เซลล์สร้างเมือกและโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และการตอบสนองต่อสารดีดีที (ไดคลอโรไดฟีนิลไตรคลอโรอีเทน)

MUCOUS CELL AND PROTEOME PROFILE OF MUCOSAL SECRETION IN THE HOODED OYSTER (*Saccostrea cucullata*) AND THEIR RESPONSES TO DDT (Dichlorodiphenyl trichloroethane)

ปาริชาต สิงห์โตทอง

มหาวิทยาลัยบูรพา

2561

2717058923
BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

59910280_2717058923

เซลล์สร้างเมือกและโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และการตอบสนองต่อสารดีดีที (ไดคลอโรไดฟีนิลไตรคลอโรอีเทน)

2717058923
BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ปาริชาต สิงห์โตทอง

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
2561

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยบูรพา

MUCOUS CELL AND PROTEOME PROFILE OF MUCOSAL SECRETION IN THE HOODED OYSTER (*SACCOSTREA CUCULLATA*) AND THEIR RESPONSES TO DDT (DICHLORODIPHENYL TRICHLOROETHANE)

2717058923
BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

PARICHAT SINGTOTHONG

A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT OF
THE REQUIREMENTS FOR MASTER OF SCIENCE
IN BIOLOGY EDUCATION
FACULTY OF SCIENCE
BURAPHA UNIVERSITY
2018

COPYRIGHT OF BURAPHA UNIVERSITY

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ ปาริชาต สิงห์โตทอง ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วรนพ สุขภารังษี)

..... กรรมการ
(อาจารย์ ดร. วาสินี พงษ์ประยูร)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาชีววิทยาศึกษา ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เอกรัฐ ศรีสุข)
วันที่ 12 เดือน กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2562

2717058923
BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

59910280: สาขาวิชา: ชีววิทยาศึกษา; วท.ม. (ชีววิทยาศึกษา)
คำสำคัญ: เซลล์สร้างเมือก, เมือก, โปรตีโอมิกส์, หอยนางรม, ดีดีที

ปาริชาต สิงห์โตทอง : เซลล์สร้างเมือกและโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และการตอบสนองต่อสารดีดีที (ไดคลอโรไดฟีนิลไตรคลอโรอีเทน). (MUCOUS CELL AND PROTEOME PROFILE OF MUCOSAL SECRETION IN THE HOODED OYSTER (*Saccostrea cucullata*) AND THEIR RESPONSES TO DDT (Dichlorodiphenyl trichloroethane)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: สุทิน กิ่งทอง, ปร.ด. ปี พ.ศ. 2561.

เมือกหลั่งจากเซลล์สร้างเมือก ในหอยสองฝาเมือกมีความสำคัญในการดักจับอนุภาคอาหารและมีปฏิสัมพันธ์กับจุลินทรีย์ที่มากับน้ำ และอาจมีความสำคัญต่อการป้องกันตัวจากสารเคมีปนเปื้อนในแหล่งน้ำอีกด้วย แม้จะมีรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลในหอยบางชนิด แต่ยังไม่พบการศึกษาในหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) งานวิจัยนี้จึงใช้เทคนิคทางมิญชวิทยาศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณแมนเทิล และใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ศึกษาโปรตีนที่หลั่งออกมาในเมือก นอกจากนี้ยังศึกษาบทบาทของเซลล์สร้างเมือกและเมือกต่อการป้องกันตัวจากสารเคมีปนเปื้อนดีดีที ซึ่งเป็นสารพิษที่สะสมในระบบนิเวศทางทะเล ผลการศึกษาพบเซลล์สร้างเมือกจำนวนมากแทรกอยู่ภายในเนื้อเยื่อบุผิวของแมนเทิล ภายในเซลล์สร้างเมือกพบนิวเคลียสที่บริเวณฐานของเซลล์และพบมิวซินแกรนูลจำนวนมากในไซโทพลาซึม ผลการทดสอบด้วยสารดีดีทีพบว่าสารดีดีทีส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อและกระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อบุผิวเพิ่มขึ้น ผลการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคเจลสองมิติพบว่าสารดีดีทีส่งผลต่อปริมาณโปรตีนที่พบในเซลล์สร้างเมือกของกลุ่มทดสอบเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) รวม 14 จุด สามารถระบุชนิดโปรตีนในกลุ่มนี้ได้ 4 จุด โดยพบสารดีดีทีกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน 3 ชนิด ได้แก่ Immunoglobulin kappa constant, Actin และ Sarcoplasmic calcium-binding protein และลดการแสดงออกของโปรตีน Serum albumin แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีนอกจากจะกระตุ้นเซลล์สร้างเมือกและการหลั่งเมือกแล้วยังมีผลต่อโปรตีนในเมือกอีกด้วย ผลจากการศึกษาในครั้งนี้ยืนยันว่านอกจากการดักจับอาหารแล้ว เมือกยังมีความสำคัญต่อกลไกการป้องกันตัวของหอยนางรมจากสารเคมีในน้ำอีกด้วย

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

59910280: MAJOR: BIOLOGY EDUCATION; M.Sc. (BIOLOGY EDUCATION)

KEYWORDS: Mucous cell, Mucus, Proteomics, Oyster, DDT

PARICHAT SINGTOTHONG : MUCOUS CELL AND PROTEOME PROFILE OF MUCOSAL SECRETION IN THE HOODED OYSTER (*SACCOSTREA CUCULLATA*) AND THEIR RESPONSES TO DDT (DICHLORODIPHENYL TRICHLOROETHANE). ADVISORY COMMITTEE: SUTIN KINGTONG, Ph.D. 2018.

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Mucus is secreted from mucous cells. In bivalves, mucus plays important roles in filtering food particles and interacts with waterborne microorganisms. It may also have a protective role to polluted chemicals in water. Although the studies of mucous cell structure in mantle of few species have been reported, none has been conducted in the Hooded oyster (*Saccostrea cucullata*). This work aimed to investigate structure and chemical properties of mucous cell in mantle tissue by using histological techniques. Secreted proteins in mucus were also explored by using proteomic technique. Additionally, protective role of mucous cell and mucus to DDT a polluted chemical in marine environment was also studied. Results showed that the mucous cells were distributed in mantle epithelia. Within mucous cell, nucleus was found at the basement of cell and numerous mucin granules were found in cytoplasm. DDT affected oyster tissue and increased number of mucous cell in mantle. While 2-DE based proteomic results showed that exposure to DDT significantly altered 14 proteins in mucus of treated group compared to the controls ($p<0.05$). Unfortunately, only 4 up-regulated protein spots were successfully identified. The 3 up-regulated proteins were Immunoglobulin kappa constant, Actin and Sarcoplasmic calcium-binding protein while and 1 regulated, Serum albumin was observed. DDT was found to increase number of mucous cell and mucus secretion. Overall, this study confirmed that mucus is not only important for filter feeding but also play an important role to protect oyster from marine environmental pollutant.

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) สถาบันส่งเสริมการสอนวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี (สสวท.) กระทรวงศึกษาธิการ

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา ให้คำแนะนา รวมถึงข้อเสนอที่มีประโยชน์อย่างสูง ตลอดจนการสนับสนุนและให้กำลังใจมาโดยตลอด ทำให้การจัดทำวิทยานิพนธ์บรรลุผลสำเร็จ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. สิทธิรักษ์ รอยตระกูล ที่กรุณาสละเวลาเป็นประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้ความอนุเคราะห์พิจารณาตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. วรนพ สุขภารังษี และอาจารย์ ดร. วาสินี พงษ์ประยูร ที่กรุณาสละเวลาเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ และให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการปรับปรุงแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอกราบขอบพระคุณ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ที่ได้กรุณาให้ความอนุเคราะห์ ให้ใช้ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ตลอดจนให้คำปรึกษา ทำให้การจัดทำวิทยานิพนธ์สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณเพื่อน ๆ และสมาชิกในห้องปฏิบัติการชีววิทยา BS-2110 ที่แบ่งปันข้อมูลระหว่างการจัดทำวิทยานิพนธ์

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นความกตัญญูกตเวทิตาแด่บิดามารดา คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่าน

ปาริชาต สิงห์โตทอง

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย .....ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ .....จ

กิตติกรรมประกาศ.....ฉ

สารบัญ .....ช

สารบัญตาราง .....ฌ

สารบัญภาพ .....ญ

สารบัญภาพ (ต่อ).....ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ.....1

ที่มาและความสำคัญของปัญหา.....1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

สมมติฐานของการวิจัย 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย 3

ขอบเขตการวิจัย.....3

สถานที่ดำเนินงานวิจัย.....4

บทที่ 2 5

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....5

2.1 ชีววิทยาของหอยนางรมปากจีบ 5

2.2 เมือกในสิ่งมีชีวิต 8

2.3 ดีดีที: DDT (Dichlorodiphenyl trichloroethane) 15

2.4 การกำหนดค่าความเป็นพิษของสารดีดีที 24

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

บทที่ 3 26
วิธีดำเนินงานวิจัย.....26
3.1 สัตว์ทดลอง 26
3.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีที.....26
3.3 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ ด้วยเทคนิคทางมิญชวิทยา.....27
3.4 การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์.....27
บทที่ 4 32
ผลการวิจัย 32
4.1 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ 32
4.2 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ 37
4.3 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ.....40
บทที่ 5 48
อภิปรายและสรุปผล 48
5.1 อภิปรายผล 48
5.2 สรุปผลการวิจัย.....59
5.3 ข้อเสนอแนะ.....60
กิตติกรรมประกาศ.....60
บรรณานุกรม.....61
ประวัติย่อของผู้วิจัย 70

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

2 - 1 ค่าความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อสัตว์ทดลอง 25
4 - 1 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน 43
4 - 2 การระบุชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบ 46

2717058923
BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

2 - 1 ลักษณะเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ……...7

2 - 2 ลักษณะลำตัวภายในเปลือกหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ……..7

2 - 3 ทิศทางการไหลของกระแสน้ำขณะเกิดกระบวนการกินแบบกรองกินในหอยนางรม ……...7

2 - 4 เซลล์โกลเบล็ตหรือเซลล์สร้างเมือกที่พบในปลากดหมูริต้า (*Rita rita*) ……...10

2 - 5 โครงสร้างของมิวซิน ……...11

2 - 6 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยสองฝา ซึ่งอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิว ……12

2 - 7 โครงสร้างของเนื้อเยื่อในชั้นแมนเทิล และเหงือกของหอยนางรมปากจีบ ……..13

2 - 8 โปรตีนในเมือกที่หลั่งออกมาจากพาเลียลออร์แกน ……15

2 - 9 โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT ……17

2 - 10 โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT เมื่อถูกเปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์ DDD และ DDE ……...17

2 - 11 ปริมาณของดีดีที ที่สะสมอยู่ในหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) …….....21

2 - 12 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในแมลงวันผลไม้ (*Drosophila melanogaster*) 23

3 - 1 ขั้นตอนการกำจัดเกลือ (Desalting) ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices……..28

4 - 1 เนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ตัดตามขวาง.....33

4 - 2 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ...……...…….34

4 - 3 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลด้านนอกที่ติดกับเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ...……...…….35

4 - 4 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลด้านนอกที่ติดกับเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 ……...36

4 - 5 กราฟอัตราการตายสะสมของหอยนางรมปากจีบ ที่เวลา 96 ชั่วโมง ……...37

4 - 6 กราฟการวิเคราะห์ค่า LC50 ……38

4 - 7 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลด้านนอกที่ติดกับเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ที่เวลา 96 ชั่วโมง ……...39

4 - 8 ผลการวิเคราะห์โปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ ……41

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่ **หน้า**

4 - 9 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายโปรตีน 44
5 - 1 ไดอะแกรมของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ 49

2717058923
BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

หอยนางรมจัดอยู่ในชั้นของหอยสองฝา ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่สำคัญและเป็นที่ต้องการของท้องตลาด เนื่องจากหอยนางรมมีคุณค่าทางโภชนาการสูงมาก ทั้งธาตุสังกะสีที่ช่วยบำรุงสายตา วิตามินบี 12 โอเมกาสาม (omega-3) และธาตุเหล็กที่ช่วยการทำงานของสมอง และหอยนางรมยังมีปริมาณโปรตีนสูง นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าหอยนางรมมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบนิเวศทางทะเล เพราะดำรงชีวิตโดยการเกาะติดอยู่กับที่ (sessile organism) จึงเปรียบเสมือนแนวปราการกันคลื่น ช่วยลดความแรงของคลื่นทำให้เกิดการตกตะกอนที่คงที่ และเป็นแหล่งที่อยู่อาศัยสำคัญของตัวอ่อนสัตว์น้ำที่มีความสำคัญที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ (Grabowski et al., 2012) จึงจัดเป็นการรักษาเสถียรภาพของระบบนิเวศบริเวณชายฝั่ง แต่จากการที่หอยนางรมดำรงชีวิตด้วยการกรองกิน (filter-feeding) โดยเกิดกระบวนการกรองกินบริเวณช่องพาเลียล (pallial cavity) อันประกอบด้วยเหงือก (gill) แมนเทิล (mantle) และแผ่นปาก (labial palp) ซึ่งบริเวณเหล่านี้ถูกปกคลุมไปด้วยเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือก (mucous cell) เมือกเป็นสารประกอบโมเลกุลใหญ่ที่เรียกว่ามิวซิน (mucin) มีไกลโคโปรตีน (glycoprotein) เป็นองค์ประกอบหลัก ขณะเกิดกระบวนการกรองกินนี้อาจเกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ และปรสิตที่ปะปนมากับการไหลของกระแสน้ำ นำไปสู่การติดเชื้อและก่อโรคในหอย มีรายงานว่าเมื่อหอยนางรมได้รับสารทีบีที (TBT) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50 และ 150 µg/l ตามลำดับ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง พบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสารทีบีทีที่สูงขึ้นจะกระตุ้นให้เซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือก และแมนเทิล มีการขยายขนาดของเซลล์ และมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้นตามไปด้วย (Khondee et al., 2016) แต่ยังไม่มีการรายงานของข้อมูลที่แน่ชัดถึงลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรม และโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรม ผู้วิจัยจึงมีความสนใจที่จะศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และโปรตีนที่พบในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากหอยนางรม ด้วยเทคนิคมิญชวิทยา และเทคนิคโปรตีโอมิกส์ ตามลำดับ โดยผู้วิจัยจะศึกษาถึงผลกระทบที่อาจทำให้ลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และโปรตีนที่พบในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากหอยนางรมเปลี่ยนแปลงไป เมื่อหอยนางรมได้รับสารดีดีที (DDT : Dichlorodiphenyl trichloroethane) เนื่องจากประเทศไทยมีการอนุญาตให้ใช้สารดีดีทีอีกครั้งในภาคสาธารณสุข เพราะสารดีดีทีมีคุณสมบัติในการกำจัดแมลงที่ดี จึงใช้ในการกำจัดยุง และราคาไม่แพง หากนำสารดีดีทีมาใช้ในภาคการเกษตรจะทำให้เกิดการ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ตกค้างในดิน ทำให้โครงสร้างของดินเสื่อมโทรมลงส่งผลกระทบต่อแหล่งน้ำ เนื่องจากการที่น้ำพัดหน้าดิน การชะล้างของฝน การทิ้งหรือล้างภาชนะที่บรรจุสารเคมีลงสู่แหล่งน้ำก่อให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำสำหรับการอุปโภคและบริโภค ทำให้สิ่งมีชีวิตในน้ำตายลง เป็นพิษกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนม ก่อให้เกิดมะเร็ง รวมถึงตกค้างในสิ่งแวดล้อม แพร่กระจาย และมีการสะสมเพิ่มขึ้นในสัตว์ต่างๆ ตามลำดับชั้นในห่วงโซ่อาหาร ซึ่ง Mcnicholas, Steinmetz, Hunkapiller, Jones, and Hood (1982) พบว่าสารดีดีทีส่งผลกระทบต่อการสูญพันธ์ของนกอินทรีหัวขาว (*Haliaeetus leucocephalus*) ในประเทศสหรัฐอเมริกา ที่ได้รับการคุ้มครองตั้งแต่ปี ค.ศ. 1940 เช่นเดียวกับ Stemmler and Lammel (2009) ได้สร้างแบบจำลองสถานการณ์ทางสิ่งแวดล้อมต่อสารดีดีที พบว่าท้ายที่สุดแล้วสารดีดีทีมีแนวโน้มที่จะสะสมอยู่ในมหาสมุทรมากขึ้น จากข้อมูลการใช้สารดีดีทีประมาณ 1.5 ล้านตันทั่วโลกในช่วงทศวรรษที่ 1940 และ 1970 ทั้งในรูปแบบของยาฆ่าแมลงจากภาคการเกษตร รวมถึงการควบคุมแมลงที่เป็นพาหะของโรคจากภาคสาธารณสุข เช่น ยุง ทั้งนี้สารดีดีทียังส่งผลกระทบต่อการดำรงชีวิตของสัตว์น้ำในวงกว้างอีกด้วย ด้วยเหตุนี้หอยนางรม ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่ดำรงชีวิตด้วยการกรองกิน และเกาะติดอยู่กับที่ จึงได้รับผลกระทบโดยตรงอันเกิดจากการสะสมของการใช้สารดีดีที ดังนั้นการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และโปรตีนที่พบในเมือกที่หลั่งออกมาจากของหอยนางรม จะทำให้เกิดความเข้าใจถึงสรีรวิทยาของเซลล์สร้างเมือก และหน้าที่ของเมือกที่ถูกสร้างและหลั่งออกมาจากหอยนางรมผ่านทางโปรตีนที่พบและระบุได้ อีกทั้งยังเป็นประโยชน์อย่างยิ่งต่องานด้านพิษวิทยา (Toxicology) อีกด้วย

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นการศึกษาหอยนางรมในจังหวัดชลบุรี ซึ่งมีพื้นที่ชายฝั่งทะเลที่ทอดยาว และติดกับอ่าวไทย ทำให้มีการเพาะเลี้ยงหอยนางรมอย่างแพร่หลาย โดยเฉพาะบริเวณแหลมแท่น ตำบลอ่างศิลา อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี จึงจัดเป็นพื้นที่ที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาเกี่ยวกับหอยนางรมเป็นอย่างมาก โดยหอยนางรมที่พบในพื้นที่ได้แก่ หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) และหอยนางรมตะโกรมกรามดำ (*Crassostrea iredalei*) ซึ่งผู้วิจัยได้เลือกทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) เนื่องจากเป็นสายพันธุ์พื้นเมืองที่มีความทนทานต่อสิ่งแวดล้อม และพบได้ทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย เมื่อตัวอ่อนลงเกาะกับวัตถุแล้วจะไม่เคลื่อนที่ตลอดชีวิต จึงดำรงชีวิตโดยการเกาะติดอยู่กับที่ ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำ สารเคมีจะสัมผัสกับหอยนางรมได้โดยตรง อีกทั้งหอยนางรมดำรงชีวิตด้วยการกรองกิน ซึ่งจะกรองเอาอาหารที่ไหลมาพร้อมกับน้ำผ่านทางเหงือกก่อนเข้าสู่ระบบย่อยอาหารต่อไป จึงมีโอกาสที่หอย

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

นางรมจะรับเอาสารตกค้างต่างๆ รวมถึงสิ่งปนเปื้อนจากแหล่งน้ำได้โดยตรง ทั้งนี้หอยนางรมยังสามารถนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหรือโรงเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดสอบสารเคมีได้ง่ายอีกด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)

2. เพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

3. เพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ

สมมติฐานของการวิจัย

1. โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ก่อนและหลังได้รับสารดีดีทีแตกต่างกัน

2. โปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ ก่อนและหลังได้รับสารดีดีทีแตกต่างกัน

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบผลกระทบต่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ในสภาวะที่ได้รับสารดีดีที

2. ทราบชนิดและการแสดงออกของโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ ที่เปลี่ยนแปลงไปเพื่อเป็นแนวทางในการศึกษา biomarker ของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนชนิดดีดีทีต่อไป

3. เพื่อบันทึกเป็นฐานข้อมูลที่มีประโยชน์อย่างยิ่งต่องานทางด้านสรีรวิทยาของหอยนางรมและด้านการควบคุมมลพิษทางน้ำอันเกิดจากกิจกรรมของมนุษย์

ขอบเขตการวิจัย

การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยเลือกหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* จากถิ่นอาศัยในบริเวณ ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี นำมาเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิล ด้วยเทคนิคมิญชวิทยา (Histological

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Techniques) และศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนของเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) จากหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้นที่ประมาณ 10% ของค่า LC50

สถานที่ดำเนินงานวิจัย

1. ห้องปฏิบัติการชีววิทยา BS-2110 ภาควิชาชีววิทยา อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี

2. โรงเพาะเลี้ยงวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

3. ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เลขที่ 54 ถนนกำแพงเพชร 6 แขวงตลาดบางเขน เขตหลักสี่ กรุงเทพมหานคร

