บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 ประเมินวิธีการที่ใช้ตรวจวัดสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส

การตรวจวัดสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและสมอง ได้ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman และคณะ (1961) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมนำมาใช้ในการวินิจฉัยความเป็นพิษที่เกิดจากสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟต เพราะเป็นวิธีที่ง่าย สะดวก รวดเร็ว มีความไว และความแม่นยำสูง ค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปร (%CV) ของสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสมองและเลือด มีค่าเท่ากับ 2.01 และ 9.38 % ตามลำดับ ซึ่งค่าสัมประสิทธิ์ความผันแปรในเลือดที่มีค่าค่อนข้างสูง อาจจะเนื่องมาจากถูกรบกวน (interfere) โดยสีของเลือด เพราะหลักการการตรวจวัดสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสของ Ellman และคณะ (1961) ใช้วิธีการวัดสีที่เกิดจากการทำปฏิกริยาระหว่าง thiocholine กับ DTNB เพราะฉะนั้นถ้ามีปัจจัยที่ทำให้สีที่เกิดขึ้นมีน้อยหรือเห็นได้ไม่ชัดเจนเช่น สมรรถนะของเอนไซม์มีน้อยหรือถูกรบกวนจากสีของเลือดก็อาจส่งผลทำให้ค่าที่ได้มีความแปรผันได้ ส่วนผลที่ได้จากการวัดเปอร์เซนต์รีโคเวอรี่ (% recovery) ในเลือดมีค่าอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ คือมีค่าไม่ต่ำกว่าร้อยละ 96 ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ ภัทรา หาญจริยากูล (2536) ที่ค่าเปอร์เซนต์รีโคเวอรี่ในสมองและกล้ามเนื้อปลากระพงขาวอยู่ในช่วง 93.75-106.12 และ 95.48-105.65 ตามลำดับ จึงสามารถที่จะนำวิธีการนี้มาใช้ในการตรวจวัดได้ ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ได้ทำการตรวจวัดค่าความคงตัวของสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส เพราะจากรายงานที่ผ่านมาพบว่าสามารถที่จะเก็บตัวอย่างสมองและกล้ามเนื้อปลากระพงขาวไว้ที่ 0 °ซ ได้นาน 30 วัน โดยไม่ทำให้สมรรถนะของเอนไซม์เปลี่ยนแปลงไปจากวันแรกที่ทำการวัด (ภัทรา หาญจริยากูล, 2536) เช่นเดียวกับการศึกษาของ สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ (2538) ที่พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสมองปลากระพงขาวยังคงมีมากกว่าร้อยละ 99 เมื่อเทียบกับวันแรกที่ทำการวัด แม้จะเก็บไว้นานถึง 30 วันในช่องเยือกแข็ง แต่ถ้าเก็บโดยการแช่แข็งปลาทั้งตัวที่อุณหภูมิ -25 °ซ สมรรถนะเอนไซม์ในสมองจะมีความคงตัวได้นานถึง 3 เดือน (Weiss, 1961) นอกจากนี้ยังมีรายงานถึงค่าความคงตัวของเอนไซม์ในตัวอย่างอื่นๆ เช่นสมรรถนะเอนไซม์ในเลือดและซีรั่มของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่เก็บรักษาในตู้แช่แข็งมีความคงตัวนานเป็นเดือน (Lank and Sklar, 1976) และจากการศึกษาของ Osweiler และคณะ (1985) ที่พบเช่นกันว่า เอนไซม์ในเลือดสามารถเก็บไว้ได้นาน

หลายสัปดาห์ที่อุณหภูมิ 0-5 °ซ และเอนไซม์ในพลาสมามีความคงตัวนานหลายเดือนถ้าเก็บในช่องเยือกแข็ง

4.2 ประเมินวิธีการที่ใช้ตรวจวัดปริมาณเมทฮีโมโกลบิน

การตรวจวัดปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดของปลาดุกพันธุ์ผสม ประยุกต์ใช้วิธีการวัดของ Wedemayer และ Yasutake (1977) โดยใช้หลักการที่ว่า เมทฮีโมโกลบินมีค่าการดูดกลืนแสงได้ดีที่สุดที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร ซึ่งแตกต่างจากดีออกซีฮีโมโกลบิน(deoxyhemoglobin) และ ออกซีฮีโมโกลบิน (oxyhemoglobin) อย่างชัดเจน ประกอบกับ Fe^{3+} (ferric ion) ในเมทฮีโมโกลบินมีความเป็นประจุบวกสูง สามารถที่จะจับกับแอนอิออน (anion) ต่างๆ ได้ดี จึงได้มีการนำไซยาไนด์อิออน (CN^-) มาใช้ในการตรวจวัดหาปริมาณเมทฮีโมโกลบิน ซึ่งไซยาไนด์อิออนเมื่อเติมลงไปในเลือดและฮีโมลัยเสตก์ (hemolysate) จะเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินเป็นไซยาโนเมทฮีโมโกลบิน (cyanomethemoglobin) ซึ่งมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำที่ความยาวคลื่น 630 นาโนเมตร (Mansouri and Lurie, 1993) แต่การศึกษาหาความคงตัวของเมทฮีโมโกลบินไม่ได้ทำการศึกษา เพราะว่าเมทฮีโมโกลบินจะไม่คงตัวถึงแม้จะเก็บไว้ในตู้เย็น และจะถูกเปลี่ยนเป็นฮีโมโกลบินได้เร็วมากเมื่อตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นอกจากนี้ปริมาณไนเตรทหรือไนไตรท์ที่มีอยู่ในพลาสมาหรือซีรั่มจะมีความคงตัวเพียง 48 ชั่วโมง (Osweiler et al., 1985) การศึกษาครั้งนี้จึงทำการตรวจเลือดปลาทันทีที่เจาะได้

4.3 ความเป็นพิษของเมททิลพาราไธออนต่อปลาดุกพันธุ์ผสม

จากการสังเกตพฤติกรรมของปลาดุกพันธุ์ผสม ภายหลังสัมผัสกับเมททิลพาราไธออนในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตาย พบว่าปลามีอาการกระวนกระวาย ว่ายน้ำไปมา ว่ายชนอ่างหรือกระโดดลอยตัวขึ้นเหนือน้ำ การตอบสนองต่อการกระตุ้นจะไวและรุนแรง พฤติกรรมที่เปลี่ยนไปนี้จะแปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ได้รับ (dose dependent) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Murphy และคณะ (1968) ที่พบว่าปลาที่ได้รับสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟต มีการว่ายน้ำที่มีทิศทางไม่แน่นอน ว่ายขึ้นเหนือน้ำบ่อยๆ แสดงถึงความต้องการออกซิเจนที่มากขึ้น อาการต่างๆ ที่เกิดขึ้นเป็นผลมาจากการที่สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มนี้รวมถึงเมททิลพาราไธออน ทำให้ปลาเกิดความเครียดจากการไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โมลินเอสเทอเรส ส่งผลทำให้เกิดการสะสมของอะเซทิลโม-

ลินที่บริเวณ cholinergic site และก่อให้เกิดผลจากการทำงานของอะเซทิลโฉลีนอย่างต่อเนื่อง (Abiota et al., 1991) โดยสังเกตได้จากอาการกระสับกระส่าย ว่ายน้ำไปมาของปลา การลอยตัวนิ่งๆ ใกล้กับผิวน้ำ ซึ่งเกิดจากความต้องการออกซิเจนที่มากขึ้นนั่นเอง เนื่องจากบริเวณผิวน้ำเป็นรอยต่อระหว่างอากาศและน้ำที่มีออกซิเจนละลายอยู่มากกว่าบริเวณพื้นตู้ การที่ปลาบางตัวที่ลอยตัวอยู่นิ่งๆ หรือนอนตะแคงตัวอยู่ที่พื้นอ่าง อาจจะเกิดจากการที่เมททิลพาราไธออนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฉลีนเอสเทอเรสทำให้มีการสะสมของอะเซทิลโฉลีนเพิ่มขึ้น อะเซทิลโฉลีนมีผลไปกระตุ้นที่นิโคตินิครีเซพเตอร์ (nicotinic receptor) ส่งผลกระทบต่อการทำงานของกล้ามเนื้อลายที่ใช้ควบคุมการเคลื่อนที่ของปลา นอกจากนี้ อาการแสดงของปลาที่บ่งบอกถึงความต้องการออกซิเจนที่เพิ่มมากขึ้นนี้ น่าจะเกิดจากการที่ ปลามีอาการหายใจลำบาก (respiratory distress) จากผลของเมททิลพาราไธออนที่ทำให้ความต้องการใช้ออกซิเจนในเนื้อเยื่อเพิ่มสูงขึ้น หลังการสัมผัสกับสารเคมีในช่วงแรก (Rao et al., 1985) นอกจากจะสังเกตความเป็นพิษของเมททิลพาราไธออนได้จากอาการที่เปลี่ยนแปลงไปของปลาแล้ว ยังสามารถดูได้จากการที่ปลาในกลุ่มทดลองขับเมือกออกมาปกคลุมผิวหนังและน้ำในอ่างมีความขุ่นมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน โดยปริมาณเมือกและน้ำที่ขุ่นนี้จะแปรผันตามความเข้มข้นของสารที่ได้รับ อาจจะเป็นผลของอะเซทิลโฉลีนที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากเมททิลพาราไธออนไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฉลีนเอสเทอเรส ส่งผลไปกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาเทติคทำให้เกิดการขับเมือก(สิ่งคัดหลั่ง)มากขึ้น หรืออาจจะเป็นกลไกการต่อต้านสิ่งแปลกปลอมโดยการพยายามสร้างเมือกขึ้นมาปกคลุมร่างกาย เพื่อลดการสัมผัสกับสารที่ก่อให้เกิดความระคายเคือง

4.4 ผลของเมททิลพาราไธออนในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายต่อสมรรถนะเอนไซม์โฉลีนเอสเทอเรสและค่าทางโลหิตวิทยา

4.4.1 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อสมรรถนะเอนไซม์โฉลีนเอสเทอเรสในเลือดและสมอง

เมททิลพาราไธออนมีผลทำให้สมรรถนะเอนไซม์โฉลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและสมองของปลาคุกพันธุ์ผสมลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตั้งแต่ความเข้มข้นแรกที่ใช้ในการศึกษา สารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออกาโนฟอสเฟตบางตัวเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูป oxygen analogs โดยกระบวนการ oxidative desulfuration จากตำแหน่ง P=S เป็น P=O ซึ่งอาศัยเอนไซม์ mixed function oxidase ทำให้ได้เมตาบอไลต์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งสมรรถนะ

ของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสที่รุนแรงขึ้น เช่นเมททิลพาราไธออนถูกเปลี่ยนเป็นเมททิลพาราออกซอน (Benke et al., 1975) นอกจากนี้สมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดและสมองที่ลดลงยังมีความสัมพันธ์กันนั่นคือ หากสมรรถนะของเอนไซม์ในสมองลดลง ก็จะมีผลทำให้สมรรถนะของเอนไซม์ในเลือดลดลงด้วย โดยดูได้จากค่าสัมประสิทธิ์ความสัมพันธ์ ($r = 0.9671$, รูปที่ 8) พบว่าเมททิลพาราไธออนทำให้สมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดถูกยับยั้งมากกว่าในสมอง เหตุที่สมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดถูกยับยั้งมากกว่าในสมอง อาจจะเนื่องมาจากคุณสมบัติของสารกำจัดศัตรูพืชแต่ละตัวที่มีความแตกต่างกัน เมื่อสารกำจัดศัตรูพืชเข้าสู่ร่างกายจะแพร่กระจายและสะสมอยู่ที่อวัยวะใดมากกว่ากัน จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นถึงค่าสัมประสิทธิ์การแพร่กระจายของเมททิลพาราไธออนในหนูขาว ที่แม้เวลาจะผ่านไปนานถึง 20 วัน แต่ปริมาณเมททิลพาราไธออนในเลือดที่วัดได้ก็ยังคงสูงกว่าในเนื้อเยื่ออื่นๆ ไม่ว่าจะเป็น adipose tissue สมอง หรือตับ (Garcia-Repetto et al., 1995) ซึ่งก็พอที่จะใช้อธิบายได้ว่า เหตุใดสมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในเลือดจึงถูกยับยั้งมากกว่าในสมอง แต่ถึงอย่างไรก็ตามการลดลงของสมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสไม่ว่าจะเป็นในเลือดหรือสมองของปลา ก็สามารถที่จะนำมาใช้เป็นตัวบ่งชี้ถึงความเป็นพิษของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟตที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำได้ (Darlington et al., 1971)

