

การศึกษาพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆของหนูขาวที่ถูกให้
สารพิษที่สร้างจากเชื้อราพวกแอสเปอร์จิลลัส ไนเกอร์



นางสาวกานดา รมรื่น

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญา เกษศาสตรมหาบัณฑิต

แผนกวิชาสารีรวิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. ๒๕๒๑

000107

HISTOPATHOLOGIC STUDIES ON VARIOUS ORGANS OF RATS TREATED WITH
THE CRUDE TOXINS PRODUCED BY REPRESENTATIVE STRAINS OF
ASPERGILLUS NIGER

Miss Kanda Romruen

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Pharmacy
Department of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1978

Thesis Title: Histopathologic Studies on Various Organs of Rats
Treated with the Crude Toxins Produced by Repres-
entative Strains of *Aspergillus niger*.

By: Miss Kanda Romruen

Department: Physiology

Thesis Advisor: Assistant Professor Dr. Thirayudh Glinsukon

Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University
in partial fulfillment of the requirements for the Master's degree

Visit Prachuabmoh Dean of Graduate School
(Professor Dr. Visit Prachuabmoh, Ph.D.)

Thesis Committee

Chumnong Visutasunthorn Chairman
.....
(Assistant Professor Chumnong Visutasunthorn, M.S.)

T. Glinsukon Member
.....
(Assistant Professor Dr. Thirayudh Glinsukon, D.Sc.)

S. Angsubhakorn Member
.....
(Assistant Professor Dr. Subhkij Angsubhakorn, D.V.M., M.S.)

Supanee Somboontham Member
.....
(Archarn Supanee Somboontham, M.S.)

Thesis Title: Histopathologic Studies on Various Organs of Rats Treated with the Crude Toxins Produced by Representation Strains of *Aspergillus niger*

Name: Miss Kanda Romruen

Thesis Advisor Assistant Professor Dr. Thirayudh Glinsukon

Department: Physiology

Academic Year: 1977



ABSTRACT

A crude toxin was prepared according to a modified method of Glinsukon and co-workers (1973). In this method, the moldy glutinous rice that inoculated with the representative strain of *A. niger* was extracted with chloroform, filtrate, dry *in vacuo* and precipitated against petroleum ether. The crude toxin (petroleum ether insoluble, 1.09 g/kg rice) and oily residue (petroleum ether soluble, 6.11 ml/kg rice) were obtained by filtration. Acute toxicity tests were done by giving the crude toxin (i.p.) and oily residue (p.o.) to weanling female rats (35-45 g BW). Dose of the crude toxin was equivalent to 50.0, 25.0, 12.5 or 6.25 g moldy rice, whereas oily residue was given at a maximum volume of 1.0 ml/rat. It was found that 25 out of 36 tested crude toxins and 15 out of 40 tested oily residues were proved to be toxic to the rats. After administration, some of the rats died within a few hours and some of them manifested the convulsions. Some of the rats died slowly within 2-3 days after toxin administration. Histopathologic

changes were observed mostly in the kidney with necrosis of the tubular epithelium, glomerular nephrosis and marked dilatation of the convoluted tubules. Minor histopathologic changes were observed in liver of the rats treated with PEI and revealed acidophilic degeneration, irregularity in nuclear sizes, necrosis of the bile duct cells and an increase in mitotic figures. However, severe centrilobular necrosis and midzonal hydropic degeneration of the hepatic cells of livers in the rats treated with PES. The interested crude toxin was further purified into various fractions to find out the active ingredient in experimental animals. In this experiment, column and thin layer chromatography were used.

