บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 การประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 ระดับไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

จากการประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสคำนวนค่า %CV ได้เท่ากับ 5.92, 6.45 และ 7.16 ซึ่งเป็นค่าที่ยอมรับได้

4.2 การประเมินความคงตัวของไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

ไซโตโครมพี 450 เป็นเอ็นไซม์ที่พบมากในไมโครโซมมีหน้าที่สำคัญในการเมตาบอลิสมสารต่างๆ ทั้งสารภายในร่างกายและสารจากภายนอกร่างกาย เช่น ยาและสารพิษต่างๆ และมีความแตกต่างกันตามชนิดและสายพันธุ์ของสัตว์จึงมีความสำคัญที่จะต้องทำการศึกษาถึงบทบาทในการเมตาบอลิสมสารพิษต่าง ๆ ของไซโตโครมพี 450 แต่ในสิ่งมีชีวิตบางชนิดการศึกษาภายในร่างกายทำได้ลำบาก เช่น ในคน จะมีปัญหาด้านจริยธรรม จึงต้องทำการศึกษาภายนอกร่างกายและมีการจัดเตรียมไมโครโซม แต่การเตรียมไมโครโซมและทำการศึกษาภายในวันเดียวเป็นไปได้ยากจึงต้องมีการจัดเก็บไมโครโซมไว้จนกว่าที่จะพร้อมทำการศึกษา ในสัตว์ก็เช่นเดียวกันในบางครั้งต้องเตรียมไมโครโซมและเก็บไว้จนกระทั่งพร้อมที่จะทำการศึกษา ดังนั้นจึงมีการศึกษาถึงการเก็บรักษาไมโครโซมและการเก็บเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำมาเตรียมไมโครโซม และพบว่าเนื้อเยื่อที่ทำการแช่แข็งในระยะเวลา 6 เดือนก่อนที่จะนำมาเตรียมไมโครโซมมีระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง 40 - 60 เปอร์เซ็นต์ (Pearce et al., 1996) และพบว่าไมโครโซมัลไซโตโครมพี 450 ที่เตรียมอยู่ในรูปไมโครโซม (microsomal pellet) ที่เก็บไว้ในอุณหภูมิเย็นระดับที่แช่แข็งหรือที่อุณหภูมิสูงกว่ามีสมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ลดลงอย่างรวดเร็ว (Barktosek et. al.,1980; Wade et al.,1972) เช่นเดียวกับไมโครโซมที่เก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส พบว่าสมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ลดลงอย่างรวดเร็ว (Bartoseak et.al.,1980 ; Levin et. al., 1969 ; Crankshaw et. al.,1990 ; Litterst et.al.,1974) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Forlin และ Andersson (1985) เก็บไมโครโซมในสารละลายที่มี 20 % glycerol ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสได้นานถึง 1 ปี

ในการศึกษาครั้งนี้ทำการประเมินความคงตัวของไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส เป็นเวลา 1 ปี 7 เดือน พบว่าปริมาณไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงประมาณ 10 , 11 และ 14 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ และจากการศึกษาครั้งนี้เก็บไมโครโซมไว้เป็นเวลานาน 1 เดือนในที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาวัดหาระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส ซึ่งผลจากการประเมินความคงตัวพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Pearce และคณะ (1996) ที่ทำการศึกษาไมโครโซมจากตับคน พบว่าไมโครโซมที่เตรียมได้จากตับคนสามารถเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียสได้นานถึง 2 ปี โดยที่ปริมาณไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เช่นเดียวกับการศึกษาของ Powis และคณะ(1988) พบว่าไมโครโซมจากตับคนสามารถเก็บได้นานถึง 1 ปี ที่อุณหภูมิ - 80 องศาเซลเซียสโดยที่ระดับไซโตโครมพี 450 มีการเปลี่ยนแปลงน้อยมาก พบว่าความคงตัวของไซโตโครมพี 450 ขึ้นอยู่กับชนิดของบัฟเฟอร์ที่ใช้เก็บ จากการเตรียมไมโครโซมของ Pearce และ Powis ใช้บัฟเฟอร์ที่มี EDTA เป็นส่วนประกอบจะป้องกันการสูญสลายของไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสได้ดีกว่าการใช้บัฟเฟอร์ที่ไม่มี EDTA เป็นส่วนประกอบ โดยที่ความคงตัวของไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสที่อุณหภูมิเดียวกันระยะเวลาการเก็บรักษาเท่ากันจะมีความแตกต่างกันตามกระบวนการเตรียมไมโครโซม นอกจาก EDTA แล้ว glycerol ยังมีส่วนช่วยให้ไซโตโครมคงตัวดีขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้เก็บไมโครโซมในบัฟเฟอร์ที่มี glycerol เป็นส่วนประกอบซึ่งจะทำให้ไซโตโครมเหล่านี้มีความคงตัวมากขึ้น (Skett และคณะ, 1995 ; Guengerich , 1994)

4.3 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนภายในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมภายหลังสัมผัสนาน 24 ชั่วโมง

เมททิลพาราไธออนเป็นสารปราบศัตรูพืชที่มีพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และใช้กันมากในทางการเกษตร เคยมีการศึกษาในหนูถีบจักรโดยฉีดเมททิลพาราไธออนเข้าทางหน้าท้อง พบว่าที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6.4 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กก. ทำให้หนูถีบจักรตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง (Kamienski and Murphy, 1971) และความเข้มข้นเท่ากับ 7 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัวหนู 1 กก. ทำให้หนูขาวตายครึ่งหนึ่งภายในเวลา 96 ชั่วโมง (DuBois and Kinoshita ,1968) Pickering และคณะ (1962) พบว่าความเข้มข้นเท่ากับ 1,900 ไมโครกรัมต่อลิตร ทำให้ปลา

Bluegill sunfish (*Hepomis macrochiris*) ตายครึ่งหนึ่งในเวลา 96 ชั่วโมง จากความแตกต่างกันของสายพันธุ์ของสัตว์ทดลองทำให้เกิดความเป็นพิษของเมททิลพาราไธออนในสัตว์แต่ละชนิดแตกต่างกันไป การศึกษาถึงผลของเมททิลพาราไธออนในปลานั้นยังมีไม่มากนักทั้งๆ ที่ปลามีความสำคัญต่อมนุษย์เนื่องจากอยู่ในห่วงโซ่อาหารที่มีมนุษย์เป็นผู้บริโภค และปลายังสัมผัสกับสารปราบศัตรูพืชโดยตรงจากสิ่งแวดล้อมอีกด้วย (Benke et. al. ,1974) นอกจากนี้เคยมีการศึกษาของ Pickering และคณะ (1962) ได้ระบุถึงปลา sunfish เป็นตัวบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตได้อีกด้วย

จากการสำรวจของกองวัตถุมีพิษการเกษตรกรมวิชาการเกษตรในปี พ.ศ. 2525 พบว่าผลผลิตทางการเกษตรที่มีปริมาณเมททิลพาราไธออนตกค้างอยู่ 0.249 ส่วนในล้านส่วน ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงเริ่มทำการศึกษาเมททิลพาราไธออนในขนาด 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0 และ 4.0 ส่วนในล้านส่วนซึ่งเป็นขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายภายใน 96 ชั่วโมง (ฐิติลาวัณย์ กลิ่นคล้ายกัน, 2539) และทำการศึกษาถึงความเป็นพิษภายในเวลา 24 ชั่วโมง

จากการสังเกตอาการของปลาดุกภายหลังสัมผัสเมททิลพาราไธออน พบว่าปลาดุกจะมีอาการกระวนกระวายว่ายน้ำไปมาชนตู้กระจกหรือกระโดดลอยตัว หลังจากนั้นจะมีอาการนอนนิ่งๆ ลำตัวมีเมือกมาก อาการเหล่านี้สังเกตได้ในปลาดุกที่ได้รับเมททิลพาราไธออนตั้งแต่ความเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นต้นไป ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Heath และคณะ(1993) ที่ทำการศึกษาในปลากระพงที่ได้รับเมททิลพาราไธออน ปลาจะมีอาการว่ายน้ำมีทิศทางไม่แน่นอน ทั้งนี้ อาจเกิดจากเมททิลพาราไธออนไปยับยั้งเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรสบริเวณปลายประสาท motor nerve และที่ synapes ของระบบประสาท ทำให้เกิดการสะสมของอะซิทิลโฆลีนบริเวณปลายประสาทมีผลทำให้มีการกระตุ้นกล้ามเนื้อลายมากกว่าปกติ รวมทั้งอาการทางระบบประสาทให้ปลามีอาการตื่นตกใจง่าย ปลาจึงมีอาการว่ายน้ำไปมาแบบมีทิศทางไม่แน่นอน เกิดการ oxidative metabolism มากขึ้นและต้องใช้ออกซิเจนมากในระยะแรกของการได้รับเมททิลพาราไธออน และในระยะหลังของการได้รับเมททิลพาราไธออนปลามีอาการเฉื่อยและนอนนิ่งๆ อาจเนื่องจากขาดออกซิเจนของเนื้อเยื่อและระบบต่างๆ ในร่างกายเป็นผลมาจากเมททิลพาราไธออนสะสมบริเวณเหงือกปลา ทำให้การขับกาซคาร์บอนไดออกไซด์ออกจากร่างกายได้ยาก และการรับออกซิเจนจากสิ่งแวดล้อมโดยผ่านทางเหงือกเป็นไปได้ลำบาก

4.3.1 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อปริมาณโปรตีนในไมโครโซมและน้ำหนักตับปลาดุกพันธุ์ผสม

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้นมีแนวโน้มทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมลดลง โดยลดลงตามความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนที่เพิ่มขึ้นแต่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าเมททิลพาราไธออนมีผลทำลายโปรตีนในไมโครโซมสอดคล้องกับการศึกษาของ Halpert และคณะ (1980) และยังสอดคล้องกับระดับไซโตโครมพี 450 ที่ลดลงจากในการศึกษาครั้งนี้อีกด้วย ซึ่งแสดงให้เห็นถึงความสัมพันธ์แปรผันตามกันระหว่างปริมาณโปรตีนในไมโครโซมและระดับไซโตโครมพี 450

จากผลในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อน้ำหนักตับปลาดุก จากการศึกษาของ ภัทรา หาญจริยกูล (2536) พบว่า เมททิลพาราไธออนมีผลทำลายเซลล์ตับในปลากระพง และจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนมีผลทำลายโปรตีนในไมโครโซม ฉะนั้นเมททิลพาราไธออนน่าจะมีผลทำให้น้ำหนักตับลดลง แต่จากการศึกษาครั้งนี้เมททิลพาราไธออนไม่ทำให้น้ำหนักตับปลาดุกลดลงอาจเกิดจากในปลาดุกแต่ละตัวมีน้ำหนักตับแตกต่างกันมาก หรือเมททิลพาราไธออนมีผลเปลี่ยนแปลงน้ำหนักตับเพียงเล็กน้อย รวมทั้งอาจจะเกิดความคลาดเคลื่อนในการตัดตับ จึงไม่พบว่าเมททิลพาราไธออนมีผลต่อน้ำหนักตับปลาดุกซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาของ Solecki และคณะ (1996) ที่ทำการศึกษาในนกคุ่มพบว่าเมททิลพาราไธออนมีผลทำให้น้ำหนักตับนกคุ่มลดลง ซึ่งอาจจะเกิดจากความแตกต่างของสัตว์ทดลองตลอดจนระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาจึงทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน

4.3.2 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และระดับไซโตโครมพี 420

จากการศึกษาพบว่าเมททิลพาราไธออนมีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง และระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้น โดยที่การลดลงและเพิ่มขึ้นเป็นไปตามความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนที่เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของ ฐิติลาวัณย์ กลิ่นคล้ายกัน (2539) ที่ทำการศึกษาในปลาดุกพันธุ์ผสมเช่นกันพบว่าเมททิลพาราไธออนทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงและระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้น แสดงว่าไซโตโครมพี 450 ถูกทำลายไปจึงทำให้วัดระดับไซโตโครมพี 450 จากการรวมตัวของไซโตโครมพี 450 กับคาร์บอนมอนอกไซด์ได้ลดลง และวัดระดับไซโตโครมพี 420 ซึ่งเป็น inactive form ของไซโตโครมพี 450 ได้มากขึ้น จากการศึกษาของ Norman และคณะ (1974) พบว่าในการเมตาบอลิสมของพาราไธออนโดยไซโตโครมพี 450 มีซัลเฟอร์อะตอมหลุดมาจากพาราไธออนและจับกับไซโตโครมพี 450 ซึ่งการจับของซัลเฟอร์กับไซโตโครมพี 450 นี้ถูกยับยั้งด้วยคาร์บอนมอนอกไซด์ แสดงว่าซัลเฟอร์อาจจะจับกับไซโตโครม

พี 450 ในตำแหน่งเดียวกับที่คาร์บอนมอนอกไซด์จับกับไซโตโครมพี 450 จึงเป็นเหตุให้การวัดระดับไซโตโครมพี 450 จากการรวมตัวของคาร์บอนมอนอกไซด์กับไซโตโครมพี 450 ได้ลดลง ในการศึกษาครั้งนี้ เมททิลพาราไธออนเป็นสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเช่นเดียวกับพาราไธออน ฉะนั้นอาจเป็นเช่นเดียวกับการเมตาบอลิสมของพาราไธออนที่มีซัลเฟอร์หลุดออกมาจับกับไซโตโครมพี 450 ทำให้วัดระดับไซโตโครมพี 450 ได้ลดลง แต่ในการศึกษาครั้งนี้พบว่ามีการทำลายไซโตโครมพี 450 เนื่องจากมีระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Halpert และคณะ (1980) พบว่าการเมตาบอลิสมของพาราไธออน โดยไซโตโครมพี 450 มีซัลเฟอร์อะตอมหลุดมาจากพาราไธออนและไปจับกับ cystein ซึ่งเป็นโปรตีนในโมเลกุลของไซโตโครมพี 450 และฮีมบนโมเลกุลไซโตโครมพี 450 มีการทำลายไซโตโครมพี 450 อย่างถาวรและนอกจากนี้เมททิลพาราไธออนยังมีผลในการทำลายเซลล์ตับได้โดยตรงซึ่งอาจเป็นอีกเหตุผลหนึ่งที่ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ในตับลดลง (Jonnalagadda and Rao, 1996)

4.3.3 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมบี 5

จากการศึกษาพบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ ฐิติลาวัณย์ กลิ่นคล้ายกัน (2539) พบว่าเมททิลพาราไธออนไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมแต่จากการศึกษาของ ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538) ที่ทำการศึกษาภายนอกร่างกาย (*in vivo*) พบว่าเมททิลพาราไธออนขนาด 1 mM มีผลทำให้ระดับไซโตโครมบี 5 ลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p< 0.05$ อย่างไรก็ตามการที่ผลการศึกษาภายนอกร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมและภายในร่างกายที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้มีผลที่แตกต่างกันไปนั้น อาจเนื่องจากปัจจัยภายในร่างกายเข้ามาเกี่ยวข้องจึงทำให้ผลที่ได้แตกต่างกัน เมททิลพาราไธออนมีผลทำลายฮีมในไซโตโครมพี 450 และในขณะเดียวกันไซโตโครมบี 5 ก็เป็นเอ็นไซม์ที่มีฮีมเป็นองค์ประกอบเช่นเดียวกัน แต่ไม่ถูกทำลายโดยเมททิลพาราไธออน แสดงว่าในการเมตาบอลิสมเมททิลพาราไธออนโดยไซโตโครมพี 450 นี้ ไซโตโครมพี 450 อาจได้รับอิเลคตรอนโดยกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนที่ไม่ผ่านไซโตโครมบี 5 ในการเมตาบอลิสมสารต่างๆ ของไซโตโครมพี 450 มีกระบวนการขนส่งอิเลคตรอน 2 กระบวนการที่สำคัญคือ ผ่านทาง เอ็นเอดีพีเอช ไซโตโครมซีรีดักเตสและอีกกระบวนการหนึ่งโดยผ่านทางไซโตโครมบี 5 ซึ่งขึ้นอยู่กับความเฉพาะของไซโตโครมบี 5 ต่อ isoform ของไซโตโครมพี 450 และสับเสตรทจากการศึกษาของ Omata และคณะ (1994) พบว่าไซโตโครมบี 5 มีความสามารถในการจับกับไซโตโครมพี 450 isoform 2B1 และ 2E1 ได้ดี

กว่า subfamily 1A1 และเมททิลพาราไธออน นั้นถูกเมตาบอลิสมโดย CYP 2B1 และมีผลยับยั้งตัวมันเองด้วย ดังนั้นอาจจะมีปัจจัยอื่น เช่น ความเฉพาะเจาะจงต่อสับเสตรทของไซโตโครมบี5 จึงทำให้เมททิลพาราไธออนไม่มีผลต่อไซโตโครมบี 5

4.3.4 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

จากผลการศึกษาเมททิลพาราไธออนขนาดความเข้มข้น 1.0, 2.0 และ 4.0 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงมากขึ้นตามความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนที่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Neskovic และคณะ (1973) ที่ศึกษาในดับหนูขาว พบว่าพาราไธออน มีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลง เมททิลพาราไธออนก็เป็นสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มเดียวกันกับพาราไธออน น่าจะมีผลในการลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสเช่นเดียวกัน ซึ่งอาจจะเกิดจากมีการทำลายฮีมบนโมเลกุลของไซโตโครมซีรีดักเตส จึงมีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลง

4.4 การศึกษาผลของโซเดียมไนไตรท์ในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมภายหลังสัมผัสนาน 24 ชั่วโมง

แหล่งปนเปื้อนของไนเตรทและไนไตรท์ที่สำคัญคือ อาหาร โดยเฉพาะ ผักกาด ผักขม พบไนเตรทสูงกว่า 1 กรัมต่อผักสดหนัก 1 กก. แต่ยังขึ้นอยู่กับภาวะการเพาะปลูก การใช้ปุ๋ยบางครั้งพบสูงถึง 3-4 กรัมต่อผักสดหนัก 1 กก. ในมะเขือเทศ กระหล่ำปลี พบ 0.1-1 กรัมต่อผักสดหนัก 1 กก. สำหรับไนไตรท์พบในพืชน้อยมากพบประมาณ 1-2 มิลลิกรัมต่อผักสดหนัก 1 กก. บางครั้งพบสูงถึง 110 มิลลิกรัมต่อผักสดหนัก 1 กก. และเคยพบในมะเขือเทศสูงถึง 2-60 มิลลิกรัมต่อผักสดหนัก 1 กก. พบว่าประชากรในประเทศทางแถบยุโรปได้รับไนเตรทเฉลี่ยวันละ 31-185 มิลลิกรัมโดยได้รับจากผัก 80 -85 เปอร์เซ็นต์ ได้รับไนไตรท์โดยเฉลี่ยวันละ 0.7-8.7 มิลลิกรัมโดยได้รับจากผักและเนื้อ (Walker ,1996) นอกจากนี้ไนไตรท์และไนเตรทยังปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำและเป็นมลพิษที่สำคัญของสัตว์น้ำ เนื่องจากไนไตรท์เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากกระบวนการ nitrification ของแบคทีเรีย และมีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำโดยเฉพาะสัตว์น้ำจืด จากการศึกษาในปลาน้ำจืด *Pimephales promelas* พบว่าความเข้มข้นที่ทำให้ปลาตายครึ่งหนึ่งในเวลา 24 ชั่วโมงเท่ากับ 1,000 มิลลิกรัมต่อลิตรเมื่อปลามีขนาดตัวที่น้ำหนักเท่ากับ 0.3 กรัม และความเข้มข้นเท่ากับ 152 มิลลิกรัมต่อลิตรในขนาดปลาหนักเท่ากับ1.0 กรัม

(Palachek and Tomasso,1984) อย่างไรก็ตามในการศึกษาครั้งนี้ใช้ไนไตรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 6.25,12.5, 25, 50, 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ไม่ทำให้ปลาดุกตาย