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 ชีววิทยาของหอยนางรมปากจีบ

หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) จัดอยู่ใน ไฟลัม Mollusca ชั้น (Class) Bivalvia อันดับ (Order) Ostreoida วงศ์ (Family) Ostreidae ซึ่งสมาชิกในวงศ์ Ostreidae นี้ประกอบด้วยหอยนางรมที่มีความสำคัญทางด้านเศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงพบได้ทั่วโลก 2 สกุล (Genus) ได้แก่ สกุล *Saccostrea* และ *Crassostrea* ยกตัวอย่างเช่น หอยนางรมแปซิฟิก (Pacific oyster), *C. gigas* เป็นหอยนางรมที่มีการเพาะเลี้ยงมากในเขตชายฝั่งทะเลญี่ปุ่น ไต้หวัน และกลุ่มประเทศในแถบยุโรป เช่น ฝรั่งเศส หอยนางรมตะวันออก (Eastern oyster), *C. virginica* ที่พบการเพาะเลี้ยงในแถบชายฝั่งประเทศสหรัฐอเมริกา และหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ที่พบการเพาะเลี้ยงในแถบเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ และพบมากในแถบบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย หอยนางรมเป็นหอยสองฝา ที่ฝาหรือเปลือกทั้งสองข้างมีขนาดไม่เท่ากัน เปลือกล่างหรือเปลือกซ้ายมีขนาดใหญ่และมีลักษณะโค้งเว้า เป็นเปลือกที่ใช้เกาะกับหินหรือวัสดุแข็งเพื่อยึดตัวหอยให้อยู่กับที่ตลอดชีวิต ส่วนเปลือกบนหรือเปลือกขวาจะมีขนาดเล็กและแบนกว่าเปลือกล่าง บริเวณขอบของเปลือกมีรอยหยักที่ไม่สม่ำเสมอ ทำให้ขอบของเปลือกมีลักษณะเป็นจีบ (ภาพที่ 2-1) มักอยู่รวมกันเป็นกลุ่ม ตั้งแต่บริเวณชายฝั่งถึงระดับน้ำลึก 5 เมตร

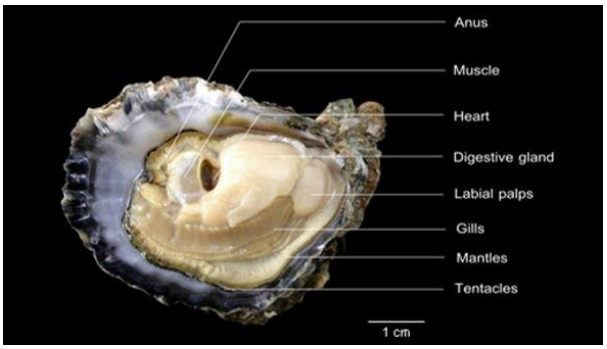
การกินอาหารของหอยนางรมจะอาศัยวิธีการกรองกิน อวัยวะที่ใช้ในกระบวนการกรองกินอาหารนี้คือเหงือก (gill) (ภาพที่ 2-2) จะกรองอาหารจำพวกไดอะตอม (diatom) ซิลิโค-แฟลคเจลเลต (silico-flagellates) และแพลงก์ตอนพืช (phytoplankton) ซึ่งแพลงก์ตอนพืชหรือสาหร่ายจะต้องมีขนาดเล็กตั้งแต่ 3 ถึง 12 ไมครอน จึงสามารถผ่านเข้าสู่ปากได้ (Grabowski et al., 2012) เหงือกของหอยนางรมมีซิเลีย (cilia) อยู่บนซี่เหงือก ซึ่งมีลักษณะคล้ายขนเล็ก ๆ ทำหน้าที่โบกพัดอาหารส่งไปยังแผ่นปาก (labial palps) แล้วจึงส่งต่อมายังปาก ซึ่งเหงือก แผ่นปาก และแมนเทิล (mantle) รวมเรียกเป็นอวัยวะว่าพาเลียล (pallial organs) เนื่องจากหอยนางรมเป็นสัตว์ที่อาศัยอยู่กับที่ จึงเกิดกระบวนการกรองกินอาหารโดยอาศัยน้ำที่ไหลผ่านเข้ามาในช่องแมนเทิล แล้วไหลผ่านต่อไปยังเหงือกก่อนออกไปยังท่อน้ำออก (ภาพที่ 2-3) ซึ่งพาเลียลนี้จะถูกปกคลุมไปด้วยเมือกที่มีความสำคัญต่อกระบวนการกรองกินของหอยนางรม เนื่องด้วยเมือกเป็นตัวช่วยในการดักจับอนุภาคของอาหารหรืออินทรียสารขนาดเล็ก และอาศัยการโบกพัดของแมนเทิลช่วยควบคุมทิศทางการไหลของกระแสน้ำผ่านเหงือกก่อนที่จะผ่านเข้าสู่แผ่นปาก และจะถูกส่งต่อไปยังหลอดอาหารและกระเพาะ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

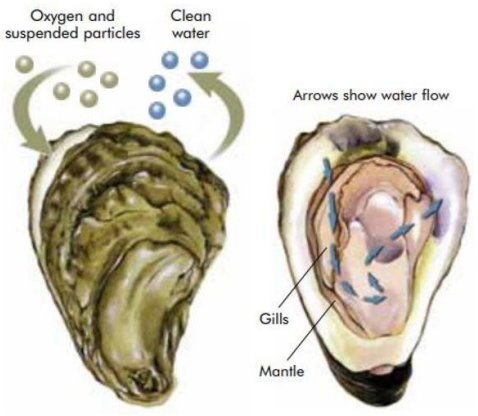
อาหารเพื่อให้หอยนางรมได้ใช้เป็นพลังงานต่อไป สำหรับอนุภาคของสารที่มีขนาดใหญ่จะถูกดักจับไว้ด้วยเมือก และปล่อยออกมาจากช่องแมนเทิล ซึ่งจะถูกชะล้างออกจากบริเวณผิวหน้าของหอยนางรมไปพร้อมกับการไหลของกระแสน้ำอย่างรวดเร็ว โดยอาศัยการเปิดและปิดของเปลือก ระหว่างเกิดกระบวนการกรองกินหอยนางรมจะสามารถกรองน้ำในปริมาณที่ค่อนข้างมาก คือ ประมาณ 1 ถึง 8 แกลลอนต่อชั่วโมง (Choi et al., 2012) ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับขนาดของหอยนางรมและปัจจัยด้านสิ่งแวดล้อม จึงเป็นข้อดีอีกประการหนึ่งของหอยนางรมต่อด้านนิเวศวิทยาที่หอยนางรมสามารถเพิ่มความใสสะอาดของน้ำผ่านการเกิดกระบวนการกรองกิน และกระบวนการนี้จะดำเนินไปได้ด้วยดีและมีประสิทธิภาพก็ต่อเมื่อปริมาณน้ำที่ไหลผ่านเข้าสู่ช่องแมนเทิลมีมากพอ และหอยนางรมต้องอาศัยอยู่ในน้ำตลอดเวลา ดังนั้นหอยนางรมที่ถูกเลี้ยงให้อยู่ในน้ำตลอดเวลา จะมีการเจริญเติบโตที่เร็วกว่าหอยนางรมที่อาศัยอยู่ในระดับน้ำขึ้นน้ำลงที่มีการสัมผัสกับอากาศเป็นบางเวลา ด้วยเหตุนี้เมื่อหอยนางรมมีจำนวนประชากรที่ลดลง จึงส่งผลให้เกิดสภาพน้ำที่ขุ่นมากขึ้นในหลายพื้นที่ ผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนที่พบในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ในการศึกษาครั้งนี้จึงได้มีการเก็บเมือกออกจากเหงือก แมนเทิล และแผ่นปาก ของหอยนางรมปากจีบ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ภาพที่ 2-1 ลักษณะเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)



ภาพที่ 2 - 2 ลักษณะลำตัวภายในเปลือกหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*)



ภาพที่ 2 - 3 ทิศทางการไหลของกระแสน้ำขณะเกิดกระบวนการกินแบบกรองกินในหอยนางรม (Galtsoff, 1964)

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
2717058923

2.2 เมือกในสิ่งมีชีวิต

2.2.1 เมือก (mucus)

เมือก (mucus) เป็นของเหลวที่ลื่นและเหนียว ถูกสังเคราะห์และหลั่งออกมาจากเยื่อบุผิวหลายแห่งของอวัยวะและต่อมในร่างกาย ที่สัมผัสและสื่อสารกับสิ่งแวดล้อมภายนอกเซลล์ สามารถพบเมือกได้ในสิ่งมีชีวิตทุกอาณาจักร (kingdom) สัตว์มีกระดูกสันหลัง (vertebrates) พบชั้นของเมือก (mucus layer) อยู่ตามอวัยวะต่างๆภายในร่างกาย ต่างจากสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำส่วนใหญ่ที่จะพบชั้นของเมือกอยู่ล้อมรอบบริเวณผิวหนัง (skin) (Schumacher et al., 1994) การศึกษาเมือกในสัตว์ที่ไม่มีกระดูกสันหลัง (invertebrates) เช่น ปลาแฮ็กฟิช (hagfish) พบว่าสามารถหลั่งเมือกจำนวนมากออกจากผิวหนังซึ่งใช้เป็นกลไกในการหลบหนีเมื่อถูกล่า (Fudge, 2005) เมือกยังเกี่ยวข้องกับการป้องกันโปรโตซัวที่ทำให้เกิดโรค (pathogenic protozoa) ของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำ และเมือกยังทำหน้าที่ในการทำความสะอาด โดยการดักจับอนุภาคที่มีขนาดใหญ่ ซึ่งอนุภาคที่มีขนาดใหญ่นี้จะติดอยู่ในชั้นของเมือก และสามารถกำจัดออกจากอวัยวะโดยอาศัยการโบกพัดของซิเลีย

2.2.2 การศึกษาเมือกในสิ่งมีชีวิต

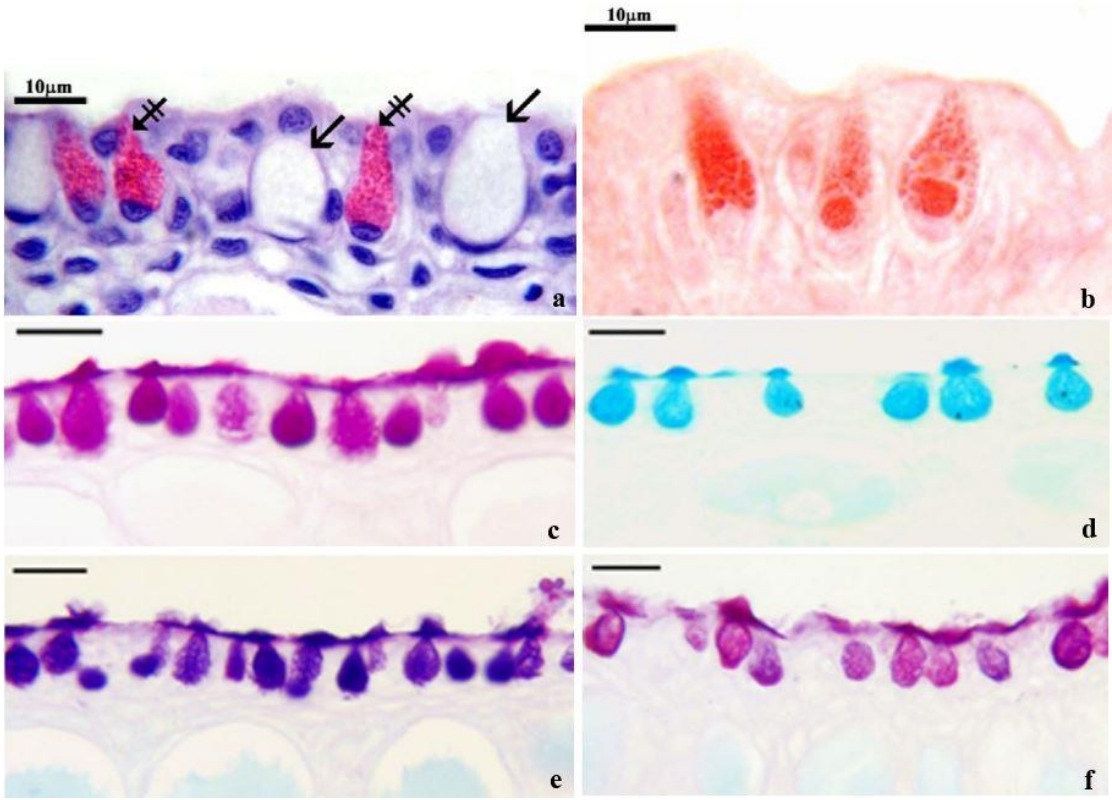
เมือกถูกสร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์โกลเบล็ตหรือเซลล์สร้างเมือก (goblet/mucous cells) เซลล์สร้างเมือกพบได้บริเวณเยื่อบุผิว ส่วนใหญ่เป็นเยื่อบุผิวชนิด ciliated columnar epithelium หรือ pseudostratified columnar epithelium (ภาพที่ 2-4) จากการศึกษาองค์ประกอบของเมือกและเซลล์สร้างเมือก พบว่าเซลล์สร้างเมือกจะสร้างสารโมเลกุลใหญ่ที่มีขนาดประมาณ 200 kDa เรียกว่า มิวซิน (mucin) บรรจุอยู่ในถุงบรรจุมิวซิน (mucin granule) โมเลกุลของมิวซินมีไกลโคโปรตีน (glycoproteins) เป็นองค์ประกอบหลัก ซึ่งประกอบไปด้วยโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ที่เกาะอยู่บนแกนโปรตีน (ภาพที่ 2-5) เมื่อเซลล์สร้างเมือกหลั่งมิวซินออกมาภายนอกเซลล์ด้วยวิธี exocytosis ซึ่งอาจหลั่งได้ทั้งแบบปล่อยออกนอกเซลล์สร้างเมือก โดยมีส่วนของไซโตพลาสซึม และเยื่อหุ้มเซลล์หลุดออกไปด้วย (apocrine) และแบบที่ปล่อยออกนอกเซลล์สร้างเมือก โดยที่เยื่อหุ้มเซลล์ และไซโตพลาสซึมไม่เสียหาย (merocrine) เมื่อโมเลกุลของมิวซินสัมผัสกับน้ำแล้วจะพองตัวขึ้น มีลักษณะลื่นและเหนียวคล้ายเจล ดังนั้นจึงสามารถพบ น้ำ อิเล็กโทรไลท์ (electrolytes) และยังพบสารชีวโมเลกุลจำนวนมาก (Phelps & Dphil, 1978) ในเมือก ตัวอย่างเช่น antimicrobial peptides (Iguchi et al., 1982) , antioxidants (Moraes et al., 2006), proteases (Brun et al., 2000), agglutinins (Fisher, 1992) และ lectins (Itoh et al., 2011)

มีรายงานว่าในสภาวะที่เซลล์สร้างเมือกถูกกระตุ้น ส่งผลให้เซลล์สร้างเมือกสร้างมิวซินแกรนูลเพิ่มขึ้น เช่น ในมนุษย์ เมื่อเซลล์สร้างเมือกบริเวณระบบทางเดินหายใจ ถูกกระตุ้นด้วยฝุ่น

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ละออง ควัน ไวรัส หรือแบคทีเรีย ส่งผลให้เซลล์สร้างเมือกสร้างมิวซินแกรนูลเพิ่มขึ้น จึงเป็นที่มาของอาการน้ำมูกไหลเวลาเป็นหวัด และภายในเซลล์สร้างเมือกจะพบนิวเคลียสและออร์แกเนลล์อื่นอยู่บริเวณฐานของเซลล์ใกล้กับ basement membrane พบมิวซินแกรนูลขนาดใหญ่เต็มพื้นที่ของไซโทพลาสซึมบริเวณด้านบน (apical surface) ของเซลล์สร้างเมือก (Gómez et al., 2014)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



ภาพที่ 2 - 4 เซลล์โกลเบล็ตหรือเซลล์สร้างเมือกที่พบในปลากดหมูริต้า (*Rita rita*)

a. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเยื่อบุผิวภายในช่องปาก (H&E)

b. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเยื่อบุผิวภายในช่องปาก พบว่ามีโปรตีนในเซลล์สร้างเมือก (Acid solochrome Cyanine-R method) scale bar = 20 µm (Yashpal & Mittal, 2014)

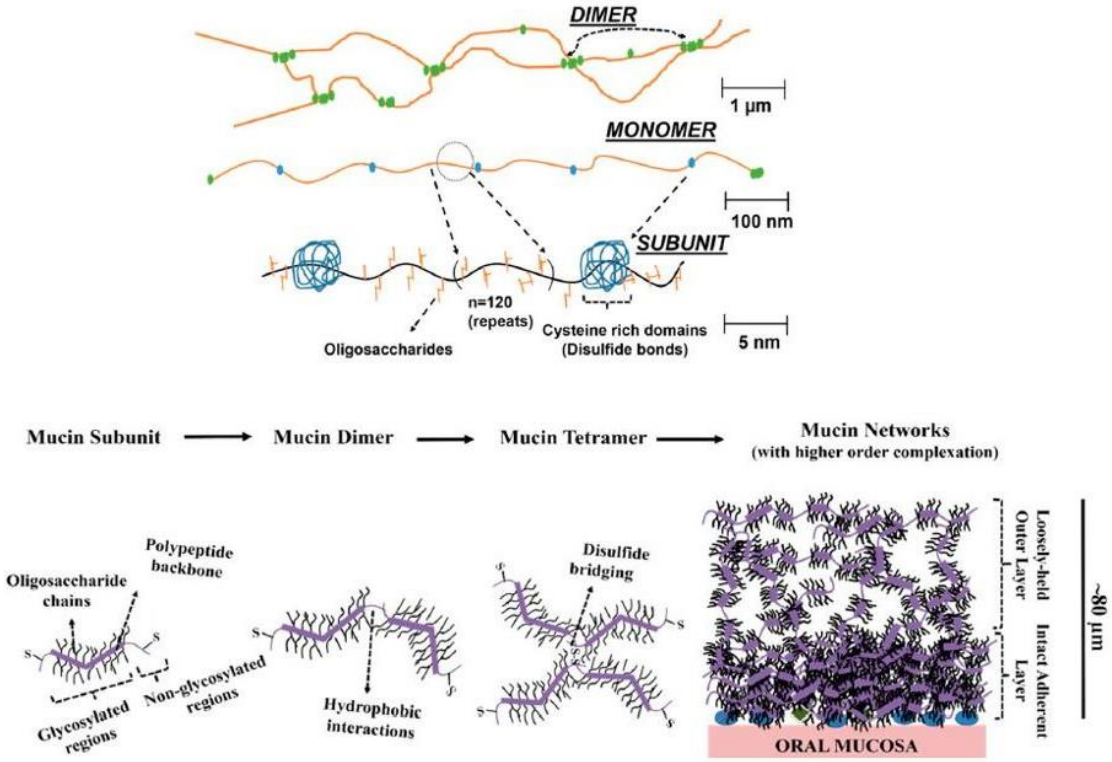
c. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเยื่อบุผิวภายในแก้มของปลากดหมูริต้า สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง (PAS)

d. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเยื่อบุผิวภายในแก้มของปลากดหมูริต้า สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกรด (AB)

e. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเยื่อบุผิวภายในแก้มของปลากดหมูริต้า สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลางและเป็นกรดภายในเซลล์เดียว (AB2.5/PAS)

f. เซลล์สร้างเมือกบริเวณเยื่อบุผิวภายในแก้มของปลากดหมูริต้า สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลางและเป็นกรดภายในเซลล์เดียว (AB1.0/PAS) scale bar = 20 µm (Yashpal et al., 2007)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

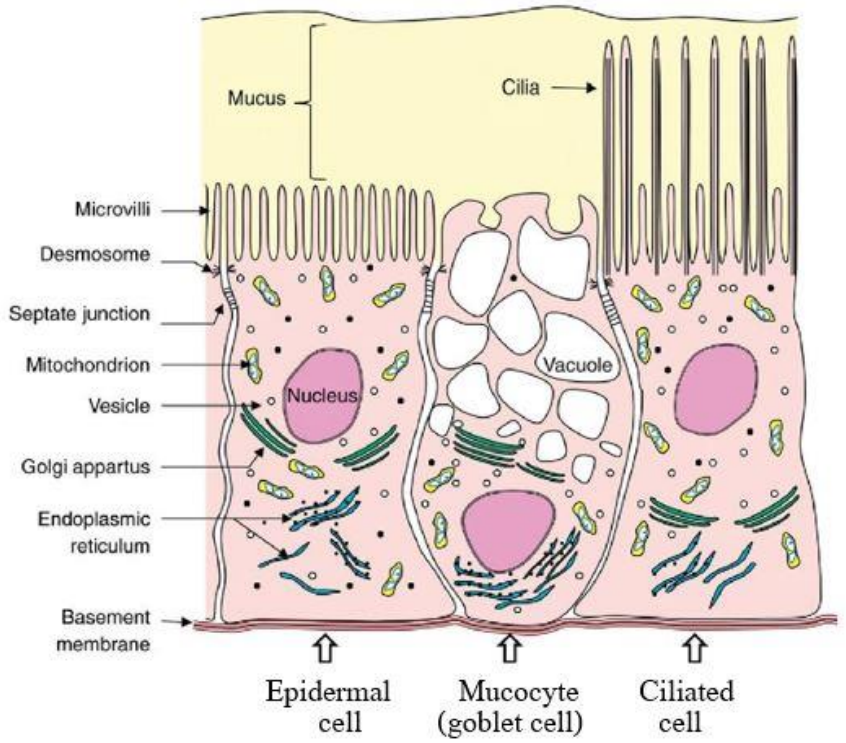


ภาพที่ 2 - 5 โครงสร้างของมิวซิน (Authimoolam & Dziubla, 2016)

2.2.3 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยสองฝา

การศึกษาทางด้านชีววิทยาของหอยสองฝาซึ่งเป็นสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังในปัจจุบัน มีงานวิจัยออกมาค่อนข้างหลากหลาย โดยส่วนใหญ่จะมุ่งเน้นไปทางด้านชีววิทยาการเจริญ ระบบการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ ระบบย่อยอาหาร และการแพร่กระจาย เป็นต้น โดยข้อมูลที่ได้ส่วนใหญ่มักเกี่ยวข้องกับระบบการเพาะเลี้ยง เนื่องจากหอยนางรมเป็นสัตว์เศรษฐกิจ ซึ่งนิยมเพาะเลี้ยงกันอย่างแพร่หลายตามแถบชายฝั่ง เนื่องด้วยหอยนางรมเป็นสัตว์ที่อาศัยเกาะติดอยู่กับที่ จึงทำให้เกิดการสัมผัสกับสารเคมีปนเปื้อนจากสิ่งแวดล้อมที่อยู่ในทะเลได้โดยตรง การศึกษาเกี่ยวกับองค์ประกอบภายในรวมถึงกลไกการทำงานในการหลั่งเมือกเพื่อออกมาปกคลุมอวัยวะภายนอกของหอยนางรม จึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจในการศึกษาเพื่อใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น และเพื่อใช้ประกอบการศึกษาสำหรับงานวิจัยในอนาคต จากข้อมูลการศึกษาในเบื้องต้นพบว่าเมือกที่ปกคลุมลำตัวของหอยสองฝา ถูกหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือก ซึ่งเซลล์ชนิดนี้จะพบได้ตามเยื่อบุผิว (ภาพที่ 2-6)

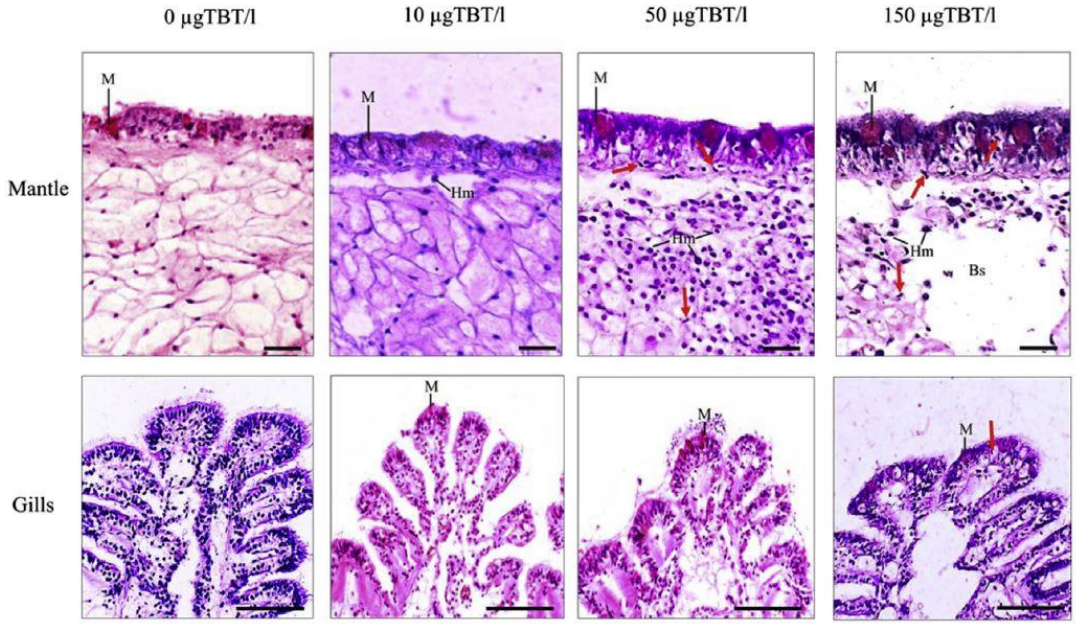
2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



ภาพที่ 2 - 6 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยสองฝา ซึ่งอยู่ในชั้นของเยื่อบุผิว (Allam & Espinosa, 2015)

ในปี 2016 มีรายงานการศึกษาถึงผลกระทบของสารทีบีที (TBT) ในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลและเหงือกของหองหอยนางรมปากจีบ ที่เวลา 48 ชั่วโมง หลังจากที่หอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสารทีบีทีที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50 and 150 µg/l ตามลำดับ พบว่าเมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสจากสารทีบีทีที่ระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้น ทำให้เซลล์สร้างเมือก (M = mucocyte) ฮีโมไซท์ (Hm = hemocyte) และ (Bs = blood sinus) เพิ่มจำนวนมากขึ้นตามไปด้วย (ภาพที่ 2-7)

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
2717058923



ภาพที่ 2 - 7 โครงสร้างของเนื้อเยื่อในชั้นแมนเทิล และเหงือกของหอยนางรมปากจีบ ที่เวลา 48 ชั่วโมง ภายหลังจากที่หอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสารทีบีทีที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50 and 150 µg/l ตามลำดับ โดย M = mucocyte ; Hm = hemocyte และ Bs = blood sinus ศึกษาโครงสร้างของเนื้อเยื่อด้วยเทคนิคมิญชวิทยา และย้อมด้วยสีเนื้อเยื่อด้วยวิธี H&E staining (Khondee et al., 2016)

จากข้อมูลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เทคนิคมิญชวิทยา สามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกของสัตว์ได้เป็นอย่างดี อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาเกี่ยวกับลักษณะของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบบริเวณอวัยวะพาเลียล ซึ่งประกอบด้วย เหงือก แมนเทิล และแผ่นปาก ด้วยเทคนิคมิญชวิทยา วิธี H&E staining

2.2.4 หน้าที่ของเมือกที่พบในหอยนางรม

เมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกนั้นมีความสำคัญต่อหอยนางรมหลายประการ มีการรายงานว่าเมือกที่พบในหอยนางรมทำหน้าที่ป้องกันอันตรายให้กับเซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cells) จากสิ่งแวดล้อมภายนอกและป้องกันการติดเชื้อ (Reel & Fuhrman, 1981) ; (Sze & Lee, 1995) สร้างความเหนียว (Beninger & Veniot, 1999) ทำความสะอาดผิวของร่างกาย (Bavington et al., 2004) และทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการกินอาหาร (Ward & Shumway, 2004)

2.2.5 การศึกษาโปรตีนในเมือก

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
2717058923

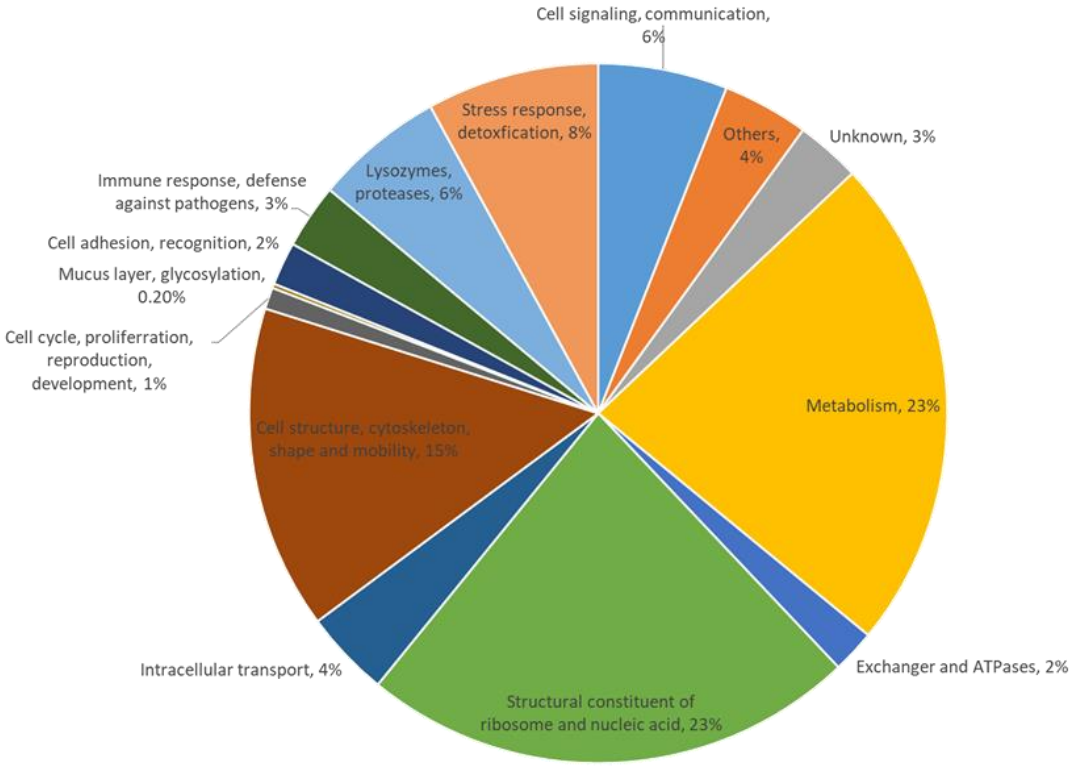
มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเมือกอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิต เนื่องด้วยเมือกนั้นถือเป็นปราการแรกในการป้องกันของระบบภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อ

การศึกษาโปรตีนในเมือกของปลา มีรายงานการค้นพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน และได้รับการระบุว่าเป็น mucosal proteins ที่หลั่งจากผิวหนังของปลากะพงแดง (*Sparus aurata*) โดยใช้วิธีการทางโปรตีโอมิกส์ (proteomics) ด้วยเทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MS/MS ทำให้พบโปรตีนโครงสร้าง (cytoskeleton) ได้แก่ actins, keratins, tubulins, tropomyosin, cofilin-2 และ filamin-A และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด ได้แก่ WAP65, HSPC70, Cu, Zn-SOD, PRDX1 และ PRDX2 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการทางโปรตีโอมิกส์สามารถใช้ตรวจสอบและระบุโปรตีนที่พบในเมือกบริเวณผิวหนังของปลาได้ (Jurado et al., 2015) มีรายงานการค้นพบโปรตีนในเมือกบริเวณผิวหนังของปลาแซลมอนแอตแลนติก (*Salmo salar*) ที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อปลาแซลมอนแอตแลนติกเกิดการติดเชื้อแบคทีเรีย *Vibrio salmonicida* โดยใช้เทคนิค 2-D gel electrophoresis ร่วมกับเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ชนิด MS/MS พบว่าโปรตีน peroxidases, TPx Grx และ AhpC มีปริมาณที่เพิ่มขึ้น โดยปริมาณของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นนี้เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะความเครียดจากการติดเชื้อแบคทีเรียชนิดข้างต้น (Uttakleiv Ræder et al., 2007) นอกจากนี้ในปลาแซลมอนแอตแลนติกยังมีรายงานการพบโปรตีนในเมือกบริเวณผิวหนังที่เปลี่ยนแปลงไป เมื่อปลาแซลมอนแอตแลนติกถูกรุกรานจากแตนทะเล (*Lepeophtheirus salmonis*) ซึ่งเป็นปรสิต โดยพบการหลั่งโปรตีน β-actin ออกมาจากบริเวณผิวหนัง เมื่อระดับของ actin และ transferrin เพิ่มขึ้นจากการติดเชื้อจะกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ macrophage ในปลาแซลมอน (Easy & Ross, 2009) และยังมีรายงานว่าพบโปรตีนอื่น ๆ หลายชนิดในเมือกบริเวณผิวหนัง เช่น peroxiredoxin 1 และ heat shock protein ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของปลาบอลลูน (*Cyclopterus lumpus*) โดยทำหน้าที่ป้องกันเชื้อโรคและความเครียดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกด้วย (Patel & Brinchmann, 2017)

การศึกษาโปรตีนในเมือกของหอย มีรายงานถึงการวิเคราะห์การแสดงออกของ C-type lectin ในเมือกของหอยนางรมฝั่งตะวันออก (*Crassostrea virginica*) โดย lectin ทำหน้าที่สำคัญในการจดจำสิ่งแปลกปลอม ซึ่งตรวจพบว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องในทางกายภาพ เช่น การจับอาหาร และภูมิคุ้มกันเยื่อเมือก (Jing et al., 2011) ด้วยเหตุนี้เมือกจึงมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของหอยนางรม และการศึกษาถึงชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมที่มีบทบาทในเชิงของกลไกการป้องกันตัวจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง โดยมีรายงานว่าพบโปรตีนในเมือกที่หลั่งออกมาจากพาเลียลออร์แกน (แมนเทิล, เหงือก และแผ่นปาก) ของหอยนางรมตะวันออก (*C. virginica*)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

เป็นครั้งแรก ซึ่งพบโปรตีนจำนวน 902 ชนิด และสามารถจำแนกตามหน้าที่กระทำงานได้ทั้งสิ้น 14 กลุ่ม (ภาพที่ 2-8) (Espinosa et al., 2016)



ภาพที่ 2 - 8 โปรตีนในเมือกที่หลั่งออกมาจากพาเลียลออร์แกน (แมนเทิล, เหงือก และแผ่นปาก) ของหอยนางรมตะวันออก (*C. virginica*) จำนวน 902 ชนิด และสามารถจำแนกตามหน้าที่การทำงานได้ทั้งสิ้น 14 กลุ่ม (Espinosa et al., 2016)

2.3 ดีดีที: DDT (Dichlorodiphenyl trichloroethane)

2.3.1 ประวัติความเป็นมาของสารดีดีที

ดีดีทีถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2416 โดย Othmar Zeidler ชาวเยอรมัน ซึ่งในขณะนั้นยังไม่ทราบว่าดีดีทีมีคุณสมบัติสามารถฆ่าแมลงได้ดี ต่อมา Paul Muller ชาวสวิสเซอร์แลนด์ เป็นผู้ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติในการฆ่าแมลงของดีดีที และมีการผลิตออกสู่ตลาดในปี พ.ศ. 2485 ในชื่อทางการค้า คือ เกซารอล (Gesaral) เพื่อใช้ในการเกษตร และในชื่อทางการค้า

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

อีกชื่อ คือ นีโอซิด (Neocid) เพื่อใช้ในด้านสาธารณสุข ดีดีทีเป็นสารฆ่าแมลงที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก ในช่วงระยะเวลากว่า 20 ปี นับตั้งแต่ที่เริ่มมีการผลิตออกขายในช่วงเวลาดังกล่าว ดีดีทียังได้รับการยกย่องว่าเป็นสารฆ่าแมลงสมบูรณ์แบบ เนื่องด้วยเหตุผลหลายประการ คือ มีพิษต่อแมลงมากชนิด มีความคงทนสามารถออกฤทธิ์ได้นาน มีพิษเฉียบพลันต่อคนและสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำ (จัดอยู่ในพิษระดับปานกลาง) และมีราคาถูกเพราะต้นทุนการผลิตต่ำ ในช่วงสงครามโลกครั้งที่สอง ดีดีทีได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคไข้รากสาดใหญ่ (Typhus) ต่อมาทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำการใช้ดีดีทีเพื่อกำจัดยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคไข้มาลาเรีย ปริมาณการใช้ดีดีทีเริ่มลดลงภายในปี พ.ศ. 2514 เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีพิษ และค่อนข้างสลายตัวช้าก่อให้เกิดปัญหามลภาวะในสิ่งแวดล้อม จึงมีประกาศห้ามใช้ดีดีทีในประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ รวมทั้งสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีการประกาศห้ามใช้ดีดีทีภายในประเทศ แต่ยังมีการผลิตเพื่อส่งขายออกสู่ประเทศกำลังพัฒนา เพื่อใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรีย และแมลงเบียนภายนอก เช่น หมัด และ เหา ซึ่งในประเทศไทยเองก็มีการห้ามใช้ดีดีทีในภาคการเกษตร แต่ยังอนุญาตให้สามารถใช้ได้ในด้านสาธารณสุข

2.3.2 โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสารดีดีที

ดีดีทีเป็นสารเคมีในกลุ่มออร์กาโนคลอรีน (Organochlorine) ที่มีธาตุไฮโดรเจน คาร์บอน และคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 2-9) มีลักษณะเป็นผลึกละเอียด สีขาว จุดหลอมเหลว 108.5 ถึง 109 องศาเซลเซียส ความดันไอ 1.9×10^{-7} มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนรูปของดีดีทีเกิดขึ้นได้โดย 3 ปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

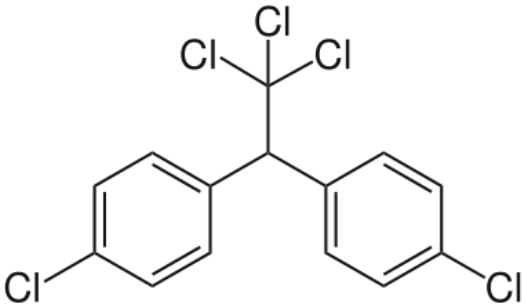
1. ปฏิกิริยาไฮโดรคลอริเนชัน (dehydrochlorination) เป็นการนำหมู่คลอไรด์ออกจากโมเลกุล ซึ่งจะเห็นได้ทั่วไปจากยาฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น ดีดีที เป็นต้น ซึ่งผลจากการเกิดปฏิกิริยาทำให้ได้สาร DDE ซึ่ง DDT จะถูกเมทาบอไลท์โดยเอนไซม์ DDT-dehydrochlorinase (DDTase) จากแมลงและสัตว์ให้กลายเป็น DDE (ภาพที่ 2-10) สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อไขมันของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารเข้าไป

2. ปฏิกิริยารีดักทีฟดีคลอริเนชัน (reductive dechlorination) เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม ผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้สาร DDD

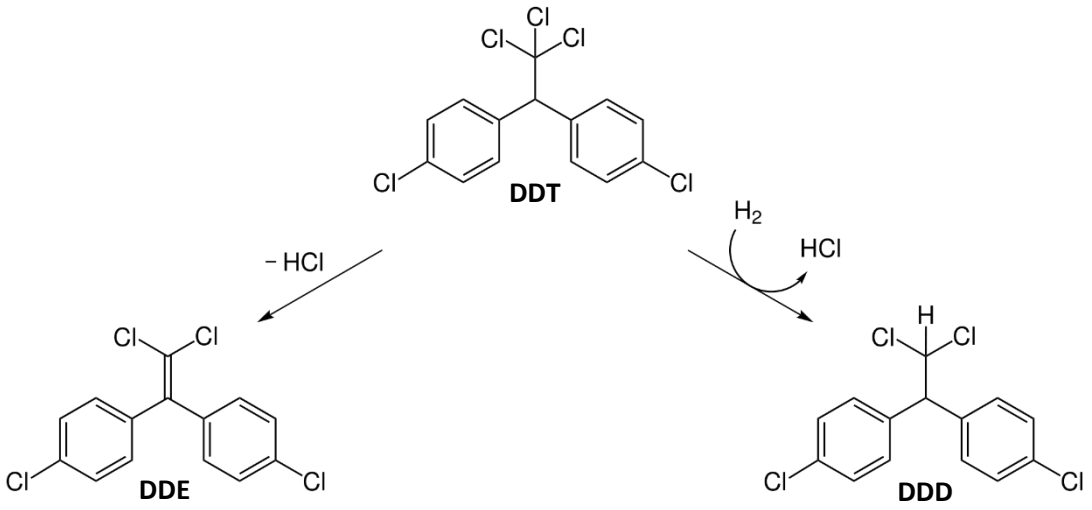
3. ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เมื่อแมลงศัตรูพืชได้รับสารดีดีทีเข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนรูปของสารโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยระบบเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส (Monooxygenase system) ได้เป็น dicofol ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูปดีดีทีให้เป็นดีดีเอ (2,2-bis (p-chlorophenyl) acetic acid; DDA) และดีบีพี (dichloro-benzo-phenone; DBP) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดไร (acaricide) และแมลงศัตรูพืช (insecticide)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ดั้งนั้นด้วยคุณสมบัติของดีดีทีว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (nonpolar molecule) จึงทำให้มีความสามารถในการละลายในน้ำได้น้อย แต่จะละลายได้ดีในไขมัน (Lipophilic) จากคุณสมบัติในการละลายได้ดีในไขมัน จึงทำให้เกิดการสะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิตและถูกถ่ายทอดตามลำดับห่วงโซ่อาหารมาสู่ผู้บริโภคขั้นสูงได้ ในรูปแบบการสะสมสารพิษที่เรียกว่าการเพิ่มขยายทางชีวภาพ (Bioaccumulation) ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษตกค้างจะถูกสะสมไว้ตลอดอายุขัย ซึ่งสารพิษที่ถูกสะสมไว้นี้จะมีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น เนื่องจากสิ่งมีชีวิตยังคงดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมแบบเดิม



ภาพที่ 2 - 9 โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT (Barker & Morrison, 1965)



ภาพที่ 2 - 10 โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT เมื่อถูกเปลี่ยนรูปเป็นอนุพันธ์ DDD และ DDE (Barker & Morrison, 1965)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

2.3.3 การสลายตัวของสารดีดีที

จากการสลายตัวของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีน พบว่าดีดีทีจะมีความเสถียรมากในดินที่มีความร่วนซุย มีการระบายอากาศที่ดี คืออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic conditions) ส่วนดินที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน (anaerobic conditions) เช่น ในกรณีที่มีน้ำท่วมขัง การสลายตัวของดีดีทีให้กลายเป็นดีดีดีจะเกิดได้เร็วขึ้น แต่การสลายตัวของดีดีทีให้กลายเป็นดีดีอีจะช้าลงในสภาพที่มีการระบายอากาศดี ซึ่งการสลายตัวของดีดีทีเพื่อเกิดเป็นสารตัวใหม่ (minor metabolites) เช่น DDA, dicofol, DBP, BA, dicofol like compounds นั้นเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์หลายกลุ่ม เช่น *Enterobacter aerogenes* (Barker & Morrison, 1965), *Trichoderma viride, Fusarium oxysporium, Aerobacter aerogenes* จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการสลายตัวของดีดีทีเกิดเป็นสารประกอบตัวใหม่นั้นเกิดได้หลายกระบวนการ (different metabolic pathways) ซึ่งแต่ละกระบวนการจะเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

2.3.4 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อสิ่งแวดล้อม

ศาสตราจารย์ เดวิด พิเมนเทล แห่งมหาวิทยาลยคอร์แนล ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้อธิบายไว้ว่าร้อยละ 99.9 ของสารกำจัดศัตรูพืชจะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม มีเพียงแค่ร้อยละ 0.1 ที่จะถูกส่งไปถึงศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมายภายหลังการฉีด พ่น หยอดหรือหว่าน สารเคมีกำจัดศัตรูพืชจะถูกดูดซึมเข้าไปในพืชและอยู่บนต้นพืชบางส่วน และที่เหลือจะปลิวไปในอากาศหรือรอเวลาที่น้ำจากแปลงเกษตรจะชะล้างสารเคมีลงสู่ดินหรือแหล่งน้ำใกล้เคียง หากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมอาจลดลง แต่ทว่าอัตราการสลายตัวหรือค่าครึ่งชีวิตมีความแตกต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อม ทั้งนี้การใช้สารกำจัดศัตรูพืชนั้นส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ให้มีผลเฉพาะต่อศัตรูที่ต้องการเท่านั้น จึงทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และสิ่งแวดล้อม (Pimentel, 1995)

แม้ว่าปัจจุบันจะมีการรณรงค์ส่งเสริมให้มีการปลูกพืชที่ปลอดสารพิษ แต่คงปฏิเสธไม่ได้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย จนกลายเป็นปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ซึ่งส่งผลร้ายต่อสุขภาพ ของทั้งเกษตรกร ผู้บริโภค และสัตว์เลี้ยง เนื่องจากผลผลิตทางการเกษตรที่นำบริโภคนั้นมีสารพิษตกค้างเกินมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ตกค้างยาวนานนับปีและเพิ่มระดับการตกค้างมากขึ้นเรื่อยๆ กล่าวคือเมื่อเกษตรกรนำสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เช่น ดีดีที ไปใช้ฉีดผักหรือข้าวก็จะเกิดเป็นสารพิษสะสมอยู่ในต้นพืช รวมไปถึงการตกค้างในดินและน้ำด้วย เมื่อคนรับประทานเข้าไปสารเคมีก็จะเข้าสู่ร่างกายคน โดยที่ไม่สามารถกำจัดออกมาได้ และเมื่อรับประทานเข้าไปมากๆ เป็นระยะเวลานานๆ จะเกิดการสะสมของสารเคมีภายในร่างกายจนกระทั่งถึงจุดที่ร่างกายหมดภูมิต้านทาน จึงจะแสดงอากการป่วยไข้ในรูปแบบต่างๆ ซึ่งยากต่อ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

การรักษา การใช้สารเคมีจึงกลับกลายเป็นการผลักภาระของผลกระทบไปสู่ระบบนิเวศ ทำให้ไม่สามารถรักษาความสมดุลในธรรมชาติและส่งผลต่อแนวโน้มการระบาดของศัตรูพืชที่นับวันจะทวีความรุนแรงที่มากขึ้น จากการศึกษาพบว่าการได้รับพิษในปริมาณน้อยแต่เรื้อรังของปลาอาจส่งผลร้ายแรงกว่าพิษเฉียบพลัน เพราะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรม และกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ซึ่งสร้างความเสียหายต่อความอยู่รอดและการเจริญพันธุ์ การใช้สารกำจัดศัตรูพืชนั้น มีเพียงส่วนน้อยที่มีผลต่อศัตรูพืชที่ต้องการกำจัด แต่ส่วนมากจะกระจายไป ซึ่งมักจะตกลงบนดินและในน้ำก่อนที่บางส่วนจะสลายไป (Kegley et al., 1990)

2.3.5 การใช้สารดีดีทีในประเทศไทยสู่การปนเปื้อนระบบนิเวศชายฝั่งทะเล

ประเทศไทยมีประกาศห้ามใช้ดีดีทีในปี พ.ศ .2526 เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีพิษและมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูง เพราะค่อนข้างสลายตัวช้า สามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้พบว่ามีการตกค้างในห่วงโซ่อาหาร และสะสมในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อม ซึ่งต่อมาตรวจพบการปนเปื้อนของสารเคมีกาจัดศัตรูพืชกลุ่มออการ์โนคลอรีนจากการสุ่มตรวจอาหารเพื่อหาสารปนเปื้อนและจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของสาธารณสุขจังหวัด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-2553 พบว่าแนวโน้มของสารปนเปื้อนที่ผสมอยู่ในอาหารมีเพิ่มมากขึ้น และในสิ่งแวดล้อมยังคงมีการสะสมตัวของสารกลุ่มดังกล่าว และถูกปลดปล่อยจากแหล่งสะสมตัวเช่น ดิน พื้นที่ทำการเกษตร ลงสู่แม่น้ำลำคลอง แล้วไหลลงสู่ทะเล ในปี พ.ศ. 2547 มีการศึกษาเพื่อหาชนิดและปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก ตั้งแต่ปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทราจนถึงปากแม่น้ำตราด จังหวัดตราด โดยเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคมและสิงหาคม ปี พ.ศ. 2547 พบว่าปริมาณรวมของสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในฤดูฝนมีการสะสมสูงกว่าฤดูแล้งมีค่าเฉลี่ย 205.31± 23.16 และ 152.73±10.35 ng/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการสะสมของสารฆ่าแมลงในแต่ละพื้นที่การใช้ประโยชน์พบว่าในแหล่งอุตสาหกรรมมีค่าสูงกว่าแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยพบค่าเฉลี่ยปริมาณรวมของสารฆ่าแมลงในพื้นที่อุตสาหกรรมมีค่า 223.72±32.47 ng/g ส่วนในพื้นที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีค่า 187.56±33.49 ng/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ (ศรีวิลาศ และ ใจดี, 2547)

2.3.6 ความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อสิ่งมีชีวิต

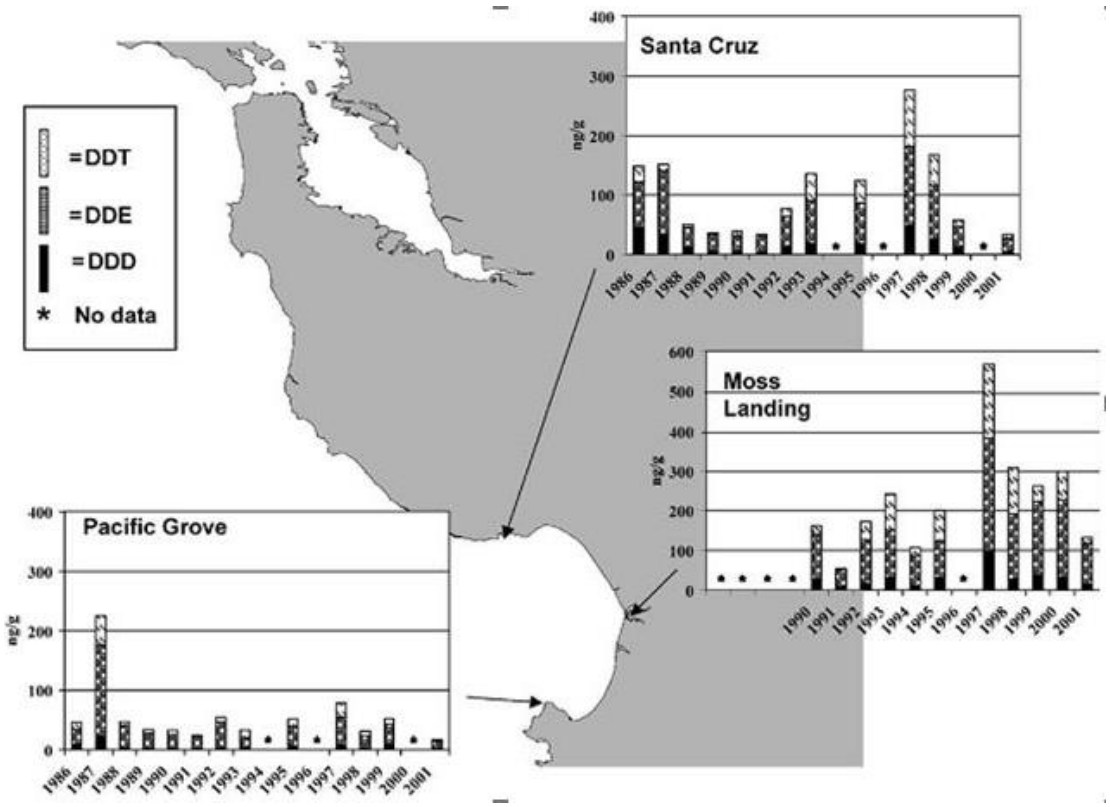
มีรายงานการศึกษาการเกิดมะเร็งต่อสารกำจัดแมลงในมนุษย์พบว่า มีความสัมพันธ์กันในการเกิดมะเร็งเต้านมของผู้หญิงกับสารดีดีที ซึ่งอาจส่งผลกระบวนการทำงานของสเตรอยด์ฮอร์โมน เนื่องจากสารดีดีทีอาจจะไปกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็ง (Cohn et al., 2007) ความเป็นพิษของดีดีทียังส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อระบบทางเดินอาหาร โดยจะมีอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง พบว่าเมื่อ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สิ่งมีชีวิตได้รับสารดีดีทีเป็นระยะเวลานานนั้นอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ ซึ่งมีผู้รายงานไว้ว่าสารดีดีที เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาว และโลหิตจาง (Thuy, 2015)

สำหรับการปนเปื้อนของสารเคมีที่มีพิษในน้ำนั้น องค์กรคุ้มครองสภาพแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดของยาฆ่าแมลง ชนิดต่างๆ ในน้ำที่เลี้ยงปลาไว้ในระดับต่างๆ โดยที่ระดับความเข้มข้นของดีดีทีต้องมีไม่เกิน 0.003 ppb ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ขนาด 4-13 มิลลิเมตร ที่สัมผัสกับดีดีทีความเข้มข้น 0.13 ppb เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าทำให้กุ้งมีความผิดปกติทางพันธุกรรมการคงสภาพ โดยที่ค่าครึ่งชีวิตของดีดีทีนั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบสิ่งแวดล้อม ซึ่งดีดีทีจะสามารถคงสภาพอยู่ได้เป็นระยะเวลานานในเขตหนาว ส่วนในเขตร้อนนั้นดีดีทีจะถูกสลายและเปลี่ยนสภาพได้เร็วกว่า ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียในดินมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีรายงานว่าดีดีทีจะมีครึ่งชีวิตประมาณ 10-12 ปี (Jo et al., 1996) มีการรายงานถึงปัจจัยของการกินอาหารที่มีผลต่อการสะสมสารดีดีทีภายในปลาสายพันธุ์หนึ่ง ชนิดปลาซีกเดียว (Flitfishes) บริเวณอ่าวมอนเทอร์เร่ย์ และสัตว์หน้าดินบริเวณเขตน้ำลึก (Sablefish and Roughscale rattail) ปลาหิมะและปลาหางหนู พบสารดีดีทีและสารเมตาบอไลท์ในปริมาณค่อนข้างสูง ในอวัยวะภายในตัวปลาที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ สูงกว่าปลาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ (Zylstra, 1972) จากผลการทดลองที่ผ่านมาได้ตั้งข้อสังเกต โดยพิจารณาที่ระดับความลึกของน้ำที่เท่ากัน ชนิดพันธุ์ที่อาศัยอยู่ตามหน้าดินบริเวณท้องน้ำ พบการสะสมสารพิษภายในร่างกายในระดับที่สูงกว่าชนิดพันธุ์ที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของดีดีทีที่สะสมอยู่ในสัตว์หน้าดินบริเวณท้องน้ำสูงกว่าชนิดที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ (Brun et al., 2000) ทั้งนี้ NOAA หรือ National Oceanic and Atmospheric Administration ซึ่งเป็นหน่วยงานด้านการพยากรณ์อากาศของสหรัฐอเมริกาได้ทำการวิจัย โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) ในแต่ละพื้นที่ของอ่าวมอนเทอร์เร่ย์มาตรวจสอบ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของสารดีดีทีที่สะสมอยู่ในหอยแมลงภู่ ที่เก็บมาจากเมืองซานตาครูซ (Santa Cruz) ซึ่งตั้งอยู่ทางตอนบนของอ่าว มีแนวโน้มการสะสมสารพิษคล้ายกับตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่เก็บมาจากเมืองมอสส์ แลนดิ้ง (Moss Landing) ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บมาจากเมืองแปซิฟิกโกรฟ (Pacific Grove) ซึ่งตั้งอยู่ทางตอนใต้ของอ่าว (ภาพที่ 2-11) พบปริมาณการสะสมของสารพิษในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ ในระดับที่แตกต่างจากทั้ง 2 เมืองที่กล่าวมาข้างต้น คือ พบในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งผลที่ได้นี้ออกมาสอดคล้องกับงานวิจัยที่ระบุถึงเส้นทางการกระจายตัวของสาร โดยผ่านการขนส่งสารจากทางตอนใต้ขึ้นสู่ทางตอนเหนือของอ่าว ซึ่งตัวแปรสำคัญคือการได้รับอิทธิพลจากกระแสลม (Ian Hartwell, 2004)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



ภาพที่ 2 - 11 ปริมาณของดีดีที ที่สะสมอยู่ในหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) ในแต่ละพื้นที่ของอ่าวมอนเทอร์เร่ย์ (Ian Hartwell, 2004)

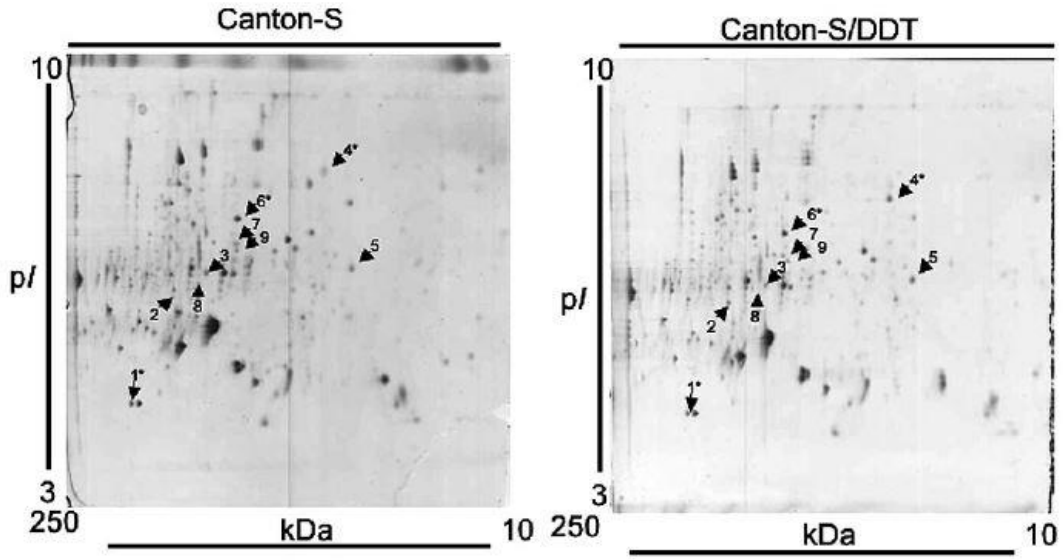
มีรายงานผลกระทบของการสะสมสารดีดีทีในห่วงโซ่อาหาร ที่เริ่มจากการปนเปื้อนของสารดีดีที ในน้ำในอัตราส่วนเพียง 0.000003 ppm ต่อสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น ไรแดง หนอนแดง พบว่ามีการสะสมของสารดีดีที ในสัตว์เหล่านี้เพิ่มขึ้นเป็น 0.04 ppm และในปลาที่กินสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้เป็นอาหาร จะมีการสะสมของสารดีดีที ในตัวปลามากถึง 2 ppm และเมื่อถึงนกที่กินปลาเป็นอาหารจะมีสารดีดีทีสะสมอยู่ในตัวได้มากถึง 25 ppm และแม้ว่านกจะมีการสะสมของสารดีดีทีในตัวค่อนข้างมาก แต่การสะสมนี้อาจไม่ได้ทำให้นกตายลงทันที แต่สามารถสางผลกระทบในด้านอื่นๆ ได้ เช่น สารดีดีทีที่สะสมอยู่ในตัวนกจะทำให้เปลือกไข่บางลง ส่งผลให้ไข่แตกขณะที่นกกำลังฟักไข่ ส่งผลให้ประชากรของนกลดลงได้อย่างรวดเร็ว (Edwards, 2004) ดังนั้นการสะสมของสารดีดีทีในห่วงโซ่อาหารไม่ได้ถูกจำกัดเฉพาะในบริเวณพื้นที่การเกษตร แต่มักจะแพร่กระจายออกไปในสิ่งแวดล้อมด้วย เนื่องจากน้ำที่ไหลผ่านแปลงเกษตรที่มีการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช จะไหลลงไปสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติในสุด จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สารเคมีในระบบนิเวศอย่างกว้างขวาง โดยสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอาจได้รับผลกระทบจากสารเคมีเหล่านี้ได้โดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำเป็นโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น

มีรายงานในแมลงวันผลไม้ (*Drosophila melanogaster*) พบว่าผลกระทบของความต้านทานต่อสารดีดีทีจากยาฆ่าแมลง ถูกตรวจสอบในยีนสองชนิด หนึ่งในนั้น คือ *Canton-S* ซึ่งทำหน้าที่สร้างโปรตีนที่มีบทบาทในการกำจัดสารพิษ เมื่อแมลงวันผลไม้ได้รับสารดีดีทีความเข้มข้น 200 mg/vial เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่งผลทำให้ยีนทั้งสองชนิดนี้เกิดความต้านทานต่อสารพิษมากยิ่งขึ้น โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์มาศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อแมลงวันผลไม้ได้รับสารดีดีทีจากยาฆ่าแมลง ซึ่งทำการแยกโปรตีนด้วกระแสไฟฟ้าแบบเจลสองมิติ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 9 ตำแหน่ง ดังแสดงในภาพที่ 2-12 (Pedra et al., 2005) และมีการศึกษาถึงการแสดงออกของโปรตีนในเหงือกของหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อได้รับสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 μg/l เป็นระยะเวลา 7 วัน ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ พบว่ามีการแสดงออกของโปรตีนที่ตอบสนองต่อภาวะความเครียด เช่น dimethylglycine ซึ่งมีหน้าที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญของร่างกาย (Song et al., 2016)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



Spot number	Gene symbol	% Coverage	MOWSE score	M_r/pI	Cytogenetic Map	Molecular Function
1	CG6058†	17	6.3 e + 05	39048 7.0	97A6	Fructose-biphosphate aldolase activity
2	CG7010†	18	4.9 e + 09	43892 7.6	4C14	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) activity
3	CG5028↔	25	9.9 e + 06	44432 6.3	96E9	Isocitrate dehydrogenase activity
4	CG5028†	46	1.8 e + 09	44432 6.3	96E9	Isocitrate dehydrogenase activity
5	CG6708↔	15	8.5 e + 03	89235 5.6	96B10	Sterol binding
6	CG6030†	15	2.4 e + 05	20201 6.1	91F1	Hydrogen exporting ATPase activity/ phosphorylation mechanism
7	RH63796p↔	9	5.1 e + 02	49199 6.4	25F3	Extracellular matrix[a)]
8	CG9031†	12	9.1 e + 02	30718 6.5	34C6	Small GTPase interacting/regulatory protein activity
9	CG6617†	8	3.1 e + 03	25997 4.9	17C7	Intracellular protein transport/ protein targeting[b)]

ภาพที่ 2 - 12 ผลการระบุชนิดของโปรตีนในแมลงวันผลไม้ (*Drosophila melanogaster*) ที่ได้รับสารดีดีทีที่ระดับความเป็นพิษ LC-25 (ความเข้มข้น 200 mg/vial) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้เครื่องแมสสเปคโตรมิเตอร์ชนิด MALDI-TOF พบโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปจากเดิม 9 ชนิด (Pedra et al., 2005)

จากข้อมูลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เทคนิคมิญวิทยา สามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และเทคนิคโปรตีโอมิกส์ สามารถนำมาใช้ในการศึกษาโปรตีนใน

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
27170589 23

เมือกของสัตว์ได้เป็นอย่างดี และช่วยระบุชนิดของโปรตีนที่พบได้หลายชนิดในคราวเดียว อย่างไรก็ดี ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และชนิดของโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย และมีแนวโน้มได้รับการปนเปื้อนสารเคมีจากสิ่งแวดล้อมทางทะเลเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีดังที่กล่าวมา โดยทำการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบบริเวณอวัยวะพาเลียล ประกอบด้วย เหงือก แมนเทิล และแผ่นปาก ด้วยเทคนิคมิญชวิทยา วิธี H&E staining และทำการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อชนิดของโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

2.4 การกำหนดค่าความเป็นพิษของสารดีดีที

การจะทราบความเป็นพิษของสารได้ เราจำเป็นจะต้องนำสารเหล่านั้นมาทดสอบความเป็นพิษกับสัตว์ทดลอง การทดสอบเมื่อให้สารที่ความเข้มข้นต่างๆกับสัตว์ทดลอง จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังรับสารพิษในช่วงระยะเวลาหนึ่งๆ แล้วนำไปหาค่าต่างๆที่ใช้แสดงระดับความเป็นพิษ ผลจากการได้รับสารแปลกปลอมในช่วงระยะ Toxicokinetic phase จะจัดเป็นระยะที่สารแปลกปลอมมีแนวโน้มเป็นสารที่อาจแสดงความเป็นพิษหรือไม่ก็ได้ แต่หลังจากเกิดกิจกรรมภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งบางส่วนอาจถูกกำจัดออกนอกร่างกาย และบางส่วนอาจมีผลต่อระบบต่างๆของสิ่งมีชีวิต ระยะดังกล่าวนี้ จะเรียกว่า Toxicodynamic phase ในการศึกษาทางพิษวิทยา มีค่าที่ใช้ในการบ่งชี้ความเป็นพิษในระยะ Toxicodynamic phase คือ Median Lethal Concentration (LC50) ซึ่ง LC50 หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารพิษซึ่งทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจำนวนศัตว์ที่นำมาทดลองทั้งหมดภายในระยะเวลาที่กำหนด ใช้หน่วยเป็น ppm (part per million), มิลลิกรัม/ ลิตร มิลลิกรัม/ กรัม หรือแม้กระทั่งใช้เป็นอัตราส่วนเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน เช่น 1:1000 และ 1:10,000 เป็นต้น ซึ่งการประเมินค่า LC นี้จะไม่รู้ว่าสัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับสารพิษในปริมาณเท่าใด แต่รู้ว่าสัตว์ทดลองได้รับสารพิษที่มีความเข้มข้นเท่าใด ซึ่งค่านี้จะได้โดยทำการทดลองกับสัตว์ทดลองกับสารที่หลายๆความเข้มข้น (อาจจะประมาณ 3-5 ความเข้มข้น) แล้ววัดอัตราการเสียชีวิตของสัตว์ทดลองที่อยู่ในช่วงระหว่าง 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำผลการทดลองมาทำกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่า log ของความเข้มข้น และแกน Y เป็นค่าเปอร์เซ็นต์การเสียชีวิต จากนั้นทำการวัดเปอร์เซ็นต์การเสียชีวิตที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ว่าตรงกับความเข้มข้นที่เท่าไหร่ แล้วนำมาหาค่า antilog ก็จะทราบปริมาณที่ทำให้สัตว์ทดลองตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ นั่นก็คือค่า LC50 นั่นเอง ทั้งนี้หากค่า LC50 มีค่าตัวเลขที่สูงก็แสดงว่าสารเคมีนั้นๆ จะมี

อันตรายน้อย เนื่องจากต้องได้รับในปริมาณมากจึงจะทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตไปครึ่งหนึ่งของกลุ่มสัตว์ที่ทำการทดลอง ในขณะที่ค่าตัวเลขต่ำจะแสดงความเป็นพิษที่รุนแรงสูงคือได้รับสารเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตไปครึ่งหนึ่ง ซึ่งค่าความเป็นพิษของสารดีดีทีดังแสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2 - 1 ค่าความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อสัตว์ทดลอง

Species	**Toxicity of LC50**	**Time of Exposure**	**Referencse**
ปลาทอง (*Carassius auratus*)	21 µg/l	96 ชั่วโมง	(Macek & Mcallister, 1970)
ปลาแซลมอน (*Oncorhynchus tshawytscha*)	18 µg/l	96 ชั่วโมง	(Post & Schroeder, 1971)
หอยกาบเปลือกหนา (*Mercenaria mercenaria*)	610 µg/l	24 ชั่วโมง	(Cohn et al., 2007)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

บทที่ 3
วิธีดำเนินงานวิจัย

3.1 สัตว์ทดลอง

เก็บตัวอย่างสัตว์ทดลอง คือ หอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* จากบริเวณพื้นที่ชายฝั่ง ตำบลอ่างศิลา จังหวัดชลบุรี โดยเลือกตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร ทำความสะอาดเปลือกเพื่อกำจัดสาหร่ายและเพรียงหินออก และย้ายมาเลี้ยงในน้ำทะเลเพื่อปรับสภาพให้กับตัวอย่างสัตว์ทดลองที่นำมาศึกษาเป็นเวลา 1-2 สัปดาห์ก่อนทำการทดลอง โดยให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. (Kingtong et al., 2007) ก่อนจะนำตัวอย่างสัตว์ทดลองไปดำเนินการทดลองในขั้นถัดไป

3.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีที

การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งผู้วิจัยทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ

3.2.1 การหาช่วงของความเป็นพิษเบื้องต้นของสารดีดีที

การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีในหอยนางรม ดัดแปลงวิธีมาจาก (Kingtong et al., 2007 ; Khondee et al., 2016) ดังนี้ นำหอยนางรมปากจีบจำนวน 15 ตัว เลี้ยงในน้ำทะเล 15 ลิตร ที่มีสารดีดีทีผสมอยู่ โดยเลี้ยงที่ระดับความเข้มข้นต่างกันดังนี้ 0, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 µg/l (ppb; part per billion) หรือจนกว่าจะได้ค่าความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับทำการทดลอง จากนั้นจึงทำการตรวจสอบจำนวนหอยที่เสียชีวิต ณ เวลาที่ 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง บันทึกผลเพื่อวิเคราะห์หาช่วงความเข้มข้นของสารดีดีทีที่มีความเหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบจริงในกลุ่มทดลอง ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองนั้นผู้ศึกษาวิจัยจะทำการเปลี่ยนน้ำทะเลที่มีสารดีดีทีผสมอยู่และให้อาหารทุกวันตลอดการทดลอง จากนั้นใช้โปรแกรม Excel คำนวณหาค่า LC50 โดยใช้ค่าจากสมการ Probit Analysis ซึ่งค่า LC50 จะบ่งบอกระดับความเป็นพิษของสารดีดีทีในหอยนางรมปากจีบ

3.2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีที

หลังจากที่ทราบค่าความเป็นพิษเบื้องต้นแล้ว ค่าความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ถูกผสมอยู่ในน้ำทะเลที่จะใช้ในกลุ่มทดลองจะถูกปรับใหม่ให้มีความเหมาะสม เพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกและโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบ โดยศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 % LC50 และใช้หอยนางรมปากจีบจำนวน 15 ตัว

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ต่อหนึ่งตู้ และเลี้ยงในน้ำทะเล 15 ลิตร จากนั้นจึงให้อาหารและเปลี่ยนน้ำทะเลมีสารดีดีทีผสมอยู่ทุกวัน ทำการเก็บตัวอย่างโปรตีนในเมือกและเนื้อเยื่อที่เวลา 96 ชั่วโมง เพื่อศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีในลำดับถัดไป

3.3 การเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคทางมิญชวิทยา

เก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยนางรมจากทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง แล้วตัดเนื้อเยื่อตามขวาง ก่อนนำไปผ่านกระบวนการตรึงเนื้อเยื่อ เพื่อทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อคงสภาพใกล้เคียงกับตอนที่ยังมีชีวิตอยู่ และเป็นการยับยั้งขบวนการ autolysis ที่เกิดขึ้น เพื่อให้สามารถใช้ตรวจและทำการศึกษาการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในเนื้อเยื่อนั้นๆ ทำเป็นลำดับตามขั้นตอนของการย้อมสีด้วย hematoxylin และ eosin (H&E) แล้วจึงส่องดูเนื้อเยื่อด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบ DIC (Differential interference contrast microscope) ยี่ห้อ Olympus รุ่น BX51 โดยใช้โปรแกรม View finder Life เพื่อดูและศึกษาเนื้อเยื่อที่กำลังขยายต่างๆ พร้อมกับถ่ายรูป

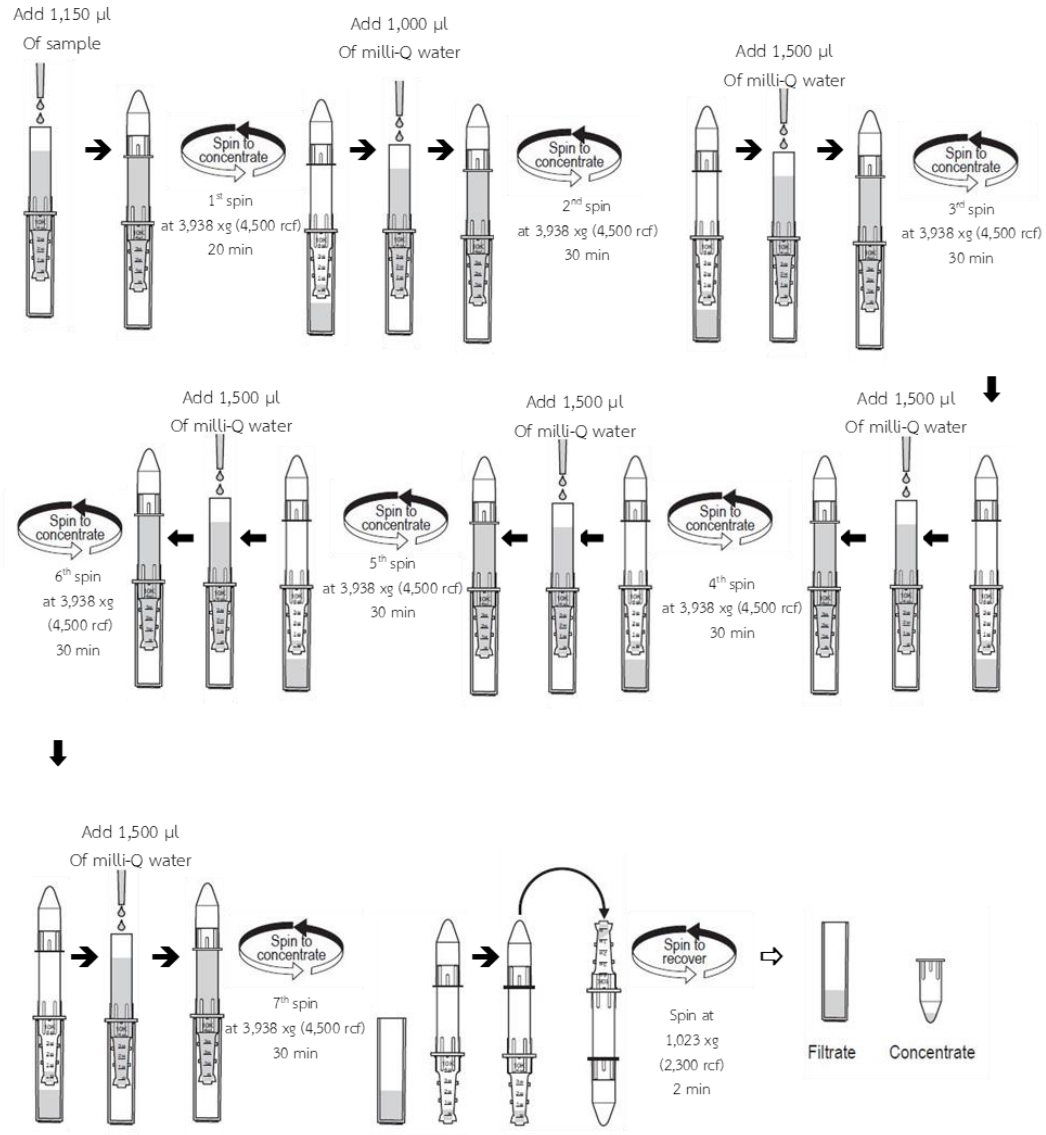
3.4 การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

3.4.1 การเก็บตัวอย่างเมือกของหอยนางรมปากจีบจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง

ทำการเก็บตัวอย่างเมือกของหอยนางรมปากจีบจำนวน 30 ตัว จากทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง เพื่อใช้สำหรับการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งจะต้องทำบนน้ำแข็ง (on ice) และต้องใช้ความรวดเร็วเพื่อป้องกันไม่ให้ตัวอย่างโปรตีนที่ต้องการศึกษาได้รับความเสียหายจากเอนไซม์โปรทีเอส โดยมีขั้นตอนดังนี้ ตัดเปลือกที่อยู่ด้านบนของหอยนางรมปากจีบออกประมาณหนึ่งในสามส่วนด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ adductor muscle ขาดหรือฉีก และเป็นการป้องกันการปนเปื้อนของพลาสมา (plasma) ที่จะไหลออกมาผสมกับเมือกที่ถูกหลั่งออกมาจากพาเลียลออร์แกน หากเพอร์ริคาเดียม (pericardium) ที่อยู่ติดกับบริเวณ adductor muscle ฉีกขาด หลังจากนั้นล้างผิวหน้าของตัวหอยด้วยน้ำทะเลเทียม เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก แล้วจึงค่อยๆ ใช้คอตตอนทิป (cotton tip) ขนาดเล็กที่ผ่านการฆ่าเชื้อ (small sterile cotton tipped) และถูกแช่อยู่ในน้ำทะเลเทียมซึ่งมีอุณหภูมิต่ำมาถู (swab) บริเวณพาเลียล ออร์แกน (Emmanuelle et al., 2009) เมือกที่เก็บได้จะติดอยู่บนคอตตอนทิป หลังจากนั้นจึงนำคอตตอนทิปนี้มาแกว่งในน้ำทะเลเทียมที่มีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งอยู่ในหลอดเซ็นติฟิ้วแบบมีฝาปิด (centrifuge tube) ขนาด 15 ml เพื่อทำให้เมือกที่เก็บได้หลุดออกจากคอนตอนทิปก่อนที่จะนำตัวอย่างเมือกที่เก็บได้ไปผ่านการกรองเอาสิ่งสกปรกออกด้วย syringe

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

filter ขนาด 0.22 µm หลังจากนั้นนำตัวอย่างเมือกมาทำการตกตะกอนโปรตีนด้วยอะซีโตน (acetone precipitation) จากนั้นจึงนำมาละลายน้ำ ทำการกำจัดเกลือ (Desalting) ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices ดังแสดงในภาพที่ 3-1 แล้วจึงนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้มาผสมกับ lysis buffer



ภาพที่ 3-1 ขั้นตอนการกำจัดเกลือ (Desalting) ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

3.4.2 การสกัดโปรตีน

เตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเมือกของหอยนางรมปากจีบโดยการเติม lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ซึ่งมีองค์ประกอบ คือ 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1 mM EDTA และ 1 mM cocktail protease inhibitor) ลงไปในตะกอนโปรตีนของเมือก จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้เศษเซลล์ตกตะกอน แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ด้านบนซึ่งเป็นโปรตีนจากเมือกของหอยนางรมปากจีบ ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay (Bradford, 1976) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น standard protein ทั้งนี้เมือกของหอยนางรมอาจมีน้ำทะเลติดมาด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการแยกโปรตีนในขั้นถัดไป จึงอาจเพิ่มขั้นตอนการทำโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก่อนการแยกโปรตีนต่อไป

3.4.3 การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคเจล 2 มิติ (Two-dimensional gel electrophoresis)

เมื่อวัดปริมาณโปรตีนแล้ว ขั้นต่อมาคือการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าโดยใช้เทคนิคเจล 2 มิติ หรือ 2-DE (Two-dimensional gel electrophoresis) การแยกโปรตีนในมิติที่หนึ่งทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าตามค่า Isoelectric focusing หรือ ค่า pI ของโปรตีน เครื่องมือที่ใช้คือ IPG Phore3 โดยนำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดแล้วมา 250 ไมโครกรัมต่อตัวอย่าง มาแยกบน IPG gel strips ขนาดความยาว 7 เซนติเมตร pH 3-10 non-linear (GE Healthcare) แบบ cup loading โดยใส่โปรตีนลงในถ้วยใส่ตัวอย่างขนาดเล็ก (sample cup) ร่วมกับ rehydration buffer (7 M urea, 4% CHAPS, 0.2% IPG buffer, 0.1 M DTT) แล้วทิ้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้สารละลายทั้งหมดซึมเข้าไปภายในแผ่นเจล เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วจึงทำการแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้า Isoelectric focusing (IEF) ที่อุณหภูมิ 25 °C ใช้ทั้งสิ้น 4 Steps ดังนี้ Step 1 คือระยะ Step and Hold ใช้ 300 Voltage Step 2 คือระยะ Gradient ใช้ 1000 Voltage Step 3 คือระยะ Gradient ใช้ 5000 Voltage และStep 4 คือระยะ Step and Hold ใช้ 5000 Voltage โดยที่ทั้ง 4 Steps นี้ใช้เวลา 6.58 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงนำ IPG gel strips ที่ทำการแยกโปรตีนตาม pI เรียบร้อยแล้วไปแช่ในสารละลาย equilibration buffer 1 (6 M urea, 50 mM Tris pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) DTT) เป็นเวลา 15 นาที จากนั้นดำเนินการในรอบที่ 2 ด้วยสารละลาย equilibration buffer 2 แต่แทนที่ DTT ด้วย 2.5% (w/v) iodoacetamide (6 M urea, 50 mM Tris pH 6.8, 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 2.5 % (w/v) iodoacetamide) เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงนำ IPG gel strips ไปแยกทำการโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าในมิติที่ 2 ต่อไป

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ในมิติที่สองจะแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้ 12.5 % SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (12.5 % SDS-PAGE) หลังจากกระบวนการ electrophoresis นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และล้างสีด้วย Destain solution และวิเคราะห์ความแตกต่างของการแสดงออกของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบระหว่างเมือกที่ได้จากกลุ่มควบคุม และเมือกของหอยนางรมปากจีบที่แยกได้จากกลุ่มทดลอง ด้วยโปรแกรม Image Master 2D Platinum 7.0 ของบริษัท GE Healthcare และนำโปรตีนที่มีความแตกต่างกันระหว่างกลุ่มการทดลองไปวิเคราะห์เพื่อหาชนิดของโปรตีนต่อไป

3.4.4 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองโดยใช้โปรแกรม Image Master™ 2D Platinum 7.0 (GE Healthcare, Sweden)

นำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วไปสแกนด้วยเครื่อง Silver fast® 8 Expression 11000XL จากนั้นทำการเปรียบเทียบจำนวนและปริมาณของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมที่ได้จากกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 ของบริษัท GE Healthcare ซึ่งโปรแกรมจะทำหน้าที่เปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนบนแผ่นเจล SDS-PAGE เพื่อวิเคราะห์ผลและเปรียบเทียบความแตกต่าง พร้อมทั้งคำนวณค่าความเชื่อมั่น ($P = 0.05$) ให้กับโปรตีนแต่ละจุดที่วิเคราะห์ โดยใช้เกณฑ์วัดจุดโปรตีนที่มี spot intensity มากกว่า 350 จุดโปรตีนที่มี spot area มากกว่า 0.1 และจุดโปรตีนที่มี spot volume มากกว่า 70 ขึ้นไป จึงทำให้ทราบข้อมูลการแสดงออกที่แตกต่างกันของโปรตีนอย่างมีนัยสำคัญ ผู้วิจัยจึงสามารถเลือกโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกที่แตกต่างกัน เพื่อใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายของการปนเปื้อนสารดีดีทีได้ โดยผ่านขั้นตอนการระบุชนิดของโปรตีนโดยการตัดจุดโปรตีนที่สนใจศึกษา แล้วจึงทำการย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และนำไประบุชนิดของโปรตีนโดยการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปกโทรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS (AmaZon™ speed ETD mass spectrometer) ต่อไป

3.4.5 การระบุชนิดของโปรตีน

3.4.5.1 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน

นำแผ่นเจล SDS-PAGE ที่มีความแตกต่างของโปรตีนมาวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยตัดจุดของโปรตีน (protein spots) ออกจากแผ่นเจล แล้วจึงนำเจลไปล้างด้วย สารละลาย 50% acetonitrile (ACN), 25 mM ammonium bicarbonate ($NH_4 HCO_3$) 2 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติม 100% acetonitrile 200 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะมีสีขาวแล้วจึงดูดสารละลายออก หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเพื่อให้ได้สายเพปไทด์ โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซินที่เจือจางอัตราส่วน 0.006 µg/µl ปริมาณ 10-15 ไมโครลิตร ลงในหลอดต่างๆ แล้วบ่มที่

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง ซึ่งเอนไซม์ทริปซินมีคุณสมบัติ คือ สามารถจดจำตำแหน่งและเข้าไปตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่ง arginine และ lycine ก่อนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS (AmaZon™ speed ETD mass spectrometer)

3.4.5.2 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS

นำเปปไทด์ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากขั้นตอนข้างต้นมาวิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (AmaZon™ speed ETD mass spectrometer) ที่ประกอบด้วย ส่วนของ liquid chromatography และส่วนของ electrospray ionization (ESI)/ ion trap mass spectrometer ซึ่งผลที่ได้จะเป็น Chromatogram และนำผลที่ได้นี้ไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาชนิดของโปรตีนโดยการสืบค้นในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เช่น MASCOT (www.matrixscience.com) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ (parameters) ค่า peptide tolerant คือ ± 1.2 Da ค่า MS/MS tolerant คือ ± 0.6 Da เลือกเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ในระหว่างขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทรมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS นี้ เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ เป็นผู้ดำเนินการให้

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

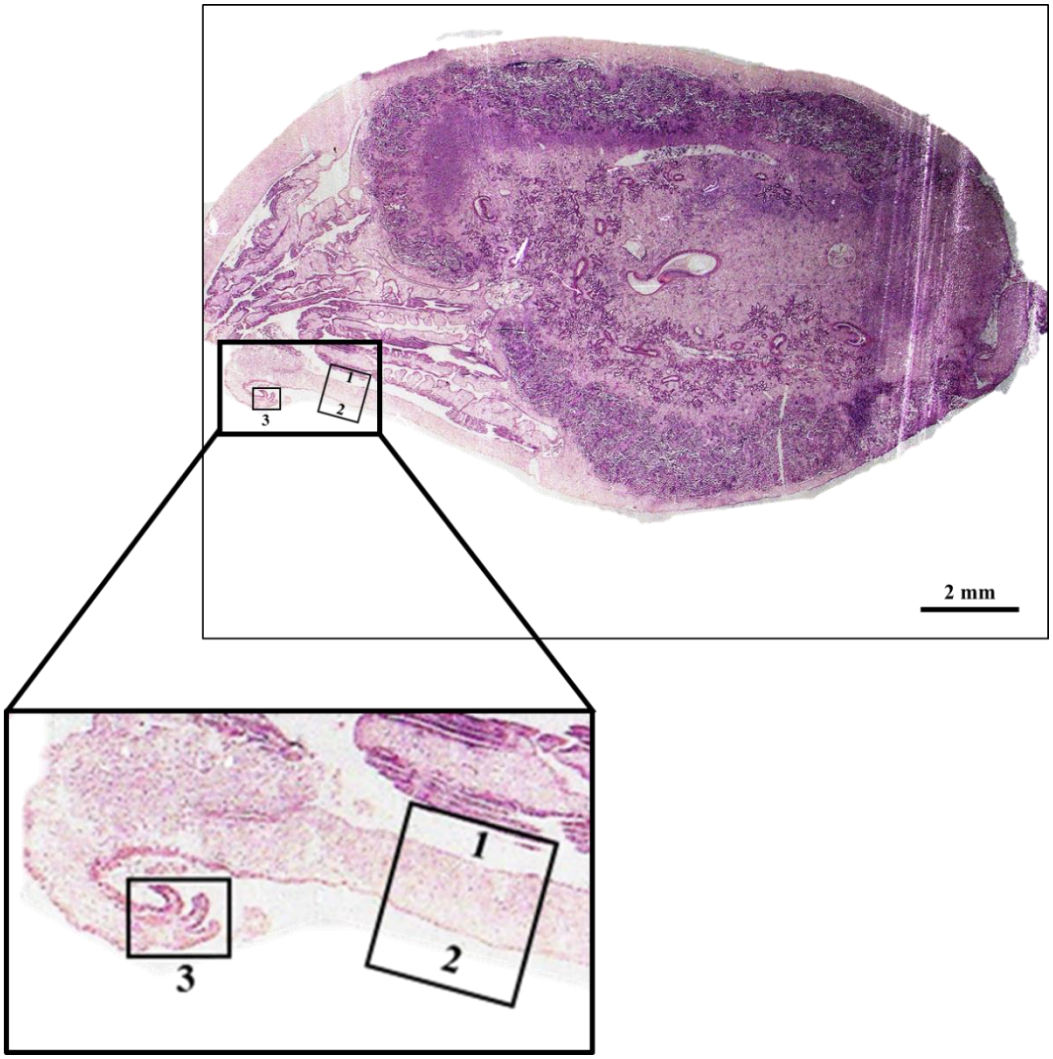
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

4.1.1 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

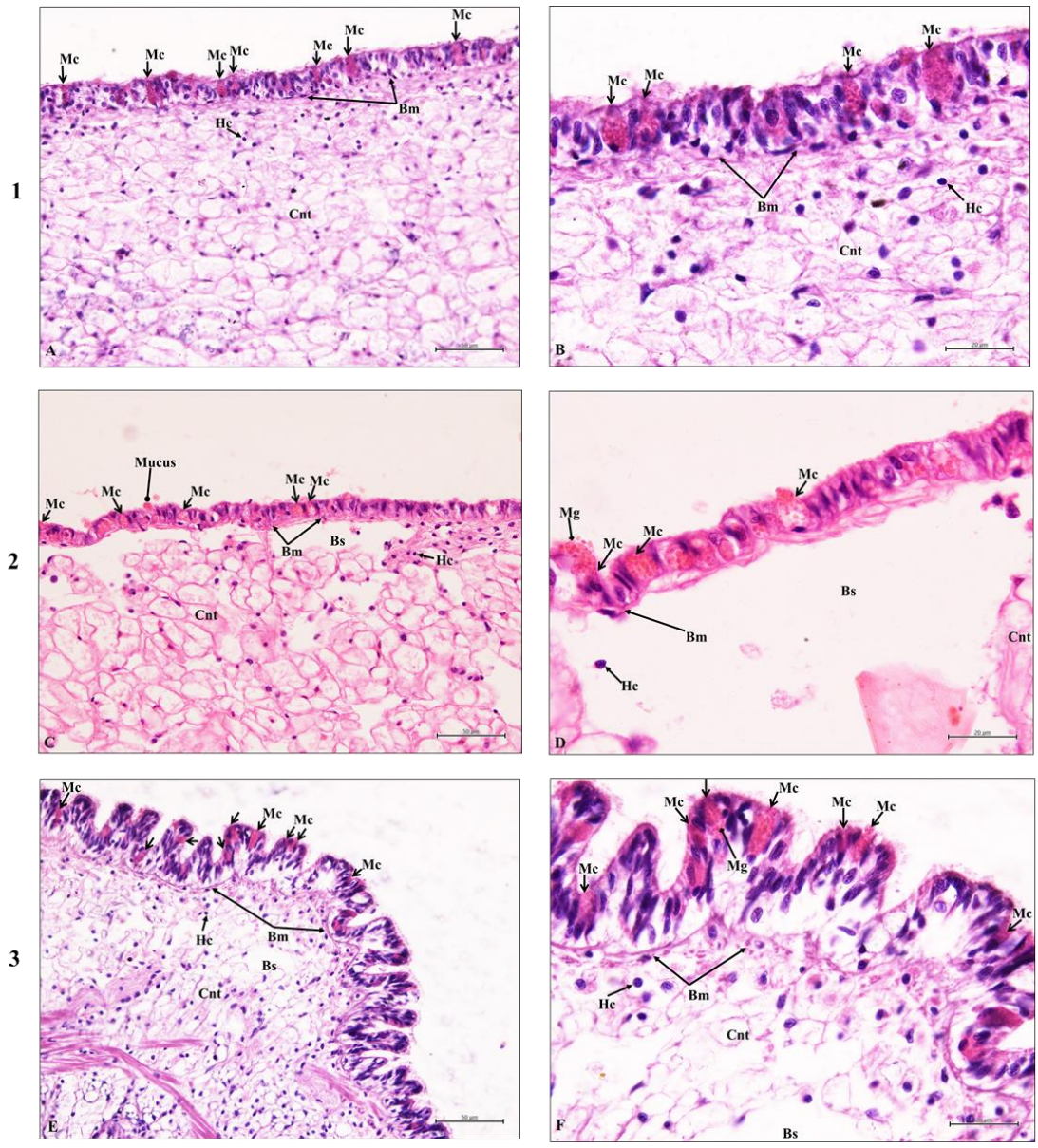
จากการศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างเมือกของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ของหอยนางรมปากจีบ โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) พบว่าเซลล์ที่ชั้นผิวของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบนี้มีลักษณะเป็นเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium ที่ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกสูงเรียงตัวชั้นเดียว แต่มีลักษณะเหมือนกับมีหลายชั้น เนื่องจากเซลล์อยู่ชิดติดกันมาก และเซลล์มีความยาวมากทำให้เบียดกันจนดูเหมือนมีหลายชั้น และพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell, mucocyte หรือ goblet cell) แทรกอยู่ตลอดความยาวของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยสองฝา ดังแสดงไว้ในภาพที่ 2 - 6 (Allam & Espinosa, 2015) เซลล์สร้างเมือกที่พบนี้เป็นเซลล์ขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายคลึงกับถ้วยหรือแก้วไวน์ พบนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ซึ่งติดสีม่วงของสีย้อม Hematoxylin ทั้งนี้พบ secretory granules ซึ่งเป็นถุงขนาดเล็กจำนวนมากที่มี mucin อยู่ภายใน เรียกว่า mucin granules ซึ่งติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin (ภาพที่ 4-2-D) ที่กำลังหลั่งออกนอกเซลล์สร้างเมือก และยังพบเซลล์สร้างเมือกที่แตกต่างกัน 2 ประเภทตามการติดสีย้อม เมื่อทำการย้อมด้วยสี Haematoxylin และ Eosin (H&E) ได้แก่ Eosinophilic (ติดสีแดงของสี Eosin) ดังแสดงในภาพที่ 4-3-A และ Basinophilic (ติดสีม่วงของสี Hematoxylin) ดังแสดงในภาพที่ 4-3-B และพบเมือก (Mucus) ที่หลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือก (ภาพที่ 4-3-A และภาพที่ 4-3-B) แต่ไม่สามารถระบุคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์สร้างเมือกได้ จึงจำเป็นต้องศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์สร้างเมือกโดยเทคนิคทางมิญชวิทยาเคมีด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) ต่อไป ซึ่งเซลล์สร้างเมือกที่แทรกอยู่ในเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium ดังที่กล่าวมานั้นจะเรียงตัวตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) ซึ่งเป็นเยื่อบางที่รองรับชั้น epithelium และใต้เยื่อฐานนี้พบเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (vesicular cell) ที่มีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์แบบหลวมๆ ในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้พบแอ่งเลือด (blood sinus) ขนาดเล็กแทรกอยู่ทั่วไป และพบเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) กระจายตัวแทรกอยู่ระหว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



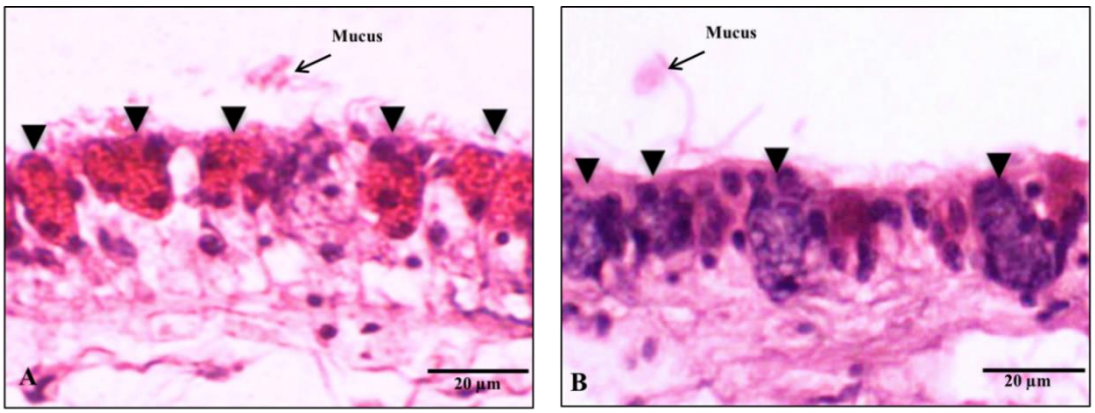
ภาพที่ 4 - 1 เนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ตัดตามขวางแสดงตำแหน่งบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมประกอบด้วยหมายเลข 1 = ด้านในของแมนเทิลที่ติดกับอวัยวะภายใน หมายเลข 2 = ด้านนอกของแมนเทิลที่ติดกับเปลือก และหมายเลข 3 = ส่วนปลายของแมนเทิล ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



ภาพที่ 4 - 2 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) หมายเลข 1 = ด้านในของแมนเทิลที่ติดกับอวัยวะภายใน **(A และ B)** หมายเลข 2 = ด้านนอกของแมนเทิลที่ติดกับเปลือก **(C และ D)** และหมายเลข 3 = ส่วนปลายของแมนเทิล **(E และ F)** พบเซลล์สร้างเมือกขณะกำลังหลั่งเมือกที่อยู่ในรูปของมิวซินแกรนูล (mucin granules) ออกนอกเซลล์ **(D)** สัญลักษณ์ Bm = Basement membrane, Bs = Blood sinus, Cnt = Connective tissue, Hc = Hemocyte, Mc = Mucous cell และMg = Mucin granule (A, C และ E กำลังขยาย 400 เท่า และ B, D และ F กำลังขยาย 1,000 เท่า)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

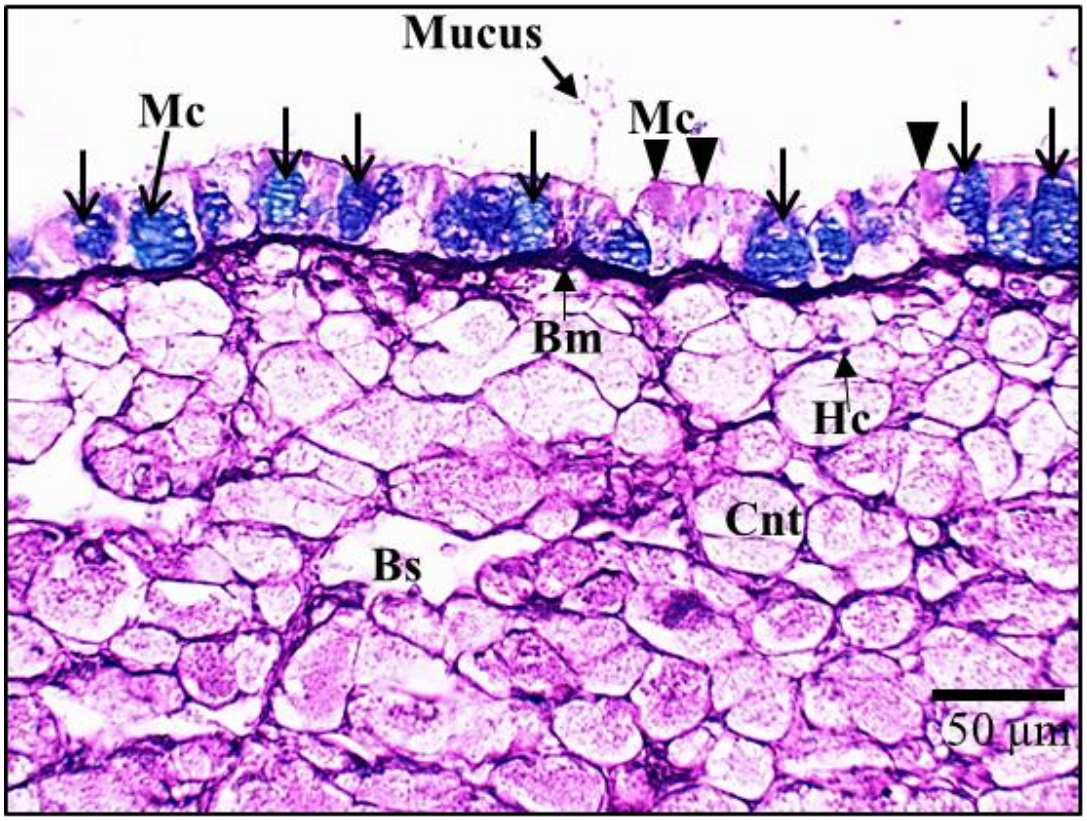


ภาพที่ 4 – 3 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลด้านนอกที่ติดกับเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) พบเมือก (mucus) ที่หลั่งออกนอกเซลล์สร้างเมือก และพบการติดสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Eosin **(A)** และกลุ่มที่ติดสีม่วงของสี Hematoxylin **(B)** (กำลังขยาย 1,000 เท่า)

4.1.2 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5)

เพื่อพิสูจน์คุณสมบัติเชิงเคมีของเซลล์สร้างเมือกของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ของหอยนางรมปากจีบ ผู้วิจัยจึงทำการศึกษาโดยเทคนิคทางมิญชวิทยาเคมีด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) ซึ่ง PAS จะย้อมติดเซลล์ที่มีคาร์โบไฮเดรต เช่น ไกลโคเจน สะสมอยู่มาก โดยจะให้ผลบวกคือเห็นเซลล์ติดสีแดงชมพูในเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และ AB 2.5 จะย้อมติดเซลล์ที่มีคาร์โบไฮเดรต เช่น ไกลโคเจน สะสมอยู่มากเช่นกัน โดยจะให้ผลบวกคือเห็นเซลล์ติดสีเขียวในเซลล์ที่มีคุณสมบัติเป็นกรด เมื่อใช้เทคนิคทางมิญชวิทยาเคมีด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) พบเซลล์สร้างเมือกย้อมติดสีได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Periodic acid–Schiff (PAS) สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และกลุ่มที่ติดสีน้ำเงินของสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียว ซึ่งช่วยยืนยันว่าเซลล์สร้างเมือกนี้นี้มีคาร์โบไฮเดรตเป็นองค์ประกอบอยู่ภายในเซลล์ และแสดงให้เห็นว่าสารที่อยู่ภายในเซลล์สร้างเมือกนี้มีคุณสมบัติเป็นกลาง รวมถึงมีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียวอีกด้วย ดังแสดงในภาพที่ 4-4

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
27170589923

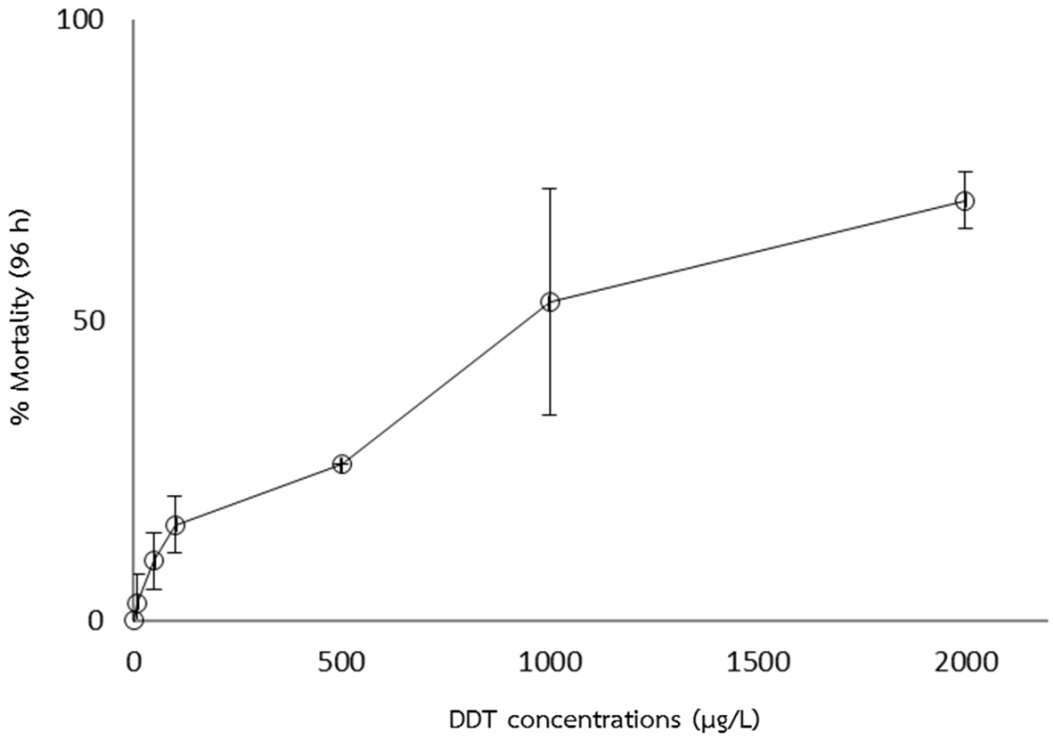


ภาพที่ 4 - 4 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลด้านนอกที่ติดกับเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) ย้อมด้วยสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) พบเซลล์สร้างเมือกขณะกำลังหลั่งเมือก (mucus) ออกนอกเซลล์ ซึ่งพบการติดสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 ได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Periodic acid–Schiff (PAS) (แสดงสัญลักษณ์ด้วยรูปสามเหลี่ยมหัวคว่ำ) สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และกลุ่มที่ติดสีน้ำเงินของสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) (แสดงสัญลักษณ์ด้วยลูกศรหัวคว่ำ) สร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียว สัญลักษณ์ Bm = Basement membrane, Bs = Blood sinus, Cnt = Connective tissue, Hc = Hemocyte และ Mc = Mucous cell (กำลังขยาย 400 เท่า)

