

จุลกายพยาธิวิทยาเบื้องต้นของเนื้อเยื่อตับและไตของปลาน้ำดอกไม้
Sphyraena obtusata Cuvier, 1829 บริเวณปากแม่น้ำปราณบุรี
Preliminary of Histopathological Observation of Liver and
Kidney Tissues of *Sphyraena obtusata* Cuvier, 1829 from
Paknam Pranburi Estuary

ปิยากร บุญยัง*

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์
วิทยาเขตหาดใหญ่ ตำบลคอหงส์ อำเภอหาดใหญ่ จังหวัดสงขลา 90112

ศิลปชัย เสนารัตน์ และเจษฎ์ เกษตรระทัต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
แขวงวังใหม่ เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

พิสิษฐ์ พูลประเสริฐ

สาขาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏพิบูลสงคราม
ตำบลพลายชุมพล อำเภอเมือง จังหวัดพิษณุโลก 65000

เอสร่า มงคลชัยชนะ

วิทยาลัยพัฒนามหานคร มหาวิทยาลัยนวมินทราธิราช
แขวงรองเมือง เขตปทุมวัน กรุงเทพมหานคร 10330

วรรณีย์ จีระอังกรสกุล

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล
แขวงทุ่งพญาไท เขตราชเทวี กรุงเทพมหานคร 10400

Piyakorn Boonyoung*

Department of Anatomy, Faculty of Science, Prince of Songkla University,
Hat Yai Campus, Kho Hong, Hat Yai, Songkhla 90112

Sinlapachai Senarat and Jes Kettratad

Department of Marine Science, Faculty of Science, Chulalongkorn University,
Wangmai, Pathumwan, Bangkok 10330

Pisit Poolprasert

Faculty of Science and Technology, Pibulsongkram Rajabhat University,
Phlai Chumphon, Muang, Phitsanulok 65000

Ezra Mongkolchaichana

Institute of metropolitan Development, Navamindrahiraj University,
Rongmuang, Pathumwan Bangkok, 10300

Wannee Jiraungkoorskul

Department of Pathobiology, Faculty of Science, Mahidol University,
Thung Phaya Thai, Ratchathewi, Bangkok 10400

บทคัดย่อ

งานวิจัยครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินสุขภาพเบื้องต้นของปลาน้ำดอกไม้ (*Sphyraena obtusata*) ช่วงระยะวัยรุ่น บริเวณปากแม่น้ำป्राณบุรี ในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างปลาด้วยวิธีการลงวนในช่วงเดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2558 หลังจากนั้นนำตัวอย่างเนื้อเยื่อตับและไตมาผ่านกระบวนการทางด้านมิถุวิทยา ผลการศึกษาจุลกายพยาธิพบการเสื่อมของเนื้อเยื่อตับและการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับ ได้แก่ การเสื่อมแบบแวคูโอลา การหดตัวและการสลายของนิวเคลียสในเซลล์ตับ การแทรกตัวของเม็ดเลือดขาวและการสะสมของเมลานินมาโครฟาจ เซนเตอร์ ในขณะที่จุลกายพยาธิของเนื้อเยื่อไตพบรูปร่างและการเสื่อมของท่อไต การเสื่อมและลดขนาดของโกลเมอรูลัส การเสื่อมแบบไฮยาไลน์ การหดตัวของนิวเคลียส และการสลายตัวของนิวเคลียสของเยื่อปท่อไต และเมลานินมาโครฟาจ เซนเตอร์ขนาดใหญ่ ผลการศึกษาในเบื้องต้นครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าทุกอาการมีส่วนเชื่อมโยงต่อหน้าที่ของเนื้อเยื่อตับและไตที่อาจส่งผลต่อสุขภาพของปลาน้ำดอกไม้ที่อาศัยในแม่น้ำป्राณบุรี

คำสำคัญ : ปลาน้ำดอกไม้; จุลกายพยาธิวิทยา; ตับ; ไต

Abstract

The purpose of this research was to assess the health of *Sphyraena obtusata* during juvenile stage in Paknam Pranburi Estuary, Thailand. All fish samples were caught using seine during April to October 2015 and then, their liver and kidney tissues were examined by using standard histological techniques. Histopathologically, the liver degeneration and cellular alterations i.e. vacuolar degeneration, pyknotic nuclei, karyolysis and melanomacrophage center (MMC) were observed in this study. The histopathology of kidney tissues including degeneration of glomerulus, pyknotic nuclei and karyolysis of renal epithelium and large MMC were also seen. The results of this preliminary study indicated that all lesions are related to functional structures in both liver and kidney, which may effect on *S. obtusata* 's health living in Paknam Pranburi Estuary.

Keywords: *Megalops cyprinoides*; fish; histopathology; liver; kidney

1. บทนำ

การตั้งถิ่นฐานอย่างหนาแน่นของชุมชนประมงบ้านเรือน สะพานปลา และโรงงานอุตสาหกรรม ตลอดแนวสองฝั่งของแม่น้ำปรางบุรี จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ โดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณปากแม่น้ำ ล้วนเป็นแหล่งกำเนิดและเกิดการปล่อยน้ำเสียลงสู่แม่น้ำปรางบุรี สอดคล้องกับการรายงานหลายปีที่ผ่านมาว่าแม่น้ำปรางบุรีไม่เหมาะสำหรับการใช้ประโยชน์ เนื่องจากมีสารอินทรีย์หรือไนเตรตเกินค่ามาตรฐาน และสารตกค้างจากยากำจัดศัตรูพืช ซึ่งมีโลหะหนักหลายชนิดที่มีความคงทนสลายตัวได้ช้า ทำให้ตกค้างในห่วงโซ่อาหารและสิ่งแวดล้อมได้นาน โดยเฉพาะตะกั่วสูงถึงค่ายอมรับมาตรฐาน (0.05 มิลลิกรัมต่อลิตร) จึงควรมีการตรวจเฝ้าระวังอย่างต่อเนื่อง ซึ่งค่านี้อาจถึงค่าวิกฤตได้ [1] ทั้งนี้เชื่อว่าปัญหาเหล่านี้ไม่เพียงมีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อม แต่สิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแม่น้ำปรางบุรี โดยเฉพาะปลา ซึ่งจัดเป็นสัตว์ที่มีการใช้ประโยชน์ในการบริโภคและเพิ่มรายได้กับชาวประมงในพื้นที่แม่น้ำปรางบุรี ย่อมมีความเสี่ยงสูงที่จะได้รับผลกระทบโดยตรง งานวิจัยในปัจจุบันจึงมีการสร้างองค์ความรู้โดยใช้ปลาที่อาศัยในบริเวณที่คาดว่าจะมีการปนเปื้อนของสารกลุ่มต่าง ๆ มาใช้เป็นสัตว์เฝ้าระวัง (sentinel species) กันอย่างแพร่หลาย [2-4] เนื่องจากวิธีการนี้นอกจากทำให้ทราบถึงสุขภาพของปลาแล้วยังอาจใช้คาดการณ์ถึงอันตรายที่อาจเกิดขึ้นต่อสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ รวมถึงมนุษย์ตามห่วงโซ่อาหารหรือสายใยอาหาร ท้ายสุดยังสามารถคาดการณ์ถึงสถานภาพของพื้นที่นั้น ๆ ได้เป็นอย่างดี [4,5]

การศึกษาครั้งนี้จึงให้ความสนใจที่จะประเมินสุขภาพของปลาน้ำดอกไม้ (*Sphyræna obtusata*) ช่วงระยะวัยรุ่น ซึ่งมีแหล่งอนุบาลระยะนี้ (nursery grounds) อยู่บริเวณปากแม่น้ำปรางบุรี [6] ทำให้ง่ายต่อการจับ และอาศัยอยู่ในขอบเขตที่ทับซ้อนกับพื้นที่ที่

มีปัญหาการปนเปื้อนของสารมลพิษ จึงอาจได้รับผลกระทบจากการเปลี่ยนแปลงของสิ่งแวดล้อมและสารมลพิษ เป็นไปตามหลักการการเลือกสิ่งมีชีวิตของ NRC [7] มาเป็นตัวแทนของสิ่งมีชีวิต โดยใช้การศึกษาจุลกายพยาธิ (histopathology) ในเนื้อเยื่อตับและไตเป็นตัววัดทางชีวภาพ (biomarkers)