จากการสังเกตพฤติกรรมของปลาดุกภายหลังสัมผัสไนไตรท์ จะมีอาการว่ายน้ำไปมาอยู่ระยะหนึ่งอาจจะเกิดจากความเครียดที่มีการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมในน้ำ หลังจากนั้นจะนอนนิ่งๆ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับไนไตรท์ที่ความเข้มข้นสูงถึง 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร ปลาดุกจะมีอาการซึมมากแทบไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น อาจเกิดจากหน้าที่ของอวัยวะต่างๆ และสภาวะสมดุลย์ของร่างกายถูกรบกวน เนื่องจากไนไตรท์ไปออกซิไดซ์ฮีโมโกบินเปลี่ยนเป็นเมทฮีโมโกบินซึ่งทำให้ความสามารถในการขนส่งออกซิเจนของฮีโมโกบินไปสู่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ได้น้อยลง ทำให้เกิดการขาดออกซิเจนของเนื้อเยื่อในอวัยวะนั้นๆ เป็นผลให้หน้าที่การทำงานของอวัยวะต่างๆ ลดลง รวมทั้งระบบประสาทที่ไวต่อการขาดออกซิเจนมีการทำงานลดลงด้วย จึงพบว่าปลามีอาการเฉื่อยไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้น และนอกจากนี้ยังสังเกตได้จากเลือดปลามีสีดำคล้ำ ตับมีสีเหลืองเปื่อยยุ่ยซึ่งแสดงถึงภาวะการเกิดเมทฮีโมโกบิน จากการศึกษาของ Westin (1974) ในปลา chinook salmon ที่มีเมทฮีโมโกบิน 70-80 เปอร์เซ็นต์ของฮีโมโกบินปลาจะมีอาการเฉื่อย และ Konikoff (1975) พบว่าปลาดุกที่มีเมทฮีโมโกบิน 100 เปอร์เซ็นต์ จะมีอาการเฉื่อยไม่ตอบสนองต่อสิ่งเร้า จากการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของปริมาณไนไตรท์ในเลือดกับพฤติกรรมของปลา พบว่าในปลา salmo gairdneri ที่มีอาการซึมเฉื่อย มีปริมาณไนไตรท์ในเลือดสูงกว่าปลาที่มีอาการปกติ และปลาที่มีอาการโคม่า เฉื่อย ไม่ตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้น มีปริมาณไนไตรท์ในเลือดสูงกว่าในสิ่งแวดล้อม 60 เท่า ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ไนไตรท์ที่ความเข้มข้นสูงๆ ปลาจะมีอาการเฉื่อย ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้น นอกจากนี้จากการศึกษาของสุกัลยา เจริญศรี (2540) พบว่าในปลาดุกพันธุ์ผสมที่มีเมทฮีโมโกบิน 60 , 61, และ 65 เปอร์เซ็นต์ ปลาดุกมีอาการเฉื่อย ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้น

4.4.1 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อปริมาณโปรตีนในไมโครโซมและน้ำหนักตับปลาดุก

จากการศึกษาไนไตรท์ไม่มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมและน้ำหนักตับปลาดุกแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการศึกษาของ Currun และคณะ (1989) พบว่าไนตริกออกไซด์ยับยั้งการสังเคราะห์โปรตีนในเซลล์ตับ และไนไตรท์ยังมีผลทำลายโปรตีนในไมโครโซมดังได้กล่าวมาแล้ว ดังนั้นไนไตรท์น่าจะมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมลดลง จากการศึกษาครั้งนี้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมลดลงตามความเข้มข้นของ

ไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้น มีบางกลุ่มการทดลองเท่านั้นที่มีปริมาณโปรตีนในไมโครโซมสูงกว่ากลุ่มควบคุมซึ่งเป็นกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่ำสุดคือ 6.25 มิลลิกรัมต่อลิตร พบว่ามีปริมาณโปรตีนสูงกว่าในกลุ่มควบคุม อาจจะเกิดจากความแตกต่างกันของปลาดุกแต่ละตัว ถึงแม้ว่าจะจัดให้อยู่ในสิ่งแวดล้อมเดียวกัน ได้รับการดูแลเช่นเดียวกัน แต่ก็มีความแตกต่างกันภายในตัวปลาเช่น เพศ ความแข็งแรงของปลาแต่ละตัว สิ่งเหล่านี้อาจจะมีผลทำให้ปลาแต่ละตัวมีปริมาณโปรตีนในไมโครโซมแตกต่างกันอยู่แล้ว และความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ 6.25 มิลลิกรัมต่อลิตรอาจจะมีผลต่อปริมาณโปรตีนในไมโครโซมเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จึงพบว่าปริมาณโปรตีนในกลุ่มการทดลองนี้สูงกว่าในกลุ่มควบคุมก็เป็นได้

สำหรับน้ำหนักตับพบว่าไนไตรท์ไม่มีผลต่อน้ำหนักตับปลาดุก จากการสังเกตด้วยตาเปล่าพบว่า ตับปลาดุกมีลักษณะเปื่อยยุ่ย สีเหลืองซีด แสดงถึงการถูกทำลาย และที่เคยกล่าวมาแล้วว่าไนไตรท์มีผลลดการสะสมของไกลโคเจนในตับ จากสาเหตุเหล่านี้น่าจะทำให้น้ำหนักตับลดลงได้ แต่อาจจะลดลงน้อยมากซึ่งไม่สามารถตรวจวัดได้จากเครื่องชั่ง จึงไม่สามารถสรุปได้ว่าไนไตรท์มีผลทำให้น้ำหนักตับปลาดุกลดลงหรือไม่

4.4.2 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมพี 450 และระดับไซโตโครมพี 420

จากผลการศึกษาโซเดียมไนไตรท์มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง และระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Shertzer และ Duthu (1979) ในไมโครโซมของตับกระต่าย พบว่าไนไตรท์จะจับกับ reduced form ของไซโตโครมพี 450 และมีผลยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ aminopyrine demethylase ซึ่งผลในการยับยั้งการเปลี่ยนแปลงสารในครั้งนั้นไม่เกี่ยวกับการถูกยับยั้งของกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนของไซโตโครมพี 450 โดยผ่านฟลาโวโปรตีนรีดักเตส และไม่เกี่ยวกับการเกิด lipid peroxidation หรือการสร้างอนุมูลอิสระ (free radical) จากไนไตรท์ แต่อาจจะเกิดจากการรีดักชันของไนไตรท์เป็นไนตริกออกไซด์ และเกิดการจับอย่างเหนียวแน่นกับ reduced form ของไซโตโครมพี 450 เป็นผลทำให้การทำงานของไซโตโครมพี 450 เสียไป และป้องกันการจับของคาร์บอนมอนอกไซด์กับไซโตโครมพี 450 ทำให้วัดระดับไซโตโครมพี 450 ได้น้อยลง และต่อมา Duthu และ Shertzer (1979) พบว่าในสภาวะที่ขาดออกซิเจนและมีตัวรีดิวซ์จะเกิดการรีดักชันของไนไตรท์เป็นไนตริกออกไซด์โดยมีไซโตโครมพี 450 เป็นตัว catalyte ไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะจับกับไซโตโครมพี 450 และเปลี่ยนเป็นไซโตโครมพี 420 เป็นผลทำให้การทำงานของไซโตโครม

พี450 ลดลง จากการศึกษาของ Khatsenko และคณะ(1993) ในหนูขาวและไก่โดยให้ lipopolysacharide (LPS) เพื่อทำให้เกิดการสร้างไนตริกออกไซด์ พบว่าไนตริกออกไซด์เป็นสาเหตุทำให้ปริมาณและสมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ลดลง โดยไนตริกออกไซด์จะทำปฏิกิริยากับ hemoprotein ของไซโตโครมพี 450 อาจจะเกิดปฏิกิริยา nitrosylation, alkylation หรือ oxidation ของฮีมหรือ apoprotein ของไซโตโครมพี450 ทำให้เกิดการทำลายฮีมหรือ apoprotein เป็นผลทำให้หน้าที่ของไซโตโครมพี 450 เสียไป นอกจากนี้ไนตริกออกไซด์ยังทำลายกระบวนการ transcription ของไซโตโครมพี 450 ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงอีกด้วย จากการศึกษาของ Kim และคณะ (1995) พบว่าไนตริกออกไซด์เปลี่ยนไซโตโครมพี 450 เป็นไซโตโครมพี 420 โดยการเกิด nitrosylation บน proximal axial heme ทำใหฮีมแยกตัวออกจากโปรตีนจึงทำให้การดูดกลืนแสงเปลี่ยนไปจากความยาวคลื่น 450 นาโนเมตรเป็น 420 นาโนเมตร และไนตริกออกไซด์ยังมีผลเพิ่ม heme oxygenase ซึ่งทำให้เกิดการทำลายฮีมเพิ่มมากขึ้นจึงทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง

สำหรับในการศึกษาครั้งนี้เป็นไปได้ว่าไนไตรท์จะเกิดการรีดักชันเป็นไนตริกออกไซด์ เป็นที่ทราบกันแล้วว่าเม็ดเลือดแดงเป็นเป้าหมายแรกของไนไตรท์ซึ่งจะจับกับ oxyhemoglobin แล้วเปลี่ยนเป็น methemoglobin ซึ่งความสามารถในการจับและขนส่งออกซิเจนไปสู่เนื้อเยื่อหรืออวัยวะต่างๆ ได้น้อยลง ซึ่งเป็นเหตุให้อวัยวะต่างๆ รวมทั้งตับอยู่ในภาวะขาดออกซิเจนได้และภายในเซลล์ของร่างกายสัตว์จะประกอบด้วยตัวรีดักแตนซ์ จึงเป็นภาวะที่จะเกิดการรีดักชันของไนไตรท์เป็นไนไตริกออกไซด์ และที่ได้กล่าวมาแล้วว่าไนไตรท์สามารถจับกับ reduced form ของไซโตโครมพี 450 จึงเกิดการรีดักชันของไนไตรท์เป็นไนไตริกออกไซด์ได้โดยไซโตโครมพี 450 และไนตริกออกไซด์ที่เกิดขึ้นจะทำลายไซโตโครมพี 450 ซึ่งเป็นการยับยั้งไซโตโครมพี 450 แบบ autoinhibitor จากการศึกษาของ Wink และคณะ (1993) พบว่าไนตริกออกไซด์มีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 ทั้งแบบ reversible และ irreversible

4.4.3 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมบี 5

ในการศึกษาครั้งนี้โซเดียมไนตรท์ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 แตกต่างจากการศึกษาของ Khatsenko และคณะ (1993) ที่ทำการศึกษาในหนูขาวและไก่ พบว่าไนตริกออกไซด์มีผลลดระดับไซโตโครมบี 5 ไซโตโครมบี 5 เป็นเอ็นไซด์ที่มีฮีมเป็นองค์ประกอบและพบมากในไมโครโซม เมื่อไนไตรท์ถูกรีดิวซ์เป็นไนตริกออกไซด์น่าจะมีผลทำลายฮีมโปรตีนของไซโตโครมบี 5 แล้วทำให้

ระดับไซโตโครมบี 5 ลดลง แต่การศึกษาครั้งนี้แตกต่างจากการศึกษาของ Khatsenko น่าจะเกิดจากความแตกต่างของสัตว์ทดลองและความเข้มข้นของไนไตรท์ที่ใช้ในการทดลอง

4.4.4 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไนไตรท์มีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงและลดลงตามความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้น ซึ่งผลที่ได้แตกต่างจากการศึกษาของ Duthu และ Shertzer (1979) ในตับกระต่ายที่พบว่าไนไตรท์ไม่มีผลต่อสมรรถนะของ เอ็นเอดีพีเอช ไซโตโครมซีรีดักเตส และในปีเดียวกัน Shertzer และ Duthu ทำการศึกษาในตับกระต่ายเช่นกัน พบว่าการยับยั้งการเมตาบอลิสมของ aminopyrine โดยไนไตรท์ไม่ได้เป็นผลมาจากสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส แสดงว่าไนไตรท์ไม่มีผลต่อสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส จากการศึกษาของ Gergel และคณะ (1997) ในหนูขาว พบว่าไนตริกออกไซด์ไม่มีผลต่อ เอ็นเอดีพีเอช ไซโตโครมซีรีดักเตสในการเมตาบอลิสมของ P- nitrophenol โดย CYP2E1 จากการศึกษาดังกล่าวข้างต้นแตกต่างจากการศึกษาครั้งนี้อาจเกิดจากความแตกต่างกันของสัตว์ทดลอง ดังที่ได้กล่าวมาแล้วในบทที่ 1 เกี่ยวกับไซโตโครมซีรีดักเตสว่า ในสัตว์ยังมีการศึกษากันไม่มากนักและพบเพียง isoform เดียวในขณะที่ในพืชชั้นสูงพบถึง 3 isoforms ในสัตว์ซึ่งมีการพัฒนามากกว่าพืชน่าจะมีมากกว่า 1 isoform และมีความเฉพาะต่อสับเสตรทแตกต่างกันไป จึงทำให้การศึกษาถึงผลของไนไตรท์ต่อสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสในสัตว์ต่างชนิดกันได้ผลแตกต่างกัน

4.5 ผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ภายในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสม

จากการสังเกตพฤติกรรมและอาการแสดงของปลาดุกภายหลังได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ พบว่าในระยะแรกปลาดุกมีอาการกระสับกระส่าย ว่ายน้ำไปมาและกระโดดสูง และต่อมาก็จะนอนนิ่งๆ เฉื่อยไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้น ในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ อาการแสดงของปลาแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนหรือโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียวที่ความเข้มข้นเท่ากันไม่ชัดเจนนัก แต่กลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นสูงๆ อาการแสดงของปลาดุกจะรุนแรงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ได้รับเมททิลพาราไธออนหรือโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียวที่ความเข้มข้นเท่ากันอย่างชัดเจน โดยเฉพาะกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียม

ไนไตรท์ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีปลาบางตัวตายซึ่งแสดงให้เห็นถึงความรุนแรงหรือมีการเสริมฤทธิ์กันของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ ซึ่งอาจเกิดจากสารทั้ง 2 นี้ต่างก็มีผลทำให้ปริมาณออกซิเจนในร่างกายปลาลดลง จึงมีการเสริมความเป็นพิษซึ่งกันและกัน อาการแสดงของปลาที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์จึงมีอาการรุนแรงกว่า ระบบประสาท สมอง รวมทั้งกล้ามเนื้อของปลาขาดออกซิเจนจึงทำให้มีอาการเฉื่อย ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นและที่ปลาบางตัวตายอาจเนื่องจากกล้ามเนื้อที่ใช้หายใจไม่ทำงานเนื่องจากขาดออกซิเจน และในกลุ่มการทดลองนี้ที่ปลาบางตัวไม่ตายนั้นอาจเกิดจากการทนต่อสารพิษของปลาที่แตกต่างกัน

4.5.1 ผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ต่อปริมาณโปรตีนในไมโครโซม และน้ำหนักตับปลาดุก

จากการศึกษาพบว่าเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมลดลงต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนหรือกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว แต่แตกต่างกันไม่เด่นชัด สอดคล้องกับผลที่ได้ตอนแรกว่าเมททิลพาราไธออนและไนไตรท์ต่างก็มีผลทำลายโปรตีน ทำลายเซลล์ตับ ซึ่งน่าจะมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมลดลง แต่ก็มีบางกลุ่มการทดลองที่มีปริมาณโปรตีนในไมโครโซมสูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนและกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว อาจจะเกิดจากความแตกต่างของปลาดุกแต่ละตัว ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมระหว่างกลุ่มทดลองแตกต่างกันไม่มากนัก และในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์เท่ากับกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวก็มีปริมาณโปรตีนแตกต่างกันไม่มากนัก แสดงว่าเมททิลพาราไธออนไม่มีผลทำให้ไนไตรท์ ลดปริมาณโปรตีนในไมโครโซมได้มากขึ้น เช่นเดียวกับที่ไนไตรท์ก็ไม่มีผลทำให้เมททิลพาราไธออนลดปริมาณโปรตีนในไมโครโซมได้มากขึ้น

เมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ทำให้น้ำหนักตับลดลงแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนหรือกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าทั้งเมททิลพาราไธออนและไนไตรท์ต่างก็มีผลในการทำลายเซลล์ตับ แต่ผลที่เกิดขึ้นอาจจะน้อยมากจึงทำให้ผลแตกต่างกันไม่ชัดเจน

4.5.2 ผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมพี 450 และระดับไซโตโครมพี 420

จากผลการศึกษาเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์มีผลทำให้ระดับไซโตโครม

พี 450 ลดลง ในขณะที่ความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนคงที่ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงตามความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้น การลดลงของระดับไซโตโครมพี 450 น่าจะเป็นผลมาจากไนไตรท์มากกว่าเมททิลพาราไธออน เนื่องจากที่ความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนคงที่ ระดับไซโตโครมพี 450 ระหว่างกลุ่มการทดลองมีความแตกต่างกันมากซึ่งแสดงถึงผลดังกล่าวเกิดขึ้นจากไนไตรท์ และเมื่อเปรียบเทียบกลุ่มการทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออน 1 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อลิตรกับกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว พบว่ามีความแตกต่างของระดับไซโตโครมพี 450 ไม่มากนักแสดงให้เห็นว่าเมททิลพาราไธออนในขนาด 1 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลต่อสมรรถนะของไซโตโครมพี450 น้อยมาก เช่นเดียวกับการทดลองอีกชุดหนึ่งที่พบว่าในกลุ่มทดลองที่มีเมททิลพาราไธออนเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์เข้มข้น 150 มิลลิกรัมต่อลิตรมีระดับไซโตโครมพี 450 ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวไม่มากนัก ผลการทดลองดังกล่าวจะเหมือนกับผลที่ได้จากการทดลองในกลุ่มทดลองทุกกลุ่มที่มีเมททิลพาราไธออน 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว พบว่ามีระดับไซโตโครมพี 450 สูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นอย่างชัดเจนว่าไนไตรท์มีผลต่อระดับไซโตโครมพี 450 เด่นชัดกว่าเมททิลพาราไธออนในขนาด 0.5 และ 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตร

จากผลการศึกษาข้างต้นแสดงว่าทั้งเมททิลพาราไธออนและไนไตรท์ต่างก็มีผลลดระดับไซโตโครมพี 450 และไนไตรท์ก็มีผลต่อระดับไซโตโครมพี 450 อย่างเด่นชัด ดังนั้นถ้าเมททิลพาราไธออนมีผลยับยั้งเอ็นไซม์น่าจะมีผลยับยั้งการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนตริกออกไซด์ที่มีผลในการทำลายไซโตโครมพี 450 แล้วเกิดการทำลายไซโตโครมพี 450 น้อยลง แต่จากผลการศึกษาครั้งนี้เมททิลพาราไธออนร่วมกับไนไตรท์มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงมากกว่าผลของเมททิลพาราไธออนหรือผลของไนไตรท์อย่างเดียว และเช่นเดียวกันเมื่อไนไตรท์มีผลยับยั้งเอ็นไซม์น่าจะมีผลทำให้การเมตาบอลิสมของเมททิลพาราไธออนลดลง ซึ่งผลจากการเมตาบอลิสมของเมททิลพาราไธออนทำให้เกิดการทำลายไซโตโครมพี 450 จาก ซัลเฟอร์ที่หลุดมาจากเมททิลพาราไธออนดังได้กล่าวมาแล้ว แต่ผลจากการศึกษานี้ไม่เป็นเช่นนั้น คาดว่าเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนหรือไนไตรท์อย่างเดียวนั้น อาจเนื่องมาจากเมททิลพาราไธออนยับยั้งไซโตโครมพี 450 isoform ที่ไม่ได้ทำการเมตาบอลิสมไนไตรท์และเช่นเดียวกันไนไตรท์อาจยับยั้งไซโตโครมพี 450

isoform ที่ไม่ได้ทำการเมตาบอลิสมเมททิลพาราไธออน ดังนั้นสารพิษทั้งสองจึงไม่มีผลยับยั้งการเมตาบอลิสมซึ่งกันและกัน เคยมีการศึกษาของ Kamataki และคณะ (1976) พบว่าเมททิลพาราไธออนถูกเปลี่ยนแปลงโดยไซโตโครมพี 450 subfamily 1A และ 2B และมีผลยับยั้งตัวมันเองด้วย นอกจากนี้ยังรายงานไว้ว่าไนตริกออกไซด์มีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 subfamily 1A, 2B, 2C และ 3A (Khasenko และคณะ (1993), Momshouwer และคณะ (1996)) ดังนั้นจึงน่าจะมีผลร่วมกันในการยับยั้งไซโตโครมพี 450 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในครั้งนี้ที่เมททิลพาราไธออน ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงต่ำกว่าผลของเมททิลพาราไธออนหรือผลของไนไตรท์อย่างเดียว และในการศึกษาครั้งนี้มีบางกลุ่มการทดลองที่พบว่าปลาดุกในกลุ่มที่ได้รับเมทททิลพาราไธออนขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตรมีระดับไซโตโครมพี 450 สูงกว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวซึ่งอาจจะเกิดจากความแตกต่างของปลาแต่ละตัว และเมททิลพาราไธออนขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรก็มีผลต่อระดับไซโตโครม.พี 450 น้อยมากอาจจะทำให้ได้ผลคลาดเคลื่อนไปได้ ดังนั้นจึงควรมีการศึกษาซ้ำเพื่อให้ได้ผลที่แน่นอนต่อไป

นอกจากนี้เมททิลพาราไธออนอาจมีผลเพิ่มความเป็นพิษของไนไตรท์ในการทำลายไซโตโครมพี 450 ได้อีกด้วย ซึ่งเกิดจากการสะสมของเมททิลพาราไธออนบริเวณเหงือกปลาทำให้มีการดูดซึมออกซิเจนได้น้อยเกิดภาวะขาดออกซิเจนในอวัยวะต่างๆ ของปลารวมทั้งตับด้วย มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนตริกออกไซด์ได้ดีขึ้น (Duthu and Shertzer,1979) เป็นผลทำให้เกิดการทำลายไซโตโครมพี 450 ได้เร็วและรุนแรงขึ้น และจากการที่เมททิลพาราไธออนมีผลเพิ่มการเมตาบอลิสมของโปรตีนอาจทำให้มี ยูเรีย หรือ แอมโมเนีย เพิ่มขึ้นแล้วจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์โดยแบคทีเรีย และไนไตรท์สามารถเข้าสู่ตัวปลาเกิดการเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ที่มีผลในการทำลายไซโตครมพี 450 จากเหตุผลดังกล่าวนี้เมททิลพาราไธออนน่าจะมีผลเพิ่มความเป็นพิษในการทำลายไซโตโครมพี 450 ของไนไตรท์ได้

จากการศึกษาของ สุกัลยา เจริญศรี (2540) ในปลาดุกพันธุ์ผสมโดยการให้เมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ พบว่าไนไตรท์ไม่มีผลในการลดสมรรถนะของเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรสซึ่งเป็นผลมาจากพาราออกซอน (เมตาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ของพาราไธออน) เป็นที่ทราบกันแล้วว่าการเมตาบอลิสมเมททิลพาราไธออนโดยไซโตโครมพี 450 จะได้เมตาบอไลท์เป็นเมททิลพาราออกซอนที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรส จากการศึกษาดังกล่าวแสดงว่าไนไตรท์ไม่มีผลในการยับยั้งหรือเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ไซโตโครมพี 450 ที่ทำการเมตาบอลิสมเมททิลพาราไธออนจึงทำให้ไม่มีการเปลี่ยนแปลงสมรรถนะของเอ็นไซม์โฆลีนเอสเทอเรสจากเมททิลพารา

ออกซอน และไซโตโครมพี 450 นี้ น่าจะไม่ได้เป็นไอโซฟอร์ม 1A1, 2B,2C และ 3A จึงมีความเป็นไปได้ว่าน่าจะเป็นไอโซฟอร์มตัวอื่นด้วย ซึ่งควรจะมีการศึกษาต่อไป

จากการศึกษาพบว่าเมททิลพาราไธออนร่วมกับไนไตรท์มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่เพิ่มขึ้นซึ่งสอดคล้องกับระดับไซโตโครมพี 450 ที่ลดลงแสดงถึงการถูกทำลายของไซโตโครมพี 450 ในกลุ่มการทดลองที่มีความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนคงที่มีความแตกต่างของระดับไซโตโครมพี 420 ระหว่างกลุ่มมากในขณะเดียวกันกลุ่มการทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่มีความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์เท่ากับกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวมีความแตกต่างกันของระดับไซโตโครมพี 420 ไม่มากนัก ซึ่งแสดงให้เห็นว่าไนไตรท์ในการศึกษาครั้งนี้มีผลในการทำลายไซโตโครมพี 450 เด่นชัดกว่าเมททิลพาราไธออน จากการที่พบว่าปลาดุกในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรมีระดับไซโตโครมพี 420 สูงกว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวโดยเปรียบเทียบที่ขนาดโซเดียมไนไตรท์เท่ากันแต่สูงกว่าเพียงเล็กน้อยแสดงให้เห็นว่าเมททิลพาราไธออนขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลต่อไซโตโครมพี 420 เพียงเล็กน้อยแต่เมื่อเมททิลพาราไธออนขนาด 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 420 ต่ำกว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวโดยเปรียบเทียบที่ขนาดโซเดียมไนไตรท์เท่ากันอาจจะเกิดจากความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนที่สูงขึ้นมีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 ที่ทำการเมตาบอลิสมไนไตรท์เกิดการเปลี่ยนไนไตรท์เป็นไนตริกออกไซด์ได้น้อยลง จึงเกิดการทำลายไซโตโครมพี 450 จากไนตริกออกไซด์น้อยลง หรืออาจจะเกิดจากเมททิลพาราไธออนขนาด 1.0 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลต่อระดับไซโตโครมพี 420 ไม่มากนักร่วมกับความแตกต่างของปลาแต่ละตัว อุณหภูมิในสิ่งแวดล้อมแตกต่างกันในขณะที่ทำการวัดระดับไซโตโครมจึงทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนจึงควรที่จะมีการทำการศึกษาซ้ำต่อไป

4.5.3 ผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมบี 5

จากการศึกษาเมททิลพาราไธออนร่วมกับไนไตรท์ไม่มีผลลดระดับไซโตโครมบี 5 สอดคล้องกับการศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนและผลของไนไตรท์ต่อระดับไซโตโครมบี 5 ที่พบว่าสารทั้ง 2 ต่างก็ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม และสอดคล้องกับการศึกษาของสุกัลยา ที่พบว่าเมททิลพาราไธออนไม่มีผลทำให้เกิดเมทฮีโมโกลบินในปลาดุกเพิ่มมากขึ้น

แสดงว่าเมททิลพาราไธออนไม่มีผลทำลายไซโตโครมบี 5 ในกระบวนการขนส่งอิเลคตรอนจาก เอ็นเอดีเอช ไซโตโครมบี 5 รีดักเตส ไปรีดิวซ์เมทฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็นฮีโมโกลบินซึ่งจะทำให้เมทฮีโมโกลบินลดลง

4.5.4 ผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ต่อสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส

จากการศึกษาพบว่ากลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับไนไตรท์มีสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออน หรือโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว มีบางกลุ่มการทดลองเท่านั้นที่มีสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนหรือโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว คือในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นเข้มข้น 50 มิลลิกรัมต่อลิตรมีสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสสูงกว่าปลาในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนขนาด 0.5 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียวและสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว อาจจะเกิดจากความแตกต่างของปลาแต่ละตัว และโซเดียมไนไตรท์ขนาด 50 มิลลิกรัมต่อลิตรมีผลต่อสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสเพียงเล็กน้อย เช่นเดียวกับกลุ่มการทดลองอีกชุดหนึ่งที่ได้รับเมททิลพาราไธออนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรกับโซเดียมไนไตรท์เข้มข้น 25มิลลิกรัมต่อลิตร มีสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสสูงกว่าในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนเข้มข้น 1 มิลลิกรัมต่อลิตรเพียงอย่างเดียว อาจจะเกิดจากความแตกต่างของปลาแต่ละตัวและความเข้มข้นของไนไตรท์ขนาดนี้อาจจะมีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงไม่มากนักจึงทำให้กลุ่มการทดลองนี้มีผลผิดพลาดไปได้

ในกลุ่มการทดลองที่ความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนคงที่และเพิ่มความเข้มข้นของไนไตรท์ พบว่าสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสแตกต่างกันไม่มากนักแสดงว่าความเข้มข้นของไนไตรท์ไม่มีผลลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส แต่เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มทดลองที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมโซเดียมไนไตรท์กับกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นเท่ากัน พบว่าสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงต่ำกว่ากลุ่มที่ให้ไนไตรท์อย่างเดียวมากถึงเท่าตัวนั้นแสดงว่าเมททิลพาราไธออนที่มีอยู่ด้วยนั้นมีส่วนทำให้ไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงมากยิ่งขึ้น

จากผลของเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ ทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงมากกว่าผลของเมททิลพาราไธออน หรือผลของโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว น่าจะเกิดจากผลร่วมกันของสารทั้ง 2 ชนิดนี้ โดยเป็นผลที่เกิดจากเมททิลพาราไธออนด้วยทำให้เห็นผลเด่นชัดกว่าผลของไนไตรท์อย่างเดียว อย่างไรก็ตามไม่สามารถสรุปได้ว่าเมททิลพารา

ไธออน มีผลทำให้ไนไตรท์ลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสได้มากขึ้นหรือเป็นที่ไนไตรท์มีผลทำให้เมททิลพาราไธออนลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสได้มากขึ้น

สรุปและข้อเสนอแนะ

1. เมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้นมีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมลดลงแต่ผลที่ได้ไม่ชัดเจน ผลในกลุ่มการทดลองแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ถ้าความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนสูงกว่านี้อาจจะได้ผลที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน นอกจากนี้เมททิลพาราไธออนยังมีผลลดระดับไซโตโครมพี 450 ในขณะเดียวกันก็มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นด้วยนั้น แสดงว่าเมททิลพาราไธออนมีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 แบบถาวร โดยเห็นผลชัดเจนที่ความเข้มข้น 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นดังกล่าวนี้ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครม บี 5 และเมททิลพาราไธออนยังมีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงด้วย
2. โซเดียมไนไตรท์มีผลลดปริมาณโปรตีนในไมโครโซมแต่ผลที่ได้ไม่ชัดเจนถ้าความเข้มข้นสูงกว่านี้หรือใช้ระยะเวลาการศึกษานานกว่านี้อาจจะได้ผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้นแต่ปลาอาจจะตายเนื่องจากพิษอย่างอื่นก่อน โซเดียมไนไตรท์ทุกความเข้มข้นมีผลลดปริมาณไซโตโครมพี 450 โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 100 และ 150 มิลลิกรัมต่อลิตร มีผลลดปริมาณไซโตโครมพี 450 ได้ชัดเจนมาก และในขณะเดียวกันโซเดียมไนไตรท์ทุกความเข้มข้นมีผลทำให้ปริมาณไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นโดยเห็นผลชัดเจนตั้งแต่ความเข้มข้นเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อลิตรเป็นต้นไป ซึ่งแสดงว่าไนไตรท์มีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 แบบถาวร นอกจากนี้ไนไตรท์ที่ความเข้มข้นสูงตั้งแต่ 12.5 มิลลิกรัมต่อลิตรยังมีผลลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสด้วย แต่ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 เช่นเดียวกับเมททิลพาราไธออน

3. ผลร่วมกันของเมททิลพาราไธออนกับไนไตรท์มีผลทำให้ปริมาณโปรตีนในไมโครโซมมีแนวโน้มที่จะลดลงและแตกต่างจากผลของเมททิลพาราไธออนหรือผลของไนไตรท์เพียงอย่างเดียวไม่ชัดเจน นอกจากนี้ยังมีผลทำให้ปริมาณไซโตโครมพี 450 ลดลงมากกว่าผลของเมททิลพาราไธออน หรือผลของไนไตรท์อย่างเดียวโดยที่ไนไตรท์มีผลลดปริมาณไซโตโครมพี 450 ได้เด่นชัดกว่าเมททิลพาราไธออน เมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์มีผลทำให้ปริมาณไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นแตกต่างจากผลของเมททิลพาราไธออนอย่างชัดเจนแต่แตกต่างจากผลของไนไตรท์ไม่ชัดเจนนัก เมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ไม่มีผลต่อปริมาณ

ของไซโตโครมบี 5 แต่มีผลทำให้สมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสลดลงซึ่งแตกต่างจากผลของโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว ผลที่เกิดขึ้นนั้นน่าจะเป็นผลเนื่องจากเมททิลพาราไธออนทำให้ไซโตโครมซีรีดักเตสลดลง

เมททิลพาราไธออนและไนไตรท์ต่างก็มีผลต่อปริมาณและสมรรถนะของเอ็นไซม์ดังกล่าวข้างต้น ซึ่งเอ็นไซม์เหล่านี้ทำการเมตาบอลิสมสารเคมีต่างๆ รวมทั้งยา ของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นสามารถที่จะใช้การเปลี่ยนแปลงของเอ็นไซม์เหล่านี้เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม และสามารถพิสูจน์ว่าสารพิษที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมมีผลกระทบต่อกระบวนการเมตาบอลิสมของสารเคมีและยาในสิ่งมีชีวิต จากผลร่วมกันของเมททิลพาราไธออนกับไนไตรทที่แสดงให้เห็นว่าสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีแนวโน้มเสริมฤทธิ์กันในการยับยั้งไซโตโครมพี 450 และลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตส รวมทั้งมีแนวโน้มในการลดปริมาณโปรตีนในไมโครโซมแต่ผลที่ได้แตกต่างจากผลของเมททิลพาราไธออนและผลของไนไตรท์เพียงอย่างเดียวอย่างไม่ชัดเจนนักถ้ามีการเพิ่มความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนหรือไนไตรท์ และควบคุมปัจจัยต่างๆ เช่น ปลาที่ใช้ทดลอง อุณหภูมิของน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง ของน้ำ ฯลฯ อาจจะได้ผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้น การเสริมฤทธิ์กันของเมททิลพาราไธออนและไนไตรท์นับว่ามีความสำคัญมากโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเกษตรกรที่มีโอกาสสัมผัสกับสารทั้ง 2 ชนิดนี้มากกว่ากลุ่มอื่นๆ นอกจากนี้ในผู้ป่วยที่มีการอักเสบ หรือเป็นมะเร็ง การไหลเวียนเลือดที่ไม่ดีนักโดยเฉพาะอย่างยิ่งในบริเวณอักเสบ หรือบริเวณที่เกิดมะเร็งอาจมีผลทำให้มีการรีดิวซ์ไนไตรท์เป็นไนตริกออกไซด์มากขึ้น ซึ่งอาจมีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 เพิ่มขึ้นและลดสมรรถนะของไซโตโครมซีรีดักเตสด้วย นอกจากนั้นยังต้องคำนึงถึงผลดังกล่าวที่อาจเกิดขึ้นเมื่อมีการให้ยาในยาตัวที่ผลยับยั้งสมรรถนะไซโตโครมพี 450 ในผู้ป่วยที่เคยสัมผัสสารกำจัดศัตรูพืชและไนไตรท์มาก่อน เพื่อความปลอดภัยและมีประสิทธิภาพในการรักษา