

ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับ
การอักเสบในเซลล์แอสโทรไซต์



นางสาวณัฐนิชา ตันทรงษ์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

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

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2559
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF LONG TERM PARACETAMOL TREATMENT ON THE PRO-
INFLAMMATORY CYTOKINE EXPRESSION IN ASTROCYTE.

Miss Nutnicha Tantarungsee



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2016

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์แอสโตรไซต์
โดย	นางสาวณัฐนิชา ตันตริงซี่
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน ดร.วรรณรินทร์ ยีสารคุณ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ดร.วรรณรินทร์ ยีสารคุณ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.พูลลาภ ชีพสุนทร)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรชวี คงสมบัติ)

ณัฐมิษา ตัมพรังษี : ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์แอสโตรไซต์ (EFFECT OF LONG TERM PARACETAMOL TREATMENT ON THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE EXPRESSION IN ASTROCYTE.) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร.ธัญญา ทองตัน, ดร.วราณรินทร์ ยิสารคุณ, 57 หน้า.

ยาพาราเซตามอลจัดเป็นยาบรรเทาปวด ลดไข้ ที่ได้รับความนิยมอย่างมากเนื่องจากก่อให้เกิดผลข้างเคียงน้อย และมีราคาถูก แต่อย่างไรก็ตามผลงานวิจัยในระยะหลังกลับบ่งชี้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังแม้เป็นขนาดของยาที่ใช้ในการรักษา สามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลาง และเนื่องจากเซลล์แอสโตรไซต์เป็นเซลล์ค้ำจุนที่มีบทบาทสำคัญทั้งทางด้านสรีรวิทยาและพยาธิวิทยาในระบบประสาทส่วนกลาง ดังนั้น งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในเซลล์แอสโตรไซต์ โดยการศึกษาครั้งนี้ ได้ทำการศึกษามลพิษของการได้รับยาพาราเซตามอลที่ขนาดความเข้มข้น 100 μM ทั้งแบบเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) และเรื้อรัง (16 และ 28 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ (C8-D1A) โดยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) และการแสดงออกของโปรตีนในวิถี NF- κB ด้วยเทคนิค western blot ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน pNF- κB ด้วยเทคนิค immunohistochemistry และเทคนิค immunofluorescence และศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม ซึ่งผลจากการศึกษาพบว่า ระดับการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α), ระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF- κB และลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม แต่ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 และ 28 วัน) พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β และ TNF- α เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม ซึ่งสอดคล้องไปกับการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีน pNF- κB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเช่นกัน อีกทั้งยังพบว่าเซลล์แอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังมีการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคที่ผิดปกติไปโดยพบว่า ลักษณะโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังมีการกระจายตัวของโครมาตินไปยังบริเวณขอบของนิวเคลียส (Chromatin margination) และพบการโป่งพองของเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมถึงถึงพบการยืดขยาย (dilatation) ของ endoplasmic reticulum (ER) และไมโทคอนเดรียที่มีลักษณะบวม (swelling) เป็นจำนวนมาก เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม นอกจากนี้ยังตรวจพบการเกิด vacuolization และ autophagosome

ผลจากงานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แอสโตรไซต์มีการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มขึ้น ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวน่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นผ่านโปรตีนในวิถี NF- κB และส่งผลให้เกิดความผิดปกติของเซลล์แอสโตรไซต์ในที่สุด

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อนิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774021430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: PARACETAMOL, ASTROCYTE, PRO-INFLAMMATORY CYTOKINES, NF-KB, ULTRASTRUCTURE

NUTNICHIA TANTARUNGSEE: EFFECT OF LONG TERM PARACETAMOL TREATMENT ON THE PRO-INFLAMMATORY CYTOKINE EXPRESSION IN ASTROCYTE.. ADVISOR: ASST. PROF. SUPANG MANEESRI LE GRAND, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. THANANYA THONGTAN, Ph.D., WARANURIN YISARAKUN, Ph.D., 57 pp.

Paracetamol (acetaminophen: APAP) is a recommended drug used for the treatment of pain and fever. It has also been recognized as a popular drug due to its low side-effects and a relatively low price. However, the information obtained from a recent study indicates that chronic APAP exposure, even though in the therapeutic dosage, had effect on the central nervous system (CNS). Since astrocytes play a crucial role in the physiology and pathology of the central nervous system (CNS), this study aimed to investigate the effect of chronic APAP treatment on the expression of pro-inflammatory cytokines in astrocytes. In the present study, the mouse-astrocyte (C8-D1A) cells were treated with APAP at the concentration of 100 μ M for 24 hour (acute expose), 16 and 28 days (chronic expose). The expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α), and pNF-kB were determined by using western blot analysis. Furthermore, the expression and localization of phosphorylation of nuclear factor-kappa B (pNF-kB), was also detected by immunohistochemistry and immunofluorescence assay. To monitor the alteration of the ultrastructure of the C8-D1A cells, transmission electron microscopy was applied. The results revealed that acute APAP treatment (24 hour) had no effect on the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and pNF-kB. It also showed that acute APAP treatment did not alter the ultrastructure of C8-D1A cells when compared with those in the control cells. However, the results obtained from western blotting showed that the expression of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α) and pNF-kB were significantly increased in the C8-D1A cells treated chronically with APAP (16 and 28 days) when compared with those in the control cells. Using the immunohistochemistry and immunofluorescence assay, an increase in pNF-kB was observed in the C8-D1A treated chronically with APAP. Furthermore, the chronic APAP treatment could induce the alteration of the ultrastructure of the C8-D1A cells. The aggregation of chromatin along the nuclear membrane, swelling of nuclear envelope and mitochondria as well as the dilatations of rough endoplasmic reticulum were clearly demonstrated in the C8-D1A cells with 28 days APAP treatment. Several cells with vacuolization were observed in APAP treated cells. Interestingly, autophagic vacuoles with degraded organelles were observed in C8-D1A cells with chronic APAP treatment as well.

The results obtained from this study suggest that chronic APAP treatment can induce an up-regulation of pro-inflammatory cytokines (IL-1 β and TNF- α). This alteration might be closely associated with the activation of the NF-kB signaling pathway and finally leads to the abnormality of astrocyte cells.

Field of Study: Medical Science

Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ไม่สามารถสำเร็จลุล่วงได้ด้วยตัวข้าพเจ้าแต่เพียงผู้เดียว ต้องขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภางค์ มณีศรีเลอกรองด์ อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธัญญา ทองตัน และ ดร.วราณัฐรินทร์ ยิสารคุณ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วมในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ที่ได้ให้ความช่วยเหลือ และคำแนะนำเป็นอย่างดี จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สามารถสำเร็จลุล่วงได้

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นประธานกรรมการ รวมถึง รองศาสตราจารย์ ดร.พุลลาภ ชีพสุนทร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรถวิ คงสมบัติ ที่ให้ความอนุเคราะห์เป็นกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ นาย ปรีชา เรืองเวชรชัย และเจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ รวมถึงอำนวยความสะดวกต่างๆจนข้าพเจ้าประสบความสำเร็จมาได้

ขอขอบคุณ นางสาว ลัดดาวัน ละเลิศ นางสาว วิลาวัลย์ จิ๋ว นางสาว ศรินภา ศรีคำและ นางสาว ทิพฐานันตร์ โชติพินิจ ที่ให้คำปรึกษาและการช่วยเหลือที่ตลอดการทำวิจัย

สุดท้ายนี้ขอขอบพระคุณครอบครัวของข้าพเจ้าที่ได้ให้กำลังใจและให้การสนับสนุนข้าพเจ้าอย่างดีตลอดมา รวมไปถึงเพื่อนๆและผู้ที่มีความช่วยเหลือแก่ข้าพเจ้า แต่ไม่ถูกกล่าวถึงในที่นี้

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ซ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 คำถามงานวิจัย (Research Questions)	4
1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives).....	4
1.4 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	4
1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework).....	5
1.6 คำสำคัญ (Keywords).....	6
1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (Benefits of study)	6
บทที่ 2	7
ทบทวนวรรณกรรม	7
2.1 ยาพาราเซตามอล (acetaminophen; APAP).....	7
2.1.1 กระบวนการเมแทบอลิซึมของยาพาราเซตามอล	7
2.1.2 การศึกษาวิจัยผลของยาพาราเซตามอลที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง	8
2.1.3 ยาพาราเซตามอลและกระบวนการอักเสบ.....	9
2.2 เซลล์แอสโตรไซต์และกระบวนการอักเสบ.....	11
2.3 Pro-inflammatory cytokines	11

2.3.1 Interleukin-1 (IL-1 β) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α).....	11
2.4 NF-kB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells).....	12
บทที่ 3	14
วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	14
3.1 แหล่งที่มาของวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี.....	14
3.1.1 สารเคมี.....	14
3.1.2 สารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์	15
3.1.3 เซลล์เพาะเลี้ยง	15
3.1.4 แอนติบอดี.....	15
3.1.5 เบ็ดเตล็ด	16
3.1.6 อาหารเลี้ยงเซลล์	16
3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์	16
3.2.1 การปลูกเซลล์ตั้งต้น (Cell line Frozen stock)	17
3.2.2 การแช่แข็งเซลล์เพื่อเก็บเป็นเซลล์ตั้งต้น	17
3.3 การนับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion.....	17
3.4 การวิเคราะห์หาค่า IC ₅₀ ของพาราเซตามอลด้วยวิธี MTS assay เพื่อเลือกความเข้มข้นที่ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Non-toxic dose).....	18
3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโทรไซต์.....	19
3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโทรไซต์	19
3.7 Western Blotting.....	20
3.7.1 สกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง.....	20
3.7.2 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis.	20
3.7.3 การย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนและการตรวจสอบ	21

3.8 การศึกษาการแสดงออกของ NF-kB signaling ด้วยเทคนิค Immunofluorescence และ เทคนิค Immunohistochemistry	21
3.9 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	23
3.10 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection).....	23
3.11. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis).....	24
บทที่ 4	25
ผลการทดลอง	25
4.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A).....	25
4.2 การศึกษาผลกระทบของยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของ Inflammatory cytokines (IL-1 β และ TNF- α) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A).....	27
4.3 การศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออก pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A).....	31
4.4 การศึกษาการแสดงออกของ NF-kB signaling ด้วยเทคนิค Immunofluorescence และ เทคนิค Immunohistochemistry.....	33
4.5 การศึกษาผลกระทบของยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน	36
4.5.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน	36
4.5.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง.....	40
บทที่ 5	46
อภิปรายและสรุปผลการทดลอง	46
รายการอ้างอิง	51
ภาคผนวก.....	52

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์ 57



สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงกลไกการทำงานของวิถี NF-kB (Nguyen, Julien, and Rivest 2002)	13
รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์	19
รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์	20
รูปที่ 4 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	26
รูปที่ 5 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของระดับโปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยง C8-D1A.....	29
รูปที่ 6 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยง C8-D1A.....	30
รูปที่ 7 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของ pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยง C8-D1A.....	32
รูปที่ 8 ผลการแสดงออกของ pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry	34
รูปที่ 9 ผลการแสดงออกของ pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยใช้เทคนิค Immunofluorescence.....	35
รูปที่ 10 ลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง).....	37
รูปที่ 11 ลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง).....	38
รูปที่ 12 แสดงลักษณะสัญญาณวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)	41

รูปที่ 13 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์ เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)	42
รูปที่ 14 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพารา เซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)	44



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา

พาราเซตามอล (paracetamol; acetaminophen) จัดเป็นยาสามัญประจำบ้านที่ใช้ในการรักษาอาการปวดพื้นฐาน มีคุณสมบัติช่วยบรรเทาอาการปวดศีรษะ อาการปวดเมื่อยและบรรเทาไข้ รวมไปถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ ซึ่งเป็นที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน เนื่องจากราคาถูก มีประสิทธิภาพดี อีกทั้งยังสามารถหาซื้อเองได้ง่ายโดยไม่ต้องมีใบสั่งจ่ายจากแพทย์และก่อให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์ต่ำ ทำให้ยาพาราเซตามอลยังคงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน

จากการศึกษาค้นคว้างานวิจัยต่างๆที่เกี่ยวข้องกับผลกระทบของยาพาราเซตามอลพบว่า โดยส่วนใหญ่จะรายงานถึงผลของยาพาราเซตามอลในด้านดีเมื่อใช้ในปริมาณที่น้อย ซึ่งพบที่สามารถปกป้องเซลล์ไม่ให้ได้รับอันตรายไม่ว่าจะเป็นการช่วยลดการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ลดการเกิดสารอนุมูลอิสระ (1) ลดระดับ reactive oxygen species (ROS) และลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจ (2) ตลอดจนช่วยลดการตายของเซลล์สมองจากการสะสมของ amyloid β plaques (3) นอกจากนี้ พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในหนูแรทสามารถลดการเสียหายของเนื้อเยื่อสมองที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemia) ได้ โดยจะไปลดการบวมของสมอง ลดการเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรีย และลดการทำงานของ caspase-3 ซึ่งแสดงถึงการตายแบบ apoptosis น้อยลงอีกด้วย (4)

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพาราเซตามอลในช่วง 10 ปีหลังกลับพบว่า การใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษา (therapeutic dose) อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานสามารถส่งผลเสียต่อเซลล์และระบบต่างๆของร่างกายได้ เช่น งานวิจัยที่พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (5) และการให้ยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (0.01-1 mM) ร่วมกับการบ่มเลี้ยงเซลล์ pneumocytes เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าส่งผลให้ระดับ glutathione

(GSH) ในเซลล์ลดลง (6) เป็นต้น ซึ่งภาวะความผิดปกติของระบบต่างๆที่เกิดขึ้นจากการได้รับยาพาราเซตามอลนั้นพบว่ามีความเกี่ยวข้องกับการเมทาบอลิซึมยาโดยเอนไซม์ CYP2E1 โดยเอนไซม์ CYP2E1 นั้น สามารถตรวจพบได้ในอวัยวะต่างๆทั่วร่างกายรวมถึงในระบบประสาทส่วนกลางด้วย ผลจากการศึกษาทางวิจัยเหล่านี้แสดงให้เห็นว่าสามารถตรวจพบการแสดงของเอนไซม์ชนิดนี้ในเซลล์หลายชนิดในสมองไม่ว่าจะเป็นเซลล์หลอดเลือดสมอง เซลล์ประสาท (7) เซลล์ไมโครเกลียและเซลล์แอสโตรไซต์ (8)

จากการค้นคว้าข้อมูลพบว่าพาราเซตามอลนั้นมีคุณสมบัติในการซึมผ่าน blood-brain barrier ของหลอดเลือดได้ (9) ดังนั้น หากได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องจึงน่าจะเกิดผลกระทบต่อเซลล์ต่างๆในระบบประสาทส่วนกลางด้วย โดยผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Yisarakun และคณะ ก็พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 30 วัน (200 mg/kg BW) ส่งผลต่อ blood-brain barrier integrity ให้มีการเปลี่ยนแปลง โดยพบการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องและยังพบว่า astrocyte foot plate ที่วางตัวอยู่โดยรอบ endothelial cells มีการบวมเพิ่มขึ้นอีกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง มีปริมาณของ tight junction proteins (ZO-1, Occludin และ Claudin-5) ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (10) ซึ่งการตรวจพบความผิดปกติของหลอดเลือดสมองเหล่านี้บ่งชี้ว่าในหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังมีการสูญเสีย blood-brain barrier integrity

เนื่องจากแอสโตรไซต์เป็นเกลียเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนการทำงานของ blood-brain barrier ซึ่งงานวิจัยบางงานได้บ่งชี้ว่า แอสโตรไซต์ช่วยควบคุมและจำกัดการซึมผ่านของ blood-brain barrier โดยมีส่วนเกี่ยวข้องกับการควบคุมโปรตีน tight junction (11) และเมื่อทำการศึกษาเพิ่มเติมพบว่า เซลล์แอสโตรไซต์มีบทบาทในการช่วยควบคุมความสมบูรณ์ของ blood-brain barrier โดยการสนับสนุนการทำงานของ blood-brain barrier ตลอดจนรักษาสมดุลของ anti-inflammation ในระบบประสาทส่วนกลาง (12) งานวิจัยของ Wang และคณะ ได้มีการรายงานไว้ว่า เมื่อให้สารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) ต่อเซลล์แอสโตรไซต์จะพบการหลั่งสาร chemokines เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังส่งผลกระทบต่อหน้าที่ในการควบคุมโปรตีน tight junction โดยพบว่าก่อให้เกิดการซึมผ่าน blood-brain barrier มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (13) ดังนั้น การเกิดภาวะความผิดปกติของเซลล์แอสโตรไซต์จึงน่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ blood-brain barrier ด้วย ด้วยเหตุผลนี้ จึงมีความเป็นไปได้ว่าการตรวจพบว่าผิดปกติของ blood-brain barrier ในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่พบในการศึกษาก่อนหน้านี้ (10) อาจมีส่วนหนึ่งที่เกิดจากผลกระทบของยาพาราเซตามอลที่ส่งผลต่อเซลล์แอสโตรไซต์ทำให้เกิดการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและก่อให้เกิดความเสียหายกับ blood-brain barrier

เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานข้างต้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่มีต่อเซลล์แอสโทรไซต์โดยทำการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของ pro-inflammation cytokines (IL-1 β และ TNF- α) และการศึกษาการแสดงออกของ NF-kB ซึ่งเป็น transcription factor ที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (inflammation) ด้วยเทคนิค western blot analysis, Immunohistochemistry, Immunofluorescence และตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค (Ultrastructure) ของเซลล์แอสโทรไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (Transmission electron microscope)



1.2 คำถามงานวิจัย (Research Questions)

คำถามงานวิจัยหลัก : การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเร็วรั้งสามารถเหนี่ยวนำเซลล์แอสโตรไซต์ให้มีการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบหรือไม่

คำถามงานวิจัยรอง : การแสดงออกของสารไซโตไคน์ของเซลล์แอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเร็วรั้งมีความเกี่ยวข้องกับวิถี NF-kB หรือไม่

1.3 วัตถุประสงค์ของงานวิจัย (Objectives)

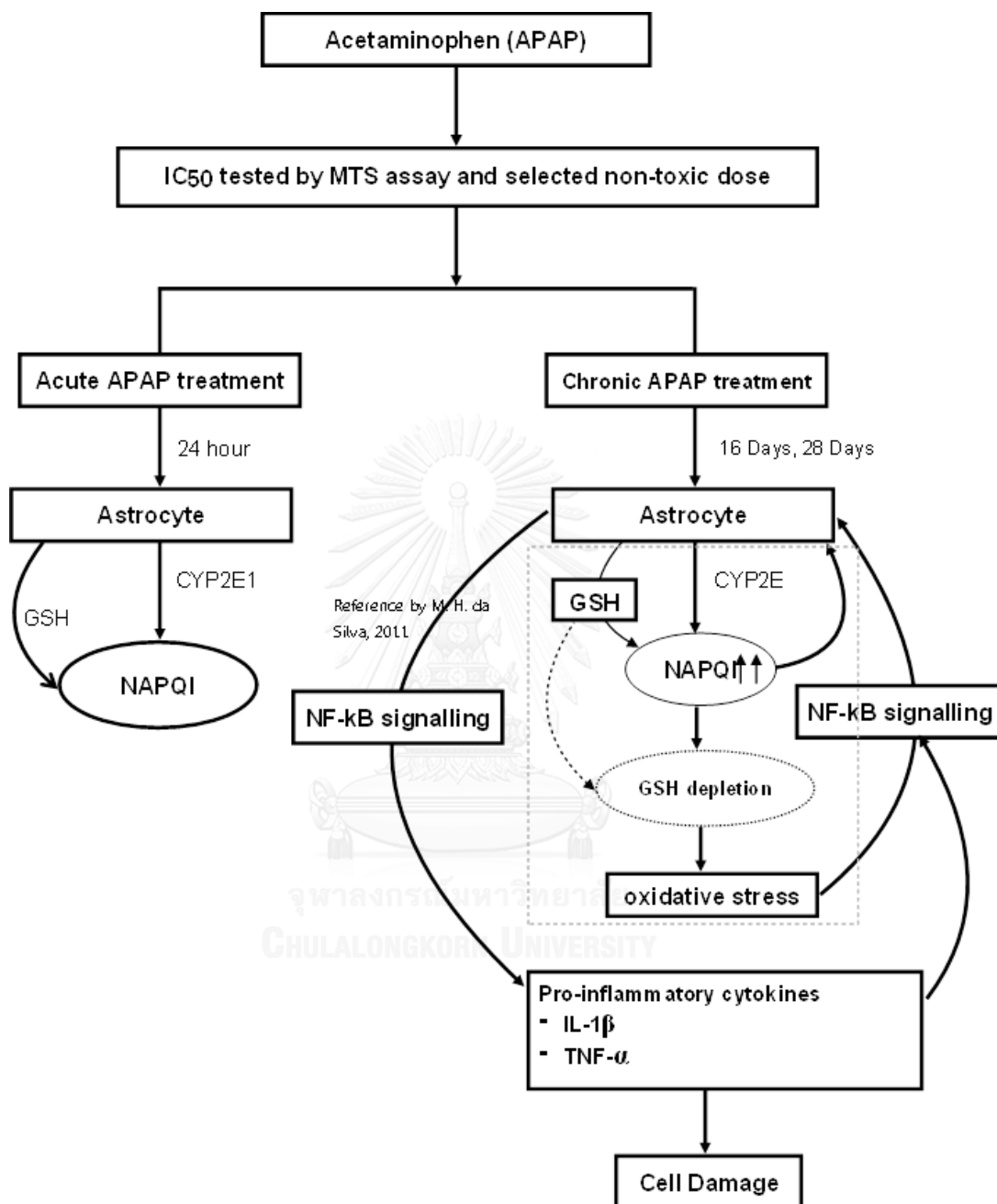
วัตถุประสงค์หลัก : เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเร็วรั้งต่อการเหนี่ยวนำเซลล์แอสโตรไซต์ให้มีการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ

วัตถุประสงค์รอง : เพื่อเปรียบเทียบผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเร็วรั้งที่มีต่อการเหนี่ยวนำเซลล์แอสโตรไซต์ให้มีการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบและวิถี NF-kB

1.4 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเร็วรั้งสามารถเหนี่ยวนำเซลล์แอสโตรไซต์ให้มีการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพิ่มขึ้นได้ โดยการเพิ่มขึ้นของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบนี้มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นวิถี NF-kB

1.5 กรอบแนวความคิดในการวิจัย (Conceptual Framework)

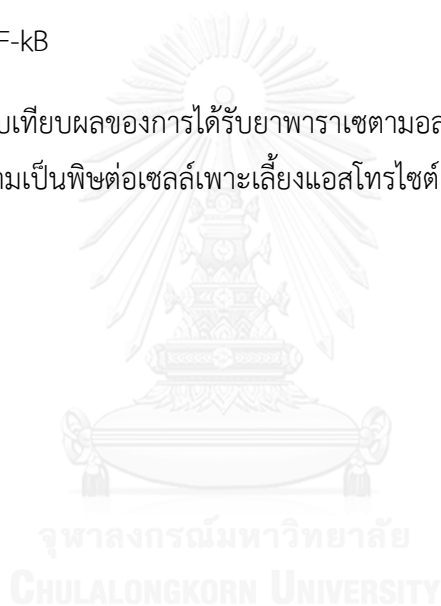


1.6 คำสำคัญ (Keywords)

Paracetamol, Astrocyte, Pro-inflammatory cytokines, NF-kB signaling, Ultrastructure

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Benefits of study)

1. ทราบถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อเซลล์แอสโตรไซต์ในด้านการแสดงออกไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ
2. ทราบถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อเซลล์แอสโตรไซต์ในด้านการแสดงออกของ NF-kB
3. สามารถเปรียบเทียบผลของการได้รับยาพาราเซตามอลที่มีต่อการแสดงออกสารไซโตไคน์ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์เมื่อได้รับยาระยะสั้นกับการได้รับยาอย่างเรื้อรัง



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ยาพาราเซตามอล (acetaminophen; APAP)

พาราเซตามอล หรือ อะเซตามิโนเฟน (acetaminophen, N-acetyl-paraaminophenol) เป็นยาที่มีคุณสมบัติในการลดไข้ บรรเทาปวด สามารถใช้เป็นยาบรรเทาปวดได้จากหลายสาเหตุ และไม่ก่อให้เกิดความระคายเคืองต่อกระเพาะอาหาร ตลอดจนสามารถใช้ร่วมกับยาอื่นๆได้โดยไม่ก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ พาราเซตามอลนั้นถูกพบในปี 1948 โดย Brodie และ Axelrod ซึ่งได้ทดลองใช้ acetanilide และพบว่าฤทธิ์บรรเทาอาการปวดของ acetanilide เกิดจากพาราเซตามอลซึ่งเป็นสารเมตาบอไลต์ของ acetanilide และพาราเซตามอลมีผลข้างเคียงน้อยกว่ามาก (14) จึงถูกนำมาใช้และเป็นที่ยอมรับกันอย่างแพร่หลาย เนื่องจากเป็นยาที่ได้รับการพิจารณาแล้วว่าเป็นยาที่ค่อนข้างปลอดภัย ไม่ก่อให้เกิดผลเสียอันร้ายแรงอีกทั้งยังหาซื้อได้ง่าย สามารถจัดจำหน่ายได้โดยไม่ต้องมีใบสั่งแพทย์ จึงทำให้พาราเซตามอลยังคงเป็นยาบรรเทาปวดลดไข้ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน

2.1.1 กระบวนการเมแทบอลิซึมของยาพาราเซตามอล

เมื่อยาพาราเซตามอลเข้าสู่ร่างกาย พาราเซตามอลจะแพร่กระจายไปตามกระแสเลือด และไปยังอวัยวะต่างๆรวมถึงสมอง โดยส่วนใหญ่ยานี้จะถูกเมแทบอลิซึมที่ตับ ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึม โดย 90% ของการได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ไม่เกินระดับที่ใช้ในการรักษา (4g/day) จะถูกเปลี่ยนเป็น O-glucuronide conjugate และ O-sulfate conjugate ซึ่งไม่มีความเป็นพิษและถูกขับออกทางปัสสาวะได้ อย่างไรก็ตามอีก 10% ของยาพาราเซตามอลที่ไม่ผ่านกระบวนการเมแทบอลิซึมในรูปแบบแรกนั้นจะถูกเมแทบอลิซึมโดยเอนไซม์ Cytochrome P450 ชนิด 2E1 (CYP2E1) กลายเป็น N-acetyl-p-benzoquinoneimine (NAPQI) ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ อย่างไรก็ตาม glutathione ที่อยู่ในตับซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระมีคุณสมบัติช่วยให้ความเป็นพิษของ NAPQI หดไปได้ (15)

เอนไซม์ CYP2E1 หรือ Cytochrome P450 ชนิด 2E1 เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญมากในการเมทาบอลิซึมของยาและสารประกอบบางชนิด ซึ่งกระบวนการเมทาบอลิซึมของยาพาราเซตามอลโดยเอนไซม์ CYP2E1 นั้นสามารถก่อให้เกิดอนุมูลอิสระ และนำไปสู่ภาวะ oxidative stress ซึ่งส่งผลกระทบต่อเซลล์ต่างๆทั้งด้านโครงสร้างและหน้าที่โดยชักนำให้เกิด lipid peroxidation, protein inactivation, DNA damage และนำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์ในที่สุด (cellular injury) และเป็นที่ทราบโดยทั่วกันว่า เอนไซม์ CYP2E1 นอกจากจะมีการแสดงออกที่ตับเป็นส่วนใหญ่แล้ว ยังพบที่มีการแสดงออกในเนื้อเยื่ออื่นๆ เช่น ไต ปอด รวมไปถึงในระบบประสาทส่วนกลางด้วย (16) ถึงแม้ว่าจะมีการพบเอนไซม์ CYP2E1 ในระบบประสาทส่วนกลางในปริมาณที่ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในตับ แต่พบว่า CYP2E1 ที่พบในระบบประสาทส่วนกลางนี้กลับมีการทำงาน (activity) ที่สูง โดยในระบบประสาทส่วนกลางพบที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 จะมีการแสดงออกมาในบริเวณ cortical neurons, striatum, substantia nigra, olfactory lobe และ hippocampus และยังพบว่าเอนไซม์ CYP2E1 มีการแสดงออกในเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของระบบประสาทส่วนกลางหลายเซลล์รวมถึง endothelial และ astrocyte cells (8) ดังนั้น จึงเป็นไปได้ว่าสมองในบริเวณที่มีการแสดงออกของ CYP2E1 อาจจะได้รับผลกระทบจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของยาพาราเซตามอลได้

2.1.2 การศึกษาวิจัยผลของยาพาราเซตามอลที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทส่วนกลาง

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่างานวิจัยโดยส่วนใหญ่รายงานถึงผลของยาพาราเซตามอลในด้านการปกป้องเซลล์ เช่น งานวิจัยของ Tripathy และ Grammas ในปี 2009 ได้รายงานไว้ว่า เมื่อทำการบ่มเลี้ยงเซลล์เอนโดทีเลียมกับยาพาราเซตามอล จากนั้นเหนี่ยวนำด้วยสารอนุมูลอิสระ (menadione) พบว่า ยาพาราเซตามอลสามารถลดการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1, IL-6, TNF- α) ได้ ซึ่งจากผลงานวิจัยนี้สามารถบ่งชี้ได้ว่า ยาพาราเซตามอลสามารถป้องกันเซลล์เอนโดทีเลียมที่บริเวณหลอดเลือดสมองจากสารอนุมูลอิสระได้ (1) ต่อมาในปี 2010 Baliga และคณะ พบว่าการได้รับพาราเซตามอลสามารถลดการเสียหายของเนื้อเยื่อสมองที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดภาวะสมองขาดเลือด (cerebral ischemia) โดยจะลดการบวมของสมอง ลดการเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรีย และลดการทำงานของ caspase-3 ซึ่งแสดงถึงการตายแบบ apoptosis อีกด้วย (4) นอกจากนี้ ผลงานวิจัยของ Bisaglia และคณะ ในปี 2002 ยังได้บ่งชี้ว่าการบ่มเลี้ยงเซลล์สมองด้วยพาราเซตามอลก่อนที่จะได้รับ amyloid β peptide (การสะสมของ amyloid β เป็นสัญลักษณ์ของโรคอัลไซเมอร์และเป็นสาเหตุการเสื่อมของเซลล์ประสาท) ช่วยให้เซลล์สมองมีการตายลดลง (3) แม้ว่าจะมีงานวิจัยต่างๆที่รายงานถึงผลของยาพาราเซตามอลในด้านการปกป้องเซลล์ แต่อย่างไรก็ตามในช่วง 10 ปีหลัง พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานสามารถก่อให้เกิดความ

เป็นพิษต่อเซลล์ได้ เช่น งานวิจัยของ Supornsilpchai และคณะ ได้รายงานไว้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังสามารถส่งผลกระทบต่อหลอดเลือดสมองและการตอบสนองของเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลางได้ โดยในกลุ่มหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่อง (200 mg/kg ซึ่งเป็นขนาดที่ไม่เกิดพิษต่อตับ) เป็นระยะเวลา 30 วัน และได้รับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ส่งผลให้มีภาวะ hyperexcitability ของ cortical neurons และมีการเปลี่ยนแปลงของการไหลเวียนเลือดในสมองมากกว่ากลุ่มควบคุม และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของตัวรับซีโรโทนินชนิด 5-HT_{2A} ซึ่งมีผลทำให้มีการกระตุ้นระบบ trigeminovascular nociceptive system ซึ่งเป็นระบบที่มีความเกี่ยวข้องกันของระบบประสาทและระบบหลอดเลือดสมองมากขึ้น (17, 18) และงานวิจัยของ Posadas และคณะ ได้มีการรายงานไว้ว่า เมื่อทำการบ่มเลี้ยง neuroblastoma cells ด้วยยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1, 2 mM พบว่า ยาพาราเซตามอลสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของ neuroblastoma cells ซึ่งกระบวนการตายของ neuroblastoma cells นั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างสารอนุมูลอิสระจากกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาพาราเซตามอลและสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ ซึ่งสิ่งเหล่านี้จะนำไปสู่การกระตุ้นกระบวนการตายของ neuroblastoma cells (19)

2.1.3 ยาพาราเซตามอลและกระบวนการอักเสบ

การอักเสบ (Inflammation) เป็นกระบวนการตอบสนองเฉพาะที่ของร่างกายที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพแวดล้อมของเนื้อเยื่อหรือเซลล์นั้นๆ โดยมีความเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา เมื่อเซลล์เกิดความเสียหายจะเกิดกระบวนการส่งสัญญาณไปเรียกเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันมายังบริเวณที่เซลล์ได้รับความเสียหายและนำไปสู่กระบวนการอักเสบซึ่งเซลล์บริเวณนั้นก็จะถูกทำลายรวมถึงสร้างความเสียหายให้กับเนื้อเยื่อหรือเซลล์บริเวณนั้นด้วย

จากการสืบค้นข้อมูลพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์มีผลไปลดการแสดงออกของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น งานวิจัยของ Bisaglia และคณะ รายงานไว้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ต่ำสามารถลดการตายแบบ apoptosis ของเซลล์เพาะเลี้ยงประสาท (neurons) ได้โดยลด transcription factor NF- κ B ในกระบวนการอักเสบ (3) เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Triphaty และคณะ ที่พบว่ายาพาราเซตามอลสามารถลดอันตรายที่เกิดจาก pro-inflammatory cytokines ที่หลั่งออกมาจากเซลล์เพาะเลี้ยง endothelial ได้เมื่อได้รับในปริมาณที่ต่ำ (1) นอกจากนี้งานวิจัยของ Kakarla และคณะ พบว่ายาพาราเซตามอลสามารถลดระดับของ ROS และสามารถลดการตายของกล้ามเนื้อหัวใจได้ (2) และยังมีผลงานวิจัยอื่นพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ใช้ในการรักษา (therapeutic dose) อย่างต่อเนื่อง (30mg/kg/day) พบว่ามีผลไปลดความหนาของชั้นกล้ามเนื้อหัวใจ (tunica media thickness) และ

ปริมาณของ oxidized protein (20) แต่ในระยะหลังกลับพบว่า มีบางงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่สูงกว่าระดับที่ใช้ในการรักษาหรือการได้รับยาอย่างต่อเนื่องสามารถก่อให้เกิดพิษและนำไปสู่กระบวนการอักเสบได้ โดยความเป็นพิษนั้นเกิดจากกระบวนการเมทาบอลิซึมของยาพาราเซตามอล เช่น ในปี 2003 James และคณะ พบว่า เนื้อเยื่อบริเวณ centrilobular (บริเวณรอบหลอดเลือดดำ) ของหนู mice ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของ inducible nitric oxide synthase (iNOS) และ nitrotyrosine เกิดการตายและมีการหลั่ง IL-1 ออกมาเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่สูงกว่าระดับที่ใช้ในการรักษา (21) ต่อมา Bourdi และ คณะ ได้ทำการศึกษาในหนู mice ที่มีภาวะพร่องทั้ง IL-10 และ IL-4 ซึ่งเป็นสาร anti-inflammatory พบว่าหนู mice มีความไวต่อความเป็นพิษของยาพาราเซตามอล โดยมีระดับของ GSH ในตับลดลง แต่มีระดับของ pro-inflammatory cytokines (TNF- α , MIP-1 α และ IL-6) เพิ่มขึ้น ซึ่งบทบาทของสารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อ (22)

Astrocyte และ Blood-Brain barrier

เซลล์แอสโตรไซต์เป็นเซลล์ค้ำจุนหรือเกลียเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบประสาทส่วนกลางแบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ ชนิดโปรโตพลาสซึม (protoplasmic astrocyte) ที่มีขนาดใหญ่ เส้นใยมีลักษณะสั้นหนา และมีการแตกแขนงออก พบมากใน gray matter ของระบบประสาทส่วนกลาง และ ชนิดไฟบรัส (fibrous astrocyte) มีขนาดเล็ก เส้นใยมีลักษณะเรียวยาวและมีการแตกกิ่งก้านค่อนข้างน้อย พบมากในบริเวณ white matter ของระบบประสาทส่วนกลางซึ่งทั้งสองชนิดมีหน้าที่การทำงานที่คล้ายคลึงกันแต่แตกต่างกันที่ลักษณะรูปร่างและตำแหน่งที่พบเท่านั้น

แอสโตรไซต์มีบทบาทการทำงานที่ค่อนข้างซับซ้อนและหลากหลายจัดเป็นเซลล์หนึ่งใน neurovascular unit ซึ่งถือได้ว่ามีความสำคัญมาก พบว่า มีความเกี่ยวข้องกับการรักษาสมดุลการทำงานในสมอง ควบคุมและคัดกรองการผ่านเข้า-ออกของสาร จัดหาสารอาหารให้กับเซลล์ประสาท ควบคุมปริมาณสารสื่อประสาท สนับสนุนการทำงานของเกลียเซลล์ชนิดอื่นๆที่อยู่โดยรอบอีกทั้งยังช่วยลดการซึมผ่าน blood-brain barrier โดยมีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมโปรตีน Tight junction (23)

2.2 เซลล์แอสโตรไซต์และกระบวนการอักเสบ

เมื่อเกิดความผิดปกติในระบบประสาทส่วนกลางหรือเซลล์ในระบบประสาทได้รับความเสียหายเซลล์แอสโตรไซต์จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการเพิ่มจำนวน มีการหลั่งสารต่างๆออกมาเพื่อควบคุมและกระตุ้นเซลล์ต่างๆเพื่อให้ระบบประสาทส่วนกลางอยู่ในภาวะปกติเช่น glutamate, Nitric Oxide (NO), Prostaglandin รวมไปถึงสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ เช่น tumors necrosis factor- α (TNF- α) และ chemokines ต่างๆ (23) ซึ่งสารบางชนิดอาจก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ และสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเหล่านี้นอกจากจะไปกระตุ้นเซลล์ต่างๆในระบบประสาทส่วนกลางแล้วยังสามารถย้อนกลับไปกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์ทำให้เซลล์แอสโตรไซต์ถูกกระตุ้นมากกว่าปกติ อาจก่อให้เกิดการสูญเสียหน้าที่การทำงานและส่งผลกระทบต่อเซลล์ประสาท ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่ทราบโดยทั่วกันแล้วว่าความผิดปกติของเซลล์แอสโตรไซต์นั้น มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคความผิดปกติในระบบประสาทส่วนกลางหลายชนิด เช่น โรคอัลไซเมอร์ โรคพาร์กินสัน โรคฮันติงตันและโรคปลอกประสาทเสื่อม เป็นต้น (23) เนื่องจากแอสโตรไซต์มีหน้าที่สำคัญในการควบคุมสมดุลในระบบประสาทส่วนกลางและมีความเกี่ยวข้องกับเซลล์ต่างๆในระบบส่วนกลางหลายชนิด เมื่อแอสโตรไซต์ถูกกระตุ้นมากเกินไปจนไม่สามารถควบคุมได้อาจทำให้สูญเสียหน้าที่การทำงานไปด้วย

2.3 Pro-inflammatory cytokines

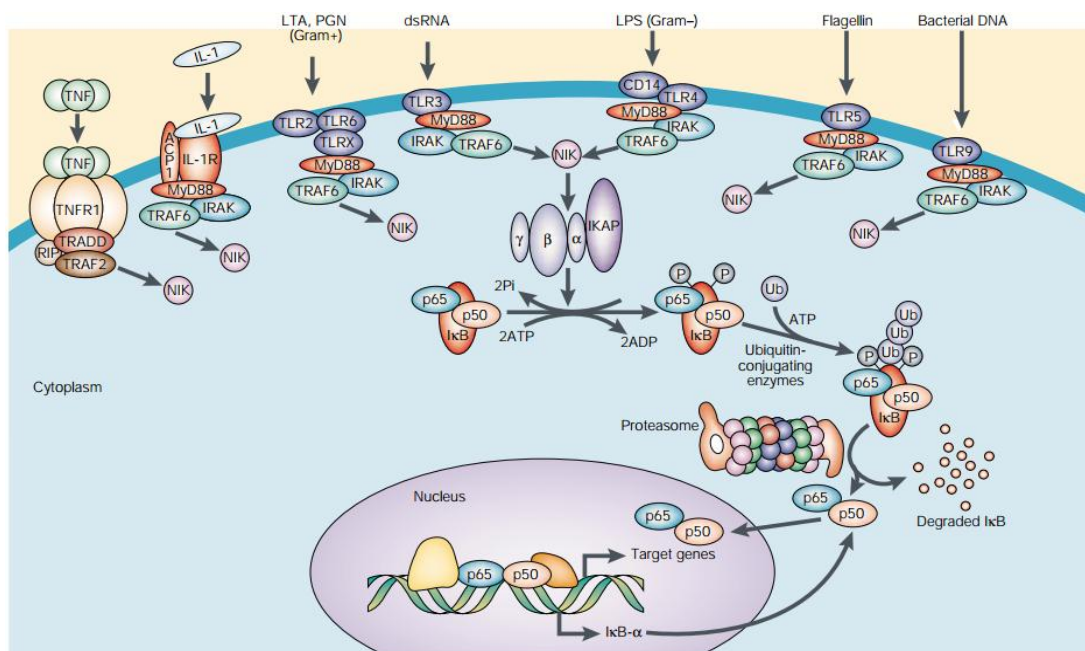
2.3.1 Interleukin-1 (IL-1 β) และ Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α)

IL-1 β และ TNF- α เป็น Pro-inflammatory cytokines ที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบโดยพบว่าถูกสร้างจาก macrophages และมีฤทธิ์การแสดงออกที่คล้ายคลึงกัน ซึ่งพบว่าเมื่อเซลล์ที่มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบถูกกระตุ้น จะมีการแสดงออกของ IL-1 β และ TNF- α เพิ่มขึ้นด้วยจากการศึกษาค้นคว้าถึงบทบาทของ IL-1 β และ TNF- α ในสมองแสดงให้เห็นว่า cytokines ทั้งสองชนิดมีบทบาทในการตอบสนองต่อกระบวนการอักเสบ เช่น ในปี 1990 งานวิจัยของ Chung และ Benveniste ได้รายงานไว้ว่า เมื่อเซลล์แอสโตรไซต์ถูกกระตุ้นด้วย interferon-gamma (IFN- γ) ร่วมกับ IL-1 β และ LPS พบว่าเซลล์แอสโตรไซต์มีการตอบสนองต่อการกระตุ้นต่อโดยมีการหลั่ง TNF- α เพิ่มขึ้น (24) อีกทั้งยังพบว่าในผู้ป่วยอัลไซเมอร์มีการแสดงออกของ IL-1 β ในสมองเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมโดยเป็นพยาธิสภาพที่สัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบ (25) นอกจากนี้พบว่าการเพิ่มขึ้นของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบสามารถกระตุ้นวิถีการทำงานของ NF- κ B ซึ่งเป็นวิถีที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบได้ โดยสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่างๆ

เหล่านี้ รวมถึง IL-1 β และ TNF- α จะจับกับโปรตีนตัวรับ (receptor) บนผิวเซลล์อย่างจำเพาะแล้ว มีผลไปกระตุ้น accessory protein (AcP) complex ได้แก่ mitogen-activated protein (MAP), interleukin-1 receptor associated kinase (IRAK), tumour necrosis factor receptor associated factor (TRAF) จากนั้นโปรตีนเหล่านี้จะมีผลไปกระตุ้นวิธีการทำงานของ NF-kB (26)

2.4 NF-kB (Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells)

NF-kB เป็น transcription factor มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร pro-inflammatory cytokine (IL-1 β และ TNF- α), Chemokines รวมไปถึง adhesion molecules ซึ่งโดยปกติแล้ว NF-kB จะอยู่ในรูปแบบไม่ทำงาน (inactive) โดยจับกับตัวยับยั้งของ NF-kB (nuclear factor kappa B inhibitor หรือ I κ B) ภายในไซโตพลาสซึมและเมื่อเซลล์แอสโทรไซต์ถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบเพิ่มขึ้นของสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (nitric oxide, pro-inflammatory cytokines ทั้ง IL-1 และ TNF- α) เชื่อว่ามีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นวิธีการทำงานของ NF-kB โดยพบว่าวิธีการกระตุ้น NF-kB ในการอักเสบอย่างเรื้อรังนั้น เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารกระตุ้นต่างๆ บนผิวเซลล์และส่งผลให้ NF-kB inducing kinase (NIK) ถูกกระตุ้น ซึ่ง NIK จะไปกระตุ้น I κ k ให้ไปเติมหมู่ฟอสเฟสให้กับ I κ B ทำให้ I κ B หลุดออกมาจากโมเลกุลของ NF-kB (p65 และ p50) และถูกทำลายด้วย ubiquitin-proteasome (UB) ส่งผลให้ NF-kB (p65 และ p50) ย้ายจากไซโตพลาสซึมไปสู่นิวเคลียสเพื่อทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (26, 27) ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงกลไกการทำงานของวิถี NF-κB (Nguyen, Julien, and Rivest 2002)

จะเห็นได้ว่าวิถี NF-κB เป็นปัจจัยสำคัญที่ควบคุมสมดุลของสาร pro-inflammatory cytokines ในเซลล์แอสโทรไซต์ โดยเมื่อเซลล์แอสโทรไซต์ถูกกระตุ้นจะมีการกระตุ้นวิถีการทำงานของ NF-κB ส่งผลให้มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของยีนต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (TNF- α , IL-1 β , iNOS) ซึ่งสารอักเสบต่างๆเหล่านี้หากมีปริมาณที่มากเกินไปจะสามารถส่งผลให้เกิดการเสียสภาวะสมดุลภายในระบบประสาทส่วนกลางและในที่สุดจะสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ต่างๆในระบบประสาทส่วนกลางได้

ดังนั้น ในงานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ โดยจะทำการศึกษาว่าเซลล์แอสโทรไซต์มีการเปลี่ยนแปลงในการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบจากการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังหรือไม่ นอกจากนั้นจะทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบว่ามีความเกี่ยวข้องกับวิถี NF-κB หรือไม่ โดยผลการศึกษาวิจัยที่ได้ อาจมีผลต่อการพิจารณาถึงข้อควรระวังของการใช้ยาพาราเซตามอลในผู้ป่วยอย่างเรื้อรังในอนาคตได้

บทที่ 3

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 แหล่งที่มาของวัสดุอุปกรณ์และสารเคมี

3.1.1 สารเคมี

Acrylamide	Vivantis
Tris Hydrochloride (Tris-HCl)	Vivantis
Glycine	Vivantis
Sodium chloride (NaCl)	Vivantis
Sodium dodecyl sulfate (SDS)	Vivantis
Tween-20	Vivantis
Ammonium persulfate (APS)	Sigma
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma
Tetramethylethylenediamine (TEMED)	AppliChem
Methanol	Merck Millipore
Bovine Serum Albumin Fraction V (BSA)	Capricorn
Skim milk powder	Sigma

3.1.2 สารสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

Dulbecco's Modified Eagle's Medium	HyClone
Fetal bovine serum (FBS)	HyClone
0.25% Trypsin/Ethylenedimintetraacetic Acid (EDTA)	HyClone
Penicilin-Streptomysin solution	HyClone
Sodium Pyruvate powder	HyClone
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	HyClone

3.1.3 เซลล์เพาะเลี้ยง

C8-D1A	ATCC
--------	------

3.1.4 แอนติบอดี

Mouse monoclonal anti IL-1 β antibody	Cell signaling
Rabbit polyclonal anti phospho-NF-kB-p65 (Ser536) (93H1) antibody	Cell signaling
Rabbit polyclonal anti-NF-kB p65 (phospho S536) antibody	Abcam
Goat polyclonal anti TNF- α antibody	Zanta Cruze
Mouse monoclonal anti β -actin antibody	Sigma
Anti-Mouse IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	Sigma
Anti-Rabbit IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	Sigma
Anti-Goat IgG (whole molecule) Peroxidase antibody	Sigma

3.1.5 เบ็ดเตล็ด

RIPA Buffer	Cell signaling
BCA protein assay kit	Thermo
ECL Prime Western Blotting Detection Reagent	GE Healthcare
Amersham Hybond ECL Nitrocellulose Membrane	GE Healthcare
PageRuler Prestained Protein Ladder	Thermo Scientific
Cell Titer 96 [®] Aqueous One Solution	Promega
Cell Proliferation Assay (MTS reagent)	

3.1.6 อาหารเลี้ยงเซลล์

C8-D1A cell line: Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM), 10% heat-inactivated Fetal bovine serum (FBS), 100 units/ml ของ Penicillin และ 100 µg/ml ของ streptomycin

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) จะถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) และเติม 10% heat-inactivated Fetal Bovine Serum (FBS), 100 unit/ml ของ penicillin และ 100 µg/ml ของ streptomycin โดยบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO₂ และมีการย้ายเซลล์(subculture) ไปยังภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ทุกๆ 72 ชั่วโมง โดยใช้ 0.25% Trypsin/EDTA เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะ

3.2.1 การปลูกเซลล์ตั้งต้น (Cell line Frozen stock)

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) ที่เก็บไว้ที่ -80°C ถูกนำมาทำให้ละลายใน water bath ที่ 37°C ทันทีก่อนถูกย้ายลงสู่หลอดปั่นขนาด 15 ml ที่ประกอบด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (10% FBS/DMEM) จากนั้นปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm ที่ 25°C นาน 5 นาที กำจัดส่วนใส (supernatant) ทิ้ง และนำตะกอนเซลล์ (cell pellet) ละลายใน 10% FBS/DMEM เซลล์ถูกเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มี 5% CO_2 ในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 cm^2

3.2.2 การแช่แข็งเซลล์เพื่อเก็บเป็นเซลล์ตั้งต้น

เซลล์ถูกทำให้หลุดออกจากภาชนะโดยใช้ 0.25% Trypsin/EDTA จากนั้นสารละลายเซลล์ ถูกปั่นและนับจำนวนเซลล์โดยใช้ 0.4% trypan blue dye (% cell viability ควรสูงกว่า 80% ถึงจะเหมาะสมสำหรับการเก็บเป็นเซลล์ตั้งต้น) ส่วนตะกอนเซลล์จะถูกทำให้ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย 20% FBS/DMEM และ 10% DMSO ในปริมาณที่เหมาะสม เพื่อให้ได้ความหนาแน่นเซลล์ประมาณ 10^7 cells/ml เซลล์จะถูกเก็บใน cryogenic tube 1 ml/tube โดยเก็บใน Mr.Frosty™ Freezing Container (Nalgene, USA) ที่ -80°C เพื่อใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นต่อไป

3.3 การนับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion

ล้างเซลล์ด้วย PBS 2 ครั้ง ก่อนทำให้เซลล์หลุดจากภาชนะเพาะเลี้ยงด้วย 0.25% Trypsin/EDTA และหยุดปฏิกิริยาด้วย 10% FBS/DMEM ในปริมาณที่เหมาะสม จากนั้น 20 ไมโครลิตร ของสารละลายเซลล์จะถูกผสมกับ 30 ไมโครลิตร ของ PBS และ 50 ไมโครลิตร ของ 0.4% trypan blue dye (สารละลายเซลล์ถูกเจือจาง 1:5) ผสมให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที จำนวนเซลล์จะถูกนับโดยใช้ Hemocytometer ภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และแสดงข้อมูลในลักษณะจำนวนเซลล์/มิลลิเมตร โดยการคูณจำนวนเฉลี่ยของเซลล์ที่นับได้ต่อพื้นที่ $1 \times 1\text{ mm}^2$ ด้วย 10^4 และคูณด้วย 5 (dilution factor)

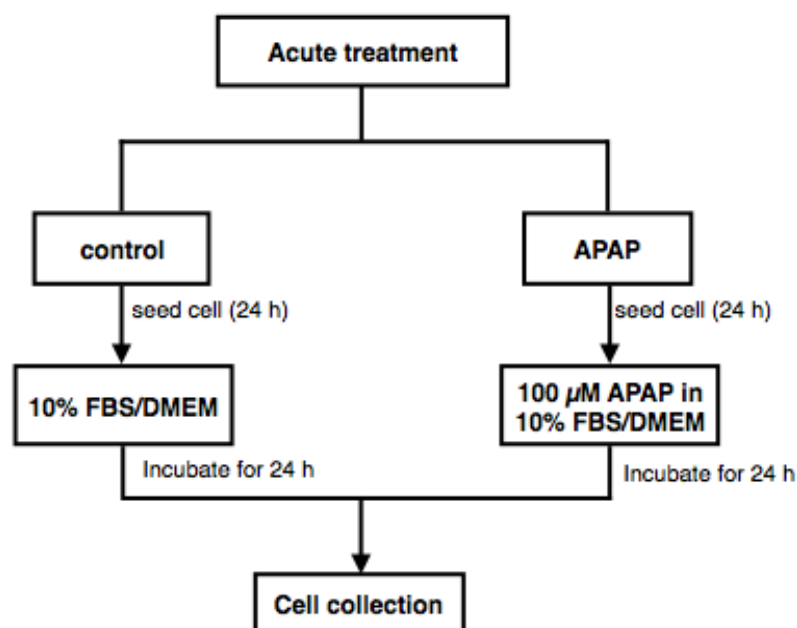
3.4 การวิเคราะห์หาค่า IC_{50} ของพาราเซตามอลด้วยวิธี MTS assay เพื่อเลือกความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (Non-toxic dose)

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) จำนวน 2.5×10^3 cells จะถูกนำไปเลี้ยงใน 96-well plate เป็นเวลา 12 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ เต็ม 100 ไมโครลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มียาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นต่างๆผสมอยู่ลงไปในกลุ่ม และนำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อ เต็ม 100 ไมโครลิตร ของอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ลงไปแทน ตามด้วย 20 ไมโครลิตร ของสารละลาย MTS ลงไป จากนั้นบ่มเลี้ยงต่อในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 490 นาโนเมตร หลังจากนั้นนำค่าที่ได้มาคำนวณหา % cell viability เมื่อหาค่า IC_{50} แล้วจากนั้นจะทำการเลือกค่าความเข้มข้นของยาพาราเซตามอล ที่ต่ำกว่าค่า IC_{50} ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมคือมีเซลล์ตายต่ำกว่า 10% เพื่อใช้ในการทดลองในการให้ยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังแก่เซลล์เพาะเลี้ยง



3.5 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์

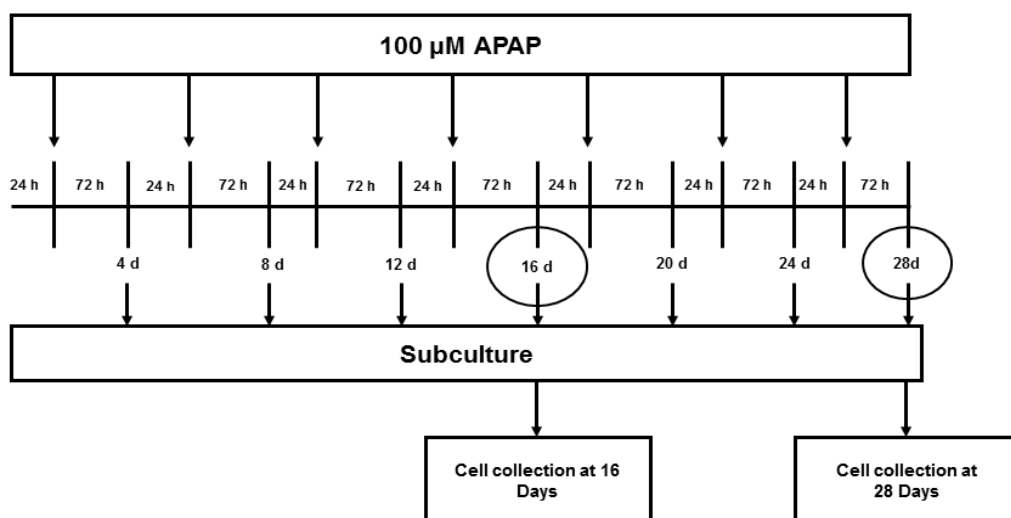
เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ (C8-D1A) จำนวน 9.5×10^5 cells จะถูกบ่มเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง จากนั้นจะเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม non-toxic doses ของยาพาราเซตามอลลงไป นำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดจะทำการเก็บตะกอนเซลล์และนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Western Blotting และ ศึกษาลักษณะ Cell morphology ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป



รูปที่ 2 แผนภาพแสดงการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์

3.6 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ (C8-D1A) จำนวน 9.5×10^5 cells จะถูกบ่มเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง จากนั้นจะเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม non-toxic doses ของยาพาราเซตามอลลงไป นำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เซลล์จะถูกย้ายไปเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ซึ่งเซลล์แอสโตรไซต์จะถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ สำหรับการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง จะเก็บตะกอนเซลล์เมื่อเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลา 16 วัน และ 28 วัน จากนั้นตะกอนเซลล์ที่เก็บจะถูกนำไปศึกษาต่อในขั้นตอนการวิเคราะห์โปรตีนโดยวิธี Western Blotting และ ศึกษาลักษณะ morphology ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป



รูปที่ 3 แผนภาพแสดงการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์

3.7 Western Blotting

3.7.1 สกัดโปรตีนจากเซลล์เพาะเลี้ยง

เซลล์เพาะเลี้ยงตัวอย่างในกลุ่มได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน และ กลุ่มได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง จะถูกนำมาสกัดโปรตีนใน RIPA buffer (50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, 0.1% SDS, 1% Sodium deoxycholate, 1% Triton x-100) ซึ่งมี 1X protease/phosphatase inhibitor cocktail และทำให้เซลล์แตกโดยใช้ sonicator จากนั้นตั้งทิ้งไว้ในน้ำแข็ง 30 นาที นำไปปั่นที่ 12,000xg ที่ 4°C เป็นเวลา 15 นาที เก็บส่วนใส (supernatant) มาวัดความเข้มข้นของโปรตีนด้วย BCA protein assay kits (Thermo, USA)

3.7.2 การแยกโปรตีนโดยวิธี SDS-PAGE electrophoresis.

โปรตีนที่ทราบความเข้มข้นแล้วจะถูกนำมาผสมกับ 4x loading dye (240mM Tris-HCl pH 6.8, 40% Glycerol, 8% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 5% β-mercaptoethanol) และนำไปต้มที่อุณหภูมิ 95°C นาน 5 นาที จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วย 15% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้ความต่างศักย์ที่ 80 โวลต์ เป็นเวลา 2 ชั่วโมง 30 นาที สำหรับการตรวจสอบ inflammatory cytokine และ 10% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis ความต่างศักย์ที่ 100 โวลต์ นาน 2 ชั่วโมง สำหรับการตรวจสอบ pNF-kB ด้วยเครื่อง Mini Trans-Blot® Electrophoresis Transfer Cell (BioRad, U.S.A) ก่อนถูกย้ายสู่เมมเบรน

3.7.3 การย้ายโปรตีนจากเจลสู่เมมเบรนและการตรวจสอบ

โปรตีนจากแผ่นเจลจะถูกย้ายลงสู่ Nitrocellulose membrane (Pall Life Sciences, Mexico) โดยใช้ Mini Trans-Blot® Electrophoresis Transfer Cell (BioRad, U.S.A) ที่ 0.35 แอมป์ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง 10 นาที จากนั้นนำเมมเบรนแช่ลงใน 5% BSA (Bovine serum albumin) ใน TBS-T buffer (5 mM Tris-HCl, pH 7.4 + 0.1% Tween 20) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมงเพื่อป้องกันการเกิด non-specific binding และบ่มด้วย primary antibody : mouse monoclonal anti IL-1 β (ความเข้มข้น 1:2,000)(#2022; Cell signaling, USA), goat polyclonal anti TNF- α (ความเข้มข้น 1:1,000)(sc-1350; Santa Cruz Biotechnology, USA), Rabbit polyclonal anti phospho-NF-kB-p65 (Ser536)(93H1) antibody (ความเข้มข้น 1:500)(#3033; Cell signaling, USA) และ mouse monoclonal anti β -actin (ความเข้มข้น 1:3,000)(AC-15; Sigma, USA) ที่เจือจางใน TBS-T (5mM Tris-HCl, pH 7.4+0.1% Tween 20) ที่มี BSA ที่อุณหภูมิ 4°C ซ้ำกัน ล้างเมมเบรน 3 ครั้ง แล้วบ่มเมมเบรนใน secondary antibody ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) ใน 5% BSA ใน TBS-T ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ต่อมาล้างเมมเบรนด้วย TBS-T 3 ครั้ง และนำแผ่นเมมเบรนไปบ่มด้วย SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kits (GE Healthcare Life Science, U.S.A) เพื่อดูการแสดงผลของโปรตีนด้วยเทคนิค Chemiluminescent และวิเคราะห์ปริมาณของโปรตีนที่สนใจโดยใช้ Image J software (Scion crop; Frederick, MD) โดยแสดงผลเป็นอัตราส่วนของ โปรตีน/ β -actin

3.8 การศึกษาการแสดงออกของ NF-kB signaling ด้วยเทคนิค Immunofluorescence และเทคนิค Immunohistochemistry

สำหรับเทคนิค Immunofluorescence นั้น เซลล์เพาะเลี้ยงตัวอย่างทั้งหมดจะถูกเก็บรวบรวมหลังจากครบกำหนดตามช่วงเวลาต่างๆ จากนั้นนำตะกอนเซลล์มาปั่นเหวี่ยง ด้วยความเร็ว 1,500 rpm ที่ 25°C นาน 5 นาที และคงสภาพเซลล์ด้วย 4% paraformaldehyde เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดนำตะกอนเซลล์ใส่ลงในแม่พิมพ์ จากนั้นเติม 4% agarose gel ลงไป ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องจนกระทั่งเจลแข็งตัว แกะเจลออกจากแม่พิมพ์ ตัดเจลส่วนเกินออกและห่อด้วยกระดาษซีตเลนส์ ต่อมานำเจลใส่ลงใน cassette และนำเข้าสู่กระบวนการ process และ embedded ต่อไป เมื่อได้ cell block แล้ว นำ cell block ที่ได้ไปตัดเป็น section หนา 3 ไมโครเมตร ด้วยเครื่อง microtome วางบนสไลด์ที่เคลือบด้วยสารที่ช่วยในการยึดเกาะ (Matsunami Glass Ind., Osaka, Japan) นำไปอบที่ 60°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการ

deparaffinized และ rehydrate ด้วยน้ำกลั่น และ retrieve antigen ด้วย citrate buffer pH6.0 (Dako, Glostrup, Denmark) โดยใช้เทคนิค microwave method จากนั้นบ่มสไลด์ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เมื่อครบกำหนดวาง rack พลาสติกลงในภาต ปล่อยน้ำไหลผ่านเพื่อล้าง antigen retrieval ออก (run tap water) นาน 5 นาที นำสไลด์ขึ้น สะบัดให้แห้ง เช็ดรอบๆ section ให้แห้ง (ห้ามให้สไลด์แห้งเด็ดขาด) และวางขอบเขต section ด้วย Dako pen นำสไลด์วางเรียงกันบน humidity chamber จากนั้น permeabilized นาน 45 นาที ด้วย 3% triton-x ใน PBS ครบกำหนด ล้าง section ด้วย 1% triton-x ใน PBS 2 ครั้งๆละ 5 นาทีจากนั้นแทนที่ด้วย Dako antibody diluents เพื่อทำการ block non-specific background นาน 1 ชั่วโมง แล้วจึงบ่มด้วย primary antibody : rabbit polyclonal anti-NF- κ B p65 (phospho S536) antibody (ความเข้มข้น 1:800)(#ab86299; abcam, USA) ที่ 4°C overnight เมื่อครบเวลาล้างด้วย phosphate buffer 3 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที (shaker) และบ่มด้วย fluorescent-labeled secondary antibody (ความเข้มข้น 1:50)(Dako, Glostrup, Denmark) ที่อุณหภูมิห้อง นาน 60 นาที ในที่มืด ครบเวลาล้างด้วย phosphate buffer 2 ครั้งๆละ 3 นาที จากนั้น บ่มด้วย DAPI (ความเข้มข้น 1:2,000) นาน 1 นาที และล้างด้วยน้ำกลั่น จากนั้น dehydrate ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (50%, 70%, 80%, 95% และ 100%) และ xylene ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที หยอด fluorescent mounting ที่ผสมสาร anti-fade ปิด cover-slip ลงบนสไลด์ ทิ้งไว้ให้แห้ง จากนั้น seal ขอบของ cover-slip ด้วยน้ำยาเคลือบเล็บและนำไปตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescent microscope) ต่อไป

ในส่วนของการตรวจสอบการแสดงออก NF- κ B signaling ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry สไลด์ที่ต้องการตรวจสอบทั้งหมดนี้จะทำการ deparaffinization และ antigen retrieval (Citrate buffer pH6.0, Dako, Glostrup, Denmark), บ่ม 3% Hydrogen peroxidase และ block-non specific ด้วย 3% normal horse serum (PAN Biotech GmbH, Aidenbach, Germany) ใน PBS จากนั้นบ่มด้วย rabbit polyclonal anti-NF- κ B p65 (phospho S536) antibody (ความเข้มข้น 1:800)(#ab86299; abcam, USA) ที่ 37°C นาน 30 นาที และตรวจสอบปฏิกิริยาด้วย UltraView Universal DAB Detection Kit (Ventana Medical Systems, Inc., USA) โดยกระบวนการทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นนั้น จะถูกดำเนินการภายใต้เครื่องย้อมสไลด์อัตโนมัติ (Benchmark XT, Ventana Medical Systems, Inc., USA) จากนั้นนำสไลด์ทั้งหมดที่ออกมาจากเครื่องย้อมสไลด์อัตโนมัติเข้าสู่กระบวนการ dehydration ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (50%, 70%, 80%, 95% และ 100%) และ xylene ทิ้งไว้ให้แห้งประมาณ 10 นาที ทำการ mounted และปิดด้วย cover slip ก่อนจะนำไปตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์ และเก็บรวบรวมข้อมูลด้วยเครื่องสแกนเนอร์ (Aperio ScanScope, Aperio, Vista, California, USA)

3.9 การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เซลล์เพาะเลี้ยงตัวอย่างในกลุ่มที่จะทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งหมดจะถูกเก็บรวบรวมหลังจากครบกำหนดตามช่วงเวลาต่างๆ โดยการเติม PBS ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ลงไปในภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นขูดเซลล์ออกเบาๆ ด้วย cell scraper ทำการดูดเซลล์ที่ได้ทั้งหมดใส่ลงในหลอดทดลองขนาด 1.5 ml นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นที่ 5,000 rpm ณ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 5 นาที ดูดส่วนที่เป็น supernatant ทิ้งไป และแทนที่ด้วย 2% glutaraldehyde เป็นเวลาอย่างน้อย 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด ล้างด้วย 0.1M phosphate buffer 3 ครั้งๆ ละ 2 นาที จากนั้นคงสภาพตะกอนเซลล์ด้วย 2% osmium tetroxide ที่ละลายใน phosphate buffer นาน 45 นาทีครบกำหนดล้าง ด้วย phosphate buffer 2 ครั้งๆ ละ 2 นาที และ dehydrate ด้วย ethanol ที่ความเข้มข้นจากน้อยไปมาก (50%, 70%, 85%, 90% และ absolute alcohol 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที จากนั้นแทนที่ด้วย propylene oxide 3 ครั้งๆ ละ 3 นาที ครบกำหนดเติม propylene oxide : resin อัตราส่วน 1:1 incubate ที่ 37°C นาน 10 นาที จากนั้นแทนที่ด้วย propylene oxide : resin อัตราส่วน 3:1 ที่ 45°C 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ครบกำหนด เปลี่ยนเติม 100% resin และนำไป incubate ที่ 45°C 2 ครั้งๆ ละ 15 นาที ครบเวลานำตะกอนเซลล์ใส่ลงใน embedding mold เติม 100% resin และนำไปป้อน ที่ 60°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ครบกำหนด นำเข้าสู่กระบวนการตัด โดยตัด semi-thin หนา ~500 นาโนเมตร แล้วทำการย้อมด้วย toluidine blue เพื่อเลือกบริเวณที่จะนำไปศึกษา จากนั้นตัด thin-section หนา 60-90 นาโนเมตร วางบน grid ทิ้งให้แห้ง อย่างน้อย 24 ชั่วโมง ครบกำหนดนำไปย้อมด้วย uranyl acetate เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยการนำ grid จุ่มในน้ำกลั่น 10 ครั้ง และ ย้อมด้วย lead citrate เป็นเวลา 30 นาที ครบกำหนด ล้างด้วยการนำ grid จุ่มในน้ำกลั่น 10 ครั้ง ซับให้แห้ง และทิ้งไว้ อย่างน้อย 30 นาที นำไปศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน โดยในการศึกษานี้จะศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์ ซึ่งโครงสร้างที่จะถูกศึกษานั้นประกอบไปด้วย เยื่อหุ้มเซลล์, ไมโทคอนเดรีย, นิวเคลียส และ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม

3.10 การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

1. ข้อมูลจากเทคนิค Western blotting จะถูกเก็บรวบรวมโดยฟิล์ม X-Ray (UltraCruz Autoradiography Film, Blue; SANTA CRUZ, USA)
2. ข้อมูลจากเทคนิค MTS assay จะถูกเก็บรวบรวมในโปรแกรม GraphPad Prism 6

3. ข้อมูลจากการศึกษาใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) จะนำมาวิเคราะห์และพิจารณาโดยดูจากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ซึ่งประกอบไปด้วยการเกิด vacuolization, การเปลี่ยนแปลงของ เยื่อหุ้มเซลล์ ไมโทคอนเดรีย นิวเคลียส และ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ที่มีการเปลี่ยนแปลงไปของกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม

4. ข้อมูลจากการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (fluorescent microscope) จะพิจารณาการแสดงออกของ NF-kB ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม

3.11. การวิเคราะห์ข้อมูล (Data Analysis)

ข้อมูลจะถูกวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 แสดงค่าเป็น mean \pm SEM ความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มจะวิเคราะห์โดยใช้ t-test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างช่วงเวลาของกลุ่มเดียวกันโดยใช้ One-way ANOVA ตามด้วย Bonferroni's multiple comparison test ซึ่งความแตกต่างจะได้รับการพิจารณาให้มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

บทที่ 4

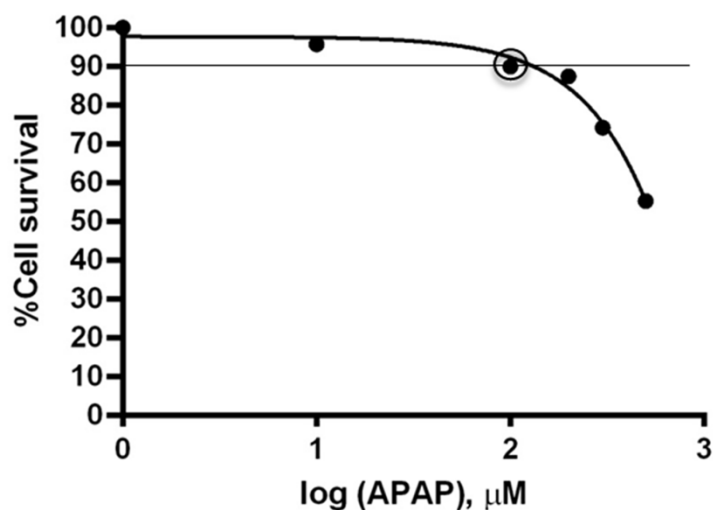
ผลการทดลอง

4.1 การวิเคราะห์หาความเข้มข้นที่เหมาะสมของยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A)

เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบผลของยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นต่างๆ เพื่อหาความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลที่เหมาะสมที่จะใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ โดยทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นต่างๆเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการวิเคราะห์อัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค MTS assay

จากผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้มีอัตราการตายของเซลล์เพาะเลี้ยง 10 % (ดังแสดงในรูปที่ 4) และเพื่อให้มั่นใจว่าความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลในช่วง 0-100 ไมโครโมลาร์ นั้น จะไม่ก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาค้นคว้าเพิ่มเติม พบว่าผลการวิจัยครั้งนี้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลในช่วงไม่เกิน 100 ไมโครโมลาร์ ไม่ส่งผลให้เกิดอันตรายต่อเซลล์เพาะเลี้ยงและยังพบว่า มีผลในด้านการปกป้องเซลล์ด้วย เช่น ในงานวิจัยของ Tripathy และคณะ (2009) ที่รายงานไว้ว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาทร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์นั้น ส่งผลให้เซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงมีการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (IL-1, IL-6 และ TNF- α) ลดลงและยังช่วยลดการเกิดภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร menadione ได้ (28) และในปีเดียวกันคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ ยังได้ทำการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงเอนโดทีเลียมซึ่งพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นช่วงเดียวกันนี้มีผลในการปกป้องเซลล์เอนโดทีเลียมจากความเป็นพิษที่ถูกกระตุ้นด้วย menadione เช่นกัน (1)

ดังนั้นในงานวิจัยนี้ซึ่งมีวัตถุประสงค์ที่จะศึกษาผลกระทบของยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) จึงได้เลือกใช้ยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากเป็นความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลที่อยู่ในช่วงที่ทำให้เซลล์ตาย 10% ซึ่งถือว่าก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ค่อนข้างน้อย



รูปที่ 4 กราฟแสดงอัตราการรอดชีวิตของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ภายหลังจากการเพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์จำนวน 2.5×10^3 cells ได้ถูกเพาะเลี้ยงใน 96 well-plate ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน (0, 100, 200, 300, 400, 500 μM) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นทำการวิเคราะห์หาอัตราการรอดชีวิตของเซลล์ (%cell survival) โดยอาศัยเทคนิค MTS Assay ข้อมูลได้ถูกแสดงในรูปแบบของ mean \pm SEM ซึ่งทำการรวบรวมข้อมูลทั้งหมดจากการทดลอง 2 ครั้ง โดยแต่ละการทดลองมีการทำซ้ำ 2 ครั้ง

4.2 การศึกษาผลกระทบของยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออกของ Inflammatory cytokines (IL-1 β และ TNF- α) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A)

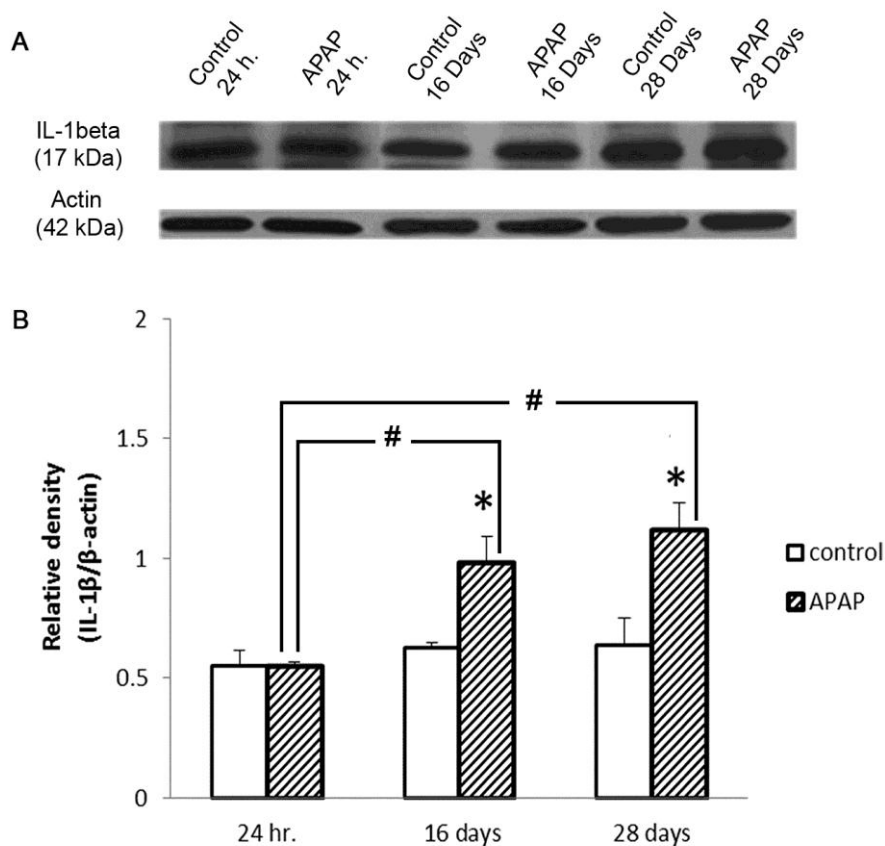
เพื่อศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ในงานวิจัยนี้จึงทำการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน Inflammatory cytokines (IL-1 β และ TNF- α) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน คือ 24 ชั่วโมง 16 วัน และ 28 วัน ซึ่งผลการทดลองพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β โดยพบวาระดับโปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (0.5467 ± 0.0156) ไม่ต่างกับระดับโปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (0.5486 ± 0.0680) ดังแสดงในรูปที่ 5 ในขณะที่การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นเดียวกันเป็นระยะเวลา 16 วันนั้น กลับพบว่ามีผลทำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β เพิ่มสูงขึ้น (0.9836 ± 0.1073) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (0.6239 ± 0.0219) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) นอกจากนี้ผลจากการวิจัยยังพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน (1.1167 ± 0.1164) เพิ่มสูงมากยิ่งขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์เซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (0.6381 ± 0.1143) เช่นกัน ดังแสดงในรูปที่ 5

ทั้งนี้เมื่อทำการเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลในช่วงเวลาต่างๆพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน และการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วันนั้น มีผลทำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (ระดับของ โปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน 16 วัน และ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 1.1167 ± 0.1164 , 0.9836 ± 0.1073 และ 0.5467 ± 0.0156 ($P < 0.05$) ตามลำดับ) และยังพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน (1.1167 ± 0.1164) มีระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β เพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน ดังผลแสดงในรูปที่ 5

สำหรับผลการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในระยะเวลาที่แตกต่างกันพบว่าให้ผลการวิจัยเป็นไปในทางเดียวกับผลการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ส่งผลกระทบต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α โดยพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (0.6724 ± 0.0497) ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (0.6708 ± 0.0536) ดังแสดงในรูปที่ 6 ในขณะที่ระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน (0.8390 ± 0.0620) พบว่ามีระดับโปรตีนเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (0.5867 ± 0.0607) (ดังแสดงในรูปที่ 6) และผลการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่า มีระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α เพิ่มสูงมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (ระดับของโปรตีน TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน และเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม เท่ากับ 0.9608 ± 0.0744 และ 0.6076 ± 0.0334) ดังผลแสดงในรูปที่ 6

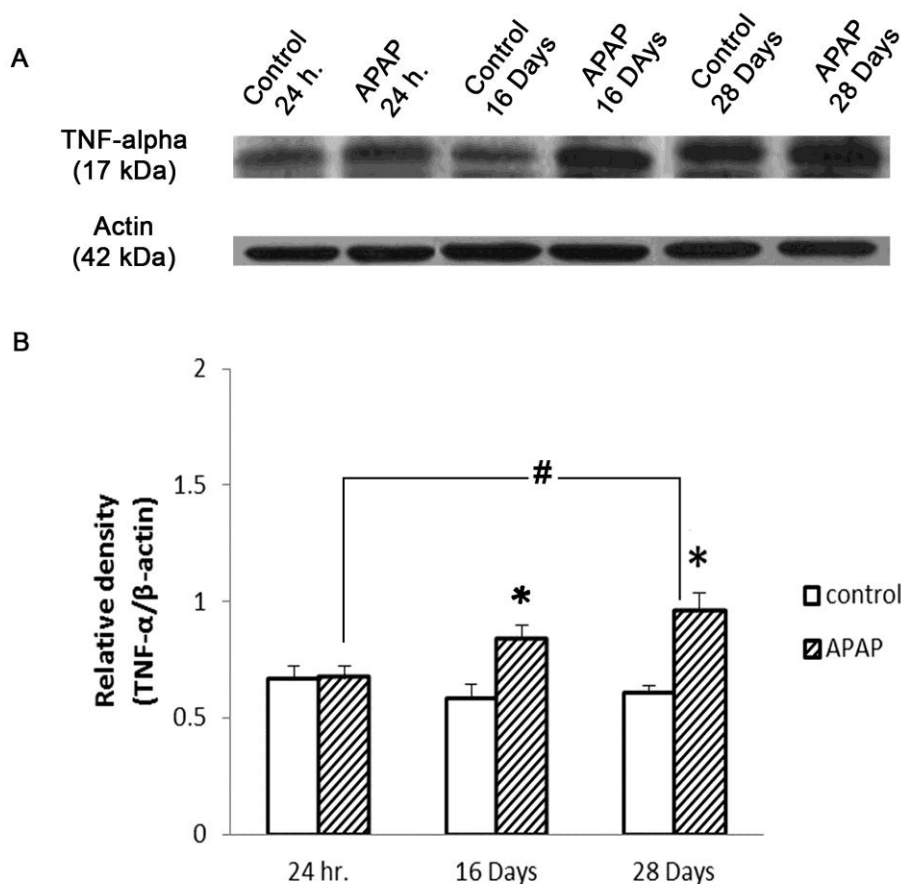
นอกจากนี้เมื่อผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ของเซลล์แอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลในระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน (0.9608 ± 0.0744) มีระดับการแสดงออกของโปรตีน TNF- α เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (0.6724 ± 0.0497) แต่ไม่ต่างกับระดับโปรตีนที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน (0.8390 ± 0.0620) ดังแสดงในรูปที่ 6

ผลการศึกษาวิจัยในส่วนนี้สามารถสรุปได้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) ไม่มีผลต่อการกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ให้มีการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) ขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเป็นระยะเวลา 16 วัน และ 28 วัน นั้น พบว่าสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์สามารถสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) เพิ่มสูงขึ้นได้



รูปที่ 5 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของระดับโปรตีน IL-1 β ในเซลล์เพาะเลี้ยง C8-D1A

- (A.) ภาพแสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน IL-1 β ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล โดยทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีน IL-1 β ด้วยเทคนิค western blotting
- (B.) กราฟแสดงข้อมูลเชิงสถิติของระดับโปรตีน IL-1 β ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล โดย * $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม
$p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

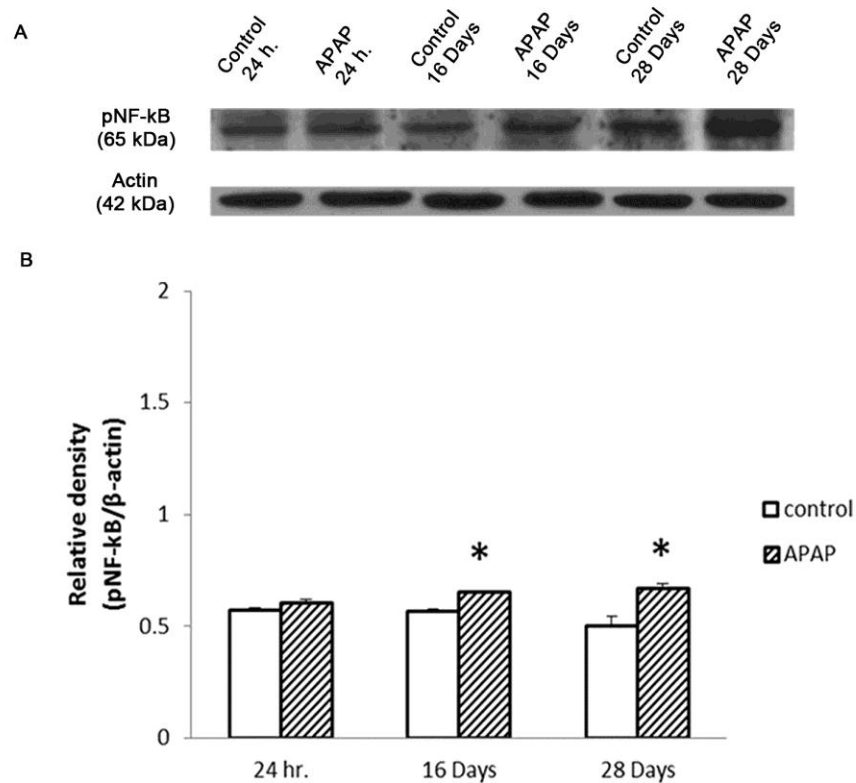


รูปที่ 6 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ในเซลล์เพาะเลี้ยง C8-D1A

- (A.) ภาพแสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน TNF- α ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล โดยทำการตรวจสอบปริมาณโปรตีน TNF- α ด้วยเทคนิค western blotting
- (B.) กราฟแสดงข้อมูลเชิงสถิติของระดับโปรตีน TNF- α ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่
- โดย * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม
 # $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

4.3 การศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการแสดงออก pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A)

ผลจากการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์พบว่า การเพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB โดยพบว่า ระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (0.6039 ± 0.0171) ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (0.5714 ± 0.0104) ดังแสดงในรูปที่ 7 ซึ่งแตกต่างจากผลการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน ซึ่งพบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงในกลุ่มนี้มีระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB (0.6495 ± 0.0058) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (0.5661 ± 0.0134) นอกจากนี้ผลการทดลองยังพบอีกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วันนั้น มีระดับโปรตีน pNF-kB เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (ระดับของ โปรตีน pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน และ เซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม เท่ากับ 0.6658 ± 0.0251 และ 0.5038 ± 0.0421 ตามลำดับ) ดังแสดงในรูปที่ 7



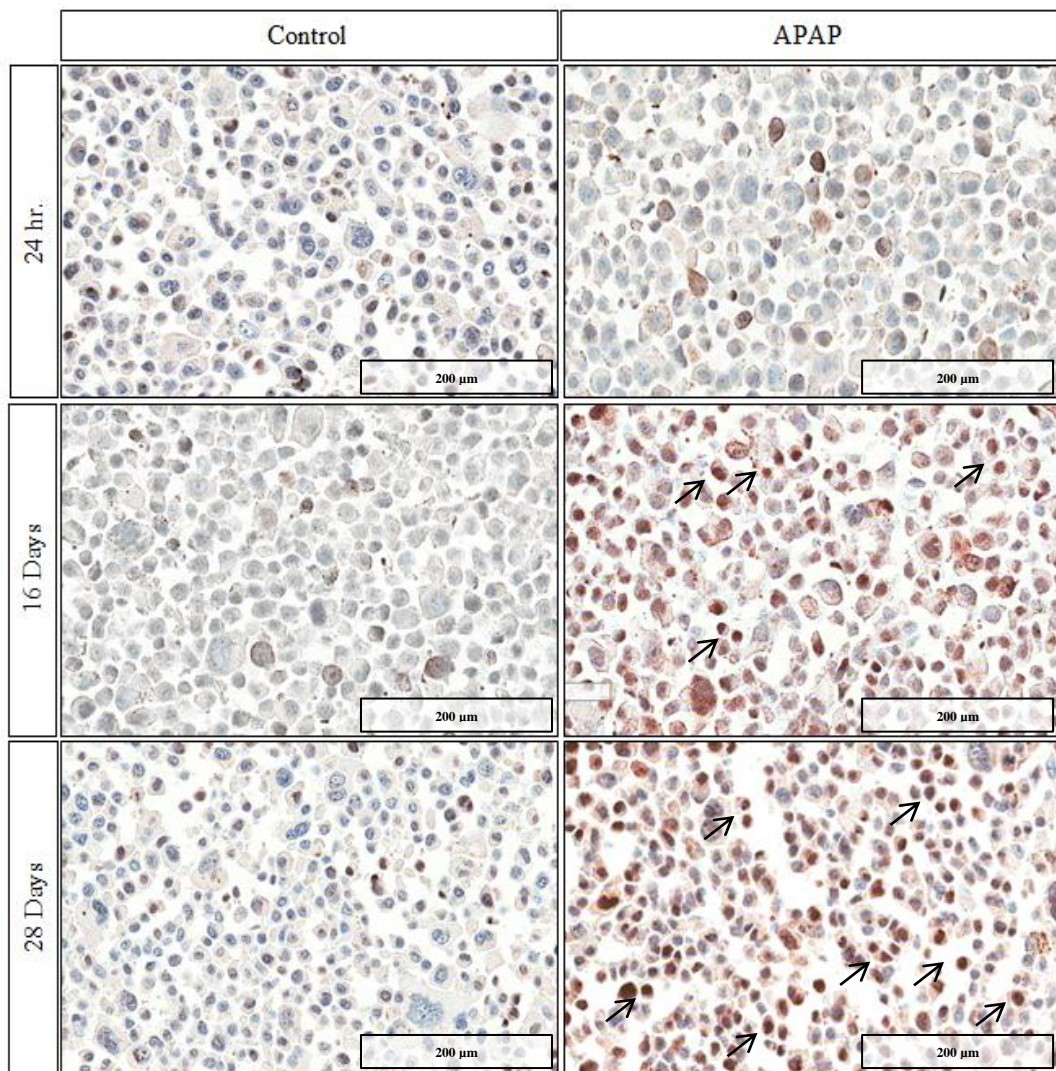
รูปที่ 7 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของ pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยง C8-D1A

- (A.) ภาพแสดงปริมาณการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล โดยทำการตรวจสอบปริมาณการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ด้วยเทคนิค western blotting
- (B.) กราฟแสดงข้อมูลเชิงสถิติของระดับโปรตีน pNF-kB ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล โดย * $p < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม

4.4 การศึกษาการแสดงออกของ NF-kB signaling ด้วยเทคนิค Immunofluorescence และเทคนิค Immunohistochemistry

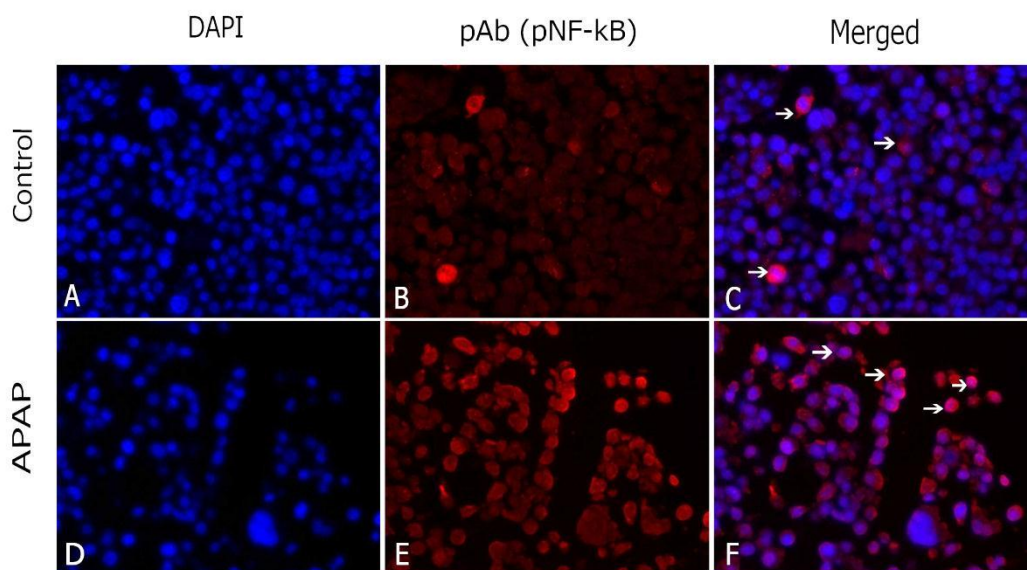
เพื่อเป็นการยืนยันว่าการสร้างสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบที่เพิ่มขึ้นในเซลล์แอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลนั้น มีความเกี่ยวข้องกับวิถี NF-kB ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาถึงผลกระทบยาชนิดนี้ต่อการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB โดยใช้เทคนิค Immunofluorescence และ Immunohistochemistry ซึ่งเป็นเทคนิคที่สามารถแสดงให้เห็นบริเวณหรือตำแหน่งของเซลล์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ว่าอยู่ในบริเวณนิวเคลียสหรือในไซโตพลาสซึม เนื่องจากโดยปกติแล้วโปรตีน NF-kB จะอยู่ในรูปแบบที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) ภายในเซลล์บริเวณไซโตพลาสซึม แต่ในสถานะที่เซลล์ถูกกระตุ้นจะส่งผลให้มีการกระตุ้นเอนไซม์ ikk (NF-kB inhibitor kinase) ซึ่งเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ในการเติมหมู่ phosphate ให้กับโปรตีน IκB (NF-kB inhibitor) ภายหลังจากการถูกเติมหมู่ Phosphate แล้ว IκB จะหลุดออกจากโมเลกุลของโปรตีน NF-kB ทำให้โมเลกุลของโปรตีน NF-kB อยู่ในรูปพร้อมทำงาน (active form) หรือเรียกว่า phospho-NF-kB (pNF-kB) จากนั้นโปรตีน pNF-kB จะเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อไปทำหน้าที่ในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่อไป

ซึ่งจากผลการทดลองพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) มีการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในนิวเคลียสไม่แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 8 และผลที่ได้จากการศึกษาในกลุ่มเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 วัน และ 28 วัน) พบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มนี้มีการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในนิวเคลียสมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมอย่างเห็นได้ชัด ดังแสดงในรูปที่ 8 และผลจากการย้อมเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยใช้เทคนิค Immunofluorescence ก็ยืนยันผลจากการทดลองนี้ โดยพบว่า มีการแสดงออกของ pNF-kB ในนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 9



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 8 ผลการแสดงผลของ pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้เทคนิค Immunohistochemistry Scale bar : 200 μ M



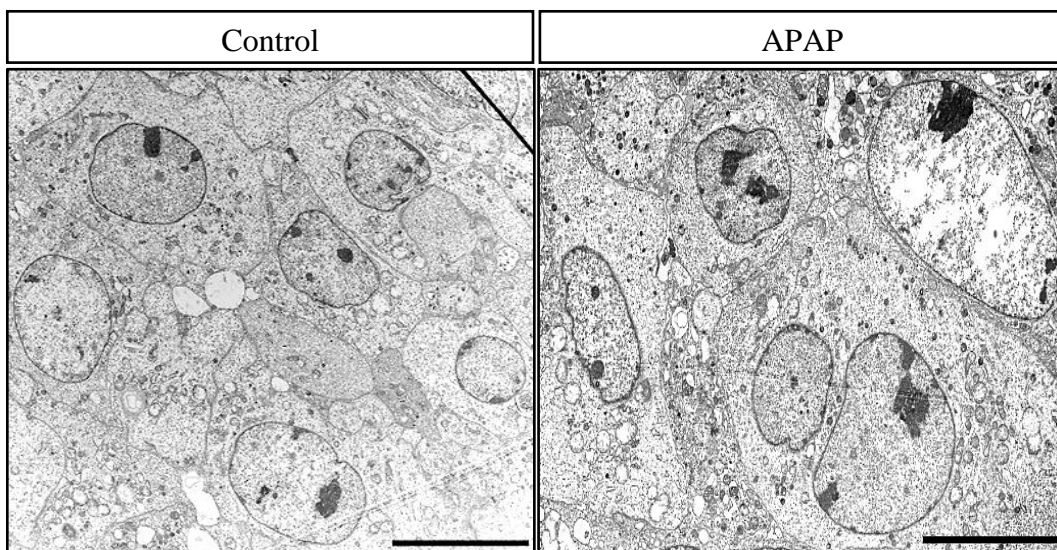
รูปที่ 9 ผลการแสดงออกของ pNF-kB ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยใช้เทคนิค Immunofluorescence

A และ D. แสดงผลของการย้อมนิวเคลียสซึ่งติดสีฟ้าของ DAPI, B. และ E. แสดงผลของการย้อม pNF-kB ซึ่งติดสีแดงของ FITC, c แสดงถึงผลของการย้อม pNF-kB ที่เคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสในเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มควบคุม และ F. แสดงถึงผลของการย้อม pNF-kB ที่เคลื่อนเข้าสู่ นิวเคลียสในเซลล์เพาะเลี้ยงกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน โดย ลูกศร หมายถึง เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่มีการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในบริเวณ นิวเคลียส scale bar: 400 μ M

4.5 การศึกษาผลกระทบของยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

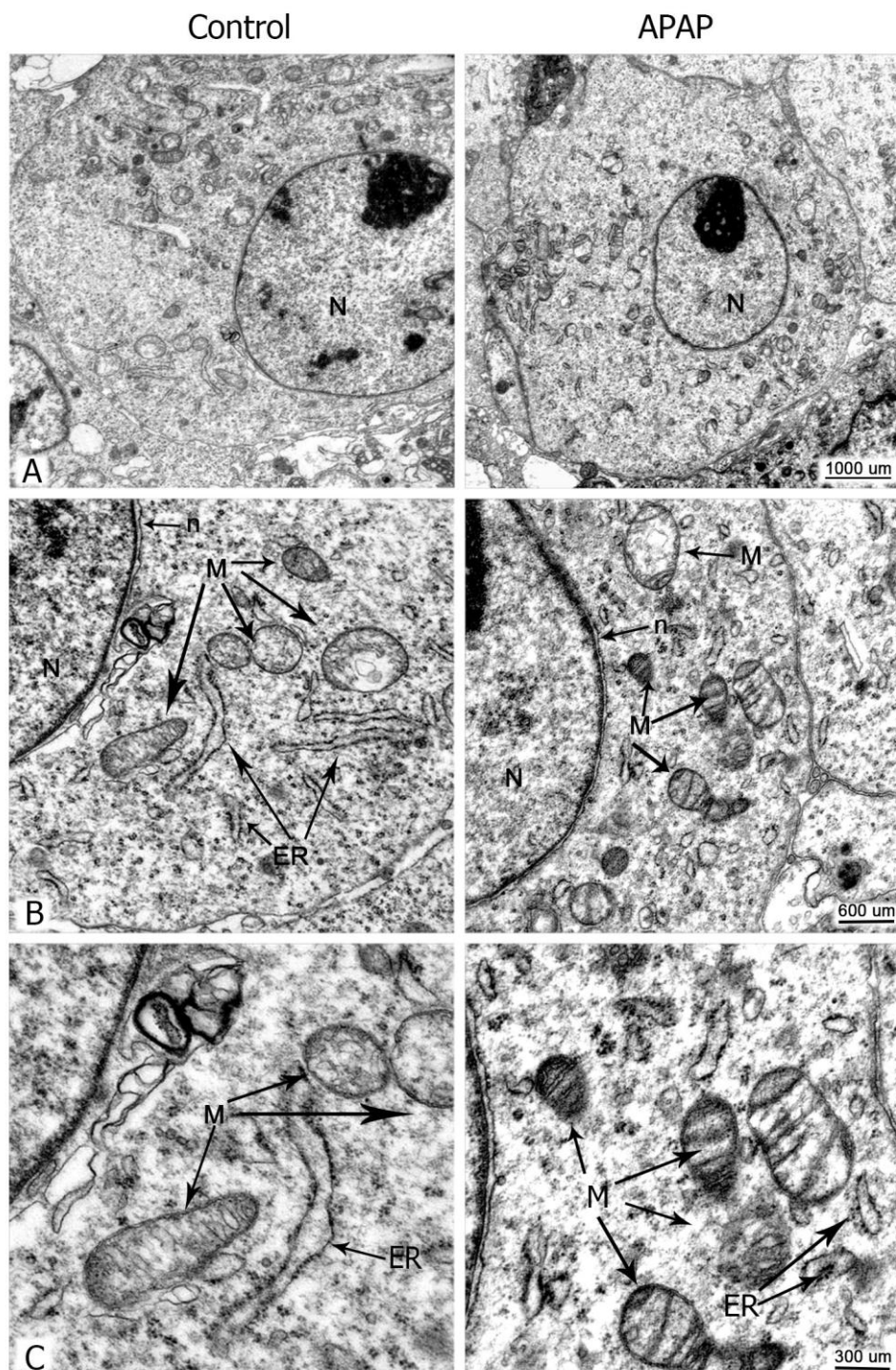
4.5.1 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน

เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุม โดยโครงสร้างระดับจุลภาคต่างๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำการตรวจสอบนั้นประกอบไปด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส ลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียส การเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียและเอนโดรพลาสมิกเรติคูลัม ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่มีความแตกต่างกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม โดยเมื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ทั้งสองกลุ่มที่กำลังขยายต่ำ (3,000 เท่า) พบว่า เซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะของออร์แกเนลล์ต่างๆปกติ ดังแสดงในรูปที่ 10 เซลล์เมมเบรนและนิวเคลียสส่วนใหญ่มีสัณฐานปกติ (รูปที่ 11A และ B) พบการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เล็กน้อย และในกำลังขยาย 15,000 เท่า ไมโทคอนเดรียที่พบส่วนใหญ่มีลักษณะปกติ ตรวจพบการบวม (swelling) ของโครงสร้างเล็กน้อย (รูปที่ 11C) ซึ่งอาจเกิดจากการขั้นตอนการเก็บเซลล์หรือการแก้ของเซลล์เพาะเลี้ยง



รูปที่ 10 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง)

แสดงถึงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) ที่กำลังขยาย 3,000X scale bar : 10.0 μ M

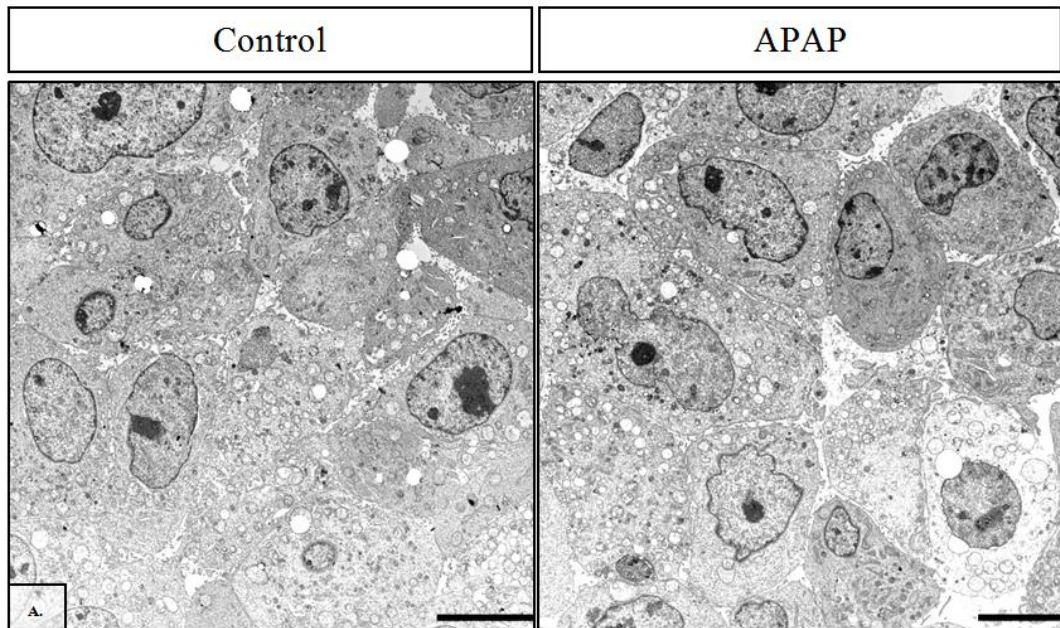


รูปที่ 11 ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง)

- A. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงถึงลักษณะของนิวเคลียสในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (ขวา) ซึ่งพบว่ามีลักษณะปกติไม่แตกต่างกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N=Nucleus scale bar : 1,000 nm
- B. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (ขวา) ซึ่งพบว่ามีลักษณะปกติไม่แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุม (ซ้าย) N=Nucleus, n=nuclear membrane, M=Mitochondria, ER=Endoplasmic Reticulum ที่กำลังขยาย 5,000X scale bar : 600 nm
- C. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงถึงลักษณะของไมโทคอนเดรียในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) พบว่ามีลักษณะปกติไม่แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุม M=Mitochondria, ER=Endoplasmic Reticulum scale bar : 300 nm

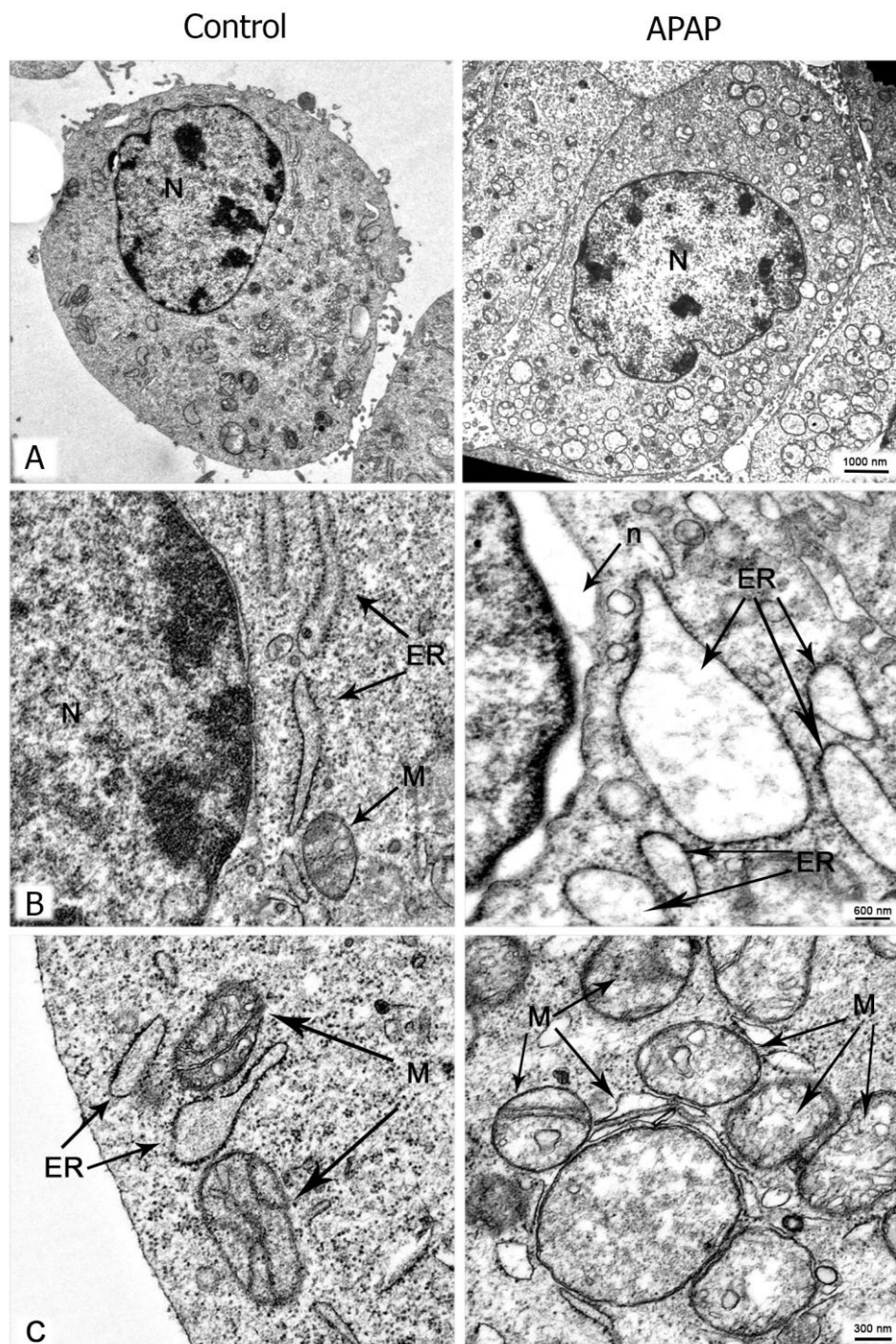
4.5.2 ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง

เพื่อศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วันเปรียบเทียบกับโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม โดยโครงสร้างระดับจุลภาคต่างๆของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกตรวจสอบ ประกอบไปด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส ลักษณะของโครมาตินในนิวเคลียส การเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน มีผลทำให้โครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม โดยพบว่าลักษณะโครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้น มีการกระจายตัวไปยังบริเวณขอบของนิวเคลียส (Chromatin margination) ดังแสดงในรูป 13A และในบางเซลล์ตรวจพบการโป่งพองของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (รูปที่ 13B) การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบความผิดปกติของออร์แกเนลล์อื่นๆที่สำคัญด้วย รวมไปถึงการพบการยืดขยาย (dilatation) ของ endoplasmic reticulum (ER) ไมโทคอนเดรียที่มีลักษณะบวม (swelling) (รูปที่ 13B และ C) เป็นจำนวนมากหรือในบางเซลล์มีการตรวจพบการเรียงตัวของ Cristae ที่ไม่เป็นระเบียบ (disarrangement) (รูปที่ 14B) มากกว่าที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม นอกจากนี้ยังพบว่าในบางเซลล์ตรวจพบการเกิด vacuolization และ autophagosome ซึ่งมีลักษณะเป็นถุงเมมเบรนที่ภายในประกอบไปด้วย cytoplasmic organelle ดังแสดงในรูป 14A และ D



รูปที่ 12 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)

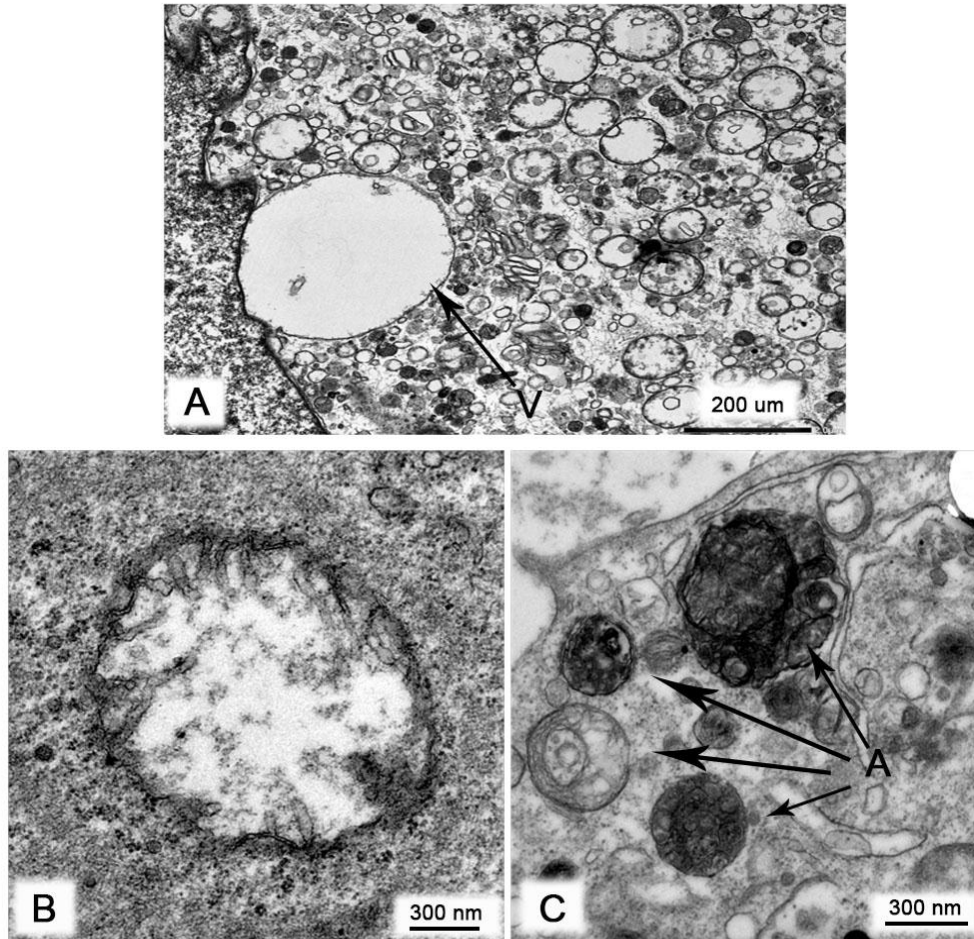
- A. แสดงถึงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน) ที่กำลังขยาย 3,000X scale bar : 10.0 μ M



รูปที่ 13 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)

- A. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของนิวเคลียสที่มีการกระจายตัวของโครมาตินไปยังบริเวณขอบของนิวเคลียส ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) มากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N=Nucleus scale bar : 1,000 nm
- B. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะการโป่งพองของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและการยืดขยายของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N=Nucleus, n=nuclear membrane, M=Mitochondria, ER=Endoplasmic Reticulum scale bar : 600 nm
- C. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของไมโทคอนเดรียที่มีการบวมเป็นจำนวนมาก ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ควบคุม (ซ้าย) M=Mitochondria, ER=Endoplasmic Reticulum scale bar : 300 nm

APAP



รูปที่ 14 แสดงลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)

- A. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะการเกิด vacuolization ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง scale bar : 2.0 μM
V=Vacuolization
- B. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของไมโทคอนเดรีย ที่เกิดการบวม (swelling) และการเรียงตัวของ Cristae ภายในเซลล์ไม่เป็นระเบียบ (disarrangement) ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง scale bar : 300 nm

- C. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง ที่พบถุงเมมเบรนที่ภายในประกอบไปด้วย cytoplasmic organelle ซึ่งคาดว่าจะน่าจะเป็นลักษณะของถุง autophagosome scale bar : 300 nm A=Autophagosome



บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังส่งผลต่อการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์แตกต่างกัน โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) ไม่มีผลต่อการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) ในขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 วัน และ 28 วัน) กลับส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์สร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลการศึกษาในส่วนนี้สัมพันธ์กับผลจากการศึกษาระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการควบคุมการแสดงออกของยีนในการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังส่งผลให้มีการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB เพิ่มสูงขึ้น

นอกจากนี้ผลของการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังยังแสดงให้เห็นว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้นส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโครงสร้างระดับจุลภาคในเซลล์อีกด้วย โดยพบว่าในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังมีความผิดปกติของโครงสร้างระดับจุลภาคแตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่า ลักษณะของเยื่อหุ้มนิวเคลียสมีการโป่งพอง มีการกระจายตัวของโครมาตินไปยังบริเวณขอบของนิวเคลียส (chromatin margination) และยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะของไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมที่มีลักษณะบวม (swelling) แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมเป็นจำนวนมาก ตลอดจนตรวจพบการเกิด vacuolization และ autophagosome ในเซลล์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังอีกด้วย

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ขนาดความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลที่ 100 ไมโครโมลาร์ เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์น้อยมาก (เซลล์ตาย 10%) จนถือได้ว่าเป็นค่าความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ (1, 29) โดยการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ของ Tripathy และคณะ ในปี 2009 ได้รายงานไว้ว่า ยาพาราเซตามอลที่ขนาดความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ นั้นสามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และลดการตายของเซลล์ที่เกิด

จากการกระตุ้นด้วย menadione ตลอดจนลดการสร้างสาร pro-inflammatory cytokines ได้ (28) ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน (เฉียบพลันและเรื้อรัง) ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ และเพื่อเป็นการยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แอสโทรไซต์ที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับ ความเข้มข้นของยาพาราเซตามอล ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ยาพาราเซตามอลที่ขนาดความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ในการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์

โดยผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ไม่ส่งผลกระทบต่อการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบของเซลล์ เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ซึ่งผลการศึกษาในส่วนนี้ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับผลของการเปลี่ยนแปลง การแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ซึ่งเป็น transcription factor ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมยีน ที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสาร inflammatory cytokines (30) เช่นกัน โดยพบว่าการได้รับยาพาราเซ ตามอลอย่างเฉียบพลันไม่มีผลกระตุ้นให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์สร้างโปรตีน pNF-kB แตกต่างไป จากเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม เมื่อพิจารณาจากผลของงานวิจัยที่ผ่านมาของ Tripathy และ คณะ ในปี 2009 ที่ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อการเปลี่ยนแปลงของ เซลล์ในเซลล์ประสาทและเซลล์เอนโดทีเลียมที่ได้รับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นที่ 100 μM นั้น พบว่าการที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดได้รับยาพาราเซตามอลในขนาดความเข้มข้นดังกล่าวเป็น ระยะเวลาสั้นนั้น นอกจากจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษใดๆต่อเซลล์ประสาทและเซลล์ เพาะเลี้ยงเอนโดทีเลียมแล้ว ยังให้ผลในด้านการปกป้องเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่ถูก เหนี่ยวนำด้วยสาร menadione อีกด้วย ซึ่งคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้เสนอว่ายาพาราเซตามอลในขนาด ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าว มีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ทั้งสองชนิดนี้จากภาวะ oxidative stress ตลอดจนลดการสร้างสาร pro-inflammatory cytokines ด้วย (1, 28) ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยของ ผู้วิจัยในครั้งนี้ได้สอดคล้องไปกับผลการศึกษาวิจัยของคณะผู้วิจัยดังกล่าว โดยสามารถยืนยันได้ว่าการ ได้ยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อย่างเฉียบพลัน ไม่มีผลต่อการสร้างสารไซโต ไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาในเซลล์ เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันยังแสดงให้เห็นว่า เซลล์ เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลมีลักษณะของโครงสร้างระดับจุลภาคไม่ แตกต่างกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม จึงเป็นการยืนยันว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่ ส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังในการ ศึกษาวิจัยครั้งนี้ ให้ผลที่แตกต่างไปจากผลการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่าง

เฉียบพลันอย่างชัดเจน โดยพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโตรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ เป็นระยะเวลา 16 วัน และ 28 วัน เหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์สร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (IL-1 β และ TNF- α) เพิ่มสูงขึ้น โดยเมื่อพิจารณาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่าผลการศึกษาในส่วนนี้ได้สอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Chantong และคณะ ในปี 2013 ที่รายงานถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการแสดงออกของสารไซโตไคน์ โดยผู้วิจัยในกลุ่มนี้ได้แสดงให้เห็นว่าในหนูทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ใช้ในการรักษาติดต่อกันเป็นระยะเวลา 30 วัน มีการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มสูงขึ้นในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส (31) และในปี 2015 Wongprom และคณะ ได้รายงานถึงความเป็นพิษของยาพาราเซตามอลต่อเซลล์ในระบบประสาทส่วนกลาง โดยคณะผู้วิจัยในกลุ่มนี้ได้แสดงให้เห็นว่า เซลล์เพาะเลี้ยงไมโครเกลียที่เลี้ยงร่วมยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (2 และ 4 สัปดาห์) ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ ซึ่งเป็นขนาดความเข้มข้นของยาที่ถูกใช้ในการศึกษาครั้งนี้ด้วยเช่นเดียวกัน สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์เพาะเลี้ยงไมโครเกลียสร้างสารไซโตไคน์เพิ่มสูงขึ้น (32)

เป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่า โปรตีนในวิถี NF- κ B ถือเป็น transcription factor ตัวหนึ่ง ที่มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบและการตายของเซลล์ โดยปกติแล้ว NF- κ B จะอยู่ในรูปแบบที่ยังไม่พร้อมทำงาน (inactive) และอยู่ในบริเวณไซโตพลาซึม แต่ในภาวะที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ การเพิ่มขึ้นของสารที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเหล่านี้สามารถไปจับกับ receptor บนผิวเซลล์และส่งผลให้เกิดการเติมหมู่ฟอสเฟตให้กับ I κ B (NF- κ B inhibitor) ทำให้โมเลกุลของ NF- κ B เปลี่ยนไปอยู่เป็นรูปโปรตีนที่สามารถทำงานได้ (phospho-NF- κ B) แล้วเคลื่อนที่เข้าสู่นิวเคลียสเข้าไปจับที่บริเวณ specific κ B region site บนสาย DNA ร่วมกับ co-activator ตัวอื่นๆ เพื่อทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (26, 27)

ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยของผู้วิจัยพบว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโตรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 ไมโครโมลาร์ อย่างเรื้อรังนั้น นอกจากจะส่งผลให้มีการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบให้เพิ่มสูงขึ้นแล้ว ยังมีผลทำให้ระดับการแสดงออกของโปรตีน pNF- κ B เพิ่มสูงขึ้นด้วย และผลจากงานวิจัยในส่วนนี้ได้รับการยืนยันจากผลการศึกษาค้นคว้าการแสดงออกของโปรตีน pNF- κ B ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ด้วยวิธีการย้อม Immunofluorescence และ Immunohistochemistry โดยผู้วิจัยพบว่า เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง มีการแสดงออกของโปรตีน pNF- κ B ในนิวเคลียสเพิ่มสูงขึ้นมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งผลจากการศึกษาในงานวิจัยของ Posadas และคณะ ในปี 2012 ที่ได้รายงานไว้ว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์ประสาท (neuroblastoma) ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นสูงเป็น

ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่ายาพาราเซตามอลกระตุ้นเซลล์ประสาทให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น และภาวะดังกล่าวนี้สามารถกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในวิถี NF-kB ภายในเซลล์ ให้มีการทำงานเพิ่มมากขึ้นจึงส่งผลให้มีการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (IL-1 β) เพิ่มขึ้น (19)

ดังนั้นผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงสามารถสรุปได้ว่าการเพิ่มขึ้นของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ภายหลังจากการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับการเพิ่มขึ้นของโปรตีนในวิถี NF-kB

จากการค้นคว้าข้อมูลเพิ่มเติม ผู้วิจัยพบว่าสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ ภายหลังจากการถูกหลั่งออกมาจากเซลล์แล้ว สามารถกลับไปกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์ให้เพิ่มการสร้างสารไซโตไคน์ได้อีก โดยผ่านทางกระบวนการทำงานของโปรตีนในวิถี NF-kB (33) ดังนั้นจากผลการศึกษาของผู้วิจัยเอง ผู้วิจัยเชื่อว่าการเพิ่มขึ้นของสารไซโตไคน์ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง น่าจะเป็นผลมาจากสารไซโตไคน์ที่เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์หลั่งออกมาย้อนกลับไปกระตุ้นเซลล์แอสโตรไซต์ให้มีการสร้างสารไซโตไคน์เพิ่มขึ้นโดยผ่านโปรตีนในวิถี NF-kB โดยยืนยันได้จากการพบว่ามี การเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน pNF-kB ในกลุ่มเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง

ซึ่งในภาวะเช่นนี้หากเซลล์ได้รับการกระตุ้นอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานานจนส่งผลให้เกิดภาวะการอักเสบแบบเรื้อรัง ก็จะส่งผลให้เกิดความเสียหายและนำไปสู่การบาดเจ็บและการตายของเซลล์ได้ในที่สุด (34) โดยแนวคิดนี้ได้รับการสนับสนุนจากผลการศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังซึ่งผู้วิจัยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้นส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโตรไซต์มีลักษณะที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม โดยพบว่าลักษณะของเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลมีการโป่งพอง โครมาตินมีการกระจายตัวไปอยู่บริเวณขอบนิวเคลียส (chromatin margination) และยังพบการเปลี่ยนแปลงลักษณะไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยพบว่าไมโทคอนเดรียมีลักษณะบวมพอง (swelling) แตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมเป็นจำนวนมาก มีการตรวจพบการเรียงตัวของ Cristae ที่ไม่เป็นระเบียบ (disarrangement) และพบการเปลี่ยนแปลงเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมที่มีลักษณะบวมพองและยืดขยาย (dilated) มากกว่าที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม นอกจากนี้ยังตรวจพบการเกิด vacuolization และ autophagosome ซึ่งผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่ก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์นั้น ได้เคยถูกรายงานไว้ปี 2011 โดย Fukunle และคณะ ที่พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ใช้ในการรักษาติดต่อกันเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ สามารถชักนำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัสของหนูทดลองได้เช่นเดียวกัน (35)

ดังนั้น ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ต่างกัน กล่าวคือ การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่มีผลต่อการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์แอสโทรไซต์ ในขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้น สามารถกระตุ้นให้เซลล์แอสโทรไซต์มีการสร้างสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มมากขึ้น ซึ่งปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้มีความเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการทำงานของโปรตีนในวิถี NF- κ B และก่อให้เกิดความเสียหายกับเซลล์ในที่สุด โดยภาวะที่มีการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเพิ่มมากขึ้นในเซลล์แอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่พบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ อาจสามารถใช้เป็นข้อมูลหนึ่งในการอธิบายภาวะความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลางและระบบหลอดเลือดสมองที่พบในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังได้



รายการอ้างอิง

1. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative stress. *Microvasc Res.* 2009;77:289-96.
2. Kakarla SK, Fannin JC, Keshavarzian S, Katta A, Paturi S, Nalabotu SK, et al. Chronic acetaminophen attenuates age-associated increases in cardiac ROS and apoptosis in the Fischer Brown Norway rat. *Basic Res Cardiol.* 2010;105:535-44.
3. Bisaglia M, Venezia V, Piccioli P, Stanzione S, Porcile C, Russo C, et al. 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.
4. Baliga SS, Jaques-Robinson KM, Hadzimichalis NM, Golfetti R, Merrill GF. Acetaminophen reduces mitochondrial dysfunction during early cerebral postischemic reperfusion in rats. *Brain Res.* 2010;1319:142-54.
5. Sudano I, Flammer AJ, Periat D, Enseleit F, Hermann M, Wolfrum M, et al. Acetaminophen increases blood pressure in patients with coronary artery disease. *Circulation.* 2010;122:1789-96.
6. Dimova S, Hoet PH, Nemery B. Paracetamol (acetaminophen) cytotoxicity in rat type II pneumocytes and alveolar macrophages in vitro. *Biochem Pharmacol.* 2000;59:1467-75.
7. Upadhya SC, Tirumalai PS, Boyd MR, Mori T, Ravindranath V. Cytochrome P4502E (CYP2E) in brain: constitutive expression, induction by ethanol and localization by fluorescence in situ hybridization. *Arch Biochem Biophys* 2000;373:23-34.
8. Garcia-Suastegui WA, Ramos-Chavez LA, Rubio-Osornio M, Calvillo-Velasco M, Atzin-Mendez JA, Guevara J, et al. The Role of CYP2E1 in the Drug Metabolism or Bioactivation in the Brain. *Oxid Med Cell Longev.* 2017;2017:4680732.
9. Courad JP, Besse D, Delchambre C, Hanoun N, Hamon M, Eschalier A, et al. Acetaminophen distribution in the rat central nervous system. *Life Sci.* 2001;69:1455-64.
10. 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. *Microvasc Res.* 2014;94:36-46.
11. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat Rev Neurosci.* 2006;7:41-53.

12. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Sci (New York, NY)*. 2011;334:1727-31.
13. Wang Y, Jin S, Sonobe Y, Cheng Y, Horiuchi H, Parajuli B, et al. Interleukin-1beta induces blood-brain barrier disruption by downregulating Sonic hedgehog in astrocytes. *PloS one*. 2014;9:e110024.
14. Bertolini A, Ferrari A, Ottani A, Guerzoni S, Tacchi R, Leone S. Paracetamol: new vistas of an old drug. *CNS Drug Rev*. 2006;12:250-75.
15. Hodgman MJ, Garrard AR. A review of acetaminophen poisoning. *Crit Care Clin*. 2012;28:499-516.
16. Hansson T, Tindberg N, Ingelman-Sundberg M, Kohler C. Regional distribution of ethanol-inducible cytochrome P450 IIE1 in the rat central nervous system. *Neurosci*. 1990;34:451-63.
17. Supornsilpchai W, le Grand SM, Srikiatkachorn A. Involvement of nociceptive 5-HT_{2A} receptor in the pathogenesis of medication-overuse headache. *Headache*. 2010;50:185-97.
18. Supornsilpchai W, le Grand SM, Srikiatkachorn A. Cortical hyperexcitability and mechanism of medication-overuse headache. *Cephalalgia*. 2010;30:1101-9.
19. Posadas I, Santos P, Cena V. Acetaminophen induces human neuroblastoma cell death through NFkB activation. *PloS one*. 2012;7:e50160.
20. Rice KM, Meduru S, Kakarla SK, Katta A, Mupparaju SP, Kidd B, et al. Chronic paracetamol treatment influences indices of reactive oxygen species accumulation in the aging Fischer 344 X Brown Norway rat aorta. *Ann Clin Lab Sci*. 2012;42:152-61.
21. James LP, Mayeux PR, Hinson JA. Acetaminophen-induced hepatotoxicity. *Drug Metab Dispos*. 2003;31:1499-506.
22. Bourdi M, Eiras DP, Holt MP, Webster MR, Reilly TP, Welch KD, et al. 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.
23. Sofroniew MV, Vinters HV. Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol*. 2010;119:7-35.
24. Chung IY, Benveniste EN. Tumor necrosis factor-alpha production by astrocytes. Induction by lipopolysaccharide, IFN-gamma, and IL-1 beta. *J Immunol*. 1990;144:2999-3007.
25. Shaftel SS, Griffin WS, O'Banion MK. The role of interleukin-1 in neuroinflammation and Alzheimer disease: an evolving perspective. *J Neuroinflammation*. 2008;5:7.

26. Barnes PJ, Karin M. Nuclear factor-kappaB: a pivotal transcription factor in chronic inflammatory diseases. *N Engl J Med*. 1997;336:1066-71.
27. Shih RH, Wang CY, Yang CM. NF-kappaB Signaling Pathways in Neurological Inflammation: A Mini Review. *Front Mol Neurosci*. 2015;8.
28. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *J Neuroinflammation*. 2009;6:10.
29. Posadas I, Santos P, Blanco A, Munoz-Fernandez M, Cena V. Acetaminophen induces apoptosis in rat cortical neurons. *PloS one*. 2010;5:e15360.
30. Tak PP, Firestein GS. NF- κ B: a key role in inflammatory diseases. *J Clin Invest*. 2001;107:7-11.
31. Chantong C, WY, Thongtan T, Grand S M. Increase of pro-inflammatory cytokine expression in hippocampus following chronic paracetamol treatment in rats. *Asian Archives of Pathology*. 2013;9:137-46.
32. Wongprom B, Thongton T. Long-term paracetamol treatment induces interleukin-1 β expression in human microglial cells. *Chula Med J*. 2015;59.
33. Moynagh PN. The interleukin-1 signalling pathway in astrocytes: a key contributor to inflammation in the brain. *J Anat*. 2005;207:265-9.
34. van Kralingen C, Kho DT, Costa J, Angel CE, Graham ES. Exposure to Inflammatory Cytokines IL-1 β and TNF α Induces Compromise and Death of Astrocytes; Implications for Chronic Neuroinflammation. *PloS one*. 2013;8.
35. P.B. Fakunle AJA, E.B. Oyewo, O.A. Alamu and A.K. Daramola. Neurohistological Degeneration of the Hippocampal Formation Following Chronic Simultaneous Administration of Ethanol and Acetaminophen in Adult Wistar Rats (*Rattus norvegicus*). *J Pharmacol Toxicol*. 2011; 6:701-9.



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

การเตรียมสาร

Fetal bovine serum (FBS)

ทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 37°C

อุ่นที่อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 30 นาที

เก็บที่ -20°C

DMEM media ปริมาตร 1 ลิตร

Sodium pyruvate	110	มิลลิกรัม
(กรองผ่านหัวกรองขนาด 0.2 µm)		
HEPES	11	มิลลิกรัม
Penicillin/streptomycin	11	มิลลิกรัม
เก็บที่ 4°C		

Freezing media

ละลาย 10% DMSO ใน 20% FBS ใน DMEM

10X SDS-PAGE running buffer ปริมาตร 1 ลิตร: [250 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine, 1% SDS]

Tris-HCl (MW. 121.14)	30.28	กรัม	ความเข้มข้นสุดท้าย 25 mM
Glycine (MW. 70.07)	144.13	กรัม	ความเข้มข้นสุดท้าย 1.92 mM
Sodium dodecylsulfate (SDS)	10	กรัม	ความเข้มข้นสุดท้าย 1%
เติม dH ₂ O ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร			

10X Transfer buffer ปริมาตร 800 มิลลิลิตร: [250 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine]

Tris-base (MW. 121.12)	30.28	กรัม
Glycine (MW. 75.07)	144.13	กรัม
เติม dH ₂ O ให้ครบ 800 มิลลิลิตร		

10X Tris-buffer Saline (TBS) ปริมาตร 1 ลิตร: [100 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl]

Tris-HCl (MW. 121.14)	121.1	กรัม
NaCl (MW 58.4)	90	กรัม

เติม dH₂O ประมาณ 900 มิลลิลิตร

ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย HCl

เติม dH₂O ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร

10% SDS (w/v) ปริมาณ 100 มิลลิลิตร

Sodium dodecylsulfate (SDS) 10 กรัม

เติม dH₂O ให้ครบ 100 มิลลิลิตร

เก็บที่อุณหภูมิห้อง

4X Running Gel buffer ปริมาตร 200 มิลลิลิตร: [1.5 M Tris-HCl, pH 8.8]

Tris-HCl (MW. 121.14) 36.3 กรัม

เติม dH₂O ประมาณ 150 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 8.8 ด้วย HCl

เติม dH₂O ให้ครบ 200 มิลลิลิตร

เก็บที่ 4°C

4X Stacking Gel buffer ปริมาตร 50 มิลลิลิตร: [0.5 M Tris-HCl, pH 6.8]

Tris-HCl (MW. 121.14) 3 กรัม

เติม dH₂O ประมาณ 40 มิลลิลิตร ปรับ pH เป็น 6.8 ด้วย HCl

เติม dH₂O ให้ครบ 50 มิลลิลิตร

เก็บที่ 4°C

4X SDS Protein Sample Buffer (4X Loading dye) ปริมาตร 10 มิลลิลิตร: [240 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% Glycerol, 8% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol]

1M Tris-HCl (pH 6.8) 2.4 มิลลิลิตร

100% Glycerol 4 มิลลิลิตร

SDS 0.8 กรัม

1% Bromophenol blue 0.4 มิลลิลิตร

β -mercaptoethanol 0.5 มิลลิลิตร

เติม dH₂O 3.1 มิลลิลิตร

1X SDS-PAGE running buffer ปริมาตร 1 ลิตร: [final conc. 25 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine, 0.1% SDS]

10X SDS-PAGE running buffer	100	มิลลิลิตร
เติม dH ₂ O ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร		
เก็บที่ 4°C		

1X Transfer buffer ปริมาตร 1 ลิตร

10X Transfer buffer	80	มิลลิลิตร
100% methanol	200	มิลลิลิตร
เติม dH ₂ O	720	มิลลิลิตร
เก็บที่ 4°C		

1X Tris-buffer Saline (TBS) ปริมาตร 1 ลิตร: [100 mM TrisHCl (pH7.5), 150 mM NaCl]

Tris-HCl (MW. 121.14)	12.11	กรัม
NaCl (MW 58.4)	9	กรัม
เติม dH ₂ O ประมาณ 900 มิลลิลิตร		ปรับ pH เป็น 7.5 ด้วย HCl
เติม dH ₂ O ให้ครบ 1,000 มิลลิลิตร		
- เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

TBS with 0.1% Tween-20 (TBST) ปริมาตร 1 ลิตร

TBS	1000	มิลลิลิตร
Tween-20	1	มิลลิลิตร
เก็บที่อุณหภูมิห้อง		

ตารางการเตรียมเจล SDS-PAGE

Stacking gel	
30% Acrylamine	0.44 ml
4X stacking gel buffer	0.83 ml
10% SDS	33 μ l
dH ₂ O	2.03 μ l
Ammonium persulfate	25 μ l
TEMED	3 μ l

Separating gel (ปริมาตรเตรียมสำหรับ 2 gel)				
	7.5%	10%	12.5%	15%
30% Acrylamine	2.5 ml	3.3 ml	4.2 ml	5 ml
4X stacking gel buffer	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml	2.5 ml
10% SDS	100 μ l	100 μ l	100 μ l	100 μ l
dH ₂ O	4.9 ml	4.0 ml	3.2 ml	2.4 ml
Ammonium persulfate	65 μ l	65 μ l	65 μ l	65 μ l
TEMED	5 μ l	5 μ l	5 μ l	5 μ l

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อนางสาว	ณัฐนิชา ตันทรงษ์
วันเดือนปีเกิด	19 พฤษภาคม 2534
สถานที่เกิด	จังหวัด นครสวรรค์
ประวัติการศึกษา	วิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (2553-2556) วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2557-ปัจจุบัน)
ที่อยู่สถาบัน	2557- ปัจจุบัน ภาควิชาพยาธิ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย 1873 ถนนพระราม 4 แขวงปทุมวัน เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330
ที่อยู่	23/1 ถนนรจนา ตำบลตากลี อำเภอดากลาส จังหวัดนครสวรรค์ 60140