

Titanium Dioxide Nanoparticles Induce Vascular Adhesion Molecule-1 in Human Vascular Endothelial Cells

Chakkaphop Jaiyen¹, Narisa Kengtrong Bordeerat²,
Sudawadee Kongkhum² and Somsak Fongsupa^{2*}

¹Graduate Program in Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand

²Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences,
Thammasat University, Rangsit Campus, Pathum Thani Province, Thailand

Abstract

Nanomaterials are composed of nanoparticles with high stability and corrosion resistance properties. The application of nanoparticles has been increasing in industrial and consumer products. Therefore, the chance of human exposure via inhalation, ingestion, and skin contact increases, and the nanoparticles can enter the blood circulation via vascular endothelial cells and induce cytotoxicity. Titanium dioxide nanoparticles (TiO₂-NPs) have been used in various products, including nano-paint, disinfectants, cosmetics, sunscreens, therapeutic drugs, medical devices, food products, and insecticides. Therefore, this research aimed to study cytotoxicity and the effects of TiO₂-NPs on human vascular endothelial cells using the HMEC-1 cell line. The results showed an average 15.4% cellular uptake of TiO₂-NPs. At 50 to 1,000 mg/L TiO₂-NPs significantly increased cell viability, induced the production of intracellular ROS levels, and elevated the expression of VCAM-1 ($p < 0.05$). In conclusion, TiO₂-NPs induced stimulation of vascular adhesion molecules (VCAM-1), which could lead to vascular inflammation and atherosclerosis.

Keywords: Titanium dioxide, Nanoparticles, Endothelial cells

*Corresponding author E-mail address: somsak.f@allied.tu.ac.th

Received: 13 April 2023

Revised: 31 May 2023

Accepted: 2 June 2023

อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์กระตุ้นการแสดงออก ของโปรตีนยึดเกาะในเซลล์บุผนังหลอดเลือด

จักรภพ ใจเย็น¹ นริสา เก่งตรง บัตรีฐ² สุดาวดี คงขำ² และ สมศักดิ์ ฟองสุภา^{2*}

¹บัณฑิตศึกษา สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

²ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จังหวัดปทุมธานี

บทคัดย่อ

วัสดุนาโนเป็นวัสดุที่มีอนุภาคนาโนเป็นส่วนประกอบ มีความเสถียรสูง และทนต่อการกัดกร่อน ปัจจุบันมีการนำอนุภาคนาโนมาใช้ประโยชน์ในการผลิตสินค้าอุตสาหกรรมและสินค้าอุปโภคบริโภคมากขึ้น ทำให้มีโอกาสสัมผัสและนำเข้าสู่ร่างกายมากขึ้น โดยผ่านทางหายใจ การกิน และทางผิวหนัง หลังจากนั้นอนุภาคนาโนจะเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตผ่านเซลล์บุผนังหลอดเลือดและอาจทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ได้ อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์เป็นอนุภาคนาโนที่มีการนำมาใช้ผลิตสินค้าหลายชนิด ได้แก่ ผลิตภัณฑ์สีทาบ้าน ผลิตภัณฑ์ป้องกันการติดเชื้อ เครื่องสำอาง ครีมกันแดด ยารักษาโรค เครื่องมือแพทย์ ผลิตภัณฑ์อาหาร และสารกำจัดแมลง ดังนั้นการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษ และผลกระทบโดยตรงของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยงชนิด HMEC-1 วัดปริมาณการเข้าสู่เซลล์ของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ อัตราการมีชีวิตของเซลล์ การสร้างอนุมูลอิสระ และการแสดงออกของโมเลกุลยึดเกาะบนผิวเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าที่ความเข้มข้น 50-1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์เข้าสู่เซลล์ได้เฉลี่ยร้อยละ 15.4 ของปริมาณที่สัมผัส มีผลเพิ่มอัตราการมีชีวิตของเซลล์ เพิ่มระดับสารอนุมูลอิสระในเซลล์ และกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) สรุปว่าอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์มีผลกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนยึดเกาะ VCAM-1 ซึ่งอาจนำไปสู่กระบวนการอักเสบของเซลล์บุผนังหลอดเลือด และภาวะหลอดเลือดแดงแข็งได้

คำสำคัญ: ไทเทเนียมไดออกไซด์ อนุภาคนาโน เซลล์บุผนังหลอดเลือด

*ผู้รับผิดชอบบทความ E-mail address: somsak.f@allied.tu.ac.th

รับบทความ: 13 เมษายน 2566

แก้ไขบทความ: 31 พฤษภาคม 2566

รับตีพิมพ์บทความ: 2 มิถุนายน 2566

บทนำ

ปัจจุบันความก้าวหน้าของศาสตร์ด้านนาโนเทคโนโลยีได้ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการสังเคราะห์สารหรือวัสดุนาโน (nanomaterial) ซึ่งประกอบด้วยอะตอมหรือโมเลกุลที่มีโครงสร้างขนาดเล็กมากอยู่ในช่วง 1 ถึง 100 นาโนเมตร ซึ่งเรียกว่าอนุภาคนาโน (nanoparticle) ทำให้ได้วัสดุใหม่ๆ ที่มีสมบัติพิเศษทั้งทางกายภาพ เคมี และชีวภาพ เช่น ความเร็ว ความแข็งแรง การนำไฟฟ้า การเป็นฉนวนไฟฟ้า การดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเล็ต เพื่อนำมาใช้ประโยชน์ในอุตสาหกรรม การผลิตเครื่องอุปโภคบริโภค วิศวกรรม เกษตรกรรม เทคโนโลยีชีวภาพ และทางการแพทย์ รวมทั้งในการเพิ่มมูลค่าของผลิตภัณฑ์⁽¹⁾ และเนื่องจากการนำวัสดุนาโนดังกล่าวมาใช้ในการผลิตและมีการใช้ผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของวัสดุนาโนอย่างแพร่หลายในหมู่ผู้บริโภค ทำให้มีความเสี่ยงในการปล่อยออกสู่สิ่งแวดล้อม และมีการสัมผัสกับร่างกายมากขึ้น

ผลการศึกษาวิจัยที่ผ่านมาเกี่ยวกับอนุภาคที่มีขนาดเล็ก (ambient particle matter) ในอากาศทั่วไปพบว่ามีความเข้มข้นอยู่ในช่วง 10-50 ไมโครกรัมต่อลูกบาศก์เมตร โดยเฉพาะอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก (ultrafine particles) น้อยกว่า 100 นาโนเมตร ซึ่งต่อมาเรียกว่าอนุภาคนาโน (nanoparticle)⁽²⁾ ได้ถูกเฝ้าระวังว่าอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ^(3,4) โดยวัสดุนาโนที่มีขนาดเล็กดังกล่าวนี้สามารถเข้าสู่ร่างกายผ่านทางหายใจเอาอนุภาคนาโนที่อยู่ในรูปอนุภาคฝุ่นละอองที่แพร่กระจายอยู่ในอากาศที่เป็นพิษ (air pollution) ผ่านหลอดลมเข้าไปยังถุงลมขนาดเล็กภายในปอดซึ่งอาจก่อให้เกิดการอักเสบเรื้อรังของปอด (chronic obstructive pulmonary disease)⁽⁵⁾ และเข้าสู่กระแสเลือดไปสะสมตามอวัยวะต่างๆ ในร่างกาย⁽⁶⁻⁸⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการเข้าสู่ระบบไหลเวียนโลหิตผ่านเซลล์บุผนังหลอดเลือด (vascular endothelial cell) ซึ่งเป็นการสัมผัสโดยตรงและ

ก่อให้เกิดความเสียหายต่อผนังหลอดเลือดได้⁽⁸⁾

การศึกษากลไกการก่อพิษของอนุภาคที่มีขนาดเล็กมาก พบว่าหลังจากอนุภาคนาโนเข้าสู่ถุงลมภายในปอด จะทำให้เกิดการอักเสบของปอด (lung inflammation) และมีการปล่อยสาร inflammatory mediators หลายชนิด^(9,10) ได้แก่ อนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species, ROS) และ ไซโตไคน์ เช่น TNF- α , IL-6, IL1 และ IL-1 β เข้าสู่กระแสเลือดไปกระตุ้นการสร้างเม็ดเลือดขาวในไขกระดูก และสามารถกระตุ้นเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้มีการแสดงออกของโปรตีนยึดเกาะบนผิวเซลล์ (adhesion molecules) ที่เรียกว่า vascular adhesion molecule-1 (VCAM-1) เพิ่มขึ้น

ในภาวะที่ร่างกายมีความผิดปกติของผนังหลอดเลือดแดงเนื่องจากการสะสมของไขมันชนิดแอลดีแอล-คอเลสเตอรอล ใต้ผนังหลอดเลือดทำให้เริ่มเกิดการเปลี่ยนแปลงระหว่างเซลล์เอนโดทีเลียม เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กล้ามเนื้อเรียบและเกล็ดเลือด โดยมี growth factor และ ไซโตไคน์ หรือ คีโมไคน์ ที่เซลล์เหล่านี้สร้างขึ้นไปกระตุ้นให้เซลล์เอนโดทีเลียมสร้าง vascular-cell adhesion molecule (VCAM-1) ซึ่งเป็นโปรตีนกลุ่ม immunoglobulin superfamily (Ig) และเป็น calcium-independent transmembrane glycoproteins ซึ่งมีบทบาทในการเกิด immune cell transmigration บนผิวของเซลล์เอนโดทีเลียม สามารถยึดเกาะกับอินทิกรินของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์ ลิมโฟไซต์ อีโอซิโนฟิล และทำให้มีการดึงเม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์มารวมตัวกันและมีการสะสมของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดโมโนไซต์เข้าสู่ใต้ผนังหลอดเลือดมากยิ่งขึ้น ก่อให้เกิดกระบวนการที่เรียกว่า leukocyte-endothelial cell signal transduction มีการทำลายเซลล์เอนโดทีเลียมที่อยู่ใกล้เคียง และมีการอักเสบเรื้อรัง (chronic inflammation) จนมีการก่อตัวของพลาต (plaque)

ซึ่งประกอบด้วยไขมัน แอลดีแอล-คอเลสเตอรอล แคลเซียม และส่วนประกอบอื่นๆ ภายในหลอดเลือด ก่อให้เกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis)⁽¹¹⁾ และมีการทำลายเซลล์เอนโดทีเลียมที่อยู่ใกล้เคียงโดยแมคโครฟาจ จะสร้าง reactive oxygen species (ROS) และ hydrolytic enzymes ต่างๆ เกิดการแตกของพลาต และเกิดภาวะลิ่มเลือดอุดตัน^(12,13) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ VCAM-1 เนื่องจากการสัมผัสกับอนุภาคนาโนในผู้ป่วยที่มีความผิดปกติของผนังหลอดเลือดแดงเนื่องจากการสะสมของไขมันชนิดแอลดีแอล-คอเลสเตอรอล จะเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดขาวมารวมตัวกันและจับที่ผนังเซลล์บุหลอดเลือดเพิ่มมากขึ้น เกิดการกระตุ้นการอักเสบของ atherosclerotic plaques^(14,15) ทำให้เสี่ยงต่อการเกิดภาวะหลอดเลือดแข็ง (atherosclerosis) โรคหัวใจขาดเลือด (ischemic heart disease) และโรคหลอดเลือดสมอง (stroke)^(16,17)

ไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2) จัดเป็นอนุภาคนาโน⁽¹⁸⁾ ซึ่งประกอบด้วยออกไซด์ของโลหะไทเทเนียม มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีสมบัติการกระจายและดูดกลืนแสงอัลตราไวโอเลต (scattering and absorbing)⁽¹⁹⁻²¹⁾ มีโครงสร้างทั้งหมด 3 แบบ ได้แก่ อะนาเทส (anatase) รูไทล์ (rutile) และบรูไคต์ (brookite)⁽²²⁾ ซึ่งผลิตภัณฑ์ไทเทเนียมไดออกไซด์บางชนิดที่มีจำหน่ายมีขนาดโมเลกุลเล็กมากถึง 10-30 นาโนเมตร เช่น small-sized TiO_2 particle/Degussa P25⁽²³⁻²⁵⁾ ซึ่งเคยตรวจพบได้ในบรรยากาศของภาคตะวันออกเฉียงใต้ของกรุงปักกิ่ง⁽²⁶⁾ และไทเทเนียมไดออกไซด์ชนิดที่มีการนำไปใช้มากที่สุดคือรูไทล์และอะนาเทส เนื่องจากมีความเสถียรและทนต่อการกัดกร่อน โดยมีการใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น สีนาโนทาบ้าน สารเคลือบผลิตภัณฑ์ ยาสีฟัน ส่วนผสมในเครื่องสำอาง ครีมบำรุงผิว ครีมกันแดด ยารักษาโรค และวัสดุเครื่องมือการแพทย์ อนุภาค

นาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2 -NPs) สามารถเข้าสู่ร่างกายได้หลายทาง แต่ส่วนใหญ่จะผ่าน 2 ทางหลัก ได้แก่ ทางเดินหายใจ และทางผิวหนัง แล้วจึงแพร่เข้าสู่กระแสเลือด⁽²⁷⁻²⁹⁾ ไปสะสมในอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย โดยพบว่าส่วนใหญ่จะไปสะสมมากที่สุด⁽³⁰⁾ แต่การก่อให้เกิดพิษของ TiO_2 -NPs มักเกิดจากการได้รับเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเดินหายใจ โดยพบว่าหนูทดลองที่ได้รับ TiO_2 -NPs ผ่านทางเดินหายใจทำให้เกิด fibroproliferative change ในปอด และมีการเพิ่มขึ้นของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลใน bronchoalveolar lavage (BAL) รวมทั้งมีการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจในปอดให้หลั่ง proinflammatory cytokines เช่น IL-8, IL-1 β และ TNF- α เข้าสู่กระแสโลหิตซึ่งบ่งชี้ว่ามีการอักเสบด้วย^(31,32) นอกจากนี้ยังพบว่ามีผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดขนาดเล็กที่หัวใจ (coronary arteriolar endothelium) และมีการสร้างอนุมูลอิสระของออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) เพิ่มขึ้นในผนังของหลอดเลือดขนาดเล็ก (coronary microvascular wall) ที่หัวใจด้วย^(33,34) ยังไม่มีรายงานผลกระทบที่เกิดขึ้นต่ออวัยวะต่างๆ จากการเกิดพิษของ TiO_2 -NPs โดยตรงแต่มีเป็นลักษณะพิษแบบเรื้อรังและอาจส่งผลในระยะยาว⁽²⁷⁾

อย่างไรก็ตามการศึกษาผลกระทบของอนุภาคนาโนขนาดเล็กมาก และ TiO_2 -NPs ต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดโดยตรงยังมีข้อมูลน้อย ตลอดจนการตรวจวัดปริมาณวัสดุนาโนยังมีความซับซ้อน ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพงอีกทั้งความรู้เกี่ยวกับความปลอดภัยและอันตรายของ TiO_2 -NPs และผลิตภัณฑ์นาโนต่อสุขภาพยังมีน้อย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าจึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษและผลกระทบโดยตรงของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2 -NPs) ต่อเซลล์บุผนังหลอดเลือดซึ่งอาจเป็นปัจจัยเสี่ยงต่อการเกิดโรคหลอดเลือดอักเสบและแข็งตัว (atherosclerosis)

โดยการตรวจวิเคราะห์ปริมาณ TiO_2 -NPs ในเซลล์ HMEC-1 (cellular uptake) ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณธาตุ⁽³⁵⁾ การทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability)^(36,37) การทดสอบการสร้างอนุมูลอิสระ^(38,39) และการทดสอบการแสดงออกของโปรตีนยึดเกาะ vascular adhesion molecules-1 (VCAM-1)⁽⁴⁰⁾

วัสดุและวิธีการ

1. เครื่องมือวิเคราะห์ ได้แก่ 1) เครื่องวิเคราะห์ inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) ยี่ห้อ Perkin Elmer รุ่น Nexion-300Q 2) เครื่อง microplate reader ยี่ห้อ Thermo รุ่น varioskans flash 3) เครื่อง fluorescence spectrophotometer ยี่ห้อ Dynex รุ่น opsys MR

2. สารเคมี ได้แก่ 1) อาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-F12 และ bovine serum ยี่ห้อ Gibco™ 2) supplements (insulin, human EGF, transferrin, selenium และ hydrocortisone, 3) 2',7'-dichlorodihydrofluorescein, diacetate (DCFH₂-DA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide, titanium (IV) oxide powder (mixture of rutile and anatase) ขนาด < 100 nm ยี่ห้อ Sigma-Aldrich 4) enhanced chemiluminescence (ECL) ยี่ห้อ Merck 5) antibodies: monoclonal β -actin antibody (rabbit mAb, cat. no.4970S), monoclonal VCAM-1 antibody (rabbit mAb, cat. no.136625), conjugated-HRP anti-globulin (goat anti rabbit IgG secondary antibody-HRP, cat. no.7074S) เป็นของยี่ห้อ Cell Signaling Technology

3. การเตรียมสารทดสอบ TiO_2 suspension (stock solution 10 กรัมต่อลิตร)

เตรียม stock solution TiO_2 เข้มข้น 10

กรัมต่อลิตร (ร้อยละ 1 โดยน้ำหนัก ในน้ำ) โดยชั่งสาร TiO_2 (ที่มีขนาด อนุภาค <100 นาโนเมตร) ปริมาณ 10 มิลลิกรัม ลงในน้ำกลั่น 1 มิลลิตร ผสมให้เข้ากัน ด้วยเครื่องเขย่าสาร (vortex mixer) อย่างแรง แล้วลดปริมาตรน้อยๆ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นที่ต้องการ (โดยใช้สูตรคำนวณ $M_1 V_1 = M_2 V_2$) และผสม TiO_2 suspension กับอาหารเลี้ยงเซลล์ให้เป็นเนื้อเดียวกันก่อนนำไปทดสอบกับเซลล์ต่อไป

4. การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผนังหลอดเลือด (HMEC-1)

เพาะเลี้ยงเซลล์บุผนังหลอดเลือด (HMEC-1/ATCC, USA) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12 (DMEM-F12) ที่เติม fetal bovine serum (เข้มข้นร้อยละ 5) และ supplements ซึ่งประกอบด้วย อินซูลิน (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), ทรานสเฟอริน (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร), growth factor (EGF) (10 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร), ไฮโดรคอร์ติโซน (36 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และ โซเดียม ซิลิเนียม (5 นาโนกรัมต่อมิลลิลิตร) และนำเซลล์ไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุกวันเว้นวัน จนมีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (70-80% confluence) จากนั้นจึงนำไปทำการทดสอบต่อไป

5. การวัดปริมาณอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO_2 -NPs) ในเซลล์ HMEC-1 (intracellular TiO_2 -NPs)

นำเซลล์ HMEC-1 ที่เจริญใน 6-wells plate ซึ่งแบ่งเป็น 6 กลุ่ม มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (70-80% confluence) ไปทดสอบกับ TiO_2 -NPs ที่ความเข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหาร DMEM-F12 ที่ไม่ผสมซีรั่ม และ supplements เป็น

เวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (PBS) 3-4 ครั้ง และแยกเซลล์ออกจาก 6-wells plate ด้วยสารละลายทริปซินเข้มข้นร้อยละ 0.25 (trypsinization) แล้วนำไปปั่นล้างเซลล์ด้วย PBS อีก 3-4 ครั้ง ที่ความเร็วรอบ 1,100 รอบต่อนาที นาน 10 นาที หลังจากนั้นนำเซลล์ไปย่อยด้วยสารละลายกรดไนตริกเข้มข้นร้อยละ 65 ที่ผสมกับสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์เข้มข้นร้อยละ 30 (อัตราส่วน 6:1) โดยใช้เครื่องไมโครเวฟ (microwave digestion) และเจือจางเซลล์ที่ย่อยแล้วด้วยน้ำกลั่นจนครบปริมาตร

10 มิลลิลิตร จากนั้นนำตัวอย่างเซลล์ที่ย่อยแล้วไปวิเคราะห์หาปริมาณ TiO_2 -NPs⁽⁴¹⁾ โดยใช้เครื่อง inductively coupled plasma- mass spectrometry (ICP-MS) รุ่น Nexion-300Q ของบริษัท Perkin Elmer เลือก isotope Ti_{49} mode โดยเทียบกับสารมาตรฐานไทเทเนียมเข้มข้นระหว่าง 0-2,000 ไมโครกรัมต่อลิตร และคำนวณร้อยละของปริมาณ TiO_2 -NPs ที่เข้าสู่เซลล์ (cellular uptake) เทียบกับปริมาณของ TiO_2 -NPs ที่เติมลงไปตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Cellular uptake} = \frac{\text{ปริมาณอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ในเซลล์ที่วัดได้}}{\text{ปริมาณอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ที่เติมลงไป}} \times 100$$

6. การทดสอบอัตราการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ด้วยวิธี MTT assay

นำเซลล์ HMEC-1 ที่เจริญใน 96-wells plate ซึ่งแบ่งเป็น 6 กลุ่ม มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (70-80% confluence) ไปทดสอบกับ TiO_2 -NPs ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-F12 (ไม่ผสมซีรัม และ supplements) เป็นเวลานาน 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อครบเวลาที่กำหนดนำเซลล์ไปเติม MTT reagent (0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazolium bromide) และนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาเติม DMSO (เข้มข้นร้อยละ 100) 0.15 มิลลิลิตร นำไปเขย่าเบาๆ 20 นาที ในที่มืด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (OD) ด้วยเครื่อง microplate reader (spectrophotometer) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงไปคำนวณอัตราการร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ไม่ผสม TiO_2 -NPs) ตามสมการดังนี้

$$\% \text{ Cell viability} = \frac{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มทดสอบ})}{(\text{ค่าการดูดกลืนแสงของกลุ่มควบคุม})} \times 100$$

7. การวิเคราะห์การสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ (intracellular ROS)⁽⁴²⁾

นำเซลล์ HMEC-1 ที่เลี้ยงใน 96-wells plate ซึ่งแบ่งเป็น 6 กลุ่ม มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (70-80% confluence)

ไปทดสอบกับ TiO_2 -NPs ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 500, และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-F12 ที่ไม่ผสมซีรัม และ supplements เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาที่กำหนด ล้างเซลล์ด้วย PBS 3-4 ครั้ง แล้วนำไปบ่ม

ด้วย 10 ไมโครโมลาร์ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH₂-DA) ใน DPBS buffer ที่ 37 องศาเซลเซียส ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ ด้วยเครื่อง fluorescence microplate reader ที่ความยาวคลื่น 492/535 นาโนเมตร และนำค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ (OD) ไปเปรียบเทียบกับค่าสร้าง ROS ในเซลล์กลุ่มควบคุม (ไม่ผสม TiO₂-NPs)

8. การวิเคราะห์การแสดงออกของ Adhesion molecules protein (VCAM-1)

นำเซลล์ HMEC-1 ที่เลี้ยงใน 6-wells plate ซึ่งแบ่งเป็น 5 กลุ่ม มีความหนาแน่นประมาณ 1×10^7 เซลล์ต่อมิลลิลิตร (70-80% confluence) ไปทดสอบกับ TiO₂-NPs ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-F12 ที่ไม่ผสม supplements และนำไปบ่มเพาะเลี้ยง ที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลานาน 8 ชั่วโมง เมื่อครบเวลา นำเซลล์ไปสกัดโปรตีนด้วย lysis buffer ที่ผสม protease inhibitors และนำสารสกัดไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford assay⁽⁴³⁾ จากนั้นนำโปรตีนที่สกัดได้จากเซลล์ไปแยกด้วยกระแสไฟฟ้าวิธี sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) และเคลื่อนย้ายแถบโปรตีนจากแผ่นเจลไปลงบนแผ่น polyvinylidene difluoride (PVDF) membrane เพื่อวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิค Western blot โดยการนำแผ่นฟิล์ม (PVDF) ที่มีโปรตีนไปย้อม (incubate) ด้วย monoclonal VCAM-1 antibody (rabbit mAb) และ monoclonal β -actin antibody (rabbit mAb) เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง ในตู้เย็นที่ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย TBST buffer 3-4 ครั้ง บ่มด้วย conjugated-HRP anti-globulin (goat anti rabbit IgG secondary antibody) นาน 1 ชั่วโมง ล้างด้วย TBST buffer 3-4 ครั้ง แล้วเติม enhanced

chemiluminescence (ECL) บนแผ่นฟิล์ม และนำฟิล์มเอกซเรย์ไปประกบบนแผ่นฟิล์มโปรตีนในห้องมืด ก็จะได้แถบสีดำแห่งของโปรตีน VCAM-1 protein และ β -actin protein บนฟิล์มเอกซเรย์ซึ่งสามารถมองเห็นการเพิ่มขึ้นด้วยตาเปล่า หรือนำไปวัดความเข้มของแถบสีด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ ImageJ (a Java-based image processing program)

9. การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

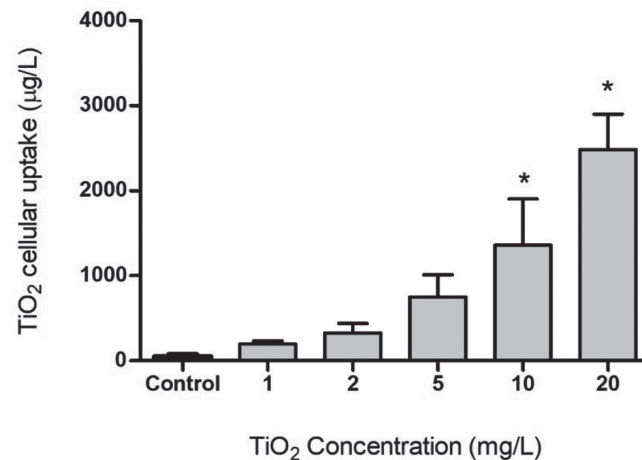
ข้อมูลที่ได้นำไปวิเคราะห์หา Mean $\pm$ SD และวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลทางสถิติ โดยใช้ one-way analysis of variance และ Turkey's method ใน GraphPad Prism[®] ในการวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลที่มีมากกว่า 2 กลุ่ม และระหว่างกลุ่ม ที่ระดับ $p < 0.05$

ผลการวิจัย

1. ผลการวัดปริมาณอนูภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO₂-NPs) ในเซลล์ HMEC-1 (cellular uptake)

จากการนำเซลล์บุผนังหลอดเลือด (HMEC-1) ที่เพาะเลี้ยงใน 6-wells plate ไปทดสอบกับ TiO₂-NPs ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM-F12 ที่ผสม TiO₂-NPs เข้มข้น 0, 1, 2, 5, 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลานาน 24 ชั่วโมง แล้วนำไปวิเคราะห์หาปริมาณ Ti ที่อยู่ในเซลล์ด้วยเครื่องวิเคราะห์ปริมาณโลหะ ICP-MS โดยใช้ isotope Ti₄₉ mode ผลการทดสอบพบว่าความเข้มค่าสัญญาณ (intensity) ของ Ti มีแนวโน้มสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TiO₂-NPs ตั้งแต่ 1-20 มิลลิกรัมต่อลิตร และเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ($p < 0.05$) (Fig. 1A) แสดงว่า TiO₂-NPs สามารถผ่านเข้าไปในเซลล์บุผนังหลอดเลือดได้ และมีอัตราการเข้าสู่เซลล์เฉลี่ยร้อยละ 15.4 ของปริมาณ TiO₂-NPs ที่เติมลงไป (Fig. 1B) แต่อัตราร้อยละ

(1A)



(1B)

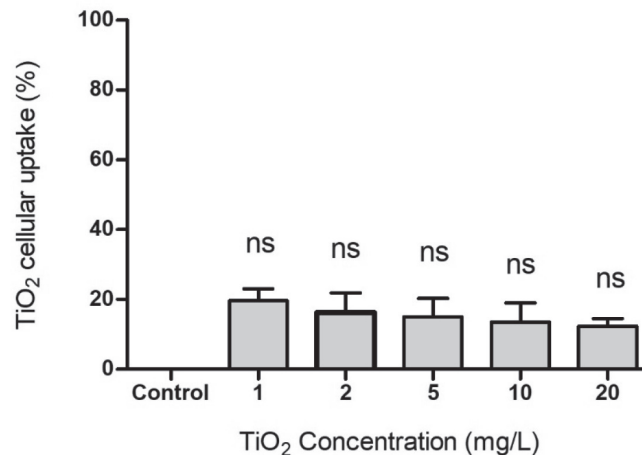


Fig. 1 Intracellular TiO₂-NPs (mean $\pm$ SD) in HMEC-1 cells after exposure to vehicle, 1, 2, 5, 10 and 20 mg/L TiO₂-NPs for 24 hr. (n = 3). (A) Intracellular TiO₂-NPs, (B) Percentage of TiO₂-NPs treatment, * p < 0.05 compared to the control group, ^{ns} p > 0.05 compared to between treatment group.

การเข้าสู่เซลล์ของ TiO₂-NPs ระหว่างกลุ่มทดสอบ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ (p > 0.05)

2. ผลการทดสอบความเป็นพิษของ TiO₂-NPs ต่อเซลล์ HMEC-1 (cytotoxicity)

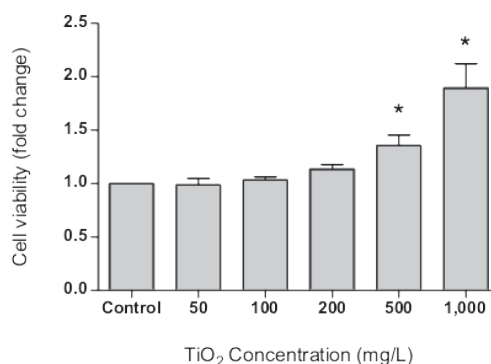
เมื่อนำเซลล์บุผนังหลอดเลือด (HMEC-1) ที่เพาะเลี้ยงใน 96-wells plate ไปทดสอบกับ TiO₂-NPs ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24, 48 และ 72

ชั่วโมง ตามลำดับ แล้วนำไปวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี MTT reagent (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) พบว่าเมื่อทดสอบเซลล์กับ TiO₂-NPs ที่ความเข้มข้น 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (p < 0.05) เทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (Fig. 2A) เมื่อทดสอบเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นของ TiO₂-NPs เท่ากับ 200, 500 และ 1,000

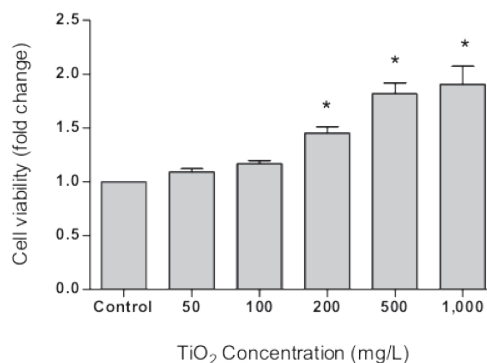
มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (Fig. 2B) และเมื่อทดสอบเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทุกระดับความเข้มข้นของ TiO_2 -NPs ตั้งแต่ 50 ถึง 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร อัตราการมีชีวิตของ

เซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) เทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (Fig. 2C) และแปรผันตรงตามความเข้มข้น (dose dependent) ของ TiO_2 -NPs ที่เพิ่มขึ้นในการทดสอบทั้งที่เวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

(2A)



(2B)



(2C)

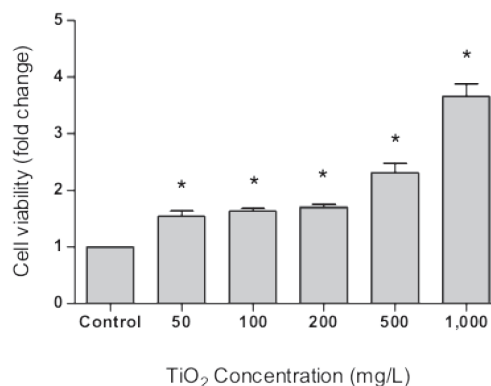


Fig. 2 Viability of HMEC-1 cells after exposure to vehicle, 50, 100, 200, 500 and 1,000 mg/L TiO_2 -NPs ($n = 3$). (A) 24 hr., (B) 48 hr., and (C) 72 hr., * $p < 0.05$ compared to the control group.

3. การทดสอบการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HMEC-1 (intracellular ROS)

เมื่อนำเซลล์ HMEC-1 ที่เพาะเลี้ยงใน 96-wells plate ไปทดสอบกับ TiO_2 -NPs ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 200, 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสาร DCFH₂-DA ใน dextrose phosphate buffer saline (DPBS) เป็นเวลา 30 นาที เพื่อตรวจจับการสร้าง ROS หลังจากนั้นนำไปวัดปริมาณสารอนุมูลอิสระ

(ROS) ในเซลล์ ด้วยเครื่อง fluorescence micro-plate reader พบว่ามีแนวโน้มของอัตราการสร้างสารอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นซึ่งแปรผันตรงตามความเข้มข้นและเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้นของ TiO_2 -NPs เท่ากับ 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับเซลล์กลุ่มควบคุม (Fig. 3) ซึ่งแสดงว่า TiO_2 -NPs สามารถกระตุ้นเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้สร้าง ROS ได้

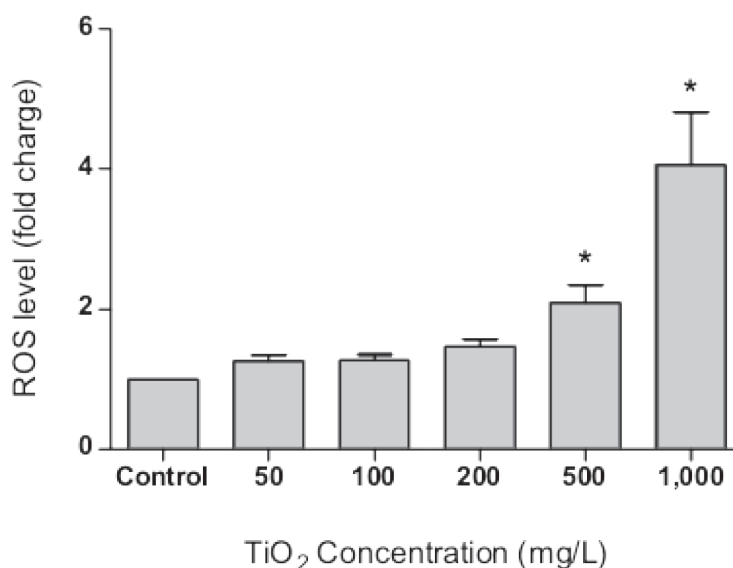


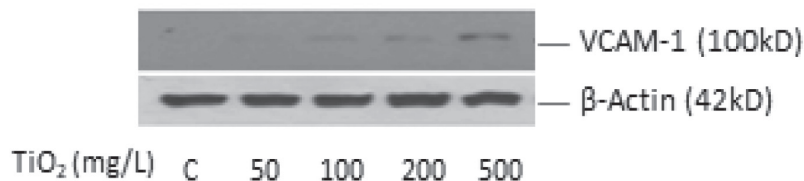
Fig. 3 Intracellular reactive oxygen species (ROS) generation in HMEC-1 cells after exposure to the vehicle, 50, 100, 200, 500 and 1,000 mg/L for 24 hr. (N = 3), * $p < 0.05$ compared to the control group.

4. ผลการวิเคราะห์การแสดงออก vascular adhesion molecules protein ในเซลล์ HMEC-1

เมื่อนำเซลล์ HMEC-1 ที่เพาะเลี้ยงใน 6-wells plate ไปทดสอบกับ TiO_2 -NPs ที่ระดับความเข้มข้น 0, 50, 100, 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 8 ชั่วโมงเพื่อตรวจสอบการแสดงออกของ vascular adhesion molecules (VCAM-1) ในเซลล์ HMEC-1 ด้วยวิธี Western

blotting พบว่า TiO_2 -NPs สามารถกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 เทียบกับโปรตีน β -actin ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ความเข้มข้น 200 และ 500 มิลลิกรัมต่อลิตร และแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของ TiO_2 -NPs (Fig. 4A, 4B) แสดงว่า TiO_2 -NPs สามารถกระตุ้นเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้มีการแสดงออกของโปรตีน VCAM-1 เพิ่มขึ้นได้

(4A)



(4B)

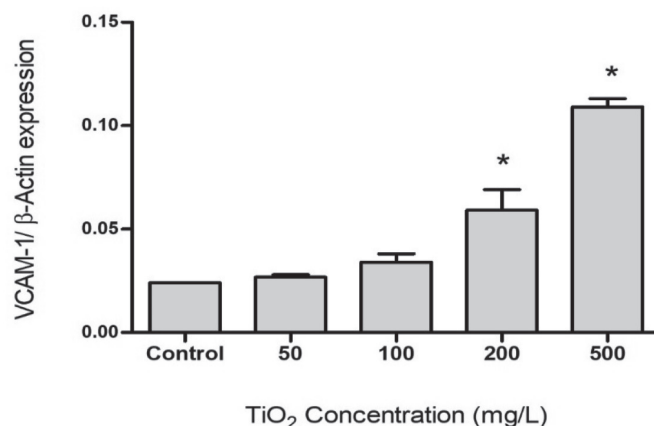


Fig. 4 Vascular adhesion molecules (VCAM-1) expression in HMEC-1 cells after exposure to the vehicle, 50, 100, 200 and 500 mg/L TiO₂-NPs (N = 3). (4A) VCAM-1 and β-actin expression with Western blot, (4B) VCAM-1/β-actin ratio expressed in a fold change, **p* < 0.05 compared to control group.

วิจารณ์

ผลการวิเคราะห์ปริมาณของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ (TiO₂-NPs) ในเซลล์ชนิด HMEC-1 แสดงถึงความสามารถในการนำ TiO₂-NPs เข้าสู่เซลล์ โดยพบว่า TiO₂-NPs เริ่มเข้าสู่เซลล์ได้ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และมีแนวโน้มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ (*p* < 0.05) แบบ dose dependent เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของ TiO₂-NPs ที่ 10 และ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร และสัดส่วนการเข้าสู่เซลล์ของ TiO₂-NPs มีอัตราเฉลี่ยร้อยละ 15.4 ของปริมาณ TiO₂-NPs ที่เติมลงไป ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Sukwong และคณะ⁽⁴⁴⁾ ปี พ.ศ. 2560 ที่ทดสอบกับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ และเซลล์แมโครฟาจ ซึ่งพบว่า TiO₂-NPs สามารถผ่าน

เข้าสู่เซลล์แมโครฟาจได้ที่มีความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อลิตร และวัดปริมาณ TiO₂-NPs ที่เข้าสู่เซลล์ได้ประมาณ 40.3 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการเข้าสู่เซลล์ประมาณร้อยละ 0.8 ส่วนเซลล์ที-ลิมโฟไซต์วัดปริมาณ TiO₂-NPs ที่เข้าสู่เซลล์ได้ประมาณ 0.2 ไมโครกรัมต่อลิตร ซึ่งคิดเป็นอัตราการเข้าสู่เซลล์ประมาณร้อยละ 0.004 ความแตกต่างของสัดส่วนการเข้าสู่เซลล์ของ TiO₂-NPs อาจเนื่องจากใช้เซลล์ต่างชนิดกันในการทดสอบ แสดงว่า TiO₂-NPs สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์บุผนังหลอดเลือดได้จริง ซึ่งอาจมีผลกระทบต่อเซลล์ได้

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของ TiO₂-NPs ต่อเซลล์ ชนิด HMEC-1 โดยวัดอัตราการมีชีวิตของเซลล์ ด้วยวิธี MTT assay พบว่าอัตราการมีชีวิต

ของเซลล์ไม่มีการลดลง แต่กลับมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ซึ่งอาจเนื่องจากความเข้มข้นของ TiO_2 -NPs ที่เซลล์สัมผัสมีความเป็นพิษที่ทำให้เซลล์สามารถสร้างกลไกลดความเป็นพิษได้บางส่วนทำให้การตายน้อยกว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัว (cell proliferation) เช่นเดียวกับ Peng และคณะ⁽⁴⁵⁾ ปี พ.ศ. 2553 ที่ทดสอบกับ human aortic endothelial cell (HAEC)) และจากการศึกษาของ Bermudez และคณะ⁽³¹⁾ ในปี พ.ศ. 2547 ที่พบว่า TiO_2 -NPs ทำให้มีการเพิ่มของเซลล์ในปอดหนู (fibroproliferative change) แต่ Montiel-Dávalos และคณะ⁽⁴⁶⁾ ในปี พ.ศ. 2555 ได้ทดสอบกับ human umbilical vein endothelial cell (HUVEC) พบว่า TiO_2 -NPs ทำให้การมีชีวิตของเซลล์มีปริมาณลดลง และการศึกษาของ Sukwong และคณะ⁽⁴⁴⁾ ในปี พ.ศ. 2560 ได้ทดสอบ TiO_2 -NPs กับเซลล์แมคโครฟาจ และ ที-ลิมโฟไซต์ พบว่าเซลล์มีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 250 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าชนิดของเซลล์ที่นำมาทดสอบมีผลต่อการมีชีวิตของเซลล์ อย่างไรก็ตามการที่พบว่า TiO_2 -NPs มีผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์โดยเฉพาะเซลล์เยื่อบุผนังหลอดเลือดอาจส่งผลต่อความหนาของผนังหลอดเลือดทำให้เกิดการอุดตันโดยเฉพาะบริเวณที่มี atherosclerotic plaque หรือเกิดความไม่เสถียรของเซลล์บุผนังหลอดเลือดเกิดการหลุดลอกแล้วไหลเวียนไปเกิดการอุดตันเส้นเลือดขนาดเล็กที่หัวใจหรือสมองได้ เสี่ยงต่อกล้ามเนื้อหัวใจขาดเลือดไปหล่อเลี้ยงเกิดภาวะที่เรียกว่า heart attacks และ strokes⁽⁴⁷⁻⁴⁹⁾

การศึกษานี้พบว่า TiO_2 -NPs สามารถกระตุ้นการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ HMEC-1 (intracellular ROS) ได้ซึ่งอาจมีกลไกจากสมบัติของอนุภาคนาโน ที่มีส่วนประกอบของโลหะทรานซิชัน ซึ่งจากการศึกษาความเป็นพิษของ TiO_2 โดยใช้

human epidermal cell พบว่ามีการสร้าง ROS ได้โดยอาศัยกลไกที่ผู้วิจัยได้เสนอแนะคือ เนื่องจากสมบัติพื้นผิวของอนุภาคนาโน ที่มีส่วนประกอบของโลหะทรานซิชัน สามารถให้หรือรับอิเล็กตรอนได้อาจทำให้เกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิปิด หรือ อาจไปเกี่ยวข้องกับ redox-cycling organic chemical เช่น ควิโนน หรือโมเลกุลของ O_2 ในเซลล์เป็นตัวรับอิเล็กตรอนแล้วเกิด $\text{O}_2^{-(50,51)}$ และมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้น อย่างมีนัยสำคัญ ($p < 0.05$) ที่ระดับความเข้มข้น 500 และ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sukwong และคณะ⁽⁴⁴⁾ ปี พ.ศ. 2560 ที่ได้ทดสอบ TiO_2 -NPs กับเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที-ลิมโฟไซต์ และแมคโครฟาจ ที่ความเข้มข้นของ TiO_2 -NPs ระหว่าง 5-500 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร และการศึกษาของ Han และคณะ⁽⁵²⁾ ในปี พ.ศ. 2556 ซึ่งทดสอบ TiO_2 -NPs กับเซลล์บุผนังหลอดเลือด (vascular endothelial cell) ที่แยกได้จาก porcine pulmonary arteries ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร จะเห็นได้ว่า TiO_2 สามารถเพิ่มภาวะ oxidative stress ในเซลล์ได้ซึ่งถือเป็นกลไกสำคัญที่ส่งผลต่อปัญหาสุขภาพที่เกิดจากอนุภาคนาโน โดยเฉพาะเซลล์บุผนังหลอดเลือด ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) ลดลง ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบหัวใจ และหลอดเลือด⁽⁵³⁻⁵⁵⁾

สิ่งที่น่าสนใจอย่างยิ่งจากผลการศึกษาค้นนี้พบว่า TiO_2 -NPs สามารถกระตุ้นเพิ่มการแสดงออกของโปรตีนยึดเกาะ (VCAM-1) ในเซลล์ HMEC-1 ได้ โดยอาจจะผ่านการสร้าง ROS ภายในเซลล์ก่อน⁽⁵⁶⁾ ซึ่งจากการศึกษาของ Deem และคณะ ในปี พ.ศ. 2547⁽⁵⁷⁾ ได้รายงานไว้ว่า ROS สามารถกระตุ้น VCAM-1 ระหว่างการเคลื่อนไหวของลิมโฟไซต์บนผิวของเซลล์บุผนังหลอดเลือด โดยการกระตุ้น

matrix metalloproteinase (MPP) ดังนั้นการเพิ่มขึ้นของ VCAM-1 จากการกระตุ้นของอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์ ในเซลล์ HMEC-1 น่าจะเกิดจาก ROS ที่เกิดขึ้น^(58,59) อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการยับยั้งการสร้าง ROS ด้วยเช่น N-acetyl cysteine (NAC) ซึ่งมีสมบัติเป็น oxidant scavenger และการเพิ่มขึ้นของ VCAM-1 แปรผันตรงกับความเข้มข้นของ TiO_2 -NPs ที่เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษาของ Han และคณะ⁽⁵²⁾ ปี พ.ศ. 2556 ซึ่งได้ทดสอบ TiO_2 กับเซลล์บุผนังหลอดเลือด ที่ได้จาก porcine pulmonary arteries พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของ inflammatory molecules เช่น vascular cell adhesion molecules-1 (VCAM-1) และ monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) การแสดงออกของ VCAM-1 ที่เพิ่มขึ้นบนผิวเซลล์บุผนังหลอดเลือดนั้นอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่สามารถเหนี่ยวนำการเกาะยึดของเซลล์เม็ดเลือดขาวในกระแสโลหิตให้มารวมตัวกันมากขึ้น โดยเฉพาะบริเวณที่มี atherosclerotic plaque ซึ่งจะเป็นการส่งเสริมทำให้เกิดการอักเสบของหลอดเลือดมากยิ่งขึ้น และเสี่ยงต่อการเพิ่มโอกาสในการเกิดการแข็งของหลอดเลือด (progressive atherosclerosis)

สรุป

การศึกษานี้สรุปว่าอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์สามารถผ่านเข้าสู่เซลล์บุผนังหลอดเลือด (HMEC-1) ได้ มีอัตราการเข้าสู่เซลล์ร้อยละ 15.4 สามารถกระตุ้นอัตราการมีชีวิตของเซลล์เพิ่มขึ้น และกระตุ้นเซลล์ให้สร้างสารอนุมูลอิสระของออกซิเจน (ROS) ซึ่งมีผลต่อการอักเสบของผนังหลอดเลือดได้ และที่สำคัญยังสามารถเหนี่ยวนำเซลล์บุผนังหลอดเลือดให้แสดงออกหรือสร้าง vascular adhesion molecules protein (VCAM-1) ซึ่งเป็นโปรตีนบน

ผิวของเซลล์บุผนังหลอดเลือดเพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเกาะยึดของเม็ดเลือดขาว และเพิ่มการอักเสบของผนังหลอดเลือด ด้วยปัจจัยดังกล่าวจะเห็นว่าอนุภาคนาโนไทเทเนียมไดออกไซด์อาจสามารถกระตุ้นให้เซลล์เยื่อผนังหลอดเลือดเกิดการอักเสบและทำงานผิดปกติ ซึ่งเป็นปัจจัยเริ่มต้นนำไปสู่ภาวะเสี่ยงการเกิดหลอดเลือดอักเสบและแข็งได้

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยนี้สำเร็จลงด้วยดีด้วยความกรุณาที่ให้การช่วยเหลือและการสนับสนุนจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.นริสา เก่งตรง บัณฑิตู ที่ได้ให้คำแนะนำข้อคิดเห็นตลอดจนแนวทางแก้ไขข้อบกพร่องในการทำวิจัยในครั้งนี้ และขอขอบคุณภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ที่อำนวยความสะดวกในการปฏิบัติในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

1. Vongpooon N, Pradipachitti N, Puvanakij-jakorn P, Sukniwatchai K, Keskovit S, Poomkam J. Current regulation on nano-products of Thai Food and Drug Administration. Thai Pharmaceutical and Health Science Journal 2015; 10: 132-8. (in Thai)
2. Buxton DB, Lee SC, Wickline SA, Ferrari M. National Heart, Lung and Blood Nanotechnology Working Group. Recommendations of The National Heart, Lung and Blood Institute Nanotechnology Working Group, Circulation 2003; 108: 2737-42.

3. Peters A, Wichmann HE, Tuch T, Heinrich J, Heyder J. Respiratory effects are associated with the number of ultrafine particles. *Am J Respir Crit Care Med* 1997; 155: 1376-83.
4. Donaldson K, Tran L, Jimenez L, *et al.* Combustion-derived Nano-particles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Particle Fibre Toxicol* 2005; 2: 1-14.
5. Hogg JC, Timens W. The pathology of chronic obstructive pulmonary disease. *Annu Rev Pathol* 2009; 4: 435-59.
6. Lu D, Luo Q, Chen R, *et al.* Chemical multi-fingerprinting of exogenous ultrafine particle in human serum and pleural effusion. *Nat. Commun* 2020; 11: 2567-74.
7. Calderón-Garcidueas L, González-Maciel A, Mukherjee PS, *et al.* Combustion-and friction-derived magnetic air pollution nanoparticle in human heart. *Environ. Res* [internet]. 2019 Sep [cited 2020 Mach 10];176. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0013935119303640> via%3Dihub
8. Miiller MR, Raftis JB, Langrish JP, *et al.* Inhaled nanoparticles accumulate at sites of vascular disease. *ACS Nano* 2017; 11: 4542-52.
9. Kido T, Tamagawa E, Bai N. Particulate matter induces translocation of LI-6 from the lung to the systemic circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2021; 44: 197-204.
10. Miyata R, Bai N, Vincent R, Sin DD, Eeden SF. Statin reduce ambient particle matter-induced lung inflammation by promoting the clearance of particulate matter < 10 µm from lung tissues. *Chest* 2013; 143: 452-60.
11. Foster CA. VCAM-1/alpha 4-integrin adhesion pathway: therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: S270-7.
12. Ross R. Atherosclerosis--an inflammatory disease. *N Engl J Med* 1999 Jan 14; 340:115-26.
13. Ballantyne CM, Nambi V. Markers of inflammation and their clinical significance. *Atheroscler Suppl* 2005; 6: 21-9.
14. Lusis AJ. Atherosclerosis. *Nature* 2000; 407: 233-41.
15. Joppa P, Petrasova D, Stancak B, Tkacova R. Systemic inflammation in patient with COPD and pulmonary hypertension. *Chest* 2006; 130: 326-33.
16. Laratta CR, Eeden SV. Acute exacerbation of chronic obstructive pulmonary disease: cardiovascular links. *BioMed Research International* 2014; 528789: 1-18.
17. Danesh J, Whincup P, Walker M, *et al.* Low-grade inflammation and coronary heart disease: prospective study and updated meta-analysis. *Br Med J* 2000; 321: 199-204.

18. Cargnello M, Gordon TR, Murray CB. Solution-phase synthesis of titanium dioxide nanoparticles and nanocrystals. *Chem Rev* 2014; 114: 9319-45.
19. Braun JH, Baidins A, Marganski RE. TiO₂ pigment technology: A review. *Prog Org Coat* 1992; 20: 105-38.
20. Shand M, Anderson AJ. Aqueous phase photocatalytic nitrate destruction using titania based materials: Routes to enhanced performance and prospects for visible light activation. *Catal Sci Technol* 2013; 3: 879-99.
21. Gopinath KP, Madhav NV, Krishnan A, Malolan R, Rangarajan G. Present applications of titanium dioxide for the photocatalytic removal of pollutants from water: A review. *J Environ Manag* [internet]. 2020 Jun [cited 2021 Oct 21]; 270. Available from: <https://www.Sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479720308367> via%3Dihub
22. Racovita AD. Titanium Dioxide: Structure, Impact, and Toxicity. *Int J Environ Res Public Health* [internet]. 2022 May [cited 2022 Oct 22]; 19. Available from: <https://www.mdpi.com/journal/ijerph>
23. Kreyling WG, Holzwarth U, Schleh C, *et al.* Quantitative biokinetics over a 28 day period of freshly generated, pristine, 20 nm titanium dioxide nanoparticle aerosols in healthy adult rats after a single two-hour inhalation exposure. *Particle and Fibre Toxicology* 2019; 16: 1-29.
24. Qia Y, Weia S, Xin T, *et al.* Passage of exogenous fine particles from the lung into the brain in humans and animals. *PNAS* 2022; 119: 1-9.
25. Wolfgang G, Kreyling WG, Holzwarth U, *et al.* Quantitative biokinetics over a 28 days period of freshly generated, pristine, 20 nm titanium dioxide nanoparticle aerosols in healthy adult rats after a single two-hour inhalation exposure. *Particle Fibre Toxicol* 2019; 16: 29-56.
26. Schleicher N, Norra S, Chai F, Chen Y, Wang S, Steuben D. Anthropogenic versus geogenic contribution to total suspended atmospheric particulate matter and its variations during a two-year sampling period in Beijing China. *J Environ Monit* 2010; 12: 434-41
27. Shakeel M, Jabeen F, Shabbir S, Asghar MS, Khan MS, Chaudhry AS. Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: A review. *Biol Trace Elem Res* 2016; 172: 1-36.
28. Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Part Fibre Toxicol* 2013; 10: 15-16.
29. Yah CS, Simate GS, Iyuke SE. Nanoparticles toxicity and their routes of exposures. *Pak J Pharm Sci* 2012; 25: 477-91.
30. Arora S, Rajwadw JM, Paknikar K. Nanotoxicology and in vitro studies: the need of hour. *Appl Pharm* 2010; 258: 151-65.

31. Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, *et al.* Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to sub-chronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci* 2004; 77: 347-57.
32. Lindberg HK, Falck GCM, Catalán J, *et al.* Genotoxicity of inhaled nanosized TiO₂ in mice. *Mutat Res Gen Toxicol Environ Mutagen* 2012; 745: 58-64.
33. LeBlanc AJ, Moseley AM, Chen BT, Frazer D, Castranova V, Nurkiewicz TR. Nanoparticle inhalation impairs coronary microvascular reactivity via a local reactive oxygen species dependent mechanism. *Cardiovasc Toxicol* 2010; 10: 27-36.
34. Nurkiewicz TR, Porter DW, Hubbs AF, *et al.* Pulmonary particulate matter and systemic microvascular dysfunction. *Res Rep Health Eff Inst* 2011; 164: 3-48.
35. Prichard E. Inorganic analytes: Determination, In: *Trace analysis: A structured approach to obtaining reliable results*. 1st Ed. Cambridge: Crown copyright for the Laboratory of the Government Chemist by the Royal Society of Chemistry 1996; 95-152.
36. Sayes CM, Reed KL, Warheit DB. Assessing toxicity of fine and nanoparticles: comparing in vitro measurements to in vivo pulmonary toxicity profiles. *Toxicol Sci* 2007; 97: 163-80.
37. Warheit DB, Hoke RA, Finlay C, Donner EM, Reed KL, Sates CM. Development of a base set of toxicity tests using ultrafine TiO₂ particles as a component of nanoparticle risk management. *Toxicol Lett* 2007; 171: 99-110.
38. Folkmann JK, Risom L, Jacobsen NR, Wallin H, Loft S, Moller P. Oxidatively damaged DNA in rats exposed by oral gavage to C60 fullerenes and single-walled carbon nanotubes. *Environ Health Perspect* 2009; 117: 703-8.
39. Karlsson HL, Cronholm P, Gustafsson J, Moller L. Copper oxide nanoparticles are highly toxic: a comparison between metal oxide nanoparticles and carbon nanotubes. *Chem Res Toxicol* 2008; 21: 1726-32.
40. Foster CA. VCAM-1/alpha 4-integrin adhesion pathway: therapeutic target for allergic inflammatory disorders. *J Allergy Clin Immunol* 1996; 98: 270-7.
41. Nia Y, Millour S, Noël L, Krystek P, Jong WD, Guérin T. Determination of Ti from TiO₂ Nanoparticles in Biological Materials by Different ICP-MS Instruments: Method Validation and Applications. *J Nanomed Nanotechnol* 2015; 6: 1-8.
42. Aranda A, Sequedo L, Tolosa L, *et al.* Dichloro-dihydro-fluorescein diacetate (DCFH-DA) assay: A quantitative method for oxidative stress assessment of nanoparticle-treated cells 2013; *Toxicol Vitro* 27 (2013) 954-63

43. Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 1976; 72: 248-54.
44. Sukwong P, Kongseng S, Chaicherd S, Yoovathaworn K, Tubtimkuna S, Pissuwan D. Comparison effects of titanium dioxide nanoparticles on immune cells in adaptive and innate immune system. *IET Nanobio-technol* 2017; 11: 759-65.
45. Peng L, Barczak AJ, Barbeau RA, *et al.* Whole Genome Expression Analysis Reveals Differential Effects of TiO₂ Nanotubes on Vascular Cells. *Nano Lett* 2010; 10: 143-8.
46. Montiel-Dávalos A, Ventura-Gallegos JL, Alfaro-Moreno E, *et al.* TiO₂ nanoparticles induce dysfunction and activation of human endothelial cells. *Chem Res Toxicol* 2012; 25: 920-30.
47. Kido T, Tamagawa E, Bai N, *et al.* Particulate matter induces translocation of IL-6 from the lung to the systemic circulation. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2011; 44: 197-204.
48. Miyata R, Bai N, Vincent R, Sin DD, Van Eeden SF. Statins reduce ambient particulate matter-induced lung inflammation by promoting the clearance of particulate matter, < 10 µm from lung tissues. *Chest* 2013; 143: 452-60.
49. Miyata R, Hiraiwa K, Cheng JC, *et al.* Statins attenuate the development of atherosclerosis and endothelial dysfunction induced by exposure to urban particulate matter (PM10). *Toxicol Appl Pharmacol* 2013; 272: 1-11.
50. Shukla RK, Sharma V, Pandey AK, Singh S, Sultana S, Dhawan A, ROS-mediated genotoxicity induced by titanium dioxide nanoparticles in human epidermal cells. *Toxicol Vitro* 2011; 25: 231-41.
51. Nel A, Xia T, Mañdler L, Li N. Toxic Potential of Materials at the Nano level. *Science* 2006; 311: 622-7.
52. Han SG, Newsome B, Hennig B. Titanium dioxide nanoparticles increase inflammatory responses in vascular endothelial cells. *Toxicology* 2013; 122: 1-8.
53. Gurr JR, Wang AS, Chen CH, Jan KY. Ultrafine titanium dioxide particles in the absence of photoactivation can induce oxidative damage to human bronchial epithelial cells. *Toxicology* 2005; 213: 66-73.
54. Long TC, Tajuba J, Sama P, *et al.* Nano-size titanium dioxide stimulates reactive oxygen species in brain microglia and damages neurons in vitro. *Environ Health Perspect* 2007; 115: 1631-7.
55. Skocaj M, Filipic M, Petkovic J, Novak S. Titanium dioxide in our everyday life; Is it safe?. *Radiol Oncol* 2011; 45: 227-47.

56. Eeden SF, Sin DD. Chronic obstructive pulmonary disease: A chronic systemic inflammatory disease. *Respiration* 2008; 75: 224-38.
57. Deem TL, Cook-Mills JM. Vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) activation of endothelial cell matrix metalloproteinases: role of reactive oxygen species, *Blood* 2004; 104: 2385-93.
58. Eeden SF, Sin DD. Chronic obstructive pulmonary disease: A chronic systemic inflammatory disease. *Respiration* 2008; 75: 224-38.
59. Sin DD, Man SF. Chronic obstruction pulmonary disease: a novel risk factor for cardiovascular disease. *Can J Physiol Pharmacol* 2005; 83: 8-13.