

เทคนิคการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคดเมียมคลอไรด์และสารสกัดสะเดา
ต่อปลาตุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

โดย

นายสุนทร กุศลสันเทียะ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2549

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**TECHNIQUES FOR ASSESSING GENOTOXICITY OF CADMIUM CHLORIDE
(CdCl₂) AND NEEM EXTRACTS ON CATFISH (*Clarias macrocephalus*)**

By

Sunate Googsantea

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree

MASTER OF SCIENCE

Department of Biology

Graduate School

SILPAKORN UNIVERSITY

2006

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “เทคนิคการประเมิน
ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคเมียมคลอไรด์และสารสกัดสะเดาต่อปลาอุกอูย (*Clarias
macrocephalus*)” เสนอโดย นายสุเนตร กุกสันเทียะ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน.....พ.ศ.....

ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์
.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. ดวงเดือน ไกรลาศ)

...../...../.....

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เรณู เวชรัชต์พิมล)

...../...../.....

.....กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. มยุรา อารีกิจเสรี)

...../...../.....

.....กรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ

(รองศาสตราจารย์ ดร. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์)

...../...../.....

46303205: สาขาวิชาชีววิทยา

คำสำคัญ : แคมเมียม/ปลาอุกอุย/ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม/ไมโครนิวเคลียส

สุนทร กุศลสันเทียะ : เทคนิคการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคมเมียม
คลอไรด์และสารสกัดสะเดาในปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) อาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์:
รศ. ดร. เรณู เวชรัชต์พิมล. 126 หน้า.

การศึกษากการใช้เทคนิค Micronucleus test ประเมินความเป็นพิษของ CdCl_2 และสะเดาไทย 111 ซึ่งเป็นสารสกัดสะเดาที่มี 0.1% Azadirachtin ต่อสารพันธุกรรมของปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*) พบว่าปลาอุกอุยที่ถูกชักนำให้มีค่า micronucleus frequencies (MNFs) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) คือ ปลาอุกอุยที่แช่ CdCl_2 0.02-0.05 mg/L ($n=20$) เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก และพบว่าค่า MNFs มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ CdCl_2 สูง คือ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.8916 และ 0.9443 ในกลุ่มที่แช่ปลา 24 ชั่วโมง และเท่ากับ 0.9056 และ 0.7880 ในกลุ่มที่แช่ปลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนค่า MNFs จากเซลล์ตับพบว่าสูงกว่ากลุ่มควบคุมเฉพาะกลุ่มที่แช่ปลาใน CdCl_2 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9325 ส่วนกลุ่มที่แช่ปลา 24 ชั่วโมง นั้นไม่พบว่าค่า MNFs มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ CdCl_2 ($P < 0.05$) เมื่อตรวจความผิดปกติของนิวเคลียส 5 ลักษณะพบว่า มี lobed nucleus และ vacuolated nucleus สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดยพบว่าค่า lobed nucleus frequencies (LNFs) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลาอุกอุยที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ CdCl_2 สูง คือ มีค่า R^2 เท่ากับ 0.8749 และ 0.8235 ตามลำดับ ส่วนปลาอุกอุยที่แช่ 48 ชั่วโมง มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9508 และ 0.8060 เมื่อตรวจจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์ตับตามลำดับ สำหรับความผิดปกติด้าน vacuolated nucleus frequencies (VNFs) นั้น พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.8324, 0.9347 และ 0.8991 เมื่อตรวจจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลาที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และจากเซลล์ตับของปลาที่แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ($P > 0.05$)

การใช้เทคนิค Micronucleus test ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาอุกอุย พบว่าปลาอุกอุยที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.7-0.9 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 0.6-1.1 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่แช่ปลาอุกอุยเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.6 mg/L ซึ่งผ่านการผึ่งแดดแล้ว 7 วัน พบค่า MNFs ในเซลล์ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างจากค่า MNFs จากกลุ่มที่แช่สารสกัดสะเดาที่มีความเข้มข้นเท่ากันซึ่งไม่ได้นำไปผึ่งแดด ($P < 0.05$) เมื่อทดลองใช้เทคนิค Comet assay ตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาที่แช่ใน CdCl_2 0.03 และ 0.05 mg/L และแช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.6 mg/L ทั้งก่อนและหลังการผึ่งแดด พบว่ามีสารพันธุกรรมถูกทำลายในระดับที่มีค่าเฉลี่ยของ tail length สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยปลาอุกอุยที่แช่ Azadirachtin เข้มข้น 0.6 mg/L ในสารสกัดสะเดาก่อนและหลังจากผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน มีค่าเฉลี่ย (%) tail DNA, tail moment, olive moment และ tail area สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

ผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าการใช้เทคนิค Micronucleus test ตรวจเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลาอุกอุยมีความไวในการใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และ Azadirachtin โดยสามารถประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 ได้ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าค่าการปนเปื้อนที่กำหนดไว้ในมาตรฐานน้ำทิ้งของประเทศ ส่วนผลการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดานั้น พบว่าจะแสดงความเป็นพิษเมื่อใช้ความเข้มข้นสูงและแสงแดดสามารถลดความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาได้ ดังนั้นปลาอุกอุยจึงเป็นปลาที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารที่มีพิษต่อสารพันธุกรรมในแหล่งน้ำได้ดี

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์.....

46303205: MAJOR: BIOLOGY

KEY WORD: CADMIUM/*Clarias macrocephalus*/GENOTOXICITY/MICRONUCLEUS

SUNATE GOOGSANTEA: TECHNIQUE FOR ASSESSING GENOTOXICITY OF CADMIUM CHLORIDE AND NEEM EXTRACTS ON CATFISH (*Clarias macrocephalus*).

THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. RENU VEJARATPIMOL. 126 pp.

In this study, the Micronucleus test was evaluated for assessing the genotoxicity of CdCl_2 and neem extracts containing 0.1% Azadirachtin (Aza) on the red blood cells (RBCs), the gill epithelial cells (GECs) and the liver cells (LCs) of *Clarias macrocephalus* (n=20). The micronucleus frequencies (MNFs) in the RBCs and GECs of CdCl_2 -treated fish at 0.02-0.05 mg/L for 24 and 48 h were higher than that of the control group ($P < 0.05$). The MNFs were highly correlated to the CdCl_2 concentrations and the correlation coefficients (R^2) were 0.8916 and 0.9443 in CdCl_2 -treated fish for 24 h and 0.9056 and 0.7860 for 48 h, respectively. While the MNFs in the LCs of CdCl_2 -treated fish at 0.01-0.05 mg/L for 48 h were higher than that of the control group ($P < 0.05$) and showed a high correlation with the CdCl_2 concentrations ($R^2 = 0.9325$). But the MNFs in the LCs of CdCl_2 -treated fish for 24 h were not correlated to the CdCl_2 concentrations ($P < 0.05$). The five nuclear abnormalities were observed indicating that the lobed nucleus frequencies (LNFs) and vacuolated nucleus frequencies (VNFs) in the RBCs and GECs of CdCl_2 -treated fish for 24 h were higher than that of the control group and were highly correlated to the CdCl_2 concentrations and the R^2 were 0.8749 and 0.8235, respectively. While the CdCl_2 -treated fish for 48 h had R^2 equal to 0.9508 and 0.8060 when observed from the GECs and LCs, respectively, the R^2 of VNFs were 0.8324, 0.9347 and 0.8991 when observed from the GECs of CdCl_2 -treated fish for 24 and 48 h, and from the LCs of 48 h treated fish, respectively ($P > 0.05$).

The fish were exposed to neem extract at the concentrations of Aza 0.7-0.9 mg/L for 24 h and 0.6-1.1 mg/L for 48 h and the MNFs were higher than that the control were observed ($P < 0.05$). The fish placed in 0.6 mg/L of Aza and exposed to sunlight for 7 days (SL-Aza) had MNFs in the RBCs lower than that of the control group but these were not significantly different from the 0.6 mg/L unexposed Aza group. The Comet assay was used to detect the DNA damage in fish RBCs. The level of DNA damage of fish treated with CdCl_2 0.03, 0.05 mg/L and 0.6 mg/L of Aza and SL-Aza for 24 h was observed and the mean tail lengths were greater than that of the control group. Fish placed in 0.6 mg/L of Aza and SL-Aza had greater (%) tail DNA, tail moment, olive moment and tail area than those of the control group ($P < 0.05$).

This study revealed that the Micronucleus test in the RBCs and GECs of fish were sensitive in detecting the genotoxic levels of CdCl_2 and Aza contamination in water, since it can detect CdCl_2 contaminations lower than the Thai waste water standard level of cadmium concentration. The results also indicated that the genotoxicity of neem extracts can be detected when fish exposed to high concentration of Aza and the sunlight can reduce the genotoxicity of Aza. The *C. macrocephalus* is therefore a good indicator for the detection of genotoxicants in a freshwater environment.

Department of Biology

Graduate School, Silpakorn University

Academic Year 2006

Student's signature.....

Thesis Advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ในการทำวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล ประธานผู้ควบคุมวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ ช่วยเหลือสนับสนุนทุนวิจัยและแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.กัลยาณี จิรศรี พงศ์พันธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.ดวงเดือน ไกรลาศ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.มยุรา อารีกิจเสรี ที่กรุณาให้คำปรึกษา แนวความคิด ตลอดจนคำแนะนำต่างๆ และคอยให้กำลังใจในการทำวิจัยครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.วัฒนา เกาศัลย์ และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลชนก พานิชกร ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ขอขอบพระคุณผู้แทนบัณฑิตวิทยาลัยที่กรุณาให้คำแนะนำ และตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้มีความสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณนงนุช กำลั้งแพทย คุณจิฎิรัตน์ สังข์ทอง คุณชินรัตน์ แจ่มแสงฟ้าและคุณสมเกียรติ ล้อมพิมาย ที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่กรุณาให้ความรู้และความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ที่ใช้ในการวิจัย

กราบขอบพระคุณ คุณพ่อสุข และคุณแม่สุภาพ กุ๊กสันเทียะ และน้องๆ ที่ได้สนับสนุนให้ทุนทรัพย์และกำลังใจตลอดมา จนทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ฉ
สารบัญรูป.....	ฉ
คำอธิบายคำย่อ.....	ฉ
บทที่	

1	บทนำ.....	1
	1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
	2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
	3. สมมติฐานการศึกษา.....	3
	4. ขอบเขตของการศึกษา.....	4
	5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
2	เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
	1. ปลาดุกอูย (<i>Clarias macrocephalus</i>)	5
	2. แคดเมียม (Cadmium, Cd)	6
	3. สารสกัดสะเดา (Neem extract)	20
	4. DNA damage	28
	5. Biomarker.....	28
	6. ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity)	29
	7. การศึกษาความเป็นพิษของ CdCl ₂ และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา	35
3	อุปกรณ์และสารเคมี.....	57
	1. อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย	57
	2. สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย	58
4	วิธีการทดลอง.....	60
5	ผลการทดลอง	71
6	อภิปรายผลการทดลอง	92

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บรรณานุกรม	103
ภาคผนวก.....	117
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมี.....	118
ภาคผนวก ข ขั้นตอนการวิเคราะห์ภาพ comet assay ด้วยโปรแกรม LUCIA	123
ประวัติผู้วิจัย.....	126

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนในอาหาร.....	9
2	ปริมาณแคดเมียมที่ตรวจพบในข้าวทั่วประเทศไทย.....	10
3	การสะสมตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียมในพืช.....	10
4	ผลของความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ได้รับแคดเมียมกลอไรด์.....	13
5	ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของแคดเมียมที่มีผลต่อมนุษย์โดยการกิน.....	13
6	ความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลองโดยการหายใจ..	14
7	การเกิด membrane damage เมื่อได้รับแคดเมียมในปริมาณต่างๆ	19
8	สารประกอบแคดเมียมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์	20
9	ผลของสารสกัดสะเดาที่ไม่อยู่ในตัวทำลายด้วยน้ำต่อสัตว์	26
10	ผลของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดสะเดาต่อสัตว์	27
11	ระดับความเสียหายของ DNA ที่เกิดขึ้น.....	29
12	รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์ และบริษัทผู้ผลิต	57
13	รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต	58
14	อัตราการตายของปลาดุกอุย (<i>C. macrocephalus</i>) ที่แช่ CdCl ₂ 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	71
15	ค่าความถี่ของ micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะในเซลล์ เม็ดเลือดแดงปลาดุกอุย (<i>C. macrocephalus</i>) ที่แช่ในน้ำที่มี CdCl ₂ เข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	73
16	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R ²) ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl ₂ กับความถี่ของ นิวเคลียสที่ตรวจพบลักษณะผิดปกติในเซลล์ 3 ชนิด ของปลาดุกอุยที่แช่ CdCl ₂ 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	75
17	ค่าความถี่ของ micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะใน เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกปลาดุกอุย (<i>C. macrocephalus</i>) ที่แช่ในน้ำที่มี CdCl ₂ เข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	77
18	ค่าความถี่ของ micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะในเซลล์ตับ ปลาดุกอุย (<i>C. macrocephalus</i>) ที่แช่ในน้ำที่มี CdCl ₂ เข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	80

สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
19 ผลการวิเคราะห์ค่า MNF (Mean±SD) ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์ตับ ของปลาดุกอุยที่แช่ CdCl ₂ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	83
20 อัตราการตายของปลาดุกอุยที่แช่ในสารละลาย Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	85
21 ค่าความถี่ของ micronucleus และ lobed nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาดุกอุย <i>C. macrocephalus</i> ที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง	86
22 ค่าความถี่ของ micronucleus และ lobed nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาดุกอุย ที่แช่ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ผึ่งแดด 7 วันและไม่ผึ่งแดด	89
23 ค่า parameter ต่างๆ (Mean±SD) ที่ใช้วิเคราะห์ด้วยเทคนิค Comet assay ¹	90
24 ความเข้มข้นของ CdCl ₂ 5 2H ₂ O ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ปลาดุกอุย	120
25 ความเข้มข้นของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อ สารพันธุกรรมปลาดุกอุย	122

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1 ปลาอุกอุย (<i>Clarias macrocephalus</i>)	5
2 เมแทบอลิซึมของแคดเมียมในร่างกายมนุษย์	11
3 ความเป็นพิษของแคดเมียมในไตของมนุษย์	15
4 กลไกการเกิดพิษที่กระดูกของแคดเมียม	16
5 ลักษณะของต้นสะเดา (ก), ลำต้น (ข), ใบ (ค), ดอก (ง) และผลของสะเดา (จ).....	21
6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากสะเดา	25
7 กลไกการเกิดความผิดปกติของ DNA ในระหว่างการแบ่งเซลล์	30
8 กลไกการชักนำให้เกิด MN, apoptosis และ necrosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง	31
9 ลักษณะของไมโครนิวเคลียสที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง (ก ไมโครนิวเคลียส, ข-ง ไม่นับเป็นไมโครนิวเคลียส)	31
10 ลักษณะของ MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลา <i>O. niloticus</i> ; micronucleus (MN), binucleus (BN), notched nucleus (N), blebbed nucleus (BL) และ lobed nucleus (LB)	32
11 ดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายมีลักษณะคล้ายดาวหาง	33
12 ส่วนประกอบของ comet ที่ใช้ด้วยโปรแกรม LUCIA	34
13 เปรียบเทียบเซลล์ที่เกิดความเสียหายและการจำแนกดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายของเซลล์ (ก = เซลล์ที่ไม่เกิด DNA damage, ข = เซลล์ที่เกิด DNA damage ปานกลาง และ ค = เซลล์ที่เกิด DNA damage มาก)	35
14 ลักษณะของ MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลา <i>O. niloticus</i> ; micronucleus (MN), binucleus (BN), notched nucleus (N), blebbed nucleus (BL) และ lobed nucleus (LB)	65
15 บริเวณของ comet ที่ใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LUCIA	69
16 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาอุกอุย (ก) กลุ่มควบคุม และ (ข-จ) กลุ่มที่ได้รับ CdCl ₂ เข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ	74
17 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl ₂ กับค่า MNF ในปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl ₂ เป็นเวลา (ก) 24 และ (ข) 48 ชั่วโมง และ กับค่า LNF ในปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl ₂ เป็นเวลา (ค) 24 และ (ง) 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง	75

สารบัญรูป(ต่อ)

รูปที่	หน้า
18 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับค่า MNF ในปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl_2 เป็นเวลา (ก) 24 และ (ข) 48 ชั่วโมง และ กับค่า LNF ในปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl_2 เป็นเวลา (ค) 24 และ (ง) 48 ชั่วโมง และ กับค่า VNF ในปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl_2 เป็นเวลา (จ) 24 และ (ฉ) 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก	79
19 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่แช่ปลาอุกอุยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง กับค่า (ก) MNF (ข) LNF และ (ค) BNF เมื่อตรวจจากเซลล์ตับ	81
20 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดากับค่า MNF ในปลาอุกอุยที่แช่สารสกัดสะเดาเป็นเวลา (ก) 24 และ (ข) 48 ชั่วโมง และกับค่า LNF ในปลาอุกอุยที่แช่สารสกัดสะเดาเป็นเวลา (ค) 24 และ (ง) 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง	87
21 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาอุกอุย (ก) กลุ่มควบคุมและ (ข-ฉ) กลุ่มทดลองเมื่อได้รับ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาเข้มข้น 0.50, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9 mg/L (NC = Normal cell, MN = Micronucleus, L = Lobed nucleus และ BN = Binucleated nucleus). 88	
22 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาอุกอุย (ก) จากกลุ่มควบคุม และจากปลาอุกอุยที่แช่สารทดสอบ (ข) มี DNA damage ระดับปานกลาง และ (ค) มี DNA damage ระดับมาก. 91	
23 ผลิตภัณฑ์สารสกัดสะเดาไทย 111 TM (ก) และเอกสารการใช้ผลิตภัณฑ์ (ข)	121

คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ	=	คำเต็ม
ACTH	=	Adenocorticotrophic hormone
BNFs	=	Binucleated frequencies
BrdU	=	5'-bromodeoxyuridine
CdCl ₂	=	Cadmium chloride
CaBP	=	Cadmium binding protein
Cd-MT	=	Cadmium metallothionine
Cells/mm ³	=	Cells/cubic millimeter
CHO	=	Chinese hamster ovary
dbc AMP	=	Dibutyl cyclic AMP
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
EC ₅₀	=	Median effective concentration
EROD	=	Ethoxyresolufin O-deethylase
EtBr	=	Ethidium bromide
FISH	=	Fluorescence in situ hybridization
Fpq	=	Formamidopyrimidine DNA glycosylase
LC ₅₀	=	Median lethal concentration
LDH	=	Lactate dehydrogenase
LMA	=	Low melting point agarose
LNFs	=	Lobed nucleus frequencies
LOEC	=	Lower observed effects concentration
mg/kg	=	Milligram/kilogram
mg/L	=	Milligram/litre
NMA	=	Normal melting point agarose
MN	=	Micronucleus
MNFs	=	Micronucleus frequencies
MQ-water	=	Milli-Q water
MT	=	Metallothionine
MTmRNA	=	Metallothionine mRNA

คำอธิบายคำย่อ (ต่อ)

คำย่อ	=	คำเต็ม
N.D.	=	No detected
ng/m ³	=	Nanogram/cubic meter
NOEC	=	No-observed effects concentration
NORs	=	Nuclear organizer regions
PCE	=	Polychromatic erythrocytes
PBS	=	Phosphate buffer saline
ppm	=	Part per million
ROS	=	Reactive oxygen species
SCEs	=	Sister chromatid exchanges
SCGE	=	Single Cell Gel Electrophoresis
VNFs	=	Vacuolated nucleus frequencies
μg	=	Microgram
μg Cd/g	=	Microgram cadmium/gram
μg/day	=	Microgram/day
μg/g	=	Microgram/gram
μg/kg	=	Microgram/kilogram
μg/L	=	Microgram/litre
μg/ml	=	Microgram/millilitre
μg/m ³	=	Microgram/cubic metre
μM	=	Micromolar
μl	=	Microlitre

บทที่ 1

บทนำ

1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ประเทศไทยเป็นแหล่งอาหารที่อุดมสมบูรณ์ ชีวิตของคนไทยส่วนใหญ่ยังมีความสัมพันธ์กับแหล่งน้ำเพื่อใช้ในการเกษตรและการอุปโภคบริโภค เช่น แม่น้ำเจ้าพระยา แม่น้ำท่าจีน แม่น้ำแม่กลอง และเป็นแหล่งอาหารของคนไทย ปัจจุบันนี้มีโรงงานอุตสาหกรรมเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทรัพยากรน้ำถูกนำมาใช้ในกระบวนการผลิตเพิ่มสูงขึ้นและปล่อยของเสียลงสู่แหล่งน้ำทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารพิษ เช่น โลหะหนักและสารฆ่าแมลงสังเคราะห์ โลหะแคดเมียมเป็นวัตถุอันตรายในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น ใช้ผสมขุบเหล็กกล้ากันสนิมในอุตสาหกรรมต่อเรือ ใช้ผสมรงควัตถุที่ให้สีสดใสในอุตสาหกรรมแก้วเซรามิกและพลาสติก ใช้ในอุตสาหกรรมแบตเตอรี่ชนิดสามารถอัดไฟฟ้าเข้าใหม่ได้ เช่น ถ่านนิเกิลแคดเมียม (Ni-Cd) ใช้ผสมกับสังกะสีขึ้นรูปเป็นปลอกถ่านไฟฉาย ใช้เป็นส่วนผสมในการผลิตยาฆ่าแมลงและปุ๋ยเคมี ใช้เพิ่มความคงตัวในการผลิตท่อน้ำ ทำให้พบแคดเมียมปนเปื้อนและกระจายอยู่ในอากาศ ดิน น้ำ และในอาหาร ซึ่งมาตรฐานคุณภาพน้ำทิ้งของอุตสาหกรรม และมาตรฐานน้ำดื่มในประเทศไทยกำหนดให้พบการปนเปื้อนแคดเมียมได้ไม่เกิน 0.03 และ 0.01 mg/L ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) แคดเมียมเป็นสารก่อมะเร็งในคนที่จัดอยู่ในกลุ่ม 1A (IARC, 2007) เมื่อร่างกายได้รับแคดเมียมเข้าไปมากๆ ทำให้เกิดเนื้องอกหรือมะเร็งที่อวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ปอดและต่อมลูกหมาก (Hodgson, 2004) และทำให้เกิดความเป็นพิษที่รุนแรงที่เรียกว่าโรคอิไต-อิไต (Itai-itai disease) หรือ ouch-ouch disease (สุภาวดี และคณะ, 2546; William, 2000; Schonwald, 2001; Yu, 2001; Dart, 2004; Brent, 2005; Hathaway, 2005) จากรายงานการวิจัยทรัพยากรน้ำและดินในประเทศไทยของสถาบันอิวมีพบการปนเปื้อนของแคดเมียมในสิ่งแวดล้อม แหล่งน้ำ นาข้าว และผลผลิตทางการเกษตรในพื้นที่ 8 หมู่บ้านของกลุ่มน้ำแม่ตาบ อ.แม่สวด จ.ตาก ซึ่งอยู่ใกล้บริเวณแหล่งแร่สังกะสีและมีการถลุงแร่สังกะสี โดยพบปริมาณสารแคดเมียมในดินสูงกว่าค่ามาตรฐานของสหภาพยุโรป (EU) ถึง 1,800 เท่า และพบว่า ร้อยละ 95 ของเมล็ดข้าวที่สุ่มตัวอย่าง มีแคดเมียมปนเปื้อนในปริมาณที่สูงกว่าที่พบในพื้นที่อื่นๆ ของประเทศไทยถึง 100 เท่า และปริมาณสารแคดเมียมที่พบนี้พบสูงในระดับเดียวกับที่พบในข้าวที่ก่อให้เกิดโรคอิไต-อิไตในประเทศญี่ปุ่น (ชุดินัน, 2547) กระทรวงสาธารณสุข กรมควบคุมโรคและกลุ่มงานเวชกรรมสังคมโรงพยาบาลแม่สวด จ.ตาก ร่วมกับสำนักโรคจากการประกอบอาชีพและสิ่งแวดล้อมตรวจหาระดับแคดเมียม ในเลือดและปัสสาวะของประชากรที่สุ่ม

ตรวจจำนวน 250 คน ระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2546 ถึง พ.ศ. 2547 พบค่าเฉลี่ยแคดเมียมในเลือด เท่ากับ 3.58 ไมโครกรัมต่อลิตร และในปีสภาวะ 3.6 ไมโครกรัมต่อกรัมครีอาตินีน ซึ่งพบว่ามีค่าต่ำกว่าค่าที่กำหนดโดยองค์การอนามัยโลกคือ 5 ไมโครกรัมต่อลิตรและ 2 ไมโครกรัมต่อกรัมครีอาตินีน (แสงโสม, 2548)

สารเคมีสังเคราะห์ที่ใช้ในการเกษตรบางชนิดสะสมในสิ่งแวดล้อมเป็นเวลานาน เช่น ดีดีที (DDT) จึงส่งผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและชีวิตของมนุษย์ ทำให้การใช้สารเคมีสังเคราะห์ในการควบคุมแมลงลดลงและใช้สารฆ่าแมลงจากพืช (biopesticide) มากขึ้น โดยเฉพาะเกษตรกรที่ผลิตสินค้าเกษตรอินทรีย์ซึ่งมีมูลค่าในตลาดโลกประมาณ 716,800 ล้านบาท ตลาดส่วนใหญ่อยู่ที่ประเทศสหรัฐอเมริกา สหภาพยุโรปและญี่ปุ่น มูลค่า 320,000, 296,800 และ 100,000 ล้านบาท ตามลำดับ โดยมีอัตราขยายตัวเพิ่มขึ้นเฉลี่ยร้อยละ 25 ต่อปี สินค้าเกษตรอินทรีย์โดยทั่วไปมีราคาสูงกว่าสินค้าปกติร้อยละ 25-50 ประเทศไทยเป็นผู้ผลิตและส่งออกอาหารสินค้าเกษตรอินทรีย์ที่สำคัญของโลก จึงเปรียบเสมือนเป็นห้องครัวของโลก และเป็นโอกาสสำคัญที่ประเทศไทยจะได้ก้าวเข้าสู่เวทีการค้าเกษตรอินทรีย์โลกที่มีแนวโน้มการส่งออกเพิ่มสูงขึ้น (สุพจน์, 2548) ข้อกำหนดสำคัญของสินค้าเกษตรอินทรีย์คือ ห้ามมีสารเคมีตกค้าง โดยอนุญาตให้ใช้สารฆ่าแมลงจากพืชบางชนิด เช่น สารสกัดสะเดา (neem extracts) ทำให้สารสกัดสะเดามีบทบาทอย่างมากในด้านเกษตรกรรมของไทย และลดการนำเข้าสารเคมีสังเคราะห์จากต่างประเทศ และมีการผลิตจำหน่ายในระดับอุตสาหกรรม สารสกัดสะเดาที่ผลิตออกจำหน่ายมีชื่อทางการค้าแตกต่างกัน มีทั้งที่ผ่านและไม่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพจากของกรมวิชาการเกษตรและกองวัตถุมีพิษ องค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (EPA) ได้ยอมรับสารอะซาดิแรคติน (azadiracthin) ให้เป็นสารป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืช (มณฑนา, 2542)

ปัจจุบันมีสารเคมีต่างๆ ทั้งจากภาคอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม ตกค้างจำนวนมากในสิ่งแวดล้อม เช่น พบแคดเมียมในตะกอนดินก้นแม่น้ำปิง แม่น้ำบางปะกง และพบแคดเมียมตกค้างในนม สัตว์น้ำ ข้าว และผัก การตรวจหาระดับแคดเมียมปนเปื้อนในแหล่งน้ำและอาหารมีค่าใช้จ่ายสูง และสารประกอบแคดเมียมบางประเภทไม่ละลายน้ำ การใช้ปลาตรวจสอบระดับของสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำ โดยเฉพาะความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) เป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับจากองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา และเป็นวิธีที่มีการรายงานการทดลองทั้งในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม (EPA, 2002) วิทยานิพนธ์นี้จึงต้องการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักแคดเมียมและสารสกัดจากสะเดาต่อสารพันธุกรรม โดยใช้ปลาอุกยูงเป็นโมเดลในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำ เนื่องจากปลาอุกยูงเป็นปลาน้ำจืดที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำทั่วไป หากอาหารกินตามพื้นดิน มีความทนทานต่อสภาพแวดล้อม เลี้ยงง่าย โตไว เป็นแหล่งอาหาร

โปรตีน และยังเป็นปลาที่นิยมในการบริโภคเนื่องจากมีรสชาติดีและมีราคาถูก (นิภา และคณะ, 2550) การใช้ปลาอุกยทดสอบเป็นวิธีหนึ่งที่จะลดความเสี่ยงจากการบริโภคสารพิษที่มีผลต่อสุขภาพหรือประยุต์ผลตรวจสอบในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม การวางแผนการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดสะเดา ยังทำให้ทราบถึงการใช้สารสกัดสะเดาให้ปลอดภัย ทั้งนี้เพราะว่าสารสกัดสะเดาที่อนุญาตให้ใช้ในการทำเกษตรอินทรีย์โดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (EPA) ยกเว้นประเทศญี่ปุ่นไม่อนุญาตให้ใช้สารสกัดสะเดาในการทำเกษตรอินทรีย์ จึงมีปัญหาต่อการส่งสินค้าอาหารเกษตรอินทรีย์ไปขายยังต่างประเทศ ผลการทดลองนี้จึงจะทำให้ได้องค์ความรู้ในการใช้สารสกัดสะเดาให้ปลอดภัยและเป็นมิตรกับสิ่งแวดล้อมเพื่อส่งเสริมการผลิตสินค้าเกษตรอินทรีย์ของประเทศ

2. วัตถุประสงค์ของการวิจัย

2.1. ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคดเมียมในรูปของ $CdCl_2$ และสารสกัดสะเดา

ต่อปลาอุกย เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ ด้วย

เทคนิค Micronucleus test และความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ

2.2. เปรียบเทียบความถี่ในการเกิด micronucleus ในเซลล์ของเนื้อเยื่อปลาอุกย 3 ชนิด

หลังจากได้รับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นอย่างน้อย 5 ระดับ

2.3. เปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาไทย 111 ก่อนและหลังนำไปผึ่งแดดเป็นเวลา

7 วัน เพื่อศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดจากสะเดาต่อการชักนำให้เกิด micronucleus

และความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาอุกย

2.4. เปรียบเทียบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ $CdCl_2$ และสารสกัดจากสะเดาต่อ

ปลาอุกย ด้วยเทคนิค Comet assay เฉพาะความเข้มข้นที่ก่อให้เกิดพิษสูง

3. สมมติฐานของการวิจัย

เมื่อปลาอุกยได้รับ $CdCl_2$ และสกัดจากสะเดา ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถ้าสารทดสอบที่ได้รับนี้มีพิษโดยทำให้ DNA แตกหัก จะสามารถตรวจสอบได้ด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay

4. ขอบเขตของการศึกษา

- 4.1. ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคดเมียมในรูปของคลอไรด์ (CdCl_2) และ สารสกัดจากสะเดา โดยวิธีแช่ปลาอุกอยู่ในสารทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และตรวจผลด้วยเทคนิค Micronucleus test
- 4.2. ศึกษาความไวของการเกิด micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียส เช่น blebbed, notched, lobed และ vacuolated nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์ตับของปลาอุกที่ได้รับ CdCl_2 เพื่อคัดเลือกเซลล์ที่มีความไวและใช้ตรวจผลในขั้นตอนการศึกษาต่อไป
- 4.3. เปรียบเทียบเทคนิคในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาอุกด้วยเทคนิค Comet assay เฉพาะบางความเข้มข้นที่มีผลชักนำให้เกิด micronucleus เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม

5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- 5.1. ทำให้ทราบค่าระดับความเข้มข้นของแคดเมียมและสารสกัดสะเดาที่มีผลให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาอุก
- 5.2. ทำให้ทราบว่าเนื้อเยื่อใดของปลาอุกมีความไวต่อการแสดงผลเมื่อได้รับสารพิษ เมื่อได้รับ CdCl_2 และสารสกัดสะเดาในระดับที่ทำลายสารพันธุกรรม เมื่อตรวจด้วยวิธี Micronucleus test และตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ
- 5.3. ทำให้ทราบผลของแสงแดดต่อการเสื่อมฤทธิ์ด้านความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาอุก
- 5.4. ทำให้ทราบความไวในการใช้เทคนิค Micronucleus และ Comet assay ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลาอุก
- 5.5. ทำให้ได้องค์ความรู้เพื่อใช้ปลาอุกเป็นโมเดล ทดสอบสารพิษที่มีผลต่อสารพันธุกรรม เพื่อเป็นแนวทางประยุกต์ใช้ข้อมูลในภาคสนามต่อไป

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

1. ปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

1.1 ลักษณะสำคัญ

ปลาอุกอุยมีชื่อสามัญ คือ Gunther's walking catfish และชื่อทางการค้า คือ broadhead catfish เป็นปลาพื้นบ้านของไทยที่ไม่มีเกล็ด รูปร่างเรียวยาว หัวเล็กค่อนข้างรีไม่แบน มีกระดูกท้ายทอยยื่นแหลมออกไปลักษณะคล้ายรูปสามเหลี่ยม มีหนวดสี่เส้นที่ริมฝีปาก ครีบหูมีเงี่ยงเล็กสั้นแหลมคมมาก ครีบหลังปลายครีบสีเทาปนดำ ครีบหางกลมไม่ใหญ่มากมีสีเทาปนดำ ผิวหนังลำตัวบริเวณด้านบนมีสีน้ำตาลหรือน้ำตาลปนดำ ผิวหนังด้านท้องมีสีขาวหรือสีเหลือง ลำตัวมีจุดขาวเล็กๆเรียงเป็นแถวขวางลำตัวหลายแถว เนื้อมีสีเหลือง มีลำตัวสั้นป้อมกว่าปลาอุกด้าน

1.2 อนุกรมวิธานปลาอุกอุย

Kingdom Animal

Phylum Chordata

Class Actinopterygii (ray-fined fish)

Order Siluridae

Family Siluriformes (catfish)

Genus Clariidae (airbreathing catfish)

Species *Clarius macrocephalus*

ที่มา : สุภาพร สุกสีเหลือง. มินวิทยา (Ichthyology). 1999.



รูปที่ 1 ปลาอุกอุย (*Clarias macrocephalus*)

ปลาถูกอุกยพบแพร่กระจายอยู่ในแหล่งน้ำจืดทั่วไปแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เช่น ประเทศอินเดีย พม่า ไทย ลาว กัมพูชา ฟิลิปปินส์ เวียดนาม และมาเลเซีย โดยพบแพร่กระจายทั่วทุกภาคของประเทศไทยตามห้วย หนอง คลอง บึง พบชุกชุมบริเวณน้ำตื้นและน้ำนิ่งที่มีพันธุ์ไม้น้ำปกคลุมและพื้นดินเป็นโคลนตม ปลาถูกอุกยเป็นปลาที่มีวิวัฒนาการพิเศษในการหายใจ เช่นเดียวกับปลาช่อน ดังนั้นจึงสามารถดำรงชีวิตอยู่ได้ในน้ำที่มีออกซิเจนเพียงเล็กน้อย ถึงแม้ว่าแหล่งน้ำจะค่อนข้างกร่อย ปลาถูกอุกยยังสามารถอาศัยอยู่ได้เป็นอย่างดี ในธรรมชาติถูกปลาถูกอุกยกินอาหารได้ทั้งพืชและสัตว์ (omnivorous) เช่น โปรโตซัว ไรน้ำขนาดเล็ก โรติเฟอร์ และแพลงก์ตอนพืช ปลาถูกอุกยที่มีขนาดโตขึ้น จะกินอาหารจำพวกตัวอ่อนของแมลง ลูกกุ้ง ลูกปู หนอน และอินทรีย์สารที่อยู่ตามพื้นโคลน บางครั้งเป็นปลาพวก scavengers เนื่องจากมีนิสัยชอบกินอาหารจำพวกเศษเนื้อที่กำลังสลายตัว (สุภาพร, 2545; กรมประมง, 2550; นิภา และคณะ, 2550)

2. แคดเมียม (Cadmium, Cd)

1. ลักษณะและคุณสมบัติ

แคดเมียมเป็นโลหะหนักที่อยู่ในกลุ่ม IIB ของตารางพีริออดิก (periodic table element) มีเลขอะตอม (atomic number) 48 มีน้ำหนักอะตอม (atomic weight) 112.40 มีจุดหลอมเหลว 321 องศาเซลเซียส เป็นธาตุที่หายาก (Yu, 2001; Dart, 2004) มีสีขาวฟ้า วาวแสง สามารถบิดโค้งงอได้และถูกตัดได้ง่ายด้วยมีด มักอยู่ในรูปแท่ง แผ่น เส้นลวด หรือเป็นผงเม็ดเล็กๆ พบแคดเมียมที่พื้นผิวโลกประมาณ 0.1 mg/L (Sterner, 1999; Massaro, 1997; WHO, 2000) แคดเมียมจะถูกออกซิไดซ์ช้าๆ ในอากาศที่มีความชื้นให้แคดเมียมออกไซด์ แคดเมียมในธรรมชาติจะรวมตัวอยู่กับกำมะถันเป็นแคดเมียมซัลไฟด์ แคดเมียมออกไซด์ หรือแคดเมียมคาร์บอเนต (Sterner, 1999) และมักปนอยู่กับสินแร่สังกะสี ตะกั่ว หรือทองแดง (Massaro, 1997; WHO, 2000; Yu, 2001) ดังนั้นในการทำเหมืองสังกะสีจะได้แคดเมียมซึ่งเป็นผลพลอยได้ การนำเอาแคดเมียมมาใช้ทำให้เกิดการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั้งในอากาศ น้ำ และดิน ทำให้เกิดการปนเปื้อนในอาหาร

แคดเมียมตามแหล่งน้ำในธรรมชาติมีอยู่ด้วยกันหลายรูป เช่น รูปของไอออน สารประกอบโลหะอนินทรีย์หรือโลหะอินทรีย์ แต่ส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ divalent cadmium ion และปัจจัยสำคัญที่ทำให้แคดเมียมอยู่ในรูปอื่นๆ คือ pH และปริมาณสารอินทรีย์ เนื่องจากไอออนของแคดเมียมจะรวมตัวกันเป็นสารประกอบกับสารหรือไอออนอื่นๆ ที่อยู่ในน้ำตามลำดับก่อนหลังในแง่ของการจับตัว คือ CO_3^{3-} , OH^+ > Cl^- > SO_4^{+}

การเปลี่ยนแปลงรูปโดยปฏิกิริยาของน้ำ แคดเมียมจะรวมตัวกันเป็นสารประกอบกับ hydroxyl group (OH) เช่น CdOH , Cd(OH)_2 (aq), Cd(OH)_3^- และ Cd(OH)_4^{2-} แคดเมียมที่ละลาย

ในน้ำเกือบทั้งหมดจะอยู่ในรูปของไอออนบวกที่มีวาเลนซ์ 2 (divalent cation) แต่เมื่อน้ำมี pH สูงขึ้น ($\text{pH} > 9$) แคลเซียมจะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปที่เป็นของแข็งไม่ละลายน้ำ คือ $\text{Cd}(\text{OH})_2$

ในกระบวนการ Sorption โดยที่แคลเซียมอยู่ติดกับผิวของเกลือแร่ หรือ hydrous metal oxide หรือสารอินทรีย์ต่างๆ เป็นการขัดเอาแคลเซียมออกมาได้มากกว่าการทำให้ตกตะกอน จากการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการ Sorption แคลเซียมที่ติดกับดินเหนียว สารอินทรีย์ hydrous iron aluminum หรือ manganese oxide และ carbonate minerals พบแคลเซียมในตะกอนที่ก้นมากกว่าในน้ำ

จากรายงานของ EPA พบว่า ปริมาณแคลเซียมในดินตะกอน (sediment) เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของสารอินทรีย์ในดินตะกอน ซึ่งการดูดซับแคลเซียมของดินตะกอนมีความสัมพันธ์กับปริมาณสารอินทรีย์ที่อยู่ในดินตะกอน โคลนสามารถดูดซับแคลเซียมในแหล่งน้ำได้ดี ซึ่งขึ้นอยู่กับชนิดของโคลน ปริมาณแคลเซียม ชนิดของแคลเซียม อุณหภูมิ pH และความกระด้างของน้ำ นอกจากนี้ยังพบว่าในโคลนนั้นมี humic material ประกอบอยู่ ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในการดูดซับแคลเซียมด้วย (Rocha และคณะ, 2007) และแคลเซียมที่สะสมอยู่ในตะกอนดินสามารถกระจายออกมาในชั้นน้ำได้ เมื่อความเค็มของน้ำเพิ่มขึ้น

2. การปนเปื้อนของแคลเซียมในสิ่งแวดล้อม

2.1 การปนเปื้อนของแคลเซียมในอากาศ

จากการตรวจวัดปริมาณความเข้มข้นของแคลเซียมในบรรยากาศ พบว่า แคลเซียมในบรรยากาศมีปริมาณต่ำมากถึงแม้จะเป็นเมืองอุตสาหกรรม ดังนั้น ปริมาณแคลเซียมที่ร่างกายได้รับโดยการสูดหายใจเข้าไปจึงมีค่อนข้างน้อยมาก ส่วนปริมาณแคลเซียมในบรรยากาศในบริเวณใกล้กับปล่องระบายอากาศเสียของแคลเซียมอาจมีปริมาณสูงกว่าบริเวณอื่นๆ มาก

สำหรับในประเทศไทยมีการตรวจวัดคุณภาพของอากาศในบริเวณใกล้เคียง โรงงานถลุงสังกะสีของบริษัท ผาแดง อินดัสทรี จำกัด จ.ตาก ในรัศมีประมาณ 1 กิโลเมตร โดยตรวจวัดในรูปของฝุ่น พบว่ามีปริมาณต่ำมาก กล่าวคือจากการตรวจวัดของ บริษัท ผาแดง อินดัสทรี จำกัด จ.ตาก ในปี พ.ศ. 2528-2530 พบปริมาณแคลเซียมในบรรยากาศเฉลี่ย 24 ชั่วโมง มีค่าประมาณ $0.007\text{--}0.02 \text{ mg/m}^3$ และจากการตรวจวัดโดยสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมและจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อเดือนพฤษภาคม 2529 พบปริมาณแคลเซียม $0.3\text{--}3.3$ และน้อยกว่า 3 mg/L ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

2.2 การปนเปื้อนของแคดเมียมในน้ำ

จากการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมในบ่อน้ำตื้น เขตอำเภอเมือง จ.ตาก ที่ใช้เพื่อการอุปโภคบริโภค เมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2532 โดยสำนักงานคณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ มีปริมาณต่ำมาก ค่าสูงสุดที่พบคือ $0.18 \mu\text{g/L}$ ในปี 2546 สถาบันอิวมี (IWMI) องค์การนานาชาติอิสระศึกษาวิจัยทรัพยากรน้ำและดินในประเทศกำลังพัฒนาของสหภาพยุโรป ศึกษาการปนเปื้อนของสารแคดเมียมในตัวอย่างข้าว กระเทียม ถั่วเหลือง ที่ตำบลแม่ตาว และตำบลพระธาตุผาแดง อ.แม่สอด จ.ตาก พบว่า กระเทียมจากตัวอย่าง 14 แปลง มีแคดเมียมปนเปื้อน $1.3\text{-}6.3 \text{ mg/kg}$ ซึ่งสูงเกินถึง 126 เท่า ของค่าที่ยอมให้มีได้สูงสุดของ CODEX ที่กำหนดไว้ 0.05 mg/kg และพบว่าถั่วเหลืองจากตัวอย่าง 76 แปลง พบปริมาณแคดเมียมปนเปื้อน $0.34\text{-}3.37 \text{ mg/kg}$ ซึ่งสูงเกินกว่าค่าที่ CODEX ยอมให้มีได้สูงสุด เท่ากับ 0.2 mg/kg ถึง $1.7\text{-}16.8$ เท่า (ชุดิมา, 2549)

2.3 การปนเปื้อนของแคดเมียมในดิน

จากการตรวจวัดปริมาณแคดเมียมในตะกอนดินจากแม่น้ำบางปะกง ปราจีนบุรี และนครนายก เมื่อปี พ.ศ. 2530 พบว่ามีค่าสูงสุด $0.5 > 0.5$ และ $< 0.5 \mu\text{g/g}$ ตามลำดับ ส่วนปริมาณสูงสุดพบในตะกอนดินแม่น้ำปิง จากการตรวจวัดเมื่อเดือนมกราคม พ.ศ. 2532 มีค่า $0.027 \mu\text{g/g}$ และนอกจากนี้ยังพบว่าแคดเมียมมาจากการใช้ปุ๋ยฟอสเฟต ในสถานะที่ดินเป็นกรดแคดเมียมจะเคลื่อนที่ได้ดีและถูกดูดซับไว้ด้วยอนุภาคตะกอนของแร่ธาตุ ดินเหนียว และทราย ซึ่งขึ้นอยู่กับความเข้มข้น ความเป็นกรด-เบส ชนิดของสารประกอบในดิน และความเข้มข้นของสารประกอบเชิงซ้อน (Yu, 2001) ในปี 2546 ตรวจพบปริมาณแคดเมียมในดินอยู่ในช่วง $0.5\text{-}218.2 \text{ mg/kg}$ กล่าวคือ มีปริมาณแคดเมียมสูงเกิน 72 เท่า ของค่าที่ยอมให้มีได้สูงสุดของสหภาพยุโรปที่กำหนดไว้ คือ 3 mg/kg (ชุดิมา, 2549) ส่วนมาตรฐานน้ำดื่มและน้ำทิ้งอุตสาหกรรมกำหนดการปนเปื้อนของแคดเมียมไว้ไม่เกิน 0.01 และ 0.03 mg/L ตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

2.4 การปนเปื้อนของแคดเมียมในอาหาร

อาหารทั่วไปมีแคดเมียมปะปนอยู่น้อยมาก อาหารที่มีแคดเมียมปนเปื้อนอยู่เนื่องมาจากในสิ่งแวดล้อมมีแคดเมียมปนเปื้อน เช่น ดิน น้ำ อากาศ เป็นต้น โดยจะพบว่าการปนเปื้อนของแคดเมียมต่ำสุดและสูงสุด คือ นมและผักกินใบ ตามลำดับ (ตารางที่ 1) ยกเว้นส่วนอาหารประเภทอื่นๆ เช่น มะเขือเทศ ผลไม้ต่างๆ และสัตว์ทะเลประเภทหอย กุ้ง ปู ที่สำรวจจากอาหารทะเลส่งออกของประเทศไทย มีค่าแคดเมียมในปริมาณสูงกว่านี้มาก อาหารประเภทเครื่องในสัตว์ เลี้ยง

ลูกด้วยนม เช่น ดับ ไต พบแคดเมียมปริมาณสูงสุด (0.1-1 mg/L) แต่สำหรับพืชผักและข้าวที่ปลูกในดินจะพบว่าแคดเมียมประมาณ 1 mg/L

จากการรายงานการสำรวจปริมาณแคดเมียมในข้าวเจ้าและข้าวเหนียวที่ผลิตเป็นข้าวกล้องและข้าวสาร จำนวน 64 ตัวอย่าง จาก 23 พันธุ์ ซึ่งเป็นตัวอย่างที่เก็บจากสถานีทดลองพันธุ์ข้าวทั่วทุกภาคทั่วประเทศ ในระหว่างปี พ.ศ. 2517-2518 โดยสำนักงานปรมาณูเพื่อสันติ พบว่าข้าวเจ้าพบปริมาณแคดเมียมสะสมอยู่สูงกว่าข้าวเหนียว โดยพบว่าข้าวกล้องมีการปนเปื้อนของแคดเมียมสูงกว่าข้าวสาร (ตารางที่ 2) ซึ่งปริมาณการสะสมแคดเมียมนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณการสะสมแคดเมียมในดิน และชนิดของพืชนั้นๆ โดยแคดเมียมมีความเข้มข้นสูงกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสังกะสีและตะกั่ว (ตารางที่ 3) เนื่องจากการทำนามีการใช้สารเคมีประเภทปุ๋ยฟอสเฟต ซึ่งมีแคดเมียมเจือปนอยู่ด้วย ทำให้น้ำและดินมีปริมาณแคดเมียมเพิ่มสูงขึ้น ข้าวจึงได้รับแคดเมียมเพิ่มมากขึ้นตามลำดับ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

ตารางที่ 1 ปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนในอาหาร

ชนิดของอาหาร	ปริมาณแคดเมียม ($\mu\text{g/g wet weight}$)
ผลิตภัณฑ์จากนม	0.01
นม	0.0015-0.004
ข้าวสาลี	0.07
ผักกินใบ	0.14
มันฝรั่ง	0.08
ผลไม้ต่างๆ	0.07
น้ำตาล	0.04
เนื้อ ปลา และสัตว์ปีก	0.03
มะเขือเทศ	0.00
ธัญพืชและผลิตภัณฑ์	0.06

ที่มา: Yu, 2001.

