นิพนธ์ต้นฉบับ

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาเคมี และจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ของตับภายหลังการกินอะฟลาท็อกซินบี 1 ครั้งเดียวในลูกไก่กระทง

มนกานต์ อินทรกำแหง* พิภพ สดสี* ไพศาล หมื่นเดช**
ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์*** จิโรจ ศศิปรียจันทร์****
อนงค์ บิณฑวิหค***** อัจฉริยา ไศละสูต***

Abstract

Manakant Intarakamhaeng* Phiphob Sodsee* Paisarn Muendech Theerayuth Kaewamatawong*** Jiroj Sasipreeyajan**** Anong Bintvihok***** Achariya Sailasuta*****

HISTOCHEMISTRY AND HISTOENZYMATIC STUDIES OF LIVER AFTER A SINGLE ORAL DOSE OF AFLATOXIN B1 IN BROILER CHICKS

Two hundred and forty, 5 day-old broiler chicks (Shaver starbo) were divided into three groups of 80 birds. Birds in group 3 were orally intubated and given a single dose of sterile water, olive oil and 5 mg/kg of aflatoxin B1. Clinical signs, gross pathology, histochemistry and histoenzymatic studies of liver were observed for 10 days. Eight birds from each group were randomly selected, sacrificed and necropsied everyday. The aflatoxin B1 group (group 3) showed depression and a decrease in feed consumption and body weight, in comparison with groups 1 and 2. Fatty degeneration of the liver was clearly demonstrated with Oil Red O, histochemical staining after 24-168 hours. The degenerative changes of the liver was confirmed by a decrease in enzyme, cytochrome oxidase activity, after labelling with cytochrome C histoenzymatic staining at 24-144 hours. Some recovery of the hepatic cells was recognized after 192 hours. Groups 1 and 2 showed no significant pathological lesions. The structure of the hepatic lobules in group 3 remained distorted showing an evidence of hepatic cell swelling until the end of the observation period.

Keywords : Aflatoxin B1, broiler chicks, orally single dose, histochemistry, histoenzyme.

***Department of Animal Husbandry ***Department of Pathology ****Department of Veterinary Medicine**
*******Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University Bangkok, 10330**
****Veterinary and Remount Department, Ministry of Military, Nakhon Prathom**

*ภาควิชาสัตวบาล ***ภาควิชาพยาธิวิทยา ****ภาควิชาอายุรศาสตร์ *****ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ 10330
**กรมการสัตว์ทหารบก กระทรวงกลาโหม จ.นครปฐม

บทคัดย่อ

มนกานต์ อินทรกำแหง* พิภพ สดสี** ไพศาล หมื่นเดช** ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์***
จิโรจ ศศิปรียจันทร์**** อนงค์ บิณฑวิหค***** อัจฉริยา ไศละสูต***

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาเคมี และจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ของตับ ภายหลังการกินอะฟลาท็อกซินบี 1 ครั้งเดียวในลูกไก่กระทง

ลูกไก่จำนวน 240 ตัวพันธุ์ Shaver starbo อายุ 5 วัน คละเพศ แบ่งเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 80 ตัว แต่ละกลุ่มป้อนน้ำกลั่น น้ำมันมะกอก และอะฟลาท็อกซินบี 1 ขนาด 5 มก.ต่อน้ำหนัก 1 กก. ครั้งเดียว ตามลำดับ ศึกษาอาการทางคลินิกติดต่อกัน เป็นเวลา 10 วัน ทุก 24 ชั่วโมงสุ่มตัวอย่างลูกไก่ 8 ตัวจากแต่ละกลุ่ม นำมาชันสูตรซากเก็บตัวอย่างตับตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเคมี และจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ ผลการทดลองพบว่าลูกไก่กลุ่มที่ 3 (กลุ่มป้อนอะฟลาท็อกซินบี 1) ส่วนใหญ่มีอาการซึม กินอาหารลดลง มีการเสื่อมแบบมีไขมันแทรกของตับซึ่งพบได้ชัดเจนโดยวิธีจุลพยาธิวิทยาเคมีย้อมด้วยสีพิเศษ Oil red O ในระหว่างชั่วโมงที่ 24-168 จุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ตรวจการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสในเซลล์ตับ พบว่าเซลล์ตับที่เสื่อมมีการทำงานของเอนไซม์ลดลงชัดเจนในระหว่างชั่วโมงที่ 24-144 เซลล์ตับกลับสู่สภาพใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมเริ่มจากชั่วโมงที่ 192 ของการทดลอง แต่การเรียงตัวของเซลล์ตับได้เสียรูปไป และคงมีร่องรอยการบวมของเซลล์ตับจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง

คำสำคัญ : อะฟลาท็อกซินบี 1 ลูกไก่กระทง การป้อนครั้งเดียว จุลพยาธิวิทยาเคมี จุลพยาธิวิทยาเอนไซม์

บทนำ

อะฟลาท็อกซิน (Aflatoxin) เป็นกลุ่มของสารเคมีพวกไบส์-ฟูราโนคิวมาริน (bis-furanocumarin) สร้างจากเชื้อรา แอสเปอร์จิลลัส ฟลาวัส *(Aspergillus flavus)* และแอสเปอร์จิลลัส พาราซิติคัส *(Aspergillus parasiticus)* (Osweiler et al., 1985) ซึ่งเป็นกลุ่มเชื้อราที่พบมากที่สุดในอาหาร (ภัทนีย์, 1997) อะฟลาท็อกซินที่พบทั่วไปในธรรมชาติ ได้แก่ อะฟลาท็อกซินบี1 บี2 จี1 และจี2 อะฟลาท็อกซินบี1 เป็นชนิดที่มีพิษร้ายแรงมากกว่าชนิดอื่นๆ (อนงค์, 1997) อาการและรอยโรคที่พบจะแสดงออกในระดับที่แตกต่างกันขึ้นอยู่กับปริมาณสารพิษ ระยะเวลา ชนิดของสัตว์ พันธุ์ อายุ เพศ รวมทั้งส่วนประกอบของโปรตีนในอาหาร (Bryden and Cumming, 1980)

ระดับของอะฟลาท็อกซินที่ทำให้ลูกไก่กระทงตายครึ่งหนึ่ง (LD_{50} dose) จากการกินสารพิษเพียงครั้งเดียวในระดับ 5 มก.ต่อกก.น้ำหนักตัว (Smith and Hamillton, 1970) ในระดับนี้จะสามารถทำให้เกิดพิษเฉียบพลันได้ Bintvihok et al. (1997) ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันในลูกไก่ ลูกเป็ด และลูกนกกระทา โดยผสมอะฟลาท็อกซินบี 1 ในอาหารให้กินในระดับ 3 ppm เป็นเวลา 7 วัน เกิดการเปลี่ยนแปลงในตับ พบการเสื่อมแบบมีไขมันแทรก (fatty degeneration)ในเซลล์ตับ และการเปลี่ยนแปลงในลูกเป็ดรุนแรงมากที่สุดใน

ชั่วโมงที่ 120 การเปลี่ยนแปลงทางเสื่อมของเซลล์ทำให้การทำงานเปลี่ยนไปโดยเซลล์ยังไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างซึ่งจะเห็นได้ไม่ชัดเจนด้วยวิธีทางจุลพยาธิวิทยาทั่วไป การตรวจทางจุลพยาธิวิทยาเคมี (histochemistry) และเทคนิคทางจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ (histoenzyme) ของเนื้อเยื่อจะเป็นวิธีที่นำมาช่วยตรวจการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์ได้ชัดเจนมากขึ้น (Theron et al., 1965) โดยใช้การตัดชิ้นเนื้อเยือกแข็ง (Bancroft, 1975)

เทคนิคทางจุลพยาธิวิทยาเคมีการใช้สีย้อมพิเศษ (special stain) เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ ได้แก่ Oil red O method ซึ่งย้อมไขมันทั่วไปในเซลล์ (simple lipid, neutral fat, triglyceride) จะติดสีแดงในบริเวณไขมันที่เป็น cholesterol และ triglyceride (Filipes and Lake, 1990) ส่วน phospholipid บางตัวติดสีชมพูอ่อน (Bancroft, 1975)

ส่วนจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ด้วยการศึกษาการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (cytochrome oxidase) ซึ่งเป็น mitochondrial marker enzyme ชนิดหนึ่ง การเกิดพิษอย่างเฉียบพลันจะพบการบวมของเซลล์และมีการทำลายของ cellular organelles ไมโตคอนเดรียในเซลล์ตับจะไวต่อสารพิษที่มีผลต่อขบวนการ metabolism ของเซลล์ตับ โดยเมื่อมีการทำลายเซลล์ตับการทำงานของเอนไซม์จะน้อยลง (Cheville, 1994) โดยให้ 3,3' diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) ทำปฏิกิริยากับ oxidized form ของ cytochrome C ทำให้เกิดสี การตรวจหาตำแหน่งการทำงานของ cytochrome oxidase จะแสดงให้เห็นว่ามีการทำลายเซลล์ตับมากน้อยเพียงใด ซึ่งอาศัย oxidative polymerization ของ DAB ทำให้เกิดผลจากปฏิกิริยา osmophilic reaction ผลจากปฏิกิริยาจะแสดงตำแหน่งของ cytochrome C ซึ่งแสดงถึงบริเวณที่มีการทำงานของ cytochrome oxidase ให้ผลเป็นสีน้ำตาล (Seligman et al., 1968; Filipes and Lake, 1990)

