เชียงใหม่สัตวแพทยสาร 2560; 15(3): 169-178. DOI: 10.14456/cmvj.2017.X

เชียงใหม่สัตวแพทยสาร

Chiang Mai Veterinary Journal

ISSN; 1685-9502 (print) 2465-4604 (online)

Website; www.vet.cmu.ac.th/cmvj

บทความต้นฉบับ

ผลของพาราควอทต่อการทำงานของเอนไซม์อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส และ แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส และการเปลี่ยนแปลงพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับในปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*)

ศิโรรัตน์ ศรีบาลแจ่ม[1], ศิริภาวี เจริญวัฒนศักดิ์[1], ธงชัย จำปาศรี[1], ชไมพร จำปาศรี[2], บัณฑิต ยวงสร้อย[1,*]

[1] *ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002*

[2] *ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002*

บทคัดย่อ สารกำจัดวัชพืชพาราควอท เป็นสารเคมีทางการเกษตรที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในประเทศไทยและมีการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำ ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอทต่อการทำงานของเอนไซม์อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส (alanine aminotransferase; ALT) และแอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส (aspartate aminotransferase; AST) และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับในปลาตะเพียนขาว (*Barbonymus gonionotus*) โดยศึกษาความเป็นพิษของพาราควอทในปลาที่มีน้ำหนักเฉลี่ย 32.60±1.62 กรัม สัมผัสกับพาราควอทที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 4, 6 และ 8 วัน ผลการศึกษาพบว่าพาราควอทมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST มีค่าสูงขึ้นในวันที่ 4 6 และ 8 อย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ ระยะแรก (4 วันหลังสัมผัสสารพิษ) พบการบวมของเซลล์ตับ รวมทั้งมีการเพิ่มจำนวนและขนาดของเซลล์ ระยะต่อมา (6 วันหลังสัมผัสสารพิษ) พบเลือดคั่งในเส้นเลือดดำ และเส้นเลือดฝอย อยู่ทั่วไปภายในเซลล์ตับ และในระยะที่รุนแรงสุด (8 วันหลังสัมผัสสารพิษ) พบเซลล์ตับเสื่อมสลายแบบมีแวคิวโอล จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าพาราควอทที่ปนเปื้อนปริมาณน้อยในแหล่งน้ำมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในเนื้อเยื่อตับ และมีความสอดคล้องกับการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับที่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาการได้รับสารพิษเพิ่มขึ้น

คำสำคัญ พาราควอท, ปลาน้ำจืด, ความเป็นพิษ, มิญชวิทยา, อะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส, แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส

* **ผู้รับผิดชอบบทความ** บัณฑิต ยวงสร้อย *ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น จ.ขอนแก่น 40002* โทรศัพท์ 0-4320-2360 โทรสาร 0-4320-2360 อีเมล์ bundyu@kku.ac.th

ข้อมูลบทความ *วันที่ได้รับบทความ 26 กรฎาคม พ.ศ.2560 วันที่ได้รับการตีพิมพ์ 8 กันยายน พ.ศ.2560 วันที่ตีพิมพ์ออนไลน์ 25 กันยายน พ.ศ.2560*

Original Article

Effects of paraquat on alanine aminotransferase and aspartate aminotransferase activities and liver histopathological changes in Silver barb (*Barbonymus gonionotus*)

Sirorat Sribanjam[1], Siripavee Charoenwattanasak[1], Thongchai Champasri[1], Chamaiporn Champasri[2] and Bundit Yuangsoi[1,*]

[1] *Department of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002*

[2] *Department of Biochemistry, Faculty of Science, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002*

Abstract Paraquat herbicide is an agricultural chemical has a widely used in Thailand and contaminated into the aquatic systems causing toxicity to aquatic animals. The purpose of the present study was to investigate toxic effects of Paraquat on alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST) activities and histopathological alteration of liver tissue in Silver barb (*Barbonymus gonionotus*). Toxicity of paraquat was studied in fish with mean wet weight 32.60±1.62 g exposed to concentration 15 mg/L of paraquat for 4, 6 and 8 days. The results found that paraquat has effects on the enzymes activities of ALT and AST were increased at 4, 6 and 8 days ($P<0.05$) when compared with control group. Histopathological alteration in the liver, the cloudy swelling, hyperplasia and hypertrophy were found at Day4. The congregation in central vain and sinusoid was found in liver cells at Day6. Finally, the highest stage was found vacuoles degeneration at Day8. The results indicated that very low contamination of paraquat in aquatic systems can affect ALT and AST activities in liver and related to the different pathological alteration of the liver when the duration of exposure to the toxic substances increased.

Keywords: paraquat, freshwater fish, toxicity, histopathology, alanine aminotransferase, aspartate aminotransferase

[*]Corresponding author: Bundit Yuangsoi *Department of of Fisheries, Faculty of Agriculture, Khon Kaen University, Khon Kaen 40002.*
Tel: 2360-4320-0; Fax: 2360-4320-0; email: bundyu@kku.ac.th

Article history; *received manuscript: 26 July 2017, accepted manuscript: 8 September 2017, published online: 25 September 2017*

บทนำ

สารกำจัดวัชพืชพาราควอท (1, 1-dimetthyl-4, 4-bipyridylium dichloride) เป็นสารเคมีกำจัดวัชพืชในกลุ่ม Bipyridinium เป็นสารประเภทสัมผัสทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (contacts-membrane disrupters) ชนิดไม่เลือกทำลาย (non-selective) ใช้ควบคุมวัชพืชได้เกือบทุกชนิดและตายทันที (broad spectrum weed knockdown) (Pornprom, 2011) เป็นสารเคมีทางการเกษตรที่นำมาใช้เพื่อการจัดการทางเกษตรอย่างแพร่หลาย และใช้ในการควบคุมการแพร่ระบาดของวัชพืชในแหล่งน้ำ จึงเป็นสาเหตุให้สารกำจัดวัชพืชพาราควอทปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำได้ การศึกษาของ Pimentel (1995) รายงานว่าจากปริมาณการใช้สารเคมีทั้งหมดในการจัดการทางการเกษตร พบว่ามีเพียงร้อยละ 0.1 เท่านั้นที่สารเคมีดังกล่าวสามารถทำงานได้ตามวัตถุประสงค์ ส่วนที่เหลืออีกร้อยละ 99.9 เชื่อว่ามีการปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม และส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศน์วิทยา รวมถึงส่งผลเสียต่อสุขภาพของมนุษย์ด้วย สารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อสิ่งมีชีวิตในระดับปานกลาง (moderately hazardous) แต่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำ (WHO, 2002) Babatunde et al., (2001) รายงานผลการศึกษาค่าความเป็นพิษเฉียบพลันของสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ต่อลูกปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่ 96 ชั่วโมง มีค่าเพียง 11.84 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลากระดี่หม้อ (*Trichogaster trichopterus*) เท่ากับ 1.41 มิลลิกรัมต่อลิตร (Banaee et al.,2013) และปลาดุกรัสเซีย (*Clarias gariepinus*) เท่ากับ 27.46 มิลลิกรัมต่อลิตร (Nwanil et al., 2014)

กลไกการเกิดพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอท เมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกรีดิวซ์โดยเอนไซม์ NADPH ไปเป็นรีดิวซ์พาราควอท และถูกออกซิไดซ์โดยออกซิเจนไปเป็นอนุมูลอิสระ (free radical) และถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (superoxide dismutase) เป็นไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ที่มีฤทธิ์กัดกร่อน ทำลายเซลล์ของอวัยวะในร่างกาย ส่งผลให้อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นนั้นมีความว่องไวต่อการเกิดปฏิกิริยา (Akinwande et al., 2013; Leadprathom, 2013) และถ้ามีมากเกินไปจะทำให้เกิดสภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) (Yangthong, 2015) ทำให้การทำงานของเอนไซม์หลายชนิด เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส เอนไซม์แคแทเลส (catalase) และกลูต้าไธโอน เปอร์ออกซิเดส (glutathione peroxidase) ซึ่งเป็นเอนไซม์ ที่มีหน้าที่ในการยับยั้งสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกาย และยังก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อในแต่ละอวัยวะที่สำคัญที่ได้รับผลกระทบโดยตรง เช่น ตับ เหงือก ไต และระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดความผิดปกติในการทำงาน (Langiano & Martinez 2008; Ogamba et al., 2011; Banaee et al., 2013; Rezaee et al., 2013) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Kori-Siakpere and Theresa (2007) ในปลาดุกรัชเชีย (*Clarias gariepinus*) พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลต่อเปลี่ยนแปลงระดับของเอนไซม์แอสพาเทท อะมิโนทรานส์เฟอเรส (aspartate aminotransferase; AST) และอะลานิน อะมิโนทรานส์เฟอเรส (alanine aminotransferase; ALT) ที่อยู่ในอวัยวะ เช่น เหงือก ไต กล้ามเนื้อ ตับ ม้าม ลำไส้ และสมอง เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) และยังพบว่าตับเป็นอวัยวะที่มีการแสดงออกของเอนไซม์ทั้งสองชนิดสูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับอวัยวะอื่น สอดคล้องกับกับการศึกษาของ Banaee et al., (2013) ในปลาคาร์ป (*Cyprinus carpio*) พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่าชีวเคมีในเลือด โดยสารพิษส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ AST, ALT, แลคเตส ดีไฮโดรจีเนส (lactate dehydrogenase; LDH), ครีเอตีน ฟอสโฟไคเนส (creatine phosphokinase; CPK), อัลคาไลฟอสฟาเทส (alkaline phosphatase; ALP) ที่เพิ่มอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) นอกจากนั้น Edori et al., (2013)

พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของค่าชีวเคมีทั้งในตับ และในเลือดของปลาดุกอาฟริกัน (*Clarias Gariepinus*) ประกอบด้วยระดับของ AST, ALT, ALP, โซเดียม (sodium) และโพแทสเซียม (potassium) เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($P<0.05$) จากการรายงานชี้ให้เห็นว่า มีเอนไซม์หลายชนิดที่มีหน้าที่ และบทบาทสำคัญในกระบวนการทำงานของร่างกายเมื่อได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอทเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำ

การศึกษานี้เป็นการประเมิณค่าความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในตับ และการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับปลาตะเพียนขาว Silver barb (*B. gonionotus*) เมื่อได้รับสารพิษในระยะเวลาที่แตกต่างกัน

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมตัวอย่างปลาตะเพียนขาว (*B. gonionotus*) อายุ 4 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 32.60±1.62 กรัม และความยาวเฉลี่ย 16.93±1.06 เซนติเมตร จากการเพาะพันธุ์และอนุบาล ในหมวดประมง ภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น นำมาพักในตู้กระจกที่มีระบบให้อากาศเป็นเวลา 7 วัน อุณหภูมิน้ำเฉลี่ย 29.50±0.44 องศาเซลเซียส ให้อาหารปริมาณร้อยละ 3 ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้า (9.00 น.) และช่วงเย็น (16.00 น.) ของทุกวัน เพื่อปรับสภาพระบบการทำงานของตัวปลาให้อยู่ในสภาพที่ปราศจากการปนเปื้อนของสารพิษ

การวางแผนการวิจัย

ออกแบบการทดลองแบบ Completely randomize design (CRD) โดยให้ระยะเวลาที่ใช้ศึกษาทดลองเป็นปัจจัยหลัก (Factor) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารพิษ โดยเตรียมผลิตภัณฑ์สารกำจัดวัชพืชพาราควอท (Gramoxone® 27.6%) ที่จะใช้แช่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นความเข้มข้นที่อยู่ในช่วง LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง (Babatunde et al., 2001) ที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 วัน โดยใช้วิธีจัดกลุ่มปลาแบบสุ่ม เพื่อให้มีการกระจายของปลาอย่างสม่ำเสมอในแต่ละตู้ ระหว่างการทดลองให้อากาศในตู้ทดลองตลอดเวลา ให้อาหาร 3% ของน้ำหนักตัว วันละ 2 ครั้ง ในช่วงเช้า (9.00 น.) และช่วงเย็น (16.00 น.) ของทุกวัน เก็บตัวอย่างปลาทั้งหมด 3 ช่วงเวลา ได้แก่ ที่ 4, 6 และ 8 วัน ตามแผนการทดลอง เก็บข้อมูลด้านคุณภาพน้ำ ประกอบด้วย ความเป็นกรด-ด่าง (pH) อุณหภูมิ (temperature) และออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen; DO)

การเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ

สุ่มเก็บตัวอย่างปลาจากกลุ่มกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองหลังจากได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ตามช่วงระยะเวลาที่กำหนดที่ 4, 6 และ 8 วัน โดยเก็บตัวอย่างปลากลุ่มละ 6 ตัว จากนั้นสลบปลาด้วยน้ำแข็งทันทีที่นำปลาขึ้นจากน้ำ แล้วผ่าเก็บเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาว ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปลาต้องทำบนถาดน้ำแข็ง (on ice) ตลอดเวลา จากนั้นนำตับไปชั่งน้ำหนักรวมทั้งหมด แล้วทำการแบ่งเนื้อเยื่อตับออกเป็นสองส่วน เนื้อเยื่อตับส่วนแรกนำไปสกัดเอนไซม์เก็บรักษาตัวอย่างที่ -20 องศาเซลเซียส ส่วนที่เหลือนั้นนำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพต่อไป

การเตรียมตัวอย่างตับเพื่อศึกษาการทำงานของเอนไซม์

นำตัวอย่างที่เก็บในตู้ -20 องศาเซลเซียส มาละลายบนน้ำแข็ง (on ice) แล้วใช้กรรไกรตัดย่อยให้เป็นชิ้นเล็ก จากนั้นเติม homogenization buffer (50 mM $Na_2HPO_4.2H_2O$; 50 mM Na_2HPO_4, pH 7.4) ที่เย็นจัดในปริมาณ 3 เท่าของน้ำหนักเนื้อเยื่อ นำไปปั่นละเอียด

ด้วยเครื่อง Homogenizer (Ultra-Turrax® T18, IKA, Germany) ที่ความเร็วประมาณ 2,000 รอบต่อนาที (rpm) หรือจนละเอียด จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่อง centrifuge (Rotina 35 R, Hettich, Germany)ที่ความเร็วรอบ 15,400 g ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที ดูดเก็บส่วนใส (supernatant) ได้ส่วนที่เป็นไซโทซอล (cytosol) เพื่อนำไปศึกษา AST และ ALT นำโปรตีนที่ได้มาตรวจวัดความเข้มข้นด้วยวิธี Bradford assay ก่อนที่จะหากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ (enzyme activity) โดยดัดแปลงมาจากวิธีการของ Sinaei and Rahmanpour, (2013)

การศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ AST

การตรวจกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ของ AST อธิบายโดยย่อคือ ใช้สารละลาย 54.3 mM imidazole pH 7.4 (Sigma-Aldrich, USA), 7 mM α-ketoglutarate (Sigma-Aldrich, USA), 7 mM L-aspartic acid (Acros organics, USA), 0.2 mM β-nicotinamide adenine dinucleotide (NADH) (Sigma-Aldrich, USA), 0.025 mM pyridoxal phosphate (Acros organics, USA), 1 U malate dehydrogenates (MDH) (Sigma-Aldrich, USA)และ 100 ไมโครลิตรของตัวอย่าง (serum และ cytosolic liver) ในปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Libra S50 UV/Vis, Biochrom, UK) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร วัดค่าทุก 30 วินาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปหาค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสง แล้วนำไปคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐาน NADH แล้วหาค่าการทำงานของเอนไซม์ (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Singer et al., 1990)

การศึกษากิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALT

การตรวจกิจกรรมการทำงานของ ALT อธิบายโดยย่อคือ โดยใช้สารละลาย 59.1 mM imidazole pH 7.4, 10.5 mM α-ketoglutarate, 200 mM L-alanine (Acros organics, USA), 0.2 mM NADH , 0.025 mM pyridoxal phosphate, 1 U lactate dehydrogenates (LDH) (Acros organics, USA) และ 100 ไมโครลิตรของตัวอย่าง (serum และ cytosolic liver) ในปริมาตรทั้งหมด 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง Spectrophotometer (Libra S50 UV/Vis, Biochrom, UK) ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร วัดค่าทุก 30 วินาที นาน 5 นาที จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าผลต่างของค่าดูดกลืนแสงที่ได้ โดยนำไปคำนวณจากสมการที่ได้จากกราฟสารละลายมาตรฐาน NADH แล้วหาค่าการทำงานของเอนไซม์ (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Singer et al., 1990)

การศึกษาทางพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อของเนื้อเยื่อตับ

ล้างเนื้อเยื่อตับด้วยโซเดียมคลอไรด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.85 ที่เย็น แล้วแช่ในน้ำยาคงสภาพเนื้อเยื่อ buffered formalin (Acros organics, USA) ร้อยละ 10 อย่างน้อย 24 ชั่วโมง จึงนำชิ้นเนื้อเยื่อมาล้างด้วยน้ำประปาจนน้ำยาคงสภาพอย่างน้อย 1 นาที แล้วตัดแยกเป็นชิ้นขนาดประมาณ 0.5 ลูกบาศก์เซนติเมตร จากนั้นนำตัวอย่างเข้าสู่ขั้นตอนการเตรียมชิ้นเนื้อเยื่อ โดยเริ่มจาก ขบวนการขจัดน้ำโดยแช่ในสารเอทานอล (ethanol) (Merck Schuchardt, Germany) ความเข้มข้นร้อยละ 70, 80, 95 และ 100 ตามลำดับ ต่อไปนำตัวอย่างเนื้อเยื่อมาแช่ในไซลีน (xylene) (Polysciences, USA) แล้วนำไปแช่ใน paraplast เหลว (Leica biosystem, Germany) ขั้นตอนละ 2 ชั่วโมง ตามลำดับ เพื่อให้ paraplast เหลวเข้าไปแทนที่เอทานอล เมื่อเสร็จสิ้นขั้นตอนดังกล่าว ทำการฝังเนื้อเยื่อในพาราฟิน (embedding) โดยเครื่อง Embedding

station (Leica EG 1150 H, Leica biosystem, Germany) โดยลดอุณหภูมิลงจนพาราฟินเหลวแข็งตัว นำเนื้อเยื่อที่ผ่านกระบวนการ embedding แล้วมาตัดเนื้อเยื่อ (section) ด้วยเครื่อง Rotary microtome (Leica RM 2255 , Leica biosystem, Germany) ให้มีความหนา 4-5 ไมโครเมตร แล้วคัดเลือกแผ่นเนื้อเยื่อที่มีสภาพสมบูรณ์ที่สุดมาติดบนกระจกสไลด์ เพื่อนำไปย้อมสี (stain) ด้วย Hematoxylin and eosin (H&E) (Sigma Aldrich, USA) สังเกตโครงสร้างในระดับเซลล์และเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพตามวิธีการของ (ดัดแปลงมาจากวิธีการของ Humason, 1979)

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติเพื่อหาความแปรปรวนระหว่างชุดการทดลอง (treatment) โดยวิธี Analysis of Variance (ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างชุดการทดลอง โดยวิธี Duncan's New Multiple Range Test วิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างชุดควบคุม และชุดทดลองที่แช่สารกำจัดศัตรูพืชในระยะเวลาที่เท่ากันแต่ละคู่โดยวิธี Dependent t-test (paired sample t-test) ด้วยโปรแกรม SPSS version 16 for windows

ผลการศึกษา

การศึกษาความเป็นพิษของสารกำจัดวัชพืชพาราควอทต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST

จากรูปที่ 1 พบว่าระดับเอนไซม์ ALT ในเนื้อเยื่อตับปลาตะเพียนขาวในกลุ่มควบคุม ทั้ง 4 ช่วงเวลาไม่แตกต่างกัน ($P>0.05$) โดยมีค่าเท่ากับ 8.36±2.30, 7.81±1.13, 6.68±0.72 และ 6.66±1.02 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สำหรับปลากลุ่มทดลองที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอทความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่าการทำงานของเอนไซม์ ALT ในกลุ่มที่ได้รับสารพิษมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 4, 6 และ 8 ($P < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 16.16±2.01, 21.64±2.28 และ 48.47±5.19 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ

ในปลากลุ่มควบคุมพบว่าการทำงานเฉลี่ยของเอนไซม์ AST ไม่แตกต่างกันตามระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ ($P>0.05$) มีค่าเท่ากับ 148.87±50.91, 130.38±8.78, 149.50±14.55, 145.63±14.30 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ สำหรับปลากลุ่มทดลองที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอทความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่า การทำงานของเอนไซม์ AST ในกลุ่มที่ได้รับสารพิษมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมในวันที่ 4, 6 และ 8 ($P<0.05$) มีค่าเท่ากับ 356.33±62.75, 325.30±12.90 และ 377.76±41.34 นาโนโมล/นาที/มิลลิกรัมโปรตีน ตามลำดับ (รูปที่ 1)

การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับ

ในกลุ่มที่ไม่ได้รับกำจัดศัตรูพืช ปลาทุกตัวไม่พบการเปลี่ยนแปลงลักษณะทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ เซลล์ตับปกติยังคงมีรูปร่างหลายเหลี่ยม มองเห็นขอบเขตเซลล์ชัดเจน มีนิวเคลียสกลมอยู่ตรงกลาง หรือค่อนไปด้านใดด้านหนึ่ง พบเส้นเลือดฝอย (sinusoid) แทรกกระจายอยู่ระหว่างเซลล์ตับ อาจพบเซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพ และตาย เพียงบางเซลล์ซึ่งพบน้อยมากในทุกตัวอย่าง (รูปที่ 2A) กลุ่มทดลองวันที่ 4 พบว่าเซลล์ตับขยายตัวเนื่องจากการเพิ่มขนาดของเซลล์ (hypertrophy) และเพิ่มจำนวนของเซลล์ (hyperplasia) ในเนื้อเยื่อและอวัยวะทำให้มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบเส้นเลือดฝอยแทรกในเนื้อเยื่อตับมีจำนวนเพิ่มขึ้น และพบเลือดคั่งในไซนูซอยด์กระจายอยู่ทั่วไป และมี melanomacrophage สีเหลืองแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อเพียงเล็กน้อย กลุ่มทดลองวันที่ 6 พบเซลล์ตับมีการเสื่อมสภาพ (vacuolar degeneration) มองเห็นเป็นช่องว่างเกิดขึ้นในไซ

โทพลาสซึม หลอดเลือดในตับขยายใหญ่ขึ้นเห็นได้ชัดเจน พบเลือดคั่งอยู่ภายในไซนูซอยด์ทำให้มองเห็นได้ชัดเจนขึ้น กลุ่มทดลองวันที่ 8 พบการมีการเสื่อมสภาพของเซลล์ (vacuolar degeneration) และพบการตายของเซลล์ (cell necrosis) มากขึ้นอย่างเห็นได้ชัดในบางบริเวณพบเยื้อหุ้มเซลล์แตกออกจนไม่เห็นโครงสร้างเดิม (รูปที่ 2)

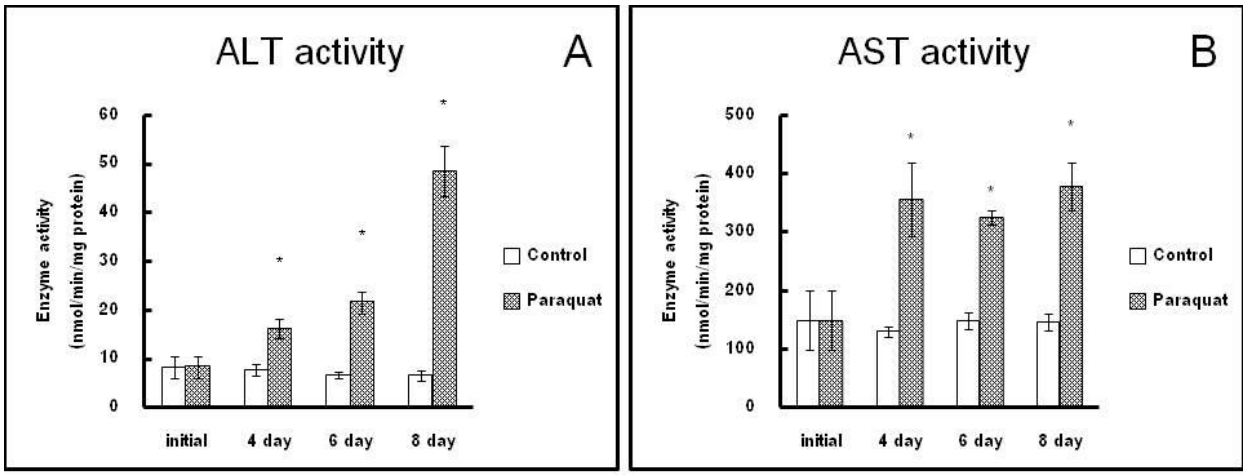

Figure1. Hepatic activity Alanine aminotranserase (ALT) and Aspartate aminotranserase (AST) in *B. gonionotus* exposed to paraquat for initial, 4, 6 and 8 days. Data are expressed as mean ± standard deviation (n=6). *Indicates significant difference in relation to control at the same time of exposure ($P < 0.05$)

วิจารณ์

สารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลต่อการชักนำให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระให้เกิดขึ้นในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมากกว่าในสภาวะปกติ ซึ่งส่งผลต่อระบบกลไกในการป้องกันตัวเองของสิ่งมีชีวิต เช่น การสร้างเอนไซม์และสารที่เกี่ยวข้องกับการต้านอนุมูลอิสระ (Leadprathom, 2013) จากการทดลองในครั้งนี้ เมื่อปลาสัมผัสกับสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ปลาจะรับสารพิษเข้าสู่ร่างกายทั้ง ทางผิวหนัง การกินผ่านทางระบบทางเดินอาหาร (alimentary cannal) และการหายใจผ่านทางเหงือก (gill) จากนั้นสารพิษจะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้อย่างรวดเร็วเข้าสู่เส้นเลือดดำส่งผ่านไปยังตับที่เป็นอวัยวะหลักที่มีหน้าสำคัญในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ (biotransformation) เพื่อเปลี่ยนแปลงโครงสารของสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ให้อยู่ในรูปเมแทบอไลท์ (metabolite) ของสารที่สามารถถูกขับออกจากร่างกายได้ (Figueiredo-Fernandes et al., 2006)

การศึกษานี้พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในตับเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ อันเนื่องมาจากการได้รับสารพิษเข้าสู่ร่างกาย หรือเซลล์ตับถูกทำลาย (Chimela et al., 2014) และนอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืชพาราควอทที่ส่งผลต่อการทำงานของเอนไซม์ในปลาอีกหลายชนิด (Kori-Siakpere et al., 2007) ทำการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืชพาราควอทในปลาดุกรัสเซียต่อการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ใน เหงือก ไต เนื้อเยื่อ ตับ ม้าม ลำไส้ และสมอง เพื่อเปรียบเทียบการทำงานของเอนไซม์ทั้งสองชนิดในอวัยวะต่าง ๆ หลังจากที่ได้รับสารพิษ พบว่าตับเป็นอวัยวะที่มีกิจกรรมการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST สูงสุด ($P<0.05$)

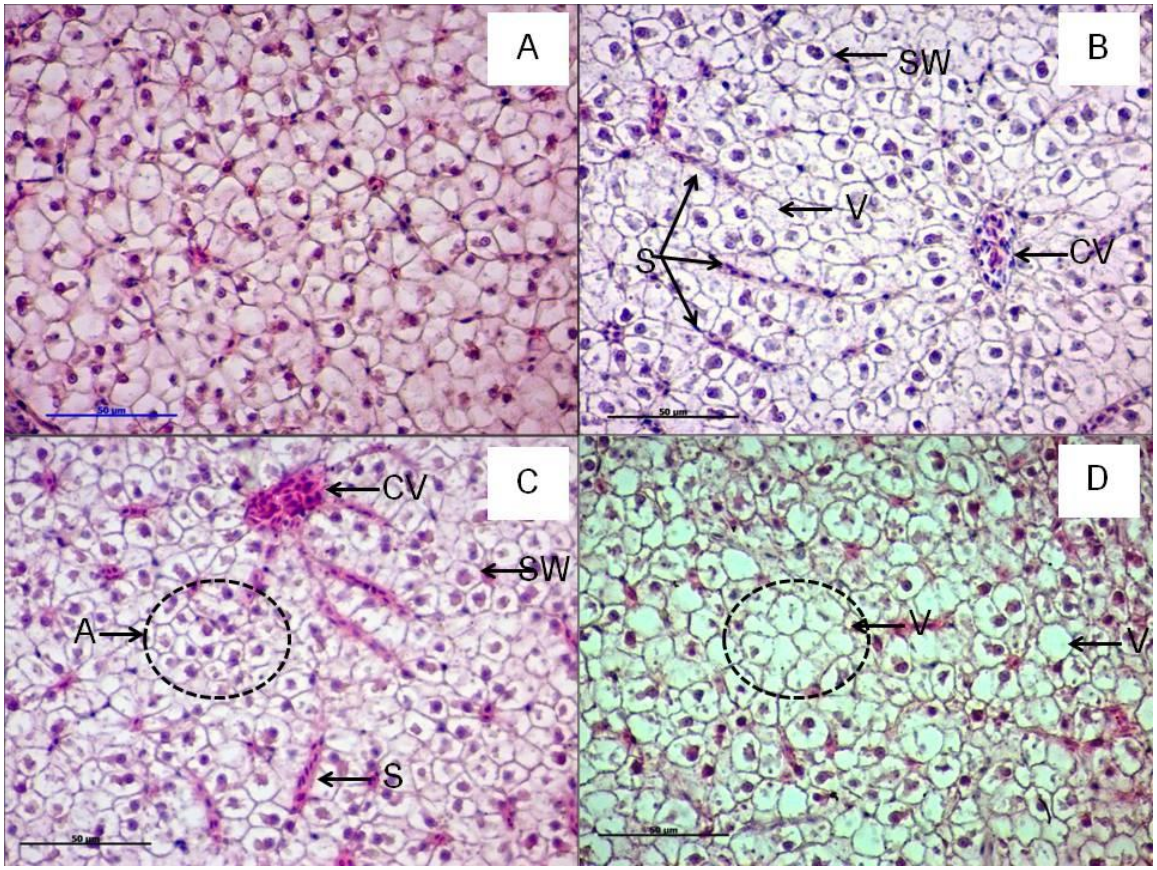

Figure 2 Light micrographs transverse sections of Sliver barb in initial and exposed to the paraquat concentration of 15 mg/L at 4 6 and 8 day, scale bar replacement 50 μm(x40).

(A) Non-exposed fish showing, normal histological structure of hepatocytes with central spherical nucleus.

(B) Fish exposed to paraquat for 4 day, where a hydropic swelling (SW), enlargement of the sinusoid (S), congestion of central vein (CV) and vacuole (V).

(C) Fish exposed to paraquat for 6 day, where atrophy (A), hydropic swelling (SW), enlargement of the sinusoid (S) and congestion of central vein (CV).

(D) Fish exposed to paraquat for 8 day, where vacuoles degeneration (V).

มีการศึกษาในปลาคาร์ปและปลาดุกรัสเซีย พบว่าสารกำจัดวัชพืชพาราควอทมีผลการทำงานของเอนไซม์ AST, ALT, LDH, CPK และ ALP ในเลือดที่เพิ่มสูงขึ้น ($P<0.05$) (Banaee et al., 2013; Ayanda et al., 2015)

สำหรับการศึกษาทางการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับเมื่อปลาได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอทในระยะเวลาที่แตกต่างกัน พบเซลล์เกิดการฝ่อลีบ การเพิ่มขนาดของเซลล์ และจำนวนของเซลล์ มีเลือดคั่งในเส้นเลือดฝอย (sinusoid) melanomacrophage สีเหลืองแทรกกระจายอยู่ในเนื้อเยื่อ และพบการเสื่อมของเซลล์แบบมีแวคิวโอลเกิดขึ้นภายในไซโทพลาสซึม การเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพเหล่านี้เกิดขึ้นเนื่องจากสารกำจัดวัชพืชพาราควอทเป็นสารพิษที่มีฤทธิ์กัดกร่อน และสัมผัสทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (Pornprom, 2011) จึงมีผลทำให้เซลล์ระคายเคือง และเกิดการบาดเจ็บของเซลล์ นอกจากนั้นสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นสามารถไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ และเยื่อหุ้มออร์แกเนล โดยจับกับไขมันเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของลิพิด (lipid peroxidation) ทำให้เซลล์

สูญเสียสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่าน และสามารถจับกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ภายในเซลล์ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีมีผลทำให้เซลล์เกิดอันตรายจนนำไปสู่ภาวะเซลล์ตายได้ในที่สุด (Akcha et al., 2000; Wessel et al., 2010) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของตับ พบว่าเมื่อปลาสัมผัสสารกำจัดวัชพืชในระยะเวลาที่เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์ต่อระดับความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ตับที่รุนแรงขึ้นเช่นกัน และเป็นไปในทิศทางเดียวกับการศึกษาของ Figueiredo-Fernandes et al., (2007) พบว่าเมื่อแช่ปลานิลในสารพิษ 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร นาน 45 วัน เซลล์ตับจะเพิ่มระดับความเสียหายมากขึ้นตามระยะเวลาที่แช่สารพิษ ส่วนในปลาคู้ดำ (*Colossoma macropomum*) ที่ได้รับสารกำจัดวัชพืชพาราควอท ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 21 วัน พบว่า โครมาตินในนิวเคลียสของเซลล์ตับถูกย่อยสลาย (karyolysis) (Salazar-Lugoa et al., 2011)

สรุป

จากการศึกษาความเป็นพิษสารกำจัดวัชพืชพาราควอทต่อปลาตะเพียนขาว ที่ความเข้มข้น 15 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 4, 6 และ 8 วัน เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ALT และ AST ในตับ และส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับ พบการบวมของเซลล์ตับ การเพิ่มจำนวนและขยายขนาดของเซลล์ มีเลือดคั่งอยู่ภายในไซนูซอยด์ทำให้หลอดเลือดขยายใหญ่ขึ้น และมีจำนวนเพิ่มขึ้นเห็นได้ชัดเจน เซลล์ตับเสื่อมสภาพแบบมีแวคิวโอล

ข้อเสนอแนะสำหรับการศึกษาครั้งต่อไป ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของอวัยวะที่สำคัญอื่น เช่น เหงือก ไต และ ม้าม เนื่องจากเป็นอวัยวะที่สำคัญ และมีความสัมพันธ์กับพิษวิทยาจลศาสตร์ในปลา (toxicokinetic in fish)

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณทุนส่งเสริมการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา ปีงบประมาณ 2558 (เพิ่มเติม) บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยขอนแก่น และทุนสนับสนุนการทำวิทยานิพนธ์ระดับบัณฑิตศึกษา สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) ปีงบประมาณ 2559 รวมถึงภาควิชาประมง คณะเกษตรศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้การสนับสนุนสถานที่ และอุปกรณ์ในการทำวิจัยครั้งนี้ให้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

Akcha, F., Izuel, C., Venier, P., Budzinski, H., Burgeot, T., Narbonne, J.F., 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo [a] pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. Aquat. Toxicol. 49, 269–287.

Akinwande, A. A., Abdulkadiri, J.O., Adesina, B.T., 2013. Oxidative Stress and Antioxidant Response in the Giant African Catfish (Heterobranchus bidorsalis Geoffroy Saint-Hilaire, 1809) under Chronic Paraquat Exposure. Nig. J. Fish. Aqua. 4, 30-37.

Ayanda, O.I., Oniye, S.J., Auta, J., Ajibola, V.O., 2015. Acute toxicity of glyphosate and paraquat to the African catfish (*Clarias gariepinus*, Teugels 1986) using some biochemical indicators. Trop. Zool. J. 28, 152–162.

Babatunde, M.M., Oladimeji, A.A., Balogum, J.K., 2001. Acute toxicity of gramoxone to *Oreochromis niloticus* (Trewavas) in Nigeria. Water Air Soil Poll. 131, 1-10.

Banaee, M., Davoodi, M.H., Zoheiri, F., 2013. Histopathological changes induced by paraquat on some tissues of gourami fish (*Trichogaster trichopterus*). Vet. J. 3, 36–42.

Chimela, W., Mesua, N., Abdulraheem, B.A., 2014.

Aspartate transaminase (AST) activity in selected tissues & organs of *Clarias Gariepinus* exposed to different levels of paraquat. J. Anal. Toxicol. 4, 3–4.

Edori, O., Edori, K., Okpara, E., 2013. Chronic toxicity of paraquat on liver and gill electrolyte in the catfish *Clarias Gariepinus*. (IOSR-JESTFT). 7, 1–4.

Figueiredo-Fernandes, A., Fontainhas- Fernandes, E.R., Reis-Henriques, M. A., 2006. The Effect of paraquat on hepatic EROD activity, liver, and gonadal histology in males and females of Nile tilapia, Oreochromis niliticus, exposed at different temperatures. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 51, 626–632.

Figueiredo-Fernandes, A., Ferreira-Cardoso, J. V., Garcia-Santos, S., Monteiro, S. M., Carrola, J., Matos, P., 2007. Histopathological changes in liver and gill epithelium of Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*, exposed to waterborne copper. Pesqui. Vet. Bras. 27, 103–109.

Humason, G. L., 1979. Animal tissue techniques , 4th ed. Freeman. Sanfrancisco.

Kori-Siakpere, A.K.M., Theresa, M.I., 2007. Acute haematological effects of sublethal levels of paraquat on the african catfish, *Clarias Gariepinus* (Osteichthyes: Clariidae). J. Environ. Sci. 1, 331–335.

Langiano, V.C., Martinez, C.B.R., 2008. Toxicity and effects of a glyphosate-based herbicide on the neotropical fish *Prochilodus lineatus*. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol. 147, 222–231.

Leadprathom, N., 2013. Toxicity of paraquat to aquaticanimal. King Mongkut's Agricultural Journal. 31, 95-101. (in Thai)

Nwanil, C.D., Ekwuemel, H.I., Ejerel, V.C., Onyeke, C.C., Chukwukal, C.O., Peacel, O.S., Nwadinigwe, A.O., 2014. Physiological effects of paraquat in juvenile african Catfish *Clarias gariepinus* (Burchel 1822). J. Coast. Life. Med. 3, 35-43.

Ogamba, E.N., Inyang, I.R., Azuma, I.K., 2011. Effect of paraquat dichloride on some metabolic and enzyme parameters of *Clarias gariepinus*. J. Biol. Sci. 3, 186–190.

Pimentel, D., 1995. Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. J. Agric. Environ. Ethics. 8,17–29.

Pornprom, T., 2011. Herbicides: principles and mode of action. Chulalongkorn university press. (in Thai)

Sinaei, M., Rahmanpour. S., 2013. Evaluation of Glutathione S-Transferase activity as a biomarker of PAH pollution in Mudskipper, Boleophthalmus Dussumieri, Persian Gulf. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 90, 369-374.

Singer, T. D., Mahadevappa, V. G., Ballantyne, J. S., 1990. Aspects of the energy metabolism of lake sturgeon Acipenser fulvescens with special emphasis on lipid and ketone body metabolism. Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47, 873-881.

Rezaee, J., Vahid. N., Tukmechi. A., Hasanzadehs. S., 2013. Histopathological effects of experimental paraquat on spleen and pronephros of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Comp Clin Pathol. 22, 491–495.

Salazar-Lugoa, R., Estrellaa. A., Oliverosa. A., Rojas-Villarroelb. E., Villalobos. L., Lemusd. M., 2009. Paraquat and temperature affect nonspecific immune response of Colossoma macropomum. Environ. Toxicol. Pharmaco. 27, 321-326.

Wessel, N., Santos, R., Menard, D., Le Menach,K., Buchet, V., Lebayon, N., Loizeau, V., Burgeot, T., Budzinski, H., Akcha, F., 2010. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*). Mar. Environ. Res. 69, 71–73.

WHO. 2002. The World Health Organization Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification 2000-2002 (WHO/IPCS/01.5).

Yangthong, M., 2015 Oxidative stress in fish. King Mongkut's Agricultural Journal. 32, 66-75. (in Thai)