1) บทนำ

ประวัติการเกิดโรคจากสารพิษอะฟลาทอกซิน พบว่าปี ค.ศ.1960 ในประเทศอังกฤษ พบไก่งวง ลูกเป็ด และสัตว์เล็กตายเป็นจำนวนมาก เมื่อผ่าชาก พบความผิดปกติที่ ตับ ไต และท่อน้ำดี โดยมีอาการตกเลือดและบวมพอง เรียกโรคนี้ว่า Turkey X-disease จนกระทั่ง ปี ค.ศ. 1960 สามารถแยกเชื้อรา *Aspergillus flavus* จากถั่วลิสงได้ ทำให้พบว่าสาเหตุที่แท้จริงไม่ได้เกิดจากตัวเชื้อ แต่เกิดจากสารพิษที่เชื้อราสร้างขึ้น และเรียกสารพิษที่เกิดขึ้นว่า aflatoxin (ศุภกิจ, 2527) สำหรับในสัตว์น้ำ พบเนื้องอกในตับปลาเรนโบว์เทร้าท์ (*Salmo gairdneri*) มาตั้งแต่ปี ค.ศ.1933 ในฟาร์มประเทศอังกฤษ ค.ศ.1937-1942 พบในโรงเพาะฟักปลาเทร้าท์ที่แคลิฟอร์เนีย (Wales and Sinhuber, 1966 อ้างโดย Wales, 1970) จนกระทั่งปี ค.ศ. 1960 พบเนื้องอกในตับปลาในโรงเพาะฟักปลาเทร้าท์หลายๆแห่ง ซึ่งเกิดเนื่องจากมีการปนเปื้อนเชื้อราของเมล็ดฝ้ายในอาหาร ทำให้เกิดอะฟลาทอกซินบี$_1$ขึ้น (Wolf and Jackson, 1963 ; Smith, 1963 อ้างโดย Ellis *et al.*, 2000) การเกิดโรคส่วนใหญ่เนื่องจากสัตว์น้ำได้รับวัสดุอาหารที่มีการปนเปื้อนสารพิษอะฟลาทอกซิน เช่น ข้าวโพด ถั่วเหลืองป่น ถั่วลิสงป่น รำข้าว และปลายข้าว เป็นต้น รวมทั้งกระบวนการในการขนส่ง และเก็บรักษาอาหารยังไม่ดีพอ จึงอาจมีอะฟลาทอกซินปนเปื้อนในอาหารสัตว์น้ำได้ ซึ่งความเป็นพิษที่เกิดจากอะฟลาทอกซินความเข้มข้นสูงทำให้สัตว์ป่วยอย่างรุนแรงและตายได้ ในขณะที่ความเข้มข้นต่ำและได้รับเป็นเวลานาน ทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะตับและไต ประสิทธิภาพการทำงานของทุกอวัยวะต่ำ ส่งผลให้ปลามีความต้านทานต่อโรคและพยาธิ รวมทั้งการเจริญเติบโตต่ำ ทำให้เกษตรกรต้องเสียค่าใช้จ่ายเพิ่ม ทั้งในเรื่องของอาหาร ยารักษาโรค แรงงาน และค่าใช้จ่ายอื่นๆ นอกจากนั้นยังมีข้อสงสัยว่าเนื้อสัตว์ที่ได้รับพิษจากอะฟลาทอกซินอาจเป็นอันตรายต่อผู้บริโภคได้ ซึ่งองค์การอาหารและเกษตรกรรมแห่งโลก (FAO) กำหนดให้มีการปนเปื้อนของอะฟลาทอกซินในอาหารได้ไม่เกิน 30 พีพีบี องค์การอาหารและยาสหรัฐอเมริกา (FDA) ให้มีในอาหารคนและสัตว์ได้ไม่เกิน 20 พีพีบี และประเทศเยอรมันยอมให้มีในอาหารได้เพียง 5 พีพีบี เท่านั้น (ปราโมทย์และคณะ, มปป.) ส่วนในประเทศไทยกำหนดให้มีในอาหารได้ไม่เกิน 20 พีพีบี (อรุณศรี, 2540) ดังนั้นการศึกษาถึงผลของอะฟลาทอกซินบี$_1$ที่มีต่อการเจริญเติบโต การรอดตาย องค์ประกอบเลือด และเนื้อเยื่อวิทยาปลานิลแดงแปลงเพศจึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อป้องกันความเสียหายที่จะเกิดขึ้นและเพื่อเป็นแนวทางพื้นฐานในการศึกษาด้านโรคที่เกิดจากสารพิษจากเชื้อราในสัตว์น้ำต่อไป

2) วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาระดับความเข้มข้นและผลของอะฟลาทอกซินบี, ในอาหารเลี้ยงปลา ต่อการเจริญเติบโต องค์ประกอบเลือด และการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อของปลานิลแดงแปลงเพศ

3) วิธีการศึกษา

3.1 การเตรียมชุดการทดลอง

- **ระบบทดลอง**

ใช้ตู้กระจกขนาด 120 x 60 x 30 เซนติเมตร ความจุน้ำ 216 ลิตร ทำความสะอาด และติดตั้งอุปกรณ์ให้อากาศให้พร้อมสมบูรณ์ แล้วเติมน้ำประปาที่ปราศจากคลอรีน ให้ได้ปริมาตรประมาณ 165 ลิตร ปิดตู้ด้วยผ้าพลาสติกสีเขียวทึบ 3 ด้าน เพื่อป้องกันการถูกรบกวนขณะทำการทดลอง

- **สัตว์ทดลอง**

นำปลานิลแปลงเพศวัยอ่อนขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร จำนวน 3,000 ตัว มาอนุบาลในถังไฟเบอร์กลาสทรงกลม ขนาดความจุ 2 ลูกบาศก์เมตร เป็นเวลา 6 สัปดาห์ จากนั้นคัดปลาใส่ตู้กระจกที่เตรียมไว้ จำนวน 20 ตัวต่อตู้ ปรับสภาพปลาให้คุ้นเคยกับสภาพแวดล้อมของตู้ และอาหารทดลองเป็นเวลา 7 วัน ชั่งน้ำหนักรวมเริ่มต้นของปลา

- **อาหาร**

วิเคราะห์วัตถุดิบอาหาร และคำนวณสูตรอาหารให้มีระดับคุณค่าทางโภชนาการเท่ากันทุกชุดการทดลอง แต่ให้มีระดับอะฟลาทอกซินบี,แตกต่างกัน 6 ระดับ คือ 0 50 100 500 1,000 และ 2,500 พีพีบี ดังแสดงในตารางที่ 1

ชั่งวัตถุดิบตามสูตร ผสมให้เข้ากันอย่างดี จากนั้นจึงผสมกับน้ำแล้วบดผ่านเครื่องบดเนื้อที่มีรูหน้าแว่น 1 มิลลิเมตร หักอาหารเป็นเม็ดแล้วอบให้แห้งในตู้อบที่ 60 องศาเซลเซียส นาน 4-5 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นแล้วเก็บใส่ถุงพลาสติก เก็บในตู้เย็นไว้ใช้ทดลองเลี้ยงปลาต่อไป

ตารางที่ 1 สูตรอาหารปลานิลแปลงเพศสำหรับทดลองผลของอะฟลาทอกซิน

วัตถุดิบ	อาหารทดลอง					
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	สูตร 5	สูตร 6
ปลาป่น	22	22	22	22	22	22
กากถั่วเหลือง	30	30	30	30	30	30
รำละเอียด	28	28	28	28	28	28
แป้งสาลี	15	14.834	14.668	13.34	11.667	6.698
อะฟลาทอกซิน*	0	0.166	0.332	1.660	3.333	8.302
วิตามินรวม	1	1	1	1	1	1
แร่ธาตุรวม	4	4	4	4	4	4
รวม	100	100	100	100	100	100
ความเข้มข้นของ AFB_1 (พีพีบี)	0	50	100	500	1,000	2,500

*อะฟลาทอกซินบี, 19.15 พีพีเอ็ม ในแป้งสาลี

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินในอาหารทดลอง

สูตรอาหาร	ความเข้มข้นของอะฟลาทอกซินบี, ในอาหาร	
	จากการคำนวณ (พีพีบี)	จากการวิเคราะห์โดย TLC (พีพีบี)
1	0	3.85
2	50	41.12
3	100	113.20
4	500	591.00
5	1,000	1,687.75
6	2,500	4,364.00

3.2 การวางแผนการทดลอง

วางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (CRD-completely randomized design) แบ่งการทดลองเป็น 6 กลุ่มการทดลอง (treatments) โดยที่แต่ละกลุ่มการทดลองมี 5 ซ้ำ ให้อาหารวันละ 3 ครั้ง คือช่วงเช้าเวลา 8.30 น. ช่วงเที่ยงเวลา 12.30 น. และช่วงเย็นเวลา 16.30 น. โดยให้ปลากินอาหารตามเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว ดังแสดงในตารางที่ 3 (ดัดแปลงจาก กรมประมง, 2541) เป็นเวลา 5 สัปดาห์

ตารางที่ 3 อัตราการให้อาหารทดลอง

สัปดาห์ที่	1	2	3	4	5
อัตราการให้อาหาร (% น้ำหนักตัวต่อวัน)	10	7	7	5	5

ที่มา : ดัดแปลงจาก กรมประมง (2541)

3.3 การเก็บรวบรวมข้อมูล

- **การตรวจสอบการเจริญเติบโตและอัตราการรอดตายของปลา**

ชั่งน้ำหนักปลาทุกสัปดาห์ โดยชั่งน้ำหนักรวมของปลาแต่ละซ้ำด้วยเครื่องชั่งไฟฟ้าทศนิยม 2 ตำแหน่ง นับจำนวนปลาที่เหลืออยู่ สังเกตลักษณะอาการปลาตลอดการทดลอง พร้อมทั้งจดบันทึกไว้ จนสิ้นสุดการทดลอง 5 สัปดาห์ นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ดัชนีตับต่อตัว และอัตราการรอดตาย

- **การศึกษาองค์ประกอบเลือด**

สุ่มปลาจากทุกกลุ่มการทดลองๆละ 15 ตัว มาสลบด้วยน้ำยา 2-phenoxyethanol เจาะเลือดจากบริเวณโคนหาง โดยใช้เอทีลินไดอะมีนเตตราอะซีติก (ethylenediaminetetraacetic acid: EDTA) 1.0 เปอร์เซ็นต์ เคลือบหลอดทดลองเพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด เพื่อศึกษาองค์ประกอบของเลือด คือ Haemoglobin Haematocrit Plasma protein และ Blood cell count

วิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีและเอนไซม์ในน้ำเลือดเมื่อสิ้นสุดการทดลองในสัปดาห์ที่ 5 และ 8 สุ่มปลาจากทุกชุดการทดลองๆละ 15 ตัวทำการเก็บเลือดปลาบริเวณโคนหาง นำเลือดใส่หลอดทิ้งไว้ 30 นาที นำไปปั่นแยกซีรัมด้วยเครื่องเซนตริฟิวจ์ 3,000 รอบต่อวินาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที ดูดเอาเฉพาะส่วนใสใส่หลอด eppendof เพื่อศึกษาปริมาณเอนไซม์ ได้แก่ อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส (ALP) Glutamic oxalacetic transminase (SGOT) และ Glutamic pyruvic transminase (SGPT) รวมทั้งปริมาณอิออนในน้ำเลือด ได้แก่ แคลเซียมและฟอสฟอรัสในน้ำเลือด โดยใช้เครื่องวิเคราะห์อัตโนมัติ Boehringer Mannheim Automated Analysis BM/Hitachi 704

