

นิพนธ์ต้นฉบับ

การตรวจหาโลหะหนัก สารปรอท เหล็กและทองแดง
จากรอยโรค anthracosis ในสุนัข

ธีระยุทธ แก้วอมตวงศ์ ธนากร อนุพันธุ์เมธา นภวัลย์ บรรพพงศ์ ปรัชญา อยู่เอี่ยมยุทธ์
อัจฉริยา ไสละสูต อภิญญา วิจารณ์ อนุเทพ รังสีพิพัฒน์

ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทคัดย่อ ทำการศึกษาโรค anthracosis ในปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดทางจุลพยาธิวิทยาจากสุนัข จำนวน 47 ตัว โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ ช่วงอายุน้อยกว่า 10 ปี จำนวน 26 ตัวอย่าง และอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ปี จำนวน 21 ตัวอย่าง ทำการย้อมสีพิเศษเพื่อตรวจหาโลหะหนักปรอท ทองแดงและเหล็กในเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองของสุนัข ผลการศึกษาพบการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ปอด การสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อปอด การขยายใหญ่ของถุงลมฝอย การเกิดเนื้อเยื่อพังพืด และการงอกขยายของเซลล์เรคติคูโลเอนโดธิเลียียม (RE cells) ในต่อมน้ำเหลือง ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของสุนัข 2 กลุ่ม ($p>0.05$) แต่การสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ต่อมน้ำเหลืองซั้วปอด และการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอย พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ผลการตรวจหาโลหะปรอทในเนื้อเยื่อปอดของสุนัขกลุ่มที่ 1 และ 2 ให้ผลบวกร้อยละ 42.31(11/26) และ 61.90 (13/21) ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ผลการตรวจหาโลหะทองแดงในเนื้อเยื่อปอด กลุ่มที่ 1 และ 2 ให้ผลบวกร้อยละ 7.69 (2/26) และ 4.76 (1/21) สำหรับเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดให้ผลลบทั้งหมด ผลการตรวจหาเหล็ก กลุ่มที่ 1 และ 2 ให้ผลบวกร้อยละ 88.46(23/26) และ 85.71(18/21) ซึ่งไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) รอยโรค anthracosis ของปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดมีการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาที่เด่นชัด และสามารถตรวจพบโลหะหนักปรอท ทองแดง และเหล็กได้ เชียงใหม่ สัตวแพทยสาร 2550;5(2):147-158

คำสำคัญ : autometallography anthracosis ปรอท ทองแดง เหล็ก

สภาวะแวดล้อมในปัจจุบันนี้โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตเมือง พบว่ามลภาวะทางอากาศซึ่งพบการปนเปื้อนอนุภาคของธาตุโลหะหนักต่างๆได้เพิ่มสูงขึ้น ก่อปัญหาและส่งผลกระทบต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ ดังนั้น การศึกษาผลจากการสัมผัสมลพิษทางอากาศต่อ

สุขภาพของมนุษย์จึงเป็นสิ่งสำคัญ ปัจจุบันได้มีการศึกษาการใช้สัตว์ทั้งจากสัตว์เซลล์เดียวจนถึงสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเพื่อเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพต้องให้ความสำคัญ การศึกษานี้ใช้สุนัขเป็นตัวแทนในการศึกษามลพิษทางอากาศเนื่องจากสุนัขเป็นสัตว์เลี้ยง

ที่อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับมนุษย์และมีช่วงชีวิตยืนยาวกว่าสัตว์ทดลองอื่น โดยพิจารณาจากรอยโรค anthracosis ที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองของสุนัข

รอยโรค anthracosis คือ การตรวจพบอนุภาคของคาร์บอนเป็นสีดำที่สะสมในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ซึ่งจากรายงานการชันสูตรซากสุนัข ณ. ภาคพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ส่วนใหญ่มักพบรอยโรค anthracosis ได้บ่อยในสุนัขในเขตตัวเมือง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในเขตกรุงเทพมหานคร และพบในหลายช่วงอายุ สาเหตุที่ทำให้สุนัขเกิดรอยโรค anthracosis ที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองนี้มีได้หลายสาเหตุ เช่น การได้สัมผัสกับมลภาวะทางอากาศ การอาศัยอยู่ในเมืองใหญ่ หรือแหล่งที่มีการทำเหมือง เป็นต้น⁽⁶⁾

การศึกษานี้มุ่งเน้นเพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างรอยโรค anthracosis และโลหะหนักที่พบในปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุนัข ซึ่งการหายใจเอาอนุภาคของโลหะหนักที่อยู่ในอากาศเข้าไป ผ่านทางเดินหายใจไปที่ถุงลมในปอดอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่างๆ ของระบบทางเดินหายใจตามมารวมถึงการอักเสบ และหากเกิดการสะสมของอนุภาคโลหะหนักในปอดเมื่อทำการผ่าชันสูตรซากจะสามารถพบรอยโรคทางมหภาคได้ โดยพบลักษณะเป็นจุดสีดำบนเนื้อปอด แต่อย่างไรก็ตามรอยโรคทางมหภาค ไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่ารอยโรคนั้นเกิดจากการสะสมของโลหะชนิดใด จึงต้องมีการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาต่อไป

Autometallography เป็นวิธีการหนึ่งทางจุลพยาธิวิทยาที่ใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาโลหะหนักในเนื้อเยื่อต่างๆ ของสิ่งมีชีวิต จากรายงานของ Shirabe⁽¹⁴⁾ สามารถนำวิธีการนี้มาตรวจหาโลหะหนัก 3 ชนิด คือ

ปรอท ซัลเฟอร์ และซีลีเนียม จากไลโซโซมของเซลล์ประสาทในสมองน้อย (cerebellum) ในผู้ป่วยโรคมีนา มาตะได้ นอกจากนี้ยังสามารถใช้วิธีนี้ในการตรวจหาโลหะหนักได้หลายรูปแบบ เช่น การตรวจหาทองและเงินในรูปของคอลลอยด์ การหาเกลือซัลไฟด์หรือซีลีไนด์ของโลหะเงิน ปรอทหรือบิสมัทในอวัยวะที่มีการสัมผัสกับโลหะนั้นๆ การหาเกลือซัลไฟด์หรือซีลีไนด์ของสังกะสีในเซลล์ที่เรียกว่า Zinc-enriched (ZEN) ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีการสะสมของสังกะสีในรูปอิสระหรือมีการจับเป็นพันธะอย่างหลวมๆ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Danscher และ Andreasen⁽¹⁾ ที่สามารถตรวจหาสังกะสีในรูปอิสระ และในรูป zinc sulfide ในสมองหนูขาวได้ Loumbourdis และ Danscher⁽⁷⁾ สามารถใช้เทคนิค autometallography ที่จำเพาะต่อการหาปรอทในรูป ซัลไฟด์หรือซีลีไนด์ (HgS/Se^{AMG}) นำมาหาปรอทในเนื้อเยื่อของกบนา Rana ridibunda ที่ได้รับสารปรอทในขนาดที่ต่างกันและสามารถพบปรอทที่เซลล์ตับ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด (endothelial cell) และ Kupffer's cell

วัตถุประสงค์ของการศึกษารั้งนี้ คือ 1.ศึกษารอยโรค anthracosis ของปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดทางจุลพยาธิวิทยาของสุนัข 2. เพื่อตรวจหาโลหะทองแดงโดยใช้การย้อมสีย้อมสีพิเศษชนิด Modified Uzman's microwave และตรวจหาโลหะเหล็กโดยใช้การย้อมสีย้อมสีพิเศษชนิด Turnbull Blue ในเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองของสุนัข 3. ศึกษาวิธี autometallography เพื่อตรวจหาโลหะหนักปรอท ในเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองของสุนัข ซึ่งการตรวจวิเคราะห์หาโลหะในปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุนัข สามารถใช้เป็นตัวแทนในการบ่งชี้ถึงมลภาวะ

ทางอากาศได้เป็นอย่างดีในเบื้องต้น เพื่อเป็นแนวทางในการวิจัยขั้นต่อไป

วิธีการศึกษา

เก็บตัวอย่างปอดและต่อมน้ำเหลืองชั่วคราวจากสุนัขที่ส่งชันสูตรซาก ที่ภาคพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยไม่จำกัดเพศ และพันธุ์ แต่จำกัดช่วงอายุโดยแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ช่วงอายุต่ำกว่า 10 ปี จำนวน 26 ตัวอย่าง และอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ปีจำนวน 21 ตัวอย่าง รวม 47 ตัวอย่าง ตั้งแต่เดือนตุลาคม 2546 ถึง เดือนตุลาคม 2547 เก็บตัวอย่างพร้อมทั้งบันทึกข้อมูลเบื้องต้น เช่น พันธุ์ เพศ อายุ สาเหตุของการป่วยหรือตาย สถานที่อยู่อาศัยของสัตว์ สิ่งแวดล้อมใกล้เคียงกับที่อยู่ของสัตว์ เป็นต้น

1. วิธีการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดจากกลีบปอดด้านขวา ซ้าย และปอดกลีบกลาง แต่ละส่วนยาว 1 ซม. หนาประมาณ 0.5 ซม. และเก็บต่อมน้ำเหลืองชั่วคราว ส่วนหนึ่งเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการตรวจวิเคราะห์หาปริมาณโลหะ และอีกส่วนหนึ่งตรึงสภาพในน้ำยา 10 % บัฟเฟอร์ฟอร์มอลิน แล้วนำมาผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อทางฮิสโตวิทยา และย้อมสีสไลด์ด้วยสีฮีมาทอกซีลินและอีโอซิน (Hematoxylin & Eosin: H&E) และสี Masson Trichrome ให้การวินิจฉัยรอยโรค anthracosis ในปอดและต่อมน้ำเหลืองชั่วคราวของสุนัข ด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว บันทึกการเปลี่ยนแปลงและให้คะแนนรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยา และนำมาหาค่าเฉลี่ยในแต่ละตัวอย่าง ดังนี้

1.1 การสะสมของอนุภาคคาร์บอน

คะแนน 0 : ไม่พบการสะสมของอนุภาคคาร์บอน

คะแนน 1 : พบกลุ่มของอนุภาคคาร์บอนขนาดเล็ก

คะแนน 2 : พบกลุ่มของอนุภาคคาร์บอนขนาดใหญ่

คะแนน 3 : พบการสะสมของกลุ่มอนุภาคคาร์บอนขนาดใหญ่และกระจายเล็กน้อย

คะแนน 4 : พบการสะสมของกลุ่มอนุภาคคาร์บอนและกระจายโดยทั่วไป

คะแนน 5 : พบการสะสมของกลุ่มอนุภาคคาร์บอนอย่างเห็นได้ชัดและกระจายทั่วไป

1.2 การสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อปอด

คะแนน 0 : ไม่พบการสะสมของแคลเซียม

คะแนน 1 : พบการสะสมของแคลเซียมเล็กน้อย

คะแนน 2 : พบการสะสมของแคลเซียมเป็นกลุ่ม

คะแนน 3 : บริเวณส่วนใหญ่ของกระดูกอ่อนหลอดลมฝอยมีการสะสมของแคลเซียม

1.3 การขยายใหญ่ของถุงลมฝอย

คะแนน 0 : ไม่พบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอย

คะแนน 1: พบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอยกระจายเป็นหย่อม

คะแนน 2 : พบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอยปานกลางกระจายหลาย ๆ หย่อม

คะแนน 3 : พบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอยเป็นบริเวณกว้างและกระจายทั่วไป

1.4 การเกิดเนื้อเยื่อพังผืด (fibrosis)

ความรุนแรง การกระจาย

คะแนน 0 : ไม่พบรอยโรค ไม่พบการกระจาย

คะแนน 1 : พบรอยโรคน้อยมาก กระจายเป็นหย่อม

คะแนน 2 : พบรอยโรคน้อย กระจายเฉพาะบริเวณ

คะแนน 3 : พบรอยโรคปานกลาง กระจายหลาย ๆ หย่อม

คะแนน 4 : พบรอยโรครุนแรง กระจายหลาย ๆ หย่อม และรวมกันเป็นกลุ่ม

คะแนน 5 : พบรอยโรครุนแรงเด่นชัด พบการกระจายโดยทั่ว (ความรุนแรงของรอยโรคดูจากการเกิดพังผืดแทรกที่ผนังถุงลมฝอยและเยื่อหุ้มปอด)

1.5 การงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอย (bronchiolar gland)

คะแนน 0 : ไม่พบการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอย

คะแนน 1 : พบการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนของต่อมที่หลอดลมฝอยเล็กน้อย

คะแนน 2 : พบการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนของต่อมที่หลอดลมฝอยปานกลาง

คะแนน 3 : พบการขยายขนาดและเพิ่มจำนวนของต่อมที่
หลอดลมฝอยมาก

1.6 การเพิ่มจำนวนของเซลล์เรคติคูโลเอนโดทิลีียม (RE
cells) ในต่อมน้ำเหลือง

คะแนน 0 : ไม่พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เรคติคูโลเอนโด
ทิลีียม

คะแนน 1 : พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เรคติคูโลเอนโด
ทิลีียมเล็กน้อย

คะแนน 2 : พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เรคติคูโลเอนโด
ทิลีียมปานกลาง

คะแนน 3 : พบการเพิ่มจำนวนของเซลล์เรคติคูโลเอนโด
ทิลีียมมาก

2. การย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ autometallography⁽¹³⁾
เพื่อตรวจหาปรอทในเนื้อเยื่อ เริ่มจากขจัดพาราฟิน
ออก จากนั้นแช่สไลด์ลงใน potassium cyanide 1%
เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่น 10 นาที นำสไลด์
แช่ลงใน physical developer (ซึ่งประกอบด้วย 50%
Arabic gum, citrate buffer , 5.6% hydroquinone
และ 17% silver nitrate) ที่อุณหภูมิ 26 องศาเซลเซียส
ในที่มืดนาน 45 นาที ล้าง silver ที่มากเกินไปออกโดย
แช่ใน sodium thiosulphate 5% เป็นเวลา 15 นาที
ทำการย้อมสีซ้ำ (counterstain) ด้วยสี Mayer's
hematoxylin ตรวจผลที่ได้จากการย้อมสีภายใต้กล้อง
จุลทรรศน์ชนิดแสงขาว ผลบวกจะพบลักษณะของเม็ด
เงินเล็กๆ สีดำรอบล้อมปรอทที่มองไม่เห็นอยู่ภายใน
เนื้อเยื่อ แสดงว่ามีปรอทอยู่ในเนื้อเยื่อ ซึ่งการทดลองนี้
จะอ่านผลเป็นผลบวกและผลลบ สไลด์ชิ้นเนื้อควบคุม
บวกที่ใช้คือ เนื้อเยื่อสมอง ปอด และไต ของหนูถีบจักร
ที่ได้รับสารปรอท (ได้รับความอนุเคราะห์จาก Prof. Dr.
Akinori Shimada ประเทศญี่ปุ่น)

3. การย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ Modified Uzman's
Microwave⁽¹²⁾ เพื่อตรวจหาทองแดงในเนื้อเยื่อ เริ่ม
จากขจัดพาราฟินออก แช่สไลด์ลงในสารละลาย
Rhodanine working solution แล้วนำเข้าเครื่อง

ไมโครเวฟที่ระดับต่ำ (Hitachi®, 600 วัตต์) เป็นเวลา 5
นาที ย้อมสีซ้ำด้วยสี Mayer's hematoxylin สไลด์ชิ้น
เนื้อควบคุมบวกที่ใช้คือ เนื้อเยื่อ ปอด ของสุกรทดลอง
ที่ได้รับทองแดงโดยการฉีดเข้าหลอดเลือดดำจากการ
ทดลอง (ได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ. น.สพ. ดร.
รุ่งโรจน์ ธนาวงษ์นุเวช) ตรวจผลที่ได้จากการย้อมสี
ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงขาว ผลบวกจะพบ
ลักษณะการตกตะกอนเป็นสีเขียวแก่ (copper-green-
black precipitate) แสดงว่ามีทองแดงอยู่ในเนื้อเยื่อ
ซึ่งการทดลองนี้จะอ่านผลเป็นผลบวกและผลลบ

4. การย้อมสีพิเศษ Turnbull blue⁽²⁾ เพื่อ
ตรวจหาเฟอร์ริกไอออน (Fe^{2+}) และเฟอร์รัสไอออน (Fe^{3+})
ในเนื้อเยื่อ เริ่มจากขจัดพาราฟินออก แช่สไลด์
สารละลาย yellow ammonium sulfide 2 ซม. แช่
สไลด์ในสารที่มีส่วนผสมของ potassium ferricyanide
และ hydrochloric acid เจือจางอย่างละครึ่ง ล้างผ่าน
ด้วยน้ำกลั่น ย้อมสี nuclear fast red 5 นาที สไลด์ชิ้น
เนื้อควบคุมบวกที่ใช้คือ เนื้อเยื่อ้ามของสุนัขปกติ
ตรวจผลที่ได้จากการย้อมสีภายใต้กล้องจุลทรรศน์ชนิด
แสงขาว ผลบวกจะพบลักษณะสีฟ้าเข้มในเนื้อเยื่อ
แสดงว่ามีเฟอร์ริกและเฟอร์รัสไอออนในเนื้อเยื่อ ซึ่งการ
ทดลองนี้จะอ่านผลเป็นผลบวกและผลลบ

5. การวิเคราะห์โลหะชนิดปรอท ทองแดง และ
เหล็ก จากเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลือง โดยวิธี
Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS)
เพื่อเป็นการยืนยันผลการย้อมสีข้างต้นทั้ง 3 วิธี โดยสุ่ม
ตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองชั่วคราวที่เก็บ
รักษาไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส น้ำหนัก
ประมาณ 1 กรัมมากลุ่มละ 10 ตัวอย่าง บดให้ละเอียด
บ่มอบเพื่อให้น้ำที่อยู่ในตัวอย่างระเหย ชั่งน้ำหนักแห้ง
ของตัวอย่าง ย่อยตัวอย่างโดยใช้สารละลายที่มี
ส่วนผสมของกรด $HNO_3:HClO_4$ (10:1) ปริมาตร 3
มล. สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดอบแห้ง และ 2 มล.
สำหรับตัวอย่างเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองชั่วคราว และเติม

น้ำกลั่น 10 มล. นำสารละลายที่ได้ไปวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยวิธี Inductively Coupled Plasma Spectroscopy (ICPS) โดยเครื่อง Inductively coupled plasma atomic emission spectrophotometer (Perkin-Elmer Plasma-1000, USA) ณ ศูนย์เครื่องมือและวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. การวิเคราะห์ผลการทดลอง โดยใช้ one-way ANOVA ในการวิเคราะห์หาความแตกต่างของรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาของสุนัขทั้ง 2 กลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และวิธี two-independent-samples tests (Mann-Whitney U) เพื่อวิเคราะห์หาความแตกต่างของผลการย้อมวิธี autometallography, modified Uzman's microwave และ Turnbull blue ใน 2 กลุ่มที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยใช้โปรแกรมสถิติสำเร็จรูป SPSS

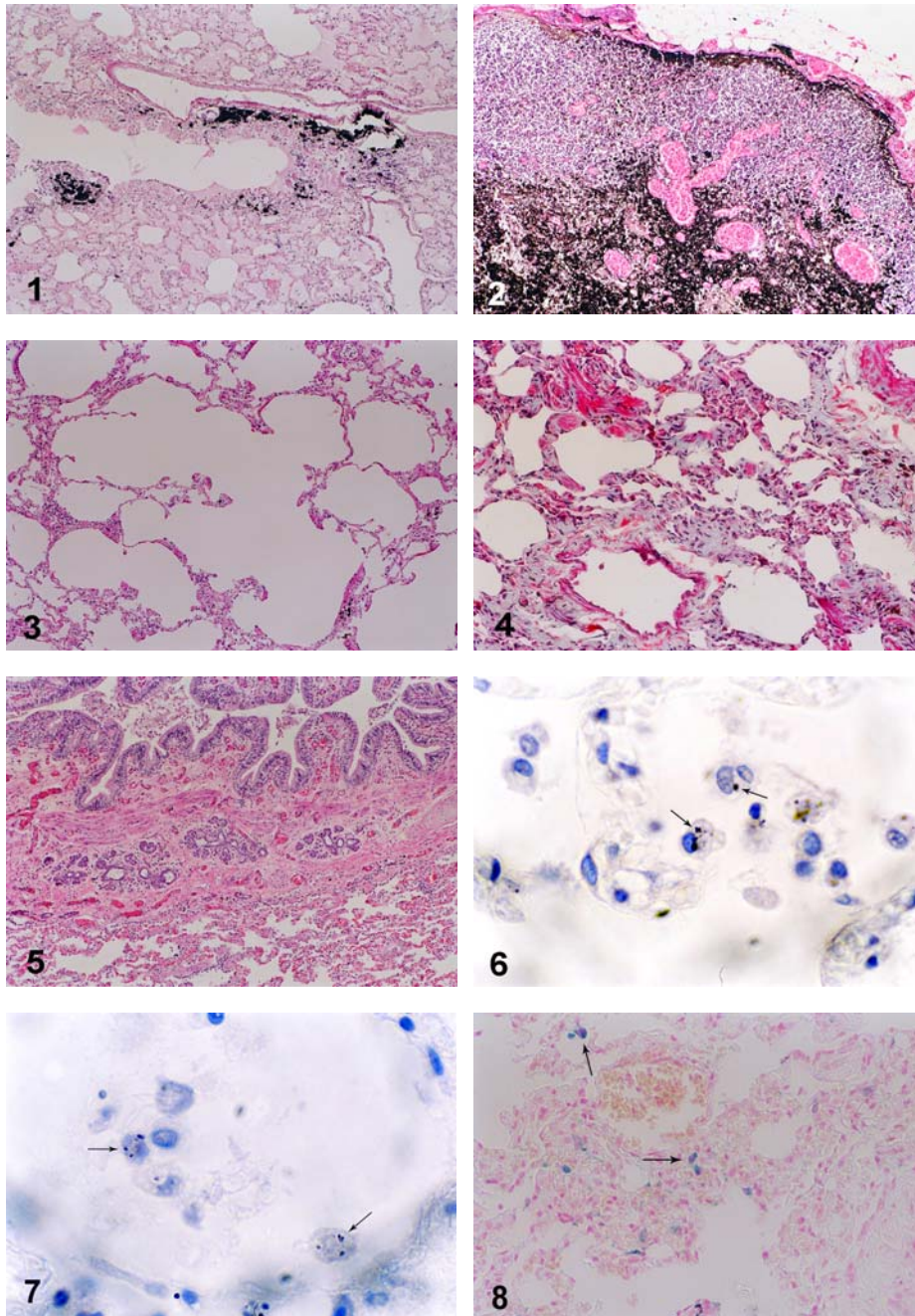
ผลการศึกษา

ข้อมูลทั่วไปของตัวอย่างสุนัขในการศึกษาค้างนี้ได้แก่ อายุ เพศ พันธุ์ แหล่งที่อยู่ ย่านหรือเขตที่อยู่อาศัย โดยกลุ่มที่ 1 เป็นสุนัขที่มีอายุน้อยกว่า 10 ปี จำนวน 26 ตัว แบ่งเป็นสุนัขเพศผู้ร้อยละ 50(13/26) และเพศเมียร้อยละ 50(13/26) สุนัขพันธุ์ผสมร้อยละ 38.46(10/26) และสุนัขพันธุ์แท้ร้อยละ 61.54(16/26) สุนัขที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุมชนร้อยละ 88.46(23/26) นอกแหล่งชุมชนร้อยละ 3.85(1/26) และไม่ทราบข้อมูลของแหล่งที่อยู่ร้อยละ 7.69(2/26) ส่วนกลุ่มที่ 2 เป็นสุนัขที่มีอายุมากกว่าหรือเท่ากับ 10 ปี จำนวน 21 ตัว แบ่งเป็นสุนัขเพศผู้ร้อยละ 61.90(13/21) และเพศ

เมียร้อยละ 38.10(8/21) สุนัขพันธุ์ผสม ร้อยละ 61.90(13/21) และสุนัขพันธุ์แท้ร้อยละ 38.10 (8/21) สุนัขที่อาศัยอยู่ในแหล่งชุมชนร้อยละ 80.95(17/21) และไม่ทราบข้อมูลร้อยละ 19.05 (4/21) ผลการวินิจฉัยโรคโดยการชันสูตรซาก พบว่าสุนัขกลุ่มที่ 1 เสียชีวิตเนื่องจากโรคทางระบบทางเดินหายใจร้อยละ 38.46(10/26) กลุ่มที่ 2 เสียชีวิตเนื่องการโรคทางระบบทางเดินหายใจร้อยละ 28.57(6/21)

ผลการศึกษารอยโรค anthracosis ทางจุลพยาธิวิทยาของปอดและต่อมน้ำเหลืองขั้วปอด สุนัขในกลุ่มที่ 1 พบการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดทุกตัว (รูปที่ 1 และ 2) ไม่พบมีการสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อปอด พบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอยร้อยละ 84.62(22/26) (รูปที่ 3) พบการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดร้อยละ 76.92 (20/26) (รูปที่ 4) พบการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอยร้อยละ 88.46(23/26) (รูปที่ 5) และพบการงอกขยายของเซลล์ RE ในต่อมน้ำเหลืองทุกตัว ส่วนสุนัขกลุ่มที่ 2 พบการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดทุกตัว มีการสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อปอดร้อยละ 19.05(4/21)

พบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอยทุกตัว พบการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดจำนวนร้อยละ 76.19(16/21) พบการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอยร้อยละ 61.90(13/21) และพบการงอกขยายของเซลล์ RE ในต่อมน้ำเหลืองทุกตัว โดยคะแนนความรุนแรงเฉลี่ยในแต่ละรอยโรคของทั้ง 2 กลุ่มอายุแสดงไว้ในตารางที่ 1



รูปที่ 1 แสดงการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ปอด (H&E, 100x)
 รูปที่ 2 แสดงการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ต่อมน้ำเหลืองซัฟปอด (H&E, 200x)
 รูปที่ 3 แสดงการขยายใหญ่ของถุงลมฝอย (H&E, 100x)
 รูปที่ 4 แสดงการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในเนื้อเยื่อปอด (Masson's Trichrome, 200x)
 รูปที่ 5 แสดงการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอย (H&E, 200x)
 รูปที่ 6 แสดงผลของการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ autometallography ในของเนื้อเยื่อปอดสุนัข พบเม็ดโลหะเงินเล็กๆที่มีสีดำรอบล้อมโลหะปรอทในไซโตพลาสซึมของเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เยื่อของถุงลมฝอย (ลูกศร, 600x)

รูปที่ 7 แสดงผลของการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ Modified Uzman's Microwave ในปอดสุนัข พบลักษณะการตกตะกอนเป็นสีเขียวแก่ในไซโตพลาสซึมของเซลล์มาโครฟาจและเซลล์เยื่อของถุงลมฝอย (ลูกศร, 600x)
 รูปที่ 8 แสดงผลของการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ Turnbull Blue ในเนื้อเยื่อปอดของสุนัข พบอนุภาคเหล็กลักษณะสีฟ้าเข้มในไซโตพลาสซึมของเซลล์มาโครฟาจ (ลูกศร, 200x)

เมื่อเปรียบเทียบผลการเปลี่ยนแปลงของ การสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ปอด การสะสมของแคลเซียมในเนื้อเยื่อปอด การขยายใหญ่ของถุงลมฝอย การกระจายตัวและความรุนแรงของการเกิดเนื้อเยื่อพังผืด และการงอกขยายของเซลล์ RE ในต่อมน้ำเหลืองระหว่างสุนัขทั้ง 2 กลุ่มพบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ต่อมน้ำเหลืองข้อปอด พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าสุนัขในกลุ่มที่ 2 มีค่าคะแนนเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มที่ 1 แต่สุนัขในกลุ่มที่ 1 พบค่าคะแนนเฉลี่ยของการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอยสูงกว่ากลุ่มที่ 2 ($p < 0.05$)

ผลการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ autometallography โดยผลบวกจะพบลักษณะของเม็ดของโลหะเงินเล็กๆที่มีสีดำรอบล้อมโลหะปรอทที่มองไม่เห็นอยู่ภายในเซลล์ (รูปที่ 6) การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละของผลบวกในการติดสีย้อมในเนื้อเยื่อปอดของสุนัขกลุ่มที่ 1 และ 2 ไม่มีความแตกต่างกัน ($p > 0.05$) (ตารางที่ 2) ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถตรวจสอบการสะสมของโลหะปรอทในเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองข้อปอดได้ เนื่องจากภายในเนื้อเยื่อของต่อมน้ำเหลืองข้อปอดมีการสะสมของอนุภาคคาร์บอนเป็นจำนวนมาก จึงทำให้รบกวนการอ่านผลการติดสีของการย้อมสีพิเศษได้

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ยของผลทางจุลพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองข้อปอดของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่มที่	การสะสมอนุภาคคาร์บอน		การสะสมของแคลเซียม	การขยายใหญ่ของถุงลมฝอย	การเกิดพังผืด		การงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอย	การงอกขยายของเซลล์ RE
	ปอด	ต่อมน้ำเหลือง			ความรุนแรง	การกระจาย		
1	1.12±0.61 ^a	3.02±0.97 ^a	0.00±0.00 ^a	1.12±0.90 ^a	1.19±1.23 ^a	1.47±1.48 ^a	0.58±0.76 ^a	1.27±0.45 ^a
2	1.33±0.60 ^a	3.79±0.97 ^b	0.13±0.49 ^a	1.40±0.99 ^a	1.41±1.21 ^a	1.68±1.46 ^a	0.51±0.69 ^b	1.38±0.59 ^a

ตัวอักษรต่างกัน (a, b) ที่ปรากฏในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงผลร้อยละของการย้อมสีพิเศษในปอดและต่อมน้ำเหลืองข้อปอดของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่มที่	Autometallography	Modified Uzman's ⁿ	Tumbull blue	
	ปอด	ปอด	ปอด	ต่อมน้ำเหลือง
1	42.31 ^a (11/26)	7.69 ^a (2/26)	76.92 ^a (20/26)	84.62 ^a (22/26)
2	61.90 ^a (13/21)	4.76 ^a (1/21)	66.67 ^a (14/21)	85.71 ^a (18/21)

ตัวอักษรต่างกันที่ปรากฏในคอลัมน์เดียวกันแสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ⁿ ต่อมน้ำเหลืองให้ผลลบ

ผลการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ Modified Uzman's Microwave ผลบวกจะพบการติดสีเขียวแก่ของอนุภาคภายในเซลล์ (copper-green-black precipitate) (รูปที่ 7) พบว่าสุนัขในกลุ่มที่ 1 และ 2 ให้

ผลบวกร้อยละไม่มีความแตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกัน กลุ่มที่ 2 ส่วนเนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลืองข้อปอดให้ผลลบทั้งหมด (ตารางที่ 2)

ผลการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ Turnbull Blue ผลบวกจะพบการติดสีฟ้าเข้มของอนุภาคภายในเซลล์ (รูปที่ 8) เมื่อเปรียบเทียบค่าร้อยละของผลบวกในเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุนัขในกลุ่มที่ 1 และ 2 พบว่าไม่มีความแตกต่างกัน ($p>0.05$)

ผลการวิเคราะห์หาโลหะปรอท ทองแดง และเหล็ก โดยวิธี ICPS จากตัวอย่างเนื้อเยื่อปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของทั้ง 2 กลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 10 ตัวอย่าง พบโลหะหนักปรอทจากปอดของกลุ่มที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ย 0.080 ± 0.040 ไมโครกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง) และ 0.235 ± 0.444 ไมโครกรัม/กรัม และต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของกลุ่มที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ย 0.100 ± 0.107 ไมโครกรัม/กรัม และ 0.075 ± 0.071 ไมโครกรัม/กรัม ตรวจพบโลหะทองแดงจากปอดของกลุ่มที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ย 5.855 ± 4.165 ไมโครกรัม/กรัม และ 6.406 ± 3.559 ไมโครกรัม/กรัม และจากต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของกลุ่มที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ย 5.717 ± 3.907 ไมโครกรัม/กรัม และ 3.406 ± 2.107 ไมโครกรัม/กรัม ตรวจพบโลหะเหล็กจากปอดของกลุ่มที่ 1 และ 2 มีค่าเฉลี่ย 1968.924 ± 3955.053 ไมโครกรัม/กรัม และ 587.645 ± 332.308 ไมโครกรัม/กรัม และจากต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของกลุ่มที่ 1 และ

2 มีค่าเฉลี่ย 1233.542 ± 2135.238 ไมโครกรัม/กรัม และ 700.762 ± 814.440 ไมโครกรัม/กรัม (ตารางที่ 3)

บทวิจารณ์

ผลทางจุลพยาธิวิทยาของปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุนัขทั้ง 2 กลุ่มอายุ ซึ่งแสดงถึงการเปลี่ยนแปลงของระบบทางเดินหายใจในสุนัขที่สูดอายุ โดยพบการสะสมของอนุภาคคาร์บอนที่ปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุนัขในกลุ่มที่ 2 พบการสะสมในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดมากกว่าสุนัขในกลุ่มที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เนื่องจากสุนัขที่มีอายุมากมีช่วงเวลาที่มีโอกาสที่จะสัมผัสกับอนุภาคของธาตุต่างๆ ในบรรยากาศมากกว่า ส่วนในปอดสามารถพบการสะสมของอนุภาคคาร์บอนได้ทั้ง 2 กลุ่มอายุและไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ 1 โดยพบการสะสมของอนุภาคคาร์บอนได้ที่มาโครฟาจที่ถุงลมฝอย (alveolar macrophage) มาโครฟาจที่อยู่ระหว่างเซลล์ (interstitial macrophage) และเซลล์ของถุงลมฝอย (alveolar cell) เนื่องจากเซลล์ดังกล่าวมีหน้าที่สำคัญในขบวนการเก็บกินสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายโดยการหายใจ

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของผลการวิเคราะห์ค่าโลหะหนักในปอดและต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดของสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม

กลุ่มที่	ทองแดง		เหล็ก		ปรอท	
	ปอด	ต่อมน้ำเหลือง	ปอด	ต่อมน้ำเหลือง	ปอด	ต่อมน้ำเหลือง
1	5.855 ± 4.165	5.717 ± 3.907	1968.924 ± 3955.053	1233.542 ± 2135.238	0.080 ± 0.040	0.100 ± 0.107
2	6.404 ± 3.559	3.406 ± 2.107	587.645 ± 332.308	700.762 ± 814.440	0.235 ± 0.444	0.075 ± 0.071

หมายเหตุ หน่วยวิเคราะห์โลหะหนักแสดงผลเป็น ไมโครกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง)

สุนัขทั้ง 2 กลุ่มพบการขยายใหญ่ของถุงลมฝอยที่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การขยายใหญ่ของถุงลมฝอยมีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบอย่างเรื้อรังของหลอดลม⁽⁹⁾ ซึ่งสอดคล้องกับรอยโรคของตัวอย่างสุนัขบางตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้

การกระจายตัวและความรุนแรงของการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในสุนัขทั้งสองกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน แต่ค่าเฉลี่ยในกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ 1 ซึ่งการเกิดเนื้อเยื่อพังผืดในปอดจะพบกระจายทั่วไปบริเวณเนื้อเยื่อปอดและบริเวณใต้เยื่อหุ้มปอด(subpleural area) สาเหตุประการแรกเกี่ยวข้องกับความเสียหายของเซลล์เยื่อถุงลมฝอย (alveolar epithelium) และ basement membrane ซึ่งเกิดจากการหลั่งสารสื่อกลางและ growth factor จากมาโครฟาจที่ถุงลมฝอยและเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องกับการบวมการอักเสบกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้นของไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) และทำให้มีการผลิตเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มมากขึ้น เป็นผลให้เกิดพังผืด ซึ่งทำให้ปอดสูญเสียความยืดหยุ่นและความสามารถในการแลกเปลี่ยนก๊าซ⁽⁵⁾ ซึ่งปัญหาดังกล่าวมักพบในสุนัขที่มีอายุมาก นอกจากนี้การสะสมของอนุภาคของธาตุต่างๆ ในปอดสามารถก่อความเสียหายต่อเซลล์เยื่อถุงลมฝอยกระตุ้นให้เกิดการอักเสบอย่างเรื้อรังและเกิดพังผืดได้

การงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอยเกิดจากการระคายเคืองอย่างเรื้อรังจากมลภาวะทางอากาศและควันบุหรี่จนทำให้เกิดการอักเสบของหลอดลมฝอย โดยจะกระตุ้นให้ต่อมเยื่อ (mucous gland) ภายในผนังหลอดลมฝอยมีการตอบสนองโดยเพิ่มจำนวนขึ้นทั้งขนาดและปริมาณ⁽⁸⁾ ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสุนัขกลุ่มที่ 1 พบการงอกขยายของต่อมที่หลอดลมฝอยในปอดมากกว่าในกลุ่มที่ 2 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากสุนัขในกลุ่มที่ 1 มีพยาธิสภาพของระบบทางเดินหายใจ เช่น การบวมน้ำและการอักเสบของปอดที่มีความรุนแรงกว่ากลุ่มที่ 2

ในระบบ monophagocytic นั้น เซลล์ histiocyte จะทำหน้าที่เก็บกินสิ่งแปลกปลอมหรือชิ้นส่วนเซลล์จากภายในร่างกายของสัตว์และส่งต่อมายังต่อมน้ำเหลือง โดยในคนที่อาศัยอยู่ในเมืองจะหายใจเอาสิ่งสกปรกที่อยู่ในอากาศเข้าไป ทำให้เกิดการสะสมของอนุภาคคาร์บอนเป็นจำนวนมากใน histiocyte ที่ต่อมน้ำเหลืองซั้วปอด⁽⁶⁾ ค่าเฉลี่ยการงอกขยายของเซลล์ RE ในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดในสุนัขกลุ่มที่ 2 มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มที่ 1 แต่ไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งรอยโรคดังกล่าวพบควบคู่กับรอยโรค anthracosis

ผลการย้อมสีพิเศษโดยวิธีการ autometallography เมื่อเปรียบเทียบผลในสุนัขทั้งสองกลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถนำวิธีดังกล่าวมาใช้ในการตรวจการสะสมของโลหะหนักปรอทในหลายๆ อวัยวะ ได้แก่ ปอด ต่อมน้ำเหลืองซั้วปอด สมอง ตับ ไต และม้าม เช่นเดียวกับรายงานของ Hansen และคณะ⁽⁴⁾ ซึ่งพบการสะสมของปรอทในไตและอวัยวะในระบบประสาท นอกจากนี้รายงานของของ Hansen และ Danscher⁽³⁾ พบว่าอวัยวะที่มีปริมาณการสะสมของปรอทได้มาก คือ ตับและไต แต่ในการทดลองครั้งนี้ไม่สามารถแปลผลการย้อมสีพิเศษนี้ในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดได้ เนื่องจากภายในต่อมน้ำเหลืองซั้วปอดมีการสะสมของอนุภาคคาร์บอนเป็นจำนวนมาก จึงทำให้รบกวนการอ่านผลการติดสีของการย้อมสีพิเศษ ดังนั้นการนำวิธี autometallography มาใช้ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรเลือกอวัยวะที่พบการสะสม

ของปรอทมาก ได้แก่ สมอง ตับ และไต เพื่อเป็นตัวบ่งชี้การสะสมของโลหะหนักปรอทในร่างกายร่วมกับภาวะ anthracosis สำหรับความไวของวิธี autometallography ในการศึกษานี้ พบว่าค่าเฉลี่ยต่ำสุดของโลหะปรอทในเนื้อเยื่อจากการวิเคราะห์โดยวิธี ICPS มีค่าเท่ากับ 0.080 ไมโครกรัม/กรัม ซึ่งสามารถให้ผลบวกโดยวิธี autometallography ได้

ผลการย้อมสีพิเศษเพื่อตรวจหาโลหะทองแดงในปอดและต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดของสุนัข เมื่อเปรียบเทียบผลในสุนัขทั้งสองกลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากรายงานของ Thornburg และคณะ⁽¹⁵⁾ พบว่าการย้อมสีพิเศษด้วยวิธีนี้ จะมีการสะสมของทองแดงอยู่ในระดับ 400 ไมโครกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง) จึงจะสามารถตรวจพบทางจุลพยาธิวิทยา แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถตรวจพบการสะสมของโลหะหนักทองแดงได้ในเนื้อเยื่อปอดของตัวอย่างสุนัขบางตัว แม้ว่าผลการวิเคราะห์ปริมาณโลหะหนักโดยวิธี ICPS จะพบว่ามีปริมาณโลหะหนักทองแดงในเนื้อเยื่อต่ำกว่า 400 ไมโครกรัม/กรัม (น้ำหนักแห้ง) ก็ตาม แต่จากการศึกษาครั้งนี้ไม่สามารถแปลผลการย้อมสีพิเศษนี้ในต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดได้ เนื่องจากภายในของต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดมีการสะสมของอนุภาคคาร์บอนเป็นจำนวนมากจึงทำให้รบกวนการอ่านผลการติดสีของการย้อมสีพิเศษ

ผลการตรวจหาเหล็กในรูปของเฟอร์ริคและเฟอร์รัสอออนในปอดและต่อมน้ำเหลืองของสุนัข เมื่อเปรียบเทียบผลสุนัขทั้ง 2 กลุ่ม พบว่าไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ จากการย้อมสีพิเศษนี้ พบว่าสีมักจะติดรอบบริเวณที่มีการสะสมของอนุภาคคาร์บอนมากกว่าบริเวณอื่นๆ ในเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้ยังพบว่าสีจะติดในบริเวณที่มีเม็ดเลือดแดงอยู่เป็นจำนวนมาก เนื่องจากในเม็ดเลือดแดงมีโลหะหนักเหล็กเป็นส่วนประกอบ⁽⁶⁾ ในการวิเคราะห์โดยวิธี ICPS พบว่ามีปริมาณการสะสมของเหล็กสูงกว่าทองแดง และปรอท(ค่าเฉลี่ยสูงสุดเท่ากับ 1968.924 ไมโครกรัม/กรัม) ซึ่งสอดคล้องกับผลการย้อมสีพิเศษทั้งนี้ปริมาณที่ตรวจพบได้สูงอาจเนื่องมาจากปริมาณของเมตาบอลิซึมของธาตุเหล็กในร่างกายโดยเฉพาะอย่างยิ่งในเม็ดเลือดแดง รวมทั้งอาจเกิดจากการปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อม สัตว์ยังไม่แสดงภาวะอาการความเป็นพิษ เนื่องจากระดับของเหล็กที่จะเริ่มแสดงอาการเป็นพิษในสัตว์คือ 20-60 มก./กก. น้ำหนักตัว และหากได้รับในปริมาณมากกว่า 200 มก./กก. น้ำหนักตัว อาจทำให้ตายได้⁽¹⁰⁾ ในสุนัขหากได้รับเหล็กจากการกินในปริมาณที่มากกว่า 60 มก./กก. น้ำหนักตัวจะก่อให้เกิดความเป็นพิษที่รุนแรงได้⁽¹¹⁾

ในสุนัขอายุมากพบว่าเกิดพยาธิสภาพของปอดที่สำคัญเนื่องจากความชราภาพ (senile change) ได้แก่ การสะสมของอนุภาคคาร์บอน การเกิดเนื้อเยื่อพังผืด และการขยายของถุงลมฝอย ซึ่งเป็นสาเหตุใ้มนำให้เกิดปัญหาของโรคทางระบบทางเดินหายใจตามมาได้ รอยโรค anthracosis จากการศึกษานี้พบการสะสมของอนุภาคโลหะหนักอื่นๆ นอกเหนือจากอนุภาคคาร์บอน ได้แก่ ปรอท ทองแดง และเหล็ก โดยวิธี Autometallography, Modified Uzman's Microwave และ Turnbull blue ตามลำดับ และผลการวิเคราะห์ปริมาณของโลหะหนักปรอททองแดง และเหล็ก โดยวิธี ICPS จะแสดงให้เห็นว่าการสะสมของโลหะหนักในปอด และต่อมน้ำเหลืองขั้วปอดของสุนัข แต่ปริมาณโลหะหนักดังกล่าวที่พบสะสมในเนื้อเยื่อยังไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อสุนัข

ดังนั้นจึงสามารถใช้สุนัขเป็นตัวแทนในการบ่งชี้ถึงการได้รับโลหะหนักที่ปนเปื้อนอยู่ในมลภาวะทางอากาศ

กิตติกรรมประกาศ

ทางคณะผู้วิจัยขอขอบคุณโครงการวิจัยเงินทุน คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย พ.ศ. 2548 ที่สนับสนุนเงินอุดหนุนในการศึกษาครั้งนี้ ผศ.ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ และคุณวลาสินี รักขาว ภาควิชาสัตวแพทย์ศาสตร์ สาธารณสุข คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับการเตรียมตัวอย่างในการตรวจวิเคราะห์โลหะหนัก และ รศ.อัฉรภา วัชสิน ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ข้อมูล

เอกสารอ้างอิง

1. Danscher G, Andreasen A. Demonstration of vessels in CNS and other organs by AMG silver enhancement of colloidal gold particles dispersed in gelatine. *J Neurosci Meth* 1997; 77: 175-181.
2. Gretchen LH. Staining pigments and minerals. In: *Animal Tissue Techniques*. San Francisco : W.H. Freeman, 1972: 271-272.
3. Hansen JC, Danscher G. Quantitative and qualitative distribution of mercury in organ form arctic sledge dogs. *Pharmacol Toxicol* 1995; 77(3): 189-195.
4. Hansen JC, Reske-Nielsen E, Thorlacius-Ussing OR, Rungby J, Danscher G. Distribution of dietary mercury in a dog. *Sci Total Environ* 1989; 78: 23-43.
5. Haschek WM, Rousseaux, C.G. Respiratory system. In: *Fundamentals of Toxicologic*

- Pathology. San Diego: San Diego Academic, 1998: 91-126.
6. Jones TC, Hunt RD, King NW. Mineral deposits and pigments. In: *Veterinary Pathology*. Baltimore: Williams & Wilkins, 1997: 62-63.
7. Loumbourdis NS, Danscher G. Autometallographic tracing of mercury in frog liver. *Environ Pollution* 2004; 129(2): 299-304.
8. MacSween RMN, Whaley K. *Muir's Textbook of Pathology*. London: Butler and Tanner, 1992.
9. Mitchell RN, Cotran RS. Cell Injury, Death, and Adaptation and Lung and the Upper Respiratory Tract. In: Kumar V, Cotran RS, Robbins SL. editors.): *Basic Pathology*. Philadelphia. W.B. Saunders, 1997: 398-401
10. Osweiler GD. Metals and minerals. In: *Toxicology*. Philadelphia: Williams & Wilkins, 1996: 185-199.
11. Plumlee KH. Copper, Iron and Mercury. In: *Clinical Veterinary Toxicology*. St. Louis: Mosby, 2004: 195- 211.
12. Sheehan D, Hrapchak B. *Theory and practice of Histotechnology*. Ohio. Battelle, 1980.
13. Shimada A, Yamamoto E, Morita T, Yoshida M, Suzuki J, Satoh M, Toyama C. Ultrastructural demonstration of mercury granules in the placenta of metallothionein-null pregnant mice after exposure to mercury vapor. *Toxicol Pathol* 2004; 32(5): 20.
14. Shirabe T. Electron microscopic X-ray microanalysis of the nervous system after mercury intoxication. *Folia Psychiatr Neurol* 1978; 32: 278-283.
15. Thornburg LP, Rottinghaus G, McGowan M, Kupka K, Crawford S, Forbes S. Hepatic copper concentrations in purebred and mixed-breed dogs. *Vet Pathol* 1990; 27(2): 81-88.