ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่และการตั้งครรภ์ในหนูแรท

นางสาวพิมลพร เชาวน์ไวพจน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาสรีรวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-580-3

EFFECTS OF TOLUENE ON OVULATION AND PREGNANCY IN RATS

MISS PIMONPORN CHAOVIPOCH

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Interdepartment of Physiology
Graduate School
Chulalongkorn University
1995

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่และการตั้งครรภ์ในหนูแรท

โดย นางสาวพิมลพร เชาวน์ไวพจน์

สหสาขาวิชา สรีรวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตาจาย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ พญ. ดร. บังอร ชมเดช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล)

.....กรรมการ
(รองศาสตรตราจารย์ ดร. สพญ. ดวงนฤมล ประชัญคดี)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ภญ. ดร. ราตรี สุดทรวง)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

พิมลพร เชาวน์ไวพจน์ : ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่และการตั้งครรภ์ในหนูแรท
(EFFECTS OF TOLUENE ON OVULATION AND PREGNANCY IN RATS)
อ.ที่ปรึกษา : รศ.ดร.ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล. 73 หน้า. ISBN 974-631-580-3

ได้ศึกษาผลของโทลูอีนต่อการตกไข่และการตั้งครรภ์ในหนูแรท พบว่าเมื่อให้โทลูอีนปริมาณ 1.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว เวลา 13.00-13.30 น.ของระยะโปรอีสตรัส จะมีหนูตกไข่ 15 ใน 20 ตัว และมีจำนวนไข่ลดลงเป็น 9.06 ± 2.04 ฟอง เมื่อฉีดโทลูอีนปริมาณเดียวกันในวัน ไดอีสตรัส-2 เวลา 17.00-18.00 น. ไม่ทำให้ระดับอีสโตรเจนช่วงเช้าของระยะโปรอีสตรัสลดลง แต่จะทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนในช่วงบ่ายของระยะโปรอีสตรัสลดลง

เมื่อฉีดโทลูอีนขนาดเดียวกันให้หนูแรทขณะตั้งครรภ์ ในช่วงระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (วันที่ 1-6) พบว่าจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อนในวันที่ 13 ของการตั้งครรภ์ลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อฉีดโทลูอีนให้หนูตั้งครรภ์ในช่วงระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน (วันที่ 6-12) พบว่ามีการสูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น และน้ำหนักตัวของลูกที่เกิดมาน้อยลง ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่พบความผิดปกติของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง ตลอดจนอัตราการเติบโตใน 5 วันแรกของลูกหนู ทั้งในกลุ่มที่ ได้รับโทลูอีนวันที่ 1-6 และ 6-12 ของการตั้งครรภ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสถาบันสิ่งแวดล้อม ลายมือชื่อนิสิต พิมลพร เชาวน์ไวพจน์
สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล
ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

##c445604 : MAJOR PHYSIOLOGY
KEY WORD: : TOLUENE/ OVULATION/ PREGNANCY

PIMONPORN CHAOVIPOCH : EFFECTS OF TOLUENE OF OVULATION AND PREGNANCY IN RATS. THESIS ADVISOR : ASSO. PROF. Dr. PRAKONG TANGPRAPRUTIGUL, Ph.D. 73 pp. ISBN 974-631-580-3

The aim of this study was to elucidate effects of toluene on ovulation and pregnancy in adult female wistar rats. Toluene blocked ovulation in 5/20 rats and reduced ova ovulated to 9.06 ± 2.04 when 1.2 gm/kg. of toluene was given at 13:00 - 13:30 of proestrus. Toluene reduced serum progesterone but had no effect on serum proestrous estrogen surge when toluene was given at 17:00- 18:00 of diestrus-2 .

Toluene reduced implantation sites significantly when pregnant rats received toluene at dose of 1.2 gm/kg./day during days 1-6 of pregnancy while pregnant rats received toluene at the same dose during days 6-12 of pregnancy increased resorption of embryos and reduced body weights of pups. No abnormality of bone and cartilage feature was observed and no change in growth rates during the first five days after birth of pups.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สรีรวิทยา ลายมือชื่อนิสิต พิมพร เชาวิโภพรน์

สาขาวิชา - ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา ประกง ตั้ง

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม -

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์นี้ได้สำเร็จลงโดยความกรุณาของ รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล อาจารย์ที่ปรึกษาซึ่งได้กรุณาให้คำแนะนำตั้งแต่เริ่มต้นการศึกษา การทดลอง ตลอดจนตรวจแก้ไขวิทยานิพนธ์จนสำเร็จเรียบร้อย จึงขอขอบพระคุณอาจารย์เป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.พญ. บังอร ชมเดช ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และ อาจารย์ ดร.ราตรี สุดทรวง ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและให้กำลังใจผู้เขียนตลอดมา

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ดวงนฤมล ประชัญคดี ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้วิทยานิพนธ์จนเป็นที่เรียบร้อย

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สุจินดา มาลัยวิจิตรนนท์ และขอขอบคุณ คุณสัมพันธ์ สุวรรณรัตน์ คุณจรัล เอกะวิภาต ที่ได้ให้ความช่วยเหลือเป็นอย่างดี ตลอดการทดลองนี้

ท้ายที่สุดนี้ ขอขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ พี่ๆ และเพื่อนทุกคน ที่ได้สนับสนุนและให้กำลังใจตั้งแต่เบื้องต้น จนถึงปัจจุบัน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญตาราง..... ช

สารบัญภาพ..... ฌ

บทที่

1 บทนำ..... 1

2 วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง..... 15

3 ผลการทดลอง..... 33

4 วิจารณ์และสรุปผลการทดลอง..... 44

เอกสารอ้างอิง..... 53

ภาคผนวก..... 66

ประวัติ..... 73

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ หน้า

1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโทลูอีนขนาดต่างๆและร่างกายของมนุษย์เมื่อได้รับโทลูอีนโดยการสูดดมในระยะเวลาสั้นๆ..... 6
2 แสดงการให้น้ำมันมะกอกหรือโทลูอีนในสัตว์ทดลองกลุ่มต่างๆ..... 21
3 แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่างๆเพื่อวิเคราะห์หาปริมาณอีสโตรเจน และ โปรเจสเตอโรน..... 25
4 แสดงผลของโทลูอีนต่อการตกไข่..... 37
5 แสดงผลของโทลูอีนต่อระดับอีสโตรเจน โปรเจสเตอโรน..... 38
6 แสดงผลของโทลูอีนต่อการฝังตัว การสูญสลาย และการเติบโตของตัวอ่อน..... 39
7 แสดงจำนวนไข่ (ovum) ในแต่ละครั้งของการตกไข่ของหนูแรทกลุ่มต่างๆในการทดลองนี้..... 67
8 แสดงการฝังตัวของตัวอ่อน (implantation) ของหนูแรทกลุ่มต่างๆในการทดลองนี้..... 68
9 แสดงการสูญสลายของตัวอ่อน (resorption) ของหนูแรทกลุ่มต่างๆในการทดลองนี้..... 69
10 แสดงพิสัยของจำนวนลูก ที่เกิดจากแม่หนูกลุ่มต่างๆในการทดลองนี้.... 70
11 แสดงพิสัยของน้ำหนักของลูกหนูและน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกและแม่หนูในกลุ่มต่างๆของการทดลองนี้..... 71
12 แสดงพิสัยของปริมาน อีสโตรเจน และ โปรเจสเตอโรนในชีรัมของหนูแรทเพศเมียวัน proestrusในการทดลองนี้..... 72

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	แสดงกราฟมาตราฐานของอีสโตรเจนเรดิโออิมมูโนเอสเสย์.....	30
2	แสดงกราฟมาตราฐานของโปรเจสเตอโรนเรดิโออิมมูโนเอสเสย์....	31
3	แสดงการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับน้ำมันมะกอก ในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (P1-6).....	40
4	แสดงการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับโทลูอีนในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน(P1-6).....	40
5	แสดงการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับน้ำมันมะกอก ในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน(P6-12).....	41
6	แสดงการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับโทลูอีนในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน(P6-12).....	41
7	แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง ในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับน้ำมันมะกอกในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน(P1-6)	42
8	แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง ในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับโทลูอีนในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน(P1-6)....	42
9	แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง ในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับน้ำมันมะกอก ในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน(P6-12).....	43
10	แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง ในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับโทลูอีนในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน.....	43

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

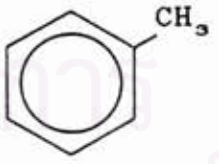
ความเป็นมา

โทลูอีนเป็นสารเคมีในกลุ่ม aromatic hydrocarbon ที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายทั้งในและนอกประเทศเป็นสารเคมีที่ผลิตจากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมโดยวิธี dehydrogenation ของ cyclohexane และ aromatization ของ saturated aliphatic hydrocarbon มีคุณสมบัติเป็นของเหลวใสไม่มีสี และมีกลิ่นเฉพาะตัว เนื่องจากมีคุณสมบัติเป็นตัวทำละลายที่ดีจึงถูกนำมาใช้ในปริมาณมากขึ้นเรื่อยๆ จากสถิติ ปี ค.ศ. 1988 พบว่ามีการผลิตโทลูอีน 6.9×10^{9} ปอนด์ (Donald, Hooper, and Hopenhayn-Rich, 1991) สำหรับโทลูอีนที่ใช้ในประเทศไทยได้จากการนำเข้าจากต่างประเทศซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนโดยจากสถิติในปี พ.ศ. 2521 มีปริมาณนำการเข้าของโทลูอีน 14,852,362 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 58,873,670 บาท ต่อมาก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นทุกปี เห็นได้จากในปี พ.ศ. 2527 มีปริมาณนำเข้าโทลูอีนถึง 21,005,950 กิโลกรัม คิดเป็นมูลค่า 291,184,641 บาท (กรมศุลกากร, 2527) จากตัวเลขเหล่านี้จะเห็นได้ว่ามีการใช้โทลูอีนในปริมาณสูงมากทำให้มนุษย์เรามีโอกาสสัมผัสกับโทลูอีนเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ทั้งจากการสัมผัสโดยตรงหรือจากการใช้สารเคมีที่มีส่วนผสมของโทลูอีน

ปัจจุบันมีการผลิตสารเคมีต่าง ๆ มากถึง 5,000 - 6,000 ชนิด และยังมีผลิตเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ เฉลี่ยปีละประมาณ 600 ชนิด (Thomas, 1991) มนุษย์เราต้องสัมผัสกับสารเหล่านี้อย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การศึกษาเกี่ยวกับผลของสารเคมีเหล่านี้ต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายจะทำให้เราทราบถึงประโยชน์และโทษของสารนั้น ๆ และสามารถเลือกใช้ได้อย่างถูกต้องปลอดภัย ตลอดจนสามารถแก้ไขเมื่อได้รับอันตราย สารเคมีกลุ่มที่รู้จักกันทั่วไปและมีปริมาณการใช้สูงมาตลอดคือสารในกลุ่ม

hydrocarbon เนื่องจากมีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตและเป็นสารตั้งต้นในการผลิตสารเคมีหลายชนิดที่สำคัญคือน้ำมันรถยนต์ (gasoline) ปัจจุบันมีการผลิตน้ำมันรถยนต์ชนิดใหม่ขึ้นแทนของเดิม ซึ่งมีส่วนผสมของสารตะกั่ว ทำให้เกิดอันตรายต่อร่างกายมนุษย์อย่างรุนแรง น้ำมันชนิดใหม่นี้คือ น้ำมันไร้สารตะกั่ว โดยจะผสมสารในกลุ่ม ethylbenzene ถึง 38 เปอร์เซ็นต์ และมีการผสมโทลูอีนเพิ่มขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของน้ำมัน ให้เทียบเท่ากับน้ำมันชนิดเดิม ทำให้เราจำเป็นต้องสัมผัสกับโทลูอีนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในวงการอุตสาหกรรม ยังได้นำสารโทลูอีนมาใช้ทดแทนเบนซีน เนื่องจากมีการศึกษาพบว่าเบนซีนก่อให้เกิดโทษต่อร่างกายมากและเป็นเวลานาน อย่างไรก็ตาม การศึกษาถึงผลของโทลูอีนต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายยังไม่มีมากนัก โดยเฉพาะที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์

<u>โครงสร้างและคุณสมบัติของโทลูอีน</u>

Systemic name	methylbenzene
Synonyms	toluene, toluol, methylbonzoy,phenylmethane, methancide
CAS number	108-88-3
Molecular formular	$C_6H_5CH_3$
Structural formula	
Molecular weight	92.13
State of 25°C, 101.3 KP_a	Colorless liquid
Boiling point at 101.3 KP_a	110.6°C
Vapor pressure at 25°C	373 Kp_a (137,500 mg/m^3)
Specific gravity	0.861 at 25°C

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Solubility	about 6.5 nmol/l of water at 20°C; soluble in acetone, miscible with ethanol, diethyl ether and benzene
Conversion factor	1 mg/m^3 = 0.267 ppm 1 ppm = 3.75 mg/m^3

ที่มา : Cohr and Stokholm, 1979

<u>ประโยชน์ของโทลูอีน</u> (สำนักงานคณะกรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2530)

เนื่องจากคุณสมบัติละลายในไขมันได้ดีกว่า ระเหยช้ากว่าเบนซิน ทำให้โทลูอีนถูกนำมาใช้ประโยชน์มากมายดังนี้

1. ใช้เป็นตัวทำละลาย (solvent) ในอุตสาหกรรมการผลิตยา สารเคมียางและพลาสติก
2. เป็นส่วนผสมในสี แลคเกอร์ กาว ทินเนอร์
3. ใช้เป็นวัตถุดิบตั้งต้นในอุตสาหกรรมอินทรีย์เคมีและใช้ในอุตสาหกรรมการสังเคราะห์สารเคมีหลายชนิดเช่น toluene diisocyanate, trinitrotoluene, benzoic acid และ benzyl chloride
4. เป็นองค์ประกอบในสูตรผสมน้ำมันเชื้อเพลิงของรถยนต์ เพราะช่วยเพิ่มค่าออกเทน
5. ใช้ในอุตสาหกรรมหนังเทียม เส้นใย การเคลือบกระดาษ และหมึกพิมพ์
6. ใช้เป็นสารขจัดหรือล้างสี (paint remover)
7. ใช้เป็นทินเนอร์ สำหรับหมึกที่ใช้ในการอัดภาพถ่าย ในร้านถ่ายรูปทั่วไป (photogravure inks)

การแพร่กระจายของโทลูอีน

ในปี 1982 Merian ได้ทำการสำรวจและประเมินว่า มีโทลูอีนรั่วไหลออกมาสู่สิ่งแวดล้อมประมาณ 6 ล้านตัน โดยส่วนใหญ่จะเข้ามาอยู่ในบรรยากาศ แบ่งเป็นการรั่วไหลจากการใช้โทลูอีนเป็นตัวทำละลาย 1-1.5 ล้านตัน จากการผลิตการขนส่งและขบวนการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิง 3-4 ล้านตัน จากการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ของเครื่องยนต์ 2 ล้านตัน เนื่องจากโทลูอีนที่ผลิตขึ้นจะถูกใช้ในการผลิตน้ำมันเชื้อเพลิงถึง 90 เปอร์เซ็นต์ ของการผลิตทั้งหมด ดังนั้นการรั่วไหลของโทลูอีนจากน้ำมันเชื้อเพลิงจึงเป็นแหล่งสำคัญที่สุด (Fishbein, 1985) เนื่องจากโทลูอีน ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมหลายชนิด เช่น สี กาว น้ำมันเคลือบเงา และในอุตสาหกรรมหลายชนิด ทำให้ผู้ที่ทำงานในโรงงานเหล่านี้สามารถสัมผัสกับโทลูอีนได้ตลอดเวลา นอกจากนี้ยังสามารถได้รับโทลูอีนจากการนำโทลูอีนซึ่งผสมอยู่ในสารเคมีต่าง ๆ เช่น กาว สี มาใช้เป็นยาเสพติด

การเข้าสู่ร่างกาย

หลังจากโทลูอีนถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายแล้ว จะแพร่กระจายไปสู่เนื้อเยื่อที่มีเส้นเลือดไปเลี้ยงมาก ที่สำคัญได้แก่ หัวใจ ตับ สมอง และจะไปสะสมในบริเวณที่ส่วนประกอบไขมันอยู่มาก (Fishbein, 1985) ที่สำคัญได้แก่บริเวณสมอง พบว่าเนื้อเยื่อที่มีไขมัน เป็นส่วนประกอบอยู่มาก จะมีความเข้มข้นของโทลูอีนสูงกว่าในเลือดถึง 80 เท่า (Cohr and Stokholm, 1979) เมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้ว 15-20 เปอร์เซนต์ ของโทลูอีนจะถูกขับออกโดยไม่เปลี่ยนรูปทางลมหายใจออกและจำนวน 0.06 เปอร์เซนต์ถูกขับออกโดยไม่เปลี่ยนรูปทางปัสสาวะส่วนที่เหลือจะถูก oxidized โดยเปลี่ยน methyl group เป็น carboxyl group ซึ่งจะถูก conjugated เป็น hippuric acid ที่ตับ และถูกขับออกทางปัสสาวะ การขับออกจะเสร็จสมบูรณ์หลังได้รับโทลูอีน 18 ชั่วโมง (Fishbein, 1985) แต่เมื่อร่างกายได้รับโทลูอีนในปริมาณสูงมากคือประมาณ 500 mg/m^3 จะทำให้ glycene conjugation อิ่มตัวเปลี่ยนเป็นการ conjugation ของ benzoic acid

