ผลการยับยั้ง ERK ต่อความผิดปกติของเส้นประสาทจากภาวะเบาหวานในหนู

นางสาว สุภาวดี สุขเสรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF ERK INHIBITION ON DIABETIC NEUROPATHY IN RATS

Miss Supawadee Sukseree

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 2007

Copyright of Chulalongkorn University

501948

Thesis Title	EFFECT OF ERK INHIBITION ON DIABETIC NEUROPATHY IN RATS
By	Ms. Supawadee Sukseree
Field of Study	Medical Science
Thesis Advisor	Assistant Professor Sithiporn Agthong, M.D., Ph.D.

Accepted by the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University in Partial Fulfillment of the Requirements for the Master's Degree.

P. Kamolratanakul .....Dean of the Faculty of Medicine

(Professor Pirom Kamolratanakul,M.D)

THESIS COMMITTEE

Vilai Chentanez .....Chairman

(Associated Professor Vilai Chentanez,M.D.,Ph.D.)

Sithiporn Agthong .....Thesis Advisor

(Assistant Professor Sithiporn Agthong,M.D.,Ph.D.)

.....Member

(Associated Professor Suthiluk Patumraj,Ph.D.)

Sittisak Honsawek .....Member

(Assistant Professor Sittisak Honsawek,M.D.,Ph.D.)

สุภาวดี สุขเสรี : ผลการยับยั้ง ERK ต่อความผิดปกติของเส้นประสาทจากภาวะเบาหวานในหนู (EFFECT OF ERK INHIBITION ON DIABETIC NEUROPATHY IN RATS) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.นพ.สิทธิพร แอกทอง, 52หน้า

บทนำ เส้นประสาทเสื่อมเป็นภาวะแทรกซ้อนที่พบได้บ่อยของโรคเบาหวาน และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยต้องพิการ ในภาวะนี้จะมีความผิดปกติทั้งทางโครงสร้างและหน้าที่ของเส้นประสาท คือ ความเร็วในการนำกระแสประสาทลดลง,การเสื่อมสลายของเยื่อหุ้ม myelin (demyelination) และการเสื่อมสลายของ axon (axon degeneration) จึงได้มีความพยายามเพื่อหาวิธีรักษาความผิดปกติเหล่านี้ มีการศึกษาก่อนหน้านี้พบว่ามีการกระตุ้นของ ERK (Extracellular regulated protein kinase) ซึ่งอยู่ในกลุ่มของเอนไซม์ mitogen-activated protein kinase (MAPK) ทั้งในหนูเบาหวานและเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูง นอกจากนี้ยังพบว่าการยับยั้งERKในเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงในภาวะน้ำตาลสูง ทำให้อัตราการตายของเซลล์ลดลง จึงเป็นไปได้ว่าการยับยั้ง ERK จะช่วยลดการเสื่อมของเส้นประสาทของหนูเบาหวาน ซึ่งทั้งนี้ยังไม่เคยมีการพิสูจน์สมมุติฐานนี้มาก่อน

วัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาผลการยับยั้งการทำงานของ ERK ต่อความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทส่วนปลาย รวมทั้งการลดลงของความเร็วในการนำกระแสประสาทที่พบในหนูที่ทำให้เป็นเบาหวาน

วิธีดำเนินการวิจัย ทำให้หนูเป็นเบาหวานโดยฉีด Streptozotocin (STZ, 55mg/kg BW,ip.)เข้าทางช่องท้องเพียงครั้งเดียว แล้วแบ่งเป็น2กลุ่มคือ กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ vehicle (Diabetic+Vehicle ;DV) และกลุ่มเบาหวานที่ได้รับยา ERKinhibitor (u0126) (Diabetic+ERK inhibitor;DI) ขนาด 300 µg/kg/day เข้าช่องท้องตั้งแต่สัปดาห์ที่ 5 หลังเริ่มเป็นเบาหวานจนสิ้นสุดการทดลองที่สัปดาห์ที่7 โดยเทียบผลกับกลุ่มควบคุมที่ไม่เป็นเบาหวาน (Control;C) โดยวัดความเร็วในการนำกระแสประสาทบนเส้นประสาท sciatic และนำเนื้อเยื่อปมประสาทไขสันหลังและเส้นประสาท sciatic ออกมาศึกษาระดับการทำงานของ ERK และการวัดเชิงโครงสร้างโดยทำการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์

ผลการศึกษา พบว่าหนูกลุ่ม DV และ DI มีน้ำหนักลดลง และมีน้ำตาลที่สูงขึ้นชัดเจนเมื่อเทียบกับกลุ่ม C นอกจากนี้ความเร็วในการนำกระแสประสาทลดลงในกลุ่ม DV และ DI เมื่อเทียบกับกลุ่ม C มีการกระตุ้น ERK ในปมประสาทไขสันหลังของกลุ่มเบาหวาน โดยค่าการกระตุ้นลดลงในกลุ่ม DI เมื่อเทียบกับ DV สำหรับผลการวิเคราะห์เชิงโครงสร้างนั้นพบว่า มีแนวโน้มการลดลงของจำนวนเซลล์ประสาทในปมประสาท และการลดขนาดของ axon และ myelin thickness ในเส้นประสาทของหนูเบาหวาน ทั้งนี้ความรุนแรงของเบาหวาน การลดลงของการนำกระแสประสาท และความผิดปกติเชิงโครงสร้างของกลุ่ม DI ไม่แตกต่างจากกลุ่ม DV อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สรุปผล u0126 สามารถลดระดับการกระตุ้นของ ERK ในปมประสาทของหนูเบาหวานได้ แต่การยับยั้ง ERK นี้ ไม่มีผลต่อความผิดปกติในแง่การลดลงของความเร็วในการนำกระแสประสาท และการเปลี่ยนแปลงเชิงโครงสร้างของระบบประสาทส่วนปลายในหนูเบาหวาน ทั้งนี้เพื่อให้ได้ข้อสรุปที่แน่ชัด จำเป็นต้องมีการปรับระยะเวลาการให้ยาที่นานขึ้นและ/หรือ เริ่มเร็วขึ้นในการศึกษาต่อๆไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

487 48100 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORD : DIABETIC NEUROPATHY/ERK/u0126
SUPAWADEE SUKSEREE: EFFECT OF ERK INHIBITION ON DIABETIC NEUROPATHY IN RATS.THESIS ADVISOR: ASST.SITHIPORN AGTHONG .M.D., Ph.D.52 pp

Introduction: Diabetic neuropathy is a major chronic complication of diabetes and the most important cause of non-traumatic amputation of the lower extremity. Several functional and structural abnormalities have been observed: impaired nerve conduction, demyelination and axon degeneration. The prevoius studies have shown that ERK, a member of mitogen-activated protein kinase (MAPK) family, was activated in primary sensory neurons cultured in high glucose condition and its inhibition resulted in decreased neuronal death. According to the above evidence, it is possible that the activation of ERK plays a deleterious role in diabetic neuropathy. However, its effect has not been studied.

Objective: Therefore, the main objective of this project was to examine the effect of ERK inhibition on structural abnormalities of peripheral nerve in diabetic rats.

Methods: Diabetes was induced by a single ip. injection of STZ 55mg/kg and the diabetic rats were randomly divided into 2 groups: vehicle (DV) and inhibitor (DI). The inhibitor of ERK (u0126) 300 μg/kg/day was given ip. from week 5 after the onset of diabetes until week 7 The study on sciatic nerve conduction velocity was done in the DV and DI groups as well as in the control(C) group. Subsequently, the rats were sacrificed and sciatic nerve and L4-5 dorsal root ganglion (DRG) were removed for western blot analyses and structural.

Results: The DV and DI groups had significant weight loss, hyperglycemia and slowing conduction velocity of sciatic nerve compared with the C group. However, there were no significant differences in these parameters between the DV and DI groups. The phosphorylation of ERK was in DRG from diabetic rats. However, the level of phosphorylation in the DI was lower than the DV groups. The structural analysis increased the showed a trend toward axonal shrinkage and a significant decrease in myelin thickness in sciatic nerve of diabetic rats without any difference between the DV and DI groups.

Conclusion: u0126 can reduce the level of ERK phosphorylation (ERK-P) in the DRG of diabetic rats. However, it appears that the ERK inhibition did not affect neurophysiological and structural abnormalities in the experimental diabetic neuropathy. To obtain a precise conclusion, future studies with earlier start or longer duration of treatment are needed.

Field of study Medical Science..... Student's signature Supawadee Sukseree.

Academic year 2007..... Advisor's signature Sithiporn Agthong

ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude to my advisor, Assistant Professor Sithiporn Agthong,M.D.,Ph.D.,for his valuable advice, guidance, and supervision which have enabled me to finish my study. My grateful appreciation is extended to, Associated Professor Vilai Chentanez,M.D.,Ph.D.,with her excellent expertise and encourangement throughout the study.

I am also very grateful to Associate Professor Suthiluk Patumraj,Ph.D. and Assistant Professor Sittisak Honsawek,M.D.,Ph.D ,my thesis committees, for their magnificent comments and the correction of this thesis. My thankful is extended to Ms.Sompit Pairao , Ms.Junjira Koonam and Mrs.Atitaya Kaewsema for their good friendship and help with the neuroscience techniques.

Finally, a special thank goes to my family and friends in Medical Science Program,Faculty of Medicine, Chulalongkorn University for their great support and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

Page

ABSTRACT (THAI).....iv
ABSTRACT (ENGLISH)..... v
ACKNOWLEDGEMENTS..... vi
TABLE OF CONTENTS..... vii
LIST OF TABLES..... x
LIST OF FIGURES.....xi
LIST OF ABBREVIATIONS.....xii

CHAPTER

I INTRODUCTION.....1
1. Background and rationale..... 1
2. Research questions..... 2
3. Objectives..... 2
4. Hypothesis.....3
5. Conceptual framwork..... 3
6. Key word..... 3
7. Expected benefits and applications.....3

II REVIEW OF RELATED LITERATURE..... 4
1. Diabetes mellitus.....4
1.1 Definition
1.2 Classification
2. Diabetic neuropathy..... 5
2.1 Prevalence and significance.....5
2.2 Clinical manifestation..... ..5
2.3. Etiologies..... ...7
3. Animal model of diabetes..... 7
3.1 Similarities and differences between animal models of diabetes and human diabetes.....8

CHAPTER **Page**

4. MAPK and diabetic neuropathy..... 9

4.1 Mitogen-activated protein kinases (MAPKs)..... .9

4.2 Roles of MAPKs in neurones..... .11

4.3 Roles of MAPKs in diabetic neuropathy..... 12

4.4 Inhibitors of the ERK pathway and applications in the nervous system.....13

III MATERIALS AND METHODS..... 15

1. Experimental design..... 15

1.1 Induction of diabetes..... 16

1.2 Confirmation of diabetes..... 16

1.3 Drug administration..... .. 16

2. Electrophysiological measurement..... 17

2.1 Introduction 17

2.2 Procedures.....17

3. Tisssue collection..... 19

3.1 Blood collection for plasma glucose determination.....19

3.2 Fresh removal for westen blot analysis..... 19

3.3 Removal after perfusion for morphological studies.....19

4. Western Blot Analysis

Introduction 20

4.1 Sample preparation.....20

4.2 Bramhall protein assay.....20

4.3 Electrophoresis.....21

4.4 Protein transfer to the membrane.....22

4.5 Immunoperoxidase procedure.....22

4.6 Densitometric analysis..... 23

5. Microscopic examination..... 24

5.1 Preparation of DRG and sciatic nerve for morphological analysis 24

5.2 Quantitative evaluation..... 24

CHAPTER **Page**

5.2.1 Nerve Morphometry..... . 24
5.2.2 DRG Morphometry..... 26

6. Statistical analysis.....27

IV RESULTS.....28
1. Severity of diabetes.....28
1.1 Body weight..... 28
1.2 Plasma glucose..... 29
2. Electrophysiological measurement.....30
3. Western blot analysis of ERK phosphorylation 31
4. Microscopic examinations.....32
4.1 Qualitative examination
- Sciatic nerve.....32
- DRG.....33

4.2 Quantitative evaluation
- Nerve morphometry.....34
- DRG morphometry..... 35

V DISCUSSION AND CONCLUSION..... 37

REFERENCES..... 40
APPENDICES..... 48
BIOGRAPHY..... 52

LIST OF TABLES

Table **Page**

Table 1. Summary of the morphometric results obtained from light microscopy 34

LIST OF FIGURES

Figure **Page**

1. Pathway of MAPK ERK..... 11
2. Experimental design.....15
3. Diagram explaining position of stimulating and recording electrode in NCV study 18
4. CMAP recording after two-point nerve stimulation where point1 is closer to the recording position than point 2.....18
5. Micrograph showing the placement of three windows within a fascicle direction and one window in the central zone.....25
6. Diagram explaning myelinated axon 25
7. Micrograph showing L4 DRG stain with toluidineblue (40x).....26
8. Changes in the body weight of C,DV and DI rats.....28
9. Plasma glucose at week 7 after the onset of diabetes.....29
10. Motor nerve conduction velocity(MNCV) in C,DV and DI groups at week 4 and the end of experiment(week7).....30
11. Western blot showed comparison of ERK phosphorylation in DRG between C,DV and DI groups..... 31
12. Micrographs obtained from sciatic nerves of C,DV and DI groups.....32
13. Micrographs obtained from L4 dorsal root ganglion of C,DV and DI groups 33
14. Distribution of myelin fiber in C, DV and DI groups..... 35
15. Cell count in L4 DRG from the C,DVand DI groups.....35
16. The areas of nucleus and nucleolus in L4 DRG neuron at the C, DV and DI groups.....36

List of abbreviations

ANOVA	Analysis of variance
CMAP	Compound muscle action potential
CNS	Central nervous system
DRG	Dorsal root ganglia
ERK	Extracellular-regulated protein kinase
ERK-P	Extracellular-regulated protein kinase -phosphorylation
ERK-T	Extracellular-regulated protein kinase-total
IL-1	Interleukin-1
JNK	c-Jun amino-terminal protein kinase
MAPK	Mitogen-activated protein kinase
MAPKKK	MAPK kinase kinase
MKK or MAPKK	MAPK kinase
NCV	Nerve conduction velocity
NGF	Nerve growth factor
PBS	Phosphate buffer saline
PFA	Paraformaldehyde
PKC	Protein kinase C
PNS	Peripheral nervous system
ROS	Reactive oxygen species
SDS-PAGE	Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis
STAT	Signal transducer and activator of transcription
SD	Standard deviation
STZ	Streptozotocin
TEMED	N,N,N',N'-tetramethylethylene