จุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับของปลานิล *Oreochromis niloticus* ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดา *Azadirachta indica* เป็นระยะเวลานาน

นางสาวกัลยา จั่นอาจ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาสัตววิทยา ภาควิชาชีววิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2540

ISBN 974-638-875-4

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17850010

HISTOPATHOLOGY OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* LIVER AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO NEEM *Azadirachta indica* SEED EXTRACT

Miss Kanlaya Janart

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Department of Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic Year 1997

ISBN 974-638-875-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	จุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับของปลานิล *Oreochromis niloticus* ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดา *Azadirachta indica* เป็นระยะเวลานาน
โดย	นางสาวกัลยา จั่นอาจ
ภาควิชา	ชีววิทยา
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชนี สิงห์อาษา)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กัลยา จั่นอาจ: จุลพยาธิวิทยาในเนื้อเยื่อตับของปลานิล *Oreochromis niloticus* ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดา *Azadirachta indica* เป็นระยะเวลานาน (HISTOPATHOLOGY OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* LIVER AFTER LONG-TERM EXPOSURE TO NEEM *Azadirachta indica* SEED EXTRACT) อ. ที่ปรึกษา: รศ.ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ, 171 หน้า. ISBN 974-638-875-4.

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อตับของปลานิล *Oreochromis niloticus* ที่ได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย ชื่อทางการค้า นีมิกซ์ การทดลองหาค่า LC_{50} ที่ 96 ชั่วโมง ของสารสกัดนีมิกซ์ในปลานิล โดยวิธีการทดสอบความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน ได้ค่าเท่ากับ 34.62 มิลลิกรัมต่อลิตร แล้วดำเนินการทดสอบความเป็นพิษต่อตับในระยะเวลา 5 เดือน ที่ความเข้มข้น 10.41 มิลลิกรัมต่อลิตร ใช้ลูกปลานิลอายุ 1 เดือน เก็บตัวอย่างตับปลาของกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมทุกหนึ่งเดือนจนถึงเดือนที่ห้า ผลการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง พบการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่มีความรุนแรงน้อยไปจนถึงรุนแรงมาก ได้แก่ การบวมน้ำของเซลล์ตับ การลดลงของแวคคิวโอลไขมันและการสะสมไฮยาลินแกรนูลในเซลล์ตับ การตายของเซลล์ตับในลักษณะที่เป็นหย่อมและแพร่กระจายรอบหลอดเลือด การขยายตัวของไซนูซอยด์ การเกิดเลือดคั่งในหลอดเลือด การหลุดของเซลล์เยื่อบุชั้นในหลอดเลือด และการอักเสบของเยื่อหุ้มตับ และจากการศึกษาโครงสร้างละเอียดของเซลล์ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงเกิดขึ้นในระยะเวลาก่อนหน้าเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง การเปลี่ยนแปลงดังกล่าวประกอบด้วย การเพิ่มจำนวน การขยายตัว การแตกหัก การเรียงตัวล้อมรอบไมโตคอนเดรีย และการเรียงตัวเป็นวงของเอนโดพลาสมิคเรติคิวลัมซนิดขรุขระ พบไมโตคอนเดรียในลักษณะที่มีการหดตัว และหรือบวมตัว มีเพิ่มจำนวนของเซคันดารีไลโซโซม และพบออโตฟาจิคแวคคิวโอลในไซโตพลาสซึม นอกจากนี้ภายในนิวเคลียสพบการรวมตัวของโครมาตินอยู่บริเวณใกล้เยื่อหุ้มนิวเคลียสของเซลล์ตับ ความเสียหายของเนื้อเยื่อตับทวีความรุนแรงเพิ่มขึ้นโดยมีความสัมพันธ์กับระยะเวลาที่ปลาได้รับสารสกัดเมล็ดสะเดา สรุปได้ว่าสารสกัดเมล็ดสะเดาอินเดีย (นีมิกซ์) ก่อให้เกิดความเป็นพิษกึ่งเรื้อรังต่อเนื้อเยื่อตับปลานิล

ภาควิชา ชีววิทยา	**ลายมือชื่อนิสิต** กัลยา จั่นอาจ
สาขาวิชา สัตววิทยา	**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา** กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ
ปีการศึกษา 2540	**ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม** –

##C725567 : MAJOR ZOOLOGY
KEY WORD: *Azadirachta indica* / TOXICITY / HISTOPATHOLOGY / *Oreochromis niloticus* / FISH / ULTRASTRUCTURE / SUBLETHAL

KANLAYA JANART : HISTOPATHOLOGY OF TILAPIA *Oreochromis niloticus* LIVER APTER LONG-TERM EXPOSURE TO NEEM *Azadirachta indica* SEED EXTRACT. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. KINGKAEW WATTANASIRMKIT, Ph.D. 171 pp. ISBN 974-638-875-4.

Histopathological alteration of Tilapia *Oreochromis niloticus* liver after long term exposure to neem seed extract (Neemix) *Azadirachta indica* A. Juss. was studied. The LC_{50} 96 hours of neem seed extract on Tilapia for acute toxicity test was 34.62 mg/l. From the application value, a sublethal concentration for long-term study was calculated at 10.41 mg/l. Young Tilapia, 1 month old were exposed to this sublethal concentrate of neemix for 5 months. The livers of treated and control groups were sampled every month for light microscopic and transmission electron microscopic study. Light microscopic examination of liver samples revealed a variety changes from mild to severe, i.e. hydropic swelling, fat droplet and hyalin granule accumulation, both focal and diffuse necrosis near blood vessels, sinusoid dilatation and blood congestion, subcapsular space inflammation and the loss of endothelial cells from blood vessels. The histochemical study also showed a reduction of lipid droplets throughout the experiment. Ultrastructural changes of liver calls began earlier than shown by the LM study and comprised proliferation, dilatation, fragmentation, parallel array and concentric lamella of RER. Mitochondrial contraction and swelling, abundace of secondary lysosomes and autophagic vacuoles were seen in cytoplasm and perichromatin clumping nucleus were noticed. The severity of changes were depended on the duration of treatment. It can be concluded that the neem-based product (Neemix) caused subchronic toxicity effects on Nile Tilapia liver.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา ชีววิทยา ลายมือชื่อนิสิต กัลยา จันมาจ

สาขาวิชา สัตววิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา Kingkaew Wattanasirmkit

ปีการศึกษา 2540 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. กิ่งแก้ว วัฒนเสริมกิจ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดต่าง ๆ ในการวิจัย ตลอดจนช่วยตรวจสอบและแก้ไขข้อบกพร่องวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนสมบูรณ์ ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร. สิริวัฒน์ วงษ์ศิริ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. ประคอง ตังประพฤทธิ์กุล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. พัชนี สิงห์อาษา ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ และช่วยแก้ไขวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้ถูกต้องและสมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ภาควิชาชีววิทยาทุก ๆ ท่านที่ได้ถ่ายทอดวิชาความรู้ และข้อคิดต่าง ๆตลอดการศึกษา

ขอขอบพระคุณ ข้าราชการ และเจ้าหน้าที่ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้ความเอื้อเฟื้อช่วยเหลือเกี่ยวกับเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ คุณสัมพันธ์ สุวรรณรัตน์ เจ้าหน้าที่ภาควิชาชีววิทยา ที่ให้ความช่วยเหลือและความสะดวกระหว่างการวิจัยในห้องปฏิบัติการ

ขอขอบพระคุณ โครงการผลิตและพัฒนาอาจารย์มหาวิทยาลัย ทบวงมหาวิทยาลัย และบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนการศึกษาและทุนเพื่อทำการวิจัยในครั้งนี้ นอกจากนี้วัสดุอุปกรณ์บางส่วนได้รับการสนับสนุนจากภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายสุดนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ครูอาจารย์ ญาติพี่น้องทุกคน เพื่อน ๆ น้อง ๆ และคุณเกียรติศักดิ์ ศรีประทีป ที่ให้กำลังใจ และให้การสนับสนุนในการศึกษามาโดยตลอด

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....จ
กิตติกรรมประกาศ.....ฉ
สารบัญ.....ช
สารบัญตาราง.....ซ
สารบัญรูป.....ฌ
บทที่
1 บทนำ.....1
2 บทสืบสวนเอกสาร..... .8
3 วิธีการทดลอง.....44
4 ผลการทดลอง.....53
5 อภิปรายผลการทดลอง.....106
6 สรุปผลและข้อเสนอแนะ.....112
รายการอ้างอิง.....113
ภาคผนวก.....131
ภาคผนวก ก.....132
ภาคผนวก ข.....136
ภาคผนวก ค.....142
ภาคผนวก ง.....150
ภาคผนวก จ.....165
ประวัติผู้เขียน.....171

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

4-1 แสดงค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC_{50}) ของสารสกัดจาก สะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ที่มีผลกระทบต่อการตายของ ปลานิล *Oreochromis niloticus*.....53

4-2 แสดงค่าเฉลี่ยของน้ำหนักตับ น้ำหนักตัว และ %Relative liver weight (%R) ของปลานิล *Oreochromis niloticus* เมื่อได้รับ สารสกัดสะเดาหรือนีมิกซ์ 10.41 mg/l จากเดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 5 เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....67

4-3 แสดงจำนวนปลานิลที่มีการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับในลักษณะต่าง ๆ ภายหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย หรือนีมิกซ์ที่ระดับ ความเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลานาน ตั้งแต่เดือนที่ 1 ถึงเดือนที่ 5 ของการทดลอง.....68

4-4 แสดงผลของความรุนแรงในการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิล *Oreochromis niloticus* ที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย หรือนีมิกซ์ ที่ระดับความเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นระยะเวลา 5 เดือน.....71

4-5 แสดงจำนวนปลานิลที่พบไขมันและไกลโคเจนภายในเซลล์ตับที่ทำการ ตรวจสอบตามวิธีทางฮีสโตเคมี.....72

4-6 แสดงสมบัติทางกายภาพของน้ำที่ใช้ตลอดการทดลอง เป็นเวลา 5 เดือน.....73

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

2.1 สูตรโครงสร้างของสารประกอบ limonoids ชนิดต่าง ๆ ที่พบในสะเดาอินเดีย....12

2.2 ลักษณะของปลานิล *Oreochromis niloticus* Linn. 22

2.3 ระบบหมุนเวียนโลหิตของปลากระดูกแข็ง....37

2.4 โครงสร้างของตับปลากระดูกแข็ง....40

3.1 สารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียทางการค้า....52

4.1 กราฟแสดงค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน LC_{50} ที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมงของสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ต่อปลานิล *Oreochromis niloticus*....54

4.2 กราฟแสดงค่าเปอร์เซนต์การอยู่รอดของปลานิลกับค่าลอกจ์ (log) ความเข้มข้นของสารสกัดสะเดา หรือนีมิกซ์ ในช่วงเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง....55

4.3 รูปของปลานิล *Oreochromis niloticus* แสดงตำแหน่งของตับภายในช่องท้อง....66

4.4 รูปแสดงลักษณะทางกายวิภาคของตับปลานิลอายุ 4 เดือน....66

4.5 ภาพแสดงลักษณะจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มควบคุมเป็นเวลา 3 เดือน....74

4.6 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะโครงสร้างของเซลล์ตับปลานิลกลุ่มควบคุมอายุ 3 เดือน....75

4.7 ภาพถ่ายของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ที่เข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 1 เดือน....78

4.8 ภาพถ่ายของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ที่เข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 1 เดือน....79

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะเนื้อเยื่อตับปลานิลซึ่งได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาหรือนีมิกซ์ 10.41 mg/l นาน 1 เดือน.....80

4.10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิวิทยาของโครงสร้างเซลล์ตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดียหรือนีมิกซ์ ในระดับความเข้มข้น 10.41 mg/L เป็นระยะเวลานาน 1 เดือน..... 81

4.11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากสะะเดาอินเดียเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 2 เดือน..... 83

4.12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์ของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากสะะเดาอินเดียเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 2 เดือน.....84

4.13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะเนื้อเยื่อตับปลานิลซึ่งได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาหรือนีมิกซ์ 10.41 mg/l นาน 2 เดือน.....85

4.14 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ตับภายหลังได้รับสารสกัด 10.41 mg/l ของนีมิกซ์เป็นเวลานาน 2 เดือน.....86

4.15 ภาพถ่ายของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย 10.41 mg/l เป็นเวลา 3 เดือน.....89

4.16 ภาพถ่ายของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองที่ได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย 10.41 mg/l เป็นเวลา 3 เดือน.....90

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.17 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะเนื้อเยื่อตับปลานิล ซึ่งได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาหรือนีมิกซ์ 10.41 mg/l นาน 3 เดือน.....91

4.18 ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลล์ตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลานาน 3 เดือน.....92

4.19 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองภายหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 4 เดือน.....95

4.20 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองภายหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 4 เดือน.....96

4.21 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะเนื้อเยื่อตับปลานิลซึ่งได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาหรือนีมิกซ์ 10.41 mg/l นาน 4 เดือน.....97

4.22 ภาพจุลทรรศน์อิเลคตรอนของเซลล์ตับปลานิลที่ได้รับสารสกัดเข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 4 เดือน.....98

4.23 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองภายหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย เข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 5 เดือน.....100

4.24 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อตับปลานิลกลุ่มทดลองภายหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาอินเดีย เข้มข้น 10.41 mg/l เป็นเวลา 5 เดือน.....101

สารบัญรูป

รูปที่ หน้า

4.25 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงแสดงลักษณะเนื้อเยื่อตับปลานิลซึ่งได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาหรือนีมิกซ์ 10.41 mg/l นาน 5 เดือน.....102

4.26 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแสดงลักษณะการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างเซลล์ตับปลานิลภายหลังได้รับสารสกัดจากเมล็ดสะเดาเข้มข้น 10.41 mg/l นาน 5 เดือน.....103

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย