นิพนธ์ต้นฉบับ

DOI : 10.14456/clmj.2018.x ─ Chula Med J Vol. 62 No. 5 September - October 2018

ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แอสโทรไซต์

ณัฐณิชา ตัณฑรังษี*
ธนัญญา ทองตัน** ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์***

Tantarungsee N, Thongtan T, Maneesri – le Grand S. Effect of chronic APAP treatment on alterations of astrocytes. Chula Med J 2018 Sep – Oct; 62 (5):859 - 70

Background : *During the last decade, a number of evidence have indicated adverse effects of paracetamol even at the therapeutic dose in several systems including the central nervous system.*

Objectives : *To investigate the effect of long-term use of chronic paracetamol on cell death and the ultrastructure alterations of astrocytes.*

Methods : *Astrocyte (C8-D1A) were treated with paracetamol at the concentration of 100 μM for 24 h, 16 and 28 days. The numbers of cell death and the ultrastructure alterations of astrocytes were monitored in the paracetamol-treated cells compare with control cells.*

Results : *Paracetamol treatment of 24 h had no effect on alterations of astrocytes, while the paracetamol treatment of 16 and 28 days could increase the numbers of astrocytic cell death than those observed in the control. The structural analysis clearly demonstrated the abnormality of nucleus, nuclear membrane, rough endoplasmic reticulum and mitochondria in the paracetamol-treated cells when compared to those in the control.*

* นิสิตปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
** ภาควิชาชีวเคมี คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
***ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Conclusion : *The long-term use of paracetamol could induce cell death and alter the ultrastructure of astrocyte cells.*

Keywords : *Paracetamol, astrocyte, ultrastructure, cell death.*

Correspondence to: Maneesri – le Grand S. Department of Pathology, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok 10330, Thailand.

Received for publication. November 21, 2017.

ณัฐณิชา ตัณฑรังษี, ธนัญญา ทองตัน, ศุภางค์ มณีศรี เลอกรองด์. ผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์แอสโทรไซต์. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 2561 ก.ย. ต.ค.; 62(5):859 – 70

เหตุผลของการทำวิจัย : *ผลการศึกษาวิจัยในช่วง 10 ปีหลังนี้บ่งชี้ว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังด้วยขนาดของการรักษาสามารถส่งผลเสียต่อเซลล์และระบบต่าง ๆ ของร่างกายได้ รวมไปถึงระบบประสาทส่วนกลางด้วย*

วัตถุประสงค์ : *เพื่อศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์*

วิธีการทำวิจัย : *เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) ถูกเพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอล ที่ความเข้มข้น 100 μM เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 16 และ 28 วัน จากนั้นทำการตรวจนับจำนวนเซลล์ตายและตรวจสอบโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ได้รับยาพาราเซตามอลเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม*

ผลการศึกษา : *การได้รับยาพาราเซตามอลที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่ส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยง แอสโทรไซต์เกิดการเปลี่ยนแปลง ขณะที่การเพาะเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 และ 28 วัน ส่งผลให้เซลล์มีการตายเพิ่มสูงขึ้นและมีลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคที่ผิดปกติไป โดยพบว่ามีความผิดปกติของนิวเคลียส เยื่อหุ้มนิวเคลียส endoplasmic reticulum (ER) และไมโทคอนเดรียอย่างชัดเจน เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม*

สรุป : *การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังสามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์แอสโทรไซต์มีการตายเพิ่มขึ้น และส่งผลต่อโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์แอสโทรไซต์ให้เปลี่ยนแปลงไป*

คำสำคัญ : *พาราเซตามอล, แอสโทรไซต์, โครงสร้างระดับจุลภาค, เซลล์ตาย.*

พาราเซตามอล (acetaminophen; APAP) จัดเป็นยาสามัญประจำบ้านที่ใช้ในการรักษาอาการปวดทั่วไป มีคุณสมบัติช่วยบรรเทาอาการปวดศีรษะ อาการปวดเมื่อย และลดไข้ รวมไปถึงฤทธิ์ใน การต้านการอักเสบ เนื่องจากยาชนิดนี้สามารถหาซื้อเองได้ง่ายโดยไม่ต้องมีใบสั่งจ่ายยาจากแพทย์และก่อให้เกิดผลข้างเคียงอันไม่พึงประสงค์น้อย ทำให้ยาพาราเซตามอลยังคงเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายจนถึงปัจจุบัน

อย่างไรก็ตามงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับพาราเซตามอลในช่วง 10 ปีหลังกลับพบว่าการใช้ยาพาราเซตามอลในขนาดของการรักษา (therapeutic dose) อย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลานานสามารถส่ง ผลเสียต่อเซลล์และระบบต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น งานวิจัยของ Sudano I. และคณะที่พบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ในผู้ป่วยโรคหลอดเลือดหัวใจส่งผลให้ความดันโลหิตสูงขึ้น [1] และการให้ยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์ (0.01 - 1 mM) ร่วมกับการบ่มเลี้ยงเซลล์ pneumocytes เป็นเวลา 4 ชั่วโมง พบว่าส่งผลให้ระดับ glutathione (GSH) ในเซลล์ลดลง [2] รวมไปถึงระบบประสาทส่วนกลางด้วย โดยผลงานวิจัยก่อนหน้านี้ของ Chantong C. และคณะในปี พ.ศ. 2556 ได้รายงานว่าหนูทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลในปริมาณที่ใช้ในการรักษาติดต่อกันเป็นระยะเวลา 30 วัน มีการแสดงออกของสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเพิ่มสูงขึ้นในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัส [3] และการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่องเป็นเวลานาน (30 วัน)(200 mg/kg BW) สามารถเหนี่ยวนำให้ภาวะความผิดปกติของ blood-brain barrier (BBB) ได้โดยพบว่าเกิดความผิดปกติของเซลล์เอนโดธีเลียมรอบหลอดเลือด และการแสดงออกของโปรตีน ICAM-1 และ VCAM-1 ที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างต่อเนื่อง อีกทั้งยังพบว่ามีปริมาณของ tight junction proteins (ZO-1, Occludin และ Claudin-5) ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [4] ซึ่งการตรวจพบความผิดปกติของหลอดเลือดสมองเหล่านี้บ่งชี้ว่าในหนูที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังมีการสูญเสีย blood-brain barrier integrity ซึ่งพบร่วมไปกับการตรวจพบการบวมของ astrocyte foot plate ที่วางตัว อยู่โดยรอบ endothelial cells [4]

เนื่องจากแอสโทรไซต์เป็นเกลียเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการสนับสนุนการทำงานของ BBB โดยมีส่วนช่วยในการควบคุมการผ่านเข้าออกของสารบริเวณ BBB ซึ่งมีผลต่อระดับการแสดงออกของโปรตีน tight junction [5] ตลอดจนรักษาสมดุลของ anti-inflammation ในระบบประสาท ส่วนกลาง [6] ทำให้มีหลายงานวิจัยที่มุ่งเน้นศึกษาถึงผลกระทบของความผิดปกติของ astrocyte ต่อการเปลี่ยนแปลงของ BBB เช่น งานวิจัยของ Neuhaus W. และคณะ ในปีพ.ศ. 2557 ที่รายงานไว้ว่า เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ astrocyte ร่วมกับ เซลล์ endothelial โดยกระตุ้นเซลล์ astrocyte ให้เกิดการบาดเจ็บด้วยวิธี oxygen/glucose deprivation สามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับ BBB ได้ โดยพบว่ามีการซึมผ่าน BBB เพิ่มมากขึ้นและมีการแสดงออกของโปรตีน tight junction น้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [7] ดังนั้น การเกิดภาวะความผิดปกติของเซลล์แอสโทรไซต์ จึงน่าจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของ BBB ด้วย ด้วยเหตุผลนี้จึงมีความเป็นไปได้ว่าการตรวจพบว่าผิดปกติของ BBB ในภาวะที่ได้รับยาพาราเซตามอล อย่างเรื้อรังที่พบในการ ศึกษาก่อนหน้านี้ [4] อาจมีส่วนหนึ่งที่เกิดจากผลกระทบของยาพาราเซตามอลที่ส่งผลต่อเซลล์แอสโทรไซต์

เพื่อเป็นการทดสอบสมมติฐานข้างต้น ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่มีต่อเซลล์แอสโทรไซต์ โดยทำการตรวจสอบการตายและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์แอสโทรไซต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิด ลำแสงส่องผ่าน (Transmission electron microscope)

วิธีการทดลอง

การเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) ถูกเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) โดยเติม 10% heat-inactivated Fetal

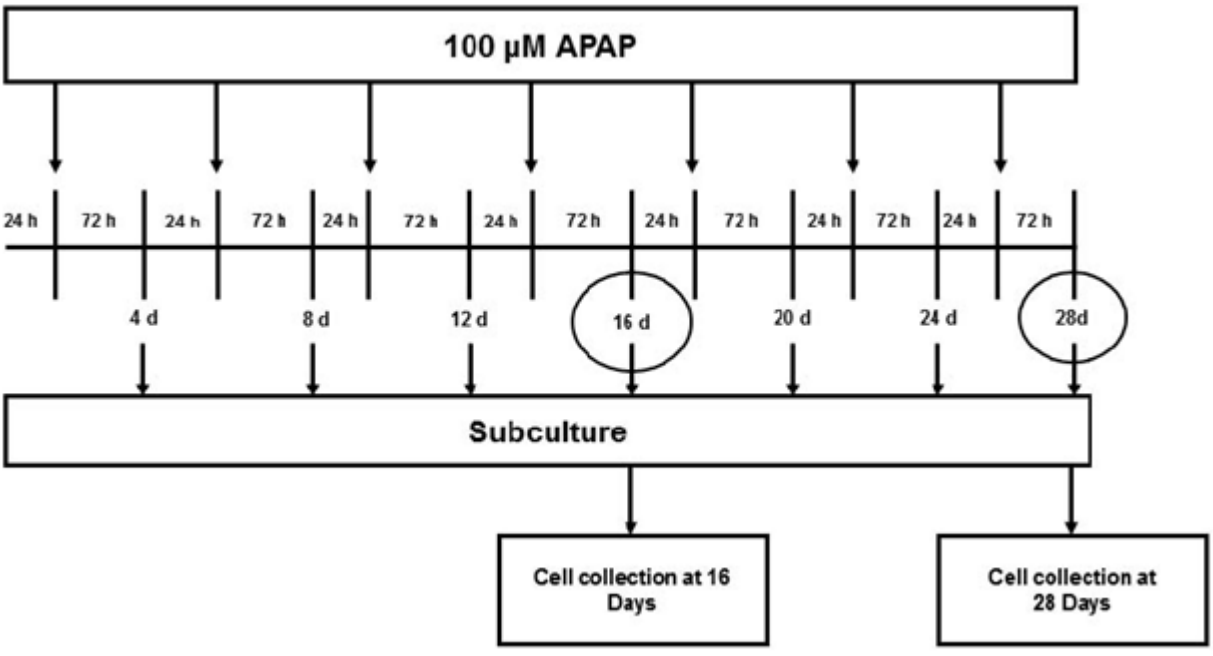
Bovine Serum (FBS), 100 unit/ml ของ penicillin และ 100 μg/ml ของ streptomycin (complete media) บ่มเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37°C ในตู้เพาะเลี้ยงที่มี 5% CO_2 โดยมีการย้ายเซลล์ (subculture) ไปยังภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ทุก ๆ 72 ชั่วโมง ด้วย 0.25% Trypsin/EDTA เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะ และในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกใช้ยา พาราเซตามอลที่ความเข้มข้น 100 μM เนื่องจากมีการรายงานว่าเป็นความเข้มข้นที่อยู่ในช่วงที่ไม่ก่อให้ เกิดอันตรายต่อเซลล์และยังมีผลในด้านการปกป้องเซลล์อีกด้วย [8]

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง)

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) จำนวน 9.5 x 10^5 cells ถูกเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยง เซลล์ขนาด 75 cm^2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสม ยาพาราเซตามอลลงไป นำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดตรวจสอบการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion และทำการเก็บตะกอนเซลล์เพื่อนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงการของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 และ 28 วัน)

เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ (C8-D1A) จำนวน 9.5 x10^5 cells ได้ถูกบ่มเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ขนาด 75 cm^2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนทำการทดลอง จากนั้นทำการเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ผสมยาพาราเซตามอลลงไป นำไปบ่มเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา เซลล์ถูกย้ายไปเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ใหม่ ซึ่งเซลล์แอสโทรไซต์ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะดังกล่าวต่อเนื่องเป็นเวลา 4 สัปดาห์ ดังแสดงในรูปที่ 1 เมื่อครบกำหนดทำการตรวจสอบการตายของเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion และเก็บตะกอนเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงมาเป็นเวลา 16 วัน และ 28 วัน เพื่อนำไปศึกษาลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนต่อไป



รูปที่ 1. แผนภาพแสดงขั้นตอนของการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอล เป็นระยะเวลา 16 และ 28 วัน

การนับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion

เซลล์ถูกล้างด้วย PBS 2 ครั้ง จากนั้นทำให้เซลล์หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วย 0.25% trypsin/EDTA และปั่นเหวี่ยงที่ 1,500 rpm นาน 5 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์ ทำการละลายตะกอนเซลล์ด้วย complete media จากนั้นนำสารละลายเซลล์ปริมาตร 20 µl มาผสมกับ 30 µl ของ PBS และ 50 µl ของ 0.4% Trypan blue Dye (สารละลายเซลล์จะถูกเจือจาง 1:5) ให้เข้ากันและตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นทำการนับจำนวนเซลล์ทั้งหมดและเซลล์ตาย โดยเซลล์ตายติดสีน้ำเงินของ Trypan blue Dye ข้อมูลถูกแสดงในลักษณะจำนวนเซลล์ตาย/มิลลิลิตร

การศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

เซลล์เพาะเลี้ยงตัวอย่างในกลุ่มที่จะทำการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ทั้งหมดได้ถูกเก็บรวบรวมหลังจากครบกำหนดตามช่วงเวลาต่าง ๆ จากนั้นขูดเซลล์ออกเบา ๆ ด้วย cell scraper นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็วที่ 5,000 rpm ณ อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลานาน 5 นาที จากนั้นนำตะกอนเซลล์เข้าสู่กระบวนการเตรียมตัวอย่างสำหรับการตรวจสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนตามขั้นตอนที่ได้อธิบายไว้ในงานวิจัยก่อนหน้านี้ [4] โดยในงานวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์ซึ่งโครงสร้างที่ถูกศึกษานั้นประกอบไปด้วย, นิวเคลียส, เยื่อหุ้มเซลล์, ไมโทรคอนเดรีย และเอนโดพลาสมิกเรติกคูลัม

การรวบรวมข้อมูล (Data Collection)

ข้อมูลที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion ได้ถูกเก็บรวบรวมและวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม IBM SPSS Statistics 22 ซึ่งข้อมูลได้ถูกแสดงค่าเป็น mean ± SEM โดยความแตกต่างทางสถิติระหว่างกลุ่มจะวิเคราะห์โดยใช้ *t*-test และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างช่วงเวลาของกลุ่มเดียวกันโดยใช้ One-way ANOVA ตามด้วย Bonferroni's multiple comparison test ซึ่งความแตกต่างได้รับการพิจารณาให้มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่ $P < 0.05$

ข้อมูลจากการศึกษาใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน (electron microscope) ได้ถูกนำมาวิเคราะห์โดยพิจารณาจากการเปลี่ยนแปลงของลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคซึ่งประกอบไปด้วย การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ ไมโทรคอนเดรีย นิวเคลียสและเอนโดพลาสมิกเรติกคูลัมของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม

ผลการทดลอง

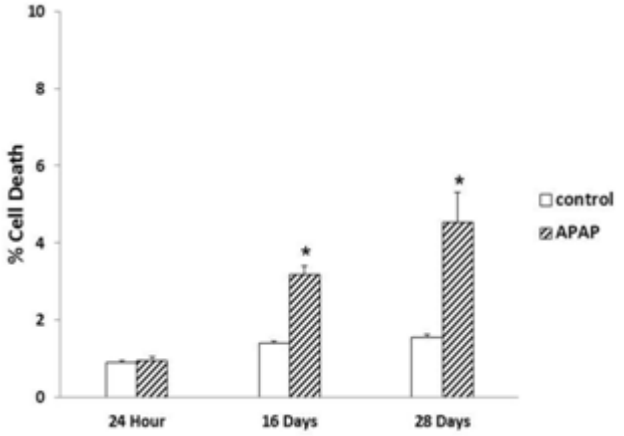
ผลการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง

ผลการทดลองพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่มีผลกระทบต่อการตายของเซลล์ ขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 และ 28 วัน) พบว่ามีจำนวนเซลล์ตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 2

การศึกษาผลกระทบของยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอน

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง)

เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง) ต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยน

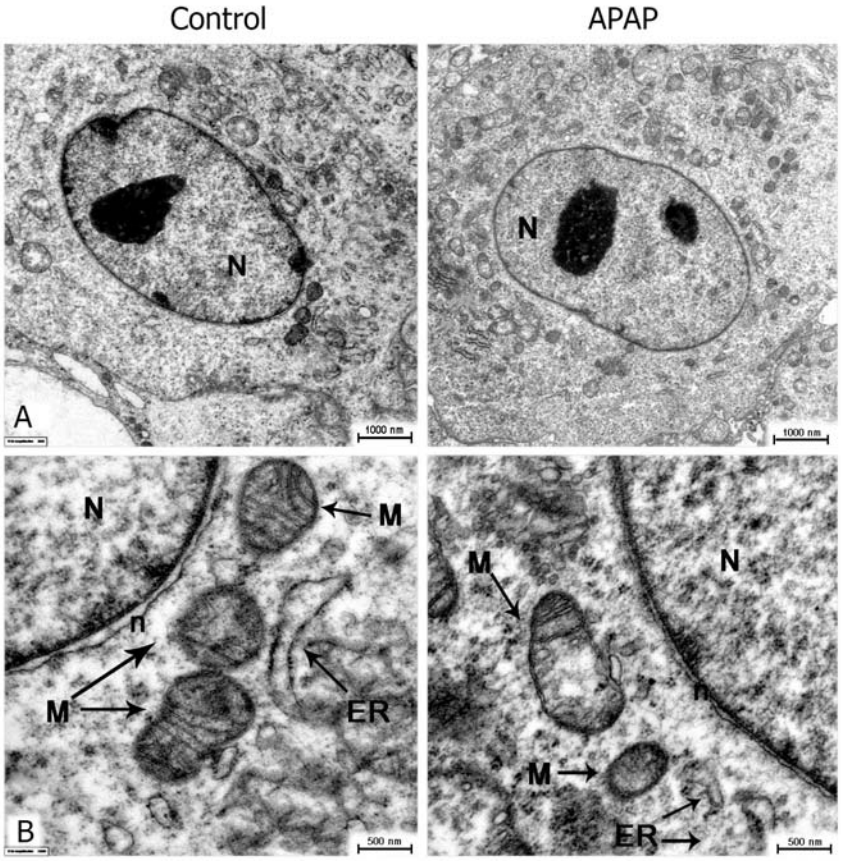


รูปที่ 2. กราฟแสดงร้อยละการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลได้รับการตรวจสอบการตายด้วยเทคนิค Trypan blue Dye Exclusion เปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม
*P <0.05 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม

แปลงโครงสร้างระดับจุลภาค ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์หลังจากที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม โดยโครงสร้างระดับจุลภาคต่าง ๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ทำการตรวจสอบนั้นประกอบไปด้วย เยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส การเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียและเอนโดรพลาสมิกเรติคูลัม ซึ่งผลการทดลองพบว่าการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน ไม่มีความแตกต่างกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม โดยเมื่อศึกษาที่กำลังขยายต่ำ (3,000 เท่า) พบว่าเซลล์ส่วนใหญ่มีลักษณะของออร์การ์เนลล์ต่าง ๆ ปกติ ดังแสดงในรูปที่ 3A และเมื่อทำการศึกษาในกำลังขยาย 5,000 เท่า พบว่าไมโทคอนเดรียส่วนใหญ่มีลักษณะปกติ ดังแสดงในรูปที่ 3B

ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะสัณฐานวิทยา (morphology) ของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 และ 28 วัน)

เพื่อศึกษาถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ในงานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ถูกเลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 และ 28 วัน) เปรียบเทียบโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม โดยโครงสร้างระดับจุลภาคต่าง ๆ ของเซลล์เพาะเลี้ยงที่ถูกตรวจสอบประกอบไปด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ เยื่อหุ้มนิวเคลียส การเปลี่ยนแปลงไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม โดยผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้พบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน มีผลทำให้โครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม โดยพบว่าลักษณะนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 16 วัน มีรูปร่างที่ผิดปกติไปเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (รูปที่ 4A) นอกจากนี้การศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนยังพบความผิดปกติของออร์แกเนลล์อื่น ๆ ที่สำคัญด้วย โดยพบการยืดขยาย (dilatation) ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมและไมโทคอนเดรียที่มีลักษณะบวม (swelling) มีการตรวจพบการเรียงตัวของ Cristae

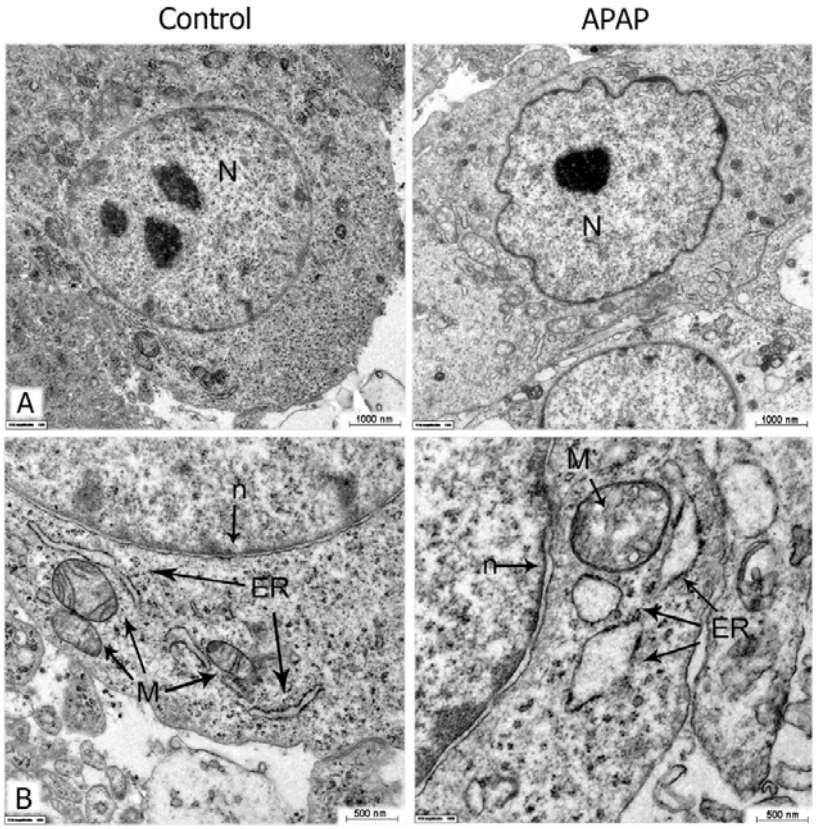


รูปที่ 3. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (24 ชั่วโมง)

A. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงถึงลักษณะของนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (ขวา) ซึ่งพบว่ามีลักษณะปกติไม่แตกต่างกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N = Nucleus, scale bar : 1,000 nm

B. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะของเยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน (ขวา) ซึ่งพบว่ามีลักษณะปกติไม่แตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุม (ซ้าย) N = Nucleus, n = nuclear membrane, M = Mitochondria, ER = Endoplasmic Reticulum ที่กำลังขยาย 5,000X, scale bar : 500 nm

ที่ไม่เป็นระเบียบ (disarrangement) มากกว่าที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (รูปที่ 4B) ในส่วนของการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลา 28 วัน พบว่าส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างในระดับจุลภาคของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ให้เปลี่ยนแปลงไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมเช่นกัน โดยพบว่าลักษณะนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลนั้น มีรูปร่างผิด ปกติไปเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (รูปที่ 5A) อีกทั้งยังตรวจพบการยืดขยาย (dilatation) ของ เอนโดพลาสมิกเรติคูลัม รวมไปถึงไมโทคอนเดรียที่มีลักษณะบวม (swelling) เป็นจำนวนมาก (รูปที่ 5B) และเมื่อทำการเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ระยะเวลา 16 วัน พบว่าการยืดขยาย (dilatation) ของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม และการบวม (swelling) ของไมโทคอนเดรียนั้นมีการยืดขยายและบวมมากกว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ระยะเวลา 16 วัน



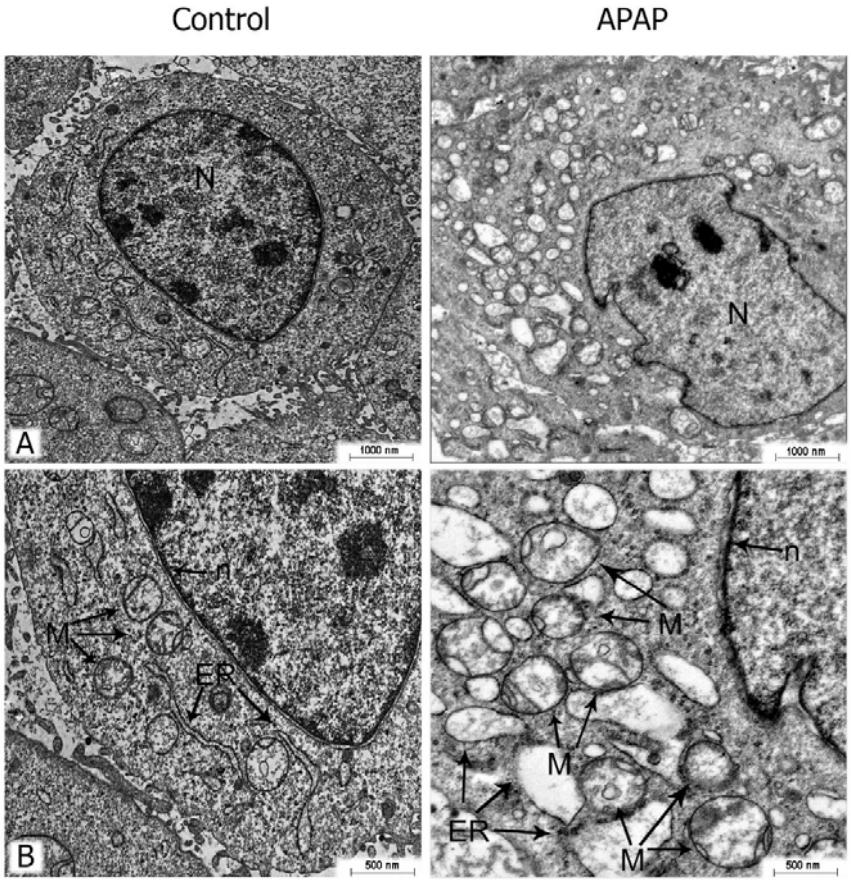
รูปที่ 4. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยงแอ สโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (16 วัน)

A. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะรูปร่างของนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) ที่มีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N = Nucleus, scale bar : 1,000 nm

B. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะการโป่งพองของเยื่อหุ้มนิวเคลียสและการยืดขยายของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N = Nucleus, n = nuclear membrane, M = Mitochondria, ER = Endoplasmic Reticulum, scale bar : 500 nm

อภิปรายผล

ผลจากการศึกษาวิจัยครั้งนี้ แสดงให้เห็นว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันและการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง ส่งผลต่อการกระตุ้นเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์แตกต่างกัน โดยพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่มีผลต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ในขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้น กลับส่งผลให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์มีการตายเพิ่มสูงขึ้น ซึ่งผลการศึกษาในส่วนนี้สัมพันธ์กับผลจากการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่ได้แสดงให้เห็นว่า การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้นส่งผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของโครงสร้างระดับจุลภาคในเซลล์ โดยพบว่าในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังมีความผิดปกติของโครงสร้างระดับจุลภาคแตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมอย่างเห็นได้ชัด โดยพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงลักษณะของนิวเคลียสรวมถึงพบ



รูปที่ 5. ลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ควบคุมและเซลล์เพาะเลี้ยง แอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (28 วัน)

A. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะรูปร่างของนิวเคลียสของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) ที่มีลักษณะรูปร่างเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม(ซ้าย) N = Nucleus, scale bar : 1,000 nm

B. ภาพถ่ายจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแสดงลักษณะการโป่งพองและการยืดขยายของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง (ขวา) เทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม (ซ้าย) N = Nucleus, n = nuclear membrane, M = Mitochondria, ER = Endoplasmic Reticulum, scale bar : 500 nm

ลักษณะการบวม (swelling) ของไมโทคอนเดรียและเอนโดพลาสมิคเรคติลูลัมแตกต่างไปจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมเป็นจำนวนมาก

ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้เลือกใช้ขนาดความเข้มข้นของยาพาราเซตามอลที่ 100 μM เนื่องจากเป็นค่าความเข้มข้นที่ส่งผลกระทบต่อเซลล์น้อยมาก จำนวนเซลล์ตาย ร้อยละ10) จนถือได้ว่าเป็นค่าความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ [8, 9] โดยการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ของ Tripathy D.และคณะ ในปีพ.ศ. 2552 ได้รายงานไว้ว่า ยาพาราเซตามอลที่ขนาดความเข้มข้น 100 μM นั้น สามารถปกป้องเซลล์ประสาทจากภาวะ oxidative stress และลดการตายของเซลล์ที่เกิดจากการกระตุ้นด้วย menadione ตลอดจนลดการสร้างสาร pro-inflammatory cytokines ได้ [10] ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลเป็นระยะเวลาที่แตกต่างกัน (เฉียบพลันและเรื้อรัง) ต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ และเพื่อเป็นการยืนยันว่าการเปลี่ยนแปลง

ของเซลล์แอสโทรไซต์ที่เกิดขึ้นนั้นไม่มีความเกี่ยวข้องกับความเข้มข้นของยาพาราเซตามอล ดังนั้นจึงได้เลือกใช้ยาพาราเซตามอลที่ขนาดความเข้มข้น 100 μM ในการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์

โดยผลการวิจัยในครั้งนี้พบว่า การได้รับยาพาเซตามอลอย่างอย่างเฉียบพลันที่ความเข้มข้น 100 μM ไม่ส่งผลกระทบต่อการตายของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ ซึ่งผลการศึกษาในส่วนนี้ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับผลที่ได้จากการศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาในเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลัน โดยพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่เลี้ยงร่วมกับยาพาราเซตามอลมีลักษณะของโครงสร้างระดับจุลภาคไม่แตกต่างกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมควบคุม เมื่อพิจารณาจากผลของงานวิจัยที่ผ่านมาของ Tripathy D. และคณะ ในปีพ.ศ. 2552 ที่ศึกษาผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ในเซลล์ประสาทและเซลล์เอนโดธีเลียมที่ได้รับยาพาราเซตามอลที่ความเข้มข้นที่ 100 μM นั้นพบว่าการที่เซลล์เพาะเลี้ยงทั้งสองชนิดได้รับยาพาราเซตามอลในขนาดความเข้มข้นดังกล่าวเป็นระยะเวลาสั้นนั้น นอกจากจะไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษใด ๆ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงประสาทและเซลล์เพาะเลี้ยงเอนโดธีเลียมแล้ว ยังให้ผลในด้านการปกป้องเซลล์จากภาวะ oxidative stress ที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสาร menadione อีกด้วย [8, 10]

อย่างไรก็ตาม ผลการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ให้ผลที่แตกต่างไปจากผลการศึกษาผลกระทบของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันอย่างชัดเจน โดยพบว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แอสโทรไซต์ร่วมกับยาพาราเซตามอลที่ระยะเวลา 16 และ 28 วัน ส่งผลให้เซลล์มีการตายเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งยังส่งผลให้ลักษณะโครงสร้างระดับจุลภาคมีการเปลี่ยนแปลงไป โดยเมื่อพิจารณาจากงานวิจัยก่อนหน้านี้ พบว่ามีการรายงานถึงผลของการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังว่าสามารถชักนำให้เกิดการบาดเจ็บและการตายของเซลล์ประสาทในสมองบริเวณฮิปโปแคมปัสได้ [11] ซึ่งผลจากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ของผู้วิจัยสอดคล้องกับผลงานวิจัยของผู้วิจัย ดังกล่าว โดยพบว่าการได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้นทำให้เซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์มีลักษณะเปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม โดยผู้วิจัยพบว่าลักษณะนิวเคลียสมีรูปร่างที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม ไมโทคอนเดรียมีลักษณะบวมพอง (swelling) แตกต่างจากเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุมเป็นจำนวนมาก มีการตรวจพบการเรียงตัวของ Cristae ที่ไม่เป็นระเบียบ (disarrangement) และพบการเปลี่ยนแปลงเอนโดพลาสมิกเรติคูลัมที่มีลักษณะบวมพองและยืดขยาย (dilated) มากกว่าที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยงควบคุม นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับผลงานวิจัยของ Posadas I. และคณะ ในปีพ.ศ. 2555 ที่ได้รายงานไว้ว่ายาพาราเซตามอลสามารถเหนี่ยวนำให้มีการตายแบบทำลายตัวเองของเซลล์ประสาท โดยผ่านการกระตุ้น intrinsic apoptotic pathway ซึ่งผู้วิจัยกลุ่มนี้ได้เสนอว่า กระบวนการดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับการสร้างสารอนุมูลอิสระ, การกระตุ้นโปรตีนในวิถี NF-kB และการสร้างสารไซโตไคน์ IL-1 ที่เพิ่มขึ้น [12]

สรุป

จากการศึกษาวิจัยในครั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าการได้รับยาพาราเซตามอลในระยะเวลาที่แตกต่างกันมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เพาะเลี้ยงแอสโทรไซต์ที่แตกต่างกัน กล่าวคือ การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเฉียบพลันไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ จึงไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างระดับจุลภาคของเซลล์แอสโทรไซต์ ในขณะที่การได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังนั้นสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อเซลล์และเหนี่ยวนำให้เซลล์เกิดการตายได้ และเป็นที่ทราบกันดีอยู่แล้วว่าแอสโทรไซต์เป็นเกลียเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของ BBB ผู้วิจัยจึงเชื่อว่า กลไกหนึ่งที่เกี่ยวข้องกับความเสียหายของ BBB integrity จากการได้รับยา

พาราเซตามอลอย่างเรื้อรัง น่าจะเกิดจากภาวะความผิดปกติของเซลล์แอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังด้วยโดยภาวะที่เซลล์แอสโทรไซต์ที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังที่พบในการศึกษาวิจัยครั้งนี้อาจสามารถใช้เป็นข้อมูลหนึ่งในการอธิบายภาวะความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลางและระบบหลอดเลือดสมองที่พบในสัตว์ทดลองที่ได้รับยาพาราเซตามอลอย่างเรื้อรังได้

เอกสารอ้างอิง

1. 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.
2. 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.
3. Chantong C, Yisarakun W, Thongtan T, Maneesri-le Grand S. Increase of pro-inflammatory cytokine expression in hippocampus following chronic paracetamol treatment in rats. Asian Arc Pathol 2013;9:137-46.
4. Yisarakun W, Supornsilpchai W, Chantong C, Srikiatkhachorn A, Maneesri-le Grand S. Chronic paracetamol treatment increases alterations in cerebral vessels in cortical spreading depression model. Microvasc Res 2014;94:36-46.
5. Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. Nat Rev Neurosci 2006;7:41-53.
6. Alvarez JI, Dodelet-Devillers A, Kebir H, Ifergan I, Fabre PJ, Terouz S, et al. The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. Science 2011;334:1727-31.
7. Neuhaus W, Gaiser F, Mahringer A, Franz J, Riethmuller C, Forster C. The pivotal role of astrocytes in an in vitro stroke model of the blood-brain barrier. Front Cell Neurosci 2014;8:352.
8. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen protects brain endothelial cells against oxidative stress. Microvasc Res 2009;77:289-96.
9. Posadas I, Santos P, Blanco A, Munoz-Fernandez M, Cena V. Acetaminophen induces apoptosis in rat cortical neurons. PLoS One 2010;5:e15360.
10. Tripathy D, Grammas P. Acetaminophen inhibits neuronal inflammation and protects neurons from oxidative stress. J Neuroinflammation 2009;6:10.
11. Fakunle PB, Ajibade AJ, Oyewo EB, Alamu OA, Daramola AK. Neurohistological degeneration of the hippocampal formation following chronic simultaneous administration of ethanol and acetaminophen in adult wistar rats (Rattus norvegicus). J Pharmacol Toxicol 2011;6: 701-9.
12. Posadas I, Santos P, Cena V. Acetaminophen induces human neuroblastoma cell death through NFKB activation. PLoS One 2012;7: e50160.