นิพนธ์ต้นฉบับ • Original Article

ฤทธิ์ของสารไกลโฟเสท 48 ต่อค่าดัชนีเม็ดเลือดแดง ความเปราะ และการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ในหลอดทดลอง

ฟ้า เชื้อหงษ์ทอง*, กันยารัตน์ หนูเอียด, จรินทร จอมจันทร์
สาขาเทคนิคการแพทย์ คณะสหเวชศาสตร์ มหาวิทยาลัยพะเยา อ.เมือง จ.พะเยา 56000

Effects of Glyphosate 48 on Human Red Blood Cell Indicies, Osmotic Fracgility and Oxidative Stress Production *in Vitro*

Fah Chueahongthong*, Kanyarat Nuead, Jarintorn Jomjun
School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province 56000, Thailand

หลักการและวัตถุประสงค์: หลายการศึกษาบ่งชี้ว่าไกลโฟเสท (Glyphosate) เช่น ราวน์อัพ (Roundup®) สามารถทำให้เม็ดเลือดแดงแตกและสร้างอนุมูลอิสระ การศึกษานี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินฤทธิ์ของไกลโฟเสท 48 อื่นต่อความเสียหายและการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ผ่านการออกซิเดชั่นของไขมัน (lipid peroxidation) ของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ในหลอดทดลอง

วิธีการศึกษา: นำเม็ดเลือดแดงปกติจากอาสาสมัคร 10 ราย ไปบ่มกับไกลโฟเสท 48 %w/v ความเข้มข้นสุดท้าย 0.1, 0.2 และ 0.4 %v/v ที่ 37°C,3 ชั่วโมง จากนั้นวัดค่าฮีโมโกลบิน (Hb), ฮีมาโตคริต (Hct), ปริมาตร (MCV), น้ำหนัก (MCH) และความเข้มข้น (MCHC) ฮีโมโกลบินเฉลี่ยต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง การแตกของเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ (osmotic fragility test) และระดับ Malondialdehyde (MDA) ผลิตภัณฑ์จากการเกิดออกซิเดชั่นของไขมันเทียบกับเม็ดเลือดแดงในน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (กลุ่มควบคุม)

ผลการศึกษา: ไกลโฟเสท 48 ที่ความเข้มข้น 0.2 %v/v ทำให้เม็ดเลือดแดงมีปริมาตร (MCV) เพิ่มขึ้น และลดความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง (MCHC) นอกจากนี้ไกลโฟเสททุกความเข้มข้นยังทำให้ความเปราะของเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแต่ทำให้ระดับ MDA เพิ่มขึ้นในระดับต่ำเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สรุป: ไกลโฟเสท 48 ในการทดสอบนี้มีฤทธิ์ในการทำลายฮีโมโกลบินและเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดง รวมทั้งเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นผ่านการทำลายโครงสร้างไขมัน ซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งเสริมให้เยื่อหุ้มเซลล์มีความเปราะเพิ่มขึ้น

Background and objectives: Several studies indicated that glyphosate, such as Roundup, could induce red blood cell lysis and produce free radicals. The researchers aimed to evaluate direct effects of another commercial glyphosate 48 on damage and oxidative stress production of red blood cell (RBC) via lipid peroxidation *in vitro*.

Methods: Normal RBC s from 10 volunteers were incubated with glyphosate 48 %w/v at final concentrations of 0.1, 0.2 and 0.4 %v/v at 37°C for 3 hour, which was the condition did not cause cell lysis. Then the cells were measured hemoglobin (Hb), hematocrit (Hct), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH) and mean corpuscular hemoglobin concertration (MCHC), cell lysis in various concentrations of hypotonic saline solution (osmotic fragility test) and MDA level, product of lipid peroxidation, compared to RBC in 0.85% NSS (vehicle control).

Results: Glyphosate 48 at the concentration of 0.2 %v/v could increase volume (MCV) and decrease hemoglobin concentration (MCHC). Moreover, all concentrations of glyphosate also increased RBC fragility significantly, but raised MDA in low level, compared to control.

Conclusions: Glyphosate 48 in this study had effect on destroying hemoglobin and cell membrane of RBC. Moreover, it induced oxidative stress production through lipid peroxidation which is the one factor that promote increasing of RBC membrane fragility.

ศรีนครินทร์เวชสาร 2560; 32(5): 398-406. • Srinagarind Med J 2017; 32(5): 398-406.

*Corresponding Author: Fah Chueahongthong, School of Allied Health Sciences, University of Phayao, Phayao Province 56000, Thailand. Email: fahmyfah@hotmail.com

บทนำ

การใช้สารเคมีป้องกันและกำจัดศัตรูพืชยังคงมีความจำเป็นเพื่อช่วยเพิ่มปริมาณและคุณภาพของผลผลิตทางการเกษตร จากข้อมูลปริมาณและมูลค่าการนำเข้าวัตถุอันตรายทางการเกษตรปี พ.ศ. 2553-2558 ประเทศไทยมีปริมาณการนำเข้าสารกำจัดวัชพืช (Herbicide) มากที่สุด โดยสูงกว่าสารเคมีชนิดอื่นๆ ถึงสิบเท่า[1] ซึ่งสารกำจัดวัชพืชที่ได้รับความนิยมและมีการใช้อย่างแพร่หลาย ได้แก่ ไกลโฟเสท (glyphosate) และพาราควอท[2]

ไกลโฟเสท เป็นสารในกลุ่มเอนฟอสโฟโนเมทิลไกลซีน (N-(phosphonomethyl) glycine) ผลิตครั้งแรกโดยบริษัทมอนซานโต้ (Monsanto) ในปี ค.ศ. 1970 ใช้ชื่อราวน์อัพ (Roundup) เป็นชื่อทางการค้า[3] มีองค์ประกอบหลักเป็นสารไกลโฟเสทและสารลดแรงตึงผิว (surfactant) เช่น โพลีออกซีเอทีลีนเอมีน (polyoxyethylene amine; POEA) โพรพีลีนไกลคอล (propylene glycol) ไกลซีน (glycerine)[4] ปัจจุบันมีวางจำหน่ายมากกว่า 150 ยี่ห้อและมีหลากหลายสูตร[4] สำหรับสูตรไกลโฟเสทที่ใช้กันทั่วไปในประเทศไทยมีสารออกฤทธิ์หลักคือ ไกลโฟเซตในรูปของเกลือไอโซโพรพิลเอมีน (Isopropylamine salt) เข้มข้น 48 %w/v อย่างไรก็ตามแต่ละผู้ผลิตอาจมีการปรับชนิดและความเข้มข้นของไกลโฟเสทและสารลดแรงตึงผิวเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพ ไกลโฟเสทมีผลต่อการเจริญของวัชพืชโดยยับยั้งการสังเคราะห์เอนไซม์ 5-enolpyruvyl-shikimate-3-phosphate synthase (EPSPS) ซึ่งจำเป็นต่อการสังเคราะห์กรดอะมิโนฟีนิลอะลานีน (phynylalanine) ไทโรซีน (tyrosine) และทริปโตเฟน (tryptophan) รวมทั้งดีเอ็นเอ (DNA) และคลอโรฟิลล์ (Chlorophyll)[5,6]

