

EFFECT OF CURCUMIN ON CISPLATIN-INDUCED NEUROPATHY IN RATS

Mr. Thanthawat Charoensap



บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

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 2014

Copyright of Chulalongkorn University

ผลของ curcumin ต่อภาวะเส้นประสาทส่วนปลายผิดปกติจากยา cisplatin ในหนูแรท



วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2557

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของ curcumin ต่อภาวะเส้นประสาทส่วนปลาย
	ผิดปกติจากยา cisplatin ในหนูแรท
โดย	นายธันธวัช เจริญทรัพย์
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิริทิพร แอกทอง

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

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

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิริทิพร แอกทอง)

.....กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สิริศักดิ์ ธรรมชาติ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร. ราตรี สุตทรวง)

ชั้นวิชา เจริญทรัพย์ : ผลของ curcumin ต่อภาวะเส้นประสาทส่วนปลาย
 ผิดปกติจากยา cisplatin ในหนูแรท (EFFECT OF CURCUMIN ON CISPLATIN-
 INDUCED NEUROPATHY IN RATS) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: รศ. นพ. สิริทิพร แอก
 ทอง, หน้า.

Cisplatin เป็นยาที่ใช้รักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ผลข้างเคียงที่สำคัญอย่างหนึ่งคือ ความ
 ผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral neuropathy) ยังไม่มีวิธีการป้องกันหรือรักษาที่มี
 ประสิทธิภาพสำหรับภาวะนี้ Curcumin เป็นสารโพลีฟีนอลในรากของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) มี
 ฤทธิ์ต้าน oxidative stress และต้านการอักเสบ โดยแสดงผลดีต่อโรคทางระบบประสาทหลายโรค
 การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของ curcumin ขนาด 500 mg/kg/day ต่อภาวะ
 neuropathy ในหนูที่ได้รับ cisplatin ขนาดสะสม 20 mg/kg ในระยะเวลา 5 สัปดาห์ ผลการศึกษา
 พบว่า cisplatin มีผลทำให้น้ำหนักตัวหนูลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ curcumin ไม่มีผลต่อ
 ภาวะนี้ ผลการทดสอบการรับความรู้สึกร้อนที่ฝ่าเท้าหลังของหนูด้วย hot plate พบว่า cisplatin ทำ
 ให้เกิดการสูญเสียต่อการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหลังของหนู และ curcumin ไม่มีผลต่อภาวะนี้ การ
 วัดความเร็วของการนำกระแสประสาท motor ที่เส้นประสาท sciatic พบว่า cisplatin มีผลทำให้ค่า
 นี้ลดลง และในกลุ่มที่ได้ curcumin ร่วมด้วยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ จากการทำ
 nerve morphometry เพื่อดูลักษณะทางโครงสร้าง พบว่า curcumin สามารถป้องกันการหดตัว
 ของ axon diameter และช่วยลดการเพิ่มขึ้นของ fiber density ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ
 เทียบกับกลุ่ม cisplatin แต่ไม่สามารถช่วยลดการบางลงของ myelin sheath ในส่วนของการศึกษา
 L4 DRG morphometry พบว่า cisplatin ทำให้เกิดการหดตัวของ nucleus และ nucleolus
 รวมทั้งการลดจำนวนของ DRG neuron curcumin ช่วยลดการหดตัวนี้ได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบ
 กับกลุ่ม cisplatin แต่ไม่มีผลต่อจำนวน DRG ที่ลดลง ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า curcumin
 สามารถป้องกันความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทและปมประสาท ความผิดปกติในการรับ
 ความรู้สึกและการนำกระแสประสาทสั่งการที่ขาหลังที่เกิดจาก cisplatin ได้ สำหรับกลไกของ
 curcumin เกี่ยวข้องกับ oxidative stress หรือไม่คงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไป

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ลายมือชื่อนิสิต

ปีการศึกษา 2557

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

5474197030 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: CURCUMIN / CISPLATIN / NEUROPATHY / OXIDATIVE STRESS

THANTHAWAT CHAROENSAP: EFFECT OF CURCUMIN ON CISPLATIN-INDUCED NEUROPATHY IN RATS. ADVISOR: ASSOC. PROF. SITHIPORN AGTHONG, M.D., pp.

Cisplatin has been used as an anti-neoplastic agent against cancers of several organs. One of its major side effects is peripheral neuropathy. So far, there is no effective prevention or treatment for this side effect of cisplatin. Curcumin is a polyphenol in the root of *Curcuma longa* with the anti-oxidant and anti-inflammatory properties. It shows beneficial effects in several neurological diseases. The main objective of this study was to investigate the effect of curcumin (500 mg/kg/day) on cisplatin-induced neuropathy in rats. Twenty mg/kg of cisplatin was administered intraperitoneally twice a week for five consecutive weeks to induce neuropathy.

The results showed that the body weight of cisplatin-treated rats became significantly lower than the controls and curcumin had no effects. Results of the hot plate test, showed that cisplatin caused significantly prolonged heat latency and curcumin had no significant effects. In the evaluation of motor nerve conduction velocity (MNCV), cisplatin reduced the sciatic MNCV and curcumin tended to increase the MNCV. The morphometric data of sciatic nerve showed that curcumin significantly corrected axon diameter reduction and increased fiber density caused by cisplatin with no significant effect on decreased myelin thickness. L4 DRG morphometric study demonstrated that curcumin significantly improved the shrinkage of nucleus and nucleolus of DRG neuron. However, the lower number of DRG neurons was not affected by curcumin.

The above data showed that curcumin likely had protective effects on morphological changes in DRG neurons and sciatic nerve, prolonged heat latency and slow MNCV caused by cisplatin. Whether these beneficial effects of curcumin are related to reduce oxidative stress remain to be investigated.

Field of Study: Medical Science

Student's Signature

Academic Year: 2014

Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รศ. นพ. สิทธิพร แอกทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และข้อเสนอแนะต่างๆ จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอกราบขอบพระคุณ ศ. กิตติคุณ ดร.ราตรี สุตทรวง ศ. พญ. วิไล ชินธเนศ และ ศ. นพ. สิทธิศักดิ์ ทรธราเวก สำหรับการตรวจสอบ แก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณอาทิตยา แก้วเสมา สำหรับความช่วยเหลือด้านการทดลอง ด้านเครื่องมือและเทคนิคต่างๆในการทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คุณปัทมา โชติวราธรรม สำหรับความช่วยเหลือด้านการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ เจ้าหน้าที่ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำและช่วยดูแลระหว่างทำการทดลองในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ประสิทธิ์ประสาทวิชาความรู้จนสำเร็จการศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และ ทุกคนในครอบครัวที่เป็นแรงบัลดาลใจ กำลังใจ และสนับสนุนจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญรูป.....	ฎ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	1
กรอบแนวคิดในการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
วิธีดำเนินการวิจัย.....	2
ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย.....	2
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	3
Cisplatin.....	3
กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action).....	3
ผลข้างเคียง (Side effect).....	4
Nephrotoxicity.....	4
Ototoxicity.....	4
Cisplatin-induced neuropathy.....	4
Cisplatin-induced neuropathy ในมนุษย์.....	5
Cisplatin-induced neuropathy ในสัตว์ทดลอง.....	5

Oxidative stress.....	6
Oxidative stress และ cisplatin.....	9
Curcumin.....	10
Curcumin กับ ระบบประสาท.....	12
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
การทดลองในสัตว์ทดลอง.....	14
วิธีการวิจัย.....	15
1.การแบ่งกลุ่มหนู.....	15
2. สภาพแวดล้อมในการดูแลหนู.....	15
3. การฉีดยาหนู.....	15
4. การให้ curcumin.....	15
5. Hot plate test.....	16
6. Motor nerve conduction velocity.....	16
7. การ sacrifice หนู.....	18
8. การเตรียมและวิเคราะห์โครงสร้างของชิ้นเนื้อ.....	18
<u>การฝังชิ้นเนื้อใน epoxy resin (embedding)</u>	18
<u>การศึกษาโครงสร้างของเส้นประสาท (nerve morphometry)</u>	19
<u>การศึกษาโครงสร้างของปมประสาทไขสันหลังในระดับ L4 (DRG morphometry)</u> ..	22
<u>การวัดพื้นที่ของ nucleus และ nucleolus</u>	24
9. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	26
10. จริยธรรม (Ethical consideration).....	26
บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล.....	27
การทดลอง.....	27

1. นำหนักตัวหนู.....	27
2. การวัดการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหนูด้วย hot plate test.....	28
3. การวัดความเร็วการนำกระแสประสาทที่เส้นประสาท sciatic.....	28
4. การศึกษาโครงสร้างของเส้นประสาท (nerve morphometry).....	29
5. การศึกษาโครงสร้างของปมประสาทไขสันหลังในระดับ L4 (DRG morphometry).....	30
บทที่ 5 สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ.....	31
ข้อสรุปการทดลอง.....	33
ข้อเสนอแนะ.....	33
.....	34
รายการอ้างอิง.....	34
ภาคผนวก ก.....	43
ภาคผนวก ข.....	47
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	51

สารบัญตาราง

ตาราง 1 แสดงค่า thermal threshold ที่เท้าหลังของหนู โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM.....	28
ตาราง 2 แสดงค่า sciatic motor NCV ของหนู โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM.....	29
ตาราง 3 แสดงข้อมูล nerve morphometry ของหนูทั้งสามกลุ่ม โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM	30
ตาราง 4 แสดงข้อมูล L4 DRG morphometry โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM.....	30



สารบัญรูป

รูป 1 โครงสร้างโมเลกุลของ cisplatin.....	3
รูป 2 แสดงกลไกการเกิดและการกำจัด ROS โดย enzymatic system.....	9
รูป 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Curcumin ในรูป Enol และ Keto.....	10
รูป 4 แสดงแผนการทดลอง	14
รูป 5 แสดงการวางตำแหน่งของ electrode	17
รูป 6 แสดงค่า latency (L) จาก CMAP ทั้งสองตำแหน่ง	17
รูป 7 แสดงการคำนวณหา fascicular area ที่กำลังขยาย 4X.....	19
รูป 8 แสดงการเลือกวาง 3 หน้าต่าง เพื่อเก็บภาพภายใน fascicle ที่กำลังขยาย 40 x.....	20
รูป 9 แปลงภาพให้เป็นขาว-ดำ เพื่อนำไปลบ artifact ในโปรแกรม photoshop	20
รูป 10 แสดงการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Image – Pro Plus.....	21
รูป 11 แสดงการเรียงลำดับของ section.....	22
รูป 12 แสดงการสุ่ม section ที่จะนำไปนับจำนวนเซลล์ใน DRG	23
รูป 13 แสดงภาพการนับจำนวนเซลล์ประสาทของ section DRG ที่กำลังขยาย 10X.....	24
รูป 14 แสดง morphometry ของ DRG ที่กำลังขยาย 40x เพื่อวัดพื้นที่ของ nucleus และ nucleolus โดยใช้โปรแกรม Image Pro plus : A. คือ ภาพแสดงการลากเส้นรอบ nucleus เพื่อคำนวณหาค่า nuclear area และ B. คือ ภาพแสดงการลากเส้นรอบ nucleolus เพื่อคำนวณหาค่า nucleolar area.....	25
รูป 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทั้งสามกลุ่มตลอดการทดลอง,ค่าที่แสดงเป็น mean \pm SEM, * $p < 0.001$ C vs. P, C vs. S.....	27

บทที่ 1

บทนำ

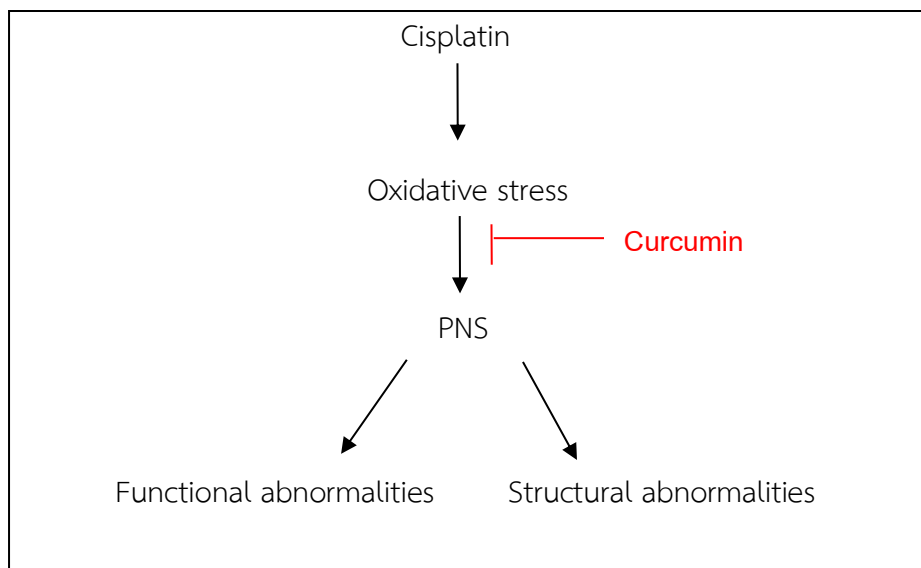
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

Cisplatin เป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งอย่างกว้างขวาง ผลข้างเคียงที่สำคัญอย่างหนึ่งของยานี้คือ การเกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนปลายที่ส่งผลต่อการรับรู้สัมผัส (sensory neuropathy) และยังเป็นสาเหตุที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อขนาดยาตามมาตรฐานได้ ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งแย่งและเกิดผลข้างเคียงที่รบกวนคุณภาพชีวิต ดังนั้นจึงมีความพยายามในการศึกษาเพื่อลดผลข้างเคียงดังกล่าว ในงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า การได้รับยา cisplatin จะกระตุ้นทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในระบบประสาทส่วนปลาย ซึ่งภาวะนี้ทำให้เกิดการทำลายโมเลกุลที่สำคัญในเซลล์และส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ประสาท ได้มีการทดลองให้สาร antioxidants ที่ช่วยลดภาวะ oxidative stress และพบว่าสามารถรักษาผลข้างเคียงของ cisplatin ต่อเส้นประสาทได้ เช่น วิตามินอีซึ่งอยู่ในชั้นทดสอบการรักษาในมนุษย์ หลักฐานเหล่านี้บ่งชี้ว่าภาวะ oxidative stress น่าจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกิดภาวะ neuropathy จาก cisplatin โดย curcumin เป็นสารกลุ่ม polyphenol ที่สกัดจากรากของขมิ้นชัน (*Curcuma longa*) ที่มีฤทธิ์ลดการอักเสบ ต่อต้านการเกิดมะเร็ง และลดภาวะ oxidative stress และจากการศึกษาพบว่าให้ผลดีต่อโรคระบบประสาท เช่น Alzheimer disease, Parkinson disease เป็นต้น ดังนั้นจากประโยชน์ข้างต้น curcumin น่าจะมีผลดีต่อ sensory neuropathy ที่เกิดจากการใช้ยา cisplatin อีกทั้งงานวิจัยที่ผ่านมาได้พบว่า curcumin มีความปลอดภัยต่อสัตว์ทดลองและมนุษย์ และมีราคาถูกสามารถหาได้ง่ายเนื่องจากขมิ้นชันเป็นพืชสมุนไพรพื้นบ้านที่พบได้ทั่วไปในประเทศไทย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของ curcumin ต่อความผิดปกติด้านหน้าที่และโครงสร้างของระบบประสาทส่วนปลายจากการได้รับยา cisplatin

กรอบแนวคิดในการวิจัย (Conceptual framework)



ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

หากพบว่า curcumin มีผลดีต่อภาวะ neuropathy จากการใช้ยา cisplatin จะเป็นพื้นฐานในการพัฒนา curcumin สำหรับการรักษาภาวะนี้ในมนุษย์ต่อไป

วิธีดำเนินการวิจัย

การทดลองในสัตว์ทดลอง

ลำดับขั้นตอนในการเสนอผลการวิจัย

ตารางปฏิบัติงาน	ระยะเวลา (เดือน)				
	1-2	3-4	5-6	7-9	10-12
ค้นคว้างานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	↔				
เขียนและสอบโครงร่างวิทยานิพนธ์		↔			
ทดสอบฤทธิ์ของ curcumin ในสัตว์ทดลอง			↔		
วิเคราะห์ผลและสรุปผลการทดลอง				↔	
เขียนและสอบวิทยานิพนธ์					↔

