

Thesis Title Toxicity Testing of Particulate Matter Collected from Chiang Mai Using the Developed Direct Alveolar Epithelial Cells-Air Exposure Prototype

Author Mr. Suruk Udomsom

Degree Master of Science (Medical Technology)

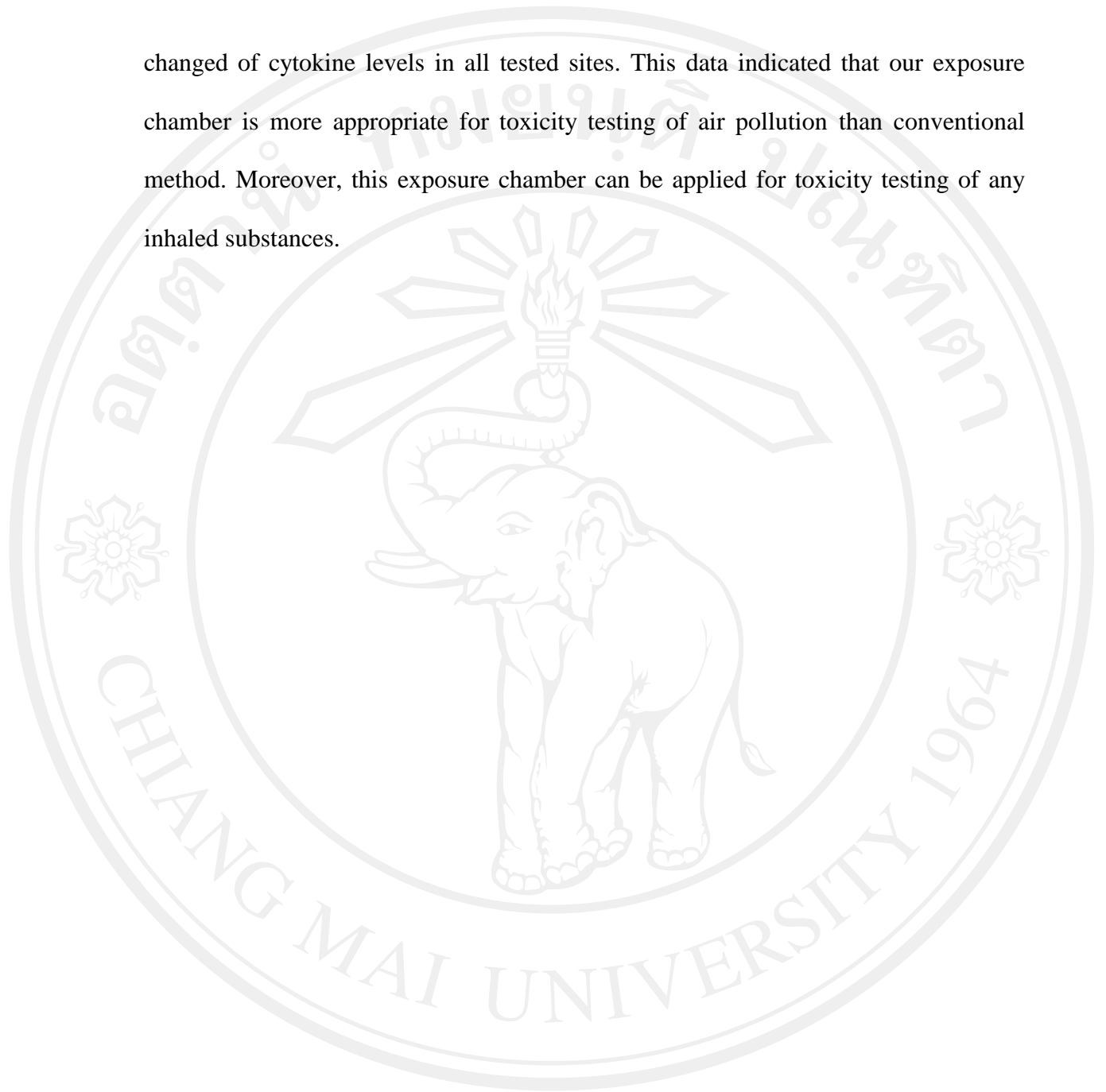
Thesis Advisory Committee Dr. Khanittha Taneyhill Advisor
Asst. Prof. Dr. Yottana Khunatorn Co-advisor

ABSTRACT

The use of animal models is the standard method for testing the toxicity of inhaled substances, including volatile organic compounds, cigarette smoke and air pollutants. This study aimed to develop an exposure chamber that could mimic the human lung. Human alveolar epithelial cells (A549) were cultured in the chamber via an air/liquid interface technique, with the apical side of the cells directly exposed to

the air. The study was divided into three parts; the comparison of the air/liquid interface to conventional cell culture, the construction of an exposure chamber and the toxicity testing of particulate matter collected from Chiang Mai by using the developed exposure chamber. First part, we cultured A549 cells using an air/liquid interface and conventional methods, in which cells were covered with culture medium. Cells were exposed to benzene vapor. Cell viability and interleukin-6 (IL-6) levels were determined using XTT and ELISA assays, respectively. Toxicity of benzene to A549 cells was higher in air/liquid interface than conventional culture technique. This suggested that the air/liquid interface technique is suitable for testing volatile compounds and other inhaled toxic substances. Second part, we constructed an exposure chamber that contained two main parts, a chamber and a culture zone. Tested air was aspirated through a UV light zone. The UV light could destroy any bacteria in the air. The air was then passed through the culture zone, which was an incubator controlling the temperature to 37 degrees Celsius. A549 cells were cultured by the air/liquid interface technique. The air was aspirated out of the chamber. The flow rate was equal to that of human breathing. The exposure chamber prototype passed the tests for sterility, temperature control, flow rate and the possibility of A549 cell culture. Last experiment, toxicity testing of air pollution by using the exposure chamber prototype and the conventional method were done at Warorot market, Saraphi district, and Phalad temple, Chiang Mai province. Both IL-6 and IL-8 were increased in response to air pollution from Saraphi district compared to Phalad temple. On the other hand, they were decreased in Warorot market. The different response of air pollution to human airway epithelial cells may cause by the different composition of air pollution. In conventional toxicity testing method, there was no

changed of cytokine levels in all tested sites. This data indicated that our exposure chamber is more appropriate for toxicity testing of air pollution than conventional method. Moreover, this exposure chamber can be applied for toxicity testing of any inhaled substances.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

การทดสอบความเป็นพิษของอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กใน
จังหวัดเชียงใหม่โดยใช้เครื่องมือดูดอากาศต้นแบบให้
สัมผัสโดยตรงกับเซลล์เยื่อปอด

ผู้เขียน

นายสุรภัย อุดมสม

ปริญญา

วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (เทคนิคการแพทย์)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

ดร.ชนิษฐา ทานีฮิล

อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก

ผศ.ดร.ยศธนา คุณาทร

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

บทคัดย่อ

สารพิษที่ได้รับโดยการหายใจมีหลายรูปแบบ ตั้งแต่สารระเหยภายในโรงงาน รวมไปถึงอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กในอากาศ การทดสอบความเป็นพิษของสารพิษกลุ่มนี้ จำเป็นต้องทำในสัตว์ทดลอง การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อผลิตเครื่องดูดอากาศต้นแบบที่สามารถดูดอากาศที่มีสารพิษเข้ามาสัมผัสกับเซลล์เยื่อปอดซึ่งเลี้ยงไว้ในสภาวะ air/liquid interface สถานการณ์นี้จะคล้ายกับการจำลองถุงลมปอดนั่นเอง การศึกษานี้แบ่งเป็น 3 ส่วนคือ การทดสอบการเลี้ยงเซลล์แบบ air/liquid interface การผลิตเครื่องดูดอากาศ และการทดสอบความเป็นพิษของอากาศในจังหวัดเชียงใหม่โดยใช้เครื่องดูดอากาศต้นแบบที่สร้างขึ้น การศึกษาส่วนแรกคือการทดสอบความเป็นพิษของเบนซีน (Benzene) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์เยื่อปอด และการหลั่งไซโตไคน์ชนิด interleukin-6 (IL-6) ในสภาวะที่เลี้ยงเซลล์แบบปกติและการเลี้ยงเซลล์แบบ air/liquid interface ผลการทดสอบพบว่าเซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะ air/liquid interface มีอัตราการมีชีวิตรอดน้อยกว่า และหลั่ง IL-6 มากกว่าเซลล์ที่เลี้ยงแบบปกติ แสดงให้เห็นว่าการทดสอบความเป็นพิษ

ของสารระเหยหรือสารพิษที่ได้รับโดยการหายใจด้วยวิธีการเลี้ยงเซลล์แบบ air/liquid interface จะแสดงความเป็นพิษของสารนั้นได้เร็วกว่า เนื่องจากเป็นสถานะที่เหมือนกับในเซลล์อุ้งลมปิด การศึกษาส่วนที่สองคือการสร้างเครื่องมือดูดอากาศต้นแบบ โดยมีหลักการทำงานของเครื่องคือ อากาศจะถูกดูดเข้ามาโดยการทำงานของปั๊ม ซึ่งสามารถควบคุมการไหลของอากาศให้มีอัตราเร็วคงที่เทียบเท่ากับอัตราการหายใจของมนุษย์ หลังจากนั้นอากาศจะถูกทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้แสงอัลตราไวโอเล็ต ก่อนที่จะถูกดูดผ่าน impactor ที่สามารถเลือกให้อนุภาคฝุ่นขนาดเล็กกว่า 2.5 ไมโครเมตร (PM2.5) เท่านั้นที่ผ่านไปยังส่วนต่อไปได้ อากาศจะเข้าไปยังตู้ที่มีเซลล์เยื่อชีวอุ้งลมปิด (A549) ซึ่งเลี้ยงไว้ในสถานะ air/liquid interface อยู่ ตู้นี้จะควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 37°C เพื่อให้มีสภาวะเหมาะสมในการเลี้ยงเซลล์ อากาศจะไหลเวียนออกไปตลอดเวลาด้วยอัตราเร็วคงที่จากการทดสอบพบว่าสามารถใช้เลี้ยงเซลล์ได้ โดยที่เซลล์มีอัตราการมีชีวิตรอดไม่แตกต่างจากการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติ และไม่พบการปนเปื้อนของเชื้อแบคทีเรีย แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เครื่องมือต้นแบบนี้ไปทดสอบความเป็นพิษของสารพิษที่สนใจได้ การศึกษาส่วนที่สามคือการทดสอบความเป็นพิษของอากาศที่เก็บจากแหล่งที่มีมลพิษสูงได้แก่ ตลาดวโรรส และ บริเวณหน้าที่ว่าการอำเภอสารภี เปรียบเทียบกับอากาศจากแหล่งที่มีมลพิษต่ำคือวัดผาลาด โดยการใช้เครื่องมือดูดอากาศที่สร้างขึ้นเปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบความเป็นพิษแบบดั้งเดิม เมื่อใช้เครื่องมือดูดอากาศในการทดสอบ พบว่าอากาศจากบริเวณอำเภอสารภี เหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อชีวอุ้งลมปิดเพิ่มปริมาณ IL-6 และ IL-8 ได้ ในทางตรงกันข้ามจะพบปริมาณไซโตไคน์ทั้งสองชนิดนี้ลดลงเมื่อทำการทดสอบที่ตลาดวโรรส ส่วนที่วัดผาลาด ไม่มีการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไซโตไคน์ การที่พบผลตรงกันข้ามอาจเกิดจากส่วนประกอบของมลพิษที่แตกต่างกัน เมื่อใช้วิธีดั้งเดิมคือเก็บอนุภาคฝุ่นขนาดเล็กลงบนกระดาษกรอง สกัด แล้วทดสอบกับเซลล์ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของปริมาณไซโตไคน์แต่อย่างใด การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าวิธีการทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เครื่องดูดอากาศต้นแบบ เป็นวิธีที่เหมาะสม นอกจากนี้เครื่องมือนี้ยังสามารถนำไปประยุกต์ใช้ได้กับการทดสอบสารพิษอื่นๆที่ร่างกายได้รับโดยการหายใจได้อีกด้วย