MOLECULARLY TOXICOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES OF NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*, LINNAEUS) TO SILVER NANOPARTICLE INDUCTION

KUBPAPHAS THUMMABANCHA 5136170 SCTX/D

Ph.D. (TOXICOLOGY)

THESIS ADVISORY COMMITTEE: NUTTAPHON ONPARN, Ph.D., KRONGTONG YOOVATHAWORN, Ph.D., PRAPANSAK SRISAPOOME, Ph.D.

ABSTRACT

Nile tilapia thioredoxin-interacting protein (*On*-TXNIP) and selenoprotein P (*On*-SEPP) cDNAs were cloned and characterized. The full-length cDNA of *On*-TXNIP cDNA was 2,260 bp and consisted of 116 bp of 5' untranslated region (UTR), 1,188 bp of open reading frame (ORF) (equal to 396 amino acid residues), 925 bp of 3'UTR and 28 bp of a poly A tail. The calculated theoretical isoelectric point (p*I*) and molecular weight (MW) of *On*-TXNIP were 7.81 and 43.95 kDa, respectively. The full-length cDNA of *On*-SEPP was 2,427 bp and consisted of 99 bp of 5'UTR, 1,239 bp of ORF (equal to 413 amino acid residues), 1,086 bp of 3'UTR, and 29 bp of a poly A tail. The calculated p*I* and MW of *On*-SEPP were 6.27 and 46.36 kDa, respectively. Evolutionary analyses of both the *On*-TXNIP and *On*-SEPP genes revealed that these genes were closely related to the TXNIP and SEPP genes in zebrafish (*Danio rerio*). A normal tissue distribution analysis indicated that the *On*-TXNIP and *On*-SEPP genes were ubiquitously expressed in all tissues examined, and the highest expression levels of these genes were observed in peripheral blood leukocytes (PBLs) and the trunk kidney, respectively. The expression analysis of cellular stress response genes using real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT PCR) in fish acutely and chronically exposed to 1, 10 and 100 mg Ag NPs/kg fish by intraperitoneal (i.p.) injection revealed that significant up-regulation of *On*-TXNIP and *On*-SEPP transcripts was in the liver, spleen, and head kidney at the early phase of Ag NP exposure (hours 6 through 48). Down-regulation of *On*-SEPP transcripts was clearly observed in the liver at weeks 1 to 4. The statistically up-regulated *On*-HSP40B9, *On*-HSP90α and *On*-HSP90β transcripts were observed in all tested tissues of fish exposed to Ag NPs at hours 6 and 12 and down-regulated *On*-HSP70 and *On*-MT genes were found in the liver at hours 6 to 48. Histopathological analysis demonstrated that the fish livers exhibited a dramatic infiltration of Kupffer cells, elevated bi-nucleated cells, expanded sinusoidal blood congestion and severe necrosis in a dose-dependent manner. Thickening of the capsule layer of the spleen was a predominant indicator of chronic Ag NP exposure under i.p. induction. Innate and adaptive immunological responses and hematological parameters of fish exposed to various doses of Ag NPs revealed that phagocytic activity, amounts of red blood cells (RBCs) and the percentage of hematocrit (%Hct) significantly decreased at week 1 after exposure. However, amounts of white blood cells (WBCs) were not significantly changed at all-time exposure ($P>0.05$). Additionally, antibody titer of fish immunized with *Streptococcus agalactiae* vaccine and simultaneously exposed to Ag NPs at 10 and 100 mg/kg were found to effectively decrease at only early phase. Finally, in the challenge test, all vaccinated fish with Ag NPs-exposed groups were still protected against *S. agalactiae* infection. Based on these findings, the expression analysis of cellular stress response genes, histopathological observation, and compromising of innate immune response of fish exposed to Ag NPs could be reliable for the assessment of Ag NP contamination in teleost fish.

KEY WORDS: NILE TILAPIA / CELLULAR STRESS RESPONSES / GENE EXPRESSION / SILVER NANOPARTICLES / IMMUNOLOGICAL RESPONSES

120 pages

การตอบสนองทางพิษวิทยาและภูมิคุ้มกันวิทยาระดับโมเลกุลของปลานิลที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยอนุภาคนาโนของธาตุเงิน
MOLECULARLY TOXICOLOGICAL AND IMMUNOLOGICAL RESPONSES OF NILE TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*, LINNAEUS) TO SILVER NANOPARTICLE INDUCTION

กัปภาส ธรรมบัญชา 5136170 SCTX/D

ปร.ด. (พิษวิทยา)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์: ณัฐพล อ่อนปาน, Ph.D., กรองทอง ยุวถาวร, Ph.D., ประพันธ์ศักดิ์ ศีรษะภูมิ, Ph.D.

บทคัดย่อ

ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ Complementary DNA (cDNA) ของยีน Thioredoxin-interacting protein (*On*-TXNIP) และ selenoprotein P (*On*-SEPP) ในปลานิลได้ถูกโคลนเพื่อศึกษาคุณลักษณะโครงสร้างโปรตีน ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการและการแสดงออกภายใต้สภาวะต่าง ๆ โดยพบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน *On*-TXNIP มีความยาวเท่ากับ 2,260 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่ง 5’ Untranslated region (UTR) ยาวเท่ากับ 116 คู่เบส ตำแหน่ง Open reading frame (ORF) ยาวเท่ากับ 1,188 คู่เบส (เท่ากับลำดับกรดอะมิโน 396 หน่วย) ตำแหน่ง 3’ UTR ยาวเท่ากับ 925 คู่เบส และตำแหน่ง poly A tail ยาวเท่ากับ 28 คู่เบส ค่าไอโซอิเล็กทริก (p*I*) และน้ำหนักโมเลกุล (MW) ของ *On*-TXNIP ที่คำนวณได้เท่ากับ 7.81 และ 43.95 กิโลดาลตัน ตามลำดับ ขณะที่ลำดับนิวคลีโอไทด์ทั้งหมดของ cDNA ของยีน *On*-SEPP มีความยาวเท่ากับ 2,427 คู่เบส ซึ่งประกอบด้วยตำแหน่ง 5’ UTR ยาวเท่ากับ 99 คู่เบส ตำแหน่ง ORF ยาวเท่ากับ 1,239 คู่เบส (เท่ากับลำดับกรดอะมิโน 413 หน่วย) ตำแหน่ง 3’ UTR ยาวเท่ากับ 1,086 คู่เบส และตำแหน่ง poly A tail ยาวเท่ากับ 29 คู่เบส ค่าไอโซอิเล็กทริกและน้ำหนักโมเลกุลของ *On*-SEPP ที่คำนวณได้เท่ากับ 6.27 และ 46.36 กิโลดาลตัน ตามลำดับ การวิเคราะห์ความสัมพันธ์เชิงวิวัฒนาการเผยให้เห็นว่า ยีนทั้ง 2 ชนิดนี้มีความสัมพันธ์ใกล้ชิดกับยีน TXNIP และยีน SEPP ในปลาม้าลาย (*Danio rerio*) มากที่สุด การวิเคราะห์การแสดงออกของทั้ง 2 ยีนนี้ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ ของปลานิลปกติ แสดงให้เห็นว่า มีการแสดงออกของยีนทั้ง 2 นี้ในทุก ๆ อวัยวะที่นำมาตรวจสอบ ซึ่งพบการแสดงออกสูงสุดในเม็ดเลือดขาวที่ไหลเวียนอยู่ในกระแสโลหิตและไตส่วนหลังตามลำดับ การศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดระดับเซลล์โดยใช้เทคนิค Real-time reverse transcription polymerase chain reaction (real-time RT PCR) ในปลานิลที่ได้รับอนุภาคนาโนของธาตุเงิน (Ag NPs) ที่ 1 10 และ 100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง ในสภาพเฉียบพลันและเรื้อรัง เผยให้เห็นว่ามีการเพิ่มการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญของยีน *On*-TXNIP และยีน *On*-SEPP ในตับ ม้ามและไตส่วนหน้าของปลานิลที่ได้รับอนุภาคนาโนของธาตุเงินในระยะแรก (ชั่วโมงที่ 6-48) ขณะที่มีการลดการแสดงออกของยีน *On*-SEPP ในตับที่สัปดาห์ที่ 1 ถึง 4 และมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของยีน *On*-HSP40B9, *On*-HSP90α และ *On*-HSP90β ในทุกเนื้อเยื่อทดสอบของปลานิลที่ได้รับ Ag NPs ที่ชั่วโมงที่ 6 และ 12 และมีการลดการแสดงออกของยีน *On*-HSP70 และ *On*-MT ในตับที่ชั่วโมงที่ 6 ถึง 48 การวิเคราะห์พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับของปลานิลแสดงให้เห็นว่ามีการแทรกผ่านของ Kupffer cells อย่างเด่นชัด มี Bi-nucleated cells เพิ่มสูงขึ้น มีการคั่งของเลือดบริเวณ Sinusoid และมีการตายของเนื้อเยื่อตับสัมพันธ์กับปริมาณของอนุภาคนาโนของธาตุเงินที่ได้รับ นอกจากนี้ยังพบว่าพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อม้ามบริเวณชั้น Capsule layer หนาขึ้น ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดที่ชัดเจนของการได้รับสัมผัสกับอนุภาคนาโนของธาตุเงินอย่างเรื้อรังโดยการฉีดเข้าทางช่องท้อง การศึกษาการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงและแบบจำเพาะเจาะจง รวมทั้งการวิเคราะห์ค่าพารามิเตอร์ของโลหิตวิทยาในปลานิลที่ได้รับอนุภาคนาโนของธาตุเงินที่ปริมาณต่าง ๆ แสดงให้เห็นว่า ค่ากิจกรรมการกลืนกินสิ่งแปลกปลอมโดยกระบวนการ Phagocytosis ปริมาณของเม็ดเลือดแดงและเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริตมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่สัปดาห์ที่ 1 แต่อย่างไรก็ตาม ปริมาณของเม็ดเลือดขาวไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญที่ทุกช่วงเวลาของการทดลอง (P>0.05) นอกจากนี้ เมื่อปลานิลที่ได้รับวัคซีนเชื้อตายของ *Streptococcus agalactiae* และได้รับอนุภาคนาโนของธาตุเงินควบคู่กันที่ 10 และ100 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม พบว่ามีค่าไตเตอร์ของแอนติบอดีลดลงในช่วงแรก และเมื่อทำการฉีดเชื้อ *S. agalactiae* พบว่า ปลาที่ได้รับวัคซีนในกลุ่มที่ได้รับอนุภาคนาโนของธาตุเงินยังคงมีความคุ้มโรคในการต่อต้านการติดเชื้อ จากการค้นพบในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อความเครียดระดับเซลล์ พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่ลดลงในปลานิลที่ได้รับอนุภาคนาโนของธาตุเงิน มีความน่าเชื่อถือสำหรับใช้ในการเป็นดัชนีเพื่อการประเมินการปนเปื้อนของอนุภาคนาโนของธาตุเงินในปลากระดูกแข็ง

120 หน้า