2. อุปกรณ์และวิธีการวิจัย

2.1 การเก็บตัวอย่างปลาน้ำดอกไม้

เก็บตัวอย่างปลาน้ำดอกไม้ในระยะวัยรุ่นที่มีความยาวมากกว่า 20 เซนติเมตร จำนวน 20 ตัว จากบริเวณใกล้ปากแม่น้ำของจังหวัดประจวบคีรีขันธ์ จำนวน 2 สถานี (N 12°24'15.8" / E 099°58'25.6" 2 และ N 12°24'21.6" / E 099°58'37.1") แต่ละจุดห่างกันประมาณ 2 กิโลเมตร ด้วยวิธีการลงอวนที่มีขนาดตาห่างประมาณ 3 เซนติเมตร ตั้งแต่เดือนเมษายนถึงเดือนตุลาคม 2558 ตัวอย่างที่เก็บได้ในแต่ละเดือนทำการสลับปลาด้วยวิธีการแช่น้ำแข็ง (rapid cooling) [8] โดยการแช่ในน้ำเย็นจัด (น้ำผสมน้ำแข็งในอัตราส่วน 1:1) อุณหภูมิ 2-4 องศาเซลเซียส เพื่อนำตัวอย่างปลามาผ่าตัดเปิดช่องท้อง นำเนื้อเยื่อตับและไตมารักษาสภาพเนื้อเยื่อในน้ำยาแดงเดวิดสัน (Davidson's fixative) เพื่อนำไปศึกษาทางด้านมิววิทยาต่อไป

2.2 การศึกษาทางด้านมิววิทยา (histological analysis)

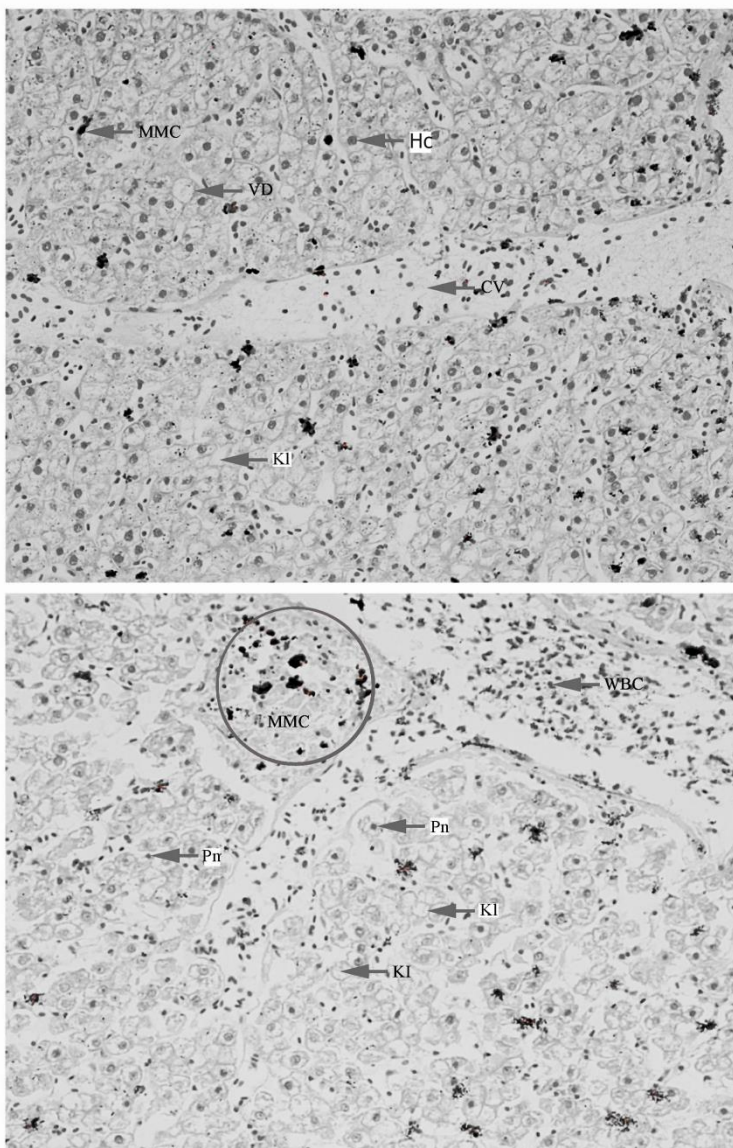
นำเนื้อเยื่อตับและไตมาผ่านกระบวนการทางด้านมิววิทยาตามวิธีของ Hamuson [9] แล้วย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (Harris's hematoxylin and eosin, H&E) ท้ายสุดนำสไลด์เนื้อเยื่อมาศึกษาจุลกายพยาธิ และทำการคำนวณแต่ละอาการด้วยเปอร์เซ็นต์ความชุก (prevalence) ภายใต้อวัยวะจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3. ผลการวิจัยและอภิปรายผล

3.1 โครงสร้างมิถุนชีวิตาและจุลกายพยาธิของเนื้อเยื่อตับ

จุลกายพยาธิที่พบในเนื้อเยื่อตับมีหลายอาการ ได้แก่ การเสื่อมของตับ (liver degeneration, 100 % prevalence) และการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ (cellular alterations) ได้แก่ การเสื่อมแบบแวคูโอลา (vacuolar degeneration, 100 % prevalence)

การหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic nuclei, 100 % prevalence) การสลายของนิวเคลียสของเซลล์ตับ (karyolysis, 100 % prevalence) นอกจากนี้ยังพบอาการที่สำคัญ ได้แก่ การแทรกตัวของเม็ดเลือดขาว (leukocyte infiltrations, 90 % prevalence) และการสะสมของเมลานินมาโครฟาจ เซนเตอร์ (melanomacrophage center) (รูปที่ 1)



รูปที่ 1 โครงสร้างภาพตัดตามขวางของเนื้อเยื่อตับของปลาน้ำดอกไม้ (CV = central vein; Hc = hepatocyte; Hp = haematopoietic tissue; KI = karyolysis; MMC = melanomacrophage center; Pn = pyknotic nuclei; VD = vacuolar degeneration; WBC = white blood cell) (scale bar: A, B = 100 μ m)