และ glucoronic acid เกิดเป็น benzoyl glucoronate ประมาณ 1 เปอร์เซนต์ของโทลูอีนที่ได้รับจะถูกhydroxylated เป็น ortho-, meta- และ para-cresol ซึ่งจะถูกเปลี่ยนเป็น glucoronide และ sulfate ก่อนถูกขับออกทางปัสสาวะ น้อยกว่า 2 เปอร์เซ็นต์ จะถูกขับออกโดยไม่เปลี่ยนแปลงทางน้ำดี ซึ่งจะถูกดูดกลับเกือบทั้งหมด (Fishbein, 1985)

<u>ความเป็นพิษของโทลูอีน</u>

ความเป็นพิษของโทลูอีนสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือเฉียบพลันและเรื้อรัง เมื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของโทลูอีน และเบนซินแล้ว โทลูอีนจะมีพิษเฉียบพลันมากกว่า แต่ในระยะยาวจะเป็นพิษน้อยกว่าเบนซิน เมื่อได้รับโทลูอีนในความเข้มข้นสูง จะทำให้เกิดอาการง่วงซึมจนหมดสติได้ แต่ถ้าในความเข้มข้นต่ำ ๆ จะทำให้รู้สึกเคลิ้มเป็นสุข (euphoria) จึงมีผู้ใช้ในทางที่ผิดโดยนำไปสูดดมเป็นสารเสพติด (Hayden, 1977) สำหรับในประเทศไทย โทลูอีนคือส่วนผสมของทินเนอร์ ดังนั้นจึงนับเป็นปัญหาสำคัญของชาติ เนื่องจากมีกลุ่มวัยรุ่นจำนวนมากที่ใช้สารระเหยประเภทนี้เป็นสารเสพติด เพราะมีราคาถูกและหาซื้อได้ง่าย ความเป็นพิษของโทลูอีนแบ่งได้เป็นดังนี้

1. ความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน

ความรุนแรงของพิษจากโทลูอีน จะขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของโทลูอีนและระยะเวลาที่สัมผัสกับสารนี้ โดยออกฤทธิ์ที่ระบบประสาทส่วนกลาง เป็นแห่งแรก ความเข้มข้นต่ำสุดที่จะเกิดผลกับมนุษย์โดยมีผลต่อ odour thrashold คือ 2.5 ppm เมื่อได้รับโทลูอีนในระดับต่ำๆ อาจทำให้เกิดอาการอ่อนเพลีย drawsiness ปวดศีรษะ เมื่อได้รับในปริมาณสูงขึ้นจะทำให้มีอาการ คลื่นไส้อาเจียน อ่อนเพลีย ปวดศีรษะ นอนไม่หลับ ฉุนเฉียว และเมื่อได้รับในปริมาณสูงขึ้นอีก อาจทำให้หมดสติในระยะเวลาสั้นๆ และอาจเสียชีวิตได้ นอกจากนี้โทลูอีนยังทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง และ เยื่อบุต่างๆ ได้มากกว่าเบนซิน ทำให้เกิดผิวหนังอักเสบ การสูดดมจะทำให้หลอดลมอักเสบ เมื่อเข้าตาในสภาพเป็น

ของเหลวจะทำให้กระจกตาเสียได้ และบางรายยังพบว่าเกิดอันตรายต่อตับและไต (สุนทร ศุภพงษ์, 2532; Norback, 1988) ผลของโทลูอีนในระดับต่าง ๆ ต่อร่างกายเมื่อได้รับในระยะสั้น แสดงให้เห็นในตารางที่ 1

2. ความเป็นพิษแบบเรื้อรัง

เมื่อได้รับโทลูอีนเป็นเวลานานอาจทำให้เกิดอาการปวดศีรษะ คลื่นไส้อาเจียนเบื่ออาหาร อ่อนเพลียไม่มีแรง ท่าเดินผิดปกติ บุคลิกภาพเปลี่ยนแปลงและความจำเสื่อม บางรายงานพบว่ามีความผิดปกติของ electrolyte การศึกษาของ Streicher และคณะ ในผู้ใหญ่ 25 คนที่สูดดมทินเนอร์พบว่า 10 คนมีอาการ neuropsychiatric syndrome อาการทางระบบทางเดินอาหารและกล้ามเนื้อไม่มีแรง 9 คน มีอาการอ่อนแรงชัดเจนและเดินไม่สะดวก 4 คน มีอาการอัมพาตบางส่วน (Streicher et al., 1891) ไม่มีข้อมูลมากนักที่แสดงถึงความผิดปกติในสมอง สำหรับในคนที่สูดดมกาวเป็นเวลานาน ๆ มีบางรายงานพบการเกิด cerebella atrophy หรือ cerebral atrophy (Knox and Nelson, 1966) หรือพบคลื่นสมองผิดปกติ ซึ่งส่วนใหญ่คลื่นคลื่นสมองจะช้ากว่าปกติ (Knox and Nelson, 1966 : Satron and Dodson, 1963) นอกจากนี้ประสาทสัมผัสและความรู้สึก เช่น ประสิทธิภาพของสายตา ประสาทรับความรู้สึกการทรงตัว ความจำ ความคล่องแคล่วของการใช้มือ ความคล่องแคล่วของการพูดและระยะเวลาการตัดสินใจอาจแย่ลง (Cherry, Venable, and Waldron, 1984 ; Husman and Karli, 1980) ไม่มีหลักฐานยืนยันว่าโทลูอีนมีพิษต่อระบบประสาทส่วนปลายมีบางรายงาน พบว่าเกิด polyneuropathy ในผู้ที่ดมกาวหรือทินเนอร์ (Axelson, 1976) ถึงแม้ว่าเบนซีนจะทำให้เกิดความผิดปกติของระบบเลือดและไขกระดูก แต่ไม่มีหลักฐานแน่ชัดว่าโทลูอีน ซึ่งเป็นสารในกลุ่มเดียวกันนี้ทำให้อันตรายต่อระบบเลือดและไขกระดูกได้ มีบางรายงานพบว่าทำให้ เม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้น เม็ดเลือดแดงลดลง แต่ไม่มีกลุ่มใดได้รับสารโทลูอีนเพียงอย่างเดียว (Cohr and Stokholm, 1979) มีรายงานน้อยมากเกี่ยวกับผลของโทลูอีนต่อการทำงานของ ตับ ไต ปอดและหัวใจ (Vithaya, 1991) มีการเปลี่ยนแปลงของ liver enzyme บางชนิด แต่สามารถ

ตารางที่ 1 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างโทลูอีนขนาดต่างๆ และร่างกายของมนุษย์เมื่อได้รับโทลูอีนโดยการสูดดมในระยะเวลาสั้น ๆ

dose	effect
9.4 mg/m^3 (2.5 ppm)	odour threshold
138.8 mg/m^3 (50-100 ppm)	probably precipitate to most human being
188-375 mg/m^3 (50-200 ppm)	subjective complaint (fatique, drawziness, or vary mild headache) but probably no observable impairment of reaction time of coordination
750 mg/m^3 (200 ppm)	mild throat and eye irritation; prolonged eye-to-hand reaction time ; some impaired cognitive function ; slight headache, dizziness, sensation of intoxication ; after effect; fatique, general confusion, moderate insomnia
1125 mg/m^3 (300 ppm)	detectable sign of incoordinatoin may be expected during exposure period up to 8 h.
1500 mg/m^3 (400 ppm)	irritation of the eyes and lachrymation; skin parestesia, gross sign of incoordination, the mental confusion expected during exposure period up to 8 h.

dose	effect
1785-2250 mg/m^3 (500-600 ppm)	anorexia,staggering gait, nausea, nervousness (persist to next day), momentary loss of memory, significant reduction in reaction time
3000 mg/m^3 (800 ppm)	pronuced nausea (after 3 h exposure); confusion, lack of self control; extreme nervousness, muscular fatique, and insomnia lasting for several days
5625 mg/m^3 (1300 ppm)	probably not lethal for exposure periods of up to 8 h. ; incoordination likely ; extreme weakness
15000 mg/m^3 (4000 ppm)	would probably cause rapid impairment of reaction time and coordination exposure of 8 h. or longer might lead to nacrosis and probably death
37500-11250 mg/m^3 (10000-30000 ppm)	onset of nacrosis within a few min.; longer exposure may be lethel

ที่มา : WHO Environmental Health Criterior 52, 1985.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เพิ่มมากเป็นปกติได้ ไม่มีการยืนยันแน่ชัดว่า โทลูอีนทำให้เกิดอันตรายต่อตับจนไม่สามารถกลับคืนมาเป็นปกติได้ การศึกษาในคนที่สูดดมกาว พบว่าทำให้เกิดพิษต่อไต (Chor and Stokholm, 1979) บางรายพบ distal tubutar acidosis, electrolyte imbalance (Tahler et al., 1974) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการระคายเคืองต่อเยื่อบุต่าง ๆ เช่น เยื่อบุตา ปอด รวมทั้งผิวหนัง ความผิดปกติเหล่านี้สามารถกลับมาเป็นปกติได้ การศึกษาผลของโทลูอีนในระบบอื่น ๆ ยังมีไม่มากนัก ไม่มีหลักฐานพบว่าโทลูอีนทำให้เกิดมะเร็ง หรือเกิดความผิดปกติของ chromosome และยังไม่มีการศึกษาแน่ชัดทางด้าน teratogenic effects

<u>การศึกษาผลของโทลูอีนต่อระบบประสาทและระบบสืบพันธุ์</u>

โทลูอีนมีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน และมีโมเลกุลขนาดเล็ก ทำให้สามารถผ่าน blood brain barrier เข้าสู่สมอง ได้มีการศึกษาถึงการสะสมของโทลูอีนในร่างกายโดยวิธี magnetic resonance imaging (MRI) ในมนุษย์พบว่าโทลูอีนทำให้มีการฝ่อของสมองหลายส่วน (Ikeda and Tsukagoshi, 1990) การศึกษาระดับโทลูอีนในร่างกายของชายที่ได้รับโทลูอีนปริมาณสูงขณะทำงานโดยวิธี gas chromatography พบว่าบริเวณที่มีระดับโทลูอีนสูงที่สุดคือในสมอง (Takeishi,Yamada, and Shigeta,1986) การศึกษาในชาย อายุ 28 ปี ซึ่งได้รับโทลูอีน 8 ปี โดยวิธี MRI และ CT scan พบว่าโทลูอีนทำให้เกิดการฝ่อของ cerebrum, cerebellum และ brainstem (Fugita et al., 1992) รวมทั้งยังพบความผิดปกติของระบบประสาทอื่นๆในชายอายุ 21 ปี ที่ได้รับโทลูอีนเป็นเวลานาน (Suzuki et al., 1992) สำหรับในประเทศไทย Poungvarin (1991) ได้รายงานกรณีศึกษาครั้งแรกในประเทศไทย โดยพบว่าผู้ป่วยชายไทยอายุ 24 ปี ซึ่งมีประวัติดมแลกเกอร์นาน 5 ปี มีอาการทางระบบประสาท และเมื่อศึกษาความเปลี่ยนของสมองโดยวิธี MRI และ CT scan พบว่ามีการฝ่อของสมองส่วน cerebral hemisphere, vermis, brainstem และ cerebellar hemisphere จากรายงานนี้แสดงให้เห็นว่าพิษของโทลูอีนต่อ

ร่างกายจัดเป็นปัญหาสำคัญประการหนึ่งของประเทศไทยที่ต้องได้รับการแก้ไข

การศึกษาผลของโทลูอีนต่อระบบประสาทในหนูแรทให้ผลสอดคล้องกับการศึกษาในมนุษย์ คือพบว่าเมื่อได้รับโทลูอีนในขนาด 1,500 และ 10,000 ppm ทางการสูดดมจะมีการสะสมของโทลูอีนปริมาณสูงใน pons, medulla oblongata, midbrain, thalamus, caudate, putamen, cerebellum และ hypothalamus (Kiriu et al., 1990) เมื่อได้รับโทลูอีนขนาด 320 ppm เป็นเวลา 30 วันในหนูแรท พบว่าเนื้อสมองส่วน gray matter ลดลง แสดงว่าโทลูอีนทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในสมองหลาย ๆ ส่วน ส่งผลให้เกิดความผิดปกติ เช่น พฤติกรรม หรือการเปลี่ยนแปลงทางด้านความทรงจำ (Kyrklund, Kjellstrand, and Haglid, 1987) ในสมองมีหลายบริเวณที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์โดยเฉพาะบริเวณที่มีการหลั่ง neurohormone ได้แก่ hypothalamus บริเวณนี้จะเชื่อมโยงกับเส้นประสาทส่วนกลางด้วยเส้นประสาทมากมาย ที่ปลายประสาทเหล่านี้จะให้สารเคมีซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวนำ ประกอบด้วย 3 กลุ่มคือ พวก monoamine ได้แก่ catecholamine, acetylcholine, serotonine กลุ่มที่ 2 คือ GABA และสุดท้ายคือ neuropeptide (ประมวล วีรุตมเสน, 2532) ปลายเส้นประสาทเหล่านี้อยู่ใกล้ชิดกับ gonadotrophin releasing hormne (GnRH) neurons ในปัจจุบันเป็นที่ยอมรับกันโดยทั่วไปว่ากลไกที่มีอิทธิพลต่อการควบคุมการหลั่ง gonadotrophic hormone จากต่อมใต้สมองโดยไฮโปทาลามัสคือ นอร์อดรีนาลีน และโดปามีน (Mamson and Kang, 1994) โทลูอีนอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง ในเซลประสาทเหล่านี้ เนื่องจากมีรายงานที่แสดงว่ามีการสะสมของโทลูอีนในบริเวณต่างๆ ของสมองดังที่ได้กล่าวมาแล้ว

ได้มีผู้ศึกษาถึงผลของโทลูอีนต่อระบบประสาทเหล่านี้ พบว่าการได้สัมผัสกับโทลูอีน ขนาด 80 - 100 ppm ในระยะสั้นๆ จะมีผลต่อระดับและการใช้สารสื่อประสาทพวก catecholamine เช่น นอร์อดรีนาลีน และโดปามีนในสมอง (Homma et al., 1983; Rea at al., 1984; Ikeda et al., 1986 and

Granholm et al., 1988) รวมถึงส่วนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ได้แก่ ไฮโปทาลามัส โดยทำให้มีการเพิ่มระดับนอร์อดรีนาลีนในไฮโปทาลามัส (Hsieh, et al., 1990; Hsieh, Sharma and Parker, 1990) ได้แก่ median eminence, paraventricular hypothalamic nucleus, anterior periventricular hypothalamic nucleus (Andersson et al., 1983) เพิ่มการ turnover ของนอร์อดรีนาลีนใน ไฮโปทาลามัส (Andersson et al., 1980) และการเพิ่มระดับโดปามีนในของ สมอง (Hsieh, Sharma, and Parker, 1990) รวมทั้งในไฮโปทาลามัส (Andersson et al., 1980; Andersson et al., 1983) นอกจากนี้ยังพบ ความเปลี่ยนแปลงระดับ serotonin ใน สมอง (Arito et al., 1985 ; Rea et al., 1984) การเปลี่ยนแปลงสารสื่อประสาท อันเนื่องจากโทลูอีนเหล่า นี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงใน hypothalamopituitary gonadal axis และระบบสืบพันธุ์ตามมา

หน้าที่สำคัญนอกเหนือจากการสร้างและการหลั่งฮอร์โมนเพศของรังไข่คือ การสร้างเซลสืบพันธุ์อันได้แก่ไข่ (ovum) ขบวนการนี้จะเกิดขึ้นอย่างสมบูรณ์ได้ต้อง อาศัยสภาวะที่เหมาะสมรวมทั้งความสมดุลย์ของฮอร์โมน จากการศึกษาพบว่ามีสาร เคมีหลายชนิดขัดขวางการตกไข่ (Thomas, 1991) จากฤทธิ์ของโทลูอีนที่กล่าวมา แล้วทำให้เป็นที่น่าสนใจว่าโทลูอีนอาจไปขัดขวางการตกไข่รวมทั้งความผิดปกติอื่น ๆ ในระบบสืบพันธุ์ ได้มีผู้ศึกษาผลของโทลูอีนต่อระบบสืบพันธุ์ ดังนี้

1. การศึกษาในมนุษย์

จากการศึกษาในคนงานหญิงในโรงงานทำรองเท้า ซึ่งต้องสัมผัสกับ โทลูอีนอยู่เป็นประจำ พบว่าหญิงเหล่านี้มีโอกาสเกิดความผิดปกติของรอบเดือน (menstrual disorder) ประจำเดือนไม่สม่ำเสมอและปวดท้องประจำเดือนมาก กว่ากลุ่มควบคุม (Huang, 1991) การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่าง หญิงที่ทำงาน ในห้องทดลองและการตั้งครรภ์ที่ผิดปกติ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างหญิงเหล่า นี้กับการเกิด spontaneous abortion (Taskinen et al., 1989) ผลการ

ครรภ์ที่ผิดปกติ พบว่ามีความสัมพันธ์ระหว่างหญิงเหล่านี้กับการเกิด spontaneous abortion (Taskinen et al,1989) ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาในหญิงที่ทำงานในแหล่งที่สัมผัสกับโทลูอีน (Ng, Foo and Yoong, 1992) การศึกษาในเด็กที่เกิดจากมารดาที่ได้รับโทลูอีนในระหว่างตั้งครรภ์ พบว่าจะทำให้อัตราการเกิดการคลอดก่อนกำหนด การตายหลังคลอด และ การเติบโตช้าเพิ่มขึ้น (Wilkins-Haug and Gabow, 1991) เกิดความผิดปกติในระบบประสาท (Hersh et al., 1985) ทำให้อาจเป็นไปได้ว่าโทลูอีนเป็นอันตรายกับตัวอ่อนในครรภ์ (Hersh et al., 1985; Arnold et al.,1994) และทำให้เกิดความพิการ (teratogenic effect) (Goodwin, 1988)

