

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

ปัญหาพิเศษ

เรื่อง

ความเป็นพิษของ Microcystin-LR ใน ปลาอุกกลมผสม

Toxicity of the Microcystin-LR in hybrid catfish (*C.macrocephalus x C.gariepinus*)

โดย

นางสาวดารินทร์ แดงฤทธิ



T104666

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

กรุงเทพมหานคร 10520

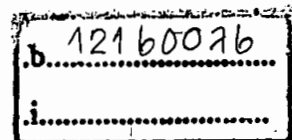
ปีการศึกษา 2551

รฟ.
๑๕๒๙๑
๑๕๕๐

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....
วันเดือนปี.....

1046664

5 พ.ย. 2552



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ใบรับรองปัญหาพิเศษ
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

เรื่อง

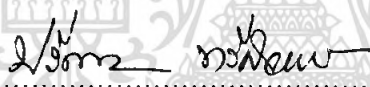
ความเป็นพิษของ Microcystin-LR ใน ปลาอุกลูกผสม
Toxicity of the Microcystin-LR in hybrid catfish (*C.macrocephalus x*
C.gariepinus)

นางสาวดารินทร์ แดงฤทธิ์

ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ

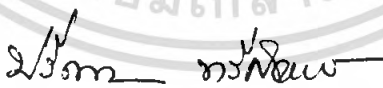
ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษา.....



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปวีณา ทวีกิจการ)

ภาควิชารับรองแล้ว



(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ)

หัวหน้าภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมง

วันที่ ๒๐ เดือน พ.ค. พ.ศ. ๒๕๖๗

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทคัดย่อปัญหาพิเศษ เรื่อง

ความเป็นพิษของ Microcystin-LR ที่มีผลต่อปลาตุ๊กแกผสม

Toxicity of the Microcystin-LR in hybrid catfish (*C.macrocephalus x C.gariepinus*)

เพื่อหาผลกระทบของพิษ Microcystin-LR ต่อสรีรวิทยาบางประการและเนื้อเยื่อของปลาตุ๊กแกผสม ในการศึกษาครั้งนี้ทำการทดลองฉีดสาร Microcystin-LR เข้าไปในช่องท้องของปลาตุ๊กแกผสม จากการประเมินจากค่าโลหิตวิทยาบางประการ และเนื้อเยื่อดับและไต ภายหลังจากฉีดสารพิษที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง และนำเลือดมาวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาพบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงมีค่าเท่ากับ 2.72 ± 0.33 , 2.55 ± 0.88 , 3.14 ± 0.43 และ 1.55 ± 0.65 และมีค่าเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 72 ชั่วโมง ปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 7.33 ± 1.06 , 6.77 ± 1.91 , 9.15 ± 0.68 , 10.12 ± 3.36 และค่าฮีมาโตคริตที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 34.10 ± 5.72 , 37.50 ± 2.69 , 35.42 ± 5.58 และ 33.67 ± 2.66 พบว่าทั้งปริมาณเม็ดเลือดขาวและค่าฮีมาโตคริตไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้จำนวนของ Thrombocyte มีค่าเท่ากับ 53.80 ± 8.47 , 76.60 ± 8.82 , 69.80 ± 2.49 และ 75.20 ± 5.81 พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับและเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน Lymphocyte ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 13.60 ± 3.85 , 7.80 ± 3.27 , 17.80 ± 6.76 และ 12.00 ± 7.58 พบว่าที่ 24 ชั่วโมงมีค่าน้อยลงเมื่อเทียบกับช่วงเวลา 0, 48 และ 72 ชั่วโมง จากการศึกษาทางเนื้อเยื่อของตับและไต พบว่าเกิดความผิดปกติขึ้นในเม็ดเลือด เนื้อเยื่อดับและไตพบอาการในปลาที่ได้รับสารพิษ Microcystin-LR เกิดอาการ pyknotic neucli ในเนื้อเยื่อดับ พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบท่อเลือดและบางแห่งพบเลือดคั่งในท่อเลือดและแองเกล็ดรวมถึงอาการตกเลือดที่บริเวณด้านนอกของเนื้อเยื่อดับพบที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ส่วนที่เนื้อเยื่อไตเกิดการบวมของ glomerulus ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ในการศึกษาครั้งนี้ไม่พบการตายของปลาที่ทำการทดลอง ปริมาณพิษ Microcystin-LR ที่ $50 \mu\text{g/kg}$ น้ำหนักตัว การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นยังไม่เด่นชัดเท่าค่าโลหิตวิทยาบางประการที่ทำการวิเคราะห์

คำนิยม

ในการจัดทำปัญหาพิเศษเล่มนี้ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปวีณา ทวีกิจการ และอาจารย์ทุกท่านในภาควิชาวิทยาศาสตร์การประมงเป็นอย่างสูงที่ให้คำแนะนำในเรื่องๆต่าง ขอขอบพระคุณภาควิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่เอื้อเฟื้อสารพิษ Microcystin-LR ในการทำปัญหาพิเศษ ขอขอบคุณครอบครัวที่ให้การช่วยเหลือและสนับสนุนการศึกษาในด้านทุน ทรัพย์ ขอขอบคุณ คุณบุปผา คุณนิพนธ์ คุณนภพล และเจ้าหน้าที่ในภาควิชาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษครั้งนี้ ขอขอบคุณเพื่อนๆทุกคนที่ช่วยเหลือในการทำปัญหาพิเศษ จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

นางสาวดารินทร์ แดงฤทธิ์

พฤษภาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
สารบัญ	I
สารบัญตาราง	II
สารบัญภาพ	III
คำนำ	1
การตรวจเอกสาร	2
อุปกรณ์และวิธีการ	9
ผลการทดลองและวิจารณ์	13
สรุปและข้อเสนอแนะ	18
เอกสารอ้างอิง	19



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและค่าฮีมาโตคริตที่เกิดขึ้นในเวลา ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง	14
2	เปรียบเทียบชนิดและจำนวนเม็ดเลือดขาวในเวลาที่แตกต่างกัน	14



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	ลักษณะการบวมของ <i>Microcystis</i> sp. ที่ผิวหน้า (A), ลักษณะโคโลนีของ <i>Microcystis</i> sp. (B)	3
2	โครงสร้างโมเลกุลของ Microcystin-LR	4
3	แสดงหยดน้ำมันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตับ (ลูกศรชี้) และช่องว่างที่มีแกรนูลบรรจุอยู่ภายในที่กำลังขยาย 8000X จากกล้องอิเล็กตรอน	5
4	เกิดความผิดปกติขึ้นในเซลล์ตับที่ได้รับ MC-LR เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) เซลล์เกิด pycnotic nuclei	6
5	การเปรียบเทียบ RBC, Hb, Ht และ WBC แต่ละกลุ่มกับกลุ่มควบคุม ในเวลาต่างๆเมื่อเวลาผ่านไป	7
6	ภาพแสดงลักษณะเฉพาะของปลาดุกลูกผสม	8
7	เนื้อเยื่อตับปกติที่เวลาเริ่มต้น	15
8	ความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับที่เวลา 24 ชั่วโมง เห็นความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์และพบว่าผนังของเซลล์ถูกทำลาย เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ pyknotic nuclei	15
9	พบลักษณะของเม็ดเลือดขาว (lymphocyte) มารวมที่บริเวณรอบท่อเลือด (ศรชี้) เมื่อทำการฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	16
10	ผนังของท่อเลือดมีการเสียหาย เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบๆเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เมื่อทำการฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง	16
11	ไตปกติเก็บที่เวลาเริ่มต้น 24 ชั่วโมง	16
12	พบความผิดปกติเกิดอาการบวมของ glomerulus ในเนื้อเยื่อไตที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง	17

คำนำ

แหล่งน้ำเป็นสิ่งจำเป็นสำหรับสิ่งมีชีวิตทั้งหลายที่อยู่บนโลก นอกจากน้ำจะมีความสำคัญในเรื่องการใช้บริโภคแล้วยังเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำที่เป็นแหล่งอาหารของมนุษย์ซึ่งมีสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กในน้ำ เป็นอาหารโดยตรงหรือกินต่อกันมาในห่วงโซ่อาหารดังนั้นหากมีแพลงก์ตอนที่สามารถสร้างสารพิษที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่นเกิดขึ้นเป็นจำนวนมากโดยเฉพาะในบ่อเลี้ยงสัตว์น้ำพิษนั้นอาจส่งผลกระทบต่อห่วงโซ่อาหารและเข้าสู่คนที่เป็นพวกบริโภคชั้นสุดท้ายได้

Cyanobacteria เป็นแพลงก์ตอนพืชชนิดหนึ่งที่พบมากในแหล่งน้ำจืดทั่วไปขณะที่เกิดการบลูมขึ้นในแหล่งน้ำ *Microcystis* ชนิดที่พบมากที่สุดคือ *Microcystis aeruginosa* ซึ่งเป็นชนิดที่สามารถปล่อยสารพิษ microcystins ในเซลล์สู่แหล่งน้ำส่งผลต่อสัตว์น้ำได้แก่ ปลาและหอยเป็นต้น โดยเกิดการสะสมพิษที่ตับ ไต และส่งผลต่อเลือดของสัตว์น้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าส่งผลต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่กินน้ำที่มีการบลูมเกิดขึ้นด้วย การศึกษาและทำการทดลองปัญหาพิเศษนี้เกิดขึ้นจากความสนใจพิษที่เกิดจากการบลูมของ *Microcystis* ในบ่อเพาะเลี้ยงปลาน้ำจืดซึ่งอาจส่งผลทางพยาธิวิทยาของสัตว์น้ำทำให้กระทบต่อการเจริญเติบโตได้และหากมีการสะสมในเนื้อปลา สารพิษนี้สามารถถ่ายทอดสู่ผู้บริโภคทำให้เกิดอันตรายได้ เนื่องจากแพลงก์ตอนนั้นมีความสัมพันธ์ที่เกี่ยวเนื่องกันกับการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำและการใช้น้ำเพื่อการบริโภคของมนุษย์

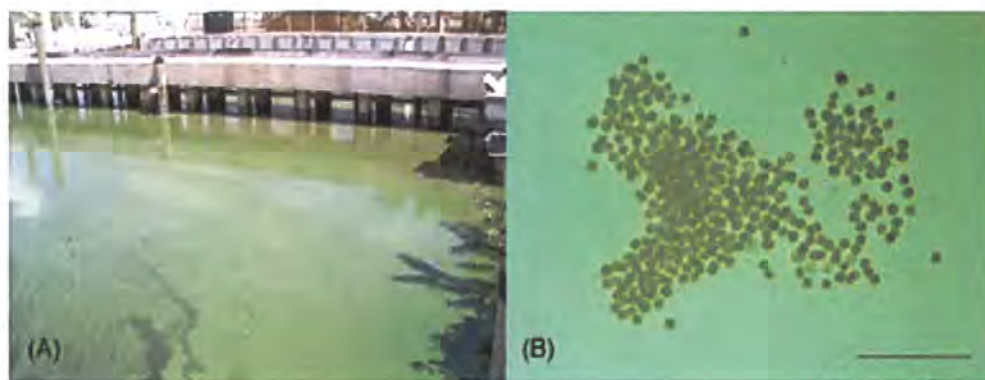
วัตถุประสงค์

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของปลาดุกลูกผสมหลังจากทำการฉีด microcystin-LR
2. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเลือดในปลาดุกลูกผสมที่ได้รับ microcystin-LR

ตรวจเอกสาร

สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีชื่อเรียกว่า cyanophytes แต่ผู้เชี่ยวชาญทางแบคทีเรียจะเรียกว่า cyanobacteria หรือ blue-green และนำเอาไปจัดไว้ใน class Schizophycophyceae Division Schizomycophyta ซึ่งเป็นกลุ่มเดียวกับแบคทีเรียทั่วไป ทั้งนี้เพราะสาหร่ายชนิดนี้มีโครงสร้างของนิวเคลียสคล้ายคลึงกับนิวเคลียสของแบคทีเรีย และบางชนิดยังมีคุณสมบัติตรึงไนโตรเจนจากอากาศได้ เช่นเดียวกับแบคทีเรียที่สามารถตรึงไนโตรเจนได้ นอกจากนั้นยังมีคุณสมบัติทางชีวเคมีคล้ายแบคทีเรียด้วย แต่นักวิชาการก็จัดสาหร่ายกลุ่มนี้แยกออกมาเนื่องจากสาหร่ายเหล่านี้สามารถสังเคราะห์แสงสร้างอาหารเองได้ ซึ่งไม่พบในแบคทีเรีย(ยูวดี ,2549)

Microcystis sp. จัดอยู่ใน Division Cyanophyta ที่มีชื่อสามัญว่า สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (ลัดดา, 2542) เป็นพืชชั้นต่ำที่เรียกว่า โปรคาริโอต (prokaryote) ซึ่งจัดรวมอยู่ในพวกเดียวกับแบคทีเรีย แต่มีคุณสมบัติที่ต่างกันอย่างชัดเจนคือ สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินมีคลอโรพิลล์ เอ จึงสามารถสังเคราะห์ได้ ซึ่งคุณสมบัตินี้จะไม่พบในพวกแบคทีเรีย โครงสร้างเซลล์ของ *Microcystis* sp. เป็นได้ทั้งเซลล์เดี่ยวและเป็นโคโลนีเซลล์สาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน ประกอบด้วยผนังเซลล์ 2 ชั้น และรอบนอกมีซีท ซึ่งเป็นสารเมือกหุ้มอยู่ถัดจากผนังเซลล์เข้าไปเป็นเยื่อบางๆ เรียกว่าเยื่อพลาสมา (plasma membrane) ทำหน้าที่หุ้มไซโตพลาสซึมไว้ ไซโตพลาสซึมส่วนนอกที่อยู่ใกล้กับผนังเซลล์มักมีสารสีกระจายอยู่เป็นจำนวนมาก ฉะนั้นจึงเรียกส่วนนี้ว่า โครโมพลาสซึม (chromoplasm) ส่วนไซโตพลาสซึมส่วนในมีลักษณะคล้ายนิวเคลียสจึงเรียกส่วนนี้ว่า เซนโตรพลาสซึม เนื่องจากส่วนนี้ไม่มีผนังหุ้ม อาหารสะสมเป็นพวกแป้งชนิดไซยาโนไฟเซียน นอกจากไซยาโนไฟซินแกรนูลแล้วยังมี แก๊สแวกิวโอ (gas vacuole) ลักษณะเป็นเม็ดเล็กกระจายอยู่ในไซโตพลาสซึม แก๊สแวกิวโอในแพลงก์ตอนบางชนิดจะหายไปถ้าอยู่ในที่มืดหรือแสงสลัวๆและจะปรากฏอีกครั้งเมื่อมีแสงจัด จึงคาดว่าแก๊สแวกิวโอจะช่วยให้เซลล์ลอยตัว ภายใน gas vacuole คาดว่าเป็นก๊าซไนโตรเจนหรือสารประกอบไนโตรเจนพวกเอมีน (amine) (ลัดดา,2542)



ภาพที่ 1 ลักษณะการบลูมของ *Microcystis* sp. ที่ผิวน้ำ (A), ลักษณะโคโลนีของ *Microcystis* sp. (B)

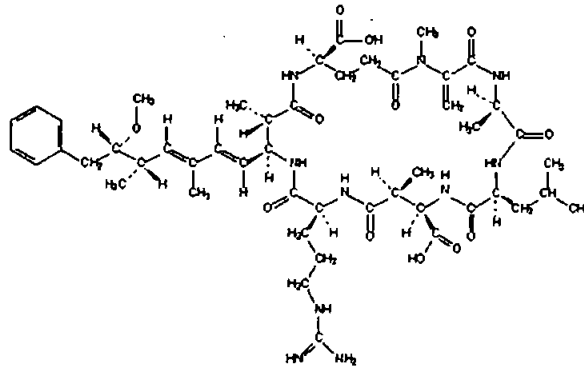
ที่มา : Ross *et al.*, 2006

การเกิดพิษและการสะสมสารพิษในแหล่งน้ำ

การบลูมของน้ำ (Water bloom) เนื่องมาจากการแพร่พันธุ์ได้อย่างรวดเร็วในเวลาอันรวดเร็วที่เรียกว่าเกิดการบลูม ส่งผลให้แหล่งน้ำในบริเวณนั้นเกิดสีตามสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงินชนิดที่เกิดการบลูมโดยส่วนใหญ่ชนิดที่เกิดการบลูมจะทำให้คุณภาพน้ำแย่ลงเนื่องจากการย่อยสลายของสาหร่ายสีเขียวชนิดที่เกิดการบลูม โดยส่วนใหญ่ชนิดที่เกิดการบลูมคือ *Microcystis* sp. ส่งผลต่อคุณภาพน้ำทำให้คุณภาพน้ำแย่ลงเนื่องจากการย่อยสลายของสาหร่ายสีเขียวแกมน้ำเงิน (Oudra *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2007)

สารพิษ Microcystins (MC) จะอยู่ในรูปของโปรตีนที่เกิดขึ้นได้แก่ MC-LR และ MC-RR ซึ่งทั้งสองชนิดต่างกันที่หมู่ของ อะมิโนแอซิดของ MC-LR เป็น 2:Leusine ,4 : Arginine 2: Arginine 4 : Arginine (Prieto *et al.*, 2006) การสะสมพิษในเซลล์ของสาหร่ายเกิดพร้อมกับขบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ เมื่อเซลล์แตกออกพิษที่สะสมอยู่ภายในเซลล์จะเข้าสู่แหล่งน้ำ Microcystins ที่เกิดขึ้นส่งผลต่อสัตว์น้ำและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ใช้น้ำในการบริโภค นอกจากนี้ยังพบว่าการบลูมที่เกิดขึ้นยังส่งผลต่อคุณภาพน้ำทั้งในเรื่องกลิ่นและรสชาติของน้ำส่งผลต่อการบำบัดน้ำในการบริโภค (Christopher *et al.*, 1998) แต่ปริมาณ Microcystins จะมีผลต่างกันเมื่อปลาที่ได้รับ Microcystins เป็นปลาคนละชนิดกัน ในปลา tilapia (*Oreochromis*) พบว่าปริมาณที่เกิดการตายคือ 500 µg/kg (Prieto *et al.*, 2006) ส่วน Crucian carp ที่ได้รับการฉีดพิษเข้าช่องท้องจะเกิดการตายภายใน 7 วัน หลังจากทำการฉีด MC-LR ที่ปริมาณ 200 µg/kg (Zhang *et al.*, 2007)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 2 โครงสร้างโมเลกุลของ Microcystin-LR

ที่มา : www.cyano-biotech.com

กลไกการทำงานของสารพิษ microcystin

Microcystin มีความสามารถในการยับยั้งโปรตีนฟอสเฟต 1 และ 2 A และชักนำโปรตีน phosphorylation ให้เพิ่มขึ้น ผลที่ตามมาคือไฮโดรลาลซิสถูกทำลายโดยตรง ทำให้ไฮโดรลาลซิสเป็นพิษ และกระตุ้นให้เกิดการบวมของเซลล์ (Perieto *et al.*, 2006) และทำให้กิจกรรมในเซลล์ลดลง (Malbrouck *et al.*, 2003) เมื่อสัตว์น้ำได้รับสารพิษเข้าไปจะพบว่าเกิดการตอบสนองขึ้น โดยมีการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระสำหรับการใช้ในการขับสารพิษ และพบว่าที่ตับและไตมีอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นมากกว่าปกติเมื่อได้รับสารพิษ MC-LR รองลงมาคือ MC-RR

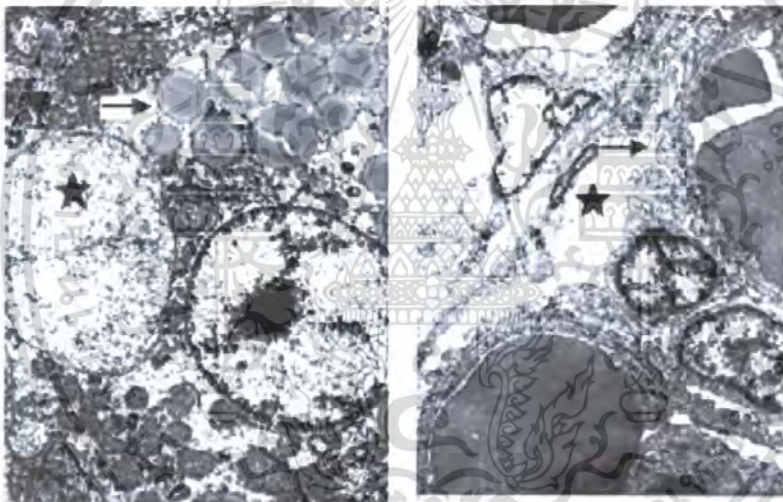
ผลของพิษต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อ

ตับและไต

ตับเป็นอวัยวะที่อยู่ส่วนบนสุดของช่องท้อง มีลักษณะเป็นพูสองข้าง มีสีเหลืองปนน้ำตาล พิษที่เกิดขึ้นยังมีผลในการทำลายตับเรียกว่า hepatotoxins เป็นสารพิษเพปไทด์น้ำหนักโมเลกุลต่ำ ซึ่งจะมีปฏิกิริยาต่อร่างกายช้ากว่าพิษที่เกิดจากสารพวกอัลคาลอยด์เป็นผลให้เซลล์ตับตาย และเกิดอาการช็อคภายในเวลา 2-3 ชั่วโมง หรือถึงแก่ความตายในเวลา 2-3 วัน (ลัดดา 2542) การสะสมของสารพิษเริ่มจากการที่สัตว์น้ำได้รับสารพิษเข้าทางร่างกายโดยกินอาหารธรรมชาติ เป็นเวลานาน Li *et al.*, 2007 ทำการศึกษาสารพิษ Microcystins โดยแบ่งเก็บผลเป็น 3 ช่วงเวลา คือ ก่อนที่จะมีการบวม ระหว่างที่มีการบวม และหลังจากที่บวมแล้ว พบว่าตับและไตจะมีความเป็นพิษเกิดขึ้นมากที่สุดในระหว่างที่บวม ส่วนหลังเกิดการบวมพบว่าความผิดปกติที่ส่งดูได้ กล้องนั้นเริ่มลดลงและมีการฟื้นสภาพกลับมาเป็นปกติ และก่อนเกิดการบวมไม่พบความผิดปกติ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่เผยแพร่ในอินเทอร์เน็ตเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่สามารถนำข้อมูลไปใช้ในการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

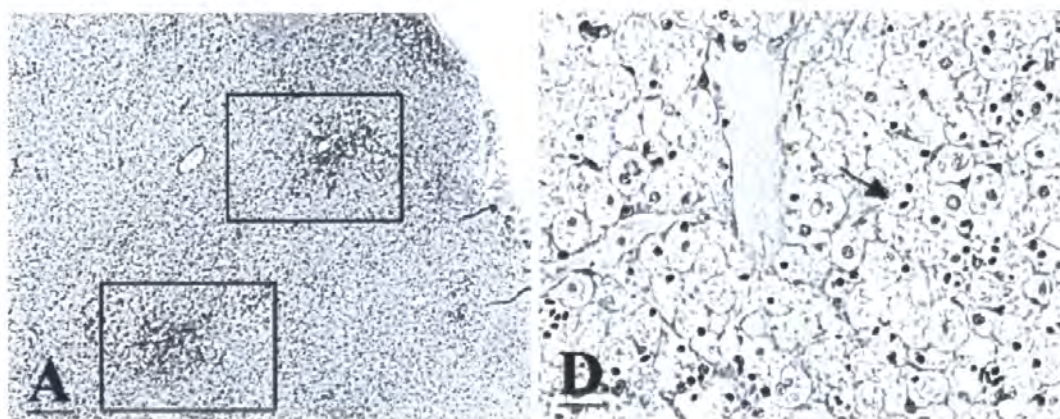
การที่เกิดความผิดปกติขึ้นเนื่องจาก Microcystins จะทำให้เกิด oxidative stress และทำให้เกิด ขบวนการ reactive oxygen species (ROS) ซึ่งจะเกิดความเสียหายในโครงสร้างเซลล์ แต่ก็ พบว่า ROS สามารถถูกขับออกได้ด้วย catalast(CAT),superoxide dismutase (SOD),glutathione peroxidase(GPX) และ glutathione S-transferase (GST) (Li et al., 2007; Ana et al.,2006) พบการเกิดหยดน้ำมันเมื่อส่องดูภายใต้กล้อง(ภาพที่ 3) และยังพบช่องว่างใน ไฮโดพลาสซึม และหลอดท่อเล็กบริเวณผนังเซลล์มีการเสื่อมลง ส่วนในไตพบความผิดปกติ เกิดขึ้นใน Bowman's capsule คือเกิดช่องว่างขึ้นและมีการขยายตัวของเส้นเลือดฝอย (ภาพที่ 3) ส่วนการทดลองของ Malbrouck *et al.*,2003 ทำการฉีด Microcystin-LR ในปลาทองขนาดเล็ก (30 g)ในปริมาณ 125 µg/kg น้ำหนักตัว พบว่าเกิดความผิดปกติของเซลล์ตับขึ้นหลังจากทำการ ฉีดเป็นเวลา 3 ถึง 48 ชั่วโมง (ภาพที่ 4)



ภาพที่ 3 ทางซ้ายแสดงหยดน้ำมันที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ตับ (ลูกศรชี้) และช่องว่างที่มีแกรนูลบรรจุอยู่ภายใน ที่กำลังขยาย 8000X จากกล้องอิเล็กตรอน ทางขวาการเกิดช่องว่างใน Bowman's ในกลุ่มเส้นเลือดฝอย กำลังขยาย 6000X (ทำการถ่ายด้วยกล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่าน)

ที่มา : Li *et al.*, 2007

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ตัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



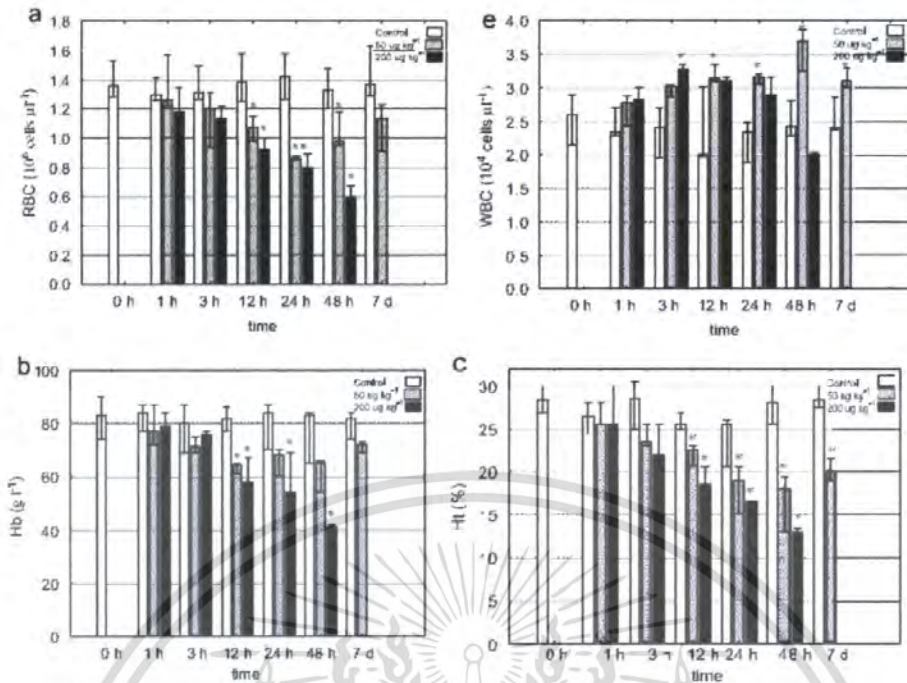
ภาพที่ 4 เกิดความผิดปกติขึ้นในเซลล์ตับที่ได้รับ MC-LR เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) เซลล์เกิด pycnotic nuclei (ลูกศรชี้)

ที่มา : Malbrouck *et al.*, 2003

การเปลี่ยนแปลงในเลือด

เมื่อปลาได้รับ Microcystins พบว่านอกจากจะเกิดความผิดปกติขึ้นที่ตับกับไตแล้วยังพบว่าเกิดความผิดปกติขึ้นในเลือดของสัตว์น้ำด้วย การเกิดการตายอย่างเฉียบพลันเนื่องจากการไหลของเลือดอย่างกะทันหันที่มีความสัมพันธ์กับความเสียหายของตับและการตกเลือดในตับ มีความสำคัญในการสร้างเม็ดโลหิตในกุ่มของปลากระดูกแข็งเมื่อไตอ่อนแอทำให้เกิดการลดจำนวนของเม็ดเลือดแดง (RBC) , hematocrit (Ht) และความเข้มข้นของ hemoglobin ทำให้เกิดโรคโลหิตจางชนิด normocytic anemia และเมื่อเกิดขึ้นบ่อยๆจะทำให้เกิดสัตว์น้ำมีพฤติกรรมที่ผิดปกติและส่งผลให้เกิดการตายในสัตว์น้ำ แต่กลับพบว่าในกลุ่มที่ได้รับ Microcystin ในปริมาณน้อยจะมีแนวโน้มที่เม็ดเลือดขาว(WBC)จะเพิ่มจำนวนขึ้นหลังจากทำการฉีดได้ 3 ชั่วโมงในการทดลองของ Zhang *et al.*,2007 พบว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับพิษที่มีปริมาณสูงจะแสดงอาการท้องบวม และมีน้ำในเยื่อช่องท้องสังเกตเห็นสีขาวขุ่นของไตหลังจากที่ทำการฉีดไปได้ 12 ชั่วโมง ในปริมาณพิษสูงที่ 200 ไมโครกรัมกิโลกรัม จากภาพที่ 4 แสดงเวลาและการลดลงของเม็ดเลือดแดง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 5 การเปรียบเทียบ RBC, Hb, Ht และ WBC แต่ละกลุ่มกับกลุ่มควบคุม ในเวลาต่างๆเมื่อเวลาผ่านไปทั้งกลุ่มที่ได้รับปริมาณพิษสูง (สีดำ) ได้รับพิษต่ำ (สีเทา) และกลุ่มควบคุม (สีขาว)

ที่มา : Zhang *et al.*, 2007

ชนิดของเม็ดเลือดขาว

1. Lymphocytes เป็นเม็ดเลือดขาวที่ไม่มี granules ลักษณะของเซลล์จะมีรูปร่างกลมเมื่อส่องดูภายใต้กล้องจะพบว่านิวเคลียสมีสีทึบ (ชะลอและคณะ, 2530) ส่วนของนิวเคลียสมีขนาดใหญ่เกือบเต็มเซลล์เยื่อหุ้มนิวเคลียสไม่เรียบและติดสีม่วงอมน้ำเงิน ไซโตพลาสซึมติดสีน้ำเงินอ่อน เมื่อย้อมด้วย Wright & Giemsa

2. Monocytes เป็นเม็ดเลือดขาวที่มีขนาดใหญ่เมื่อเทียบกับเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น (ชะลอและคณะ, 2530)

3. Thrombocytes เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่พบมากที่สุดเมื่อเทียบกับเม็ดเลือดขาวชนิดอื่น รูปร่างที่พบมากคือนิวเคลียสยาวรี ไซโตพลาสซึมมีจำนวนน้อยมากซึ่งจะติดสีชมพูอ่อน

4. Neutrophilic granulocytes มีลักษณะคล้ายกับ Monocytes ต่างกันตรงที่ไซโตพลาสซึมของ Monocytes ติดสีชมพู

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ชีววิทยาของปลาดุกลูกผสม

ปลาดุกลูกผสมเกิดจากการผสมข้ามพันธุ์ระหว่างปลาดุกอุยเทศเมีย (*Clarias macrocephalus*) และปลาดุกรัสเซียเทศผู้ (*Clarias gariepinus*) และมีการแพร่กระจายอย่างรวดเร็วโดยการเพาะเลี้ยงของสถาบันน้ำจืด ลูกปลาดุกลูกผสมที่เกิดขึ้นจะมีความต้านทานโรคและมีอัตราการเจริญเติบโตสูงทำให้เป็นที่นิยมในการเพาะเลี้ยง จึงมีการแพร่พันธุ์อย่างรวดเร็ว



ภาพที่ 6 ภาพแสดงลักษณะเฉพาะของปลาดุกลูกผสม

ลักษณะเฉพาะและนิสัยของปลาดุก

ลักษณะภายนอกที่เห็นอย่างชัดเจนคือ ผิวหนังหนามีเมือกที่ผิวมาก ไม่มีเกล็ด ครีบอกมีส่วนแหลม ปลาดุกชอบหากินตามหน้าดิน มีนิสัยขุดรู สามารถจะขึ้นมาอยู่บนบกได้นานกว่าปลาชนิดอื่น ๆ รวมถึงสามารถที่จะอาศัยอยู่ในดิน โคลน เลน และ ในน้ำที่มีปริมาณออกซิเจนต่ำได้นาน เนื่องจากมีอวัยวะพิเศษช่วยในการหายใจ ส่วนมากเป็นอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ที่ปลาดุกชอบกิน แต่ก็สามารถฝึกให้กินอาหารเม็ดได้ รวมถึงสามารถฝึกนิสัยให้ปลาดุกขึ้นมากินอาหารบริเวณผิวน้ำแทนการหาอาหารกินตามหน้าดินได้

การแยกเพศลักษณะที่เห็นได้ชัดเจน คือ บริเวณใกล้ช่องทวารของปลาดุกเพศผู้จะมีอวัยวะเพศเรียวยาวยื่นออกมา หากเป็นปลาดุกเพศเมียอวัยวะเพศจะมีลักษณะค่อนข้างกลม และสั้นกว่าซึ่งมองเห็นได้อย่างชัดเจน ขนาดของปลาดุกที่แยกเพศได้ต้องเป็นปลาที่มีขนาดยาวกว่า 15 เซนติเมตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์และวิธีการ

1. ปลาตุ๊กกลมผสมจำนวน 20 ตัว
2. เข็มและกระบอกฉีดยา
3. กล้องจุลทรรศน์
4. 10 % Trisodium citrate
5. สีย้อม Wright & Giemsa
6. Microhaematocrit tube ชนิดที่มีการเคลือบสารกันเลือดแข็งตัว
7. ดินน้ำมันขาว
8. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Refrigerated Centrifuge)
9. เครื่องนับจำนวน
10. สีย้อมเม็ดเลือด Yokoyama's white cell fluid
11. Microcystin
12. สารละลาย PBS pH 7.4
13. สไลด์ และ cover glass
14. กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง
15. ชุดเครื่องแก้ว
16. เครื่อง tissue processor
17. เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (microtome)
18. อ่างลงชิ้นเนื้อ
19. paraffin bath
20. slide warmer
21. เครื่องชั่งสาร
22. ชุดย้อมสีเนื้อเยื่อ
23. สีย้อม hematoxin และ eosin
24. 10% buffer formalin
25. decalcification solution

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วิธีการ

แผนการทดลอง

ใช้ปลาดุกลูกผสมจำนวน 20 ตัว ขนาด 20.14 ± 2.14 เซนติเมตร น้ำหนัก 60.28 ± 0.08 กรัม ทำการพักปลาไว้เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์เพื่อให้ปลาปรับตัวในบ่อซีเมนต์ขนาด 1×1 เมตร นำ Microcystin-LR มาฉีดเข้าที่บริเวณช่องท้องของปลาดุกลูกผสมที่ปริมาณโดส $50 \mu\text{g}/\text{kg}$. เก็บผลเป็นเวลา 3 วันที่เวลา 24, 48, 72 ชั่วโมงตามลำดับ ทำการเก็บตัวอย่างครั้งละ 5 ตัวเก็บตัวอย่างใน 10% buffer formalin อย่างต่ำเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

วิธีการทดลอง

เริ่มต้นการทดลองโดยทำการพักปลาดุกลูกผสมเป็นเวลา 2 อาทิตย์ ให้อาหารปลาดุกขนาดกลาง 2 เวลา (เช้า-เย็น) ชั่งน้ำหนัก 60.28 ± 0.08 กรัม และวัดความยาว 20.14 ± 2.14 เซนติเมตร

1. ทำการฉีดพิษ Microcystin-LR

1.1. นำพิษ Microcystin-LR ที่ได้มาทำการละลายด้วยสารละลาย PBS (phosphate buffer solution) pH 7.4 ทำการคำนวณน้ำหนักปลาโดยให้ใน 0.1 มิลลิลิตรของสารละลาย PBS มีสารพิษ Microcystin-LR เท่ากับ $50 \mu\text{g}/\text{kg}$ น้ำหนักปลา

1.2. ทำการฉีด Microcystin-LR เข้าช่องท้องของปลาดุกลูกผสมใน

1.3. นำปลาไปเลี้ยงในบ่อ ให้อาหารเวลาเช้า-เย็น

2. การวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา

ทำการเก็บเลือดปลาในเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ตามลำดับสลับปลาด้วย 10% chinadine เก็บตัวอย่างเลือดปลาทันทีที่ปลานิ่งด้วยวิธีการดูดเลือดจากเส้นเลือดบริเวณหาง (caudal blood vessels puncture) โดยเคลือบ 10% trisodium citrate ในกระบอกฉีดยา เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด จากนั้นจึงทำการวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยา ดังนี้

1. การวิเคราะห์ค่าเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต

ทำการเจาะเลือดปลายนิ้วปริมาณ 0.3-0.5 มิลลิลิตร เพื่อใส่ใน microhaematocrit tube จำนวน 3 หลอด ปักลงในถาดดินน้ำมันและนำไปปั่นด้วยเครื่อง centrifuge ที่ความเร็วรอบ 12,000 รอบต่อนาทีที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5 นาที แล้วทำการคำนวณค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์ ดังนี้

$$\text{เปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต} = \frac{\text{ความยาวของชั้นเม็ดเลือดแดง} \times 100}{\text{ความยาวของเลือดทั้งหมด}}$$

2. การแยกชนิดเม็ดเลือดขาว

นำ microhaematocrit tube มาหยดลงที่ด้านหนึ่งของแผ่นสไลด์ ใช้สไลด์อีกแผ่นวางทำมุม 45 องศากับสไลด์แผ่นที่ทำการหยดเลือด จากนั้นทำการปาดเลือดให้ทั่วแผ่นสไลด์รอให้แห้งที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นทำการย้อมด้วยสสารละลาย Wright & Giemsa

3. การวิเคราะห์ปริมาณเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว

นำเลือดปลายนิ้วที่เจาะได้ดูดใส่ diluting pipette ปริมาณ 0.5 เซ็ดเลือดที่ปลายออกให้หมด ก่อนจุ่มลงในน้ำยา Yokoyama's white cell fluid จนถึงขีด 101 จะได้เลือดที่มีความเจือจางเท่ากับ 1:200 ทำการเขย่าผสมเลือดกับน้ำยาเป็นเวลา 2 นาที จากนั้นเซ็ดปลายหลอดหรือทำการหยดเลือดที่ผสมกับน้ำยาทิ้ง 2-3 หยดก่อนนำมาแตะที่สไลด์นับเม็ดเลือด และ cover glass ทำการนับจำนวนภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เม็ดเลือดแดงนับที่ช่องกลาง ส่วนเม็ดเลือดขาวนับที่มุมทั้ง 4 ของสไลด์นับเม็ดเลือด แล้วใช้สูตรข้างล่างในการคำนวณ

$$\begin{aligned} \text{จำนวนเม็ดเลือดแดง} &= \text{จำนวนที่นับได้ 5 ช่อง} \times 5 \times 10 \times 200 \\ &= \text{_____} 10^6 / \text{mm}^3 \end{aligned}$$

$$\begin{aligned} \text{จำนวนเม็ดเลือดขาว} &= \text{จำนวนที่นับได้เฉลี่ยต่อช่อง} \times 10 \times 200 \\ &= \text{_____} 10^4 / \text{mm}^3 \end{aligned}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อวิเคราะห์ทางพยาธิสภาพ

1. ทำการผ่าปลาทันทีหลังจากที่เจาะเลือดแล้ว เอาตับและไตลงใน 10% buffer formalin เมื่อต้องเป็นเวลา 24 จึงนำมาตัดใส่แคชเช็ต ทำการเตรียมแคชเช็ต เขียนรหัสเนื้อเยื่อที่เราต้องการ ใส่แคชเช็ตนั้นแล้วปิดให้สนิท พร้อมเขียนรหัสและมาผ่านน้ำไหลประมาณ 1 ชั่วโมง เพื่อให้ฟอร์มาลินออกจากเนื้อเยื่อ

2. นำเข้าเครื่อง tissue processor เพื่อดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อ และฝังเนื้อเยื่อตับและไตลงใน พาราฟลาส นำชิ้นเนื้อที่ตรงกับ parafin มา ตัดส่วนที่เกินออก หรือเรียกว่าการแต่ง block (timing) จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาตัด เนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 4 ไมโครเมตร

3. ทำการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin เมื่อจบขั้นตอนการย้อมสีนำสไลด์เนื้อเยื่อที่ได้ วิเคราะห์ทางพยาธิสภาพเพื่อหาความผิดปกติที่เกิดจากการฉีด MC-LR เข้าทางช่องท้องเมื่อเวลา ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

การวิเคราะห์ข้อมูล

ใช้โปรแกรม SPSS วิเคราะห์ข้อมูลจากการเปรียบเทียบค่าโลหิตวิทยาโดยวิธีของ Duncan และใช้โปรแกรม Excell ในการวิเคราะห์ข้อมูล

การบันทึกข้อมูล

1. บันทึกเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต
2. บันทึกชนิดของเม็ดเลือดขาว
3. บันทึกจำนวนของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวที่ได้จากการวิเคราะห์
4. บันทึกตัวอย่างตับและไตของปลาที่ทำการเก็บ

สถานที่ทำการทดลอง

ภาควิชา วิทยาศาสตร์การประมง

คณะเทคโนโลยีการเกษตร

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ระยะเวลาในการทดลอง

เดือน เมษายน 2550 ถึง เดือน พฤษภาคม 2551

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลการทดลองและวิจารณ์ผลการทดลอง

1. ผลของค่าโลหิตวิทยา

จากการนำเลือดของปลาดุกลูกผสมที่ทำการฉีดพิษ Microcystin-LR ที่ 50 µg/kg น้ำหนักตัว มาทำการวิเคราะห์ค่าโลหิตวิทยาบางประการที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงค่าเม็ดเลือดแดงที่ได้คือ 2.72 ± 0.33 , 2.55 ± 0.88 , 3.14 ± 0.43 และ 1.55 ± 0.65 และมีค่าเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่เวลา 72 ชั่วโมง Zhang *et al.*, 2007 พบว่าเมื่อทำการฉีดปลาครีฟที่ 50 และ 200 µg/kg น้ำหนักตัว พบว่าการเปลี่ยนแปลงของค่าโลหิตวิทยาที่ 3 ชั่วโมงหลังทำการฉีดมีปริมาณของเม็ดเลือดแดงลดลงเนื่องจากค่าโลหิตวิทยาจะมีความไวต่อความผิดปกติที่เกิดขึ้นในร่างกายเป็นอย่างแรก (Zhang *et al.*, 2007) ปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงมีค่าเท่ากับ 7.33 ± 1.06 , 6.77 ± 1.91 , 9.15 ± 0.68 , 10.12 ± 3.36 และค่าฮีมาโตคริตที่เวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 34.10 ± 5.72 , 37.50 ± 2.69 , 35.42 ± 5.58 และ 33.67 ± 2.66 พบว่าทั้งปริมาณเม็ดเลือดขาวและค่าฮีมาโตคริตไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเนื่องจากพิษที่เกิดขึ้นมีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตกตัวได้ (Zhang *et al.*, 2007) นอกจากนี้จำนวนของ Thrombocyte มีค่าเท่ากับ 53.80 ± 8.47 , 76.60 ± 8.82 , 69.80 ± 2.49 และ 75.20 ± 5.81 พบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับและเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วน Lymphocyte ที่ 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 13.60 ± 3.85 , 7.80 ± 3.27 , 17.80 ± 6.76 และ 12.00 ± 7.58 พบว่าที่ 24 ชั่วโมงมีค่าน้อยลงเมื่อเทียบกับช่วงเวลา 0, 48 และ 72 ชั่วโมง

ตารางที่ 1 ปริมาณเม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาวและค่าฮีมาโตคริตที่เกิดขึ้นในเวลา 0, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
เม็ดเลือดแดง ($10^6/\text{mm}^3$)	2.72±0.33 ^a	2.55±0.88 ^a	3.14±0.43 ^a	1.55±0.65 ^b
เม็ดเลือดขาว ($10^4/\text{mm}^3$)	7.33±1.06 ^{ab}	6.77±1.91 ^a	9.51±0.68 ^{ab}	10.12±3.36 ^b
ฮีมาโตคริต (%)	34.10±5.72 ^a	37.50±2.69 ^a	35.42±5.58 ^a	33.67±2.66 ^a

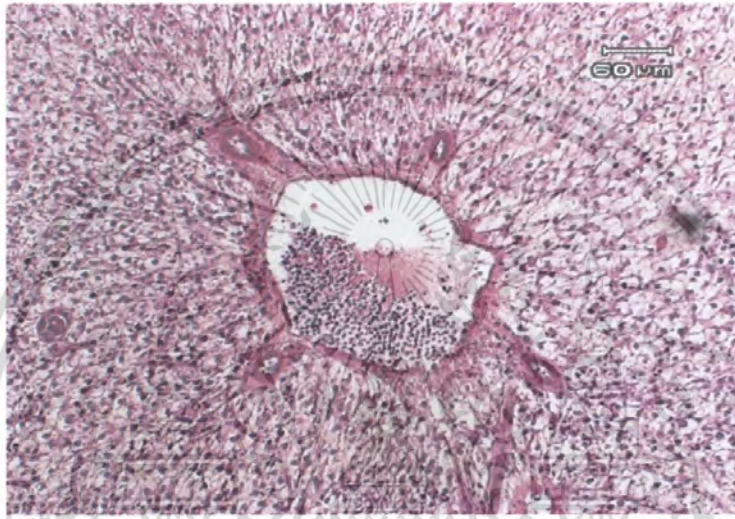
ตารางที่ 2 เปรียบเทียบชนิดและจำนวนเม็ดเลือดขาวในเวลาต่างกัน

	0 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง
thrombocytes	53.80±8.47	76.60±8.82	69.80±2.49	75.20±5.81
neutrophile	2.22±12.93	10.8±2.68	4.20±4.32	4.20±2.68
lymphocytes	13.60±3.85	7.80±3.27	17.80±6.76	12.00±7.58
monocytes	7.40±4.39	5.00±2.92	5.40±3.51	4.80±1.92

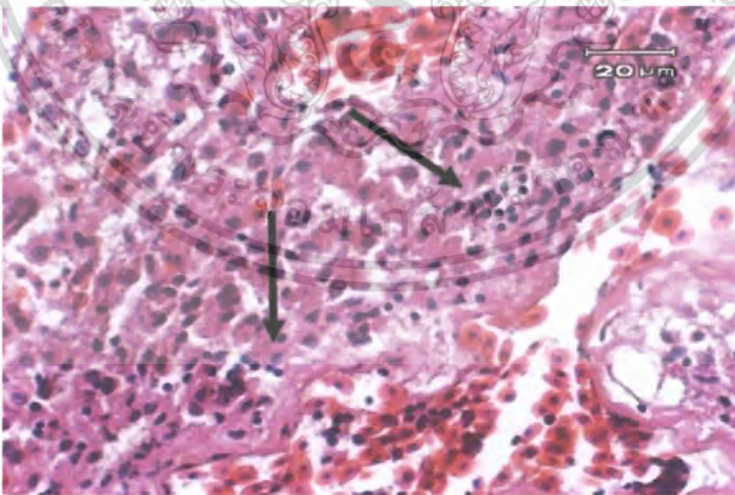
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ผลทางพยาธิสภาพ

จากการนำเนื้อเยื่อของปลาตุ๊กตูกผสมมาส่องดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับพบการตกเลือดที่บริเวณส่วนปลายของตับรวมถึงมีอาการเลือดเลือดคั่งในท่อเลือดและหลอดเลือด ที่เวลา 48 ชั่วโมงพบการเปลี่ยนแปลงเช่นเดียวกับที่เวลา 24 ชั่วโมงแต่พบได้น้อยจากตัวอย่างปลาตุ๊กตูกผสม

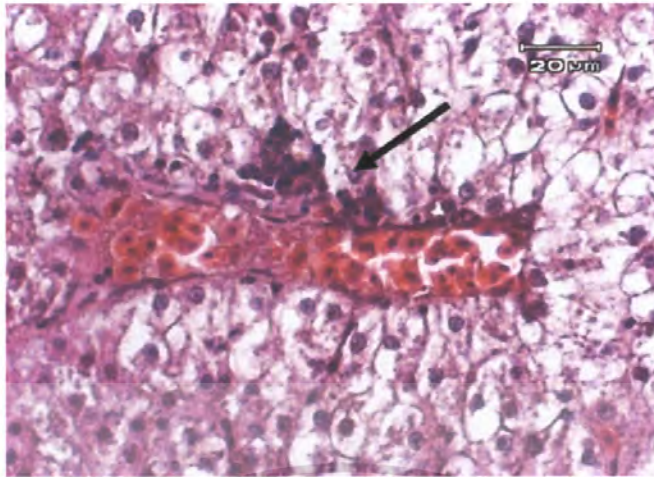


ภาพที่ 7 เนื้อเยื่อตับปกติที่เวลาเริ่มต้น

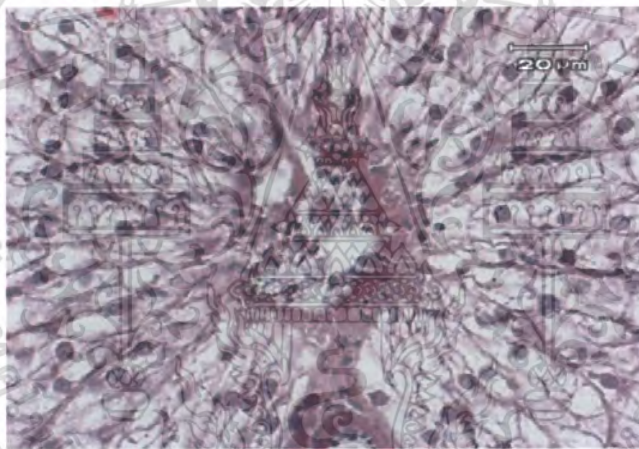


ภาพที่ 8 ความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับที่เวลา 24 ชั่วโมง เห็นความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์ และพบว่าผนังของเซลล์ถูกทำลาย เกิดการเปลี่ยนแปลงแบบ pyknotic nuclei (ลูกศรชี้)

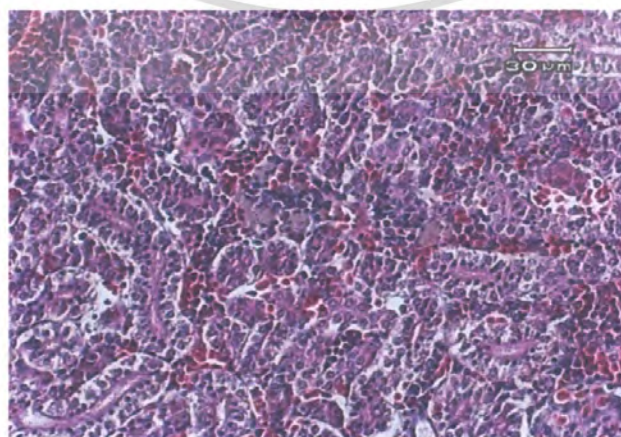
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่าจะกรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



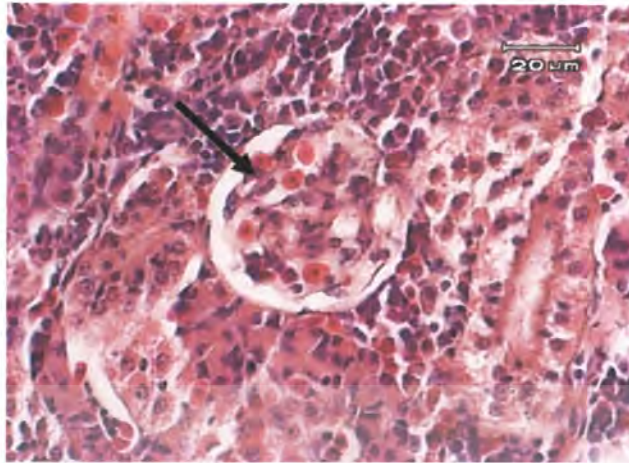
ภาพที่ 9 พบลักษณะของเม็ดเลือดขาว (lymphocyte) มารวมที่บริเวณรอบท่อเลือด (ครีซี) เมื่อทำการฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



ภาพที่ 10 ผนังของท่อเลือดมีการเสื่อมสภาพ เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่รอบๆ เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ เมื่อทำการฉีดเป็นเวลา 24 ชั่วโมง



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้ **ภาพที่ 11** ได้ปกติเก็บที่เวลาเริ่มต้น 24 ชั่วโมง แต่ให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้าไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



ภาพที่ 12 พบความผิดปกติเกิดอาการบวมของ glomerulus ในเนื้อเยื่อไต ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง (ศรีชัย)

การที่เนื้อเยื่อมีการเปลี่ยนแปลงในเวลา 24 ชั่วโมงหลังจากทำการฉีด microcystin-LR เข้าช่องท้องปลาตุ๊กตาผสมพบการเปลี่ยนแปลงที่ตับมากที่สุดเนื่องจากเซลล์ตับเนื่องจากพิษที่เกิดขึ้นเป็น hepatotoxins จะเจาะจงกับตับมากที่สุด (ลัดดา, 2545) และจะเกิดความผิดปกติมากที่สุดเวลา 24 ชั่วโมง และจะค่อยๆลดลงหลังจากนี้ สอดคล้องกับการทดลองของ Li et al., 2007 ที่ทำการเก็บตัวอย่างปลาจากอ่างเก็บน้ำก่อนการบ่มและหลังการบ่มของแพลงก์ตอนพบว่า ปลาคาร์พ จะมีการเปลี่ยนแปลงของตับเมื่อทำการส่องดูภายใต้กล้องอิเล็กตรอนแบบส่องผ่านจะพบหยดน้ำมัน และปลาที่เก็บหลังการบ่มจะพบว่าเซลล์ตับมีการซ่อมแซมตัวเองกลับสู่สภาพเดิมเมื่อระยะเวลาที่รับพิษนานขึ้น

สรุปผลการทดลอง

จากการทดลองพบว่าเม็ดเลือดแดงมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเห็นได้ชัดเจนที่เวลา 72 ชั่วโมง ส่วนเม็ดเลือดขาวและค่าฮีมาโตคริตไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญ ที่เนื้อเยื่อตับ พบความผิดปกติที่เวลา 24 ชั่วโมงเห็นลักษณะของเซลล์เป็นแบบ pyknotic nuclei ส่วนไตพบความผิดปกติที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง เกิดการบวมของ glomerulus ในท่อไต ในการทดลองไม่มีการตายของปลาเกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณ Microcystin-LR 50 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ที่ฉีดเข้าตัวปลานั้นมีปริมาณน้อยเกินไป



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

- ไม่ปรากฏผู้แต่ง. 2551. โครงสร้าง Microcystin-LR. <http://www.cyano-biotech.com>
- ชะลอ ลิมสุวรรณ ปวีณา กิจสวัสดิ์ และ สุปรภาณี ชินบุตร. 2530. เนื้อเยื่อปลาตุ๊กด้าน. คณะ
ประมง. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. 138 น.
- ยิวดี พีรพรพิศาล 2549. สำหรับรายวิทยา. คณะวิทยาศาสตร์ มหาลัยเชียงใหม่, 525น.
- ลัดดา วงศ์รัตน์ 2542. แพลงก์ตอนพืช. คณะประมง มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพ 851น.
- Chow, W.K. C., M. Drikas, J.House, M.D.Burch and R. M.A. Velzeboer. 1999. The impact
of conventional water treatment processes on cells of the cyanobacterium
Microcystis aeruginosa. Pergamon 33 : 3253 – 3262.
- Li,L., P. Xiea and J.Chen. 2007. Biochemical and ultrastructural changes of the liver and
kidney of the phytoplanktivorous silver carp feeding naturally on toxic
Microcystin blooms in Thihu Lake, China .Toxicon 49 : 1024 -1053
- Malbrouck,C.,G. Trausch, P. Devos and P. Kestemont. 2003. Hepatic accumulation and
effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L. Comparative
Biochemistry and Physiology Part C 135: 39-48
- Oudra, B., M.Loudiki, B. Sbiyyaa, R.Martins, V. Vasconcelos and N. Namikoshi. 2001.
Isolation, characterization and quantification of microcystins (heptapeptides
hepatotoxins) in *Microcystis aeruginosa* dominate bloom of Lalla Takerkoust lake
– reservoir (Morocco).Toxicon 39 : 1375 -1381.
- Prieto, A. I., A. Jos, S. Pichardo, I. Moreno and A. M. Camenan. 2006. Differential
oxidative stress responses to microcystin LR and RR in intraperitoneally exposed
tilapia fish (*Oreochromis sp.*). Aquatic Toxicology 77 : 314 -321.
- Ross,C., L. Santiago-Vazquez and V. Paul. 2006. Toxin release in response to oxidative
stress and programmed cell death in the cyanobacterium *Microcystis*
aeruginosa. Aquatic Toxicology 78: 66-73.

Zhang,X., P.Xie, D.Li and Z. Shi. 2007. Hematological responses of crucian carp (*Carassius auratus*) to intraperitoneal injection of extracted microcystin with the possible mechanisms of anemia. *Toxicon* 49 : 1150 – 1157.



เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้