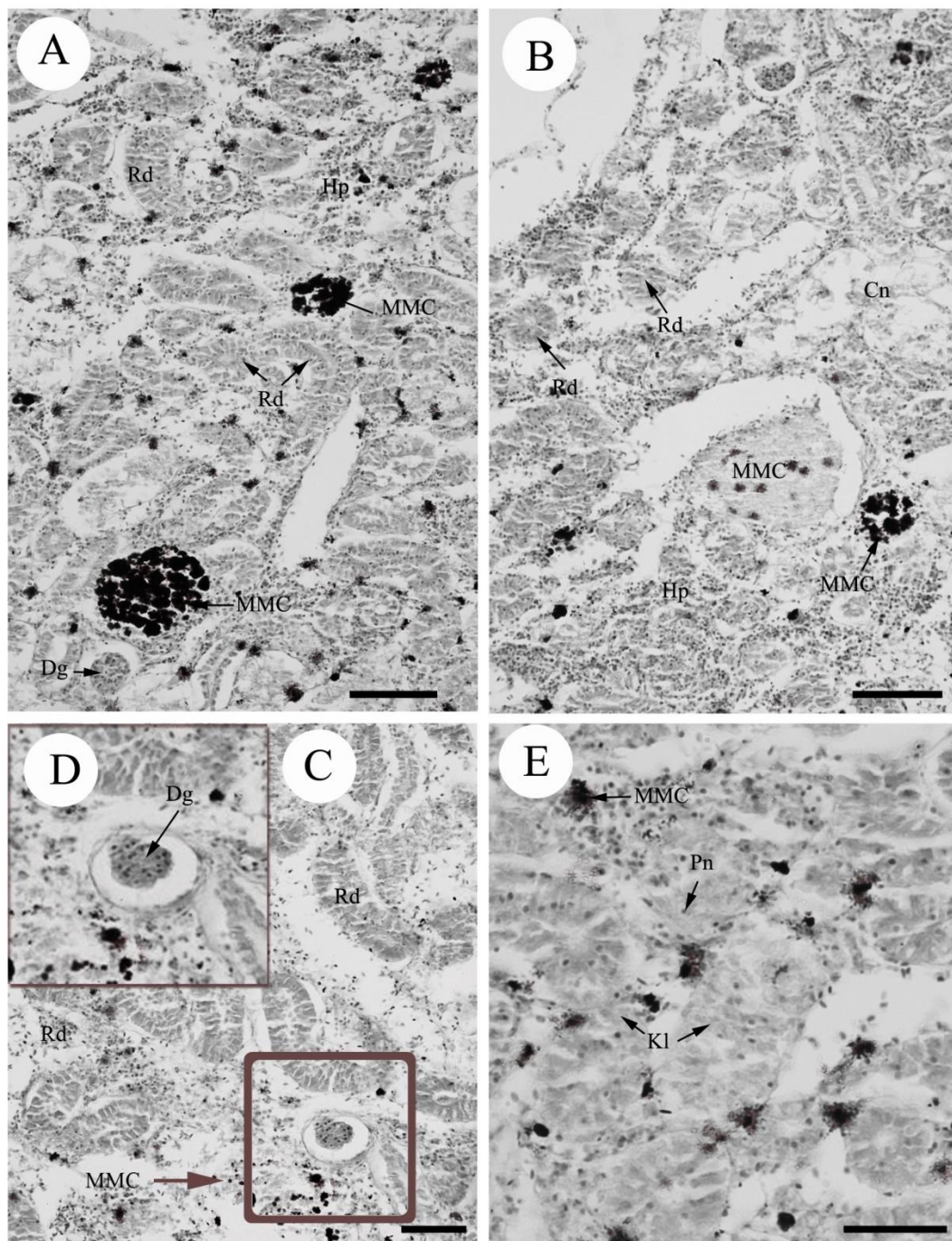
การศึกษาครั้งนี้อาการที่พบทั้งหมดเป็นตัวบ่งบอกถึงภาวะเสี่ยงต่ออันตรายในเนื้อเยื่อตับและที่อาจเป็นการตอบสนองของปลาน้ำดอกไม้เมื่ออยู่ในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนหรือมาจากพฤติกรรมการกินอาหารของปลาที่กินสิ่งมีชีวิตตามพื้นน้ำจึงทำให้เกิดการสะสมสารมลพิษได้ [10,11] สอดคล้องกับปลา *Prochilodus lineatus* และ ปลา *Pleuronectes americanus* ที่อาศัยในพื้นที่ใกล้แหล่งอุตสาหกรรมและมีการปล่อยน้ำเสีย พบอาการคล้ายคลึงกัน ได้แก่ การเสื่อมและการสลายของเนื้อเยื่อตับ [10,12] ส่วนท้ายสุดนักวิจัยยังได้เสนอแนะว่าอาการเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการทำงานของตับทั้งสิ้น ทั้งก่อให้เกิดความเสียหายต่อกระบวนการเมแทบอลิซึม (metabolic damage) การทำงานของเอนไซม์ (enzymatic activity) และการสะสมไกลโคเจน [12] นอกจากนี้การเข้ามาของเมลานोมาโครฟาจ เซนเตอร์ที่พบกระจายทั่วไปในเนื้อเยื่อตับแสดงถึงการตอบสนองต่อการอักเสบเรื้อรังทางด้านภูมิคุ้มกันหลังได้รับสารพิษ เพื่อเก็บทำลายเซลล์ที่ตาย [13] สอดคล้องกับการศึกษาในปลา *P. americanus* ที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของ polycyclic aromatic hydrocarbons บริเวณแหล่งอุตสาหกรรมของประเทศสหรัฐอเมริกา [14] นอกจากนี้มีรายงานก่อนหน้านี้ว่าการพบมาโครฟาจ จำนวนมากแสดงความเชื่อมโยงถึงปริมาณที่สูงขึ้นของ CYP1A ซึ่งโปรตีนชนิดนี้มีความสำคัญต่อกระบวนการทำลายพิษ [15] ดังการศึกษาของ Carlson และคณะ [16] และ Carlson และคณะ [17] ซึ่งฉีด benzo(a)pyrene เข้าช่องท้อง พบว่า CYP1A มีปริมาณมากที่ความเข้มข้น 20 และ 200 ไมโครกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม สอดคล้องกับ White และคณะ [15] ที่กล่าวไว้เช่นกันว่าการเข้ามาของมาโครฟาจเป็นเหตุให้ CYP1A สูงขึ้น พร้อมกับความเสียหายที่มีต่อท่อไตและเยื่อปอดไตในปลา *Leuciscus cephalus* ตามลำดับ