2. การศึกษาในสัตว์ทดลอง

จากการศึกษาพบว่าโทลูอีนทำให้เกิดความผิดปกติในมนุษย์ ดังกล่าวมาแล้ว แต่มีการศึกษาไม่มากนัก และขณะทำการศึกษากลุ่มตัวอย่างอาจได้รับสารเคมีอื่น ๆ ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ร่วมด้วย เช่น สุรา บุหรี่ ยาเสพติด และอาจมีสารเคมีชนิดอื่น ๆ ผสมอยู่ในโทลูอีนด้วย จึงได้มีผู้สนใจทำการศึกษาผลของโทลูอีนในสัตว์ทดลอง โดยมักทำการศึกษาในหนูไมซ์ หนูแรท และกระต่าย

มีการศึกษาในหนูไมซ์ ก็พบว่าโทลูอีนสามารถผ่านเข้าไปสู่ตัวอ่อนได้อย่างรวดเร็ว (Ghantous, 1986) แสดงว่าโทลูอีนสามารถผ่านรกเข้าสู่ทารกในครรภ์ได้ และอาจเป็นสาเหตุให้ทารกที่เกิดมามีความผิดปกติ การศึกษาในหนูแรทที่สัมผัสกับโทลูอีนในปริมาณ 0, 100, 500, และ 2000 ppm นาน 6 ชั่วโมงต่อวัน ตั้งแต่ก่อนการตั้งครรภ์ 80 วัน และ ต่อไปจนถึงวันที่ 19 ของการตั้งครรภ์รวม 99 วัน พบว่าลูกที่เกิดมามีน้ำหนักน้อยในกลุ่มที่ได้รับโทลูอีน 2000 ppm (Donalds, Hopper and Hopenhayn-Rich, 1991) โดยไม่พบความผิดปกติในแม่หนู การศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) ก็เช่นเดียวกันคือ โทลูอีนทำให้ตัวอ่อนมีการเจริญเติบโตช้า (Brown-Woodman et al,, 1991) การศึกษาในหนูแรทที่ได้รับโทลูอีนวันที่ 6 - 15 ของการตั้งครรภ์ พบว่าลูกที่เกิดมาน้ำหนักน้อยลงและมีอัตราการตายของตัวอ่อนสูงขึ้น (Nowrot and Staples, 1979) การ

สูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น (Ungvary and Tatrai, 1985) และเมื่อได้รับโทลูอีน โดยการสูดดมในขนาด 133 ppm ในวันที่ 6 - 13 ของการตั้งครรภ์และได้รับในขนาด 400 ppm วันที่ 1 - 8 ของการตั้งครรภ์ก็ทำให้ลูกที่เกิดมามีน้ำหนักน้อยเช่นเดียวกัน (Hudak and Ungrvary, 1978) การศึกษาด้าน teratogenic effects มีการศึกษาในหนูไมซ์พบว่าโทลูอีนทำให้เกิดความพิการในลูกที่เกิดมา โดยเมื่อให้โทลูอีนในขนาด 1000 ppm วันที่ 1 - 17 ของการตั้งครรภ์ ทำให้ลูกที่เกิดมามีซี่โครงคู่ที่ 14 เกิน 1 คู่ (Shigeta, Aikawa, and Misawa, 1982) เกิดปากแหว่ง และเพดานโหว่ในหนูไมซ์ที่ได้รับโทลูอีนทางปากปริมาณ 10 มิลลิลิตร/กิโลกรัม วันละ 3 ครั้ง (Nawrot and Staples, 1979) นอกจากทำให้เกิดความพิการแล้ว Ungvary และ Tatrai (1985) ได้ทำการศึกษาพบว่าเมื่อได้รับโทลูอีนขนาด 266 ppm ในวันที่ 7 - 20 ของการตั้งครรภ์ทำให้เกิดการล้มเหลวของการตั้งครรภ์ โดยทำให้มีการสูญสลายของตัวอ่อน การแท้ง และตายหลังคลอด และเมื่อให้โทลูอีนในหนูไมซ์ ก็ทำให้เกิดการสูญสลายของตัวอ่อนเช่นกัน (Nawrot and Staples, 1979) การศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) โดยโทลูอีน 8.67 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร จะขัดขวางการปฏิสนธิและทำให้ตัวอ่อนสลายไปก่อนการฝังตัว (Yelion and Dukelow, 1992)

โทลูอีนและสารประกอบโทลูอีนเป็นสารเคมีที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลาย ทั้งในงานอุตสาหกรรม ในบ้านเรือน ตลอดจนห้องทดลอง ผู้ที่เกี่ยวข้องหรือทำงานในที่เหล่านี้จึงต้องสัมผัสกับโทลูอีนอย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ การศึกษาถึงผลของโทลูอีนต่อร่างกายจึงเป็นเรื่องน่าสนใจ และน่าจะเป็นประโยชน์ ที่ผ่านมาการศึกษาเกี่ยวกับโทลูอีนยังมีไม่มากนัก จะเห็นว่าผู้ที่สัมผัสกับโทลูอีนมักอยู่ในวัยทำงานซึ่งเป็นวัยเจริญพันธุ์ และพบว่าปัจจุบันมีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์สูงขึ้นเรื่อย ๆโดยเฉพาะการตั้งครรภ์ หนึ่งในห้าของคู่แต่งงานเป็นหมัน หนึ่งในสามของตัวอ่อนไม่สามารถเจริญเติบโต ร้อยละ 15 ของการตั้งครรภ์ต้องแท้งไป และเมื่อทารกคลอดออกมาพบว่าร้อยละ 3 มักจะเจริญเติบโตผิดปกติ (Thomas, 1991) ความผิดปกติเหล่านี้เกิดมากขึ้นเรื่อย ๆ เช่นเดียวกับที่มนุษย์เราใช้สารเคมีมากขึ้น และมีรายงานว่าในบางรายที่พบความผิดปกติเหล่านี้เกี่ยวข้องกับสารเคมีบางชนิด

รวมทั้งโทลูอีนโดยพบว่า ผู้ที่ทำงานในแหล่งที่สัมผัสกับโทลูอีนมีแนวโน้มของความผิดปกติในระบบสืบพันธุ์สูงขึ้น (Huang, 1991) และในประเทศไทยก็ยังมีหลายโรงงานที่มีระดับโทลูอีนสูงในอากาศ เกินมาตราฐานที่กำหนดไว้ ผู้ที่ได้รับโทลูอีนปริมาณสูงเป็นเวลานาน โดยการสูดดมเป็นยาเสพติดก็ยังคงมีอยู่มาก ผู้วิจัยเห็นว่าการศึกษาถึงผลของโทลูอีนต่อระบบสืบพันธุ์จะทำให้เราทราบข้อมูลให้เราได้ตระหนักถึงประโยชน์และโทษของโทลูอีนควบคู่กันไปสามารถใช้โทลูอีนได้อย่างถูกต้องโดยทำการศึกษาพิษของโทลูอีนต่อระบบสืบพันธุ์ ในส่วนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญพันธุ์ได้แก่ การตกไข่ การเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนเพศ การตั้งครรภ์ และความผิดปกติของลูกหลังคลอด โดยวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของโทลูอีนดังนี้

1. ผลต่อการตกไข่
2. ผลต่อการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน
3. ผลต่อการตั้งครรภ์ในระยะก่อนการฝังตัวและระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน
4. ผลต่อโครงสร้างของร่างกายของตัวอ่อน

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และการทดลอง

สัตว์ทดลอง

ใช้หนูแรทพันธุ์ Wistar เพศเมียอายุ 90-120 วัน น้ำหนัก 180-220 กรัม เลี้ยงในห้องทดลองภาควิชาชีววิทยาคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในห้องปรับอากาศอุณหภูมิ 22-25 องศาเซลเซียส ควบคุมแสงสว่างวันละ 14 ชั่วโมง (06.00-20.00 น.) ได้รับอาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ และน้ำตลอดเวลา และเลือกเฉพาะหนูที่มีวงอัสตรัสปกติอย่างน้อย 2 วงจร มาใช้ในการทดลอง

สารเคมี

สารเคมีที่ใช้เป็น AR grade ดังนี้

Alcian blue: E.Merck, Germany

Alizarin red: Serva, U.S.A.

Charcoal reagent : Batch No.K220520 จาก WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Dextran reagent : Batch No.82/83/S จาก WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Diethyl ether: E.Merck, Germany

Dioxane: E.Merck, Germany

Disodium hydrogen orthophosphate: E.Merck, Germany

Ethanol, absolute: E.Merck, Germany

Formalin: E.Merck, Germany

Gelatin: Difeo Laboratories, U.S.A.

Glycerine: E.Merck, Germany

Nembutal : Sigma, U.S.A.

PoPOP (1,4-bis [5-Phenyl-2 oxazolyl] benzene; 2,2-P-phenylene-bis [5-phenyloxazole] : Sigma Chemical Company, U.S.A.

PPO (2,5-Diphenyloxazole : Sigma Chemical Company, U.S.A.

Potassium hydroxide: E.Merck, Germany

Sodium borate,saturated aqueous: E.Merck, Germany

Sodium chloride: E.Merck, Germany

Sodium dihydrogen orthophosphate: E.Merck, Germany

Trypsin: E.Merck, Germany

<u>ฮอร์โมนและแอนติบอดี</u>

Antiserum to estradiol 17*B* : Batch No. K158330, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Estradiol 17*B* standard : Batch No. WHO2, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

(2,4,6,7,16,17-H^3) estradiol 17*B* : Batch No. 155, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Antiserum to progesterone : Batch No. K. 873610, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

Progesterone standard : Batch No.K.079410, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

(1,2,6,7-H^3) progesterone : Batch No.49, WHO RIA Reagent Programme, Switzerland

สารละลายและวิธีเตรียม

1. การเตรียม Assay buffer จำนวน 1000 มิลลิลิตร ประกอบด้วย

Sodium dihydrogen orthophosphate	3.25	กรัม
Disodium hydrogen orthophosphate	11.6	กรัม
Sodium Chloride	8.8	กรัม
Thiomersal	0.1	กรัม
Getatin	1.0	กรัม

เตรียมโดยละลาย gelatin ลงในน้ำกลั่นจำนวน 300 มิลลิลิตรโดยใช้อุณห. ประมาณ 50 องศาเซลเซียส ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเติมสารที่เหลือลงไป คนให้ละลายเ กันทั้งหมด เติมน้ำกลั่นให้ได้ 1000 มิลลิลิตร แล้วปรับ pH 7.2-7.4 เตรียมเก็บไว้ ได้นาน 1เดือน

2. การเตรียม Charcoal suspension

เตรียมโดยใช้ Dextran 0.0625 กรัม ละลายใน assay buffer 100 มิลลิลิตร แล้วเติม charcoal 0.625 กรัม ปั่นให้เข้ากัน 30 วินาที เก็บ ไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส ใช้ได้นาน 1 เดือน

3. การเตรียม Counting solution ประกอบด้วย

PPO	5	กรัม
dimethyl PoPOP	0.3	กรัม
toluene	1	ลิตร
dioxane	200	มิลลิลิตร

เตรียมโดยผสมสารทั้งหมดเข้าด้วยกัน เก็บในขวดป้องกันแสง และควรเตรียมก่อนใช้ 1 เดือน

4. การเตรียม estradiol 17*B* และ progesterone working tracer

เตรียมโดยใช้ estradiol 17*B* หรือ progesterone tracer ซึ่งมีความแรง 10 ไมโครคูรี่/มิลลิลิตร จำนวนชนิดละ 100 ไมโครลิตร นำมาเป่าให้แห้งด้วย compressor air แล้วเติม assay buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร ในแต่ละ tracer ผสมให้เข้ากัน จะได้สารละลาย estradiol 17*B* และ progesterone working tracer ที่มีความแรง 100 นาโนคูรี่/มิลลิลิตร เก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม standard ของ estradiol 17*B* และ progesterone standard

เตรียมโดยใช้ estradiol 17*B* standard ที่มีความเข้มข้น 150 นาโนโมล/ลิตร และ progesterone standard จาก WHO ที่มีความเข้มข้น 250 นาโนโมล/ลิตร ปิเปตสารมาตราฐานชนิดละ 100 ไมโครลิตร เติม assay buffer 10 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน เขย่าเบา ๆ แล้วไป incubate ที่ 40 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที จะได้สารละลายอีสโตรเจนที่มีความเข้มข้น 15 นาโนโมล/ลิตร และสารละลายโปรเจสเตอโรน ที่มีความเข้มข้น 2.5 นาโนโมล/มิลลิลิตร นำสารละลายที่ได้มาทำ serial dilution โดยให้อีสโตรเจนมีความเข้มข้นตั้งแต่ 750 ถึง 11.5 เฟมโตโมล/ หลอดทดลอง และโปรเจสเตอโรนมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1,250 ถึง 19.5 เฟมโตโมล/ หลอดทดลอง

6. การเตรียม estradiol 17*B* และ Progesterone antisera

เตรียมโดยใช้ estradiol 17*B* และ progesterone antisera จาก WHO ซึ่งถูกทำให้แห้งเก็บไว้ในขวด นำไปเติม assay buffer จำนวน 10 มิลลิลิตร เขย่าให้ละลาย เ[illegible]ล้วใช้ทันที

7. การเตรียม alcian blue

ผสม alcian blue 8 GN 10 มิลลิกรัม, 95% ethyl alcohol 80 มิลลิลิตร และ glacial acetic acid 20 มิลลิลิตร

11. การเตรียม Ali

ผสม stock solution ของ alizarin red ลงใน 0.5% KOH จนสารละลายกลายเป็นสีม่วงเข้ม

12. การเตรียม enzyme solution

ผสม trypsin 1 กรัม ลงในสารละลายอิ่มตัวของ sodium borate 30 มิลลิลิตร และ distilled water 70 มิลลิลิตร

<u>อุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง</u>

Beta-liquid scintillation counter : Model BPL ของ Packard Instrument Co., U.S.A.

Dri-block heater : Model DB-3 ของ Tecam Laboratory and Industrial Equipment, U.S.A.

Dynac centrifuge : Clay Adams, Bectom Dickinson & Company Parsippaly, U.S.A.

Magnetic stirrer : S-18520, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.

Micropipette : Pipetteman M.81 Gilson France, Eppendorf 3130 Germany; Pipette Gun Glay Adams, U.S.A.

pH meter : 5985, Cole Parmer Instrument Equipment, U.S.A.

Refrigerate centrifuge : Model PR-J, International Equipment Company, U.S.A.

Vortex mixer : M.16715, Thermolyne Corporation Iowa, U.S.A.

ตู้อบแห้ง : Drying Cabinet Series 2000 Termark; U.S.A.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แผนการทดลองและการทดลอง

แผนการทดลอง

1. ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่

ใช้หนูแรทเพศเมียอายุ 90-120 วัน ซึ่งมีวงอีสตรัสปกติติดต่อกันอย่างน้อย 2 วง แบ่งเป็น 4 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 20 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดน้ำมันมะกอกปริมาตร 1.6 มิลลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัวทางชั้นไขมันใต้ผิวหนัง เวลา 13.00 - 13.30 น. ของวัน proestrus

กลุ่มที่ 2 ฉีด nembutal ขนาด 35 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวทางช่องท้อง เวลา 13.00 - 13.30 น. ของวัน proestrus

กลุ่มที่ 3 ฉีดโทลูอีน 1.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ผสมในน้ำมันมะกอกให้ได้ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัวทางชั้นไขมันใต้ผิวหนังเวลา 13.00 - 13.30 น. ของวันproestrus

กลุ่มที่ 4 ฉีดโทลูอีน 1.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวผสมในน้ำมันมะกอกให้ได้ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัวทางชั้นไขมันใต้ผิวหนังเวลา 17.00 - 18.00 ของวันdiestrus-2

หนูทุกกลุ่มเมื่อฉีดยาตามที่กำหนดแล้วจะนำไปเลี้ยงต่อจนถึงวัน estrus เวลา 8.00 - 9.00 น. นำไปนับการตกไข่

2. ผลของโทลูอีนต่อระดับฮอร์โมนอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

ใช้หนูแรทเพศเมียอายุ 90 - 120 วัน ซึ่งมีวงอัสตรัสติดต่อกัน 2 วง แบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ กลุ่มละ 40 ตัว ดังนี้

กลุ่มที่ 1 ฉีดน้ำมันมะกอกในปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัวทางชั้นไขมันใต้ผิวหนัง เวลา 17.00 - 18.00 น. ของวัน diestrus-2

กลุ่มที่ 2 ฉีดโทลูอีน 1.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ผสมในน้ำมันมะกอกให้ได้ปริมาตร 1.6 มิลลิลิตร/กิโลกรัมน้ำหนักตัว ทางชั้นไขมันใต้ผิวหนัง เวลา 17.00 - 8.00 น.ของวันdiestrus-2

นำหนูกลุ่มที่ 1 และ 2 ไปเลี้ยงต่อจนถึงวันรุ่งขึ้น เป็นระยะ proestrus แบ่งหนูแต่ละกลุ่มออกเป็นกลุ่มละ 20 ตัว โดย 20 ตัวแรกของทั้ง 2 กลุ่มจะนำมาเจาะเลือดเวลา 11.00 - 11.30 น. เพื่อนำไปตรวจหาฮอร์โมนอีสโตรเจน ส่วนหนูที่เหลือ 20 ตัวหลังของแต่ละกลุ่ม จะนำมาเจาะเลือด เวลา 17.00 - 18.00 น. เพื่อตรวจหาฮอร์โมนโปรเจสเตอโรน

3. ผลของโทลูอีนต่อการตั้งครรภ์ในระยะก่อนฝังตัว และระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน

ศึกษาผลของโทลูอีนต่อการตั้งครรภ์ในระยะก่อนการฝังตัว ของตัวอ่อน (preimplantation) คือวันที่ 1-6 ของการตั้งครรภ์ (P1-6) และระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน (during implantation) คือวันที่ 6 - 12 ของการตั้งครรภ์ (P6 - 12) โดยแบ่งหนูเป็น 4 กลุ่ม ๆ ละ 20 ตัว นำหนูทุกตัวไปผสมพันธุ์กับหนูแรทเพศผู้ โดยตรวจดูวงอีสตรัสจนถึงวัน proestrus ซึ่งระยะนี้เป็นระยะที่ใกล้กับเวลาตกไข่ หนูตัวเมียจะยอมให้ตัวผู้ผสมพันธุ์ในช่วงท้าย ๆ ของระยะนี้ โดยเมื่อถึงระยะ proestrus จะนำหนูตัวเมียไปใส่ในกรงของหนูตัวผู้ โดยใช้อัตราส่วนพ่อพันธุ์ : แม่พันธุ์ 1:1 ทิ้งไว้ 1 คืน วันรุ่งขึ้น นำหนูตัวเมียมาตรวจดูสเปิร์มโดยวิธี vaginal smear ถ้าพบ sperm plug จะนับเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์ (P1) นำหนูตั้งท้องมาแบ่งเป็น 4 กลุ่ม ทำการทดลองโดยให้โทลูอีน น้ำมันมะกอก หรือ nembutal แก่หนูแรทกลุ่มต่างๆในการทดลองตามตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงการให้น้ำมันมะกอกหรือโทลูอีนในการทดลองนี้

treatment (n)	days of treatment	days of laparotomy
1. olive oil 1.6 ml./kg.b.w. (20)	P 1 - 6	P13
2. toluene 1.2 ml./kg.b.w. + olive oil up to 1.6 ml./kg.b.w.(20)	P 1 - 6	P13
3. olive oil 1.6 ml./kg.b.w. (20)	P 6 - 12	P13
4. toluene 1.2 ml./kg.b.w. + olive oil up to 1.6 ml./kg.b.w.(20)	P 6 - 12	P13

หลังจากได้รับสารเคมีตามที่กำหนดแล้ว นำหนูทั้งหมดมาเลี้ยงต่อจนถึงวันที่ 13 ของการตั้งครรภ์จึงนำมาทำ laparotomy ตรวจดูมดลูก นับจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน (implantation site) จำนวนการสูญสลายของตัวอ่อน (resorption site)

เมื่อทำ laparotomy แล้ว นำหนูทั้งหมดไปเลี้ยงต่อจนถึงวันที่ 20 ของการตั้งครรภ์ จึงแยกหนูออกมาเลี้ยงกรงละ 1 ตัว บันทึกน้ำหนักวันแรกของการตั้งครรภ์ (P1) และวันที่ 21 ของการตั้งครรภ์ (P21) เลี้ยงหนูทั้งหมดต่อไปจนถึงวันคลอด นับจำนวนลูกที่เกิด บันทึกน้ำหนักและสังเกตความผิดปกติของลูกทุกตัว แยกลูกหนูออกไปเลี้ยงกับแม่หนูกรงละ 8 ตัว ลูกที่เหลือจะแยกออกไปทิ้ง โดยลูกที่เก็บไว้จะเลี้ยงต่อไปอีก 5 วัน บันทึกน้ำหนักของลูกและสังเกตความผิดปกติของลูกหนูทุกตัว กรณีที่แม่หนูคลอดลูกไม่ครบ 8 ตัว จะให้แม่หนูเลี้ยงลูกทั้งหมดที่เกิดมา

4. ผลของโทลูอีนต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวอ่อน

นำลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูในการทดลองที่ 3 ทั้ง 4 กลุ่ม แม่หนูละ 1 ตัว จะได้ลูกหนู 4 กลุ่ม กลุ่มละ 20 ตัว แต่ละตัวจะนำมาดูโครงสร้าง ด้วยวิธีย้อม กระดูกอ่อนและ กระดูกแข็ง

<u>การทดลอง</u>

1. การตรวจวงอีสตรัส

ทำ vaginal smear ดัดแปลงจากวิธีของ Long & Evan 1962 โดยใช้แท่งแก้วปลายมนทำความสะอาดด้วย 70% alcohol แล้วจุ่มใน 0.9%NaCl นำมาสอดเข้าไปในช่องคลอด ป้ายบริเวณผนังช่องคลอดเบา ๆ แล้วนำแท่งแก้วนั้นมาป้ายบนสไลด์สะอาดที่บรรจุ 0.9% NaCl เล็กน้อย ตรวจดูลักษณะของเซลภายใต้กล้องจุลทรรศน์ กำลังขยาย 10 เท่า โดยจะตรวจดูในเวลา 07.00-08.00 น. ปกติหนูแรทจะมีวงอัสตรัส 4 วัน ประกอบด้วยระยะต่าง ๆ ดังนี้

1.1 proestrus โดย vaginal smear พบ nucleated epithelial cells

1.2 estrus โดย vaginal smear พบ cornified cell ระยะนี้ใช้เวลา 9 ถึง 15 ชั่วโมง

1.3 diestrus โดย vaginal smear พบ leucocytes อาจพบร่วมกับ cornified cell หรือ nucleated epithelial cell ได้เล็กน้อย ระยะนี้จะใช้เวลานานประมาณ 72 ชั่วโมง ตัวที่มีวงอีสตรัส 5 วัน จะมีช่วงที่เป็น diestrus ยาวขึ้นเป็น 3 วัน หรือมี proestrus ยาวขึ้นเป็น 2 วัน

2. การตรวจนับไข่

เมื่อ vaginal smear พบระยะ estrus จะนำหนูตัวนั้นมา autopsy แล้ว ตัดท่อนำไข่ (oviduct) ออกมา เมื่อตัดท่อนำไข่ออกมาแล้ว นำมาวางบนจานหลุมที่มี 0.9%NaCl นำไปวางใต้กล้อง stereoscope ตรวจหา

fimbria เมื่อพบใช้ syringe บรรจุ 0.9%NaCl ติดเข็มเบอร์ 27 ปลายมนสอดเข้าไปใน fimbria แล้วดัน 0.9% NaCl จาก syringe เข้าไปใน fimbria น้ำจะดันเอา content ภายในท่อนำไข่ออกมาอยู่ในจานหลุม นำ content ที่ได้ไปตรวจนับไข่ทั้งหมด

3. การตรวจการตั้งครรภ์

เมื่อหนูตั้งครรภ์จนถึงวันที่ 13 จะนำมาตรวจการตั้งครรภ์โดยวิธี laparotomy คือสลบหนูโดยใช้ diethyl ether นำมานอนหงายทำความสะอาดหน้าท้องด้วยน้ำยา dettol แล้วใช้กรรไกรตัดผิวหนังและกล้ามเนื้อหน้าท้องแนวกลางลำตัวเป็นแผลยาวประมาณ 2 เซนติเมตร ทำการตรวจดูมดลูกโดยใช้ forcep คีบมดลูกออกมาอย่างระมัดระวัง นับจำนวนการฝังตัวของตัวอ่อน การสูญสลายของตัวอ่อนหลังจากนั้นคีบมดลูกใส่คืนช่องท้องเย็บปิดด้วยไหมเบอร์ 3/0

4. การเก็บตัวอย่างเลือด

ทำโดยวิธีเจาะจากหัวใจ (cardiac puncture) โดยสลบหนูด้วย diethyl ether แล้วให้นอนหงาย ตรวจบริเวณที่หัวใจเต้นแรงแล้วใช้เข็มเบอร์ 26 ยาว 1/2 นิ้ว แทงลงไปที่บริเวณนั้น ดูดเลือดออกมาประมาณ 1 - 2 มิลลิลิตร นำเลือดที่ได้ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส 24 ชั่วโมง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 4,500 รอบ/นาที นาน 20 นาที แยกส่วนที่เป็น serum ไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณฮอร์โมน

5. การตรวจหาระดับฮอร์โมนอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

ใช้วิธี radioimmunoassay ดัดแปลงจาก manual ของ WHO (Sufi et al., 1990) ดังนี้

นำตัวอย่างซีรัมมาละลาย แล้วปิเปตลงในหลอดทดลองรูปกรวยโดยใช้ปริมาณซีรัม 250 ไมโครลิตร สำหรับวิเคราะห์หาอีสโตรเจน และ 5 ไมโครลิตร สำหรับวิเคราะห์หาโปรเจสเตอโรน โดยปิเปตซีรัมตัวอย่างละ 2

2 หลอด (duplicate sample) ส่วน recovery of extraction (RCE) และ recovery of assay (TCR) จะ ปิเปตตัวอย่างละ 3 หลอด (triplicate) และปิเปตตัวอย่างละ 2 หลอด สำหรับ quality control โดยอีสโตรเจนจะใช้ซีรัม 250 ไมโครลิตร ส่วนโปรเจสเตอโรนใช้ 5 ไมโครลิตร นำมาเติม ether 5 มิลลิลิตร vortex หลอดละ 1 นาที แช่แข็งส่วนที่เป็นน้ำในหลอดทดลองโดยใช้ ethanol ผสมน้ำแข็งแห้ง จากนั้นรินส่วนที่ไม่แข็งลงในหลอดทดลอง (assay tube) แล้วนำไปทำให้แห้งด้วย dry block heater ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส นำหลอดที่ระเหยจนแห้งแล้วทั้งหมดมาเติม assay buffer หลอดละ 500 ไมโครลิตร ยกเว้นหลอดที่เป็น RCE จะเติม assay buffer 700 ไมโครลิตร แบ่งใส่ counting vial ขวดละ 350 ไมโครลิตร เติม assay buffer อีกขวดละ 350 ไมโครลิตร และ scintillation fluid 5 มิลลิลิตร สำหรับ count พร้อมกับหลอดอื่น ๆ

เตรียม standard estradiol 17*B* ให้มีความเข้ม 11.5 ถึง 750 เฟมโตโมล/หลอดทดลอง และstandard progesterone ให้มีความเข้มข้น 19.5 ถึง 1250 เฟมโตรโมล/หลอดทดลอง โดยการทำ serial dulution แต่ละความเข้มข้น จะทำเป็น triplicate โดยใช้ปริมาตร 500 ไมโครลิตร/หลอดทดลอง

นำ assay tubes และ standard tubes มาเติม tracer หลอดละ 100 ไมโครลิตร และ antisera หลอดละ 100 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลอด ยกเว้นหลอดที่เป็น non-specific binding (NSB) ขณะเดียวกันก็ทำ non-specific binding (NSB), maximum binding (Bo), quality control (QC) และ total count (TC) ดังรายละเอียดในตารางต่อไปนี้

ตาราง 3 แสดงการเติมสารละลายลงในหลอดทดลองต่าง ๆ

หลอดทดลอง	tracer (ul)	antisera (ul)	buffer (ul)	diluted serum (ul)	diluted standard (ul)	total
NSB	100	-	600	-	-	700
Bo	100	100	500	-	-	700
Standard	100	100	-	-	500	700
Sample	100	100	-	500	-	700
QC	100	100	-	500	-	700

vortex แต่ละ assay tube นาน 30 วินาที ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 30 นาที แล้วเก็บไว้ในตู้เย็นปรับอุณภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 - 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำหลอดทดลองทั้งหมดมาวางบนน้ำแข็ง เติม charcoal suspension จำนวน 200 ไมโครลิตร vortex แล้วทิ้งไว้บนน้ำแข็ง 15 นาที นำไป centrifuge ที่ 2500 rpm อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 15 นาที รินส่วนใสลงใน vials เติม counting solution 5 มิลลิลิตร

total count เพื่อตรวจนำปริมาณรังสี (cpm) ของ tracer ที่เติมลงไปทั้งหมด โดยเติม tracer จำนวน 100 ไมโครลิตร กับ assay buffer จำนวน 600 ไมโครลิตร ลงใน vial และเติม counting solution จำนวน 5 มิลลิลิตร ทำเป็น triplicate

total count recovery เพื่อตรวจนับปริมาณรังสี ที่เติมลงไปก่อนการสกัด ซึ่งจะนำไปใช้ในการคำนวณ %recovery โดยเติม progesterone tracer 20 ไมโครลิตร หรือ estrogen tracer 50

ไมโครลิตร กับ buffer 700 ไมโครลิตร ลงใน vial เติม counting solution 5 มิลลิลิตร ทำเป็น triplicate

การคำนวน

1. standard curve นำ cpm ของ standard estradiol 17*B* และ standard progesterone แต่ละความเข้มข้น มาหาค่าเฉลี่ย แล้วลบออกด้วย NSB แล้วนำแต่ละค่าไป plot กับความเข้มข้นของ standard เป็น เฟมโตโมล/หลอดทดลอง บน semilogarithmic graph

2. ตัวอย่างซีรัม นำค่า cpm ของแต่ละตัวอย่างซีรัมที่เป็น duplicate มาหาค่าเฉลี่ย ลบออกด้วย NSB แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มข้นจาก standard curve แล้วเปลี่ยนให้เป็นค่าความเข้มข้นเป็น โมล/มิลลิลิตร

radioimmunoassay ของ อีสโตรเจน

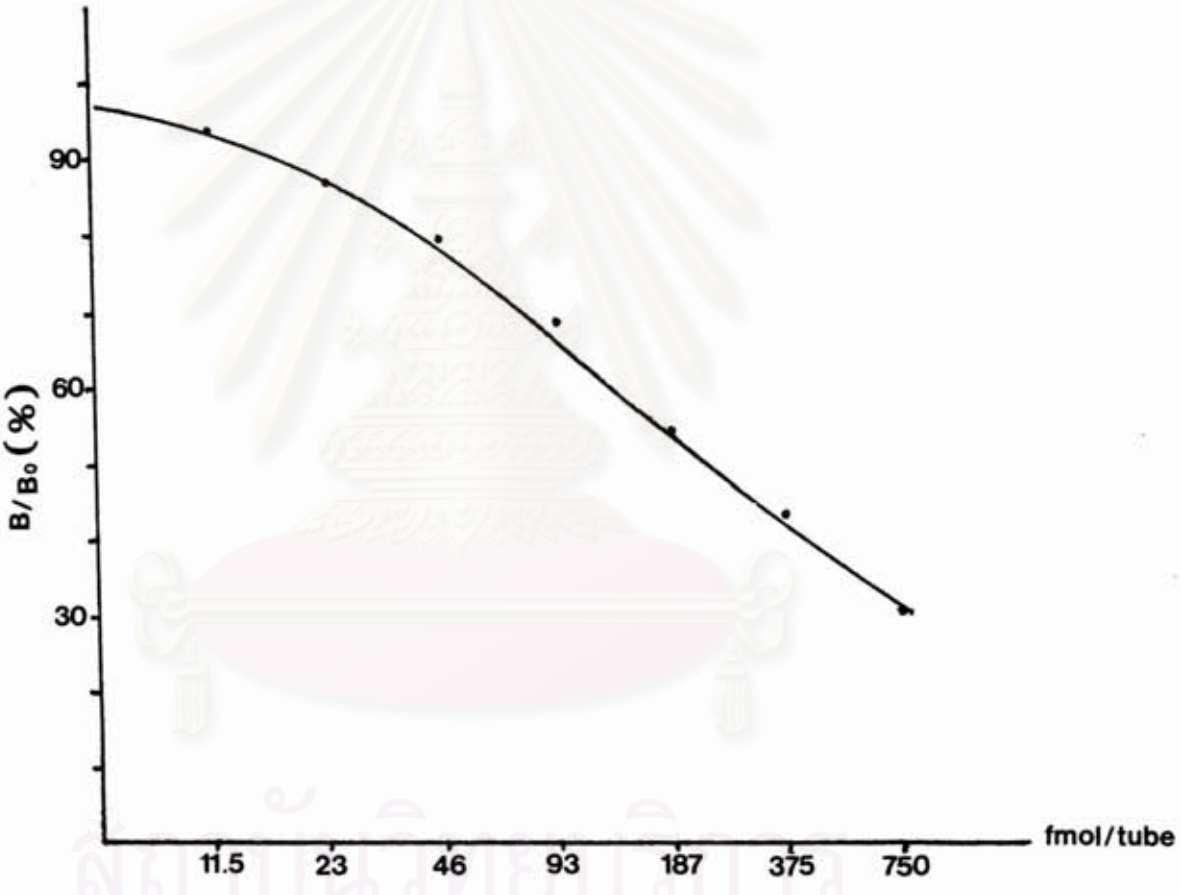
จากรูปที่ 1 แสดงกราฟมาตราฐานของอีสโตรเจน โดยแต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (B/B_0) ที่ความเข้มข้นของอีสโตรเจนมาตราฐาน 11.5 23 46 93 187 375 และ 750 เฟมโตโมล/หลอดทดลอง จากการเอสเสย์ 2 ครั้ง ความไว (senstivity) สูงสุดของการเอสเสย์นี้เท่ากับ 11.5 เฟมโตโมล/หลอดทดลอง coefficient of variation (%CV) ของ intraassay และ interassay นี้เท่ากับ 7.51 และ 18.04 ตามลำดับ % accuracy เท่ากับ 91.11

radioimmunoassay ของ โปรเจสเตอโรน

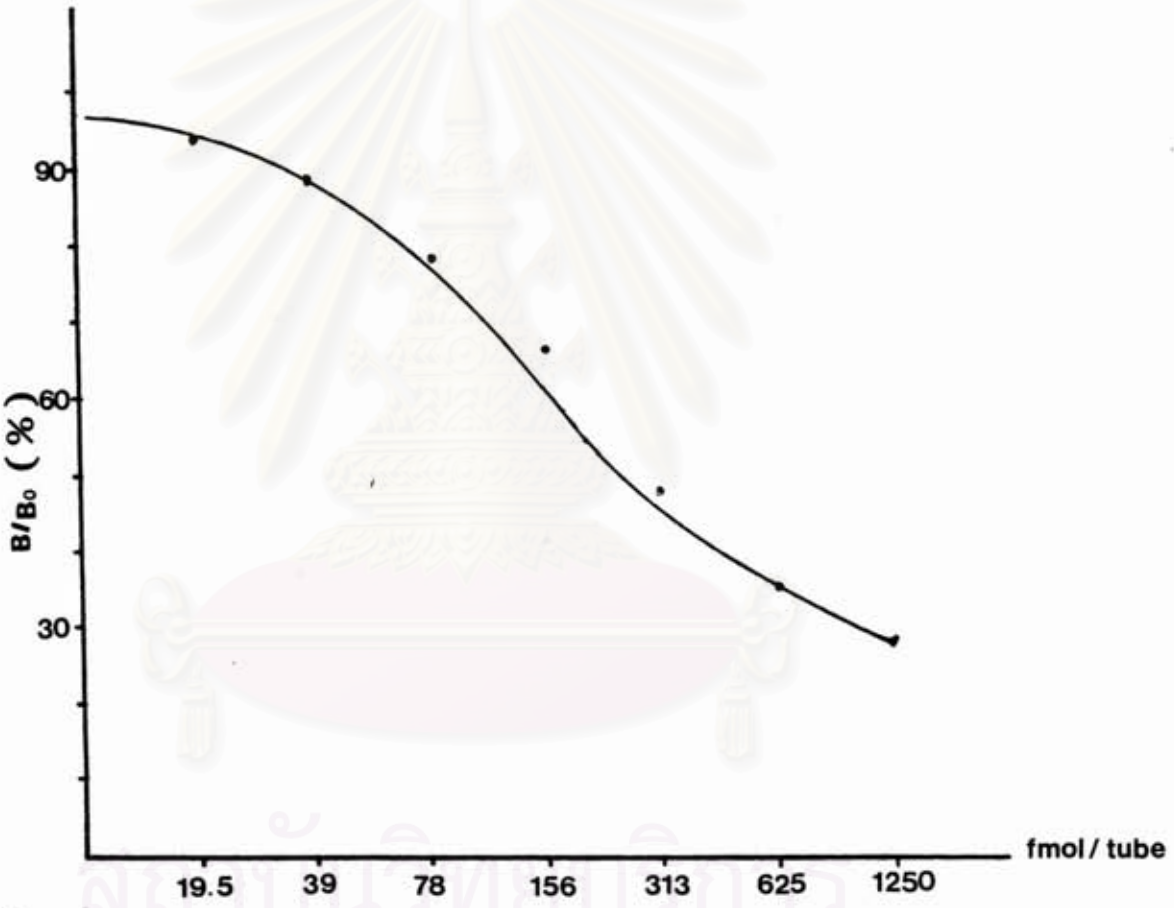
จากรูปที่ 2 แสดงกราฟมาตราฐานของโปรเจสเตอโรนโดยแต่จุดแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว (B/B_0) ที่ความเข้มข้นของโปรเจสเตอโรนมาตราฐาน 19.5 39 78 156 313 625 และ 1250 เฟมโตโมล/หลอดทดลอง จากการเอสเสย์ 2 ครั้ง ความไว (senstivity)

สูงสุดของการเอสเสย์นี้เท่ากับ 22 เฟมโตโมล/หลอดทดลอง coefficient of variation (%CV) ของ intraassay และ interassay นี้ เท่ากับ 10.29 และ 11.91 ตามลำดับ %accuracy เท่ากับ 92.42

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 แสดงกราฟมาตราฐานของอีสโตรเจนเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว ที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายอีสโตรเจนมาตรฐานจากการเอสเสย์ 2 ครั้ง



รูปที่ 2 แสดงกราฟมาตราฐานของโปรเจสเตอโรนเรดิโออิมมูโนเอสเสย์ แต่ละจุดแสดงค่าเฉลี่ยของเปอร์เซนต์การเกาะเกี่ยว ที่แต่ละความเข้มข้นของสารละลายโปรเจสเตอโรนมาตราฐานจากการเอสเสย์ 2 ครั้ง

6. การย้อมกระดูกอ่อนและกระดูกแข็ง มีวิธีทำตามขั้นตอนดังนี้

6.1 นำลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูในการทดลองที่ 3 มาแช่ใน 10%formalin นาน 2 - 3 วัน

6.2 ล้างในน้ำกลั่น 2 - 3 ครั้ง พร้อมกับลอกหนังออก และระวังบริเวณปลายเท้าซึ่งหลุดง่าย

6.3 ผ่าท้อง ถึงอวัยวะภายในออกทั้งหมด

6.4 นำไปแช่ใน alcian blue 24 - 48 ชั่วโมง ส่วนที่เป็น cartilage จะติดสีฟ้า

6.5 นำไปแช่ใน 95% ethyl alcohol 2 ครั้ง ห่างกัน 2- 3 ชั่วโมง

6.6 นำไปแช่ใน 75% 40% และ 15% ethyl alcohol ตามลำดับ ห่างกัน 2-3 ชั่วโมง

6.7 นำไปแช่ในน้ำกลั่น 2 - 3 ชั่วโมง หรือจนกระทั่งตัวหนูจม

6.8 นำไปแช่ใน enzyme solution จนกล้ามเนื้อใส เปลี่ยน solution ทุก 3 วัน หรือเมื่อเปลี่ยนเป็นสีฟ้า ทิ้งไว้ 2 - 3 สัปดาห์ กล้ามเนื้อจะใสเห็นกระดูกชัดเจน

6.9 นำไปแช่ใน alizarin red working solution กระดูกแข็งจะติดสีแดง ใช้เวลา 1 วัน ถึง 1 สัปดาห์ ไม่ควรเกินนี้

6.10 นำไปแช่ใน 0.5%KOH : glycerine ในอัตราส่วน 3:1, 1:1, 1:3 ห่างกัน 6 ชั่วโมง จากนั้นเก็บใน pure glycerine

เมื่อผ่านขั้นตอนทั้งหมดแล้ว จะได้ลูกหนูที่มีกล้ามเนื้อใสเห็นกระดูกชัดเจนโดยที่กระดูกอ่อนติดสีน้ำเงิน กระดูกแข็งติดสีแดง

<u>สถิติที่ใช้ในการทดลอง</u>

student unpaired t-test

บทที่ 3

ผลการทดลอง

ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่

จากตารางที่ 4 แสดงการตกไข่ของกลุ่มทดลองแต่ละกลุ่ม โดยตัวเลขแสดงจำนวนหนูที่มีการตกไข่ และจำนวนไข่จากการตกไข่แต่ละครั้ง กลุ่มควบคุมซึ่งได้รับน้ำมันมะกอกมีการตกไข่ตามปกติ คือ 12.31 $\pm$ 1.26 ฟอง ในกลุ่มนี้มีหนู 4 ตัวที่ไม่มีการตกไข่ เมื่อได้รับรับโทลูอีนเวลา 17.00 - 18.00 น. ของวัน diestrus-2 พบว่าหนูยังคงตกไข่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมคือ 12.47 $\pm$ 2.25 ฟอง และมีหนูที่ไม่มีการตกไข่ 1 ตัว ในขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนเวลา 13.00 - 13.30 น. ของวัน proestrus จะมีการตกไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.001$) คือมีการตกไข่ 9.06 $\pm$ 2.14 ฟอง โดยกลุ่มนี้จะมีหนูที่ไม่มีการตกไข่ 5 ตัว กลุ่มที่ได้รับ nembutal ทั้งหมด 10 ตัว เวลา 13.00 - 13.30 น. ของวัน proestrus มีจำนวน 9 ตัวที่ไม่มีการตกไข่ ยกเว้นเพียง 1 ตัวที่มีการตกไข่ได้ 1 ฟอง หลังจากที่ได้รับสารตามการทดลอง ไม่มีหนูตัวใดเสียชีวิต กลุ่มที่ฉด nembutal จะสลบไปประมาณ 3 - 5 ชั่วโมง หลังจากนั้นหนูจะฟื้นกลับมาปกติ

ผลของโทลูอีนต่อระดับอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

ตารางที่ 5 แสดงระดับฮอร์โมนอีสโตรเจนเวลา 11.00-11.30 น. ของวัน proestrus ซึ่งเป็นระยะที่มีระดับ อีสโตรเจนสูงที่สุดในวงอีสตรัส กลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกจะมีระดับ อีสโตรเจน 205.05 $\pm$ 60.17 เฟมโตโมล/มิลลิลิตร ส่วนกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนจะมีระดับอีสโตรเจนลดลงคือ 184.42 $\pm$ 81.93 เฟมโตโมล/มิลลิลิตร แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

ระดับโปรเจสเตอโรนเวลา 17.00 - 18.00 น.ของวัน proestrus ซึ่งเป็นระยะที่มีระดับฮอร์โมนโปรเจสเตอโรนสูงที่สุดในวงอีสตรัส แสดงให้เห็นในตารางที่ 5 คือเท่ากับ 173.80 ± 62.46 พิโคโมล/มิลลิลิตร แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<.001) โดยกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนมีระดับโปรเจสเตอโรน 83.00 ± 44.96 พิโคโมล/มิลลิลิตร

ผลของโทลูอีนต่อการฝังตัวของตัวอ่อน

1. ระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน(P1-6)

ตารางที่ 6 แสดงผลของโทลูอีนต่อการตั้งครรภ์เมื่อได้รับโทลูอีนในระยะวันที่ 1 - 6 ของการตั้งครรภ์ กลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกมีระยะเวลาตั้งท้อง 23 วัน เช่นเดียวกับกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนระหว่างตั้งครรภ์ในระยะนี้ พบว่าหนูทุกตัวไม่มีความผิดปกติหรือมีการตาย หนูบางตัวในกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนจะมีแผลจากการระคายเคืองของโทลูอีนที่ผิวหนัง กลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกมีการฝังตัวอ่อนจำนวน 13.15 ± 1.38 แห่ง การสูญสลายของตัวอ่อน 0.50 ± 0.40 แห่ง ซึ่งแสดงให้เห็นในรูปที่ 3 เมื่อลูกคลอดออกมาพบว่ามีจำนวน 11.40 ± 2.06 ตัว กลุ่มที่ได้รับโทลูอีนมีการฝังตัวของตัวอ่อนลดลงเล็กน้อยคือ 11.65 ± 1.42 แห่ง ความแตกต่างถึงแม้ว่าจะเล็กน้อยแต่มีนัยสำคัญทางสถิติ (P<.01) การสูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นเป็น 1.67 ± 0.79 แห่ง แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผลของโทลูอีนต่อการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนนี้แสดงให้เห็นในรูปที่ 4 ส่วนลูกที่เกิดมาหลังคลอดมีจำนวนลดลงเป็น 9.6 ± 2.95 ตัว ซึ่งเป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ(P<.05)

ตารางที่ 6 นี้ยังได้แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของลูกหนูกลุ่มต่างๆ พบว่าลูกที่เกิดมาในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกจะมีน้ำหนัก 5.37 ± 0.43 กรัม และเมื่อนำไปเลี้ยงต่ออีก 5 วัน ลูกหนูเหล่านี้จะมีน้ำหนักเพิ่มขึ้น 5.47 ± 1.73 กรัม กลุ่มที่ได้รับโทลูอีนในเวลาเดียวกัน จะพบว่าลูกที่เกิดมามีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย คือ 5.28 ± 0.33 กรัม เมื่อนำมาเลี้ยงต่ออีก 5 วัน พบว่าลูกหนูมี

น้ำหนักตัวเพิ่มขึ้น 4.79 ± 0.83 กรัม แต่ความแตกต่างของน้ำหนักแรกเกิด และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นเมื่ออายุ 5 วันของลูกไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

2. ระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน(P6-12)

ตารางที่ 6 แสดงผลของโทลูอีนต่อการตั้งครรภ์เมื่อได้รับโทลูอีนในระยะวันที่ 6 - 12 ของการตั้งครรภ์ทั้ง 2 กลุ่มมีระยะเวลาการตั้งครรภ์เท่ากันคือ 23 วัน กลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกมีการฝังตัวของตัวอ่อน 12.80 ± 1.24 แห่ง ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนคือ 12.35 ± 1.46 แห่ง การสูญสลายของตัวอ่อนในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกมีจำนวน 1.00 + 0.00 แห่ง รูปที่ 5 แสดงการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนเมื่อได้รับน้ำมันมะกอกในระยะนี้ ส่วนกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนจะมีการสูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นเป็น 3.53 ± 2.68 แห่ง เป็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.01$) ผลของโทลูอีนต่อการฝังตัวและการสูญสลายของตัวอ่อนในกลุ่มนี้แสดงให้เห็นในรูปที่ 6 จำนวนลูกที่เกิดมาจากกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนมีจำนวนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือมีจำนวน 7.60 ± 2.95 ตัว ในขณะที่กลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกมีลูกจำนวน 11.35 ± 1.95 ตัว ($P<.001$)

ตารางที่ 6 ยังได้แสดงการเปรียบเทียบน้ำหนักของลูกหนู ในกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกหรือโทลูอีนในวันที่ 6 - 12 ของการตั้งครรภ์ พบว่าลูกที่เกิดมาจากกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกมีน้ำหนักตัว 5.51 ± 0.58 กรัม น้ำหนักเมื่ออายุ 5 วัน เพิ่มขึ้น 5.47 ± 0.95 กรัม ส่วนลูกที่เกิดจากแม่ในกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนช่วงเวลาเดียวกันมีน้ำหนักตัว 5.08 ± 0.44 กรัม ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.05$) ส่วนน้ำหนักตัวของลูกเมื่ออายุ 5 วันในกลุ่มนี้เพิ่มขึ้นน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำมันมะกอกคือ 4.44 ± 1.34 กรัม แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ

I16732923

ผลของโทลูอีนต่อโครงสร้างของตัวอ่อน

ลูกที่เกิดจากแม่หนูซึ่งได้รับโทลูอีนในระยะก่อนการฝังตัวและระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อนนี้ ไม่พบความผิดปกติภายนอกที่แสดงให้เห็น

รูปที่ 7 และ 9 แสดงโครงสร้างกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งของลูกหนูแรกเกิดในกลุ่มที่แม่หนูได้รับน้ำมันมะกอกในวันที่ 1 - 6 และ 6 - 12 ของการตั้งครรภ์ ตามลำดับ ไม่พบความผิดปกติของโครงกระดูก รูปที่ 8 และ 10 แสดงโครงสร้างของกระดูกอ่อน และกระดูกแข็ง ของลูกหนูแรกเกิดในกลุ่มที่แม่หนูได้รับโทลูอีนในวันที่ 1 - 6 และ 6 - 12 ของการตั้งท้องตามลำดับ ไม่พบว่าหนูทั้งสองกลุ่มมีความผิดปกติใดๆ แต่ละกลุ่มมีกระดูกซี่โครงคู่ที่ 13 ปกติ และไม่มีกระดูกซี่โครงคู่ที่ 14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่

การทดลอง	จำนวนหนูที่ตกไข่/ จำนวนหนูทดลอง(ตัว)	จำนวนไข่ (ฟอง) (x ± SD)
control	16 / 20	12.31 ± 1.26
toluene proestrus	15 / 20	*** 9.06 ± 2.14
toluene diestrus-2	19 / 20	12.47 ± 2.25
nembutal	1 / 10	*** 1.00 ± 0.00

หมายเหตุ : * = P < .05, ** = P < .01, *** = P < .001

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 5 แสดงผลของโทลูอีนต่อระดับอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

การทดลอง	ปริมาณ E_2 (เฟมโตโมล/มล.)	ปริมาณ P (พิโคโมล/มล.)
control	205.05 ± 60.17	173.80 ± 62.46
toluene diestrus-2	184.42 ± 81.93	*** 83.00 ± 44.96

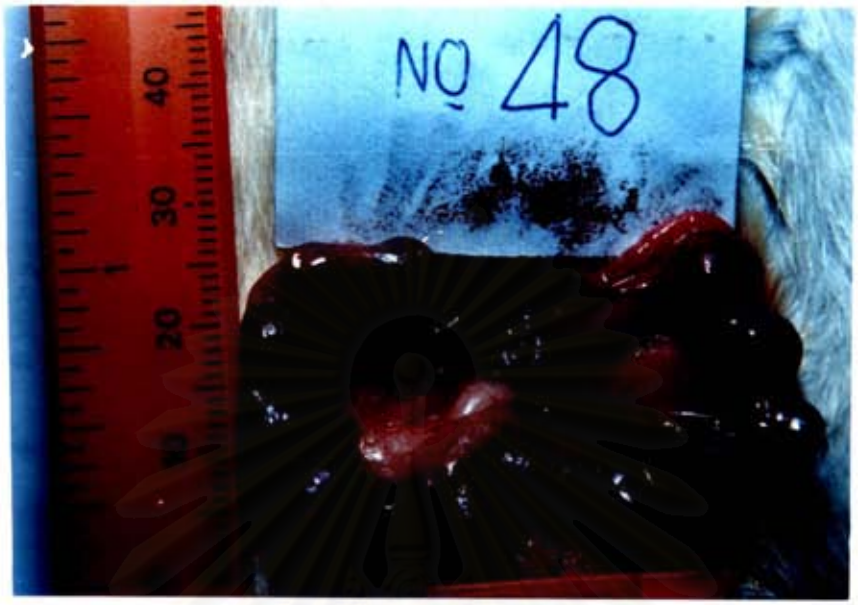
หมายเหตุ : * = $P < .05$, ** = $P < .01$, *** = $P < .001$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