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาถึงผลจากการกินอะฟลาท็อกซินบี1 ในลูกไก่กระทง โดยการป้อนอะฟลาท็อกซินบี1 ครั้งเดียว 5 มก.ต่อ1กก. (Smith and Hamilton, 1970) โดยตรวจการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับด้วยวิธี จุลพยาธิวิทยาเคมี และจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ของเนื้อเยื่อตับ

วัสดุและวิธีการ

ลูกไก่กระทงพันธุ์เชฟเวอร์ สตาร์โบ (Shaver starbo) อายุ 1 วัน คละเพศ จำนวน 240 ตัว แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม กลุ่มละ 80 ตัว นำมาแยกเลี้ยงบนกรงลวดถักพื้นที่ 0.6 ตารางเมตร จำนวนกลุ่มละ 4 กรง กรงละ 20 ตัว ให้อาหารสำเร็จรูปซึ่งตรวจพบว่ามีระดับอะฟลาท็อกซิน 25.8 ppb ด้วยวิธี Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) ให้อาหารและน้ำแบบเต็มที่ในทุกกลุ่มเพื่อปรับสภาพร่างกาย เมื่อลูกไก่อายุ 5 วันและมีน้ำหนักเฉลี่ย 99 กรัม จึงเริ่มการทดลอง (คณารัตน์และคณะ, 2000)

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับการป้อนน้ำกลั่นในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม กลุ่มที่ 2 เป็นกลุ่มควบคุมได้รับการป้อนน้ำมันมะกอก (Olive oil) ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายอะฟลาท็อกซิน บี1 ในการทดลองนี้ นำมาป้อนในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ได้รับการป้อนอะฟลาท็อกซินบี1 (Sigma®, USA) ในขนาด 5 มก.ต่อน้ำหนักตัว 1 กก. (LD_{50} dose) (Smith and Hamilton, 1970) โดยใช้อะฟลาท็อกซิน บี1 ปริมาณ 50 มก.ละลายในน้ำมัน (olive oil) ปริมาณ 5 มล. นำมาป้อนลูกไก่ในปริมาณ 50 ไมโครลิตรต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม

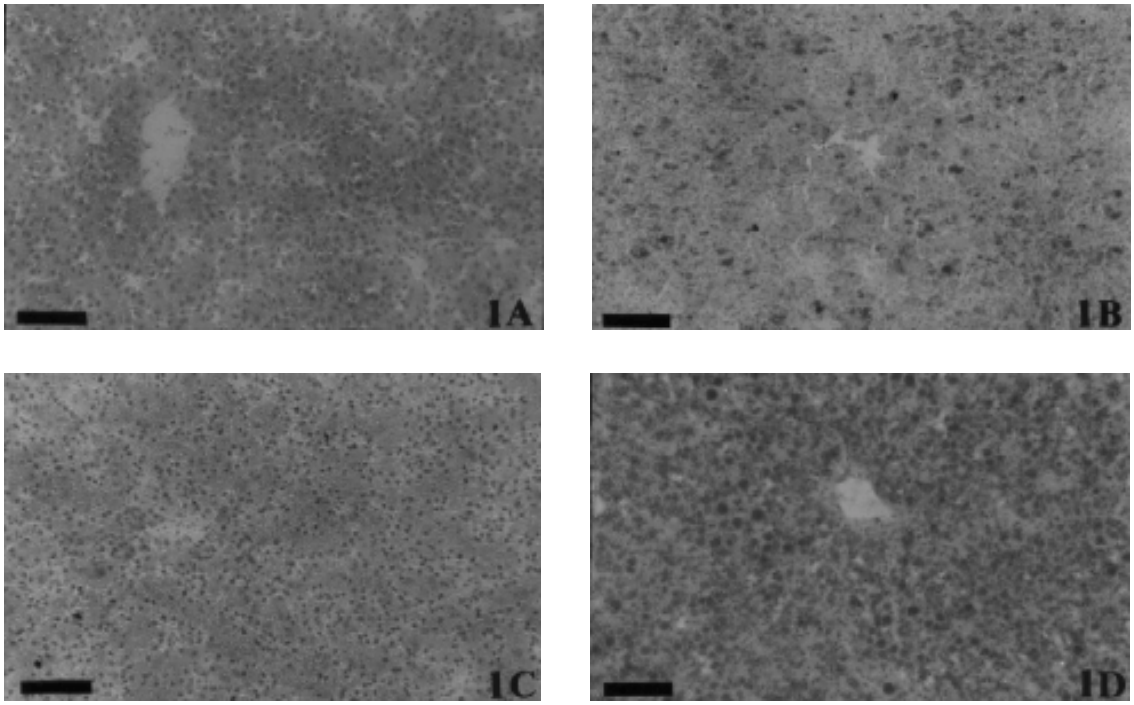
ทำการทดลองเป็นเวลา 10 วัน โดยทุก 24 ชั่วโมง สังเกตอาการทางคลินิก สุ่มตัวอย่างลูกไก่กลุ่มทดลองละ 8 ตัว ผ่าชากเก็บตัวอย่างตับ เพื่อตรวจดูความผิดปกติของเซลล์ทางจุลพยาธิวิทยาเคมีและจุลพยาธิ

วิทยาเอนไซม์ ตัดชิ้นเนื้อเยื่อตับด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อเยือกแข็งหนา 10 μm ตรวจหาไลปิดด้วย oil red O method (พิสุทธิ์, 1995) โดยการแช่เนื้อเยื่อตับในสารละลาย oil red O เป็นเวลา 15-30 นาที ล้างใน 85% propylene glycol และ น้ำกลั่น ย้อมสีทับด้วย Harris hematoxylin ล้างออกด้วยน้ำ ปิดชิ้นเนื้อเยื่อด้วย glycerine jelly โดย cholesteryl ester และ triglyceride ให้สีแดง และตรวจการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส (Filipes and Lake, 1990) โดยการแช่เนื้อเยื่อตับในสารละลาย ประกอบด้วย DAB catalase เข้มข้น 20 μg/ml cytochrome C (type 2), sucrose และ 0.1 mol/ml ของ phosphate buffer pH 7.4 บ่มที่ 22°ซ. เป็นเวลาอย่างน้อย 1 ชั่วโมง ล้างออกด้วยน้ำกลั่น ตรึงเนื้อเยื่ออีกครั้งใน formal calcium เป็นเวลา 15 นาที ดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ และ xylene ตรวจผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ บริเวณที่พบปฏิกิริยาของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสจะให้สีน้ำตาล

ผล

อาการทางคลินิก ชั่วโมงที่ 24 หลังป้อนอะฟลาท็อกซิน พบว่าลูกไก่ทั้ง 3 กลุ่มไม่แสดงอาการผิดปกติใดๆ ชั่วโมงที่ 48 พบว่าในกลุ่มที่ 3 มีลูกไก่ตาย 1 ตัวและ 2 ตัวนอนซึม ส่วนลูกไก่ที่เหลือส่วนใหญ่แสดงอาการซึม เคลื่อนไหวช้า เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 1 และ 2 ในชั่วโมงที่ 72 ลูกไก่ที่แสดงอาการซึม กลับมามีอาการเป็นปกติ คล้ายกับกลุ่มที่ 1 และ 2

ผลทางจุลพยาธิวิทยาเคมี จากการย้อมด้วยสี Oil red O ใน 24 ชั่วโมงหลังป้อนอะฟลาท็อกซินพบว่าทั้ง 3 กลุ่ม ให้ระดับผลบวกต่อสี Oil red O ในระดับที่ใกล้เคียงกัน พบว่ามีเซลล์ตับที่พบถุงไขมันบ้างแต่มีจำนวนไม่มาก การติดสีของเม็ดไขมันมีลักษณะกลมสีแดงเป็นถุงขนาดเล็กจำนวนหลายถุงอยู่ภายในไซโตพลาสมของเซลล์ในระดับ ++ (รูปที่ 1B) ใน48 ชั่วโมงในกลุ่มที่1 และ 2 ไม่เปลี่ยนแปลง ส่วนในกลุ่มที่ 3 จะแตกต่างโดยพบว่าเซลล์ตับมีลักษณะการติดสีของไขมันในเซลล์ให้สีแดง ลักษณะเป็นถุงกลมขนาดใหญ่ในไซโตพลาสมอย่างชัดเจน ดันนิวเคลียสของเซลล์ตับไปอยู่ชิดกับขอบของเซลล์ รอยโรคนี้กระจายทั่วไปโดยเซลล์ที่ให้ผลบวกจะชัดเจนบริเวณรอบ central vein (centrilobular area) (รูปที่ 1C) ในชั่วโมงที่ 72 ในกลุ่มที่ 3 การติดสีถุงไขมันชัดเจนและกระจายทั่วไป (panlobular area) (รูปที่ 1D) ในชั่วโมงที่ 96-240 ของการทดลองพบว่า ในกลุ่มที่ 1 ระดับผลบวกต่อสี Oil red O จะเริ่มลดลงไปเรื่อยๆ และมีค่าน้อยในชั่วโมงที่ 120 ชั่วโมงที่ 144-240 พบเซลล์ที่ให้ผลบวกน้อยมาก เซลล์ตับส่วนใหญ่จะไม่ให้ผลบวกต่อสี Oil red O ในกลุ่มที่ 2 นั้นให้ผลการการทดสอบใกล้เคียงกับกลุ่มที่ 1 ส่วนในกลุ่มที่ 3 ระดับเซลล์ที่ให้ผลบวกจะคงอยู่และพบถุงไขมันมีลักษณะเป็นถุงกลมขนาดใหญ่ในไซโตพลาสม ผลบวกจากการทดสอบนานติดต่อกันในระดับสูงจนถึงชั่วโมงที่ 96 ของการทดลอง และเริ่มลดลงในชั่วโมงที่ 120 โดยมีขนาดของถุงไขมันในเซลล์ลดลงแต่จำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกยังมีมาก และเริ่มลดลงอย่างชัดเจนในชั่วโมงที่ 168 และในชั่วโมงที่ 192 เซลล์ที่มีถุงไขมันขนาดใหญ่มีจำนวนลดลงมาก แต่ยังพบเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อสี Oil red O อยู่บ้าง ในชั่วโมงที่ 216-240 เซลล์ตับให้ผลบวกน้อยมาก (รูปที่ 1A) ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาเคมีมีความคล้ายคลึงกับในชั่วโมงที่ 144 กลุ่มที่ของกลุ่มที่ 1 และ 2 (ตารางที่ 1) ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ การตรวจการทำงานของ cytochrome oxidase ด้วย cytochrome C ติดสี DAB เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์จะให้ผลเป็นสีน้ำตาล ในบริเวณที่มีการทำงานของ cytochrome oxidase กลุ่มที่1และกลุ่มที่ 2 พบว่าเซลล์ตับติดสีน้ำตาลเข้มภายในไซโตพลาสม ยกเว้นส่วนที่เป็นถุงไขมันซึ่งไม่ติดสี มีทั้งเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลเข้มและเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลอ่อน (รูปที่ 2A) กลุ่มที่ 3 พบว่าไซโตพลาสมของเซลล์ตับติดสีน้ำตาลอ่อนจนถึงไม่ติดสี (รูปที่ 2B)

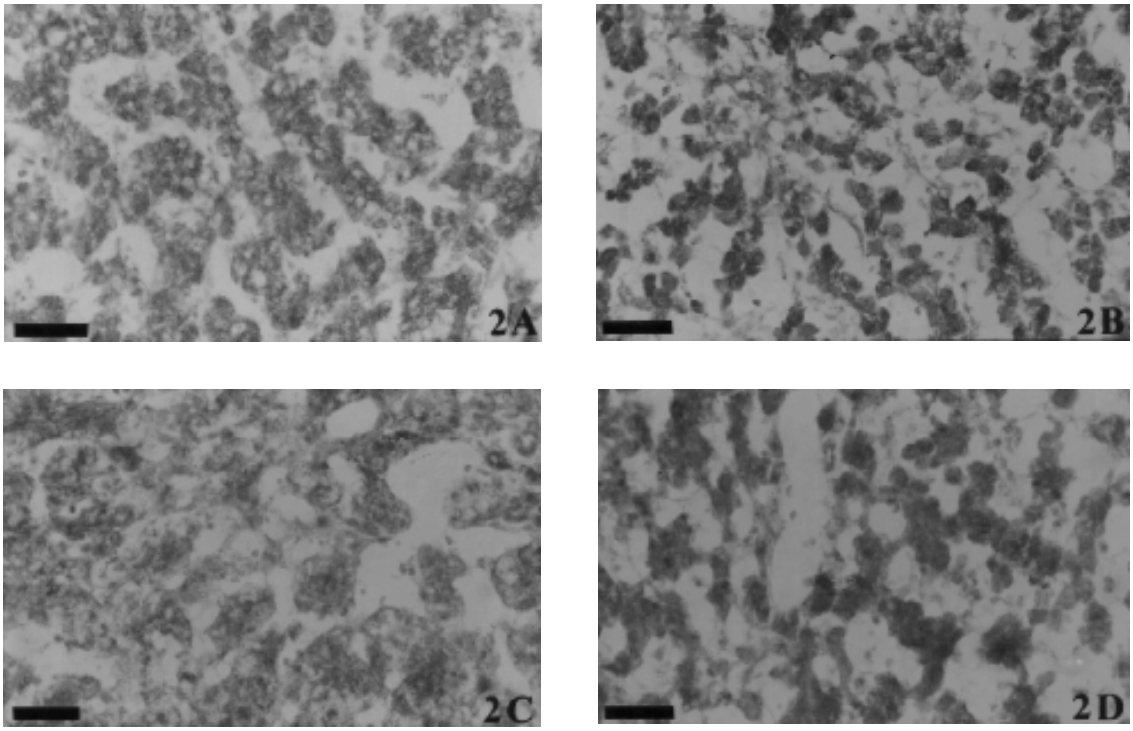


รูปที่ 1 ภาพแสดงผลทางจุลพยาธิวิทยาเคมี แบ่งระดับความเข้มของการติดสี ขนาดของถุงไขมัน และการกระจายในเนื้อเยื่อตับย้อมสีพิเศษ Oil red O โดยใช้เครื่องหมาย + ซึ่งแบ่งเกณฑ์เป็น 4 ระดับ คือ + หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดเล็กมาก < 25% ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule (กลุ่มควบคุมที่1, ชั่วโมงที่ 240 : รูปที่ 1A), ++ หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดเล็กเป็นบริเวณ 25-50% ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule (กลุ่มที่ 3, ชั่วโมงที่ 24 : รูปที่ 1B), +++ หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดกลาง 50-75% ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule(กลุ่มที่ 3, ชั่วโมงที่ 48 : รูปที่ 1C), ++++ หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดใหญ่ 75-100% ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule (กลุ่มที่ 3, ชั่วโมงที่ 72 : รูปที่ 1D) Bar= 20 μm

โดยจะพบได้ในเซลล์บริเวณรอบๆ central vein ซึ่งชัดเจนในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ภายหลังการป้อนอะฟลาท็อกซิน ภายในไซโตพลาสมเต็มไปด้วยเม็ดไขมันขนาดใหญ่ ทำให้เหลือส่วนที่เป็นไซโตพลาสมน้อยลง ในชั่วโมงที่ 72 ถึง 144 พบว่ามีเซลล์ที่ติดสีน้ำตาลอ่อนและเซลล์ที่ไม่ติดสีจำนวนมาก (รูปที่ 2C) หลังจากชั่วโมงที่ 144 พบว่าเซลล์มีการติดสีน้ำตาลมากขึ้น กระจายทั่ว (panlobular area) (รูปที่ 2D) ผลของการศึกษาดังแสดงไว้ในตารางที่ 2

วิจารณ์

การเสื่อมแบบมีไขมันแทรกพบได้ชัดเจนโดยใช้วิธีจุลพยาธิวิทยาเคมีย้อมด้วยสี Oil red O ซึ่งเป็นเทคนิคในการย้อมไขมันทั่วไปในเซลล์ (simple lipid และ triglyceride) (Filipes and Lake,1990) Merkley et al. (1986) รายงานชนิดของไขมันที่พบในตับภายหลัง



รูปที่ 2 ภาพแสดงผลทางจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ แบ่งระดับความเข้มของการติดสีและการกระจายในเนื้อเยื่อตับย้อมไซโตโครม ซี (Cytochrome C) ด้วยสี DAB (3,-3' Diaminobenzidine tetrahydrochloride) ตรวจการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส (Cytochrome oxidase)ในเซลล์ตับซึ่งแบ่งเกณฑ์เป็น 3 ระดับ คือ ++++ หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกความเข้มของสีเป็น 75-100 % ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule (กลุ่มควบคุมกลุ่มที่ 1, ชั่วโมงที่ 48 : รูปที่ 2A) +++ หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกความเข้มของสีเป็น 50-75% ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule(กลุ่มที่ 3, ชั่วโมงที่ 48 : รูปที่ 2B และชั่วโมงที่ 144 : รูปที่ 2D) ++ หมายถึงรอยโรคให้ผลบวกความเข้มของสีเป็น 25-50% ในแต่ละบริเวณของ hepatic lobule (กลุ่มที่ 3, ชั่วโมงที่ 72 : รูปที่ 2C) Bar= 10 μm

การได้รับอะฟลาท็อกซิน พบว่ามีไขมันเพิ่มมากขึ้นตามปริมาณสารพิษอะฟลาท็อกซินบี 1 ที่ผสมในอาหาร ซึ่งสัมพันธ์กับภาวะการเสื่อมแบบมีไขมันแทรกซึ่งสีย้อม oil red O ละลายได้ดีให้สีแดงอย่างชัดเจนในถุงไขมันในเซลล์ส่วนใหญ่ที่เป็น neutral lipid

ไซโตโครมออกซิเดสเป็นเอนไซม์ที่มีอยู่ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับ การตรวจการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดส ด้วยสี DAB ตามวิธีการของ Filipes and Lake (1990) พบว่าเซลล์ตับของกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่มให้ผลสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสมแสดงถึงบริเวณที่มีการทำงานของไซโตโครมออกซิเดสได้ดี ผลทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า การเกิดพิษอย่างเฉียบพลันจากอะฟลาท็อกซินทำให้เกิดการเสื่อมสภาพของเซลล์ เซลล์ที่มีการเสื่อมจะพบการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนทางจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ เนื่องจากไมโตคอนเดรียไวต่อสารพิษมีผลต่อกระบวนการเมตาโบลิสม

ตารางที่ 1 แสดงผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาเคมีของเซลล์ตับในลูกไก่กระทง โดยการย้อมสีพิเศษ Oil red O

วัน (ชั่วโมง)	กลุ่มทดลอง	ผลทางจุลพยาธิวิทยาเคมีของตับ/บริเวณ		
		Centrilobular	**Panlobular**	**Perilobular**
1 (24 ชั่วโมง)	1	++	++	++
	2	++	++	++
	3	++	++	++
2 (48 ชั่วโมง)	1	++	++	++
	2	++	++	++
	3	++++	+++	+++
3 (72 ชั่วโมง)	1	++	++	++
	2	++	++	++
	3	++++	++++	++++
4 (96 ชั่วโมง)	1	++	++	++
	2	++	++	++
	3	++++	++++	++++
5 (120 ชั่วโมง)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+++	+++	+++
6 (144 ชั่วโมง)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+++	+++	+++
7 (168 ชั่วโมง)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	++	++
8 (192 ชั่วโมง)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
9 (216 ชั่วโมง)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+
10 (240 ชั่วโมง)	1	+	+	+
	2	+	+	+
	3	+	+	+

โดยแบ่งระดับความเข้มของการติดสี ขนาด ลักษณะถุงไขมัน และ การกระจายในเนื้อตับใน 3 บริเวณของตับ (centrilobular, panlobular, perilobular) โดยใช้เครื่องหมาย + ซึ่งแบ่งเกณฑ์เป็น 4 ระดับคือ

\+ รอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดเล็กมาก เป็นบริเวณ < 25% ของ hepatic lobule

++ รอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดเล็ก เป็นบริเวณ 25-50% ของ hepatic lobule

+++ รอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดกลาง เป็นบริเวณ 50-75% ของ hepatic lobule

++++ รอยโรคให้ผลบวกของถุงไขมันขนาดใหญ่ เป็นบริเวณ 75-100% ของ hepatic lobule

*เกณฑ์การจำแนกระดับการเปลี่ยนแปลงในตับ (Watabiki et al.,1997)

ตารางที่ 2 แสดงการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาเอนไซม์ของเซลล์ตับในลูกไก่กระทง เพื่อตรวจการทำงานของเอนไซม์ไซโตโครม ออกซิเดส โดยตรวจการติดสีของไซโตโครม ซี และ DAB (3-3', diaminobenzidine tetrahydrochloride)

วัน/ชั่วโมง	กลุ่มทดลอง	ผลทางจุลพยาธิวิทยาเคมีของตับ/บริเวณ		
		Centrilobular	**Panlobular**	**Perilobular**
1 (24 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	+++	++++	++++
2 (48 ชั่วโมง)	1	++++	+++	+++
	2	++++	++++	++++
	3	++	+++	+++
3 (72 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	+++	+++	+++
	3	++	++	++
4 (96 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++	++	++
5 (120 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++	++	++
6 (144 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	+++	+++	+++
7 (168 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++
8 (192 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++
9 (216 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++
10 (240 ชั่วโมง)	1	++++	++++	++++
	2	++++	++++	++++
	3	++++	++++	++++

โดยแบ่งระดับความเข้มของการติดสี ขนาด ลักษณะถุงไขมัน และ การกระจายในเนื้อตับใน 3 บริเวณของตับ (centrilobular, panlobular, perilobular) โดยใช้เครื่องหมาย + ซึ่งแบ่งเกณฑ์เป็น 4 ระดับคือ

++ รอยโรคให้ผลบวกความเข้มของ cytochrome C เป็นบริเวณ 25-50% ของ hepatic lobule

+++ รอยโรคให้ผลบวกความเข้มของ cytochrome C เป็นบริเวณ 50-75% ของ hepatic lobule

++++ รอยโรคให้ผลบวกความเข้มของ cytochrome C เป็นบริเวณ 75-100% ของ hepatic lobule

* เกณฑ์การจำแนกระดับการเปลี่ยนแปลงในตับ (Watabiki et al.,1997)

ของตับ (Hodgson and Levi, 1994) ในกลุ่มที่ได้รับการป้อนด้วยอะฟลาท็อกซินพบว่า ผลของอะฟลาท็อกซินต่อไมโตคอนเดรียทำให้การทำงานของเอนไซม์ไซโตโครมออกซิเดสลดลง ทำให้ตรวจพบการเกิดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสมลดลง เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม ซึ่งสอดคล้องกับ Choudhary et al. (1997) ซึ่งได้รายงานผลของอะฟลาท็อกซินต่อเอนไซม์ในเซลล์ตับของลูกสุกร

การกลับคืนสู่สภาพปกติของเซลล์ตับ โดยพิจารณาจากการตรวจไม่พบการเสื่อมแบบมีไขมันแทรก การย้อมสี Oil red O ร่วมกับการติดสีไซโตโครมออกซิเดสที่เริ่มติดสีเข้มขึ้น พบว่าเซลล์เริ่มมีสภาพใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมประมาณชั่วโมงที่ 192 แต่พบว่าโครงสร้างของเซลล์ตับได้เสียรูปไป และยังคงมีร่องรอยการบวมของเซลล์ตับจนกระทั่งสิ้นสุดการทดลอง ผลการศึกษานี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการอธิบายพยาธิสภาพของเซลล์ตับ ซึ่งเป็นอวัยวะเป้าหมายหลังจากได้รับสารพิษอะฟลาท็อกซินบี 1 ครั้งเดียว โดยใช้การย้อมสีพิเศษในการพยากรณ์ความรุนแรงมีความแม่นยำมากยิ่งขึ้น ซึ่งสามารถนำมาประยุกต์ใช้ในอุตสาหกรรมการเลี้ยงไก่ในการแก้ปัญหาสารพิษจากเชื้อราต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณโครงการเสริมทักษะการวิจัย คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2541 สพ.ญ.คณารัตน์ หรินทรานนท์ น.สพ.อนุชา ศิริมาลัย สุวรรณ คุณอมรรัตน์ ทัศนกิจ และเจ้าหน้าที่หน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา และหน่วยชีวเคมี ภาควิชาสรีรวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

คณารัตน์ หรินทรานนท์ อัจฉริยา ไศละสูต อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ อนงค์ บิณฑวิหค และจิโรจ ศศิปรียจันทร์. 2000 (2543). การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและการขับออกทางอุจจาระของอะฟลาท็อกซินบี 1 ภายหลังให้ลูกไก่กระทงกินครั้งเดียว. เวชชสารสัตวแพทย์ 30(2): 36-49

พิสุทธิ์ มังกรกาญจน์. 1995 (2538). เอกสารประกอบการสอนวิชามิชญเคมี (histochemistry). ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 39 หน้า

ภัทนีย์ เล็กศรีสมพงษ์. 1997 (2540). สารพิษจากเชื้อราในวัตถุดิบอาหารสัตว์.การประชุมทางวิชาการเรื่องสารพิษเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 13-14 มีนาคม 2540: 85-68.

อนงค์ บิณฑวิหค. 1997 (2540). สารพิษอะฟลา ความสัมพันธ์ระหว่างความเป็นพิษกับการเกิดมะเร็งในสัตว์ปีก. การประชุมทางวิชาการเรื่องสารพิษเชื้อรา: ผลกระทบต่อสุขภาพสัตว์ คณะสัตวแพทย-ศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 13-14 มีนาคม 2540: 119-121.

Bancroft, J.D. 1975. Cryostats Histochemical Techniques . 2nded. London: Butterworth. 30-47.

Bintvihok, A., Kiatipattanasakul, A. and Doi, K . 1997. Acute toxicity of aflatoxin B1 in three species of aomestic fowls . J. Toxicol. Pathol . 10: 149-152.

Bryden, W.L. and Cumming, R.B. 1980. Observation on the liver of the chicken following aflatoxin B1 ingestion. Avian Pathol. 9: 551-556 .

Cheville, N.F. 1994. Cytopathology of toxic Disease. In: Ultrastructural Pathology: An Introduction to Interpretation. 1st ed. Ames Iowa state University Press. Ames. 791-829.

Choudhary, M.R., Rahman, T. and Bhattacharya, M. 1997. Clinicopathological and histoenzymatic studies in experimental acute aflatoxicosis in piglets. Indian J. Vet. Pathol. 21(1): 16-19.

Filipes, M.I. and Lake, B.D. 1990 . Histhochemistry technique. Histhochemistry in Pathology . 2nd ed. London : Butter & Janner. 435-465.

Hodgson, E. and Levi, P.E. 1994. Hepatotoxicity. In: Introduction to Biochemical Toxicology. 2nd ed. Norwalk Lonn: Appleton & Lange. 470-473 .

Merkley, J.W., Maxwell, R.J., Phillips, J.G. and Huff, W.E. 1986. Hepatic fatty acid profiles in profiles in aflatoxin-exposed in broiler chickens. Poultry Sci. 66: 59-67.

Osweiler, G.D., Carson, T.L., Buck, W.B. and Gelder, G.A.V. 1985. Aflatoxin. In: Clinical and Diagnosis Veterinary Toxicology. 3rd ed. Iowa: Kendall/Hunt Publishing. 412-415.

Seligman, A.M., Karnovsky, M.J., Wasserknug, H.L. and Hanker, J.S. 1968. Nondroplet ultra-structure demonstration of cytochromeoxidase activity activity with a polymerizing osmophilic reagent, diaminobenzidine(DAB). J. Cell biol. 38: 1-14.

Smith, G.D. and Hamilton, P.B. 1970. Aflatoxicosis in broiler chicken. Poultry Sci. 49: 207-215.

Theron, J.J., Liebenberg, N. and Joubert, H.J.B. 1965. Histochemistry and electron microscopy of acute liver lesion induced by aflatoxin B1 in ducklings. Nature. 206: 908-909 .

Watabiki, T., Tokiyasu, T., Yoshida, M., Okii, Y., Yoshimura, S. and Akane, A. 1997. Histochemical localization of alcohol dehydrogenase activities in the livers of mice, rat, hamster and guinea pigs. Acta Histochem. Cytochem. 30: 381-387.