

บทที่ 4

การอภิปรายผล

การวิจัยครั้งนี้ได้ศึกษาผลของสารกำจัดแมลง 3 ชนิด ได้แก่ แลนเนท-แอล ทามารอน 600 เอสแอล และฟูราดาน 3% จี ต่อดีเอ็นเอและโครโมโซม โดยศึกษาความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซมของคนและการทดสอบ single cell gel electrophoresis หรือ comet assay แลนเนท-แอล และทามารอน 600 เอสแอล เป็นสารกำจัดแมลงที่มีรูปแบบเป็น soluble concentrates (SL) ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์ละลายได้ในน้ำ และฟูราดาน 3% จี มีรูปแบบเป็นเม็ด (granules) ประกอบด้วยสารออกฤทธิ์เคลือบติดอยู่กับเม็ดทรายละเอียด ใช้โดยการโรย หว่านบนดินหรือรองกันหลุมขณะปลูก ซึ่งอาจมีการตกค้างในดิน ดังรายงานการศึกษาของพงษ์พันธ์ จึงอยู่สูงและคณะ ปี 2538 พบสารพิษตกค้างที่มีอยู่ในดิน 90 % ส่วนใหญ่เป็นสารกลุ่มออร์กาโนคลอรีน รองลงมาคือสารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตตามลำดับ การเจือจางแลนเนทและทามารอนใช้น้ำกลั่น แต่ฟูราดานซึ่งละลายน้ำได้ยากต้องใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) ทำละลายและเจือจางก่อนนำมาทดสอบ ก่อนการทดสอบความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซม จะต้องทำการทดสอบความเป็นพิษของสารก่อน (cytotoxic estimation) โดยการทดลองเลี้ยงเซลล์ในหลอดทดลอง แล้วเติมสารที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อทำการเตรียมโครโมโซมแล้ว นำสไลด์มานับค่า mitotic index (M.I) เมื่อนับค่า mitotic index ได้ทุกความเข้มข้นแล้ว นำมาเปรียบเทียบกับค่า mitotic index ของหลอดที่เติมน้ำกลั่น แล้วเลือกความเข้มข้นที่ทำให้ค่า mitotic index ลดลงประมาณ 50 % เป็นความเข้มข้นสูงสุดในการทดสอบ ในการทดลอง แลนเนท-แอล พบว่า ความเข้มข้น 1,600 µg/ml ทำให้ค่า mitotic index ลดลง 50% จึงใช้เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบ และใช้ความเข้มข้น 1/2 1/4 และ 1/16 ของความเข้มข้นสูงสุดมาใช้ในการทดสอบแลนเนท รวมเป็น 4 ระดับความเข้มข้น ทามารอน 600 เอสแอล ความเข้มข้น 800 µg/ml ทำให้ค่า mitotic index ลดลง 50 % และใช้ความเข้มข้น 1/2 และ 1/8 ของความเข้มข้นสูงสุดมาใช้ในการทดสอบทามารอน รวมเป็น 3 ระดับความเข้มข้น ฟูราดาน 3% จี ความเข้มข้น 150 µg/ml ทำให้ค่า mitotic index ลดลง 50 % และใช้ความเข้มข้น 2/3 และ 1/3 ของความเข้มข้นสูงสุดมาใช้ในการทดสอบฟูราดาน รวมเป็น 3 ระดับความเข้มข้น จึงได้ความเข้มข้นของแลนเนทที่ใช้ทดสอบ คือ 100, 400, 800 และ 1,600 µg/ml ความเข้มข้นของทามารอนที่ใช้ทดสอบคือ 100, 400 และ 800 µg/ml ความเข้มข้นของฟูราดานที่ใช้ในการทดสอบคือ 50, 100 และ 150 µg/ml

ในการศึกษาความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซม พบว่าแลนเนท-แอล ความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มมากขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Amer และคณะ (1996) ที่ได้ทดสอบสารกำจัดแมลงจำนวน 5 ชนิด ได้แก่ DDT, Malathion, Sevin, Dursban และ Lannate โดยวิธีตรวจวิเคราะห์เชิงโครงสร้างของโครโมโซมในม้ามของหนู mouse พบว่าสารทั้ง 5 ชนิด ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ และการศึกษาของ Bonatti และคณะ (1994) พบว่า Lannate 25 เป็นพิษต่อยีน ทดสอบโดยวิธี chromosome aberration assay และ micronucleus test โดยใช้ whole blood human lymphocytes ส่วนทามารอน 600 เอสแอล ไม่พบว่าทำให้เกิดความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซมเพิ่มขึ้น ซึ่งไม่สอดคล้องกับการศึกษาสารกำจัดแมลงที่อยู่ในกลุ่มเดียวกัน คือกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต ได้แก่ Methyl parathion, Hinosan, Acephate, Ethion และ Dichlofos สารดังกล่าวทุกชนิดทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม และ micronucleus เพิ่มมากขึ้น (Vijayaghavan และคณะ, 1994; Bhunya และ Jena, 1994) แต่ก็มีสารบางชนิดในกลุ่มนี้คือ chlorpyrifos ที่ไม่เป็นพิษต่อยีน (Gollapudi และคณะ, 1995) และการทดสอบฟูราดาน 3% จี ซึ่งเป็นสารกำจัดแมลงกลุ่มคาร์บาเมต ชื่อสามัญคือ คาร์โบฟูราน พบว่าฟูราดานความเข้มข้นสูง ทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มมากขึ้น สอดคล้องกับการศึกษา genotoxicity ของสารกำจัดแมลงในกลุ่มคาร์บาเมต ได้แก่ propoxur, aldicarb, methomyl และ carbosulfan ซึ่งเป็นพิษต่อยีนทุกชนิด (Topaktas และคณะ, 1993; Wei และคณะ, 1997) แต่ในการศึกษาครั้งนี้ ความเข้มข้นของฟูราดานสูงสุดคือ 150 $\mu\text{g/ml}$ พบว่ามีความผิดปกติของโครโมโซมไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม สาเหตุเนื่องจากฟูราดานที่เติมความเข้มข้นมากขึ้น อาจทำให้เซลล์ที่มีโครโมโซมผิดปกติตายไป นอกจากนี้โครโมโซมที่เตรียมได้มีลักษณะสั้นลงกว่าปกติคล้ายโครมาตินรวมตัวกันแน่นขึ้น จึงอาจทำให้ตรวจวิเคราะห์ chromatid gap และ chromosome gap ผิดพลาดได้

ผลการศึกษาความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซมแยกเป็น chromatid type และ chromosome type จากตารางที่ 2 และ 3 พบความผิดปกติชนิด chromatid type ซึ่งได้แก่ chromatid break, chromatid gap และ chromatid deletion จากหลอดที่เติม แลนเนท-แอล ทามารอน 600 เอสแอล และฟูราดาน 3% จี มากกว่าชนิด chromosome type เช่น chromosome break, chromosome gap, acentric fragment แสดงว่าเซลล์ที่ได้รับอันตรายจากสารกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิด ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ S และ G_2 มากกว่าระยะ G_0 และ G_1 และจากตาราง 3 พบว่าหลอดที่เติมแลนเนทความเข้มข้น 800 และ 1,600 $\mu\text{g/ml}$ มีจำนวนความผิดปกติของโครโมโซมชนิด chromosome type เท่ากัน แต่เมื่อทดสอบค่าทางสถิติ พบว่าหลอดที่เติมแลนเนท ความเข้มข้น

ชั้น 800 $\mu\text{g/ml}$ มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แต่หลอดที่เติมแลนเทนทความเข้มข้น 1,600 $\mu\text{g/ml}$ ไม่แตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุม เนื่องจากความแปรปรวนของข้อมูลทั้งสองกลุ่มไม่เท่ากัน

การตรวจวัดค่า Mitotic index (M.I.) ในแต่ละหลอดทดลอง พบว่าหลอดที่เติมแลนเทนทและทามารอน 600 เอสแอล มีค่า Mitotic index ลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าสารทั้งสองชนิดมีผลทำให้การเจริญและการแบ่งตัวของเซลล์ลดลง และหลอดที่เติมฟูราดานทุกความเข้มข้นมีค่า Mitotic index ลดต่ำกว่ากลุ่มควบคุม

ในการทดสอบวิธี comet assay ซึ่งเป็นวิธีตรวจสอบ DNA strand breaks ในแต่ละเซลล์ วิธีนี้ถูกนำมาใช้ในการทดสอบสารเคมีมากขึ้นในปัจจุบัน เป็นการทดสอบที่ไม่ยุ่งยาก ทำได้รวดเร็วมีความไวสูง ผลเชื่อถือได้ ใช้ตัวอย่างเซลล์เพียงเล็กน้อย ทำการทดสอบได้ทั้งในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลอง ใช้ประโยชน์ในการตรวจสอบ mutagen และ carcinogen, DNA repair studies, environmental monitoring และ human monitoring (Fairbairn และคณะ, 1994; Rojas และคณะ, 1999; Collins และคณะ, 1997) การวิจัยครั้งนี้ได้ปรับปรุงและดัดแปลงจากรายงานวิจัยที่ผ่านมาในด้านขั้นตอนการทำ การตรวจวิเคราะห์เพื่อความสะดวกในการนำมาใช้ในห้องปฏิบัติการ ปัญหาและอุปสรรคที่พบในขั้นตอนการทำ comet assay ช่วงที่ทำ pilot study ได้แก่ เซลล์ทดลองมีส่วนหางที่ยาวมาก ตรวจวิเคราะห์ลำบาก จึงได้ทำการปรับความเข้มข้นของเจลชั้นที่ 2 เพิ่มมากขึ้น ลดปริมาณกระแสไฟฟ้าและเวลาในการ run electrophoresis ลง มีการปรับเวลาที่ใช้ในการทำให้ดีเอ็นเอคลายเกลียว โดยการศึกษาของ Yendle และคณะ (1997) พบว่า เวลาที่ใช้ในการคลายเกลียวของดีเอ็นเอนั้น มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ (DNA migration) โดยถ้าใช้เวลานานก็จะทำให้ดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ไกลมากขึ้น อุณหภูมิก็มีผลเช่นกัน Speit และ คณะ (1999) ได้ทำการศึกษาพบว่าอุณหภูมิที่ใช้ในขณะที่ทำการคลายเกลียวดีเอ็นเอ และ run electrophoresis มีผลต่อการเคลื่อนที่ของดีเอ็นเอ โดยอุณหภูมิสูงจะทำให้เกิดดีเอ็นเอเคลื่อนที่ได้ไกลกว่า ผู้วิจัยได้ทำการทดลองจนกระทั่งได้สภาวะที่เหมาะสมดังกล่าวในบทวิธีดำเนินการวิจัย ในส่วนของการนำเซลล์มาใช้ในการทดสอบ เริ่มแรกผู้วิจัยได้ใช้ whole blood แต่พบว่าขนาดของเซลล์ที่ตรวจวิเคราะห์มีขนาดแตกต่างกัน ทำให้ยากแก่การประเมินผล เนื่องจากใน whole blood มีเซลล์เม็ดเลือดขาวหลายชนิด ดังนั้นจึงได้ใช้ isolated lymphocytes มาทำการทดสอบ ทำให้ได้เซลล์ที่มีขนาดใกล้เคียงกัน การศึกษาครั้งนี้ใช้ตัวอย่างเป็น fresh blood ทำการแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ทันทีหลังจากเก็บตัวอย่างเลือด แล้วทำการทดสอบ แต่ Anderson และคณะ (1997) ศึกษาพบว่าตัวอย่าง

เลือด สามารถเก็บที่ 4°C หรืออุณหภูมิห้อง ได้นาน 4 วัน โดยให้ผล comet assay ไม่แตกต่างกัน ส่วนการตรวจวัดเซลล์ถ้าไม่ได้ทำทันทีหลังจากย้อมด้วย ethidium bromide สามารถเก็บไว้ใน moist chamber ที่ 4°C ได้เป็นเวลานาน มากกว่า 2 สัปดาห์ แต่สีจะจางลง ดังนั้นก่อนทำการตรวจวัดต้องย้อมด้วย ethidium bromide ซ้ำ จึงจะเห็นเซลล์ชัดเจน นอกจากการเก็บใน moist chamber แล้ว สามารถเก็บได้โดย ใช้ lacquer ขาขอบของ cover slip (Dai, 1999) เก็บได้เป็นเวลานาน อีกวิธีหนึ่งคือการทำให้แห้งโดยใช้อุณหภูมิ 22-50°C เมื่อจะตรวจวิเคราะห์ก็นำสไลด์มา rehydrate พบว่าผลไม่แตกต่างกับ fresh slide (Woods และคณะ, 1999)

เนื่องจากการทดสอบ comet assay ต้องทำการแยกเซลล์ลิมโฟไซท์ก่อนนำมาทดสอบกับสารต่างๆ ทำให้ปริมาณเซลล์ที่จะใช้ทดสอบลดลงเมื่อเทียบกับการทดสอบความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซม ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดลองแยกเซลล์ลิมโฟไซท์แล้วเติมสารเลนเนท ทามารอน และฟูราดาน ความเข้มข้น เช่นเดียวกับการทดสอบ chromosome aberration แล้วนับจำนวนเซลล์ที่เหลืออยู่ แสดงผลดังตารางที่ 13 พบว่า หลอดที่เติมเลนเนท และฟูราดาน ทุกความเข้มข้น มีจำนวนเซลล์ลดลงเล็กน้อย แต่หลอดที่เติมทามารอน ความเข้มข้น 100, 400 µg/ml มีจำนวนเซลล์ลดลงมาก และความเข้มข้น 800 µg/ml ไม่มีเซลล์เหลืออยู่เลย ผู้วิจัยจึงใช้ความเข้มข้นของทามารอนที่ใช้ทดสอบ comet assay เป็น 100, 200 และ 400 µg/ml เพื่อให้มีจำนวนเซลล์มากพอในการตรวจวิเคราะห์

ผลการศึกษาโดยวิธี comet assay พบว่า เลนเนท-แอล ทุกความเข้มข้นคือ 100, 400 800 และ 1,600 µg/ml ทำให้เกิดการขาดของสายดีเอ็นเอมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่า เลนเนท-แอล มีผลอันตรายต่อดีเอ็นเอ เมื่อเปรียบเทียบกับทดสอบความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซม ซึ่งให้ผลแตกต่างทางสถิติกับกลุ่มควบคุมเฉพาะหลอดที่เติมเลนเนท-แอล ความเข้มข้น 800 และ 1,600 µg/ml และโดยวิธี comet assay พบว่า ทามารอน 600 เอสแอล ทุกความเข้มข้น คือ 100, 200 และ 400 µg/ml ทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายเพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่การทดสอบด้วยวิธี chromosome aberration assay ไม่พบความผิดปกติแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แสดงว่า ทามารอน 600 เอสแอล ในระดับความเข้มข้นดังกล่าว เป็นสารก่อกัดแมลงที่มีผลทำให้เกิดการขาดของสายดีเอ็นเอ แต่ไม่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม จากผลการทดสอบทั้งหมดในการศึกษานี้พบว่าวิธี comet assay มีความไวดีกว่า chromosome aberration assay การทดสอบวิธี comet assay พบว่าส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (S.D.) ของค่าเฉลี่ยความยาวส่วนหางของเซลล์ทุกหลอดทดลองมีค่าสูงมาก แสดงดังตารางที่ 5 และ 6 เนื่องมาจากการตรวจวิเคราะห์วิธีนี้เป็นการวัดความยาวของเซลล์ ซึ่งสารที่เติมไม่ได้มีผลต่อทุก

เซลล์ บางเซลล์อาจมีการขาดของสายดีเอ็นเอหลายจุด หรือบางเซลล์อาจไม่มีการขาดของสายดีเอ็นเอเลย ดังนั้นจึงมีผลต่อความยาวของเซลล์เช่นเดียวกัน เซลล์ที่มีการขาดของสายดีเอ็นเอมากก็จะทำให้เซลล์มีส่วนหางยาวมาก แต่เซลล์ที่ไม่มีการขาดของสายดีเอ็นเอส่วนหางของเซลล์ก็จะสั้นหรือไม่มีเลย การทดสอบค่าทางสถิติในการทดสอบ comet assay ขึ้นแรกได้ทดสอบการแจกแจงของข้อมูลว่ามีการแจกแจงแบบปกติ(normal distribution) หรือไม่ โดยใช้ Kolmogorov-Smirnov test (K-S test) พบว่าข้อมูลทุกกลุ่มได้แก่ กลุ่มแลนเนท กลุ่มทามารอน กลุ่มฟูราดาน มีการแจกแจงของข้อมูลไม่ปกติจึงต้องใช้วิธี Kruskal-Wallis one-way analysis of Variance ทดสอบแต่ละกลุ่มว่ามีความแตกต่างทางสถิติหรือไม่ พบว่าแต่ละกลุ่มมีความแตกต่างทางสถิติภายในกลุ่ม จึงต้องมีการทดสอบทางสถิติเปรียบเทียบรายคู่ โดยวิธี Mann-Whitney test เช่นเดียวกับงานวิจัยของ Björn Hellman และคณะ (1994,1995) Anderson และคณะ (1997) Andreoli และคณะ (1997)

จากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าสารเคมีกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิด คือ แลนเนท-แอล ทามารอน 600 เอสแอล และฟูราดาน 3% จี ทุกความเข้มข้นที่ทดสอบ ทำให้มีการขาดของสายดีเอ็นเอเพิ่มขึ้นทดสอบโดยวิธี comet assay กับเซลล์ลิมโฟไซท์ของคนในหลอดทดลอง แลนเนท-แอล ความเข้มข้น 800 และ 1,600 $\mu\text{g/ml}$ และฟูราดาน 3% จี ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เกิดความผิดปกติเชิงโครงสร้างของโครโมโซมของเซลล์ลิมโฟไซท์ของคนในหลอดทดลองเพิ่มมากขึ้น แสดงว่าสารกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิด เป็นสารพันธุพิษ ซึ่งอาจทำอันตรายต่อดีเอ็นเอและโครโมโซมเมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการเกิดอันตรายนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณสารที่ได้รับ ตำแหน่งที่สารเข้าสู่ร่างกาย ระยะเวลาที่ได้รับสารนั้น ความเข้มข้นของแลนเนท-แอล ที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำให้ใช้พ่นกำจัดแมลง คือ 540 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งอยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ความเข้มข้นของทามารอนที่บริษัทผู้ผลิตแนะนำให้ใช้พ่นกำจัดแมลงคือ 600-1,200 $\mu\text{g/ml}$ อยู่ในช่วงความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ เช่นกัน แต่ฟูราดาน 3% จี ใช้โดยการหว่าน โรย หรือรองกันหลุม ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชผัก ปริมาณการใช้ก็แตกต่างกันในพืชแต่ละชนิด จึงไม่สามารถทราบความเข้มข้นที่ใช้แน่นอน ความเข้มข้นของสารที่บริษัทแนะนำให้ใช้กำจัดแมลงดังกล่าว แม้ว่าจะทำให้ดีเอ็นเอถูกทำลายในหลอดทดลอง ปริมาณสารดังกล่าวจะลดลงหลายเท่า เมื่อเข้าสู่ร่างกายคน ซึ่งแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่สารเข้าสู่ร่างกาย ถ้าได้รับทางหายใจก็จะได้รับปริมาณมากกว่าทางสัมผัสผิวหนัง นอกจากนี้สารกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิดนี้ เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยขบวนการเมตาบอลิซึม ซึ่งอาจจะทำให้ความเป็นพิษต่อยีนลดลงหรืออาจจะเพิ่มขึ้นก็ได้ ดังนั้นควรจะมีการศึกษาต่อไป โดยทำการทดสอบกับสัตว์ทดลอง เช่น

หนูถีบจักร หนูพุกขาว หรือ หนูแฮมสเตอร์ รวมทั้งทำการทดสอบสารที่เกิดจากขบวนการเมตาบอลิซึมของสารกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิด ทำการทดลองโดยการเติมสาร S9 mix ซึ่งเป็นส่วนผสมของเอนไซม์และโคแฟกเตอร์ที่จำเป็นในการกระตุ้นขบวนการเมตาบอลิซึมของสารเคมีลงไปในการละลายที่ใช้ทดสอบ เพื่อนำข้อมูลที่ได้ไปใช้ในการประเมินผลการทำให้เกิดพิษต่อคนต่อไป

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า สารกำจัดแมลงทั้ง 3 ชนิด คือ แลนเนท-แอล ทามารอน 600 เอสแอล และฟูราดาน 3 % จี มีผลต่อสารพันธุกรรมของมนุษย์ในหลอดทดลอง จึงสมควรอย่างยิ่งที่จะเผยแพร่ความรู้ถึงอันตรายของสารดังกล่าว การใช้สารเคมีกำจัดแมลงอย่างถูกต้องเพื่อความปลอดภัยของเกษตรกรเองและประชาชนผู้บริโภคพืชผักและผลไม้ต่อไป