

พิษของแคดเมียมต่อม้ามของปลานิล



นางสาวโปติกา โชติพงษ์

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

TOXICITY OF CADMIUM ON TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SPLEEN.



Miss Potiga Chotipong

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology

(Interdisciplinary Program)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	พิษของแคดเมียมต่อม้ามของปลานิล
โดย	นางสาวปติกา โชติพงษ์
สาขาวิชา	เภสัชวิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร.พาลาภ สิงหเสนี
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นพดล พิฬารัตน์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน  
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

.....รองอธิการบดี  
รักษาการแทนคณบดีบัณฑิตวิทยาลัย  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ม.ร.ว.กัลยา ติงศภักดิ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุรียะ เจียรนังมงคล)

.....อาจารย์ที่ปรึกษานัก  
(รองศาสตราจารย์ ดร.พาลาภ สิงหเสนี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นพดล พิฬารัตน์)

.....กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุพัชรา ศรีไชยรัตน์)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ วิทยา จันทสูตร)

.....กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิ ลิ้มปนสีทิฏกุล)

โปติกา ไซติฟงส์: พิษของแคดเมียมต่อม้ามของปลานิล. (TOXICITY OF CADMIUM ON TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SPLEEN) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร.พาลาภ สิงหนณี, อ. ที่ปรึกษาร่วม: ผศ.น.สพ.ดร.นพดล พิฬารัตน์, 72 หน้า.

การศึกษานี้เป็นการทดสอบพิษมาตรฐานของแคดเมียมในปลานิลน้ำหนักประมาณ 20-35 กรัม ปลาถูกนำมาปรับสภาพและทดสอบกับแคดเมียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.1 ถึง 10 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง การทดสอบเป็นลักษณะน้ำนิ่ง (แสง 12 ชั่วโมง อุณหภูมิ 25.5 ถึง 27 องศาเซลเซียส ค่าการละลายของออกซิเจน 5.4 ถึง 5.6 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความเป็นด่าง 6 ถึง 7 และค่าความกระด้าง 50 มิลลิกรัมต่อลิตรแคลเซียมคาร์บอเนต) ผู้วิจัยวัดระดับแคดเมียมในอ่างทดสอบตลอดช่วงเวลาที่ทำการทดสอบพิษ สังเกตลักษณะอาการของปลา อัตราการตายสะสม การเกิดโลหิตเปอร้ออกซิเดชันและจุลพยาธิวิทยาของม้ามในปลานิล และนอกจากนี้ยังศึกษากลไกการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยดูการแสดงออกของ NF-kB (c-Rel) โปรตีน บีเซลล์ และ IgM โดยใช้เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

จากการศึกษาพบว่าปลามีอัตราการตายเพิ่มสูงขึ้นเมื่อแคดเมียมมีความเข้มข้นสูงขึ้น พบการเพิ่มขึ้นของการเกิดโลหิตเปอร้ออกซิเดชันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) นอกจากนี้พบความผิดปกติของจุลพยาธิวิทยาของม้ามปลา โดยความรุนแรงของความผิดปกติจะมีความสัมพันธ์กับขนาดของสารพิษในอ่างทดสอบ ลักษณะความผิดปกติจากม้ามปลาที่ได้รับแคดเมียม ได้แก่ Ellipsoidal tissue enlargement, การรวมกลุ่มของ Melanomacrophage (macrophage aggregation), Vacuolar degeneration และ Edematous capillary ของหลอดเลือดฝอยใน white pulp ที่เกิดพิษ พบการเปลี่ยนแปลงภูมิคุ้มกันของปลานิลต่อแคดเมียมโดยพบการเพิ่มขึ้นของบีเซลล์ (IgM) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) และการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวมีความสัมพันธ์กับขนาดของแคดเมียมที่ใช้ทดสอบ ในการทดลองครั้งนี้ผู้วิจัยไม่สามารถตรวจพบการแสดงออกของ NF-kB (c-Rel) โปรตีนในม้ามปลานิล ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากการที่แอนติบอดีที่ใช้ในครั้งนี้อาจไม่มีความจำเพาะต่อ NF-kB (c-Rel) โปรตีนของปลานิลหรือแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เหมาะสมในการทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

การทดลองครั้งนี้ยืนยันความเป็นพิษของแคดเมียมต่อเนื้อเยื่อม้ามปลานิล โดยระดับความเป็นพิษขึ้นกับปริมาณแคดเมียมที่ได้รับ (dose dependent) โดยใช้ปลานิลซึ่งเป็นปลาที่มีความทนทานและมีพัฒนาการปรับตัวเข้ากับสิ่งแวดล้อมในเขตร้อนได้ดี แคดเมียมมีพิษต่อหลายระบบ การประเมินความเสี่ยงจากพิษจึงควรต้องพิจารณาถึงพัฒนาการด้านชีวเคมีและกายวิภาคของสัตว์ทดสอบในแง่ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้วย

สาขาวิชา ภาสัชวิทยา

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่อนิสิต.....โปติกา ไซติฟงส์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....พ.ดล พิฬารัตน์  
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....พ.ดล พิฬารัตน์

# # 4789113820 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD : CADMIUM / TOXICITY /TILAPIA / SPLEEN

POTIGA CHOTIPONG: TOXICITY OF CADMIUM ON TILAPIA (*OREOCHROMIS NILOTICUS*) SPLEEN. THESIS ADVISOR :ASSOC.PROF.PALARP SINHASANI, Ph. D.,  
 THESIS COADVISOR: ASST. PROF.NOPPADON PILARAT, D.V.M., Ph. D., 72 pp.

This study examined toxicity of cadmium to tilapias (20-35 g body weight). Fish were acclimatized and exposed to cadmium chloride in varying concentrations (0.1-10 mg/l) for 96 hrs under controlled environmental condition (12 hrs light-length/day, 25.5-27 °C in temperature, 5.4-6.5 in DO, 6-7 in pH and 50 mg/l in hardness). Concentration of cadmium was regularly measured during experimental period. Cadmium effects were investigated by clinical signs, cumulative mortality, biochemical lipid peroxidation (MDA measurement) and histopathological investigations. The expression of NF-kB (c-Rel) protein, B cell and IgM was also measured.

In this study, statistically significant ( $P < 0.05$ ) increase in lipid peroxidation was found to be dose related. This is a relationship between the histopathological change and cadmium doses investigated. Ellipsoidal tissue enlargement, the melano-macrophage cell aggregations, the vacuolar degeneration and the edematous capillary are seen.

B cell proliferation was detected, in parallel to IgM increase. No positive NF-KB (c-Rel) protein antibody reaction in splenic tissue was detected. It might be explained that antibody used in this study was not cross-reacted with NF-kB(c-Rel) protein of tilapia or the antibody was not suitable for immunohistochemical detection.

This study confirmed the toxicity of cadmium to splenic tissue of tilapias in a dose – dependent manner. Tilapia is a tolerant fish which has high capacity to adapt to toxic environmental conditions. Screening–test for cadmium toxicity, therefore need to take into account comparative ecological development of organism in related biochemical and anatomical response of organisms tested for toxicity.

Field of Study : .....Pharmacology..... Student's Signature : .....Potiga Chotipong.....  
 Academic Year :...2007..... Advisor 's Signature : .....Assoc. Prof. Palarp Sinhasani.....  
 Co-advisor's Signature : .....Asst. Prof. Noppadon Pilarat.....

## กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. พาลาภ สิงหเสนี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้ ตลอดจนเสียสละอันมีค่าตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆจนวิทยานิพนธ์เสร็จสมบูรณ์

ขอกราบของพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.นพดล พิพัรัตน์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำ ข้อคิดเห็นและข้อเสนอแนะต่างๆที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยนี้

ขอกราบของพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.สมเกียรติ ปิยะธีรธิดาวรกุล ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ และอุปกรณ์ต่างๆ รวมทั้งคำชี้แนะ ตลอดระยะเวลาศึกษาวิจัย

ขอกราบของพระคุณ ดร. เนาวรัตน์ ธาราททรัพย์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต และคุณทองใบ จันสีชา เจ้าหน้าที่ปฏิบัติการคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ที่อำนวยความสะดวกในด้านอุปกรณ์ในการตัดชิ้นเนื้อเยื่อ รวมทั้งความช่วยเหลือต่างๆ ตลอดจนความเป็นกันเองที่มีให้แก่ผู้วิจัย

ขอกราบขอบพระคุณคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ คณาจารย์ประจำหลักสูตรสหสาขาวิชาเภสัชวิทยาทุกท่าน ที่ให้ความรู้ คำแนะนำ และความเอาใจใส่ในตัวลูกศิษย์ตลอดการศึกษา

สุดท้ายผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา พี่น้อง เพื่อนๆ ที่เป็นแรงผลักดันให้มีกำลังกาย กำลังใจและความมานะพยายามในการศึกษามาตลอด

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฌ
สารบัญภาพ.....	ญ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ฎ
<b>บทที่</b>	
1.บทนำ.....	1
วัตถุประสงค์การวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	2
2.ทบทวนวรรณกรรม.....	3
ปลานิล.....	4
Spleen (ม้าม).....	5
การตอบสนองต่อความเครียดของปลา.....	7
การตอบสนองต่อOsmotic stress ในปลา.....	9
ภูมิคุ้มกันในปลา (immunity in fish).....	6
NF-kB .....	13
ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative Stress).....	16
แคดเมียม.....	20
3.อุปกรณ์และวิธีการทดลอง.....	24
สัตว์ทดลอง เครื่องมือ และสารเคมี.....	24
การเลี้ยงปลานิลที่สัมผัสกับแคดเมียมและการควบคุมคุณภาพน้ำ.....	26
การวิเคราะห์ lipid peroxidation และตรวจวัด Antioxidant enzyme.....	27
Activity.....	
การทดลองทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาโดยศึกษาพยาธิวิทยาของม้าม.....	29
การย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี.....	31
สถิติ.....	33

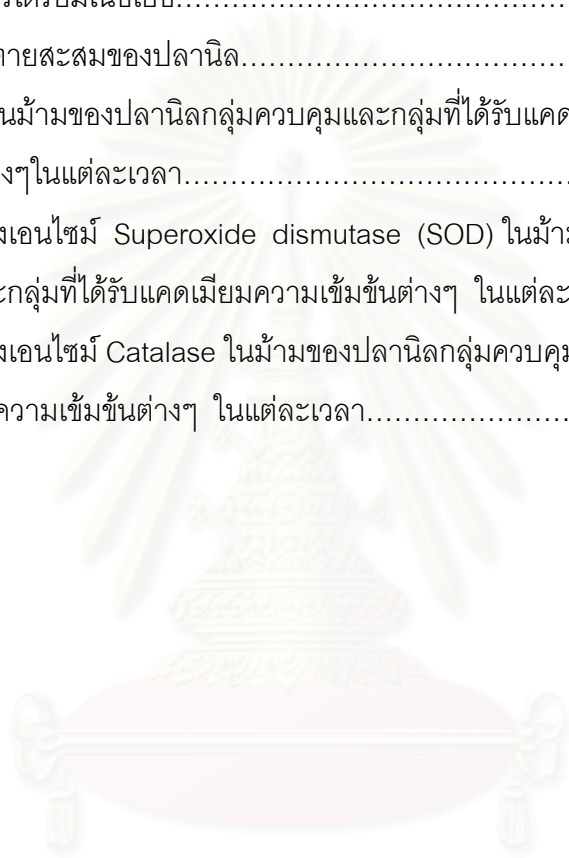
## บทที่

การกำจัดสารเคมี.....	33
4. ผลการทดลอง.....	34
การศึกษาพิษของแคดเมียมในปลานิล.....	34
ผลของแคดเมียมต่อปริมาณ MDA ในน้ำมของปลานิล.....	37
ผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD).....	38
ผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์ Catalase.....	39
ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของน้ำมที่.....	40
ระยะเวลาต่างๆ.....	
ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงของบีเซลล์และ NF- kB (c-Rel).....	49
ตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี.....	
5. อภิปรายสรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ.....	54
รายการอ้างอิง.....	59
ภาคผนวก.....	68
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	72



สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1.พิษของแคดเมียมต่อปลาน้ำจืด.....	23
2.แสดงคุณภาพน้ำระหว่างทำการทดลอง.....	27
3.แสดงขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ.....	29
4.แสดงอัตราการตายสะสมของปลานิล.....	36
5.ปริมาณ MDA ในม้ามของปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียม.....	37
ความเข้มข้นต่างๆในแต่ละเวลา.....	
6.ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในม้ามของปลานิล.....	38
กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละเวลา.....	
7.ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ Catalase ในม้ามของปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่.....	39
ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละเวลา.....	



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญภาพ

รูป	หน้า
1.ปลาไนล.....	4
2.โครงสร้างของม้ามปลา.....	7
3.แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis ..... และระบบภูมิคุ้มกันซึ่งตอบสนองต่อความเครียดในปลา.....	8
4.Osmosensory signal transduction network ในปลา.....	9
5.แสดงวิถีกระตุ้นผ่าน TLR4.....	11
6.แสดงสมาชิก NF-kB หรือ Rel family.....	15
7.การกระตุ้น NF-kB.....	15
8.การเกิด lipid peroxidation.....	18
9.จุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อม้ามจากปลาไนล(Hematoxylin & Eosin 20X).....	41
10.จุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อม้ามจากปลาไนล (Hematoxylin & Eosin 100X).....	41
11.แสดงการเกิด Ellipsoidal tissue enlargement ..... (Hematoxylin & Eosin 20X).....	42
12.แสดงการเกิด Ellipsoidal tissue enlargement ..... (Hematoxylin & Eosin 100X).....	42
13. แสดงคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุลพยาธิสภาพ Ellipsoidal tissue enlargement.....	43
14.แสดงการเกิด Melanomacrophage cell aggregation..... (Hematoxylin & Eosin 4X).....	44
15.แสดงการเกิด Melanomacrophage cell aggregation..... (Hematoxylin & Eosin 10X).....	44
16.แสดงคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุลพยาธิสภาพ เกิด Melanomacrophage .....	45
17.แสดงการเกิด vacuolar degeneration ..... (Hematoxylin & Eosin 20X).....	46
18.แสดงการเกิด vacuolar degeneration ..... (Hematoxylin & Eosin 100X).....	46
19.แสดงคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุลพยาธิสภาพ เกิด Vacuolar degeneration.....	47
20.แสดงการเกิด Edematous capillary(Hematoxylin & Eosin 20X).....	48

รูป

21.แสดงการเกิด Edematous capillary (Hematoxylin & Eosin 100X).....	48
22.จุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบจากปลานิล แสดงบีเซลล์.....	50
(Hematoxylin & Eosin 20X).....	
23.จุลกายวิภาคของเนื้อเยื่ออักเสบจากปลานิล แสดงบีเซลล์.....	50
(Hematoxylin & Eosin 100X).....	
24.จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออักเสบจากปลานิล แสดงบีเซลล์.....	51
(Hematoxylin & Eosin 20X).....	
25.จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออักเสบจากปลานิล แสดงบีเซลล์.....	51
(Hematoxylin & Eosin 100X).....	
26.แสดงคะแนนเฉลี่ยการย้อมติดสี Tilapia polyclonal anti- IgM antibody.....	52
27.ความสัมพันธ์ระหว่าง Innate immunity และ Adaptive immunity.....	56

## คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ชม.	ชั่วโมง
%	เปอร์เซ็นต์
°C	degree celsius
CD	cluster of differentiation
DO	dissolved Oxygen
LC <sub>50</sub>	median lethal concentration
μl	microlitre
μg/ml	microgram per millilitre
mg/kg	milligram per litre
M	Molar
MHC	Major Histocompatibility Complex
nmoles/l	nanomole per litre
ng/ml	nanogram per millilitre
ppm	part per million
pH	potential of Hydrogenion
SE	standard error
TCR	T cell receptor
TNF	Tumor necrosis factor

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 1

### บทนำ

ในชีวิตประจำวันของมนุษย์สารโลหะหนัก (Heavy metal) ถูกนำมาใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรม และการเกษตร สารโลหะหนักจะตกค้าง และปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไป เช่น แหล่งน้ำ ดิน อาหาร ภาชนะเครื่องใช้ต่าง ๆ เครื่องสำอาง ฯลฯ ดังนั้นจึงมีโอกาสก่ออันตรายต่อมนุษย์เป็นวงกว้าง ยกตัวอย่างอันตรายจากของเสียที่มีสารแคดเมียมเจือปนอยู่ ได้แก่ กรณีของโรคอิไต-อิไตที่เกิดขึ้นในมณฑลโทยามา ประเทศญี่ปุ่น ซึ่งเกิดจากการปล่อยน้ำเสียจากเหมืองตะกั่วและสังกะสี รวมทั้งโรงงานถลุงตะกั่วและสังกะสีที่มีสารแคดเมียมเจือปนอยู่ลงในแม่น้ำจินชู ซึ่งเป็นแหล่งน้ำดื่ม และน้ำใช้ในการเกษตรกรรมทำให้มีสารแคดเมียมสะสมอยู่ในน้ำและในข้าวที่ใช้น้ำจากแม่น้ำเพื่อการเพาะปลูก เมื่อประชาชนนำน้ำและข้าวนั้นมาบริโภคจึงได้รับสารแคดเมียมด้วย หรือกรณีที่เกิดขึ้นในประเทศไทยหลังจากการที่สถาบันจัดการคุณภาพน้ำนานาชาติ (International Water Management Institute-IWMI) ได้นำเสนอในปี พ.ศ. 2546 ว่ามีสารแคดเมียมปนเปื้อนอยู่ในดิน ในน้ำ และในพืช บริเวณแถบลุ่มน้ำแม่ตาบ รวมเนื้อที่กว่า 1.5 หมื่นไร่ ในพื้นที่หมู่บ้านแม่ตาบ ต.แม่ตาบ บ้านพะเด๊ะ, บ้านแม่ตาบใหม่ บ้านค่างภิบาล ต.พระธาตุผาแดง และบ้านแม่กู่ ต.แม่กู่ อ.แม่สอด จ.ตาก ส่งผลให้ประชาชนที่มีอาชีพทำไร่บริเวณลุ่มน้ำแม่ตาบต้องเปลี่ยนอาชีพและอาจส่งผลต่อสุขภาพประชาชนในบริเวณดังกล่าวอีกด้วย

โลหะหนักอาจปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมที่สัตว์น้ำอาศัยอยู่ การพัฒนาทางด้านการเกษตร การปศุสัตว์และการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ น้ำทิ้งจากชุมชนเมือง ล้วนเป็นปัจจัยให้เกิดความเสื่อมโทรมของแหล่งน้ำซึ่งเป็นที่อยู่อาศัยของสัตว์น้ำ สิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้คือการปนเปื้อนของโลหะหนักซึ่งถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ เช่น อุปกรณ์ผลิตพลาสติก พีวีซี สี ถ่านไฟฉาย ทางด้านการเกษตร ใช้เป็นส่วนผสมของยาฆ่าแมลงและปุ๋ย ทางด้านการแพทย์ใช้เป็นส่วนผสมของยา อุปกรณ์ทางการแพทย์และเครื่องสำอาง

โลหะหนักเป็นสารที่คงตัว ไม่สามารถสลายตัวได้ในกระบวนการธรรมชาติ จึงมีบางส่วนตกตะกอนสะสมอยู่ในดิน ดินตะกอนที่อยู่ในน้ำ ดังนั้น การปนเปื้อนของโลหะหนักในสัตว์น้ำจึงเป็นสิ่งหลีกเลี่ยงไม่ได้ โดยเฉพาะปลาซึ่งเป็นแหล่งอาหารโปรตีนของมนุษย์ และเป็นสัตว์น้ำที่มีผู้นิยมบริโภคเป็นจำนวนมาก

การใช้ปลาเป็นสัตว์ทดสอบ อาจมีวัตถุประสงค์การอนุรักษ์ทรัพยากรปลา เนื่องจากปลาเป็นส่วนสำคัญในระบบนิเวศน์ หรืออาจมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจคัดกรองสารเคมีที่อาจก่อให้เกิดผลอันไม่พึงประสงค์ในมนุษย์ ซึ่งในลักษณะหลังนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาถึงความคล่องตัวของ การสนองตอบในสิ่งมีชีวิตที่นำมาทดสอบพิษนั้นกับระบบของมนุษย์ด้วย จึงจะสามารถนำไปสู่

การประเมินความเสี่ยงสำหรับผลิตภัณฑ์ที่นำมาใช้ประโยชน์ เช่น การรักษาโรคต่าง ๆ หรือ ผลกระทบอันไม่พึงประสงค์อื่นอาจเกิดจากการกระจายของผลิตภัณฑ์นั้น ๆ เข้าสู่สิ่งแวดล้อมในวงกว้าง เช่น สารเคมีที่นำมาใช้ในอุตสาหกรรมและกากของเสียอันตราย หรือน้ำทิ้งจากการผลิต ผลิตภัณฑ์จากบ้านเรือน สารกำจัดศัตรูพืชในการเกษตรกรรม เป็นต้น ซึ่งทั้งสองประเด็นต้องนำมาสู่การพิจารณาขึ้นทะเบียนหรือการประเมินความเสี่ยงในสภาพต่างๆ โดยต้องพิจารณา

1. ความคล่องตัวของ การตอบสนองในสิ่งมีชีวิต กลไกในระดับโมเลกุลรวมถึงกลไกการ เกิดพิษในการปรับตัว (Adaptive coping) ทั้งนี้เพราะพลวัต (dynamics) ของกระบวนการ ดังกล่าวนำมาซึ่งการตอบสนองและระดับกัน (threshold) ในสิ่งมีชีวิตซึ่งได้รับอันตรายจากพิษ

2. การศึกษาผลและขนาดของสารพิษที่ก่อให้เกิดการปรับตัวและการตอบสนองว่า สังเกตเห็นในขนาดและสภาวะที่เป็นไปได้จริงหรือไม่

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการสนองตอบของปลานิลต่อแคดเมียมในประเด็นที่ตั้งว่า การใช้ ปลานิลทดสอบพิษต่อแคดเมียมในสภาวะที่เป็นกรแยกเซลล์จากม้าม และดูการสนองตอบต่อ ภูมิคุ้มกันมีความเหมาะสมหรือไม่

### วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อม้ามของปลานิลในระดับที่ไม่ทำให้ปลาตายเมื่อได้รับ สารที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงโดยศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลง ลักษณะทางจุลพยาธิสภาพของม้ามในปลานิล
2. ศึกษาพิษของแคดเมียมที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันโดยวัดจากเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ ในม้ามของปลานิลและสมรรถนะของ NF-kB โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

### ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ทราบถึงพิษของแคดเมียมในระดับความเข้มข้นที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะ ทางจุลพยาธิสภาพของม้ามในปลานิล
2. ทราบถึงความสัมพันธ์ระหว่างพิษของแคดเมียมที่ก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันกับ NF- kB ในม้ามของปลานิล

## บทที่ 2

### บททวนวรรณกรรม

ปัจจุบัน National Institutes of Health (NIH) ได้พัฒนาสัตว์ทดลองที่นอกเหนือจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อทดสอบความเป็นพิษเช่นทดสอบเซลล์ในหลอดทดลองหรือการใช้คอมพิวเตอร์เป็นแบบในการทดลอง ในปี 1992 NTP immunotoxicity testing เสนอให้ใช้ปลาเป็นสัตว์ทดลอง เหตุผลที่มีผู้เลือกใช้ปลาประการแรกคือ การผลิตและดูแลรักษามีค่าใช้จ่ายน้อยกว่า ประการที่สอง ปลา มีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ประการที่สาม ปลาไวต่อสารเคมีที่เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Gogal Jr *et al.*, 1999) การศึกษาหลายการศึกษาที่ใช้ปลาเป็นสัตว์ทดลองเช่น ปลาเรนโบว์เทราซีที่ได้รับแคดเมียมขนาด 2 ppb พบว่ามีการรบกวนการ phagocytosis ของ macrophage นอกจากนี้ยังมีการสร้าง free radical เพิ่มขึ้นซึ่งสัมพันธ์กับเวลา (Zelikoff *et al.*, 1995) นอกจากนี้ยังพบว่า Lipopolysaccharide ขนาด 0.1 และ 1.5  $\mu\text{g/ml}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมงสามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน IL-1 $\beta$  ใน leucocyte ของปลาเรนโบว์เทราซีได้ (Zou *et al.*, 2000)

การศึกษพบว่าปลานิลมีความไวในการตอบสนองต่อสารเคมีหลายชนิด เช่น ปลานิลที่ได้รับสาร lindane ทางช่องท้องขนาด 40 mg/kg เป็นเวลา 2 วัน พบว่าจำนวนเม็ดเลือดขาวในน้ำมและไตลดลง (Hart *et al.*, 1997) ดังนั้นจึงมีการใช้ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นสัตว์ทดลองทางเลือกในการศึกษาพิษทางภูมิคุ้มกันเนื่องจากพบว่าภูมิคุ้มกันในปลานิลมีความคล้ายคลึงกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม นอกจากนี้ปลานิลเป็นสัตว์เศรษฐกิจและเป็นแหล่งโปรตีน (Wright *et al.*, 1999) เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีขนาดใหญ่และจำนวนมากกว่าปลาชนิดอื่น เลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการและราคาถูกเมื่อเทียบกับหนูทดลอง การพัฒนาปลานิลเป็นสัตว์ทดลองโดยศึกษาจากสารเคมี 14 ชนิดแบ่งออกเป็นสารที่เป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน 9 ชนิด และไม่เป็นพิษต่อภูมิคุ้มกันอีก 4 ชนิด ศึกษาโดยวิธีการ peripheral lymphocyte differentials, splenic white blood cell enumeration, lymphocyte blastogenesis , sheep RBC antigenspecific antibody production (ใช้ plaque forming cell assay, PFC) , antigen-specific cytotoxic T lymphocyte และ natural killer (NK) cell cytolytic activity พบว่าระบบภูมิคุ้มกันของปลานิลมีความไวต่อสารเคมีในขนาดต่ำกว่าในหนู (Gogal Jr *et al.*, 1999) และจากวิทยานิพนธ์ของ Smith และคณะ (1998) ซึ่งศึกษาโดยวิธี hemolytic plaque forming cell (PFC) และ cytotoxic T-lymphocyte (CTL) กับสารเคมี 14 ชนิดรวมถึงแคดเมียมคลอไรด์ พบว่าปลานิลมีระบบภูมิคุ้มกันคล้ายคลึงกับหนู

## ปลานิล (รูปที่ 1)

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Oreochromis niloticus* (Linn.)

### ลักษณะและอนุกรมวิธานของปลานิล

Phylum	Vertebrata
Class	Osteichthyes
Order	Perciformes
Family	Cichlidae
Genus	Oreochromis
Species	niloticus

ชื่อสามัญ Nile mouth-Brooder และ Nile tilapia

ปลานิลเป็นปลาน้ำจืดที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจเนื่องจากประชาชนนิยมเลี้ยงทั้งในรูปการค้าและบริโภค สามารถเลี้ยงได้ในสภาพแวดล้อมทุกสภาพ เนื้อปลามีรสชาติดี มีผู้นิยมบริโภคมาก เป็นปลาที่เลี้ยงง่าย เจริญเติบโตเร็ว กินอาหารได้เกือบทุกชนิด ขยายพันธุ์ได้ตลอดปี (ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ไครบุตร, 2542) ปลานิลตัวผู้จะมีอวัยวะเพศยาวยื่นออกมา ลำตัวมีสีเข้มกว่าตัวเมีย ปลานิลตัวเมียอวัยวะเพศมีลักษณะเป็นรูค่อนข้างใหญ่และกลม



รูปที่ 1 ปลานิล



จากการที่มีโลหะหนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งแคดเมียมปนเปื้อนลงในแหล่งน้ำธรรมชาติทำให้เกิดผลกระทบต่างๆมากมาย อาทิเช่น ทำให้ปลาที่อยู่ใกล้บริเวณที่มีแคดเมียมปนเปื้อนได้รับแคดเมียมเข้าไปมาก จึงก่อให้เกิดอันตรายต่อผู้บริโภคถ้าปริมาณสารตกค้างมีมากเกินไปเกินค่าความปลอดภัย ดังนั้นจึงได้มีการนำปลามาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษจากสารกลุ่มต่างๆ เพื่อความปลอดภัยของมนุษย์และเพื่อการอนุรักษ์ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำซึ่งเป็นวัตถุประสงค์ของการใช้ปลาเป็นสัตว์ทดลองในด้านวริชพิษวิทยา (พาลาก สิงห์เสนี และวินิจ ตันสกุล, 2530) ดังนั้นการใช้ปลานิลเป็นสัตว์ทดลองเพื่อศึกษาพิษต่อภูมิคุ้มกันถือว่าเป็นทางเลือกหนึ่ง เหตุผลประการแรกปลานิลเป็นแหล่งอาหารซึ่งให้โปรตีนและเป็นสัตว์เศรษฐกิจ และเป็นไปได้ว่าการเพาะเลี้ยงอาจมีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำซึ่งจะมีผลกระทบต่อมนุษย์ ประการที่สอง อวัยวะและเม็ดเลือดของปลานิลมีขนาดใหญ่เมื่อเปรียบเทียบกับปลาที่มีขนาดเล็ก เช่น ปลา madaka เป็นต้น ประการที่สามปลานิลสามารถเลี้ยงได้ง่ายในห้องปฏิบัติการและสุดท้ายราคาถูกเมื่อเทียบกับหนูทดลอง ดังนั้นปัจจุบันได้มีการนำปลามาใช้อย่างแพร่หลายเพื่อทดสอบพิษของยาและสารพิษต่างๆต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Smith, 1998)

### Spleen (ม้าม)

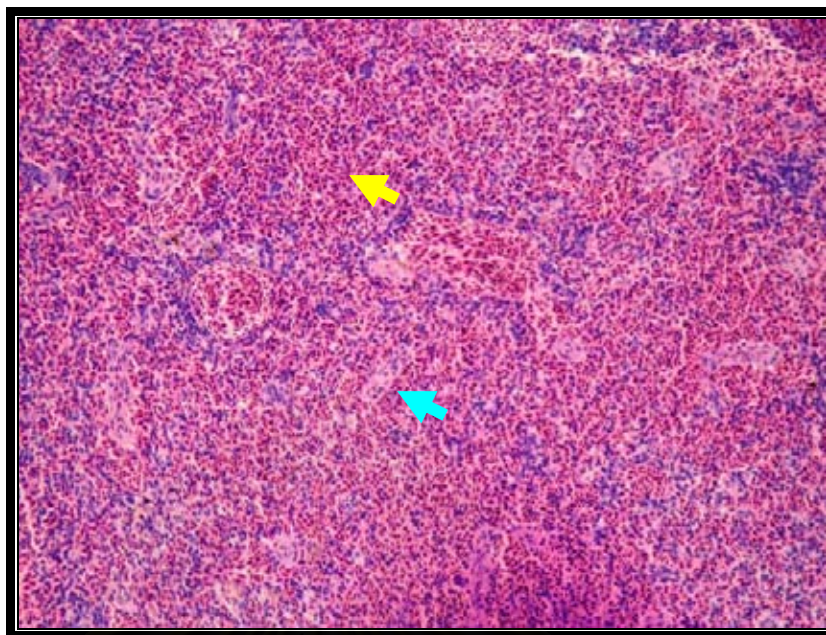
ม้ามเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันพบในปลาโตเต็มวัย ลักษณะเป็นอวัยวะที่ยาว และทอดตัวในแนวเดียวกับกระเพาะอาหารในช่องท้อง ม้ามอาจเป็นอวัยวะแรกสำหรับนำเซลล์ที่อ่อนแอเนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีอายุมากหรือเซลล์ที่ติดเชื้อออกไป ม้ามมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันซึ่งคล้ายกับต่อมน้ำเหลืองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนนอกของม้ามประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งประกอบกันเป็นผนังบางๆและยื่นเข้ามา ม้ามปลาจะประกอบด้วยเม็ดเลือดแดงโตเต็มวัยซึ่งสามารถปล่อยออกมาในกระแสเลือดในระหว่างที่เกิดภาวะเครียดและมี ม้ามปลาก็สามารถผลิต Thrombocytes ซึ่งควบคุมการแข็งตัวของเลือด

เนื้อเยื่อม้ามประกอบด้วยสามส่วนหลักๆ คือ pulp, ellipsoids และ melanomacrophage center (Fange *et al.*, 1985) ดังรูปที่ 2

Pulp ในปลาพบว่า red pulp และ white pulp จะแยกกันชัดเจนน้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น ในปลา rainbow trout ส่วนของ red pulp และ white pulp จะอยู่รวมกันจนกระทั่งอายุ 6 เดือน ถึง 1 ปี จึงจะแยกกันให้เห็นชัดเจน และเห็นการรวมกลุ่มของเม็ดเลือดขาว ซึ่งการเกิดในลักษณะนี้ตำแหน่งดังกล่าวอาจมีการจับกับแอนติเจน (Ag) และก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันต่อไป (Zapata, 1982) และมีรายงานพบว่า white pulp ในปลานิลจะมี reticular area แต่ไม่มี lymphoid center นอกจากนี้ยังพบ erythrocyte ด้วย (Sailendri *et al.*, 1975)

Splenic ellipsoids เป็นเส้นเลือดฝอยที่มีผนังเส้นเลือดหนาซึ่งสามารถเก็บแอนติเจนในขนาดเล็กได้โดยมีการศึกษาพบว่าหลังจากฉีด fluorescent latex beads เข้าไปในปลา Japanese conger (*Conger myriaster*) พบว่าจะถูกรองโดย ellipsoid แล้วถูกเก็บกินโดย macrophage (Furukawa *et al.*, 2002) หลังจากทีแอนติเจนถูกจับกินโดยเซลล์ macrophage แล้วจะถูกขนส่งไปยัง melanomacrophage center ต่อไป

Melanomacrophage center (MMC) เป็นตำแหน่งที่มีการรวมกันของ macrophage (macrophage aggregates) ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีแกรนูล แต่มีนิวเคลียส 1 อันและมีไซโทพลาสซึมขนาดใหญ่ จัดเป็น myeloid cells ส่วนใหญ่จะพบ macrophage ในชั้น Stroma ของม้ามหรือไต ซึ่งถือว่าเป็น hematopoietic tissue ยังมีรายงานไว้ในปลาบางชนิดอาจพบ MMC ในตับ ลักษณะของ MMC จะมีลักษณะเป็นกลุ่มๆ ติดสีน้ำตาลเข้มจะพบ pigment ต่างๆ เช่น melanin hemosiderin, lipofuscin และ ceroid เป็นต้น (Wolke *et al.*, 1985) มีรายงานพบว่าการรวมกันของ macrophage (macrophage aggregates) จะเกี่ยวข้องกับการเก็บเหล็กและการนำไปใช้ รวมถึงการกำจัดพิษที่เกิดจากสารพิษอีกด้วย (Agius, 1981) จากการศึกษาพบว่าลักษณะที่ปรากฏจะแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ (Agius, 1981) หรือเกิดจากสิ่งแวดล้อมเปลี่ยนแปลง (Fournie *et al.*, 2001) เช่นเมื่อปลาเกิดความเครียดพบว่าจำนวน macropage เพิ่มขึ้นและมีการเพิ่มขนาดของ MMC อีกด้วย (Wolke *et al.*, 1985) ซึ่งปัจจุบันได้มีการใช้ MMC มาเป็นสิ่งบ่งชี้ว่าสิ่งแวดล้อมก่อให้เกิดความเครียดในปลา (Fournie *et al.*, 2001) นอกจากนี้ความเครียดยังเหนี่ยวนำให้มีการสลายของเม็ดเลือดแดงอีกด้วย ในปลาชั้นสูงนอกจากจะพบ macrophage แล้ว ยังพบ lymphocytes อีกด้วยซึ่งมีความสำคัญในการจับกับแอนติเจน



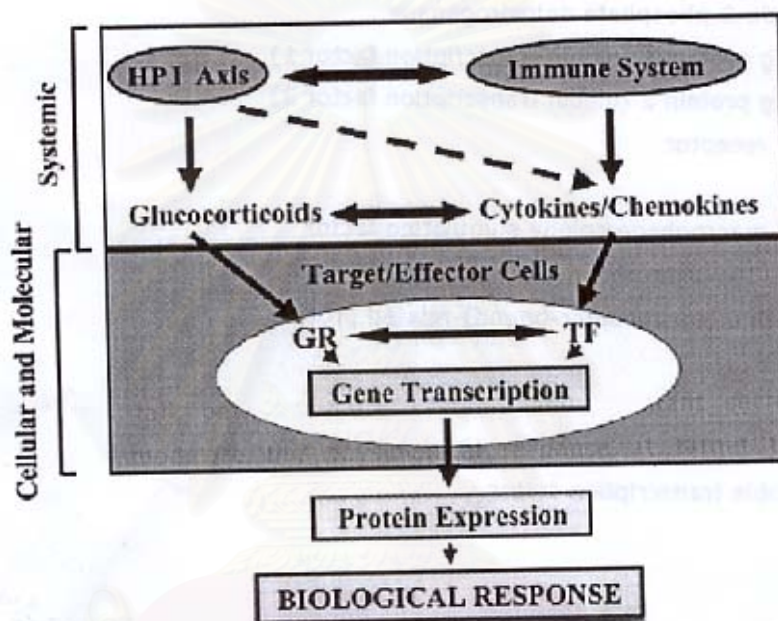
**รูปที่ 2** โครงสร้างของม้ามปลา แสดงถึง red pulp (ลูกศรสีเหลือง) และ white pulp (ลูกศรสีฟ้า) (Hematoxylin & Eosin 20X)

### การตอบสนองต่อความเครียดของปลา

การตอบสนองต่อความเครียดของปลาในตระกูล teleost จะมีความคล้ายคลึงกับสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง โดยเกี่ยวข้องกับ brain-sympathetic-chromaffin cell axis ผ่านทางใยประสาทของ chromaffin cell ในไตส่วนหน้า และ hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis ซึ่งเทียบได้กับ brain-sympathetic-adrenal medulla axis และ brain - sympathetic-adrenal axis ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง ดังรูปที่ 3 hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis จะทำงานผ่านทางฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด ได้แก่ catecholamines และ cortisol ซึ่งจะมีการหลั่งมาในกระแสเลือด โดย Catecholamines และ cortisol จะหลั่งจากเนื้อเยื่อ chromaffin และ interrenal ในไตส่วนหน้าของปลาตามลำดับ การหลั่งของ cortisol เกิดจาก Corticotrophin Releasing hormone (CRH) จะไปกระตุ้น adrenocorticotrophic hormone (ACTH) จึงเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง cortisol จากไตส่วนหน้า ซึ่งจะไปกระตุ้น leukocyte โดยตรง (Weyts *et al.*, 1999) จากการศึกษาพบว่าในปลาแซลมอนที่อยู่ในสภาวะพักและสภาวะเครียดจะมีการหลั่งฮอร์โมนทั้งสองแตกต่างกัน คือ adrenaline มีค่าน้อยกว่า 3 แต่ในสภาวะเครียดพบว่ามีค่าเท่ากับ 20 - 70 nmoles/l และ cortisol มีค่าน้อยกว่า 10 และในสภาวะเครียดพบว่ามีค่าเท่ากับ 40 - 200 ng/ml (Barton, 2002) การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า LPS สามารถกระตุ้น hypothalamic-pituitary adrenal

(คล้ายกับ HPI ในปลา) ทำให้มีการหลั่ง cytokine มากขึ้น (Perlstein *et al.*, 1993) ปัจจุบันพบว่าปลาสามารถทนต่อ LPS ต่างจากสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเนื่องจากมี receptor ที่จดจำ LPS ต่างกัน เช่น TLR 4 อาจไม่พบในปลาหรือมีหน้าที่แตกต่างกัน (Iliev *et al.*, 2005)

มีการศึกษาพบว่าใน macrophage ของปลา rainbow trout ที่ได้รับ LPS มีการหลั่ง TNF- $\alpha$  เหมือนกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (MacKenzie *et al.*, 2003)

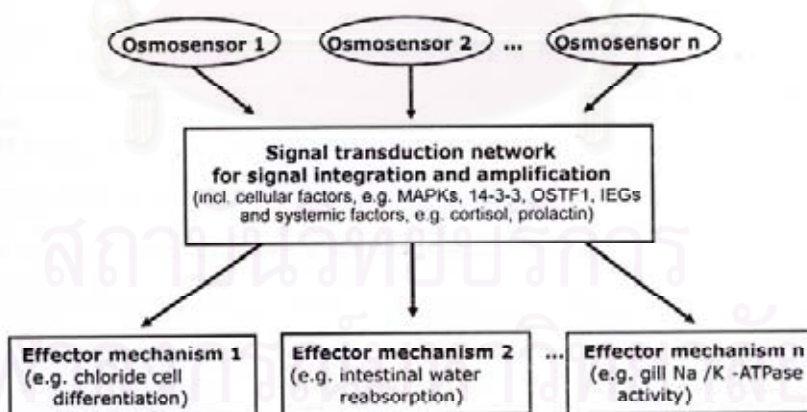


รูปที่ 3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่าง hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis และระบบภูมิคุ้มกันซึ่งตอบสนองต่อความเครียดในปลา (Haddad *et al.*, 2002)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## การตอบสนองต่อ Osmotic stress ในปลา

การตอบสนองต่อ Osmotic stress ในปลาจะมีกลไกที่ควบคุมทั้งด้านสรีระและพฤติกรรมของปลาซึ่งประกอบด้วย 3 ส่วนสำคัญดังรูปที่ 4 คือ Osmosensors, signal transduction และ effector ซึ่งจะมีการทำงานร่วมกันโดย Osmosensors จะควบคุมการทำงานของ signal transduction และส่งผลต่อ effector ต่างๆทำให้ปลามีการตอบสนองต่อ Osmotic stress ในรูปแบบต่างๆดังรูปที่ ยกตัวอย่างเช่น calcium sensing receptor (CaSR) ซึ่งเป็น osmosensor ที่สำคัญในปลาหลายชนิด หนึ่งในนั้นคือปลานิล (*Oreochromis mossambicus*) จะใช้ CaSR ต่อ  $Ca^{2+}$  ภายนอกแล้วจึงไปกระตุ้นวิถีของ phospholipase C และ mitogen-activated protein kinase (MAPK) (Loretz *et al.*, 2004) และจากการศึกษาพบว่า เมื่อปลา killfish (*Fundulus heteroclitus*) อยู่ในภาวะ osmotic stress พบว่ามีการกระตุ้น MAPK ที่ epithelium บริเวณเหงือกปลา (Fiol *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่าตัวที่ควบคุม MAPK คือ mitogen-activated protein kinase kinase kinase 7 interacting protein 2 (TAK 1 binding protein 2 : TAB 2) ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบ epithelium บริเวณเหงือกปลานิลเมื่อเกิดภาวะ osmotic stress นอกจากนี้ยังพบว่าในปลานิลการตายของเซลล์แบบ apoptosis และวงจรชีวิตของเซลล์จะเกี่ยวข้องกับ suppression subtractive hybridization (SSH) ยีนซึ่งเกี่ยวข้องกับ MAPKs (Thomson *et al.*, 1999)



รูปที่ 4 Osmosensory signal transduction network ในปลา (Fiol *et al.* 2007)

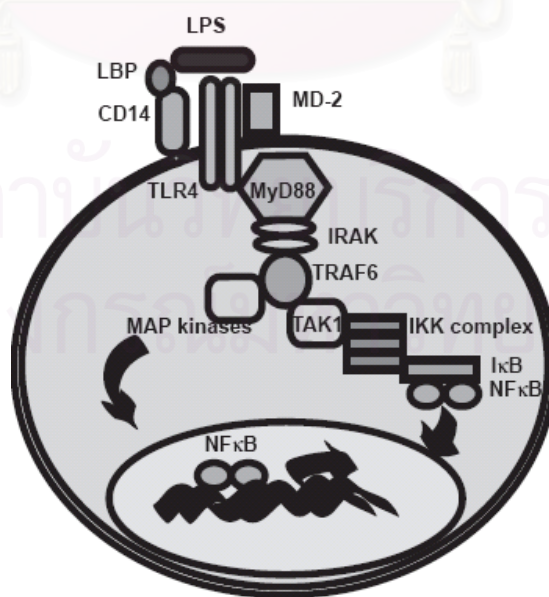
## ภูมิคุ้มกันในปลา (immunity in fish)

ปลาเป็น Primitive vertebrates มีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอม โดยเฉพาะปลาที่อาศัยอยู่เป็นฝูง ในเขตร้อนต้องมีการพัฒนาระบบภูมิคุ้มกันต่อ ไวรัส แบคทีเรีย ทอกซิน และ พาราไซต์ จากสัตว์อื่น ๆ ที่อาศัยแหล่งน้ำร่วมกัน ปัจจุบันการศึกษาภูมิคุ้มกันในปลาซึ่งมีมากกว่า 20,000 สปีชีส์ยังมีน้อยอยู่แต่ก็ยังมีบางสปีชีส์ที่นำมาทดสอบ ยกตัวอย่างเช่น rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*), carp (*Cyprinus carpio*) และ channel catfish (*Ictalurus punctatus*) เป็นต้น จากการศึกษาดังกล่าวพบว่าภูมิคุ้มกันระหว่างปลาและสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีความคล้ายคลึงกัน (Luebke *et al.*, 1997) ระบบภูมิคุ้มกันในส่วนแรกจะเกี่ยวข้องกับการป้องกันสิ่งแปลกปลอมเข้ามาโดยเฉพาะในส่วนของเซลล์ต่างๆ เช่น B lymphocyte, T lymphocyte, natural killer (NK) cell, macrophage และ granulocyte เป็นต้น ซึ่งเซลล์ส่วนใหญ่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะผลิตมาจากไขกระดูก (bone marrow) ซึ่งในปลาพบว่าไม่มีไขกระดูกแต่มีไตส่วนต้น (anterior kidney) ซึ่งมีขนาดเล็ก และมีสีแดงเข้ม ซึ่งอยู่ด้านหน้าเหนือ pharyngeal plate โดยพบว่าไตส่วนต้นทำหน้าที่ผลิตเม็ดเลือดต่างๆ และภูมิคุ้มกันต่างๆ คล้ายกับไขกระดูก (bone marrow) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และในส่วนของ secondary lymphoid organ ในปลาได้แก่ ม้ามและตับ (Zapata *et al.*, 2006)

### 1. ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะเจาะจง (Non-Specific Immunity หรือ innate Immunity)

ร่างกายของปลา เช่น ครีบก้น ลำตัว เหงือก และเซลล์ผิวของรูจมูก ต่างต้องสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอม ดังนั้น เมื่ออกของปลาจึงเป็นระบบภูมิคุ้มกันแรก โดยมีการรายงานถึง Lysozymes และ แอนติบอดี ในเมือกของปลาด้วย (Kaattari *et al.*, 1996; Kear, 1999) จากการศึกษาพบว่า lysozyme สามารถสลาย peptidoglycan ในผนังเซลล์ทำให้เซลล์ของแบคทีเรียแตกได้ (Ellis, 2001) และหากสิ่งแปลกปลอมสามารถผ่านเข้าสู่ร่างกายได้ก็จะถูก phagocytosis โดย macrophage ซึ่งมีความสำคัญอย่างมากในภูมิคุ้มกันระบบนี้ (Corbel, 1975) ส่วนใหญ่สุขภาพปลาจะขึ้นกับภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ (non-specific immunity หรือ innate immunity) ภูมิคุ้มกันชนิดนี้ถือเป็นด่านแรกในการป้องกันการเข้าทำลายของเชื้อโรคต่างๆ และมีการตอบสนองอย่างรวดเร็วเพื่อป้องกันการบุกรุกของเชื้อโรคหลายชนิด จากการศึกษาพบว่าเซลล์ที่ทำงานในระบบ Innate immunity ได้แก่ macrophages, monocytes, neutrophils และ natural killer cell เซลล์เหล่านี้จะมีรูปแบบในการจำต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะจุลชีพซึ่ง หมายถึง Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) และ pattern recognition receptors ซึ่งทำให้มีการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมอย่างรวดเร็ว ซึ่งสามารถแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ได้แก่

