

Thesis Title : Effects of Aflatoxin B₁ on Plasma Lipoproteins
and Erythrocyte Morphology in Albino Rats

Author : Mr. Udomphand Khansuwan

Master of Science : Biochemistry

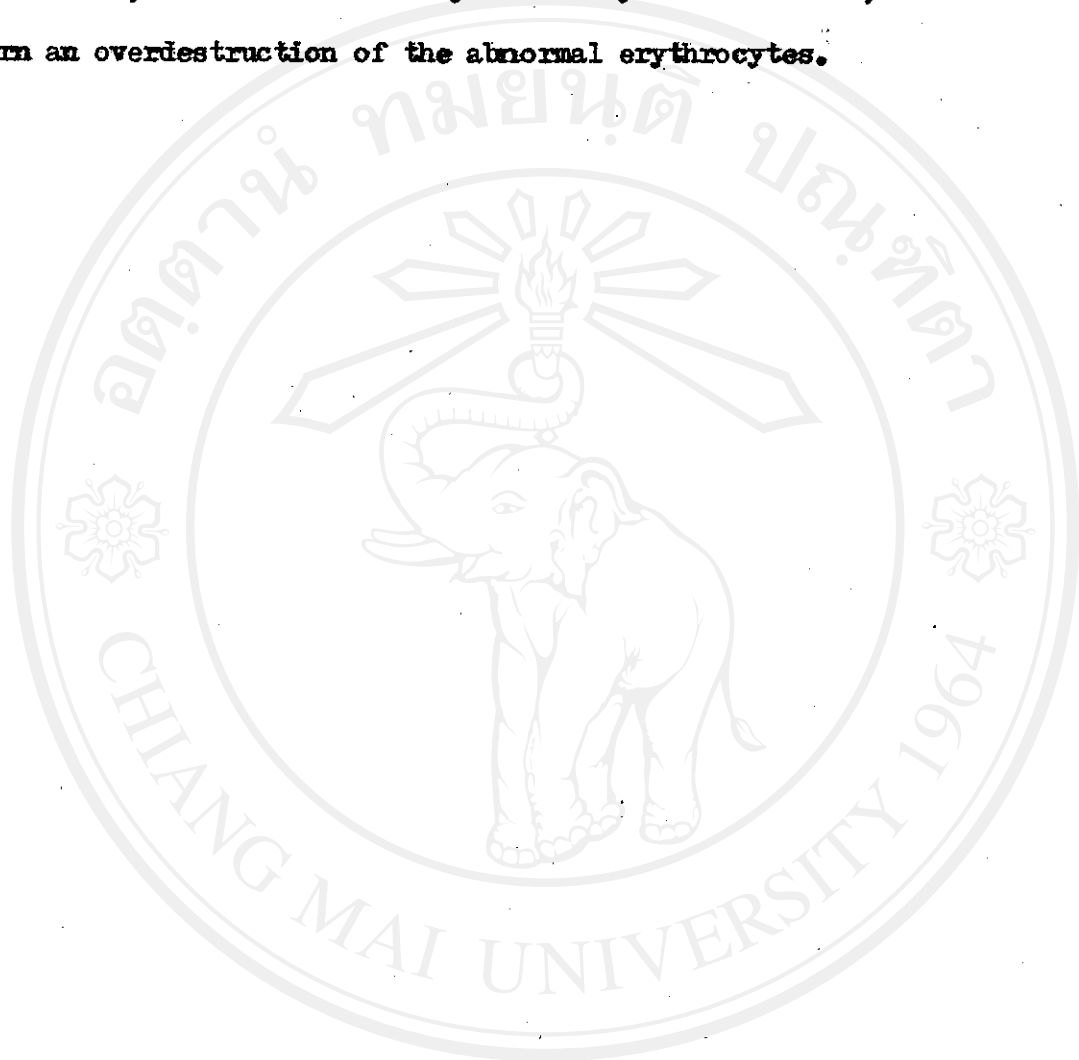
Examining Committee: Assoc.Prof.Dr. Viboon Rattanapanone Chairman
Assist.Prof.Dr. Vichai Wongchai Member
Assoc.Prof.Dr. Maitree Suttajit Member
Assoc.Prof.Dr. Yuthana Smitasiri, M.Sc... Member
Assist.Prof.Dr. Pramote Vanittanachom ... Member

ABSTRACT

Aflatoxin B₁ is the most potent hepatotoxin. In addition, administration of sublethal doses of aflatoxin B₁ for a period of 4-6 weeks had been reported to induce anemic status in several animals. However, mechanism of anemia-induction is not clear. In this thesis, a dose of 3.0 mg aflatoxin B₁ per kg body weight was injected into the albino rats, intraperitoneally, 6 consecutive days in a week, for a period of 4 weeks. The results were compared among the control, the AFB₁-treated and the paired-fed rats. The results showed obviously that all abnormalities occurred in the AFB₁-treated rats were caused by aflatoxin B₁-toxicity and not by starvation. The growth rate of the AFB₁-treated rats was 75% lower than the control and 25% lower than the paired-fed ones. Changes in the values of plasma albumin, alkaline phosphatase and glutamate-oxaloacetate transaminase activities suggested that livers of the AFB₁-treated rats were

damaged within a few days after the first injection of aflatoxin B₁. Examination of the AFB₁-treated rat-livers showed the significant ($p < .01$) accumulation of total lipid and cholesterol. An alkaline phosphatase and glutamate-oxaloacetate transaminase activities were also increased. Degenerating liver cells and bile-ductule proliferation were observed. Lipid accumulation in liver was corresponded with the disappearance of the α -lipoprotein fraction and the decreases of total lipid and cholesterol in plasma. Abnormalities of plasma lipoproteins have been reviewed in relation to morphological changes of the erythrocytes. In this thesis, a type of spicule cells, the echinocytes, was observed in blood of the AFB₁-treated rats at day 6th of the experiments. The percentage peaks of the echinocyte formation were about 30 and 50 % at day 8th and 14th, respectively, of the experiments. The echinocytes have been proposed to be interconvertible with the spherocytes. The percentage of the spherocytes was reached to 100 % peak at day 16th, only a few days before the AFB₁-treated rats were anemic and died. The results also showed that echinocytes and spherocytes could not be formed when incubation of the normal erythrocytes at 37°C, in vitro, with aflatoxin B₁ and its metabolites. The abnormal erythrocytes were more resistant to osmotic fragility than normal erythrocytes. Biochemical alterations in the echinocytes and spherocytes were examined. The results showed normal contents of reduced glutathione and membrane cholesterol and phospholipids. However, the membrane-bound phosphatase activity was increased in the echinocytes and spherocytes about two-fold more than discoid erythrocytes. An increase of the enzyme phosphatase was discussed in relation to the disappearance of the plasma α -lipoprotein fraction and to the formation of echinocyte and spherocytes.

Since, the membrane of the echinocytes and spherocytes is so rigid. The cells were trapped and destroyed in the spleen. The anemic status in the AFB₁-treated rat, which occurred only a few days before death, was discussed to concern an overdestruction of the abnormal erythrocytes.



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Copyright© by Chiang Mai University

All rights reserved

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์

ฤทธิ์ของอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง คอลิโปโปรตีนในปลาสด
และรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงในหนูขาว

ชื่อผู้เขียน

นายอุดมภัทร ชาลสุวรรณ

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต

ชีวเคมี

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์ :

รศ. ดร. วิบูลย์ รัตนานนท์	ประธานกรรมการ
ผศ. ดร. วิชัย วงศ์ไชย	กรรมการ
รศ. ดร. ไมตรี สุทธิจิตต์	กรรมการ
รศ. ยุทธนา สมิตะสิริ	กรรมการ
ผศ. ดร. ปราโมทย์ วัฒนธนาคม	กรรมการ

บทคัดย่อ

อะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง เป็นสารพิษที่มีพิษต่อตับรุนแรงที่สุด นอกจากนี้ การให้สัตว์ทดลองได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง ติดต่อกันเป็นระยะเวลาานาน 4-6 สัปดาห์ โดยปริมาณของสารพิษที่ให้นั้นมีขนาดน้อยกว่าปริมาณที่จะทำให้สัตว์แต่ละชนิดตายไป 50 เปอร์เซ็นต์ภายในเวลา 7 วัน อาจทำให้สัตว์หลายชนิดเกิดภาวะโลหิตจางได้ อย่างไรก็ตาม กลไกการเกิดภาวะโลหิตจางในสัตว์ที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง นี้ยังไม่เป็นที่กระจ่างชัดในการศึกษานี้ได้ทดลองฉีดสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง เข้าช่องท้องของหนูขาวสัปดาห์ละ 6 วันติดต่อกันเป็นระยะเวลาานาน 4 สัปดาห์ ขนาดที่ใช้ฉีด คือ อะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง 3.0 มิลลิกรัม ค่อน้ำหนักตัวหนู 1 กิโลกรัม ผลของการทดลองได้นำมาเปรียบเทียบกันระหว่างหนูขาว 3 กลุ่ม คือ กลุ่มปกติ กลุ่มที่ได้รับสารพิษ และกลุ่มที่ถูกจำกัดปริมาณอาหาร พบว่าความผิดปกติทั้งหลายที่เกิดขึ้นในหนูกลุ่มที่ได้รับสารพิษ มีสาเหตุมาจากพิษของอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง นั้นเอง ไม่ใช่เกิดขึ้นเนื่องจากการอดอาหาร หนูกลุ่มที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง 1.5 มิลลิกรัม ค่อน้ำหนักตัวหนู 75 เปอร์เซ็นต์ และจำกัดปริมาณอาหาร 25

เปอร์เซ็นต์ โดยการศึกษาการเปลี่ยนแปลงค่าของอัลบูมิน เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และเอ็นไซม์กลูตาเมท-ออกซาโลอะซิเตททรานอะมิเนส ทราบว่าคัมของหนูกลุ่มที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง เริ่มเสียหายภายในเวลาเพียง 2 - 3 วัน หลังจากฉีดสารพิษเข้าไปครั้งแรก ผลการตรวจคัมหนูกลุ่มที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง พบว่าลิวคิตทั้งหมด และ โพลีเอสเทอรอล สะสมปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p < .01$) เอ็นไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส และ กลูตาเมท-ออกซาโลอะซิเตททรานอะมิเนสก็เพิ่มขึ้นด้วย ยังพบอีกด้วยว่าเซลล์ถูกทำลาย และมีเซลล์ของท่อน้ำดีเพิ่มจำนวนขึ้นมาก การสะสมลิวคิตในคัมมีความเกี่ยวข้องกับอาการขาดหายไปของอัลฟา-ลิโปโปรตีน และการลดลงของปริมาณลิวคิตทั้งหมด และโพลีเอสเทอรอลในพลาสมา โคเคย์มีรายงานว่า ความผิดปกติของรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของลิโปโปรตีนในพลาสมา ในการศึกษาครั้งนี้ โคสังเกตุพบเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบ *echinocytes* ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงแบบหนึ่งที่มีหนามรอบเซลล์ อยู่ในเลือดของหนูที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง ตั้งแต่วันที่ 6 ของการทดลอง พบว่าจำนวนเปอร์เซ็นต์ของ *echinocytes* มีค่าสูงสุด 30% และ 50% ในวันที่ 8 และวันที่ 14 ของการทดลอง ตามลำดับ โคเคย์มีผู้เสนอแนะว่า *echinocytes* สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปเป็น *spherocytes* ได้ ในการศึกษานี้ก็พบว่า *spherocytes* ค่อย ๆ เพิ่มปริมาณมากขึ้นจนถึง 100% ในวันที่ 16 ของการทดลอง ซึ่งหลังจากนั้นอีกเพียง 2 - 3 วัน หนูที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง ก็เกิดภาวะโลหิตจาง และตาย ผลการทดลองก็พบว่าสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง และสาร *metabolites* ของมัน ที่ใส่ลงไปในการทดลองในเลือดของหนูขาวในหลอดทดลอง ๗ อนุหนุมิ ๑7 ซี ไม่สามารถทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงปกติกลายเป็นเซลล์ *echinocytes* และ *spherocytes* ได้ พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งผิดปกติทั้ง 2 ชนิดนี้ สามารถต้านทานแรงดันออสโมติกได้ดีกว่าเซลล์เม็ดเลือดปกติ ผลการตรวจสอบเซลล์ *echinocytes* และ *spherocytes* โดยทางชีวเคมี พบว่าปริมาณของสารรีดิวซ์กลูตาไรโอน โพลีเอสเทอรอล และฟอสโฟลิปิด ไม่แตกต่างไปจากค่าปกติ แต่พบว่ามีปริมาณเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสซึ่งติดอยู่กับเยื่อเซลล์เพิ่มมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงปกติถึง 2 เท่า โคเคย์แสดงความคิดเห็นถึงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณที่เพิ่มขึ้นของเอ็นไซม์ฟอสฟาเตสซึ่งติดอยู่กับเยื่อเซลล์ กับ การหายไปของอัลฟา-ลิโปโปรตีนในพลาสมา และการเกิดเซลล์

เม็ดเลือดแดงแบบ *echinocytes* และ *spherocytes* เอาไว้ และเนื่องจากว่าเซลล์ *echinocytes* และ *spherocytes* ค่อนข้างแข็ง จึงถูกกักเอาไว้ และถูกทำลายได้ในม้าม ดังนั้นภาวะโลหิตจางในหนูกลุ่มที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน บี หนึ่ง ซึ่งเกิดขึ้นก่อนตายเพียง 2 - 3 วันนั้นจึงน่าจะเกี่ยวข้องกับการทำลายเซลล์เม็ดเลือดแดงซึ่งผิดปกติอย่างรุนแรง



ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

ACKNOWLEDGEMENT

The author wishes to express his sincere gratitude to Associate Professor Dr. Viboon Rattanapanone for his advice and guidance throughout all stages of this work. His great appreciation is extended to Dr. Tip-aksorn Sinchaisee for her kind assistance in the preparation and examination of liver slices and blood smears.

His deep gratitude is heartily expressed to Assistant Professor Dr. Vichai Wongchai, Chairman of the Department of Biochemistry, Associate Professor Dr. Maitree Suttajit, Associate Professor Yuthana Smitasiri and Assistant Professor Dr. Pramote Vanittanachom for their creative criticism and useful advice for this thesis.

This work was carried out with the aid of a grant from the China Medical Board of New York, U.S.A. to whom he wishes to express his attitude as well. He is also grateful to the Faculty of Medicine, Chiang Mai University for the official permission for him to further continue the higher education.

Finally, he would like to thank all his friends, colleagues, and everyone in his family for their love, support, sympathy and understanding. These will remain in his memory forever.

All rights reserved