



ผลของสารหนุต่อความเป็นพิษของสารพันธุกรรมและความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในปลากระพงขาว  
(*Lates calcarifer*)

# มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

โดย

นางสาวนพมาศ พิงทรัพย์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ผลของสารหนุต่อความเป็นพิษของสารพันธุกรรมและความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในปลากระพงขาว  
(*Lates calcarifer*)

โดย

นางสาวนพมาศ พึ่งทรัพย์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีววิทยา

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

**EFFECTS OF ARSENIC ON GENOTOXICITY AND TOXICITY ON LIVER CELLS IN  
WHITE SEA BASS (*Lates calcarifer*)**

**By**

**Noppamas Puengsap**

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

**A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements for the Degree**

**MASTER OF SCIENCE**

**Department of Biology**

**Graduate School**

**SILPAKORN UNIVERSITY**

**2009**

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร อนุมัติให้วิทยานิพนธ์เรื่อง “ ผลของสารหนูต่อความ  
เป็นพิษของสารพันธุกรรมและความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในปลากระพงขาว (*Lates calcarifer*) ” เสนอ  
โดย นางสาวนพมาศ พึ่งทรัพย์ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตร  
มหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยา

.....  
(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริชัย ชินะตั้งกูร)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่.....เดือน..... พ.ศ.....

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รองศาสตราจารย์ ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล

คณะกรรมการตรวจสอบวิทยานิพนธ์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

..... ประธานกรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิตยา จิตติहरรษา)

...../...../.....

..... กรรมการ

(ดร. สราวุธ รัตนงเกียรติ)

...../...../.....

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร. เรณู เวชรัชต์พิมล)

...../...../.....

50303204 : สาขาวิชาชีววิทยา

คำสำคัญ : NaAsO<sub>2</sub>/ปลากะพงขาว/ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม/ไมโครนิวเคลียส/Comet assay/ลิวปีดเพอรอกซิเดชัน  
นพมาศ พึ่งทรัพย์ : ผลของสารหนูต่อความเป็นพิษของสารพันธุกรรมและความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ  
ในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*). อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ : รศ.ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล. 119 หน้า.

การศึกษาความเป็นพิษของสารหนู (NaAsO<sub>2</sub>) ต่อลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) พบว่ามีค่า LC<sub>50</sub> ของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ 24 ชั่วโมง เท่ากับ 16.4224 mg/L เมื่อใช้ความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ต่ำกว่าค่า LC<sub>50</sub> ไปศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากะพงขาว โดยแช่ปลาใน NaAsO<sub>2</sub> เข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยปลากลุ่ม positive control ได้รับ CdCl<sub>2</sub> 0.05 mg/L (N=20) แล้วตรวจความเสียหายของสารพันธุกรรมจากเซลล์เม็ดเลือดแดงลูกปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) ด้วยเทคนิค micronucleus test (MNT) และ comet assay ผลการตรวจด้วยเทคนิค MNT พบว่าปลากลุ่มที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 2 mg/L ชักนำให้มีค่า micronucleus frequencies (MNFs) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และพบว่าค่า MNFs มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ในกลุ่มที่แช่ปลา 24 และ 48 ชั่วโมง โดยมีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.3960 และ 0.9245 เมื่อตรวจความผิดปกติของนิวเคลียส 4 ลักษณะพบว่าในกลุ่มที่แช่ปลา 24 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นมีความถี่ของ Notch nucleus (NT), Lobe nucleus (LB) และ Blebed nucleus (BL) สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ซึ่งมีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.8771, 0.7937 และ 0.8901 ตามลำดับ และกลุ่มที่แช่ปลา 48 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> พบว่ามีเฉพาะ NT เท่านั้นที่มีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และมีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.9044 ซึ่งลำดับความไวของพารามิเตอร์ คือ NT > LB > BL ส่วนการตรวจด้วยเทคนิค comet assay พบว่าสามารถตรวจวัดความเสียหายของ DNA แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ในปลากลุ่มที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> ความเข้มข้นต่ำสุด 0.25 mg/L ซึ่งลำดับความไวของพารามิเตอร์ คือ Tail length > Tail DNA% = Olive moment > Tail moment โดย Tail length มีค่า R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.7613 และ 0.5392 ในกลุ่มที่แช่ปลานาน 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองนี้ชี้ให้เห็นว่าการใช้เทคนิค comet assay มีความไวในการตรวจความเสียหายของสารพันธุกรรมมากกว่าเทคนิค MNT เมื่อศึกษาความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> ต่อเซลล์ โดยใช้เทคนิค lipid peroxidations ตรวจวัดระดับ malondialdehyde (MDA) จากเซลล์ตับปลากะพงขาว พบว่าปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ทุกความเข้มข้นมีค่าเฉลี่ย MDA ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และไม่แตกต่างระหว่างช่วงเวลาทดสอบ ( $P > 0.05$ ) ทั้งนี้เพราะความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ปลาได้รับอยู่ในระดับต่ำจึงไม่สามารถชักนำให้ปริมาณของ MDA ในเซลล์ตับเพิ่มขึ้นเพื่อบ่งชี้การเกิด oxidative damage ในปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> 0.25-2 mg/L ได้ ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าลูกปลากะพงขาวมีความไวในการตรวจความเสียหายของสารพันธุกรรมได้ในระดับที่เฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารหนูในน้ำทิ้งของอุตสาหกรรมด้วยเทคนิค comet assay และมีประโยชน์ต่อการนำไปประยุกต์ใช้จัดการแหล่งเลี้ยงปลาในกระชังให้ปลอดภัยต่อการบริโภคและเฝ้าระวังคุณภาพสิ่งแวดล้อมของประเทศ

ภาควิชาชีววิทยา

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร

ปีการศึกษา 2552

ลายมือชื่อนักศึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ .....

50303204 : MAJOR : BIOLOGY

KEY WORDS :NaAsO<sub>2</sub>/*Lates calcarifer*/GENOTOXICITY/MICRONUCLEUS/COMET ASSAY/  
LIPID PEROXIDATIONS

NOPPAMAS PUENGSAK : EFFECTS OF ARSENIC ON GENOTOXICITY AND  
TOXICITY ON LIVER CELLS IN WHITE SEA BASS (*Lates calcarifer*). THESIS ADVISOR :  
ADVISOR : ASSOC. PROF. RENU VEJARATPIMOL, Ph.D. 119 pp.

This study describes the investigation of the genotoxic effect of NaAsO<sub>2</sub> to *Lates calcarifer*. The LC<sub>50</sub> exposed to NaAsO<sub>2</sub> for 24 h was 16.224 mg/L. Fish were exposed to sublethal concentration of 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/L of NaAsO<sub>2</sub> for 24 and 48 h while CdCl<sub>2</sub> at the concentration of 0.05 mg/L was set as positive control group (N=20). The genotoxicity of red blood cells (RBCs) from test fish was examined by the micronucleus test (MNT) and the comet assay. Micronucleus frequencies (MNFs) in the fish exposed to 2 mg/L NaAsO<sub>2</sub> significantly increased more than those in the control group ( $P < 0.05$ ). The correlation coefficients ( $R^2$ ) between MNFs and NaAsO<sub>2</sub> concentrations at the exposure times of 24 and 48 h were 0.3960 and 0.9245. Four characteristics of nucleus abnormalities were studied and the results indicated that the notched nucleus (NT), lobed nucleus (LB) and blebed nucleus (BL) at all concentrations of 24 h NaAsO<sub>2</sub> treated-fish were significantly ( $P < 0.05$ ) higher than the control group with the value of  $R^2 = 0.8771$ , 0.7937 and 0.8901, respectively but in 48 h NaAsO<sub>2</sub> treated-fish, NT was the only parameter that was higher than the control group ( $P < 0.05$ ), and the values of  $R^2 = 0.9044$ . The most sensitive parameters of MNT were NT > LB > BL. At the concentration of 0.25 mg/L of NaAsO<sub>2</sub>, the comet assay indicated that the DNA damage in the treated group was significantly higher than the control group. The most sensitive parameters of comet assay were Tail length > Tail DNA% = Olive moment > Tail moment. The values of  $R^2$  of Tail length were 0.7613 and 0.5392 in 24 and 48 h. This led to the conclusion that the comet assay was more sensitive and reliable than MNT. In addition, lipid peroxidation was performed to the level of malondialdehyde from liver cells of *L. calcarifer*. But there was no significant difference between 24 and 48 h and the control group ( $P > 0.05$ ). NaAsO<sub>2</sub> at the concentrations of 0.25-2 mg/L might be too low to induce an increase of malondialdehyde in liver cells. This study revealed that *L. calcarifer* was sensitive in detecting genotoxicity levels of arsenic contamination in industrial effluent by the comet assay. Thus it may be beneficial to be used in fish farming for monitoring the arsenic contaminations to ensure food safety and to monitor the environmental quality.

Department of Biology      Graduate School, Silpakorn University      Academic Year 2009

Student's signature .....

Thesis Advisor's signature .....

## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยความกรุณาอย่างยิ่งจาก รองศาสตราจารย์ ดร.เรณู เวชรัชต์พิมล อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ที่ได้กรุณาช่วยเหลือสนับสนุนทุนวิจัยและให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ พร้อมทั้งตรวจทานแก้ไขข้อบกพร่องและข้อเสนอแนะในการทำวิทยานิพนธ์นี้จนสำเร็จสมบูรณ์ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูง ไว้ ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ทิตติยา จิตติहरรษา ประธานสอบวิทยานิพนธ์ และกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ดร. สราวุธ รัตนจงเกียรติ ที่ได้เสียสละเวลาและกรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมในการแก้ไขปรับปรุงวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น รวมทั้งคณาจารย์ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัย ดังนี้ รองศาสตราจารย์ ดร. สุรชัย นิมจิรวัดน์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.กมลชนก พานิชการ อาจารย์ชัยวัฒน์ แก้วพินงาม รองศาสตราจารย์ พญ. สุภัทรา เตียวเจริญ และ ดร. จันทรีดี ระเบียบเลิศ

ขอบคุณบริษัทปูนซิเมนต์ไทย ที่มอบทุนสนับสนุนการวิจัยและการอนุรักษ์สิ่งแวดล้อม

ขอขอบคุณคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่กรุณาให้ความรู้และความสะดวกในด้านอุปกรณ์ สารเคมี และสถานที่ที่ใช้ในการวิจัย รวมทั้งคุณนงนุช กำลั้งแพทย คุณสุเนตร กุกสันเทียะ คุณชมพูนุท นุดศุภร คุณเพ็ญสุภา ศรีพรหมทอง และคุณศิริพร แก้วกลม ที่คอยให้ความช่วยเหลือมาโดยตลอด

สุดท้ายนี้ ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ และครอบครัว ที่ให้กำลังใจและสนับสนุนในการทำงานชิ้นนี้ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คุณค่าทั้งหมดที่เกิดขึ้นจากการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้ ขอมอบให้กับ บิดา มารดา บุรพจารย์ทั้งหลายที่ได้อบรมสั่งสอนและปลูกฝังคุณความดี ตลอดจนประสิทธิ์ประสาทวิทยาการความรู้ให้กับผู้วิจัยมาตั้งแต่ต้นจนถึงปัจจุบัน

นพมาศ พึ่งทรัพย์

พฤษภาคม 2553

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย .....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง .....	ฅ
สารบัญรูป .....	ฉ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย .....	3
สมมติฐานการศึกษา .....	3
ขอบเขตของการศึกษา.....	4
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ .....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
ปลากะพงขาว ( <i>Lates calcarifer</i> ).....	5
สารหนู (Arsenic, As).....	6
ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage).....	14
Biomarker .....	15
ความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity).....	16
การศึกษาความเป็นพิษของ NaAsO <sub>2</sub> และ CdCl <sub>2</sub> .....	24
Lipid peroxidations (LPO).....	39
การศึกษา Oxidative stress ของสารหนู ในเซลล์และสิ่งมีชีวิต.....	40
3 อุปกรณ์และสารเคมี .....	43
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย .....	43
สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย .....	46
4 วิธีการทดลอง .....	47
5 ผลการทดลอง.....	56
6 อภิปรายผลการทดลอง .....	72



บทที่	หน้า
บรรณานุกรม .....	82
ภาคผนวก.....	95
คำอธิบายคำย่อ .....	96
การเตรียมสารเคมี .....	99
ขั้นตอนการวิเคราะห์ภาพ comet assay ด้วยโปรแกรม LUCIA .....	104
ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS .....	107
ค่าความถี่ของความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดง ของปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ทดสอบกับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20) .....	115
Lipid peroxidation .....	116
ประวัติผู้วิจัย .....	117

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

## สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ระดับความเสียหายของ DNA ที่เกิดขึ้น .....	16
2	รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต .....	43
3	รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต .....	46
4	ค่าความถี่ของ Micronucleus (MNFs) ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ทดสอบกับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20).....	59
5	ค่าความถี่ของความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียส ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของ ปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ทดสอบกับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20) .....	61
6	ค่าเฉลี่ยของ Tail DNA (%) จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ได้รับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20) .....	65
7	ค่าเฉลี่ยของ Tail length จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ได้รับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20) .....	66
8	ค่าเฉลี่ยของ Tail moment จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ได้รับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20) .....	67
9	ค่าเฉลี่ยของ Olive moment จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ได้รับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20) .....	68
10	ค่าเฉลี่ยของ Malondialdehydes (MDA) ในเซลล์ตับของปลากระพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ทดสอบกับ NaAsO <sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง .....	71
11	น้ำหนักโมเลกุลของ NaAsO <sub>2</sub> .....	101
12	ความเข้มข้นของ NaAsO <sub>2</sub> ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม ปลากระพงขาว .....	102

ตารางที่		หน้า
13	น้ำหนักโมเลกุลของ $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$ .....	102
14	ค่าความถี่ของความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียส ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ของปลากะพงขาว ( <i>L. calcarifer</i> ) ที่ทดสอบกับ $\text{NaAsO}_2$ ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20).....	115

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

## สารบัญรูป

รูปที่		หน้า
1	ปลากะพงขาว ( <i>Lates calcarifer</i> ).....	6
2	การปนเปื้อนสารหนูในธรรมชาติ .....	7
3	ความเป็นพิษของสารหนูต่อสิ่งมีชีวิต.....	13
4	กลไกการเกิดความผิดปกติของ DNA ในระหว่างการแบ่งเซลล์ .....	17
5	กลไกการชักนำให้เกิด MN, apoptosis และ necrosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง ..	18
6	ลักษณะของไมโครนิวเคลียสที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง.....	19
7	ลักษณะของ MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสใน เซลล์เม็ดเลือดแดงปลา <i>O. niloticus</i> .....	20
8	ดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายมีลักษณะคล้ายดาวหาง.....	21
9	ดีเอ็นเอของเซลล์ cardiomyocytes ของหนู ซึ่งเกิดความเสียหายจาก H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	21
10	ความเสียหายของ DNA ที่ได้จากเทคนิค Comet assay เมื่อวัดผลด้วย โปรแกรม LUCIA .....	22
11	เปรียบเทียบเซลล์ที่เกิด DNA เสียหายระดับต่างกัน .....	23
12	กลไกการเกิด lipid peroxidation .....	40
13	บริเวณของ comet ที่ใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LUCIA .....	52
14	แสดงค่า LC <sub>50</sub> ของ NaAsO <sub>2</sub> ต่อปลากะพงขาวอายุ 2 เดือน ที่ได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง .....	57
15	เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว .....	62
16	เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว .....	69
17	การเตรียมสารละลาย NaAsO <sub>2</sub> .....	102
18	การเตรียมสารละลาย CdCl <sub>2</sub> .....	103
19	ลักษณะความเป็นพิษของ NaAsO <sub>2</sub> ต่อปลากะพงขาว.....	103
20	ลักษณะการเกิดสีของ malondialdehyde.....	116

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1. ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา (Statements and significance of the problems)

ทะเลเป็นสาธารณสมบัติซึ่งเป็นแหล่งผลิตสัตว์น้ำซึ่งเป็นอาหารโปรตีนที่สำคัญของคนไทย แหล่งทรัพยากรชายฝั่งทะเลของไทยในปัจจุบันเสื่อมโทรมลงมาก โดยเฉพาะเมื่อมีการขยายตัวของภาคอุตสาหกรรม เกษตรกรรม การท่องเที่ยวและชุมชน ทำให้มีการปล่อยของเสียออกสู่สิ่งแวดล้อมปริมาณมาก ปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมจึงทวีความรุนแรงและยากต่อการแก้ไขมากขึ้น หนึ่งในผลกระทบนั้นคือการรั่วไหลปนเปื้อนของโลหะหนักในแหล่งน้ำ เกิดการปนเปื้อนสารมลพิษทั้งในแหล่งน้ำธรรมชาติ ตะกอนดินและเนื้อเยื่อสัตว์น้ำ

สารหนู (arsenic) เป็นสารก่อมะเร็งในคนที่จัดอยู่ในกลุ่ม 1A (IARC, 2004) โดยปกติสามารถเข้าสู่ร่างกายมนุษย์ได้ทางการหายใจ การดูดซึมของลำไส้ และผ่านผิวหนัง สารหนูเป็นวัตถุพิษในกระบวนการผลิตในอุตสาหกรรมหลายประเภท เช่น หลอมโลหะ ยาปราบศัตรูพืช ผลิตภัณฑ์รักษาเนื้อไม้ และการทำเหมืองแร่ ทำให้พบสารหนูปนเปื้อนในอากาศ ดิน น้ำและอาหาร ความเป็นพิษของสารหนูที่มีต่อร่างกายขึ้นกับปัจจัยหลายประการ คือ การเข้าสู่ร่างกาย ปริมาณและระยะเวลาที่รับเข้าไป อายุ เพศ และความต้านทานของแต่ละบุคคล นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับคุณลักษณะทางเคมีและกายภาพของสารหนูด้วย สารหนูอาจพบในรูปของสารหนูอินทรีย์ (organic arsenic) และสารหนูอนินทรีย์ (inorganic arsenic) โดยรูปที่เป็นพิษมากที่สุด คือ สารหนูอนินทรีย์ที่มีวาเลนซ์ 3 ( $A^{3+}$ ) ซึ่งสามารถก่อให้เกิดอาการระคายเคืองและความเป็นพิษต่อระบบทางเดินหายใจ ระบบทางเดินอาหาร ระบบหัวใจและหลอดเลือด ระบบประสาท อีกทั้งยังสามารถก่อให้เกิดมะเร็งตับ ปอด ไต กระเพาะปัสสาวะและผิวหนังได้ (Tinwell, 1991; Smith, 1992; Kitchin, 2010) กลไกการก่อโรคของสารหนู คือ สารหนูสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดที่มีหมู่ซัลไฟด์ (-SH groups) โดยเฉพาะเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น acetyl-CoA ทำให้การสร้างกรดไขมัน โคเลสเตอรอลและขบวนการทำงานของ Krebs's cycle ในไมโทคอนเดรียลดลง (Tchounwou, 2004) สารหนูมีโครงสร้างคล้ายฟอสเฟตทำให้เกิด Phosphorelation ในการสร้าง ATP (Huang, 2004) ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ยับยั้งการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนของเซลล์รวมทั้งยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (Roy, 2002) ซึ่งรวมถึง

oxidative stress, genotoxic damage, DNA repair inhibition, epigenetic events และ signal transduction pathways นำไปสู่การแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ (Kitchin, 2003) จากรายงานปัญหาของสารหนูในประเทศต่างๆ เช่น อินเดีย บังกลาเทศ จีน มองโกเลีย ไต้หวัน สหรัฐอเมริกา อาร์เจนตินา ชิลี และกัมพูชา (Luong, 2004; Esparza, 2006; Savarimuthu, 2006; Wade, 2009) พบว่าสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการดื่มน้ำที่ปนเปื้อนของสารหนู ส่งผลกระทบต่อสุขภาพของคนประมาณ 137 ล้านคน จากจำนวนมากกว่า 70 ประเทศ จึงทำให้มีผู้ป่วยโรคผิวหนัง โรคเกี่ยวกับระบบทางเดินหายใจและมะเร็งจำนวนมาก โดยองค์การอนามัยโลกกำหนดให้มีสารหนูปนเปื้อนในน้ำดื่มได้ไม่เกินระดับ 0.01 mg/L (WHO, 2001)

ประเทศไทยพบสารหนูในพื้นที่เสี่ยง 25 จังหวัด เช่น นครศรีธรรมราช ชลบุรี ประจวบคีรีขันธ์ นครสวรรค์ เชียงใหม่ ยะลา สงขลาและระยอง โดยเฉพาะที่ อ.ร่อนพิบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช เกิดปัญหาโรคพิษจากสารหนู ในปี พ.ศ. 2530 ซึ่งเกิดจากการทำเหมืองแร่ดีบุกที่มีสารหนูปนเปื้อนมากับสายแร่ ในกระบวนการแยกแร่ธาตุโดยไม่มีการจัดการที่เหมาะสม จึงทำให้สารหนูปนเปื้อนไปยังแหล่งน้ำของชุมชน 0.07-0.78 mg/L (กรมพัฒนาที่ดิน, 2538) ปี พ.ศ. 2545 พบสารหนูที่ปนเปื้อนในดินจากการทำเหมืองใน อ.บันนังสตา จ.ยะลา มีปริมาณตั้งแต่ 21-16,000 mg/L (วิโรจน์, 2548) ปี พ.ศ. 2549 พบการปนเปื้อนสารหนูสูงในน้ำผิวดินใน อ.ด่านช้าง จ.สุพรรณบุรี มีค่าระหว่าง 109 -606  $\mu\text{g/L}$  เกินมาตรฐาน ซึ่งกำหนดไว้ไม่เกิน 10  $\mu\text{g/L}$  (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2549) จากการตรวจสอบกลุ่มบุคคลที่อยู่ในพื้นที่พบว่าบางรายมีสารหนูปนเปื้อนในปัสสาวะ สาเหตุอาจเกิดจากการปนเปื้อนโดยธรรมชาติและการจัดการเหมืองแร่ที่ไม่เหมาะสม (กลุ่มงานอนามัยสิ่งแวดล้อม, 2551) ปี พ.ศ. 2550 ตรวจพบสารหนูปนเปื้อนในน้ำทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จ.ระยอง บริเวณปากคลองชากหมากและบางเปิด 11  $\mu\text{g/L}$  สูงเกินกว่ามาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2549) และล่าสุดในปี พ.ศ. 2552 พบสารหนูปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติใน ต.เขาหลวง อ.วังสะพุง จ.เลย ทำให้ชาวบ้านประสบปัญหาขาดแคลนน้ำอย่างหนัก (ชัยภูมิต, 2553) ซึ่งข้อกำหนดการปนเปื้อนสารหนูในน้ำทิ้งของอุตสาหกรรม น้ำทะเลและอาหารของประเทศไทยให้ปนเปื้อนได้ไม่เกิน 0.25 mg/L, 10  $\mu\text{g/L}$  (กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม, 2539; คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2549) และ 2 mg/L (กระทรวงสาธารณสุข, 2546) ตามลำดับ

ประเทศไทยมีสถิติการตายจากโรคมะเร็งสูงที่สุด โดยการปนเปื้อนของสารก่อมะเร็งในอาหารและเครื่องดื่มเป็นหนึ่งในสาเหตุหลัก (Sinha, 2003; สถาบันมะเร็งแห่งชาติ, 2551) จากการสำรวจการปนเปื้อนของสารหนูในอาหาร ประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่าอาหารทะเลมีสารหนูปนเปื้อนมาก โดยเฉพาะในปลาทะเลพบสารหนูอินทรีย์ 2.360 ng/L (Schoof, 1999) ดังนั้น

การศึกษาการปนเปื้อนของสารหนูในสัตว์น้ำจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง เพราะเป็นการศึกษาเพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารหนูในสัตว์น้ำซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์ และเพื่อป้องกันอันตรายจากการบริโภคสัตว์น้ำที่ปนเปื้อนสารหนู

ปัญหาการปนเปื้อนของสารหนูในสิ่งแวดล้อมและสัตว์น้ำซึ่งเป็นอาหารของคน ปลาจึงเป็นสัตว์น้ำที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้เป็นยามเฝ้าระวังการตรวจการปนเปื้อนสารหนูในแหล่งน้ำ โดยเฉพาะความเป็นพิษของสารหนูต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) ซึ่งเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับจากองค์กรพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (U.S. EPA, 1996) การศึกษานี้จึงทดลองในปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*) เพราะเป็นปลาน้ำกร่อยสามารถเจริญเติบโตได้ดีทั้งน้ำจืดและน้ำทะเลที่มีความเค็มประมาณ 10 g/L โดยศึกษาความเป็นพิษของสารหนูต่อสารพันธุกรรมปลากะพงขาวในห้องปฏิบัติการด้วยเทคนิค Micronucleus test, Comet assay และศึกษาผลกระทบที่เกิดจาก oxidative stress ในเซลล์ คือ lipid peroxidation เพื่อนำองค์ความรู้ไปประยุกต์ใช้ในการเฝ้าระวัง การปนเปื้อนของสารหนูในแหล่งน้ำ และสัตว์น้ำซึ่งเป็นอาหารของมนุษย์

## 2. ความมุ่งหมายและวัตถุประสงค์ของการศึกษา (Goal and objective)

2.1 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารหนูในรูปของ โซเดียมอาร์ซีไนต์ ( $\text{NaAsO}_2$ ) ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากะพงขาว โดยใช้เทคนิค micronucleus test และ comet assay

2.2 เพื่อเปรียบเทียบความไวในการตรวจความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมปลากะพงขาว 2 เทคนิค คือ micronucleus test และ comet assay

2.3 เพื่อศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อปริมาณชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ตับปลากะพงขาว

## 3. สมมติฐานของการศึกษา (Hypothesis to be tested)

3.1 สารหนูมีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากะพงขาว ดังนั้นถ้าปลาที่ได้รับสารหนูในรูป  $\text{NaAsO}_2$  ในปริมาณและระยะเวลาที่เหมาะสม ควรจะตรวจพบสารพันธุกรรมปลาถูกทำลายสูงกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อตรวจด้วยเทคนิค micronucleus test และ comet assay

3.2 สารหนูมีความเป็นพิษและก่อให้เกิดความเครียดต่อปลากะพงขาว ดังนั้นถ้ากลไกต่างๆ ภายในเซลล์ของปลาพยายามลดความเป็นพิษของสารหนู ควรจะตรวจพบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงของชีวโมเลกุลในเซลล์ปลาเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

#### 4. ขอบเขตของการศึกษา (Scope or delimitation of the study)

ศึกษาพิษของสารหนูในรูปโซเดียมอาร์เซไนต์ ( $\text{NaAsO}_2$ ) ในปลากระพงขาว โดยใช้สารหนูความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L และตรวจความเป็นพิษหลังจากปลาได้รับสารหนูเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง แล้วตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากเซลล์เม็ดเลือดแดง ด้วยเทคนิค micronucleus test, comet assay และตรวจการเปลี่ยนแปลงการทำงานของชีวโมเลกุลในเซลล์ตับ

#### 5. ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

5.1 ทำให้ทราบความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลากระพงขาว

5.2 ทำให้ทราบความไวของเทคนิค micronucleus test และเทคนิค comet assay ในการใช้ตรวจความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมในปลากระพงขาว

5.3 ทำให้ทราบความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อปริมาณชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ตับปลากระพงขาว

5.4 ทำให้ได้ข้อมูลพื้นฐานในการใช้ปลากระพงขาวเป็นโมเดลทดสอบสารพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมในห้องปฏิบัติการเพื่อประยุกต์ใช้ทดสอบในภาคสนามต่อไป



## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 1. ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

##### 1.1 ลักษณะสำคัญ

กะพงขาว เป็นปลาทะเลชนิดหนึ่งที่สามารถปรับตัวให้อยู่ในน้ำจืดหรือน้ำกร่อยได้ มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Lates calcarifer* อยู่ในวงศ์ปลากะพงขาว (Latidae) มีรูปร่างลำตัวหนาและด้านข้างแบน หัวโต จะงอยปากค่อนข้างยาวและแหลม นัยน์ตาโต ปากกว้างยึดหดได้ มุมปากอยู่เลยไปทางหลังนัยน์ตา ฟันเป็นฟันเขี้ยวอยู่บนขากรรไกรบนและล่าง ขอบกระดูกแก้มเป็นหนามแหลม ขอบกระดูกกระพุ้งเหงือกแข็งและคม คอดหางมีขนาดใหญ่และแข็งแรง เกล็ดใหญ่มีขอบหยักเป็นหนาม เมื่อลูบจะสากมือ (Ctenoid) ครีบหลังอันแรกมีก้านครีบเป็นหนามแข็ง ปลายแหลม อันที่สองเป็นครีบอ่อนมีขนาดใกล้เคียงกัน ครีบใหญ่ปลายกลมมน พื้นลำตัวสีขาวยเงินปนน้ำตาล

##### 1.2 อนุกรมวิธานปลากะพงขาว

Phylum Chordata

Sub-phylum Vertebrata

Sub-class Teleostomi

Order Percomorphi

Family Centropomidae

Genus *Lates*

Species *Calcarifer*

ที่มา : สุภาพร สุกสีเหลือง. มีนวิทยา (Ichthyology). 1999.

ปลากะพงขาวเป็นปลาน้ำกร่อยขนาดใหญ่ สามารถอาศัยอยู่ได้ทั้งในน้ำจืด น้ำกร่อย และน้ำเค็ม สำหรับในประเทศไทยพบปลากะพงขาวแพร่กระจายอยู่ทุกจังหวัดชายทะเลทั้งในอ่าวไทยและฝั่งทะเลอันดามัน จะอาศัยอยู่ในแหล่งน้ำที่ไม่ห่างไกลออกไปจากชายฝั่งมากนัก โดยอาศัยอยู่ชุกชุมตามปากแม่น้ำ ลำคลอง และปากทะเลสาบ นอกจากนี้ปลากะพงขาวยังสามารถขึ้นไปอาศัยและเจริญเติบโตในแหล่งน้ำจืดได้อีกด้วย จึงจัดเป็นปลาประเภทสองน้ำ มีการอพยพย้ายถิ่นระหว่างน้ำจืดและน้ำเค็มอยู่เสมอ โดยเฉพาะเมื่อมีความสมบูรณ์ทางเพศต้องอพยพไปสู่ปากแม่น้ำและทะเล

เพื่อสืบพันธุ์วางไข่ต่อไป โดยธรรมชาติปลากะพงขาวเป็นปลาที่ปราดเปรียว ว่องไว ว่ายน้ำรวดเร็ว สามารถกระโดดพ่นน้ำได้สูงขณะตกใจหรือไล่เหยื่อ มีนิสัยชุกชอนอยู่ตามซุ่ม กัลำ หลักโป๊ะ หรือ กองหินใต้น้ำ และออกหากินในบริเวณที่มีกระแสน้ำอ่อน ปลาที่มีขนาดใหญ่มักไม่รวมฝูง นอกจากฤดูผสมพันธุ์จะรวมเป็นกลุ่มเล็กๆ (กรมประมง, 2544)



รูปที่ 1 ปลากะพงขาว (*Lates calcarifer*)

## 2. สารหนู (Arsenic, As)

### 2.1 ลักษณะและคุณสมบัติของสารหนู

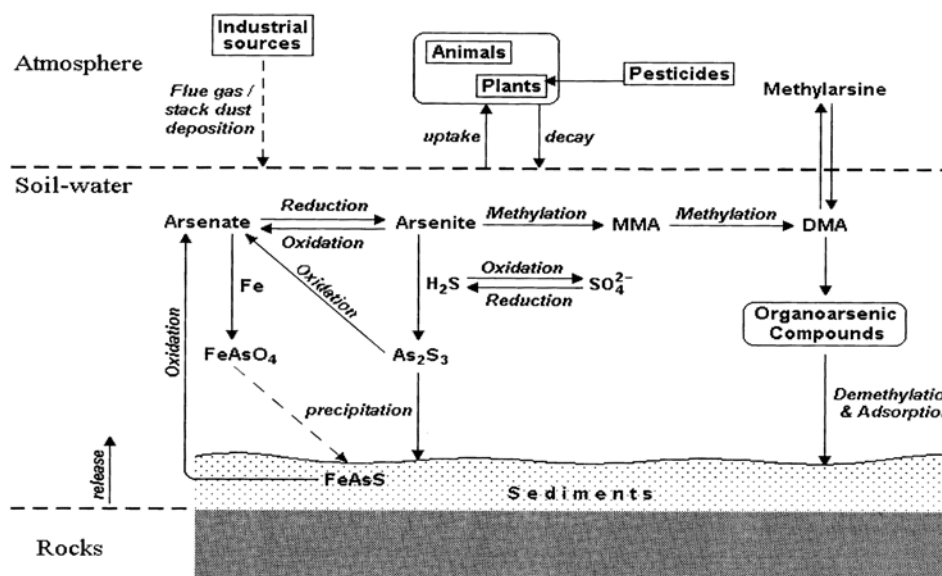
สารหนู หรือ อาร์เซนิก (arsenic) เป็นชื่อธาตุลำดับที่ 33 สัญลักษณ์ As ลักษณะเป็นของแข็ง เป็นธาตุที่มีพิษอย่างร้ายแรง สารหนูมีเลขอะตอม (atomic number) 33 อยู่ในคาบที่ 4 หมู่ VA หรือหมู่ 15 ตามแต่การจัดหมู่ของตารางพีริออดิก (periodic table element) และเป็นธาตุกึ่งโลหะ โครงแบบอิเล็กตรอนเป็นดังนี้  $[Ar] 4s^2 3d^{10} 4p^3$  โดย  $[Ar]$  คือ โครงแบบอิเล็กตรอนแสดงการกระจายตัวของอิเล็กตรอนในระดับพลังงานต่าง ๆ ของธาตุอาร์กอน น้ำหนักอะตอม (atomic weight) 74.9216 สารหนูมีไอโซโทปเสถียรเพียงไอโซโทปเดียว คือ As-75 และมีไอโซโทปกัมมันตรังสีสังเคราะห์อีกยี่สิบสองไอโซโทป สถานะออกซิเดชันของสารหนู คือ -3, 0, +3, +5 กล่าวคือเป็นได้ทั้งบวกและลบ สารหนูเป็นธาตุกึ่งโลหะ การมีสมบัติเป็นกึ่งโลหะหมายความว่าสามารถทำปฏิกิริยาได้กับทั้งโลหะและอโลหะ ออกไซด์ของสารหนูเป็นทั้งกรดและเบส ทำปฏิกิริยาได้ดีกับคลอรีนและฟอสฟอรัสซึ่งเป็นอโลหะ และทำปฏิกิริยากับโลหะอื่นจำนวนมากให้อาร์เซไนต์ (Garland, 2007)

สารหนูเป็นธาตุกึ่งโลหะ เป็นสารที่มีลักษณะเป็นผงโลหะสีเทา มีมากเป็นอันดับที่ 20 ของธาตุที่พบบากบนโลก โดยจะพบในสิ่งที่มีชีวิตพืชและสัตว์ ตลอดจนพบธรรมชาติ ได้แก่ ในพื้นดิน ทะเล มหาสมุทรและแหล่งน้ำต่างๆ สารหนูในแหล่งน้ำธรรมชาติมาจากการระเบิดของดินภูเขาไฟ การเผาถ่านหิน การถลุงแร่ การใช้สารกำจัดศัตรูพืชและมาจากสารหนู ซึ่งเป็นองค์ประกอบของหินตามธรรมชาติ นอกจากนี้สารหนูยังออกมาสู่บรรยากาศโลกจากอุตสาหกรรม

บางประเภทที่มีการใช้สารชนิดนี้ เช่น การอบไม้ การผลิตสีทาบ้าน และการผลิตสารกำจัดศัตรูพืช (รูปที่ 2)

สารหนูที่พบในธรรมชาติมี 2 แบบ คือ สารหนูอินทรีย์ (Organic) เช่น Dimethylarsinic acid (DMA) Arsenobetaine (AsB) เป็นต้น และสารหนูอนินทรีย์ (Inorganic) เช่น Arsenate Arsenic trioxide Sodium arsenite เป็นต้น ซึ่งสารหนูอนินทรีย์ มีพิษร้ายแรงกว่าธาตุสารหนูบริสุทธิ์หรือสารหนูอินทรีย์ สารหนูอนินทรีย์ส่วนใหญ่พบในโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้สารหนูในบริเวณถลุงแร่และเกษตรกรรมที่มีการใช้สารกำจัดศัตรูพืช มนุษย์มีโอกาสได้รับสารหนูทั้งการสัมผัสที่ผิวหนัง การหายใจเอาละอองฝุ่นที่มีสารหนูหรือไอระเหยของสารหนูและการรับประทานอาหารหรือน้ำดื่มที่ปนเปื้อนโดยปกติร่างกายมนุษย์สามารถขจัดสารหนูได้ปริมาณน้อยโดยกำจัดออกทางปัสสาวะภายในระยะเวลา 2 วัน แต่ถ้าหากได้รับสารหนู 130 mg จะทำให้ลำไส้และตับถูกทำลาย อาเจียนมีสีเขียวและเหลือง ท้องเสียอย่างรุนแรง มีนเมาเพื่อ และถึงแก่ชีวิต หากได้รับปริมาณน้อยและมีระยะเวลานานเป็นเวลาหลายปีจะทำให้เกิดโรคพิษสารหนูเรื้อรังหรืออาร์ซีนิกโคซิส (Arsenicosis) อาการเริ่มจากผิวหนังเกิดการระคายเคืองจนมีความคันและหนาสีผิวเปลี่ยนเป็นสีดำ เข้ม ฝ่ามือและฝ่าเท้าเป็นจุดสีดำใหญ่กลายเป็นมะเร็งผิวหนัง มะเร็งปอด มะเร็งไต มะเร็งกระเพาะปัสสาวะรวมทั้งมีผลต่อระบบหลอดเลือดหัวใจและระบบประสาทจนเสียชีวิตในที่สุด (Smith, 1992)

## 2.2 การปนเปื้อนของสารหนูในสิ่งแวดล้อม



รูปที่ 2 การปนเปื้อนสารหนูในธรรมชาติ

ที่มา: Roy P. and Saha A “Metabolism and toxicity of arsenic: A human Carcinogen”

CURRENT SCIENCE, 82, 1 (2002): 38-45.