บทที่ 2

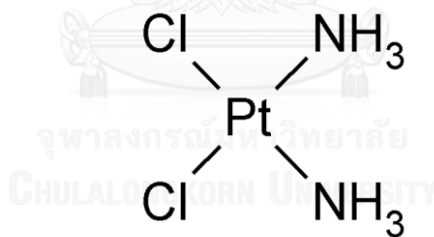
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Cisplatin

Cisplatin (*cis* – diaminodichloroplatinum หรือ CDDP) ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี 1845 โดย Peyrone หลังจากนั้นในปี 1965 Rosenberg ได้พบว่า cisplatin มีผลในการยับยั้งการแบ่งตัวของ *Escherichia coli* ซึ่งได้ทำการทดลองโดยใช้กระแสไฟฟ้าที่ปล่อยจากขั้วกระตุ้นไฟฟ้าของแพลทินัม (platinum) ผ่านอาหารเหลว [1] หลังจากนั้น cisplatin ได้เป็นยาที่รู้จักกันอย่างกว้างขวางในการใช้รักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งปอด มะเร็งศีรษะและคอ มะเร็งอัณฑะ มะเร็งรังไข่ มะเร็งเต้านม และมะเร็งกล่องเสียง เป็นต้น [2] ผลข้างเคียงทางคลินิกที่สำคัญอย่างหนึ่งที่เกิดจากการใช้ยา cisplatin ที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถทนต่อขนาดยาตามมาตรฐานได้คือการเกิดความผิดปกติของระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral neuropathy) [3, 4]

กลไกการออกฤทธิ์ (Mechanism of action)

Cisplatin เป็นยาที่เป็นอนุพันธ์ของแพลทินัม โดยมีส่วนประกอบของ NH_3 และกลุ่มคลอไรด์ (Cl^-)



รูป 1 โครงสร้างโมเลกุลของ cisplatin

โดยพบว่า cisplatin สามารถเข้าสู่ภายในเซลล์โดยกระบวนการ passive diffusion ซึ่งเกิดจากการที่ภายนอกเซลล์ มีปริมาณคลอไรด์ไอออนมากกว่าภายในเซลล์ ทำให้เกิดการแพร่ผ่านเข้าไปได้ นอกจากนี้ยังอาจผ่านเข้าไปโดยอาศัย copper transporter อีกด้วย [5] เมื่อ cisplatin เข้าสู่ภายในเซลล์ ก็จะมีการเปลี่ยนรูปเป็น aqueous จากการเกิดปฏิกิริยา hydrolysis โดยเกิดการแลกเปลี่ยนโมเลกุลระหว่างคลอไรด์ไอออนกับน้ำ [6, 7] หลังจากนั้น aqueous form ของ cisplatin จะเข้าไปมีผลโดยตรงต่อ DNA ในนิวเคลียส โดยจะเข้าไปสร้างพันธะโควาเลนต์ (covalent bond) ทำให้เกิด intra-strand และ inter-strand cross-links ที่บริเวณตำแหน่ง N-7 ของ guanines และ adenine ทำให้เกิด DNA damage และเกิด apoptosis ของเซลล์มะเร็ง [8, 9]

ผลข้างเคียง (Side effect)

จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่าหลังจากที่ให้ cisplatin เข้าทางหลอดเลือดแล้ว จะมีการกระจายไปตามอวัยวะต่างๆในร่างกายโดยจะพบเป็นปริมาณมากที่บริเวณไต, ตับ, รั้งไข่, อัณฑะ, ผิวหนัง, กระดูก รวมทั้ง dorsal root ganglion (DRG) [9] ซึ่งเป็นสาเหตุที่ทำให้เกิดผลข้างเคียงในหลายด้าน เช่น nephrotoxicity [10] ototoxicity [11] และ peripheral neuropathy [2]

Nephrotoxicity

จากการที่มี cisplatin สะสมมากที่บริเวณไตก่อให้เกิดความผิดปกติต่อการทำงานของไต จนอาจถึงขั้นไตวาย (renal failure) และจากการศึกษา morphology พบว่าเกิด necrosis ที่บริเวณ terminal portion ของ proximal tubule และ เกิด apoptosis ที่ distal nephron [10] ปัจจุบันสามารถลดผลข้างเคียงของ cisplatin ที่ส่งผลต่อไตได้โดยการทำให้เกิด hydration ร่วมกับการใช้ยา กลุ่ม diuretics และ serotonin receptor antagonist [12]

Ototoxicity

ผลข้างเคียงของ cisplatin ทำให้เกิดพยาธิสภาพที่สำคัญต่อเส้นประสาทที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการได้ยิน โดยทำให้เกิดการสูญเสียการได้ยินในช่วงความถี่สูงและส่งผลกระทบต่อช่วงความถี่ในระดับเดียวกับการพูด [13] และยังสามารถส่งผลให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ tinnitus ทั้งแบบ transient และแบบ permanent [14]

Cisplatin-induced neuropathy

จากการศึกษาพบว่า cisplatin สะสมใน DRG มากกว่าใน nerve, spinal cord และ brain [9, 15] โดยกลไกที่ทำให้เกิด cisplatin-induced neuropathy เป็นผลจาก DNA damage และจากโครงสร้างของ DNA ที่ผิดปกติทำให้ cell cycle มีความผิดปกติและทำให้เกิด apoptosis ของ DRG neuron โดยผ่านกลไก re-entry ของ cell cycle [16, 17] โดยมีการกระตุ้นการแสดงออกของ p53 ซึ่งเป็นโปรตีนทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ cell cycle ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ cell cycle แล้วไปทำให้เกิดการย้ายของ Bax ไปที่ mitochondria ทำให้มีการปล่อย Cytochrome C ออกมาจาก mitochondria มากระตุ้น caspase ต่างๆแล้วนำไปสู่ apoptosis [18] และยังพบว่า DRG neuronal apoptosis ที่เกิดจาก cisplatin น่าจะเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นเอนไซม์ในกลุ่ม mitogen-activated protein kinases (MAPKs) โดยกระตุ้นผ่าน p38 และ extracellular signal-regulated kinase (ERK) [19] จากการศึกษาเมื่อไม่นานมานี้พบว่า นอกจากมีผลต่อ nuclear DNA ของ neuron ข้างต้นแล้ว cisplatin ยังมีผลต่อ mitochondrial

DNA เช่นเดียวกัน โดย mitochondrial DNA damage ทำให้การสร้างพลังงานจาก mitochondria ลดลง neuron ซึ่งเป็นเซลล์ที่ต้องการพลังงานในการขนส่งสารผ่าน axon รวมทั้งการสื่อสารผ่าน synapse โดยใช้ neurotransmitter ก็จะถูกพร่องและจากการศึกษาพบว่า cisplatin-induced neuropathy ทำให้การขนส่งสารต่างๆภายใน axon (axonal transport) ลดลงทั้งในทิศทาง anterograde และ retrograde [20] นอกจากนี้การที่ transcription ของ nuclear DNA เสียไปจากที่ cisplatin ไปจับก็ยังทำให้การสังเคราะห์โปรตีนต่างๆ ที่จำเป็นต่อการทำงานของเซลล์เสียไป [21] นอกจากนี้กลไกข้างต้น cisplatin ยังส่งผลเสียต่อ neuron โดยการไปเพิ่มภาวะ oxidative stress ทั้งนี้เนื่องจากในการศึกษาผลของ vitamin E ซึ่งเป็น antioxidant พบว่ามีผลดีต่อภาวะ cisplatin neuropathy ทั้งในคนและสัตว์ทดลอง [22, 23]

Cisplatin-induced neuropathy ในมนุษย์

Sensory neuropathy เป็นอาการข้างเคียงที่พบได้บ่อยในผู้ป่วยที่รักษามะเร็งด้วยยา cisplatin [24] ลักษณะของ cisplatin neuropathy ในคนที่พบบ่อยที่สุดคือ distal symmetrical polyneuropathy คือเป็นมากที่ปลายมือปลายเท้า เป็นทั้งสองข้างใกล้เคียงกันและเป็นกับเส้นประสาทหลายเส้นพร้อมๆ กัน [25, 26] อาการชาปลายมือปลายเท้า เป็นลักษณะคล้ายใส่ถุงมือ-ถุงเท้า (glove-stocking pattern) อาจจะปรากฏหลังเริ่มการรักษาได้ระยะหนึ่งและจะมีอาการมากขึ้นเมื่อผู้ป่วยได้รับการรักษาได้หลายเดือนหรือหลังสิ้นสุดการรักษาและเมื่อตรวจร่างกายมักพบว่าเกิด abnormal sensation เช่น paresthesia, รับรู้ vibration ได้ลดลง ,รับรู้ joint position ได้ลดลง และการลดลงหรือหายไปของ deep tendon reflexes [25] นอกจากนี้ยังพบการลดลงของ sensory nerve conduction amplitude และ velocity แต่ไม่มีอาการอ่อนแรงของกล้ามเนื้อ [27] เมื่อทำ biopsy ของเส้นประสาท sural มาตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่ามีการหายไปของ myelinated fiber ขนาดใหญ่ [26] ดังนั้นการเกิด neuropathy จึงเป็นเหตุผลสำคัญที่ทำให้ผู้ป่วยไม่สามารถรับยา cisplatin ได้ต่อเนื่อง ส่งผลให้ประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งลดลง

Cisplatin-induced neuropathy ในสัตว์ทดลอง

การศึกษาพบว่าหนูที่ได้รับยา cisplatin มีความไวในการรับรู้ต่อความร้อนน้อยลง แต่เกิดความเจ็บปวดต่อ mechanical stimuli (mechanical allodynia) ได้ [28-34] และจากการศึกษา motor และ proprioceptive function โดยใช้ rota-rod test ก็พบว่ามีความผิดปกติด้วย [30, 35] Motor nerve conduction velocity อาจลดลงได้ในกรณีได้ขนาดยา cisplatin ที่สูง [34, 35] แต่เมื่อเทียบกับขนาดยาที่ต่ำกว่าอาจไม่พบการลดลงของ Motor nerve conduction velocity [32, 36] ในส่วนของโครงสร้าง DRG พบว่ามี atrophy ของ cell body, nucleus และ nucleolus [28,

29, 33, 34, 37-39] แต่การลดลงของจำนวน DRG neuron นั้นยังไม่ชัดเจน โดยมีรายงานว่าพบการลดลงหลังได้รับยา cisplatin แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ [34, 39] ส่วนโครงสร้างของ nerve พบมีการลดขนาดของ myelinated fiber และมีการลดลงเล็กน้อยของจำนวน myelinated fiber [28, 34, 37, 39]

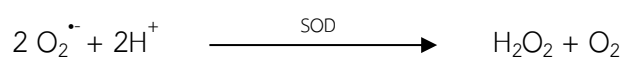
สรุปได้ว่า cisplatin มีผลต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยเฉพาะ ต่อ DRG neuron ซึ่งเป็น sensory neuron เป็นหลัก ทำให้ผู้ป่วยเกิดภาวะ sensory neuropathy จนส่งผลเสียต่อการรักษา มะเร็ง ดังนั้นการรักษา cisplatin-induced neuropathy จึงมีความจำเป็นอย่างมาก ซึ่งต้องอาศัยความรู้เกี่ยวกับ molecular mechanism ของการเกิดภาวะนี้ ปัจจุบันมีหลักฐานมากขึ้นแสดงว่า oxidative stress มีบทบาทสำคัญในภาวะนี้ [40]

Oxidative stress

Oxidative stress คือภาวะของความไม่สมดุลระหว่างการเกิด reactive oxygen species (ROS) และกระบวนการป้องกันอันตรายจาก ROS ในเซลล์หรือร่างกายโดยเอนไซม์และสารต้านออกซิเดชัน (antioxidant)

ROS เกิดจากกระบวนการ metabolism โดยเฉพาะจากการสร้าง ATP ด้วยกระบวนการ electron transport chain ที่ mitochondria เมื่อมี electron leakage เกิดขึ้น จะเกิดการจับระหว่าง electron กับ oxygen (O_2) เกิดเป็น superoxide anion radical ($O_2^{\cdot-}$) ซึ่งเป็น ROS ตัวแรกที่มีคุณสมบัติเป็น oxidizing agent และเมื่อมีการเกิดหรือเพิ่มขึ้นของ ROS ในร่างกาย จะเกิดกระบวนการที่ช่วยควบคุมปริมาณของ ROS ซึ่งมีกลไกหลักอยู่ 2 กลไก ได้แก่

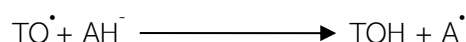
1) Enzymatic system เอนไซม์ที่สำคัญได้แก่ superoxide dismutase (SOD) โดยจะทำหน้าที่ขจัด โดยการเร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน $O_2^{\cdot-}$ ให้เป็น hydrogen peroxide (H_2O_2) และ oxygen (O_2) ดังสมการต่อไปนี้



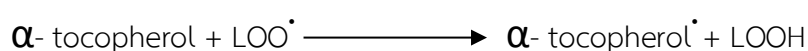
ซึ่ง H_2O_2 จะถูกกำจัดต่อโดยเอนไซม์ catalase (CAT) โดยการเปลี่ยน H_2O_2 เป็นโมเลกุลของน้ำ และออกซิเจน และ เอนไซม์ glutathione peroxidase (GPx) ที่มี glutathione (GSH) เป็นตัวร่วมในปฏิกิริยา ทำหน้าที่เร่งปฏิกิริยาเปลี่ยน H_2O_2 เพื่อให้ได้โมเลกุลของน้ำและออกซิเจน [41, 42]

2) Non-enzymatic system ได้แก่ antioxidant ต่างๆ เช่น vitamin C, vitamin E และ GSH (41) พบว่า vitamin C สามารถกำจัด ROS ได้โดยจะเข้าไปทำปฏิกิริยากับ H_2O_2 และ hydroxyl radical (OH^{\cdot}) [43] นอกจากนี้ vitamin C หรือ ascorbic acid (AH) ยังช่วยเสริม

ประสิทธิภาพการทำงานของ vitamin E อีกด้วย โดยจะช่วยเปลี่ยน α -tocopherol \cdot (TO \cdot) ให้กลับไปเป็น α -tocopherol (TOH) ให้สามารถทำงานได้ ดังสมการต่อไปนี้ [44] และสุดท้าย GSH จะช่วยให้ vitamin C กลับมาอยู่ในรูป active form ได้อีกครั้ง



ในส่วนของ vitamin E กำจัด ROS โดยเป็นตัวให้ไฮโดรเจนแก่ peroxy radical (LOO \cdot) ดังสมการต่อไปนี้ [43]

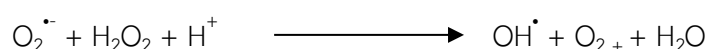


และอนุมูล α -tocopherol \cdot ที่เกิดขึ้น สามารถทำปฏิกิริยากับ peroxy radical ตัวอื่นทำให้ได้ LOO- α -tocopherol ส่งผลให้ปฏิกิริยาออกซิเดชันของไขมันหยุดลง ทำให้ป้องกันการทำลายของเยื่อหุ้มเซลล์จากปฏิกิริยาดังกล่าวได้

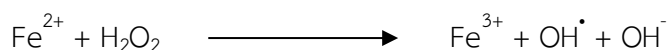
นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดของ antioxidant ได้ตามกลไกดังต่อไปนี้ [43]

1. Preventive antioxidant ป้องกันการเกิด ROS
2. Scavenging antioxidant ทำลายหรือยับยั้ง ROS ที่เกิดขึ้น
3. Chain breaking antioxidant ทำให้ลูกโซ่ของการเกิด ROS สิ้นสุดลง

นอกจากนี้ เมื่อ O $_2^{\cdot-}$ ทำปฏิกิริยากับ H $_2$ O $_2$ เกิดเป็น hydroxyl radical (OH \cdot) เรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haber-Weiss reaction ดังสมการต่อไปนี้



Fenton reaction เกิดจากการทำปฏิกิริยากันระหว่าง reduced transition metal ion เช่น Fe $^{2+}$, Cu $^{1+}$ กับ H $_2$ O $_2$ ก็จะทำให้ได้ hydroxyl radical (OH \cdot) ดังสมการต่อไปนี้

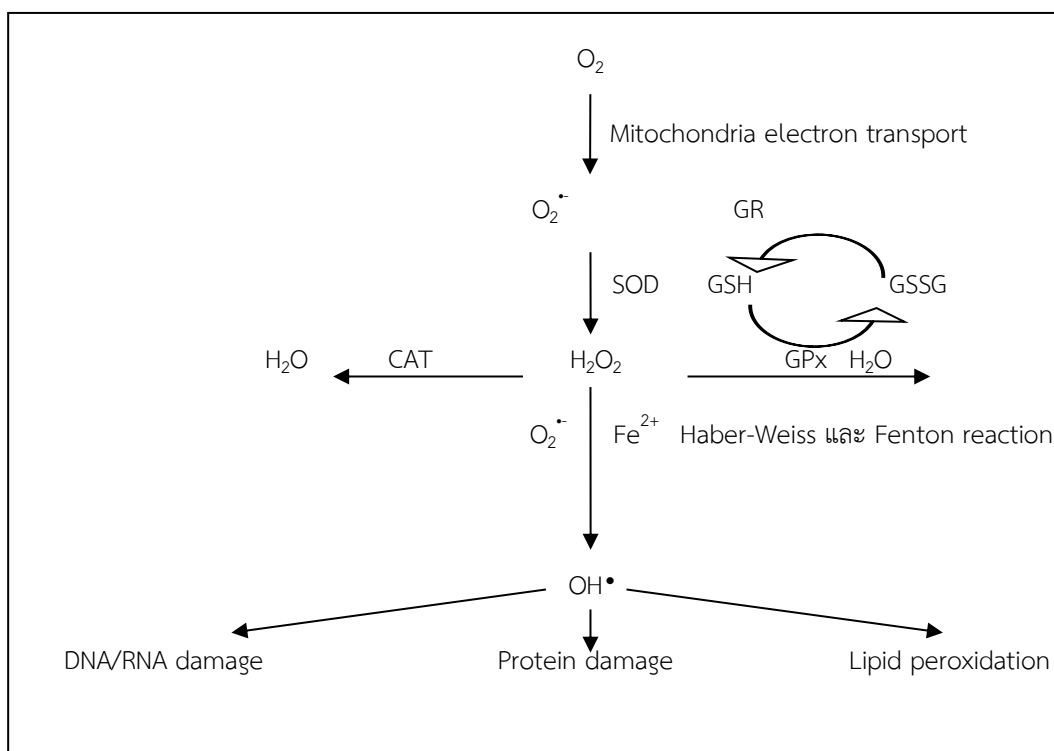


โดย hydroxyl radical (OH \cdot) ที่เกิดขึ้นจากสองปฏิกิริยาเป็น ROS ที่สำคัญที่สุดในการทำลายโครงสร้างของเซลล์ ในกรณีโปรตีน กรดอะมิโนที่ไวต่อภาวะ oxidative stress มากที่สุดคือ cysteine และ methionine นอกจากนี้โปรตีนที่มี -SH group ยังไวต่อการทำปฏิกิริยากับ hydrogen peroxide อีกด้วย ซึ่งโปรตีนที่ได้รับความเสียหายจาก ROS อาจเกิดการเปลี่ยนแปลงที่กรดอะมิโนบางตัวหรืออาจมีการเปลี่ยนแปลงในโครงสร้าง tertiary ของโปรตีนหรืออาจนำไปสู่การ

ทำลายโปรตีนนั้นๆ ได้ ทำให้เกิดการเสียหายที่ของเอนไซม์ซึ่งส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ โปรตีนที่เกิด oxidative damage นี้สามารถตรวจพบได้ในรูป เช่น aldehyde หรือ carbonyl [45, 46]

สำหรับไขมันที่ไวต่อการทำลายจาก ROS ได้แก่ polyunsaturated fatty acids ซึ่งเป็นส่วนประกอบสำคัญใน phospholipid ของเยื่อหุ้มเซลล์และ organelle รวมทั้ง myelin sheath ในระบบประสาทด้วย ซึ่งเมื่อทำปฏิกิริยาแล้วจะได้ peroxy radicals ($\text{ROO}\cdot$) ซึ่งจะทำปฏิกิริยา peroxidation เป็นลูกโซ่ (chain reaction) กับกรดไขมันข้างเคียงต่อเนื่องไปเรื่อยๆ สาร antioxidant ที่สามารถหยุดกระบวนการนี้ได้จึงเรียกว่าเป็น chain-breaking antioxidant ปฏิกิริยาดังกล่าวนี้นำให้เกิด lipid hydroperoxide และมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารกลุ่ม aldehyde หรือ endoperoxide ได้ โดยผลผลิตของ oxidative damage ต่อไขมันที่สำคัญ คือ malondialdehyde (MDA), 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) และ 4-oxo-2-nonenal (ONE) ซึ่งเรียกว่าเป็น lipid peroxidation products [45, 46]

ในกรณีของความเสียหายที่เกิดกับ DNA กลไกการทำลายเกิดจาก ROS ทำปฏิกิริยากับเบส หรือ การเกิด DNA strand break หรือการเปลี่ยนแปลงของน้ำตาล deoxyribose หรือ cross-linkage ของ DNA กับโปรตีน รวมไปถึงความเสียหายต่อระบบการซ่อมแซมตัวเองของ DNA เบสจะถูกออกซิไดส์ได้เป็น 8-hydroxyguanosine (8-OH-G), 8-hydroxyadenine ซึ่งความเสียหายต่อ DNA หากไม่มีการซ่อมแซมโดยเอนไซม์จะทำให้การจับคู่เบสเปลี่ยนจาก Guanine-Cytosine (GC) เป็น Thymin-Adenine (TA) ซึ่งเกี่ยวข้องกับเกิดการเนื้องอกหรือมะเร็งได้ [45-47] สามารถสรุปการเกิด ROS และผลต่อโครงสร้างในเซลล์ได้ในรูป 2



รูป 2 แสดงกลไกการเกิดและการกำจัด ROS โดย enzymatic system

(SOD = superoxide dismutase, CAT = catalase, GPx = glutathione peroxidase, GSH = glutathione, GSSG = glutathione disulide, GR = glutathione reductase)

Oxidative stress และ cisplatin

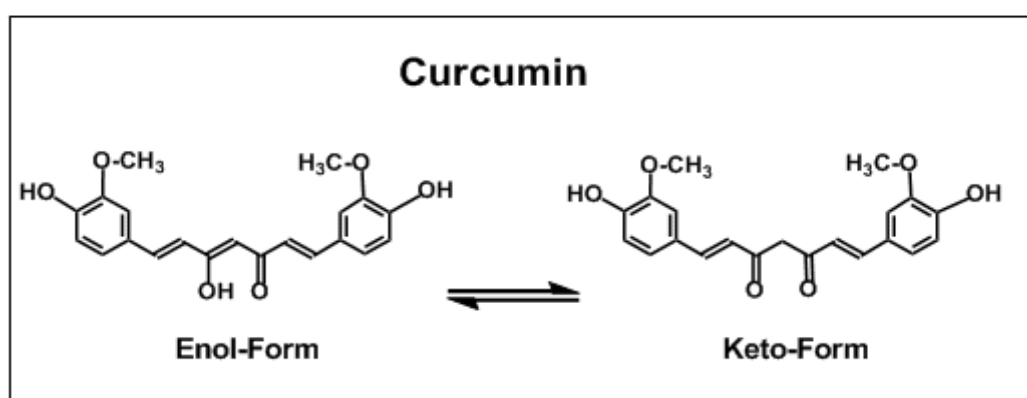
จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าการเกิด oxidative stress จากการใช้ยา cisplatin มีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ ROS เช่น superoxide anion ซึ่งมีผลทำให้มีการเพิ่มของ lipid peroxidation และการลดลงของระดับ enzymatic antioxidant เช่น catalase และ glutathione peroxidase แล้วชักนำให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และส่วนประกอบต่างๆ เช่น โปรตีน, ไขมันและกรดนิวคลีอิก ทั้งใน *in vitro* และ *in vivo* [48-50] และแม้ว่ากลไกการเกิด neuropathy ที่เกิดจาก cisplatin จะยังไม่สามารถสรุปได้ชัดเจน [4] แต่มีหลักฐานบ่งชี้ว่ากลไกหนึ่งที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องคือภาวะ oxidative stress [40] จากการทดลองเพาะเลี้ยง DRG neuron ที่ได้รับ cisplatin พบว่ามีความเสียหายต่อ mitochondria เป็นผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เพิ่มมากขึ้น ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ mitochondria รวมทั้งจำนวนของ DRG neuron กับ Schwann cell ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ [51] และจากงานวิจัยที่ผ่านมา ก็พบว่าการใช้ antioxidant เช่น vitamin C [52], vitamin E [53, 54] และ glutathione [55, 56] พบว่ามีผลดีต่อการลดภาวะ cisplatin neuropathy ทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง ดังนั้นภาวะ oxidative stress น่าจะมีบทบาทสำคัญใน

การเกิดภาวะ neuropathy จาก cisplatin ดังนั้นการใช้ยาในกลุ่ม antioxidant ก็น่าจะส่งผลดีต่อภาวะ neuropathy จาก cisplatin

Curcumin

Curcumin เป็นสารในกลุ่ม curcuminoids ซึ่งสกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชันที่มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Curcuma longa* Linn อยู่ในวงศ์ Zingiberaceae ซึ่งเป็นวงศ์เดียวกับพืชตระกูลขิงหรือข่า ซึ่งเป็นสมุนไพรที่คนไทยรู้จักดี หาซื้อได้ง่าย ถูกนำมาใช้ประกอบอาหาร ใช้เป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอาง รวมทั้งใช้เป็นยารักษาโรคเป็นเวลายาวนาน ปัจจุบันขมิ้นชันได้ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน ซึ่งมีการรณรงค์ให้ปลูกและใช้ภายในครัวเรือน ตามตำราการแพทย์แผนไทยโบราณ ขมิ้นชันได้มีการใช้รักษาโรคหลายชนิด เช่น ใช้ในการรักษาบาดแผล โรคผิวหนัง โรคติดเชื้อทางตา โรคระบบทางเดินหายใจ และโรคระบบทางเดินอาหาร

ในขมิ้นชันมีส่วนประกอบหลัก 2 ชนิด คือ turmeric oil และ curcuminoids ซึ่งในส่วนของ curcuminoids ที่พบมีปริมาณมากที่สุดคิดเป็น 3-5 % ของสารที่สกัดได้จากเหง้าของขมิ้นชัน ประกอบด้วยสารหลัก 3 ชนิด ได้แก่ curcumin, dimethoxycurcumin และ bisdemethoxycurcumin จากการวิจัยที่ผ่านมาพบว่า curcumin เป็นสารประกอบโพลีฟีนอล (Polyphenol) ชนิด lipophilic polyphenol ซึ่งไม่สามารถละลายน้ำได้ แต่ละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ เช่น methanol, ethanol, dimethylsulfoxide และ acetone มีลักษณะเป็นสีเหลืองสด อยู่ในรูป Enol และ Keto มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 368.38 มีสูตรโครงสร้างคือ $C_{21}H_{20}O_6$ (รูป 3) [57-59]



รูป 3 แสดงลักษณะโครงสร้างของ Curcumin ในรูป Enol และ Keto

มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของ curcumin ทั้งในห้องปฏิบัติการ ในสัตว์ทดลอง รวมถึงในมนุษย์ โดยพบว่า curcumin มีฤทธิ์เป็น antioxidant ที่ดี นอกจากนี้ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ ฤทธิ์ยับยั้งแบคทีเรีย และมีฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง เป็นต้น

ฤทธิ์ antioxidant พบว่ามีความสัมพันธ์กับโครงสร้างทางเคมีของ curcuminoids ซึ่งประกอบด้วย methoxylated phenols 2 ตัว เชื่อมกันด้วย alpha/beta unsaturated carbonyl groups ซึ่งอยู่ในรูปของ enol-form [57] นอกจากนี้ยังพบว่า curcumin มีฤทธิ์ในการยับยั้งปฏิกิริยา lipid peroxidation [60] และมีรายงานว่า curcumin มีความสามารถในการจับ ROS หลายชนิดที่สร้างโดย macrophages เช่น superoxide anion, hydrogen peroxide และ nitric oxide radicals ทั้งในการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ และในสัตว์ทดลอง [61] และยังพบว่า curcumin มีฤทธิ์เพิ่มการทำงานของ SOD และเพิ่มระดับ glutathione peroxidase [62, 63]

ฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ การทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่า curcumin มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ เนื่องจากการกระตุ้นด้วย carrageenan ในหนูทดลอง ซึ่งมีความสามารถเทียบเท่ากับยาลดการอักเสบชนิด phenylbutazone [64] นอกจากนี้ curcumin ยังมีฤทธิ์ในการยับยั้ง 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate (TPA) และ arachidonic acid ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการอักเสบบริเวณผิวหนังในหนูทดลอง [65] curcumin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง prostaglandin E2 ซึ่งเป็นสารที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ [66] นอกจากนี้ยังพบว่า curcumin สามารถยับยั้ง enzyme ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น 5-lipo-oxygenase, 12-lipo-oxygenase และ cyclo-oxygenase (COX) และการยับยั้งสารพวก cytokines เช่น IL1, IL6 และ TNF- α ทำให้การอักเสบลดลง [67, 68]

ฤทธิ์ยับยั้งมะเร็ง มีการศึกษาฤทธิ์ของ curcumin ต่อการยับยั้งมะเร็งของอวัยวะต่างๆ เช่น skin, breast, colon, pancreas, prostate gland, ovary และ head and neck, โดยพบว่า curcumin มีฤทธิ์ในการยับยั้ง cell proliferation และกระตุ้นให้เกิด apoptosis ใน cancer cell [61] และยังพบว่า curcumin มีความสามารถในการยับยั้ง UV irradiation ซึ่งกระตุ้นให้เกิด DNA mutagenesis [69] และมีรายงานพบว่า curcumin มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเกิดมะเร็งหลายชนิดในสัตว์ทดลอง เช่น oral cancer, breast carcinoma และ intestinal tumors [61] และ curcumin สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์มะเร็งได้ โดยไปกระตุ้นการทำงานของโปรตีน p53 ทำให้เซลล์มะเร็งถูกยับยั้งหรือตายไป [59, 67]

Curcumin กับ ระบบประสาท

พบว่า curcumin ยังสามารถใช้ในรักษาโรคทางระบบประสาทบางโรคที่เกี่ยวข้องกับภาวะ oxidative stress ได้ เช่น Alzheimer's disease, Parkinson's disease , และ โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) [70]

ในกรณีของ Alzheimer's disease ซึ่งเป็นโรคที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ประสาทที่มีการสะสมของ neurofibrillary tangles (NFTs) และ senile plaques ที่สร้างจาก β -amyloid ($A\beta$) peptide ที่บริเวณส่วนของ hippocampus [71] จากการศึกษาทั้งใน in vitro และ in vivo พบว่า curcumin ทำให้ $A\beta$ peptide มีปริมาณลดลง [72, 73] นอกจากนี้เมื่อ $A\beta$ peptide รวมตัวกับ ฮีโมโกลบิน จะได้เป็น peroxidase ซึ่งเป็นอันตรายต่อเซลล์ [74] และพบว่า curcumin สามารถต้าน ROS ดังกล่าวได้

ในส่วนของ Parkinson's disease เป็นโรคที่เกิดจากสองสาเหตุหลัก คือ 1. เกิดจากการเพิ่มขึ้นของ oxidative stress [75] และเกิด mitochondrial dysfunction [76] ทำให้มี ROS เกิดขึ้น ส่งผลทำให้เซลล์ประสาทที่สร้าง dopamine ใน substantia nigra เสียหาย จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า curcumin สามารถลด ROS ที่เกิดขึ้นได้ [77] 2. เกิดจากสาเหตุของความผิดปกติทางพันธุกรรม จะพบความผิดปกติของการสร้างโปรตีน α -synuclein ทำให้เกิดการสะสมของโปรตีนอยู่ในเซลล์ประสาท [78] จากการศึกษาพบว่า curcumin สามารถลดการสะสมของโปรตีน α -synuclein ได้ [79]

โรคหลอดเลือดสมอง (stroke) มีงานวิจัยในมนุษย์ที่พบว่า curcumin สามารถป้องกันสาร homocysteine ที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อเยื่อผนังหลอดเลือดได้ [80] จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า curcumin ไปยับยั้ง ROS ที่เกิดจากภาวะหลอดเลือดในสมองตีบตัน (ischemic stroke) [81]

นอกจากนี้มีการศึกษาผลของ curcumin ต่อภาวะ spinal cord injury ในหนูพบว่า ในกลุ่มที่ได้รับ curcumin มีปริมาณ SOD เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ methylprednisolone และกลุ่มควบคุม อีกทั้งมีการลดลงของ malondialdehyde (MDA) ที่แสดงถึงการลดลงของ lipid peroxidation [82] และงานวิจัยก่อนหน้านี้ยังพบว่า curcumin ไปลดภาวะการเกิด apoptosis ของเซลล์ประสาทได้ รวมทั้งลดการสร้าง glia scar โดยไปควบคุมการทำงานของ astrocyte และ microglia [83] และในการศึกษาภาวะ peripheral neuropathy จากการใช้ยา cisplatin และ oxaliplatin ในหนูทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับ curcumin ร่วมกับยา cisplatin และ oxaliplatin มีปริมาณการสะสมของ platinum compounds น้อยกว่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และมีระดับของ

neurotensin ใน plasma ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งระดับของ neurotensin เป็น marker หนึ่งใน การบ่งชี้ภาวะ peripheral neuropathy [84]

จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่า curcumin มีฤทธิ์ในการป้องกันและรักษาโรคทางระบบประสาท หลายโรคที่เกิดจากภาวะ oxidative stress โดยอาศัยคุณสมบัติของ polyphenol ในการเป็นสาร antioxidant ที่ดี นอกจากนี้ยังมีการใช้ curcumin ในการรักษาภาวะ peripheral neuropathy ที่เกิดจากการใช้ยาในกลุ่ม cisplatin อย่างไรก็ตามข้อมูลดังกล่าวยังไม่เพียงพอที่จะยืนยันฤทธิ์ของ curcumin ต่อ cisplatin neuropathy ได้ เนื่องจากผลต่อความผิดปกติด้านหน้าที่ยังไม่แน่ชัดและยังขาดข้อมูลการวิเคราะห์โครงสร้างของปมประสาทและเส้นประสาท ดังนั้นงานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของ curcumin ต่อความผิดปกติทั้งด้านหน้าที่และโครงสร้างของ PNS ที่เกิดจากการได้ยา cisplatin ในหนูแรท



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย


การทดลองในสัตว์ทดลอง

กลุ่มประชากรที่ใช้ในการศึกษา

หนูเพศเมียพันธุ์ Wistar จำนวน 20 ตัว น้ำหนัก 190-220 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล

รูปแบบการวิจัย

การทดลองในสัตว์



	Week1	Week2	Week3	Week4	Week5	End
C (n=6)	—————	NSS i.p. 2/wk 2% SCMC oral OD		—————	—————	
P (n=7)	—————	cisplatin i.p. 2/wk 2% SCMC oral OD		—————	—————	
S (n=7)	—————	cisplatin i.p. 2/wk curcumin oral OD		—————	—————	
	Hot plate NCV				Hot plate NCV	Sacrifice Morphometry

รูป 4 แสดงแผนการทดลอง

วิธีการวิจัย

1. การแบ่งกลุ่มหนู 20 ตัว โดยสุ่มเลือกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 6-7 ตัว คือ

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม (control หรือ C) ได้รับการฉีด normal saline ที่เป็น vehicle สำหรับ cisplatin และป้อน vehicle สำหรับ curcumin คือ 2% sodium carboxy methyl cellulose (SCMC) จำนวน 6 ตัว

กลุ่มที่ 2 (P) กลุ่มที่ได้รับการฉีด cisplatin และป้อน SCMC จำนวน 7 ตัว

กลุ่มที่ 3 (S) กลุ่มที่ได้รับการฉีด cisplatin และป้อน curcumin ที่ละลายใน SCMC จำนวน 7 ตัว

2. สภาพแวดล้อมในการดูแลหนู

ซึ่งน้ำหนักแรกรับทุกสัปดาห์จนถึงสิ้นสุดการทดลอง ให้หนูได้รับน้ำและอาหารเม็ดสำเร็จรูปในปริมาณที่เพียงพอ ที่อุณหภูมิห้อง 25 องศาเซลเซียส ช่วงเวลากลางคืนและกลางวัน 12/12 ชั่วโมง ทั้งนี้ก่อนเริ่มการวิจัย โครงการได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยเรียบร้อยแล้ว เลขที่โครงการวิจัย 04/56 และผู้วิจัยได้ทำตามหลักเกณฑ์/คำแนะนำ ในการใช้สัตว์ทดลองที่ออกโดยสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

3. การฉีดยาหนู

กลุ่มที่ 1 (C) ได้รับการฉีด normal saline เข้าช่องท้อง

กลุ่มที่ 2 (P) ได้รับการฉีด cisplatin ผสมใน normal saline เข้าช่องท้อง 2 mg/kg/ครั้ง สัปดาห์ ละ 2 ครั้ง ทั้งหมด 5 สัปดาห์ติดต่อกัน รวม dose ที่ได้ทั้งหมด 20 mg/kg

กลุ่มที่ 3 (S) ได้รับการฉีด cisplatin เหมือนกับกลุ่ม P

3.1. วิธีการเตรียมยาและสารเคมี

ยาและสารเคมีที่ใช้

1. Sterile normal saline สำหรับฉีด
2. cisplatin (Pfizer, ขนาด 50 mg in 50 ml)

การผสมยา

1. cisplatin เจือจางด้วย normal saline ให้ได้ความเข้มข้น 0.25 mg/ml เพื่อฉีดเข้าช่องท้องปริมาตร 8 ml/kg

4. การให้ curcumin

กลุ่มที่ 1 (C) ได้รับการป้อน SCMC วันละ 1 ครั้งทางปาก

กลุ่มที่ 2 (P) ได้รับการป้อน SCMC วันละ 1 ครั้งทางปาก

กลุ่มที่ 3 (S) ได้รับการป้อน curcumin ผสมใน SCMC วันละ 1 ครั้งทางปาก

ระยะเวลาทั้งหมด 5 สัปดาห์

4.1. วิธีการเตรียมยาและสารเคมี

ยาและสารเคมีที่ใช้

1. sodium carboxy methyl cellulose (Sigma, Cat. No. 419273)
2. curcumin (Cayman, Cat. No. 81025)

การผสมยา

1. ละลาย vehicle คือ SCMC ในน้ำกลั่นให้ได้ 2%
2. นำ curcumin ขนาด 500 mg ละลายใน 2% SCMC 5 ml สำหรับป้อนปริมาตร 5 ml/kg เพื่อให้หนูได้ curcumin 500 mg/kg

5. Hot plate test

Hot plate test เป็นเครื่องมือที่ใช้วัดการรับรู้อุณหภูมิของหนู โดยวางหนุบนแผ่นความร้อนที่ควบคุมอุณหภูมิ และจับเวลาตั้งแต่เท้าของหนูสัมผัสแผ่นความร้อน และจะหยุดจับเวลาเมื่อหนูเลียอุ้งเท้าหลัง

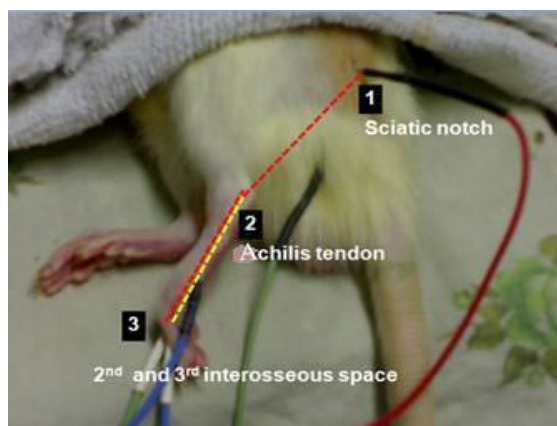
วิธีทดลอง หนูทุกตัว ในแต่ละกลุ่มจะถูกวางลงบนแผ่นความร้อนที่มีอุณหภูมิ 55 ± 0.5 °C นำหนูแต่ละตัวมาทำ 3 ครั้ง แต่ละครั้งห่างกันประมาณ 10 นาที โดยที่ cut-off time เท่ากับ 35 วินาทีเพื่อป้องกันการบาดเจ็บของเท้า สังเกตพฤติกรรมการเลียอุ้งเท้าของหนู บันทึกเวลาตั้งแต่วางหนูลงบนแผ่นความร้อนจนกระทั่งหนูแสดงพฤติกรรมดังกล่าว จากนั้นนำเวลา 3 ครั้ง มาหาค่าเฉลี่ยของหนูตัวนั้นๆ โดยจะทำก่อนให้ยา และที่ 5 สัปดาห์ก่อนสิ้นสุดการทดลอง เปรียบเทียบระยะเวลาของหนูกลุ่มต่างๆ ในแต่ละครั้ง

6. Motor nerve conduction velocity

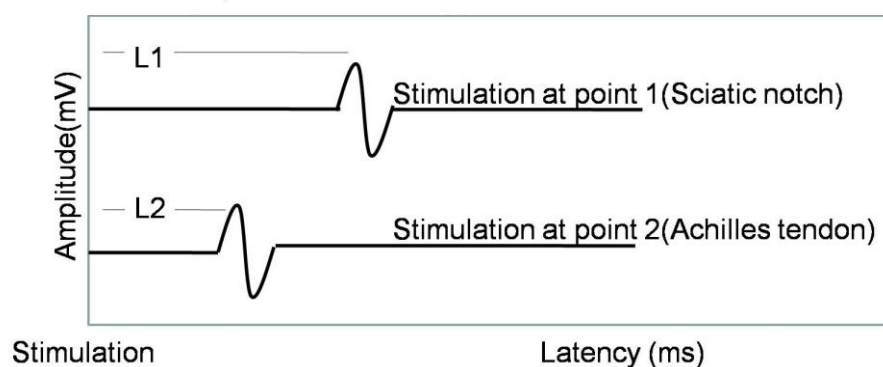
Motor nerve conduction velocity (MNCV) เป็นวิธีการตรวจวัดความสามารถในการนำกระแสไฟฟ้าของ motor nerve fiber โดยการทดลองนี้จะทำการวัดค่า MNCV ก่อนการให้ยา และในสัปดาห์ที่ 5 ก่อนสิ้นสุดการทดลอง

วิธีทดลอง หนูที่ใช้ในการทดสอบจะถูกทำให้สลบโดยใช้ 4% isoflurane ผ่าน oxygen 1000 ml/min หลังจากนั้นลดความเข้มข้นของ isoflurane เป็น 2.5% ผ่าน oxygen 500 ml/min เพื่อคงภาวะสลบของหนูและรักษาอุณหภูมิร่างกายของหนูที่ 37 °C ระหว่างการทดสอบหนุอยู่ในลักษณะนอนคว่ำบนแผ่นร้อนที่คลุมด้วยผ้า จากนั้นทำการเสียบ stimulating electrode ที่บริเวณ sciatic notch (point 1, รูป 5) ซึ่งอยู่ใกล้บริเวณ sciatic nerve และเสียบ recording electrode ที่บริเวณ interosseous space ที่ 2 และ 3 ของขาด้านเดียวกัน ground electrode ถูกเสียบที่สันเท้าที่อยู่ระหว่าง stimulating และ recording electrodes โดย electrodes ทุกตัวถูกเชื่อมต่อกับเครื่อง Electromyography (EMG) แล้วทำการกระตุ้นระดับ supramaximal stimulus ที่บริเวณ

point 1 และ หลังจากกระตุ้น motor fiber ใน sciatic nerve แล้วกล้ามเนื้อจะมีการกระตุ้นซึ่งจะบันทึกการตอบสนองได้เป็น Compound muscle action potential (CMAP) ทำการกระตุ้นซ้ำอย่างน้อย 4 ครั้ง ในหนูแต่ละตัวเพื่อหาค่าเฉลี่ยจากนั้นวัดระยะเวลาตั้งแต่ถูกกระตุ้นจนถึง M wave peak ของ CMAP ที่ point1 ที่เรียกว่า latency1 (L1, รูป 6) หลังจากนั้นตรวจดูบาดแผลและทา betadine ที่บริเวณบาดแผล แล้วจึงย้าย stimulating electrode จากบริเวณ sciatic notch (point 1) ไปเสียบข้าง Achilles tendon (point 2, รูป 5) ซึ่งอยู่ใกล้กับแขนง tibial ของ sciatic nerve ทำการทดสอบซ้ำเหมือนกับ point 1 ข้างต้น ซึ่งจะได้ค่า latency2 (L2, รูป 6) จากนั้นคำนวณ MNCV โดยนำระยะทางระหว่าง point 1 และ point 2 หารด้วยผลต่างของ L1 กับ L2 ตามสูตรดังต่อไปนี้



รูป 5 แสดงการวางตำแหน่งของ electrode



รูป 6 แสดงค่า latency (L) จาก CMAP ทั้งสองตำแหน่ง

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

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

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

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

7. การ sacrifice หนู มีขั้นตอนดังนี้

7.1 นำหนูทุกตัวมาดม isoflurane จนหนูสลบ

7.2 ผ่าตัดเปิดช่องอกเพื่อทำ cardiac perfusion ด้วย normal saline 200 ml

7.3 ตามด้วย 4% paraformaldehyde (PFA) 400 ml

7.4 จากนั้นผ่าเลาะเพื่อเก็บ DRG ระดับ L4 ข้างซ้าย และ sciatic nerve ข้างซ้าย

7.5 แล้วนำ DRG ระดับ L4 และ sciatic nerve นำมาถ่วงและแช่ใน 3% glutaraldehyde เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

7.6 แล้วเปลี่ยนมาเป็น 0.2 M PBS pH 7.4 ซึ่งเก็บไว้จนกว่าจะเข้าสู่กระบวนการฝังใน epoxy resin (embedding)

8. การเตรียมและวิเคราะห์โครงสร้างของชิ้นเนื้อ

การฝังชิ้นเนื้อใน epoxy resin (embedding)

นำ sciatic nerve มาตัดแบ่งเป็น 4 ท่อนสั้นๆ ยาวท่อนละ 5 mm และ DRG ระดับ L4 ข้างซ้าย เข้าสู่กระบวนการฝังใน epoxy resin ด้วยขั้นตอนดังนี้

8.1 นำชิ้นเนื้อทั้ง sciatic nerve และ DRG มาล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วย 0.1 M Cacodylate buffer (pH 7.4) บนเครื่องเขย่า จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

8.2 จากนั้น post-fixation ด้วย 1% Osmium tetra oxide บนเครื่องเขย่า เป็นเวลา 2 ชั่วโมง

8.3 แล้วล้างน้ำยาคงสภาพออกด้วย 0.1 M Cacodylate buffer (pH 7.4) บนเครื่องเขย่า อีกครั้ง จำนวน 3 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที

8.4 ต่อด้วยการทำ dehydration ด้วยแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่ำไปยังความเข้มข้นสูงดังนี้

70% Ethyl alcohol แช่ไว้ 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

8.5 ต่อด้วยการ clearing ด้วย propylene oxide จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 15 นาที

8.6 จากนั้นเข้าสู่กระบวนการ infiltration ดังนี้

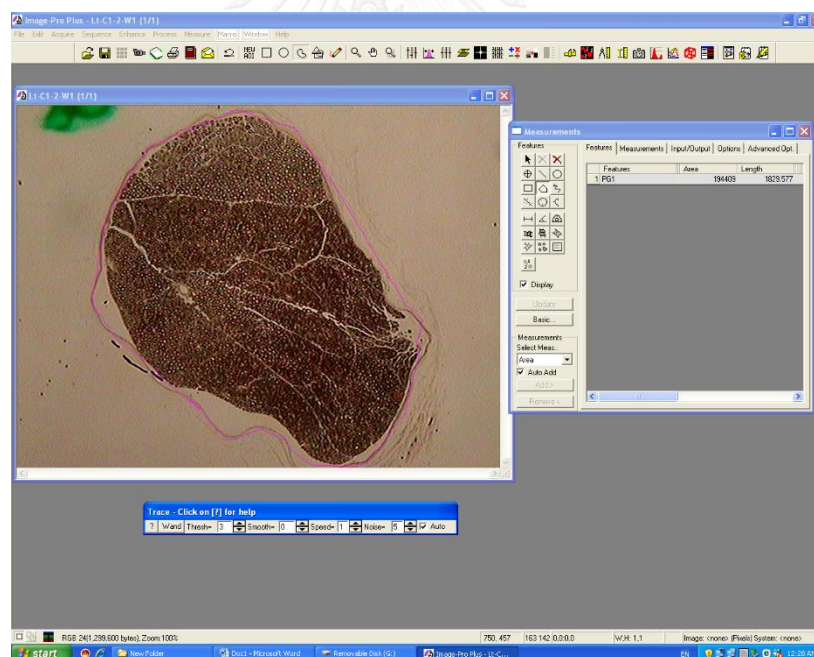
Propylene oxide: Epon mixture = 1:1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

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

8.7 หลังจากนั้นจะ infiltration ต่อด้วย epon mixture 100% อีก 1 ชั่วโมง แล้วจึงแล้วฝังชิ้นเนื้อลงในแม่พิมพ์ที่มี epon mixture 100% บรรจุอยู่ และนำไปเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 3 วัน แล้วนำ plastic block ออกมาจากแม่พิมพ์ เพื่อเตรียมนำมาตัดชิ้นเนื้อ

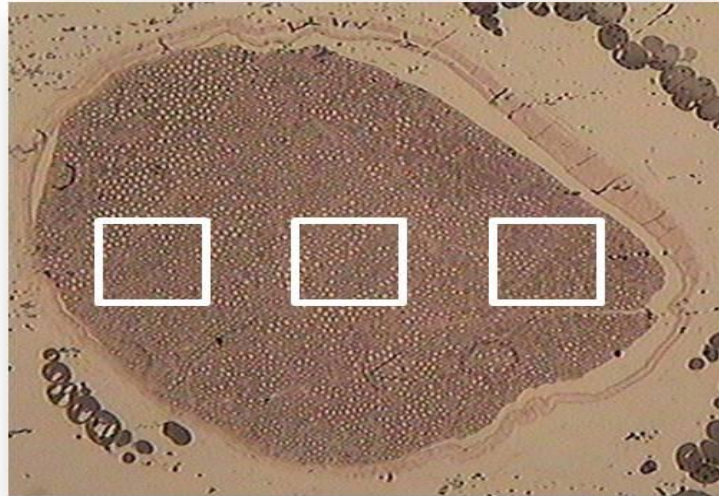
การศึกษาโครงสร้างของเส้นประสาท (nerve morphometry)

นำชิ้นเนื้อ sciatic nerve ข้างซ้าย ที่ฝังใน plastic block มาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ที่ความหนา 1 μm แล้วทำการย้อมด้วย 1% para-phenylenediamine แล้วนำสไลด์เส้นประสาทที่เตรียมไว้ มาดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่มีกล้องถ่ายภาพติดอยู่ โดยใช้กำลังขยาย 4X แล้วเปิดโปรแกรม Image-Pro plus เพื่อคำนวณหาพื้นที่ของ fascicle เรียกว่า fascicular area (หน่วยตารางมิลลิเมตร) ดังในรูป 7



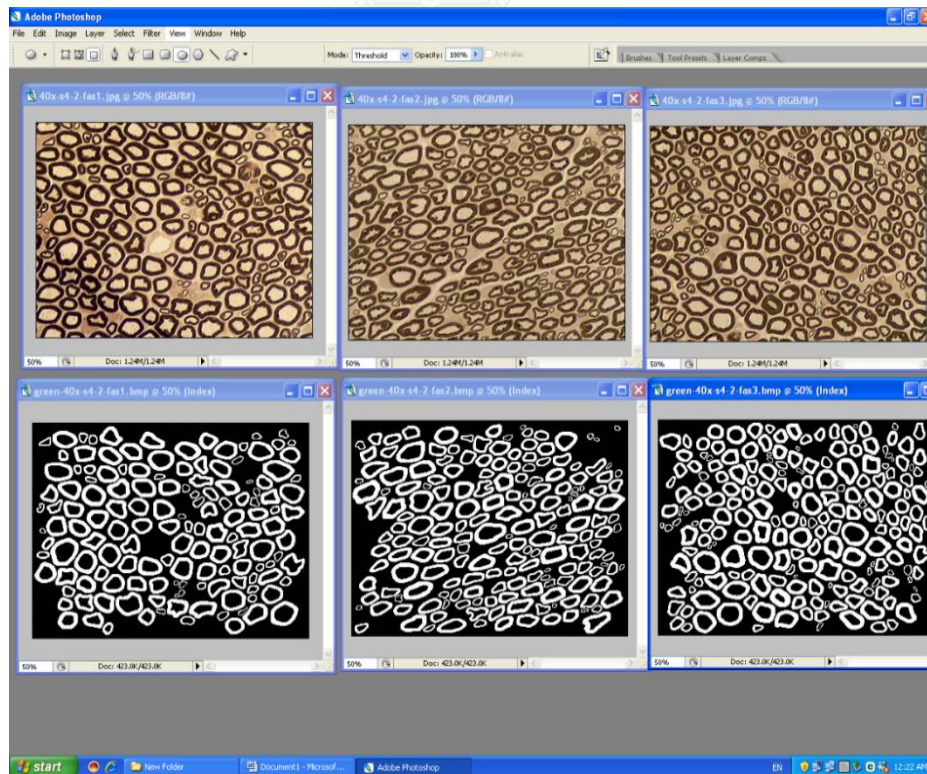
รูป 7 แสดงการคำนวณหา fascicular area ที่กำลังขยาย 4X

จากนั้นใช้กำลังขยาย 40x เพื่อเก็บภาพภายใน fascicle โดยเก็บภายในกรอบหน้าต่างขนาด 0.012 mm^2 จำนวน 3 หน้าต่าง โดยวางตรงกลาง fascicle 1 หน้าต่างและอีก 2 หน้าต่างบริเวณด้านข้างของหน้าต่างแรกในแนวเดียวกัน ดังในรูป 8 และถ้าหาก section นั้น มี fascicle จำนวนมากกว่าหนึ่ง fascicle จะเก็บภาพภายในทุกๆ fascicle ที่สามารถวางได้ครบทั้ง 3 หน้าต่าง



รูป 8 แสดงการเลือกวาง 3 หน้าต่าง เพื่อเก็บภาพภายใน fascicle ที่กำลังขยาย 40 x

หลังจากนั้นเมื่อได้ภาพทั้ง 3 หน้าต่างแล้ว ทำการบันทึกภาพที่กำลังขยาย 40x แล้วนำภาพมาแปลงเป็นภาพขาวดำ เพื่อนำภาพไปตกแต่งหรือแก้ไข artifact ด้วยโปรแกรม Photoshop เพื่อลด error ในการคำนวณค่าต่างๆ ดังในรูป 9



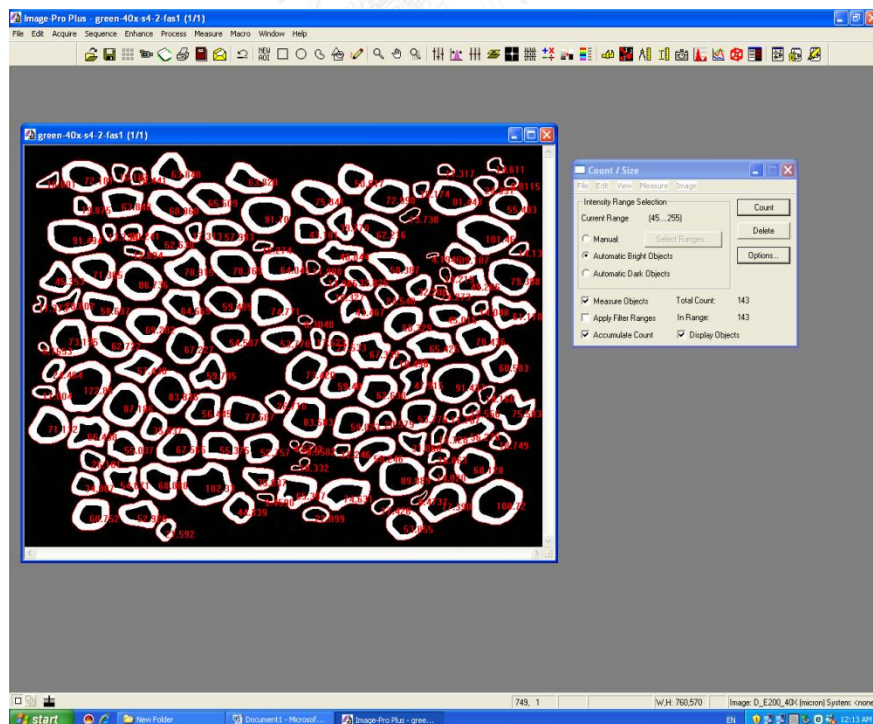
รูป 9 แปลงภาพให้เป็นขาว-ดำ เพื่อนำไปลบ artifact ในโปรแกรม photoshop

จากนั้นเปิดโปรแกรม image Pro plus นำภาพที่แก้ไขเสร็จแล้วใน photoshop มา คำนวณหาค่าต่างๆดังต่อไปนี้

1. Axon diameter คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ axon
2. Fiber diameter คือ เส้นผ่านศูนย์กลางของ myelinated nerve fiber
3. Myelin thickness คือ ความหนาของปลอก myelin คำนวณได้จากเส้นผ่านศูนย์กลางของ myelinated nerve fiber ลบด้วยเส้นผ่านศูนย์กลางของ axon แล้วหาร 2
4. G ratio คือ สัดส่วนระหว่าง axon diameter ต่อ fiber diameter
5. Total number of nerve fiber คือ จำนวน myelinated nerve fiber ทั้งหมดในเส้นประสาท โดยคำนวณจากสูตรข้างล่างดังนี้

$$\text{จำนวน fiber ทั้งหมดในเส้นประสาท} = \frac{\text{จำนวน fiber ในทุกกรอบหน้าต่าง} \times \text{total fascicular area ของทุก fascicle}}{\text{พื้นที่ของทุกกรอบหน้าต่าง}}$$

6. Nerve fiber density คือ total number of nerve fiber หาร total fascicular area ของทุก fascicle

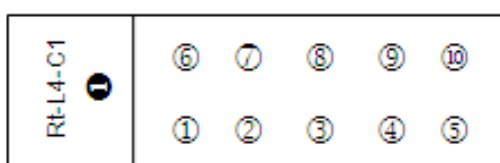


รูป 10 แสดงการหาค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ด้วยโปรแกรม Image – Pro Plus

การศึกษาโครงสร้างของปมประสาทไขสันหลังในระดับ L4 (DRG morphometry)

การนับจำนวนเซลล์ใน dorsal root ganglion (DRG)

1. นำ DRG ที่ฝังอยู่ใน plastic block มาตัดด้วยเครื่อง ultramicrotome ที่ความหนา 2 μm โดยเริ่มเก็บ section แรกที่เริ่มเห็นเซลล์ใน DRG เรียงลำดับไปจนถึง section สุดท้าย โดยนำ section ที่ตัดมาวางบนสไลด์ให้ได้ 10 section ต่อสไลด์ 1 แผ่น โดยเรียงลำดับดังในรูป 11



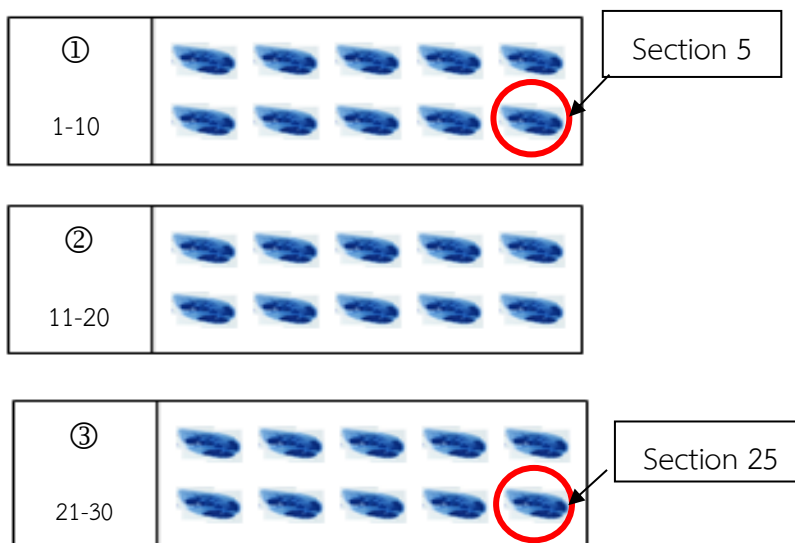
รูป 11 แสดงการเรียงลำดับของ section

2. นำสไลด์ที่มี section มาวางบน hotplate อุณหภูมิ 60-90 $^{\circ}\text{C}$ ประมาณ 3-4 นาที จนแห้งสนิท

3. แล้วทำการย้อมด้วย toluidine blue ซึ่งจะติดสีฟ้าที่ cytoplasm และสีน้ำเงินเข้มที่ nucleolus ของเซลล์ประสาทใน DRG

4. หลังจากนั้น ควรตากสไลด์ขึ้นเนื้อตัวอย่างที่ย้อมแล้วให้แห้งสนิท แล้วนำมาปิด cover slip

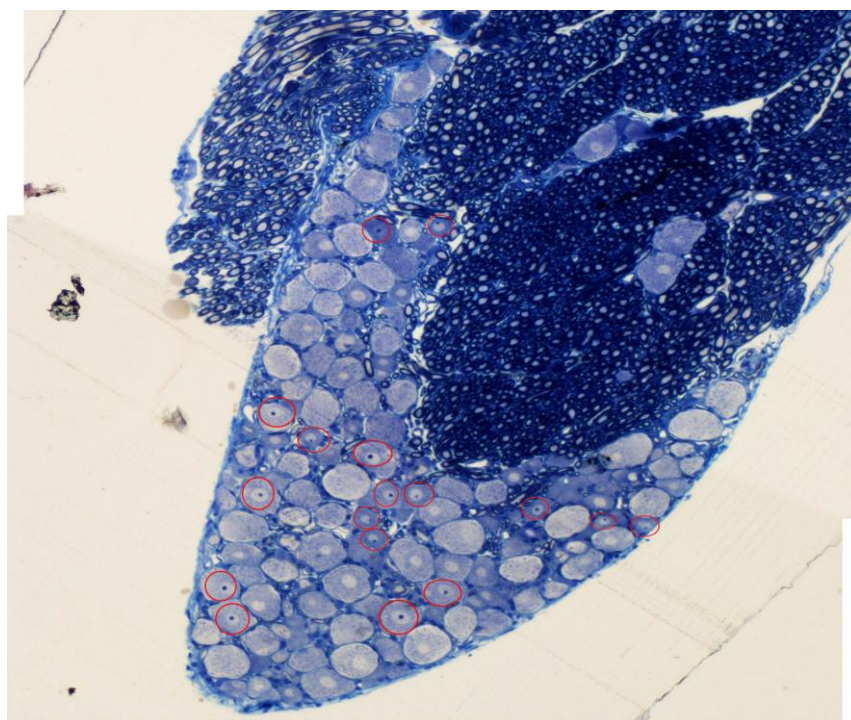
5. จากนั้น ทำการสุ่มเลือก section ที่จะทำการนับเซลล์ประสาท โดยสุ่มเลือกหมายเลข section แรกจาก 1-10 จากนั้นเลือกในตำแหน่งถัดไปโดยห่างจากตำแหน่งที่ได้จากการสุ่มครั้งแรก 20 section (เทียบเป็นความหนาเท่ากับ 40 μm) เช่น การสุ่มที่ 5, 25, 45, 65,..... เป็นต้น (รูป 12) เพื่อป้องกันการนับเซลล์ประสาทซ้ำเซลล์เดียวกัน 2 ครั้ง



รูป 12 แสดงการส้อม section ที่จะนำไปนับจำนวนเซลล์ใน DRG

6. จากนั้นเก็บภาพ section ที่ส้อมเลือกด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10x แล้วนำภาพเข้าสู่คอมพิวเตอร์ผ่านกล้องถ่ายรูปที่ติดอยู่ แล้วใช้โปรแกรม photoshop นับจำนวนเซลล์ประสาทจาก section ที่ส้อมเลือกทั้งหมดโดยนับเซลล์ประสาทเมื่อปรากฏ nucleus และ nucleolus ชัดเจน (รูป13) นำค่าที่ได้ไปแทนค่าในสูตรต่อไปนี้เพื่อคำนวณหาจำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG ระดับนั้น

$$\text{จำนวนเซลล์ประสาททั้งหมดใน DRG} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ประสาทในทุก section ที่ส้อม} \times \text{จำนวน section ทั้งหมด}}{\text{จำนวน section ที่ได้รับการส้อม}}$$

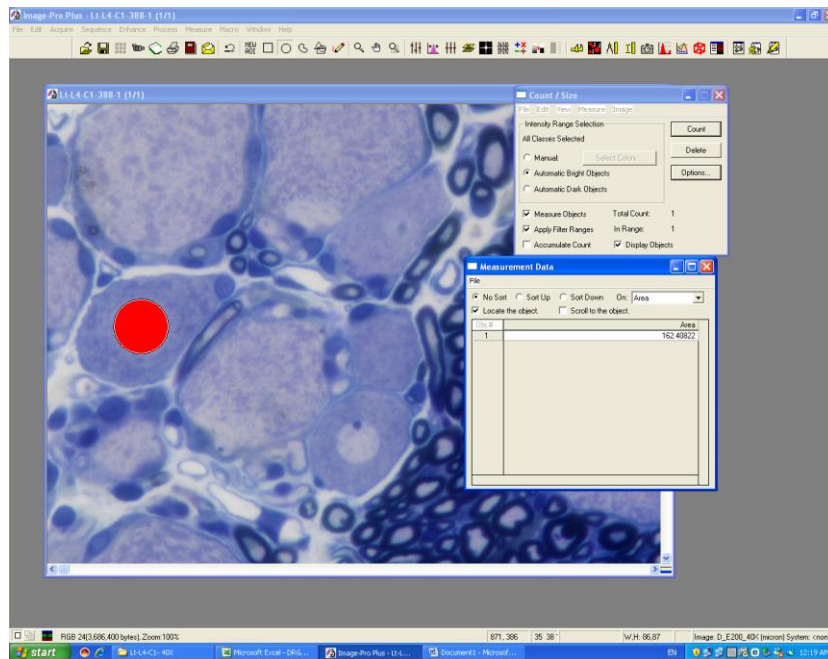


รูป 13 แสดงภาพการนับจำนวนเซลล์ประสาทของ section DRG ที่กำลังขยาย 10X

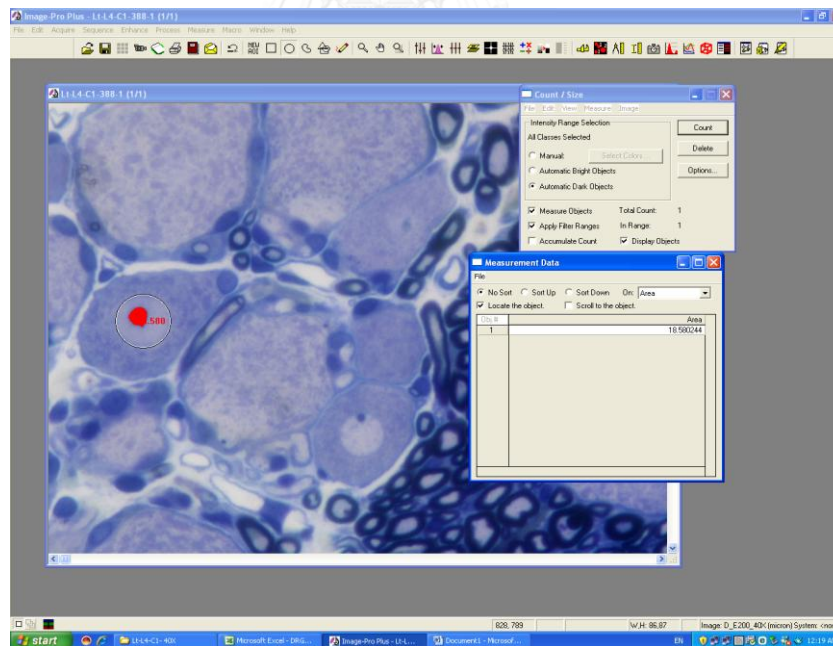
การวัดพื้นที่ของ nucleus และ nucleolus

นำสไลด์ DRG มาเก็บภาพที่กำลังขยาย 40x โดยใช้โปรแกรม Image-Pro plus เก็บภาพจากสไลด์ที่เลือกแบบสุ่มให้กระจายทั่ว DRG จนได้จำนวนเซลล์ครบ 300 เซลล์ต่อ 1 DRG แล้ววัดขนาดของ DRG โดยใช้โปรแกรม Image Pro plus ในการลากเส้นรอบ nucleus และ nucleolus เพื่อนำมาคำนวณ nuclear และ nucleolar area เมื่อวัดครบแล้วนำข้อมูลมาหาค่าเฉลี่ย (รูป 14)

A.



B.



รูป 14 แสดง morphometry ของ DRG ที่กำลังขยาย 40x เพื่อวัดพื้นที่ของ nucleus และ nucleolus โดยใช้โปรแกรม Image Pro plus : A. คือ ภาพแสดงการลากเส้นรอบ nucleus เพื่อคำนวณหาค่า nuclear area และ B. คือ ภาพแสดงการลากเส้นรอบ nucleolus เพื่อคำนวณหาค่า nucleolar area

9. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

เปรียบเทียบ ค่าเฉลี่ยของ hot plate test, ค่าMNCV , จำนวนเซลล์และพื้นที่ของ nucleus, nucleolus ของเซลล์ประสาทใน DRG และค่าต่างๆ ของ nerve mophometry ระหว่างกลุ่มต่างๆ ด้วยการใช้การวิเคราะห์ทางสถิติ one-way ANOVA โดยถือความแตกต่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อ $p < 0.05$

10. จริยธรรม (Ethical consideration)

โครงการนี้ต้องผ่านการรับรองจากคณะกรรมการดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยก่อนเริ่มดำเนินการวิจัยในสัตว์และผู้วิจัยได้ทำตาม จริยธรรมการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติอย่างเคร่งครัด

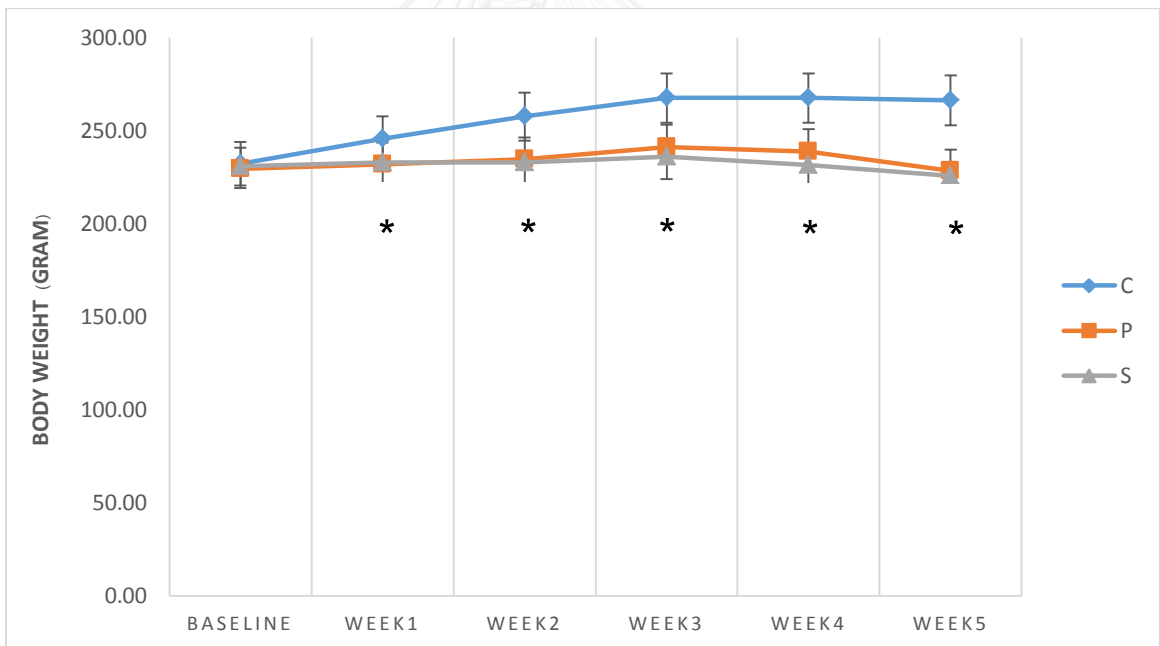


บทที่ 4 ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การทดลอง

1. น้ำหนักตัวหนู

น้ำหนักตัวเฉลี่ยของหนูตลอดการทดลอง ทั้งในกลุ่ม C, P และ S แสดงใน ภาพที่ 4.1 โดยที่ baseline น้ำหนักตัวของหนูทั้งสามกลุ่มมีค่าไม่แตกต่างกัน จนมาถึงสัปดาห์ที่ 2 ถึงสัปดาห์ที่ 5 น้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม C มีค่าเพิ่มขึ้น ขณะที่น้ำหนักตัวของหนูกลุ่ม P และกลุ่ม S มีค่าไม่เพิ่มขึ้น ทำให้อัตราการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัวน้อยกว่ากลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบน้ำหนักตัวของหนูระหว่างกลุ่ม P และกลุ่ม S พบว่า ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า cisplatin มีผลทำให้น้ำหนักตัวลดลง และ curcumin ไม่มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักตัว



รูป 15 แสดงการเปลี่ยนแปลงน้ำหนักเฉลี่ยของหนูทั้งสามกลุ่มตลอดการทดลอง, ค่าที่แสดงเป็น mean \pm SEM, * $p < 0.001$ C vs. P, C vs. S

2. การวัดการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหนูด้วย hot plate test

ค่า thermal threshold ของหนูตลอดการทดลอง ทั้งในกลุ่ม C, P และ S แสดงในตาราง 1 พบว่าการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหลังของหนูในช่วง baseline ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในช่วงสิ้นสุดการทดลองนี้ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า thermal threshold ของกลุ่ม P และ S มีค่ามากกว่ากลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบ thermal threshold ระหว่างกลุ่ม P และ S พบว่า กลุ่ม S มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม P เล็กน้อย สรุปได้ว่า cisplatin ส่งผลทำให้เกิดการสูญเสียต่อการรับความรู้สึกร้อนที่เท้าหลังของหนู และ curcumin ไม่มีผลต่อภาวะนี้

ตาราง 1 แสดงค่า thermal threshold ที่เท้าหลังของหนู โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

Groups	Thermal threshold (Sec.)	
	Baseline	End
Control (C)	16.2 ± 0.8	10.2 ± 0.7
Cisplatin (P)	16.2 ± 0.8	15.8 ± 0.5 ^a
Cisplatin+curcumin (S)	17.4 ± 0.3	14.4 ± 0.4 ^b

โดย ^a คือ $p < 0.001$ เมื่อ C vs. P และ ^b คือ $p < 0.01$ เมื่อ C vs. S

3. การวัดความเร็วการนำกระแสประสาทที่เส้นประสาท sciatic

ค่า sciatic motor NCV ของหนูทั้งสามกลุ่ม แสดงในตาราง 2 พบว่า ในช่วง baseline ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในช่วงสิ้นสุดการทดลองนี้ในสัปดาห์ที่ 5 พบว่า NCV ของกลุ่ม P และ S มีค่าน้อยกว่ากลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบค่า NCV ระหว่างกลุ่ม P และ S พบว่า ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สรุปได้ว่า cisplatin มีผลทำให้ค่า motor NCV ของ sciatic n.ลดลง และ curcumin ไม่มีผลต่อความผิดปกตินี้

ตาราง 2 แสดงค่า sciatic motor NCV ของหนู โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

Groups	Sciatic motor NCV (m/s)	
	Baseline	End
Control (C)	48.6 ± 4.4	64.7 ± 2.2
Cisplatin (P)	48.8 ± 4.1	36.4 ± 1.4 ^a
Cisplatin+curcumin (S)	51.9 ± 3.2	41.5 ± 2.4 ^a

โดย^a คือ $p < 0.001$ เมื่อ C vs. P, C vs. S

4. การศึกษาโครงสร้างของเส้นประสาท (nerve morphometry)

พบว่าในกลุ่ม P มีค่า axon diameter และ myelin thickness ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม C (ตาราง 3) นอกจากนี้ยังมีค่า fiber density เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่ม C และ S ส่วนจำนวน fiber นั้นมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติสรุปได้ว่า cisplatin ทำให้เกิดการลดลงของขนาด axon และมีผลต่อการบางลงของ myelin sheath แต่กลับทำให้ fiber มีจำนวนและความหนาแน่นมากขึ้น

สำหรับกลุ่ม S พบว่าค่า axon diameter และ fiber density มีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่ม C แต่มีค่า myelin thickness ที่น้อยกว่ากลุ่ม C อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนจำนวน fiber มีแนวโน้มลดลงเทียบกับกลุ่ม C และโดยเฉพาะกลุ่ม P ที่มีนัยสำคัญ สรุปได้ว่า การให้ curcumin สามารถป้องกันการฝ่อของขนาด axon และความหนาแน่นของ fiber ที่เพิ่มขึ้นจากภาวะดังกล่าวได้ แต่ไม่มีผลต่อการบางลงของ myelin sheath และกลับทำให้จำนวน fiber ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม P

ตาราง 3 แสดงข้อมูล nerve morphometry ของหนูทั้งสามกลุ่ม โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

Groups	Axon diameter (µm)	Myelin thickness (µm)	g ratio	Fiber density (/mm ²)	No. of fibers
Control (C)	3.33 ± 0.04	1.27 ± 0.03	0.59 ± 0.01	18,950.0 ± 394.4 ^c	9,167 ± 186
Cisplatin (P)	3.06 ± 0.03 ^a	1.15 ± 0.01 ^b	0.58 ± 0.01	21,172.2 ± 886.7	9,813 ± 214
Cisplatin + Curcumin (S)	3.38 ± 0.02	1.15 ± 0.02 ^b	0.60 ± 0.01	17,961.1 ± 260.5 ^d	8,556 ± 119 ^e

โดย ^a คือ $p < 0.001$ vs. C และ S, ^b คือ $p < 0.01$ vs. C, ^c คือ $p < 0.05$ vs. P, ^d คือ $p < 0.01$ vs. P, และ ^e คือ $p < 0.01$ vs. P

5. การศึกษาโครงสร้างของปมประสาทไขสันหลังในระดับ L4 (DRG morphometry)

การวัดขนาด nucleus และ nucleolus ของทั้งสามกลุ่มดังตาราง 4 พบว่า ในกลุ่ม P และ S มีขนาดลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม C และเมื่อเทียบระหว่างกลุ่ม P กับ S พบว่าขนาด nucleus และ nucleolus ของกลุ่ม S นั้นมีค่ามากกว่ากลุ่ม P อย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน ในส่วนของการนับจำนวนเซลล์ปมประสาทไขสันหลัง พบว่า กลุ่ม P และ S มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่ม C โดยที่ค่าของกลุ่ม P และ S ไม่แตกต่างกัน สรุปได้ว่า cisplatin ทำให้เกิดการหดตัวของ nucleus และ nucleolus ของเซลล์ประสาท และทำให้เกิดการสูญเสียจำนวนเซลล์ปมประสาทไขสันหลัง ในระดับ L4 และ curcumin สามารถลดการหดตัวของเซลล์ประสาทจากภาวะดังกล่าวได้บางส่วน แต่ไม่มีผลต่อการลดจำนวนเซลล์ปมประสาทไขสันหลัง

ตาราง 4 แสดงข้อมูล L4 DRG morphometry โดยค่าที่แสดงเป็น mean±SEM

Groups	Nuclear area (µm ²)	Nucleolar area (µm ²)	No. of DRG neuron
Control (C)	136.8 ± 1.3	13.7 ± 0.1	21,760 ± 358
Cisplatin (P)	112.6 ± 1.3 ^a	11.1 ± 0.1 ^a	18,318 ± 1,095 ^d
Cisplatin + Curcumin (S)	125.0 ± 1.5 ^b	11.9 ± 0.2 ^c	17,804 ± 844 ^d

โดย ^a คือ $p < 0.001$ vs. C, ^b คือ $p < 0.001$ vs. C และ P, ^c คือ $p < 0.01$ vs. C และ P, ^d คือ $p < 0.05$ vs. C

บทที่ 5

สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

ภาวะ cisplatin neuropathy จะเกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทส่วนปลาย โดยเฉพาะความเสียหายด้านหน้าที่และโครงสร้าง การศึกษานี้ต้องการดูผลของ curcumin ขนาด 500 mg/kg/day ต่อความผิดปกติด้านหน้าที่และโครงสร้างของระบบประสาทส่วนปลายในหนูที่ได้รับยา cisplatin ขนาดสะสม 20 mg/kg ใน 5 สัปดาห์ จากผลการทดลองแสดงว่าน้ำหนักของหนูที่ได้รับ cisplatin ลดลง เมื่อเทียบกับหนูควบคุม ซึ่งแสดงถึงภาวะ general toxicity ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่าน [28-30, 32-34] และ curcumin ไม่มีผลต่อการลดลงของน้ำหนักตัว ข้อมูลนี้สอดคล้องกับผลการทดลองก่อนหน้านี้ของผู้วิจัย (งานวิจัยที่ไม่ได้ตีพิมพ์) รวมถึงการศึกษาของ Al Moundhari และคณะในปี 2012 [84] ก็พบว่า หนูในกลุ่มที่ได้รับ cisplatin ร่วมกับ curcumin ไม่มีผลต่อภาวะนี้ ดังนั้นผลของ curcumin ต่อระบบประสาทที่จะอภิปรายต่อไปนี้จึงไม่น่าจะเกิดจากการลด general toxicity ของ cisplatin

สำหรับการรับรู้สึกร้อนที่ฝ่าเท้าหลังของหนู พบว่า cisplatin ทำให้การรับรู้สึกร้อนช้าลงจากการที่ค่า threshold เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้า [28-34] และ ในกลุ่มที่ได้ cisplatin ร่วมกับ curcumin พบว่า ค่า threshold ยังคงสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ เพียงแต่ระดับนัยสำคัญน้อยกว่ากลุ่มที่ได้ cisplatin อย่างเดียว ซึ่งการทำ behavioral test นี้มีความผันแปรมากเพราะขึ้นกับสิ่งแวดล้อมและพฤติกรรมของหนูเองในแต่ละช่วงเวลา ซึ่งในการศึกษาของ Al Moundhari และคณะ [84] ก็พบความผันแปรที่มากจนความแตกต่างไม่มีนัยสำคัญเช่นกัน ดังนั้นจึงยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า curcumin มีผลต่อความผิดปกติจากภาวะนี้หรือไม่ จำเป็นต้องมีการทดสอบยืนยันเพิ่มเติมต่อไป

ในการทดลองวัดความเร็วการนำกระแสประสาท motor ที่เส้นประสาท sciatic (sciatic motor NCV) พบว่า cisplatin มีผลทำให้ค่า motor NCV ของ sciatic n. ลดลง ซึ่งจากงานวิจัยที่ผ่านมา ก็พบว่า cisplatin ทำให้ค่า motor NCV ลดลง ในกรณีที่ใช้ปริมาณยา cisplatin ที่สูง [34, 35] และ curcumin ไม่มีผลต่อความผิดปกติดังกล่าว โดยค่าในกลุ่มนี้มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญ ผลการทดลองข้างต้นน่าจะบ่งชี้ว่าการรักษาความผิดปกติภาวะนี้ของ cisplatin ด้วย curcumin อาจต้องใช้ระยะเวลาเพิ่มขึ้น

ในการทำ nerve morphometry พบว่า cisplatin ทำให้เกิดการลดลงของ axon diameter และ myelin thickness ในหนูที่ได้ cisplatin เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ข้อมูลนี้ตรงกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [34] ในหนูกลุ่มที่ได้ curcumin มีขนาด axon กลับไปเท่ากับกลุ่มควบคุม ไม่มีผลต่อการบางลงของ myelin thickness ซึ่งสามารถอธิบาย motor NCV ที่ไม่ดีขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

ได้ ซึ่งการบางลงของ myelin sheath นี้้อาจเกิดจาก cisplatin toxicity ต่อ schwann cell แต่ต่างกับรายงานของ Al Moundhari และคณะ ที่พบว่า curcumin มีผลดีต่อการบางลงของ myelin [84] นอกจากนี้ในกลุ่ม cisplatin ยังมีค่า fiber density ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย curcumin สามารถลดการเพิ่มขึ้นของ fiber density จนไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม โดยกลไกที่ทำให้ fiber density เพิ่มขึ้นยังไม่ทราบแน่ชัด แต่อาจเกิดจากขนาดของ axon ที่ลดลงทำให้ axon อยู่ชิดกันมากขึ้น ดังนั้นจึงเห็นได้ว่า curcumin น่าจะมีผลดีต่อโครงสร้างของเส้นประสาทอย่างน้อยในเรื่องขนาดของ axon และ fiber density ในการศึกษาของ Mendonca และคณะที่แสดงว่า curcumin สามารถลดผลเสียของ cisplatin ต่อการงอกใหม่ของ neurite ในเซลล์ประสาท [85] ช่วยยืนยันผลดีต่อเส้นประสาท อย่างไรก็ตามมีข้อสังเกตในเรื่องจำนวนของ nerve fiber ที่ลดลงในกลุ่ม cisplatin + curcumin ในศึกษานี้ สาเหตุยังไม่ทราบชัด แต่อาจเกิดจากความผันแปรของข้อมูลที่ค่อนข้างมากโดยดูจาก standard error of mean (SEM)

ในการทำ L4 DRG morphometry พบว่า cisplatin ทำให้ขนาด nucleus และ nucleolus ของเซลล์ประสาทลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ผ่านมา [28, 29, 33, 34, 37, 38, 40] นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มที่ได้รับ cisplatin มีการลดลงของจำนวนเซลล์ปมประสาทไขสันหลังเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสอดคล้องกับการศึกษาก่อนหน้านี้ [34, 39] ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า เนื่องจาก DRG อยู่นอก blood-brain barrier และเลี้ยงด้วยหลอดเลือดฝอยชนิดที่มีผนังรูพรุน (fenestrated capillary) ดังนั้นยา cisplatin ในเลือดสามารถผ่านเข้าสู่ DRG ได้โดยตรง [3] จึงทำให้พบ cisplatin สะสมใน DRG มากกว่าเส้นประสาท ไขสันหลังและสมอง [9, 15] จึงทำให้เกิดความเสียหายต่อ DNA ใน DRG neuron ทำให้ cell cycle มีความผิดปกติ โดยผ่านกลไก re-entry ของ cell cycle ส่งผลทำให้เกิด apoptosis ของ DRG neuron [16, 17] การศึกษานี้พบว่า curcumin สามารถลดการหดตัวของเซลล์ประสาทจากภาวะดังกล่าวได้บางส่วน แต่ไม่ได้ช่วยการลดลงของจำนวนเซลล์ปมประสาทไขสันหลังจาก cisplatin โดยข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Mendonca และคณะแสดงให้เห็นว่า curcumin ไม่ช่วยเพิ่มการรอดของเซลล์ประสาท PC12 ที่ลดลงจาก cisplatin [85]

ผลดีของ curcumin ต่อโครงสร้างเส้นประสาทและปมประสาทบางส่วนนี้อาจเกิดจากฤทธิ์ antioxidant ของ curcumin เพราะมีการพบภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มขึ้นจาก cisplatin ซึ่งสอดคล้องกับจากงานวิจัยที่ผ่านมาของ Melli และคณะ ที่พบว่า DRG neuron ที่ได้รับ cisplatin จะเกิดความเสียหายต่อ mitochondria ซึ่งเป็นผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เพิ่มมากขึ้น [51] ซึ่งสามารถอธิบายได้ว่า cisplatin สามารถจับกับ mitochondrial DNA และทำให้เกิดความเสียหายเช่นเดียวกับ nuclear DNA ของ neuron ส่งผลให้การทำงานของ mitochondrial ผิดปกติไป เป็นผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress เพิ่มมากขึ้น และจากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าการใช้

antioxidant ตัวอื่นๆ มีผลดีต่อการลดภาวะ cisplatin neuropathy ทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง เช่น vitamin C [52], vitamin E [53, 54] และ glutathione [55, 56] ดังนั้น curcumin ที่เป็น antioxidant ด้วย ก็น่าจะอาศัยกลไกเดียวกัน แต่อย่างไรก็ตามควรมีการพิสูจน์และวัดระดับ oxidative stress ว่าลดลงจริงหรือไม่หลังได้ curcumin สำหรับ curcumin ถึงแม้ว่าจะช่วยป้องกันความผิดปกติทางโครงสร้างของเส้นประสาทและปมประสาทได้ แต่ไม่ได้ช่วยในเรื่องการคืนหน้าที่ของเส้นประสาท จากการที่ myelin sheath บางลงและจำนวน DRG neuron ที่ยังลดลงอยู่ แม้ได้ curcumin ไปแล้ว ตรงนี้สอดคล้องกับ MNCV และ thermal threshold ที่ยังดีขึ้นไม่ชัดเจน

ข้อสรุปการทดลอง

1. Curcumin มีแนวโน้มที่จะลดความผิดปกติในการรับรู้สีกและการนำกระแสประสาท สิ่งการที่ขาหลัง จากยา cisplatin ได้
2. Curcumin มีผลดีต่อโครงสร้างของเส้นประสาท เช่น สามารถป้องกันการฝ่อของขนาด axon และ ป้องกัน fiber density ที่เพิ่มขึ้นจากยา cisplatin ได้อย่างมีนัยสำคัญ
3. Curcumin มีผลดีต่อโครงสร้างของปมประสาท เช่น สามารถลดการหดตัวของ nucleus และ nucleolus ในเซลล์ปมประสาทไขสันหลังจากยา cisplatin ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ข้อเสนอแนะ

ควรต้องมีการศึกษาต่อไปเพื่อพิสูจน์ผลของ curcumin ต่อ cisplatin neuropathy โดยอาจต้องทดสอบ curcumin ในขนาดที่สูงขึ้นและขยายเวลาการรักษาให้นานขึ้น รวมทั้งวัดภาวะ oxidative stress ในเส้นประสาทโดยตรง

รายการอ้างอิง

1. Rosenberg, B., et al., *The inhibition of growth or cell division in Escherichia coli by different ionic species of platinum (IV) complexes*. The Journal of Biological Chemistry, 196: p. 1347–1352.
2. Mollman, J.E., *Cisplatin Neurotoxicity*. The new england journal of medicine, 1990. 322: p. 126–127.
3. Windebank, A.J. and W. Grisold, *Chemotherapy-induced neuropathy*. Journal of Peripheral Nervous System, 2008. 13: p. 27–46.
4. Cavaletti, G. and P. Marmiroli, *Chemotherapy-induced peripheral neurotoxicity*. Nature Reviews Neurology, 2010. 6: p. 657–666.
5. Ishida, S., et al. *Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals*. in *The National Academy of Sciences of the United States of America*. 2002.
6. El-Khateeb, M., et al., *Reactions of cisplatin hydrolytes with methionine, cysteine, and plasma ultrafiltrate studied by a combination of HPLC and NMR techniques*. Journal of Inorganic Biochemistry, 1999. 77: p. 13–21.
7. Jamieson, E.R., et al., *Structure, Recognition, and Processing of Cisplatin-DNA Adducts*. Chemical Reviews, 1999. 99: p. 2467–2498.
8. Ta, L.E., et al., *Neurotoxicity of oxaliplatin and cisplatin for dorsal root ganglion neurons correlates with platinum-DNA binding*. Neurotoxicology, 2006. 27: p. 992–1002.
9. McDonald, E.S., et al., *Cisplatin preferentially binds to DNA in dorsal root ganglion neurons in vitro and in vivo: A potential mechanism for neurotoxicity*. Neurobiology of Disease, 2005. 18: p. 305–313.
10. Arany, I. and R.L. Safirstein, *Cisplatin nephrotoxicity*. Seminars in Nephrology, 2003. 23: p. 460–464.
11. Brock, P.R., et al., *Cisplatin ototoxicity in children: a practical grading system*. Medical and Pediatric Oncology, 1991. 19: p. 295–300.

12. Wong, E. and C.M. Giandomenico, *Current status of platinum-based antitumor drugs*. Chemical Reviews, 1999. 99: p. 2451–2466.
13. Laurell, G. and U. Jungnelius, *High-dose cisplatin treatment: hearing loss and plasma concentrations*. The Laryngoscope, 1990. 100: p. 724–734.
14. Simon, T., et al., *The incidence of hearing impairment after successful treatment of neuroblastoma*. Klinische. Padiatrie, 2002. 214: p. 149–152.
15. Dzagnidze, A., et al., *Repair capacity for platinum-DNA adducts determines the severity of cisplatin-induced peripheral neuropathy*. The Journal of Neuroscience, 2007. 27: p. 451–9457.
16. Gill, J.S. and A.J. Windebank, *Cisplatin-induced apoptosis in rat dorsal root ganglion neurons is associated with attempted entry into the cell cycle*. Journal of Clinical Investigation, 1998. 11: p. 2842–2850.
17. Fischer, S.J., et al., *Alterations in cell cycle regulation underlie cisplatin induced apoptosis of dorsal root ganglion neurons in vivo*. Neurobiology of Disease, 2001. 8(1027–1035).
18. McDonald, E.S. and A.J. Windebank, *Cisplatin-induced apoptosis of DRG neurons involves bax redistribution and cytochrome c release but not fas receptor signaling*. Neurobiology of Disease, 2002. 9: p. 220–233.
19. Scuteri, A., et al., *Role of MAPKs in platinum-induced neuronal apoptosis*. Neurotoxicology, 2009. 30: p. 312–319.
20. Russell, J.W., et al., *Effect of cisplatin and ACTH4-9 on neural transport in cisplatin induced neurotoxicity*. Brain Research, 1995. 676: p. 258–267.
21. Podratz, J.L., et al., *Cisplatin induced Mitochondrial DNA damage in dorsal root ganglion neurons*. Neurobiology of Disease, 2011. 41: p. 661–668.
22. Leonett, C., et al., *Alpha-tocopherol protects against cisplatin-induced toxicity without interfering with antitumor efficacy*. International Journal of Cancer, 2003. 104: p. 243–250.
23. Pace, A., et al., *Vitamin e neuroprotection for cisplatin neuropathy: A randomized, placebo-controlled trial*. Neurology, 2010. 74: p. 762–766.
24. Albers, J., et al., *Interventions for preventing neuropathy caused by cisplatin and related compounds*. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2007. 3.

25. Cavaletti, G., et al., *Cisplatin-induced peripheral neurotoxicity is dependent on total-dose intensity and single-dose intensity*. *Cancer*, 1992. 69: p. 203-207.
26. Krarup-Hansen, A., et al., *Examination of distal involvement in cisplatin-induced neuropathy in man. An electrophysiological and histological study with particular reference to touch receptor function*. *Brain*, 1993. 116: p. 1017-1041.
27. Krarup-Hansen, A., et al., *Neuronal involvement in cisplatin neuropathy: Prospective clinical and neurophysiological studies*. *Brain*, 2007. 130: p. 1076-1088.
28. Barajon, I., et al., *Neuropeptides and morphological changes in cisplatin-induced dorsal root ganglion neuronopathy*. *Experimental Neurology*, 1996. 138: p. 93-104.
29. Tredici, G., et al., *Experimental cisplatin neuronopathy in rats and the effect of retinoic acid administration*. *Journal of Neuro-oncology*, 1998. 36(31-40).
30. Boyle, F.M., H.R. Wheeler, and G.M. Shenfield, *Amelioration of experimental cisplatin and paclitaxel neuropathy with glutamate*. *Journal of Neuro-oncology*, 1999. 41: p. 107-116.
31. Authier, N., et al., *Assessment of allodynia and hyperalgesia after cisplatin administration to rats*. *Neuroscience Letters*, 2000. 291: p. 73-76.
32. Bárdos, G., et al., *BGP-15, a hydroxamic acid derivative, protects against cisplatin- or taxol-induced peripheral neuropathy in rats*. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003. 190: p. 9-16.
33. Öztürk, G., et al., *Effect of leukemia inhibitory factor in experimental cisplatin neuropathy in mice*. *Cytokine*, 2005. 29: p. 31-41.
34. Wongtawatchai, T., et al., *Sex-related differences in cisplatin-induced neuropathy in rats*. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 2009. 92: p. 1485-1491.
35. Verdú, E., et al., *Physiological and immunohistochemical characterization of cisplatin-induced neuropathy in mice*. *Muscle & Nerve*, 1999. 22: p. 329-340.

36. Muller, L.J., et al., *Morphological and electrophysiological study of the effects of cisplatin and ORG??2766 on rat spinal ganglion neurons*. *Cancer Research*, 1990. 50: p. 2437–2442.
37. Cavaletti, G., et al., *Morphometric study of the sensory neuron and peripheral nerve changes induced by chronic cisplatin (DDP) administration in rats*. *Acta Neuropathologica*, 1992. 84: p. 364–371.
38. Schmidt, Y., et al., *Effect of nerve growth factor on peptide neurons in dorsal root ganglia after taxol or cisplatin treatment and in diabetic (db/db) mice*. *Experimental Neurology*, 1995. 123: p. 16–23.
39. Tredici, G., et al., *Effect of recombinant human nerve growth factor on cisplatin neurotoxicity in rats*. *Experimental Neurology*, 1999. 159: p. 551–558.
40. Carozzi, V.A., P. Marmioli, and G. Cavaletti, *The role of oxidative stress and anti-oxidant treatment in platinum-induced peripheral neurotoxicity*. *Current Cancer Drug Targets*, 2010. 10: p. 670–682.
41. Finkel, T. and N.J. Holbrook, *Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing*. *Nature*, 2000. 408: p. 239–247.
42. Sayre, L.M., G. Perry, and M.A. Smith, *Oxidative stress and neurotoxicity*. *Chemical Research in Toxicology*, 2008. 21: p. 172–188.
43. Benzie, I.F., *Evolution of antioxidant defence mechanisms*. *European Journal of Nutrition*, 2000. 39: p. 53–61.
44. Padayatty, S.J., et al., *Vitamin C as an antioxidant: evaluation of its role in disease prevention*. *The Journal of American College of Nutrition*, 2003. 22: p. 18–35.
45. Kohen, R. and A. Nyska, *Invited Review: Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification*. *Toxicologic Pathology*, 2002. 30(6): p. 620–650.
46. Valko, M., et al., *Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease*. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 2007. 39: p. 44–84.
47. Dizdaroglu, M., et al., *Free radical-induced damage to DNA: Mechanisms and measurement*. *Free Radical Biology and Medicin*, 2002. 32: p. 1102–1115.

48. Hara, M., et al., *Melatonin, a pineal secretory product with antioxidant properties, protects against cisplatin-induced nephrotoxicity in rats*. *Journal of Pineal Research*, 2001. 30: p. 129–138.
49. Işeri, S., et al., *Simvastatin attenuates cisplatin-induced kidney and liver damage in rats*. *Toxicology*, 2007. 230: p. 256–264.
50. Yüce, A., et al., *Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats*. *Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology*, 2007. 101: p. 345–349.
51. Melli, G., et al., *Alpha-lipoic acid prevents mitochondrial damage and neurotoxicity in experimental chemotherapy neuropathy*. *Experimental Neurology*, 2008. 214: p. 276–284.
52. Antunes, L.M., J.D. Darin, and M.D. Bianchi, *Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study*. *Pharmacological Research*, 2000. 41: p. 405–411.
53. Pace, A., et al., *Neuroprotective effect of vitamin E supplementation in patients treated with cisplatin chemotherapy*. *Journal of Clinical Oncology*, 2003. 21: p. 927–931.
54. Argyriou, A.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*. *Supportive Care in Cancer*, 2006. 14: p. 1134–1140.
55. Cavaletti, G., et al., *Protective effects of glutathione on cisplatin neurotoxicity in rats*. *International Journal of Radiation Oncology, Biology, Physics*, 1994. 29: p. 771–776.
56. Tredici, G., et al., *Low-dose glutathione administration in the prevention of cisplatin-induced peripheral neuropathy in rats*. *Neurotoxicology*, 1994. 15: p. 701–704.
57. Anand, P., et al., *Bioavailability of curcumin: Problems and promises*. *Molecular Pharmaceutics*, 2007. 4: p. 807–818.
58. Payton, F., P. Sandusky, and W.L. Alworth, *NMR study of the solution structure of curcumin*. *Journal of Natural Products*, 2007. 70: p. 143–146.

59. Goel, A., A.B. Kunnumakkara, and B.B. Aggarwal, *Curcumin as 'Curecumin': From kitchen to clinic*. *Biochemical Pharmacology*, 2008. 75: p. 787–809.
60. Maheshwari, R.K., et al., *Multiple biological activities of curcumin: A short review*. *Life Sciences*, 2006. 78: p. 2081–2087.
61. Wilken, R., et al., *Curcumin: A review of anti-cancer properties and therapeutic activity in head and neck squamous cell carcinoma*. *Molecular Cancer*, 2011. 10: p. 12.
62. Piper, J.T., et al., *Mechanisms of anticarcinogenic properties of curcumin: The effect of curcumin on glutathione linked detoxification enzymes in rat liver*. *The International Journal Biochemistry & Cell Biology*, 1998. 30: p. 445–456.
63. Shahed, A.R., E. Jones, and D. Shoskes, *Quercetin and curcumin up-regulate antioxidant gene expression in rat kidney after ureteral obstruction or ischemia/reperfusion injury*. *Transplantation Proceedings*, 2001. 33(1): p. 2988.
64. Srimal, R.C. and B.N. Dhawan, *Pharmacology of diferuloyl methane (curcumin), a non-steroidal anti-inflammatory agent*. *The Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 1973. 25: p. 447–452.
65. Huang, M.T., et al., *Inhibitory effects of curcumin on in vitro lipoxygenase and cyclooxygenase activities in mouse epidermis*. *Cancer Research*, 1991. 51: p. 813–819.
66. Koeberle, A., H. Northoff, and O. Werz, *Curcumin blocks prostaglandin E2 biosynthesis through direct inhibition of the microsomal prostaglandin E2 synthase-1*. *Molecular Cancer Therapeutics*, 2009. 8: p. 2348–2355.
67. Hatcher, H., et al., *Curcumin: From ancient medicine to current clinical trials*. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2008. 65: p. 1631–1652.
68. Epstein, J., I.R. Sanderson, and T.T. Macdonald, *Curcumin as a therapeutic agent: the evidence from in vitro, animal and human studies*. *British Journal of Nutrition*, 2010. 103: p. 1545–1557.
69. Oda, Y., *Inhibitory effect of curcumin on SOS functions induced by UV irradiation*. *Mutation Research*, 1995. 348: p. 67–73.
70. Cole, G.M., B. Teter, and S.A. Frautschy, *Neuroprotective effects of curcumin*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 2007. 595: p. 197–212.

71. Hardy, J., *Amyloid, the presenilins and Alzheimer's disease*. Trends in Neurosciences, 1997. 20: p. 154–159.
72. Ono, K., et al., *Curcumin Has Potent Anti-Amyloidogenic Effects for Alzheimer's beta-Amyloid Fibrils In Vitro*. Journal of Neuroscience Research, 2004. 75: p. 742–750.
73. Yang, F., et al., *Curcumin inhibits formation of amyloid beta oligomers and fibrils, binds plaques, and reduces amyloid in vivo*. The Journal of Biological Chemistry, 2005. 280: p. 5892–5901.
74. Atamna, H. and K. Boyle. *Amyloid-beta peptide binds with heme to form a peroxidase: relationship to the cytopathologies of Alzheimer's disease*. in *The National Academy of Sciences of the United States of America*. 2006.
75. Jenner, P. and C. W. Olanow, *Understanding cell death in Parkinson's disease*. Annals of Neurology, 1998. 44: p. S72–S84.
76. Schapira, A.H., et al., *Mitochondria in the etiology and pathogenesis of Parkinson's disease*. Annals of Neurology, 1998. 44: p. S89–S98.
77. Zbarsky, V., et al., *Neuroprotective properties of the natural phenolic antioxidants curcumin and naringenin but not quercetin and fisetin in a 6-OHDA model of Parkinson's disease*. Free Radical Research, 2005. 39: p. 1119–1125.
78. Galvin, J.E., et al., *Neurodegeneration with brain iron accumulation, type 1 is characterized by alpha-, beta-, and gamma-synuclein*. Neuropathology, 2000. 157: p. 361–368.
79. Pandey, N., et al., *Curcumin inhibits aggregation of alpha-synuclein*. Acta Neuropathologica, 2008. 115: p. 479–489.
80. Ramaswami, G., et al., *Curcumin blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries*. Journal of Vascular Surgery, 2004. 40: p. 1216–1222.
81. Wang, Q., et al., *Neuroprotective mechanisms of curcumin against cerebral ischemia-induced neuronal apoptosis and behavioral deficits*. Journal of Neuroscience Research, 2005. 82: p. 138–148.

82. Kavaklı, H.S., C. Koca, and O. Alici, *Antioxidant effects of curcumin in spinal cord injury in rats*. *Ulusal Travma Ve Acil Cerrahi Dergisi*, 2011. 17: p. 14–18.
83. Lin, M.S., et al., *Curcumin provides neuroprotection after spinal cord injury*. *Journal of Surgical Research*, 2011. 166: p. 280–289.
84. Moundhri, M.S.A., et al., *The Effect of Curcumin on Oxaliplatin and Cisplatin Neurotoxicity in Rats: Some Behavioral, Biochemical, and Histopathological Studies*. *Journal of Medical Toxicology*, 2013. 9: p. 25–33.
85. Mendonça, L.M., et al., *Curcumin reduces cisplatin-induced neurotoxicity in NGF-differentiated PC12 cells*. *Neurotoxicology*, 2013. 34: p. 205–211.



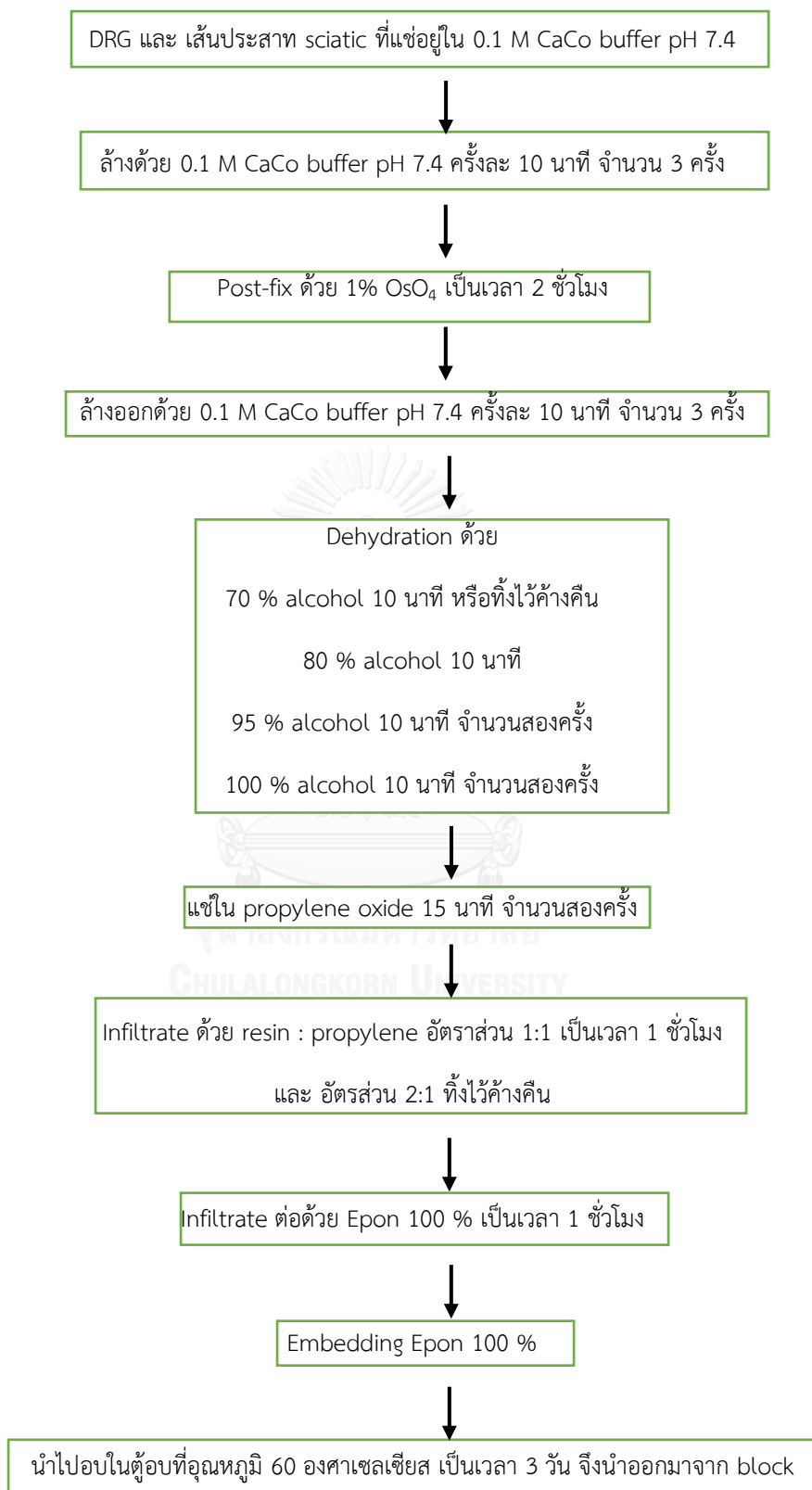


ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



Tissue processing



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

5. การเตรียม 1% para-phenylenediamine

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

6. การเตรียม Toluidine blue

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





Nerve morphometry

Group C [Control]	Axon diameter (μm)	Myelin thickness (μm)	g ratio	Fiber density ($/\text{mm}^2$)	No. of fibers
C1	3.30	1.36	0.55	17,522.8	8,670
C2	3.39	1.24	0.61	19,500.0	9,497
C3	3.43	1.23	0.60	18,666.7	9,520
C4	3.21	1.31	0.57	19,666.7	9,381
C5	3.33	1.20	0.61	19,388.9	8,765
Mean	3.33	1.27	0.59	18,950.0	9,166.5
SD	0.08	0.07	0.03	882.0	414.9
SEM	0.04	0.03	0.01	394.4	185.5

Group P [Cisplatin]	Axon diameter (μm)	Myelin thickness (μm)	g ratio	Fiber density ($/\text{mm}^2$)	No. of fibers
P1	2.98	1.18	0.57	23,694.4	10,568
P2	3.04	1.18	0.56	21,027.8	9,882
P3	3.02	1.15	0.57	18,722.2	9,378
P4	3.14	1.11	0.60	19,916.7	9,808
P5	3.10	1.12	0.60	22,500.0	9,427
Mean	3.06	1.15	0.58	21,172.2	9,812.7
SD	0.06	0.03	0.02	1,982.7	477.7
SEM	0.03	0.01	0.01	888.7	213.6

Group S [Cisplatin + curcumin]	Axon diameter (μm)	Myelin thickness (μm)	g ratio	Fiber density (/mm ²)	No. of fibers
S1	3.44	1.16	0.61	17,277.8	8,956
S2	3.43	1.12	0.61	18,250.0	8,585
S3	3.38	1.12	0.61	18,666.7	8,525
S4	3.33	1.21	0.58	17,444.4	8,502
S5	3.34	1.12	0.61	18,166.7	8,212
Mean	3.38	1.15	0.60	17,961.1	8,556.0
SD	0.05	0.04	0.01	582.5	266.0
SEM	0.02	0.02	0.01	260.5	199.0

DRG morphometry

Group C [Control]	Nuclear area	Nucleolar area	No. of DRG neuron
C1	137.63	14.03	22,513
C2	134.02	13.88	-
C3	140.12	14.46	22,182
C4	133.60	13.63	21,397
C5	139.12	13.70	20,946
Mean	136.80	13.74	21,760
SD	2.96	0.33	716.1
SEM	1.32	0.15	358.0

Group P [Cisplatin]	Nuclear area	Nucleolar area	No. of DRG neuron
P1	109.35	11.21	19,248
P2	110.28	10.70	21,894
P3	114.81	11.29	18,122
P4	111.90	11.26	15,463
P5	116.11	11.15	16,863
Mean	112.59	11.12	18,318
SD	2.90	0.24	2,447.5
SEM	1.30	0.11	1,094.6

Group S [Cisplatin + Curcumin]	Nuclear area	Nucleolar area	No. of DRG neuron
S1	123.93	12.29	15,936
S2	126.05	11.79	19,121
S3	130.39	12.41	20,033
S4	121.12	11.53	15,813
S5	123.75	11.52	18,116
Mean	125.05	11.91	17,804
SD	3.46	0.42	1,888.0
SEM	1.54	0.19	844.3

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ชันธวัช เจริญทรัพย์ เกิดวันเสาร์ที่ 14 ธันวาคม 2528 ที่อยู่ตามภูมิลำเนา 197/82
ม.4 ต.บ้านคู อ.เมือง จ.เชียงราย 57100

จบการศึกษาระดับปริญญาตรี

คณะกายภาพบำบัด

จาก

มหาวิทยาลัยหัวเฉียวเฉลิมพระเกียรติ เมื่อ

พ.ศ. 2550

