

ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลง

ของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของหนูแรท

นางสาวทิพย์ฐานันดร โขติพิณิจ



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

Chronic treatment of paracetamol induces alteration of rat cortical neuron

Miss Tipthanan Chotipinit



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	ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานาน ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์ เท็กซ์ของหนูแรท
โดย	นางสาวทิพย์ฐานันตร์ โชติพิณีจ
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระ สุพรศิลป์ชัย

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่ง
ของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ สุทธิพงษ์ วัชรสินธุ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

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

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วีระ สุพรศิลป์ชัย)

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

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรรระวี คงสมบัติ)

ทิพย์ฐานันตร์ โชติพิณีจ : ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของหนูแรท (Chronic treatment of paracetamol induces alteration of rat cortical neuron) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผศ. ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองต์, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: ผศ. ดร. วีระ สุพรศิลป์ชัย, 76 หน้า.

การศึกษาวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น (0 และ 5 วัน) และระยะเวลายาวนาน (15 และ 30 วัน) ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของหนูแรท การศึกษาในครั้งนี้ได้ทำการแบ่งหนูทดลองสายพันธุ์สต็อกออกเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดยในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลนั้นจะได้รับยาขนาด 200 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนึ่งกิโลกรัมด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องเพียงครั้งเดียวสำหรับกลุ่มที่ได้รับยาเป็นเวลา 0 วัน และทำการฉีดยาหนึ่งครั้งต่อวันต่อเนื่องกันเป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลต่อเนื่องเป็นเวลา 5, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ เมื่อครบช่วงเวลาที่กำหนดสัตว์ทดลองทุกกลุ่มจะถูกรักษาให้ตายอย่างสงบโดยการฉีดโซเดียมเพนโทบาร์บิทัลที่ความเข้มข้นสูงเข้าทางช่องท้อง และเก็บชิ้นเนื้อสดของสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์เพื่อทำการศึกษากายแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3, การแสดงออกของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF), ระดับของโปรตีนคาร์บอร์นิลและกลูตาไธโอน อีกทั้งทำการเก็บชิ้นเนื้อโดยการคงสภาพไว้ในน้ำยา 4%paraformaldehyde เพื่อนำไปศึกษาด้วยเทคนิค TUNEL assay และ immunohistochemistry และคงสภาพชิ้นเนื้อไว้ในน้ำยา 3% glutaraldehyde เพื่อนำมาศึกษาด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน

ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้พบว่าได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น (0 และ 5 วัน) ไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ในบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองโดยพบว่าจำนวน TUNEL-immunoreactive cell, การแสดงออกของ caspase-3, pro-BDNF และ mature-BDNF รวมถึงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อีกทั้งยังไม่พบผลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับโปรตีนคาร์บอร์นิลและระดับกลูตาไธโอนในสมองอีกด้วย ในขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนาน (15 และ 30 วัน) กลับส่งผลให้มีจำนวน TUNEL-immunoreactive cell และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลจากการวิจัยยังได้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ที่แตกต่างอย่างชัดเจน โดยพบว่าบางเซลล์มีการรวมตัวกันของโครมาตินบริเวณขอบของนิวเคลียสและยังพบว่าไมโทคอนเดรียมีภาวะความผิดปกติตั้งนี้ มีการบวมของไมโทคอนเดรีย มีการฉีกขาดบริเวณเยื่อหุ้มและการจัดเรียงตัวของคริสตีที่ผิดปกติ อีกทั้งยังตรวจพบการโป่งพองและยึดขยายของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมอีกด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนาน 30 วันส่งผลให้มีแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ผลจากการศึกษายังแสดงให้เห็นว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับโปรตีนคาร์บอร์นิลและมีการลดลงของระดับกลูตาไธโอนในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นภายในเซลล์

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นไม่ได้ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ แต่การได้รับยานี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานกลับเห็นย่นำให้มีการตายของเซลล์ โดยเชื่อว่าการตายของเซลล์ที่เพิ่มสูงขึ้นมีความสัมพันธ์กับการลดลงของโปรตีน mature-BDNF และการเพิ่มขึ้นของ caspase-3 ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าการเกิดภาวะ oxidative stress ภายหลังจากการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานเป็นกลไกสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา 2559

ลายมือชื่อ นิสิต

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5774029530 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEYWORDS: CHRONIC PARACETAMOL TREATMENT, OXIDATIVE STRESS, CELL DEATH, BRAIN DERIVED-NEUROTROPHIC FACTOR

TIPTHANAN CHOTIPINIT: Chronic treatment of paracetamol induces alteration of rat cortical neuron. ADVISOR: ASST. PROF. SUPANG MANEESRI LE GRAND, Ph.D., CO-ADVISOR: ASST. PROF. WEERA SUPRONSINCHAI, Ph.D., 76 pp.

The present study aimed to investigate the effects of paracetamol (APAP) for short-term (0 and 5 days) and long-term (15 and 30 days) treatment on the alteration of neuronal cells in rat cerebral cortex. In this study, adult male Wistar rats were divided into two groups; control and APAP-treated group. In the APAP-treated group, the animals were single intraperitoneally injected with APAP at the dose of 200 mg/kg bw in the 0-day APAP-treated group, while the once daily injection as the same dose were performed for 5, 15 and 30 days for the APAP-treated group for 5, 15 and 30 days, respectively. After completion of the treatment, all rats were euthanized by injection of an excessive dose of sodium pentobarbital. The fresh specimens were collected and used for the determined the detection of the caspase-3 expression, brain-derived neurotrophic factor (BDNF) expression, protein carbonyl contents and glutathione. The 4% paraformaldehyde fixed samples were collected for TUNEL assay and immunohistochemical study while 3% glutaraldehyde fixed samples were collected for transmission electron microscopic study.

The results obtained from this study demonstrated that short-term treatment (0 and 5 days) with APAP had no effect on the TUNEL-immunoreactive cells, caspase-3 expression, pro-BDNF and mature-BDNF in the cerebral cortex. The ultrastructural of the neuronal cells with short-term treatment was as well not different from those obtained from control group. Moreover, the levels of glutathione and protein carbonyl were not significantly different when compared to the control. However, the results demonstrated that the expression of caspase-3 and the TUNEL-immunoreactive cells in the long-term APAP-treated groups were significantly greater than those in the control. The electron microscope study also demonstrated severed ultrastructural changes of the neurons obtained from the rats with long-term APAP-treated. Swelling of mitochondria as well as the disruption of mitochondrial membrane were observed. Moreover the dilatation of rough endoplasmic reticulum was clearly observed in the neurons obtained from the rat with long term APAP treatment. The expression of mature-BDNF was significantly decreased in the 30-day APAP- treated group than those observed in control group. In addition, an increment of protein carbonyl levels as well as a decreased glutathione were observed in the long-term APAP-treated group when compared to the control, indicated the oxidative stress in the cerebral cortex.

The results obtained from the present study suggest that short-term APAP treatment had no effect on neuronal death in the cerebral cortex. However, long-term treatment with this drug can induce cell death. This alteration is associated with a decrement of mature-BDNF and elevated Caspase-3 expression. The increment of oxidative stress is at least one mechanism involved adverse effect of this drug in the alteration of cells in cerebral cortex.

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

Field of Study: Medical Science
Academic Year: 2016

Student's Signature

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้จะไม่สำเร็จลุล่วงไปได้หากปราศจากความเมตตาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลักผู้ซึ่งให้คำแนะนำตลอดจนวิธีการแก้ปัญหาอุปสรรคต่างๆ ในขณะที่ทำการวิจัยจนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงตามเป้าหมาย

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วิระ สุพรศิลป์ชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่คอยให้คำปรึกษา ตลอดจนแนะแนวทางในการทำงานวิจัย จนวิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร.พญ.วิไล ชินธเนศ, รองศาสตราจารย์ ดร.พลุลาก ชีพสุนทร และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรรชวี คงสมบัติ ประธานและกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิที่ช่วยชี้แจงกติกาวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความสมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชาญชัย บุญหล้า ผู้ให้คำปรึกษาและแนะแนวเทคนิคในการทำงานวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณ คุณจักรีวงศ์ มาอ้น รวมถึงนิสิตในกองปฏิบัติการผู้นำรักทุกท่านที่คอยสอนเทคนิคตลอดจนให้คำแนะนำต่างๆ แก่ตัวข้าพเจ้า

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ปรีชา เรืองเวชวรชัย ที่คอยให้คำปรึกษารวมถึงการแนะแนววิธีการแก้ปัญหาในเรื่องการย้อม immunohistochemistry รวมถึงพี่เจ้าหน้าที่ภาควิชาพยาธิวิทยาทุกท่านที่คอยช่วยเหลือข้าพเจ้าในการทำงานวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณคุณวสิน มนุประเสริฐ ผู้ที่คอยให้คำปรึกษารวมถึงความช่วยเหลือต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณสมาชิกในกองปฏิบัติการจุลทรรศน์อิเล็กทรอนิกส์ในความดูแลของ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์ ประกอบด้วย คุณลัดดาพรรณ ละเลิศ, คุณวิลาวัลย์ จิ๋ว, คุณศิริรินภา ศรีคำ, คุณวรานุรินทร์ ยิสารคุณ, คุณชลลวีย์ แสงเจริญธรรม, คุณฉัตรพร ฉันทอง, คุณเบญจวรรณ วงศ์พรม รวมถึงคุณณัฐนิชา ตันขรังษี ผู้ที่คอยเอื้อเฟื้อและมอบความเอ็นดูต่อข้าพเจ้าเสมอมา รวมถึงคอยให้คำปรึกษากับข้าพเจ้าในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

ขอขอบพระคุณพ่อรวมถึงน้องชายของข้าพเจ้าที่คอยเป็นกำลังใจและสนับสนุนกำลังใจทั้งในการศึกษาต่อในครั้งนี้ของข้าพเจ้า

ท้ายที่สุดนี้ข้าพเจ้าขอขอบพระคุณนางปรัชญานี นาแพงสอน มารดาซึ่งคอยให้กำลังใจข้าพเจ้าในการสอบเข้าเรียนต่อระดับบัณฑิตศึกษาคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมถึงผู้เป็นต้นแบบที่ดีในด้านความขยันและอดทนต่ออุปสรรคต่างๆ ที่เกิดขึ้น

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญรูป	ฎ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale).....	1
1.2 คำสำคัญ (Key word)	3
1.3 รูปแบบงานวิจัย (Research design).....	4
1.4 คำถามงานวิจัย (Research question)	4
1.5 วัตถุประสงค์งานวิจัย (Objective)	4
1.6 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis).....	4
1.7.กรอบแนวความคิดงานวิจัย (Conceptual framework).....	6
1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับการวิจัย (Expected Benefit and Application).....	7
บทที่ 2	8
ทบทวนวรรณกรรม	8
2.1 ยาพาราเซตามอล (acetaminophen; APAP).....	8
2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาพาราเซตามอล (Pharmacodynamic) และกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาพาราเซตามอล (Pharmacokinetics).....	8
2.3 ผลจากการได้รับยาพาราเซตามอล.....	9
2.3.1 การศึกษาวิจัยผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระบบต่างๆของร่างกาย	9
2.3.2 การศึกษาวิจัยผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระบบประสาทส่วนกลาง.....	11

2.4 พาราเซตามอลและภาวะ oxidative stress	13
2.5 สารอนุมูลอิสระกับการเกิดภาวะ oxidative stress.....	14
2.6 ภาวะ oxidative stress และกระบวนการตายของเซลล์ประสาทแบบทำลายตัวเอง (apoptosis).....	15
2.7 ความสัมพันธ์ระหว่าง Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และ caspase-3.....	16
บทที่ 3	19
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	19
3.1 สัตว์ทดลอง.....	19
3.2 ออกแบบการทดลอง.....	19
3.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษา.....	21
3.3.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยเทคนิค Western blotting, DNPH assay และ Glutathione assay.....	21
3.3.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้าน immunohistochemistry, TUNEL assay และ electron microscopy.....	21
3.5 การศึกษาทางด้านอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemical study).....	23
3.6 การศึกษาการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค Terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) dUTP Nick-End Labeling (TUNEL assay).....	24
3.7 การศึกษาโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (Transmission electron microscopic study;TEM).....	25
3.8 การศึกษาการเกิด Protein oxidation โดยการวัดระดับ protein carbonyl ด้วยเทคนิค DNPH assay.....	26
3.9 การศึกษาระดับกลูตาไธโอน (GSH).....	27
3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis).....	28
รายงานผลการศึกษา.....	29

4.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	29
4.1.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง.....	29
4.1.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	36
4.1.3 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	41
4.1.3.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง.....	41
4.1.3.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	43
4.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์	47
4.2.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง.....	47
4.2.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Mature brain-derive neurotrophic factor (mature-BDNF) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์.....	50

4.3 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะ เวลานานต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์	53
4.4 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะ เวลานานต่อระดับกลูต้าไธโอน (Glutathione) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์	56
อภิปรายผลการทดลอง.....	59
รายการอ้างอิง	65
สารเคมีและการเตรียมสารเคมี	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	76



สารบัญรูป

รูปที่ 1 แสดงการออกแบบการทดลอง	20
รูปที่ 2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง.....	32
รูปที่ 3 แสดงลักษณะตัวอย่างการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	33
รูปที่ 4 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง.....	34
รูปที่ 5 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	35
รูปที่ 6 แสดงลักษณะตัวอย่างการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง ที่ถูกตรวจสอบด้วยเทคนิค TUNEL assay	38
รูปที่ 7 แสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานและผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง.....	39
รูปที่ 8 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานและผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง	40
รูปที่ 9 ภาพถ่ายอิเล็กตรอน (Electron micrograph) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานและสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม.....	42
รูปที่ 10 ภาพถ่ายอิเล็กตรอน (Electron micrograph) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 15 วันและสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม.....	44

รูปที่ 11 ภาพถ่ายอิเล็กตรอน (Electron micrograph) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของ เซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 30 วันและ สัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม..... 45

รูปที่ 12 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็น ระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัล คอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง..... 49

รูปที่ 13 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็น ระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซี รีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง..... 52

รูปที่ 14 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับ protein carbonyl ของเซลล์ ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง..... 55

รูปที่ 15 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับกลูต้าไธโอนของเซลล์ในสมอง บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง..... 58

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ที่มาและความสำคัญของปัญหา (Background and rationale)

ยาพาราเซตามอลเป็นยาบรรเทาปวดและลดไข้ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก รวมถึงประเทศไทยด้วย เนื่องจากยาพาราเซตามอลได้รับการยอมรับว่าเป็นยาที่มีความปลอดภัย ราคาถูก หาซื้อง่าย อีกทั้งไม่จำเป็นต้องมีใบสั่งจากแพทย์ อย่างไรก็ตามก็ยังมีหลายงานวิจัยที่รายงานถึงความเป็นพิษต่อตับจากการได้รับยาพาราเซตามอลเกินขนาดหรือการได้รับยาชนิดนี้อย่างเรื้อรังรวมถึงการได้รับยาชนิดนี้ร่วมกับการดื่มแอลกอฮอล์ด้วย (1, 2) ซึ่งจากการสืบค้นข้อมูลพบว่ากลไกการเกิดความเป็นพิษของยาพาราเซตามอลต่อการทำงานของตับนั้นเกี่ยวข้องกับการสร้างสารตัวกลางของยาที่ถูกย่อยด้วยเอนไซม์ Cytochrome P450 2E1 (CYP2E1) และพบว่าสารตัวกลางดังกล่าวคือ N-acetyl-p-benzoquinone imine (NAPQI) ซึ่ง NAPQI เองเป็นสารพิษที่สามารถจับกับ cellular protein ได้โดยตรง นอกจากนี้ปริมาณ NAPQI ที่เพิ่มสูงขึ้นยังเหนี่ยวนำให้กลูต้าไธโอนภายในเซลล์ลดลงจนนำไปสู่การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) และเกิดความเสียหายต่อเซลล์ได้ (3)

จากข้อมูลต่างๆเหล่านี้จะเห็นได้ว่าเอนไซม์ CYP2E1 มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์อันเนื่องมาจากการได้รับยาพาราเซตามอลซึ่งจากการตรวจหาการแสดงออกของเอนไซม์นี้ในอวัยวะต่างๆของร่างกายพบว่านอกจากในตับแล้วเอนไซม์ CYP2E1 ยังมีการแสดงออกในอวัยวะอื่นด้วย เช่น ปอด หัวใจและสมอง (4, 5) ซึ่งบ่งชี้ว่าเมื่อมีการกระจายตัวของยาพาราเซตามอลไปยังอวัยวะเหล่านี้ตัวยาก็จะสามารถถูกเปลี่ยนเป็น NAPQI ได้โดยพบว่ามีผลการวิจัยหลายงานวิจัยในช่วง 10 ปีหลังนี้รายงานถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อเซลล์นิวโมไซต์ในปอด (6) และผลกระทบต่อระบบหัวใจและหลอดเลือด (7)

ผลจากการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาได้พบว่าสามารถตรวจพบการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 ในเซลล์ต่างๆของสมองไม่ว่าจะเป็นเซลล์ประสาท แอสโตรไซต์ ไมโครเกลียและเอนโดทีเลียม (8-10) ซึ่งได้มีงานวิจัยที่พบว่ายาพาราเซตามอลมีคุณสมบัติในการซึมผ่านชั้น blood-brain barrier (BBB) ของสมองได้ทั้งในสัตว์ฟันแทะ (rodent) และในมนุษย์ (11) ดังนั้นหลังจากที่ยาพาราเซตามอลกระ

จ่ายตัวถึงระบบไหลเวียนเลือดในสมองยานี้สามารถถูกเปลี่ยนไปเป็น NAPQI ได้และน่าจะมีผลกระทบต่อเซลล์ต่างๆในสมอง

เนื่องจากสมองเป็นอวัยวะที่สำคัญที่มีหน้าที่ควบคุมการทำงานของเซลล์และอวัยวะต่างๆทั้งหมด ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อสมองจึงเป็นที่สนใจของนักวิจัยต่างๆในช่วง 10 ปีหลังนี้ อย่างไรก็ตามผลการศึกษาวิจัยของกลุ่มวิจัยต่างๆทั้งหมดยังไม่สามารถสรุปผลกระทบที่แน่ชัดของการใช้ยาพาราเซตามอลต่อสมองได้ กลุ่มวิจัยบางกลุ่มแสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถปกป้องเซลล์จากภาวะความผิดปกติต่างๆได้ทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลองเช่นการปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress ในเซลล์เพาะเลี้ยง cerebral cortical neuron ที่พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 50 ไมโครโมลาร์(μM) ก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress สามารถลดการหลั่งสาร cytokines และ chemokines ได้(12) และจากการศึกษาของคณะผู้วิจัยที่มเดียวกันที่ได้ทำการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง brain endothelial cell ซึ่งได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 25-100 ไมโครโมลาร์ ก่อนการเหนี่ยวนำด้วย menadione พบว่ายาพาราเซตามอลสามารถลดการแสดงออกของ inflammatory protein รวมถึงซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส(superoxide dismutase) อีกทั้งยังส่งเสริมให้มีการแสดงออกของ Bcl-2 ซึ่งเป็น anti-apoptotic protein ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้น (13) นอกจากนี้ยังมีกลุ่มวิจัยที่ได้ทำการศึกษาถึงบทบาทของยาพาราเซตามอลต่อเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัสพบว่ายาพาราเซตามอลขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม สามารถลดการเกิด ซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และ lipid peroxidation อีกทั้งยังช่วยลดความเสียหายของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณดังกล่าวอีกด้วย (14) ในขณะที่กลุ่มวิจัยบางกลุ่มกลับมีผลวิจัยที่บ่งชี้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถส่งผลเสียต่อระบบประสาทได้ เช่น การศึกษาในปี 2007 ของ Nencini และคณะที่พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลส่งผลให้มีระดับกลูตาไธโอนลดลงและเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress (15) นอกจากนี้ในปี 2010 Posadas และคณะได้พบว่ายาพาราเซตามอลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress และเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ประสาท (10) อีกทั้งยังมีงานวิจัยที่พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ ส่งผลให้มีการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัสอีกด้วย (16) โดยผลการศึกษาของการได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ cortical spreading depression (CSD) ซึ่งเป็นโมเดลที่

เกี่ยวข้องกับโรคปวดศีรษะไมเกรนแล้วพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันช่วยลดการเกิด hyperexcitation ของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ แต่การได้รับยาชนิดนี้เป็นระยะเวลานานกลับส่งผลตรงกันข้าม (17) ในขณะที่กลุ่มวิจัยกลุ่มเดียวกันศึกษาผลของยาพาราเซตามอล ร่วมกับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ CSD ต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันช่วยปกป้องความเสียหายของหลอดเลือดสมองได้ (18)

นอกจากนี้คณะผู้วิจัยได้สนใจโปรตีนศึกษา Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ซึ่งเป็นโปรตีนมีส่วนสำคัญในกระบวนการเรียนรู้และความจำและการพัฒนาการของเซลล์ประสาท รวมทั้งยังยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท โดยในการศึกษาของ Han และคณะในปี 2000 พบว่า BDNF สามารถยับยั้งการแสดงออกของ caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองได้จากภาวะ Hypoxic-ischemic (H-I) injury (19) และในการศึกษาวิจัยของ viberg พบว่า หนูแรกเกิดที่ได้รับยาพาราเซตามอลส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับ BDNF ในสมองบริเวณ parietal cortex (20) ดังนั้นโปรตีน BDNF ก็เป็นโปรตีนอีกตัวหนึ่งที่น่าสนใจที่จะนำมาศึกษาในกรณีที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่ยาวนาน

จากผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมา นั้นแสดงให้เห็นว่าผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอล ต่อการเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับกลไกการเกิดภาวะ oxidative stress ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างแน่ชัดอาจเป็นไปได้ว่ายานี้สามารถส่งผลได้ทั้งผลในการปกป้องและผลอันตรายต่อเซลล์ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ตั้งสมมติฐานว่าผลกระทบของยาพาราเซตามอลต่อระบบประสาท น่าจะมีความเกี่ยวข้องกับปริมาณและระยะเวลาที่ได้รับยาพาราเซตามอลเข้าสู่ร่างกาย ดังนั้นในงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจึงมุ่งที่จะศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม ซึ่งเมื่อทำการเปรียบเทียบกลับเป็นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในคนแล้วถือว่ายังเป็นความเข้มข้นของยาที่ใช้ในการรักษา (1.6 กรัม/วัน) (21) ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน 0, 5, 15 และ 30 วัน ตามลำดับ

1.2 คำสำคัญ (Key word)

Chronic paracetamol treatment, Oxidative stress, Cell death, Brian derived-neurotrophic factor

1.3 รูปแบบงานวิจัย (Research design)

เป็นการศึกษาทดลองโดยการใช้สัตว์ทดลอง (experimental study)

1.4. คำถามงานวิจัย (Research question)

1.4.1 การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หรือไม่

1.4.2 การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หรือไม่

1.4.3 การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์หรือไม่

1.5 วัตถุประสงค์งานวิจัย (Objective)

1.5.1 เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

1.5.2 เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องต่อการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

1.5.3 เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

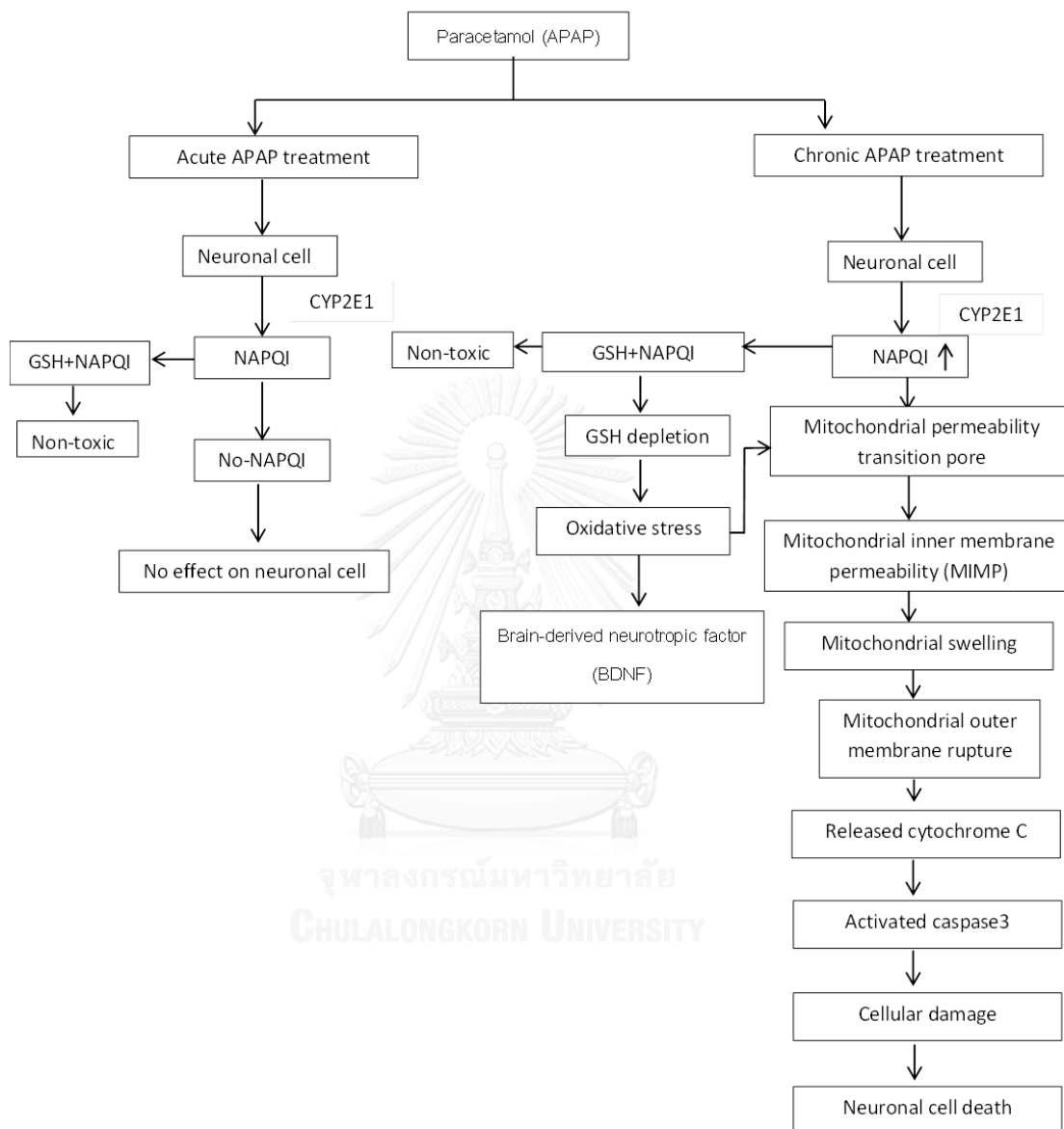
1.6 สมมติฐานงานวิจัย (Hypothesis)

เมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเข้าไปในระดับที่ใช้ในการรักษาและระยะเวลาสั้นๆจะไปออกฤทธิ์ยังอวัยวะเป้าหมายจากนั้นจึงถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษและกำจัดออกจากร่างกาย แต่เมื่อได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ใช้ในการรักษาเป็นระยะเวลาที่ยาวนานทำให้มีการสะสมของ NAPQI ในเซลล์เพิ่มมากขึ้นและเหนี่ยวนำให้ระดับกลูตาไธโอนภายในเซลล์ลดปริมาณลงส่งผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นโดยมีผลทำให้โครงสร้างภายในเซลล์เปลี่ยนแปลงไปนอกจากนี้ยังมีผลต่อการสร้างโปรตีนภายในเซลล์เช่นการสร้าง

BDNF อีกทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์และในที่สุดสามารถส่งผลให้มีการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ในระบบประสาทส่วนกลาง



1.7.กรอบแนวความคิดงานวิจัย (Conceptual framework)



1.8 ผลหรือประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Expected Benefit and Application)

1. ทราบผลกระทบจากการได้รับยาพาราเซตามอลในขนาด(ปริมาณยา)ในระดับที่ใช้ในการรักษาเป็นระยะเวลาสั้นและระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

2. ทราบผลกระทบจากการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับ BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์

3. ทราบผลกระทบจากการได้รับยาพาราเซตามอลในขนาด(ปริมาณยา)ในระดับที่ใช้ในการรักษาเป็นระยะเวลาสั้นและระยะเวลานานต่อภาวะ oxidative stress ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์



บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรม

2.1 ยาพาราเซตามอล (acetaminophen; APAP)

ยาพาราเซตามอลเป็นยาที่ใช้บรรเทาอาการปวดและลดไข้ นิยมใช้กันในปัจจุบันเนื่องจากราคาถูกและหาซื้อได้ง่ายตามร้านขายยาทั่วไป นอกจากนั้นยังไม่ต้องมีใบรับรองจากแพทย์ในการสั่งซื้อ อีกทั้งยังจัดเป็นยาที่มีความปลอดภัยทำให้สามารถใช้บรรเทาอาการปวดและลดไข้ได้ในผู้ใหญ่และในเด็ก (22) ยาพาราเซตามอลถือว่าเป็นยาที่มีความปลอดภัยสูงเมื่อได้รับยาในขนาดที่เหมาะสมและระยะเวลาสั้น อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลเสียที่เกิดจากการได้รับยาพาราเซตามอล โดยส่งผลให้เกิดความเป็นพิษขึ้นที่ตับหากได้รับยาเกินขนาดที่แนะนำในปริมาณมากกว่า 4 กรัม/วัน เป็นระยะเวลาเฉียบพลันหรือเป็นระยะเวลายาวนานหรือในกรณีที่มีการอดอาหาร ภาวะทุพโภชนาการหรือแม้กระทั่งการได้รับแอลกอฮอล์ร่วมด้วย (1, 2) นอกจากความเป็นพิษที่เกิดขึ้นที่ตับแล้ว ในการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลนั้นมีผลต่อระบบอื่นๆภายในร่างกายอีกด้วย เช่น ระบบหัวใจและหลอดเลือด (7) ระบบทางเดินหายใจ (23) รวมถึงระบบประสาท (10) ซึ่งเป็นระบบที่มีความสำคัญต่อร่างกายทั้งสิ้น

2.2 กลไกการออกฤทธิ์ของยาพาราเซตามอล (Pharmacodynamic) และกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาพาราเซตามอล (Pharmacokinetics)

ถึงแม้ว่ายาพาราเซตามอลเป็นที่นิยมใช้ในการบรรเทาปวดและลดไข้มาเป็นระยะเวลานาน แต่กลไกการออกฤทธิ์ก็ยังไม่สามารถสรุปได้อย่างชัดเจน ในช่วงที่ผ่านมามีคณะผู้วิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของยาพาราเซตามอลในการบรรเทาปวดและลดไข้ โดยได้นำเสนอสมมติฐานที่แตกต่างกันออกไป เช่น จากงานวิจัยพบว่ายาพาราเซตามอลมีความสัมพันธ์กับระบบซีโรโทนินโดยมีฤทธิ์ในการลดความเจ็บปวดผ่านตัวรับ 5-hydroxytryptamine type 3 (5-HT₃) (24) และยับยั้งการสร้างเอนไซม์ prostaglandin synthase (PGHS) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเปลี่ยน arachidonic acid ไปเป็น prostaglandin H₂ (PGH₂) และสารตัวกลางต่างๆที่ก่อให้เกิดการอักเสบ การเกิดไข้ รวมทั้งทำให้เกิดอาการปวด (25) อีกทั้งยังสามารถยับยั้งตัวรับ N-methyl-D-aspartate

(NMDA) receptor ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหลังของ ไนตริกออกไซด์ (NO) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่เกี่ยวข้องในกระบวนการรับรู้ความเจ็บปวดของร่างกาย (26)

เมื่อได้รับยาพาราเซตามอลเข้าไปในร่างกายยาสามารถกระจายตัวไปตามกระแสเลือดแล้วไปออกฤทธิ์ยังอวัยวะเป้าหมาย โดยปกติแล้วยาพาราเซตามอลมีค่าครึ่งชีวิตในกระแสเลือดได้นาน 2 ชั่วโมง (27) กระบวนการเมตาบอลิซึมของยาพาราเซตามอลส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ตับโดยทั่วไปการได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ใช้ในการรักษา (4กรัม/วัน) ประมาณร้อยละ 90 ยาพาราเซตามอลจะรวมตัวกับ glucuronic acid และ sulfate ก่อนถูกขับออกจากร่างกายในรูปที่ไม่ก่อให้เกิดพิษ นอกจากนี้ยังมียาพาราเซตามอลบางส่วนอีกประมาณร้อยละ 10 ที่ไม่สามารถรวมตัวกับ glucuronic acid และ sulfate จะถูกเมตาบอลิซึมด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ให้ได้เป็นสารตัวกลางคือ NAPQI หลังจากนั้น NAPQI จะถูกทำให้หมดความเป็นพิษโดยการทำปฏิกิริยากับกลูตาไธโอนที่อยู่ภายในเซลล์ กลายเป็น nontoxic cysteine และ mercapturate จากนั้นจึงถูกขับออกจากร่างกายผ่านทางระบบปัสสาวะ แต่อย่างไรก็ตามหากได้รับยาพาราเซตามอลเข้าไปในปริมาณที่มาก (overdose) ทำให้ตัวยามีความสามารถเมตาบอลิซึมกลายเป็น NAPQI ได้มากขึ้นจนกระทั่งกลูตาไธโอนที่อยู่ภายในเซลล์ไม่สามารถกำจัด NAPQI ได้หมดซึ่ง NAPQI ที่ไม่ถูกจับทำลายสามารถไปจับกับ cellular protein โดยเฉพาะอย่างยิ่ง mitochondrial protein ซึ่งทำให้ไมโทคอนเดรียได้รับความเสียหาย นอกจากนี้การที่ กลูตาไธโอนภายในเซลล์ลดลงก็เป็นผลให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นได้และส่งผลให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ในท้ายที่สุดสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ (28, 29)

2.3 ผลจากการได้รับยาพาราเซตามอล

2.3.1 การศึกษาวิจัยผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระบบต่างๆของร่างกาย

การศึกษาวิจัยถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระบบต่างๆของร่างกายนั้นได้มีรายงานการวิจัยที่นำเสนอถึงบทบาทของยาพาราเซตามอลในการปกป้องระบบต่างๆของร่างกาย อย่างเช่น การศึกษาในระบบ cardiovascular ของหนูแก่สายพันธุ์ Fischer brown norway ที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 30มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันเป็นระยะเวลา 6 เดือนพบว่าทำให้มีระดับสารอนุมูลอิสระและลดอัตราการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเอง (apoptosis) โดยสังเกตได้จากการลดลงของ Bax/Bcl-2 และ caspase-3 เมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ไม่ได้รับยาพาราเซตามอล จากงานวิจัยดังกล่าวนี้ นักวิจัยกลุ่มนี้ได้สรุปว่าเนื่องจากอายุที่มากขึ้นเป็นผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ

สารอนุมูลอิสระแล้วเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์เกิดขึ้น ดังนั้นการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถใช้เป็นยาที่ต้านสารอนุมูลอิสระต่างๆภายในเซลล์และลดความเสี่ยงต่อการเกิดโรคในระบบหัวใจและหลอดเลือดได้ (30) และผลการศึกษาวิจัยการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 30 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันเป็นระยะเวลายาวนานในหนูแก่ส่งผลให้มีระดับน้ำตาลในเลือดลดลงโดยผ่านการเพิ่มการทำงานของ glucose-transporter4(Glut4) อีกทั้งยังสามารถลดระดับของซูเปอร์ออกไซด์และการเกิด protein oxidation ได้อีกด้วย (31) ต่อมาในปี 2013 ได้มีคณะผู้วิจัยศึกษาผลของยาพาราเซตามอลต่อ human neutrophils โดยบ่งชี้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถยับยั้งสารอนุมูลอิสระไฮโปคลอรัส(Hypochlorous acid) และ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide) อีกทั้งสามารถยืดอายุในการทำงานของ human neutrophils ได้ (32)

ถึงแม้ว่ายาพาราเซตามอลจะเป็นยาที่ปลอดภัยหากใช้ในปริมาณที่เหมาะสมแต่อย่างไรก็ตามในช่วงหลาย 10 ปีที่ผ่านมาพบว่ามีรายงานถึงผลกระทบจากการได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ใช้ในการรักษาในระยะเวลาเฉียบพลันต่อระบบต่างๆของร่างกาย อย่างเช่น การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง rat type II pneumocytes และ alveolar macrophage ที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 1 มิลลิโมลาร์เป็นระยะเวลานาน 4 ชั่วโมงพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลทำให้ระดับกลูตาไธโอนภายในเซลล์ลดลงและเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress เป็นที่ทราบกันดีว่า type II pneumocytes เกี่ยวข้องกับการสร้างสารลดแรงตึงผิวช่วยป้องกันไม่ให้ถุงลมแพบขณะหายใจออก ดังนั้นการได้รับยาพาราเซตามอลจึงส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ดังกล่าวซึ่งอาจจะเป็นสาเหตุอย่างหนึ่งที่ทำให้เกิดโรคหอบหืดได้ (6) จากการศึกษาของ Nassini และคณะในปี 2010 ในระบบทางเดินหายใจพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลส่งผลให้มีการหลั่งของ calcitonin gene-related peptide (CGRP) และ substance P (SP) โดยสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ neurogenic inflammation ด้วยการกระตุ้นตัวรับ transient receptor potential ankyrin-1 (TRPA1) จาก NAPQI ซึ่งเป็นสารพิษที่เกิดขึ้นในกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาพาราเซตามอล (23) จากการศึกษาวิจัยในระยะหลังมานี้มีคณะผู้วิจัยหลายกลุ่มได้ศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในขนาดที่ใช้ในการรักษาติดต่อกันเป็นระยะเวลานานซึ่งเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถส่งผลกระทบต่อระบบต่างๆของร่างกายได้ เช่น การศึกษาในหนูแรทที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมจำนวน 2 ครั้งต่อวัน เป็นระยะเวลา 9 สัปดาห์พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลทำให้ระดับ

sulfate serum ลดลงอีกทั้งยังส่งผลให้ระดับ glycosaminoglycan ในกระดูกสะบ้าลดลงตามไปด้วย (33) และจากผลงานวิจัยในปี 2010 ของ Sudano และคณะพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลส่งผลให้ความดันโลหิตเพิ่มสูงขึ้นถึงแม้ว่าจะได้รับยาในขนาด 1 กรัมจำนวน 3 ครั้ง/วัน เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ก็ตาม (7) นอกจากนี้ในการศึกษาวิจัยแบบเชิงสังเกตพบว่าในเพศหญิงที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 500 มิลลิกรัมต่อวัน ส่งผลให้มีความดันโลหิตเพิ่มสูงขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับผู้หญิงที่ไม่ได้รับประทานยาพาราเซตามอลเลย และในปี 2007 ได้มีการศึกษาในเพศชายที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 7 วันพบว่าส่งผลให้มีความดันโลหิตเพิ่มมากขึ้นเช่นเดียวกัน (34, 35)

2.3.2 การศึกษาวิจัยผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระบบประสาทส่วนกลาง

จากการศึกษาที่ผ่านมา มีหลายงานวิจัยที่บ่งชี้ว่ายาพาราเซตามอลสามารถปกป้องเซลล์จากสภาวะต่างๆ ในระบบประสาทส่วนกลางได้โดยมีการศึกษาทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยงและในสัตว์ทดลอง เช่น การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยง brain endothelial ที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 25-100 ไมโครโมลาร์ ก่อนเหนี่ยวนำด้วย menadione ให้เกิดภาวะ oxidative stress พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลส่งผลให้ brain endothelial มีอัตราการรอดชีวิตเพิ่มมากขึ้นและยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ นอกจากนี้ยังเพิ่มการแสดงออกของ Bcl2 ซึ่งเป็นโปรตีนที่ต่อต้านการตายของเซลล์ (13) ต่อมาคณะผู้วิจัยที่เหมือนกันก็นำเสนอถึงบทบาทของยาพาราเซตามอลต่อระบบหลอดเลือดสมองในเซลล์เพาะเลี้ยง brain endothelial cell โดยศึกษาถึงการได้รับยาพาราเซตามอลต่อแสดงออกของโปรตีน vascular endothelial growth factor (VEGF), pigment epithelial-derived factor (PEDF) และ pituitary adenylate cyclase activating peptide (PACAP) ซึ่งเป็น neuroprotective proteins พบว่ายาพาราเซตามอลขนาด 100 ไมโครโมลาร์ ส่งผลให้มีการเพิ่มการแสดงออกของ VEGF, PEDP แต่ไม่มีผลต่อระดับ PACAP ซึ่งคณะผู้วิจัยก็ได้สรุปว่ายาพาราเซตามอลน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่ช่วยในเรื่องการทำงานของระบบประสาทในผู้สูงอายุได้ (36) และจากการศึกษาในหนูทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 15 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมก่อนเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ ischemia พบว่ายาพาราเซตามอลสามารถลดการบาดเจ็บของไมโทคอนเดรียและยับยั้งการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเอง (apoptosis) ได้ (37) ดังนั้นจะเห็นได้ว่าผลของยาพาราเซตามอลในการปกป้องระบบประสาทส่วนกลางนั้นสืบเนื่องมาจากการได้รับยาพาราเซตามอลในระดับความเข้มข้นที่ต่ำและระยะเวลาที่สั้น

อย่างไรก็ตามในระยะหลังมีรายงานวิจัยถึงผลกระทบจากการได้รับยาพาราเซตามอลในระบบประสาทส่วนกลางถึงแม้ว่าจะได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ใช้ในการรักษา เช่น การศึกษาถึงผลของยาพาราเซตามอลทั้งในเซลล์เพาะเลี้ยง rat cortical neuron และในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับมีผลทำให้เกิดความเป็นพิษเซลล์ประสาท โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลส่งผลให้มีการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ CYP2E1 นอกจากนี้ยังพบว่ามีกรร้าวไหลของ cytochrome C ทำให้มีการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 เป็นผลให้มีการตายของเซลล์ประสาทเพิ่มมากขึ้นผ่านวิถีของไมโทคอนเดรีย (10) ต่อมาคณะผู้วิจัยทีมดังกล่าวได้ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 1 และ 2 มิลลิโมลาร์ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง neuroblastoma พบว่ายพาราเซตามอลส่งผลให้มีการตายของ neuroblastoma cell ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้นอีกทั้งยังมีการกระตุ้นการทำงานผ่านวิถี NF- κ B ส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของระดับ IL-1 β (38)

นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงผลเสียของการได้รับยาพาราเซตามอลติดต่อกันเป็นระยะเวลานานถึงแม้ว่าจะได้รับยาในขนาดที่ใช้ในการรักษาต่อระบบประสาทส่วนกลาง เช่น การศึกษาในปี 2011 โดย Fakunle และคณะได้ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลในระดับที่ใช้ในการรักษาขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ร่วมกับการดื่มแอลกอฮอล์บริเวณฮิปโปแคมปัสของหนูแรทพบว่าเซลล์ประสาทบริเวณดังกล่าวได้รับความเสียหายเมื่อเทียบกับหนูกลุ่มควบคุม ดังนั้นการได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับปัจจัยภายนอกเช่นการดื่มแอลกอฮอล์ก็สามารถส่งผลต่อเซลล์ประสาทบริเวณดังกล่าวได้ (16) และการศึกษาในปี 2014 ของ Blecharz-Klin และคณะบ่งชี้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 10 และ 50 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมตามลำดับโดยการฉีดเข้าทางใต้ผิวหนัง เป็นระยะเวลานาน 8 สัปดาห์ส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทชนิด monoamine เช่น noradrenaline, dopamine, และ serotonin ในสมองบริเวณ prefrontal cortex, hypothalamus และ striatum เป็นที่ทราบกันดีว่าสมองบริเวณดังกล่าวนี้เกี่ยวข้องกับระบบความจำซึ่งการเปลี่ยนแปลงของระดับสารสื่อประสาทดังกล่าวสามารถส่งผลกระทบต่อระบบการเรียนรู้และความจำได้ (39) ต่อมาในการศึกษาของคณะผู้วิจัยของเราได้ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันเป็นระยะเวลานาน 30 วันซึ่งจากงานวิจัยได้บ่งชี้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานส่งผลให้มีการเพิ่มขึ้นของ pro-

inflammatory cytokines ในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส (40) และการศึกษาผลของยาพาราเซตามอลร่วมกับ CSD โมเดลต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดสมองพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเร็วทำให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของหลอดเลือดสมองอีกทั้งมีการแสดงออกของ cell adhesion molecule (ICAM-1 and VCAM-1) เพิ่มมากขึ้น โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับการกระตุ้นด้วยปรากฏการณ์ CSD (18)

2.4 พาราเซตามอลและภาวะ oxidative stress

การศึกษาวิจัยถึงการได้รับยาพาราเซตามอลกับการเกิดภาวะ oxidative stress นั้นก็ได้มีผู้ทำการศึกษาวิจัยโดยนำเสนอผลของยาพาราเซตามอลในด้านต่างๆที่มีความสัมพันธ์กับการปกป้องเซลล์และผลเสียที่เกิดจากภาวะ oxidative stress ในแง่ของการปกป้องเซลล์นั้นการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองและในเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 50 มิลลิโมลาร์ก่อนการเหนี่ยวนำด้วย Oxaliplatin ซึ่งส่งผลให้เพิ่มมากขึ้นของไนตริกออกไซด์และ lipid peroxidation รวมทั้งก่อให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียและมีการเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์ประสาทผ่าน P2X7 Cell Death Receptor พบว่ายาพาราเซตามอลส่งผลให้สารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลงอีกทั้งยังสามารถยับยั้งการตายของเซลล์ประสาทได้ (41) ต่อมา มีคณะผู้วิจัยได้ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมพบว่ายาพาราเซตามอลสามารถลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับไมโทคอนเดรียรวมถึงการสร้างซูเปอร์ออกไซด์ ทั้งนี้คณะผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้สรุปว่ายาพาราเซตามอลน่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท (42)

อย่างไรก็ตามการได้รับยาพาราเซตามอลก็สามารถส่งผลเสียได้เช่นเดียวกันหากได้รับในขนาดที่สูงกว่าระดับในการรักษา จากการศึกษาของ Nencini และคณะในปี 2007 พบว่าหนูทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 3 กรัมต่อกิโลกรัมทำให้มีการลดลงของระดับ กลูต้าไธโอนและวิตามินซี (ascorbic acid) ซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จึงเป็นผลทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ขึ้นโดยสังเกตได้จากการเพิ่มขึ้นของระดับ malondialdehyde (MDA) ซึ่งบ่งชี้ถึงการเกิด lipid peroxidation (15) การศึกษาวิจัยในปี 2012 ของ Da silva และคณะพบว่าหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมส่งผลให้เกิดความเป็นพิษต่อตับและระบบประสาทส่วนกลางและมีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มมากขึ้นอีกทั้งยังเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress จากการลดลงของกลูต้าไธโอน (43)

2.5 สารอนุมูลอิสระกับการเกิดภาวะ oxidative stress

สารอนุมูลอิสระ (free radicals) คืออะตอมหรือโมเลกุลที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว (unpaired electron) อยู่ในวงโคจรจึงทำให้อะตอมหรือโมเลกุลเหล่านั้นมีความไม่เสถียร สารอนุมูลอิสระมีคุณสมบัติที่ว่องไวในการทำปฏิกิริยากับสารอื่นสูงมากโดยสามารถเข้าไปแย่งจับหรือรับอิเล็กตรอนจากสารอื่นเพื่อทำให้ตัวเองเสถียรขึ้น ในสิ่งมีชีวิตอนุมูลอิสระที่มีความสำคัญคือสารอนุมูลอิสระจำพวก reactive oxygen species (ROS) เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ (superoxide anion), ไฮดรอกซิล (hydroxyl) และซุปเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) นอกจากนี้ยังมีสารอนุมูลอิสระจำพวก Reactive nitrogen species (RNS) เช่น ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide) อีกด้วย (44)

สารอนุมูลอิสระสามารถถูกกระตุ้นได้โดยทั้งปัจจัยภายนอกในร่างกายเช่น โลหะหนัก ยา แสงอัลตราไวโอเล็ต (ultraviolet) รังสี (irradiation) หรือแม้กระทั่งมลพิษทางอากาศ เป็นต้น (45) และปัจจัยภายในในร่างกายได้แก่การหายใจระดับเซลล์ที่เกิดขึ้นในไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นแหล่งการเกิดสารอนุมูลอิสระที่สำคัญภายในเซลล์ เป็นที่ทราบกันดีว่าสิ่งมีชีวิตต้องการพลังงานในรูปแบบของ ATP เพื่อดำเนินกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ซึ่งแหล่งผลิตพลังงานภายในเซลล์ที่สำคัญคือไมโทคอนเดรีย นอกจากจะผลิตพลังงานแล้วก็ยังมีการปลดปล่อยสารอนุมูลอิสระออกมาในรูปแบบของซุปเปอร์ออกไซด์อีกด้วย ซุปเปอร์ออกไซด์ เหล่านี้จะทำปฏิกิริยากับ ซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ต้านสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (anti-oxidant enzyme) ให้กลายเป็น ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ หลังจากนั้นไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เกิดขึ้นสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์คะทาเลส (catalase) หรือกลูต้าไธโอน เพอร์ออกซิเดส (Glutathione Peroxidase) ให้อยู่ในรูปแบบของน้ำและออกซิเจน ซึ่งขั้นตอนเหล่านี้เป็นกลไกที่ดำเนินไปเพื่อรักษาสมดุลและเพื่อธำรงกิจกรรมต่างๆภายในเซลล์ให้อยู่ในสภาวะปกติ (46)

ดังนั้นจะเห็นได้ว่าแหล่งผลิตสารอนุมูลอิสระของร่างกายไม่ได้มาจากแค่ปัจจัยภายนอกอย่างเดียว แต่ยังมีมาจากการกระตุ้นจากปัจจัยภายในในร่างกายเอง แต่อย่างไรก็ตามร่างกายก็มีกลไกในการกำจัดสารอนุมูลอิสระเหล่านั้นด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ สารต้านอนุมูลอิสระภายในร่างกายที่สำคัญได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ดีสมิวเทส, กลูต้าไธโอนเพอร์ออกซิเดส, คะทาเลส, กลูต้าไธโอนเอสทรานเพอร์เรส, กลูต้าไธโอนรีดักเทสหรือแม้กระทั่งวิตามินซี วิตามินอี แคโรทีนอยด์ (carotenoids) เป็นต้น ในกรณีที่ร่างกายของเรามีปริมาณสารอนุมูลอิสระมากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระก็สามารถส่งผลให้เกิดความไม่

สมดุลทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในร่างกายและส่งผลให้สารอนุมูลอิสระเหล่านี้สามารถเข้าไปทำลายโครงสร้างที่เป็นส่วนประกอบที่สำคัญภายในเซลล์ได้เช่น กรดนิวคลีอิก โปรตีน และไขมัน (46)

2.6 ภาวะ oxidative stress และกระบวนการตายของเซลล์ประสาทแบบทำลายตัวเอง (apoptosis)

ภาวะ oxidative stress เกิดจากความไม่สมดุลระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระซึ่งส่งผลกระทบต่อโครงสร้างที่สำคัญภายในเซลล์ เป็นที่ทราบกันดีว่าสมองเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อการเกิด oxidative stress เนื่องจากประกอบไปด้วยกรดไขมันเป็นจำนวนมากซึ่งส่งผลให้เกิดปฏิกิริยา peroxidation ได้ง่ายและมีการใช้ออกซิเจนค่อนข้างสูงและสมองเองยังมีสารต้านอนุมูลอิสระในปริมาณที่น้อยโดยคิดเป็น 10 % เมื่อเทียบกับอวัยวะอื่นอย่างเช่นตับ (47) และจากการศึกษาที่ผ่านมาก็พบว่าภาวะ oxidative stress มีความเกี่ยวข้องกับโรคในระบบประสาทต่างๆมากมายเช่น Parkinson's disease (PD), Alzheimer's disease (AD), Multiple Sclerosis (MS) และ amyotrophic lateral sclerosis (ALS) เป็นต้น(48)

กระบวนการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเป็นปกติในการเจริญเติบโตของร่างกายนอกจากนี้ยังช่วยกำจัดเซลล์ที่เสื่อมสภาพหรือหมดอายุเพื่อรักษาสมดุลต่างๆอีกด้วย กระบวนการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเอง แบ่งออกเป็น 2 วิธี โดยวิธีแรกเรียกว่า extrinsic pathway หรือ death receptor-mediated pathway เป็นการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ death receptor ซึ่งเป็นโปรตีนตัวรับบนผิวเซลล์ในกลุ่ม Tumor Necrosis Factor superfamily ประกอบไปด้วย extracellular domains, transmembrane domains และ cytoplasmic domain ตัวอย่างของตัวรับที่อยู่ในกลุ่ม Tumor Necrosis Factor superfamily เช่น Tumor necrosis factor receptor 1 (TNFR1) และ FAS receptor (FasR) เป็นต้น การทำงานของตัวรับเหล่านี้จะเกิดเมื่อมี death ligand เช่น TNF- α หรือ FasL เข้ามาจับกับตัวรับแล้วเกิดการส่งสัญญาณภายในเซลล์ขึ้น ยกตัวอย่างเช่น เมื่อ FasL ซึ่งเป็น death ligand เข้ามาจับกับ Fas death receptor (FasR) ทำให้ cytoplasmic domain เกิดการรับรู้แล้วเกิดการกระตุ้นสัญญาณภายในเซลล์ หลังจากนั้นจึงเหนี่ยวนำให้ adaptor protein เช่น Fas-associated death domain (FADD) ที่ประกอบไปด้วย death domain (DD) และ death effector domain (DED) เข้ามาเกาะ โดย

DED สามารถจับกับ procaspase-8 แล้วนำไปสู่การกระตุ้น procaspase-8 ให้กลายเป็น active caspase-8 ที่พร้อมจะทำงานโดยการไปกระตุ้น procaspase-3 ให้อยู่ในรูปของ active caspase-3 ต่อไป นอกจากนี้ caspase-8 ยังมีความเกี่ยวข้องกับ intrinsic pathway โดยสามารถไปสลาย Bid ให้อยู่ในรูปของ truncated form (t-bid) โปรตีนดังกล่าวนี้สามารถไปกระตุ้นการทำงานของ Bax ซึ่งเป็น pro-apoptotic โปรตีนให้มาเกาะที่เยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียส่งผลให้มีการหลั่งของสารต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ (49)

Intrinsic pathway หรือ mitochondria-mediated pathway กระบวนการตายของเซลล์ที่ผ่านไมโทคอนเดรียซึ่งเป็นออร์แกเนลล์ที่สำคัญภายในเซลล์ การตายของเซลล์ที่ผ่านไมโทคอนเดรียจะมีการปล่อยสารที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ กระบวนการตายของเซลล์ผ่านไมโทคอนเดรียนี้จะถูกควบคุมโดยโปรตีนที่อยู่ใน Bcl-2 family ซึ่งประกอบไปด้วยกลุ่มโปรตีนที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์อย่างเช่น Bax, Bak, Bid และ Bad และโปรตีนที่ต้านการตายของเซลล์ เช่น Bcl-2, Bcl-XL(50) ปัจจัยที่กระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ได้แก่ รังสี สารพิษต่างๆ การติดเชื้อไวรัสหรืออนุโมล อิสระภายในเซลล์ เป็นต้น ซึ่งสิ่งกระตุ้นเหล่านี้สามารถกระตุ้นการตายของเซลล์ผ่านการทำงานของโปรตีนใน Bcl-2 family โดยการกระตุ้น Bax ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณไซโทพลาสซึมให้เคลื่อนตัวมายังชั้นนอกของไมโทคอนเดรียส่งผลให้มีการเปิดของ mitochondrial permeability transition (MPT) pore และมีการหลั่งของ cytochrome c ซึ่งเป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์จากไมโทคอนเดรียออกมายังไซโทพลาสซึม เมื่อ cytochrome c ออกมาสู่ไซโทพลาสซึมจะรวมตัวกับ apoptotic protease-activating factor 1 (Apaf-1) และ procaspase-9 ทำให้เกิดเป็นโครงสร้างที่เรียกว่า apoptosome และกระตุ้นการทำงานของ caspase-9 กระบวนการเหล่านี้จะอาศัยพลังงาน ATP เข้ามาช่วยด้วย ต่อมา caspase-9 จะไปกระตุ้น procaspase-3 ให้กลายเป็น active caspase-3 ซึ่งพร้อมที่จะทำงาน caspase-3 จะไปสลาย inhibitor of caspase-activated DNase (ICAD) ที่ติดอยู่กับ Caspase Activated DNase (CAD) ส่งผลให้ CAD สามารถไปทำลาย chromosomal DNA ที่อยู่ภายในนิวเคลียสได้ (51)

2.7 ความสัมพันธ์ระหว่าง Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) และ caspase-3

Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) เป็นโปรตีนที่จัดอยู่ในกลุ่ม neurotrophin family มีบทบาทสำคัญในการพัฒนา การรักษาสสมดุลรวมถึงการปรับตัวของเซลล์ประสาทที่อยู่ใน

ระบบประสาทส่วนกลาง (central nervous system; CNS) และระบบประสาทส่วนปลาย (peripheral nervous systems; PNS) การสังเคราะห์ BDNF ในช่วงแรก BDNF จะถูกสร้างออกมาในรูปของ pre-proneurotrophin จากนั้นถูก cleave ให้อยู่ในรูปของ pro-BDNF แล้วจึงผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงต่างๆจนได้เป็น mature-BDNF กระบวนการเปลี่ยน pro-BDNF ให้กลายเป็น mature-BDNF นั้นอาศัยการทำงานของเอนไซม์ furin และ proconvertases ที่อยู่ใน secretory vesicle ตัว mature-BDNF สามารถจับกับตัวรับ protein-kinase neurotrophin receptors ที่มีชื่อว่า tropomyosine-related kinase (Trk) ซึ่งมีส่วนสำคัญในกระบวนการเรียนรู้และความจำ กระบวนการสร้างความจำ การพัฒนาการของเซลล์ประสาทรวมทั้งยังป้องกันการตายของเซลล์ประสาท (52-54) ในขณะที่เดียวกันตัว pro-BDNF จับกับตัวรับที่ชื่อว่า p75 neurotrophin receptor (p75NTR) ส่งผลให้มีการกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ประสาท (55)

Caspases (cysteine-dependent aspartate specific protease) เป็นเอนไซม์ cysteine proteases ที่มีบริเวณ active site ประกอบด้วยกรดอะมิโน cysteine และทำการตัด target protein ที่ตำแหน่ง aspartic acid เอนไซม์ caspases แบ่งออกเป็น initiator caspases (caspase-2, 8, 9 และ 10) และ executioner caspases (caspase-3, 6 และ 7) โดยปกติ caspases จะถูกสร้างออกมาให้อยู่ในรูปของ procaspase ซึ่งเป็น inactive form ต่อมาจะมีเปลี่ยนแปลงไปเป็น active form เมื่อเกิดกระบวนการตายของเซลล์แบบ apoptosis ในส่วนของ initiator caspases เมื่อเกิดปฏิกิริยา autocatalytic cleavage โดยมีการตัดส่วน N-terminal prodomain ออก ทำให้เกิดส่วน large subunit และ small subunit จากนั้นจึงมีการ form รูปร่างเกิดเป็น tetramer ซึ่งจะอยู่ในรูปของ active form และพร้อมที่จะไปกระตุ้น executioner caspases ตัวถัดไป สำหรับ executioner caspases จะอยู่ในรูปของ active form ก็ต่อเมื่อมีการกระตุ้นให้มีการตัดส่วนของ prodomain ออกด้วย initiator caspases ให้อยู่ในรูปของ active form ทำให้สามารถสลายโปรตีนหลายชนิดที่นำไปสู่กระบวนการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองสำหรับ executioner caspase ที่สำคัญคือ caspase-3 มีขนาด 17 KDa ซึ่งสามารถตัด death substrate เช่น ICAD ให้หลุดออกจาก CAD แล้วเกิดการตัดสาย DNA จนทำให้เกิด DNA fragmentation (56)

ในการศึกษาวิจัยของ Han และคณะในปี 2000 ที่ทำการทดลองในหนูแรกเกิดอายุ 7 วัน โดยได้รับการฉีด BDNF เข้าทาง Intracerebroventricular ก่อนการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ Hypoxic-

ischemic (H-I) injury พบว่า BDNF สามารถยับยั้งการแสดงออกของ caspase-3 ซึ่งเป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองได้จากภาวะ Hypoxic-ischemic (H-I) injury ในสมองส่วนคอร์เทกซ์, striatum และฮิปโปแคมปัส ซึ่งคณะผู้วิจัยได้สรุปว่าภาวะ Hypoxic-ischemic (H-I) injury ส่งผลให้มีการตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นแต่อย่างไรก็ตามหากได้รับ BDNF ก็สามารถยับยั้งการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายของเซลล์ได้ (19) เพื่อเป็นการยืนยันการศึกษาคณะวิจัยก่อนหน้านี้ Kim และคณะได้ทำการศึกษาดูฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์ของ BDNF จากการบาดเจ็บผ่านการทำงานของ caspase-3 เอนไซม์โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง primary neuronal จาก embryonic rat cortex ที่ทำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์โดยการให้รังสี, การขาดออกซิเจนมาเลี้ยง รวมทั้งการขาดออกซิเจนและกลูโคส ทั้งนี้คณะผู้วิจัยพบว่า BDNF สามารถยับยั้งการทำงานของ caspase-3 เอนไซม์ได้ ซึ่งอาจจะเป็นอีกกลไกหนึ่งในการป้องกันการตายของเซลล์ได้ (57) และได้มีคณะผู้วิจัยศึกษาบทบาทของ BDNF โดยนำ BDNF ก่อนการกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ด้วยกลูตาเมต พบว่า BDNF สามารถลดการตายของเซลล์ลงได้ผ่านการทำงานของวิถี Ras/MAPK และ PI3-K นอกจากนี้ยังเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน Bcl-2 ที่เกี่ยวข้องกับการต้านการตายของเซลล์ และลดการแสดงออกของ caspase-3 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส อีกด้วย (58) ต่อมา มีผู้ศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง BDNF และตัว precursor ของ BDNF และระดับของ active caspase-3 ในสมองของหนูแรกเกิดแต่ละบริเวณพบว่าสมองส่วนซีรีบรัลคอร์เทกซ์มีการเพิ่มขึ้นของระดับ active caspase-3 ซึ่งมีความสัมพันธ์กับการลดการแสดงออกของ mat-BDNF/pro-BDNF (59)

บทที่ 3

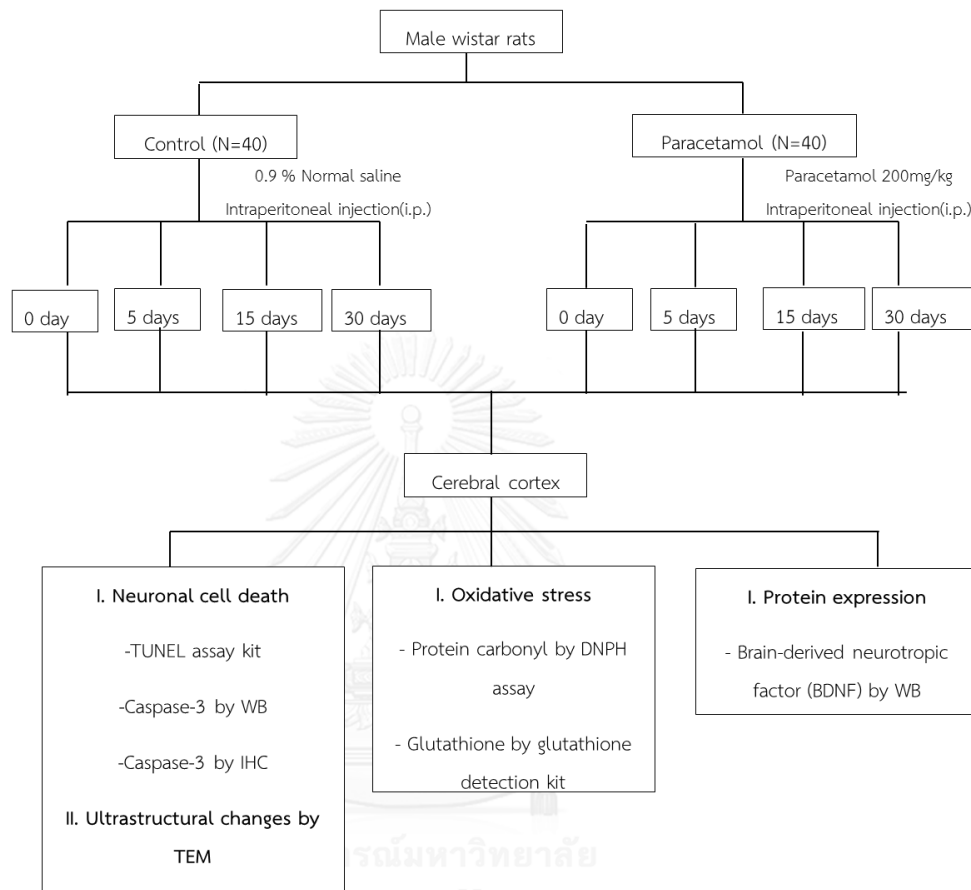
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 สัตว์ทดลอง

การศึกษาครั้งนี้ใช้สัตว์ทดลองซึ่งเป็นหนูแรท (Rat) เพศผู้สายพันธุ์ Wistar น้ำหนัก 250-300 กรัม จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล โดยสัตว์ทดลองจะอาศัยอยู่ในกรงสแตนเลส จำนวน 5 ตัวต่อกรง นอกจากนี้สัตว์ทดลองทุกตัวยังได้รับน้ำและอาหารเม็ดสำเร็จรูป (ad libitum) อีกทั้งมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง 25 องศาเซลเซียส ($^{\circ}\text{C}$) และได้รับแสงสว่างอย่างน้อย 12 ชั่วโมง สัตว์ทดลองทุกตัวจะได้รับการเลี้ยงดูเป็นอย่างดีและการใช้สัตว์ทดลองในครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจริยธรรมจากคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (เลขที่โครงการ 11/59)

3.2 ออกแบบการทดลอง

การทดลองนี้แบ่งสัตว์ทดลองออกเป็น 2 กลุ่มคือสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมและสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดยสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลจะได้รับยาขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้อง (intraperitoneal injection (i.p.)) จำนวน 1 ครั้งต่อวัน ส่วนสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมจะได้รับสารละลาย 0.9% normal saline ในปริมาณเดียวกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลผ่านการฉีดเข้าทางช่องท้องจำนวน 1 ครั้งต่อวันเป็นระยะเวลา 0, 5, 15 และ 30 วันตามลำดับ ภายหลัง 1 ชั่วโมงจากการฉีดยาพาราเซตามอลหรือ 0.9% normal saline ครั้งสุดท้ายสำหรับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลและสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 0 วัน และภายหลัง 24 ชั่วโมงจากการฉีดยาพาราเซตามอลหรือ 0.9% normal saline ครั้งสุดท้ายสำหรับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลและสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมเป็นระยะเวลา 5, 15 และ 30 วัน ตามลำดับสัตว์ทดลองจะถูกนำมาศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ต่อไป



TEM = Transmission electron microscopic study

IHC = Immunohistochemical study

WB = Western blot analysis

รูปที่ 1 แสดงการออกแบบการทดลอง

3.3 การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษา

3.3.1 การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาด้วยเทคนิค Western blotting, DNPH assay และ Glutathione assay

ภายหลังจาก 1 และ 24 ชั่วโมงจากฉีดยาพาราเซตามอลครั้งสุดท้าย สัตว์ทดลองถูกทำให้ตายด้วยวิธีที่สงบโดยการฉีดสารละลายความเข้มข้นสูง sodium pentobarbital จากนั้นจะทำการ perfuse ด้วยสารละลาย 0.1M phosphate buffer (PBS) pH 7.4 จำนวน 250 มิลลิลิตร ผ่านทางหัวใจและเก็บสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ โดยใส่ใน eppendorf tube ขนาด 1.7 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเคลื่อนย้ายไปใส่ไนโตรเจนเหลว (liquid nitrogen) ต่อมานำตัวอย่างสมองที่ได้ไปเก็บที่ตู้ -80 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาทำการสกัดโปรตีน

ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์จะถูกนำมา homogenize ด้วย homogenizer ในสารละลาย RIPA buffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM Na₂ EDTA, 1mM EGTA, 1% NP-40, 1% sodium deoxycholate, 2.5 mM sodium pyrophosphate, 1 mM β -glycerophosphate, 1mM Na₃VO₄, 1 ug/ml leupeptin) ที่มีส่วนผสมของ 1X protease/phosphatase inhibitor cocktail (ในอัตราส่วน 100:1) หลังจากนั้นนำไป sonicate ด้วยเครื่อง ultra sonicator จากนั้นทำการบ่มในน้ำแข็งเป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็ว 12,000 g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการดูดส่วนใส (supernatant) โดยใช้ไปเปตต์ (pipette) แล้วทำการเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสความเข้มข้นของโปรตีนจะนำมาวัดโดยใช้ BCA protein assay kit (Pierce®, USA)

3.3.2 การเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาด้าน immunohistochemistry, TUNEL assay และ electron microscopy

สำหรับการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาด้าน immunohistochemistry และศึกษาการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค TUNEL assay ภายหลังจาก 1 และ 24 ชั่วโมงจากฉีดยาพาราเซตามอลครั้งสุดท้าย สัตว์ทดลองจะถูกทำให้ตายด้วยวิธีที่สงบด้วยการฉีดสารละลาย sodium pentobarbital ที่ความเข้มข้น 60 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นจะทำการ perfuse ด้วยสารละลาย 0.1M PBS pH 7.4

จำนวน 250 มิลลิลิตร ผ่านทางหัวใจแล้วตามด้วย 4% paraformaldehyde จำนวน 250 มิลลิลิตรที่ละลายใน 0.1M PBS จากนั้นทำการตัดสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ที่ต้องการโดยกำหนดตำแหน่งด้านหน้าต่อ bregma เป็นระยะ 3 มิลลิเมตรและนำมาแช่ใน 4% paraformaldehyde ที่ละลายใน 0.1M PBS ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาข้ามคืน ต่อมานำชิ้นเนื้อไปเข้าสู่กระบวนการ process และฝังตัวลงใน paraffin block

ส่วนการศึกษาโครงสร้างของเซลล์ในระดับจุลภาคด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน การศึกษาในครั้งนี้จะทำการตัดสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ที่ต้องการโดยกำหนดตำแหน่งด้านหน้าต่อ bregma เป็นระยะ 6 มิลลิเมตรและตัดชิ้นเนื้อบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ให้มีขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (mm^3) จากนั้นนำมาแช่ใน 3% glutaraldehyde ทันทีและนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นระยะเวลาข้ามคืน แล้วทำการ process ชิ้นเนื้อและฝังตัวลงใน resin

3.4 การศึกษาด้วยเทคนิค Western blotting

โปรตีนจำนวน 40-50 ไมโครกรัม ที่ได้จากการสกัดถูกนำมาผสมกับ 4x SDS Protein sample buffer ที่ประกอบด้วย 240 mM Tris-HCl (pH 6.8), 40% Glycerol, 8% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol หลังจากนั้นนำโปรตีนไปต้มที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที โปรตีนทั้งหมดจะถูกแยกด้วย 10-15 % sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) โดยใช้กระแสไฟฟ้า 80-100 โวลต์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นโปรตีนที่แยกได้จะถูกเคลื่อนย้ายสู่ Nitrocellulose membranes ที่กระแสไฟฟ้า 0.35 แอมแปร์นาน 1 ชั่วโมงโดยใช้เครื่อง Mini Trans-Blot® Electrophoresis Transfer Cell (BioRad, USA) และทำการ block non-specific binding ด้วย 5% bovine serum albumin (BSA) หรือ 5% nonfat milk (NFM) ที่ละลายใน TBS โดยมีส่วนผสมของ tween-20 (TBST) เป็นเวลา 1 ชั่วโมงที่อุณหภูมิห้อง ต่อมา membrane ถูกบ่มด้วย primary antibody ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน primary antibody : rabbit polyclonal anti-BDNF (ความเข้มข้น 1:500)(sc-546; Santa Cruz Biotechnology, California, USA), Rabbit monoclonal anti-BDNF (ความเข้มข้น 1:3000)(ab108319; Abcam, Cambridge, MA, USA) และ mouse monoclonal anti- β -actin (ความเข้มข้น 1:3000)(AC-15; Sigma, St. Louis, Missouri, USA) ที่ละลายใน 5%BSA/TBST

หรือ 5% NFM/TBST ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลานานข้ามคืน สำหรับการศึกษารายการแสดงออกของ เอนไซม์ caspase-3 นั้น membrane จะถูก block non-specific binding ด้วย 5% BSA/TBST เป็นเวลานานข้ามคืน จากนั้นทำการบ่ม primary antibody mouse monoclonal anti-caspase3 (ความเข้มข้น 1:500)(#Sc-7272;Santa cruz Biotechnology, California, USA) ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 3 ชั่วโมง เมื่อทำการบ่มแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนแล้วจากนั้นทำการล้าง membrane ทั้งหมดด้วย membrane TBST จำนวน 3 ครั้งๆละ 10 นาที แล้วจึงใส่ secondary antibody: anti-mouse or rabbit secondary antibody (sigma, St. Louis, Missouri, USA) ที่ติดฉลากด้วย horseradish peroxidase (HRP) enzyme ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและทำการล้าง membranes อีกครั้งด้วย TBST จำนวน 3 ครั้งๆละ 10 นาที การติดตามการแสดงออกของ โปรตีนโดยใช้ SuperSignal® West Pico Chemiluminescent Substrate Kits (PIERCE biotechnology, USA) และทำการวัดค่า intensity ของ band ด้วยโปรแกรม scion image software (Scion; Frederick, MD) โดยมีการใช้ β -actin เป็น internal control และแสดงผลเป็น อัตราส่วนของ protein/ β -actin

3.5 การศึกษาทางด้านอิมมูโนพยาธิวิทยา (Immunohistochemical study)

เพื่อทำการศึกษารายการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ขึ้นเนื้อสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์จะถูกตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร จำนวน 2 sections ต่อ สัตว์ทดลอง 1 ตัว (n= 20 ตัว/กลุ่ม) แล้วนำมาวางบน adhesive Glass slide (Matsunami, Yasaka-cho, Kishiwada City, Osaka, Japan) และทำการ deparaffin ด้วย xylene ต่อมา rehydrate ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นมากไปน้อยแล้วจึง retrieved antigen โดย citrate buffer pH 6.0 และยับยั้งเพอรอกซิเดสเอนไซม์ (peroxidase) ด้วย 3% hydrogen peroxide จากนั้นทำการ block non-specific binding ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 30 นาทีและบ่ม แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจน caspase-3 (rabbit anti-caspase-3 (sc-7148; Santa Cruz Biotechnology, California, USA) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นานข้ามคืน ถัดมาใส่ anti-rabbit secondary antibody (Dako EnVision kits, Glostrup, Denmark). ที่ไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นเซลล์ที่มีการแสดงออกเอนไซม์ caspase-3 จะถูกติดตามโดยการใส่ DAB chromogen ต่อมาทำการ dehydrate ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นน้อยไปมาก แล้วทำการ

mount สไลด์ และปิดด้วย cover-slip เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย้อมแล้ว สไลด์ทั้งหมดจะผ่านการสแกนด้วยเครื่อง slide scanner (Aperio ScanScope, Aperio, Vista, California, USA)

เพื่อที่จะนับเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 (Caspase-3 immunoreactive cell) ที่ติดสีน้ำตาลของ DAB บริเวณไฮโดพลาสซึมทำโดยการกำหนดกรอบสี่เหลี่ยม (field) ให้ทั่วทั้งบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ตั้งแต่ชั้นที่ 1 ถึง 6 (lamina I-VI) โดยแต่ละกรอบสี่เหลี่ยมจะมีพื้นที่ (area) ที่เท่ากันขึ้นมาจำนวน 4 กรอบ เพื่อทำการนับเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลบริเวณไฮโดพลาสซึมซึ่งแสดงถึงการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์ โดยใช้โปรแกรม positive pixel counting algorithms (v9.1, Aperio, Vista, California, USA) ซึ่งจะทำการนับจำนวน Positive pixel ในพื้นที่ที่กำหนดและรายงานผลเป็น Number of positive + strong positive pixel ต่อ Total number of pixel ต่อพื้นที่ (mm^2) ในส่วนการแสดงผลของเอนไซม์ Caspase-3 จะถูกนำเสนอในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์โดยเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม

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

กระบวนการในการศึกษาการตายของเซลล์ได้ทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ใน ApopTag® Peroxidase In Situ Apoptosis Detection Kit ;S7100 ดังนี้ ชิ้นเนื้อสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์จะถูกตัดด้วยเครื่อง microtome ให้มีความหนา 5 ไมโครเมตร จำนวน 2 sections ต่อสัตว์ทดลอง 1 ตัว (n= 20ตัว/กลุ่ม) จากนั้นจึงนำมาวางบน adhesive Glass slide (Matsunami, Yasaka-cho, Kishiwada City, Osaka, Japan) แล้ว deparaffin ด้วย xylene ถัดมาจึง rehydrate ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นมากไปน้อย ต่อมา retrieved antigen ด้วย citrate buffer pH 6.0 (Dako, Glostrup, Denmark) และยับยั้งเพอรอกซิเดสเอนไซม์ (peroxidase) ด้วย 3% ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ขั้นตอนต่อมาทำการใส่ equilibration buffer ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 10 นาที แล้วบ่มด้วย working TdT enzyme(reaction buffer:TdT enzyme ในอัตราส่วน 7:3) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 60 นาที จากนั้นหยุดปฏิกิริยาดังกล่าวด้วย working stop/wash buffer และล้างด้วย 1M PBS ที่ประกอบไปด้วย 0.1% tritonX-100 (PBST) แล้วบ่มด้วย anti-digoxigenin antibody ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 60 นาที และ

ล้างชิ้นเนื้ออีกครั้งด้วย 1M PBST หลังจากนั้นเซลล์ที่มีการตายเกิดขึ้นจะถูกติดตามโดยการใส่ DAB chromogen จากนั้นทำการ dehydrate ด้วยแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นน้อยไปมาก แล้ว mount สไลด์ และปิดด้วย cover-slip เมื่อเสร็จสิ้นกระบวนการย้อมแล้ว สไลด์ทั้งหมดจะผ่านการสแกนด้วย เครื่อง slide scanner (Aperio ScanScope, Aperio, Vista, California, USA)

เพื่อที่จะนับเซลล์ที่มีการตาย (TUNEL- immunoreactive cell/positive cell) เกิดขึ้นโดยที่มีการติดสีน้ำตาลของ DAB บริเวณนิวเคลียสทำการกำหนดกรอบสี่เหลี่ยม (field) ให้ทั่วทั้งบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ตั้งแต่ชั้นที่ 1 ถึง 6 (lamina I-VI) โดยแต่ละกรอบสี่เหลี่ยมจะมีพื้นที่ (area) ที่เท่ากันขึ้นมาจำนวน 4 กรอบ เพื่อทำการนับเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียสซึ่งแสดงถึงการตายของเซลล์ ด้วยเครื่องด้วยเครื่องคอมพิวเตอร์โดยใช้โปรแกรม Nuclear V.9 (Aperio, Vista, California, USA) ซึ่งจะทำให้การนับจำนวน TUNEL- immunoreactive cell ในพื้นที่ที่กำหนดและรายงานผลเป็นจำนวนTUNEL- immunoreactive cell ต่อพื้นที่ (mm^2) และการตายของเซลล์ในบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์จะถูกนำเสนอในรูปแบบของเปอร์เซ็นต์โดยเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม

3.7 การศึกษาโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทด้วยเทคนิคจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (Transmission electron microscopic study;TEM)

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาท ชิ้นเนื้อสมองบริเวณ cerebral cortex ที่แช่อยู่ใน 3% glutaraldehyde ถูกนำมาล้างด้วย 0.1M PBS ก่อนนำมา post-fix ด้วย 1% osmium tetroxideและทำการ dehydration ผ่านแอลกอฮอล์จากความเข้มข้นน้อยไปมาก ถัดมาทำการใส่ propylene oxide ตามด้วย resin: propylene oxide ในอัตราส่วน 1:1 และ resin: propylene oxide ในอัตราส่วน 3:1 ตามลำดับ ต่อมา embed ชิ้นเนื้อด้วย 100% resin ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการ embed จะถูกนำมาตัด thick sections ให้มีความหนา 500 นาโนเมตร (nm) และย้อมด้วย toluidine blue เพื่อเลือกบริเวณที่ต้องการศึกษา เมื่อเลือกบริเวณที่ต้องการศึกษาได้แล้วจึงการตัด thin sections ให้มีความหนา 70-90 นาโนเมตร แล้ววาง sections ลงบน copper grid และนำไป counter stain ด้วย

uranyl acetate และ lead citrate ตามลำดับ จากนั้นทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทในระดับ ultrastructure ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน (TEM) (JEM-1400 plus; JEOL, Tokyo, Japan)

ในการศึกษานี้จะทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์ ดังนี้

1. ศึกษาลักษณะเซลล์เมมเบรน (Cell membrane)
2. ศึกษาการบวมของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria)
3. ศึกษาการบวม/ ขยายของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมชนิดที่มีไรโบโซมเกาะ (Rough endoplasmic reticulum; RER)
4. ศึกษาการกระจายตัวของ chromatin ในนิวเคลียส (Nucleus)

การเปลี่ยนแปลงขององค์ประกอบต่างๆที่บ่งชี้ถึงความผิดปกติของเซลล์จะรายงานผลเป็นไปในเชิงคุณภาพลักษณะ descriptive analysis โดยการเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

3.8 การศึกษาการเกิด Protein oxidation โดยการวัดระดับ protein carbonyl ด้วยเทคนิค DNPH assay

นำโปรตีนในส่วน supernatant ที่ได้แบ่งออกเป็น 2 ส่วนๆละ 62.5 มิลลิลิตร (โปรตีนใช้ความเข้มข้น 0.1-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยส่วนแรกนำไปเติม 2N HCl ปริมาตร 250 มิลลิลิตร เพื่อทำเป็น blank sample และอีกส่วนหนึ่งนำไปเติม 10 mM DNPH ปริมาตร 250 μ l เพื่อทำเป็น test sample จากนั้นนำไปบ่มในที่มืด ณ อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 1 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลาแล้วให้เติม 20% trichloroacetic acid (TCA) ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วนำมาแช่ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 10 นาที จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000 g นาน 15 นาที เมื่อทำการปั่นเหวี่ยงเสร็จทำการเทสารละลายด้านบนทิ้งและนำตะกอนที่ได้ไปล้างด้วย ethanol : ethylacetate (1:1) ปริมาตร 625 มิลลิลิตร ต่อมานำไปปั่นเหวี่ยงที่ 10,000g นาน 15 นาที แล้วเทสารละลายด้านบนทิ้ง นำตะกอนที่ได้ไปละลายด้วย guanidine hydrochloride ปริมาตร 300 มิลลิลิตร แล้วบ่มที่ 60 องศาเซลเซียส อีก 60 นาที เพื่อละลายตะกอน จากนั้นนำสารละลายไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 375 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ไปคำนวณหาปริมาณ protein carbonyl โดยนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคูณด้วยค่าคงที่ 45.45 จะได้ปริมาณ protein carbonyl

ในหน่วย nmol/ml จากนั้นนำปริมาณที่ได้นำไปเทียบเป็นปริมาณ protein carbonyl ต่อปริมาณ โปรตีนทั้งหมด ดังนี้

$$\text{Protein carbonyl (nmol/mg)} = \frac{A375 \times 45.45 \text{ (nmol/mL)}}{\text{Total protein concentration (mg/mL)}}$$

3.9 การศึกษาระดับกลูต้าไธโอน (GSH)

เป็นการใช้วิธี enzymatic recycling reaction โดยปกติ glutathione reductase เป็นตัวรีดิวซ์ oxidized glutathione (GSSG) ให้กลายเป็น reduced glutathione (GSH) ในสภาวะที่มี NADPH เทคนิคนี้อาศัยหลักการที่ หมู่ sulfhydryl group ของ กลูต้าไธโอนจะเข้าทำปฏิกิริยากับ DTNB ซึ่งทำให้เกิดสารสีเหลืองขึ้นจากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ 405 นาโนเมตร โดยใช้เครื่อง spectrophotometry ซึ่งสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับระดับกลูต้าไธโอนภายในเซลล์

การตรวจหาระดับกลูต้าไธโอนภายในเซลล์จะทำตามขั้นตอนที่ระบุไว้ใน Glutathione assay kit (Cat. No.703002; caymanchemical, Ann Arbor, MI, USA) ดังนี้ นำ supernatant จำนวน 100 มิลลิลิตร มาทำปฏิกิริยากับ 10% metaphosphoric acid (MPA) จำนวน 100 มิลลิลิตร เพื่อทำการ deproteination จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3000 g เป็นเวลา 5 นาที และทำการเก็บส่วน supernatant ไว้ ต่อมานำ supernatant มาผสมกับ 4M triethanolamine (ในอัตราส่วน 4M triethanolamine จำนวน 50 ไมโครลิตร ต่อ supernatant จำนวน 1000 ไมโครลิตร) เพื่อเป็นการเพิ่ม pH เมื่อทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีข้างต้นเสร็จเรียบร้อยแล้วจึงทำการใส่ supernatant จำนวน 50 ไมโครลิตร ลงใน 96-well plate แล้วตามด้วย assay cocktail ที่ประกอบด้วยไปด้วย MES buffer, Cofactor mixture, Enzyme mixture, water และ DTNB จำนวน 150 ไมโครลิตรต่อหลุม เพื่อให้ทำปฏิกิริยาต่อกันโดยการนำไป shake ด้วยเครื่อง orbital shaker ที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 25 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) 405 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer และนำไปคำนวณหาระดับกลูต้าไธโอนโดยเทียบกับ GSH standard โดยระดับกลูต้าไธโอนภายในเซลล์จะแสดงในหน่วยของไมโครโมลาร์ (μM)

3.10 การวิเคราะห์ข้อมูล (Data analysis)

ข้อมูลทั้งหมดจะนำเสนอในรูปแบบของค่าเฉลี่ย \pm ความคลาดเคลื่อนของค่าเฉลี่ย (mean \pm S.E.M.) ในการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองจะใช้ student's t-test และการศึกษาการเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างช่วงเวลาโดยใช้ one-way ANOVA ตามด้วย Bonferroni post hoc test โดยใช้โปรแกรม SPSS 22.0 และกำหนดค่านัยสำคัญทางสถิติที่ p-value <0.05



บทที่ 4

รายงานผลการศึกษา

การศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการรายงานผลของการศึกษาโดยแบ่งออกเป็น 2 ช่วงระยะเวลา ดังต่อไปนี้คือ ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้น (0 และ 5 วัน) และผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน (15 และ 30 วัน)

4.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

4.1.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อทำการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ในการศึกษาครั้งนี้ สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ด้วยเทคนิค western blotting จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้น (0 และ 5 วัน) มีระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 99.67 ± 1.90 VS 100 ± 10.03 , $P > 0.05$ และระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 109.79 ± 15.59 VS 100 ± 8.24 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 2)

แต่อย่างไรก็ตามสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน (15 และ 30 วัน) กลับพบว่ามีระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับการแสดงออกของเอนไซม์

caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 145.18 ± 6.28 VS 100 ± 8.58 , $P < 0.05$ และระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 146.68 ± 6.80 VS 100 ± 9.58 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 2)

โดยเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วันเปรียบเทียบกับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วันแล้วพบว่า การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วันมีระดับที่สูงกว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 145.18 ± 6.28 VS 99.67 ± 1.90 , $P < 0.05$ และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 146.68 ± 6.80 VS 99.67 ± 1.90 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 2)

นอกจากนี้ผู้ศึกษาวิจัยยังได้ทำการศึกษาการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองบริเวณซีรีบัลลัมคอร์เท็กซ์ด้วยเทคนิค immunohistochemistry โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 (caspase-3-immunoreactive cell) จะย้อมติดสีน้ำตาลบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ดังแสดงในรูปที่ 3

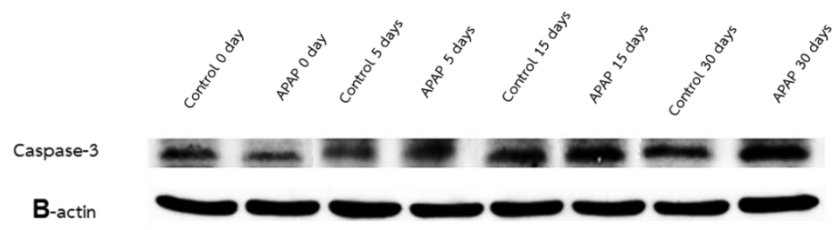
จากผลการศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเทคนิค Immunohistochemistry มีความสอดคล้องกับระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ด้วยเทคนิค Western blotting โดยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นมีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน VS กลุ่มควบคุม 91.72 ± 4.35 VS 100.00 ± 10.30 , $P > 0.05$ และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 5 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 115.34 ± 8.58 VS 100.00 ± 11.43 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 4-5)

แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน กลับพบว่ามี การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ภายในสมองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 142.27 ± 6.67 VS 100.00 ± 12.13 , $P < 0.05$ และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 156.84 ± 14.15 VS 100.00 ± 14.52 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 4-5)