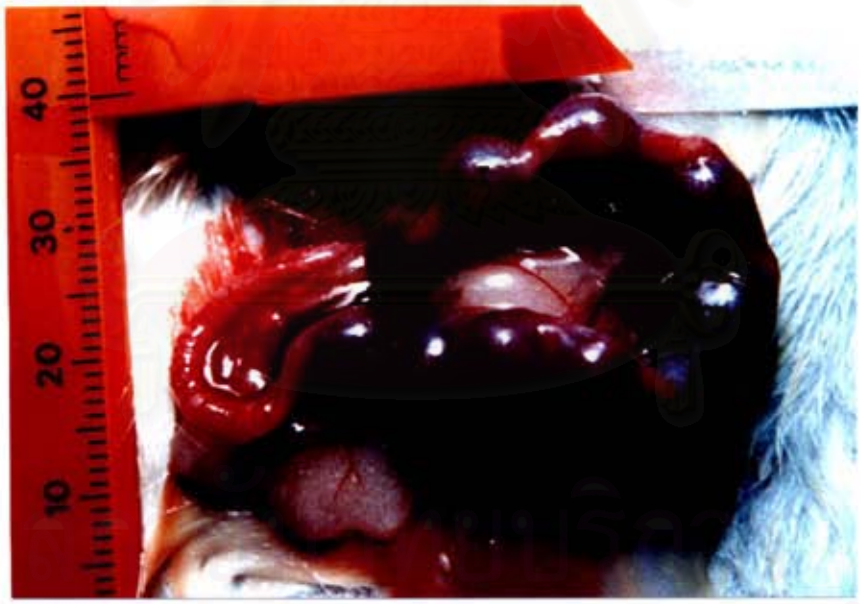
ตารางที่ 6 แสดงผลของโทลูอีนต่อการฝังตัว การสูญสลาย และการเจริญเติบโตของตัวอ่อน

การทดลอง	จำนวนการฝังตัวที่ P13 (แห่ง)	จำนวนการสูญสลายที่ P13 (แห่ง)	จำนวนลูกที่คลอด (ตัว)	น้ำหนักตัวแรกเกิด (กรัม)	น้ำหนักตัวเพิ่มเมื่ออายุ 5วัน (กรัม)
control P1-6	13.15±1.38	1.50±0.40	11.45±2.06	5.37±1.73	5.47±1.73
toluene P1-6	** 11.65±1.42	1.67±0.79	* 9.6±2.95	5.28±0.33	4.79±0.83
control P6-12	12.80±1.24	1.00±0.00	11.35±1.96	5.51±0.58	5.47±0.95
toluene P6-12	12.35±1.46	*** 3.53±2.68	*** 7.6±0.95	* 5.08±0.44	4.44±1.34

หมายเหตุ : * = P < .05, ** = P < .01, *** = P < .001



รูปที่ 3 แสดงการฝังตัว และ การสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับน้ำมันมะกอก ในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (P1-6)



รูปที่ 4 แสดงการฝังตัว และ การสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับโทลูอีน ในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (P1-6)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย I = implantation site

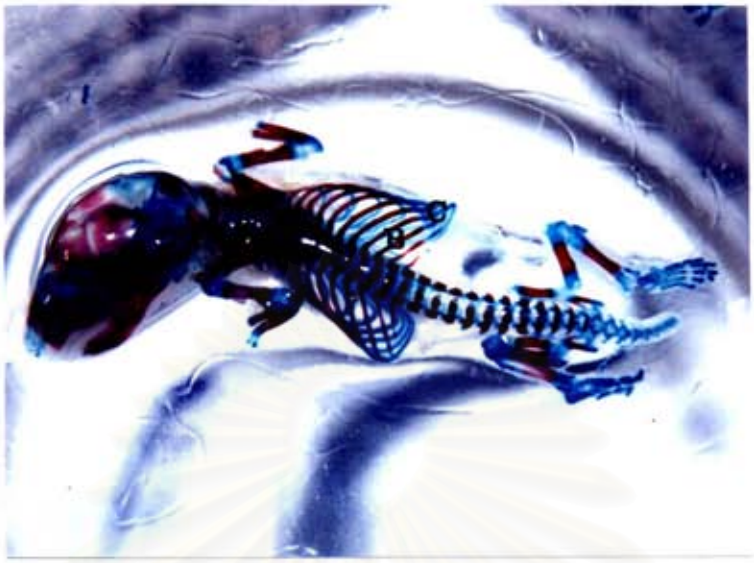
R = resorption site

รูปที่ 5 แสดงการฝังตัว และ การสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับน้ำมันมะกอก ในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน (P6-12)

รูปที่ 6 แสดงการฝังตัว และ การสูญสลายของตัวอ่อนหลังได้รับโทลูอีน ในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน (P6-12)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย I = implantation site

R = resorption site



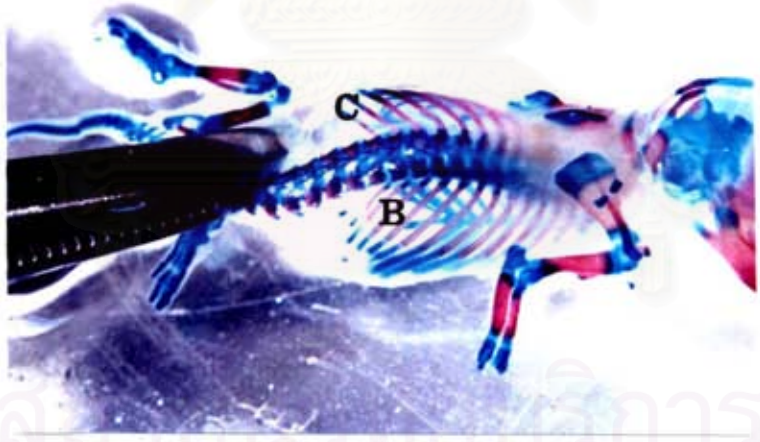
รูปที่ 7 แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับน้ำมันมะกอกในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (P1-6)

รูปที่ 8 แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับโทลูอีนในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (P1-6)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย B = bone

C = cartilage

รูปที่ 9 แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับน้ำมันมะกอกในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน (P6-12)



รูปที่ 10 แสดงลักษณะของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งในร่างกายของลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูที่ได้รับโทลูอีนในระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน (P6-12)

หมายเหตุ: เครื่องหมาย B = bone

C = cartilage

บทที่ 4

สรุปและวิจารณ์ผลการทดลอง

ผลของโทลูอีนต่อการตกไข่

การศึกษาครั้งนี้พบว่าโทลูอีนมีผลต่อการตกไข่ของหนูแรท โดยเมื่อให้ในขนาด 1.2 กรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัวทางชั้นไขมันใต้ผิวหนังซึ่งเป็นขนาดที่จะทำให้มีปริมาณโทลูอีนในกระแสเลือดสูงสุดได้นาน 24 ชั่วโมง (Benignus, et al., 1982; Da-Silva et al., 1990) จะทำให้มีการตกไข่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.001$) เมื่อให้โทลูอีนในระยะ proestrus และสามารถยับยั้งการตกไข่ได้ 5 ใน 20 ตัว แต่เมื่อให้ในระยะ diestrus-2 จะไม่เปลี่ยนแปลงการตกไข่ ผลการศึกษานี้แสดงว่าโทลูอีนไปขัดขวางการตกไข่หรือไปเปลี่ยนแปลงขบวนการที่เกี่ยวข้องกับการตกไข่ สำหรับผลของโทลูอีนต่อการตกไข่นี้ ยังไม่มีรายงานมาก่อน และเนื่องจากคุณสมบัติที่ละลายในไขมันได้ดี มีโมเลกุลเล็ก ทำให้สามารถผ่านเข้าสู่สมองและไปสะสมในส่วนต่าง ๆ ของสมอง รวมทั้งบริเวณที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ได้แก่ ไฮโปทาลามัส (Kiriu et al., 1990) ทำให้เชื่อว่าโทลูอีนอาจเป็นสาเหตุให้เกิดความเปลี่ยนแปลงในระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์

สำหรับขบวนการตกไข่นี้จะแตกต่างกันไปตามสายพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตชนิดนั้นๆ เช่น กระต่าย แมว จะมีการตกไข่เมื่อมีการผสมพันธุ์หรือมีการกระตุ้นที่ปากมดลูก ส่วนสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ส่วนใหญ่จะต้องอาศัยฮอร์โมนหลายชนิดที่มีการเปลี่ยนแปลงเป็นวงจรมาเกี่ยวข้อง (Thomas, 1991) ในหนูแรทก็เช่นเดียวกันคือจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเป็นวงจรที่เรียกว่าวงอีสตรัส โดยในช่วงก่อนการตกไข่นี้จะต้องมีการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนที่สำคัญ เพื่อชักนำให้เกิดการตกไข่ โดยที่มีอีสโตรเจนระดับสูงชักนำให้มีการหลั่ง LH ในปริมาณสูง (estrogen-induced gonadotrophin surge) (Johnson and Everitt, 1988) สำหรับระยะ proestrus นี้เป็นระยะหนึ่งในวงอีสตรัส ที่มีการเพิ่มระดับ

luteinizing hormone (LH) (Johnson and Everitt, 1988) ซึ่งมีความสำคัญต่อการตกไข่ การที่โทลูอีนขัดขวางการตกไข่ของหนูแรท 5 ใน 20 ตัว และลดจำนวนไข่ในการตกไข่ของหนูที่เหลือในการทดลองครั้งนี้ อาจมีสาเหตุจากฤทธิ์ของโทลูอีนต่อระดับ LH ในระยะนี้ โดยทำให้มีการสร้าง หรือการหลั่ง LH ลดลงได้มีผู้ศึกษาผลของโทลูอีนต่อระดับ LH ในหนูแรท พบว่าโทลูอีนมีฤทธิ์ลดการหลั่ง LH (Andersson et al., 1980) การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการทดลองเปรียบเทียบกับ nembutal ซึ่งเป็นยาที่ออกฤทธิ์กดประสาทส่วนกลาง และเป็นที่ทราบกันโดยทั่วไปว่าสามารถลดระดับ LH ในระยะ proestrus (Mattheiji et al., 1992) พบว่าเมื่อให้ nembutal ในระยะ proestrus แล้วสามารถขัดขวางการตกไข่ได้ 9 ใน 10 ตัว และตัวที่สามารถตกไข่ได้มีการตกไข่เพียง 1 ฟอง ดังแสดงในตารางที่ 4 เป็นข้อมูลยืนยันว่าโทลูอีนอาจยับยั้งการตกไข่ได้โดยลดระดับ LH ซึ่งหลังจากต่อมใต้สมองภายใต้การควบคุม gonadotrophin releasing hormone (GnRH) จากไฮโปทาลามัสซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของโทลูอีนนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาที่พบว่ามีการสะสมของโทลูอีนในไฮโปทาลามัส แสดงให้เห็นว่าโทลูอีนอาจทำให้การผลิตหรือการหลั่ง GnRH จากไฮโปทาลามัสลดลง ส่งผลให้ระดับ LH ลดลงตามมา บริเวณที่เกี่ยวข้องกับการหลั่ง GnRH ในไฮโปทาลามัสได้แก่ supraoptic nucleus, paraventricular hypothalamic nucleus, suprachiasmatic nucleus, arcuate nucleus และventromedial nucleus (Johnson and Everitt,1988)

การที่โทลูอีนไม่สามารถยับยั้งการตกไข่ได้ทั้งหมดเหมือนกับที่ได้รับ nembutal นั้น อาจอธิบายได้ว่าโทลูอีนทำให้มีการลดระดับ luteinizing hormone เพียงบางส่วนเท่านั้น การทดลองหาระดับฮอร์โมนนี้จะทำให้เราทราบถึงผลของโทลูอีนได้แน่นอนขึ้น อย่างไรก็ตามการตกไข่นี้ อาจเปลี่ยนแปลงได้จากสาเหตุอื่น ๆ ในการทดลองนี้ได้ให้โทลูอีนทาง subcutaneous injection ซึ่งอาจทำให้หนูเกิดความเครียด (stress) จากความเจ็บปวดและความระคายเคืองของสารนี้ส่งผลให้มีการตกไข่ลดลง ในการทดลองครั้งนี้พบว่าหนูในกลุ่มทดลองบางตัวสามารถตกไข่ได้ตามปกติ ในขณะที่หนูบางตัวในกลุ่มควบคุมซึ่งฉีดน้ำมันมะกอก

ไม่มีการตกไข่ การศึกษาเพิ่มเติมโดยให้โทลูอีนขนาดสูงขึ้นหรือให้โทลูอีนโดยวิธีอื่นที่ไม่ทำให้หนูได้รับความเจ็บปวดจะทำให้เราทราบผลที่แน่ชัดของโทลูอีนต่อการตกไข่

ผลของโทลูอีนต่อระดับอีสโตรเจนและโปรเจสเตอโรน

จากการศึกษาผลของโทลูอีนต่อระดับ อีสโตรเจนและ โปรเจสเตอโรนในวัน proestrus ในครั้งนี้พบว่าโทลูอีนทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าโทลูอีนทำให้การผลิตหรือการหลั่งโปรเจสเตอโรนจากรังไข่ในระยะ proestrus ลดลง โดยไม่เปลี่ยนแปลงระดับอีสโตรเจนซึ่งฮอร์โมนสองชนิดนี้มีความสำคัญต่อขบวนการต่าง ๆ ในระบบสืบพันธุ์ เนื่องจากความสมดุลย์ของฮอร์โมนเพศระหว่างรอบประจำเดือนจะมีผลกระทบต่อท่อนำไข่ มดลูก ปากช่องคลอด รวมทั้งการเปลี่ยนแปลงสรีระวิทยาอื่น ๆ (Johnson and Everitt, 1988) พบว่าสารเคมีในกลุ่ม hydrocarbon หลายชนิดทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศได้ มีการศึกษาพบว่าโทลูอีนทำให้เกิดความผิดปกติหรือความเบี่ยงเบนในระบบสืบพันธุ์โดยทำให้เกิดความผิดปกติของรอบเดือน และการแท้ง (Ng, Foo and Young, 1992) สาเหตุของความผิดปกติเหล่านี้อาจเกิดจากความบกพร่องของฮอร์โมนเพศแต่ที่ผ่านมาไม่มีการศึกษาถึงผลของโทลูอีนต่อฮอร์โมนเหล่านี้ มีบางรายงานพบว่า โทลูอีนทำให้เกิดความผิดปกติของส่วนที่เกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเพศ เช่น การลดระดับ LH ในหนูแรกที่ได้รับโทลูอีน (Andersson et al., 1988) การทำลายระบบประสาทส่วนปลายที่รังไข่ซึ่งจะรบกวนการหลั่งฮอร์โมนเพศของรังไข่ (Ungvary and Donath, 1984)

ในระบบสืบพันธุ์เพศหญิงฮอร์โมนเพศจะถูกหลั่งจากรังไข่ โดยกลไกที่ซับซ้อน ภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนจากต่อมใต้สมองคือ gonadotrophin ได้แก่ FSH และ LH และฮอร์โมนจากไฮโปทาลามัส ได้แก่ GnRH ให้มีการเปลี่ยนแปลงเป็นวงจร การควบคุมการหลั่ง gonadotrophin จากต่อมใต้สมองขณะอยู่ในวงอีสตรัสมาจากฮอร์โมนเพศซึ่งหลั่งจากรังไข่ที่เรียกว่า กลไกย้อนกลับ (Feedback regulation) (Johnson and Everitt, 1988) เพื่อให้ได้

ระดับฮอร์โมนที่เป็นปกติ ซึ่งจะทำให้ระบบสืบพันธุ์ดำเนินต่อไปได้ ขบวนการนี้จะมีกลไกที่ระดับเซลทั้งในระบบประสาทส่วนกลางและต่อมใต้สมอง ซึ่งบางกลไกยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาในปัจจุบันทำให้เราทราบว่า อีสโตรเจน และโปรเจสเตอโรน ไม่ได้ไปมีผลโดยตรงที่ GnRH neurons แต่จะทำงานโดยผ่านระบบอื่น ๆ ก่อน เราพบว่ามีสารสื่อประสาท (neurotransmitter) หลายชนิดเกี่ยวข้องกับ GnRH neurone ภายใน arcuate nucleus จะมีกลุ่มเซลประสาทที่เรียกว่า tuberoinfundibular dopaminergic neurons อยู่ชิดใกล้กับปลายประสาท GnRH เมื่อได้รับ dopamine agonist จะทำให้ GnRH ลดลง กลไกของความสัมพันธ์เหล่านี้ยังไม่ทราบแน่ชัด นอกจากนี้ยังมีสารสื่อประสาทอีกหลายชนิดที่อยู่ในตำแหน่งใกล้กับ GnRH neurons ซึ่งสารสื่อประสาทเหล่านี้อาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ GnRH neurons ได้ และเมื่อมีสิ่งใดมาทำให้สารสื่อประสาทเหล่านี้เปลี่ยนแปลงไปก็ย่อมเกิดผลกระทบต่อ GnRH neurons รวมทั้งใน hypothalamopituitary gonadal axis การศึกษาที่ผ่านมา พบว่าโทลูอีนทำให้เกิดความเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทเหล่านี้ และอาจเป็นสาเหตุให้เกิดการเปลี่ยนแปลงฮอร์โมนเพศ เนื่องจากโทลูอีนทำให้มีการเพิ่ม catecholamine ในไฮโปทาลามัส ปลายประสาทของ noradrenaline จะไป facilitate ให้มีการหลั่งฮอร์โมนโปรแลคตินเพิ่มขึ้น (Andersson et al, 1983) นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลง catecholamine turnover จะไปเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของตัวรับ (receptor) (Von-Euler et al, 1988) โดยเฉพาะตัวรับของโดปามีนนี้จะถูกเร้าให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เมื่อได้รับโทลูอีน (Von-Euler et al.,1991) ทำให้มีการลดระดับ dopamine receptor affinity เป็นสาเหตุให้ลดการขัดขวางการหลั่งฮอร์โมนโปรแลกตินโดยโดปามีนจาก tuberoinfundibular dopaminergic neurons (TIDA) ภาวะของ hyperprolactinemia นี้จะทำให้มีการหลั่ง luteinizing hormone ลดลง เกิด amenorrhea และขัดขวางการตกไข่ได้ (lofstrom et al, 1976) สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ที่พบว่าโทลูอีนสามารถลดการตกไข่ได้ การบกวนการสร้าง และการหลั่ง gonadotrophin จากต่อมใต้สมองนี้ย่อมมีผลกระทบต่อฮอร์โมนเพศ สอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้คือ โทลูอีน

ทำให้ระดับโปรเจสเตอโรนลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากโทลูอีนจะได้รับการยืนยันว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารสื่อประสาทในระดับสมองดังกล่าวมาแล้ว มีบางรายงานพบว่าโทลูอีนมีผลต่อ ระบบประสาทส่วนปลายซึ่งอยู่ในอวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย พบว่าโทลูอีนขนาด 1500 มิลลิกรัม/กิโลกรัมน้ำหนักตัว จะทำลายเส้นประสาทส่วนปลายของรังไข่และมดลูก ทำให้มีผลกระทบต่อเส้นเลือดที่มาหล่อเลี้ยงและการสร้างฮอร์โมนของรังไข่ รวมทั้งอาจเป็นสาเหตุให้เกิดความผิดปกติของลูกในท้อง (Ungvary and Donath, 1984) การศึกษาในหลอดทดลองจะช่วยให้เข้าใจถึงกลไกของโทลูอีนต่อฮอร์โมนเพศมากขึ้น อย่างไรก็ตาม การศึกษาของ stepanov และคณะ (1990) พบว่าการทำงานของรังไข่ในการหลั่งฮอร์โมนเพศขณะได้รับโทลูอีนยังคงปกติได้ เมื่อได้รับการกระตุ้น แสดงให้เห็นว่าสาเหตุที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮอร์โมนเพศนี้มาจากการที่สารโทลูอีนไปรบกวน hypothalamo hypophyseal link ของระบบสืบพันธุ์

<u>ผลของโทลูอีนต่อการตั้งครรภ์ในหนูแรท</u>

จากตารางที่ 6 แสดงให้เห็นว่า โทลูอีนทำให้เกิดความผิดปกติในการตั้งครรภ์โดยขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับโทลูอีน เมื่อได้รับโทลูอีนในระยะแรกของการตั้งครรภ์ (P1-6) จะทำให้การฝังตัวของตัวอ่อนลดลง เมื่อได้รับโทลูอีนในระยะที่สอง (P6-12) ของการตั้งครรภ์จะไม่เปลี่ยนแปลงการฝังตัวของตัวอ่อน แต่จะทำให้มีการสูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น ทั้งสองกลุ่มให้ผลเหมือนกันคือทำให้ลูกที่เกิดมามีจำนวนน้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<.05$, .001 ตามลำดับ)

การที่หนูมีการฝังตัวของตัวอ่อนลดลงเมื่อได้รับโทลูอีนในช่วงวันที่ 1-6 ของการตั้งครรภ์ แสดงให้เห็นว่าเกิดความผิดปกติของปัจจัยต่าง ๆ ที่มีความจำเป็นต่อการฝังตัวของตัวอ่อน ปัจจัยที่สำคัญได้แก่ฮอร์โมนเพศ เนื่องจากเยื่อบุมดลูกจะยอมรับการฝังตัวของตัวอ่อนได้จะต้องอาศัยฮอร์โมนเพศที่เหมาะสม โดยมีการเพิ่มระดับโปรเจสเตอโรนและมีอีสโตรเจนในระดับสูง (estrogen search) ก่อนการฝังตัวของตัวอ่อน (Dickmann, 1972) ความผิดปกติของฮอร์โมนเพศเหล่านี้จะทำให้ตัวอ่อนไม่สามารถฝังตัวในเยื่อบุมดลูกดังผลการทดลองในตารางที่ 7 และ

เมื่อได้รับโทลูอีนในวันที่ 6-12 ของการตั้งท้อง พบว่าทำให้เกิดการสูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ สอดคล้องกับการศึกษาของ Ungvary และ Tatrai ในปี 1985 สำหรับในระยะนี้ฮอร์โมนที่สำคัญต่อการตั้งครรภ์คือ โปรเจสเตอโรน ภาวะบกพร่องของโปรเจสเตอโรน จะเป็นสาเหตุให้เกิดการสูญสลายของตัวอ่อนได้ นอกจากภาวะบกพร่องของฮอร์โมนเพศแล้วโทลูอีนยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของ noradrenergic neurons ที่อยู่บริเวณเยื่อบุมดลูก ซึ่งโดยปกติหนูจะเป็นสัตว์ประเภทเดียวที่มี noradrenergic neurons เพิ่มขึ้นเมื่อมีการตั้งครรภ์ (Ungvary and Donath, 1984) การที่โทลูอีนทำให้ noradrenergic neurons บริเวณเยื่อบุมดลูกถูกทำลาย จะไปรบกวนการไหลเวียนของเลือดที่ไปเลี้ยงมดลูก รวมทั้งการหลั่งฮอร์โมนจากรังไข่ ดังนั้นตัวอ่อนจึงไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปและเกิดการสูญสลายของตัวอ่อนตามมา

โทลูอีนสามารถผ่านจากมารดาเข้าสู่ทารกในครรภ์ได้ โดยผ่านทางรก (Hudak and Ungvary, 1978; Ghantous and Danielssen, 1986; Goodwin, 1988) ทำให้สามารถออกฤทธิ์ต่อทารกในครรภ์ได้โดยตรงพบว่าโทลูอีนจะไปสะสมในตับของตัวอ่อนมากที่สุด (Ghantous and Danielsson, 1986) โดยทั่วไปแล้วอันตรายต่อตัวอ่อนที่พบได้บ่อยเมื่อมีสิ่งอื่นมารบกวนคือ การเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตัว และโครงสร้างของร่างกาย ได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ของโทลูอีนต่อทารกในครรภ์ของมนุษย์โดยศึกษาในเด็กแรกเกิด 21 คนที่เกิดจากมารดาซึ่งได้รับโทลูอีนในขณะตั้งครรภ์ พบว่าทำให้เกิดการคลอดก่อนกำหนดการตายหลังคลอดและการเติบโตช้ากว่าปกติ (Wilkins-Haug and Gabow, 1991)ทำให้ลูกมีน้ำหนักน้อย (Hersh et al, 1985; Goodwin, 1988; Arnold, et al, 1994) การศึกษาในสัตว์ทดลองก็ให้ผลเช่นเดียวกับในมนุษย์ (Nawrot and Staples, 1979; Da-Silva et al, 1990) การศึกษาครั้งนี้พบว่า เมื่อให้โทลูอีนในระยะแรกของการตั้งครรภ์ (P1-6) ไม่ทำให้ลูกมีน้ำหนักน้อย แต่เมื่อให้โทลูอีนในระยะที่สองของการตั้งครรภ์ (P6-12) ทำให้ลูกที่เกิดมามีน้ำหนักน้อยกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการทดลองของ Nawrot และ Staples ในปี 1979 อย่างไรก็ตามมีบางรายงานพบว่าเมื่อได้รับโทลูอีนในวันที่ 1-8 ของ

การตั้งครรภ์จะทำให้ลูกมีน้ำหนักน้อย (Hudak and Ungvary, 1978) ซึ่งผลการทดลองแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้ โดยปกติการเกิดอันตรายต่อตัวอ่อนในการตั้งครรภ์ระยะแรก จะเกิดผลต่อความผิดปกติของโครงสร้างของร่างกาย เนื่องจากระยะแรกของการตั้งครรภ์เป็นช่วงที่มีการเจริญ และพัฒนาโครงสร้างของร่างกาย โดยที่กล้ามเนื้อหรือเซลล์ใหม่ ๆ จะถูกสร้างขึ้นเมื่ออายุครรภ์มากขึ้นและจะถูกสร้างมากที่สุดในช่วงสุดท้ายของการตั้งครรภ์ (Dobbing, 1985) ซึ่งสนับสนุนการศึกษาครั้งนี้คือ โทลูอีนทำให้น้ำหนักตัวของลูกลดลงในกลุ่มที่ได้รับโทลูอีนในช่วงที่สองของการตั้งครรภ์ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตของตัวอ่อนแต่ไม่เปลี่ยนแปลงการเติบโตของตัวอ่อน เมื่อให้ในระยะแรกของการตั้งครรภ์ ซึ่งเป็นช่วงที่มีการเติบโตของตัวอ่อนน้อยมาก แต่การศึกษาครั้งนี้ไม่ได้มีการศึกษาผลของโทลูอีนในระยะสุดท้ายของการตั้งครรภ์ของหนูแรทซึ่งจะทำให้เราทราบฤทธิ์ของโทลูอีนต่อตัวอ่อนมากขึ้น

กลไกที่ทำให้โทลูอีนมีผลต่อการเติบโตของตัวอ่อนยังไม่ทราบแน่ชัดสาเหตุที่เป็นไปได้ คือ โทลูอีนซึ่งสามารถออกฤทธิ์ต่อระบบหัวใจ และหลอดเลือดจะไปลดการไหลเวียนของเลือดในรก หรือเกิดจากการเปลี่ยนแปลงของโทลูอีนภายในร่างกายโดยที่โทลูอีนจะสลายตัวไปจับกับ glycene แทนที่จะถูกขับออกจากร่างกาย ทำให้มีกรดอะมิโนไม่เพียงพอที่จะสังเคราะห์โปรตีน (Hudak and Ungvary, 1978) ซึ่งเป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างเสริมโครงสร้างของร่างกาย

ผลของโทลูอีนต่อโครงสร้างของร่างกาย

การศึกษาครั้งนี้ได้ติดตามผลของโทลูอีนต่อความเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของตัวอ่อน ผลการศึกษาพบว่าลูกหนูที่เกิดจากแม่หนูซึ่งได้รับโทลูอีนทั้ง ในระยะแรกและระยะที่ 2 ของการตั้งครรภ์ไม่มีความผิดปกติภายนอกใด ๆ และเมื่อย้อมกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งเพื่อดูความผิดปกติซึ่ง Yasusa และ Maeda ได้เสนอไว้ว่าปรากฏการณ์ที่มีกระดูกซี่โครงคู่ที่ 14 อาจเป็นตัวแสดง (indicator) ที่ดีของการเกิด teratogenicity ในหนูแรทและหนูไมซ์ (Yasuda and Maeda,

1973) ผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาในหลอดทดลอง (in vitro) ของ Brow-Woodman และคณะในปี 1991 คือไม่ทำให้เกิดความผิดปกติของโครงสร้างแต่ทำให้มีการเติบโตช้า ในขณะที่มีบางรายงานพบว่าหนูที่ได้รับโทลูอีนขนาด 100 - 1000 ppm ในขณะตั้งครรภ์จะทำให้ลูกที่เกิดมามีกระดูกซี่โครงคู่ที่ 14 (Shigeta, Aikawa and Misawa, 1982) แต่การศึกษาของ Shigeta และคณะได้ให้โทลูอีนโดยการสูดดมซึ่งอาจทำให้เกิดภาวะ stress ต่อมารดาและไปเพิ่มฤทธิ์ของโทลูอีน (Kimmel and Willson, 1973) ดังนั้นเราอาจทำการทดลองเพื่อทราบผลของโทลูอีนที่แน่ชัดโดยการเพิ่มปริมาณของโทลูอีนขึ้น แต่ก็มีข้อจำกัดคืออาจเป็นอันตรายต่อมารดาได้

โทลูอีนมีน้ำหนักโมเลกุลน้อยกว่า 1000 ทำให้สามารถผ่านรกเข้าสู่ลูกหนูในครรภ์ได้ และมีผลต่อตัวอ่อนโดยตรง ซึ่งกลไกที่ทำให้เกิดความผิดปกตินี้ยังไม่ทราบแน่ชัด การศึกษาผลของโทลูอีนต่อการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ พบว่าโทลูอีนทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลง permeability ของผนังเซลล์ ทำให้สารโมเลกุลใหญ่ผ่านเข้าเซลล์ได้ (Yelian and Dukelow, 1992) และเกิดอันตรายต่อเซลนั้น ด้วยสาเหตุนี้ทำให้โทลูอีนเป็นอันตรายต่อตัวอ่อนโดยอาจไปขัดขวาง metabolism ของ oocyte และ DNA replication มีบางราบงานพบความเปลี่ยนแปลงของโครโมโซม จากคุณสมบัตินี้แสดงให้เห็นว่า โทลูอีนอาจทำให้เกิดความพิการของตัวอ่อนในครรภ์ได้ โดยเฉพาะในช่วงที่มีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายและมีบางรายงานที่แสดงถึงความพิการของร่างกาย เมื่อ ได้รับโทลูอีน ทั้งในมนุษย์และในสัตว์ทดลองดังที่กล่าวมาแล้ว อย่างไรก็ตาม การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติของกระดูกอ่อนและกระดูกแข็งรวมทั้งความผิดปกติของร่างกายภายนอก ซึ่งอาจเกิดจากได้รับโทลูอีนในปริมาณน้อยเกินไปหรือระยะเวลาสั้นเกินไป ดังนั้นการศึกษา ครั้งนี้จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าโทลูอีนไม่เป็นพิษต่อทารกในครรภ์ความผิดปกติของร่างกายภายนอก

<u>การศึกษาครั้งนี้พอจะสรุปได้ว่า</u>

1. โทลูอีนมีผลยับยั้งการตกไข่ได้บางส่วนโดยไปมีผลที่ระดับไฮโปทาลามัส

2. โทลูอีนมีผลต่อการตั้งครรภ์ทั้งในระยะก่อนการฝังตัวและระยะระหว่างการฝังตัวของตัวอ่อน โดยเมื่อได้รับโทลูอีนในระยะก่อนการฝังตัวของตัวอ่อนจะทำให้มีการฝังตัวของตัวอ่อนลดลง และเมื่อได้รับในระยะระหว่างการฝังตังของตัวอ่อนจะทำให้มีการสูญสลายของตัวอ่อนเพิ่มขึ้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, สำนักงาน. เอกสารเผยแพร่ปี 2530 เรื่องโทลูอีน. กรุงเทพมหานคร : คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2530.

ประมวล วีรุตมเสน. สรีรวิทยาการเจริญพันธุ์. กรุงเทพมหานคร :โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2532.

ศุลกากร, กรม. Foreign trade statistic. กรุงเทพมหานคร : กรมศุลกากร, 2527

สุนทร ศุภพงษ์. ผลกระทบของโทลูอีนต่อสุขภาพ. จุฬาลงกรณ์เวชสาร 33 (2532) : 4-10.

ภาษาอังกฤษ

Amdur, M.O, Doull, J., and Klaassen, C.D. Casarett & Doull's toxicology : the basic science of poisons 4th ed U.S.A. : Pergamon Press Office, Inc., 1991.

Andersson, K., Fuxe, K., Toftgard, R., Nilsen, O.G., Eneroth, P. and Gustafsson, J.A. Toluene-induced activation of certain hypothalamic and median eminence catecholamine nerve terminal systems of the male rat and its effects on anterior pituitary hormone secretion. Toxicoloty Letters 5 (1980) : 393 - 398.

_____. et al. Increased amine turnover in several hypothalamic noradrenaline nerve terminal systems and changes in prolactin secretion in the male rat by exposure to varions concentrations of toluene. Neuro. Toxicology 4 (1983) : 43 - 56.

Arito, H., Tsuruta, H., Nakagaki, K., and Tanaka, S. Partial insornnia, hyperactivity and hyperdipsea induced by repeated administration of toluene in rats : their relation to brain monoamine metabolism. toxicology 37 (1985) : 99 - 110.

Arnold, G.L., Kirby, R.S., Langendoerfer, S., and Wilkins-Haug, L.Toluene embryopathy : clinical delineation and developmental follow-up. Pediatrics 93 (1994) : 216 -220.

Axelson, O., Hane, M., and Hogstedt, D. A case reference study on neuropsychitric disorders among workers exposed to solvents. Scand. J. Work Environ. Health 2 (1976) : 14 - 20.

Benignus, V.A., Muller, K.E., Barton, C.N. and Bittikofer, J.A. Toluene blood level following subcutaneous injection of toluene in the rat. Environmental Research 33 (1984) : 441 - 453.

Brown-Woodman, P.D., Webster, W.S., Picker, K. and Hug, F. In vitro assessment of individual and interactive effects of aromatic hydrocarbons to embryonic development of the rat. Reprod.Toxicol. 8 (1991) : 121 - 135.

Canadian Environmental Protection Act. Priority substances list assessment report No. 4: toluene. Canada : Canada Communication Group-Publishing, 1992.

Cherry, N. Venables, H., Waldrom, H.A. British studies on the neuropsychological effects of solvent exposure. Scand. J. Work Environ. Health 10 (1984) : 10 - 12.

Cohr, K.H. and Stokholm, J. Toluene : a toxicologic review. Scand. J. Work Environ. Health 5 (1979) : 71 - 90.

Da Silva, V.A., Malheiros, L.R., Paumgartten, F.J.R., De Mato, S. Sa-Rego, M., Riul, T.R., and Golovattei, M.A.R. Developmental toxicity of in utero exposure to toluene in malnourished and well nourished rats. Toxicology 64 (1990) : 155 - 168.

Dickmann, Z. Implantation in the rat : progesterone priming requirements. J. Endocrinol. 53 (1972) : 327 - 328.

Dobbing, J. Maternal nutrition in pregnancy and later achievement of offspring : a personal interpretation. Eary Hum. Dev. 12 (1985):1.

Donald, J.M., Hooper, K., and Hopenhayn-Rich, C. Reproductive and developmental toxicity of toluene : a review. Environ. Health Perspet. 49 (1991) : 237 - 244.

Ellenhom, M.J., and Braceloux, D.G. Medical toxicology : diagnosis and treatment human poisoning. New York : Elsevier Science Publishing Company, Inc., 1988.

Elofsson, S.A., Gamberale, F., Hindmarsh, T., et al. Exposure to organic solvents cross-sectional epidermiologic investigation on occupationally exposed car and industral spray painters with special reference to the nervous system. Scand J.Work Environ.Health 6 (1980) : 239-273.

Fairhall, L.T. Industral toxicology. 2 nd ed. New York : Hafner Publishing Company, 1969.

Fishbein,L.an overview of environment and toxicological aspects of aromatic hydrocarbons. The Science of the Total Environment 42 (1985) : 267 - 288.

Fugita, K., Koga, Y., Takeyama, K., Koike, H., and Akai, J. A case of chronic toluene intoxication with atrophy of cerebrum, cerebellum and brainstem on CT and MRI. Rinsho. Shinkeigaku 32 (1992) : 421 - 425.

Ghantous, H., and Danielsson, B.R.G. Placental transfer and distribution to toluene, xylene and benzene, and their metabolites during gestation in mice. Biological Research in Pregnancy 7 (1986) : 98 - 105.

Ghantous, A.C. et al. Toluene exposure during maturation intraoccular brain tissue transplants: alteration of host and graft cerebellar perkinje neurone and function and senstivity to norepinephrine. Toxicol. Appl. Phramacol. 96 (1988) : 296 - 304.

Goodwin, T.M. Toluene abuse and renal tubular acidisis in pregnancy. Obstet.Gynecol. 71 (1988) :715 - 718.

Greenburg, L., Heimann, H., and Moskowitz, S. The effects of exposure to toluene in industry. J.A.M.A. 1189 (1942) : 753 - 579.

Hayden, J.W., Peterson, R.G., and Bruckner, J.V. Toxicology of toluene (methylbenzene) : review of current literature. Clinical Toxicology 11 (1977) : 549 - 599.

Heap, R.B., Perry, J.S., and Challis, J.R.G. Hormonal maintainance of pregnancy. In R.O. Ggreep and E.B. Astwood (ed.), Handbook ofphysiology. Endocrinology II, pp. 217 - 251 U.S.A.: Waverty Press, 1973.

Heinrichs, W.L. and Gibbons, W.E. Endocrinology of pregnancy. In S.A. Bordy, and K. Uelard (ed.), Endocrine disorder in pregnancy, pp.65 - 80. California : Applenten & Lange, 1989.

Hersh, J.H., Podruch, P.E., Roger, G. and Weisskopf, B. Toluene embryopathy. J.Pediatr. 106 (1985) : 922 - 927.

Holmberg, P.C. Central-nervous-system defects in children born to mothers exposed to organic solvents during pregnancy. Lancet 28 (1979) : 177 - 179.

Homma, T., Sudo, A., Miyagawa, M., Sato, M., and Hasegawa, H. Significant changes in the amounts of neurotransmitter and related substances in rat brain induced by subacute exposure to low levels of toluene and xylene. Industral Health 21 (1983) : 143 - 151.

Hsieh, G.C., Sharma, R.P., Parker, R.D., and Coulombe, R.A.Jr. Evaluation of toluene exposure via drinking water on levels of regional brain biogenic monoamines and their metabolites in CD-1 mice. Ecotoxicol. Environ. Safety 20 (1990) : 175 - 184.

_____., Sharma, R.P. and Parker, R.D. Subclinical effects of groundwater contaminants. IV. Effects of repeated oral exposure to combinations of benzene and toluene on regional brain monoamine metabolism in mice. Arch. Toxicol. 64 (1990) : 669 - 676.

Huang, X.Y. Influence on benzene and toluene to reproductive function of female workers in leathershoe-making industry. Chung-Hua-Yu-Fang-I-Hsueh-Tsa-Chih. 25 (1991) : 89 - 91.

Hudak, A., and Ungvary, G. Embryotoxic effects of benzene and its methyl derivatives: toluene, xylene. Toxicology 11 (1978) : 55 - 63.

Husman, K., and Kerli, P.Clinical neurological findings among car painters exposed to a mixture of organic solvents. Scand. J. Work Environ. Health 6 (1980) : 33 - 39.

Ikeda, M. Public health problems of organic solvents. Toxicol-Lett 64 - 65 (1992) : 191 - 201.

_____., M., and Tsukagoshi, H. Encephalopathy due to toluene sniffing : report of case with magenic resonance imaging. Eur. Neurol. 30 (1990): 347 - 349.

_____., Koizumi, A., Kasahara, M., and Fujita, H. Combined effects of n-hexane and toluene on norepinephrine and dopamine level in rat brain tissues after long term exposures. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36 (1986): 510 - 517.

Johnson, M., and Everitt, E. Essential reproduction 3rd ed. London : Blackwell Scientific Publications, 1988.

Kimmel, C.A., and Wilson, J.G. Skeletal deviation in rats : malformations or variations? Teratology 8: 309 - 316.

Kiriu, T., Ameno, K., Fuke, C., Ameno, S., and Ijiri, I. The distribution of toluene in the brain and its effects on the brain catecholamines in acute toluene poisoning. Nippon Hoigaku Zasshi 44 (1990) : 25 - 33.

Knox, J.W. and Nelson, J.R. Permanent encephalopathy from toluene inhalation. N.Engl. J. Med. 275 (1966) : 1494 - 1496.

Koike, K., et al. Prolactin stimulate [^{3}H] dopamine release from despersed rat tubero-infundibular dopaminergic neurons and dopamine decrease gonadotrophin releasing hormone release induced by calcium inophores, Acta. Endocrinologica 129 (1993) : 548 - 553.

Kyrklund, T., Kjellstrand, P., and Haglid, K. Brain lipid changes in rats exposed to xylene and toluene. Toxicology 45 (1987) : 123 - 133.

Lighman ,S.L.Neuroendocrinology. London : Butler & Tanner. 1988.

Lofstrom, A., Johnson, G.,Wiesel,F.A., and Fuxe, K. Microfluorimetric quantitation of catecholamine fluorescence in rats median eminence II.Turnover changes in hormonal states. J. Histochem Cytochem. 24 (1976) : 430 - 432.

Manson, J.M., and Kang, Y, J.Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology. In A.W. Hayes 3rd ed. Principle and methods of toxicology, pp.989-1038. New York : Raven Press Ltd.,1994.

Mattheiji, J.A., Swarts, J.J., Van-Het-Hot, K.H., Verburg, J., and Visser, J. The effect of decrease in body temperature with nembutal on meiosis and ovulation by gonadotrophin-releasing-hormone and lutinizing hormone in adult rats. J.Reprod. Fertil. 95 (1992): 775 - 782.

McDonald, C.J., Lavoie, J., Cote, R. and McDonald, A.D. Chemical exposures at work in early pregnancy and congenital defect: a case-referent study. British J. Ind. Med. 44 (1987) : 527 - 533.

Morck, H.I., Winkel, P., and Gyntelberg, F. Health effects of toluene exposure. Dan-Med-Bull 35 (1988) : 196 - 200.

Moses, R.E, and Richardson, C.C. Replication and repair DNA in cells of *Escherichia coli* treated with toluene. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A 67 (1970) : 674.

Mutti, A., Falzol, M., Romanelli A., Bocchi, M.C., Ferroni, C., and Franchini, I. Brain dopamine as target for solvent toxicity : effects of some monocyclic aromatic hydrocarbon. Toxicology 49 (1988) : 77-82.

Nawrot, P.S., and Staples, R.E. Embryofetal toxicity and teratogenicity of benzene and toluene in the mouse. teratology 49 (1979) : 41A.

Ng, T.P., Foo, S.C., and Yoong, T. Risk of spontaneous abortiion in workers exposed to toluene. British J. Ind. Med. 49 (1992) : 804 - 808.

Norback, C.T. Hazardous chemical on files. New York : Fack on file Publications, 1988.

Oettingen, W.F., Neal, P.A., and Donahue, D.D. The toxicity and potential dangers of toluene. J.A.M.A. 118 (1942): 579 - 584.

Pongvanin, N. Multifocal brain damage due to lacqure sniffing: the first case report of Thailand. J. Med. Assoc. Thai. 74 (1991) : 421 - 425.

Rea, T.M., Nash, J.F., Zabik, J.E., Born, G.S., and Kessler, W.V. Effects of toluene inhalation on brain biogenic amines in the rats. Toxicology. 31 (1984) : 143 - 150.

Rees,D.,Wood, R.w.,McCormick,J.P.,and Cox,C.Toxicokinetics of toluene in the rat. Seand J. Work Environ. Health. 11 (1985) : 301 - 306.

Sato, A. Toxicokinetics of benzene, toluene and xylenes. IARC. Sci. Publ.85 (1988) : 47 - 64.

Satron, R. and Dodson, V.N. Toluene habituation : report of a case. N. Engl. J. Med. 268 (1963) : 719 - 721.

Shigeta, S., Aikawa, H., and Misawa, T. Effects of maternal exposure to toluene during pregnancy on mouse embryos and fetuses. Tokai. J. Exp. Clin. Med. 7 (1982) : 265 - 270.

Smith, S.S., and Ojeda, S.R. Estradiol-induced LH release in juvenile female rats : nembutal blocks both the decline and the exposure of non-available pituitary LHRH recepter sites. Neuroendocrinology 41 (1985) : 246 - 251.

Stengard, K., Thams, R., O'Connor, W.T., Hoglund, G., and Ungerstedt, C. Acute toluene exposure increases extracerebellar GABA in the cerebellum of rat : a microdialysis study. Pharmacol. Toxicol. 73 (1993): 315 - 318.

Stepanov, M.G., Altukhov, V.V., Proimina, F.I., Savehenko, O.N., and Danilova, O.A. Physiologic mechanisms of the reaction of the reproductive system in female rats to chronic exposure to low dose toluene. Fiziol-Zh-USSR 76 (1990) : 1096 - 1102.

Streicher, H.A., Gabow, P.A., Moss, A.H., Kono, D., and Kaehny, W.D. Syndromes of toluene sniffing in adults. Ann. Int. Med. 94 (1981): 758 - 762.

Sufi, S.D., Donalson, A. and Jeftcoate, S.L., WHO matched reagent program method manual 14th. ed. London : WHO collaborating center of immunoassay, 1982.

Suzuki, T., Wakayama, Y., Tanaka, H. and Okayasu, H. A case of chronic toluene intoxication with abnormal MRI findings: abnormal intensity area in cerebral white matter, basal ganglia, internal capsule, brainstem and cerebellar preduncle. Rinsho. Shinkeigaku 32 (1992) : 84 - 87.

Tahler, S.M., Anderson, R.J., McCartney, R., Popvtzer, M.M., and Schrier,R.W. Renal tubular acidosis associated with toluene "Sniffing". N. Engl. J. Med. 290 (1974): 765.

Tahti, H., Ruuska, J., and Vapaatalo, H. Toluene toxicity studies on rats after one week inhalation exposure. Acta. Pharmacl.Toxical. 41 (1977) suppl. 4 : 78.

Takeishi, S., Yamada, T. and Shigata, I. cute toluene poisoning. Forensci.Sci. Int. 32 (1986) : 109 - 115.

Taskinen, H., Anttila, A., Lindbohm, M.L., Sallmen, M., and Hemminki, K. Spontaneous abortions and congenital malformations among the wives of men occupationally exposed to organic solvents. Scand. J. Work environ. Health 15 (1989) : 345 - 352.

Thomas A.J. Toxic responses of the reproductive system. In M.O. Amdur, J. Doull, and C.D. Klaassen. Casarett and Doull's toxicology : the basic science of poisons, pp. 484 - 520. U.S.A. : Pergamon Press Office, Inc., 1991.

Toutant, C., and Lippmann, S., Fetal solvent syndrome, Lancet. 23 (1979) : 80 - 83.

Ungrary, G., and Donath, T. Effect of benzene and its methylderivatives (toluene, para-xylene) on postganglionic noradrenergic nerves. Z. Mikrosk. Anat. Forseh. Leipzig. 98 (1984) : 755 - 763.

_____., and Tatrai, E. On the embryotoxic effects of benzene and its alkyl derivatives in mice, rats and rabbits. Arch. Toxicol. 8 (1985) : 425 - 430.

Vithaya Buaprasert. A study of chromosomal changes in shoes workers exposed to toluene and benzene in adhesive. Master's Thesis, Mahidol University, 1991.

Von-Euler, G. et al. Effects of acute haloperidol treatment on regional catechotamine levels and utilization in rats exposed to toluene. Acta. Physiol. Scand. 132 (1988) : 199 - 208.

_____., et al. Subacute exposure to low concentrations of toluene affects dopamine-mediated locomotor activity in the rat. Toxicology.67 (1991): 333 - 349.

_____., Fuxe, K., and Bondy, S.C. Ganglioside GM1 prevents and reverses toluene induced in membrane fluidity and calcium levels in rats. Brain Research 508 (1990) : 210 - 214.

Wells, T.A.G. The rat : a practical guide. New York : Dover Publications, 1964.

Wilkins-Haug, L., Gabow, P.A. Toluene abuse during pregnancy: obstetric complications and perinatal outcomes. Obstet. Gynecal. 77 (1991): 504 - 509.

World Health Organization. The international programme on chemical safety. Environmental Health Criterior 52 : toluene. WHO, 1985.

Yasuda, M., Maeda, H. Significance of the lumbar rib as an indicator in teratogenicity tests. Cong. Anom. 13 (1973) :25_29.

Yelian, F.D., and Dukelow, W.R. Cellular toxicity of toluene on mouse gamete cells and preimplantation embryo. Arch. Toxicol. 66 (1992) : 443 - 445.

Yen, S.S.C., and Jaffe, R.B. Reproductive endocrinology 3rd ed. U.S.A. : W.B. Saunders Company, 1991.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 7 แสดงจำนวนไข่ (ovum) ในแต่ละครั้งของการตกไข่ของหนูขาว กลุ่มต่าง ๆ การทดลองนี้

สัตว์ทดลอง	จำนวนไข่			
	olive oil	toluene (proestrus)	toluene (diestrus-2)	nembutal (proestus)
1	12	10	14	0
2	0	11	0	0
3	11	11	13	1
4	0	10	13	0
5	12	5	12	0
6	11	8	13	0
7	11	7	11	0
8	13	0	5	0
9	11	12	15	0
10	13	8	13	
11	11	6	13	
12	13	0	14	
13	14	12	12	
14	12	0	12	
15	13	8	9	
16	0	0	13	
17	0	11	15	
18	14	0	13	
19	11	7	15	
20	15	10	12	
พิสัย	0-15	0-12	0-15	0-1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 8 แสดงการฝังตัวของตัวอ่อนในการทดลองนี้

สัตว์ทดลอง	การฝังตัวของตัวอ่อน (แห่ง)			
	olive oil P1 - 6	toluene P1 - 6	olive oil P6 - 12	nembutal P6 - 12
1	14	12	13	13
2	14	13	16	14
3	14	13	13	12
4	12	11	13	14
5	12	12	13	15
6	14	12	12	12
7	14	12	14	11
8	14	12	10	12
9	13	12	14	13
10	15	8	11	13
11	13	11	13	11
12	15	13	14	12
13	14	12	12	11
14	10	11	13	9
15	11	12	12	12
16	15	13	13	12
17	13	14	13	11
18	12	10	12	13
19	12	9	12	15
20	12	11	13	12
พิสัย	10-15	8-13	10-16	9-15

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 9 แสดงการสูญสลายของตัวอ่อนในการทดลองนี้

สัตว์ทดลอง	การสูญสลายของตัวอ่อน (ตัว)			
	olive oil P1 - 6	toluene P1 - 6	olive oil P6 - 12	nembutal P6 - 12
1	1	3	0	3
2	0	0	0	3
3	1	1	0	1
4	0	2	0	4
5	0	2	1	8
6	0	1	0	1
7	0	1	0	2
8	0	3	0	1
9	0	1	0	4
10	2	0	0	6
11	0	3	1	4
12	0	1	0	2
13	0	1	1	1
14	0	0	1	12
15	1	0	0	5
16	1	2	1	3
17	0	0	1	3
18	0	1	0	2
19	0	1	0	2
20	0	2	1	0
พิสัย	0-2	0-3	0-1	0-12

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 10 แสดงพิสัยของจำนวนลูกที่เกิดจากแม่หนูกลุ่มต่าง ๆ ในการทดลองนี้

สัตว์ทดลอง	การทดลอง			
	olive oil P1 - 6	toluene P1 - 6	olive oil P6 - 12	nembutal P6 - 12
พิสัยของจำนวนลูก (ตัว)	7 - 15	3 - 13	8 -16	0 -11

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 11 แสดงพิสัยของน้ำหนักของลูกหนู และน้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของลูกและแม่หนูในกลุ่มต่างๆของการทดลองนี้

น้ำหนัก(gm)				
	olive oil P1-6	toluene P1-6	olive oil P6-12	toluene P6-12
น้ำหนักแรกเกิดของลูกหนู	4.4 - 6.1	4.8 - 5.7	4.7 - 6.8	4.2 - 6.0
น้ำหนักที่เพิ่มเมื่ออายุ 5 วัน	4.1 - 6.4	3.9 - 7.0	3.3 - 6.3	2.7 - 6.5
น้ำหนักเพิ่มระหว่าง P1-21 ของแม่หนู	50 - 115	30 - 100	65 - 120	25 - 100

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 12 แสดงพิสัยของปริมาณ อีสโตรเจน และ โปรเจสเตอโรน ในหนูแรทเพศเมียของวัน proestrus

การทดลอง	พิสัยของ อีสโตรเจน (fmol/ml)	พิสัยของโปรเจสเตอโรน (pmol/ml)
น้ำมันมะกอก	84 - 304	58 - 250
โทลูอีน	40 - 264	26 - 162

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวพิมลพร เชาวน์ไวพจน์ เกิดวันที่ 2 มกราคม 2510 เป็นชาวจังหวัดสุพรรณบุรี สำเร็จการศึกษาวิทยาศาสตร์บัณฑิต (พยาบาลและผดุงครรภ์) จากมหาวิทยาลัยมหิดล ปีการศึกษา 2532 เข้าศึกษาปริญญาวิทยาศาสตร์มหาบัณฑิตในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2533 และ ได้รับทุนวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในปีการศึกษา 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย