

ผลของสารทีทูทอกซินต่อความเป็นพิษและการตาย ของเซลล์ไฟโบบลาสจากเอมบริโอไก่พื้นเมือง

Effects of T - 2 Toxin on Cytotoxicity and Apoptosis of Embryonic Fibroblast Cells Obtained from Native Chicken

ชมพูนุช หล้าแสงกุล*, มานินพันธ์ ทองคำ กรวรรณ ศรีงาม
วรรณพร ทะพิงค์แก และ มนตรี ปัญญาทอง
Chompunut Lumsangkul*, Marninphan Thongkham, Korawan Sringarm,
Wanaporn Tapingkae and Montri Punyatong

ภาควิชาสัตวศาสตร์และสัตว์น้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ จ. เชียงใหม่ 50200
Department of Animal and Aquatic Sciences, Faculty of Agriculture, Chiang Mai University, Chiang Mai 50200, Thailand

*Corresponding author: Email: chompunut.lum@cmu.ac.th

(Received: 8 October 2020; Accepted: 23 November 2020)

Abstract: The objective of this study was to determine the toxicity of T - 2 toxin in poultry. Chicken embryonic fibroblast (CEF) cells were derived from crossbred native chickens and used as a model for cytotoxicity evaluation of T - 2 toxins at various concentrations (0, 0.01, 0.1, 1, and 10 $\mu\text{g} / \text{ml}$) for 24 and 48 hours. Cytotoxicity of CEF was increased when exposed to increasing concentrations of T - 2 toxin. Cell viability of CEF was lower than 40 % and 20 % for all concentrations of T - 2 toxin at 24 and 48 hours, respectively. CEF cells were induced to death and mostly in the early apoptosis phase (62.27 %) by T - 2 toxin. The results indicated that crossbred native chickens were less resistant and more sensitive to T - 2 toxin. Therefore, the contamination caused by T - 2 toxin should be monitored in poultry feed as it may cause disease in chickens.

Keywords: T - 2 toxin, cytotoxicity, apoptosis, crossbred native chicken embryonic fibroblast cells (CEFs)

บทคัดย่อ: การศึกษามีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารพิษที่หนูในสัตว์ปีก โดยใช้เซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสมเป็นต้นแบบจำลอง เพื่อวัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ระดับ 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนของไก่ที่ได้รับสารพิษที่หนูนั้น มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารพิษที่หนู และอัตราการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 40 และ 20 % ในทุกระดับของสารพิษที่หนูที่ใช้ทดสอบ ที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ เซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสมที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายโดยสารพิษที่หนู ส่วนใหญ่อยู่ในระยะอะพอพโทซิสที่มีการตายของเซลล์ในช่วงต้น (early apoptosis) เท่ากับ 62.27 % ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าไก่พื้นเมืองลูกผสมมีความทนทานน้อยและตอบสนองไวมากต่อสารพิษที่หนู ดังนั้น ควรมีการเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารพิษที่หนูในอาหารสัตว์ปีก เพราะอาจเป็นสาเหตุก่อโรคในไก่ได้

คำสำคัญ: สารพิษจากเชื้อราที่หนู ความเป็นพิษต่อเซลล์ การตายแบบอะพอพโทซิส เซลล์ไฟโบรลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม

คำนำ

ไก่พื้นเมืองลูกผสม คือ ไก่ที่ผ่านการปรับปรุงสายพันธุ์ระหว่างสายพันธุ์ทางการค้ากับสายพันธุ์พื้นเมือง เพื่อพัฒนาการเจริญเติบโตและความทนทานต่อสภาพแวดล้อมในท้องถิ่นนั้น ๆ จากสภาพอากาศที่ร้อนชื้นในหน้าฝนของประเทศไทยเป็นหนึ่งในปัจจัยสำคัญที่อาจเกิดการปนเปื้อนจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์ ซึ่งก่อให้เกิดสารพิษจากเชื้อรา (mycotoxins) ซึ่งเป็นผลจากเมแทบอลิซึมทุติยภูมิ (secondary metabolite) ของเชื้อราตามมาด้วย ไม่เพียงแต่ในประเทศไทยเท่านั้นในปัจจุบันอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีกทั่วโลกยังคงประสบกับปัญหาการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารที่นำมาประกอบเป็นอาหารสัตว์ จากการสำรวจ พบว่า มีการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราในผลผลิตทางการเกษตรหลากหลายชนิด (Gruber-Dominger *et al.*, 2019; Mahdjoubi *et al.*, 2020) เช่น ข้าวโพด ถั่ว ข้าวสาลี และอื่น ๆ ที่นำมาประกอบเป็นวัตถุดิบหลักมากกว่า 50 % ของอาหารสัตว์ปศุสัตว์ โดยเฉพาะอาหารสัตว์ปีก สอดคล้องกับหลากหลายการศึกษาที่มีการตรวจพบการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราหลายชนิดอยู่ในอาหารสัตว์ปีกและส่วนผสมของวัตถุดิบอาหารต่าง ๆ (Ezekiel *et al.*, 2012; Kana *et al.*, 2013; Labuda *et al.*, 2005; Rodrigues and Naehrer 2012; Shareef, 2010; Streit *et al.*, 2013) ดังนั้น ความเสี่ยง

ที่สัตว์จะได้รับสารพิษจากเชื้อรา โดยผ่านทางกรกินอาหารที่ประกอบขึ้นจากวัตถุดิบที่มีการปนเปื้อนจากสารพิษจากเชื้อรานี้มีสูงมาก

สารพิษที่หนู (T-2 toxin) เป็นสารพิษจากเชื้อราที่จัดอยู่ในกลุ่มของ trichothecene (Bouaziz *et al.*, 2006; Desjardins *et al.*, 1993; Sudakin, 2003) โดยเกิดจากเชื้อราในสกุล *Fusarium* เช่น *F. sporotrichioides*, *F. poae*, *F. equiseti* และ *F. acuminatum* (Desjardins *et al.*, 1993) ซึ่งมีการพบว่า สารพิษจากเชื้อราในกลุ่มนี้มีการปนเปื้อนอยู่ในอาหารสัตว์ปีกและอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพอนามัยของสัตว์ โดยสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ อาจเป็นพิษต่อเซลล์ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายและอาจเป็นสารก่อมะเร็ง อีกทั้งอาจตกค้างในผลิตภัณฑ์ของสัตว์ อาทิ ผลิตภัณฑ์จากสัตว์ปีก จำพวกเนื้อและไข่ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพของผู้บริโภคได้อีกด้วย สำหรับรายงานข้อมูลที่แสดงความเป็นพิษและกลไกของสารพิษที่หนูนั้นมีจำนวนน้อยมากและไม่เพียงพอต่อการนำมาอ้างอิงสำหรับการทดสอบและศึกษาในภาคสนาม อีกทั้งความทนทานของสัตว์ปีกสายพันธุ์พื้นเมืองของไทยต่อสารพิษที่หนูนั้นยังไม่มีข้อมูลปรากฏ เพื่อเป็นการทดสอบระดับของความเป็นพิษของสารพิษจากเชื้อราที่อาจปนเปื้อนมากับอาหารสัตว์ ก่อนนำไปทดสอบในภาคสนามกับตัวสัตว์ จึงได้มีออกแบบการศึกษาขั้นต้นโดยการนำเซลล์ของสัตว์มาทดสอบภายในห้องปฏิบัติการ ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ จึงมีวัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารพิษที่ดูดซับในสัตว์ปีก โดยใช้เซลล์ไฟโบรลัสจากตัวอ่อนของไก่พื้นเมือง ลูกผสมเป็นต้นแบบจำลอง เพื่อวัดระดับความเป็นพิษต่อเซลล์ และใช้เป็นฐานข้อมูลขั้นต้นด้านความเป็นพิษต่อสัตว์ปีก โดยเฉพาะไก่พื้นเมืองลูกผสมของไทย ก่อนทำการทดลองในภาคสนามที่ใช้สัตว์ทดลองในสิ่งแวดล้อมร่างกายปกติ (*in vivo* study) ในอนาคตต่อไปเพื่อได้ผลการศึกษาเบื้องต้น

อุปกรณ์และวิธีการ

เซลล์ที่ใช้ในการทดสอบและการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนไก่ (chicken embryonic fibroblast; CEF) ได้มาจากการแยกเซลล์ผิวหนังของไก่พื้นเมืองลูกผสม 3 สายพันธุ์ (ประดู่หางดำ (Pradu Hang Dam) x สายพันธุ์ไฮฮับบาร์ด (Hubbard) x สายพันธุ์เนือฮับบาร์ด (Hubbard) และทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) ที่ประกอบด้วย fetal bovine serum 10% และยาปฏิชีวนะ 1% (เพนนิซิลลิน (penicillin) 10,000 ยูนิตต่อมิลลิลิตร + สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร + แอมโฟเทอริซิน บี (amphotericin B) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) โดยบ่มในตู้บ่มเซลล์แบบใช้คาร์บอนไดออกไซด์ (CO₂) ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ 5.0% ระหว่างการเพาะเลี้ยงทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์แบบวันเว้นวัน

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยวิธี MTT colorimetric assay

นำเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสม (เลี้ยงไว้เป็นเวลา 1 passage) เลี้ยงในไมโครเพลทแบบ 96 หลุม (96-well microplate) หลุมละ 5,000-10,000 เซลล์ บ่มในตู้บ่มเลี้ยงเซลล์จนกว่าเซลล์จะเจริญในระดับ 80% จากนั้นเตรียมสารละลายจากสารพิษมาตรฐานที่ 7 (Dried Standard T-2 Toxin, Trilogy®) และเจือจาง (serial dilution) ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ ประกอบด้วย 0, 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ทำการดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมทั้ง

และเติมสารละลายสารพิษมาตรฐานที่ 7 ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มไมโครเพลทในตู้บ่มเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 °C และมีความเข้มข้นคาร์บอนไดออกไซด์ 5% โดยกำหนดเวลาทดสอบที่ 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาการบ่มทำการเติมสารละลาย MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyl tetrazolium bromide) 100 ไมโครลิตร ที่ความเข้มข้น 0.5 กรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นทำการบ่มไมโครเพลทในตู้บ่มเซลล์เป็นเวลา 1-4 ชั่วโมง จากนั้นดูดสารละลาย MTT ที่เติมไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethyl sulfoxide, DMSO) 100 ไมโครลิตร จากนั้นนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ (spectrophotometer) โดยในแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 3 หลุม และทำการทดลองจำนวน 3 ซ้ำ การคำนวณร้อยละของการมีชีวิต (% cell viability) ทำโดยเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงในหลุมควบคุม ดังสมการ

$$\% \text{ cell viability} = (\text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดทดสอบ} / \text{ค่าการดูดกลืนแสงของชุดควบคุม}) \times 100$$

การทดสอบผลของสารพิษที่ดูดซับต่อการเหนี่ยวนำการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม ด้วยเครื่อง Imaging flow cytometry

การตรวจสอบระยะการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม โดยใช้ชุดทดสอบ Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I (APT750, Millipore, Temecula, CA) เป็นวิธีการย้อมแอนติบอดีที่ติดสฟลูออเรสเซน (annexin V-FITC) และ propidium iodide (PI) เพื่อติดตามการเปลี่ยนแปลงของพลาสมาเมมเบรน ของเซลล์ โดยใช้เครื่อง imaging flow cytometry ในการตรวจสอบ โดยทำการปั่นล้างเซลล์ไฟโบรลัสตัวอ่อนของไก่พื้นเมืองลูกผสมจำนวน 200,000 เซลล์ ด้วยสารละลาย phosphate buffered saline (PBS) และทำการเติมสารละลาย 1X binding buffer ปริมาตร 200 ไมโครลิตร จากนั้นเติม annexin V-FITC 3 ไมโครลิตร และเติม propidium iodide 2 ไมโครลิตร ลงไปในหลอดทดลองขนาด 1.5 ไมโครลิตร ทำการบ่มเซลล์เป็นเวลา 15 นาที

ที่อุณหภูมิห้อง และป้องกันจากแสง เมื่อครบเวลาทำการปั่นเหวี่ยงที่ 2,000 RPM เป็นเวลา 15 นาที เพื่อเก็บตะกอนเซลล์และเติม PBS เย็น (ice-cold PBS) 40 ไมโครลิตร หลังจากการย้อมสีตัวอย่างเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม ตัวอย่างเซลล์ได้รับการประเมินด้วยเครื่อง imaging flow cytometry (FlowSight, Seattle, WA, USA) โดยใช้กำลังของเลเซอร์ที่ 488 นาโนเมตรในการกระตุ้นการเปล่งแสงสีฟลูออเรสเซนซ์ โดยที่ annexin V-FITC มีช่วงการเปล่งแสงอยู่ที่ 505 - 560 นาโนเมตร และ PI มีช่วงการเปล่งแสงอยู่ที่ 595 - 642 นาโนเมตร เครื่อง imaging flow cytometry ทำการตรวจวัดตัวอย่างอย่างน้อย 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง จากนั้นมีการประมวลผลด้วยระบบคอมพิวเตอร์ IDEAS version 6.2 (Amnis, Seattle, WA, USA) โดยเริ่มจากการระบุเซลล์เดี่ยวของตัวอย่างที่มีความชัดเจนและทำการจำแนกเซลล์ตัวอย่างตามลักษณะการติดสี annexin V-FITC และ PI (Figure 3B) จากนั้นคำนวณร้อยละของจำนวนตัวอย่างเซลล์ในแต่ละระยะการตายอะพอพโทซิสตามการติดสี annexin V-FITC และ PI (Figure 3A)

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อเปรียบเทียบร้อยละของการมีชีวิตและการตายแบบอะพอพโทซิสแต่ละกลุ่มการทดลองทำโดยใช้ GLM procedure ของโปรแกรม SAS version 9.1 และทดสอบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองด้วยวิธี Duncan's new multiple range test (Steel and Torrie, 1980)

ผลการศึกษาและวิจารณ์

ความเป็นพิษของสารพิษที่หนูในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม

ผลการทดลองใน Figure 1A และ 1B แสดงร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมเมื่อได้รับสารพิษที่หนูในระดับที่ต่างกัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลพบว่า ร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่ เท่ากับ 32.3, 29.8, 24.8 และ 18.9 หลังจาก

ได้รับสารพิษที่หนูระดับ 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (Figure 1A) และร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่หลังจากได้รับสารพิษที่หนูเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เท่ากับ 19.0, 15.9, 12.6 และ 12.1 เมื่อได้รับสารพิษที่หนูระดับ 0.01, 0.1, 1 และ 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ (Figure 1B) พบว่า ความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์ตัวอ่อนไก่มีความรุนแรงเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.01$) เมื่อเซลล์ได้รับปริมาณสารพิษที่หนูมากขึ้น (dose-dependent) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wu *et al.* (2019) ที่พบว่าเซลล์ L02 (human fetal liver cell line) มีเปอร์เซ็นต์การตายของเซลล์ที่มากขึ้นเมื่อเพิ่มระดับของสารพิษที่หนูในการทดสอบ

นอกจากระดับความเข้มข้นของสารพิษระยะเวลาที่ได้รับสารพิษก็มีผลเช่นกัน จากการเปรียบเทียบผลของร้อยละการมีชีวิตของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่ต่อเวลาที่ได้รับสารพิษที่หนูพบว่า เมื่อเวลาเพิ่มมากขึ้นจาก 24 ชั่วโมงเป็น 48 ชั่วโมง ทำให้อัตราการมีชีวิตของเซลล์ต่ำกว่า 20 % ในทุกระดับของสารพิษที่หนูที่ใช้ทดสอบ (Figure 1A และ 1B)

รูปร่างของเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่ที่ได้รับสารพิษที่หนูในระดับที่แตกต่างกัน แสดงใน Figure 2A และ 2B ผลการศึกษาพบว่า รูปร่างของเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารพิษที่หนูมีลักษณะคล้ายกระสวย ยาวกลมหรือรูปแฉกและมีส่วนยื่นยาว แต่ในทางกลับกันพบว่า เมื่อเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่ได้รับสารพิษที่หนูแล้วจะมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ลดลง และรูปร่างของเซลล์มีลักษณะหดลีบและเล็กลง จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่า กลไกหลักความเป็นพิษของสารพิษที่หนูนั้น เป็นผลจากการเหนี่ยวนำภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress) ทำให้อนุมูลอิสระที่เพิ่มขึ้น เข้าไปทำลายระบบต่าง ๆ ที่ควบคุมกลไกสำคัญภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตได้ เช่น อนุมูลอิสระออกซิเจน (reactive oxygen species; ROS) (Wu *et al.*, 2013; Wu *et al.*, 2014) ซึ่งส่งผลทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอเปลี่ยนแปลงหรือเกิดการออกซิเดชันของไขมันที่เป็นองค์ประกอบในเมมเบรนของเซลล์ได้ เป็นสารเพอร์ออกไซด์ (lipid peroxidation) ส่งผลให้เซลล์เมมเบรนเสียสภาพ (Ozguner *et al.*, 2005)

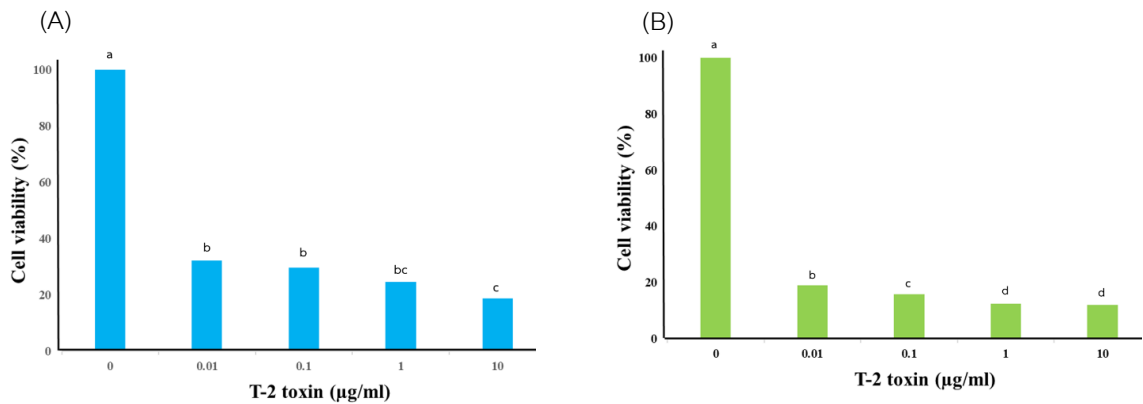


Figure 1. Cell viability in CEF after treatment with various concentrations (0, 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$) of T-2 for 24 (A) or 48 h (B). The percentage of survival cells was relative to the control cells and by the mean ($n = 3$). * Significantly different from the control ($P < 0.05$)

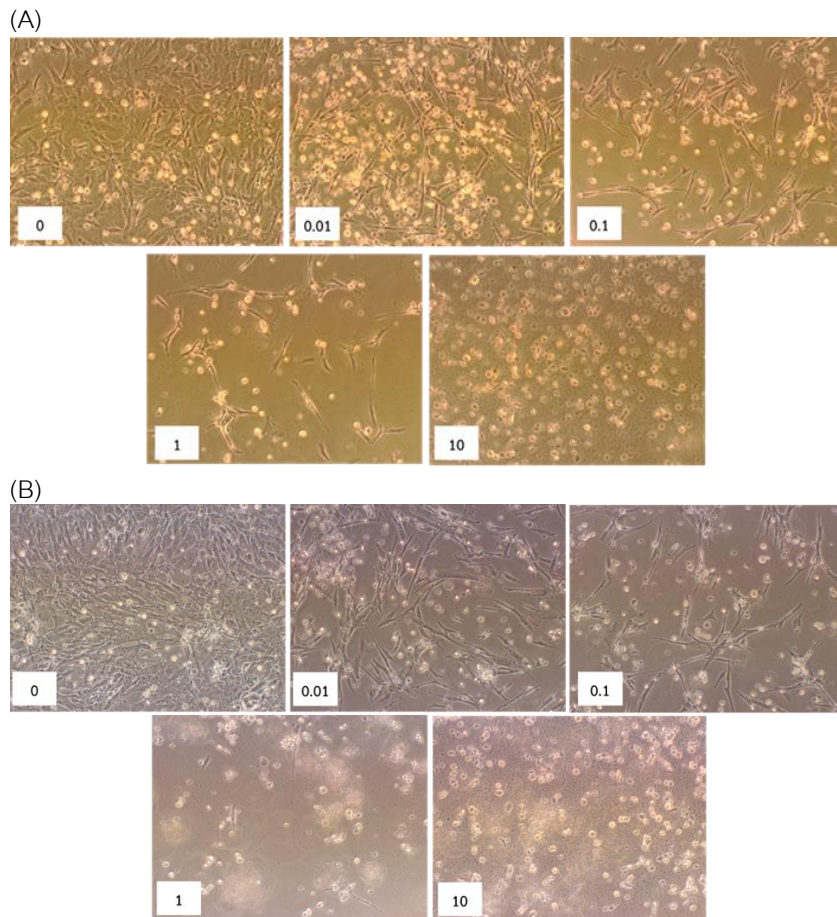


Figure 2. Cell morphology and growth characteristics of CEF at 24 h (A) and 48 h (B) after plating. CEF cells were treated with T-2 at 0 (control), 0.01, 0.1, 1 and 10 $\mu\text{g/ml}$

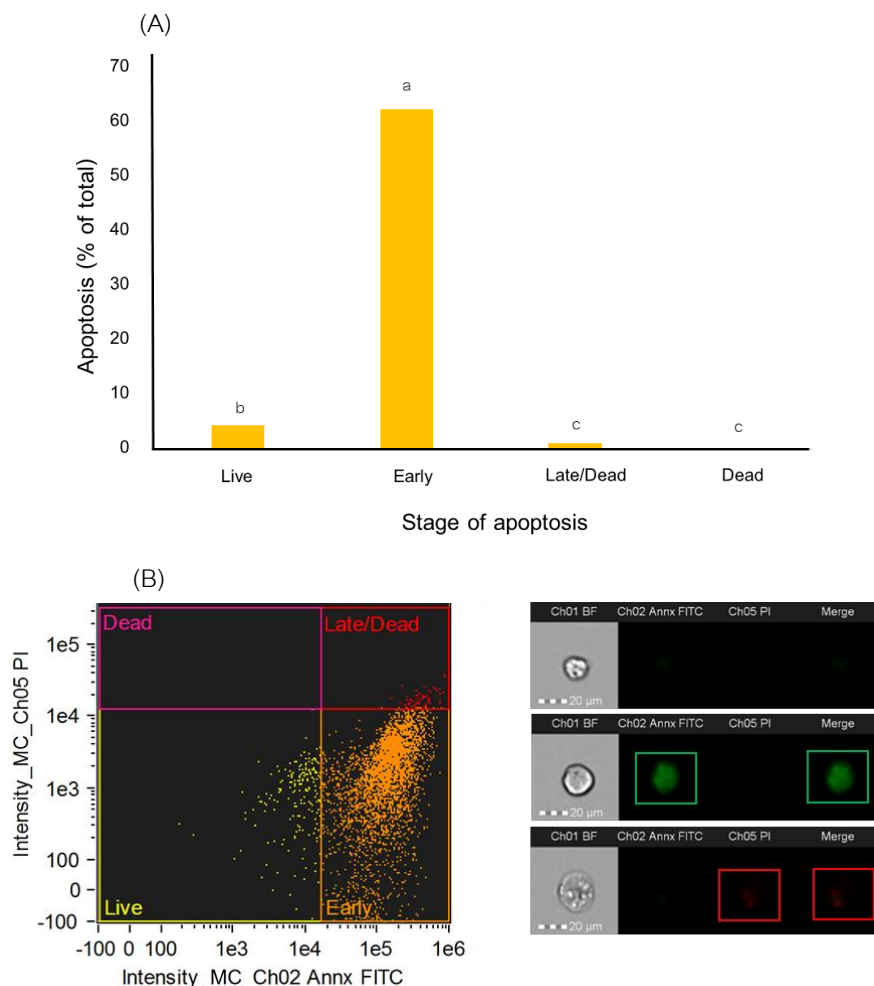


Figure 3. Apoptotic effects of CEF cells caused by T-2 toxin. Flow cytometry analysis of the apoptosis rate of CEF cells after T-2 toxin treatment. Cells stained with Annexin V - Propidium iodine (AV - PI) after exposure to 1 μg/ml T-2 toxin for 24 h (A) in addition to the quantification of the apoptotic cells, is shown in the right-hand side of the histogram (B). Results are the mean $\pm$ SD, n = 3

ระยะการตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบร بلاสต์ จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมโดยสารพิษที่ทู

การทดสอบระยะการตายหรือเสื่อมสลายของเซลล์รูปแบบหนึ่งที่เรียกว่า อะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม หลังจากได้รับสารพิษที่ทูในครั้งนี้ได้ทำการคัดเลือกเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมที่ได้รับสารพิษที่ทูปริมาณ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผลการศึกษาพบว่าสารพิษที่ทูทำให้เกิด

การตายแบบอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบร بلاสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสม เซลล์ที่ถูกเหนี่ยวนำให้ตายโดยสารพิษที่ทูมีสัดส่วนของระยะอะพอพโทซิสที่มีชีวิต (live) เฉลี่ย 4.24 % การตายของเซลล์ในช่วงต้น (early apoptosis) เฉลี่ย 62.27 % และการตายของเซลล์ในช่วงปลาย (late apoptosis) เฉลี่ย 1.04 % (Figure 3A)

การตรวจสอบระยะของเซลล์ที่ตายจากการถูกกระตุ้นให้ตายแบบอะพอพโทซิส โดยการทดสอบด้วยการย้อมสี แอนติบอดี annexin V - FITC และ PI โดยที่

เซลล์ระยะเริ่มเกิดอะพอพโทซิสจะมีการเปลี่ยนแปลงโดย phosphatidyl serine เคลื่อนที่ออกจากบนนอกพลาสมาเมมเบรน จากนั้น annexin V - FITC สามารถจับกับประจุลบของ phosphatidyl serine ได้ ซึ่งในขณะนี้ PI ยังไม่สามารถผ่านพลาสมาเมมเบรนได้ แต่เมื่อพลาสมาเมมเบรนเสียคุณสมบัติ PI เข้าไปจับดีเอ็นเอของเซลล์ ซึ่งสามารถบ่งบอกการตายของเซลล์ได้ (Khongthong *et al.*, 2019) โดย annexin V ทำปฏิกิริยากับ PI แทรกเข้าไปในเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถติดสี เมื่อ DNA เกิดการตายแบบอะพอพโทซิส โดยทำการแบ่งแยกเซลล์ที่ติดสีเขียวของ annexin V อยู่ในกลุ่การตายแบบอะพอพโทซิสของเซลล์ในช่วงต้น แต่เมื่อเซลล์มีการติดสีทั้ง 2 ชนิดคือ สีแดงที่เกิดจาก PI (PI - positive) และสีเขียวของ annexin V (FITC - positive) สามารถจำแนกให้อยู่ในระยะเซลล์กลุ่มที่มีการตายในช่วงปลาย (Figure 3B) ดังนั้นในการวัดอะพอพโทซิสเซลล์ (apoptotic cells) จะใช้การติดที่ทั้ง 2 ชนิดนี้เพื่อทำการแยกเค้าโครงของจุด (density dot plot) เซลล์ตายต่างชนิดสีและนำมาใช้ในการแบ่งแยกระยะต่าง ๆ ของการตายแบบอะพอพโทซิส โดยแบ่งออกเป็นสถานะที่มีชีวิต (FITC - negative / PI - negative) การตายของเซลล์ในช่วงต้น (FITC - positive / PI - negative) การตายของเซลล์ในช่วงปลาย (FITC-positive / PI-positive) และการตายของเซลล์แบบเฉียบพลัน (necrosis) (FITC - negative / PI - positive)

ผลกระทบจากการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิสเป็นสัญญาณบ่งบอกถึงการฝ่อ การเจริญที่ผิดปกติ และการเสื่อมถอยของเซลล์ ที่ทำหน้าที่สำคัญในการเป็นส่วนประกอบของการควบคุมกระบวนการทางสรีรวิทยาพยาธิและสรีรวิทยาในตัวสัตว์ จากการศึกษาพบว่า สารพิษที่หนูมีผลทำให้เซลล์ไฟโบบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมเกิดความผิดปกติ โดยอาจทำให้เซลล์มี DNA เสียหายโดยการตายแบบอะพอพโทซิสเป็นการตายแบบเฉียบไม่ใช้การตายแบบเฉียบพลันแบบเนโครซิส (necrosis) เนื่องจากเซลล์ได้รับบาดเจ็บอย่างรุนแรง การตายแบบอะพอพโทซิสไม่มีลักษณะการบวมหรือพอง

แต่เป็นการตายในลักษณะที่มีการหดตัวลงส่งผลให้เซลล์มีขนาดเล็กลง ดังนั้น เมื่อมีการโจมตีของเชื้อโรคต่าง ๆ ทำให้เกิดโปรแกรมการสัง่ตายของเซลล์ได้และไปยับยั้งการทำงานของโปรตีนที่สำคัญในร่างกายสัตว์ เช่น p53 ทำให้เกิดการทํางานที่ผิดปกติของระบบในร่างกายจนเป็นสาเหตุให้เกิดโรคร้ายแรงกับตัวสัตว์ได้ เช่น ก่อให้เกิดเซลล์มะเร็ง ดังนั้น ในร่างกายสัตว์ไม่ควรมีการเกิดโปรแกรมการตายแบบอะพอพโทซิสเกิดขึ้นมากในสัตว์เกินความจำเป็น (Duke *et al.*, 1996)

สารพิษที่หนูเหี่ยวน่าให้เกิดอะพอพโทซิสในเซลล์ไฟโบบลาสต์จากตัวอ่อนไก่พื้นเมืองลูกผสมโดยผ่านทางสภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชันซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในเซลล์ชนิดอื่น ๆ ที่ได้รับสารพิษที่หนู เช่น เซลล์ต้นกำเนิดจากตัวอ่อนและเซลล์ส่วนของอัณฑะที่ทำหน้าที่เป็นต่อมไร้ท่อที่ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนเพศชาย (Leydig cell) ของหนู (Fang *et al.*, 2012; Wu *et al.*, 2018; Yuan *et al.*, 2016) อีกทั้งยังมีการศึกษาเบื้องต้นของ Zhuang *et al.* (2013) พบว่า สารพิษที่หนูทำให้เกิดการตายและอะพอพโทซิสในเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (Hela, Bel - 7402 และ Chang liver) โดยผ่านทางไมโทคอนเดรีย (mitochondria pathway) และภาวะเครียดที่เกิดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

สรุป

จากผลการทดลองเบื้องต้นพบว่า สารพิษที่หนูมีความเป็นพิษต่อเซลล์ของไก่พื้นเมืองลูกผสมอย่างรุนแรง แม้ได้รับสารพิษในระดับต่ำเพียง 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้น ข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำไปใช้ในการคำนวณขนาดของการใช้สารพิษที่หนูเพื่อทดสอบกับตัวสัตว์ในภาคสนาม และเสนอแนะให้มีการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราชนิดนี้ในอาหารสัตว์ปีก เพราะอาจส่งผลกระทบต่อทำให้เกิดพิษเฉียบพลันต่อสัตว์ได้และส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ปีก

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยได้รับทุนสนับสนุนทุนวิจัยจาก คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ คณะผู้วิจัย ขอขอบคุณ หน่วยงานฟาร์มสัตว์ปีก ภาควิชาสัตวศาสตร์ และสัตวน้ำ คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่ช่วยเหลือโดยการสนับสนุนไข่ไก่พื้นเมืองลูกผสม 3 สายพันธุ์ที่ใช้ในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Bouaziz, C., S. Abid-Essefi, A. Bouslimi, E. El Golli and H. Bacha. 2006. Cytotoxicity and related effects of T-2 toxin on cultured Vero cells. *Toxicon* 48(3): 343-352.
- Desjardins, A.E., T.M. Hohn and S.P. McCormick. 1993. Trichothecene biosynthesis in *Fusarium* species: chemistry, genetics, and significance. *Microbiology Reviews* 57(3): 595-604.
- Duke, R.C., D.M. Ojcius and J.D.-E. Young. 1996. Cell suicide in health and disease. *Scientific American* 275(6): 80-87.
- Ezekiel, C.N., R. Bandyopadhyay, M. Sulyok, B. Warth and R. Krska. 2012. Fungal and bacterial metabolites in commercial poultry feed from Nigeria. *Food Additives and Contaminants* 29(8): 1288-1299.
- Fang, H., Y. Wu, J. Guo, J. Rong, L. Ma, Z. Zhao, D. Zuo and S. Peng. 2012. T-2 toxin induces apoptosis in differentiated murine embryonic stem cells through reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway. *Apoptosis* 17(8): 895-907.
- Gruber-Dorninger, C., T. Jenkins and G. Schatzmayr. 2019. Global mycotoxin occurrence in feed: a ten-year survey. *Toxins* 11(7): 375, doi: 10.3390/toxins11070375.
- Kana, J.R., B.G.J. Gnonlonfin, J. Harvey, J. Wainaina, I. Wanjuki, R.A. Skilton and A. Tegua. 2013. Assessment of aflatoxin contamination of maize, peanut meal and poultry feed mixtures from different agroecological zones in Cameroon. *Toxins* 5(5): 884-894.
- Khongthong, S., W. Khongthong and Y. Theaparat. 2019. Effect of cepharanthine on the cytotoxicity of doxorubicin in human b-lymphoma cells. *Rajamangala University of Technology Srivijaya Research Journal* 11(3): 451-460. (in Thai)
- Labuda, R., A. Parich, E. Vekiru and D. Tancinova. 2005. Incidence of fumonisins, moniliformin and *Fusarium* species in poultry feed mixtures from Slovakia. *Annals of Agricultural and Environmental Medicine* 12(1): 81-86.
- Mahdjoubi, C.K., N. Arroyo-Manzanares, N. Hamini-Kadar, A.M. García-Campaña, K. Mebrouk and L. Gámiz-Gracia. 2020. Multi-mycotoxin occurrence and exposure assessment approach in foodstuffs from Algeria. *Toxins* 12(3): 194, doi: 10.3390/toxins12030194.
- Ozguner, F., A. Koyu and G. Cesur. 2005. Active smoking causes oxidative stress and decreases blood melatonin levels. *Toxicology and Industrial Health* 21(1-2): 21-26.
- Rodrigues, I. and K. Naehrer. 2012. A three-year survey on the worldwide occurrence of mycotoxins in feedstuffs and feed. *Toxins* 4(9): 663-675.
- Shareef, A.M. 2010. Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential mycotoxicosis. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences* 24(1): 17-25.
- Steel, R.G.D. and J.H. Torrie. 1980. *Principles and Procedures of Statistics: A Biometrical*

- Approach. 2nd ed. McGraw-Hill Book Co., New York. 633 p.
- Streit, E., C. Schwab, M. Sulyok, K. Naehrer, R. Krska and G. Schatzmayr. 2013. Multi-mycotoxin screening reveals the occurrence of 139 different secondary metabolites in feed and feed ingredients. *Toxins* 5(3): 504-523.
- Sudakin, D.L. 2003. Trichothecenes in the environment: relevance to human health. *Toxicology Letters* 143(2): 97-107.
- Wu, J., D. Tu, L.Y. Yuan, H. Yuan and L.X. Wen. 2013. T-2 toxin exposure induces apoptosis in rat ovarian granulosa cells through oxidative stress. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 36(2): 493-500.
- Wu, J., W. Huang, H. Xiao, Y. Xie, Z. Yuan, J. Yi, J. Chen, D. Tu and Y. Tian. 2018. Procyanidins B2 reverses the T-2 toxin-induced mitochondrial apoptosis in TM3 Leydig cells. *Journal of Functional Foods* 45: 118-128.
- Wu, J., Y. Zhou, Z. Yuan, J. Yi, J. Chen, N. Wang and Y. Tian. 2019. Autophagy and apoptosis interact to modulate T-2 toxin-induced toxicity in liver cells. *Toxins* 11(1): 45, doi: 10.3390/toxins11010045.
- Wu, Q.H., X. Wang, W. Yang, A.K. Nüssler, L.Y. Xiong, K. Kuča, V. Dohnal, X.J. Zhang and Z.H. Yuan. 2014. Oxidative stress-mediated cytotoxicity and metabolism of T-2 toxin and deoxynivalenol in animals and humans: An update. *Archives of Toxicology* 88(7): 1309-1326.
- Yuan, Z., F.B. Matias, J.E. Yi and J. Wu. 2016. T-2 toxin-induced cytotoxicity and damage on TM3 Leydig cells. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 181-182: 47-54.
- Zhuang, Z., D. Yang, Y. Huang and S. Wang. 2013. Study on the apoptosis mechanism induced by T-2 Toxin. *PLoS ONE* 8(12): e83105, doi: 10.1371/journal.pone.0083105.
-