



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

หัวหน้าโครงการวิจัย
ดร.วรานูรินทร์ ยิสารคุณ
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๖๑
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 256108A1080005

สัญญาเลขที่ 183/2561

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

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

หัวหน้าโครงการวิจัย

ดร.วรานูรินทร์ ยิสารคุณ

คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

1 ตุลาคม 2560 ถึง 30 กันยายน 2561

กิตติกรรมประกาศ (Acknowledgement)

โครงการวิจัยนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากความช่วยเหลืออย่างดีจากคณะบุคคลต่าง ๆ ดังนี้
ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ ผู้ร่วมโครงการวิจัยและที่ปรึกษาโครงการที่ได้ให้
คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการศึกษาวิจัยมาโดยตลอด รวมถึงตัวอย่างที่ใช้สำหรับการศึกษา
คุณวิลาวัลย์ จิ๋ว ที่ให้ความช่วยเหลือในการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ศึกษา
นิติระดับปริญญาตรี หลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาพยาธิวิทยาภาควิภาค ที่มีส่วนร่วมใน
การทำงานวิจัยและรวบรวมข้อมูลในการเขียนเล่มรายงาน
คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย ที่ให้การสนับสนุนเครื่องมือ และสถานที่ในการทำวิจัยครั้งนี้
งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณ
แผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการการวิจัยแห่งชาติ
เลขที่สัญญา 183/2561

ดร.วรานูรินทร์ ยีสารคุณ
หัวหน้าโครงการวิจัย

บทคัดย่อ

พาราเซตามอล เป็นยาที่นิยมใช้บรรเทาอาการปวดหลายชนิด เช่น ปวดศีรษะ ปวดกล้ามเนื้อ และปวดท้อง เป็นต้น เนื่องจากมีผลข้างเคียงน้อยและไม่ระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยที่ผ่านมาพบว่ายาพาราเซตามอลสามารถส่งผลเสีย (adverse effect) ต่อหลายอวัยวะในร่างกายแม้ใช้ในขนาดของการรักษา (therapeutic dose) ซึ่งคณะวิจัยเราได้พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ calcitonin gene-related peptide (CGRP) ใน trigeminal ganglion ที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องทำให้เกิดกระบวนการอักเสบแบบปลอดภัย ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงทำการศึกษเพิ่มเติมเพื่อพิสูจน์สมมติฐานดังกล่าว โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาต่อการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 β , TNF- α และ IL-10 การแสดงออกของ CGRP การแสดงออกของ superoxide dismutase (SOD) และระดับ glutathione ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรท โดยแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ normal saline และ 2. กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล ขนาด 200 mg/kg body weight ทุก 24 ชั่วโมง เป็นเวลา 30 วัน ผ่านทางช่องท้อง เมื่อครบกำหนดจึงเก็บปอดมาผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ และนำไปย้อมสีด้วยวิธี Hematoxylin & Eosin (H&E) และ Immunohistochemistry (IHC) เพื่อดูการแสดงออกของ IL-1 β , TNF- α และ IL-10 ผลการศึกษาพบว่าเมื่อย้อมด้วย H&E ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้าง ขนาด และการเรียงตัวของเยื่อเซลล์ชนิดต่างๆ ของเนื้อเยื่อปอดในหนูทั้ง 2 กลุ่ม แต่ผลการศึกษาด้วยการย้อม IHC พบว่ามีการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลมีการติดสีของ DAB ใน immunopositive cells เข้มสูงกว่ากลุ่มควบคุม และสอดคล้องกับกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของ CGRP ในปอดที่น่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องทำให้เกิดกระบวนการอักเสบแบบปลอดภัย ซึ่งตรงข้ามกับผลการศึกษาการแสดงออกของ IL-10 โดยการเปลี่ยนแปลงของระดับ cytokines ทั้ง 3 ชนิด เป็นผลมาจากการลดปริมาณการทำงานของ SOD และระดับ glutathione ดังนั้น จากการศึกษาครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานทำให้เพิ่มการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α สูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการเพิ่มของ CGRP หรือ toxic metabolite ของยານี้ ที่ไปมีผลกระตุ้นกระบวนการอักเสบและลดการทำงานของ anti-oxidants ทำให้เซลล์เกิดภาวะ oxidative stress

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 expression of calcitonin gene-related peptide (CGRP) in trigeminal ganglion in which cause of sterile inflammation. Thus, this study aimed to investigate the effect of this drug on expression of pro- and anti-inflammatory cytokines, CGRP, superoxide dismutase (SOD), and glutathione in lung tissues. The results show that long-term use of APAP increases the expression of IL-1 β และ TNF- α in a time dependent manner compare with the controls as correlate with the expression of CGRP. 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 SOD, glutathione, and toxic metabolite of this drug involve with oxidative stress.

สารบัญเรื่อง (Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	3
Abstract (ไทย).....	4
Abstract (English).....	5
บทนำ.....	9
วิธีดำเนินการวิจัย.....	16
ผลการศึกษวิจัย.....	21
อภิปรายผลการทดลอง.....	37
สรุปและข้อเสนอแนะ.....	37
เอกสารอ้างอิง.....	40
ภาคผนวก.....	43

สารบัญญภาพ (List of illustrations)

	หน้า
ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุม (0 วัน) แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอด.....	21
ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลัน แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอด.....	21
ภาพที่ 3 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุม (0 วัน) ที่มีการแสดงออกของ CGRP.....	22
ภาพที่ 4 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลันที่มีการแสดงออกของ CGRP.....	22
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดกลุ่มควบคุม (15 วัน) แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอด.....	23
ภาพที่ 6 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบกึ่งเรื้อรัง (15 วัน) แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอด.....	23
ภาพที่ 7 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุม (15 วัน) ที่มีการแสดงออกของ CGRP.....	24
ภาพที่ 8 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบกึ่งเรื้อรัง (15 วัน) ที่มีการแสดงออกของ CGRP.....	25
ภาพที่ 9 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน) แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอด.....	27
ภาพที่ 10 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุม (30 วัน) ที่มีการแสดงออกของ CGRP.....	28
ภาพที่ 11 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน) ที่มีการแสดงออกของ CGRP.....	29
ภาพที่ 12 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการออกของ SOD ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน)	31
ภาพที่ 13 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการออกของ IL-1 β ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน)	32
ภาพที่ 14 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการออกของ TNF- α ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน)	33
ภาพที่ 15 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการออกของ IL-10 ของหนูกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน)	34
ภาพที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบความเข้มสีของการติด DAB ของ IL-1 β ในเนื้อเยื่อปอดและไต.....	35
ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบความเข้มสีของการติด DAB ของ TNF- α ในเนื้อเยื่อปอดและไต.....	36

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย (List of Abbreviations)

APAP	N-acetyl- <i>p</i> -aminophenol, Acetaminophen, Paracetamol
BBB	Blood brain barrier
CGRP	Calcitonin Gene Related Peptide
CSD	Cortical Spreading Depression
CYP2E1	Cytochrome P450 2E1
NAPQI	<i>N</i> -acetyl- <i>p</i> -benzoquinoneimine
TNF- α	Tumor necrosis factor-alpha
IL-1 β	Interlukin-1 beta
IL-10	Interleukin-10
SOD	Superoxide dismutase

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 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นเกินกว่าข้อบ่งใช้ของยานี้ 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 เพิ่มมากขึ้นเมื่อใช้ยาเป็นระยะเวลานาน 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) ดังนั้นการใช้ยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานจึงอาจส่งผลให้เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของระบบหลอดเลือดสมองได้รับผลกระทบได้ ซึ่งยืนยันได้จากผลงานวิจัยของคณะวิจัยเราที่ผ่านมา ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังในหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบรับรู้ความเจ็บปวดของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ โดยพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเป็นเวลา 30 วัน มีการตอบสนองของ cortical neurons ต่อการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ CSD มากกว่ากลุ่มควบคุม (Suprongsilpchai และคณะ, 2010) และนอกจากนี้ยังพบว่ามี การแสดงออกของ 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 ซึ่งมีการวิจัยที่ทำการทดสอบการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษาในหนูแรทเป็นระยะเวลานาน 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 เนื่องจากมีรายงานผลการวิจัยจำนวนมากที่แสดงให้เห็นว่าการใช้น้ำอย่างต่อเนืองเป็นเวลานาน ทำให้มีความเสี่ยงของการเป็นโรคหอบหืด (asthma) เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งการใช้น้ำขณะแม่ตั้งครรภ์หรือในเด็กเล็ก (McBride, 2011; Gonzalez-Barcala et al., 2013; Shaw, 2013; Sordillo et al., 2015) ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง 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 ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ pro-inflammatory neuropeptide (calcitonin-gene related peptide) และระดับของ glutathione จากเนื้อปอด

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

3. ขอบเขตของโครงการวิจัย

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

4. ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นๆ จะทำให้เกิดความผิดปกติต่อเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของไตและปอด 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 และมีผลข้างเคียงของการใช้ยาน้อย ดังนั้นจึงทำให้ประชาชนทั่วไปเลือกใช้นี้เป็นอันดับแรกเมื่อมีอาการปวดหรือเป็นไข้ นอกจากนี้ในปัจจุบันยังมีการโฆษณาขายยานี้ตามสื่อต่างๆ อย่างแพร่หลาย จึงเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ประชาชนเข้าถึงการใช้ยาได้ง่าย

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) ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับซีโรโตนิน (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

กลไกการออกฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับซีโรโตนิน

การศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่า ความสามารถในการลดปวดของยาพาราเซตามอลนั้นเกี่ยวข้องกับกระบวนการควบคุมความเจ็บปวดจากระบบประสาทส่วนกลางโดยซีโรโตนิน โดยมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นต่อตัวรับซีโรโตนินชนิด 5-HT₃ (Tjolsen และคณะ, 1991; Alloui และคณะ, 2002) ซึ่งสอดคล้องกับการวิจัยในคนที่พบว่าเมื่อมีการให้ tropisetron หรือ granisetron ซึ่งเป็น 5-HT₃ receptor antagonist ร่วมกับการให้ยาพาราเซตามอล จะสามารถยับยั้งผลในการลดปวดของยานี้ได้ทั้งหมด (Pickering และคณะ, 2006) ซึ่งแสดงให้เห็นว่ากลไกการออกฤทธิ์ของยาพาราเซตามอลนั้นน่าจะมีส่วนที่ออกฤทธิ์ผ่านการกระตุ้นต่อระบบซีโรโตนิน 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-aminophenal ได้ด้วย ซึ่ง p-aminophenal 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 H₂ synthetase

เอนไซม์ Prostaglandin H₂ synthetase เป็นเอนไซม์ที่สำคัญในกระบวนการเปลี่ยน arachidonic acid ให้เป็น unstable prostaglandin H₂ (PGH₂) โดยผลการวิจัยแสดงว่า ยาพาราเซตามอลสามารถยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ PGH₂ synthetase ในบริเวณเร่ง peroxidase (pox) site โดยการรบกวนต่อการสร้าง Fe⁴⁺=OPP ซึ่งเป็น co-substrate (Anderson และคณะ, 2008) นอกจากนี้ยังมีอีกหลายการวิจัย ที่สนับสนุนว่า ยาพาราเซตามอลสามารถยับยั้งเอนไซม์ PGH₂ synthetase ได้ (Boutaud และคณะ, 2002; Schidknecht และคณะ, 2008)

กระบวนการเมทาบอลิซึมของพาราเซตามอล

ในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ใช้สำหรับการรักษาพบว่า ยานี้มีกระบวนการเมทาบอลิซึมหลักที่ตับโดยการ 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 ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานเกินกว่าข้อบ่งใช้ของยานี้ 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) แต่จากการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนี้เป็นเพียงการศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลานั้นๆ เท่านั้น

แต่อย่างไรก็ตาม ในช่วงระยะเวลา 10 ปีที่ผ่านมา เริ่มมีรายงานถึงผลเสียที่เกิดจากการได้รับยาพาราเซตามอลแม้ว่าจะใช้ในขนาดของการรักษา โดยพบว่าคนไข้ที่มีอาการของ coronary heart diseases เมื่อ

ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับยาที่ใช้รักษาโรคตามปกติเป็นเวลานาน 2 สัปดาห์ขึ้นไป มีระดับความดันเลือดสูงมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมด้วย (Sudano และคณะ, 2010; 2012) ดังนั้นการใช้ยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานจึงอาจส่งผลให้เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของระบบหลอดเลือดสมองได้รับผลกระทบได้ ซึ่งยืนยันได้จากผลงานวิจัยของคณะวิจัยเราที่ผ่านมา ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังในหนูที่ได้รับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ซึ่งเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของระบบรับรู้ความเจ็บปวดของหลอดเลือดบริเวณศีรษะ โดยพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเป็นเวลา 30 วัน มีการตอบสนองของ cortical neurons ต่อการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ CSD มากกว่ากลุ่มควบคุม (Suprongsilpchai และคณะ, 2010a) และนอกจากนี้ยังพบว่ามี การแสดงออกของ 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 ยังพบว่าการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษาในหนูแรทเป็นระยะเวลานาน 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 ซึ่งสัมพันธ์กับผลการย้อมการแสดงผลของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ nitrotyrosine (James และคณะ, 2003) และยังพบว่า IL-1 β มีการหลั่งออกมาเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว และสามารถเหนี่ยวนำ iNOS ได้ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในหนู mice ที่มีภาวะพร่องทั้ง IL-10 และ IL-4 ที่พบว่ามีความไวสูงมากต่อความเป็นพิษของยาพาราเซตามอล โดยมีระดับของ glutathione ในตับลดต่ำลง แต่มีระดับของ pro-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้นอย่างมาก เช่น TNF α , MIP-1 α 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- κ B ในกระบวนการอักเสบ (Bisaglia และคณะ, 2002) เช่นเดียวกับลดการหลั่ง pro-inflammatory cytokines จากเซลล์ประสาทได้ (Tripathy และ Grammas, 2009b)

แต่อย่างไรก็ตาม การศึกษาของคณะวิจัยเราเมื่อไม่นานมานี้ได้แสดงให้เห็นว่า การให้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษา ก็สามารถเพิ่มการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines เพิ่มขึ้นทั้งสมอง

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 เป็นสารสื่อประสาทที่ได้รับการยอมรับมานานแล้วที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดความรู้สึกร้าว และสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ neurogenic inflammation ได้ (Moskowitz, 1993)

สรุป

ดังนั้น ระยะเวลาของการใช้ยาจึงเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่จะมีผลต่อการแสดงของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบถึงแม้จะใช้ยาในขนาดของการรักษาก็ตาม ซึ่งนอกเหนือจากผลกระทบของการใช้ยาพาราเซตามอลต่อระบบประสาทและหลอดเลือดสมองแล้ว คณะผู้วิจัยยังสนใจศึกษาถึงผลกระทบของการใช้ยานี้ที่อาจเกิดขึ้นที่อวัยวะอื่นๆ เช่น ไต และปอด เพื่อนำข้อมูลผลของการใช้ยาเผยแพร่ให้กับผู้ใช้นี้ในการรักษาได้รับทราบและเป็นข้อควรระวังในการใช้ยาต่อไป ดังเช่น กลุ่มผู้ป่วยโรคเรื้อรังต่างๆ ที่มีการใช้พาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน

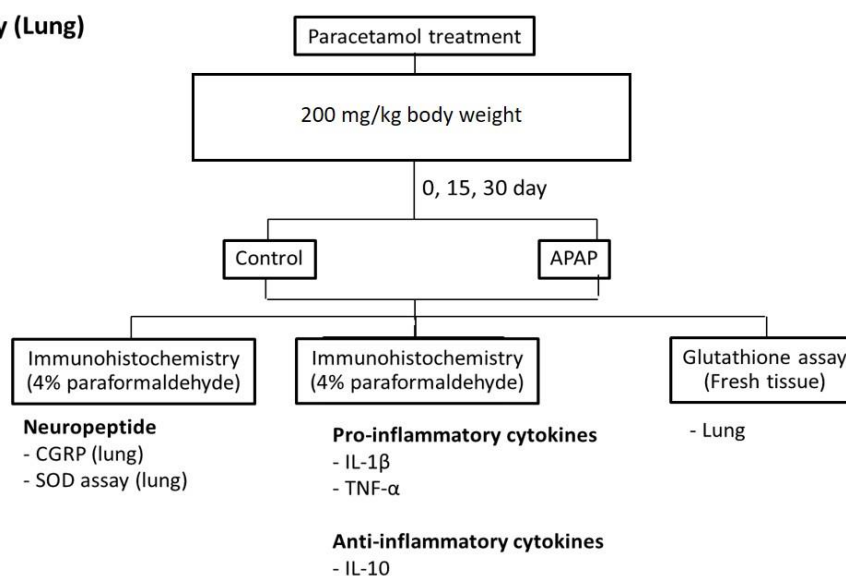
วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาย่อยที่ 1 (ดังแสดงในภาพที่ 1)

ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (200 mg/kg body weight) เป็นเวลา 15 และ 30 วัน ต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ pro-inflammatory neuropeptide ในปอด การแสดงออกของ pro-inflammatory cytokine และ anti-inflammatory cytokine และระดับของ glutathione เปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (0 วัน)

In vivo study (Lung)



ภาพที่ 1 แผนภาพการแบ่งสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของปอด 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 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 หลังจากนั้นผ่าตัดเก็บปอด ทำการแช่ชิ้นเนื้อทั้งหมดลงในสารละลาย

4% paraformaldehyde ใน 0.1 M PBS (อุณหภูมิ 4°C) นานข้ามคืน สำหรับใช้ศึกษาทาง immunohistochemistry

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 ล้างสีส่วนเกินด้วย น้ำประปาไหลผ่านและ 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 แล้วเติมน้ำเข้าในเนื้อเยื่อด้วยการแช่สไลด์ใน 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 หากสีย้อมติดสีเข้มเกินไปให้ละลายด้วย phosphomolybdic-phosphotungstic acid เป็นเวลา 10-15 นาทีจนกว่าคอลลาเจนไม่ติดสีแดงของ biebrich scarlet-acid fuchsin จากนั้นย้อมสไลด์เนื้อเยื่อด้วย aniline blue หรือ light green เป็นเวลา 5-10 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น ทำการเติมน้ำออกด้วย 95% ethanol และ absolute ethanol ตามลำดับ แช่สไลด์ใน xylene 2 ครั้ง ครั้งละ 3 นาที และจากนั้นทำการการยัด mounting medium แล้วปิดด้วย cover glass

กระบวนการเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาโดยเทคนิค Immunohistochemistry เพื่อศึกษาการแสดงออกของ CGRP

หลังจากทำการแช่ชิ้นเนื้อปอดใน 4% paraformaldehyde นานข้ามคืนแล้ว จากนั้นจึงนำชิ้นเนื้อมา dehydrate ลงในแอลกอฮอล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ (70% ถึง 100%) ก่อนฝังลงใน paraffin และตัด section ที่ความหนา 3 μm ด้วยเครื่องไมโครทอม หลังจากนั้นนำ slide มาทำการ deparaffinization แล้วเติม antigen retrieval (citrate buffer pH 6) ลงไป แล้วจึงทำการ block endogenous peroxidase และ non-specific binding โดยใช้ 3% H_2O_2 และ 4% bovine serum albumin ตามลำดับ บ่ม section ด้วย primary antibody (rabbit anti-CGRP ที่ dilution 1:5,000 ใน PBST) จากนั้น incubate ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส overnight จากนั้นนำมาล้าง primary antibody ออกด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที แล้วลง Secondary antibody (goat anti-rabbit conjugated HRP ที่ dilution 1: 1,000) incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้าง Secondary antibody ส่วนเกินออกด้วย 0.1% PBST 3 ครั้ง ครั้งละ 5

นาที่ และน้ำกลั่น 5 นาที่ ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้ชุด DAB Detection Kit นำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้ว มาล้างและติดบน slide และปิดด้วย cover slip นำ slide ที่ได้มาศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่มี immunoreactivity ต่อ antibody ที่ศึกษาจะติดสีน้ำตาลเข้ม หลังจากนั้นศึกษาตำแหน่งและการกระจายของเซลล์ที่เกิด immunoreactivity

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 μm ด้วยเครื่องมือโครโตม หลังจากนั้นนำ slide มาทำการ deparaffinization แล้วเติม antigen retrieval (citrate buffer pH 6) ลงไป แล้วจึงทำการ block endogenous peroxidase และ non-specific binding โดยใช้ 3% H_2O_2 และ 4% bovine serum albumin ตามลำดับ บ่ม section ด้วย primary antibody ต่อ IL-1 β , TNF- α , IL-10 ที่ 4 $^{\circ}\text{C}$ นานข้ามคืน ซึ่งปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นใช้ชุด DAB Detection Kit นำชิ้นเนื้อที่ทำปฏิกิริยาเรียบร้อยแล้ว มาล้างและติดบน 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

การเก็บตัวอย่างสด

เมื่อครบกำหนดเวลาการได้รับ 0.9% normal saline และยาพาราเซตามอลแล้ว หนูทดลองกลุ่มละ 5 ตัวจะได้รับการฉีดยาสลบ (sodium pentobarbital) แบบ overdose แล้วทำการผ่าเปิดสัตว์ทดลองตั้งแต่ช่องท้องจนถึงบริเวณหัวใจ ใช้เข็มแทงผ่านตั้งแต่ส่วนยอดหัวใจผ่านหลอดเลือดแดงใหญ่ (aorta) แล้วจึง perfuse ด้วย 0.1 M PBS ปริมาตร 250 มิลลิลิตร หลังจากนั้นผ่าตัดเก็บปอดใส่ลงใน cryotube และแช่ลงในไนโตรเจนเหลวก่อนนำไปเก็บไว้ที่ -80 $^{\circ}\text{C}$

การตรวจวัด glutathione

นำเนื้อเยื่อปอด homogenize ด้วย ice-cold 50 mM MES หรือ phosphate, pH 6-7 ที่มี 1mM EDTA มาทำการปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 10,000xg เป็นเวลา 15 นาที ที่ 4°C เก็บส่วน supernatant เก็บที่ -80°C หลังจากนั้นนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ด้วยชุด Glutathione assay kit และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer

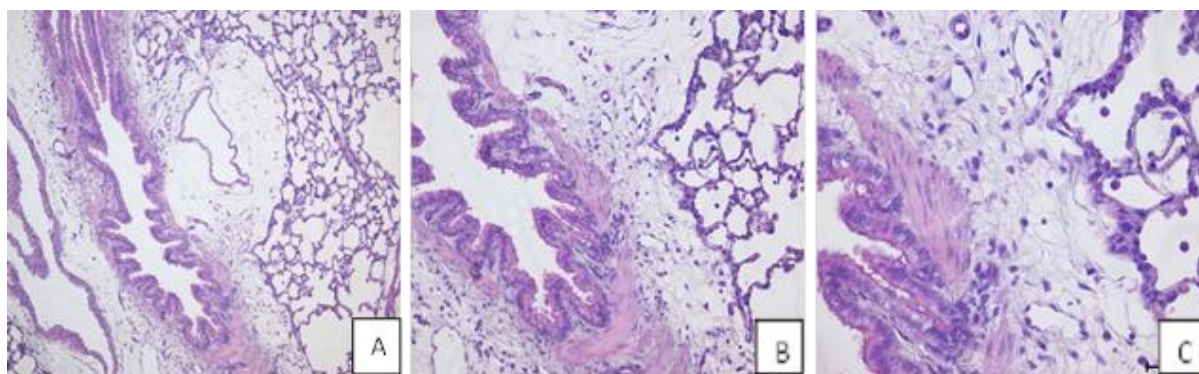
ตรวจวัด SOD โดยวิธี immunohistochemistry

ทำการตัดชิ้นเนื้อปอดที่ฝังใน paraffin หนา 5-7 um วางบน superfrost slide หลังจากนั้นทำการ deparaffin ด้วย xylene และทำการดึงน้ำกลับเข้าสู่เซลล์โดยการนำสไลด์แช่ลงใน ethanol จากความเข้มข้นสูงไปต่ำ (100%, 95%, 70%) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้นทำการบล็อก endogenous peroxidase ด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 10 นาที และนำไปล้างด้วย PBS 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และทำการบล็อก non-specific background ด้วย 10% bovine serum albumin เป็นเวลา 30 นาที ในสภาพควบคุมความชื้น เมื่อครบเวลาเทซีรัมทิ้ง แล้วใส่ primary antibody (MnSOD) ที่ dilution 1: 200 หลังจากนั้นนำสไลด์ไป incubate เป็นเวลา ชั่วโมง ในสภาพควบคุมความชื้น และนำไปล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที และจึงนำมาใส่ secondary antibody (goat-anti-rabbit-mouse IgG) ใน dilution 1: 500 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ในสภาพควบคุมความชื้น แล้วจึงล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นทำการใส่ avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) จำนวน 300 ul ลงบนสไลด์ แล้วล้างด้วย PBS จำนวน 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หลังจากนั้นใส่ DAB ปริมาณ 300 ul ให้เกิดปฏิกิริยาเป็นเวลา 1-2 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 2 นาที นำสไลด์ไปย้อมด้วย hematoxylin เพื่อ counterstain เป็นเวลา 3 นาที หลังจากนั้นนำมาล้างด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 1 นาที ทำการดึงน้ำออกจากเซลล์ด้วย ethanol จากความเข้มข้นต่ำไปสูง (70%, 95%, 100%) ตามด้วย xylene และจึงทำการ mounting slide เพื่อนำไปศึกษาผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

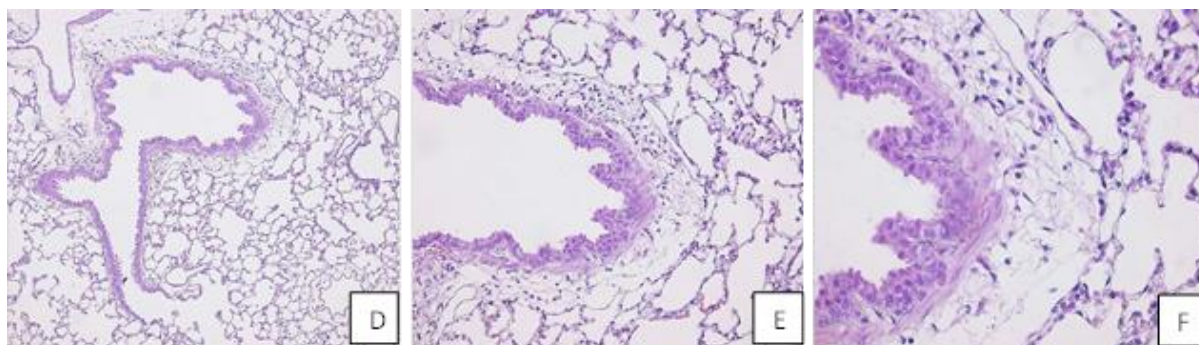
ผลการวิจัย

1. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลัน (0 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอดในหนูแรท

การติดสีของ Hematoxylin และ Eosin ในเนื้อเยื่อปอดพบว่าประกอบไปด้วย bronchiole ซึ่งจะสังเกตจากชั้น mucolaris mucosa ที่เป็นตัวแบ่งชั้น mucosa และ submucosa ซึ่งการหดตัวของกล้ามเนื้อจะทำให้เกิดการ folding ของ mucosa ซึ่งผิวด้านในจะบุด้วย simple low columnar epithelium ถึง simple cuboidal และเซลล์บุผิวส่วนใหญ่จะเป็น ciliated columnar epithelium ด้านนอกล้อมรอบด้วย loose fibro-elastic connective tissue ซึ่งรอบๆ เซลล์ bronchiole จะประกอบไปด้วยถุงลมปอดที่บุด้วย simple squamous epithelium cell



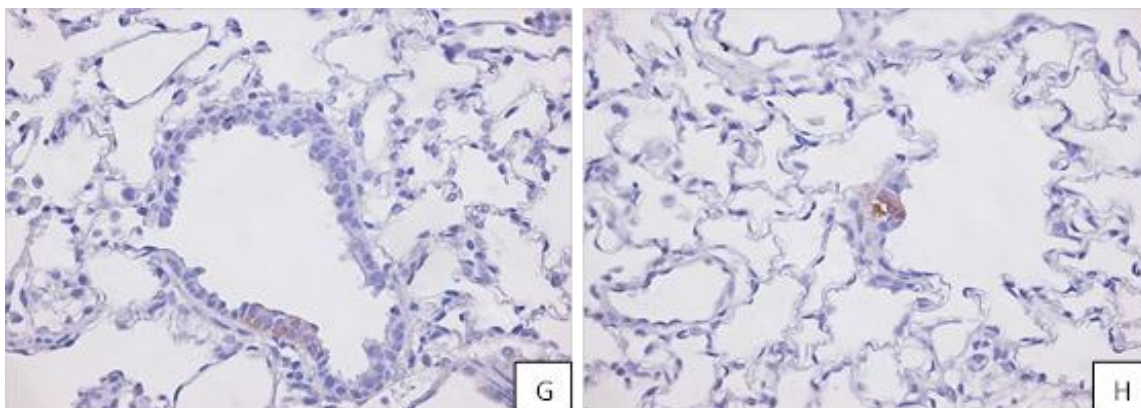
ภาพที่ 1 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุม แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอดที่กำลังขยาย 10X (A), 20X (B), และ 40X (C)



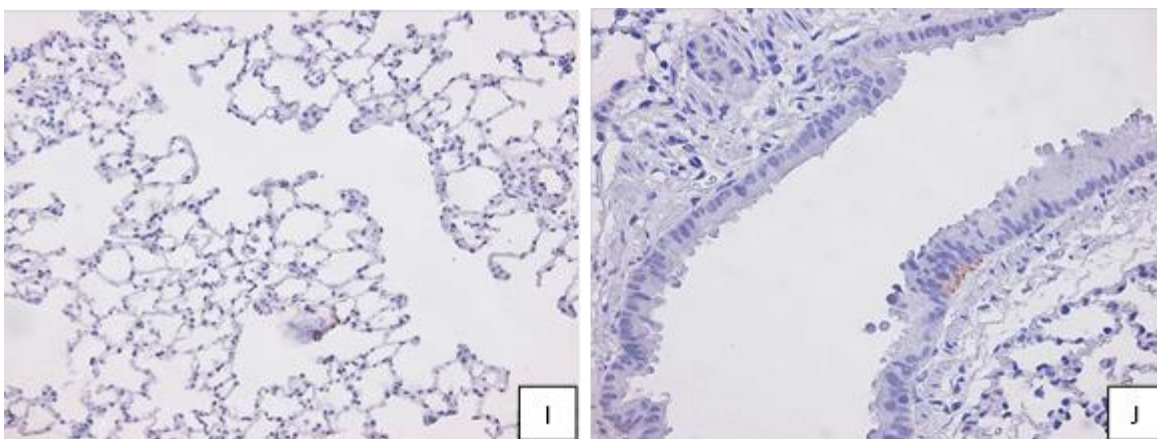
ภาพที่ 2 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลัน แสดงลักษณะทางจุลกายวิภาคของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอดที่กำลังขยาย 10X (D), 20X (E), และ 40X (F)

จากการทดลองการใช้ยาพาราเซตามอลเพื่อการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลันต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของปอดในหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม ด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin ตามภาพพบว่าในหนูแรทกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งลักษณะโครงสร้าง ขนาด และการ

เรียงตัวของเยื่อชนิดต่างๆ ของเนื้อเยื่อปอด เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสังเกตจากโดยสังเกตจาก เซลล์เยื่อของผนัง bronchiole ไม่พบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดอื่นจากการทดลองการใช้ยาพาราเซตามอลเพื่อการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลันต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ CGRP ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรททั้ง 2 กลุ่มด้วยวิธี immunohistochemistry พบว่าในหนูแรททั้งกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลและกลุ่มควบคุม เนื้อเยื่อปอดมีเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลของ CGRP ใกล้เคียงกันทั้ง 2 กลุ่ม ในบริเวณของ epithelium ของ bronchiole



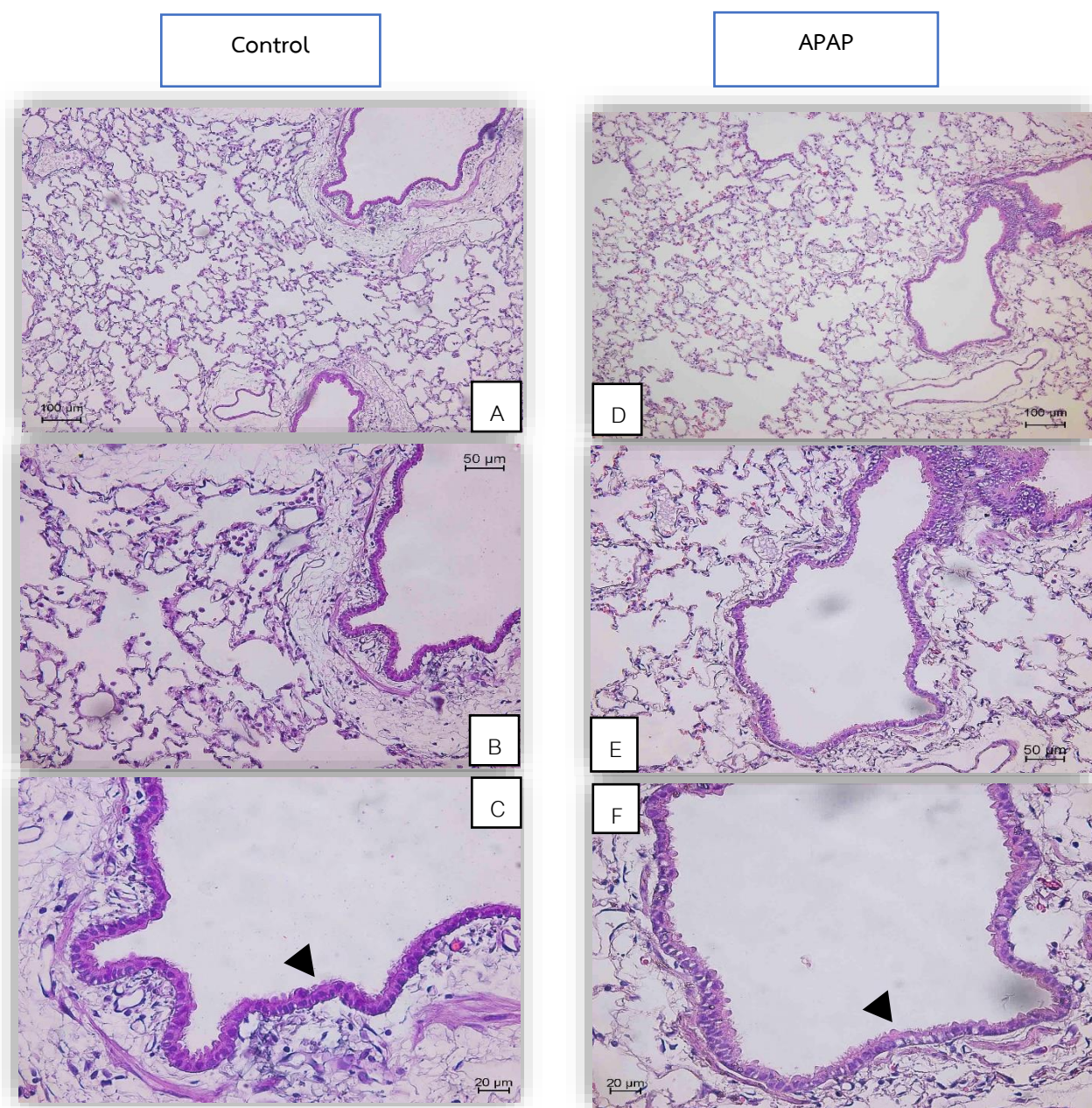
ภาพที่ 3 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุมที่มีการแสดงออกของ CGRP บริเวณ Bronchiole epithelium (G) และ alveolar duct (H) จากการติดสีของ DAB ลักษณะสีน้ำตาลอ่อน (Light brown)



ภาพที่ 4 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเฉียบพลันที่มีการแสดงออกของ CGRP บริเวณ alveolar duct (I) และ Bronchiole epithelium (J) จากการติดสีของ DAB ลักษณะสีน้ำตาลอ่อน (Light brown)

2. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบกึ่งเรื้อรัง (15 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอดในหนูแรท

การเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างของเนื้อเยื่อปอดที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin and Eosin เพื่อดูลักษณะทางโครงสร้างของเนื้อเยื่อปอดระหว่างกลุ่มควบคุม (Control) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (APAP)

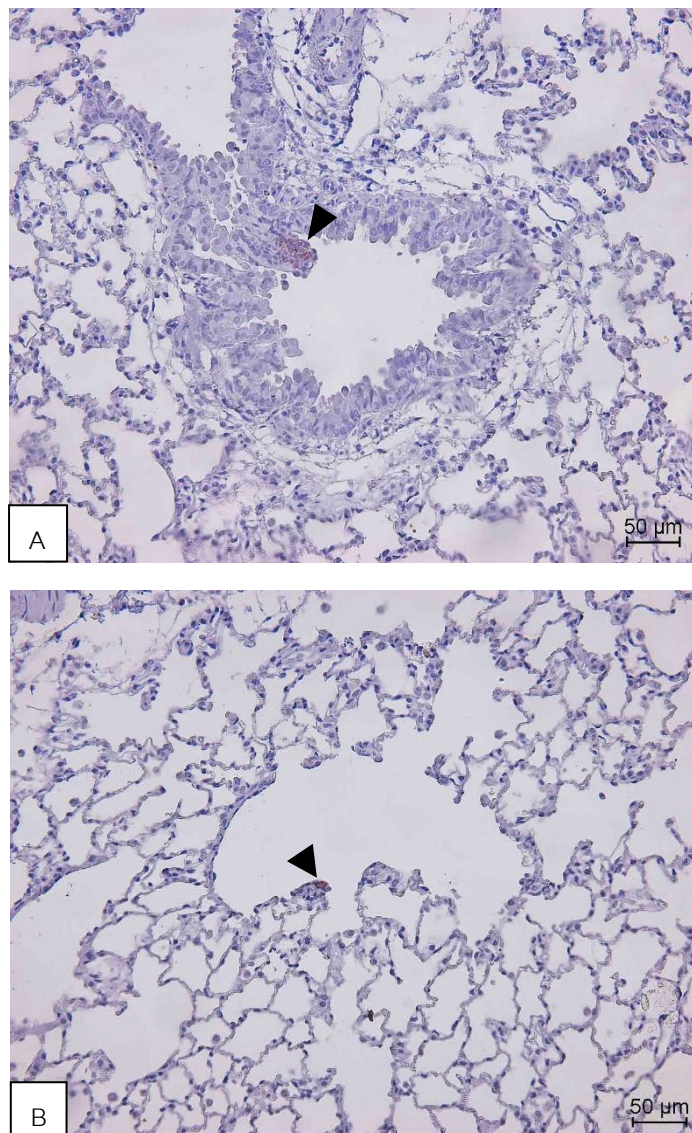


ภาพที่ 5 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของกลุ่มควบคุมด้วยกำลังขยาย 10X(A), 20X(B), 40X(C)

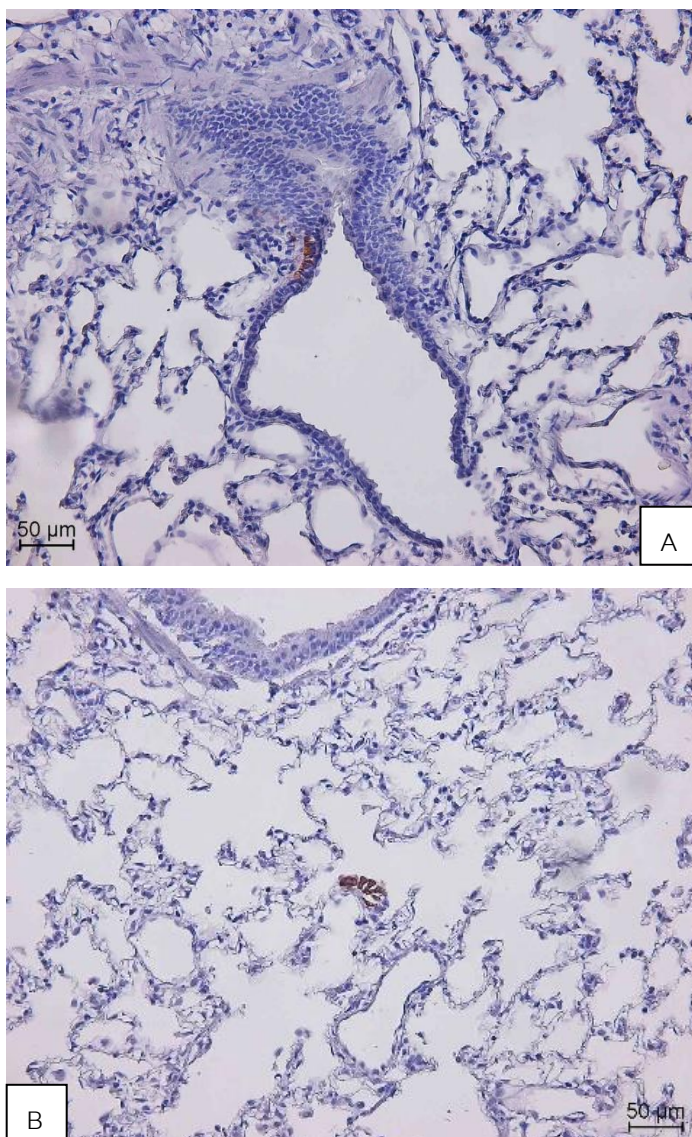
ภาพที่ 6 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลกำลังขยาย 10X(D), 20X(E), 40X(F)

จากศึกษาลักษณะโครงสร้างของทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง ขนาด การเรียงตัวของชั้นเยื่อชนิดต่างๆ ของเนื้อเยื่อปอด โดยสังเกตจากผนังของ bronchiole ชั้น mucosa ที่มี epithelium cell ชนิด pseudo stratified columnar ciliated ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นชนิดอื่น ชั้น lamina propria มี elastic fiber ชั้น muscularis mucosea เป็นกล้ามเนื้อเรียบที่เรียงตัวกันเป็นวงกลมและชั้น adventitia เป็น loose connective tissue นอกจากนี้ส่วน respiratory portion ที่มี alveolar duct เป็นท่อยาวที่เกิดจากการรวมตัวกันของ alveolar sac, alveolar sac เป็นส่วนคล้ายถุงที่เกิดจากการรวมตัวของ alveolus ระหว่าง alveolus ที่อยู่ติดกันมี interalveolar septum กันอยู่โดยมี simple squamous epithelium เป็น cell lining โดยพบเซลล์ 2 ชนิด คือ pneumocyte Type I และ pneumocyte type II

การแสดงออกของโปรตีน Calcitonin gene-related peptide (CGRP) ด้วยการย้อม Immunohistochemistry โดยการเปรียบเทียบความแตกต่างของการติดสีที่ย้อมด้วย DAB



ภาพที่ 7 (A) ภาพถ่ายกลุ่มควบคุมที่มีการติดบริเวณ Bronchiole epithelium (B) alveolar duct ที่มีการติดสีของ DAB ลักษณะสีน้ำตาลอ่อน (Light brown)



ภาพที่ 8 ภาพถ่ายกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลพบว่ามีลักษณะการติดสีน้ำตาลเข้ม (Dark brown) ของ DAB ในบริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct

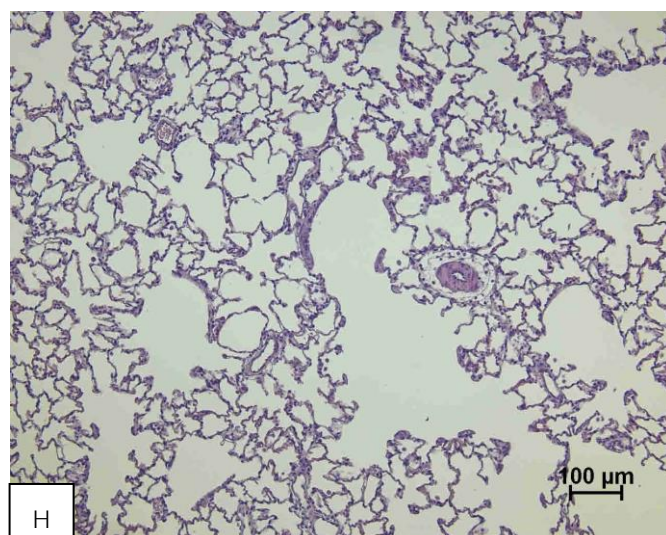
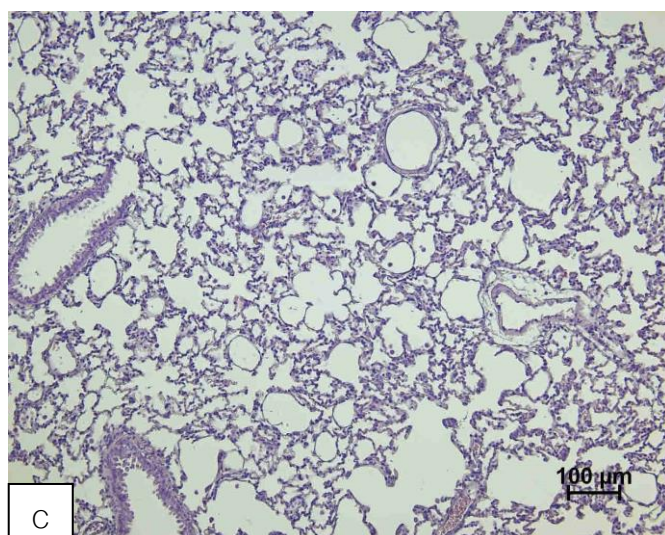
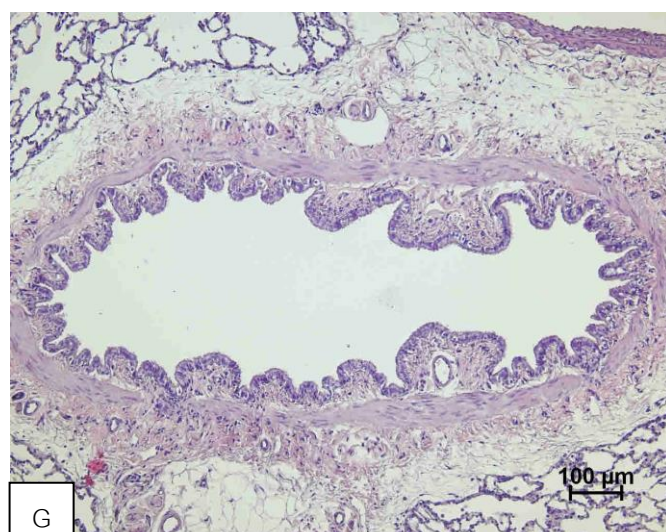
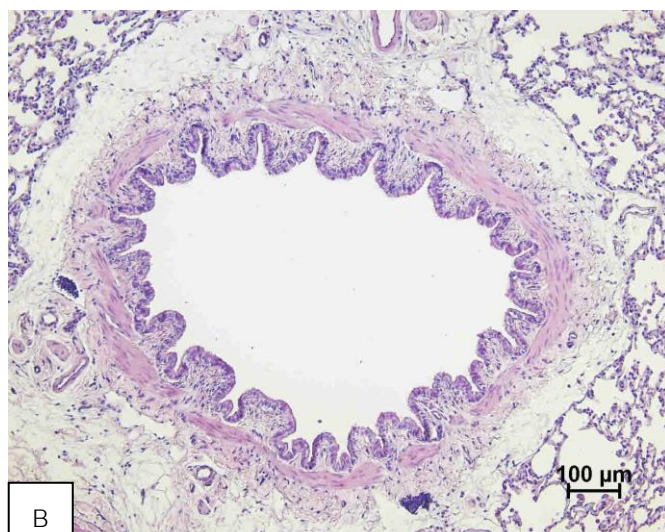
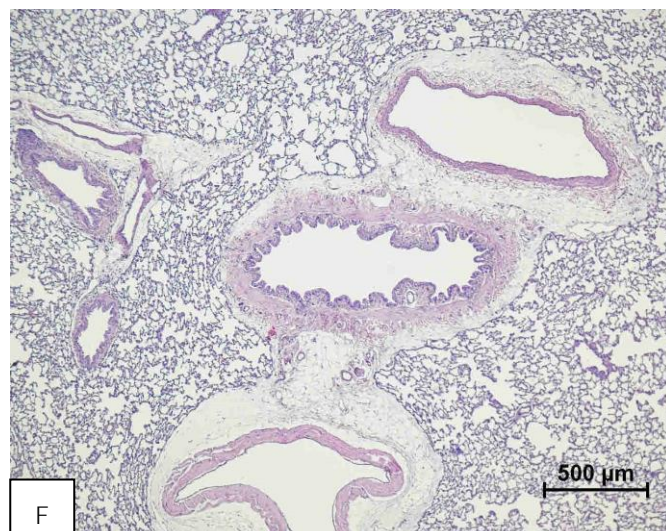
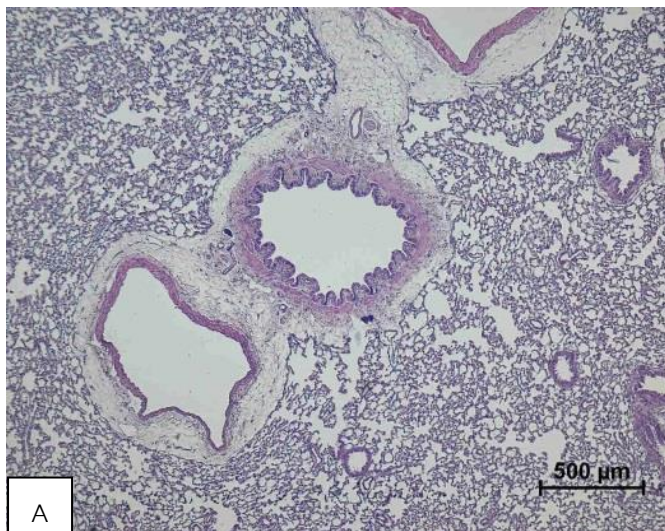
จากการศึกษาการแสดงออกของ CGRP ที่ย้อมด้วยวิธี Immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ CGRP ทั้ง 2 กลุ่ม แต่มีความแตกต่างกันในระดับความเข้มของการติดสี โดยในกลุ่มควบคุมมีการติดสีน้ำตาลอ่อน (light brown) หรือไม่มีการติดของสี DAB เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลที่พบว่าการติดสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน

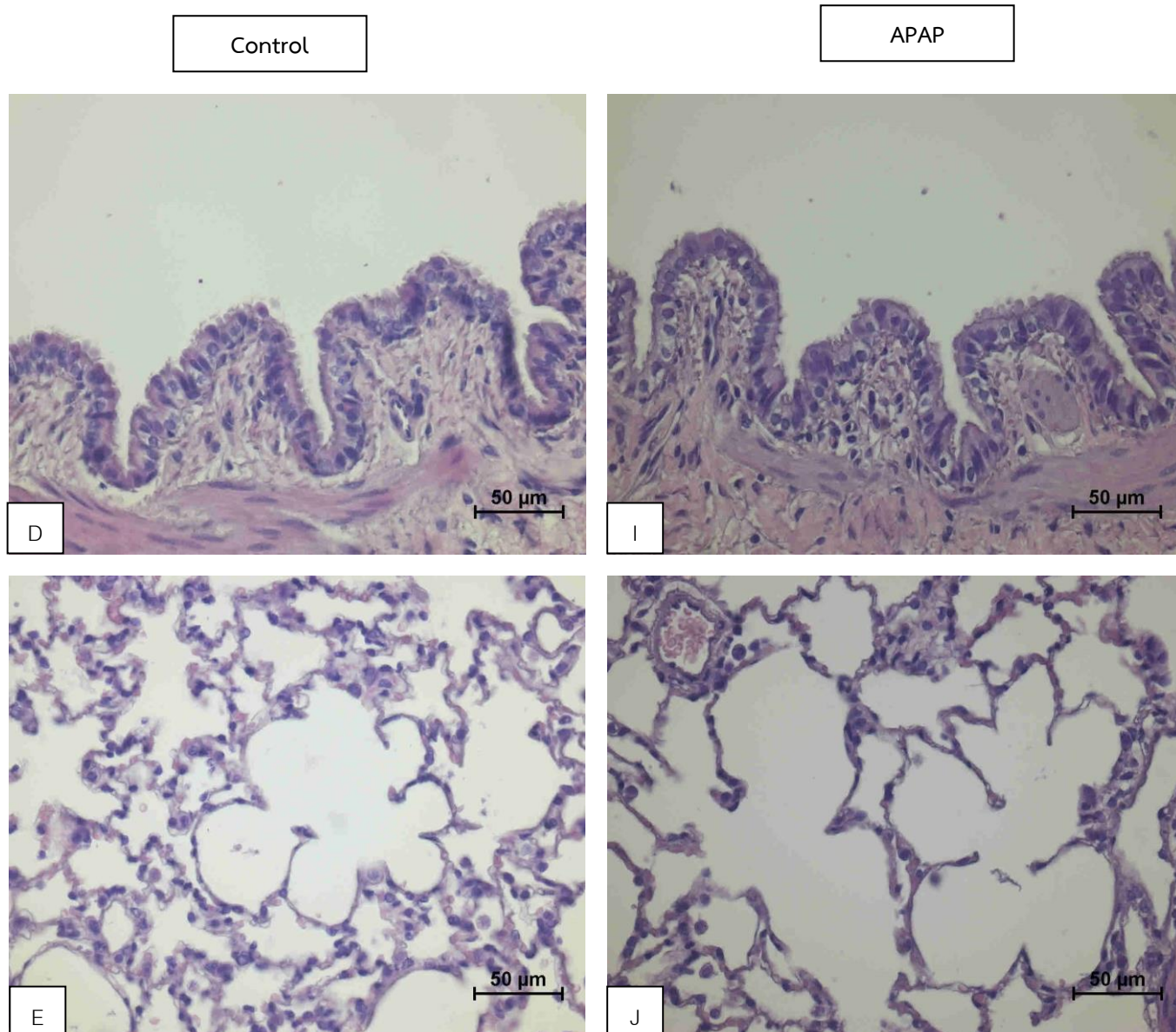
3. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเนื้อเยื่อปอดในหนูแรท

Hematoxylin และ Eosin

Control

APAP



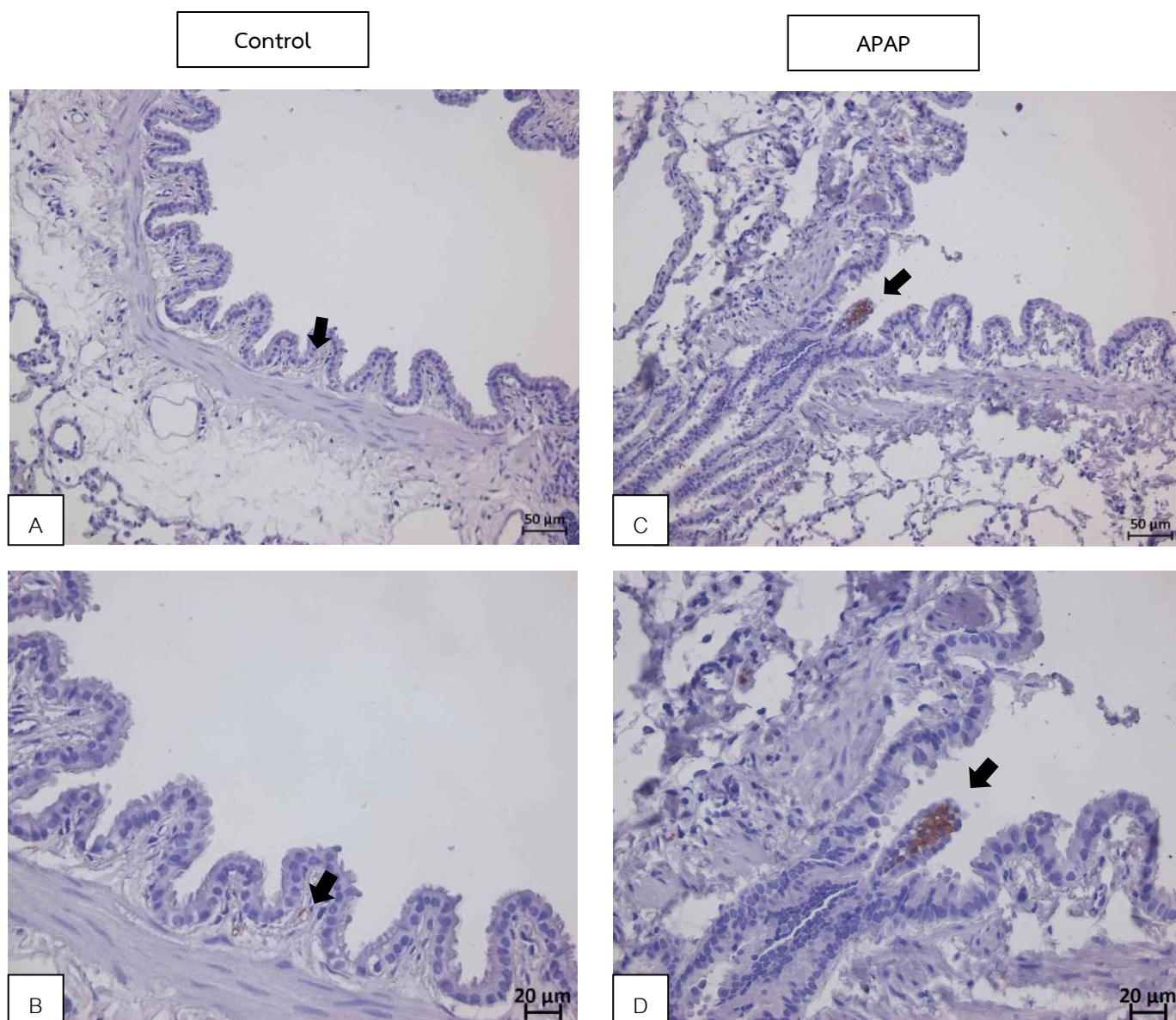


ภาพที่ 9 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุม (A, B, C, D, E) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (F, G, H, I, J) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อปอด

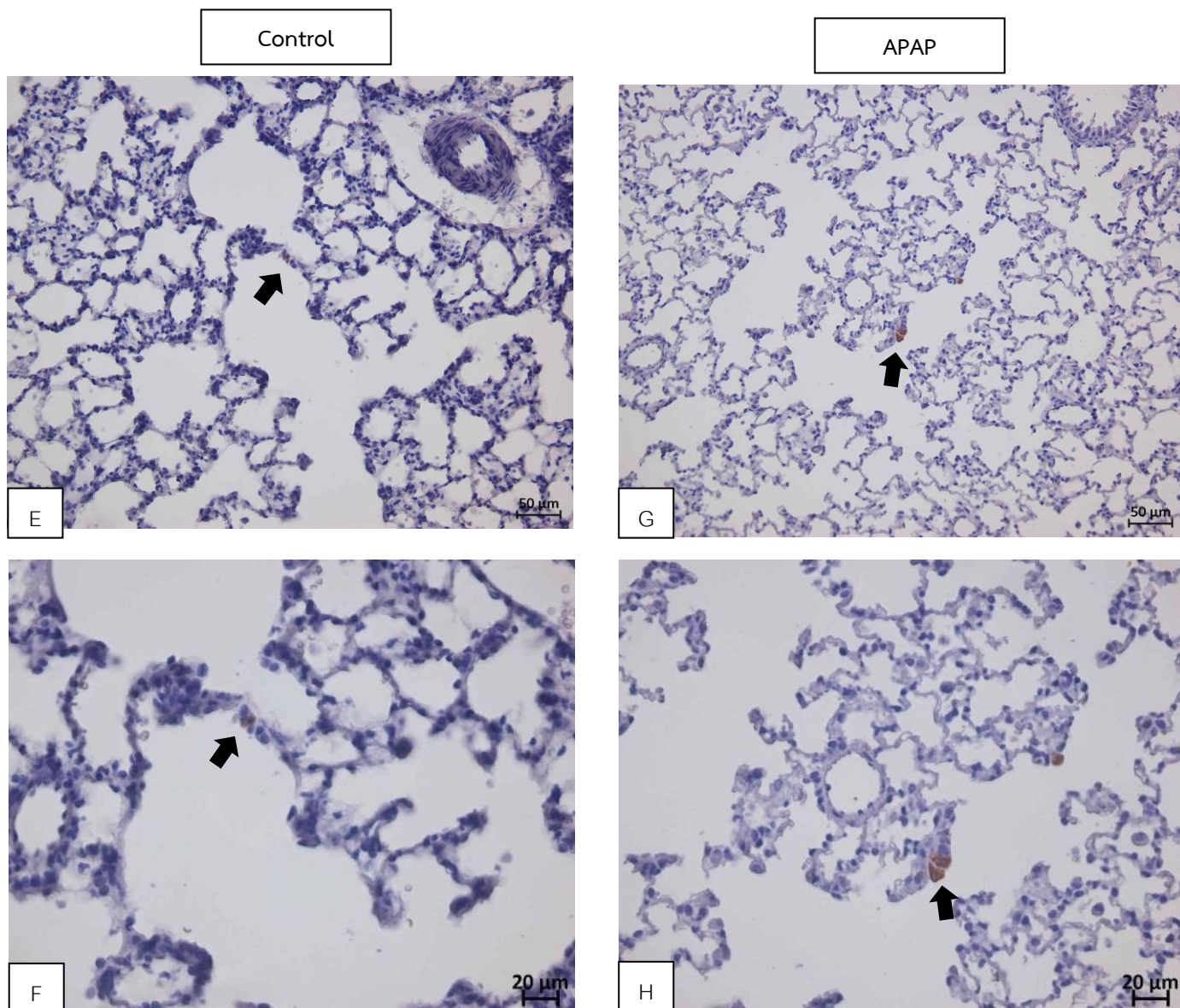
จากการทดลอง เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของปอดในหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม ด้วยการย้อม Hematoxylin และ Eosin พบว่าในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลไม่มีการเปลี่ยนแปลงทั้งลักษณะโครงสร้าง ขนาด และการเรียงตัวของเยื่อบุชนิดต่างๆ ของเนื้อเยื่อปอดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสังเกตจากผนังของ bronchiole ชั้น mucosa ซึ่งมี epithelium ชนิด pseudostratified ciliated columnar epithelium ที่ไม่พบการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเยื่อบุชนิดอื่น ชั้น lamina propria มี elastic fiber ชั้น muscularis mucosae เป็นกล้ามเนื้อเรียบเรียงตัวกันเป็นวงกลมและชั้น adventitia เป็น loose connective tissue นอกจากนี้ส่วน respiratory portion ที่มี alveolar duct เป็นท่อยาวที่เกิดจากการรวมตัวกันของ alveolar sac, alveolar sac เป็นส่วนคล้ายถุงที่เกิดจากการรวมตัว

ของ alveolus ระหว่าง alveolus ที่อยู่ติดกันมี interalveolar septum กั้นอยู่โดยมี simple squamous epithelium เป็น cell lining โดยพบเซลล์ 2 ชนิด คือ pneumocyte type I และ pneumocyte type II นอกจากนี้ไม่พบการอักเสบของเนื้อเยื่อทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล

Immunohistochemistry (CGRP)



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มควบคุมแสดงการติด CGRP บริเวณ Bronchiole epithelium สีน้ตาลอ่อนของ DAB (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง การติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB (C, D)



ภาพที่ 11 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดของหนูกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง แสดงการติด CGRP บริเวณ Alveoli, Alveolar duct ติดสีน้ำตาลอ่อนของ DAB (E, F) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรังติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB (G, H)

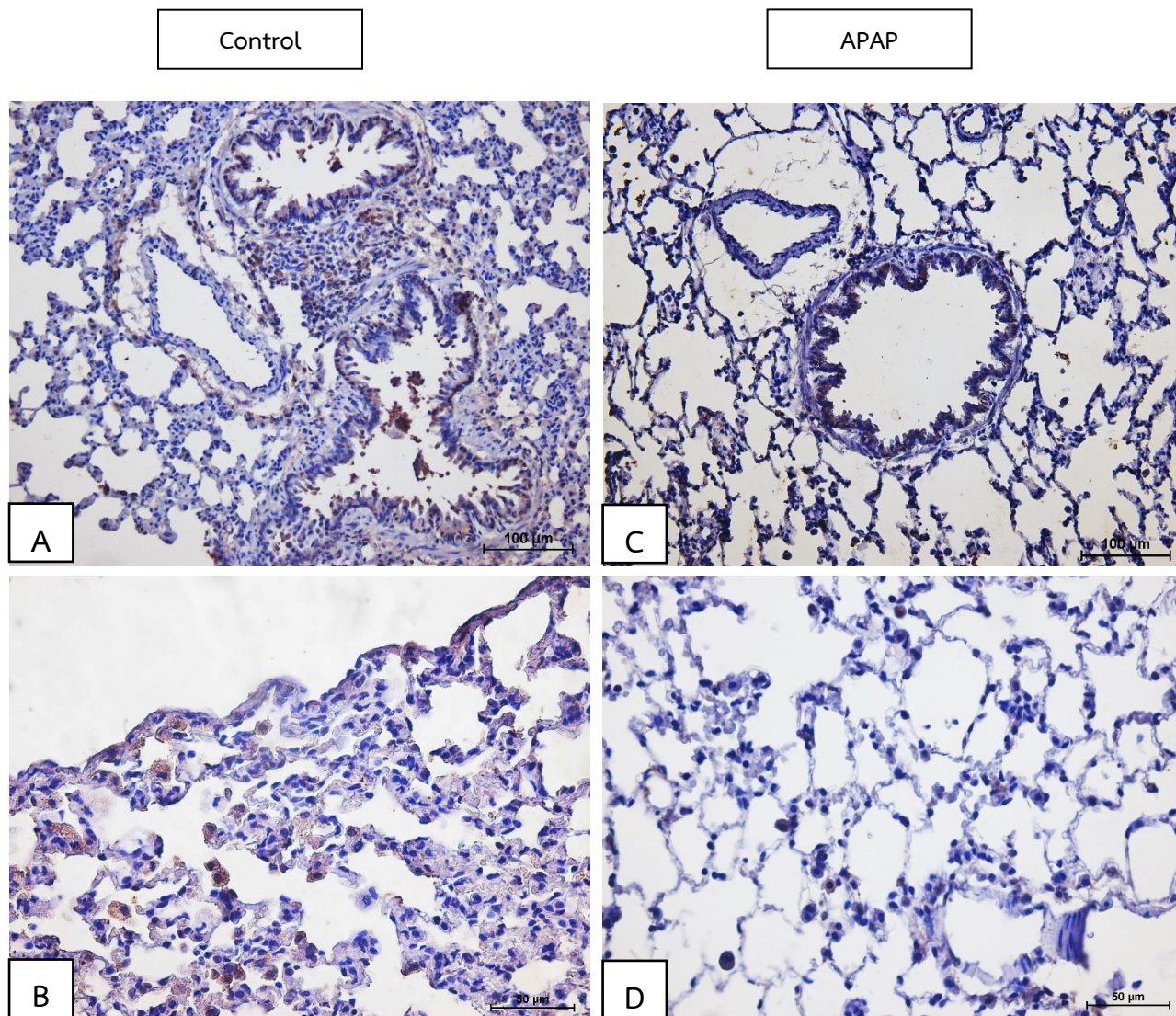
จากการทดลอง เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรังต่อการแสดงออกของ CGRP ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม ด้วยการย้อม Immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ CGRP ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันจากการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีน้ำตาลอ่อนๆของ DAB ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอลมีการติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct, alveoli

CGRP ซึ่งเป็นนิวโรเปปไทด์ที่พบได้ภายในเนื้อเยื่อปอดบริเวณ airway nerve และ neuroendocrine cell (Amara et al., 1982; Rsenfeld et al., 1983; Keith et al., 1991) โดย CGRP เป็น pro-inflammatory neuropeptide ที่สามารถก่อให้เกิดการอักเสบและทำลายของ epithelium cell ส่งผลให้มี airway

vasodilation และ bronchoconstriction (Springera et al., 2003) จากการศึกษาที่ผ่านมา มีกลุ่มนักวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของการใช้ยาพาราเซตามอลกับการเกิดอาการของโรคหอบหืด (McBride, 2011; Gonzales-Barcala et.al., 2013; Shaw, 2013; Sordillo et.al., 2015) แต่ยังไม่มีความชัดเจนถึงกลไกที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการทำงานของปอด จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าการใช้ยาพาราเซตามอลขนาด 200 mg/kg body weight ไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างปอด ซึ่งน่าจะเป็นผลมาจากขนาดของยาที่ได้รับอยู่ในช่วงขนาดของการรักษา (therapeutic dose) ทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงในระดับโครงสร้างของเนื้อเยื่อปอด แต่อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาในครั้งนี้ ถึงแม้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปอด แต่กลับพบว่ามี การแสดงออกของ pro-inflammatory neuropeptide ชนิด CGRP เพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลแบบกึ่งเรื้อรังและเรื้อรัง โดยเนื้อเยื่อปอดของหนูทดลองทั้ง 2 กลุ่มมีการติดสีของ DAB ที่ทำปฏิกิริยากับ CGRP บริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct และ alveoli แต่มีความแตกต่างกันในลักษณะของการติดสี โดยกลุ่มควบคุมมีการติดสีน้ำตาลอ่อน (light brown) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลมีการติดสีน้ำตาลเข้ม (dark brown) แสดงว่าการติดสีที่แตกต่างกันของ CGRP ของกลุ่มทดลองทั้ง 2 กลุ่มเป็นผลมาจากการได้รับยาพาราเซตามอล จึงอาจเป็นเหตุผลที่สามารถสนับสนุนผลการวิจัยที่พบก่อนหน้านี้ที่สัมพันธ์กับการเกิดอาการหอบหืดในเด็กเล็กหรือแม่ที่ใช้ยาพาราเซตามอลระหว่างตั้งครรภ์

4. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน) ต่อการแสดงออกของ superoxide dismutase (SOD) และ glutathione ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรท

SOD



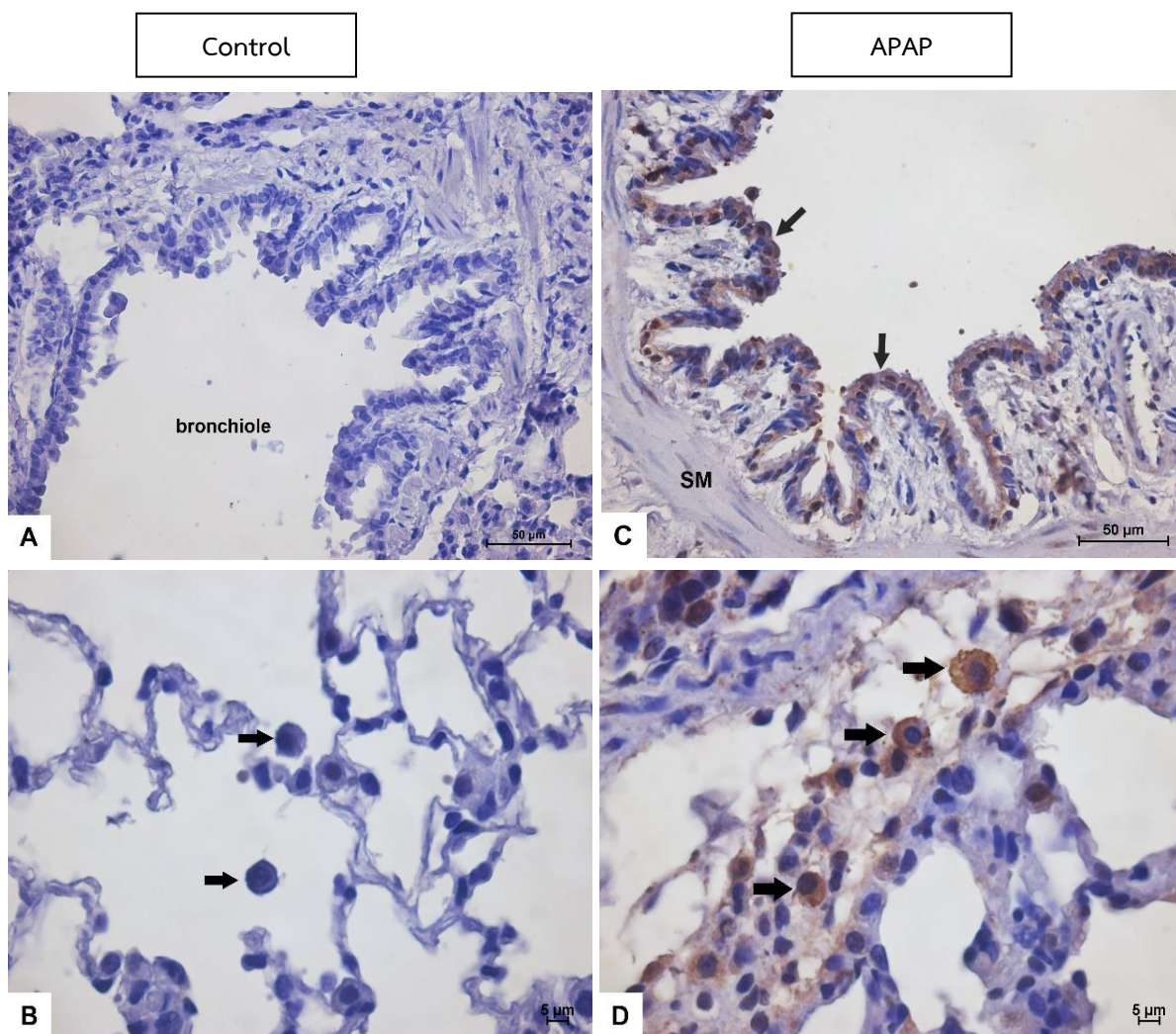
ภาพที่ 12 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ SOD ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (C, D)

จากการทดลอง เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรังต่อการแสดงออกของ SOD ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม ด้วยการย้อม Immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ SOD ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันจากการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีน้ำตาลเข้มของ DAB ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอลมีการติดสีน้ำตาลอ่อนของ DAB โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct, alveoli ซึ่งการแสดงออกของ SOD เป็นไปในทางเดียวกับระดับของ glutathione แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังสามารถลด

ความสามารถในการลดความเป็นพิษของยาหลง โดยมีระดับของ glutathione ลดต่ำกว่าภาวะปกติ ซึ่งน่าจะเกิดจากมีการใช้ glutathione มากกว่าปกติและไม่สามารถสร้างออกมาใช้งานได้ทัน

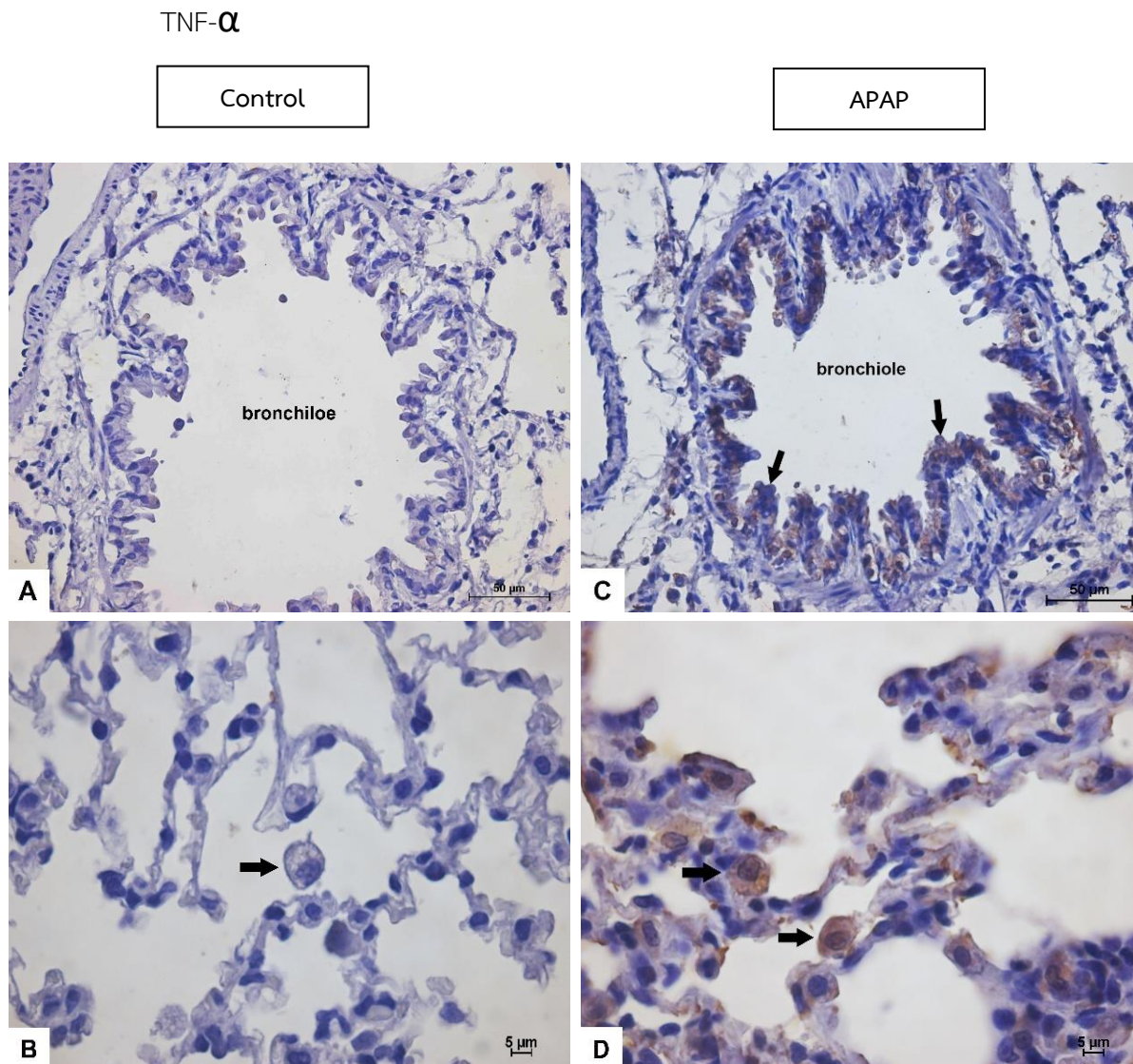
6. ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (30 วัน) ต่อการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 β , TNF- α และ IL-10 ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรท

IL-1 β



ภาพที่ 13 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-1 β ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (C, D); SM=Smooth muscle

จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 30 วัน ต่อการแสดงออกของ IL-1 β ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ IL-1 β ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันของระดับการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีจางของ DAB (คะแนนเฉลี่ย = 1) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอลมีการติดสีค่อนข้างปานกลางของ DAB (คะแนนเฉลี่ย = 1.8) โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct, alveoli, และ alveolar macrophage โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลที่เห็นการแสดงออกของ IL-1 β เป็นจำนวนมาก



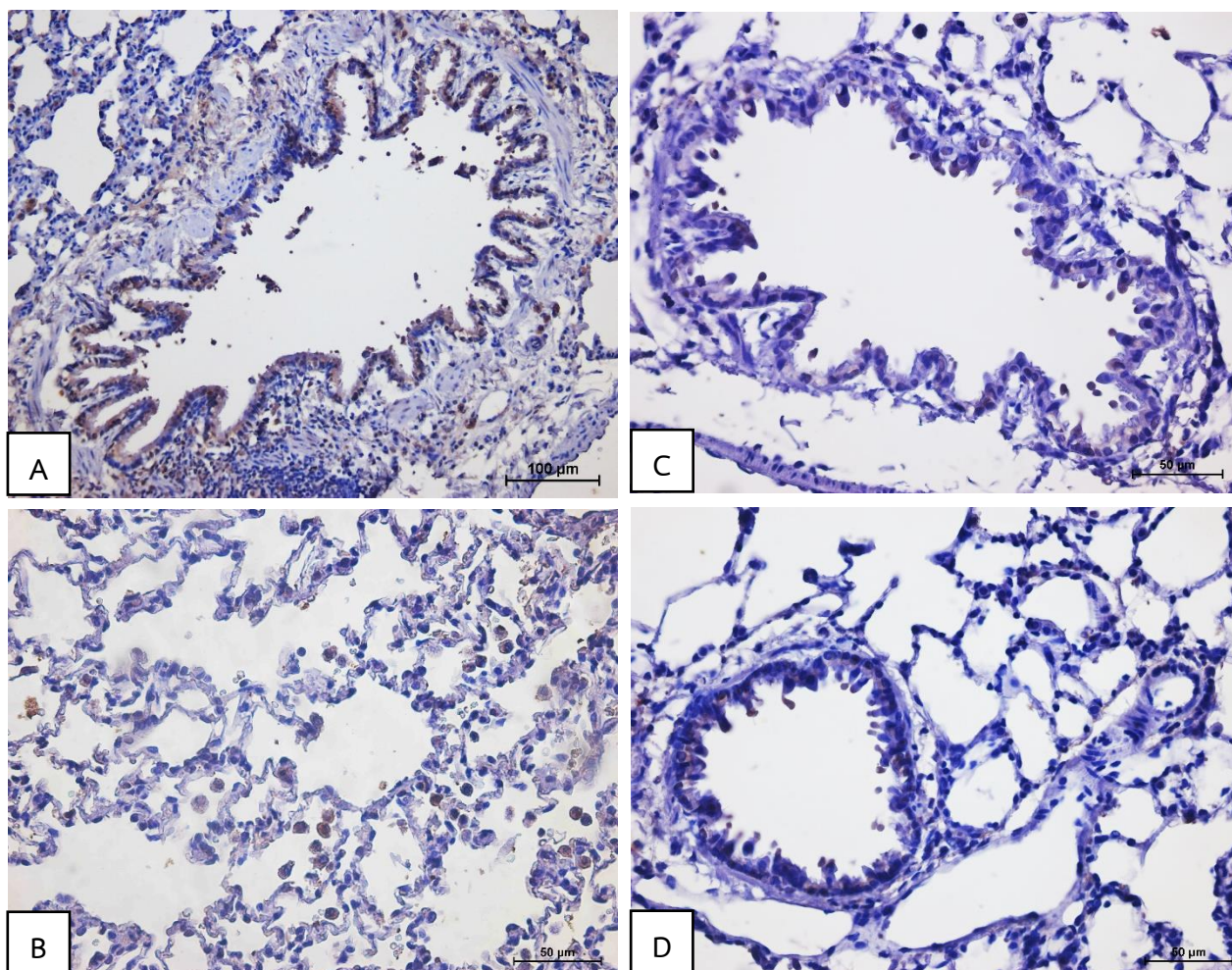
ภาพที่ 14 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ TNF- α ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (C, D)

จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 30 วัน ต่อการแสดงออกของ TNF- α ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ TNF- α ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันของระดับการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีจางถึงค่อนข้างปานกลางของ DAB (คะแนนเฉลี่ย = 1.6) ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับพาราเซตามอลมีการติดสีปานกลางของ DAB (คะแนนเฉลี่ย = 2) โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct, alveoli, และ alveolar macrophage โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลที่เห็นการแสดงออกของ TNF- α เป็นจำนวนมากเช่นเดียวกับ IL-1 β

IL-10

Control

APAP



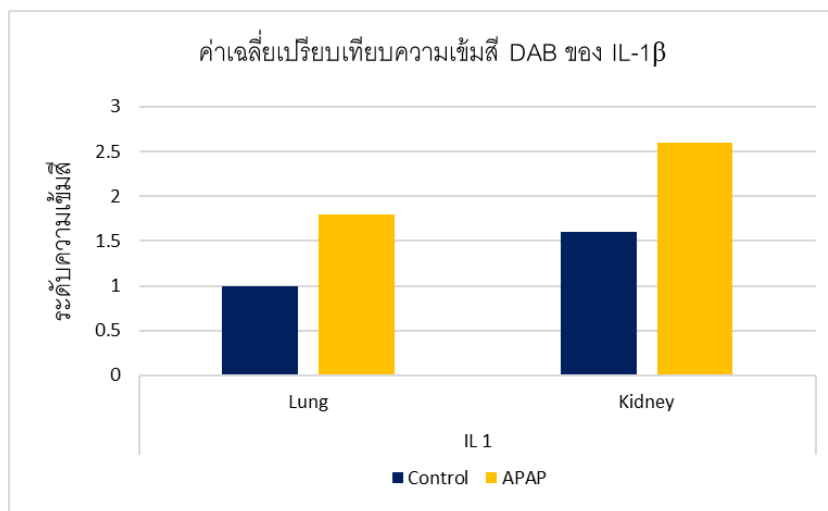
ภาพที่ 15 ภาพถ่ายเนื้อเยื่อปอดแสดงการติดสีน้ำตาลของ DAB ต่อ IL-10 ของหนูกลุ่มควบคุม (A, B) และกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล (C, D)

จากการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 30 วัน ต่อการแสดงออกของ IL-10 ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม พบว่ามีการแสดงออกของ IL-10 ทั้ง 2 กลุ่มการทดลอง แต่จะมีความแตกต่างกันของระดับการติดสีของ DAB โดยในกลุ่มควบคุมจะติดสีปานกลางถึงเข้มของ DAB ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลมีการติดสีค่อนข้างจางของ DAB โดยทั้ง 2 กลุ่มจะติดสีของ DAB บริเวณ bronchiole epithelium, alveolar duct, alveoli, และ alveolar macrophage

7. เพื่อศึกษาผลของระดับความเข้มข้นและการกระจายตัวของบริเวณที่ติด DAB ในเนื้อเยื่อปอดและไตของหนูแรท

IL-1 β

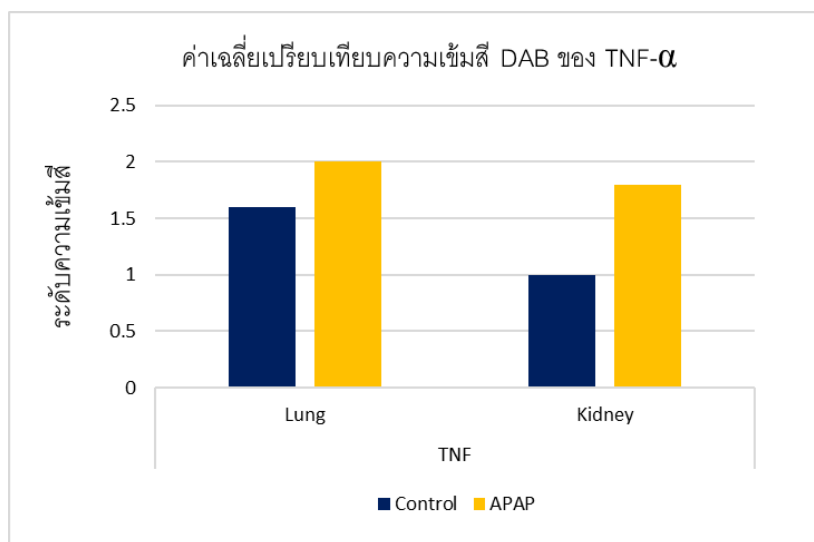
จากผลการศึกษาค่าเฉลี่ยระดับความเข้มข้นและการกระจายตัวของบริเวณที่ติด DAB ของ IL-1 β ในเนื้อเยื่อปอดและไตของหนูแรท พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 30 วัน มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ทั้งในเนื้อเยื่อปอดและไต แสดงว่ายาพาราเซตามอลส่งผลให้เซลล์มีการแสดงออกของ IL-1 β เพิ่มมากขึ้น (กราฟที่ 1)



ภาพที่ 16 แสดงค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบความเข้มข้นของการติด DAB ของ IL-1 β ในเนื้อเยื่อปอดและไต

TNF- α

จากผลการศึกษาค่าเฉลี่ยระดับความเข้มสีและการกระจายตัวของบริเวณที่ติด DAB ของ TNF- α ในเนื้อเยื่อปอดและไตของหนูแรท พบว่ากลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 30 วัน มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ทั้งในเนื้อเยื่อปอดและไต แสดงว่ายาพาราเซตามอลส่งผลให้เซลล์มีการแสดงออกของ TNF- α เพิ่มมากขึ้น (กราฟที่ 2)



ภาพที่ 17 แสดงค่าเฉลี่ยเปรียบเทียบความเข้มสีของการติด DAB ของ TNF- α ในเนื้อเยื่อปอดและไต

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

จากผลการศึกษาของคณะวิจัยแม้จะไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อปอด แต่กลับพบว่ามีการแสดงออกของ pro-inflammatory neuropeptide ชนิด CGRP เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลา 15 และ 30 วัน จึงอาจเป็นเหตุผลที่สามารถสนับสนุนผลการวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นความสัมพันธ์ของการเกิดอาการหอบหืดในเด็กเล็กหรือแม่ที่ใช้ยาพาราเซตามอลระหว่างตั้งครรภ์ แต่อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการยืนยันว่า CGRP กระตุ้นกระบวนการอักเสบได้จริงหรือไม่ จึงทำให้ผู้วิจัยทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 β และ TNF- α ในเนื้อเยื่อปอดของหนูแรท ซึ่งพบว่ายาพาราเซตามอลส่งผลให้เกิดการแสดงออกของ cytokines ทั้งสองชนิดเพิ่มขึ้นกว่าภาวะปกติอย่างเห็นได้ชัด จึงเป็นไปได้ว่าการได้รับยานี้เป็นเวลานานในขนาดของการรักษาแม้จะไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ในเนื้อเยื่อ แต่ก็สามารถทำให้เกิดการหลั่ง neuropeptide ที่ไปกระตุ้น pro-inflammatory cytokine ในกระบวนการอักเสบแบบตลอดเชื้อ

ในปีที่ผ่านมากลุ่มคณะวิจัยของเราได้แสดงให้เห็นว่า หนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาดในขนาดของการรักษา (therapeutic dose) 200 mg/kg/day ติดต่อกันเป็นระยะเวลา 30 วัน ไม่พบความผิดปกติของโครงสร้างเนื้อเยื่อบริเวณเปลือกไตส่วนนอกเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง แต่เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องผ่านพบว่า มีความผิดปกติที่ mitochondria โดยเกิดการบวม (swelling) และ cristae ภายใน mitochondria มีจำนวนลดลงที่บริเวณท่อไตส่วนต้น ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยในครั้งนี้ที่แสดงให้เห็นว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานกระตุ้นให้เซลล์บุท่อไตหลั่ง pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 β และ TNF- α เพิ่มมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ซึ่งการเปลี่ยนแปลงในระดับ ultrastructure จึงอาจมีสาเหตุมาจากกระบวนการอักเสบจากการใช้ยาเป็นเวลานาน

นอกจากนี้ ผลของการเพิ่มการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α อาจเป็นผลมาจากการสะสมของ NAPQI ที่เพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานาน ทำให้ร่างกายไม่สามารถกำจัดความเป็นพิษได้หมด ก่อให้เกิดการหลงเหลืออยู่ในอวัยวะต่างๆ จากการเมตาบอลิซึมจากเอนไซม์ CYP2E1 จึงทำให้ NAPQI ไปกระตุ้นการเกิดภาวะ oxidative stress ของเซลล์และเหนี่ยวนำให้เกิดการแสดงออกของ pro-inflammatory cytokines ชนิด IL-1 β และ TNF- α เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ astrocyte ที่มีการเพิ่มขึ้นของ IL-1 β และ TNF- α เมื่อได้รับพาราเซตามอลแบบเรื้อรัง (Tantarungsee และคณะ, 2018) และสัมพันธ์กับการเพิ่มการแสดงออกของ CGRP ใน trigeminal ganglion (Yisarakun และคณะ, 2015) และความผิดปกติของ tight junction ของ blood brain barrier รวมถึงการเพิ่มขึ้นของระดับ ICAM-1 ในสมอง (Yisarakun และคณะ, 2014) ซึ่งผู้วิจัยได้ยืนยันสมมติฐานดังกล่าวด้วยการตรวจการ แสดงออกของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และระดับ glutathione ที่พบว่ามีการแสดงออกลดลงเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน ซึ่งส่งผลทำให้ไม่สามารถลดความเป็นพิษของ NAPQI ที่สะสมเพิ่มขึ้นได้ดีเหมือนในภาวะปกติ

จากการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานในขนาดของการรักษา มีการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเพิ่มสูงขึ้นและการลดลงของ IL-10 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยสามารถอธิบายกลไกของยาพาราเซตามอลได้ชัดเจนขึ้นจากการศึกษาระดับการ

แสดงออกของระดับของ glutathione ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานาน ทำให้ยืนยัน
ได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานมีส่วนเกี่ยวข้องกับการเกิดภาวะ oxidative stress ของเซลล์

รายงานการเงิน

เลขที่โครงการระบบบริหารงานวิจัย (NRMS 13 หลัก) 256108A1080005 สัญญาเลขที่ 183/2561

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)

ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา

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

ชื่อหัวหน้าโครงการวิจัยผู้รับทุน ดร.วราณูรินทร์ ยีสารคุณ

รายงานในช่วงตั้งแต่วันที่ 1 ตุลาคม 2560 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2561

ระยะเวลาดำเนินการ 1 ปี เดือน ตั้งแต่วันที่ (วัน/เดือน/ปี).....

รายรับ

จำนวนเงินที่ได้รับ

งวดที่ 1 (50%) 225,000.00 บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี 31 ต.ค. 2560

งวดที่ 2 (40%) 180,000.00 บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี 12 ก.ย. 2562

งวดที่ 3 (10%) 45,000.00 บาท เมื่อวันที่ เดือน ปี.....-.....

รวม 405,000 บาท (สี่แสนห้าพันบาทถ้วน)

รายจ่าย

รายการ	งบประมาณที่ตั้งไว้	งบประมาณที่ใช้จริง	จำนวนเงินคงเหลือ/ เกิน
1. ค่าตอบแทน	45,000	45,000	0
2. ค่าจ้าง	0	0	0
3. ค่าวัสดุ	295,000	330,000	-35,000
4. ค่าใช้สอย - ค่าจ้างเตรียมตัวอย่าง	65,000	15,000	50,000
5. ค่าครุภัณฑ์	0	0	0
6. ค่าใช้จ่ายอื่น ๆ (โปรดระบุเป็นข้อย่อย) - ค่าสาธารณูปโภค	45,000	45,000	0
รวม	450,000	435,000	15,000

(ดร.วราณูรินทร์ ยีสารคุณ)

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 FJ, Pertega S, Perez Castro T, Sampedro 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, Laracuate 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.
- 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.