



การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อหอยตะไกรกรมกรามขาว ในระยะความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของปรอท

สุกัญญา พลิตกุล^{1,#} และสิทธิชน รัตนจันทร์²

¹ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพฯ 10530

²ภาควิชาคลินิกโรคสัตว์น้ำ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีมหานคร หนองจอก กรุงเทพฯ 10530

บทคัดย่อ: ปรอท จัดเป็นโลหะหนักที่เป็นพิษที่มีการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทั่วทุกแห่ง มีการสะสมเพิ่มขึ้นตามลำดับชั้นในห่วงโซ่อาหาร ดังนั้นพิษจากปรอทในมนุษย์เกิดได้จากการกินอาหารที่มีการปนเปื้อนสารปรอท หอยสองฝา เช่น หอยนางรม มีการนำมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในสิ่งแวดล้อม การศึกษาครั้งนี้ได้ทำการศึกษาความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารปรอทต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงและกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดในหอยนางรม (*Crassostrea belcheri*) ทำการทดลองจากหอยนางรมทั้งหมด 200 ตัว แบ่งเป็นกลุ่มควบคุม 1 กลุ่มและกลุ่มทดลอง 4 กลุ่ม ประกอบด้วย กลุ่มที่ได้รับเมอร์คิวรีคลอไรด์ ($HgCl_2$) ที่ความเข้มข้น 2.5, 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ และทุกกลุ่มทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมแบบสุ่มทุก 3 วัน เป็นระยะเวลา 1 เดือน พบว่าการได้รับสารปรอทแบบกึ่งเฉียบพลันทำให้การปิดเปิดของเปลือกหอยลดลงและหลังเมื่อออกมามากขึ้น ต่อมาทางเดินอาหารมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพมากที่สุด พบฮีโมไซด์และเมลาโนแมโครฟาจ เช่นเตอร์ไขมันสะสมลดลง การฝ่อลีบของต่อมทางเดินอาหาร และมีการแทรกตัวของฮีโมไซด์เพิ่มขึ้นร่วมกับการฝ่อลีบที่เหงือก นอกจากนี้พบว่าความเข้มข้นของ $HgCl_2$ ที่ 15 ไมโครกรัมต่อลิตรก่อให้เกิดเสียหายของพยาธิมากที่สุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมสามารถนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลันของสารปรอทในสิ่งแวดล้อมได้

คำสำคัญ: ปรอท หอยนางรม ตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ความเป็นพิษกึ่งเฉียบพลัน

#ผู้รับผิดชอบบทความ

สัตวแพทยมหาวิทยาลัย. 2561. 13(1): 35-47.

E-mail address: phsukany@mutacth.com

Histopathological Changes on Oyster *Crassostrea belcheri* Exposed to Subacute Mercury Toxicity

Sukanya Phalitakul^{1,#} and Sitthichon Rattanachan²

¹Department of Pharmacology, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology

²Department of Aquatic Animal Clinic, Faculty of Veterinary Medicine, Mahanakorn University of Technology, Nongchok, Bangkok, 10530

Abstract: Mercury (Hg) is a toxic heavy metal that is ubiquitous environmental contaminants. It leads to biomagnification to food chain. Therefore, mercury poisoning in human can be caused by consuming mercury contaminating diets. Bivalve shellfish, such as oysters, focus on the biomarker for environmental monitoring. In this study, we examine subacute toxicity of mercury to histopathological changes by using light microscope and scanning electron microscope in oyster (*Crassostrea belcheri*). Two hundred oysters were divided into one control group and four experimental groups. Each experimental group was treated mercuric chloride (HgCl₂) at different concentrations including 2.5, 5, 10 and 15 µg/l respectively. Each group was randomly sampling every three days for one month. The results found that subacute mercury exposure diminished the occurrence of shell gaping as well as increased mucus secretion. Digestive gland was significant pathological damages. Histopathology showed hemocytes and melanomacrophage centers infiltration, decreasing lipid storage and digestive gland atrophy. Increasing of hemocytes infiltration and gill atrophy were also found. In addition, the concentration of HgCl₂-exposure at 15 µg/l affected on the most histopathological changes (p<0.05). The present result indicated that the oysters can be used as the biomarker of subacute toxicity of mercury in the environment.

Keywords: Mercury, Oyster, Biomarker, Subacute toxicity

#Corresponding author

J. Mahanakorn Vet. Med. 2018. 13(1): 35-47.

E-mail address: phsukany@mutacth.com

บทนำ

โลหะหนักเป็นธาตุที่ถูกลำเลียดออกมาใช้อย่างกว้างขวางทั้งทางด้านอุตสาหกรรม เครื่องสำอาง การแพทย์ ตลอดจนใช้เป็นส่วนประกอบอาหาร เป็นผลทำให้มีโอกาสตกค้างอยู่ในสิ่งแวดล้อม (จิราภรณ์, 2543) โดยเฉพาะในแหล่งน้ำ ซึ่งก่อให้เกิดปัญหาต่อมนุษย์และสัตว์ได้ทั้งทางตรงและทางอ้อม สารพิษกลุ่มโลหะหนักที่มักพบปนเปื้อนในแหล่งน้ำและมีผลต่อมนุษย์ เช่น ปรอท แคดเมียม ตะกั่ว ทองแดง เป็นต้น (Flora, 2014) ปรอท เป็นโลหะหนักที่พบว่ามี ความสำคัญอย่างมาก เนื่องจากมีการนำปรอทมาใช้เป็นส่วนประกอบที่สำคัญในอุตสาหกรรมหลายชนิด ทางเกษตรกรรม ตลอดจนอุปกรณ์และวัสดุการแพทย์ เช่น วัสดุอุดฟันอมัลกัม (amalgam) เทอร์โมมิเตอร์ เป็นต้น (Nikinmaa, 2014) ในช่วงศตวรรษที่ผ่านมาพบการปนเปื้อนของปรอทเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องใน แหล่งน้ำเนื่องมาจากการเพิ่มขึ้นของอุตสาหกรรม โดยพบการปนเปื้อนปรอทอยู่ในปลาทะเล (Mason *et al.*, 2012) ด้านความเป็นพิษต่อร่างกาย ปรอทมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตอย่างมาก เนื่องจากสามารถถูกเปลี่ยนรูปเป็นสารประกอบที่มีความเป็นพิษเพิ่มขึ้น ก่อให้เกิดความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลันและเรื้อรัง โดยมีผลต่ออวัยวะต่างๆ ได้แก่ สมอง หัวใจ ตับและไต รวมถึงระบบสำคัญของร่างกาย เช่น ระบบประสาท ภูมิคุ้มกัน และ ตลอดจนทำให้เสียชีวิตได้ (Azevedo *et al.*, 2012; Nikinmaa, 2014) การได้รับปรอทของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำนั้นจะได้รับจากน้ำผ่านเข้าทางเหงือก ผิวหนัง ตลอดจนกิน phytoplankton หรือสัตว์น้ำด้วยกันเองที่มีการปนเปื้อนสารพิษ โดยสารปรอทจะเพิ่มขึ้นตามลำดับชั้นในห่วงโซ่อาหาร (biomagnification) (Di Guilio and Newman, 2013; Hodgson *et al.*, 2015) ส่วน

การได้รับสารปรอทในมนุษย์ ผ่านมาทางอากาศในรูปของไอ ทางผิวหนัง และทางการกิน โดยเฉพาะการกินปลาหรือสัตว์น้ำที่มาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนของสารปรอท (Kumar *et al.*, 2017)

หอย เป็นสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำใกล้ชายฝั่งและมีการเคลื่อนที่ได้ช้า กินอาหารโดยการกรอง จึงทำให้ได้รับสารพิษปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ (ศิริวรรณ, 2544) โดยเฉพาะหอยสองฝาจะพบการสะสมของโลหะหนัก จากแหล่งน้ำที่ปนเปื้อน (Gosling, 2015) จึงนิยมใช้เป็นตัวบ่งชี้วัดทางชีวภาพ (biological marker หรือ biomarker) (Hodgson *et al.*, 2015) เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างสารพิษที่ได้รับและผลทางสรีรวิทยา รวมถึงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Kaplan *et al.*, 2013) หอยนางรมเป็นสัตว์น้ำเศรษฐกิจที่มีความสำคัญของประเทศไทย โดยมีมูลค่าทางเศรษฐกิจเพิ่มมากขึ้นในทุกๆปี โดยในปี 2560 มีมูลค่าสูงถึง 769.9 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร, 2560) ชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงในประเทศไทย ได้แก่ หอยปากจีบ ซึ่งเป็นหอยนางรมพันธุ์เล็ก และหอยตะไกรกรมกรามขาวและดำ จัดเป็นหอยนางรมพันธุ์ใหญ่ (มณีย์, 2547) หอยนางรมเป็นหอยชนิดหนึ่งที่นิยมใช้เป็น biomarker เพื่อบ่งบอกความผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังจากการสัมผัสกับสารหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยศึกษาจากผลและขนาดของอันตรายที่เกิดขึ้นต่อร่างกาย ณ อวัยวะเป้าหมาย (target organ) (ศิริลักษณ์, 2552) ดังนั้น การศึกษาปริมาณโลหะหนักในสิ่งมีชีวิตมีความสำคัญยิ่ง เนื่องจากเป็นตัวชี้วัดทางสิ่งแวดล้อมเพื่อให้ทราบถึงอันตรายที่จะก่อให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค จุดประสงค์ของการทดลองในการศึกษาครั้งนี้จึงได้ ทำการศึกษาพิษกึ่งเฉียบพลันของสารปรอทโดยศึกษาผลที่เกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงทางลักษณะ

ทางจุลพยาธิวิทยาด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (light microscope) และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope, SEM) ในหอยนางรม

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลองและอุปกรณ์

หอยนางรมที่ใช้ในการทดลองครั้งนี้ เป็นหอยนางรมชนิดปากจีบ (*Crassostrea belcheri*) ขนาดประมาณ 6-8 เซนติเมตร อายุ 8 เดือน จากจังหวัดชลบุรี จำนวนทั้งหมด 200 ตัว ระยะเวลาทดลองทั้งหมด 31 วัน ล้างเศษดินโคลนออกให้หมดด้วยน้ำทะเลก่อนเริ่มทดลอง โดยหอยนางรมแต่ละกลุ่มจะนำมาเลี้ยงในตู้กระจกที่มีปริมาตรน้ำ 30 ลิตร ขนาด 45 x 30 x 30 ซม. จำนวน 5 ตู้ บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 กรัมต่อลิตร ปริมาตร 30 ลิตร อุณหภูมิ (temperature) 28-30 องศาเซลเซียส ค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH) 7.8-8 ปริมาณออกซิเจนที่ละลายในน้ำ (dissolved oxygen) 6-6.2 มิลลิกรัมต่อลิตร ค่าความกระด้างของน้ำ (total hardness) 100-140 มิลลิกรัมต่อลิตร และค่าสภาพความเป็นด่าง (alkalinity) 120-150 มิลลิกรัมต่อลิตร โดยเปลี่ยนถ่ายน้ำทุก 3 วันในระหว่างการทดลอง

วิธีการทดลอง

แบ่งหอยเป็น 5 กลุ่ม กลุ่มละ 40 ตัว ด้วยวิธีการสุ่มตัวอย่างแบบ convenience sampling กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม (control group) เป็นหอยที่เลี้ยงในน้ำทะเลและไม่ได้รับสารปรอท ส่วนกลุ่มที่ 2, 3, 4 และ 5 เป็นกลุ่มทดลองที่ให้สารเมอร์คิวริกคลอไรด์ (mercuric chloride, HgCl₂) ในปริมาณ 2.5, 5, 10 และ 15 ไมโครกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ทำการสังเกตอาการ (clinical signs) ของหอย

หลังจากได้รับสารปรอทด้วยตาเปล่า ทุก 12 ชั่วโมง และรอยโรคทางมหัพยาวิทยา (gross lesions) เก็บตัวอย่างในวันที่ 0, 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22, 25, 28 และ วันที่ 31 ตามลำดับ อยุ่ระยะที่ศึกษาในครั้งนี้ ได้แก่ เหงือก ต่อมทางเดินอาหาร (digestive gland) และกล้ามเนื้อ นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (histopathological changes) ด้วย light microscope และ scanning electron microscope

การศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ light microscope ทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีของ Howard *et al.* (2004) โดยนำตัวอย่างหอยแช่ลงในน้ำยา Davidson's fixative ก่อนเข้าสู่ขบวนการ tissue processing ต่อจากนั้นทำการตัดเนื้อเยื่อหอยให้บาง 4 - 6 ไมครอน และย้อมด้วยสี Haematoxylin and eosin (H&E) ส่วนการเตรียมตัวอย่างด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (scanning electron microscope) ดัดแปลงวิธีของ Tall and Nauman (1981) ด้วยการแช่ตัวอย่างหอยเพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อด้วยสารเคมีทั้งหมด 2 ชนิด ได้แก่ สารละลายกลูตาราดีไฮด์ (glutaraldehyde solution) ความเข้มข้น 3% ในครั้งแรก และ ออสเมียมเตตรอกไซด์ (osmium tetroxide, OsO₄) ความเข้มข้น 1% ในครั้งที่สอง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อด้วยเอทานอล (ethanol) ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ (ตั้งแต่ 30 - 100 เปอร์เซ็นต์) และทำให้เนื้อเยื่อแห้ง ณ จุดวิกฤต (critical point drying) โดยเข้าเครื่องทำแห้งตัวอย่างแบบวิกฤต (critical point dryer) หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อที่แห้งไปติดบนแท่นวาง แล้วนำไปเคลือบด้วยทองคำหรือทองคำ

ผสมพลาเตียมด้วยเครื่องฉาบทอง (sputter coater) ก่อนนำเนื้อเยื่อไปศึกษาด้วยกล้อง SEM

การบันทึกผลการทดลองและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ประเมินลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของรอยโรคในหอยที่ได้รับปรอทแต่ละความเข้มข้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยนำการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่เกิดขึ้น มากำหนดคะแนนระดับความรุนแรงของรอยโรค (lesion score) จาก 0 – 4 โดยมีเกณฑ์ดังนี้ 1) คะแนน 0 คือ ไม่มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (normal lesion) 2) คะแนน 1 คือ มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา 25% (mild lesion) 3) คะแนน 2 คือ มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา 50% (moderate) 4) คะแนน 3 คือ มีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา 75% (severe lesion) แล้วนำคะแนนที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา แล้วทำการวิเคราะห์ความแปรปรวนทางสถิติ (Analysis of Variance) ด้วยวิธี one-way ANOVA (Program R)

นอกจากนั้นดูผลทางจุลพยาธิวิทยาร่วมกับผลจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อหอยที่ได้รับสารปรอท

ผลการทดลอง

จากการศึกษาพบว่าระบบทางเดินอาหารเป็นอวัยวะที่ได้รับความเสียหายทางพยาธิสภาพมากที่สุดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม รองลงมาเป็นเหงือก โดยความเข้มข้นของ $HgCl_2$ ที่มีผลต่อพยาธิสภาพของหอยนางรมมากที่สุด คือ 15, 10, 5 และ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตรตามลำดับ โดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

อาการทางคลินิก

อาการที่แสดงออกที่เห็นจากการสังเกตด้วยตาเปล่าในกลุ่มทดลองที่ได้รับ $HgCl_2$ ทุกกลุ่มเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ มีการขับเมือกออกมากขึ้น การตอบสนองต่อสิ่งเร้าตามธรรมชาติ (shell gaping) ลดลงอย่างชัดเจน ร่วมกับเปลือกหอยมีการเปิดอ้ามากขึ้นในช่วงวันที่ 22 เป็นต้นไป มีจำนวนหอยที่แสดงอาการ shell gaping ในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ รวม 45 ตัว

ผลทางมหัพاثวิทยา

กลุ่มควบคุมจะไม่พบรอยโรค (ภาพที่ 1A) ส่วนกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ เนื้อเยื่อหอยมีสีซีด (pale appearance) (ภาพที่ 1B) มีถุงน้ำ (blister) (ภาพที่ 1C) และเนื้อเหลว (watery appearance) (ภาพที่ 1D)



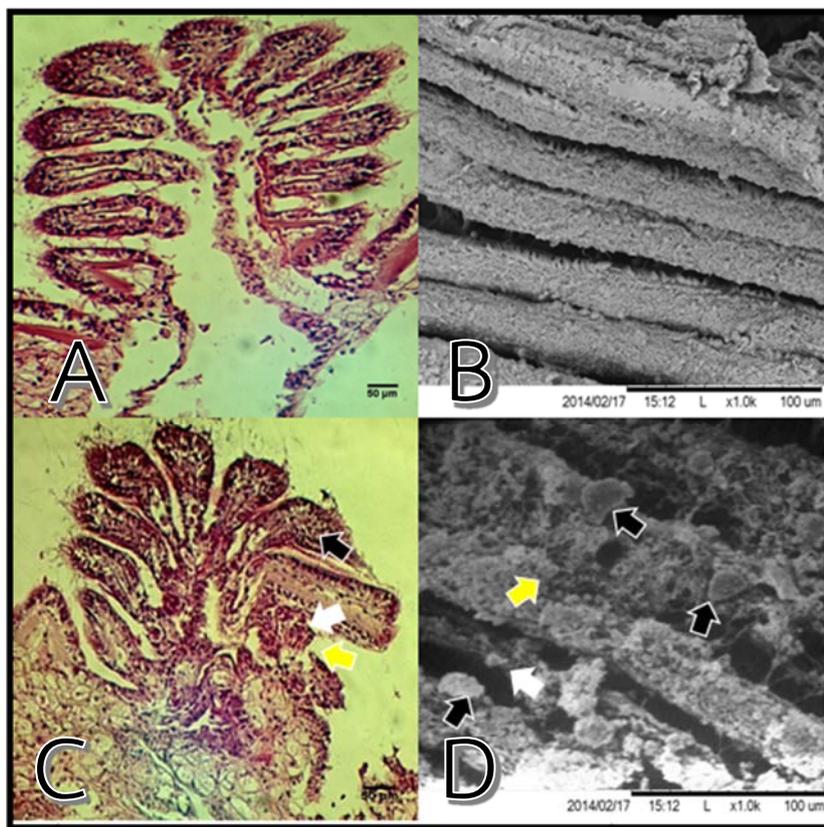
ภาพที่ 1 แสดงผลทางมหัพاثวิทยาของหอยนางรมชนิดปากจีบ (A: กลุ่มควบคุม; B: เนื้อเยื่อหอยมีสีซีด; C: ถุงน้ำ; D: เนื้อเหลว)

ผลทางจุลพยาธิวิทยาและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราด

ผลทางจุลพยาธิวิทยาและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่เหงือก

วันที่ 1 (24 ชั่วโมง) ในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ทุกกลุ่ม พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของซี่เหงือก (gill filament) ซี่กรองเหงือก (gill lamella) และ cilia ที่ปกคลุม โดยในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 5 ถึง 15 ไมโครกรัมต่อลิตร พบการแทรกตัวของฮีโมไซต์ที่เหงือก (gill hemocytes infiltration) และมีจำนวน hemocytes เพิ่มขึ้นมากตั้งแต่วันที่ 7 เป็นต้นไป ตั้งแต่วันที่ 10 พบ hemocytes infiltration

ร่วมกับการฝ่อลีบที่เหงือก (gill atrophy) ของหอยนางรมในทุกกลุ่มทดลองที่ได้รับ $HgCl_2$ โดยมีระดับความรุนแรงของ gill atrophy แปรตามระดับความเข้มข้นของ $HgCl_2$ ที่ได้รับ คือ ความเข้มข้นที่ 15 ไมโครกรัมต่อลิตร พบ gill atrophy มากที่สุด ในวันที่ 22 พบ hemocytes infiltration, gill atrophy ร่วมกับซี่เหงือกเกิดการรวมกัน (fusion of gill filament) (ภาพที่ 2C) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากกล้อง SEM (ภาพที่ 2D) โดยในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับปรอทไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (ภาพที่ 2A และภาพที่ 2B)



ภาพที่ 2 แสดงภาพทางจุลพยาธิสภาพและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่เหงือก (A: เหงือกปกติในกลุ่มควบคุม^H; B: เหงือกปกติในกลุ่มควบคุม^S; C: การแทรกของ hemocytes (ลูกศรสีดำ) ฝ่อลีบของเหงือก(ลูกศรสีขาว) ร่วมกับ fusion of gill filament (ลูกศรสีเหลือง)^H; D: การแทรกของ hemocytes (ลูกศรสีดำ) ฝ่อลีบของเหงือก (ลูกศรสีขาว) ร่วมกับ fusion of gill filament (ลูกศรสีเหลือง)^S)

หมายเหตุ: ^H: H&E; ^S: SEM

ผลทางจุลพยาธิวิทยาและกล้องจุลทรรศน์ แบบส่องกราดที่ digestive gland

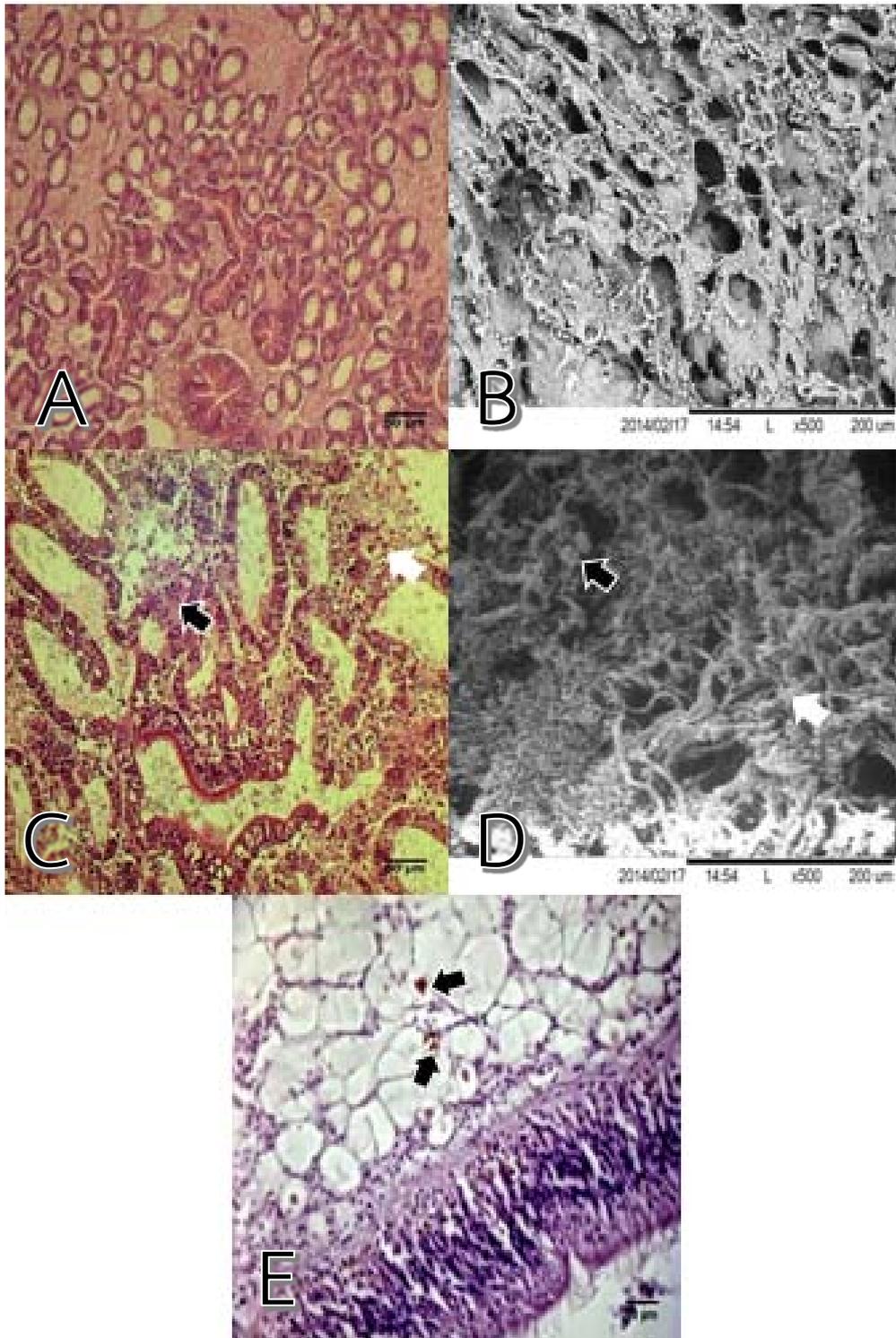
วันที่ 1 (24 ชั่วโมง) ในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 15 ไมโครกรัมต่อลิตร พบการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของ digestive gland และ hemocytes infiltration นอกจากนี้ในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อลิตร พบเมลานิน แมคโครฟาจ เซ็นเตอร์ (melanomacrophage centers, MMCs) ร่วมกับเริ่มมีปริมาณของไขมันสะสม (lipid storage) ลดลง วันที่ 4 ในทุกกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ พบ MMCs ในทางเดินอาหารร่วมกับการฝ่อลีบของ digestive gland โดยกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตร พบการเกิด digestive gland atrophy มากที่สุด วันที่ 7 ในทุกกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ มีจำนวน hemocytes เพิ่มขึ้นมากโดยเฉพาะในกลุ่มที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตร วันที่ 10 กลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตร มีการลดลง lipid storage ในเซลล์ตับชัดเจน ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร จะพบการลดลง lipid storage ในเซลล์ตับชัดเจนในวันที่ 13 เป็นต้นไป นอกจากนี้ในวันที่ 13 ทุกกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ พบ digestive gland atrophy ร่วมกับ hemocytes infiltration (ภาพที่ 3C) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากกล้อง SEM ที่พบ digestive gland atrophy และมี hemocytes infiltration (ภาพที่ 3D) และวันที่ 13 ของการทดลอง มีจำนวนของ MMCs ที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 3E) โดยพบการเพิ่มขึ้นมากที่สุดของจำนวน MMCs ในวันที่ 28 ของการทดลอง ในกลุ่มควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยา (ภาพที่ 3A และภาพที่ 3B)

ผลทางจุลพยาธิวิทยาที่กล้ามเนื้อ

วันที่ 22 ในกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ ความเข้มข้นที่ 10 ไมโครกรัมต่อลิตร พบการเสื่อมสภาพของเซลล์กล้ามเนื้อ (hyaline degeneration) (ภาพที่ 4B) โดยในกลุ่มควบคุมไม่พบการเปลี่ยนแปลงของพยาธิสภาพ (ภาพที่ 4A)

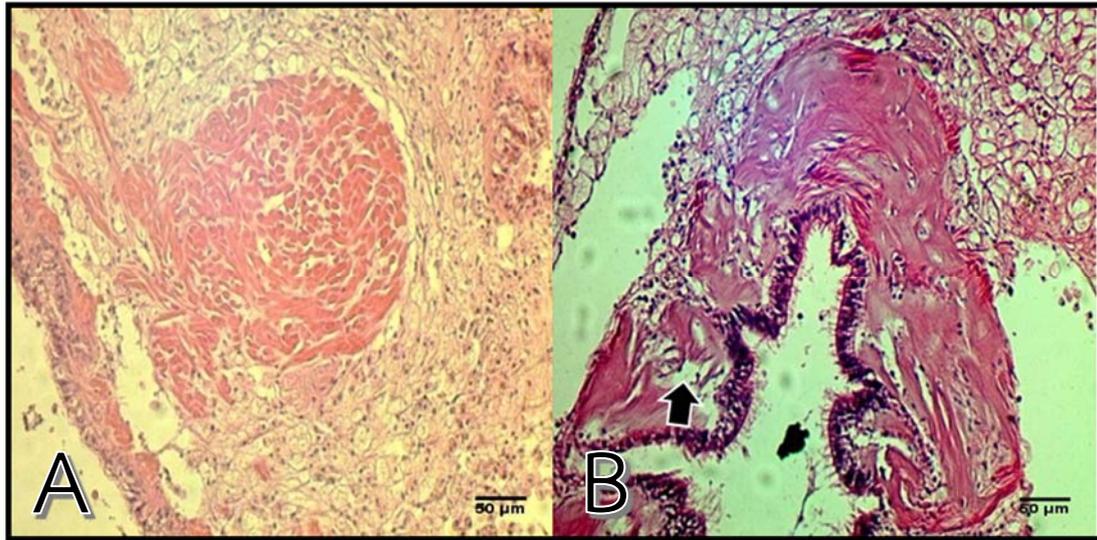
วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้ ทุกกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ มี shell gaping ลดลงอย่างมากร่วมกับการเปิดอ้าของเปลือกหอยในช่วงท้ายของการศึกษาตั้งแต่วันที่ 22 ของการศึกษา ซึ่งอาจกล่าวได้ว่าระยะเวลาในการได้รับสารปรอท มีผลต่อการลดลงของ shell gaping ส่วนการเปิดอ้าของเปลือกหอยในช่วงท้ายของการทดลอง น่าจะเกิดจากปรอทมีผลทำให้เนื้อเยื่อในส่วนของ adductor muscle เสียหาย (Sheir *et al.*, 2010) ซึ่งเป็นกล้ามเนื้อในส่วนที่ช่วยในการปิดเปิดของเปลือกหอย (Gosling, 2015) ทำให้เปลือกหอยเปิดอ้าได้ สอดคล้องกับการศึกษาการได้รับสารปรอทในหอยแมลงภู่ (*Bathymodiolus azoricus*) ของ Karda และคณะ (2005) ที่พบการลดลงของ shell gaping ตั้งแต่วันที่ 21 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ร่วมกับมีการอ้าของเปลือกหอยแมลงภู่ ซึ่งแตกต่างจากพฤติกรรมโดยทั่วไปในหอยสองฝาชนิดอื่นที่เปลือกหอยจะปิดเพื่อป้องกันผู้ล่าหรืออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่พึงประสงค์ (Gosling, 2015) โดยหอยสองฝาจะเปลี่ยนไปเผาผลาญแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic metabolism) โดยลดการใช้ออกซิเจนร่วมกับการใช้ประโยชน์จากไกลโคเจนและคาร์โบไฮเดรต (Devi, 1996)



ภาพที่ 3 แสดงภาพทางจุลพยาธิสภาพและกล้องจุลทรรศน์แบบส่องกราดที่ digestive gland (A: digestive gland ปกติในกลุ่มควบคุม^H; B: digestive gland ปกติในกลุ่มควบคุม^S; C: การแทรกของ hemocytes (ลูกศรสีดำ) digestive gland atrophy (ลูกศรสีขาว)^H; D: การแทรกของ hemocytes (ลูกศรสีดำ) digestive gland atrophy (ลูกศรสีขาว)^S; E: MMCs ใน digestive gland (ลูกศรสีดำ)^H)

หมายเหตุ: ^H: H&E; ^S: SEM



ภาพที่ 4 แสดงภาพทางจุลพยาธิสภาพที่กล้ามเนื้อ (A: กล้ามเนื้อปกติในกลุ่มควบคุม; B: hyaline degeneration (ลูกศรสีดำ))

การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาในทุกกลุ่มที่ได้รับ $HgCl_2$ พบว่าสารปรอทก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพในหอยนางรมทุกกลุ่มภายใน 24 ชั่วโมงแรกหลังได้รับ และรุนแรงมากขึ้นเมื่อได้รับเป็นระยะเวลานานขึ้นโดยเฉพาะในช่วงวันที่ 22 ของการทดลองเป็นต้นไป จึงกล่าวได้ว่าสารปรอททำให้เกิดความเป็นพิษเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลันได้ในหอยนางรม เช่นเดียวกับหอยสองฝาชนิดอื่น (Ramakritinan *et al.*, 2012) โดยพบพยาธิสภาพที่เหงือกและ digestive gland พบการแทรกตัวของ hemocytes จำนวนมาก และมี MMCs ร่วมด้วย แสดงให้เห็นว่าเหงือกและ digestive gland เป็นอวัยวะเป้าหมายของการได้รับสารปรอท โดยเหงือกเป็นอวัยวะที่พบการสะสมของปรอท (Bigas *et al.*, 2001) เนื่องจากเป็นอวัยวะที่ใช้ในการแลกเปลี่ยนก๊าซ ทำให้สารปรอทที่อยู่ในน้ำผ่านเข้าสู่ร่างกาย และมีหน้าที่ในการกรองอาหารเพื่อส่งต่อไปยังปากก่อนเข้าสู่ระบบทางเดินอาหารต่อไป (Di Giulio, 2013) เหงือกจึงถือเป็นอวัยวะแรกที่เกิดพยาธิสภาพจากสาร

ปรอท (Bigas *et al.*, 2001) ด้วยปัจจัยดังกล่าว เหงือกจึงถูกนำมาใช้เพื่อการศึกษาการปนเปื้อนของโลหะหนักที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าเหงือกมีการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพอย่างเห็นได้ชัด โดยบริเวณ cilia มีการลอกหลุดและเกิดความเสียหายร่วมกับ gill atrophy ซึ่งจะเห็นได้ชัดเจนยิ่งขึ้นเมื่อทำการส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องกราด (ภาพที่ 2D)

ส่วนของ digestive gland เป็นอวัยวะหลักอีกอวัยวะหนึ่งที่พบการเปลี่ยนแปลงเมื่อได้รับโลหะหนัก เนื่องจากชีววิทยาของหอยสองฝาจะได้รับอาหารผ่านทางเหงือก โครงสร้างทางเดินอาหารในหอยจะเกี่ยวข้องกับระบบหายใจ โดยในการศึกษารั้งนี้ พบว่า digestive gland เป็นอวัยวะที่ได้รับความเสียหายทางพยาธิสภาพมากที่สุด ซึ่งต่างจาก Karda และคณะ (2005) ที่พบการสะสมของสารปรอทในหอยแมลงภู่ที่เหงือกมากกว่า digestive gland เมื่อได้รับสารปรอท 20 ppb เป็นเวลานาน 20 วัน อาจเนื่องจากชนิดของหอยเป็นผลทำให้การได้รับสาร

ปรอทแตกต่างกัน (ศิริวรรณ, 2544) นอกจากนี้ปัจจัยทางชีวภาพ ได้แก่ อาหาร อายุ และเพศของหอยแต่ละชนิด มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมของสารที่ได้รับเข้าร่างกายรวมถึงปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็ม อุณหภูมิ ปริมาณสารอินทรีย์ที่แขวนลอยอยู่ในน้ำ เป็นต้น ล้วนมีผลต่อการเปลี่ยนรูปของสารปรอทในน้ำ ซึ่งทำให้เกิดการสะสมสารปรอทในเนื้อเยื่อที่แตกต่างกัน (ดาราวดี, 2546)

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารปรอทก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ทั้งแบบเฉียบพลันและกึ่งเฉียบพลัน ตั้งแต่ความเข้มข้นที่ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร ความเข้มข้นของปรอทที่สูงจะส่งผลให้เกิดพยาธิสภาพทั้งในส่วนของเหงือกและระบบทางเดินอาหารที่มากขึ้นโดยหอยที่ได้รับ $HgCl_2$ ที่ความเข้มข้น 15 ไมโครกรัมต่อลิตร เกิดพยาธิสภาพมากกว่าในกลุ่มที่ได้รับที่ความเข้มข้นน้อย หอยมีระบบ lysosomal อยู่เป็นจำนวนมากซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวช่วยเก็บกินสิ่งแปลกปลอมและสารพิษ เมื่อหอยได้รับสารปรอทเข้าไป ประจุบวกของปรอท (mercury cation) จะไปมีผลต่อลักษณะภายนอกและโครงสร้างการทำงานของเยื่อหุ้มเซลล์ของระบบ lysosomal เป็นผลให้ permeability ของเซลล์เสียไป (Moore, 1991; Viarengo *et al.*, 2000) ทำให้ hydrolytic enzymes ที่อยู่ภายใน lysosome ไหลออกมาสู่ cytoplasm ในเซลล์เป็นผลให้เซลล์ถูกทำลายอย่างรุนแรงมากขึ้น (Marchi *et al.*, 2004) โดยเห็นได้จากโครงสร้างการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพที่ชัดเจนขึ้นเมื่อส่องด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (ภาพที่ 3D) ทั้งนี้ควรมีการศึกษาความผิดปกติในระดับเซลล์ที่ชัดเจนมากยิ่งขึ้นด้วยเทคนิคการใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนส่องผ่าน (transmissible electron microscope, TEM)

รวมถึงการระบุตำแหน่งของอนุภาคปรอทบนผิวเซลล์ โดยใช้เทคนิค backscattered electron (BSE) หรือการศึกษาด้วยการหาโปรตีนเมทัลโลไทโอนีน (metallothionein) ร่วมกับการเกิดอนุมูลอิสระ (oxidative stress) เพื่อยืนยันการการทำลายเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นเนื่องจากสารปรอท

สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาในครั้งนี้ พบว่าสารปรอทก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อหอยนางรมทั้งแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) และกึ่งเฉียบพลัน (subacute toxicity) ได้ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 2.5 ไมโครกรัมต่อลิตร อวัยวะที่เสียหายมากที่สุด ได้แก่ digestive gland เหงือกและกล้ามเนื้อ ตามลำดับ โดยในช่วงท้ายของการทดลองของทุกกลุ่มที่ได้รับสารปรอท ซึ่งจัดอยู่ในระยะ subacute toxicity นั้น มีค่าเฉลี่ยของการเกิดรอยโรคสูงสุด ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าหอยนางรมเป็นหอยสองฝาอีกชนิดหนึ่งที่สามารถนำมาใช้เป็น biomarker ในการบ่งบอกการปนเปื้อนของสารปรอทในสิ่งแวดล้อมจากการได้รับสารพิษแบบเฉียบพลัน (acute exposure) และกึ่งเฉียบพลัน (subacute exposure) รวมถึงการประเมินการปนเปื้อนของสารปรอทในสัตว์น้ำชนิดอื่นในแหล่งน้ำนั้นๆได้ เพื่อใช้เฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารปรอทในสัตว์น้ำและสิ่งแวดล้อมได้

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณผศ.น.สพ.ดร.สำราญ บรรณจักรกุล ผศ.น.สพ.ดร.จำลอง มิตรชาวไทย ผศ.น.สพ.ดร.ทนงศักดิ์ มะมม สพ.ญ.ชนิษฐา วงษ์สร้อยสน สพ.ญ.จุฑามาศ ไชยหล่อ และน.สพ.เปี่ยมปลื้ม ยี่สุนรัมย์ที่ให้ความช่วยเหลือในงานวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

เอกสารอ้างอิง

- จิราภรณ์ อ่ำพันธ์. 2543. หนังสือความรู้สิ่งเป็นพิษ ตอนที่ 14 กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ กระทรวง สาธารณสุข. 9-13.
- ดาราวดี ใจคุ้มเกล้า. 2546. การสะสมของสารปรอท ในหอยนางรมและหอยแมลงภู่จากบริเวณอ่าวไทยและทะเลอันดามัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยบูรพา. 110 หน้า.
- มณีย์ กรรณรงค์. 2547. การเจริญเติบโต การปนเปื้อนของแบคทีเรียในหอยตะไคร่กรมกรามขาว, หอยตะไคร่กรมกรามดำและหอยนางรมปากจیب บริเวณแหล่งเลี้ยงอ่าวบ้านดอน จังหวัดสุราษฎร์ธานี. ผลงานวิชาการการสัมมนาทางวิชาการครั้งที่ 44 ศูนย์วิจัยและพัฒนาประมงชายฝั่งนครศรีธรรมราช. สิงหาคม – กันยายน 2547: 60-74.
- ศิริวรรณ ลากทับทิมทอง. 2544. การสะสมโลหะหนักบางชนิดในหอยเศรษฐกิจ บริเวณชายฝั่งทะเลของอ่าวไทยและทะเลอันดามัน. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม, มหาวิทยาลัยบูรพา. 130 หน้า.
- ศิริลักษณ์ วงษ์จิตรสุข. 2552. Biomarker กับบทบาทที่สำคัญในงานอาชีวอนามัยและความปลอดภัย. *วารสาร มฉก.วิชาการ*. 12(24): 89-99.
- สำนักงานเศรษฐกิจการเกษตร. 2560. (สืบค้นข้อมูลเมื่อ 5 เมษายน 2561). สถิติการเกษตรของประเทศไทย. เข้าถึงได้จาก: http://www.oae.go.th/download/download_journal/2560/yearbook59.pdf.
- Azevedo, B.F., Furieri, L.B., Pecanha, F.M., Wiggers, G.A., Vassallo, P.F., Simoes, M.R., Fiorim, J., de Batista, P.R., Fioresi, M., Rossoni, L., Stefanon, I., Alonso, M.J., Salaces, M. and Vassallo, D.V. 2012. Toxic Effects of mercury on the cardiovascular and central nervous systems. *J. Biomed. Biotechnol.* 2012: 1-11.
- Bigas, M., Durfort, M. and Poquet, M. 2001. Cytological effects of experimental exposure to Hg on the gill epithelium of the European flat oyster *Ostrea edulis*: ultrastructural and quantitative changes related to bioaccumulation. *Tissue & Cell.* 33(2): 178-188.
- Devi, V.U. 1996. Changes in oxygen consumption and Biochemical composition of the Marine Fouling Dreissinid bivalve *Mytilopsis sallei* (Recluz) exposed to Mercury. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 33(2): 168-174.
- Di Giulio, R.T. and Newman, M.C. 2013. Ecotoxicology. In: Casarett and Doull's Toxicology. 8th ed. Klassen, C.D. (ed). McGraw-Hill Education. New York. 1473.
- Flora, S.J.S. 2014. Metals. In: Biomarkers in toxicology. Gupta, R.C. (ed.) Academic Press. MA. 1088 p.
- Gosling, E. 2015. Marine Bivalve Molluscs. 2nd ed. Wiley Blackwell. NJ. 537 p.

- Hodgson, E., Roe, R.M., Mailman, R.B. and Chambers, J.E. 2015. Dictionary of Toxicology. 3rd ed. Elsevier. CA. 372 p.
- Howard, D.W., Lewis, E.J., Keller, B.J. and Smith, C.S. 2004. Histological techniques for marine bivalve mollusks and crustaceans. 2nd ed. NOAA Technical Memorandum NOS NCCOS 5. Oxford. 218 p.
- Kaplan, B.L.F., Sulentic, C.E.W., Holsapple, M.P. and Kaminski, N.E. 2013. Toxic responses of the immune system. In: Casarett and Doull's Toxicology. 8th ed. Klassen, C.D. (ed). McGraw-Hill Education. New York. 1473.
- Kadar, E., Costa, V., Santos, R.S. and Lopes, H., 2005. Behavioural response to the bioavailability of inorganic mercury in the hydrothermal mussel *Bathymodiolus azoricus*. J. Exp. Biol. 208: 505-513.
- Kumar, B, Smita, K. and Flores, L.C. 2017. Plant mediated detoxification of mercury and lead. Arab. J. Chem. 10: S2335-S2342.
- Marchi, B., Burlando, B., Moore, M.N. and Viarengo, A. 2004. Mercury- and copper-induced lysosomal membrane destabilisation depends on $[Ca^{2+}]_i$ dependent phospholipase A2 activation. Aquat. Toxicol. 66(2): 197-204.
- Mason, R.P., Choi, A.L., Fitzgerald, W.F., Hammerschmidt, C.R., Lamborg, C.H., Soerensen, A.L. and Sunderland, E.M. 2012. Mercury biogeochemical cycling in the ocean and policy implications. Environ. Res. 119: 101-117.
- Moore, M.N., 1991. Lysosomal changes in the response of molluscan hepatopancreatic cells to extracellular signals. Histochem. J. 23(10): 495-500.
- Nikinmaa, M. 2014. Introduction: What is Aquatic Toxicology?. In: An introduction to aquatic toxicology. 1st ed. Academic Press. MA. 236 p.
- Ramakritinan, C.M., Chandurvelan, R. and Kumaraguru, A.K. 2012. Acute Toxicity of Metals: Cu, Pb, Cd, Hg and Zn on Marine Molluscs, *Cerithedia cingulate* G., and *Modiolus philippinarum* H. Indian J. Geomarine Sci. 41(2): 141-145.
- Sheir, S.K., Handy, R.D. and Galloway, T.S. 2010. Tissue injury and cellular immune responses to mercuric chloride exposure in the common mussel *Mytilus edulis*: Modulation by lipopolysaccharide. Ecotoxicol. Environ. Saf. 73(6): 1338-1344.
- Tall, B.D. and Nauman, R.K. 1981. Scanning electron microscopy of *Cristispira* species in Chesapeake Bay oysters. Appl. Environ. Microbiol. 42(2): 336-343.

Viarengo, A., Marro, A., Marchi, B., Burlando, B.,
2000. Single and combined effects of
heavy metals and hormones on
lysosomes of haemolymph cells from
the mussel *Mytilus galloprovincialis*.
Mar. Biol. 137(5-6): 907–912.

