

11-1-2018

การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท

ทิพย์ธำมิตร์ โขติขนิมิจ

วีระ สุพรรณศิลป์ชัย

สัตตดาวรรณ ละเลิศ

วิลาวัลย์ จิ๋ว

ปรัชชา เรืองเวชารชัย

See next page for additional authors

Follow this and additional works at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal>

 Part of the [Medicine and Health Sciences Commons](#)

Recommended Citation

โขติขนิมิจ, ทิพย์ธำมิตร์; สุพรรณศิลป์ชัย, วีระ; ละเลิศ, สัตตดาวรรณ; จิ๋ว, วิลาวัลย์; เรืองเวชารชัย, ปรัชชา; and เลอกรองด์, ศุภางค์ มณิศรี (2018) "การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท," *Chulalongkorn Medical Journal*: Vol. 62: Iss. 6, Article 3.

Available at: <https://digital.car.chula.ac.th/clmjjournal/vol62/iss6/3>

This Article is brought to you for free and open access by the Chulalongkorn Journal Online (CUJO) at Chula Digital Collections. It has been accepted for inclusion in Chulalongkorn Medical Journal by an authorized editor of Chula Digital Collections. For more information, please contact ChulaDC@car.chula.ac.th.

การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท

Authors

กัญญาณันตร์ โชติพิณิจ, วีระ สุพรรณศิลป์ชัย, ลัดดาวรรณ ละเลิศ, วิลาวัลย์ จิ๋ว, ปรีชา เรืองเวชวารชัย, and ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์

การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท

ทิพย์ฐานันดร ชาติพิณิจ* วีระ สุพรศิลป์ชัย**
 ลัดดาวรรณ ละเลิศ* วิลาวลัย จิอุ*
 ปรีชา เรืองเวชวรชัย* ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์*

**Chotipinit T, Supronsinchai W, La-lert L, Ji-au W, Reuangwechvorachai P, le Grand SM.
 Long-term treatment with paracetamol induces cell death in cerebral cortex of rat brain.
 Chula Med J 2018 Nov – Dec;62(6): 921 - 33**

Background : *Paracetamol (APAP) is the most widely used for treatment of pain and fever. In the last decade, several studies have demonstrated the effect of the drug in several systems including the nervous system. However, the effect is still controversial.*

Objective : *The present study aimed to investigate the effects of APAP for short-term (0 and 5 days) and long-term (15 and 30 days) treatment on cell death in rat's cerebral cortex*

Methods : *In this study, adult male Wistar rats were divided into two groups: control and APAP-treated groups. In the APAP-treated group, the animals were singly intraperitoneally injected with APAP at the dose of 200 mg/kg in 0 - day. In the APAP-treated group and the once daily injection at the same dose was performed in 5, 15 and 30 days APAP-treated group, respectively. After completion of the treatment, all rats were humanely killed, and the fresh specimens were collected to determine the expression of caspase-3. While the 4% paraformaldehyde fixed samples were collected for Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay and immunohistochemical study.*

* ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
 ** ภาควิชาสรีรวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Results : *The results obtained from this study demonstrated that short-term treatment (0 and 5 days) with APAP had no effect on the caspase-3 expression and TUNEL-immunoreactive cells in the cerebral cortex. However, the results demonstrated that the expression of caspase-3 and the TUNEL-immunoreactive cells in the long-term APAP-treated groups were significantly greater than those in the control.*

Conclusion : *Based on these results, it can be suggested that short-term APAP treatment had no effect on the neurons in the cerebral cortex. However, long-term treatment with the drug can induce an increment of caspase-3 expression and neuronal cell death in this brain region.*

Keywords : *Long-term paracetamol treatment, neuronal cell death, cerebral cortex, caspase-3.*

Correspondence to: Ie Grand SM. Head, Electron Microscope Unit Department of Pathology,
Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.
E-mail: ie.grand.maneesri.s@gmail.com

Received: November 27, 2017

Revised : January 20, 2018

Accepted : March 15, 2018

ทิพย์ฐานันดร โขติพิณิจ, วีระ สุพรศิลป์ชัย, ลัดดาวรรณ ละเลิศ, วิลาวัลย์ จิ๋ว, ปรีชา เรืองเพชรชัย, ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองต์. การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2561 พ.ย. - ธ.ค.; 62(6): 921 - 33

- เหตุผลของการทำวิจัย** : ยาพาราเซตามอลเป็นยาที่ใช้บรรเทาอาการปวดและลดไข้ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย และในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาพบว่ามีหลายงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆ ของร่างกายรวมถึงระบบประสาทได้ อย่างไรก็ตามผลกระทบของการใช้ยาของพาราเซตามอลก็ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน
- วัตถุประสงค์** : เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาสั้น (0 และ 5 วัน) และในช่วงระยะเวลานาน (15 และ 30 วัน) ต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท
- วิธีการทำวิจัย** : การศึกษานี้ได้ทำการแบ่งหนูทดลองสายพันธุ์วิสตาออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดยในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลนั้นได้รับยาขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียวสำหรับกลุ่มที่ได้รับยาเป็นเวลา 0 วัน และทำการฉีดยาหนึ่งครั้งต่อวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลต่อเนื่องเป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมได้รับการฉีด 0.9% normal saline เข้าทางช่องท้องในช่วงระยะเวลาเดียวกับกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล เมื่อครบช่วงเวลาที่กำหนดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มถูกทำให้ตายอย่างสงบโดยการฉีดโซเดียมเพนโทบาร์บิทัลที่ความเข้มข้นสูงเข้าทางช่องท้อง และเก็บชิ้นเนื้อสดของสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ เพื่อทำการศึกษากการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 อีกทั้งทำการเก็บชิ้นเนื้อโดยการคงสภาพไว้ในน้ำยา 4% paraformaldehyde เพื่อนำไปศึกษาด้วยเทคนิค Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay และอิมมูโนพยาธิวิทยา
- ผลการศึกษา** : ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาสั้น (0 และ 5 วัน) ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ประสาท ในขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน (15 และ 30 วัน) กลับส่งผลให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และมีจำนวน TUNEL-immunoreactive cell เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

- สรุป** : จากการศึกษาวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ในช่วงระยะเวลาสั้นไม่ได้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ แต่การได้รับยาพาราเซตามอลในความเข้มข้นนี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลาเวลานานกลับเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ caspase-3 และมีการตายของเซลล์เพิ่มขึ้น
- คำสำคัญ** : การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน, การตายของเซลล์ประสาท, ซีรีบรัลคอร์เท็กซ์, caspase-3.

ยาพาราเซตามอลเป็นยาบรรเทาปวดและลดไข้ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากได้รับการยอมรับว่าเป็นยาที่มีความปลอดภัย อย่างไรก็ตามก็ตีจากการสืบค้นงานวิจัยพบว่าได้มีการรายงานถึงผลเสียของยาพาราเซตามอลต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น ความเป็นพิษต่อตับจากการได้รับยาพาราเซตามอลเกินขนาดหรือการได้รับยาชนิดนี้อย่างรวดเร็ว รวมถึงการได้รับยาชนิดนี้ร่วมกับการดื่มแอลกอฮอล์ด้วย^(1, 2) ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลพบว่าการเกิดความเป็นพิษของยาพาราเซตามอลต่อการทำงานของตับนั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างสารตัวกลางของยาที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) และพบว่าสารตัวกลางดังกล่าว คือ N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI)⁽³⁾

ผลจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาพบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 ในเซลล์ต่าง ๆ ของสมอง รวมทั้งเซลล์ประสาท แอสโตรไซต์ ไมโครเกลีย และเอนโดทีเลียม^(4 - 6) นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่ายาพาราเซตามอลมีคุณสมบัติในการซึมผ่านชั้น blood-brain barrier (BBB) ของสมองได้ทั้งในสัตว์ฟันแทะ (rodent) และในมนุษย์⁽⁷⁾ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ที่ภายหลังจากการกระจายตัวของยาพาราเซตามอลไปถึงระบบไหลเวียนเลือดในสมองแล้ว ยาสามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น NAPQI ได้ ซึ่งนำมาซึ่งผลกระทบต่อเซลล์ต่าง ๆ ในสมองด้วยเช่นกัน ทั้งนี้ผลงานวิจัยจากกลุ่มวิจัยหลายกลุ่มแสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถปกป้องเซลล์จากภาวะความผิดปกติต่าง ๆ ได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง และในสัตว์ทดลอง เช่น การปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)^(8 - 10) แต่ในขณะที่การศึกษาวิจัยใน พ.ศ. 2553 โดย Posadas I. และคณะ⁽⁶⁾ พบว่ายาพาราเซตามอลในขนาดที่สูงกลับทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ประสาท นอกจากนี้ผลการศึกษาของการได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ซึ่งเป็นโมเดลที่เกี่ยวข้องกับโรคปวดศีรษะไมเกรน

พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในความเข้มข้นที่ใช้ในการรักษาเป็นระยะเวลาสั้น ช่วยลดการเกิด hyperexcitation ของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ได้ แต่การได้รับยานี้เป็นระยะเวลานานกลับส่งผลตรงกันข้าม⁽¹¹⁾

จากการรวบรวมผลงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่าผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อเซลล์ประสาทยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัด โดยมีงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลนั้นสามารถส่งผลกระทบต่อเซลล์ในระบบประสาททั้งในด้านการปกป้องเซลล์ และส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ โดยในการศึกษาวิจัยนี้ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าระยะเวลาในการได้รับยาพาราเซตามอลมีบทบาทสำคัญ ในการเปลี่ยนแปลงผลกระทบของการได้รับยาต่อเซลล์ประสาท ดังนั้นเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าวผู้วิจัยจึงศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกลับเป็นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในคนแล้วถือว่าเป็นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการรักษา (1.6 กรัม/วัน)⁽¹²⁾ ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน คือ 0, 5, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ

วิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง

การศึกษานี้ใช้หนูแรท (rat) เพศผู้สายพันธุ์ Wistar จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งการใช้สัตว์ทดลองในครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่โครงการ 11/59)

การทดลองนี้แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม คือ สัตว์ทดลองกลุ่มควบคุม (N = 40) และสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล (N = 40) โดยสัตว์ทดลองทั้ง 2 กลุ่มถูกแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อย (n = 10) ดังนี้ กลุ่มสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมที่ได้รับ 0.9% normal saline (NSS) และกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0, 5, 15 และ 30 วันตามลำดับ โดยสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลนั้นได้รับยาขนาด 200 มิลลิกรัมต่อ

กิโลกรัมด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียว สำหรับกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 0 วัน และทำการฉีดยาพาราเซตามอลหนึ่งครั้งต่อวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลต่อเนื่องเป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ ส่วนสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมได้รับสารละลาย 0.9% NSS ในปริมาณเดียวกับยาพาราเซตามอลโดยการฉีดเข้าทางช่องท้องในช่วงเวลาเดียวกันกับการให้ยาพาราเซตามอล

เมื่อครบระยะเวลาที่ได้รับยาพาราเซตามอล หรือ 0.9% NSS สัตว์ทดลองทุกกลุ่มถูกทำให้ตายด้วยวิธีที่สงบด้วยการฉีดโซเดียมเพนโทบาร์บิทัลที่ความเข้มข้นสูง (60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ เพื่อทำการศึกษารายการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเทคนิค Western blotting และอิมมูโนพยาธิวิทยา (immunohistochemistry) และศึกษาการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling (TUNEL) assay

โดยมีช่วงเวลาของการเก็บตัวอย่างจากสัตว์ทดลองกลุ่มต่าง ๆ ดังนี้ สำหรับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล หรือ 0.9% NSS เป็นระยะเวลา 0 วัน ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากที่ได้รับยาพาราเซตามอล หรือ 0.9% NSS ครั้งสุดท้ายเป็นระยะเวลา 1 ชั่วโมง และสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลหรือ 0.9% NSS เป็นระยะเวลา 5, 15 และ 30 วัน ทำการเก็บตัวอย่างหลังจากที่ได้รับยาพาราเซตามอล หรือ 0.9% NSS ครั้งสุดท้ายเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาดูด้วยเทคนิค western blotting, TUNEL assay และอิมมูโนพยาธิวิทยา

สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาดูด้วยเทคนิค Western blotting นั้น สัตว์ทดลองได้ถูกทำให้ตายด้วยวิธีที่สงบ และทำการ perfuse ด้วยสารละลาย 0.1M phosphate buffer (PBS) pH 7.4 ผ่านทางหัวใจ จากนั้นทำการเก็บสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ใส่ใน Eppendorf tube แล้วจึงเคลื่อนย้ายไปใส่ในไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ก่อนนำไปเก็บที่ตู้ -80 องศาเซลเซียส จากนั้นนำมาทำการสกัดโปรตีนตามขั้นตอนของงานวิจัยก่อน

หน้า⁽¹³⁾

สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาดูด้วยเทคนิค TUNEL assay และอิมมูโนพยาธิวิทยานั้น สัตว์ทดลองได้ถูกทำให้ตายด้วยวิธีที่สงบ และทำการ perfuse ด้วยสารละลาย 0.1M PBS pH 7.4 ผ่านทางหัวใจแล้วตามด้วย 4% paraformaldehyde ที่ละลายใน 0.1M PBS pH 7.4 จากนั้นทำการตัดสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ที่ต้องการและนำไปเข้าสู่กระบวนการเตรียมตัวอย่างต่อไปตามขั้นตอนที่ระบุไว้ในงานวิจัยก่อนหน้า⁽¹³⁾

การศึกษาดูด้วยเทคนิค Western blotting

ในการศึกษาดูด้วยเทคนิค Western blotting ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม โดยโปรตีนปริมาณ 50 ไมโครกรัมที่ได้จากการสกัดจะถูกแยกด้วย 15 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และโปรตีนที่แยกได้จะถูกเคลื่อนย้ายสู่ไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน จากนั้นนำแผ่นเมมเบรนแช่ลงใน 5% bovine serum albumin (BSA) ที่ละลายใน Tris buffered saline (TBS) โดยมีส่วนผสมของ tween-20 (TBST) เป็นเวลาข้ามคืนที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส แล้วจึงบ่มเมมเบรนใน mouse anti-caspase-3 antibody (ความเข้มข้น 1:500)(#Sc-7272; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง หลังจากนั้นทำการล้างเมมเบรนด้วย TBST แล้วจึงเติม anti-mouse IgG secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) (sigma, St. Louis, Missouri, USA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วทำการล้างเมมเบรนอีกครั้งด้วย TBST จากนั้นทำการติดตามการแสดงผลของโปรตีนโดยใช้ SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kits (PIERCE biotechnology, USA) และทำการตรวจวัดค่าความหนาแน่นของแถบโปรตีนที่ได้ด้วยโปรแกรม ImageJ analysis software โดยมีการใช้ β -actin เป็น internal loading control ซึ่งผลการแสดงผลของโปรตีนได้ ถูกนำเสนอเป็นอัตราส่วนของ caspase-3 protein/ β -actin

การศึกษาทางด้านอิมมูโนพยาธิวิทยา

ในการศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม โดยขึ้นเนื้อสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ถูกตัดให้มีขนาดหน้า 5 ไมโครเมตร แล้วนำมาวางบน adhesive glass slide หลังจากนั้นนำสไลด์ขึ้นเนื้อมาผ่านกระบวนการ deparaffinization และ rehydration แล้วจึงแช่สไลด์ขึ้นเนื้อลงใน citrate buffer pH 6.0 เพื่อผ่านกระบวนการ antigen retrieval ด้วยวิธีไมโครเวฟ จากนั้นทำการแช่สไลด์ขึ้นเนื้อใน 3% hydrogen peroxide และทำการยับยั้งการเกิด non-specific binding ด้วย DAKO antibody diluent ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาที และทำการบ่มด้วย rabbit anti-caspase-3 antibody (ความเข้มข้น 1:300)(#Sc-7148; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน จากนั้นล้างด้วย DAKO wash buffer และบ่มต่อด้วย anti-rabbit secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย HRP (Dako EnVision kits, Glostrup, Denmark) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง แล้วล้างด้วย DAKO wash buffer จากนั้นทำการเติม DAB chromogen เพื่อติดตามการแสดงออกของโปรตีน ต่อมา นำสไลด์ที่ได้มาผ่านกระบวนการ dehydration จากนั้นทำการ mount และปิดสไลด์ด้วย cover-slip ซึ่งการวิเคราะห์ผลการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 จะทำโดยการนับเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลบริเวณไซโตพลาสซึม ด้วยโปรแกรม positive pixel counting algorithms (v9.1, Aperio, Vista, California, USA)

การศึกษาการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL) assay

ในการศึกษาด้วยเทคนิค TUNEL assay ใช้สัตว์ทดลองจำนวน 5 ตัวต่อกลุ่ม ขึ้นเนื้อสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ถูกตัดให้มีขนาดหน้า 5 ไมโครเมตร จากนั้นจึงนำมาวางบน adhesive glass slide หลังจากนั้นขึ้นเนื้อทั้งหมดถูกนำมาผ่านกระบวนการศึกษาการตายของเซลล์ดังขั้นตอนที่ระบุไว้ในชุดทดสอบ ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit ;S7100 เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการเตรียมชิ้นเนื้อแล้ว ทำการวิเคราะห์การตายของเซลล์โดยพิจารณาจากการติด

สีน้ำตาล บริเวณนิวเคลียสของเซลล์ และทำการนับจำนวนการตายของเซลล์ด้วยโปรแกรม Nuclear V.9 (Aperio, Vista, California, USA)

การวิเคราะห์ข้อมูล

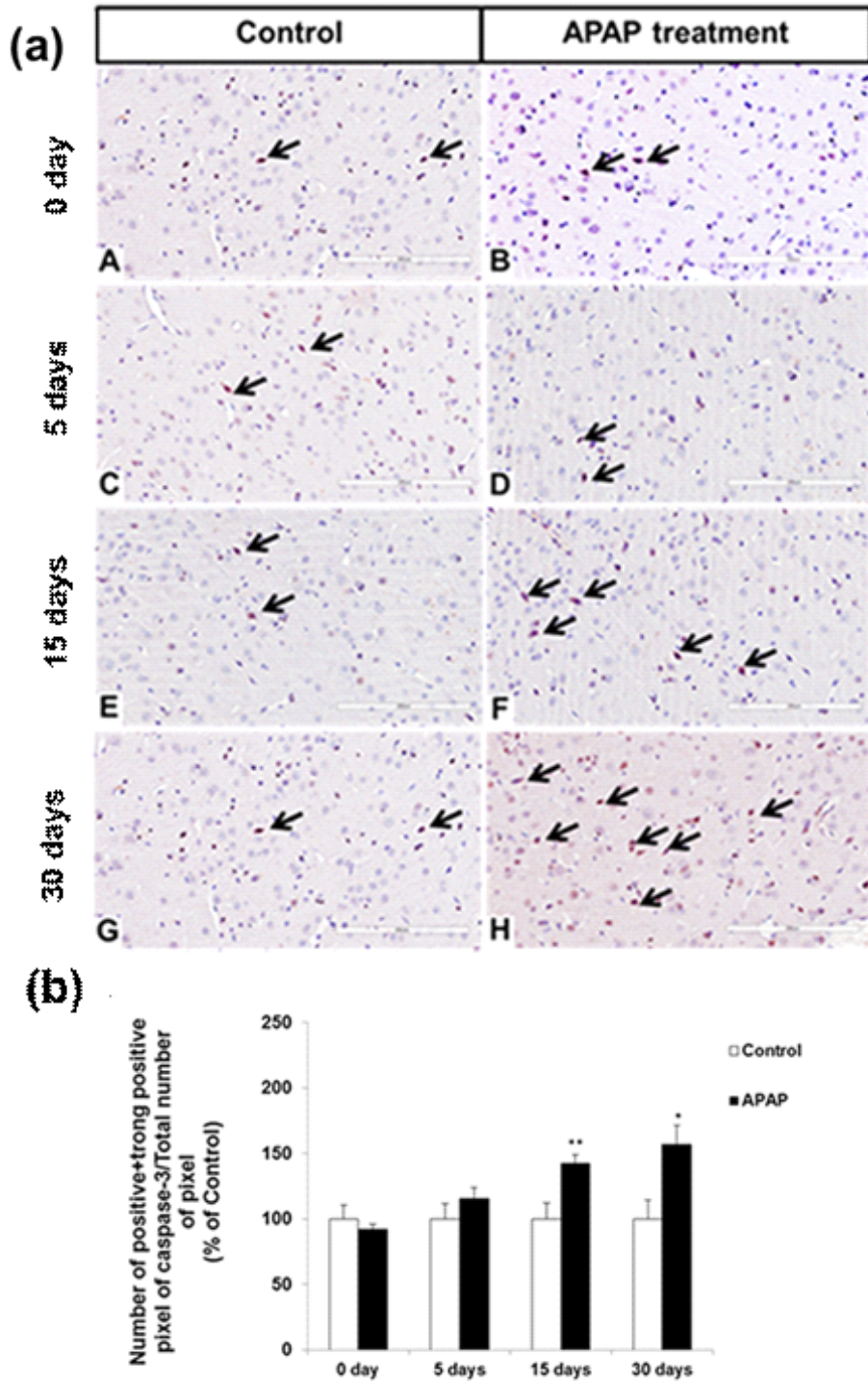
ข้อมูลทั้งหมดนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) ซึ่งในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองได้ใช้ Student's *t*-test โดยใช้โปรแกรม SPSS 22.0 และกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ผลการทดลอง

การศึกษานี้ทำการรายงานผลของการศึกษาโดยแบ่งออกเป็น 2 ช่วงระยะเวลา ดังต่อไปนี้คือ ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาสั้น (0 และ 5 วัน) และผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลานาน (15 และ 30 วัน)

ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

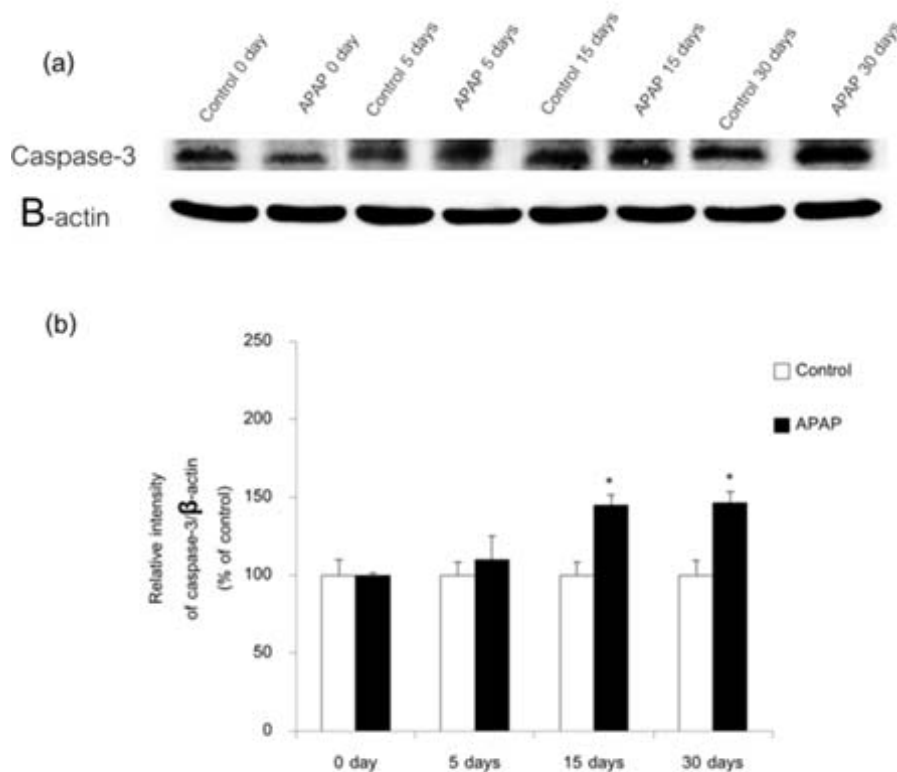
จากผลการศึกษาการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเทคนิคอิมมูโนพยาธิวิทยา พบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาสั้น มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลานานกลับพบว่าการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ภายในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 142.27 ± 6.67 VS 100.00 ± 12.13 , $P < 0.01$ และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 156.84 ± 14.15 VS 100.00 ± 14.52 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 1)



รูปที่ 1. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง (n = 5) (a) ภาพแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี (b) กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสมองบริเวณ ซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ * $P < 0.05$ และ** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผู้ศึกษาวิจัยยังได้ทำการศึกษาระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเทคนิค Western blotting และผลการศึกษายังมีความสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ที่ศึกษาด้วยเทคนิคอิมมูโนฟลูออโรสโคปี โดยผลการศึกษายังพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาสั้นมีระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลานานกลับพบว่ามีความระดับการแสดงออกของ

เอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 145.18 ± 6.28 VS 100.00 ± 8.58 , $P < 0.05$ และระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 146.68 ± 6.80 VS 100.00 ± 9.58 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 2)



รูปที่ 2. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง (n = 5) (a) ภาพแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเทคนิค Western blotting ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ (b) กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

* $P < 0.05$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์

จากผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาสั้นมีการตายของเซลล์ไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลานาน พบว่ามีการตายของเซลล์ในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (การตายของเซลล์ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 159.33 ± 4.34 VS 100.00 ± 8.58 , $P < 0.01$ และการตายของเซลล์ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 184.10 ± 9.07 VS 100.00 ± 14.90 , $P < 0.01$; ดังแสดงในรูปที่ 3)

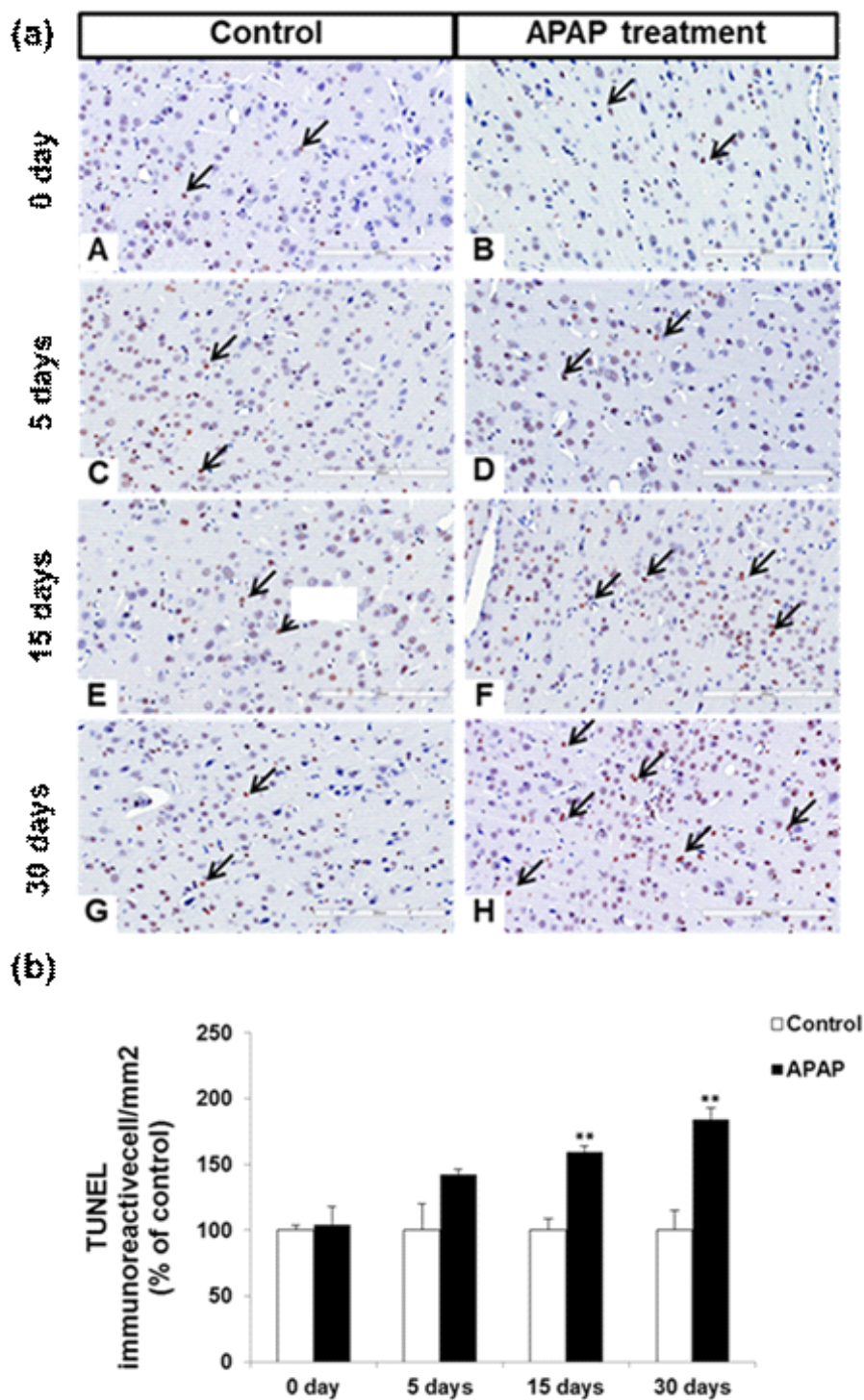
อภิปรายผล

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลกระทบต่อเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์แตกต่างกัน โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกลับเป็นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในคนแล้วถือว่ายังเป็นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการรักษา (1.6 กรัม/วัน)⁽¹²⁾ ในช่วงระยะเวลาดังนั้นไม่มีผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมอง แต่อย่างไรก็ตามหากได้รับยานี้เป็นระยะเวลานานกลับส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองโดยพบว่าการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้น

จากการศึกษาวิจัยสามารถบ่งชี้ได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาดัง (0 และ 5 วัน) ไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 และการตายของเซลล์ในสมอง จากการสืบค้นข้อมูลที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าภายหลังจากการที่ร่างกายได้รับยาพาราเซตามอลแล้ว ส่วนหนึ่งของยานี้สามารถถูกเมแทบอลิซึมด้วยเอนไซม์ CYP2E1 จะทำให้ได้สาร

ตัวกลางชนิดหนึ่ง คือ NAPQI ซึ่งสารตัวกลาง NAPQI นี้เป็นสารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ แต่สามารถถูกขจัดความเป็นพิษได้ด้วยการทำปฏิกิริยากับกลูตาไธโอนซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ในเซลล์ จึงทำให้ไม่เกิดภาวะเป็นพิษต่อเซลล์^(14, 15) ดังนั้นผลการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาดังนั้นไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์น่าจะเกิดจากการที่ตัวยาได้ถูกเปลี่ยนแปลงด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ไปเป็นสารตัวกลาง NAPQI ได้ในปริมาณที่ไม่มาก และสามารถถูกจับทำลายด้วยกลูตาไธโอนได้ทั้งหมด ซึ่งผลจากการศึกษานี้ก็ได้สนับสนุนสมมติฐานของงานวิจัยที่ผ่านมาว่าการใช้ยาในระยะเวลาที่พอเหมาะไม่ส่งผลกระทบต่อให้เกิดอันตรายต่อร่างกาย นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่บ่งชี้ว่าการได้รับยานี้ในระยะเวลาสั้นนอกจากไม่ก่อให้เกิดภาวะความเป็นพิษต่อเซลล์แล้วยังสามารถปกป้องเซลล์จากภาวะที่อันตรายได้อีกด้วย โดยจากการศึกษาของ Baliga SS. และคณะใน พ.ศ. 2553 พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถลดการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองผ่านวิถีไมโทคอนเดรียและสามารถป้องกันมิให้ไมโทคอนเดรียได้รับความเสียหายได้⁽¹⁶⁾

อย่างไรก็ตามผลการศึกษาวิจัยในกลุ่มหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน (15 และ 30 วัน) กลับพบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองและทำให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ที่เพิ่มขึ้นโดยกลไกที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องกับ การเปลี่ยนแปลงครั้งนี้ อาจเกิดจากการเพิ่มปริมาณของสาร NAPQI ในสมอง ในกรณีที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานจะทำให้มีการสังเคราะห์ NAPQI อย่างต่อเนื่องในสมองและส่งผลให้มีการคั่งค้างของสาร NAPQI อีกทั้งยังส่งผลให้มีระดับของกลูตาไธโอนลดลงไปอีกด้วย ทั้งปริมาณของ NAPQI ที่เพิ่มสูงขึ้นประกอบกับระดับกลูตาไธโอนที่ลดลงสามารถนำไปสู่การเกิดภาวะ oxidative stress ได้^(14, 15)



รูปที่ 3. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการตายเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง (n = 5)
(a) ภาพแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการตายเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ด้วยเทคนิค TUNEL assay (b) กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์
** $P < 0.01$ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

จากหลักฐานของงานวิจัยต่าง ๆ นั้นทำให้เป็นที่ยอมรับกันดีว่าการเกิดภาวะ oxidative stress สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำให้คุณสมบัติของการเป็นเยื่อเลือกผ่านของไมโทคอนเดรียถูกทำลายไป และส่งผลให้มีการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองออกมา⁽¹⁷⁾ โดยผลจากการวิจัยนี้ก็ได้สนับสนุนทฤษฎีในข้างต้น ซึ่งพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานส่งผลให้มีการตายแบบทำลายตัวเอง และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้น ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเกิดภาวะ oxidative stress โดยผลจากการวิจัยในส่วนนี้ได้สอดคล้องกับงานศึกษาวิจัยของ Posadas I. และคณะ⁽⁶⁾ ใน พ.ศ. 2553 ที่ได้รายงานไว้ว่าทั้งเซลล์ประสาทเพะเลี้ยงและหนูแรทที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่สูงเกินกว่าขนาดที่ใช้ในการรักษามีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ ในงานวิจัยของ Fakunle PB. และคณะ ในพ.ศ. 2554 ยังได้รายงานว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้มีการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัสและความเสียหายดังกล่าวที่ความรุนแรงมากยิ่งขึ้นเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลรวมกับการได้รับแอลกอฮอล์⁽¹⁸⁾

สรุป

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าระยะเวลาของการได้รับยาพาราเซตามอลถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งการได้รับยาชนิดนี้ในความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมติดต่อกันเป็นระยะเวลานานสามารถเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองเพิ่มสูงขึ้น ดังนั้นผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงน่าใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาพาราเซตามอลติดต่อกันเป็นระยะเวลานานต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษานี้ได้รับการสนับสนุนด้านงบประมาณในการทำวิจัยจากสภาวิจัยแห่งชาติ (NRCT, GB-B_60_071_30_15)

เอกสารอ้างอิง

1. Bolesta S, Haber SL. Hepatotoxicity associated with chronic acetaminophen administration in patients without risk factors. *Ann Pharmacother* 2002;36:331-3.
2. Kurtovic J, Riordan SM. Paracetamol-induced hepatotoxicity at recommended dosage. *J Intern Med* 2003;253:240-3.
3. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis* 2007;11:525-48.
4. Zimatkin SM, Rout UK, Koivusalo M, Buhler R, Lindros KO. Regional distribution of low-Km mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol Clin Exp Res* 1992;16:1162-7.
5. Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol* 2005;78:1223-32.
6. Posadas I, Santos P, Blanco A, Munoz-Fernandez M, Cena V. Acetaminophen induces apoptosis in rat cortical neurons. *PLoS One* 2010;5:e15360.
7. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *J Pharmacol Exp Ther* 1981;219:281-6.
8. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons

- from oxidative stress. *J Neuroinflammation* 2009;6:10.
9. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative stress. *Microvasc Res* 2009;77:289-96.
10. Maharaj H, Maharaj DS, Daya S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity. *Metab Brain Dis* 2006; 21:189-99.
11. Supornsilpchai W, le Grand SM, Srikiatkhachorn A. Cortical hyperexcitability and mechanism of medication-overuse headache. *Cephalalgia* 2010;30:1101-9.
12. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J* 2008;22:659-61.
13. Yisarakun W, Supornsilpchai W, Chantong C, Srikiatkhachorn A, Maneesri-le Grand S. Chronic paracetamol treatment increases alterations in cerebral vessels in cortical spreading depression model. *Microvasc Res* 2014;94:36-46.
14. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology* 2004;40:1170-9.
15. Heard KJ. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med* 2008;359:285-92.
16. Baliga SS, Jaques-Robinson KM, Hadzimichalis NM, Golfetti R, Merrill GF. Acetaminophen reduces mitochondrial dysfunction during early cerebral postischemic reperfusion in rats. *Brain Res* 2010;1319:142-54.
17. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie* 2002;84:131-41.
18. Fakunle PB, Ajibade AJ, Oyewo EB, Alamu OA, Daramola AK. Neurohistological degeneration of the hippocampal formation following chronic simultaneous administration of ethanol and acetaminophen in adult wistar rats (*Rattus norvegicus*). *J Pharmacol Toxicol* 2011;6:701-9.