### 2.2.1 การปนเปื้อนของสารหนูในอากาศ

อนุภาคของสารหนูในบรรยากาศมีทั้งในรูปสารประกอบอนินทรีย์และสารประกอบอินทรีย์ในบรรยากาศบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อน (nonpolluted area) พบมีความเข้มข้นของสารหนูต่ำมาก คือ  $< 1-2 \text{ ng/m}^3$  ส่วนบริเวณที่ใกล้เคียงกับแหล่งถลุงแร่ทองแดง ตะกั่ว ปริมาณสารหนูในบรรยากาศที่ตรวจวัดได้  $> 1 \text{ ng/m}^3$  เช่น ที่ประเทศสหภาพแห่งสาธารณรัฐสังคมนิยมโซเวียต ตรวจวัดได้  $0.7-2.5 \text{ ng/m}^3$  จากพื้นที่ในบริเวณรัศมี 4 กิโลเมตรจากโรงงานถลุงทองแดงที่เมืองวอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา ตรวจวัดตลอดเดือนมีค่าเฉลี่ย  $1.4 \text{ ng/m}^3$  จากพื้นที่ใกล้โรงงานถลุงทองแดงและที่เมืองแคลิฟอร์เนีย ประเทศสหรัฐอเมริกา ตรวจวัดได้  $7.4 - 24$  ตัน/ปี จากกระบวนการเผาไหม้ไม้และของเสียตกค้างจากการกลั่นน้ำมัน (California Air Resources Board, 1990)

### 2.2.2 การปนเปื้อนของสารหนูในแหล่งน้ำ

สารหนูในน้ำพบในรูปสารประกอบอนินทรีย์ ได้แก่ arsenite และ arsenate ซึ่งพบมากกว่าสารประกอบอินทรีย์ ได้แก่ methylarsonic acid และ dimethylarsinic acid

จากรายงานการสำรวจคุณภาพน้ำในบริเวณพื้นที่ชายฝั่งทะเลมาบตาพุด จ.ระยอง โดยทั่วไปตรวจพบสารหนูอยู่ในเกณฑ์มาตรฐาน แต่มีแนวโน้มที่จะได้รับผลกระทบจากกิจกรรมบนพื้นที่ชายฝั่งในระดับที่รุนแรงได้ ทั้งจากอุตสาหกรรมที่มีอยู่เป็นจำนวนมากและชุมชนที่อยู่ในพื้นที่ โดยคุณภาพน้ำทะเลในบางสถานีตรวจพบสารหนู  $24 \text{ } \mu\text{g/L}$  สูงเกินค่ามาตรฐานที่กำหนดไว้ไม่เกิน  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2549) จากการตรวจวัดปริมาณสารหนู แคดเมียม และตะกั่วในน้ำและตะกอนท้องน้ำบริเวณลุ่มแม่น้ำปากพนัง จ. นครศรีธรรมราช พบอยู่ในระดับใกล้เคียงกับแหล่งน้ำอื่นๆ และจัดว่าอยู่ในเกณฑ์ปกติยกเว้นปริมาณสารหนูที่พบว่ามีค่าสูงกว่าค่ามาตรฐานน้ำดื่มที่องค์การอนามัยโลกกำหนดไว้  $0.01 \text{ mg/L}$  โดยปริมาณสารหนูในน้ำที่ตรวจพบมีค่า  $21.02-427.07 \text{ mg/L}$  และในตะกอนท้องน้ำมีค่า  $6.89- 381.24 \text{ mg/L}$  สำหรับปริมาณการปนเปื้อนของโลหะทั้ง 3 ชนิด ในดินมีค่าสูงกว่าค่าในดินปกติทั่วไปโดยสารหนู แคดเมียม และตะกั่ว มีค่า  $2.85-5.80, 2.67-11.67$  และ  $16.04-27.37 \text{ mg/L}$  ตามลำดับ (วรพิน, 2537)

### 2.2.3 การปนเปื้อนสารหนูในน้ำดื่ม

องค์การอนามัยโลกกำหนดให้คุณภาพน้ำสำหรับการบริโภคไม่ควรมีสารหนูปนเปื้อนเกิน  $0.01 \text{ mg/L}$  หรือ  $10 \text{ } \mu\text{g/L}$  ในขณะที่ประเทศไทยโดยกรมควบคุมมลพิษ กำหนดให้คุณภาพน้ำผิวดินที่จะนำมาบริโภคที่ผ่านการฆ่าเชื้อโรคและบำบัดเบื้องต้นแล้ว ต้องมีการปนเปื้อนสารหนูไม่เกิน  $0.01 \text{ mg/L}$  เช่นกัน แต่มาตรฐานผลิตภัณฑ์ อุตสาหกรรมน้ำบริโภค คุณภาพน้ำดื่มใน

ภาชนะบรรจุที่ปิดสนิท คุณภาพน้ำบาดาลที่ใช้บริโภค อนุโลมให้มีสารหนูปนเปื้อนได้ไม่เกิน 0.05 mg/L (กระทรวงอุตสาหกรรม, 2521; กระทรวงสาธารณสุข, 2524; กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม, 2552)

ปริมาณความเข้มข้นของสารหนูโดยธรรมชาติในน้ำดื่ม มีค่าแตกต่างกันไปตามแต่ละส่วนของโลก เช่น จากการสำรวจน้ำประปาจากชุมชนต่างๆ ในประเทศสหรัฐอเมริกา ประมาณ 18,000 แห่ง พบว่าน้อยกว่า 1% ที่มีปริมาณสารหนูในน้ำประปาเกิน 0.01 mg/L หรือจากการสำรวจน้ำบ่อในเมือง Nova Scotia ประเทศแคนาดาประมาณ 800 บ่อ พบว่า 13% ที่มีสารหนูเกิน 0.05 mg/L ซึ่งปรากฏว่าบ่อเหล่านี้บางบ่อปนเปื้อนจากการเหมืองทองในอดีต ส่วนในบางพื้นที่ซึ่งมีปัญหาเกี่ยวกับโรคพิษของสารหนูเรื้อรังพบสารหนูในน้ำบ่อ >1 mg/L โดยพบสารหนูสูงสุด 0.9-3.4 mg/L แถบเมือง Cordoba ประเทศอาร์เจนตินา หรือพบสารหนูถึง 1.8 mg/L ในน้ำบ่อน้ำบาดาลของเมือง Tainan ประเทศไต้หวัน สำหรับปริมาณสารหนูในน้ำดื่มประเทศไทย กรมอนามัยตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำบ่อต้น จำนวน 6 หมู่บ้าน จาก ต. ร่อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช ในปี 2526 พบว่ามี สารหนู 3-388 mg/L (จันทรวิจิตร, 2543)

สำนักอนามัยสิ่งแวดล้อม ได้ทำการตรวจวิเคราะห์ตัวอย่างแหล่งน้ำใน 29 จังหวัด ในปี 2534 จำนวนตัวอย่าง 1,467 ตัวอย่าง และตรวจวิเคราะห์น้ำหาปริมาณสารหนูในบ่อน้ำต้น 2,412 บ่อ ร่วมกับแหล่งน้ำอื่น ๆ พบสารหนูปนเปื้อนในบ่อน้ำมากที่สุดที่ ต. ร่อนพิบูลย์ อ. ร่อนพิบูลย์ จำนวน 672 บ่อ ซึ่งบริเวณเขาร่อนนา และเขาร่อนจันทร์ มีสายแร่ดีบุก วุลแฟรม และพลวง ที่มีปริมาณแร่ไพไรต์ และอาร์ซีโนไพไรต์ (ซึ่งเกิดการชะล้างของหินและแร่ที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ) อยู่รวมกันร้อยละ 0-1 เมื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างการเจ็บป่วยกับการดื่มน้ำบ่อพบว่าสัมพันธ์กันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P=0.004$ )

#### 2.2.4 การปนเปื้อนของสารหนูในอาหารและเครื่องดื่ม

อาหารทั่วไปมีสารหนูปริมาณต่ำกว่า 1 mg/L (ww) ยกเว้นในอาหารทะเล เช่น ปลาทะเลที่มีปริมาณสารหนูถึง 5 mg/L (ww) หรือสัตว์ที่มีเปลือกหุ้ม มีปริมาณสูงถึง 10 mg/L การศึกษาการปนเปื้อนสารหนูในอาหารทะเลและอวัยวะสุกรจากตลาด 5 แห่งในเขตกรุงเทพมหานครด้วย spectrophotometer ตรวจพบสารหนูในอาหารทะเล 0.012 - 0.300 mg/L ส่วนในสุกรพบ 0.32-0.271 mg/L ตรวจพบสารหนู 28.57 - 86.67 เปอร์เซ็นต์จาก 522 ตัวอย่างทั้งหมดค่าเฉลี่ยสารหนูในตับสุกรมีมากกว่าในอาหารทะเลอย่างมีนัยสำคัญ และจากเนื้อสุกรมีมากกว่าหอยลายอย่างมีนัยสำคัญเช่นเดียวกัน ทั้งนี้ค่าเฉลี่ยเนื้อสุกรที่ตลาดสะพานควายสูงกว่าจากตลาดอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ( $P<0.01$ ) (ดาณิศ, 2533)

### 2.2.5 การปนเปื้อนสารหนูในพืชและสัตว์

ผลการตรวจหาสารหนูในพืชปลูกในพื้นที่ซึ่งไม่เคยมีการใช้สารพิษป้องกันกำจัดแมลงศัตรูพืชที่มีสารหนูเป็นองค์ประกอบ พบว่ามีปริมาณสารหนูแตกต่างกันไป ตั้งแต่ 0.1-5.0 mg/L (น้ำหนักแห้ง) ส่วนพืชที่ปลูกในพื้นที่ที่ได้รับการปนเปื้อนสารหนูนั้น พบสารหนูในพืชในปริมาณสูงโดยเฉพาะในราก (Bhattacharya, 2009)

บริเวณพื้นที่ที่อยู่ใกล้กับแหล่งกำเนิดการแพร่กระจายของสารหนูใน ต. ร่อนพิบูลย์ จ. นครศรีธรรมราช ตรวจพบสารหนูในพืชน้ำมีค่าระหว่าง 0.23-2.97 mg/L (น้ำหนักเปียก) โดยพืชน้ำที่พบสารหนูสูงสุดคือผักตบชวา (*Eichhornia crassies*) ส่วนในสัตว์น้ำ มีค่า 0-2.45 mg/L (น้ำหนักเปียก) โดยพบสูงสุดในหอยขม (*Sinotaia ingallsiana*) ปริมาณสารหนูในน้ำ มีค่าระหว่าง 0-0.246 mg/L และปริมาณสารหนูในดินตะกอนมีค่าระหว่าง 100.7-1,854.84 mg/L (น้ำหนักแห้ง) พบว่าปริมาณสารหนูในน้ำและดินตะกอนจะมีปริมาณสารหนูสูง (ตรีรัตน์, 2540)

### 2.2.6 การปนเปื้อนของสารหนูในบุหรี

ยาสูบที่ปลูกบนพื้นที่ซึ่งไม่มีการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชโดยทั่วไป ตรวจพบสารหนูเป็นองค์ประกอบ < 3 mg/L ซึ่งบุหรี 1 มวน มีน้ำหนักประมาณ 1 g ส่วนพื้นที่ซึ่งใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืช พบสารหนูในยาสูบถึง 52 mg/L เมื่อการใช้สารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชประเภทสารหนูลดลง ปริมาณสารหนูในยาสูบก็ลดลงด้วย โดยพบปริมาณสารหนู < 8 mg/L

### 2.2.7 การปนเปื้อนของสารหนูในยารักษาโรค

ในอดีตมีการใช้สารหนูเป็นส่วนผสมของยารักษาโรค เช่น สารประกอบอินทรีย์สารหนู ซึ่งรูปที่นิยมใช้กันมาก คือ sodium arsenite (Fowler's solution) เพื่อใช้รักษาโรคมะเร็งเม็ดเลือดขาวผิดปกติ (leukaemia) และ โรคผิวหนังเรื้อรัง (psoriasis) เป็นต้น (Antman, 2001) ส่วนสารประกอบอินทรีย์สารหนูที่ยังคงใช้เป็นยารักษาโรค โดยส่วนใหญ่เป็นสารกำจัดปรสิต เช่น carbarsone, melarsoprol และ tryparsamide

## 2.3 การเข้าสู่ร่างกายและการแพร่กระจายของสารหนู

สารหนูสามารถผ่านเข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจ รับประทาน และทางผิวหนัง โดยทั่วไปได้รับสารหนูอินทรีย์จากการหายใจขณะทำงาน หรือระหว่างการสูบบุหรี่ และส่วนใหญ่อยู่ในรูปของ aerosol อนุภาคของสารหนูจากโรงงานอุตสาหกรรมมีขนาดค่อนข้างใหญ่

ดังนั้นระยะแรกจะไปตกค้างอยู่ที่ทางเดินหายใจตอนต้น ได้แก่ ช่องจมูก คอหอย กล่องเสียง หลอดคอ และหลอดลม จากนั้นจะถูกดูดซึมเข้าไปในระบบทางเดินหายใจหรือทางเดินอาหาร โดยระยะเวลาที่ตกค้างและดูดซึมจากระบบทางเดินหายใจจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติการละลายของสาร

การดูดซึมสารหนูอนินทรีย์จากระบบทางเดินอาหาร หรือจากระบบทางเดินหายใจ และเข้าสู่กระแสโลหิต สารหนูที่เข้าสู่ร่างกายประมาณครึ่งหนึ่งจะแพร่กระจายไปอยู่ในกระแสโลหิตโดยเฉพาะในเม็ดเลือดแดง นอกจากนั้นก็จะแพร่กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ เช่น ตับ ไต ผิวหนัง ปอด และม้าม เป็นต้น (Underhill, 1914)

#### 2.4 การได้รับและการตรวจพบสารหนูในร่างกาย

มนุษย์ได้รับสารหนูเข้าสู่ร่างกายจากการบริโภคอาหารทะเลเป็นส่วนใหญ่ โดยปริมาณที่รับไม่เกิน 0.2 mg/วัน และไม่ควรรับเอาสารประกอบสารหนูอนินทรีย์เกิน 50 µg/วัน ส่วนในรายผู้สูบบุหรี่จะหายใจเอาสารหนูเข้าไป 2-20 µg/วัน โดยปัจจุบันนี้ยังไม่ทราบว่ารูปของสารหนูที่ได้รับจากการสูบบุหรี่ ได้มีการคาดประมาณว่าผู้ที่อาศัยในบริเวณที่ไม่มีกรปนเปื้อนสารหนูจะหายใจเอาสารหนูเข้าสู่ร่างกายประมาณ 0.05 µg/วัน หรือน้อยกว่านี้ โดยคำนวณจากการหายใจเอาอากาศเข้า 20 m<sup>3</sup>/วัน ส่วนบริเวณเหมืองถ่านหิน โรงถลุงแร่ ซึ่งมีปริมาณสารหนูในบรรยากาศประมาณ 1 µg/m<sup>3</sup> นั้นสารหนูที่ร่างกายหายใจเข้าไปประมาณวันละ 20 µg/วัน สารหนูเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะเข้าไปอยู่ตามส่วนต่างๆของร่างกาย เช่น เลือด ปัสสาวะ เส้นผม และเนื้อเยื่ออื่นๆ ในปริมาณที่แตกต่างกัน

ปริมาณสารหนูในเลือดของบุคคลทั่วไปที่ตรวจวัดได้มีค่า 2-3 µg/L ส่วนบุคคลที่ได้รับสารหนูจากการดื่มน้ำที่มีสารหนูปนเปื้อนสูง พบว่ามีสารหนูในเลือดสูงกว่า 50 µg/L นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาในของผู้หญิงที่สูบบุหรี่จำนวน 50 คน ของประเทศสหรัฐอเมริกา มีสารหนูในเลือดเฉลี่ย 0.0023 mg/L ส่วนผู้ที่ไม่สูบบุหรี่จำนวน 49 คน พบสารหนูในเลือดเฉลี่ย 0.0015 mg/L

จากการศึกษาปริมาณสารหนูในเลือดของเด็กอายุ 10 ขวบ ในประเทศเซโกสโลวาเกีย พบว่าเด็กที่อาศัยอยู่ในแถบชนบท มีปริมาณสารหนูเฉลี่ย 0.00145 mg/L ส่วนเด็กที่อาศัยอยู่ในเมืองใหญ่และเด็กที่อาศัยอยู่ใกล้โรงงานถ่านหิน มีสารหนูเฉลี่ย 0.00188 และ 0.00453 mg/L ตามลำดับ

สารหนูในปัสสาวะคนทั่วไปตรวจพบ 10-50 µg/L ส่วนคนงานในโรงงานถลุงโลหะ ซึ่งสัมผัสกับสารประกอบสารหนูอนินทรีย์ ตรวจพบสารหนูในปัสสาวะ 200-300 µg/L ปริมาณ

สารหนูในปัสสาวะเป็นตัวบ่งชี้การสัมผัสสารประกอบสารหนูอนินทรีย์ที่ดี เนื่องจากผลจากการศึกษาส่วนใหญ่พบว่าทั้งคนและสัตว์ขับสารหนูผ่านทางไตเป็นส่วนใหญ่

คนที่ไม่ได้สัมผัสกับสารหนูโดยทั่วไป ตรวจพบสารหนูในเส้นผม <1 mg/L ส่วนรายที่เป็นโรคพิษสารหนูเรื้อรังเนื่องจากการดื่มน้ำที่มีสารหนู ตรวจพบสารหนูในเส้นผมมีค่าสูงถึง 80 mg/L แต่ยังไม่มีความชัดเจนว่าการกินอาหารทะเลที่มีสารหนูปนเปื้อนจะไปเพิ่มปริมาณสารหนูในเส้นผม (Mosaferi, 2005)

## 2.5 การขับสารหนูออกจากร่างกาย

สารหนูส่วนใหญ่ถูกขับออกมากับปัสสาวะ แต่บางส่วนขับออกมากับอุจจาระ เส้นผม เล็บ และมีจำนวนน้อยมากที่ขับออกมากับลมหายใจ อัตราการขับสารหนูออกจากร่างกายค่อนข้างช้า ใช้เวลาประมาณ 10 วัน หลังจากสัมผัสสารหนูเข้าไปแบบเฉียบพลัน และในรายที่สัมผัสต่อเนื่องกันต้องใช้เวลาในการขับสารหนูออกจากร่างกายนานมากกว่า 1 ปี โดยสารหนูที่ขับมาพร้อมปัสสาวะจะอยู่ในรูป dimethylarsinic acid ประมาณ 65% และ methylarsonic acid ประมาณ 20% (Kapaj, 2006)

## 2.6 ความเป็นพิษของสารหนูต่อสิ่งมีชีวิต

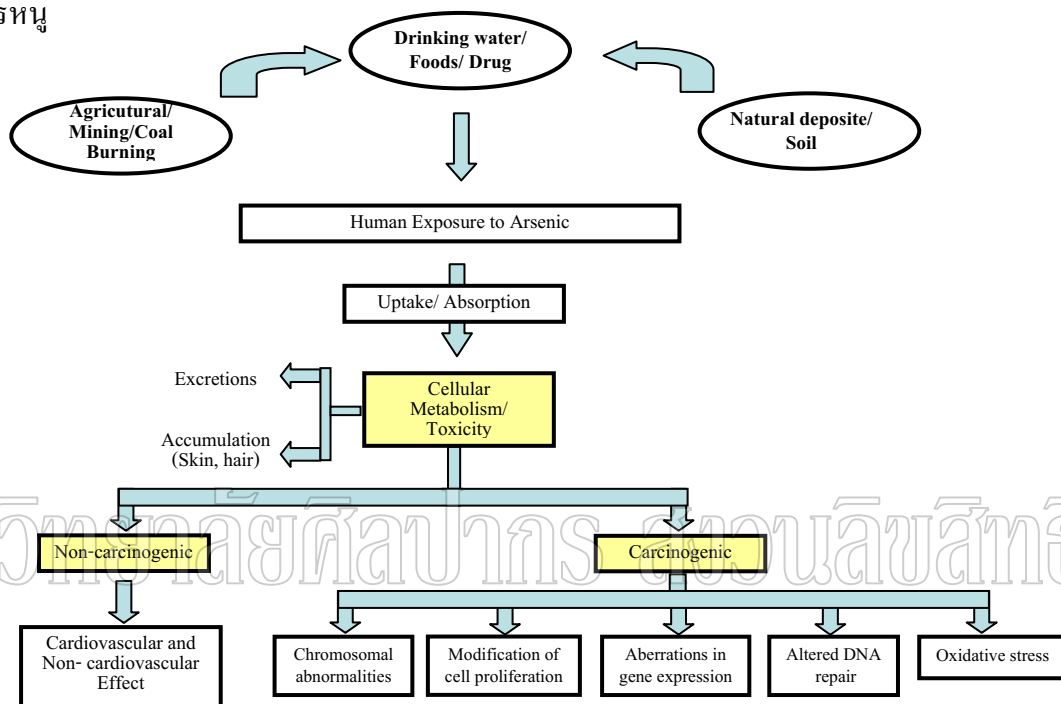
สารหนูจัดเป็นสารก่อมะเร็งในมนุษย์ อยู่ในกลุ่ม 1A โดย International Agency Research Cancer (IARC) จากการศึกษาพบว่าสารหนูสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ mutagenic ในคนได้ และพบว่ามีผลผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์น้ำเหลืองของผู้ที่เป็นโรคผิวหนังเรื้อรัง (Chien, 2004) รายงานความเป็นพิษต่อทารกในครรภ์ (teratogenicity) ในหนู โดยการฉีด  $\text{NaAsO}_2$  เข้าไปในช่องท้องของหนูที่ตั้งท้องเป็นวันที่ 9 ในปริมาณ 10 mg/L ผลปรากฏว่า หนูในท้อง 18 วัน มีความเปลี่ยนแปลงที่ผิดปกติรูปร่างหรือผิดส่วน (malformations) (Desesso, 2001)

จากการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าสารหนูอนินทรีย์ที่เป็น trivalent inorganic arsenic มีความเป็นพิษมากกว่า pentavalent และสารประกอบมีคุณสมบัติละลายน้ำได้จะมีความเป็นพิษมากกว่าสารละลายที่ไม่ละลายน้ำ ทั้งนี้อาจเกี่ยวเนื่องกับการดูดซึมเข้าสู่ในร่างกาย

กลไกการก่อโรคของสารหนู เกิดจากสารหนูสามารถยับยั้งเอนไซม์หลายชนิดที่มีหมู่ซัลไฟด์คิล (-SH groups) โดยเฉพาะเอนไซม์ pyruvate dehydrogenase ทำให้ไม่สามารถเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น acetyl-CoA ทำให้การสร้างกรดไขมัน โคเลสเตอรอลและกระบวนการทำงานของ Krebs' cycle ในไมโทคอนเดรียลดลง (Tchounwou, 2004) ทำให้เซลล์เสื่อมสภาพ ยับยั้งการเจริญเติบโต การเพิ่มจำนวนของเซลล์ รวมทั้งยับยั้งการสร้างหลอดเลือด (Roy, 2002) ซึ่งรวมถึง



oxidative stress, genotoxic damage, DNA repair inhibition, epigenetic events และ signal transduction pathways นำไปสู่การแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ (Kitchin, 2003) โครงสร้างของสารหนูคล้ายฟอสเฟตทำให้ขัดขวางการเกิด phosphorylation ในการสร้าง ATP (Huang, 2004) เนื่องจากคราตินเป็นองค์ประกอบที่พบมากในเส้นผมและเล็บซึ่งพบว่ามีฟอสเฟตเป็นองค์ประกอบ สารหนูจึงไปแย่งจับแทนฟอสเฟตทำให้ตรวจพบสารหนูสะสมในเล็บและผมของคนที่มีอาการโรคสารหนู



รูปที่ 3 ความเป็นพิษของสารหนูต่อสิ่งมีชีวิต

ที่มา: Roy P. and Saha A “Metabolism and toxicity of arsenic: A human Carcinogen” CURRENT SCIENCE, 82, 1 (2002): 38-45.

### 2.6.1 ความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารหนู

อาการพิษเฉียบพลัน (acute effects) จะพบเมื่อผู้ป่วยได้รับสารหนูปริมาณสูงเพียงครั้งเดียว เช่น กินยาผิดหรือในรายที่ใส่ยาเบื่อหนูหรือยาฆ่าแมลงเป็นยาฆ่าตัวตาย โดยการดื่มเข้าไปเป็นปริมาณมาก กรณีเช่นนี้จะเกิดอาการร้อนปาก ร้อนท้อง ปวดท้องรุนแรง คลื่นไส้ อาเจียนแน่นหน้าอก ความดันโลหิตตก เม็ดเลือดแดงแตกจนไตวาย หมดสติ และถึงแก่ชีวิตได้ ถ้าไม่เสียชีวิตในเวลาสั้นก็อาจพบอาการทางผิวหนัง เป็นแผลพุพองลอกเป็นแผ่นทั่วตัว มีผมร่วงจนหมดศีรษะในเวลาต่อมา (Saha, 1999)

### 2.6.2 ความเป็นพิษแบบเรื้อรังของสารหนู

อาการเป็นพิษเรื้อรัง (Long term effect) พบบ่อยกว่าพิษเฉียบพลันเพราะเกิดโดยผู้ที่ได้รับสารพิษไม่รู้สึกรู้ตัวเนื่องจากได้รับทีละน้อย และกว่าจะเกิดอาการหลังจากได้รับสารหนูเป็นเวลาต่อเนื่องมานาน อาจนานถึง 5-10 ปี บางครั้งผู้ป่วยเองแทบไม่เชื่อว่าโรคที่เกิดขึ้นเป็นผลจากยาซึ่งเคยกินมาเมื่อ 10 ปีก่อน แล้วเพิ่งจะมามากฤทธิ์ เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงเป็นไปอย่างช้าๆ ซึ่งอาการที่แสดงออกทางระบบต่างๆ (Saha, 1999)

คนที่ได้รับพิษสารหนูเรื้อรัง ผิวหนังจะเกิดผิวดำลงจนเป็นสีดำ เช่น ใบหน้าดำ มีจุดดำขึ้นตามฝ่ามือและฝ่าเท้า ลักษณะของจุดดำกระจายทั่วไปมีสลับด้วยจุดขาว ทำให้เห็นผิวดำๆต่างๆ ที่ฝ่ามือฝ่าเท้ามีตุ่มแข็งๆ เกิดขึ้นเนื่องจากเซลล์ที่ผิวหนังหนาตัวขึ้น ตุ่มนูนเหล่านี้เริ่มเป็นใหม่ๆ มีขนาดเล็กเท่าหัวเข็มหมุด ต่อมาขยายขนาดโตขึ้นหลายๆตุ่ม อาจรวมกันเป็นปื้นใหญ่แข็งและหนา เป็นสีน้ำตาล ตุ่มเหล่านี้อาจมีการเปลี่ยนแปลงกลายเป็นมะเร็งของผิวหนัง ขณะเดียวกันมะเร็งผิวหนังก็อาจเกิดขึ้นบริเวณลำตัวที่ดำได้อีกด้วย เรียกว่า ไขดำ

ระบบหายใจ สารหนูจะไปสะสมที่ปอด ทำให้หลอดลมเกิดการอักเสบ อาจมีผลทำให้เกิดมะเร็งที่ปอด ส่วนการได้รับฝุ่นผงหรือก๊าซที่ปนเปื้อนสารหนูทางเยื่อเมือก (mucous membrane) จะทำให้เกิดการระคายเคือง และฝุ่นผงบางส่วนลงสู่ปอด มีอาการคล้ายเป็นหวัด คัดจมูก ส่วนการเข้าสู่ตา ทำให้เกิดตาแดง ตาอักเสบ (conjunctivitis)

ระบบประสาทและสมอง สารหนูเมื่อเข้าสู่ระบบไหลเวียนของโลหิตจะไปมีผลต่อเอนไซม์ (cellular enzyme) ที่ช่วยในการเมตาบอลิซึม ทำให้เสียหายที่ในการทำงาน เกิดการเบื่ออาหาร ปลายประสาทอักเสบ แขนขาชาและอาจเป็นอัมพาตได้ สารหนูทำให้เกิดการระคายเคืองที่สมอง กระสับกระส่ายและความจำเสื่อม

### 3. ความเสียหายของดีเอ็นเอ (DNA damage)

DNA damage เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งมีอัตราการเกิดความเสียหายประมาณ 50,000-500,000 โมเลกุลต่อเซลล์ต่อวัน สามารถทำให้เกิดความผิดปกติต่อสิ่งมีชีวิต DNA damage เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในเซลล์ ซึ่งจะมีอัตราการเกิดความเสียหายประมาณ 50,000-500,000 โมเลกุลต่อเซลล์ต่อวัน สามารถทำให้เกิดความผิดปกติต่อสิ่งมีชีวิต โดยมีสาเหตุของการเกิด DNA damage แบ่งเป็น 2 ประเภท คือ (1) เกิดจากปัจจัยภายในเซลล์ (Endogenous damage) เนื่องจากมีอนุมูลอิสระ (reactive oxygen radical) ที่เป็นผลพลอยได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมภายในสิ่งมีชีวิต และ (2) เกิดจากปัจจัยต่างๆ ภายนอก

ร่างกายของสิ่งมีชีวิต (Exogenous damage) เช่น รังสี สารเคมี โลหะหรือยาบางชนิด (ตรีทิพย์, 2552)

ความเสียหายของดีเอ็นเอพบตั้งแต่ระดับยีน (ตารางที่ 1) ได้แก่ การจัดเรียงตัวของลำดับคู่กรด-เบสบนสาย DNA หรือเกิดการขาดของสาย DNA ทำให้เกิดเป็น micronucleus ความเสียหายที่เกิดขึ้นนี้สามารถตรวจสอบได้ในแต่ละระดับซึ่งขึ้นอยู่กับความสนใจ เช่น ตรวจการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีหรือระดับของเอนไซม์ ซึ่งเป็นผลมาจากการเกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม ดังนั้นจึงสามารถใช้สิ่งเหล่านั้นเป็นตัวบ่งชี้ (biomarker) ความเสียหายระดับพันธุกรรมที่เกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตได้

#### 4. Biomarker จำแนกเป็น 3 ชนิด คือ

**4.1 Biomarker of exposure** เป็นตัวบ่งชี้ถึงการรับเอาสารเคมีจากสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ร่างกาย สามารถตรวจหาสารเคมีนั้นๆ โดยตรง การตรวจทางชีวเคมีของปฏิกิริยาระหว่างร่างกายกับสารเคมี หรือผลผลิตจากปฏิกิริยาระหว่างสารเคมีหรือ metabolite ของสารเคมีกับเซลล์หรือโมเลกุลเป้าหมายในเซลล์ ซึ่งมีวิธีตรวจวัดจากตัวอย่างเลือด ปัสสาวะ หรือสารคัดหลั่งอื่นๆ ดังนั้น Biomarker of exposure จึงใช้เป็นตัวบ่งชี้หลังจากได้รับสารเคมีเข้าสู่ร่างกายแล้ว โดยปริมาณสารเคมีที่ตรวจพบจะลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณที่พบในสิ่งแวดล้อม เนื่องจากมีบางส่วนถูกขับออกจากร่างกายในรูปเดิม ส่วนที่เหลืออยู่ในร่างกายนั้นเรียกว่าเป็น internal dose และถูก metabolize โดยกลไกตามธรรมชาติของร่างกาย เนื่องจากร่างกายมีระบบป้องกันตัวเองจากสิ่งแปลกปลอม ทำให้สารเคมีบางส่วนเปลี่ยนสภาพไปเป็นสารเคมีที่ละลายน้ำได้มากขึ้นและถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะ แต่ก็ยังมีสารเคมีส่วนหนึ่งที่เปลี่ยนสภาพเป็นสารพิษเพิ่มขึ้น (biologically effective dose) เนื่องจากโดยสภาพทางเคมี มันได้กลายเป็นสารที่ไม่มีความเสถียรพร้อมที่จะไปทำปฏิกิริยากับสารโมเลกุลใหญ่ เช่น โปรตีน ไขมัน หรือ DNA หรือไปขัดขวางกระบวนการทำงานของภูมิคุ้มกันซึ่งการไปขัดขวางกระบวนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันถือว่าเป็นอันตรายต่อสุขภาพอย่างยิ่ง

**4.2 Biomarker of effect** การตอบสนองของร่างกายต่อสารพิษซึ่งอยู่ในรูปของการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมี สรีระวิทยา พฤติกรรม หรืออื่นๆ ที่เกิดขึ้นในร่างกายหลังจากที่รับสารเคมีนั้นเข้าสู่ร่างกายแล้ว เป็นผลให้เกิดโรคหรือความผิดปกติในร่างกาย โดยความเข้มข้นของสารเคมีที่ก่อให้เกิดพิษเป็น biologically effective dose

**4.3 Biomarker of susceptibility** เป็นตัวบ่งชี้ทางพันธุกรรมซึ่งจะมีผลต่อความไวของการเกิดพิษ ในประชากรบางกลุ่มอาจจะมีการกลายพันธุ์หรือความผิดปกติของ DNA (ตารางที่ 1)

ทำให้ขาดหรือลดประสิทธิภาพของเอ็นไซม์ที่ช่วยกำจัดสารพิษได้ ซึ่งจะนำไปสู่ความเสี่ยงสูงต่อการเกิดโรคมะเร็ง (Chen, 2005)

ตารางที่ 1 ระดับความเสียหายของ DNA ที่เกิดขึ้น

ระดับความเสียหาย	ผลที่เกิดขึ้น
Whole genome	Anueploidy
Chromosome level	Chromosome aberration
Base-sequence level	Point mutation
DNA-helix level	DNA lesions

ที่มา: Walum, E. and Jenssen, D. "Understanding Cell Toxicology: Principles and Practice" Ellis Horwood, Chichester (1990) : 203.

## 5. เทคนิคการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity)

การตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมีต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต (genotoxicity test) ซึ่งนับเป็นกลไกสำคัญประการหนึ่งของการป้องกันการเกิดมะเร็ง เพราะช่วยตรวจสอบได้ว่าสารตัวใดมีคุณสมบัติเป็นสารก่อกลายพันธุ์หรือสารก่อมะเร็ง ซึ่งเป็นการลดอัตราเสี่ยงของการนำสารก่อมะเร็งเข้าสู่ร่างกาย อีกทั้งการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่มีฤทธิ์ต่อ DNA นี้ได้ถูกกำหนดให้เป็นการทดสอบสากลสำหรับการวิจัยและพัฒนาเพื่อประเมินความปลอดภัยของยาก่อนนำไปใช้ทดลองในมนุษย์ (clinical trial) การทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้รับการยอมรับและระบุไว้ในมาตรฐานสากลนานาชาติ เช่น Organisation for Economic Co-operation and Development (OECD) แห่งกลุ่มสหภาพยุโรป, องค์การอนามัยโลก (World Health Organization, WHO) และองค์การพิทักษ์สิ่งแวดล้อมแห่งสหรัฐอเมริกา (United States Environmental Protection Agency, U.S. EPA) ซึ่งมีเทคนิควิธีที่ตรวจหลากหลาย เช่น เทคนิค Micronucleus test, Comet assay, Chromosome aberration, Fluorescence in situ hybridization (FISH), sister chromatid exchange. (SCE) เป็นต้น ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับความเหมาะสมของการนำไปใช้ รวมถึงประสิทธิภาพของเทคนิคด้วย

เทคนิค Micronucleus test และเทคนิค Comet assay เป็นเทคนิคหนึ่งที่เป็นที่ยอมรับในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต โดย U.S. EPA (2002) และ OECD (1997) ได้ยอมรับว่าเทคนิคดังกล่าวว่าเป็น standard method เนื่องจากเทคนิคดังกล่าวมีขั้นตอน ในการ

ตรวจสอบง่ายและมีความไวในการตรวจสอบสารเคมีที่ทำให้เกิดความเสียหายต่อสารพันธุกรรมได้ (Al-sabti, 1995; Frenzilli, 2009)

### 5.1 Micronucleus test

Micronucleus test เป็นวิธีประเมินความเสียหายเกิดจากความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration) หรือชิ้นส่วนของโครโมโซมที่เกิดการแตกหักในระหว่างการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสในระยะเมทาเฟสถึงระยะแอนาเฟส (Al-sabti, 1995) หลังจากโครโมโซมได้รับความเสียหายและไม่สามารถรวมตัวเป็น daughter nuclei ได้ จึงเป็นชิ้นส่วนโครโมโซมขนาดเล็กเกิดรอบๆ เยื่อหุ้มนิวเคลียส (Udroiu, 2006) เมื่อสารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเข้าสู่เซลล์แล้ว จะทำให้สาย DNA ขาด เกิดเป็นชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักอยู่ในไซโตพลาสซึม เมื่อถึงการแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟส โครโมโซมจะถูกดึงเข้าสู่ที่ขั้วเซลล์ ชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักจะไม่ถูกดึงเนื่องจากไม่มีเซนโทรเมียร์ จึงเกิดเป็น micronucleus (รูปที่ 4) ที่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลักอยู่ในเซลล์ (Fenech, 2006) นอกจากจะเกิดไมโครนิวเคลียสแล้ว เซลล์ที่ได้รับสารเคมีที่มีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมแล้ว ยังสามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติอย่างอื่น ๆ ในกระบวนการแบ่งเซลล์ เช่น การเกิด apoptosis และ necrosis (รูปที่ 5)

1. 

Excision of adduct and inhibition of gap-filling by ARA results in SSB

2. 

Conversion of SSB to DSB following replicative DNA synthesis

3. 

DSB expressed as chromatid break

4. 

Lagging chromatid break expressed as micronucleus

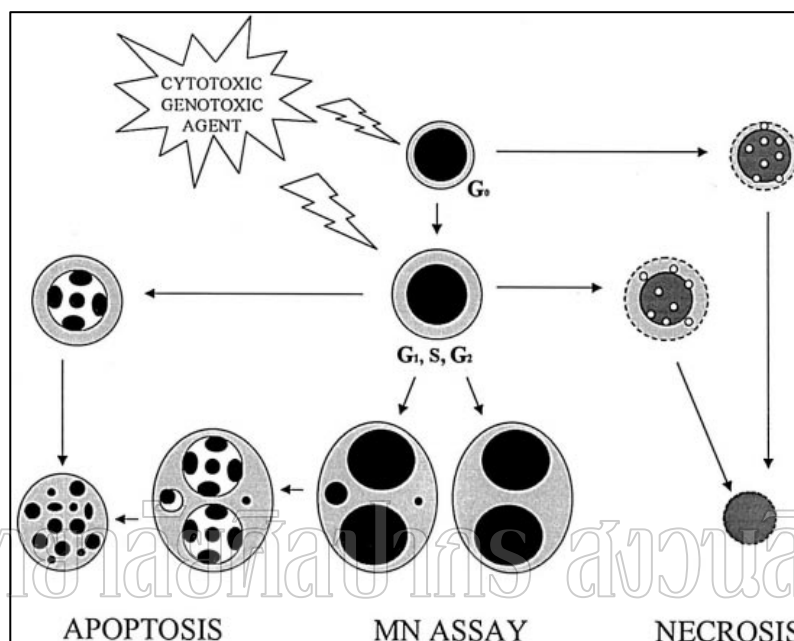
5. 

รูปที่ 4 กลไกการเกิดความผิดปกติของ DNA ในระหว่างการแบ่งเซลล์

ที่มา: Fenech, M. "Cytokinesis-block micronucleus assay involves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death." *Mutat. Res.* 600 (2006): 58-66.

(ARA = arabinoside, SSB = single strand break, DSB = double strand break)

Micronucleus test เป็นเทคนิคที่มีความไวในการตรวจสอบหาความสัมพัทธ์ของสารที่สามารถทำลายสารพันธุกรรมที่ความเข้มข้นต่ำ ซึ่งสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ทำให้โครโมโซมเกิดการแตกหัก (clastogen) หรือสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ในพืช สัตว์ และเซลล์เพาะเลี้ยงเพื่อใช้เป็น bioindicator บอกความเป็นพิษระดับทำลายสารพันธุกรรมของสารที่นำมาทดสอบได้ (Fenech, 2000)

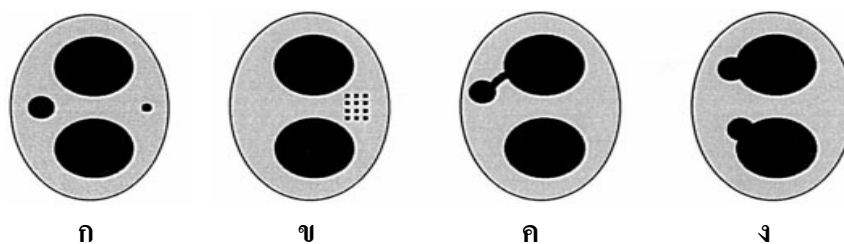


รูปที่ 5 กลไกการชักนำให้เกิด Micronucleus, apoptosis และ necrosis ในเซลล์เพาะเลี้ยง

ที่มา: Fenech, M. "In vitro micronucleus technique." *Mutation Research*. 435 (2000): 81-95.

เกณฑ์การนับจำนวน MN ซึ่งเสนอโดย Carrasso (1990) และ Fenech (2000) เพื่อให้ นักวิจัยใช้เกณฑ์เดียวกัน และสามารถเปรียบเทียบผลการศึกษามีประสิทธิภาพ โดยใช้เกณฑ์ 3 ข้อ (รูปที่ 6) คือ

1. มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของไมโครนิวเคลียสประมาณ 1/9-1/3 ของนิวเคลียสหลัก
2. ตำแหน่งของไมโครนิวเคลียสจะต้องไม่ติดกับนิวเคลียสหลัก
3. ตำแหน่งของไมโครนิวเคลียสจะต้องอยู่ในไซโตพลาสซึม ไม่มีการซ้อนทับกับ นิวเคลียสหลัก และล้อมติดสีเข้มระดับเดียวกัน



รูปที่ 6 ลักษณะของไมโครนิวเคลียสที่พบในเซลล์เพาะเลี้ยง (ก) ไมโครนิวเคลียส และ (ข-ง) โครงสร้างในไซโทพลาสซึมที่ไม่นับเป็นไมโครนิวเคลียส

ที่มา: Fenech, M. "In vitro micronucleus technique." *Mutation Research*. 435 (2000): 81-95.

การศึกษาความเป็นพิษของสารเคมียังสามารถตรวจพบความผิดปกติของนิวเคลียส บางลักษณะ ตามที่ Carrasso (1990) และ Cavas and Ergene-Gözükar (2005) ได้ศึกษาและจำแนก ความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเยื่อหุ้มนิวเคลียสไว้ ดังนี้ (รูปที่ 7)

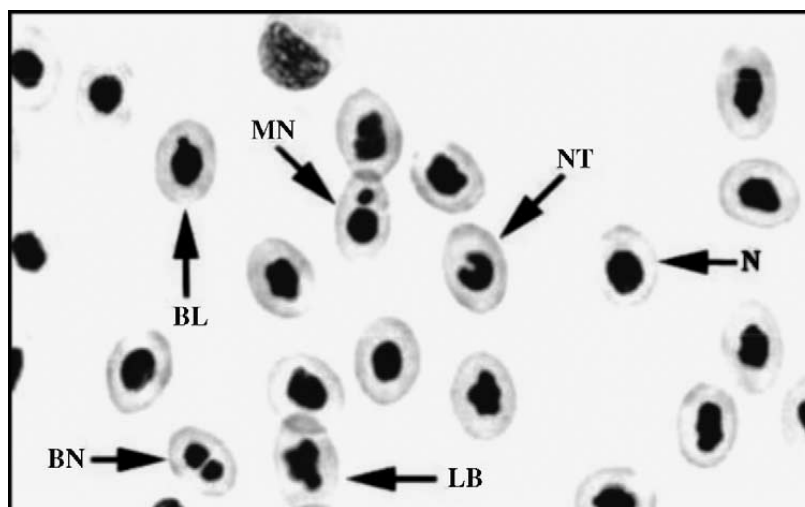
1. Blebbed nucleus คือ นิวเคลียสที่มีเยื่อหุ้มนิวเคลียสลักษณะล้อมรอบด้วยโครงสร้าง คล้ายฟองอากาศที่มีรูปร่างเหมือน dumbbell โดยมี heterochromatin อยู่ตรงกลางหรือเป็นลักษณะที่ เกิดฟองก๊าซรอบนิวเคลียส

2. Notched nucleus คือ นิวเคลียสที่มีลักษณะการเว้าลึกเข้าไปด้านในของเยื่อหุ้ม นิวเคลียส เกิดขึ้นเนื่องจากไม่มีสารพันธุกรรมและถูกล้อมรอบด้วยเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear envelope)

3. Lobed nucleus คือ นิวเคลียสที่มีลักษณะคล้าย micronucleus แต่อยู่ติดกับเยื่อหุ้ม นิวเคลียสคล้ายเป็นดั่งปูดออกมา โดยมี 1 หรือมากกว่า 1 ภายในมี euchromatin หรือ heterochromatin ที่มีสีเข้ม มีรูปร่างเหมือนก้านยื่นออกมาด้านนอก หรือปูดออกไปของเยื่อหุ้ม นิวเคลียส

4. Vacuolated nucleus คือ นิวเคลียสที่มีฟองอากาศใส ไม่ติดสี ซึ่งมีรูปร่างไม่แน่นอน และไม่มีสารพันธุกรรมอยู่ภายใน

5. Binucleus คือ เซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส ซึ่งมีขนาดเท่ากันและย้อมติดสีเข้มระดับเดียวกัน



รูปที่ 7 ลักษณะของ MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลา

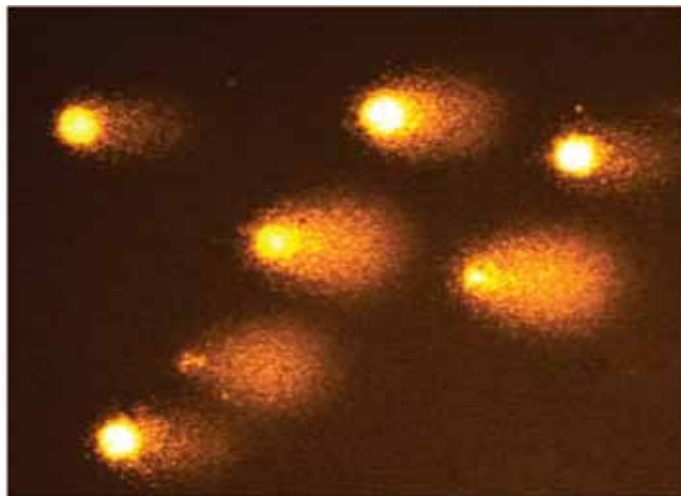
*Oreochromis niloticus*; micronucleus (MN), binucleated cell (BN), normal cell (N), blebbed nucleus (BL), lobed nucleus (LB) และ notched nucleus (NT)

ที่มา: Cavas, T. and Ergene-Gozukara, S. "Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalotrin using nuclear and nucleolar biomarker on fish cell." *Mutat. Res.* 534 (2003): 264-271.

### 5.2 Comet assay

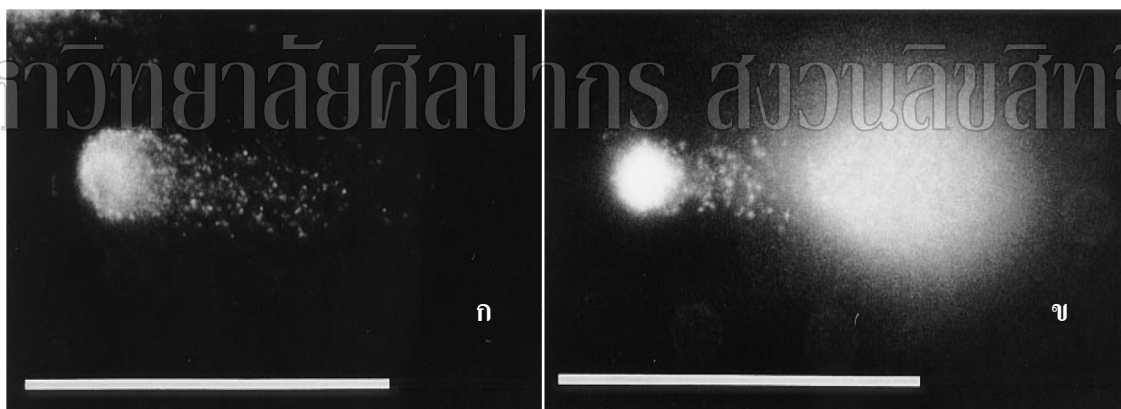
Comet assay หรือ Single cell gel electrophoresis (SCGE) หรือ microgel เป็นวิธีที่พัฒนาโดย N.P. Singh ในปี 1984 เพื่อใช้ตรวจวัดความเสียหายของ single strand และ double strand DNA ที่แตกหัก เนื่องจากการเกิด DNA damage แต่ละเซลล์สามารถที่จะตรวจสอบความเสียหายได้โดยตรวจสอบระยะทางที่สาร DNA ที่แตกหักเคลื่อนที่ออกไปจากนิวเคลียสหลัก (Helma, 2000; Collins, 2004; Gabbianelli, 2006) ผลที่ได้จากการวิเคราะห์รูปที่ได้มีลักษณะคล้ายดาวหาง แบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนหัวและหาง โดยบริเวณหางเป็นส่วนหนึ่งของ DNA ที่เกิดความเสียหาย (รูปที่ 8) ประโยชน์ของเทคนิค comet assay คือ (1) สามารถตรวจความเสียหายของ DNA ในแต่ละเซลล์จึงมีข้อมูลที่สมบูรณ์เพื่อวิเคราะห์ผลทางสถิติ (2) ใช้ตัวอย่างเซลล์จำนวนน้อยต่อหนึ่งตัวอย่าง (< 10,000 เซลล์) (3) มีความไวในการตรวจหา DNA ที่เสียหาย ทั้งนี้ไม่นับรวมเซลล์ DNA ที่เสียหายจากกระบวนการ necrosis และ apoptosis ซึ่งเซลล์ที่ DNA เสียหายจาก necrosis จะมี DNA ที่ส่วนหัวและหางอยู่ห่างจากกันมาก (รูปที่ 9) (Collins, 2004)





รูปที่ 8 ดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายมีลักษณะคล้ายดาวหาง

ที่มา: Wong, Vincy W.C. et al. "THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research" *Current Topics in Nutraceutical Research*. 3 (2005): 1-14.



รูปที่ 9 ดีเอ็นเอของเซลล์ cardiomyocytes ของหนู ซึ่งเกิดความเสียหายจาก  $H_2O_2$

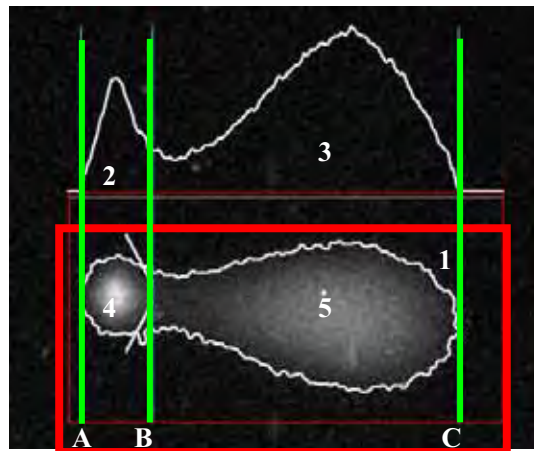
(ก) necrosis cell (ข) apoptosis cell

ที่มา: Krown K A. et al. "Tumor Necrosis Factor Alpha-induced Apoptosis in Cardiac Myocytes" *J. Clin. Invest* 98, 12 (1996): 2854–2865.

#### การวิเคราะห์ภาพจากเทคนิค Comet assay

การวิเคราะห์ภาพ Comet assay ซึ่งผู้วิจัยเลือกใช้โปรแกรม LUCIA Comet Assay ซึ่งมีรายละเอียดในการวิเคราะห์ ดังนี้

### 1. ส่วนประกอบต่างๆ ของ comet



1. วัด Integrated intensity
2. วัด Head DNA [%]
3. วัด Tail DNA [%]
4. วัด Head radius
5. วัด Tail length

รูปที่ 10 ความเสียหายของ DNA ที่ได้จากเทคนิค Comet assay เมื่อวัดผลด้วยโปรแกรม LUCIA Comet assay (ก) กราฟ histogram วัดปริมาณ DNA และ (ข) ภาพ DNA ของ 1 เซลล์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์

ที่มา: LUCIA Comet Assay. [Online], Accessed 25 April 2010. Available from

[http://www.lbtcn.com/ranseti/CONENT/PRODUCT/PRODUCT2/product\\_1/download/Comet%20Assay.pdf](http://www.lbtcn.com/ranseti/CONENT/PRODUCT/PRODUCT2/product_1/download/Comet%20Assay.pdf)

### 2. พารามิเตอร์ที่วัดด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay

2.1 Integrated intensity (II) คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงปล่อยออกมาจาก DNA ซึ่งย้อมด้วย EtBr จึงวัดค่าความเข้มของแสงจาก DNA ทั้งหมดของเซลล์ 1 เซลล์ (รูปที่ 10 หมายเลข 1)

$$\text{Integrated intensity (II)} = I_H + I_T$$

$$\text{โดยที่ } I_H = f_{\text{Head area}} \text{ idA}$$

$$I_T = f_{\text{Tail area}} \text{ idA}$$

$f_{\text{Head area}} \text{ idA}$  = ผลรวมค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงปล่อยออกมาจากส่วนหัวของ comet

$f_{\text{Tail area}} \text{ idA}$  = ผลรวมค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงปล่อยออกมาจากส่วนหางของ comet

2.2 Head DNA [%] คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เรืองแสงออกมาจาก DNA ที่อยู่ในนิวเคลียสซึ่งเป็นส่วนหัวของ comet เป็น DNA ที่ไม่ถูกทำลายให้ขาดออกเป็นชิ้นเล็กๆ เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 10 หมายเลข 2)

$$\text{Head DNA [\%]} = [I_H / II] \times 100$$

2.3 Tail DNA [%] คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เรืองแสงออกมาจาก DNA ที่เกิดความเสียหายในส่วน comet tail และอยู่ทางขวาของนิวเคลียสเมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 10 หมายเลข 3)

$$\text{Tail DNA [\%]} = [I_T / II] \times 100$$

2.4 Head radius คือ รัศมีของนิวเคลียสซึ่งเป็นส่วนของ DNA ที่ไม่เกิดความเสียหาย พบที่ส่วนหัวของ comet เท่ากับความยาวครึ่งหนึ่งของระยะจาก A ถึง B (รูปที่ 10 หมายเลข 4) มีหน่วยเป็น ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ )

2.5 Tail length คือ ความยาวของส่วนหางของ comet เป็นระยะทางที่ DNA ซึ่งเสียหายและขาดออกเป็นชิ้นเล็กๆ เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสไปตามกระแสไฟฟ้า เท่ากับระยะระหว่าง B ถึง C เป็น parameter ที่ขึ้นอยู่กับวิธีการวัดเป็นอย่างมากจึงต้องระมัดระวังในการวัด (รูปที่ 10 หมายเลข 5) มีหน่วยเป็น ไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ )

2.6 Tail moment คือ ค่าตัวเลขที่ได้จากการคำนวณระหว่าง tail length คูณกับ tail DNA [%]

$$\text{Tail moment} = \text{Tail length} \times \text{Tail DNA [\%]}$$

2.7 Olive moment คือ ค่าที่ได้จากผลของระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางจากส่วนหัวและหาง กับ tail DNA [%]



รูปที่ 11 เปรียบเทียบเซลล์ที่เกิด DNA เสียหายระดับต่างกัน (ก) เซลล์ที่ไม่เกิด DNA damage

(ข) เซลล์ที่เกิด DNA damage ปานกลาง และ (ค) เซลล์ที่เกิด DNA damage มาก

ที่มา: The Comet Assay. [Online], Accessed 25 April 2010. Available from

<http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetsCometAssay.pdf>

## 6. การศึกษาความเป็นพิษของ $\text{NaAsO}_2$ และ $\text{CdCl}_2$

### 6.1 การศึกษาสอบความเป็นพิษของ $\text{NaAsO}_2$ ในสัตว์ทดลอง

Abernathy และคณะ (1999) รายงานกลไกของสารหนูว่า สารหนูไม่สามารถจับกับ DNA โดยตรงในการก่อกลายพันธุ์ของยีน ยกเว้นสารหนูที่ความเข้มข้นสูง อย่างไรก็ตามสารหนูมีผลต่อการเพิ่มจำนวนยีนและความเสียหายต่อโครโมโซมที่ความเข้มข้นต่ำ และสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้สูงขึ้นเมื่อเสริมฤทธิ์กับสารอื่นๆ สารหนูไปยับยั้งการทำงานของ DNA repair เนื่องจากยังไม่มี DNA repair enzyme ในการยับยั้งการทำงานของ arsenite ได้ เพราะ arsenite มีโครงสร้างคล้ายกับ DNA repair enzyme นอกจากนี้ arsenite ทำให้โครโมโซมมีจำนวนผิดปกติ โดยเพิ่มหรือลดเพียงบางโครโมโซม (aneuploidy) โดยกลไกของ arsenite ไม่ได้ยับยั้งการเกิด spindle fiber แต่รบกวนองค์ประกอบของ spindle fiber ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิด microtubule polymerization

Kamrin และคณะ (1997) รายงานการจำแนกความเป็นพิษเฉียบพลันของสารต่อปลาและสัตว์น้ำชนิดต่างๆ โดยดูจากค่า lethal concentrations ( $\text{LC}_{50}$ ) หรือความเข้มข้นที่ทำให้สัตว์ตายร้อยละ 50 ในช่วงเวลาที่กำหนด ซึ่งสามารถจำแนกความเป็นพิษได้ดังนี้

Toxicity Category	Birds acute oral $\text{LD}_{50}$ (mg/L)	Bird dietary $\text{LC}_{50}$ (mg/L)	Fish water $\text{LC}_{50}$ (mg/L)
Very highly toxic	<10	<50	<0.1
Highly toxic	10-50	50-500	0.1-1
Moderately toxic	>50-500	>500-1,000	>1-10
Slightly toxic	>500-2,000	>1,000-5,000	>10-100
Practically nontoxic	>2,000	>5,000	>100

Barchowsky และคณะ (1999) ศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ในเซลล์ endothelial cells ที่เพาะเลี้ยงจากหลอดเลือดแดงใหญ่ของหมู พบว่าการกระตุ้นให้เกิดอนุมูลอิสระปริมาณต่ำๆ เป็นกลไกแรกเริ่มเมื่อเซลล์เยื่อผิวได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  โดยที่ความเข้มข้น  $\leq 5 \mu\text{M/L}$  และอนุมูลอิสระไม่ทำลายเซลล์และก่อให้เกิดความเครียดต่อเซลล์ แต่ทำให้เกิด tyrosine kinase signaling cascade กระตุ้น transcription เช่น transcription factor NF- $\kappa\text{B}$  ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมรหัสของ DNA และส่งเสริมการแบ่งเพิ่มจำนวนเซลล์ตามระยะเวลาที่ได้รับสาร ผลการทดลองชี้ชัดว่าระดับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ไปกระตุ้น signaling pathways ที่เกี่ยวข้องกับการเกิดความเครียดและการตายของเซลล์ โดยอนุมูลอิสระชนิดแรกที่เซลล์ถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นในปริมาณไม่ได้สูงมาก คือ  $\text{H}_2\text{O}_2$

แต่  $\text{NaAsO}_2$  ไปมีบทบาทต่อการควบคุมหรือการกระตุ้นกลไกที่เกี่ยวข้องกับเกิดอนุมูลอิสระของเซลล์ จึงไม่มีผลให้เซลล์ตายด้วยความเครียดออกซิเดชัน แต่  $\text{NaAsO}_2$  ไปส่งเสริมให้เกิดโรคของเส้นเลือดหัวใจ พบว่าความเข้มข้นสูง ( $>50-100 \mu\text{M/L}$ ) มีผลต่อการตายของเซลล์ แต่ไม่พบเซลล์ตายในกลุ่มที่ได้รับความเข้มข้นต่ำ คือ  $5 \mu\text{M/L}$  จึงเสนอว่า  $\text{NaAsO}_2$  สามารถกระตุ้นให้เกิด oxidant-sensitive regulation ต่อการทำงานของเซลล์ได้มากกว่าการเป็นพิษต่อเซลล์โดยตรง

Siminova และคณะ (2001) ศึกษาความสัมพันธ์ของการได้รับสารหนูกับการทำงานของโปรตีน (AP)-1 DNA-binding ซึ่งเป็น cancer precursor marker ในเซลล์กระเพาะปัสสาวะหนูที่ได้รับสารหนูจากน้ำดื่มและตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อทางจุลพยาธิวิทยาและปริมาณสารหนูในเนื้อเยื่อ ด้วยเทคนิค Nuclear extracts and electrophoresis mobility-shift assay (EMSA) ผลการศึกษาหลักฐานทางระบาดวิทยาและกลไกของสารหนูในการก่อมะเร็ง มีข้อโต้แย้งของการใช้โมเดลในการคำนวณด้านความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของสารหนูกับความเสี่ยงของการก่อมะเร็ง โดยพบว่าความเสี่ยงจะไม่สัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงความเข้มข้นต่ำ แต่จะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นในความเข้มข้นสูง การศึกษานี้พบว่ามีความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นของสารหนูกับ cancer precursor marker เช่น การกระตุ้นกิจกรรมการจับกันของโปรตีน (AP)-1 DNA-binding ในกระเพาะปัสสาวะของหนูเม้าส์ที่ดื่มน้ำปนเปื้อน  $\text{NaAsO}_2$  ผลการทดลองพบว่ามีกิจกรรมของ AP-1 น้อยในหนูกลุ่มที่ตรวจไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาในเซลล์เยื่อบุผิวหรือตรวจพบสารหนูสะสมในเนื้อเยื่อ แต่จะพบการจับกันของ AP-1 DNA binding มากในกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$   $20 \mu\text{g/ml}$  โดยพบทั้งการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาและการสะสมสารหนูในเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะปัสสาวะ ถึงแม้จะไม่สามารถสรุปเชิงสถิติเป็น โมเดลด้านความสัมพันธ์เชิงเส้นของความเข้มข้นของสารหนู แต่ก็พบความสัมพันธ์ที่สอดคล้องกับงานวิจัยที่เสนอทฤษฎีความสัมพันธ์เชิงโมเดลระหว่างความเข้มข้นของสารหนูกับการชักนำให้เกิดมะเร็งแบบไม่มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกัน

Roy และคณะ (2002) รายงานว่าสารหนูอนินทรีย์นับเป็นสารก่อมะเร็งที่มีศักยภาพสูงชนิดหนึ่งในคน โดยคนได้รับผ่านการปนเปื้อนในดิน น้ำ อากาศและอาหาร เมตาบอลิซึมของสารหนูอนินทรีย์ถูก methylate เปลี่ยนเป็น monomethylarsonic acid และเกิดเป็น dimethylarsinic acid จึงขับออกทางปัสสาวะ ดังนั้นผู้ที่ได้รับสารหนูอาจเกิด DNA hypomethylation เนื่องจากมีการขับ methyl ออกไปกับปัสสาวะอย่างต่อเนื่อง จึงส่งเสริมให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติ (aberrant gene expression) ถึงแม้จะเป็นสารหนูจะไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยตรงก็ตาม (nonmutagenic agent) แต่มันสามารถมีปฏิกิริยาเสริมกันกับ genotoxic agents ทำให้เกิดการกลายพันธุ์และชักนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมและการแบ่งเซลล์ได้

Li และคณะ (2003) ศึกษาชนิดของสารหนู ในอาหารทะเลในประเทศจีน ได้แก่ สาหร่าย สีนํ้าตาล สาหร่ายสีแดง ปลา ปู กุ้ง หอย หอยนางรมและหอยกาบ โดยตรวจหาสารหนูในเนื้อเยื่อ ด้วยวิธี Anion and cation exchange high performance liquid chromatograph (HPLC) ร่วมกับ Inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) พบว่า สารหนูในปลาและหอยเท่ากับ 0.086-7.54 mg/g ww และตรวจพบ Arseno-sugar ทุกตัวอย่างของปลาและหอย 0.025-6.604 mg/g ww แต่พบ Inorganic Arsenic ในปลาและหอยพบสารหนูต่ำกว่า 2% ส่วนในสาหร่ายไม่พบ สารหนู

Liao และคณะ (2003) ศึกษา acute toxicity และ bioaccumulation ของสารหนูรวมใน ปลานิล (*Oreochromis mossambicus*) จากบริเวณที่พบโรค black foot ในประเทศไต้หวัน พบว่าค่า  $LC_{50}$  ของสารหนูที่เป็นพิษต่อปลานิลที่เวลา 24 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 600 และ 28.68 mg/L ตามลำดับ และเมื่อใช้ Atomic absorption spectrometer ตรวจการสะสมของสารหนูรวมในเนื้อเยื่อ พบสารหนูในลำไส้มากกว่า กระเพาะ ตับ เหงือกและเนื้อปลาตามลำดับ

Amlund และ Berntssen (2004) ศึกษาอาร์เซโนบีเทน (arsenobetain ;  $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$ ) ในปลาแอตแลนติกแซลมอน (*Salmo salar* L.) เนื่องจาก atlantic salmon เป็น ปลา 2 น้ำคือ ถูกปลาเกิดในน้ำจืดและเมื่อถูกปลาเจริญเข้าสู่ระยะ smolt จะออกจากน้ำจืดเข้าสู่ทะเล แลบบมหาสมุทรแอตแลนติก ผู้วิจัยเปรียบเทียบระหว่างการที่ปลาในน้ำจืดได้รับ  $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$  ผสมกับอาหารมีความเข้มข้น  $1.23 \pm 0.08 \mu\text{g/L}$  weight ส่วนกลุ่มที่เลี้ยงใน น้ำทะเลได้รับ  $0.99 \pm 0.10 \mu\text{g/L}$  weight ทดสอบเป็นเวลา 1.5, 3, 6, 12, 44 และ 144 ชั่วโมง แล้ววัด  $Na^+/K^+$  ATPase activity และการสะสม  $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$  ในเลือดและกล้ามเนื้อปลา พบว่า atlantic salmon ที่เลี้ยงด้วยน้ำจืดและน้ำทะเลมีการดูดซับสารบริเวณลำไส้หลังจากได้รับสาร 6 ชั่วโมง โดยกลุ่มที่เลี้ยงด้วยน้ำทะเลมีการสะสม  $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$  ในเลือดสูงกว่ากลุ่มที่เลี้ยง ในน้ำจืด ( $P < 0.05$ ) เท่ากับ  $1.8 \pm 0.4$  และ  $0.9 \pm 0.2 \mu\text{g}$  ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าทั้งกลุ่มที่เลี้ยง ด้วยน้ำจืดและน้ำทะเล มีการสะสม  $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$  ในกล้ามเนื้อเท่ากับ 0.08 และ 0.104  $\mu\text{g}$  ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่าความเค็มของน้ำทะเลไม่มีอิทธิพลต่อการสะสม  $(CH_3)_3As^+CH_2COO^-$  ใน กล้ามเนื้อของปลากระดุกแข็ง

Das และคณะ (2004) สุ่มเก็บตัวอย่าง 100 ตัวอย่าง ข้าว ผัก และปลา รวมทั้งเก็บตัวอย่าง น้ำและดินจาก Kahua และ Hajiganj ในมณฑล Chandpur, Sharishabari, Jamalpur ประเทศ บังกลาเทศ เพื่อศึกษาความเป็นพิษของสารหนู และตรวจด้วย atomic absorption spectrophotometry พบว่า ความเข้มข้นของสารหนูในน้ำจากท่อส่งน้ำ เท่ากับ  $0.52 \pm 0.21 \text{ mg/L}$  ซึ่งสูงเกินค่ามาตรฐานของ WHO และมาตรฐานของบังกลาเทศที่กำหนด คือ 0.01 และ 0.05 mg/L

ตามลำดับ ในเขตมณฑล Kahua Upazila พบสารหนูในดิน  $15.68 \pm 6.59$  mg/L ซึ่งสูงกว่าค่าเฉลี่ยของสารหนูที่มีอยู่ในดินจากทั่วโลก คือ 10 mg/L พบสารหนูในข้าว ราก และลำต้น เฉลี่ย 0.27, 1.58 และ 9.71 mg/L ตามลำดับ ส่วนตัวอย่างของมณฑล Kahua Upazila พบสารหนูในผักบุงจิ้น (*Ipomoea reptans*) เฉลี่ย 0.68 mg/L ในปลา (*Phicephalus punctatus*) พบสารหนู 0.02-0.04 mg/L

บุญมี และคณะ (2548) ศึกษาปริมาณของโลหะหนักคือทองแดง โครเมียม แคดเมียม ตะกั่วและสารหนู ในเนื้อปลาลิ้นหมา (*Cynoglossus bilineatus*) ที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณสะพานปลาแหลมฉบังระหว่างเดือนกันยายนถึงเดือนพฤศจิกายน 2546 พบปริมาณความเข้มข้นเฉลี่ยของทองแดง โครเมียม แคดเมียม ตะกั่วและสารหนู อยู่ในช่วง 5.5297-13.0968, 1.0034-3.1244, 0.0862-1.3302, 0.2020-3.0786 และ 0.6635-0.8446  $\mu\text{g/g}$  ww และพบว่ามีตะกั่วและสารหนูสูงกว่ามาตรฐานที่อนุญาตให้มีได้ในอาหารทะเลตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข (2529)

วรารักษ์ และคณะ (2548) ได้พัฒนาวิธีการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารหนูในปลา โดยใช้วิธีการสกัดด้วยตัวทำละลายแล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย HPLC/ICP-OES พบว่าตัวสกัดที่เป็นสารผสมระหว่างเมทานอลกับน้ำอัตราส่วน 3:1 สามารถสกัดสารหนูจากเนื้อปลาได้สูงถึง 91.6% สามารถแยกสารประกอบสารหนูได้ 3 ชนิด คือ arsenobetaine (AsB), monomethylarsonic acid (MAs) และสารหนูอนินทรีย์ได้อย่างสมบูรณ์ภายในเวลา 15 นาที การทดสอบประสิทธิภาพของวิธีการวิเคราะห์ด้วยวัสดุคืบที่ได้รับการรับรองแล้วชนิด DORM-2 ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อปลาลิ้นหมา และพบว่าประสิทธิภาพการวิเคราะห์เท่ากับ 86.9% ซึ่งให้เห็นว่าวิธีวิเคราะห์ที่พัฒนาได้สามารถนำไปวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของสารหนูในปลาขึ้นอย่างมีประสิทธิภาพ

Otero และคณะ (2005) ตรวจสอบโลหะหนัก 8 ชนิด คือ โครเมียม (Cr), สังกะสี (Zn), แคดเมียม (Cd), ตะกั่ว (Pb), นิกเกิล (Ni), สารหนู (As),ปรอท (Hg) และ ทองแดง (Cu) ในหอย 2 ฝา พบ Cr และ Zn สูง ซึ่งอาจจะถูกทิ้งมาจากโรงงานฟอกหนังสัตว์และในตะกอนดินพบ Cd และ Pb สูงด้วย โลหะหนักที่พบสูงเหล่านี้จะพบรวมตัวกับคาร์บอเนต เกิดเป็นชั้นทับถมกัน ส่วน Ni นั้นพบว่ามีค่าการเกิด pyritization ที่สูงกว่าธาตุอื่นๆ ส่วน As, Hg และ Cu พบว่ามีการปล่อยออกมามากผ่านกระบวนการออกซิเดชันของโลหะซัลไฟด์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำทะเลทำให้เกิดความเป็นพิษ และผลที่ตามมาคือเพิ่มอัตราเสี่ยงของผลที่จะเกิดกับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในทะเล

Oresacnin และคณะ (2006) ตรวจสอบการปนเปื้อนโลหะหนักและสารหนูในพื้นที่ชายฝั่งตะวันออกเฉียงของ Adriatic Sea ตอนกลาง โดยใช้หอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) โดยเก็บตัวอย่างจาก 6 จุด ในเดือนตุลาคม ปี ค.ศ. 2003 และปี ค.ศ. 2004 กับ เดือนเมษายน ปี ค.ศ. 2004 และ ปี ค.ศ. 2005 มาตรวจสอบด้วย excited Energy Dispersive X-ray Fluorescence Method (EDXRF) วัดความเข้มข้นของ Pb, As, Cr, Mn, Fe, Ni, Cu และ Zn ได้ 2-7, 4-30, 1.29, 2-13,

53.4-719, 0.8-5, 3.7-11.1 และ 59.1-273 mg/L ตามลำดับ พบว่าค่าสูงสุดส่วนใหญ่ตรวจพบในตัวอย่างจาก Vranjic region และพบว่า As, Fe และ Zn วัดได้ความเข้มข้นสูงในช่วงฤดูใบไม้ผลิอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ )

Ahmed และคณะ (2008) ศึกษาความเป็นพิษของสารหนูต่อปลาน้ำจืด spotted snakehead (*Channa punctatus*, Bloch) ในประเทศบังกลาเทศ โดยปลาได้รับ sodium arsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ) 0.5, 1 และ 2 mM พบว่าปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้น 2 mM ตายภายใน 2 ชั่วโมง 30 นาที ส่วนความเข้มข้น 1 และ 0.5 mM นั้นพบว่าปลาตายหลังทดสอบ 5 และ 18 ชั่วโมง ตามลำดับ เมื่อนำเซลล์ตับปลามาวิเคราะห์ด้วย Trypan blue dye exclusion พบว่าที่ความเข้มข้น 1 mM และ 2 mM เซลล์มีชีวิตรอดลดลง 68% และ 38% ตามลำดับ ส่วนที่ความเข้มข้น 0.5 mM ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อวิเคราะห์ DNA ด้วย gel electrophoresis และพบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้เซลล์ตับปลาเกิดการตายแบบ apoptosis ซึ่งกระบวนการนี้มีความเกี่ยวข้องกับการเกิด DNA fragment

Akter และคณะ (2008) ศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของ  $\text{NaAsO}_2$  และ  $\text{HgCl}_2$  ต่อปลาหมอ (*Anabas testudineus*) เพื่อความเข้มข้นของสารที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ( $\text{LC}_{50}$ ) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยเปลี่ยนน้ำทุกวัน เพื่อลดการเกิดของเสียในน้ำ พบว่าค่า  $96\text{h-LC}_{50}$  ของ  $\text{NaAsO}_2$  และ  $\text{HgCl}_2$  เท่ากับ 18.211 และ 0.606 mg/L ตามลำดับ ( $P < 0.05$ )

Ninh และคณะ (2008) ศึกษาการสะสมสารประกอบของสารหนูในดอกไม้ทะเล (sea anemones) 7 สายพันธุ์ คือ *Anthopleura asiatica*, *Actinia equine*, *Actinodendron arboretum*, *Phymanthus loligo*, *Entacmaea actinostoloides*, *Stichodactyla gigantean*, *Stichodactyla haddoni*, *Stichodactyla mertensii* และ *Metridium senile* ด้วยเทคนิค LC/ESI-MS พบว่า ดอกไม้ทะเลทุกสายพันธุ์มีสารหนูปนเปื้อน 4 ชนิด คือ arsenobetaine (AB), arsenocholine (AC), trimethylarsoni propionate และ tetramethylarsonium ion (TEMA) นอกจากนี้ยังพบสารหนูในรูปแบบของ arsenate, methylarsonic acid, dimethylarsinic acid และ trimethylarsine oxide ในดอกไม้ทะเล 3 สายพันธุ์ คือ *S. gigantean*, *S. haddoni* และ *M. senile* พบการสะสมสารประกอบสารหนูในรูปแบบ AC ในดอกไม้ทะเลสายพันธุ์ *A. arboretum* และ *P. loligo* และสายพันธุ์ *A. asiatica*, *A. equine*, *E. actinostoloides* และ *S. mertensii* พบการสะสมสารประกอบสารหนูในรูปแบบ TEMA ในสัดส่วนที่สูงเมื่อเปรียบเทียบกับสารประกอบสารหนูที่ละลายในน้ำ (24.6-87.1%) แสดงให้เห็นว่าดอกไม้ทะเลแต่ละสายพันธุ์สามารถสะสมสารหนูในรูปแบบที่แตกต่างกัน

Palaniappan และ Vijayasundaram (2008) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทุติยภูมิของโปรตีนในกล้ามเนื้อปลาคาร์พ (*Labeo rohita*) ที่ได้รับสาร Arsenic trioxide ( $\text{As}_2\text{O}_3$ ) เข้มข้น



41.5 mg/L เป็นเวลา 14 วัน (sub-acute exposure) ด้วยวิธี Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy ซึ่งใช้หลักการแยกแยะจากการสั่นสะเทือน ซึ่งเกิดจากข้อสองขั้วมีการเคลื่อนที่ระหว่างโมเลกุลที่สั่นสะเทือนและการสั่นสะเทือนทำให้เกิด spectrum band ซึ่งมีความจำเพาะกับโมเลกุลและให้ข้อมูลเป็นองค์ประกอบชีวเคมีหลัก ผลการทดสอบชี้ให้เห็นว่าความเป็นพิษของสารหนูชักนำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบหลักทางชีวเคมี เช่น โปรตีน ไขมันและกรดนิวคลีอิก ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในองค์ประกอบโปรตีนของกล้ามเนื้อปลา

Sanderson และคณะ (2008) ตรวจสอบเบื้องต้นเกี่ยวกับการปนเปื้อนของสารเคมีที่ใช้ในสงครามในทะเลบอลติก ซึ่งสารเหล่านี้มีสารหนูเป็นองค์ประกอบโดยถูกนำมาใช้ในช่วงสงครามโลกครั้งที่ 2 และได้กำจัดทิ้งลงในทะเลบอลติก บริเวณเกาะ Bornholm มากถึง 11,000 ตัน จึงพบปลาที่มีความผิดปกติของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังตรวจพบสารหนูปริมาณสูงในตะกอนดิน แสดงให้เห็นว่าการกำจัดสารเคมีที่ใช้ในสงครามลงในทะเลบอลติกทำให้เกิดการปนเปื้อนสารหนูในเนื้อเยื่อของปลาและตะกอนดินในบริเวณเกาะ Bornholm

Li และคณะ (2009) ศึกษาความเป็นพิษของสารหนู ( $\text{NaAsO}_2$ ) ต่อการพัฒนาของเอ็มบริโอในปลาหมากลาย (*Danio rerio*) พบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้นต่ำกว่า 0.5 mM ไม่มีผลต่อเอ็มบริโอของปลา แต่ที่ความเข้มข้นสูง 0.5-10.0 mM มีผลต่อเอ็มบริโอปลา เช่น พบการพัฒนาตัวอ่อนของปลาผิดปกติ และพบว่าปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  2.0-5.0 mM เป็นเวลา 30 ชั่วโมง มีผลให้ประสาทสัมผัสซาลงเมื่อได้รับแสง ถ้าได้รับความเข้มข้น 2.0 mM เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ทำให้กระดูกสันหลังผิดรูปร่าง และเมื่อได้รับสารหนูเข้มข้น 0.5-2.0 mM เป็นเวลา 60 ชั่วโมง ทำให้หัวใจทำงานผิดปกติ ส่วนความเป็นพิษต่อเซลล์และสารพันธุกรรมนั้นพบว่า ปลาที่ได้รับสารหนูเข้มข้น 2.0 mM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้เกิด apoptosis และได้รับความเข้มข้น 2.0 mM เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้เกิด genomic DNA methylation

## 6.2 การศึกษาความเป็นพิษของ $\text{NaAsO}_2$ ในเซลล์เพาะเลี้ยง

Warner และคณะ (1994) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในประชากรประเทศเนวาดาที่มีประวัติการดื่มน้ำที่มีสารหนู 1312  $\mu\text{g/L}$  เปรียบเทียบกับแหล่งควบคุมที่มี  $\text{NaAsO}_2$  ในน้ำดื่ม 16  $\mu\text{g/L}$  ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่ามีความถี่ของ MN ในเซลล์เยื่อบุผิวกระเพาะปัสสาวะ กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ศึกษาเท่ากับ 1.57 และ 2.73 ต่อ 1,000 เซลล์ ตามลำดับ ( $P = 0.03$ ) แต่ไม่พบความแตกต่างจากเซลล์เยื่อบุข้างแก้ม แสดงว่าสารหนูอนินทรีย์ไม่มีความสัมพันธ์กับการเกิด Micronucleus ในเซลล์เยื่อบุข้างแก้ม การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า การบริโภคน้ำดื่มที่มี

สารหนูเป็นเวลานานมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวน micronucleus ในเซลล์เยื่อผิว กระเพาะปัสสาวะ

Mouron และคณะ (2001) ศึกษาผลของสารเคมีที่มีพิษต่อการทำลาย DNA ใน human lung fibroblast cell line MRC-5 โดยทดสอบ  $CdCl_2$  เข้มข้น 1, 2 และ 4  $\mu M$   $CdSO_4$  เข้มข้น 0.033, 0.067 และ 0.13  $\mu M$   $NaAsO_2$  เข้มข้น 2.5, 5 และ 10  $\mu M$  และ  $C_2H_7AsO_2$  เข้มข้น 125, 250 และ 500  $\mu M$  เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และวัดผลด้วยวิธี SCGE assay หรือ Comet assay พบว่า  $CdSO_4$  และ  $NaAsO_2$  ทำให้เกิด TD% แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ) ส่วน  $CdCl_2$  ชักนำให้เกิด DNA เสียหายเช่นกันแต่น้อยกว่า  $CdSO_4$  ส่วน  $C_2H_7AsO_2$  พบว่าเกิดความเสียหายของ DNA ลดลง ( $P < 0.001$ )

Basu และคณะ (2002) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในประชากรประเทศอินเดีย ที่มีประวัติการดื่มน้ำที่มีสารหนู 368.11  $\mu g/L$  เปรียบเทียบกับแหล่งควบคุมที่มี  $NaAsO_2$  ในน้ำดื่ม 5.49  $\mu g/L$  ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่ามีความถี่ของ MN ในเซลล์ช่องปาก (oral mucosa) เซลล์บุท่อปัสสาวะ (urothelial cells) และเม็ดเลือดขาว (lymphocytes) ของกลุ่มที่ศึกษา เท่ากับ 5.15, 5.74 และ 6.39 ต่อ 1,000 เซลล์ ตามลำดับ ส่วนกลุ่มควบคุมเท่ากับ 0.77, 0.56 และ 0.53 ต่อ 1,000 เซลล์ ตามลำดับ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าคนที่แสดงลักษณะอาการของสารหนูจากการบริโภคน้ำที่มีสารหนูปนเปื้อน ตรวจพบความเสียหายระดับเซลล์และสารพันธุกรรม (cytogenetic damage)

Ahsan และคณะ (2003) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของในประชากรประเทศบังคลาเทศที่บริโภคน้ำดื่มที่ปนเปื้อนสารหนู 30 คน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม 104 คน ด้วยการตรวจสอบความผิดปกติของตำแหน่งยีน MPO และ CAT ในปัสสาวะพบว่าสารหนูชักนำให้เกิดความผิดปกติของยีน MPO ถ้ามีระดับของสารหนูสูงจะพบยีนตำแหน่ง GG มาก และถ้ามีระดับของสารหนูต่ำจะพบยีนตำแหน่ง AA มาก ส่วนยีน CAT ถ้ามีระดับของสารหนูสูงจะพบยีนตำแหน่ง TT มาก และถ้ามีระดับของสารหนูต่ำจะพบยีนตำแหน่ง CC มาก และพบว่าเมื่อได้รับสารหนูในปริมาณสูงมีความสัมพันธ์กับความเสี่ยงของการเกิดโรค hyperkeratosis ด้วย

Yanez และคณะ (2003) ศึกษาการเกิด DNA damage ในประชากร ที่อาศัยอยู่บริเวณเหมืองแร่สารหนูและตะกั่วเมือง Villa de la Paz ของประเทศเม็กซิโก เปรียบเทียบกับแหล่งอ้างอิงบริเวณเมือง Matehuala ด้วยเทคนิค Comet assay พบว่าค่า Tail length และ tail moment ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของกลุ่มอาศัยในพื้นที่เหมืองแร่สูงกว่ากลุ่มอ้างอิง ( $P < 0.05$ )

Basu และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในประชากรที่มีประวัติการดื่มน้ำที่มีสารหนู 214.72  $\mu g/L$  ของประเทศอินเดีย เปรียบเทียบกับแหล่งควบคุมที่มี  $NaAsO_2$  ใน

น้ำดื่ม 9.20  $\mu\text{g/L}$  ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่ามีความถี่ของ MN ใน lymphocytes, mucosa cells และ urothelial cells ของกลุ่มที่ศึกษาสูงขึ้นกว่าคนจากแหล่งควบคุมเท่ากับ 5.33, 4.63 และ 4.71 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.001$ ) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการบริโภคน้ำดื่มที่ปนเปื้อนสารหนูเป็นเวลานานจะชักนำให้เกิด micronuclei ใน lymphocytes, mucosa cells และ urothelial cells

Guillamet และคณะ (2004) ศึกษาความเป็นพิษ (toxicity) และความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม (genotoxicity) ของสารหนูในรูปอนินทรีย์ คือ sodium metaarsenite ( $\text{NaAsO}_2$ ), sodium hydrogenarsenate heptahydrate ( $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), sodium hexafluoroarsenate ( $\text{NaAsF}_6$ ) และสารหนูในรูปอินทรีย์ คือ arsenobetaine ( $\text{C}_5\text{H}_{11}\text{AsO}_2$ ) MMA ( $\text{CH}_3\text{H}_2\text{AsO}$ ), DMA [ $(\text{CH}_3)_2\text{HAsO}_2$ ], tetramethylarsonium iodide [ $(\text{CH}_3)_4\text{AsI}$ ], tetraphenylarsonium chloride hydrate [ $(\text{C}_6\text{H}_5)_4\text{AsCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$ ] ต่อ human lymphoblastoid cell line (TK6) เป็นเวลา 30 นาที หรือ 3 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10  $\mu\text{M}$  ด้วยเทคนิค Comet assay โดยใช้ฟารามิเตอร์ Olive tail moment พบว่าสารหนูอนินทรีย์ที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) คือ sodium arsenite และ sodium arsenate ส่วนสารหนูอินทรีย์ที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) คือ tetramethylarsonium iodide และ tetraphenylarsonium chloride ซึ่ง sodium arsenite ตรวจพบ Olive tail moment ต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ที่ความเข้มข้น 0.1  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 30 นาที

Martinez และคณะ (2005) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของประชากรในภาคเหนือของประเทศไทย ที่มีประวัติการดื่มน้ำที่มีสารหนู 0.75  $\mu\text{g/L}$  เปรียบเทียบกับแหล่งควบคุมที่มี  $\text{NaAsO}_2$  ในน้ำดื่ม 0.002  $\mu\text{g/L}$  ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่ามีความถี่ของ MN ในเยื่อข้างแก้มของกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ศึกษาเท่ากับ  $2.74 \pm 0.26$  และ  $3.14 \pm 0.32$  ต่อ 1,000 เซลล์ ตามลำดับ แต่ยังไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าคนที่บริโภคน้ำที่มีสารหนูปนเปื้อนไม่สามารถชักนำให้เกิด cytogenetic damage ในเซลล์เยื่อข้างแก้ม

Chakraborty และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในประชากรของประเทศไทย ที่มีประวัติการดื่มน้ำที่มีสารหนู 66.75  $\mu\text{g/L}$  เปรียบเทียบกับแหล่งควบคุมที่มี  $\text{NaAsO}_2$  ในน้ำดื่ม 6.44  $\mu\text{g/L}$  ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่ามีความถี่ของ MN ในเยื่อข้างแก้มกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ศึกษาเท่ากับ  $0.29 \pm 0.01$  และ  $0.98 \pm 0.07$  ต่อ 1,000 เซลล์ ตามลำดับ ( $P < 0.01$ ) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าเทคนิค Micronucleus test เป็นเทคนิคที่ใช้ตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในเยื่อข้างแก้มได้ผลดี

Chai และคณะ (2007) ศึกษา genotoxicity ของ  $\text{NaAsO}_2$  1, 2, 4, 8 and 10  $\mu\text{M}$ . เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ในเซลล์เพาะเลี้ยง SV-40 immortalized human uroepithelial cells ด้วยเทคนิค Comet assay, Immunocytochemistry และ western blotting พบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้เกิด DNA damage

สัมพันธ์กับความเข้มข้น และทำให้การแสดงออกของยีน mutant p53 และ COX-2 proteins เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับ Comet assay โดยพบความเสียหายสูงสุดที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{M}$

Wang และคณะ (2007) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2  $\mu\text{M}$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อ human leukemia cells และ Chinese hamster ovary cells ด้วยเทคนิค Comet assay พบว่าทุกความเข้มข้น  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้เกิด DNA damage โดยตรวจพบ comet moments แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และพบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้ DNA adducts ผ่านทาง calcium-mediated production of peroxynitrite, hypochlorous acid และ hydroxyl radicals.

Akram และคณะ (2009) ศึกษา genotoxicity และ DNA fragmentation ของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้น 50, 100, and 200 mg/L เป็นเวลา 28 วัน ต่อ ovarian cells ของหนู ด้วยเทคนิค Comet assay พบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้น 100 และ 200 mg/L ชักนำให้เกิด DNA damage โดยตรวจพบ tail length, %DNA in tail, tail moment และ olive moment แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) และยังทำให้รังไข่มีน้ำหนักลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.05$ ) จากการศึกษาี้แสดงให้เห็นว่า  $\text{NaAsO}_2$  สามารถชักนำให้เกิด DNA damage ใน ovarian cells ที่ความเข้มข้นสูงๆได้ และพบว่าเทคนิค Comet assay เป็นเทคนิคที่ดีในการตรวจวัด DNA damage ในเนื้อเยื่อของสัตว์ที่ได้รับโลหะหนัก

### 6.3 การศึกษาความเป็นพิษของ $\text{CdCl}_2$ ในสัตว์ทดลอง

Ayllon และคณะ (2000) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ colchicine, mitomycin C, cyclophosphamide และโลหะหนัก 2 ชนิด คือ แคดเมียมและปรอท ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในปลา European minnow (*Phoxinus phoxinus*) และปลา Mollie (*Poecilia latipinna*) ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่าในปลา minnow ที่ฉีด colchicine (10 mg/L) และ mitomycin C (20 mg/L) สามารถชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสอื่นๆ ( $P < 0.01$ ) ส่วนความเครียดที่เกิดจากการฉีดซ้ำหลายครั้งไม่มีผล ปลาที่ฉีด  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 1.7 mg/L โดยฉีด 2 ครั้ง สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียส แต่ไม่ชักนำให้เกิด MN ในปลาทั้ง 2 ชนิด ( $P < 0.05$ ) ปลา minnow ที่ฉีด  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  ไม่ชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียส ทุกความเข้มข้น แต่ปลา mollie ที่ฉีด  $\text{Hg}(\text{NO}_3)_2$  เข้มข้น 0.17 และ 1.7 mg/L ชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียส ( $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ) แสดงให้เห็นว่าปลา mollie มีความไวต่อสารพิษและการชักนำให้เกิด MN มากกว่าปลา minnow

Tilton และคณะ (2003) ศึกษาผลของ  $\text{CdCl}_2$  ต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยาในระบบสืบพันธุ์ของปลา Japanese mekada (*Oryzias latipes*) ซึ่งได้รับ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 0-0.01 mg/L เป็นเวลา

7 สัปดาห์ พบว่าทั้งปลาเพศผู้และเพศเมียทุกกลุ่มที่ได้รับ  $CdCl_2$  มีการปล่อย gonadal steroid ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ส่วนปลาเพศเมียที่ได้รับ  $CdCl_2$  เข้มข้น 5 mg/L พบว่ามีระดับของ plasma estradiol สูงกว่าปลาควบคุม ( $P<0.05$ )

Cavas และคณะ (2005) ศึกษาการชักนำให้เกิด MN และ BN ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อพิวเหงือกและเซลล์ตับของปลา 3 ชนิด common carp, prussian carp และ peppered cory โดยปลาได้รับ  $CdCl_2$  เข้มข้น 0.005-0.1 mg/L และ  $CuSO_4$  เข้มข้น 0.01-0.25 mg/L เป็นเวลา 21 วัน โดยใช้โครเมียม ( $Cr^{+6}$ ) เข้มข้น 5 mg/L เป็น positive control เมื่อเปรียบเทียบการเพิ่มขึ้นของ MN และ BN กับกลุ่มควบคุม พบว่าปลา peppered cory ที่ได้รับ  $CdCl_2$  เข้มข้น 0.005 mg/L มีค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดง ( $P<0.01$ ) และพบค่า BNFs ในเซลล์ตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.01$ ) ส่วนปลาที่ได้รับ  $CdCl_2$  เข้มข้น 0.1 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เยื่อพิวเหงือกและตับ และค่า BNFs ในเซลล์เลือดและตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.01$ ) ในปลา prussian carp ที่ได้รับ  $CdCl_2$  เข้มข้น 0.1 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์ตับ และพบค่า BNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อพิวเหงือก และเซลล์ตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$  และ  $P<0.001$ ) ตามลำดับ ในปลา common carp ที่ได้รับ  $CdCl_2$  เข้มข้น 0.1 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์ตับสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$  และ  $P<0.01$ ) ตามลำดับ และพบค่า BNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อพิวเหงือกสูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.01$ ) ตามลำดับ ส่วนปลา common carp และปลา prussian carp ที่ได้รับ  $CuSO_4$  เข้มข้น 0.01 mg/L พบค่า MNFs ในเซลล์เยื่อพิวเหงือก ปลา prussian carp สูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.01$ ) ส่วนเซลล์เยื่อพิวเหงือกและตับของปลา common carp ที่ได้รับ  $CuSO_4$  เข้มข้น 0.25 mg/L พบค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) และเซลล์เม็ดเลือดแดง เซลล์เยื่อพิวเหงือกและเซลล์ตับของปลา prussian carp ที่ได้รับ  $CuSO_4$  เข้มข้น 0.25 mg/L พบค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มควบคุม ( $P<0.01$ ,  $P<0.01$  และ  $P<0.05$ ) ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา peppered cory มีความไวต่อ  $CdCl_2$  มากกว่าปลา common carp และ prussian carp และเซลล์เยื่อพิวเหงือกของปลา prussian carp มีความไวต่อ  $CuSO_4$  มากกว่าปลา common carp และ peppered cory

Jayakumar และคณะ (2006) ศึกษาการสะสมของแคดเมียมในเนื้อเยื่อบริเวณต่างๆของปลาดุกค้ำ *C. batrachus* โดยแช่ใน  $CdCl_2$  เข้มข้น 7 mg/L เป็นเวลา 60 วัน พบว่า ในเนื้อเยื่อของปลาดุกค้ำมีการสะสมของแคดเมียมมาก คือ เหงือก > ไต > ตับ > พิวหนัง > กล้ามเนื้อ โดยมีค่าเฉลี่ยของ  $CdCl_2$  เท่ากับ  $0.98\pm 0.03$ ,  $0.81\pm 0.01$ ,  $0.77\pm 0.01$ ,  $0.31\pm 0.01$  และ  $0.04\pm 0.00$  mg/L ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมของแต่ละเนื้อเยื่อ ( $P<0.05$ )

Matsumoto และคณะ (2006) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของโครเมียมที่ปนเปื้อนจากบริเวณต่างๆ จากลำธาร Corrogo dos bargres ในประเทศบราซิลต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ปลาชนิด *O. niloticus* โดยใช้เทคนิค micronucleus test และ comet assay พบว่า ปริมาณโครเมียมที่พบในส่วนต้นลำธารนั้นไม่ชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสต่างจากกลุ่มควบคุม ส่วนแหล่งน้ำบริเวณที่มีของเสียปนเปื้อน (effluent discharge) และส่วนปลายลำธารนั้นพบความเสียหายของสารพันธุกรรมโดยมีค่า comet scores เฉลี่ยเท่ากับ 70.17 และ 62.0 ตามลำดับ ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ )

Chai และคณะ (2007) ศึกษา genotoxicity ของ  $\text{NaAsO}_2$  1, 2, 4, 8 and 10  $\mu\text{M}$ . เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ต่อ SV-40 immortalized human uroepithelial cells ด้วยเทคนิค Comet assay, Immunocytochemistry และ western blotting พบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้เกิด DNA damage สัมพันธ์กับความเข้มข้น และทำให้การแสดงออกของยีน mutant p53 และ COX-2 proteins เพิ่มขึ้น เช่นเดียวกับ comet assay และพบความเสียหายสูงสุดที่ความเข้มข้น 4  $\mu\text{M}$  ซึ่งความผิดปกติของยีน p53 อาจเกิดมาจาก TATA-binding proteins (TBPs) และ transcription initiation complex ทำให้ wild-type p53 ยับยั้งการรวมตัวของ TBP และ human COX-2 promoters ใน cellfree system ทำให้เซลล์ไม่มีการป้องกันจากการเกิด apoptosis จากการชักนำจากความเครียดต่างๆ

Jiraungkoorskul และคณะ 2007 ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของตะกั่ว ทองแดง แคดเมียม ใช้ความเข้มข้น 25% ของ 69 h  $\text{LC}_{50}$  เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ต่อปลาชนิด (*Oreochromis niloticus*) ปลาจระเม็ด (*Poronotus triacanthus*) ปลาตะเพียนทอง (*Punticus altus*) ด้วยเทคนิค Micronucleus test พบว่า ความถี่ในการเกิด micronucleus และความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสพบสูงในตะกั่ว ทองแดงและแคดเมียม ตามลำดับ ซึ่งไม่สอดคล้องกับรายงานของ Sanchez-Galan และคณะ (2001) พบว่า  $\text{CdCl}_2$  มีผลชักนำให้เกิด micronucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลา *Anguilla anguilla* ขณะที่ทองแดงไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ และปลานิลมีความไวสูงสุดในการตรวจความเป็นพิษของโลหะทั้ง 3 ชนิด ส่วนความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียสที่ตรวจพบทุกกลุ่มการทดลอง พบความถี่ในการเกิด  $\text{NT} > \text{LB} > \text{BN} > \text{BL}$

#### 6.4 การศึกษาความเป็นพิษของ $\text{CdCl}_2$ ในเซลล์เพาะเลี้ยง

Kasuba และ Rozejaj (2000) ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  M ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงอยู่ในระยะ  $G_0$  และ S ในวัฏจักรเซลล์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ผสม phytohemagglutinin และตรวจการเกิด MN พบว่า  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น  $10^{-3}$  M ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะ  $G_0$

เพิ่มขึ้นต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ และเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะ S ที่ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น  $10^{-3}$ - $10^{-6}$  M พบค่า MNFs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ )

Mouron และคณะ (2001) ศึกษาผลของสารเคมีที่มีพิษต่อการทำลาย DNA ในเซลล์ human lung fibroblast ด้วยวิธี comet assay พบว่า  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 4  $\mu\text{M}$ ,  $\text{CdSO}_4$  เข้มข้น 0.067 และ 0.13  $\mu\text{M}$ ,  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้น 2.5, 5  $\mu\text{M}$  และ  $\text{C}_2\text{H}_7\text{AsO}_2$  เข้มข้น 125, 250 และ 500  $\mu\text{M}$  ทำให้เกิด DNA damage ในเซลล์ human lung fibroblast อย่างมีนัยสำคัญ

Seoane และ Dulout (2001) ศึกษาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพื่อประเมิน DNA damage, gene mutation และ chromosome breakage ของเกล็ดโลหะโดยใช้วิธี micronucleus test ด้วยการย้อมสี kinetochore ในเซลล์ fibroblast ของมนุษย์ (MRC-5) พบว่า สารประกอบ  $\text{CdCl}_2$ ,  $\text{CdSO}_4$ ,  $\text{NiCl}_2$ ,  $\text{Ni}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{CrCl}_3$  และ  $\text{K}_2\text{SO}_4$  ทำให้ความถี่ของ MN ที่เป็น kinetochore-positive เพิ่มขึ้นกว่ากลุ่ม kinetochore-negative ( $P < 0.001$ ) และพบว่าเกล็ดของ แคลเมียมและโครเมียมสามารถชักนำให้เกิด clastogenic และ aneugenic เท่าๆ กัน ส่วนนิกเกิลนั้น พบว่าสามารถชักนำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมต่ำกว่าเกล็ดโลหะอื่นๆ

Fatur และคณะ (2002) ศึกษา DNA damage และการสังเคราะห์ metallothionine ในเซลล์ เซลล์ตับมนุษย์ (HepG2) เมื่อได้รับ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 10, 100 และ 1000 nM ผสมกับ 2-amino-3-methylimidazo (4,5-f) quinoline (IQ) และ benzo [a] pyrene (B(a)P) พบว่า เซลล์ HepG2 ที่ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 10-1000 nM เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ทำให้เกิด DNA damage และมีการสังเคราะห์ metallothionine เพิ่มขึ้น และเมื่อเซลล์ HepG2 ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 10-100 nM กับ IQ เข้มข้น 300  $\mu\text{M}$  สามารถชักนำให้เกิด DNA damage เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ได้รับ IQ เพียงอย่างเดียว และยังสามารถชักนำให้เกิด MN เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับ IQ ร่วมด้วย

## 6.5 การนำเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay ไปประยุกต์ใช้ในการ ตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิต

ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีในระดับที่ทำลายสารพันธุกรรมโดยใช้ เทคนิค micronucleus test และ comet assay ซึ่ง U.S. EPA กำหนดให้เป็นวิธีที่เป็นมาตรฐานในการ ตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

Cavas และคณะ (2003) ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่ง ทอ เข้มข้น 5, 10 และ 20% เป็นเวลา 3, 6 และ 9 วัน ต่อปลา *Oreochromis niloticus* ด้วยเทคนิค Micronucleus test และวิเคราะห์ผลด้วย interphase silver-stained nucleolar organizer regions (AgNORs) พบว่าน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอชักนำให้เกิด micronucleus และความผิดปกติอื่นๆ

ของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงสูงขึ้นสอดคล้องกับความเข้มข้น ( $P < 0.01$ ) แต่ไม่สอดคล้องกับระยะเวลาที่ทดสอบ อาจเกิดจากการสร้างและเปลี่ยนใหม่ของเซลล์ และความถี่ในการเกิดความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียสที่ตรวจ พบว่า  $NT > LB > BN > BL$  ส่วนเซลล์เหงือกพบ micronucleus สูงกว่าเซลล์เม็ดเลือดแดง และเวลาและความเข้มข้นมีความสอดคล้องกันในการเกิด micronucleus ( $P < 0.05$ ) เนื่องจากเป็นบริเวณที่ได้รับสารโดยตรงจากน้ำที่ปนเปื้อน

Frenzilli และคณะ (2004) ศึกษา DNA damage ในบริเวณ Goteborg Harbour ที่เกิดน้ำมันรั่วในปี ค.ศ. 2003 โดยใช้วิธี comet assay พบว่า เกิด DNA damage ของปลา eelpout (*Zoarces viviparus*) ในบริเวณ Goteborg Harbour มากกว่าปลาที่จับมาจากแหล่งน้ำบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนน้ำมัน และพบว่าวิธี comet assay มีความไวในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลา eelpout ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า เทคนิค comet assay สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในปลาได้

Cavas และ Ergene-Gozukara (2005) ทดลองใช้ปลา *O. niloticus* ประเมินการปนเปื้อนของสารที่มีพิษระดับทำลายสารพันธุกรรมของน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม คือ petroleum refinery effluent และ chromium processing plant effluent เข้มข้น 5-20% (v/v) เป็นเวลา 9 วัน ด้วยเทคนิค micronucleus test พบว่า ปลากลุ่มที่ได้รับ cyclophosphamide (positive control) เข้มข้น 4 mg/L เป็นเวลา 6-9 วัน สามารถชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียสในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เยื่อบุผิวเหงือกได้ ( $P < 0.05$ ) ส่วนปลาที่แช่ใน chromium processing plant effluent เข้มข้น 20% (v/v) เป็นเวลา 6-9 วัน สามารถชักนำให้เกิด MN และ BN ในเซลล์ ( $P < 0.05$ ) ส่วน petroleum refinery effluent เข้มข้น 5-20% (v/v) เป็นเวลา 3-9 วัน สามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เหงือกได้ ( $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ) และ chromium processing plant effluent เข้มข้น 20% (v/v) เป็นเวลา 9 วัน สามารถชักนำให้เกิด binucleated, lobed และ blebbed nucleus ในเซลล์ ( $P < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ) แต่ไม่สามารถชักนำให้เกิด notched nucleus ได้ในทุกความเข้มข้น ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สามารถใช้ปลาเป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารพิษในน้ำในระดับที่ทำลายสารพันธุกรรมโดยใช้เทคนิค micronucleus test นอกจากนี้ lobed และ blebbed nucleus สามารถใช้เป็น indicator ในการตรวจสอบการเกิดความผิดปกติต่อเซลล์ได้

Rigonato และคณะ (2005) ศึกษาผลของ methylmethane sunfonate ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมใน hemolymph, gill tissue และ digestive gland tissue ของหอยน้ำจืดสองฝา (*Corbicula fluminea*) ด้วยเทคนิค comet assay พบว่า *C. fluminea* ที่ได้รับ methylmethane sunfonate เข้มข้น 0.6, 1.2 และ  $2.4 \times 10^{-4}$  M เป็นเวลา 40 นาที ทำให้ gill tissue เกิด



DNA damage ในระดับสูง ส่วน haemolymph และ digestive gland tissue และในเซลล์เหงือกจะพบระดับของ DNA damage สูง เนื่องจากเป็นอวัยวะที่รับสารพิษโดยตรง การทดลองพบว่าการตรวจ DNA damage จาก hemolymph และ digestive gland tissue ให้ผลที่มีความน่าเชื่อถือมากกว่า โดยเฉพาะ hemolymph ที่เป็นตัวอย่างที่ดีในการตรวจสอบเพราะนำมาตรวจได้ง่าย ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าหอยน้ำจืด *C. fluminea* สามารถใช้เป็น bioindicator ในการตรวจสอบสารเคมีที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

Barsiene และคณะ (2006) ศึกษาการชักนำให้เกิด MN และความผิดปกติของนิวเคลียส ลักษณะอื่นๆ คือ nuclear buds, bi-nucleated cells และ fragmented-apoptotic cells ในเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์จากไตส่วนหน้า (cephalic kidney) ของปลา turbot (*Scophthalmus maximus*) และปลา atlantic cod (*Gardus morua*) โดยแช่ปลาใน spiked oil 0.5 mg/L, crude oil 0.5 mg/L และ nonylphenol 30 mg/L พบว่าปลา turbot ที่ได้รับสารทดสอบสามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์เม็ดเลือดแดงมากกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ตามลำดับ คือ nonylphenol > spiked oil > crude oil ส่วนการชักนำให้เกิด MN ในเซลล์ไตส่วนหน้านั้น พบว่าเกิด MN เพิ่มขึ้น 3.6, 3.6 และ 2.6 เท่า หลังจากได้รับ nonylphenol, spiked oil และ oil ตามลำดับ ส่วนในปลา atlantic cod ที่ได้รับ nonylphenol ไม่สามารถชักนำให้เกิด MN ในเซลล์ไตส่วนหน้าเพิ่มขึ้นได้ นอกจากนี้ยังพบค่าเฉลี่ยของ MN ในเซลล์ไตส่วนหน้านั้นสูงกว่าในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลา turbot ที่ได้รับสารทดสอบทุกความเข้มข้น และพบว่าปลา turbot ที่ได้รับสารทดสอบทั้งหมดเกิด nuclear buds ในเซลล์ไตส่วนหน้าและเซลล์เม็ดเลือดแดง และพบระดับของ fragmented-apoptotic cells หลังจากได้รับ nonylphenol และ spiked oil ( $P < 0.0001$ ) แสดงให้เห็นว่า เทคนิค micronucleus test สามารถใช้ประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้ และสามารถวัดความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียส เป็น biomarker ได้

Gabbianelli และคณะ (2006) ศึกษาสารประกอบ organotins ชนิดต่างๆ ที่มีผลต่อ DNA ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของหอยสองฝา *Scapharca inaequalis* ด้วยวิธี comet assay ในหลอดทดลองที่มีเซลล์เม็ดเลือดแดงกับสารประกอบ organotins 3 ชนิด คือ monobutyltin-chloride (MBTC), dibutyltin-chloride (DBTC) และ tributyltin-chloride (TBTC) เข้มข้น 10  $\mu$ M เป็นเวลา 30 นาที พบว่า MBTC ทำให้ DNA แตกหัก 31.33% แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วน DBTC ทำให้ DNA แตกหัก 20.00% โดยไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วนการทดสอบ TBTC 50 mg/L กับหอยสองฝา เป็นเวลา 11 วัน พบว่า TBTC สามารถชักนำให้เกิด DNA damage โดยมี tail length, tail intensity และ tail moment เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ )

Pandey และคณะ (2006) ประเมินความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของ endosulfan เข้มข้น 0-12 mg/L ในเซลล์เหงือกและตับของปลาน้ำจืด *Channa punctatus* (Bloch) เป็นเวลา 24-96 ชั่วโมง ด้วยเทคนิค alkaline single-cell gel electrophoresis พบว่า endosulfan มีค่า LC<sub>50</sub> ในปลา *C. punctatus* เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เท่ากับ 19.67, 12.95, 10.15 และ 7.75 mg/L ตามลำดับ และ endosulfan สามารถทำให้เกิด DNA damage ในเซลล์เหงือกและเซลล์ตับ โดยพบ DNA damage ในเซลล์เหงือกมากกว่าเซลล์ตับ

Talapatra และ Banerjee (2006) ศึกษา genotoxic effects ในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากเซลล์เหงือกและตับของปลา *Labio bata* ที่เลี้ยงในน้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงปลา ด้วยเทคนิค micronucleus test พบว่าเซลล์เม็ดเลือดแดงจากไตปลามีค่า MNFs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P < 0.001$ ) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงจากเหงือกและไต พบค่าความถี่ของ necrotic cells, apoptotic cells, notch nucleated cells และ binucleated cells เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $P < 0.001$ ,  $P < 0.01$  และ  $P < 0.05$  ตามลำดับ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างเซลล์เหงือกและไตพบความถี่ของ nuclear abnormalities ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังตรวจพบโลหะหนักบางชนิดในน้ำทิ้งจากฟาร์มเลี้ยงปลา คือ chromium, zinc, copper, lead, iron และ sludge

Celik และคณะ (2007) ศึกษาการเกิด cytogenetic damage ของคนงานที่ได้รับผลกระทบจากการเผาไหม้ของถ่านหินในโรงงาน Afsin-Elbistan พบว่าเกิด chromosomal aberration, polyploidy และ sister chromatid exchange เท่ากับ  $0.033 \pm 0.015$ ,  $0.52 \pm 0.09$  และ  $6.08 \pm 0.12$  ตามลำดับ และพบ MN มีค่าเท่ากับ  $8.20 \pm 0.61$  cells/1,000 โดยพบ sister chromatid exchange และ MN ในเซลล์เม็ดเลือดขาวสูงกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ  $4.60 \pm 0.11$  และ  $6.56 \pm 0.43$  cells/1,000 ตามลำดับ ( $P < 0.01$  และ  $P < 0.05$ ) และพบว่าความถี่ของ chromosomal aberration และ MN มีค่าเพิ่มขึ้นในแต่ละปีอย่างมีนัยสำคัญ จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า คนงานที่ได้รับผลกระทบจากการเผาไหม้ถ่านหินมีความผิดปกติของโครโมโซมซึ่งตรวจได้จากเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์

Fenech Michael (2007) รายงานว่าเทคนิค cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay เป็นเทคนิคที่ครอบคลุมการตรวจวัด DNA damage, cytostasis และ cytotoxicity โดยการตรวจวัด DNA damage ด้วย binucleated (BN) cells, micronuclei (MNi), nucleoplasmic bridges (NPBs), nuclear buds (NBUDs) การตรวจวัด cytostasis ด้วย mono-, bi- และ multinucleated cells ส่วนการตรวจวัด cytotoxicity ด้วย necrotic และ apoptotic cell โดยพบว่าเทคนิคสามารถตรวจวัด MN เกิดจาก lagging whole chromosomes หรือ acentric chromosome fragments ส่วน NPBs เกิดจาก dicentric chromosomes ซึ่งเป็นผลมาจากความผิดพลาดของการซ่อมแซม double strand DNA breaks หรือ telomere end fusions และ NBUDs เป็นตัวชี้วัดของ gene amplification ซึ่งมีลักษณะ

คล้าย MN แต่ไม่แยกชัดเจนจากนิวเคลียสหลัก การติดฉลากที่ Centromeric จะสามารถทราบถึงกลไกการเกิด MN และ aneuploidy ถ้า MN เกิดจาก chromosome breaks (centromere negative) ถ้า MN เกิดจาก chromosome loss (centromere positive) การติดฉลากที่จำเพาะกับ centromere บนโครโมโซม สามารถตรวจวัด malsegregation (owing to non-disjunction หรือ chromosome loss) ในโครโมโซมได้ แต่การติดฉลากที่ pancentromeric ไม่สามารถตรวจวัดในเซลล์ที่เกิด non-disjunction เพราะมีความยากและไม่น่าเชื่อถือในการตรวจนับ

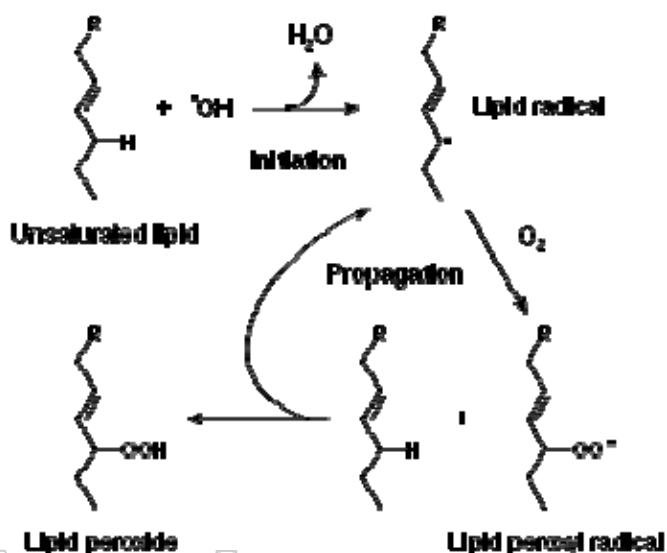
### 7. Lipid peroxidations (LPO)

กลไกการเผาผลาญสารหนูผ่านทางกลไก reduction และ oxidations ซึ่งทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) รวมถึง superoxide anion, hydrogen peroxide และ hydroxyl radicals การเกิด ROS ในเซลล์จะทำให้ DNA เกิดความเสียหาย เกิด LPO และ Protein peroxidation ซึ่ง Yamanaka รายงานเมื่อปี 1990 เป็นคนแรกว่า dimethylarsenic peroxy และสารหนูอื่นสามารถชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระ (free radical) จาก methylated arsenic นอกจากนี้มีรายงานต่างๆ พบว่า สารหนูชักนำให้โครโมโซมเกิดความผิดปกติและ sister chromatid exchanges (Nordenson, 1981) โดย  $\text{NaAsO}_2$  จะไปจับกับระบบการซ่อมแซม DNA หรือ DNA methylation state ซึ่งเป็นสาเหตุให้ DNA เกิดความเสียหายจากการเกิด ROS ซึ่งยับยั้งการทำงานของยีน p53 และเอนไซม์ telomerase มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และ signal transduction pathways นำไปสู่การทำงานของ transcription factors (Wang, 2001)

LPO เป็นกลไกหลักของการเกิดภาวะบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ในสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชและสัตว์ เป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเกี่ยวข้องกับไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid) ซึ่งส่วนใหญ่เป็นส่วนประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์สูญเสียอิเล็กตรอน (oxidized) แล้วเปลี่ยนรูปเป็น lipid radical ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่าเป็นของเสียที่เป็นพิษ (toxic by-product) และสามารถทำอันตรายต่อระบบในสิ่งมีชีวิตนั้นๆ ได้ โดยเฉพาะ polyunsaturated fatty acids (PUFA) มีความไวต่อการถูกดั่งอิเล็กตรอน (oxidation) ด้วยสารอนุมูลอิสระได้ง่าย เช่น อนุมูลอิสระไฮดรอกซิล ( $\text{OH}\cdot$ ) เมื่อทั้งสองเข้าทำปฏิกิริยากันเกิดเป็น lipid peroxy radical ( $\text{LOO}\cdot$ ) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยากับ PUFA ตัดออกไปได้ แล้วอยู่ในรูปของ lipid peroxide และ  $\text{LOO}\cdot$  ซึ่งเป็นผลให้เกิดปฏิกิริยาสืบเนื่องต่อไปเป็นลูกโซ่ สำหรับ lipid peroxide ที่เกิดขึ้นนั้นจะไม่มีเสถียร และจะต้องเกิดปฏิกิริยาสลายตัวต่อไปเพื่อให้อยู่ในรูปสารเชิงซ้อนจำพวกสารประกอบ carbonyl (Halliwell, 1993)

เมื่อ polyunsaturated fatty acid peroxides หรือ lipid peroxide เกิดปฏิกิริยาสลายตัวไปอยู่ในรูปของ malondialdehyde (MDA) ซึ่งเป็นหนึ่งในหลายๆ end-product ที่เกิดขึ้น MDA พบได้ใน

ผลิตภัณฑ์จากสิ่งมีชีวิต เช่น อาหาร, serum, plasma, เนื้อเยื่อ และปัสสาวะ MDA นิยมใช้เป็นดัชนีวิเคราะห์ปริมาณ lipid peroxidation เพื่อประเมินผลกระทบที่เกิดจากภาวะเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ที่บริเวณไขมัน ซึ่งสามารถวัดได้จากปริมาณของ end-product ที่เกิดขึ้นจากกระบวนการ lipid peroxidation โดยใช้เทคนิคประเมินที่เรียกว่า TBARs Assay (วิภาดา, 2550)



รูปที่ 12 กลไกการเกิด lipid peroxidation

### 8.การศึกษา Oxidative stress ของสารหนูในเซลล์และสิ่งมีชีวิต

Samokhvalov และคณะ (2003) ศึกษา oxidative stress ของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อยีสต์ *Saccharomyces cerevisiae* ด้วยเทคนิค Lipid peroxidations พบว่า ยีสต์ที่สัมผัส  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโต และพบ Oxidative stress สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ที่ความเข้มข้น  $10^{-4}$  และ  $10^{-6}$  M (12.9 และ 0.129 mg/L) ซึ่งความเข้มข้น  $10^{-2}$  M (1,290 mg/L) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P > 0.05$ ) จากการศึกษาพบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ยับยั้งการทำงานของ  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase และ pyruvate dehydrogenase ในเซลล์ ทำให้มีผลต่อ lipid peroxidation

Shila และคณะ (2005) ศึกษาผล DL- $\alpha$  lipoic acid ต่อ  $\text{NaAsO}_2$  ซึ่งชักนำให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ glutathione และเอนไซม์ในกลุ่มที่เกี่ยวข้อง คือ GPx, GR และ glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) รวมถึง lipid peroxidation (LPO) ในสมองหนูส่วน cortex, hypothalamus, striatum, cerebellum และ hippocampus ในกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เพียงอย่างเดียวมีผลลดระดับ glutathione activity และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องลดลงอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้กลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ DL- $\alpha$  lipoic acid เพียงอย่างเดียวให้ผลไม่มีความแตกต่างกันทั้งใน cortex, striatum และ hippocampus แต่ปริมาณ LPO ที่เพิ่มสูงขึ้นอย่างมากในบริเวณสมองของ

กลุ่มที่ได้รับสารหนูเพียงอย่างเดียว สำหรับกลุ่มที่ได้รับ DL- $\alpha$  lipoic acid ร่วมกับ NaAsO<sub>2</sub> พบว่าช่วยลดพิษจากสารหนู และลดการเกิด LPO รวมทั้งเพิ่มระดับ GSH และ activity ของเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องให้มากขึ้นเพื่อดำเนินความเป็นพิษของสารหนูเนื่องจาก lipoic acid นั้นมีบทบาทในการเปลี่ยน sulphhydryl nucleophile ไปเป็น glutathione เพื่อป้องกันจับขวางออกซิเดชัน จึงมีผลต่อ glutathione disulfide ในปฏิกิริยาขจัดสารพิษ

สุวิตา และคณะ (2550) ศึกษาความสัมพันธ์ของเอนไซม์ glutathione peroxidase ในประชาชนอำเภอรัตนพิบูลย์ซึ่งเป็นพื้นที่ที่พบรายงานการปนเปื้อนของสารหนู โดยจะเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมคือจากอำเภอท่าศาลา อาสาสมัครเป็นกลุ่มตัวอย่างจากอำเภอรัตนพิบูลย์มีจำนวน 25 คนและจากอำเภอท่าศาลามีจำนวน 22 คน โดยที่ทั้งหมดเป็นผู้ที่มีสุขภาพดีและไม่มีโรคประจำตัว ผลการศึกษาพบว่ากลุ่มตัวอย่างในพื้นที่อำเภอรัตนพิบูลย์มีระดับ glutathione peroxidase activity เท่ากับ  $32 \pm 6.91$  U/gHb ซึ่งต่ำกว่าระดับที่พบในกลุ่มตัวอย่างจากอำเภอท่าศาลาซึ่งมีค่าเท่ากับ  $37 \pm 8.78$  U/gHb อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $P < 0.05$ ) การลดลงของระดับ glutathione peroxidase activity อาจใช้เป็นตัวชี้วัดภาวะ oxidative stress ระดับต่ำๆ ที่เกิดขึ้นภายในร่างกายอันเนื่องมาจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่อาศัยของประชาชนในเขตพื้นที่อำเภอรัตนพิบูลย์ที่พบการปนเปื้อนของสารหนู

Bhattacharya และคณะ (2007) ศึกษา oxidative stress ของ As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> เข้มข้น 4.2 และ 8.4 mg/L เป็นเวลา 10 วัน ต่อตัวปลาตุ๊กตาอินเดีย *Clarias batrachus* ด้วยเทคนิค lipid peroxidation, glutathione, glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), catalase และ glutathione reductase (GR) พบว่า ตั้งแต่เวลา 1 วัน As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> ชักนำให้เกิด lipid peroxidation, glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), catalase สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) ส่วน glutathione และ glutathione reductase (GR) ลดลงจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ )

Vutukuru และคณะ (2007) ศึกษา Hepatotoxicity และ Cellular damage ในปลาชี่สกเทศ (*Labeo rohita*) ที่ได้รับสารหนูและแคดเมียม (Cd<sup>2+</sup>) ด้วยวิธี enzyme assay พบว่าปลาที่ได้รับสารหนูมีการทำงานของ Alanine aminotransferase (ALT) เพิ่มขึ้น ( $P < 0.001$ ) แสดงว่าเกิดการทำลายเซลล์ตับแต่ในปลาในกลุ่มที่ได้รับ Cd<sup>2+</sup> ปริมาณเอนไซม์ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุม และการศึกษาพบว่า การตรวจวัด ALT และ Aspartate amino transferase (AST) สามารถเป็นตัวชี้วัดการเกิด Hepatotoxicity จากสารหนูต่อปลา *L. rohita* ได้

Lima และคณะ (2009) ศึกษา oxidative stress ของ KHAAsO<sub>4</sub> ต่อเหงือกปลาฆ่าลาย (*Danio rerio*) ที่สัมผัส KHAAsO<sub>4</sub> ความเข้มข้น 1, 10 และ 100  $\mu$ g/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าชักนำให้เกิด glutathione (GSH) และ glutamate cysteine ligase (GCL) สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ )

ที่ความเข้มข้น 10 และ 100  $\mu\text{g/L}$  แต่พบ oxygen consumption ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) ที่ความเข้มข้น 100  $\mu\text{g/L}$  และพบ glutathione reductase, glutathione-Stransferase, catalase, oxygen reactive species generation และ LPO ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P>0.05$ ) การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า  $\text{KAsO}_4$  มีผลต่อการเกิด antioxidant โดยทำให้ GCL และ GSH เพิ่มขึ้น

Soundararajan และคณะ (2009) ศึกษา oxidative stress ของ arsenic trioxide ที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.05  $\text{mg/L}$  เป็นเวลา 5 และ 10 วัน ตับปลานิล *Tilapia mossambica* พบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ชักนำให้เกิด lipid peroxidation superoxide dismutase (SOD) และ catalase สูงขึ้นจากกลุ่มควบคุม ( $P<0.05$ ) และพบ glutathione และ glutathione reductase (GR) ลดลงจากกลุ่มควบคุม

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

### บทที่ 3

#### อุปกรณ์และสารเคมี

##### 1.1 วัสดุ อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการทำวิจัย

ตารางที่ 2 รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต

รายการ	บริษัท
<b>1. เครื่องมือ</b>	
Autoclave	Astell
Centrifuge รุ่น Wise Spin <sup>®</sup> CF-10	Gibthai
Cold room	Riwacold
Digital Specific Gravity/Salinity-Meter (DSG-10)	บริษัท โปร โทนิคส์อินเตอร์เทรด จำกัด
Electrophoresis power supply	Consort E884
Fluorescence microscope	Nikon
Fume hood	Wiwatsan lab
Horizontal electrophoresis chamber	HU10
Hot Air Oven	Memmert-Schwabach
Hot plate& sterier	Lab tech
Laboratory DC counter	Gemmy IDS. CORP.
Light microscope	Olympus
Microwave	Sharp
pH meter	Hanna
Program LUCIA Comet assay	Hollywood International LTD.
Refrigerator -20°C	SANYO
Refrigerator 4°C	Electrolux
Spectrophotometer รุ่น UV-160A	Shimadzu
Thermometer	

ตารางที่ 2 รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต (ต่อ)

รายการ	บริษัท
Thermal-lock dry-bath	USA Scientific
Timer	
Unsterred Digital Bath รุ่น Ecothep TW20	Scientific promotion
Vortex mixer (minishaker)	
เครื่องชั่งสาร	
เครื่องทำน้ำกลั่น	FISTREEM
เครื่องล้างความถี่สูง (Ultrasonic)	
<b>2. อุปกรณ์</b>	
Aluminum foil	
Beaker 100, 250, 600, 1000 ml.	Pyrex®
Centrifuge tube	Gibco
Coupling jar	
Cover glasses (22x22 mm)	Mensel-Glaser
Cover glasses (22x40 mm)	Mensel-Glaser
Cryotube™ vial	nunc Lot No. 375 418
Cuvette quartz	Hellma
Disposable Syringe	Nipro Lot.No. 07 G 21
Dressing forceps size 18cm.	Mira Cat No. 15-124
Duran bottle 150, 250, 500, 1000 ml.	Schott
Examination gloves	บริษัท วันเดอร์อินเตอร์เทรด จำกัด
Flask 100, 125, 250, 500, 1000 ml.	Pyrex®
Fume hood	Wiwatsan lab
Glass-dropper-bottle	
Glass dropper with rubber bulbs	
Glass pipettes 5 , 10 ml	
Graduated Cylinder	Schott



ตารางที่ 2 รายชื่อวัสดุ อุปกรณ์และบริษัทผู้ผลิต (ต่อ)

รายการ	บริษัท
Hemocytometer	BOECO
Icepack	
Magnetic stirring bars	Spinbar® Cat No. 371200030
Metal test tube rack	
Microcentrifuge tubes	บริษัท ซีระเทรคดิง จำกัด
Micropipette 10-100 µl	ViPRΩ Cat No. 720050
Micropipette 20-200 µl	ViPRΩ Cat No. 720070
Micropipette 100-1000 µl	ViPRΩ Cat No. AP72006
Microscope slide Box	
Microscope slides frosted	Sial Band Cat. No. 7105
Mortar and Pestle	Gibthai
Needle 1 ml. 26Gx½”	Nipro Lot.No. 04D17
Petri Culture Dishes - Glass	Pyrex®
pH-indicator strips	Merck
Pipetboy acu	IBS integra biosciences
Pipette Boxes Stainless Steel	
Pipette tip	บริษัท ซีระเทรคดิง จำกัด
Polypropylene Graduated Cylinder	Bell-Art
Scalpel Handle No.4	Feather
Spatula	
Standard operating scissor	
Stirring Rod	
Surgical Blades No.22	Feather Lot.00210
Tissue forcep size6”	Mira Cat No. 15-143

## 1.2 สารเคมีที่ใช้ในการทำวิจัย

ตารางที่ 3 รายการสารเคมีและบริษัทผู้ผลิต

รายการ	บริษัท
Agarose I <sup>TM</sup> (Normal melting point agarose, NMP)	Amresco
DePeX mounting medium (DPX)	BDH AnalaR® Lot HX932746
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Amresco
Di-sodium Hydrogen orthophosphate (Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	Amresco
2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol	Merck
EDTA disodium salt dihydrate (C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O)	Amresco
Ethanol alcohol	องค์การสุรา กรมสรรพสามิต
Ethidium bromide (EtBr)	Fluka
Hydrochloride acid fuming 37% (HCl)	Merck
Immersion oil for microscopy	Olympus
Liquid nitrogen	
Potassium chloride (KCl)	Fluka chemika
Potassium dihydrogen phosphate (KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> )	Fluka chemika
Quinaldine	บริษัท วิทยาธรรม จำกัด
Sodium chloride (NaCl)	J.T. Baker Cat C25337
Sodium Hydroxide (NaOH)	BDH AnalaR®
2-Thiobarbituric acid	Merck
Trichloroacetic acid	Merck
Trypan blue 0.5% (w/v) in physiological saline	Seromed
Tris Base (C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub> )	Amresco
Triton X-100	Amresco
Ultra pure <sup>TM</sup> LMP Agarose (Low melting point)	Invitrogen Lot No. L062107
Wright rapid stain set	Biotech Lot. 241108
Xylene	Merck

## บทที่ 4

### วิธีการทดลอง

การทดลองนี้ดำเนินการ ณ ห้องปฏิบัติการเซลล์เทคโนโลยีและห้องปฏิบัติการ Biodiversity & Genotoxicity Laboratory ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์ จังหวัดนครปฐม โดยทดสอบสารพิษกับปลากระพงขาวดำเนินการในช่วงเดือนกันยายน – ตุลาคม 2552 ซึ่งเป็นช่วงที่ปลาทดลองมีความสมบูรณ์ และอุณหภูมิของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลาอยู่ในช่วง 27-28 °C คุณภาพน้ำเลี้ยงปลาเป็นน้ำทะเลเทียมที่ไม่มีคลอรีน

การทดลองใช้ปลากระพงขาวประเมินความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมและใช้  $\text{CdCl}_2$  เป็น Positive control โดยแช่ปลาในสารละลายที่ทดสอบเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง การศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งนั้นใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay เพื่อประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม และเปรียบเทียบความไวของทั้ง 2 เทคนิคในการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากระพงขาว นอกจากนี้ยังศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อเซลล์โดยใช้เทคนิคตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของชีวโมเลกุลภายในเซลล์ตับปลากระพงขาว ได้แก่ lipid peroxidation (LPO)

#### 1. วิธีเลี้ยงปลาทดลอง

1. นำปลากระพงขาวจากแหล่งเพาะพันธุ์ปลาในจังหวัดฉะเชิงเทรา ขนาด 4 นิ้ว อายุประมาณ 2 เดือน จำนวน 500 ตัว มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ
2. ก่อนนำปลามาทดลองนำปลามาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมของห้องปฏิบัติการ โดยเลี้ยงในตู้เลี้ยงปลาขนาด 30 X 60 X 40 ซม. ที่มีน้ำทะเลเทียมซึ่งมีความเค็มของ NaCl 10 g/L และไม่มีคลอรีน น้ำมีอุณหภูมิ 27-28 °C และมีออกซิเจนอย่างเพียงพอ เป็นเวลา 1 สัปดาห์
3. ให้อาหารปลาคือ อาร์ทีเมีย 2 ครั้งต่อวัน ระหว่างเวลา 8.30-9.00 น. และ 16.00-17.00 น. และเปลี่ยนน้ำทุก 2 วัน
4. คัดเลือกปลาที่แข็งแรงและมีขนาดใกล้เคียงกัน  $7.79 \pm 0.09$  ซม. น้ำหนัก  $9.14 \pm 0.40$  g แล้วสุ่มตัวอย่างปลาเข้าสู่กลุ่มทดลอง กลุ่มละ 20 ตัว (N=20) โดยงดอาหารระหว่างการทดลอง

## 2. วิธีเตรียมสารเคมีและเครื่องแก้ว (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

1. เครื่องแก้วและวัสดุที่ใช้ในการทดลองต้องผ่านการล้างด้วยกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเพื่อละลายโลหะหนักที่อาจตกค้างออกและเติมน้ำจนกระทั่งเกิดตะกอนขาว และเติม 6M HCl ลงไปเพื่อให้ละลายอีกครั้ง แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งและล้างในน้ำ deionize 1 ครั้ง โดยน้ำ deionize เตรียมมาจากน้ำกลั่น 2 ครั้ง เพื่อให้มั่นใจว่าไม่มีโลหะหนักตกค้าง

2. วิธีเตรียม NaAsO<sub>2</sub> การทดลองเลือกใช้ NaAsO<sub>2</sub> ในรูปของ sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>) เนื่องจากละลายน้ำได้ดี โดยชั่ง NaAsO<sub>2</sub> ตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วเจือจางอย่างต่อเนื่องจากความเข้มข้นสูงสุดเพื่อให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

## 3. วิธีศึกษาความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 (Letal Concentrations, LC<sub>50</sub>)

ทดลองเลี้ยงปลากะพงขาวในตู้เลี้ยงปลาขนาด 30 x 60 x 40 ซม. จุน้ำ 40 ลิตร ความหนาแน่นของปลา 20 ตัวต่อตู้ โดยใช้ NaAsO<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64 mg/L ให้ปลาได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และนับจำนวนปลาตาย โดยนับว่าปลาตายเมื่อสังเกตเห็นว่าปลาหยุดหายใจและแผ่นปิดเหงือก (operculum) ไม่เคลื่อนไหว บันทึกผลและนำข้อมูลไปวิเคราะห์เพื่อหาค่า LC<sub>50</sub> โดยใช้ Probit Analysis ในโปรแกรม SPSS

## 4. วิธีศึกษาความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่มีพิษทำลายสารพันธุกรรมและเซลล์

นำค่า LC<sub>50</sub> ที่ได้จากการศึกษาไปใช้พิจารณาศึกษาความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ต่ำกว่าค่า LC<sub>50</sub> มาใช้ทดลองเพื่อหาความเข้มข้นน้อยสุดที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยตรวจสอบผลด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay นอกจากนี้จะพิจารณาความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> สูงสุดที่กำหนดให้ปนเปื้อนได้ในค่ามาตรฐานน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรม คือ 0.25 mg/L ไว้เป็นความเข้มข้นที่ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมควบคู่ไปด้วย และศึกษาผลกระทบที่เกิดจาก oxidative stress ในเซลล์ คือ lipid peroxidation

## 5. วิธีทดสอบความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> ต่อสารพันธุกรรม

1. นำปลากะพงขาวมาเลี้ยงในน้ำทะเลเทียมที่มี NaAsO<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L โดยใช้ปลากลุ่มละ 20 ตัว และทดลองให้ปลาได้รับ NaAsO<sub>2</sub> 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

2. เจาะเลือดปลาบริเวณหาง (caudal vein) เพื่อนำไปวิเคราะห์ความผิดปกติของสารพันธุกรรม (genotoxicity) ด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay และเก็บตัวอย่างตับจากปลาตัวเดียวกันไปวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์

## 6. วิธีการตรวจสอบความผิดปกติของ DNA

### 6.1 วิธี Micronucleus test (Barsiene, 2007 และ sunate, 2549)

1) นำปลากระพงขาวในน้ำทะเลเทียมที่มี  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง นำปลากระพงขาวมาทำให้สลบโดยหยด Quinaldine 1 หยดในน้ำทะเลเทียม 3 ลิตร

2) เจาะเลือดปลาบริเวณหางด้วยเข็มฉีดยาขนาด 26 G  $\frac{1}{2}$  นิ้ว เติมน้ำหยดเลือดบนสไลด์สะอาดแล้วปล่อยให้แห้ง เขียนรหัสกำกับไว้ด้วยดินสอ เตรียมสไลด์เลือดปลา 3 สไลด์/ตัว แล้วนำเลือดที่เหลือไปทำ Comet assay

3) นำสไลด์ที่แห้งแล้วมา fixed ใน absolute ethanol เป็นเวลา 10 นาที

4) ปล่อยให้แห้งแล้วนำไปย้อมสีเม็ดเลือด หรือเก็บใส่กล่องไว้ในที่แห้งเพื่อรอเวลาย้อมสี

5) นำสไลด์ที่มีฟิล์มเลือดปลามาย้อมด้วยสี Wright rapid stain ประกอบด้วย fixative, eosin solution เพื่อย้อมไซโทพลาสซึมและสี polychrome methylene blue solution เพื่อย้อมนิวเคลียส โดยใช้เวลาย้อมสีละ 30 วินาที ล้างสีส่วนเกินด้วยน้ำกลั่นแล้วปล่อยให้แห้ง

6) นำสไลด์ไป mounted ด้วย DPX แล้วนำมาตรวจหาความถี่ของ micronucleus และ nuclear abnormalities จากเซลล์เม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์/สไลด์ รวมตรวจปลาตัวละ 3 สไลด์

7) วิเคราะห์ผลโดยนำสไลด์เลือดปลาที่เตรียมไว้มาใส่รหัส ที่ป้องกันผู้ตรวจทราบ ว่าสไลด์ที่ตรวจเป็นปลาได้รับสารทดสอบในกลุ่มใด แล้วนำไปตรวจหา micronucleus ด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1,500 เท่า

8) เกณฑ์การประเมิน micronucleus การนับว่าเซลล์มี micronucleus นั้น ใช้เกณฑ์ของ Carrasso, 1990 และ Fenech, 2000 (รูปที่ 6)

9) เกณฑ์การประเมินความผิดปกติอื่นๆ ของนิวเคลียส คือ blebbed nucleus, notched nucleus และ lobed nucleus ที่ตรวจนับนั้น ใช้เกณฑ์ของ Carrasso, 1990 และ Cavas, 2005 (รูปที่ 7)

### 6.2 วิธี Comet assay/Single cell gel electrophoresis (SCGE) (Akcha, 2003)

#### 6.2.1 วิธีการเตรียมเซลล์บนกระจกสไลด์

1) นำเลือดปลาเดียวกับที่ทำฟิล์มเลือดเพื่อตรวจผลด้วยเทคนิค micronucleus test มาเตรียมเซลล์เลือดบนสไลด์ ใช้เลือดจำนวน 1 หยดใส่ในหลอดทดลองที่มี phosphate buffer saline (PBS) pH 7.4, 4 ml. (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.8 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ , 10 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ )

เพื่อเจือจางเซลล์เม็ดเลือดให้เป็น cell suspension แล้วนับจำนวนเซลล์ให้มีจำนวน  $10^7 - 10^8$  cells/ml ด้วย hemocytometer

2) เตรียมกระจกสไลด์ให้สะอาด นำสไลด์จุ่มใน 0.8% Normal melting point agarose (NMA) อุณหภูมิ 50 - 55 °C แล้วทำให้สไลด์เย็นโดยวางสไลด์บน ice pack เป็นเวลา 5 นาที ทำซ้ำ 3 ครั้ง เพื่อให้ NMA ฉาบบนผิวกระจกสไลด์หนาพอ

3) ปิเปตสารละลายเซลล์ ปริมาตร 30  $\mu$ l ลงใน microcentrifuge tube ผสมกับ 0.5% Low melting point agarose (LMA) อุณหภูมิ 65.5°C ปริมาตร 225  $\mu$ l ลงไปใน microcentrifuge tube และอุ่นที่อุณหภูมิ 37-40 °C ใน heat block แล้วผสมให้เซลล์แขวนลอยอยู่ในสารละลาย agarose โดยเขย่าด้วยเครื่อง mixer เบาๆ

4) ปิเปตเซลล์ที่ผสมอยู่ใน LMP แล้ว ปริมาตร 70  $\mu$ l ลงบนกระจกสไลด์ที่มี 0.8% NMA ฉาบอยู่ด้านบนกระจกสไลด์ แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์และนำสไลด์วางบน ice pack เพื่อให้ agarose แข็งจึงนำกระจกปิดสไลด์ออก

5) ปิเปต 0.5% LMA ปริมาตร 90  $\mu$ l ทับบนชั้นเซลล์ที่ตรึงใน LMA แล้วปิดทับด้วยกระจกปิดสไลด์ นำสไลด์วางบน ice pack เพื่อรอให้ agarose แข็ง

6) นำกระจกปิดสไลด์ออก นำกระจกสไลด์ที่มีเซลล์ตรึงอยู่ไปแช่ใน lysis solution pH 10-10.5 (2.5 M NaCl, 0.1 M EDTA, 10 mM Tris base, 10% DMSO, 1% triton X-100) ที่ 4°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อทำลายเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane)

7) นำกระจกสไลด์ไปวางใน horizontal electrophoresis chamber ที่มี Alkaline buffer pH=13 (300 mM NaOH, 1 mM EDTA) ให้ท่วมสไลด์ประมาณ 1 เซนติเมตร เป็นเวลา 10 นาที เพื่อปรับสภาพของเซลล์กับสารละลาย ทำให้ DNA อยู่ในรูปของ supercoiled แบบหลวมๆ โดยวางกระจกสไลด์ที่ตรึงเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาของกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองไว้ใน chamber เดียวกัน

8) เปิด Power supply ให้กระแสไฟฟ้า 270 mA, 20 V เข้าสู่เครื่อง electrophoresis เพื่อแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำสไลด์ไปแช่ใน neutralization buffer pH 7.5 (0.4 M Tris base) ให้ท่วมสไลด์ประมาณ 0.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ครั้งๆ ละ 5 นาที เพื่อล้างเอาเกลือออกและปรับ pH ของตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ให้เป็นกลาง

9) นำสไลด์ไปแช่ใน absolute ethanol เป็นเวลา 5 นาที เพื่อตรึง DNA ไว้ไม่ให้เสียหายและช่วยละลายไขมันส่วนเกินออก เพื่อให้ตัวอย่าง DNA บนกระจกสไลด์ติดสีย้อมดีขึ้น

10) นำ DNA ไปย้อมสารเรืองแสง UV เพื่อวิเคราะห์ผล DNA damage หรือเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ 4 °C ในที่ชื้นเพื่อรอการวิเคราะห์ ควรวิเคราะห์ผลภายใน 14 วัน

หมายเหตุ ขั้นตอนในการทำ Comet assay ทำในที่มืดทุกขั้นตอนเพื่อป้องกัน DNA แตกหัก

### 6.2.2 การย้อม DNA เพื่อตรวจภายใต้กล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (สุนทร, 2549)

1) นำสไลด์ DNA ที่ผ่านการทำ electrophoresis ตามข้อ 10 มาย้อมด้วย Ethidium bromide (EtBr) ความเข้มข้น 20 mg/ml เป็นเวลา 15 นาที แล้วล้าง EtBr ส่วนเกินออกด้วยน้ำกลั่น เช็ดกระจกสไลด์ด้านล่างให้แห้ง สาร EtBr เป็นสารก่อมะเร็ง จึงควรทำปฏิบัติการด้วยความระมัดระวังในการทำ เพื่อป้องกัน EtBr ปนเปื้อนในพื้นที่ปฏิบัติการและใส่ถุงมือทำปฏิบัติการ

2) นำกระจกสไลด์ไปตรวจผล DNA damage ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนซ์ (fluorescence) เนื่องจาก EtBr มีค่า excitation 488 nm emission 580-630 nm จึงเลือกใช้ filter box G- 2A (excited 510-560 nm, dichroic mirror 575 nm และ emission 590 nm) กำลังขยาย 400 เท่า บันทึกผลการทดลองและถ่ายรูป DNA ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาที่เคลื่อนที่ไปในขั้นตอนการทำ DNA electrophoresis กระแสไฟฟ้าจากขั้วลบไปยังขั้วบวกโดย DNA ที่มีขนาดเล็กจะเคลื่อนที่ไปได้ระยะทางไกลจึงมองเห็นเป็นส่วนหางของ Comet ส่วน DNA ที่ไม่ถูกทำลาย มีขนาดใหญ่ จะเคลื่อนที่ไปเพียงเล็กน้อย จึงมองเห็นเป็นส่วนหัวของ Comet ภายใต้กล้องจุลทรรศน์จึงบันทึกผลการทดลองโดยถ่ายรูป

3) ถ่ายรูป DNA damage ของแต่ละเซลล์ที่ไม่ซ้อนทับกันรวม 50 เซลล์/สไลด์ โดยสุ่มวัด DNA ของเซลล์ทุกจุดตัดของแกน X และแกน Y ที่ศึกษาไว้เพื่อกำหนดการวัดผล DNA ของเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาด้วยวิธีสุ่ม ส่วนเซลล์ที่เกิด apoptosis ซึ่งสังเกตพบว่า DNA damage มีลักษณะพิเศษ คือส่วนหัวและหางของ comet ที่ยาวมากจะไม่วัด DNA damage ของเซลล์เหล่านี้

4) วัด DNA damage โดยใช้ด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay เลือกวิเคราะห์ DNA damage จาก 4 parameter คือ Tail DNA [%], Tail length, Tail moment และ Olive moment

### 6.2.3 นิยามและข้อกำหนดในการวัดลักษณะต่างๆ ในโปรแกรม LUCIA Comet Assay ดังนี้

ก. นิยามคำศัพท์ใช้วัดใน โปรแกรม LUCIA Comet Assay

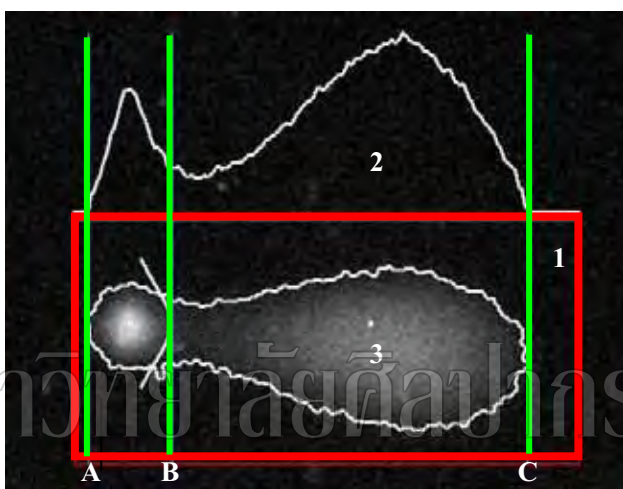
1) comet คือ โครงสร้างที่เกิดจาก DNA ที่เกิดความเสียหายเคลื่อนที่ในขั้นตอนการทำ single cell gel electrophoresis (SGCE) จึงเห็นเป็นรูปคล้ายดาวหางประกอบด้วยส่วนหัว คือ DNA ที่ไม่ถูกทำลาย และส่วนหาง คือ DNA ที่ถูกทำลาย

2) comet head คือ นิวเคลียสของเซลล์ที่มี DNA เหลืออยู่ภายใน เป็น DNA ที่ไม่ถูกทำลาย

3) comet tail คือ โครงสร้างที่มีลักษณะยาวซึ่งเป็นส่วนของ DNA ภายในนิวเคลียสที่ถูกทำลาย DNA หักออกเป็นชิ้นขนาดเล็ก จึงเคลื่อนที่ออกไปจากนิวเคลียส ปรากฏเป็นส่วนหางของดาวหาง

4) SCGE คือ การวัดเกี่ยวกับ DNA ที่เกิดความเสียหายโดยจะเคลื่อนที่ออกไปจากนิวเคลียสด้วยกระแสไฟฟ้าในเจล

ข. ค่าที่ใช้วัดใน โปรแกรม LUCIA Comet Assay



จากรูป Comet

- 1. วัด Integrated intensity
- 2. วัด Tail DNA [%]
- 3. วัด Tail length

รูปที่ 13 บริเวณของ comet ที่ใช้วิเคราะห์ด้วยโปรแกรม LUCIA

ที่มา: <http://www.lim.cz/download.php?id=16&>

1) Integrated intensity (II) คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงปล่อยออกมาจาก DNA ซึ่งย้อมด้วย EtBr จึงวัดค่าความเข้มของแสงจาก DNA ทั้งหมดของเซลล์ 1 เซลล์ (รูปที่ 13 หมายเลข 1)

$$\begin{aligned} \text{Integrated intensity (II)} &= I_H + I_T \\ \text{โดยที่ } I_H &= \int_{\text{Head area}} idA \\ I_T &= \int_{\text{Tail area}} idA \end{aligned}$$

$\int_{\text{Head area}} idA$  = ผลรวมค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงปล่อยออกมาจากส่วนหัวของ comet

$\int_{\text{Tail area}} idA$  = ผลรวมค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนส์ที่เรืองแสงปล่อยออกมาจากส่วนหางของ comet



2) Tail DNA [%] คือ ค่าความเข้มของแสงฟลูออเรสเซนซ์ที่เรอินแสงออกมาจาก DNA ที่เกิดความเสียหายในส่วน comet tail และอยู่ทางขวาของนิวเคลียส เมื่อเปรียบเทียบกับ 100 % ของ Integrated intensity (II) (รูปที่ 13 หมายเลข 3)

$$\text{Tail DNA [\%]} = [I_T / II] \times 100$$

3) Tail length คือ ความยาวของส่วนหางของ comet เป็นระยะทางที่ DNA ซึ่งเสียหายและขาดออกเป็นชิ้นเล็กๆ เคลื่อนที่ออกจากนิวเคลียสไปตามกระแสไฟฟ้า เท่ากับระยะระหว่าง B ถึง C เป็น parameter ที่ขึ้นอยู่กับวิธีการวัดเป็นอย่างมากจึงต้องระมัดระวังในการวัด (รูปที่ 13 หมายเลข 5) มีหน่วยเป็นไมโครเมตร ( $\mu\text{m}$ )

4) Tail moment คือ ค่าตัวเลขที่ได้จากการคำนวณระหว่าง tail length คูณกับ tail DNA [%]

$$\text{Tail moment} = \text{Tail length} \times \text{Tail DNA [\%]}$$

5) Olive moment คือ ค่าที่ได้จากผลของระยะห่างระหว่างจุดศูนย์กลางจาก ส่วนหัวและหาง กับ tail DNA [%]

## 7. วิธีตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ (liver toxicity)

ศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อเซลล์โดยใช้เทคนิคตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงของชีวโมเลกุลภายในเซลล์ตับปลากะพงขาว ได้แก่ lipid peroxidation (LPO) เพื่อประเมินความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จากการได้รับสารพิษ

### 7.1 วิธีเตรียมตัวอย่างตับ

1) แช่ปลากะพงขาวด้วย  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ  $\text{CdCl}_2$  เมื่อครบกำหนด นำปลา มาทำให้สลบด้วย Quinidine และเจาะเลือดปลาทดสอบด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay

2) ทำการผ่าตัดตับปลาบนน้ำแข็ง และล้างตับใน plate ที่มี PBS 7.4 อุณหภูมิ  $4^\circ\text{C}$  เพื่อล้างสิ่งสกปรกออก

3) เขียนฉลากที่ Cryotube และนำตับที่ล้างแล้ว แช่ในไนโตรเจนเหลว 1 นาที เพื่อหยุดปฏิกิริยาของชีวโมเลกุลภายในเซลล์ตับ แล้วปิดฝาเก็บใส่กล่องที่อุณหภูมิ  $-80^\circ\text{C}$  จนกว่าจะ ไร้ทผลอง

4) นำตับมาชั่งรวมกันให้ได้ 0.5 g. จำนวน 5 ซ้ำ ในแต่ละความเข้มข้น

5) บดตับในไนโตรเจนเหลว ให้เป็นผงละเอียดเพื่อให้เซลล์แตก และเติม PBS 7.4 จำนวน 3 ml ละลายให้เข้ากัน

6) คูดสารละลายปั่นตก 13,500 รอบต่อนาที เป็นเวลา 20 นาที คูด supernate มาใช้วิเคราะห์ หรือเก็บไว้ที่  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกว่าจะใช้ทดลอง

## 7.2 วิธี Lipid peroxidation (Ordovas, 1998)

1) คูด supernate 400  $\mu\text{l}$  ผสมกับ 10% Trichloroacetic acid อุณหภูมิ  $4^{\circ}\text{C}$  800  $\mu\text{l}$  เพื่อตกตะกอนโปรตีน และเติม 50 mM 2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol 40  $\mu\text{l}$  เพื่อกันหืนและ autooxidation โดยทำซ้ำใน 3 microcentrifuge tube

2) ปั่นตก 8,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 3 นาที แล้วคูด supernate รวมกัน 3 microcentrifuge tube ปริมาตร 1.8 ml ผสมกับ 0.67% Thiobarbituric acid 1.8 ml ในหลอดทดลอง

3) นำไปต้มในน้ำ  $95^{\circ}\text{C}$  เป็นเวลา 10 นาที เพื่อให้ Thiobarbituric acid ทำปฏิกิริยากับ Malondialdehyde (MDA) ในเซลล์ดับ

4) หยุดปฏิกิริยาในน้ำเย็น  $4^{\circ}\text{C}$  และวัดค่าความดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 532 nm นำข้อมูลที่ได้ไปคำนวณจากสมการค่ามาตรฐาน MDA

## 8. วิเคราะห์ผลการทดลองทางสถิติ (กรมชนก, 2549)

### 8.1 ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ

จากทีละข้อมูล ด้วยสถิติทดสอบ One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

8.2 ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ ให้ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีความแปรปรวนเท่ากัน จากค่าเฉลี่ย-ข้อมูล ด้วยสถิติทดสอบ One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test

8.2.1 ถ้าข้อมูลมีความแปรปรวนเท่ากัน ให้ทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$

1) ถ้าข้อมูลเวลาและความเข้มข้นมีปฏิสัมพันธ์กัน ให้ใช้สูตรคำนวณของ Turkey test แยกความแตกต่างที่ละเอียด (เวลาและความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$ )

\* ถ้าจำนวนตัวอย่างเท่ากัน ใช้สูตร

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > q_{\alpha}(k, N-K) \sqrt{\text{MSE}/n}$$

\* ถ้าจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน ใช้สูตร

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > \frac{q_{\alpha}(k, N-K)}{\sqrt{2}} \sqrt{\text{MSE} \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

2) ถ้าข้อมูลเวลาและความเข้มข้นไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ให้ใช้ Post hoc แยกทีละปัจจัย (เวลาและความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$ )

8.2.2 ถ้าข้อมูลมีความแปรปรวนไม่เท่ากัน ให้ใช้คำสั่ง Analyze > Nonparametric Tests > K-Independent Sample สถิติทดสอบ Kruskal-Wallis Test

8.3 ถ้าข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ ให้ใช้คำสั่ง Analyze > Nonparametric Tests > K-Independent Sample สถิติทดสอบ Kruskal-Wallis Test

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

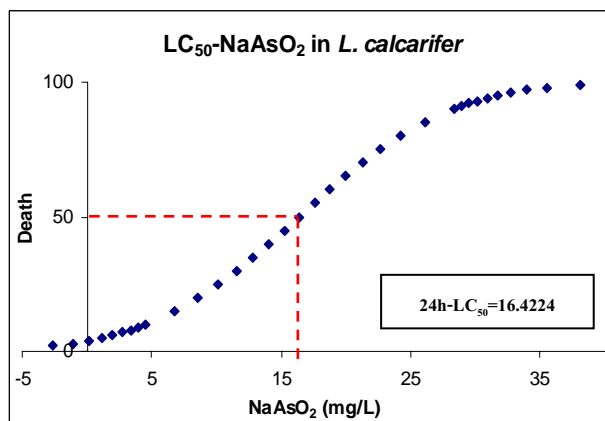
## บทที่ 5

### ผลการทดลอง

การใช้ปลากระพงขาวอายุ 2 เดือน ขนาด  $7.79 \pm 0.09$  ซม. น้ำหนัก  $9.14 \pm 0.40$  กรัม ทดสอบความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมของปลา โดยมีกลุ่มควบคุม 2 กลุ่ม คือ กลุ่ม negative control คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  และกลุ่ม positive control ซึ่งได้รับ  $\text{CdCl}_2$  0.05 mg/L ทดสอบ โดยแช่ปลาในสารละลาย  $\text{NaAsO}_2$  เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง ด้วยวิธีทดสอบแบบ Static-renewel test คือ เปลี่ยนสารละลายที่แช่ปลาใหม่ทั้งหมดทุกวันและใช้ปลาทดลองกลุ่มละ 20 ตัว เริ่มการทดลองโดยศึกษาค่า  $\text{LC}_{50}$  ของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ 24 ชั่วโมง แล้วใช้ความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ต่ำกว่าค่า  $\text{LC}_{50}$  ไปศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากระพงขาว โดยวัดผลด้วยเทคนิค Micronucleus test และ Comet assay และเปรียบเทียบความไวของเทคนิคที่ใช้ตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากระพงขาว นอกจากนี้ยังศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ โดยใช้เทคนิค Lipid peroxidations (LPO) ตรวจวัดระดับ Malondialdehyde จากเซลล์ตับปลากระพงขาว ซึ่งมีผลการทดลองดังนี้

#### 1. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ $\text{NaAsO}_2$ ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 (Lethal Concentrations, $\text{LC}_{50}$ )

จากการทดสอบความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  โดยแช่ปลากระพงขาวอายุ 2 เดือน ในสารละลาย  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่า ปลาเมื่ออัตราการตายเท่ากับ 5, 5, 0, 0, 30, 60, 90 และ 100% ตามลำดับ ส่วนปลาที่ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  0.05 mg/L นั้นมีอัตราการตายเท่ากับ 10% ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพื่อศึกษาความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ( $\text{LC}_{50}$ ) ด้วยโปรแกรมสำเร็จรูป SPSS โดยใช้ Probit Analysis พบว่าความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 คือ 16.4224 mg/L (รูปที่ 14) ส่วนความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ทำให้ปลาตาย 100% คือ 64 mg/L



รูปที่ 14 แสดงค่า LC<sub>50</sub> ของ NaAsO<sub>2</sub> ต่อปลากระพงขาวอายุ 2 เดือน ที่ได้รับสารทดสอบเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

## 2. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่มีพิษทำลายสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Micronucleus test

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมนั้น ใช้ความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ต่ำกว่าค่า LC<sub>50</sub> โดยใช้ความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.25 mg/L เนื่องจากประกาศกระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม ฉบับที่ 3 (พ.ศ. 2539) เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมการระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม กำหนดให้มีสารหนูปนเปื้อนได้ไม่เกิน 0.25 mg/L และจากการทดลองเบื้องต้นพบว่า NaAsO<sub>2</sub> เข้มข้น 1 mg/L ตรวจพบความถี่ของ micronucleus แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) จึงศึกษาความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L ต่อปลากระพงขาว เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มทดลองที่เวลา 72 ชั่วโมง ปลากระพงขาวในกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> มีอัตราการตาย 30% ซึ่งสูงกว่าเกณฑ์ของ U.S. EPA (2002) ซึ่งกำหนดให้มีอัตราการตายของปลาในกลุ่มควบคุมไม่เกิน 10% จึงตรวจผลเฉพาะกลุ่มทดลองที่ใช้เวลาทดสอบ NaAsO<sub>2</sub> 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลาด้วยเทคนิค Micronucleus test และตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสลักษณะอื่นจากเซลล์เม็ดเลือดแดงจากปลาตัวละ 3,000 เซลล์ แล้วคำนวณเป็นความถี่ของ micronucleus (Micronucleus Frequencies, MNFs) ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง 1,000 เซลล์ จากการตรวจหา micronucleus จากปลาทุกกลุ่ม พบว่ามีเพียง 1 micronucleus ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น (รูปที่ 15)

**ผลการวิเคราะห์ค่า MNFs ปลากระพงขาวที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> 2 ช่วงเวลา คือ 24 และ 48 ชั่วโมง** ด้วยโปรแกรม SPSS และใช้คำสั่ง Univariate เพื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ปัจจัย คือ ระยะเวลาที่ได้รับสารและความเข้มข้นของสารทดสอบ พบว่าทั้ง 2 ปัจจัยไม่มีผลร่วมกันในการชักนำให้เกิด micronucleus แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> ต่อสารพันธุกรรมปลาเมื่อตรวจจากค่า MNFs ไม่แตกต่างกันถึงแม้จะเพิ่มระยะเวลาที่ปลาได้รับ NaAsO<sub>2</sub> จาก 24 เป็น 48 ชั่วโมง และเมื่อวิเคราะห์ค่า MNFs ด้วย Turkey test พบว่าปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ทุกความเข้มข้นมีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ยกเว้นปลากลุ่มที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เข้มข้น 2 mg/L นั้นถูกชักนำให้มีจำนวน micronucleus เพิ่มขึ้นสูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) 6.11 เท่า โดยปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้นพบว่ามีค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 2.19 เท่า ( $P < 0.05$ , ตารางที่ 4)

ส่วนปลากลุ่ม positive control ซึ่งได้รับ CdCl<sub>2</sub> 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีจำนวน micronucleus สูงกว่ากลุ่มควบคุม ( $P < 0.05$ ) 2.47 เท่า โดยเฉพาะปลาที่ได้รับ CdCl<sub>2</sub> เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้นพบว่ามีค่า MNFs สูงกว่าปลากลุ่มที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ( $P < 0.05$ ) 1.67 เท่า (ตารางที่ 4)

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> พบว่ามีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.3960 และ 0.9245 ในปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า NaAsO<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0.025-2 mg/L สามารถชักนำให้เกิด micronucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาเพิ่มขึ้นอย่างมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นสูงเฉพาะปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> นาน 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 4)

**ผลการวิเคราะห์ความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียสของปลากระพงขาวที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> 2 ช่วงเวลา คือ 24 และ 48 ชั่วโมง** ด้วยโปรแกรม SPSS และใช้คำสั่ง Univariate เพื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของ 2 ปัจจัย คือ ระยะเวลาที่ปลาได้รับ NaAsO<sub>2</sub> และความเข้มข้นของสารทดสอบ ต่อความถี่ของการเกิด notched nucleus (notched nucleus frequencies, NNFs), lobed nucleus (lobed nucleus frequencies, LNFs), blebed nucleus (blebed nucleus frequencies, BNFs) และ nucleus abnormalities (nucleus abnormalities frequencies, NAFs) พบว่าทั้ง 2 ปัจจัยมีความสัมพันธ์ที่ส่งผลในการชักนำให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียสที่ตรวจสอบ ผลการวิเคราะห์ปัจจัยของเวลาและความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ปลาได้รับด้วย Turkey test พบว่าปลากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสาร NaAsO<sub>2</sub> มีค่า LNFs ของกลุ่มทดลองนาน 48 ชั่วโมงสูงกว่ากลุ่มทดลอง 24 ชั่วโมง 5.04 เท่า ( $P < 0.05$ , ตารางที่ 5) แสดงให้เห็นว่าพบความผิดปกติของนิวเคลียสเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาทดสอบ

ตารางที่ 4 ค่าความถี่ของ Micronucleus (MNFs) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากระพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ทดสอบกับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่รอดชีวิตและนำมาตรวจผล (ตัว)		Micronucleus Frequencies /1,000 cells (mean±SE)		เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น
	24h	48h	24h	48h	
0	20	20	0.00±0.00	0.35±0.14	0.17±0.20 <sub>a</sub>
0.25	20	19	0.70±0.30	0.88±0.28	0.79±0.20 <sub>ab</sub>
0.5	20	19	0.40±0.12	0.84±0.23	0.62±0.20 <sub>ab</sub>
1	20	20	0.48±0.17	1.22±0.35	0.80±0.20 <sub>ab</sub>
2	19	19	0.67±0.14	1.42±0.63	1.04±0.20 <sub>b</sub>
เปรียบเทียบระหว่างเวลา	99	97	0.43±0.13 <sup>a</sup>	0.94±0.13 <sup>b</sup>	
R <sup>2</sup>			0.3960	0.9245	
CdCl <sub>2</sub> 0.05 mg/L	19	20	0.39±0.10 <sup>a*</sup>	0.65±0.11 <sup>b*</sup>	

mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย MNFs ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากระพงขาวที่รอด 1 ตัว

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

R<sup>2</sup> คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับความถี่ micronucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากระพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มควบคุมด้วย ( $P < 0.05$ ) ส่วนปลากลุ่ม positive control ซึ่งได้รับ CdCl<sub>2</sub> 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีค่า MNFs, LNFS และ BNFS สูงกว่ากลุ่มควบคุม 2.51-2.67, 2.98-6.46 และ 3.44-3.65 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) โดยเฉพาะปลาที่ได้รับ CdCl<sub>2</sub> เป็น

เวลา 48 ชั่วโมงนั้นพบว่ามีความผิดปกติของนิวเคลียสของปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง 1.59, 2.33 และ 4.27 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.05$ , ตารางที่ 5)

เมื่อวิเคราะห์ความผิดปกติของนิวเคลียสของปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  นั้น พบว่าทุกความเข้มข้นชักนำให้ค่า NNFs, LNFs และ BNFs เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่นานขึ้นจาก 24 เป็น 48 ชั่วโมงตามลำดับ โดยปลากลุ่มทดลองที่ 48 ชั่วโมง มีค่าสูงกว่ากลุ่มทดลองที่ 24 ชั่วโมง 1.19-2.35, 1.70-3.91 และ 1.16-2.73 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้น BNFs ของปลากลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.5 mg/L ( $P > 0.05$ )

ส่วนปลากลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  ทั้ง 2 ช่วงเวลานั้นพบว่าทุกความเข้มข้นชักนำให้ค่า NNFs, LNFs และ BNFs ของกลุ่มทดลองที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L แตกต่างจากกลุ่มควบคุม 1.19-3.64, 1.12-9.75 และ 1.24-7.75 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ยกเว้นค่า LNFs และ BNFs ของปลากลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25 mg/L ( $P > 0.05$ ) แสดงว่าปลากลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  24 และ 48 ชั่วโมง พบความผิดปกติของนิวเคลียสในปลาเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างค่า NNFs, LNFs และ BNFs กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  พบว่ามีค่า  $R^2$  ระหว่างความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  กับค่า NNFs เท่ากับ 0.8771 และ 0.9044 ในปลากลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนค่า  $R^2$  ของค่า LNFs เท่ากับ 0.7937 และ 0.9345 และค่า  $R^2$  ของค่า BNFs เท่ากับ 0.8901 และ 0.8345 ในปลากลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 5) จึงสามารถเรียงลำดับค่า  $R^2$  ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความผิดปกติของนิวเคลียสกับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ในกลุ่มที่ได้รับสาร 24 ชั่วโมง คือ BNFs > NNFs > LNFs ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร 48 ชั่วโมง คือ LNFs > NNFs > BNFs ส่วนค่าความถี่ของ binucleus (binucleus frequencies, BiNFs) นั้น พบจำนวนน้อยและพบว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ จึงใช้สถิติทดสอบ คือ Kruskal-Wallis test และแสดงผลไว้ในภาคผนวก รวมทั้งผลรวมของ nuclear abnormality ทั้ง 4 ประเภทที่ตรวจพบ

ผลการตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสของปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  สรุปได้ว่าลักษณะความผิดปกติทุกลักษณะ คือ NNFs, LNFs และ BNFs มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นสูง ทั้งในกลุ่มที่ได้รับสาร 24 และ 48 ชั่วโมง จึงสามารถบ่งชี้ความผิดปกติที่เกิดจากปลาได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  ได้ดี และสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ร่วมกับการตรวจความเสียหายของ DNA จากค่า MNFs



ตารางที่ 5 ค่าความถี่ของความคิดเห็นอื่นๆของนิวเคลียส ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ทดสอบกับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่รอดชีวิตและนำมาตรวจผล(ตัว)		Frequency/1,000 cells					
	Notched nucleus		Lobed nucleus		Blebbed nucleus			
	24h	48h	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	20	20	18.13±2.59 <sup>a</sup>	30.58±3.69 <sup>a</sup>	3.07±0.71 <sup>a</sup>	15.50±2.37 <sup>b</sup>	0.80±0.30 <sup>a</sup>	3.22±0.86 <sup>b</sup>
0.25	20	19	30.62±4.86 <sup>a</sup>	36.42±3.65 <sup>b</sup>	7.22±1.70 <sup>a</sup>	17.37±2.65 <sup>b</sup>	1.80±0.47 <sup>b</sup>	2.42±0.77 <sup>a</sup>
0.5	20	19	36.55±4.09 <sup>a</sup>	52.84±5.14 <sup>c</sup>	10.58±1.33 <sup>a</sup>	26.95±3.34 <sup>b</sup>	3.45±0.52 <sup>d</sup>	4.00±0.87 <sup>c</sup>
1	20	20	39.05±6.33 <sup>a</sup>	91.77±10.19 <sup>b</sup>	11.58±2.00 <sup>a</sup>	45.33±4.71 <sup>b</sup>	3.20±0.70 <sup>c</sup>	8.72±1.84 <sup>d</sup>
2	19	19	66.08±5.64 <sup>a</sup>	90.75±9.78 <sup>b</sup>	29.93±3.10 <sup>a</sup>	50.74±6.02 <sup>b</sup>	6.20±1.11 <sup>c</sup>	12.37±2.70 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>			0.8771	0.9044	0.7937	0.9345	0.8901	0.8345
CdCl <sub>2</sub> 0.05 mg/L	19	20	48.32±5.46 <sup>a*</sup>	76.67±11.05 <sup>b*</sup>	19.84±1.82 <sup>a*</sup>	46.20±6.69 <sup>b*</sup>	2.75±0.50 <sup>a*</sup>	11.75±3.21 <sup>b*</sup>

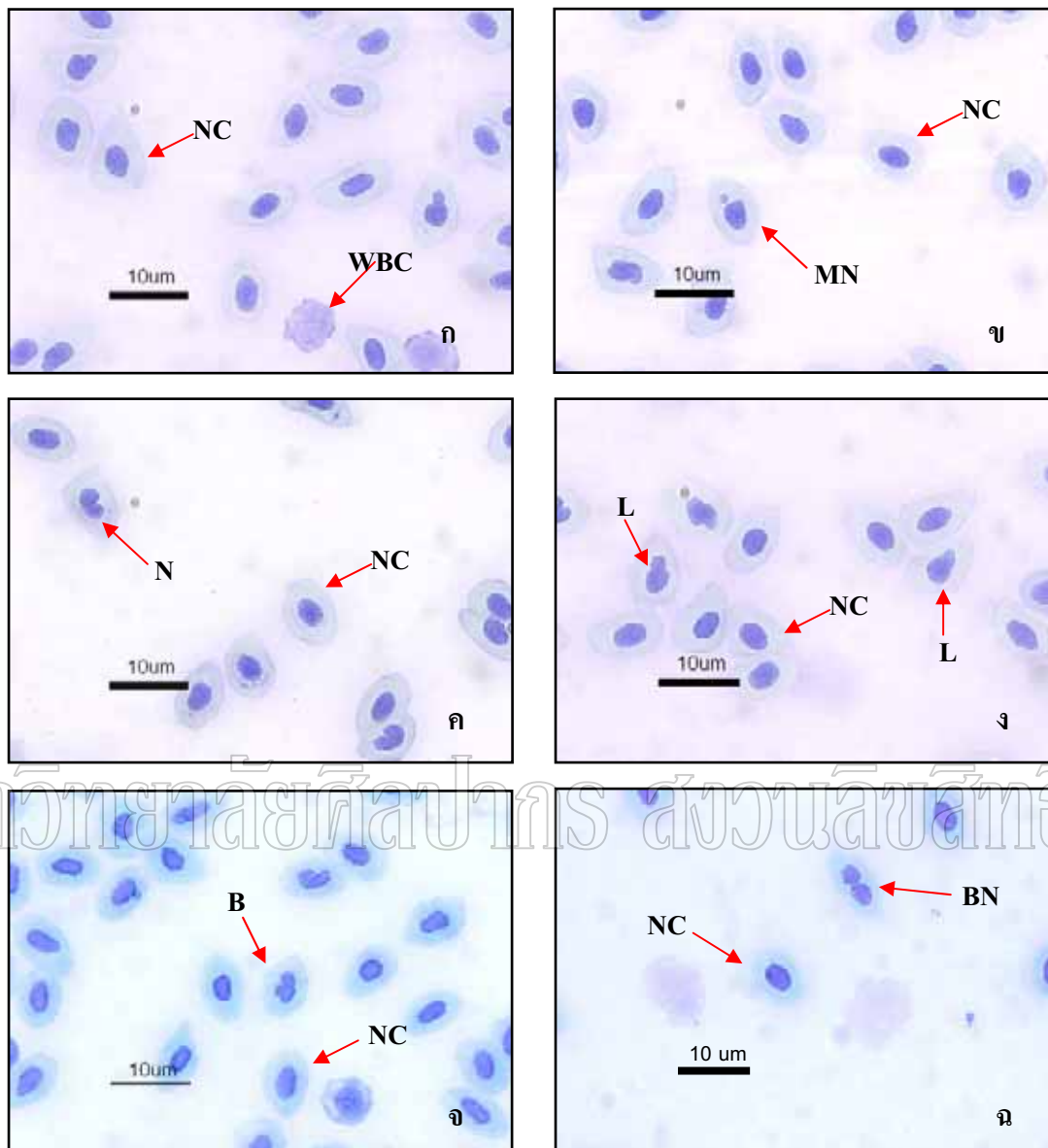
mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย Notched, Lobed และ Blebbed nucleus ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่รอด 1 ตัว

<sup>a-cd</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ได้ รับสารทดสอบ 24 ชั่วโมงกับระยะเวลาอื่น ๆ ในความเข้มข้นของสารทดสอบเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P<0.05$ )

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบภายในช่วงเวลาเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P<0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P<0.05$ )

R<sup>2</sup> คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับความถี่ Notched, Lobed และ Blebbed nucleus ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub>



รูปที่ 15 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว (ก) กลุ่มควบคุม (ข-จ) กลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตามลำดับ และ (ฉ) กลุ่มที่ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  เข้มข้น 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (NC = Normal cell, MN = Micronucleus, N = Notched nucleus, L = Lobed nucleus, B = Blebbed nucleus และ BN = Binucleated nucleus)

### 3. ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ NaAsO<sub>2</sub> ในปลากระพงขาวด้วยเทคนิค

#### Comet assay

การทดลองเพื่อหาความเข้มข้นต่ำสุดของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมปลากระพงขาวนั้น ใช้ความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ต่ำกว่าค่า LC<sub>50</sub> คือ ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง แล้วตรวจผลจากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลานั้น ใช้ตัวอย่างเลือดปลาชุดเดียวกันกับที่นำไปตรวจผลด้วยวิธี Micronucleus Test แล้วแบ่งเลือดปลาส่วนหนึ่งมาตรวจผลด้วยเทคนิค Comet assay โดยตรวจผลจากเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาตัวละ 100 เซลล์ (รูปที่ 16) และวิเคราะห์ผลด้วยการวัดค่าความเสียหายของ DNA 4 ค่า คือ ค่าเฉลี่ยของ Tail DNA (%) (TD%), Tail Length (TL), Tail Moment (TM) และ Olive Moment (OM) ด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay

ผลการวิเคราะห์ความเสียหายของ DNA (DNA damage) ของปลากระพงขาวที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (ตารางที่ 6, 7, 8 และ 9) ด้วยโปรแกรม SPSS และใช้คำสั่ง Univariate เพื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ปัจจัย คือ ระยะเวลาที่ได้รับสารและความเข้มข้นของสารทดสอบต่อค่าเฉลี่ยความเสียหายของ DNA คือ TD%, TL, TM และ OM พบว่าทั้ง 2 ปัจจัยไม่มีความสัมพันธ์ต่อค่าความเสียหายของ DNA ทั้ง 4 ค่าที่ตรวจสอบ แสดงว่าเมื่อเพิ่มระยะเวลาให้ปลาได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เพิ่มขึ้นจาก 24 เป็น 48 ชั่วโมง ไม่มีผลให้ DNA เสียหายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) ส่วนผลการวิเคราะห์ปัจจัยของเวลาและความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ปลาได้รับด้วย Turkey test พบว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสาร NaAsO<sub>2</sub> ตรวจพบว่ามีค่า TD%, TL, TM และ OM ของกลุ่มควบคุมที่ทดลองนาน 48 ชั่วโมง สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ทดลองนาน 24 ชั่วโมง แต่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) ส่วนปลากลุ่ม positive control ซึ่งได้รับ CdCl<sub>2</sub> 0.05 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ถูกชักนำให้มีค่าเฉลี่ย TD%, TL, TM และ OM สูงกว่ากลุ่มควบคุมเท่ากับ 2.45, 3.82, 1.19 และ 4.46 เท่า ในกลุ่มทดลองนาน 24 ชั่วโมง และเท่ากับ 1.95, 2.23, 4.41 และ 3.35 เท่า ในกลุ่มทดลองนาน 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) เมื่อเปรียบเทียบระหว่างระดับความเสียหายของ DNA ปลาที่ได้รับ CdCl<sub>2</sub> 2 ช่วงเวลา พบว่ากลุ่มที่ได้รับนาน 48 ชั่วโมง นั้นมีค่า TD%, TL, TM และ OM สูงกว่ากลุ่มที่ได้รับนาน 24 ชั่วโมง อย่างไรก็ตามมีเฉพาะค่า TD% เท่านั้นที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ 1.67 เท่า ( $P < 0.05$ , ตารางที่ 6, 7, 8 และ 9) เมื่อวิเคราะห์ค่า TD%, TL, TM และ OM ด้วย Turkey test พบว่าปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> เข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L ทั้ง 2 ช่วงเวลาที่ทดลอง พบว่า NaAsO<sub>2</sub> ทุกความเข้มข้นสามารถชักนำให้ DNA เสียหายได้เมื่อวัดจากค่า TL ซึ่งมีค่าสูงกว่ากลุ่มควบคุม 2.15, 2.49, 3.04 และ 3.19 เท่า จากปลาในกลุ่มที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ส่วนค่า TD% และ OM นั้นสามารถจำแนก

ความเสียหายของ DNA แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.5, 1 และ 2 mg/L โดยมีค่าสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 1.85-2.87, 2.22-3.72 และ 2.02-3.47 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ส่วนค่า TM นั้น สามารถจำแนกความเสียหายของ DNA แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเฉพาะกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  1 และ 2 mg/L โดยมีค่าสูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม 6.03 และ 5.64 เท่า ตามลำดับ ( $P < 0.05$ ) ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าค่าความเสียหายของ DNA ที่วัด 4 ค่า นั้น ค่า TL มีความไวสูงสุดในการวัดความเสียหายของ DNA รองลงมา คือ TD% และ OM และที่มีความไวน้อยที่สุดคือ TM (ตารางที่ 6, 7, 8 และ 9)

จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างค่า TD%, TL, TM และ OM กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  พบว่ามีค่า  $R^2$  ซึ่งแสดงความสัมพันธ์ของความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  กับค่า TD% เท่ากับ 0.8219 และ 0.3211 ในปลากลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ส่วนค่า  $R^2$  ของค่า TL มีค่าเท่ากับ 0.7613 และ 0.5392 สำหรับค่า  $R^2$  ของค่า TM มีค่าเท่ากับ 0.7818 และ 0.5986 และค่า  $R^2$  ของค่า OM มีค่าเท่ากับ 0.7652 และ 0.5330 ในปลากลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ (ตารางที่ 6, 7, 8 และ 9) ซึ่งสามารถเรียงลำดับค่า  $R^2$  ที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเสียหายของ DNA กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ในกลุ่มที่ได้รับสาร 24 ชั่วโมง คือ  $\text{TD}\% > \text{TM} > \text{OM} > \text{TL}$  ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร 48 ชั่วโมง คือ  $\text{TM} > \text{TL} > \text{OM} > \text{TD}\%$  ผลการวัดระดับความเสียหายของ DNA โดยเฉพาะกลุ่มที่ทดลองนาน 24 ชั่วโมงแสดงให้เห็นว่า ค่า TL มีความไวสูงสุดเพราะสามารถจำแนกระดับความแตกต่างระหว่าง DNA ของกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  กับกลุ่มควบคุมได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.25 mg/L แต่พบว่ามีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.7613 ซึ่งต่ำกว่าค่าอื่น ๆ และค่าที่มีความไวรองลงมา คือ TD% และ OM เพราะสามารถจำแนกความเสียหายของ DNA แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อปลาได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้นต่ำ คือ 0.5 mg/L ได้ แต่พบว่า TD% มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.8219 ซึ่งสูงกว่าค่าอื่น ๆ ส่วน OM นั้น มีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.7652 ส่วนการวัดค่าความเสียหายของ DNA จากปลาทดลองนาน 48 ชั่วโมง นั้น พบว่าความเสียหายของ DNA ที่วัดจากค่าต่าง ๆ รวม 4 ค่านั้น มีค่า  $R^2$  ระหว่าง 0.3211-0.5986 ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ แต่ก็สามารถบ่งชี้ความเสียหายของ DNA ได้เพียงแต่ความเสียหายเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  น้อย

จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าปลาชะพงขาวที่แช่ใน  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ทำให้เกิดความเสียหายของ DNA จึงสามารถใช้เทคนิค Comet assay ตรวจสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมที่เกิดจากปลาได้รับสารพิษในระดับที่ไปทำลายสารพันธุกรรมได้ และความเข้มข้นต่ำสุดของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ทำให้เกิดความเสียหายของ DNA คือ 0.25 mg/L และเมื่อวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างค่าพารามิเตอร์ต่างๆ กับความเข้มข้นของ

NaAsO<sub>2</sub> พบว่ามีค่า R<sup>2</sup> สูง โดยเฉพาะกลุ่มทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ผลการทดลองยังชี้ให้เห็นว่าความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่เพิ่มสูงขึ้นมีผลทำให้เกิดความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมเพิ่มสูงขึ้นด้วย

ตารางที่ 6 ค่าเฉลี่ยของ Tail DNA (%) จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่รอดชีวิตและนำมาตรวจผล (ตัว)		Tail DNA (%) [TD%]		เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น
	24h	48h	24h	48h	
0	20	20	3.64±0.41	7.63±1.30	5.67±1.01 <sub>a</sub>
0.25	20	19	6.23±0.71	11.07±0.96	8.65±1.02 <sub>ab</sub>
0.5	20	19	6.04±0.72	15.02±0.38	10.53±1.02 <sub>bc</sub>
1	20	20	8.07±0.84	17.12±0.44	12.60±1.01 <sub>c</sub>
2	19	19	9.05±0.89	13.88±0.39	11.46±1.04 <sub>c</sub>
เปรียบเทียบระหว่างเวลา	99	97	6.61±0.66 <sup>a</sup>	12.95±0.66 <sup>b</sup>	
R <sup>2</sup>			0.8219	0.3211	
CdCl <sub>2</sub> 0.05 (mg/L)	19	20	8.91±1.59 <sup>a*</sup>	14.86±0.42 <sup>b*</sup>	

mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย Tail DNA (%) ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่รอดชีวิต 1 ตัว

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

R<sup>2</sup> คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับค่าเฉลี่ยของ Tail DNA (%) ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 7 ค่าเฉลี่ยของ Tail length จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*)  
 ที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง  
 (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่รอดชีวิตและนำมาตรวจผล (ตัว)		Tail length (μm) (TL)		เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น
	24h	48h	24h	48h	
0	20	20	8.98±0.63	19.07±3.01	14.03±3.60 <sub>a</sub>
0.25	20	19	22.91±2.43	37.47±3.84	30.19±3.65 <sub>b</sub>
0.5	20	19	20.15±2.29	49.81±5.24	34.98±3.65 <sub>bc</sub>
1	20	20	34.97±5.06	52.38±7.05	42.68±3.60 <sub>bc</sub>
2	19	19	36.86±4.30	52.64±10.72	44.75±3.70 <sub>c</sub>
เปรียบเทียบระหว่างเวลา	99	97	24.77±2.36 <sup>a</sup>	42.28±2.39 <sup>b</sup>	
R <sup>2</sup>			0.7613	0.5392	
CdCl <sub>2</sub> 0.05 (mg/L)	19	20	34.28±5.44 <sup>a*</sup>	42.57±7.22 <sup>a*</sup>	

mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย Tail length ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่รอดชีวิต 1 ตัว

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบ

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

R<sup>2</sup> คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับค่าเฉลี่ยของ Tail length ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 8 ค่าเฉลี่ยของ Tail moment จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่รอดชีวิตและนำมาตรวจผล (ตัว)		Tail moment (TM)		เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น
	24h	48h	24h	48h	
0	20	20	0.57±0.06	3.04±1.02	1.81±1.47 <sub>a</sub>
0.25	20	19	2.63±0.41	7.36±1.02	4.99±1.49 <sub>ab</sub>
0.5	20	19	2.59±0.52	12.43±2.14	7.51±1.49 <sub>abc</sub>
1	20	20	5.51±1.07	16.31±3.45	10.91±1.47 <sub>c</sub>
2	19	19	5.67±0.93	14.74±4.91	10.20±1.50 <sub>bc</sub>
เปรียบเทียบระหว่างเวลา	99	97	3.39±0.93 <sup>a</sup>	10.77±0.94 <sup>b</sup>	
R <sup>2</sup>			0.7818	0.5986	
CdCl <sub>2</sub> 0.05 (mg/L)	19	20	6.79±1.91 <sup>a*</sup>	13.41±3.72 <sup>a*</sup>	

mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย Tail moment ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่รอดชีวิต 1 ตัว

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบ

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

R<sup>2</sup> คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับค่าเฉลี่ยของ Tail moment ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

ตารางที่ 9 ค่าเฉลี่ยของ Olive moment จากเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่รอดชีวิตและนำมาตรวจผล (ตัว)		Olive moment (OM)		เปรียบเทียบระหว่างความเข้มข้น
	24h	48h	24h	48h	
0	20	20	1.20±0.09	2.74±0.52	1.97±0.81 <sub>a</sub>
0.25	20	19	2.65±0.34	5.50±0.54	4.08±0.82 <sub>ab</sub>
0.5	20	19	2.66±0.41	8.64±1.27	5.65±0.82 <sub>bc</sub>
1	20	20	4.25±0.64	10.39±1.84	7.32±0.81 <sub>c</sub>
2	19	19	4.37±0.54	9.28±2.68	6.83±0.83 <sub>bc</sub>
เปรียบเทียบระหว่างเวลา	99	97	3.03±0.53 <sup>a</sup>	7.31±0.53 <sup>b</sup>	
R <sup>2</sup>			0.7652	0.5330	
CdCl <sub>2</sub> 0.05 (mg/L)	19	20	5.35±1.23 <sup>a*</sup>	9.18±2.16 <sup>a*</sup>	

mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย Olive moment ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่รอดชีวิต 1 ตัว

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

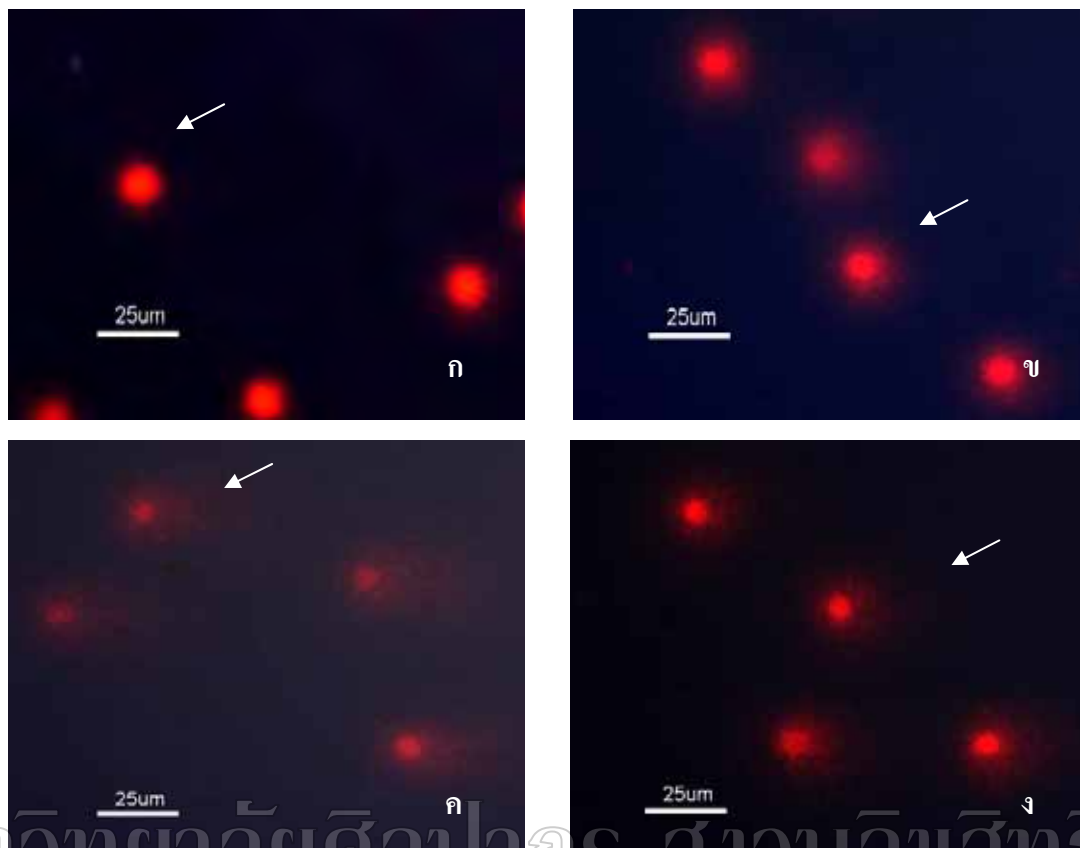
<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบ

ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

R<sup>2</sup> คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับค่าเฉลี่ยของ Olive moment ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากะพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง





รูปที่ 16 เซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากระพงขาว (ก) จากกลุ่มควบคุม และ (ข) จากปลาที่แช่  $\text{NaAsO}_2$  0.25 mg/L ซึ่งพบ DNA damage ระดับปานกลาง (ค) จากปลาที่แช่  $\text{NaAsO}_2$  2 mg/L ซึ่งพบ DNA damage ระดับมาก และ (ง) จากปลาที่แช่  $\text{CdCl}_2$  0.05 mg/L ซึ่งพบ DNA damage ระดับมาก เมื่อตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์ fluorescence กำลังขยาย 400 เท่า

#### 4. ผลการตรวจสอบความเป็นพิษเซลล์ตับ (liver toxicity) ของ $\text{NaAsO}_2$ ในปลากระพงขาวด้วยเทคนิค Lipid proxidations (LPO)

จากการศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L ต่อปลากระพงขาว เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นั้นใช้ปลากลุ่มเดียวกับที่ศึกษาความเป็นพิษต่อสารพิษรูปผลึกปลา โดยหลังจากเก็บเลือดปลาไปตรวจผลด้วยเทคนิค Micronucleus Test และ Comet assay แล้วนำปลาไปทำให้ตายด้วยวิธีแช่เย็น  $-20^\circ\text{C}$  แล้วจึงผ่าตัดนำตับปลาแต่ละกลุ่มไปเก็บรักษาไว้ที่  $-80^\circ\text{C}$  เพื่อนำมาศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อเซลล์ตับของปลาด้วยเทคนิค Lipid proxidations โดยชั่งน้ำหนักตับจากปลากลุ่มทดลองละ 0.5 กรัม ซึ่งเตรียมมาจากปลากลุ่มละ

15-20 ตัว และตรวจซ้ำรวม 5 ซ้ำ เพื่อวัดปริมาณ Malondialdehydes (MDA) แล้วคำนวณเป็นค่าเฉลี่ยของ MDA ที่เซลล์ตับสร้างขึ้น เพราะปริมาณของ MDA บ่งชี้การเกิด oxidative damage ที่เกิดจากอนุมูลอิสระที่เกิดจากปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$

**ผลการวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยของ MDA ของปลากระพงขาวที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  2** ช่วงเวลา คือ 24 และ 48 ชั่วโมง ด้วยโปรแกรม SPSS และใช้คำสั่ง Univariate เพื่อเปรียบเทียบทั้ง 2 ปัจจัย คือ ระยะเวลาที่ได้รับสารและความเข้มข้นของสารทดสอบ พบว่าทั้ง 2 ปัจจัยมีผลร่วมกันในการชักนำให้เกิด MDA ส่วนผลการวิเคราะห์ปัจจัยของเวลาและความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ปลาได้รับด้วย Turkey test พบว่ากลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสาร  $\text{NaAsO}_2$  ตรวจพบว่ามีค่า MDA ของกลุ่มควบคุมที่ทดลองนาน 48 ชั่วโมง สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ทดลองนาน 24 ชั่วโมง แต่ไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ( $P > 0.05$ ) ส่วนปลาในกลุ่ม positive control ซึ่งได้รับ  $\text{CdCl}_2$  0.05 mg/L นั้น พบว่ามีค่าเฉลี่ย MDA แตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แต่ไม่แตกต่างกันเมื่อระยะเวลาทดลองเพิ่มขึ้นจาก 24 เป็น 48 ชั่วโมง ( $P > 0.05$ , ตารางที่ 10)

ส่วนปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้น 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นั้นพบว่าทุกความเข้มข้นมีค่าเฉลี่ย MDA ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และไม่แตกต่างระหว่างช่วงเวลาทดสอบ ( $P > 0.05$ , ตารางที่ 10) จากการวิเคราะห์ค่าสหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างค่า MDA กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  พบว่ามีค่า  $R^2$  เท่ากับ -0.5418 และ 0.0538 ในปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ปลาได้รับอยู่ในระดับต่ำจึงไม่สามารถชักนำให้เกิดปริมาณของ MDA ในเซลล์ตับให้เพิ่มขึ้นและแตกต่างจากปลาในกลุ่มควบคุม เพื่อบ่งชี้การเกิด oxidative damage ในปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  ระหว่าง 0.25-2 mg/L ได้

ตารางที่ 10 ค่าเฉลี่ยของ Malondialdehydes (MDA) ในเซลล์ตับของปลากะพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ทดสอบกับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	Malondialdehydes (μM)	
	24h	48h
0	37.21±8.71 <sup>a</sup>	45.52±7.11 <sup>a</sup>
0.25	40.98±6.69 <sup>a</sup>	27.34±4.80 <sup>a</sup>
0.5	42.29±6.06 <sup>a</sup>	23.95±3.71 <sup>a</sup>
1	28.60±3.35 <sup>a</sup>	64.21±10.02 <sup>a</sup>
2	29.66±1.70 <sup>a</sup>	39.63±8.63 <sup>a</sup>
CdCl <sub>2</sub> 0.05 mg/L	40.44±1.98 <sup>a*</sup>	29.97±4.46 <sup>a*</sup>
R <sup>2</sup>	-0.5418	0.0538

ค่าเฉลี่ย (mean±SE) จากเซลล์ตับ 0.5 กรัม จำนวน 15-20 ตัว

<sup>a-b</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง

ในความเข้มข้นของสารทดสอบเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

<sup>a-b</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบภายในช่วงเวลาเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P < 0.05$ )

R<sup>2</sup> คือค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับค่าเฉลี่ยของ

Malondialdehydes ในเซลล์ตับปลากะพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 กับ 48 ชั่วโมง

## บทที่ 6

### สรุปและอภิปรายผลการทดลอง

การทดลองใช้ปลากระพงขาวประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ  $\text{NaAsO}_2$  และ  $\text{CdCl}_2$  (Positive control) หลังจากปลาได้รับสารที่ทดสอบเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (Acute toxicity) โดยการศึกษาพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้นน้อยที่สุดที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของปลากระพงขาวโดยใช้เทคนิค Micronucleus test และ Comet assay รวมทั้งเปรียบเทียบความไวในการตรวจความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมปลากระพงขาว 2 เทคนิค คือ Micronucleus test และ Comet assay นอกจากนี้ยังศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อปริมาณชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชันภายในเซลล์ตับปลากระพงขาว โดยมีผลการทดลองในรายละเอียด ดังนี้

#### 1. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ $\text{NaAsO}_2$ ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ( $\text{LC}_{50}$ )

ผลการทดสอบความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  โดยการแช่ปลากระพงขาวในสารละลาย  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้น 0, 1, 2, 4, 8, 16, 32 และ 64 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ทำให้ปลาตายร้อยละ 50 ( $\text{LC}_{50}$ ) ในเวลา 24 ชั่วโมง คือ 16.4224 mg/L เมื่อวิเคราะห์ตามวิธีของ Kamrin (1997) พบว่าความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่มีค่า  $\text{LC}_{50}$  เท่ากับ 16.4224 mg/L นี้ จัดให้  $\text{NaAsO}_2$  มีความเป็นพิษในระดับที่ค่อนข้างเป็นพิษ (slightly toxic) ในปลา ส่วนความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ทำให้ปลาตาย 100% คือ 64 mg/L

จากการทดลองพบว่าปลากระพงขาวที่แช่  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้น 64 mg/L เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีพฤติกรรมผิดปกติ เช่น มีการเคลื่อนไหวของครีบ การปิดเปิดเหงือกบ่อยๆ กระโดดขึ้นเหนือน้ำ มีการว่ายน้ำที่ช้าลงและตายในที่สุด การที่ปลามีพฤติกรรมที่ผิดปกติอาจเกิดจาก  $\text{NaAsO}_2$  ไปทำลายระบบประสาท (Vahidnia, 2008) ทั้งยังพบว่าปลากระพงขาวที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  มีเกล็ดหลุดลอกออกจากผิวหนังด้วย (รูปที่ 19) ซึ่งคล้ายกับอาการความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ที่แสดงออกที่ผิวหนังคน (Yu, 2006) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Fromm และคณะ (1975) ที่พบว่าโลหะหนัก เช่น สังกะสีปรอทและสารหนู จะทำลาย epithelial cell ของเหงือกปลาให้หลุดออก เพราะตะกอนของสารประกอบโลหะหนักเข้าไปอุดตันตามซอกเหงือก และทำลายเซลล์บุผิวชั้นนอก ทำให้การแลกเปลี่ยนก๊าซออกซิเจนเป็นไปอย่างลำบาก ปลาจึงจมน้ำตาย

ผลการทดลองนี้พบว่าค่า 24h-LC<sub>50</sub> ของ NaAsO<sub>2</sub> ในปลากระพงขาวขนาด 7.79±0.09 ซม. น้ำหนัก 9.14±0.40 กรัม เท่ากับ 16.4224 mg/L มีค่าใกล้เคียงกับรายงานการศึกษาค่า 24h-LC<sub>50</sub> ของ NaAsO<sub>2</sub> ในปลาชนิดต่างๆ โดย Lima และคณะ (1984) รายงานว่ามีค่าเท่ากับ 18.9 และ 18.3 mg/L ในเอมบริโอของปลา fathead minnows (*Pimephales promelas*) และ ปลา flagfish (*Jordanella floridae*) ตามลำดับ และมีค่าเท่ากับ 14.77 mg/L ในปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn.) ขนาด 3-5 ซม. (เบญจวรรณ, 2549) แต่มีความแตกต่างจากค่า 24h-LC<sub>50</sub> ของ NaAsO<sub>2</sub> ในลูกปลา channel catfish ซึ่งมีค่าสูงเท่ากับ 49.9 mg/L (Schlenk, 1997) และมีค่าสูงมากเท่ากับ 69.09 mg/L ในปลานิล (*O. mossambicus*) ขนาด 17.67±1.65 cm. (Liao, 2003) แสดงให้เห็นว่าปลาแต่ละชนิดมีความไวต่อความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> ต่างกัน นอกจากนี้ขนาดของปลาและวิธีที่ปลาได้รับสารหนูด้วย โดยการทดลองนี้ใช้ NaAsO<sub>2</sub> ซึ่งเป็นสารหนูอนินทรีย์ที่สามารถละลายน้ำได้ดีและมีความเป็นพิษสูงสุด ส่วนสารหนูในรูป As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> เป็นสารหนูอนินทรีย์ที่สามารถละลายน้ำได้น้อยมาก (Kamrin, 1997) จึงมีความเป็นพิษน้อยลง (Garland, 2007) วิธีทดลองในปลากระพงขาวซึ่งการทดลองนี้เลือกใช้สอดคล้องกับเกณฑ์ของ EPA (1996) และ OECD (2007) ซึ่งกำหนดให้ใช้ปลาทดสอบกลุ่มละ 20 ตัว และปลากลุ่มควบคุมต้องมีอัตราการตายน้อยกว่า 10% และขนาดลูกปลาที่ใช้ทดสอบนี้สอดคล้องกับแนวทางทดสอบสารพิษโดยใช้ปลาขนาดเล็กระหว่าง 7.79±0.09 ซม. น้ำหนัก 9.14±0.40 กรัม เป็นระยะปลาวัยอ่อนซึ่งมีความไวในการตรวจความเป็นพิษโดย U.S. EPA, 2002 และการเลือกใช้การทดลองแบบ Static-renewal test โดยเปลี่ยนสารละลายใหม่ทั้งหมดทุกวันนี้ เพื่อลดการเกิดของเสียในน้ำ และป้องกันการลดลงของความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> (Akter, 2008) เนื่องจากมีรายงานว่าสารหนูอนินทรีย์จะมีความเข้มข้นลดลง 50% หลังจากได้รับสาร เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง (Mckinney, 1992) ส่วนข้อเสีย คือ ใช้น้ำจำนวนมาก ทำให้น้ำทิ้งที่มีโลหะ NaAsO<sub>2</sub> ตกค้าง ซึ่งผู้วิจัยกำจัดโดยตกตะกอนด้วยการเติมปูนขาวในปริมาณที่มากเกินไป เพื่อให้ NaAsO<sub>2</sub> ตกตะกอนในรูป calcium arsenate และ calcium arsenite ตามแนวทางที่กรมควบคุมมลพิษแนะนำ (กรมควบคุมมลพิษ, 2541) ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าปลากระพงขาวที่ใช้ในการทดลองนี้มีความไวต่อความเป็นพิษของ NaAsO<sub>2</sub> มากกว่าปลา channel catfish และปลานิล (*O. mossambicus*) ซึ่งรายงานโดย Schlenk, 1997 และ Liao, 2003 อย่างไรก็ตามในธรรมชาตินั้น แหล่งน้ำที่ปลาอาศัยอยู่อาจมีสารพิษหลายชนิดปนเปื้อน ซึ่งอาจเสริมความเป็นพิษซึ่งกันและกัน หรืออาจมีผลหักล้างกันเองทำให้ความเป็นพิษแปรปรวนไป (ฉัตรรัตน์, 2526)

## 2. ผลการศึกษาความเข้มข้นของ $\text{NaAsO}_2$ ที่มีพิษทำลายสารพันธุกรรมด้วยเทคนิค Micronucleus test

ผลการทดลองนี้พบว่าปลากระดูกขาวกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25-2 mg/L มีค่า MNFs ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลาสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ความเข้มข้น 2 mg/L โดยเฉพาะเมื่อกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ซึ่งมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างค่า MNFs กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  คือ  $R^2$  เท่ากับ 0.9245 ส่วนกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมงนั้นพบว่ามีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.3243 ทั้งนี้เพราะค่า MNFs ของปลากระดูกขาวกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25 mg/L มีค่าสูงกว่าที่ตรวจพบในปลากระดูกขาวกลุ่มอื่น ๆ เมื่อวิเคราะห์ค่า  $R^2$  เฉพาะความสัมพันธ์ของค่า MNFs กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  เฉพาะช่วงความเข้มข้น 0.5-2 mg/L พบว่าค่า MNFs มีความสัมพันธ์เชิงเส้นกับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  โดยมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.9983 ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Siminova และคณะ (2001) ที่พบว่าความสัมพันธ์ของการได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  กับการทำงานของโปรตีน (AP)-1 DNA-binding ในเซลล์กระเพาะปัสสาวะหนู ซึ่งตรวจด้วยเทคนิค nuclear extracts and electrophoresis mobility-shift assay นั้น พบว่าความเสี่ยงของการเกิดมะเร็งจะไม่สัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงความเข้มข้นต่ำ (0.5-10  $\mu\text{g/L}$ ) แต่จะมีความสัมพันธ์เชิงเส้นในช่วงที่มีความเข้มข้นสูง (10-100  $\mu\text{g/L}$ ) โดย  $\text{NaAsO}_2$  จะไปจับกับ sulfhydryl group บน c-Jun N-terminal kinase (JNK) phosphatase ซึ่งเป็นสาเหตุให้ JNK ไม่ทำงาน และยังไม่กระตุ้น c-fos และ c-jun nuclear proteins ทำให้ยับยั้งการเกิด AP-1 เพิ่มขึ้น (Siminova, 2000; Liao, 2004) การที่ผลการทดลองนี้พบว่าปลากระดูกขาวกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25 mg/L มีค่า MNFs สูงกว่ากลุ่มอื่น ๆ นั้นอาจเป็นเพราะ  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้นต่ำนี้ไปมีผลต่อ signaling pathways และ transcription factor ต่าง ๆ ของเซลล์ ดังรายงานของ Barchowsky และคณะ (1999) ที่ศึกษาความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ในเซลล์ endothelial cells ที่เพาะเลี้ยงจากหลอดเลือดแดงใหญ่ของหมู และพบว่า  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้นต่ำ ( $\leq 5 \mu\text{M/L}$ ) มีผลต่อการเกิด signaling pathways เช่น transcription factor NF- $\kappa\text{B}$  ซึ่งเป็นโปรตีนที่ควบคุมการถอดรหัสของ DNA ซึ่งมีความสัมพันธ์กับ DNA damage ถ้าเกิดความผิดพลาดอาจส่งผลต่อความ DNA damage ได้ (Boland, 2001) โดย MN เป็นหนึ่งในผลของการเกิด DNA damage (Fenech, 2008) ดังนั้น  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้นต่ำอาจสนับสนุนการเกิด DNA damage ได้มาก ตามกลไกที่มีรายงานการศึกษาไว้ดังกล่าว ทำให้ตรวจพบค่า MNFs สูงที่ความเข้มข้น 0.25 mg/L ซึ่งรายงานการศึกษาของ Roy และคณะ (2002) สนับสนุนว่าสารหนูไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยตรง ทั้งในแบคทีเรียและเซลล์เพาะเลี้ยงของคน แต่สามารถมีปฏิกิริยาเสริมกันกับ genotoxic agents ชนิดต่าง ๆ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ และเชื่อว่าการเกิดโรคพิษสารหนูเรื้อรังหรืออาร์เซนิกโคซิส (arsenicosis) นั้นถูกกระตุ้นจากการเกิด

ความผิดปกติของโครโมโซม การคัดแปรผลการแสดงออกของยีนและการแบ่งเซลล์อื่นเนื่องมาจากความเครียดออกซิเดชันรวมทั้งความผิดปกติอื่น ๆ ด้วย

จากการศึกษาพบว่าเทคนิค micronucleus test สามารถตรวจวัดความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมปลากระพงขาวได้ที่ความเข้มข้น  $2 \text{ mg/L}$  ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นพบว่า เป็นความเข้มข้นที่ต่ำกว่าสารหนูรูปแบบอื่นที่มีรายงานว่าสามารถชักนำให้เกิด MNFs สูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ คือ  $5 \text{ mg/L}$  ของ  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  ในปลาม้าลาย (*Danio rerio*) และ  $6.936 \text{ mg/L}$  ของ  $\text{As}_2\text{O}_3$  ในปลาช่อน (*Channa punctata*) (Ramirez, 2005 และ Kamlesh, 2009) อย่างไรก็ตามชนิดของสารหนูที่ทดสอบต่างรูปกันจึงมีคุณสมบัติในการละลายน้ำและมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตต่างกัน จึงไม่สามารถเปรียบเทียบระดับความเป็นพิษกับความเข้มข้นของสารหนูได้โดยตรง แต่สนับสนุนได้ว่าปลากระพงขาวเป็นปลาที่มีความไวในการตรวจความเป็นพิษของสารหนูต่อสารพันธุกรรม ด้วยเทคนิค micronucleus test

ผลการตรวจความผิดปกติของนิวเคลียสซึ่งตรวจพบนอกเหนือจากการตรวจ micronucleus นั้น พบว่าค่า NT, LB และ BN ของปลากลุ่มทดลองมีค่าสูงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมเมื่อได้รับ  $\text{NaAsO}_2$   $0.25 \text{ mg/L}$  เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  เป็นเวลา 48 ชั่วโมงนั้น พบว่าที่ความเข้มข้น  $0.5 \text{ mg/L}$  พบความผิดปกติของนิวเคลียสทุกลักษณะแตกต่างจากกลุ่มควบคุม จึงแสดงให้เห็นว่า  $\text{NaAsO}_2$  สามารถชักนำให้เกิดความผิดปกติของนิวเคลียสลักษณะอื่น ๆ คือ  $\text{NT} > \text{LB} > \text{BN}$  โดยความผิดปกติของนิวเคลียสที่พบความถี่สูงสุด คือ NT (notched nucleus) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลาชนิดต่าง ๆ ที่ได้รับสารพิษ เช่น การศึกษาในปลานิล (*Oreochromis niloticus*) ที่แช่ในน้ำทิ้งจากโรงงานสิ่งทอ เป็นเวลา 3, 6 และ 9 วัน ตรวจพบความผิดปกติของนิวเคลียส  $\text{NT} > \text{LB} > \text{BN} > \text{BL}$  ทุกกลุ่มทดลอง (Cavas, 2003) การศึกษาในปลาที่ได้รับโลหะหนัก คือ ตะกั่ว ทองแดง แคดเมียม เป็นเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ตรวจพบผิดปกติของนิวเคลียส  $\text{NT} > \text{LB} > \text{BN} > \text{BL}$  ในปลานิล (*O. niloticus*) ปลาจระเม็ด (*Poronotus triacanthus*) และปลาตะเพียนทอง (*Punticus altus*) ทุกกลุ่มทดลอง (Jiraungkoorskul, 2007) ส่วนปลานิลที่แช่ในน้ำทิ้งจากโรงงานโครเมียมและโรงงานน้ำมัน เป็นเวลา 3, 6 และ 9 วัน นั้นตรวจพบความผิดปกติของนิวเคลียส  $\text{NT} > \text{LB} > \text{BL} > \text{BN}$  ทุกกลุ่มทดลอง (Cavas และ Ergene-Gozukara, 2005)

ผลการทดลองนี้พบว่าความเข้มข้นต่ำสุดของ  $\text{NaAsO}_2$   $0.25$  และ  $0.5 \text{ mg/L}$  ชักนำให้เกิดค่าความผิดปกติของนิวเคลียสทุกลักษณะสูงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมในปลากระพงขาวที่ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จึงแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นและระยะเวลาที่ปลาได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  ทำให้เกิดลำดับความเสียหายของสารพันธุกรรมที่สอดคล้องกับข้อเสนอของ Shimizu และคณะ (1998) ที่เสนอว่าความผิดปกติของนิวเคลียสเกิดจากการแยกกันอย่างซับซ้อนและติดกันของ

โครโมโซม ทำให้ยื่นเกิดการแตกหักหรือรวมตัวกัน จึงเป็นสาเหตุให้เกิด lobed หรือ bleb nuclei ในระหว่างการเพิ่มจำนวน DNA ในนิวเคลียส ถึงแม้จะยังไม่มีรายงานการศึกษากลไกความผิดปกติของนิวเคลียสเหล่านี้กับการบ่งชี้ความเป็นพิษของสารต่อการทำลายสารพันธุกรรมโดยตรงก็ตาม ซึ่งกลไกการทำลายสารพันธุกรรมมีรายงานการศึกษาว่าโลหะหนักจะไปจับกับโครโมโซมและยับยั้งการสร้าง actin tubules และ mitotic spindle เมื่อมีการแบ่งเซลล์ (Yih,1997) ดังนั้นสารหนูซึ่งเป็นโลหะหนักที่เป็นพิษชนิดหนึ่งสามารถก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ซึ่งสารหนูไม่สามารถจับกับ DNA โดยตรง แต่ไปยับยั้งการทำงานของ DNA repair enzyme ทำให้ไม่มีการซ่อมแซม DNA ที่เกิดความเสียหายจากการได้รับสารพิษ จึงทำให้เกิดโครโมโซมแตกหัก (Abernathy, 1999) MN เป็นผลมาจากความเสียหายของโครโมโซมหรือชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ได้รับสารเคมีที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรมจะทำให้สาย DNA ขาด เกิดเป็นชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักอยู่ในไซโตพลาสซึม เมื่อถึงการแบ่งเซลล์ในระยะแอนาเฟสโครโมโซมจะถูกดึงเข้าสู่ขั้วเซลล์ ชิ้นส่วนของ DNA ที่แตกหักจะไม่ถูกดึงไปพร้อมโครโมโซมที่มีเซนโทรเมียร์ จึงเกิดเป็น MN ที่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลักอยู่ในเซลล์ (Al-Sabti, 1995; Ayllon, 2000; Fenech, 2000; 2006) ดังนั้นเทคนิค micronucleus test จึงเป็นเทคนิคที่ดีเทคนิคหนึ่งในการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ  $\text{NaAsO}_2$  นอกจากนี้ยังสามารถตรวจวัดค่า NAFs ไปพร้อมๆกับการตรวจ MN ซึ่งผลการทดลองนี้พบว่า ค่า NAFs มีค่า  $R^2$  สูงและมีความไวในการจำแนกความแตกต่างของปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  จากกลุ่มควบคุมได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด 0.25 mg/L

### 3. ผลการตรวจสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ $\text{NaAsO}_2$ ในปลากระพงขาวด้วยเทคนิค

#### Comet assay

ผลการวัดระดับความเสียหายของ DNA ของปลากระพงขาวที่แช่ใน  $\text{NaAsO}_2$  ความเข้มข้น 0.25-2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง พบว่าปลากลุ่มทดลองนาน 24 ชั่วโมงสามารถตรวจวัดค่าความเสียหายของ DNA ได้ชัดเจน และค่า TL มีความไวสูงสุดเพราะสามารถจำแนกระดับความแตกต่างระหว่าง DNA damage ของกลุ่มทดลองกับกลุ่มควบคุมได้ที่มีความเข้มข้นต่ำสุด คือ 0.25 mg/L โดยมีค่า  $R^2$  เท่ากับ 0.7613 และ 0.5392 ในกลุ่มทดลองนาน 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ จึงสรุปได้ว่า  $\text{NaAsO}_2$  เข้มข้นต่ำที่สุด คือ 0.25 mg/L สามารถชักนำให้เกิด DNA damage ในปลากระพงขาวได้ ส่วนพารามิเตอร์ที่มีความไวรองลงมา คือ TD% และ OM เพราะสามารถจำแนกระดับ DNA damage แตกต่างจากกลุ่มควบคุมได้ที่มีความเข้มข้น 0.5 mg/L ได้ โดยค่า  $R^2$  ของ TD% มีค่าเท่ากับ 0.8219 ซึ่งสูงกว่าค่าพารามิเตอร์อื่น ๆ และ OM มีค่าเท่ากับ 0.7652 จึงสรุปได้ว่าการตรวจ DNA damage ด้วยเทคนิค comet assay จากการวัดค่า TL เป็น



เทคนิคที่มีความไวสูง สามารถใช้เฝ้าระวังค่าการปนเปื้อนของสารหนูในน้ำทิ้งจากอุตสาหกรรมซึ่งกำหนดให้ปนเปื้อนสารหนูได้ไม่เกิน 0.25 mg/L ได้ (คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ, 2549) การตรวจวัด DNA damage ด้วยเทคนิค comet assay ในปลาและในสิ่งมีชีวิตอื่นมีรายงานการศึกษาจำนวนมากสนับสนุนว่า TL เป็นค่าการตรวจวัดที่ดี (Akram, 2009; Zilli, 2003) โดย Jeong (2007) ได้เสนอว่า TL เป็นพารามิเตอร์ที่มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารหนูต่อการตรวจวัด DNA damage จากเซลล์เพาะเลี้ยง hepatocellular carcinoma (PLHC-1 Cell lines) ของปลา *Poeciliopsis lucida* อย่างไรก็ตามผลการศึกษาในปลากระพงขาวพบว่า DNA damage จากปลากลุ่มทดลองที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> นาน 48 ชั่วโมง นั้น มีค่า R<sup>2</sup> ระหว่าง 0.3211-0.5986 ซึ่งถือว่ามีค่าต่ำ แต่ก็สามารถบ่งชี้ความเสียหายของ DNA ได้เพียงแต่ความเสียหายเหล่านั้นมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> น้อย ยังไม่พบรายงานการศึกษาความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ทำให้เกิด DNA damage ในปลาด้วยเทคนิค comet assay แต่พบค่าความเข้มข้นจากการศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงของปลา เช่น เซลล์ RTG-2 ซึ่งเพาะเลี้ยงจาก rainbow trout gonad-2 ที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> และ Na<sub>2</sub>HAsO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 mg/L และในเซลล์ PLHC-1 Cell lines ที่ได้รับ As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> และ As<sub>2</sub>O<sub>5</sub> 1, 5 และ 10 μM (0.1-1 mg/L) ทำให้เกิด DNA damage (Raisuddin, 2004 และ Jeong, 2007) อย่างไรก็ตามการทดลองในเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นการสัมผัสเซลล์กับสารหนูโดยตรงในอาหารเลี้ยงเซลล์ ค่าความเข้มข้นที่ชักนำให้เกิด DNA damage จึงมีค่าต่ำกว่าผลการทดลองในปลากระพงขาว จากรายงานการศึกษาว่าสารหนูยับยั้งการทำงานของ DNA repair enzyme ทำให้ไม่มีการซ่อมแซม DNA ที่เกิดความเสียหายจากการได้รับสารพิษ จึงทำให้เกิดโครโมโซมแตกหัก รวมทั้งไปมีผลต่อยีนที่เกี่ยวข้องกับ DNA damage เช่น ยีน MPO, CAT และ p53 ด้วย (Abermathy, 1999; Ahsan, 2003; Chai, 2007) ดังนั้น DNA ที่ถูกทำลายกลายเป็นสายสั้น ๆ เมื่อแยก DNA ด้วยกระแสไฟฟ้า DNA ที่แตกหักเป็นชิ้นเล็กๆ จะเคลื่อนที่ไปได้เร็วกว่า DNA ขนาดใหญ่ ทำให้เกิดลักษณะคล้ายดาวหาง

ผลการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่าเทคนิค comet assay เป็นเทคนิคที่ดีเทคนิคหนึ่งในการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ NaAsO<sub>2</sub> ในปลาซึ่งความเสียหายของ DNA มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่เพิ่มขึ้น โดยเฉพาะค่า TL มีความไวในการจำแนกความแตกต่างของปลาที่ได้รับ NaAsO<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุมได้ที่ความเข้มข้น 0.25 mg/L ทั้ง 2 ช่วงเวลา ปลากระพงขาวจึงมีความไวในการใช้เป็นโมเดลในการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของ NaAsO<sub>2</sub> ในแหล่งน้ำ ซึ่งกรมควบคุมมลพิษกำหนดให้น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมปนเปื้อนสารหนูได้ไม่เกิน 0.25 mg/L นอกจากนี้เทคนิค Comet assay มีข้อดี คือ สามารถตรวจวัดความเสียหายของสารพันธุกรรมครั้งละเซลล์ได้ เหมาะในการศึกษาในเซลล์ยูคาริโอต ใช้เซลล์จำนวนน้อยในการศึกษา เป็นวิธีที่เร็วและมีความไวกว่าเทคนิคอื่นๆในการศึกษา DNA damage (Frenzilli, 2009) เทคนิค Comet assay

ในปลาจึงเป็นเทคนิคที่สามารถนำมาใช้ในการตรวจเพื่อเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารพิษประเภทที่มีฤทธิ์ทำลายสารพันธุกรรมในแหล่งน้ำ (Frenzilli,2004; Russo,2004) อย่างก็ตามผลการตรวจ DNA damage ไม่ได้จำเพาะต่อ  $\text{NaAsO}_2$  แต่หมายรวมถึงผลกระทบของสารปนเปื้อนในแหล่งน้ำในภาพรวมที่มีฤทธิ์ทำลายสารพันธุกรรม การใช้ปลาเป็นยามเฝ้าระวังมลพิษในแหล่งน้ำจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อเฝ้าระวัง เตือนภัยและป้องกันปัญหาที่อาจส่งผลกระทบต่อทรัพยากรธรรมชาติ สิ่งแวดล้อมและเกิดผลกระทบต่อสุขภาพของคน โดยเฉพาะสถิติการเกิดโรคมะเร็งที่กระทรวงสาธารณสุขรายงานพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นและสาเหตุสำคัญเกิดจากการปนเปื้อนในอาหาร (Jeong, 2003)

จากผลการเปรียบเทียบความไวของเทคนิค comet assay และ micronucleus test ในการตรวจ DNA damage โดยการทดลองนี้เปรียบเทียบผลในปลาตัวเดียวกัน ที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25-2 mg/L พบว่า comet assay มีความไวกว่า micronucleus test 8 เท่า เมื่อตรวจโดยใช้ ค่า TL เนื่องจากสามารถตรวจวัด DNA damage แตกต่างจากกลุ่มควบคุมได้ที่มีความเข้มข้นต่ำ คือ 0.25 mg/L ส่วน micronucleus test ตรวจวัดได้ที่ 2 mg/L เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาในปลาชนิดอื่นพบว่าได้ผลที่สอดคล้องกัน โดย comet assay มีความไวกว่า micronucleus test 2 เท่า ในการตรวจความเป็นพิษของสาร N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine ต่อปลา rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) และ สาร glyphosate 5 ppm ต่อปลาทอง *Carassius auratus* (Kim, 2006 และ Casas, 2007) ทั้งนี้เพราะ comet assay สามารถตรวจวัด DNA damage ที่เกิดความเสียหายได้ทั้ง single strand และ double strand DNA (Tice, 2000) ส่วน เทคนิค micronucleus ตรวจความเสียหายได้เฉพาะ double strand DNA (Trosic, 2002) ซึ่งการเกิด DNA damage นั้นอาจเกิดที่ single strand จึงทำให้เทคนิค comet assay มีความไวในการตรวจวัดความเสียหายได้มากกว่า micronucleus test

#### 4. ผลการตรวจสอบความเป็นพิษเซลล์ตับ (liver toxicity) ของ $\text{NaAsO}_2$ ในปลากระพงขาวด้วยเทคนิค Lipid peroxidations

lipid peroxidations เป็นกลไกหลักของการเกิดภาวะบาดเจ็บของเซลล์ (cell injury) ในสิ่งมีชีวิตจำพวกพืชและสัตว์ โดยเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจากอนุมูลอิสระ ซึ่งเกี่ยวข้องกับไขมันไม่อิ่มตัว (unsaturated lipid) ที่พบตามผนังของเซลล์ได้รับความเสียหาย เกิดเป็น lipid peroxidations หรือ thiobarbituric acid reactive substances (TBARs) หรือ malondialdehyde (MDA) ถ้าร่างกายเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidations มากขึ้น จะเหนี่ยวนำให้เกิดอนุมูลอิสระมากขึ้นเช่นกัน และมีผลต่อการทำลายเซลล์และสารพันธุกรรม (Halliwell, 1993)

จากการทดลองพบค่าเฉลี่ย MDA ของปลากลุ่มควบคุมมีค่าสูงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองและมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ย MDA ของปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  1-2 mg/L เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และสูงกว่าปลาที่ทดลองที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  0.25-0.5 และ 2 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง รวมทั้งสูงกว่าค่าเฉลี่ย MDA ของปลาที่ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  0.05 mg/L เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วย ถึงแม้จะไม่แตกต่างกันทางสถิติก็ตาม จึงทำให้ค่าสหสัมพันธ์ ( $R^2$ ) ระหว่างค่า MDA กับความเข้มข้นของ  $\text{NaAsO}_2$  มีค่าต่ำกว่า 0.0538 ส่วนปลาในกลุ่ม positive control ซึ่งได้รับ  $\text{CdCl}_2$  0.05 mg/L นั้น พบว่ามีค่าเฉลี่ย MDA แตกต่างกันระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองเฉพาะเวลา 24 ชั่วโมง และไม่แตกต่างกันระหว่างกลุ่มที่ได้รับ  $\text{CdCl}_2$  24 และ 48 ชั่วโมง เมื่อเปรียบเทียบค่า MDA จากเซลล์ตับของปลาในการทดลองนี้พบว่ามีค่าเท่ากับ 58 และ 128  $\mu\text{M/g}$  ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าที่มีรายงานการตรวจพบ ได้แก่ ปลากระพงแดง (*Sparus aurata*) 0.018-0.022  $\mu\text{M/g}$  (Varo, 2007) ปลากระพงขาว (*L. calcarifer*) 4-20  $\mu\text{M/g}$  (Buaneow, 2008) ปลากระพงขาว (*Dicentrarchus labrax*) 0.0025-0.0030  $\mu\text{M/mg protein}$  (Maria, 2008) และในปลา Rainbow Trout 8-16  $\mu\text{M/mg}$  (Yildiz, 2006) จึงทำให้  $\text{NaAsO}_2$  ทุกความเข้มข้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม

ผลการทดลองนี้พบว่าเทคนิค lipid peroxidations ไม่สามารถตรวจวัดความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อสารพันธุกรรมปลากระพงขาว ได้ที่ความเข้มข้น 0.25-2 mg/L ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่นพบว่าสอดคล้องกับ Schlenk และคณะ (1997) ศึกษาในปลา channel catfish ขนาด 300-400 g ที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$ ,  $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  และ Herbicide Monosodium Methyl Arsonate (MSMA) เข้มข้น 0.01, 0.1 และ 1 mg/L เป็นเวลา 7 วัน ซึ่งตรวจไม่มีผลต่อการเกิด oxidative stress ในทุกความเข้มข้นเมื่อวัดค่า MDA และ glutathione อย่างไรก็ตามรายงานการศึกษาในปลาชนิดอื่นที่ได้รับสารประกอบสารหนูในรูปของ  $\text{As}_2\text{O}_3$  ที่ความเข้มข้นสูงและระยะเวลาสั้นขึ้นพบว่า MDA สูงขึ้น เช่น ในปลานิล (*Tilapia mossambica*) ที่ได้รับ  $\text{As}_2\text{O}_3$  0.1 และ 0.05 mg/L นาน 15 และ 30 วัน ทุกกลุ่มทดลองพบค่าเฉลี่ย MDA เท่ากับ  $5.54 \pm 0.09$  และ  $5.89 \pm 1.01$   $\mu\text{M/mg protein}$  และพบว่าค่า superoxide dismutase (SOD) และ catalase สูงขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมด้วย (Soundararajan, 2009) ซึ่งผลการทดลองในปลาอุกด้าน (*Clarias batrachus*) ที่ได้รับ  $\text{As}_2\text{O}_3$  เข้มข้น 4.2 และ 8.4 mg/L เป็นเวลา 10 วัน ให้ผลการทดลองในทำนองเดียวกัน (Bhattacharya, 2007) จากรายงานข้างต้นแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของสารหนูและระยะเวลาที่ปลาได้รับสารเป็นปัจจัยสำคัญต่อการเกิด lipid peroxidation รวมทั้งชนิดและขนาดของปลาที่ทดลองอาจมีผลให้การตรวจวัดแตกต่างกันด้วย เมื่อพิจารณาจากผลการศึกษาควรปรับปรุงวิธีการตรวจ MDA ในปลาที่ได้รับ  $\text{NaAsO}_2$  รวมทั้งตรวจจากเซลล์ตับสด ๆ ที่ไม่ได้ผ่านการเก็บแช่แข็ง ปรับปรุงวิธีสูมตัวอย่างเนื้อเยื่อให้ดีขึ้น โดยเจือจางตัวอย่างอย่างต่อเนื่องอย่างน้อย 3 ความเข้มข้นเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของวิธีตรวจด้วย และใช้

เทคนิคอื่น ๆ ตรวจสอบการเกิดอนุมูลอิสระร่วมด้วย เช่น glutathione, GPX, SOD , catalase และ glutathione reductase (Allen, 2003; Lima, 2009) เพราะแต่ละเทคนิคอาจมีความไวที่แตกต่างกัน ด้วย รวมทั้งให้ปลาได้รับ NaAsO<sub>2</sub> ที่เข้มข้นสูงขึ้นและใช้ระยะเวลาทดสอบนานขึ้น ถึงแม้ว่า NaAsO<sub>2</sub> 2 mg/L ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดของการทดลองนี้จะไม่สามารถชักนำให้เกิด lipid peroxidation ในเซลล์จากตับปลาได้

สารหนูมีพิษต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกายถึงแม้จะได้รับในปริมาณน้อย แต่ถ้าได้รับสะสมอย่างต่อเนื่องก็ก่อให้เกิดปัญหาต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตและของคนได้ ในประเทศไทยมีพื้นที่ปนเปื้อนสารหนูกระจายอยู่ในพื้นที่ต่าง ๆ ได้แก่ ยะลา นครศรีธรรมราช สุพรรณบุรี และระยอง โดยกิจกรรมของอุตสาหกรรมและเกษตรกรรม การท่องเที่ยวและชุมชนยังเป็นการเพิ่มการปนเปื้อนของสารหนูในสิ่งแวดล้อมด้วย เพราะ NaAsO<sub>2</sub> เป็นสารก่อมะเร็งในคนที่สำคัญที่มีผลต่อประชากรหลายล้านคนทั่วโลกผ่านทาง การปนเปื้อนในน้ำดื่ม (Kazi , 2009) และสามารถก่อให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ได้ (Ahsan, 2003) และกลไกการเผาผลาญสารหนูผ่านทางกลไก reduction และ oxidations สามารถทำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ในเซลล์ซึ่งจะทำให้ DNA damage รวมทั้งเกิด lipid peroxidations และ protein peroxidation ซึ่ง Yamanaka รายงานเป็นคนแรกในปี 1990 ว่า dimethylarsenic peroxy และสารหนูสามารถชักนำให้เกิดอนุมูลอิสระจาก methylated arsenic นอกจากนี้ยังมีรายงานการศึกษาพบว่าสารหนูชักนำให้โครโมโซมเกิดความผิดปกติและเกิดการแลกเปลี่ยนของ sister chromatid ด้วย (Nordenson, 1981) โดย NaAsO<sub>2</sub> จะไปจับกับระบบการซ่อมแซม DNA หรือ DNA methylation state ซึ่งเป็นสาเหตุให้ DNA เกิดความเสียหายจากการเกิด ROS ซึ่งยับยั้งการทำงานของยีน p53 และเอนไซม์ telomerase มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์และ signal transduction pathways นำไปสู่การทำงานของ transcription factors ที่ผิดปกติ (Wang, 2001)

ผลการศึกษาความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของ NaAsO<sub>2</sub> ในปลากระพงขาวนี้สามารถสรุปได้ว่า NaAsO<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0.25 mg/L เป็นความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถชักนำให้เกิด DNA damage ได้ โดยเทคนิค comet assay โดยพารามิเตอร์ TL ซึ่งมีความไวกว่า micronucleus test 8 เท่า ซึ่งความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> 0.25-2.00 mg/L เป็นความเข้มข้นที่เป็น sublethal dose และมีความเข้มข้นต่ำจึงตรวจไม่พบค่าเฉลี่ย MDA ที่แตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามทั้ง comet assay และ micronucleus test สามารถนำมาใช้ตรวจวัดระดับ DNA damage ในเลือดปลาที่ดีและมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ดังนั้นจึงสามารถใช้ทั้ง 2 เทคนิคนี้ในการตรวจความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมได้ โดยสามารถใช้ปลาเป็นโมเดลในการทดสอบได้ทั้งในห้องปฏิบัติการและการสำรวจในแหล่งน้ำที่สงสัยว่าปนเปื้อนสารพิษ

(Seoane, 2001; Pandey, 2006; Al-sabhi, 1995; Frenzilli, 2009) ลูกปลาตะเพียนขาวจึงเป็นปลาที่มีความไวในการตรวจความเสียหายของสารพันธุกรรมได้ในระดับที่เฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารหนูในน้ำทิ้งของอุตสาหกรรม (0.25 mg/L) ในแหล่งน้ำได้ดี จึงสามารถนำไปประยุกต์ใช้เพื่อจัดการแหล่งเลี้ยงปลาในกระชังเพื่อการบริโภคเพื่อความปลอดภัยของผู้บริโภคและคุณภาพสิ่งแวดล้อมและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของแหล่งน้ำโดยเฉพาะแหล่งน้ำที่นำมาใช้ผลิตเป็นน้ำประปาเพื่อการบริโภคอุปโภคของประเทศ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

## บรรณานุกรม

### ภาษาไทย

กมลชนก พานิชการ. การวางแผนการตลาดเบื้องต้น: การประยุกต์และการวิเคราะห์ด้วย SPSS. พิมพ์ครั้งที่ 1. นครปฐม: โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยาเขตพระราชวังสนามจันทร์, 2549.

กรมควบคุมมลพิษ, กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. สารหนู. กรุงเทพฯ : บริษัท อินทริเกรต โพรโมชัน เทคโนโลยี จำกัด, 2541.

กรมประมง. การเลี้ยงปลาน้ำกร่อย. กรุงเทพมหานคร: โรงพิมพ์ชุมนุมสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด, 2544.

กรมพัฒนาที่ดิน กองแผนงาน. “รายงานผลงานวิจัยประจำปี 2535-2536 เรื่อง การศึกษาปริมาณสารหนูและตะกั่วในดินและน้ำบริเวณพื้นที่ที่ผ่านการทำเหมืองมาแล้ว อ.ร้อนพินบูลย์ จ.นครศรีธรรมราช” 2538

กระทรวงวิทยาศาสตร์ เทคโนโลยีและสิ่งแวดล้อม. “พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานควบคุมและระบายน้ำทิ้งจากแหล่งกำเนิดประเภทโรงงานอุตสาหกรรมและนิคมอุตสาหกรรม” ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 113, ตอนที่ 13ง (13 กุมภาพันธ์ 2539) : 85-89.

กระทรวงสาธารณสุข. “มาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน” ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 120, ตอนที่ 77ง (16 กรกฎาคม 2546)

กลุ่มงานอนามัยสิ่งแวดล้อม สำนักงานสาธารณสุขจังหวัดสุพรรณบุรี. “สรุปผลการดำเนินงานป้องกันและแก้ไขปัญหาสารหนู อำเภอด่านช้าง จังหวัดสุพรรณบุรี ปี 2551-2552” 2551

กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม [Online]. Accessed 27 April 2010. Available from [http://www.dmr.go.th/ewt\\_news.php?nid=4619&filename=index](http://www.dmr.go.th/ewt_news.php?nid=4619&filename=index)

กระทรวงอุตสาหกรรม. “พระราชบัญญัติมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรม พ.ศ. 2511 เรื่อง กำหนดมาตรฐานผลิตภัณฑ์อุตสาหกรรมน้ำบริโภค” ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 95, ตอนที่ 68 (4 กรกฎาคม 2521)

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. “พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำทะเล” ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 124, ตอนที่ 11 (26 ธันวาคม 2549): 123-133.

คณะกรรมการสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ. “พระราชบัญญัติส่งเสริมและรักษาคุณภาพสิ่งแวดล้อมแห่งชาติ พ.ศ. 2535 เรื่อง กำหนดมาตรฐานคุณภาพน้ำในแหล่งน้ำผิวดิน” ราชกิจจานุเบกษา เล่มที่ 111, ตอนที่ 16 (24 กุมภาพันธ์ 2537): 123-133.

ชัชวาลย์ จันทรวิจิตร ยูยงค์ เขียวพานนท์ และทองใบ เวชพันธ์. “ปัจจัยเสี่ยง และขนาดของความเสียหายต่อสุขภาพ ของชาวบ้านในตำบลร้อยพิบูลย์ จากการรับสัมผัสสารหนู” วารสารการส่งเสริมสุขภาพ และอนามัยสิ่งแวดล้อม ปีที่ 23 ฉบับที่ 1 (2543)

ณัฐวรรณ์ ปภาวสิทธิ์. (2526). ความเป็นพิษเฉียบพลันของสารมีพิษบางชนิดต่อสัตว์น้ำในประเทศไทย, น. 57-59. อ้างถึงใน พาลาก สิงหเสนี, ระบิล รัตนพานี และจรัสศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ (บรรณาธิการ). โรคระบาดในปลาน้ำจืด: 2525-2526. กรุงเทพฯ: จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ดาณิศ ทวีตยานนท์. การศึกษาเพื่อหาปริมาณสารหนูในอาหารทะเลและอวัยวะสุกร [Online]. Accessed 27 April 2010. Available from <http://vivaldi.cpe.ku.ac.th:443/dspace/handle/123456789/187>

ตรีรัตน์ ทองบริบูรณ์. “การปนเปื้อนของสารหนูในพืชน้ำ และสัตว์น้ำ บริเวณตำบลร้อยพิบูลย์ ถึงลุ่มน้ำปากพนัง จังหวัดนครศรีธรรมราช” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2540.

ธัญญาภรณ์ สุรภักดี. เปลี่ยนไป “เลย”ชะตากรรมของเมืองเลยหลังจากการเข้ามาของเหมืองทองคำ. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์แปลนพรีนติ้ง, 2553.

บุญมี ปัญญาภรณ์ และคณะ. “เรื่องเต็มการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 43: สาขาประมง สาขาการจัดการทรัพยากรและสิ่งแวดล้อม เรื่องความเข้มข้นของโลหะหนักบางชนิดในเนื้อปลาลิ้นหมา (*Cynoglossus bilineatus*) ที่จับได้จากบริเวณชายฝั่งทะเลแหลมฉบัง จังหวัดชลบุรี” (2548): 532-539.

เบญจวรรณ เสวตวงษ์. “ผลของสารหนูและปรอทที่มีรีนน้ำจืด (*Chiromomus* sp.) และปลานิล (*Oreochromis niloticus* Linn)” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาทรัพยากร การเกษตรและสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยขอนแก่น, 2549.

ตรีทิพย์ รัตนวรชัย. อนุพันธุศาสตร์เบื้องต้นนมหัสจรรย์ของดีเอ็นเอ กรุงเทพฯ : สำนักพิมพ์แห่ง จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2552.

วารภรณ์ ศรีมูล. “การพัฒนาการวิเคราะห์รูปแบบทางเคมีของอาร์เซนิกในปลาด้วยวิธี HPLC/ICP-OES” วิทยานิพนธ์ปริญญาโท สาขาวิชาเคมี บัณฑิตวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

วรพิน วิทยาวาวัฒน์. “การปนเปื้อนของสารหนู แคดเมียม และตะกั่วในลุ่มแม่น้ำปากพอง จังหวัด นครศรีธรรมราช” วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาวิชาการจัดการสิ่งแวดล้อม บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์, 2537.

วิโรจน์ บุญอำนวยวิทยา. สารหนูกับสิ่งแวดล้อม [Online]. Accessed 27 April 2010. Available from <http://digital.lib.kmutt.ac.th/magazine/issue2/articles/art2.html>

วิภาดา กิตยารักษ์. “ผลกระทบของ Linear Alkylbenzene Sulfonate (LAS) ต่อการตอบสนอง ระดับเซลล์ของปูม้า.” วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์ สิ่งแวดล้อม มหาวิทยาลัยบูรพา, 2550.

สถาบันมะเร็งแห่งชาติ. สาเหตุและปัจจัยเสี่ยงของการเกิดมะเร็ง [Online]. Accessed 27 April 2010. Available from <http://www.nci.go.th/knowledge/reasonrisk.htm>

สุนทร กุกสันเทียะ. “เทคนิคการประเมินความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมของแคดเมียมคลอไรด์ และสารสกัดสะเดาในปลาชุกอูย (*Clarias macrocephalus*)” วิทยานิพนธ์ปริญญาโทบริหารธุรกิจ สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัยมหาวิทยาลัยศิลปากร, 2549.

สุภาพร สุกสีเหลือง. มินวิทยา (Ichthyology). 1999.

สุวิตา เจริญศรี และคณะ “การลดลงของระดับ glutathione peroxidase activities ในประชาชน อำเภอรัตนบุรี” 33rd Congress on Science and Technology of Thailand. (2550)

### ภาษาต่างประเทศ

Abernathy, Charles O. et al. “Arsenic: Health Effects, Mechanisms of Actions, and Research Issues.” Environ. Health Perspect. 107 (1999): 593-597.

Ahmed, K. “Toxicity of Arsenic (Sodium Arsenite) to Fresh Water Spotted Snakehead *Channa punctatus* (Bloch) on Cellular Death and DNA Content.” Amer-Eurasian J Agri & Environ Sci . 4 (2008): 18-22.

Ahsan, Habibul. et al. “Susceptibility to arsenic-induced hyperkeratosis and oxidative stress genes myeloperoxidase and catalase.” Cancer Letters 201 (2003): 57–65.

Akcha, F., G. Leday , and A. Pfohl-Leszkowicz. “Measurement of DNA adducts and strand breaks in dab (*Limanda limanda*) collected in the field: effects of biotic (age, sex) and abiotic (sampling site and period) factors on the extent of DNA damage.” Mutat. Res. 552 (2004): 197–207.



- Akram, Zertashia. et al. "Genotoxicity of sodium arsenite and DNA fragmentation in ovarian cells of rat." Toxicol Lett. 190 (2009): 81–85.
- Akter, Mosammat S. et al. "Acute Toxicity of Arsenic and Mercury to Fresh Water Climbing Perch, *Anabas testudineus* (Bloch)." World Journal of Zoology 3 (2008): 13-18.
- Allen T, Singhal R, and Rana SV. "Resistance to Oxidative Stress in a Freshwater Fish *Channa punctatus* After Exposure to Inorganic Arsenic." Biol Trace Elem Res. 98 (2003):63-72.
- Al-Sabti, Kabil, and Chris D. Metcalfe. "Fish micronuclei for assessing genotoxicity in water." Mutat. Res 343 (1995): 121-135.
- Amlund, Heidi. and Marc H.G. Berntssen. "Arsenobetaine in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.): influence of seawater adaptation." Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 138 (2004): 507–514.
- Antman, Keren H. "Introduction: The History of Arsenic Trioxide in Cancer Therapy." The Oncologist. 6 (2001): 1-2
- Ayllon, F. and Garcir-Vanquez, F. "Induction of micronuclei and other nuclear abnormalities in European minnow (*Phoxinus phoxinus*) and mollie (*Poecilia latipinna*): an assessment of the fish in micronucleus test." Mutat. Res. 467 (2000):177-186.
- Ballantyne, Bryan. Perspective in basic and applied Toxicology. Wright, USA. 1988.
- Barchowsky, Aaron. et al. "Low Levels of Arsenic Trioxide Stimulate Proliferative Signals in Primary Vascular Cells without Activating Stress Effector Pathways" Toxicol. Appl. Pharmacol. 159 (1999): 65–75.
- Barsiene, Janina. et al. "Investigation of micronuclei and other nuclear abnormalities in peripheral blood and kidney of marine fish treated with crude oil." Aquat. Toxicol. 78S (2006): S99-S104.
- Baršiene, Janina, Aleksandras Rybakovas, and Laura Andreik nait. "Environmental genotoxicity studies in marine fish and mussels." ICES CM. (2007)
- Barsiene, Janina. et al. "Environmental genotoxicity studies in mussels and fish from the Göteborg area of the North Sea." Acta Zoologica Lituanica 18 (2008): 240-247.
- Basu, Anamika. et al. "Enhanced frequency of micronuclei in individuals exposed to arsenic through drinking water in West Bengal, India." Mutat. Res. 516 (2002): 29–40.

- Basu, Anamika. et al. "Micronuclei as Biomarkers of Carcinogen Exposure in Populations Exposed to Arsenic through Drinking Water in West Bengal, India: A Comparative Study in Three Cell Types." Cancer Epidemiol. Biomark. Prev. 13 (2004): 820-827.
- Bhattacharya, S., A. Bhattacharya, and S. Roy. "Arsenic-induced responses in freshwater teleosts." Fish Physiol Biochem. 33 (2007):463–473.
- Bhattacharya, P. et al. "Transfer of Arsenic from Groundwater and Paddy Soil to Rice Plant (*Oryza sativa* L.): A Micro Level Study in West Bengal, India" World Journal of Agricultural Sciences. 5 (2009): 425-431.
- California Air Resources Board, "Proposed Identification of Inorganic Arsenic as a Toxic Air Contaminant." (1990): 1-12
- Carrasso, K.R., Tibury, K.L., and Myers, M.S. "Assessment of the piscine micronucleus test as an in situ biological indicator of chemical contaminant effects." Can. J. Fish. Aquat. Sci. 47 (1990): 2123-2136.
- Cavas, T., and Ergene-Gozukara, S. "Evaluation of the genotoxic potential of lambda-cyhalotrin using nuclear and nucleolar biomarker on fish cell." Mutat. Res. 534 (2003): 264-271.
- Cavas, T., and Ergene-Gozukara, S. "Induction of micronuclei and nuclear abnormalities in *Oreochromis niloticus* following exposure to petroleum refinery and chromium processing plant effluents." Aquat. Toxicol. 74 (2005): 264-271.
- Cavas, T., Garanko, N.N., and Arkhipchuk, V.V. "Induction of micronuclei and binuclei in blood, gill and liver cells of fishes subchronically exposed to cadmium chloride and copper sulphate." Food Chem Toxicol. 43 (2005): 569-574.
- Cavas, T. and Serpil Ko"nen. "Detection of cytogenetic and DNA damage in peripheral erythrocytes of goldfish (*Carassius auratus*) exposed to a glyphosate formulation using the micronucleus test and the comet assay" Mutagenesis. (2007): 1–6.
- Celik, U., and Oehlenschlaeger, J. "High contents of cadmium, lead, zinc and copper in popular fishery products sold in Turkish supermarkets." Food Control. 18 (2007): 258-261.
- Chai, Chee-Yin. et al. "Arsenic salt-induced DNA damage and expression of mutant p53 and COX-2 proteins in SV-40 immortalized human uroepithelial cells" Mutagenesis. 22 (2007): 403–408.

- Chakraborty, T. et al. "Micronuclei and Chromosomal Aberrations as Biomarkers: A Study in an Arsenic Exposed Population in West Bengal, India." Bull. Environ. Contam. Toxicol. 76 (2006):970–976.
- Chen C.J. "Biomarkers of exposure, effect, and susceptibility of arsenic-induced health hazards in Taiwan" Toxicol. Appl. Pharmacol. 206 (2005): 198– 206.
- Collins, A.R. "The comet assay for DNA damage and repair : principles, applications and limitations." Mol Biotechnol. 26 (2004): 249 – 251.
- Das, H.K. et al. "Arsenic concentrations in rice, vegetables, and fish in Bangladesh: a preliminary study." Environ Int. 30 (2004): 383– 387.
- Desesso, John M. "Teratogen Update: Inorganic Arsenic" TERATOLOGY. 63 (2001):170–173.
- Environmental Protection Agency (EPA), USA. "Fish Acute Toxicity Test, Freshwater and Marine." [Online], Accessed 27 April 2010. Available from [http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS\\_Harmonized/850\\_Ecological\\_Effects\\_Test\\_Guidelines/Drafts/850-1075.pdf](http://www.epa.gov/opptsfrs/publications/OPPTS_Harmonized/850_Ecological_Effects_Test_Guidelines/Drafts/850-1075.pdf)
- Environmental Protection Agency (EPA), USA. "Short-term Methods for Estimating the Chronic Toxicity of Effluents and Receiving Waters to Freshwater Organisms." 4th ed., rev. Washington, DC., 2002.
- Esparza, M.L. Castro de. "The presence of arsenic in drinking water in Latin America and its effect on public health." International Congress Mexico City, 20-24 June 2006
- Fatur, T. et al. "DNA damage and metallothionine synthesis in human hepatoma cells (HepG2) exposed to cadmium." Food Chem. Toxicol. 40 (2002): 1069-1076.
- Fenech, M. "In vitro micronucleus technique." Mutat. Res. 435 (2000): 81-95.
- Fenech, M. "Cytokinesis-block micronucleus assay involves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death." Mutat. Res. 600 (2006): 58-66.
- Fenech, Michael. "Cytokinesis-block micronucleus cytome assay" NATURE PROTOCOLS. 2 (2007): 1084-1104.
- Frenzilli, G. et al. "DNA damage in eelpout (*Zoarces viviparus*) from Goteborg harbour." Mutat. Res. 552 (2004): 187-195.

- Frenzilli G., M. Nigro, and B.P. Lyons “The Comet assay for the evaluation of genotoxic impact in aquatic environments.” Mutat. Res. 681 (2009): 80–92.
- Gabbianelli, R. et al. “Effect of different organotins on DNA of mollusk (*Scapharca inaequivalis*) erythrocytes assessed by the comet assay.” Sci. Total Environ. (2006)
- Garland, Tam. “Arsenic.” Veterinary Toxicology (2007): 418-421
- Guillamet, Emma. et al. “In vitro DNA damage by arsenic compounds in a human lymphoblastoid cell line (TK6) assessed by the alkaline Comet assay.” Mutagenesis. 19 (2004): 129-135.
- Halliwell, Barry, and Susanna Chirico. “Lipid peroxidation: its mechanism, measurement, and significance.” Am J Clin Nutr. 57 (1993): 15S-25S.
- Helma, C., and Uhl, M. “A public domain image-analysis program for the single-cell gel-electrophoresis (comet) assay.” Mutat. Res. 466 (2000): 9-15.
- Huang, C. et al. “Molecular mechanisms of arsenic carcinogenesis.” Mol Cell Biol., 255 (2004): 57–66.
- IARC. “Some drinking water disinfectants and contaminant, including arsenic.” IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic risks to Humans. 84 (2004): 269-477.
- Jayakumar, P., and Paul, VI. “Patterns of cadmium accumulation in selected tissues of the catfish *Clarias batrachus* (Linn.) exposed to sublethal concentration of cadmium chloride.” Vet. Arhiv. 76, 2 (2006): 167-177.
- Jeong, Yeong Nam, M.S. “Arsenic toxicity in PLHC-1 cell line and the distribution of arsenic in Central Appalachia.” Marshall University, (2007).
- Jie, Liu, and Michael P. Waalkes. “Liver is a Target of Arsenic Carcinogenesis.” Toxicol Sci. 105 (2008): 24–32.
- Jiraungkoorskul, W. et al. “Evaluation of Micronucleus Test’s Sensitivity in Freshwater Fish Species” Research Journal of Environmental Sciences. 1 (2007): 56-63.
- Kamlesh, K. Y. and Sunil, P. Trivedi. “Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*” Chemosphere 77 (2009): 1495–1500.
- Kamrin, MA. “Pesticide Profiles: Toxicity, Environmental Impact, and Fate.” Lewis Publishers. Boca Raton (1997)

- Kapaj, S. et al. "Human Health Effects From Chronic Arsenic Poisoning—A Review" J. Environ. Sci. Health, Part A: Environ. Sci. Eng. 41 (2006):2399–2428.
- Kazia, Tasneem Gul. et al. "The correlation of arsenic levels in drinking water with the biological samples of skin disorders." Sci. Total Environ. 407 (2009): 1019–1026.
- Kitchin, Kirk T., and Sarfaraz Ahmad. "Oxidative stress as a possible mode of action for arsenic Carcinogenesis." Toxicol. Let. 137 (2003): 3 -13.
- Kitchin, K.T.,and Rory, Conolly. "Arsenic-Induced CarcinogenesisOxidative Stress as a Possible Mode of Action and Future Research Needs for More Biologically Based Risk Assessment" Chem. Res. Toxicol. 23 (2010): 327–335.
- Kim, Il-Yong, and Chang-Kee Hyun. "Comparative evaluation of the alkaline comet assay with the micronucleus test for genotoxicity monitoring using aquatic organisms." Ecotoxicol. Environ. Saf. 64 (2006): 288–297.
- Krown K A. et al. "Tumor Necrosis Factor Alpha–induced Apoptosis in Cardiac Myocytes" J. Clin. Invest 98, 12 (1996): 2854–2865.
- Kusuba, Vilena, and Rozgaj, Ruzica. "Micronucleus distribution in human peripheral blood lymphocytes treats in vitro with cadmium chloride in G<sub>0</sub> and S of the cell cycle." Chemosphere. 49 (2002): 91-95.
- Li, W. et al. "A survey of arsenic species in chinese seafood" Food Chem. Toxicol. 41 (2003): 1103–1110.
- Li, D. et al. "Developmental mechanisms of arsenite toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos." Aquat. Toxicol. 19 (2009): 229-37.
- Liao, Chung-Min. et al. "Acute Toxicity and Bioaccumulation of Arsenic in Tilapia (*Oreochromis mossambicus*) from a Blackfoot Disease Area in Taiwan." (2003): 252-259.
- Lima, Ann R. et al. "Acute and Chronic Toxicities of Arsenic(III) to Fathead Minnows, Flagfish, Daphnids, and an Amphipod" Arch. Environ. Contam. Toxicol. 13 (1984): 595-601.
- Lima, Juliane Ventura. et al. "Effects of arsenic (As) exposure on the antioxidant status of gills of the zebrafish *Danio rerio* (Cyprinidae)." Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 149 (2009): 538–543.

- Li, Weihua. et al. "A survey of arsenic species in chinese seafood." Food Chem. Toxicol. 41 (2003): 1103–1110
- Luong, T.V. et al. "Endemic Chronic Arsenic Poisoning – China." 30th WEDC International Conference, Vientiane, Lao PDR, (2004): 586-589.
- Maria, V.L., Ahmad, I., M.A. Santos. "Juvenile sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) DNA strand breaks and lipid peroxidation response following  $17\beta$ -estradiol two mode of exposures" Environ. Int. 34 (2008): 23–29.
- Martínez, V. et al. "Evaluation of micronucleus induction in a Chilean population environmentally exposed to arsenic." Mutat. Res. 564 (2004): 65–74.
- Martínez, V. et al. "Micronuclei assessment in buccal cells of people environmentally exposed to arsenic in northern Chile." Toxicol. Let. 155 (2005): 319–327.
- Matsumoto, S.T. et al. "Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery effluents, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberrations in onion root-tips." Genet. Mol. Biol. 29, 1 (2006): 148-158
- Mckinney, James D. "Metabolism and disposition of inorganic arsenic in laboratory animals and humans" Environ Geochem Health. 14 (1992): 43-48.
- Mouron, S.A., Golijow, C.D., and Dulout, F.N. "DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay." Mutat. Res. 498 (2001): 47-55.
- Ninh, T.D, Nagashima, Y., and Shiomi, K. "Unusual arsenic speciation in sea anemones." Chemosphere. 70 (2008): 1168-74.
- Nordenson, Ingrid. et al. "Chromosome aberrations in cultured human lymphocytes exposed to trivalent and pentavalent arsenic" SC and j work environ health. 7 (1981): 277-281.
- OECD. OECD Guideline for the testing of chemicals. "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test." 1997.
- OECD. OECD GUIDELINE FOR THE TESTING OF CHEMICALS. [Online], Accessed 27 April 2010. Available from [http://www.epa.gov/endo/pubs\\_uterotrophic\\_OECD\\_guideline.pdf](http://www.epa.gov/endo/pubs_uterotrophic_OECD_guideline.pdf).

- Orescanin, V. et al. "Biomonitoring of heavy metals and arsenic on the east coast of the Middle Adriatic Sea using *Mytilus galloprovincialis*. Nuclear Instruments and Methods in Physics." Research Section B. 245 (2005): 495-500.
- Ordovas, Jose M. *Methods in Molecular Biology*, 1998.
- Otero, X.L. et al. "Trace elements in biodeposits and sediments from mussel culture in the Ria de Arousa (Galicia, NW Spain)." Environ Pollut. 136 (2005): 119-34.
- Palaniappan, PL.RM., and Vijayasundaram V. "FTIR STUDY OF ARSENIC INDUCED BIOCHEMICAL CHANGES ON THE LIVER TISSUES OF FRESH WATER FINGERLING *SLABEO ROHITA*." Rom J Biophys. 18 (2008): 135-44.
- Pandey, S. et al. "Genotoxicity evaluation of acute doses of endosulfan to freshwater teleost *Channa punctatus* (Bloch) by alkaline single-cell gel electrophoresis." Ecotoxicol. Environ. Saf. 65 (2006): 56-61.
- Raisuddin S, and Jha AN. "Relative sensitivity of fish and mammalian cells to sodium arsenate and arsenite as determined by alkaline single-cell gel electrophoresis and cytokinesis-block micronucleus assay." Environ Mol Mutagen. 44 (2004):83-9.
- Ramirez, Oliveria A. Baez, and Francisco Prieto Garci. "Genotoxic damage in zebra fish (*Danio rerio*) by arsenic in waters from Zimapan, Hidalgo, Mexico." Mutagenesis. 20 (2005): 291-295.
- Ringonato, J., Mantovani, MS., and Jordao, BQ. "Comet assay comparison of different *Corbicula fluminea* (mollusca) tissues for the detection of genotoxicity." Genet Mol Biol. 28 (2005): 464-468.
- Roy, Pradosh, and Anupama Saha. "Metabolism and toxicity of arsenic: A human Carcinogen." Curr Sci. 82 (2002): 38-45.
- Russo, Consiglia. et al. "Assessment of environmental stress by the micronucleus test and the Comet assay on the genome of teleost populations from two natural environments." Ecotoxicol. Environ. Saf. 57 (2004): 168-174.
- Saha, J. C. et al. "A REVIEW OF ARSENIC POISONING AND ITS EFFECTS ON HUMAN HEALTH" Crit. Rev. Environ. Sci. Technol. 29 (1999): 281-313.
- Samokhvalov, V. A. et al. "Arsenite as an Inducer of Lipid Peroxidation in *Saccharomyces cerevisiae* Cells." Microbiology. 72 (2003): 266-269.

- Sanderson, H., Thomsen, M. and Fauser, P. "DPSIR and Risk Assessment of Dumped Chemical Warfare Agents in the Baltic Sea." NATO Science for Peace and Security Series C: Environmental Security. (2008): 191-201.
- Savarimuthu, Xavier. et al. "Seasonal Variation of Arsenic Concentrations in Tubewells in West Bengal, India." J Health Popul Nutr. 24 (2006): 277-281.
- Schknk, D. et al. "Effect of Arsenite, Arsenate, and the Herbicide Monosodium Methyl Arsonate (MSMA) on Hepatic Metallothionein Expression and Lipid Peroxidation in Channel Catfish." Camp. Biochem. Physiol. 118C (1997):177-183.
- Schoff, R.A. "A Market Basket Survey of Inorganic Arsenic in Food." Food Chem. Toxicol. 37 (1999): 839-846.
- Seoane, A.I., and Dulout, F.N. "Genotoxic ability of cadmium, Chromium and nickel salt studies by chinetochore staining in the cytokinesis-blocked micronucleus assay." Mutat. Res. 490 (2001): 99-106.
- Shila, Samuel. et al. "Arsenic intoxication-induced reduction of glutathione level and of the activity of related enzymes in rat brain regions: reversal by DL-*a*-lipoic acid." Arch Toxicol. 79 (2005): 140-146.
- Shimizu, Noriaki. et al. "Selective Entrapment of Extrachromosomally Amplified DNA by Nuclear Budding and Micronucleation during S Phase." Cell Biology. 140 (1998): 1307-1320.
- Sinha, R. et al. "Cancer risk and diet in India." J Postgrad Med. 49 (2003): 222-228.
- Simeonova P.P. et al. "Quantitative Relationship between Arsenic Exposure and AP-1 Activity in Mouse Urinary Bladder Epithelial" Toxicol Sci. 60 (2001): 279-284.
- Smith, A.H. et al. "Cancer Risks from Arsenic in Drinking Water." Environ. Health Perspect. 97 (1992): 259-267.
- Soundararajan, M. , G. Veeraiyan, and S. Sankar Samipillai. "ARSENIC-INDUCED OXIDATIVE STRESS IN FRESH WATER CATFISH *TILAPIA MOSSAMBICA*." J. Phys. Sci. 1 (2009): 267-276.
- Tarapatra, S.N. , and Bannerjee, S.K. "Detection of micronucleus and abnormal nucleus in erythrocytes from the gill and the kidney of *Labeo bata* cultivated in sewage-fed fish farm." Food Chem. Toxicol. (2006)



- Tchounwou, P.B., J.A. Centeno, and A.K. Patlolla. "Arsenic toxicity, mutagenesis, and carcinogenesis – a health risk assessment and management approach." Mol Cell Biochem. 255 (2004): 47–55.
- The Comet Assay. [Online], Accessed 25 April 2010. Available from <http://www.genpharmtox.de/downloads/AssaySheetsCometAssay.pdf>
- Tilton, S.C., C.M. Foran, and Benson, W.H. "Effects of cadmium on the reproductive axis of Japanese mekada (*Oryzias latipes*)." Comp. Biochem. Physiol. C: Toxicol. Pharmacol. 136 (2003): 265-276.
- Tinwell, H, SC Stephens, and J. Ashby. "Arsenite as the Probable Active Species in the Human Carcinogenicity of Arsenic: Mouse Micronucleus Assays on Na and K Arsenite, Orpiment, and Fowler's Solution." Environ. Health Perspect. 95 (1991): 205-210.
- Udroiu, I. "The micronucleus test in piscine erythrocytes." Aquat. Toxicol. 79 (2006): 201-204.
- Underhill F.P. "The distribution of arsenic in human body" J. Biol. Chem. 19 (1914): 513-515.
- U.S. E.P.A. Short-term method for estimating the chronic toxicity of effluent and receiving water to freshwater organism. 4<sup>th</sup> Washington, DC 20460, 2002.
- Varo, Inmaculada. et al. "Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings" Aquat. Living Resour. 20 (2007): 263–270.
- Vahidnia, A. et al. "Arsenic-induced neurotoxicity in relation to toxicokinetics: Effects on sciatic nerve proteins." Chem Biol Interact. 176 (2008): 188–195.
- Varo, I. et al. "Effect of sublethal concentrations of copper sulphate on seabream *Sparus aurata* fingerlings" Aquat. Living Resour. 20 (2007): 263–270.
- Vutukuru S.S. et al. "Effect of arsenic and chromium on the serum amino-transferases activity in Indian major carp, *Labeo rohita*." Int. J. Environ. Res. Public Health. 4 (2007): 224-227.
- Wade, Timothy J. "Increased Mortality Associated with Well-Water Arsenic Exposure in Inner Mongolia, China" Int. J. Environ. Res. Public Health. 6 (2009): 1107-1123.
- Walum, E., Stenberg, K. and Jensens, D. "Understanding cell toxicology: principle and practice." Ellis Hoorwood Limited. England. 1990.
- Wang, Tsu-Shing. et al. "ARSENITE INDUCES OXIDATIVE DNA ADDUCTS AND DNA-PROTEIN CROSS-LINKS IN MAMMALIAN CELLS" Free Radic Biol Med. 31 (2001):321–330.

- Warner, Marcella L. et al. "Increased Micronuclei in Exfoliated Bladder Cells of Individuals Who Chronically Ingest Arsenic-contaminated Water in Nevada" Canc Epidemiol Biomarkers Prev. 3 (1994): 583-590.
- Wong, Vincy W.C. et al. "THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research" Curr. Top. Nutr. Res. 3 (2005): 1-14.
- World Health Organization (WHO). Arsenic in drinking water [Online]. Accessed 27 April 2010. Available from <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs210/en/>
- Wong, V.W.C. et al. "THE COMET ASSAY: a biomonitoring tool for nutraceutical research" Curr. Top. Dev. Biol. 3 (2005):1-14.
- Yadav, Kamlesh K.and Sunil P. Trivedi. "Sublethal exposure of heavy metals induces micronuclei in fish, *Channa punctata*" Chemosphere 77 (2009): 1495–1500.
- Yanez, Leticia. et al. « DNA damage in blood cells from children exposed to arsenic and lead in a mining area" Environ Res. 93 (2003): 231–240.
- Yih, Ling-Huei, I-Ching Ho, and Te-Chang Lee. "Sodium Arsenite Disturbs Mitosis and Induces Chromosome Loss in Human Fibroblasts" Cancer Res. 57 (1997): 5051-5059.
- Yu, Hsin-Su, Wei-Ting Liao, and Chee-Yin Chai. "Arsenic carcinogenesis in the skin" J Biomed Sci. 13 (2006):657–666.

มหาวิทยาลัยศิลปากร ภาคผนวก สงวนลิขสิทธิ์

## คำอธิบายคำย่อ

คำย่อ		คำเต็ม
AC	=	Arsenocholine
ALT	=	Alanine aminotransferase
ARA	=	Arabinoside
AsB	=	Arsenobetaine
AST	=	Aspartate amino transferase
As <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	=	Arsenic trioxide
B	=	Blebbbed nucleus
BiNFs	=	Binucleus frequencies
BL	=	Blebbbed nucleus
BN	=	Binucleated nucleus
BNFs	=	Blebed nucleus frequencies
BNMN	=	binucleated micronucleated cells
C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	=	Tris Base
C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> N <sub>2</sub> O <sub>8</sub> Na <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	=	EDTA disodiumsalt dihydrate
C <sub>5</sub> H <sub>11</sub> AsO <sub>2</sub>	=	Arsenobetaine
CHO-K1	=	Chinese hamster ovary-K1 cells
(C <sub>6</sub> H <sub>5</sub> ) <sub>4</sub> AsCl·H <sub>2</sub> O	=	Tetraphenylarsonium chloride hydrate
CdCl <sub>2</sub>	=	Cadmium chloride
CdSO <sub>4</sub>	=	Cadmium sulfate
(CH <sub>3</sub> ) <sub>4</sub> AsI	=	Etramethylarsonium iodide
(CH <sub>3</sub> ) <sub>3</sub> As <sup>+</sup> CH <sub>2</sub> COO	=	Arsenobetain
DBTC	=	Dibutyltin-chloride
DMSO	=	Dimethyl sulfoxide
DPX	=	DePeX mounting medium
DSB	=	Double strand break
DSG-10	=	Digital Specific Gravity/Salinity-Meter
EDXRF	=	Excited Energy Dispersive X-ray Fluorescence Method
EtBr	=	Ethidium bromide

## คำอธิบายคำย่อ (ต่อ)

คำย่อ		คำเต็ม
G6PDH	=	Glucose-6-phospahte dehydrogenase
GCL	=	Glutamate cysteine ligase
GPx	=	Glutathione peroxidase
GR	=	Glutathione reductase
GSH	=	Glutathione
HCl	=	Hydrochloride acid fuming 37%
HPLC	=	Anion and cation exchange high performance liquid chromatograph
ICPMS	=	Inductively coupled plasma mass spectromrtry
KCl	=	Potassium chloride
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	=	Potassium dihydrogen phosphate
L	=	Lobed nucleus
LB	=	Lobed nucleus
LC <sub>50</sub>	=	Letal Concentrations
LMP Agarose	=	Low melting point Agarose
LNFs	=	Lobed nucleus frequencies
LPO	=	Lipid peroxidations
MAs	=	Monomethylarsonic acid
MBTC	=	Monobutyltin-chloride
MDA	=	Malondialdehyde
mg/L	=	Milligram/kilogram
mg/g ww	=	milligram per gram wet by weight
mg/L	=	Milligram/litre
MN	=	Micronucleus
MNFs	=	Micronucleus frequencies
MNNG	=	N-methyl-N0-nitro-N-nitrosoguanidine
N	=	Notched nucleus
NaAsF <sub>6</sub>	=	Sodium hexafluoroarsenate

## คำอธิบายคำย่อ (ต่อ)

คำย่อ		คำเต็ม
NaAsO <sub>2</sub>	=	Sodium arsenite, Sodium metaarsenite
NaCl	=	Sodium chloride
NAFs	=	Nucleus abnormalities frequencies
NaOH	=	Sodium Hydroxide
Na <sub>2</sub> HAsO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	=	Sodium hydrogenarsenate heptahydrate
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	=	Sodium Hydrogen orthophosphate
NC	=	Normal cell
NMA	=	Normal melting point agarose
NNFs	=	Notched nucleus frequencies
OM	=	Olive Moment
PBS	=	Phosphate buffer saline
ppb	=	Part per billion
ppm	=	Part per million
ROS	=	Reactive oxygen species
RTG-2 cells	=	Rainbow trout gonad-2 cells
SCEs	=	Sister chromatid exchanges
SCGE	=	Single Cell Gel Electrophoresis
SOD	=	Superoxide dismutase
SSB	=	Single strand break
TBARs	=	Thiobarbituric acid reactive substances
TBTC	=	Tributyltin-chloride
TD%	=	Tail DNA (%)
TL	=	Tail Length
TM	=	Tail Moment
μg	=	Microgram
μg/g	=	Microgram/gram
μg/L	=	Microgram/litre
μM	=	Micromolar

## การเตรียมสารละลาย

### 1. การเตรียมสารละลายสำหรับวิธี comet

#### 1.1 PBS (Phosphate Buffer Saline)

- NaCl	137	mM
- KCl	2.7	mM
- KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.8	mM
- Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	10	mM

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 800 ml. (น้ำที่ autoclave ที่อุณหภูมิ 121 °C ความดันไอน้ำ 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที) ปรับ pH = 7.4 ด้วย NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนครบ 1,000 ml. เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C

#### 1.2 Lysis solution

- NaCl	2.5	M
- EDTA	100	mM
- Tris	10	mM

- Triton x-100	1%	} เติมก่อนใช้
- DMSO	10%	

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปรับ pH = 10 ด้วย 10 M NaOH และปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นปราศจากเชื้อจนครบ 1,000 ml. เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C เมื่อจะใช้ นำมาเติม Triton x-100 ปริมาตร 1 ml. และเติม DMSO ปริมาตร 10 ml. ใน Lysing solution 89 ml.

#### 1.3 Neutralization

- Tris	400	mM
- น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ	1	L

ละลายส่วนผสมลงในน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ ปรับ pH = 7.5 เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C

#### 1.4 Alkaline buffer (fresh daily)

- NaOH	10	N
- EDTA	200	mM





### 2.3 0.67% Thiobarbituric acid (TBA)

- Thiobarbituric acid 0.67 g
- Deionize distilled water 100 ml.

ละลายส่วนผสมให้เข้ากันที่อุณหภูมิ 100 °C เก็บไว้ที่มีดในอุณหภูมิห้อง

### 2.4 Malondialdehyde stock 20 mM

- Malondialdehyde 98.3% 73.5 µl
- PBS 50 ml

ละลายส่วนผสมให้เข้ากัน เก็บไว้ในที่อุณหภูมิ 4°C

## 3. การเตรียมสารละลาย Sodium arsenite (NaAsO<sub>2</sub>)

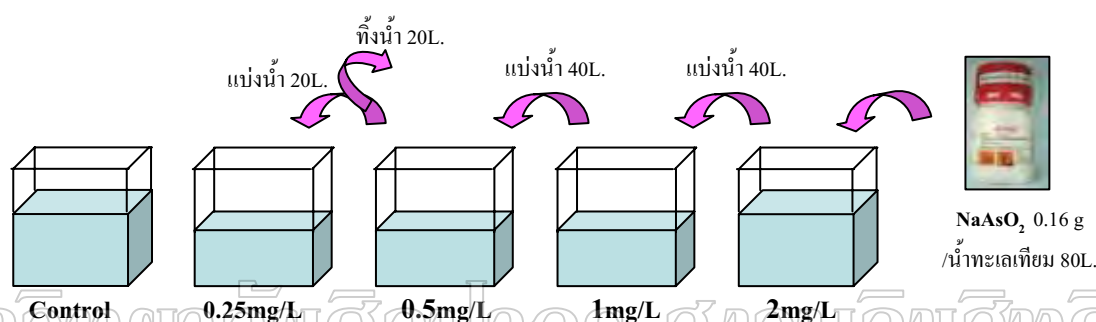
ตารางที่ 11 น้ำหนักโมเลกุลของ NaAsO<sub>2</sub>

Molecular formula	NaAsO <sub>2</sub>
IUPAC name	sodium arsenite
Molar mass	129.91017 g/mol
	Na = 22.99 g/mol
	As = 74.92 g/mol
	O = 16 g/mol
	NaAsO <sub>2</sub> = 22.99+74.92+32= 129.91 g/mol

ซึ่งสารหนูตามความเข้มข้นที่ต้องการ แล้วเจือจางอย่างต่อเนื่องจากความเข้มข้นสูงสุด นั้นคือ 2 mg/L ซึ่งใช้น้ำเลี้ยงปลาตู้ละ 40 L ดังนั้นตู้แรกต้องเตรียมน้ำเป็น 2 เท่าเพื่อนำน้ำอีกส่วนไปเจือจางอย่างต่อเนื่องในความเข้มข้นต่ำลงต่อไป ส่วนตู้ปลากลุ่มควบคุมใส่เฉพาะน้ำทะเลเทียมเท่านั้น

ตารางที่ 12 ความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> ที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมปลากระพงขาว

ความเข้มข้นของ NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	ความเข้มข้นของ NaAsO <sub>2</sub> (mM)	ความเข้มข้นของ NaAsO <sub>2</sub> (μM)
0.25	$1.92 \times 10^{-3}$	1.92
0.5	$3.85 \times 10^{-3}$	3.85
1	$7.70 \times 10^{-3}$	7.70
2	$1.54 \times 10^{-2}$	15.4

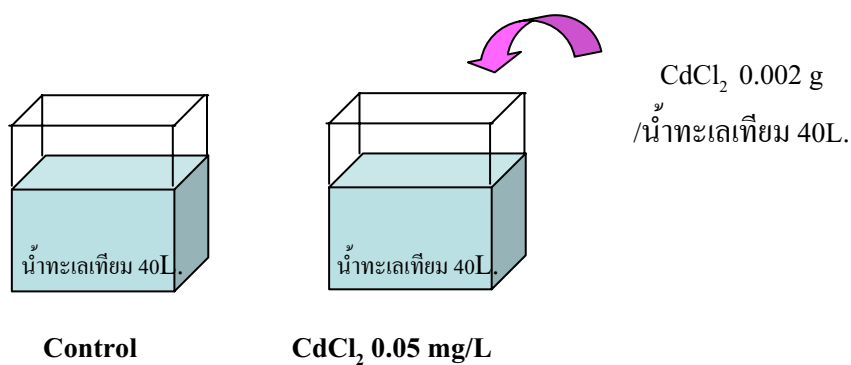


รูปที่ 17 การเตรียมสารละลาย NaAsO<sub>2</sub>

#### 4. การเตรียมสารละลาย CdCl<sub>2</sub> (Positive control)

ตารางที่ 13 น้ำหนักโมเลกุลของ CdCl<sub>2</sub> 5/2H<sub>2</sub>O

Molecular formula	CdCl <sub>2</sub> 5/2H <sub>2</sub> O
IUPAC name	Cadmium chloride
Molar mass	228.3164 g/mole
	Cd = 112.411 g/mol Cl = 35.4527 g/mol H = 1 g/mol O = 16 g/mol CdCl <sub>2</sub> 5/2H <sub>2</sub> O = 112.411 + 2 (35.4527) + 2.5 (18) g/mole = 228.3164 g/mole



รูปที่ 18 การเตรียมสารละลาย  $\text{CdCl}_2$

โดยห้  $\text{CdCl}_2 \cdot 5/2\text{H}_2\text{O}$  0.002 g ละลายในน้ำทะเลเทียม 40 L. จะได้  $\text{CdCl}_2$  ความเข้มข้น 0.05 mg/L

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์



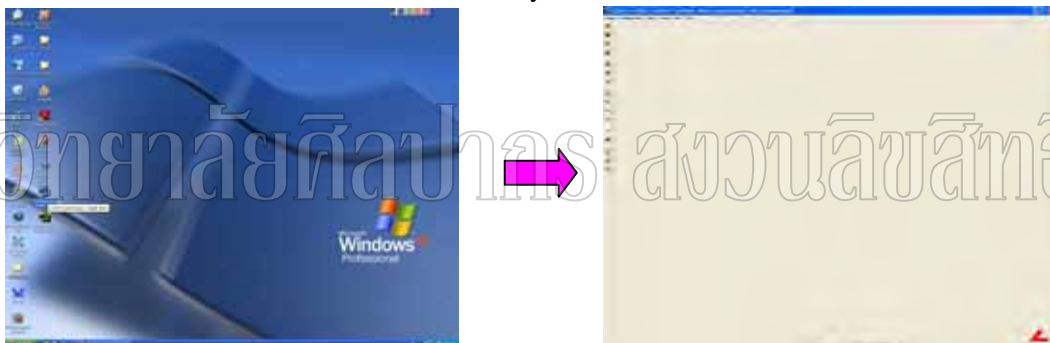
รูปที่ 19 ลักษณะความเป็นพิษของ  $\text{NaAsO}_2$  ต่อปลากะพงขาว

## ขั้นตอนการวิเคราะห์ภาพ comet assay ด้วยโปรแกรม LUCIA

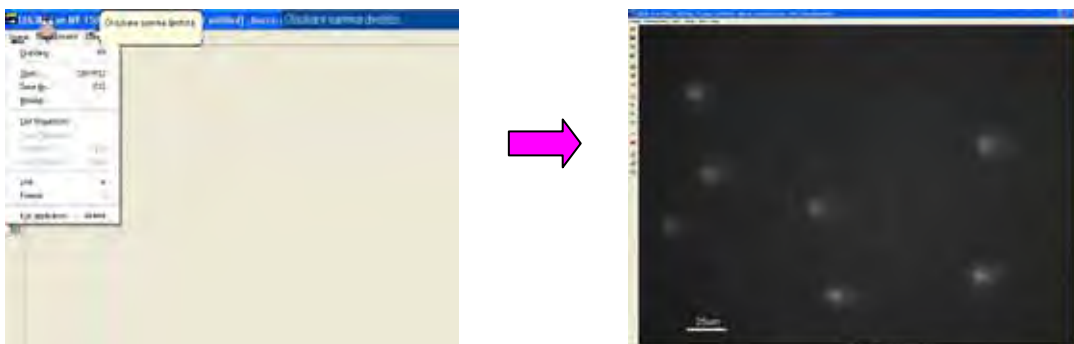
1. แปลงรูปภาพทั้งหมดที่ถ่ายด้วยโปรแกรม LUCIA Comet Assay เป็นภาพขาว-ดำ เพื่อใช้วิเคราะห์ภาพ



2. เปิดโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ LUCIA Comet Assay



3. เปิดเข้าไปที่ เมนู Image แล้วเปิดเพิ่มรูปที่ถ่ายไว้ขึ้นมา ต่อจากนั้นเลือกเมนู measurement เลือก Folder ที่เก็บภาพจากการถ่ายไว้ ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ภาพแรกเสร็จแล้วก็จะเรียกภาพใหม่ขึ้นมาวิเคราะห์ต่อไป จนรูปที่ถ่ายไว้ทั้งหมด ถ้ามีหลาย Folder ก็จะเรียกภาพทั้งหมดใน Folder นั้นๆ มาวิเคราะห์ทั้งหมด แล้วขึ้น Folder ต่อไปเรียงตามลำดับ (ควรใส่รหัสภาพเป็นตัวเลขต่อท้าย เช่น 2mg\_1 หมายถึง  $\text{NaAsO}_2$  ที่ความเข้มข้น 2 mg/L ลำดับรูปที่ 1 เป็นต้น)



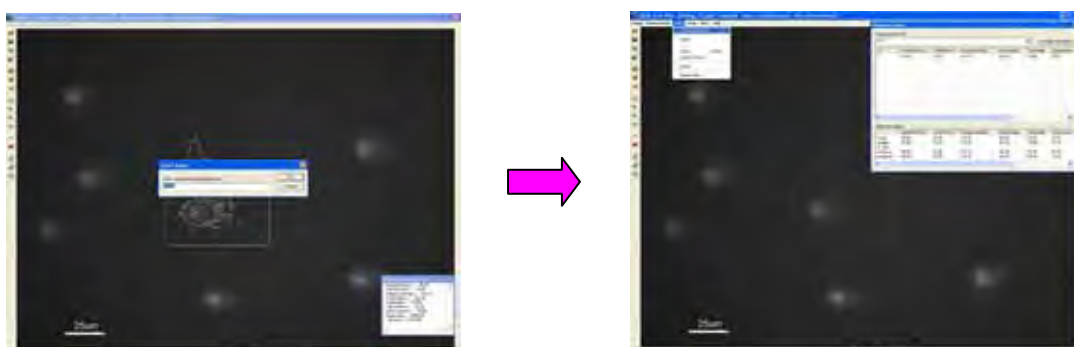
4. เลือกบริเวณรูปที่จะวิเคราะห์ โดย click mouse ด้านซ้ายในบริเวณใดๆ บริเวณหนึ่ง (ควรเลือกบริเวณที่ครอบคลุมภาพทั้งหมด เพื่อป้องกันความคลาดเคลื่อน) แล้วก็ลากต่อไปจนเกิดเป็นรูปสี่เหลี่ยม ซึ่งจะเป็บริเวณที่จะทำการวิเคราะห์เซลล์ทีละเซลล์ โดยสามารถปรับขนาดเซลล์ให้ตรงความเป็นจริง โดยเข้าเมนู Set up > thresholding จะปรากฏ dialog box ของขนาดเซลล์ ปรับขนาดเสร็จแล้วกด Enter ดังรูป



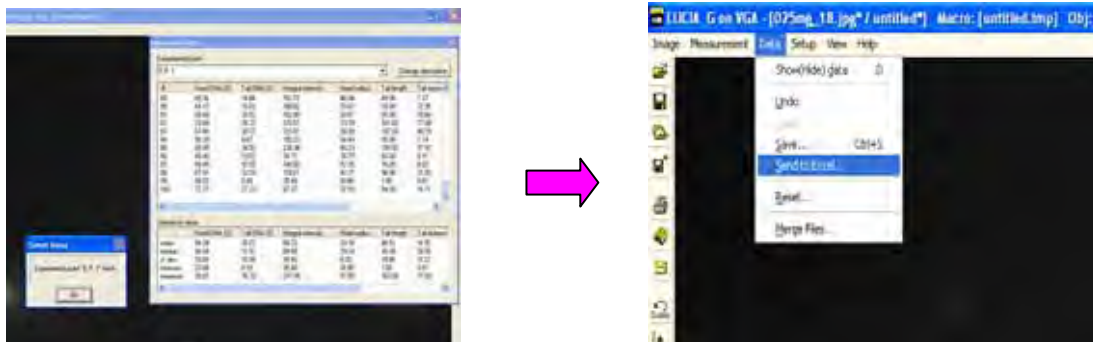
5. กด Enter จะปรากฏเป็น histogram ของรูปที่ทำการวิเคราะห์ขึ้นมา ซึ่งสามารถดูรายละเอียดของภาพได้โดยเข้าเมนู Measurement > Show(Hide) Feature Window จะปรากฏ dialog box ของค่าพารามิเตอร์ต่างๆ ที่ใช้ในการวิเคราะห์ภาพ comet ออกมา ดังรูป



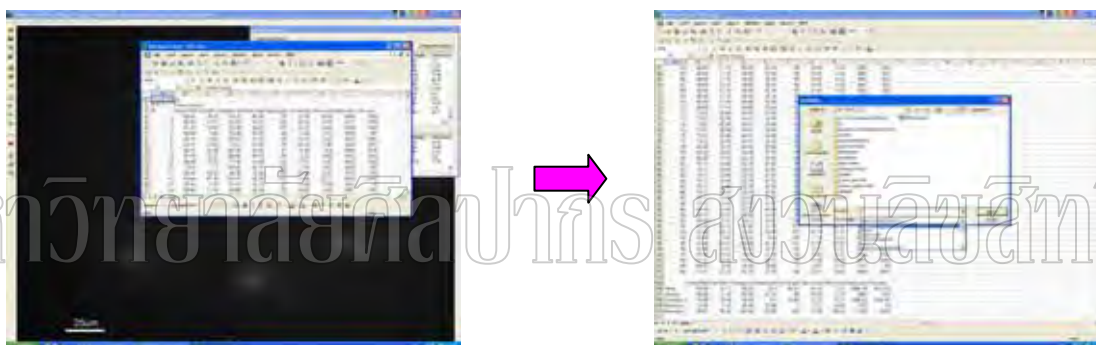
6. เมื่อวิเคราะห์ภาพ comet assay เสร็จแล้ว ก็ยืนยันผลโดยการกด Enter บน keyboard โปรแกรมจะปรากฏ dialog box ถามชื่อข้อมูลที่จัดเก็บ แล้วกด Enter ถ้าต้องการดูรายละเอียดของข้อมูลที่จัดเก็บเข้าเมนู Data > Show (Hide) data จะปรากฏ dialog box แสดงรายละเอียดแต่ละเซลล์ ถ้ามีรูปที่ต้องการวิเคราะห์อีก ก็เปิด Folder ภาพถัดไป



7. เมื่อวิเคราะห์ภาพจนครบ 100 เซลล์/ปลา 1 ตัว โปรแกรมจะปรากฏ dialog box แสดงผลการวิเคราะห์จนครบ จากนั้นจัดเก็บข้อมูลใน Excel โดยเข้าเมนู Data > Send to Excel จะได้ดังรูป



8. จะปรากฏตาราง Excel ของเซลล์ที่วิเคราะห์ และจัดเก็บโดยข้อมูลเป็นชนิดของ สมุดงาน Microsoft excel ดังรูป



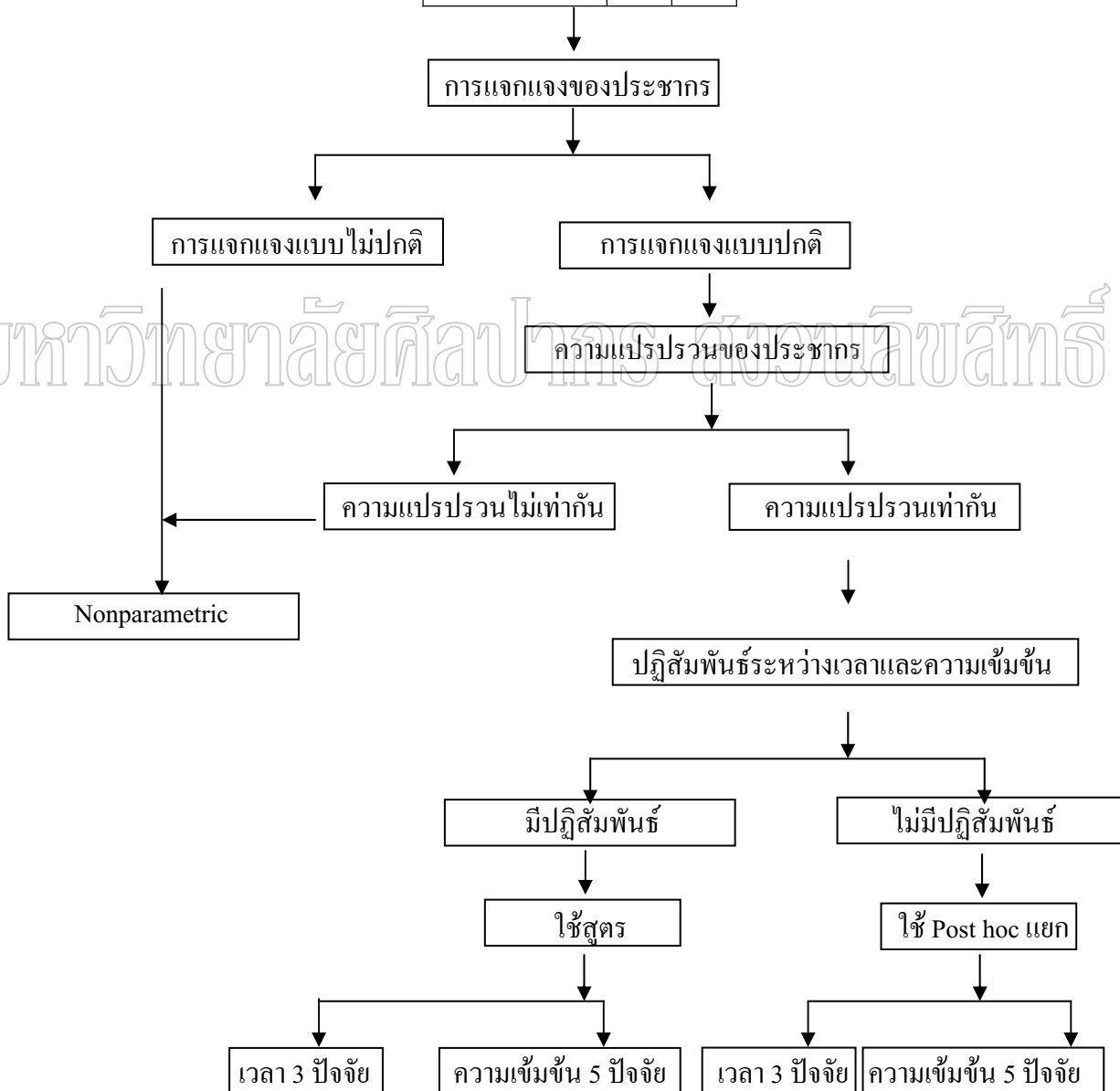
9. เมื่อทำการวิเคราะห์ภาพเสร็จแล้วก็ปิดโปรแกรม โดยเลือกที่เมนู (ด้านล่างสุด) ปรากฏ dialog box เลือก OK ดังรูป



10. ปิดเครื่องคอมพิวเตอร์ให้เรียบร้อย

ขั้นตอนการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วย SPSS

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	24h	48h
Control		
0.25		
0.5		
1		
2		



### การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติด้วยโปรแกรม SPSS

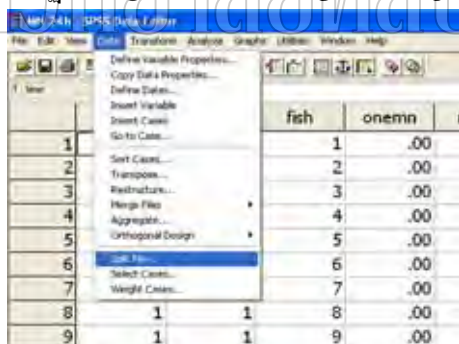
การวิเคราะห์ทางสถิติของข้อมูลนั้นเนื่องจากการทดลองมี 2 ปัจจัย คือ ระยะเวลาที่ทดสอบและความเข้มข้นของสารทดสอบ คำสั่งที่ใช้วิเคราะห์ความแปรปรวนที่มีปัจจัยตั้งแต่ 2 ปัจจัยขึ้นไป ด้วยโปรแกรม SPSS คือ Univariate ซึ่งเลือกใช้สถิติทดสอบของ Tukey's test เป็นวิธีการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยประชากร ซึ่งเมื่อวิเคราะห์ทางสถิติในบางข้อมูลพบว่าไม่มีความสัมพันธ์กันระหว่างระยะเวลาที่ทดสอบและความเข้มข้นของสารทดสอบ ซึ่งข้อจำกัดของโปรแกรม SPSS คือไม่สามารถแยกความแตกต่างของค่าเฉลี่ยประชากรต่อได้ จึงต้องใช้สูตรคำนวณและเลือกใช้สถิติทดสอบของ Tukey's test เพราะมีสูตรในการคำนวณทั้งแบบจำนวน n เท่ากัน และ n ไม่เท่ากัน ซึ่งครอบคลุมการวิเคราะห์ความแตกต่างของข้อมูลได้ดีกว่าสถิติทดสอบอื่น

#### 1 การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับข้อมูลกลุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ

##### 1.1 นำข้อมูลใส่ใน SPSS

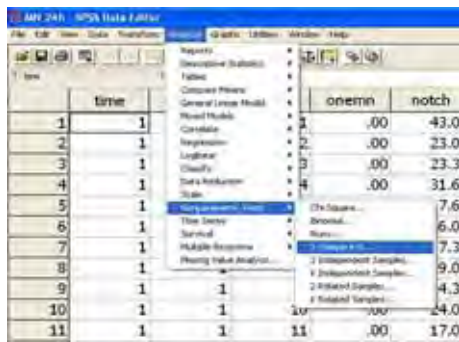
##### 1.2 Split file เพื่อแยกวิเคราะห์ทีละความเข้มข้น โดยเลือกเมนู Data > Split File จะ

ปรากฏ dialog box ให้คลิก Organize output by group > Group Base on: Concen > OK



##### 1.3 วิเคราะห์การแจกแจงปกติโดยเลือกเมนู Analyze > Nonparametric test > 1-Sample

K-S เลือกพารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์การแจกแจงปกติใส่ช่อง Test Variable List คลิก OK





1.4 จะได้ Out put ออกมาที่ละความเข้มข้น โดยดูที่ค่า Asymptotic Significance (2-tailed) โดย

$H_0$  : ข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบปกติ

$H_1$  : ข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ

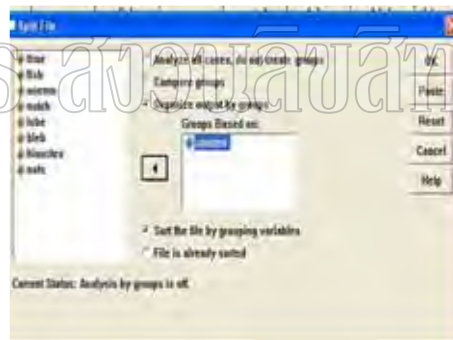
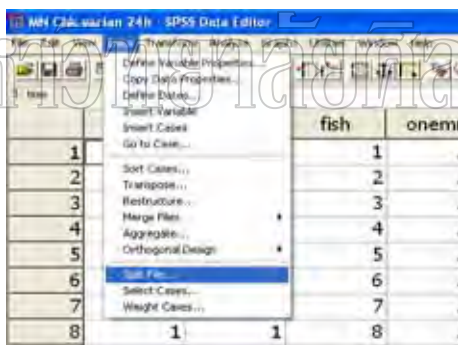
1.5 สรุปผลการวิเคราะห์การแจกแจงแบบปกติที่เวลา 24 ชั่วโมง ถ้าค่า Asymptotic Significance (2-tailed) มากกว่า 0.01 แสดงว่า ข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ ( $P < 0.01$ )

1.6 ตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติทุกเวลา และทุกความเข้มข้น โดยทำเช่นนี้ที่เวลา 48 ชั่วโมง

## 2 การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีความแปรปรวนเท่ากัน

2.1 นำข้อมูลใส่ใน SPSS ซึ่งข้อมูลมาจาก  $y_i - y_j$

2.2 Split file เพื่อแยกวิเคราะห์ที่ละความเข้มข้น โดยเข้าเมนู Data > Split file > Organize output by group > Group Base on: Concen > OK



2.3 วิเคราะห์การแจกแจงปกติโดยเข้า Analyze > Nonparametric test > 1-Sample K-S เลือกพารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์การแจกแจงปกติใส่ช่อง Test Variable List คลิก OK



2.4 จะได้ Out put ออกมาที่ละความเข้มข้น โดยดูที่ค่า Asymptotic Significance (2-tailed) ถ้ามมากกว่า 0.01 ยอมรับ  $H_0$  แสดงว่าข้อมูลมีการแจกแจงแบบปกติ ( $P < 0.01$ )

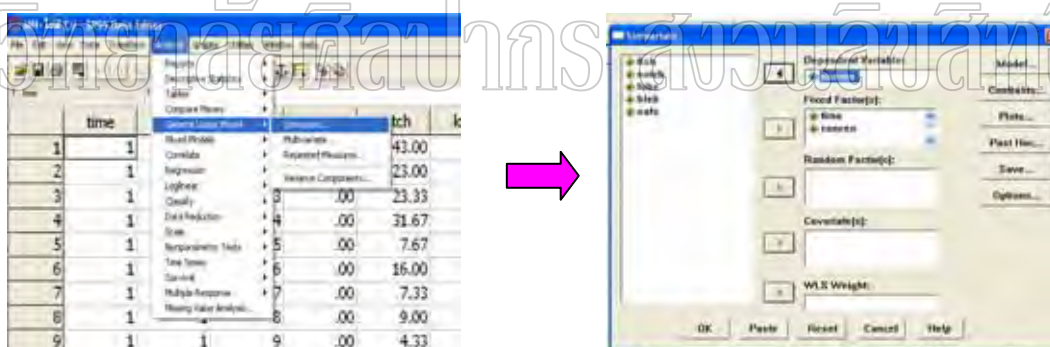
$H_0$  : ข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีความแปรปรวนเท่ากัน

$H_1$  : ข้อมูลถูกสุ่มมาจากประชากรที่มีความแปรปรวนเท่ากัน

2.5 ตรวจสอบการแจกแจงแบบปกติทุกเวลา และทุกความเข้มข้น โดยทำเช่นนี้ที่เวลา 48 ชั่วโมง

### 3. การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้น (ข้อมูลไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน)

3.1 เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงปกติและมีความแปรปรวนเท่ากันแล้ว จะทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของ 2 ปัจจัย คือ เวลาและความเข้มข้นของสารหนู โดยใส่ข้อมูลทั้งหมดใน SPSS และคลิก Analyze > General Linear Model > Univariate ช่อง Dependent Variable ให้ใส่พารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์ทีละค่า ส่วนช่อง Fixed Factor ให้ใส่ปัจจัยที่ต้องการทดสอบปฏิสัมพันธ์ คือ เวลาและความเข้มข้น และคลิก OK

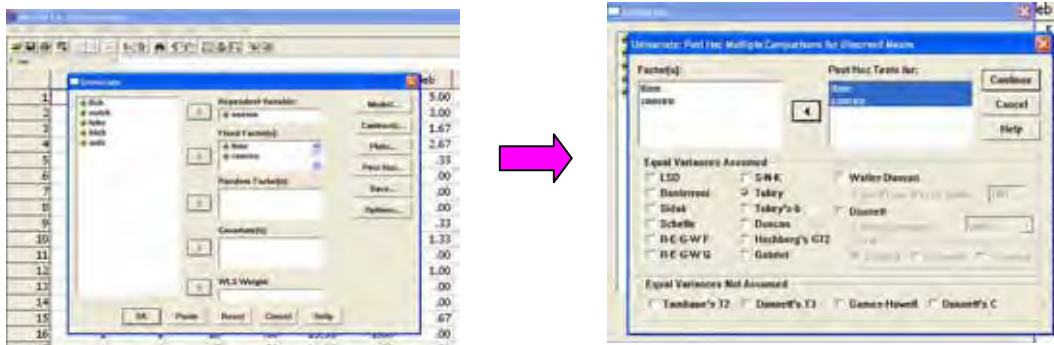


3.2 ได้ Out put ออกมา วิเคราะห์ผลที่ได้โดย ดูค่า p-value ถ้ามมากกว่า 0.05 แสดงว่ายอมรับ  $H_0$  คือ เวลาและความเข้มข้น ไม่มีปฏิสัมพันธ์กัน ในการเกิด ดังนั้นจึงเลือก Post hoc วิธีทดสอบของ Tukey

$H_0$  : ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้น

$H_1$  : มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้น

3.3 เลือก Post hoc ในช่อง Post Hoc Tests for: ใส่ปัจจัยที่ต้องการทดสอบปฏิสัมพันธ์ คือ ความเข้มข้น และคลิก Tukey >Continue> OK



3.4 ได้ Out put ออกมา วิเคราะห์ผลที่ได้ของปัจจัยความเข้มข้น โดย

$H_0$  : ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารหนู

$H_1$  : มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารหนู

3.5 แยกความแตกต่างของเวลา ให้ใช้คำสั่ง Analyze > Compare Means > One way anova ในช่อง Dependent List ใส่พารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนช่อง Factor ใส่ปัจจัยที่ต้องการวิเคราะห์ เลือก Turkey test ใน Post hoc เพื่อแยกความแตกต่างของเวลา ได้ Out put ออกมา วิเคราะห์ผลที่ได้ของปัจจัยเวลา โดย ดูค่า p-value ถ้าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่าปฏิเสธ  $H_0$  คือ เวลา มีความแตกต่างกัน

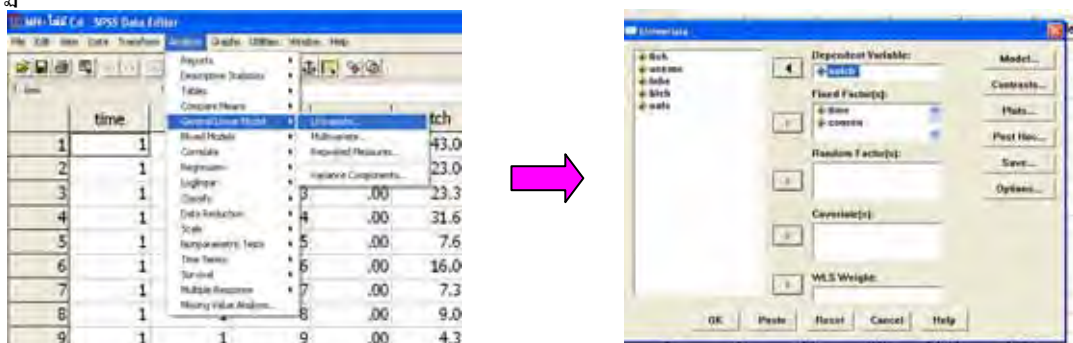
$H_0$  : ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลา

$H_1$  : มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลา

3.6 ทำเช่นนี้ในทุกพารามิเตอร์ และสรุปผล

#### 4. การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลาและความเข้มข้น (ข้อมูลมีปฏิสัมพันธ์กัน)

4.1 เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงปกติและมีความแปรปรวนเท่ากันแล้ว จะทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ของ 2 ปัจจัย คือ เวลาและความเข้มข้นของสารหนู โดยใส่ข้อมูลทั้งหมดใน SPSS และคลิก Analyze > General Linear Model > Univariate ช่อง Dependent Variable ให้ใส่พารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์ทีละค่า ส่วนช่อง Fixed Factor ให้ใส่ปัจจัยที่ต้องการทดสอบปฏิสัมพันธ์ คือ เวลาและความเข้มข้น และคลิก OK



4.2 ได้ Out put ออกมา วิเคราะห์ผลที่ได้โดย ค่า p-value ถ้าน้อยกว่า 0.05 แสดงว่า ปฏิเสธ  $H_0$  คือ เวลาและความเข้มข้นมีปฏิสัมพันธ์กันในการเกิด 1 MN, Notch, Lobe, Bleb และ NAFs ต้องใช้สูตร เนื่องจาก SPSS วิเคราะห์ต่อไม่ได้

4.3 การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลา

$H_0$  : ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลา

$H_1$  : มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างเวลา

ดังนั้นจึงใช้วิธีทดสอบของ Tukey จะปฏิเสธสมมติฐานเมื่อ

\* ถ้าจำนวนตัวอย่างเท่ากัน ใช้สูตร

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > q_{\alpha}(k, N-K) \sqrt{MSE/n}$$

\* ถ้าจำนวนตัวอย่างไม่เท่ากัน ใช้สูตร

$$|\bar{y}_i - \bar{y}_j| > \frac{q_{\alpha}(k, N-K)}{\sqrt{2}} \sqrt{MSE \left( \frac{1}{n_i} + \frac{1}{n_j} \right)}$$

4.4 การทดสอบสมมติฐานเกี่ยวกับปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นใช้สูตรเช่นเดียวกัน

กับเวลา

$H_0$  : ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น

$H_1$  : มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น

4.5 ทำเช่นนี้ในทุกพารามิเตอร์ที่มีปฏิสัมพันธ์กัน โดยทำทีละปัจจัยและนำข้อมูลมารวมผล

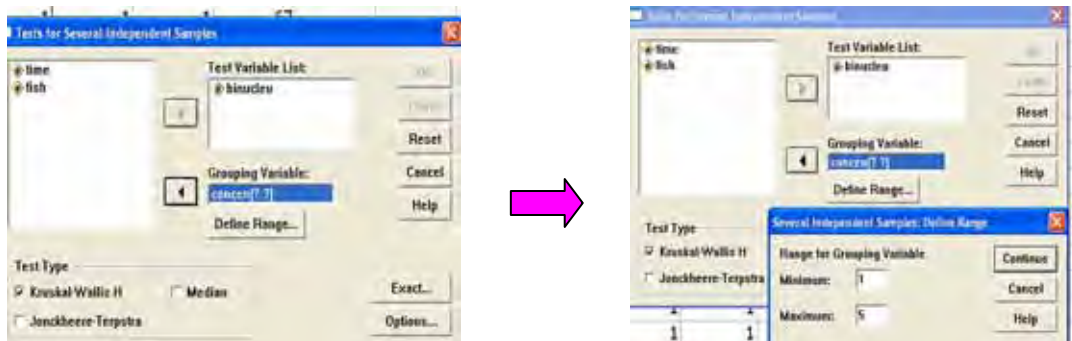
## 5. เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงแบบไม่ปกติ

5.1 ให้ใส่ข้อมูลทั้งหมดของค่านี้และ Split file ในช่อง Group Based on: ใส่ Time เพื่อเปรียบเทียบข้อมูลที่ละเวลา คลิก OK เลือก Analyze > Nonparametric Tests > K-Independent Sample ในช่อง Test Variable List ให้ใส่พารามิเตอร์ที่มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ



time	binucleu
1	.57
2	.00
3	.00
4	.00
5	.00
6	.00
7	.00
8	.00
9	.00
10	.00
11	.00

5.2 ในช่อง Grouping Variable ให้ใส่ปัจจัยที่ต้องการวิเคราะห์ (ความเข้มข้น) และช่อง Define Range เติม Minimum คือความเข้มข้นต่ำสุด และ Maximum คือความเข้มข้นสูงสุด > Continue > OK



5.3 ได้ Out put ออกมา โดยตั้งสมมติฐานแต่ละความเข้มข้น โดยดูค่า p-value ถ้ามากกว่า 0.05 แสดงว่ายอมรับ  $H_0$  คือ มีค่ากลางแต่ละเวลา ที่ความเข้มข้นนั้น ไม่แตกต่างกัน

$H_0$  : ค่ากลางแต่ละเวลา ที่ความเข้มข้นนั้น ไม่แตกต่างกัน

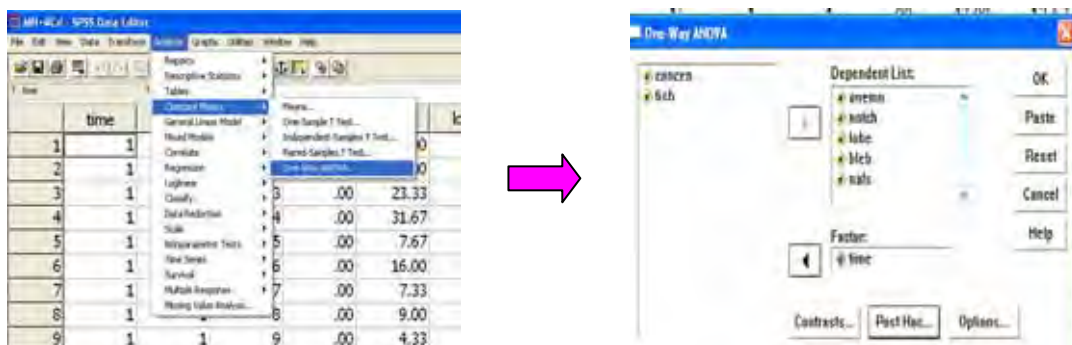
$H_1$  : ค่ากลางแต่ละเวลา ที่ความเข้มข้นนั้น แตกต่างกันอย่างน้อย 1 คู่

5.4 ทำเช่นนี้ ในทุกเวลาและความเข้มข้นของพารามิเตอร์ที่มีการแจกแจงแบบไม่ปกติ

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

6. การวิเคราะห์ข้อมูลเมื่อเปรียบเทียบกับ Positive control

6.1 เมื่อข้อมูลมีการแจกแจงปกติและความแปรปรวนเท่ากันแล้ว ใส่ข้อมูลทั้งหมดใน SPSS เลือกเมนู Analyze > Compare Means > One way anova ในช่อง Dependent List ใส่พารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์ ส่วนช่อง Factor ใส่ปัจจัยที่ต้องการวิเคราะห์ เลือก Turkey test ใน Post hoc เพื่อแยกความแตกต่างของเวลา



6.2 ได้ Out put ออกมา โดยตั้งสมมติฐานปฏิเสธกันระหว่างเวลา ถ้า p-value < 0.05 แสดงว่ายอมรับ  $H_0$  คือ เวลาไม่ปฏิเสธกันในการเกิด 1 MN, Notch, Lobe, Bleb และ NAFs

$H_0$  : ไม่มีปฏิเสธกันระหว่างเวลา

$H_1$  : มีปฏิเสธกันระหว่างเวลา

6.3 ตั้งสมมติฐานปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น ทำเช่นข้อ 6.2 ได้ Out put ออกมา ถ้า  $p\text{-value} < 0.05$  แสดงว่ายอมรับ  $H_0$  คือ ความเข้มข้นมีปฏิสัมพันธ์กันในการเกิด 1 MN, Notch, Lobe, Bleb และ NAFs

$H_0$  : ไม่มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น

$H_1$  : มีปฏิสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้น

6.4 สรุปผลทั้งหมดและทำเช่นนี้ในทุกพารามิเตอร์ที่ต้องการวิเคราะห์

มหาวิทยาลัยศิลปากร สงวนลิขสิทธิ์

ตารางที่ 14 ค่าความถี่ของความผิดปกติอื่นๆของนิวเคลียส ในเซลล์เม็ดเลือดแดงของปลากระพงขาว (*L. calcarifer*) ที่ทดสอบกับ NaAsO<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง (N=20)

NaAsO <sub>2</sub> (mg/L)	จำนวนปลาที่ รอดชีวิตและ นำมาตรวจผล(ตัว)		Frequency/1,000 cells			
			Binucleus		Nucleus abnormalities frequencies	
	24h	48h	24h	48h	24h	48h
0	20	20	0.03±0.03 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	22.03±3.48 <sup>a</sup>	49.30±6.62 <sup>b</sup>
0.25	20	19	0.02±0.02 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	39.65±6.83 <sup>b</sup>	56.21±6.76 <sup>b</sup>
0.5	20	19	0.02±0.02 <sup>a</sup>	0.07±0.04 <sup>a</sup>	50.60±5.54 <sup>c</sup>	83.86±9.19 <sup>c</sup>
1	20	20	0.05±0.05 <sup>a</sup>	0.05±0.04 <sup>a</sup>	53.88±8.70 <sup>d</sup>	145.87±16.10 <sup>d</sup>
2	19	19	0.02±0.02 <sup>a</sup>	0.03±0.02 <sup>a</sup>	102.23±8.80 <sup>e</sup>	153.90±17.96 <sup>b</sup>
R <sup>2</sup>			0.0002	0.3916	0.8554	0.9194
CdCl <sub>2</sub> 0.05 mg/L	19	20	0.05±0.04 <sup>a</sup>	0.00±0.00 <sup>a</sup>	70.96±7.12 <sup>a*</sup>	134.62±20.67 <sup>b*</sup>

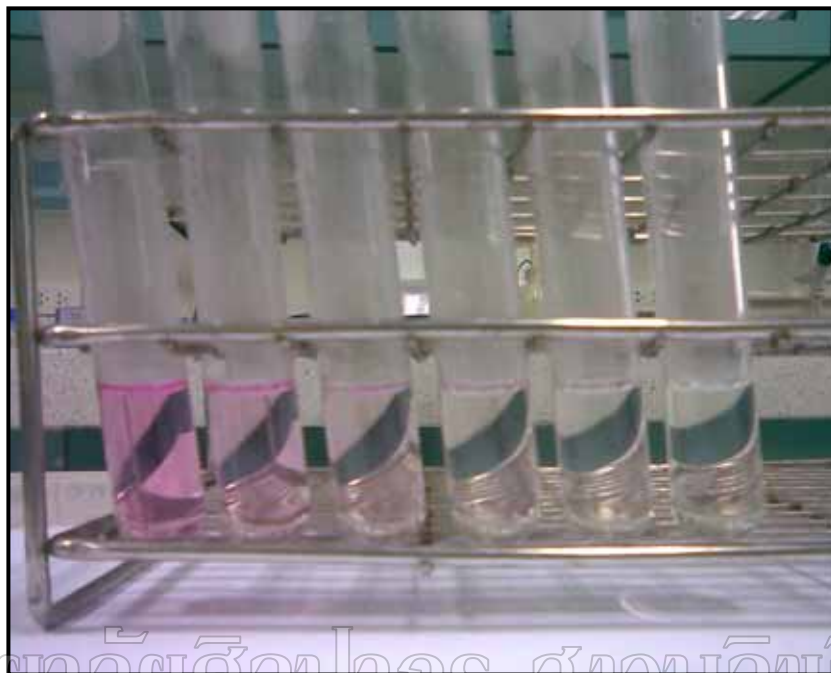
mean±SE เป็นค่าเฉลี่ย Binucleus และ Nucleus abnormalities frequencies ที่ตรวจพบในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากระพงขาวที่รอดชีวิต 1 ตัว

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างระยะเวลาที่ปลาได้รับสารทดสอบ 24 ชั่วโมงกับระยะเวลาอื่นๆ ในความเข้มข้นของสารทดสอบเดียวกัน ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P<0.05$ )

<sup>a-d</sup> เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบความเข้มข้นต่าง ๆ กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับสารทดสอบภายในช่วงเวลาเดียวกันที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P<0.05$ )

\* เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่าง CdCl<sub>2</sub> และกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $P<0.05$ )

R<sup>2</sup> คือ ค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ NaAsO<sub>2</sub> กับความถี่ Binucleus และ Nucleus abnormalities frequencies ในเซลล์เม็ดเลือดแดงปลากระพงขาวที่แช่ NaAsO<sub>2</sub> 0.25, 0.5, 1 และ 2 mg/L เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ตามลำดับ

**Lipid peroxidation**

มหาวิทยาลัยศิลปากร ส่วนผลิตภัณ์

รูปที่ 20 ลักษณะการเกิดสีของ malondialdehyde



## ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ – สกุล	นางสาวนพมาศ พึ่งทรัพย์
วัน เดือน ปี เกิด	วันพุธที่ 7 พฤศจิกายน พ.ศ. 2527
ที่อยู่	41/1 หมู่ 6 ตำบลสามง่าม อำเภอโพธิ์ทอง จังหวัดอ่างทอง 14120
ประวัติการศึกษา	<p>พ.ศ. 2539 สำเร็จการศึกษาระดับประถมศึกษา โรงเรียนอนุบาลวัดอ่างทอง อ. เมือง จ. อ่างทอง</p> <p>พ.ศ. 2542 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนต้น โรงเรียนสตรีอ่างทอง อ.เมือง จ.อ่างทอง</p> <p>พ.ศ. 2545 สำเร็จการศึกษาระดับมัธยมศึกษาตอนปลาย โรงเรียนสตรีอ่างทอง อ.เมือง จ.อ่างทอง</p> <p>พ.ศ. 2549 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี คณะวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยนเรศวร</p> <p>พ.ศ. 2550 ศึกษาต่อระดับปริญญาโท สาขาวิชาชีววิทยา บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศิลปากร วิทยานิพนธ์เรื่อง “ผลของสารหนูต่อความเป็นพิษของ สารพันธุกรรมและความเป็นพิษต่อเซลล์ตับในปลา กะพงขาว (<i>Lates calcarifer</i>)”</p>

## ผลงาน

1. Puengsap N. and Vejaratpimol R. “Effects of arsenic on genotoxicity in White sea bass (*Lates calcarifer*) using the comet assay.” งานประชุมวิชาการและเสนอผลงานวิจัยสร้างสรรค์ ศิลปากรวิจัย ครั้งที่ 3 (SURF 3) 28-29 มกราคม 2553 ณ มหาวิทยาลัยศิลปากร พระราชวังสนามจันทร์ นครปฐม.
2. Puengsap N. and Vejaratpimol R. “EVALUATION OF GENOTOXICITY INDUCED BY ARSENIC IN THE ERYTHROCYTES OF WHITE SEA BASS (*Lates calcarifer*) USING THE MICRONUCLEUS TEST AND COMET ASSAY.” งานประชุมวิชาการวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ครั้งที่ 35 (STT 35) 15-17 ตุลาคม 2552 ณ เดอะ ไฮด์ รีสอร์ท (หาดบางแสน) จ. ชลบุรี

3. Tiewcharoen S., J. Rabablert, N. Malainual, V. Junnu and N. Puengsap. “Genotyping and cytopathogenesis of *Naegleria fowleri* isolated from the environment in Thailand.” Joint International Tropical Medicine Meeting 2007, 29-30 November 2007, Imperial Queen's Park Hotel, Thailand.
4. Tiewcharoen S., J. Rabablert, P. Chetanachan, V. Junnu, N. Puengsap and S. Sudchada. “Scanning electron Microscope of *Naegleria fowleri* Thai strain during cytopathogenesis in human neuroblastoma cells.” การประชุมวิชาการศิริราช ครั้งที่ 46, 5-9 มีนาคม 2550, หอประชุมกองทัพเรือ, กรุงเทพฯ.

#### ประสบการณ์ในการอบรมเชิงปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	กิจกรรม	สถานที่
1. การเพิ่มพูนความรู้ นอกเหนือจากหลักสูตร			
1.1	14 สิงหาคม 2550	เข้าร่วมอบรมเรื่อง “Applied environmental toxicology workshop” supported by Lincoln University, New Zealand and Silpakorn University, Thailand	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
1.2	24 – 25 มิถุนายน 2551	เข้าอบรมเชิงปฏิบัติการ “Applied environmental toxicology workshop on Metabolism of Chemical: How chemicals are broken down by enzymes in living organisms”	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
1.3	2-3 มิถุนายน 2552	เข้าอบรมเชิงปฏิบัติการเรื่อง การทดสอบ ความเป็นพิษในสิ่งแวดล้อม เทคโนโลยี ด้านไบโอเซนเซอร์และไมโครเบียลฟูลเซลล์	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม
1.4	25-26 มิถุนายน 2552	เข้าร่วมอบรมงานสัมมนาเสริมเซลล์ โครงการบริการวิชาการแก่ชุมชน ภาควิชา เทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์ และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม	อาคารห่อมหหลวงปิ่น ชั้น 5 มหาวิทยาลัย ศิลปากร

ประสบการณ์ในการอบรมเชิงปฏิบัติการที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย (ต่อ)

ลำดับที่	วัน/เดือน/ปี	กิจกรรม	สถานที่
1.5	21 มกราคม 2553	เข้าอบรม “การใช้โปรแกรม SPSS ระดับบัณฑิตศึกษา” สำหรับสายวิทยาศาสตร์	ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร
2. เป็นผู้ช่วยอาจารย์จัดกิจกรรมบริการวิชาการเพื่อสังคมและชุมชนเน้นด้านการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม			
2.1	5 มิถุนายน 2551	ผู้ช่วยวิทยากรในการอบรมเชิงปฏิบัติการกิจกรรมวันสิ่งแวดล้อมโลกร่วมรักษ์ทะเลไทย ให้สวยใส ไร้ขยะ	หาดพยุหะ อ.บ้านฉาง จ. ระยอง
2.2	12-13 ตุลาคม 2551	วิทยากรในการอบรมเชิงปฏิบัติการ “พลังเยาวชนกับการรักษาสิ่งแวดล้อม: เทคนิคการทำโครงการวิทยาศาสตร์เพื่อเฟ้าระวังสารพิษปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม”	ศูนย์ศิลปวัฒนธรรม เฉลิมพระเกียรติ 6 รอบพระชนมพรรษา มหาวิทยาลัยศิลปากร
2.3	5-7 พฤษภาคม 2552	ผู้ช่วยวิทยากรในการอบรมเชิงปฏิบัติการ “บทบาทของประชาชนและเยาวชนในการอนุรักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม”	จ. นครศรีธรรมราช
2.4	18-20 สิงหาคม 2551-2552	วิทยากรประจำภาควิชาชีววิทยาในงานนิทรรศการสัปดาห์วิทยาศาสตร์ประจำปีของมหาวิทยาลัยศิลปากร	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร จังหวัดนครปฐม
2.5	19-20 ธันวาคม 2552	วิทยากรในการอบรมเชิงปฏิบัติการ การใช้ศิลปะเสริมสร้างพลังรัก พิทักษ์ทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม	อ. ทับสะแก จ. ประจวบคีรีขันธ์