ตารางที่ 2 ปริมาณแคดเมียมที่ตรวจพบในข้าวทั่วประเทศไทย

ชนิดของข้าว	ปริมาณแคดเมียม ($\mu\text{g/g}$)	
	ข้าวกล้อง	ข้าวสาร
ข้าวเจ้า	0.1270-0.9695	0.0283-0.3972
ข้าวเหนียว	0.0665-1.2740	0.0382-0.3948

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2541.

ตารางที่ 3 การสะสมตะกั่ว สังกะสี และแคดเมียมในพืช

ชนิดโลหะ	ความเข้มข้น (ppm ต่อน้ำหนักแห้ง)		
	ดิน	พืช	อัตราส่วนระหว่างพืชกับดิน
ตะกั่ว	10	4.5	0.45
สังกะสี	50	32	0.6
แคดเมียม	0.06	0.60	10

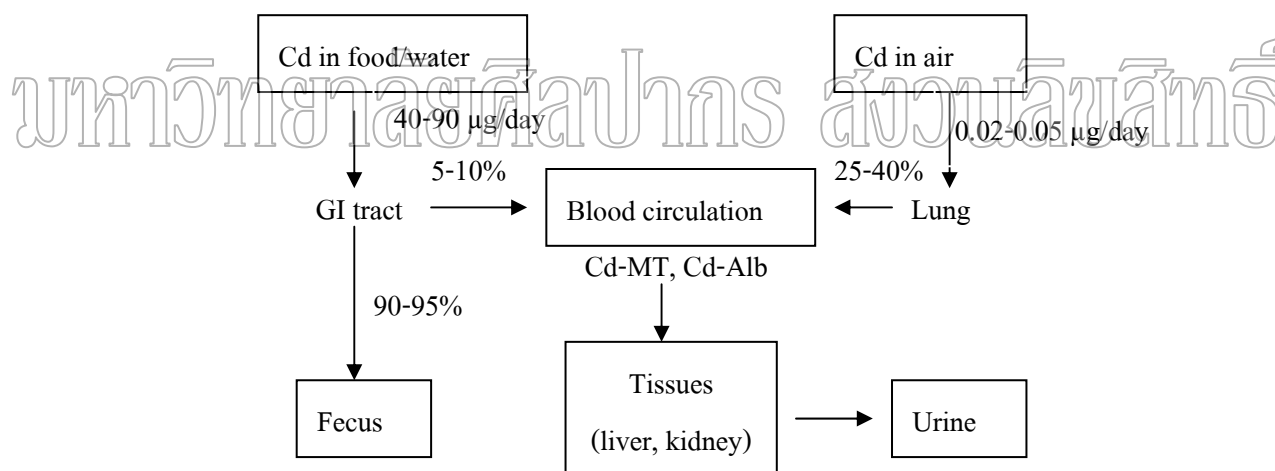
ที่มา : Yu, 2001.

จากรายงานของกองตรวจสอบรับรองมาตรฐานคุณภาพสัตว์น้ำและ ผลิตภัณฑ์สัตว์น้ำ กรมประมง ดำเนินการตรวจชนิดของปลาหมึกในน่านน้ำไทยที่มีความสำคัญต่อเศรษฐกิจและมีผู้นิยมบริโภคแพร่หลาย มี 4 ชนิด คือ หมึกกระดอง หมึกกล้วย หมึกสาย และหมึกกกลม ผลการตรวจวิเคราะห์ผลิตภัณฑ์หมึกส่งออกประจำปี 2546 พบว่ามีค่าเฉลี่ยของแคดเมียมที่ตรวจพบในหมึกกล้วย หมึกกระดอง และหมึกสาย เท่ากับ 0.28 0.32 และ 0.47 mg/kg ตามลำดับ ซึ่งต่ำกว่ามาตรฐานปริมาณแคดเมียมที่ปนเปื้อนในปลาหมึกส่งออกไปยังสหภาพยุโรป ออสเตรเลีย และสหรัฐอเมริกา ซึ่งกำหนดไว้เท่ากับ 1, 2 และ 4 mg/kg ตามลำดับ และปริมาณแคดเมียมที่พบลดลงจากรายงานการศึกษาปี 2535-2543 ที่มีค่าเฉลี่ยแคดเมียมที่ตรวจพบ เท่ากับ 0.89 mg/kg

3. การดูดซึมและการกำจัดแคดเมียมของร่างกาย

แคดเมียมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 3 ทาง คือ ระบบทางเดินอาหาร ระบบหายใจ และการสัมผัส เมื่อแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายแล้ว แคดเมียมจะจับกับหมู่-SH ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ และสามารถนำแคดเมียมเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิต การดูดซึมแคดเมียมเข้าทางระบบ

ทางเดินอาหารนั้นพบว่าร่างกายดูดซึมเข้าได้น้อยมาก ประมาณ 5-10% ของปริมาณแคดเมียมที่รับเข้าไป แต่การดูดซึมจะเปลี่ยนแปลงได้จากสารอื่นๆ ที่ร่างกายรับเข้าไป เช่น แคลเซียม เหล็ก และโปรตีน ซึ่งโมเลกุลเหล่านี้มีโครงสร้างที่คล้ายกับแคดเมียม จึงสามารถพาแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายได้ โดยเฉพาะแคลเซียมจะถูกดูดซึมได้ดีในลำไส้เล็ก โดยอาศัยโปรตีน ชื่อ calcium binding protein (CaBP) (Dart, 2004) ซึ่งการดูดซึมแคดเมียมก็อาศัย CaBP ด้วยเช่นกัน แคดเมียมที่ปนเปื้อนทางระบบทางเดินอาหารส่วนใหญ่จะถูกขับถ่ายออกจากร่างกาย มีเพียง 5-10% ที่จะถูกลำเลียงเข้าสู่กระแสเลือด ส่วนแคดเมียมที่เข้าทางระบบทางเดินหายใจถูกลำเลียงเข้าสู่กระแสเลือดประมาณ 25-40% โดยอาศัยเซลล์เม็ดเลือดแดงเป็นตัวพาแคดเมียมเข้าสู่กระแสเลือด โดยแคดเมียมจะจับกับฮีโมโกลบินในตำแหน่งที่จับกับออกซิเจน จากนั้นแคดเมียมที่อยู่ในกระแสเลือดจับกับโปรตีนที่มีมวลโมเลกุลสูง ได้แก่ albumin ทำให้แคดเมียมไปสะสมอยู่ในตับและไต ส่วนในตับนั้นแคดเมียมจะไปกระตุ้นให้เซลล์ตับสร้าง metallothionein ซึ่งจะเป็นตัวพาแคดเมียมเข้าสู่เซลล์หรือเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ และมีแคดเมียมบางส่วนขับถ่ายออกมาในรูปของ urine (Casarett, 2001)



รูปที่ 2 เมแทบอลิซึมของแคดเมียมในร่างกายมนุษย์

หมายเหตุ : Cd-MT = แคดเมียมที่จับกับ metallothionein, Cd-Alb = แคดเมียมที่จับกับ albumin

ที่มา: Yu, 2001.

4. ความเป็นพิษของแคดเมียมต่อสิ่งมีชีวิต

สัตว์ได้รับแคดเมียมจากการกินอาหาร แคดเมียมจะทำให้โครงสร้างของเซลล์ผิดปกติ และปัจจัยสำคัญที่ทำให้แคดเมียมเข้าสู่เซลล์ของสัตว์น้ำ คือ ความเค็มและอุณหภูมิ เมื่อความเค็มและอุณหภูมิสูงขึ้นจะทำให้เกิดการดูดซึมแคดเมียมเพิ่มมากขึ้น (Yu, 2001) (ตารางที่ 4) โดยทั่วไป

มนุษย์ได้รับแคดเมียมผ่านทางกรกินเป็นส่วนใหญ่ ในผู้ที่สูบบุหรี่จะได้รับแคดเมียมเพิ่มขึ้น และปริมาณแคดเมียมทั้งหมดในร่างกายครึ่งหนึ่งไปสะสมอยู่ที่ตับและไต โดยจะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ ATPase of myosin pulmonary alveolar macrophage cell (Massaro, 1997; Yu, 2001) การจับเอาแคดเมียมที่ร่างกายดูดซึมเข้าไปแล้วออกจากร่างกายเป็นไปค่อนข้างช้ามาก และครึ่งชีวิตของแคดเมียมในคนค่อนข้างยาว 16-33 ปี (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

1. ความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (Acute effects)

1.1 ความเป็นพิษต่อระบบทางเดินอาหาร

ระบบทางเดินอาหารเป็นระบบแรกในร่างกายที่จะได้รับพิษเมื่อร่างกายได้รับแคดเมียมโดยการกิน ซึ่งส่วนใหญ่มีสาเหตุมาจากการกินอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีแคดเมียมปนเปื้อน เนื่องจากอาหารหรือเครื่องดื่มดังกล่าวบรรจุในภาชนะที่เคลือบด้วยแคดเมียม อาการที่ปรากฏเริ่มแรกคือรู้สึกคลื่นเหียนอย่างรุนแรง ตามด้วยการอาเจียน ท้องร่วง เป็นตะคริว และน้ำลายฟูมปาก ในรายที่เป็นมากอาจจะมีอาการอื่นๆ แทรก คือ อาจเกิดอาการช็อคเนื่องจากร่างกายสูญเสียน้ำมาก และอาจทำให้ตายได้ในเวลา 24 ชั่วโมง (ตารางที่ 5) หรือระบบการทำงานของไตล้มเหลวและอาจถึงตายได้ภายใน 7-14 วัน นอกจากนี้ยังมีผลทำลายตับด้วย

1.2 ความเป็นพิษต่อระบบทางเดินหายใจ

ความเป็นพิษที่เกิดขึ้นกับระบบทางเดินหายใจ เนื่องจากการสูดหายใจฝุ่นของแคดเมียม ส่วนใหญ่เกิดเนื่องจากกิจกรรมทางอุตสาหกรรม โดยเฉพาะการเชื่อมโลหะด้วยความร้อนสูง แต่โดยทั่วไปในขณะที่สูดหายใจจะไม่ปรากฏอาการหรือมีอาการเพียงเล็กน้อย และฝุ่นที่เกิดจากการใช้กระแสไฟฟ้าจะมีความเป็นพิษเป็นสองเท่าของฝุ่นที่เกิดจากความร้อน อาการโดยส่วนรวมจะปรากฏหลังจากการสูดหายใจฝุ่นเข้าไปแล้ว 2-3 ชั่วโมง (ตารางที่ 6) เกิดการระคายเคืองที่หลอดลมและปอด (acute inhalation) อาจมีอาการอื่นๆด้วย เช่น ระคายเคืองที่จมูกและคอ ไอ ปวดศีรษะ อ่อนเพลีย หนาวสั่น มีไข้ เจ็บหน้าอก ซึ่งลักษณะอาการแบบนี้เรียกว่า cadmium fume fever (Williams, 2000; WHO, 2000) นอกจากนี้ยังมีอาการอย่างอื่นปรากฏร่วมด้วย เช่น คลื่นเหียน อาเจียน ท้องร่วง และเกิด pulmonary edema (Dart, 2004: 1411.)

ตารางที่ 4 ผลของความเป็นพิษต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ได้รับแคดเมียมคลอไรด์

CdCl ₂ ที่ทำให้เกิดพิษ (mg/kg-bw/day)	ระยะเวลา สัมผัส (วัน)	การเข้าสู่ ร่างกาย	สัตว์ทดลอง	ผลที่เกิดขึ้น
16	378	การกิน	กระต่าย	โลหิตจาง ปัสสาวะมี โปรตีน และน้ำตาลมาก ผิดปกติ เบื่ออาหารและ น้ำหนักลด
9	1 ครั้ง	ฉีดเข้าใต้ ผิวหนัง	กระต่าย	ทำลายเซลล์ลูกอันทะ ภายใน 5-21 วัน และยังมี ผลต่อดับ ไต และม้าม
6.25	90	การดื่มน้ำ	หนู	ระดับ hemoglobin ลดลง
2.0	7 (2 ครั้ง/ วัน)	ฉีดเข้าใต้ ผิวหนัง	หนู	มีผลต่อดับอ่อน
0.63	365	การดื่มน้ำ	หนู	ความดันโลหิตสูงเนื่องจาก ความผิดปกติของไต
0.25	77	ฉีดเข้าใต้ ผิวหนัง	กระต่าย	แผลที่ไต
0.2	335	การดื่มน้ำ	หนู	มีผลต่อดับ

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2541.

ตารางที่ 5 ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของแคดเมียมที่มีผลต่อมนุษย์โดยการกิน

ปริมาณแคดเมียม (mg)	อาการที่เกิดขึ้น
3-90	อาเจียน ไม่มีผลถึงตาย
15	อาเจียน
10-326	มีความเป็นพิษอย่างรุนแรงแต่ไม่ถึงตาย
350-3500	มีความเป็นพิษอย่างรุนแรง
1530-8900	มีความเป็นพิษอย่างรุนแรง

หมายเหตุ ปริมาณที่ไม่มีผลต่อร่างกายแบบเฉียบพลันเมื่อกินเข้าไป คือ 3 mg

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2541.

ตารางที่ 6 ความเข้มข้นของแคดเมียมที่ทำให้เกิดพิษอย่างเฉียบพลันต่อสัตว์ทดลองโดยการหายใจ

สารประกอบแคดเมียม	สัตว์ทดลอง	LC ₅₀ (mg/m ³)
Cadmium oxide	หนู	500-1300 ¹
	หนูเม้าส์	700 ²
	หนูเม้าส์	250 ²
	สุนัข	4000 ²
	กระต่าย	2500 ²
	หนูกีนี	3500 ²
	ลิง	1500 ²
Cadmium stearate	หนู	1500 ⁴
Cadmium chloride	สุนัข	LC ₉₀ = 8 ³

หมายเหตุ 1 = 1 นาที, 2 = 10 นาที, 3 = 30 นาที และ 4 = 12 ชั่วโมง

ที่มา: กรมควบคุมมลพิษ, 2541.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

1.3 ความเป็นพิษต่อระบบอื่นๆ

การทดลองในสัตว์พบว่า แคดเมียมมีพิษต่อระบบอื่นๆ เช่น ไต ตับ อวัยวะตับอ่อน ระบบประสาท ระบบที่เกี่ยวข้องกับการสร้างเม็ดโลหิต และระบบเส้นเลือด หัวใจ สำหรับความเป็นพิษต่อระบบอื่นๆ ในคนยังไม่เด่นชัดเนื่องจากมีการศึกษาตรวจสอบได้ยาก

2. ความเป็นพิษแบบเรื้อรัง (Long term effect)

ความเป็นพิษแบบเรื้อรังที่มีต่อมนุษย์หลังจากที่ร่างกายได้รับแคดเมียมในปริมาณปานกลาง เข้าไปนานติดต่อกัน ความเป็นพิษมักจะไปปรากฏที่ปอดและไตเป็นส่วนใหญ่ ส่วนในระบบอื่นๆ พบว่าปรากฏอาการเช่นเดียวกัน เช่น ที่กระดูก เม็ดโลหิต ส่วนในสัตว์ทดลองพบว่ามีความดันโลหิตสูง

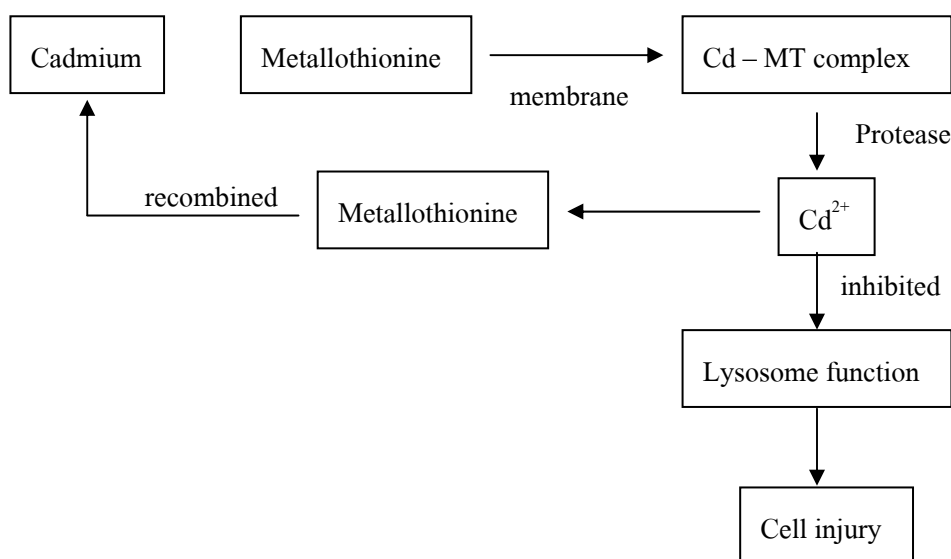
2.1 ความเป็นพิษต่อปอด

คนที่หายใจเอาฝุ่นของแคดเมียมเข้าไปทำให้เกิดความเป็นพิษ คือ มีการบวมของเนื้อเยื่อปอด และเกิดอาการหายใจขัด โดยความเข้มข้นต่ำสุดของแคดเมียมที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษในระยะยาวยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด แต่รายงานบางฉบับเสนอว่า คนที่ได้รับแคดเมียม 2 µg/g ต่อวัน ตลอด 24 ชั่วโมง นาน 70 ปี เป็นระดับที่ไม่มีผลต่อปอด ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดอนุภาคของแคดเมียม

โดย CdO ถูกดูดซึมประมาณ 50% ซึ่งน้อยกว่า CdS อย่างไรก็ดีตามถึงแม้ว่าแคดเมียมที่ร่างกายได้รับ ทั้งจากการกินและการหายใจจะมีปริมาณต่ำจนไม่มีผลต่อปอด แต่แคดเมียมปริมาณดังกล่าวอาจจะสะสมอยู่ในร่างกายจนไปมีผลต่อไตได้ (WHO, 2000)

2.2 ความเป็นพิษต่อไต

คนที่ได้รับแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายนานติดต่อกัน เช่น คนงาน หรือชาวญี่ปุ่น โดยเฉพาะในกลุ่มผู้หญิงสูงอายุซึ่งบริโภคข้าวที่ปลูกในพื้นที่ที่มีแคดเมียมปนเปื้อนจนก่อให้เกิดโรคจากพิษของแคดเมียม เรียกว่า โรคอิไต-อิไต (Massaro, 1997; Williams, 2000; Timbrell, 2002) ซึ่งจะพบความเป็นพิษที่ไตก่อนที่ปอด การทำลายแคดเมียมจากตับมายังไตในรูปของ Cd-MT ทำให้ตรวจพบที่บริเวณ cortex มากเป็น 2 เท่าของที่พบในไต ซึ่งเกิดจากการดูดกลับในส่วน tubule ของแคดเมียมอีกครั้งหลังจากที่กรองผ่าน glomerulus ทำให้เกิด renal tubular disfunction (Tardiff, 1991) รวมถึงไตขับปัสสาวะที่มีโปรตีนมากกว่าปกติ ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำๆ เช่น microglobulin, lysozyme, ribonuclease, retinol-binding protein และ immunoglobulin chains โดยแคดเมียมที่ขับออกมาทางปัสสาวะจะอยู่ในรูป Cd-MT และมีแคดเมียมบางส่วนที่ไม่ถูกกำจัดออกจากร่างกาย โดยแคดเมียมจะไปรวมตัวกับ metallothionein ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เกิดเป็นสารประกอบ Cd-MT ผ่านเข้าสู่เซลล์ หลังจากนั้นจะถูกย่อยด้วยเอนไซม์ เกิดเป็น Cd^{2+} และ metallothionein โดยที่ metallothionein นั้นสามารถกลับไปจับกับ Cd โมเลกุลอื่นๆ ได้ ต่อจากนั้น Cd^{2+} จะไปยับยั้งการทำงานของไลโซโซม ส่งผลทำให้เซลล์ดับเสียหาย (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ความเป็นพิษของแคดเมียมในไตของมนุษย์

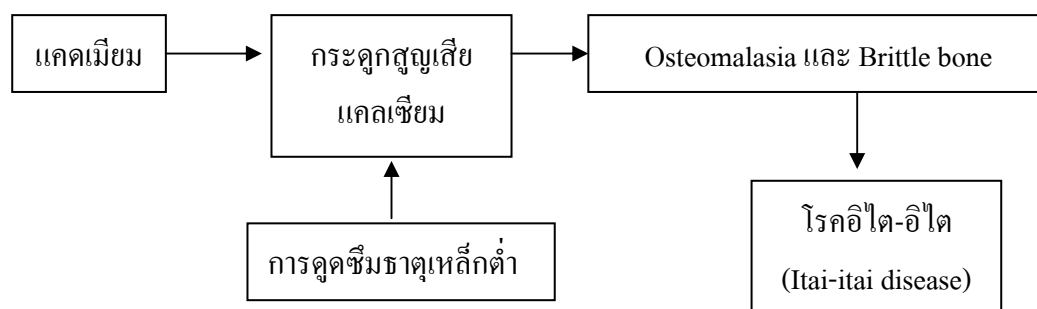
ที่มา : Timbrell, 2002; Hodgson, 2004.

2.3 ความเป็นพิษต่อระบบเลือดเข้าสู่หัวใจ

ความเป็นพิษของแคดเมียมต่อระบบเลือดที่เข้าสู่หัวใจ คือ เกิดความดันโลหิตสูง จากรายงานการทดลอง ให้หนูกินแคดเมียมในปริมาณต่ำมากๆ โดยผสมในอาหาร 0.02 mg/L และในน้ำ 0.2 mg/L ปรากฏว่าหนูมีอาการความดันโลหิตสูงเกิดขึ้น และมีบางรายงานไม่พบอาการดังกล่าว นอกจากนี้ยังมีรายงานว่า CdCl_2 1 mg/L สามารถทำให้เกิดความเป็นพิษเรื้อรังในหัวใจของปลา toadfish ได้ และยังมีผลกระทบต่อเซลล์หัวใจอีกด้วย (Joaquim, 2004)

2.4 ความเป็นพิษต่อกระดูก

ความเป็นพิษต่อกระดูกปรากฏเด่นชัดในกรณีที่เกิดโรคอิตาลี-อิตาลีในประเทศญี่ปุ่น จากการบริโภคข้าวที่มีแคดเมียมปนเปื้อนในปริมาณสูง ผู้ป่วยส่วนใหญ่จะเป็นหญิงอายุประมาณ 50 ปีขึ้นไป ทำให้เป็นโรคกระดูกผุ คือ กระดูกจะพริ้วจนงอโค้งได้ กระดูกเสียรูปทรงและหักได้ และมีอาการปวดที่เอว ปวดกล้ามเนื้อขาและเจ็บที่กระดูก ตลอดจนมีผลต่อการเคลื่อนไหวได้ บางรายอาการที่เกิดขึ้นที่กระดูกไม่ได้มีผลโดยตรงจากพิษของแคดเมียม แต่อาจเนื่องมาจากความเป็นพิษที่เกิดขึ้นที่ไตก่อนแล้วส่งผลไปขัดขวางปฏิกิริยาการทำงานของแคลเซียมและฟอสฟอรัส ซึ่งกลไกการเกิดพิษที่กระดูก ทำให้ร่างกายสูญเสียแคลเซียมและการดูดซึมธาตุเหล็กต่ำ เกิด osteomalasia และ brittle bone (รูปที่ 4) หรือที่เรียกว่า โรคอิตาลี-อิตาลี (Massaro, 1997; Timbrell, 2002.)



รูปที่ 4 กลไกการเกิดพิษที่กระดูกของแคดเมียม

ที่มา: Timbrell, 2002

2.5 ความเป็นพิษต่อระบบการสร้างเม็ดโลหิต

ในกลุ่มผู้ป่วยที่เป็นโรคอิตาลี-อิตาลีและคนงานที่สัมผัสกับแคดเมียมจะพบอาการของโรคโลหิตจาง ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองในสัตว์ซึ่งพบอาการของโรคโลหิตจางเช่นเดียวกัน โดย

ความเข้มข้นของแคดเมียมที่จะไม่มีผลต่อการสร้างเม็ดเลือดในสัตว์ คือ 5-10 mg/L โดยจะไปมีผลต่อการดูดซึมของเหลวในระบบทางเดินอาหารในช่วงเวลาสั้นๆ

2.6. ความเป็นพิษต่อตับ

ความเป็นพิษต่อตับในมนุษย์ มีรายงานค่อนข้างน้อยมาก แต่จากการทดลองในสัตว์พบว่า แคดเมียมในปริมาณน้อย เช่น 1 mg/L มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์ในตับเปลี่ยนไป

3. การศึกษาความเป็นพิษเฉพาะด้าน

3.1 ความเป็นพิษต่อปฏิกิริยาชีวเคมีในร่างกาย (biochemical interactions)

นอกจากนี้แคดเมียมยังไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อื่นๆ เช่น s-aminolevulinic acid hydratase, pyruvate-dehydrogenase และ pyruvate decarboxylase ลดการทำงานของเอนไซม์ s-aminolevulinic acid synthetase, alcohol dehydrogenase, arylsulphatase และ lipoamide dehydrogenase ทำให้เกิด membrane damage (ตารางที่ 7) (Almeida, 2002; Rana, 2006)

3.2 การเป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็ง (carcinogenicity)

แคดเมียมจัดเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ อยู่ในกลุ่ม 1B ที่จำแนกโดย Environmental Protection Agency (EPA) และจัดอยู่ใน กลุ่ม 1A โดย International Agency Research Cancer (IARC) ซึ่งจะไปทำให้ lysosomal membrane เกิดความเสียหาย ทำให้มีการปล่อยเอนไซม์ lactate dehydrogenase เพิ่มขึ้น (Rana, 2006)

จากการทดลองโดยฉีด CdCl_2 5.5 mg/kg เข้าใต้ผิวหนังของหนูเม้าส์ โดยฉีดครั้งเดียว จะพบเนื้องอกเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ภายในเวลา 14 เดือน

จากการทดลองโดยการฉีด CdCl_2 เข้าใต้ผิวหนังของหนูเพียงครั้งเดียว จะพบเนื้องอกเกิดขึ้นระหว่างเซลล์ และเกิดเนื้องอก เป็นบริเวณรอบๆ ภายในเวลา 11 เดือน และจากการทดลองโดยการฉีด CdCl_2 เข้าใต้ผิวหนังของหนู 0.85 mg/kg (หรือ 0.17 mg/L) โดยฉีดรวม 4 ครั้ง จะพบเนื้องอกเกิดขึ้นบริเวณใต้ผิวหนังที่ฉีดภายในเวลา 12-16 เดือน (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

3.3 การเป็นสารที่ก่อเกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity)

แคดเมียมจัดเป็นสารก่อกลายพันธุ์อยู่ในกลุ่ม 1B ที่จำแนกโดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (EPA) โดยแคดเมียมจะทำให้เกิด DNA single strand breaks, DNA protein cross-links, chromosomal aberrations และ apoptosis (ตารางที่ 8) นอกจากนี้แคดเมียมยังชักนำให้เกิด proto-oncogenes c-fos, c-jun และ c-myc เหมือนกับ gene p53 ที่ทำให้เกิดเนื้องอก (Xu, 1999)

chromatin condensation, nuclear fragmentation, plasma membrane blebbing และ DNA fragment (Watjen, 2002) และแคดเมียมยังทำให้เกิด mitochondria และ lysosomal damage ใน hepatoma cell (Fotakis, 2005)

จากการทดลองฉีด CdCl_2 7 mg/kg เข้าช่องท้องของหนูเม้าส์ตัวผู้ ตรวจไม่พบความผิดปกติใดๆ ส่วนการทดลองในเพาะเลี้ยงเซลล์รังไข่ของหนูแฮมสเตอร์ในอาหารที่มี CdCl_2 เข้มข้น 0.224 mg/L ปรากฏว่าโครโมโซมแตกเป็นชิ้นๆ และโครมาทิดที่เพิ่มจำนวนขึ้นมีขนาดเล็กลง (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

3.4. ความเป็นพิษต่อระบบประสาท (neurotoxicity)

จากการตรวจวินิจฉัยคนงานที่ต้องทำงานกับการสัมผัสสารประกอบแคดเมียม ตรวจพบว่า มีอาการปวดศีรษะบ่อย จุกเสียดง่าย และนอนไม่หลับกระสับกระส่าย ในบางรายเกิดอาการทางประสาทที่มีอาการอ่อนเพลียอย่างเรื้อรัง บางทีเหนื่อย อ่อนแรง อ่อนใจ อาการจิตซึม เบื่ออาหาร นอนไม่หลับ (neurasthenia) และมีอาการทางประสาทที่เกี่ยวกับความผิดปกติทางอารมณ์เนื่องจากการเบื่ออาหาร (vegetative neurosis)

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 7 การเกิด membrane damage เมื่อได้รับแคดเมียมในปริมาณต่างๆ

CdCl ₂	ระบบ	ความเสียหายที่เกิด	กลไกที่เกิด
5 mM	Hepatocytes	Decreased membrane potential	Acidification
9.4 μ M	Shark rectal gland	Decreased Na-K ATPase	Competes with a Mg site
0.21 μ M	Rabbit kidney cells	Decreased Na-K ATPase	Competes with a K binding site
	Rat brain synaptosomal plasma membrane	Lipid peroxidation	Free radicals
4 mg/kg	Rat liver	Decreased microsomal fluidity; Lipid peroxidation	Free radicals
50 mM	MDCK cells	Increased K ⁺ conduction	Activated K ⁺ channel
50 mM	Hepatocytes	Decreased cellular K content; release of LDH	Acidification
0.25 mM	Fish gills	Decreased Ca ²⁺ transport	Inhibits Ca ²⁺ - transporting enzymes
0.4 mg/kg (30 วัน)	Rat liver and kidney	Lipid peroxidation	Superoxide radical
1 mM	Rat hepatocytes	Decreased ATP/ADP ratio; Lipid peroxidation in mitochondria	Free radicals

ที่มา: Massaro, 1997.

ตารางที่ 8 สารประกอบแคดเมียมที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์

สารประกอบ	ความเข้มข้น	เซลล์เป้าหมาย	ผลที่เกิด
CdCl ₂	50 µM (2 hr)	Chinese hamster V79 cell	SS breaks
	1 µM	Human diploid fibroblasts	DNA breaks
CdSO ₄	30 µM (nontoxic)	CHO cell	SS but not DS breaks
	300 µM (toxic)	CHO cell	SS and DS breaks
Cd ²⁺	0.18-1.8 µM	Cultured hepatocytes	UDS
Cd ²⁺	500 µM	<i>S. typhimurinum</i>	Mutations
Cd ²⁺ + MNN	500 µM	<i>S. typhimurinum</i>	Mutations increased
Cd ²⁺	4 µM	Cultured human and simian cell	UV damage repair inhibited

หมายเหตุ: SS = single-stand; DS = double-stand; UDS = unscheduled DNA synthesis;

MNN = N-methyl-N'-nitrosamine; CHO = chinese hamster ovary; UV = ultraviolet

ที่มา : Massaro, 1997.

3. สารสกัดสะเดา (Neem extract)

3.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

สะเดามีชื่อสามัญ คือ สะเดา (ภาคกลาง), กาเดา (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ), กะเดา (ภาคใต้), สะเลียม (ภาคเหนือ) ชื่อวิทยาศาสตร์ *Azadirachta indica* A. Juss. var. *siamensis* Val. สะเดาเป็นพืชยืนต้นขนาดกลาง สูง 12–15 เมตร เรือนยอดเป็นพุ่มกลม เปลือกของลำต้นสีน้ำตาลเทาหรือเทาปนดำ แตกสะเก็ดเป็นร่องเล็กๆ ตามคัน แต่เปลือกของกิ่งอ่อนเรียบ ใบ เป็นช่อแบบขนนก ใบย่อยรูปหอก ขอบใบหยัก ใบออกเวียนกัน ตอนปลายกิ่งจะผลิใบใหม่พร้อมกับผลิดอกในฤดูหนาว ดอก เป็นช่อสีขาว ผล กลมรี อวบน้ำ ผลแก่สีเหลือง ภายในผลมี 1 เมล็ด (รูปที่ 5)



รูปที่ 5 ลักษณะของต้นสะเดา (ก), ลำต้น (ข), ใบ (ค), ดอก (ง) และผลของสะเดา (จ)

ที่มา: <http://www.forest.go.th/Private/sadao1.htm>

3.2 อนุกรมวิธานของสะเดา

Kingdom Plant

Division Magnoliophyta

Class Rutanae

Order Sapindales

Family Meliaceae (Mahogany family)

Genus Azadirachta

Species *Azadirachta indica*

ที่มา: Biswas, 2002: 1336-1345.

3.3 สารสำคัญที่พบในสารสกัดสะเดา

สารสำคัญที่พบในสารสกัดสะเดา คือ Azadirachtin, Salannin และ Nimbin ซึ่ง Azadirachtin เป็นสารออกฤทธิ์ชนิดหนึ่งจากหลายชนิดมีลักษณะคล้ายสเตียรอยด์ (steroidlike) (กรมวิชาการเกษตร, 2545) ที่สกัดจากเมล็ดสะเดาไทย (*Azadirachta indica* var. *siamensis*) สะเดา อินเดีย (*A. indica* A. Jass.) และสะเดาเทียม (*A. excelsa*) สูตรโครงสร้างของ Azadirachtin (รูปที่ 6) คือ $C_{35}H_{44}O_{16}$ (Schmutterer, 1995; Mancebo, 2002; Khan, 2003) มีมวลโมเลกุล 720.2688 g/mole อยู่ในกลุ่มสารประกอบเรียกว่า tetranortriterpenoids ซึ่งมีผลต่อระบบการสร้างฮอร์โมนของแมลง สูงที่สุด (ขวัญชัย, 2541; Singh and Saxena, 1999; Raizada, 2001)

1. Triterpenoids หรือ protolimonoids (protomeliacins) สารในกลุ่มนี้เป็นสารเคมีที่เป็นสารตั้งต้น (precursor) ที่พืชจะสร้างต่อไปเป็นสาร limonoids ส่วนสารที่มีผลต่อแมลงได้แก่ meliantriol ($C_{30}H_{50}O_5$) เป็นสารที่สกัดได้จากเมล็ดสะเดาออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการกินอาหาร (antifeedants) ของแมลงบางชนิด เช่น ตั๊กแตน (*Schistocerca gregaria*) และด้วงปีกแข็ง (*Epilachna varivestis*) โดยออกฤทธิ์ยับยั้งการกินอาหารของตั๊กแตนได้ถึง 100% ในความเข้มข้นค่อนข้างต่ำ คือ $8 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ส่วน azadirachtin พบว่าออกฤทธิ์เช่นเดียวกันในความเข้มข้นที่ต่ำกว่าคือ $1 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ ซึ่งต่ำกว่าถึง 8 เท่า

2. Tetranotriterpenoids (limonoids หรือ meliacin) สารในกลุ่มนี้เป็นอนุพันธ์ของ triterpenoids โดยมี carbon อะตอมที่ตำแหน่งที่ C_{24} – C_{27} หายไป และ carbon อะตอมที่เหลือจับตัวเป็น furan ring จึงมีชื่อเรียกว่า tetranotriterpenoids สารเคมีต่าง ๆ ในกลุ่มนี้ประกอบด้วย

2.1 Azadirone group สารในกลุ่มนี้มีสูตร โครงสร้างที่มี 4 carbon ring หลักที่ปิด เช่น

(1) **Azadirone** ($C_{28}H_{36}O_4$) สกัดได้จากผลสะเดาหรือน้ำมัน มีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการกินอาหารของ ด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) ค่อนข้างต่ำ คือ มีค่า $EC_{50} = 5,500 \text{ mg/L}$

(2) **Azadiradione** ($C_{28}H_{34}O_5$) สกัดได้จากผลสะเดาหรือน้ำมัน ออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการกินอาหารของ ด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) และแมลงปีกแข็ง (*P. gossypiella*) คือ มีค่า $EC_{50} = 320$ และ 42 mg/L ตามลำดับ

(3) **Epoxyazadiradione (Nimbinin)** ($C_{28}H_{34}O_6$) สกัดได้จากน้ำมันมีฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการกินอาหารของด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) คือ มีค่า $EC_{50} = 1,300 \text{ mg/L}$

(4) **Nimocinolide** ($C_{28}H_{36}O_7$) และ **Isonimocinolide** ($C_{28}H_{36}O_7$) สกัดได้จากใบสะเดาสดในฤดูหนาว มีพิษสูงทำให้ลูกน้ำยุง *Aedes aegypti* ตายโดยมีค่า $LC_{50} = 0.625$ และ 0.74 mg/L ตามลำดับ

2.2 Gedunin group สารในกลุ่มนี้พัฒนามาจากกลุ่ม azadirone และเกิด ring D lactones

Gedunin ($C_{28}H_{34}O_7$) สกัดได้จากผลและเปลือก ออกฤทธิ์ในทางเป็นสารยับยั้งการกินอาหาร ยับยั้งการเจริญเติบโต และฆ่าเชื้อมาลาเรีย (*Plasmodium falciparum*) เป็นสารยับยั้งการกินของด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) โดยมีค่า $LD_{50} = 930 \text{ ppm}$ และยับยั้งการเจริญเติบโตของหนอน *Helicoverpa zea* และ *Spodoptera frugiperda* โดยมีค่า $EC_{50} = 50$ และ 47 mg/L ตามลำดับ

2.3 Vilasinin group เป็นสารที่พบได้ทั่วไปในพืช Meliaceae สูตรโครงสร้างมี oxygen bridge ระหว่าง C_{28} และ C_6 สันนิษฐานว่าเป็นสาร intermediates ในการสังเคราะห์ c-seco meliacine เช่น nimbin nimbolide salannin และอาจเป็น azadirachtin

Vilasinin ($C_{26}H_{36}O_3$) เป็นสารที่พบได้ในใบสะเดาแต่ไม่ได้มีการทดสอบประสิทธิภาพที่มีผลต่อแมลง

2.4 C-seco Miliacins สารในกลุ่มนี้มีสูตรโครงสร้างคล้าย Vilasinin แต่ที่ c-ring เปิด เป็นกลุ่มที่สำคัญที่สุดของ tetranortriterpenoids ซึ่งประกอบด้วยสารหลายชนิดที่มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันและกำจัดแมลง เช่น

(1) **Nimbin** ($C_{30}H_{36}O_9$) สกัดได้จากเมล็ดและใบ ออกฤทธิ์ในทางเป็นสารยับยั้งการกินอาหารของด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) โดยมีค่า $EC_{50} = 50 \text{ mg/L}$

(2) **6-Deacetylnimbin** ($C_{25}H_{34}O_8$) สกัดได้จากเมล็ด เปลือก และใบ ออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการกินอาหารของด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) โดยมีค่า $EC_{50} = 50 \text{ mg/L}$

(3) **Nimbolide** ($C_{27}H_{30}O_7$) สกัดได้จากใบ ออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อมาลาเรีย (*P. falciparum*) โดยมีค่า $EC_{50} = 0.95 \text{ } \mu\text{g/ml}$ และยับยั้งการกินอาหารของด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) โดยมีค่า $EC_{50} = 70 \text{ mg/L}$

(4) **28-Deoxonimbolide** ($C_{27}H_{32}O_6$) สกัดได้จากใบออกฤทธิ์เป็นสารยับยั้งการกินอาหารของด้วงปีกแข็ง (*E. varivestis*) โดยมีค่า $EC_{50} = 65 \text{ mg/L}$

คุณสมบัติทางเคมีและฟิสิกส์ของ Azadirachtin

Azadirachtin มีจุดหลอมเหลวที่ $155 - 158 \text{ }^{\circ}\text{C}$ ละลายน้ำได้น้อย ที่อุณหภูมิ $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ แต่จะละลายได้ดีใน ethanol, ethyl ether, acetone และ chloroform แต่ไม่ละลายใน hexane มีค่า $\log P\text{-Valve} = 1.09$ และมีค่าการหมุนระนาบแสง : $[\alpha]_D = -53$ ($C = 0.5$ ใน chloroform)

ความเสถียรของ azadirachtin (Stability of azadirachtin)

ผลึกของ Azadirachtin ก่อนข้างเสถียรถ้าเก็บไว้ในที่ไม่มีแสง มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ใน pH 4 และ 5 ที่อุณหภูมิห้อง ประมาณ 50 วัน จะสลายตัวอย่างรวดเร็วถ้าได้รับอุณหภูมิสูงและอยู่ในสาร alkaline และกรดเข้มข้น (Jarvis และคณะ, 1998; Sanduram และคณะ, 1995 ; Szeto และ Wan, 1996) ผลจากการถูกย่อยสลายด้วยแสงยังคงมีฤทธิ์ในการกำจัดแมลง (Barnby, 1990) สารสะเดาที่มีส่วนประกอบของ azadirachtin มีประสิทธิภาพดีสามารถเก็บไว้ใช้ได้เป็นปีถ้าเก็บรักษาที่ 25°C จากรายงานการศึกษาองค์ประกอบของสาร azadirachtin สูตรที่ใช้ทางการค้า ซึ่งผลิตจากเมล็ดสะเดา

สกัดสามารถคงสภาพในภาคสนามได้ถึง 8 – 10 วัน (Sundaram, 1995) อย่างไรก็ตามความเสถียรของสารนั้นขึ้นอยู่กับกระบวนการย่อยสลายด้วยน้ำ (hydrolysis) และการย่อยสลายด้วยแสง (Photodegradation) ด้วย พบว่าค่าครึ่งชีวิต (half-life) ของ azadirachtin บนใบไม้มีค่าไม่เกิน 17 ชั่วโมง ส่วนในดินมีค่าสูงประมาณ 25 วัน ขึ้นอยู่กับปริมาณแสง อุณหภูมิ และในรูปที่มีการเติมไฮโดรเจน (Hydrogenation) ของ Azadirachtin มี 2 ชนิดหรือมากกว่า ชื่อ 22,23-dihydro และ 2-,3-,22,23-tetrahydroazadirachtin (Barnby, 1990; Immaraju, 1994; U.S. EPA, 1997)

3.4 การดูดซึมและการกำจัด Azadirachtin ของร่างกาย

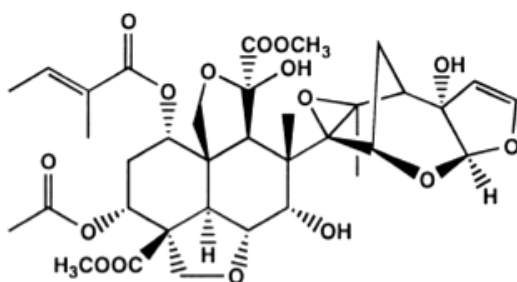
เนื่องจากสาร azadirachtin ที่สามารถจะปนเปื้อนเข้าไปในร่างกายของมนุษย์โดยการกินหรือสัมผัสโดยตรง จากรายงานของ Boeke และคณะ (2004) รายงานว่า ใบสะเดาที่ไม่ผ่านกระบวนการใดๆ เลย ที่กินเข้าไปประมาณ 2 ช้อนโต๊ะ จะทำให้เกิด anti-diabetic effect และ ไตล้มเหลวเฉียบพลันในมนุษย์ ส่วนในแกะที่กินใบสะเดาพบว่ามีผลต่อระบบประสาท คือ การเคลื่อนไหวของหัว การเดินเป็นวงกลม อุณหภูมิในร่างกายเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังทำให้เซลล์อสุจิของหนูมีโครงสร้างส่วนหัวที่ผิดปกติและมีจำนวนของเซลล์อสุจิลดลง (Khan และ Awasthy, 2003) แต่ในหนูที่ได้รับผงสะเดาพบว่ามีผลต่อองค์ประกอบของโปรตีนและกลไกของเอนไซม์ acid phosphatase ลดน้อยลง และยังไปเพิ่มปฏิกิริยาของเอนไซม์ alkaline phosphatase และ lactate dehydrogenase

3.5 ความเป็นพิษของ Azadirachtin

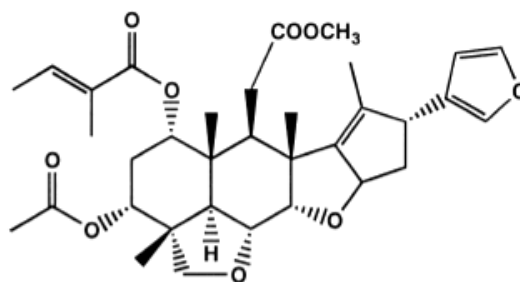
3.5.1 ความเป็นพิษของสารสกัดจากสะเดาต่อแมลง

สาร azadirachtin มีปริมาณสูงสุดเมื่อผลสะเดาสุกเต็มที่ (โชคชัย, 2537) ออกฤทธิ์ในการป้องกันกำจัดแมลงได้หลายรูปแบบ คือเป็นสารฆ่าแมลง ไล่แมลง ทำให้แมลงไม่ชอบกินอาหาร ทำให้การเจริญเติบโตของแมลงผิดปกติ ยับยั้งการเจริญเติบโตของแมลง มีผลทำให้หนอนไม่สามารถลอกคราบเจริญเติบโตต่อไป หนอนจะตายในระยะลอกคราบ เพราะสารออกฤทธิ์นี้มีผลต่อการสร้างฮอร์โมน จึงทำให้การผลิตไข่และอัตราการฟักไข่จะลดน้อยลง และเมื่อแมลงได้รับสาร azadirachtin เข้าไป จะทำให้แมลงหยุดการย่อยอาหารเนื่องจากไปยับยั้งการย่อยเชิงกลของระบบทางเดินอาหาร กินอาหารน้อยลง ไม่ลอกคราบและตายในที่สุด นอกจากนี้ยังมีผลลดอัตราการวางไข่ด้วย (Trumm และ Dorn, 2000)

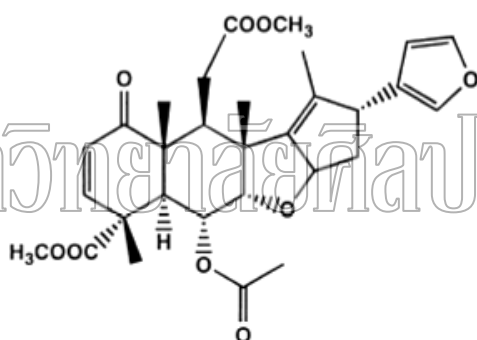
Azadirachtin



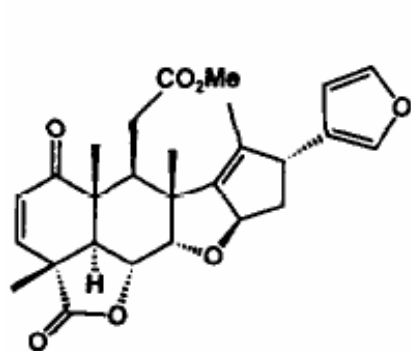
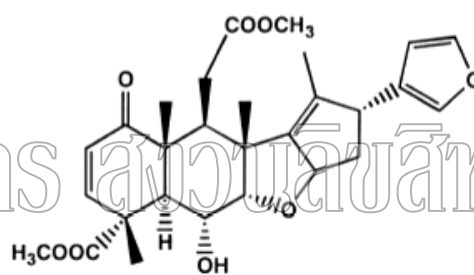
Salannin



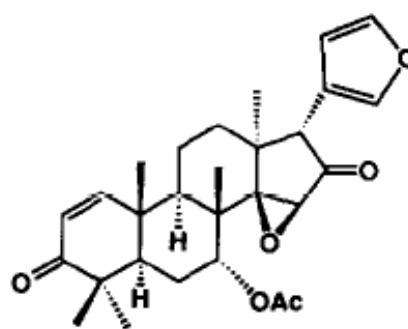
Nimbin



6-Desacetylnimbin



nimbolide



epoxyazadiradione

รูปที่ 6 สูตรโครงสร้างทางเคมีของสารสกัดจากสะเดา

ที่มา: Sanduram และคณะ, 1995

3.5.2 ความเป็นพิษของสารสกัดจากสะเดาต่อสัตว์

ในการศึกษาความเป็นพิษของสะเดาที่เตรียมจากส่วนต่างๆ ของสะเดา ในสัตว์นั้นขึ้นอยู่กับตัวทำละลายที่เป็นองค์ประกอบและชนิดของสาร Azadirachtin ที่ได้รับ (ตารางที่ 9)

3.6 ประโยชน์ของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่มีต่อแมลง

Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของ ไข่ หนอน และดักแด้ การกินอาหาร การวางไข่ของตัวเต็มวัยทำให้การผลิตไข่ลดน้อยลง ทำให้หนอนหรือตัวอ่อนไม่ลอกคราบ ได้ตัวหนอนและตัวเต็มวัย ยับยั้งการสร้างสารไคติน การผสมพันธุ์ และการสื่อสารเพื่อการผสมพันธุ์ของแมลงทำให้หนอนไม่กลืนอาหาร (ลดการเคลื่อนตัวของกระเพาะอาหาร)

ที่มา : ขวัญชัย สมบัติศิริ. “หลักการและวิธีใช้สารสะเดาป้องกันและกำจัดแมลงศัตรูพืช” [Online]

Available from: http://www.eto.ku.ac.th/neweto/e-book/plant/herb_gar/neem2.pdf

ตารางที่ 9 ผลของสารสกัดสะเดาที่ไม่อยู่ในตัวทำละลายด้วยน้ำต่อสัตว์

ส่วนต่างๆ ของสะเดา	สัตว์ ทดลอง	ตัว ทำละลาย	ความเข้มข้น (mg/kg bw)	ระยะเวลา (วัน)	ผลที่เกิดขึ้น
1. Acute					
ใบ	หนูเม้าส์	Ethanol	500, 1000, 2000	7	Genotoxicity
2. Subacute					
ใบ	หนู	Chloroform, hexane, methanol	12.5% in diet	14	- Anti-mutagenic, anti-carcinogenic effect
ดอก					- Effect on hepatic enzyme activities
3. Semi-chronic					
ใบ	หนูเม้าส์	Alcohol	500, 1000, 2000	42	Genotoxicity sperm deformations

ที่มา: Boeke และคณะ, 2004: 25-51.

ตารางที่ 10 ผลของผลิตภัณฑ์จากสารสกัดสะเดาต่อสัตว์ทดลอง

สารสกัดสะเดา	สัตว์ทดลอง	ความเข้มข้น (mg/kg bw)	ระยะเวลา (วัน)	ผลที่เกิดขึ้น
1. Acute				
Azadirachtin	หนู	0.1 LD ₅₀ = 57 ppm	1-3	Effect on liver function
Limonoids	หนูเม้าส์	2 ml/mouse	1	Effect against intestinal parasites
		135	4	No anti-malarial effect
Nimbidin	หนู	20, 30, 40	1	Anti-arthritis and Anti- inflammatory effect
2. Subacute				
Azadirachtin	หนู	LD ₅₀ 0.1	21	Effect on blood constituents
		500, 1000, 1500	21	No fetotoxicity or teratogenicity
Nimbidin	Rats, dogs, guinea pig	20-80	1, 10, 28	Anti-ulcer effect
3. Semi-chronic				
Azadirachtin	หนู	0.5, 1.5, 4.5	60	Effect on liver and haemopoietic system
		LD ₅₀ 0.1	42	Effect on blood constituents
		5000, 500-1500	1, 90	No toxicity
Nimbidin	สุนัข, หนู เม้าส์, หนู	20-2000, 25- 100, 10, 20	1, 42, 28	No toxicity

ที่มา: Boeke และคณะ, 2004: 25-51.

4. DNA damage

DNA damage เกิดจากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งจะมีอัตราการเกิดความเสียหายประมาณ 50,000-500,000 โมเลกุลต่อเซลล์ต่อวัน สามารถทำให้เกิดความผิดปกติต่อสิ่งมีชีวิต

สาเหตุของการเกิด DNA damage แบ่งออกเป็น 2 ประเภท คือ

1. Endogenous damage เกิดจากปัจจัยภายในเซลล์เนื่องจากมีอนุมูลอิสระ (reactive oxygen radical) ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการเมแทบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต
2. Exogenous damage เกิดจากปัจจัยต่างๆ ภายนอกร่างกายของสิ่งมีชีวิต เช่น รังสี สารเคมี โลหะหรือยาบางชนิด

ซึ่งการเกิด DNA damage ทำให้เกิดความเสียหายตั้งแต่ระดับยีน ได้แก่ การจัดเรียงตัวของลำดับคู่กรด-เบส บนสาย DNA การขาดของสาย DNA ทำให้เกิดเป็น micronucleus ซึ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจสอบได้หลายอย่างในแต่ละระดับ ซึ่งขึ้นอยู่กับความสนใจ เช่น ตรวจการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีหรือระดับของเอนไซม์ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม ซึ่งสามารถใช้สิ่งเหล่านั้นเป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) ความเสียหายระดับพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตได้

5. Biomarker

biomarker จำแนกเป็น 3 ชนิด คือ

1. Biomarker of exposure เป็นตัวบ่งชี้ถึงการรับเอาสารเคมีจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ร่างกาย สามารถตรวจหาสารเคมีนั้นๆ โดยตรง การตรวจทางชีวเคมีของปฏิกิริยาระหว่างร่างกายกับสารเคมี หรือผลิตผลจากปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีหรือ metabolite ของสารเคมีกับเซลล์หรือโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์ ซึ่งมีวิธีตรวจวัดจากตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ หรือสารคัดหลั่งอื่นๆ Biomarker of exposure จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้หลังจากได้รับสารเคมีเข้าสู่ร่างกายแล้ว ซึ่งจะตรวจพบในปริมาณที่ลดลงเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีบางส่วนถูกขับออกจากร่างกายในรูปเดิม ส่วนที่เหลืออยู่ในร่างกายนั้นเรียกว่าเป็น internal dose และถูก metabolize โดยกลไกตามธรรมชาติของร่างกาย เนื่องจากร่างกายมีระบบป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอม ทำให้สารเคมีบางส่วนเปลี่ยนสภาพไปเป็นสารเคมีที่ละลายน้ำได้มากขึ้นและถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ แต่ก็ยังมีสารเคมีส่วนหนึ่งที่เปลี่ยนสภาพเป็นสารพิษเพิ่มขึ้น (biologically effective dose) เนื่องจากโดยสภาพทางเคมี มันได้กลายเป็นสารที่ไม่มีความเสถียร พร้อมทั้งจะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน ไขมัน หรือ DNA หรือไปขัดขวางกระบวนการทำงานของภูมิคุ้มกันซึ่งการไปขัดขวาง

กระบวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันถือว่าเป็นอันตรายต่อสุขภาพอย่างยิ่ง

2. Biomarker of effect การตอบสนองของร่างกายต่อสารพิษซึ่งอยู่ในรูปของความเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สรีระวิทยา พฤติกรรม หรืออื่นๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายหลังจากที่รับเอาสารเคมีเข้าสู่ร่างกายแล้ว เป็นผลให้เกิดโรคหรือความผิดปกติในร่างกาย กล่าวคือ ความเข้มข้นของสารเคมีที่ก่อให้เกิดพิษเป็น biologically effective dose

3. Biomarker of susceptibility เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมซึ่งจะมีผลต่อความไวของการเกิดพิษในประชากรบางกลุ่มอาจจะมีการกลายพันธุ์หรือความผิดปกติของ DNA (ตารางที่ 11) ทำให้ขาดหรือลดประสิทธิภาพของเอนไซม์ที่ช่วยกำจัดสารพิษได้ ซึ่งจะนำไปสู่ความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคภัย

ตารางที่ 11 ระดับความเสียหายของ DNA ที่เกิดขึ้น

ระดับความเสียหาย	ผลที่เกิดขึ้น
Whole genome	Anueploidy
Chromosome level	Chromosome aberration
Base-sequence level	Point mutation
DNA-helix level	DNA lesions

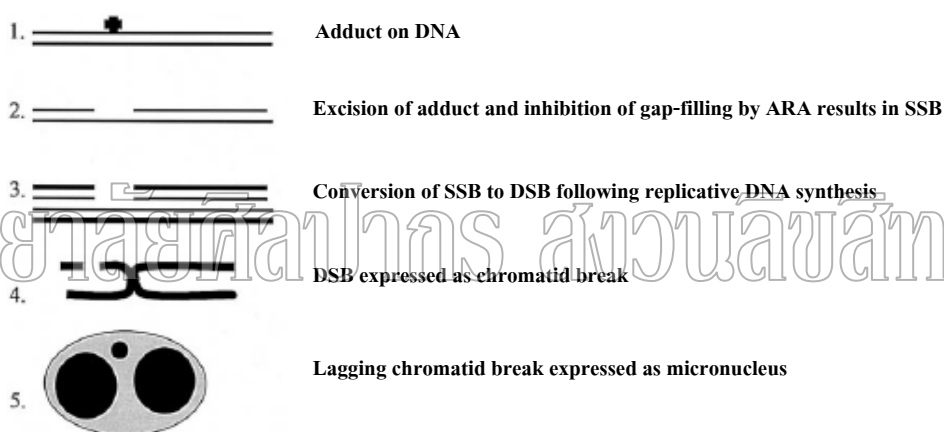
ที่มา: Walum, 1990.

6. ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity)

เนื่องจากการตรวจสอบการเกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตนั้น มีเทคนิคและวิธีการตรวจสอบที่หลากหลายวิธี เช่น เทคนิค Micronucleus test, Comet assay, FISH ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการนำไปใช้ รวมไปถึงประสิทธิภาพของเทคนิคที่ใช้การตรวจสอบด้วย ซึ่งเทคนิคที่เป็นมาตรฐานและเป็นที่ยอมรับในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต คือ เทคนิค Micronucleus test และเทคนิค Comet assay โดย U.S. EPA (2004) และ OECD (1997) ได้ยอมรับว่าเทคนิคดังกล่าวว่าเป็น standard method เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีขั้นตอนในการตรวจสอบง่ายๆ ไม่ต้องใช้สารเคมีมากและมีความไวในการตรวจสอบสารเคมีที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรมได้ การตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมีต่อสารพันธุกรรมในปลาสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Micronucleus test, Comet assay และ Chromosome aberration

1. Micronucleus test

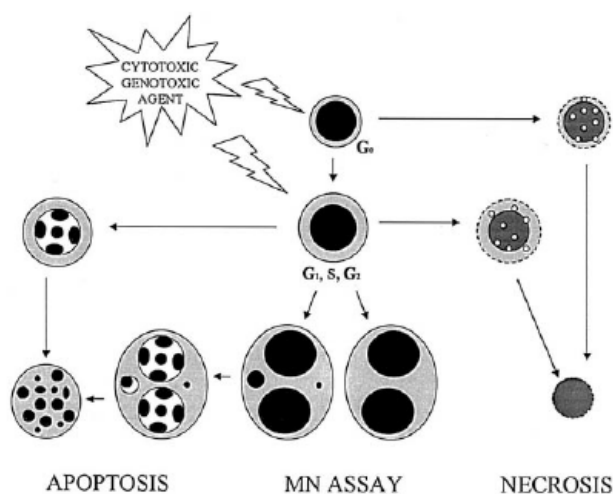
Micronucleus test เป็นวิธีประเมินความเสียหายเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) หรือชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกิดการแตกหักในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสถึงระยะแอนาเฟส เนื่องมาจากการเกิดมิวเตชัน (Ballantyne, 1988; Udrou, 2006) หลังจากโครโมโซมได้รับความเสียหายและไม่สามารถรวมตัวเป็น daughter nuclei ได้ จึงเป็นชิ้นส่วนของโครโมโซมขนาดเล็กเกิดรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (Tradiff, 1991) เมื่อสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์แล้ว จะทำให้สาย DNA ขาด เกิดเป็นชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักอยู่ในไซโตพลาสซึม เมื่อถึงการแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส โครโมโซมจะถูกดึงเข้าสู่ที่ขั้วเซลล์ ชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักจะไม่ถูกดึงเนื่องจากไม่มีเซนโทรเมียร์ จึงเกิดเป็น micronucleus (MN)(รูปที่7)ที่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลักอยู่ในเซลล์ (Fenech, 2006)



รูปที่ 7 กลไกการเกิดความผิดปกติของ DNA ในระหว่างการแบ่งเซลล์

ที่มา: Fenech, M. "Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death." Mutation Research. 445 (2006): 58-66. (ARA = arabinoside, SSB = single strand break, DSB = double strand break)

นอกจากจะเกิดไมโครนิวเคลียสแล้ว เซลล์ที่ได้รับสารเคมีที่มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติอย่างอื่นๆ ในกระบวนการแบ่งเซลล์ เช่น การเกิด apoptosis และ necrosis (รูปที่ 8)



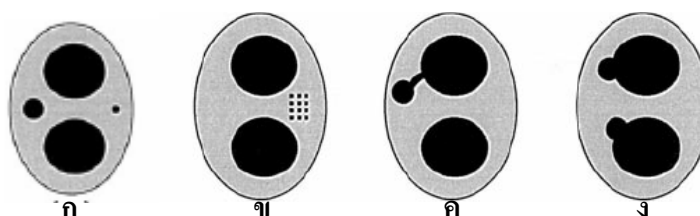
รูปที่ 8 กลไกการชักนำให้เกิด MN, apoptosis และ necrosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ที่มา: Fenech, M. "The in vitro micronucleus technique." *Mutation Research*, 445 (2000): 81-95.

Micronucleus test เป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจสอบหาความสัมพันธ์ของสารที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ทำให้โครโมโซมเกิดการแตกหัก (clastogen) หรือสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในพืช สัตว์ และเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็น bioindicator บอกความเป็นพิษระดับทำลายสารพันธุกรรมของสารที่นำมาทดสอบได้

เกณฑ์การนับจำนวน MN ซึ่งเสนอโดย Carrasso (1990) และ Fenech (2000) เพื่อให้ให้นักวิจัยใช้เกณฑ์เดียวกัน ซึ่งจะนำมาสู่การเปรียบเทียบผลการศึกษามีประสิทธิภาพ โดยใช้เกณฑ์ 3 ข้อ (รูปที่ 9) คือ

1. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไมโครนิวเคลียสประมาณ 1/9-1/3 ของนิวเคลียส
2. ตำแหน่งของไมโครนิวเคลียสจะต้องไม่ติดกับนิวเคลียส
3. ตำแหน่งของไมโครนิวเคลียสจะต้องอยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่มีการซ้อนทับกับนิวเคลียสหลัก และล้อมติดสีเข้มระดับเดียวกับนิวเคลียสหลัก



รูปที่ 9 ลักษณะของไมโครนิวเคลียสที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง (ก) ไมโครนิวเคลียส และ (ข-ง) ไม่นับเป็นไมโครนิวเคลียส

ที่มา: Fenech, M. "The in vitro micronucleus technique." *Mutation Research*, 445 (2000): 81-95.

นอกจากนี้การศึกษาความเป็นพิษของสารสามารถตรวจพบความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ ตามที่ Carrasso (1990) และ Cavas and Ergene-Gözükar (2005) ได้ศึกษาและแบ่งความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มนิวเคลียส ดังนี้ (รูปที่ 10)

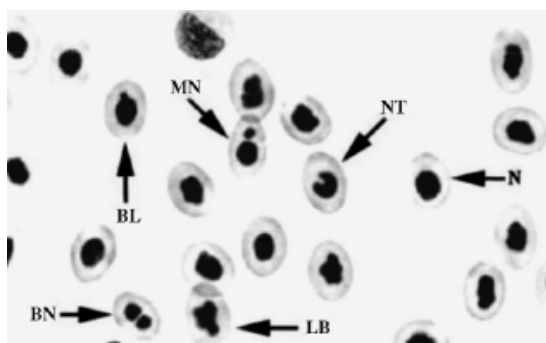
1. Blebbed nucleus คือ นิวเคลียสซึ่งที่ผิวของนิวเคลียสมีลักษณะคล้ายฟองอากาศ ที่มีรูปร่างเหมือน dumbbell โดยมี heterochromatin อยู่ตรงกลางหรือเป็นลักษณะที่เกิดฟองก๊าซรอบนิวเคลียส

2. Notched nucleus คือ นิวเคลียสที่มีลักษณะการเว้าลึกเข้าไปด้านในของเยื่อหุ้มนิวเคลียส เกิดขึ้นเนื่องจากไม่มีสารพันธุกรรมและถูกกำหนดขอบเขตโดยเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear envelope)

3. Lobed nucleus คือ นิวเคลียสที่มีลักษณะคล้าย micronucleus แต่อยู่ติดกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสคล้ายเป็นติ่งปูดออกมา โดยมี 1 หรือมากกว่า 1 ภายในมี euchromatin หรือ heterochromatin ที่มีสีเข้ม มีรูปร่างเหมือนก้านยื่นออกมาด้านนอก หรือปูดออกไปของเยื่อหุ้มนิวเคลียส

4. Vacuolated nucleus คือ นิวเคลียสที่เกิดเป็นลักษณะหลุมที่ไม่มีขอบเขตและเห็นสารพันธุกรรมอยู่ภายใน และมีเส้นผ่านศูนย์กลางใกล้เคียงกับ micronucleus หรือลักษณะการเกิดฟองอากาศภายในนิวเคลียส

นอกจากลักษณะที่กล่าวมานี้ ยังมีการวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ที่มีเกณฑ์การพิจารณาที่แตกต่างกันไปตามความเหมาะสมเพื่อที่จะบอกว่าสารเคมีที่ทดสอบนั้นมีความเป็นพิษที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมได้หรือไม่ เช่น fragmented-apoptotic cells, nuclear buds และ binucleated เป็นต้น (รูปที่ 10)



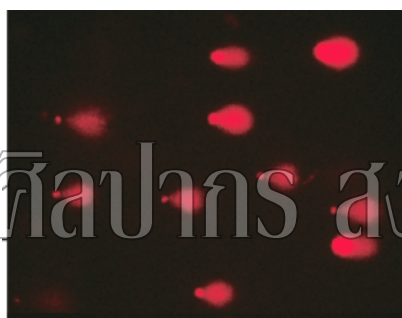
รูปที่ 10 ลักษณะของ MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลา

O. niloticus; micronucleus (MN), binucleus (BN), notched nucleus (N), blebbed nucleus (BL) และ lobed nucleus (LB)

ที่มา: Cavas, 2003.

2. Comet assay

Comet assay หรือ Single cell gel electrophoresis (SCGE) หรือ microgel เป็นวิธีที่พัฒนาโดย N.P. Singh ในปี 1984 ใช้ในการตรวจวัดความเสียหายของ single strand และ double strand DNA ที่แตกหัก เนื่องจากการเกิด DNA damage แต่ละเซลล์สามารถที่จะตรวจสอบความเสียหายได้ โดยตรวจสอบระยะทางที่สารพันธุกรรมเคลื่อนที่ออกไปจากนิวเคลียสหลัก (Merk, 2000; Helma and Uhl, 2000; Verchaeve and Van Grop, 2006 : 123-130; Collins, 2004 : 249-251; Gabbianelli, 2006) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์ภาพที่ได้มีลักษณะคล้ายดาวหาง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ หัวและหาง โดยบริเวณหางเป็นชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหาย (รูปที่ 16) ประโยชน์ของเทคนิค comet assay คือ (1) สามารถตรวจผลของแต่ละเซลล์จึงมีข้อมูลที่สมบูรณ์ในการวิเคราะห์ทางสถิติ (2) ใช้เซลล์จำนวนน้อยต่อหนึ่งตัวอย่าง (< 10,000 เซลล์) (3) มีความไวในการตรวจหา DNA ที่เสียหาย



รูปที่ 11 ดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายมีลักษณะคล้ายดาวหาง

ที่มา : Comet assay analysis for DNA damage. [Online], Accessed 27 Oct 2006. Available from

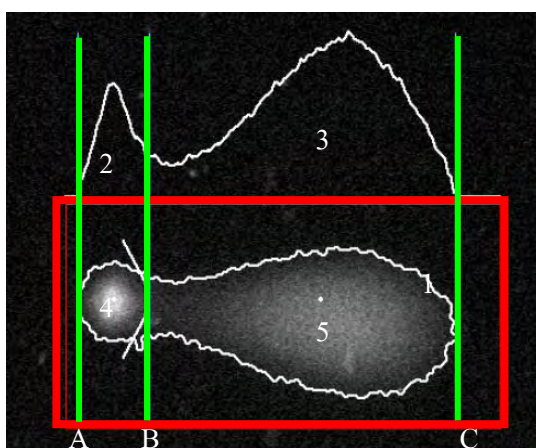
<http://www.compucyte.com/pubcometassay.htm>

การตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Comet assay จะวัดเซลล์ที่เกิดเกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรมเท่านั้น โดยไม่นับรวมเซลล์ที่เกิด necrosis เนื่องจากเป็นความเสียหายที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่เกิดจาก necrosis จะมีลักษณะหัวและหางอยู่ห่างจากกันมาก

การวิเคราะห์ภาพจากเทคนิค Comet assay

การวิเคราะห์ภาพ Comet assay ผู้วิจัยเลือกใช้โปรแกรม LUCIA Comet Assay ซึ่งมีรายละเอียดในการวิเคราะห์ ดังนี้

1. ส่วนประกอบต่างๆ ของ comet



จากรูป Histogram (บน)

1. วัด Integrated intensity

2. วัด Head DNA [%]

3. วัด Tail DNA [%]

จากรูป comet (ล่าง)

4. วัด Head radius

5. วัด Tail length

รูปที่ 12 ส่วนประกอบของ comet ที่ใช้ด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay

ที่มา: <http://www.lim.cz/download.php?id=16&>

2. พารามิเตอร์ที่วัดด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay

1. Integrated intensity (II) คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดจากแสงปล่อยออกมาจาก DNA ซึ่งย้อมด้วย EtBr จึงวัดค่าความเข้มของแสงที่ปล่อยจาก DNA ใน comet ทั้งหมด (รูปที่ 12 หมายเลข 1)

$$\text{Integrated intensity (II)} = I_H + I_T$$

$$\text{โดยที่ } I_H = \int_{\text{Head area}} idA$$

$$I_T = \int_{\text{Tail area}} idA$$

2. Head DNA [%] คือ ค่าความเข้มของแสงที่ปล่อยออกมาจาก DNA ที่เกิดความเสียหายซึ่งเหลืออยู่ในนิวเคลียส เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 12 หมายเลข 2)

$$\text{Head DNA [\%]} = [I_H / II] \times 100$$

3. Tail DNA [%] คือ ค่าความเข้มของแสงที่ปล่อยออกมาจาก DNA ที่เกิดความเสียหายในส่วน comet tail และอยู่ทางขวาของนิวเคลียส เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 12 หมายเลข 3)

$$\text{Tail DNA [\%]} = [I_T / I_H] \times 100$$

4. Head radius (micrometers) คือ รัศมีของนิวเคลียสคือส่วนของ DNA ที่ไม่เกิดความเสียหายที่ส่วนหัวของ comet เท่ากับความยาวครึ่งหนึ่งของระยะจาก A ถึง B (รูปที่ 12 หมายเลข 4)

5. Tail length (micrometers) คือ ความยาวของส่วนหางของ comet ที่บ่งบอกความเสียหายของ DNA เท่ากับระยะระหว่าง B ถึง C เป็น parameter ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการวัดเป็นอย่างมาก (รูปที่ 12 หมายเลข 5)

6. Tail moment คือ ค่าตัวเลขที่ได้จากการคำนวณระหว่าง tail length คูณกับ tail DNA [%]

$$\text{Tail moment} = \text{Tail length} \times \text{Tail DNA [\%]}$$

7. Olive moment คือ ค่าที่ได้จากผลของระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางจากส่วนหัวและหาง กับ tail DNA [%]



รูปที่ 13 เปรียบเทียบเซลล์ที่เกิด DNA เสียหายระดับต่างกัน (ก = เซลล์ที่ไม่เกิด DNA damage, ข = เซลล์ที่เกิด DNA damage ปานกลาง และ ค = เซลล์ที่เกิด DNA damage มาก)

ที่มา: Comet assay analysis for DNA damage. [Online], Accessed 27 Oct 2006. Available from <http://www.compucyte.com/pubcometassay.htm>

7. การศึกษาความเป็นพิษของ CdCl_2 และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา

7.1. การศึกษาสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 ในสัตว์ทดลอง

เมื่อหนูได้รับแคดเมียม 0.25 mg/kg จะไปสะสมมากที่ไต และความเป็นพิษที่เริ่มแสดงอาการ คือ มีการขับน้ำตาลกลูโคส โปรตีน กรดอะมิโน แคดเมียม และกรดยูริกเพิ่มมากขึ้นในปัสสาวะ มีการสังเคราะห์น้ำตาลกลูโคสจากสารอื่นเพิ่มมากขึ้นที่ตับ ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง ส่วนพิษต่อตับอ่อนมีผลทำให้ระดับอินซูลินในเลือดต่ำลง (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

Nepomuceno และคณะ (1997) ศึกษา micronuclei ในเม็ดเลือดแดงของปลา *Cyprinus carpio* ที่ได้รับสารปรอทหรือโลหะปรอทที่มีความเข้มข้น 2, 20 และ 200 mg/L เป็นเวลา 159 วัน พบว่า หลังจากการได้รับสารปรอทเป็นเวลา 31 วัน พบค่าความถี่ของ micronucleus (micronucleus frequencies; MNFs) สูงสุด 27.39 และ 21.07% ที่ความเข้มข้น 20 และ 200 mg/L ตามลำดับ ($P < 0.05$) ส่วนความเข้มข้น 2 mg/L ไม่พบค่า MNFs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$)

Castano และคณะ (1998) ศึกษาความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันและเรื้อรังของ $CdCl_2$ โดยการฉีดเข้าช่องท้องปลา Rainbow trout 6 ครั้งคือ 0.5 mg/kg (วันที่ 1), 1.0 mg/kg (วันที่ 3, 7 และ 11) และ 2.0 mg/kg (วันที่ 15 และ 19) เพื่อวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคดเมียม โดยวัดการเคลื่อนย้ายของแคดเมียมไปยังเซลล์หรือเนื้อเยื่อซึ่งทำให้เกิด micronucleus (MN) และความผิดปกติอื่นๆ ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยวิธี Flow cytometry พบว่าในตับมีแคดเมียมสะสมเท่ากับ 27.8 $\mu\text{g/g}$ พบค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เท่ากับ 0.012 ± 0.008 และ 0.013 ± 0.021 ตามลำดับ

Ayllon และคณะ (2000) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ colchicine, mitomycin C และ cyclophosphamide และโลหะหนัก 2 ชนิด คือ แคดเมียมและปรอท ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในปลา European minnow (*Phoxinus phoxinus*) และ mollie (*Poecilia latipinna*) ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่าในปลา minnow ที่ฉีด colchicine (10 mg/L) และ mitomycin C (20 mg/L) สามารถชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสอื่นๆ ($P < 0.01$) ส่วนความเครียดที่เกิดจากการฉีดซ้ำหลายครั้งไม่มีผล ปลาที่ฉีด $CdCl_2$ เข้มข้น 1.7 mg/L โดยฉีด 2 ครั้ง สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียส แต่ไม่ชักนำให้เกิด MN ในปลาทั้ง 2 ชนิด ($P < 0.05$) ปลา minnow ที่ฉีด $Hg(NO_3)_2$ ไม่ชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสทุกความเข้มข้น แต่ในปลา mollie ที่ฉีด $Hg(NO_3)_2$ เข้มข้น 0.17 และ 1.7 mg/L ชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียส ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าชนิดของปลา mollie มีความไวต่อสารพิษและการชักนำให้เกิด MN เร็วกว่าปลา minnow

Kalay และ Canli (2000) ศึกษาการกำจัดโลหะออกจากเนื้อเยื่อของปลา *Tilapia zilli* ที่ได้รับ Cu, Zn, Cd และ Pb เข้มข้น 1.0 mg/L เป็นเวลา 10 วัน พบว่า Cd และ Pb สะสมอยู่ในตับ เหงือก สมอง และกล้ามเนื้อเพิ่มขึ้นหลายเท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) โดยในสมองพบ Pb สะสมอยู่ในระดับสูง ส่วน Cu พบสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อทุกชนิด ยกเว้นในกล้ามเนื้อ ส่วน Zn สะสมในเนื้อเยื่อทุกชนิดไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) หลังจากเมื่อย้ายปลาไปเลี้ยงในน้ำที่ไม่มีโลหะเจือปน เพื่อตรวจหาโลหะจากเนื้อเยื่อของปลาหลังจากเลี้ยงไว้เป็นเวลา 30 วัน พบว่า ระดับของ Cd, Cu และ Pb ในเหงือกลดลง เท่ากับ 21.5, 7.37 และ 3.02 เท่า อย่างมีนัยสำคัญ

($P < 0.001$, $P < 0.05$ และ $P < 0.05$) ตามลำดับ ส่วนในตับปลาพบว่าไม่สามารถกำจัด Cd และ Cu ได้ มีเพียง Pb เท่านั้นที่สามารถกำจัดออกจากตับได้อย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่า การกำจัดโลหะออกจากเนื้อเยื่อของ ปลาขึ้นอยู่กับชนิดของเนื้อเยื่อและชนิดของโลหะ

สุวิมล (2003) ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและความเป็นพิษแบบเรื้อรังของ $CdCl_2$ ต่อปลาตะเพียนขาววัยอ่อนในระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 3 เดือน ด้วยการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน metallothionein mRNA (MTmRNA) จากการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ $CdCl_2$ ต่อปลาตะเพียนขาวที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่ามีค่า LC_{50} เท่ากับ 3.81, 3.41, 3.23 และ 2.88 mg/L ตามลำดับ และพบว่าในตับและไตมีการแสดงออกของยีน MTmRNA มากที่สุดระหว่างวันที่ 28-35 และในระหว่างวันที่ 63-84 ในปลากลุ่มที่ได้รับ $CdCl_2$ โดยเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม และการแสดงออกของยีน MTmRNA ในตับและไตของปลาที่ได้รับ $CdCl_2$ เข้มข้น 0.012 mg/L มีค่าเท่ากับ 4.20 และ 3.34 เท่า ตามลำดับ ส่วนปลากลุ่มที่ได้รับ $CdCl_2$ เข้มข้น 0.12 mg/L พบการแสดงออกของยีน MTmRNA ในตับและไต มีค่าเท่ากับ 4.93 และ 5.57 เท่า ตามลำดับ การแสดงออกของยีน MTmRNA ที่เพิ่มขึ้น อาจมีความสำคัญต่อการยึดจับของเซลล์กับ แคดเมียมที่สะสมมากขึ้นในเซลล์ตับและไต

Rodriguez-Cea และคณะ (2003) ใช้เทคนิค Micronucleus test ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเม็ดเลือดแดงจากไตของปลา brown trout, European eel และ European minnow ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำจืดที่เกิดมลพิษของยุโรปและใช้ปลาเป็น biomarker โดยให้ปลาได้รับ genotoxic compounds 3 ชนิด คือ colchicine, cyclophosphamide และ cadmium โดยวิธีการแช่ พบว่าปลา brown trout มีความไวต่อสารพิษทั้ง 3 ชนิดมากกว่าปลา minnow และ eel และเมื่อสำรวจปลาในแหล่งน้ำจืดทั่วไป ที่มีระดับความเป็นพิษแตกต่างกัน พบว่า ปลา minnow และปลาไหล ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ปนเปื้อนสารพิษ มีค่าร้อยละของ MN ไม่สูงกว่าค่าเฉลี่ยของ MN ที่พบในปลาที่จับได้จากแหล่งน้ำสะอาด ส่วนในปลา brown trout ที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่เป็นมลพิษ มีค่าร้อยละของ MN สูงกว่าค่าเฉลี่ยของ MN ที่พบในปลาที่จับได้จากแหล่งน้ำสะอาด แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้ปลา brown trout เป็น biomonitoring ของสารปนเปื้อนที่มีฤทธิ์ทำลายสารพันธุกรรมในแหล่งน้ำจืดได้

Tilton และคณะ (2003) ศึกษาผลของ $CdCl_2$ ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาในระบบสืบพันธุ์ของปลา Japanese medaka (*Oryzias latipes*) ซึ่งได้รับ $CdCl_2$ เข้มข้น 0-0.01 mg/L เป็นเวลา 7 สัปดาห์ พบว่าปลาทั้งเพศผู้และเพศเมียทุกกลุ่มที่ได้รับ $CdCl_2$ มีการปล่อย gonadal steroid ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปลาเพศเมียวัยระยะสืบพันธุ์เพศเมียที่ได้รับ $CdCl_2$ เข้มข้น 5 mg/L พบระดับของ plasma estradiol สูงกว่าในปลากลุ่ม ($P < 0.05$)

Chandra และ Khuda-Bukhsh (2004) ศึกษา genotoxic effects ของ CdCl_2 เข้มข้น 0.003 และ 0.05% และ Azadirachtin (Aza) เข้มข้น 0.0005% โดยฉีดสารชนิดเดียวหรือสารสองชนิดในปลา *O. mossambicus* พบว่าทั้ง CdCl_2 เข้มข้น 0.003 และ 0.05% และ Azadirachtin เข้มข้น 0.0005% เป็นเวลา 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเนื้อเยื่อ คือ กล้ามเนื้อ หัวใจ ตา สมอง เหนือกดับ ม้าม และไตของปลาเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) และเมื่อฉีด CdCl_2 เข้มข้น 0.003 และ 0.05% ร่วมกับ Aza เข้มข้น 0.0005% เข้าในกล้ามเนื้อปลา พบว่าทุกกลุ่มก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลานิล โดยผลจะเพิ่มมากขึ้นถึง 48 ชั่วโมง และเริ่มลดลงใน 72 และ 96 ชั่วโมง

Lacroix และ Hontela (2004) ศึกษาผลกระทบของ CdCl_2 เข้มข้น 0.01-100 mM ต่อเซลล์ adrenocortical ในปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และปลา yellow perch (*Perca flavescens*) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่า CdCl_2 สามารถยับยั้งการหลั่ง cortisol ที่ถูกกระตุ้นโดย Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) ในปลาทั้งสองชนิด โดยมีค่า EC_{50} ของปลาทั้งสองชนิดแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ คือ CdCl_2 0.09 และ 0.26 mM ในปลา rainbow trout และปลา yellow perch ตามลำดับ และ CdCl_2 สามารถทำให้เกิด endocrine disruptor โดยวัดจากอัตราส่วนของ $\text{LC}_{50}/\text{EC}_{50}$ พบว่ามีค่าเท่ากับ 175.6 ในปลา rainbow trout ซึ่งสูงกว่าปลา yellow perch ที่มีค่าเท่ากับ 37.7 สรุปได้ว่า CdCl_2 ทำให้เกิด endocrine disruptor ในปลา rainbow trout มากกว่าปลา yellow perch และมีผลต่อ ACTH, dibutyl cyclic AMP (dbcAMP) และ pregnenolone ที่กระตุ้นให้เกิดการหลั่ง cortisol นอกจากนี้ยังรบกวนการส่งสัญญาณในการสังเคราะห์ cortisol ในปลาทั้งสองชนิดด้วย

Yilmaz และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ต่อพฤติกรรมของปลาหางนกยูง (*Poecilia reticulata*) พบว่า ปลาหางนกยูงที่ได้รับ $\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ มีค่า LC_{50} ที่ 90 ชั่วโมง เมื่อตรวจด้วยด้วยเทคนิค EPA computer programe และ Behrens-Kaerber's method เท่ากับ 30.4 และ 30.6% ตามลำดับ และมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลาหางนกยูง คือ ว่ายน้ำไม่ตรง ว่ายชนขอบภาชนะ หายใจไม่ถนัด และไปรวมกลุ่มกันที่บริเวณแผ่นกรองอากาศ

อุดรรัตน์ และคณะ (2005) ดำเนินการปนเปื้อนของโลหะหนักแคดเมียมในเนื้อเยื่อของปลาคูก้าน (*C. batrachus*) จากแหล่งขายในกรุงเทพมหานครระหว่างเดือนเมษายน-พฤษภาคม 2547 ด้วยเทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometry พบว่าการปนเปื้อนของแคดเมียมในเนื้อหนัง เหนือก และตับ เท่ากับ 0-0.036, 0-0.045, 0.001-0.0067 และ 0.010-0.185 mg/L ตามลำดับ โดยตับมีระดับการสะสมแคดเมียมมากที่สุด

Arkhipchuk และ Garanko (2005) ศึกษา cytotoxicity และ genotoxicity ของ CuSO_4 เข้มข้น 0.1 และ 2.5 mg/L, CdCl_2 เข้มข้น 0.005 และ 1.0 mg/L และ chloral hydrate ซึ่งเป็นยาระงับประสาท เป็นเวลา 30-180 นาที ต่อเนื้อเยื่อบริเวณครีบทหางปลา common carp, crucian carp และ Mozambique tilapia พบว่า ปลา common carp และปลา crucian carp ที่ได้รับ CuSO_4 และ CdCl_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิดจำนวน nucleolus ลดลง ($P < 0.001$) ส่วนปลา crucian carp พบว่า CuSO_4 เข้มข้น 0.1 และ 2.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิด BN ในเลือดเพิ่มขึ้น ($P < 0.01$ และ $P < 0.001$) และ CdCl_2 เข้มข้น 0.005 และ 1.0 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN และ BN เพิ่มขึ้น ($P < 0.001$) และพบว่า CuSO_4 เข้มข้น 2.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN และ BN ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลา crucian carp เพิ่มขึ้น ($P < 0.01$) ส่วน CdCl_2 เข้มข้น 1.0 mg/L ชักนำให้เกิด MN และ BN เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$ และ $P < 0.05$) ส่วนเซลล์จากครีบทหางปลา crucian carp พบว่า CuSO_4 เข้มข้น 0.1 และ 2.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น ($P < 0.001$) CdCl_2 เข้มข้น 1.0 mg/L ชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น ($P < 0.01$) แสดงให้เห็นว่า CuSO_4 เข้มข้น 2.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN และ BN ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์จากครีบทหางปลา crucian carp สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือด ส่วน CdCl_2 เข้มข้น 0.1 และ 1.0 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN และ BN ในเซลล์เหงือกและเซลล์เม็ดเลือด สูงกว่าเซลล์จากครีบทหางปลา crucian carp และพบค่า BNFs ของเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก แต่พบค่า MNFs ต่ำกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกในปลา crucian carp ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 1.0 mg/L

Cavas และคณะ (2005) ศึกษาการชักนำให้เกิด MN และ BN ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์ตับในปลา 3 ชนิด common carp, prussian carp และ peppered cory โดยปลาได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.005-0.1 mg/L และ CuSO_4 เข้มข้น 0.01-0.25 mg/L เป็นเวลา 21 วัน โดยใช้โครเมียม (Cr^{+6}) เข้มข้น 5 mg/L เป็น positive control เมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นเป็นร้อยละของ MN และ BN กับกลุ่มควบคุม พบค่า ในปลา peppered cory ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.005 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ($P < 0.01$) และพบค่า BNFs ในเซลล์ตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) ส่วนปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.1 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและตับ และค่า BNFs ในเซลล์เลือดและตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) ในปลา prussian carp ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.1 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์ตับ และพบค่า BNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก และเซลล์ตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$, $P < 0.01$ และ $P < 0.001$) ตามลำดับ ในปลา common carp ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.1 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$) ตามลำดับ และพบค่า BNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) ตามลำดับ ส่วนปลา

common carp และปลา prussian carp ที่ได้รับ CuSO_4 เข้มข้น 0.01 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เยื่อ
บุผิวเหงือกปลา prussian carp สูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P<0.01$) ส่วนเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและตับ
ของปลา common carp ที่ได้รับ CuSO_4 เข้มข้น 0.25 mg/L พบค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มควบคุม
($P<0.05$) และเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์ตับของปลา prussian carp ที่ได้รับ
 CuSO_4 เข้มข้น 0.25 mg/L พบค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ($P<0.01$, $P<0.01$ และ $P<0.05$)
ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา peppered cory มีความไวต่อ CdCl_2 มากกว่า
ปลา common carp และ prussian carp และเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลา prussian carp มีความไวต่อ
 CuSO_4 มากกว่าปลา common carp และ peppered cory

Cicik และ Engin (2005) ศึกษาาระดับของ glucose ในซีรัมและ glycogen ที่สะสมในปลา
common carp ที่ได้รับแคดเมียมเข้มข้น 0.05, 0.1, 0.5, 1.0 mg/L เป็นเวลา 10 วัน พบว่า แคดเมียมทุก
ความเข้มข้นทำให้ระดับ glucose ในซีรัมเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม โดยระดับ glucose ในซีรัมเพิ่ม
สูงขึ้นเมื่อปลา common carp ได้รับแคดเมียม 0.5 และ 1.0 mg/L อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$)
นอกจากนี้ยังพบระดับของ glycogen ที่สะสมในตับและกล้ามเนื้อลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
($P<0.05$) โดยเฉพาะแคดเมียมเข้มข้น 1.0 mg/L มีผลทำให้ระดับของ glycogen ที่สะสมในตับและ
กล้ามเนื้อลดลง 23.72 และ 29.05% ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่า แคดเมียมสามารถเปลี่ยน
carbohydrate metabolism ในปลา common carp ได้

Fourie และคณะ (2006) ศึกษาเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdSO_4
เข้มข้น 2.5-20 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในไส้เดือนดิน 5 ชนิด ด้วยเทคนิค Comet assay พบว่า
ไส้เดือนดิน 3 ชนิด คือ *Aporrectodea caliginosa*, *Dendrodrilus rubidus* และ *Eisenia fetida* มี
ความไวต่อสารพิษมากกว่า *Amyntas diffringens* และ *Microchaetus benhami* โดยพบว่าเกิด DNA
damage สูงกว่ากลุ่มควบคุมถึง 3 เท่า ($P<0.05$) ส่วน *E. fetida* พบว่า CdSO_4 ทำให้เกิด DNA damage
สูงสุด

Jayakumar และคณะ (2006) ศึกษาการสะสมของแคดเมียมในเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆของปลา
คูก้าน *C. batrachus* โดยแช่ใน CdCl_2 เข้มข้น 7 mg/L เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ในเนื้อเยื่อของปลาคูก
ด้านมีการสะสมของแคดเมียมมาก คือ เหงือก > ไต > ตับ > ผิวหนัง > กล้ามเนื้อ โดยมีค่าเฉลี่ยของ
 CdCl_2 เท่ากับ 0.98 ± 0.03 , 0.81 ± 0.01 , 0.77 ± 0.01 , 0.31 ± 0.01 และ 0.04 ± 0.00 mg/L ตามลำดับ ซึ่ง
แตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมของแต่ละเนื้อเยื่อ ($P<0.05$)

Matsumoto และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของโครเมียมที่ปนเปื้อน
จากบริเวณต่างๆ จากลำธาร Corrogo dos bargres ในประเทศบราซิลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงปลานิล
O. niloticus โดยใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay พบว่า ปริมาณโครเมียมที่พบใน

ส่วน upstream นั้น ไม่ชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนแหล่งน้ำบริเวณ effluent discharge และ downstream site นั้น ทำให้เซลล์เกิดความเสียหายโดยมีค่า comet scores เฉลี่ยเท่ากับ 70.17 และ 62.0 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

Matz และคณะ (2007) ศึกษาการสะสมและการกำจัด CdCl_2 0-125 μM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ในตัวอ่อนปลาหมอ (Danio rerio) ด้วยเทคนิค graphite furnace AAS พบว่า ตัวอ่อนปลาหมอที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 1.0 และ 5 μM เป็นเวลา 3 ชั่วโมง มีแคดเมียมสะสมมากกว่าตัวอ่อนปลาหมอกฎคุม ($P < 0.001$) และหลังจากได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 5.0, 25 และ 125 μM เป็นเวลา 0, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ตัวอ่อนปลาหมอกฎคุมที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 5 μM มีการสะสมแคดเมียมในตัวปลาหมอลดลง ซึ่งไม่แตกต่างจากปลาหมอกฎคุมที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 25 และ 125 μM อย่างมีนัยสำคัญ โดยพบแคดเมียมในตัวอ่อนปลาหมอน้อยกว่าตัวอ่อนปลาหมอกฎคุมที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 125 μM ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า ตัวอ่อนของปลาหมอสามารถลดระดับของแคดเมียมในร่างกายหลังจากได้รับ CdCl_2 ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษอย่างเฉียบพลันในระยะเวลานั้นๆ

7.2. การศึกษาความเป็นพิษของ CdCl_2 ในเซลล์เพาะเลี้ยง

จิวิรัตน์ (2005) ศึกษาเปรียบเทียบวิธีประเมินความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อเซลล์และความ เป็นพิษต่อการเพิ่มจำนวนของแคดเมียมต่อเซลล์ L929, BHK21 และ HepG2 ในอาหาร DMEM ที่มี 0 และ 2.5% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด ที่เลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี 0 และ 2.5% FBS เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุมไม่มีความแตกต่างกัน ($P > 0.05$) ส่วนเซลล์ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.64 μM มีอัตราการรอดชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) จากการเปรียบเทียบวิธีตรวจสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อเซลล์ พบว่า ความไวของวิธีตรวจสอบพิษของ CdCl_2 ต่อเซลล์ L929 ในกลุ่มที่ไม่มีซีรัม คือ Trypan Blue > Neutral red > MTT assay และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.90 ± 0.30 , 1.00 ± 0.17 และ 4.94 ± 1.96 ตามลำดับ ในกลุ่มที่มีซีรัม 2.5% ความไวของวิธีตรวจสอบ คือ Neutral red > MTT assay > Trypan Blue และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 4.25 ± 1.98 , 6.85 ± 3.33 และ 9.13 ± 1.18 ตามลำดับ ส่วนเซลล์ BHK21 และ HepG2 พบว่ามีความไวในการตรวจสอบเหมือนกัน คือ Neutral red > Trypan Blue > MTT assay พบว่า ผลของซีรัมทำให้ความถี่ของ MN เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ CdCl_2 เมื่อทดสอบกับเซลล์ L929 พบว่า เซลล์ L929 มีความเหมาะสมต่อการใช้ประเมินความเป็นพิษต่อการเพิ่มจำนวน และเทคนิค Trypan Blue และ Neutral red เป็นวิธีที่มีความไวในการทดสอบสารพิษของ CdCl_2 ต่อเซลล์

Kasuba และ Rozej (2000) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 เข้มข้น 10^{-3} - 10^{-6} M ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในระยะ G_0 และ S ในวัฏจักรเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหาร F-10 culture medium ผสม phytohemagglutinin และวัดการเกิด MN พบว่า CdCl_2 เข้มข้น 10^{-3} M ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะ G_0 เพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะ S ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 10^{-3} - 10^{-6} M พบค่า MNFs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P > 0.05$)

Mouron และคณะ (2001) ศึกษาผลของสารเคมีที่มีพิษต่อการทำลายดีเอ็นเอในเซลล์ human lung fibroblast ด้วยวิธี SCGE assay หรือ Comet assay พบว่า CdCl_2 เข้มข้น 4 μM , CdSO_4 เข้มข้น 0.067 และ 0.13 μM , NaAsO_2 เข้มข้น 2.5, 5 μM และ $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$ เข้มข้น 125, 250 และ 500 μM ทำให้เกิด DNA damage ในเซลล์ human lung fibroblast อย่างมีนัยสำคัญ

Seoane และ Dulout (2001) ศึกษาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพื่อประเมิน DNA damage, gene mutation และ chromosome breakage ของเกลือโลหะโดยใช้วิธีการ Micronucleus test ด้วยการย้อมสี kinetochore ในเซลล์ fibroblast ของมนุษย์ (MRC-5) พบว่า สารประกอบ CdCl_2 , CdSO_4 , NiCl_2 , Ni_2SO_4 , CrCl_3 และ K_2SO_4 ทำให้ความถี่ของ MN ที่เป็น kinetochore-positive เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่ม kinetochore-negative ($P < 0.001$) และพบว่าเกลือของ แคดเมียมและโครเมียมสามารถชักนำให้เกิด clastogenic และ aneugenic เท่าๆ กัน ส่วนนิกเกิลนั้น พบว่าสามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมต่ำกว่าเกลือโลหะอื่นๆ

Fatur และคณะ (2002) ศึกษา DNA damage และการสังเคราะห์ metallothioneine ในเซลล์ HepG2 ซึ่งเป็นเซลล์ตับมนุษย์ เมื่อได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 10, 100 และ 1000 nM และผสมกับ 2-amino-3-methyl-imidazo (4,5-f) quinoline (IQ) และ benzo [a] pyrene (B(a)P) พบว่า เซลล์ HepG2 ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 10-1000 nM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เกิด DNA damage และมีการสังเคราะห์ metallothioneine เพิ่มขึ้น และเมื่อเซลล์ HepG2 ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 10-100 nM กับ IQ เข้มข้น 300 μM สามารถชักนำให้เกิด DNA damage เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ IQ เพียงอย่างเดียว และยังสามรถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ IQ รวมด้วย

Yang และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ cadmium acetate เข้มข้น 4 μM ที่มี 3-amino-1,2,4-triazole (3-AT) เข้มข้น 80 mM ต่อเซลล์ CHO-K1 พบว่า cadmium acetate สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ CHO-K1 โดยพบความถี่ของเซลล์ที่กลายพันธุ์ 11 และ 16 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่า cadmium acetate สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ transversions มากกว่าแบบ transitions โดย cadmium acetate ที่มี 3-AT จะทำให้เซลล์ CHO-K1 เกิดการกลายพันธุ์แบบ GC-AT transitions เพิ่มขึ้น และการกลายพันธุ์แบบ TA-AT และ TA-GC

transversions ลดลง นอกจากนี้ยังพบว่าเอนไซม์ catalase ภายในเซลล์จะช่วยป้องกันการเกิด oxidative DNA damage พร้อมๆ กับการกลายพันธุ์แบบ deletions และ GC-AT transitions ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับ

ศรัญญา (2006) ศึกษาปริมาณแคดเมียมที่สะสมในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของปลาช่อน (*Ophicephalus striatus*) จากตลาดบางกอกน้อย ตลาดราชวัตร ตลาดยิ่งเจริญ ตลาดวงเวียนใหญ่และตลาดสายเนตรในกรุงเทพมหานคร ด้วยเทคนิค Atomic Absorption Spectrophotometer และศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์ปลาช่อนเพาะเลี้ยงด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่าปริมาณแคดเมียมในเนื้อ เท่ากับ 0.02-0.11 mg/L หนังและเหงือก เท่ากับ 0.02-0.08 mg/L และพบที่ระดับปริมาณสูงสุด เท่ากับ 0.13-1.68 mg/L โดยเฉพาะตับจากปลาตัวอย่างที่เก็บจากตลาดบางกอกน้อยมีปริมาณสูงถึง 1.68 mg/L และผลการศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 เข้มข้น 0.005, 0.05, 0.5 และ 5 mg/L ในเซลล์ปลาช่อนเพาะเลี้ยง (SSN-1 cells) เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.05, 0.5 และ 5 mg/L เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง มี MNFs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยค่า MNFs ที่เพิ่มขึ้นนั้นมีความสัมพันธ์กับระดับของแคดเมียมและระยะเวลาที่สัมผัสกับแคดเมียม ในขณะที่ CdCl_2 เข้มข้น 0.005 mg/L พบค่า MNFs ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตลอดระยะเวลาที่ศึกษา แสดงให้เห็นว่า เซลล์ SSN-1 สามารถใช้เป็นโมเดลในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้ และระดับของแคดเมียมที่เข้าสู่เซลล์มีความสัมพันธ์กับ MNFs โดยระดับค่า MNFs จะเพิ่มตามระดับของแคดเมียมที่มีอยู่ภายในเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับระดับแคดเมียมและเวลาที่สัมผัสกับสารแคดเมียม

7.3. การศึกษาสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาในสัตว์ทดลอง

วินัย และคณะ (2542) ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเมล็ดสะเดาเทียม (*A. excelsa*) ด้วยเครื่องระเหยแบบสูญญากาศ และผลของสารสกัดต่อหนอนใยผัก (*Plutella xylostella*) พบว่า มี azadirachtin A, B และ M เท่ากับ 0.5-1, 2-3 และ 4-5 mg/g ตามลำดับ และประสิทธิภาพของสารสกัดสะเดาเทียมกับหนอนใยผักวัย 3 มีค่า LD_{50} เท่ากับ 46.8 mg/L และพบปริมาณกรดไขมันในน้ำมันสะเดาเทียมคล้ายกับน้ำมันจากสะเดาไทย ประกอบด้วย palmitic, stearic, oleic, linolenic และ arazinodic acid ในปริมาณ 14.2, 8.7, 42.7, 31.4, 1.6 และ 1% ตามลำดับ

Mancebo และคณะ (2001) ศึกษาผลของสารสกัดจากสะเดาไทย (*Azadirachta indica* A. Juss.) 2 ยี่ห้อ คือ Azathin และ Nim 80 ที่มี Azadirachtin 3% และ 0.1% ตามลำดับ โดยผสมให้เข้มข้น 0.1, 0.32, 1.0, 3.2 และ 10% ของอาหารในแมลงที่กักกินยอดต้นมะฮอกกานี (*Hypsipyla grandella*) พบว่า Azathin และ Nim 80 ความเข้มข้น 1.0, 3.2 และ 10% ทำให้แมลงตายและมีผล

ยับยั้งการเจริญเติบโต และ Nim 80 ทุกความเข้มข้นยังทำให้ตัวอ่อนแมลงตายหลังจากลอกคราบ 4 วัน

Raizada และคณะ (2001) ศึกษาความเป็นพิษแบบเรื้อรังของ Azadirachtin (Aza 12%) ซึ่งเป็นสารฆ่าแมลงที่สกัดจากสะเดา โดยให้หนูกิน 500, 1,000 และ 1,500 mg/kg ต่อวัน เป็นเวลา 90 วัน ตรวจไม่พบความเป็นพิษเกิดขึ้น ส่วนอัตราการตาย การเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ ได้แก่ aminotransferase, alanine aminotransferase และ alkaline phosphatase ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม และพบว่าหนูทั้งสองเพศสามารถทนอยู่ได้ จึงใช้ผลการทดลองนี้เป็นพื้นฐานในการกำหนดระดับความเข้มข้นที่ไม่แสดงผล NOEL (No Observed effects level) ของสาร Azadirachtin เท่ากับ 1500 mg/kg

Khan และคณะ (2003) ศึกษาผลของสารสกัดจากใบสะเดาที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อจำนวนและโครงสร้างของ sperm จาก epididymis ระยะ metaphase I ในหนู (*Mus musculus*) โดยวิเคราะห์ความเสียหายของโครโมโซม คือ fragments และ translocations ส่วนความผิดปกติของชุดโครโมโซม คือ polyploidy, aneuploidy และ synap disturbance พบว่า Azadirachtin เข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 g ทำให้เกิดความผิดปกติทุกลักษณะเพิ่มขึ้น ($P < 0.001$) และ ยังเป็นสารก่อมะเร็งใน epididymis ของหนูอีกด้วย แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบสะเดาทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในหนู

Khan และ Awasthy (2003) ศึกษาการเกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดจากใบสะเดาด้วยเอทานอล 80%(v/v) ในหนู Swiss albino อายุ 6-8 สัปดาห์ แล้วตรวจความผิดปกติของโครโมโซมด้วยเทคนิค G-band technique พบว่า สารสกัดจากใบสะเดาเข้มข้น 0.5, 1.0 และ 2.0 g สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซม ซึ่งคิดเป็น 17.6, 23.07 และ 25.4% ตามลำดับซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.01$) แต่ไม่พบว่าเซลล์อสุจิมีความแตกต่างกันกับกลุ่มควบคุม ส่วนจำนวนอสุจินั้น พบว่า มีปริมาณลดลงในกลุ่มทดลอง เท่ากับ 7.92×10^6 , 5.998×10^6 และ 5.81×10^6 cells/ml ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากใบสะเดาทำให้เกิดความผิดปกติของจำนวนโครโมโซมในหนู

Baral และ Chattopadhyay (2004) ศึกษาการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันและยับยั้งการเกิดมะเร็งชนิด Ehrlich carcinoma และ B16 melanoma ของหนูพันธุ์ Swiss และ C57BL/6 โดยให้หนูฉีดสารสกัดจากใบสะเดา เข้มข้น 1 ml/week เป็นเวลา 4 สัปดาห์ พบว่า สารสกัดจากใบสะเดาจะลดอัตราการเจริญของมะเร็งและเนื้องอก ($P < 0.01$) และยังเพิ่มอัตราการรอดชีวิตของหนูด้วย และพบว่า สารสกัดจากใบสะเดาไม่สามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์เนื้องอกได้เหมือนกับกลุ่มควบคุมที่ได้รับ PBS ส่วนกลุ่มที่ได้รับการฉีดสารสกัดสะเดามีอัตราการแบ่งเซลล์ของเม็ดเลือดขาวจากม้ามเข้าสู่

กระแสเลือดเพิ่มสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมเมื่อตรวจด้วยเทคนิค Flow cytometry นอกจากนี้ยังมีการเพิ่มขึ้นของ CD^{4+} และ CD^{8+} ของ T-cell ทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแบ่งตัวเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบสะเดามีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยทำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวแบ่งตัวเพิ่มขึ้น

Farah และคณะ (2005) ศึกษาการยับยั้งการก่อกลายพันธุ์ของสาร pentachlorophenol (PCP) เข้มข้น 0.06 mg/L และ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 75 mg/L เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมให้สารสกัดจากใบสะเดาอินเดีย 3 mg/L ในปลาช่อน (*Channa punctatus*) ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมและ MN เพิ่มขึ้น ยกเว้นปลากลุ่มที่ได้รับสารสกัดสะเดา ส่วนปลากลุ่มที่ได้รับสารสกัดสะเดา 1, 2 และ 3 mg/L ซึ่งผสมกับ PCP และ 2,4-D พบว่า ปลาช่อนที่ได้รับสารผสมระหว่างสารสกัดสะเดากับ PCP และ 2,4-D มีความถี่ของโครโมโซมที่ผิดปกติลดลง 40-75 และ 45.4-83.3% ตามลำดับ และค่า MNFs ลดลง 40.2-75.3 และ 44.1-65.8% ตามลำดับ ($P < 0.05$)

7.4. การศึกษาความเป็นพิษของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาในเซลล์เพาะเลี้ยง

คณิศร์ (2005) ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมของสารสกัดจากสะเดาซึ่งมีชื่อทางการค้าว่า สะเดาไทย 111 ที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.10-0.20 μ M ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงของหนู (L929) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า อัตราการรอดชีวิตของเซลล์ L929 ในอาหารที่มีและไม่มีซีรัมที่ตรวจด้วยเทคนิค Trypan Blue exclusion มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.23 และ 0.15 μ M ตามลำดับ และมีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.37 และ 0.21 μ M ตามลำดับ เมื่อตรวจด้วยวิธี MTT assay ส่วนความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมซึ่งตรวจด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่า Azadirachtin เข้มข้น 0.10, 0.15 และ 0.20 μ M สามารถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.01$) และลดอัตราการแบ่งเซลล์ลง

Salehzadeh และคณะ (2003) ศึกษาการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda* (Sf9) และ *Aedes albopictus* (C3/36) ที่ได้รับ Azadirachtin เข้มข้น 10^{-4} - 10^{-8} M เป็นเวลา 20-72 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Flow cytometry พบว่า การเจริญของเซลล์แมลง Sf9 ในอาหาร TNM-NH ที่ไม่มี Azadirachtin พบเซลล์ที่อยู่ในระยะ G_1 , S และ G_2/M เท่ากับ 61 ± 6 , 11 ± 6 และ $28 \pm 3\%$ ตามลำดับ แต่ถ้าเซลล์ได้รับ Azadirachtin 5×10^{-8} M เป็นเวลา 20 ชั่วโมง มีผลทำให้วัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์ Sf9 ที่อยู่ในระยะ G_2/M ค่าเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม 42% ส่วนเซลล์ในระยะ G_1 มีสัดส่วนลดลง แต่ถ้าเซลล์ได้รับ Azadirachtin 5×10^{-6} M เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบเซลล์ที่อยู่ในระยะ G_2/M มากกว่า 90% ในทางตรงกันข้าม Azadirachtin 10^{-4} M มีผลทำให้วัฏจักรการแบ่งเซลล์ของเซลล์ Sf9 และมีสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G_1 กับ G_2/M เท่ากับ 8% ส่วนในเซลล์ C3/36 ที่ได้รับ

Azadirachtin 5×10^{-6} M เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบเซลล์ที่อยู่ในระยะ G_2/M และสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G_1 กับ G_2/M มีค่าเท่ากับ 7 และ 87% ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งพบว่ามีค่าเท่ากับ 50 และ 32% ตามลำดับ แต่การทดลองในเซลล์ L929 ที่ได้รับ Azadirachtin เข้มข้น 10^{-4} M เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์

Bandyopadhyay และคณะ (2004) ศึกษาสารสกัดจากเปลือกสะเดา (*A. indica*) ที่มีผลต่อการยับยั้งการหลั่งสารและการเกิดแผลเป็นหนองในลำไส้ส่วน duodenum ของมนุษย์ พบว่า คนที่เป็น lyophilized ulcer ซึ่งรับประทานสารสกัดสะเดา 30 mg รวม 2 ครั้งต่อวัน เป็นเวลา 10 วัน สามารถรักษาแผลที่เป็นหนองในลำไส้เล็กให้หายได้ โดยมีผลลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหารประมาณ 70% ($P < 0.002$) และปริมาตรในการหลั่งกรดและ pepsin ในกระเพาะอาหารมีค่าเท่ากับ 63 และ 50% ตามลำดับ และพบสารบางชนิดที่หลั่งออกมา เช่น sugar, urea, creatinine, serum glutamate oxaloacetate, transaminase, serum glutamate pyruvate transaminase, albumin, globulin และ hemoglobin และระดับการตกตะกอนของเซลล์เม็ดเลือดแดง ในขณะที่อวัยวะนั้นเกิดความผิดปกติต่อสารพันธุกรรม

Thompson และคณะ (2004) ผลของการฉีดพ่น Azadirachtin 0.006 และ 0.100 mg/L ลงสู่ระยะน้ำตัก 90 ชั่วโมงในป่า โดยใช้สารสกัดสะเดาในชื่อการค้า Neemix 4.5 พบว่าเมื่อเก็บตัวอย่างน้ำมาตรวจทุกสัปดาห์เป็นเวลา 70 วัน พบว่าเมื่อสารลงสู่แหล่งน้ำแล้วจะตรวจพบปริมาณลดลง 50% ตามระยะเวลา คือ 24, 45 และ 50 วัน สำหรับ Azadirachtin A, Azadirachtin B และ Azadirachtin residue ตามลำดับ แต่เมื่อตรวจจากน้ำในตะกอนดินก้นสระพบ Azadirachtin residue เพิ่มขึ้นช้า ๆ โดยพบมากหลังจากฉีดพ่น 49-70 วัน แสดงให้เห็นว่าสิ่งมีชีวิตจะได้รับสารตกค้างแบบสะสมต่อเนื่องของ Azadirachtin residue ซึ่งในช่วงเวลาเดียวกันนี้ตรวจไม่พบ Azadirachtin A & B ในน้ำ

7.5. การนำเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay ไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต

ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีในระดับที่ทำลายสารพันธุกรรมนั้น ได้ใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay ซึ่ง EPA กำหนดให้เป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ลักขณา และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดเฮกเซนจากว่านชักมดลูกต่อสารพันธุกรรมของเซลล์เม็ดเลือดแดงชนิด polychromatic erythrocytes (PCE) จากไขกระดูกหนูเมาส์ ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่า หนูที่กินสารสกัดจากว่านชักมดลูกเข้มข้น 250, 500 และ

1,000 mg/kg-body weight จากนั้นฆ่าหนูที่เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หลังจากได้รับสารสกัดเฮกเซน จากवानชักมด และพบค่า MNFs ที่ตรวจจาก PCE ลดต่ำลงแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากวานชักมดถูกด้วยเฮกเซนไม่ก่อให้เกิดพิษต่อสารพันธุกรรมในหนูเมาส์

Ateep และคณะ (2002) ใช้เทคนิค Micronucleus test ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ในเม็ดเลือดแดงของปลาคูก้านที่ได้รับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) เข้มข้น 25, 50 และ 75 mg/L และ butachlor เข้มข้น 1, 2 และ 2.5 mg/L เป็นเวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่า ปลาที่ได้รับ 2,4-D เข้มข้น 75 mg/L เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่า MNFs เท่ากับ 1.75 ± 0.9 ถึง 3.69 ± 1.96 และ 9.64 ± 2.55 ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับ butachlor เข้มข้น 2.5 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า MNFs เท่ากับ 3.10 ± 0.89 ถึง 4.04 ± 1.97 และกลุ่มที่ได้รับ butachlor 1.0 mg/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง และ butachlor เข้มข้น 2.5 mg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง มีค่า MNFs เท่ากับ 7.44 ± 1.84 ทั้งสองกลุ่ม ซึ่งมีค่าเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

Palhares และคณะ (2002) ศึกษาเปรียบเทียบความถี่ของ micronucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของไคและเซลล์เหงือกจากปลานิล 2 ชนิด คือ *T. pendali* และ *O. niloticus* โดยฉีด mitomycin C เข้มข้น 2 mg/L และ cyclophosphamide เข้มข้น 20 mg/L เข้าช่องท้องปลา เป็นเวลา 15 วัน พบว่าปลา *T. pendali* มีค่า MNFs มากกว่า *O. niloticus* และ ค่า MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของไคและเซลล์เหงือกไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แสดงให้เห็นว่าปลา *T. pendali* มีความไวในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมมากกว่า *O. niloticus*

Cavas และ Ergene-Gozukara (2003) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ pyrethroid lambda-cyhalotrin (PLC) เข้มข้น 5-50 mg/L ในปลา *Garua rufa* เป็นเวลา 36 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Micronucleus test และรูปร่างและจำนวนของ nucleolar organizer regions (NORs) ที่ย้อมด้วยสี silver technique พบว่า PLC เข้มข้น 10-50 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่ม positive control ที่ได้รับ benzene ส่วนความถี่ NORs ที่ตรวจพบจากเซลล์เยื่อบุผิวจากครีบลดลงในกลุ่ม positive control และจำนวนของเซลล์ที่เป็น single nucleolus ลดลง ($P < 0.001$) ยกเว้นปลาในกลุ่มที่ได้รับ PLC เข้มข้น 5 mg/L เป็นเวลา 90 นาที แสดงให้เห็นว่า NORs จากเซลล์เยื่อบุผิวครีบลปลาสามารถใช้เป็น biomarker เพิ่มขึ้นควบคู่กับเทคนิค Micronucleus test ในการประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ ของสารเคมีที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ

Grisolia (2003) ศึกษาเปรียบเทียบเทคนิค Micronucleus test ในหนู Swiss และปลา *T. rendelli* ที่ทดสอบด้วย cyclophosphamide, mitomycin C, ยาฆ่าเชื้อรา alliete, brestanid และ thiram, ยาฆ่าแมลง Decis 25 CE (deltamethrin) และ Kelthane 480 CE (difocol) และยาฆ่าหญ้า Imazapyr

และ roundup (glyphosate) พบว่า ทั้ง cyclophosphamide, mitomycin C สามารถชักนำให้เกิด MN ในหนู Swiss และปลา *T. rendelli* ส่วน deltamethrin 1.0 และ 5.0 mg/L และ difocol 50, 100 และ 200 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN ในปลา *T. rendelli* แต่ไม่ชักนำให้เกิด MN ในหนู Swiss ($P<0.05$) ส่วน alliete และ brestanid ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้เกิด MN ในปลา *T. rendelli* และหนู Swiss ($P<0.05$) ส่วนปลา *T. rendelli* ที่ได้รับ Imazapyr 1,200 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN ($P<0.05$) แต่ไม่ชักนำให้เกิด MN ในหนู และพบว่า thiram 42, 85 และ 170 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN ในปลา *T. rendelli* แต่ไม่ชักนำให้เกิด MN ในหนู ($P<0.05$) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิค Micronucleus test สามารถใช้ตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลาในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารพิษได้

Izquierdo และคณะ (2003) ดำรวจผลกระทบของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ตั้งอยู่ในบริเวณตัวเมือง Gijon และ Puerto Madryn จากตัวอย่างหอยแมลงภู่ *Mytilus edulis* ที่เก็บได้จากบริเวณต่างๆ ที่อยู่ห่างจากโรงงานอุตสาหกรรม 300 เมตร พบว่า ค่า MNFs ในเซลล์เหงือกลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากบริเวณที่เก็บตัวอย่างทั้ง 3 ตำแหน่ง คือ มีค่า MNFs อยู่ในช่วง 1.42-17.5 เซลล์จาก 1,000 เซลล์ตัวอย่าง และพบความถี่ลดลงเมื่อเก็บตัวอย่างห่างออกไปจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารเคมี นอกจากนี้ยังพบค่า BNFs อยู่ในช่วง 3.25-10.33 เซลล์จาก 1,000 เซลล์ตัวอย่าง ซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เทคนิค Micronucleus test เป็นวิธีที่มีความไวสำหรับใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีในภาคสนามได้ และสามารถใช้หอยแมลงภู่เป็น bioindicator ในแหล่งน้ำได้

Palus และคณะ (2003) ศึกษาประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในคนงานที่ทำงานในโรงงานที่ผลิตแบตเตอรี่ที่ได้รับแคดเมียมและตะกั่วด้วยเทคนิค Micronucleus test ร่วมกับ fluorescence in situ hybridization (FISH) ที่ย้อมติด pan-centromere, sister chromatid exchanges (SCEs) กับ 5'-bromodeoxyuridine (BrdU) และ Comet assay ใน somatic cells พบว่า คนงานได้รับสารตะกั่วในเลือดมีตะกั่วเข้มข้น 0.282-0.655 mg/L ในขณะที่กลุ่มควบคุมมีตะกั่วและแคดเมียมอยู่ในเลือด 0.017-0.180 mg/L ส่วนคนงานกลุ่มที่ตรวจพบแคดเมียมในเลือดอย่างเฉียบ 5.4-30.8 µg/L นั้น กลุ่มควบคุมมีตะกั่วอยู่ในเลือด 0.002-0.0057 mg/L นอกจากนี้ยังพบค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนงานที่ได้รับตะกั่วและแคดเมียมสูงกว่ากลุ่มควบคุม 2 เท่า ($P<0.001$) เมื่อใช้เทคนิค Micronucleus test ร่วมกับ FISH และ pan-centromere พบว่ามีค่าเพิ่มสูงขึ้นเนื่องจากเกิด clastogenic และ aneugenic คนงานที่ได้รับแคดเมียมและตะกั่วมีความถี่ของ SCEs ในเซลล์เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) เนื่องจากเกิด DNA fragment และหลังจากบ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว 3 ชั่วโมง พบว่า ระดับความเสียหายของ DNA มีค่าลดลงเท่ากับกลุ่มควบคุม

Valentin-Severin และคณะ (2003) ใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay ตรวจสอบ DNA damage, clastogenic และ aneugenic effects ของสารประกอบที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรม คือ 4-nitroquinoline-N-oxide (4-NQO), methyl methanesulfonate (MMS), N-nitrosodimethylamine (NDMA), benzo[a]pyrene (B[a]P) และ 2-aminoflourene (2-AAF) พบว่า 4-NQO, B[a]P และ 2-AAF มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 มาก โดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 1.9 μM เมื่อบ่มกับ 4-NQO เป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ IC_{50} เท่ากับ 3.4 และ 112 μM เมื่อบ่มกับ B[a]P และ 2-AAF เป็นเวลา 20 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วน MMS มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 ในระดับปานกลาง มีค่า IC_{50} เท่ากับ 0.9 mM หลังบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง และ NDMA มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HepG2 น้อยโดยมีค่า IC_{50} เท่ากับ 110 mM เมื่อบ่มเป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อมีความเข้มข้นของ NDMA 250 mM สามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมต่อเซลล์ HepG2 จากการใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay ตรวจสอบการเกิด DNA damage เปรียบเทียบกันพบว่า เทคนิค Micronucleus test สามารถตรวจสอบสารเคมีที่ทำให้เกิด DNA damage ในปริมาณที่ต่ำกว่าเทคนิค Comet assay เพราะมีความไวน้อยกว่า ซึ่งการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ 2-AAF ทุกความเข้มข้น ด้วยเทคนิค Comet assay จึงตรวจไม่พบ DNA damage

Buschini และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารฆ่าเชื้อโรคในน้ำดื่ม คือ $NaClO$, ClO_2 และ CH_3COO_2H เป็นเวลา 10 และ 20 วัน ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา *Cyprinus carpio* ด้วยเทคนิค Comet assay และ Micronucleus test พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา *C. carpio* ที่ได้รับ $NaClO$ และ ClO_2 เป็นเวลา 20 วัน มีค่าเท่ากับ 1.24 ± 0.19 และ 1.64 ± 0.21 mg/L ตามลำดับ สามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Comet assay และ Micronucleus test ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารฆ่าเชื้อโรคในน้ำดื่มสามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลา *C. carpio*

Frenzilli และคณะ (2004) ศึกษา DNA damage ในบริเวณ Goteborg Harbour ที่เกิดน้ำมันรั่วในปี 2003 โดยใช้วิธี Comet assay พบว่า เกิด DNA damage ของปลา eelpout (*Zoarces viviparus*) ในบริเวณ Goteborg Harbour มากกว่าปลาที่จับมาจากแหล่งน้ำบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนน้ำมัน และพบว่าวิธี Comet assay มีความไวในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลา eelpout ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค Comet assay สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาได้

Russo และคณะ (2004) ใช้ *Gambusia holbrooki* ประเมินความเป็นพิษของสารที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำ Sarno ด้วยวิธี Micronucleus test และ Comet assay พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงจากปลาที่จับจากแม่น้ำ Sarno มี MN และระยะทางที่ DNA migration มากกว่าของปลากลุ่มควบคุมที่จับจาก

แม่น้ำ Astroni ($P < 0.05$) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาได้

Cavas และ Ergene-Gozukara (2005) ทดลองใช้ปลา *O. niloticus* ประเมินการปนเปื้อนของสารที่มีพิษระดับทำลายสารพันธุกรรมของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม คือ petroleum refinery effluent และ chromium processing plant effluent เข้มข้น 5-20% (v/v) เป็นเวลา 9 วัน ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่า ปลากลุ่มที่ได้รับ cyclophosphamide (positive control) เข้มข้น 4 mg/L เป็นเวลา 6-9 วัน สามารถชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดง และเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกได้ ($P < 0.05$) ส่วนปลาที่แช่ใน chromium processing plant effluent เข้มข้น 20% (v/v) เป็นเวลา 6-9 วัน สามารถชักนำให้เกิด MN และ BN ($P < 0.05$) ส่วน petroleum refinery effluent เข้มข้น 5-20% (v/v) เป็นเวลา 3-9 วัน สามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เหงือกได้ ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) และ chromium processing plant effluent เข้มข้น 20% (v/v) เป็นเวลา 9 วัน สามารถชักนำให้เกิด binucleated, lobed และ blebbed nucleus ($P < 0.05$ และ $P < 0.01$ ตามลำดับ) แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิด notched nucleus ได้ในทุกความเข้มข้น ผลการทดลองสรุปได้ว่า สามารถใช้ปลาเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารพิษในน้ำในระดับที่ทำลายสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค Micronucleus test นอกจากนี้ lobed และ blebbed nucleus สามารถใช้เป็น indicator ในการตรวจสอบการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ได้

Lajmanovich และคณะ (2005) ศึกษาผลของสารประกอบ endosulfan ที่มีผลความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดแดงของลูกอ๊อด *Hyla puchella* ด้วยวิธี Micronucleus test พบว่า *H. Puchella* ที่ได้รับ endosulfan เข้มข้น 0.005 และ 0.010 mg/L เป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง มีค่าความถี่ของ MN เพิ่มขึ้นทุกช่วงเวลาที่ทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และกลุ่มที่ได้รับ endosulfan เข้มข้น 0.0025 และ 0.010 mg/L เป็นเวลา 48 และ 96 ชั่วโมง มี MNFs เพิ่มขึ้นเหมือนกับกลุ่มที่ได้รับ cyclophosphamide เข้มข้น 40 mg/L ($P < 0.05$) โดย endosulfan มีค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 0.01117-0.1290 mg/L

Lemiere และคณะ (2005) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเลือด ตับ และไขกระดูกของหนูที่กินหอยแมลงภู่งูที่ปนเปื้อนสาร polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) ที่ผสมกับ toxic equivalent quantities to benzo (a) pyrene (BaP)/kg (TEQs) เข้มข้น 312 $\mu\text{g}/16$ PAHs/kg (33.8 μg TEQs/kg), 569 $\mu\text{g}/16$ PAHs/kg (83.6 μg TEQs/kg) และ 870 $\mu\text{g}/16$ PAHs/kg (180.7 μg TEQs/kg) เป็นเวลา 2 และ 4 สัปดาห์ วัด DNA damage โดยใช้เทคนิค Comet assay พบว่า ในตับและไขกระดูกของหนูจะเกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้นเมื่อได้กินหอยแมลงภู่งูที่ปนเปื้อน PAHs ในช่วงเวลา 15-30 วัน ส่วนในตับและไขกระดูกของหนูที่กินหอยแมลงภู่งูที่ปนเปื้อนสาร TEQs/kg

33.8 μg เป็นเวลา 15 วันเปรียบเทียบกับ 30 วัน พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิค Comet assay เป็นวิธีที่มีความไวในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังสารเคมีที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

Lemos และคณะ (2005) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ methylmethanesulfonate (MMS) เข้มข้น 4.0×10^{-2} M โดยฉีดให้ปลา *T. rendalli* ในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 1 ชั่วโมงและตรวจ DNA damage ด้วยวิธี Comet assay พบว่า ปลาในห้องปฏิบัติการที่ฉีดสาร MMS และจากทะเลสาบ มีค่าเฉลี่ยของ DNA damage 61.55 ± 20.2 และ 67.75 ± 8.8 ตามลำดับ ส่วนปลาที่จับจากทะเลสาบพบ DNA damage ในระดับปานกลางและมาก ซึ่งมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 16.85 ± 2.1 และ 13.75 ± 6.6 ตามลำดับ

Rigonato และคณะ (2005) ศึกษาผลของ methylmethane sunfonate ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมใน hemolymph, gill tissue และ digestive gland tissue ของหอยน้ำจืดสองฝา (*Corbicula fluminea*) ด้วยเทคนิค Comet assay พบว่า *C. fluminea* ที่ได้รับ methylmethane sunfonate เข้มข้น 0.6, 1.2 และ 2.4×10^{-4} M เป็นเวลา 40 นาที ทำให้ gill tissue เกิด DNA damage ในระดับสูง ส่วน hemolymph และ digestive gland tissue และในเซลล์เหงือกจะพบระดับของ DNA damage สูงเนื่องจากเป็นอวัยวะที่รับสารพิษโดยตรง การทดลองพบว่าการตรวจ DNA damage จาก hemolymph และ digestive gland tissue ให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า โดยเฉพาะ hemolymph ที่เป็นตัวอย่างที่ดีในการตรวจสอบเพราะนำมาตรวจได้ง่าย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า หอยน้ำจืด *C. fluminea* สามารถใช้เป็น bioindicator ในการตรวจสอบสารเคมีที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

Takai และคณะ (2005) ศึกษาการชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เหงือกปลา mekada (*Oryzias latipes*) ที่ได้รับรังสี X-ray เข้มข้น 4 Gy ด้วยเทคนิคการย้อมสี acridine orange (AO) พบว่า เซลล์เหงือกปลา mekada ที่ได้รับรังสี X-ray เข้มข้น 4 Gy สามารถชักนำให้เกิด MNFs สูงกว่าค่า MNFs ที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ 7.2% หลังจากการได้รับรังสีเป็นเวลา 24 ชั่วโมง และพบว่าค่า MNFs ที่เกิดขึ้นเองในเซลล์เหงือกไม่มีความสัมพันธ์กับน้ำหนักตัว และแตกต่างกันกับเพศผู้และเพศเมีย และพบว่าการย้อม MN ด้วยสี AO ทำให้วิเคราะห์ผลด้วยเทคนิค Micronucleus test มีประสิทธิภาพขึ้น

Barsiene และคณะ (2006) ศึกษาการชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสลักษณะอื่นๆ คือ nuclear buds, bi-nucleated cells และ fragmented-apoptotic cells ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์จากไตส่วนหน้า (cephalic kidney) ของปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) และปลา atlantic cod (*Gardus morua*) โดยแช่ปลาใน crude oil และ nonylphenol พบว่าปลา turbot ที่ได้รับ spiked oil เข้มข้น 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ oil

เข้มข้น 0.5 mg/L ($P=0.0369$) และพบว่า nonylphenol เข้มข้น 30 mg/L สามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่ากลุ่มที่ได้รับ oil เข้มข้น 0.5 mg/L และ spiked oil เข้มข้น 0.5 mg/L ส่วนการชักนำให้เกิด MN ในเซลล์ไตส่วนหน้านั้น พบว่า ปลาทั้งสองชนิดในกลุ่มควบคุมจะเกิด MN ในระดับใกล้เคียงกัน โดยในปลา turbot เกิด MN เพิ่มขึ้น 3.6, 2.6 และ 3.6 เท่า หลังจากได้รับ nonylphenol 30 mg/L, oil 0.5 mg/L และ spiked oil 0.5 mg/L ตามลำดับ ส่วนในปลา atlantic cod ที่ได้รับ nonylphenol 30 mg/L ไม่สามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์ไตส่วนหน้าเพิ่มขึ้นได้นอกจากนี้ยังพบค่าเฉลี่ยของ MN ในเซลล์ไตส่วนหน้านั้นสูงกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา turbot ที่ได้รับสารทดสอบทุกความเข้มข้น และพบว่า ปลา turbot ที่ได้รับ nonylphenol 30 mg/L, oil 0.5 mg/L และ spiked oil 0.5 mg/L สามารถชักนำให้เกิด nuclear buds ในเซลล์ไตส่วนหน้าและเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยพบว่า ความถี่ของ nuclear buds เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญหลังจากได้รับ oil 0.5 mg/L และพบระดับของ fragmented-apoptotic cells หลังจากได้รับ nonylphenol 30 mg/L และ spiked oil 0.5 mg/L ($P<0.0001$) แสดงให้เห็นว่า เทคนิค Micronucleus test สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้ และสามารถวัดความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียส เป็น biomarker ได้

Bolognesi และคณะ (2006) ศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม (chromosomal damage) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาชนิดต่างๆ ที่ได้รับ diethyl phthalate, biphenol A และ tetrabromodiphenol ether 0.05 mg/L และ nonylphenol 0.30 mg/L ภายใต้สภาวะที่ควบคุมได้ เป็นเวลา 3 สัปดาห์ โดยใช้เทคนิค Micronucleus test พบว่า ปลา *Scophthalmus maximus* ตรวจพบค่า MNFs และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียส เช่น blebbed, notched และ lobed nucleus โดยพบค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา *S. maximus* ที่ได้รับ biphenol A และ tetrabromodiphenol ether เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และสารผสมระหว่าง north sea oil กับ alkylphenols ชักนำให้เกิดความถี่ของ MN สูงสุด คือ มีค่า MNFs เท่ากับ 2.95 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

Gabbianelli และคณะ (2006) ศึกษาสารประกอบ organotins ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อ DNA ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหอยสองฝา *Scapharca inaequivalis* ที่ประเมินด้วยวิธี Comet assay ในหลอดทดลองที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงกับสารประกอบ organotins 3 ชนิด คือ monobutyltin-chloride (MBTC), dibutyltin-chloride (DBTC) และ tributyltin-chloride (TBTC) เข้มข้น 10 μ M เป็นเวลา 30 นาที พบว่า MBTC ทำให้ DNA แตกหัก 31.33% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วน DBTC ทำให้ DNA แตกหัก 20.00% ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P<0.05$) ส่วนการทดสอบ TBTC 50 ppb กับหอยสองฝา เป็นเวลา 11 วัน พบว่า TBTC สามารถชักนำให้เกิด DNA damage โดยมี tail length, tail intensity และ tail moment เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P<0.05$)

Itoh และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ quinolone ซึ่งเป็นยาฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ 8 ชนิด คือ nalidixic acid, pipemidic acid, oxolinic acid, piromidic acid, enoxacin, ofloxacin, norfloxacin และ eiprofloxacin เข้มข้น 62.5-1000 $\mu\text{g/mol}$ ต่อเซลล์ WTK-1 เป็นเวลา 2, 4 และ 20 ชั่วโมงด้วยวิธี Comet assay และ Ciconucleus test พบว่า หลังจากเซลล์ได้รับ norfloxacin และ eiprofloxacin เป็นเวลา 4 และ 20 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เกิด DNA damage เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบวิธีทำ Comet assay ในสภาวะ pH 12.1 และ 13 เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า ทำให้เกิด DNA migration เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ทำ Comet assay ที่ pH 10 ($P < 0.05$) โดย quinolone อีก 6 ชนิดไม่สามารถชักนำให้เกิด DNA damage และเมื่อใช้วิธี Micronucleus test ตรวจสอบเซลล์ WTK-1 ที่ได้รับ nalidixic acid, pipemidic acid, norfloxacin และ eiprofloxacin 15.63-125 $\mu\text{g/mol}$ เป็นเวลา 20 ชั่วโมง พบว่า norfloxacin ทำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$)

Kadmiri และคณะ (2006) ศึกษาเทคนิค Micronucleus test กับ cytochalasin B จากเซลล์เม็ดเลือดของแกะ วัว และล่อ ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของน้ำทิ้งจากการเกษตรของเมือง Diadla และ Boukallou เพื่อประเมินผลกระทบที่เกิดขึ้นกับสารพันธุกรรม พบว่าในเซลล์เม็ดเลือดขาวของแกะตรวจพบ MN เท่ากับ $14 \pm 7.89 \text{ MN}/500 \text{ BNC}$ ซึ่งเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่มีค่าเท่ากับ $3 \pm 1.54 \text{ MN}/500 \text{ BNC}$ นอกจากนี้ยังมีผลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ เมื่อพิจารณาจากดัชนีการแบ่งเซลล์ (cellular proliferation index) ซึ่งมีค่าไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) โดยพบค่า MNFs สูงสุดในล่อ เนื่องจากเป็นสัตว์ที่หากินบริเวณพื้นดินทำให้สัตว์ได้รับสารพิษโดยตรงจากการดื่มน้ำ

Kumaravel และ Jha (2006) ศึกษาการใช้วิธี Comet assay ตรวจสอบ DNA damage ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของมนุษย์ที่ชักนำด้วยรังสีแกมมาจาก ^{137}Cs ขนาด 1, 2, 4 และ 8 Gy โดยใช้โปรแกรม Komet 5.0 software (Kinetic Imaging Ltd., UK) พบว่า พารามิเตอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์คือ olive tail moment (OTM) และ % of DNA in tail (% Tail DNA) มีความสัมพันธ์อย่างมากกับความเข้มของรังสีที่ได้รับ โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9990 จึงนำค่า OTM และ % Tail DNA มาใช้ในการวัด DNA damage ที่ตรวจสอบด้วยเทคนิค Comet assay โดย % Tail DNA จะถูกนำมาใช้เป็นพารามิเตอร์มากกว่า และสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในห้วงปฏิบัติที่เป็นประจำได้

Lankoff และคณะ (2006) ศึกษาการชักนำให้เกิด DNA damage ของสาร nodularin เข้มข้น 0.001, 0.0025, 0.005 และ 0.010 mg/L ในเซลล์ HepG2 เป็นเวลา 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค FISH-Micronucleus test, Comet assay และ Flow cytometry พบว่า FISH-Micronucleus test สามารถตรวจสอบการเกิด clastogenic และ aneugenic ของเซลล์ HepG2 ที่ได้รับ nodularin และเทคนิค Comet assay ร่วมกับ เอนไซม์ Fpg (formamidopyrimidine DNA glycosylase) สามารถตรวจสอบการเกิด DNA damage ตรงตำแหน่งที่เกิด oxidized purines ซึ่งเป็นตำแหน่งที่เกิด

transversion mutation ได้ จึงตรวจพบ DNA damage มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ใช้เอนไซม์ Fpg ร่วมกับวิธี Comet assay ส่วนเทคนิค Flow cytometry สามารถตรวจสอบเซลล์ HepG2 ที่เกิด apoptosis และ necrosis เมื่อได้รับ nodularin เข้มข้น 0.005 และ 0.010 mg/L เป็นเวลา 12 และ 24 ชั่วโมง

Pandey และคณะ (2006) ศึกษาประเมินความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ endosulfan เข้มข้น 0-12 mg/L ในเซลล์เหงือกและตับของปลาน้ำจืด *Channa punctatus* (Bloch) เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค alkaline single-cell gel electrophoresis พบว่า endosulfan มีค่า LC_{50} ในปลา *C. punctatus* เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 19.67, 12.95, 10.15 และ 7.75 mg/L ตามลำดับ และ endosulfan สามารถทำให้เกิด DNA damage ในเซลล์เหงือกและเซลล์ตับ โดยจะเกิด DNA damage ในเซลล์เหงือกมากกว่าเซลล์ตับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า เทคนิค Comet assay มีความน่าเชื่อถือสำหรับใช้ในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารเคมีต่างๆ ในปลาได้

Souza และ Fontanetti (2006) ศึกษาผลกระทบของน้ำทิ้งจากโรงกลั่นน้ำมันในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลานิล *O. niloticus* ในแม่น้ำ Paraíba do Sul ตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2004 ถึงเดือนกรกฎาคม 2005 ด้วยเทคนิค Micronucleus และ Nuclear alteration test พบว่า ในระหว่างเดือนพฤษภาคม และ สิงหาคม 2004 พบค่า MNFs ในบริเวณตอนกลางของแม่น้ำแตกต่างกัน ($P < 0.05$) ส่วนพฤศจิกายน 2004 และ มกราคม 2005 พบค่า MNFs ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) และพบความถี่ของ nuclear alteration สูงขึ้นด้วย โดยในเดือนพฤษภาคม 2004 พบความถี่ของ binucleated erythrocytes, nuclear buds, เซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตายแล้วและเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติจากปลาที่จับมาจากบริเวณตอนกลางแม่น้ำแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) เดือนสิงหาคม 2004 พบความถี่ของ nuclear buds, microcytes, erythrocytes ที่ตายแล้วและเซลล์ที่มีนิวเคลียสผิดปกติจากปลาที่จับมาจากบริเวณตอนกลางแม่น้ำ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ในเดือนพฤศจิกายน 2004 พบความถี่ของ erythrocytes ที่ตายแล้วจากปลาที่จับมาจากบริเวณตอนกลางแม่น้ำแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) จากผลการศึกษานี้จึงแสดงให้เห็นว่า สามารถใช้ปลาเป็นยามเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารเคมีจากโรงกลั่นน้ำมันที่สามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในแม่น้ำได้

Talapatra และ Banerjee (2006) ศึกษา genotoxic effects ในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากเซลล์เหงือกและตับของปลา *Labio bata* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงปลา ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่า เซลล์เม็ดเลือดแดงจากปลาพบค่า MNFs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.001$) และในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากเหงือกและตับของปลา *L. bata* พบค่าความถี่ของ necrotic cells, apoptotic cells, notch nucleated cells และ binucleated cells เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.001$,

$P < 0.01$ และ $P < 0.05$ ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เหงือกและไตพบความถี่ของ nuclear abnormalities ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังตรวจพบโลหะหนักบางชนิดในน้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงปลา คือ chromium, zinc, copper, lead, iron และ sludge

Villela และคณะ (2006) ศึกษา DNA damage ในเซลล์ hemolymph ของ golden mussel (*Limnoperna fortunei*) ที่ได้รับรังสี UV 0-5 J/m², CuSO₄ และ pentachlorophenol (PCP) ด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay พบว่า เซลล์ hemolymph ของ golden mussel ที่ได้รับรังสี UV 0.7-4.5 J/m² มีค่า DNA damage index (DI) และ DNA damage frequency (DF) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$ และ $P < 0.001$ ตามลำดับ) แต่ถ้าได้รับ UV 5 J/m² พบค่า DI และ DF มีค่าลดลงจากเซลล์ hemolymph ของ golden mussel ที่ได้รับรังสี UV 4.5 J/m² เมื่อหอยได้รับ CuSO₄ เข้มข้น 3.75 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง หรือ CuSO₄ เข้มข้น 7.50 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หรือ PCP ทุกความเข้มข้นเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า สามารถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น ($P < 0.01$) ส่วนการใช้เทคนิค Comet assay ตรวจหอยที่ได้รับ CuSO₄ เข้มข้น 7.50, 15.00 และ 20.00 mg/L เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า มีค่า DI เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) แต่ถ้าได้รับ CuSO₄ เข้มข้น 3.75 mg/L ตรวจพบว่า มีค่า DF เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ส่วน PCP เข้มข้น 0.1 และ 0.15 mg/L มีค่า DI และ DF เพิ่มขึ้น ($P < 0.05$) เมื่อใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay ตรวจหอย DNA damage ใน golden mussel และ planaria ที่เลี้ยงน้ำที่ปนเปื้อนสารเคมี พบว่า golden mussel มีความไวในการตรวจ DNA damage ด้วยเทคนิค Comet assay มากกว่า planaria จึงเหมาะต่อการใช้เป็น bioindicator ในการตรวจสอบสารเคมีที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งแวดล้อม

An และคณะ (2007) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ sudan I ต่อเซลล์ HepG2 ด้วยเทคนิค Comet assay และ Micronucleus test พบว่า sudan I เข้มข้น 25-100 µM สามารถชักนำให้เกิด DNA migration และ MN เพิ่มขึ้นในทุกความเข้มข้นของ sudan I และยังสามารถชักนำให้เกิด DNA strand breaks และ chromosome breaks ส่วน sudan I เข้มข้น 100 และ 50-100 µM พบระดับของ reactive oxygen species (ROS), 8-hydroxyquinosine และ thiobabituric acid reactive-substance ในเซลล์ HepG2 เพิ่มขึ้น ($P < 0.01$) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า sudan I เป็นสาเหตุทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมโดยชักนำให้เกิด ROS เมื่อได้รับความเข้มข้นสูงๆ

Celik และคณะ (2007) ศึกษาการเกิด cytogenetic damage ของคนงานในโรงงาน Afsin-Elbistan ที่ได้รับผลกระทบจากการเผาไหม้ของถ่านหิน สามารถชักนำให้เกิด chromosomal aberration, polyploidy และ sister chromatid exchange พบว่าคนงานมีค่าเท่ากับ 6.08 ± 0.12 และ MN มีค่าเท่ากับ 8.20 ± 0.61 โดยพบ sister chromatid exchange และ MN ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 4.60 ± 0.11 และ 6.56 ± 0.43 ตามลำดับ ($P < 0.01$ และ $P < 0.05$) และพบว่า

ความถี่ของ chromosomal aberration และ MN มีค่าเพิ่มขึ้นในแต่ละปีอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า คนงานที่ได้รับผลกระทบจากการเผาไหม้ถ่านหินมีความผิดปกติของโครโมโซมซึ่งตรวจได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์

Kaya และ Topaktas (2007) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ KBrO_3 เข้มข้น 400-550 mg/L ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่เลี้ยงในอาหาร chromosome medium B เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค Sister chromatid exchange (SCE), chromosome aberration (CA) และ Micronucleus test พบว่า เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับ KBrO_3 400-500 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิด SCE เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) และเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับ KBrO_3 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สามารถชักนำให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิด CA ชนิด strikingly เท่ากับกลุ่มควบคุมและกลุ่ม positive control ที่ได้รับ MMC 0.25 mg/L เพิ่มขึ้น ($P < 0.01$) และยังสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ซึ่งตรวจได้จาก Proliferation index และ Mitotic index

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 3

อุปกรณ์และสารเคมี

1. วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

สารเคมีที่ใช้ในการทดลองความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาต่อปลาอุกขุย ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการเซลล์เทคโนโลยีและห้องปฏิบัติการ Biodiversity & Genotoxicity Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม

ตารางที่ 12 รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต

รายการ	บริษัท
1. เครื่องมือ	
Auto pipette	บริษัท ซีระเทรคดิง จำกัด
Balance	Santariou
Centrifuge	Iwaki CFM100
Cold room	Riwacold
Electrophoresis chamber	HU10
Electrophoresis power supply	Consort E884
Fluorescence microscope	Nikon eclipse 80i
Fume hood	Wiwatsan lab
Refrigerator	Toshiba, Sharp
Hemocytometer	BOECO
Hot plate& sterier	Lab tech
Inverted microscope	Nikon PFX
Laboratory DC counter	Gemmy IDS. CORP.
Light microscope	Olympus CH30
Microcentrifuge tubes	บริษัท ซีระเทรคดิง จำกัด
Micropipette	บริษัท ซีระเทรคดิง จำกัด

ตารางที่ 12 รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต (ต่อ)

Microwave	Sharp
pH meter	Hanna
Thermal-lock dry-bath	USA Scientific
Vortex mixer (minishaker)	IKA MS1
2. วัสดุ	
Coverslips (22x24 mm)	Mensel-Glaser Lot.2240484
Coverslips (24x40 mm)	Mensel-Glaser
Microscope slides frosted	Sial Band Cat.No. 7105
Microscope slides plain	Sial Band Cat.No. 7101
Needle 1 ml.	Nipro Lot.No. 04D17
6 well culture plate	Gibthai Cat.No. 92006
Program LUCIA Comet assay	Hollywood International LTD.

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

2. สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

ตารางที่ 13 รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

รายการ	บริษัท
Acetic acid, analytical grade	JT Baker Cat.No.9507-03
Azadirachtin ในรูปของสารสกัดสะเดา ที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.1% (w/v)	บริษัท ผลิตภัณฑ์สะเดาไทย จำกัด
CdCl ₂ 5/2H ₂ O	Sigma Cat.No. 031K1263
Dimethylsulfoxide (DMSO)	Amresco Cat.No. 67685
Wright rapid stain set	Biotech Lot. 241108
Eosin solution	Biotech Lot. 241108
Ethanol alcohol	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต
Ethidium bromide (EtBr)	Fluka
Ethylenediamine tetra acetic acid (EDTA)	Fluka Cat.No.21100
Fixative solution	Biotech Lot. 241108
HCl	JT. Baker Cat No: 7647-01-0

ตารางที่ 13 รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต (ต่อ)

Heparin	Leo pharmaceutical product, Denmark Lot.No.A2246A
Nitric acid 70%	J.T. Baker Cat.No.7697-37-2 Lot.No.A43055
Polychrome Methylene Blue solution	Biotech Lot. 241108
Potassium Chloride (KCl)	BDH laboratory reagent Cat.No. 1942750
Potassium hydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Fluka 296174-490
Lower melting point (LMP) agarose	Promega Cat.No. V3111
Normal melting point (NMP) agarose	Promega Cat.No. V3121
Sodium Hydroxide (NaOH)	Merck Cat.No. B915758
Sodium Hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck F1438886-626
Sodium – EDTA ($\text{Na}_2\text{-EDTA}$)	Merck K37319118-337
Sodium Chloride (NaCl)	Univar Cat.No. AF502277
Triton X-100	Amresco Cat.No. 9002931
Tris Base	Promega Cat.No.H5131

บทที่ 4

วิธีการทดลอง

การทดลองนี้ทำ ณ ห้องปฏิบัติการเซลล์เทคโนโลยีและ ห้องปฏิบัติการ Biodiversity & Genotoxicity Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม การทดสอบสารพิษกับปลาถูกดำเนินการในช่วงเดือนพฤษภาคม – ตุลาคม 2549 ซึ่งเป็นช่วงที่ปลาทดลองมีความสมบูรณ์ และอุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาอยู่ในช่วง 25-26 °C คุณภาพน้ำเลี้ยงปลาเป็นน้ำที่ไม่มีคลอรีน

การทดลองใช้ปลาคูอุยประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา โดยแช่ปลาในสารที่ทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง การศึกษาพิษของ CdCl_2 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งนั้นใช้เทคนิค Micronucleus test และสังเกตความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียสด้วย เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม รวมทั้งเปรียบเทียบผลการใช้เทคนิค Micronucleus test และความผิดปกติของนิวเคลียสกับเนื้อเยื่อปลา 3 ชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อปอดเหงือก และเซลล์ตับ เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่มีความไวและสะดวกต่อการประเมินผลความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Micronucleus test แล้วนำเนื้อเยื่อที่คัดเลือกกว่ามีความไวไปใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดสะเดา นอกจากนี้ยังได้ทดลองเปรียบเทียบผลการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาด้วยเทคนิค Micronucleus test และเทคนิค Comet assay เฉพาะบางความเข้มข้นด้วย

การศึกษความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาได้ออกแบบการทดสอบเป็น 2 กลุ่ม เพื่อให้สามารถเปรียบเทียบผลของสารสกัดสะเดาที่นำมาจากขวดที่บริษัทผลิตพร้อมจำหน่ายซึ่งบรรจุในขวดสีชา และสารสกัดสะเดาในขวดแก้วใสที่นำไปผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน เพื่อศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาที่ได้รับแสงแดดเป็นเวลา 7 วัน โดยนำขวดบรรจุสารสกัดสะเดาซึ่งเป็นขวดแก้วใสมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ซม. สูง 8.5 ซม. บรรจุสารสกัดสะเดาขวดละ 10 มล. ไปวางเอียง 45 องศา ให้ได้รับแสงอาทิตย์ในที่โล่งเป็นเวลา 7 วัน โดยหมุนกลับขวดแก้ว เวลา 8.30 น. ทุกวัน เพื่อให้ด้านตรงข้ามของขวดขึ้นมาอยู่ด้านบนและสารสกัดสะเดาได้รับแสงแดด

1. การเลี้ยงปลาทดลอง

ปลาดุกอุยที่ใช้ทดลองเป็นปลาที่นำมาจากฟาร์มเพาะพันธุ์ปลาในจังหวัดนครปฐม มีอายุประมาณ 1 เดือน ก่อนนำปลามาทดลองนำมาเลี้ยงในอ่างเลี้ยงปลาขนาด 30 X 60 X 40 ซม. ให้อาหารปลา คือ อาหารเม็ดซึ่งเป็นอาหารปลาดุกเล็กชนิดเม็ดเล็กลอยน้ำ ผลิตโดยบริษัทซีพี ประกอบด้วย กากถั่วเหลือง รำ ปลาขี้ขาวและข้าวโพด วันละ 2 ครั้ง ช่วงเวลา 08.30 - 09.00 น. และ 17.30 - 18.00 น. โดยเปลี่ยนน้ำทุกสัปดาห์ เลี้ยงปลาเป็นเวลา 1 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพของปลาให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ แล้วประเมินความสมบูรณ์แข็งแรงของปลาจากอัตราการรอดชีวิตของปลา คือ ต้องมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 90% นำปลามาคัดแยกขนาดโดยการวัดความยาวลำตัวและชั่งน้ำหนัก และสุมปลาในอ่างเลี้ยงแยกออกเป็น 12 กลุ่มๆ ละ 10 ตัว ปลาที่ใช้ทดลองมีความยาวเฉลี่ย 8.16 ± 2.52 ซม. และน้ำหนักเฉลี่ย 8.30 ± 0.94 กรัม เพื่อนำไปทดสอบกับสารพิษในขวดโหลแก้ว ความเข้มข้นละ 2 โหล โดยใช้ปลาทดสอบโหลละ 10 ตัว และ ปลาแต่ละตัวถูกกั้นแยกอยู่ในขวดโหลด้วยตาข่ายพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้ปลาใช้เงี่ยงเกี่ยวกันเป็นแผลและเบียดกันจนให้อาหารปลา 24 ชั่วโมง ก่อนนำไปใช้ทดลองและงดให้อาหารปลาในขณะที่ทดสอบ

2. การศึกษาเพื่อคัดเลือกระดับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ

ก่อนเตรียมสารละลายได้นำเครื่องแก้วที่ใช้ในการเตรียมสารละลายไปล้างด้วยกรดไนตริก 20% (nitric acid) แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและล้างในน้ำ deionize 1 ครั้ง (น้ำ deionize มาจากน้ำกลั่นที่นำไปกลั่น 2 ครั้ง) เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีโลหะหนักตกค้าง

2.1 วิธีเตรียมแคดเมียม การทดลองนี้ใช้แคดเมียมในรูปของ $CdCl_2$ โดยเตรียมจาก $CdCl_2 \cdot 5/2H_2O$ ให้เป็นสารละลาย $CdCl_2$ เข้มข้น 10^{-4} M ในน้ำกลั่นเป็น stock solution ซึ่งการเตรียมแต่ละครั้งให้พอดีกับปริมาณที่ต้องการใช้ เพื่อป้องกันสารละลายเปลี่ยนเป็นรูปอื่น แล้วจึงนำไปเจือจางในน้ำกลั่นใส่โหลแก้วให้มีความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L โหลละ 3 ลิตร สำหรับแช่ปลา เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

2.2 วิธีเตรียมสารสกัดสะเดา ใช้สารสกัดสะเดาที่ผลิตจำหน่ายสำเร็จรูปและได้รับการขึ้นทะเบียนจากกรมควบคุมมลพิษ โดยบรรจุจำหน่ายในขวดสีชา ซึ่งมีชื่อทางการค้า คือ สะเดาไทย 111 โดยผู้ผลิตระบุความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาเท่ากับ 0.1% (w/v) นำสารสกัดสะเดามาเตรียมขึ้นใหม่เป็น stock solution ที่มี Azadirachtin เข้มข้น 1.4×10^{-4} M ก่อนใช้ทดสอบ โดยเจือจางด้วยน้ำกลั่นให้มีความเข้มข้นของ Azadirachtin 0.5-1.1 mg/L (ตารางที่ 25 ภาคผนวก ก)

ส่วนวิธีเตรียมสารสกัดสะเดาเพื่อศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาหลังจากได้รับแสงแดดเป็นเวลา 7 วัน นั้น ทำโดยปีปเตสารสกัดสะเดาจากขูดสีชา 10 มล. ใส่ในขวดแก้วใสมีเส้นผ่านศูนย์กลาง 2 ซม. สูง 8.5 ซม. แล้วนำไปวางเอียง 45 องศา ให้ได้รับแสงอาทิตย์ในที่โล่งเป็นเวลา 7 วัน และหมุนกลับขวดแก้ว เวลา 8.30 น. ทุกวัน เพื่อให้ด้านตรงข้ามของขวดขึ้นมาอยู่ด้านบนและสารสกัดสะเดาได้รับแสงแดด หลังจากนั้นนำไปผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน จึงนำไปเตรียมเป็นสารละลายตามวิธีข้างต้น เพื่อทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาที่ผ่านการผึ่งแดดนาน 7 วัน เปรียบเทียบผลกับสารสกัดสะเดาที่เตรียมขึ้นใหม่จากขูด สะเดาไทย 111

3. วิธีศึกษาเพื่อคัดเลือกระดับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ เพื่อใช้ทดสอบความเป็นพิษ

นำปลาดุกอุย ทดสอบกับ $CdCl_2$ 5 ความเข้มข้น โดยเลือกความเข้มข้น 0.01 – 0.05 mg/L เนื่องจากมีรายงานค่า LD_{50} ของปลา pejerrey และปลา *O. mykiss* เท่ากับ 0.036 และ 0.005 mg/L ตามลำดับ (Carriouiriborde, 2006) จึงนำมาใช้เป็นแนวทางพิจารณาคัดเลือกระดับความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ และเลือกความเข้มข้นให้ครอบคลุมช่วงที่กรมควบคุมมลพิษ กระทรวงอุตสาหกรรม ประกาศเป็นพระราชบัญญัติโรงงาน พ.ศ. 2512 ค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมซึ่งอนุญาตให้มีแคดเมียมเจือปนอยู่ 0.03 mg/L (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) นอกจากนี้ยังพิจารณาเกณฑ์การทดสอบแต่ละครั้งตามมาตรฐานของ U.S. EPA (1996), U.S. EPA (2004) และ OECD (1997) ที่ระบุไว้ว่า ปลาที่ใช้ในการทดสอบให้อยู่ในระยะ 30 วันหลังจากที่ฟักออกเป็นตัว โดยใช้ปลากลุ่มละ 20 ตัวต่อความเข้มข้นที่ทดสอบ และความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ 5 ความเข้มข้น เมื่อทำการทดลองแล้วปลากลุ่มควบคุมจะต้องมีอัตราการรอดชีวิตมากกว่า 90% ขึ้นไป จึงเริ่มทำการทดลอง

4. การศึกษาเพื่อคัดเลือกระดับความเข้มข้นของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ใช้ในการทดสอบความเป็นพิษ

นำปลาดุกอุยมาทดสอบกับ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา 0, 0.3 และ 3 mg/L เนื่องจากมีรายงานมีค่า LC_{50} Azadirachtin บริสุทธิ์ในปลา *Channa batrachus* เท่ากับ 1-3 mg/L (Farah, 2006) หลังจากแช่ปลาดุกอุยในสารสกัดสะเดา เป็นเวลา 48-96 ชั่วโมง พบว่า ปลาดุกอุยมีอัตราการรอดชีวิตเท่ากับ 100, 20 และ 0% ตามลำดับ ซึ่งสารสกัดสะเดา 3.0 mg/L ทำให้ปลาดุกอุยมีอัตราการรอดชีวิตต่ำกว่า 50% จึงปรับความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาที่ใช้ทดสอบเป็น 8 กลุ่ม คือ 0, 0.25, 0.50, 0.75, 1.00, 1.25, 1.50 และ 1.75 mg/L และทดลองแช่ปลาเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่า หลังจากแช่ปลาดุกอุยในสารสกัดสะเดาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าปลาดุกอุยมีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 100, 100, 100, 70, 20, 0, 0 และ 0 % ตามลำดับ และปลาดุกอุยที่แช่สารสกัดสะเดาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการรอดชีวิต เท่ากับ 100, 50, 70, 70, 30, 30, 0 และ 0%

ตามลำดับ และหลังจากแช่ปลาในสารละลายเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา 0.25-0.50 mg/L ไม่มีผลให้ปลาดุกตาย จึงเลือกช่วงความเข้มข้นของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา 0.5-1.1 mg/L มาศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาดุกอุย โดยใช้เกณฑ์การทดสอบเหมือนกันกับที่ทำการทดสอบกับ $CdCl_2$

5. วิธีทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ $CdCl_2$ และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา

ด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay

นำปลาดุกอุยที่เลี้ยงปรับสภาพไว้มาแช่ใน $CdCl_2$ ความเข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/L และ Azadirachtin ที่เจือจางในสารละลายน้ำกลั่นที่มีความเข้มข้น 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 และ 1.1 mg/L โดยแช่ปลาในขวดแก้วขนาด 12 ปอนด์ ปริมาตร 3 ลิตร ความหนาแน่นของปลา 10 ตัวต่อขวดโหลขนาด 12 ปอนด์ ปลาแต่ละตัวถูกกักแยกอยู่ในขวดโหลด้วยตาข่ายพลาสติกเพื่อป้องกันไม่ให้ปลาใช้เงี่ยงเกี่ยวกันเป็นแผลและเบียดกันหลังจากแช่ปลาเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้ว จากนั้นนำเลือดปลามาตรวจผลเพื่อเปรียบเทียบความผิดปกติของสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค

Micronucleus test และเทคนิค Comet assay

5.1. การตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรม

1. วิธี Micronucleus test (MNT)

Micronucleus test เป็นวิธีการตรวจสอบความผิดปกติของดีเอ็นเอ (DNA damage) (Ballantyne, 1988) ในระยะเมทาเฟส (metaphase) จนถึงระยะแอนาเฟส (anaphase) ของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ทำให้โครโมโซมเกิดการแตกหัก (chromosome break) (Carrasso, 1990; Walum, 1990; Fenech, 2000; Cavas, 2005)

การศึกษา Micronucleus test ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาดุกอุย

1. การเตรียมสไลด์

- 1.1.1. แช่ปลาดุกอุยด้วยเคดเมียมคลอไรด์และสารสกัดสะเดาที่มีความเข้มข้นต่างๆ เมื่อครบกำหนดเวลา นำปลามาทำให้สลบที่อุณหภูมิ $0^{\circ}C$
- 1.1.2. เจาะเลือดปลาบริเวณ caudal vein แล้วเสมียร์เลือดลงบน กระดาษสไลด์จำนวน 3 แผ่นต่อปลา 1 ตัว
- 1.1.3. นำกระดาษสไลด์ที่แห้งแล้วมา fixed ใน absolute methanol เป็นเวลา 20 นาที
- 1.1.4. กระดาษสไลด์ที่แห้งแล้วไปย้อมสีนิวเคลียส

2. การย้อมสีเซลล์เม็ดเลือดแดง

- 1.2.1. นำสไลด์ตัวอย่างเลือดปลาที่เตรียมแล้ว มาย้อมด้วยสี Wright rapid stain (Fixative, eosin solution และ polychrome methylene blue solution) โดยจุ่ม 2-3 ครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น
- 1.2.2. นำกระจกสไลด์ไปล้างผ่านน้ำกลั่นแล้วปล่อยให้แห้ง
- 1.2.3. นำกระจกสไลด์ไป mounted ด้วย DPX

3. การวิเคราะห์ผล

- 1.3.1. นำสไลด์ตัวอย่างเลือดปลาที่ได้มาตรวจหา micronucleus และ other nuclear abnormalities ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000 เท่า
- 1.3.2. ตรวจพบของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี micronucleus และ other nuclear abnormalities ต่อจำนวนเซลล์เม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ ตามวิธีของ Carrasso (1990) และ Fenech (2000)
- 1.3.3. วิเคราะห์ทางสถิติด้วย Duncan test โดยใช้โปรแกรม SPSS versions 11.0

การศึกษา micronucleus test ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกปลาอุย

1. การเตรียมสไลด์

- 1.1. แช่ปลาอุยด้วยแคดเมียมคลอไรด์และสารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อครบกำหนด นำปลามาทำให้สลบที่อุณหภูมิ 0 °C
- 1.2. ทำการผ่าตัดเหงือกปลาอุยใส่ลงใน plate ที่มี 0.075 M KCl
- 1.3. ผ่าตัดเหงือกปลาเพื่อให้เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกหลุดออกมา นำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที
- 1.4. ปิเปตสารละลายส่วนใสออก แล้วเติม 20% acetic acid ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
- 1.5. นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที แล้ว fixed ด้วย Carnoy's fixative จากนั้นตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 ชั่วโมงเพื่อให้ fixative เข้าสู่เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก
- 1.6. เติมน้ำเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกบนกระจกสไลด์ที่สะอาด โดยปลาอุย 1 ตัวต่อ 2 กระจกสไลด์
- 1.7. ปล่อยให้กระจกสไลด์ให้แห้งแล้วนำไปย้อมสี

2. การย้อมสีและการวิเคราะห์ผลของเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ใช้วิธีการเดียวกับการศึกษาจากเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่ตรวจผลจำนวน 2 สไลด์ต่อปลา 1 ตัว รวมตรวจ 2,000 เซลล์ต่อตัว

การศึกษา Micronucleus test ในเซลล์ตับปลาดุกอุย

1. การเตรียมสไลด์

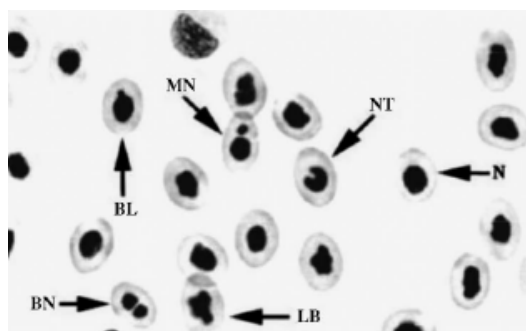
- 1.1. แช่ปลาดุกอุยด้วยแคดเมียมคลอไรด์และสารสกัดสะเดาที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อครบกำหนด นำปลามาทำให้สลบที่อุณหภูมิ 0 °C
- 1.2. ทำการผ่าตัดตับปลาลงใน plate ที่มี 0.075 M KCl
- 1.3. ตัดตับเป็นชิ้นเล็กแล้ว ใช้แท่งแก้วกดตับเพื่อให้เซลล์หลุดออกมา แล้วนำไปปั่นเหวี่ยง 5 นาที
- 1.4. ปิเปตสารละลายส่วนใสออก แล้วเติม 40% acetic acid ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที
- 1.5. นำไปปั่นเหวี่ยงเป็นเวลา 5 นาที แล้ว fixed ด้วย Carnoy's fixative
- 1.6. นำไปเสมียร์บนกระจกสไลด์ที่สะอาด จำนวน 2 สไลด์ต่อปลา 1 ตัว
- 1.7. เมื่อกระจกสไลด์ให้แห้งแล้วนำไปย้อมสี

2. การย้อมสีและการวิเคราะห์ของเซลล์ตับ ใช้วิธีเดียวกับการศึกษาจากเซลล์เม็ดเลือดแดง แต่ตรวจผลจำนวน 2 สไลด์ต่อปลา 1 ตัว รวมตรวจ 2,000 เซลล์ต่อตัว

เกณฑ์การประเมิน micronucleus และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียส (Carrasso, 1990 และ Fenech, 2000) การนับว่าเซลล์มี micronucleus นั้น พิจารณาจากเกณฑ์ดังนี้

1. ต้องมีขนาดของ micronucleus ระหว่าง 1/3-1/9 ขนาดของนิวเคลียสหลัก (รูปที่ 14)
2. micronucleus ย้อมติดสีเข้มในระดับเดียวกับนิวเคลียสหลัก
3. ตำแหน่งของ micronucleus อยู่ในไซโตพลาสซึม และแยกเป็นอิสระจากนิวเคลียสหลัก
4. ความผิดปกติของ nuclear abnormalities ที่ตรวจสอบ คือ blebbed, notched, lobed และ

vacuolated nucleus



รูปที่ 14 ลักษณะของ MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลา

O. niloticus; micronucleus (MN), binucleus (BN), notched nucleus (N), blebbed nucleus (BL) และ lobed nucleus (LB)

ที่มา: Cavas, 2003.

2. วิธี Comet assay/Single cell gel electrophoresis (SCGE)

Comet assay (Single cell gel electrophoresis, SCGE) เป็นวิธีการตรวจสอบความผิดปกติของดีเอ็นเอ (DNA) ที่เกิดการแตกหัก วิธีการนี้สามารถตรวจสอบกับเซลล์ทุกชนิดที่แยกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ ซึ่งเป็นเทคนิคที่ง่ายและรวดเร็วในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ใช้ปริมาณตัวอย่างน้อย สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบในห้องปฏิบัติการและภาคสนาม (Rank, 2003; Verschaeve and Van Gorp, 2005)

2.1. การเตรียมสไลด์

- 2.1.1. แช่ปลาอุกอยู่ด้วยแคดเมียมคลอไรด์และสารสกัดสะเดา โดยใช้ความเข้มข้นที่ทำให้เกิด micronucleus และ other nuclear abnormalities สูงมาทำการทดลอง เมื่อครบกำหนดเวลา นำปามาสลับที่อุณหภูมิ 0 °C
- 2.1.2. เจาะเลือดปลาที่ caudal vein ใส่ในหลอดทดลองที่มี phosphate buffer saline (PBS) pH 7.5 (135 mM NaCl, 2.5 mM KCl, 1.75 mM K₂HPO₄, 8 mM Na₂HPO₄) เพื่อเตรียมเซลล์ให้เป็น cell suspension
- 2.1.3. เตรียม cell suspension ในสารละลาย PBS แล้วนับจำนวนเซลล์ให้มีจำนวน $10^7 - 10^8$ cells/ml ด้วย hemocytometer
- 2.1.4. เตรียมกระจกสไลด์ให้สะอาด หยด 0.5% normal melting point agarose (NMA) บนกระจกสไลด์ที่สะอาด 3 หยด เพื่อให้ NMA ฉาบบนผิวของกระจกสไลด์จึงปิดทับด้วยกระจกสไลด์ แล้วนำไปทำให้ agarose แข็ง โดยแช่ตู้เย็นเป็นเวลา 5-10 นาที
- 2.1.5. ปิเปตเซลล์ปริมาตร 5 µl ลงใน microcentrifuge tube ที่มี PBS ปริมาตร 15 µl จากนั้นปิเปต 2% Low melting point agarose (LMP) ปริมาตร 20 µl ลงไปใน microcentrifuge tube และอุ่น ที่อุณหภูมิ 37-40 °C ใน heat block แล้วผสมให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลาย agarose ด้วยเครื่อง mixer
- 2.1.6. ปิเปตเซลล์ที่ผสมใน LMA แล้ว ปริมาตร 40 µl ลงบนกระจกสไลด์ที่มี 0.5% NMA ฉาบอยู่ 1 ชั้น
- 2.1.7. ปิเปต 0.5% LMA ปริมาตร 40 µl ลงตรงบริเวณที่หยดเซลล์ผสมลงไป แล้วปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ นำกระจกสไลด์วางบน ice pack แล้วเอากระจกปิดสไลด์ออก นำกระจกสไลด์ไปแช่ใน lysis solution (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris, 10% DMSO, 1% triton X-100) ที่ 4 °C เป็นเวลา 3-24 ชั่วโมง (overnight) เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์

- 2.1.8. นำกระจกสไลด์ไปวางใน electrophoresis chamber ที่มี electrophoresis solution (10 N NaOH, 200 mM EDTA, pH>13) ให้ท่วมสไลด์ประมาณ 1 ซม. เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ปรับสภาพของเซลล์ให้เท่ากับสารละลาย แล้วจึงเปิดให้กระแสไฟฟ้า 300 mA, 25 V เข้าสู่เครื่อง electrophoresis เพื่อแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 40 นาที การแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า ทำกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมใน chamber เดียวกัน
- 2.1.9. นำตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ไปล้างด้วย neutralization buffer (0.4 M Tris, pH 7.5) 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที เพื่อปรับ pH ของตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ให้เป็นกลาง
- 2.1.10. นำตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ไป fix ใน absolute methanol เป็นเวลา 5 นาที เพื่อช่วยละลายไขมันส่วนเกินออกไปทำให้ตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ติดดียึดติดดีขึ้น
- 2.1.11. นำไปย้อมสี DNA เพื่อวิเคราะห์ผล DNA damage หรือรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C เพื่อรอการวิเคราะห์

2.2. การย้อมสีสไลด์ DNA

- 2.2.1. นำกระจกสไลด์ที่มีตัวอย่าง DNA ใน agarose มาย้อมด้วย Ethidium bromide (EtBr) ที่มีความเข้มข้น 20 mg/ml เป็นเวลา 15 นาที ล้างสี EtBr ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น เช็ดกระจกสไลด์ให้แห้ง
- 2.2.2. นำกระจกสไลด์ไปตรวจผล DNA damage ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) เนื่องจาก EtBr มีค่า excitation 488 nm emission 580-630 nm จึงเลือกใช้ filter box G- 2A (excited 510-560 nm, decroic mirror 575 nm และ emission 590 nm)บันทึกผลการทดลองและถ่ายรูป DNA ในนิวเคลียสของเม็ดเลือดแดงปลาซึ่งเคลื่อนที่ไปตามกระแสไฟฟ้า จากข้อลบบไปยังขั้วบวก โดยนิวเคลียสที่มีปริมาณ DNA damage มาก และมี DNA หักเป็นท่อน ๆ หลายขนาด ซึ่ง DNA ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลจึงมองเห็น เป็นส่วนหางของ Comet ส่วน DNA ที่ไม่ถูกทำลาย มีขนาดใหญ่ จะไม่เคลื่อนที่ไปไกลในภาวะที่ทำ electrophoresis จึงมองเห็นเป็นส่วนหัวของ Comet ภายใต้กล้องจุลทรรศน์พร้อมถ่ายรูปบันทึกผลการทดลอง

2.3. การวิเคราะห์ผล

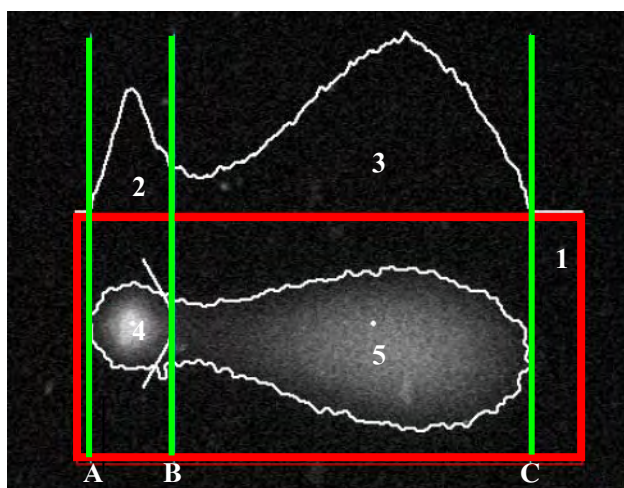
- 2.3.1. สไลด์ที่มีตัวอย่าง DNA ใน agarose มาตรวจผล DNA damage ด้วยกล้องจุลทรรศน์ Fluorescence ที่กำลังขยาย 40 เท่า
- 2.3.2. ถ่ายรูป DNA damage ของแต่ละเซลล์ที่ไม่ซ้อนทับกันรวม 50 เซลล์ โดยสุ่มวัดเซลล์ทุกจุดตัดของแกน X และแกน Y และไม่วัด DNA damage จากเซลล์ที่เกิด apoptosis ซึ่งสังเกตได้จากหัวและหางของ comet ที่ยาวมาก ปลา 1 ตัว ตรวจวัด 50 เซลล์
- 2.3.3. วัด DNA damage ตามวิธีของ Rank (2003) โดยใช้ด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay ซึ่งวิเคราะห์ DNA damage จาก parameter 7 ชนิด

2.4 นิยามและข้อกำหนดในการวัดลักษณะต่างๆ ในโปรแกรม LUCIA Comet Assay ดังนี้

2.4.1. นิยามคำศัพท์ที่ใช้วัดในโปรแกรม LUCIA Comet Assay

1. comet คือ โครงสร้างที่เกิดจาก DNA ที่เกิดความเสียหายเคลื่อนที่ในขั้นตอนการทำ single cell gel electrophoresis (SCGE) จึงเห็นเป็นรูปคล้ายดาวหางประกอบด้วยส่วนหัว คือ DNA ที่ไม่ถูกทำลาย และส่วนหาง คือ DNA ที่ถูกทำลาย โครงสร้างที่เกิดจาก DNA ที่เกิดความเสียหายเคลื่อนที่ในขั้นตอนการทำ single cell gel electrophoresis (SCGE)
2. comet head คือ นิวเคลียสของเซลล์ที่มี DNA เหลืออยู่ภายใน เป็น DNA ที่ไม่ถูกทำลาย
3. comet tail คือ โครงสร้างที่มีลักษณะยาวซึ่งเป็นส่วนของ DNA ภายในนิวเคลียสที่ถูกทำลาย DNA หักออกเป็นชิ้นขนาดเล็ก จึงเคลื่อนที่ออกไปจากนิวเคลียส ปรากฏเป็นส่วนหางของดาวหาง
4. SCGE คือ การวัดเกี่ยวกับ DNA ที่เกิดความเสียหายโดยจะเคลื่อนที่ออกไปจากนิวเคลียสด้วยกระแสไฟฟ้าในเจล

2.4.2. ค่าที่ใช้วัดในโปรแกรม LUCIA Comet Assay



จากรูป Histogram (บน)

1. วัด Integrated intensity

2. วัด Head DNA [%]

3. วัด Tail DNA [%]

จากรูป comet (ล่าง)

4. วัด Head radius

5. วัด Tail length

รูปที่ 15 บริเวณของ comet ที่ใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LUCIA

ที่มา: <http://www.lim.cz/download.php?id=16&>

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนอนุรักษ์สัตว์

1. Integrated intensity (II) คือ ค่าความหนาแน่นของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เกิดจากสะท้อนแสงของ DNA ซึ่งย้อมด้วย EtBr แล้ววัดความหนาแน่นของแสงที่เกิดจากการสะท้อนแสงของ DNA ที่ย้อมด้วย EtBr อยู่ใน comet ทั้งหมด (รูปที่ 15 หมายเลข 1)

$$\text{Integrated intensity (II)} = I_H + I_T$$

$$\text{โดยที่ } I_H = \int_{\text{Head area}} idA$$

$$I_T = \int_{\text{Tail area}} idA$$

2. Head DNA [%] คือ ค่าความหนาแน่นของแสงที่คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ DNA ที่ไม่เกิดเสียหายซึ่งเหลืออยู่ในนิวเคลียส เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 15 หมายเลข 2)

$$\text{Head DNA [\%]} = [I_H / II] \times 100$$

3. Tail DNA [%] คือ ค่าของแสงที่คำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์ของ ที่เกิดความเสียหายซึ่งเป็น comet tail และอยู่ทางซ้ายของนิวเคลียส เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 15 หมายเลข 3)

$$\text{Tail DNA [\%]} = [I_T / II] \times 100$$

4. Head radius (micrometers) คือ รัศมีของนิวเคลียสคือส่วนของ DNA ที่ไม่เกิดเสียหายที่ส่วนหัวของ comet เท่ากับความยาวครึ่งหนึ่งของระยะจาก A ถึง B (รูปที่ 15 หมายเลข 4)

5. Tail length (micrometers) คือ ความยาวของส่วนหางของ comet ที่บ่งบอกความเสียหายของ DNA เท่ากับระยะระหว่าง B ถึง C เป็น parameter ซึ่งขึ้นอยู่กับวิธีการวัดเป็นอย่างมาก (รูปที่ 15 หมายเลข 5)

6. Tail moment คือ ค่าตัวเลขที่ได้จากการคำนวณระหว่าง tail length คูณกับ tail DNA [%] ค่าตัวเลขที่ได้จากการคำนวณระหว่าง tail length คูณกับ tail DNA [%]

$$\text{Tail moment} = \text{Tail length} \times \text{Tail DNA} [\%]$$

7. Olive moment คือ ค่าที่ได้จากผลของระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางกับค่าที่วัดได้จากส่วนหัวและหาง และ tail DNA [%]

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บทที่ 5

ผลการทดลอง

การทดลองใช้ปลาอุกยูงประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และสารสกัดสะเดา หลังจากได้รับสารที่ทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการศึกษาพิษของ CdCl_2 ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งประเภท 1B นั้นใช้เทคนิค Micronucleus test และตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม รวมทั้งเปรียบเทียบผลการใช้ เทคนิค Micronucleus test และความผิดปกติของนิวเคลียสกับเนื้อเยื่อปลา 3 ชนิด เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่มีความไวและสะดวกต่อการประเมินผลด้วยเทคนิค Micronucleus test แล้วนำไปใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดสะเดาก่อนและหลังจากผึ่งแดดนาน 7 วัน นอกจากนี้ยังได้ทดลองเปรียบเทียบผลการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และสารสกัดสะเดาด้วยเทคนิค Micronucleus test และเทคนิค Comet assay บางความเข้มข้นด้วย โดยมีผลการทดลองในรายละเอียด ดังนี้

1. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ CdCl_2 ต่ออัตราการตายของปลาอุกยูง

จากการทดสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L ต่อการตายของปลาอุกยูง โดยแช่ปลาในสารละลาย CdCl_2 ความเข้มข้นละ 20 ตัว เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นับจำนวนปลารอดชีวิตจากเกณฑ์ คือ ปลามีลักษณะแข็งแรงว่ายน้ำหนีเมื่อถูกสัมผัส พบว่า ปลามีอัตราการตายเมื่อแช่ปลาใน CdCl_2 เข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่ากับ 0, 50 และ 100% ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้นพบว่าอัตราการตาย 0, 0, 0, 0, 10 และ 20% ตามลำดับ (ตารางที่ 14)

ตารางที่ 14 อัตราการตายของปลาอุกยูง (*C. macrocephalus*) ที่แช่ CdCl_2 0, 0.5 และ 1.0 mg/L เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง

CdCl_2 (mg/L)	อัตราการตาย (%)	
	24 h	48 h
0	0	0
0.01	0	0
0.02	0	0
0.03	0	0
0.04	0	10
0.05	0	20

2. ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมของปลาอุกอุย

2.1 ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมปลาอุกอุย

จากเซลล์เม็ดเลือดแดง

จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษของ CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L ต่อปลาอุกอุย เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อหุ้มเหงือกและเซลล์ตับจากปลาที่ใช้ทดสอบความเข้มข้นละ 20 ตัว โดยเทคนิค Micronucleus test และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 3 สไลด์ต่อปลา 1 ตัว ตรวจสไลด์ละ 1,000 เซลล์ ส่วนเหงือกและตับนั้นนำไปตรวจผลในการศึกษาต่อไป ผลการวิเคราะห์ความถี่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี micronucleus (Micronucleus Frequencies, MNFs) พบว่าปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีจำนวน micronucleus เพิ่มขึ้นโดยมีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และพบความผิดปกติของนิวเคลียส คือ พบความถี่ของ lobed nucleus (lobed nucleus frequencies, LNFs) สูงกว่ากลุ่มควบคุมทุกความเข้มข้น (ตารางที่ 15) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ คือ blebbed, notched, vacuolated และ binucleated nucleus (ตารางที่ 15 และรูปที่ 16) พบไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับความผิดปกติของนิวเคลียสที่ตรวจพบได้แก่ ความถี่ของ MN, lobed, blebbed, notched, vacuolated และ binucleated nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาอุกอุย พบค่า MNFs กับความเข้มข้นของ CdCl_2 มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) เท่ากับ 0.8916 และ 0.9056 ในปลากลุ่มที่ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 17) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสลักษณะอื่นๆ คือ blebbed, notched, vacuolated และ binucleated nucleus นั้น มีค่า R^2 ต่ำกว่าค่า MNFs โดยค่า LNFs มีค่า R^2 รองลงมาจากค่า MNFs ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.8749 และ 0.4676 ในปลากลุ่มที่ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 17)

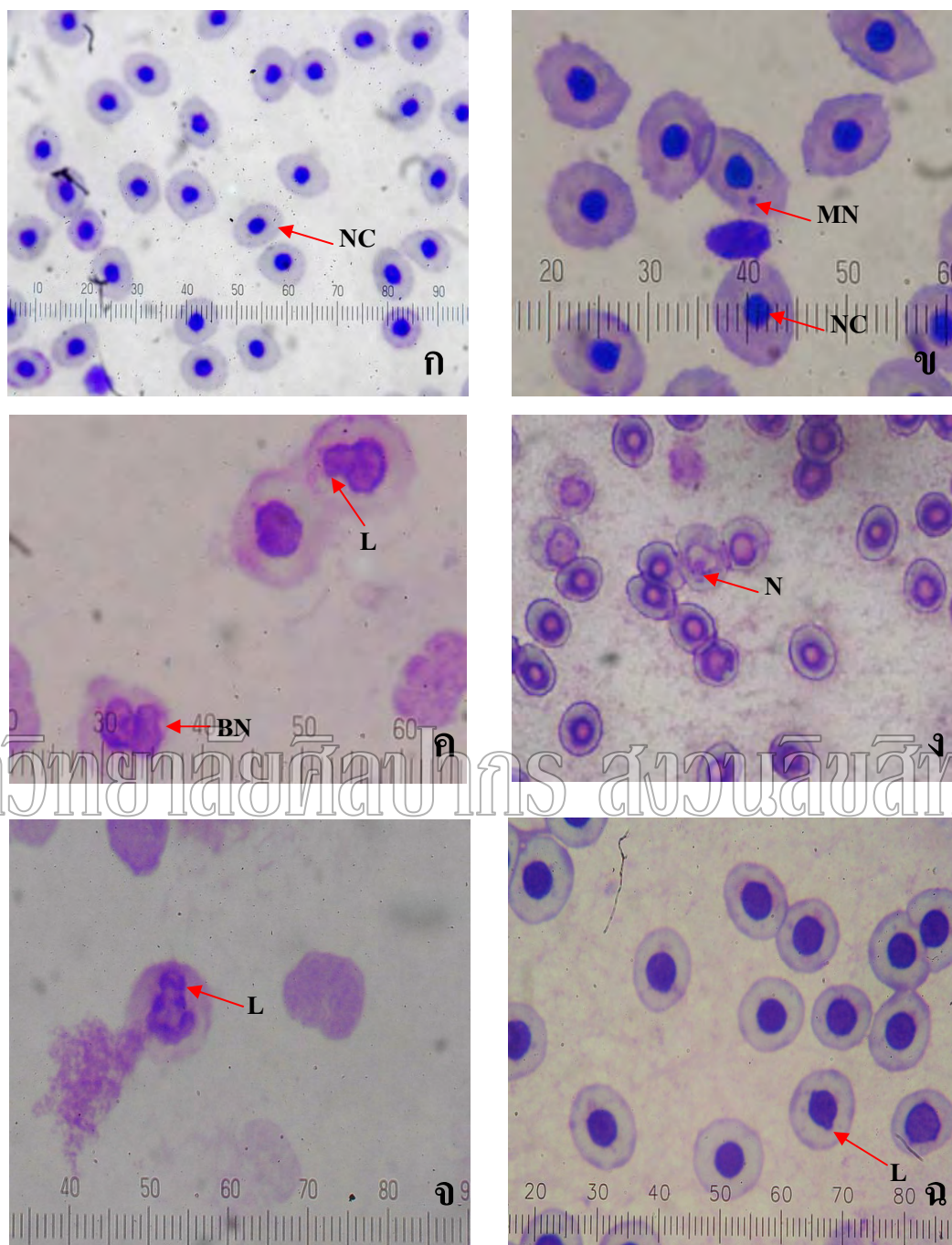
จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม จึงสามารถใช้เทคนิค Micronucleus test ตรวจหาความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากปลาได้รับสารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ CdCl_2 พบว่ามีค่า R^2 สูง จึงชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่เพิ่มสูงขึ้นทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพิ่มสูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 15 ค่าความถี่ของ micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาตุ๊กตอูย (*C. macrocephalus*) ที่ใช้น้ำที่มี CdCl₂ เพิ่มขึ้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

CdCl ₂ (mg/L)	Frequency/1,000 cells									
	Micronucleus		Blebbied nucleus		Notched nucleus		Lobed nucleus		Vacuolated nucleus	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	3.50±1.47 ^a	5.67±2.08 ^a	0.10±0.12 ^a	0.00±0.00 ^a	0.46±0.55 ^b	0.13±0.17 ^{bc}	3.43±1.18 ^a	4.60±2.38 ^a	1.96±1.18 ^a	0.43±0.47 ^a
0.01	3.60±1.14 ^a	5.13±2.10 ^a	0.33±0.23 ^a	0.27±0.47 ^a	0.23±0.40 ^{ab}	0.20±0.17 ^{ab}	5.93±2.44 ^{bc}	6.93±2.70 ^{bc}	2.47±1.54 ^a	1.90±1.68 ^a
0.02	4.97±2.00 ^b	10.30±4.36 ^b	0.00±0.00 ^a	0.03±0.06 ^a	0.17±0.29 ^{ab}	0.00±0.00 ^{ab}	5.70±2.12 ^{bc}	4.67±2.25 ^{ab}	0.90±1.10 ^a	1.67±1.12 ^a
0.03	7.97±3.30 ^{bc}	12.13±3.12 ^{bc}	0.20±0.29 ^a	0.07±0.06 ^a	0.37±0.35 ^{ab}	0.10±0.17 ^{ab}	9.23±5.21 ^{cd}	6.03±2.52 ^{cd}	2.73±2.78 ^a	1.53±1.74 ^a
0.04	12.03±3.98 ^c	12.07±3.53 ^c	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.10±0.17 ^{ab}	0.27±0.39 ^{ab}	9.67±4.02 ^{cd}	6.50±2.28 ^{cd}	1.17±1.42 ^a	1.73±1.39 ^a
0.05	12.03±3.98 ^c	16.20±4.82 ^d	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.03±0.06 ^a	0.03±0.06 ^a	9.63±2.71 ^d	7.90±2.95 ^d	0.90±1.08 ^a	1.77±1.24 ^a

ข (mean±SD) จากเซลล์เม็ดเลือดแดง 3,000 เซลล์ จาก 3 สไลด์ต่อปลาตุ๊กตอูย 1 ตัว
แปลทอดลงความเพิ่มขึ้นละ 20 ตัว

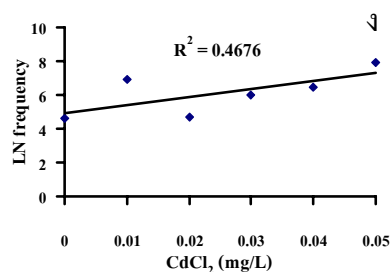
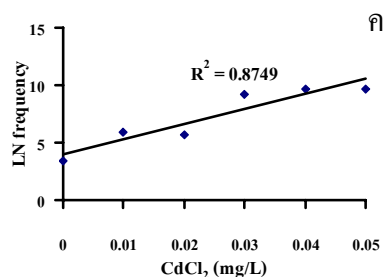
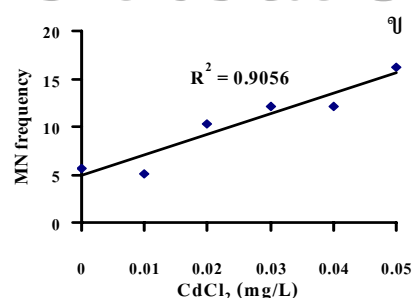
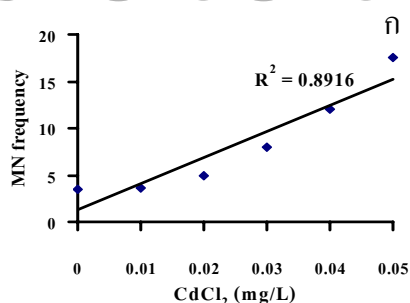
เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 16 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาดุกอุย (ก) กลุ่มควบคุม และ (ข-จ) กลุ่มที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ (NC = Normal cell, MN = Micronucleus, N = Notched nucleus, L = Lobed nucleus, V = vacuolated nucleus และ BN = binucleated nucleus)

ตารางที่ 16 ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับความถี่ของนิวเคลียสที่ตรวจพบลักษณะผิดปกติในเซลล์ 3 ชนิด ของปลาดุกอยู่ที่แช่ CdCl_2 0.01- 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ค่าความถี่ของความผิดปกติของนิวเคลียสที่นำมาวิเคราะห์ค่า R^2 กับความเข้มข้นของ CdCl_2	ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2)					
	เซลล์เม็ดเลือดแดง		เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก		เซลล์ตับ	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
micronucleus	0.8916	0.9056	0.9443	0.7880	0.0407	0.9325
blebbed nucleus	-0.2563	-0.1516	0.1115	-0.4285	-0.4939	-0.4286
notched nucleus	-0.5884	-0.0099	0.5505	0.0296	-0.1693	-0.0330
lobed nucleus	0.8749	0.4676	0.8235	0.9508	0.2185	0.8060
vacuolated nucleus	-0.2365	0.3581	0.8324	0.9347	0.0220	0.8991
binucleated nucleus	0.1080	-0.4258	0.6784	0.4435	0.5798	0.7834



รูปที่ 17 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับค่า MNF ในปลาดุกอยู่ที่แช่ใน CdCl_2 เป็นเวลา (ก) 24 และ (ข) 48 ชั่วโมง และกับค่า LNF ในปลาดุกอยู่ที่แช่ใน CdCl_2 เป็นเวลา (ค) 24 และ (ง) 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง

2.2 ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมปลาอุกอุย

จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก

การตรวจจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลาอุกอุยกลุ่มเดียวกับที่นำเซลล์เม็ดเลือดไปตรวจ ภายหลังจากที่แช่ใน CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยตรวจ เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก 2 สไลด์ต่อปลา 1 ตัว ผลการวิเคราะห์ความถี่ของเซลล์ที่มี MN พบว่าปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีจำนวน MN เพิ่มขึ้น โดยมีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และพบความผิดปกติของนิวเคลียส คือพบค่า LNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุมเฉพาะปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.03-0.05 mg/L (ตารางที่ 17) ส่วน ความผิดปกติของนิวเคลียส คือ blebbed และ lobed nucleus นั้น พบไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ยกเว้นความถี่ของ vacuolated nucleus (vacuolated nucleus frequencies, VNFs) พบสูงกว่ากลุ่ม ควบคุมเฉพาะปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.05 mg/L ทั้งกลุ่มที่แช่ปลาเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนปลากลุ่มที่พบค่าความถี่ของ binucleated nucleus (binucleated nucleus frequencies, BNFs) สูง กว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) คือ ปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.03 และ 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับความผิดปกติของ นิวเคลียส ได้แก่ ความถี่ของ MN, lobed, blebbed, notched, vacuolated และ binucleated nucleus ที่ ตรวจพบในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลา พบว่า ค่า R^2 ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ CdCl_2 มีค่าเท่ากับ 0.9443 และ 0.7880 ในปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 18) ส่วนค่า R^2 ของลักษณะความผิดปกติของนิวเคลียสที่มีความสัมพันธ์กับ ความเข้มข้นของ CdCl_2 สูง คือ lobed และ vacuolated nucleus มีค่า R^2 เท่ากับ 0.8235 และ 0.8324 ในปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9508 และ 0.9347 ในปลากลุ่มที่ แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 18)

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปลาอุกอุยที่แช่ใน CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L เป็น เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แสดงความเป็นพิษจาก CdCl_2 ในระดับสารพันธุกรรมสูงกว่ากลุ่มควบคุม และมีค่า R^2 ระหว่างค่า MNFs, LNFs และ VNFs กับความเข้มข้นของ CdCl_2 สูง จึงสามารถใช้ เทคนิค Micronucleus test และลักษณะความผิดปกติของนิวเคลียส คือ lobed และ vacuolated nucleus ตรวจหาความเป็นพิษระดับทำลายสารพันธุกรรมและก่อให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียส ที่เกิดจากปลาได้รับสารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมได้จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลา นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MNFs, LNFs และ VNFs สูงขึ้นเมื่อปลาได้รับ CdCl_2 เพิ่มขึ้น ดังนั้นความถี่ ของความผิดปกติดังกล่าวยังบ่งชี้ความรุนแรงของพิษที่ปลาได้รับอีกด้วย

ตารางที่ 17 ค่าความถี่ของ micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสของปลานิลในเซลล์เยื่อใยเหงือกปลาตุ๋น (*C. macrocephalus*) ที่แช่ในน้ำที่มี CdCl₂ เพิ่มขึ้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

CdCl ₂ (mg/L)	Frequency/1,000 cells											
	Micronucleus		Blebbled nucleus		Notched nucleus		Lobed nucleus		Vacuolated nucleus		Bimucleated nucleus	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	5.20±1.13 ^a	5.10±0.99 ^a	0.00±0.00 ^a	0.05±0.07 ^a	0.10±0.14 ^a	0.25±0.21 ^a	6.45±1.63 ^a	4.50±0.99 ^a	1.75±0.78 ^a	0.70±0.71 ^a	2.00±1.27 ^a	3.15±1.06 ^a
0.01	7.95±1.20 ^{ab}	7.80±1.27 ^{ab}	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.10±0.14 ^a	0.10±0.14 ^a	7.95±1.48 ^{ab}	5.60±1.56 ^{ab}	1.40±0.85 ^a	1.00±0.99 ^a	2.85±0.78 ^{ab}	5.25±0.47 ^{ab}
0.02	10.40±1.70 ^b	8.85±1.91 ^b	0.15±0.21 ^a	0.00±0.00 ^a	0.25±0.35 ^{ab}	0.10±0.14 ^{ab}	7.45±2.05 ^{ab}	5.75±1.63 ^{ab}	2.85±0.92 ^a	1.65±1.20 ^a	4.20±1.41 ^{ab}	3.60±1.63 ^{ab}
0.03	15.30±1.98 ^c	12.3±2.12 ^c	0.10±0.14 ^a	0.00±0.00 ^a	0.30±0.42 ^{ab}	0.30±0.42 ^{ab}	8.10±2.83 ^b	7.95±1.99 ^b	3.60±1.56 ^{ab}	1.75±1.20 ^{ab}	4.05±0.64 ^b	4.30±1.98 ^b
0.04	14.70±1.98 ^c	12.75±2.05 ^c	0.20±0.28 ^a	0.00±0.00 ^a	0.60±0.57 ^b	0.30±0.28 ^b	11.65±2.33 ^c	9.45±1.48 ^c	3.25±1.20 ^{ab}	2.05±0.78 ^{ab}	3.30±1.56 ^{ab}	4.40±0.85 ^{ab}
0.05	21.5±2.97 ^d	26.30±2.55 ^d	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.30±0.42 ^{ab}	0.15±0.21 ^{ab}	14.10±4.24 ^d	11.55±2.90 ^d	5.45±2.62 ^b	2.15±0.78 ^b	6.25±1.63 ^c	6.60±1.56 ^c

2,000 เซลล์ จาก 3 ปลาต่อปลาตุ๋น 1 ตัว

องและกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)

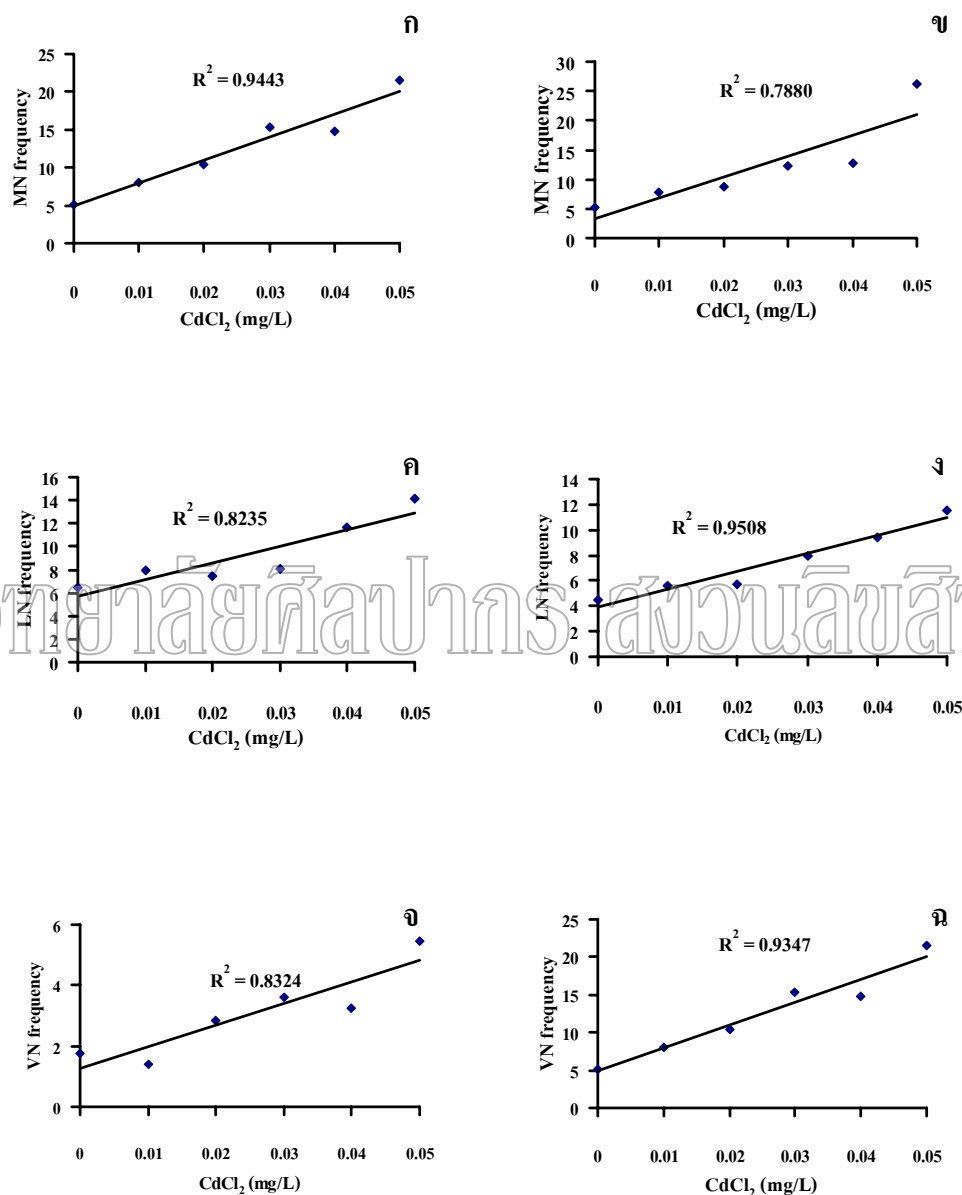
2.3 ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมปลาอุกอุยจากเซลล์ตับ

จากการตรวจเซลล์ตับของปลาอุกอุยกลุ่มเดียวกับที่นำเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกไปตรวจภายหลังจากที่แช่ใน CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ซึ่งตรวจเซลล์ตับ 1,000 เซลล์ต่อสไลด์ และตรวจ 2 สไลด์ต่อปลา 1 ตัว ผลการวิเคราะห์พบว่าปลาที่แช่ CdCl_2 ทุกกลุ่ม มีค่า MNFs ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 18) ยกเว้นปลาในกลุ่มที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.04 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เท่านั้นที่ชักนำให้เกิด MN ลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นั้นพบว่าปลาที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.01-0.05 mg/L มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสลักษณะอื่น คือ blebbed, notched และ vacuolated nucleus ไม่พบจำนวนสูงกว่ากลุ่มควบคุม (ตารางที่ 18) ยกเว้นปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.04 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และ 0.02-0.05 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า LNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม และปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 เข้มข้น 0.01 และ 0.03-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีค่า BNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับความผิดปกติของนิวเคลียสได้แก่ความถี่ของ MN, lobed, blebbed, notched, vacuolated และ binucleated nucleus ที่ตรวจพบในเซลล์ตับของปลา พบว่าค่า MNFs กับความเข้มข้นของ CdCl_2 มีค่า R^2 เท่ากับ 0.0407 และ 0.9325 ในปลากลุ่มที่ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับค่าความถี่ของ blebbed และ notched nucleus นั้น พบว่ามีค่า R^2 ต่ำทุกลักษณะของความผิดปกติ ยกเว้นค่า R^2 ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับค่าความถี่ของ lobed, vacuolated และ binucleated nucleus มีค่าเท่ากับ 0.8060, 0.8991 และ 0.7834 เมื่อปลาได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 16 และรูปที่ 19) ซึ่งพบว่ามีค่า R^2 สูงกว่าปลาในกลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่มีข้อสังเกต คือ ค่า MNFs และ BNFs ในกลุ่มควบคุมของปลาที่แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่าต่ำกว่าที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ส่วนความสัมพันธ์ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ CdCl_2 ในกลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า R^2 ต่ำ จึงไม่สามารถนำมาใช้ตรวจหาความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากปลาได้รับสารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมได้

ผลการทดลองพบว่าเทคนิค Micronucleus test จากเซลล์ตับนั้นใช้ตรวจความเป็นพิษ ของ CdCl_2 ระดับสารพันธุกรรมได้จำกัด คือ ไม่สามารถตรวจหาเมื่อปลาได้รับสารพิษเป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยตรวจได้เฉพาะเมื่อได้รับสารพิษเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และความผิดปกติของนิวเคลียสจากค่า LNFs, VNFs และ BNFs ซึ่งมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่แช่ปลานานเฉพาะ

กลุ่มที่แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า R^2 สูง จึงสามารถใช้ความผิดปกติของนิวเคลียสซึ่งเกิดจากเซลล์ได้รับสารพิษได้



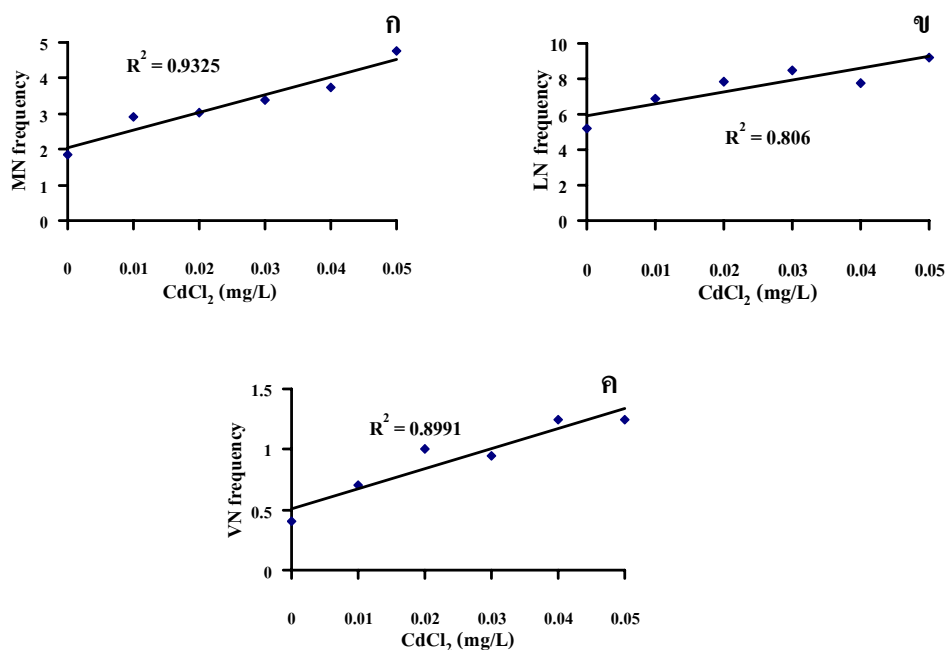
รูปที่ 18 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ $CdCl_2$ กับค่า MNFs ในปลาอุกอยู่ที่แช่ใน $CdCl_2$ เป็น เวลา (ก) 24 และ (ข) 48 ชั่วโมง และ กับค่า LNFs ในปลาอุกอยู่ที่แช่ใน $CdCl_2$ เป็นเวลา (ค) 24 และ (ง) 48 ชั่วโมง และ กับค่า VNFs ในปลาอุกอยู่ที่แช่ใน $CdCl_2$ เป็นเวลา (จ) 24 และ (ฉ) 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เยื่อหุ้มเหงือก

ตารางที่ 18 ค่าความถี่ของ micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์ตับปลาตุลย์ (*C. macrocephalus*) ที่แช่ในน้ำที่มี CdCl₂ เข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

CdCl ₂ (mg/L)	Frequency/1,000 cells									
	Micronucleus		Blebbled		Notched		Lobed		Vacuolated	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	4.35±0.92 ^a	1.85±0.92 ^a	0.05±0.07 ^a	0.05±0.07 ^a	0.05±0.07 ^a	0.25±0.21 ^a	7.60±1.27 ^{ab}	5.20±0.85 ^a	1.00±0.85 ^a	1.00±0.57 ^a
0.01	4.40±0.85 ^{ab}	2.90±0.71 ^b	0.10±0.14 ^a	0.00±0.00 ^a	0.15±0.21 ^a	0.05±0.07 ^a	5.95±1.48 ^a	6.85±1.06 ^{ab}	0.90±1.71 ^a	2.25±0.49 ^b
0.02	3.55±1.06 ^{ab}	3.05±0.78 ^b	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.10±0.14 ^a	6.85±1.77 ^{ab}	7.85±1.20 ^{bc}	0.45±0.49 ^a	1.70±0.71 ^a
0.03	4.85±0.92 ^{ab}	3.40±0.85 ^b	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.20±0.14 ^a	7.40±1.56 ^{ab}	8.50±1.06 ^{bc}	1.00±0.42 ^a	2.85±1.06 ^{bc}
0.04	3.80±1.27 ^b	3.75±0.92 ^b	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.10±0.14 ^a	8.95±1.20 ^b	7.80±0.99 ^{bc}	1.00±0.57 ^a	2.15±0.78 ^{bc}
0.05	4.10±1.27 ^{ab}	4.75±1.06 ^c	0.00±0.00 ^a	0.00±0.00 ^a	0.05±0.07 ^a	0.15±0.21 ^a	7.40±1.41 ^{ab}	9.20±1.70 ^c	0.95±0.64 ^a	2.85±0.78 ^c

ได้จาก 3 สไลด์ต่อปลาตุลย์ 1 ตัว

องและกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P<0.05$)



รูปที่ 19 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่แช่ปลาตกอยู่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง กับค่า (ก) MNFs (ข) LNfs และ (ค) BNfs เมื่อตรวจจากเซลล์ตับ

2.4 ผลการเปรียบเทียบความไวของเนื้อเยื่อปลาตกอยู่ที่ใช้ตรวจสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรม

การเปรียบเทียบความไวของเนื้อเยื่อ 3 ชนิด จากปลาตกอยู่ที่ใช้ใน CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าเนื้อเยื่อที่สามารถใช้เป็น biomarker เพื่อบ่งชี้ความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมที่ดี โดยใช้เกณฑ์ คือ (1) สามารถตรวจพบค่า MNFs สูงกว่าที่พบในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อปลาได้รับ CdCl_2 เข้มข้นต่ำที่สุด (2) มีค่า R^2 ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับ ค่า MNFs สูง ทั้งเมื่อแช่ปลาเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และ (3) ตรวจหา MN จากภายใต้กล้องจุลทรรศน์ได้ง่าย ส่วนประเด็นอื่นๆ ที่ใช้พิจารณาประกอบ คือ มีจำนวน MN สูงและมีผลทำให้ปลาตาย

จากการใช้เกณฑ์ข้อที่ 1 และ ข้อที่ 2 พบว่าการตรวจ ค่า MNFs ที่ตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก มีความไวในการตรวจระดับเดียวกัน คือ สามารถตรวจพบค่า MNFs สูงกว่าที่พบในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อปลาได้รับ CdCl_2 0.02 mg/L โดยพบว่าค่า R^2 ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับ ค่า MNFs เท่ากับ 0.8916 และ 0.9443 เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและจากเยื่อบุผิวเหงือกหลังจากแช่ปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนกลุ่มที่แช่ปลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้น พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.9056 และ 0.7880 เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง

และจากเยื่อหุ้มเหงือก ตามลำดับ จากการพิจารณาใช้เกณฑ์ทั้ง 2 ข้อนี้ทำให้การตรวจจากเซลล์ตับไม่ใช่เนื้อเยื่อที่มีความไวในการบ่งชี้ความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมที่ดี ถึงแม้จะตรวจพบค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ในปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 0.01 mg/L เพราะตรวจได้เฉพาะในปลา กลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนกลุ่มที่แช่ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นั้น ค่า MNFs ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.0407 จึงแสดงให้เห็นว่าค่า MNFs ไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่ใช้แช่ปลา จึงสรุปได้ว่าเซลล์ที่มีความไวในการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมที่ดี คือ เซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อหุ้มเหงือก ซึ่งมีข้อได้เปรียบและเสียเปรียบที่ควรพิจารณาเมื่อจะเลือกไปใช้ คือ การตรวจจากเลือดมีข้อดีเพราะไม่มีเซลล์และเนื้อเยื่ออื่นปนอยู่ในตัวอย่างที่ตรวจ และเซลล์มีขนาดใหญ่ จึงตรวจหา MN ภายใต้อกล้องจุลทรรศน์ง่าย ส่วนการตรวจจากเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกอาจพบเศษเนื้อเยื่อ คราบเมือก และแบคทีเรียปนอยู่ในตัวอย่างเซลล์ นอกจากนี้ขนาดของเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกมีขนาดเล็กกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง ทำให้ตรวจหา MN ได้ยากกว่า แต่ข้อดีของเซลล์เยื่อหุ้มเหงือก คือ มีจำนวน MN มากกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าค่า MNFs ของปลาคูอกุยที่แช่ใน CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่แตกต่างกัน ($P > 0.05$) (ตารางที่ 19) ส่วนข้อด้อยของการตรวจจากเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกอีกประการหนึ่ง คือ เป็นวิธีที่ทำให้ปลาตาย จึงไม่เหมาะต่อการติดตามผลกระทบยาว ผู้วิจัยจึงเลือกตรวจ MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดแดงเมื่อตรวจความเป็นพิษของสารสกัดสะเดาในการทดลองขั้นต่อไป

จากการเปรียบเทียบค่า R^2 ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับความผิดปกติของนิวเคลียสพบว่ามีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะสูง ได้แก่ ค่า LNFs และ VNFs ซึ่งพบว่ามีค่า R^2 สูงเฉพาะเมื่อตรวจจากเซลล์เยื่อหุ้มเหงือก หลังจากแช่ปลาใน CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ส่วนการตรวจจากเซลล์ตับนั้น พบว่าค่า R^2 สูงเฉพาะกลุ่มที่แช่ปลาใน CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 16) ดังนั้นค่า LNFs จึงเป็นความผิดปกติที่ตรวจพบในเนื้อเยื่อปลาทั้ง 3 ชนิด สูงกว่าความผิดปกติของนิวเคลียสอื่นๆ

จึงสรุปได้ว่าเนื้อเยื่อที่มีความไวสูงสุด คือ ตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อหุ้มเหงือกของปลาคูอกุย และเมื่อเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อทั้ง 2 ชนิดนี้ถ้าพิจารณาจากความสะดวกในการเก็บตัวอย่าง ใช้เวลาน้อย ทำง่าย และทำให้ปลาไม่ตาย ทำให้สะดวกต่อการใช้ปลาเป็นยามเฝ้าระวังมลพิษที่ปนเปื้อนในน้ำถึงระดับที่ทำให้ลายสารพันธุกรรม ดังนั้นการตรวจหา MNFs จากเม็ดเลือดปลาจึงมีความไวต่อการตรวจความเป็นพิษในระดับที่ทำให้ลายสารพันธุกรรมและมีความสะดวกต่อการตรวจ

ตารางที่ 19 ผลการวิเคราะห์ค่า MNFs ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและ
เซลล์ตับของปลาดุกอุย (*C. macrocephalus*) ที่แช่ CdCl₂ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

CdCl ₂ (mg/L)	MN frequency ¹ /1,000 cells (mean±SD)					
	เซลล์เม็ดเลือดแดง		เซลล์เยื่อบุผิวเหงือก		เซลล์ตับ	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
0	3.50±1.47 ^b	5.67±2.08 ^b	5.20±1.13 ^c	5.10±0.99 ^c	4.35±0.92 ^a	1.85±0.92 ^a
0.01	3.60±1.14 ^b	5.13±2.10 ^b	7.95±1.20 ^c	7.80±1.27 ^c	4.40±0.85 ^a	2.90±0.71 ^a
0.02	4.97±2.00 ^b	10.30±4.36 ^b	10.40±1.70 ^c	8.85±1.91 ^c	3.55±1.06 ^a	3.05±0.78 ^a
0.03	7.97±3.30 ^b	12.13±3.12 ^b	15.30±1.98 ^c	12.3±2.12 ^c	4.85±0.92 ^a	3.40±0.85 ^a
0.04	12.03±3.98 ^b	12.07±3.53 ^b	14.70±1.98 ^c	12.75±2.05 ^c	3.80±1.27 ^a	3.75±0.92 ^a
0.05	17.47±5.82 ^b	16.20±4.82 ^b	21.5±2.97 ^c	26.30±2.55 ^c	4.10±1.27 ^a	4.75±1.06 ^a

¹ ค่าเฉลี่ย (mean±SD) จากเซลล์เม็ดเลือดแดง 3,000 เซลล์ เซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและเซลล์ตับอย่างละ 2,000 เซลล์

ต่อปลาดุกอุย 1 ตัว ความเข้มข้นละ 20 ตัว

^{a,c} เปรียบเทียบค่า MNF ระหว่างชนิดของเซลล์ และระยะเวลาที่แช่ปลา 24 กับ 48 ชั่วโมง

3. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา ต่ออัตราการตายของ

ปลาดุกอุย

จากการทดสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L ต่อการรอดชีวิตของปลาดุกอุย โดยแช่ปลาในสารละลาย Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาความเข้มข้นละ 20 ตัว เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นับจำนวนปลารอดชีวิตจากเกณฑ์ คือ ปลาที่มีลักษณะแข็งแรงว่ายน้ำหนีเมื่อถูกสัมผัส พบว่าหลังจากแช่ปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงใน Azadirachtin เข้มข้น 0, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8, 0.9, 1.0 และ 1.1 mg/L ปลาที่มีอัตราการตายเท่ากับ 0, 50, 30, 30, 70, 70, 100 และ 100% ตามลำดับ ส่วนการทดสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาเป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้นพบว่าอัตราการตาย เท่ากับ 0, 0, 10, 10, 10, 20, 60 และ 80% ตามลำดับ (ตารางที่ 20) พบว่าปลาดุกอุยกลุ่มที่ได้รับ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาเข้มข้น 1.0-1.1 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จะว่ายน้ำไปมาตลอดเวลาและตายภายใน 6 ชั่วโมง

4. ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาต่อปลาอุกอุย

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ต่อสารพันธุกรรมของปลาอุกอุย ผู้วิจัยจึงเลือกเทคนิค Micronucleus test มาตรวจความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาต่อสารพันธุกรรมและศึกษาความผิดปกติของนิวเคลียส คือ lobed nucleus โดยศึกษาจากเซลล์เม็ดเลือดแดง นอกจากนี้ยังศึกษาการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดาจากแสงแดด โดยเปรียบเทียบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมระหว่าง Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา ก่อนและหลังจากนำไปผึ่งแดดนาน 7 วัน

4.1 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาต่อ

สารพันธุกรรมของปลาอุกอุย

จากการทดสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L ต่อปลาอุกอุย เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเทคนิค Micronucleus test และความผิดปกติของนิวเคลียสคือ lobed nucleus จากเซลล์เม็ดเลือดแดงจำนวน 3 สไลด์/ปลา 1 ตัว ตรวจสไลด์ ละ 1,000 เซลล์ และใช้ปลาที่ทดลองความเข้มข้นละ 10 ตัว ผลการวิเคราะห์ค่า MNFs และ LMFs พบว่าปลาที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจพบค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ในปลากลุ่มที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin 0.7-0.9 mg/L ส่วนกลุ่มที่แช่เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจพบปลาที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin 0.6-1.0 mg/L (ตารางที่ 21) ส่วนค่า LMFs นั้นพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ Azadirachtin ทั้งในปลากลุ่มที่แช่เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีค่า R^2 เท่ากับ 0.0112 และ 0.0002 ตามลำดับ (รูปที่ 20) ส่วนค่า R^2 ระหว่าง MNFs กับความเข้มข้นของ Azadirachtin นั้น พบว่ามีค่า R^2 เท่ากับ 0.6793 และ 0.6182 ตามลำดับ

ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาความเข้มข้นตั้งแต่ 0.7 mg/L เวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งตรวจได้จากค่า MNFs ที่พบสูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) จึงสามารถใช้เทคนิค Micronucleus test ตรวจหาความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากปลาได้รับสารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา พบว่ามีค่า R^2 ต่ำกว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ จึงชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสะเดามีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมน้อยกว่า $CdCl_2$ นอกจากนี้ยังพบว่า ความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาที่ชักนำให้มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม คือ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา 0.7 mg/L หลังแช่ปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า MNFs 8.05 ± 2.10 (ตารางที่ 21) ซึ่งใกล้เคียงกับค่า MNFs 7.97 ± 3.00 (ตารางที่ 15)

ของปลาอุกอุยที่แช่ CdCl_2 0.03 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงแสดงให้เห็นว่า ต้องใช้สารสกัดสะเดา ที่มี Azadirachtin มากกว่า CdCl_2 ถึง 23.33 เท่า จึงสามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ปลาอุกอุยได้ในระดับใกล้เคียงกัน ส่วนกรณีเปรียบเทียบระหว่างปลาอุกอุยที่แช่ในสารสกัดสะเดา และ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ต้องใช้สารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin มากกว่า CdCl_2 ถึง 30 เท่า จึงสามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาอุกอุยได้ในระดับใกล้เคียงกัน คือ เท่ากับ 9.78 ± 1.98 และ 10.3 ± 4.36 ในปลาอุกอุยที่แช่สารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.6 mg/L และแช่ CdCl_2 0.02 mg/L ตามลำดับ

ตารางที่ 20 อัตราการตายของปลาอุกอุย (*C. macrocephalus*) ที่แช่ในสารสกัดสะเดา ที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

สารสกัดสะเดาที่มีความเข้มข้นของ Azadirachtin (mg/L)	อัตราการตาย (%)	
	24 h	48 h
0	0	0
0.50	50	0
0.60	30	10
0.70	30	10
0.80	70	10
0.90	70	20
1.00	100	60
1.10	100	80

4.2 ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของ azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่เสื่อมฤทธิ์ต่อ

สารพันธุกรรมของปลาอุกอุย

จากผลการทดสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาต่อสารพันธุกรรมของปลาอุกอุย พบว่าปลาอุกอุยที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.6 mg/L เป็นความเข้มข้นต่ำที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมและความเข้มข้นที่ใช้ต่ำกว่าความเข้มข้นของ CdCl_2 ที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมถึง 30 เท่า ผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบผลของแสงแดดต่อการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา ด้วยเทคนิค Micronucleus test โดยนำสารสกัดสะเดา ที่มี Azadirachtin 0.6 mg/L ไปผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน แล้วนำมาทดสอบกับปลาอุกอุย เป็นเวลา 24

ชั่วโมง พบว่าในปลากลุ่มที่แช่ในสารสกัดสะเดาเข้มข้น 0.6 mg/L ที่ไม่นำไปผึ่งแดด มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) และมีค่า MNFs สูงกว่าปลาคูยกกลุ่มที่แช่สารสกัดสะเดาที่ทำให้เสื่อมฤทธิ์โดยวิธีผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน (ตารางที่ 21) ส่วนปลาที่แช่สารสกัดสะเดาที่ผ่านการผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีค่า MNFs ลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุมแต่ไม่แตกต่างค่า MNFs ของปลาที่แช่สารสกัดสะเดาเข้มข้น 0.6 mg/L ที่ไม่นำไปผึ่งแดด ($P < 0.05$) ส่วนค่า LNFs นั้นพบว่าปลาที่แช่สารสกัดสะเดาทั้งที่ไม่ผึ่งแดดและที่ผ่านการผึ่งแดดไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 21) จากผลการทดลองสรุปได้ว่าการนำสารสกัดสะเดาไปผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน ทำให้ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาลดน้อยลง แต่การลดลงนี้ยังไม่มากพอที่จะตรวจพบความแตกต่างจากพิษต่อสารพันธุกรรมของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาที่ยังไม่นำไปผึ่งแดด จึงควรทำการทดลองซ้ำและเพิ่มระยะเวลาในการนำสารสกัดสะเดาไปผึ่งแดดให้นานขึ้น รวมทั้งทดสอบกับสารสกัดสะเดาอย่างน้อย 3 ความเข้มข้น

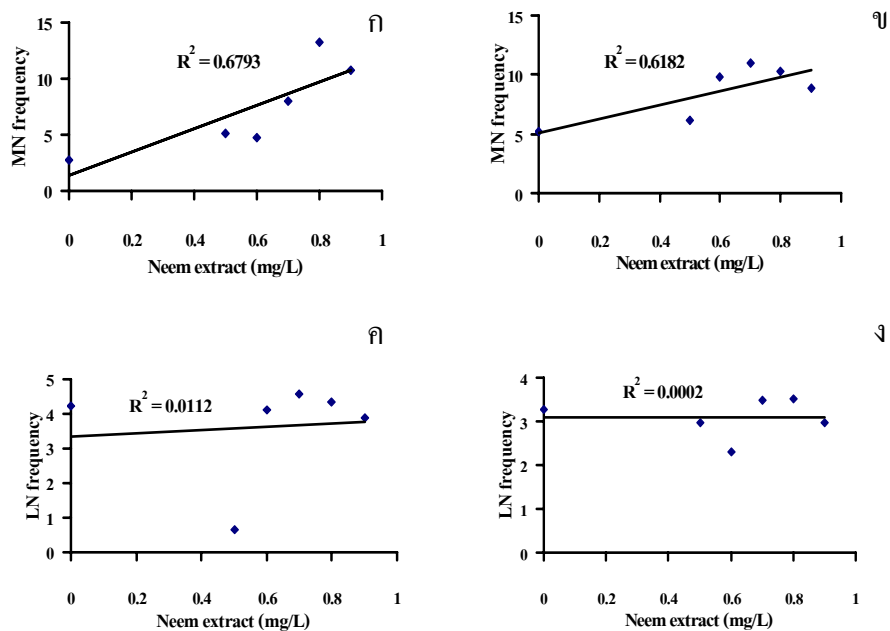
ตารางที่ 21 ค่าความถี่ของ micronucleus และ lobed nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาคูยก (*C. macrocephalus*) ที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

Azadirachtin จาก สารสกัดสะเดา (mg/L)	Frequency /1,000 cells (mean $\pm$ SD)			
	Micronucleus		Lobed nucleus	
	24 h	48 h	24 h	48 h
0	2.80 $\pm$ 0.83 ^a	5.17 $\pm$ 1.68 ^a	4.23 $\pm$ 1.19 ^b	3.27 $\pm$ 1.95 ^b
0.5	5.08 $\pm$ 1.51 ^{ab}	6.10 $\pm$ 1.86 ^{ab}	0.67 $\pm$ 0.14 ^a	2.97 $\pm$ 1.67 ^b
0.6	4.71 $\pm$ 1.69 ^{ab}	9.78 $\pm$ 1.98 ^{cd}	4.10 $\pm$ 1.89 ^b	2.30 $\pm$ 1.89 ^{ab}
0.7	8.05 $\pm$ 2.10 ^b	10.96 $\pm$ 5.40 ^d	4.57 $\pm$ 2.12 ^b	3.48 $\pm$ 2.16 ^b
0.8	13.22 $\pm$ 3.27 ^c	10.33 $\pm$ 2.34 ^{cd}	4.57 $\pm$ 2.12 ^b	3.52 $\pm$ 0.00 ^b
0.9	10.78 $\pm$ 3.79 ^b	8.88 $\pm$ 1.80 ^{bcd}	3.89 $\pm$ 2.92 ^b	2.96 $\pm$ 1.58 ^b
1	0.00 $\pm$ 0.00 ²	10.92 $\pm$ 3.58 ^d	0.00 $\pm$ 0.00 ²	3.33 $\pm$ 1.24 ^b
1.1	0.00 $\pm$ 0.00 ²	7.17 $\pm$ 3.36 ^{abc}	0.00 $\pm$ 0.00 ²	3.33 $\pm$ 1.24 ^b

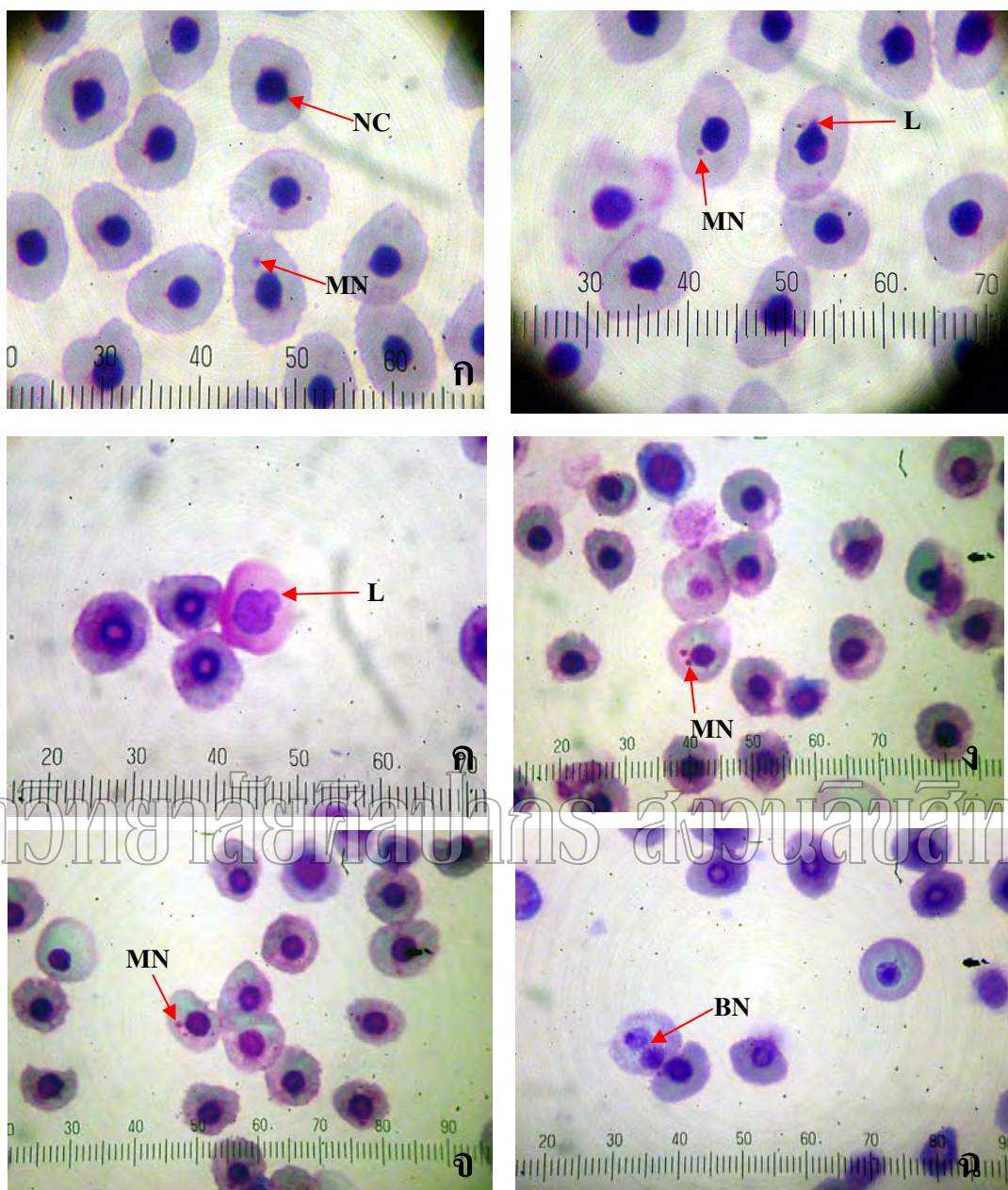
¹ ค่าเฉลี่ยจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก 3,000 เซลล์ต่อปลาคูยก 1 ตัว จำนวนปลาทดลองความเข้มข้นละ 20 ตัว

² ปลาที่ใช้ทดสอบตายหมดทั้งกลุ่ม

^{a-d} เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความถี่ที่พบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



รูปที่ 20 ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดากับค่า MNF ในปลาดุกอยู่ที่แช่สารสกัดสะเดาเป็นเวลา (ก) 24 และ (ข) 48 ชั่วโมง และ กับค่า LNF ในปลาดุกอยู่ที่แช่สารสกัดสะเดาเป็นเวลา (ค) 24 และ (ง) 48 ชั่วโมง เมื่อตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง



รูปที่ 21 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาดุกอุย (ก) กลุ่มควบคุมและ (ข-ง) กลุ่มทดลองที่ได้รับ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาเข้มข้น 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 และ 0.9 mg/L ตามลำดับ (NC = Normal cell, MN = Micronucleus, L = Lobed nucleus และ BN = Binucleated nucleus)

ตารางที่ 22 ค่าความถี่ของ micronucleus และ lobed nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาตุกอย (*C. macrocephalus*) ที่เข้สารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin 0.6 mg/L ที่นำไปฝั้งแดด 7 วันและไม่ฝั้งแดด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

Azadirachtin (mg/L)	Micronucleus	Lobed nucleus
0	4.27 ± 3.30 ^a	2.70 ± 1.55 ^a
0.6	4.63 ± 1.61 ^b	4.29 ± 1.30 ^a
0.6 ²	3.22 ± 1.75 ^a	2.81 ± 1.66 ^a

¹ ค่าเฉลี่ยจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก 3,000 เซลล์ต่อปลาตุกอย 1 ตัว จำนวนปลาทดลองความเข้มข้นละ 20 ตัว

² Azadirachtin 0.6 mg/L ที่นำไปฝั้งแดดเป็นเวลา 7 วัน

^{a-d} เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความถี่ที่พบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)

5. ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl₂, Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา

ก่อนและหลังจากฝั้งแดดในปลาตุกอยด้วยเทคนิค Comet assay

จากผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Micronucleus test ซึ่งพบว่าได้ผลดีแต่ใช้เวลาในการตรวจสอบสูงและในการศึกษานี้ภาควิชาชีววิทยาได้ส่งข้อถกเถียง จุลทรรศน์และโปรแกรมสำเร็จรูปที่สามารถวัดปริมาณของ DNA damage ของแต่ละเซลล์ได้ จึงสามารถตรวจ DNA damage ด้วยเทคนิค Comet assay ผู้วิจัยจึงทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อใช้เทคนิค Comet assay ตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาตุกอย โดยแช่ปลา ใน CdCl₂, สารสกัดสะเดาก่อนและหลังนำไปฝั้งแดดนาน 7 วัน เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ปลาทดลองกลุ่มละ 5 ตัว และตรวจ DNA damage จากเซลล์ 50 เซลล์ต่อปลา 1 ตัว และวิเคราะห์ผลด้วย ด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay และวัดค่า parameter 9 ค่า คือ ค่าเฉลี่ยของ [%] head DNA, [%] tail DNA, integral intensity, head radius, tail length, tail moment, olive moment, head area และ tail area

ผลการทดลองพบว่าเมื่อตรวจสอบความเป็นพิษของ CdCl₂ และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาตุกอยด้วยเทคนิค Comet assay และวิเคราะห์ภาพ comet รวม 9 parameter พบว่า CdCl₂ และ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาทุกความเข้มข้น สามารถชักนำให้เกิด DNA damage (รูปที่ 22) ที่มีค่าเฉลี่ย tail length แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) โดยปลาในกลุ่มที่ แช่ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ฝั้งแดดเป็นเวลา 7 วัน และไม่ฝั้งแดด มีค่าเฉลี่ยของ tail

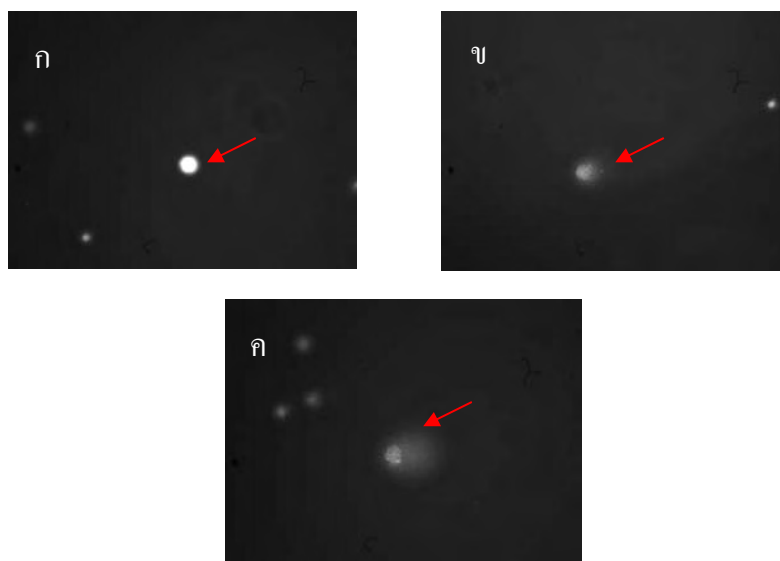
length ใกล้เคียงกันและมีค่าเฉลี่ยมากกว่าปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 0.03 และ 0.05 mg/L อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) (ตารางที่ 23) ส่วนพารามิเตอร์อื่นๆ ที่ตรวจนั้น พบว่าค่าเฉลี่ยของ [%] tail DNA, tail moment, olive moment สูงกว่ากลุ่มควบคุม เฉพาะปลาคูขุยที่แช่ในสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin 0.6 mg/L ที่ฟุ้งแดดเป็นเวลา 7 วันและไม่ฟุ้งแดด มีค่าเฉลี่ยของ [%] tail DNA, tail moment, olive moment สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) (ตารางที่ 23) ส่วนค่าเฉลี่ย integral intensity และ head area ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P > 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่า ค่าเฉลี่ย [%] head DNA ในปลากลุ่มที่แช่ CdCl_2 0.03 และ 0.05 mg/L มีค่าสูงกว่าของปลากลุ่มที่แช่ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ฟุ้งแดดเป็นเวลา 7 วัน และไม่ฟุ้งแดด อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ซึ่งค่าเฉลี่ย [%] head DNA กับ [%] tail DNA มีความสัมพันธ์กัน คือ เซลล์ที่เกิด DNA damage น้อยจะมีค่าเฉลี่ย [%] head DNA มาก

ตารางที่ 23 ค่า parameter ต่างๆ (mean $\pm$ SD) ที่ใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay

สารเคมี	Head DNA (%)	Tail DNA (%)	Integral intensity	Head radius	Tail length	Tail moment	Olive moment	Head area	tail area
Control	96.01 $\pm$ 3.14 ^a	2.75 $\pm$ 3.14 ^a	140.37 $\pm$ 45.23 ^a	28.93 $\pm$ 3.92 ^a	9.12 $\pm$ 8.07 ^a	0.39 $\pm$ 0.80 ^a	0.66 $\pm$ 0.75 ^a	3,397.23 $\pm$ 773.82 ^a	356.01 $\pm$ 281.99 ^a
CdCl_2 0.03 mg/L	80.64 $\pm$ 10.67 ^b	19.36 $\pm$ 10.67 ^b	128.46 $\pm$ 44.21 ^a	18.92 $\pm$ 4.33 ^{ab}	105.90 $\pm$ 51.24 ^b	24.92 $\pm$ 22.65 ^a	8.67 $\pm$ 7.87 ^a	1,610.22 $\pm$ 497.81 ^a	2,605.21 $\pm$ 1,840.08 ^a
CdCl_2 0.05 mg/L	80.00 $\pm$ 11.72 ^b	20.00 $\pm$ 11.72 ^a	139.49 $\pm$ 48.98 ^a	21.95 $\pm$ 5.92 ^{ab}	132.24 $\pm$ 44.35 ^b	33.33 $\pm$ 25.39 ^a	11.25 $\pm$ 11.51 ^a	2,244.02 $\pm$ 986.81 ^a	3,506.97 $\pm$ 1,921.51 ^a
Neem extract 0.6 mg/L	48.74 $\pm$ 13.94 ^a	51.26 $\pm$ 13.94 ^b	154.43 $\pm$ 62.85 ^a	14.61 $\pm$ 2.83 ^a	234.07 $\pm$ 44.60 ^c	137.04 $\pm$ 49.50 ^b	50.61 $\pm$ 25.61 ^b	1,156.92 $\pm$ 357.41 ^a	11,662.70 $\pm$ 4,693.79 ^b
Neem extract 0.6 mg/L ฟุ้งแดด 7 วัน	55.22 $\pm$ 17.82 ^a	44.78 $\pm$ 17.82 ^b	161.90 $\pm$ 63.24 ^a	14.60 $\pm$ 2.54 ^a	232.26 $\pm$ 51.44 ^c	111.59 $\pm$ 53.73 ^b	43.91 $\pm$ 30.09 ^b	1,260.07 $\pm$ 388.22 ^a	10,696.76 $\pm$ 4,629.14 ^b

¹ ค่าเฉลี่ยจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจาก 100 เซลล์ต่อปลาคูขุย 1 ตัว จำนวนปลาทดลองความเข้มข้นละ 5 ตัว

^{a-c} เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความถี่ที่พบระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($P < 0.05$)



รูปที่ 22 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาดุกอุย (ก) จากกลุ่มควบคุม และ (ข) จากปลากลุ่มที่แช่

CdCl_2 0.03 mg/L ซึ่งพบ DNA damage ระดับปานกลาง และ (ค) Azadirachtin 0.6 mg/L

ซึ่งพบ DNA damage ระดับระดับมาก เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence

กำลังขยาย 40 เท่า

บทที่ 6

สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การทดลองใช้ปลาอุกอุยประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และสารสกัดสะเดา หลังจากปลาได้รับสารที่ทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยการศึกษาพิษของ CdCl_2 ด้วยเทคนิค Micronucleus test และตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะเพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม รวมทั้งเปรียบเทียบผลการใช้เทคนิค Micronucleus test และตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสจากเนื้อเยื่อปลา 3 ชนิด คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อผิวหนังเหงือก และเซลล์ตับจากปลาในกลุ่มทดลองเดียวกัน เพื่อคัดเลือกเนื้อเยื่อที่มีความไวและสะดวกต่อการใช้ประเมินความเป็นพิษของ CdCl_2 ในระดับที่ทำลายสารพันธุกรรม และก่อให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียสแล้วนำไปใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารสกัดสะเดาก่อนและหลังจากผึ่งแดด 7 วัน เพื่อเปรียบเทียบผลของแสงแดดต่อการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา นอกจากนี้ยังได้ทดลองเปรียบเทียบผลการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 และสารสกัดสะเดาบางความเข้มข้น ด้วยเทคนิค Micronucleus test และเทคนิค Comet assay โดยมีผลการทดลองในรายละเอียดดังนี้

1. ผลการศึกษาความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่ออัตราการตายของปลาอุกอุย

การทดสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อปลาอุกอุยขนาด 8.93 ± 0.94 ซม. โดยวิธีแช่ในสารละลาย CdCl_2 เข้มข้น 0.01, 0.02, 0.03, 0.04 และ 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าปลาในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีอัตราการตาย 0% และปลาที่ได้รับ CdCl_2 0.04 และ 0.05 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีอัตราการตาย 20 และ 10% ตามลำดับ ผลการทดสอบความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อปลาอุกอุยในขั้นตอนนี้เพื่อทดสอบสภาพแวดล้อมและวิธีทดสอบ CdCl_2 ต่อปลาอุกอุยในห้องปฏิบัติการ ซึ่งพบว่าเป็นไปตามเกณฑ์มาตรฐานของ EPA (2004) และ OECD (1997) ซึ่งมีเกณฑ์ คือ จากปลาทดสอบกลุ่มละ 20 ตัว ปลาในกลุ่มควบคุมต้องมีอัตราการรอดชีวิตไม่น้อยกว่า 90%

2. ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมของปลาอุกอุย

2.1 ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมปลาอุกอุย

จากเซลล์เม็ดเลือดแดง

จากการศึกษาความเป็นพิษของ CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L ต่อปลาอุกอุย เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยเทคนิค Micronucleus test และตรวจหาความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ พบว่าปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีจำนวน MN เพิ่มขึ้น จึงมีค่าความถี่ของเซลล์เม็ดเลือดแดงที่ตรวจพบ micronucleus (MNFs) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสที่ตรวจ คือ ความถี่ของ MN, lobed, blebbed, notched, vacuolated และ binucleated nucleus พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R^2) ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 มีค่า R^2 สูงที่สุด คือ ความสัมพันธ์กับ MNFs และ LNFs เท่ากับ 0.8916 และ 0.9347 ตามลำดับ ในกลุ่มที่แช่ปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่แช่ปลาเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า R^2 เท่ากับ 0.9056 และ 0.9508 ตามลำดับ (ตารางที่ 16) ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ปลาอุกอุยตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ในน้ำได้ โดยการตรวจพบค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) เมื่อมี CdCl_2 เป็นป้อนไม่น้อยกว่า 0.02 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมได้ด้วยเทคนิค Micronucleus test

องค์กรวิจัยมะเร็งระหว่างประเทศ หรือ IARC รายงานว่าแคดเมียมเป็นสารก่อมะเร็ง class 1A (IARC, 2004) ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองของ Wu และคณะ (2006) ที่พบว่าเมื่อศึกษาในไตของปลา silver crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) ที่ได้รับ Cd^{2+} พบว่า Cd^{2+} มีผลทำให้สาย DNA ขาดลงโดย Cd^{2+} ไปกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ deoxyribonuclease และมีผลให้เกิดการสะสมอนุมูลอิสระ (reactive oxygen species) รวมทั้งไปทำลายระบบต้านอนุมูลอิสระโดยมีผลให้เกิดการลดกิจกรรมของเอนไซม์ superoxide dismutase, catalase และ peroxidase ลง รวมทั้งเพิ่มปฏิกิริยา lipid peroxidation ส่วนผลการศึกษาความเป็นพิษของ CdCl_2 ในเซลล์ HepG2 พบว่าความเข้มข้น 0-1000 nM ทำให้เกิด DNA damage จึงตรวจพบค่า MNF เพิ่มขึ้นหลังจากเซลล์ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (Fatur และคณะ, 2002) และการศึกษาในเซลล์ CHO-K1 พบว่า cadmium acetate สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ในเซลล์ CHO-K1 โดยพบความถี่ของเซลล์ที่กลายพันธุ์ 11 และ 16 เท่า เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่า cadmium acetate สามารถชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์แบบ transversions มากกว่าแบบ transitions (Yang และคณะ, 2004)

จากการรายงานผลของแคดเมียมต่อการทำลายสารพันธุกรรม จึงสนับสนุนผลที่ได้จากการทดลองนี้ ซึ่งพบว่าสามารถใช้เทคนิค Micronucleus test ตรวจวัดระดับความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อ

การทำลายสารพันธุกรรมของปลาถูกอยู่ได้จากการตรวจหาความถี่ของจำนวน MN ที่พบในเซลล์เม็ดเลือดแดง เนื่องจาก MN เกิดจากความผิดปกติของโครโมโซมหรือชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกิดการแตกหักในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสถึงระยะแอนาเฟส เนื่องมาจากการเกิดมิวเตชัน (Ballantyne, 1988; Udroui, 2006) หลังจากโครโมโซมได้รับความเสียหายและไม่สามารถรวมตัวเป็น daughter nuclei ได้ จึงเป็นชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็กอยู่รอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (Tradiff, 1991) โดยสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเมื่อเข้าสู่เซลล์จะทำให้สาย DNA ขาด เกิดเป็นชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักอยู่ในไซโตพลาสซึม เมื่อถึงการแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟสโครโมโซมจะถูกดึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ ชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักจะไม่ถูกดึง จึงเกิดเป็น MN ที่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลักอยู่ในเซลล์ (Fenech, 2006)

เทคนิค Micronucleus test จึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษประเภทที่มีผลทำลายสารพันธุกรรมในแหล่งน้ำ โดยทำให้ DNA หรือโครโมโซมแตกหัก จึงเป็นการตรวจผลของสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำที่ส่งผลกระทบต่อทำลายสารพันธุกรรม ซึ่งไม่ได้จำเพาะต่อ $CdCl_2$ เท่านั้น ดังที่ปรากฏในรายงานผลการศึกษาของ Matsumoto และคณะ (2006) ที่พบว่าโครเมียมที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำสามารถชักนำให้เกิด micronucleus และความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลานิล (*O. niloticus*) เมื่อตรวจสอบด้วยเทคนิค Micronucleus test จากเซลล์เม็ดเลือดแดง และจากรายงานของ Cavas และ Ergene-Gozukara (2005) พบว่าปลานิลที่ได้รับ metronidazole เข้มข้น 5, 10 และ 15 mg/L เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง แล้วตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Micronucleus test จากเซลล์เม็ดเลือดแดงที่โตไม่เต็มที่ (immature erythrocytes) สามารถตรวจพบค่า MNFs มากกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงที่โตเต็มที่ (mature erythrocytes) โดยจะพบค่า MNFs เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ได้รับ metronidazole นอกจากนี้ยังมีรายงานการใช้เทคนิค Micronucleus test ศึกษา genotoxic effects ของยาฆ่าแมลงในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาคูดาน พบว่า ปลาที่ได้รับ 2,4-dichlorophenoxyacetic acid เข้มข้น 75 mg/L เป็นเวลา 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่า MNFs เท่ากับ 1.75 ± 0.9 ถึง 3.69 ± 1.96 และ 9.64 ± 2.55 ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับ butachlor เข้มข้น 2.5 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีค่า MNFs เท่ากับ 3.10 ± 0.89 ถึง 4.04 ± 1.97 ซึ่งมีค่าเพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (Ateep และคณะ, 2002) ส่วนรายงานการศึกษาในปลานิล 2 ชนิด ที่ฉีด mitomycin C เข้มข้น 2 mg/kg และ cyclophosphamide เข้มข้น 20 mg/kg เข้าช่องท้องปลาเป็นเวลา 15 วัน พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงจากไตและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก มีค่า MNFs ในปลา *T. pendali* มากกว่าปลา *O. niloticus* แสดงให้เห็นว่าปลา *T. pendali* มีความไวต่อการถูกชักนำให้เกิด micronucleus มากกว่า *O. niloticus* (Palhares และคณะ, 2002)

จากผลการทดลองซึ่งพบว่าการตรวจค่า MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาตุ๊กตามีความไวในการตรวจสอบการปนเปื้อนของ CdCl_2 ในน้ำไม่น้อยกว่า 0.02 mg/L หลังจากแช่ปลาในน้ำที่ปนเปื้อน CdCl_2 เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จึงมีความไวเพียงพอที่จะนำปลาตุ๊กตไปใช้เป็นโมเดลในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของ CdCl_2 ในน้ำทิ้งซึ่งกรมโรงงานอุตสาหกรรมกำหนดให้ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 0.03 mg/L (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) นอกจากนี้การตรวจหาค่า MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดพบว่ามีข้อดี คือ ในเลือดปลาไม่มีเซลล์ชนิดอื่นปน ทำให้ง่ายต่อการตรวจหาเซลล์เม็ดเลือดแดงที่มี micronucleus และตรวจความผิดปกติของนิวเคลียส ส่วนการตรวจหาค่า MNFs จากเซลล์ชนิดอื่น ๆ ซึ่งเตรียมมาจากเนื้อเยื่อปลา จึงพบว่ามีปัญหาในการตรวจหาเซลล์ที่มี MN เพราะมีเศษเนื้อเยื่อปนอยู่ในตัวอย่างเซลล์ที่ตรวจด้วย นอกจากนี้การตรวจหาค่า MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดแดงยังเอื้อประโยชน์ในด้านการใช้ปลาตุ๊กตเป็นยามเฝ้าระวังมลพิษในแหล่งน้ำระยะยาว เช่น การทำกระชังแขวนไว้ในแหล่งน้ำที่ต้องการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรม และติดตามการเปลี่ยนแปลงของค่า MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดแดงในปลาตัวเดิมหรือปลากลุ่มเดิมตามระยะเวลาที่ต้องการศึกษาได้ เพราะวิธีเก็บตัวอย่างเลือดไม่ทำให้ปลาตาย และสามารถเปรียบเทียบผลกับค่า MNFs ของปลาตุ๊กตที่เลี้ยงในแหล่งน้ำที่ไม่ปนเปื้อนสารพิษ นอกจากนี้ยังสามารถเปรียบเทียบค่า MNFs โดยอ้างอิงเปรียบเทียบผลกับค่า MNFs ของปลาตุ๊กตที่ได้รับ CdCl_2 จากรายงานผลการทดลองนี้ได้ด้วย

การนำปลามาเป็นโมเดลในการตรวจการปนเปื้อนของสารพิษที่มีผลทำลายสารพันธุกรรมนั้นพบว่าชนิดของปลาและชนิดของเนื้อเยื่อที่ใช้ตรวจหาค่า MNFs มีความไวแตกต่างกันทำให้สามารถตรวจผลได้ในระดับความเข้มข้นของสารพิษที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำแตกต่างกันด้วย ดังที่ปรากฏในรายงานของ Ayllon และคณะ (2000) ซึ่งรายงานว่าปลา European minnow และ ปลา mollie ที่ได้รับการฉีด CdCl_2 1.7 mg/L เข้าช่องท้อง 2 ครั้ง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีค่า MNFs เท่ากับ 1.333 และ 0.166 /1,000 เซลล์ ซึ่งไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่มีค่า MNFs เท่ากับ 0.583 และ 0.187 ตามลำดับ แต่พบว่ามีความผิดปกติของนิวเคลียสแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) นอกจากนี้ยังพบว่าการเลือกชนิดของปลามีความสำคัญต่อการประเมินผลดังที่ปรากฏในรายงานของ Rodriguez-Cea และคณะ (2003) ซึ่งรายงานว่า ปลา brown trout ที่แช่ในน้ำที่มี CdCl_2 ปนเปื้อน 0.02-0.04 mg/L เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Micronucleus test หลังแช่ปลาเป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าค่า MNFs ของปลา brown trout แตกต่างจากปลาที่จับได้จากแหล่งน้ำสะอาด ส่วนค่า MNFs ของปลา minnow และปลาไหลไม่มีความแตกต่าง แสดงให้เห็นว่าปลา brown trout มีความไวในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมมากกว่าปลา minnow และปลาไหล ($P < 0.05$) Casas และคณะ (2005) พบว่าเมื่อการทดลองแช่ปลาใน CdCl_2 เข้มข้น 0.005-0.1 mg/L เป็นเวลา 21 วัน สามารถตรวจพบว่า

ค่า MNFs และ BNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยปลามีความไวต่อการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมสูงสุด คือ ปลา peppered cory เพราะสามารถตรวจค่า MNFs และ BNFs ได้สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดง เมื่อปลาได้รับ CdCl_2 0.005 mg/L ถ้าพิจารณาจากตัวเลขนี้ ปลา peppered cory มีความไวกว่าปลาคอกุย ซึ่งมีค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มควบคุมเมื่อปลาได้รับ CdCl_2 0.005 mg/L เป็นเวลา 21 วัน ส่วนปลากลุ่มที่ได้รับ CdCl_2 0.1 mg/L สามารถตรวจค่า MNFs ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก และเซลล์ตับ และตรวจค่า BNFs ได้จากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับสูงกว่ากลุ่มควบคุม จึงสรุปได้ว่าการตรวจ MNFs จากเม็ดเลือดแดงมีความไวที่สุดในปลา peppered cory ส่วนปลา Prussian carp และปลา common carp นั้นมีความไวในการใช้ตรวจพิษต่อการทำลายสารพันธุกรรมเท่ากัน โดยตรวจจากเนื้อเยื่อแตกต่างกัน คือ ตรวจค่า MNFs ได้จากเซลล์ตับของปลา Prussian carp ส่วนปลา common carp นั้นตรวจ MNFs จากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก เมื่อปลาได้รับ CdCl_2 0.01 mg/L ในกรณีที่พิจารณาจากความเข้มข้นต่ำสุดของ CdCl_2 คือ 0.005 mg/L ที่ปลา peppered cory ได้รับเป็นเวลา 21 วัน แล้วตรวจพบค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุมกับผลการทดลองนี้พบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่แช่ ปลาคอกุยเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจพบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมคือ ความเข้มข้น 0.02 mg/L ซึ่งมีค่าสูงกว่าที่พบในปลา peppered cory อย่างไรก็ตามระยะเวลาที่ปลาทั้งสองชนิดนี้ได้รับ CdCl_2 มีความเข้มข้นแตกต่างกันมาก ส่วนการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย MNFs ของปลาคอกุยที่แช่ CdCl_2 0.02 และ 0.04 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ที่พบในการทดลองนี้พบว่ามีความใกล้เคียงกับ 10.30 $\pm$ 4.36 และ 12.07 $\pm$ 3.53 ตามลำดับ กับปลาชนิดอื่นพบว่าค่า MNFs ของปลา brown trout ที่แช่ CdCl_2 ที่ความเข้มข้น 0.02 และ 0.04 mg/L เป็นเวลา 72 ชั่วโมง มีค่าเฉลี่ย MNFs เท่ากับ 1.83 $\pm$ 0.98 และ 1.50 $\pm$ 1.05 ตามลำดับ (Rodriguez-Cea และคณะ, 2003) ดังนั้นเมื่อเปรียบเทียบความไวของปลาคอกุยในการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl_2 ด้วยเทคนิค Micronucleus test กับปลา brown trout พบว่าปลาคอกุยมีค่า MNFs สูงกว่าปลา brown trout 5.63 และ 8.05 เท่า ตามลำดับ ดังนั้นปลาคอกุยมีความไวในการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมมากกว่าปลา brown trout

2.2 ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมปลาคอกุย

จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก

จากการนำเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลาคอกุยที่ได้รับ CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค Micronucleus test และตรวจหาความผิดปกติของนิวเคลียสบางลักษณะ พบว่าปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีจำนวน MN เพิ่มขึ้น จึงมีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่ม

ควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสนั้นพบว่าค่า R^2 ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ มีค่าเท่ากับ 0.9443 และ 0.7880 ในปลากลุ่มที่ได้รับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และพบว่าความผิดปกติของนิวเคลียสที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ สูง คือค่า LNFs และ VNFs ซึ่งมีค่า R^2 เท่ากับ 0.8235 และ 0.8324 ในปลาที่ได้รับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และมีค่า R^2 เท่ากับ 0.9508 และ 0.9347 ในปลาที่ได้รับ $CdCl_2$ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ดังนั้นลักษณะความผิดปกติของนิวเคลียส คือ lobed และ vacuolated nucleus เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเสียหายของ $CdCl_2$ ได้ดี แต่ความผิดปกติดังกล่าวยังไม่มีรายงานถึงความสัมพันธ์กับ DNA damage ดังนั้นผลการทดลองนี้จึงชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ปลาคุยกูยตรวจความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ในน้ำที่มีความเข้มข้นสูงในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมได้ โดยใช้เทคนิค Micronucleus test จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก นอกจากนี้ยังพบว่า MNFs, LNFs และ VNFs สูงขึ้นเมื่อปลาได้รับ $CdCl_2$ เพิ่มขึ้น ดังนั้นความถี่ของความผิดปกติดังกล่าวยังบ่งชี้ความรุนแรงของพิษที่ปลาได้รับอีกด้วย

จากผลการตรวจค่า MNFs จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกและจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาคุยกูยซึ่งพบในการทดลองนี้ พบว่าเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้มีความไวในการตรวจความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ที่มีพิษทำลายสารพันธุกรรมเท่ากัน คือ ที่ความเข้มข้นไม่น้อยกว่า 0.02 mg/L หลังจากแช่ปลาในน้ำที่เป็นพิษ $CdCl_2$ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แต่เมื่อเปรียบเทียบความไวจากจำนวน micronucleus ที่ตรวจพบในเซลล์ พบว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมีความไวกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง เพราะทุกความเข้มข้นของ $CdCl_2$ คือ 0.01-0.05 mg/L ตรวจพบค่า MNFs จากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกสูงกว่าจากเซลล์เม็ดเลือดแดง และพบว่าระยะเวลาที่แช่ปลาใน $CdCl_2$ คือ 24 และ 48 ชั่วโมง ไม่มีผลชักนำให้เกิด micronucleus แตกต่างกัน ดังนั้นค่า MNFs จึงไม่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ปลาได้รับ $CdCl_2$ 24 และ 48 ชั่วโมง จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าสามารถใช้ปลาคุยกูยตรวจความเป็นพิษของ $CdCl_2$ ในน้ำที่มีความเข้มข้นในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Micronucleus test โดยตรวจจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกหรือเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่ากัน คือ ตรวจพบค่า MNFs แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อความเข้มข้นของ $CdCl_2$ ไม่น้อยกว่า 0.02 mg/L โดยข้อดีของการตรวจจากเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก คือ ตรวจพบจำนวน micronucleus มาก แต่ใช้เวลาเตรียมสไลด์มากกว่าการตรวจจากเลือด และพบเศษเนื้อเยื่อปนกับตัวอย่างเซลล์ที่ตรวจ จึงสังเกตผลยากกว่าการตรวจจากเลือด นอกจากนี้ยังมีข้อจำกัด คือ ไม่สามารถตรวจผลการเปลี่ยนแปลงของจำนวน micronucleus ได้ต่อเนื่อง เพราะการนำเหงือกออกมาเตรียมเซลล์เยื่อบุผิวทำให้ปลาตาย จากรายงานการศึกษาการสะสมของแคดเมียมในเนื้อเยื่อของปลาคูดาน หลังจากแช่ใน $CdCl_2$ 7 mg/L เป็นเวลา 60 วัน พบว่ามีการสะสมของแคดเมียมมากตามลำดับ คือ พบที่เหงือกมากกว่าตรวจพบที่ไต ตับ ผิวหนังและกล้ามเนื้อตามลำดับ คือ มีค่าเฉลี่ยของ $CdCl_2$ เท่ากับ 0.98 ± 0.03 , 0.81 ± 0.01 , 0.77 ± 0.01 , 0.31 ± 0.01 และ 0.04 ± 0.00 mg/L

ตามลำดับ ซึ่งสูงกว่าที่พบในกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) Jayakumar และคณะ (2006) รายงานนี้ชี้ให้เห็นว่าเหงือกเป็นอวัยวะที่มีแคดเมียมสะสมอยู่มากที่สุด ดังนั้นการที่ตรวจพบ micronucleus ในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมากกว่าเซลล์เม็ดเลือดนั้น อาจเป็นเพราะเหงือกเป็นอวัยวะที่สะสมแคดเมียมสูงจึงทำลายสารพันธุกรรมในเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกมากกว่าในเซลล์เม็ดเลือดของปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้นเท่ากัน ซึ่งผลการศึกษาที่สอดคล้องกับรายงานของ Kalay และ Canli (2000) ที่ศึกษาการกำจัดโลหะออกจากเนื้อเยื่อของปลานิล (*T. zilli*) ที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 1.0 mg/L เป็นเวลา 10 วัน แล้วนำไปเลี้ยงต่อน้ำสะอาด เพื่อศึกษาการกำจัดแคดเมียมออกจากเนื้อเยื่อต่างๆ จนครบ 30 วัน พบว่าหลังจากแช่ปลาใน CdCl_2 เป็นเวลา 10 วัน ตรวจพบแคดเมียมสะสมในเนื้อเยื่อเหงือก > ตับ > กล้ามเนื้อ > และสมอง ตามลำดับ และเมื่อนำมาแช่ในน้ำสะอาดเพื่อให้กำจัดแคดเมียมออก พบว่ามีการกำจัดแคดเมียมออกทางเหงือกได้ตั้งแต่วันแรกและลดลงอย่างรวดเร็ว โดยพบว่าปริมาณแคดเมียมในเหงือกลดลง 21.5 เท่า ภายในเวลา 30 วัน ($P < 0.001$) ส่วนในเนื้อเยื่อตับและกล้ามเนื้อ และสมอง ไม่พบว่าการกำจัดแคดเมียมออกจากเนื้อเยื่อ จึงตรวจพบแคดเมียมตกค้างในเนื้อเยื่อจำนวนมาก และยังพบมีการสะสมแคดเมียมในสมองเพิ่มขึ้นในวันแรกของช่วงที่ให้ปลากำจัดแคดเมียมด้วย

2.3 ผลการตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 ต่อสารพันธุกรรมปลาอุกจากเซลล์ตับ

จากการนำเซลล์ตับของปลาอุกที่ได้รับ CdCl_2 ความเข้มข้น 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มาตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม พบว่าปลาที่ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นไม่พบค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม โดยกลุ่มที่มีค่า MNFs ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม คือ ปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.04 mg/L ($P < 0.05$) ส่วนปลาที่ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นั้นพบว่าปลาที่ได้รับ CdCl_2 เข้มข้น 0.02-0.05 mg/L มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนความผิดปกติของนิวเคลียสนั้นพบว่าค่า R^2 ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับ MNFs มีค่า R^2 สูงที่สุด คือ 0.0407 และ 0.9325 ในปลากลุ่มที่ได้รับแคดเมียมเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ และมีค่า R^2 ระหว่างความเข้มข้นของ CdCl_2 กับ LNFS, VNFS และ BNFS เท่ากับ 0.8060, 0.8991 และ 0.7834 ตามลำดับ เมื่อปลาได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าไม่สามารถตรวจความเป็นพิษของ CdCl_2 จากการตรวจค่า MNFs จากเซลล์ตับของปลาที่ได้รับ CdCl_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ปลาที่ได้รับ CdCl_2 0.01-0.05 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่ามีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) ดังนั้นการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากการตรวจค่า MNFs จากเซลล์ตับจึงมีข้อจำกัด และพบว่าจำนวน MN ที่ตรวจพบในเซลล์ตับมีน้อยกว่าที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดและเซลล์เยื่อบุข้างแก้มในปลาที่แช่ CdCl_2 ทุกความ

เข้มข้น จึงชี้ให้เห็นว่าเซลล์ตับถูกทำลายสารพันธุกรรมน้อยกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกของปลาที่ได้รับ CdCl_2 ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jayakumar และคณะ (2006) ที่พบว่าการสะสมของแคดเมียมที่เนื้อเยื่อของปลาคูด้านในเหงือกสูงกว่าในตับ หลังจากแช่ปลาคูด้านใน CdCl_2 เข้มข้น 7 mg/L เป็นเวลา 60 วัน จึงน่าจะเป็นอธิบายถึงการตรวจพบว่าเซลล์ตับมีจำนวน micronucleus น้อยกว่าเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก

การสะสมของแคดเมียมในปลาไปชักนำให้มีการสร้างโปรตีน metallothionein (MT) เพิ่มขึ้น (Fatur และคณะ, 2002) ซึ่งโปรตีนชนิดนี้พบมากที่สุดและโต เมื่อแคดเมียมเข้าสู่เซลล์ตับแล้วจะไปจับกับโปรตีน MT ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความสำคัญต่อการขจัดพิษโลหะหนักโดยเฉพาะ Cd (Yu, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของสุวิมล (2003) ศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันและความเป็นพิษแบบเรื้อรังของ CdCl_2 ต่อปลาตะเพียนขาววัยอ่อนในระยะเวลา 96 ชั่วโมงและ 3 เดือน ด้วยการตรวจวัดระดับการแสดงออกของยีน MTmRNA พบว่า จากการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ CdCl_2 ต่อปลาตะเพียนขาว มีค่า LC_{50} ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 3.81, 3.41, 3.23, และ 2.88 mg/L ตามลำดับ และพบว่าในตับและไตมีการแสดงออกของยีน MTmRNA มากที่สุดระหว่างวันที่ 28-35 และในระหว่างวันที่ 63-84 พบการแสดงออกของยีน MTmRNA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งการแสดงออกของยีน MTmRNA ซึ่งควบคุมการสร้างโปรตีน MT เพิ่มขึ้นจึงมีความสำคัญสำหรับการยึดจับแคดเมียมที่สะสมมากขึ้นในเซลล์ตับและไต การควบคุมโลหะเกี่ยวข้องกับขั้นตอน signal transducer ในการควบคุมการนำเข้าและขั้นตอนการลดความเป็นพิษ การควบคุมด้วย MT เป็นการตอบสนองของเซลล์ต่อความเข้มข้นของโลหะภายในเซลล์ ซึ่งการควบคุมอาจเกิดขึ้นที่ระดับ transcription, translation หรือที่ระดับการทำงานของเอนไซม์ สำหรับปลาน้ำจืดนั้น เมื่อแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายผ่านทางเหงือก แคดเมียมจะจับกับ albumin และเซลล์เม็ดเลือดแดงและถูกขนส่งไปยังเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ เมื่อแคดเมียมจับกับ MT ที่สังเคราะห์ขึ้นจากยีน MTmRNA ในตัวปลา ซึ่งทำให้แคดเมียมไม่ถูกขับออกจากเซลล์ ทำให้เกิดการสะสมแคดเมียมในเนื้อเยื่อปริมาณสูงทำให้เกิดโรคได้

จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่าเทคนิค Micronucleus assay สามารถนำมาใช้ตรวจความเป็นพิษในระดับสารพันธุกรรมของ CdCl_2 ได้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการตรวจจากเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือก ซึ่งมีข้อดีและข้อด้อยแตกต่างกัน ส่วนการตรวจจากเซลล์ตับนั้นมีข้อจำกัดในการใช้งาน

3. ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาต่อสารพันธุกรรมของปลา คูกอยและผลของแสงแดดต่อการเสื่อมฤทธิ์ของสารสกัดสะเดา

จากการทดสอบความเป็นพิษของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา เข้มข้น 0.5-1.1 mg/L ต่อปลาคูกอย เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้นตั้งแต่ 0.6 และ 0.7 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง มีความความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเมื่อตรวจจาก เซลล์เม็ดเลือดแดง ซึ่งตรวจได้จากค่า MNFs ที่พบสูงกว่ากลุ่มควบคุมตามลำดับ ($P < 0.05$) จึงสามารถใช้เทคนิค Micronucleus test ตรวจหาความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากปลาได้รับ สารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา และเมื่อวิเคราะห์ ความสัมพันธ์ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดา พบว่ามีค่า R^2 ต่ำกว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ $CdCl_2$ จึงชี้ให้เห็นว่าสารสกัดสะเดามี ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมน้อยกว่า $CdCl_2$ นอกจากนี้ยังพบว่าในปลากลุ่มที่แช่ในสารสกัด สะเดาที่มี Azadirachtin เข้มข้น 0.6 mg/L ที่นำไปฝังแดด มีค่า MNFs ลดต่ำลงแตกต่างจากกลุ่ม ควบคุม ($P < 0.05$) ส่วนกลุ่มที่แช่สารสกัดที่ไม่ฝังแดด มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม แสดงให้เห็น ว่าการนำสารสกัดสะเดาไปฝังแดดเป็นเวลา 7 วันมีผลให้สาร Azadirachtin เสื่อมฤทธิ์ลง สอดคล้อง กับรายงานของ Barnby (1990) ที่พบว่า Azadirachtin ย่อยสลายได้ด้วยแสง (photodegradation) โดยมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) บนใบไม้และในดิน มีค่าไม่เกิน 17 ชั่วโมง และ 25 วัน ตามลำดับ นอกจากนี้ Guerrini และ Kriticos (1998) พบว่า Azadirachtin จะถูกย่อยสลายอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับ แสง ความร้อนและความชื้น การใช้งานจึงควรใช้ตามข้อแนะนำของผู้ผลิต คณิตส์ และคณะ (2005) รายงานการทดสอบสารสกัดสะเดาโดยใช้สารสกัดสะเดาไทย 111 กับเซลล์ L929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ค่า LC_{50} ของสารสกัดสะเดา มีค่าเท่ากับ 0.21 และ 0.23 μM เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Trypan Blue exclusion และ MTT assay ตามลำดับ และสารสกัดสะเดาเข้มข้น 0.15 และ 2.0 μM สามารถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้น เมื่อตรวจด้วยเทคนิค Micronucleus test เมื่อพิจารณาจากความ เข้มข้นของสาร Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาที่มีรายงานว่าทำให้เกิด DNA damage กับความ เข้มข้นของ Azadirachtin ในสารสกัดสะเดาที่ตรวจพบว่ามีพิษต่อสารพันธุกรรมของปลาคูกอยใน การทดลองนี้ คือ ความเข้มข้น 0.6 mg/L พบว่าเทคนิค Micronucleus test สามารถนำไปใช้ตรวจ ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลาคูกอยในแหล่งน้ำได้ เพราะมีความไวในการตรวจมากกว่า ความเข้มข้นที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำให้เกษตรกรเตรียม สะเดาไทย 111 เพื่อใช้งาน คือ ผสมสารสกัด ในอัตรา 25 ml ต่อน้ำ 20 ลิตร ซึ่งมีสาร Azadirachtin เข้มข้น 0.9 mg/L นอกจากนี้ในสภาพการใช้ สารสกัดสะเดาเพื่อป้องกันแมลงศัตรูพืชนั้นสารสกัดสะเดาที่ตกลงสู่แหล่งน้ำยังถูกเจือจางลง ซึ่ง Thompson และคณะ (2004) พบว่าสารสกัดสะเดาเมื่อดตกลงสู่แหล่งน้ำจะตรวจพบว่ามีปริมาณลดลง

ในน้ำ 50 % ตามระยะเวลา คือ 24, 45 และ 50 วัน แต่พบว่าการสะสมในตะกอนดินช้าๆ ส่วนการตกค้างของสารสกัดสะเดาในสิ่งแวดล้อมอื่น ๆ เช่น ตกค้างบนพืชและดินยังเมื่อได้รับแสงแดดจะมีผลทำให้สารสกัดสะเดาเสื่อมฤทธิ์ลงด้วย สารสกัดซึ่งมีรายงานผลของแสงแดดต่อการเสื่อมฤทธิ์ของ Azadirachtin ซึ่งสอดคล้องกับผลการวิจัยนี้ สารสกัดสะเดาเป็นสารที่องค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา อนุญาตให้ใช้ในการทำเกษตรอินทรีย์ อย่างไรก็ตามการใช้สารสกัดสะเดานับเป็นสารกำจัดแมลงที่มีความปลอดภัยและอนุญาตให้ใช้ในการทำเกษตรอินทรีย์โดยองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา เพราะถือว่าเป็น biopesticide ที่มีความปลอดภัยเนื่องจากสลายตัวได้ง่าย ดังนั้นถึงแม้สารสกัดสะเดาจะค่อนข้างมีความปลอดภัยแต่เพื่อป้องกันการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม ควรใช้อย่างระมัดระวังและควรกักเก็บน้ำในร่องสวนซึ่งเป็นที่สะสมของสารสกัดสะเดาไว้ระยะหนึ่งเพื่อรอให้สารสกัดสะเดาเสื่อมพิษลง จึงสามารถปล่อยน้ำลงสู่แม่น้ำและคูคลองได้

4. ผลการทดลองใช้เทคนิค Comet assay ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ CdCl₂ และสารสกัดสะเดา

จากการทดลองใช้เทคนิค Comet assay ตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาดุกอุย โดยแช่ปลาเป็นเวลา 24 ชั่วโมงใน CdCl₂ 0.03 และ 0.05 mg/L และสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin ก่อนและหลังนำไปผึ่งแดดเป็นเวลา 7 วัน และวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay และวัด parameter 9 ค่า พบว่าค่าเฉลี่ยของ tail length สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ความเสียหายต่อสารพันธุกรรมของปลาดุกอุยที่แช่ CdCl₂ และสารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin ก่อนและหลังนำไปผึ่งแดดได้ ผลคือมีค่าเฉลี่ยความยาว tail length สูงกว่ากลุ่มควบคุม ($P < 0.05$) แสดงว่าสารที่ทดสอบทำให้ดีเอ็นเอหักเป็นชิ้นหลายขนาด เมื่อแยกดีเอ็นเอด้วยกระแสไฟฟ้า ดีเอ็นเอที่มีขนาดเล็กจึงเคลื่อนที่ไปเป็นระยะทางไกลกว่าดีเอ็นเอขนาดใหญ่ นอกจากนี้ยังพบว่าปลากลุ่มที่แช่สารสกัดสะเดาที่มี Azadirachtin 0.6 mg/L ที่นำไปผึ่งแดดนาน 7 วันและไม่ผึ่งแดด เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบค่าเฉลี่ย [%] tail DNA, tail length, tail moment, olive moment และ tail area สูงกว่าปลากลุ่มที่แช่ CdCl₂ 0.03 และ 0.05 mg/L อย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.05$) ผลการทดลองนี้สอดคล้องกับรายงานของ Gabbianelli (2006) ได้รายงานว่า ค่าเฉลี่ยของ tail length, tail moment และ tail intensity ในหอยสองฝา (*Scapharca inaequivalis*) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($P < 0.05$)

เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษของสารเคมีต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต คือ หอย (Villela, 2006) ปลา (Buschini, 2004; Frenzilli, 2004; Russo, 2004) เซลล์เพาะเลี้ยง ได้แก่ HepG2 (Valentin-Severin, 2003; An, 2006; Lankoff, 2006)

อย่างไรก็ตามการทดลองนี้เป็นการทดลองเบื้องต้นกับปลากลุ่มละ 5 ตัว จึงควรมีการทดลองเพิ่มจำนวนปลาต่อกลุ่มและใช้สารทดสอบอย่างน้อย 5 ความเข้มข้นจึงจะสามารถเปรียบเทียบและสรุปผลได้อย่างมีประสิทธิภาพ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

บรรณานุกรม

ภาษาไทย

กรมควบคุมมลพิษ, กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. แคดเมียม. กรุงเทพฯ :

บริษัท อินทรีเกรต โปรโมชัน เทคโนโลยี จำกัด, 2541.

กรมประมง, กระทรวงเกษตรและสหกรณ์. การเพาะเลี้ยงปลาอุกบึกอุย. [Online], Accessed 7 January

2007. Available from http://web.oae.go.th/e_book/animal/dookfish.pdf

กรมวิชาการเกษตร. “สะเดา กำจัดศัตรูพืช.” วารสารโครงการหลวง. 5, 207 (มีนาคม-เมษายน 2545): 30-31.

ขวัญชัย สมบัติศิริ. สะเดา มิติใหม่ของการป้องกันและกำจัดแมลง. ภาควิชากีฏวิทยา

มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. 2541.

ขวัญชัย สมบัติศิริ. สารสกัดสะเดากับสิ่งแวดล้อม. [Online], Accessed 17 September 2005.

Available from <http://www.ku.ac.th/e-magazine/june47/agri/sadoe.html>

คณิตส์ เสี่ยมสุนทร. “ความเป็นพิษของสารสะเดาสกัดที่มีผลต่อสารพันธุกรรมในเซลล์เพาะเลี้ยงของหนู (L929).” 31st Congress on Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005

ชุดินัน นุ่นมัน. แคดเมียม อีกความแปดเปื้อนซ้ำซากประเทศไทย. [Online], Accessed 17

September 2005. Available from http://www.dmr.go.th/news/27_01_47_2.html

โชคชัย พรหมแพทย์. ไม้สะเดาและการใช้สารสกัดสะเดาป้องกันกำจัดแมลง. พิมพ์ครั้งที่ 2.

สำนักพิมพ์โอโร คอมมิวนิกา, มปท. 2537.

จิฎิรัตน์ สังข์ทอง. ความเป็นพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ L929, BHK21 และ HepG2 และ

เทคนิคประเมินความเป็นพิษ. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย

มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2548.

นิภา กาลศรี, พิมพ์า อุดมรัตน์และชัยศิริ ศิริกุล. การอนุบาลปลาดุกอยู่ในกระชัง. [Online],

Accessed 21 March 2007. Available from

<http://www.fisheries.go.th/cf-chan/Paper/seminar/seminar-dof-46/fish-fresh/019-ff.pdf>

มันทนา มิลล์. “การไปประชุมที่ World Neem Conference ที่แวนคูเวอร์.” ข่าวสารวัดภูมิพิศ

26, 3 (ก.ค.-ก.ย. 2542): 117-124.

วินัย ปิทยานต์ และคณะ. “การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีบางชนิดจากเมล็ดสะเดาเทียมและผล

ของสารสกัดต่อหนอนใยผัก.” ข่าวสารวัดภูมิพิศ 26, 3 (ก.ค.-ก.ย. 2542): 88-99.

วลัยเงิน มหาคุณ และพิมพ์หทัย วิจิตรนาวัน. “เกษตรอินทรีย์ : ทางเลือกใหม่ของเกษตรกรไทย.”

สารวิจัยธุรกิจ. 8, 27 (พฤษภาคม 2547). [Online], Accessed 3 November 2005.

Available from <http://www.scb.co.th/LIB/th/article/ktb/data/k8-27.html>

ศรัญญา เหล่าวิทยางค์กุล. ผลกระทบของระดับแคดเมียมต่อโครงสร้างโครโมโซมของปลาช่อน

Ophicephalus striatus. วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2549.

สะเดา. [Online], Accessed 17 November 2005. Available from

<http://www.ipmthailand.org/th/Components/neem.htm>

สะเดา. [Online], Accessed 17 November 2005. Available from

http://www.panmai.com/Pvtree/tr_75.htm

สะเดา. [Online], Accessed 24 March 2007. Available from

<http://www.forest.go.th/Private/sadao1.htm>

สุภาพร สุกสีเหลือง. มินวิทยา (Ichthyology). 1999.

สุภาวดี ศิริวัฒนานนท์ และ สุจรรยา หมวดคารักษ์. สารพิษจากโลหะหนัก (Toxicity from

Heavy metal). ภาควิชาเทคโนโลยี คณะเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยมหาสารคาม, 2546.

แสงโสม เกิดคล้าย และ เจวดสร นามวาท. สถานการณ์ผู้ได้รับผลกระทบจากสารแคดเมียม
อแม่สอด จ.ตาก. สำนักกระบวนวิทยากรมควบคุมโรค. [Online], Accessed 10 January

2005. Available from

http://epid.moph.go.th/weekly/WESR47/Group3/Group_3_2.html.

สุพจน์ ชัยวิมล. เกษตรอินทรีย์. สำนักพัฒนาคุณภาพสินค้าเกษตร. [Online]. Accessed 2

November 2005. Available from

<http://www.doae.go.th/library/html/detail/nsfng/indexh.htm>

สุวิมล อุทาร์พงศา. ผลกระทบของแคดเมียมต่อ metallothionein mRNA ในปลาตะเพียนขาว

วิทยานิพนธ์มหาบัณฑิต, บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยมหิดล, 2546.

อุดรรัตน์ บุญรักษา, อรทัย อร่ามพวงพันธ์ และ ลักษณา หิมะคุณ. “การปนเปื้อนโลหะ

แคดเมียมในปลาดุกจากตลาดในกรุงเทพมหานคร.” 31st Congress on Science and

Technology of Thailand at Suranaree University of Technology, 18 – 20 October 2005

ภาษาต่างประเทศ

Abou-Eisha, A. "Evaluation of cytogenetic and DNA damage induced by the antibacterial drug, trimethoprim." Toxicology in Vitro. 20 (2006): 601-607.

Akudugu, J., Gade, G. and Bohm, L. "Cytotoxicity of azadirachtin A in human glioblastoma cell line." Life Sciences. 68 (2001): 1153-1160.

Almeida, J.A., Diniz, Y.S., Marques, S.F.G., Faine, L.A., Ribas, B.O., Burneiko, R.C. and Novelli, E.L.B. "The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination." Enviromental International 27 (2002): 673-679.

An, Yu., Jiang, L., Cao, J., Geng, C. and Zhong, L. "Sudan I induced genotoxic effects and oxidative DNA damage in HepG2 cells." Mutation Research. 627 (2007): 164-170.

Anderson, B., Nicely, P., Gilbert, K., Kosaka, R., Hunt, J. and Philips, B. Overview of freshwater and marine toxicity tests. Office of Environmental Health Hazard

Assessment Reproductive and Cancer Hazard Assessment section Ecotoxicology Unit, California Environmental Protection Agency; 2004.

Andrade, V.M., Freitas, T.R. and Silva, J. "Comet assay using mullet (*Mugil sp.*) and sea catfish (*Netuma sp.*) erythrocytes for detection of genotoxic pollutants in aquatic enviroment." Mutation Research. 560 (2004): 57-67.

Arkhipchuk, V.V. and Garanko, N.N. "Using the nucleolar biomarker and the micronucleus test on in vivo fish fin cells." Ecotoxicology and Environmental Safety. 62 (2005): 42-52

Ateep, B., Abul farah, M., Niamat Ali, M. and Ahmad, Waseem. "Induction of micronuclei and erythcyte alterations in the catfish *Clarias batrachus* by 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and butachlor." Mutation Research. 518 (2002) : 135-144.

Ayllon, F. and Garcir-Vanquez, F. "Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow (*Phoxinus phoxinus*) and mollie (*Poecilia latipinna*) : an assessment of the fish in micronucleus test." Mutation Research. 467 (2000):177-186.

Ballantyne, Bryan. Perspective in basic and applied Toxicology. Wright, USA. 1988.

- Barnby, M.A. and Klocke, J.A. "Effects of azadirachtin on levels of ecdysteroids and prothoracicotropic hormone-like activity in *Heliothis virescens* (Fabr.) larvae." *Journal of Insect Physiology*. 36, 2 (1990): 125-131.
- Bandyopadhyay, U., Biswas, K., Sengupta, A., Moitra, P., Dutta, P., Sarkar, D., Debnath, P., Ganguly, C.K. and Banerjee, R.K. "Clinical studies on the effect of Neem (*Azadirachta indica*) bark extract on gastric secretion and gastroduodenal ulcer." *Life Sciences*. 75 (2004): 2867-2878.
- Baral, R. and Chattopadhyay, U. "Neem azadirachtin indica leaf mediated immune activation cause prophylactic growth inhibition of murine Ehrlich carcinoma and B16 melanoma." *International Immunopharmacology*. 4 (2004): 355-366.
- Barsiene, J., Dedonyte, V., Rybakovas, A., Andreikenai, L. and Anderson, O.K. "Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil." *Aquatic Toxicology*. 78S (2006): S99-S104.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I., Banerjee, R.K. And Bandyopadhyay, U. "Biological activities and medicinal properties of neem (*Azadirachta indica*)." *Current Science*. 82, 11 (2002): 1336-1345.
- Boeke, S., Boersma, M.G., Alink, G.M., Loon, J.J.A., Huis, A., Dicke, M. and Rietjens, I.M.C.M. "Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides." *Journal of Ethnopharmacology*. 94 (2004): 25-41.
- Bolognesi, C., Perrone, E., Roggieri, P., Pampanin, D.M. and Sciutto, A. "Assessment of micronuclei induction in peripheral erythrocytes of fish exposed to xenobiotics under controlled conditions." *Aquatic Toxicology*. 78S (2006): S93-S98.
- Brent, J., Wallace, K., Burkhart, K.K., Phillips, S.D. and Donovan, J.W. Critical care toxicology diagnosis and management of the critically poisoned patient. Mosby, Inc., USA. 2005.
- Buschini, A., Martino, A., Gastavino, B., Monfrinotti, M., Poli, P., Rossi, C., Santoro, M., Dorr, A.J.M. And Rizzoni, M. "Comet assay and micronucleus test in circulating erythrocytes of *Cyprinus carpio* specimens exposed in situ lake water treated with disinfectants for potabilization." *Mutation Research*. 557 (2004): 119-129.

Cadmium. [Online]. Accessed 2 November 2005. Available from

<http://www.cadmium.org/introduction.html>

Carrasso, K.R., Tibury, K.L. and Myers, M.S. "Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects."

Canadian Journal Fisheries Aquatic Science. 47 (1990): 2123-2136.

Castano, A., Carbonell, G., Carbonell, M., Fernandez, C., Boleas, S. and Tarazona, J.V.

Sublethal effects of repeated intraperitoneal cadmium injections on Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ecotoxicology and Environmental Safety. 41 (1998) : 29-35.

Chandra, P. and Khuda-Bukhsh, A.R. "Genotoxic effects of cadmium chloride and

azadirachtin treated singly and in combination in fish." Ecotoxicology and

Environmental Safety. 58 (2004): 194-201.

Cavas, T. and Ergene-Gozukara, S. "Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in

Oreochromis niloticus following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents." Aquatic Toxicology. 74 (2005): 264-271.

Cavas, T. and Ergene-Gozukara, S. "Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalothrin

using nuclear and nucleolar biomarker on fish cell." Mutation Research.

534 (2003): 264-271.

Cavas, T. and Ergene-Gozukara, S. "Micronucleus test in fish cells: a bioassay for in situ

monitoring of genotoxic in the marine environment." Environ Mo Mutagen.

46, 1 (2005): 64-70.

Cavas, T., Garanko, N.N. and Arkhipchuk, V.V. "Induction of micronuclei and binuclei in

blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride

and copper sulphate." Food and Chemical Toxicology. 43 (2005): 569-574.

Celik, M., Donbak, L., Unal, F., Yuzlasioglu, D., Aknoy, H. and Yilmaz, S. "Cytogenetic damage

in worker from a coal-fired power plant." Mutation Research. 627 (2007): 158-163.

Celik, U. and Oehlenschlaeger, J. "High contents of cadmium, lead, zinc and copper in popular

fishery products sold in Turkish supermarkets." Food Control. 18 (2007): 258-261.

Cicik, B. and Engin, K. "The effects of cadmium on level of glucose in serum and glycogen reserved in the liver and muscle tissues of *Cyprinus carpio* (L., 1758)."

Research Article. 29 (2005): 113-117.

Chandra, P. and Kruda-Buksh, A.R. "Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish." Ecotoxicology and Enviromental Safety. 58 (2004): 194-201.

Collins, A.R. "The comet assay for DNA damage and repair : principles, applications and limitations." Molecular Biotechnology. 26 (2004): 249 – 251.

Comet assay interest group. [Online]. Accessed 2 November 2005. Available from <http://cometassay.com/>

Comet assay Cancer research. [Online]. Accessed 2 November 2005.

Available from http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest

[/Life_Science/Cancer_Research/Key_Resources/Comet_Assay.html](http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Cancer_Research/Key_Resources/Comet_Assay.html)

The comet assay. [Online]. Accessed 15 September 2006. Available from

<http://www.genpharmtox.com/downloads/AssaySheetsCometAssay.pdf>

Comet assay and comet-Fish. [Online]. Accessed 15 September 2006. Available from

http://www.imb-jena.de/www_kog/research/dnadamage/comet.html

Compound . [Online]. Accessed 17 November 2005. Available from

http://www.genome.jp/dbget-bin/www_bget?cpd+C08748

Cooper, C.A., Handy, R.D. and Bury, N.R. "The effects of dietary iron concentration on gastrointestinal and branchial assimilation of both iron and cadmium in zebrafish (*Danio rerio*)."

Aquatic Toxicology. 79 (2006): 167-175.

Dart, R.C. Medical Toxicology. Lippicott Williams & Wilkins, USA. 2004.

Dhawan, Alok., Bajpayee, Mahima. and Pendy, A.K. "Protocol for the single cell gel electrophoresis/comet assay for rapid genotoxicity assessment."

ITRC: THE SCGE/ COMET ASSAY PROTOCOL. India.

Environmental Protection Agency (EPA), USA.. "Robust Summaries & Test Plans: Crude Butadiene C4 Response to Comments." [Online], Accessed 2 November 2005.

Available from <http://www.epa.gov/chemrtk/olefins/acc12840.htm>

- Fatur, T., Tusek, M., Falnoga, I., Scancar, J., Lah, T.T., and Filipic, M. "DNA damage and metallothionine synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium." Food and Chemical Toxicology. 40 (2002): 1069-1076.
- Farah, M.A., Ateep, B. and Ahmad, W. "Antimutagenic effect of neem leave extract in freshwater fish, *Channa punctatus* evaluated by cytogenetic tests." Science of the Total Environmental. XX (2005): XXX-XXX
- Fenech, M. "In vitro micronucleus technique." Mutation Research. 435 (2000): 81-95.
- Fenech, M. "Cytokinesis-block micronucleus assay involves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death." Mutation Research. 600 (2006): 58-66.
- Fotakis, G., Cemeli, E., Anderson, D. and Timbrell, J.A. "Cadmium chloride-induced DNA and lysosomal damage in a hepatoma cell line." Toxicology in Vitro. 19 (2005) : 481-489.
- Fourie, F., Reinecke, S.A. and Reinecke, A.J. "The determination of earthworm species sensitivity differences to cadmium genotoxicity using the comet assay." Ecotoxicology and Environmental Safety. XXX (2006): XXX-XXX.
- Frenzilli, G., Scarcelli, V., Bargar, I.D., Nigro, M., Folin, L., Bolognesi, C. and Sturve, J. "DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour." Mutation Research. 552 (2004): 187-195.
- Gabbianelli, R., Moretti, M., Carpena, E. and Falcioni, G. "Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalis*) erythrocytes assessed by the comet assay." Science of the Total Environment. XX (2006): XXX – XXX.
- Grisolia, C.K. "A comparison between mouse and fish micronucleus test using cyclophosphamide, mitomycin C and various pesticides." Mutation Research. 518 (2002):145-150.
- Guerrini, V.H. and Kriticos, C.M. "Effects of azadiractin on *Ctenocephalides felis* in the dog and the cats." Veterinary Parasitology. 74 (1998): 289-297.
- Hamilton, R.J., Phillips, S.D. and McCluskey, G.J. Occupational, industrial and environmental toxicology. 2nd edition. Mosby, USA. 2003.
- Hartmann, A. and Pharma, N. "Genetic and Experimental Toxicology." [Online], Accessed 2 November 2005. Available from <http://www.swan.ac.uk/cget/ejgt/eemsysaw.rtf>

- Hathaway, G.L. and Nick, H. Chemical Hazard of the Workplace. John Wiley & Sons., Inc, USA. 2005.
- Helma, C. and Uhl, M. "A public domain image-analysis programe for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay." Mutation Research. 466 (2000): 9-15.
- Himakoun, L., Puchadapirom, P., Kongtim, S. and temchaioen, P. "Lack of genotoxic activity of *Curcuma comosa* extract on micronucleus formation of mouse bone marrow cells." 32nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT. 32).
- Hodgson, E. A Textbook of Modern Toxicology. John Wiley & Sons., Inc, Canada . 2004.
- Hoffmann, D.J., Rattner, B.A., Burton, G.A. and Cairns, J. Handbook of Ecotoxicology. CRC Press, Inc., USA, 1995.
- Hoffmann, H. and Speit, G. "Assessment of DNA damage in peripheral blood of heavy smokers with the comet assay and and the micronucleus test." Mutation Research. 581 (2005) : 105-1114.
- Itoh, T., Misumari, K., Kawaguchi, S. and Sasaki, Y.F. "Genotoxic potential of quinolone antimicrobials in the in vitro comet assay and micronucleus test." Mutation Research. 603 (2006): 135-144.
- Izquierdo, J.I., Machado, G., Ayllon, F., Amico, V.L., Bala, L.O., Vallarino, E., Elias, R. and Garcia-Vazquez, E. "Assessing pollution in coastal ecosystems: a preliminary survey using the micronucleus test in the mussel *Mytilus edulis*." Ecotoxicology and Environmental Safety. 55 (2003): 24-29.
- Jayakumar, P. and Paul, VI. "Patterns of cadmium accumulation in selected tissues of the catfish *Clarias batrachus* (Linn.) exposed to sublethal concentration of cadmium chloride." VETERINARSKI ARHIV. 76,2 (2006): 167-177.
- Joadquim, N. "Cadmium toxic effects on heart ventricle of halobatrachus dedactylus-chronic exposure study." 2004.
- Kadmiri, M., Glouib, K., Verschaeve, L. and Hilali, A. "Cytogenetic monitoring of domestic mammals exposed to wastewater from the localcities of Dladla and Boukallou near Settat, Morocco." Environmental International. 32 (2006): 690-696.
- Kalay, M. and Canli, M. "Elimination of essential (Cu, Zn) and non-essential (Cd, Pb) metals from tissues of a freshwater fish *Tilapia zilli*." Turky Journal Zoology. 24 (2000): 429-436.

Kaya, F.F. and Topaktas, M. "Genotoxic effects of potassium bromate on human peripheral lymphocytes in vitro." Mutation Research. 626 (2007): 48-52.

Khan, P.K., and Awasthy, K.S. "Cytogenetic toxicity of neem." Food and Chemical Toxicology. (2003): 1325-1328.

Kim, I. and Hyun, C. "Comparative evaluation of the comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms."

Ecotoxicology and Environmental Safety. 64 (2006): 288-297.

Kusuba, Vilena and Rozgaj, Ruzica. "Micronucleus distribution in human peripheral blood lymphocytes treated in vitro with cadmium chloride in G₀ and S of the cell cycle."

Chemosphere. 49 (2002): 91-95.

Kumaravel, T.S. and Jha, A.N. "Reliable comet assay measurements for detecting DNA damage induced by ionizing radiation and chemicals." Mutation Research.

XXX (2006): XXX-XXX.

Lacroix, A. and Hontela, A. "A comparative assessment of the adenotoxic effects of cadmium in teleost species, rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, and yellow perch, *Perca flavescens*." Aquatic Toxicology. 67 (2004): 13-21.

Lajmanovich, R.C., Cabagna, M., Peltzer, P.M., Stringhini, G.A., and Attademo, A.M.

"Micronucleus induction in erythrocytes of the *Hyla pulchella* tadpoles (Amphibia:

Hylidae) exposed to insecticide endosulfan." Mutation Research. 587 (2005): 67-72.

Lankoff, A., Wojcik, A., Merluoto, V. and Fessard, J. "Noduralin-induced genotoxicity

following oxidative DNA damage and aneuploidy in HepG2 cells." Toxicology.

XXX (2006): XXX-XXX

Ley, S.T. "Synthesis and chemistry of the insect antifeedant azadirachtin." Pure & Appl. Chem.

66, 10/11 (1994): 2099-2102.

Limiere, S., Cossu-Leguille, C., Bispo, A., Jourain, M.J., Lanhers, M.C., Burnel, D. and Vasseur, P.

"DNA damage measured by the single-cell gel electrophoresis (Comet) assay in

mammals fed with mussels contaminated by the 'Erika' oil-spill." Mutation Research.

581 (2005): 11-21.

LUCIA Comet Assay for single and double staining. [Online]. Accessed 25 April 2007.

Available from <http://www.lim.cz/download.php?id=16&>

Lumos, N.N., Dias, A.L., Silva-Souza, A.T. and Mantovani, M.S. "Evaluation of environmental waters using the comet assay in *Tilapia rendelli*."

Enviromental Toxicology and Pharmacology. 19 (2005): 197-201.

Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A. and Salazar, R. "Biological activity of two neem (*Azardirachta indica* A. Juss., Meliaceae) products on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera : Pyralidae) larvae." Crop protection. 39 (2002): 107-112.

Massaro, E.J. Handbook of Human Toxicology. CRC Press LLC, USA. 1999.

Matsumoto, S.T., Mantovani, M.S., Malaguttii, M.I., Dias, A.L., Fonseca, I.C. and Marin-morales, M.A. "Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips."

Genetics and Molecular Biology. 29,1 (2006): 148-158

The micronucleus test. [Online]. Accessed 2 November 2005. Available from

http://www.litronlabs.com/test_micronucleus.asp

Micronucleus test. [Online]. Accessed 2 November 2005. Available from

<http://we.vub.ac.be/~cege/ENG/tests/MN.htm>

Mouron, S.A., Golijow, C.D. and Dulout, F.N. "DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay." Mutation Research. 498 (2001): 47-55.

Nathan, S.S., Choi, M.Y., Paik, C.H., Kim, J.D. and Kang, S.M. "The toxic effects neem extract and azadirachtin on the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* (stal) (BPH) (Hemoptera: Delphacidea)." Chemosphere. 67 (2007): 80-88.

NEEM (Azadirachta indica). [Online]. Accessed 17 November 2005. Available from

<http://www.neemproduct.com/>

Mienelt, T., Playle, R.C., Piertrock, M., Burnison, B.K., Wienke, A. and Steinberg, G.E.W. "Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of the zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances." Aquatic Toxicology. 54 (2001): 205-215.

The Neem tree. [Online]. Accessed 17 November 2005. Available from

http://www.mhhe.com/biosci/pae/botany/botany_map/articles/article_33.html

Nepomuceno, J.C., Ferrari, I. Spano, M.A. and Centeno, A.J. "Detection of micronuclei in peripheral erythrocytes of *Cyprinus carpio* exposed to metallic mercury".

Enviromental and Molecular Mutagenesis 30 (1997): 293-297.

OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals. "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test." 1997.

OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals Drat proposal for the new guideline No. 487: In vitro micronucleus test. 2004.

Available: www.oecd.org/document/55/0,2340,en_2649_34377_2349687_1_1_1_1,00.html

Palhares, D. and Grisolia, C.K. "Comparision between the micronucleus reuqencies of kidney and gill erythrocytes in tilapia fish, following mitomycin C treatment."

Genetic and Molecular Biology. 25, 3 (2002): 281-284.

Palus, J., Rydzynski, K., Dziubaltowska, E., Wyszynska, K., Natarajan, A. and Nilsson, R.

"Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium." Mutation Research. 540 (2003): 19-28.

Pandey, S. Nagpure, N.S., Kumar, R., Sharma, S., Srivastava, S.K., Verma, M.S.

"Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis." Ecotoxicology and Environmental Safety. 65 (2006): 56-61.

Phelps, J.B., Garriott, M.L. and Hoffman, W.P. "A protocol for the in vitro micronucleus assay II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity." Mutation Research. 521 (2002): 103-112.

Raizada, R.B., Srivastava, M.K., Kaushal, R.A. and Singh, R.P. "Azadiracthin, A neem biopesticide: subchronic toxicity assessment in rats." Food and Chemical Toxicology. 39 (2001): 477-483.

Rana, S.V.S. Environmental Pollution: Health and Toxicology. Alpha Science international Ltd. Oxford, U.K. 2006.

Rank, Jette., Jensen, Klara. "Comet assay on gill cells and hemolytes from the blue mussels (*Mytilus edulis*). " Ecotoxicology and Enviromental Safety 54 (2003): 323-329.

- Ringonato, J., Mantovani, MS. and Jordao, BQ. "Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (mollusca) tissues for the detection of genotoxicity." Genetics and Molecular Biology. 28 (2005): 464-468.
- Rocha, N.C.C., Mavropoulos, E., Prado da Silva, M.H., Campos, R.C. and Rossi, A.M. "Studies on cadmium uptake by Hydroxyapatite." Engineering Materials. 330-332 (2007): 123-126.
- Rodriguez-Cea, A., Ayllon, F. and Garcia-Vazquez, E. "Micronucleus test in freshwater fish species : An evaluation of its sensitivity for application in field surveys." Ecotoxicology and Environmental safety. 56 (2003): 442-448.
- Salezadeh, A., Akhkha, A., Cushley, W., Adams, R.L.P., Kusel, J.R. and Strang, R.H.C. "The antimutagenic effect of the neem terpenoid azadirachtin on culture insect cells." Insect Biochemistry and Molecular Biology. 33 (2003): 681-689.
- Seoane, A.I. and Dulout, F.N. "Genotoxic ability of cadmium, Chromium and nickel salt studies by chinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay." Mutation Research. 490 (2001): 99-106.
- Schmutterer, H. The Neem Tree Azadirachta indica A. Juss. And other meliaceae plants. VCH Verlagsgesellschaft mbH, Germany. 1995
- Schonwald, Seth. Medical Toxicology : a synopsis and studied guide. Lippicott Williams & Wilkins, USA. 2001.
- Singh, R.P. and Saxena, R.C. Azadirachta indica A. Juss. Science Publishers Inc., USA. 1999.
- Souza, T.S. and Fontanetti, C.S. "Micronucleus test and observation of nuclear alterations in erythrocytes of Nile tilapia exposed to waters affected by refinery effluent." Mutation Research. 605 (2006): 87-93.
- Speit, G., Schmid, O, Frohler-Keller, M., Lang, I. and Triebig, G. "Assessment of local genotoxic effects of formaldehyde in human measured by the micronucleus test with exfoliated buccal mucosa cells." Mutation Research. 627 (2007): 129-135.
- Srivastava, M.K. and Raizada, R.B. "Lack of toxic effect of technical azadirachtin during postnatal development of rats." Food and Chemical Toxicology. 45 (2007): 465-471.
- Tarapatra, S.N. and Bannerjee, S.K. "Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and the kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farm." Food and Chemical Toxicology. XXX (2006): XXX-XXX.

- Tice, R.R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B. Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C. and Sasaki, YF. "Single cell gel/Comet assay: Guidelines for In vitro and In vivo genetic toxicology testing." Environmental and Molecular Mutagenesis. 35 (2000): 206-221.
- Tilton, S.C., Foran, C.M. and Benson, W.H. "Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese medaka (*Oryzias latipes*)." Comparative Biochemistry and Physiology Part C. 136 (2003): 265-276.
- Timbrell, J. Introduction of toxicology. McGraw-Hill, USA. 2000.
- Thompson, D.G., Chartrand, D.T. and Kreutzweiser, D.P. "Fate and effects of azadirachtin in aquatic mesocosms 1: fate in water and bottom sediments." Ecotoxicology Environmental Safety. 59 (2004): 186-193.
- Trumm, P. and Dorn, A. "Effects of azadirachtin on the regulation of midgut peristalsis by the stomatogastric nervous system in *Locusta migratoria*." Phytoparasitica. 28,1 (2000): 7-26.
- U.S. E.P.A. Short-term method for estimating the chronic toxicity of effluent and receiving water to freshwater organism. 4th Washington, DC 20460, 2002.
- U.S. E.P.A. Microbial Pesticide Test Guideline: Freshwater Fish Testing, Tier I. 1996.
- Udroiu, I. "The micronucleus test in piscine erythrocytes." Aquatic Toxicology. 79 (2006): 201-204.
- Valentin-Severin, I., Hegarat, L.L., Lhuguenot, J., Bon, A.L. and Chagnon, M. "Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assay." Mutation Research. 536 (2003): 79-90.
- Verschaeve, L. and Van Gorp, U. "The comet assay." [Online], Accessed 20 January 2006. Available from <http://www.kineticimaging.com/kidocs.comet9.pdf>
- Villela, I.V., Oliveira, I.M., Silva, J. and Henriques, J.A. "DNA damage and repair in hemolymph cells of golden mussel (*Limnoperna fortunei*) exposed to environmental contaminants." Mutation Research. 605 (2006): 78-86.
- What is comet? [Online], Accessed 2 November 2005. Available from <http://www.ebioinfogen.com/comet.htm>

Walum, E., Stenberg, K. and Jensens, D. "Understanding cell toxicology: principle and practice."

Ellis Hoorwood Limited, England. 1990.

Watjen, W., Haase, H., Biagioli, M. and Beyersmann, D. "Induction of apoptosis in mammalian cells by cadmium and zinc." Enviromental Health Perspective. 110, 15

(2002): 865-867.

Williams, P.L., James, R.C. and Robert, S.M. Principle Toxicology: Enviromental and Industrial application. John Wiley & Sons, Inc., USA. 2000.

Xu, G., Zhou, G., Zhou, T., Jin, T., Hammarstrum, S., Bergh, A. and Nordberg, G. "Apoptosis and p53 gene expression in male reproductive tissues of cadmium exposed rats."

Biometals. 12,2 (1999): 131-139.

Xuan, TD., Eiji, T., Hiroyuki, T., Mitsuhiro, M., Khanh, TD. and Chung, I. "Evaluation on phytotoxicity of neem (*Azadirachtin indica*. A. Jass) to crop and weeds."

Crop Protection. 23 (2004): 335-345.

Yilmaz, M., Gul, A. and Karakose, E. "Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*)."

Chemospere. 56 (2004): 375-380.

Yu, Ming-Ho. Enviromental Toxicology : Impacts of Enviromental Toxicants on Living

Systems. RCR Press LLC, USA. 2001.

ภาคผนวก

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ก
การเตรียมสารละลาย

1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิธี comet assay

1.1. Kenny's salt solution

- NaCl	200	mM
- KCl	9	mM
- K ₂ HPO ₄	0.7	mM
- NaHCO ₃	2	mM

1.2. PBS (phosphate buffer saline)

- NaCl	135	mM
- KCl	2.5	mM
- K ₂ HPO ₄	1.75	mM
- Na ₂ HPO ₄	8	mM

1.3. Lysing solution

- NaCl	2.5	M
- EDTA	0.1	M
- Tris	10	mM
- DMSO	10%	
- Triton X-100	1%	

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่น ปรับ pH = 7.0 ด้วย NaOH ให้ได้ pH เท่ากับ 10 ปรับปริมาตรให้ได้ 89 ml. และเก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อจะใช้ค่อยนำมาเติม Triton x-100 ปริมาตร 1 ml. และเติม DMSO ปริมาตร 10 ml. จนครบปริมาตร 1,000 ml.

1.4. Electrophoresis solution

- NaOH	10	N
- EDTA	200	mM

การเตรียม Electrophoresis buffer โดยผสม 10 N NaOH ปริมาตร 30 ml. กับ 200 mM EDTA ปริมาตร 5 ml. โดยต้องผสมในที่อุณหภูมิ 4°C ปรับให้ได้ pH เท่ากับ 13 และปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml.

1.5. 0.5% Normal melting agarose (NMA)

- Normal melting agarose	0.5	g
- ละลายใน PBS	100	ml.

1.6. 0.5% Low melting agarose (LMA)

- Low melting agarose	0.5	g
- ละลายใน PBS	100	ml.

1.7. 2 % Low melting agarose (LMA)

- Low melting agarose	2	g
- ละลายใน PBS	100	ml.

1.8. Neutralisation buffer (1 L)

- Tris Base	48.5	g
-------------	------	---

ละลายในน้ำกลั่น และปรับปริมาตรให้ครบ 800 ml. และปรับ pH ด้วย 1N HCl ให้ได้ pH เท่ากับ 7.4 แล้วปรับปริมาตรให้ครบ 1,000 ml.

1.9. Ethidium Bromide (10X)

- Ethidium Bromide	10	mg
--------------------	----	----

ละลายในน้ำกลั่นปรับปริมาตรให้ครบ 50 ml. โดยก่อนที่จะใช้ต้องเจือจางให้มีความเข้มข้น เป็น (1X) โดยดูดจาก stock (10X) ปริมาตร 1 ml. และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นให้ครบ 10 ml.

2. การเตรียมสารละลายสำหรับวิธี Micronucleus test**2.1. 20% acetic acid**

- glacial acetic acid	20	ml.
ปรับปริมาตรให้ครบ	100	ml.

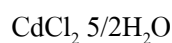
2.2. 40% acetic acid

- glacial acetic acid	40	ml.
ปรับปริมาตรให้ครบ	100	ml.

2.3. 0.075 M KCl

- KCl	5.61	g
ปรับปริมาตรให้ครบ	1,000	ml.

3. การเตรียมสารละลาย cadmium chloride



$$\text{Cd} = 112.411$$

$$\text{Cl} = 35.4527$$

$$\text{H} = 1$$

$$\text{O} = 16$$

$$\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O} = 112.411 + 2(35.4527) + 2.5(18) \text{ g/mole}$$

$$= 228.3164 \text{ g/mole}$$

1. การเตรียม stock $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ เข้มข้น 10^{-4} M ปริมาตร 50 ml.

ซึ่ง $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2 \text{H}_2\text{O}$ เท่ากับ 0.00114 g ละลายในน้ำกลั่น 50 ml.

$$\text{สารละลาย } 1,000 \text{ ml. } \text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O} = 10^{-4} \text{ mole}$$

$$\text{สารละลาย } 50 \text{ ml. } \text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O} = \frac{10^{-4} \text{ mole} \times 50 \text{ ml.}}{1,000 \text{ ml.}}$$

$$= 0.000005 \text{ mole}$$

$$\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O} \text{ 1 mole นั้น} = 228.3164 \text{ g/mole}$$

$$\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O} \text{ 0.000005 mole นั้น} = \frac{228.3164 \text{ g/mole} \times 0.000005 \text{ mole}}{1 \text{ mole}}$$

$$= 0.0011415 \text{ g}$$

ซึ่ง $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ 0.0011415 g ละลายในน้ำกลั่น 50 ml. จะได้ $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ 10^{-4} M

ตารางที่ 24 ความเข้มข้นของ $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมปลาอุย

ความเข้มข้นของ CdCl_2 (mg/L)	ความเข้มข้นของ CdCl_2 (M)	ความเข้มข้นของ CdCl_2 (mM)	ความเข้มข้นของ CdCl_2 (μM)
0.01	0.000000043	0.000043	0.043
0.02	0.000000087	0.000087	0.087
0.03	0.000000131	0.000131	0.131
0.04	0.000000175	0.000175	0.175
0.05	0.000000218	0.000218	0.218

4. การเตรียมสารละลาย Azadirachtin จากสารสกัดสะเดา

การเตรียม Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ใช้ทดสอบชื่อมาในรูปสารกำจัดแมลงเครื่องหมายการค้า สะเดาไทย 111™ รูปสารละลาย ขึ้นทะเบียนโดยกรมวิชาการเกษตร เลขทะเบียนวัตถุอันตรายเลขที่ 364/2540 ที่ผลิตและจำหน่ายโดยบริษัท ผลิตภัณฑ์สะเดาไทย จำกัด 126/2 หมู่ 3 ถนน สายสุพรรณบุรี-อ่างทอง กม. 6.5 ตำบล วังยาง อำเภอ ศรีประจันต์ จังหวัด สุพรรณบุรี (วันที่บรรจุ 17 มีนาคม 2549 วันหมดอายุ 17 กันยายน 2550) วิธีการเตรียมสารสะเดาที่ใช้ทดสอบทำดังนี้



สารสำคัญ : Azadirachtin 0.1% (w/v)

ประโยชน์ : สะเดาไทย หมายเลข 111™ เป็นสารสกัด

จากสะเดา ใช้ป้องกันและกำจัดหนอน

วิธีใช้ : ใช้ สะเดาไทย หมายเลข 111™ อัตรา

ส่วนผสม 20-25 มล. ผสมน้ำ 20 ลิตร พ่นให้ทั่วต้นพืช

ในระยะเริ่มทั้งบนใบและใต้ใบ โดยเฉพาะยอด

ติดต่อกัน 2-3 ครั้ง โดยพ่นห่างกัน 7 วันต่อครั้ง

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนวนวัฒนวิทยา

รูปที่ 23 ผลิตภัณฑ์สารสกัดสะเดาไทย 111™ (ก) และเอกสารการใช้ผลิตภัณฑ์ (ข)

1. จากความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์ Azadirachtin ตามฉลากข้างขวดที่ผู้ผลิตขึ้นทะเบียนไว้กับกรมวิชาการเกษตร คือ 0.1% (w/v) และข้อมูลน้ำหนักโมเลกุลของ azadirachtin ที่มีผู้ได้รายงานไว้คือ 720.7 g/mole (Bilton และคณะ, 1987; Krause, 1987; Turner และคณะ, 1987)

2. คำนวณความเข้มข้นของ azadirachtin จากสารสกัดสะเดา 0.1% (w/v) หมายถึง ในสารละลาย 100 ml. มีเนื้อสาร azadirachtin 0.1 g (มวลโมเลกุลของสาร azadirachtin = 720.7 g/mole)

ดังนั้น สารละลาย 100 ml. มีเนื้อสารอยู่ $0.1/720.7 = 1.3875 \times 10^{-4}$ mole

สารละลาย 1000 ml. มีเนื้อสารอยู่ $= \frac{1000 \text{ ml.} \times 1.3875 \times 10^{-4}}{100 \text{ ml.}}$ mole

100 ml.

$= 1.3875 \times 10^{-3} \text{ M.}$

ตารางที่ 25 ความเข้มข้นของ Azadirachtin จากสารสกัดสะเดาที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อ
สารพันธุกรรมปลาดุกอุย

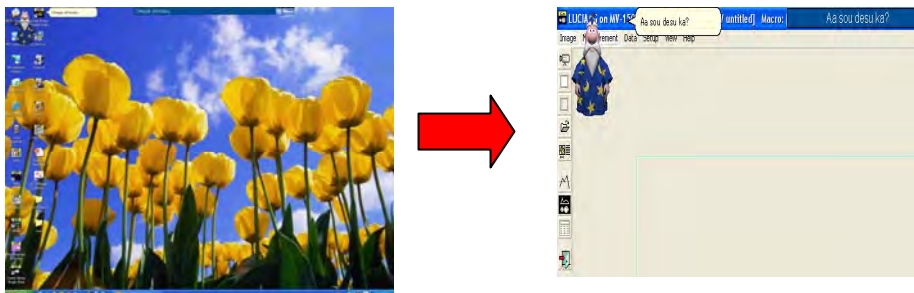
ความเข้มข้นของ Azadirachtin (mg/L)	ความเข้มข้นของ Azadirachtin (M)	ความเข้มข้นของ Azadirachtin (mM)	ความเข้มข้นของ Azadirachtin (μ M)
0.5	0.000000693	0.000693	0.693
0.6	0.000000832	0.000832	0.832
0.7	0.000000971	0.000971	0.971
0.8	0.000001110	0.001110	1.110
0.9	0.000001248	0.001248	1.248
1.0	0.000001387	0.001387	1.387
1.1	0.000001526	0.001526	1.526

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ภาคผนวก ข

ขั้นตอนการวิเคราะห์ภาพ comet assay ด้วยโปรแกรม LUCIA

1. เปิดโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ LUCIA Comet Assay



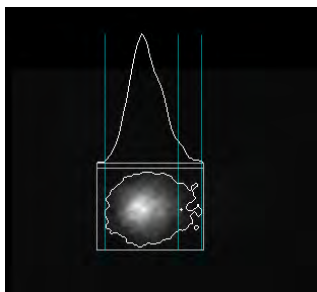
2. เปิดเข้าไปที่ เมนู Image แล้วเปิดแฟ้มภาพที่ถ่ายไว้ขึ้นมา ต่อจากนั้นเลือกเมนู measurement เลือก Folder ที่เก็บภาพจากการถ่ายไว้ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ภาพแรกเสร็จแล้วก็จะเรียกภาพใหม่ขึ้นมาวิเคราะห์ต่อไป จนภาพที่ถ่ายไว้ทั้งหมด ถ้ามีหลาย Folder ก็จะเรียกภาพทั้งหมดใน Folder นั้นๆ มาวิเคราะห์ทั้งหมด แล้วขึ้น Folder ต่อไปเรียงตามลำดับ (ควรจะใส่รหัสภาพเป็นตัวเลขต่อท้าย เช่น Cd 0.02-1-001 หมายถึง Cd 0.02 = ความเข้มข้นที่ทดสอบ, 1 = สไลด์, 001 = ลำดับภาพ เป็นต้น)



3. เลือกบริเวณภาพที่จะวิเคราะห์ โดย click mouse ด้านซ้ายในบริเวณใดๆ บริเวณหนึ่ง (ควรเลือกบริเวณที่ครอบคลุมภาพทั้งหมด เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อน) แล้วก็ลากต่อไปจนเกิดเป็นรูปสี่เหลี่ยม ซึ่งจะเป็นบริเวณที่จะทำการวิเคราะห์ภาพ ดังรูป

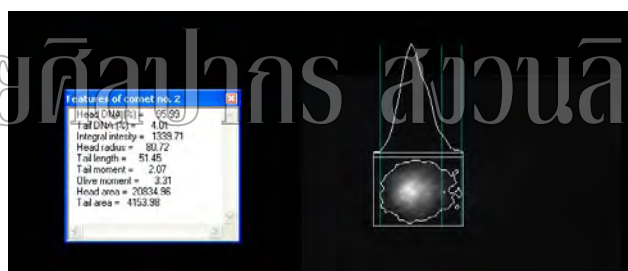


4. Click mouse ด้านขวาในบริเวณที่เลือก ให้ปรากฏเป็น histogram ของภาพที่ทำการวิเคราะห์ ขึ้นมา ดังรูป

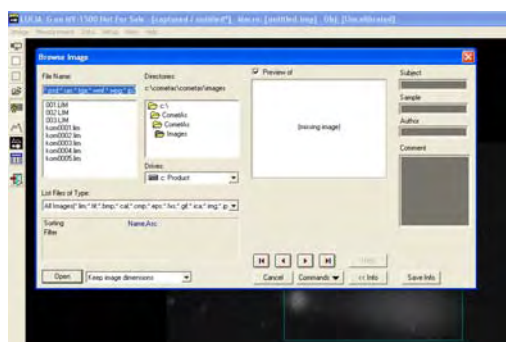


ขั้นตอนนี้ สามารถทำการเปลี่ยนแปลงตำแหน่งการวัดให้ถูกต้องได้ โดยการเลื่อนเส้น (สีเขียว) ให้ตรงกับขอบเขตที่ต้องการวิเคราะห์ได้ เพื่อให้เกิดความถูกต้องมากขึ้น

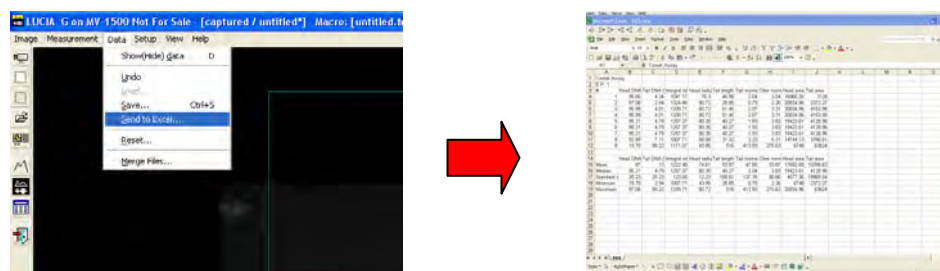
5. ถ้าต้องการดูข้อมูลที่ทำการวิเคราะห์ภาพ comet ให้เลือกเลือกเมนู Feature ภายในตารางที่ทำการวิเคราะห์ภาพ comet จะปรากฏ dialog box ของค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ภาพ comet ออกมา ดังรูป



6. เมื่อวิเคราะห์ภาพ comet assay เสร็จแล้ว ก็ยืนยันผลโดยการกด Enter บน keyboard ถ้ามีภาพที่ต้องการวิเคราะห์อีก ก็จะปรากฏภาพในลำดับต่อมาขึ้นมาแทน (ถ้าหมดภาพใน Folder นั้นแล้ว โปรแกรมก็จะนำภาพที่จะทำการวิเคราะห์ใน Folder ต่อไปขึ้นมาแทน) แล้วทำการเลือกบริเวณในการวิเคราะห์ภาพต่อไปจนหมด แล้วทำการบันทึกผลเมื่อทำการวิเคราะห์ภาพเสร็จในแต่ละชุด โดยเลือกเมนู Data ดังรูป



7. ถ้าต้องการข้อมูลที่ได้จากการวัดให้อยู่ในตาราง Excel เลือกเมนู Data เลือกที่ Send to Excel จะได้ดังรูป



8. เมื่อทำการวิเคราะห์ภาพเสร็จแล้วก็ปิดโปรแกรม โดยเลือกที่เมนู.... (ด้านล่างสุด) ปรากฏ dialog box เลือก OK ดังรูป



9. ปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ให้เรียบร้อย

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – นามสกุล : นายสุนทร กุกสันเทียะ
 วัน เดือน ปี เกิด : วันพฤหัสบดีที่ 14 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2523
 ที่อยู่ : บ้านเลขที่ 14/2 หมู่ 4 ตำบลนิคมฯ อำเภอพิมาย จังหวัดนครราชสีมา
 การศึกษา : พ.ศ. 2532 สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษา
 โรงเรียนนิคมฯ 3 ต. นิคม อ. พิมาย จ. นครราชสีมา
 พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย
 โรงเรียนพิมายวิทยา อ. พิมาย จ. นครราชสีมา
 พ.ศ. 2546 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะศึกษาศาสตร์
 สาขาวิชาชีววิทยา สถาบันราชภัฏนครราชสีมา
 พ.ศ. 2546 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา
 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลงาน

1. Sunate Googsantea, Nongnuch Gumlungpat, Renu Vejaratpimol. "GENOTOXICITY OF CdCl₂ IN PERIPHERAL ERYTHROCYTES AND GILL EPITHELIAL CELLS OF *Clarias macrocephalus*" งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 32 (STT 32) 10-12 ตุลาคม 2549 ณ ศูนย์ประชุมแห่งชาติสิริกิติ์
2. Sunate Googsantea, Nongnuch Gumlungpat, Renu Vejaratpimol. "GENOTOXICITY EFFECTS OF CdCl₂: AN ASSESSMENT IN FISH ERYTHROCYTES MICRONUCLEUS ASSAY." งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 31 (STT 31) 21-23 ตุลาคม 2548 ณ เทคโนธานี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประสบการณ์ในการอบรมเชิงปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

- ปี 2546 การใช้โปรแกรม "Image Analyzer" ในการวิเคราะห์ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ ณ มหาวิทยาลัยศิลปากร
- ปี 2547 อบรมเชิงปฏิบัติการ "Basic Fluorescenc and Imaging Workshop" ณ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา
- ปี 2549 อบรมเชิงปฏิบัติการ "Environmental Toxicology and Biosensor Technology" ณ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร