

ผลของสารเคอร์ซิทินต่อการทำหน้าที่ของเซลล์เฮเทอโรฟิลของไก่

ภาณุพงษ์ โนจิตร¹, จิรเดช อำไพพันธุ์¹, พงศกร เชื่อมไมตรี^{2*}

¹นักศึกษาสัตวแพทย์ชั้นปีที่ 6 ปีการศึกษา 2556 คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²หน่วยพาราศัลนิททางสัตวแพทย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข

คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

บทคัดย่อ เฮเทอโรฟิลเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของไก่ที่สำคัญ โดยมีหน้าที่ตอบสนองเบื้องต้นต่อการติดเชื้อเนื่องจากมีกลไกทำลายเชื้อโรคทั้งแบบภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ วัตถุประสงค์ของการศึกษานี้เพื่อทดสอบผลของสารเคอร์ซิทิน (QH) ต่อกระบวนการทำลายเชื้อโรคภายในเซลล์ ได้แก่ การสร้างสารปฏิชีวนะออกซิเจนที่เป็นพิษ (ROS) การเก็บกินและการทำลายเชื้อโรค (phagocytosis and microbial killing) และต่อกระบวนการทำลายเชื้อภายนอกเซลล์ คือ การสร้าง Heterophil Extracellular Traps (HETs) ผลการศึกษาพบว่าเซลล์เฮเทอโรฟิลที่แยกได้จากไขกระดูกเมื่อนำมากระตุ้นเบื้องต้นด้วยสารเคอร์ซิทินที่ระดับความเข้มข้น 50 ไมโครโมล (μM) นาน 30 นาที และกระตุ้นเซลล์ซ้ำด้วยสาร PMA สารเคอร์ซิทินสามารถส่งเสริมให้เกิดการผลิต ROS เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.005$) กระบวนการเก็บกินเชื้อ *Salmonella Enteritidis* ที่ย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ของเฮเทอโรฟิลในกลุ่ม QH ให้ผลการเก็บกินที่ลดลงเล็กน้อย ($p=0.62$) กระบวนการทำลายเชื้อ *Salmonella Enteritidis* ในกลุ่ม QH พบการทำลายเชื้อเพิ่มขึ้น ($p=0.04$) นอกจากนี้สารเคอร์ซิทินยังมีผลต่อการเพิ่มการสร้างโครงสร้าง HETs อย่างมีนัยสำคัญ ($p=0.007$) การศึกษานี้สรุปได้ว่าการเสริมสารเคอร์ซิทินที่ความเข้มข้น 50 μM ส่งผลต่อหน้าที่ของเซลล์เฮเทอโรฟิลโดยเพิ่มกระบวนการทำลายเชื้อแบคทีเรียได้ เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2557; 12(3): 167-178

คำสำคัญ: เฮเทอโรฟิล เคอร์ซิทิน การทำหน้าที่ของเซลล์ ไก่

ติดต่อสอบถามได้ที่ : พงศกร เชื่อมไมตรี หน่วยพาราศัลนิททางสัตวแพทย์ ภาควิชาชีวศาสตร์ทางสัตวแพทย์และสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ต.แม่เหียะ อ.เมือง จ.เชียงใหม่ 50100 Email address : phongsakorn.c@cmu.ac.th ได้รับบทความวันที่ 3 มิถุนายน 2557

บทนำ

โรคติดเชื้อแบคทีเรียเป็นปัญหาหนึ่งที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของสัตว์ปีก เช่น ไก่ เป็ด เป็นต้น ก่อให้เกิดผลเสียต่ออุตสาหกรรมการเลี้ยงสัตว์ปีก ในปัจจุบันสารสกัดสมุนไพรมีบทบาทในการเป็นสารต่อต้านจุลชีพ (antimicrobials) ซึ่งสามารถนำมาแปรรูป

และเสริมในอาหารเพื่อใช้เลี้ยงสัตว์ และอาจทำหน้าที่เป็นวัตถุทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ ตัวอย่างของสมุนไพรที่มีฤทธิ์ในการเป็นสารต่อต้านแบคทีเรีย ได้แก่ ขมิ้นชัน มังคุด บัวบก (Temrangsee, Kondo, & Itharat, 2011) ฟ้ายาละลายใจ ใบชา สะเดา อบเชย ชิง (Alzoreky & Nakahara, 2003) เป็นต้น สารสำคัญที่พบในพืชสมุนไพร

อาจออกฤทธิ์ในการยับยั้งหรือทำลายเชื้อแบคทีเรียได้โดยตรง เช่น สาร flavonoids (Cushnie & Lamb, 2005) หรืออาจเป็นสารส่งเสริมเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น สาร quercetin เป็นต้น

เซลล์เฮเทอโรฟิลของสัตว์ปีก (avian heterophils) ทำหน้าที่เช่นเดียวกับเซลล์นิวโทรฟิลในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และเป็นเซลล์ที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (innate immunity) โดยการทำหน้าที่ต่อต้านสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเป็นอันดับต้น ๆ เมื่อเฮเทอโรฟิลรับรู้การปรากฏของเชื้อโรค เซลล์จะอาศัยกระบวนการในการทำลายเชื้อโรคร่วมกันหลายกระบวนการ ได้แก่ กระบวนการเก็บกิน (phagocytosis) การสร้าง reactive oxygen species (ROS) และการปล่อยแกรนูลและเอนไซม์ (degranulation) ซึ่งกระบวนการดังกล่าวข้างต้นจัดเป็นการทำลายเชื้อโรคภายในเซลล์ (intracellular microbial killing) (Boots, Haenen, & Bast, 2008; Brooks, Bounous, & Andreasen, 1996) นอกจากนี้เซลล์ดังกล่าวยังสามารถทำลายเชื้อโรคโดยอาศัยกลไกในการทำลายแบบภายนอกเซลล์ ได้แก่ heterophil extracellular traps (HETs) ซึ่งเป็นโครงสร้างที่มีองค์ประกอบหลัก ได้แก่ ดีเอ็นเอ (DNA) และโปรตีนฮิสโตน (histones) (Chuammitri et al., 2009) องค์ประกอบอื่นของ HETs ยังอาจประกอบด้วยโมเลกุล ROS แอนติไมโครเบียลเปปไทด์ (antimicrobial peptide, AMP) และเอนไซม์ชนิดต่าง ๆ โดย HETs จะช่วยดักจับลดการแพร่กระจายและทำลายเชื้อโรคที่อยู่รอบๆ โครงสร้างดังกล่าว (Brinkmann et al., 2004)

สารเคอร์ซีตินเป็นสารพฤกษเคมี (phytochemicals) ในกลุ่มฟีนอล (phenols) พบได้ในพืชหลายชนิดตามธรรมชาติ เช่น หัวหอม พืชตระกูลถั่ว ส้ม แอปเปิ้ล องุ่น ฝรั่ง และใบชา เป็นต้น จากการศึกษาในมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่าสารเคอร์ซีตินมีสรรพคุณในการเป็นสารต่อต้านอนุมูลอิสระ และฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบ (antioxidant and anti-inflammation)

โดยการควบคุมการแสดงออกของยีนในกระบวนการอักเสบ เช่น Cox-2, iNOS, IL-1, IL-6, TNF- α และไซโตไคน์อื่น ๆ (Chan et al., 2012; Kim et al., 2004; J. Liu et al., 2005) ตลอดจนฤทธิ์ต่อต้านจุลชีพ (Arima, Ashida, & Danno, 2002) และยังสามารถมีคุณสมบัติในการปรับสมดุลในระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulation) การนำสารเคอร์ซีติน (quercetin) ซึ่งเป็นสารที่สกัดได้จากธรรมชาติมาใช้ประโยชน์ในการส่งเสริมหรือควบคุมการทำหน้าที่ของเซลล์เฮเทอโรฟิล (heterophils) ในกระบวนการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งอาจช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจ สร้างความปลอดภัยต่อผู้บริโภคและสุขภาพสัตว์ เนื่องจากเป็นสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติและอาจมีส่วนช่วยลดการใช้ยาปฏิชีวนะลง นอกจากนี้การศึกษาลงของสารเคอร์ซีตินต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์ปีกยังมีการศึกษาที่จำกัด และการศึกษาสารเคอร์ซีตินนี้มุ่งเน้นในด้านการเจริญเติบโตและการเพิ่มผลผลิตในไก่เนื้อและไก่ไข่ (Y. Liu et al., 2013; Rupasinghe et al., 2010) ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการศึกษานี้ เพื่อศึกษาผลของการเสริมสารเคอร์ซีตินในการส่งเสริมหรือยับยั้งกระบวนการทำงานของเฮเทอโรฟิลในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรียทั้งกระบวนการทำลายเชื้อภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ซึ่งจะช่วยให้เกิดความเข้าใจและสามารถประยุกต์ใช้สารชนิดนี้ต่อไป

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง

ลูกไก่เนื้อปลอดโรคอายุ 1-3 วัน (*Gallus gallus domesticus*) จำนวนมากกว่าหรือเท่ากับ 5 ตัวอย่างต่อการทดลอง ($n \geq 5$) ที่สั่งซื้อจากบริษัทเบทาโกรภาคเหนือเกษตรอุตสาหกรรม จำกัด ใช้สำหรับเก็บตัวอย่างเซลล์เฮเทอโรฟิลจากไขกระดูก (bone marrow heterophils) ด้วยวิธีการชะล้างเซลล์จากไขกระดูกก่อนนำมาทำการแยกเซลล์เฮเทอโรฟิลภายในเวลา 1 ชั่วโมง สัตว์ทดลองได้รับการอนุมนต์ให้ใช้งานภายใต้เงื่อนไขของคณะกรรมการ

จรรยาบรรณสัตว์ทดลอง ประจำคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ใบอนุญาตเลขที่ S6/2556 ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง คนละช่วงเวลา

การแยกเซลล์เฮเทอโรฟิลจากไขกระดูกของลูกไก่

ท่อนกระดูกจากขาและปีก ซึ่งประกอบด้วย femur, tibia, humerus และ radius นำมาตัดบริเวณปลายกระดูกทั้งสองข้าง แล้วจึงฉีดยาล้างด้วยสารละลาย Hank's balanced salt solution (HBSS) ที่เติม 1% fetal bovine serum (FBS) นำเซลล์ไขกระดูกที่ปะปนอยู่ในของเหลวที่ได้จากการฉีดยาล้างมาแยกเซลล์เฮเทอโรฟิลโดยใช้วิธีการของ Chuammitri et al., 2009 โดยการตัดแปลงขั้นตอนในระหว่างการแยกซึ่งสามารถสรุปได้ดังต่อไปนี้ ของเหลวที่ได้จากการฉีดยาล้างไขกระดูกมาเติมบน Histopaque gradient (Sigma-Aldrich) ที่มีความถ่วงจำเพาะ 1.077 (ชั้นบน) และ 1.119 g/mL (ชั้นล่าง) ปั่นแยกด้วยความเร็ว 700 xg อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส (°C) นาน 30 นาที เก็บเซลล์ที่อยู่ระหว่างชั้น 1.077 และ 1.119 และนำมาย่อยเม็ดเลือดแดงที่ตกค้างด้วย RBC lysis buffer (1 g/L KHCO_3 , 0.87 g/L NH_4Cl ในน้ำกลั่น) นำก้อนเซลล์ที่เหลือในชั้นตอนสุดท้าย ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด RPMI 1640 (Gibco) ที่เติม 1% FBS ตรวจสอบจำนวนเซลล์มีชีวิต (viability) ภายหลังจากแยกด้วย 0.4% trypan blue ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ ปรับจำนวนเซลล์มีชีวิตให้เท่ากับ 1×10^6 heterophils/mL เซลล์ที่ได้จากการแยกมีชีวิตมากกว่า 95% ขึ้นไป และมีความบริสุทธิ์มากกว่า 90% จากการตรวจโดย cyto-spin ซึ่งย้อมสี Wright Rapid Stain Set (DipQuick)

สารเคอร์ซีติน

สารเคอร์ซีติน (Quercetin hydrate, QH) ความบริสุทธิ์ $\geq 95\%$ โดย HPLC สั่งซื้อจากบริษัท Sigma-Aldrich นำมาเตรียมสารละลายสต็อก (stock solution) ด้วยการทาละลาย QH ใน 95% ethanol

ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 mM กรองสารละลายและห่อฟอยด์เพื่อป้องกันแสง เก็บรักษาที่อุณหภูมิห้องจนกว่าจะนำมาเจือจางเพื่อเตรียมสารเพื่อการใช้งาน (working solution)

แบคทีเรียและการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ให้กับแบคทีเรีย

แบคทีเรียที่ใช้ในการทดลองนี้ คือ เชื้อ *Salmonella* Enteritidis (SE) ที่แยกได้จากไก่ที่ปนเปื้อน โดยได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.น.สพ.ดร.ประภาส พงษ์นิ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ วิธีการย้อมสีฟลูออเรสเซนต์ปฏิบัติตามวิธีการของ Chuammitri et al., 2011 โดยสรุป นำแบคทีเรียมาเพิ่มจำนวนใน Luria-Bertani Broth (LB) จนได้จำนวนแบคทีเรียมีชีวิตเท่ากับ 10^8 CFU/mL ก่อนนำมาทดลอง นำแบคทีเรียบางส่วนมาฆ่าเชื้อด้วยความร้อนที่ 60 °C นาน 90 นาที ปั่นตกตะกอนและย้อมแบคทีเรียด้วยสีฟลูออเรสเซนต์ชนิด Hoechst 33342 (Life Technologies) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 5 $\mu\text{g/mL}$ ปรับจำนวนแบคทีเรียให้เท่ากับ 10^6 CFU/mL เพื่อนำมาใช้ใน phagocytosis assay ก่อนการทดสอบนำแบคทีเรียที่ย้อมสีฟลูออเรสเซนต์มาห่อหุ้มด้วยแอนติบอดี (opsonization) โดยใช้ 10% heat-inactivated normal chicken serum

การทดสอบความเป็นพิษของสารเคอร์ซีตินต่อเซลล์เฮเทอโรฟิล

การทดสอบความเป็นพิษของสารเคอร์ซีตินต่อเซลล์ ทำการทดลองตามการรายงานของ Das, Mukherjee, & Chaudhuri, 2012 เริ่มต้นด้วยการเติมเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ในถาดหลุม 96-well flat plate จากนั้นเติมสารละลาย QH ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 0, 12.5, 25, 50 และ 100 μM นำเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มที่ 41 °C, 5% CO_2 นาน 1 ชั่วโมง ภายหลังจากบ่มเซลล์ นำถาดหลุมไปปั่นที่ 1,200 รอบต่อนาที

นาน 5 นาที ดูดของเหลวด้านบนทิ้ง และเติมสารละลาย HBSS ที่มีส่วนประกอบของ filtered sterile Thiazolyl blue tetrazolium dye (MTT, Sigma-Aldrich) ผสมลงในเซลล์ (ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 2 µg/mL) บ่มเซลล์นาน 15 นาทีในตู้บ่มอุณหภูมิ 41°C, 5% CO₂ เพื่อให้เซลล์ที่มีชีวิตได้เปลี่ยนองค์ประกอบในโมเลกุลของ MTT ให้เกิดเป็นสีม่วงของ Formazan จากนั้นจึงเติม dimethyl sulfoxide (DMSO) เพื่อละลายผลึกของ Formazan ปั่นถาดหลุมและดูดของเหลวด้านบน นำมาเติมในถาดหลุมชิ้นใหม่ ตรวจวัดและเปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสง (optical density; OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Anthos Labtec) นำค่าที่วัดได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่มีชีวิตเปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้นของคอร์ซิทินที่แตกต่างกัน

การตรวจวัด Reactive Oxygen Species (ROS) ภายในเซลล์

การตรวจวัดระดับ reactive oxygen species (ROS) ในเฮทเทอโรฟิลใช้วิธีการของ He, Farnell, & Kogut, 2003 โดยมีการดัดแปลง วิธีการโดยสรุป เติมเซลล์จำนวน 1×10^5 เซลล์ ใน 96-well flat plate กระตุ้นเซลล์เบื้องต้นด้วย 50 µM QH (ความเข้มข้นที่เหมาะสมจากการทดสอบความเป็นพิษ) หรือ phosphate buffered saline (PBS) ที่ใช้เป็นสารควบคุม นาน 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นอีกครั้งเพื่อให้เกิดการสร้าง ROS ด้วยการเติม 100 nM PMA (Calbiochem) นาน 15 นาทีในตู้บ่ม จากนั้นตรวจสอบ ROS ที่เซลล์สร้างขึ้นด้วยการเติม สียฟลูออเรสเซนต์ (10 µM fluorescent probe H₂DCF-DA, Life Technologies) บ่มเซลล์ในตู้บ่มนาน 15 นาที เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างเซลล์ด้วย PBS ที่อุณหภูมิ 4 °C ตรึงเซลล์ด้วย 1% paraformaldehyde (PFA) ส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์โดย Flow Cytometer จากข้อมูลรูปแบบ fluorescence (FL1) จากเซลล์ของกลุ่ม

ที่ไม่ได้รับ QH (QH -) และกลุ่มที่ได้รับ QH (QH+) โดยโปรแกรม FCS Express 4 Flow cytometry (De Novo Software)

การตรวจวัดจำนวนเฮทเทอโรฟิลในกระบวนการเก็บกิน (Phagocytosis)

การทดสอบกระบวนการเก็บกินทำการทดลองตามวิธีการของ Chuammitri et al., 2011 โดยสรุป ภายหลังกระตุ้นเซลล์เบื้องต้นด้วย QH หรือ PBS เช่นเดียวกับการทดลองตรวจวัด ROS นำ opsonized Hoechst 33342-labelled *Salmonella* Enteritidis จำนวน 1×10^6 แบคทีเรีย (อัตราส่วนเซลล์ต่อแบคทีเรียเท่ากับ 1 ต่อ 10) ผสมรวมกับเซลล์ บ่มเซลล์ในตู้บ่มนาน 60 นาที ล้างเซลล์ด้วย PBS ตรึงเซลล์ด้วย 1% PFA ส่งตัวอย่างเพื่อตรวจวิเคราะห์โดย Flow Cytometer จากข้อมูลรูปแบบ fluorescence (FL6) จากเซลล์ของกลุ่ม QH - และกลุ่ม QH+ โดยโปรแกรม FCS Express 4 Flow cytometry

การทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์เฮทเทอโรฟิล (Bactericidal Assay)

ตรวจสอบการทำลายเชื้อ *Salmonella* Enteritidis โดยมีการดัดแปลงวิธีการที่มีการรายงานโดย Chuammitri et al., 2011 กล่าวคือ ใช้วิธี MTT bactericidal assay แทนวิธี XTT assay ด้วยการนำแบคทีเรียที่มีชีวิตมาห่อหุ้มด้วยแอนติบอดีก่อนนำมาทดสอบ ทำการทดลองคล้ายกับวิธีการตรวจวัด ROS และ phagocytosis โดยภายหลังการกระตุ้นเซลล์เบื้องต้นแล้วจึงเติมแบคทีเรียที่มีชีวิต จำนวน 1×10^6 แบคทีเรีย เพื่อให้เซลล์เก็บกินและทำลายนาน 45 นาที ในตู้บ่ม บั่นล้างแบคทีเรียภายนอกเซลล์ที่ไม่ได้ถูกเก็บกิน ย่อยเซลล์เฮทเทอโรฟิลด้วยน้ำกลั่นเพื่อให้เซลล์แตก และปลดปล่อยแบคทีเรียที่ถูกเก็บกิน จากนั้นเติม LB broth สำหรับให้แบคทีเรียที่มีชีวิตได้ใช้ในการ

