



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์  
โครงการผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลง  
ของไตและปอดในหนูแรท  
(Effect of chronic paracetamol treatment on the alteration of kidney  
and lung in rat animal model)

หัวหน้าโครงการวิจัย  
ดร.วารานุรินทร์ ยิสารคุณ  
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้  
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๐  
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 2560A10802224

สัญญาเลขที่ 136/2560

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของไต  
และปอดในหนูแรท

(Effect of chronic paracetamol treatment on the alteration of kidney and  
lung in rat animal model)

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร.วรานุกรินทร์ ยีสารคุณ

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1 ตุลาคม 2559 ถึง 30 กันยายน 2560

## กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลืออย่างดีจากคณะบุคคลต่าง ๆ ดังนี้  
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ ผู้ร่วมโครงการวิจัยและที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้  
คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษาและความ  
อนุเคราะห์ในการศึกษาด้วยเทคนิคกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

คุณวิลาวัลย์ จิ๋ว ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ศึกษาด้วยเทคนิคกล้อง  
จุลทรรศน์อิเล็กตรอน

นิสิตระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาพยาบาลวิทยาภาควิภาค และสาขาวิชาชีว  
เวชศาสตร์ ที่มีส่วนร่วมในการทำงานวิจัยและรวบรวมข้อมูลในการเขียนเล่มรายงาน

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาพยาบาลวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์  
มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณ  
แผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ  
เลขที่สัญญา 136/2560

ดร.วรานูรินทร์ ยิสารคุณ  
หัวหน้าโครงการวิจัย

## บทคัดย่อ

พาราเซตามอล เป็นยาที่นิยมใช้บรรเทาอาการปวดหลายชนิด เช่น ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ และปวดท้อง เป็นต้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยและไม่ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายาพาราเซตามอลสามารถส่งผลเสีย (adverse effect) ต่อหลายอวัยวะในร่างกายแม้ใช้ในขนาดของการรักษา (therapeutic dose) ซึ่งงานวิจัยก่อนหน้านี้ คณะผู้วิจัยพบว่าผลกระทบของการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษาก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อระบบประสาทและหลอดเลือดสมอง ดังนั้น การศึกษาในครั้งนี้จึงต้องการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไตทั้งระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์การแสดงออกของสาร pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine จากเนื้อเยื่อไต ผลการศึกษาพบว่า พาราเซตามอลมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรียในท่อไตส่วนต้น และพบว่ามี การแสดงออกของ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการได้รับยานี้ และยังส่งผลให้การแสดงออกของ IL-10 ลดต่ำลง จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานทำให้เพิ่มการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มของ pro-inflammatory neuropeptide (calcitonin-gene related peptide) ระดับของ glutathione ที่เปลี่ยนแปลงไป และ toxic metabolite ของยานี้ที่ไปมีผลกระทบต่อนกระบวนการอักเสบเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานาน

## Abstract

Paracetamol (APAP) is one of most popular drugs for the treatment of fever and pain; headache, muscle pain, and stomachache, which minimal side effects. However, in the last decade, several studies have revealed the adverse effects of this drug on many organs even use at the therapeutic dose. Our previous studies demonstrated the alteration of the central nervous system and its microcirculation after treatment with long-term use of APAP. Thus, this study aimed to investigate the effect of this drug on other organs such as kidney both of ultrastructural changes and expression of pro- and anti-inflammatory cytokines. The results show that long-term use of APAP cause mitochondria swelling as well as increase the expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  in a time dependent manner compare with the controls. Conversely, APAP decrease the expression of IL-10. Therefore, the increase of pro-inflammatory cytokines after long-term treatment of APAP might be affected from the enhance of pro-inflammatory neuropeptide (calcitonin-gene related peptide) that was explored in previous study as well as abnormal level of glutathione and toxic metabolite of this drug.

## สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	3
Abstract (ไทย).....	4
Abstract (English).....	5
บทนำ.....	9
วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
ผลการศึกษาวิจัย.....	20
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.....	33
เอกสารอ้างอิง.....	36
ภาคผนวก.....	40

## สารบัญภาพ (List of illustrations)

หน้า

ภาพที่ 1	แผนภาพการแบ่งสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอล อย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของไต.....	16
ภาพที่ 2	ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไต ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน ย้อมด้วยสี H&E.....	20
ภาพที่ 3	ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไต ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน ย้อมด้วยสี H&E .....	21
ภาพที่ 4	ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไต ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน ย้อมด้วยสี H&E .....	22
ภาพที่ 5	ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ของไตบริเวณเปลือกไตส่วนนอกของ หนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน ย้อมสีด้วย Masson's Trichrome.....	23
ภาพที่ 6	ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 $\beta$ ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน .....	24
ภาพที่ 7	ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 $\beta$ ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน .....	25
ภาพที่ 8	ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 $\beta$ ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน .....	26
ภาพที่ 9	ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ TNF- $\alpha$ ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน .....	27
ภาพที่ 10	ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-10 ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0, 15, 30 วัน .....	28
ภาพที่ 11	แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ภายใน โกลเมอรูลัสของเนื้อเยื่อไตกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล .....	29
ภาพที่ 12	แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ บริเวณ filtration membrane กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล .....	30
ภาพที่ 13	แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ของ เนื้อเยื่อไต บริเวณ filtration membrane กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ ยาพาราเซตามอล .....	31
ภาพที่ 14	แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ ของเนื้อเยื่อไตบริเวณท่อไตส่วนต้น กลุ่มควบคุม (ซ้าย) และกลุ่มที่ได้รับ ยาพาราเซตามอล 30 วัน .....	32

**คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)**

APAP	N-acetyl-p-aminophenol, Acetaminophen, Paracetamol
BBB	Blood brain barrier
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CSD	Cortical Spreading Depression
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
NAPQI	N-acetyl-p-benzoquinoneimine
TEM	Transmission electron microscope
TNF- $\alpha$	Tumor necrosis factor-alpha
IL-1	Interlukin-1 alpha



## บทนำ

### 1. ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่า ยาพาราเซตามอล (acetaminophen; APAP) เป็นยาที่ออกฤทธิ์ในการบรรเทาอาการปวดและลดไข้ ซึ่งนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทย เนื่องจากเป็นยาที่สามารถซื้อได้โดยทั่วไปตามร้านขายยาหรือร้านสะดวกซื้อต่างๆ โดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์ และเหตุผลหลักที่ยาพาราเซตามอลเป็นที่นิยมมากคือ มีราคาถูก ดังนั้นจึงทำให้ประชาชนทั่วไปเลือกใช้นี้เป็นอันดับแรกเมื่อมีอาการปวดหรือเป็นไข้ เนื่องจากมีผลข้างเคียงของการใช้น้อย แต่อย่างไรก็ตาม ถึงแม้ว่ายาชนิดนี้จะเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลาย แต่กลไกการออกฤทธิ์นั้นกลับยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่อย่างไรก็ตาม เป็นที่ยอมรับว่าการออกฤทธิ์ของยานี้น่าจะเกิดขึ้นที่ระบบประสาทส่วนกลางเป็นที่แรก (Woodbury, 1965 และ Bromm และคณะ, 1992)

ในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ใช้สำหรับการรักษาพบว่า ยานี้มีกระบวนการเมตาบอลิซึมหลักที่ตับโดยการ conjugate ด้วย glucuronic acid และ sulphate เพื่อให้ได้สารที่ไม่มีความเป็นพิษที่สามารถขับออกทางปัสสาวะได้ แต่พบว่ายังมียาบางส่วนที่ไม่ถูก conjugate จึงทำให้ยังมียาหลงเหลืออยู่ ซึ่งยาส่วนที่เหลือนี้จะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) และได้สารเมตาโบไลต์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ *n*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) แต่ในภาวะปกติ NAPQI จะถูก oxidized ด้วย glutathione เพื่อลดความเป็นพิษและขับออกนอกร่างกายต่อไป ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นเกินกว่าข้อบ่งชี้ของยานี้ น่าจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาและได้สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีปริมาณของ NAPQI เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณของ glutathione ที่ร่างกายสร้างออกมาเพื่อจำกัดความเป็นพิษ จึงมีโอกาสที่ NAPQI จะทำอันตรายต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้นในบริเวณที่มีการเมตาโบไลต์ยา โดยพบว่าเอนไซม์ CYP2E1 ที่มีบทบาทในกระบวนการเมตาบอลิซึมยานี้สามารถตรวจพบได้ในอวัยวะต่างๆ หลายอวัยวะทั่วร่างกายรวมถึงตับ สมอง ไต และปอด เป็นต้น (Hansson และคณะ, 1990; Liu และ Baliga, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าอวัยวะเหล่านี้จะได้รับผลกระทบจาก NAPQI และทำให้เกิดผลเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงจากการจับตัวระหว่าง NAPQI กับโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ (Meyers และคณะ, 1988) และคณะผู้วิจัยยังเชื่อว่า NAPQI น่าจะส่งผลทางอ้อมโดยการทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในอวัยวะต่างๆ เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ยาเป็นระยะเวลาสั้นๆ ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์และอวัยวะต่างๆ ตามมา

จากผลการศึกษาการใช้ยาพาราเซตามอลในอดีตโดยส่วนใหญ่ แสดงให้เห็นถึงผลในทางบวกของการใช้นี้ ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่สรุปว่ายาพาราเซตามอลมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ โดยมีรายงานว่ายาพาราเซตามอลสามารถเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงเอนโดทีเลียมและเซลล์เพาะเลี้ยงนิวรอนจากสมองหนูจากภาวะ oxidative stress (Trypathy และ Grammas, 2009a; 2009b) รวมถึงการเกิด aging ได้ (Trypathy และคณะ, 2012) และยังพบว่าเมื่อหนูได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถช่วยเพิ่มการทำงานของ P-glycoprotein ในการลดการสะสมสารพิษของ morphine ได้อีกด้วย (Slosky และคณะ, 2013) แต่จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นเพียงการศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลานั้นๆ เท่านั้น

แต่อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เริ่มมีรายงานถึงผลเสียที่เกิดจากการได้รับยาพาราเซตามอลแม้ว่าจะใช้ในขนาดของการรักษา โดยพบว่าคนไข้ที่มีอาการของ coronary heart diseases เมื่อ

ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับยาที่ใช้รักษาโรคตามปกติเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ขึ้นไป มีระดับความดันเลือดสูงมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมด้วย (Sudano และคณะ, 2010; 2012) ดังนั้นการใช้ยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาานจึงอาจส่งผลให้เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของระบบหลอดเลือดสมองได้รับผลกระทบได้ ซึ่งยืนยันได้จากผลงานวิจัยของคณะวิจัยเราที่ผ่านมา ที่ทำการศึกษเปรียบเทียบผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังในหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบรับรู้ความเจ็บปวดของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ โดยพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเป็นเวลา 30 วัน มีการตอบสนองของ cortical neurons ต่อการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ CSD มากกว่ากลุ่มควบคุม (Supronsilpchai และคณะ, 2010) และนอกจากนี้ยังพบว่ามีการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้นทั้งสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus (Maneesri และคณะ, 2010; Chantong และคณะ, 2013) รวมถึงเพิ่มการแสดงออกของ cell adhesion molecules ควบคู่กับการสูญเสีย blood brain barrier (BBB) integrity ของ cerebral microvessels (Yisarakun และคณะ, 2014)

ซึ่งนอกจากผลกระทบของการใช้ยาพาราเซตามอลที่เกิดขึ้นที่ระบบประสาทและหลอดเลือดสมองแล้ว คณะผู้วิจัยยังคาดการณ์ถึงผลกระทบที่อาจจะเกิดขึ้นที่อวัยวะอื่นๆ ที่มีหลอดเลือดเป็นองค์ประกอบจำนวนมาก ซึ่งได้แก่ ไต เนื่องจากไตเป็นอวัยวะที่ประกอบไปด้วยเส้นเลือดฝอย (capillary) จำนวนมากในส่วนของ glomerulus และจากที่กล่าวข้างต้นว่าเอนไซม์ CYP2E1 สามารถพบการแสดงออกได้ที่ไตนั้น จึงเป็นไปได้ว่าไตจะเป็นอีกอวัยวะหนึ่งที่จะได้รับอันตรายจาก NAPQI ด้วยเช่นกัน ซึ่งมีการวิจัยที่ทำการทดสอบการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษาในหนูแรทเป็นระยะเวลาาน 3 เดือน พบว่ายานี้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไต โดยพบการฝ่อลงของ glomerulus ร่วมกับการเกิด hemorrhage รวมถึงการเกิดการ degeneration ของส่วน renal tubule ด้วย (Majeed et al., 2013) จึงทำให้คณะผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (15 และ 30 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของไตในระดับจุลทรรศน์อิเล็กตรอน ซึ่งได้แก่ endothelium, epithelium, basement membrane, และ renal tubule ร่วมกับการศึกษาการแสดงออกของสาร pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (0 วัน)

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยยังสนใจศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของปอดด้วยเช่นกัน เนื่องจากมีรายงานผลการวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ยานี้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้มีความเสี่ยงของการเป็นโรคหอบหืด (asthma) เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ยาขณะแม่ตั้งครรภ์หรือในเด็กเล็ก (McBride, 2011; Gonzalez-Barcala et al., 2013; Shaw, 2013; Sordillo et al., 2015) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง เป็นเวลา 15 และ 30 วัน เปรียบเทียบกับการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (0 วัน) เพื่อดูแสดงออกของสาร pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine จากเนื้อปอด ร่วมกับการหลั่งของสาร pro-inflammatory neuropeptide (calcitonin-gene related peptide) และระดับของ glutathione ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลด้วย

## 2. วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

2.1 เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและเรื้อรัง (0, 15, 30 วัน) ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลทรรศน์ อิเล็กตรอนของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของไต

2.2 เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและเรื้อรัง (0, 15, 30 วัน) ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม ต่อการแสดงออกของสาร pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine จากเนื้อเยื่อไต

## 3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

การศึกษานี้เป็นการศึกษาวิจัยผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรัง ในหนูแรทสายพันธุ์ Wistar เพศผู้ โดยแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่มหลัก คือ กลุ่มหนูปกติ (ควบคุม) และกลุ่มหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม โดยได้รับความอนุเคราะห์จากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ และคณะ

## 4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานน่าจะทำให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของไตและปอด เนื่องจากมีการสะสมของ NAPQI ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มสูงขึ้น โดยเหนี่ยวนำให้กระตุ้นการทำงานของ CGRP เพิ่มสูงขึ้น จากภาวะ oxidative stress ที่สืบเนื่องจากการลดลงของระดับ glutathione ซึ่งเป็นผลให้มีการหลั่งสาร pro-inflammatory cytokines สูงขึ้นตามไปด้วย สุดท้ายทำให้เซลล์ได้รับความเสียหายในที่สุด

## 5. การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศ (information) ที่เกี่ยวข้อง

### พาราเซตามอล

พาราเซตามอล (acetaminophen, N-acetyl-para-aminopheno, APAP) เป็นยาที่ถูกค้นพบตั้งแต่ปี 1948 (Brodie และ Axelrod, 1948) ซึ่งพบว่ามีคุณสมบัติคล้ายยาแอสไพรินคือ สามารถใช้เป็นยาลดไข้และบรรเทาปวดได้ และต่อมาพาราเซตามอลกลายเป็นยาที่ได้รับความนิยมใช้อย่างแพร่หลายมาจนถึงปัจจุบัน สาเหตุที่พาราเซตามอลเป็นยาลดปวดที่เป็นที่นิยมใช้กันมากโดยเฉพาะในประเทศไทย เนื่องจากเป็นยาที่สามารถซื้อได้โดยทั่วไปตามร้านขายยาหรือร้านสะดวกซื้อต่างๆ โดยไม่ต้องมีใบสั่งยาจากแพทย์ และที่สำคัญคือ มีราคาถูก และมีผลข้างเคียงของการใช้น้อย ดังนั้นจึงทำให้ประชาชนทั่วไปเลือกใช้นี้เป็นอันดับแรกเมื่อมีอาการปวดหรือเป็นไข้ นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการโฆษณาขายยานี้ตามสื่อต่างๆ อย่างแพร่หลาย จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ประชาชนเข้าถึงการได้ง่าย

### กลไกการออกฤทธิ์ของยาพาราเซตามอล

ถึงแม้ว่าพาราเซตามอลจะเป็นยาที่ใช้สำหรับการรักษาโดยทั่วไป แต่ในปัจจุบันยังไม่สามารถระบุถึงกลไกการออกฤทธิ์ได้ชัดเจน แต่อย่างไรก็ตาม เป็นที่ยอมรับว่าการออกฤทธิ์ของยานี้น่าจะเกิดขึ้นที่ระบบประสาทส่วนกลางเป็นที่แรก (Woodbury, 1965 และ Bromm และคณะ, 1992) ซึ่งมีงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยานี้ เช่น มีกลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับการยับยั้งการสร้าง NO

(Bjorkman และคณะ, 1994, Bujalska และคณะ, 2004) การออกฤทธิ์ผ่าน substance P หรือ N-methyl-D aspartate (NMDA) ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับซีโรโทนิน (Pickering, 2008) และการออกฤทธิ์ผ่าน cannabinoid receptor (Hogestatt และคณะ, 2005; Ottani และคณะ, 2006) เป็นต้น

#### กลไกการออกฤทธิ์ผ่านไนตริกออกไซด์

ไนตริกออกไซด์ (NO) เป็นสารสื่อประสาทชนิดหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการรับรู้ความเจ็บปวด (Ovadia และคณะ, 1995 ; Inoue และคณะ, 1998) ซึ่งยาพาราเซตามอลนี้มีผลงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่ามีความสามารถยับยั้งการปวดได้ โดยการยับยั้งต่อการกระตุ้นตัวรับชนิด N-methyl-D aspartate (NMDA) บริเวณไขสันหลัง ซึ่งน่าจะเป็นผลเนื่องมาจากการยับยั้งการสร้าง NO ในบริเวณไขสันหลังนั่นเอง (Bjorkman และคณะ, 1995) แต่อย่างไรก็ตาม Herrero และคณะ ได้รายงานในปี 2003 ว่า NO ที่หลั่งออกมาจากการได้รับ nitroparacetamol นั้นมีปริมาณน้อย แต่สามารถมีผลในการยับยั้งการเกิดการอักเสบได้ (anti-inflammation effect) (Herrero และคณะ, 2003) และจากงานวิจัยในปี 2004 ของ Ito และคณะ พบว่าในหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอล มีการหลั่งของ NO ออกมาจาก iNOS และ NO เป็นตัวเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการบาดเจ็บและมีผลไปรบกวนการไหลเวียนของเลือดภายในตับ (Ito และคณะ, 2004) ดังนั้นกลไกในการลดปวดของยาพาราเซตามอลอันเนื่องมาจากผลการยับยั้งต่อการสร้าง NO จึงยังไม่สามารถสรุปแน่ชัดได้

#### กลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับซีโรโทนิน

การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการลดปวดของยาพาราเซตามอลนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมความเจ็บปวดจากระบบประสาทส่วนกลางโดยซีโรโทนิน โดยมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นต่อตัวรับซีโรโทนินชนิด 5-HT<sub>3</sub> (Tjolsen และคณะ, 1991; Alloui และคณะ, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในคนที่พบว่าเมื่อมีการให้ tropisetron หรือ granisetron ซึ่งเป็น 5-HT<sub>3</sub> receptor antagonist ร่วมกับการให้ยาพาราเซตามอล จะสามารถยับยั้งผลในการลดปวดของยานี้ได้ทั้งหมด (Pickering และคณะ, 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของยาพาราเซตามอลนั้นน่าจะมีส่วนที่ออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นต่อระบบซีโรโทนิน ซึ่งถือเป็นระบบที่ควบคุมความเจ็บปวดที่สำคัญระบบหนึ่ง

#### กลไกการออกฤทธิ์ผ่านตัวรับ Canabinoid

ผลการศึกษาวิจัยพบว่า ส่วนที่เป็น active metabolite ของพาราเซตามอล ได้แก่ Fatty acid amide N- arachidonoyl phenolamine (AM404) นั้น มีบทบาทเหมือนกับ cannabinoid (CB) ในการลดปวดและการลดอุณหภูมิของร่างกาย (Bisogno และคณะ, 2008; Guhring และคณะ, 2002) และเป็นที่ทราบกันดีว่า พาราเซตามอล นั้นจะถูกขับออกทางตับ ในรูปของ glucuronoid sulfate conjugate แต่ผลจากการศึกษาวิจัยในสมองและไขสันหลังของหนูทดลองพบว่า พาราเซตามอล สามารถถูก deacetylated ไปเป็น p-aminophenol ได้ด้วย ซึ่ง p-aminophenol นี้สามารถ conjugate กับ arachidonic acid โดยเอนไซม์ fatty acid amide hydrolase ให้เป็น AM404 ได้ ซึ่งจากการศึกษาพบว่า AM404 นั้นเป็นตัวกระตุ้นต่อตัวรับ vanilloid subtype 1 (TRPV1) (Zygmunt และคณะ, 2000) ซึ่ง TRPV1 นั้นเป็น ligand ต่อ CB1 receptor และเป็นตัวยับยั้งต่อการนำ anandamine เข้าสู่เซลล์ ซึ่งจะทำให้ระดับของ CB ในเซลล์เพิ่มขึ้น และในปี 2005 Hogestatt และคณะได้ทำการศึกษาผลของยาพาราเซตามอล ในสมอง ตับ ไขสันหลังและ dorsal root ganglion ของหนูก็ให้ผลเช่นเดียวกันกับงานวิจัยที่กล่าวมาข้างต้น (Hogestatt และคณะ, 2005)

### กลไกการออกฤทธิ์ผ่านการยับยั้งเอนไซม์ Prostaglandin H<sub>2</sub> synthetase

เอนไซม์ Prostaglandin H<sub>2</sub> synthetase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น unstable prostaglandin H<sub>2</sub> (PGH<sub>2</sub>) โดยผลการวิจัยแสดงว่า ยาพาราเซตามอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PGH<sub>2</sub> synthetase ในบริเวณเร่ง peroxidase (pox) site โดยการรบกวนต่อการสร้าง Fe<sup>4+</sup>=OPP ซึ่งเป็น co-substrate (Anderson และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการวิจัย ที่สนับสนุนว่า ยาพาราเซตามอลสามารถยับยั้งเอนไซม์ PGH<sub>2</sub> synthetase ได้ (Boutaud และคณะ, 2002; Schidknecht และคณะ, 2008)

### **กระบวนการเมทาบอลิซึมของพาราเซตามอล**

ในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ใช้สำหรับการรักษาพบว่า ยานี้มีกระบวนการเมทาบอลิซึมหลักที่ดับโดยการ conjugate ผ่าน glucuronidation และ sulfation เพื่อให้ได้สารที่ไม่มีความเป็นพิษที่สามารถขับออกทางปัสสาวะได้ แต่พบว่ายังมียาบางส่วนที่ไม่ถูก conjugate จึงทำให้ยังมียาหลงเหลืออยู่ ซึ่งยาส่วนที่เหลือนี้จะถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) และได้สารเมตาโบไลต์ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ได้แก่ *n*-acetyl-*p*-benzoquinone imine (NAPQI) แต่ในภาวะปกติ NAPQI จะถูก oxidize ด้วย glutathione เพื่อลดความเป็นพิษและขับออกนอกร่างกายต่อไป ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นเกินกว่าข้อบ่งชี้ของยานี้ น่าจะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงกระบวนการเมทาบอลิซึมของยาและได้สารที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้น เนื่องจากมีปริมาณของ NAPQI เพิ่มสูงขึ้น ทำให้ไม่สัมพันธ์กับปริมาณของ glutathione ที่ร่างกายสร้างออกมาเพื่อจำกัดความเป็นพิษ จึงมีโอกาสที่ NAPQI จะทำอันตรายต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้นในบริเวณที่มีการเมตาโบไลต์ยา โดยพบว่าเอนไซม์ CYP2E1 ที่มีบทบาทในกระบวนการเมทาบอลิซึมยานี้สามารถตรวจพบได้ในอวัยวะต่างๆ หลายอวัยวะทั่วร่างกายรวมถึงตับ สมอง ไต และปอด เป็นต้น (Hansson และคณะ, 1990; Liu และ Baliga, 2003) จึงเป็นไปได้ว่าอวัยวะเหล่านี้จะได้รับผลกระทบจาก NAPQI และทำให้เกิดผลเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรงจากการจับตัวระหว่าง NAPQI กับโปรตีนต่างๆ ภายในเซลล์ (Meyers และคณะ, 1988) และคณะผู้วิจัยยังเชื่อว่า NAPQI น่าจะส่งผลทางอ้อมโดยการทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในอวัยวะต่างๆ เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ยาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจจะส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์และอวัยวะต่างๆ ตามมา

### **การศึกษาวิจัยผลของยาพาราเซตามอล**

จากผลการศึกษาการใช้ยาพาราเซตามอลในอดีตโดยส่วนใหญ่ แสดงให้เห็นถึงผลในทางบวกของการใช้ยานี้ ซึ่งมีหลายงานวิจัยที่สรุปว่ายาพาราเซตามอลมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ โดยมีรายงานว่ายาพาราเซตามอลสามารถเพิ่มการอยู่รอดของเซลล์เพาะเลี้ยงเอนโดทีเลียมและเซลล์เพาะเลี้ยงนิวรอนจากสมองหนูจากภาวะ oxidative stress (Trypathy และ Grammas, 2009a; 2009b) รวมถึงการเกิด aging ได้ (Trypathy และคณะ, 2012) และยังพบว่าเมื่อหนูได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 500 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สามารถช่วยเพิ่มการทำงานของ P-glycoprotein ในการลดการสะสมสารพิษของ morphine ได้อีกด้วย (Slosky และคณะ, 2013) แต่จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นเพียงการศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลาสั้นๆ เท่านั้น

แต่อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เริ่มมีรายงานถึงผลเสียที่เกิดจากการได้รับยาพาราเซตามอลแม้ว่าจะใช้ในขนาดของการรักษา โดยพบว่าคนไข้ที่มีอาการของ coronary heart diseases เมื่อ

ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับยาที่ใช้รักษาโรคตามปกติเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ขึ้นไป มีระดับความดันเลือดสูงมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมด้วย (Sudano และคณะ, 2010; 2012) ดังนั้นการใช้ยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาานจึงอาจส่งผลให้เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของระบบหลอดเลือดสมองได้รับผลกระทบได้ ซึ่งยืนยันได้จากผลงานวิจัยของคณะวิจัยเราที่ผ่านมา ที่ทำการศึกษเปรียบเทียบผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังในหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบรับรู้ความเจ็บปวดของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ โดยพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเป็นเวลา 30 วัน มีการตอบสนองของ cortical neurons ต่อการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ CSD มากกว่ากลุ่มควบคุม (Supronsilpchai และคณะ, 2010a) และนอกจากนี้ยังพบว่าการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้นทั้งสมองส่วน cerebral cortex และ hippocampus (Maneesri และคณะ, 2010; Chantong และคณะ, 2013) รวมถึงเพิ่มการแสดงออกของ cell adhesion molecules ควบคู่กับการสูญเสีย blood brain barrier (BBB) integrity ของ cerebral microvessels (Yisarakun และคณะ, 2014)

ซึ่งนอกจากผลกระทบของการใช้ยาพาราเซตามอลที่เกิดขึ้นที่ระบบประสาทและหลอดเลือดสมองแล้ว ยังพบว่าการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษาในหนูแรทเป็นระยะเวลาาน 3 เดือน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไต โดยพบการฝ่อลงของ glomerulus ร่วมกับการเกิด hemorrhage รวมถึงการเกิดการ degeneration ของส่วน renal tubule ด้วย (Majeed et al., 2013) และยังมีรายงานผลการวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการใช้ยานี้อย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน ทำให้มีความเสี่ยงของการเป็นโรคหอบหืด (asthma) เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้ยาขณะแม่ตั้งครรภ์หรือในเด็กเล็ก (McBride, 2011; Gonzalez-Barcala et al., 2013; Shaw, 2013; Sordillo et al., 2015)

#### ยาพาราเซตามอลและกระบวนการอักเสบ (Paracetamol and Inflammation)

กระบวนการอักเสบมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา รวมถึงความเสียหายของเนื้อเยื่อเมื่อได้รับอันตรายจากยาพาราเซตามอล การทดสอบยาชนิดนี้ที่ความเข้มข้นของยาสูงในหนู mice มีผลทำให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อบริเวณ centrilobular ซึ่งสัมพันธ์กับผลการแสดงออกของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ nitrotyrosine (James และคณะ, 2003) และยังพบว่า IL-1 $\beta$  มีการหลั่งออกมาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถเหนี่ยวนำ iNOS ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในหนู mice ที่มีภาวะพร่องทั้ง IL-10 และ IL-4 ที่พบว่ามีความไวสูงมากต่อความเป็นพิษของยาพาราเซตามอล โดยมีระดับของ glutathione ในตับลดต่ำลง แต่มีระดับของ pro-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้นอย่างมาก เช่น TNF $\alpha$ , MIP-1 $\alpha$  และ IL-6 ซึ่งบทบาทของสารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (Bourdi และคณะ, 2007) ดังนั้น ปริมาณของโปรตีนกลุ่ม pro-inflammatory cytokines จะถูกหลั่งมากขึ้น เมื่อได้รับยาชนิดนี้ที่ dose สูง แต่มีบางงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่ายาพาราเซตามอล ที่ dose ต่ำ สามารถลดอันตรายที่เกิดจาก pro-inflammatory cytokines ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เพาะเลี้ยง brain endothelial cells ได้ (Tripathy และ Grammas, 2009a) ซึ่งให้ผลในแบบเดียวกับการศึกษาในเซลล์ประสาท (neurons) เพาะเลี้ยงที่สามารถลดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้ โดยการลด transcription factor NF- $\kappa$ B ในกระบวนการอักเสบ (Bisaglia และคณะ, 2002) เช่นเดียวกับการลดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines จากเซลล์ประสาทได้ (Tripathy และ Grammas, 2009b)

แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาของคณะวิจัยเราเมื่อไม่นานมานี้ได้แสดงให้เห็นว่า การให้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษา ก็สามารถเพิ่มการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines สูงขึ้นทั้งสมอง

หนูแรทส่วน cerebral cortex และ hippocampus เมื่อมีการใช้ยาเป็นระยะเวลานาน (Maneesri และคณะ, 2010; Chantong และคณะ, 2013) และงานวิจัยล่าสุดของคณะวิจัยเราได้แสดงให้เห็นว่าผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้นสามารถกระตุ้นการหลั่งของสาร pro-inflammatory neuropeptide (calcitonin-gene related peptide; CGRP) ในส่วนของ trigeminal ganglion ได้ (Yisarakun และคณะ, 2015) ซึ่งเป็นที่ยอมรับกันว่า CGRP เป็นสารสื่อประสาทที่ได้รับการยอมรับมานานแล้วว่ามีข้องเกี่ยวกับกระบวนการเกิดความรู้สึกร้าว และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ neurogenic inflammation ได้ (Moskowitz, 1993)

## สรุป

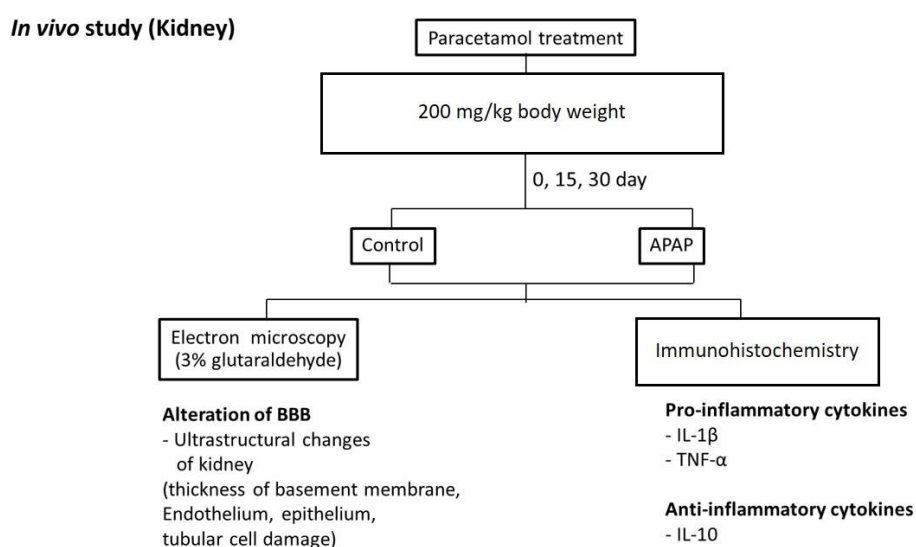
ดังนั้น ระยะเวลาของการใช้ยาจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะมีผลต่อการแสดงของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบถึงแม้จะใช้ยาในขนาดของการรักษาก็ตาม ซึ่งนอกเหนือจากผลกระทบของการใช้ยาพาราเซตามอลต่อระบบประสาทและหลอดเลือดสมองแล้ว คณะผู้วิจัยยังสนใจศึกษาถึงผลกระทบของการใช้ยานี้ที่อาจเกิดขึ้นที่อวัยวะสำคัญอื่นๆ เช่น ไต และปอด เพื่อนำข้อมูลผลของการใช้ยาเผยแพร่ให้กับผู้ใช้นี้ในการรักษาได้รับทราบและเป็นข้อควรระวังในการใช้ยาต่อไป ดังเช่น กลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังต่างๆ ที่มีการใช้พาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน

## วิธีดำเนินการวิจัย

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### การศึกษาย่อยที่ 1 (ดังแสดงในภาพที่ 1)

ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (200 mg/kg body weight) เป็นเวลา 15 และ 30 วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของไต และการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine เปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (0 วัน)



ภาพที่ 1 แผนภาพการแบ่งสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของไต ที่ความเข้มข้น 200 mg/kg body weight

### การแบ่งกลุ่มสัตว์ทดลอง

การศึกษาย่อยที่ 1 และ 2 ใช้กลุ่มตัวอย่างเดียวกันในการเก็บตัวอย่างมาศึกษา ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดยแต่ละกลุ่มจะถูกแยกเป็นกลุ่มย่อยตามช่วงเวลา 0, 15, และ 30 วัน ดังนี้

#### 1. กลุ่ม 0 วัน

##### 1.1 กลุ่มควบคุม

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติ จะได้รับการฉีด 0.9% normal saline solution เข้าทางช่องท้อง (ในปริมาณเดียวกับยาพาราเซตามอล) เมื่อครบเวลา 3 ชั่วโมง ทำการฉีดยาสลบหนูทุกตัวเพื่อเก็บตัวอย่างไตและปอดไปทำการศึกษาต่อไป

##### 1.2 กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 200 mg/kg body weight



หนูแรทสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติ จะได้รับการฉีด ยาพาราเซตามอลความเข้มข้น 200 mg/kg body weight เข้าทางช่องท้อง เมื่อครบเวลา 3 ชั่วโมง ทำการฉีด ยาสลบหนูทุกตัวเพื่อเก็บตัวอย่างไตและปอดไปทำการศึกษาต่อไป

## 2. กลุ่ม 15 วัน

### 2.1 กลุ่มควบคุม

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติ จะได้รับการฉีด 0.9% normal saline solution เข้าทางช่องท้อง (ในปริมาณเดียวกับยาพาราเซตามอล) วันละครั้ง เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย ทำการฉีดยาสลบหนูทุกตัวเพื่อเก็บตัวอย่างไตและปอดไปทำการศึกษาต่อไป

### 2.2 กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 200 mg/kg body weight

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติ จะได้รับการฉีด ยาพาราเซตามอลความเข้มข้น 200 mg/kg body weight เข้าทางช่องท้อง วันละครั้ง เป็นเวลา 15 วัน เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย ทำการฉีดยาสลบหนูทุกตัวเพื่อเก็บตัวอย่างไตและปอดไปทำการศึกษาต่อไป

## 3. กลุ่ม 30 วัน

### 3.1 กลุ่มควบคุม

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติ จะได้รับการฉีด 0.9% normal saline solution เข้าทางช่องท้อง (ในปริมาณเดียวกับยาพาราเซตามอล) วันละครั้ง เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย ทำการฉีดยาสลบหนูทุกตัวเพื่อเก็บตัวอย่างไตและปอดไปทำการศึกษาต่อไป

### 3.2 กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 200 mg/kg body weight

หนูแรทสายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 200-250 กรัม ได้รับอาหารและน้ำดื่มตามปกติ จะได้รับการฉีด ยาพาราเซตามอลความเข้มข้น 200 mg/kg body weight เข้าทางช่องท้อง วันละครั้ง เป็นเวลา 30 วัน เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากการฉีดครั้งสุดท้าย ทำการฉีดยาสลบหนูทุกตัวเพื่อเก็บตัวอย่างไตและปอดไปทำการศึกษาต่อไป

## วิธีการเก็บตัวอย่างและวิธีการทดลอง

กระบวนการ perfusion เพื่อเตรียมตัวอย่างสำหรับงาน transmission electron microscope และ immunohistochemistry

เมื่อครบกำหนดเวลาการได้รับ 0.9% normal saline และยาพาราเซตามอลแล้ว หนูทดลองกลุ่มละ 5 ตัว จะได้รับการฉีดยาสลบ (sodium pentobarbital) แบบ overdose แล้วทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลอง ตั้งแต่ช่องท้องจนถึงบริเวณหัวใจ ใช้เข็มแทงผ่านตั้งแต่ส่วนยอดหัวใจผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) แล้วจึง perfuse ด้วย 0.1 M PBS ปริมาตร 250 มิลลิลิตร แล้วจึงทำการ perfuse ต่อด้วย 4% paraformaldehyde ใน 0.1 M PBS ปริมาตร 300 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผ่าตัดเก็บไต โดยตัดแบ่งเป็นชิ้นเล็ก ขนาด 1x1 ตาราง มิลลิเมตร ประมาณ 6 ชิ้น ทำการแช่ชิ้นเนื้อทั้งหมดลงในสารละลาย 3% glutaraldehyde นานข้ามคืน เพื่อ

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ด้วยกล้อง transmission electron microscope และนำปอดแช่ใน 4% paraformaldehyde ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4 °C) นานข้ามคืน สำหรับใช้ศึกษางาน immunohistochemistry

### กระบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโดยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

หลังจากทำการแช่ชิ้นเนื้อลงใน 3% glutaraldehyde ข้ามคืนแล้ว จะทำการ post-fix ด้วย 2% osmium tetroxide นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นทำการ dehydration ออกจากชิ้นเนื้อตัวอย่างด้วยแอลกอฮอล์ ความเข้มข้น จาก 70% ถึง 100% จากนั้น infiltration ชิ้นเนื้อด้วยสารละลายพลาสติก (epon 812) ก่อนนำมาฝังใน embedding mold หลังจากนั้นตัวอย่างทั้งหมดจะถูกนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °C เป็นเวลา 2 คืน สุดท้ายทำการตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนา 80-90 nm วางบน copper grid แล้วจึงย้อมด้วยสารละลายโลหะหนัก 2 ชนิด คือ uranyl acetate และ lead citrate แล้วจึงนำชิ้นเนื้อที่ได้ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน เปรียบเทียบลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาขององค์ประกอบได้แก่ endothelium, epithelium, basement membrane, และ tubular cell damage

### กระบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโครงสร้างด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin

เมื่อครบกำหนดการคงสภาพด้วย 4% paraformaldehyde ใน 0.1 M PBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อไปผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟินบล็อก จากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่อง rotary microtome ที่ความหนา 3 ไมโครเมตร หลังจากนั้นนำสไลด์ที่มีเนื้อเยื่อมาละลายพาราฟินและทำการ rehydration ด้วย alcohol ก่อนทำการย้อมนิวเคลียสด้วย Mayer's hematoxylin ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำประปาไหลผ่านและ Acid alcohol แล้วจึงย้อมสีไซโตพลาสซึมด้วยสี Eosin Y ล้างสีส่วนเกินด้วย 95% Ethyl alcohol และทำการ dehydration แล้วนำสไลด์ mount ด้วย permount

### กระบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างด้วยการย้อมสี Masson's Trichrome

เมื่อครบกำหนดการคงสภาพด้วย 4% paraformaldehyde ใน 0.1 M PBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำชิ้นเนื้อไปผ่านกระบวนการต่างๆ เพื่อฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟินบล็อก จากนั้นนำมาตัดด้วยเครื่อง rotary microtome ที่ความหนา 3 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อมานำเอาพาราฟินออกด้วย xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วดึงน้ำเข้าในเนื้อเยื่อด้วยการแช่สไลด์ใน ethanol จากความเข้มข้นมากไปน้อยโดยเริ่มจาก absolute ethanol 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที, 95% ethanol, 70% ethanol และน้ำกลั่น อย่างละครั้ง ครั้งละ 3 นาที ตามลำดับ ย้อมสไลด์เนื้อเยื่อในสารละลาย Wiegert's iron hematoxylin เป็นระยะเวลา 5-10 นาที ล้างสไลด์ด้วยการเปิดน้ำประปาให้ไหลผ่านเป็นเวลา 10-15 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้ง แล้วนำมาย้อมด้วย biebrich scarlet-acid fuchsin เป็นเวลา 10-15 นาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่น หากสีย้อมติดสีเข้มเกินให้ละลายด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid เป็นเวลา 10-15 นาทีจนกว่าคอลลาเจนไม่ติดสีแดงของ biebrich scarlet-acid fuchsin จากนั้นย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วย aniline blue หรือ light green เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการดึงน้ำออกด้วย 95% ethanol และ absolute ethanol ตามลำดับ แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที และจากนั้นทำการการยัด mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass

## กระบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโดยเทคนิค Immunohistochemistry เพื่อศึกษาการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines และ anti-inflammatory cytokine

หลังจากทำการแช่ชิ้นเนื้อปอดใน 4% paraformaldehyde นานข้ามคืนแล้ว จากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อมา dehydrate ลงในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (70% ถึง 100%) ก่อนฝังลงใน paraffin และตัด section ที่ความหนา 3  $\mu\text{m}$  ด้วยเครื่องไมโครทอม หลังจากนั้นนำ slide มาทำการ deparaffinization แล้วเติม antigen retrieval (citrate buffer pH 6) ลงไป แล้วจึงทำการ block endogenous peroxidase และ non-specific binding โดยใช้ 3%  $\text{H}_2\text{O}_2$  และ normal horse serum ตามลำดับ บ่ม section ด้วย primary antibody ต่อ IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-10 ที่ 4°C นานข้ามคืน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้ชุด DAB Detection Kit นำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้วมาล้างและติดบน slide และปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มี immunoreactivity ต่อ antibody ที่ศึกษาจะติดสีน้ำตาลเข้ม หลังจากนั้นศึกษาตำแหน่งและการกระจายของเซลล์ที่เกิด immunoreactivity

## เปรียบเทียบความเข้มสีและการกระจายตัวของเนื้อเยื่อบริเวณที่ติด DAB ในเนื้อเยื่อไตของหนูแรท

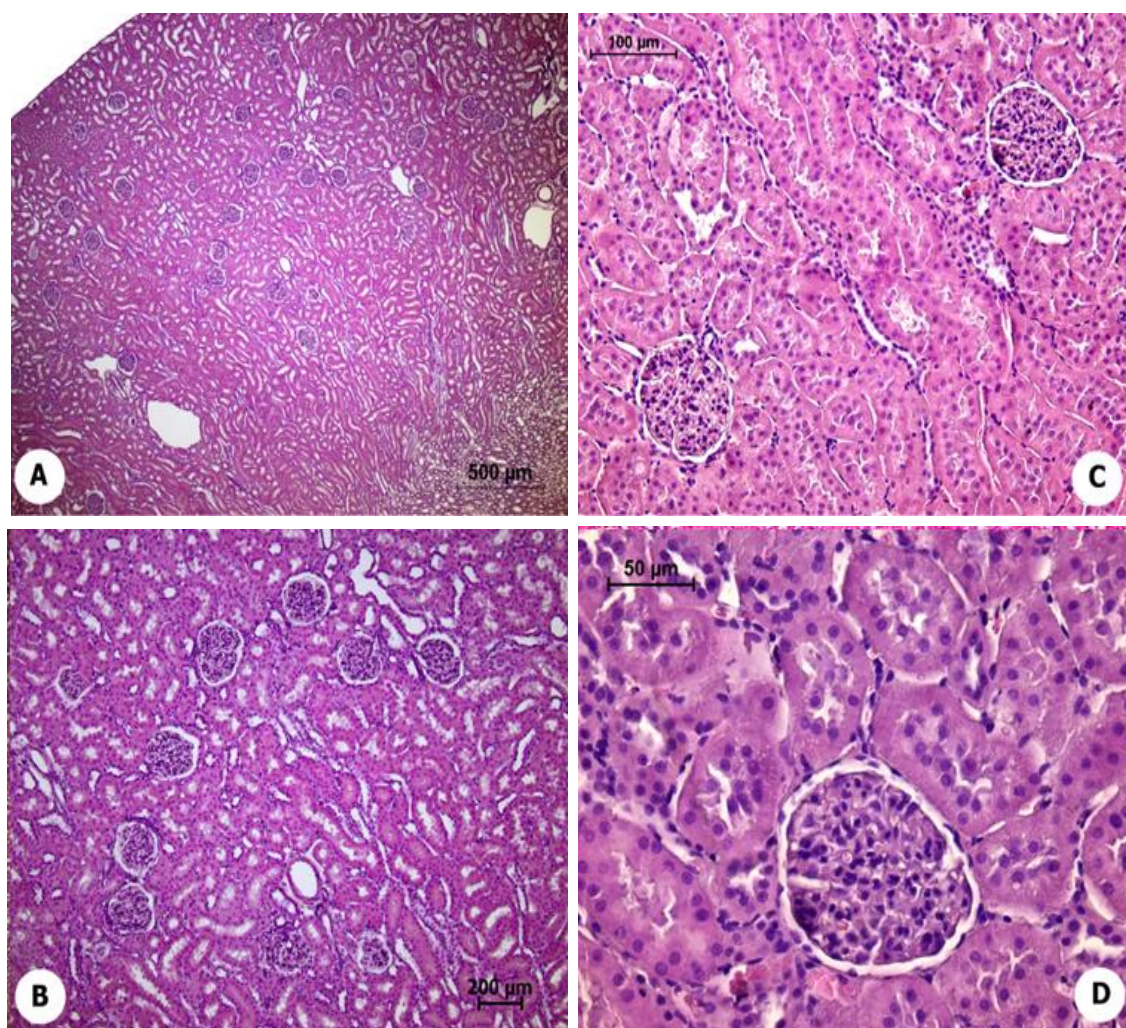
มีเกณฑ์การให้คะแนนดังตารางต่อไปนี้ (ที่กำลังขยาย 400 เท่า)

ระดับสี	คะแนน
จางมากถึงไม่ติดเลย	0
จาง	1
ปานกลาง	2
เข้ม	3

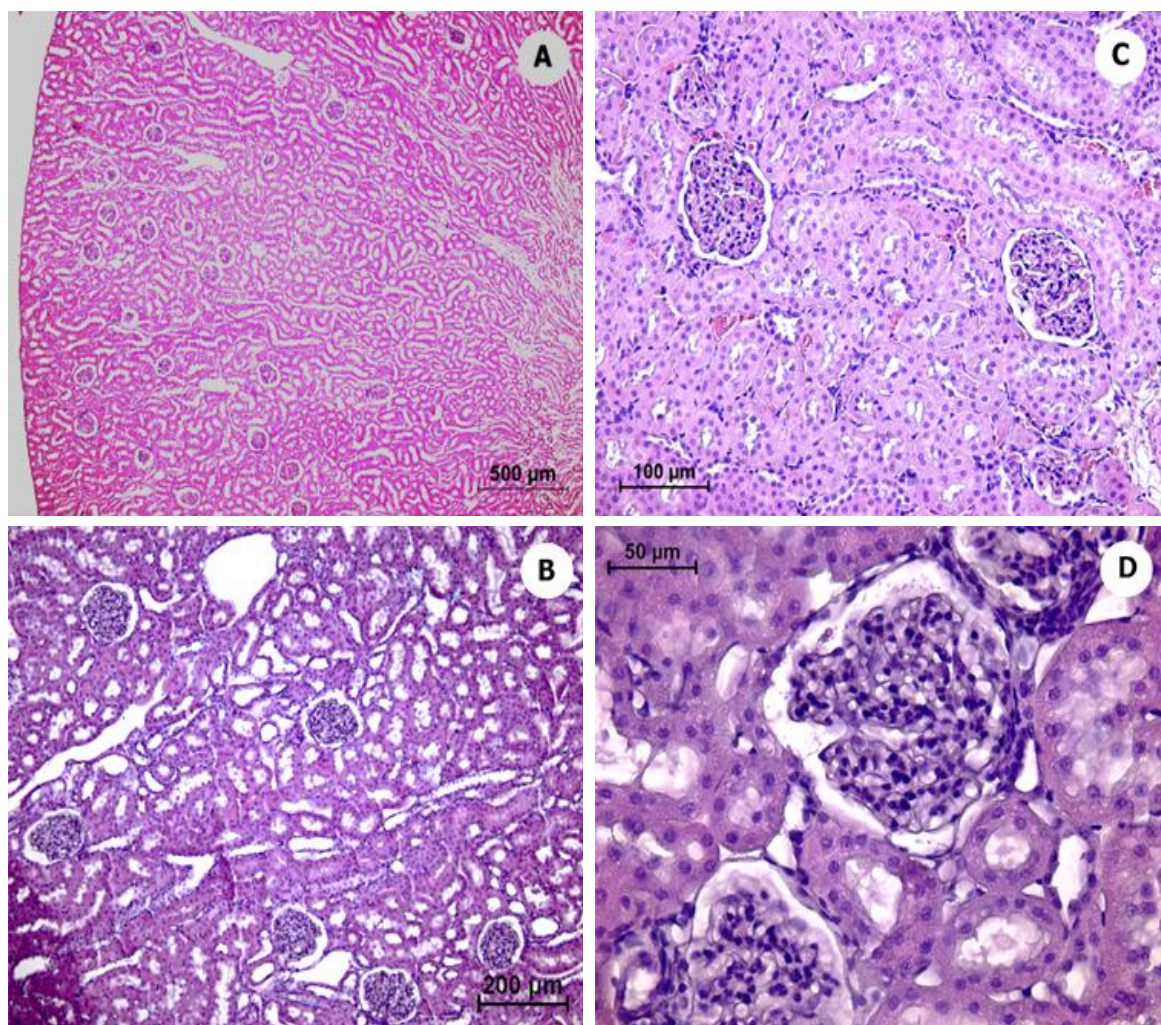
## ผลการวิจัย

### 1. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อไตของหนูแรท

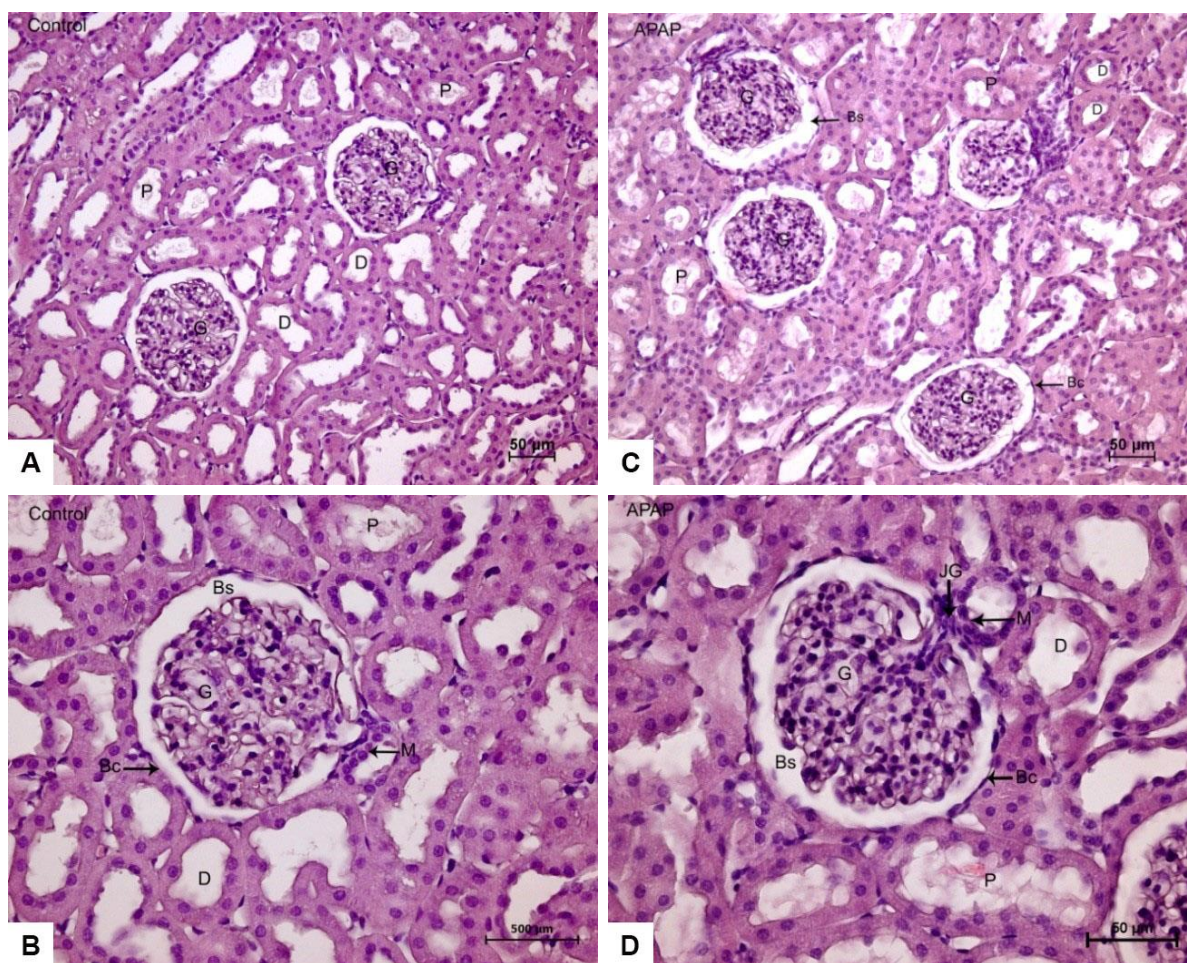
*Hematoxylin และ Eosin*



ภาพที่ 2 ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไต ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule, M= Macula densa, JG=Juxtaglomerular cell, Bc=Bowman's capsule, Bs = Bowman's space



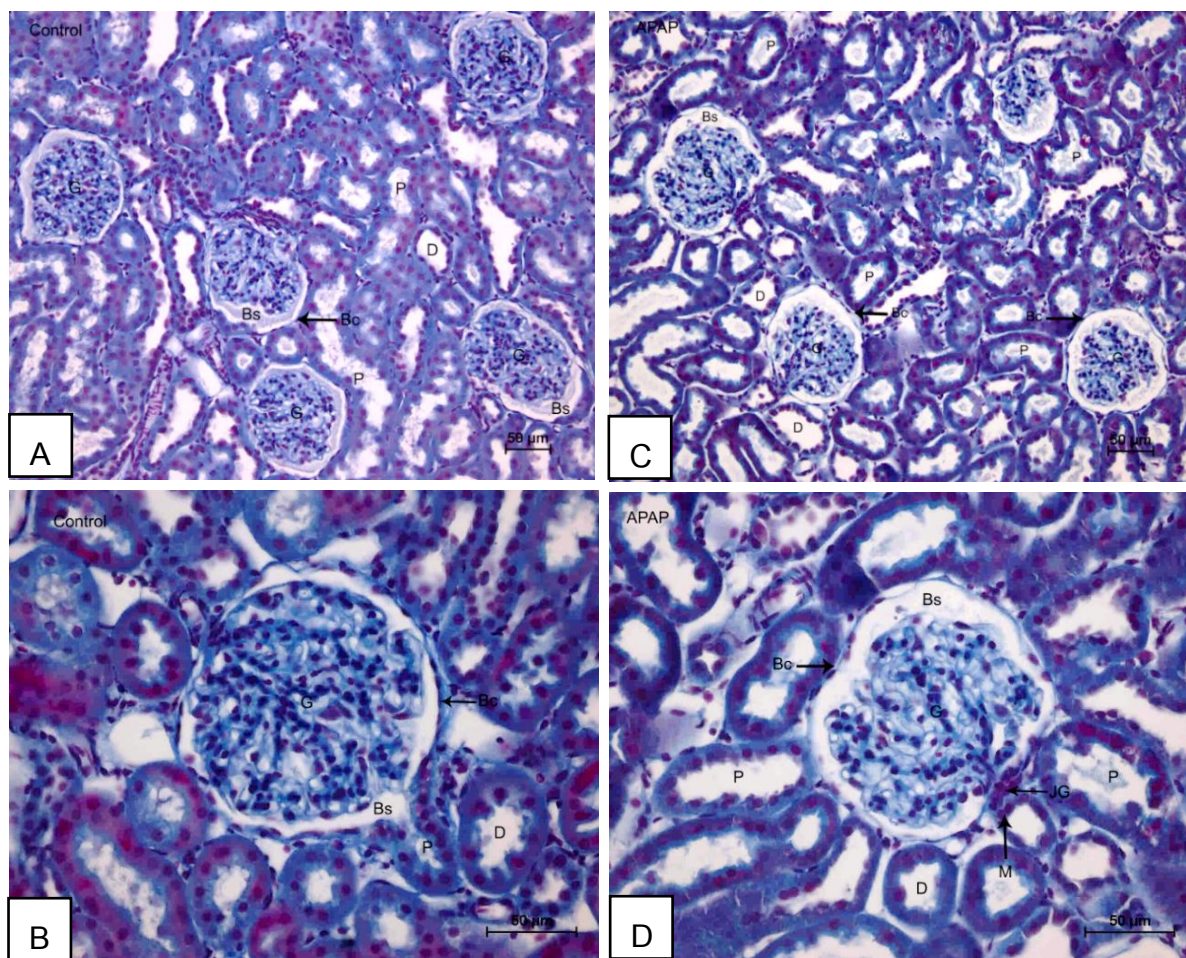
ภาพที่ 3 ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไต ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule, M= Macula densa, JG=Juxtaglomerular cell, Bc=Bowman's capsule, Bs = Bowman's space



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อไต ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule, M= Macula densa, JG=Juxtaglomerular cell, Bc=Bowman's capsule, Bs = Bowman's space

จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไตในหนูแรททั้ง 2 กลุ่มด้วยการย้อม Hematoxylin และ Eosin (ภาพที่ 2-4) พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อไต โกลเมอรูลัสมีขนาดปกติใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และบริเวณท่อไตส่วนต้น ทั้ง Proximal convoluted tubule และ Distal convoluted tubule ไม่พบการเปลี่ยนแปลง สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเซลล์ของท่อไตส่วนต้นได้ชัดเจนและพบว่าไม่เกิดการสูญเสียของ Brush border ภายในท่อไตส่วนต้น

### Masson's Trichrome



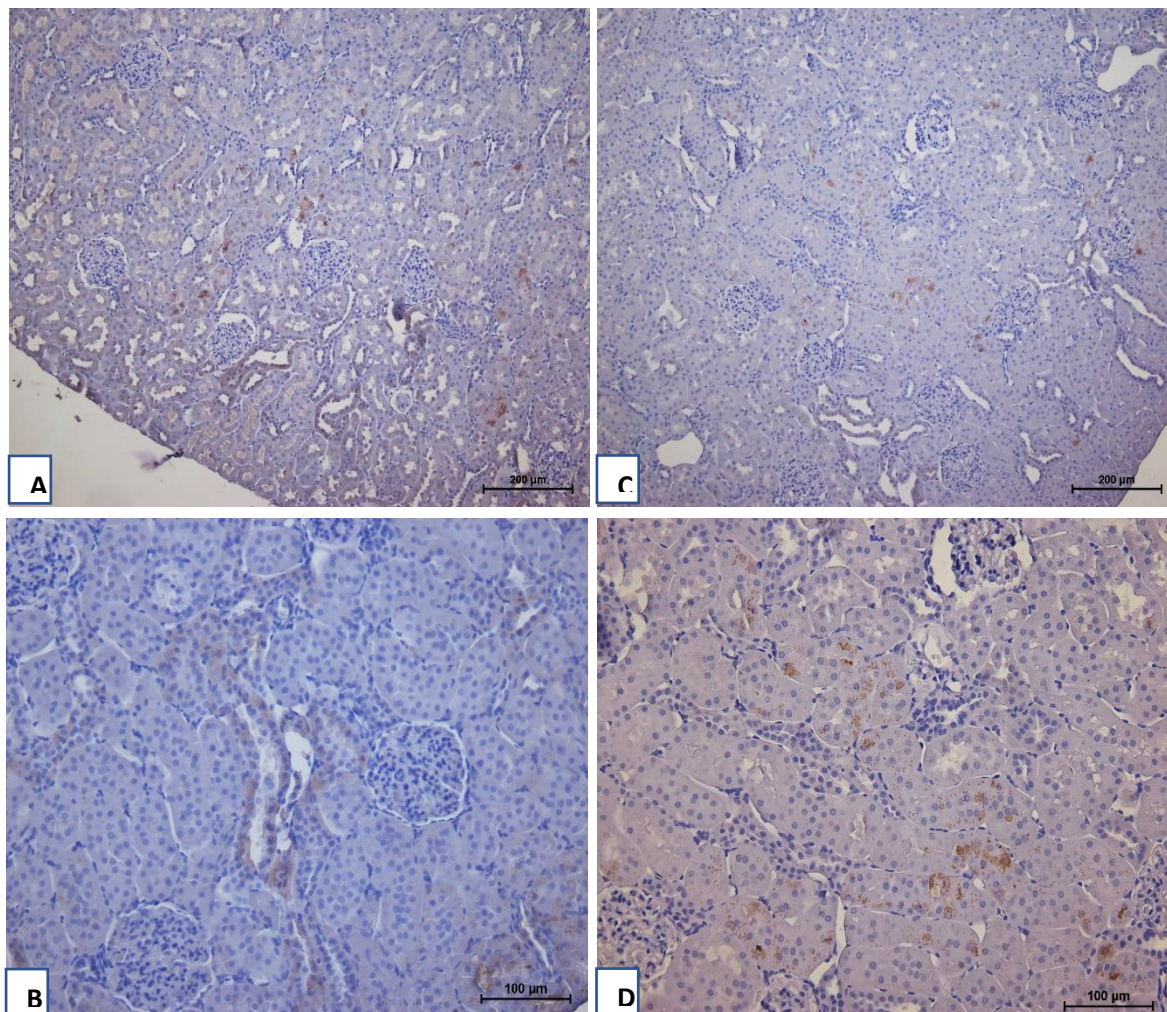
ภาพที่ 5 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ของไตบริเวณเปลือกไตส่วนนอก ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน (C, D) ย้อมสีด้วย Masson's Trichrome; G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule, Bc=Bowman's capsule, Bs=Bowman's space

เพื่อยืนยันผลการย้อมด้วยสี H&E ว่าไม่มีการเกิดการซ่อมแซมของแผลหรือพังผืด (fibrosis) ในเนื้อเยื่อไต จึงทำการย้อมเนื้อเยื่อไตด้วยสี Masson's Trichrome (ภาพที่ 5) ซึ่งพบว่าไม่พบการเปลี่ยนแปลงทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล ในกลุ่มควบคุมแสดงให้เห็นถึงไตที่มีความปกติ ทั้งในส่วนโกลเมอรูลัสและท่อไตที่อยู่ในของบริเวณ เปลือกไตชั้นนอก ซึ่งเป็นส่วนที่มีความสำคัญต่อการทำหน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับการกรองในส่วนโกลเมอรูลัสและการดูดกลับสารในส่วนของท่อไต และในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล พบว่าเนื้อเยื่อไตของกลุ่มตัวอย่างนี้ไม่พบความผิดปกติ ส่วนของโกลเมอรูลัสมีขนาดเป็นปกติ ไม่พบขนาดที่เล็กลงหรือใหญ่ขึ้นของโกลเมอรูลัส มีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุม และบริเวณท่อไตส่วนต้น ทั้ง Proximal convoluted tubule และ Distal convoluted tubule ไม่พบการเปลี่ยนแปลง สามารถสังเกตเห็นขอบเขตของเซลล์ของท่อไตส่วนต้นได้ชัดเจนและพบว่าไม่เกิดการสูญเสียของ Brush border ภายในท่อไตส่วนต้น

2. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ในเนื้อเยื่อไตของหนูแรท

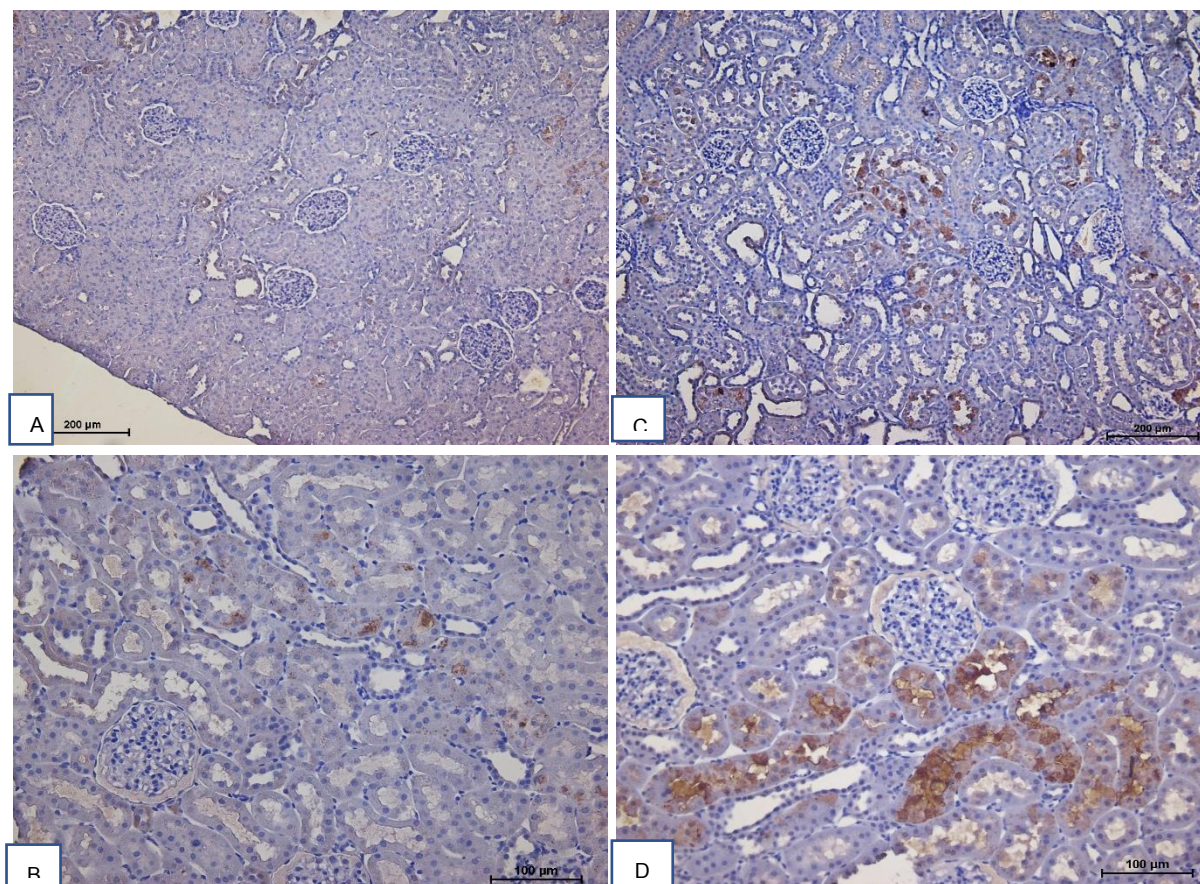
### Immunohistochemistry

#### 1) IL-1 $\beta$

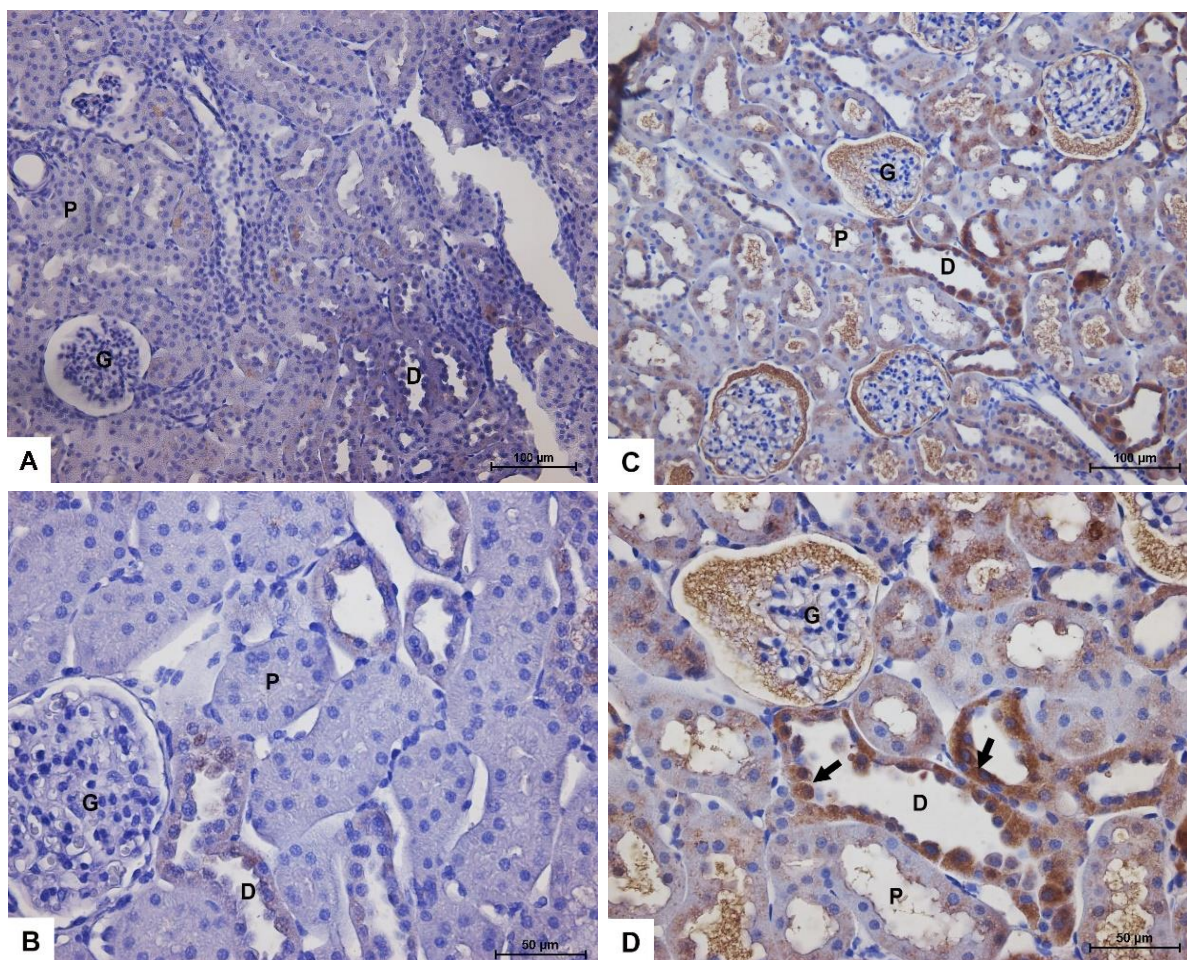


ภาพที่ 6 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 $\beta$  ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule



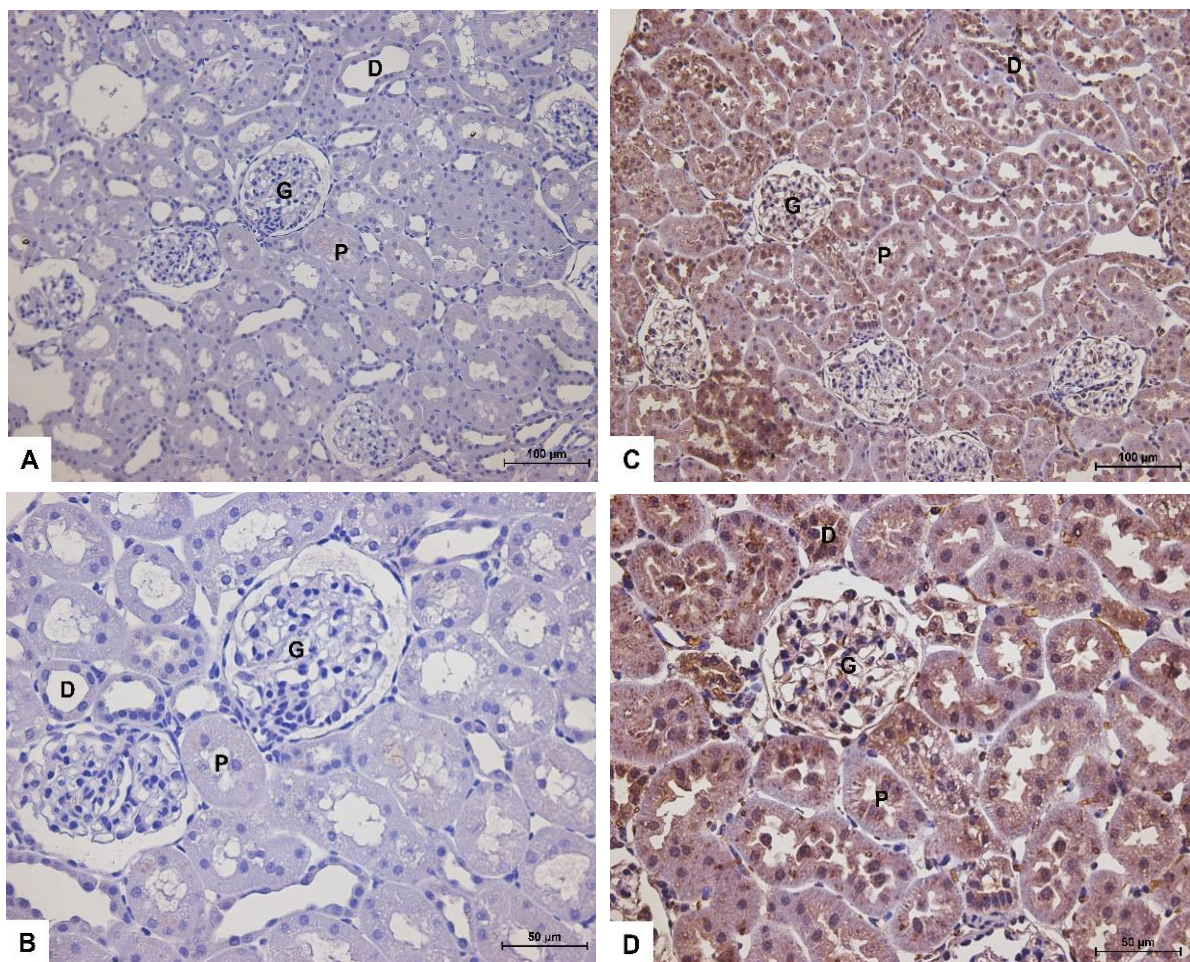


ภาพที่ 7 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 $\beta$  ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule



ภาพที่ 8 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 $\beta$  ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule

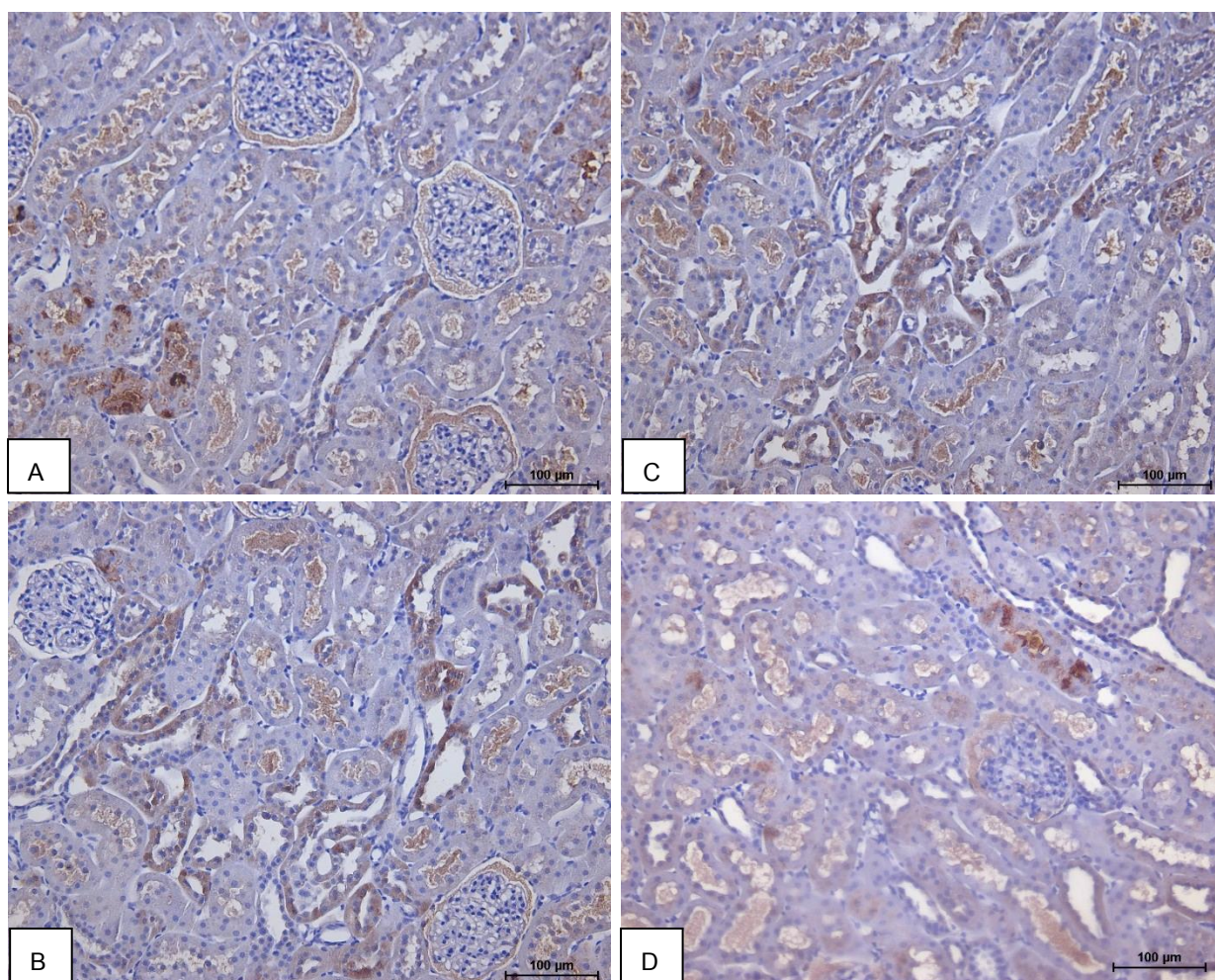
จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 0, 15, 30 วัน (ภาพที่ 6-8) ต่อการแสดงออกของ IL-1 $\beta$  ในเนื้อเยื่อไตของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ IL-1 $\beta$  ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันของระดับการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีจางถึงค่อนข้างปานกลางของ DAB ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอลมีการติดสีค่อนข้างเข้มของ DAB ซึ่งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการได้รับยาในวันที่ 15 และ 30 ตามลำดับ โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ distal convoluted tubules, proximal convoluted tubules และ glomerulus

2) TNF- $\alpha$ 

ภาพที่ 9 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ TNF- $\alpha$  ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน (C, D); G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule

จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของ TNF- $\alpha$  ในเนื้อเยื่อไตของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ TNF- $\alpha$  ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันของระดับการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีจางของ DAB ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอลมีการติดสีค่อนข้างปานกลางของ DAB ซึ่งเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการได้รับยาวันที่ 15 และ 30 ตามลำดับ (ภาพที่ 9) โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ distal convoluted tubules, proximal convoluted tubules และ glomerulus เช่นเดียวกับ IL-1 $\beta$

## 3) IL-10

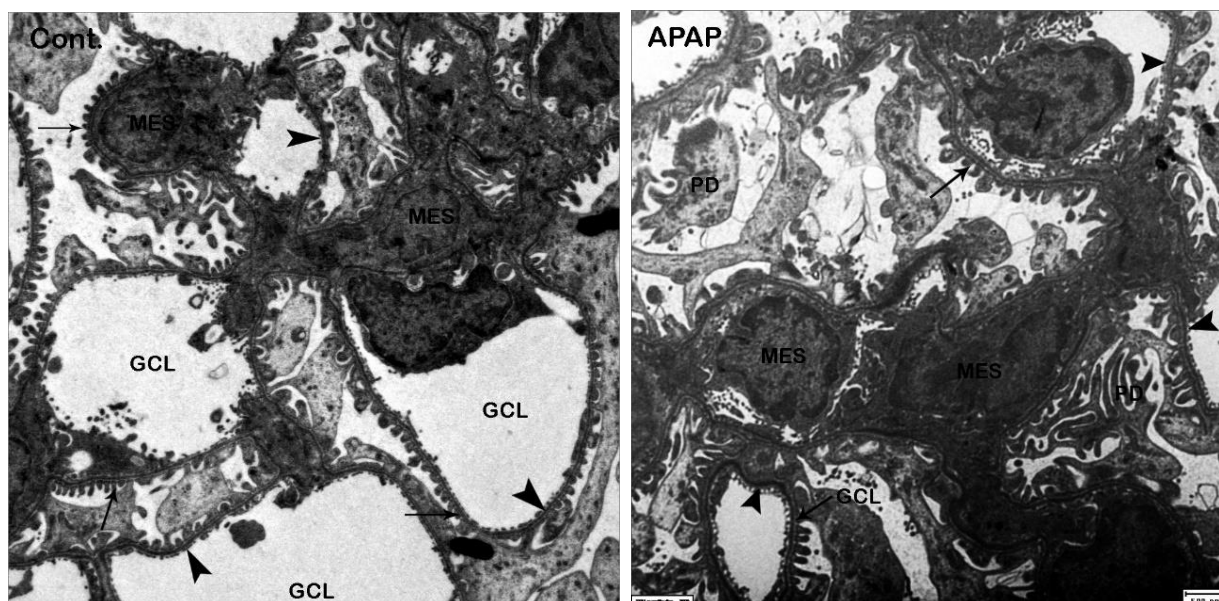


**ภาพที่ 10** ภาพถ่ายเนื้อเยื่อไตแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-10 ของหนูกลุ่มควบคุม (A) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0, 15, 30 วัน (B, C, D) ตามลำดับ; G=Glomerulus, P=Proximal convoluted tubule, D=Distal convoluted tubule

จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของ IL-10 ในเนื้อเยื่อไตของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ IL-10 ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันของระดับการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 และ 5 วัน จะติดสีของ DAB ระดับปานกลาง ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอล 30 วัน มีการติดสีของ DAB จางถึงปานกลาง (ภาพที่ 10) โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ distal convoluted tubules, proximal convoluted tubules และ glomerulus

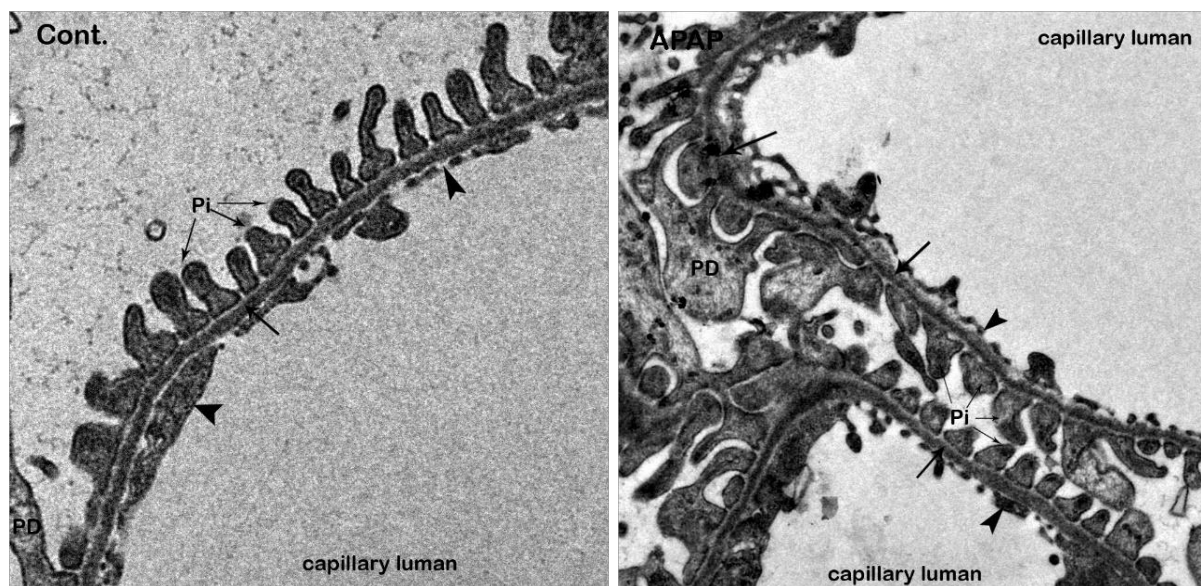
### 3. ผลการศึกษาโครงสร้างระดับเซลล์ของไตด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน

ศึกษาโครงสร้างระดับเซลล์ของเนื้อเยื่อไตเปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล นำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน ภายในบริเวณโกลเมอรูลัส แสดงดังภาพที่ 13 พบว่า glomerular capillary loop ขดม้วนเป็นวงรอบ mesangium ค้ำจุนหลอดเลือด มี podocytes แยกแขนงเป็น foot process หรือ pedicle และ endothelium เรียงรายติดอยู่กับผิวของ glomerular basement membrane ซึ่งในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลไม่มีการหลุดลอกหรือสูญเสียรูปร่างขององค์ประกอบภายใน glomerulus และเซลล์ภายในไม่แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติ



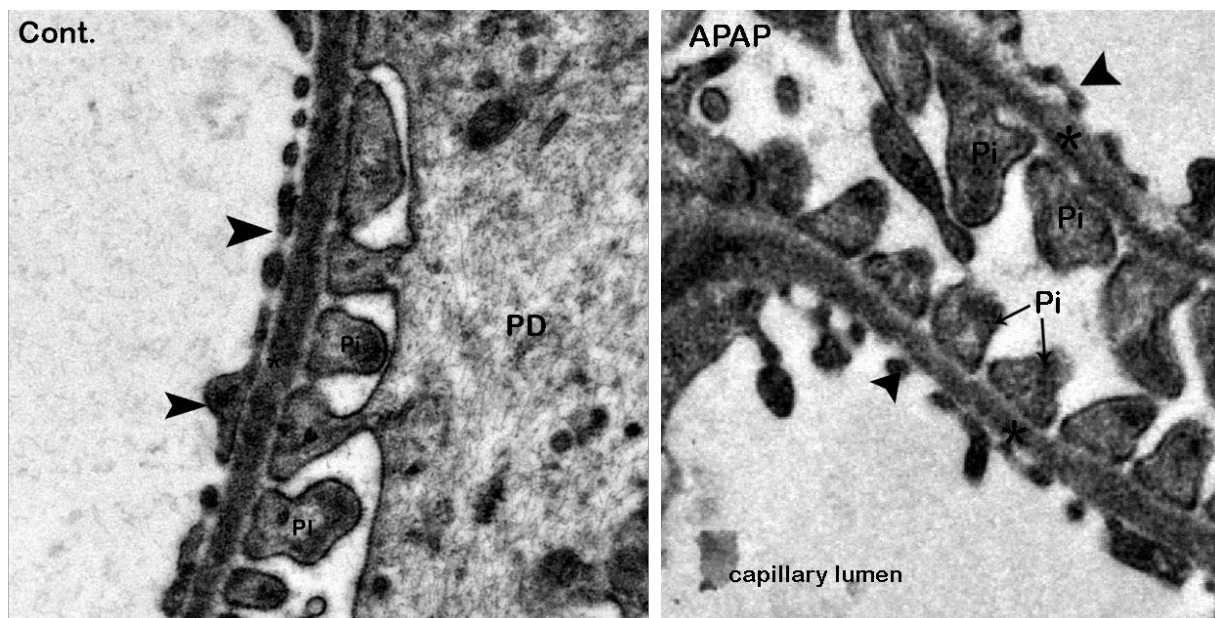
ภาพที่ 11 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ภายในโกลเมอรูลัสของเนื้อเยื่อไตกลุ่มควบคุม (ซ้าย) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (ขวา) กำลังขยาย 2000x glomerular capillary loop (GCL), mesangium (MES), podocytes (PD) การเรียงตัวของ pedicle(หัวลูกศร) glomerular basement membrane (ลูกศร)

ศึกษาความหนาที่บริเวณ Glomerular Basement Membrane เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดยความหนาวัดบริเวณส่วนของผนังหลอดเลือดฝอย ซึ่ง Glomerular Basement Membrane มี 3 ชั้น ประกอบด้วย Central lamina densa, Lamina interna rara และ Lamina rara externa พบว่าทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลมีการแยกชั้นเป็น 3 ชั้น ชัดเจน จากการศึกษาพบว่ามีความหนาของ Glomerular Basement Membrane ของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลโดยการวัดส่วนของ densa ไม่นับส่วนโปร่งใส บริเวณส่วนโค้งของ Basement Membrane พบว่าความหนาใกล้เคียงกันและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p$ -value=0.05)



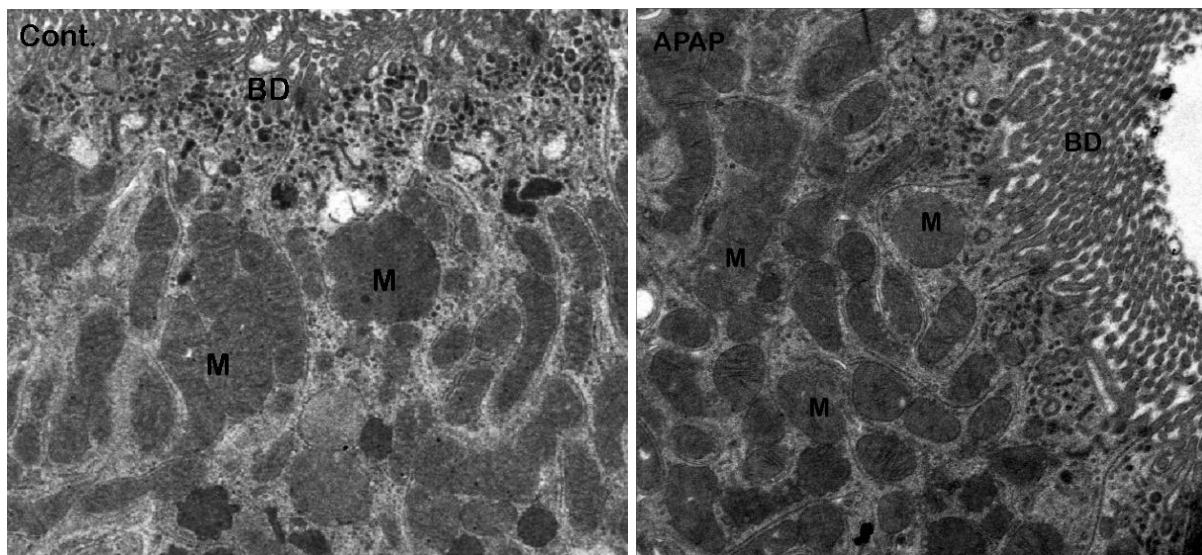
ภาพที่ 12 แสดงแสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ บริเวณ filtration membrane กลุ่มควบคุม (ซ้าย) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (ขวา) กำลังขยาย 3000x podocytes: PD การเรียงตัวของ pedicle: Pi glomerular basement membrane: ลูกศร, endothelium: หัวลูกศร

filtration slit เป็นช่องว่างระหว่าง pedicle เมื่อวัดช่อง filtration slit พบว่าความหนาใกล้เคียงกัน และไม่มี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p-value=0.05)



ภาพที่ 13 แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ของเนื้อเยื่อไต บริเวณ filtration membrane กลุ่มควบคุม (ซ้าย) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (ขวา) กำลังขยาย 10000x , podocytes: PD การเรียงตัวของ pedicle: Pi glomerular basement membrane: (\*), endothelium: หัวลูกศร

บริเวณท่อไตส่วนต้นจะพบ Brush boulder และ Mitochondria จำนวนมาก ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลไม่พบความเสียหายกับ Brush boulder แต่พบว่าในบริเวณ Mitochondria มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นทรงกลมกว่ากลุ่มควบคุมในกลุ่ม 30 วัน ซึ่งอาจจะเกิดจากการบวม (cellular swelling) ภายใน Mitochondria เกิดการเสียหายของ Cristae ทำให้เห็นรอยพับของ Cristae ใน Mitochondria ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม



**ภาพที่ 14** แสดงภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนเปรียบเทียบโครงสร้างระดับเซลล์ของเนื้อเยื่อไตบริเวณท่อไตส่วนต้น กลุ่มควบคุม (ซ้าย) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน (ขวา) กำลังขยาย 3000x ประกอบด้วย Brush boulder :BD และ Mitochondria :M



## อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาเนื้อเยื่อไตบริเวณเปลือกไตส่วนนอกจากกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 mg/kg/day ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 30 วันที่น่าย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin และสี Masson's Trichrome ของเนื้อเยื่อไตบริเวณเปลือกไตชั้นนอก (Cortex) ที่ประกอบไปด้วยโกลเมอรูลัส (Glomerulus) ท่อไตส่วนต้น (Proximal convoluted tubule) และท่อไตส่วนปลาย (Distal convoluted tubule) แล้วนำมาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบว่าในการศึกษานี้ไม่เกิดความผิดปกติของเนื้อเยื่อจากกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับยาพาราเซตามอล ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้าของ Suchismita ที่ให้พาราเซตามอลด้วยวิธี intraperitoneal ติดต่อกันเป็นเวลา 14 วัน พบว่าเฉพาะขนาดยาที่สูงๆ หรือขนาดยาตั้งแต่ 550 mg/kg/day จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของไตทางเนื้อเยื่อวิทยา โดยที่ส่วนของโกลเมอรูลัสและท่อไตเกิดความเสียหาย โดยพบว่าเซลล์ของท่อไตเกิดการสูญเสียขอบเขตของเซลล์ แต่ที่ขนาดยาต่ำๆ ที่ 175 mg/kg/day ไม่พบความผิดปกติในเนื้อเยื่อไต (Suchismita et al., 2015) และจากงานวิจัยของ Neto ที่ทำการทดลองในกลุ่มตัวอย่างที่ตั้งครรภ์โดยให้พาราเซตามอลด้วยวิธี Gavage พบว่าที่ขนาดยาต่ำๆ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไต ทั้งใน maternal และ fetal (Neto et al., 2004) แต่จากงานวิจัยก่อนหน้า พบว่าหากให้พาราเซตามอลที่ขนาดยาต่ำกว่าขนาดยาของการรักษาในระยะเวลาติดต่อกันยาวนานมากขึ้น สามารถทำให้เกิดความผิดปกติภายในไตได้ ในงานวิจัยทำการทดสอบการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างและโครงสร้างของไตระหว่างสัปดาห์ที่ 21 ถึง สัปดาห์ที่ 65 พบ การตายแบบ Necrosis ของ epithelium ส่วน thin limbs ของ loop of Henle และภายหลังพบการเกิด Cortical interstitial fibrosis และ tubular atrophy (Judith et al., 1990) ดังนั้นสำหรับการศึกษาในงานวิจัยนี้หากเพิ่มระยะเวลาในการให้พาราเซตามอลที่ติดต่อกันยาวนานมากขึ้น อาจจะพบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อไตเมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แต่อย่างไรก็ตาม ด้วยข้อจำกัดของการใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงที่มีกำลังขยายต่ำ จึงทำให้ไม่สามารถศึกษาโครงสร้างของไตได้ในระดับที่เล็กลงไปได้ ฉะนั้นหากโครงสร้างของมีการเปลี่ยนแปลงเพียงเล็กน้อยที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ การใช้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงจึงไม่สามารถที่จะบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นได้

และจากการศึกษาในครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อไตจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง ผู้วิจัยจึงยืนยันผลการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในระดับเซลล์ด้วยการศึกษาโครงสร้างระดับเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายในโกลเมอรูลัสและท่อไตส่วนต้น จากกลุ่มพบว่าภายในโกลเมอรูลัสประกอบด้วย mesangium podocytes และ endothelium เรียงรายติดอยู่กับผิวของ glomerular basement membrane ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อโครงสร้างดังกล่าวและความหนาของ glomerular basement membrane ของทั้งสองกลุ่ม ไม่แตกต่างกัน แต่พบ Mitochondria ที่อยู่ในท่อไตส่วนต้นมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นทรงกลม แสดงถึง Mitochondria เกิดการบวมและ Cristae ภายใน Mitochondria ลดลง ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Emma และคณะ ที่พบว่าความผิดปกติ Mitochondria จะเกิดที่ท่อไตส่วนต้นเป็นที่แรก เนื่องจากท่อไตส่วนต้นจะมี Mitochondria จำนวนมากมีการดูดกลับและขับสาร ความผิดปกติของท่อจึงมักจะเกิดความผิดปกติบริเวณ Mitochondria ของ tubular epithelium ซึ่งจะส่งผลให้ Mitochondria บวม จำนวนลดลง และ Cristae ลดลง (Emma et al., 2016) ซึ่งจะส่งผลต่อการดูดกลับและการขับสารออกนอกร่างกาย (Trumpet et al., 1992)

จากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นแสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาดในขนาดของการรักษา (therapeutic dose) 200 mg/kg/day ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 30 วัน ไม่พบความผิดปกติของโครงสร้างเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกไตส่วนนอกเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง และเมื่อยึดยึดผลด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน พบว่า มีความผิดปกติเฉพาะส่วนของ mitochondria โดยเกิดการบวม (swelling) และ cristae ภายใน mitochondria มีจำนวนลดลงที่บริเวณท่อไตส่วนต้น ซึ่งสอดคล้องกับผลงานวิจัยของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตหลั่ง pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมตามระยะเวลาที่ได้รับยาติดต่อกันนานขึ้น ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระดับ ultrastructure ที่พบจึงอาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการอักเสบจากการใช้ยาเป็นเวลานาน และจากผลของการเพิ่มการแสดงออกของ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  อาจเป็นผลมาจากการสะสมของ NAPQI ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานาน ทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดความเป็นพิษได้หมด ก่อให้เกิดการหลงเหลืออยู่ในอวัยวะต่างๆ ที่สามารถเมทาบอลิซายานี้ได้จากเอนไซม์ CYP2E1 จึงทำให้ NAPQI ไปกระตุ้นการเกิดภาวะ oxidative stress ของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  เพิ่มมากขึ้น และยับยั้งการแสดงออกของ anti-inflammatory cytokines ชนิด IL-10 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ astrocyte ที่มีการเพิ่มขึ้นของ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  เมื่อได้รับพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (Tantarungsee และคณะ, 2018) ซึ่งสัมพันธ์กับการเพิ่มการแสดงออกของ CGRP ใน trigeminal ganglion (Yisarakun และคณะ, 2015) และความผิดปกติของ tight junction ของ blood brain barrier รวมถึงการเพิ่มขึ้นของระดับ ICAM-1 ในสมอง (Yisarakun และคณะ, 2014)

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานในขนาดของการรักษา มีการแสดงออกของ IL-1 $\beta$  และ TNF- $\alpha$  ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเพิ่มสูงขึ้นและการลดลงของ IL-10 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุของพยาธิสภาพที่พบได้ในเนื้อเยื่อไต อย่างไรก็ตาม เพื่อให้สามารถอธิบายกลไกของยาพาราเซตามอลได้ชัดเจนขึ้น ควรทำการศึกษาระดับการแสดงออกของระดับของ glutathione ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานเพื่อยืนยันว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ oxidative stress หรือไม่

## รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 2560A10802224 สัญญาเลขที่ 136/2560  
โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)  
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2560 มหาวิทยาลัยบูรพา

ชื่อโครงการ ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของไตและปอดในหนู  
แรท (Effect of chronic paracetamol treatment on the alteration of kidney and lung in rat animal  
model)

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร.วราณรินทร์ ยิสารคุณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2559 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2562

ระยะเวลาดำเนินการ 3 ปี 0 เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี).....

### รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%)	244,500.00	บาท	เมื่อวัน	เดือน	ปี 22 พ.ย. 2559
งวดที่ 2 (40%)	195,600.00	บาท	เมื่อวัน	เดือน	ปี.....-.....
งวดที่ 3 (10%)	48,900.00	บาท	เมื่อวัน	เดือน	ปี.....-.....

รวม สองแสนสี่หมื่นสี่พันห้าร้อยบาทถ้วน

### รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	72,000	30,000	42,000
2. ค่าจ้าง	60,000	0 (ไม่ได้จ้างผู้ช่วยวิจัย)	60,000
3. ค่าวัสดุ	293,100	139,500	153,600
4. ค่าใช้สอย - ค่าจ้างเตรียมตัวอย่าง	15,000	15,000	0
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย) - ค่าสาธารณูปโภค	48,900	48,900	0
<b>รวม</b>	<b>489,000</b>	<b>233,400</b>	<b>255,600</b>

(ดร.วราณรินทร์ ยิสารคุณ)  
หัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน

## เอกสารอ้างอิง

- Alloui A, Chassaing C, Schmidt J, Ardid D, Dubray C, Cloarec A, Eschalier A. Paracetamol exerts a spinal, tropisetron-reversible, antinociceptive effect in an inflammatory pain model in rats. *Eur J Pharmacol.* 2002; 443:71-7.
- Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, Stanzione S, Porcile C, Russo C, Mancini F, Milanese C, Schettini G. Acetaminophen protects hippocampal neurons and PC12 cultures from amyloid beta-peptides induced oxidative stress and reduces NF-kappaB activation. *Neurochem Int.* 2002; 41: 43-54.
- Bisogno T. Endogenous cannabinoids structure and metabolism. *J Neuroendocrinol.* 2008; 20(Suppl 1): 1-9.
- Bjorkman R. Central antinociceptive effects of non-steroidal anti-inflammatory drugs and paracetamol. Experimental studies in the rat. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl.* 1995; 103:1-44.
- Björkman R, Hallman KM, Hedner J, Hedner T, Henning M. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain.* 1994; 57:259-64.
- Bourdi M, Eiras DP, Holt MP, Webster MR, Reilly TP, Welch KD, Pohl LR. Role of IL-6 in an IL-10 and IL-4 double knockout mouse model uniquely susceptible to acetaminophen-induced liver injury. *Chem Res Toxicol.* 2007; 20: 208-16.
- Boutaud O, Aronoff DM, Richardson JH, Marnett LJ, Oates JA. Determinants of the cellular specificity of acetaminophen as an inhibitor of prostaglandin H2 synthases. *National Acad Sciences.* 2002; 99:7130-35.
- Brodie BB, Axelrod J. The estimation of acetanilide and its metabolic products, aniline, N-acetyl p-aminophenol and p-amino-phenol, free and total conjugated, in biological fluids and tissues. *J Pharmacol Exp Ther.* 1948; 1:22-8.
- Bromm B, Forth W, Richter E, Scharein E. Effects of acetaminophen and antipyrine on non-inflammatory pain and EEG activity. *Pain.* 1992; 50: 213-21.
- Bujalska M. Effect of nitric oxide synthase inhibition on antinociceptive action of different
- Chantong C, Yisarakun W, Thongtan T, Maneesri-le Grand S. Increases of pro-inflammatory cytokine expression in hippocampus following chronic paracetamol treatment in rats. *Asian Archives of Pathology.* 2013; 9:137-146.
- Gonzalez-Barcala FJ1, Pertega S, Perez Castro T, Sampetro M, Sanchez Lastres J, San Jose Gonzalez MA, et al. Exposure to paracetamol and asthma symptoms. *Eur J Public Health.* 2013; 23: 706-10.
- Guhring H, Hamza M, Sergejeva M. A role for endocannabinoids in indomethacin-induced spinal antinociception. *Eur J Pharmacol.* 2002; 454:153-63.

- Hansson T., Tindberg N., Ingelman-Sundberg M. and Köhler C. Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neuroscience*. 1990; 34: 451-63.
- Herrero JF, Romero-Sandoval EA, Gaitan G, Mazario J. Antinociception and the new COX inhibitors: research approaches and clinical perspectives. *CNS Drug Rev*. 2003; 9:227-52.
- Högstätt ED, Jönsson BA, Ermund A, Andersson DA, Björk H, Alexander JP, et al. Conversion of acetaminophen to the bioactive N-acylphenolamine AM404 via fatty acid amide hydrolase-dependent arachidonic acid conjugation in the nervous system. *J Biol Chem*. 2005; 280: 31405-12.
- Inoue T, Mashimo T, Shibata M, Shibata S, Yoshiya I. Rapid development of nitric oxide-induced hyperalgesia depends on an alternate to the cGMP-mediated pathway in the rat neuropathic pain model. *Brain Res*. 1998; 792:263-70.
- Ito Y, Abril ER, Bethea NW, McCuskey RS. Role of nitric oxide in hepatic microvascular injury elicited by acetaminophen in mice. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286: G60-7.
- James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2003; 31: 1499-506.
- Majeed S.K., Ramadhan M.A. and Monther W. Long-term toxicological effects of paracetamol in rats. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 2013;27: 65-70.
- Meyers LL, Beierschmitt WP, Khairallah EA, Cohen SD. Acetaminophen-induced inhibition of hepatic mitochondrial respiration in mice. *Toxicol Appl Pharmacol*. 1988;93: 378-87.
- McBride JT. The association of acetaminophen and asthma prevalence and severity. *Pediatrics*. 2011; 128: 1181-5.
- Moskowitz MA, Cutrer FM. SUMATRIPTAN: a receptor-targeted treatment for migraine. *Annu Rev Med*. 1993; 44:145-54.
- Ottani A, Leone S, Sandrini M, Ferrari A, Bertolini A. The analgesic activity of paracetamol is prevented by the blockade of cannabinoid CB1 receptors. *Eur J Pharmacol*. 2006; 531:280-1.
- Ovadia H, Wohlman A, Mechoulam R, Weidenfeld J. Characterization of the hypothermic effect of the synthetic cannabinoid HU-210 in the rat. Relation to the adrenergic system and endogenous pyrogens. *Neuropharmacology*. 1995; 34:175-80.
- Pickering G, Estève V, Lorient MA, Eschalier A, Dubray C. Acetaminophen reinforces descending inhibitory pain pathways. *Clin Pharmacol Ther*. 2008; 84:47-51.
- Pickering G, Lorient MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther*. 2006; 79:371-8.

- Schildknecht S, Daiber A, Ghisla S, Cohen RA, Bachschmid MM. Acetaminophen inhibits prostanoid synthesis by scavenging the PGHS-activator peroxynitrite. *The FASEB Journal*. 2008; 22:215-24.
- Slosky LM, Thompson BJ, Sanchez-Covarrubias L, Zhang Y, Laracuenta ML, Vanderah TW, et al. Acetaminophen modulates P-glycoprotein functional expression at the blood-brain barrier by a constitutive androstane receptor-dependent mechanism. 2013. *Mol Pharmacol*. 84, 774-86.
- Sordillo JE, Scirica CV, Rifas-Shiman SL, Gillman MW, Bunyavanich S, Camargo CA Jr., et al. Prenatal and infant exposure to acetaminophen and ibuprofen and the risk for wheeze and asthma in children. *J Allergy Clin Immunol*. 2015; 135: 441-8.
- Sudano I, Flammer AJ, Périat D, Enseleit F, Hermann M, Wolfrum M, et al. Acetaminophen increases blood pressure in patients with coronary artery disease. *Circulation*. 2010; 122:1789-96.
- Sudano I, Flammer AJ, Roas S, Enseleit F, Noll G, Ruschitzka F. Nonsteroidal antiinflammatory drugs, acetaminophen, and hypertension. *Curr Hypertens Rep*. 2012; 14: 304-9.
- Supornsilpchai, W., le Grand, S.M., Srikiatkachorn, A. Cortical hyperexcitability and mechanism of medication-overuse headache. 2010. *Cephalalgia* 30, 1101-09.
- Tantarungsee, N. et al. (2018). Upregulation of Pro-inflammatory Cytokine Expression Following Chronic Paracetamol Treatment in Astrocyte. *Neurotoxicity Research*. 34(1), 137-146.
- Tjolsen A, Lund A, Hole K. Antinociceptive effect of paracetamol in rats is partly dependent on spinal serotonergic systems. *Eur J Pharmacol*. 1991; 193:193-201.
- Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative stress. *Microvasc Res*. 2009a; 77:289-96.
- Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *J Neuroinflammation*. 2009b; 6:10.
- Tripathy D, Sanchez A, Yin X, Martinez J, Grammas P. Age-related decrease in cerebrovascular-derived neuroprotective proteins: effect of acetaminophen. 2012. *Microvasc Res*. 84, 278-85.
- Woodbury, D.M., 1965. Analgesics and Antipyretics, in: Goodman, L.S., Gilman, A., (Eds.), *The pharmacological basis of therapeutics* 3rd edition. The Macmillan Company, New York, pp. 312–344.
- Yisarakun W, Supornsilpchai W, Chantong C, Srikiatkachorn A, Maneesri-le Grand S. Chronic paracetamol treatment increases alterations in cerebral vessels in cortical spreading depression model. *Microvascular Research*. 2014; 94:36–46
- Yisarakun W, Supornsilpchai W, Chantong C, Thongtan T, Srikiatkachorn A, Reuangwechvorachai P, Maneesri-le Grand S. Up-regulation of calcitonin gene-

related peptide in trigeminal ganglion following chronic exposure to paracetamol in a CSD migraine animal model. *Neuropeptides* 2015; 51: 9-16.

Zygmunt PM, Chuang H, Movahed P, Julius D, Högestätt ED. The anandamide transport inhibitor AM404 activates vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol.* 2000; 396:39-42.