

Thesis Title Effect of Total Suspended Particles in Chiang Mai Polluted Air on Degranulation of Mast Cells

Author Mr.Tanee Lerkprasoppol

Degree Master of Science (Toxicology)

Thesis Advisory Committee

Dr. Wilaiwan Petsophonsakul

Assoc.Prof.Dr. Werawan Ruangyuttikarn

Chairperson

Member

ABSTRACT

Chiang Mai's air quality has been steadily deteriorating over the last decade. Statistically, admission of respiratory patients has almost doubled over the last few years at Maharaj Nakhon Chiang Mai Hospital, a major hospital. Although numerous epidemiological studies have demonstrated positive correlations between polluted air and allergic disease, polluted air as well as concentrations of the individual components of particulate matter (PM) often do not over acceptable levels. Therefore, more sensitive biological markers are needed to relate the association of polluted air to the relevant health effect. In this study, a new method to detect the immunotoxicity of total suspended particles (TSPs) from polluted air was established. The allergic reaction was assessed *in vitro* by measuring the release of a mediator, β -hexosaminidase, during induction of mast cell degranulation. The direct cytotoxicity of TSPs was determined by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay. In addition, the effects in air of PM components such as cadmium, lead and benzo[a]pyrene on the mediator release of mast cells were investigated.

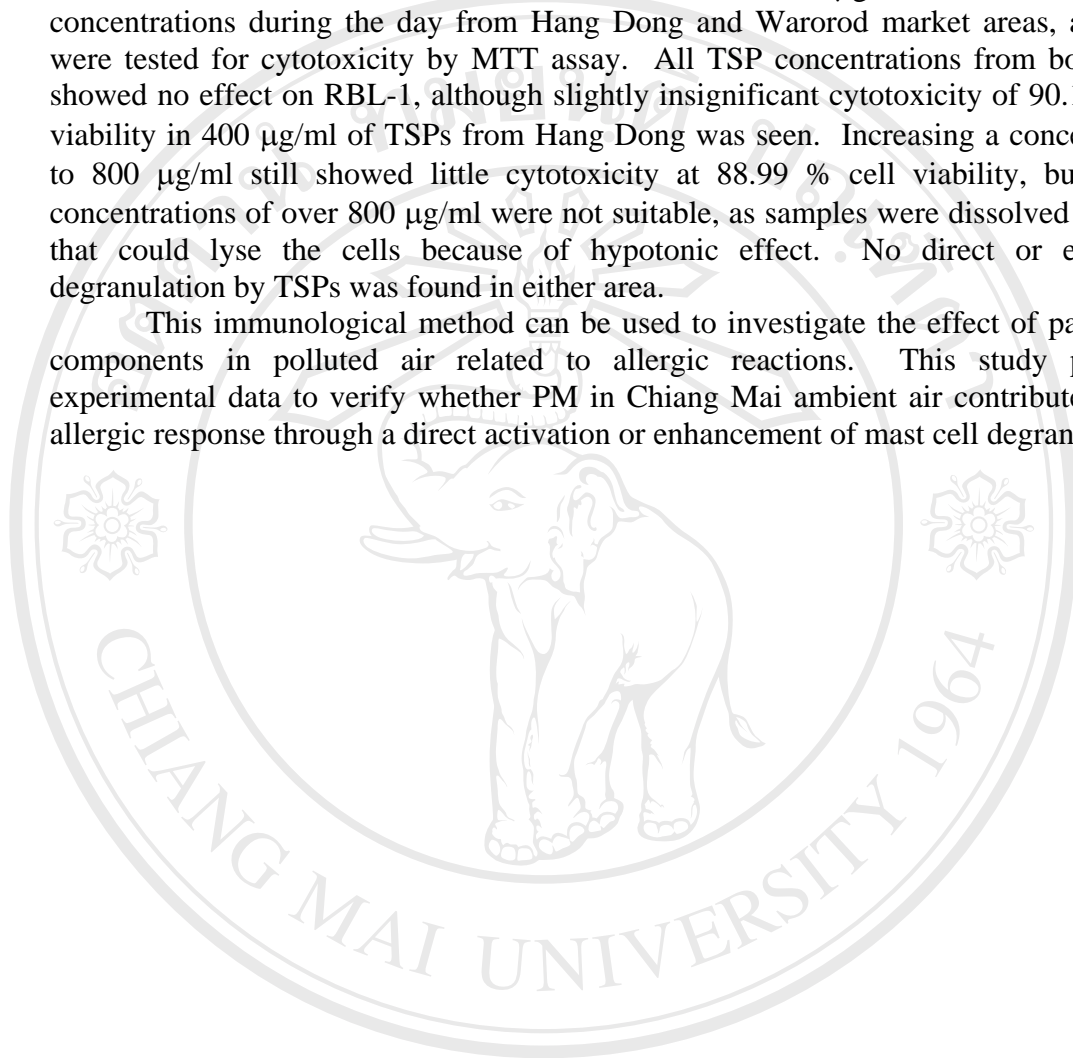
RBL-1 cells, a rat basophilic leukemia mast cell, between 1×10^4 – 1.6×10^5 cells/well were titrated. The 8×10^4 cells/well gave optimal value, which could clearly see the cytotoxicity as well as sufficient amount of detectable β -hexosaminidase. To investigate the enhancement of degranulation, the suboptimal condition for induction of degranulation was titrated. The $1 \mu\text{g/ml}$ of IgE antibody in combination with 10 and 100 ng/ml of dinitrophenylated-human serum albumin (DNP-HAS) was chosen for sensitization and activation, respectively, of RBL-1 mast cells.

The concentrations of benzo[a]pyrene, CdCl_2 and PbCl_2 were determined for their cytotoxicity by MTT assay. Benzo[a]pyrene did not show cytotoxicity to RBL-1 cells. Only CdCl_2 at 10^{-4} M was toxic and it directly induced the release the β -hexosaminidase, suggesting that cellular cytotoxicity of CdCl_2 led to the degranulation of RBL-1 cells. In contrast, PbCl_2 at all concentration between 10^{-4} -

10^{-9} M was neither toxic nor did it directly induce degranulation of RBL-1 cells. However, the enhancement of degranulation by PbCl_2 could be found at concentrations 10^{-8} and 10^{-9} M in the combination of 10 ng/ml DNP-HSA and 1 $\mu\text{g/ml}$ IgE antibody.

TSPs at the concentrations of 50, 100, 200 and 400 $\mu\text{g/ml}$ covered the average concentrations during the day from Hang Dong and Warorod market areas, and they were tested for cytotoxicity by MTT assay. All TSP concentrations from both areas showed no effect on RBL-1, although slightly insignificant cytotoxicity of 90.12% cell viability in 400 $\mu\text{g/ml}$ of TSPs from Hang Dong was seen. Increasing a concentration to 800 $\mu\text{g/ml}$ still showed little cytotoxicity at 88.99 % cell viability, but higher concentrations of over 800 $\mu\text{g/ml}$ were not suitable, as samples were dissolved in water that could lyse the cells because of hypotonic effect. No direct or enhanced degranulation by TSPs was found in either area.

This immunological method can be used to investigate the effect of particulate components in polluted air related to allergic reactions. This study provided experimental data to verify whether PM in Chiang Mai ambient air contributes to the allergic response through a direct activation or enhancement of mast cell degranulation.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright © by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลของอนุภาคฝุ่นรวมจากอากาศเสียในเมืองเชียงใหม่ต่อการติดเชื้อของมาสต์เซลล์

ผู้เขียน นายธานี ฤกษ์ประสพผล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (พิษวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

อ.ดร.วิไลวรรณ เพชรโสภณสกุล

ประธานกรรมการ

รศ.ดร.วีระวรรณ เรืองยุทธิการณ์

กรรมการ

บทคัดย่อ

ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาคุณภาพอากาศในเมืองเชียงใหม่มีภาวะที่แย่ลง จากสถิติผู้ป่วยของโรงพยาบาลมหาราชนครเชียงใหม่ซึ่งเป็นโรงพยาบาลใหญ่ในจังหวัดเชียงใหม่ พบว่ามีจำนวนผู้ป่วยทางเดินหายใจเพิ่มขึ้นเป็นเท่าตัวในหลายปีที่ผ่านมา แม้จะมีการศึกษาทางระบาดวิทยาเป็นจำนวนมากที่แสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างมลภาวะทางอากาศกับโรคภูมิแพ้ แต่ระดับและองค์ประกอบในมลภาวะเหล่านั้นส่วนมากไม่ได้เกินระดับที่ยอมรับได้ ดังนั้นจึงจำเป็นที่จะต้องมีการศึกษาชีวภาพที่มีความไวสูงมาเป็นตัวระบุถึงความสัมพันธ์ระหว่างมลภาวะทางอากาศกับผลกระทบต่อสุขภาพ การศึกษาครั้งนี้ได้นำเสนอวิธีใหม่ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษที่เกิดต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยทดสอบภาวะการเกิดภูมิแพ้ในหลอดทดลองด้วยการวัดการหลั่ง mediators ได้แก่ เอนไซม์ β -hexosaminidase ที่หลั่งจากแกรนูลของมาสต์เซลล์ พร้อมกับศึกษาความเป็นพิษของฝุ่นรวม (total suspended particles, TSPs) โดยใช้วิธี MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] นอกจากนี้สารที่มีรายงานว่าพบในอนุภาคฝุ่น เช่น ตะกั่ว แคดเมียม และ benzo[a]pyrene ได้นำมาทดสอบการหลั่ง mediator จากมาสต์เซลล์ด้วย

ได้ใช้เซลล์ RBL-1 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งของมาสต์เซลล์ของหนูขาวจำนวนระหว่าง 1×10^4 ถึง 1.6×10^5 เซลล์ต่อหลุมทดสอบ พบว่าจำนวนเซลล์ 8×10^4 เซลล์เป็นปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม

ที่สุดสามารถเห็นผลการเกิดพิษโดยตรงได้ และเห็นผลการหลัง β -hexosaminidase ได้อย่างชัดเจน สำหรับการศึกษากการเสริมการหลังสาร ได้ใช้ IgE antibody ความเข้มข้น 1.0 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ร่วมกับสารก่อภูมิแพ้ dinitrophenylated-human serum albumin (DNP-HAS) ความเข้มข้น 10 และ 100 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการหลังสารจากแกรนูล

การทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT พบว่า benzo[a]pyrene ไม่เกิดพิษต่อเซลล์ RBL-1 มีเฉพาะแค่ความเข้มข้น 10^{-4} โมลาร์ ที่มีพิษต่อเซลล์โดยตรงและกระตุ้นให้มีการหลัง β -hexosaminidase ขณะที่ $PbCl_2$ ความเข้มข้นระหว่าง $10^{-4} - 10^{-9}$ โมลาร์ ไม่เกิดพิษและไม่กระตุ้นการหลังสารโดยตรงจากแกรนูล อย่างไรก็ตาม $PbCl_2$ ที่ความเข้มข้น 10^{-8} และ 10^{-9} โมลาร์ สามารถเสริมการหลังสารจากแกรนูลได้เมื่อให้ร่วมกับ DNP-HSA 10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร และ IgE antibody 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ฝุ่นรวมหรือ TSPs ที่สกัดได้จากตลาดหางดงและตลาดวโรรสความเข้มข้น 50, 100, 200 และ 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งครอบคลุมถึงปริมาณที่พบในอากาศประจำวันได้นำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าฝุ่นรวมที่ได้จากทั้งสองบริเวณไม่มีผลต่อเซลล์ RBL-1 แต่ฝุ่นรวมจากตลาดหางดงที่ความเข้มข้น 400 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นพิษต่อเซลล์บ้างเล็กน้อยแต่ไม่ถึงระดับนัยสำคัญ โดยมีเซลล์ที่มีชีวิตรอดเพียงร้อยละ 90.12 และเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของฝุ่นรวมถึง 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ก็ยังพบเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ถึงร้อยละ 88.99 การเพิ่มความเข้มข้นที่สูงกว่า 800 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่เหมาะสมสำหรับการทดสอบเนื่องจากตัวอย่างที่ได้ละลายในน้ำสามารถทำให้เซลล์แตกได้จากภาวะ hypotonic สรุปโดยรวมได้ว่าฝุ่นรวมจากทั้งสองแหล่งไม่มีฤทธิ์โดยตรงหรือเสริมการกระตุ้นการหลังสารจากแกรนูล

วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันจากงานวิจัยครั้งนี้สามารถนำไปใช้ทดสอบผลกระทบของมลสารในอากาศต่อการเกิดภาวะภูมิแพ้ได้ เป็นการประยุกต์เพื่อพิสูจน์ว่ามลภาวะทางอากาศมีผลต่อภาวะภูมิแพ้หรือกระตุ้นการหลังของสารจากมาเซลล์ได้มากน้อยเพียงใด