

รายงานการวิจัย

การตรวจโลหะหนักปรอท ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีนและ

จีน Metallothionein ในปลานิล

Mercury Heavy Metal Detection Related to Expression of Metallothionein Gene

in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

โดย

รศ. นสพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์

รศ. สพ.ญ. ดร. อรัญญา พลพรทิสิตู

ผศ. น.สพ. ดร. นพดล ทิพารัตน์

ตุลาคม 2552

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2551

รายงานการวิจัย

การตรวจโลหะหนักปรอท ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีนและ

จีน Metallothionein ในปลานิล

Mercury Heavy Metal Detection Related to Expression of Metallothionein Gene

in Nile Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

โดย

รศ. นสพ. ดร. อนุเทพ รังสีทิพัฒน์

รศ. สพ.ญ. ดร. อรัญญา พลพรพิสิฐ

ผศ. น.สพ. ดร. นพดล พิพัรัตน์

ตุลาคม 2552

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปีงบประมาณ 2551

กิตติกรรมประกาศ
(Acknowledgement)

โครงการวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากเงินงบประมาณแผ่นดินประจำปี
งบประมาณ 2551 สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ การตรวจโลหะหนักปรอท ที่สัมพันธ์กับการแสดงออกของโปรตีนและจีน

Metallothionein ในปลานิล

ชื่อผู้วิจัย รศ. นสพ. ดร. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์¹

รศ. สพ.ญ. ดร. อรัญญา พลพรพิสิฐ²

ผศ. น.สพ. ดร. นพดล พิฬารัตน์¹

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2551 จำนวนเงิน 770,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ 1 ตุลาคม 2550 ถึง กันยายน 2551

ปรอทเป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูงชนิดหนึ่งซึ่งสามารถปนเปื้อนได้ในแหล่งน้ำตามธรรมชาติ มนุษย์สามารถได้รับปรอทจากการบริโภคปลา ดังนั้นจึงสามารถใช้ปลาเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของปรอทในสิ่งแวดล้อมได้ วัตถุประสงค์ของการศึกษาคือ เพื่อหาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอทในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) โดยการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา การย้อมพิเศษด้วยวิธีออโตเมทัลโลกราฟี การตรวจวิเคราะห์โลหะหนักด้วยวิธี ICP-AES และการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีนเมทัลโลไซโอนิน ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี และการแสดงออกของจีนเมทัลโลไซโอนิน ทำการทดลองโดยการแบ่งปลานิลออกเป็น 12 กลุ่ม และกลุ่มควบคุม 1 กลุ่ม กลุ่มทดลองประกอบด้วยกลุ่มที่ได้รับสารเมอร์คิวรિકคลอไรด์ ($HgCl_2$) ความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อกรัม โดยการฉีดเข้าช่องท้อง กลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 0.5, 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อกรัมโดยการป้อน และกลุ่มที่ได้รับโดยการสัมผัสน้ำที่มีความเข้มข้นของ $HgCl_2$ 0.5, 1, 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ พบว่าปลาทุกตัวในกลุ่มที่ได้รับสัมผัสน้ำที่มีความเข้มข้น 2 และ 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรเสียชีวิตทั้งหมดภายในวันแรกของการทดลอง รอยโรคหลักทางจุลพยาธิวิทยาประกอบด้วย การเสื่อมของเซลล์เยื่อบุท่อไต การเพิ่มขึ้นของหน่วยไตใหม่ และการเกิดสติกโนท่อไต การเพิ่มจำนวนของเซลล์เมลาโนแมโครฟาจ

(MMCs) ในม้าม การลดลงของไขมันที่สะสมในเซลล์ตับ การเสื่อมของเซลล์ตับ ร่วมกับการฝ่อของตับอ่อนในตับ จากการตรวจสอบด้วยวิธีอิมมูโนโพลีกราฟฟี พบโลหะปรอทสะสมอยู่ในเซลล์เยื่อบุท่อไต เซลล์ MMCs ในม้าม และที่ตับอ่อน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณปรอทที่วัดได้ โดยปริมาณและตำแหน่งที่พบการสะสมของปรอทแตกต่างกันตามวิธีและขนาดของ $HgCl_2$ ที่ได้รับ ในกลุ่มที่เลี้ยงปลาในน้ำที่มีปรอท และได้รับขนาดสูง จะพบการสะสมของปรอทในปริมาณมากกว่าการให้ด้วยวิธีอื่น และขนาดที่ได้รับต่ำกว่า การตรวจหาการแสดงออกของโปรตีนเมทัลโลไซโอนินด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี พบการแสดงออกเฉพาะในเซลล์เยื่อบุท่อไต เซลล์ MMCs ในม้าม และตับอ่อนของปลาในกลุ่มที่เลี้ยงไว้ในน้ำที่มีความเข้มข้นของ $HgCl_2$ เท่ากับ 0.5 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร หลังจากวันที่ 9 และ 6 ของการทดลองตามลำดับ จากการศึกษาในครั้งนี้สรุปได้ว่าสามารถใช้รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา การย้อมพิเศษด้วยวิธีอิมมูโนโพลีกราฟฟี และการแสดงออกของโปรตีนเมทัลโลไซโอนินด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี เพื่อศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอทในปลานิลได้

คำสำคัญ ปลานิล, โลหะหนักปรอท, ความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน, รอยโรคทางพยาธิวิทยา, ออโตเมทัลโลโกราฟี, เมทัลโลไซโอนินจีน

รองศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
10330 โทรศัพท์ 02-218-9618

รองศาสตราจารย์ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
10330 โทรศัพท์ 02-218-9407

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กรุงเทพฯ
10330 โทรศัพท์ 02-218-9623

ABSTRACT

Title Mercury Heavy Metal Detection Related to Expression of Metallothionein Gene in Nile

Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

Researcher Anudep Rungsipipat¹, DVM, PhD, Associate Professor

Aranya Ponpornpisit², DVM, MSc, PhD, Associate Professor

Nopadon Pirarat¹, DVM, PhD, Assistant Professor

Budget 770,000 Baht

Period 1 year from October 2007- September 2008

Mercury is one of the most toxic heavy metals which can contaminate natural water sources. Humans can be exposed to mercury by consumption of mercury-contaminated fish. Therefore, it is the most appropriate model to use fish as an environmental marker of mercury contamination. The purpose of this study is to investigate acute mercury toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*) via histopathological technique, autometallography, Hg analysis by ICP-AES method and expression of metallothionein protein by immunohistochemistry techniques and metallothionein gene expression. Tilapias were divided into twelve experimental groups and one control group. The experimental groups included intraperitoneally injected with 0.5, 1, 2, 5 µg/g mercuric chloride (HgCl₂), oral administration with 0.5, 1, 2, 5 µg/g HgCl₂, and 0.5, 1, 2, 5 µg/ml HgCl₂ semi-static exposure groups. All fish showed clinical appearances of respiratory failure followed by death in 2 and 5 µg/ml HgCl₂ semi-exposure groups on first day (day 0) of

experiment. The major histopathological lesions included tubulonephrosis, increasing immature nephrons, and deposit of crystals in trunk kidneys, increasing melanomacrophages centers (MMCs) in spleen, and loss of fat storage, degeneration of hepatocytes, and pancreatic atrophy in hepatopancreas. Following autometallography, silver-enhanced Hg grains were visualized in renal tubular epithelium, MMCs in spleen and in pancreatic acini in accordance with high mercury levels. The amount and location of visualized grains differed from routes and doses of HgCl₂. The semi-exposure groups and higher concentration produced more grains than other routes and lower concentration. An expression of metallothionein (MT) revealed in renal tubular epithelium, MMCs in spleen, and pancreatic acini of 0.5, and 1 µg/ml semi-static exposure groups after day 9 and 6 respectively. From this present study, it concludes that pathological lesions, autometallography and expression of metallothionein protein by immunohistochemistry can be used to investigate acute mercury toxicity in tilapia.

Keywords: tilapia, mercury, acute toxicity, pathological lesions, autometallography, metallothionein gene

¹Associate Professor, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

²Associate Professor, Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

¹Assistant Professor, Department of Veterinary Pathology, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok 10330

สารบัญเรื่อง

(Table of Contents)

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	2
บทคัดย่อ (THAI).....	3
ABSTRACT (ENGLISH).....	5
สารบัญเรื่อง	7
สารบัญตาราง.....	8
สารบัญรูป	9
สัญลักษณ์และคำย่อ.....	13
บทนำ.....	15
ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	21
วิธีดำเนินการวิจัย	31
ผลการวิจัย.....	45
อภิปรายและวิจารณ์.....	91
บทสรุปและข้อเสนอแนะ.....	98
บรรณานุกรม.....	99
ภาคผนวก.....	105

สารบัญตาราง

(List of Tables)

ตาราง		หน้า
1	แหล่งที่มาของโลหะหนักปรอท	23
2	Primers for RT-PCR	42
3	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มควบคุม (Histopathological scores of control group)	54
4	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง i.p. groups.	55
5	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง i.p. groups (continue)	56
6	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง oral groups.	57
7	รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง semi-static exposure group	59
8	Autometallography and immunohistochemistry scores in experimental tilapias	69
9	ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลาในกลุ่มทดลอง (Total Hg in experimental tilapias)	76
10	The sequences of nucleotides of RT-PCR products from the current experiment	80
11	Comparison of histopathological lesions, autometallography and expression of metallothionine protein between experimental groups	83
12	ปริมาณโลหะปรอทที่วัดด้วยวิธีการ ICP จากปลาที่เก็บตัวอย่าง	89

สารบัญรูป

(List of Illustrations)

รูปที่		หน้า
1	ลำดับของกรดอะมิโนของ (1) winter flounder MT (2) rainbow trout MT-A (3) rainbow trout MT-B (4) stone-loach MT (5) goldfish MT และ (6) tilapia MT (Chan, 1994)	29
2	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเมทลโลไซโอเนนจีนของปลานิล <i>O.aureus</i> (แถวบน) และ <i>O.mossambicus</i> (แถวล่าง) ตำแหน่งของอินตรอน (intron) แสดงด้วยอักษรตัวพิมพ์เล็ก (Cheung et al., 2005)	30
3	ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเมทลโลไซโอเนน cDNA ของปลานิล (<i>Tilapia mossambica</i>) (Chan, 1994)	42
4	การบวมของช่องท้อง พบได้ในปลาในกลุ่ม 2 ppm HgCl ₂ intraperitoneally injection group (ลูกศร)	46
5	การชันสูตรซากในปลาในกลุ่ม 2 ppm HgCl ₂ intraperitoneally injection ที่การบวมของช่องท้อง มีการสะสมของก้อนหนองสีเหลืองในช่องท้อง ร่วมกับมีการซีดเกาะกันของอวัยวะภายในช่องท้อง (bar = 2.5 ซม.)	46
6	ผลการชันสูตรซากในปลาทุกกลุ่ม ไม่พบรอยโรคใดในวันที่ 15 ของการทดลอง A. Control, B. 2 ppm HgCl ₂ i.p. tilapia, C. 5 ppm HgCl ₂ , D. 0.5 ppm HgCl ₂ bath, E. 1 ppm HgCl ₂ bath and F. 5 ppm HgCl ₂ oral administration, bar=2 cm.	46
7	ภาพจุลพยาธิวิทยาไตของปลากลุ่มควบคุมในวันที่ 15 (HE staining, bar=150 μm)	50
8	การเสื่อมของเซลล์เยื่อบุท่อไตระดับรุนแรง ร่วมกับการสะสมของ Hyaline granules ในไตของปลากลุ่ม 2 ppm semi-static exposure tilapia (HE staining, bar = 150 μm)	50
9	การสะสมของ Hyaline droplets ในเซลล์เยื่อบุท่อไตที่เสื่อม ในปลากลุ่ม 2 ppm semi-static exposure (หัวลูกศร) (HE staining, bar = 35 μm)	50
10	ไตของปลากลุ่ม 2 ppm i.p. ที่ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ Immature nephrons	50

	(ลูกศร) (HE staining, bar = 300 μ m)	
11	ไตของปลาในกลุ่ม 2 ppm i.p. ที่ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ Immature nephrons	50
	(ลูกศร) (HE staining, bar = 80 μ m)	
12	การสะสมของ Pleomorphic crystals ในท่อไตของปลาในกลุ่ม 0.5 ppm HgCl ₂ i.p.	50
	(HE staining, bar = 400 μ m)	
13	ตับและตับอ่อนของปลาในกลุ่มควบคุมในวันที่ 15 (Fat storage score +3) (HE	51
	staining, bar = 30 μ m)	
14	เซลล์ตับที่พบการสูญเสียการสะสมของไขมันอย่างรุนแรง (Fat storage score	51
	+1) ในวันที่ 3 ของปลาในกลุ่ม 5 ppm HgCl ₂ intraperitoneally injection และพบ	
	การฟ่อลีบของตับอ่อนร่วมกับการแทรกของเซลล์ MMCs (ลูกศร) (HE	
	staining, bar = 125 μ m)	
15	เซลล์ตับที่พบการสูญเสียการสะสมของไขมันอย่างรุนแรง (fat storage score	51
	+1) ในวันที่ 15 ของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl ₂ semi-static exposure group และพบ	
	การฟ่อลีบของตับอ่อน (ลูกศร) (HE staining, bar = 60 μ m)	
16	ในวันที่ 12 ของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl ₂ semi-static exposure group, เซลล์ตับมี	51
	นิวเคลียสขนาดใหญ่ นิวคลีโอรัสที่เด่นชัด ร่วมกับการสะสมของ Hyaline	
	droplets ในไซโตพลาสซึม (หัวลูกศร) (HE staining, bar = 15 μ m)	
17	ม้ามของปลาในกลุ่มทดลองที่พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs กลุ่มควบคุม	52
	(A), 0.5 ppm HgCl ₂ semi-static exposure group on day 15 (score +3) (B), 1	
	ppm HgCl ₂ semi-static exposure group on day 12 (C) and day 15 (D)	
	(score+3) (HE staining, bar; A=450 μ m, B=450 μ m, C=450 μ m, D=250 μ m)	
18	การงอกขยายของเซลล์ Goblet ที่เชื่อมของลำไส้ของปลาในกลุ่ม 1 ppm semi-	53
	static exposure groups on day 6 (HE staining, bar = 80 μ m)	
19	การตายของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร ร่วมกับการแทรกตัวของเซลล์โมโน	53
	นิวเคลียส ของปลาในกลุ่ม 2 ppm HgCl ₂ oral administration tilapia on day 3	
	(arrow) (HE staining, bar = 300 μ m)	
20	Secondary gill lamellae of control tilapia on day 15(HE staining, bar=150 μ m)	53
21	Secondary gill lamellae of 1 ppm semi-static exposure group on day 15 (HE	53

	staining, bar = 160 μm)	
22	Secondary gill lamellae of 5 ppm semi-static exposure group on day 15 (HE staining, bar = 100 μm)	53
23	ไตของปลากลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ (AMG staining, bar = 50 μm)	62
24	Silver grains ที่ตรวจพบมีสีเหลืองน้ำตาล และสีดำ (score +2) ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 2 ppm HgCl_2 i.p. ในวันที่ 15 (หัวลูกศร) (AMG staining, bar = 150 μm)	62
25	Silver grains ที่ตรวจพบมีสีดำ (score +3) ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl_2 semi-static exposure ในวันที่ 15 (หัวลูกศร) (AMG staining, bar = 150 μm)	62
26	Silver grains ที่ตรวจพบมีสีเหลืองน้ำตาล และสีดำ (score +2) ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 0.5 ppm HgCl_2 semi-static exposure ในวันที่ 15 (หัวลูกศร) (AMG, bar = 45 μm)	62
27	A. Silver grains ที่ตรวจพบในเซลล์ MMCs ที่ดับอ่อนของปลากลุ่ม 0.5 ppm HgCl_2 semi-static exposure ในวันที่ 3 (ลูกศร) B. เซลล์ดับและดับอ่อนที่ให้ผลลบของปลากลุ่มควบคุม (AMG staining, bar; A = 300 μm and B = 150 μm)	62
28	ม้ามของปลาที่ข้อมี autometallography A. ผลลบในกลุ่มควบคุม B. ปลากลุ่ม 1 ppm HgCl_2 i.p. พบ silver grains ในเซลล์ MMCs ในวันที่ 3 (score +1), C. ปลากลุ่ม 0.5 ppm HgCl_2 semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +3), and D. ปลากลุ่ม 1 ppm HgCl_2 semi-static exposure ในวันที่ 15 (score+3) (bar; A = 450 μm , B = 550 μm , C = 450 μm and D = 450 μm)	63
29	A. and B. เซลล์เยื่อผนังลำไส้ของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl_2 semi-static exposure tilapia ในวันที่ 15. Silver grains (score +3) ตรวจพบในเซลล์เยื่อ (หัวลูกศร) (AMG staining, bar; A = 120 μm and B = 80 μm)	63
30	การแสดงออกของโปรตีน metallothionein ในเซลล์ Canine mammary (IHC, DAB, counter stained with Mayer's hematoxylin, bar = 100 μm)	66

31	<p>A. ปลาในกลุ่มควบคุมไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไต</p> <p>B. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลาในกลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 9 (score +2), C. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลาในกลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ Semi-static exposure tilapia ในวันที่ 15 (score +3), D. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure tilapia ในวันที่ 6 (score +1), E. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +2) (IHC, DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, bar = 80 μm)</p>	66
32	<p>A. ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 12. B. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของปลาในกลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +2), C. and D. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl₂ Semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +3) (IHC, DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, bar; A, B, C = 270 μm, D = 40 μm)</p>	67
33	<p>A. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ของปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +1), และ B. ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MT ของปลาในกลุ่มควบคุม (IHC, DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, bar; A = 60 μm, B = 125 μm)</p>	67
34	ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลาในกลุ่มควบคุม	78
35	ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลาในกลุ่ม ip group	78
36	ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลาในกลุ่มควบคุม oral group	79
37	ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลาในกลุ่ม semi-static exposure	79
38	RT-PCR products when using 2 pairs of primers.....	81
39	RT-PCR products.....	82

สัญลักษณ์และคำย่อ

(List of abbreviations)

AAS	atomic absorption spectrometry
AFS	atomic fluorescence spectrometry
Ag	silver
AgNO ₃	silver nitrate
AMG	autometallography
ASV	anodic stripping voltametry
ATSDR	Agency for Toxic Substances and Diseases Registry
bp	base pair (s)
BSA	bovine serum protein
β	beta
°C	degree Celsius (centigrade)
Cd	cadmium
cDNA	complimentary deoxyribonucleic acid
cm	centrimeter
CV	cold vapor
GC	gas chromatography
Cu	copper
DO	dissolved oxygen
DAB	3, 3-diaminobenzidine
DNA	deoxyribonucleic acid
EC ₅₀	median effective concentration
g	gram (s)
G	gravity
HE	hematoxylin and eosin staining
IHC	immunohistochemistry
l	liter (s)
ICP-AES	Inductive coupled plasma atomic emission

LC ₅₀	median lethal concentration
Hg	mercury
HgCl ₂	mercuric chloride
HgS/Se ^{AMG}	mercury sulfide/selenide autometallography
ml	milliliter (s)
mg	milligram (s)
mRNA	messenger ribonucleic acid
MS	mass spectrometry
MT	metallothionein
μl	microliter (s)
μg	microgram (s)
μm	micrometer (s)
NAA	neutron activation analysis
Ni	nickel
NJDEP	New Jersey Department of Environmental Protection
Pb	lead
PBS	phosphate buffer saline
pH	power of hydrogen ion
ppm	part per million
%	percent
RFD	reference dose
RT-PCR	reverse transcriptase polymerase chain reaction
rpm	revolution per minute
STREC	Scientific and Technological Research Equipment Center
US EPA	United States Environmental Protection Agency
UV	ultraviolet
WHO	World Health Organization
Zn	Zinc

บทนำ

(Introduction)

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการวิจัยใหม่ที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหาโลหะหนักปรอท จากตัวอย่างเนื้อเยื่อของปลานิล ที่ได้รับโลหะหนักปรอท ทั้งโดยตรงจากการทดลองก่อโรค และการได้รับทางอ้อมจากสิ่งแวดล้อมที่เลี้ยงปลา และทำการตรวจหาการแสดงออกของโปรตีนจิ้น Metallothionein จากตัวอย่างเนื้อเยื่อปลานิล ซึ่งจะหาความสัมพันธ์ของรอยโรคที่เกิดขึ้น การตรวจพบโลหะหนัก และการแสดงออกของโปรตีนจิ้นที่เกี่ยวข้อง เป็นการประยุกต์ใช้ข้อมูลทางพยาธิวิทยา การพัฒนาเทคนิค Automellaography ร่วมกับเทคนิคทางอนุชีววิทยา ในการประเมินความเป็นพิษของโลหะหนักปรอทในสิ่งแวดล้อม เป็นศาสตร์ใหม่ในการศึกษาทางพยาธิวิทยา สิ่งแวดล้อม (Environmental Pathology) ซึ่งข้อมูลที่ได้รับสามารถนำมาเป็นข้อมูลพื้นฐานและข้อมูลประยุกต์ในการศึกษาทางด้านพิษพยาธิวิทยา ในด้านการจัดการทรัพยากรแหล่งน้ำและอุตสาหกรรมการเลี้ยงปลา ซึ่งเป็นแหล่งโปรตีนคุณภาพที่สำคัญในห่วงโซ่อาหารของมนุษย์ การเลี้ยงปลาในกระชังในแหล่งน้ำธรรมชาติรวมถึงการเลี้ยงปลาในฟาร์มที่มีการนำน้ำจากแหล่งน้ำสาธารณะมาใช้ในการเลี้ยงทำให้ปลามีโอกาสสูงในการได้รับสารปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมอันอาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ในระยะยาว นอกจากนี้ยังสามารถนำวิธีการและผลการศึกษาที่ได้มาประยุกต์ใช้ในกลุ่มสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่อยู่ในแหล่งน้ำจืดธรรมชาติ ทะเล และมหาสมุทร รวมถึงสัตว์บกชนิดอื่นๆ ที่มนุษย์เลี้ยงไว้เพื่อการบริโภคและสัตว์ที่เลี้ยงเป็นเพื่อน เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของพลวัตโลกในอนาคต

การพัฒนาประเทศในด้านต่าง ๆ อย่างรวดเร็ว โดยเฉพาะด้านอุตสาหกรรม ส่งผลให้มีการพัฒนาชีวิต และความเป็นอยู่ของประชาชนในประเทศเพิ่มขึ้น มีการใช้ทรัพยากรในด้านต่าง ๆ มี

การผลิตสินค้าอุปโภค บริโภคเพื่อตอบสนองต่อการดำรงชีวิตในรูปแบบต่าง ๆ ในกระบวนการผลิต หรือแม้แต่ภายหลังการใช้สินค้าอุปโภค บริโภคต่าง ๆ มักก่อให้เกิดของเสียในปริมาณมาก โดยเฉพาะอย่างยิ่ง กากของเสียจากอุปกรณ์สื่อสาร อิเล็กทรอนิกส์ และกากของเสียจากโรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงชิ้นส่วน วัสดุต่าง ๆ ที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์แล้วจากอาคาร บ้านเรือน กากของเสียเหล่านี้มีโอกาสนปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำได้โดยความตั้งใจ และมีได้ตั้งใจ เช่น การทิ้งขยะลงแหล่งน้ำ การปล่อยน้ำเสียที่บำบัดแล้ว การปล่อยน้ำเสียที่มีได้บำบัดจากบ้านเรือน โรงงานอุตสาหกรรม รวมทั้งการเกิดอุบัติเหตุรั่วไหลของสารอันตราย การเกิดภาวะน้ำท่วมขัง เป็นต้น เหล่านี้เป็นสาเหตุเพียงบางประการที่ทำให้กากของเสีย หรือขยะอันตรายปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ ตัวอย่างกากของเสีย หรือขยะอันตราย ได้แก่ แบตเตอรี่ สีทาบ้าน โดยเฉพาะโลหะหนัก เช่น ปรอท แคดเมียม ทองแดง ซึ่งเมื่อมีการปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำแล้ว สามารถสะสมและเข้าสู่ร่างกายสัตว์น้ำได้หลายทาง เช่น การดูดซึมผ่านผิวหนัง และเหงือกของสัตว์น้ำโดยตรง หรือเข้าสู่ร่างกายโดยการกินสิ่งมีชีวิตอื่นที่มีการปนเปื้อน เช่น สัตว์หน้าดิน (Benthos) แพลงตอนพืช แพลงตอนสัตว์ หรือตะกอนสารอินทรีย์หน้าดิน รวมถึง การรับน้ำที่มีสารปนเปื้อนเข้าสู่ร่างกายโดยตรง เมื่อสัตว์น้ำได้รับโลหะหนักเหล่านี้ก็จะเกิดการขับออกบางส่วน และบางส่วนจะถูกสะสมไว้ในร่างกาย การสะสมในปริมาณน้อย ๆ อาจไม่ส่งผลต่อสัตว์น้ำ ให้ไม่มีอาการผิดปกติ แต่หากสะสมในปริมาณมากขึ้น ก็จะทำให้เกิดภาวะผิดปกติ เช่น การตายที่ไม่ทราบสาเหตุ ความไวในการเกิดโรคติดเชื้อต่างๆ ในกรณีสัตว์น้ำที่มนุษย์เลี้ยงไว้เพื่อการบริโภค เมื่อสัตว์น้ำแสดงอาการผิดปกติ และไม่สามารถรักษาหรือบรรเทาอาการได้ ผู้เลี้ยงสัตว์น้ำจะลดความสูญเสียโดยทำการจับขาย เมื่อมนุษย์ได้บริโภคสัตว์น้ำที่มีการสะสมของโลหะหนักในปริมาณมากก็อาจส่งผลเสียต่อสุขภาพร่างกาย เช่น ความผิดปกติทางระบบประสาท ความผิดปกติของระบบย่อยอาหาร ความเป็นพิษต่อตับ เป็นต้น ส่วนสัตว์น้ำที่อยู่อาศัยในแหล่งน้ำ

ธรรมชาติก็อาจเกิดภาวะอ่อนแอ ถูกสัตว์น้ำที่มีขนาดใหญ่บริโภค และถูกมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภค ลำดับสุดท้ายในห่วงโซ่อาหารนำมาบริโภคต่อผลที่สุดก็คือการสะสมของโลหะหนักที่สะสมมากขึ้นเป็นลำดับ และเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ ทั้งโดยทางตรง และโดยทางอ้อม

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) เป็นปลาน้ำจืดที่เป็นที่นิยมบริโภคของคนไทย มีการเลี้ยงในกระชังในแหล่งน้ำธรรมชาติ ใช้เวลาเลี้ยงจนถึงระยะที่สามารถนำมาบริโภคได้ ประมาณ 5 เดือน การเลี้ยงปลานิลนั้นผู้เลี้ยงนิยมเลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูปเป็นส่วนใหญ่ แต่เนื่องจากปลาอยู่ในแหล่งน้ำที่เป็นระบบเปิด ถ้าหากมีการปนเปื้อนของโลหะหนัก หรือสารพิษต่าง ๆ ก็มีโอกาสรับเข้าสู่ร่างกายได้โดยตรง ในทำนองเดียวกัน ปลาตะเพียนขาว (*Lates calcarifer*) ซึ่งเป็นปลาที่นิยมบริโภคอีกชนิดหนึ่ง เป็นปลาที่เลี้ยงในกระชังเช่นเดียวกัน ใช้เวลาเลี้ยงนาน ประมาณ 8 เดือน กระชังส่วนใหญ่ติดตั้งในบริเวณใกล้ปากแม่น้ำ ซึ่งเป็นระบบเปิดจึงมีโอกาสดำรับสารปนเปื้อนจากแหล่งน้ำทั้งที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรม และน้ำทิ้งจากบ้านเรือนเช่นเดียวกัน แต่จากระยะเวลาการเลี้ยงที่ใช้เวลา 5- 8 เดือน ปลาทั้งสองชนิดนี้อาจไม่แสดงอาการภายนอก แต่อวัยวะภายในอาจมีการสะสมสารปนเปื้อนเหล่านี้ได้

การตรวจวิเคราะห์โลหะหนักด้วยวิธี Autometallography เป็นวิธีการที่ใช้ในการตรวจสอบสารปนเปื้อนในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตที่มีความไว และความละเอียดสูง ซึ่งวิธีดังกล่าวยังไม่มีผู้ใดนำมาประยุกต์ใช้ในการตรวจการตกค้างของโลหะหนักในเนื้อเยื่อปลามาก่อน ดังนั้นการนำวิธีการตรวจโลหะหนักในเนื้อเยื่อมาใช้ในการตรวจในปลานิลซึ่งเป็นปลาที่มีข้อมูลการศึกษาวิจัยในด้านอื่น ๆ หลายด้าน จะช่วยให้การพัฒนาวิธีการตรวจได้รวดเร็ว และนำมาประยุกต์ใช้ในปลาชนิดอื่นได้ง่าย และรวดเร็วขึ้น เทคนิคดังกล่าวนี้ หากนำมาพัฒนาเพื่อใช้ตรวจโลหะหนักในปลาธรรมชาติที่อาศัยบริเวณคิวน้ำดินหรือมีการดำรงชีวิตในแหล่งน้ำระบบเปิดเป็นเวลานาน ซึ่งมีโอกาสสัมผัสสาร

ตกค้างมากกว่า และเป็นเวลานานกว่าก็จะช่วยให้ทราบถึงปริมาณสูงสุดที่อาจมีการตกค้างในปลา
เพื่อการบริโภคของมนุษย์ได้ การใช้ปลาจากแหล่งน้ำธรรมชาติเป็นตัวบ่งชี้สิ่งแวดล้อมทางชีวภาพ
(Environmental biomarker) จะช่วยลดความเสี่ยงของประชาชนที่จะได้รับสารปนเปื้อนจากแหล่ง
น้ำที่มีการปนเปื้อนของโลหะหนัก โดยการบริโภคสัตว์น้ำที่ไม่แสดงอาการผิดปกติแต่มีสาร
ปนเปื้อนในปริมาณที่อาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพ การเฝ้าระวัง การให้ข้อมูล และประชาสัมพันธ์
ให้ประชาชนทราบถึงอันตรายที่อาจได้รับในการนำสัตว์น้ำดังกล่าวมาบริโภคหรือจำหน่าย นับเป็น
ความจำเป็นอย่างยิ่งที่ทุกฝ่ายต้องให้ความร่วมมือในการป้องกันอันตรายที่อาจเกิดขึ้น ดังกล่าว

1. วัตถุประสงค์ของงานวิจัย

1. พัฒนารูปแบบการตรวจหาโลหะหนักปรอท โดยวิธี Autometallography จากตัวอย่างอวัยวะของ
ปลานิลที่ได้รับโลหะหนักปรอท จากการทดลองศึกษาความเป็นพิษและผลของสารปรอท
ต่อสุขภาพร่างกายปลานิลในห้องปฏิบัติการ และปลานิลที่เลี้ยงในกระชัง จากแหล่งน้ำ
สาธารณะ
2. ศึกษาผลกระทบและความเป็นพิษของปรอท ความสัมพันธ์ของรอยโรคทางพยาธิวิทยา
การตรวจหาโลหะหนักปรอทโดยวิธี Autometallography และการตรวจวิเคราะห์โลหะ
หนักปรอท โดยวิธี Inductively Coupled Plasma Spectropotometry (ICPS) จากตัวอย่าง
อวัยวะในข้อ 1.
3. ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนจีน Metallothionein และหาความสัมพันธ์ของการ
แสดงออกของโปรตีนจีนดังกล่าวและการตรวจหาโลหะหนักปรอท ในตัวอย่างอวัยวะใน
ข้อที่ 1

- นำหลักการดังกล่าวไปประยุกต์ใช้กับตัวอย่างสัตว์น้ำชนิดอื่นๆ ที่ได้รับโลหะหนักปรอทหรือโลหะหนักชนิดอื่นๆ เพื่อศึกษามลภาวะทางสิ่งแวดล้อม

2. ขอบเขตของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้ประกอบด้วย การตรวจหารอยโรคทางพยาธิวิทยา ทั้งทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา การตรวจหาโลหะหนักปรอทจากตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะภายใน โดยการพัฒนาเทคนิค Autometallography การตรวจหาโลหะหนักปรอทโดยวิธี ICPS และการตรวจการแสดงออกของโปรตีนจีน Metallothionein ในตัวอย่างอวัยวะโดยเทคนิค Immunohistochemistry และ Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction โดยแบ่งการดำเนินงานเป็น 2 ส่วน คือ การทดลองก่อโรคความเป็นพิษของปรอท ในห้องปฏิบัติการ ใช้ปลาไนล์ (*Oreochromis niloticus*) เป็นต้นแบบในการศึกษา และการศึกษาจากตัวอย่างปลาไนล์ที่เลี้ยงในแหล่งน้ำธรรมชาติ

3. สมมุติฐานงานวิจัยและกรอบแนวคิด

- ความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท สามารถก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยา ในอวัยวะภายในต่างๆของปลาไนล์ที่ได้รับโลหะหนักจากการปนเปื้อนในแหล่งน้ำ
- เทคนิค Autometallography สามารถนำมาใช้ในการตรวจหาโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อ ได้เปรียบเทียบกับวิธีการวิเคราะห์หาโลหะหนักโดยวิธี ICPS
- การแสดงออกของโปรตีนจีน Metallothionein มีความสัมพันธ์กับรอยโรค และการตรวจพบโลหะหนักในเนื้อเยื่อ

4. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ผลงานวิจัยวิจัยสามารถพัฒนาเทคนิค การตรวจหา โลหะหนักจากอวัยวะภายในทางตรง โดยวิธี Autometallography และการตรวจทางอ้อม โดยหาความสัมพันธ์ของการ

แสดงออกของโปรตีนจีน Metallothionein ก็กับการตรวจหาโลหะหนักทางตรง

2. ผลงานวิจัยสามารถเผยแพร่ในวารสารนานาชาติ ทางด้าน พยาธิวิทยาสิ่งแวดล้อม
3. ผลงานวิจัยสามารถประยุกต์ ใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท ในสัตว์
กลุ่มอื่น และใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักชนิดอื่น ได้เป็นอย่างดี

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

(Literature review)

ปัญหามลพิษทางน้ำจากสารโลหะหนักที่เกิดขึ้นจากขบวนการผลิตของโรงงาน

อุตสาหกรรม ปูน หรือยาฆ่าแมลง ซึ่งเป็นวัตถุมีพิษที่มีความทนทาน สลายตัวได้ยาก จึงสามารถตกค้างและสะสมอยู่ในธรรมชาติได้นานและสามารถสะสมอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยการดูดซึมโดยตรงจากน้ำ และจากการกินอาหาร ซึ่งจะเพิ่มปริมาณสูงขึ้นตามห่วงโซ่อาหาร สารพิษเหล่านี้ก่อให้เกิดผลเสียต่อสัตว์น้ำโดยตรง เมื่อได้รับในปริมาณสูง จะเข้าไปทำลายระบบประสาทส่วนกลาง ซึ่งทำให้สัตว์นั้นตายไปในที่สุด ส่วนสัตว์น้ำที่ได้รับสารพิษในปริมาณน้อยยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้แต่อาจจะดำรงชีวิตที่ผิดปกติ โดยมีการเจริญเติบโตและการแพร่ขยายพันธุ์ได้น้อยลง

โลหะหนักปรอท (Mercury) เป็นโลหะหนักที่มีความเป็นพิษสูง สามารถพบได้ในรูปแบบต่างๆ คือ ปรอทธาตุ (Elemental mercury, Hg^0) ปรอทอนินทรีย์หรือเกลือปรอท (Inorganic mercury or mercury salts) และปรอทอินทรีย์ (Organic mercury) (WHO, 2003) ในธรรมชาติโลหะหนักปรอทที่พบส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปปรอทธาตุ และปรอทอนินทรีย์ ปรอทธาตุจะมีสถานะเป็นของเหลวที่อุณหภูมิห้อง ปรอทธาตุบางส่วนสามารถระเหยสู่อากาศอยู่ในรูปไอปรอท (Mercury vapour) ซึ่งสามารถแพร่กระจายไปได้ไกล ไอปรอทจะสามารถเปลี่ยนไปอยู่ในรูปแบบอื่นๆ โดยผ่านไปกับน้ำฝนหรือหิมะ แล้วปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำหรือดิน ส่วนปรอทอนินทรีย์สามารถเข้าสู่สิ่งแวดล้อมจากการสลายตัวของหินหรือดิน (ATSDR, 1999) ปรอทอนินทรีย์ (Inorganic compounds) เช่น ฟีนิลเมอร์คิวรี (Phenyl mercury, PM) เป็นปรอทที่มีความเป็นพิษต่ำ แต่ถ้าปรอทอนินทรีย์ถูกเปลี่ยนไปให้อยู่ในรูปสารอินทรีย์ (Organic compounds) เช่น เมทิลเมอร์คิวรี (methyl mercury, MM) จะทำให้มีความเป็นพิษสูงขึ้น โดยปรอทอนินทรีย์จะถูกเปลี่ยนให้เป็น

ปรอทอินทรีย์โดยอาศัยแบคทีเรียบางชนิดได้แก่ แบคทีเรียในสกุล *Escherichia* sp., *Enterobacter* sp., *Streptococcus* sp. และ *Bacillus* sp. เรียกกระบวนการดังกล่าวว่า กระบวนการเมทิลเลชัน (Methylation) แล้วปรอทอินทรีย์ก็จะสะสมอยู่ในจุลชีพเหล่านั้น เมื่อปลาหรือสัตว์น้ำได้รับจุลชีพเหล่านี้เข้าไปจากวงจรห่วงโซ่อาหารก็จะเกิดการสะสมในร่างกาย ซึ่งปรอทอินทรีย์นั้นจะสามารถสะสมในร่างกายได้นานและสลายตัวได้ยาก เนื่องจากจะเข้าไปเกาะกับอะตอมของคาร์บอนในโปรตีนในร่างกายสัตว์เหล่านั้น (WHO, 2003)

นับตั้งแต่การค้นพบสาเหตุของการเกิดโรคมินามาตะ (Minamata disease) ที่ประเทศญี่ปุ่น ในช่วง ค.ศ. 1950 เป็นต้นมา ทั่วโลกก็เริ่มให้ความสนใจเกี่ยวกับการปนเปื้อนของโลหะหนักปรอทในสิ่งแวดล้อมกันมากขึ้น (Raldúa et al., 2007) โลหะหนักปรอทที่ปนเปื้อนจากกิจกรรมของมนุษย์เกิดจากของเสียจากขบวนการผลิตของโรงงานอุตสาหกรรมต่างๆ สารตกค้างจากการเกษตรกรรม เช่น ปุ๋ย และยาฆ่าแมลง ยาฆ่าเชื้อรา จากการแพทย์ เช่น ในน้ำยาฆ่าเชื้อ (Pandey et al., 2005) และจากบ้านเรือน (ตารางที่ 1) โลหะหนักปรอทเป็นสารพิษที่มีความทนทาน สลายตัวได้ยาก จึงสามารถตกค้างสะสมอยู่ในธรรมชาติได้นาน และสามารถเพิ่มปริมาณสูงขึ้นตามลำดับห่วงโซ่อาหาร (Raldúa et al., 2007) ปัจจุบันพบว่าโลหะหนักปรอทเป็นสาเหตุของการเกิดโรคต่างๆ เช่น โรคมินามาตะ Acrodynia (Pink disease) หรือ Mad Hatter's disease (Bernard et al., 2001) แหล่งสำคัญที่มนุษย์ได้รับโลหะหนักปรอท คือ จากการหายใจเอาไอปรอทเข้าไป และจากการรับประทานน้ำหรืออาหารที่มีการปนเปื้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งจากการบริโภคปลา (de Oliveira Ribeiro et al., 1996.; de Oliveira Ribeiro et al., 1999; Limke et al., 2004; Drevnick et al., 2006) หรืออาหารทะเล (ATSDR, 1999) องค์การอนามัยโลกได้กำหนดมาตรฐานปริมาณสูงสุดที่ร่างกายจะรับปรอทชนิดเมทิลเมอร์คิวรีได้คือ 0.2 มิลลิกรัม และปริมาณสูงสุดที่ร่างกายจะรับปรอททั้งหมด

(Total mercury) ได้คือ 0.3 มิลลิกรัม ภายในระยะเวลา 1 สัปดาห์ (Woshiner et al., 2002) เมื่อร่างกายได้รับโลหะหนักปรอทเข้าไปจะส่งผลกระทบต่อการทำงานของร่างกาย เมทิลเมอร์คิวรีจะยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ในกระบวนการเมตาบอลิซึมของกลูโคส เกิดความเสียหายอย่างมากต่อระบบประสาท โดยจะทำลายเซลล์ประสาท สมอง ไต และเนื้อเยื่อต่างๆ และส่งผลทำให้โครโมโซมผิดปกติ ปรอทที่สะสมในร่างกายจะสามารถเก็บไว้ในลักษณะแฝงได้หลายชั่วอายุ (Shimada et al., 2004) ปรอทจะแพร่กระจายไปที่ร่างกายผ่านทางระบบไหลเวียนเลือด และระบบน้ำเหลือง (Hansen and Danscher, 1995) จากนั้นจะไปสะสมอยู่ที่บริเวณเซลล์เยื่อหุ้มไต และเซลล์ประสาทในสมอง (Zabir et al., 2005) Hansen et al. (1989) รายงานว่าการให้สุนัขกินอาหารที่มีส่วนผสมของเมทิลเมอร์คิวรี จะพบโลหะหนักปรอทสะสมได้ในทุกอวัยวะภายในของร่างกาย โดยไตเป็นอวัยวะที่มีการสะสมมากที่สุด ในขณะที่ระบบทางเดินอาหารและกล้ามเนื้อโครงร่างพบได้น้อย ในระบบประสาทพบการกระจายตัวของปรอทแบบไม่สม่ำเสมอมากนัก โดยพบการรวมกลุ่มของปรอทในทุกบริเวณของ Cerebral hemispheres ก้านสมอง และไขสันหลัง รวมทั้งเซลล์ประสาทแอสโตรไซต์ (astrocytes) ไมโครเกลีย (microglia) และผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ Hansen และ Danscher (1995) พบว่าอวัยวะที่มีปริมาณการสะสมของปรอทมากที่สุดคือ ต่อม้ำเหลืองที่เชื่อมขวางลำไส้ (Mesenteric lymph node) ตับ และไต ตามลำดับ ซึ่งสามารถบ่งชี้ได้ว่าระบบน้ำเหลืองมีส่วนสำคัญในการขนส่งปรอทไปยังอวัยวะเป้าหมาย

ตารางที่ 1 แหล่งที่มาของโลหะหนักปรอท

(กองจัดการสารอันตราย และกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ, 2545)

แหล่งที่มา	ตัวอย่าง
งานทางวิทยาศาสตร์	บารอมิเตอร์ (barometer) ตัวเร่งปฏิกิริยาเคมี (catalysts)

การแพทย์	ส่วนผสมของยารักษาโรค ยาม่าเชื้อ สารอุดฟัน (amalgam) เครื่องมือแพทย์ เช่น พรอทวัดไข้ (thermometer) เครื่องวัดความดัน
เกษตรกรรม	สารเคมีกำจัดแมลงและศัตรูพืช (pesticides) สารฆ่าเชื้อรา (fungicides)
อุตสาหกรรม	อุตสาหกรรมการผลิตเครื่องมือและอุปกรณ์ไฟฟ้า การทอผ้า การชุบโลหะ การผลิตสีทาบ้าน การผลิตน้ำยาซักแห้ง การผลิตคลอรีนและโซดาไฟ
อื่นๆ	การผลิตระเบิด การทำเหมืองแร่

อาการแสดงของปลาเมื่อเกิดความเป็นพิษของโลหะหนักปรอทแบบเฉียบพลัน (Acute mercury toxicity) คือ จะพบความผิดปกติของระบบหายใจ โดยปลาจะมีการขึ้นมาหายใจที่ผิวน้ำมากขึ้น จะพบการเปิดและปิดของแผ่นปิดเหงือก (Gill covers) อย่างรวดเร็ว หลังจากนั้นปลาจะสูญเสียการทรงตัว เชื่องซึมและตายลงในที่สุด แต่หากปลาได้รับโลหะหนักปรอทแบบเรื้อรัง (Chronic mercury toxicity) หรือในปริมาณที่ต่ำกว่าค่า LC_{50} (sublethal dose) โลหะหนักปรอทจะส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ การเจริญเติบโต พฤติกรรม เมตาบอลิซึม ค่าเคมีของเลือด การควบคุมสมดุลของน้ำ (Osmoregulation) และการแลกเปลี่ยนออกซิเจน ซึ่งจะพบความผิดปกติเหล่านี้ได้ทั้งปลาน้ำจืดและปลาน้ำเค็ม (NJDEP, 2002) สำหรับการศึกษาทางพยาธิวิทยาในปลาที่ได้รับโลหะหนักปรอท มีการทดลองในปลาหลายชนิด พบว่าในปลาแต่ละชนิดก็จะมีอาการแสดงออกของรอยโรคทางพยาธิวิทยาแตกต่างกัน จากรายงานของ Raldúa et al. (2007) พบว่าปลาอาร์เบล

(Barbels) จะพบการผิดปกติรูปร่าง การเสื่อมและการตายของเซลล์ตับ (Hepatocytes) มีการเพิ่มจำนวนของเม็ดสีซีรอยไลโปฟัสซิน (Ceroid-lipofuscin) ในตับ มีการอักเสบเป็นหย่อมๆ (Multifocal inflammation) และมีการสะสมของไขมันในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ ส่วนปลาบลิค (Bleak) จะพบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา คือ มีการอักเสบเป็นหย่อม และเสื่อมสภาพของไขมันในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับ ส่วนการได้รับโลหะหนักปรอทอย่างเฉียบพลันในปลาอาร์กติกชาร์ (Arctic char) จะพบการบวมของเซลล์ตับ โครโมโซมในนิวเคลียสของเซลล์ตับติดสีเข้ม (Heterochromatin) เป็นจำนวนมากกระจายทั่วไป และนิวเคลียสมีขนาดใหญ่ขึ้น แต่ไม่พบการเสื่อมของเซลล์ตับ ส่วนการได้รับปรอทอย่างเรื้อรังพบว่าการลดลงของไขมันที่สะสมในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับอย่างมาก พบปริมาณโครโมโซมติดสีเข้มในนิวเคลียสเพิ่มขึ้น และมองเห็นเยื่อหุ้มเซลล์ได้ยาก มีเนื้อตายบริเวณกว้างอยู่ติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่แผ่ขยาย และพบการแทรกเข้ามาของเซลล์แมคโครฟาจ (macrophages) (de Oliveira Ribeiro et al., 2002) ส่วนในปลาดุกแชนเนล (Channel catfish) พบรอยโรคทางมหกายวิภาคคือ ตับจะมีหย่อมเนื้อตายที่ผิวของเยื่อหุ้ม (Capsule) ด้านนอก มีการอักเสบแบบมีหนอง มีขยายและการคั่งน้ำดีของถุงน้ำดี และพบการลอกหลุด (Desquamation) ของเซลล์เยื่อบุท่อ น้ำดี (Kendall, 1977) ปลาหางนกยูงจะพบการเพิ่มจำนวน (Proliferation) ของเซลล์เยื่อบุท่อ น้ำดี (Wester and Canton, 1992) เหนือการพบการแยกออกมาของเยื่อบุชนิด Exfoliative เกิดช่องว่าง (Vacuolation) การบวมน้ำ และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์เม็ดเลือดแดงในหลอดเลือดฝอยของปลาอาร์กติกชาร์ (de Oliveira Ribeiro et al., 2002) การทดลองในปลาอาร์กติกชาร์ พบการลดจำนวนและขนาดของเซลล์ในไต พบการเพิ่มจำนวนของเม็ดเลือดแดง แมคโครฟาจ (de Oliveira Ribeiro et al., 2002) ในปลาวูล์ฟ (Wolf fish) ไตจะเกิดเนื้อตาย พบเซลล์เม็ดเลือดขาว และพบกระบวนการเก็บกิน (Phagocytosis) เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้

ยังพบการเพิ่มจำนวนของเมลานินแมโครฟาจ (Melano-macrophage centers, MMCs) ที่บริเวณใต้
ส่วนต้นอีกด้วย (Mela et al., 2007)

การตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักปรอทมีหลายวิธี ได้แก่ การตรวจสอบจากตัวอย่าง
สิ่งไม่มีชีวิต เช่น อากาศ หรือน้ำในสิ่งแวดล้อมโดยตรง และการตรวจโดยอ้อมจากสิ่งมีชีวิต เช่น
จากเนื้อเยื่อปลา หรือสัตว์น้ำชนิดต่างๆ (ATSDR, 1999) เนื่องจากปลาเป็นสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ
และมีความไวต่อการปนเปื้อนของโลหะหนัก จึงสามารถใช้ปลาเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพ และมลภาวะ
สิ่งแวดล้อมในน้ำได้ (de Oliveira Ribeiro, et al., 2002; Pandey et al., 2005, Jewett and Duffey,
2007; Raldúa et al., 2007)

Autometallography เป็นวิธีการที่ดัดแปลงมาจากเทคนิคการถ่ายภาพเมื่อตอนปลายของ
ศตวรรษที่ 19 โดยช่างถ่ายภาพ เรียกวิธีการนี้ว่า Physical development จากนั้น Liesegang เป็นผู้
ริเริ่มนำวิธีการนี้มาประยุกต์ใช้ทางจุลพยาธิวิทยา (Danscher, 2000) ในปี ค.ศ.1935 Roberts
รายงานการปรากฏของโลหะในเนื้อเยื่อของสัตว์ทดลองที่ได้รับโลหะชนิดนั้น และในปี ค.ศ. 1981
พบว่าในเนื้อเยื่อของสัตว์ซึ่งสัมผัสกับทองจะสามารถพบประจุของทองแล้วใช้แสงอุลตราไวโอเลต
ในการรีดิวซ์ประจุของทองในเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปของ Metallic gold ก่อนจะเข้าสู่ขั้นตอนของวิธี
Autometallography นอกจากนี้ในปีเดียวกันนั้นสามารถตรวจหาและแสดงกลุ่มของโลหะเงิน ใน
เนื้อเยื่อที่ได้สัมผัสกับเกลือของเงิน (Silver salt) ได้สำเร็จโดยวิธี Autometallography (Danscher,
2000)

ในปี ค.ศ. 1983 จากการใช้วิธีการรีดิวซ์ประจุของโลหะทองที่มีในเนื้อเยื่อให้อยู่ในรูปของ
Metallic gold ทำให้สามารถที่จะพบกลุ่มของโลหะทองที่มีขนาดเล็ก เช่น คอลลอยด์ของทองที่จับ
กับแอนติบอดี (Danscher, 2000) และคอลลอยด์ของทองที่จับกับเอนไซม์ ในปี ค.ศ. 1962 Timm ได้

พัฒนาวิธีการ Autometallography สามารถหาปรอทในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่สัมผัสกับเกลือของปรอท (Mercury salt) โดยพบว่าปรอทจะสะสมในร่างกายในรูปของ Mercury sulphide และเป็นที่ทราบโดยทั่วไปว่ากลุ่มของ Mercury sulphide จะมีสีดำ รวมถึงยังพิสูจน์ได้ว่า Mercury sulphide เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาในกระบวนการ Autometallography (Danscher, 2000)

การตรวจโลหะหนักด้วยวิธีออโตเมทัลโลกราฟี (autometallography) เป็นวิธีการหนึ่งที่น่ามาใช้หาโลหะในเนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตชนิดหนึ่ง Shirabe (1978) สามารถนำวิธีการนี้มาตรวจหาโลหะหนักปรอท จากไลโซโซมของเซลล์ประสาทในสมองน้อย (Cerebellum) ในผู้ป่วยโรคมินามาตะได้ สำหรับรูปแบบการกระจายตัวของโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อจากการตรวจสอบด้วยวิธีนี้ขึ้นกับชนิดของโลหะหนักปรอท ปริมาณ และวิธีการที่ได้รับ ส่วนมากพบการสะสมของโลหะหนักปรอท การสะสมในไลโซโซมของเนื้อเยื่อต่างๆของสัตว์ที่ได้รับโลหะหนักปรอท (Danscher and Stoltenberg, 2006) ได้มีการใช้เทคนิคนี้ในการตรวจหาการปนเปื้อนโลหะหนักปรอทจากสารอุดฟัน (amalgam) โดยพบการสะสมโลหะหนักปรอทที่ปมประสาท ตับอ่อน ปอด และต่อมใต้สมอง (Danscher and Stoltenberg, 2006) นอกจากนี้สามารถใช้วิธีนี้ในการตรวจหาโลหะหนักได้หลายรูปแบบ เช่น การตรวจหาทองและเงินในรูปของคอลลอยด์ การหาเกลือซัลไฟด์หรือซัลไฟด์ของโลหะเงิน ปรอทหรือบิสมัทในอวัยวะที่มีการสัมผัสกับโลหะนั้นๆ การหาเกลือซัลไฟด์หรือซัลไฟด์ของสังกะสีในเซลล์ที่เรียกว่า Zinc-enriched (ZEN) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการสะสมของสังกะสีในรูปอิสระหรือมีการจับเป็นพันธะอย่างหลวมๆ (Danscher, 2000) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Danscher และ Andreassen (1997) ที่สามารถตรวจหาสังกะสีในรูปอิสระ และในรูป Zinc sulfide ในสมองหนูขาวได้ นอกจากนี้ยังมีการใช้ตรวจหาการสะสมโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อไตของหนู พบว่าจะมีการสะสมของโลหะหนักปรอทในบริเวณท่อไตส่วนต้น (proximal tubes) (NØrregaard et

al., 1994) สำหรับการประยุกต์ใช้ในสัตว์น้ำนั้น Loumbourdis และ Danscher (2004) สามารถใช้เทคนิคออดิโอเมทริกัลกราฟฟีที่จำเพาะต่อการหาปรอทในรูปซัลไฟด์หรือซีลีไนด์ (HgS/Se^{AMG}) มาใช้ในการหาโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อของกบนา (*Rana ridibunda*) พบว่าหลังจากวันแรกของการได้รับโลหะหนักปรอทจะพบโลหะหนักปรอทในเม็ดเลือดแดง หลอดเลือดฝอยที่ตับ (Sinusoid) บริเวณด้านบนของเซลล์ตับ (Apical part of hepatocytes) และในท่อน้ำดีฝอย (Bile canaliculi) และในวันที่ 6 หลังได้รับโลหะหนักปรอทจะพบการสะสมใน Kuffer cell และเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (Endothelial cells)

เมทัลโลไธโอนีน (Metallothionein) เป็นโปรตีนขนาดโมเลกุลเล็กที่มีส่วนประกอบของกรดอะมิโนซิสตีอีน (Cysteine) อยู่สูง (Lau et al., 2001) ทำให้มีความสามารถในการจับอย่างจำเพาะกับอนุมูลประจุบวก (Divalent cations) ได้อย่างแน่นหนา เมทัลโลไธโอนีนนี้พบได้ทั้งในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ รวมถึงปลาชนิดต่างๆ (Cheung et al., 2004) และสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง รวมทั้งมนุษย์ด้วย (Shimada et al., 2004) ถึงแม้ว่าบทบาทที่แน่นอนของเมทัลโลไธโอนีนในปลาหรือสัตว์น้ำชนิดอื่นยังไม่แน่ชัด แต่ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีรายงานถึงหน้าที่ของโปรตีนชนิดนี้ว่าใช้ในการควบคุมสมดุลของอนุมูลโลหะหนักที่จำเป็นภายในเซลล์ เช่น สังกะสี (Zn) และยังสามารถลดความเป็นพิษของโลหะหนักต่างๆ เช่น ตะกั่ว (Pb) ปรอท (Hg) และแคดเมียม (Cd) Chan (1995) รายงานว่าสารโลหะหนักสามารถกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์ขึ้นและโปรตีนเมทัลโลไธโอนีน ในเนื้อเยื่อปลาหลายชนิด และสามารถทำหน้าที่ลดความเป็นพิษของพวกโลหะหนักที่ไม่จำเป็นที่ตกค้างภายในร่างกายได้ จึงสามารถใช้เมทัลโลไธโอนีนตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (Biomarker) ของการปนเปื้อนโลหะหนักในแหล่งน้ำได้ (Cheung et al., 2004; Cheung et al., 2005; Quirós et al., 2007) สำหรับวิธีการในการตรวจสอบเมทัลโลไธโอนีน ได้แก่ วิธีดูโซโพลีเมอร์ส

(Polymerase chain reaction, PCR) เพื่อตรวจสอบการแสดงออกของจีน หรือการวัดปริมาณของโปรตีนเมทัลโลโปรตีนที่เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อสัตว์ (Quirós et al., 2007) และใช้วิธีทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry) (Chan, 1995) จากการทดลองนำปลาชนิดที่ได้รับทองแดง (Cu^{2+}) แคดเมียม (Cd^{2+}) ปรอท (Hg^{2+}) นิกเกิล (Ni^{2+}) ตะกั่ว (Pb^{2+}) และสังกะสี (Zn^{2+}) มาทำการแสดงออกของเมทัลโลโปรตีนจีนจากเนื้อเยื่อตับ ไต และเหงือกโดยวิธีดูโซโฟลิเมอร์สพบว่ามีความไวสูงโดยมีการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของเมทัลโลโปรตีน mRNA ในกลุ่มทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Cheung et al., 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าขนาดของโลหะหนักที่สูงกว่ามีผลต่อการเพิ่มปริมาณเมทัลโลโปรตีน (Chan, 1995) มีรายงานการตรวจหาลำดับของกรดอะมิโนของเมทัลโลโปรตีนของปลาชนิดต่างๆ พบว่าเมทัลโลโปรตีนในสัตว์จำพวกปลา (teleosts) มีความอนุรักษ์ (Conserve) สูง และมีกรดอะมิโนซิสเทอีน (Cysteine) จำนวนถึง 20 ตัวที่ไม่มีการเปลี่ยนแปลงไป (Chan, 1994) ดังแสดงในรูปที่ 1 สำหรับในปลาชนิดที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของเมทัลโลโปรตีนของปลาชนิด *Oreochromis aureus* และ *O. mossambicus* พบว่ามีลำดับนิวคลีโอไทด์จำนวน 1,452 คู่เบส (bp) และ 1,426 bp ตามลำดับ (Cheung et al., 2005) (รูปที่ 2)

```

MDFCECKTGTTCNCGGSCCKNCSCCTTCNK SCCPCCPSGCPKASGCVCKGKTCDDTTCCQ (1)
-----S-----K-S--A--S-K-A---D-----S-----S--- (2)
-----S-----K-S--A--S-K- -----D--S-----S--- (3)
-----AT-K-T--Q---K- -----S-----NS--SS--- (4)
-----A-----AT-K-T-----K- ---F-----S-----N-NS-GSS--- (5)
-----A-----S-TK---KS-S- ---D-----S-----S--- (6)

```

รูปที่ 1 ลำดับของกรดอะมิโนของ (1) winter flounder MT (2) rainbow trout MT-A (3) rainbow trout MT-B (4) stone-loach MT (5) goldfish MT และ (6) tilapia MT (Chan, 1994)

1 GGTGGTCAACATCATGATGACTATATATTTTTATTATGAAAAATGAGCAAGCTGAGGAGTCACAGATATATTAAATGAATFATTGTTTAGATF
 GGTGTTCAACATCATGATGACTATATATTTTTATTATGAAAAATGAGCAAGCTGAGGAGTCACAGATATATTAAATGAATFATTATTTAGATF
 101 TGGATTTAGGATATTTAATGTGGATTTTACTCCAGTGAATGATCGCACTATCAAAATAATACCGGCATAGAGTGTATTAGTTCATTAATTAAGTAC
 TGGATTTAGGATATTTAATGTGGATTTTACTCCAGTGAATGATCGCACTATCAAAATAATACCGGCATAGAGTGTATTAGTTCATTAATTAAGTAC
 201 AAGGTTAAGTTTGGAAATGAAAAGATGAAAAAATCTGCACCGAAATGTTTTCTGTGAAGATCTTCGCAGATGCTGAAAAGTTTTTTTGTAAATTTTAA
 GAGGTTAAGTTTGGAAATGAAAAGATGAAAAAATCTGCACCGAAATGTTTTCTGTGAAGATCTTCGCAGATGCTGAAAAGTTTTTTTGTAAATTTTAA
 301 AATAAFACTGTTGGTGATAATTCGCGCCCATCCACCCACATCCTCTCATATTAGCCCCAAATGGTTGTATAAAATTCACCTTCAGGCCATATAAACTA
 AATAAFACTGTTGGTGATAATTCGCGCCCATCCACCCACATCCTCTCATATTAGCCCCAAATGGTTGTATAAAATTCACCTTCAGGCCATATAAACTA
 401 AGAGTCTCTGATGGGAGACCCGCA----TGTAGCCCATCTCAAAATGAAATCCGTTGTGTGGTGAAGGCTTTGTGACCTGTGTTCAGATCTCCGTGTAGCC
 AGAGTCTCTGATGGGAGACCCGCA----TGTAGCCCATCTCAAAATGAAATCCGTTGTGTGGTGAAGGCTTTGTGACCTGTGTTCAGATCTCCGTGTAGCC
 501 TGCAGATGTTCTCCTCTGTATTACATCATGAATTAATGCAATGGTTGAATTTCTCCAGAAGTTGACATTCCTATATATATGTTCAAGCAGCAGGCCATAGA
 TGCAGATGTTCTCCTCTGTATTACATCATGAATTAATGCAATGGTTGAATTTCTCCAGAAGTTGACATTCCTATATATATGTTCAAGCAGCAGGCCATAGA
 501 TCTGGGTATGAGATCTCTCTGTTCCTCCGCTCTGAAAGCTTGTCTGTGTGCAAACTCTCTGTAATCATTAACCAAGTCTGCTGCTGAGGCTGACAGCC
 TCTGGGTATGAGATCTCTCTGTTCCTCCGCTCTGAAAGCTTGTCTGTGTGCAAACTCTCTGTAATCATTAACCAAGTCTGCTGCTGAGGCTGACAGCC
 TATA box
 701 GTGTTTGCAGCTGGCTCTGTGTCTCAGGACCTATAAAATGAGCCACTCTACTACCCATCTTCACAAATTCATTCAAGTCCCGAAGAGACAAGAGCA
 GTGTTTGCAGCTGGCTCTGTGTCTCAGGACCTATAAAATGAGCCACTCTACTACCCATCTTCACAAATTCATTCAAGTCCCGAAGAGACAAGAGCA
 801 ACGCCAGCATCACTCTGAAACAAACGAGCCATCAACTGAAAATGTAACCCCTGGGAGTGGCCAAAGTgagtggttctctgcyctggtttaaacaaggttatt
 ACGCCAGCATCACTCTGAAACAAACGAGCCATCAACTGAAAATGTAACCCCTGGGAGTGGCCAAAGTgagtggttctctgcyctggtttaaacaaggttatt
 901 taataogctgcttggtaaccagoggacogcatgaaacttaactgttcttttatgttccagCTGCAACTGCAACTGCGGAGGATCTGCACTGCAAAAG
 taataogctgcttggtaaccagoggacogcatgaaacttaactgttcttttatgttccagCTGCAACTGCAACTGCGGAGGATCTGCACTGCAAAAG
 100: TGCTCTGCAAGAGCTGCAAGAGGtagtaagtaaaacaccacacagcacagcaaaacaactctatogacctggttaaagttacgcctccctggttctctcccaag
 TGCTCTGCAAGAGCTGCAAGAGGtagtaagtaaaacaccacacagcacagcaaaacaactctatogacctggttaaagttacgcctccctggttctctcccaag
 110: taacatgcatagtgtagcagatgggtctctctatagtcacgcccattctctcaaaaattgogcaatttgatgcccctttttt----aagtgctgogcaggtgggtc
 taacatgcatagtgtagcagatgggtctctctatagtcacgcccattctctcaaaaattgogcaatttgatgccccttttttttttaagtgctgogcaggtgggtc
 120: taattgctttaaagacttaagttctctgtctctctgtgtctctgact-----gcagGCTGCTGCACTCTGCCCCATCCCGCTGCAAGCA
 taattgctttaaagacttaagttctctgtctctctgtgtctctgact-----gcagGCTGCTGCACTCTGCCCCATCCCGCTGCAAGCA
 130: AATGCGCTCTGGCTGGTGTGCAAAAGGAAAGACATGCGACACCCAGCTGCTGCCAGTGApyagttctgcagcatcagctctctctgctgcaattaaggagtoa
 AATGCGCTCTGGCTGGTGTGCAAAAGGAAAGACATGCGACACCCAGCTGCTGCCAGTGApyagttctgcagcatcagctctctctgctgcaattaaggagtoa
 140: tttatttggcaactaaatcataaatttgcacatgctccagaaatgaaacgaatg
 tttatttggcaactaaatcataaatttgcacatgctccagaaatgaaacgaatg

รูปที่ 2 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเมทัลโลไซโอนินจีนของปลานิล *O.aureus* (แถวบน) และ *O.mossambicus* (แถวล่าง) ตำแหน่งของอินตรอน (intron) แสดงด้วยอักษรตัวพิมพ์เล็ก (Cheung et al., 2005)

ปลานิลเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีมากที่สุดในสภาพแวดล้อมทางน้ำ และมีความไวต่อการปนเปื้อนของ โลหะหนัก สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพและมลภาวะทางสิ่งแวดล้อมในน้ำ โปรตีนจีน Metallothionein มีส่วนประกอบของกรดอะมิโน Cysteine อยู่สูงทำให้มีความสามารถในการจับจำเพาะกับพวกอนุคลประจุบวก (Divalent cations) ได้แม่นยำ โปรตีน Metallothionein นี้พบได้ทั้ง

ใน สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น หอย ปู สัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ เช่นปลา (Cheung et al., 2004; Roberta et al., 1999) และสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นสูง เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม รวมถึงมนุษย์ (Shimada et al., 2004) ถึงแม้ว่าบทบาทที่แน่นอนของ โปรตีนจีน Metallothionein ในปลาหรือสัตว์น้ำชนิดอื่นนั้นยังไม่แน่ชัด แต่รายงานในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมมีรายงานถึงบทบาทและหน้าที่ของ โปรตีนชนิดนี้ในการควบคุมสมดุลของอนุมูลโลหะหนักที่จำเป็นภายในเซลล์ และยังสามารถลด ความเป็นพิษของโลหะหนักที่ไม่จำเป็น เช่น พิษของตะกั่ว ปรอท และแคดเมียม จากการศึกษาของ Chan และคณะ (1995) พบว่า สารโลหะหนักสามารถเหนี่ยวนำกระตุ้นให้เกิดการสังเคราะห์จีนและ โปรตีน Metallothionein (MT) ในเนื้อเยื่อปลาหลายชนิด (Cheung et al., 2005) สามารถทำหน้าที่ ในการควบคุมการแสดงออกของโลหะหนักที่จำเป็นต่อร่างกาย เช่น สังกะสี ทองแดง และทำหน้าที่ ช่วยลดความเป็นพิษของพวกโลหะหนักที่ไม่จำเป็น ตกค้างภายในร่างกาย เช่น แคดเมียม ตะกั่ว ปรอท ดังนั้นควรประยุกต์ใช้โปรตีน MT เป็นตัวบ่งชี้คุณภาพทางชีวภาพและมลภาวะการปนเปื้อน ของโลหะหนักทางอ้อมในสิ่งแวดล้อมควบคู่กับการตรวจวัดปริมาณการตกค้างในเนื้อเยื่อโดยตรง โดยเฉพาะในแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำในประเทศไทย

วิธีดำเนินการวิจัย

(Materials and Methods)

โครงการนี้แบ่งการศึกษาเป็น 2 ส่วน คือ

1. การทดลองก่อโรคในห้องปฏิบัติการ
2. การเก็บตัวอย่างปลา จากแหล่งเลี้ยงตามธรรมชาติ

การทดลองก่อโรคในห้องปฏิบัติการ

ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอทในปลานิล (*Oreochromis niloticus*)

1. สัตว์ทดลอง

ปลานิล (*Oreochromis niloticus*) น้ำหนักประมาณ 25-50 กรัม ความยาว 9-12 เซนติเมตร อายุประมาณ 30 วัน จำนวน 325 ตัว แบ่งเป็น 13 กลุ่มการทดลอง กลุ่มการทดลองละ 25 ตัว เตรียมตู้กระจกขนาด 62.5 ลิตร สำหรับเลี้ยงปลานิลโดยเติมน้ำให้มีปริมาตร 50 ลิตร วัดอุณหภูมิ น้ำ ค่าความเป็นกรดด่าง (pH) และค่าการละลายของออกซิเจนในน้ำ (Dissolved oxygen, DO) แล้วแยกปลาเป็นกลุ่ม เลี้ยงในแต่ละตู้ดังนี้

1.1 กลุ่มควบคุมปกติ จำนวน 25 ตัว

1.2 กลุ่มที่เลี้ยงในน้ำที่ผสมเมอร์คิวริกคลอไรด์ (Mercuric chloride, HgCl₂, Sigma-Aldrich)

1.2.1 ความเข้มข้น 0.5 พีพีเอ็ม (0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 25 ตัว

1.2.2 ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม (1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 25 ตัว

1.2.3 ความเข้มข้น 2 พีพีเอ็ม (2 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 25 ตัว

1.2.4 ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม (5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) จำนวน 25 ตัว

1.3 กลุ่มที่ฉีดเมอร์คิวริคคอลลอยด์ เข้าในช่องท้อง (Intraperitoneal administration)

1.3.1 ความเข้มข้น 0.5 พีพีเอ็ม (0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

1.3.2 ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม (1 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

1.3.3 ความเข้มข้น 2 พีพีเอ็ม (2 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

1.3.4 ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม (5 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

โดยทำการฉีดเมอร์คิวริคคอลลอยด์โดยใช้เข็มฉีดขนาด 26G ฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง ปริมาตรตัวละ 0.5 มิลลิลิตร

1.4 กลุ่มที่ป้อนเมอร์คิวริคคอลลอยด์ให้กิน (Oral administration)

1.4.1 ความเข้มข้น 0.5 พีพีเอ็ม (0.5 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

1.4.2 ความเข้มข้น 1 พีพีเอ็ม (1 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

1.4.3 ความเข้มข้น 2 พีพีเอ็ม (2 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

1.4.4 ความเข้มข้น 5 พีพีเอ็ม (5 ไมโครกรัมต่อกรัม) จำนวน 25 ตัว

โดยทำการป้อนเมอร์คิวริคคอลลอยด์โดยใช้หลอดฉีดยาป้อนสารเคมีเข้าไปในช่องปาก ปริมาตรตัวละ 0.5 มิลลิลิตร

เลี้ยงปลาชนิดโดยให้ออกซิเจนอย่างเพียงพอตลอดเวลา และให้อาหารเม็ดสำเร็จรูปวันละ 2 ครั้ง ทำการเปลี่ยนน้ำในแต่ละตู้ทุกๆ 2 วัน

2. การเก็บตัวอย่าง

เก็บตัวอย่างทุกๆ 3 วัน ได้แก่ วันที่ 0, 3, 6, 9, 12 และ 15 ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่นำมาทำการศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา และการตรวจหาโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อด้วยวิธีออดิเมทัลโลกราฟี และการแสดงออกของเมทัลโลโปรตีนจีน และเก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 3, 9 และ 15

ตามลำดับ สำหรับตัวอย่างที่จะนำไปวิเคราะห์หาปริมาณโลหะหนักปรอทในเนื้อเนื้อด้วยวิธี ICP-AES โดยจะทำการเก็บตัวอย่างกลุ่มละ 2 หรือ 4 ตัวอย่างต่อวันที่ทำการเก็บตัวอย่าง ก่อนทำการเก็บตัวอย่างทำสไลด์ปาลานิลโดยใช้ความเย็น จากนั้นทำการการุณฆาต (Euthanasia) แล้วชันสูตรตัวอย่างปาลานิลในแต่ละกลุ่ม บันทึกภาพและจดบันทึกรอยโรคทางพยาธิวิทยา เก็บตัวอย่างอวัยวะได้แก่ สมอง หัวใจ ตับ ม้าม ไต กล้ามเนื้อลำตัว และอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร เก็บรักษาสภาพใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มอลิน (10% Buffered formalin) แบ่งอวัยวะปริมาณประมาณ 1 กรัม เก็บในหลอด Eppendorf แล้วนำไปรักษาสภาพ ที่ตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส สำหรับตัวอย่างที่จะนำไปทำการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักในเนื้อเนื้อด้วยวิธี ICP-AES ทำการแยกเก็บอวัยวะ คือ กล้ามเนื้อลำตัว หัวใจ และอวัยวะภายในช่องท้อง ได้แก่ ตับและม้ามร่วมกับอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร รักษาสภาพที่ตู้แช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3. การศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา

3.1 การศึกษาทางรอยโรคจุลพยาธิวิทยา

นำตัวอย่างอวัยวะที่รักษาสภาพใน 10% บัฟเฟอร์ฟอร์มอลิน มาผ่านกระบวนการทางฮิสโตเทคนิค ฝังในพาราฟิน และตัดให้หนาประมาณ 4-6 ไมโครเมตร ย้อมด้วยสีฮีมาท็อกซิลิน และอีโอซิน (Hematoxylin and eosin) แล้วนำไปศึกษารอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง ดังนี้

3.1.1 ไต (Kidney, trunk)

การตรวจรอยโรคของไต โดยดูการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุท่อไต (Hydropic degeneration of tubular epithelium) ร่วมกับการสะสมของ Hyaline droplets ในไซโตพลาสซึม ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้ (Oliveria Ribeiro et al., 2002; Peebua et al., 2006).

Score 0: normal kidney

Score +1: mild hydropic degeneration of tubular epithelium

Score +2: moderate hydropic degeneration of tubular epithelium with hyaline

droplets

Score +3: severe hydropic degeneration of tubular epithelium with diffuse hyaline

droplets

3.1.2 ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas)

การตรวจรอยโรคของตับและตับอ่อน โดยดูการปรากฏของไขมันที่สะสมในเซลล์ตับ (Fat storage in hepatocytes) และ การฝ่อลีบของเซลล์ตับอ่อน (Pancreatic acinar atrophy) (Oliveria Ribeiro et al., 2002). ตับและตับอ่อน ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้

Fat storage

Score 0: No fat storage in hepatocytes

Score +1: fat storage in hepatocytes less than 25%

Score +2: fat storage in hepatocytes about 50-75 %

Score +3: fat storage in hepatocytes more than 75%

Pancreatic acinar atrophy

Score 0: normal pancreatic acini

Score +1: mild pancreatic acinar atrophy

Score +2: moderate pancreatic acinar atrophy

Score +3: severe diffuse pancreatic acinar atrophy

3.1.3 ม้าม (Spleen)

รอยโรคของม้ามโดยการตรวจดู การเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs (MMCs in white pulp)

(Mela et al., 2007) ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้

Score 0: no MMCs

Score +1: mild increase MMCs

Score +2: moderate increase MMCs

Score +3: severe increase MMCs

3.1.4 เหงือก (Gill)

รอยโรคของเหงือก ตรวจดูการอักเสบของเหงือก (Oliveira Ribeiro et al., 2002) ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้

Score 0: normal gill

Score +1: mild gill inflammation

Score +2: moderate gill inflammation

Score +3: severe gill inflammation

3.1.5 อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal organs)

ทำการประเมินรอยโรค การอักเสบของทางเดินอาหาร (Gastroenteritis) การเพิ่มขึ้นของเซลล์สร้างเมือก หรือ Goblet cells ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้

Score 0: normal gastrointestinal tract

Score +1: mild gastroenteritis/ mild increasing of mucous glands

Score +2: moderate gastroenteritis/ moderate increasing of mucous glands

Score +3: severe gastroenteritis/ severe increasing of mucous glands

3.1.6 สมอง (Brain)

ทำการประเมินรอยโรค การอักเสบของสมอง (Encephalitis) การเสื่อมและการตายของเซลล์ประสาท (Degeneration and/or necrosis of neuron). ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้

Score 0: normal brain

Score +1: mild encephalitis/ degeneration/ necrosis

Score +2: moderate encephalitis/ degeneration/ necrosis

Score +3: severe encephalitis/ degeneration/ necrosis

3.1.7 กล้ามเนื้อ (Muscle)

ทำการประเมินรอยโรค การอักเสบของกล้ามเนื้อ (Myositis) การเสื่อมและการตายของเซลล์กล้ามเนื้อ (Muscular degeneration and/or necrosis). ระดับความรุนแรงให้คะแนนรอยโรค ดังนี้

Score 0: normal muscle

Score +1: mild myositis/ muscle degeneration

Score +2: moderate myositis/ muscle degeneration

Score +3: severe myositis/ muscle degeneration

4. การตรวจหาโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อด้วยวิธีออโตเมทัลโลกราฟี (Autometallography)

นำตัวอย่างอวัยวะที่ฝังในพาราฟินที่ตัดให้มีขนาดหนาประมาณ 4-6 ไมโครเมตร มาทำการขจัดพาราฟิน นาน 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำยา 1% โพแทสเซียมไซยาไนด์ (1% Potassium cyanide) เพื่อขจัดโลหะส่วนเกินนอกเหนือจากปรอท นาน 2 ชั่วโมง แล้วนำไปแช่ในน้ำยาฟอสฟอรัสคลอไรด์

เปอ์ (Physical developer) ซึ่งประกอบด้วย 50% อาราบิกกัม (50% Arabic gum) 50% ซิเตรตบัฟเฟอร์ (50% Citrate buffer) 5.6% ไฮโดรควิโนน (5.6% Hydroquinone) และ 17% ซิลเวอร์ไนเตรต (17% Silver nitrate) นาน 1 ชั่วโมงจากนั้นนำไปจัดคราบเหล็กส่วนเกินด้วย 10% โซเดียมไทโอซัลเฟต (10% Sodium thiosulfate) นาน 20 นาที และน้ำยาฟาร์มเมอร์ (Farmer solution ซึ่งประกอบด้วย 20% โซเดียมไทโอซัลเฟต กับ 7.5% โพแทสเซียมเฟอริกไซยาไนด์; Potassium ferric cyanide) 30-60 นาที เพื่อจัดคราบเงินส่วนเกิน แล้วนำไปย้อมสีทับด้วยเมเซอร์ฮีมาท็อกซิลิน (Mayer's hematoxylin) และทำการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยใช้สไลด์เนื้อเยื่อของหนูทดลองที่ได้รับโลหะหนักปรอทจากการสูดดมเป็นสไลด์ชิ้นเนื้อควบคุมบวก โดยจะอ่านผลเป็นผลบวกและผลลบ และให้คะแนนผลบวกตามปริมาณเซลล์ที่มีการสะสมของอนุภาคเงิน (Ag) ภายในเซลล์ ร่วมกับดูการกระจายตัวของการย้อมติดที่เนื้อเยื่อต่างๆ

5. การตรวจวิเคราะห์โลหะหนักปรอทด้วยวิธี inductive coupled plasma atomic emission spectrophotometry (ICP-AES)

นำตัวอย่างอวัยวะที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาบดให้ละเอียด บ่มเพาะระเหยน้ำในตัวอย่างด้วยความเย็น (Lyophilized) ทำการชั่งน้ำหนักตัวอย่าง จากนั้นย่อยตัวอย่างด้วยกรดไนตริกและกรดไฮโปคลอริก อัตราส่วน 10 ต่อ 1 เป็นเวลา 1 วัน ระเหยสารละลายที่ย่อยแล้วด้วยความร้อนประมาณ 60 องศาเซลเซียสบนเตาให้ความร้อนให้เหลือสารละลายปริมาณ 1 มิลลิลิตร ทำการเจือจางสารละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ปริมาตร 10 มิลลิลิตร จากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักปรอทโดยเครื่อง Inductive coupled plasma atomic emission spectrophotometry (Perkin Elmer model PLASMA-100) ณ ศูนย์เครื่องมือวิจัยวิทยาศาสตร์และ

เทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยปริมาณที่วัดได้คำนวณเป็นหน่วยพีพีเอ็มต่อน้ำหนักแห้ง (ppm/dry weight)

6. การตรวจการแสดงออกของเมทัลโลไธโอนีนจีน (Metallothionein gene)

6.1 การตรวจด้วยวิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemistry)

นำตัวอย่างอวัยวะที่ฝังในพาราฟินที่ตัดให้มีความหนาประมาณ 4-6 นาโนเมตร มาทำการขจัดพาราฟิน นาน 30 นาที จากนั้นนำตัวอย่างอวัยวะที่ฝังในพาราฟินไปผ่านกระบวนการเผาแอนติเจนด้วยคู่อบความดัน (Autoclave) ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส นาน 30 นาทีในซิเตรทบัฟเฟอร์ pH 6 (Citrate buffer pH 6) ตามด้วยการยับยั้งปฏิกิริยา Endogenous peroxidase ด้วย 3% ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (3% Hydrogen peroxide) ในเมทานอล (Methanol) หลังจากนั้นล้างสไลด์ด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) ครั้งละ 5 นาที จำนวน 3 ครั้ง ใช้ Monoclonal mouse anti-horse metallothionein (Dako®, Denmark) เป็น Primary antibody โดยเจือจางในอัตราส่วน 1:400 จากนั้นบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในกล่องควบคุมความชื้น นาน 60 นาที จากนั้นใช้ Biotinylated anti-mouse IgG antibody และ EnVision™ polymer (Dako REAL™ EnVision™ Detection system, Dako®, Denmark) เป็น Secondary antibody นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส นาน 60 นาที แล้วย้อมด้วย 3, 3'-ไดอะมีโนเบนซีน เตตระไฮโดรคลอไรด์ (3, 3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, DAB) แล้วนำไปตรวจผลภายใต้กล้องจุลทรรศน์แสงสว่าง โดยใช้สไลด์เนื้อเยื่อเด้านมมนุษย์เป็นสไลด์ชิ้นเนื้อควบคุมบวก โดยจะอ่านผลเป็นผลบวกและผลลบ และให้คะแนนผลบวกตามปริมาณเซลล์ที่มีการย้อมติดสี ร่วมกับดูการกระจายตัวของการย้อมติดสีที่เนื้อเยื่อต่างๆ

6.2 การตรวจการแสดงออกของเมทัลโลไทโอนีนจีนด้วยวิธีลูกโซ่โพลีเมอเรส (reverse transcriptase polymerase chain reaction; RT-PCR)

นำตัวอย่างเนื้อเยื่ออวัยวะต่างๆที่เก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส (Hepatopancreas, trunk of kidney, spleen, intestine and muscle) ปริมาณ 50 มิลลิกรัมมาทำการสกัด mRNA โดยใช้สารละลายจากชุดสกัดสำเร็จรูป (Trizol[®], Invitrogen, USA) จากนั้นนำเข้าสู่ปฏิกิริยา Reverse transcription จาก messenger RNA (mRNA) ให้เป็น Complementary DNA (cDNA) โดยใช้ชุด RT-PCR สำเร็จรูป แล้วนำไปทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสเพิ่มจำนวนชิ้นส่วน DNA ด้วยเครื่องทำปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอเรสอัตโนมัติ (Thermocycler) ปฏิกิริยามีปริมาตร 0.5 μ l at 48°C for 45 minutes using kit condition (AccessQuick[™] RT-PCR, Promega, USA). ใช้ Primer ที่ออกแบบมาให้จำเพาะกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของเมทัลโลไทโอนีนจีนตามวิธีของ Chan (1994) (รูปที่ 3) โดยใช้ TMTB primer (5'-GAGGATCCTGCTCGTGCACT-3') เป็น Forward primer และ TMTC เป็น reverse primer (5'-CAGCAAATGCGCCTCCGGCTG-3') (ตารางที่ 2) และใช้ β -actin primers เป็นตัวควบคุมภายใน Primers were designed from metallothionein sequence of tilapia (*Oreochromis mossambicus*) reported in GenBank (AY257202) (Cheung et al., 2004). Forward primer and reverse primer were 5'-GCCCCACCTAGCGTAAATA-3' and 5'-AAAGGTGGACAGGAGGCCA-3', respectively

For PCR condition, 3 μ l of samples were supplemented with the addition of 0.5 μ l of forward primer, 0.5 μ l of reverse primer, 8 μ l of nuclease-free water and 12.5 μ l of dNTP mix (AccessQuick[™] Master Mix, Promega, USA).

โดยปฏิกิริยาของลูกโซ่โพลีเมอร์ประกอบด้วย preheat ที่ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 นาที แล้วเข้าปฏิกิริยาลูกโซ่โพลีเมอร์จำนวน 30 รอบ แต่ละรอบประกอบด้วย Denaturation ที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที Annealing ที่อุณหภูมิ 56 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที และ Extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 40 วินาที แล้วให้ตัวอย่างอยู่ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ก่อนที่จะทำให้เย็นลงจนอุณหภูมิ 15 องศาเซลเซียส (modified from Cheung et al., 2004).

หลังจากนั้นทำการตรวจสอบขนาดชิ้นส่วน DNA ด้วยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิสบน 1.5% อะกาโรสเจล (Agarose gel electrophoresis) ย้อมสีชิ้นส่วน DNA บนเจลด้วยเอทิดียมโบรไมด์ (Ethidium bromide) ตรวจสอบผลบวกของชิ้นส่วน DNA ที่มีความยาว 127 bp

1 ATG GAT CCG TGC GAA TGC GCC AAG ACT GGA ACC TGC AAC TGC

Met Asp Pro Cys Glu Cys Ala Lys Thr Gly Thr Cys Asn Cys

43 GGA GGA TCC TGC TCG TGC ACT AAG TGC TCC TGC AAG AGC TGC

Gly Gly Ser Cys Ser Cys Thr Lys Cys Ser Cys Lys Ser Cys

85 AAG AAG AGC TGC TGC GAC TGC TGC CCA TCC GGC TGC AGC AAA

Lys Lys Ser Cys Cys Asp Cys Cys Pro Ser Gly Cys Ser Lys

127 TGC GCC TCC GGC TGC GTG TGC AAA GGA AAG ACA TGC GAC ACC

Cys Ala Ser Gly Cys Val Cys Lys Gly Lys Thr Cys Asp Thr

169 AGC TGC TGC CAG TGAaggagtctgcagcatcagctctctgctgcaattctgga

Ser Cys Cys Gln End

221 gtctttatttgccactaatcatgaattgacatgtccagaaatgataacggatga

277 tttgtacttggtttgaataaacatggttggtgacgcta

รูปที่ 3 ลำดับนิวคลีโอไทด์ของเมทลโดโรโอนีน cDNA ของปลานิล (*Tilapia mossambica*) (Chan, 1994)

ตารางที่ 2 Primers for RT-PCR.