1. โปรตีนซึ่งทำงานอยู่ใน alternative complement pathway ,lectin activation pathways, surfactants, C-reactive protein, serum amyloid protein, lipopolysaccharide (LPS) binding protein ซึ่งโปรตีนเหล่านี้ทำให้แอนติเจนถูกกินโดย phagocytic cell ได้ดีขึ้น
2. Endocytic เช่น macrophage mannose receptor และ macrophage scavenger receptor
3. Toll-like receptor (TLRs) พบครั้งแรกใน *Drosophila* ในมนุษย์พบประมาณ 10 ชนิดซึ่งจะมีรูปแบบในการจำต่อสิ่งแปลกปลอมไม่เหมือนกัน การจำของ TLR ต่อสิ่งแปลกปลอม นั้นไม่ได้เกิดขึ้นโดยตรงแต่ต้องการปัจจัยอื่นร่วมด้วยเช่นการจำ Lipopolysaccharide (LPS) โดยผ่าน TLR4 protein เกี่ยวข้องกับ MyD88 เป็นต้น นอกจากนี้การทำงานของ TLR ทุกชนิดยังเกี่ยวข้องกับ NF- $\kappa$ B ดังรูปที่ 5 เนื่องจากหลังการจำต่อสิ่งแปลกปลอมจะมีการส่งสัญญาณเข้าไปใน nucleus นั้น เป็นผลทำให้มีการแสดงออกของยีนของสารต่างๆที่เกี่ยวข้องเช่น Cytokine เป็นต้น TLR อาจกระตุ้นการ phagocytosis ของ Macrophage ผ่านทาง mitogen-activated protein (MAP) kinase ในปลาพบว่า TLR ในปลามีหลายชนิด เช่น TLR4 ใน zebrafish (Roach *et al.*, 2005) และในปลา puffer fish จะมีการแสดงออกของ TLR ในเนื้อเยื่อต่างๆเช่น TLR 1 และ TLR 7 จะพบในไต เป็นต้น (Oshiumi *et al.*, 2003) และจากการศึกษาโดยใช้ TLR 4 Agonist ขนาด 10 ไมโครกรัมต่อลิตร ใน leukocyte ซึ่งได้จากไตส่วนต้นของปลาเทราท์ พบว่ามีการแสดงออกของยีนของ proinflammatory cytokine (Purcell *et al.*, 2006)



รูปที่ 5 แสดงวิถีกระตุ้นผ่าน TLR4 (Andrews *et al.* 2003)

## 2. ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจง (Specific Immunity)

แม้ว่าภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific immunity) มีการพัฒนาช้ากว่าภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ แต่ภูมิคุ้มกันแบบนี้จะมีความจำ (immunological memory) ทำให้ปลาตอบสนองอย่างรวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงมากหากได้สัมผัสกับแอนติเจนครั้งต่อไป ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะเจาะจงในปลานั้นจะหมายถึง humoral หรือ cell – mediated immune function ซึ่งจะมีเซลล์และโปรตีนต่างๆที่คล้ายในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ระบบภูมิคุ้มกันแบบนี้สามารถที่จะจำการกระตุ้นของสิ่งแปลกปลอมต่างๆที่เคยเข้าสู่ร่างกายมาก่อนโดยเม็ดเลือดขาวหรือ macrophage หลังจากนั้นจะมีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง interleukin หรือกระตุ้น T-helper cell (Th) หรือ cytotoxic T-cell (Tc) (Warr, 1997) macrophage เป็น Antigen Presenting Cells (APCs) เซลล์เหล่านี้สามารถจดจำและนำเสนอสิ่งแปลกปลอมให้กับเซลล์ต่างๆ เช่นเมื่อเกิดการ phagocytosis ขึ้นซึ่งจะได้ peptide สั้น ๆ ซึ่งเกิดจากการย่อยด้วยเอนไซม์อยู่ภายใน APC แล้วจะถูกนำเสนอไปบน membrane พร้อมกับ MHC Class II กลายเป็น peptide-class II MHC complex ซึ่งจะจำเพาะกับ specific receptor บน  $CD4^+$  T-lymphocytes การกระตุ้น  $CD4^+$  T-lymphocytes จะทำให้มีการส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์ ทำให้  $CD4^+$  T-lymphocytes เกิดการแบ่งตัวและมีการสร้างสาร lymphokines (interlukines หรือ cytokines) ออกมามากมาย ซึ่ง lymphokines จะกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดให้จับกินสิ่งแปลกปลอมนั้น

สำหรับภูมิคุ้มกันสารน้ำในปลาจะคล้ายกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมคือผ่านทางแอนติบอดีที่สร้างมาจาก plasma cells ซึ่ง plasma cells เปลี่ยนมาจาก B-lymphocyte แอนติบอดีในปลา gnathostomes จะพบ IgM แอนติบอดีเพียงอย่างเดียว ซึ่งในปลาดุก (catfish) และ Atlantic Salmon จะพบ IgD (Wilson *et al.*, 1997) นอกจากนี้จากการศึกษาในปลาดุกที่ได้รับแคดเมียมคลอไรด์ขนาด 10, 20 และ 30 ไมโครกรัมต่อลิตรระยะเวลา 2 สัปดาห์ พบว่า IgM titer เพิ่มขึ้น

การกระตุ้น T cells เริ่มจากการที่ TCR เพิ่มการสัมผัสระหว่าง T cells และ APC จำ MHC บนผิวของ APCs จะนำไปสู่สัญญาณจาก Costimulatory signals เช่น CD28, CD154 ซึ่งอยู่บน Tcell ให้จับกับ CD80/CD86 บน APCs ความเข้าใจเรื่องการกระตุ้น T cells ในปลายังมีน้อยมาก (Bernard *et al.*, 2006) เข้าใจว่าการจำของ T cells ใกล้เคียงกับของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยศึกษาพบ CD28 family ในปลาเทราท์ ซึ่งเมื่อจับกับ cytoplasmic tail ของ CD28 ของมนุษย์จะสามารถกระตุ้น IL-2 ได้ พบว่า CD154 ของปลาเทราท์ ขาด conserved tyrosine based-motif ซึ่งมีหน้าที่ในการจับกับ PI-3K แต่ไปพบ tyrosine-based motif ที่ cytoplasmic tail ทั้งในปลาเทราท์ และปลา Atlantic salmon

ได้มีผู้รายงานถึง Immunoglobulin Ig ในปลาฉลามที่มีการพบ Cys ใน CDR<sub>3</sub> คล้าย Cys Codon ใน D segment ของ antigen receptor ในมนุษย์ และเสนอว่าเกี่ยวข้องกับ



วิวัฒนาการในระดับโมเลกุล (Roux *et al.*, 1998) เช่นเดียวกับ Hansen และคณะ (2005) ได้รายงานวิวัฒนาการของ Ig isotype IgT ในม้ามและ Pronephros ของปลาเรนโบว์เทราท์ ซึ่งไม่พบในปลาอื่น เช่นปลาดุก จากการศึกษพบว่าโปรตีน Activation-induced cytidine deaminase (AID) ซึ่งเป็น B cell-specific protein จำเป็นสำหรับการเกิด class switch recombination (CSR) และ Somatic hyperstimulation (SHM) ของ Ig heavy chain (IgH) ยีน (Wakae *et al.*, 2006) ในปลากระดูกอ่อนพบว่าโปรตีน AID จะใช้ใน SHM เท่านั้น แต่ใน zebrafish จะเกิดทั้ง CSR และ SHM และการเกิด inflammation เหนี่ยวนำทำให้เกิดการ mobilize B cell ใน bone marrow และทำให้เกิด extramedullary B lymphopoiesis โดยเฉพาะในม้าม และพบมีการเพิ่มขึ้นของโปรตีน AID อีกด้วยทำให้เกิด CSR ซึ่งสนองตอบต่อ TLR ligand (Ueda *et al.*, 2007)

B-lymphocyte ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมจะพบที่ไขกระดูก แต่ในปลาจะพบที่ไตและม้าม เป็นต้น B cell จะจดจำ antigen โดยผ่านทาง B-cells receptor

#### NF-kB

NF-kB เป็น transcription factor ถูกค้นพบครั้งแรกในปี 1986 โดยถูกค้นพบใน *Drosophila* และสิ่งมีชีวิตชนิดต่างๆ รวมทั้งมนุษย์ NF-kB โปรตีนประกอบด้วย p65, c-Rel, Rel B, p50 และ p65 ดังรูปที่ 6 NF-kB ควบคุมการทำงานภายในเซลล์เช่น การอักเสบ, การเจริญของเซลล์, การตายของเซลล์แบบ apoptosis และ ระบบภูมิคุ้มกัน (Aggarwal *et al.*, 2004) Complex ของ โปรตีน Rel และ NF-kB จะอยู่ในรูปไม่มีฤทธิ์โดยจับกับโปรตีน I $\kappa$ B $\alpha$  ใน cytosol และถูกปล่อยเข้าสู่การทำลายของ proteasome โดย kinase complex (IKK) และ NF-kB จึงจะสามารถเข้าสู่นิวเคลียสเพื่อกระตุ้นการ transcription ของยีนได้ ดังรูปที่ 7

IKK complex ทำหน้าที่เป็นเอนไซม์ Kinase มีหน้าที่ catalytic subunit จับกันคือ IKK $\alpha$  และ IKK  $\beta$  โดยมีตัวควบคุมเป็นโปรตีน IKK  $\gamma$  ( หรือ IKKAP หรือ NEMO) ปัจจุบันจากการศึกษาหนูที่ตกแต่งยีนทำให้ทราบว่า การควบคุมปฏิกิริยาของ IKK complex ที่เป็นเอนไซม์ kinase คือ IKK  $\beta$  และ IKK  $\gamma$  ซึ่งจะทำให้ kinase complex นี้ เต็มกลุ่มฟอสเฟตให้แก่ I $\kappa$ B $\alpha$  ได้ (Moscat, 2003 #110) และการศึกษาพบว่าความผิดปกติของ NEMO ทำให้ NF-kB (c-Rel) ถูกกระตุ้นผิดปกติส่งผลให้เกิด Ig somatic hypermutation (SHM) และความผิดปกติของ Class recombination switching (CRS) ใน B cell (Jain *et al.*, 2004)

อย่างไรก็ตามกลไกการทำงานของ NF-kB ขึ้นกับตัวกระตุ้นซึ่งกลไกอาจเหมือนหรือแตกต่างกันเช่น TNF ซึ่งเป็นตัวกระตุ้น NF-kB โดย TNF จะจับกับ TNF receptor (TNFR) ที่

TNFR-associated death domain ซึ่งโปรตีนชนิดนี้จะจับกับ TNFR-associated factor (TRAF) 2 จากนั้นจะไปกระตุ้น IKK  $\alpha$  ซึ่งจะไปเติมฟอสเฟตและสลาย p 100 โดยตรงให้เปลี่ยนเป็น p50 ซึ่งจะเข้าสู่นิวเคลียสกระตุ้นการ transcription ของยีนต่อไป

การกระตุ้น NF-kB เกี่ยวข้องกับ Reactive oxygen species (ROS) เช่น hydrogen peroxide โดยตรงในเซลล์บางเซลล์สามารถกระตุ้น NF-kB ได้และการแสดงออกของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เปลี่ยน superoxide anion เป็น hydrogen peroxide (Li and Karin 1999) นอกจากนี้การศึกษาที่ผ่านมาพบว่า LPS, TNF- $\alpha$  และ IL-1 $\beta$  สามารถกระตุ้น NF-kB ได้ มีผู้เสนอว่า ROS ทำหน้าที่คล้าย second messenger ในการกระตุ้น NF-kB หลังจากที่เซลล์ได้รับสัมผัสสารต่างๆ (Schreck *et al.*, 1994)

จากการศึกษาพบว่า NF-kB เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันทั้งใน innate และ adaptive immune โดยใน innate immune จะเกี่ยวข้องโดยการควบคุมการ transcription ของยีนต่างๆ เช่น cytokine (IL1, IL2, TNF- $\alpha$  และ IL12) โมเลกุลเหล่านี้จะเกี่ยวข้องกับเซลล์ที่มีหน้าที่ในการ phagocytosis สิ่งแปลกปลอม เช่น แบคทีเรียต่างๆ (Hawiger, 2001) และมีหลักฐานชี้ว่าการกระตุ้นวิถีของ TLR ทำให้มีการแสดงออกของยีนซึ่งควบคุมโดย NF-kB เช่น cytokine, nitric oxide เป็นต้น (Li *et al.*, 2002)

การศึกษาที่พบว่า NF-kB เกี่ยวข้องกับ Adaptive immunity พบว่า c-Rel ซึ่งเป็น proto-oncogene ของ NF-kB มีความสำคัญต่อการเพิ่มจำนวน และ cell cycle ของ B cell โดยพบว่าหนูที่ไม่มียีน c-Rel จะมีความผิดปกติของ B cell ในม้าม (Hsia *et al.*, 2002) แต่อย่างไรก็ตาม การเพิ่มจำนวนของ B cell อาจเกี่ยวข้องกับยีนอื่นๆซึ่งถูกควบคุมโดย NF-kB เช่น IL6 หรือเกี่ยวข้องกับ NF-kB ตัวอื่นเช่น p50 ก็ได้ (McKay *et al.*, 1999) นอกจากนี้ c-Rel ยังอาจมีบทบาทกับการทำงานผ่านโปรตีนอื่นๆ เช่น เมื่อมีการแสดงออกของโปรตีน phosphatase มากขึ้น จะกระตุ้นการจับของ c-Rel กับดีเอ็นเอได้ดีขึ้น 4 เท่า (Hu *et al.*, 1998)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

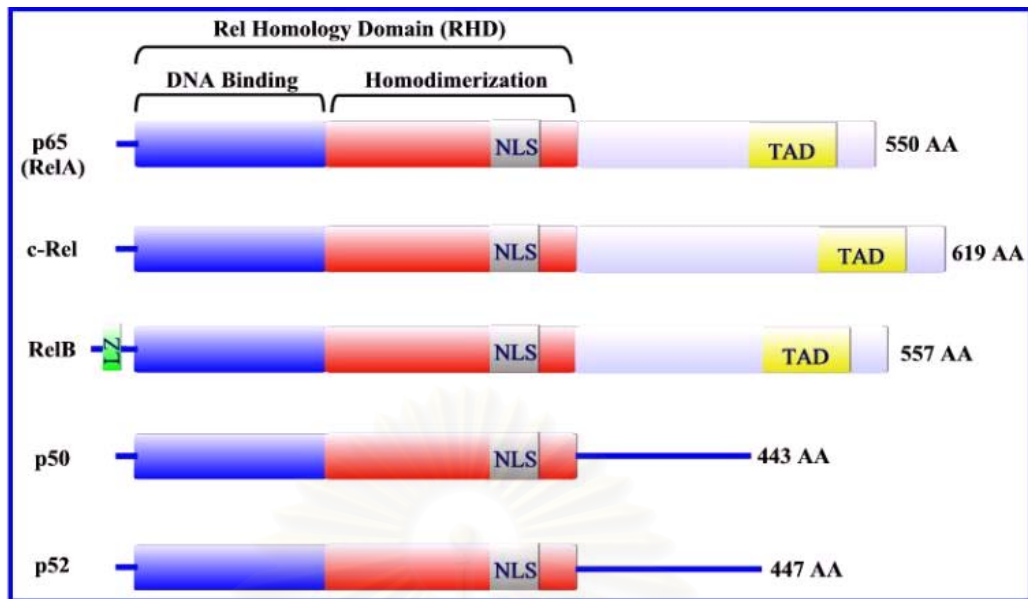
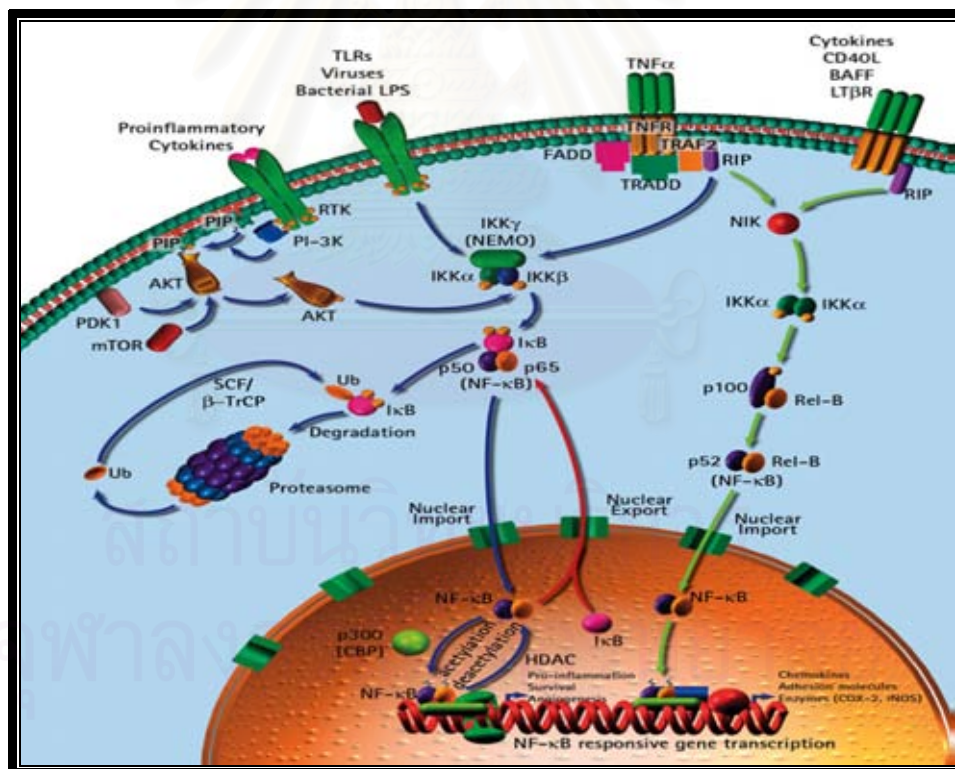


Figure 1 Members of NF- $\kappa$ B family

รูปที่ 6 แสดงสมาชิก NF- $\kappa$ B หรือ Rel family (Xiao, 2004)



รูปที่ 7 การกระตุ้น NF- $\kappa$ B

ที่มา : [http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFKB\\_NFkappaB\\_IkappaB\\_IKK\\_Pathway\\_Products.htm](http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFKB_NFkappaB_IkappaB_IKK_Pathway_Products.htm)

## ภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative Stress)

Oxidative stress คือ ภาวะที่เซลล์ภายในร่างกายได้รับบาดเจ็บหรือถูกทำลายเนื่องจากมีการเพิ่มขึ้นของ free radical หรือเกิดจากการที่มี antioxidant ลดลง ทำให้เกิดความไม่สมดุลกันระหว่าง free radical และ antioxidant เกินความสามารถของเซลล์ที่จะป้องกันได้ เป็นผลทำให้การทำงานของระดับเซลล์ผิดปกติ การเกิด oxidation มักเกิดที่ตำแหน่งของชีวโมเลกุลต่างๆ เช่น ไขมัน โปรตีน หรือดีเอ็นเอ (Freeman *et al.*, 1982; Beckman, 1994)

### สารอนุมูลอิสระ (Free radical)

อะตอมหรือโมเลกุลที่ไม่เสถียร เนื่องจากโครงสร้างของมันมีอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวจึงทำให้มันสามารถไปทำปฏิกิริยา (ปฏิกิริยา oxidation) กับโมเลกุลอื่นๆ เพื่อที่จะดึงอิเล็กตรอนจากโมเลกุลนั้นมาให้อิเล็กตรอนที่มันเสถียรขึ้น ซึ่งโมเลกุลที่พวก free radical นั้นเข้าไปทำปฏิกิริยาดังนั้นอาจเป็นกรดไขมัน กรดนิวคลีอิก โปรตีน ซึ่งปฏิกิริยา oxidation นี้มีผลทำให้เซลล์ภายในร่างกายถูกทำลายหรือได้รับบาดเจ็บแล้วทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในโครงสร้างหรือหน้าที่ของเซลล์เหล่านั้นจนกลายเป็นสาเหตุของการเกิดโรคร้ายในมนุษย์และสัตว์ free radical ที่เกิดขึ้นนี้ได้แก่ (Gutteridge, 1994)

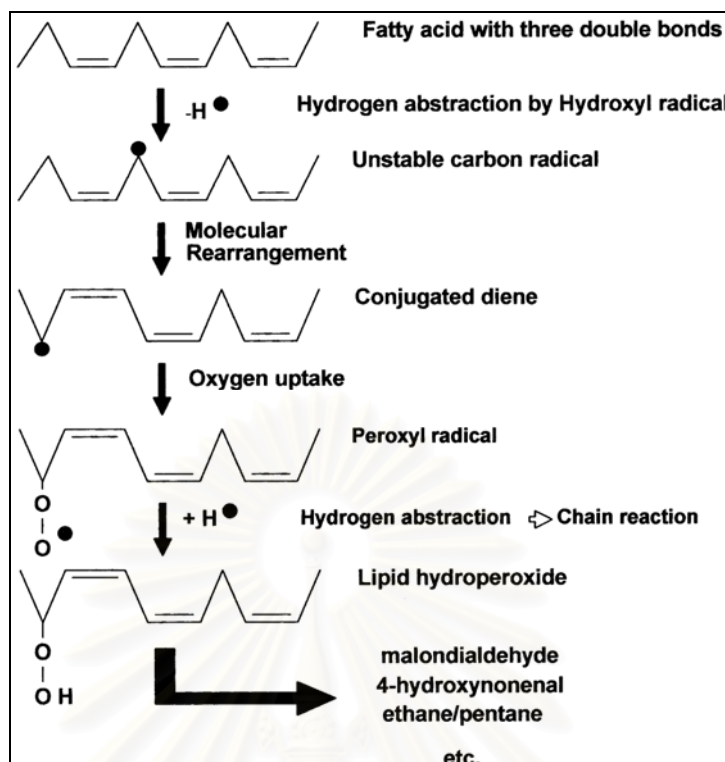
1. Reactive oxygen species (ROS) เช่น Superoxide anion ( $O_2^-$ ) , Hydroxyl radical ( $OH^\cdot$ ) , Peroxide radical ( $ROO^\cdot$ ) , Ozone ( $O_3$ ) และ Single oxygen ( $1O_2$ )
  2. Hydrogen radical ( $H^\cdot$ )
  3. Hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ )
  4. Methyl radical ( $CH_3^\cdot$ )
  5. Carbonate radical ( $CO_3^{2-\cdot}$ )
  6. Reactive nitrogen species (RNS) เช่น Nitrate radical ( $NO_3^\cdot$ ) , Nitrogen dioxide ( $NO_2$ ) และ Nitric oxide (NO)
  7. Reactive chlorine species (RCS) เช่น Hypochlorite ( $OCl^-$ )  
ซึ่ง free radical นี้จะไปทำให้เกิดปฏิกิริยาได้
1. Hydrogen abstraction : free radical จะไปทำปฏิกิริยากับโมเลกุลที่มีไฮโดรเจนอะตอมอิสระ ทำให้ตัวมันเกิดความเสถียรขึ้น แต่โมเลกุลที่ให้ไฮโดรเจนนั้นจะกลายเป็น free radical ใหม่ขึ้นมาแทน
  2. Addition : free radical จะไปจับกับโมเลกุลที่เสถียรแล้วจะเปลี่ยนโมเลกุลที่จับด้วยนั้นให้เป็น free radical ไปด้วย

### Lipid peroxidation

ภาวะเครียดออกซิเดชันเป็นภาวะที่มีความไม่สมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ภาวะดังกล่าวทำให้เกิด peroxidative damage กับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกาย เช่นโมเลกุลของไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid, PUFA) โดยกระบวนการ lipid peroxidation ของพอสโพลิปิด ซึ่งเป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ (Halliwell *et al.*, 1993) lipid peroxides เป็น primary product ซึ่งมีความไม่คงตัวและสามารถเปลี่ยนแปลงกลายเป็น secondary products ได้เช่น Malondialdehyde (MDA) ดังนั้นระดับของ MDA ที่สูงขึ้นหมายถึงการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชันได้

การเกิด lipid peroxidation แบ่งเป็น 3 ขั้นตอนได้แก่ initiation, propagation และ termination ดังรูปที่ 8

1. Initiation: เมื่อ free radical ไป attack กับสายของกรดไขมันของ lipoprotein ทำให้แยกไฮโดรเจนโมเลกุลออกมาเป็นผลทำให้มี carbon radical ออกมา
2. Propagation: carbon จะไปทำปฏิกิริยากับออกซิเจนเกิดเป็น peroxy radical ซึ่งจะ去做ปฏิกิริยากับ polyunsaturated fatty acid
3. Termination: ปฏิกิริยาดำเนินต่อไปจนกระทั่งมี free radical scavenger เช่น antioxidants เข้ามา ปฏิกิริยาจึงหยุด



รูปที่ 8 การเกิด lipid peroxidation (Young *et al.*, 2001)

### สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant)

เป็นโมเลกุลที่สามารถจะไป neutralize free radical ได้โดยที่ antioxidant จะเป็นตัวที่ให้หรือรับอิเล็กตรอน เพื่อที่จะกำจัดอิเล็กตรอนที่มีอยู่ใน free radical โมเลกุลของ antioxidant หลังจากที่ได้ไป neutralize free radical แล้วจะกลายเป็น free radical แทน แต่มันจะมีความไวในการเกิดปฏิกิริยาต่างๆ น้อยกว่าพวก free radical โมเลกุลของ antioxidant อาจจะถูก antioxidant ตัวอื่นๆ และ/หรือกลไกต่างๆ neutralize ต่อไปจนปราศจากสภาพที่เป็น free radical ในโมเลกุลที่มี hydrogen atom อยู่สามารถทำให้เกิดการ neutralize free radical ได้ โดยที่จะเรียก hydrogen atom ว่า reducing equivalent และ เรียกโมเลกุลที่มี hydrogen atom ว่าอยู่ใน reduced state

สาร antioxidant ที่พบในร่างกายสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด (Gutteridge, 1994) คือ

1. สาร antioxidant ที่พบในร่างกายและจัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Superoxide dismutase ( SOD ) , Catalase ( CAT ) , Glutathione peroxide ( GPX ) ,  
Glutathione reductase ( GR ) , Glutathione S – transferase ( GST )

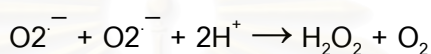
2. สาร antioxidant ที่พบในร่างกายและไม่จัดเป็นเอนไซม์ ได้แก่

Glutathione , Lipoic acid , Ceruloplasmin , Albumin , Transferrin ,Haptoglobin , Hemopexin , Uric acid , Bilirubin , Cysteine

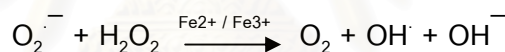
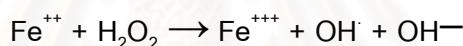
โดยทั่วไปภายในเซลล์ของคนและสัตว์จะมีเอนไซม์ 3 ชนิดที่เป็นส่วนสำคัญในการจัดการกับ superoxide และ hydrogen peroxide ได้แก่

### 1. Superoxide dismutase ( SOD )

SOD ถูกค้นพบครั้งแรกในปี ค.ศ 1968 โดย Mc cord and Fridovich ในสหรัฐอเมริกา (Gutteridge, 1994)เป็นเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน superoxide radical 2 โมเลกุลให้เป็น hydrogen peroxide และ oxygen



ในการกำจัด hydrogen peroxide จะเกิดปฏิกิริยา Fenton Reaction ซึ่งจะให้ผลผลิตที่เป็น hydroxyl radical จำนวนมาก ร่างกายจะใช้เอนไซม์ catalase และ/ หรือ glutathione peroxidase มาเร่งปฏิกิริยาการกำจัด hydroxyl radical



### 2. Catalase ( CAT )

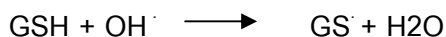
Catalase เป็นเอนไซม์ขนาดใหญ่จะเร่งปฏิกิริยาการเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้เป็นน้ำและออกซิเจนอิสระ catalase พบใน organelle ต่าง ๆ ที่มี membrane พบว่า catalase มี affinity ต่อ hydrogen peroxide น้อย ดังนั้นถ้ามี hydrogen peroxide มาก Catalaseจะทำงานเร็วขึ้น (Gutteridge, 1994)



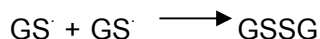
### 3. Glutathione system

ประกอบด้วย glutathione, glutathione peroxidase ( GPX ) และ glutathione reductase (GR ) เป็นกลไกหลักในการกำจัด hydrogen peroxide และ peroxide ตัวอื่นๆ (Gutteridge, 1994) Glutathione ( GSH , L- gamma – glutamyl – L –cysteinylglycine ) เป็น antioxidant ที่มีบทบาทภายใน cytoplasm ของเซลล์ ซึ่งในเซลล์ทั่วไปต้องการ glutathione ในการดำรงอยู่และการทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ และเป็น antioxidant ที่สำคัญในการกำจัด

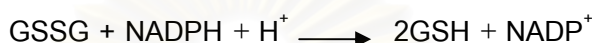
peroxynitrate และ hydroxyl radical ได้ดีโดยจะเปลี่ยน hydrogen peroxide ให้เป็นน้ำ ดังสมการ



ถึงแม้ว่าจะมี glutathione radical (.GS) เกิดขึ้นจากปฏิกิริยา ก็จะไม่เป็นปัญหา เพราะ GS 2 โมเลกุลจะมารวมกันเป็น oxidized glutathione (GSSG) ดังสมการ



GSSG สามารถที่จะถูกเปลี่ยนกลับไปเป็น GSH ได้โดย NADPH – dependent glutathione reductase enzyme



### แคดเมียม

แคดเมียมเป็นโลหะที่อยู่ในกลุ่ม IIb ตามตารางธาตุ มีวาเลนซ์เท่ากับ +2 มีคุณสมบัติอ่อนแอได้ มีสีขาวปนน้ำเงิน มีความต้านทานการกัดกร่อนสูง มีจุดหลอมเหลว (Melting point) ประมาณ 321 องศาเซลเซียส จุดเดือด (Boiling point) เท่ากับ 676 องศาเซลเซียส แคดเมียมอาจอยู่ในรูปเกลือของสารประกอบต่างๆ เช่น แคดเมียมออกไซด์มีสีแดง แคดเมียมซัลเฟต ส่วนใหญ่ใช้ในอุตสาหกรรมต่างๆ ประมาณร้อยละ 50 ใช้ในการเคลือบเงาด้วยไฟฟ้าที่เรียกว่า Electroplated coating ทำให้มีความเงางามและทนต่อการกัดกร่อน โลหะที่เคลือบด้วยแคดเมียมจะใช้ในอุปกรณ์รถยนต์ต่างๆ นอกจากนี้แคดเมียมยังอยู่ในรูปของสารประกอบต่างๆ อีกมากมาย เช่น แคดเมียมซัลไฟด์ และ แคดเมียมซัลไฟซีลีไนด์ ใช้เป็นตัวสีในสิ่งต่างๆ เช่น พลาสติก สีทา สีฟัน หมึก ยาง เป็นต้น ประโยชน์ของแคดเมียมยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแบตเตอรี่ขนาดเล็กที่เรียกว่า แคดเมียมนิเกิลแบตเตอรี่ (CdNi batteries) นอกจากนี้ยังพบว่าโลหะแคดเมียมใช้ใน Photoelectric cells ผสมในสารฆ่าเชื้อราที่ใช้ในกิจการเกษตร และปัจจุบันยังใช้ในเตาปฏิกรณ์ปรมาณูด้วย

จากการใช้อย่างกว้างขวางจึงทำให้สามารถพบโลหะแคดเมียมปะปนอยู่ในสิ่งแวดล้อมบรรยากาศ นอกจากนี้ก็มาจากแหล่งต่างๆ อาทิเช่น เหมืองแร่ โรงงานถลุงสังกะสี ซึ่งทำให้แคดเมียมแพร่กระจายไปในบรรยากาศทำให้มนุษย์สามารถสัมผัสกับแคดเมียมได้จากบรรยากาศ แคดเมียมสามารถเข้าสู่ร่างกายได้ 2 ทาง คือ โดยการหายใจอากาศที่มีแคดเมียมหรือสารประกอบของแคดเมียมเข้าไป ส่วนคนที่ไม่ได้ทำงานในโรงงานอุตสาหกรรมเหล่านี้ก็มีโอกาสได้รับแคดเมียมได้ จากการสูบบุหรี่โดยตรงหรือได้รับจากควันบุหรี่ อีกทางหนึ่งที่ร่างกายอาจ



ได้รับแคดเมียม คือ ทางการรับประทานอาหาร หรือน้ำดื่มที่มีแคดเมียมเจือปนอยู่ (WHO, 1992)

แคดเมียมที่เข้าสู่ร่างกายโดยการกินถูกดูดซึมในระบบทางเดินอาหารประมาณร้อยละ 2 ถึง 6 แต่ในภาวะที่ร่างกายขาดธาตุเหล็กจะให้มีการดูดซึมแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายได้สูงถึงร้อยละ 20 ของปริมาณแคดเมียมที่กินเข้าไป การสูบบุหรี่แคดเมียมจะถูกดูดซึมได้ทางปอดประมาณร้อยละ 20-50 แคดเมียมที่เข้าสู่ระบบทางเดินอาหารจะถูกดูดซึมเข้าร่างกายประมาณร้อยละ 0.5-1.2

แคดเมียมที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้วจะถูกลำเลียงไปยังตับและจับตัวกับโปรตีน Metallothioneins (MTs) ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ (600-10000 ดาลตัน) และมี มีกรดอะมิโน cysteine เป็นส่วนประกอบถึงร้อยละ 30 ในโครงสร้างของโปรตีน (Cherian *et al.*, 1978) พบว่าเมื่อแคดเมียมเข้าสู่ร่างกายจะไปสะสมที่ตับและไตเป็นอวัยวะแรก (Goyer, 1997) เนื่องจากแคดเมียมมีค่าครึ่งชีวิต (Half - life) ประมาณ 17->30 ปีในร่างกาย (Tsuchiya, 1971) ดังนั้นก็จะทำให้เกิดพิษต่ออวัยวะดังกล่าวและอวัยวะอื่นๆได้ จากการศึกษาพิษของแคดเมียมที่ผ่านมามีพบว่าแคดเมียมทำให้เกิดการบาดเจ็บของตับ เกิดความผิดปกติที่ไต ระบบสืบพันธุ์ ทำให้เกิดมะเร็ง (Markovich *et al.*, 1999; Waalkes, 2003) และพิษของแคดเมียมยังมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันอีกด้วย (Muller *et al.*, 1979) โดยเฉพาะที่ม้ามและไขกระดูก (Yamano *et al.*, 1998)

นอกจากนี้แคดเมียมยังทำให้เม็ดเลือดแดง ฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต ในหนูขาวลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Kostic *et al.*, 1993) และยังพบว่าแคดเมียมเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยทำให้เกิดภาวะม้ามโต (splenomegaly) โดยพบในหนูขาวทั้งเพศผู้และเพศเมีย (Hamada *et al.*, 1998) นอกจากนี้ยังพบว่าหลังจากให้แคดเมียมในหนูเล็กความเข้มข้น 1.8 มิลลิกรัมแคดเมียมต่อน้ำหนักตัวพบว่า white pulp มีขนาดลดลงนอกจากนี้ยังพบ polymorphonuclear leukocyte และ myeloid cells ใน red pulp เป็นจำนวนมากอีกด้วย (Yamada *et al.*, 1981)

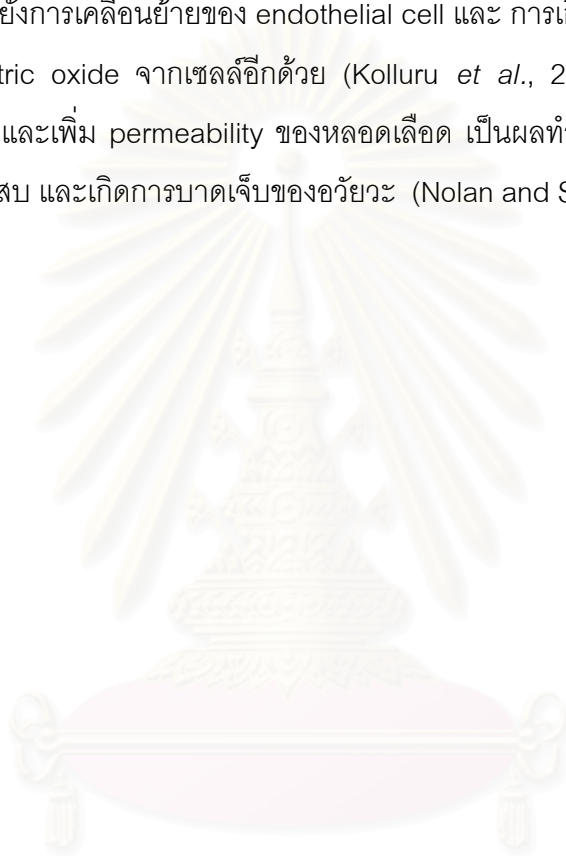
จากการศึกษาพิษของแคดเมียมในปลาไนพบว่ปลาไนที่ได้รับสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.35, 0.75, 1.5 และ 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 6 วัน ปริมาณ glycogen, glucose uptake, สมรรถนะ LDH ลดลง และพบว่าเอนไซม์ GSH และ SOD มีการเพิ่มขึ้นในแคดเมียมขนาด 3.0 มิลลิกรัมต่อลิตร (Almeida *et al.*, 2002) และเมื่อให้ปลาไนสัมผัสกับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 4.45 ไมโครโมลาร์เป็นระยะเวลา 5-15 วันพบว่าเอนไซม์ lysozyme ในซีรัมมีปริมาณเพิ่มขึ้น (Wu *et al.*, 2007)

ปลาไน (*Oreochromis niloticus*) ทนต่อพิษแคดเมียม โดยพบว่ามี LC 50 ที่ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 14.8 mg/L ซึ่งเป็นขนาดที่สูงมากเมื่อเทียบกับปลาน้ำจืดชนิดอื่น ดังสรุปในตารางที่ 1 ซึ่งการที่ LC<sub>50</sub> ในสัตว์มีค่าแตกต่างกันขึ้นกับปัจจัยต่างๆไม่ว่าจะเป็นชนิดของสัตว์ทดลอง ขนาด

อายุ ตลอดจนรูปแบบการทดลองที่อาจแตกต่างกันในแต่ละห้องปฏิบัติการ (Zbinden and Flury-Roversi, 1981)

นอกจากนี้หลังจากให้ปลาฉีดสัมผัสกับแคดเมียมเป็นเวลา 96 ชั่วโมงพบ  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase immunoreactive cells ลดลงแต่หลังจากนั้นจะมีการปรับสภาพของเซลล์ดังกล่าว (Garcia-Santos *et al.*, 2006)

พิษของแคดเมียมก่อให้เกิดความผิดปกติใน endothelial cell แคดเมียมขนาด 0, 1 และ 5 ไมโครโมลาร์ยับยั้งการเคลื่อนย้ายของ endothelial cell และ การเกิด angiogenesis นอกจากนี้ยับยั้งการหลั่ง Nitric oxide จากเซลล์อีกด้วย (Kolluru *et al.*, 2006) แคดเมียมทำให้สูญเสีย barrier integrity และเพิ่ม permeability ของหลอดเลือด เป็นผลทำให้เกิดการบวม, เลือดออก, hypoxia, การอักเสบ และเกิดการบาดเจ็บของอวัยวะ (Nolan and Shaikh, 1986)



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 1 พิษของแคดเมียมต่อปลาน้ำจืด

Species	Endpoint	Value	Comment	Reference
Colorado squawfish, bonytail, razorback sucker	96-h LC <sub>50</sub>	78 – 168 µg/L	- Larval and juvenile stage	(Buhl, 1997)
Rainbow Trout	Incipient lethal level (ILL)	6 µg/L at 187 hrs 122 µg/L at 226 hrs	- Non acclimated adult fish - Acclimated to 10.2 µg/L For 21 day	(Stubblefield <i>et al.</i> , 1999)
Rainbow Trout	96-h LC <sub>50</sub>	3.02 µg/L 6.12 µg/L 5.70 µg/L	- 50 mg/L hardness (Mg) - 200 mg/L hardness - 400 mg/L hardness	(Davies <i>et al.</i> , 1993)
Rainbow Trout	48-h LC <sub>50</sub>	5.0 µg/L	- Embryo-larval toxicity	(Dave <i>et al.</i> , 1981)
Rainbow Trout	48-h LC <sub>50</sub>	91-667 µg/L 358 µg/L 3,698 µg/L	- 20 mg/L hardness (Ca) - 80 mg/L hardness - 320 mg/L hardness	(Arillo <i>et al.</i> , 1984)
Rainbow Trout	96-h LC <sub>50</sub>	6-7 µg/L		(Kumada <i>et al.</i> , 1973)
Rainbow Trout	96-h LC <sub>50</sub>	10 – 20 µg/L and 4700 – 8000 µg/L	- Early life stage	(Van Leeuwen <i>et al.</i> , 1985)
Fathead Minnow	96-h LC <sub>50</sub>	60 µg/L	- 290 mg/L hardness	(Schubauer-Berigan <i>et al.</i> , 1993)
Fathead Minnow	96-h LC <sub>50</sub>	4.8 µg/L	- 20 mg/L hardness	(Suedel <i>et al.</i> , 1997)

### บทที่ 3

## อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

### วัสดุวิธีการวิจัย (Material and methods)

1. สัตว์ทดลอง และอุปกรณ์สำหรับการเตรียมสัตว์ทดลอง
  - 1.1 ปลานิลขนาดน้ำหนักตัว 20 – 35 กรัม
  - 1.2 ตู้กระจกขนาด 36 x 36 x 60 ลูกบาศก์เซนติเมตร
  - 1.3 air pump และหัวทราย
  - 1.4 อาหารปลาสำเร็จรูปชนิดเม็ด
  
2. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง
  - 2.1 เครื่องมือผ่าตัด
  - 2.2 เครื่องมือวัดอุณหภูมิและออกซิเจนที่ละลายในน้ำ
  - 2.3 pH meter
  - 2.4 ชุดบำบัดน้ำ
  - 2.5 กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงส่องผ่าน ( Light microscope) (Olympus)
  - 2.6 เครื่องตัดชิ้นเนื้อ (Microtome ของ Tissue Tex<sup>®</sup>)
  - 2.7 ไบโอมิตเตนเลส NO. S-35
  - 2.8 อ่างปรับอุณหภูมิสำหรับลอยชิ้นเนื้อ (Tissue floatation bath)
  - 2.9 เทอร์โมมิเตอร์
  - 2.10 กล้องถ่ายภาพดิจิทัล Nikon coolpix 995 ต่อกับกล้องจุลทรรศน์
  - 2.11 ตลับมีรูสำหรับใส่ชิ้นเนื้อ (Cassete ของ Tissue Tex<sup>®</sup>)
  - 2.12 สไลด์แก้ว
  - 2.13 ฝาปิดสไลด์ (Cover slip)
  - 2.14 เครื่องฝังเนื้อเยื่อ (Embedding ของ Tissue Tex<sup>®</sup>)
  - 2.15 ชุดย้อมสี (Staining jar)
  - 2.16 Spectrophotometer Jasco model UVDEC 650
  - 2.17 Spectrofluorometer Jasco model FP-777

### 3. สารเคมี

- 3.1 Butylated hydroxytoluene (BHT)
- 3.2  $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$  (Sigma chemical Company)
- 3.3 Clove oil
- 3.4 Eosin
- 3.5 Ethyl alcohol (70% EtOH, 80% EtOH, 90% EtOH และ 100 % EtOH )
- 3.6 10% Formalin (E.Merck)
- 3.7 Gelatin powder
- 3.8 Hematoxylin
- 3.9 Nitroblue tetrazolium (NBT)
- 3.10 Paraffin
- 3.11 Permout (Sciencetific Co.)
- 3.12 phosphate buffer saline (PBS)
- 3.13 Tetraethoxypropane (TEP)
- 3.14 Thiobarbitaic acid (TBA)
- 3.15 Trichoroacetic acid (TCA)
- 3.16 Standard SOD
- 3.17 Xylene (Sciencetific Co.)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ขั้นตอนการทดลอง

### 1. การเลี้ยงปลานิลที่สัมผัสกับแคดเมียมและการควบคุมคุณภาพน้ำ (aquarium, static bioassay)

1.1 การเลี้ยงปลานิลที่สัมผัสกับแคดเมียม ซึ่งปลานิลได้รับความอนุเคราะห์จากคณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยนำปลานิลน้ำหนัก 20-35 กรัม มาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 36x36x60 ซม. เลี้ยงก่อนทำการทดลอง 1 อาทิตย์เพื่อปรับสภาพให้คุ้นเคยกับห้องปฏิบัติการ ในแต่ละตู้ใส่น้ำ 40 ลิตร มีหัวทรายและ air pump

1. แบ่งปลานิลเป็น 5 กลุ่มกลุ่มละ 24 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม คือไม่ได้รับแคดเมียม

กลุ่มที่ 2 ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่ 3 ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่ 4 ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

กลุ่มที่ 5 ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

\* ขนาดความเข้มข้นของแคดเมียมที่ใช้ในการศึกษาในครั้งนี้ปรับปรุงมาจาก (Bae *et al.* 2005) ปลาทั้ง 5 กลุ่มจะได้รับแคดเมียมในระบบน้ำนิ่งแบบเปลี่ยนน้ำทุกวัน ความเข้มข้น 0.1, 0.5., 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและกลุ่มควบคุมอีก 1 กลุ่มซึ่งไม่ได้รับแคดเมียม

1.2 การวัดคุณภาพน้ำโดยวิเคราะห์ค่าต่างๆ ดังนี้

1. ความเป็นกรด-ด่าง (pH)

2. อุณหภูมิ (Temperature)

3. ความกระด้าง (Hardness)

4. ปริมาณออกซิเจนละลาย (Dissolve Oxygen-DO)

สังเกตอาการปลาในเวลา 24, 48, 72, และ 96 ชั่วโมง ของแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และบันทึกจำนวนปลาที่ตายในแต่ละกลุ่ม เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลาให้นำปลาขึ้นมาครั้งละ 6 ตัว แล้ววางสลบปลานิลด้วย Clove oil จากนั้นเก็บม้ามเพื่อวัดปริมาณ Malondialdehyde (MDA) และเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ นอกจากนี้เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อม้ามแช่ใน 10% ฟอรัมาลินเพื่อศึกษาจุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อม้ามและทำการศึกษาขั้นต่อไป

ตารางที่ 2 แสดงคุณภาพน้ำระหว่างทำการทดลอง

คุณภาพน้ำ	ค่าก่อนการทดลอง	ค่าหลังการทดลอง
อุณหภูมิ °C	25 – 26.6	25.5 – 27
ค่าการละลายของออกซิเจน mg/l	5.5 – 6.0	5.4 – 5.6
ค่าความเป็นกรด – ด่าง pH	6.8 – 7.3	6 – 7
ค่าความกระด้าง mg/L CaCO <sub>3</sub>	50	50

## 2. การวิเคราะห์ lipid peroxidation และตรวจวัด Antioxidant enzyme activity

2.1 นำปลาที่ได้สัมผัสแดดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆมาวางสลับแล้วนำม้ามออกมาชั่งน้ำหนัก ก่อนที่จะนำไป homogenized ใน 0.01 M phosphate buffer (pH 7.0) จากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 14,000 g 30 นาที และนำ supernatant ไปวิเคราะห์ปริมาณการเกิด lipid peroxidation และวัด activity ของ Antioxidant enzyme ต่อไป

2.2 การวิเคราะห์ปริมาณการเกิด lipid peroxidation โดยวิธี spectrofluorometer

1. เตรียม Standard TEP ที่ความเข้มข้น 0.2, 0.4, 0.8, 1.2 และ 1.6 nmol/l และใช้ pure water เป็น blank

2. นำ supernatant หรือ standard ปริมาตร 1 ml. เติม 100 nm BHT ปริมาตร 50  $\mu$ l , 10 % TCA 1 ml , 0.6% TBA 1.5 ml ตามลำดับ โดย vortex ทุกครั้งที่เติมสาร โดยเฉพาะหลังเติม 10 % TCA และ 0.6% TBA ให้ vortex นาน 1 นาที

3. นำ supernatant หรือ standard ที่เตรียมไปต้มใน water bath โดยตั้งอุณหภูมิ 100 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที

4. ทำให้เย็นด้วยน้ำแล้วนำไปปั่นที่ความเร็ว 3000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที

5. นำ supernatant มาวัดระดับ Malondialdehyde ด้วย spectrofluorometer ที่  $\lambda_{EX} = 535$  nm

2.3 การตรวจวัด Superoxide Dismutase (SOD) Activity วัดโดยใช้เครื่อง multiple microplate reader ที่ความยาวคลื่น 560 nm (Oberley *et al.*, 1984)

1. เตรียม standard SOD โดยละลายด้วย 0.01 mol/l phosphate buffer

2. เตรียม mixed substrate ซึ่งประกอบด้วย Xanthine 0.05 mmol/l และ Nitroblutetrazolium (NBT) 0.025 mmol/l ทำละลายด้วย 50 mM Sodium Carbonate buffer with 1 mmol/l EDTA pH 10.2
3. ปิเปต standard SOD, diluted sample หรือ Phosphate buffer ปริมาตร 5  $\mu$ l ลงใน 96-well microplate เติม 170  $\mu$ l ของ mixed substrate จากนั้นเติม Xanthine oxidase ความเข้มข้น 60 U/l ปริมาตร 25  $\mu$ l ผสมให้เข้ากัน
4. นำไปวัดค่าดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง multiple microplate reader ด้วยแสง ultraviolet ที่ความยาวคลื่น 450 nm ทุก 30 วินาที เป็นเวลา 5 นาที คำนวณหาค่า SOD Activity ของ sample เทียบกับ SOD standard

2.4 การวัด Catalase(CAT) Activity วัดโดยใช้ spectrophotometer ความยาวคลื่น 540 nm

1. เตรียม Formaldehyde Standards
2. เติม Assay Buffer ปริมาตร 100  $\mu$ l, Methanol ปริมาตร 30  $\mu$ l และ Formaldehyde ปริมาตร 20  $\mu$ l ทั้งในตัวอย่างและ Formaldehyde Standards
3. เติม H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ปริมาตร 20  $\mu$ l และนำไปป่มที่อุณหภูมิห้อง 20 นาที
4. เติม Potassium Hydroxide 30  $\mu$ l และ Purpald 30  $\mu$ l นำไปป่มที่อุณหภูมิห้อง 10 นาที
4. เติม Potassium Periodate 10  $\mu$ l และนำไปป่มที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที
5. นำไปวัดโดยใช้ spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 540 nm
6. นำไปคำนวณ Catalase activity ตามสูตร

$$\text{CAT} = \frac{\mu\text{M of sample} \times \text{sample dilution}}{20 \text{ min}} = \text{nmol/min/ml}$$

สถาบันวิจัยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### 3. การทดลองทางด้านเนื้อเยื่อวิทยาโดยศึกษาพยาธิวิทยาของม้าม

#### 3.1 เนื้อเยื่อที่ใช้ตรวจจสอบ

ม้ามของปลานิลซึ่งเก็บรักษาไว้ใน 10 % buffered formalin

#### 3.2 ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาความผิดปกติของเนื้อเยื่อเพื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์

ชนิดส่องแสง ดังตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อ (ย้อมสีด้วย Hematoxylin & Eosin)

วิธี	ขั้นตอนการทำ
1.Fixation	นำม้ามของปลา มาผ่าครึ่งตามแนวยาวใส่ใน casset แล้วนำไปแช่ใน 10 % formalin
2.Dehydration	นำม้ามของปลา (specimen) ผ่าน Ethanol ที่มีความเข้มข้นจากต่ำไปหาสูง โดยเริ่มจาก 70 %, 80%, 90% และ 100% Ethanol ตามลำดับ
3.Clearing	นำ specimen แช่ใน Xylene
4.Infiltration	นำ specimen มาจุ่มลงใน Paraffin เหลว ที่อุณหภูมิประมาณ 56-60 °C จนกระทั่ง paraffin เหลวซึมเข้าไปใน specimen จนทั่วถึงกัน
5.Embedding	ฝัง specimen ใน Paraffin โดยจัดให้ด้านหน้าตัดของม้ามแนบติดกับแม่พิมพ์ จากนั้นทำให้ Paraffin เหลวลงจนแข็งตัว จะได้ paraffin block
6.Section	นำ Paraffin block มาหั่นเป็นชิ้นบางๆ ด้วย Microtome ด้วยความเร็วสม่ำเสมอให้ได้ section ที่ความหนาประมาณ 0.5 ไมโครเมตรต่อกับเป็นแถบยาว (ribbon) แล้วนำไปลอยใน Tissue floating bath จากนั้นจึงวาง section บน slide
7.Staining	ย้อมสีด้วย Hematoxylin & Eosin (H & E Staining) โดยมีขั้นตอนดังนี้
- Deparaffinization	ล้าง paraffin ออกจาก slide โดยจุ่ม slide ที่มี section ลงใน Xylene
- Hydration	นำ slide ไปจุ่มใน Ethanol ที่มีความเข้มข้นจากสูงไปหาต่ำโดยเริ่มจาก 100% , 95%, และ 80% Ethanol ตามลำดับ
- Primary staining	ย้อมด้วยสี Hematoxylin 7-10 นาที
- Differentiation	ล้างสีที่มากเกินไปออกด้วยน้ำประปาที่เปิดให้ไหลผ่านตลอดเวลา
- Counterstaining	ย้อมสีซ้ำด้วยสี Eosin ประมาณ 30 นาที
- Dehydration	นำ Slide ผ่าน Ethanol ที่มีความเข้มข้นจากต่ำไปหาสูงโดยเริ่มจาก 95% และ 100% Ethanol
- Clearing	จุ่ม slide ใน Xylene เพื่อให้ section ใสหรือโปร่งแสงขึ้น เหมาะสมต่อ

- Mounting	การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ หยด Permount บน section แล้วปิดทับด้วย cover slip
------------	---

### 3.3 ศึกษาเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์

นำ slide ที่ทำการย้อมสี Hematoxylin & Eosin ซึ่งแห้งแล้วไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ โดยศึกษาจุลพยาธิสภาพทั่วไปที่สังเกตเห็นและจุลพยาธิ 3 ลักษณะซึ่งจะให้คะแนนเฉลี่ยจาก 1- 3 โดยมีเกณฑ์การให้คะแนนดังนี้ (Pirarat *et al.*, 2006) แล้วถ่ายภาพด้วยกล้องถ่ายภาพดิจิทัล

1. Ellipsoidal tissue enlargement หมายถึงมีการเพิ่มขนาดของ white pulp

คะแนน

0	ปกติ
1	1-2 เท่า
2	3-5 เท่า
3	5 เท่า

2. Melanomacrophage cell aggregation

0	ปกติ
1	1-3 บริเวณ
2	3-5 บริเวณ
3	> 5 บริเวณ

3. Vacuolar degeneration

0	ปกติ
1	1-3 บริเวณ
2	3-5 บริเวณ
3	> 5 บริเวณ

#### 4. การย้อมชิ้นเนื้อด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

นำชิ้นเนื้อ้ามมาตัดด้วยเครื่อง microtome ในห้องปฏิบัติการตรวจสอบชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา โดยตัดที่ความหนาประมาณ 4 - 5 ไมครอน โดยนำมาติดบนสไลด์แก้วที่สะอาดและได้รับการเคลือบสารติดเนื้อเยื่ออย่างชิ้นเนื้อที่ได้ตัดและวางบนสไลด์แก้วด้วยวิธีการทางอิมมูโนฮิสโตเคมีโดยจัดสไลด์ออกเป็น 5 กลุ่มดังนี้ กลุ่มควบคุม คือปลานิลที่ไม่ได้สัมผัสแคดเมียม และปลานิลที่ได้สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มก.ต่อลิตร จากนั้นนำไปกำจัดพาราฟินออกโดยจุ่มลงใน Xylene แล้วหยดด้วย 3% hydrogen peroxide ใน methanol ประมาณ 20 นาที เพื่อกำจัด endogenous peroxidase ออกไป ล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) 3 ครั้งๆละ 5 นาที ทำการแช่ตำแหน่งการจดจำที่จำเพาะของแอนติบอดีต่อแอนติเจน (antigen retrieval) โดยนำสไลด์แก้วแช่ในสารละลายโซเดียมซิเตรตบัฟเฟอร์ที่มีความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ (0.01M sodium citrate buffer) pH 6.0 แล้วนำเข้าไมโครเวฟประมาณ 5 นาทีจากนั้นล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที แล้วจึงนำไปย้อมด้วยแอนติบอดี โดยแบ่งเป็น

4.1 Rabbit polyclonal anti- IgM antibody Tilapia (1:1000 dilution) ซึ่งเป็น primary antibody แล้วไปบ่มที่ 4 °C ข้ามคืน (overnight) นำสไลด์ไปล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) จากนั้นใส่ secondary antibody ซึ่งคอนจูเกตด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นหยด alkaline phosphatase substrate ประมาณ 10 นาที แล้วไปย้อมทับ (counter stain) ด้วยสีฮีมาทอกซาลิน hematoxylin ปล่อยให้จาง slide แห้งแล้วนำมาหยด Permount บน section แล้วปิดทับด้วย cover slip

หลังจากนั้นประเมินปริมาณการติดสี (stained cell) โดยอ่านผลและบันทึกข้อมูลด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาวโดยมีเกณฑ์ดังนี้

การนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ Tilapia IgM antibody

การแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ IgM antibody คือเซลล์ที่ติดสีแดงเข้มบริเวณไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และ/หรือ ผนังเซลล์เมมเบรน (cell membrane) โดยนับทุกเซลล์ในสไลด์ที่ย้อมติดสี

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อทำการนับเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงเข้มแล้วทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มก.ต่อลิตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน

4.2 Rabbit Anti-NF-kB (c-Rel) Polyclonal Antibody (1:50 dilution) ซึ่งเป็น primary antibody แล้วไปบ่มที่ 4 °C ซ้ำคืน (overnight) นำสไลด์ไปล้างด้วย Phosphate buffered saline (PBS) จากนั้นใส่ secondary antibody ซึ่งคอนจูเกตด้วยเอนไซม์ alkaline phosphatase ประมาณ 30 นาทีที่อุณหภูมิห้องแล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง จากนั้นหยด Alkaline phosphatase substrate แล้วไปย้อมทับ (counter stain) ด้วยสีอีมาทอกไซลิน hematoxylin ปล่อยให้จาง slide แห้งแล้วนำมาหยด Permount บน section แล้วปิดทับด้วย cover slip หลังจากนั้นประเมินปริมาณการติดสี (stained cell) โดยอ่านผลและบันทึกข้อมูลด้วยการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดาโดยมีเกณฑ์ดังนี้

การนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ polyclonal anti c-Rel (anti-NFkB) antibody การแสดงออกของเซลล์ที่ให้ผลบวกทางอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อ polyclonal anti c-Rel (anti-NFkB) antibody คือเซลล์ที่ติดสีแดงบริเวณนิวเคลียส (nucleus) และ/หรือ ไซโทพลาสซึม (cytoplasm) และ/หรือ ผนังเซลล์เมมเบรน (cell membrane) โดยนับทุกเซลล์ในสไลด์ที่ย้อมติดสี

เกณฑ์การให้คะแนนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ Tilapia IgM antibody และ polyclonal anti c-Rel (anti-NFkB) antibody มีดังนี้ (Pirarat *et al.*, 2006)

0	ไม่พบเซลล์
1	1 - 50 เซลล์
2	51 – 100 เซลล์
3	> 100 เซลล์

#### การวิเคราะห์ข้อมูล

เมื่อทำการนับเซลล์ที่ย้อมติดสีแดงเข้มแล้วทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มก.ต่อลิตร แล้วนำมาเปรียบเทียบกัน

## 5. สถิติ

วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในน้ำมูกของปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆและเวลาต่างๆ แสดงค่า Mean  $\pm$  SE โดยใช้ Two way ANOVA Pos Hoc Multiple comparisons Bonferroni และ One way ANOVA : Pos Hoc Multiple comparisons Duncan นอกจากนี้วิเคราะห์คะแนนเฉลี่ยจากจุลพยาธิวิทยาโดยใช้โปรแกรม SPSS for Windows version 13 วิเคราะห์ทางสถิติโดยใช้ non- Parametric Mann-Whitney test ( $p < 0.05$ )

## 6. การกำจัดสารเคมี

เนื่องจากแคดเมียมเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษจึงไม่สามารถทิ้งลงที่ระบายน้ำได้ ดังนั้นจึงทำการกรองน้ำที่ปนเปื้อนแคดเมียมผ่านเครื่องกรองที่มี anion resin โดยที่ anion resin จะจับกับแคดเมียมซึ่งมีประจุเป็นบวก จากนั้นนำน้ำที่ผ่านการกรองไปตรวจหาแคดเมียมอีกครั้ง ก่อนที่จะนำไปกำจัดอย่างถูกต้องจากบริษัทที่รับกำจัดของเสีย

## บทที่ 4

### ผลการทดลอง

#### 4.1 การศึกษาพิษของแคดเมียมในปลานิล

##### 4.1.1 อาการทั่วไปของปลานิลที่ได้รับแคดเมียม

เมื่อให้ปลานิลสัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ และบันทึกผลการทดลองเป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าพิษของแคดเมียมมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับ โดยบันทึกอัตราการตายสะสมซึ่งแสดงในตารางที่ 4 และสามารถสรุปอาการแยกเป็นกลุ่มดังนี้

##### กลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้รับแคดเมียม)

อาการภายนอกปกติ ว่ายน้ำไปมาปกติ

##### กลุ่มที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาการภายนอกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม มีบางตัวสีคล้ำขึ้น ครีบหลังแผ่กางออก

##### กลุ่มที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตร

อาการคล้ายกลุ่ม 0.1 มิลลิกรัมต่อลิตร คือ มีบางตัวสีคล้ำขึ้น ครีบหลังแผ่กางออก เริ่มมีปลาตายที่ชั่วโมง 48

##### กลุ่มที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

หลังได้รับแคดเมียมปลาลำตัวคล้ำขึ้น ครีบหลังแผ่กางออก มีอาการตื่นตัว กระวนกระวาย (hyperexcitability) และมาอยู่ในบริเวณใกล้ๆ กับหัวทราย บางตัวมีจุดเลือดออกบริเวณเหงือก เริ่มมีปลาตายชั่วโมงที่ 24 น้ำขุ่น

**กลุ่มที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น 10.0 มิลลิกรัมต่อลิตร**

หลังได้รับแคดเมียมปลาตัวค้ำขึ้น ครีบหลังแผ่กางออก ปลาเริ่มนิ่งไม่ว่ายน้ำ  
ปลามีจุดเลือดออกบริเวณเหงือกมากขึ้น เริ่มมีปลาตายชั่วโมงที่ 24 โดยมีปลาตายมากกว่ากลุ่ม  
ทดลองอื่นซึ่งได้รับแคดเมียมในระดับความเข้มข้นต่ำ ปลาที่ตายมีเมือกมาก น้ำขุ่นมากขึ้น



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงอัตราการตายสะสมของปลาที่สัมผัสแคดเมียมที่ความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อลิตร)	จำนวน ปลา/ครั้ง (ตัว)	การตายสะสมในระยะเวลาหลังสัมผัสแคดเมียม											
		24hr.			48hr.			72 hr.			96 hr.		
		ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
กลุ่มควบคุม	24	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.1	24	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0
0.5	24	0	1	0	0	1	1	0	1	1	0	1	1
1.0	24	2	1	1	1	0	2	2	1	2	2	1	1
10	24	2	3	2	3	4	2	2	4	2	3	2	3



## 4.2 ผลของแคดเมียมต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน

### 4.2.1 ผลของแคดเมียมต่อปริมาณ MDA ในม้ามของปลานิล

แคดเมียมความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ทำให้ปริมาณ MDA ในม้ามของปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) โดยพบว่าแคดเมียมที่ความเข้มข้นสูงขึ้นไปทำให้ปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นและมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ได้รับแคดเมียมด้วย ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 ปริมาณ MDA ในม้ามของปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละเวลา

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ปริมาณ MDA ในม้ามปลานิล (nmol MDA/gram tissue)			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
กลุ่มควบคุม	2.34 $\pm$ 0.11	2.05 $\pm$ 0.72	2.78 $\pm$ 1.80	2.93 $\pm$ 0.05
0.1	3.03 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	3.45 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	3.26 $\pm$ 0.10 <sup>a</sup>	3.76 $\pm$ 0.11 <sup>a</sup>
0.5	3.36 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	3.82 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.51 $\pm$ 0.09 <sup>ab</sup>	4.01 $\pm$ 0.08 <sup>a</sup>
1.0	3.56 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	3.90 $\pm$ 0.06 <sup>b</sup>	3.86 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>	4.40 $\pm$ 0.14 <sup>b</sup>
10.0	4.12 $\pm$ 0.10 <sup>c</sup>	4.35 $\pm$ 0.04 <sup>c</sup>	4.54 $\pm$ 0.16 <sup>c</sup>	4.67 $\pm$ 0.17 <sup>b</sup>

แสดงค่า Mean  $\pm$  S.E. (n=3)

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ )

#### 4.2.2 ผลของแคดเมียมต่อสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในม้ามของปลานิล

จากการทดลองพบว่าสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในม้ามของปลานิลลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ในกลุ่มปลาที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้นสูงเมื่อเปรียบเทียบแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน และเมื่อเปรียบเทียบแต่ละช่วงเวลาในแต่ละกลุ่มการทดลองพบว่าค่าที่ได้ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้นในกลุ่มที่ได้รับแคดเมียม 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ดังตารางที่ 6

**ตารางที่ 6** ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในม้ามของปลานิล กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละเวลา

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) (U/ml)			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
กลุ่มควบคุม	0.09657 $\pm$ 0.005	0.12400 $\pm$ 0.008	0.09158 $\pm$ 0.018	0.12320 $\pm$ 0.010
0.1	0.10820 $\pm$ 0.006	0.09532 $\pm$ 0.016 <sup>b</sup>	0.08949 $\pm$ 0.011	0.07576 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>
0.5	0.10447 $\pm$ 0.013	0.06244 $\pm$ 0.005 <sup>a</sup>	0.07992 $\pm$ 0.001	0.08658 $\pm$ 0.015 <sup>a</sup>
1.0	0.08949 $\pm$ 0.007	0.07950 $\pm$ 0.011 <sup>ab</sup>	0.13195 $\pm$ 0.014	0.09489 $\pm$ 0.005
10.0	0.06327 $\pm$ 0.006 <sup>a</sup>	0.06993 $\pm$ 0.004 <sup>ab</sup>	0.10529 $\pm$ 0.008	0.06869 $\pm$ 0.009 <sup>a</sup>

แสดงค่า Mean  $\pm$  S.E. (n=3)

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ )

#### 4.2.3 ผลของแคดเมียมต่อสมรรถนะของเอนไซม์ Catalase ในน้ำมของปลานิล

จากการทดลองพบว่าสมรรถนะของเอนไซม์ Catalase ในน้ำมของปลานิลที่ได้รับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงมีความแปรปรวนค่อนข้างสูงเมื่อเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มการทดลองและแต่ละช่วงการทดลอง แต่อย่างไรก็พบว่าที่ 96 ชั่วโมงสมรรถนะของเอนไซม์ Catalase ในน้ำมของปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) ค่าที่แสดง คือ ค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ดังตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ catalase ในน้ำมของปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ในแต่ละเวลา

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อ ลิตร)	ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ catalase (nmol/min/ml)			
	24 ชั่วโมง	48 ชั่วโมง	72 ชั่วโมง	96 ชั่วโมง
กลุ่มควบคุม	19.3895 $\pm$ 0.51	20.9012 $\pm$ 0.86	21.7151 $\pm$ 0.79	15.4360 $\pm$ 0.90
0.1	21.2520 $\pm$ 1.90	16.8314 $\pm$ 0.80 <sup>a</sup>	19.7384 $\pm$ 0.23	17.5291 $\pm$ 0.72
0.5	17.6453 $\pm$ 1.02	18.8663 $\pm$ 0.98	22.1221 $\pm$ 1.08	22.4419 $\pm$ 0.97 <sup>b</sup>
1.0	16.5988 $\pm$ 0.51	15.6686 $\pm$ 0.72 <sup>a</sup>	22.1512 $\pm$ 1.04	18.5756 $\pm$ 1.19 <sup>a</sup>
10.0	19.6221 $\pm$ 0.33	21.0465 $\pm$ 1.31	19.6802 $\pm$ 2.05	20.4651 $\pm$ 0.67 <sup>ab</sup>

แสดงค่า Mean  $\pm$  S.E. (n=3)

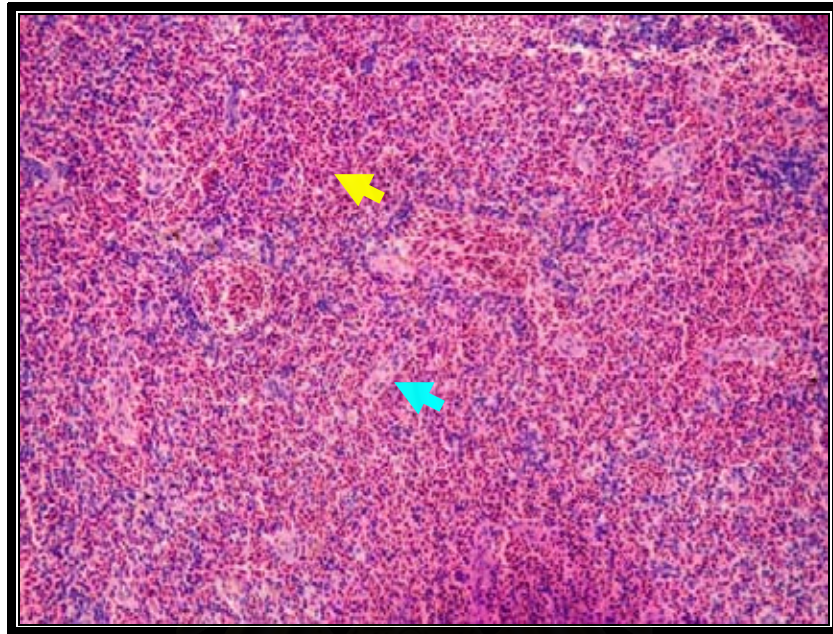
อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ )

#### 4.3 ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของม้ามที่ระยะเวลาต่างๆ

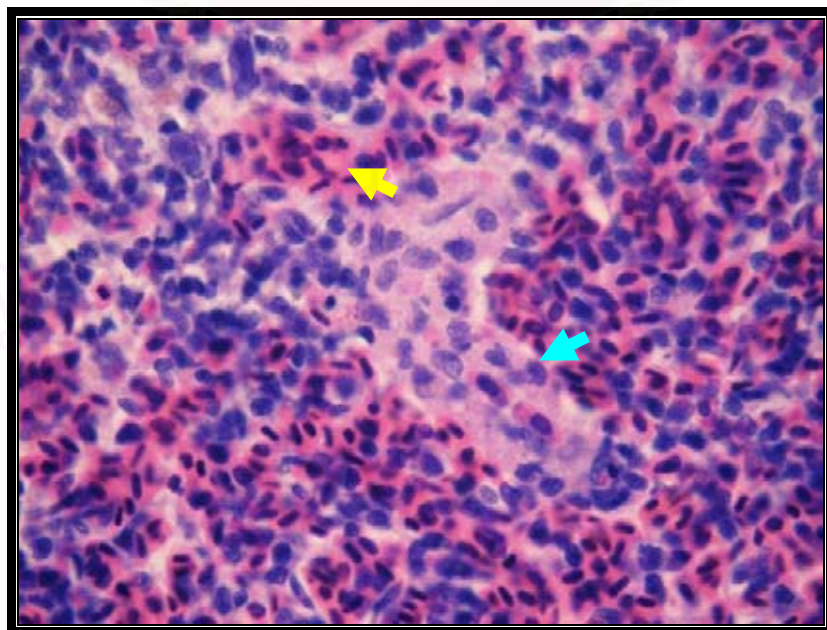
การศึกษาจุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อม้ามในปลาชนิดที่สัมผัสแคดเมียมความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงธรรมดา โดยศึกษาจุลพยาธิที่เกิดขึ้น 3 ลักษณะ คือ Ellipsoidal tissue enlargement , Melanomacrophage cell aggregation และ Vacuolar degeneration ซึ่งจะให้เป็นคะแนนเฉลี่ยจาก 0 - 3 (Pirarat *et al.*, 2006) และสังเกตเห็นจุลพยาธิสภาพที่เกิดขึ้น คือ Edematous capillary ที่บริเวณ white pulp ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรระยะเวลา 96 ชั่วโมงอีกด้วย (รูปที่ 9 – 21 )

1. Ellipsoidal tissue enlargement จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม
2. Melanomacrophage cell aggregation จะเพิ่มมากขึ้นเมื่อระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับสูงขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่มีความแตกต่างกันในช่วงเวลาการทดลอง
3. Vacuolar degeneration จะเพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่ปลาสัมผัสกับแคดเมียม

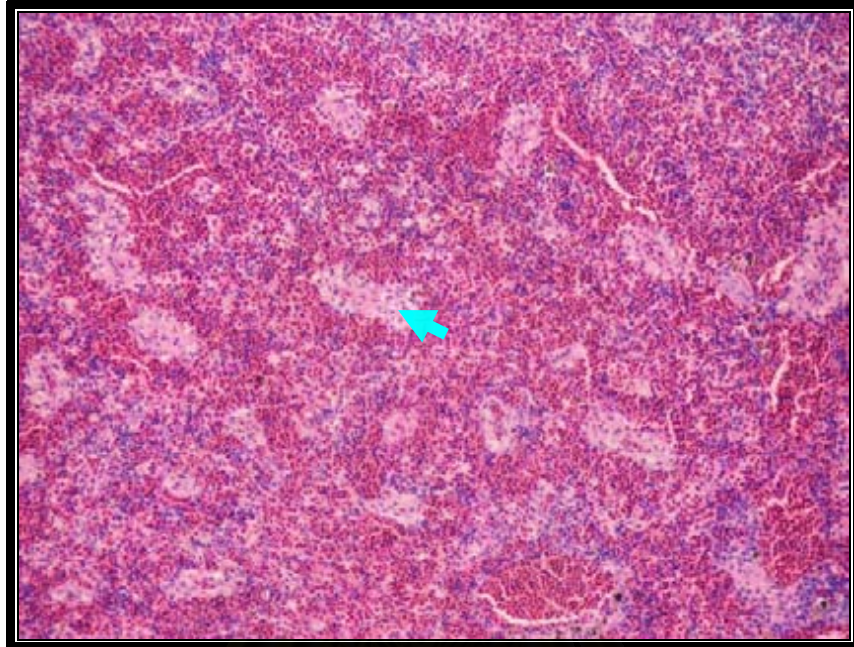
**รูปที่ 9** จุดกายวิภาคของเนื้อเยื่อม้ามจากปลานิล แสดงถึง red pulp (ลูกศรสีเหลือง) และ white pulp (ลูกศรสีฟ้า) ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อม้าม (Hematoxylin & Eosin 20X)



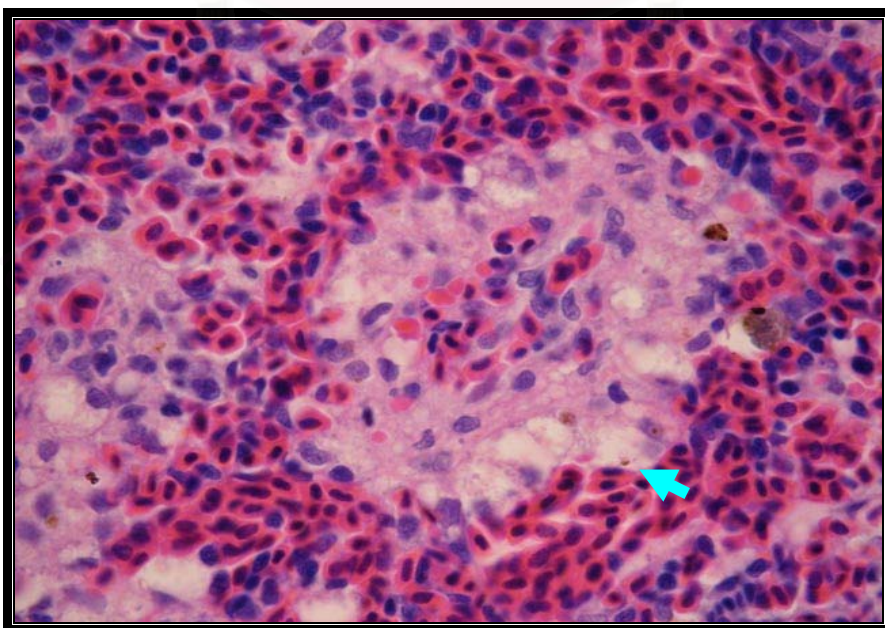
**รูปที่ 10** จุดพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อม้ามจากปลานิล แสดงถึง red pulp (ลูกศรสีเหลือง) และ white pulp (ลูกศรสีฟ้า) ซึ่งอยู่ในเนื้อเยื่อม้าม (Hematoxylin & Eosin 100X)

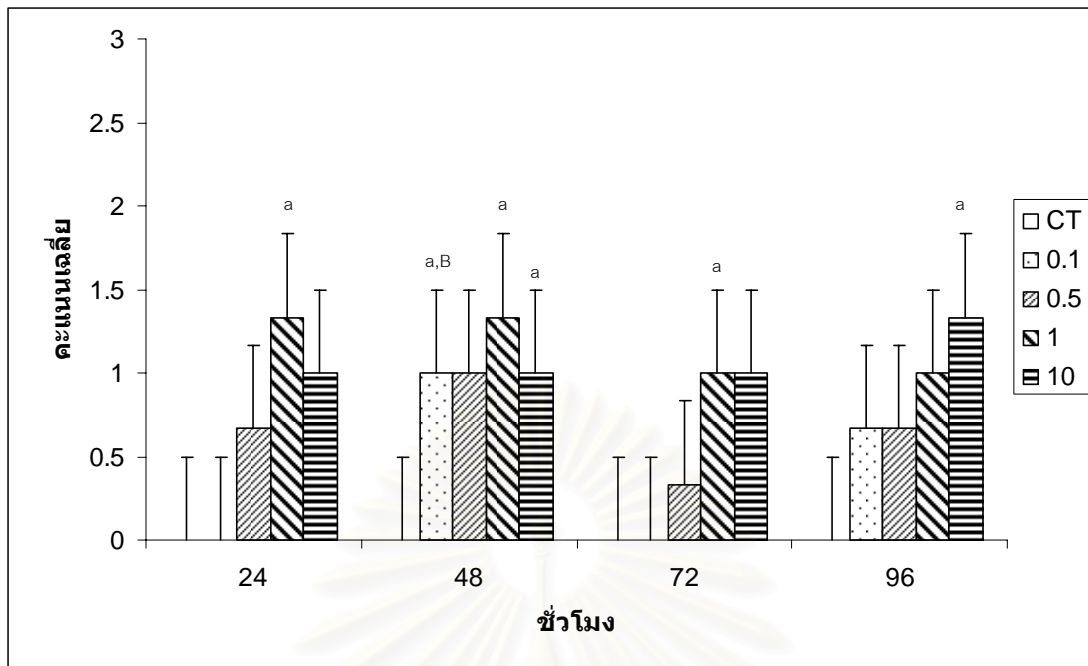


**รูปที่ 11** จุลพยาธิสภาพของม้ามปลานิลที่ได้รับแคดเมียม แสดงการเกิด Ellipsoidal tissue enlargement (white pulp มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น) กระจายทั่วไปในบริเวณเนื้อเยื่อม้าม (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 20X)



**รูปที่ 12** จุลพยาธิสภาพของม้ามปลานิลที่ได้รับแคดเมียม แสดงการเกิด Ellipsoidal tissue enlargement (white pulp มีการขยายขนาดเพิ่มขึ้น) กระจายทั่วไปในบริเวณเนื้อเยื่อม้าม (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 100X)



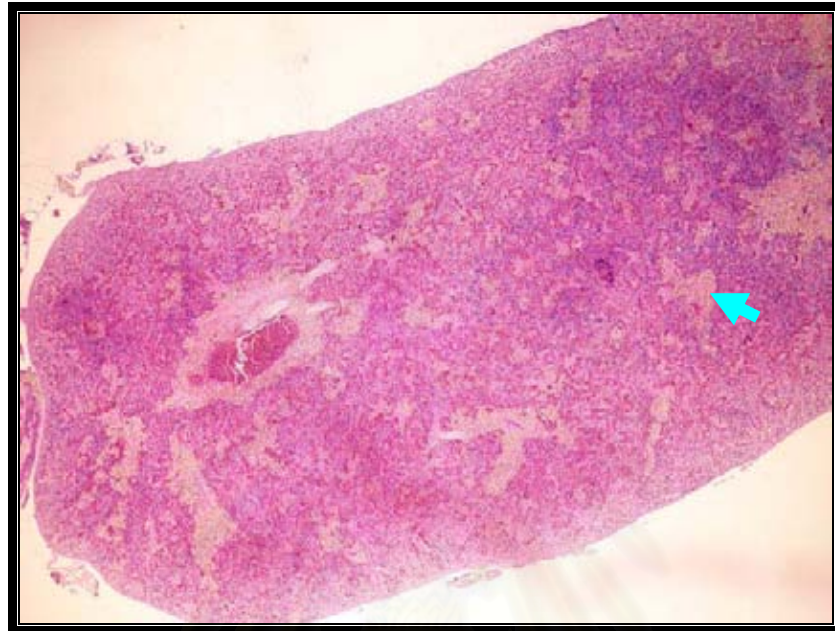


**รูปที่ 13** แสดงคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุลพยาธิสภาพ เกิด Ellipsoidal tissue enlargement ใน ม้ามปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาต่างๆ

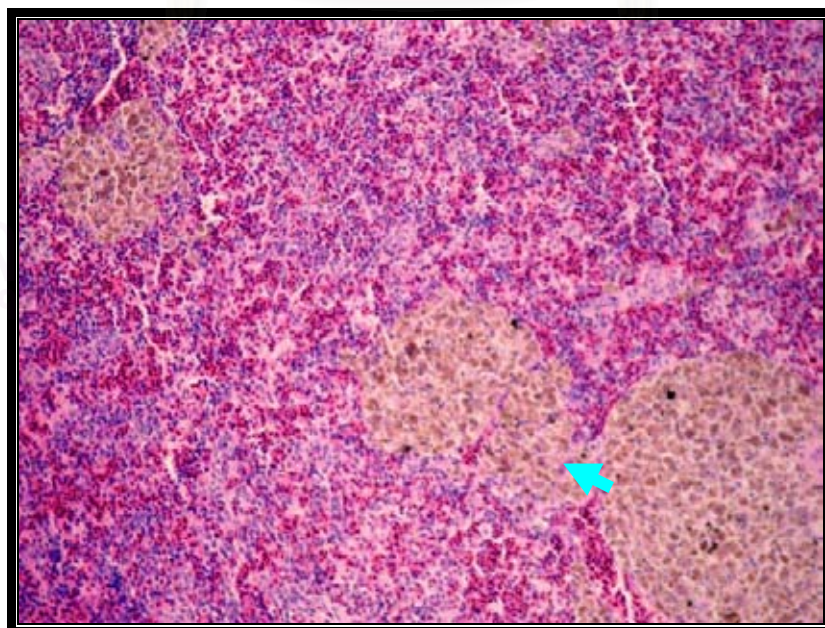
อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลา ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

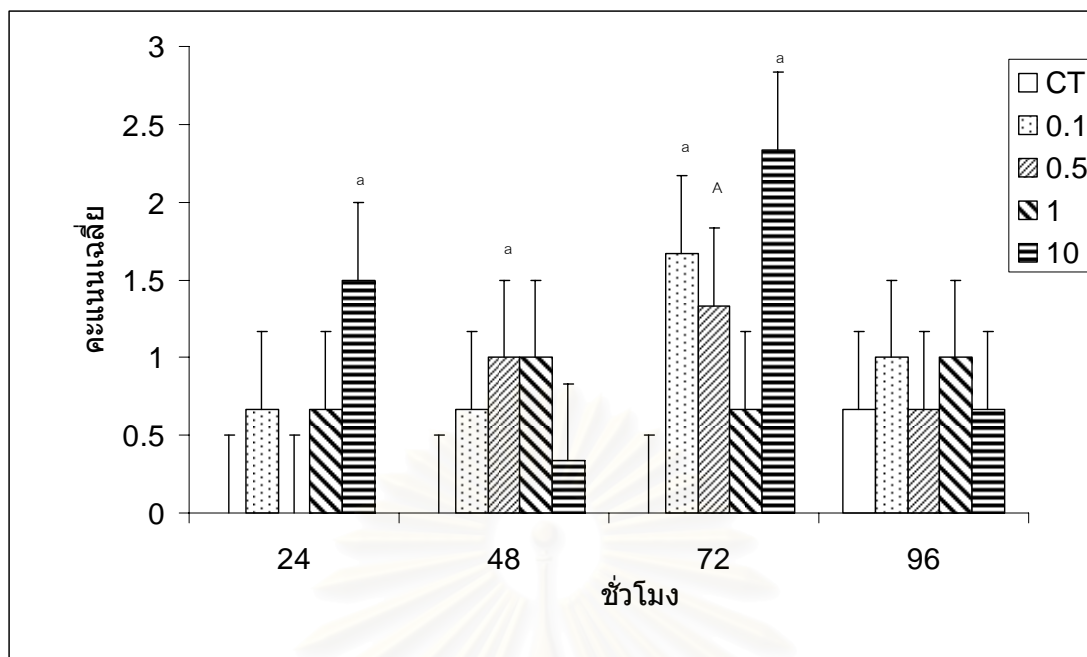
**รูปที่ 14** จุลพยาธิสภาพของม้ามปลานิลที่ได้รับแคดเมียม แสดงการเกิด Melanomacrophage cell aggregation กระจายทั่วไปในบริเวณเนื้อเยื่อม้าม (Hematoxylin & Eosin 4X)



**รูปที่ 15** จุลพยาธิสภาพของม้ามปลานิลที่ได้รับแคดเมียม แสดงการเกิด Melanomacrophage cell aggregation กระจายทั่วไปในบริเวณเนื้อเยื่อม้าม (Hematoxylin & Eosin 10X)





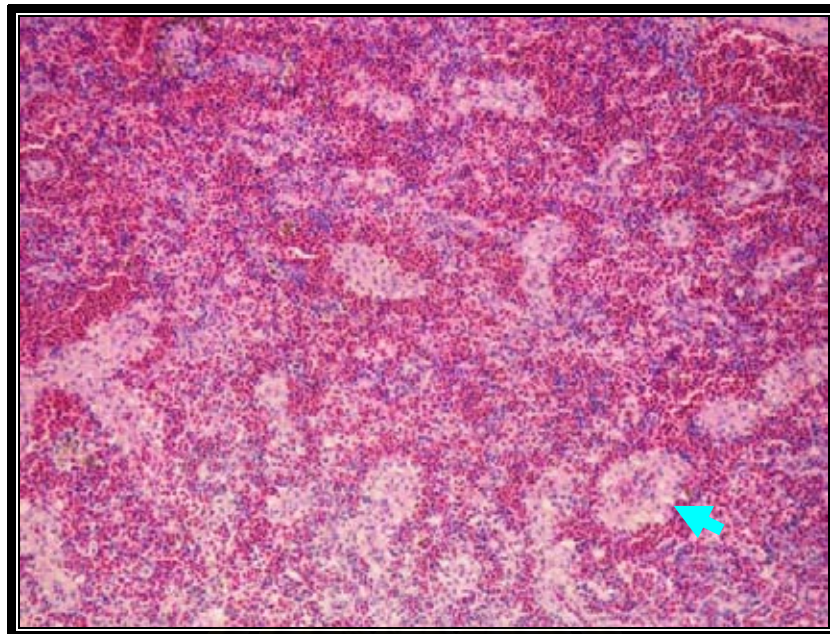


**รูปที่ 16** แสดงคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุลพยาธิสภาพ เกิด Melanomacrophage cell aggregation ในม้ามปลาในลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาต่างๆ

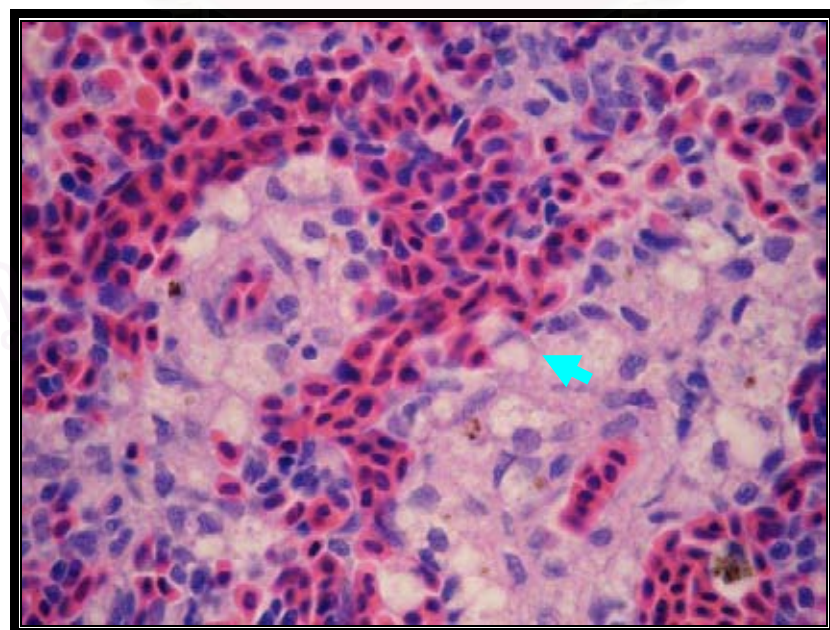
อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

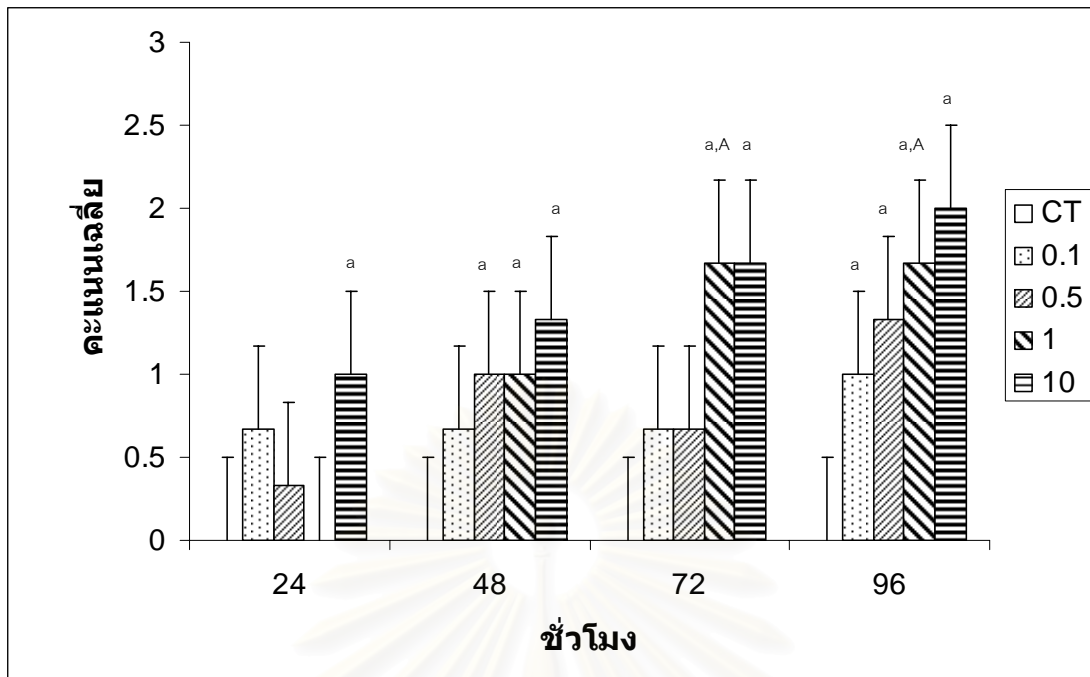
อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลา ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

รูปที่ 17 จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อม้ามจากปลานิล แสดงการเกิด vacuolar degeneration ในไซโทพลาสซึมที่บริเวณ white pulp (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 20X)



รูปที่ 18 จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อม้ามจากปลานิล แสดงการเกิด vacuolar degeneration ในไซโทพลาสซึมที่บริเวณ white pulp (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 100X)



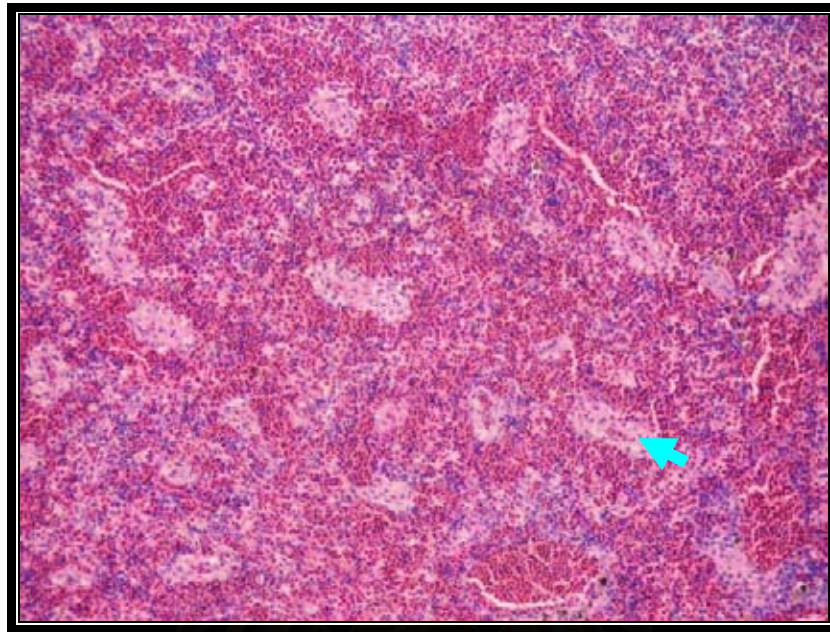


**รูปที่ 19** แสดงคะแนนเฉลี่ยการเกิดจุดพยาธิสภาพ เกิด Vacuolar degeneration ในน้ำมปลานิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาต่างๆ

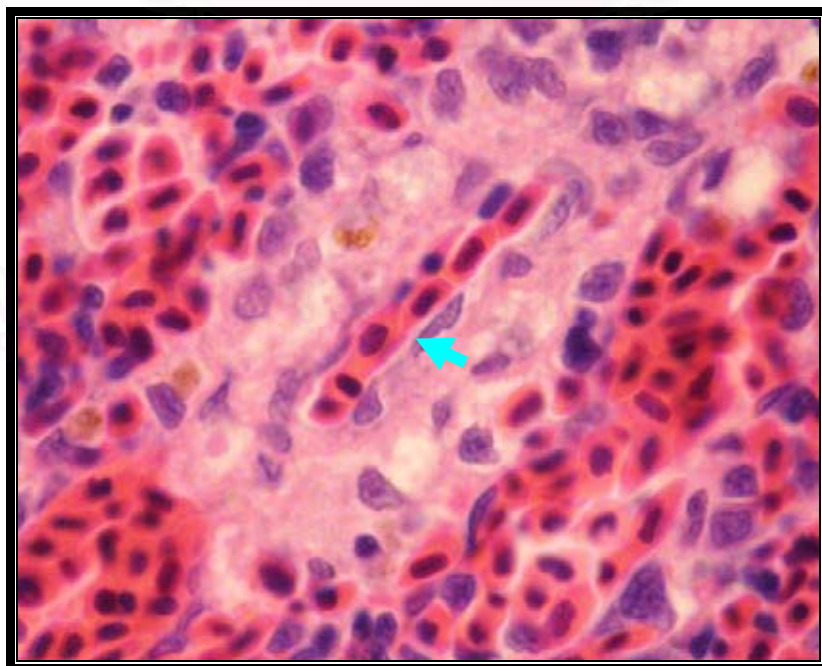
อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของกลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลา ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

**รูปที่ 20** จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อม้ามจากปลานิล แสดงการเกิด Edematous capillary ที่บริเวณ white pulp และพบการคั่งของเม็ดเลือดแดงภายในเส้นเลือดฝอย นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นการเสื่อมของ endothelial cell รอบๆเส้นเลือดฝอยอีกด้วย (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 20X)



**รูปที่ 21** จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อม้ามจากปลานิล แสดงการเกิด Edematous capillary ที่บริเวณ white pulp และพบการคั่งของเม็ดเลือดแดงภายในเส้นเลือดฝอย นอกจากนี้ยังสังเกตเห็นการเสื่อมของ endothelial cell รอบๆเส้นเลือดฝอยอีกด้วย (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 100X)



#### 4.4 ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงของบีเซลล์และ NF- kB (c-Rel) ตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

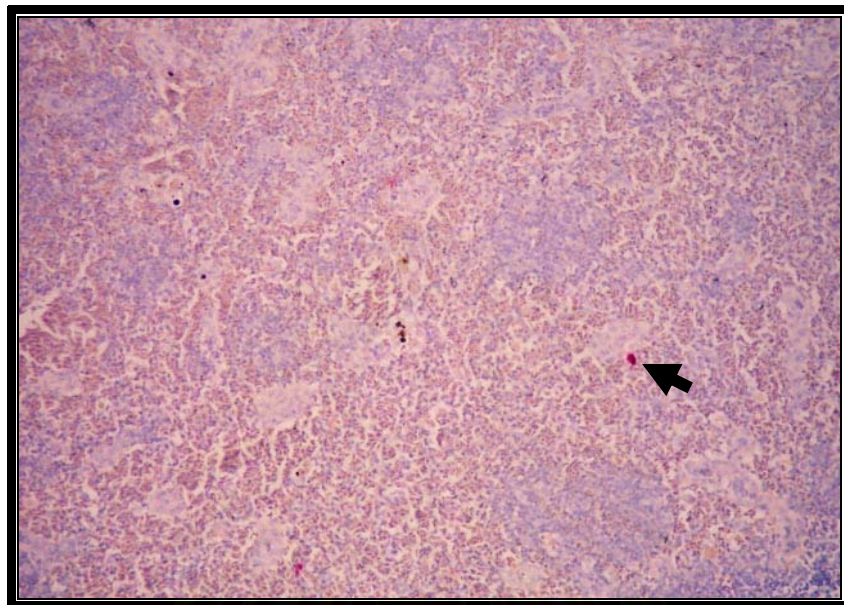
##### 4.4.1 ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงของบีเซลล์ตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

พบว่าจำนวนบีเซลล์เพิ่มมากขึ้นตามระดับความเข้มข้นของแคดเมียมที่ได้รับเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งจะพบในกลุ่มการทดลองที่ได้รับแคดเมียม 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรและการเพิ่มขึ้นของจำนวนบีเซลล์สัมพันธ์กับระยะเวลาที่ได้รับแคดเมียมอีกด้วย โดยจะเห็นได้ชัดเจนในชั่วโมงที่ 48 เป็นต้นไป

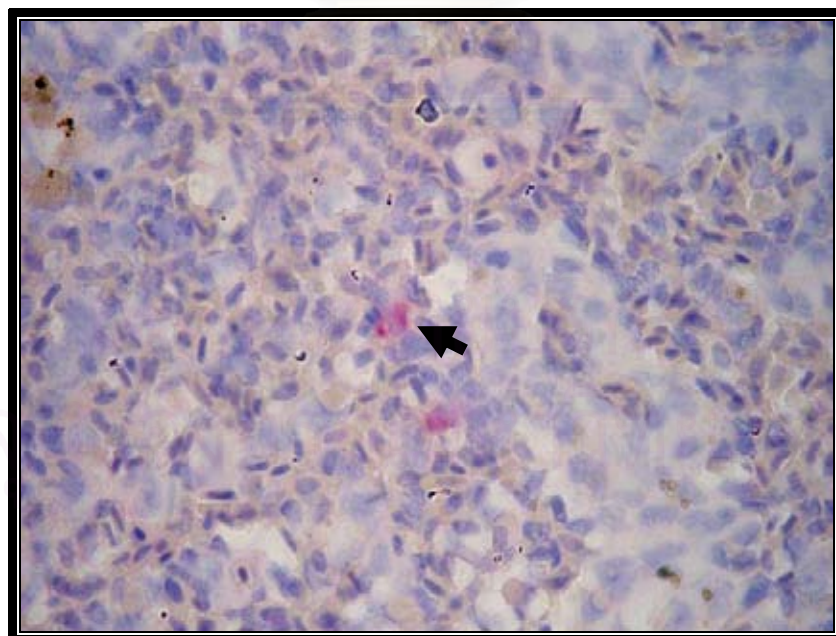


สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

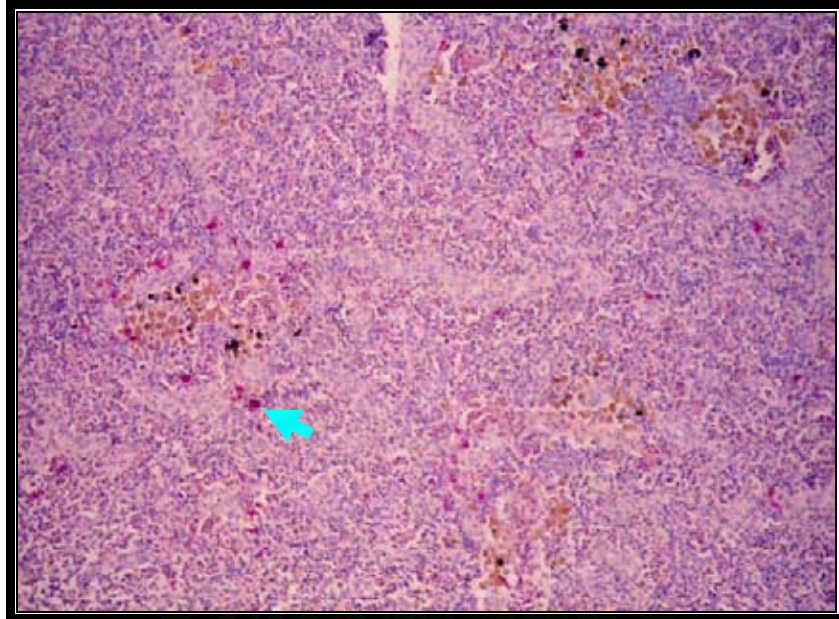
รูปที่ 22 จุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ้ามจากปลานิล แสดงบีเซลล์ ซึ่งย้อมติด IgM antibody โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 20X)



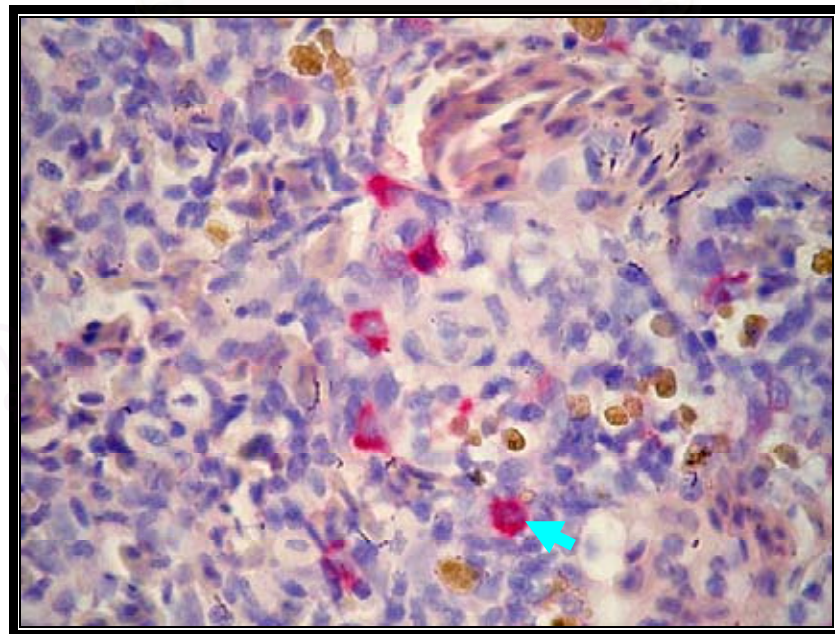
รูปที่ 23 จุลกายวิภาคของเนื้อเยื่อ้ามจากปลานิล แสดงบีเซลล์ ซึ่งย้อมติด IgM antibody โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 100X)

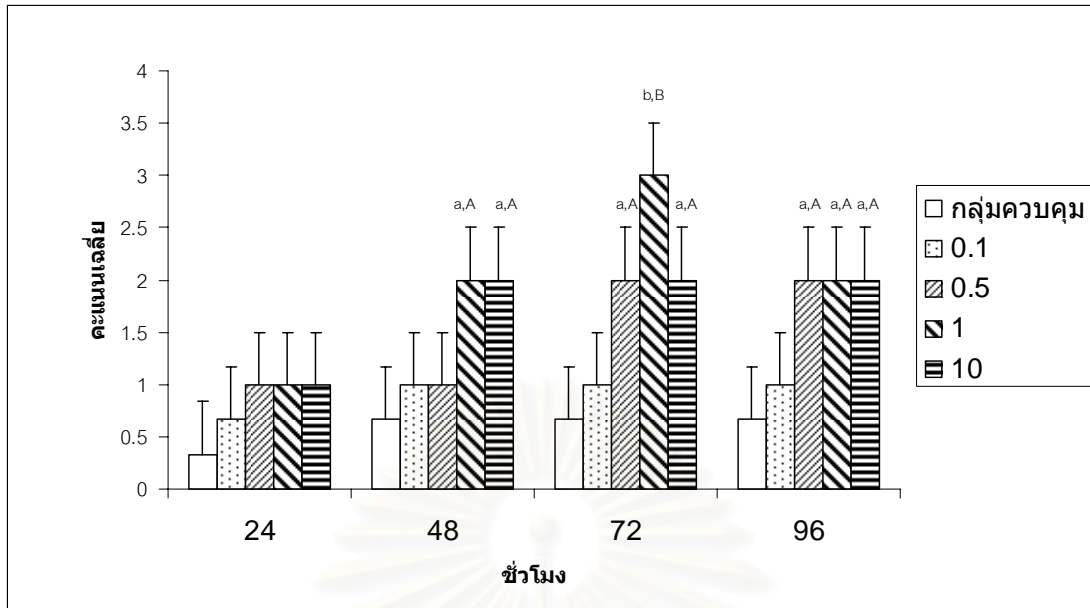


**รูปที่ 24** จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ้ามจากปลานิล แสดงบีเซลล์ ซึ่งย้อมติด IgM antibody โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 20X)



**รูปที่ 25** จุลพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อ้ามจากปลานิล แสดงบีเซลล์ ซึ่งย้อมติด IgM antibody โดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (ลูกศร) (Hematoxylin & Eosin 100X)





**รูปที่ 26** แสดงคะแนนเจลลีย์การยับยั้งติตติ Tilapia polyclonal anti- IgM antibody ในน้ำมปลา นิลกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นต่างๆ ที่เวลาต่างๆ

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์เล็กที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของแต่ละกลุ่มการทดลองในช่วงเวลาเดียวกัน ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )

อักษรภาษาอังกฤษตัวพิมพ์ใหญ่ที่ต่างกัน หมายถึง ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของกลุ่มการทดลองในแต่ละช่วงเวลา ( $P < 0.05$ ) ( $n=3$ )



#### 4.4.2 ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงของNF- $\kappa$ B (c-Rel) ตรวจสอบโดยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี

ไม่พบการตอบสนองเกิดขึ้นในม้ามปลานิลจากพิษของแคดเมียมในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## อภิปราย สรุปผลการทดลอง และข้อเสนอแนะ

## 5.1 พิษของแคดเมียมต่อปลานิล

อาการแสดงและอัตราการตายสะสมของปลานิลที่ได้รับแคดเมียมที่ความเข้มข้น

0.1 – 10 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง

จากการศึกษาความเป็นพิษของแคดเมียมในน้ำของปลานิลที่ความเข้มข้น 0.1 – 1 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าปลานิลหลังจากได้รับสัมผัสกับแคดเมียมที่ระดับความเข้มข้นสูง จะมีอาการผิดปกติโดยอาการที่สังเกตพบได้แก่ ลำตัวสีคล้ำขึ้น ครีบหลังแผ่กางและมีจุดเลือดออกบริเวณเหงือก นอกจากนี้อัตราการตายสะสมของปลานิลจะมากขึ้นและเกิดขึ้นในเวลาอันรวดเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับสัมผัสกับแคดเมียมในระดับความเข้มข้นต่ำ โดยพบว่าเริ่มมีปลาตายหลังจากได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรในชั่วโมงที่ 48 และเริ่มมีปลาตายมากขึ้นเมื่อได้รับแคดเมียมความเข้มข้น 1 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตรโดยจะสังเกตเห็นในชั่วโมงที่ 24 แสดงว่าระดับความเป็นพิษของแคดเมียมขึ้นกับปริมาณสารที่ได้รับ (dose dependent) จากการทดลองจะเห็นได้ว่าปลานิลทนต่อพิษของแคดเมียมเนื่องจากปลานิลที่ได้รับแคดเมียมที่ขนาดความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อลิตรมีอัตราการตายสะสมสูงสุดแค่ 4 ตัว จาก 24 ตัว ซึ่งอาจเป็นผลมาจากการปรับตัวต่อสภาพสิ่งแวดล้อมของปลาในตระกูล Cyclid teleost นอกจากนี้ยังพบว่าลักษณะของปลาก่อนตายจะมีการขับเมือก ซึ่งอธิบายได้ว่าเมื่อเกิดภาวะเครียดในปลาจากการกระตุ้นของแคดเมียมโดยผ่าน brain - sympathetic-chromaffin cell axis และ hypothalamic-pituitary-interrenal (HPI) axis ทำให้มีการกระตุ้นการ transcription ของยีน ส่งผลให้มีการหลั่งเมือกเพิ่มมากขึ้นจาก mucous gland ในเหงือกและผิวหนัง

## 5.2 ผลของแคดเมียมต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress)

สภาวะ redox ภายใน cell จำเป็นต่อ homeostasis ของร่างกาย การเกิด reactive oxygen species เกินกว่าความสามารถของ cell และระบบ ป้องกันโดย antioxidant ทำให้เกิดภาวะที่เรียกว่า oxidative stress หรือ ภาวะเครียดออกซิเดชัน การศึกษาผลของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งศึกษาจากการเกิด lipid peroxidation และสมรรถนะของเอนไซม์ SOD และ

Catalase พบว่าแคดเมียมทำให้เกิด lipid peroxidation เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญโดยดูจากปริมาณของ MDA ซึ่งสิ่งที่เกิดขึ้นสามารถอธิบายได้ว่าแคดเมียมก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน ซึ่งเป็นภาวะที่เกิดจากความไม่สมดุลของปริมาณอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ภาวะดังกล่าวจะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นส่งผลให้เกิด peroxidative damage กับสารชีวโมเลกุลต่างๆ ในร่างกาย โดยเฉพาะโมเลกุลของไขมันไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fatty acid, PUFA) ดังนั้นระดับของ MDA สามารถนำมาใช้เพื่อดูภาวะเครียดออกซิเดชันได้ ถ้าปริมาณของ MDA มีปริมาณมากแสดงว่าผนังเซลล์มีการสลายเนื่องมาจากอนุมูลอิสระ การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวทำให้การทำงานของร่างกายเสียหายเกิดการตายของเซลล์ได้

### 5.3 ผลของแคดเมียมต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของม้ามปลานิล

การศึกษาผลของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากการทดสอบพบว่าเมื่อ antioxidant capacity ลดลง พยาธิสภาพที่เปลี่ยนแปลงชัดเจนที่ม้ามโดยสังเกตพยาธิสภาพ 3 ลักษณะคือ

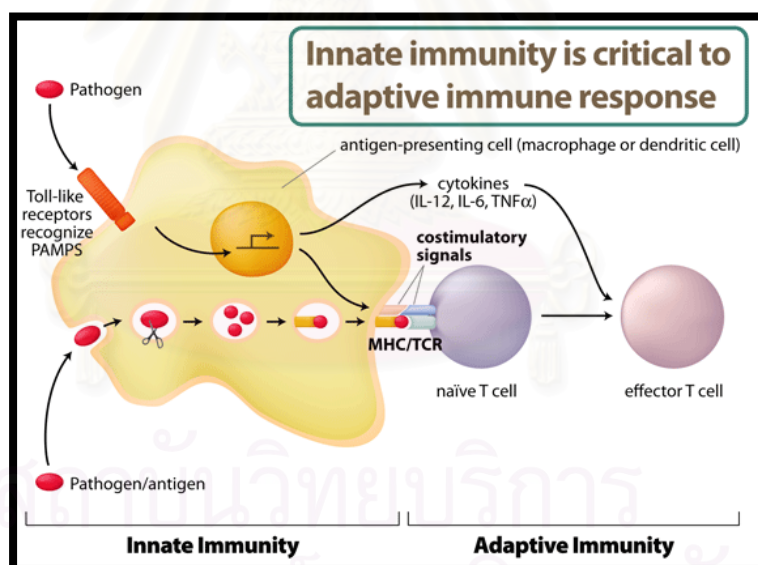
1. Ellipsoidal tissue enlargement ซึ่งหมายถึงส่วนของ white pulp พบว่ามีการขยายขนาดเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดย white pulp จะประกอบด้วย lymphocyte, Phagocytic cell และ Antigen presenting cell ซึ่งทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกัน
2. Melanomacrophage cell aggregation พบว่ามีการเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม
3. Vacuolar degeneration พบว่าเพิ่มขึ้น ซึ่งเป็น vacuole เกิดจากการสะสมของของเหลวภายในไซโทพลาสซึม ทำให้มีการบวมเกิดขึ้น

จะเห็นได้ว่าทั้ง Ellipsoidal tissue enlargement และ Melanomacrophage cell aggregation จะเกี่ยวข้องกับเซลล์ต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันของปลาในระบบ innate immunity ได้แก่ เซลล์ Macrophage ซึ่งมีหน้าที่สำคัญอย่างยิ่งต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลามากกว่าสัตว์มีกระดูกสันหลังชนิดอื่นๆ ซึ่ง Macrophage จะมีรูปแบบในการจับต่อสิ่งแปลกปลอมโดยเฉพาะจุลชีพซึ่ง หมายถึง Pathogen-associated molecular patterns (PAMPs) โดยผ่าน Toll like receptor (TLR) และจากการศึกษาพบว่า TLR สามารถกระตุ้น NF- $\kappa$ B ซึ่งเป็น transcription factor ได้ทำให้มีการหลั่ง cytokine และโมเลกุลต่างๆออกมาโดยเกี่ยวข้องทั้งภูมิคุ้มกันไม่จำเพาะ (innate immunity) และภูมิคุ้มกันจำเพาะ (adaptive immunity)

จากการวิจัยครั้งนี้พบการเปลี่ยนแปลงม้ามในลักษณะที่เรียกว่า edematous capillary ในกลุ่มการทดลองที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นสูงซึ่งอาจเป็นผลมาจากการที่แคดเมียมเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation มากขึ้นและเกิดจากภาวะการมีของเหลวคั่ง (fluid excess edema) เป็นผลมาจากความไม่สมดุลของแรงซึ่งส่งผลให้ของเหลวอยู่ในหลอดเลือดและแรงที่ส่งผลต่อการขับของเหลวออกสู่ช่องว่างระหว่างเซลล์ซึ่งภาวะดังกล่าวอาจได้แก่ การอักเสบ ความดันกลับของหลอดเลือดดำ การอุดตันของท่อน้ำเหลือง ภาวะคั่งของเกลือโซเดียม

#### 5.4 ผลของแคดเมียมต่อการเพิ่มขึ้นของ B-cell

การศึกษาผลของแคดเมียมที่ความเข้มข้น 0.1, 0.5, 1.0 และ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากการทดสอบพบว่าปลาที่ได้รับแคดเมียมความเข้มข้นสูง B cell ในม้ามปลานิลเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) การเพิ่มขึ้นของ B cell เกี่ยวข้องกับหลายๆกลไก เช่นผ่าน Toll like receptor (TLR) ซึ่งเชื่อมโยงทั้งใน innate immunity และ adaptive immunity ดังรูปที่ 27



รูปที่ 27 ความสัมพันธ์ระหว่าง Innate immunity และ Adaptive immunity

ที่มา : <http://research.dfci.harvard.edu/innate/innate.html>

เนื่องจากมีผู้ศึกษาว่าแคดเมียมทำให้เกิดการกระตุ้น Lipooxygenase ผ่านทาง CD28 และ C-Rel Ubiquitination – Cox2 conjugation ในเซลล์ประสาทของหนูขาว (Rao *et al.*, 2003; Figueiredo-Pereira *et al.*, 2002 ) ผู้วิจัยจึงเลือกแอนติบอดีต่อโปรตีน C-Rel ซึ่งบริษัทผู้ผลิตรายงานว่าเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะในหนูขาวและปลาเทราท์เพื่อทำการทดสอบ ทั้งนี้เพราะ c-Rel เป็น proto – oncogene coded protein ซึ่งมีความสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ และการเพิ่มจำนวนของ B cell (Hsia *et al.*, 2002)

จากการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถแปรผลการทดลองพิษของแคดเมียมต่อการแสดงออกของ NF-kB (c-Rel) โปรตีนในม้ามปลานิลเนื่องจาก ไม่พบการแสดงออกของ NF-kB (c-Rel) โปรตีนในม้ามปลานิล ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจากการที่แอนติบอดีที่ใช้ในครั้งนี้ไม่มีความจำเพาะต่อ NF-kB (c-Rel) โปรตีนของปลานิลหรือแอนติบอดีที่ใช้ในการทดลองนี้ไม่เหมาะสมในการทดสอบด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สรุปผลและข้อเสนอแนะ

ลักษณะความผิดปกติจากม้ามปลาที่ได้รับแคดเมียมได้แก่ Ellipsoidal tissue enlargement ,การรวมกลุ่มของ Melanomacrophage (macrophage aggregation), Vacuolar degeneration และ Edematous capillary ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษของเส้นเลือดฝอยใน white pulp ที่เกิดพิษ นอกจากนี้ยังพบการเพิ่มขึ้นของบีเซลล์และ IgM อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่พบการตอบสนองต่อ NF- $\kappa$ B (c-Rel) เกิดขึ้นในปลานิลจากพิษของแคดเมียมในทุกความเข้มข้นที่ทำการทดสอบ ทั้งนี้อาจมาจากหลายสาเหตุ เช่น ความไม่จำเพาะของแอนติบอดีหรือจากความแตกต่างระหว่างกระบวนการสร้างโปรตีนภูมิคุ้มกันในปลาชนิดต่างๆ เพื่อสนองตอบต่อความเป็นพิษของแคดเมียมเป็นต้น

ปลานิลเป็นปลาที่มีความทนเมื่อเทียบกับปลาชนิดอื่น โดยเฉพาะอย่างยิ่งมีกลไกในการปรับความเครียดออกซิเดชัน ความทนต่ออนุมูลอิสระและภาวะออกซิเจนต่ำ กระบวนการในการสร้างภูมิคุ้มกันในปลาชนิดต่างๆมีแอนติเจนอยู่ใน endosome และ lysozyme ดังนั้นขั้นตอนการเหนี่ยวนำให้เกิดและนำเสนอภูมิคุ้มกันจึงมีความสำคัญยิ่งในสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่นปลาชนิดต่างๆ

การขาดแอนติบอดีต่อ c-Rel ของปลานิลยังเป็นอุปสรรคต่อการทำงานวิจัยในเรื่องนี้ต่อไป นอกจากนี้พัฒนาการด้านชีวเคมีในสมองและกายวิภาคของสัตว์ทดสอบที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันในการส่งสัญญาณมายังอวัยวะต่างๆเป็นข้อมูลซึ่งจำเป็นต่อการพิจารณาวิเคราะห์ความเสี่ยงจากอันตรายของสารพิษชนิดต่างๆด้วย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเสนอให้มีการสนับสนุนการวิจัยเพื่อหาข้อมูลพื้นฐานที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันของปลานิลซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีอยู่อย่างแพร่หลาย มีความสำคัญในวงจรห่วงโซ่อาหารในระบบนิเวศน์เขตร้อนเช่น แอฟริกา และเอเชียให้เพิ่มมากขึ้นกว่านี้

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

พาลาภ สิงหเสนี และวินิจ ตันสกุล, 2530. การศึกษาข้อมูลการใช้ปลาน้ำจืดในประเทศไทยเพื่อเป็นสัตว์ทดลองทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีในห้องปฏิบัติการ. ใน จิรัชศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ ทศพร วงศ์รัตน์. ทรัพยากรสิ่งมีชีวิตทางน้ำ. หน้า 101-137.

กรุงเทพมหานคร: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ยุพินท์ วิวัฒน์ชัยเศรษฐ์ และ พันธุ์ศักดิ์ ไครบุตร, 2542. การเลี้ยงปลานิล. ฝ่ายเผยแพร่ กองส่งเสริม การประมง กระทรวงเกษตรและสหกรณ์.

### ภาษาอังกฤษ

Aggarwal, B. B., Takada, Y., Shishodia, S., Gutierrez, A. M., Oommen, O. V., Ichikawa, H., Baba, Y., and Kumar, A. (2004). Nuclear transcription factor NF-kappa B: role in biology and medicine. *Indian J Exp Biol*, 42(4), 341-353.

Agius, C. (1981). Preliminary studies on the ontogeny of the melano-macrophages of teleost haemopoietic tissues and age-related changes. *Dev Comp Immunol*, 5(4), 597-606.

Almeida, J. A., Diniz, Y. S., Marques, S. F. G., Faine, L. A., Ribas, B. O., Burneiko, R. C., and Novelli, E. L. B. (2002). The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 27(8), 673-679.

Arillo, A., Calamari, D., Margiocco, C., Melodia, F., and Mensi, P. (1984). Biochemical effects of long-term exposure to cadmium and copper on rainbow trout (*Salmo gairdneri*): validation of water quality criteria. *Ecotoxicol Environ Saf*, 8(2), 106-117.

Bae, H., Nam, S., Park, H., and Park, K. (2005). Metallothionein mRNA Sequencing and Induction by Cadmium in Gills of the Crucian Carp, *Carassius auratus*. *J. Health Sci.*, 51(3), 284-290.

Barton, B. A. (2002). Stress in Fishes: A Diversity of Responses with Particular Reference to Changes in Circulating Corticosteroids (Vol. 42, pp. 517-525).

- Beckman, J. S. (1994). Peroxynitrite versus hydroxyl radical: the role of nitric oxide in superoxide-dependent cerebral injury. *Ann N Y Acad Sci*, 738, 69-75.
- Bernard, D., Riteau, B., Hansen, J. D., Phillips, R. B., Michel, F., Boudinot, P., and Benmansour, A. (2006). Costimulatory receptors in a teleost fish: typical CD28, elusive CTLA4. *J Immunol*, 176(7), 4191-4200.
- Buhl, K. J. (1997). Relative sensitivity of three endangered fishes, Colorado squawfish, bonytail, and razorback sucker, to selected metal pollutants. *Ecotoxicol Environ Saf*, 37(2), 186-192.
- Cherian, M. G., and Goyer, R. A. (1978). Methallothioneins and their role in the metabolism and toxicity of metals. *Life Sci*, 23(1), 1-9.
- Corbel, M. J. (1975). The immune response in fish: a review (Vol. 7, pp. 539-563).
- Dave, G., Andersson, K., Berglund, R., and Hasselrot, B. (1981). Toxicity of eight solvent extraction chemicals and of cadmium to water fleas, *Daphnia magna*, rainbow trout, *Salmo gairdneri*, and zebrafish, *Brachydanio rerio*. *Comp Biochem Physiol C*, 69C(1), 83-98.
- Davies, P. H., Gorman, W. C., Carlson, C. A., and Brinkman, S. F. (1993). Effect of hardness on bioavailability and toxicity of cadmium to rainbow trout. *Chem. Speciat. Bioavail*, 5(2), 67-76.
- Ellis, A. E. (2001). Innate host defense mechanisms of fish against viruses and bacteria. *Dev Comp Immunol*, 25(8-9), 827-839.
- Fange, R., and Nilsson, S. (1985). The fish spleen: structure and function. *Experientia*, 41(2), 152-158.
- Figueiredo-Pereira, M. E., Li, Z., Jansen, M., and Rockwell, P. (2002). N-acetylcysteine and celecoxib lessen cadmium cytotoxicity which is associated with cyclooxygenase-2 up-regulation in mouse neuronal cells, *J Biol Chem* (Vol. 277, pp. 25283-25289).
- Fiol, D. F., and Kultz, D. (2007). Osmotic stress sensing and signaling in fishes. *Febs J*, 274(22), 5790-5798.
- Fournie, J., Summers, K. J., Courtney, L. A., Engle, V. D., and Blazer, V. S. (2001). Utility of splenic Macrophage Aggregates as a indicator of fish exposure to degraded environments. *J. Aquat. Anim. Health*, 13(2), 105-116.



- Furukawa, T., Nakamura, O., Suzuki, Y., Atsuta, S., Nakamura, H., and Watanabe, T. (2002). Entrapment and transport of foreign material in the spleen and kidney of Japanese conger *Conger myriaster* (Vol. 68, pp. 1219-1225).
- Freeman, B. A., and Crapo, J. D. (1982). Biology of disease: free radicals and tissue injury. *Lab Invest*, 47(5), 412-426.
- Garcia-Santos, S., Fontainhas-Fernandes, A., and Wilson, J. M. (2006). Cadmium tolerance in the Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) following acute exposure: assessment of some ionoregulatory parameters. *Environ Toxicol*, 21(1), 33-46.
- Gilmore, T. D., Kalaitzidis, D., Liang, M. C., and Starczynowski, D. T. (2004). The c-Rel transcription factor and B-cell proliferation: a deal with the devil. *Oncogene*, 23(13), 2275-2286.
- Gogal Jr, R. M., Ahmed, S. A., Smith, S. A., and Holladay, S. D. (1999). Mandates to develop non-mammalian models for chemical immunotoxicity evaluation: are fish a viable alternate to rodents? *Toxicology Letters*, 106(2-3), 89-92.
- Goyer, R. A. (1997). Toxic and essential metal interactions. *Annu Rev Nutr*, 17, 37-50.
- Gutteridge, J. M. (1994). Antioxidants, nutritional supplements and life-threatening diseases. *Br J Biomed Sci*, 51(3), 288-295.
- Haddad, J. J., Saade, N. E., and Safieh-Garabedian, B. (2002). Cytokines and neuro-immune-endocrine interactions: a role for the hypothalamic-pituitary-adrenal revolving axis. *J Neuroimmunol*, 133(1-2), 1-19.
- Halliwell, B., and Chirico, S. (1993). Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance. *Am J Clin Nutr*, 57(5 Suppl), 715S-724S; discussion 724S-725S.
- Hamada, T., Tanimoto, A., Arima, N., Ide, Y., Sasaguri, T., Shimajiri, S., Murata, Y., Wang, K. Y., and Sasaguri, Y. (1998). Pathological study of splenomegaly associated with cadmium-induced anemia in rats. *J Uoeh*, 20(1), 11-19.
- Hansen, J. D., Landis, E. D., and Phillips, R. B. (2005). Discovery of a unique Ig heavy-chain isotype (IgT) in rainbow trout: Implications for a distinctive B cell developmental pathway in teleost fish. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(19), 6919-6924.
- Hart, L. J., Smith, S. A., Smith, B. J., Robertson, J., and Holladay, S. D. (1997). Exposure

of tilapia fish to the pesticide lindane results in hypocellularity of the primary hematopoietic organ (pronephros) and the spleen without altering activity of phagocytic cells in these organs. *Toxicology*, 118(2-3), 211-221.

Hawiger, J. (2001). Innate immunity and inflammation: a transcriptional paradigm.

*Immunol Res*, 23(2-3), 99-109.

Hsia, C. Y., Cheng, S., Owyang, A. M., Dowdy, S. F., and Liou, H. C. (2002). c-Rel regulation of the cell cycle in primary mouse B lymphocytes. *Int Immunol*, 14(8), 905-916.

<http://research.dfci.harvard.edu/innate/innate.html>

[http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFKB\\_NFkappaB\\_IkK\\_IKK\\_Pathway\\_Products.htm](http://www.emdbiosciences.com/html/CBC/NFKB_NFkappaB_IkK_IKK_Pathway_Products.htm)

Hu, M. C., Tang-Oxley, Q., Qiu, W. R., Wang, Y. P., Mihindukulasuriya, K. A., Afshar, R., and Tan, T. H. (1998). Protein phosphatase X interacts with c-Rel and stimulates c-Rel/nuclear factor kappaB activity. *J Biol Chem*, 273(50), 33561-33565.

Iliev, D. B., Roach, J. C., Mackenzie, S., Planas, J. V., and Goetz, F. W. (2005).

Endotoxin recognition: in fish or not in fish? *FEBS Lett*, 579(29), 6519-6528.

Jain, A., Ma, C. A., Lopez-Granados, E., Means, G., Brady, W., Orange, J. S., Liu, S., Holland, S., and Derry, J. M. (2004). Specific NEMO mutations impair CD40-mediated c-Rel activation and B cell terminal differentiation. *J Clin Invest*, 114(11), 1593-1602.

Kaattari, S. L., and Pignelli, J. D. (1996). *The specific immune system: Humoral defense*. In *"The Fish Immune System: Organism, Pathogen, and Environment"*. San Diego: Academic press.

Kearn, G. C. (1999). The survival of monogenean (platyhelminth) parasites on fish skin. *Parasitology*, 119 Suppl, S57-88.

Kostic, M. M., Ognjanovic, B., Dimitrijevic, S., Zikic, R. V., Stajn, A., Rosic, G. L., and Zivkovic, R. V. (1993). Cadmium-induced changes of antioxidant and metabolic status in red blood cells of rats: in vivo effects. *Eur J Haematol*, 51(2), 86-92.

Kolluru, G. K., Tamilarasan, K. P., Geetha Priya, S., Durgaha, N. P., and Chatterjee, S. (2006). Cadmium induced endothelial dysfunction: consequence of defective

- migratory pattern of endothelial cells in association with poor nitric oxide availability under cadmium challenge. *Cell Biol Int*, 30(5), 427-438.
- Kumada, H., Kimura, S., Yokote, M., and Matida, Y. (1973). Acute and chronic toxicity, uptake and retention of cadmium in freshwater organisms. *Bull Freshwater Fish Res. Lab (Tokyo)*, 22(2), 157-165.
- Li, N., and Karin, M. (1999). Is NF-kappaB the sensor of oxidative stress? *Faseb J*, 13(10), 1137-1143.
- Li, Q., and Verma, I. M. (2002). NF-kappaB regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol*, 2(10), 725-734.
- Loretz, C. A., Pollina, C., Hyodo, S., Takei, Y., Chang, W., and Shoback, D. (2004). cDNA cloning and functional expression of a Ca<sup>2+</sup>-sensing receptor with truncated C-terminal tail from the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *J Biol Chem*, 279(51), 53288-53297.
- Luebke, R. W., Hodson, P. V., Faisal, M., Ross, P. S., Grasman, K. A., and Zelikoff, J. (1997). Aquatic pollution-induced immunotoxicity in wildlife species. *Fundam Appl Toxicol*, 37(1), 1-15.
- MacKenzie, S., Planas, J. V., and Goetz, F. W. (2003). LPS-stimulated expression of a tumor necrosis factor-alpha mRNA in primary trout monocytes and in vitro differentiated macrophages. *Dev Comp Immunol*, 27(5), 393-400.
- Manca, D., Ricard, A. C., Trottier, B., and Chevalier, G. (1991). Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicology*, 67(3), 303-323.
- Markovich, D., and James, K. M. (1999). Heavy metals mercury, cadmium, and chromium inhibit the activity of the mammalian liver and kidney sulfate transporter sat-1. *Toxicol Appl Pharmacol*, 154(2), 181-187.
- McKay, L. I., and Cidlowski, J. A. (1999). Molecular control of immune/inflammatory responses: interactions between nuclear factor-kappa B and steroid receptor-signaling pathways. *Endocr Rev*, 20(4), 435-459.
- Muller, S., Gillert, K. E., Krause, C., Jautzke, G., Gross, U., and Diamantstein, T. (1979). Effects of cadmium on the immune system of mice. *Experientia*, 35(7), 909-910.

- National Research Council (1992). *Biologic Markers in Immunotoxicology*. Washington D.C.: National Academy Press.
- Nolan, C. V., and Shaikh, Z. A. (1986). The vascular endothelium as a target tissue in acute cadmium toxicity. *Life Sci*, 39(16), 1403-1409.
- Oberley, L. W., and Spitz, D. R. (1984). Assay of superoxide dismutase activity in tumor tissue. *Methods Enzymol*, 105, 457-464.
- Oshiumi, H., Tsujita, T., Shida, K., Matsumoto, M., Ikeo, K., and Seya, T. (2003). Prediction of the prototype of the human Toll-like receptor gene family from the pufferfish, *Fugu rubripes*, genome. *Immunogenetics*, 54(11), 791-800.
- Perlstein, R. S., Whitnall, M. H., Abrams, J. S., Mougey, E. H., and Neta, R. (1993). Synergistic roles of interleukin-6, interleukin-1, and tumor necrosis factor in the adrenocorticotropin response to bacterial lipopolysaccharide in vivo. *Endocrinology*, 132(3), 946-952.
- Pirarat, N., Kobayashi, T., Katagiri, T., Maita, M., and Endo, M. (2006). Protective effects and mechanisms of a probiotic bacterium *Lactobacillus rhamnosus* against experimental *Edwardsiella tarda* infection in tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Vet Immunol Immunopathol*, 113(3-4), 339-347.
- Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L., Winton, J. R., and Roach, J. C. (2006). Conservation of Toll-Like Receptor Signaling Pathways in Teleost Fish. *Comp Biochem Physiol Part D Genomics Proteomics*, 1(1), 77-88.
- Rao, S., Gerondakis, S., Woltring, D., and Shannon, M. F. (2003). c-Rel is required for chromatin remodeling across the IL-2 gene promoter. *J Immunol*, 170(7), 3724-3731.
- Roach, J. C., Glusman, G., Rowen, L., Kaur, A., Purcell, M. K., Smith, K. D., Hood, L. E., and Aderem, A. (2005). The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102(27), 9577-9582.
- Roux, K. H., Greenberg, A. S., Greene, L., Strelets, L., Avila, D., McKinney, E. C., and Flajnik, M. F. (1998). Structural analysis of the nurse shark (new) antigen receptor (NAR): molecular convergence of NAR and unusual mammalian immunoglobulins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95(20), 11804-11809.

- Sailendri, K., and Muthukkaruppan, V. (1975). Morphology of lymphoid organs in a cichlid teleost, *Tilapia mossambica* (Peters). *J Morphol*, 147(1), 109-121.
- Schreck, R., and Baeuerle, P. A. (1994). Assessing oxygen radicals as mediators in activation of inducible eukaryotic transcription factor NF-kappa B. *Methods Enzymol*, 234, 151-163.
- Schubauer-Berigan, M. K., Dierkes., J. R., Monson., P. D., and Ankley., G. T. (1993). pH-dependent toxicity of Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn to *Ceriodaphnia dubia*, *Pimephales promelas*, *Hyalella azteca* and *Lumbriculus variegatus*. *Environ Toxicol Chem*, 12, 1261-1266.
- Smith, D. A. (1998). *The Development and Application of a Hemolytic Plaque Forming Cell Assay (PFC) and a Cytotoxic T-Lymphocyte Assay (CTL) in Tilapia (Oreochromis niloticus) for Immunotoxic Risk Assessment of Environmental Contaminants*. Virginia-Maryland Regional College of Veterinary Medicine.
- Stohs, S. J., and Bagchi, D. (1995). Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic Biol Med*, 18(2), 321-336.
- Stohs, S. J., Bagchi, D., Hassoun, E., and Bagchi, M. (2001). Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 20(2), 77-88.
- Stubblefield, W. A., Steadman, B. L., La Point, T. W., and Bergman, H. L. (1999). Acclimation-induced changes in the toxicity of zinc and cadmium to rainbow trout. *Environ. Toxicol.Chem*, 18(12), 2875-2881.
- Suedel, B. C., Rodgers, J. H., Jr., and Deaver, E. (1997). Experimental factors that may affect toxicity of cadmium to freshwater organisms. *Arch Environ Contam Toxicol*, 33(2), 188-193.
- Thomson, S., Mahadevan, L. C., and Clayton, A. L. (1999). MAP kinase-mediated signalling to nucleosomes and immediate-early gene induction. *Semin Cell Dev Biol*, 10(2), 205-214.
- Tsangaris, G. T., and Tzortzatou-Stathopoulou, F. (1998). Cadmium induces apoptosis differentially on immune system cell lines. *Toxicology*, 128(2), 143-150.
- Tsuchiya, K. (1971). [Cadmium poisoning and cadmium pollution]. *Saishin Igaku*, 26(10), 1945-1953.

- Tumang, J. R., Hsia, C. Y., Tian, W., Bromberg, J. F., and Liou, H. C. (2002). IL-6 rescues the hyporesponsiveness of c-Rel deficient B cells independent of Bcl-xL, Mcl-1, and Bcl-2. *Cell Immunol*, 217(1-2), 47-57.
- Ueda, Y., Liao, D., Yang, K., Patel, A., and Kelsoe, G. (2007). T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells. *J Immunol*, 178(6), 3593-3601.
- Van Leeuwen, C. J., Griffioen., P. S., Vergouw., W. H. A., and Maas-Diepeveen., J. L. (1985). Differences in susceptibility of early life stages of rainbow trout (*Salmo gairdneri*) to environmental pollutants. *Aquat Toxicol*, 7, 59-78.
- Waalkes, M. P. (2003). Cadmium carcinogenesis. *Mutat Res*, 533(1-2), 107-120.
- Wakae, K., Magor, B. G., Saunders, H., Nagaoka, H., Kawamura, A., Kinoshita, K., Honjo, T., and Muramatsu, M. (2006). Evolution of class switch recombination function in fish activation-induced cytidine deaminase, AID. *Int Immunol*, 18(1), 41-47.
- Warr, G. W. (1997). The adaptive immune system of fish. *Dev Biol Stand*, 90, 15-21.
- WHO. (1992). Cadmium, Environmental health Criteria, International Progress in Chemical Safety, WHO, Geneva.
- Wendelaar Bonga, S. E. (1997). The stress response in fish. *Physiol Rev*, 77(3), 591-625.
- Weyts, F. A. A., Cohen, N., Flik, G., and Verburg-van Kemenade, B. M. L. (1999). Interactions between the immune system and the hypothalamo-pituitary-interrenal axis in fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 9(1), 1-20.
- Wilson, M., Bengten, E., Miller, N. W., Clem, L. W., Du Pasquier, L., and Warr, G. W. (1997). A novel chimeric Ig heavy chain from a teleost fish shares similarities to IgD. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94(9), 4593-4597.
- Wolke, R. E., Murchelano, R. A., Dickstein, C. D., and George, C. J. (1985). Preliminary evaluation of the use of macrophage aggregates (MA) as fish health monitors. *Bull Environ Contam Toxicol*, 35(2), 222-227.
- Wright, J. R., Zlogar, D. F., Taylor, J. C., Zlogar, T. M., and Restrepo, C. I. (1999). Effects of endotoxin on surfactant protein A and D stimulation of NO production by alveolar macrophages. *Am J Physiol*, 276(4 Pt 1), L650-658.

- Wu, S. M., Shih, M. J., and Ho, Y. C. (2007). Toxicological stress response and cadmium distribution in hybrid tilapia (*Oreochromis* sp.) upon cadmium exposure. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 145(2), 218-226.
- Xiao, W. (2004). Advances in NF-kappaB signaling transduction and transcription. *Cell Mol Immunol*, 1(6), 425-435.
- Yamada, Y. K., Shimizu, F., Kawamura, R., and Kubota, K. (1981). Thymic atrophy in mice induced by cadmium administration. *Toxicol Lett*, 8(1-2), 49-55.
- Yamano, T., Shimizu, M., and Noda, T. (1998). Comparative effects of repeated administration of cadmium on kidney, spleen, thymus, and bone marrow in 2-, 4-, and 8-month-old male Wistar rats. *Toxicol Sci*, 46(2), 393-402.
- Young, I. S., and McEneny, J. (2001). Lipoprotein oxidation and atherosclerosis. *Biochem Soc Trans*, 29(Pt 2), 358-362.
- Zapata, A., Diez, B., Cejalvo, T., Gutiérrez-de Frás, C., and Cortés, A. (2006). Ontogeny of the immune system of fish. *Fish & Shellfish Immunology*, 20(2), 126-136.
- Zapata, A. (1982). Lymphoid organs of teleost fish. III. Splenic lymphoid tissue of *Rutilus rutilus* and *Gobio gobio*. *Dev Comp Immunol*, 6(1), 87-94.
- Zbinden, G., and Flury-Roversi, M. (1981). Significance of the LD50-test for the toxicological evaluation of chemical substances. *Arch Toxicol*, 47(2), 77-99.
- Zelikoff, J. T., Bowser, D., Squibb, K. S., and Frenkel, K. (1995). Immunotoxicity of low level cadmium exposure in fish: an alternative animal model for immunotoxicological studies. *J Toxicol Environ Health*, 45(3), 235-248.
- Zou, J., Holland, J., Pleguezuelos, O., Cunningham, C., and Secombes, C. J. (2000). Factors influencing the expression of interleukin-1[beta] in cultured rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) leucocytes. *Developmental & Comparative Immunology*, 24(6-7), 575-582.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



### ข้อมูลดิบ

ปริมาณ MDA ในกล้ามเนื้อปลานิล (nmol MDA/gram tissue) (n=3)

	24	48	72	96
CT (1)	2.21	1.95	2.53	2.84
CT (2)	2.26	2.19	2.68	3.02
CT (3)	2.55	2.01	3.13	2.93
0.1(1)	3.12	3.6	3.12	3.94
0.1(2)	2.87	3.25	3.45	3.57
0.1(3)	3.1	3.5	3.21	3.77
0.5(1)	3.19	3.88	3.67	3.85
0.5(2)	3.38	3.56	3.38	4.1
0.5(3)	3.51	4.02	3.48	4.08
1(1)	3.62	3.78	3.8	4.43
1(2)	3.77	3.93	3.65	4.62
1(3)	3.29	3.99	4.13	4.15
10(1)	4.32	4.36	4.79	4.35
10(2)	3.99	4.27	4.23	4.9
10(3)	4.05	4.42	4.6	4.76

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) (U/ml)

	24	48	72	96
CT (1)	0.08653	0.1358	0.12632	0.1052
CT (2)	0.1035	0.12698	0.06607	0.12438
CT (3)	0.09968	0.10922	0.08235	0.14002
0.1(1)	0.11568	0.08612	0.08525	0.0875
0.1(2)	0.09632	0.12645	0.07135	0.07248
0.1(3)	0.1126	0.07339	0.11186	0.0673
0.5(1)	0.1025	0.0726	0.0796	0.0821
0.5(2)	0.1285	0.0595	0.0815	0.11589
0.5(3)	0.08241	0.05522	0.07891	0.06175
1(1)	0.10255	0.06275	0.1228	0.09799
1(2)	0.0899	0.0745	0.1255	0.08524
1(3)	0.07702	0.10215	0.16755	0.10144
10(1)	0.075	0.0788	0.122	0.05242
10(2)	0.0523	0.0652	0.0965	0.0865
10(3)	0.06251	0.06579	0.09737	0.06715

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าสมรรถนะของเอนไซม์ catalase (nmol/min/ml)

	24	48	72	96
CT (1)	18.5242	22.188	23.224	16.26
CT (2)	20.295	19.2693	20.5658	16.42
CT (3)	19.3493	21.2463	21.3555	13.63
0.1(1)	20.255	15.2412	20.176	16.256
0.1(2)	24.932	17.429	19.6285	18.748
0.1(3)	18.569	17.824	19.4107	17.5833
0.5(1)	18.122	19.387	23.1655	22.4505
0.5(2)	15.695	20.251	19.968	24.119
0.5(3)	19.1189	16.9609	23.2328	20.7562
1(1)	17.258	16.126	23.9005	20.125
1(2)	16.9388	14.2505	22.254	16.238
1(3)	15.5996	16.6293	20.29916	19.3638
10(1)	20.256	23.652	19.6547	21.658
10(2)	19.1206	19.5234	23.251	19.3268
10(3)	19.4897	19.9641	16.1349	20.4105

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

ชื่อ	นางสาวโปติกา โชติพงษ์
วันเกิด	14 กรกฎาคม 2524
สถานที่เกิด	นครศรีธรรมราช
การศึกษา	หลักสูตร วท.บ. (วิทยาศาสตร์ชีวการแพทย์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยรังสิต ปีการศึกษา 2546
ที่อยู่	บ้านเลขที่ 7 ถนนอรุณประชา ตำบลชะอวด อำเภอชะอวด จังหวัดนครศรีธรรมราช 80180



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย