นิพนธ์ต้นฉบับ ▪ Original Article

ผลของพาราควอตต่อการสร้างอินเตอร์ฟีรอน-แกมมาโดยทีเซลล์

สุรชาติ พุทธิษา[1*], พัชราภรณ์ ทิพยวัฒน์[2], รุ่งนภา ศรานุชิต[3], นัฐพล ประกอบแก้ว[4]

[1]หน่วยความเป็นเลิศด้านภูมิคุ้มกันวินิจฉัยและรักษาในระดับเซลล์และโมเลกุล ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา

[2]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

[3]วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี

[4]ภาควิชาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

Effect of Paraquat on Interferon-gamma Production by T cell

Surachat Buddhisa[1*], Patcharaporn Tippayawat[2], Rungnapa Sranujit[3], Nattaphol Prakobkaew[4]

[1]Unit of Excellence in Cellular and Molecular Immunodiagnosis and Therapy, Department of Medical Technology, School of Allied Health Sciences, University of Phayao.

[2] Department of Medical Technology, Faculty of Associated Medical Sciences, Khon Kaen University

[3] Thai Traditional Medicine College, Rajamangala University of Technology Thanyaburi

[4] Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, Burapha University

Received: 4 September 2019

Accepted: 3 February 2020

หลักการและวัตถุประสงค์: พาราควอตเป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั่วโลก และมีรายงานถึงความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลกระทบต่อทีเซลล์มนุษย์ ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพาราควอตต่อการสร้างไซโตไคน์อินเตอร์ฟีรอน-แกมมา (IFN-γ) ของทีเซลล์มนุษย์ในหลอดทดลอง

วิธีการศึกษา: กระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิด peripheral blood mononuclear cells ในสภาวะที่มีพาราควอตความเข้มข้นต่างๆ ตรวจสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยวิธี trypan blue exclusion และตรวจหา metabolic activity ด้วยวิธี MTT ตรวจวัดระดับ IFN-γ โดยเทคนิค ELISA หลังจากกระตุ้นการทำงานของทีเซลล์ด้วย phytohemagglutinin

ผลการศึกษา: พาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีผลทำให้ร้อยละความมีชีวิตลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม ($p< 0.05$) และการตอบสนองของทีเซลล์โดยการสร้าง IFN-γ เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับพาราควอตทั้งสองความเข้มข้นมีค่าร้อยละของการยับยั้งการสร้าง IFN-γ เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม ($p< 0.05$) นอกจากนี้พบว่าพาราควอตมีผลยับยั้งการทำงานของทีเซลล์ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกและการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นในอาสาสมัครทุกรายหลังสัมผัสกับพาราควอตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

สรุป: ผลการศึกษาบ่งชี้ว่าพาราควอตความเข้มข้น 100 และ

Background and objective: Paraquat is one of the most widely used global herbicides for weed control. Recently, paraquat has been reported to have immune toxic effects in animal models, while effects on human T cell function remain undetermined. To resolve these issues, the effects of paraquat on IFN-γ production by human T cells in vitro were evaluated.

Methods: Peripheral blood mononuclear cells were co-cultured with various concentrations of paraquat dichloride or phytohemagglutinin (PHA). Cell viability was determined by trypan blue exclusion and relative metabolic activity was assayed by MTT method. IFN-γ production was measured after co-culture with phytohemagglutinin by ELISA.

Results: Paraquat at 100 µg/mL did not affect cell viability, whereas 300 µg/mL paraquat significantly reduced the percentage of viable cells compared with the control ($p< 0.05$). Addition of 100 and 300 µg/mL of paraquat significantly increased the percentage of IFN-γ production inhibition compared with the control ($p< 0.05$). Moreover, inhibition of IFN-γ production by paraquat was observed after 24 h co-culture and showed a robust effect in all individuals after 48 h co-culture.

*Corresponding author : Surachat Buddhisa, Unit of Excellence in Cellular and Molecular Immunodiagnosis and Therapy, Department of Medical Technology, Faculty of Allied Health Sciences, University of Phayao. E-mail: sb.dhisa@gmail.com; surachat.bu@up.ac.th

300 µg/mL มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง IFN-γ ของทีเซลล์ ซึ่งอาจนำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากความไม่สมดุลของการตอบสนองของทีเซลล์ในผู้ที่ได้รับพาราควอตโดยตรงหรือการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรได้

คำสำคัญ: พาราควอต, อินเตอร์ฟีรอน-แกมมา

Conclusion: Data indicated that paraquat at the concentration of 100 and 300 µg/mL had an inhibitory effect on IFN-γ production by T cells. Thus, direct contact with paraquat or paraquat contaminated environments and agricultural products increased risk of diseases caused by T cell dysfunction.

Keyword: Paraquat, T cell, Interferon-gamma

ศรีนครินทร์เวชสาร 2563; 35(2): 129-134. ● Srinagarind Med J 2020; 35(2): 129-134.

บทนำ

พาราควอต (paraquat) หรือ N,N′-dimethyl-4,4′-bipyridinium dichloride เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช (Pesticide) ในกลุ่มสารกำจัดวัชพืช (Herbicide) ที่เกษตรกรไทยนิยมใช้กันอย่างแพร่หลายเพื่อช่วยเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร พาราควอตมีความคงทนในสภาพแวดล้อมสูงจึงพบการปนเปื้อนบนผิวดิน แหล่งน้ำธรรมชาติ น้ำอุปโภคและบริโภค[1,2] พาราควอตสามารถตกค้างในร่างกายเกษตรกรผู้ใช้หรือผู้ที่อาศัยในบริเวณใกล้เคียง[3] และยังสามารถผ่านรกจากมารดาสู่ทารกในครรภ์ได้[4] นอกจากนี้ การใช้พาราควอตในปริมาณมากและการเก็บเกี่ยวผลผลิตเร็วกว่าเวลาที่กำหนดหลังการใช้สารเคมี เป็นสาเหตุให้ผักและผลไม้ที่วางจำหน่ายในตลาดสดและห้างสรรพสินค้าร้อยละ 38 มีพาราควอตตกค้างในระดับสูงเกินมาตรฐานสารพิษตกค้างสูงสุด (maximum residue limit)[5] ซึ่งสะท้อนถึงปัญหาของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่เกิดขึ้นกับเกษตรกร ผู้บริโภคและสิ่งแวดล้อมและเป็นผลให้ประชาชนทั่วไปอาจได้รับสารพิษโดยตรงจากการสัมผัสหรือการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมหรือการถ่ายทอดในห่วงโซ่อาหาร

แม้ว่าองค์การอนามัยโลกจะจัดพาราควอตเป็นสารเคมีกลุ่มที่มีพิษระดับปานกลาง แต่การได้รับสารพิษในปริมาณมากจากการรับประทานหรือการสัมผัสทางผิวหนัง สามารถก่อให้เกิดพิษแบบเฉียบพลัน รุนแรง เป็นผลให้ตับ ปอด หัวใจ และไตทำงานล้มเหลวนำไปสู่การเสียชีวิตได้ทั้งในมนุษย์และสัตว์ทดลอง[6] ในขณะที่การได้รับพาราควอตในระดับต่ำเป็นระยะเวลานานมีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคพาร์กินสัน[7,8]และมะเร็ง[9] จากรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า พาราควอตในระดับปานกลางและสูงเมื่อเข้าสู่ร่างกายสามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในร่างกายเกิดเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) และส่งผลให้เซลล์ต่างๆ ในร่างกายตายแบบอะพอพโทซิส (apoptosis) หรือทำหน้าที่ผิดปกติ รวมถึงเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน (immune system) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการป้องกันร่างกายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิต หรือต่อต้านมะเร็ง[10] นอกจากนี้ยังส่งผลต่อการสร้างและการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) ของหนูทดลองโดยชักนำให้เกิดการตายของแมคโครฟาจ (macrophage)[11] กดการสร้างเอ็นเคเซลล์ (NK cell) และกดการทำหน้าที่จับกินเชื้อแบคทีเรียของแมคโครฟาจและนิวโทรฟิล (neutrophil)[12] รวมถึงลดประสิทธิภาพในการฆ่าเซลล์เป้าหมายของเอ็นเคเซลล์[13]

ทีเซลล์ (T cell) เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวในระบบภูมิคุ้มกันรับมาภายหลัง (adaptive immunity) มีบทบาทสำคัญในการป้องกันร่างกายจากการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส ปรสิตและต่อต้านเซลล์มะเร็ง โดย IFN-γ เป็นไซโตไคน์ที่สร้างและหลั่งจากทีเซลล์ทั้งชนิด $CD4^+$ และ $CD8^+$ ซึ่งมีบทบาทส่งเสริมการทำงานของเซลล์อื่นๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน[10] เพื่อกำจัดเชื้อจุลชีพที่บุกรุกเข้าสู่ร่างกาย หรือยับยั้งเซลล์มะเร็ง จากรายงานการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า พาราควอตสามารถชักนำให้เกิดการตายของทีเซลล์ทั้งชนิด $CD4^+$ และ $CD8^+$ ในหนูทดลอง[14] อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีรายงานการศึกษาถึงผลของพาราควอตต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของทีเซลล์มนุษย์ ดังนั้น การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของพาราควอตต่อการตอบสนองของทีเซลล์มนุษย์โดยการสร้าง IFN-γ ในหลอดทดลอง ซึ่งผลการศึกษาจะเป็นองค์ความรู้แสดงถึงผลของพาราควอตต่อการทำงานของทีเซลล์ สามารถนำไปเผยแพร่สู่ประชาชนให้ตระหนักถึงผลกระทบของสารเคมีจำกัดศัตรูพืชต่อการทำงานของทีเซลล์ ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการป้องกันร่างกายจากการเป็นโรค และนำไปสู่การรณรงค์เพื่อลดการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่ส่งผลต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมต่อไป

วิธีการศึกษา

1. อาสาสมัครและตัวอย่างที่ใช้ในการศึกษา

ตัวอย่างเลือดรวม (whole blood) ซึ่งมีเฮพาริน (heparin) เป็นสารกันเลือดแข็ง เจาะเก็บจากอาสาสมัครสุขภาพดีในจังหวัดพะเยา จำนวน 7 ราย อายุระหว่าง 21-56 ปี ไม่มีโรคประจำตัว คือ เบาหวาน โรคไต โรคมะเร็ง หรือโรคความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันต่างๆ ไม่มีอาการที่บ่งบอกถึงการติดเชื้อเฉพาะที่หรือในกระแสเลือดภายในระยะเวลา 1 เดือนก่อนการศึกษา ไม่อยู่ในช่วงรับประทานยาปฏิชีวนะ ยากดภูมิคุ้มกัน และมีจำนวนและชนิดเม็ดเลือดขาวอยู่ในช่วงปกติ ตรวจนับจำนวนและแยกชนิดเม็ดเลือดขาวด้วยเครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ (Sysmex, Japan) การศึกษานี้ ได้ผ่านการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์มหาวิทยาลัยบูรพา เลขที่โครงการวิจัย Sci 046/2562 หมายเลขใบรับรองเลขที่ 109/2562

2. การแยก Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs)

ตัวอย่างเลือดครบส่วนปริมาตร 5 มิลลิลิตร ถูกเจือจางด้วย Phosphate buffer saline (PBS) ในอัตราส่วน 1:1 แล้วปล่อย

ลงบนน้ำยา LymphoPrep (STEMCELL Technologies) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร จากนั้นปั่นแยกด้วยความเร็วรอบ 1,800 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลา ดูดเก็บชั้นสีขาวขุ่นของ PBMCs ใส่ลงในหลอดทดลองใหม่ ปั่นล้างเซลล์ที่ได้ 2 ครั้งด้วย PBS ที่ความเร็ว 1,400 รอบ/นาที อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที กระจายเซลล์ที่ได้ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ (ประกอบด้วย 10% fetal bovine serum (Gibco) Penicilin-Streptomicin (Gibco) ความเข้มข้น 100 µg/mL และ Gentamycin (Sigma) ความเข้มข้น 100 µg/mL ใน RPMI 1,640 medium (Gibco)) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร จากนั้นนับจำนวนเซลล์และตรวจสอบความมีชีวิตด้วยวิธี trypan blue exclusion

3. การทดสอบความเป็นพิษของพาราควอตต่อ PBMCs โดยทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธี Trypan Blue Exclusion และทดสอบหา metabolic activity ด้วยวิธี MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) tetrazolium reduction assay

เพาะเลี้ยง PBMCs ในสภาวะที่ไม่มี (สภาวะควบคุม) หรือมีพาราควอตไดคลอไรด์ (paraquat dichloride; เข้มข้น 27.6%w/v) ที่มีจำหน่ายตามท้องตลาด โดยความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ PBMCs เท่ากับ 100 หรือ 300 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเซลล์ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ผสมกับ 0.4% Trypan Blue (Gibco) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงใน hemocytometer นับจำนวนเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสี) และเซลล์ไม่มีชีวิต (ติดสี) ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และคำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์

วิธี MTT หลังจากเพาะเลี้ยง PBMCs เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เติมสารละลาย 0.5% MTT (AppliChem) ปริมาตร 20 ไมโครลิตร และบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาปั่นตกตะกอนที่ความเร็วรอบ 3,000 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที ดูดน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใสด้านบนปริมาตร 190 ไมโครลิตรทิ้ง เติม DMSO ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและคำนวณร้อยละ relative metabolic activity ดังสูตร ร้อยละ relative metabolic activity = ((OD สภาวะไม่มีพาราควอต – OD สภาวะมีพาราควอต) x 100)/OD สภาวะไม่มีพาราควอต

4. การทดสอบผลของพาราควอตต่อการตอบสนองของทีเซลล์โดยการสร้าง IFN-γ

PBMCs ความเข้มข้น $1x10^6$ cells/µL ($1x10^5$ cells/well) เพาะเลี้ยงร่วมกับ PHA (Phytohemagglutinin; Biochrom AG) ซึ่งเป็นตัวกระตุ้นสำหรับทีเซลล์ความเข้มข้น 1 µg/mL ในสภาวะที่ไม่มี (0) ซึ่งเป็นสภาวะควบคุมหรือมีพาราควอต โดยมีความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับ PBMCs เท่ากับ 100 และ 300 µg/mL บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ในสภาวะที่มี CO_2 ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาดูดเก็บน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใสด้านบนปริมาตร 120 ไมโครลิตรและเก็บรักษาไว้ที่ -70 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการตรวจวัดระดับ IFN-γ

5. การตรวจวัดระดับ IFN-γ ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์

เคลือบเพลทด้วย mouse monoclonal anti-human IFN-γ (BD Biosciences) และบล็อกเพลทด้วย 10% fetal bovine serum ใน PBS ตามวิธีการทดสอบของบริษัทผู้ผลิต (BD Biosciences) จากนั้นเติมสารละลายมาตรฐาน IFN-γ และน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใสด้านบน ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างเพลทด้วย 0.5% Tween 20 ใน PBS จำนวน 3 ครั้ง เติม Biotinylated anti-human IFN-γ และ Avidin-hoseradish peroxidase conjugated reagent ปริมาตร 50 ไมโครลิตรและบ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาล้างจำนวน 5 ครั้ง เติม tetrathylbenzidine substrate solution (TMB, Invitrogen) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิห้องในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที หยุดปฏิกิริยาด้วย 2N H_2SO_4 ปริมาตร 25 ไมโครลิตร จากนั้นตรวจวัดค่าดูดกลืนแสง (OD) ที่ความยาวคลื่น 450 นาโนเมตร หาค่าความเข้มข้นของ IFN-γ โดยนำ OD ที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐานและคำนวณร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ ดังสูตร ร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ = (ระดับ IFN-γ สภาวะไม่มีพาราควอต – ระดับ IFN-γ สภาวะมีพาราควอต) x 100)/ระดับ IFN-γ สภาวะไม่มีพาราควอต

6. การวิเคราะห์ข้อมูล

รายงานผลในรูปแบบของค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean ± SEM) และวิเคราะห์ผลของพาราควอตต่อความสามารถในการสร้าง IFN-γ เทียบสภาวะมีพาราควอตกับไม่มีพาราควอตโดยใช้สถิติ Mann-whitney U Test มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อ $p < 0.05$ (ความเชื่อมั่นที่ร้อยละ 95)

ผลการศึกษา

1. ผลของพาราควอตต่อความมีชีวิตของ PBMCs

ผลการทดลองความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs ของพาราควอต หลังบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ในสภาวะไม่มีพาราควอต (สภาวะควบคุม) มีร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์เมื่อย้อมด้วยสี trypan blue เท่ากับ 98.38 และในสภาวะที่มีพาราควอตความเข้มข้นสุดท้าย 100 µg/mL มีค่าเท่ากับ 97.31 ซึ่งแตกต่างอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม ($p = 0.2089$) ในขณะที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีร้อยละของความมีชีวิตของเซลล์เท่ากับ 94.25 ซึ่งลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม ($p = 0.0216$) (รูปที่ 1A) นอกจากนี้ เมื่อทดสอบด้วยวิธี MTT พบว่า ร้อยละของ relative metabolic activity มีค่าเท่ากับ 90.45 และ 84.62 เมื่อบ่มร่วมกับพาราควอตความเข้มข้นสุดท้ายที่ 100 และ 300 µg/mL ตามลำดับ ซึ่งความเข้มข้น 300 µg/mL มีร้อยละของ relative metabolic activity ลดต่ำลงอย่างมีนัย

สำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม (p = 0.0286) (รูปที่ 1B) แสดงให้เห็นว่า พาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ แต่พาราควอตทั้ง 2 ความเข้มข้นมีระดับร้อยละของความมีชีวิตอยู่ในระดับมากกว่าร้อยละ 80 ดังนั้น จึงเลือกใช้พาราควอตทั้งสองความเข้มข้นในการศึกษาขั้นต่อไป

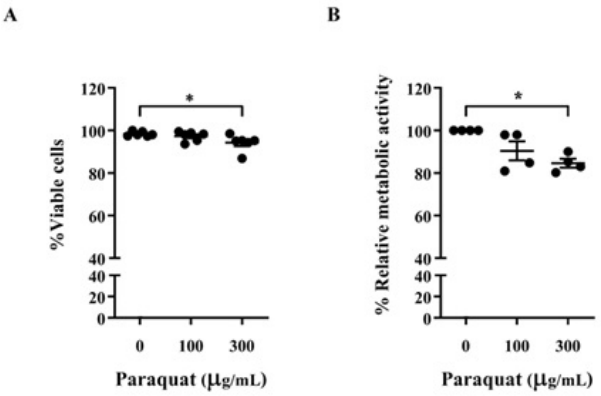
2. ผลของพาราควอตต่อการยับยั้งการสร้าง IFN-γ ของทีเซลล์

การศึกษาผลของพาราควอตต่อการสร้าง IFN-γ ของ PBMCs พบว่า การตอบสนองของทีเซลล์ต่อตัวกระตุ้น PHA เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL และ 300 µg/mL มีระดับการสร้าง IFN-γ เฉลี่ยลดต่ำลงจาก 13.57 เป็น 8.29 และ 3.56 ng/mL ตามลำดับ และพบว่าที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีค่าลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม (p = 0.0025) (รูปที่ 2A) เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลเป็นร้อยละของการยับยั้งการสร้าง IFN-γ พบว่า ทีเซลล์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL มีร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ เท่ากับ 43.15 ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม (p = 0.0006) และร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ สูงขึ้นเป็น 83.69 เมื่อเพาะเลี้ยงร่วมกับพาราควอตความเข้มข้น 300 µg/mL ซึ่งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับสภาวะควบคุม (p = 0.0013) และสภาวะเพาะเลี้ยงร่วมกับพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL (p = 0.0025) (รูปที่ 2B) นอกจากนี้ พบว่าทีเซลล์จากอาสาสมัครจำนวน 3 รายจาก 5 ราย (ร้อยละ 60 ของอาสาสมัครทั้งหมด) ถูกยับยั้งการสร้าง IFN-γ หลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และการยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p = 0.0278) หลังบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับการบ่ม 24 ชั่วโมง (รูปที่ 3) (ร้อยละ 100 ของอาสาสมัครทั้งหมด) จากข้อมูลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพาราควอตมีผลกดการทำงานของทีเซลล์ตั้งแต่ 24 ชั่วโมงแรกหลังการสัมผัสและยับยั้งเพิ่มสูงขึ้นในทุกตัวอย่างหลังการสัมผัสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

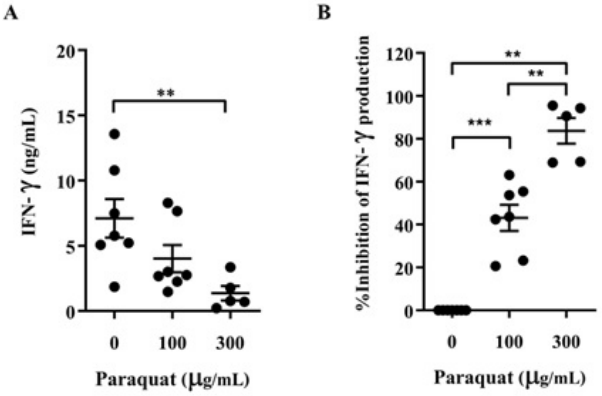
วิจารณ์

ทีเซลล์ชนิด $CD4^+$ และ $CD8^+$ เป็นเซลล์หลักที่ทำหน้าที่ตอบสนองระดับเซลล์ (cell mediated immunity) ในระบบภูมิคุ้มกันที่ได้รับมาภายหลังต่อการติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัส หรือกำจัดเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะและมีประสิทธิภาพ โดยการสร้างและหลั่ง IFN-γ ซึ่งมีบทบาทส่งเสริมการพัฒนาของทีเซลล์ชนิด CD4+ เป็น T helper 1 (Th1) เพื่อทำหน้าที่สร้างและหลั่ง IFN-γ กระตุ้นแมคโครฟาจและนิวโทรฟิลให้ทำงานได้ดีขึ้น และส่งเสริมการกำจัดเซลล์มะเร็งโดยทีเซลล์ชนิด $CD8^{+}$[15,16] นอกจากนี้ IFN-γ ยังออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งได้โดยตรง[17]

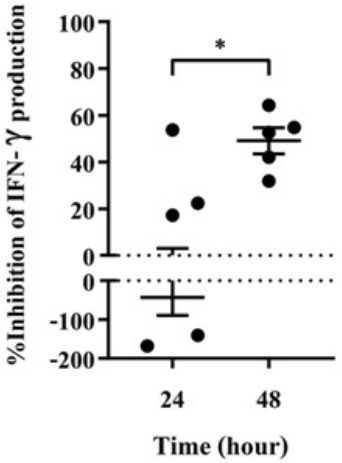
จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า พาราควอตเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่มีฤทธิ์กดการสร้างและกดการทำงานของ



รูปที่ 1 ผลของพาราควอตต่อความมีชีวิตของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMC จากอาสาสมัครสุขภาพดีบ่มร่วมกับ medium (0) หรือพาราควอตความเข้มข้น 100 หรือ 300 µg/mL (n = 4-6) ตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยเทคนิค trypan blue exclusion (รูปที่ 1A) และตรวจหา metabolic activity ด้วยวิธี MTT assay (รูปที่ 1B) (*p < 0.05)



รูปที่ 2 ผลของพาราควอตต่อการสร้าง IFN-γ ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs จากอาสาสมัครสุขภาพดี (n = 5-7) บ่มร่วมกับ PHA ในสภาวะไม่มีพาราควอต (medium; 0) หรือมีพาราควอตความเข้มข้น 100 หรือ 300 µg/mL เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รูปที่ 2A แสดงระดับ IFN-γ ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ รูปที่ 2B แสดงร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ (** p < 0.01, *** p < 0.001)



รูปที่ 3 ร้อยละการยับยั้งการสร้างและหลั่ง IFN-γ ที่ 24 และ 48 ชั่วโมง ในเม็ดเลือดขาวชนิด PBMCs จากอาสาสมัครสุขภาพดี (n = 5) บ่มร่วมกับ PHA ในสภาวะไม่มีพาราควอต หรือมีพาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL หลังจากบ่มเป็นระยะเวลา 24 หรือ 48 ชั่วโมง ตรวจวัดระดับ IFN-γ ในน้ำเพาะเลี้ยงเซลล์ แสดงผลเป็นร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ (*p < 0.05)

เซลล์โดยส่งเสริมการตายของเซลล์ในระบบเลือด[18,19] และระบบภูมิคุ้มกัน[11,12,14] โดยอาศัยกลไกการส่งเสริมการตายแบบอะพอพโทซิส จากผลการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ PBMCs ของพาราควอต พบว่า พาราควอตความเข้มข้น 100 µg/mL ไม่มีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ PBMCs ในขณะที่ความเข้มข้น 300 µg/mL มีผลเหนี่ยวนำการตายของเซลล์เพิ่มสูงขึ้น (รูปที่ 1) จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า เมื่อพาราควอตถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกาย สามารถทำปฏิกิริยากับออกซิเจนในร่างกาย เกิดเป็น reactive oxygen species (ROS) ชนิด superoxide radicals ($O2^{\bullet-}$) hydrogen peroxide (H_2O_2) และ hydroxyl radicals ($^{\bullet}OH$) สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถสร้างความเสียหายให้กับเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรีย (mitochondrial membrane) และไซโตโครมซี (cytochrome C) ถูกหลั่งออกสู่ไซโทพลาสซึมไปกระตุ้นโปรตีนคาสเปส (caspases) เป็นผลให้เซลล์ตายแบบอะพอพโทซิส[20]

นอกจากฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยผ่านกระบวนการส่งเสริมการตายของเซลล์ พาราควอตยังมีฤทธิ์กดการทำงานของทีเซลล์ จากผลการศึกษาพบว่า ร้อยละการยับยั้งการสร้าง IFN-γ เพิ่มสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อบ่มร่วมกับพาราควอตความเข้มข้น 100 และ 300 µg/mL (รูปที่ 2) ซึ่งการได้รับภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) จากการสร้าง ROS ระดับต่ำภายในเซลล์เป็นระยะเวลานานจากการสัมผัสพาราควอตสามารถก่อความเสียหายให้กับไมโทคอนเดรียและเยื่อหุ้มออร์กาเนลล์เป็นผลให้เซลล์เข้าสู่ภาวะชรา (senescent) เร็วกว่าปกติ[21] นอกจากนี้ยังสามารถทำลายดีเอ็นเอ (DNA) จนเกินความสามารถที่จะซ่อมแซมให้ปกติได้ ส่งผลให้การถอดรหัสและแปลรหัสการสร้างโปรตีนที่จำเป็นผิดปกติ[22] รวมถึงเป็นสาเหตุให้โปรตีนสูญเสียโครงสร้างจากการเปลี่ยนแปลงขั้วของกรดอะมิโนซิสเทอีน (cysteine) และเมไทโอนีน (methionine) เป็นผลให้โปรตีนผิดปกติและง่ายต่อการถูกทำลาย[23] ซึ่งเหตุการณ์ดังกล่าวอาจเป็นสาเหตุให้การกระตุ้นและการทำงานของทีเซลล์โดยสร้าง IFN-γ ผิดปกติ นอกจากนี้การสร้าง ROS ภายในเซลล์สามารถเหนี่ยวนำการแสดงออกตัวรับยับยั้งร่วม Programmed Death-1 (PD-1) บนผิวทีเซลล์[24] และ Programmed Cell Death Ligand-1 (PD-L1) บนผิว antigen presenting cells (APCs)[25] ซึ่งการจับของโมเลกุลทั้งสองมีผลยับยั้งการกระตุ้นการแบ่งตัวและสร้าง IFN-γ ของทีเซลล์ จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระยะเวลาในการสัมผัสพาราควอตมีผลต่อการสร้าง ROS ภายในเซลล์ การบ่มเซลล์ร่วมกับพาราควอตเป็นเวลา 24 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้สร้าง ROS เพิ่มสูงขึ้นภายในเซลล์แต่มีระดับสูงสุดเมื่อบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง[26] รวมถึงการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และความทนต่อภาวะเครียดออกซิเดชันที่แตกต่างกันในอาสาสมัครแต่ละราย อาจเป็นสาเหตุให้พบการยับยั้งการสร้าง IFN-γ ในอาสาสมัครบางรายหลังการบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพบการยับยั้งในทุกอาสาสมัครเมื่อบ่มร่วมกับพาราควอตเป็นเวลา 48 ชั่วโมง (รูปที่ 3)

ดังนั้นการได้รับพาราควอตโดยตรงหรือการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตรอาจนำไปสู่การกดการตอบสนองของทีเซลล์ จึงเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคติดเชื้อแบคทีเรีย ไวรัสหรือปรสิต รวมถึงมะเร็งในเกษตรกรหรือผู้บริโภคทั่วไป

สรุป

พาราควอตมีฤทธิ์ยับยั้งการสร้าง IFN-γ ของทีเซลล์มนุษย์ในหลอดทดลอง ซึ่งอาจนำไปสู่ความเสี่ยงต่อการเกิดโรคที่มีสาเหตุจากความไม่สมดุลของการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของทีเซลล์ในผู้ที่ได้รับพาราควอตโดยตรงหรือการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมและผลิตภัณฑ์ทางการเกษตร อย่างไรก็ตามการศึกษาเพิ่มเติมถึงชนิดของทีเซลล์ที่ได้รับผลกระทบ ตลอดจนกลไกการกดภูมิคุ้มกันของพาราควอตอาจใช้เป็นแนวทางในการป้องกันหรือรักษาโรคที่เกิดจากพิษของพาราควอตและนำไปสู่การรณรงค์เพื่อลดการใช้สารกำจัดศัตรูพืชที่ส่งผลต่อสุขภาพและสิ่งแวดล้อมต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้ทำการศึกษาขอขอบคุณอาสาสมัครทุกท่านที่ให้ความร่วมมือในการศึกษาครั้งนี้ และทุนสนับสนุนหน่วยความเป็นเลิศ มหาวิทยาลัยพะเยา ปีงบประมาณ 2562 หมายเลขทุน UoE62008

เอกสารอ้างอิง

1. Pataranawatab P, Kitkaewab D, Suppaudomab K. Paraquat Contaminations in the Chanthaburi River and vicinity areas, Chanthaburi province, Thailand. J Sci Technol Hum. 2012; 10: 17–24.
2. Amondham W, Parkpian P, Polprasert C, DeLaune R, Jugsujinda A. Paraquat adsorption, degradation, and remobilization in tropical soils of Thailand. J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes. 2006; 41: 485–507.
3. Van Wendel De Joode BN, De Graaf IAM, Wesseling C, Kromhout H. Paraquat exposure of knapsack spray operators on banana plantations in Costa Rica. Int J Occup Environ Health 1996; 2: 294–304.
4. Konthonbut P, Kongtip P, Nankongnab N, Tipayamongkholgul M, Yoosook W, Woskie S. Paraquat exposure of pregnant women and neonates in agricultural areas in Thailand. Int J Environ Res Public Health 2018; 15: 1–14.
5. Thai-PAN. ผลการเฝ้าระวังสารพิษตกค้าง ในผักผลไม้ ปี 2560. [สืบค้นเมื่อ 30 พฤศจิกายน 2562] Available from: http://www.thaipan.org/sites/default/files/file/pesticide_doc36.pdf
6. Suh GJ, Jeong S, Kwak YH, Shin S Do, Kim J. Effect of prohibiting the use of Paraquat on pesticide-associated mortality. BMC Public Health 2017; 17: 1–11.
7. Berry C, La Vecchia C, Nicotera P. Paraquat and Parkinson's disease. Cell Death Differ 2010; 17: 1115-25.

8. Dinis-Oliveira RJ, Remião F, Carmo H, Duarte JA, Navarro AS, Bastos ML, et al. Paraquat exposure as an etiological factor of Parkinson's disease. Neurotoxicology 2006; 27: 1110–22.

9. Wesseling C, Ahlbom A, Antich D, Rodriguez AC, Castro R. Cancer in banana plantation workers in Costa Rica. Int J Epidemiol 1996; 25: 1125–31.

10. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S; Cellular and Molecular Immunology. Philadelphia: Elsevier, 2014.

11. Jang YJ, Won JH, Back MJ, Fu Z, Jang JM, Ha HC, et al. Paraquat induces apoptosis through a mitochondria-dependent pathway in RAW264.7 cells. Biomol Ther 2015; 23: 407–13.

12. Fakhr A, Tabasi N, Mahmoudi M, Karimi G, Rafatpanah H, Riahi B, et al. Evaluation of suppressive effects of paraquat on innate immunity in Balb/c mice. J Immunotoxicol 2011; 8: 39–45.

13. Ahn KH, Ha HC, Lim JH, Won JH, Kim DK, Fu Z, et al. Paraquat reduces natural killer cell activity via metallothionein induction. J Immunotoxicol 2014; 12: 342–9.

14. Sengupta A, Manna K, Datta S, Das U, Biswas S, Chakrabarti N, et al. Herbicide exposure induces apoptosis, inflammation, immune modulation and suppression of cell survival mechanism in murine model. RSC Adv 2017; 7: 13957–70.

15. Bhat P, Leggatt G, Waterhouse N, Frazer IH. Interferon-γ derived from cytotoxic lymphocytes directly enhances their motility and cytotoxicity. Cell Death Dis 2017; 8: 1-11.

16. Ligocki AJ, Brown JR, Niederkorn JY. Role of interferon-γ and cytotoxic T lymphocytes in intraocular tumor rejection. J Leukoc Biol 2015; 99: 735–47.

17. Handgretinger R, Bauer J, Braumüller H, Schaller M, van den Broek M, Zender L, et al. T-helper-1-cell cytokines drive cancer into senescence. Nature 2013; 494(7437): 361–5.

18. Prihartono N, Kriebel D, Woskie S, Thetkhathuek A, Sripaung N, Padungtod C, et al. Risk of aplastic anemia and pesticide and other chemical exposures. Asia Pacific J Public Heal 2011; 23: 369–77.

19. Bhardwaj N, Saxena RK. Elimination of young erythrocytes from blood circulation and altered erythropoietic patterns during paraquat induced anemic phase in mice. PLoS One 2014; 9: 1-11.

20. Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondria, oxidative stress and cell death. Apoptosis 2007; 12: 913–22.

21. Schieber M, Chandel NS. ROS function in redox signaling and oxidative stress. Curr Biol 2014; 24: 453–62.

22. Jena NR. DNA damage by reactive species: Mechanisms, mutation and repair. J Biosci 2012; 37: 503–17.

23. Holmström KM, Finkel T. Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling. Nat Rev Mol Cell Biol 2014; 15: 411–21.

24. Franchi L, Byersdorfer CA, Glick GD, Tkachev V, Opipari AW, Ferrara JLM, et al. Programmed death-1 controls T cell survival by regulating oxidative metabolism. J Immunol 2015; 194: 5789–800.

25. Roux C, Moghadas S, Shinde R, Duncan G, Cescon DW, Silvester J. Reactive oxygen species modulate macrophage immunosuppressive phenotype through the up-regulation of PD-L1. Proc Natl Acad Sci USA. 2019; 116: 4326-35.

26. Yao J, Zhang J, Tai W, Deng S, Li T, Wu W, et al. High-dose paraquat induces human bronchial 16HBE cell death and aggravates acute lung intoxication in mice by regulating Keap1/p65/Nrf2 signal pathway. Inflammation 2019; 42: 471–84.

SMJ