- **การเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยา**

เมื่อสิ้นสุดการทดลองทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อตับ จากตัวอย่างปลากลุ่มการทดลองละ 15 ตัว มาแช่ใน ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์ 2 วัน แล้วเปลี่ยนน้ำยาดองเป็นแอลกอฮอล์ 70 เปอร์เซ็นต์ ก่อนนำไปผ่านกรรมวิธีเตรียมเนื้อเยื่อของ Humason (1979) เนื้อเยื่อตับถูกตัดให้มีความ

หนา 3-4 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin & Eosin (H&E) (Bancroft, 1967) จากนั้นนำตัวอย่างไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ และถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ Olympus AX 70

- **การศึกษาทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน**

ทำการเก็บตัวอย่างโดยสุ่มเก็บเนื้อเยื่อตับและไต จากตัวอย่างปลาทดลองในสัปดาห์ที่ 4 และ 8 มาชุดการทดลองละ 2 ตัวโดยตัดเป็นชิ้นเล็กๆขนาด 1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร ดองในน้ำยารักษาสภาพ คือ กลูตาราลดีไฮด์ (glutaraldehyde) ความเข้มข้น 2.5 เปอร์เซ็นต์ ในคาโคดีเลทบัฟเฟอร์ (cacodylate buffer) นาน 24 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำยาคงสภาพทิ้งและใช้สารละลายบัฟเฟอร์รักษาสภาพเนื้อเยื่อแทนและเก็บในตู้เย็น นำตัวอย่างล้างด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ 3 ครั้งๆละ15 นาที ผ่านขั้นตอนการคงสภาพขั้นสุดท้าย ด้วยออสเมียมเตตราออกไซด์ (osmium tetraoxide) นาน 1 ชั่วโมง จากนั้นผ่านกระบวนการดึงน้ำออกจากเซลล์โดยใช้เอทธานอล ความเข้มข้นต่างกัน เติมอีป๊อกซีเรซิน (epoxy resin) ในอัตราส่วน 1:1โดยปริมาตร นาน 1 ชั่วโมง และอีป๊อกซีเรซินบริสุทธิ์นาน 2 ชั่วโมง ย้ายตัวอย่างลงในแคปซูลพลาสติกและเติมอีป๊อกซีเรซินจนเต็ม นำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส นาน 24 ชั่วโมง เพื่อให้พลาสติกแข็งตัว ตัดตัวอย่างเนื้อเยื่อด้วยอัลตราไมโครโตมโดยครั้งแรกตัดแบบหนา (thick section) อยู่ในช่วง 0.5-1ไมครอน ย้อมด้วยสีทูลูดีนบลู (toluidine blue) เคลือบสไลด์ด้วยน้ำยาเปอร์เมาท์ แล้วนำไปตรวจเช็คด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา จากนั้นนำไปตัดแบบบาง (thin section) ความหนาอยู่ในช่วง 60-90 นาโนเมตร ทำการย้อมด้วยยูรานิลอะซิเตท (uranyl acetate) และเลดซิเตรท (lead citrate) ตามวิธีการของ Robinson และคณะ (1987) นำไปศึกษาโครงสร้างภายในด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบลำแสงส่องผ่าน Joel ที่กำลังเร่ง 80 KV และบันทึกภาพโดยกำลังขยายตั้งแต่ 2,000-20,000 เท่า

- **การวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินตกค้าง**

เมื่อสิ้นสุดการทดลองที่ 5 และ 8 สัปดาห์ ทำการผ่าเปิดช่องท้อง เก็บเฉพาะอวัยวะส่วนตับ จากนั้นเก็บตัวอย่างเนื้อปลาโดยทำการแล่เฉพาะส่วนเนื้อ สำหรับมูลปลาทำการเก็บใน 3 สัปดาห์สุดท้ายของการทดลอง โดยทำการดูดตะกอนก่อนและหลังให้อาหาร ก่อนจะเก็บมูลปลาเพื่อป้องกันการปนเปื้อนของเศษอาหารในมูลปลา นำตัวอย่างเนื้อปลา ตับและมูลปลาที่ได้ไปทำให้แห้ง โดยการลดอุณหภูมิจนตัวอย่างแข็งแล้วดึงน้ำออกจากเซลล์โดยอาศัยการระเหิด ด้วยเครื่องแช่แข็งแห้ง (freeze dry) นำตัวอย่างเนื้อปลาและตับที่แห้งแล้วบรรจุใส่ถุง ส่งกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์จังหวัดนนทบุรี เพื่อวิเคราะห์ปริมาณอะฟลาทอกซินที่สะสมโดยวิธี Contamination Branch Method (CB) และหาปริมาณโดยใช้ Thin Layer Chromatography (TLC)

3.4 **การวิเคราะห์ข้อมูล**

วิเคราะห์ข้อมูลโดยใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน ANOVA แบบ CRD (Steel and Torrie, 1980)

4) ผลการทดลอง

4.1 ความผิดปกติและพฤติกรรมของปลานิลที่ได้รับอาหารสูตรต่าง ๆ

ผลการศึกษาพบว่า เมื่อเริ่มให้อาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี,ต่างกัน 6 ระดับ ปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี,ระดับสูงสุด (2,500 พีพีบี) แสดงพฤติกรรมเฉื่อยชา หลบตามมุมตู้ แสดงอาการไม่ยอมรับอาหารตั้งแต่เริ่มให้อาหารทดลองจนสิ้นสุดการทดลอง โดยปลาจะแสดงอาการหิวขัดเจนแต่เมื่อให้อาหาร จะแสดงพฤติกรรมการกินอาหารที่ต่างไปจากปกติ คือ เข้ามาดมอาหารแต่ไม่กิน แล้วว่ายหนี วนเวียนหลายรอบกว่าจะกิน และเมื่อกินเข้าไปแล้วก็จะพ่นอาหารออกมาใหม่ ใช้เวลานานกว่าจะกินอาหารจนหมด ช่วงสัปดาห์สุดท้ายปลากินอาหารไม่หมดตามเปอร์เซ็นต์ที่ให้ ในขณะที่ปลากลุ่มอื่นๆ แสดงความอยากอาหารปกติดี การปิดเปิดของแผ่นปิดเหงือก (gill cover) จะเร็วขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี,ระดับสูงขึ้น สำหรับรูปร่างลักษณะภายนอก ไม่พบความผิดปกติทุกชุดการทดลอง

4.2 การเจริญเติบโตและการรอดตาย

4.2.1 น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัว

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลานิลที่ได้รับอาหารทดลองทั้ง 6 สูตรตลอดระยะเวลาการทดลอง 5 สัปดาห์ พบว่าปลามีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเพิ่มสูงขึ้นตามระยะเวลาของการทดลอง โดยที่น้ำหนักปลาเฉลี่ยต่อตัวปลาในสัปดาห์แรกไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วง 6.76 ± 0.09 ถึง 6.44 ± 0.20 กรัม เริ่มมีความแตกต่างกันเมื่อเลี้ยงได้ 2 สัปดาห์ โดยน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ถึง 5 (0-1,000 พีพีบี) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ อยู่ในช่วง 9.48 ± 0.12 ถึง 9.33 ± 0.27 กรัม ในขณะที่ปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,สูงสุด (2,500 พีพีบี) มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุดแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ ($p<0.05$) คือ 8.82 (0.28 กรัม จนกระทั่งสัปดาห์ที่ 5 ปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 2,500พีพีบี มีน้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวต่ำที่สุดแตกต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ถึง 5 (0-1,000 พีพีบี) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 19.11 กรัม (ตารางที่ 4)

4.2.2 น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ดัชนีตับต่อตัว และการรอดตาย

น้ำหนักเฉลี่ยต่อตัวเริ่มต้นและสิ้นสุดการทดลอง เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ ดัชนีตับต่อตัว และการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารทั้ง 6 สูตรเป็นระยะเวลา 5 สัปดาห์ แสดงในตารางที่ 4 โดยพบว่า เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นของปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ถึง 5 (0 ถึง 1,000 พีพีบี) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 468.48 ± 23.43 ถึง 448.07 ± 18.59 เปอร์เซ็นต์ ต่างจากปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีอะฟลาทอกซินบี, สูงสุด (2,500 พีพีบี) ซึ่งมีค่าต่ำสุดอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 363.38 ±15.66 เปอร์เซ็นต์ อัตราการแลกเนื้อ

พบว่าปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 ถึง 5 (0 ถึง 1,000 พีพีบี) ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 1.02 ± 0.02 ถึง 1.05 ± 0.04 ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่มีอะฟลาทอกซินบี$_1$ สูงสุด (2,500 พีพีบี) มีค่าสูงที่สุดแตกต่างจากกลุ่มอื่นๆ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) คือ 1.21 ± 0.05 (ตารางที่ 4)

ค่าดัชนีตับต่อตัวของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีระดับอะฟลาทอกซินบี$_1$ต่างกันในสัปดาห์ที่ 5 พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี$_1$ 0 และ 50 พีพีบี มีค่าไม่แตกต่างกัน โดยมีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี$_1$0 100 500 และ 1,000 พีพีบี มีค่าต่ำลงมา และปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี$_1$ระดับสูงสุด (2,500 พีพีบี) มีค่าต่ำที่สุด คือ 1.08 ± 0.05 เปอร์เซ็นต์ ใกล้เคียงกับปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี$_1$100 พีพีบี (ตารางที่ 4)

สำหรับการรอดตายของปลาที่ได้รับอาหารทั้ง 6 สูตรไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ โดยไม่พบการตายตลอดการทดลอง (ตารางที่ 4)

ตารางที่ 4 น้ำหนักเริ่มต้น น้ำหนักสุดท้าย น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการแลกเนื้อ และอัตราการรอดตายของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี$_1$ ระดับต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์[1]

สูตรอาหาร (ระดับAFB_1)	น้ำหนักเริ่มต้น (กรัม/ตัว)	น้ำหนักสุดท้าย (กรัม/ตัว)	น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น (%)	การแลกเนื้อ	ดัชนีตับต่อตัว (%)	อัตราการรอดตาย (%)
1 (0 พีพีบี)	4.15 ±0.05^{a}	23.53±0.64^{a}	466.37±10.50^{a}	1.02±0.02^{a}	1.48±0.05^{ab}	100
2 (50 พีพีบี)	4.16 ±0.02^{a}	22.79±0.72^{a}	448.07±18.59^{a}	1.05±0.04^{a}	1.65±0.18^{a}	100
3 (100 พีพีบี)	4.13 ±0.03^{a}	23.48±1.00^{a}	468.48±23.43^{a}	1.02±0.02^{a}	1.27±0.19^{bc}	100
4 (500 พีพีบี)	4.16±0.02^{a}	23.39±0.60^{a}	462.79±14.47^{a}	1.02±0.02^{a}	1.31±0.12^{bc}	100
5 (1,000 พีพีบี)	4.14±0.05^{a}	23.05±0.57^{a}	457.20±20.11^{a}	1.02±0.02^{a}	1.38±0.05^{b}	100
6 (2,500 พีพีบี)	4.12±0.04^{a}	19.11±0.76^{b}	363.38±15.66^{b}	1.21±0.05^{b}	1.08±0.05^{c}	100

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 5 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับ ไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์

4.3 ผลของอะฟลาทอกซินบี, ต่อองค์ประกอบเลือดปลานิล

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดพบว่า ในสัปดาห์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต เม็ดเลือดแดง เม็ดเลือดขาว ปริมาณฮีโมโกลบิน และโปรตีนในพลาสมา มีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ โดยมีค่าเฉลี่ย 35.14 ± 5.17 เปอร์เซ็นต์ 2.64 ± 0.1 (x10^6 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) 1.11 ± 0.07 (x10^5 เซลล์ต่อลูกบาศก์มิลลิเมตร) 7.00 ± 0.23 กรัมต่อเดซิลิตร และ 10.04 ± 0.28 กรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ (ตารางที่ 5)

ตารางที่ 5 ค่าองค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, ระดับต่างๆ ในสัปดาห์ที่ 5[1]

AFB, (พีพีบี)	ฮีมาโตคริต %	เม็ดเลือดแดง (X10^6 cell/mm^3)	เม็ดเลือดขาว (X10^5cell/mm^3)	ฮีโมโกลบิน (g/dl)	โปรตีนในพลาสมา g%
0	36.18±4.27^a	2.66±0.16^a	1.03±0.16^a	6.95±0.81^a	10.10±0.47^a
50	35.26±6.32^a	2.51±0.25^a	1.08±0.22^a	7.16±0.52^a	10.37±0.77^a
100	36.85±5.67^a	2.65±0.17^a	1.21±0.19^a	6.97±0.78^a	9.68±0.83^a
500	36.30±5.71^a	2.82±0.24^a	1.08±0.18^a	7.06±0.38^a	9.74±1.36^a
1000	31.66±4.27^a	2.59±0.33^a	1.16±0.17^a	6.87±0.56^a	10.07±0.98^a
2500	34.61±4.75^a	2.61±0.39^a	1.08±0.15^a	6.96±0.16^a	10.29±0.43^a

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 5 ซ้ำ
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95เปอร์เซ็นต์ ($p<0.05$)

องค์ประกอบทางเคมีและเอนไซม์ในเลือด

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ได้รับอาหารอะฟลาทอกซินบี, แสดงไว้ในตารางที่ 6 พบว่าปริมาณของเอนไซม์อัลคา[1]จน์ฟอสฟาเตสในซีรัม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($P<0.05$) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 68.60 ± 7.37 ถึง 92.80 ± 8.17 ยูนิตต่อลิตร ส่วนปริมาณเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณเอนไซม์ SGOT ในซีรัมมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 55.67 ± 8.08 ถึง 168.33 ± 29.02 ยูนิตต่อลิตร ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 3 4 และ 5 (100 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณเอนไซม์สูงที่สุดและมีค่าไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) คืออยู่ในช่วง 120.67 ± 9.29 ถึง 168.33 ± 29.02 ยูนิตต่อลิตร รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 6 และ 1 (2,500 และ 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีปริมาณเอนไซม์ 104.67 ± 15.31 และ 77.00 ± 20.81 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ ปลานิลที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 2 (50 ไมโครกรัม

ต่อกิโลกรัม) มีปริมาณเอนไซม์ SGOT ในซีรัมต่ำที่สุด คือ 55.67 ± 8.08 ยูนิตต่อลิตร ส่วนปริมาณเอนไซม์ SGPT ในซีรัมมีค่าอยู่ในช่วง 22.80 ± 5.07 ถึง 42.00 ± 8.89 ยูนิตต่อลิตร ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 และ 6 (100 และ 2,500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณเอนไซม์สูงที่สุด คือ 42.00 ± 8.89 และ 40.80 ± 2.95 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ โดยมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) รองลงมาคือ ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 5, 4 และ 2 (1,000 , 500 และ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 24.00 ± 5.66 ถึง 32.60 ± 4.85 ยูนิตต่อลิตร และปลาที่ได้รับอาหารสูตร 1 มีปริมาณเอนไซม์ SGPT ต่ำที่สุดคือ 22.80 ± 5.07 ยูนิตต่อลิตร

ตารางที่ 6 ค่าองค์ประกอบเลือดปลานิลที่ได้รับอาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี$_1$ ระดับต่างๆใน สัปดาห์ที่ 5

สูตรอาหาร	องค์ประกอบเลือด				
AFB_1(µg/kg)	แคลเซียม (mg%)	ฟอสฟอรัส (mg%)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	ALP (U/L)
0	10.80±1.28^{bc}	24.60±5.95^{bc}	77.00±20.81^{bc}	22.80±5.07^{c}	81.40±16.52^{a}
50	11.58±0.72^{abc}	31.90±2.55^{a}	55.67±8.08^{c}	24.00±5.66^{bc}	92.80±8.17^{a}
100	12.74±0.68^{a}	29.50±4.06^{ab}	168.33±29.02^{a}	42.00±8.89^{a}	88.60±16.01^{a}
500	12.12±1.42^{ab}	29.75±3.99^{ab}	121.33±20.79^{a}	31.20±5.66^{bc}	85.80±10.73^{a}
1,000	12.18±0.67^{a}	20.05±2.92^{c}	120.67±9.29^{a}	32.60±4.85^{ab}	90.80±17.95^{a}
2,500	10.68±0.78^{c}	25.73±2.53^{abc}	104.67±15.31^{ab}	40.80±2.95^{a}	68.60±7.37^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 5 ซ้ำ
ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น95เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

ปริมาณไอออนคือ แคลเซียมและฟอสฟอรัสในซีรัมของปลาที่ได้รับอาหารอะฟลาทอกซินบี$_1$ มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p<0.05$) โดยปริมาณแคลเซียมมีค่าอยู่ในช่วง 10.68 ± 0.78 ถึง 12.74 ± 0.68 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 และ 5 (100 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณแคลเซียมในซีรัมสูงที่สุดคือ 12.74 ± 0.68 และ 12.18 ± 0.67 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 4, 2 และ 1 (500, 50 และ 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 10.80 ± 1.28 ถึง 12.12 ± 1.42 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และปลาในสูตรที่ 5 (1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณแคลเซียมในซีรัมต่ำที่สุดคือ 10.68 ± 0.78 มิลลิกรัม

เปอร์เซ็นต์ สำหรับปริมาณฟอสฟอรัสในซีรัมมีค่าอยู่ในช่วง 20.05 ± 2.92 ถึง 31.90 ± 2.55 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีค่าสูงที่สุดคือ 31.90 ± 2.55 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 4 3 6 และ 1 (500 100 2,500 และ 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 24.60 ± 5.95 ถึง 29.75 ± 3.99 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และปลาในสูตรที่ 5 (1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณฟอสฟอรัสในซีรัมต่ำที่สุดคือ 20.05 ± 2.92 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบเลือดของปลานิลที่ได้รับอาหารอะฟลาทอกซินบี,ในสัปดาห์ที่ 8 แสดงไว้ในตารางที่ 7 พบว่าทุกระดับปริมาณอะฟลาทอกซินบี, ปริมาณของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตส ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ (P<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 94.00 ± 9.70 ถึง 112.40 ± 18.46 ยูนิตต่อลิตร ส่วนปริมาณเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรัมมีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ SGOT ในซีรัมอยู่ในช่วง 69.20 ± 31.43 ถึง 162.60 ± 64.34 ยูนิตต่อลิตร ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 6 และ 5 (2,500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณเอนไซม์สูงที่สุดคือ 162.60 ± 64.34 และ 152.60 ± 84.39 ยูนิตต่อลิตร รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 3 และ 4 (100 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีปริมาณเอนไซม์ 120.60 ± 69.63 และ 90.40 ± 11.46 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ และปลานิลที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 2 และ 1 (50 และ 0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณเอนไซม์ SGOT ในซีรัมต่ำที่สุด คือ 70.80 ± 31.48 และ 69.20 ± 31.43 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ สำหรับปริมาณเอนไซม์ SGPT ในซีรัมมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 22.60 ± 3.97 ถึง 44.40 ± 12.26 ยูนิตต่อลิตร โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 5 และ 6 (1,000 และ 2,500 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) มีปริมาณเอนไซม์สูงที่สุดคือ 44.40 ± 12.26 และ 41.00 ± 10.42 ยูนิตต่อลิตร ตามลำดับ แตกต่างกับกลุ่มที่เหลือ (สูตร 1-4) อย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ยของเอนไซม์ SGPT อยู่ในช่วง 22.60 ± 3.97 ถึง 27.60 ± 3.36 ยูนิตต่อลิตร ซึ่งมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05)

ปริมาณไอออนคือ แคลเซียมและฟอสฟอรัสในซีรัมของปลาที่ได้รับอาหารอะฟลาทอกซินบี, มีความแตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) เช่นกัน โดยปริมาณแคลเซียมมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12.12 ± 0.66 ถึง 13.52 ± 0.53 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 2 (50 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) มีปริมาณแคลเซียมในซีรัมสูงที่สุดคือ 13.52 ± 0.53 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ รองลงมาคือปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1, 4 และ 3 (0, 500 และ 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 12.88 ± 0.61 ถึง 13.02 ± 0.95 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และปลา 2 กลุ่มสุดท้ายซึ่งมีปริมาณแคลเซียมต่ำที่สุดคือ ปลาที่ได้รับอาหารในสูตรที่ 5 และ6 (1,000 และ 2,500 ไมโครกรัม/กิโลกรัม) และมีค่าเฉลี่ยไม่แตกต่างกันทางสถิติ (p<0.05) โดยมีค่าเฉลี่ย 12.42 ± 0.29 และ 12.12 ± 0.66 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สำหรับปริมาณฟอสฟอรัสในซีรัมมีค่าอยู่ในช่วง 24.50 ± 1.00 ถึง 32.88 ± 2.38 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

โดยปลาที่ได้รับอาหารสูตรที่ 1 (0 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณฟอสฟอรัสสูงที่สุดคือ 32.88 ± 2.38 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ รองลงมาได้แก่ปลาที่ได้รับอาหารสูตร 3 5 6 และ 4 (100 1,000 2,500 และ 500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) โดยมีค่าเฉลี่ยอยู่ในช่วง 24.50 ± 1.00 ถึง 30.96 ± 2.27 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์ และปลาในสูตรที่ 2 (500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม) มีปริมาณฟอสฟอรัสในซีรัมต่ำที่สุดคือ 22.62 ± 1.83 มิลลิกรัมเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 7 ค่าองค์ประกอบเลือดปลานิลที่ได้รับอาหารปนเปื้อนอะฟลาทอกซินบี$_1$ ระดับต่างๆใน สัปดาห์ที่ 8

สูตรอาหาร	องค์ประกอบเลือด				
AFB_1(µg/kg)	แคลเซียม (mg%)	ฟอสฟอรัส (mg%)	SGOT (U/L)	SGPT (U/L)	ALP (U/L)
0	13.02±0.95^{ab}	32.88±2.38^{a}	69.20±31.43^{b}	23.80±6.22^{b}	107.60±11.2^{a}
50	13.52±0.53^{a}	22.62±1.83^{c}	70.80±31.48^{b}	22.60±3.97^{b}	107.80±11.1^{a}
100	12.88±0.61^{ab}	30.96±2.27^{ad}	120.60±69.63^{ab}	26.20±7.22^{b}	112.40±18.4^{a}
500	12.98±0.56^{ab}	24.50±1.00^{bc}	90.40±11.46^{ab}	27.60±3.36^{b}	101.80±8.64^{a}
1,000	12.42±0.29^{b}	30.54±2.52^{ad}	152.60±84.39^{a}	44.40±12.26^{a}	94.00±9.70^{a}
2,500	12.12±0.66^{b}	28.06±4.82^{bd}	162.60±64.34^{a}	41.00±10.42^{a}	95.40±7.99^{a}

[1] ตัวเลขที่นำเสนอเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากข้อมูล 5 ซ้ำ

ค่าเฉลี่ยในสดมภ์ที่มีตัวอักษรเหมือนกันกำกับไม่มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p>0.05$)

4.4 การศึกษาเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนปลานิลแดงแปลงเพศ

ผลการศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อนปลานิลแดงแปลงเพศที่ได้รับอะฟลาทอกซินระดับต่างๆ เป็นเปอร์เซ็นต์จำนวนตัวที่มีความผิดปกติ แสดงดังตารางที่ 8-9 พบว่า

ตับ

ปลานิลกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 0 50 และ 100 พีพีบี พบเซลล์ตับและนิวเคลียสมีขนาด รูปร่างและการจัดเรียงตัวปกติ โดยวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์ได้ 14.88 ไมครอน และขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางนิวเคลียส 3.72 ไมครอน (ภาพที่ 1)

พบความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับในปลานิลกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 500 1,000 และ 2,500 พีพีบี ได้แก่

เซลล์ตับมีลักษณะบวมพอง (swollen) (ภาพที่ 2) พบมากที่สุดในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 2,500 พีพีบี รองลงมาคือปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 500 และ 1,000 พีพีบี ตามลำดับ มีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเซลล์โตที่สุดถึง 37.2 ไมครอน ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 พีพีบี รวมทั้งลักษณะเซลล์บวมพองและขุ่นมัว (cloudy swelling) (ภาพที่ 4) พบนิวเคลียสขยายขนาด (hypertrophic nuclei) ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 500 พีพีบี จำนวนมาก และลดลงในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 และ 2,500 พีพีบี ตามลำดับ (ภาพที่ 3) นิวเคลียสหดตัว (pkynotic nuclei) เล็กน้อย (ภาพที่ 3) และไซโตพลาสซึมติดสีแดงของอีโอซิน (eosinophilic cell) มากผิดปกติ (ภาพที่ 4) ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 500 ถึง 2,500 พีพีบี โดยพบมากขึ้นในปลาที่ได้รับสารพิษระดับสูงขึ้น รวมทั้งพบการสะสมโปรตีนในไซโตพลาสซึม และลักษณะริ้วไมโครฟิลาเมนต์ (microfilaments) ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 500 ถึง 2,500 พีพีบี โดยพบมากที่สุดในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 พีพีบี และพบเซลล์ตาย (cell necrosis) จำนวนมากในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซิน บี, 500 ถึง 2,500 พีพีบี, เซลล์ตับติดสีย้อมสีน้ำเงินของฮีมาทอกไซลิน (basophilic cell) จากเซลล์เกิดใหม่ที่ยังไม่เจริญ (regenerative cell) (ภาพที่ 5) เซลล์ตับเกิดการอักเสบ (inflammation) เม็ดเลือดขาวแทรก และเมลาโนมาโครฟาจ (melanomacrophage) เพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าปกติเล็กน้อย ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 ถึง 2,500 พีพีบี

ความผิดปกติโดยรวมในตับปลาที่ได้รับอาหารทดลองเป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบว่า มีความรุนแรงที่สุดในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 2,500 1,000 และ 500 พีพีบี ตามลำดับ

ตับอ่อน

เซลล์ตับอ่อนและนิวเคลียสของปลานิลกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 0 50 100 และ 500 พีพีบี มีขนาดและรูปร่างปกติ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางนิวเคลียส 4.0 ไมครอน (ภาพที่ 5)

พบความผิดปกติในเซลล์ตับอ่อนของปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 ถึง 2,500 พีพีบี โดยมีเซลล์ตาย และเมลาโนมาโครฟาจเพิ่มจำนวนขึ้นกว่าปกติเล็กน้อย รวมทั้งเกิดการอักเสบ (ภาพที่ 6) นิวเคลียสบวมพองวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางนิวเคลียสได้ถึง 9.92 ไมครอน ไซโมเจนกรานูล (zymogen granule) ลดลง และ เซลล์ลีบ (atrophy) (ภาพที่ 7)

ในสัปดาห์ที่ 5 พบจำนวนตัวปลาที่มีความผิดปกติของตับอ่อนสูงที่สุดในกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 พีพีบี อย่างไรก็ตามปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 2,500 พีพีบี แม้จะมีจำนวนตัวที่ผิดปกติน้อย แต่พบความผิดปกติในแต่ละตัวค่อนข้างมากเช่นกัน

ตารางที่ 8 แสดงลักษณะความผิดปกติของตับปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,ระดับต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์[1]

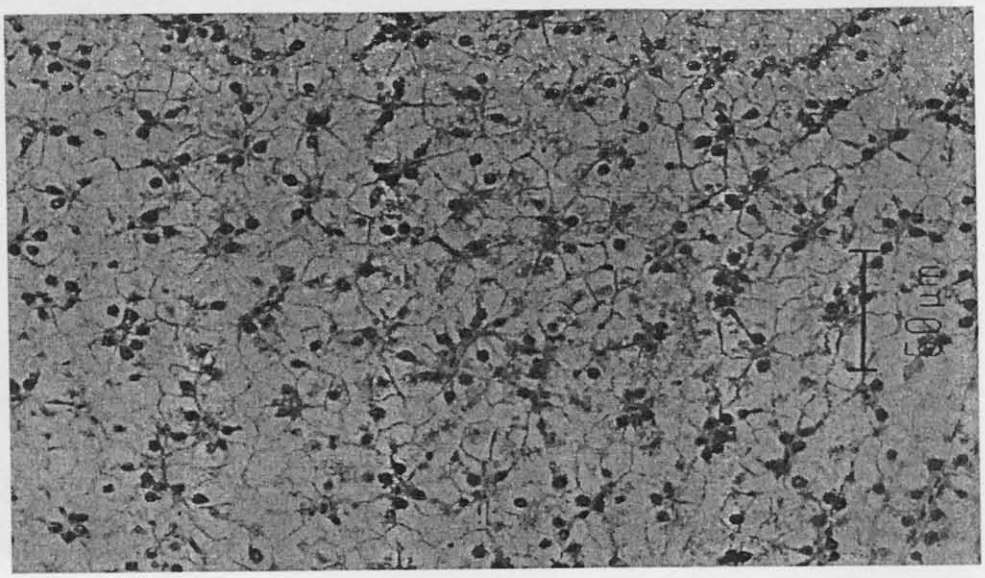
Treatment	Proliferal chromatin	Cell swollen	Eosinophilic cell	Pyknotic nuclei	Hypertrophic nuclei	Mottle liver	Cell necrosis	Regenerative cell	Inflammation	Increase of Melano macrophage
T1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
T4	-	41.67% (5/12)	16.67% (2/12)	16.67% (2/12)	33.33% (4/12)	16.67% (2/12)	66.67% (12/12)	25% (3/12)	-	-
T5	-	40% (6/15)	33.33% (5/15)	26.67% (4/15)	13.33% (2/15)	40% (6/15)	66.67% (10/15)	26.67% (4/15)	13.33% (5/15)	20% (3/15)
T6	-	58.85% (7/13)	69.23% (9/13)	16.67% (2/13)	6.67% (1/13)	23.08% (3/13)	69.23% (9/13)	46.15% (6/13)	23.08% (3/13)	23.08% (3/13)

[1]% ความผิดปกติ = (จำนวนปลาผิดปกติ/จำนวนปลาทั้งหมด) × 100

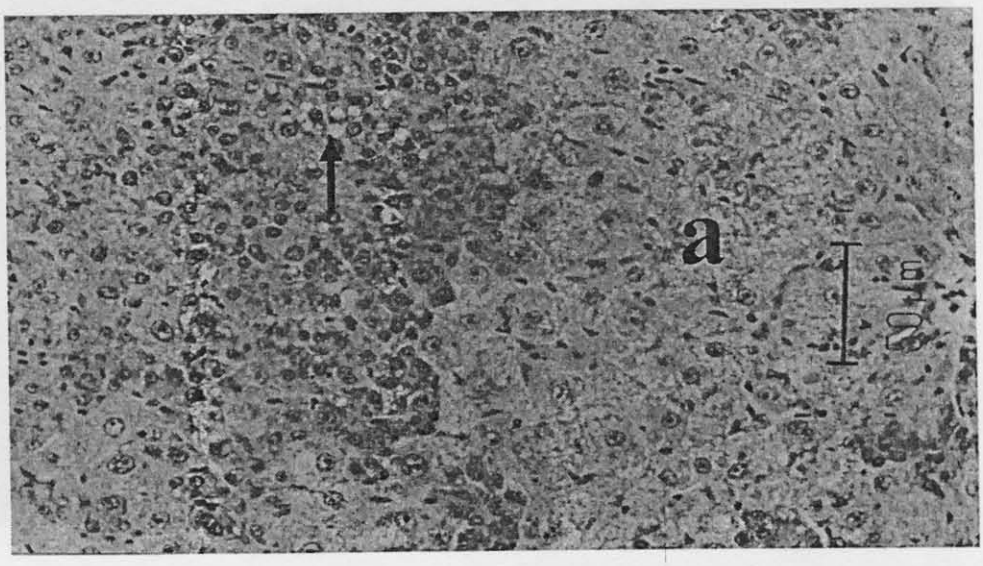
ตารางที่ 9 แสดงลักษณะความผิดปกติของตับอ่อน ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,ระดับต่างๆ เป็นเวลา 5 สัปดาห์

Treatment	Inflammation	Increase of Melanomacrophage	Hypertrophic nuclei	Decrease of Zymogen granule	Cell atrophy
T1	-	-	-	-	-
T2	-	-	-	-	-
T3	-	-	-	-	-
T4	-	-	-	-	-
T5	40% (6/15)	26.67% (4/15)	73.33% (11/15)	46.67% (7/15)	53.33% (8/15)
T6	15.38% (2/13)	38.46% (3/13)	23.03% (3/13)	23.03% (3/13)	30.77% (4/13)

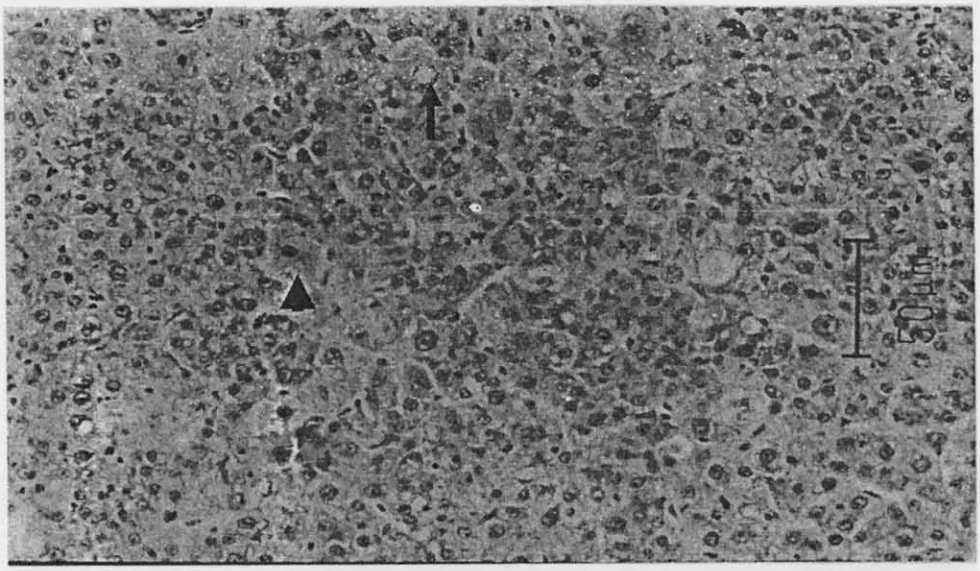
[1]% ความผิดปกติ = (จำนวนปลาผิดปกติ/จำนวนปลาทั้งหมด) × 100



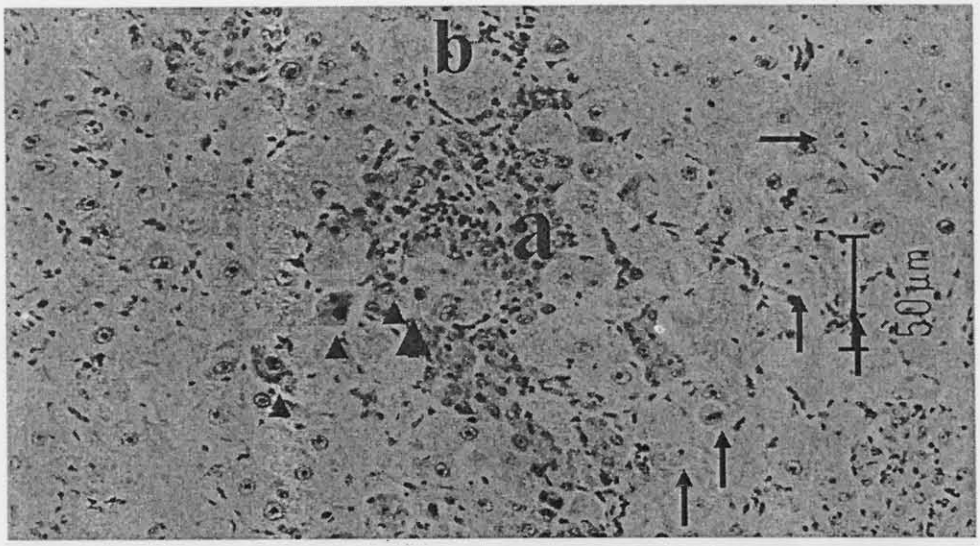
ภาพที่ 1 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB_1 0 พีพีบี (กลุ่มควบคุม) เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เซลล์ตับปกติ การจัดเรียงเซลล์ ขนาดเซลล์ และนิวเคลียสปกติ (H&E, Bar = 50 µm)



ภาพที่ 2 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB_1 500 พีพีบี เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เกิดช่องว่างในเซลล์ (vacuolation) (ศรชี้) เซลล์บวมพอง ขยายขนาด (a) (H&E, Bar = 50 µm)

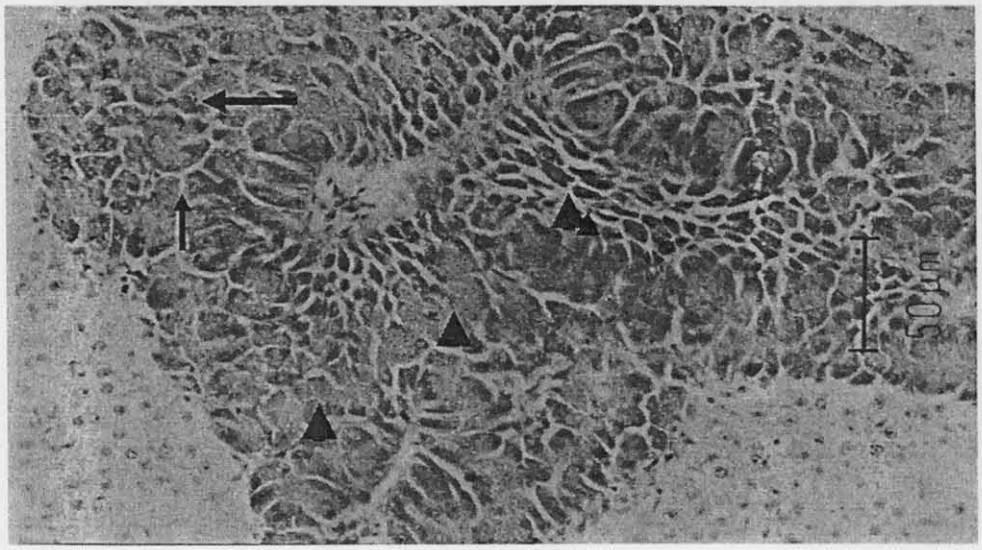


ภาพที่ 3 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB_1 2,500 พีพีบี เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบนิวเคลียสขยายขนาด (hypertrophic nuclei) (ศรชี้) นิวเคลียสหด (pyknotic nuclei) (หัวลูกศร) (H&E, Bar = 50 µm)

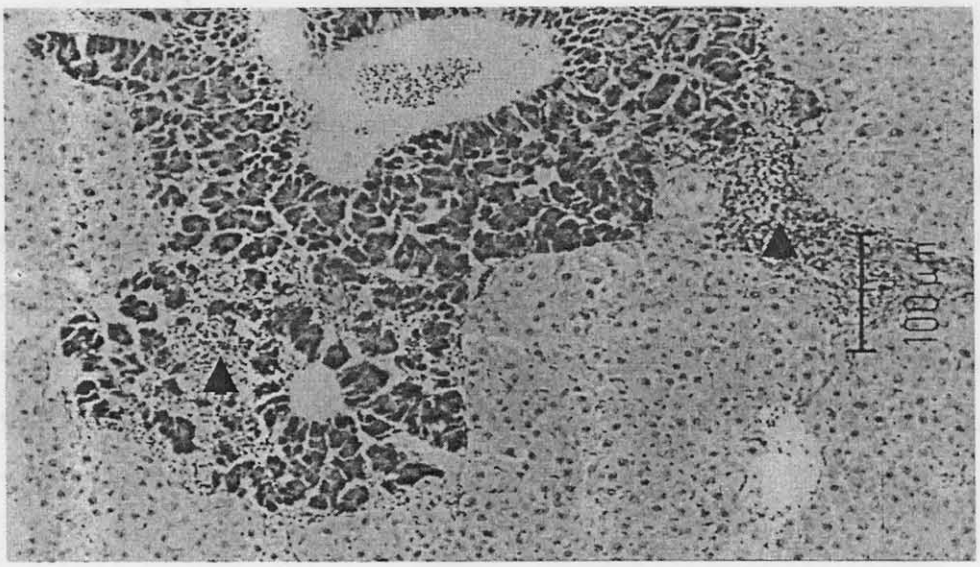


ภาพที่ 4 แสดงเนื้อเยื่อตับของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB_1 1,000 พีพีบี เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบเซลล์เกิดใหม่ที่ยังไม่เจริญ (regenerative cell) (a) เซลล์บวมพองและขุ่นมัว (b) ไซโตพลาสซึมติดสีย้อมของอีโอซินชัดเจน (หัวลูกศร) เซลล์ตาย (ศรชี้) (H&E, Bar = 50 µm)

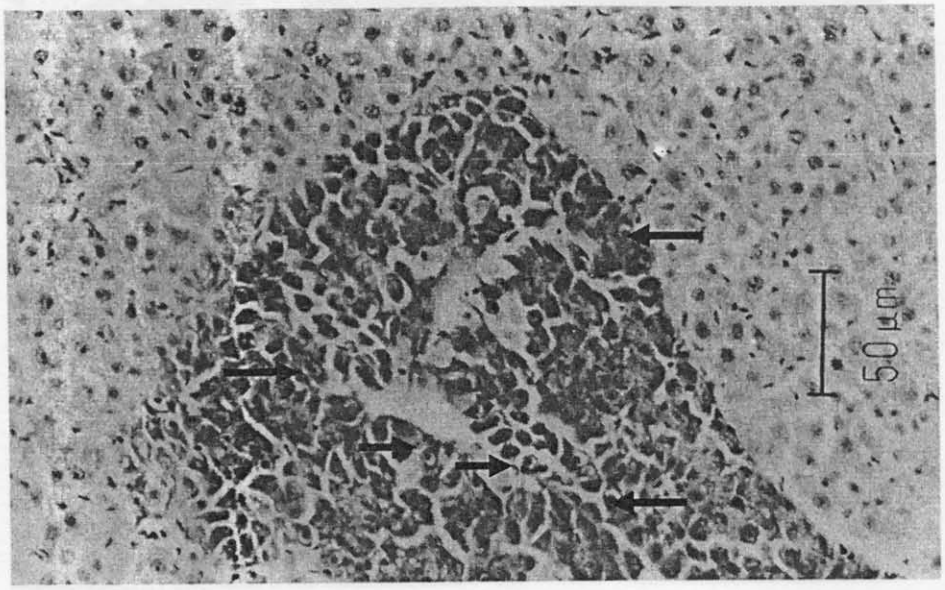
ฝ่ายหอสมุด
คุณหญิงหลง อรรถกระวีสุนทร



ภาพที่ 5 แสดงเนื้อเยื่อตับอ่อนของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB$_1$ 0 พีพีบี เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เซลล์ตับอ่อนปกติ นิวเคลียส (ศรชี้) และไซโมเจนกรานูล (หัวลูกศร) มีขนาดและจำนวนปกติ (H&E, Bar = 50 µm)



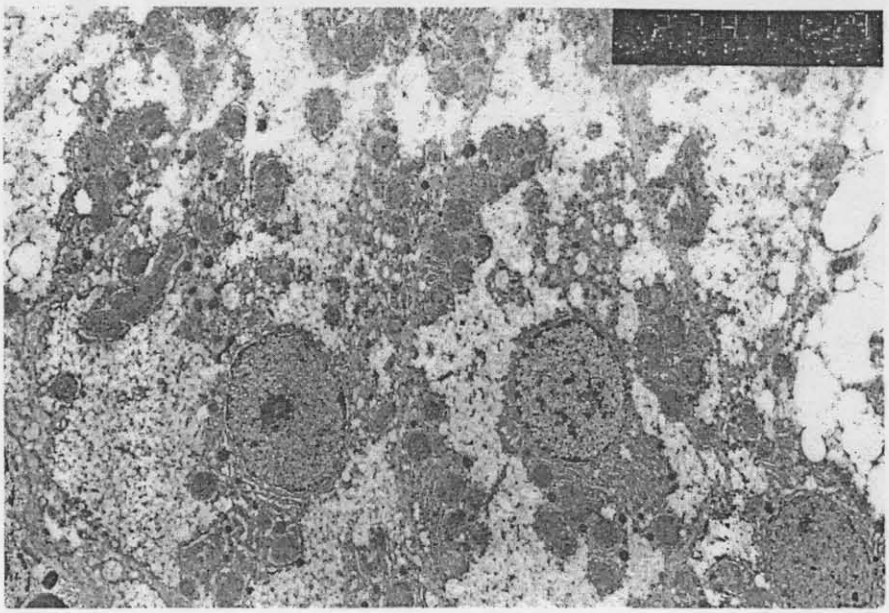
ภาพที่ 6 แสดงเนื้อเยื่อตับอ่อนของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB$_1$ 1,000 พีพีบี เป็นเวลา 5 สัปดาห์ พบการอักเสบของตับอ่อนโดยมีเซลล์เม็ดเลือดขาวแทรกซึม (หัวลูกศร) (H&E, Bar = 100 µm)



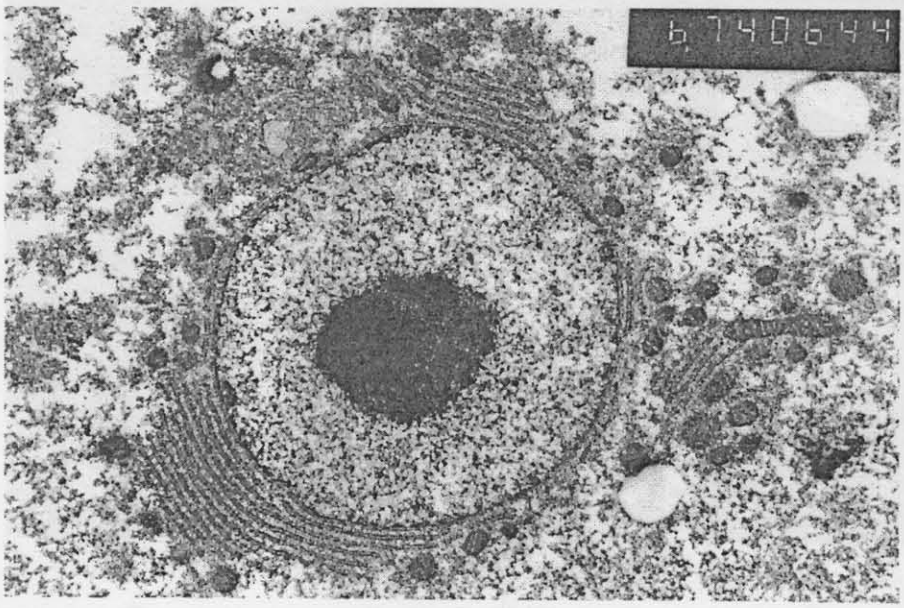
ภาพที่ 7 แสดงเนื้อเยื่อตับอ่อนของปลานิลที่ได้รับอาหารที่มี AFB_1 2,500 พีพีบี เป็นเวลา 5 สัปดาห์ เซลล์ตับอ่อนลีบ ไซโมเจนกรานูลลดลง และนิวเคลียสบวมพอง (hypertrophic nuclei) (ศรชี้) อย่างรุนแรง (H&E, Bar = 50 µm)

4.5 การเปลี่ยนแปลงทางจุลทรรศน์อิเลคตรอน

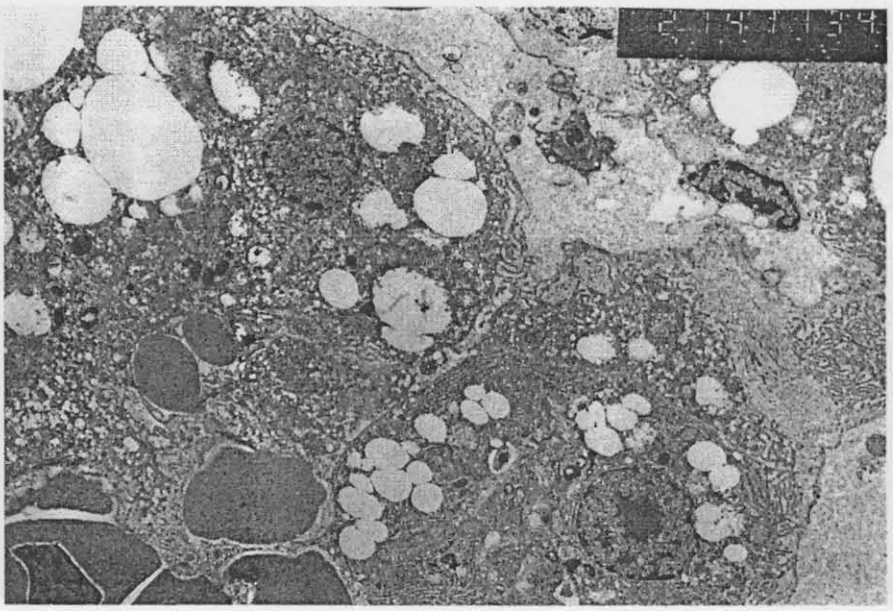
ลักษณะทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลปกติพบว่าเซลมีการสะสมไกลโคเจนมาก นิวเคลียสปกติและมีออร์กาเนลต่างๆ อยู่ในสภาพปกติ (ภาพที่ 8-9) ในขณะที่ปลานิลที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินที่ระดับ 100 ppb ที่ 8 สัปดาห์จะพบการเปลี่ยนแปลงทางจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับคือมีการบวมพองของ rough endoplasmic reticulum ลดปริมาณการสะสมไกลโคเจนในตับ, ไมโตคอนเดรียมีการขยายและพองตัว บางครั้งอาจพบมีการสะสมไขมันในส่วนของนิวเคลียส (ภาพที่ 10-13) ไม่พบความผิดปกติของเซลและออร์กาเนลในปลานิลที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซินที่ระดับ 50 ppb



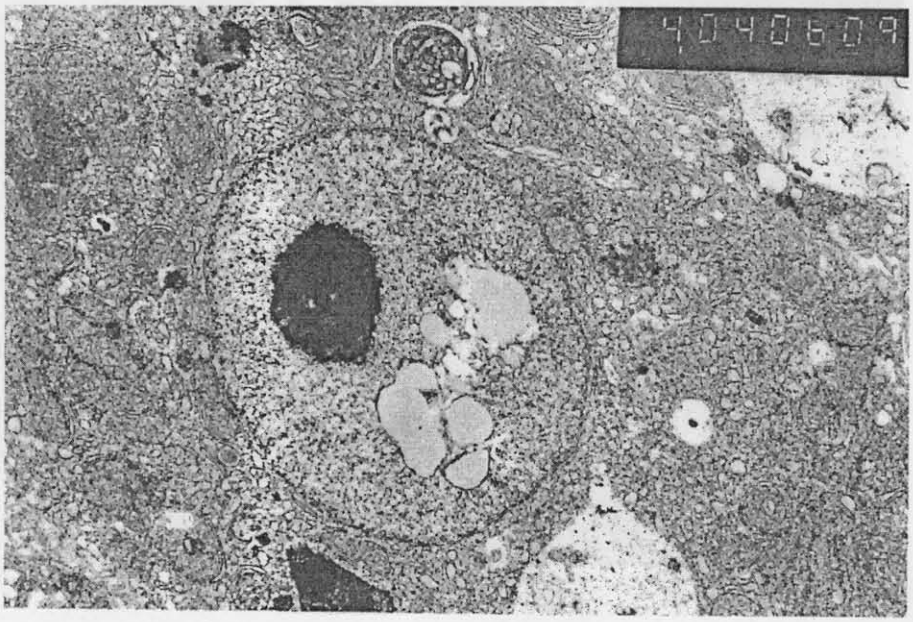
ภาพที่ 8 จุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลปกติ เซลและออร์กาเนลปกติ มีการสะสมไกลโคเจนบริเวณไซโตพลาสซึมม uranyl acetate and lead citrate (2,600 X)



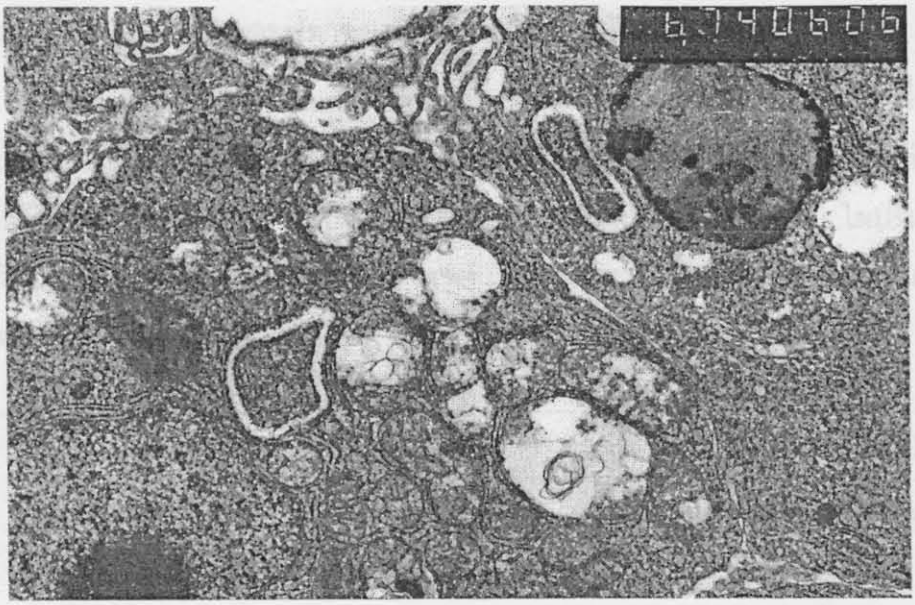
ภาพที่ 9 จุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลปกติ นิวเคลียสปกติ ไมโตคอนเดรีย และ rough endoplasmic reticulum อยู่ในสภาพปกติ uranyl acetate and lead citrate (7,800X)



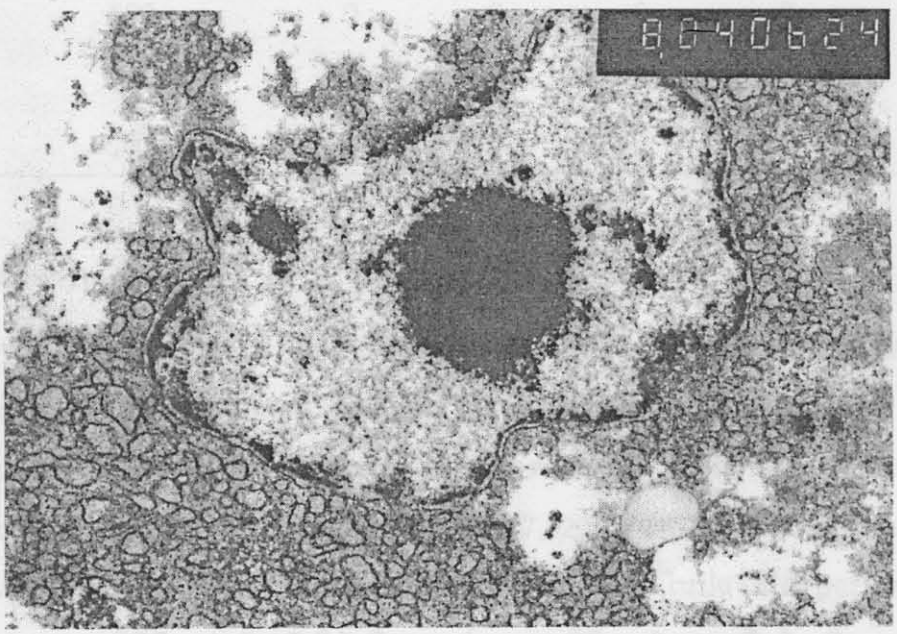
ภาพที่ 10 จุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน 100 ppb นาน 8 สัปดาห์ พบช่องว่างในไซโตพลาสซึมจำนวนมาก uranyl acetate and lead citrate (2,600X)



ภาพที่ 11 จุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน 100 ppb นาน 8 สัปดาห์ พบการสะสมไขมันในนิวเคลียส (steatosis) uranyl acetate and lead citrate (5,200X)



ภาพที่ 12 จุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน 100 ppb นาน 8 สัปดาห์ พบการบวมพองของไมโตคอนเดรีย uranyl acetate and lead citrate (7,800X)



ภาพที่ 13 จุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลตับปลานิลที่ได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน 100 ppb นาน 8 สัปดาห์ พบการขยายตัวของ rough endoplasmic reticulum จำนวนมาก uranyl acetate and lead citrate (10,400X)

4.6 การศึกษาปริมาณอะฟลาทอกซินบี, ตกค้างในตับปลา

ผลการศึกษาปริมาณอะฟลาทอกซินบี, ตกค้างในเนื้อเยื่อตับปลานิล เมื่อให้อาหารทดลองเป็นเวลา 5 และ 8 สัปดาห์ พบว่าตรวจไม่พบการตกค้างของอะฟลาทอกซินบี, ในเนื้อปลาและในตับปลาที่ได้รับอาหารทุกสูตร สำหรับในมูลปลาพบการตกค้างอะฟลาทอกซินบี, ในปริมาณ 15.13 ถึง 27.53 ไมโครกรัม/กิโลกรัม ในปลาที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี, 500 ถึง 2,500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม (ตารางที่ 7)

สูตรอาหาร	ความเข้มข้น AFB_1 ในอาหาร (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)	ปริมาณ AFB_1ตกค้าง (ไมโครกรัมต่อกิโลกรัม)				
		เนื้อปลา		ตับปลา		มูลปลา
		สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 8	สัปดาห์ที่ 8
1	0	0	0	0	0	0
2	50	0	0	0	0	0
3	100	0	0	0	0	0
4	500	0	0	0	0	15.13
5	1,000	0	0	0	0	15.95
6	2,500	0	0	0	0	27.53

5) สรุปและวิจารณ์

ความผิดปกติด้านพฤติกรรมที่ตรวจพบในปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินสอดคล้องกับ Chavez-Sanchez และคณะ (1994) คือปลานิลในกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 940 ถึง 30,000 พีพีบี นาน 25 วัน จะแสดงความอยากกินอาหารลดลงและปฏิเสธอาหาร พฤติกรรมเชื่องซึมเช่นเดียวกับในปลากดอเมริกันที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 7,520 ถึง 30,000 พีพีบี (Jantrarotai *et al.*, 1990) สำหรับในผลการทดลองครั้งนี้ ตรวจพบความผิดปกติเหล่านี้ในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, ระดับสูงสุด (2,500 พีพีบี) เท่านั้น ทั้งนี้สันนิษฐานว่าอาหารที่มีอะฟลาทอกซินในปริมาณมาก อาจมีกลิ่นที่ปลาไม่ยอมรับ ไม่พบความผิดปกติใดๆ ภายนอกตัวปลา สอดคล้องกับ Jantrarotai และคณะ (1990; Chavez-Sanchez *et al.*, 1994) การปิดเปิดของแผ่นปิดเหงือกจะเร็วขึ้นในปลาที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี,ระดับสูงขึ้น เนื่องจากปลามีขนาดเล็กกว่า และมีอัตราเมทาโบลิซึมสูง ซึ่ง Gallagher และคณะ (1984) พบว่า ปลาไหลอเมริกัน (American elver, *Anguilla rostrata*) ที่โตช้าจะมีอัตราการหายใจสูงกว่าพวกที่โตเร็วกว่า และมีความสัมพันธ์กับอัตราเมทาบอลิซึมที่สูง ชี้ให้เห็นถึงความไม่มีประสิทธิภาพในการใช้สารอาหาร และการเพิ่มความต้องการ

การเจริญเติบโตของปลาตลอดระยะเวลา 5 สัปดาห์ พบว่าปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, ระดับสูงสุด (2,500 พีพีบี) มีค่าการเจริญเติบโต และเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 0 ถึง1,000 พีพีบี อย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ในขณะที่อัตราการแลกเนื้อสูงกว่ากลุ่มอื่นๆ สอดคล้องกับ Chavez-Sanchez และคณะ (1994) ซึ่งพบว่าอะฟลาทอกซินบี, มากกว่า 1,880 พีพีบี มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิล โดยมีน้ำหนักสุดท้าย เปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้น อัตราการเจริญเติบโตจำเพาะ (เปอร์เซ็นต์) น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่อตัว และอัตราการกินอาหารต่ำกว่าปลาที่ได้รับ 0 ถึง 940 พีพีบี เช่นเดียวกับ Tuan และคณะ (2002) พบว่าปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 2,500 พีพีบี มีค่าเปอร์เซ็นต์น้ำหนักที่เพิ่มขึ้นต่ำกว่าและอัตราการแลกเนื้อสูงกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตาม ในการทดลองครั้งนี้ ได้ให้อาหารเป็นเปอร์เซ็นต์น้ำหนักตัว หากให้ปลากินจนอิ่มอาจเห็นผลการเจริญเติบโตได้ชัดเจนยิ่งขึ้น เนื่องจากปลาทุกชุดการทดลอง ยกเว้นกลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,สูงสุด สามารถกินอาหารได้อีก โดยปลายังแสดงอาการกระตือรือร้นที่จะกินอาหารอีกเมื่อให้อาหารหมดแล้ว ในขณะที่ปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, สูงสุด ใช้เวลากินนานกว่าครึ่งชั่วโมง ซึ่งคุณค่าทางโภชนาการอาหาร และอะฟลาทอกซินบี, อาจลดลง เนื่องจากเม็ดอาหารเปื่อยยุ่ย

สำหรับผลของอะฟลาทอกซินบี, ที่มีต่อดัชนีตับต่อตัว พบว่าปลากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,ระดับสูงสุด มีค่าดัชนีตับต่อตัวต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงว่าอะฟลาทอกซินบี,ระดับสูงมีผลต่อค่าดัชนีตับต่อตัวของปลานิล สอดคล้องกับ Lee และคณะ (1978) ซึ่งรายงานว่า ปลาเรนโบว์เทร้าท์ที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,ความเข้มข้นสูงกว่าจะมีตับขนาดเล็กกว่ากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี,ความเข้มข้นต่ำกว่า นอกจากนั้น Hung และคณะ (1997) พบว่าปลาสเตอร์เกียน (sturgeon, *Acipenser transmontanus*) ที่อดอาหาร 2-10 สัปดาห์ มีค่าดัชนีตับต่อตัว 0.90-0.60 เปอร์เซ็นต์ ในขณะที่ปลาปกติมีค่าดัชนีตับต่อตัว 1.46 เปอร์เซ็นต์ ในการทดลองครั้งนี้ การที่ปลากลุ่มที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินระดับสูงกินอาหารได้น้อย และการนำสารอาหารไปใช้อย่างไม่มีประสิทธิภาพเนื่องจากมีเซลล์ตับเสื่อมมาก น่าจะเป็นเหตุผลที่ทำให้ค่าดัชนีตับต่อตัวรวมทั้งการเจริญเติบโตต่ำ

จากการศึกษาองค์ประกอบเลือด พบว่าเมื่อปลาได้รับอะฟลาทอกซินบี, ทุกระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 5 สัปดาห์ ไม่มีผลต่อองค์ประกอบเลือดปลานิล แม้ว่าจะมีผลต่อการเจริญเติบโตและสภาพทางเนื้อเยื่อวิทยาตับก็ตาม สอดคล้องกับ Jantrarotai และ Lovell (1990) ซึ่งรายงานว่าอะฟลาทอกซินบี, 0 ถึง 2,154 พีพีบี ไม่มีผลต่อต่อเปอร์เซ็นต์ฮีมาโตคริต เม็ดเลือดแดง และเม็ดเลือดขาวของปลากดอเมริกันที่ได้รับอะฟลาทอกซินนาน 10 สัปดาห์ สำหรับการศึกษาครั้งนี้ พบความผิดปกติในเซลล์ตับปลาที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินระดับสูง แสดงให้เห็นว่าอะฟลาทอกซินทำให้การทำงานของตับผิดปกติ ส่งผลให้โปรตีนในพลาสมาลดลง เนื่องจากตับเป็นแหล่งสำคัญของการสังเคราะห์โปรตีนในพลาสมาเกือบทุกชนิด ยกเว้นแกมมาโกลบูลิน (วิจิตรา, 2528) จากการทดลอง

ครั้งนี้ พบว่าค่าองค์ประกอบเลือดปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, ในอาหาร ได้แก่ ค่าแคลเซียมและฟอสฟอรัสในซีรัม รวมทั้งเอนไซม์ SGOT SGPT และ ALK มีค่าอยู่ในเกณฑ์มาตรฐานของปลาปกติ และมีค่าใกล้เคียงกับการทดลองของ อัจฉริยา (2547) โดยผลจากการศึกษาครั้งนี้ พบว่าอะฟลาทอกซินบี, ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์อัลคาไลน์ฟอสฟาเตสในซีรัมของปลาตลอดระยะเวลา แต่พบว่ามีผลทำให้เอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรัมเพิ่มปริมาณสูงขึ้น เอนไซม์ในพลาสมาแยกได้เป็น 2 ชนิด คือ plasma specific enzymes และ plasma non specific enzymes มักจะถูกหลั่งมาจากเซลล์ที่ใกล้ตาย การวัดค่าการทำงานของ plasma non specific enzymes ช่วยในการวินิจฉัยว่าปลาอาจได้รับสารพิษหรืออาจเกิดโรคขึ้นเนื่องจากการทำงานของเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงไปสามารถบอกได้ว่าสัมพันธ์กับความผิดปกติของเซลล์ในอวัยวะนั้น เช่น เซลล์ตับมักจะมีเอนไซม์ SGOT และ SGPT การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวจึงแสดงถึงความผิดปกติในการทำงานของตับ เช่น ในปลาเรนโบว์เทร้าที่ได้รับ carbon tetrachoride (CCL_4) ซึ่งจัดเป็นสารที่เป็นพิษต่อตับ (hepatotoxin) พบว่าค่าเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในพลาสมา มีปริมาณเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน ปริมาณเอนไซม์ SGOT และ SGPT ในซีรัมของตัวปลาสามารถใช้เป็นค่าดัชนีในการวัดความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับตับได้เช่นเดียวกับที่ใช้ในมนุษย์ เอนไซม์ SGOT และ SGPT เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสลายกรดอะมิโนเพื่อสร้างพลังงานในตับ จากการทดลองในครั้งนี้มีการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ SGOT และ SGPT เพิ่มมากขึ้นจากการได้รับสารพิษอะฟลาทอกซิน แสดงให้เห็นว่าตัวปลามีการปรับตัวตอบสนองต่อสารพิษดังกล่าวนี้มากขึ้น

เอนไซม์ในซีรัมที่ช่วยในการวินิจฉัยโรคที่มีการทำลายเซลล์ (hepatocellular injury) ตับในรูปแบบต่างๆ และส่วนใหญ่จะตรวจความผิดปกติของตับจากระดับความว่องไวของเอนไซม์ SGOT ควบคู่กับ ALP และอาจตรวจความว่องไวของเอนไซม์ SGPT ร่วมด้วย ไมโตคอนเดรียเป็นแหล่งของเอนไซม์ชนิดนี้ ซึ่งพบมากในหัวใจ ตับ กล้ามเนื้อและไต เอนไซม์ SGOT จะมีปริมาณสูงขึ้นเมื่อเกิดการทำลายของเนื้อเยื่อดังกล่าว พบว่าปริมาณเอนไซม์จะสูงขึ้นมากในกรณีที่มีการตายของเซลล์ตับ แหล่งของเอนไซม์ SGPT พบในไซโตซอลของเนื้อเยื่อหลายชนิดโดยเฉพาะที่ตับ ค่าปกติของเอนไซม์ SGPT จะต่ำกว่า SGOT (วิจิตรา, 2528) เช่นเดียวกับการทดลองนี้ โดยมีปริมาณเอนไซม์ SGPT ในซีรัมอยู่ในช่วง 22.60±3.97 ถึง 44.40±12.26 ยูนิตต่อลิตร และเอนไซม์ SGOT มีค่าสูงกว่าคือ อยู่ในช่วง 55.67±8.08 ถึง 168.33±29.02 ยูนิตต่อลิตร

พบเอนไซม์ ALP ได้ตาม brush border ของท่อไตส่วนต้น และลำไส้เล็ก ALP ในซีรัมเป็นเอนไซม์ที่ได้มาจากตับ การเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ดังกล่าวเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของตับโดยเฉพาะท่อน้ำดี เอนไซม์จะเกาะกับไขมันในเยื่อเซลล์โดยเฉพาะบริเวณที่เป็นทางเดินท่อน้ำดี เมื่อเกิดความผิดปกติที่เกี่ยวข้องกับการไหลของน้ำดีทั้งภายในและภายนอกตับ จะช่วยเร่งการ

สังเคราะห์เอนไซม์ให้สูงขึ้น ซึ่งคาดว่าโดยปกติการทำลายเอนไซม์เกิดขึ้นในตับ และการทำลายจะเกิดขึ้นน้อยในกรณีที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับตับ จึงทำให้ปริมาณเอนไซม์สูงขึ้น

การศึกษาของ Miller และคณะ (1982) ศึกษาในหมูโดยให้อะฟลาทอกซินบี, โดยการกิน 1.2 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัว พบว่าการทำงานเอนไซม์ในตับ SGOT และ ALP มีค่าเพิ่มมากขึ้น การเปลี่ยนแปลงทางกล้องจุลทรรศน์และกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอน พบว่าไกลโคเจนลดลง mitochondria และ ER บวม

การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของซีรัมมีความสัมพันธ์กับอะฟลาทอกซินที่ปลาได้รับเนื่องจากอะฟลาทอกซินและเมตาบอไลท์มีผลโดยตรงต่อตับ อย่างไรก็ตามปัจจัยเกี่ยวกับอุณหภูมิ ความเค็ม ฤดูวางไข่หรือการได้รับสารพิษ มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณเอนไซม์ในซีรัมในตัวปลา จากการศึกษาของ Michael และคณะ (1987) ในปลาดุก (*Clarias lazera*) พบว่าปริมาณเอนไซม์ SGOT และ SGPT สูงขึ้นหลังจากได้รับไนไตรท์ เป็นเวลา 6 เดือน นอกจากนี้สารเคมีอื่นๆ เช่น แคดเมียม ทองแดง (Sastry *et. al.*, 1997) มาลาไคท์กรีน (Lanari *et.al.*, 1996) ยาฆ่าแมลง เช่น thiotox, dichlorvos, carbofuran (Verma *et. al.*, 1981) ยาปราบศัตรูพืช เช่น phosphamidon (Ganguly *et. al.*, 1997) trifuralin (Poleksicacute and Karen, 1999) ต่างมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของปริมาณเอนไซม์ในซีรัม เอนไซม์ คือ โปรตีนที่มีในเนื้อเยื่อของร่างกาย ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาเฉพาะเจาะจง ให้การเปลี่ยนแปลงทาง metabolic ภายในร่างกายเกิดขึ้นเร็วกว่าปกติ อวัยวะแต่ละชนิดอาจมีเอนไซม์ชนิดเดียวหรือหลายชนิด เมื่อเซลล์ของเนื้อเยื่อถูกทำลายจากสาเหตุการติดเชื้อหรือการบาดเจ็บ (trauma) เอนไซม์จากเซลล์จะหลั่งเข้าไปในเลือดทำให้เอนไซม์ในเลือดสูงผิดปกติ

อะฟลาทอกซินบี, มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณแคลเซียม และฟอสฟอรัสในซีรัม ซึ่งจัดเป็นสารอิเลคโทรไลท์ที่มาจากการแตกตัวเป็นไอออน มีหน้าที่ในการปรับความดันออสโมติกให้น้ำกระจายไปสู่ส่วนต่างๆ ของร่างกาย ปรับความเป็นกรดเป็นด่างภายในร่างกาย ช่วยในการทำงานของหัวใจและกล้ามเนื้อต่างๆ ร่วมในปฏิกิริยา ออกซิเดชั่น-รีดักชั่น และเป็นโคแฟคเตอร์ในปฏิกิริยาการออกฤทธิ์ของเอนไซม์ ซึ่งระดับของอิเลคโทรไลท์ที่ผิดปกติชี้บ่งถึงความผิดปกติในร่างกาย

อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงระดับของแคลเซียมและฟอสฟอรัสในร่างกาย ยังขึ้นกับหลายปัจจัย เช่น ชนิดปลา ระดับเมทาบอลิซึมของปลา อุณหภูมิน้ำ ปริมาณแคลเซียมและฟอสฟอรัสในอาหารและในน้ำ ฟอสฟอรัสในเลือดจะเกี่ยวพันกับพลาสมาแคลเซียมในอัตราส่วน 1:1 ถ้าร่างกายได้รับวิตามินดีเพียงพอ ดังนั้นการตรวจจึงตรวจแคลเซียมควบคู่ไปกับฟอสฟอรัสเนื่องจาก parathyroid hormone ทำหน้าที่ควบคุมระดับของแคลเซียมและฟอสฟอรัส โดยการเพิ่มอัตราการดูดกลับของไตซึ่งจะมีระดับกั้น (threshold) เพื่อเก็บกักแคลเซียมหรือขับฟอสฟอรัสออกทางไต การขับสารดังกล่าวทางปัสสาวะจึงขึ้นอยู่กับระดับของฟอสเฟตและแคลเซียม

การศึกษาทางเนื้อเยื่อวิทยา พบว่าปลาที่ได้รับอาหารที่มีอะฟลาทอกซินบี, 500 ถึง 2,500 เป็นเวลา 5 สัปดาห์ มีความผิดปกติทางเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับ Chavez-Sanchez และคณะ (1994) ซึ่งพบความผิดปกติของเนื้อเยื่อปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซิน 940 ถึง 30,000 พีพีบี ในขณะที่ Tuan และคณะ (2002) ไม่พบการเปลี่ยนแปลงทางเนื้อเยื่อวิทยาใดๆ ของปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 250-2,500 พีพีบี แต่พบการเปลี่ยนแปลงที่ระดับ 10,000 พีพีบี ต่างจาก El-Banna และคณะ (1992 อ้างโดย Tuan *et al.*, 2002) ซึ่งพบการเกิดช่องว่างและเซลล์ตับตายในปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, เพียง 50-200 พีพีบี ทั้งนี้ความแตกต่างของระดับอะฟลาทอกซินบี,ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อวิทยา อาจเนื่องจากหลายปัจจัย ได้แก่ ชนิดปลาที่ใช้ ทดลอง อาหารทดลอง และปัจจัยแวดล้อมอื่นๆ เช่น คุณภาพน้ำของการเลี้ยงที่แตกต่างกัน เป็นต้น

ลักษณะความผิดปกติของเนื้อเยื่อตับที่พบในการศึกษาครั้งนี้ได้แก่ เซลล์บวมพอง ซึ่ง Ashley and Halver (1968) รายงานว่า อะฟลาทอกซินทำให้โครงสร้างตับผิดปกติไป โดยมีขนาดเซลล์โตขึ้นและติดสีย้อมไม่ดี วัดขนาดนิวคลีโอลัสได้ 8 ไมครอน หรือมากกว่า สอดคล้องกับในการทดลองครั้งนี้ ซึ่งพบเซลล์บวมพองวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางได้ถึง 37.2 ไมครอน และวัดขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางนิวเคลียสได้ถึง 14.88 ไมครอน เช่นเดียวกับ Tuan และคณะ (2002) ซึ่งพบเซลล์บวมพอง และติดสีจางในปลาที่ได้รับอะฟลาทอกซิน 10,000 ถึง 100,000 พีพีบี นอกจากนั้นในการศึกษาครั้งนี้ ยังพบลักษณะเซลล์บวมพองและขุ่นมัว (cloudy swelling) ในปลากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินปริมาณสูง ซึ่ง Hibiya (1982) อธิบายว่า ลักษณะ cloudy swelling นั้น เซลล์จะบวมพองและขุ่นมัว โดยมีหยดของเหลวติดสีชมพูของอีโอซิน (eosinophilic hyaline droplets) ในไซโตพลาสซึม เนื่องจากเอนโดพลาสมิกเรกติคูลัม (ER) และไมโตคอนเดรีย (mitochondria) บวมพอง

นอกจากนั้น ยังพบลักษณะไมโครฟิลาเมนต์ และพบก้อนโปรตีนในไซโตพลาสซึมของเซลล์ตับปลากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินระดับสูง ซึ่ง Shehr และคณะ (1988 อ้างโดย Nunez *et al.*, 1991) อธิบายว่า ลักษณะไมโครฟิลาเมนต์ภายในไซโตพลาสซึม และก้อนโปรตีนในไซโตพลาสซึมซึ่งติดสีย้อมอีโอซินชัดเจนเป็นจำนวนมากผิดปกติ มักเกิดในปลาซีกเดียว (English sole, *Parophys vetulus*) ที่มีเนื้องอกตับ มี RER cisternae ขยายกว้างเต็มไปด้วยรงควัตถุคล้ายไมโครฟิลาเมนต์ ซึ่งในกล้องจุลทรรศน์ธรรมดาจะเห็นเป็นริ้วฟิลาเมนต์ในไซโตพลาสซึม การที่ RER มีจำนวนเพิ่มขึ้นและขยายตัวกว้าง เป็นลักษณะเด่นชัดที่จะอธิบายถึงการเกิดเนื้องอก แสดงให้เห็นว่าปลานิลที่ได้รับอะฟลาทอกซินระดับสูงในการศึกษาครั้งนี้ อาจมีแนวโน้มที่จะเกิดเนื้องอกในตับได้หากได้รับเป็นเวลานานขึ้น จนทำให้การทำงานของดีเอ็นเอและอาร์เอ็นเอผิดปกติไป เช่นเดียวกับ Scarpelli และคณะ (1963 อ้างโดย Nunez *et al.*, 1991) รายงานว่า ก้อนโปรตีนในไซโตพลาสซึมเป็นจำนวนมาก ชี้ให้เห็นว่า RER มีไรโบโซมอยู่ภายในเป็นจำนวนมาก ทำให้โครงสร้างขยายกว้างออก ทั้งนี้เนื่องจากมีการสังเคราะห์โปรตีนเพิ่มมากขึ้น

สำหรับตับอ่อนพบความผิดปกติในปลากลุ่มที่ได้รับอะฟลาทอกซินบี, 1,000 และ 2,500 พีพีบี ความผิดปกติที่พบได้แก่ เซลล์หดลีบ นิวเคลียสบวมโต มีการอักเสบของตับอ่อน และพบเมลาโนมาโครฟาจจำนวนมากผิดปกติ นอกจากนั้นยังพบไซโมเจนกรานูลลดลง ซึ่งอาจเกิดจากพิษของอะฟลาทอกซินทำให้ปลาเบื่ออาหาร รวมทั้งเซลล์ตับและตับอ่อนผิดปกติ ประสิทธิภาพการทำงานของตับและตับอ่อนน้อยลง ส่งผลให้ปลานำประโยชน์จากอาหารไปใช้อย่างไม่มีประสิทธิภาพ ซึ่ง Hibiya (1982) รายงานว่า ความผิดปกติในตับอ่อน มักพบ เซลล์หดลีบ เซลล์ตาย ไซโมเจน กรานูลลดลง เนื่องจากการอดอาหารเป็นเวลานาน สอดคล้องกับการศึกษาใน *Silurus meridionalis* Chen. (Zhaobin and Xuefu, 2000) ปลากะพง (sea bass, *Dicentrarchus labrax* L.) (Beccaria *et al.*, 1992) และ งูน้ำ (water snake, *Natrix tessellata*) (Zhalka and Bdolah, 1987)

การศึกษาครั้งนี้ไม่พบความผิดปกติในกระเพาะอาหาร ลำไส้ และหัวใจ ของปลาทุกกลุ่มการทดลองที่ได้รับอะฟลาทอกซินตลอดระยะเวลา 5 สัปดาห์ สอดคล้องกับ Tuan และคณะ (2002)

สรุป

1. อะฟลาทอกซินที่ระดับ 1,000 พีพีบี ไม่มีผลต่อการเจริญเติบโตของปลานิลที่ระยะเวลา 5 สัปดาห์
2. อะฟลาทอกซินที่ระดับ 500 – 2,500 พีพีบี จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับและตับอ่อน
3. อะฟลาทอกซินที่ระดับ 100 ppb จะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงในระดับเซลล์
4. ไม่พบการตกค้างของอะฟลาทอกซินในเนื้อและตับ จากที่ปลาได้รับสูงสุด 2,500 พีพีบี นาน 8 สัปดาห์ แต่จะพบมีการตกค้างในมูลปลา