4.4.2 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อค่าทางโลหิตวิทยา

เมททิลพาราไธออนในทุกความเข้มข้น (0.125-4.0 มก./ลิตร) ไม่มีผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาว แต่มีแนวโน้มที่จะทำให้ฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนสูงขึ้นแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาถึง ผลของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟตที่มีต่อค่าทางโลหิตวิทยายังไม่เป็นที่แน่ชัด เพราะว่าบางงานวิจัยที่ทำการศึกษาแล้ว พบว่ามาลาไธออนที่ความเข้มข้น 4.5 มก./ลิตร มีผลทำให้ ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาดุก (channel catfish) เพิ่มขึ้น ภายหลังจากสัมผัสนาน 72 และ 96 ชั่วโมง (Areechon and Plumb, 1990) ซึ่งขัดแย้งกับบางรายงานที่พบว่า มาลาไธออนในขนาดความเข้มข้น 1.2 มก./ลิตร ไปมีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงและค่าฮีโมโกลบินของปลา *Heteropneustes fossilis* ลดลงเรื่อยๆ ตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (0-72 ชั่วโมง) (Dutta et al., 1992) หรือจากรายงานที่ทำการศึกษาโดยให้ปลาดุกพันธุ์ผสมสัมผัสกับเมททิลพาราไธออนในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตาย (10 มก./ลิตร) นาน 96 ชั่วโมง พบว่าเมททิลพาราไธออนไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา (อัจฉริยา ไศละสูต และคณะ, 2536) เพราะฉะนั้น

จากข้อมูลดังกล่าวข้างต้นจึงทำให้ไม่สามารถที่จะสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า เมทฮีโมโกลบินมีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาอย่างไร

4.5 ความเป็นพิษของโซเดียมไนไตรท์ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตายต่อปลาดุกพันธุ์ผสม

ความเป็นพิษของโซเดียมไนไตรท์ที่มีต่อมนุษย์ สัตว์ต่างๆ รวมถึงสิ่งมีชีวิตในน้ำนั้น เกิดจากการที่ไนไตรท์ไปออกซิไดส์ฮีโมโกลบินในเม็ดเลือดแดงให้กลายเป็นเมทฮีโมโกลบิน ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินในรูปที่ไม่สามารถนำออกซิเจนไปส่งให้กับอวัยวะต่างๆ ได้ เป็นสาเหตุทำให้ร่างกายขาดออกซิเจน (Smith and Russo, 1975) การเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมของปลาดุกภายหลังสัมผัสกับโซเดียมไนไตรท์ คาดว่าน่าจะเกิดจากการที่เนื้อเยื่อต่างๆ ในร่างกายได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอกับความต้องการ ถ้าร่างกายได้รับไนเตรทหรือไนไตรท์ในปริมาณมาก การสร้างเมทฮีโมโกลบินในเลือดก็จะสูงขึ้นด้วย จึงเหลือปริมาณฮีโมโกลบินที่จะนำส่งออกซิเจนให้กับเนื้อเยื่อต่างๆ ลดลง เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้ ที่ให้ปลาดุกพันธุ์ผสมสัมผัสกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ทำการสังเกตพฤติกรรมที่เปลี่ยนแปลงไป พบว่าที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ต่ำๆ ปลาจะยังไม่ค่อยแสดงอาการผิดปกติมากนัก แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้น ปลาจะลอยตัวอยู่นิ่งๆ ใกล้ผิวน้ำหรือใกล้กับหัวทรายที่ช่วยเพิ่มออกซิเจน ซึ่งเป็นการแสดงถึงความต้องการออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นของปลา นอกจากนั้นปลายังแสดงอาการเฉื่อยอย่างชัดเจน ไม่ค่อยตอบสนองต่อการกระตุ้น อาจเป็นการปรับตัวของปลาเพื่อลดการใช้ออกซิเจนและใช้ออกซิเจนที่ละลายอยู่ในพลาสมาได้อย่างเพียงพอ (Huey et al., 1980) แต่ก็ยังคงมีปลาบางตัวที่ยังแสดงอาการกระสับกระส่าย ว่ายน้ำไปมาอย่างรวดเร็วอยู่ จากการศึกษาที่ผ่านมา ปลาส่วนใหญ่จะแสดงอาการเฉื่อยเมื่อปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดสูงขึ้น แต่ปลาจะยังไม่ตายทันทีจากภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียที่รุนแรง ถ้าปลามีการปรับตัวที่ดี ดังจะเห็นได้จากรายงานของ Huey และคณะ (1980) ที่พบว่าปลา channel catfish ที่มีปริมาณเมทฮีโมโกลบินสูงถึงร้อยละ 90 สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ ถ้าไม่ถูกรบกวนให้มีความต้องการใช้ออกซิเจนเพิ่มมากขึ้น แต่จะตายภายในไม่กี่นาทีหลังจากถูกกระตุ้นให้มีการเคลื่อนไหว เช่นเดียวกับการศึกษาของ Tomasso และคณะ (1979) ที่พบว่า channel catfish สามารถที่จะมีชีวิตอยู่ได้ถึงแม้จะมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินสูงถึงร้อยละ 100 นอกจากอาการเฉื่อยที่เด่นชัดขึ้นหลังจากสัมผัสกับไนไตรท์ที่ความเข้มข้นสูงๆ แล้ว การปรับตัวของปลาอีกอย่างหนึ่งคือการสร้างเมือกที่มีปริมาณมากขึ้นนั่นเอง ซึ่งการสร้างเมือกของปลาน่าจะเป็นผลมาจากการที่ร่างกายลดโอกาสที่จะสัมผัสกับสารพิษเมื่ออยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

4.6 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย ผลต่อสมรรถนะเอนไซม์โฉถีนเอสเทอเรส และค่าทางโลหิตวิทยา

4.6.1 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียในปลาดุกพันธุ์ผสม

ภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียเป็นภาวะที่เกิดจากมีการออกซิไดส์ Fe^{2+} (ferrous form) ของฮีโมโกลบินไปอยู่ในรูป Fe^{3+} (ferric form) ซึ่งเป็นฮีโมโกลบินในสภาวะที่ไม่สามารถนำออกซิเจนไปส่งให้กับเนื้อเยื่อต่างๆ ได้ สาเหตุการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียในปลาก็เช่นเดียวกับที่พบในคนและสัตว์อื่นๆ คือ การได้รับไนเตรทและ/หรือไนไตรท์ ซึ่งเป็นสารประกอบไนโตรเจนที่มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์น้ำ ที่สามารถพบได้ทั่วไปในธรรมชาติทั้งในน้ำจืดและน้ำเค็ม (Russo et al., 1974) โดยจะพบได้มากในน้ำที่มี ซากพืช ซากสัตว์อยู่มาก ในน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารไนเตรทที่ปล่อยมาจากโรงงานอุตสาหกรรม น้ำที่ไหลผ่านพื้นที่ที่ทำการเกษตรที่มีการใช้ปุ๋ยเพื่อเพิ่มผลผลิต (Russo et al., 1981; Huey et al., 1984) โดยปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่เกิดขึ้นจะแปรผันตามความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ ดังจะเห็นได้จากผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ แต่ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 75-150 มก./ลิตร ปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่เกิดขึ้นมีความแตกต่างกันอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจจะเนื่องมาจากช่วงความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่กำหนดขึ้นมีความห่างกันไม่มากนัก หรือเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ NADH-methemoglobin reductase ในเม็ดเลือดแดงของปลาดุกพันธุ์ผสม ที่สามารถเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินให้กลับมาอยู่ในรูปฮีโมโกลบินปกติได้ (Cameron, 1971) ความเป็นพิษของไนไตรท์ที่มีต่อปลาแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายๆอย่างได้แก่ ชนิด ขนาด อายุของปลา คุณสมบัติของน้ำ ความเป็นกรด-ด่าง อุณหภูมิ ความกระด้างของน้ำที่ใช้เลี้ยงปลา รวมถึงความแตกต่างกันของ methemoglobin reductase system ที่มีอยู่ในปลาแต่ละชนิด และความสามารถของปลาแต่ละตัวในการที่จะรับหรือขับไนไตรท์ออกจากร่างกาย ซึ่งล้วนแต่มีผลต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย (Tomasso, 1986) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงได้พยายามเลือกใช้ปลาที่มีขนาดใกล้เคียงกัน น้ำที่ใช้ในการทดลองเป็นน้ำที่ได้มาจากแหล่งเดียวกัน ความหนาแน่นของปลาต่อตู้เท่ากัน สภาพการทดลองที่เหมือนกัน เพื่อเป็นการลดปัจจัยต่างๆ ที่อาจจะมีผลทำให้ผลการทดลองที่ได้มีความผันแปร ภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียที่เกิดจากไนเตรท และ/หรือไนไตรท์ นักวิทยาศาสตร์หลายท่านถือว่าเป็นกลไกความเป็นพิษลำดับแรกสำหรับปลา (Tomasso et al., 1979; Huey et al., 1980) แต่ก็มีนักวิทยาศาสตร์อีกหลายท่านที่มีความคิดเห็นขัดแย้งกันว่า ภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียไม่ได้เป็นความเป็นพิษลำดับแรกของไนไตรท์ เพราะว่าปลาบางตัวที่ตายจากภาวะนี้มีปริมาณเมทฮีโมโกลบินต่ำกว่าปลาที่ยังมีชีวิตอยู่ (Smith and William, 1974; Brown and McLeay, 1975; Crawford and Allen, 1977; Margiocco et al., 1983)

แต่ถึงอย่างไรก็ตามภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียที่เกิดขึ้นก็ยังคงเป็นพิษต่อปลา รวมถึงเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตต่างๆ ด้วย

4.6.2 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อสมรรถนะเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรส

จากรายงานการศึกษาที่ผ่านมาและผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ ไม่พบว่าไนไตรท์หรือสารประกอบไนโตรเจนอื่นๆ มีผลต่อสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและในสมองแต่อย่างใด ถึงแม้จะเคยมีรายงานว่าไนไตรท์อาจจะมีบทบาทในการเป็น mixed function oxidase inhibitor (Shertzer and Duthu, 1975) ซึ่งน่าจะมีผลลดความเป็นพิษจากการที่เมทฮีโมโกลบินถูกเปลี่ยนเป็นเมทฮีโมโกลบินออกซอนลดลง ประกอบกับการศึกษาครั้งนี้ใช้เวลาเพียง 24 ชั่วโมง ไนไตรท์อาจจะยังไม่แสดงผลออกมา จึงไม่พบว่าสมรรถนะของเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสของกลุ่มที่ได้รับเมทฮีโมโกลบินเพียงอย่างเดียวแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมทฮีโมโกลบินร่วมกับโซเดียมไนไตรท์

4.6.3 ผลของโซเดียมไนไตรท์ต่อค่าทางโลหิตวิทยา

จากการศึกษาพบว่าโซเดียมไนไตรท์ตั้งแต่ความเข้มข้น 50 มก./ลิตร มีผลทำให้ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและที่ความเข้มข้น 100 และ 150 มก./ลิตรยังทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม มีหลายรายงานที่ให้ผลสอดคล้องกับผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เช่น ในปลา *Clarius lazera* ที่สัมผัสกับ NO_2-N นาน 96 ชั่วโมง มีจำนวนเม็ดเลือดแดง ฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินลดลง (Hilmy et al., 1987) ปลา rainbow trout ที่สัมผัสกับโซเดียมไนไตรท์ทั้งในน้ำจืดและน้ำทะเล (16%) นาน 24 ชั่วโมง มีค่าฮีมาโตคริตลดลงตามระยะเวลาที่เพิ่มขึ้น (0-24 ชั่วโมง) (Eddy et al., 1983) การที่ค่าฮีมาโตคริตลดลงอาจจะเป็นผลจากที่มีการหดตัว (shrink) ของเม็ดเลือดแดง (Jensen, 1990) หรือเกิดจากการที่จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลง หรือการเพิ่มขึ้นของปริมาตรเลือดในร่างกาย (volume of blood plasma) แต่เหตุผลสุดท้ายดูจะเป็นไปได้มากที่สุด เพราะจากที่ทราบแล้วว่าไนไตรท์สามารถที่จะเปลี่ยนไปอยู่ในรูปไนตริค ออกไซด์ได้ (NO) ที่เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelial cell) ซึ่งจะส่งผลทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด จากการไปกระตุ้นเอนไซม์ guanylate cyclase (Ignarro and Gruetter, 1980) เหตุผลอีกอย่างหนึ่งที่ไนไตรท์ไปทำให้ฮีโมโกลบินมีค่าลดลง อาจจะเป็นผลที่เกิดจากการที่ฮีโมโกลบินถูกเปลี่ยนไปเป็นเมทฮีโมโกลบิน จึงทำให้ปริมาณฮีโมโกลบินทั้งหมดเหลืออยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าปกติ (Brown and McLeay, 1975) อย่างไรก็ตามภาวะโลหิตจาง

(anemia) ที่เกิดจากการที่ฮีโมโกลบินถูกเปลี่ยนไปเป็นเมทฮีโมโกลบินจะสามารถกลับคืนสู่สภาพปกติได้ หลังจากนำปลาไปปล่อยในน้ำที่สะอาด จากการที่ปลาก็มีกระบวนการที่สามารถเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินกลับเป็นฮีโมโกลบินปกติได้ โดยอาศัยการทำงานของเอนไซม์ methemoglobin reductase ที่มีอยู่ในเม็ดเลือดแดงของปลา (Cameron, 1971) ผลจากการทำงานของเอนไซม์ในระบบนี้ อาจจะทำให้เม็ดเลือดแดงมีการสูญเสียพลังงานมาก ส่งผลทำให้เม็ดเลือดแดงมีอายุสั้นลง ดังนั้นเม็ดเลือดแดงก็จะตายลงเรื่อยๆ ซึ่งการตายนี้จะเกิดขึ้นรวดเร็วกว่าการสร้างเม็ดเลือดแดงใหม่ จึงเป็นอีกหนึ่งสาเหตุที่ทำให้ปริมาณ ฮีโมโกลบินในเลือดมีค่าลดลง (Scarano and Saroglia, 1984)

4.7 ความเป็นพิษของโซเดียมไนไตรท์เมื่อให้ร่วมกับเมททิลพาราไธออน ต่อปลาดุกพันธุ์ผสม

จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นถึง ความเป็นพิษของสารแต่ละตัวที่มีต่อพฤติกรรมของปลาดุก แต่การศึกษาในขั้นตอนนี้จะใช้เมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นเดียวคือ 0.25 มก./ลิตร แต่ใช้โซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน พฤติกรรมของปลาดุกกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ยังแตกต่างจากกลุ่มควบคุมไม่ชัดเจน แต่เมื่อเพิ่มความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ขึ้นเรื่อยๆ จนถึงความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ ปลาจะแสดงพฤติกรรมที่เกิดจากความเป็นพิษของโซเดียมไนไตรท์อย่างชัดเจนคือ ปลาจะแสดงอาการเฉื่อย ไม่ค่อยตอบสนองต่อการกระตุ้น นอนลอยตัวนิ่งๆ ใกล้ผิวน้ำ หรือใกล้กับหัวทรายเพิ่มออกซิเจน ซึ่งอาการที่เกิดขึ้นก็ไม่ได้แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์หรือเมททิลพาราไธออนอย่างเดียว แต่ระยะเวลาเริ่มต้นของอาการแสดง (onset of action) จะเร็วกว่ากลุ่มที่ได้รับสารตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียว เพราะที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ต่ำๆ ปลาบางตัวก็แสดงอาการกระสับกระส่าย กระวนกระวาย เหมือนกับที่ได้รับเมททิลพาราไธออน แต่อาการจะเกิดเร็วและชัดเจนกว่า เพราะในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนเพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้นเดียวกันนี้ ปลาจะยังไม่แสดงพฤติกรรมที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเลย นอกจากนั้นน้ำในอ่าง จะขุ่นเต็มไปด้วยเมือกที่ปลาขับออกมา รวมถึงที่ตัวปลาก็มีเมือกมากขึ้น แสดงว่าการที่ปลาได้รับสารทั้งสองตัวพร้อมกัน มีผลกระทบต่อปลามากกว่าการที่ได้รับสารพิษเพียงตัวเดียว แต่การแสดงพฤติกรรมของปลาเพียงอย่างเดียว ไม่สามารถที่จะนำมาใช้เป็นข้อมูลที่บ่งชี้ได้อย่างแน่ชัด เพราะพฤติกรรมที่สังเกตเห็นนั้น ขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสารที่ปลาได้รับ ถ้าได้รับสารตัวใดในปริมาณที่มากกว่าก็จะแสดงพฤติกรรมที่เกิดจากสารตัวนั้นชัดเจนกว่าอีกตัว ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่จะต้องทำการตรวจวัดทางห้องปฏิบัติการว่า ความเป็นพิษที่เกิดจากการที่ได้รับสารทั้งสองตัวพร้อมกันนั้นทำให้เกิดอันตรายต่อปลามากกว่าการที่ได้รับสารพิษตัวใดตัวหนึ่งเพียงอย่างเดียวหรือไม่

4.8 ผลของโซเดียมไนไตรท์เมื่อให้ร่วมกับเมททิลพาราไธออนต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย ผลต่อสมรรถนะเอนไซม์โมถีนเอสเทอเรส และค่าทางโลหิตวิทยา

4.8.1 ผลของโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อให้ร่วมกับเมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร ต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย

จากผลการศึกษาที่ได้ในขั้นตอนนี้ พบว่าเมททิลพาราไธออนเมื่อให้ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ ไม่ได้ไปมีผลทำให้ปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่เกิดขึ้นสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว ในทางตรงกันข้าม กลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวที่ความเข้มข้น 12.5-50 มก./ลิตรกลับมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออน ซึ่งอาจจะเป็นเพราะว่า ปลาคุกพันธุ์ผสมที่ใช้เป็นปลากนละชุดกัน และปลากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออนยังมีความแข็งแรงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว ดังจะเห็นได้จาก ค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเม็ดเลือดแดงในกลุ่มควบคุมของปลาชุดที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออนมีค่าสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียว และในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ในขนาดต่ำกว่า 50 มก./ลิตร ค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินที่ลดลงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ดังนั้นจึงไม่อาจสรุปได้ว่า เมททิลพาราไธออนในขนาดความเข้มข้น 0.25 มก./ลิตร มีผลต่อภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียที่เกิดขึ้นจากโซเดียมไนไตรท์ที่ขนาดความเข้มข้นต่ำกว่า 50 มก./ลิตร แต่ปลากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ขนาดความเข้มข้น 50-150 มก./ลิตร มีจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ โดยที่ในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียวมีเพียงที่ขนาด 100 และ 150 มก./ลิตรเท่านั้น ที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงอย่างมีนัยสำคัญ จากผลที่ได้นี้จึงเห็นได้ว่า เมทฮีโมโกลบินในเลือดของปลากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออนสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียว ซึ่งจะเห็นได้อย่างชัดเจนในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ในขนาด 150 มก./ลิตร โดยเหตุที่ปลาในกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่ำๆ มีค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเม็ดเลือดแดงสูงกว่าและมีปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดต่ำกว่าปลาในกลุ่มทดลองชุดที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียว จึงคาดว่าภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียที่เกิดขึ้นจะไม่รุนแรงนักถ้าปลามีความแข็งแรง โดยสังเกตจากค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดงที่สูงกว่า โดยที่ระดับฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดงที่มากกว่า มีส่วนช่วยในการคืนกลับของเมทฮีโมโกลบินไปเป็นฮีโมโกลบินปกติได้ดี จากที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้นว่า ในเม็ดเลือดแดงของปลามีเอนไซม์ methemoglobin reductase ที่

สามารถเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินกลับไปอยู่ในรูปฮีโมโกลบินปกติได้ ซึ่งในกรณีนี้ปลากลุ่มที่มีค่าฮีมาโตคริตและจำนวนเม็ดเลือดแดงมากกว่า อาจจะมีเอนไซม์นี้ในปริมาณที่มากกว่า การเปลี่ยนเมทฮีโมโกลบินกลับไปอยู่ในรูปฮีโมโกลบินก็สามารถทำได้มากขึ้นตามไปด้วย จึงอาจเป็นสาเหตุที่ทำให้ปริมาณเมทฮีโมโกลบินในปลากลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ในความเข้มข้นต่ำๆ เกิดขึ้นน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์อย่างเดียว แต่อย่างไรก็ตามเมททิลพาราไธออนก็อาจจะทำให้ความเป็นพิษของโซเดียมไนไตรท์สูงขึ้นได้ จากการที่ไปมีผลต่อไนโตรเจนเมตาบอลิซึมทำให้เกิดการสร้างแอมโมเนีย ยูเรีย กลูตามีน และเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการเผาผลาญของ purine และกรดอะมิโนอื่นๆ ส่งผลทำให้เกิดการสร้างแอมโมเนียมากขึ้นและแอมโมเนียที่เกิดขึ้นนี้อาจจะถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปของไนไตรท์ต่อไปได้ (Reddy and Rao, 1988) แอมโมเนียเป็นผลสุดท้ายที่เกิดจากการเผาผลาญโปรตีน การกำจัดสารนี้ออกจากร่างกายอาจกำจัดออกมาในรูป กรดยูริค ยูเรีย หรือรูปแอมโมเนียโดยตรง ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ สำหรับปลาและสัตว์น้ำอื่นๆ จะขับของเสียผ่านทางเหงือกออกสู่แหล่งน้ำในรูปของแอมโมเนียโดยตรง (Russo, 1985) นอกจากเมททิลพาราไธออนจะมีผลทำให้มีปริมาณไนไตรท์เพิ่มขึ้นโดยตรงแล้ว ยังอาจจะส่งผลกระทบทางอ้อมต่อการทำงานของเอนไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450 อีกด้วย จากการศึกษาที่ผ่านมามีรายงานว่า พาราไธออน ซึ่งเป็นสารกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออกาโนฟอสเฟตเช่นเดียวกับเมททิลพาราไธออน ไปมีผลทำให้ไซโตโครมพี 450 ในตับหนูลดลง (Halpert, Hammond and Neal, 1980) ส่วนเมททิลพาราไธออนมีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ของปลาดุกพันธุ์ผสมลดลง ซึ่งเป็นการศึกษาแบบภายนอกร่างกาย *(in vitro)* (ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์, 2538) แต่จากการศึกษาของ ฐิติลาวัณย์ กลิ่นคล้ายกัน (2539) พบว่าเมททิลพาราไธออน ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 1-5 มก./ลิตร ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง แต่ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม *(in vivo)* ซึ่งการทำงานของไซโตโครมพี 450 จะต้องอาศัยเอนไซม์ไซโตโครมบี 5 รีดักเตส เป็นตัวส่งผ่านอิเลคตรอนจาก NADH ให้แก่ ฟลาโวโปรตีนและไซโตโครมบี 5 เพื่อเข้าสู่วงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450 ต่อไป (Bethizy and Hayes, 1994) ถ้าเมททิลพาราไธออนไปมีผลทำให้ระดับไซโตโครมบี 5 ลดลง หรือการที่ไซโตโครมบี 5 ลดลงไม่ว่าจะเกิดจากสาเหตุใดก็ตาม ก็ล้วนแต่มีผลกระทบต่อการทำงานของไซโตโครมพี 450 และการที่ไซโตโครมบี 5 /ไซโตโครมบี 5 รีดักเตสลดลง ยังอาจส่งผลทำให้การเกิดพิษของไนไตรท์เพิ่มสูงขึ้นอีกด้วย เพราะในคนหรือปลาจำเป็นจะต้องอาศัยไซโตโครมบี 5 และเอนไซม์ไซโตโครมบี 5 รีดักเตสจากเม็ดเลือดแดงในการรีดิวส์เมทฮีโมโกลบินให้กลับมาอยู่ในรูปฮีโมโกลบินปกติ โดยการส่งอิเลคตรอนจาก NADH ให้แก่ ไซโตโครมบี 5 แล้วส่งให้กับเมทฮีโมโกลบินต่อไป ดังแสดงในสมการ (Mansouri and Lurie, 1993)

$$NADH + \text{cyt b5 } (Fe^{3+}) \text{ (ox)} \longrightarrow NAD + \text{cyt b5 } (Fe^{2+}) \text{ (red)}$$

$$\text{cyt b5 } (Fe^{2+}) \text{ (red)} + \text{MetHb } (Fe^{3+}) \longrightarrow \text{cyt b5 } (Fe^{3+}) + \text{Hb } (Fe^{2+})$$

Petragnani และ Nogueira (1959) ได้แสดงให้เห็นว่าไซโตโครมบี 5 และเอนไซม์ไซโตโครมบี 5 รีดักเตสจากตับหมูสามารถที่จะลดปริมาณเมทฮีโมโกลบินในม้าได้ และจากการศึกษาของ Passon และ Hultquist (1972) พบว่าเอนไซม์ NADH cyt b5 reductase ที่แยกมาจากฮีโมลัยเสตก์ของเม็ดเลือดแดงคน สามารถที่จะไปกระตุ้นให้ ไซโตโครมบี 5 จากเม็ดเลือดแดงของวัวและกระต่ายทำงานได้ ซึ่งจากตรงนี้อาจจะทำให้ได้แง่คิดที่ว่าไซโตโครมบี 5 และเอนไซม์ไซโตโครมบี 5 รีดักเตส ไม่ว่าจะถูกสร้างที่อวัยวะใด ก็อาจจะมีความสามารถในการที่จะแสดงผลลดปริมาณเมทฮีโมโกลบินได้ เพราะฉะนั้นถ้าเมททิลพาราไธออนไปมีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในตับ ก็อาจส่งผลกระทบต่อการลดปริมาณเมทฮีโมโกลบินในเลือดได้เช่นกัน นอกจากข้อมูลต่างๆ ข้างต้น ความเครียดของปลาที่เกิดจากการได้รับสารมีพิษพร้อมกันสองตัวก็มีผลทำให้การสร้างเมทฮีโมโกลบินเพิ่มสูงขึ้นได้เช่นกัน

4.8.2 ผลต่อสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสของโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อให้ร่วมกับเมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร

จากผลที่ได้พบว่าสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและสมอง ในทุกความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์เมื่อให้ร่วมกับเมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ไม่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่ม ผลของสมรรถนะเอนไซม์ที่ลดลงนี้น่าจะเป็นผลจากเมททิลพาราไธออนเพียงอย่างเดียว เพราะความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ที่สูงขึ้นไม่ได้มีผลไปเพิ่มหรือลดสมรรถนะเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส ถึงแม้ว่าไนไตรท์อาจจะไปมีผลลดการเกิดพิษจากเมททิลพาราไธออนได้ จากที่เคยมีรายงานถึง ผลของไนไตรท์ต่อตับกระต่ายว่า อาจจะมีคุณสมบัติเป็น mixed-function oxidase inhibitor (Shertzer and Duthu, 1975) ถ้าไนไตรท์มีคุณสมบัตินี้จริงก็ย่อมจะส่งผลดี จากการที่ไปลดการเปลี่ยนเมททิลพาราไธออนไปเป็นเมททิลพาราออกซอน ความเป็นพิษต่อสัตว์ที่เกิดจากการที่เอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสถูกยับยั้งก็จะลดลงตามไปด้วย นอกจากนั้นการที่ไนไตรท์ไปมีผลทำให้การขนส่งออกซิเจนไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ลดลงจากการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย อาจจะมีผลกระทบต่อการทำงานของไซโตโครมพี 450 ซึ่งจำเป็นต้องอาศัยออกซิเจน 1 โมเลกุล ในการออกซิไดส์ ไซโตโครมพี 450 ที่จับอยู่กับยาหรือสารเคมีต่างๆ (cyt P-450 (red) complex) โดย 1 อะตอมของออกซิเจนจะให้กับ

สับสเตรทและอีก 1 อะตอมจะถูกทำให้อยู่ในรูปของน้ำ (H_2O) (Bethizy and Hayes, 1994) การทำงานของไซโตโครมพี 450 ที่ลดลง ไม่ว่าจะเป็นผลจากไนไตรท์โดยตรงหรือผลทางอ้อมจากการขาดออกซิเจนก็ตาม ย่อมส่งผลไปรบกวนการทำงานของไซโตโครมพี 450 ในการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารเคมีต่างๆ (biotransformation) ในวัฏภาคที่ 1(phase I) ผลที่น่าจะเกิดตามมาก็คือ การเปลี่ยนเมททิลพาราไธออนไปเป็นเมททิลพาราออกซอนลดลง แต่การศึกษาครั้งนี้อาจจะใช้เวลาในการศึกษาที่สั้น (24 ชั่วโมง) จึงทำให้ไม่สามารถที่จะบอกได้ว่าโซเดียมไนไตรท์ไปมีผลลดการเกิดพิษจากเมททิลพาราไธออนได้หรือไม่

4.8.3 ผลของโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นต่างๆ เมื่อให้ร่วมกับเมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร ต่อค่าทางโลหิตวิทยา

ค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินในปลาดุกพันธุ์ผสมกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออนลดลงจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ตั้งแต่ 75 มก./ลิตร ส่วนผลต่อจำนวนเม็ดเลือดแดง กลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มก./ลิตร มีผลเพิ่มการลดลงของจำนวนเม็ดเลือดแดงมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวที่มีจำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงที่ความเข้มข้น 100 และ 150 มก./ลิตรเท่านั้น ซึ่งผลต่อค่าทางโลหิตวิทยาในปลากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออน คล้ายกับผลของปลากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวเพียงแต่ทำให้ผลที่ได้เด่นชัดขึ้น จากผลที่ได้นี้เมททิลพาราไธออนอาจจะไม่ได้ไปมีผลกระทบต่อค่าทางโลหิตวิทยาที่เกิดจากโซเดียมไนไตรท์ หรือถ้ามีก็มีเพียงเล็กน้อยเท่านั้น เพราะจากผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ จะเห็นได้ว่าเมททิลพาราไธออนในทุกความเข้มข้นไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา จึงไม่สามารถที่จะสรุปได้อย่างแน่ชัดว่า เมททิลพาราไธออนไปมีผลเสริมฤทธิ์ของโซเดียมไนไตรท์ เพราะเมททิลพาราไธออนที่ใช้ในขั้นตอนนี้เป็นความเข้มข้นในขนาดที่ต่ำๆ ไม่ทำให้ปลาตาย และยังใช้เพียงความเข้มข้นเดียว อีกทั้งระยะเวลาที่ใช้ในการศึกษาก็สั้น (24 ชั่วโมง)

สรุปผลและข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาผลของโซเดียมไนไตรท์และเมททิลพาราไธออนในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตาย ต่อปลาดุกพันธุ์ผสม เมื่อได้รับสารตัวใดตัวหนึ่งเพียงตัวเดียว เปรียบเทียบกับเมื่อได้รับสารทั้งสองตัวพร้อมกัน พอที่จะได้ข้อสรุปที่สำคัญดังนี้

1. เมททิลพาราไธออนในทุกความเข้มข้น มีผลไปยับยั้งสมรรถนะเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและสมอง โดยสมรรถนะเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรสในเลือดจะถูกยับยั้งมากกว่าในสมอง แต่ไม่มีผลต่อค่าทางโลหิตวิทยา

2. โซเดียมไนไตรท์ มีผลทำให้เกิดภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย ซึ่งปริมาณเมทฮีโมโกลบินที่เกิดขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของโซเดียมไนไตรท์ทำให้ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินลดลงที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มก./ลิตร และยังมีผลทำให้จำนวนเม็ดเลือดแดงลดลงที่ความเข้มข้น 100 และ 150 มก./ลิตร

3. เมื่อให้โซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออน 0.25 มก./ลิตร ปลาดุกพันธุ์ผสมกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นเดียวเท่านั้นคือ ความเข้มข้น 150 มก./ลิตร ที่มีปริมาณเมทฮีโมโกลบินสูงกว่ากลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวอย่างชัดเจน ค่าฮีมาโตคริตและฮีโมโกลบินที่ลดลงไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์เพียงอย่างเดียวยกเว้นที่ความเข้มข้น 50 มก./ลิตร แต่ในกลุ่มที่ได้รับโซเดียมไนไตรท์ร่วมกับเมททิลพาราไธออน ทำให้การลดลงของจำนวนเม็ดเลือดแดงเพิ่มมากขึ้นที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 50 มก./ลิตร ส่วนผลต่อสมรรถนะเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรสทั้งในเลือดและสมองแตกต่างจากกลุ่มควบคุม แต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับเมททิลพาราไธออนเพียงอย่างเดียว

4. ความรุนแรงของภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมีย ขึ้นอยู่กับค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดงของปลาดุกพันธุ์ผสม โดยที่ค่าฮีมาโตคริต ฮีโมโกลบินและจำนวนเม็ดเลือดแดง มีส่วนช่วยให้ความรุนแรงของภาวะเมทฮีโมโกลบินนีเมียที่เกิดขึ้นลดลง

จะเห็นได้ว่า สารทั้งสองตัวต่างก็มีความเป็นพิษต่อปลาแตกต่างกันตามคุณสมบัติของสารแต่ละตัว แต่ถึงอย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ที่สารทั้งสองตัวจะมีผลกระทบต่อกัน ไม่ว่าจะเป็นผลจากการที่ไปเสริมฤทธิ์กันหรือหักล้างฤทธิ์ของตัวใดตัวหนึ่ง จากข้อสันนิษฐานที่ได้กล่าวไปแล้วในหัวข้ออภิปรายผลการทดลอง ในการศึกษาครั้งต่อไปควรจะเลือกใช้เมททิลพาราไธออนที่หลายๆ ค่าความเข้มข้นและใช้เวลาในการศึกษาที่นานกว่านี้ นอกจากนั้นการควบคุมคุณภาพของสัตว์ทดลองให้มีความแตกต่างกันน้อยที่สุด ก็เป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในการทดลองแต่ละครั้ง แต่จากผลการศึกษา

ครั้งนี้ก็พอที่จะได้ข้อสังเกตที่น่าสนใจคือ เมททิลพาราไธออนเมื่อให้ร่วมกับโซเดียมไนไตรท์ที่ความเข้มข้นสูงๆ มีผลไปทำให้ความเป็นพิษของโซเดียมไนไตรท์ต่อการเกิดภาวะเมทฮีโมโกลบิน-นีเมียเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน จากที่ได้กล่าวไปแล้วว่า มีความเป็นไปได้ที่สิ่งมีชีวิตในน้ำรวมถึงปลา มีโอกาสที่จะได้รับอันตรายทั้งจากสารกำจัดศัตรูพืชและไนไตรท์ที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำพร้อมกัน จึงควรจะได้มีการตระหนักถึงความสำคัญของการเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารมีพิษต่างๆ ในแหล่งน้ำ หาแนวทางในการป้องกันและควบคุมปัญหาที่อาจจะเกิดจากการเกษตร ที่นอกจากจะมีผลกระทบโดยตรงต่อสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในสิ่งแวดล้อมนั้นๆ แล้ว ยังอาจจะส่งผลกระทบถึงมนุษย์ที่อาจจะได้รับสารพิษทั้งสองจากทางตรงและทางอ้อมอีกด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย