



การวิเคราะห์ T lymphocyte subpopulation ในโคพันธุ์ผสมที่เป็นโรค Theileriosis แบบไม่แสดงอาการ

ธีรวิทย์ บัวมา^{1,*} จิรฤต แซ่ตั้ง² และสุรศักดิ์ สังขทัต ณ อยุธยา³

¹สาขาวิชาสัตวกรรมการผลิตสัตว์และการจัดการ คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110;

²ศูนย์ความเป็นเลิศนานาชาติ ด้านวิทยาศาสตร์และนวัตกรรมอาหารทะเล คณะอุตสาหกรรมเกษตร มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110; ³สาขาวิชาสัตวศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ อ.หาดใหญ่ จ.สงขลา 90110

บทคัดย่อ: โรค Theileriosis เกิดจากเชื้อปรสิตที่เรียกว่า *Theileria spp.* เชื้อปรสิตสามารถอาศัยอยู่บนเม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง โคพื้นเมืองที่ติดเชื้อมักไม่แสดงอาการให้เห็นอย่างเด่นชัด อาจเนื่องมาจากการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน การทำงานของ CD4⁺ cells ส่งผลกระตุ้นการทำงานของ CD8⁺ cells ให้ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อ ผลจากการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันก่อให้เกิดอาการความผิดปกติต่างๆ ดังที่กล่าวมาแล้ว ขณะที่ Tregs มีหน้าที่ในการยับยั้งการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น CD4⁺ cells และ CD8⁺ cells เป็นต้น การทำงานของเซลล์ Tregs ในโคที่เป็นโรค Theileriosis ยังไม่มีรายงานที่ชัดเจน การศึกษาครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อดูสัดส่วนของ CD4⁺ cells CD8⁺ cells และ Tregs ในโคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* แบบไม่แสดงอาการ โคพื้นเมืองที่ไม่แสดงอาการป่วย จะถูกเก็บเลือดมาตรวจทางโลหิตวิทยา ชีวเคมี พยาธิในเม็ดเลือดและสัดส่วนของเซลล์ลิมโฟไซต์ ผลการศึกษาพบว่า โคพื้นเมืองที่มีการติดเชื้อปรสิต *Theileria spp.* มีผลเลือดทางโลหิตวิทยาและชีวเคมีที่อยู่ในระดับปกติ สัดส่วนของ CD4⁺ cells และ CD8⁺ cells มีระดับที่ลดลงเล็กน้อย ขณะที่สัดส่วนของ Tregs มีระดับที่ไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเปรียบเทียบกับสัดส่วนของเซลล์ลิมโฟไซด์ของโคที่ไม่มีการติดเชื้อและได้มีการรายงานไว้ก่อนหน้านี้ การที่สัดส่วนของ CD4⁺ cells และ CD8⁺ cells มีระดับที่ลดลง อาจเป็นผลมาจากกลไกการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่ไม่ผ่านการทำงานของ Tregs

คำสำคัญ: โคเนื้อ *Theileria spp.* CD4⁺ cells CD8⁺ cells Tregs

*ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2566. 18(1): 31-40.

E-mail address: teerawin.vet@gmail.com

Analysis of Bovine T Lymphocyte Subpopulation in Asymptomatic Cross Breed Cattle with Theileriosis

Teerawin Bouma^{1,#}, Jirakrit Saetang², and Surasak Sangkhathat³

¹Animal Production Innovation and Management Division, Faculty of Natural Resources Prince of Songkla University, Hat Yai District, Songkhla, 90110, Thailand; ²International Center of Excellence in Seafood Science and Innovation, Faculty of Agro-Industry, Prince of SongKla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand 90110;

³Department of Surgery, Faculty of Medicine, Prince of SongKla University, Hat Yai, Songkhla, Thailand 90110

Abstract: Bovine theileriosis is caused by *Theileria spp.* that infect white blood cells (WBCs) and red blood cells (RBCs). Native cattle infected with *Theileria spp.* does not show clearly clinical signs that may be associated with the function of immune cells. CD4⁺ cells are required to activate the function of CD8⁺ cells that involve the elimination of the infected cells. As a result, the function of immune response can contribute those abnormal clinical signs. Tregs are responsible for inhibiting the function of immune cells such as CD4⁺ cells and CD8⁺ cells etc. The function of Tregs in cattle with Theileriosis has not been clearly explored. This study is to investigate the proportion of CD4⁺ cells, CD8⁺ cells and Tregs in symptomatic cattle infected with *Theileria spp.* Crossbred Native and Brahman cattle with healthy clinical signs were chosen to collect blood for hematology, biochemistry profiles and the proportion of lymphocytes. The results showed that the cattle infected with *Theileria spp.* has the blood test results, hematology, biochemical profiles, within the normal range. The proportion of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells tend to be lower slightly, whereas the proportion of Tregs is not affected comparing with the proportion of lymphocytes in uninfected cattle from previous reports. Then, the reduction of CD4⁺ cells and CD8⁺ cells might be affected by other pathway of immune response that does not involve the function of Tregs.

Keywords: Cattle, *Theileria spp.*, CD4⁺ cells, CD8⁺ cells, Tregs

[#]Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2023 18(1): 31-40.

E-mail address: teerawin.vet@gmail.com

บทนำ

โรค Theileriosis ในโค เกิดจากเชื้อปรสิตที่มีชื่อว่า *Theileria spp.* ซึ่งมีหลายชนิด โดยเชื้อปรสิตที่มีรายงานการระบาดในประเทศไทย ได้แก่ *Theileria*

orientalis (Altangerel et al., 2011; Rakwong et al., 2022) โคสามารถติดเชื้อ *Theileria spp.* ผ่านจากการดูดเลือดของเห็บที่มีเชื้อปรสิต เชื้อปรสิตที่อยู่ในระยะ Sporozoites อาศัยอยู่ในต่อมน้ำลายของเห็บ เมื่อเห็บ

ดูดเลือดโค เชื้อก็สามารถถ่ายทอดไปยังระบบไหลเวียนเลือดของโคได้ เชื้อจะเข้าไปอยู่ในเม็ดเลือดขาวและแพร่กระจายต่อไปยังต่อมน้ำเหลืองม้ามและตับ ขณะที่เชื้อปรสิตที่อยู่ในระยะ Merozoites จะพัฒนาไปเป็นระยะ Piroplasm บนเม็ดเลือดแดง (Ahmed et al., 2008)

หลังจากที่โคติดเชื้อ เชื้อปรสิตจะมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ซึ่งตรงกันข้ามกับการทำงานหรือการเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด T lymphocyte และ B lymphocyte รวมทั้ง Monocyte ที่มีการตอบสนองที่ไม่สมบูรณ์ (Preston et al.) โคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* มักพบอาการผิดปกติต่างๆ ได้แก่ ซึม ไข้ ไม่กินอาหาร ต่อมน้ำเหลืองบวมโต ตัวเหลือง (jaundice) โลหิตจาง ปริมาณน้ำนมลดลง แท้งลูก และโคอาจเสียชีวิตได้หากไม่ได้รับการรักษา (Agina et al., 2020)

เซลล์ที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* จะถูกกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ MHC class I ซึ่งมีความสำคัญต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบ Cell-mediated immune response โดยเฉพาะเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD8⁺ cells (Ahmed et al., 2008; Torina et al., 2020) ถึงแม้ว่าจะยังไม่ทราบกลไกที่ชัดเจนในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* แต่จากรายงานการศึกษาการทำงานของ CD8⁺ cells ในมนุษย์ และสัตว์ทดลองพบว่าเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟไซต์ชนิด CD8⁺ cells ทำหน้าที่สร้าง Granzyme B ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ทำลายเชื้อปรสิต และควบคุมไม่ให้มีการแบ่งตัวมากเกินไป (Yang et al., 2018; Torina et al., 2020)

เชื้อ *Theileria spp.* สามารถกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันแบบ Adaptive immune response และยังสามารถกระตุ้นการสร้างและหลั่งสาร Cytokines ที่ช่วยในการทำงานหรือการตอบสนองของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4⁺ cells ต่อแอนติเจนของเชื้อปรสิต CD4⁺ cells ทำหน้าที่สร้าง Interferon gamma (IFN- γ) ซึ่งไปกระตุ้นให้เซลล์ macrophage ให้มีการสร้างและหลั่งสาร Tissue

necrosis factor alpha (TNF- α) และ Nitric oxide (NO) ในการทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ ขณะที่เซลล์ CD8⁺ cells ทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อผ่านกระบวนการ Major histocompatibility (MHC) restricted mechanism (Ahmed, 2002; Torina et al., 2020)

ดังนั้นอาการผิดปกติของโคที่ติดเชื้อปรสิตเป็นผลมาจากการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีการสร้างและหลั่งสารเคมีออกมาตอบสนองต่อการติดเชื้อปรสิต และการทำงานของ Macrophage ที่เปลี่ยนแปลงไป รายงานก่อนหน้านี้พบว่าเซลล์ Macrophage ที่ติดเชื้อ *Theileria annulate* สามารถกระตุ้นการพัฒนาของเซลล์ CD4⁺ cells ที่ไม่มีการแสดงออกของ CD2 ซึ่งส่งผลทำให้เซลล์ CD4⁺ cells ที่สร้างขึ้นไม่สามารถทำงานในระบบภูมิคุ้มกันได้อย่างสมบูรณ์ นอกจากนี้โคที่มีความต้านทานต่อโรค Theileriosis มักพบว่าต่อมน้ำเหลืองไม่บวมโต เซลล์ Macrophage และ T lymphocytes แบ่งตัวเพิ่มจำนวนลดลง (Torina et al., 2020)

การทำงานของ Phagocytic cells ในการทำลายเชื้อจุลินทรีย์รวมทั้งเชื้อปรสิต อาจมีประสิทธิภาพลดลง ซึ่งอาจเกิดจากการกระบวนการยับยั้งการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกัน โดยเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานหรือตอบสนองของเซลล์เม็ดเลือดชนิดต่างๆ เรียกว่า Regulatory T cells (Tregs) หรือ CD4⁺CD25⁺ FoxP3⁺ cells ซึ่งจัดเป็นเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด Helper T cells (Velavan and Ojuronbe, 2011; Sajiki et al., 2020) การศึกษาถึงคุณสมบัติของ Regulatory T cells ในกลุ่มโคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* ยังมีไม่มากนัก ทำให้การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของ Tregs ระหว่างกลุ่มโคเนื้อพื้นเมืองที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* แบบไม่แสดงอาการ การเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของ CD4⁺ cells CD8⁺ cells และ Tregs อาจเป็นข้อมูลที่สำคัญต่อการรักษาโคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* ในอนาคตได้

วิธีการวิจัย

การตรวจร่างกายและการคัดเลือกโคเนื้อเข้าร่วมงานวิจัย

กระบวนการศึกษาครั้งนี้ได้ผ่านกระบวนการพิจารณาจากคณะกรรมการการใช้สัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โคเนื้อพันธุ์ผสมระหว่างโคเนื้อพันธุ์พื้นเมืองกับโคเนื้อพันธุ์บราห์มันจำนวน 8 ตัว โดยโคเนื้อที่มีคุณสมบัติเข้าสู่กระบวนการศึกษาครั้งนี้มีอายุตั้งแต่ 1 ปีเป็นต้นไป ไม่จำกัดเพศ มีสุขภาพแข็งแรง ไม่แสดงอาการป่วย

การเก็บตัวอย่างเลือดและการตรวจวิเคราะห์เลือด

ในการเก็บตัวอย่าง โคเนื้อถูกต้อนเข้าของบังคับ และทำการเจาะเก็บเลือดตรงตำแหน่งหลอดเลือด Jugular vein ปริมาตร 20 mL เลือดจะถูกแบ่งเก็บใส่ในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือดชนิด EDTA และหลอดเก็บเลือดที่ไม่มีสาร EDTA ตามลำดับ ตัวอย่างเลือดที่ได้จะถูกส่งไปวิเคราะห์ที่ศูนย์ชันสูตรโรคสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ เพื่อวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา (hematology) ค่าชีวเคมี (blood chemistry) และพยาธิเม็ดเลือด (blood parasite)

การตรวจค่าโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของเลือด ประกอบด้วย ค่าเม็ดเลือดแดง ปริมาณฮีโมโกลบิน ค่าเม็ดเลือดขาว ค่าเกล็ดเลือด ค่าโปรตีนในเลือด ค่าโปรตีนอัลบูมิน (Albumin) เอนไซม์ Aspartate transferase (AST) และค่า Blood urea nitrogen (BUN)

การเก็บเซลล์เม็ดเลือดชนิด Peripheral blood mononuclear cells (PBMC)

ตัวอย่างเลือดในหลอดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (ปริมาตร 10 มิลลิลิตร) ถูกดูดมาใส่ในหลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตรที่มีสาร Ficoll อยู่ในหลอดทดลองปริมาตร 3 มิลลิลิตร จากนั้นนำหลอดทดลองมาปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง หลังปั่นเหวี่ยงเซลล์ ใช้ Pasteur pipettes ทำการดูดเซลล์ PBMC ออกมาใส่ใน

หลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ทำการปั่นล้างเซลล์ 2 รอบด้วยสารละลาย Phosphate buffered saline (PBS) ที่ความเร็ว 2000 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการเติม 20% DMSO เพื่อเก็บเซลล์ไว้ในไนโตรเจนเหลว รวบรวมย้อมสีและวิเคราะห์สัดส่วนของเซลล์ต่อไป

การย้อมเซลล์ PBMC และการทำ Flow cytometry analysis

เซลล์ PBMC ถูกนำมาละลายและปั่นล้างรอบแรกด้วย 10% RPMI และทำการปั่นล้างรอบที่สองด้วย FACS buffer ที่ความเร็ว 500 g เป็นเวลา 5 นาที นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงใน 96 well plate และทำการย้อมเซลล์ด้วยแอนติบอดีต่างๆ ดังนี้ anti-CD4, anti-CD8, anti-CD25 ในการย้อมสีผิวเซลล์แอนติบอดีปริมาตร 5 ไมโครลิตรถูกเติมลงในตัวอย่าง จากนั้นทำการบ่ม (Incubation) ในที่มืดเป็นระยะเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการปั่นล้างด้วย Flow cytometry staining buffer 2 ครั้ง เซลล์ที่ได้จะถูกนำมาย้อม Intracellular staining โดยเซลล์จะถูกปั่นล้างด้วยสารละลาย Fix/Perm buffer และสารละลาย Perm ตามลำดับ จากนั้นเติม anti-FOXP3 ปริมาตร 2 ไมโครลิตรลงในตัวอย่างและทำการบ่ม (Incubation) ในที่มืด เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิห้อง เซลล์ถูกปั่นล้างด้วย Perm buffer จำนวน 2 รอบแล้วนำเซลล์ไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Amnis® ImageStream®X Mk II imaging flow cytometer (Luminex Corporation, TX, US; 488 nm, 642 nm, และ 785 nm lasers) โดยใช้โปรแกรม Analysis Software (IDEAS®) version 6.2 ในการวิเคราะห์สัดส่วนของเซลล์ CD4, CD8 และ Tregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$) ตามลำดับ

ผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้ โคเนื้อพันธุ์ผสมทุกตัวมีอายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป มีสุขภาพแข็งแรง Body score

condition (BSC) อยู่ประมาณ 1-2/5 โคถูกเลี้ยงให้กินอาหารชั้นและหญ้า มีการปล่อยแปลงเป็นประจำทุกวัน ไม่แสดงอาการป่วย และไม่ซึม

ค่าโลหิตวิทยาของโคเนื้อพันธุ์ผสมได้รับการตรวจสอบและแสดงผลดังตารางที่ 1 ผลโลหิตวิทยาของโคเนื้อพันธุ์ผสม (n=8) ได้แก่ค่าความเข้มข้นของเม็ดเลือดแดงและฮีโมโกลบิน ค่าความเข้มข้นของเม็ดเลือดขาว และเกล็ดเลือดมีค่าอยู่ในช่วงค่ามาตรฐาน.

นอกจากนี้ ค่าชีวเคมีของเลือดโคเนื้อพันธุ์ผสม (ตาราง 2) ได้แก่ ค่า AST ค่า BUN ค่าโปรตีน Albumin และค่าโปรตีนรวมในกระแสเลือด (Total protein) มีค่าอยู่ในช่วงค่ามาตรฐาน

ผลการตรวจพยาธิเม็ดเลือดในโคเนื้อพันธุ์ผสม

ผลการตรวจพยาธิเม็ดเลือด (รูปที่ 1) พบพยาธิเม็ดเลือดชนิด *Theileria spp.* บนเม็ดเลือดแดงของโคเนื้อพันธุ์ผสมทุกตัว

ตาราง 1 ค่าโลหิตวิทยาของโคเนื้อพันธุ์ผสม

ชนิดค่าเลือด	หน่วย	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	Reference
WBC	10^3 cells/mm ³	11.39	2.16	4.0–12.0
Seg neutrophils	%	29.13	5.82	15–33
Band neutrophils	%	0.00	0.00	0–2
Lymphocytes	%	59.13	10.36	45–75
Monocytes	%	1.50	0.93	0–8
Eosinophils	%	10.25	5.65	0–20
Basophils	%	0.00	0.00	0–2
RBC	10^6 cells/mm ³	8.26	1.92	5.0–10.0
PCV	%	34.25	4.71	24–46
Hb	g/dL	12.46	1.86	8–15
MCV	fL	44.29	6.09	40–60
MCH	Pg	15.44	2.13	11–17
MCHC	g/dL	34.86	0.53	30–36
RDW	%	20.33	0.98	-
PLT	$\times 10^3$ cells/mm ³	338.88	80.96	100–800
Plasma protein	g/100mL	7.98	0.85	6.0–8.0

WBC: white blood cells; Seg neutrophils: segmented neutrophils; RBC: red blood cells; PCV: pack cell volume; Hb: hemoglobin; MCV: mean corpuscular volume; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCH: mean corpuscular hemoglobin; RDW: red blood cell distribution width; PLT: platelet

ตาราง 2 ค่าชีวเคมีของเลือดโคเนื้อพันธุ์ผสม

ชนิดค่าเลือด	หน่วย	ค่าเฉลี่ย	ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน	Reference
AST	U/L	70.63	18.30	60-125
BUN	mg/dL	15.89	3.19	10-25
Albumin	g/L	28.51	2.86	25-38
Total protein	g/L	71.56	9.39	60-80

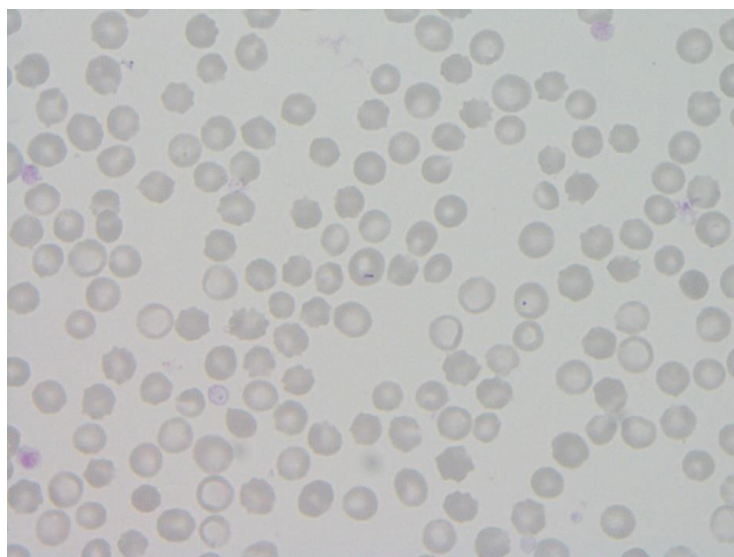
AST: aspartate aminotransferase; BUN; blood urea nitrogen;

สัดส่วนของเซลล์ T lymphocyte subpopulation ในโคเนื้อพันธุ์ผสมที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* แบบไม่แสดงอาการ

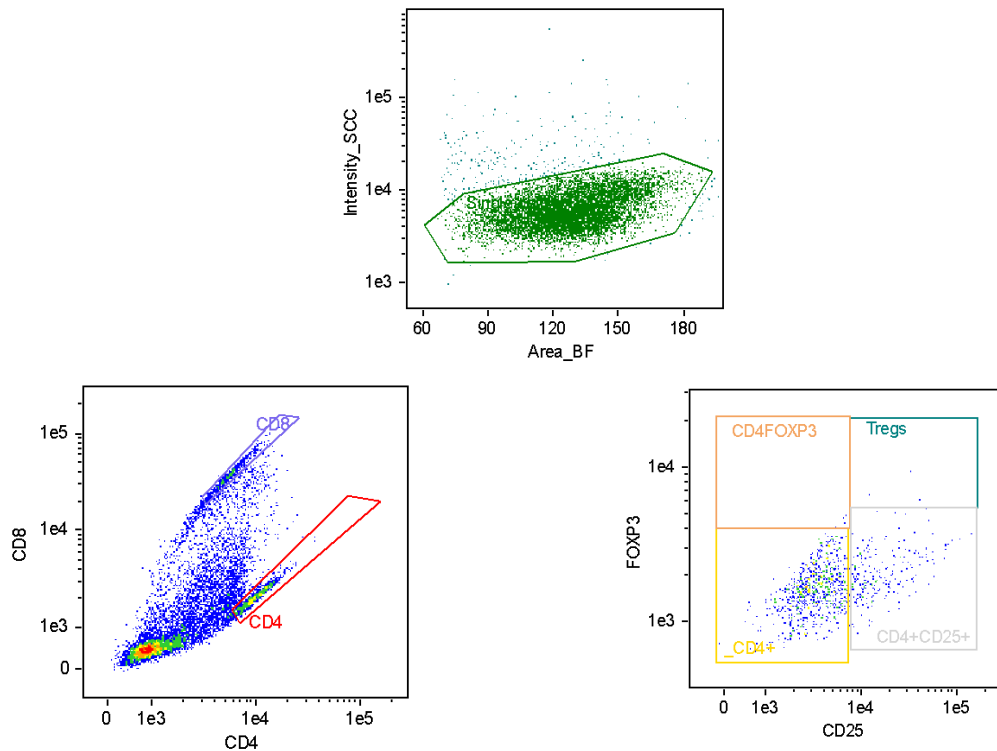
เซลล์ PBMC ที่ผ่านกระบวนการย้อมสีด้วยแอนติบอดี เซลล์ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยใช้โปรแกรม Analysis Software IDEAS® ส่วนของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4⁺ cells CD8⁺ cells และ Tregs ได้แสดงผลในรูปแบบที่ 2 และตารางที่ 3 เซลล์ PBMC ที่กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ถูกเลือกนำมาวิเคราะห์ประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์ (subpopulation) ได้แก่ CD4⁺ cells CD8⁺ cells และ Tregs รวมทั้งหาค่า CD4⁺/CD8⁺ ratio จากโคเนื้อพันธุ์ผสม 8 ตัวมีค่าดังต่อไปนี้ 17.93% 7.05% 0.23% และ 2.54 ตามลำดับ

สัดส่วนของเซลล์ T lymphocyte subpopulation ในโคเนื้อพันธุ์ผสมที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* แบบไม่แสดงอาการ

เซลล์ PBMC ที่ผ่านกระบวนการย้อมสีด้วยแอนติบอดี เซลล์ถูกนำมาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยใช้โปรแกรม Analysis Software IDEAS® ส่วนของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิด CD4⁺ cells CD8⁺ cells และ Tregs ได้แสดงผลในรูปแบบที่ 2 และตารางที่ 3 เซลล์ PBMC ที่กระจายตัวเป็นเซลล์เดี่ยว ถูกเลือกนำมาวิเคราะห์ประชากรย่อยของเซลล์ลิมโฟไซต์ (subpopulation) ได้แก่ CD4⁺ cells CD8⁺ cells และ Tregs รวมทั้งหาค่า CD4⁺/CD8⁺ ratio จากโคเนื้อพันธุ์ผสม 8 ตัวมีค่าดังต่อไปนี้ 17.93% 7.05% 0.23% และ 2.54 ตามลำดับ



รูปที่ 1 พยาธิเม็ดเลือดชนิด *Theileria spp.* ที่อยู่บนเม็ดเลือดแดงของโคเนื้อพันธุ์ผสม (n=8)



รูปที่ 2 การพิจารณาคูณลักษณะของ PBMCs ด้วย Flow cytometry analysis A. การ Gating เซลล์ PBMCs B. การ Gating เซลล์ CD4⁺ และ CD8⁺ ใน PBMCs C. การ Gating เซลล์ Tregs (CD4⁺CD25⁺FOXP3⁺ cells)

ตาราง 3 ค่าสัดส่วนของ T lymphocyte subpopulation

In single cells	Mean (%)	SD
CD4 ⁺ cells	17.93	9.64
CD8 ⁺ cells	7.05	8.25
CD4 ⁺ CD25 ⁺ FOXP3 ⁺ cells	0.23	0.28
CD4 ⁺ /CD8 ⁺ ratio	2.54	

อภิปรายผลการทดลอง

จากรายงานการวิจัยก่อนหน้านี้ โคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* พบมี Body condition score (BCS) ที่ต่ำมาก (Agina et al., 2021; Almazán et al., 2022) สารอาหารที่โคได้รับ จะถูกนำไปสร้างเป็นพลังงานในกระบวนการเจริญเติบโต รวมทั้งกระบวนการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย (Ingvarsen and Moyes, 2013) การได้รับสารอาหาร โดยเฉพาะโปรตีนที่ไม่เพียงพอต่อความต้องการของร่างกาย จะส่งผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันทำงานบกพร่อง ขณะที่โคมีการติดเชื้อ

เซลล์ในภูมิคุ้มกันต้องการพลังงานที่เพิ่มขึ้นเพื่อใช้ในกระบวนการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนหรือกระบวนการทำลายเชื้อที่เข้าสู่ร่างกาย ทำให้พลังงานที่จะใช้ในกระบวนการเจริญเติบโตลดน้อยลงได้ (Calder, 2013)

ถึงแม้ว่าพบเชื้อ *Theileria spp* บนเม็ดเลือดแดงของโค แต่ผลการตรวจโลหิตวิทยาและค่าชีวเคมีของโคอยู่ในช่วงค่าปกติได้ เช่นเดียวกับการรายงานของ Ayadi et al. ซึ่งได้ศึกษาค่าเลือดของโคพื้นเมือง และโคพันธุ์ผสมที่ติดเชื้อ *Theileria annulata* พบว่ามีค่าเลือดเม็ดเลือดขาว ค่าความเข้มข้นของฮีโมโกลบิน ค่าความเข้มข้น

ของเม็ดเลือดแดง ค่าโปรตีนรวมในเลือดและค่าโปรตีน albumin มีค่าอยู่ในช่วงค่าปกติของโค (Ayadi et al., 2016)

โคพื้นเมืองมีความสามารถในการทนทานต่อการติดเชื้อ *Theileria annulata* ได้ดีกว่าโคสายพันธุ์ที่มาจากต่างประเทศ นอกจากนี้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของโคพื้นเมืองมีการตอบสนองในการสร้างสารที่ก่อให้เกิดกระบวนการอักเสบได้น้อยกว่าโคสายพันธุ์ต่างประเทศด้วย (Ayadi et al., 2016)

ถึงแม้ว่า Tregs ถูกรู้จักกันในนาม Suppressor cells ที่ทำหน้าที่ในการยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ แต่การเปลี่ยนแปลงของ Tregs ในโคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* แบบไม่แสดงอาการยังไม่ได้มีการศึกษาหรือรายงาน ซึ่งอาจมีความเกี่ยวข้องกับการติดเชื้อในโคแบบไม่แสดงอาการป่วยก็ได้ (Veiga-Parga, 2016; Agina et al., 2020)

ในการศึกษาสัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells ของโคเนื้อพันธุ์ Korean native (Hanwoo) เพศเมีย และโคนมพันธุ์ Holstein เพศเมีย พบว่าโคเนื้อมีสัดส่วน $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells อยู่ที่ 18.71% และ 12.96% ตามลำดับ ขณะที่โคนมมีสัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells อยู่ที่ 27.49% และ 13.20% ตามลำดับ (Kim et al., 2016) นอกจากนี้มีการศึกษาสัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells ในลูกโคที่มีสุขภาพดีและไม่มีการติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *Babesia bigemina* ผลการศึกษาพบว่าสัดส่วนของเซลล์อยู่ที่ 8.5% และ 15.1% ตามลำดับ อย่างไรก็ตามเมื่อลูกโคมีการติดเชื้อ *Babesia bigemina* พบว่าสัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells มีค่าลดลงเหลือ 1.37% และ 1.6% ตามลำดับ (Rauf et al., 2020)

ถึงแม้ว่ายังไม่มีรายงานการตรวจสอบสัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells ในเลือดโคที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *Theileria spp.* ด้วยวิธี Flow cytometry

แต่มีการรายงานสัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells ในเลือดโคที่ติดเชื้อพยาธิเม็ดเลือดชนิด *Theileria spp.* ด้วยวิธี Immunohistochemistry มีค่า 18.69% และ 20.36% ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่ากลุ่มโคที่ไม่ติดเชื้อ ซึ่งมีค่าอยู่ที่ 30.87% และ 18.38% (Aziz et al., 2019)

จากการศึกษาดังกล่าวพบว่า การติดเชื้อในโคส่งผลทำให้สัดส่วนของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells มีสัดส่วนที่ลดลงได้ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ โคมีการติดเชื้อ *Theileria spp.* มีสัดส่วนของ $CD4^+$ cells (18.52%) และ $CD8^+$ cells (7.05%) ที่ต่ำกว่าระดับ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells ของโคที่มีสุขภาพดีและไม่ติดเชื้อตามที่กล่าวมาข้างต้น

ขณะที่ $CD4^+/CD8^+$ ratio ของโคสายพันธุ์ Hanwoo และสายพันธุ์ Holstein มีค่า 1.47 และ 2.08 ตามลำดับ (Kim et al., 2016) หรือโคที่ไม่ติดเชื้อ *Theileria spp.* มี $CD4^+/CD8^+$ ratio อยู่ที่ 1.72 ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มโคที่ติดเชื้อซึ่งมีค่า 0.93 (Aziz et al., 2019) แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าค่า $CD4^+/CD8^+$ ratio (2.63) ยังมีค่าสูงอยู่เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ติดเชื้อที่เคยรายงานมาก่อนหน้า

การที่ปริมาณของ $CD4^+$ cells และ $CD8^+$ cells ไม่เพิ่มขึ้นหลังจากมีการติดเชื้อ อาจเป็นผลมาจากกระบวนการยับยั้งของ Suppressor cells อย่างไรก็ตามระดับ Tregs ในโคที่เป็น Bovine Theileriosis ยังไม่ได้มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ ในการศึกษาครั้งนี้ระดับ Tregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$ cells) ในเลือดโคที่ติดเชื้อ *Theileria spp.* มีระดับที่ใกล้เคียงกับระดับ Tregs ($CD4^+CD25^+FOXP3^+$ cells) ที่ได้จากโคที่ไม่ติดเชื้อ (Sajiki et al., 2020) ซึ่งมีความสอดคล้องกับการศึกษาของ Abbott et al. พบว่าโคที่ติดเชื้อ *Anaplasma marginale* มีปริมาณ $CD4^+$ cells ที่ไม่เพิ่มขึ้น ขณะที่ผลจากการเปลี่ยนแปลงปริมาณ $CD4^+CD25^+$ cells ก็ไม่เปลี่ยนแปลงเช่นกัน (Abbott et al., 2005)

สรุป

โคพื้นเมืองพันธุ์ผสมที่ติดเชื้อปรสิต *Theileria* spp. พบว่าโคไม่ได้แสดงอาการป่วย และยังมีผลการโลหิตวิทยา และชีวเคมีที่อยู่ในช่วงปกติ ปริมาณของ CD4⁺ cells และ CD8⁺ cells มีปริมาณลดลงเพียงเล็กน้อย ขณะที่ปริมาณ Tregs ไม่เปลี่ยนแปลง ดังนั้น การลดลงของ CD4⁺ cells และ CD8⁺ cells อาจเป็นผลมาจากการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ไม่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ Tregs

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนส่วนหนึ่งจาก ศูนย์วิจัยความเป็นเลิศเทคโนโลยีชีวภาพเกษตรและทรัพยากรธรรมชาติ ระยะที่ 3 คณะทรัพยากรธรรมชาติ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

เอกสารอ้างอิง

- Abbott, J. R. et al. 2005. Rapid and Long-Term Disappearance of CD4⁺ T Lymphocyte Responses Specific for Anaplasma Marginale Major Surface Protein-2 (MSP2) in MSP2 Vaccinates following Challenge with Live A. marginale¹. The Journal of Immunology 174: 6702-6715.
- Agina, O. et al. 2020. Clinical Pathology, Immunopathology and Advanced Vaccine Technology in Bovine Theileriosis: A Review.
- Agina, O. A. et al. 2021. Molecular detection of Theileria species, Anaplasma species, Candidatus Mycoplasma haemobos, Trypanosoma evansi and first evidence of Theileria sinensis-associated bovine anaemia in crossbred Kedah-Kelantan x Brahman cattle. BMC Veterinary Research 17: 246.
- Ahmed, J. 2002. The role of cytokines in immunity and immunopathogenesis of pirolasmoses. Parasitology Research 88: S48-S50.
- Ahmed, J. S., E. J. Glass, D. A. Salih, and U. Seitzer. 2008. Review: Innate immunity to tropical theileriosis. Innate Immunity 14: 5-12.
- Almazán, C., R. C. Scimeca, M. V. Reichard, and J. Mosqueda. 2022. Babesiosis and Theileriosis in North America. Pathogens 11 Accessed Date Accessed.| doi:DOI|
- Altangerel, K. et al. 2011. Molecular prevalence of different genotypes of Theileria orientalis detected from cattle and water buffaloes in Thailand. The Journal of Parasitology 97: 1075-1079.
- Ayadi, O., M. Gharbi, and M. Benchikh-Elfegoun. 2016. Haematological and biochemical indicators of tropical theileriosis diseased cattle in wilaya of Sétif (North East Algeria). Journal of parasitic diseases 41.
- Aziz, N., M. Maksudi, and Y. Prakoso. 2019. Correlation between hematological profile and theileriosis in Bali cattle from Muara Bulian, Jambi, Indonesia. Veterinary World 12: 1358-1361.
- Calder, P. C. 2013. Feeding the immune system. Proceedings of the Nutrition Society 72: 299-309.
- Ingvartsen, K. L., and K. Moyes. 2013. Nutrition, immune function and health of dairy cattle. Animal 7: 112-122.

- Kim, Y.-M. et al. 2016. Reference ranges of hematology and lymphocyte subsets in healthy Korean native cattle (Hanwoo) and Holstein dairy cattle. *Animal Science Journal* 87: 796-801.
- Preston, P. M. et al. A dual role for immunosuppressor mechanisms in infection with *Theileria annulata*: well-regulated suppressor macrophages help in recovery from infection; profound immunosuppression promotes non-healing disease.
- Rakwong, P., N. Keawchana, R. Ngasaman, and K. Kamyinkird. 2022. *Theileria* infection in bullfighting cattle in Thailand.
- Rauf, U. et al. 2020. Humoral and Cell-Mediated Immune Response Validation in Calves after a Live Attenuated Vaccine of *Babesia bigemina*. *Pathogens* 9: 936.
- Sajiki, Y. et al. 2020. The Suppression of Th1 Response by Inducing TGF- β 1 From Regulatory T Cells in Bovine Mycoplasmosis. *Frontiers in Veterinary Science* 7: 1031.
- Torina, A. et al. 2020. Immune Response to Tick-Borne Hemoparasites: Host Adaptive Immune Response Mechanisms as Potential Targets for Therapies and Vaccines. *International Journal of Molecular Sciences* 21: 8813.
- Veiga-Parga, T. 2016. Regulatory T Cells and Their Role in Animal Disease. *Veterinary Pathology* 53: 737-745.
- Velavan, T. P., and O. Ojurongbe. 2011. Regulatory T cells and parasites.
- Yang, J., A. Pemberton, W. I. Morrison, and T. Connelley. 2018. Granzyme B Is an Essential Mediator in CD8+ T Cell Killing of *Theileria parva*-Infected Cells. *Infection and Immunity* 87: e00386-00318.