เพิ่มจำนวน นำหลอดหลุมไปบ่มที่ 37 °C นาน 90 นาที เติม LB broth ที่มีส่วนผสมของ filtered sterile MTT (2 µg/mL) แบททีเรียมีชีวิตจะเปลี่ยนองค์ประกอบในโมเลกุลของ MTT ให้เกิดเป็นสีม่วงของ Formazan เปรียบเทียบค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง spectrophotometer (Anthos Labtec) นำค่าที่วัดได้มาคำนวณค่าการทำลายเชื้อแบคทีเรียซึ่งสัมพันธ์กับจำนวนแบคทีเรียมีชีวิตที่เหลืออยู่ (percentage killing)

การสร้าง Heterophil Extracellular Traps (HETs)

ตรวจสอบการสร้าง Heterophil Extracellular Traps (HETs) ตามวิธีการของ Chuammitri et al., 2009 โดยนำแผ่นปิดสไลด์กระจกทรงกลมขนาด 15 มิลลิเมตร ที่เคลือบด้วย 0.001% poly-L-lysine (Sigma-Aldrich) มาวางในหลอดหลุมแบบ 24-well plate เติมเซลล์จำนวน 2.5×10^4 เซลล์บริเวณกึ่งกลางแผ่นปิดสไลด์ กระตุ้นเซลล์เบื้องต้นด้วย 50 µM QH บ่มเซลล์นาน 30 นาที จากนั้นทำการกระตุ้นอีกครั้งเพื่อให้เกิดการสร้างโครงสร้าง HETs ด้วยการเติม 1 mM hydrogen peroxide (H₂O₂) โดยมี PBS เป็นสารควบคุม บ่มเซลล์นาน 3 ชั่วโมงในตู้บ่ม 41 °C, 5% CO₂ ตรีงเซลล์ด้วย 4% PFA และย้อมสีโครงสร้าง HETs ด้วย Fluoroshield mounting medium ที่มี DAPI (Sigma-Aldrich) สำหรับย้อมโครงสร้างดีเอ็นเอ ส่องตรวจและบันทึกภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ Axio Scope A1 (Carl Zeiss) นับจำนวนโครงสร้าง HETs จากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองจากบริเวณที่สุ่ม นับจำนวน 5 บริเวณ ที่กำลังขยายต่ำ (5X)

การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่ได้จากการทดลองจำนวน 3 ครั้ง นำมาวิเคราะห์หา outlier โดย Grubbs' test หรือ extreme studentized deviate (ESD) method ก่อนนำมาวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป

GraphPad Prism เวอร์ชัน 5.0 โดยใช้วิธีการทางสถิติ คือ Unpaired *t* test สำหรับข้อมูลที่มีกลุ่มเซลล์ทดลองจำนวน 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม (ได้รับ PBS) และกลุ่มที่ได้รับสารเคอร์ซิดิน (QH) สำหรับการทดสอบความเป็นพิษของสารเคอร์ซิดินต่อเซลล์นำมาวิเคราะห์ด้วย One-way ANOVA ผลของการวิเคราะห์ทางสถิติที่ถือว่า มีนัยสำคัญ เมื่อ $p \leq 0.05$ ข้อมูลที่ได้จากการวิเคราะห์ทางสถิตินำมาสร้างเป็นแผนภูมิโดย GraphPad ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างหรือฟลูออเรสเซนส์นำมาระบุตำแหน่งและแถบมาตราส่วนโดยโปรแกรมสำเร็จรูป Photoshop CS4

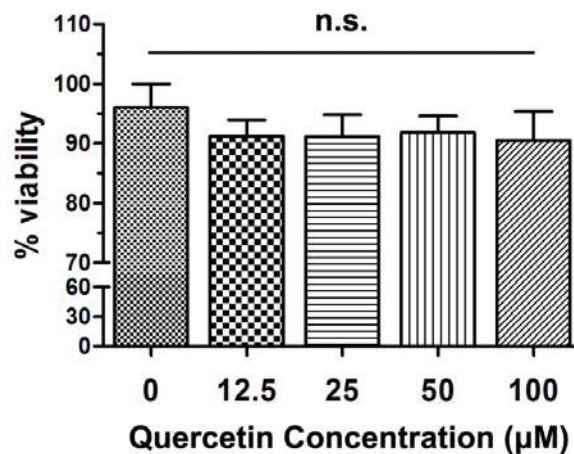
ผลการศึกษา

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารเคอร์ซิดิน (QH) ต่อเซลล์เฮเทอโรฟิลในหลอดทดลองโดยวิธี MTT ไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ในทุกความเข้มข้นของสาร QH ที่ใช้ศึกษา ($p = 0.82$, รูปที่ 1) ค่าเฉลี่ย (mean) และค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (SE) ของเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตที่ระดับความเข้มข้นของสาร QH ที่ความเข้มข้น 0, 12.5, 25, 50 และ 100 µM มีค่าเท่ากับ 96.04 ± 3.96 , 91.22 ± 2.72 , 91.14 ± 3.64 , 91.81 ± 2.81 และ 90.53 ± 4.82 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ เมื่อวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ คณะผู้วิจัยพิจารณาเลือกใช้ความเข้มข้นที่ 50 µM ในการทดลองอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องเพียงความเข้มข้นเดียวเนื่องจากเป็นความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด

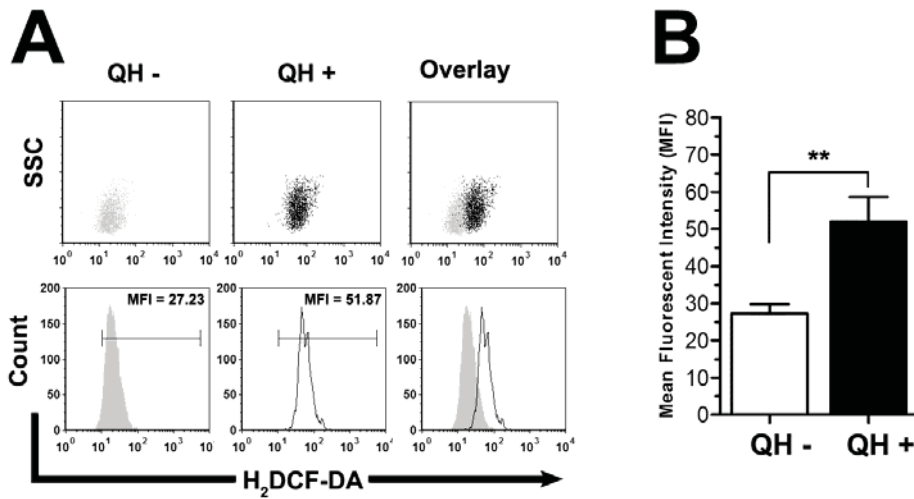
ผลการเสริมสารเคอร์ซิดินต่อการสร้าง Reactive Oxygen species (ROS) พบว่าเซลล์ที่ได้รับสารเคอร์ซิดิน (QH+) ถูกกระตุ้นและผลิต ROS ได้มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้รับสารเคอร์ซิดิน (QH-) โดยมีค่าเฉลี่ย Mean Fluorescent Intensity (MFI) \pm SE เท่ากับ 51.87 ± 6.73 และ 27.23 ± 2.48 ตามลำดับ ($p = 0.005$, รูปที่ 2) ผลการตรวจวัดจำนวนเฮเทอโรฟิลในกระบวนการเก็บกินเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่ย้อมสีฟลูออเรสเซนส์ พบเซลล์ในกลุ่ม QH +

(MFI = 174.20 ± 7.59) มีความสามารถในการเก็บกินลดลงเล็กน้อย เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่ม QH - (MFI = 179.80 ± 8.09) ผลการทดสอบทางสถิติมีค่า $p = 0.62$ (รูปที่ 3) การตรวจวัดการทำลายเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ที่มีชีวิตภายในเซลล์เฮเทอโรฟิลล์ ด้วยวิธี MTT bactericidal assay พบว่ากลุ่ม QH + มีเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 95.00 ± 2.13 และกลุ่ม QH - มีเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อแบคทีเรียเท่ากับ 91.62 ± 5.59 ($p=0.04$, รูปที่ 4A) ผลการทำลายเชื้อแบคทีเรียจากการตรวจสอบโดยการย้อมสี Wright Rapid Stain พบการเก็บกินเชื้อ *Salmonella* Enteritidis ของเซลล์ในกลุ่ม QH - และ QH + (รูปที่ 4B) ผลการตรวจสอบ

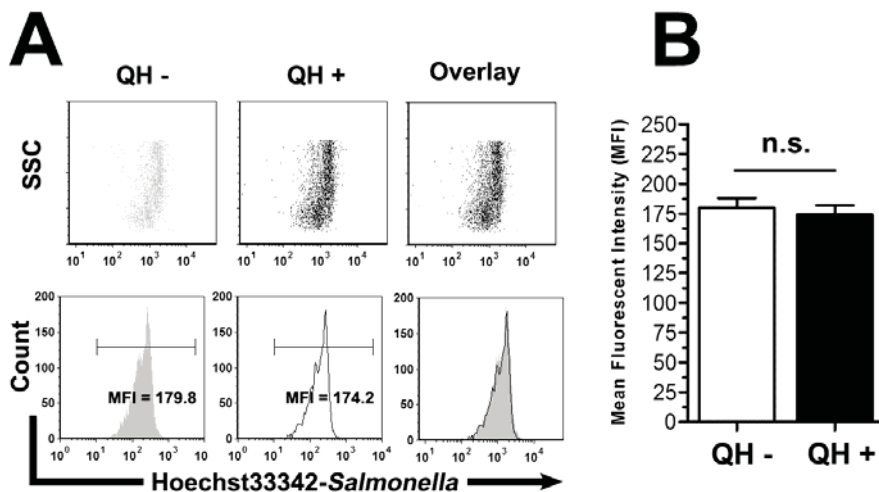
จำนวน heterophil extracellular traps (HETs) ที่เซลล์สร้างขึ้นภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วยสารเคอร์ซีติน หรือ PBS ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์ พบเซลล์เฮเทอโรฟิลล์ในกลุ่ม QH + มีการสร้าง HETs เป็นจำนวน 4.29 ± 0.74 HETs/field ซึ่งมีจำนวนมากกว่ากลุ่ม QH - (1.68 ± 0.46 HETs/field) การทดสอบทางสถิติมีค่า $p=0.007$ (รูปที่ 5A) ผลการประเมินภาพถ่ายจากกล้องฟลูออเรสเซนส์พบโครงสร้างของสารพันธุกรรม (DNA) ที่ย้อมติดสีภายในบริเวณโครงสร้างของ HETs ที่แผ่กระจายออกจากเซลล์ (รูปที่ 5B) และพบโครงสร้างในลักษณะเดียวกันนี้จากภาพถ่ายชนิด bright field (ภาพซ้อนบริเวณรูปที่ 5B)



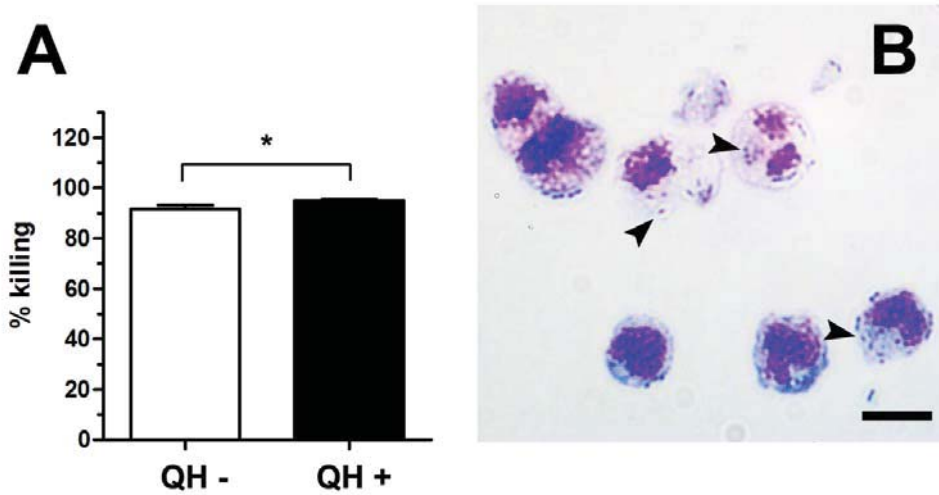
รูปที่ 1 แสดงข้อมูลเฮเทอโรฟิลล์ที่มีชีวิตภายหลังการทดสอบความเป็นพิษของสารเคอร์ซีติน (QH) กราฟแท่ง (bar graphs) แสดงจำนวนเปอร์เซ็นต์เซลล์มีชีวิตที่ความเข้มข้นของสาร QH ที่ 0, 12.5, 25, 50 และ 100 µM และทดสอบโดย MTT cytotoxicity test ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (Mean) \pm SE และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย 1-Way ANOVA จากข้อมูลตัวแทนผลการทดลองจำนวน 2 การทดลอง โดยมีจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 5 ในแต่ละการทดลอง (n.s. = not significant)



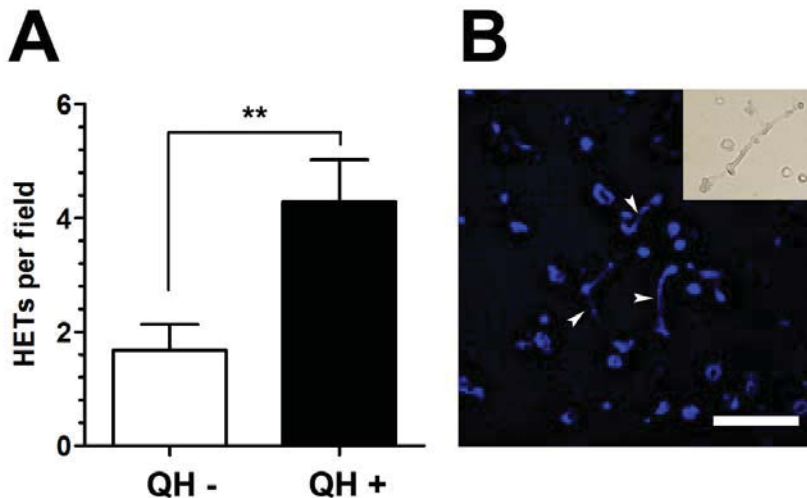
รูปที่ 2 แสดงผลของสารเคอร์ซิทิน (QH) ในการกระตุ้นการสร้าง Reactive Oxygen Species (ROS) ใน chicken heterophils (A) ข้อมูลจาก flow cytometry แบบ dot plots (แถวบน) และฮิสโตแกรม (แถวล่าง) แสดงเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับ QH (สีทึบ) และกลุ่มที่ได้รับ QH (สีโปร่ง) ที่ย้อมติดสี H₂DCF-DA เพื่อระบุโมเลกุล ROS ภายในเซลล์ (B) Bar graph เปรียบเทียบค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับ (กราฟโปร่ง) และได้รับสาร QH (กราฟทึบ) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ± SE และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย Unpaired *t* test with Welch's correction จากข้อมูลผลการทดลองจำนวน 3 การทดลอง โดยมีจำนวนตัวอย่าง ≥ 5 ในแต่ละการทดลอง (***p* < 0.01)



รูปที่ 3 แสดงผลของสารเคอร์ซิทิน (QH) ในการกระตุ้นกระบวนการ phagocytosis ใน chicken heterophils (A) ข้อมูลจาก flow cytometry แบบ dot plots (แถวบน) และฮิสโตแกรม (แถวล่าง) แสดงเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับ QH (สีทึบ) และกลุ่มที่ได้รับ QH (สีโปร่ง) ที่เกิด phagocytosis นำ Hoechst 33342-Salmonella Enteritidis เข้าสู่เซลล์ (B) Bar graph เปรียบเทียบค่า Mean Fluorescent Intensity (MFI) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับ (QH -) และได้รับสาร QH (QH +) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (Mean) ± SE และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย Unpaired *t* test จากข้อมูลผลการทดลองจำนวน 3 การทดลอง โดยมีจำนวนตัวอย่าง ≥ 5 ในแต่ละการทดลอง (n.s. = not significant)



รูปที่ 4 แสดงเปอร์เซ็นต์การทำลายเชื้อแบคทีเรียภายในเซลล์เฮเทอโรฟิล (A) โดย MTT bactericidal assay เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารเคอร์ซีดิน (QH + กราฟสีทึบ) มีเปอร์เซ็นต์การทำลายแบคทีเรียเพิ่มขึ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารเคอร์ซีดิน (QH – กราฟสีโปร่ง) ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (Mean) \pm SE และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย Unpaired t test with Welch's correction จากข้อมูลผลการทดลองจำนวน 3 การทดลอง โดยมีจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 5 ในแต่ละการทดลอง ($*p < 0.05$) (B) ภาพถ่ายจากเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายสูง 40X แสดงเฮเทอโรฟิลกลุ่มที่ได้รับสารเคอร์ซีดินที่เก็บกินแบคทีเรียชนิด *Salmonella* Enteritidis (หัวลูกศร) ย้อมสี Wright Rapid Stain แถบมาตราวัดขนาดเท่ากับ 10 μ m



รูปที่ 5 แสดงการสร้าง Heterophil Extracellular Traps (HETs) (A) Bar graphs เปรียบเทียบจำนวน HETs ระหว่างเซลล์กลุ่มที่ไม่ได้รับ (QH – กราฟสีโปร่ง) และได้รับสารเคอร์ซีดิน (QH + กราฟสีทึบ) พบจำนวน HETs เพิ่มขึ้นในกลุ่ม QH + ข้อมูลแสดงค่าเฉลี่ย (Mean) \pm SE และวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดย Unpaired t test จากข้อมูลผลการทดลองจำนวน 2 การทดลอง โดยมีจำนวนตัวอย่างเท่ากับ 5 ในแต่ละการทดลอง ($**p < 0.01$) (B) ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนส์แสดงโครงสร้าง HETs จากเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โครงสร้าง HETs ประกอบด้วยดีเอ็นเอที่ย้อมติดสีแฉ่ออกจากนิวเคลียส (หัวลูกศร) ภาพซ้อนแสดงโครงสร้าง HETs จากถ่ายภาพชนิด bright field ภาพ (B) ถ่ายจากเลนส์ใกล้วัตถุกำลังขยายต่ำ (10X) แถบมาตราวัดขนาดเท่ากับ 50 μ m

สรุปและวิจารณ์ผลการศึกษา

การทดลองในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของการเสริมสารเคอร์ซิตินต่อการตอบสนองของเซลล์เฮเทอโรฟิลของไก่ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิดเช่นเดียวกับเซลล์นิวโทรฟิล การศึกษาผลของสารเคอร์ซิตินในสัตว์ปีกที่เคยมีรายงานเป็นการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียด (stress) หรือการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญเติบโตและผลผลิต (Y. Liu et al., 2013; Rupasinghe et al., 2010) ทั้งนี้การศึกษาในแง่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันยังมีการศึกษาที่จำกัด โดยเฉพาะผลของสารเคอร์ซิตินต่อการกระตุ้นการทำหน้าที่ภายในเซลล์เฮเทอโรฟิลและการสร้าง heterophil extracellular traps (HETs) ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการทำลายเชื้อโรคนอกเซลล์

ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าสารเคอร์ซิตินที่ความเข้มข้น 50 μM ช่วยให้เกิดการสร้าง H_2O_2 (ROS) ในเซลล์เฮเทอโรฟิลเพิ่มขึ้น กระบวนการ oxidative burst เพื่อผลิตโมเลกุล ROS ของเฮเทอโรฟิลซึ่งเป็นเซลล์ที่ขาดเอนไซม์ myeloperoxidase (MPO) พบว่ามีระดับ ROS ภายในเซลล์ที่ต่ำมากเมื่อเปรียบเทียบกับนิวโทรฟิล (Wells et al., 1998) การกระตุ้นกลุ่มโปรตีนบริเวณ cytosolic subunits ของ $\text{p47}^{\text{phox}}/\text{p67}^{\text{phox}}/\text{p40}^{\text{phox}}$ complex ร่วมกับ $\text{gp91}^{\text{phox}}/\text{p22}^{\text{phox}}$ complex ซึ่งประกอบขึ้นเป็น NADPH oxidase (NOX) บริเวณถุงฟาโกโซม ส่งผลให้ NOX ทำหน้าที่เปลี่ยนออกซิเจน (O_2) ให้เป็น superoxide ion ($\text{O}_2^{\bullet-}$), hydrogen peroxide (H_2O_2), hydroxyl radicals (OH^{\bullet}) ซึ่งล้วนแล้วแต่เป็นองค์ประกอบของ ROS ทั้งสิ้น (Lambeth, 2004) การกระตุ้นการสร้าง ROS ช่องทางหนึ่ง คือ การส่งผ่านสื่อสัญญาณภายในเซลล์ผ่านทาง protein kinase C (PKC) ที่พบจากการกระตุ้นด้วย PMA ดังนั้นฤทธิ์ของเคอร์ซิตินที่เพิ่ม ROS ในเฮเทอโรฟิลอาจเกิดจากการกระตุ้นกลุ่มโปรตีน NOX หรือ PKC/Akt ได้ (Genovese et al., 2013; He et al., 2008; Piccoli et al., 2007) ข้อมูลการศึกษาเบื้องต้นของคณะผู้วิจัยที่ทำการศึกษา

ยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้าง ROS ในเซลล์เฮเทอโรฟิลโดยวิธี real-time PCR เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยเคอร์ซิตินพบระดับการแสดงออกของยีน NCF1 (p47^{phox}), NCF2 (p67^{phox}), NOX1, CYBB (NOX2), RAC2 และ SOD1 (superoxide dismutase) เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (PBS) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าสารเคอร์ซิตินช่วยเพิ่มระดับ ROS ในเซลล์เฮเทอโรฟิลได้

คุณสมบัติหนึ่งของสารเคอร์ซิตินมีผลในการยับยั้งกระบวนการอักเสบผ่านการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์นิวโทรฟิล (chemotaxis) ที่เข้ามายังบริเวณที่มีการอักเสบ โดยทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการจัดเรียงตัวของแอกติน (actin polymerization) และโมเลกุลยึดเกาะ (adhesion molecules) ที่เกี่ยวข้อง ทำให้ความสามารถในการเคลื่อนที่และการผ่านผนังหลอดเลือดของเซลล์ลดลง (Souto et al., 2011; Suri et al., 2008) นอกจากการยับยั้งกระบวนการข้างต้นแล้ว กระบวนการเก็บกินและการหลอมรวมกันของฟาโกโซมและไลโซโซม (phagosome/lysosome fusion) ตลอดจนการปล่อยแกรนูโลมมาทำลายเชื้อโรคงอาจได้รับผลจากการสูญเสียความสามารถในการจัดเรียงตัวของแอกติน

ผลการศึกษาเกี่ยวกับการทำลายเชื้อโรคนอกเซลล์โดย heterophil extracellular traps (HETs) ที่พบว่าเฮเทอโรฟิลเมื่อได้รับสารเคอร์ซิตินมีการปล่อยโครงสร้าง HETs มากขึ้นนั้นอาจเป็นผลที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง ROS ที่เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ทั้งนี้จากการศึกษาของ Ermert et al., 2009 เกี่ยวกับ neutrophil extracellular traps (NETs) ในหนูทดลองที่พบความสัมพันธ์ของการสร้าง ROS และประสิทธิภาพของการสร้าง NETs เนื่องจากหนูที่ขาดโปรตีนองค์ประกอบของ NOX เช่น gp91 ($\text{gp91}^{-/-}$) หรือ $\text{p47}^{\text{phox}}^{-/-}$ ไม่สามารถสร้าง NETs ได้ (Ermert et al., 2009; Röhm et al., 2014) โดยอาจอธิบายได้ว่าการสร้าง ROS กระตุ้นสื่อสัญญาณในเซลล์ เช่น PKC และเพิ่มการผลิต ROS ซึ่งส่งผลต่อเนื่องในการกระตุ้นให้มีการสร้างโครงสร้าง Extracellular

Traps (ETs) เซลล์เฮเทอโรฟิลของไก่ขาดเอนไซม์ MPO ที่ส่งผลต่อการผลิต oxidative burst โดยเฉพาะ H_2O_2 และ hypochlorous acid (HOCl) ที่มีปริมาณน้อยมาก (Genovese et al., 2013; Wells et al., 1998) การสร้าง HETs ที่เพิ่มมากขึ้นเป็นการใช้ประโยชน์จากการทำลายเชื้อโรคแบบไม่อาศัยกระบวนการออกซิเดชัน (nonoxidative microbial mechanism) ซึ่งทดแทนการทำลายเชื้อโรคโดยอาศัย MPO และอนุพันธ์อื่นของ ROS ที่ขาดในเฮเทอโรฟิลของไก่ การที่สารเคอร์ซีตินกระตุ้นให้ผลิต HETs เพิ่มขึ้นจึงน่าจะเป็นประโยชน์ในการช่วยจับและทำลายเชื้อแบคทีเรียได้

โดยสรุปการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นถึงผลของสารเคอร์ซีตินต่อเซลล์เฮเทอโรฟิลในไก่ โดยที่สารเคอร์ซีตินสามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง ROS ซึ่งเป็นกระบวนการทำลายเชื้อโรคภายในเซลล์ที่เพิ่มจากการสร้างโมเลกุล ROS ที่เพิ่มขึ้นยังเกี่ยวข้องกับกระบวนการทำลายเชื้อโรคนอกเซลล์ (HETs) ให้ทำหน้าที่ได้ดีขึ้นด้วย สำหรับกระบวนการเก็บกินเชื้อโรคและการทำลายเชื้อภายในเซลล์นั้นยังไม่สามารถสรุปได้ว่าการเสริมสารเคอร์ซีตินจะส่งผลดีหรือผลเสียที่ชัดเจน ทั้งนี้ยังคงต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความชัดเจนยิ่งขึ้น ก่อนนำสารเคอร์ซีตินนี้ไปประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้โดยได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รหัสโครงการ R000009071 คณะผู้วิจัยขอขอบคุณคุณสินีนาด สันติธีรากุล ศูนย์เครื่องมือวิจัยทางวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่อำนวยความสะดวกในตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างเซลล์โดย Flow cytometry

References

Alzoreky, N., & Nakahara, K. (2003). Antibacterial activity of extracts from some edible plants commonly

consumed in Asia. *International Journal of Food Microbiology*, 80(3), 223-230.

- Arima, H., Ashida, H., & Danno, G.-i. (2002). Rutin-enhanced antibacterial activities of flavonoids against *Bacillus cereus* and *Salmonella enteritidis*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 66(5), 1009-1014.
- Boots, A. W., Haenen, G. R., & Bast, A. (2008). Health effects of quercetin: from antioxidant to nutraceutical. *European Journal of Pharmacology*, 585(2), 325-337.
- Brinkmann, V., Reichard, U., Goosmann, C., Fauler, B., Uhlemann, Y., Weiss, D. S. (2004). Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*, 303(5663), 1532-1535.
- Brooks, R. L., Bounous, D. I., & Andreasen, C. B. (1996). Functional comparison of avian heterophils with human and canine neutrophils. *Comparative Haematology International*, 6(3), 153-159.
- Chan, S.-T., Chuang, C.-H., Yeh, C.-L., Liao, J.-W., Liu, K.-L., Tseng, M.-J. (2012). Quercetin supplementation suppresses the secretion of pro-inflammatory cytokines in the lungs of Mongolian gerbils and in A549 cells exposed to benzo [a] pyrene alone or in combination with β -carotene: *in vivo* and *ex vivo* studies. *The Journal of Nutritional Biochemistry*, 23(2), 179-185.
- Chuammitri, P., Ostojic, J., Andreasen, C. B., Redmond, S. B., Lamont, S. J., & Palić, D. (2009). Chicken heterophil extracellular traps (HETs): Novel defense mechanism of chicken heterophils. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 129(1-2), 126-131.
- Chuammitri, P., Redmond, S. B., Kimura, K., Andreasen, C. B., Lamont, S. J., & Palić, D. (2011). Heterophil functional responses to dietary immunomodulators vary in genetically distinct chicken lines. *Veterinary Immunology and*

- Immunopathology*, 142(3), 219-227.
- Cushnie, T., & Lamb, A. J. (2005). Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 26(5), 343-356.
- Das, T., Mukherjee, S., & Chaudhuri, K. (2012). Effect of quercetin on *Vibrio cholerae* induced nuclear factor-**κ**B activation and interleukin-8 expression in intestinal epithelial cells. *Microbes and Infection*, 14(9), 690-695.
- Ermert, D., Urban, C. F., Laube, B., Goosmann, C., Zychlinsky, A., & Brinkmann, V. (2009). Mouse neutrophil extracellular traps in microbial infections. *Journal of Innate Immunity*, 1(3), 181-193.
- Genovese, K. J., He, H., Swaggerty, C. L., & Kogut, M. H. (2013). The avian heterophil. *Developmental & Comparative Immunology*, 41(3), 334-340.
- He, H., Farnell, M. B., & Kogut, M. H. (2003). Inflammatory agonist stimulation and signal pathway of oxidative burst in neonatal chicken heterophils. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*, 135(1), 177-184.
- He, H., Genovese, K. J., Swaggerty, C. L., Nisbet, D. J., & Kogut, M. H. (2008). Differential induction of nitric oxide, degranulation, and oxidative burst activities in response to microbial agonist stimulations in monocytes and heterophils from young commercial turkeys. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 123(3-4), 177-185.
- Kim, H. P., Son, K. H., Chang, H. W., & Kang, S. S. (2004). Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. *Journal of Pharmacological Sciences*, 96(3), 229-245.
- Lambeth, J. D. (2004). NOX enzymes and the biology of reactive oxygen. *Nature Reviews Immunology*, 4(3), 181-189.
- Liu, J., Li, X., Yue, Y., Li, J., He, T., & He, Y. (2005). The inhibitory effect of quercetin on IL-6 production by LPS stimulated neutrophils. *Cellular & Molecular Immunology*, 2(6), 455-460.
- Liu, Y., Li, Y., Liu, H., Suo, Y., Hu, L., Feng, X. (2013). Effect of quercetin on performance and egg quality during the late laying period of hens. *British Poultry Science*, 54(4), 510-514.
- Piccoli, C., D'Aprile, A., Ripoli, M., Scrima, R., Lecce, L., Boffoli, D. (2007). Bone-marrow derived hematopoietic stem/progenitor cells express multiple isoforms of NADPH oxidase and produce constitutively reactive oxygen species. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 353(4), 965-972.
- Röhm, M., Grimm, M. J., D'Auria, A. C., Almyroudis, N. G., Segal, B. H., & Urban, C. F. (2014). NADPH oxidase promotes neutrophil extracellular trap formation in pulmonary aspergillosis. *Infection and Immunity*, 82(5), 1766-1777.
- Rupasinghe, H. P. V., Ronalds, C. M., Rathgeber, B., & Robinson, R. A. (2010). Absorption and tissue distribution of dietary quercetin and quercetin glycosides of apple skin in broiler chickens. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 90(7), 1172-1178.
- Souto, F. O., Zarpelon, A. C., Staurenngo-Ferrari, L., Fattori, V., Casagrande, R., Fonseca, M. J. (2011). Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization. *Journal of Natural Products*, 74(2), 113-118.
- Suri, S., Taylor, M. A., Verity, A., Tribolo, S., Needs, P. W., Kroon, P. A. (2008). A comparative study of the effects of quercetin and its glucuronide and sulfate metabolites on human neutrophil function *in vitro*. *Biochemical Pharmacology*, 76(5), 645-653.

- Temrangsee, P., Kondo, S., & Itharat, A. (2011). Antibacterial activity of extracts from five medicinal plants and their formula against bacteria that cause chronic wound infection. *Journal of the Medical Association of Thailand*, 94(12), S166-171.
- Wells, L. L., Lowry, V. K., Deloach, J. R., & Kogut, M. H. (1998). Age-dependent phagocytosis and bactericidal activities of the chicken heterophil. *Developmental & Comparative Immunology*, 22(1), 103-109.

Effects of quercetin on chicken heterophil cellular functions

Panupong Nojit¹, Jiraded Ampaipun¹, Phongsakorn Chuammitri^{2,*}

¹The 6th year veterinary student, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

²Paraclinical Sciences Unit, Department of Veterinary Biosciences and Public Health, Faculty of Veterinary Medicine, Chiang Mai University

Abstract Chicken heterophils responds to microbial invasions by utilizing innately equipped-intracellular and extracellular killing mechanisms. The objective of this research was to study the effects of quercetin (QH) on chicken heterophil effector functions, namely; ROS generation, phagocytosis & bacterial killing, and Heterophil Extracellular Traps (HETs). To conduct the experiments, BM-derived heterophils were first primed with 50 μ M QH for 30 min and subsequently stimulated with PMA. The results showed that ROS molecules were remarkably increased in QH-primed group ($p=0.005$) whereas quercetin slightly suppressed phagocytosis of fluorescent labeling of *Salmonella* Enteritidis (SE) ($p=0.62$). Supplementation of quercetin aided heterophils in killing of live SE more efficiently than PBS ($p=0.04$). Extracellular killing was assessed by enumeration of HETs. The observation of HET structures obviously revealed that the QH-primed cells had note worthy HET-DNA release ($p=0.007$). Taken together, 50 μ M of quercetin supplementation enhances functional activities of heterophils in the killing of bacteria.

Keywords: chicken heterophil, quercetin, cellular functions