ชื่อหัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาพยาธิสภาพของอวัยวะต่างๆของหนูขาว ที่ถูกให้สารพิษที่สร้างจากเชื้อราพวก <u>แอสเพอร์จิลลัส</u> <u>ไนเกอร์</u>
ชื่อนิสิต	นางสาวกานดา ร่มรื่น
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์
แผนกวิชา	สรีรวิทยา
ปีการศึกษา	๒๕๒๐

บทคัดย่อ



สารพิษจากเชื้อราได้เตรียมตามวิธีการของนายธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์และผู้ร่วมงาน (๑๙๗๓) วิธีการเตรียมนี้ทำได้โดยการเอาข้าวเหนียวที่หุงแล้ว และมีเชื้อราพวกแอสเพอร์จิลลัส ไนเกอร์ ขึ้นอยู่มากักด้วยโคลโรฟอร์ม แล้วกรองและทำให้แห้งจากโคลโรฟอร์ม จากนั้นก็นำมาตกตะกอนในปิโตเลียม อีเทอร์ ได้ส่วนที่เป็นตะกอน (๑.๐๘ ก/กก.ข้าวเหนียว) และส่วนที่เป็นน้ำมัน (๖.๑๑ มล/กก.ข้าวเหนียว) จากนั้นนำส่วนที่เป็นตะกอนและส่วนที่เป็นน้ำมันมาทดสอบหาความเป็นพิษในหนูแรทตัวเมียที่เพิ่งหย่านมใหม่ๆ (๓๕-๔๕ ก.) ปริมาณของส่วนที่เป็นตะกอนนำมาให้กับหนูแรทนั้นเทียบได้เท่ากับข้าวที่มีเชื้อราขึ้นอยู่ ๒๕ ก./หนูหนึ่งตัว สำหรับส่วนที่เป็นน้ำมันนั้นได้ให้หนูขาวในปริมาณมากที่สุด ๑.๐ มล/ตัว จากการทดลองพบว่าส่วนที่เป็นตะกอน ๒๕ ตัวจากเชื้อรา ๓๗ ตัว ทำให้เกิดพิษอย่างรุนแรงแก่หนูขาว ในส่วนที่เป็นน้ำมันก็พบว่าสามารถทำให้เกิดพิษอย่างรุนแรงแก่หนูขาวได้เช่นเดียวกันใน ๑๕ ตัวจากเชื้อรา ๔๐ ตัว ภายหลังจากการให้สารพิษแก่หนูขาวแล้วพบว่า หนูขาวส่วนใหญ่จะตายภายในเวลา ๒-๓ ชม. และหนูขาวยังแสดงอาการชักอีกด้วย แต่มีสารพิษบางตัวที่ทำให้หนูขาวตายได้ในเวลา ๒-๓ วัน การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพนั้นพบมากในไต ซึ่งเป็นการตายของเซลล์ที่บุท่อไตเป็นส่วนใหญ่ เซลล์ของโคลเมออร์รูลัสและ

การขยายของท่อไตชนิดต่างๆ สำหรับตั้บนั้นมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพ
น้อยมาก ได้แก่ตัวเซลล์ที่ย้อมติดสีแอซิดโคฟิลลิก ขนาดของนิวเคลียสต่างกัน
การตายของเซลล์ของท่อน้ำดีเป็นต้น ได้นำสารพิษจากเชื้อราที่น่าสนใจบาง
ตัวมาแยกเป็นส่วนๆ เพื่อหาสารบริสุทธิ์ที่ทำให้เกิดพิษในสัตว์ทดลอง โดยใช้
คอลัมน์ และทินแลร์ โคลมาโตกราฟีเป็นหลัก



ACKNOWLEDGEMENTS

I would like to express my sincere gratitude and deepest appreciation to:

Assistant Professor Dr. Thirayudh Glinsukon of Department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University for his continuous supervision, guidance, valuable advice and his encouragement, which has enable me to carry on this study successfully.

Assistant Professor Chumnong Visutasunthorn, head department of Physiology, Faculty of Pharmaceutical Science, Chulalongkorn University, for his valuable advice and allowing me the opportunity to carry on this study.

Assistant Professor Dr. Somphong Sahaphong, head department of Pathobiology, and Assistant Professor Dr. Liangchai Limlomwongse, head department of Physiology, Faculty of Science, Mahidol University for their valuable suggestions and permission in conducting this study.

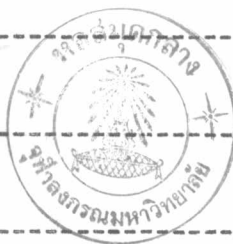
Assistant Professor Dr. Subhkij Angsubhakorn for his valuable suggestion, encourage, advise and use of the instruments, and Assistant Professor Dr. Witaya Thamavit for his valuable suggestion in preparing the photographs. Dr. Vinita Boriraj and Mrs. Supanee Somboontham for their valuable advices.

Mrs. Kosoom Vongthai for her excellent typing.

Finally, I would like to thank to Mr. Chalerm Jitprasop, Mrs. Pranee Jitprasop and Mr. Suresak Karnchanasatid for proficient technical assistance and preparing paraffin sections.

TABLE OF CONTENT

	Page
ENGLISH ABSTRACT -----	iv
THAI ABSTRACT -----	vi
ACKNOWLEDGEMENTS -----	viii
TABLE OF CONTENT -----	ix
LIST OF TABLES -----	x
LIST OF FIGURES -----	xii
INTRODUCTION -----	1
MATERIALS AND METHODS -----	6
RESULTS -----	14
DISCUSSION -----	49
REFERENCES -----	55
APPENDIX -----	60
VITAE -----	71



LIST OF TABLES

	Page
Table 1 Production of the crude toxin by various strains of <i>A. niger</i> on glutinous rice for 14 days at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ --	15
Table 2 Production of the crude toxin by the fungal isolates from other species on glutinous rice for 14 days at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ -----	16
Table 3 Production of the PES by various strains of <i>A. niger</i> on glutinous rice for 14 days at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ -----	17
Table 4 Production of the PES by the fungal isolates from other species on glutinous rice for 14 days at $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ -----	19
Table 5 Content of aflatoxin in the crude toxins produced by various strains of <i>A. niger</i> and other species---	20
Table 6 Content of oxalate in the crude toxins produced by various strains of <i>A. niger</i> and other species---	21
Table 7 Acute toxicity of the crude toxins produced by various strains of <i>A. niger</i> on weanling female rats given ip. -----	23
Table 8 Acute toxicity of the crude toxins produced by various strains of other species on weanling female rats given ip. -----	24
Table 9 Acute toxicity of the PES produced by various strains of <i>A. niger</i> on weanling female rats given po. -----	25

Table 10	Acute toxicity of the PES produced by various strains of other species on weanling female rats given po. -----	27
Table 11	Summary of the possible target organs of weanling female rats treated with the lethal dose of the crude toxin from <i>A. niger</i> -----	30
Table 12	Summary of the possible target organs of weanling female rats treated with the lethal dose of the crude toxin and PES from <i>A. niger</i> and other strains -----	31



LIST OF FIGURES

Figure 1	Kidney of weanling female rat died on the second day after ip administration of PEI (25.0 g moldy rice) produced by <i>A. niger</i> (AN-004-75)-----	32
Figure 2	Liver of weanling female rat died on the first day after po administration of PES (0.9 ml/rat) produced by <i>A. niger</i> (AN-010-75) -----	34
Figure 3	Kidney of weanling female rat died on the first day after ip administration of PEI (12.5 g moldy rice) produced by <i>A. niger</i> (AN-008-75) -----	35
Figure 4	Kidney of weanling female rat died on the first day after po administration of PES (1.0 ml/rat) produced by <i>A. niger</i> (AN-034-75)-----	37
Figure 5	Kidney of weanling female rat died on the first day after ip administration of PEI (12.5 g moldy rice) or partial purified PEI produced by <i>A. niger</i> (AN-A30-75) -----	38
Figure 6	Liver of weanling female rat died on the second day after po administration of PES (0.4 ml/rat) produced by <i>A. candidus</i> (AC-023-75) -----	40
Figure 7	Kidney of weanling female rat died on the second day after po administration of PES (0.4 ml/rat) produced by <i>A. candidus</i> (AC-023-75) -----	41
Figure 8	Kidney of weanling female rat died on the first day after po administration of PES (1.0 ml/rat) produced by <i>A. fumigatus</i> (AFU-007-75) -----	43

Figure 9	Kidney of weanling female rat sacrificed on the seventh day after po administration of PES (1.0 ml/rat) produced by <i>A. nidulan</i> (AND-005-75) -----	44
Figure 10	Compound in crude toxin and various fraction of volume eluate -----	45
Figure 11	LD ₅₀ of potassium oxalate and crude toxin from AN-A30-75 -----	48