3.2 โครงสร้างมิชฌูวิทยาและจุลกายพยาธิของเนื้อเยื่อไต

จุลกายพยาธิที่พบในเนื้อเยื่อไตที่สำคัญมีหลายอาการ ได้แก่ การตายของเนื้อเยื่อไต (renal necrosis) รูปร่างและการเสื่อมของท่อไต การเสื่อมและลดขนาดของโกลเมอรูลัส (glomerulus degeneration) และการเสื่อมระดับเซลล์ ได้แก่ การเสื่อมแบบไฮยาลิน (hyaline degeneration, 90 % prevalence) การหดตัวของนิวเคลียส (pyknotic nuclei, 100 % prevalence) และการสลายตัวของนิวเคลียสของเยื่อปอดไต (karyolysis, 100 % prevalence) นอกจากนี้ยังพบเมลานोมาโครฟาจ เซนเตอร์ขนาดใหญ่ (melanomacrophage center, 100 % prevalence) กระจายตัวอยู่ทั่วไปในเนื้อเยื่อไต (รูปที่ 2) จากผลการศึกษาครั้งนี้อาการที่กล่าวมาข้างต้นเป็นสัญญาณบ่งชี้ว่าเซลล์กำลังจะตาย เช่นเดียวกับการศึกษาในปลาที่อาศัยในพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารพิษกลุ่มโลหะหนักเช่น ปลา *Oreochromis mossambicus* [18] และ ปลา *Lates calcarifer* [19]

4. สรุปและเสนอแนะ

ข้อมูลดังที่กล่าวมาทั้งหมดแสดงให้เห็นว่าจุลกายพยาธิหลากหลายอาการ โดยเฉพาะอย่างยิ่งการพบการสะสมของเมลานोมาโครฟาจ เซนเตอร์ที่เกิดขึ้นทั้งตับและไตของปลาน้ำดอกไม้ ถึงแม้ว่าอาการดังกล่าวขึ้นอยู่กับอายุ เพศ อาหาร และปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม [9] แต่เป็นหลักฐานที่ดีและช่วยยืนยันเบื้องต้นได้ว่าปลาน้ำดอกไม้มีความเสี่ยงต่อสุขภาพที่ลดลง และจะเชื่อมโยงสิ่งแวดล้อมที่อาจไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ซึ่งเป็นส่วนที่จะต้องกระทำเพื่อติดตามและเฝ้าระวังในอนาคตต่อไป



รูปที่ 2 โครงสร้างจุลกายพยาริของเนื้อเยื่อไตของปลาน้ำดอกไม้ (Cn = central necrosis; Dg = degeneration of glomerulus; Hp = hematopoietic tissue; Kl = karyolysis; MMC = melanomacrophage center; Pn = pyknotic nuclei; Rd = renal degeneration; WBC = white blood cell) (Scale bar: A, B = 100 μ m, C, D = 50 μ m)

5. กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณ นายภากร ณ ลำปาง และ นางสาวอัมภรณ์พรรณ พลาคัย ที่ช่วยเหลือในขณะเก็บตัวอย่างปลาน้ำดอกไม้ และภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ ที่ช่วยอนุเคราะห์อุปกรณ์สำหรับการเตรียมและวิเคราะห์ตัวอย่าง

6. รายการอ้างอิง

- [1] Cheevaporn, V. and Menasveta, P., 2003, Water pollution and habitat degradation in the Gulf of Thailand, *Marine Pollut.* 47: 43-51.
- [2] Beeby, A., 2001, What do sentinels stand for ?, *Environ. Pollut.* 112: 285-298.
- [3] Frame, L. and Dickerson, R.L., 2006, Fish and Wildlife as Sentinels of Environment Contamination, pp. 202-222, In Norris, D.O. and Carr, J.A. (Eds.), *Endocrine Disruption: Biological Bases for Health Effects in Wildlife and Humans*, Oxford University Press, New York.
- [4] National Research Council (NRC), 1987, Biological marker in environmental health research, *Environ. Health Perspect.* 74: 3-9.
- [5] van der Schalie, W.H., Gardner, H.S.Jr., Bantle, J.A., de Rosa, C.T., Finch, R.A., Reif, J.S., Reuter, R.H., Backer, L.C., Burger, J., Folmar, L.C. and Stokes, W.S., 1999, Animals as sentinels of human health hazards of environmental chemicals, *Environ. Health Perspect.* 107: 309-315.
- [6] Blaber, S.J.M., 2000, *Tropical Estuarine Fishes*, Blackwell Science, Oxford.
- [7] National Research Council (NRC), 1991, *Animals as Sentinel of Environmental Health Hazards*, National Academy Press, Washington, D.C.
- [8] Wilson, J.M., Bunte, R.M. and Carty, A.J., 2009, Evaluation of rapid cooling and tricaine methanesulfonate (MS222) as methods of euthanasia in zebrafish (*Danio rerio*), *J. Am. Assoc. Lab. Anim. Sci.* 48: 785-789.
- [9] Humason, G.L., 1979, *Animal Tissue Techniques*. 4th Ed., Freeman, San Francisco, 661 p.
- [10] Camargo, M.M.P. and Martinez, C.B.R., 2006, Biochemical and physiological biomarkers in *Prochilodus lineatus* submitted to in situ tests in an urban stream in southern Brazil, *Environ. Toxicol. Pharm.* 21: 61-69.
- [11] Roberts, J.R., 2000, *Fish Pathology*. 4th Ed., Bailliere Tindall, London, 590 p.
- [12] Shimada, T., Sugie, A., Shindo, M., Nakajima, T., Azuma, E., Hashimoto, M. and Inoue, K., 2003, Tissue-specific induction of cytochromes P450 1A1 and 1B1 by polycyclic aromatic hydrocarbons and polychlorinated biphenyls in engineered C57BL/6J mice of arylhydrocarbon receptor gene, *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 187: 1-10.
- [13] Kumar, V., Abbas, A.K. and Fausto, N.,

- 2004, Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease, 7th Ed., Saunders, New York, 1525 p.
- [14] Chang, S., Zdanowicz, V.S. and Murchelano, R.A., 1998, Associations between liver lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) and sediment chemical contaminants from north-east United States estuaries, J. Mar. Sci. 55: 954-969.
- [15] White, K.L., Kawabate, T.T. and Ladics, G.S., 1994, Mechanisms of Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Immunotoxicity, pp. 123-142, In Dean, J.H., Luster, M.I., Munson, A.E. and Kimber, I. (Eds.) Immunotoxicology and Immunopharmacology, 2nd Ed., Raven Press, New York.
- [16] Carlson, E.A., Li, Y. and Zelikoff, J.T., 2004, Benzo(a)pyrene-induced immunotoxicity in Japanese medaka (*Oryzias latipes*): Relationship between lymphoid CYP1A activity and humoral immune suppression, Toxicol. Appl. Pharmacol. 201: 40-52.
- [17] Carlson, E.A., Li, Y. and Zelikoff, J.T., 2004, Suppressive effects of benzo(a)pyrene upon fish immune function: Evolutionarily conserved cellular mechanisms of immunotoxicity, Mar. Environ. Res. 58: 731-734.
- [18] Handy, R.D. and Penrice, W.S., 1993, The influence of high oral doses of mercuric chloride on organ toxicant concentrations and histopathology in rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, Comp. Biochem. Physiol. (C) 106: 717-724.
- [19] Thophon, S., Kruatrachue, M., Upathan, E.S., Pokethitiyook, P., Sahaphong, S. and Jarikhuan. S., 2003, Histopathological alterations of white seabass, *Lates calcarifer* in acute and subchronic cadmium exposure, Environ. Pollut. 121: 307-320.