แม้ว่าไกลโฟเสทจะเป็นสารสลายตัวได้เร็วในธรรมชาติและมีความเป็นพิษอยู่ที่ระดับ IV คือต่ำสุดเมื่อเข้าสู่ร่างกายผ่านการรับประทานหรือทางผิวหนัง จากรายงานการทดสอบในหนูตามเกณฑ์ของ FDA[3] หลายการศึกษาบ่งชี้ว่าไกลโฟเสทราวน์อัพสามารถทำให้เม็ดเลือดแดงเกิดการเปลี่ยนแปลง เช่น เหนี่ยวนำให้เกิดการแตกของเม็ดเลือดแดงมนุษย์[7] ทำให้สัตว์ทดลองเกิดภาวะโลหิตจาง[8] และมีความเสี่ยหายของสารพันธุกรรม[7,9] นอกจากนี้ยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์สร้างอนุมูลอิสระในกลุ่มซุปเปอร์ออกไซด์ (O_2^-) เช่น reactive oxygen species (ROS)[10] และเกิดการออกซิไดซ์ของไขมันซึ่งเป็นตัวบ่งชี้หนึ่งของการเกิดภาวะเครียดออกซิชั่น (oxidative stress)[9-11] เนื่องจากเม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซ และถูกทำลายได้ง่ายจากสารเคมีและสารอนุมูลอิสระ การสัมผัสกับไกลโฟเสทจึงอาจส่งผลให้เม็ดเลือดแดงเกิดความเสียหายโดยตรง และทำให้เกิดภาวะโลหิตจาง โดยเฉพาะกลุ่มเกษตรกรซึ่งมีโอกาสได้รับสารชนิดนี้โดยตรง ทั้งนี้ภาวะโลหิตจางเป็นปัญหาทางโลหิตวิทยาที่พบได้บ่อยส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยและอาจนำไปสู่การเกิดโรคอื่นๆ

สำหรับ ในประเทศไทย ปัจจุบันมีการผลิตไกลโฟเสทออกมาในชื่อทางการค้าต่างๆ หลายยี่ห้อ นอกเหนือจากราวด์อัพซึ่งเป็นยี่ห้อดั้งเดิมที่มีการนำเข้าจากต่างประเทศ โดยไกลโฟเสทเหล่านี้ส่วนใหญ่พบว่ายังคงปริมาณของสารของฤทธิ์ตามสูตรมาตรฐาน (glyphosate 48 %w/v) แต่อาจมีการปรับสูตรโดยปรับปริมาณหรือชนิดของสารลดแรงตึงผิว หรือเพิ่มสารที่เป็นพิษต่อวัชพืชอื่นๆ เพื่อช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการกำจัดวัชพืช ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับไกลโฟเสทที่มีจำหน่ายในท้องตลาดเหล่านี้ในประเทศไทยยังมีน้อย โดยเฉพาะพิษต่อเซลล์ในระบบเลือด การศึกษานี้จึงมีแนวคิดในการทดสอบฤทธิ์โดยตรงของไกลโฟเสท (glyphosate 48 %w/v) อื่นที่ไม่ใช่ราวน์อัพต่อการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดง ได้แก่ ฮีโมโกลบิน (hemoglobin) ฮีมาโตคริต (hematocrit) ดัชนีเม็ดเลือดแดง (RBC indicies) ประกอบด้วยค่าขนาด (MCV) น้ำหนักฮีโมโกลบิน (MCH) และความเข้มข้นฮีโมโกลบิน (MCHC) ต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง ความเปราะของเยื่อหุ้มเซลล์ด้วยการตรวจ osmotic fragility และการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) ผ่านกระบวนการออกซิไดซ์ของไขมัน (lipid peroxidation) โดยการวัดสารมาลอนไดแอลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ของการบวนการดังกล่าวในหลอดทดลอง เพื่อศึกษาฤทธิ์ของไกลโฟเสทต่อการเหนี่ยวนำให้เกิดความเสียหายต่อเม็ดเลือดแดงมนุษย์ ซึ่งจากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการรายงานผลของไกลโฟเสทต่อการเปลี่ยนแปลงระดับฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต ดัชนีของเม็ดเลือดแดง ความเปราะของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ และความสัมพันธ์กับการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น

วิธีการศึกษา

วัสดุและน้ำยา

ไกลโฟเสท48 (ส่วนประกอบ ได้แก่ ไกลโฟเสทไอโซโพรพิลแอมโมเนียม (glyphosate isopropylammonium) เข้มข้น 48 %w/v (480 g/L) และสารลดแรงตึงผิวประมาณ 10%) น้ำเกลือความเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) สำหรับปั่นล้างและเจือจางไกลโฟเสท, น้ำยาสำหรับการทดสอบ OF test ได้แก่ น้ำเกลือความเข้มข้น 1% (1%NaCl) น้ำยาสำหรับการทดสอบ MDA ได้แก่ 1, 1, 3, 3-tetramethoxypropane (TMP), 0.2% butylated hydroxytoluene (BHT) ใน ethanol,

0.6% Thiobarbituric acid (TBA)ในน้ำกลั่น, 0.44M H_3PO_4 ในน้ำกลั่น และ n-Butanol

การคัดเลือกอาสาสมัครเพื่อเก็บตัวอย่างเลือด

คัดเลือกอาสาสมัครจำนวน 10 ราย เพศชายหรือหญิง อายุ 20 ปีขึ้นไป ที่มีค่าฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และดัชนีเม็ดเลือดแดงอยู่ในเกณฑ์ปกติ ไม่มีภาวะพร่องเอนไซม์ glucose-6-phosphate dehydrogenase ไม่รับประทานอาหารเสริมที่มีสารต้านอนุมูลอิสระ ไม่สูบบุหรี่ และงดดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสมอย่างน้อย 1 สัปดาห์ มีค่าเอนไซม์โคลีนเอสเทอเรสอยู่ในระดับปกติ ซึ่งอาสาสมัครต้องอ่านข้อกำหนดและลงนามยินยอมเข้าร่วมการวิจัย หากขาดคุณสมบัติข้อใดข้อหนึ่งข้างต้น อาสาสมัครจะถูกคัดออก การศึกษาครั้งนี้ผ่านการรับรองจริยธรรมวิจัยโดยคณะกรรมการจริยธรรม มหาวิทยาลัยพะเยา

การเจาะเก็บตัวอย่างเลือด

เจาะเก็บตัวอย่างเลือดอาสาสมัคร 2 ครั้ง โดยครั้งที่ 1 เพื่อนำตัวอย่างเลือดไปตรวจคัดกรองอาสาสมัครโดยส่วนหนึ่งใช้สารกันเลือดแข็งชนิด ethylene diaminetetraacetic acid (EDTA) และอีกส่วนทำเป็นซีรัม เมื่ออาสาสมัครผ่านเกณฑ์คัดเข้าจะเจาะเก็บตัวอย่างเลือดอีกครั้งโดยใช้สารกันเลือดแข็งชนิด EDTA เพื่อนำไปทดสอบกับไกลโฟเสทและศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเม็ดเลือดแดงต่อไป

การเตรียมตัวอย่างเลือดและสารเคมีเพื่อใช้ในการทดสอบ

นำเลือดแต่ละตัวอย่างไปปั่นล้าง 2 ครั้ง ด้วยน้ำเกลือเข้มข้น 0.85% (0.85% NaCl) ที่ความเร็ว 1,500 xg เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเก็บเฉพาะเม็ดเลือดแดงใน 0.85% NaCl เมื่อจะนำไปทดสอบจึงปรับปริมาณเซลล์ให้เท่ากับ 1x 10^6/μL โดยเม็ดเลือดแดงแต่ละตัวอย่างจะถูกแบ่งเป็นกลุ่มที่ทดสอบกับไกลโฟเสท ซึ่งการเตรียมสารทำโดยเจือจางไกลโฟเสทด้วย 0.85% NaCl ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเมื่อบ่มกับเม็ดเลือดแดงมีค่าเท่ากับ 0.10, 0.20 และ 0.40 %v/v และกลุ่มควบคุม (vehicle control) ซึ่งเตรียมโดยนำเม็ดเลือดแดงไปบ่มกับ 85% NaCl จากนั้นนำตัวอย่างทั้งสองกลุ่มไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ครบเวลาจึงนำไปวัดค่าฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต ดัชนีเม็ดเลือดแดง ความเปราะของเยื่อหุ้ม และการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นต่อไป

การวิเคราะห์ค่าฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง

ตรวจวัดค่าฮีโมโกลบิน (Hemoglobin: Hb) ฮีมาโตคริต (Hematocrit: Hct) และค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง ซึ่งประกอบด้วยขนาดเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular volume: MCV) ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของฮีโมโกลบินต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin: MCH) และค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง (Mean corpuscular hemoglobin concentration: MCHC) โดยใช้เครื่องวิเคราะห์เม็ดเลือดอัตโนมัติ Celltac α MEK-6400series (Nihon Kohden, Japan) โดยค่า Hb และ MCV เป็นค่าที่ได้จากการวิเคราะห์โดยตรงของเครื่อง ส่วนค่า Hct, MCH และ ค่า MCHC ได้จากการคำนวณด้วยเครื่องโดยใช้สูตร Hct (%) = MCV (fL) x RBC count (x 10^6/ μL), MCH = Hb (g / dL)/ RBC count (x 10^6 μL)และ MCHC = Hb (g / dL)/ Hct (%) ตามลำดับ

การทดสอบความเปราะบางของเม็ดเลือดแดงด้วยวิธี Osmotic fragility test (OF test)[12]

เจือจางสารละลายน้ำเกลือเข้มข้น 1% (1% NaCl) ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้นเท่ากับ 1.00, 0.85, 0.75, 0.65, 0.60, 0.55, 0.50, 0.45, 0.40, 0.35, 0.30, 0.20, 0.10 และ 0% ตามลำดับ จากนั้นแบ่งใส่หลอดทดลอง 2.5 mL เติมเลือดตัวอย่างหลอดละ 25 μL ผสมให้เข้ากัน บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที ครบเวลานำไปปั่นที่ 1,200 xg เป็นเวลา 10 นาที จากนั้นนำของเหลวส่วนบนมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 nm โดยใช้ 1% NaCl เป็นตัวปรับเทียบ คำนวณหา % Hemolysis ของแต่ละหลอดโดยใช้สูตร % Hemolysis = (O.D. test / O.D. 0% NaCl) x 100 และเขียนกราฟแสดง % Hemolysis กับความเข้มข้นของ NaCl เพื่อหาค่า Median corpuscular fragility (MCF) หรือความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50% (50%Hemolysis) โดยเม็ดเลือดแดงปกติจะมีค่า MCF เท่ากับ 0.40-0.45% NaCl หากค่า MCF > 0.45% NaCl แสดงว่าเม็ดเลือดแดงสามารถแตกได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นมากกว่าปกติ (Increased osmotic fragility) หากค่า MCF < 0.40% NaCl แสดงว่าเม็ดเลือดแดงสามารถแตกได้ในน้ำเกลือที่มีความเข้มข้นน้อยกว่าปกติ (Decreased osmotic fragility)

ทดสอบการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นในเม็ดเลือดแดงผ่านกระบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น[13]

การเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไขมัน (lipid peroxidation) โดยสารอนุมูลอิสระ เป็นตัวบ่งชี้การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นของเซลล์ เมื่อเกิดกระบวนการดังกล่าวจะทำให้ได้สารมาลอนไดแอลดีไฮด์ (Malondialdehyde: MDA) เป็นผลิตภัณฑ์ ซึ่งสารดังกล่าวตรวจวัดได้โดยนำตัวอย่างเลือดที่ต้องการทดสอบมาปั่นด้วยความเร็ว 1,800 xg เป็นเวลา 5 นาที นำส่วนใสที่ได้และสารมาตรฐาน 1, 1, 3, 3-Tetramethoxypropane (TMP) ความเข้มข้น 1.25, 2.5, 5, 10, 20 และ 40 μM 250μL ผสมกับ 0.2% Butylated hydroxytoluene(BHT) ใน Ethanol 25μL และ 0.44 M H_3PO_4 ในน้ำกลั่น 750 μL ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม 0.6% Thiobarbituric acid (TBA) ในน้ำกลั่น 250 μLและนำไปอุ่นในน้ำอุณหภูมิ 90°C เป็นเวลา 30 นาที ครบเวลานำไปแช่ในน้ำเย็นเป็นเวลา 10 นาที จากนั้นเติม n-Butanol 2 mL ผสมให้เข้ากัน แล้วนำไปปั่นที่ 1,900 xg เป็นเวลา 10 นาที ดูดชั้น n-Butanol ใส่ในหลอดอ่านชนิดแก้ว นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 532 nm หาค่าความเข้มข้นของ MDA โดยนำ OD ที่ได้ไปเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การรายงานผลและการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลการทดสอบเป็นค่าเฉลี่ย (Mean) ของตัวอย่างเลือด 10 ราย และค่าคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Standard error of mean: SE) (Mean ± SE) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติโดยเปรียบเทียบผลของเซลล์เม็ดเลือดแดงปั่นล้างที่บ่มกับไกลโฟเสทที่ระดับความเข้มข้นต่างกันกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติ Independent sample t-test

ผลการศึกษา

ฤทธิ์ของไกลโฟเสท 48 ต่อการเปลี่ยนแปลงค่าฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และค่าดัชนีของเม็ดเลือดแดง

จากการทดสอบพบว่าสารไกลโฟเสทไม่ส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงค่า Hct และ MCH ของเม็ดเลือดแดงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่พบว่าที่ความเข้มข้น 0.20 และ 0.40 %v/v ไกลโฟเสททำให้ค่า Hb ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) และไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 0.20 %v/v ยังทำให้ค่า MCV เพิ่มขึ้น และค่า MCHC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเชื่อมั่น 95% ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 1)

ฤทธิ์ของไกลโฟเสท 48 ในการเพิ่มความเปราะของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดง

จากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มเซลล์โดยการทำ Osmotic fragility พบว่ากราฟแสดง % Hemolysis เฉลี่ยของไกลโฟเสททุกความเข้มข้นมีลักษณะเบี่ยงขวาตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น (รูปที่ 1) และเมื่อนำไปหาค่าความเข้มข้นของน้ำเกลือที่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก 50% (MCF) พบว่าเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 0.10 %v/v มีค่า MCF เท่ากับ 0.408 ± 0.004 เพิ่มขึ้นอย่างที่นัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 95% ($p<0.05$) และไกลโฟเสทที่ความเข้มข้น 0.20 และ 0.40 %v/v มีค่าเท่ากับ 0.436 ± 0.006 และ 0.567 ± 0.021 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ค่าความเชื่อมั่นที่ 99% ($p<0.01$) เทียบกับกลุ่มควบคุม (ตารางที่ 2) แสดงว่าไกลโฟเสทส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมี increased osmotic fragility

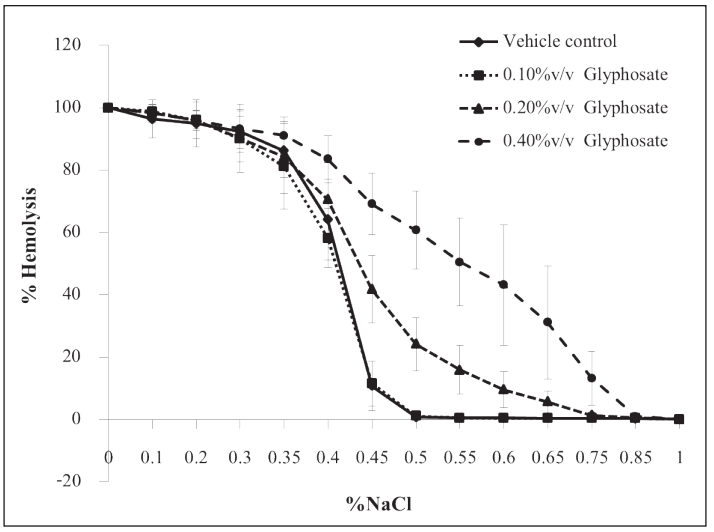
ตารางที่ 1 ค่าเฉลี่ยการตรวจฮีโมโกลบิน ฮีมาโตคริต และดัชนีของเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสทเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control) จำนวน 10 ตัวอย่าง

Test		RBC parameter (Mean ± S.E.)				
		Hb (g/dL)	Hct (%)	MCV (fL)	MCH (pg)	MCHC (g/dL)
Vehicle control		8.38 ± 0.15	27.06 ± 0.39	88.5 ± 2.0	27.46 ± 0.69	31.03 ± 0.17
Glyphosate	0.10 %v/v	8.34 ± 0.14	26.88 ± 0.38	88.9 ± 1.9	27.45 ± 0.68	30.87 ± 0.20
	0.20 %v/v	8.22 ± 0.15*	27.02 ± 0.46	90.3 ± 1.9**	27.50 ± 0.67	30.43 ± 0.24*
	0.40 %v/v	8.21 ± 0.13*	27.81 ± 1.39	88.3 ± 1.9	27.58 ± 0.68	31.21 ± 0.21

หมายเหตุ: Vehicle control = เม็ดเลือดแดงปั่นล้างที่บ่มในน้ำเกลือความเข้มข้น 0.85%, Hb = ฮีโมโกลบิน, Hct = ฮีมาโตคริต, MCV = ขนาดเฉลี่ยของเม็ดเลือดแดง, MCH = ค่าเฉลี่ยน้ำหนักของฮีโมโกลบินต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง และ MCHC = ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของฮีโมโกลบินต่อหนึ่งเม็ดเลือดแดง

* แสดงถึงผลการทดสอบที่มีค่าแตกต่างจากกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** แสดงถึงผลการทดสอบที่มีค่าแตกต่างจากกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)



รูปที่ 1 กราฟแสดง % Hemolysis ของเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control) เมื่ออยู่ในน้ำเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆ

ฤทธิ์ของไกลโฟเสท 48 ต่อการเหนี่ยวนำให้เม็ดเลือดแดงเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นผ่านการบวนการลิปิดเปอร์ออกซิเดชั่น

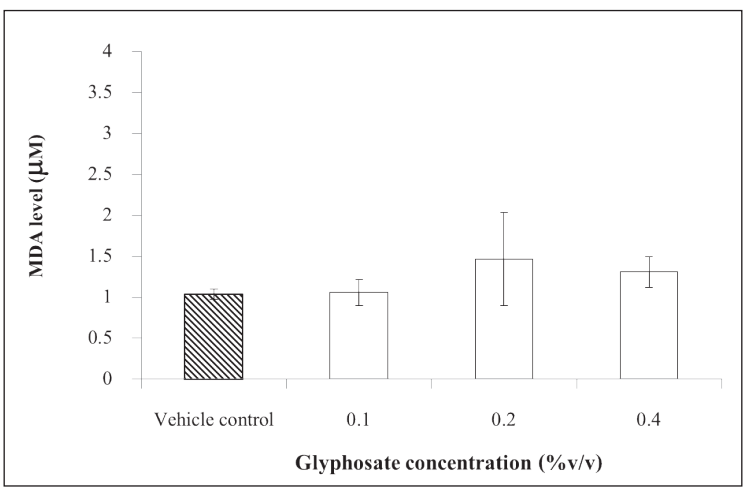
สารมาลอนไดแอลดีไฮด์ (MDA) ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระไปทำลายโมเลกุลไขมันไม่อิ่มตัวเป็นตัวบ่งชี้การเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น จากผลการทดสอบพบว่าเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสทความเข้มข้น 0.10, 0.20 และ 0.40 %v/v มีค่าเฉลี่ยปริมาณ MDA เท่ากับ 1.06 ± 0.16, 1.46 ± 0.57 และ 1.31 ± 0.19 μM ตามลำดับ ซึ่งพบว่ามีแนวโน้มเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปที่ 2)

ตารางที่ 2 ค่า Median corpuscular fragility (MCF) ของเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสทเทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control) จำนวน 10 ตัวอย่าง

Test		Median corpuscular fragility (MCF) (Mean ± S.E.)
Vehicle control		0.420 ± 0.003
Glyphosate	0.10 %v/v	0.408 ± 0.004*
	0.20 %v/v	0.436 ± 0.006**
	0.40 %v/v	0.567 ± 0.021**

* แทนค่าการแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

** แทนค่าการแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.01$)



รูปที่ 2 กราฟแท่งแสดงระดับ MDA ของเม็ดเลือดงที่บ่มกับไกลโฟเสทที่ความเข้มข้นต่างๆ เทียบกับกลุ่มควบคุม (vehicle control)

วิจารณ์

ไกลโฟเสทที่มีจำหน่ายในประเทศไทยส่วนใหญ่มักอยู่ในรูปของ glyphosate isopropylammonium โดยมีปริมาณเท่ากับ 48 g/L และผสมกับสารลดแรงตึงผิว polyoxyethyleneamine (POEA) ซึ่งมีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 ถึง 21% (ในราวน์อัพมีประมาณ 15%) เพื่อช่วยให้สารออกฤทธิ์สัมผัสกับใบพืชได้มากขึ้น อย่างไรก็ตามผู้ผลิตแต่ละบริษัทอาจมีการปรับปริมาณหรือชนิดของเกลือไกลโฟเสท และสารลดแรงตึงผิวส่งผลให้คุณภาพและความเป็นพิษของสารไกลโฟเสทแต่ละยี่ห้อมีความแตกต่างกัน ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของระบบอวัยวะต่างๆ ของผู้ที่สัมผัสสารดังกล่าว ในการศึกษานี้ผู้วิจัยจึงได้ทำการประเมินฤทธิ์ของไกลโฟเสท 48 ต่อความเสียหายของเม็ดเลือดแดง ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการขนส่งออกซิเจน โดยการตรวจประเมินค่าฮีโมโกลบิน (Hb) ฮีมาโตคริต (Hct) และดัชนีของเม็ดเลือดแดง (MCV, MCH และ MCHC) รวมทั้งการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นซึ่งอาจเป็นกลไกลหนึ่งที่ทำให้เกิดความเสียหายของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ในหลอดทดลอง โดยไกลโฟเสทที่ใช้ในการทดสอบนี้มีปริมาณของสารออกฤทธิ์ไกลโฟเสทตามสูตรมาตรฐาน (glyphosate 480 g/L) และมีปริมาณของสารลดแรงตึงผิวอยู่ที่ประมาณ 10% (บริษัทผู้ผลิตไม่ได้ระบุชนิดและปริมาตรที่แน่นอนของสารลดแรงตึงผิว แต่มีการระบุว่าเป็นชนิดทนฝน ซึ่งแสดงว่ามีการเพิ่มปริมาณสารลดแรงตึงผิวจากปริมาณปกติ) และได้ทำการเตรียมความเข้มข้นของไกลโฟเสทเป็น 0.1, 0.2 และ 0.4 %v/v (1,440, 2,880, 5,760 ppm) โดยอ้างอิงจากที่ผู้ผลิตได้ระบุไว้บนฉลาก (ไกลโฟเสท 400-480 mL ผสมน้ำ 60-80 ลิตร) และจากการศึกษาของ Rodigues และคณะ[7] และ Bukowska และคณะ[11] จากนั้นบ่มกับเม็ดเลือดแดงที่ 37°C เป็นเวลา 3 ชั่วโมงซึ่งพบว่าความเข้มข้นและเวลาดังกล่าวไม่ทำให้เม็ดเลือดแดงแตก จึงเลือกใช้ความเข้มข้นดังกล่าวในการบ่มเซลล์ก่อนนำไปทำการทดสอบอื่นๆ

จากการประเมินค่า Hb, Hct, MCV, MCH และ MCHC ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้คุณภาพของเม็ดเลือดแดง พบว่าเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสททุกความเข้มข้นมีค่า Hb และ MCHC ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาในปลา *cyprinus carpio* ที่ได้รับราวน์อัพ 3-14 ppm เป็นเวลา 7 วัน[14] และหนู albino Swiss ที่ได้รับราวน์อัพ 50 และ 500 mg/kg เป็นเวลา 60 วัน[8] โดยสัตว์ทดลองมีค่า RBC count, Hb, Hct และ MCHC ลดลง และมีค่า MCV เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่าที่เปลี่ยนแปลงนี้อาจเกิดจากสารไกลโฟเสท[8,14,15] และ/หรือสารลดแรงตึงผิว polyoxyethyleneamine (POEA) ซึ่งเป็นตัวเสริมความเป็นพิษ[14,16] สามารถเข้าสู่เซลล์และไปทำลายโครงสร้างของฮีโมโกลบินโดยตรงทำให้ทั้งความเข้มข้นของฮีโมโกลบินภายในหนึ่งเม็ดเลือดแดงลดลง (MCHC) ส่งผลให้ปริมาณฮีโมโกลบินรวม (Hb) ลดลงไปด้วย ซึ่งการลดลงของฮีโมโกลบินในร่างกายเป็นปัจจัยหนึ่งที่ทำให้เกิดภาวะโลหิตจางในมนุษย์และสัตส่วนปริมาตรของเม็ดเลือดแดง (MCV) ที่เพิ่มขึ้นคาดว่าเกิดจากพิษโดยตรงของไกลโฟเสทและสารลดลงตึงผิวเช่นกันแต่ด้วยกลไกที่ต่างกัน โดยในสัตว์ทดลองพบว่าเกิดจากไขกระดูกเร่งสร้างเม็ดเลือดแดงตัวอ่อนทดแทนเม็ดเลือดแดงที่เสียหายทำให้พบเซลล์ขนาดใหญ่[7,17] ในขณะที่การศึกษานี้เม็ดเลือดแดงถูกบ่มกับไกลโฟเสทโดยตรง ขนาดของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจึงอาจเกิดจากการบวมน้ำ เนื่องจากสารอาจไปรบกวนโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สูญเสียการเป็นเยื่อเลือกผ่าน น้ำจึงแพร่เข้าสู่เซลล์ได้มากกว่าปกติ

เพื่อศึกษาความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์จึงทำการทดสอบ osmotic fragility ซึ่งเป็นการศึกษาความเปราะของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงเมื่ออยู่ในสารละลายน้ำเกลือที่ความเข้มข้นต่างๆโดยพบว่า % hemolysis ของเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสทมีลักษณะเบี่ยงขวา (รูปที่ 1) สอดคล้องกับค่า MCF ที่เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติแสดงให้เห็นว่าไกลโฟเสทที่ใช้ในการทดสอบมีฤทธิ์ทำให้เยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงมีความเปราะส่งผลเม็ดเลือดแดงจึงแตกได้ง่ายแม้อยู่ในสารละลายที่มีความเข้มข้นเกลือสูง สอดคล้องกับค่า MCV ที่เพิ่มสูงขึ้น ซึ่งคาดว่าเกิดจากมีความผิดปกติของเยื่อหุ้มเซลล์โดยความเสียหายที่เกิดขึ้นอาจเป็นผลมาจากพิษของสารไกลโฟเสทโดยตรงหรือสารลดแรงตึงผิวหรือสารทั้งสองชนิดร่วมกัน แต่จากการศึกษาของ Rodigues และคณะ[7]รายงานว่าราวน์อัพ (glyphosate 480 g/L) ที่ความเข้มข้น 31.725 ± 3.03 μL/dL (313 ppm) ทำให้เม็ดเลือดแดงมนุษย์แตก 50% (D_{50}) เมื่อบ่มเป็นเวลา 30 นาที และ Bukowska และคณะ[11] รายงานว่าราวน์อัพอัลตร้า 360 SL (glyphosate isopropyloamino salt 360 g/L) ที่ความเข้มข้น 500 ppmทำให้เม็ดเลือดแดงมนุษย์แตกได้ 11.12 ± 6.93% เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารหรือเวลาที่เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ต่างจากการศึกษานี้ที่ความเข้มข้นสูงสุดของไกลโฟเสทที่เลือกใช้ (0.4 %v/v หรือ 5,760 ppm) ไม่พบว่ามีผลทำให้เม็ดเลือดแดงแตกเมื่อบ่มเป็นเวลา 3 ชั่วโมง แสดงว่าการสัมผัสสารโดยตรงในระยะสั้นหรือที่ความเข้มข้นต่ำ ไกลโฟเสทที่ใช้ในการทดสอบน่าจะมีฤทธิ์เพียงก่อให้เกิดความเสียหายต่อของโครงสร้างของเยื่อหุ้มเซลล์ โดยมีผลต่อการลดความยืดหยุ่น

ของเซลล์โดยไปทำให้องค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ผิดปกติ ส่งผลให้เม็ดเลือดแดงมีความสามารถในการเปลี่ยนรูปร่างได้น้อยลง (deformability) ทำให้มีโอกาสแตกได้ง่ายกว่าเซลล์ปกติหากอยู่ในร่างกาย เม็ดเลือดแดงที่มีความเปราะนี้จะทำให้ถูกทำลายได้ง่ายกว่าปกติทั้งในหลอดเลือด และจากอวัยวะที่ทำหน้าที่กำจัดเม็ดเลือดแดง เช่น ม้าม ซึ่งเป็นอีกสาเหตุหนึ่งที่อาจนำไปสู่ภาวะโลหิตจาง[18]

ไกลโฟเสทมีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เซลล์สร้างสารอนุมูลอิสระในกลุ่ม Reactive Oxygen Species (ROS)[10,19,20] และกดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระ เช่น GSH[8] ซึ่งความไม่สมดุลของสารเหล่านี้อาจส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น (oxidative stress) และก่อให้เกิดความเสียหายกับสารชีวโมเลกุลเช่น ไขมัน และโปรตีน[21] ซึ่งเม็ดเลือดแดงเป็นเซลล์ที่ประกอบด้วยเยื่อหุ้มเซลล์ ฮีโมโกลบิน และเอนไซม์ แต่ไม่มีไมโตคอนเดรียทำให้ถูกทำลายโดยสารอนุมูลอิสระได้ง่ายโดยเฉพาะส่วนของเยื่อหุ้มเซลล์ซึ่งมีกรดไขมันชนิดไม่อิ่มตัวเป็นจำนวนมากและไวต่อการเกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่นโดย ROS[22] การทดสอบนี้จึงทำการวัดปริมาณ MDA ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระไปทำลายโครงสร้างไขมันเพื่อประเมินการเกิดอนุมูลอิสระเบื้องต้น ซึ่งหลายการศึกษาบ่งชี้ว่าราวน์อัพสามารถเหนี่ยวนำให้เกิด lipid peroxidation ในเซลล์ตับหนู[8]กล้ามเนื้อ กระเพาะ และตับปลา[23] และเพื่อหาสาเหตุของความเสียหายของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงโดยจากการศึกษานี้พบว่าเม็ดเลือดแดงที่บ่มกับไกลโฟเสททุกความเข้มข้นมีปริมาณ MDA เฉลี่ยเพิ่มขึ้นเพียงเล็กน้อยต่างจากการศึกษาของ Bukowska และ คณะที่ราวน์อัพอัลตร้า 360SL ทำให้เม็ดเลือดแดงมีปริมาณ MDA เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ความเข้มข้น 500 ppm[11] ซึ่งอาจเกิดจากปริมาณหรือชนิดของสารไกลโฟเสทและสารลดแรงตึงผิวที่ต่างกัน[19] นอกจากนี้เมื่อนำค่า MDA ที่ได้มาเปรียบเทียบกับค่า MCF พบว่าไม่สอดคล้องกัน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าการเสียสภาพของเยื่อหุ้มเม็ดเลือดแดงนอกจากความเป็นพิษของสารโดยตรงและการเกิดออกซิเดชั่นของไขมัน ยังอาจเกิดจากการเกิดออกซิเดชั่นของโปรตีนจากอนุมูลอิสระ เช่น ไฮดรอกซิล (OH^-) ซึ่งมีประสิทธิภาพสูงในการทำลายทั้งโปรตีนและไขมัน[22] โดยโปรตีนเป็นส่วนประกอบสำคัญเยื่อหุ้มเซลล์ รวมทั้งฮีโมโกลบิน และเอนไซม์ของเม็ดเลือดแดง ดังนั้นความเสียหายของโครงสร้างโปรตีนจากปฏิกิริยาออกซิเดชั่นจึงส่งอาจผลกระทบอย่างมากต่อเซลล์

จากผลการทดสอบทั้งหมดจะเห็นว่าไกลโฟเสท 48 สามารถทำลายทั้งฮีโมโกลบินและเยื่อหุ้มเซลล์เม็ดเลือดแดงได้ในระยะเฉียบพลันซึ่งองค์ประกอบดังกล่าวมีความสำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการขนส่งออกซิเจนในร่างกาย จึงเป็นไปได้ว่าการได้รับไกลโฟเสท 48 ในปริมาณที่มากแบบเฉียบพลัน หรือในระยะยาวอาจส่งผลต่อการทำลายเม็ดเลือดแดงและนำไปสู่ภาวะโลหิตจางได้ อย่างไรก็ตามในการศึกษานี้ไม่ได้ทำการทดสอบความเสียหายของโปรตีนโดยอนุมูลอิสระ ดังนั้นเพื่อให้สามารถอธิบายกลไกการทำลายเม็ดเลือดแดงได้อย่างถูกต้องมากขึ้น จึงอาจต้องมีการศึกษากลไกดังกล่าวเพิ่มเติมรวมทั้งควรมีการศึกษาเฉพาะฤทธิ์ของสารลดแรงตึงผิวที่ใช้เป็นส่วนผสมเนื่องจากสารไกลโฟเสท (N-(phosphonomethyl) glycine) ออกฤทธิ์โดยการยับยั้ง shikimic acid metabolic pathway ซึ่งพบได้เฉพาะในพืช จึงอาจส่งผลให้มีความเป็นพิษต่ำในสัตว์ทดลอง[24] โดยไกลโฟเสทมีค่า LD50 จากการรับประทานโดยเฉียบพลันในหนู (rat) เท่ากับ 5,600 mg/kg นอกจากนี้สารไกลโฟเสทบริสุทธิ์ฤทธิ์ในการทำลายเม็ดเลือดแดงต่ำเมื่อเทียบกับสารเมตาบอไลท์และสารอื่นที่เติมลง[19, 20, 24-26] ในขณะที่สารลดแรงตึงผิว POEA พบว่ามีค่า LD50 ในหนูเท่ากับ 1,200 mg/kg 12 แสดงถึงความเป็นพิษของ POEA ที่มากกว่า[27] รวมทั้งมีหลายการศึกษารายงานว่าสาร POEA สามารถทำให้เกิดความผิดปกติที่ระบบทางเดินอาหาร ระบบประสาทส่วนกลาง กดการทำงานของหัวใจ และมีฤทธิ์ในการแตกเม็ดเลือดแดง[27] จึงมีความเป็นไปได้สูงว่าความเสียหายของเม็ดเลือดแดงน่าจะเกิดจากสารลดแรงตึงผิวเป็นหลัก

ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษานี้สามารถนำมาใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความเป็นพิษของสาร ที่จะเป็นประโยชน์แก่ผู้บริโภค เพื่อเสริมความตระหนักถึงอันตรายจากการใช้สารในกลุ่มดังกล่าว รวมถึงอาจเป็นประโยชน์ในการพัฒนายาเพื่อป้องกันหรือรักษาพิษที่เกิดจากไกลโฟเสททั้งในเม็ดเลือดแดงและเซลล์อื่นๆ ต่อไป อย่างไรก็ตามแม้ในปัจจุบันการใช้สารป้องกันและกำจัดวัชพืชโดยเฉพาะไกลโฟเสทจะมีรายงานความเป็นพิษต่อคนและสัตว์ การใช้สารดังกล่าวเพื่อช่วยในการเพิ่มผลผลิตทางการเกษตรก็ยังคงแพร่หลาย และมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นทุกปีดังนั้นผู้ที่ใช้สารเหล่านี้จึงควรศึกษาวิธีการใช้และปฏิบัติตามคำแนะนำของผู้ผลิตอย่างเคร่งครัด รวมทั้งรู้จักวิธีเป้องกันตนเองเบื้องต้นอย่างถูกต้องทุกครั้งที่มีการสัมผัสสาร เช่น การสวมเสื้อผ้าที่มิดชิด และมีเครื่องป้องกัน ได้แก่ถุงมือ ถุงเท้า รองเท้าบู๊ท อุปกรณ์ปิดปากและจมูก และแว่นตา[28] เพื่อลดโอกาสการรับพิษจากไกลโฟเสททั้งในระยะสั้นและระยะยาวต่อไป

สรุป

สารไกลโฟเสท 48 (glyphosate 480 g/L) มีฤทธิ์ในการทำลายฮีโมโกลบิน และโครงสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ของเม็ดเลือดแดงมนุษย์ในหลอดทดลองรวมทั้งยังสามารถกระตุ้นให้เซลล์เกิดภาวะเครียดออกซิเดชั่น โดยส่วนหนึ่งผ่านการทำลายไขมันโดยอนุมูลอิสระ ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งความเสียหายของเม็ดเลือดแดงที่เกิดขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ถึงความสามารถของไกลโฟเสทในการเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะโลหิตจาง

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบพระคุณงบประมาณการร่วมทุนระหว่างมหาวิทยาลัยพะเยาและสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (มพ.-สกว.) ที่ได้สนับสนุนทุนอุดหนุนการวิจัยโครงการวิจัยเพื่อพัฒนาเชิงพื้นที่ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 และขอขอบคุณอาสาสมัครที่เข้าร่วมโครงการทุกท่าน

เอกสารอ้างอิง

1. Oae.go.th [homepage on the Internet]. Bangkok: Office of Agricultural Economics [cited Oct 1, 2016].Available from: http://www.oae.go.th/ewt_news.php?nid=146
2. Siripanich S. Situation and health effects related to pesticides, 2013. Weekly Epidemiological Surveillance Report 2013; 44: 689-92.
3. Environmental Protection Agency U.S. Pesticide Tolerance for Glyphosate, Federal Register 1992; 57: 8739-40.
4. Watts M. Glyphosate : Addendum 2012 [monograph on internet]. Pesticide Action Network Asia and the Pacific [cited Oct 13, 2016]. Available from: http://www.panap.net/en/p/post/pesticides-info-database/115
5. Malik J, Barry G, Kishore G. The herbicide glyphosate. Biofactors 1989; 2: 17-25.
6. Williams GM, Kroes R, Munro IC. Safety evaluation and risk assessment of the herbicide Roundup and its active ingredient, glyphosate, for humans. Regul Toxicol Pharmacol 2000; 31: 117-65.
7. Rodrigues HG, Penha-Silva N, Pereira de Araujo MF, Nishijo H, Aversi-Ferreira TA. Effects of Roundup® pesticide on the stability of human erythrocyte membranes and micronuclei frequency in bone marrow cells of Swiss mice. Open Biol J 2011; 4: 54-9.
8. Jasper R, Locatelli GO, Pilati C,Locatelli C. Evaluation of biochemical, hematological and oxidative parameters in mice exposed to the herbicide glyphosate-Roundup®. Interdiscip Toxicol. 2012; 5: 133-40.
9. Nwani CD, Nagpure NS, Kumar R,Kushwaha B, Lakra WS. DNA damage and oxidative stress modulatory effects of glyphosate-based herbicide in freshwater fish, Channa punctatus. Environ Toxicol Pharmacol 2013; 36: 539-47.
10. Costa MJ, Monteiro DA, Oliveira-Neto AL, et al. Oxidative stress biomarkers and heart function in bullfrog tadpoles exposed to Roundup original®. Ecotoxicology 2008; 17: 153-63.
11. Bukowska B, Pieniazek D, Duda W. Effect of Roundup on human erythrocytes. Curr Top Biophys 2002; 26: 245-9.
12. William WJ, Beutler E, Erslev AL, eds. Hematology. 4th ed. New York: McGraw-Hill public company; 1990.
13. The society for free radical research-Thai (SFRR-Thai). Techniques in the analysis of free radicals, antoxidants and oxidative stress markers. Chiang Mai: Nopburee Press Company, 2555.
14. Gholami-Seyedkolaei SJ, Mirvaghefi A, Farahmand H, et al. Effect of a glyphosate-based herbicide in *Cyprinus carpio*: Assessment of acetylcholinesterase activity, hematological responses and serum biochemical parameters. Ecotoxicol Environ Saf 2013; 98: 135-41.
15. Svobodova Z, Groch L, Flajshans M, Vykusova B, Machova J. The effect of long-term therapeutic bath of malachite green on common carp (*Cyprinus carpio* L). ActaVet Brno 1997; 66: 111-7.
16. Bradberry SE, Proudfoot AT, Vale JA. Glyphosate poisoning. Toxicol Rev 2004; 23: 159-67.
17. Saravanan M, Kumar KP, Ramesh M. Haematological and biochemical responses of fresh water teleost fish *Cyprinus carpio* (Actinopterygii: Cyprini-formes) during acute and chronic sublethal exposure to lindane. Pestic Biochem Physiol 2011; 100: 206-11.
18. Bunn HF, Lux ES. Hemolytic disorders of the red cell membrance and red cell metabolism. In: Bunn HF, Aster JC editors. Hematologic pathophysiology. New York: McGraw-Hill, 2006: 110-21.
19. Pieniazek D, Bukowska B, Duda W. Comparison of the effect of Roundup Ultra 360 SL pesticide and its active compound glyphosate on human erythrocytes. Pestic Biochem Physiol 2004; 79: 58-63.
20. Kwiatkowska M, Huras B, Bukowska B. The effect of metabolites and impurities of glyphosate on human erythrocytes (*in vitro*). Pestic Biochem Physiol 2014; 109: 34-43.
21. The society for free radical research-Thai (SFRR-Thai). Free radicals and antioxidants. Chiang Mai: Smart coating and services; 2555.

22. Kruidenier L, Versoaget HW. Review article: oxidative stress as a pathogenic factor in inflammatory bowel disease--radicals or ridiculous. Aliment Pharmacol Ther 2002; 16: 1997-2015.
23. Sawada Y, Nagai Y, Ueyama M, Yamamoto I. Probable toxicity of surface-active agent in commercial herbicide containing glyphosate. Lancet 1988: 331: 299.
24. Harayashikia CAY, Juniorb ASV, Machado AAS, Cabrerad LC, Primeld EG, Bianchini A, et al. Toxic effects of the herbicide Roundup in the guppy *Poecilia vivipara* acclimated to fresh water. Aquat Toxicol 2013; 142-143: 176-84.
25. Martini CN, Gabrielli M, Vila G del C. A commercial formulation of glyphosate inhibits proliferation and differentiation to adipocytes and induces apoptosis in 3T3-L1 fibroblasts. Toxicol In Vitro 2012; 26: 1007-13.
26. Mesnage R, Bernay B, Seralini GE. Ethoxylated adjuvants of glyphosate based herbicides are active principles of human cell toxicity. Toxicology 2012; 313: 122-8.
27. Stella J, Ryan M. Glyphosate herbicide formulation: A potentially lethal ingestion. Emerg Med Australas 2004; 16: 235-9.
28. Sapbamrer R, Damrongsat A, Kongtan P. Health impact assessment of pesticide use in northern thai farmers. J Environ Res 2011; 33: 1-11.