Primer name	sequences (5'-3')	Nucleotide position
TMTB	GAGGATCCTGCTCGTGCACT	44-63
TMTC	CAGCAAATGCGCCTCCGGCTG	120-140
tActins	GCCCCACCTGAGCGTAAATA	1,072-1,091
tActinas	AAAGGTGGACAGGAGGCCA	1,118-1,136

การเก็บตัวอย่างปลา จากแหล่งเลี้ยงตามธรรมชาติ

สัตว์ทดลอง

1. เก็บตัวอย่างปลานิล จากกระชังในแหล่งเพาะเลี้ยงธรรมชาติ จำนวน 4 แหล่งๆ ละ 10-15 ตัวอย่าง และทำการเก็บตัวอย่างน้ำ เพื่อตรวจวิเคราะห์คุณภาพ
2. นำตัวอย่างที่ได้มาศึกษาทางห้องปฏิบัติการเช่นเดียวกับ การทดลองก่อโรคในห้องปฏิบัติการ
 - 2.1 ทำการชันสูตรตัวอย่างปลาที่เก็บมา
 - 2.2 เก็บตัวอย่าง อวัยวะปลา ได้แก่ เหงือก ตับ ม้าม ไต ทางเดินอาหาร สมอง และเนื้อปลา บริเวณคั่นท้อง โดยแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ
 - 1 เก็บรักษาใน น้ำยา 10% ฟอรัมาลิน เพื่อศึกษา รอยโรคทางพยาธิวิทยา และการตรวจหา โลหะหนักปรอท โดยวิธี Autometallography
 - 2 เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 ซ. เพื่อรอวิเคราะห์โลหะหนัก
 - 3 เก็บรักษาในตู้แช่แข็ง อุณหภูมิ -80 ซ. เพื่อรอการศึกษาการแสดงออกของเงิน Metallothionein

การรวบรวมข้อมูลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

วิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรคทางมหพยาธิวิทยา และจุลพยาธิวิทยา การตรวจหา โลหะหนักปรอทด้วยวิธีอโตเมทัลโลกราฟี และ ICP-AES ในแต่ละกลุ่มการทดลองที่แตกต่าง กัน โดยใช้สถิติเชิงพรรณนาเป็นตัวเปรียบเทียบ (Descriptive analysis) วิเคราะห์ปริมาณ โลหะหนัก ปรอทในเนื้อเยื่อจากการวิเคราะห์ด้วยวิธี ICP-AES ด้วย One-way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น ร้อยละ 95 ($p < 0.05$) และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของการแสดงออกของเมทัลโลไธโอนีนจีน และ

mRNA ของเมทิลโลไซโอนีนจีนในแต่ละกลุ่มการทดลองที่แตกต่างกัน โดยใช้สถิติโดยใช้สถิติเชิง

พรรณนา

สถานที่ทำการวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการศูนย์วิจัยโรคสัตว์น้ำ ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยมหาวิทยาลัย
2. ห้องปฏิบัติการหน่วยพยาธิวิทยา ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
3. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์โลหะหนัก ภาควิชาสัตวแพทย์สาธารณสุข คณะสัตว
แพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
4. ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์โลหะหนัก สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์การแพทย์ จุฬาลงกรณ์
มหาวิทยาลัย
5. แหล่งเพาะเลี้ยงปลานิล และ แหล่งน้ำธรรมชาติ จังหวัดกรุงเทพมหานคร นครปฐม ราชบุรี
สมุทรสาคร และสมุทรสงคราม

ผลการวิจัย

(Results)

4.1 น้ำหนักและความยาวของปลานิล

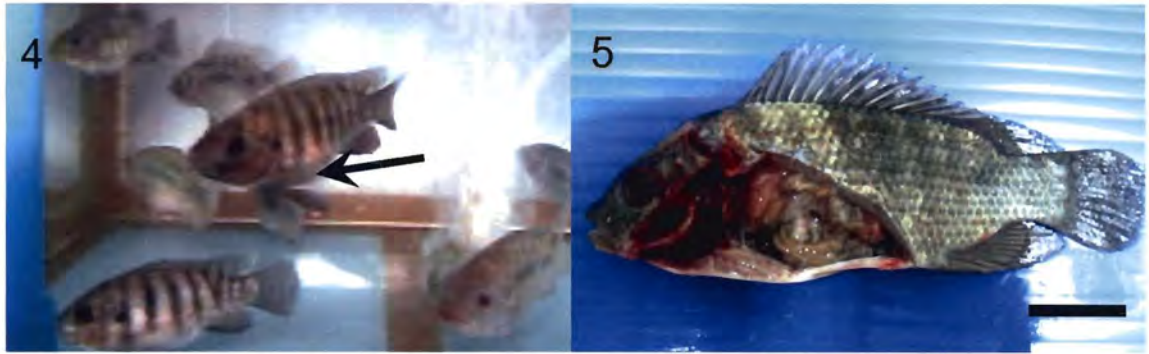
ค่าน้ำหนักเฉลี่ยของปลานิล มีค่าเท่ากับ 34.41 ± 8.22 กรัม และความยาวเฉลี่ย 11.52 ± 1.17 ซม.

4.2 อุณหภูมิ ค่าความเป็นกรด-ด่าง ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) (Temperature, pH and dissolved oxygen (DO) of water)

อุณหภูมิเฉลี่ยของน้ำ มีค่า 27.14 ± 0.39 °ซ. ค่าความเป็นกรด-ด่าง เท่ากับ 7.30 ± 0.11 ค่าการละลายของออกซิเจน (DO) เท่ากับ 9.56 ± 0.60 mg/l.

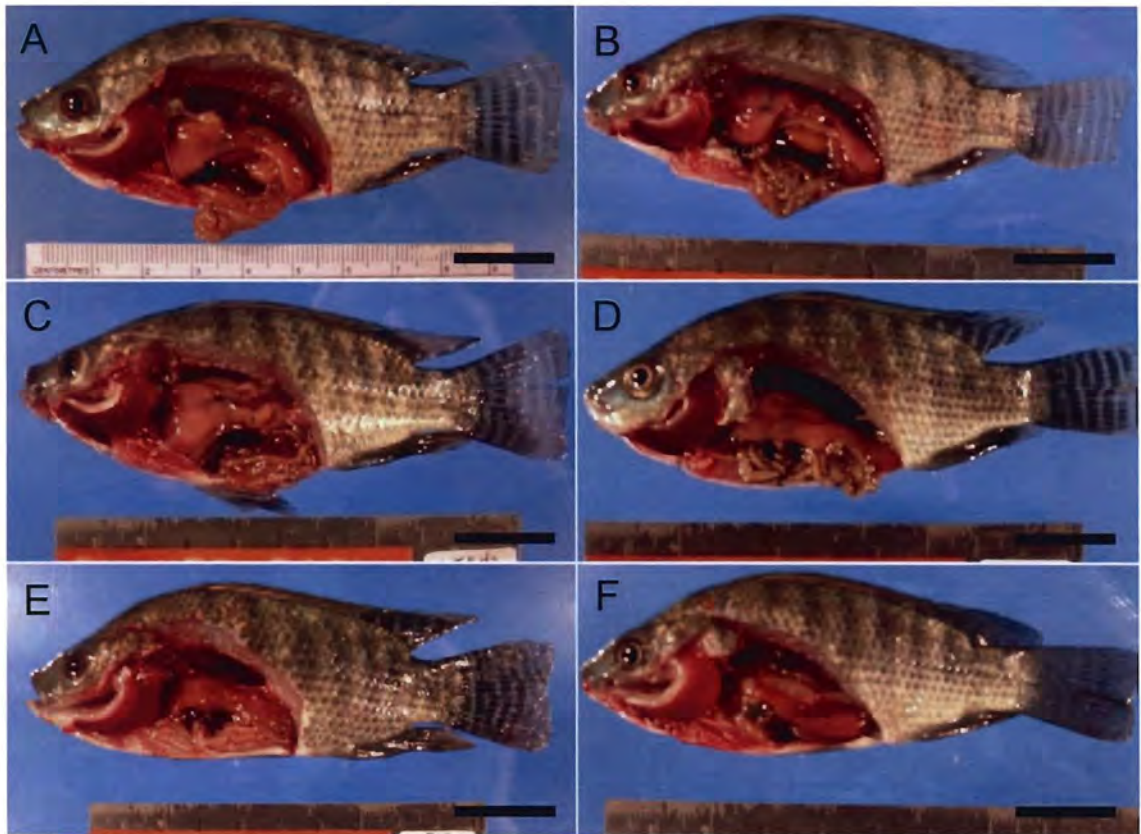
4.3 อาการทางคลินิก และรอยโรคพยาธิวิทยา (Clinical signs and gross lesions)

ปลานิลในกลุ่ม 2 และ 5 ppm semi-static exposure แสดงอาการที่สังเกตเห็นได้ คือ การว่ายวนขึ้นมาบนผิวน้ำ การเพิ่มอัตราการหายใจโดยการเพิ่มการเคลื่อนไหวของแผ่นปิดเหงือกที่ถี่ขึ้น การว่ายน้ำวน (Splash swimming) และตายทันทีภายในระยะเวลา 1-2 ชั่วโมง ปลานิลกลุ่มที่ฉีดเข้าช่องท้อง (Intraperitoneal groups) ปลาจะเคลื่อนไหวช้าลง และนอนจมลงที่บริเวณด้านล่างของอ่างเลี้ยงในวันแรกของการทดลอง ปลานิลกลุ่ม 2 และ 5 ppm i.p. พบการบวมของช่องท้อง ภายหลังจากวันที่ 3 ของการฉีด $HgCl_2$ จำนวน 2 ตัว (รูปที่ 4) ซึ่งการบวมของช่องท้อง จะพบการสะสมของก้อนหนองสีเหลืองในช่องท้อง ร่วมกับการยึดเกาะกันของอวัยวะภายในช่องท้อง (รูปที่ 5) สำหรับในกลุ่มทดลองอื่นๆ ไม่พบรอยโรคที่มีความแตกต่างกัน (รูปที่ 6)



รูปที่ 4 การบวมของช่องท้อง พบได้ในปลาในกลุ่ม 2 ppm HgCl₂ intraperitoneally injection group (ลูกศร)

รูปที่ 5 การชันสูตรซากในปลาในกลุ่ม 2 ppm HgCl₂ intraperitoneally injection ที่การบวมของช่องท้อง มีการสะสมของก้อนหนองสีเหลืองในช่องท้อง ร่วมกับการยึดเกาะกันของอวัยวะภายในช่องท้อง (bar = 2.5 ซม.)



รูปที่ 6 ผลการชันสูตรซากในปลาทุกกลุ่ม ไม่พบรอยโรคใดในวันที่ 15 ของการทดลอง A. Control, B. 2 ppm HgCl₂ i.p. tilapia, C. 5 ppm HgCl₂, D. 0.5 ppm HgCl₂ bath, E. 1 ppm HgCl₂ bath and F. 5 ppm HgCl₂ oral administration, bar = 2 cm.

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา (Histopathological lesions)

1. ไต (Kidney, trunk)

พบการเสื่อมและการตายของเซลล์เยื่อหุ้มไตในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 8) พบการเสื่อมของเซลล์เยื่อหุ้มไตระดับรุนแรง (Tubulonephrosis) ในปลากลุ่ม Semi-static exposure groups และมีค่าคะแนนรอยโรคสูงสุด เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และกลุ่มอื่นๆ (คะแนน +3) โดยในวันแรกของการทดลอง (day 0) ปลากลุ่ม 0.5, 1, 2, and 5 ppm semi-static exposure groups มีค่าคะแนนรอยโรคเท่ากับ +2, +3, +3 และ +2 ตามลำดับ ในวันที่ 3 และ 6 ของปลากลุ่ม 0.5 and 1 ppm semi-static exposure groups คะแนนรอยโรคมีค่าลดลงเท่ากับ +2 และมีค่าต่ำสุดในวันที่ 12 และ 15 ในวันที่ 12 และ 15 ของปลากลุ่ม 0.5 and 1 ppm semi-static exposure group มีค่าคะแนนรอยโรคเท่ากับ +1

พบการสะสมของ Hyaline droplets ในเซลล์เยื่อหุ้มไตที่เกิดการเสื่อม ในปลากลุ่ม Semi-static exposure groups (รูปที่ 9) ปลากลุ่ม Intraperitoneally injection พบการเสื่อมของ เซลล์เยื่อหุ้มไต ค่าคะแนนรอยโรคในกลุ่ม 0.5, 1, 2 and 5 ppm i.p. groups มีค่าเท่ากับ +1, +1, +1 and +2 ตามลำดับ ภายหลังจากวันที่ 3 ค่าคะแนนรอยโรคในกลุ่ม 0.5, 1, 2 and 5 ppm i.p. groups มีค่าเพิ่มขึ้นเท่ากับ +2, +2, +2 and +3 ตามลำดับ และในวันที่ 15 มีค่าคะแนนรอยโรค เท่ากับ +1, +1, +2 and +2 ตามลำดับ ในปลากลุ่ม Oral groups มีค่าคะแนนรอยโรคต่ำสุด คือ พบการเสื่อมของ เซลล์เยื่อหุ้มไตระดับอ่อนในวันที่ 0 คะแนนรอยโรคของปลากลุ่ม 0.5, 1, 2 and 5 ppm oral groups มีค่าเท่ากับ +1, +2, +2 and +2 ตามลำดับ ค่าคะแนนรอยโรค มีค่าลดลง ในวันที่ 3 ดังนี้ คือ +1, +1, 0 and +1 ตามลำดับ

ปลาในกลุ่มการทดลอง มักตรวจพบ Immature nephrons และกลุ่มเซลล์เยื่อท่อไตที่สร้างทดแทน (Regeneration of tubular epithelium) (รูปที่ 10 และ 11) ค่าคะแนนรอยโรคดังแสดงในตารางที่ 4 โดยพบว่าปลาในกลุ่ม 5 ppm i.p. group ในวันที่ 12 มีคะแนนเท่ากับ +3 ปลาในทุกกลุ่ม Semi-static exposure groups มีคะแนนรอยโรค เท่ากับ +1 ในวันที่ 0, 3, 6, 9 และ 15

ตรวจพบการสะสมของคริสตัลที่มีรูปร่างหลากหลาย (Pleomorphic crystals) สะสมในท่อไต ในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 12) โดยเฉพาะในกลุ่ม 1, 2 and 5 ppm semi-static exposure ในวันที่ 0 พบการสะสมของคริสตัล ระดับรุนแรง (score +3)

2. ตับและตับอ่อน (Hepatopancreas)

พบการสะสมไขมันในเซลล์ตับ (Fat storage in hepatocytes) ของปลากลุ่มควบคุม ในระดับสูง ค่าคะแนน +3 (รูปที่ 13) ค่าคะแนนการสะสมไขมันในเซลล์ตับในทุกกลุ่มดังแสดงในตารางที่ 4 เซลล์ตับของปลาในกลุ่มทดลอง จะขยายใหญ่ และมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ ร่วมกับ นิวคลีโอลัสที่เด่นชัด ปลาในกลุ่ม i.p. groups พบการลดลงของการสะสมไขมันในเซลล์ตับระดับรุนแรง ในวันที่ 6 ของปลากลุ่ม 2 ppm dose และหลังวันที่ 3 ของปลากลุ่ม 5 ppm dose (รูปที่ 14) ปลาในกลุ่ม Semi-static exposure group พบการลดลงของการสะสมไขมันในเซลล์ตับระดับรุนแรง ในวันที่ 3 ของปลากลุ่ม 0.5 ppm dose นอกจากนี้ยังพบการสะสมของ Hyaline droplets ในเซลล์ตับ ในวันที่ 12 ของปลากลุ่ม 1 ppm semi-static exposure group (รูปที่ 16)

การฝ่อลีบของตับอ่อน (Pancreatic atrophy) สามารถตรวจพบได้ในทุกกลุ่มการทดลอง แต่มีค่าคะแนนแตกต่างกัน การฝ่อลีบของตับอ่อนนั้นแสดงให้เห็นโดยการลดลงของจำนวนเซลล์เยื่อตับอ่อน และปรากฏเป็นเศษเนื้อเยื่อ บริเวณโดยรอบของหลอดเลือดในตับ (รูปที่ 15) ปลาในกลุ่ม

i.p. and semi-static exposure groups ในวันแรกของการทดลอง พบการฝ่อลีบของตับอ่อน ในระดับปานกลางถึงรุนแรง (score +2 and +3)

3. ม้าม (Spleen)

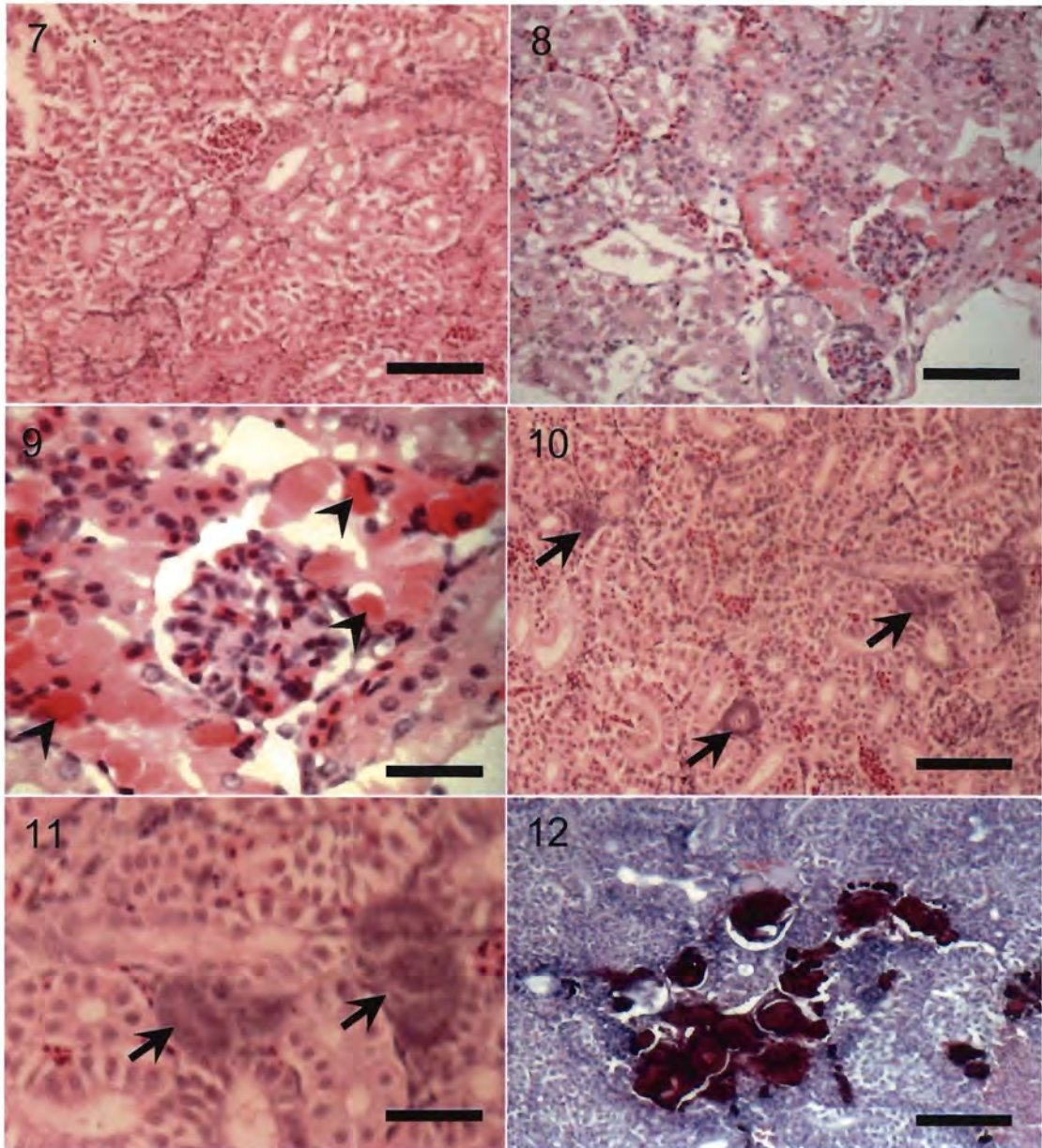
พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs ในเนื้อเยื่อของม้าม ในปลาในกลุ่มการทดลองเมื่อเปรียบเทียบกับปลากลุ่มควบคุม (รูปที่ 17) การลดลงของเซลล์ลิมโฟไซต์ (Lymphoid depletion) สามารถตรวจพบในบางกลุ่มการทดลอง

4. อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร (Gastrointestinal organs)

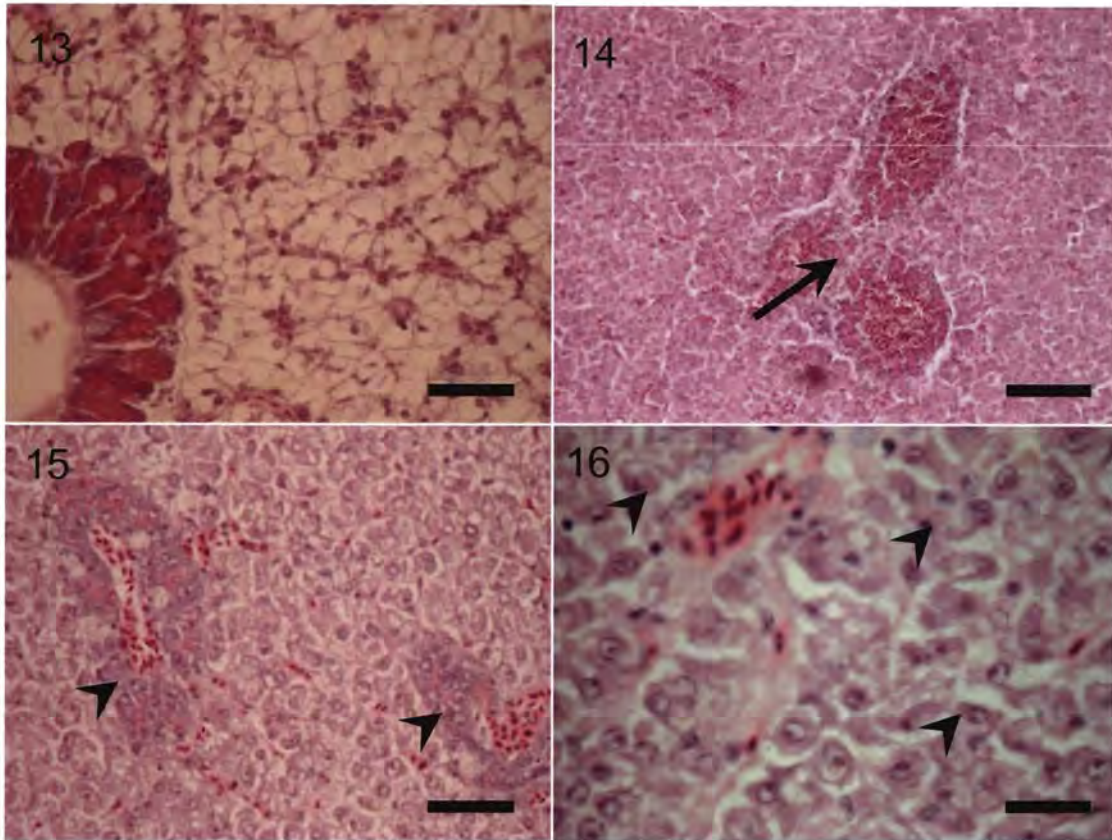
ปลาในกลุ่ม Oral and semi-static exposure groups พบการงอกขยายของ Goblet cells และการแทรกตัวของเซลล์โมโนนิวเคลียสในชั้นใต้เยื่อของลำไส้ (รูปที่ 18). ค่าคะแนนรอยโรคดังแสดงในตารางที่ 4 ปลากลุ่ม 2 ppm oral ในวันที่ 3 ตรวจพบการตายของเซลล์เยื่อผนังกระเพาะอาหาร ร่วมกับการแทรกตัวของเซลล์โมโนนิวเคลียสในชั้นใต้เยื่อ (รูปที่ 19)

5. อวัยวะอื่นๆ เหงือก สมอง และกล้ามเนื้อ (Gills, brain and skeletal muscle)

ไม่พบรอยโรคใดๆ ที่เหงือก สมอง และกล้ามเนื้อในปลากลุ่ม ทดลอง และกลุ่มควบคุม



- รูปที่ 7 ภาพจุลพยาธิวิทยาไตของปลากลุ่มควบคุมในวันที่ 15 (HE staining, bar = 150 μ m).
- รูปที่ 8 การเสื่อมของเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตระดับรุนแรง ร่วมกับการสะสมของ Hyaline granules ในไตของปลากลุ่ม 2 ppm semi-static exposure tilapia (HE staining, bar = 150 μ m).
- รูปที่ 9 การสะสมของ Hyaline droplets ในเซลล์เยื่อหุ้มท่อไตที่เสื่อม ในปลากลุ่ม 2 ppm semi-static exposure (หัวลูกศร) (HE staining, bar = 35 μ m).
- รูปที่ 10 และ 11 ไตของปลากลุ่ม 2 ppm i.p. ที่ตรวจพบการเพิ่มขึ้นของ Immature nephrons (ลูกศร) (HE staining, bar; figure 10 = 300 μ m และรูปที่ 11 = 80 μ m).
- รูปที่ 12 การสะสมของ Pleomorphic crystals ในท่อไตของปลากลุ่ม 0.5 ppm $HgCl_2$ i.p. (HE staining, bar = 400 μ m).

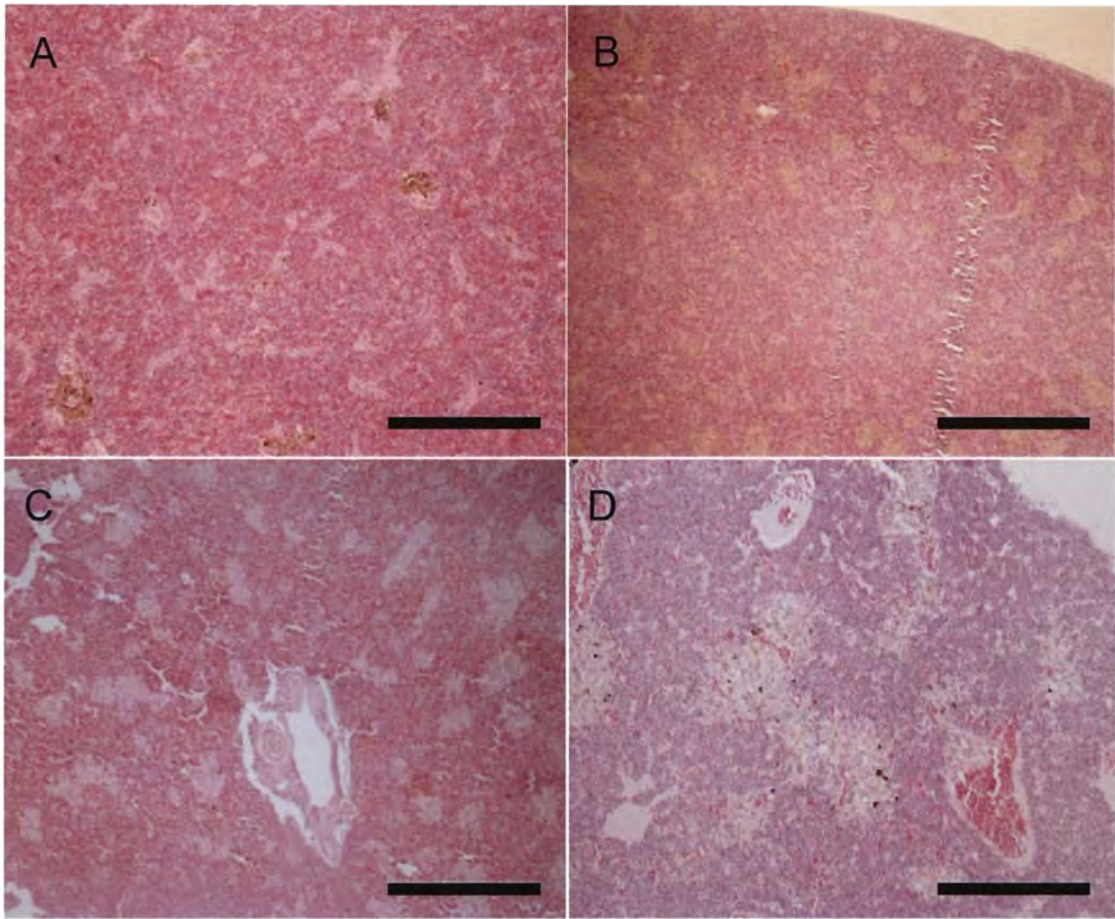


รูปที่ 13 ตับและตับอ่อนของปลากลุ่มควบคุมในวันที่ 15 (Fat storage score +3) (HE staining, bar = 30 μ m).

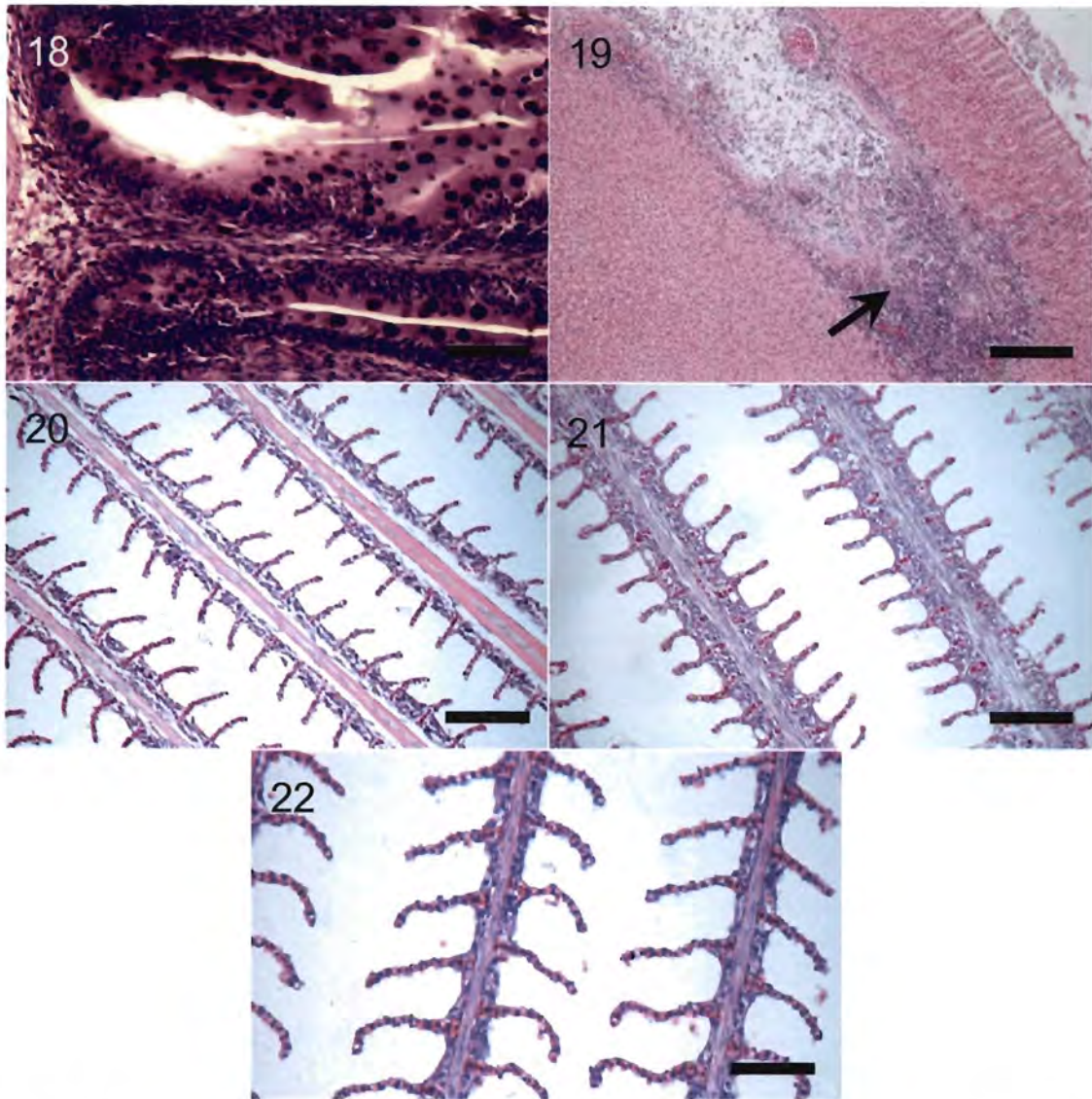
รูปที่ 14 เซลล์ตับที่พบการสูญเสียการสะสมของไขมันอย่างรุนแรง (Fat storage score +1) ในวันที่ 3 ของปลากลุ่ม 5 ppm $HgCl_2$ intraperitoneally injection และพบการฟ่อลีบของตับอ่อน ร่วมกับการแทรกของเซลล์ MMCs (ลูกศร) (HE staining, bar = 125 μ m).

รูปที่ 15 เซลล์ตับที่พบการสูญเสียการสะสมของไขมันอย่างรุนแรง (fat storage score +1) ในวันที่ 15 ของปลากลุ่ม 1 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure group และพบการฟ่อลีบของตับอ่อน (ลูกศร) (HE staining, bar = 60 μ m).

รูปที่ 16 ในวันที่ 12 ของปลากลุ่ม 1 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure group, เซลล์ตับมีนิวเคลียสขนาดใหญ่ นิวคลีโอไลต์ที่เด่นชัด ร่วมกับการสะสมของ Hyaline droplets ในไซโตพลาสซึม (หัวลูกศร) (HE staining, bar = 15 μ m).



รูปที่ 17 ม้ามของปลาในกลุ่มทดลองที่พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs กลุ่มควบคุม (A),
 0.5 ppm HgCl₂ semi-static exposure group on day 15 (score +3) (B),
 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure group on day 12 (C)
 and day 15 (D) (score+3)
 (HE staining, bar; A = 450 μm, B = 450 μm, C = 450 μm, and D = 250 μm).



รูปที่ 18 การงอกขยายของเซลล์ Goblet ที่เชื่อมของลำไส้ของปลาในกลุ่ม 1 ppm semi-static exposure groups on day 6 (HE staining, bar = 80 μ m).

รูปที่ 19 การตายของเซลล์เยื่อบุกระเพาะอาหาร ร่วมกับการแทรกตัวของเซลล์โมโนนิวเคลียร์ ของปลาในกลุ่ม 2 ppm $HgCl_2$ oral administration tilapia on day 3 (arrow) (HE staining, bar = 300 μ m).

รูปที่ 20 Secondary gill lamellae of control tilapia on day 15 (HE staining, bar = 150 μ m).

รูปที่ 21 Secondary gill lamellae of 1 ppm semi-static exposure group on day 15 (HE staining, bar = 160 μ m).

รูปที่ 22 Secondary gill lamellae of 5 ppm semi-static exposure group on day 15 (HE staining, bar = 100 μ m).

ตารางที่ 3 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลากลุ่มควบคุม (Histopathological scores of control group)

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score										
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs		
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation	(gill, brain, muscle)		
Contro	0	0	0	0	0	+3	0	0	0	0	0	NRL	
1		3	0	0	0	+3	0	0	0	0	0	0	NRL
		6	0	0	0	+3	0	0	0	0	0	0	NRL
		9	0	0	0	+3	0	0	0	0	0	0	NRL
		12	0	0	0	+3	0	0	0	0	0	0	NRL
		15	0	0	0	+3	0	0	+1	0	0	0	NRL

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

ตารางที่ 4 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง i.p. groups.

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score								
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs (gill, brain, muscle)
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation	
i.p.	0.5 µg/g	0	0	0	0	+3	0	0	0	0	NRL
		3	0	0	0	+3	0	0	0	0	NRL
		6	0	0	+1	+1	0	+3	0	0	NRL
		9	+2	0	+3	+2	0	+3	0	0	NRL
		12	+2	0	+1	+2	0	+3	0	0	NRL
		15	+2	0	+3	+2	+1	+3	0	0	NRL
	1 µg/g	0	+1	0	0	+3	+1	0	0	0	NRL
		3	0	0	0	+3	+1	0	0	0	NRL
		6	+2	+2	+1	+2	+1	+1	0	0	NRL
		9	+1	0	+2	+2	+2	+3	0	0	NRL
		12	+1	0	+3	+2	+1	+2	0	0	NRL
		15	+1	+1	+3	+2	+2	+2	0	0	NRL

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

ตารางที่ 5 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลากลุ่มทดลอง i.p. groups (continue).

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score								
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs (gill, brain, muscle)
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation	
i.p.	2 µg/g	0	+1	0	0	+3	0	0	0	0	NRL
		3	+1	0	0	+2	+2	+1	0	0	NRL
		6	+2	+2	+1	+2	+2	+1	0	0	NRL
		9	+2	+2	+2	+1	+2	+2	0	0	NRL
		12	+2	0	+3	+2	+1	+2	0	0	NRL
		15	+2	+1	+3	+2	+2	+2	0	0	NRL
	5 µg/g	0	+2	0	0	+2	+1	0	0	0	NRL
		3	+3	0	0	+1	+2	+1	0	0	NRL
		6	+2	0	0	+2	+2	+2	0	0	NRL
		9	+2	+1	+1	+2	+2	+2	0	0	NRL
		12	+2	+3	+3	+2	+3	+2	0	0	NRL
		15	+2	+1	+1	+1	+2	+3	0	0	NRL

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

ตารางที่ 6 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง oral groups.

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score								
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation	(gill, brain, muscle)
Oral	0.5 µg/g	0	0	0	0	+3	0	0	0	0	NRL
		3	+1	0	0	+2	+2	0	0	+3	NRL
		6	+1	0	+1	+2	+2	+3	0	+3	NRL
		9	+1	0	+1	+2	+2	+2	0	+3	NRL
		12	0	0	0	+2	+1	+2	0	+2	NRL
		15	+1	0	+2	+2	+2	+2	0	+3	NRL
	1 µg/g	0	0	0	0	+3	0	0	0	0	NRL
		3	+2	0	+1	+2	+2	+2	0	+3	NRL
		6	+1	0	0	+2	+1	+2	0	+2	NRL
		9	+1	0	0	+2	+1	+1	0	+3	NRL
		12	0	0	0	+2	+1	+2	0	0	NRL
		15	+1	0	+1	+2	+1	+3	0	0	NRL

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

ตารางที่ 6 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง oral groups (continue).

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score								
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs (gill, brain, muscle)
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation	
Oral	2 µg/g	0	+1	0	+3	+1	+3	0	0	0	NRL
		3	0	0	0	+2	+1	0	+2	+2	NRL
		6	0	0	+1	+2	+1	+2	0	0	NRL
		9	0	0	0	+3	0	+2	0	0	NRL
		12	0	0	0	+3	0	+2	0	0	NRL
		15	0	0	0	+2	+1	+2	0	0	NRL
	5 µg/g	0	0	0	0	+3	0	0	0	0	NRL
		3	0	0	0	+2	+1	+1	0	0	NRL
		6	+1	0	+1	+3	+1	+2	0	0	NRL
		9	+1	0	+1	+3	+1	+2	+1	+2	NRL
		12	+1	0	0	+2	+1	+2	0	+2	NRL
		15	+2	0	+3	+2	+1	+3	0	0	NRL

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

ตารางที่ 7 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง semi-static exposure groups.

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score								
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs (gill, brain, muscle)
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation	
Semi- static exposure	0.5 µg/ml	0	+3	+1	+2	+2	+1	+1	0	+1	NRL
		3	+2	+1	+2	+1	+2	+3	0	+1	NRL
		6	+2	+1	+1	+2	+1	+3	+2	0	NRL
		9	+2	+1	+1	+1	+2	+3	+2	0	NRL
		12	+1	0	+2	+2	+2	+3	+2	0	NRL
		15	+2	+1	+1	+2	+2	+3	+2	0	NRL
	1 µg/ml	0	+3	0	+3	+3	+2	+2	0	0	NRL
		3	+2	0	+2	+2	+2	+2	0	0	NRL
		6	+2	+1	+2	+1	+2	+3	0	0	NRL
		9	+1	0	+2	+1	+2	+3	0	0	NRL
		12	+2	0	+2	+1	+2	+3	0	0	NRL
		15	+1	0	+2	+1	+3	+3	0	0	NRL

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

ตารางที่ 7 รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของปลาในกลุ่มทดลอง semi-static exposure groups (continue).

Group	Dose	Day	Histopathological lesion score									
			Trunk of kidney			Hepatopancreas		Spleen	Gastrointestinal organs		Other organs (gill, brain, muscle)	
			Degeneration/ necrosis of tubular epithelium	Immature nephron	Crystal in tubules	Fat storage	Pancreatic acinar atrophy	MMCs	Infiltration of mononuclear cells	Goblet cells proiferation		
Semi- static exposure	2 µg/ml	0	+3	0	+3	+3	+2	+1	0	0	NRL	
		3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
	5 µg/ml	0	+3	NA	+3	+3	+2	+1	0	0	NRL	
		3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NRL: no remarkable lesion, +1: mild, +2: moderate, +3: severe

4.5 การย้อมสี Autometallography เพื่อตรวจการสะสมของโลหะหนักปรอท

(Autometallographic tracing of Hg accumulation)

อนุภาคปรอทที่สะสมในเนื้อเยื่อ จะพบเป็นจุดของเม็ดเงิน (Silver grains) สีเหลืองน้ำตาล จนถึงสีดำ ในไซโตพลาสซึมของเซลล์นั้น ระดับของการติดสี และตำแหน่งของเซลล์ที่ให้ผลบวก มีความแตกต่างกันในแต่ละอวัยวะ และจำนวนวันที่ได้รับโลหะหนักปรอท

4.5.1 ไต

จุดของ Silver grains จะตรวจพบในเซลล์เยื่อปอด ระดับความรุนแรงของการสะสม จะสูงในกลุ่มปลาทดลอง i.p. และ Semi-static exposure groups. ค่าคะแนนของ Autometallography ดังแสดงในตารางที่ 8 ตรวจพบการสะสมของ silver grains จำนวนมาก (score +3) ในปลากลุ่ม 5 ppm i.p. กลุ่ม 0.5 และ 1 ppm semi-static exposure groups ภายหลังวันที่ 3 ของการทดลอง (รูปที่ 24, 25 และ 26).

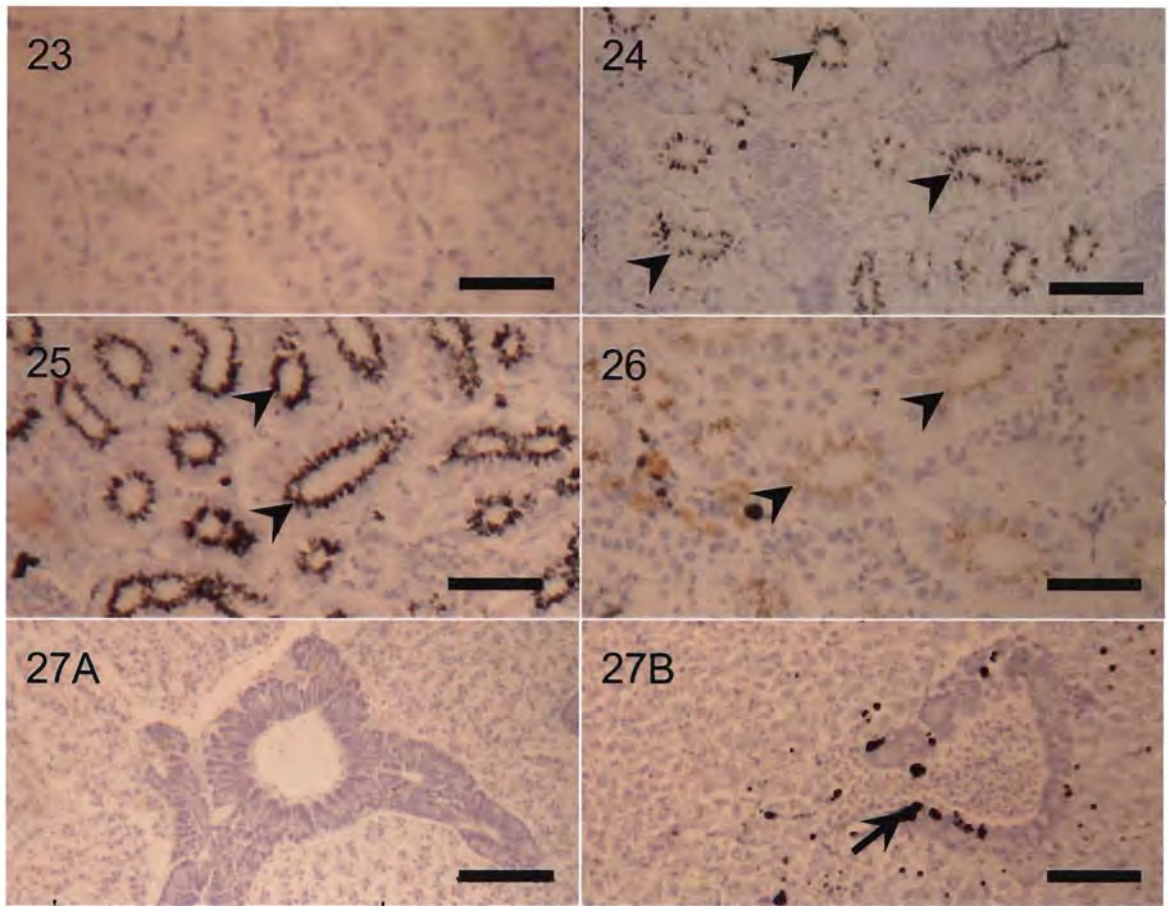
จุดของ Silver grains สามารถตรวจพบในเซลล์ MMCs ที่เคลื่อนตัวเข้ามาแทรกในเนื้อเยื่อ ไต ซึ่งปลาทุกตัวในกลุ่มควบคุมให้ผลลบ (score 0) (รูปที่ 23).

4.5.2 ตับและตับอ่อน

จุดของ Silver grains สามารถตรวจพบในเซลล์ MMCs ที่มีการฟอลิบบของเซลล์ตับอ่อน (รูปที่ 27) ค่าคะแนนความรุนแรงดังแสดงในตารางที่ 5 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ

4.5.3 ม้าม

เซลล์ MMCs ที่เพิ่มขึ้นในม้าม จะสามารถตรวจพบ Silver grains ที่ติดสีเหลืองหรือดำ ในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 28). โดยเซลล์ MMCs จะตรวจพบหลังวันที่ 3 ของการทดลอง (ตารางที่ 8)



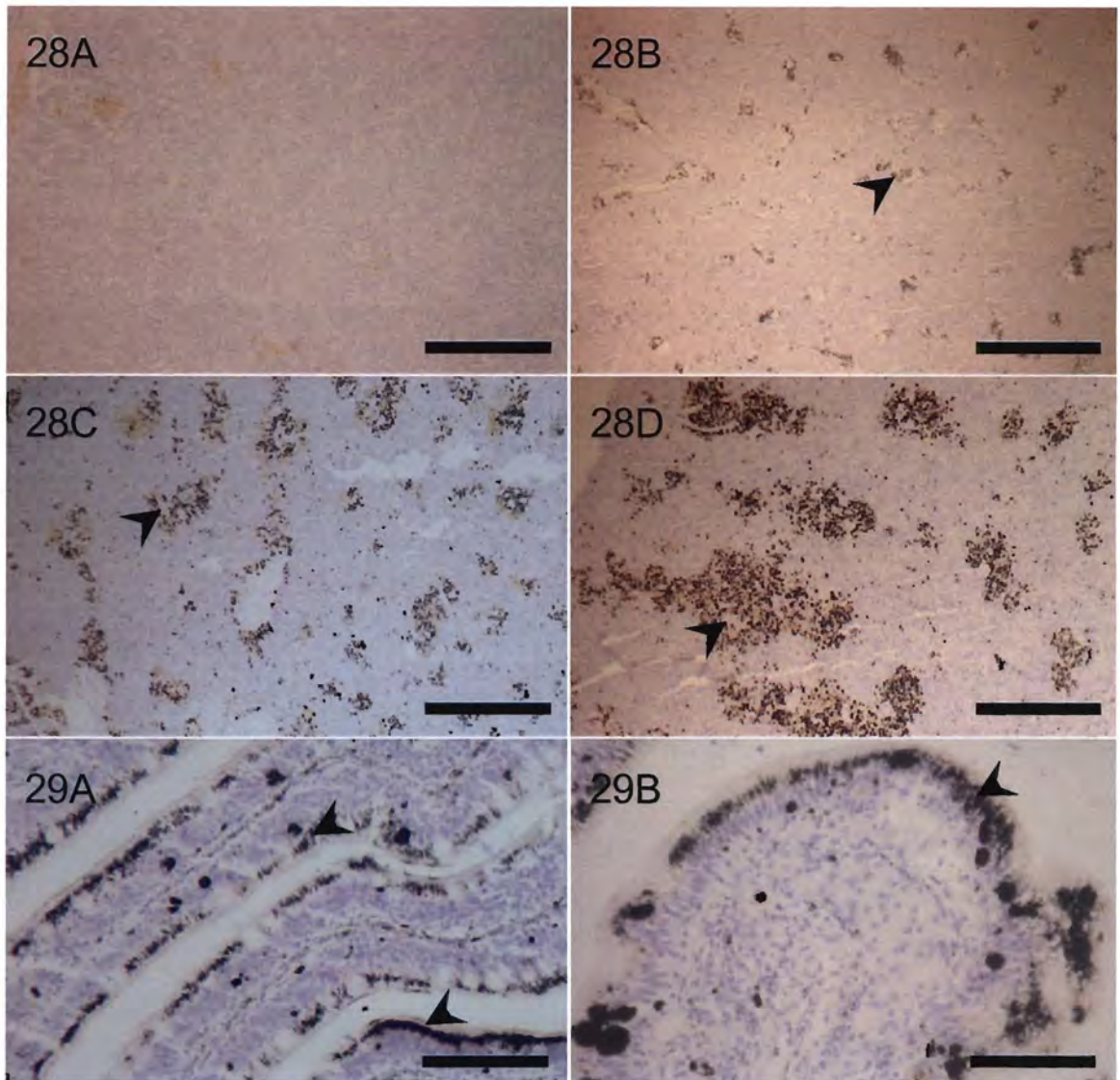
รูปที่ 23 ไตของปลากลุ่มควบคุมที่ให้ผลลบ (AMG staining, bar = 50 μ m).

รูปที่ 24 Silver grains ที่ตรวจพบมีสีเหลืองน้ำตาล และสีดำ (score +2) ในเซลล์เยื่อหุ้มไตของปลากลุ่ม 2 ppm $HgCl_2$ i.p. ในวันที่ 15 (หัวลูกศร) (AMG staining, bar = 150 μ m).

รูปที่ 25 Silver grains ที่ตรวจพบมีสีดำ (score +3) ในเซลล์เยื่อหุ้มไตของปลากลุ่ม 1 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure ในวันที่ 15 (หัวลูกศร) (AMG staining, bar = 150 μ m).

รูปที่ 26 Silver grains ที่ตรวจพบมีสีเหลืองน้ำตาล และสีดำ (score +2) ในเซลล์เยื่อหุ้มไตของปลากลุ่ม 0.5 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure ในวันที่ 15 (หัวลูกศร) (AMG, bar = 45 μ m).

รูปที่ 27 A. Silver grains ที่ตรวจพบในเซลล์ MMCs ที่ตับอ่อนของปลากลุ่ม 0.5 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure ในวันที่ 3 (ลูกศร) B. เซลล์ตับและตับอ่อนที่ให้ผลลบของปลากลุ่มควบคุม (AMG staining, bar; A = 300 μ m and B = 150 μ m).



รูปที่ 28 ม้ามของปลาที่ข้อมสี autometallography A. ผลลบในกลุ่มควบคุม B. ปลากลุ่ม 1 ppm $HgCl_2$ i.p. พบ silver grains ในเซลล์ MMCs ในวันที่ 3 (score +1), C. ปลากลุ่ม 0.5 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +3), and D. ปลากลุ่ม 1 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score+3) (bar; A = 450 μm , B = 550 μm , C = 450 μm and D = 450 μm).

รูปที่ 29 A. and B. เซลล์เยื่อผนังลำไส้ของปลากลุ่ม 1 ppm $HgCl_2$ semi-static exposure tilapia ในวันที่ 15. Silver grains (score +3) ตรวจพบในเซลล์เยื่อ (หัวลูกศร) (AMG staining, bar; A = 120 μm and B = 80 μm).

4.5.4 อวัยวะในระบบทางเดินอาหาร

ตรวจพบการสะสมของ Silver grains ในเซลล์เยื่อของผนังลำไส้ของปลากลุ่ม Oral and semi-static exposure treated groups ปลากลุ่ม Oral groups, AMG ให้ผลบวกเฉพาะกลุ่ม 5 ppm dose ในวันที่ 3 และ 6 ของการทดลอง ปลากลุ่ม 0.5 and 1 Semi-static exposure groups ให้ผลบวกเฉพาะกลุ่มในวันที่ 3 (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 29).

4.5.5 อวัยวะอื่นๆ เหงือก สมอ และกล้ามเนื้อ

เหงือก สมอ และกล้ามเนื้อ ให้ผลลบในปลากลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง (ตารางที่ 8).

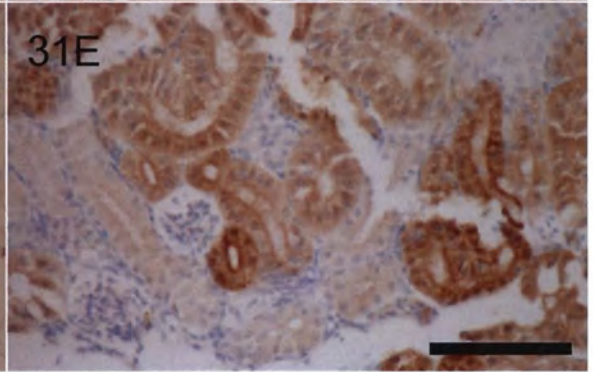
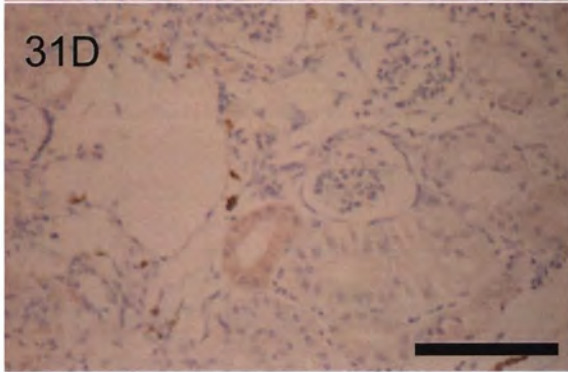
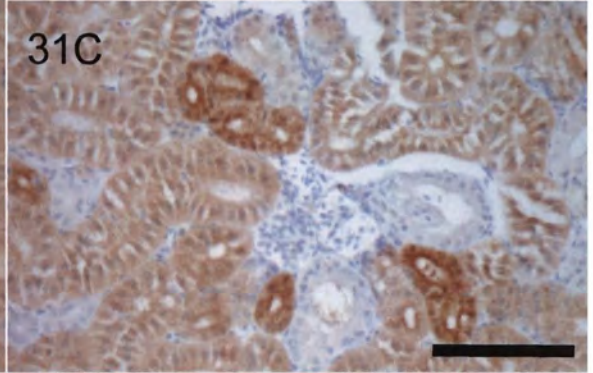
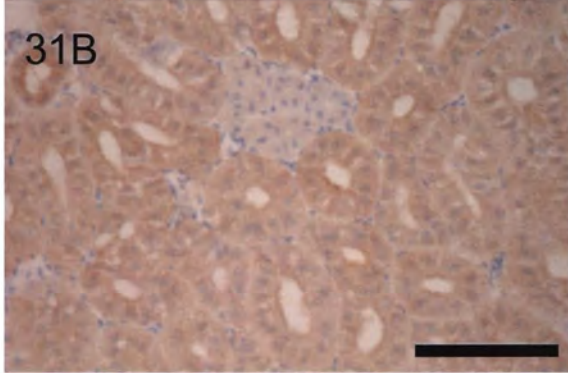
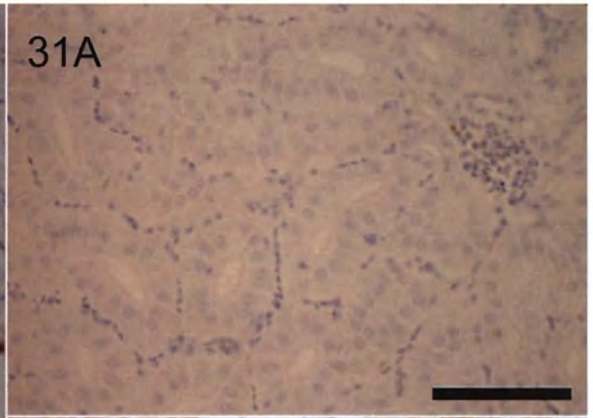
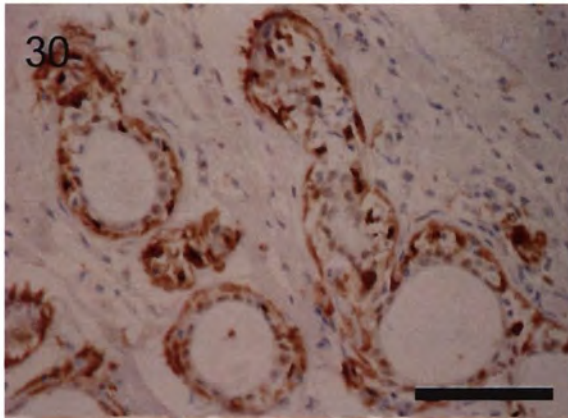
4.6 การแสดงออกของโปรตีน Metallothionein โดยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี (Expression of metallothionein protein by immunohistochemistry)

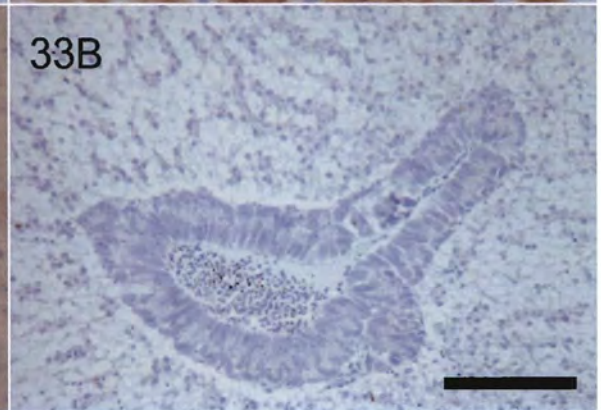
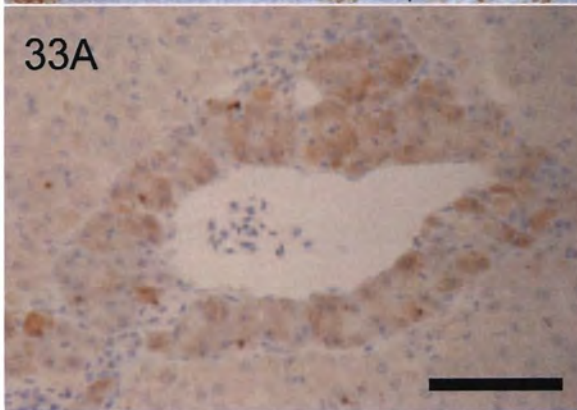
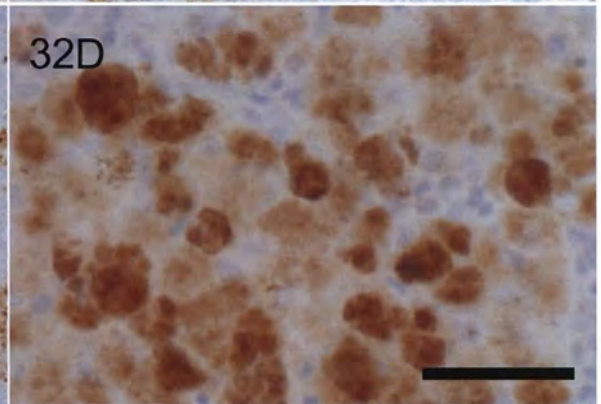
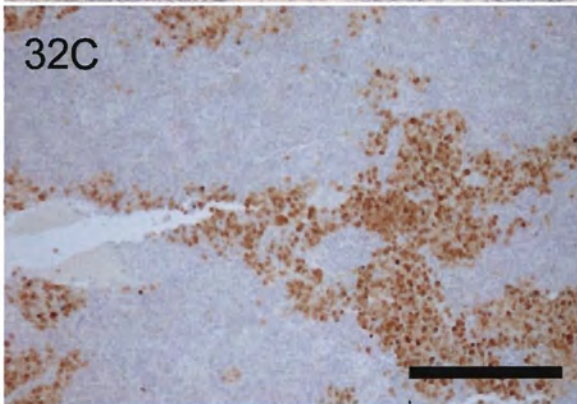
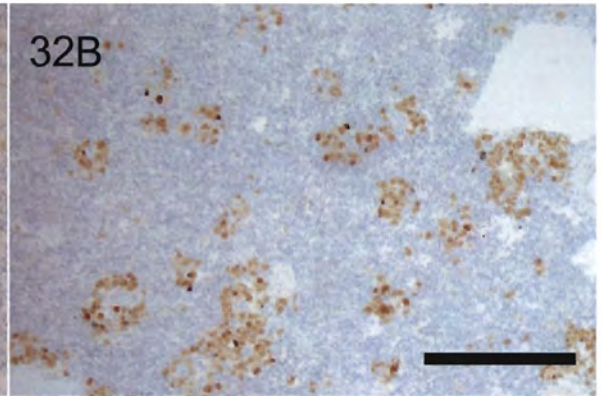
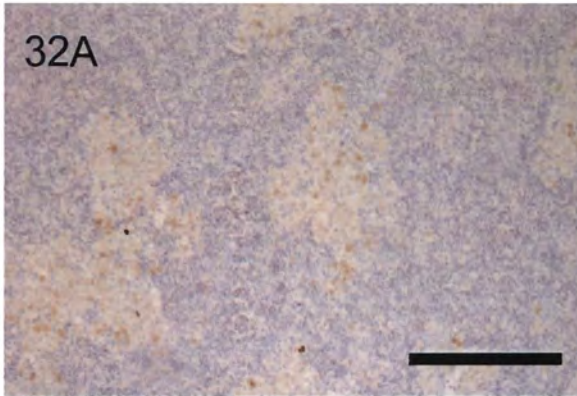
ตัวควบคุมบวกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือ Canine mammary adenocarcinoma ซึ่งแสดงออกการติดสีน้ำตาลเข้มที่ไซโตพลาสซึมของเซลล์ (รูปที่ 30) การแสดงออกของโปรตีน Metallothionein สามารถตรวจพบในปลากลุ่ม 0.5 and 1 ppm semi-static exposure groups โดยปลากลุ่ม 0.5 ppm semi-static exposure group พบการแสดงออกของโปรตีน Metallothionein ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อท่อไต ภายหลังจากวันที่ 9 ของการทดลอง โดยมีค่าคะแนน คือ +3, +3 และ +3 ในวันที่ 9, 12 และ 15 ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และรูปที่ 31) นอกจากนี้ยังตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของม้ามในวันที่ 15 (score +2) (รูปที่ 32).

พบการแสดงออกของโปรตีน Metallothionein ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อท่อไต ของปลากลุ่ม 1 ppm semi-static exposure groups ภายหลังจากวันที่ 6 ของการทดลอง โดยมีค่าคะแนน คือ

+1, +3, +3 และ +3 ในวันที่ 6, 9, 12 และ 15 ตามลำดับ. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของม้ามในวันที่ 15 คล้ายคลึงกับปลาในกลุ่ม 0.5 ppm semi-static exposure group (ตารางที่ 8 และ รูปที่ 31)

พบการแสดงออกของโปรตีน Metallothionein ในตับอ่อนของปลากลุ่ม 0.5 และ 1 ppm semi-static exposure groups ในวันที่ 15. โดยมีค่าคะแนน คือ +2 และ +3 ของปลากลุ่ม 0.5 ppm และ 1 ppm ตามลำดับ (ตารางที่ 8 และรูปที่ 33)





รูปที่ 30 การแสดงออกของโปรตีน metallothionein ในเซลล์ Canine mammary (IHC, DAB, counter stained with Mayer's hematoxylin, bar = 100 μ m).

รูปที่ 31 A. ปลากลุ่มควบคุมไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไต

B. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 9 (score +2),

C. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ Semi-static exposure tilapia ในวันที่ 15 (score +3),

D. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure tilapia ในวันที่ 6 (score +1),

E. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์เยื่อบุท่อไตของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +2) (IHC, DAB, counter stained with Mayer's hematoxylin, bar = 80 μ m).

รูปที่ 32 A. ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 12. B. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของปลากลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +2), C. and D. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl₂ Semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +3) (IHC, DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, bar; A, B, C = 270 μ m, D = 40 μ m).

รูปที่ 33 A. พบการแสดงออกของโปรตีน MT ของปลากลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 15 (score +1), และ B. ไม่พบการแสดงออกของโปรตีน MT ของปลากลุ่มควบคุม (IHC, DAB, counterstained with Mayer's hematoxylin, bar; A = 60 μ m, B = 125 μ m)

ตารางที่ 8 Autometallography and immunohistochemistry scores in experimental tilapias.

Group	Dose	Day	AMG score				IHC score		
			Renal tubular	MMCs at	MMCs at spleen	Epithelium of GI	Renal tubular	Pancreatic acini	MMCs at spleen
			epithelium	pancreatic acini		mucosa	epithelium		
Control	0	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		9	0	0	0	0	0	0	0
		12	0	0	0	0	0	0	0
		15	0	0	0	0	0	0	0
i.p.	0.5 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	0	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		9	+2	0	+2	0	0	0	0
		12	+2	+1	+2	0	0	0	0
		15	+2	0	+2	0	0	0	0
	1 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	+1	0	0	0	0	0
		6	+1	+1	+1	0	0	0	0
		9	+2	+1	+2	0	0	0	0
		12	+2	+1	+2	0	0	0	0
		15	+1	+1	+1	0	0	0	0

NA = not examined, +1: mild, +2: moderate, +3: strong

ตารางที่ 8 Autometallography and immunohistochemistry scores in experimental tilapias (continue).

Group	Dose	Day	AMG score				IHC score		
			Renal tubular epithelium	MMCs at pancreatic acini	MMCs at spleen	Epithelium of GI mucosa	Renal tubular epithelium	Pancreatic acini	MMCs at spleen
i.p.	2 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	+1	0	+1	0	0	0	0
		6	+1	+1	+2	0	0	0	0
		9	+1	+1	+2	0	0	0	0
		12	+2	+1	+1	0	0	0	0
		15	+2	+1	+1	0	0	0	0
	5 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	+3	+2	+3	0	0	0	0
		6	+2	+1	+2	0	0	0	0
		9	+2	+1	+2	0	0	0	0
		12	+2	+1	+1	0	0	0	0
		15	+2	+1	+1	0	0	0	0
Oral	0.5 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	+1	+1	0	0	0	0
		6	0	0	0	0	0	0	0
		9	0	0	0	0	0	0	0
		12	0	0	0	0	0	0	0
		15	0	0	0	0	0	0	0

NA = not examined, +1: mild, +2: moderate, +3: strong

ตารางที่ 8 Autometallography and immunohistochemistry scores in experimental tilapias (continue).

Group	Dose	Day	AMG score				IHC score		
			Renal tubular epithelium	MMCs at pancreatic acini	MMCs at spleen	Epithelium of GI mucosa	Renal tubular epithelium	Pancreatic acini	MMCs at spleen
Oral	1 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	+1	0	0	0	0
		6	0	0	+1	0	0	0	0
		9	0	0	0	0	0	0	0
		12	0	0	0	0	0	0	0
		15	0	0	0	0	0	0	0
	2 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	0	0	+1	0	0	0	0
		6	0	0	+1	0	0	0	0
		9	0	0	+1	0	0	0	0
		12	0	0	+1	0	0	0	0
		15	0	0	+1	0	0	0	0
	5 µg/g	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	+2	0	+1	+2	0	0	0
		6	0	0	+1	+3	0	0	0
		9	+1	0	+2	0	0	0	0
		12	0	0	+2	0	0	0	0
		15	0	0	+1	0	0	0	0

NA = not examined, +1: mild, +2: moderate, +3: strong

ตารางที่ 8 Autometallography and immunohistochemistry scores in experimental tilapias (continue).

Group	Dose	Day	AMG score				IHC score		
			Renal tubular epithelium	MMCs at pancreatic acini	MMCs at spleen	Epithelium of GI mucosa	Renal tubular epithelium	Pancreatic acini	MMCs at spleen
Bath	0.5 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	+1	+3	+1	+2	0	0	0
		6	+2	+2	+1	+3	0	0	0
		9	+2	+1	+2	+3	+2	0	0
		12	+2	+1	+2	+3	+3	0	0
		15	+2	+1	+3	+2	+3	0	+2
	1 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	+1	+1	+1	+2	0	0	0
		6	+2	+1	+1	+2	+1	0	0
		9	+3	+2	+2	+3	+3	0	0
		12	+3	+1	+3	+2	+3	+1	0
		15	+3	+1	+3	+2	+3	+1	+3
	2 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA = not examined, +1: mild, +2: moderate, +3: strong

ตารางที่ 8 Autometallography and immunohistochemistry scores in experimental tilapias (continue).

Group	Dose	Day	AMG score				IHC score		
			Renal tubular epithelium	MMCs at pancreatic acini	MMCs at spleen	Epithelium of GI mucosa	Renal tubular epithelium	Pancreatic acini	MMCs at spleen
Bath	5 µg/ml	0	0	0	0	0	0	0	0
		3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		6	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		9	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		12	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA
		15	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA

NA = not examined, +1: mild, +2: moderate, +3: strong

4.7 การตรวจหาโลหะหนักจากเนื้อเยื่อโดยวิธี (ICP-AES for measurement total mercury in tissues)

ค่า Cut-off value ของปริมาณโลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อทั้งสามส่วนของกลุ่มควบคุม มีค่าน้อยกว่า 0.2 ppm/g dry weight (รูปที่ 34) ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจโดยวิธี ICP-AES มีความแตกต่างขึ้นกับทางที่ได้รับสาร และปริมาณของโลหะหนักปรอท (ตารางที่ 9) ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในอวัยวะภายในมีค่าสูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับเหงือก และกล้ามเนื้อของกลุ่มทดลองเดียวกัน

ปลาทดลองกลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ i.p. groups ในวันที่ 3 ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในอวัยวะภายในมีค่าสูงกว่า แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับเหงือก และกล้ามเนื้อ ($p < 0.05$) แต่ในวันที่ 9 และ 15 ไม่พบว่ามีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบมีค่าความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ของวันที่ 3, 9 และ 15 และระหว่างกลุ่มทดลองด้วย (0.5 ppm i.p., 2 ppm i.p., 5 ppm i.p., 0.5 ppm oral, 2 ppm oral, and 5 ppm oral) (รูปที่ 35A, 35C, 35D, 36A, 36C และ 36D). ปลาทดลองกลุ่ม 2 ppm oral group พบว่าปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับโลหะหนักปริมาณที่ต่างกัน และพบว่าปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในอวัยวะภายใน มีความแตกต่างจาก เหงือก และกล้ามเนื้อ ในวันที่ 3, 9 และ 15 ($p < 0.05$) ในกลุ่มการทดลองนี้ ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบ มีค่าเท่ากับ 6.266 ± 0.460 , 4.223 ± 0.115 and 1.384 ± 0.131 ppm/g dry weight ตามลำดับ ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในเหงือกในวันที่ 9 มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับในวันที่ 3 และ 15 ($p < 0.05$) (รูปที่ 36C).

ปลาทดลองกลุ่ม 1 ppm semi-static exposure, พบว่ามีปริมาณโลหะหนักปรอทสูงสุดเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองอื่นๆ (ตารางที่ 9). ปริมาณโลหะหนักปรอทในอวัยวะภายใน มีค่าสูงสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (รูปที่ 37B).

ตารางที่ 9 ปริมาณ โลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลากลุ่มทดลอง (Total Hg in experimental tilapias)

Group	Dose	Day	Organ			
			Gill (ppm/g dry weight)	Visceral organs in abdomen (ppm/g dry weight)	Muscle (ppm/g dry weight)	
Control	0	3	0.163 ± 0.014	0.132 ± 0.023	0.152 ± 0.018	
		9	0.110 ± 0.005	0.149 ± 0.007	0.180 ± 0.032	
		15	0.101 ± 0.019	0.133 ± 0.003	0.173 ± 0.051	
i.p.	0.5 µg/g	3	1.157 ± 0.439	5.709 ± 1.609	0.424 ± 0.241	
		9	0.888 ± 0.124	1.689 ± 0.786	0.981 ± 0.575	
		15	0.687 ± 0.191	1.857 ± 1.417	0.515 ± 0.219	
	1 µg/g	3	2.212 ± 0.142	14.757 ± 7.114	1.870 ± 1.142	
		9	1.467 ± 1.039	9.965 ± 1.359	1.588 ± 0.657	
		15	0.895 ± 0.030	3.119 ± 2.787	0.233 ± 0.097	
	2 µg/g	3	5.884 ± 5.484	19.701 ± 2.100	1.047 ± 0.364	
		9	4.152 ± 1.845	8.239 ± 3.261	3.163 ± 0.430	
		15	3.783 ± 1.577	9.518 ± 4.014	2.584 ± 0.970	
	5 µg/g	3	4.144 ± 0.686	31.629 ± 11.392	4.659 ± 1.302	
		9	2.257 ± 0.974	13.070 ± 1.151	3.195 ± 1.590	
		15	0.989 ± 0.339	4.786 ± 1.403	1.378 ± 0.335	
	Oral	0.5 µg/g	3	0.395 ± 0.040	0.910 ± 0.143	0.389 ± 0.037
			9	0.237 ± 0.071	0.330 ± 0.139	0.284 ± 0.087
			15	0.365 ± 0.108	0.411 ± 0.016	0.160 ± 0.081
1 µg/g		3	0.484 ± 0.030	0.727 ± 0.186	0.099 ± 0.040	
		9	0.365 ± 0.146	0.496 ± 0.115	0.178 ± 0.057	
		15	0.421 ± 0.007	0.606 ± 0.212	0.337 ± 0.043	
2 µg/g		3	1.337 ± 0.472	6.266 ± 0.460	1.465 ± 0.272	
		9	3.292 ± 0.314	4.223 ± 0.658	1.419 ± 0.662	
		15	0.778 ± 0.136	1.384 ± 0.131	0.685 ± 0.201	
5 µg/g		3	3.422 ± 0.306	9.263 ± 4.737	0.761 ± 0.299	
		9	1.337 ± 0.472	3.936 ± 0.446	0.385 ± 0.015	
		15	1.438 ± 0.286	3.015 ± 0.515	0.552 ± 0.170	

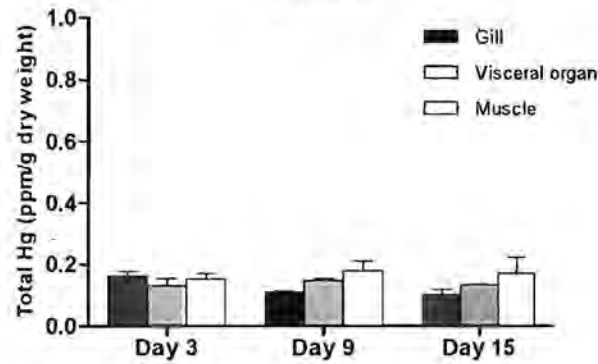
ตารางที่ 9 ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลาในกลุ่มทดลอง (Total Hg in experimental tilapias)

Group	Dose	Day	Organ		
			Gill (ppm/g dry weight)	Visceral organs in abdomen (ppm/g dry weight)	Muscle (ppm/g dry weight)
Semi-static exposure	0.5 µg/ml	3	15.847 ± 2.884	33.279 ± 13.171	2.473 ± 0.646
		9	36.861 ± 4.785	51.859 ± 11.140	10.616 ± 0.923
		15	55.778 ± 2.113	42.654 ± 26.111	18.235 ± 5.642
	1 µg/ml	3	20.210 ± 2.583	45.747 ± 25.849	3.208 ± 1.330
		9	33.568 ± 9.335	183.274 ± 7.208	10.041 ± 3.847
		15	44.972 ± 2.847	139.507 ± 8.611	15.917 ± 8.627
	2 µg/ml	3	NA	NA	NA
		9	NA	NA	NA
		15	NA	NA	NA
5 µg/ml	3	NA	NA	NA	
	9	NA	NA	NA	
	15	NA	NA	NA	

NA: not examined

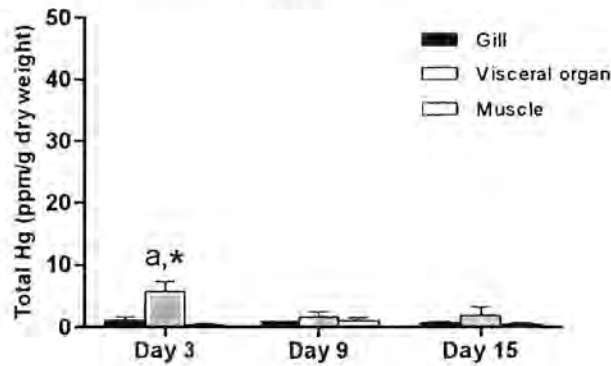
34

Control



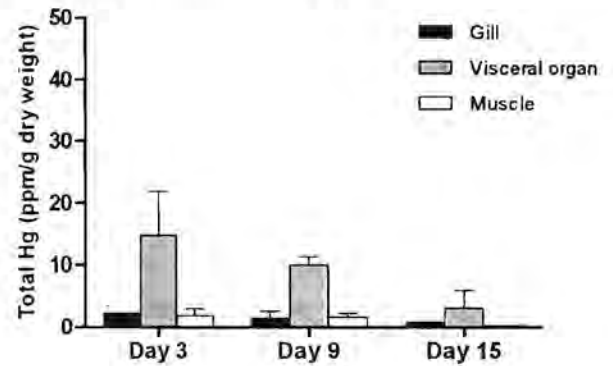
35A

0.5 i.p.



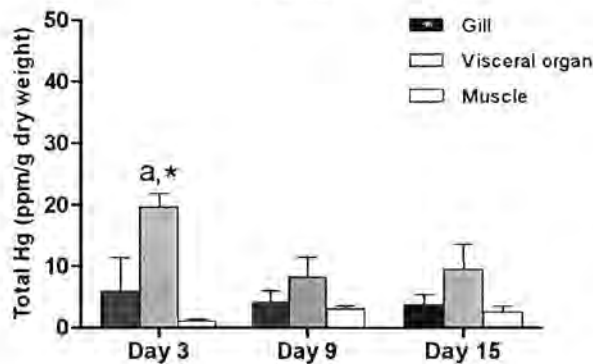
35B

1 i.p.



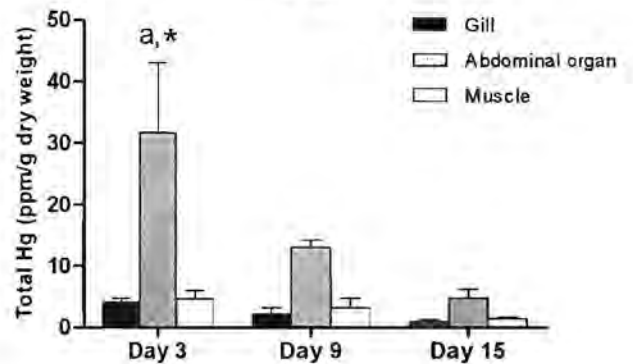
35C

2 i.p.



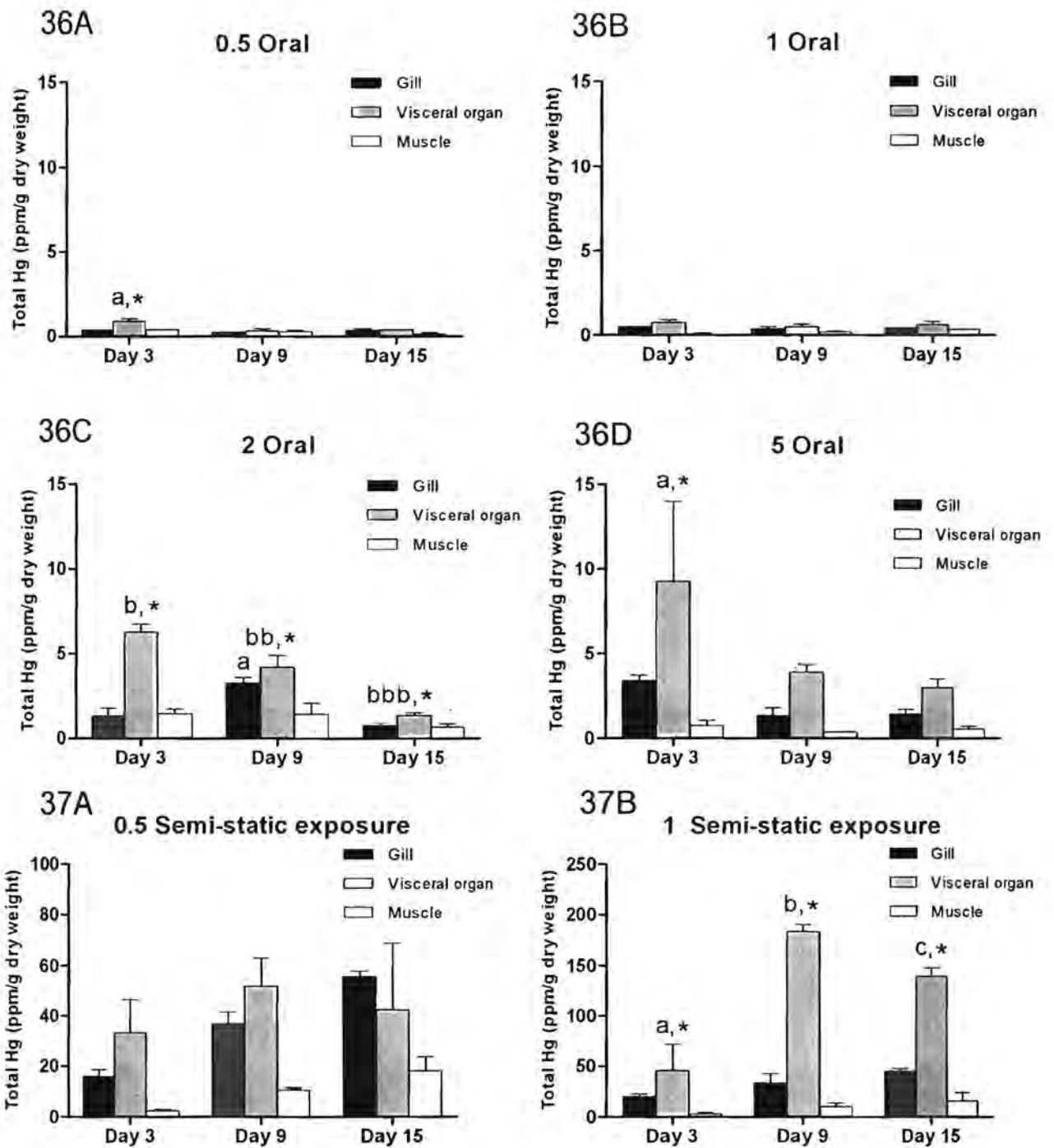
35D

5 i.p.



รูปที่ 34 ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลากลุ่มควบคุม (Total Hg levels from ICP-AES of Control group)

รูปที่ 35A-D ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลากลุ่ม i.p. groups. The different alphabets shows when statistic significantly different in the same organ between days. ($p < 0.05$) and the stars (*) showed when statistic significantly different between organs in the same day. ($p < 0.05$) Statistic analysis was using one-way ANOVA and followed by Newman-Keuls multiple comparison test.



รูปที่ 36A-D ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลากลุ่ม oral group.

รูปที่ 37A-B ปริมาณโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในปลากลุ่ม semi-static exposure groups. The different alphabets shows when statistic significantly different in the same organ between days. ($p < 0.05$) and the stars (*) showed when statistic significantly different between organs in the same day. ($p < 0.05$) Statistic analysis was using one-way ANOVA and followed by Newman-Keuls multiple comparison test.

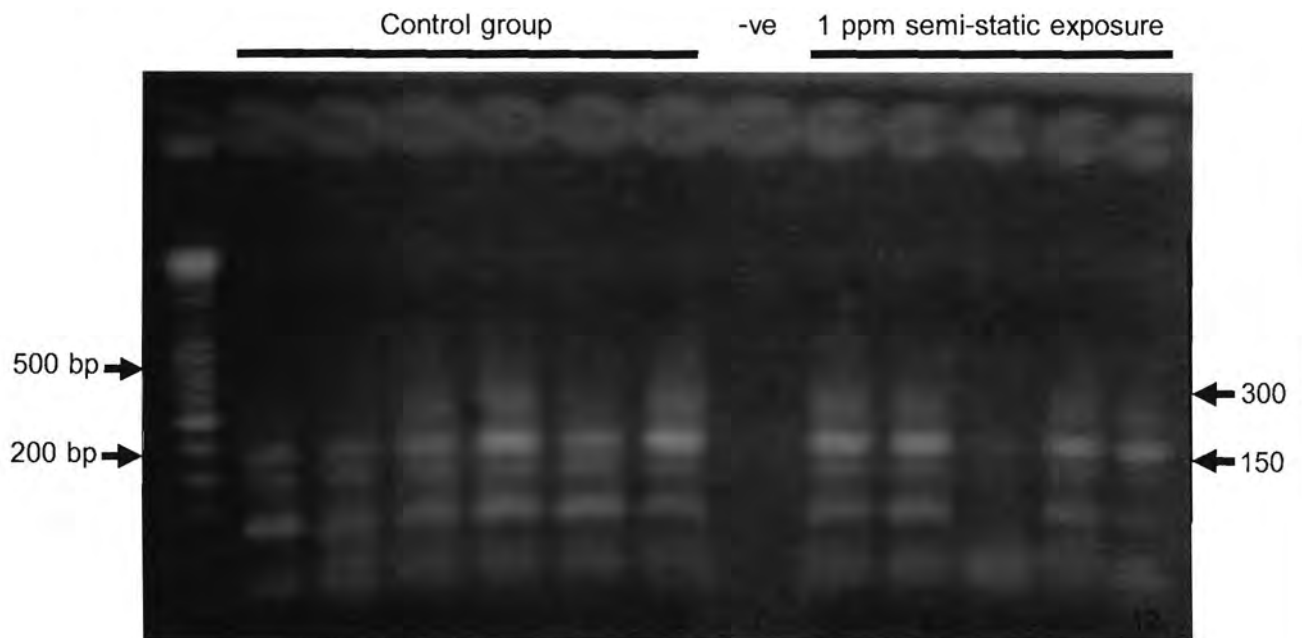
4.8 การตรวจการแสดงออกของจีน Metallothionein

(Reverse transcriptase polymerase chain reaction for detecting metallothionein gene expression)

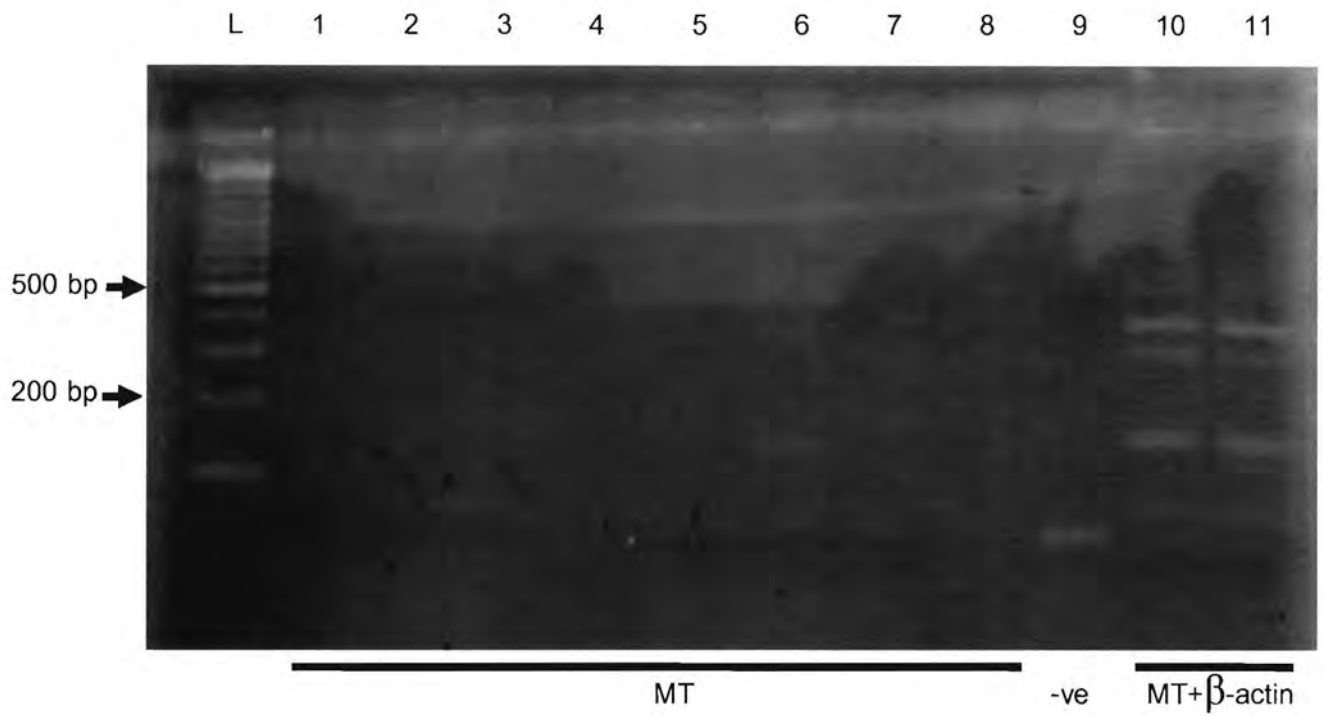
ในทุกกลุ่มการทดลองรวมทั้งกลุ่มควบคุม ให้ผลผลิต ที่ไม่จำเพาะ (Unspecific bands) เมื่อใช้ไพรเมอร์ดังนี้ Forward and reverse primers of tilapia (*O. mossambica*) MT gene (TMTB and TMTC) and forward and reverse primers of tilapia β -actin gene (รูปที่ 38 และ 39) PCR products (150 and 300 bp PCR products) ที่ได้ถูกนำไปตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ (Nucleotide sequencing) เมื่อนำลำดับนิวคลีโอไทด์มาเปรียบเทียบกับลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน *O. mossambica* MT in GenBank (AY257202) (Cheung et al., 2004). พบว่าไม่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ (ตารางที่ 10). เมื่อทำการใช้ไพรเมอร์เฉพาะ Forwards and reverse primers of tilapia (TMTB and TMTC) ให้ผลลบในทุกกลุ่มการทดลอง (รูปที่ 39).

ตารางที่ 10 The sequences of nucleotides of RT-PCR products from the current experiment.

Sequence of nucleotides	Length (bp)
5'- CACCAAGATCTGCACCCGCGGCGGGCTCCACCCGGGCTCGCGCCCTAGG CTTCCGTGCTCACCGCGGCGGCCCTCCTACTCGTCGCGGCGTAGCCCTC GCGGCTCCTATTGCCGGCGACGGCCGGGTATGGGCCCGACGCTCCAGC GCCATCCATTTTCAGGGCTAGTTGATTCCGGCAGGTGAGTTGTTACACA CTCCTTAGCGGATTCCAACCTCCATGGCCTCCTGTCCACCTTTA -3'	238



รูปที่ 38 RT-PCR products when using 2 pairs of primers (tilapia (*O. mossambicus*) MT; TMTB and TMTC) and tilapia β -actin. The samples were kidney tissues of control and 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure group. Lane 1, 2, 3, 4, 5 and 6: control, lane 7: negative control, lane 8, 9, 10, 11 and 12: 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure group and L: 100 bp marker.



รูปที่ 39 RT-PCR products. Lane 1, 2, 3, 4, 5, 6, and 7 were using forward and reverse primers of tilapia (*O. mossambica*) MT; TMTB and TMTC. Lane 10 and 11 were using 2 pairs of primers MT and tilapia β -actin. The samples were kidney tissues of control (lane 1, 2, 3 and 4) and 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure group (lane 5, 6, 7 and 8). The results were all negative when using only MT primers. L: 100 bp marker, lane 9: negative control.

ตารางที่ 11 Comparison of histopathological lesions, autometallography and expression of metallothioneine protein between experimental groups.

Group	Histopathological lesions	Autometallography	Expression of metallothioneine protein by Immunohistochemistry
Control	- No histopathological lesion	- Negative AMG	- Negative IHC
i.p.	- Mild to severe tubulonephrosis, immature nephrons and deposition of crystal in renal tubules. - Mild to severe loss of fat deposition in hepatocytes, and mild to severe pancreatic acinar atrophy. - Marked increased MMCs.	- Mild to severe localized of silver grains in tubular epithelium, MMCs of spleen and pancreatic acini.	- Negative IHC
Oral	- Mild to moderate tubulonephrosis and deposition of crystal in renal tubules. - Mild to severe loss of fat deposition in hepatocytes, and mild	- Mild to moderate localized of silver grains in tubular epithelium, and MMCs of spleen.	- Negative IHC

	<ul style="list-style-type: none"> - to moderate pancreatic acinar atrophy. - Marked increased MMCs. - Mild to severe infiltration of mononuclear cells and goblet cells in GI epithelium. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mild to moderate localized of silver grains in GI epithelium. 	
Bath	<ul style="list-style-type: none"> - Severe tubulonephrosis, mild immature nephrons and deposition of crystal in renal tubules. - Moderate to severe loss of fat deposition in hepatocytes, and mild to severe pancreatic acinar atrophy. - Marked increased MMCs. - Mild to severe infiltration of mononuclear cells and goblet cells in GI epithelium 	<ul style="list-style-type: none"> - Mild to severe localized of silver grains in tubular epithelium, MMCs of spleen and pancreatic acini. - Mild to severe localized of silver grains in GI epithelium. 	<ul style="list-style-type: none"> - Positive IHC in renal tubular epithelium after day 6, MMCs in spleen and pancreatic acini after day 15

การเก็บตัวอย่างปลา จากแหล่งเลี้ยงตามธรรมชาติ

1. ทำการเก็บตัวอย่างปลานิล ทับทิม จากแหล่งเพาะเลี้ยงต่างๆ

แหล่งเพาะเลี้ยงในกระชัง ริมฝั่งแม่น้ำเจ้าพระยา ในเขต จังหวัด อ่างทอง มีโรงงานอุตสาหกรรม ที่ใกล้เคียง คือ โรงงานน้ำตาลทราย และ โรงงานผลิตปุ๋ยเคมี

ตัวอย่างปลา จำนวน 15 ตัวอย่าง น้ำหนักประมาณ 400-500 กรัม เลี้ยงในกระชัง เป็นเวลาประมาณ 3

เดือน

วันที่เก็บ 12 พฤษภาคม 2551 เวลา 12.00 น.

สถานที่ บ้านคุณประจวบ กู้สำออง

บ้านคุณสุนันท์ อ่าข่า

29 หมู่ 2 ต.โสมแดง อ.ป่าโมกข์ จ.อ่างทอง

แหล่งน้ำ แม่น้ำเจ้าพระยา

ขนาดกระชัง 2x2 เมตร

น้ำลึก 8 เมตร (4 วา)

ประวัติ ปลาทับทิมลงเลี้ยงได้ 3 เดือน สัปดาห์ที่ผ่านมาปลาค่อยๆทยอยตาย ตามตัวเป็นจำๆ เลี้ยงด้วย

อาหารเม็ด และให้ผสมอาหาร (ไม่ทราบชนิดยา) อัตราการป่วย 50% อัตราการตาย 50%

โรงงานอุตสาหกรรมข้างเคียง โรงงานผลิตผงชูรส และ โรงงานผลิตเสื้อผ้า

ตัวอย่างที่เก็บ ปลาทับทิม 20 ตัว น้ำหนักตัวละประมาณ 350 กรัม

1.2 แหล่งเพาะเลี้ยงในกระชัง ริมสาขาดคลองแยกจากแม่น้ำป่าสัก ในเขต จังหวัดปทุมธานี

อยู่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อาศัยของชุมชน มีการเลี้ยงปลาชนิดอื่นหนาแน่น ตลอดแนวลำ

คลอง ตัวอย่างปลา จำนวน 15 ตัวอย่าง น้ำหนักประมาณ 200-300 กรัม เลี้ยงในกระชัง เป็นเวลาประมาณ 2 เดือน

วันที่เก็บ 12 พฤษภาคม 2551 เวลา 15.00 น.

สถานที่ คลองสิบสาม กม.13 จ.ปทุมธานี

แหล่งน้ำ คลองสิบสาม ต้นน้ำอยู่ที่เขื่อนป่าสัก จ.ลพบุรี

ขนาดกระชัง 4x4 เมตร ลึก 1.5 เมตร จำนวน 23 กระชังติดต่อกัน

น้ำลึก -

ประวัติ ปลาทับทิมลอยตายเป็นจำนวนมาก เจ้าของแจ้งว่าตามลำตัวมีตัวปลิงใสๆเกาะตามเกล็ด เจ้าของให้ยาหลายอย่าง ช่วงเดือน เม.ย. ถึง พ.ค. มักมีปลาตายจำนวนมาก ในคลองสิบสามมีการเลี้ยงปลาในกระชังกันหนาแน่นตลอดลำคลอง ไปจนถึง อ.หนองแค จ.สระบุรี

โรงงานอุตสาหกรรมข้างเคียง เกษตรกรรม เช่น ปลูกผัก ทำนา สวนส้ม

ตัวอย่างที่เก็บ ปลาทับทิม

1.3 แหล่งเพาะเลี้ยงในกระชัง ริมฝั่งแม่น้ำท่าจีน (นครชัยศรี) ในเขตอำเภอ กำแพงแสน จังหวัด นครปฐม อยู่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อาศัยของชุมชน มีการเลี้ยงปลานิล ทับทิม กระจายตาม ฝั่งแม่น้ำ ตัวอย่างปลา จำนวน 15 ตัวอย่าง น้ำหนักประมาณ 400-500 กรัม เลี้ยงในกระชัง เป็นเวลาประมาณ 3 เดือน

วันที่เก็บ 15 พ.ค. 2551 เวลา 11.00 น.

สถานที่ หมู่ 9 ต.วังน้ำเขียว อ.กำแพงแสน จ.นครปฐม

แหล่งน้ำ สาขาของแม่น้ำนครชัยศรี (ไหลมาจาก จ.กาญจนบุรี และอ.บ้านโป่ง จ.ราชบุรี)

ขนาดกระชัง 4x3 เมตร จำนวน 20 กระชัง

น้ำลึก ท่วมศีรษะ

ประวัติ ปล่อยปลาได้ประมาณ 2 เดือน ช่วง เม.ย. ปลาตาย แต่หลังฝนตกปลาตายน้อยลง ให้อาหารวันละ 3 เวลา บริเวณต้นน้ำปลาเริ่มป่วย

โรงงานอุตสาหกรรมข้างเคียง ตลาดกำแพงแสน ไร่อ้อย สวนผัก

ตัวอย่างที่เก็บ ปลาทับทิม

อื่นๆ DO 6.2 ppm temp 27°C

1.4 แหล่งเพาะเลี้ยงในกระชัง ริมฝั่งแม่น้ำแม่กลอง ในเขตอำเภอ ดำเนินสะดวก จังหวัดราชบุรี อยู่ใกล้เคียงกับแหล่งที่อาศัยของชุมชน และ โรงงานอุตสาหกรรม ที่รับน้ำ มาจากจังหวัด กาญจนบุรี เป็นกระชังปลาที่มีมีขนาดใหญ่ และมีมาตรฐานในการจัดการดูแล มีการเลี้ยง ปลานิล ทับทิม กระจายตามฝั่งแม่น้ำ ตัวอย่างปลา จำนวน 15 ตัวอย่าง น้ำหนักประมาณ 400-500 กรัม เลี้ยงในกระชัง เป็นเวลาประมาณ 3 เดือน

วันที่เก็บ 15 พ.ค. 2551 เวลา 11.00 น.

สถานที่ 54 หมู่ 2 ต.บางนกแขวก อ.บางคนที จ.สมุทรสงคราม

แหล่งน้ำ แม่น้ำแม่กลอง

ขนาดกระชัง 3x3 เมตร ลึก 1.5 เมตร จำนวน 170 กระชัง

น้ำลึก 6-7 เมตร

ประวัติ ปลาทับทิมเริ่มตาย มีแผล และไม่มียแผล ให้ยาไปแล้วยังไม่ดีขึ้น อัตราการตาย 3-4 % ป่วยทุก ขนาดปลาที่เลี้ยง เป็นมาแล้วประมาณ 4-5 วัน เดือนที่แล้วที่ จ.กาญจนบุรีมีปัญหา อาหารใช้รำผสมเนื้อ ปลาทับทิมที่ตายบดผสมกัน มีการเพิ่มออกซิเจนช่วงน้ำนิ่ง มีการใช้ยามาเชื้อแช่ปลาในแม่น้ำ

โรงงานอุตสาหกรรมข้างเคียง โรงงานสุรา จ.ราชบุรี โรงงานทอผ้า โรงงานกระดาษ

ตัวอย่างที่เก็บอื่นๆ DO 5.3 ppm temp 27.5°C

2. ทำการชันสูตรตัวอย่างปลาที่เก็บมา

2.1 เก็บตัวอย่าง อวัยวะปลา ได้แก่ เหงือก ตับ ม้าม ไต ทางเดินอาหาร สมอง และเนื้อปลา

บริเวณหนังท้อง โดยแบ่งเป็น 3 ส่วน คือ

2.2 เก็บรักษาใน น้ำยา 10% ฟอร์มัลลิน เพื่อศึกษา รอยโรคทางพยาธิวิทยา และการตรวจหา

โลหะหนักปรอท โดยวิธี Autometallography

ผลการศึกษารอยโรคทางพยาธิวิทยา ไม่พบรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญ ที่เกี่ยวข้องกับการ ได้รับ

ความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท

ผลการตรวจหาโลหะหนักปรอทด้วยวิธีการย้อมสี Autometallography ทุกตัวอย่างให้ผลลบ

3. การตรวจหาโลหะหนักจากเนื้อเยื่อโดยวิธี (ICP-AES for measurement total mercury in tissues)

ค่า Cut-off value ของปริมาณ โลหะหนักปรอทในเนื้อเยื่อทั้งสามส่วนของกลุ่มควบคุม มีค่าน้อยกว่า 0.2 ppm/g dry weight (รูปที่ 34). ปริมาณ โลหะหนักปรอทที่ตรวจโดยวิธี ICP-AES มีค่าน้อยกว่าค่า cut-off value (ตารางที่ 12)

ตารางที่ 12 ปริมาณโลหะปรอทที่วัดด้วยวิธีการ ICP จากปลาที่เก็บตัวอย่าง

กลุ่ม	อวัยวะ	ตัวอย่างที่ 1 (n=8)	ตัวอย่างที่ 2 (n=7)	ปริมาณ Hg ต่อน้ำหนัก (ppm/g)
1	Muscle	NA	NA	NA
	GI tract	0.0143	0.0215	0.0179
	Gill	0.0419	0.0504	0.0461
2	Muscle	NA	NA	NA
	GI tract	0.0306	0.0247	0.0276
	Gill	0.0059	0.0587	0.0323
3	Muscle	0.0436	0.0638	0.0537
	GI tract	0.0155	0.0158	0.0156
	Gill	0.0398	0.0272	0.0335
4	Muscle	0.0548	0.0348	0.0448
	GI tract	0.0770	0.0264	0.0517
	Gill	0.0732	0.0337	0.0535

NA: not examined



อภิปรายและวิจารณ์

(Discussion)

จากรายงานการศึกษา ค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอท ในปลาไนในการศึกษาครั้งนี้ ที่พบการตายแบบเฉียบพลัน ในปลาไนที่ได้รับโลหะหนักในปริมาณ 2 and 5 ppm ($\mu\text{g/l}$) HgCl_2 semi-static exposure groups ที่พบการตายของปลาในช่วงเวลา 2 ชั่วโมงแรกของการได้รับสาร ซึ่งสอดคล้องกับรายงานความเป็นพิษของโลหะปรอทในปลาไน ค่า Mean lethal concentration (LC_{50}) of Hg^{2+} ภายใน 24 ชั่วโมง มีค่า 1 $\mu\text{g/ml}$ (NJDEP, 2002) อาการทางคลินิกที่สำคัญที่ตรวจพบในปลาไน มักพบอาการทางระบบทางเดินหายใจ ได้แก่ การว่ายน้ำมาหายใจเหนือผิวน้ำ การเพิ่มอัตราการหายใจ โดยการเพิ่มการเปิดปิดของแผ่นเหงือก มีรายงานกล่าวถึงภาวะ Hypoxia เป็นอาการหลักที่ตรวจพบในปลาที่ได้รับโลหะหนักปรอทอนินทรีย์ (Inorganic Hg) ในน้ำ ซึ่งโลหะหนักปรอทอนินทรีย์ จะมีผลต่อการหายใจของปลาโดยการลดลงของประสิทธิภาพการแลกเปลี่ยนออกซิเจนของเหงือก (Raldúa et al., 2007)

อวัยวะภายในต่างๆที่ได้รับผลเนื่องจากความเป็นพิษของปรอทแบบเฉียบพลัน ได้แก่ อวัยวะหลัก คือ ไต ตับและตับอ่อน และม้าม รอยโรคที่สำคัญของไต มักพบที่เซลล์เยื่อท่อไต ซึ่งมีความไวรับต่อการเป็นพิษของโลหะหนักปรอท เช่นเดียวกับในไตของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Hansen and Danscher, 1995) จากผลการศึกษาในครั้งนี้ ไตเป็นอวัยวะเป้าหมายที่พบรอยโรค จากความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน คือการเสื่อมของเซลล์เยื่อท่อไตอย่างรุนแรง (Severe tubulonephrosis) โดยพบการเสื่อมแบบ Hydropic degeneration การตายของเซลล์เยื่อท่อไต ร่วมกับการสะสมของ Hyaline droplets ในไซโตพลาสซึมของเซลล์เยื่อท่อไต และการสะสมของคริสตัลในท่อไต ซึ่งความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอท สามารถก่อรอยโรคอย่างเฉียบพลันและรุนแรง ในปลาในกลุ่ม Semi-static exposure route ในขนาดสูงและในวันแรกของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานความเป็นพิษของโลหะหนักปรอทใน

ปลา Channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ซึ่งพบการเสียหายอย่างรุนแรงของเซลล์เยื่อบุท่อไต และหน่วยกรองไต ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมงภายหลังจากที่ได้รับโลหะหนักปรอท เนื่องจากเซลล์เยื่อบุท่อไตทำหน้าที่หลักในการขับออกของไอออน (Divalent ions) รวมทั้งโลหะปรอท (Hg^{2+}) (Kendall, 1977)

รอยโรคทางพยาธิวิทยาของตับและตับอ่อนที่สำคัญ คือ การสูญเสียการสะสมไขมันในเซลล์ตับ ซึ่งเมื่อปลาได้รับโลหะหนัก น่าจะเกี่ยวข้องกับขบวนการตอบสนองทางเมตาบอลิซึม ได้แก่ การขยายขนาดของนิวเคลียส และนิวคลีโอไลต์ที่เด่นชัด ในเซลล์ตับที่เกิดการเสื่อม Oliveira Ribeiro และคณะ (2002) รายงานการสูญเสียการสะสมไขมันในเซลล์ตับของปลา Arctic charr (*Salvelinus alpinus*) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าว มีผลเนื่องจาก การสะสมของ Lipid peroxidation products ก่อให้เกิดภาวะเซลล์เครียด (Oxidative stress) อย่างไรก็ตาม Drevnick และคณะ (2008) ตั้งสมมุติฐานการลดลงของการสะสมไขมันในเซลล์ตับ ของปลา Northern pike (*Esox lucius*) มักเกิดขึ้นภายหลังจากที่ปลาเกิดความเครียดและไม่กินอาหาร ทำให้มีการใช้สร้าง กลูโคสจากไขมัน ในเซลล์ตับ

ผลการศึกษาในครั้งนี้ รอยโรคที่พบในตับและตับอ่อนสอดคล้องและแตกต่างจากรายงานที่ผ่านมา คือ การศึกษาในปลา Arctic charr ที่ได้รับสาร MeHg พบการตายอย่างรุนแรงของเซลล์ตับ (Oliveira Ribeiro et al., 2002) ซึ่งการตายของเซลล์ตับเป็นขบวนการต่อเนื่อง ในการขัดขวางการทำงานองเอนไซม์ การเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์ และการเปลี่ยนแปลงในการขบวนการสังเคราะห์ โปรตีนและคาร์โบไฮเดรต (Mela et al., 2007) รายงานในปลา Beaks ที่ได้รับโลหะหนักปรอท พบการสร้างก้อนแกรนูโลมาในตับ ไขมันอักเสบและมีการสร้างถุงน้ำ (Macrovesicular steatosis) และการตายของเซลล์ตับ นอกจากนี้ยังพบ การงอกขยายของเซลล์เยื่อบุท่อน้ำดี (Raldúa et al., 2007).

การฟอสฟอรัสของเซลล์ตับอ่อน ปรากฏหลังจากได้รับโลหะหนักปรอท ซึ่งมีกลไกคล้ายคลึงกับพยาธิสภาพของตับ Kendall (1977) รายงานว่าเนื้อเยื่อของตับอ่อนของปลา Catfish (*I. punctatus*) ซึ่งพบรอยโรคได้ในช่วงแรกของความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท

ปลาในกลุ่มทดลอง พบการเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs ในม้าม อย่างมีนัยสำคัญ โดยเซลล์ MMCs เพิ่มขึ้นทั้งขนาดและจำนวนเซลล์ ซึ่งการเพิ่มขึ้นดังกล่าว จะเปลี่ยนแปลงขึ้นกับระยะเวลาของการได้รับโลหะหนักปรอท การเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs ในม้ามและอวัยวะภายในอื่นๆ มักเกี่ยวข้องกับเพิ่มขึ้นของกิจกรรมการเก็บกิน เนื่องจากเซลล์ต่างๆที่ถูกทำลายโดยโลหะหนักปรอท ซึ่งเซลล์มาโครฟาจในปลาจะเป็นเซลล์ชนิดแรกที่ตอบสนองต่อการเป็นพิษของโลหะหนักปรอท (Lombourdis and Dancher, 2004) ในไซโตพลาสซึมของเซลล์ MMCs มักประกอบด้วยสาร Melanin ซึ่งมีบทบาทที่สำคัญในการทำให้เป็นกลางของไอออนต่างๆ และอนุมูลอิสระ และปกป้องเซลล์ต่างๆ ในลำดับถัดมา (Robert et al., 1978). และมีบทบาทในการขจัดเศษเซลล์ในระหว่างที่เซลล์เสียหายในการอักเสบ (Mela et al., 2007) และการซ่อมแซมเซลล์ (Agius, 1985) ดังนั้น การเพิ่มขึ้นของเซลล์ MMCs ในปริมาณมาก ในม้ามของปลาสามารถใช้เป็นเซลล์บ่งชี้ ความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท (Potent biomarker for Hg pollutant) (Mela et al., 2007)

การพัฒนาวิธีการตรวจโลหะหนักโดยการย้อมสี Autometallography โดยดูการติดสีของเม็ดเงิน ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ พบการติดสีเหลืองน้ำตาล จนถึงสีดำ ในเซลล์เยื่อบุท่อไต เซลล์ MMCs ในม้าม และที่แทรกตัวในตับอ่อน เซลล์เยื่อบุผนังลำไส้ ในปลากลุ่มทดลอง จากผลการทดลองพบว่า ไตและม้ามเป็นอวัยวะหลัก ในการตรวจหาการสะสมของโลหะหนักปรอท ในเนื้อเยื่อ ซึ่งอวัยวะทั้งสองจะเป็นอวัยวะเป้าหมายหลักที่พบการสะสมของโลหะหนักปรอท โลหะหนักปรอทที่ตรวจพบในเซลล์ MMCs ที่เคลื่อนตัวเข้ามาในบริเวณที่มีการทำลายของเซลล์เนื้อแท้ของอวัยวะนั้น การให้ผลบวกของ Autometallography ที่ได้รับสารในปริมาณที่สูง โดยเฉพาะในกลุ่ม Semi-static exposure groups กลุ่ม i.p. group และกลุ่ม oral groups ในไตและม้าม ตามลำดับ การตรวจพบในเซลล์เยื่อบุลำไส้ในกลุ่ม Oral groups แต่ตรวจไม่พบในกลุ่ม Semi-static exposure groups ซึ่งสามารถอธิบายเส้นทางการสะสมของโลหะหนักปรอท ในเนื้อเยื่อต่าง ๆ การตรวจพบโลหะหนักปรอท ในเซลล์เยื่อบุท่อไต และม้าม พบ

ผลบวกสูงในกลุ่ม Semi-static exposure groups แสดงว่าโลหะหนักปรอท จะถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด ระบบไหลเวียนเลือด และกระจายสะสมในอวัยวะเป้าหมาย เช่นเดียวกับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม (Zahir et al., 2005) เมื่อปลาได้รับโลหะหนักปรอทโดยการป้อนให้กิน พบว่า โลหะหนักปรอท จะถูกดูดซึม ผ่านเซลล์เยื่อผนังลำไส้ สะสมในชั้นใต้เยื่อ และดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือด และสะสมในอวัยวะเป้าหมายในลำดับถัดไป ปลาทดลองกลุ่ม Semi-static exposure groups จะได้รับโลหะหนักปรอทอย่างต่อเนื่องและตลอดเวลา ดังนั้นจึงสามารถตรวจพบการสะสมของโลหะหนักปรอทในหลายอวัยวะ ในการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบการสะสมของโลหะหนักปรอท ในเซลล์เหงือก ซึ่งแตกต่างจากรายการศึกษาในของ Alverado et al. (2006) ที่ตรวจพบเม็ดเงินในเซลล์ Mucocytes, filament epithelium, and the secondary lamellae ในกบ Turbot (*Scophthalmus maximus*) ในกบที่ได้รับความเป็นพิษของโลหะหนักทองแดง ดังนั้นอาจสรุปได้ว่ามีความแตกต่างของการสะสมของโลหะหนักแต่ละชนิด และในอวัยวะเป้าหมาย (Danscher and Stoltenberg, 2006) การสะสมของโลหะหนักปรอทที่ตรวจโดยวิธี AMG ขึ้นกับชนิดของโลหะหนักที่ได้รับ แหล่งของโลหะหนักปรอท ทั้งในรูปอินทรีย์และอนินทรีย์ ทางที่สัตว์ได้รับโลหะหนัก ปริมาณ และระยะเวลาที่ได้รับ (Danscher and Stoltenberg, 2006)

การแสดงออกของโปรตีน Metallothionein ในปลากลุ่ม Semi-static exposure group ให้ผลบวกในเซลล์เยื่อท่อไต เซลล์ตับอ่อน และเซลล์ MMCs ในม้าม มีรายงานการตรวจพบโลหะหนักปรอทในเซลล์ตับของปลา Mandarin fish การแสดงออกของโปรตีน MT ในเนื้อเยื่อปลานิลในการศึกษาครั้งนี้ แสดงว่า MT gene มีความเกี่ยวข้องกับขบวนการกำจัดโลหะหนักในเซลล์ต่างๆ

โปรตีน MT สามารถตรวจพบในปลาในกลุ่ม 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure ในวันที่ 6 และปลาในกลุ่ม 0.5 ppm HgCl₂ semi-static exposure group ในวันที่ 9 และไม่สามารถตรวจพบในปลาทดลองกลุ่มอื่นๆ แสดงว่าการแสดงออกของโปรตีน MT ขึ้นกับปริมาณของโลหะหนักปรอทที่ได้รับ ระยะเวลาที่ได้รับ และทางที่ได้รับ

Chan (1995) รายงาน ระดับของจีน MT ในเซลล์ตับของปลา ขึ้นกับปริมาณที่ได้รับโลหะหนัก Cadmium, Copper และ Zinc. โดยพบการเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญของการกระตุ้น MT mRNA ในเซลล์ตับและเหงือกของปลานิลที่ได้รับโลหะหนักในสัปดาห์ที่ 3 นอกจากนี้มีรายงานการตรวจพบการแสดงออกของโปรตีน MT ในไตและตับของปลา mandarin fish (*Siniperca chuatsi*) เช่นเดียวกับการศึกษาในครั้งนี้ (Lam et al., 1998)

การแสดงออกของ โปรตีน MT ในเซลล์ MMCs ของม้าม ที่ตรวจโดยวิธี อิมมูโนฮิสโตเคมี โดยใช้การย้อมด้วย DAB อาจสัมพันธ์กับการติดสีเหลืองน้ำตาลของเม็ดสีเมลานินในเซลล์ (Agius, 1985; Gao et al., 2009) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำการเปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม ซึ่งพบผลบวก อย่างเด่นชัด ในเซลล์ MMCs ในปลากลุ่ม 0.5 and 1 ppm HgCl₂ semi-static exposure groups, พบผลบวกอย่างเด่นชัด ในเซลล์ MMCs ในม้าม

รายงานการศึกษาการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์บางชนิดของเหงือก ในปลานิล (*O. mossambica*) ภายหลังได้รับโลหะหนักทองแดง ซึ่งให้ผลแตกต่างจากการศึกษาความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท ในครั้งนี้ นอกจากนี้ มีรายงานตรวจพบ การแสดงออกของโปรตีน MT ในอวัยวะในปลาที่จับได้ในแหล่งน้ำธรรมชาติ ได้แก่ ในเหงือกของปลา Brown trout (*Salmo trutta fario* L.), rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss* Richardson) and turbot (*Scophthalmus maximus*) และเซลล์ Chloride cells of gill filaments after exposed to the sewage in brown trout and rainbow trout (Burkhardt-Holm et al., 1999). ในกบ พบการแสดงออกของโปรตีน MT ในเซลล์ Mucocytes ภายหลังการได้รับโลหะหนัก Cadmium, Copper และ Zinc (Alvarado et al., 2006) จากการศึกษาในครั้งนี้ สรุปได้ว่าเซลล์เชื่อมท่อไต เซลล์ตับอ่อน และเซลล์ MMCs ในม้ามและตับอ่อน พบการแสดงออกของโปรตีน MT ภายหลังการได้รับความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท

ปริมาณของโลหะหนักปรอท ที่ตรวจโดยวิธี ICP-AES ในการศึกษาครั้งนี้ แสดงถึงอวัยวะภายในช่องท้องของปลาทดลอง พบการสะสมของโลหะหนักปรอทสูงสุด ในปลาทดลองกลุ่มที่ได้รับปรอทในครั้งเดียว พบว่ามีค่าสูงสุดในวันที่ 3 และลดลงตามลำดับในวันที่ 15 ซึ่งแตกต่างจากปลาทดลองกลุ่ม Semi-static exposure group ที่ได้รับปรอท อย่างต่อเนื่อง โดยการเปลี่ยนถ่ายน้ำทุกๆ 3 วัน ปริมาณของโลหะหนักปรอทที่ตรวจพบจะสะสมเพิ่มขึ้น จนถึงวันที่ 15 ของการทดลอง ซึ่งแสดงว่าปลาที่แสดงอาการความเป็นพิษของโลหะปรอทในแหล่งน้ำธรรมชาติ นั้น น่าจะเกิดการได้รับสารอย่างต่อเนื่องและเกิดการสะสมในอวัยวะภายใน ซึ่งการตรวจพบปริมาณของโลหะหนักปรอทที่สูง มีความสอดคล้องกับรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และการตรวจโดยวิธี AMG ในปลากลุ่ม HgCl₂ semi-static exposure groups ในปลาทดลองกลุ่มที่ได้รับปรอท เพียงครั้งเดียว พบว่าปลามีความสามารถในการกำจัดปรอท ออกจากร่างกาย ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการตรวจพบ ปริมาณของโลหะหนักปรอท ที่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญในวันที่แตกต่างกัน ปริมาณของโลหะหนักปรอทในกล้ามเนื้อของปลา มีค่าน้อยกว่า อวัยวะภายในอย่างมีนัยสำคัญ เนื่องจากการสะสมของโลหะปรอท ในธรรมชาติ ปรอทรูปอนินทรีย์ จะถูกเปลี่ยนเป็นรูป อินทรีย์ โดยขบวนการ biomethylation และปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ ซึ่งปรอทที่สะสมในกล้ามเนื้อมักอยู่ในรูปอินทรีย์ แตกต่างจากปรอทรูปอนินทรีย์ ในการศึกษาครั้งนี้ (WHO, 2003) มีรายงานการตรวจหาปริมาณของโลหะหนักปรอทในปลา มีค่าประมาณ 20 ppb (20 µg/l) to 2 ppm (2 mg/l) (Han et al., 2006).

การแสดงออกของ MT gene mRNA ได้มีการนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึง การได้รับความเป็นพิษของโลหะหนักที่มีความไวสูง และมีประสิทธิภาพ ในสัตว์น้ำหลายสปีชีส์ (Gao et al., 2009) ในการศึกษาครั้งนี้ ได้ดัดแปลงวิธีการตรวจหาการแสดงออกของ MT gene mRNA โดยวิธี RT-PCR เช่นเดียวกับกับรายงานการศึกษา ความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท ในปลานิล *O. mossambica* ของ Cheung et al. (2004) โดยใช้ คุ้ไพรเมอร์ของ MT cDNA of *O. mossambica*. และไพรเมอร์ของตัวควบคุมภายใน

ปฏิกิริยาของ Forward and reverse primers of β -actin gene, house keeping gene for tilapia species, designed from GenBank (AY116536) (Hwang et al., 2003) ผลผลิตที่คาดไว้ คือ 127 bp for MT gene product และ 90 bp for β -actin gene product แต่จากผลการทดลองพบว่าเมื่อใช้ไพรเมอร์ 2 คู่ ดังกล่าว พบ unspecific bands และเมื่อใช้คู่ไพรเมอร์เฉพาะ MT cDNA of *O. mossambica*. พบว่าให้ผลลบทั้งในกลุ่มทดลองที่ให้ผลบวกโดยวิธีอิมมูโน โนฮิสโตเคมี และกลุ่มควบคุม มีการนำ ผลผลิต ที่ 300 และ 150 bp มาตรวจหาลำดับนิวคลีโอไทด์ ซึ่งพบว่า ลำดับนิวคลีโอไทด์ไม่มีความคล้ายคลึงกับ ลำดับนิวคลีโอไทด์ของ MT cDNA of *O. mossambica* ดังที่มีรายงานของ Cheung et al. (2004). ซึ่งจากผลการทดลองแสดงว่าไม่มีความคล้ายคลึงของลำดับนิวคลีโอไทด์ MT gene of *O. mossambica* และ *O. niloticus* ซึ่งมีรายงานว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน MT ดังกล่าวเป็น Conserved region ของปลาในตระกูล สปีชีส์ (Chan, 1994). มีรายงานการศึกษาการแสดงออกของ MT mRNA gene ในปลานิล *O. aureus* และ *O. mossambicus* (Cheung et al., 2005) แต่ข้อมูลของปลานิล *O. niloticus* ยังไม่ชัดเจน ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาถึงลำดับนิวคลีโอไทด์ของจีน MT ที่จำเพาะเพื่อนำมาใช้ในการตรวจหาการแสดงออกของ MT mRNA gene ในปลานิล *O. niloticus* ต่อไป

จากผลการทดลองพบว่าไม่พบรอยโรคที่มีนัยสำคัญ ผลลบการตรวจหาโลหะหนักปรอท โดยวิธี AMG และการแสดงออกของโปรตีน MT ในสมอง หัวใจ และ กล้ามเนื้อ ซึ่งอาจสรุปได้ว่า อวัยวะดังกล่าวไม่มีบทบาทสำคัญ ในการศึกษา ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของโลหะหนักปรอทในปลานิล

บทสรุปและข้อเสนอแนะ

เป็นที่ทราบกันอย่างกว้างขวางว่าโลหะหนักปรอท มีความเป็นพิษสูงและสามารถปนเปื้อนได้ในสิ่งแวดล้อม ขบวนการสะสมของโลหะหนักปรอทในห่วงโซ่อาหาร เป็นสาเหตุหลักที่ตรวจพบความเป็นพิษต่อมนุษย์ ปลาไนล (O. niloticus) ถูกเลือกมาเป็นต้นแบบในการศึกษา ความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท เนื่องจากในประเทศไทย มีการเลี้ยงอย่างกว้างขวางในแหล่งน้ำธรรมชาติ และเป็นแหล่งโปรตีนของมนุษย์ ผลการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าทางของการได้รับโลหะหนักแบบ Semi-static exposure มีความเหมาะสม สำหรับการศึกษความเป็นพิษของโลหะหนักปรอท เนื่องจากสามารถก่อให้เกิดรอยโรคที่สำคัญทางจุลพยาธิวิทยาในปลาไนลทดลอง

รอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาที่สำคัญ ในการศึกษาครั้งนี้ คือ ไต ม้าม ตับและตับอ่อน วิธีการตรวจหาโลหะหนักปรอทโดยการย้อมสี Autometallography สามารถพัฒนาเพื่อตรวจดูการสะสมของโลหะหนักปรอท ในเนื้อเยื่อได้เป็นอย่างดี ซึ่งมีความสัมพันธ์กับรอยโรคที่ตรวจพบ และรูปแบบของการคิดสี Autometallography ขึ้นกับ ปริมาณของโลหะหนักปรอทที่ได้รับ แหล่งของโลหะหนักปรอท ระยะเวลา และทางที่ได้รับ ที่ก่อความเป็นพิษในปลาไนล

จีน และโปรตีนจีน Metallothionein มีความสำคัญที่แสดงออกในสัตว์หลายชนิดที่ได้รับความเป็นพิษจากโลหะหนัก จึงสามารถใช้ในการแสดงออกของโปรตีนจีน Metallothionein เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของโลหะหนักปรอทในสิ่งแวดล้อม และก่อความเป็นพิษในปลาไนล เช่นเดียวกับรายงานที่ผ่านมาในการศึกษาภาวะความเป็นพิษจากโลหะหนักชนิดอื่นๆ และการเป็นพิษของโลหะหนักปรอทในปลาและสัตว์ชนิดอื่นๆ ซึ่งสามารถใช้เทคนิคการตรวจการแสดงออกของโปรตีน Metallothionein โดยวิธี Immunohistochemistry และ mRNA metallothionein expression โดยวิธี Reverse Transcriptase Polymerase Chain Reaction (RT-PCR)

บรรณานุกรม

(Bibilography)

กลุ่มวิจัยสัทธิการประมง ศูนย์สารนิเทศ กรมประมง. 2548. หนังสือสัทธิการประมงแห่งประเทศไทย พ.ศ. 2548. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ. 19-54.

กองจัดการสารอันตราย และกากของเสีย กรมควบคุมมลพิษ. 2545.ปรอท (mercury). พิมพ์ครั้งที่ 3. กรุงเทพฯ. 9-10.

Agius, C.1985. In: Fish Immunology. The melano-macrophage centers of fish: a review. M.J. Manning and M.F. Tatner (ed.) London: Academic Press, Inc. 85-105.

Alvarado, A.E., Quesada, I., Hylland, K., Marigómez and Soto, M. 2006. Quantitative changes in metallothionein expression in target cell-types in the gills of turbot (*Scophthalmus maximus*) exposed to Cd, Cu, Zn and after a depuration treatment. Aquat. Toxicol. 77: 64-77.

Atli, G. and Canli, M. 2003. Natural occurrence of metallothionein-like proteins in the liver of fish *Oreochromis niloticus* and effects of cadmium, lead, copper, zinc, and iron exposures on their profiles. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 70: 619-627.

ATSDR. 1999. Toxicology profile for mercury. Washington D.C.: Agency for Toxic Substances and Diseases Registry, U.S. Department of Health and Human Service. 1-27.

Bernard, S., Enayati, A., Redwood, L., Roger, H. and Binstock, T. 2001. Autism: a novel form of mercury poisoning. Med. Hypotheses. 56 (4):462-471.

Chan, K.M. 1994. PCR-cloning of goldfish and tilapia metallothionein complementary DNAs. Biochem. Biophys. Res. Commun. 205 (1):368-374.

- Chan, K.M. 1995. Metallothionein: potential biomarker for monitoring heavy metal pollution in fish around Hong Kong. *Marine. Pollut. Bull.* 31:411-415.
- Cheung, A.P.L., Lam, T.H-J. and Chan, K.M. 2004. Regulation of Tilapia metallothionein gene expression by heavy metal ions. *Marine. Environ. Res.* 58:389-394.
- Cheung, A.P.L., Lam, V.K.L. and Chan, K.M. 2005. Tilapia metallothionein genes: PCR-clonning and gene expression studies. *Biochemica et Biophysica Acta.* 1731:191-201.
- Dang, Z., Lock, R.A.C., Flik, G. and Bonga, S.E.W. 1999. Metallothionein response in gills of *Oreochromis mossambicus* exposed to copper in fresh water. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 277: R320-R331.
- Danscher, G. 1984. Autometallography. A new technique for light and electron microscopic visualization of metals in biological tissue (gold, silver, metal sulphides and metal selenides). *Histochem.* 81: 331-335.
- Danscher G. and NØrgaard J.O.R. 1985. Ultrastructural autometallography: a method for silver amplification of catalytic metals. *J. Histochem. Cytochem.* 33(7): 706-710.
- Danscher, G. and Stoltenberg, M. 2006. Autometallography (AMG) Silver enchancement of quantum dots resulting from (1) metabolism of toxic metals in animals and humans, (2) in vivo, in vitro and immersion created zinc-sulphur/zinc-selenium nanocrystals, (3) metal ions liberated from metal implants and particles. *Progr. Histochem. Cytochem.* 41: 57-139.
- Danscher, G. Stoltenberg, M., Kemp, K. and Pamphlett, R. 2000. Bismuth Autometallography: protocol, specificity, and differentiation. *J. Histochem. Cytochem.* 48(11): 1503-1510.

- de Oliveira Ribeiro, C.A., Guimarães, J.R. and Pfeiffer, W.C. 1996. Accumulation and distribution of inorganic mercury in a tropical fish (*Trichomycterus zonatus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 34:190-195.
- de Oliveira Ribeiro, C.A., Rouleau, C., Pelletier, E., Audet, C. and Tjalve, H. 1999. Distribution kinetics of dietary methylmercury in the arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Sci. Technol.* 33:902-907.
- de Oliveira Ribeiro, C.A., Belger L., Pelletier E. and Rouleau, C. 2002. Histopathological evidence of inorganic mercury and methyl mercury toxicity in the arctic char (*Salvelinus alpinus*). *Environ. Res.* 90:217-225.
- Dimitriadis, V.K., Domouhtsidou, G.P. and Raftopoulou, E. 2003. Localization of Hg and Pb in the palps, the digestive gland and the gills in *Mytilus galloprovincialis* (L.) using autometallography and X-ray microanalysis. *Environ. Pollut.* 125: 345-353.
- Drevnick, P.E., Sandheinrich, M.B. and Oris, J.T. 2006. Increased ovarian follicular apoptosis in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to dietary methylmercury. *Aquat. Toxicol.* 79: 49-54.
- Eroglu, K., Atli, G. and Canli, M. 2005. Effects of metal (Cd, Cu, Zn) interactions on the profiles of metallothionein-like proteins in the Nile fish *Oreochromis niloticus*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 75: 390-399.
- Gao, D., Wang, G.T., Chen, X.T. and Nie, P. 2009. Metallothionein-2 gene from the mandarin fish *Siniperca chuatsi*: cDNA cloning, tissue expression, and immunohistochemical localization. *Com. Biochem. Physiol.* 149: 18-25.

- Han, F.X., Patterson, W.D., Xia, Y., Sridhar, B.B.M., and Su, Y. 2006. Rapid determination of mercury in plant and soil samples using inductive coupled plasma atomic emission spectrometry, a comparative study. *Water, Air, Soil Pollut.* 170: 161-171.
- Hansen, J.C. and Danscher, G. 1995. Quantitative and qualitative distribution of mercury in organ from arctic sledgedogs. *Pharmacol. Toxicol.* 77 (3):189-195.
- Hansen, J.C., Reske-Nielsen, E., Thorlacius-Ussing, O.R., Rungby, J. and Danscher, G. 1989. Distribution of dietary mercury in dog. *Sci. Total. Environ.* 78:23-43.
- Jewett S.C. and Duffy, L.K. 2007. Mercury in fishes of Alaska, with emphasis on subsistence species. *Sci. Total. Environ.* 387:3-27.
- Kendall, M.W. 1977. Acute effects of methyl mercury toxicity in channel catfish (*Ictalurus punctatus*) liver. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 18 (2):143-151.
- Lam, K.L., Ko, P.W., Wong, J.K. and Chan, K.M. 1998. Metal toxicity and metallothionein gene expression studies in common carp and tilapia. *Mar. Environ. Res.* 46(1-5): 563-566.
- Lau, J.C., Jackson-Boeters, L., Daley, T.D., Wycoki, G.P. and Cherian, M.G. 2001. Metallothionein in human gingival amalgam tattoos. *Arch. Oral. Bio.* 46: 1015-1020.
- Limke, T.L., Heidemann, S.F. and Atchison, W.D. 2004. Disruption of intraneuronal divalent cation regulation by methylmercury: are specific targets involved in altered neuronal development and cytotoxicity in methylmercury poisoning? *Neuro. Toxicol.* 25: 741-760.
- Loumbourdis, N.S. and Danscher, G. 2004. Autometallography tracing of mercury in frog liver. *Environ. Pollut.* 129(2): 299-304.

Macleán, N., Rahman, M.A., Sobh, F., Hwang, G., Iyengar, A., Ayad, H., Smith, A. and Farahmand, H.

2002. Transgenic tilapia and the tilapia genome. *Gene*. 295: 265-277.

Mela, M., Randi, M.A.F., Ventura, D.F., Carvalho, C.E.V., Pelletier, E. and Ribeiro Oliveira, C.A.

2007. Effects of dietary methylmercury on liver and kidney histology in the neotropical fish *Hoplias malabaricus*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 68(3): 426-435.

NJDEP. 2002. Chapter 6 ecological effects of mercury. In: New Jersey Mercury Task Force. Vol. II.

New Jersey: New Jersey Department of Environmental Protection. 55-69.

NØrgaard J.O.R., Ernst, E. and Juhl, S. 1994. Efficiency of autometallographic detection of mercury in

the rat kidney. *Histochem. J.* 26: 100-102.

Pandey, S., Kumar, R., Sharma, S., Nagpure, N.S., Srivastava, S.K. and Verma, M.S. 2005. Acute

toxicity bioassays of mercuric chloride and malathion on air-breathing fish *Channa punctatus* (Bloch). *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 61:114-120.

Peebua, P., Kruatrachue, M., Pokethitiyook, P. and Kosiyachinda, P. 2006. Histological effects of

contaminated sediments in Mae Klong river tributaries, Thailand, on Nile tilapia, *Oreochromis niloticus*. *ScienceAsia*. 32: 143-150.

Quirós, L., Piña, B., Solé, M., Blasco, J., López, M.Á., Riva, M.C., Barceló, D. and Raldúa, D. 2007.

Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: laboratory and field studies. *Chemosphere*. 67:1144-1154.

Raldúa, D., Díez, S., Bayona, J.M. and Barceló, D. 2007. Mercury levels and liver pathology in feral

fish living in the vicinity of a mercury cell chlor-alkali factory. *Chemosphere*. 66:1217-1225.

- Roberts, R.F. and Ellis, A.E. 1978. In: Fish Pathology. The pathophysiology and systemic pathology of teleosts. Robert, R.J. (ed.) London: Bailliere Tindall. 55-91.
- Shimada, A., Yamamoto, E., Morita, T., Yoshida, M., Suzuki, J., Satoh, M. and Toyama, C. 2004. Ultrastructural demonstration of mercury granules in the placenta of metallothionein-Null pregnant mice after exposure to mercury vapor. *Toxicol. Pathol.* 32 (5):20-26.
- Shirabe, T. 1978. Electron microscopic X-ray microanalysis of the nervous system after mercury intoxication. *Folia. Psychiatr. Neurol. Jpn.* 32:278-283.
- Wester, P.W. and Canton, H.H. 1992. Histopathological effects in *Poecilia reticulana* (guppy) exposed to methyl mercury chloride. *Toxicol. Pathol.* 20 (1):81-92.
- WHO. 2003. Elemental mercury and inorganic mercury compounds: human health aspects. Concise International Chemical Assessment Document. 50:1-32.
- Woshiner, V.M., O'Hara, T.M., Eurell, J.A., Wallig, M.A., Bratton, G.R., Suydam, R.S. and Beasley, V.R., 2002. Distribution of inorganic mercury in liver and kidney of Beluga and Bowhead whales through autometallographic development of light microscope tissue sections. *Toxicol. Pathol.* 30:209-215.
- Wu, S., Weng, C., Hwang, J., Huang, C. and Hwang, P. 2008. Metallothionein induction in early larval stages of tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Physio. Biochem. Zool.* 73(5): 531-537.
- Zahir, F., Rizwi, S.J., Haq, S.K. and Khan, R.H. 2005. Low dose mercury toxicity and human health. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* 20: 351-360.

APPENDICES

Appendix A

Table 1A Total mercury concentration of gills

Group	Day	Total Hg concentration (ppm/g dry weight)			
Control	3	0.190	0.140	0.160	
	9	0.12	0.11	0.100	
	15	0.064	0.12	0.120	
0.5 i.p.	3	2.000	0.947	0.524	
	9	0.730	1.133	0.800	
	15	0.320	0.778	0.962	
1 i.p.	3	1.940	2.417	2.278	
	9	0.710	3.522	0.169	
	15	0.950	0.846	0.889	
2 i.p.	3	0.400	11.368		
	9	7.474	1.100	3.882	
	15	0.950	4.000	6.400	
5 i.p.	3	2.090	4.695	4.912	4.879
	9	3.227	0.308	3.235	
	15	0.530	0.789	1.650	
0.5 oral	3	0.437	0.316	0.433	
	9	0.305	0.311	0.095	
	15	0.151	0.444	0.500	
1 oral	3	0.509	0.523	0.394	
	9	0.118	0.694	0.520	
	15	0.428	0.407		
2 oral	3	2.220	1.186	0.605	
	9	3.441	2.688	3.746	
	15	0.699	0.592	1.043	
5 oral	3	2.840	3.552	3.875	
	9	2.220	1.186	0.605	
	15	1.915	1.475	0.925	
0.5 semi-static	3	10.295	17.266	19.980	
	9	38.545	27.861	44.178	
	15	53.664	57.891		
1 semi-static	3	16.984	27.917	18.289	17.649
	9	51.412	19.889	29.402	
	15	42.125	47.819		

Table 1B Total mercury concentration of visceral organ in abdomen

Group	Day	Total Hg concentration (ppm/g dry weight)			
Control	3	0.086	0.150	0.160	
	9	0.136	0.150	0.160	
	15	0.130		0.130	
0.5 i.p.	3	7.318	4.100		
	9	0.690	1.136	3.240	
	15	0.440	3.273		
1 i.p.	3	1.490	16.938	25.842	
	9	8.133	12.619	9.143	
	15	0.300	0.364	8.692	
2 i.p.	3	22.272	15.540	21.291	
	9	1.833	12.500	10.385	
	15	2.920	16.778	8.857	
5 i.p.	3	2.400	57.720	30.242	36.154
	9	15.057	11.071	13.083	
	15	3.330	3.438	7.591	
0.5 oral	3	0.981	0.633	1.116	
	9	0.088	0.333	0.568	
	15	0.444	0.395	0.395	
1 oral	3	0.357	0.937	0.888	
	9	0.282	0.386	0.820	
	15	0.403	1.029	0.386	
2 oral	3	7.054	5.461	6.283	
	9	4.995	4.760	2.914	
	15	1.643	1.221	1.289	
5 oral	3	14.000	4.526		
	9	4.612	3.094	4.103	
	15	2.902	3.959	2.185	
0.5 semi-static	3	4.683	67.821	35.465	25.148
	9	73.984	43.082	38.512	
	15	16.543	68.765		
1 semi-static	3	14.590	25.597	121.274	97.053
	9	26.000	185.002	194.805	170.015
	15	148.118	130.895		

Table 1C Total mercury concentration of muscle tissues

Group	Day	Total Hg concentration (ppm/g dry weight)			
Control	3	0.110	0.170	0.140	0.190
	9	0.090	0.190	0.240	0.200
	15	0.040	0.290	0.180	0.180
0.5 i.p.	3	0.190	0.906	0.175	
	9	0.280	0.542	2.120	
	15	0.280	0.952	0.314	
1 i.p.	3	0.860	4.150	0.600	
	9	0.340	2.571	1.852	
	15	0.330	0.136		
2 i.p.	3	0.370	1.154	1.618	
	9	2.576	2.914	4.000	
	15	0.750	4.050	2.952	
5 i.p.	3	0.950	5.778	4.958	6.950
	9	0.381	5.885	3.318	
	15	0.720	1.596	1.818	
0.5 oral	3	0.421	0.431	0.315	
	9	0.353	0.111	0.389	
	15	0.312	0.035	0.133	
1 oral	3	0.083	0.175	0.038	
	9	0.271	0.074	0.190	
	15	0.400	0.355	0.256	
2 oral	3	1.824	1.639	0.932	
	9	0.777	0.737	2.742	
	15	1.077	0.411	0.568	
5 oral	3	0.696	0.280	1.308	
	9	0.416	0.368	0.372	
	15	0.256	0.555	0.845	
0.5 semi-static	3	0.657	2.435	2.973	3.683
	9	8.908	12.078	10.862	
	15	1.385	24.207	24.949	22.399
1 semi-static	3	0.733	3.601	5.291	
	9	2.505	12.467	15.152	
	15	2.505	32.024	13.222	

Appendix B

Preparing of 1,000 ppm HgCl_2 (stock HgCl_2)

0.675 g HgCl_2 (FW=271.50) added distilled water to yield 500 ml

Reagent for autometallography

- A. 1% potassium cyanide (5 g of potassium cyanide add with 500 ml of distilled water)
- B. Physical developer
 - a. 60 ml of 50% gum Arabic (30 g gum Arabic from acacia tree add with 30 ml of a distilled water and incubate in 60°C overnight)
 - b. 10 ml of citrate buffer (2.55 g citric acid anhydrous and 2.375 g tri-sodium citrate dehydrate add with 10 ml of a distilled water)
 - c. 30 ml of 5.6% hydroquinone (1.68 g of hydroquinone add with 30 ml of distilled water)
 - d. 0.5 ml of 17% silver nitrate (0.34 g of silver nitrate add with 2 ml of distilled water)
- C. 5% sodium thiosulfate (25 g of sodium thiosulfate add with 500 ml of distilled water)
- D. Farmer's solution
 - a. 0.6 ml of 7.5% potassium ferric cyanide (0.75 g of potassium ferric cyanide add with 10 ml of distilled water)
 - b. 2.4 ml of 2% sodium thiosulfate (2 g of sodium thiosulfate add with 100 ml of distilled water)
 - c. Add with 120 ml of distilled water

Reagent of immunohistochemistry

- A. 0.1 M phosphate buffer saline (stock PBS)
 - a. 40 g sodium chloride
 - b. 1 g potassium chloride
 - c. 5.75 g di-sodium hydrogen orthophosphate
 - d. 1 g potassium dihydrogen phosphate
 - e. Add distilled water to yield 500 ml
- B. Citrate buffer pH 6.0
 - a. citric acid
- C. Peroxidase blocking solution
 - a. 750 μ l of 30% hydrogen peroxide
 - b. Add 75 ml of methanol
- D. 1% BSA
 - a. 1 g BSA
 - b. 100 ml of working PBS (1X)

Reagent of ICP-AES samples

10 : 1 sulfuric acid : hypochloric acid

- A. 900 ml of sulfuric acid
- B. 100 ml of hypochloric acid

Reagent for RT-PCR

- A. TBE (17 g TBE buffer powder (Amresco[®], USA) add with 1 l of distilled water)
- B. 1.5% agarose gel for electrophoresis
 - a. 1.5 g agarose gel
 - b. 100 ml of TBE

P16 Histopathological and Autometallographic Tracing of Acute Mercury Toxicity in Tilapia (*Oreochromis niloticus*)

K. Rattanapinyopituk¹ A. Ponponpisit² N. Pirarat¹ T. Kaewamatawong¹ A. Rungsipipat¹

¹Department of Veterinary Pathology, ²Department of Veterinary Medicine, Faculty of Veterinary Science, Chulalongkorn University, Bangkok, 10330, Thailand

Keywords: autometallography, histopathology, mercury, tilapia

Introduction and Objectives

Mercury is one of most toxic heavy metals which can contaminate natural water sources. Humans can be exposed to mercury by inhalation and ingestion and especially by the consumption of fish. (1) Therefore, it is most appropriate to use fish as environmental marker of mercury contamination. (2) The purpose of this study is to investigate acute mercury toxicity in tilapia (*Oreochromis niloticus*) via histopathological and autometallographic techniques.

Material and Methods

Tilapia (*Oreochromis niloticus*) (9-13 cm; 25-50 g) were divided into eight experimental groups, in each group, twenty five tilapia were placed in 62.5-l glass aquaria filled with 50-l tapwater. Four of the groups were intraperitoneally injected with 0.5, 1, 2, and 5 µg/g (ppm) mercuric chloride (HgCl₂, Sigma-Aldrich) respectively and the rest of the aquaria were bathed with 0.5, 1, 2, and 5 µg/l (ppm) HgCl₂ respectively. There was also one control group. All fish were fed twice daily with commercially available food throughout the experimental period. Water in the aquaria were changed every two days. Samples (gill, liver, spleen, intestine, brain, heart, and muscle tissues) were collected after euthanasia by hypothermia every three days until the 15th day of exposure. All samples were fixed with 10% buffered formalin, embedded in paraffin, sectioned at 6 µm, then stained with hematoxylin and eosin (H&E) and the mercury visualized by autometallographic method. (3) The results were observed under light microscope.

Results and Discussion

Mercuric chloride can produce remarkable histopathological changes in tilapia, especially in the kidneys, hepatopancreas and spleen. All animals were dead in 2 and 5 µg/l HgCl₂ bath groups on the first day of experiment. Severe tubulonephrosis; swelling of tubular epithelial cells with hyaline droplets and hyaline casts in tubular lumen, was observed on the first day. (day 0) Immature nephrons; regenerating tubular epithelium, were also found on days 6, 9, 12 and 15 of the experiment. The histological changes of liver were the regenerating of

hepatocytes after 6 days. The hepatocytes were swellings with large nuclei and prominent nucleoli and a loss of cytoplasmic fat when compared with the control group. Mild pancreatic atrophy could also be found. There was a marked increasing of melanomacrophage centers (MMCs) in splenic parenchyma compared with the control group. MMCs were increased on days 3, 6, 9, 12 and 15 respectively. The kidney is a target organ of heavy metals, such as Hg, in species including mammals. (4) High concentrations of Hg compounds produce severe tubulonephrosis. Hepatocytes regenerate and loss of fat storage is involved in the hepatic detoxification of Hg. (5) Increasing of MMCs in spleen and head of kidney may involve an increase phagocytic activity due to tissue damage by Hg given that macrophages belong to the first line of protection of mercury intoxicification. (3) Following autometallography development, silver-enhanced Hg grains are visualized as black granules in renal tubular epithelium. MMCs in spleen, in head of the kidney and in macrophages at pancreatic acini. From an autometallographic tracing of mercury, the trunk of the kidney and spleen of tilapia are major organs for mercury accumulation. The amount and location of mercury grains are different after observation between administration routes and doses. (3) The bath group demonstrated more mercury grains than the i.p. administration group and higher concentrations of HgCl₂ produced more grains than lower concentrations.

Acknowledgements

This work was financially supported by the National Research Council (NRC) 2007-2008.

References

1. WHO. 2003. Concise International Chemical Assessment Document. 50:1-32.
2. Pandey et al. 2005. Ecotoxicol Environ Saf 61: 1144-1154.
3. Loumbourdis and Danscher. 2004. Environ Pollut 129 (4): 299-304.
4. Hansen and Danscher. 1995. Pharmacol. Toxicol. 77(3): 189-195.
5. Mela et al. 2007. Ecotoxicol. Environ. Saf. 68(3): 426-435