มีการศึกษาในสัตว์ทดลองที่มีการมัดเส้นประสาท sciatic พบว่า มีการเพิ่มขึ้นของ marker of oxidative stress ได้แก่ Malondialdehyde (MDA) และ Advanced oxidation protein product (AOPP) ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิด lipid peroxidation และ protein oxidation ตามลำดับ มีการเพิ่มขึ้นของ radical scavenging enzyme ได้แก่ SOD และ GPx มีการลดลงของ antioxidant CAT และ GSH (Varija et al., 2009) ต่อมามีการศึกษาถึงการขาด SOD ต่อการงอก axon ของเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยง พบว่า เซลล์ที่ขาด SOD จะทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เพิ่มขึ้น และมีผลให้เกิด axon degeneration รวมทั้งอาจมีการตายของเซลล์เกิดขึ้นด้วย (Fische et al., 2010) ดังนั้นมีหลักฐานแสดงว่า ในการบาดเจ็บของเส้นประสาท น่าจะมีภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลเสียต่อการงอกใหม่ของ axon

3.5 Vitamin E

วิตามินอีเป็นกลุ่มสารที่ละลายในไขมัน และมีฤทธิ์ในการต่อต้านอนุมูลอิสระ มีโครงสร้างที่แตกต่างกัน 2 ชนิด คือ โทโคฟีรอล (Tocopherol) และ โทโคไตรอีนอล (Tocotrienol) ซึ่งสารทั้งสองชนิดยังมีโครงสร้างภายในที่แตกต่างกัน ทำให้แยกได้อีก 4 isoform ได้แก่ แอลฟา (Alpha), เบต้า (Beta), แกมมา (Gamma) และ เดลต้า (Delta) ซึ่งแต่ละโครงสร้างก็จะมีบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพที่แตกต่างกัน โดยที่ แอลฟาโทโคฟีรอล (Alpha tocopherol) เป็นโครงสร้างที่พบมากที่สุดในธรรมชาติและมีประสิทธิภาพสูงสุดทางชีวภาพ

ในปี ค.ศ. 1922 เริ่มมีการค้นพบว่า วิตามินอีเป็นสารอาหารที่จำเป็นในระบบสืบพันธุ์ในหนู (Evans and Bishop, 1922) ต่อมาปี ค.ศ. 1950 มีการค้นพบเพิ่มเติมว่า วิตามินอีมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และมีประสิทธิภาพในการป้องกัน lipid peroxidation (Schwarz, 1965) ดังนั้นจึงมีการศึกษาอย่างต่อเนื่องถึงปัจจุบันถึงประโยชน์ของวิตามินอีในการป้องกันและรักษาโรคได้

หน้าที่ของวิตามินอี

1. Antioxidant function

วิตามินอีมีหน้าที่ในการจับกับอนุมูลอิสระ ช่วยลด lipid peroxidation ของ low density lipoprotein (LDL) ทำให้ช่วยซ่อมแซม endothelium มีผลดีต่อภาวะ cardiovascular disease, atherosclerosis นอกจากนี้ยังช่วยป้องกัน mitochondria dysfunction ในภาวะ severe oxidative stress ได้ (Brigelius-flohe and Traber, 1999)

2. Non-antioxidant function

วิตามินอีมีบทบาทสำคัญภายในเซลล์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งวิตามินอีที่มีโครงสร้างชนิดแอลฟาโทโคฟีรอล มีหน้าที่ยับยั้ง smooth muscle cell proliferation (Boscoboinik et al., 1991), ลด protein kinase C activity (Boscoboinik et al., 1991), เพิ่ม phosphoprotein phosphate 2A activity (Ricciarelli et al., 1998) และควบคุม expression of the alpha-tropomyosin (Azzi et al., 1998) นอกจากนี้ยังเป็นตัวควบคุมที่สำคัญในกระบวนการอักเสบ (inflammation) โดยยับยั้งการหลั่ง cytokine จาก monocyte ที่จะส่งผลเสียต่อเซลล์ (Devaraj, 1998)

การได้รับวิตามินอีเข้าสู่ร่างกาย

แหล่งอาหารที่พบวิตามินอี ได้แก่ เนื้อสัตว์ ปลา นม ผัก ผลไม้ ธัญพืชและน้ำมันข้าวโพด ซึ่งเมื่อเข้าสู่ร่างกายผ่านจากปากลงสู่ กระเพาะอาหาร จะยังไม่มีกรย่อยวิตามินอี จนเข้าสู่ลำไส้เล็กส่วนต้น (duodenum) จะมีเอนไซม์ไลเปส (lipase) จากตับอ่อน ย่อยสลายให้ไขมันแตกตัว และมีการดูดซึมวิตามินอีพร้อมกับไขมัน โดยการแพร่ผ่านเยื่อหุ้มผนังด้านใน (brush border membrane of enterocyte) รวมกันเป็นไขมันในเลือดที่เรียกว่า ไคโลไมครอน (chylomicron) เมื่อลำเลียงมาถึงตับ โครงสร้างของวิตามินอีที่อยู่ในรูป แอลฟาโทโคฟีรอล จะเข้าจับกับ alpha tocopherol transport protein (α -TTP) ซึ่งเป็นโปรตีนขนส่งวิตามินอี เพื่อรักษาระดับวิตามินอีในเลือดให้คงที่ ส่วนวิตามินอีโครงสร้างอื่นๆ ได้แก่ เบต้า, แกมมา, และเดลต้า โทโคฟีรอล แอลฟา, เบต้า, แกมมา และเดลต้า โทโคไตรอีนอล จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะและอุจจาระ (Eggermont et al., 2006)

วิตามินอีและระบบประสาท

ปัจจุบันได้มีการศึกษาบทบาทหน้าที่ของวิตามินอีต่อระบบประสาท เนื่องจากภาวะ oxidative stress มีบทบาทในการดำเนินโรคของระบบประสาทส่วนกลาง จึงได้มีการพยายามนำสารต้านอนุมูลอิสระมารักษาผู้ป่วย โดยเฉพาะวิตามินอีพบว่า สามารถชะลอความเสื่อมของสมองในผู้ป่วยโรคอัลไซเมอร์ในระยะกลางได้ (Sano et al., 1997), สามารถลดความเสี่ยงและชะลอการเกิดโรคพาร์กินสันได้ (Tanner, 1992; Golbe et al., 1988, 1990) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราการเกิด motor dysfunction ซ้ำลงอีกด้วย (Peyser et al., 1995) ส่วนในระบบประสาทส่วนปลาย มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับการนำวิตามินอีมาใช้รักษาความผิดปกติของเส้นประสาท ดังนี้

กรณี neuropathy มีการศึกษาโดยการชักนำให้เกิดโรคเบาหวานและดูการสูญเสียหน้าที่ของเส้นประสาท พบว่า หนูเบาหวานที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณที่สูง (12g/kg) มีการทำหน้าที่ของเส้นประสาทดีขึ้นได้ (Dam et al., 1999)

ต่อมามีการศึกษาผลของวิตามินอีในการลดความเจ็บปวด โดยใช้วิตามินอีขนาด 0.1, 1, 5 g/kg ใน model หนูที่ถูกชักนำให้เกิด neuropathic pain พบว่าวิตามินอีมีประสิทธิภาพลดความไวต่อการรับรู้ความรู้สึกเจ็บปวดได้ ซึ่งวิตามินอีขนาด 5 g/kg ให้ผลดีที่สุด (Kim et al., 2006)

ปี ค.ศ. 2009 มีการศึกษาผลของวิตามินอีต่อ model หนูที่เป็น alcoholic neuropathy โดยใช้วิตามินอี 2 โครงสร้างคือ แอลฟาโทโคฟีรอล (100 mg/kg) และ โทโคไตรอีนอล (50, 100 และ 200 mg/kg) พบว่าวิตามินอีทั้ง 2 โครงสร้าง สามารถต่อต้านการเกิด oxidative stress และยับยั้งการเกิด neuropathic pain ได้ และพบว่า ในกรณีนี้ ผลของโทโคไตรอีนอลมีประสิทธิภาพมากกว่าแอลฟาโทโคฟีรอล (Tiwari et al., 2009)

นอกจากนี้แล้วยังมีการศึกษาถึงการป้องกันผลกระทบจากยา cisplatin ซึ่งเป็นยาต้านมะเร็งที่จะทำให้เกิดความเสียหายต่อเส้นประสาท (Kottschade et al., 2007 ; Pace et al., 2010) มีการศึกษาในสัตว์ทดลองโดยการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งในหนูและให้การรักษามะเร็งโดยการได้รับ cisplatin ให้ครบจำนวนการรักษามะเร็ง ร่วมกับการให้หนูได้รับวิตามินอี พบว่าผลของวิตามินอีจะไม่ไปแทรกแซงประสิทธิภาพการทำงานของ cisplatin และสามารถป้องกันผลกระทบที่เกิดจาก cisplatin ที่จะเป็นอันตรายต่อเส้นประสาทได้ (Leonetti et al., 2003 ; Pace et al., 2003) ต่อมาได้มีการศึกษาในมนุษย์ถึงผล neuroprotective ของวิตามินอี ในผู้ป่วยที่ได้รับยาต้านมะเร็ง โดยอาสาสมัครผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งทุกชนิด ที่ได้รับ cisplatin ครบตามจำนวน คือ 300 มิลลิกรัมต่อพื้นที่ 1 ตารางเมตร ร่วมกับการได้รับวิตามินอี พบว่ากลุ่มที่ได้รับวิตามินอี จะมีผลทดสอบทางระบบประสาทดีกว่ากลุ่มที่ได้รับยาต้านมะเร็งเพียงอย่างเดียว (Argyriou et al., 2005 ; Argyriou et al., 2006)

กรณี nerve injury ได้มีการศึกษาผล neuroprotective effect ของ vitamin E ต่อการบาดเจ็บของเส้นประสาท facial ในหนู โดยการให้วิตามินอีในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 20 µg/mg และ 200 µg/mg โดยการกินทางปากทุกวัน เป็นเวลา 4 สัปดาห์ จากนั้นจึงวัดผลของ lipid peroxidation (LPO) ซึ่งบ่งชี้ถึงภาวะ oxidative stress พบว่าวิตามินอี ทั้งขนาด 20 µg/mg และ 200 µg/mg สามารถลดการเกิด LPO และลดการเกิด neuronal degeneration และ gliosis ได้ ซึ่งวิตามินอีขนาด 20 µg/mg มีประสิทธิภาพดีกว่า ขนาด 200 µg/mg แสดงว่าวิตามินอีสามารถยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระจากการบาดเจ็บของเส้นประสาทได้และมีผลดีต่อเซลล์ประสาท (Hosida et al., 2009)

มีการศึกษาการให้ vitamin E ร่วมกับ methylcobalamin (B12) ในหนูที่ทำ sciatic nerve crush injury ซึ่งมีตัววัดผลคือ thermal hyperalgesia (TH) และ motor nerve conduction

velocity (MNCV) พบว่าหนูที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณ 50 mg/kg และ methylcobalamin ปริมาณ 500 µg/kg โดยการฉีดเข้าทางหน้าท้อง ช่วยรักษาภาวะ thermal hyperalgesia และการลดลงของ MNCV ซึ่งบ่งบอกถึงภาวะการฟื้นฟูของเส้นประสาท (Morani et al., 2010)

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงผลกระทบที่เกิดจากการขาดวิตามินอีต่ออาการของเส้นประสาทในหนู หลังเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท sciatic nerve โดยการหนีบ พบว่าหนูในกลุ่มที่ได้รับวิตามินอีปกติ (50 mg/kg) มีการฟื้นตัวของเส้นประสาทได้ แต่หนูกลุ่มที่ขาดวิตามินอีจะพบว่าขนาดและความหนาแน่นของเส้นประสาทลดลง รวมถึงขนาดของกล้ามเนื้อก็ลดลงด้วย (Enrione et al., 1999)

จากข้อมูลที่ได้กล่าวข้างต้น จะเห็นว่าวิตามินอีมีสรรพคุณที่ดีในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาทส่วนปลาย ทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง อีกทั้งภาวะการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลายนั้น ในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาใดที่มีประสิทธิภาพ ดังนั้นการทดลองนี้จึงนำวิตามินอีชนิด แอลฟาโทโคฟีรอล ซึ่งเป็นชนิดที่พบมากที่สุดในธรรมชาติและมีประสิทธิภาพมากที่สุด มาศึกษาในกรณีที่เส้นประสาทได้รับบาดเจ็บ เพื่อดูว่าวิตามินอีจะช่วยส่งเสริมการงอกใหม่ของ axon และลดการสูญเสียเซลล์ประสาทหรือไม่ อย่างไร

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

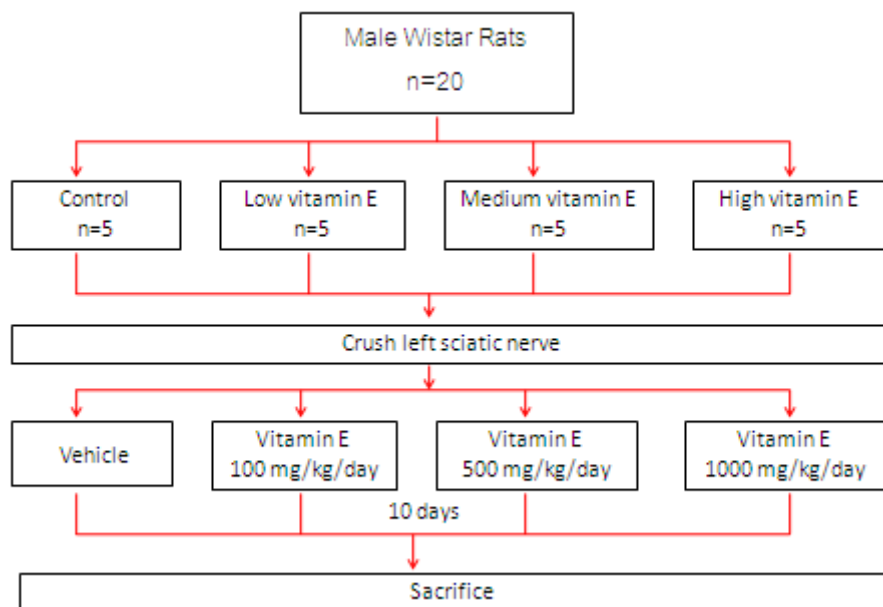
จากการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่า เมื่อเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย จะพบการตายของเซลล์ประสาทมากที่สุดที่ประมาณ 2 สัปดาห์ (Hart et al.,2002) จึงเป็นที่มาของการทดลองแรกที่ศึกษามลของวิตามินอีในปริมาณต่างๆต่อการตายของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลังที่ระยะเวลา 10 วัน จากนั้นเลือกขนาดของวิตามินอีที่ดีที่สุดในการทดลองแรก มาศึกษาในการทดลองที่ 2 โดยรอระยะเวลาหลังการบาดเจ็บที่นานขึ้น คือ 3 สัปดาห์ เพื่อศึกษามลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่การคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาค ที่ไม่สามารถประเมินในการศึกษาแรกได้

การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง
กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

หนูเพศผู้พันธุ์ Wistar จำนวน 20 ตัว น้ำหนัก 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

รูปแบบการวิจัย

การทดลองในสัตว์



ภาพที่ 3.1 แสดงแผนการทดลองที่ 1

วิธีการวิจัย

1. การแบ่งกลุ่มหนู โดยสุ่มเลือกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มละ 5 ตัว คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control,C) ได้รับ vehicle คือ corn oil

กลุ่มที่ 2 low E ได้รับ Vitamin E 100 mg/kg/day เจือจางใน corn oil

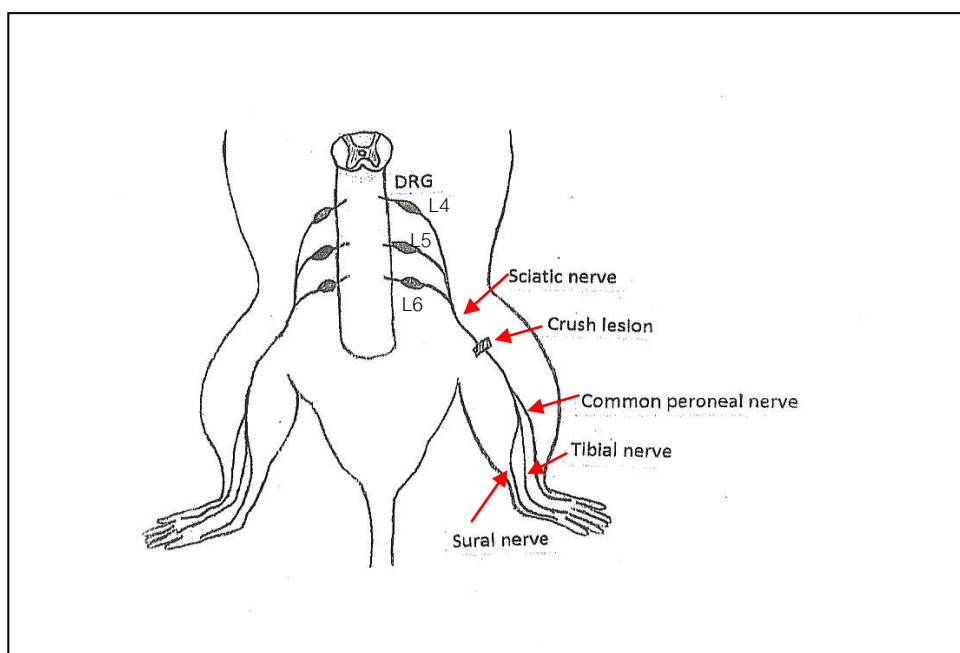
กลุ่มที่ 3 medium E ได้รับ Vitamin E 500 mg/kg/day เจือจางใน corn oil

กลุ่มที่ 4 high E ได้รับ Vitamin E 1,000 mg/kg/day เจือจางใน corn oil

2. สภาพแวดล้อมในการดูแลหนู ต้องซั้งน้ำหนักแรกจับจนถึงสิ้นสุดการทดลอง และให้หนูได้รับน้ำ อาหารเม็ดสำเร็จรูป ในปริมาณที่เพียงพอ อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ช่วงเวลา กลางคืนและกลางวัน 12/12 ชั่วโมง ทั้งนี้ก่อนเริ่มการวิจัย โครงการได้ผ่านการรับรองจาก คณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เรียบร้อยแล้ว เลขที่โครงการวิจัย 09/54 และผู้วิจัยได้ทำตามหลักเกณฑ์/คำแนะนำ ในการใช้ สัตว์ทดลองที่ออกโดยสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

3. การทำให้หนูเกิดการบาดเจ็บโดยการหนีบเส้นประสาท sciatic

ทำหลังจากให้หนูปรับตัวกับสภาพแวดล้อมใหม่ เป็นเวลา 1 สัปดาห์แล้ว โดยที่ เส้นประสาท sciatic รับแขนง sensory จาก dorsal root ganglion (DRG) ระดับ L4-6 และมี แขนงประสาทสั่งการ โดยส่วนปลายแยกเป็นเส้นประสาท common peroneal, tibial และ sural



ภาพที่ 3.2 แสดงตำแหน่ง crush ที่เส้นประสาท sciatic ข้างซ้าย

ขั้นตอนการทำ

- 3.1 วางยาสลบหนูโดยใช้ isoflurane ผสม oxygen ใ้หนูทดลองดมจนสลบ
- 3.2 โกงขนที่ขาหลังและสะโพกด้านซ้าย และทาน้ำยา betadine เพื่อฆ่าเชื้อโรค
- 3.3 ผ่าตัดเปิดชั้นผิวหนัง และแหวกกล้ามเนื้อเพื่อหาเส้นประสาท sciatic ทำการหนีบเส้นประสาท sciatic ระดับกลางต้นขาโดยใช้ arterial clamp หนีบเป็นเวลา 30 วินาที
- 3.4 ทำตำหนิบริเวณที่หนีบโดยใช้ไหมชนิดไม่ละลายเบอร์ 8/0 ผูกที่ชั้น epineurium และเย็บปิดผิวหนังด้วยไหมไม่ละลายเบอร์ 5/0 รอให้หนูฟื้น
- 3.5 เมื่อหนูรู้สึกตัวฟื้นดีแล้ว นำกลับสู่ห้องเลี้ยง โดยหลังจากนี้คอยสังเกตบริเวณแผล ผ่าตัดว่าแผลเย็บหลุดหรือไม่ เพื่อจะได้เย็บปิดบาดแผลได้ทันทุกวันจนกว่าแผลจะปิดสนิท

4. วิธีการให้ยาและสารเคมี

หลังการผ่าตัด เมื่อหนูเริ่มรู้สึกตัวฟื้นดีแล้ว เริ่มให้ยาด้วยการป้อนเข้าทางปาก (gavage) วันละ 1 ครั้ง ที่เวลาเดียวกัน เป็นระยะเวลา 10 วัน โดยให้ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 หนูกลุ่มควบคุม ได้รับ vehicle=corn oil 2 ml/kg

กลุ่มที่ 2 ได้รับ Vitamin E =100 mg/kg

กลุ่มที่ 3 ได้รับ Vitamin E =500 mg/kg

กลุ่มที่ 4 ได้รับ Vitamin E =1,000 mg/kg

ขั้นตอนการเตรียมยา

4.1 ยาและสารเคมีที่ใช้

4.1.1 Corn oil จากบริษัท Sime Darby Edible Products Limited ซึ่งไม่มี vitamin E ผสมอยู่

4.1.2 Vitamin E จากบริษัท Sigma ชื่อสารเคมี คือ DL- α -Tocopherol acetate, Cat. No. T3376

4.2 การผสมยา

นำ vitamin E เจือจางใน corn oil ให้ได้ความเข้มข้น 100 mg/ml สำหรับป้อนในกลุ่มที่ 2, 500 mg/ml สำหรับป้อนในกลุ่มที่ 3 และ 1,000 mg/2ml สำหรับป้อนในกลุ่มที่ 4 ดังนั้น ปริมาตรยาป้อนหนูจึงเท่ากับ 1 ml/kg สำหรับกลุ่มที่ 2 และ 3 และ 2 ml/kg สำหรับกลุ่มที่ 4

5. เมื่อครบกำหนด 10 วันหลังผ่าตัด ทำการ sacrifice หนู มีขั้นตอน ดังต่อไปนี้
 - 5.1 นำหนูทุกตัวมาดม isoflurane เกินขนาด
 - 5.2 ผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อทำ cardiac perfusion ด้วย normal saline 200 ml
 - 5.3 ตามด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) 400 ml
 - 5.4 ผ่าเลาะเพื่อเก็บ DRG ระดับ L4 และ L5 ทั้งสองข้าง
 - 5.5 นำ DRG มาแช่ใน 3% glutaraldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
 - 5.6 เปลี่ยนมาแช่ใน 0.2 M PBS pH 7.4 จนกว่าจะเข้าสู่การเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับนับ

จำนวนเซลล์ประสาท

6. การเตรียมชิ้นเนื้อสำหรับนับจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG
 - การฝังชิ้นเนื้อใน Epoxy resin
 - 6.1 นำ DRG ที่แช่อยู่ใน 0.2 M PBS pH 7.4 มาล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วย 0.1 M Cacodylate Buffer pH 7.4 ครั้งละ 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง บนเครื่องเขย่า
 - 6.2 Post-fixation ด้วย 1% Osmium tetra oxide เป็นเวลา 2 ชั่วโมง บนเครื่องเขย่า
 - 6.3 ล้างน้ำยาคงสภาพส่วนเกินออกด้วย 0.1 M Cacodylate Buffer pH 7.4 ครั้งละ 10 นาที จำนวน 3 ครั้ง บนเครื่องเขย่า
 - 6.4 ทำการขจัดน้ำ (dehydrate) ออกด้วย alcohol เปอร์เซ็นต์ต่างๆ จากความเข้มข้นต่ำไปสู่ความเข้มข้นสูง ดังนี้
 - 70% Ethyl alcohol พักไว้ 24 ชั่วโมง
 - 80% Ethyl alcohol 10 นาที
 - 95% Ethyl alcohol 10 นาที
 - 95% Ethyl alcohol 10 นาที
 - 100% Ethyl alcohol 10 นาที
 - 100% Ethyl alcohol 10 นาที
 - 6.5 ผ่านกระบวนการ clearing และดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อมากยิ่งขึ้นด้วย Propylene oxide ครั้งละ 15 นาที จำนวน 2 ครั้ง

6.6 ผ่านกระบวนการ infiltration ด้วย

Propylene oxide : Epon mixture = 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

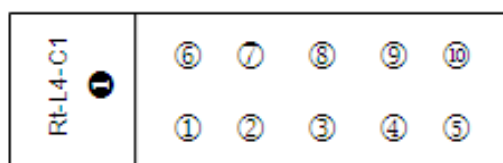
Propylene oxide : Epon mixture = 1:2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

6.7 Infiltration ต่อด้วย Epon mixture 100% อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงฝังใน Epon mixture 100% และนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 3 วัน จึงนำออกมาเข้าสู่กระบวนการตัดต่อไป

7. การตัดและการย้อมสี DRG

7.1 นำ DRG ที่ฝังใน resin มาตัดด้วยเครื่องตัด Ultramicrotome โดยใช้ใบมีดแก้ว ตัดที่ความหนา 2 μm

7.2 เริ่มเก็บ section แรกที่ตัดได้ ตั้งแต่เริ่มเห็นเซลล์ใน DRG เรียงลำดับไปจนถึง section สุดท้าย โดยนำ section ที่ตัดได้ มาวางบนสไลด์ ซึ่งกำหนดให้มี 10 section ต่อสไลด์ 1 แผ่น โดยเรียงลำดับดังในภาพที่ 3.3



ภาพที่ 3.3 แสดงการวางเรียงลำดับของ Section ที่ตัดได้

7.3 วางสไลด์ที่มี section บน hotplate อุณหภูมิระหว่าง 60-90 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท ประมาณ 3-4 นาที

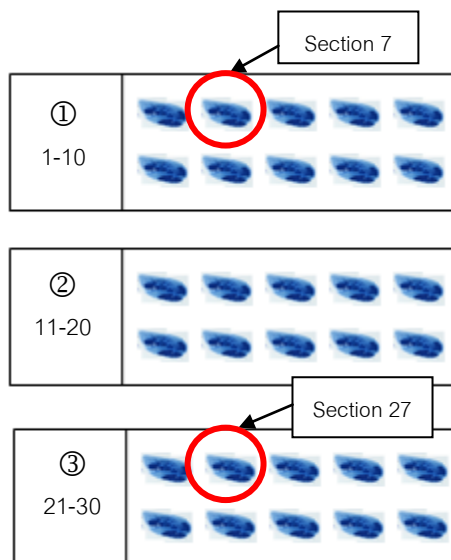
7.4 ทำการย้อมสีด้วยสีย้อม Toluidine blue ซึ่งจะติดสีฟ้าที่ไซโตพลาสซึม และสีน้ำเงินเข้มที่นิวคลีโอลัส ของตัวเซลล์ประสาทใน DRG

7.5 หลังการย้อมสีเสร็จแล้ว ควรตากสไลด์ให้ขึ้นเนื้อแห้งสนิทประมาณ 1 เดือน จึงจะสามารถปิด cover slip และส่องเลือก section เพื่อเก็บภาพได้

8. การนับเซลล์ใน DRG

8.1 ทำการส่องเลือก section ที่จะทำการนับเซลล์ประสาท โดยส่องเลือกหมายเลข section แรกจาก 1-9 จากนั้นเลือกในตำแหน่งถัดไปโดยห่างจากตำแหน่งที่ได้จากการส่องครั้งแรก

20 section (เทียบเป็นความหนาเท่ากับ 40 μm) เช่น การสุ่มที่ 7,27,47,67,... เป็นต้น (ภาพที่ 3.4) เพื่อป้องกันการนับเซลล์ประสาทซ้ำเซลล์เดียวกัน 2 ครั้ง

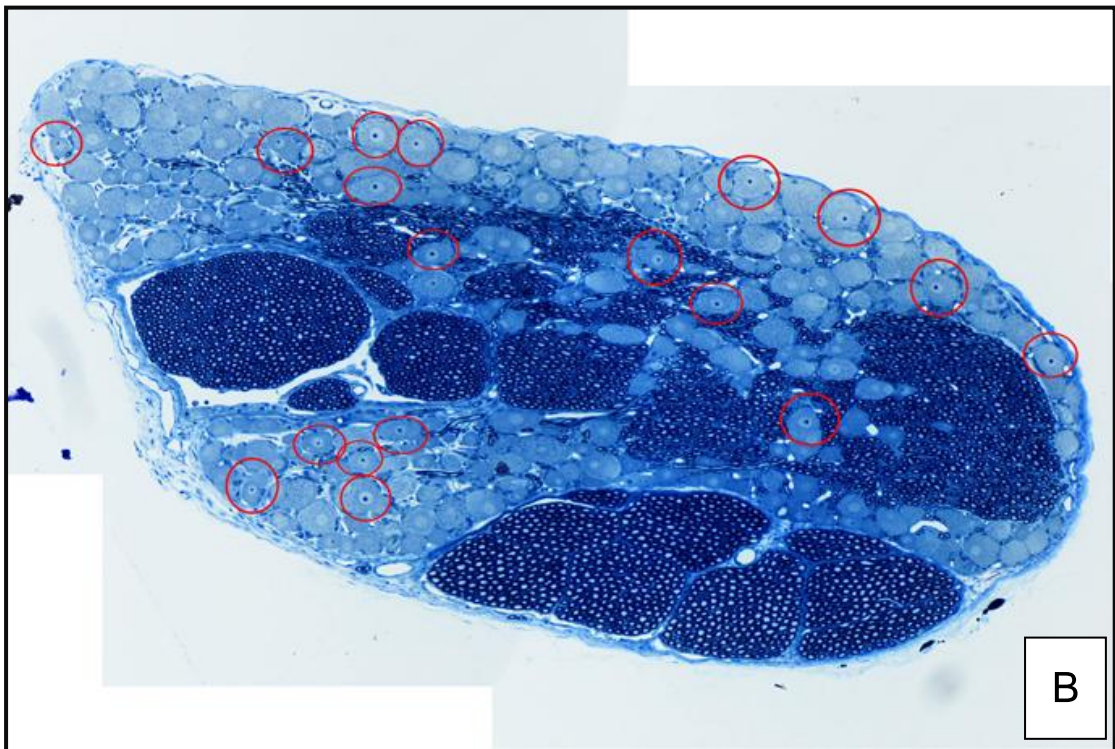
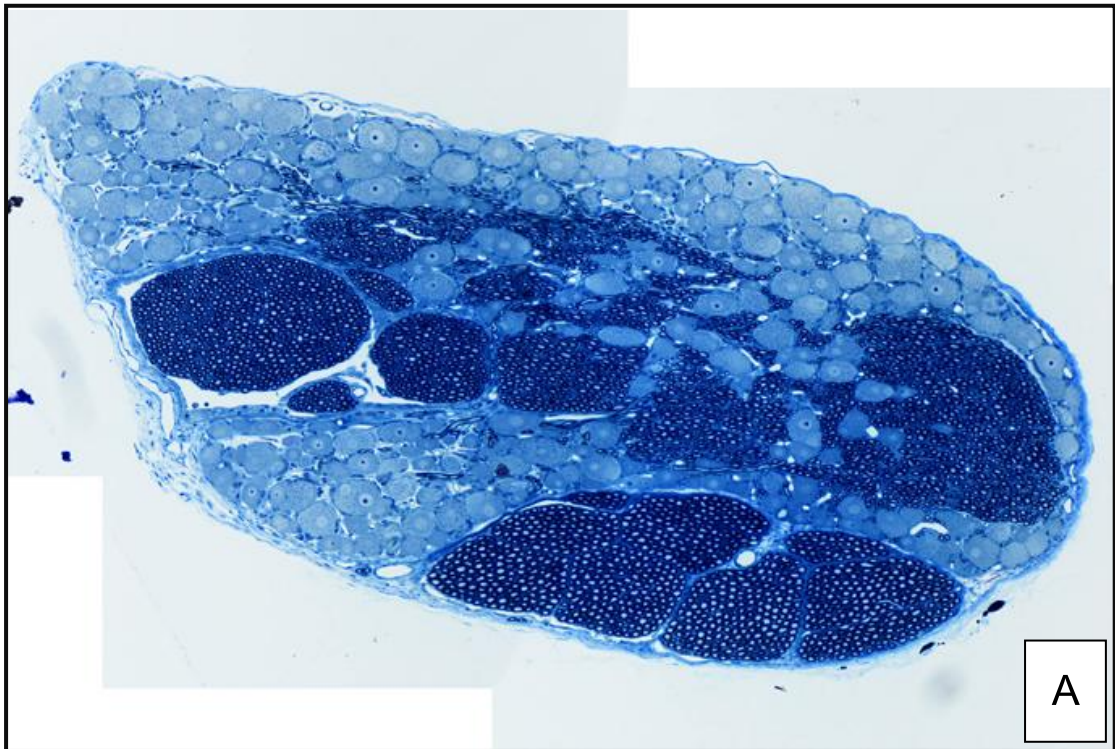


ภาพที่ 3.4 แสดงการสุ่มเลือก section ที่จะนำไปนับจำนวนเซลล์ใน DRG

8.2 การเก็บภาพ section ที่สุ่มเลือก โดยดูภาพจากกล้องจุลทรรศน์ใช้กำลังขยาย 10x แล้วนำภาพเข้าสู่คอมพิวเตอร์ผ่านกล้องถ่ายภาพที่ติดอยู่ด้วย ใช้โปรแกรม photoshop นับจำนวนเซลล์ประสาทจาก section ที่สุ่มเลือกทั้งหมด ตัวอย่าง section ที่ใช้นับแสดงในภาพที่ 3.5 นำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสูตรต่อไปนี้ เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG ขึ้นนั้นๆ

$$\text{จำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ประสาทในทุกๆ section ที่สุ่ม} \times \text{จำนวน section ทั้งหมด}}{\text{จำนวน section ที่ได้รับการสุ่ม}}$$

(Tredici et al., 1999 ; Schenker et al., 2003)



ภาพที่ 3.5 แสดงตัวอย่างภาพของ section DRG หนา 2 μm กำลังขยาย 10X ที่นำมาทำการนับจำนวนเซลล์
ประสาท A แสดงภาพของทั้ง section B แสดงตัวอย่างการนับจำนวนเซลล์ประสาทใน A

9. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

เปรียบเทียบจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระหว่างกลุ่มต่างๆ ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA โดยถือความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p \leq 0.05$

10. จริยธรรม (Ethical consideration)

โครงการนี้ต้องผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนเริ่มดำเนินการวิจัยในสัตว์ และผู้วิจัยได้ทำตาม จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่การคืนหน้าที่ และลักษณะทางจุลกายวิภาค

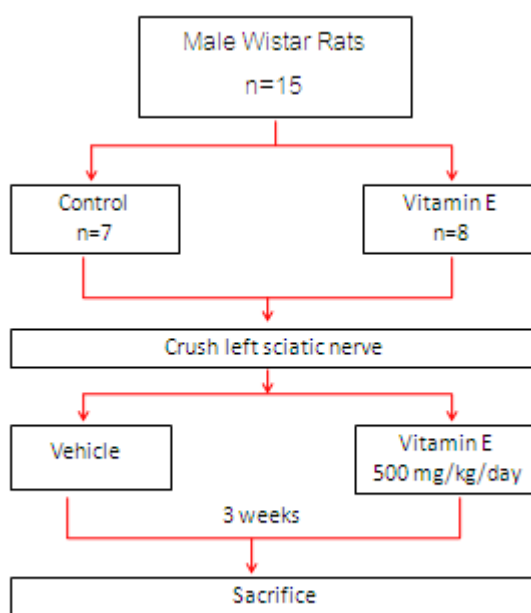
เนื่องจากการทดลองแรก ไม่สามารถประเมินด้าน motor ของเส้นประสาท sciatic ได้ จึงมาทำการศึกษาในการทดลองนี้ โดยรอระยะเวลาการบาดเจ็บที่นานขึ้น คือ 3 สัปดาห์ เพื่อประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสังการของเส้นประสาท sciatic และศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ที่มีการงอกใหม่

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

หนูเพศผู้พันธุ์ Wistar จำนวน 15 ตัว น้ำหนัก 200-250 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

รูปแบบการวิจัย

การทดลองในสัตว์



ภาพที่ 3.6 แสดงแผนการทดลองที่ 2

วิธีการวิจัย

1. การแบ่งกลุ่มหนู โดยสุ่มเลือกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกมี 7 ตัว กลุ่มที่ 2 มี 8 ตัว
ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control,C) ได้รับ vehicle คือ corn oil

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม Vitamin E ได้รับ Vitamin E 500 mg/kg/day เจือจางใน corn oil

2. สภาพแวดล้อมในการดูแลหนูและการทำ Left sciatic nerve crush เหมือนกับการทดลองที่ 1

3. วิธีการให้ยาและสารเคมี

หลังการผ่าตัด เมื่อหนูเริ่มรู้สึกตัวฟื้นดีแล้ว เริ่มให้ยาด้วยการป้อนเข้าทางปาก (gavage) วันละ 1 ครั้ง ที่เวลาเดียวกัน เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ โดยให้ดังต่อไปนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ได้รับ vehicle=corn oil 1 ml/kg

กลุ่มที่ 2 กลุ่ม Vitamin E ได้รับ vitamin E =500 mg/kg

ขั้นตอนการเตรียมยา

3.1 ยาและสารเคมีที่ใช้

3.1.1 Corn oil (เหมือนกับการทดลองที่ 1)

3.1.2 Vitamin E (เหมือนกับการทดลองที่ 1)

3.2 การผสมยา

นำ vitamin E เจือจางใน corn oil ให้ได้ความเข้มข้น 500 mg/ml สำหรับป้อนกลุ่มที่ 2 ด้วยปริมาตร 1 ml/kg

4. การทดสอบการคืนหน้าที่ด้าน motor ของเส้นประสาท sciatic โดยวิธี Walking track analysis

4.1 เตรียมกล่องจำกัดทางเดินของหนู ขนาด ยาว 70 cm กว้าง 12 cm สูง 18 cm และใช้กระดาษขาวปูพื้น (ภาพที่ 3.7)



ภาพที่ 3.7 แสดงการเดินของหนูในกล่องจำกัดทางเดิน

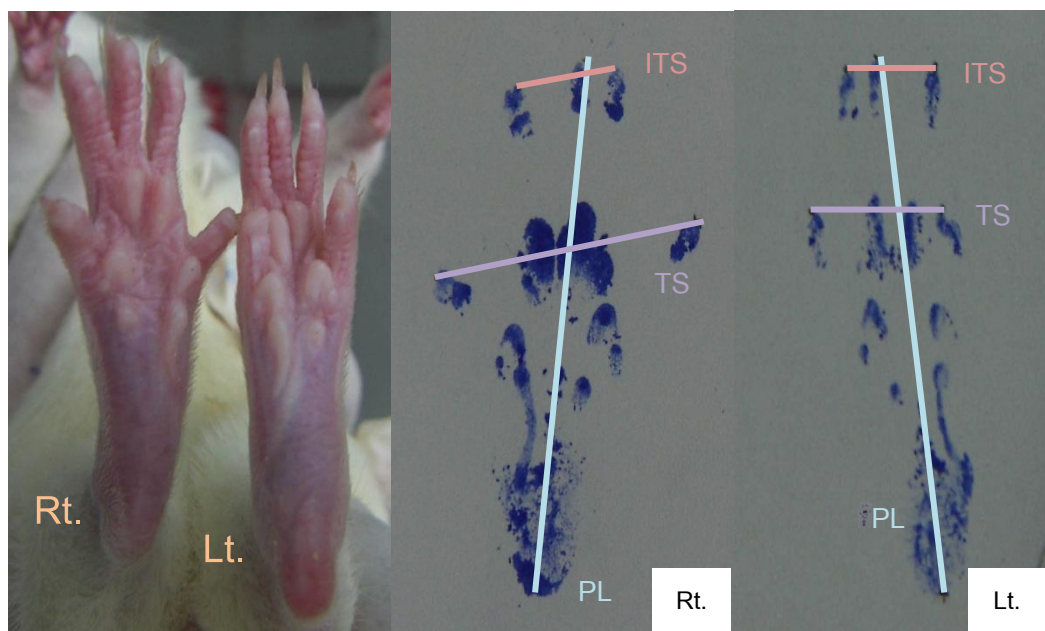
4.2 ป้อนหมึกสีเข้มที่เท้าทั้งสองข้างของหนู ให้หนูเดินตามทางในกล่อง (ภาพที่ 3.7)

4.3 วัดค่าต่างๆต่อไปนี้ บนรอยพิมพ์เท้าทั้ง 2 ข้างของหนู (ภาพที่ 3.8)

4.3.1 ค่า Foot print length (PL) คือ ค่าความยาวตั้งแต่ปลายนิ้วเท้าจนถึง
ปลายนิ้วที่ 3

4.3.2 ค่า Toe spread (TS) คือ ค่าความยาวระหว่างปลายนิ้วที่ 1 ถึง ปลาย
นิ้วที่ 5

4.3.3 ค่า Intermediate toe spread (ITS) คือ ค่าความยาวระหว่างปลายนิ้ว
ที่ 2 ถึง ปลายนิ้วที่ 4



ภาพที่ 3.8 แสดงการวัดค่าต่างๆ บนรอยเท้าหนูเพื่อหาค่า Sciatic functional index PL= Print length ,

TS= Toe spread และ ITS= Intermediate toe spread

4.4 นำค่าต่างๆเข้าสู่สูตรคำนวณ Sciatic functional index (SFI)

$$SFI = -38.3 \left[\frac{EPL-NPL}{NPL} \right] + 109.5 \left[\frac{ETS-NTS}{NTS} \right] + 13.3 \left[\frac{EIT-NIT}{NIT} \right] - 8.8$$

N = normal (Right) side

E = experiment (Left) side

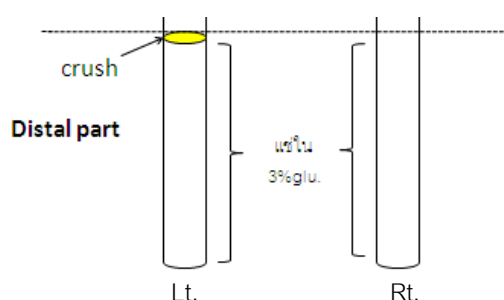
ค่า SFI ที่ได้ จะเป็นค่าติดลบ โดยหากเข้าใกล้ -100 แสดงว่ามีความพิการมาก แต่หากเข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีการคืนหน้าที่ใกล้เคียงปกติ (Varejao., 2001 ; Varejao., 2004)

5. ขั้นตอนการ sacrifice หนู มีขั้นตอน ดังต่อไปนี้

5.1 นำหนูทุกตัวมาดม isoflurane เกินขนาด

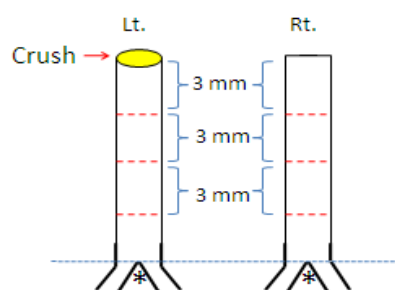
5.2 ผ่าตัดเปิดช่องอก ใช้เข็มฉีดยาขนาด 10 ml ดูดเลือดออกจากหัวใจให้หมด เพื่อให้หนูเสียชีวิตแน่นอน

5.3 ผ่าเลาะเก็บเส้นประสาท sciatic ทั้ง 2 ข้าง โดยเก็บส่วนตั้งแต่รอย crush ลงไป (distal) นำมาถ่วงด้วยตุ้มน้ำหนัก เพื่อให้เส้นประสาทมีลักษณะเป็นท่อนยาวตรง แช่ใน 3% glutaraldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 °c



ภาพที่ 3.9 แสดงวิธีการเก็บรักษาเส้นประสาท sciatic

5.4 นำส่วน distal ที่แช่อยู่ใน 3% glutaraldehyde ทั้งข้างซ้ายและข้างขวาออกมา เพื่อตัดเป็น segment สั้นๆ โดยนำเส้นประสาททั้งสองข้างมาวางเทียบกันเพื่อให้ตำแหน่งตรงกัน โดยใช้ landmark คือ จุดที่เส้นประสาท sciatic แยกแขนงเป็นเส้นประสาท tibial และ peroneal แล้วจึงเริ่มแบ่งเป็น segment สั้นๆ ขนาด 3 mm ตั้งแต่ตำแหน่งที่ทำการ crush ลงมา ดังภาพที่ 3.10 โดยใช้ทั้งหมด 3 segment ในเส้นประสาทแต่ละข้าง เนื่องจากต่ำกว่าระดับนี้ลงไป axon ที่งอกใหม่ในเส้นประสาท ยังมีขนาดเล็กและเพิ่งเริ่มมี myelin sheath หุ้ม ทำให้ยากต่อการวิเคราะห์โครงสร้าง



ภาพที่ 3.10 แสดงตำแหน่ง * ที่ใช้เป็น landmark ในการเทียบระดับเส้นประสาท sciatic

ทั้งข้างซ้ายและข้างขวาเพื่อแบ่งเป็น segment สั้นๆ ขนาด 3 mm

5.5 นำแต่ละท่อนของเส้นประสาท sciatic มาแช่ใน 3% glutaraldehyde อีก 24 ชั่วโมง แล้วจึงเปลี่ยนไปแช่ต่อใน buffer pH 7.4 ได้นานจนกว่าจะเข้าสู่กระบวนการฝังใน Epoxy resin

6. กระบวนการฝังชิ้นเนื้อใน Epoxy resin เหมือนกับการทดลองที่ 1

7. การตัดและการย้อมสีเส้นประสาท sciatic

7.1 นำท่อนของเส้นประสาท sciatic ที่ฝังใน resin มาตัดด้วยเครื่องตัด

Ultramicrotome โดยใช้ใบมีดแก้วตัดที่ความหนา 1 μm

7.2 เลือก section ที่ตัดได้ดีที่สุด วางในสไลด์ที่มีหยดน้ำผสม 20% acetone เพื่อให้ section แผลตั้ง ไม่ย่น แล้ววางบน hot plate อุณหภูมิระหว่าง 60 – 90 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้แห้งสนิท ประมาณ 3-5 นาที

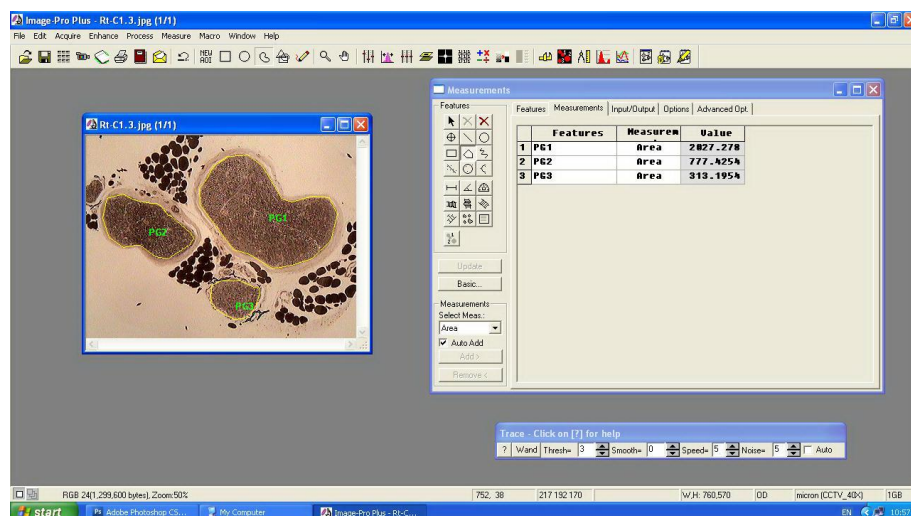
7.3 ทำการย้อมด้วยสี 1% Para-phenylenediamine

7.4 หลังการย้อมสีแล้ว ควรตากสไลด์ให้ชิ้นเนื้อแห้งสนิทประมาณ 1 เดือน จึงจะสามารถปิด cover slip และเก็บภาพได้

8. การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic (Nerve morphometry)

8.1 นำ sciatic section ที่เลือกไว้ ไปดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ (Light microscope) ที่เชื่อมต่อกับคอมพิวเตอร์ และเปิดโปรแกรม Image – Pro Plus

8.2 ใช้กำลังขยาย 4X เก็บภาพ เพื่อคำนวณหาพื้นที่ภาคตัดขวางของเส้นประสาททุก fascicle (Total fascicular area) ใช้หน่วยตารางมิลลิเมตร



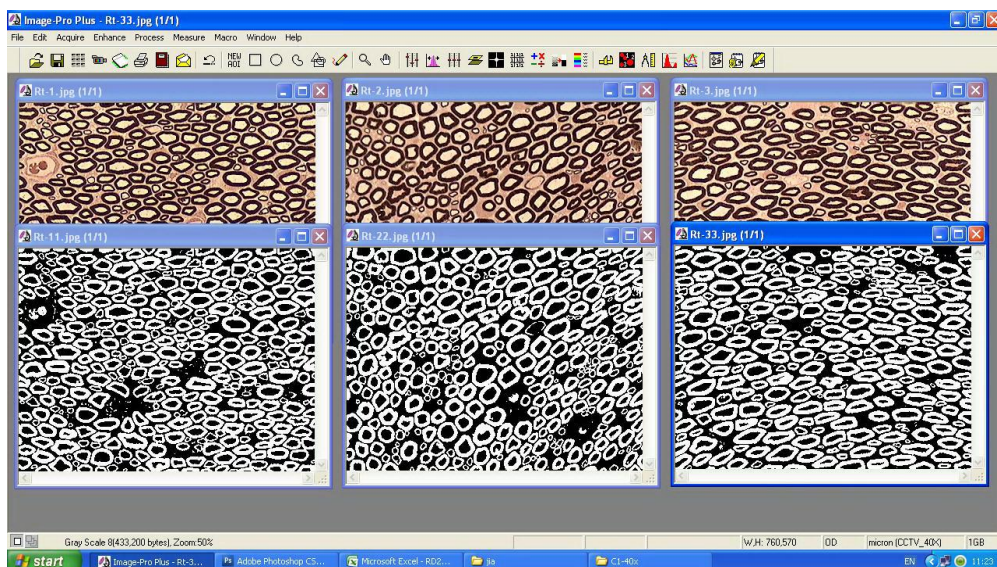
ภาพที่ 3.11 แสดงการวัดพื้นที่ภาคตัดขวางของเส้นประสาทขนาด 4X

8.3 ใช้กำลังขยาย 40X เก็บภาพโดยเลือกวางกรอบหน้าต่าง (window) ขนาด 0.012 mm^2 จำนวน 3 หน้าต่าง โดย 1 หน้าต่าง วางตรงกลางและอีก 2 หน้าต่าง วางในแนวเดียวกันกับหน้าต่างแรก แต่อยู่คนละข้างกัน ดังภาพที่ 3.12 โดยที่ขอบของหน้าต่างต้องไม่แตะ perineurium/epineurium โดยหาก section นั้น มีหลาย fascicle จะเก็บภาพ 3 หน้าต่าง ทุก fascicle ที่มีขนาดใหญ่พอที่จะวางได้ครบทั้ง 3 หน้าต่าง



ภาพที่ 3.12 แสดงการเลือกวาง 3 window ในแนวทแยงเดียวกัน

8.4 เมื่อได้ภาพแล้ว แปลงภาพให้เป็นภาพขาวดำ และนำไปแก้ไข artifact ในโปรแกรม Photoshop



ภาพที่ 3.13 แสดงการแปลงภาพให้เป็นขาว-ดำ เพื่อนำไปแก้ไขในโปรแกรม photoshop

8.5 เปิดโปรแกรม Image – Pro Plus ดึงภาพที่ตกแต่งแล้วใน photoshop มาคำนวณหาค่าต่างๆ ดังต่อไปนี้

8.5.1 Fiber diameter คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ myelinated nerve fiber

8.5.2 Axon diameter คือ ค่าเส้นผ่านศูนย์กลางของ axon

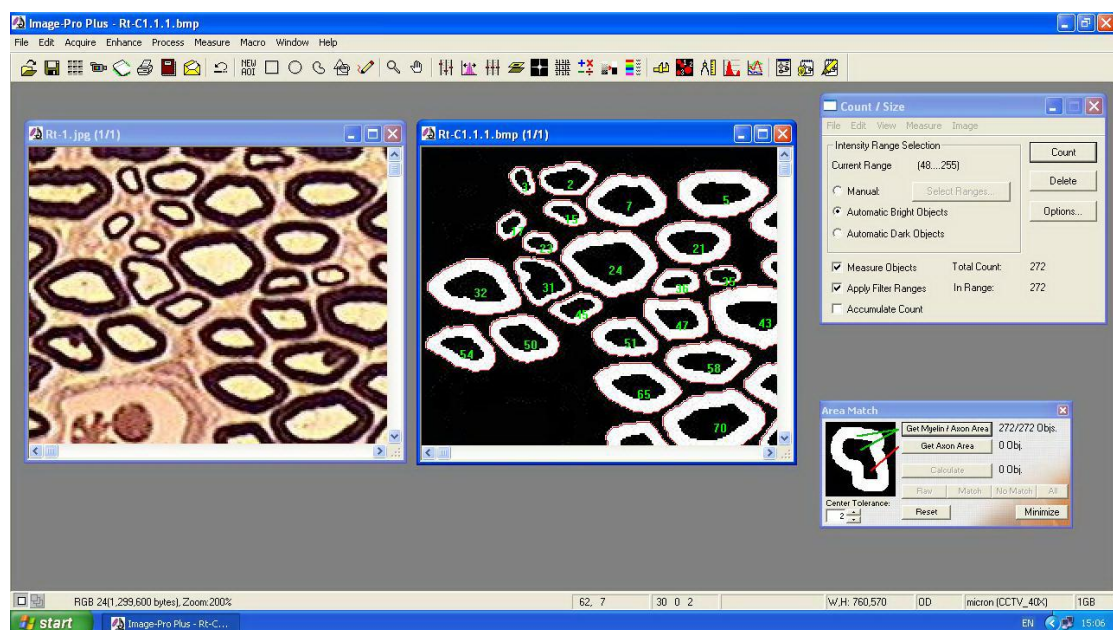
8.5.3 Myelin thickness คือ ค่าที่ได้จากเส้นผ่านศูนย์กลางของ myelinated nerve fiber ลบด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของ axon แล้วหาร 2

8.5.4 G ratio คือ ค่าที่ได้จากค่า axon diameter หารด้วยค่า fiber diameter

8.5.5 Total number of nerve fiber

8.5.6 Nerve fiber density คือ จำนวนของ myelinated nerve fiber ต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร

เปรียบเทียบค่าเหล่านี้ระหว่างข้างซ้ายกับข้างขวาในระดับเดียวกันทุกระดับ ในหนูแต่ละตัว โดยคำนวณออกมาเป็นร้อยละของข้างซ้ายเทียบกับข้างขวา (ร้อยละของข้างที่หนีบเส้นประสาทเปรียบเทียบกับข้างที่ปกติ)



ภาพที่ 3.14 แสดงการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Image – Pro Plus

9. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

เปรียบเทียบค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ในข้อ 8 ในเส้นประสาทระดับต่างๆ ระหว่างกลุ่มทดลอง ด้วยการวิเคราะห์ทางสถิติ Unpaired t-test โดยถือความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p \leq 0.05$

10. จริยธรรม (Ethical consideration)

โครงการนี้ต้องผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ก่อนเริ่มดำเนินการวิจัยในสัตว์ และผู้วิจัยได้ทำตาม จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

บทที่ 4

ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

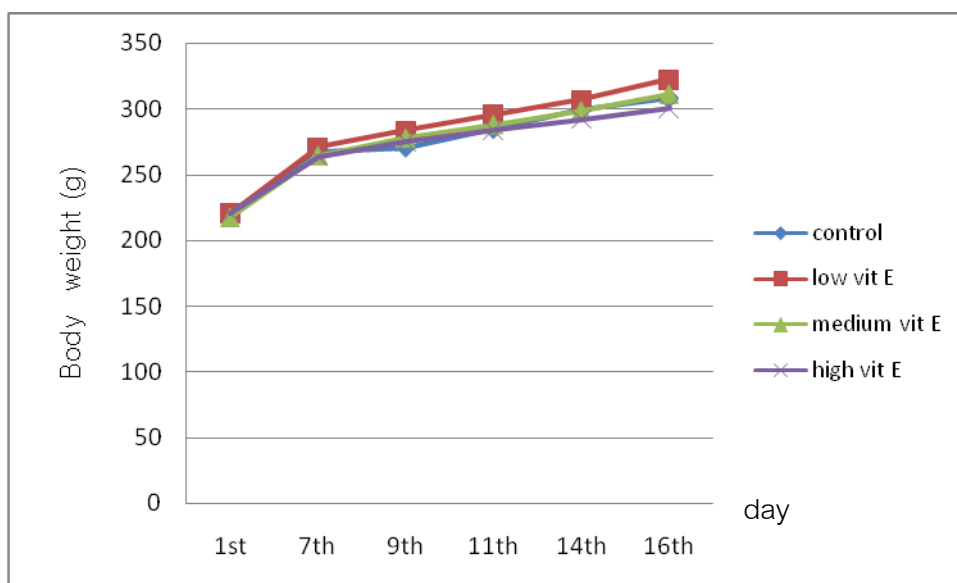
การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง

1. น้ำหนักหนู

น้ำหนักเฉลี่ยของหนูตลอดการทดลอง ทั้งในกลุ่ม control ,low vitamin E, medium vitamin E และ high vitamin E แสดงในตารางที่ 4.1 และภาพที่ 4.1 โดยที่น้ำหนักแรกเริ่มเริ่มต้นในแต่ละกลุ่มใกล้เคียงกัน เมื่อหนูได้รับอาหารและยาทุกวัน ทำให้มีน้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น โดยที่น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูทั้งสี่กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ไม่ว่าจะในช่วงเวลาใดในระหว่างการทดลอง

ตารางที่ 4.1 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของหนู

Day	Body weight (g)			
	(Mean \pm SEM)			
	Control	Low Vitamin E	Medium Vitamin E	High Vitamin E
1 st	220.8 \pm 3.5	220.4 \pm 2.5	217.2 \pm 5.4	220.4 \pm 2.1
7 th	267.2 \pm 4.8	270.8 \pm 2.1	264.4 \pm 5.6	264.0 \pm 3.7
9 th	270.4 \pm 4.8	283.2 \pm 2.3	277.6 \pm 8.1	275.2 \pm 4.0
11 th	284.4 \pm 5.4	295.6 \pm 2.1	288.0 \pm 7.1	284.0 \pm 4.8
14 th	299.2 \pm 5.4	307.2 \pm 2.0	298.4 \pm 7.1	292.4 \pm 4.4
16 th	308.0 \pm 5.7	322.4 \pm 1.9	311.2 \pm 7.2	300.8 \pm 5.2



ภาพที่ 4.1 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทุกกลุ่มตลอดการทดลอง

2. จำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง

การนับจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระดับ L4 ข้างขวา (ข้างที่ปกติ) ในกลุ่ม control, low vitamin E, medium vitamin E และ high vitamin E มีจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดเท่ากับ $19,660 \pm 660$, $20,038 \pm 77$, $20,162 \pm 42$ และ $20,115 \pm 230$ ตามลำดับ และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในข้างซ้าย (ข้างที่หนีบเส้นประสาท) มีจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระดับ L4 ทั้งหมดเท่ากับ $13,458 \pm 299$, $13,696 \pm 311$, $16,709 \pm 435$ และ $17,396 \pm 363$ ตามลำดับ (ตารางที่ 4.2) แสดงให้เห็นว่ามีการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ของข้างซ้ายเมื่อเทียบกับข้างขวาในทุกกลุ่ม โดยที่ในกลุ่ม high vitamin E มีการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทน้อยที่สุดคือ $13.5 \pm 1.3\%$ และกลุ่ม medium vitamin E มีการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทน้อยรองลงมาคือ $17.1 \pm 2.2\%$ ซึ่งการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ของกลุ่ม medium vitamin E และ high vitamin E มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม control และ low vitamin E ขณะเดียวกันถ้าเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม control และ low vitamin E พบว่าการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG นั้นไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และการเปรียบเทียบในระหว่างกลุ่ม medium vitamin E และ high

vitamin E การลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.2 แสดงจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ระดับ L4 ในแต่ละข้าง รวมทั้งร้อยละการลดลงของข้างซ้ายเมื่อเทียบกับข้างขวา

Group	Numbers of DRG		
	Right (normal)	Left (injury)	% Decrease
Control	19,660±660	13,458±299	31.5±1.2
Low Vitamin E	20,038±77	13,696±311	31.6±1.7
Medium Vitamin E	20,162±42	16,709±435	17.1±2.2*
High Vitamin E	20,115±230	17,396±363	13.5±1.3*

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± SEM, *p<0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

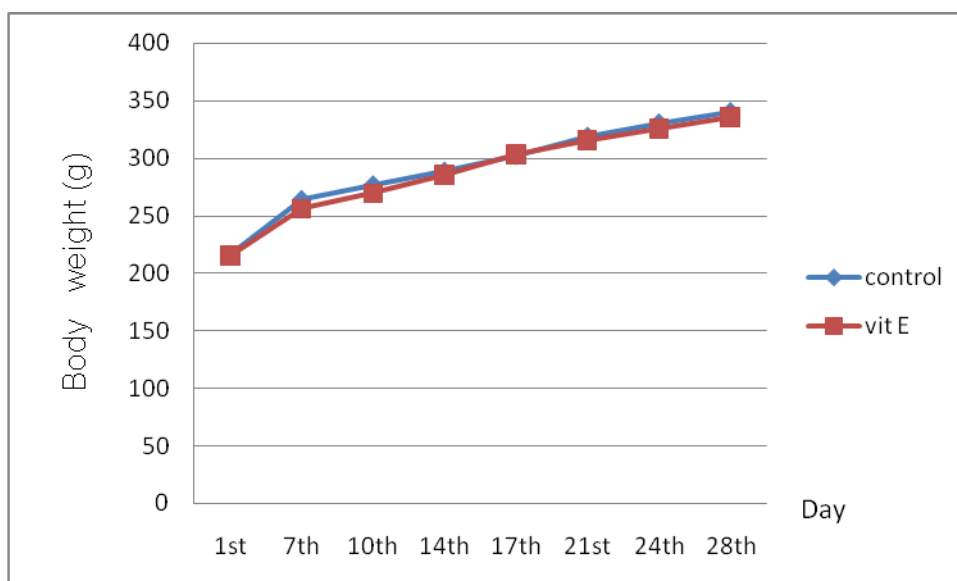
การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่การคืน
น้ำหนักและลักษณะทางจุลกายวิภาค

1. น้ำหนักหนู

น้ำหนักเฉลี่ยของหนูตลอดการทดลอง ทั้งในกลุ่ม Control และกลุ่ม Vitamin E แสดงในตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.2 โดยที่น้ำหนักแรกจับใกล้เคียงกันทั้ง 2 กลุ่ม เมื่อได้รับอาหารและยาทุกวัน ทำให้มีน้ำหนักเพิ่มขึ้น ซึ่งน้ำหนักของหนูทั้งสองกลุ่มในแต่ละช่วงเวลาไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตารางที่ 4.3 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยตลอดการทดลองของหนูทั้งสองกลุ่ม

Day	Body weight (g) (Mean \pm SEM)	
	Control	Vitamin E
1 st	216.0 \pm 3.9	215.3 \pm 2.1
7 th	263.7 \pm 5.1	256.0 \pm 1.9
10 th	276.6 \pm 4.9	269.5 \pm 2.1
14 th	288.6 \pm 5.3	285.5 \pm 3.3
17 th	302.6 \pm 6.5	303.5 \pm 3.9
21 st	318.9 \pm 7.2	315.5 \pm 3.6
24 th	330.6 \pm 6.9	325.5 \pm 5.2
28 th	340.3 \pm 7.8	335.8 \pm 7.0



ภาพที่ 4.2 แสดงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูตลอดการทดลองทั้งสองกลุ่ม

2. การทดสอบการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสังการของเส้นประสาท sciatic

2.1 ลักษณะทางกายวิภาคของเท้าหนู

ลักษณะเท้าหนูด้านซ้ายที่ถูกหนีบเส้นประสาท sciatic มีลักษณะเท้าอ่อนแรง ลีบเล็กและนุ่มลง นิ้วเท้าทั้งห้าชิดกัน ซึ่งแตกต่างจากเท้าด้านขวาที่เป็นข้างปกติ มีลักษณะเท้าที่แข็งแรงและนิ้วเท้าทั้งห้ากางออกจากกัน ขณะที่หนูเดิน เท้าซ้ายจะเดินลากขาเล็กน้อย ส่วนเท้าขวามีการก้าวเดินที่ปกติดี

2.2 การวัดค่า Sciatic functional index

การทดสอบการคืนหน้าที่ของเส้นประสาท sciatic เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 3 สัปดาห์หลังผ่าตัด พบว่าค่า Sciatic functional index (SFI) เฉลี่ยของกลุ่ม Control มีค่า -30.6 ± 4.2 และในกลุ่ม Vitamin E มีค่า -31.1 ± 6.9 ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มการทดลอง

3. ลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic

ได้ค่าพารามิเตอร์ต่างๆ (ตารางที่ 4.4-4.6) ดังต่อไปนี้

3.1 การวัดค่า Fiber diameter โดยการเปรียบเทียบด้านซ้ายต่อด้านขวา คำนวณเป็นร้อยละ พบว่าในกลุ่ม control และกลุ่ม vitamin E ทั้ง 3 segment ได้แก่ segment ที่ 1, 2 และ 3 ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.2 การวัดค่า Axon diameter โดยการเปรียบเทียบด้านซ้ายต่อด้านขวา คำนวณเป็นร้อยละ พบว่าในกลุ่ม control และกลุ่ม vitamin E ทั้ง 3 segment ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.3 การวัดค่า Myelin thickness พบว่าค่าร้อยละของด้านซ้ายต่อด้านขวา ทั้งในกลุ่ม control และกลุ่ม vitamin E ทั้ง 3 segment ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.4 การวัดค่า G-ratio พบว่าค่าร้อยละของด้านซ้ายต่อด้านขวา ทั้งในกลุ่ม control และกลุ่ม vitamin E ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.5 การวัดค่า Fiber density พบว่าค่าร้อยละของด้านซ้ายต่อด้านขวาของกลุ่ม vitamin E ใน segment ที่ 2 มีค่า 177.4 ± 10.0 และใน segment ที่ 3 มีค่า 158.1 ± 12.7 เมื่อเทียบกับกลุ่ม control มีค่า 151.8 ± 3.6 และ 125.6 ± 6.0 ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า ค่า fiber density เพิ่มขึ้นในกลุ่ม vitamin E โดยความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

3.6 การวัดค่า Total count พบว่าค่าร้อยละของด้านซ้ายต่อด้านขวาของกลุ่ม vitamin E ใน segment ที่ 3 มีค่า 130.2 ± 7.9 เทียบกับ 107.3 ± 2.5 ในกลุ่ม control ซึ่งแสดงว่าค่า total fiber count เพิ่มขึ้นในกลุ่ม vitamin E โดยความแตกต่างนี้มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 4.4 แสดงค่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ในข้างซ้ายและข้างขวาและคำนวณเป็นร้อยละของข้างซ้าย (injury) เทียบกับข้างขวา (normal) ใน segment ที่ 1,ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM
*p<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Group		Fiber	Axon	Myelin	G- ratio	Fiber	Total
Segment1		diameter	diameter	thickness		density	count
Control	Lt.	3.20 \pm 0.09	1.86 \pm 0.10	0.67 \pm 0.02	0.57 \pm 0.02	29,822.2 \pm 1,603.2	7,833 \pm 361
	Rt.	5.50 \pm 0.07	2.87 \pm 0.05	1.32 \pm 0.03	0.52 \pm 0.01	21,494.4 \pm 469.1	7,138 \pm 330
	%L/R	58.2 \pm 1.9	64.7 \pm 3.2	51.2 \pm 2.1	108.1 \pm 3.1	138.5 \pm 5.7	110.0 \pm 4.0
Vitamin E	Lt.	3.16 \pm 0.09	1.78 \pm 0.10	0.69 \pm 0.03	0.55 \pm 0.02	34,597.2 \pm 1,119.6	9,515 \pm 807
	Rt.	5.42 \pm 0.08	2.92 \pm 0.05	1.25 \pm 0.02	0.54 \pm 0.00	22,597.2 \pm 875.2	7,522 \pm 70
	%L/R	58.4 \pm 1.6	61.1 \pm 3.7	55.3 \pm 1.9	101.8 \pm 3.5	153.7 \pm 13.4	126.4 \pm 10.2

ตารางที่ 4.5 แสดงค่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ในข้างซ้ายและข้างขวาและคำนวณเป็นร้อยละของข้างซ้าย (injury) เทียบกับข้างขวา (normal) ใน segment ที่ 2,ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM
*p<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Group		Fiber	Axon	Myelin	G- ratio	Fiber	Total
Segment2		diameter	diameter	thickness		density	count
Control	Lt.	3.05 \pm 0.06	1.63 \pm 0.02	0.71 \pm 0.02	0.53 \pm 0.01	32,111.1 \pm 478.2	7,804 \pm 295
	Rt.	5.56 \pm 0.07	2.87 \pm 0.05	1.35 \pm 0.05	0.52 \pm 0.01	21,194.4 \pm 483.6	7,124 \pm 295
	%L/R	54.8 \pm 1.2	57.0 \pm 0.8	52.7 \pm 2.3	101.9 \pm 2.3	151.8 \pm 3.6	109.9 \pm 4.4
Vitamin E	Lt.	3.11 \pm 0.05	1.62 \pm 0.06	0.71 \pm 0.04	0.52 \pm 0.02	35,616.7 \pm 1,057.6	9,122 \pm 764
	Rt.	5.63 \pm 0.07	2.99 \pm 0.09	1.32 \pm 0.02	0.53 \pm 0.01	20,205.6 \pm 641.2	7,186 \pm 132
	%L/R	55.3 \pm 2.0	54.4 \pm 3.4	53.3 \pm 2.5	98.9 \pm 3.8	177.4 \pm 10.0*	126.7 \pm 9.5

ตารางที่ 4.6 แสดงค่าลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ในข้างซ้ายและข้างขวาและคำนวณเป็นร้อยละของข้างซ้าย (injury) เทียบกับข้างขวา (normal) ใน segment ที่ 3,ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย \pm SEM
*p<0.05 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

Group		Fiber	Axon	Myelin	G- ratio	Fiber	Total
Segment3		diameter	diameter	thickness		density	count
Control	Lt.	3.03 \pm 0.06	1.71 \pm 0.01	0.66 \pm 0.03	0.56 \pm 0.01	25,861.1 \pm 965.1	7,481 \pm 224
	Rt.	5.55 \pm 0.04	2.88 \pm 0.06	1.33 \pm 0.04	0.52 \pm 0.01	20,650.0 \pm 384.1	6,974 \pm 160
	%L/R	54.5 \pm 1.2	59.6 \pm 1.7	49.3 \pm 1.8	107.1 \pm 2.1	125.6 \pm 6.0	107.3 \pm 2.5
Vitamin E	Lt.	3.06 \pm 0.10	1.69 \pm 0.04	0.68 \pm 0.04	0.55 \pm 0.01	31,155.6 \pm 1,607.6	8,914 \pm 373
	Rt.	5.72 \pm 0.17	3.03 \pm 0.13	1.34 \pm 0.04	0.53 \pm 0.01	19,966.7 \pm 1,091.1	6,891 \pm 256
	%L/R	53.6 \pm 1.9	56.3 \pm 2.1	50.6 \pm 2.5	103.0 \pm 2.1	158.1 \pm 12.7*	130.2 \pm 7.9*

สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง

พบว่า vitamin E ช่วยบรรเทาการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ได้ ซึ่งขนาดที่มีประสิทธิภาพมากที่สุดคือ 1,000 mg/kg/day รองลงมาคือ ขนาด 500 mg/kg/day ซึ่งทั้ง 2 ขนาด มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มวิตามินอีขนาด 100 mg/kg/day และกลุ่ม control

การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่การคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาค

พบว่า vitamin E ขนาด 500 mg/kg/day ไม่มีผลต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic โดยการคำนวณจากค่า sciatic functional index แต่ในทางจุลกายวิภาค พบว่า vitamin E สามารถช่วยเพิ่ม fiber density และจำนวน myelinated nerve fiber ได้

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ในการบาดเจ็บของเส้นประสาทส่วนปลาย (peripheral nerve injury) จะเกิดกระบวนการเสื่อมสลายของเส้นประสาท (nerve degeneration) และกระบวนการงอกใหม่ของเส้นประสาท (nerve regeneration) ซึ่งทั้งสองกระบวนการเป็นกลไกทางธรรมชาติที่จะเกิดต่อเนื่อง โดยนอกจากจะมีการเสื่อมสลายของ axon แล้ว ยังมีการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG ด้วย ซึ่งน่าจะเกิดจาก apoptosis (Hart et al., 2002) การศึกษานี้จึงต้องการดูผลของวิตามินอีต่อการลดจำนวนของเซลล์ประสาทในปมประสาทไขสันหลัง การคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic และการงอกใหม่ของ axon ภายหลังจากการบาดเจ็บของเส้นประสาท

การทดลองที่ 1 ผลของวิตามินอีต่อการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG

พบว่าวิตามินอี ทำให้การลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DGR น้อยลง โดยในกลุ่ม high vitamin E มีการลดลงน้อยที่สุด คือ $13.5 \pm 1.3\%$ รองลงมาคือกลุ่ม medium vitamin E $17.1 \pm 2.2\%$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control $31.5 \pm 1.2\%$ และกลุ่ม low vitamin E $31.6 \pm 1.7\%$ แสดงว่าวิตามินอี สามารถลดการสูญเสียของเซลล์ประสาทใน DRG ได้ ที่ปริมาณ 1,000 mg/kg/day และ 500 mg/kg/day โดยที่การศึกษาก่อนหน้านี้มีความหลากหลายมากของการเลือกใช้ขนาดของวิตามินอี ดังต่อไปนี้ ในกรณีของ neuropathy มีการศึกษาของ Dam และคณะ โดยเลือกใช้วิตามินอีขนาด 12 g/kg, 70 mg/kg และ 25 mg/kg ให้หนูที่เป็นโรคเบาหวานกินทางปากและพบว่าวิตามินอีขนาด 12 g/kg ให้ผลดีที่สุดที่ทำให้การทำหน้าที่ของเส้นประสาทดีขึ้น (Dam et al., 1999) ต่อมามีการศึกษาของ Kim และคณะ ที่ใช้วิตามินอีลด neuropathic pain โดยการฉีดเข้าทาง I.P. โดยให้วิตามินอีขนาด 0.1, 1 และ 5 g/kg และพบว่าวิตามินอีขนาด 5 g/kg เป็นขนาดที่ให้ผลดีที่สุดในการลด neuropathic pain (Kim et al., 2006) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Tiwari และคณะ ที่เลือกใช้วิตามินอี 2 โครงสร้าง คือ แอลฟาโทโคฟีรอล ขนาด 100 mg/kg และโทโคไตรอีนอล ขนาด 50, 100 และ 200 mg/kg ใน model หนูเป็น alcoholic neuropathy โดยการกินทางปาก และพบว่าวิตามินอีทั้ง 2 โครงสร้าง สามารถยับยั้งการเกิด neuropathic pain ได้ ซึ่งผลของโทโคไตรอีนอลมีประสิทธิภาพมากกว่าแอลฟาโทโคฟีรอล (Tiwari

et al., 2009) ส่วนในกรณีของ nerve injury นั้น มีการศึกษาของ Hosida และคณะ ที่ใช้วิตามินอีผสมในน้ำกินทางปาก ในปริมาณที่แตกต่างกันคือ 20 µg/ml (ได้รับวิตามินอี 1.67-2.8 mg/kg/day) และ 200 µg/ml (ได้รับวิตามินอี 16.7-28 mg/kg/day) ใน model หนูที่ได้รับบาดเจ็บของเส้นประสาท facial พบว่าวิตามินอีขนาด 20 µg/ml มีประสิทธิภาพดีกว่า 200 µg/ml ในการยับยั้งการเกิดอนุมูลอิสระและมีผลดีต่อเซลล์ประสาทหลังการบาดเจ็บ (Hosida et al., 2009) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Morani และคณะ ในหนูที่ทำ sciatic nerve crush injury และหนูได้รับวิตามินอีขนาด 50 mg/kg โดยการฉีดเข้าทาง I.P. ผสมกับวิตามินบี 12 และพบว่าวิตามินอีขนาดนี้ร่วมกับวิตามินบี 12 ให้ผลดีต่อการฟื้นฟูเส้นประสาทได้ (Morani et al., 2010) จากการศึกษาที่ได้กล่าวมาข้างต้นจะเห็นว่าบางการศึกษามีการเลือกใช้ขนาดของวิตามินอีในปริมาณที่สูงและพบว่าให้ผลดีต่อเส้นประสาทได้ ในขณะที่เดียวกันก็มีบางการศึกษาที่วิตามินอีในขนาดที่ต่ำก็ให้ผลดีกว่าขนาดที่สูง ดังนั้น ในการทดลองนี้จึงเลือกวิตามินอีขนาด 500 mg/kg/day ไปทำการศึกษาในการทดลองที่ 2 เนื่องจากเป็นขนาดต่ำสุดที่ยังให้ผลดี สำหรับการลดจำนวนลงของจำนวนเซลล์ประสาทใน DRG นั้น น่าจะเกิดจากภาวะ oxidative stress ภายหลังการเกิดการบาดเจ็บของเส้นประสาท โดยมีการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ทำกรหนีบเส้นประสาท sciatic แล้วพบว่ามี marker ของ oxidative stress เพิ่มขึ้น (Varija et al., 2009) ซึ่ง oxidative stress นี้ สามารถทำให้ neuron เกิดการตายแบบ apoptosis ได้ (Langley et al., 2004) ดังนั้น วิตามินอีซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant จึงน่าจะช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทใน DRG โดยผ่านกลไกการลดภาวะ oxidative stress ทำให้จำนวนเซลล์ประสาทเหลืออยู่มากขึ้น แต่อย่างไรก็ตาม ยังสรุปไม่ได้ชัดเจนว่าภาวะ oxidative stress ลดลงหลังให้วิตามินอี จนกว่าจะวัดระดับ oxidative stress ใน DRG เสียก่อน สรุปว่า วิตามินอีให้ผลดีต่อ sensory neurons ใน DRG และสำหรับการทดลองแรกนี้ การทดสอบผลของวิตามินอีต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทยังไม่สามารถทำได้เนื่องจากระยะเวลาเพียง 10 วัน ยังไม่เพียงพอสำหรับการเกิด nerve regeneration ไปถึงอวัยวะเป้าหมาย ทั้งยังยังไม่สามารถศึกษาโครงสร้างของเส้นประสาทที่งอกใหม่ได้ เพราะ nerve fiber ยังเล็กเกินกว่าจะศึกษารายละเอียดได้

จึงนำเข้าสู่การทดลองต่อมา เพื่อศึกษาในระยะเวลาที่นานขึ้นคือ 3 สัปดาห์ เพื่อศึกษาผลของวิตามินอีต่อการคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ที่งอกใหม่

การทดลองที่ 2 ผลของวิตามินอีต่อการงอกใหม่ของเส้นประสาท sciatic ทั้งในแง่การคืนหน้าที่และลักษณะทางจุลกายวิภาค

การประเมินการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic โดยการวัดค่า sciatic functional index (SFI) ซึ่งเป็นค่าที่คำนวณได้ หากเข้าใกล้ -100 แสดงว่ามีความพิการมาก แต่หากค่าเข้าใกล้ 0 แสดงว่ามีการทำงานของประสาทสั่งการใกล้เคียงปกติ พบว่า ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ กลุ่มควบคุมมีค่า SFI -30.6 ± 4.2 และกลุ่มวิตามินอี มีค่า -31.1 ± 6.9 ซึ่งไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าวิตามินอี ไม่น่าจะมีผลต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาท sciatic

ส่วนทางด้านจุลกายวิภาคของเส้นประสาท sciatic ที่งอกใหม่ พบว่า ในระยะเวลา 3 สัปดาห์ ในกลุ่มวิตามินอี ค่า % ของด้านซ้ายต่อด้านขวาของค่า fiber density ใน segment ที่ 2 คือ 177.4 ± 10.0 และใน segment ที่ 3 คือ 158.1 ± 12.7 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่า 151.8 ± 3.6 และ 125.6 ± 6.0 ตามลำดับ และค่า total count ใน segment ที่ 3 ของกลุ่มวิตามินอี คือ 130.2 ± 7.9 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีค่า 107.3 ± 2.5 แสดงให้เห็นว่าค่า % ของด้านซ้ายต่อด้านขวาของกลุ่มวิตามินอีใน nerve segment ดังกล่าว มีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนใน segment ที่ 1 นั้น ค่าของกลุ่มวิตามินอีก็สูงกว่ากลุ่มควบคุมเช่นกัน เพียงแต่ไม่ถึงนัยสำคัญ จากผลการทดลองบ่งชี้ว่า มีการเพิ่มจำนวนของ axonal sprout มากขึ้นในเส้นประสาทที่บาดเจ็บเมื่อได้รับวิตามินอี โดย sprout ที่งอกใหม่นั้น เป็นการนับจำนวนรวม ซึ่งไม่สามารถแยกได้ว่าเป็น motor หรือ sensory axon แต่อย่างไรก็ตามการเพิ่มจำนวนของ axon ที่งอกใหม่นี้ น่าจะมีผลดี เนื่องจากจะเพิ่มโอกาสให้ axon งอกไปถึงอวัยวะเป้าหมายที่ถูกต้องได้มากขึ้น ทำให้เกิดกระบวนการ nerve regeneration ได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้อีกกลไกที่อาจช่วยอธิบายการเพิ่มจำนวนของ axon ที่งอกใหม่เมื่อได้รับวิตามินอีนั้น คือ การที่จำนวนของเซลล์ประสาทใน DRG ของกลุ่มวิตามินอีมีมากกว่ากลุ่มควบคุมจากการทดลองแรก ทำให้มีการงอกใหม่ของ axon ได้มากกว่า

สำหรับวิตามินอี ที่ถึงแม้จะเพิ่มจำนวนของ axon ที่งอกใหม่ได้ แต่ไม่ได้ช่วยในเรื่องการคืนหน้าที่ของระบบประสาทสั่งการ เพราะ จำนวน axon ที่เพิ่มขึ้นนั้น ไม่สามารถแยกแยะได้ว่าเป็น sensory หรือ motor ดังนั้นจำนวนที่เพิ่มขึ้นนี้ อาจเป็น sensory axon ที่สะท้อนว่ามีจำนวน

DRG neurons ในกลุ่มวิตามินอีมากกว่ากลุ่มควบคุม ทั้งนี้ไม่ได้บ่งว่ามีจำนวน motor axon เพิ่มขึ้นแต่อย่างใด หรือถึงแม้จำนวน motor axon มีการเพิ่มขึ้นแต่การคืนหน้าที่ด้าน motor ยังขึ้นกับปัจจัยอื่นๆอีก นอกเหนือจาก จำนวน axon เช่น การทำงานของ motor neuron ใน spinal cord, ความเร็วในการงอกใหม่ของ axon เป็นต้น ซึ่งวิตามินอีอาจไม่มีผลต่อปัจจัยเหล่านี้

สรุปผลการทดลอง

1. วิตามินอีสามารถลดการสูญเสียเซลล์ประสาทรับความรู้สึกในปมประสาทไขสันหลัง (DRG) หลังการบาดเจ็บของเส้นประสาทได้
2. วิตามินอีไม่มีผลต่อการคืนหน้าที่ของเส้นประสาทสั่งการของเส้นประสาท sciatic แต่ในทางจุลกายวิภาคสามารถเพิ่มจำนวนการงอกใหม่ของ axon (axonal regeneration) หลังการบาดเจ็บของเส้นประสาทได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรศึกษาเพิ่มเติมว่า ผลของวิตามินอีที่เห็นในการทดลองนี้ เกิดจากภาวะ oxidative stress ที่ลดลงจริงหรือไม่ โดยใช้ marker ของ oxidative stress
2. ควรมีการศึกษาการคืนหน้าที่ทางด้าน sensory เพิ่มเติมด้วย เพื่อเปรียบเทียบว่าจะมีผลแตกต่างจากการคืนหน้าที่ทาง motor หรือไม่ อย่างไร
3. ศึกษาจำนวน motor neuron ใน spinal cord ว่ามีการลดลงหรือไม่ หลังเส้นประสาทบาดเจ็บ รวมทั้งดูว่า วิตามินอีช่วยลดการตายของเซลล์ประสาทเหล่านี้บ้างหรือไม่

รายการอ้างอิง

- Argyriou AA, Chroni E, Koutras A, et al. A randomized controlled trial evaluating the efficacy and safety of vitamin E supplementation for protection against cisplatin-induced peripheral neuropathy: final results. J Support Care Cancer 14 (2006):1134-40.
- Argyriou AA, Chroni E, Koutras A, et al. Vitamin E for prophylaxis against chemotherapy-induced neuropathy: A randomized controlled trial. J Neurology 64 (2005):26-31.
- Azzi A, Aratri E, Boscoboinik D, et al. Molecular basis of alpha-tocopherol control of smooth muscle cell proliferation. J Biofactors 7 (1998):3-14.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Azzi A. α -tocopherol (Vitamin E) regulates vascular smooth muscle cell proliferation and protein kinase C. J Arch Biochem Biophys 286 (1991):264-9.
- Boscoboinik D, Szewczyk A, Hensey C, et al. Inhibition of cell proliferation by alpha-tocopherol. Role of protein kinase C. J Biol Chem 266 (1991):6188-94.
- Brigelius-flohe R, Traber MG. Vitamin E : function and metabolism. J FASEB 13 (1999):1145-55.
- Camara-Lemarrooy CR, Guzman-de la Garza FJ, Fernandez-Garza. Molecular inflammatory mediators in peripheral nerve degeneration and regeneration. J Neuroimmunomodulation 17 (2010):314-24.
- Dam P, Bravenboer B, Asbeck B, et al. High rat food vitamin E content improves nerve function in streptozotocin-diabetic rats. Eur J Pharmacol 376 (1999):217-22.

- Damier P, Hirsch EC, Zhang P, et al. Glutathione peroxidase, glial cells and Parkinson's disease. J Neuroscience 52 (1993):1-7.
- Devaraj S, Jallal I. The effect of alpha tocopherol on critical cells in atherogenesis. J Curr Opin Lipidol 9 (1998):1115-17.
- Eggermont E. Recent advances in vitamin E metabolism and deficiency. Eur J Pediatr 165 (2006):429-34.
- Enrione EB, Weeks OI, Kranz S, et al. A Vitamin E-deficient diet affects nerve regeneration in rats. J Nutritions 15 (1999):140-4.
- Evan HM, Bishop KS. On the existence of a hitherto unrecognized dietary factor essential for reproduction. J Science 56 (1922):650-1.
- Felten DL, Shetty AN, Netter's atlas of neuroscience 2 (2010):138.
- Fischer LR, Glass JD. Oxidative stress induced by loss of Cu,Zn-superoxide dismutase (SOD1) or superoxide-generating herbicides causes axonal degeneration in mouse DRG culture. J Acta Neuropathol 119 (2010):249-59.
- Gilgun-Sherki Y, Melamed E, Offen D. Oxidative stress induced-neurodegenerative disease: the need for antioxidants that penetrate the blood brain barrier. J Neuropharmacology 40 (2001):959-75.
- Golbe LI, Farrel TLM, Davis PH. Case control study of early life dietary factors in Parkinson's disease. J Arch Neurol 45 (1988):1350-3.
- Golbe LI, Farrel TLM, Davis PH. Follow up study of early-life protective and risk factor in Parkinson's disease. J Mov Disord 5 (1990):66-70.
- Gutteridge JMC. Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. J Clinical Chemistry 41 (1995):1819-28.

- Hart AM, Brannstrom T, Wiberg M, et al. Primary sensory neurons and satellite cells after peripheral axotomy in the adult rat. J Exp Brain Res 142 (2002):308-18.
- Hosida S, Hatano M, Furukawa M, et al. Neuroprotective effect of vitamin E on adult rat motor neurons following facial nerve avulsion. J Acta Otolaryngol 129 (2009):330-6.
- Ide C. Peripheral nerve regeneration. J Neurosci Res 25 (1996):101-21.
- Jenner P, Olanow CW. Oxidative stress and pathogenesis of Parkinson's disease. J Neurology 47 (1996):S161-S176.
- Kim HK, Kim JH, Gao X, et al. Analgesic effect of vitamin E is mediated by reducing central sensitization in neuropathic pain. J Pain 122 (2006):53-62.
- Kohen R, Nyska A. Oxidation of biological system : Oxidative stress phenomena, antioxidant, redox reaction, and methods for their quantification. J Toxicologic Pathology 30 (2002):620-50.
- Kottschade L, Loprinzi C, Rao R. Vitamin E for the prevention of chemotherapy-induced peripheral neuropathy: rationale for an ongoing clinical trial. J Support Cancer Ther 4 (2007):251-3.
- Langley B, Ratan RR. Oxidative stress-induced death in the nervous system : cell cycle dependent or independent?. J Neurosci Res 77 (2004):621-9.
- Leonetti C, Biroccio A, Gabellini C, et al. α -tocopherol protects against cisplatin-induced toxicity without interfering with antitumor efficacy. Int J Cancer 104 (2003):243-50.

- Lovell MA, Ehmann WD, Butler SM, et al. Elevated thiobarbituric acid reactive substances and antioxidant enzyme activity in the brain in Alzheimer's disease. J Neurology 45 (1995):1594-601.
- Mates JM, Perez-Gomez C, Castro I. Antioxidant enzymes and human disease. J Clinical Biochemistry 32 (1999):595-603.
- Morani AS, Bodhankar SL. Early co-administration of vitamin E acetate and methylcobalamin improves thermal hyperalgesia and motor nerve conduction velocity following sciatic nerve crush injury in rats. J Pharmacol Rep 62 (2010):405-9.
- Moutaery KA, Arshaduddin M, Tariq M, et al. Functional recovery and vitamin E level following sciatic nerve crush injury in normal and diabetic rats. Int J Neurosci 96 (1998):245-54.
- Muller D. Vitamin E and neurological function. J Mol. Nutr. Food Res 54 (2010):710-18.
- Noorafshan A, Omidi A, Karbalay-Doust S, et al. Effect of curcumin on the dorsal root ganglion structure and functional recovery after sciatic nerve crush in rat. J Micron 42 (2011):449-55.
- Pace A, Giannarelli D, Galie E, et al. Vitamin E neuroprotection for cisplatin neuropathy a randomized, placebo-controlled trial. J Neurology 74 (2010):762-6.
- Pace A, Savarese A, Picardo M, et al. Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy. J Clin Oncol 21 (2003):927-31.
- Pappella MA, Omar RA, Kim KS, et al. Immunohistochemical evidence of antioxidant stress in Alzheimer's disease. American Journal of Pathology 140 (1992):621-8.

- Peyser CE, Folstein M, Chase GA, et al. Trial of α -tocopherol in Huntington's disease. American Journal of Psychiatry 152 (1995):1771-5.
- Ricciarelli R, Tasinato A, Clement S, et al. α -tocopherol specifically inactivates cellular protein kinase C alpha by changing its phosphorylation state. J Biochem 334 (1998):243-9.
- Sain J, Dexter DT, Less AJ, et al. Alteration in glutathione levels in Parkinson's disease and other neurodegenerative disorders affective basal ganglia. J Annals of Neurology 36 (1994):348-55.
- Sano M, Erresto C, Thomas RG, et al. A controlled trial of selegiline, alpha tocopherol or both as treatment for Alzheimer's disease. New England Journal of Medicine 336 (1997):1216-22.
- Sayre LM, Perry G, Smith MA. Oxidative stress and neurotoxicity. J Chem Res Toxicol 21 (2008):172-88.
- Schenker M, Kraftsik R, Glauser L, et al. Thyroid hormone reduces the loss of axotomized sensory neurons in dorsal root ganglia after sciatic nerve transection in adult rat. J Exp Neuro 184 (2003):225-36.
- Schwarz K. Role of vitamin E, selenium and related factors in experimental nutritional liver disease. J Federation Proc 24 (1965):58-67.
- Senoglu M, Nacitarhan V, Kurutas EB, et al. Intraperitoneal alpha-lipoic acid to prevent neural damage after crush injury to the rat sciatic nerve. J Brachial Plex Peripher Nerve Inj 4 (2009):22.
- Stoll G, Muller HW. Nerve injury, axonal degeneration and neural regeneration: basic insights. J Brain Pathol 9 (1999):313-25.
- Tanner C. Epidemiology of Parkinson's disease. J Neurological Clinician 10 (1992):317-27.

- Tredici G, Braga M, Nicolini, et al. Effect of recombinant human nerve growth factor on cisplatin neurotoxicity in rats. J Exp Neuro 159 (1999):551-8
- Then SM, Mazlan M, Top GM, et al. Is vitamin E toxic to neuron cell?. J Cell Mol Neurobiol 29 (2009):485-96.
- Tiwari V, Kuhad A, Chopra K. Tocotrienol ameliorates behavioral and biochemical alterations in the rat model of alcoholic neuropathy. J Pain 145 (2009):129-35.
- Traber MG, Packer L. Vitamin E : beyond antioxidant function. Am J Clin Nutr 62 (1995):1501s-9s.
- Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological function and human disease. J Biochemistry and cell biology 39 (2007):44-84.
- Varejao A S P, Meek M F, Ferreira A J A, et al. Functional evaluation of peripheral nerve regeneration in the rat:walking track analysis. J Neurosci Met 108 (2001):1-9.
- Varejao A S P, Pinto M P, Meek F M, et al. Methods for the experiment function assessment of rat sciatic nerve regeneration. J Neuro Res 26 (2004):186-94.
- Varija D, Kumar KP, Reddy KP, et al. Prolong constriction of sciatic nerve affecting oxidative stressors & antioxidant enzymes in rat. Indian J Med Res 129 (2009):587-92.
- Yoitaka A, Hyttori N, Uchida K, et al. Immunohistochemical detection of 4-hydroxynonenal protein adducts in Parkinson's disease. Proceeding of the National Academy of Sciences of the USA 93 (1996):2696-701.

Zemlan FP, Theinhaus OJ, Bosmann HB. Superoxide dismutase activity in Alzheimer's disease: possible mechanism for paired helical formation. J Brain Res 476 (1989):160-2.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

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_2HPO_4 28.40 g.

Distilled water 1000 ml.

นำ Stock solution A ผสมกับ Stock solution B ในปริมาณ 19 ml. และ 81 ml.

ตามลำดับ แล้วปรับให้ได้ 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	100	150	200
สารเคมีที่ใช้ (ml.)				
1. Epon 812	25	50	75	100
2. DDSA	20	40	60	80
3. NMA	10	20	30	40
4. DMP-30	1	2	3	4

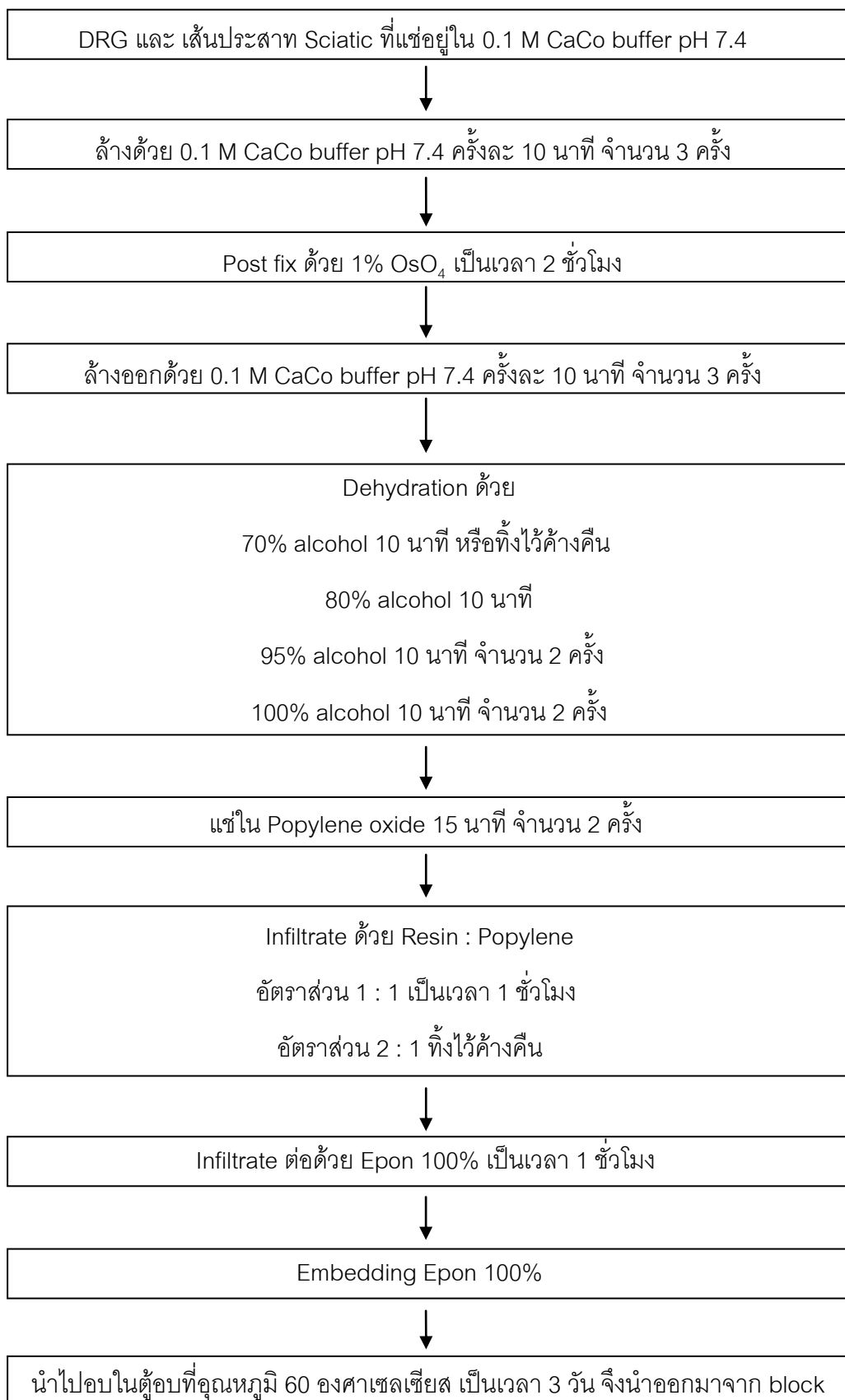
5. การเตรียมสีย้อม DRG (1% para-phenylenediamine)

1% para-phenylenediamine	3 g.
Distilled water	15 ml.

6. การเตรียมสีย้อมเส้นประสาท sciatic (Toluidine blue)

Sodium borate	5 g.
Toluidine blue	5 g.
Azure II	5 g.
Distilled water	500 ml.

Process Resin



ภาคผนวก ข

ตารางสรุปผลการนับ DRG

Group	Rt.	Lt.	%ลดลง
C1	18,338.75	12,904.80	29.6
C2	21,488.19	14,168.70	34.1
C4	19,363.33	13,026.04	32.7
C5	19,451.68	13,732.35	29.4
Mean	19,660	13,458	31.5
SD	1,319	598	2.3
SQRT	2.00	2.00	2.00
SEM	660	299	1.2

E2	20,213.00	13,327.81	34.1
E3	19,989.63	13,050.00	34.7
E4	19,852.36	14,422.15	27.4
E5	20,095.04	13,983.16	30.4
Mean	20,038	13,696	31.6
SD	153	623	3.4
SQRT	2.00	2.00	2.00
SEM	77	311	1.7

E6	20,245.63	16,588.74	18.1
E7	20,121.03	17,515.33	13.0
E9	20,120.62	16,021.78	20.4
Mean	20,162	16,709	17.1
SD	72	754	3.8
SQRT	1.73	1.73	1.73
SEM	42	435	2.2

E12	20,087.12	18,081.90	10.0
E13	20,768.28	17,952.86	13.6
E14	19,726.15	16,646.32	15.6
E15	19,879.00	16,904.68	15.0
Mean	20,115	17,396	13.5
SD	460	727	2.5
SQRT	2.00	2.00	2.00
SEM	230	363	1.3

Walking track analysis

Group	Rat	PL (cm.)		TS (cm.)		ITS (cm.)		Functional test			
		Lt.	Rt.	Lt.	Rt.	Lt.	Rt.	[EPL-NPL]/NPL	[ETS-NTS]/NTS	[EIT-NIT]/NIT	SFI
Control	C1	3.4	3.4	1.7	2.2	1.0	1.1	0.00	-0.23	-0.12	-35.26
	C2	3.5	3.5	2.2	2.3	1.2	1.1	0.01	-0.05	0.04	-13.56
	C3	3.4	3.4	2.0	2.4	1.0	1.2	-0.01	-0.15	-0.21	-28.03
	C4	3.4	3.4	1.8	2.2	0.8	1.1	-0.01	-0.18	-0.31	-32.55
	C5	3.4	3.4	2.0	2.3	0.9	1.2	0.02	-0.15	-0.28	-29.27
	C6	3.2	3.3	1.6	2.3	0.6	1.0	-0.03	-0.29	-0.38	-44.62
MEAN		3.4	3.4	1.9	2.3	0.9	1.1	0.0	-0.2	-0.2	-30.5
SD		0.09	0.05	0.22	0.07	0.19	0.07	0.01	0.08	0.15	10.21
SQRT		2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45
SEM		0.0	0.0	0.1	0.0	0.1	0.0	0.01	0.03	0.06	4.17

Vit.E	E1	3.3	3.3	2.1	2.2	1.2	1.1	0.01	-0.07	0.12	-15.69
	E2	3.3	3.3	1.6	2.3	1.0	1.1	0.02	-0.32	-0.15	-46.31
	E3	3.4	3.3	1.8	2.3	1.1	1.1	0.05	-0.21	0.03	-32.90
	E4	3.2	3.2	1.2	2.0	0.8	0.9	0.00	-0.41	-0.16	-55.65
	E5	3.2	3.2	1.8	2.0	0.9	1.1	0.01	-0.08	-0.16	-20.20
	E6	3.3	3.3	1.9	2.0	0.8	0.8	0.01	-0.06	-0.02	-15.68
MEAN		3.3	3.3	1.7	2.1	1.0	1.0	0.0	-0.2	-0.1	-31.1
SD		0.08	0.05	0.30	0.16	0.17	0.12	0.02	0.15	0.12	16.92
SQRT		2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45	2.45
SEM		0.0	0.0	0.1	0.1	0.1	0.0	0.01	0.06	0.05	6.91

Nerve Morphometry [Control]

Rat	Fiber diameter	Axon diameter	Myelin thickness	G- ratio	Number fiber	Fiber density	Total area	Total count
Rt-C1.1	5.5961	2.9826	1.3068	0.5361	745	20694.44	0.3293	6815.37
Rt-C1.2	5.6413	2.9216	1.3599	0.5247	733	20361.11	0.3275	6668.55
Rt-C1.3	5.5168	2.9595	1.2787	0.5384	726	20166.67	0.3285	6624.47
Lt-C1.1	3.0602	1.8206	0.6198	0.5794	1100	30555.56	0.2453	7496.13
Lt-C1.2	3.0021	1.6205	0.6908	0.5307	1105	30694.44	0.2214	6797.03
Lt-C1.3	3.0720	1.7109	0.6806	0.5464	923	25638.89	0.2719	6970.29

Rt-C2.1	5.6044	2.7749	1.4147	0.4998	776	21555.56	0.3157	6805.14
Rt-C2.2	5.7044	2.6978	1.5033	0.4775	738	20500.00	0.3239	6639.21
Rt-C2.3	5.6867	2.7972	1.4447	0.4971	702	19500.00	0.3427	6682.10
Lt-C2.1	3.2178	1.9471	0.6354	0.5903	1124	31222.22	0.2239	6989.35
Lt-C2.2	2.9185	1.5621	0.6782	0.5264	1203	33416.67	0.2264	7564.21
Lt-C2.3	3.0483	1.7347	0.6568	0.5570	952	26444.44	0.2871	7592.16

Rt-C3.1	5.6279	2.9254	1.3512	0.5184	729	20250.00	0.3111	6299.72
Rt-C3.2	5.6838	3.0038	1.3400	0.5229	739	20527.78	0.3284	6741.73
Rt-C3.3	5.4320	2.7065	1.3628	0.4966	782	21722.22	0.3182	6911.86
Lt-C3.1	3.1481	1.7074	0.7203	0.5326	886	24611.11	0.3162	7782.72
Lt-C3.2	3.2439	1.6741	0.7849	0.5042	1135	31527.78	0.2675	8435.06
Lt-C3.3	3.0316	1.7235	0.6541	0.5561	867	24083.33	0.2892	6965.56

Rt-C4.1	5.3180	2.7052	1.3064	0.5113	822	22833.33	0.3337	7619.29
Rt-C4.2	5.4746	2.8080	1.3333	0.5102	782	21722.22	0.3413	7413.08
Rt-C4.3	5.5551	2.8668	1.3441	0.5116	761	21138.89	0.3389	7164.51
Lt-C4.1	3.0486	1.6115	0.7186	0.5163	1234	34277.78	0.2256	7732.74
Lt-C4.2	3.1492	1.6772	0.7360	0.5206	1182	32833.33	0.2411	7917.16
Lt-C4.3	3.1767	1.7269	0.7249	0.5334	861	23916.67	0.3380	8084.33

Rt-C5.1	5.3687	2.9574	1.2057	0.5509	797	22138.89	0.3682	8150.56
Rt-C5.2	5.3124	2.9156	1.1984	0.5506	823	22861.11	0.3567	8155.00
Rt-C5.3	5.5594	3.0803	1.2395	0.5562	746	20722.22	0.3614	7487.98
Lt-C5.1	3.5264	2.1950	0.6657	0.6100	1024	28444.44	0.3221	9163.02
Lt-C5.2	2.9286	1.6333	0.6477	0.5482	1155	32083.33	0.2589	8307.38
Lt-C5.3	2.8043	1.6706	0.5668	0.5893	1052	29222.22	0.2667	7793.12

Nerve Morphometry [Vitamin E]

Rat	Fiber diameter	Axon diameter	Myelin thickness	G- ratio	Number fiber	Fiber density	Total area	Total count
Rt-E1.1	5.3926	2.8670	1.2628	0.5368	822	22833.33	0.3331	7606.10
Rt-E1.2	5.5839	2.8120	1.3859	0.5068	762	21166.67	0.3423	7245.56
Rt-E1.3	5.5818	2.8602	1.3608	0.5171	723	20083.33	0.3456	6941.24
Lt-E1.1	3.4692	2.1677	0.6507	0.6140	821	22805.56	0.3693	8421.41
Lt-E1.2	3.2348	1.7960	0.7194	0.5463	1227	34083.33	0.2372	8085.81
Lt-E1.3	3.3693	1.7591	0.8051	0.5163	920	25555.56	0.3086	7885.66

Rt-E2.1	5.4100	2.8597	1.2752	0.5366	793	22027.78	0.3483	7672.32
Rt-E2.2	5.5185	2.7873	1.3656	0.5113	755	20972.22	0.3505	7350.28
Rt-E2.3	5.5977	2.7832	1.4072	0.5063	761	21138.89	0.3397	7180.66
Lt-E2.1	3.1587	1.7174	0.7207	0.5302	1183	32861.11	0.3846	12637.70
Lt-E2.2	3.0851	1.6352	0.7250	0.5172	1200	33333.33	0.3562	11874.84
Lt-E2.3	3.0479	1.6785	0.6847	0.5395	1069	29694.44	0.3357	9969.77

Rt-E3.1	5.4106	2.8896	1.2605	0.5327	844	23444.44	0.3214	7535.56
Rt-E3.2	5.8323	3.2073	1.3125	0.5457	699	19416.67	0.3451	6699.73
Rt-E3.3	6.1826	3.3825	1.4001	0.5385	599	16638.89	0.3692	6142.43
Lt-E3.1	3.1618	1.5985	0.7816	0.4945	1181	32805.56	0.2521	8270.37
Lt-E3.2	3.1491	1.4986	0.8252	0.4685	1239	34416.67	0.2373	8165.38
Lt-E3.3	3.1190	1.6763	0.7214	0.5291	1171	32527.78	0.2765	8993.87

Rt-E4.1	5.6903	3.1083	1.2910	0.5431	736	20444.44	0.3552	7261.16
Rt-E4.2	5.5882	3.0102	1.2890	0.5354	771	21416.67	0.3487	7468.70
Rt-E4.3	5.9902	3.2857	1.3523	0.5427	678	18833.33	0.3482	6557.42
Lt-E4.1	3.1377	1.7570	0.6904	0.5495	1268	35222.22	0.2681	9442.21
Lt-E4.2	2.9849	1.6895	0.6477	0.5565	1350	37500.00	0.2586	9698.61
Lt-E4.3	2.9875	1.8028	0.5923	0.5933	1215	33750.00	0.2786	9403.95

Rt-E5.1	5.1838	2.8674	1.1582	0.5575	881	24472.22	0.3079	7535.56
Rt-E5.2	5.6794	3.1488	1.2653	0.5600	650	18055.56	0.3970	7167.91
Rt-E5.3	5.2314	2.8282	1.2016	0.5496	833	23138.89	0.3299	7632.84
Lt-E5.1	2.8851	1.6571	0.6140	0.5668	1350	37500.00	0.2347	8802.11
Lt-E5.2	2.6958	1.4668	0.6145	0.5361	1395	38750.00	0.2009	7784.51
Lt-E5.3	2.7569	1.5560	0.6005	0.5560	1233	34250.00	0.2428	8314.95

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ – สกุล	นางสาวจุฑามาศ ดอกแก้ว
วัน เดือน ปีเกิด	วันพฤหัสบดีที่ 20 กุมภาพันธ์ 2529
ที่อยู่ตามภูมิลำเนา	182/4 ม.5 ต.สบสาย อ.สูงเม่น จ.แพร่ 54130
หมายเลขติดต่อ	081-0234396

ประวัติการศึกษา

วุฒิการศึกษา	สถาบันการศึกษา	พ.ศ.ที่สำเร็จการศึกษา
ประถมศึกษาปีที่ 4	โรงเรียนเทพพิทักษ์วิทยา จ.แพร่	2539
ประถมศึกษาปีที่ 6	โรงเรียนอนุบาลแพร่	2541
มัธยมศึกษาปีที่ 3	โรงเรียนนารินทร์จังหวัดแพร่	2544
มัธยมศึกษาปีที่ 6	โรงเรียนพิริยาลัยจังหวัดแพร่	2547
ปริญญาตรี	คณะสหเวชศาสตร์ (กายภาพบำบัด) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2551