

ผลการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p38 MAPK ในโมเดลหนูที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรอง และไม่ผ่านไส้กรอง ในระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน

The Alterations of p38 MAPK in Acute and Subacute Cigarette Smoke Exposure with Filter and Without Filter on Rat Model

ฟาฏิส โอกรี (Fatist Okrit)* ปุณยวิชฐ์ จันทรานูวัฒน์ (Punchavit Chantranuwat)**

สมพล สงวนรังศิริกุล (Sompol Sanguanrungsirikul)***

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p38 MAPK ในโมเดลหนูแรท ที่ได้รับ ควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรอง โดยทำการศึกษา 2 ช่วงระยะเวลาคือ ระยะเฉียบพลัน (7วัน) และระยะ กึ่งเฉียบพลัน (14วัน) โดยแบ่งหนูในแต่ละช่วงเวลาออกเป็น 3 กลุ่มได้แก่ กลุ่มควบคุม (ได้รับอากาศปกติ) กลุ่มได้รับ ควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรอง และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ที่ผ่านไส้กรอง เมื่อสิ้นสุดระยะการทดลอง ทำการการุณฆมาต เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของปอดและการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ผลการศึกษาพบว่า ควันบุหรี่ทั้งชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรอง ต่างส่งผลให้มีการเปลี่ยนแปลงทางด้านพยาธิวิทยาในระบบ ทางเดินหายใจให้มีแนวโน้มการอักเสบเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนรูปแบบของอิมูโนเซลล์ในหลอดลมและมีการเพิ่ม จำนวนขึ้นของอิมูโนเซลล์รอบท่อลมปอด ร่วมกับการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ที่เพิ่มมากขึ้นทั้งสองกลุ่ม การทดลอง โดยกลุ่มที่ไม่ผ่านไส้กรองจะแสดงออกเพิ่มขึ้นในระยะเฉียบพลัน และกลุ่มที่ผ่านไส้กรองจะแสดงออก เพิ่มขึ้นในระยะกึ่งเฉียบพลันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ซึ่งบ่งชี้ได้ว่าการได้รับควันบุหรี่ทั้งสองชนิดต่างส่งผล ให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์ซึ่งเป็นการตอบสนองที่สอดคล้องกับโมเดลในการเกิดโรคถุงลมโป่งพองในระยะ แรกเริ่มที่ทำการศึกษาวิจัย

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the alterations of p38 MAPK in acute and subacute cigarette smoke exposure with filter and without filter on rat model. Male Wistar rats were randomly divided into 6 groups; which allocated on 7 days or 14 days and then subdivided in control, without filter and filter groups. At the end of the experiment, the animals were euthanized and collected both lungs to estimate the histopathological changes and p38 MAPK protein expression. The results suggested that not only the histopathology significantly increased of tracheal squamous cell metaplasia, peribronchiolar epithelial cells proliferation and increased a trend of lung parenchymal inflammation but also p38 MAPK signaling was significantly ($p < 0.05$) elevated in cigarette smoking without filter group and cigarette smoking with filter group on 7 days and 14 days respectively. Consequently, both types of cigarette smoking resulted in changes in the cellular level, which corresponded to the pattern of emphysema model in the early phase of our study.

คำสำคัญ: การรมควันบุหรี่ โปรตีน p38 แมพไคเนส หนูวิสตาแรท

Keywords: Cigarette smoke exposure, p38 mitogen-activated protein kinase, Wistar rat

* นิสิต หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

ในปัจจุบันควันบุหรี่เป็นสาเหตุหลักที่ทำให้มีอัตราการตายเพิ่มขึ้นจากโรคในระบบทางเดินหายใจ ซึ่งพบอัตราการตายเป็นลำดับต้นๆของโลก ทำให้สมาคมสุขภาพปอดแห่งสหรัฐอเมริกา (American lung association, 2010) ได้ทำการศึกษารายการประกอบของบุหรี่ พบว่าบุหรี่มีส่วนประกอบของสารเคมีต่าง ๆ มากกว่า 7,000 ชนิด กว่า 70 ชนิด พบว่ามีความเกี่ยวข้องเป็นสารพิษและสารก่อมะเร็ง (Center for disease control and prevention, 2010) และบางชนิดเกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพต่างๆในมนุษย์ ได้แก่ ภาวะการอักเสบของท่อทางเดินหายใจ (airway inflammation) นำไปสู่การเกิดโรคปอดอุดกั้นเรื้อรัง (Chronic Obstructive Pulmonary Disease, COPD), โรคหลอดเลือดแดงแข็ง (atherosclerosis) และความผิดปกติต่างๆที่สัมพันธ์กับอายุที่เพิ่มมากขึ้น (age-related disorder) (Umesh et al., 2013) โดยควันบุหรี่สามารถแพร่เข้าสู่ร่างกายได้หลักๆ 2 ทางคือ จากการสูบบุหรี่โดยตรง และการได้รับควันจากผู้สูบบุหรี่ (Nemmar et al., 2012) ทั้งนี้เมื่อร่างกายได้รับควันบุหรี่จะมีปฏิกิริยาการตอบสนองผ่านการส่งสัญญาณกันระหว่างเซลล์ในรูปแบบที่มีความซับซ้อน ซึ่งพบว่าการส่งสัญญาณระหว่างกันภายในเซลล์ชนิดหนึ่งที่มีความเกี่ยวข้องกับควันบุหรี่คือ Mitogen activated protein kinase (MAPK) ซึ่งสามารถแบ่งได้เป็นสามกลุ่มใหญ่ๆได้แก่ extracellular regulated kinase (ERK), c-Jun N-terminal kinase (JNK) และ p38 ในการศึกษาที่น่าสนใจการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p38 ที่ประกอบด้วย 4 isoforms ได้แก่ α , β , γ และ δ ซึ่งพบว่า alpha isoform เป็นรูปแบบที่นิยมทำการศึกษาเนื่องจากมีการแสดงออกในเซลล์หลากหลายชนิด และสามารถถูกกระตุ้นได้จากปัจจัยต่างๆ เช่น สารกระตุ้นการอักเสบ และสภาพแวดล้อมที่ทำให้เซลล์เกิดสภาวะเครียด (Lee et al., 2000) จึงมีการศึกษาเกี่ยวกับ ระดับตั้งต้นของโปรตีน p38 MAPK ใน alveolar macrophages พบว่าในกลุ่มผู้ที่สูบบุหรี่มีมากกว่าในกลุ่มผู้ที่ไม่สูบบุหรี่ ในขณะที่ ERK และ JNK กลับไม่แตกต่างกัน (Mochida-Nishimura et al., 2001) และมีการทดลองในหนูเม้าส์ก่อนหน้านี้พบว่า โปรตีน p38 ในปอดของหนูเม้าส์สามารถถูกกระตุ้นด้วยควันบุหรี่ได้ทั้งในระยะเฉียบพลัน (5 วัน) และในระยะเรื้อรัง (6 เดือน) ร่วมกับการเพิ่มขึ้นของการอักเสบ การเกิด apoptosis และเกิดการบาดเจ็บของ DNA จากกระบวนการออกซิเดชัน อีกทั้งสามารถถูกยับยั้งได้ด้วย p38 inhibitor ในระยะเฉียบพลัน จึงแสดงให้เห็นได้ว่า p38 MAPK เป็นอีกโมเลกุลเป้าหมายหนึ่งในกระบวนการสื่อสารของเซลล์ที่มีส่วนสำคัญจากการตอบสนองต่อควันบุหรี่ที่จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆขึ้นในปอด (Marumo et al., 2014) ดังนั้นการออกแบบการทดลองโดยเปรียบเทียบการได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองและชนิดที่ไม่ผ่านไส้กรอง ซึ่งเลือกใช้โมเดลหนูที่ได้รับควันบุหรี่เพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดโรคถุงลมโป่งพองจึงเป็นโมเดลที่เหมาะสมและน่าสนใจในการศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงต่างๆจากการได้รับควันบุหรี่ทั้งสองแบบที่เกิดขึ้นในปอดเพื่อเลียนแบบพฤติกรรมการณ์การได้รับควันบุหรี่ในมนุษย์ในระยะแรกเริ่มก่อนการนำไปสู่การเกิดโรคได้

วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน p38 MAPK ใน โมเดลหนูแรทที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรองในระยะเฉียบพลันและระยะกึ่งเฉียบพลัน

วิธีการวิจัย

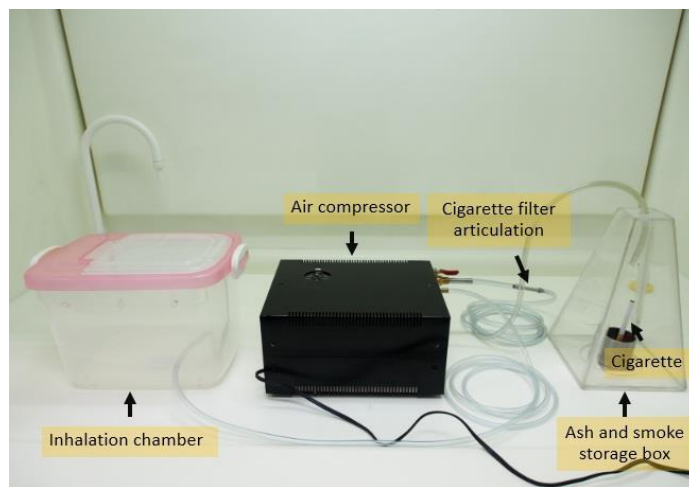
สัตว์ทดลอง

หนูแรท สายพันธุ์ Wistar เพศผู้ อายุ 6-8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-250 กรัม จำนวน 24 ตัว ถูกนำเข้ามาจากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งผ่านกระบวนการตรวจสอบและอนุมัติจากคณะกรรมการกำกับดูแลการเลี้ยงและใช้สัตว์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่อนุมัติโครงการ 009/2559 หนูแรทจะถูกเลี้ยงไว้ใน

ทรงสแตนเลสทรงละประมาณ 3 ตัว ที่อุณหภูมิ 25°C โดยควบคุมให้มีแสงสว่างวันละ 12 ชั่วโมงต่อวัน ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปและน้ำ reverse osmosis ที่ผสมคลอรีนความเข้มข้น 5-6 ppm อย่างไม่จำกัด

แผนการทดลองและอุปกรณ์การรมควันบุหรี่

สำหรับการทดลองรมควันบุหรี่ หนูแรททั้งหมด 24 ตัวถูกสุ่มแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มอย่างสุ่ม กลุ่มละ 4 ตัว ดังนี้ กลุ่ม 7 วัน (ระยะยับยั้งปล้น) ได้แก่ 1) กลุ่มควบคุม 2) กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง 3) กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรองและกลุ่ม 14 วัน (ระยะกึ่งยับยั้งปล้น) ได้แก่ 4) กลุ่มควบคุม 5) กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง 6) กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรอง ซึ่งหนูทั้ง 6 กลุ่มไม่มีความแตกต่างกันก่อนทำการทดลอง โดยอุปกรณ์ที่ใช้ในการรมควันจะประกอบด้วย 5 ส่วนหลักคือ ฐานรองบุหรี่และขี้เถ้า กล่องเก็บควันบุหรี่ สายนำควันบุหรี่ เครื่องดูด-พ่นควันบุหรี่ และกล่องรมควันสำหรับใส่หนูทดลอง ดังแสดงในรูปที่ 1



รูปที่ 1 แสดงอุปกรณ์ที่ใช้ในการรมควันบุหรี่

ขั้นตอนการรมควันบุหรี่

การรมควันหนูกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรอง จะมีข้อต่อไว้สำหรับบรรจุไส้กรองของมวนบุหรี่นั้นๆ ส่วนหนูกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ไม่ผ่านไส้กรองจะไม่มีท่อใส่ไส้กรองตรงข้อต่อเพื่อให้ควันบุหรี่เข้าผ่านท่อไปยังตัวหนูได้โดยตรง ซึ่งเป็นการเลียนแบบการได้รับควันบุหรี่ทั้งสองชนิดตามลำดับ การทดลองจะเริ่มจากการนำหนูใส่ลงไปในกล่องรมควัน จากนั้นจุดบุหรี่ที่อยู่ในฐานรองบุหรี่แล้วครอบด้วยกล่องเก็บควันเพื่อกักและเก็บควันบุหรี่ จากนั้นเปิดเครื่องดูด-พ่นควันบุหรี่ด้วยอัตราเร็วคงที่ที่ 12 V เพื่อดูดควันบุหรี่จากที่เก็บควันผ่านไปยังกล่องรมควัน โดยใช้บุหรี่ 6 มวน/วัน/ตัว บุหรี่หนึ่งมวนจะมีอัตราการเผาไหม้อยู่ที่ 10-15 นาที โดยหนูจะถูกรมควันอยู่ในกล่องเป็นเวลา 20 นาที/ครั้ง/ตัว แบ่งเป็น 2 ช่วงเวลาคือช่วงแรกเริ่มเวลา 10.00 น. และช่วงที่สองเริ่ม 14.00 น. เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน ตามลำดับ สำหรับกลุ่มควบคุม หนูจะได้รับอากาศปกติที่อุณหภูมิห้อง

การศึกษาทางพยาธิวิทยา

ในวันที่ 8 และ 15 หลังการศึกษา ทำการุณยฆาตโดยการฉีดสาร sodium pentobarbital เกินขนาด (>100mg/kg) ทางช่องท้อง จากนั้นทำการเก็บชิ้นเนื้อจากหลอดลมและปอดข้างซ้าย โดยคงสภาพของชิ้นเนื้อด้วย 10% neutral buffered formalin แล้วเข้าสู่กระบวนการเตรียมสไลด์พาราฟินต่อไป เพื่อศึกษาการเกิดพยาธิสภาพในปอด และ

เก็บชิ้นเนื้อจากปอดข้างขวา เก็บในไนโตรเจนเหลว แล้วย้ายไปเก็บรักษาในตู้เย็นที่มีอุณหภูมิ -80 °C เพื่อทำการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน p38 ที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ในขั้นตอนต่อไป

นำชิ้นเนื้อที่ได้จากการคงสภาพประมาณ 24-48 ชั่วโมง ไปผ่านกระบวนการต่างๆกระทั่งถึงขั้นฝังพาราฟินจนได้เป็นบล็อกพาราฟิน ทำการตัดชิ้นเนื้อที่อยู่ในบล็อกพาราฟิน ให้มีความหนาขนาด 4 ไมครอน จากนั้นศึกษาการเกิดพยาธิสภาพในปอด จากการย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธี hematoxylin และ eosin (Dogan et al., 2011) โดยมีตัวชี้วัดดังนี้ tracheal epithelial cell proliferation, peribronchiolar epithelial cell proliferation, lung parenchymal infiltration เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การเกิดพยาธิสภาพในการศึกษานี้ ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้แบบ semi-quantitative scale กำหนดให้ 0=ไม่พบการเปลี่ยนแปลง, 1=มีการเปลี่ยนแปลงในระดับน้อย, 2=มีการเปลี่ยนแปลงในระดับปานกลาง, 3=มีการเปลี่ยนแปลงในระดับมาก และ 4=มีการเปลี่ยนแปลงในระดับรุนแรง สำหรับการประเมิน tracheal epithelial cell proliferation, peribronchiolar epithelial cell proliferation และ lung parenchymal infiltration ให้คะแนนจากการพบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ดังเกณฑ์ในตารางที่ 1 โดยที่ lung parenchymal infiltration ให้คะแนนจากเปอร์เซ็นต์การแทรกผ่านของเซลล์อักเสบ leukocytes และ neutrophils นำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยจากคะแนนรวมการสุ่มภาพตัวอย่าง 5 ภาพที่กำลังขยาย 40x ต่อหนึ่งตัวอย่าง ซึ่งแปลผลโดยนักพยาธิวิทยาที่ไม่ทราบข้อมูลของกลุ่มตัวอย่างมาก่อน

ตารางที่ 1 เกณฑ์การประเมินผลทางพยาธิวิทยา

ลักษณะทางพยาธิวิทยา คะแนน	0: ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	1: น้อย	2: ปานกลาง	3: มาก	4: รุนแรง
- การเปลี่ยนแปลงของอีพิทีเลียลเซลล์รอบหลอดลม	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	Squamous cell metaplasia (S2 met)	S2 met + hyperplasia	S2 met + hyperplasia+ diffuse	S2 met + hyperplasia+ Diffuse+ inflammation
- การเพิ่มจำนวนของอีพิทีเลียลเซลล์รอบท่อลมปอด	0%	1-24%	25-50%	51-74%	75-100%
- การอักเสบในเนื้อเยื่อปอด	0%	Injury 1-24% of field	Injury 25-50% of field	Injury 51-74% of field	Injury 75-100% of field

(ดัดแปลงจาก Dogan et al., 2011)

ขั้นตอนการสกัดโปรตีน

นำชิ้นเนื้อของปอดข้างขวาที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 °C ตั้งทิ้งไว้บนน้ำแข็งที่อุณหภูมิห้องเพื่อลดอุณหภูมิชิ้นเนื้อลงจากนั้นบดให้ละเอียดด้วยวิธีโฮโมจีไนเซชัน โดยสกัดโปรตีนด้วย Tissue Protein Extraction Reagent (T-PER) (Thermo Scientific, USA) ในอัตราส่วน 1:20 น้ำหนักชิ้นเนื้อเป็นมิลลิกรัมต่อน้ำยาสกัดเป็นมิลลิลิตร จากนั้นนำไปปั่นด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงความเร็วสูงที่ 10,000 xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วเก็บส่วนใสที่ได้ไว้ที่อุณหภูมิ -80 °C เพื่อทำการศึกษาในขั้นตอนต่อไป

การศึกษาการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ด้วยวิธี Western blot

นำส่วนใสของโปรตีนที่ได้สกัดไว้แล้วมาศึกษาการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ได้แก่ p38 และ phosphorylated-p38 ซึ่งเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวด้วยอัตราส่วนระหว่างการเกิดปฏิกิริยา phosphorylation กับ dephosphorylation (total) โดยใช้ปริมาณโปรตีนจากกลุ่มตัวอย่างที่ 50 µg เท่ากันจากทุกตัวอย่าง นำมารันบนเจลอิเล็กโตรโฟรีซิสด้วย 10% SDS-PAGE แล้วทำการย้ายโปรตีนจากเจลมาอยู่บน PVDF เมมเบรน บล็อกโปรตีนที่ไม่จำเพาะด้วย 1%Bovine serum albumin ค้างคืน จากนั้นนำเมมเบรนมาบ่มด้วย primary antibody (rabbit p-p38, t-p38 and β-actin, Cell Signaling Technology) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างเมมเบรนด้วย PBST (1XPhosphate buffer saline with 0.1%Tween20) pH 7.4 จำนวน 3 ครั้งครั้งละ 10 นาที บ่มต่อด้วย secondary antibody (anti-rabbit IgG HRP linked, Cell Signaling Technology) เป็นเวลาอีก 1 ชั่วโมง จากนั้นล้างด้วย PBST เช่นเดิม จำนวน 6 ครั้งครั้งละ 10 นาที นำเมมเบรนไปตรวจหาความเข้มของ band ด้วยชุดตรวจ Enhance chemiluminescence kit (ECL, Thermo Scientific) โดยใช้เครื่อง Molecular Imager[®] ChemiDoc Touch (Bio-rad) จากนั้นเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนดังกล่าวข้างต้น ด้วยโปรตีน β-actin (ซึ่งเป็น housekeeping gene) โดยใช้อัตราส่วนความเข้มข้นของแอนติบอดีในการทดลอง ดังนี้ phosphorylated-p38 (1:1,000), total p38 (1:1,000), β-actin (1:10,000) และ secondary antibody (1:10,000) และคำนวณความเข้มของ band ด้วยโปรแกรม Image Lab[™] 5.2 (Bio-rad)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ในการศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลในรูปแบบของ mean ± standard error of mean (SEM) ซึ่งวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการเปรียบเทียบผลทางพยาธิวิทยาและผลการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ระหว่างกลุ่มการทดลอง โดยใช้การวิเคราะห์หาค่าความแปรปรวน (Analysis of variance; one-way ANOVA ด้วย Post hoc test คือ Tukey's HSD โดยพิจารณาค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ p<0.05 ซึ่งในการวิเคราะห์ค่าทางสถิตินี้ใช้โปรแกรม spss เวอร์ชัน 22

ผลการวิจัย

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา

1) การเปลี่ยนแปลงของอิมูโนโพลีแซคคาไรด์ในหลอดลม

ผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 7 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรองพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.01) โดยมีค่าเฉลี่ยของคะแนนเท่ากับ 1.75 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ต่างกันกับกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรองที่มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.75 ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สำหรับผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 14 วัน พบว่า กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรองมีค่าเฉลี่ยคะแนนเท่ากับ 2 และ 2.5 ตามลำดับ แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.005) ดังแสดงในรูปที่ 2-4 ตามลำดับ

2) การเปลี่ยนแปลงของอิพิทีเลียลเซลล์รอบท่อลมภายในปอด

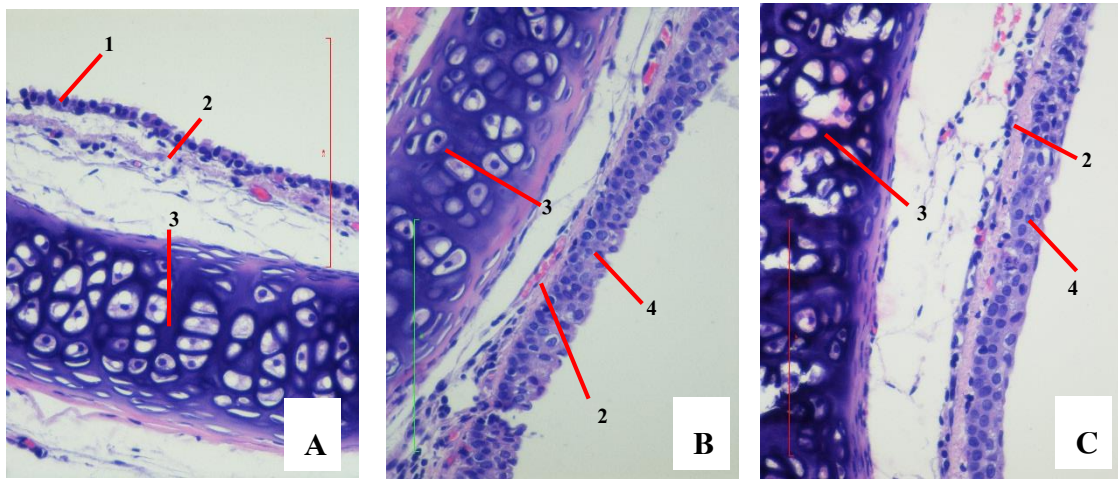
ผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 7 วัน พบว่ากลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรองมีค่าเฉลี่ยคะแนนเท่ากับ 1 และ 2.5 ตามลำดับ ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม สำหรับผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 14 วันพบว่ากลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรองมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) โดยมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 2.75 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสำหรับกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองมีคะแนนเฉลี่ยเท่ากับ 1.75 ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 5-7 ตามลำดับ

3) การเพิ่มขึ้นของเซลล์อักเสบภายในเนื้อเยื่อปอด

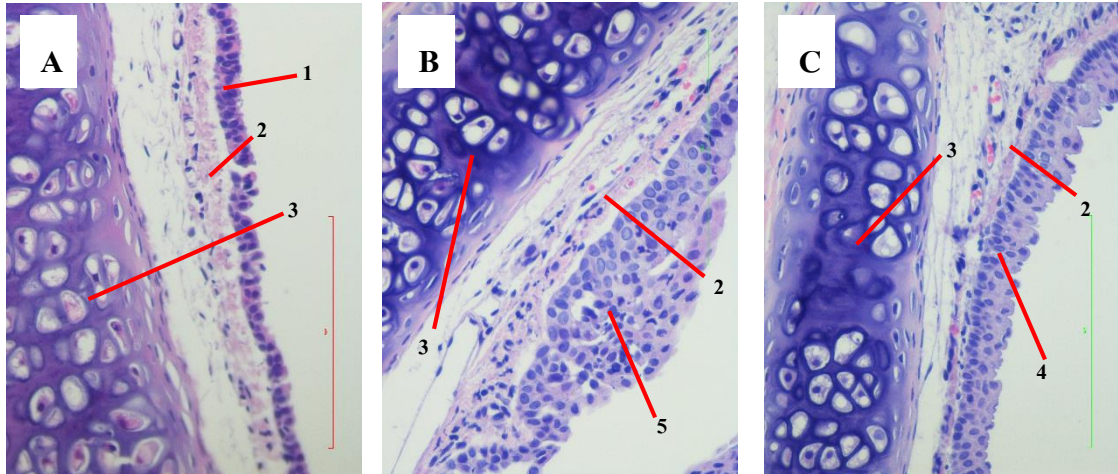
ผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 7 วัน และ 14 วัน ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรองกับกลุ่มควบคุม โดยประเมินคะแนนเฉลี่ยได้ เท่ากับ 1.25, 1.75 และ 1 แต่พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงไปในทิศทางที่เพิ่มขึ้นต่อกระบวนการอักเสบภายในเนื้อเยื่อปอด ดังแสดงในรูปที่ 8-10 ตามลำดับ

การแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK

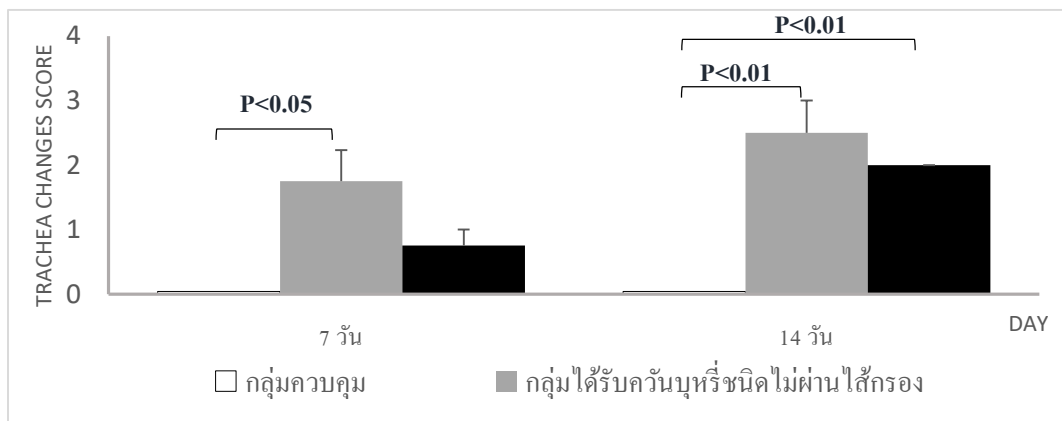
ผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 7 วัน พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญของอัตราส่วนการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีน p38 MAPK เท่ากับ 0.83 ในกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ไม่ผ่านไส้กรอง แต่ไม่พบความต่างของกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรอง ที่มีอัตราส่วนการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK เท่ากับ 0.46 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนผลการศึกษาช่วงระยะเวลา 14 วัน พบการอัตราส่วนแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ลดลงในกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ไม่ผ่านไส้กรอง เท่ากับ 0.26 แต่ในกลุ่มควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองกลับมีอัตราส่วนการแสดงออกของโปรตีนเพิ่มขึ้น เท่ากับ 0.93 ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังแสดงในรูปที่ 11 และ 12 ตามลำดับ



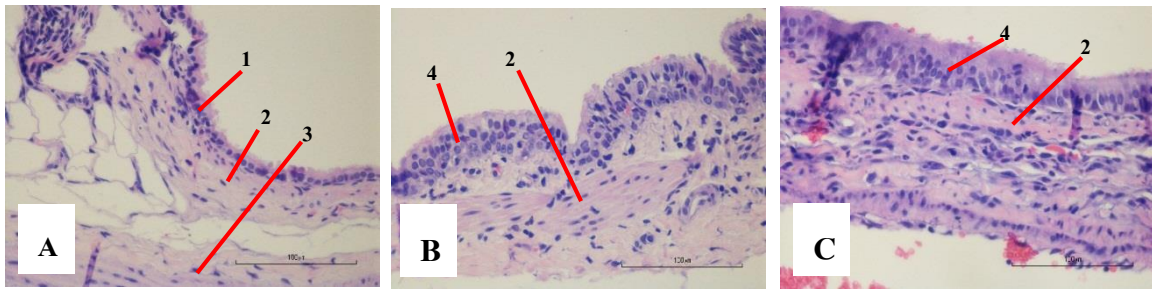
รูปที่ 2 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอิพิทีเลียลเซลล์ในหลอดลม ระยะเวลา 7 วัน ของกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรอง(B) และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง(C) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X) (1= pseudostratified respiratory epithelium, 2=laminar propria, 3=hyaline cartilage, 4=squamous cell metaplasia)



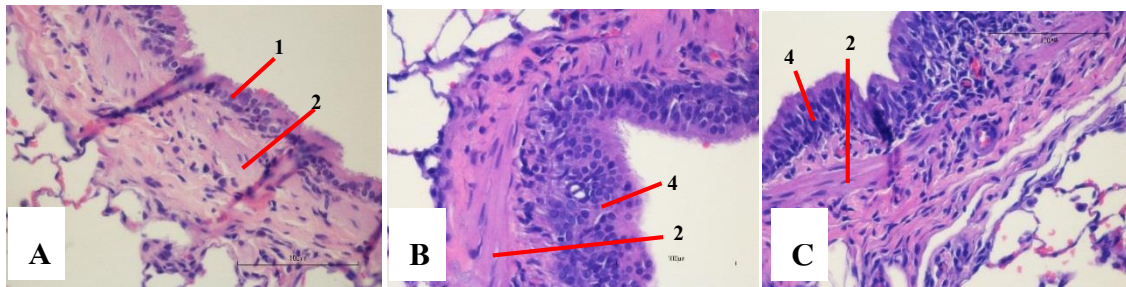
รูปที่ 3 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอีพิทีเลียลเซลล์ในหลอดลม ระยะเวลา 14 วัน ของกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านใส่กรอง (B) และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านใส่กรอง (C) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X) (1= pseudostratified respiratory epithelium, 2= lamina propria, 3= hyaline cartilage, 4= squamous cell metaplasia, 5=hyperplasia with squamous cell metaplasia)



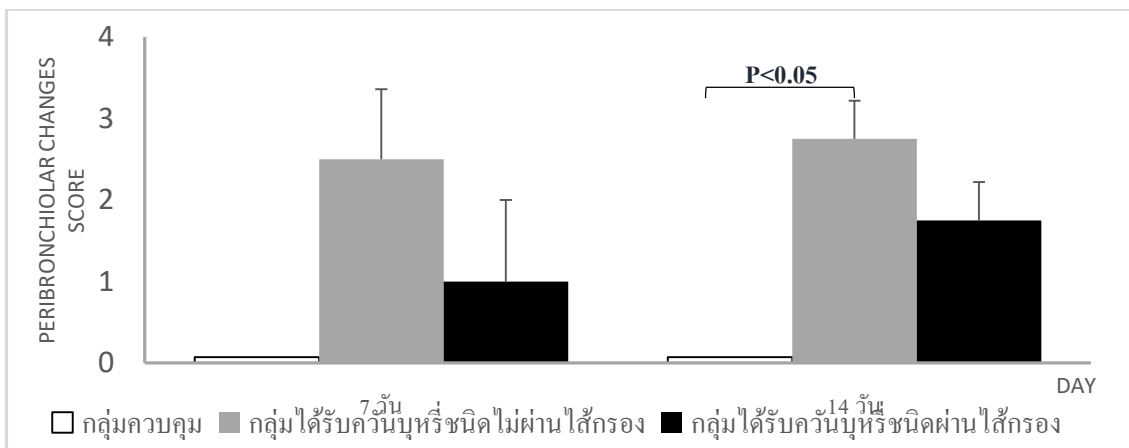
รูปที่ 4 ผลการวิเคราะห์อีพิทีเลียลเซลล์ในหลอดลม ทั้งสามกลุ่มการทดลองในระยะ 7 วันและ 14 วัน



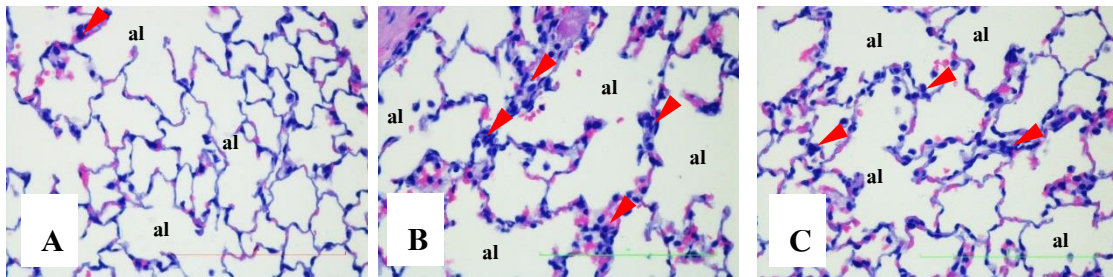
รูปที่ 5 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอีพิทีเลียลเซลล์ในท่อลมของปอด ระยะเวลา 7 วัน ของกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิด ไม่ผ่านไส้กรอง (B) และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง (C) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X)
(1=respiratory epithelium, 2=smooth muscle, 3=connective tissue, 4=respiratory epithelial cell hyperplasia)



รูปที่ 6 แสดงการเปลี่ยนแปลงของอีพิทีเลียลเซลล์ในท่อลมของปอด ระยะเวลา 14 วัน ของกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิด ไม่ผ่านไส้กรอง (B) และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง (C) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X)
(1=respiratory epithelium, 2=smooth muscle, 3=connective tissue, 4=respiratory epithelial cell hyperplasia)

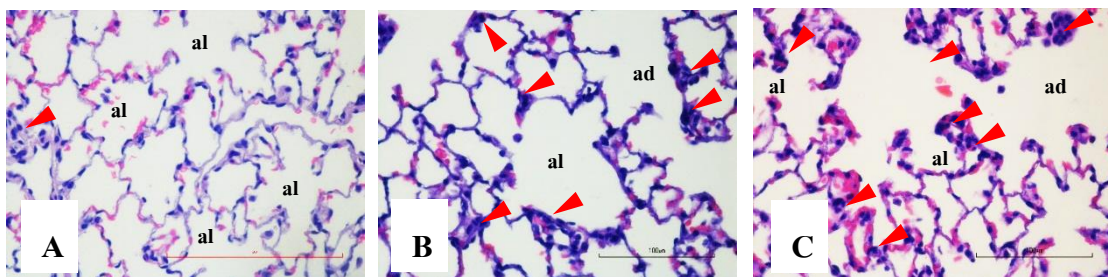


รูปที่ 7 ผลการวิเคราะห์อีพิทีเลียลเซลล์ในท่อลมของปอด ทั้งสามกลุ่มการทดลองในระยะ 7 วันและ 14 วัน



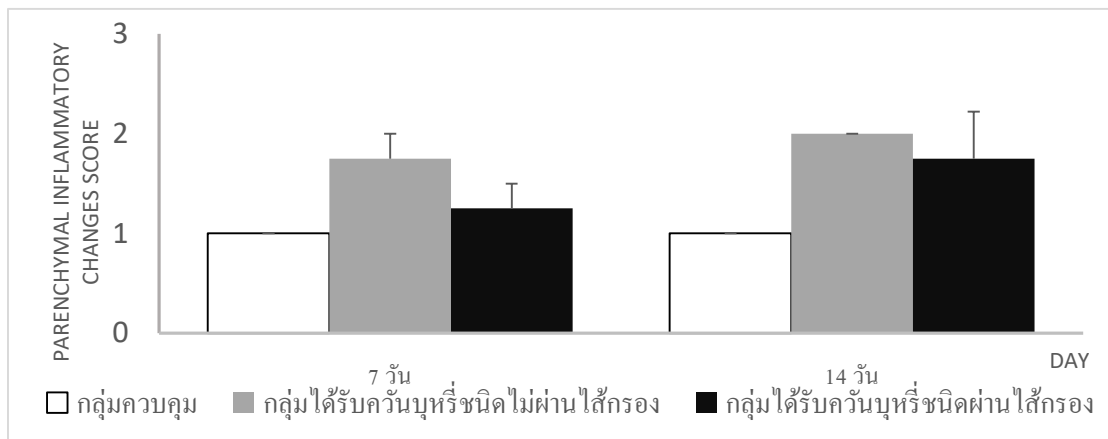
รูปที่ 8 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อักเสบในเนื้อเยื่อปอด ที่ระยะเวลา 7 วัน ของกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรอง (B) และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง (C) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X)

(al=alveolus, Δ =inflammatory cells infiltration)

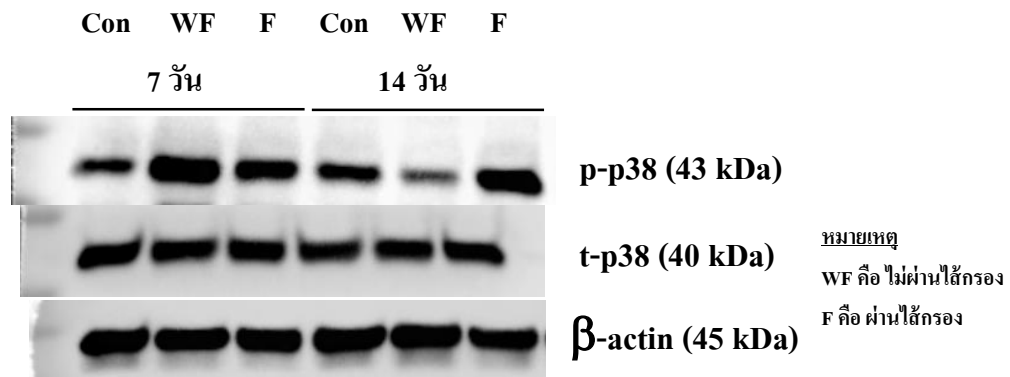


รูปที่ 9 แสดงการเปลี่ยนแปลงของเซลล์อักเสบในเนื้อเยื่อปอด ที่ระยะเวลา 14 วัน ของกลุ่มควบคุม (A) กลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรอง (B) และกลุ่มได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง (C) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40X)

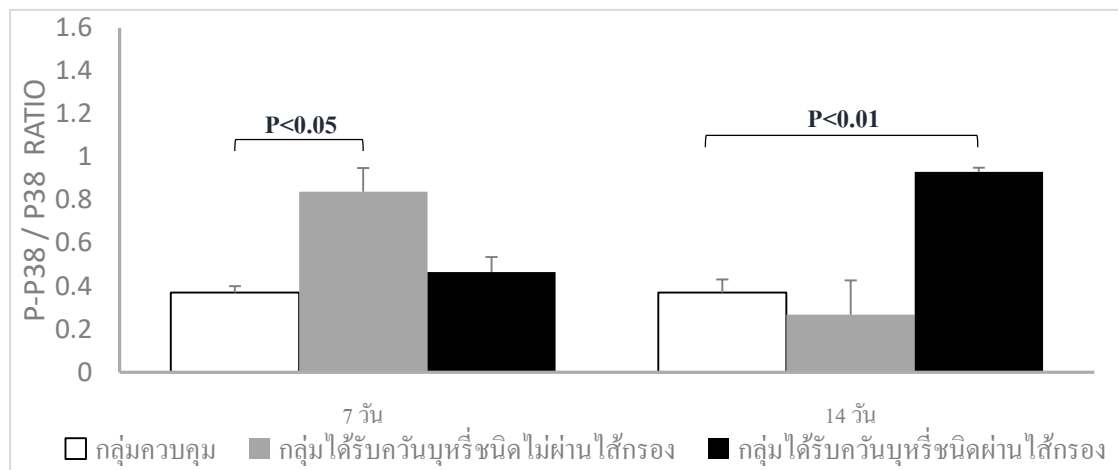
(ad=alveolar duct, al=alveolus, Δ =inflammatory cells infiltration)



รูปที่ 10 ผลการวิเคราะห์การอักเสบที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อปอด ทั้งสามกลุ่มการทดลองในระยะ 7 วันและ 14 วัน



รูปที่ 11 ผลการแสดงผลของโปรตีน p-p38, p38 และ β-actin ทั้งสามกลุ่มการทดลองในระยะ 7 วันและ 14 วัน



รูปที่ 12 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงผลของ p-p38 กับ p38 โดยใช้ β-actin เป็น normalized protein ทั้งสามกลุ่มการทดลองในระยะ 7 วันและ 14 วัน

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

การได้รับควันบุหรี่ทั้งชนิดที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรอง ในระยะเฉียบพลัน (7 วัน) และระยะกึ่งเฉียบพลัน (14 วัน) ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ตั้งแต่ระบบทางเดินหายใจส่วนต้น ไปจนถึงระบบทางเดินหายใจส่วนล่าง ดังนี้

ในระบบทางเดินหายใจส่วนต้นซึ่งเป็นบริเวณแรกที่ได้สัมผัสกับควันบุหรี่ จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับควันบุหรี่ทั้งสองชนิด ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของอีพิทีเลียลรอบๆ หลอดลมเป็น squamous cell metaplasia ซึ่งจะเริ่มเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ตั้งแต่วันที่ 7 และเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ชัดในวันที่ 14

เมื่อควันบุหรี่ผ่านลงมาในระบบทางเดินหายใจส่วนล่างและสัมผัสกับเซลล์รอบๆ ท่อลมภายในปอด ทั้งการได้รับควันบุหรี่มือทั้งสองชนิด มีแนวโน้มที่จะทำให้อีพิทีเลียลเซลล์รอบๆ มีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนขึ้น โดยที่ในช่วง 7 วันแรก ยังไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม แต่เห็นความต่างได้ชัดในกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่มือสองในวันที่ 14 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งมีการประเมินคะแนนอยู่ในระดับปานกลาง

สำหรับการศึกษาการอักเสบที่เกิดขึ้น ผลการทดลองชี้ให้เห็นแนวโน้มการเพิ่มจำนวนของเซลล์อักเสบในเนื้อเยื่อปอด ตั้งแต่ในระยะเวลา 7 วันแรกและวันที่ 14 ทั้งในกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ที่ผ่านไส้กรองและไม่ผ่านไส้กรอง แต่ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุม

การส่งสัญญาณภายในเซลล์ของโปรตีน p38 MAPK มีความเกี่ยวข้องกับควันบุหรี่ ในด้านการก่อให้เกิดสภาวะเครียดของเซลล์และการกระตุ้นกระบวนการอักเสบ เมื่อได้รับควันบุหรี่เข้าไปในปอด ในช่วง 7 วันแรก กลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ผ่านไส้กรองยังมีการส่งสัญญาณของโปรตีน p38 MAPK ในระดับน้อย แต่จะเห็นการส่งสัญญาณที่เพิ่มมากขึ้นของโปรตีน p38 MAPK อย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Cavallo et al. (2013) ซึ่งศึกษาภาวะความเป็นพิษของเซลล์ปอดในหลอดทดลองจากควันบุหรี่ทั้งสองแบบ พบว่าการได้รับควันบุหรี่ชนิดไม่ผ่านไส้กรองจะทำให้เซลล์เกิดความเครียดมากกว่าชนิดที่ผ่านไส้กรองในระยะจับปล้น เนื่องมาจากการได้รับอนุภาคนาโนขนาดใหญ่ของสารพิษจากควันบุหรี่จึงทำให้เซลล์เกิดความเครียดและเกิดสภาวะเครียดทำให้มีการส่งสัญญาณได้อย่างมากและรวดเร็วในช่วงแรก

นอกจากนี้จากผลการทดลองข้างต้นสอดคล้องกับงานวิจัยของ Moretto et al. (2012) ที่ทำการทดลองแบบ in vitro โดยให้ควันบุหรี่ไปสัมผัสกับอวัยวะเซลล์ของคนโดยตรงแล้ววัดการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK พบว่าในช่วง 30 นาทีแรกมีการแสดงออกเพิ่มขึ้นของโปรตีนดังกล่าวอย่างมาก แต่หลังจากนั้น 4-24 ชั่วโมงการแสดงออกจะค่อยๆลดลง และจากการศึกษาของ Marumo et al. (2014) ซึ่งทำการทดลองในหนูเมาส์โดยให้ควันบุหรี่ในช่วงระยะจับปล้น (4 วัน) และระยะเรื้อรัง (24 สัปดาห์) พบการแสดงออกของโปรตีน p38 MAPK ในลักษณะเช่นเดียวกัน

สำหรับผลการทดลองในช่วงวันที่ 14 ให้ผลตรงกันข้ามกับในช่วง 7 วันแรก โดยกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรองจะเห็นการส่งสัญญาณเพิ่มขึ้นจากเดิมอย่างมีนัยสำคัญ แต่สำหรับกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ไม่ผ่านไส้กรอง การแสดงออกจะลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นการส่งสัญญาณของ p38 MAPK เกิดขึ้นได้มากกว่าในกลุ่มที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดผ่านไส้กรอง อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษที่เกิดการสะสมมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Song et al. (2017) พบว่า ไส้กรองในบุหรี่จะทำให้การเผาไหม้ภายในมวนบุหรี่เกิดขึ้นแบบไม่สมบูรณ์ ต้องใช้เวลาในการเผาไหม้เพิ่มมากขึ้น จึงให้ปริมาณควันที่เพิ่มขึ้น ออกซิเจนไหลผ่านเข้ามาได้น้อยเกิดความชื้นขึ้นภายในทำให้มีการจับรวมตัวกันของสารพิษต่างๆ เกิดเป็นอนุภาคนาโนใหญ่ขึ้นหลังจากผ่านไส้กรองออกมา ส่งผลให้ผู้สูบบุหรี่ต้องสูดควันในปริมาณที่เยอะและลึกขึ้น ทำให้ได้รับปริมาณสารเคมีและสารพิษต่างๆเพิ่มมากขึ้นไปด้วย เซลล์จึงเกิดความเครียดและส่งผลให้กระตุ้นกระบวนการอักเสบ จึงมีการส่งสัญญาณแสดงให้เห็นมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ในกลุ่มสัตว์ทดลองที่ได้รับควันบุหรี่ชนิดที่ผ่านไส้กรอง

จากการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่าการได้รับควันบุหรี่ทั้งสองชนิดในระยะจับปล้นและระยะกึ่งจับปล้นต่างส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาต่างๆในปอดได้เช่นเดียวกัน อีกทั้งยังมีการส่งสัญญาณของโปรตีน p38 MAPK ที่เพิ่มมากขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงที่จะเห็นขบวนการเกิดพยาธิสภาพต่างๆของโรคในระบบทางเดินหายใจตามมาได้ ดังนั้น การส่งสัญญาณของ p38 MAPK นี้จะเป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สามารถทำให้ทราบถึงกระบวนการการตอบสนองภายในเซลล์หลังจากที่ได้รับควันบุหรี่ทั้งสองชนิด ช่วยให้เล็งเห็นถึงอันตรายของการสูบบุหรี่ที่ส่งผลในระดับเซลล์ อีกทั้งเพื่อต่อยอดในการหาวิธีการป้องกันหรือรักษาตั้งแต่ระยะเริ่มต้นต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รศ.นพ.สมพล สงวนรังศิริกุล และรศ.นพ.ปัญชวิษฐ์ จันทรานูวัฒน์ ที่ให้ความอนุเคราะห์ในการให้คำปรึกษาและอ่านผลการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ตลอดจนการเข้าใช้ห้องปฏิบัติการทางวิทยาศาสตร์ ภาควิชาสรีรวิทยา และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย รวมทั้ง ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการให้การสนับสนุนในการทำวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Cavallo D, Ursini CL, Freseghna AM, Maiello R, Ciervo A, Ferrante R, et al. Cyto-genotoxic effects of smoke from commercial filter and non-filter cigarettes on human bronchial and pulmonary cells. Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis 2013; 750(1-2): 1-11.
- Centers for Disease Control and Prevention (US), National Center for Chronic Disease Prevention and Health Promotion (US). How tobacco smoke causes disease: the biology and behavioral basis for smoking-attributable disease: a report of the surgeon general. 3. Atlanta (GA): Centers for Disease Control and Prevention (US): Chemistry and Toxicology of Cigarette Smoke and Biomarkers of Exposure and Harm; 2010. p. 487-94.
- Dogan OT, Elagoz S, Ozsahin SL, Epoturk K, Tuncer E, Akkurt I. Pulmonary toxicity of chronic exposure to tobacco and biomass smoke in rats. Clinics 2011; 66(6): 1081-1087.
- Lee JC, Kumar S, Griswold DE, Underwood DC, Votta BJ, Adams JL. Inhibition of p38 MAP kinase as a therapeutic strategy. Immunopharmacology 2000; 47(2-3): 185-201.
- Marumo S, Hoshino Y, Kiyokawa H, Tanabe N, Sato A, Ogawa E, et al. p38 mitogen-activated protein kinase determines the susceptibility to cigarette smoke-induced emphysema in mice. BMC Pulmonary Medicine 2014; 14(1): 1-14.
- Mochida-Nishimura K, Surewicz K, Cross JV, Hejal R, Templeton D, Rich EA, et al. Differential activation of MAP kinase signaling pathways and nuclear factor-kappaB in bronchoalveolar cells of smokers and nonsmokers. Molecular Medicine 2001; 7(3): 177-85.
- Moretto N, Bertolini S, Iadicicco C, Marchini G, Kaur M, Volpi G, et al. Cigarette smoke and its component acrolein augment IL-8/CXCL8 mRNA stability via p38 MAPK/MK2 signaling in human pulmonary cells. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2012; 303(10): 929-38.
- Nemmar A, Raza H, Subramanian D, John A, Elwasila M, Ali BH, et al. Evaluation of the pulmonary effects of short-term nose-only cigarette smoke exposure in mice. Exp Biol Med (Maywood) 2012; 237(12): 1449-56.
- Song M-A, Benowitz NL, Berman M, Brasky TM, Cummings KM, Hatsukami DK, et al. Cigarette Filter Ventilation and its Relationship to Increasing Rates of Lung Adenocarcinoma. JNCI: Journal of the National Cancer Institute 2017; 109(12): dxx075-dxx.
- Umesh CS Yadav, KV Ramana, Srivastava S. Aldose reductase regulates acrolein-induced cytotoxicity in human small airway epithelial cells. Free Radic Biol Med 2013 December; 65: 1-22.