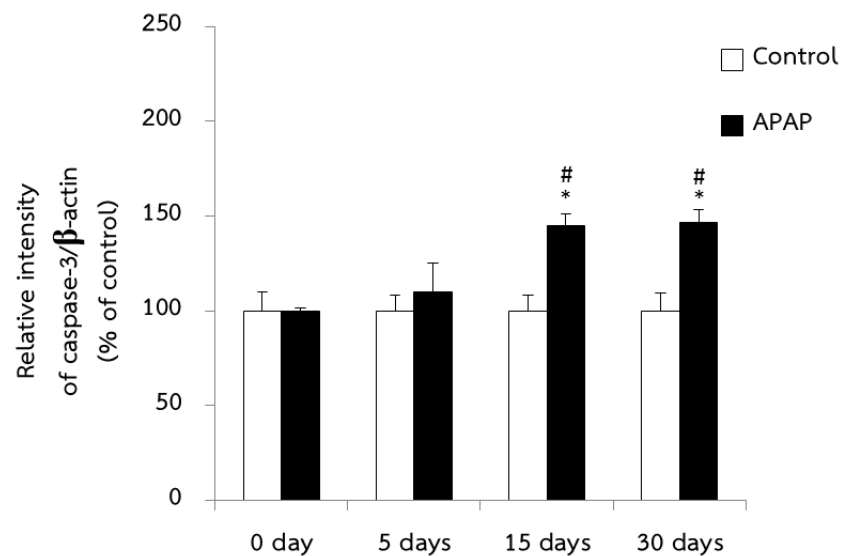
โดยเมื่อเปรียบเทียบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วันเปรียบเทียบกับ การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วันแล้วพบว่า การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วันมีระดับที่สูงกว่า สัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (การแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 142.27 ± 6.67 VS 91.72 ± 4.35 , $P < 0.05$ และการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ใน สัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 156.84 ± 14.15 VS 91.72 ± 4.35 , $P < 0.01$; ดังแสดงในรูปที่ 4-5)

โดยจากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะแสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้น ไม่มีผลต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 อย่างไรก็ตามการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะ เวลานานกลับส่งผลให้มีการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์ เท็กซ์ของสัตว์ทดลองเพิ่มมากขึ้น

(A)



(B)



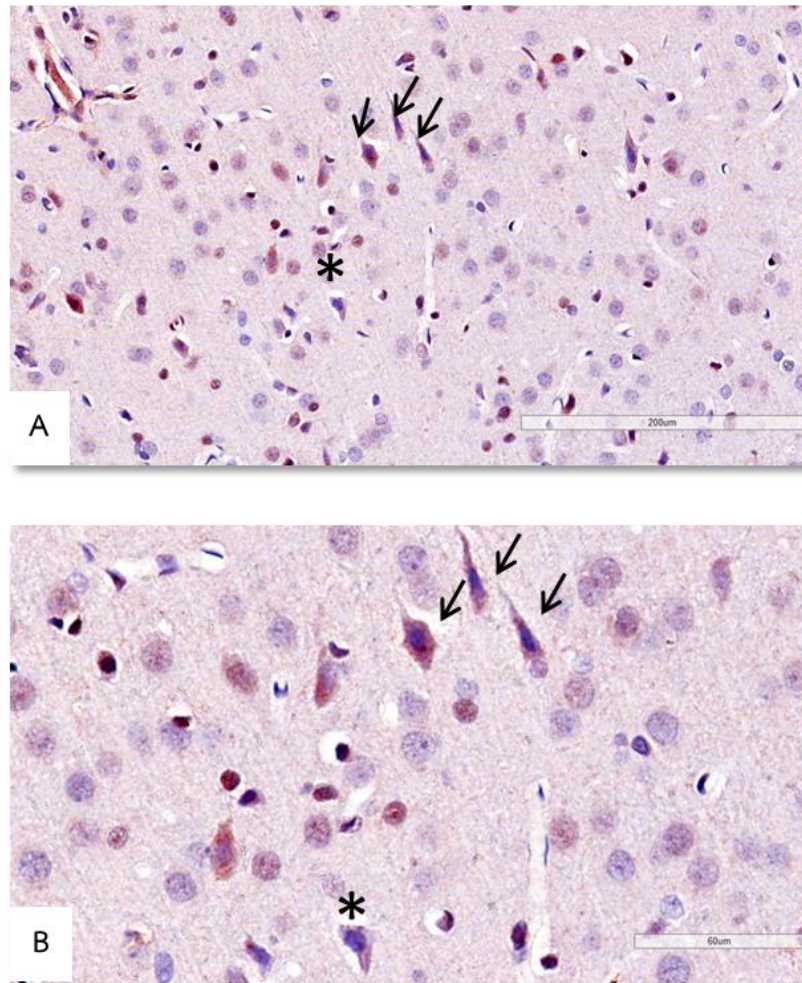
รูปที่ 2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

(A) ภาพแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ Caspase-3 ด้วยเทคนิค western blotting ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

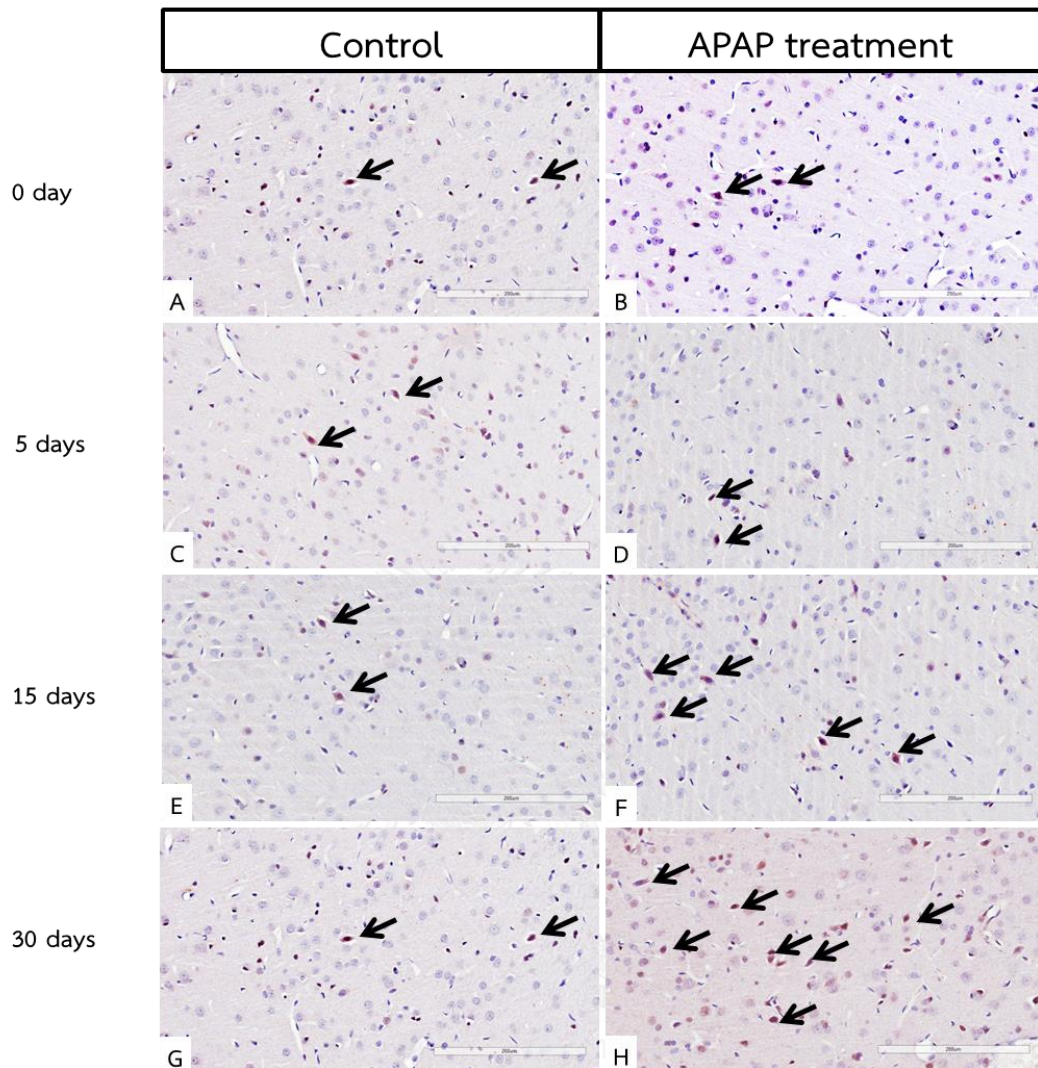
(B) กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ Caspase-3 ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

* P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม,

P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

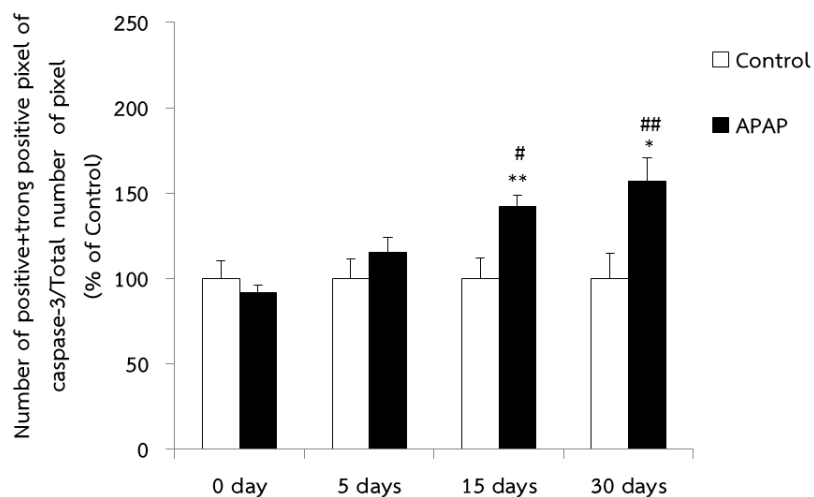


รูปที่ 3 แสดงลักษณะตัวอย่างการแสดงออกของแอนไจม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมอง บริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง โดยเซลล์ที่มีการแสดงออกของแอนไจม์ caspase-3 หรือ caspase-3-immunoreactive cell จะย้อมติดสีน้ำตาลบริเวณไซโตพลาสซึมของเซลล์ (ลูกศร) ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจากเซลล์ที่ไม่มีการแสดงออกของแอนไจม์ caspase-3 หรือ Negative cell (*) ดังแสดงในภาพ A และ B; Scale bar = 200 และ 60 μm ตามลำดับ



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 4 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง โดยอาศัยเทคนิค immunohistochemistry; A, C, E และ G หมายถึง กลุ่มควบคุม และ B, D, F และ H หมายถึง กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดย Scale bar = 200 μ m



รูปที่ 5 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

* P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

** P -value < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

P -value < 0.01 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

4.1.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อทำการศึกษารายละเอียดของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อการตายแบบทำลายตัวเองของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ในการศึกษาครั้งนี้สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นทำการศึกษารายละเอียดของการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค TUNEL assay โดยเทคนิคนี้เป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจสอบการเกิด DNA fragmentation ซึ่งถือเป็นลักษณะที่จำเพาะของการตายแบบทำลายตัวเอง ซึ่งเซลล์ที่มีการตายเกิดขึ้นในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองจะย้อมติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ (TUNEL-Immunoreactive cell) ดังแสดงในรูปที่ 6

จากผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นมีการตายของเซลล์ไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (การตายของเซลล์ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 104.20 ± 13.82 VS 100.00 ± 3.38 , $P > 0.05$ และการตายของเซลล์ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 5 วัน VS กลุ่มควบคุม 142.50 ± 3.34 VS 100.00 ± 20.22 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 7-8)

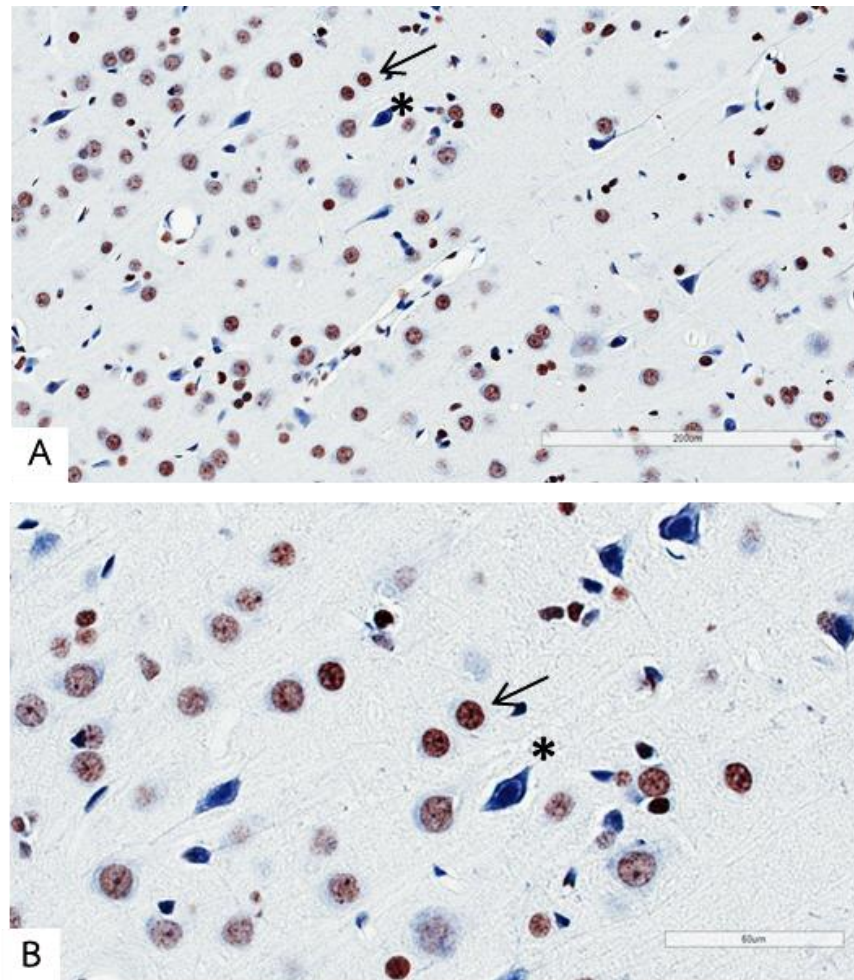
แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานกลับพบว่าการตายของเซลล์ในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (การตายของเซลล์ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 159.33 ± 4.34 VS 100.00 ± 8.58 , $P < 0.01$ และการตายของเซลล์ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 184.10 ± 9.07 VS 100.00 ± 14.90 , $P < 0.01$; ดังแสดงในรูปที่ 7-8)

โดยเมื่อเปรียบเทียบการตายของเซลล์ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วันเปรียบเทียบกับผลการตายของเซลล์ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วันแล้วพบว่าผลการตายของเซลล์ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วันสูงกว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (การตายของเซลล์ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน

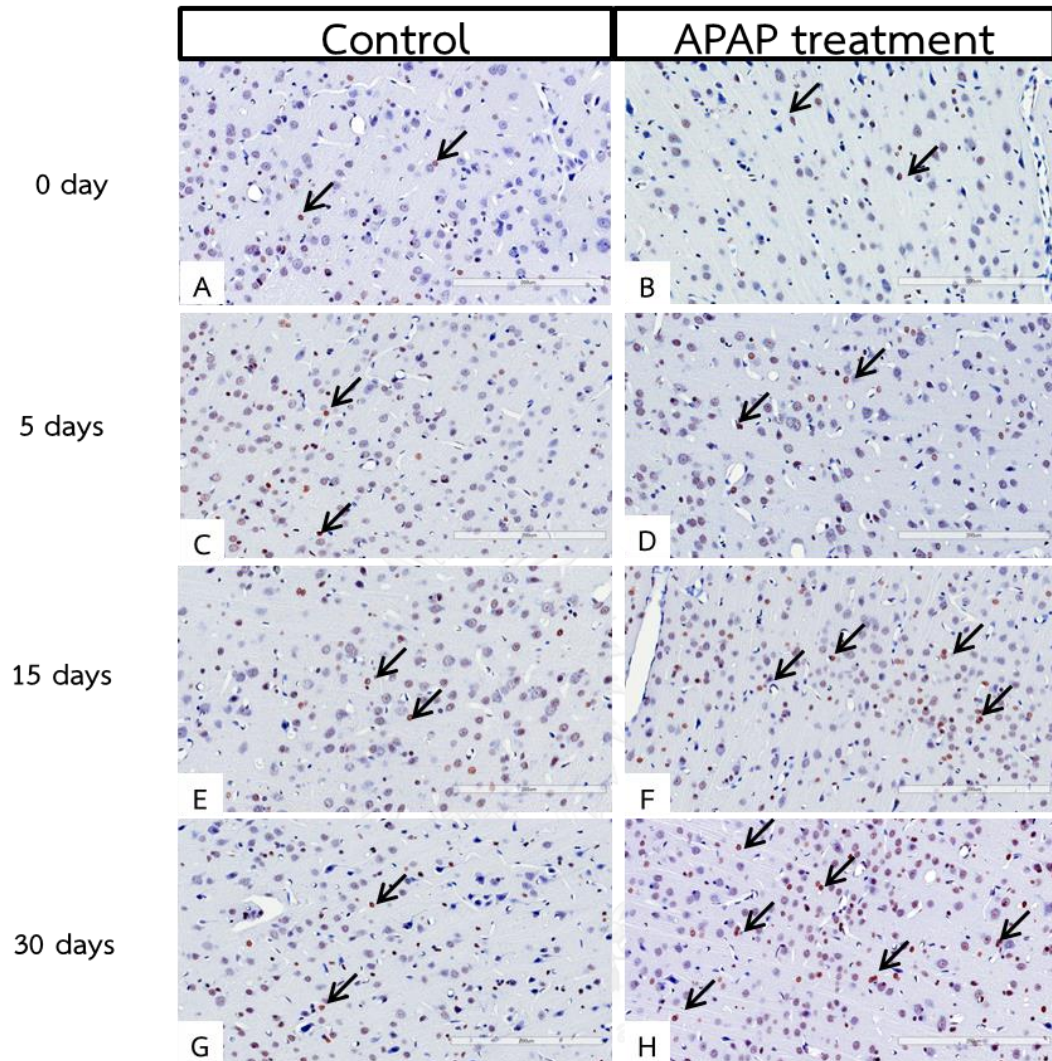
VS 0 วัน เท่ากับ 159.33 ± 4.34 VS 104.20 ± 13.82 , $P < 0.01$ และการตายของเซลล์ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 184.10 ± 9.07 VS 104.20 ± 13.82 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 7-8)

โดยจากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จะแสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้น ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ อย่างไรก็ตามการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานกลับส่งผลให้มีการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองเพิ่มมากขึ้น



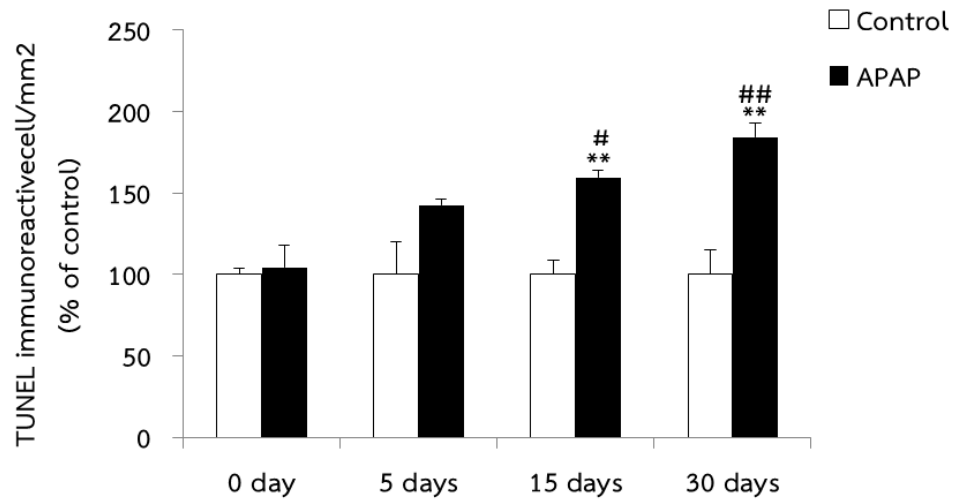


รูปที่ 6 แสดงลักษณะตัวอย่างการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองที่ถูกรวบรวมด้วยเทคนิค TUNEL assay โดยเซลล์ที่มีการตายแบบทำลายตัวเองหรือ TUNEL- immunoreactive cell จะย้อมติดสีน้ำตาลบริเวณนิวเคลียสของเซลล์ (ลูกศร) ซึ่งแตกต่างอย่างชัดเจนจากเซลล์ที่ไม่มีการตายเกิดขึ้น หรือ Negative cell (*) ดังแสดงในภาพ A และ B; Scale bar = 200 และ 60 µm ตามลำดับ



CHULALONGKORN UNIVERSITY

รูปที่ 7 แสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นและผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง โดยอาศัยเทคนิค TUNEL assay; A, C, E และ G หมายถึง กลุ่มควบคุม และ B, D, F, และ H หมายถึง กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล โดย Scale bar = 200 μ m



รูปที่ 8 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นและผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการตายของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

** P -value < 0.01 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

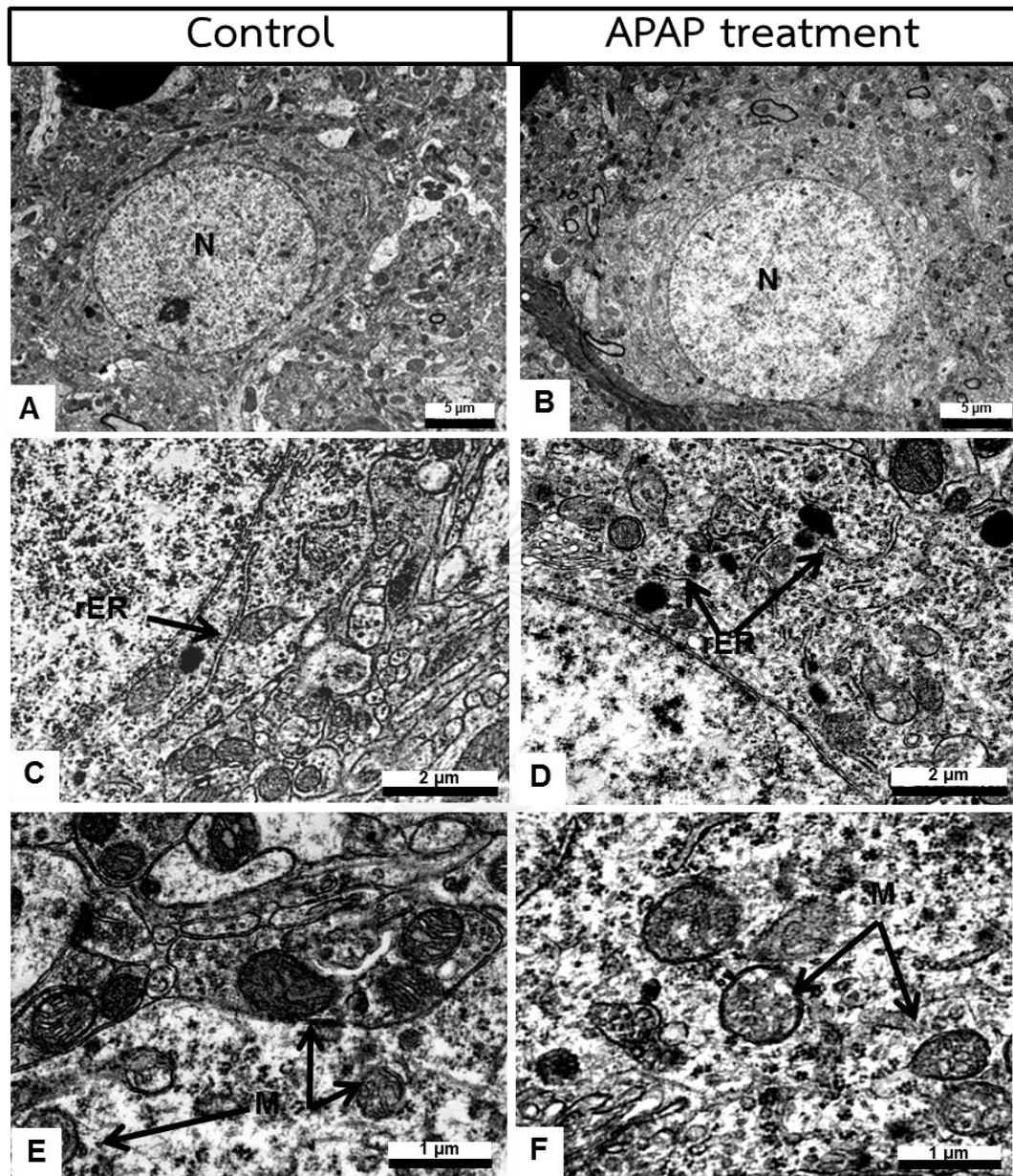
P -value < 0.01 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

4.1.3 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันต่อโครงสร้างของในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ในการศึกษาวิจัยนี้จึงทำการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน โดยผลของการศึกษาสามารถรายงานแยกเป็น 2 ส่วนได้ดังนี้

4.1.3.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นระยะเวลา 0 วันและได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะนาน 5 วัน จากนั้นนำสมองของสัตว์ทดลองมาศึกษาโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน ผลจากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาดังนั้นไม่ได้ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง โดยพบว่าโครงสร้างของเซลล์และออร์แกเนลล์ของเซลล์ประสาทที่มาจากสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 0 วันและ 5 วันไม่มีความแตกต่างจากลักษณะโครงสร้างของเซลล์และออร์แกเนลล์ต่างๆที่พบในกลุ่มควบคุม โดยผลการศึกษาพบว่าเซลล์เมมเบรนของเซลล์ยังมีความสมบูรณ์ไม่พบการฉีกขาดหรือโป่งพอง นิวเคลียสที่ตรวจพบส่วนใหญ่มีลักษณะกลมและมีการกระจายตัวของโครมาตินเป็นปกติ ดังแสดงในรูปที่ 9A และ 9B อีกทั้งออร์แกเนลล์ต่างๆภายในเซลล์อย่างเช่น ไมโทคอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัมก็มีลักษณะโครงสร้างปกติไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมโดยไม่พบการบวมหรือการขยายตัวของ cristae ดังแสดงในรูปที่ 9C-9F

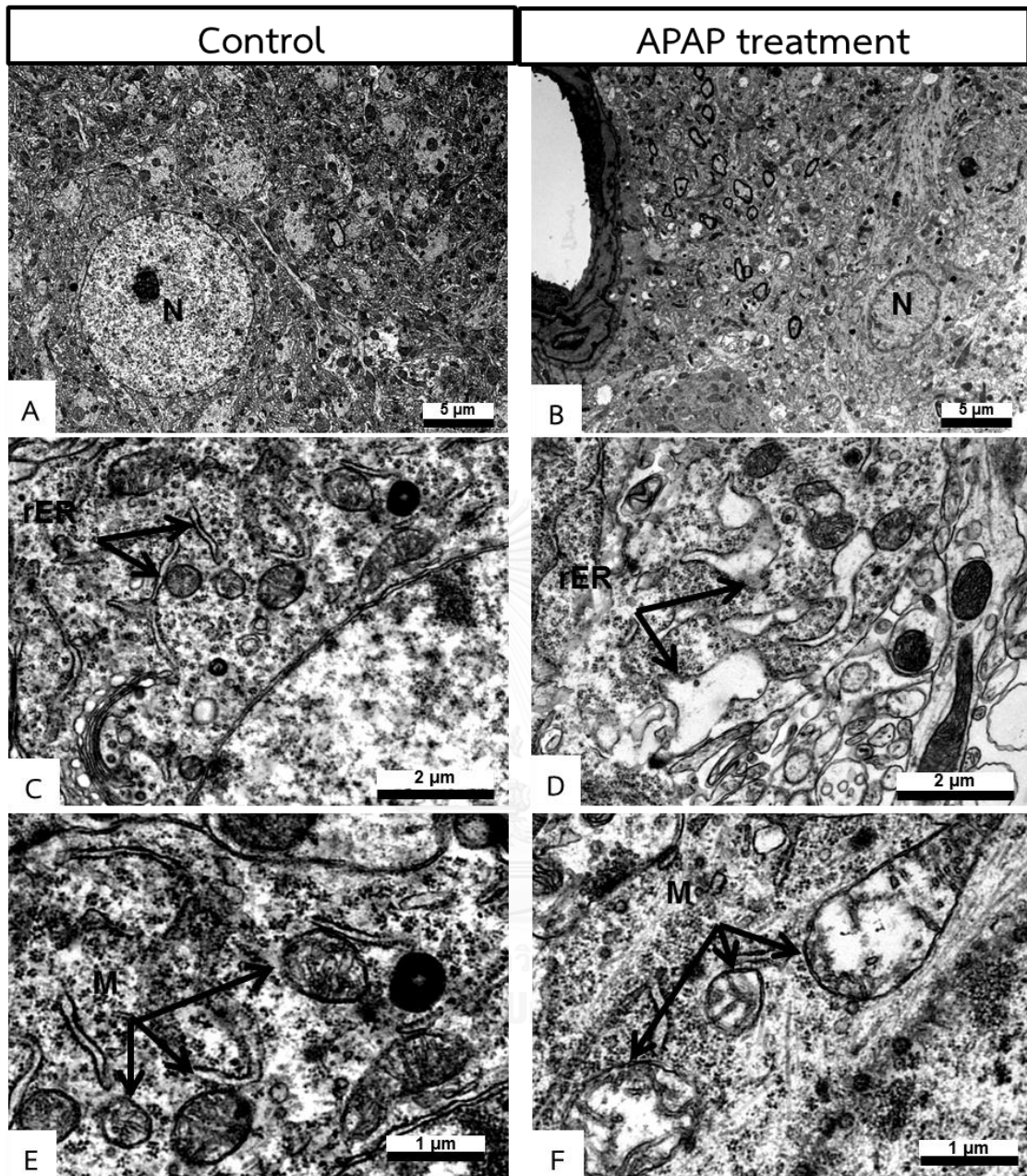


รูปที่ 9 ภาพถ่ายอิเล็กตรอน (Electron micrograph) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (A, C, E) เปรียบเทียบกับโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น (B, D, F) ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม N = นิวเคลียส, rER = เอนโดพลาสมิก เรติคิวลัมชนิดขรุขระและ M = ไมโทคอนเดรีย

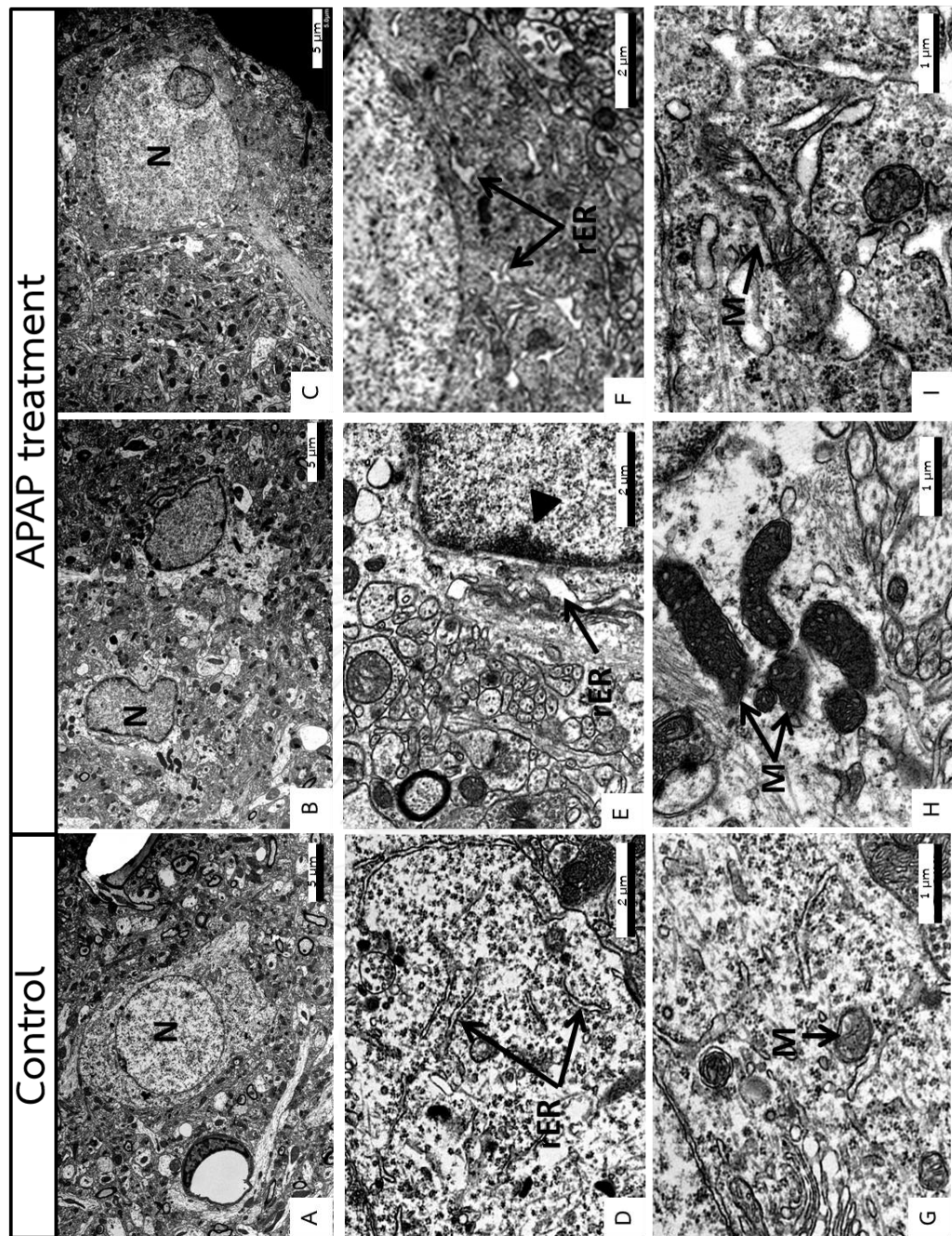
4.1.3.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วัน จากนั้นนำสมองของสัตว์ทดลองมาศึกษาโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดลำแสงส่องผ่าน ผลจากการศึกษาวิจัยแสดงให้เห็นว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 และ 30 วัน มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทที่แตกต่างอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมโดยพบว่าลักษณะของเซลล์ที่ตรวจพบมีการเกาะกลุ่มของโครมาตินบริเวณขอบของนิวเคลียสในจำนวนที่มากกว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 11H นอกจากนี้เมื่อทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงต่างๆของออร์แกเนลล์ภายในเซลล์ ก็พบว่าสามารถตรวจพบไมโทคอนเดรียที่มีการฉีกขาดบริเวณเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย ดังแสดงในรูปที่ 10F, 11H และ 11I อีกทั้งยังพบร่วมกับภาวะการบวม ดังแสดงในรูปที่ 10F และการจัดเรียงตัวของ cristae ที่ผิดปกติไปของเซลล์ประสาทที่มาจากกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 15 และ 30 วัน ดังแสดงในรูปที่ 10F และ 11I ซึ่งแตกต่างจากลักษณะที่พบในสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 10A, 10C, 10E, 11A, 11D และ 11G และผลจากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบการบวมหรือการขยายตัวของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมในเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 15 และ 30 วันมากกว่าที่พบในสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมดังแสดงในรูปที่ 10D, 11E และ 11F

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 15 และ 30 วัน พบว่าความผิดปกติของโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทที่พบในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 30 วันไม่แตกต่างสัตว์ทดลองที่ได้รับพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 15 วัน



รูปที่ 10 ภาพถ่ายอิเล็กตรอน (Electron micrograph) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน ซึ่งพบว่าการตรวจพบการโป่งพองของ rER (D) และการบวมของไมโทคอนเดรีย (F) ที่มากกว่ากลุ่มควบคุม (C, E) อย่างชัดเจน N = นิวเคลียส, rER = เอนโดพลาสมิก เรติคูลัมชนิดขรุขระและ M = ไมโทคอนเดรีย



รูปที่ 11 ภาพถ่ายอิเล็กตรอน (Electron micrograph) แสดงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองกลุ่มควบคุมเปรียบเทียบกับโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์ประสาทของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน ซึ่งพบว่าสามารถตรวจพบการกระจายตัวของโครมาทินไปยังขอบของนิวเคลียส (B) ซึ่งเป็นลักษณะที่แตกต่างไปจากกลุ่มควบคุม (A) และพบการโป่งพองของ rER (E, F) และการบวมของไมโทคอนเดรีย (H, I) ซึ่งแตกต่าง

อย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม N = นิวเคลียส, rER = เอนโดพลาสมิก เรติคิวลัมชนิด
ขรุขระ, M = ไมโทคอนเดรีย, ▲ = บริเวณที่มีการเกาะกลุ่มของโครมาทิน



4.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา ยาวนานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของ โปรตีน BDNF ในสมองของสัตว์ทดลอง การศึกษาในครั้งนี้จึงได้ทำการศึกษาการถึงผลของการ เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีน BDNF ทั้งในรูปแบบของ pro-BDNF และ mature BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง โดยอาศัยเทคนิค Western blotting ซึ่ง สามารถแบ่งอธิบายผลได้ดังนี้

4.2.1 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานและการได้รับยาพาราเซตามอล เป็นระยะเวลายาวนานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Pro-brain-derived neurotrophic factor (pro-BDNF) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการตาย ของเซลล์ สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นนำมาศึกษา ระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ด้วยเทคนิค western blotting ผลการศึกษาวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลในระยะสั้น มีระดับการ แสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับการ แสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 1.09 ± 0.07 VS 1.20 ± 0.03 , $P > 0.05$ และ ระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 1.30 ± 0.17 VS 1.42 ± 0.29 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 12)

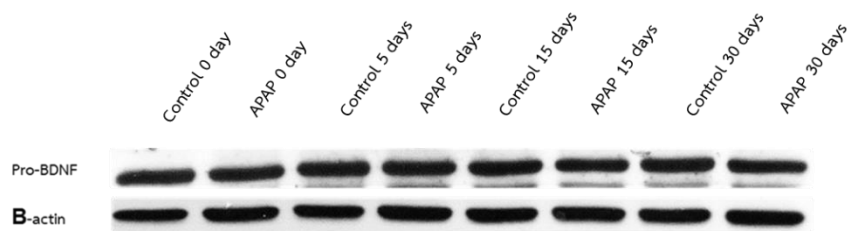
เมื่อศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานพบว่าสัตว์ทดลองใน กลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานมีระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ใน สมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมเช่นเดียวกัน (ระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.91 ± 0.04 VS 1.03 ± 0.04 , $P > 0.05$ และ ระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ในสัตว์ทดลองที่

ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ $0.92 \pm .07$ VS 0.93 ± 0.03 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 12)

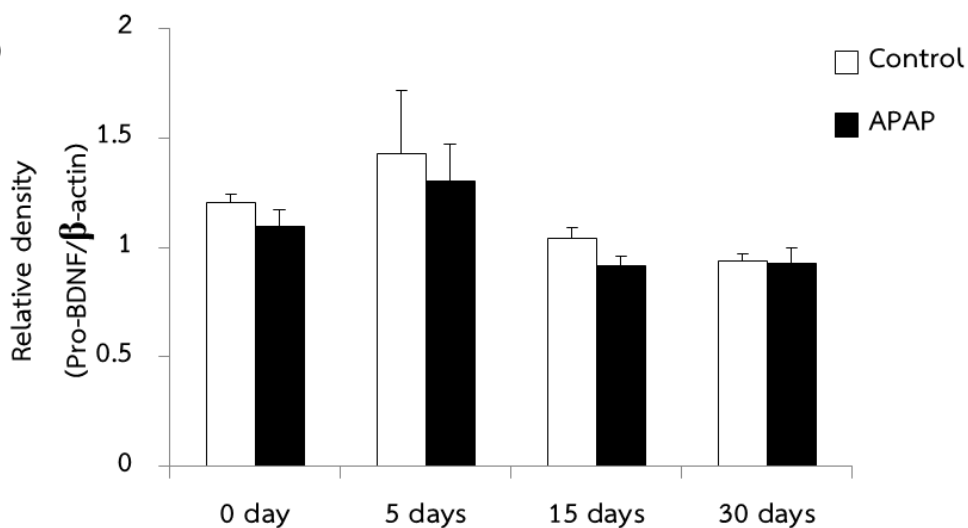
ผลการศึกษานี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลทั้งในระยะสั้นและการได้รับยาติดต่อกันเป็นเวลานานไม่มีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ของเซลล์ในสมองของสัตว์ทดลอง



(A)



(B)



รูปที่ 12 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

(A) ภาพแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF ด้วยเทคนิค western blotting ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

(B) กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของ pro-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

4.2.2 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Mature brain-derive neurotrophic factor (mature-BDNF) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

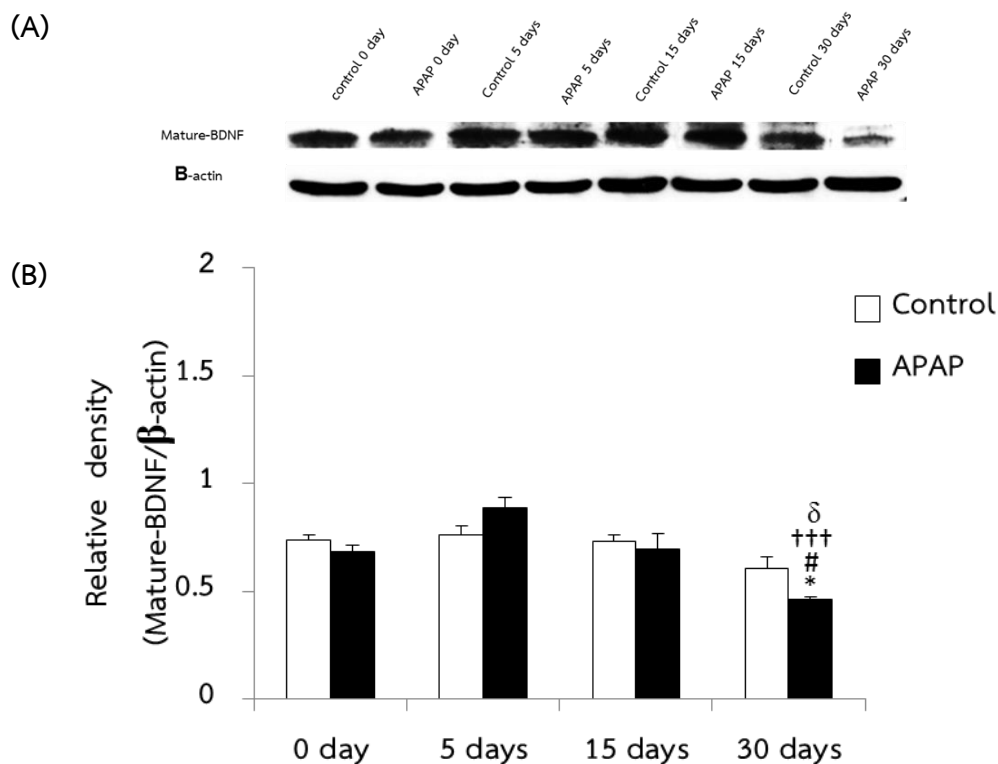
เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน Mature brain-derived neurotrophic factor (mature-BDNF) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาการของเซลล์ประสาทรวมทั้งยับยั้งการตายของเซลล์ประสาท สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นนำมาศึกษาาระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ ด้วยเทคนิค western blotting จากผลการศึกษาวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นมีระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.68 ± 0.02 VS 0.73 ± 0.02 , $P > 0.05$ และระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.88 ± 0.05 VS 0.76 ± 0.04 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 13)

นอกจากนี้สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 15 วัน มีระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุมเช่นกัน (ระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.69 ± 0.07 VS 0.73 ± 0.06 , $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 11) แต่ผลจากการศึกษาวิจัยได้พบว่าในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วันกลับพบว่าระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.46 ± 0.12 VS 0.60 ± 0.04 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 13)

โดยเมื่อเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกันพบว่ากลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอล

เป็นระยะเวลา 30 วัน มีระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาว (ระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 0.46 ± 0.012 VS 0.68 ± 0.02 , $P < 0.05$ และระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 30 วัน VS 5 วัน เท่ากับ $0.46 \pm .012$ VS 0.88 ± 0.05 , $P < 0.001$; ดังแสดงในรูปที่ 11) และยังคงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน (ระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานาน 30 วัน VS 15 วัน เท่ากับ $0.46 \pm .012$ VS 0.69 ± 0.07 , $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 13)

ดังนั้นการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นจนถึงการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วันไม่ได้ส่งผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF แต่อย่างไรก็ตามหากได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานถึง 30 ทำให้มีระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองลดลงได้



รูปที่ 13 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

(A) ภาพแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ด้วยเทคนิค western blotting ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

(B) กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับการแสดงออกของ mature-BDNF ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

* P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

+++ P -value < 0.001 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน

⊖ P -value < 0.05 เมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน

4.3 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบัลลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเกิดภาวะ oxidative stress ที่เกิดขึ้นภายในสมอง สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม จากนั้นนำมาศึกษาการเกิดภาวะ oxidative stress โดยวัดระดับ protein carbonyl ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้การเกิด protein oxidation จากผลการวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาดังกล่าวมีระดับ protein carbonyl ไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.56 ± 0.04 VS 0.48 ± 0.02 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P > 0.05$ และ ระดับของ protein carbonyl ในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.51 ± 0.05 VS 0.61 ± 0.08 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 14)

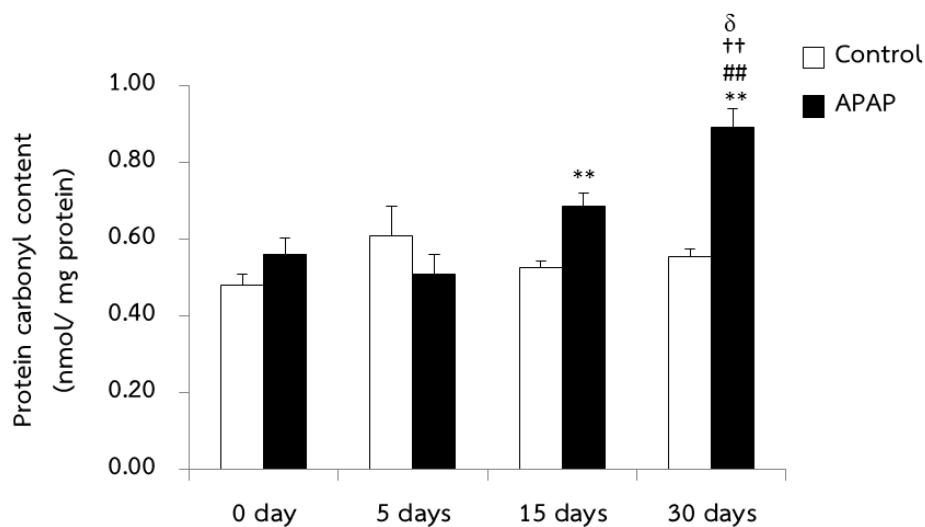
แต่อย่างไรก็ตามผลจากการวิจัยในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานกลับพบว่าระดับของ protein carbonyl ที่บ่งชี้ถึงการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในสมองเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับของ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.68 ± 0.03 VS 0.53 ± 0.02 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P < 0.01$ และระดับของ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 0.89 ± 0.05 VS 0.55 ± 0.02 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P < 0.01$; ดังแสดงในรูปที่ 14)

โดยเมื่อเปรียบเทียบระดับ protein carbonyl ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วันเปรียบเทียบกับระดับ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาดังกล่าวแล้วพบว่าระดับ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วันมีค่าสูงกว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ระดับ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 0.89 ± 0.05 VS 0.55 ± 0.04 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P < 0.01$ และระดับ

protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 5 วัน เท่ากับ 0.89 ± 0.05 VS 0.51 ± 0.05 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P < 0.01$) และยังสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน (ระดับ protein carbonyl ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 15 วัน เท่ากับ 0.89 ± 0.05 VS 0.68 ± 0.04 นาโนโมลต่อมิลลิกรัมโปรตีน, $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 14)

จากผลการศึกษาวิจัยสามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลาสั้นไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงระดับ protein carbonyl ในสมอง ขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลาที่ยาวนานขึ้นกลับส่งผลให้ระดับ protein carbonyl ของเซลล์ในสมองเพิ่มสูงขึ้น





รูปที่ 14 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับ protein carbonyl ของ เซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

** P -value < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

P -value < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน

†† P -value < 0.01 เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน

δ P -value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน

4.4 ผลของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นและการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานต่อระดับกลูต้าไธโอน (Glutathione) ของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

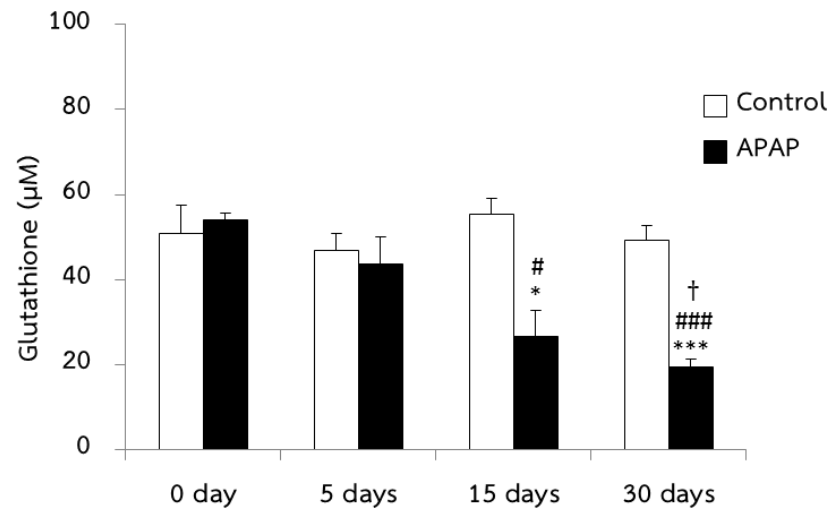
กลูต้าไธโอนคือสารต้านอนุมูลอิสระโดยมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของยาพาราเซตามอล หลังจากที่ยาพาราเซตามอลถูกเมตาบอลิซึมด้วยเอนไซม์ CYP2E1 จนได้เป็นสารตัวกลางคือ NAPQI ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ จากนั้น NAPQI จะถูกทำให้หมดความเป็นพิษโดยการรวมตัวกับกลูต้าไธโอนที่อยู่ภายในเซลล์แล้วกำจัดออกจากร่างกายผ่านทางระบบปัสสาวะ เพื่อเป็นการศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของระดับกลูต้าไธโอนในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ สัตว์ทดลองจะได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 200 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม เป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน จากนั้นนำสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลองมาวิเคราะห์ถึงการเปลี่ยนแปลงระดับของกลูต้าไธโอน ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยพบว่าสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะสั้นมีระดับของกลูต้าไธโอนในสมองไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับของกลูต้าไธโอนในสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 53.94 ± 1.74 ไมโครโมลาร์ VS 50.87 ± 6.69 ไมโครโมลาร์, $P < 0.05$ และ ระดับของ กลูต้าไธโอนในสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 5 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 43.48 ± 6.49 ไมโครโมลาร์ VS 46.73 ± 3.95 ไมโครโมลาร์, $P > 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 15)

อย่างไรก็ตามจากการศึกษาผลการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานพบว่า สัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานมีระดับของกลูต้าไธโอนในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม (ระดับของกลูต้าไธโอน ในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 26.58 ± 6.10 ไมโครโมลาร์ VS 55.39 ± 3.61 ไมโครโมลาร์, $P < 0.05$; และระดับของกลูต้าไธโอนในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS กลุ่มควบคุม เท่ากับ 19.43 ± 1.78 ไมโครโมลาร์ VS 49.16 ± 1.78 ไมโครโมลาร์, $P < 0.001$; ดังแสดงในรูปที่ 15)

เมื่อทำการเปรียบเทียบระดับของกลูต้าไธโอนในสมองของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงเวลาที่แตกต่างกันพบว่ากลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน มีระดับ

ของ กลูต้าไธโอนในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับ ยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 0 วัน (ระดับของกลูต้าไธโอนของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 15 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 26.59 ± 6.11 ไมโครโมลาร์ VS 53.95 ± 1.75 ไมโครโมลาร์, $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 14) นอกจากนี้ผลการวิจัยยังพบอีกว่าสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับ ยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วันมีระดับของ กลูต้าไธโอนในสมองลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น (ระดับของกลูต้าไธโอนของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 0 วัน เท่ากับ 19.43 ± 1.79 ไมโครโมลาร์ VS 53.95 ± 1.75 ไมโครโมลาร์, $P < 0.05$ และระดับของกลูต้าไธโอนของสัตว์ทดลองในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 30 วัน VS 5 วัน เท่ากับ 19.43 ± 1.79 ไมโครโมลาร์ VS 43.49 ± 6.49 ไมโครโมลาร์, $P < 0.05$; ดังแสดงในรูปที่ 15)

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น ไม่ได้ส่งผลต่อระดับกลูต้าไธโอนในสมอง แต่อย่างไรก็ตามการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่ยาวนานกลับส่งผลให้ระดับกลูต้าไธโอนของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ลดลง



รูปที่ 15 กราฟแสดงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อระดับกลูต้าไธโอนของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัมคอร์เท็กซ์ของสัตว์ทดลอง

* P -value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

*** P -value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

P -value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน

P -value < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 0 วัน

† P -value < 0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอล 5 วัน

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

จากผลการศึกษาวิจัยในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในช่วงระยะเวลาที่แตกต่างกันส่งผลกระทบต่อเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์แตกต่างกัน โดยพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นนั้นไม่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมอง แต่อย่างไรก็ตามหากได้รับยาเป็นระยะเวลาที่ยาวนานกลับส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมอง โดยพบว่ามี การตายของเซลล์เพิ่มมากขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการเกิดภาวะ oxidative stress ที่เพิ่มสูงขึ้นในสมอง บริเวณดังกล่าวอีกด้วย

จากการศึกษาวิจัยสามารถบ่งชี้ได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น (0 และ 5 วัน) ไม่มีผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ โดยพบว่า สัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น มีอัตราการตายของเซลล์และระดับการ แสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์แบบทำลาย ตัวเอง (apoptosis) ไม่แตกต่างจากสัตว์ทดลองในกลุ่มควบคุม ผลจากการศึกษาดังกล่าวนี้ได้สัมพันธ์ ไปกับผลจากการศึกษาโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ โดยพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็น ระยะเวลาสั้นนั้นไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์ อันประกอบไปด้วย นิวเคลียส ไมโท คอนเดรีย เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และรวมไปถึงเยื่อหุ้มเซลล์ที่ยังคงสภาพสมบูรณ์ ดังนั้นการได้ยา พาราเซตามอลในระยะสั้นไม่ส่งผลกระทบให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมอง

นอกจากนี้ยังมีหลักฐานจากหลายๆงานวิจัยบ่งชี้ว่าการอยู่รอดและการตายของเซลล์ในระบบ ประสาทมีความเกี่ยวข้องกับโปรตีนในกลุ่ม Neutrophin ชนิดหนึ่ง ได้แก่ โปรตีน BDNF ซึ่งนอกจาก มีบทบาทสำคัญต่อการเจริญเติบโต การเปลี่ยนแปลงรูปร่าง การอยู่รอด และการตายของเซลล์ใน ระบบประสาทแล้ว BDNF ยังมีบทบาทที่สำคัญในการปกป้องเซลล์จากภาวะอันตรายต่อเซลล์ใน ระบบประสาทอีกด้วย (19, 60) โดยการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงระดับ การแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมอง แล้วพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะสั้นไม่ส่งผล ให้มีการเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของโปรตีน BDNF ในสมอง ดังนั้นผลจากการศึกษาในส่วนนี้ จึงสนับสนุนข้อสรุปที่ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น ไม่ส่งผลกระทบต่อ การเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมอง

จากการสืบค้นข้อมูลที่ผ่านมาทำให้ทราบว่าภายหลังจากการที่ร่างกายได้รับยาพาราเซตามอลแล้ว ส่วนหนึ่งของยานี้สามารถถูกเมตาบอลิท์ด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ซึ่งการทำปฏิกิริยาของยา

พาราเซตามอลและเอนไซม์ดังกล่าวจะทำให้ได้สารตัวกลางชนิดหนึ่งคือ NAPQI ซึ่งเป็นสารที่มีคุณสมบัติเป็นพิษต่อเซลล์ แต่สารตัวกลางนี้สามารถถูกจัดความเป็นพิษได้ด้วยการทำปฏิกิริยากับกลูต้าไธโอนซึ่งเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ภายในเซลล์ จึงทำให้ไม่เกิดภาวะเป็นพิษต่อเซลล์ (28, 29) ดังนั้นการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 จึงถือว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญของกลไกการก่อความเป็นพิษของยาพาราเซตามอล และจากการสืบค้นข้อมูลเพิ่มเติมนั้น ทำให้ทราบว่า มีงานวิจัยจำนวนหนึ่งที่ได้รายงานว่าการแสดงออกของเอนไซม์ CYP2E1 ในหลายๆอวัยวะ เช่น ตับ หัวใจ และปอด (4, 5) และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่ามีค้นพบการแสดงออกของเอนไซม์ชนิดนี้ในสมองอีกด้วย โดยเอนไซม์ชนิดนี้ได้มีการกระจายตัวอยู่ในเซลล์หลากหลายชนิดด้วยกัน ได้แก่ เซลล์ประสาท แอสโตรไซต์ ไมโครเกลีย และเอนโดทีเลียม (8, 9) ซึ่งทำให้เชื่อได้ว่าหากมีการกระจายตัวของยาพาราเซตามอลไปยังสมองได้ ยาชนิดนี้จะถูกเอนไซม์ CYP2E1 ในสมองเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของสารพิษ NAPQI ในบริเวณสมองเช่นเดียวกัน และจากการสืบค้นงานวิจัยที่ผ่านมาทำให้ผู้วิจัยได้ทราบว่ายาพาราเซตามอลมีคุณสมบัติในการซึมผ่านชั้น blood-brain-barrier ได้เป็นอย่างดี (11) ดังนั้นหากมีการได้รับยาพาราเซตามอลเข้าสู่ร่างกายแล้วยานี้สามารถกระจายตัวไปตามระบบไหลเวียนโลหิตไปจนถึงบริเวณสมองได้และสามารถถูกเมตาบอลิซึมด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ในเซลล์ชนิดต่างๆที่มีอยู่ในสมองดังกล่าวไว้ในข้างต้น

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้บ่งชี้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นนั้นไม่ก่อให้เกิดภาวะ oxidative stress เนื่องจากพบว่าในสมองของสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลในระยะสั้นมีระดับของกลูต้าไธโอน และ Protein carbonyl ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าตัวยานี้ได้ถูกเมตาบอลิซึมด้วยเอนไซม์ CYP2E1 และเปลี่ยนไปเป็นสารตัวกลาง NAPQI ได้ในปริมาณที่สามารถถูกจับทำลายด้วยสารต้านอนุมูลอิสระ glutathione ได้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับรายงานจากองค์การอาหารและยาที่ได้เสนอว่ายาพาราเซตามอลเป็นยาที่มีความปลอดภัยสูงเนื่องจากมีผลข้างเคียงที่น้อยมากเมื่อใช้ในปริมาณที่ใช้ในการรักษา (4 กรัมต่อวัน) (Food and Drug administration [FDA], 2007) (61) ซึ่งผลจากการศึกษานี้ก็ได้สนับสนุนสมมติฐานของงานวิจัยที่ผ่านมาว่าการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดที่ใช้ในการรักษาในระยะเวลาสั้นไม่ก่อให้เกิดผลข้างเคียงที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ในสมอง และนอกจากการใช้ในปริมาณที่พอดีจะไม่ส่งผลกระทบต่อให้เกิดอันตรายหรือก่อให้เกิดผลข้างเคียงแล้ว ยังมีการรายงานอีกว่ายาพาราเซตามอลยังมีฤทธิ์ในการปกป้องเซลล์จากภาวะที่อันตรายได้อีกด้วย โดยจากการศึกษาของ Baliga และคณะในปี 2010 พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลสามารถลดการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองผ่านวิถีไมโทครอนเดรียและสามารถป้องกันมิให้ไมโทครอนเดรียได้รับความเสียหายได้ (37) และในปี 2006 ได้มีคณะผู้วิจัยรายงานว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในขนาดที่ใช้ในการรักษาสามารถลดการเกิดสารอนุมูลอิสระซูเปอร์ออกไซด์ภายในเซลล์ได้เช่นกัน (42)

อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้น (15 และ 30 วัน) ให้ผลที่แตกต่างออกไปจากการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลาสั้น โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นนั้นสามารถเหนี่ยวนำให้มีการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องไปกับการตรวจพบระดับการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 ที่เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อีกทั้งเมื่อศึกษาถึงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ก็พบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในระดับจุลภาคโดยพบว่าการฉีกขาดของเยื่อหุ้มเซลล์ การเกาะตัวกันของโครมาตินที่บริเวณขอบของนิวเคลียส การขยายตัวของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม อีกทั้งยังมีการบวมพองของไมโทคอนเดรียอีกด้วย ภาวะความผิดปกติของเซลล์ในสมองเหล่านี้ถูกพบควบคู่ไปกับการลดลงของ mature-BDNF ในระยะเวลาสั้น 30 วัน แต่ไม่ได้มีผลกระทบต่อแสดงออกของโปรตีน pro-BDNF โดยกลไกที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองบริเวณซีรีบรัลคอร์เท็กซ์ที่พบนั้นน่าจะเกิดพร้อมกันกับการเกิด oxidative stress จากการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่ยาวนานซึ่งสอดคล้องไปผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งใหม่ที่พบว่าระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้นพร้อมกับมีระดับกลูต้าไธโอนภายในเซลล์ที่ลดลง

จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่ายาพาราเซตามอลสามารถถูกเมตาบอไลต์ด้วยเอนไซม์ CYP2E1 ที่มีการแสดงออกในเซลล์ต่างๆให้เป็นสารตัวกลางที่เป็นพิษคือ NAPQI ในสมองได้ ในกรณีที่ได้รับยาพาราเซตามอลต่อเนื่องเป็นระยะเวลาสั้นจะทำให้มีการสร้างสาร NAPQI อย่างต่อเนื่องในสมองจนกระทั่งปริมาณของสารกลูต้าไธโอนภายในเซลล์มีไม่เพียงพอต่อการทำปฏิกิริยาเพื่อลดความเป็นพิษของ NAPQI ได้หมด จึงส่งผลให้มีการคั่งค้างของสาร NAPQI และยังคงส่งผลให้มีระดับของกลูต้าไธโอนลดลงไปอีกด้วย ทั้งปริมาณของ NAPQI ที่เพิ่มสูงขึ้นประกอบกับระดับกลูต้าไธโอนที่ลดลงสามารถนำไปสู่การเกิดภาวะ oxidative stress ได้ (28, 29) ซึ่งผลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้ได้สอดคล้องไปกับทฤษฎีข้างต้น โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นส่งผลให้ระดับกลูต้าไธโอนในสมองลดลง ซึ่งบ่งชี้ถึงการเพิ่มขึ้นของ NAPQI ในสมอง และผลจากการศึกษา ระดับของ protein carbonyl ที่บ่งชี้ถึงการเกิด protein oxidation ในสมอง ก็ได้สอดคล้องไปกับการเปลี่ยนแปลงของ glutathione เช่นเดียวกัน โดยพบว่า การได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นทำให้มีระดับ protein carbonyl เพิ่มขึ้นในสมอง ดังนั้น จึงสามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาสั้นสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ในสมองได้

จากหลักฐานของงานวิจัยต่างๆนั้นทำให้เป็นที่ยอมรับกันดีว่าการเกิดภาวะ oxidative stress เป็นปัจจัยกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองได้ โดยได้มีการรายงานว่าสารอนุมูลอิสระต่างๆที่เกิดขึ้นในระหว่างการเกิดภาวะ oxidative stress สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติภายในเซลล์ รวมถึงการเปลี่ยนแปลงบริเวณเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรีย ซึ่งทำให้คุณสมบัติของการเป็น

เยื่อเลือกผ่านของไมโทคอนเดรียถูกทำลายไป ส่งผลให้ออร์แกนอลนี้มีลักษณะบวมพองเกิดขึ้น นอกจากนี้ความเสียหายของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียยังส่งผลให้มีการรั่วไหลของสาร cytochrome c ออกมาจากไมโทคอนเดรียสู่บริเวณไซโตพลาซึม สาร cytochrome c เป็นโปรตีนควบคุมที่มีการเปลี่ยนรูปร่างก่อนที่จะเกิดกระบวนการตายแบบทำลายตัวเอง เมื่อ cytochrome c ถูกปล่อยออกมาสู่บริเวณไซโตพลาซึมแล้วจะเข้าจับกับโปรตีน Apaf-1 และจับกับโปรตีน pro-caspase-9 โดยมีการอาศัยพลังงาน ATP ร่วมด้วยแล้วเกิดเป็นโครงสร้างเชิงซ้อนที่เรียกว่าอะพอพโทโซม (apoptosome) และอะพอพโทโซมจะย่อย pro-caspase-9 ไปเป็นเอนไซม์รูปที่ทำงานได้คือ caspase-9 ซึ่งเอนไซม์ชนิดนี้จะไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ caspase-3 ให้เริ่มกระบวนการการตายแบบทำลายตัวเองต่อไป (51) ซึ่งผลที่ได้จากการการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ก็ได้สนับสนุนทฤษฎีในข้างต้น โดยผลจากการวิจัยได้พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาานานส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ประสาท โดยการเปลี่ยนแปลงอย่างหนึ่งที่ได้เห็นได้ชัดเจนคือลักษณะการบวมพองของไมโทคอนเดรียซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าเยื่อหุ้มของไมโทคอนเดรียมีการสูญเสียสภาพการทำงานไป ทำให้ไม่สามารถควบคุมการไหลเข้าออกของสารต่างๆภายในเซลล์ได้ ดังนั้นการที่พบว่ามี การตายแบบทำลายตัวเองของเซลล์ในสมองเพิ่มขึ้นหลังจากการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาานาน อาจเป็นผลมาจากการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์ที่เหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย จนอาจส่งผลให้มีการรั่วไหลของสาร cytochrome c ออกจากไมโทคอนเดรียมาสู่บริเวณไซโตพลาซึม และไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการตายแบบทำลายตัวเองของเซลล์ ซึ่งสัมพันธ์ไปกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาานานส่งผลให้มีการเพิ่มสูงขึ้นของเอนไซม์ caspase-3 ในสมอง ผลจากการวิจัยในส่วนนี้ได้สอดคล้องกับงานวิจัยก่อนหน้านี้ที่ได้ศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเกินขนาดต่อการตายของเซลล์ประสาท โดยงานศึกษาวิจัยของ Posadas และคณะ ในปี 2010 รายงานว่าทั้งเซลล์ประสาทเพาะเลี้ยงของหนูแรทที่ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล (1 และ 2 มิลลิโมลาร์) และในสมองของหนูแรทที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่สูงเกินกว่าขนาดที่ใช้ในการรักษา (250 และ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม) นั้น มีระดับของสารอนุมูลอิสระเพิ่มมากขึ้น รวมถึงมีการลดลงของกลูตาไธโอนภายในเซลล์ อีกทั้งยังพบการแสดงออกของเอนไซม์ caspase-3 เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งสัมพันธ์กับอัตราการตายแบบทำลายตัวเองของเซลล์ประสาทที่เพิ่มสูงขึ้น (10) และจากงานศึกษาวิจัยของ da Silva ในปี 2012 ที่ได้รายงานว่าการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 600 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมซึ่งถือเป็นขนาดที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมพองของไมโทคอนเดรีย และมีการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ ประกอบกับมีระดับกลูตาไธโอนภายในเซลล์ลดลง อีกทั้งยังส่งผลให้เซลล์มีอัตราการอยู่รอดลดลง (43) นอกจากนี้ ยังมีกลุ่มวิจัยที่ได้ทำการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาานานต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ประสาทเช่นกัน โดยในงานวิจัยของ Fakunle

และคณะในปี 2011 ได้รายงานว่าการได้รับยาพาราเซตามอลขนาด 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมเป็นระยะเวลา 6 สัปดาห์ สามารถเหนี่ยวนำให้มีการบาดเจ็บของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส และความเสียหายดังกล่าวจะทวีความรุนแรงมากยิ่งขึ้นเมื่อได้รับยาพาราเซตามอลร่วมกับการได้รับแอลกอฮอล์ (16) ดังนั้นจึงสามารถสรุปได้ว่าภาวะความเป็นพิษต่อเซลล์ประสาทที่เกิดจากการได้รับยาพาราเซตามอลถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นได้ทั้งจากการที่ได้รับยาในปริมาณที่มากเกินไปและการได้รับยาต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน โดยกลไกที่สำคัญประการหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของยาพาราเซตามอลต่อเซลล์ประสาทนั้นคือการเกิดภาวะ oxidative stress ในสมอง

จากการสืบค้นงานวิจัยพบว่าการเปลี่ยนแปลงระดับของโปรตีน BDNF มีความซับซ้อนและขึ้นอยู่กับหลายๆปัจจัยและปัจจัยที่สำคัญประการหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อการสร้างโปรตีนดังกล่าวคือ การเกิดภาวะ oxidative stress โดยมีหลักฐานยืนยันจากงานวิจัยของ Wu และคณะในปี 2004 ที่พบว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ส่งผลให้มีระดับ BDNF mRNA และโปรตีน BDNF ลดลง (62) และจากการศึกษาวิจัยของ Xei ในปี 2010 ก็ได้รายงานว่าหนู mouse ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress โดยใช้ chronic intermittent hypoxia (IH) model มีการแสดงออกของโปรตีน BDNF ลดลง (63) นอกจากนี้ในกลุ่มคณะผู้วิจัยเดียวกันก็ได้รายงานถึงผลการศึกษาวิจัยโดยพบว่าภาวะ IH ไม่ได้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระดับ pro-BDNF แต่เหนี่ยวนำให้มีการลดการแสดงออกของโปรตีน plasmin ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีบทบาทในการเปลี่ยน pro-BDNF ให้อยู่ในรูปของ mature-BDNF ดังนั้นคณะผู้วิจัยกลุ่มนี้จึงได้สรุปว่าการลดการแสดงออกของ BDNF นี้ น่าจะเกี่ยวข้องกับโปรตีน plasmin ที่อยู่ในกระบวนการ proteolytic cleavage จาก pro-BDNF มาเป็น mature-BDNF มากกว่าการเปลี่ยนแปลงในระดับยีน ผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ได้สนับสนุนข้อสันนิษฐานของงานวิจัยที่ได้กล่าวมาแล้วในข้างต้น โดยพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลานานได้เหนี่ยวนำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งสัมพันธ์ไปกับระดับการแสดงออกของโปรตีน mature BDNF ที่ลดลง ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าการเกิดภาวะ oxidative stress เป็นสาเหตุของการยับยั้งการสร้างโปรตีน BDNF ในสมอง และปรากฏการณ์ดังกล่าวนี้ส่งผลให้กลไกการปกป้องเซลล์จากภาวะอันตรายต่างๆ ลดน้อยถอยลง จึงทำให้มีการตายของเซลล์ในสมองเพิ่มสูงขึ้น

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าระยะเวลาของการได้รับยาพาราเซตามอลถือเป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งสอดคล้องไปกับผลการศึกษาวิจัยที่พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลายาวนานไม่ได้ส่งผลกระทบต่อเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมอง แต่การได้รับยาชนิดนี้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานแม้จะเป็นขนาดของยาที่ใช้ในการรักษาก็ตามกลับเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในสมองโดยมีการตายของเซลล์แบบทำลายตัวเองในสมองเพิ่มสูงขึ้นและลดแสดงออกของโปรตีน mature-BDNF ลงโดยเชื่อว่ากลไกที่ก่อให้เกิดการ

เปลี่ยนแปลงดังกล่าวนี้ น่าจะเป็นผลมาจากการเกิดภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์อันเนื่องมาจากการได้รับยาพาราเซตามอลต่อเนื่องเป็นระยะเวลานาน ดังนั้นผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้จึงน่าจะใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเฝ้าระวังอันตรายที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาพาราเซตามอลติดต่อกันเป็นระยะเวลานานต่อไป



รายการอ้างอิง

1. Bolesta S, Haber SL. Hepatotoxicity associated with chronic acetaminophen administration in patients without risk factors. *Ann Pharmacother.* 2002;36:331-3.
2. Kurtovic J, Riordan SM. Paracetamol-induced hepatotoxicity at recommended dosage. *J Intern Med.* 2003;253:240-3.
3. Larson AM. Acetaminophen hepatotoxicity. *Clin Liver Dis.* 2007;11:525-48, vi.
4. Vieira I, Pasanen M, Raunio H, Cresteil T. Expression of CYP2E1 in human lung and kidney during development and in full-term placenta: a differential methylation of the gene is involved in the regulation process. *Pharmacol Toxicol.* 1998;83:183-7.
5. Elbekai RH, El-Kadi AO. Cytochrome P450 enzymes: central players in cardiovascular health and disease. *Pharmacol Ther.* 2006;112:564-87.
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. 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.
8. Zimatkin SM, Rout UK, Koivusalo M, Buhler R, Lindros KO. Regional distribution of low-K_m mitochondrial aldehyde dehydrogenase in the rat central nervous system. *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 1992;16:1162-7.
9. Haorah J, Knipe B, Leibhart J, Ghorpade A, Persidsky Y. Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. *J Leukoc Biol.* 2005;78:1223-32.
10. Posadas I, Santos P, Blanco A, Munoz-Fernandez M, Cena V. Acetaminophen induces apoptosis in rat cortical neurons. *PLoS ONE.* 2010;5:e15360.
11. Fischer LJ, Green MD, Harman AW. Levels of acetaminophen and its metabolites in mouse tissues after a toxic dose. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1981;219:281-6.

12. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. *J Neuroinflammation*. 2009;6:10.
13. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative stress. *Microvasc. Res*. 2009;77:289-96.
14. Maharaj H, Maharaj DS, Daya S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against oxidative neurotoxicity. *Metab Brain Dis*. 2006;21:189-99.
15. Nencini C, Giorgi G, Micheli L. Protective effect of silymarin on oxidative stress in rat brain. *Phytomedicine*. 2007;14:129-35.
16. 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.
17. Supornsilpchai W, le Grand SM, Srikiatkachorn A. Cortical hyperexcitability and mechanism of medication-overuse headache. *Cephalalgia*. 2010;30:1101-9.
18. Yisarakun W, Supornsilpchai W, Chantong C, Srikiatkachorn A , le Grand SM. Chronic paracetamol treatment increases alterations in cerebral vessel in cortical spreading depression model. *Microvasc. Res.* 2014;94:36-46
19. Han BH, D'Costa A, Back SA, Parsadarian M, Patel S, Shah AR, et al. BDNF blocks caspase-3 activation in neonatal hypoxia-ischemia. *Neurobiol. Dis*. 2000;7:38-53.
20. Viberg H, Eriksson P, Gordh T, Fredriksson A. Paracetamol (acetaminophen) administration during neonatal brain development affects cognitive function and alters its analgesic and anxiolytic response in adult male mice. *Toxicol Sci*. 2014;138:139-47.
21. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. *FASEB J*. 2008;22:659-61.
22. Mund ME QD, Gyo C, Brüggmann D, Groneberg DA. Paracetamol as a toxic substance for children: aspects of legislation in selected countries. *J Occup Med Toxicol*. 2015;10.

23. Nassini R, Materazzi S, Andre E, Sartiani L, Aldini G, Trevisani M, et al. Acetaminophen, via its reactive metabolite N-acetyl-p-benzo-quinoneimine and transient receptor potential ankyrin-1 stimulation, causes neurogenic inflammation in the airways and other tissues in rodents. *FASEB J.* 2010;24:4904-16.
24. Pickering G, Lorient MA, Libert F, Eschalier A, Beaune P, Dubray C. Analgesic effect of acetaminophen in humans: first evidence of a central serotonergic mechanism. *Clin Pharmacol Ther.* 2006;79:371-8.
25. Graham GG, Scott KF. Mechanism of action of paracetamol. *Am J Ther.* 2005;12:46-55.
26. Bjorkman R, Hallman KM, Hedner J, Hedner T, Henning M. Acetaminophen blocks spinal hyperalgesia induced by NMDA and substance P. *Pain.* 1994;57:259-64.
27. MB BChir Barney Ward FJMA-W. Paracetamol revisited: A review of the pharmacokinetics and pharmacodynamics. *Acute Pain.* 1999;2:139-49
28. Kon K, Kim JS, Jaeschke H, Lemasters JJ. Mitochondrial permeability transition in acetaminophen-induced necrosis and apoptosis of cultured mouse hepatocytes. *Hepatology.* 2004;40:1170-9.
29. Heard KJ. Acetylcysteine for acetaminophen poisoning. *N Engl J Med.* 2008;359:285-92.
30. 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.
31. Wu M, Desai DH, Kakarla SK, Katta A, Paturi S, Gutta AK, et al. Acetaminophen prevents aging-associated hyperglycemia in aged rats: effect of aging-associated hyperactivation of p38-MAPK and ERK1/2. *Diabetes Metab Res Rev.* 2009;25:279-86.
32. Freitas M, Costa VM, Ribeiro D, Couto D, Porto G, Carvalho F, et al. Acetaminophen prevents oxidative burst and delays apoptosis in human neutrophils. *Toxicol. Lett.* 2013;219:170-7.
33. van der Kraan PM, Vitters EL, de Vries BJ, van den Berg WB, van de Putte LB. The effect of chronic paracetamol administration to rats on the glycosaminoglycan content of patellar cartilage. *Agents and actions.* 1990;29:218-23.

34. Curhan GC BA, Hankinson SE, Willett WC, Speizer FE, Stampfer MJ. Frequency of use of acetaminophen, nonsteroidal anti-inflammatory drugs, and aspirin in US women. *Pharmacoepidemiol Drug Saf.* 2002;11:687-93.
35. Forman JP RE, Curhan GC. Frequency of analgesic use and risk of hypertension among men. *Arch Intern Med.* 2007;26:394-9.
36. Tripathy D, Sanchez A, Yin X, Martinez J, Grammas P. Age-related decrease in cerebrovascular-derived neuroprotective proteins: effect of acetaminophen. *Microvasc. Res.* 2012;84:278-85.
37. 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.
38. Posadas I, Santos P, Cena V. Acetaminophen induces human neuroblastoma cell death through NFKB activation. *PLoS ONE.* 2012;7:e50160.
39. Blecharz-Klin K J-MI, Piechal A, Pyrzanowska J, Wawer A, Widy-Tyszkiewicz E. Paracetamol impairs the profile of amino acids in the rat brain. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 2014;37:95-102.
40. Chantong C, Yisarakun W, Thongtan T , le Grand SM. Increases of pro-inflammatory cytokine expression in hippocampus following chronic paracetamol treatment in rats. *Asian Archives of Pathology* 2013;9:137-46.
41. Massicot F, Hache G, David L, Chen D, Leuxe C, Garnier-Legrand L, et al. P2X7 Cell Death Receptor Activation and Mitochondrial Impairment in Oxaliplatin-Induced Apoptosis and Neuronal Injury: Cellular Mechanisms and In Vivo Approach. *PLoS ONE.* 2013;8:e66830.
42. Maharaj H, Maharaj DS, Daya S. Acetylsalicylic acid and acetaminophen protect against MPP⁺-induced mitochondrial damage and superoxide anion generation. *Life Sci.* 2006;78:2438-43.
43. da Silva MH, da Rosa EJ, de Carvalho NR, Dobrachinski F, da Rocha JB, Mauriz JL, et al. Acute brain damage induced by acetaminophen in mice: effect of diphenyl diselenide on oxidative stress and mitochondrial dysfunction. *Neurotox Res.* 2012;21:334-44.

44. Valko M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MT, Mazur M, Telser J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. *nt. J. Biochem. Cell Biol.* 2007;39:44-84.
45. Sinha K DJ, Pal PB, Sil PC. Oxidative stress: the mitochondria-dependent and mitochondria-independent pathways of apoptosis. *Arch Toxicol.* 2013;87:1157-80.
46. Circu ML, Aw TY. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 2010;48:749-62.
47. Floyd RA, Carney JM. Free radical damage to protein and DNA: mechanisms involved and relevant observations on brain undergoing oxidative stress. *Ann Neurol.* 1992;32 Suppl:S22-7.
48. Uttara B, Singh AV, Zamboni P, Mahajan RT. Oxidative stress and neurodegenerative diseases: a review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Curr Neuropharmacol.* 2009;7:65-74.
49. Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35:495-516.
50. Cory S, Adams JM. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat Rev Cancer.* 2002;2:647-56.
51. Fleury C, Mignotte B, Vayssiere JL. Mitochondrial reactive oxygen species in cell death signaling. *Biochimie.* 2002;84:131-41.
52. Chao MV, Rajagopal R, Lee FS. Neurotrophin signalling in health and disease. *Clin Sci.* 2006;110:167-73.
53. Murer MG, Yan Q, Raisman-Vozari R. Brain-derived neurotrophic factor in the control human brain, and in Alzheimer's disease and Parkinson's disease. *Prog Neurobiol.* 2001;63:71-124.
54. Tyler WJ, Alonso M, Bramham CR, Pozzo-Miller LD. From acquisition to consolidation: on the role of brain-derived neurotrophic factor signaling in hippocampal-dependent learning. *Learn Mem.* 2002;9:224-37.
55. Teng HK, Teng KK, Lee R, Wright S, Tevar S, Almeida RD, et al. ProBDNF induces neuronal apoptosis via activation of a receptor complex of p75NTR and sortilin. *J Neurosci.* 2005;25:5455-63.

56. Mcllwain DR, Berger T, Mak TW. Caspase functions in cell death and disease. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2015;7.
57. Kim DH, Zhao X. BDNF protects neurons following injury by modulation of caspase activity. *Neurocrit Care.* 2005;3:71-6.
58. Almeida RD, Manadas BJ, Melo CV, Gomes JR, Mendes CS, Graos MM, et al. Neuroprotection by BDNF against glutamate-induced apoptotic cell death is mediated by ERK and PI3-kinase pathways. *Cell Death Differ* 2005;12:1329-43.
59. V. V. Muzyka PNM, A. V. Bannova, N. N. Dygalo. The interrelationship between BDNF and its precursor and the level of active caspase-3 in the brain regions of neonatal rats. *Neurochemical Journal.* 2012;6:260-4.
60. Marosi K, Mattson MP. BDNF mediates adaptive brain and body responses to energetic challenges. *Trends Endocrinol Metab: TEM.* 2014;25:89-98.
61. FDA Background information for september 19-20, 2002, NDAC Meeting. FDA 2002; Available at; <http://www.fda.gov/ohrms/dockets/ac/02/briefing/3882b1.htm>. [Internet]. 2002 [cited june 26, 2007].
62. Wu A, Ying Z, Gomez-Pinilla F. The interplay between oxidative stress and brain-derived neurotrophic factor modulates the outcome of a saturated fat diet on synaptic plasticity and cognition. *Eur J Neurosci.* 2004;19:1699-707.
63. Xie H, Leung KL, Chen L, Chan YS, Ng PC, Fok TF, et al. Brain-derived neurotrophic factor rescues and prevents chronic intermittent hypoxia-induced impairment of hippocampal long-term synaptic plasticity. *Neurobiol Dis.* 2010;40:155-62.

ภาคผนวก
สารเคมีและการเตรียมสารเคมี

Stock solution

10x SDS-PAGE running buffer volume 1 liter: [250 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine, 1% SDS]

- Tris-HCl (MW 121.14)	30.28 g	--> final conc. 25 mM
- Glycine (MW 75.07)	144.13 g	--> final conc. 192 mM
- Sodium dodecylsulfate (SDS)	10 g	--> final conc. 0.1%

Add dH₂O up to 1000 ml

10x transfer buffer volume 800 ml: [250 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine]

- Tris-HCl (MW 121.14)	30.28 g	--> final conc. 25 mM
- Glycine (MW 75.07)	144.13 g	--> final conc. 192 mM

Add dH₂O up to 800 ml

10x Tris-buffer Saline (TBS) volume 1 liter: [100 mM Tris-HCl (pH7.5), 150 mM NaCl]

- Tris-HCl (MW 121.14)	121.1 g	--> final conc. 100 mM
- NaCl (MW 58.4)	90 g	--> final conc. 150 mM

Add dH₂O almost ~ 800 ml --> adjust pH to 7.5 by HCl

Add dH₂O up to 1000 ml

10x Tris-buffer Saline (TBS) volume 1 liter: [50 mM Tris-HCl (pH7.6), 150 mM NaCl]

- Tris-HCl (MW 121.14)	60.57 g	--> final conc. 100 mM
- NaCl (MW 58.4)	87.6 g	--> final conc. 150 mM

Add dH₂O almost ~ 800 ml --> adjust pH to 7.6 by HCl

Add dH₂O up to 1000 ml

10x SDS (w/v) volume 100 ml

- Sodium dodecylsulfate (SDS)	10 g
-------------------------------	------

Add dH₂O up to 100 ml

Store at room temperature

4x Running gel buffer volume 200 ml: [1.5 M Tris-HCl, pH8.8]

- Tris-HCl (MW 121.14) 36 g

Add dH₂O almost ~150 ml --> adjust pH to 8.8 by HCl

Add dH₂O up to 200 ml

Store at 4°C

4x stacking gel buffer volume 200 ml: [0.5 M Tris-HCl, pH6.8]

- Tris-HCl (MW 121.14) 3 g

Add dH₂O almost ~40 ml --> adjust pH to 6.8 by HCl

Add dH₂O up to 50 ml

Store at 4°C

Coomassie blue staining volume 1 liter: [0.1 % (w/v) Coomassie Brilliant Blue R250, 40% methanol, 10% glacial acetic acid]

- Coomassie Brilliant Blue R250 1 g

- Methanol 400 ml

Stir ~ 3 hr until dissolved then add:

- Glacial acetic acid 100 ml

Add dH₂O up to 1000 ml * filter before store*

Store at room temperature

Destaining solution I volume 1 liter: [40% methanol, 10% acetic acid]

- Methanol 400 ml

- Acetic acid 100 ml

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

Destaining solution II volume 1 liter: [10% methanol, 5% acetic acid]

- Methanol 100 ml

- Acetic acid 50 ml

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

0.2 M Na-KPB pH 7.4

- Na₂HPO₄ (MW 141.96) 22.98 g

- KH₂PO₄ (MW 136.09) 5.16 g

Add dH₂O almost ~800 ml --> adjust pH to 7.4 by NaOH

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

10x phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS)

- Na₂HPO₄ (MW 141.96) 55 g

- NaH₂PO₄ (MW 137.99) 13 g

- NaCl (MW 58.44) 117 g

Add dH₂O almost ~ 800 ml --> adjust pH to 7.4 by NaOH

Add dH₂O up to 1000 ml

Working solutions

Ice-cold Tris buffer (5mM Tris-HCl, pH7.4 autoclave) volume 500 ml:

- Tris-base (MW 121.14) 0.3 g

Add dH₂O almost ~400 ml --> adjust pH to 7.4 by

HCl

Add dH₂O up to 500 ml

Store at 4°C

4x SDS protein sample Buffer (4x Loading dye) volume 10 ml:[240 mM Tris-HCl(pH 6.8), 40% Glycerol, 8% SDS, 0.04% Bromophenol blue, 5% β -mercaptoethanol]

- 1 M Tris-HCl (pH 6.8) 2.4 ml

- 100% Glycerol 4 ml

-SDS 0.8 g

- 1% Bromophenol blue 0.4 ml

- β -mercaptoethanol 0.5 ml

Add dH₂O up to 3.1 ml

1x SDS-PAGE running buffer volume 1 liter: [final conc. 25 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine, 0.1% SDS]

- 10x SDS-PAGE running buffer 100 ml

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at 4°C

1x Transfer buffer volume 1 liter: [final conc. 25 mM Tris-HCl, 1.92 mM Glycine]

- 10x transfer buffer 80 ml
- 100% methanol 200 ml

Add dH₂O up to 720 ml

Store at 4°C

1X Tris-buffer saline (TBS) volume 1 liter: [10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 15 mM NaCl]

- Tris-HCl (MW 121.14) 12.11 g
- NaCl (MW 58.4) 9 g

Add dH₂O almost ~900 ml --> adjust pH to 7.5 by

HCl

Add dH₂O up to 1000 ml

Store at room temperature

1x TBS with 0.1% Tween-20 (TBST) volume 1 liter:

- 1x TBS 1000 ml
- Tween-20 1 ml

Store at room temperature

10% Metaphosphoric acid (MPA)

- MPA (MW 79.97) 5 g

Add dH₂O up to 50 ml

Store at room temperature

4M Triethanolamine

- Triethanolamine (MW149.188) 469 µl
- dH₂O 531 µl

Store at room temperature

20% Trichloroacetic acid (20% w/v TCA)

- TCA (MW 163.40) 20 g
- dH₂O 100 ml

Store at 4°C

10mM Dinitrophenylhydrazine (DNPH) in 2N Hydrochloric acid (HCl)

- DNPH (MW 198.14) 0.991 g
- 2N HCl 500 ml

Store in the dark at room temperature

Ethanol: Ethyl acetate (1:1)

- 95 % ethanol (MW 46.07) 500 ml
- Ethyl acetate (MW 88.11) 500 ml

Store at room temperature

6M Guanidine hydrochloride (GdmCl)

- GdmCl (MW 95.53) 286.6 g
- Potassium phosphate monobasic (KH_2PO_4) (Mw 136.092) 34.023 g
- Add dH_2O almost ~ 400 ml --> adjust pH to 2.5 by

HCl

Add dH_2O up to 500 ml

Store at room temperature

0.1M Na-KPB pH 7.4

- 0.1 M Na-KPB pH 7.4 500 ml
- dH_2O 500 ml

Store at 4°C

4% Paraformaldehyde in 0.1 M Na-KPB pH 7.4

- Paraformaldehyde 40 g
- add dH_2O 500 ml
- heat at 60°C and stir
- add 1 N NaOH until solution clear
- add 0.2 M Na-KPB pH 7.4 500 ml

Store at 4°C

1x phosphate buffer saline, pH 7.4 (PBS)

- 10X PBS 100 ml
- add dH_2O 900 ml

Store at room temperature

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ- นามสกุล ทิพย์ฐานันดร โชติพิณิจ

วัน เดือน ปีเกิด 28 ธันวาคม 2533

สถานที่เกิด จังหวัดอุดรธานี

สถานที่ติดต่อ 79/9 หมู่ที่ 8 ถนนทหาร ตำบลหมากแข้ง อำเภอเมือง จังหวัด
อุดรธานี 41000

วุฒิการศึกษา ปริญญาวิทยาศาสตรการแพทย์บัณฑิต คณะวิทยาศาสตร์
การแพทย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

นเรศวร ปริญญานิติศาสตรบัณฑิต คณะนิติศาสตร์ มหาวิทยาลัย
นเรศวร