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
2717058923

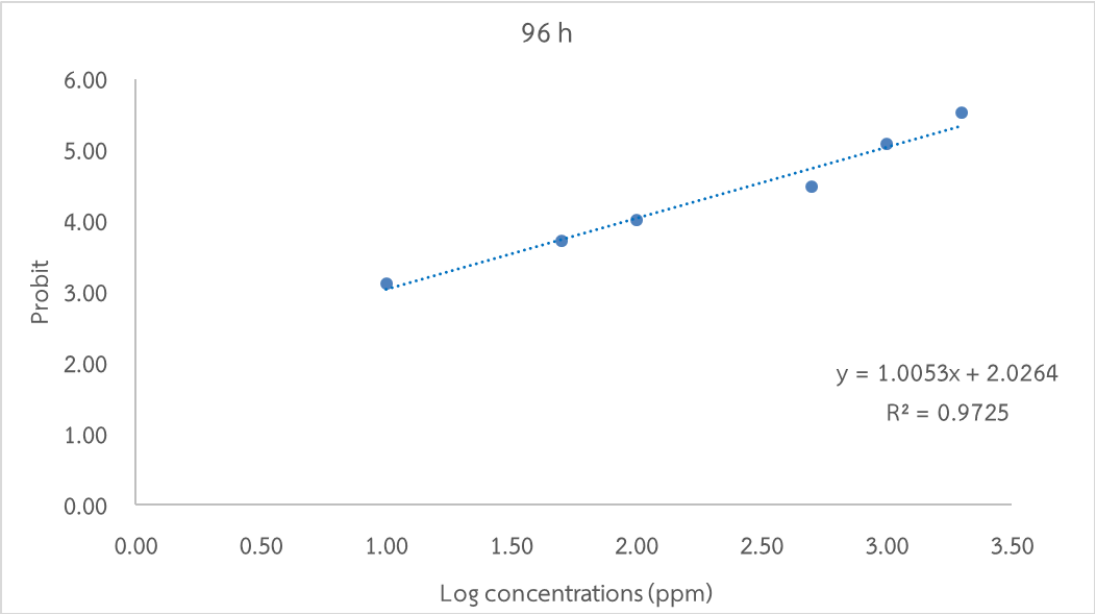
4.2 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ เมื่อนำตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 µg/L เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง โดยทำการเปลี่ยนน้ำและให้อาหารทุก 24 ชั่วโมง ปรากฏผลดังนี้



ภาพที่ 4 - 5 กราฟอัตราการตายสะสม (% Mortality) ของหอยนางรมปากจีบเมื่อได้ดับสารดีดีทีเป็นเวลา 96 ชั่วโมง

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



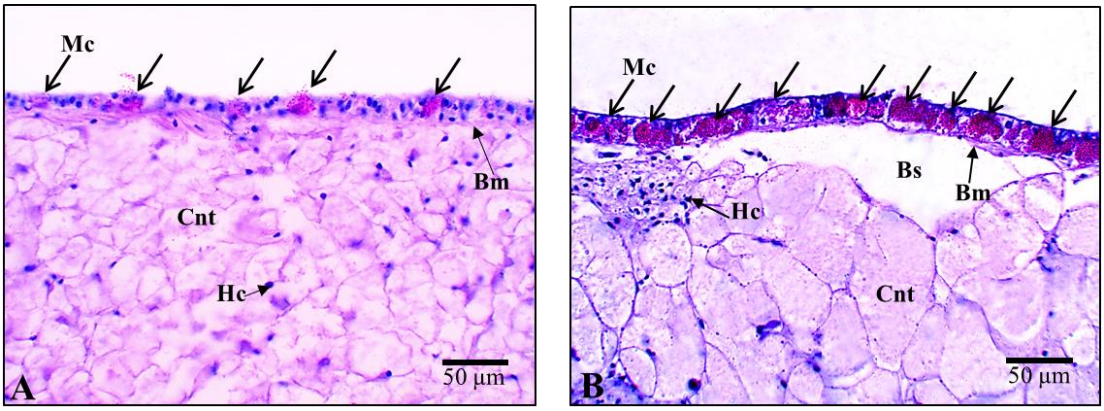
ภาพที่ 4 - 6 กราฟการวิเคราะห์ค่า LC50 โดยการแปลงเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (% Cumulative mortality) เป็นค่า Probit จากตาราง probit และความเข้มข้นของสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 µg/L ตามลำดับ ที่เวลา 96 ชั่วโมง

ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 µg/L พบว่าเมื่อครบระยะเวลาที่ 96 ชั่วโมง อัตราการตายของหอยนางรมปากจีบมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ผสมอยู่ในน้ำทะเล จากการวิเคราะห์ผลด้วยโปรแกรม Excel จากค่าสมการ Probit analysis ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของความเข้มข้น (X) และ ค่า Probit (Y) ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-5) ทำการวิเคราะห์หาค่า LC50 โดยการแปลงเปอร์เซ็นต์การตายสะสม (% Cumulative mortality) เป็นค่า Probit จากตาราง Probit ความเข้มข้นของสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 µg/L ตามลำดับ ที่เวลา 96 ชั่วโมง สามารถคำนวณหาค่า LC50 ของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีที เป็นเวลา 96 ชั่วโมง คือ 1,000 µg/L ดังนั้นค่าประมาณ 10% ของค่า LC50 ที่จะนำไปใช้กับกลุ่มทดลองเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในการทดสอบครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 100 µg/L ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการศึกษาการตอบสนองของเซลล์เมื่อได้รับสารพิษ และเนื่องด้วยต้องการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ ในเชิงของพิษวิทยา

จากการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเซลล์สร้างเมือกของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ของหอยนางรมปากจีบ โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
2717058923

เปรียบเทียบที่เวลา 96 ชั่วโมง ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที (ภาพที่ 4-6-A) กับกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L (ภาพที่ 4-6-B) พบว่าภายในเซลล์สร้างเมือกมี mucin granules ซึ่งติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin ทั้งนี้พบว่าเซลล์สร้างเมือกมีจำนวนเพิ่มขึ้น มีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้น และพบว่าภายในเซลล์สร้างเมือกมี Mucin granule เพิ่มขึ้นจำนวนมากในกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L ยังพบการกระจุกตัวของเซลล์ฮีโมไซท์ และพบแอ่งเลือดที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีอีกด้วย ซึ่งการเพิ่มทั้งจำนวน และขนาดของเซลล์เมือกนี้เป็นการยืนยันว่าหอยนางรมปากจีบมีการตอบสนองต่อความเครียดที่ถูกกระตุ้นด้วยสารดีดีที ดังนั้นผู้วิจัยคาดว่าเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกในกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L น่าจะแตกต่างจากเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที จึงจำเป็นต้องศึกษาความแตกต่างของเมือกระหว่าง 2 กลุ่มการทดลองด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์ในขั้นถัดไป



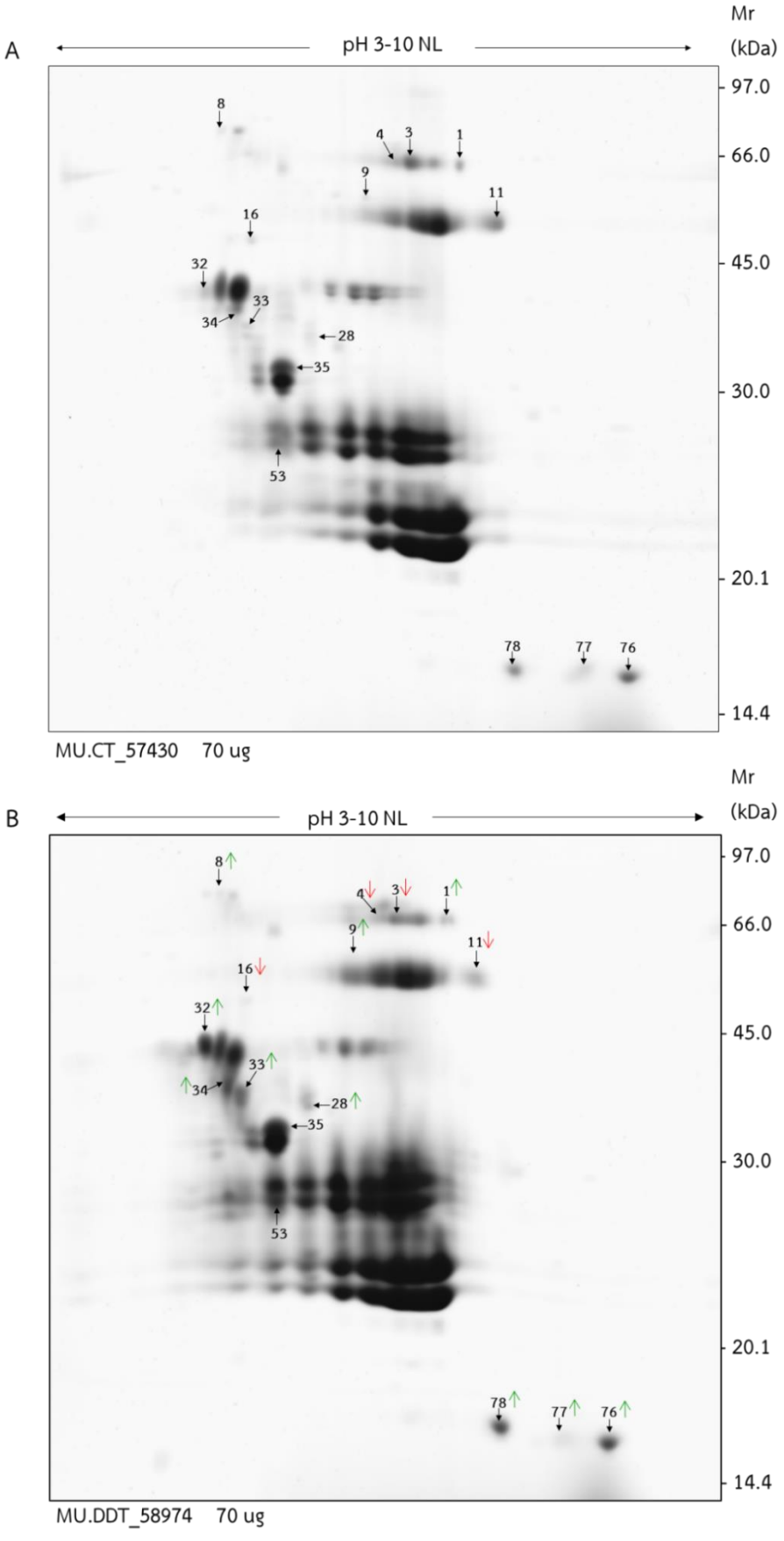
ภาพที่ 4 - 7 เซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลด้านนอกที่ติดกับเปลือกของหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) ที่เวลา 96 ชั่วโมง **A** คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที และ **B** คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L พบ mucin granules จำนวนมากอยู่ภายในเซลล์สร้างเมือก ซึ่งติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin (กำลังขยาย 400 เท่า) สัญลักษณ์ Bs = Blood sinus, Bm = Basement membrane, Cnt = Connective tissue, Hc = Hemocyte และ Mc = Mucous cell

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

4.3 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ

การเปรียบเทียบผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบในการศึกษาครั้งนี้ ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์สำหรับการศึกษา โดยทำการเปรียบเทียบโปรตีนจากเมือกของหอยนางรม 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยในกลุ่มทดสอบ เลือกหอยนางรมกลุ่มที่ได้รับสารพิษดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มขึ้นดังกล่าวใกล้เคียงกับค่า ร้อยละ 10 ของค่า LC50 ณ เวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นความเข้มข้นดังกล่าวไม่ทำให้ตัวอย่างสัตว์ทดสอบตายจึงเหมาะสมสำหรับการศึกษากลไกการทำงานของเซลล์ โดยทำการสกัดโปรตีนจากเมือกหอยทั้งสองกลุ่ม และตกตะกอนด้วย Acetone ที่อุณหภูมิ - 20 °C กำจัดเกลือออกด้วยการกรองผ่าน จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยเจล 2 มิติ โดยใช้ปริมาณโปรตีน 70 ไมโครกรัม/เจล จากนั้นทำการย้อมด้วยสี Coommassie Brilliant Blue ทำให้ได้ผลดังภาพที่ 4-7 และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) โดยใช้เกณฑ์การวิเคราะห์คือวัดจุดโปรตีน (protein spot) ที่มี spot area มากกว่า 0.1 และมี spot intensity มากกว่า 350 และมี spot volume มากกว่า 70 ขึ้นไป จากเกณฑ์ดังกล่าวพบว่าสามารถระบุจำนวนจุดโปรตีนในกลุ่มควบคุมได้ 140.67±10.53 จุด (N=3) สำหรับกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบจำนวนจุดโปรตีน 111.67±18.45 จุด (N=3) โดยในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยทำการเปรียบเปรียบปริมาณโปรตีนโดยใช้ spot volume เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 4-8 พบว่าสารดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งสิ้น 14 จุด ประกอบด้วยโปรตีนที่ปริมาณเพิ่มขึ้นด้วยสารดีดีที 10 จุด และโปรตีนที่ปริมาณลดลงด้วยสารดีดีที 4 จุด ดังภาพที่ 4-7 และ ตารางที่ 4.1 ซึ่งค่า pI/Mr (kDa) experiment คำนวณได้จากค่าสมการ $y = -24.75\ln(x) + 70.039$ และ $R^2 = 0.9862$

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
2717058923

ภาพที่ 4 - 8 ผลการวิเคราะห์โปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ ใช้ตัวอย่างเมือกหอยนางรม จากการตกตะกอนด้วย Acetone เย็น นำมาละลายน้ำ แล้วทำการกำจัดเกลือ (Desalting) ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices แล้วนำมาแยกโปรตีนในเจล 2 มิติ โดยในมิติที่ 1 ทำการแยกด้วย pI 3-10 (non linear) และ มิติที่สองทำการแยกใน 12.5% SDS-PAGE โดยใช้ปริมาณโปรตีน 70 µg/gel **A** คือ กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที และ **B** คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง สัญลักษณ์รูปสามเหลี่ยมสีเขียว = Up-reulated proteins หมายถึง โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสารดีดีที เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และสัญลักษณ์รูปสามเหลี่ยมสีแดง = Down-regulated proteins หมายถึง โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสารดีดีที เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

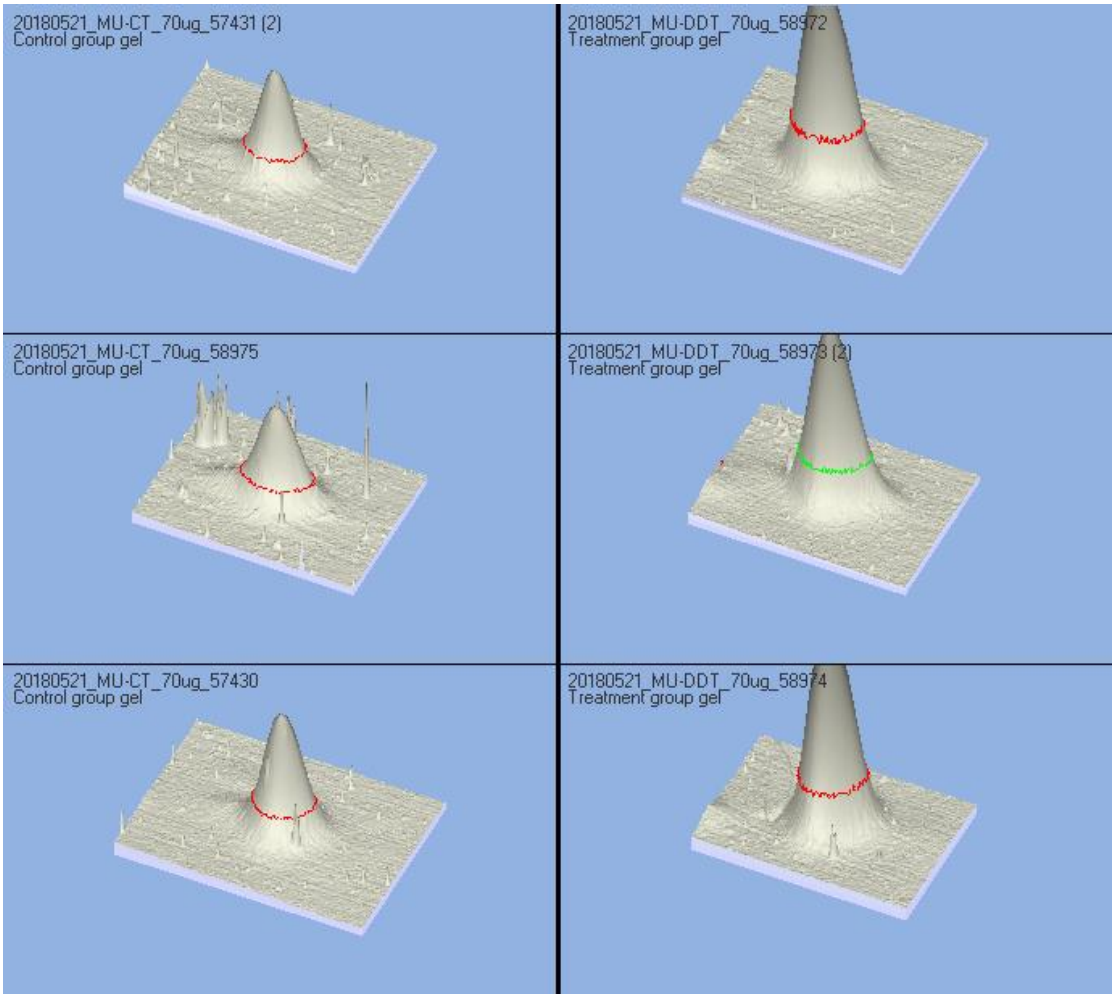
2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ตารางที่ 4 - 1 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน ในตัวอย่างเมือกจากหอยนางรมปากจีบ (S. cucullata) เมื่อได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม

Spot No.	pI/Mr (KDa) experiment	*Fold changes
28	5.75/36.35	9.34
8	4.75/75.56	4.09
33	5.00/36.35	2.25
78	7.87/16.35	2.19
77	8.25/16.21	1.99
9	6.12/52.88	1.79
34	4.87/37.66	1.55
32	4.60/41.64	1.44
76	8.90/15.66	1.35
1	7.15/63.55	1.34
16	5.10/48.37	-1.39
3	6.65/64.42	-1.45
11	7.35/51.09	-1.95
4	6.45/64.52	-2.25

*ค่า Fold changes อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) คำนวณจาก spot volume ของ protein spot ระหว่างกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11



ภาพที่ 4 - 9 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) ภายหลังการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ แล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของ spot volume ของจุดโปรตีนดังตัวอย่างในภาพเป็นจุดโปรตีนหมายเลข 76 ของกลุ่มควบคุม (A, C, E) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (B, D, F)

เมื่อเปรียบเทียบจุดของโปรตีนบนแผ่นเจลแล้ว ผู้วิจัยทำการระบุชนิดของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันทั้ง 14 จุด ด้วยเทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) (Waters, amaZon™ speed ETD mass spectrometer, Bruker Daltonics, Bremen, German) ร่วมกับ Bioinformatics search โดยเริ่มจากการตัดจุดของโปรตีนบนแผ่นเจลโพลิอะคริลาไมด์ออกจากแผ่นเจล และย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Promega™ Sequencing Grade Modified Trypsin, Lyophilized ;

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Manufacturer: Promega™ V5111) หลังจากนั้นจึงนำไปวิเคราะห์ด้วย (LC-MS/MS) (Waters, amaZon™ speed ETD mass spectrometer, Bruker Daltonics, Bremen, German) และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI

โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ MASCOT (www.matrixscience.com) ณ วันที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2561 พบว่าสามารถระบุโปรตีนได้ 4 จุด ประกอบด้วย protein spot หมายเลข 8, 4, 32 และ 76 (ตารางที่ 4-2) นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้สุ่มวิเคราะห์จุดโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่พบในเมือกอีก 12 จุด แต่พบว่ามีจุดโปรตีนที่มีขนาดใหญ่เพียง 2 จุด เท่านั้นที่สามารถระบุชนิดได้ ประกอบด้วย protein spot หมายเลข 35 และ 53 (ตารางที่ 4-2)

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

BUU Library 5991028O thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
27170589 23

ตารางที่ 4 - 2 การระบุชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบกลุ่มควบคุมกับเมือกของหอยนางรมปากจีบกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Spot No.	SwissProt Accession	Score	Peptide Match	pI/Mr (KDa) theoretical	pI/Mr (KDa) experiment	% Coverage	Fold changes	Protein Identification	Protein Function	Organism
[1]Up-regulated proteins										
8	P01834	121	1(1)	6.11/11.76	4.75/75.56	18%	4.09	Immunoglobulin kappa constant	immune system process	*Homo sapiens* (Human)
32	Q00214	69	1(1)	5.23/42.33	4.60/41.64	2%	1.44	Actin, muscle	cytoskeleton	*Styela plicata*
76	P86909	60	1(1)	9.62/8.42	8.90/15.66	100%	1.35	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)	calcium-binding protein	*Chionoecetes opilio* (Snow crab)
[2]Down-regulated proteins										
4	P02769	183	7(7)	5.82/69.25	6.45/64.52	9%	-2.25	Serum albumin	protein-containing complex	*Bos taurus* (Cow)

BUU Library 5991028O thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11
27170589 23

ตารางที่ 4-2 (ต่อ) การระบุชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบกลุ่มควบคุมกับเมือกของหอยนางรมปากจีบกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง

Spot No.	SwissProt Accession	Score	Peptide Match	pI/Mr (KDa) theoretical	pI/Mr (KDa) experiment	% Coverage	Fold changes	Protein Identification	Protein Function	Organism
[3]Unchanged proteins										
35	P50417	76	1(1)	6.09/38.45	5.37/33.94	3%	1.00	Haptoglobin	antioxidant activity	*Ateles geoffroyi* (Black-handed spider monkey)
53	B0R061	66	1(1)	6.22/11.03	5.35/28.30	1%	1.08	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A	ATP binding	*Danio rerio* (Zebrafish)

[1]Up-regulated proteins หมายถึง โปรตีนที่ถูกแสดงออกมากขึ้นด้วยสารดีดีที เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

[2]Down-regulated proteins หมายถึง โปรตีนที่ถูกแสดงออกน้อยลงด้วยสารดีดีที เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

[3]Unchanged proteins หมายถึง โปรตีนที่การแสดงออกไม่เปลี่ยนแปลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

5.1 อภิปรายผล

5.1.1 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

5.1.1.1 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

จากการศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างเมือกของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ของหอยนางรมปากจีบ โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) พบว่าเซลล์ที่ชั้นผิวของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบนี้มีลักษณะเป็นเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium ที่ประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกสูงเรียงตัวชั้นเดียวแต่มีลักษณะเหมือนกับมีหลายชั้น เนื่องจากเซลล์อยู่ชิดติดกันมาก และเซลล์มีความยาวมากเบียดกันจนดูเหมือนมีหลายชั้น และพบเซลล์สร้างเมือก (mucous cell, mucocyte หรือ goblet cell) แทรกอยู่ตลอดความยาวของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในหอยน้ำจืด ฝาเดียวสองชนิด คือ *Lymnaea stagnalis* และ *Biomphalaria pfeifferi* (Zylstra, 1972) ที่พบเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium บริเวณผิวของเนื้อเยื่อแมนเทิล (ภาพที่ 5-1) เซลล์สร้างเมือกที่แทรกอยู่ในเยื่อบุผิวชั้นเดียวชนิด pseudostratified columnar epithelium ดังที่กล่าวมานั้นจะเรียงตัวตั้งอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) ซึ่งเป็นเยื่อบางที่รองรับชั้น epithelium และใต้เยื่อฐานนี้พบเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (vesicular cell) ที่มีลักษณะการเรียงตัวของเซลล์แบบหลวมๆ เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สะสมสารอาหารประเภทคาร์โบไฮเดรต (Barnard, 1961)ในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันนี้พบแอ่งเลือด (blood sinus) ขนาดเล็กแทรกอยู่ทั่วไป เพื่อนำเลือดมาเลี้ยงอวัยวะในส่วนนี้ ลักษณะของแอ่งเลือดยังช่วยยืนยันว่าหอยนางรมมีระบบเลือดแบบเปิดอีกด้วย และพบเซลล์เม็ดเลือด (hemocyte) กระจายตัวแทรกอยู่ระหว่าเซลล์ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

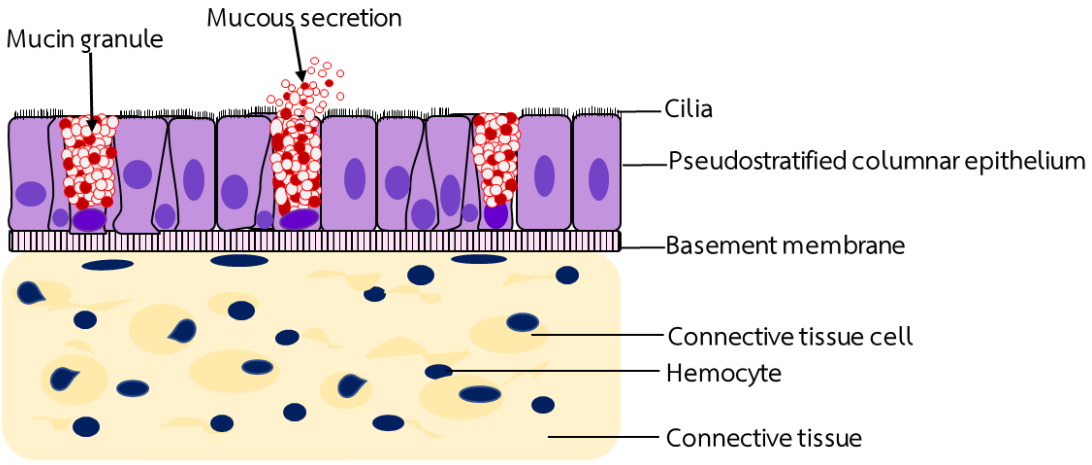
เซลล์สร้างเมือกที่พบในหอยนางรมปากจีบเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายคลึงกับถ้วยหรือแก้วไวน์ พบนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ (basal side) ซึ่งติดสีม่วงของสีย้อม Hematoxylin ลักษณะของเซลล์สร้างเมือกที่พบในครั้งนี้ตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณแมนเทิลในหอยนางรม *Crassostrea virginica* และ *C. gigas* (Beninger & Veniot, 1999) บริเวณเหงือกและแมนเทิลในหอยสองฝาน้ำเค็ม (Allam & Espinosa, 2015) เนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล และเหงือกในหอยนางรมปากจีบ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

(Khondee et al., 2016) และโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเท้าในหอยทากบก (*Helix pomatia*) (Greistorfer et al., 2017)

นอกจากนี้ยังสามารถพบการหลั่งมิวซินจากเซลล์สร้างเมือกซึ่งมีลักษณะเป็นถุงขนาดเล็กหรือแกรนูล (secretory granules/ mucin granules) จำนวนมาก ซึ่งหลั่งบริเวณผิวด้านนอกของเซลล์ (apical surface) แกรนูลเหล่านี้ติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin ตรงกับรายงานการศึกษาของเมธิยา อุทำกา และคณะในปี พ.ศ. 2560 (Uthamka et al., 2017) ที่พบ mucin granules จำนวนมากในเซลล์สร้างเมือกภายในท่อรวมของต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบ

ในหอยนางรมปากจีบพบเซลล์สร้างเมือกที่แตกต่างกัน 2 ประเภทตามการติดสีย้อม Haematoxylin และ Eosin (H&E) ได้แก่ ประเภทแรก คือเซลล์สร้างเมือกที่ติดสีย้อมอีโอซินเห็นเป็นสีแดง และประเภทที่สอง คือเซลล์สร้างเมือกที่ติดสีย้อมฮีมาท็อกไซลินเห็นเป็นสีม่วง ลักษณะดังกล่าวคล้ายกับการศึกษาเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกของปลาน้ำจืด *Abramis brama* ที่ได้รับสัมผัสการปนเปื้อนน้ำมันดิบที่พบเซลล์สร้างเมือก 3 ประเภทตามลักษณะการติดสี ได้แก่ เซลล์สร้างเมือกที่ติดสีย้อมอีโอซิน เซลล์สร้างเมือกที่ติดสีย้อมฮีมาท็อกไซลิน และเซลล์สร้างเมือกที่ไม่ติดสีย้อมทั้งสองชนิด (Giari et al., 2012) อย่างไรก็ดีการศึกษาในหอยนางรมปากจีบครั้งนี้ไม่พบเซลล์สร้างเมือกที่ไม่ติดสีย้อมทั้งสองชนิดดังที่พบในปลาน้ำจืด *Abramis brama* จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันอาจมีโครงสร้างและคุณสมบัติของเซลล์สร้างเมือกที่แตกต่างกันซึ่งตอบสนองต่อรูปแบบการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ



ภาพที่ 5 - 1 ไดอะแกรมของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

5.1.1.2 การศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5)

เมื่อใช้เทคนิคทางมิญชวิทยาเคมีด้วยการย้อมสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) พบเซลล์สร้างเมือกย้อมติดสีได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Periodic acid–Schiff (PAS) จะสร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และกลุ่มที่ติดสีน้ำเงินของสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) ซึ่งเซลล์สร้างเมือกที่พบส่วนใหญ่ติดสีย้อมนี้ จะสร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียวกัน ลักษณะเชิงเคมีดังกล่าวตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเท้าในหอยทากบก (*Helix pomatia*) โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาเคมี (Greistorfer et al., 2017) และคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกในปลากดหมูริต้า (*Rita rita*) (Yashpal et al., 2007 ; Yashpal & Mittal, 2014) ทั้งนี้ยังตรงกับรายงานการศึกษาโครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์สร้างเมือกบริเวณทางเดินอาหารและทางเดินหายใจในปลา Bronze Corydoras (Leknes, 2015) และเมื่อทำการย้อมด้วยสี PAS/AB 2.5 ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเซลล์สร้างเมือกที่พบในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ของหอยนางรมปากจีบนี้ ทำหน้าที่สร้าง และหลั่งมิวซิน (mucin) ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทคาร์โบไฮเดรต สอดคล้องกับรายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีของเซลล์สร้างเมือกบริเวณลำไส้ใหญ่ในนกกระจอกเทศที่ยืนยันถึงการพบ mucopolysaccharides ตามการติดสีย้อมชนิดนี้ (Duritis & Mugurevics, 2016) ดังนั้นด้วยคุณสมบัติทางเคมีของเมือกที่สร้างและหลั่งออกจากเซลล์สร้างเมือก จึงอาจเกี่ยวข้องกับกระบวนการป้องกันตัวเองจากอันตรายที่ได้รับจากสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อมที่หอยนางรมอาศัยอยู่ (defensive mechanism) (Arrighetti et al., 2015) ซึ่งจะช่วยป้องกันการติดเชื้อโรคที่ปนเปื้อนมากับน้ำ และป้องกันไม่ให้เชื้อโรคสัมผัสโดยตรงกับเนื้อเยื่อ สอดคล้องกับรายงานการศึกษาหน้าที่ของเมือกต่อระบบภูมิคุ้มกันที่หลั่งออกมาปกคลุมผิวหนังของปลา (Benhamed et al., 2014) และสอดคล้องกับการศึกษาเมือกที่หลั่งออกมาปกคลุมผิวหนังของปลา olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) เพื่อดักจับจุลชีพ (Jang et al., 2017) รวมถึงเอื้อต่อกระบวนการกรองกินอาหารของหอยนางรม และเมื่อมิวซินที่หลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกสัมผัสกับน้ำจะพองตัวกลายเป็นชั้นเมือกปกคลุมเนื้อเยื่อบุผิว สอดคล้องกับรายงานการศึกษาในปลา corallivorous ซึ่งเป็นปลากินพืชที่อาศัยอยู่ในน้ำเค็ม โดยจะหลั่งเมือกออกมาปกคลุมผิวบริเวณปากเพื่อป้องกันอันตรายจากการกินพืชขณะผิวปากสัมผัสกับพืช (Huertas & Bellwood, 2017) จากข้อมูลแสดงให้เห็นว่าเมือกในสิ่งมีชีวิตต่างชนิดกันอาจมีหน้าที่แตกต่างกัน ซึ่งขึ้นอยู่กับสภาพแวดล้อมในการดำรงชีวิตของสิ่งมีชีวิตนั้นๆ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

5.1.2 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

การทดสอบความเป็นพิษของสารดีดีทีที่ทำให้หอยนางรมปากจีบตายครึ่งหนึ่ง ในระยะเวลา 96 ชม. โดยศึกษาที่ระดับความเข้มข้นของสารดีดีทีที่ 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 μg/L ผลการศึกษาพบว่าหอยนางรมปากจีบมีเปอร์เซ็นต์การตายเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสารดีดีทีในความเข้มข้นที่สูงขึ้น เมื่อวิเคราะห์หา ค่า LC50 ของสารดีดีทีที่ 96 ชม. พบว่ามีค่าเท่ากับ 1,000 μg/L ซึ่งแตกต่างจากการศึกษาค่าความเป็นพิษของสารดีดีทีในหอยกาบเปลือกหนา (*Mercenaria mercenaria*) ที่มีค่า LC50 = 610 μg/L ที่เวลา 24 ชั่วโมง (Cohn et al., 2007) และค่าประมาณ 10% ของค่า LC50 ที่จะนำไปใช้กับกลุ่มทดลองเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในการทดสอบครั้งนี้ใช้ความเข้มข้นที่ระดับ 100 μg/L ทั้งนี้ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบเป็นระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการศึกษาการตอบสนองของเซลล์เมื่อได้รับสารพิษ และเนื่องด้วยต้องการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ ในเชิงของพิษวิทยา

จากการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อเซลล์สร้างเมือกของเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล ของหอยนางรมปากจีบ โดยเทคนิคทางมิญชวิทยาด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) เปรียบเทียบที่เวลา 96 ชั่วโมง ระหว่างกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที กับกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 μg/L อาการที่พบทั้งหมดเป็นตัวบ่งชี้ถึงภาวะเสี่ยงต่ออันตรายในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ที่ตอบสนองต่อการปนเปื้อนของสารดีดีทีในน้ำทะเล จึงทำให้เกิดการตอบสนองต่อสารดีดีที ซึ่งเป็นสารพิษที่ได้รับ โดยอาการที่พบ ได้แก่ เซลล์สร้างเมือกมีจำนวนเพิ่มขึ้น (hyperplasia) และมีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นในกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 μg/L ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกในปลา Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) ด้วยเทคนิคทางมิญชวิทยาเคมี พบว่าเซลล์สร้างเมือกบริเวณเหงือกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของแอมโมเนีย (ammonia) 0.4 mg/L เป็นระยะเวลา 90 วัน และเมื่ออาศัยอยู่ในน้ำที่มีความเข้มข้นของเกาลิน (kaolin) 7000 mg/L เป็นระยะเวลา 64 วัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Ferguson et al., 1992) การเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเมือกนี้จะส่งผลให้เกิดการสร้างและหลั่งเมือกเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ตรงกับรายงานการศึกษาเมือกบริเวณท่อทางเดินหายใจในหนูเมื่อได้รับควันบุหรี่เป็นระยะเวลา 4 สัปดาห์ พบว่ามีการหลั่งเมือกออกมาตามท่อทางเดินหายใจเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับควันบุหรี่ จัดเป็นการตอบสนองต่อความเครียดจากสารเคมีที่ได้รับ (Ueha et al., 2017) ผลจากการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยยังพบมิวซินแกรนูลอยู่ภายในเซลล์สร้างเมือก ซึ่งติดสีแดงชมพูของสีย้อมอีโอซิน มีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที ตรงกับการศึกษาในมนุษย์ โดยพบว่าในสภาวะที่เซลล์สร้างเมือกถูกกระตุ้น จะส่งผลให้เซลล์สร้างเมือกสร้างมิวซินแกรนูลเพิ่มขึ้น

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

เช่น เมื่อเซลล์สร้างเมือกบริเวณระบบทางเดินหายใจถูกกระตุ้นด้วยฝุ่นละออง ควัน ไวรัส หรือแบคทีเรีย จะส่งผลให้เซลล์สร้างเมือกในบริเวณนั้นสร้างมิวซินแกรนูลเพิ่มขึ้น จึงเป็นที่มาของอาการน้ำมูกไหลเวลาเป็นหวัด (Gómez et al., 2014) นอกจากนี้ยังพบการรวมกลุ่มกันของเซลล์ฮีโมไซท์ (Hemocyte infiltration) บริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของอวัยวะแมนเทิล และพบแอ่งเลือดที่มีขนาดใหญ่ขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที อาการที่แสดงออกในระดับเนื้อเยื่อจากผลการศึกษาที่กล่าวมาข้างต้นนั้น เป็นสัญญาณบ่งชี้ว่าเซลล์กำลังเกิดการอักเสบ เช่นเดียวกับการศึกษาถึงผลกระทบของสารทีบีที (TBT) ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50 and 150 µg/l ตามลำดับ ณเวลาที่ 48 ชั่วโมง ในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิล และเหงือกของหองหอยนางรมปากจีบ (Khondee et al., 2016)

ดังนั้นการเพิ่มทั้งจำนวน และขนาดของเซลล์เมือกนี้เป็นการยืนยันว่าหอยนางรมปากจีบมีการตอบสนองต่อความเครียดที่ถูกกระตุ้นด้วยสารดีดีที และเหตุที่พบเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลจำนวนมาก เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารเคมี เนื่องจากแมนเทิลเป็นส่วนที่ปกคลุมอวัยวะภายในทั้งหมดของหอยนางรม เมื่อหอยมีการเปิดเปลือกเพื่อหายใจหรือกรองกินอาหารอวัยวะส่วนนี้ก็จะสัมผัสกับสารปนเปื้อนเป็นส่วนแรก

ข้อมูลดังกล่าวแสดงให้เห็นว่า หอยนางรมปากจีบ ซึ่งเป็นสัตว์ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง เกิดความเครียดจากสารเคมีที่ได้รับ และมีกลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยา โดยการหลั่งเมือกมากขึ้น แต่ไม่ทราบถึงองค์ประกอบของเมือกที่ถูกสร้างภายใต้สภาวะเครียดจากสารเคมีที่ได้รับ เมื่อเทียบกับเมือกที่ถูกสร้างในสภาวะปกติจากสัตว์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที จึงจำเป็นต้องศึกษาด้วยวิธีทางโปรตีโอมิกส์

5.1.3 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ

ผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของจุดโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ เมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่ระดับ 100 µg/L เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าดีดีทีมีผลต่อปริมาณโปรตีนในเมือกของหอยนางรม ในกลุ่มทดสอบที่มีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจำนวนทั้งสิ้น 14 จุด ($P < 0.05$) โดยพบว่าสารดีดีทีกระตุ้นให้สร้างโปรตีนในเมือกเพิ่มขึ้นจำนวน 10 จุด และยับยั้งการสร้างโปรตีนทำให้ปริมาณโปรตีนในเมือกลดลงจำนวน 4 จุด เมื่อทำการระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มนี้สามารถระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มที่มีการกระตุ้น 3 ชนิด ได้แก่ 1. Immunoglobulin kappa constant 2. Actin และ 3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) และสามารถระบุโปรตีนในกลุ่มที่มีการยับยั้งได้ 1 ชนิด คือ Serum albumin แสดงให้เห็นว่าสารดีดีที มีผลต่อการ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

สร้างและหลั่งโปรตีนที่พบในเมือก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการสุ่มวิเคราะห์โปรตีนที่มีปริมาณมาก และสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ 2 ชนิด คือ 1. Haptoglobin และ 2. SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A

โปรตีนที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยสารดีดีทีี

1. Immunoglobulin kappa constant (P01834, จุดโปรตีนหมายเลข 8) MW = 11.76 KDa โปรตีน Immunoglobulin kappa constant เป็นส่วนประกอบของ Immunoglobulin หรือ แอนติบอดี

โครงสร้างของ Immunoglobulin หรือ แอนติบอดี ประกอบด้วย พอลิเพปไทด์ 4 สาย เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ พอลิเพปไทด์ทั้ง 4 สาย ประกอบด้วยสายยาวหรือสายหนัก (heavy chain) 2 และสายสั้นหรือสายเบา (light chain) 2 สาย ทั้งสายหนักและสายเบา ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ บริเวณที่พบลำดับกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงได้มาก (variable region) กับบริเวณที่พบลำดับกรดอะมิโนคงที่ (constant region) โดยโปรตีน Immunoglobulin kappa constant (P01834) ที่ระบุได้ในครั้งนี้ตรงกับบริเวณที่พบลำดับกรดอะมิโนคงที่ (constant region) ในสายยาวของ Immunoglobulin ซึ่งจะถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งเพิ่มขึ้นในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีี

เนื่องจากโปรตีน Immunoglobulin เป็นแอนติบอดี ที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocytes จึงพบโปรตีนชนิดนี้ภายนอกเซลล์ เช่น พบในน้ำเลือด หรือบริเวณ extracellular matrix ของเนื้อเยื่อ โดย Immunoglobulin kappa constant เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immune defense) ทำหน้าที่เป็น immune system process (Janardan et al., 2014)

การศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบโปรตีน Immunoglobulin ชนิด Ig kappa chain V-III region WOL และ Ig lambda VI THO ในเมือกบริเวณผิวหนังของปลา Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*) (Geng et al., 2015) ยืนยันได้ว่าในเมือกของสัตว์มีกระดูกสันหลังมีแอนติบอดีอยู่ด้วย

การศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบโปรตีน Immunoglobulin ชนิด IgGFc-binding protein ในเมือกของหอยนางรมตะวันออก (*Crassostrea virginica*) (Pales Espinosa et al., 2016) ยืนยันได้ว่าในเมือกของหอยนางรมมีแอนติบอดีอยู่ด้วย

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของโปรตีน Immunoglobulin kappa constant ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มทดสอบ คาดว่ามาจาก hemocyte แสดงให้เห็นว่าเมื่อหอยนางรมดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากสารดีดีทีที่เจือปนอยู่ในน้ำ อาจไปกระตุ้นหอยนางรมให้กำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสารดีดีทีที่ได้รับเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพ

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

2. Actin (Q00214, จุดโปรตีนหมายเลข 32) MW = 42.33 KDa โปรตีน Actin เป็นโปรตีนชนิดรูปร่างกลม (Globular protein หรือ G-actin) ในภาวะที่ถูกกระตุ้น Globular actin จะเกิดการรวมตัวเป็นเกลียวคู่ (actin polymerization) ได้อย่างรวดเร็ว เกิดเป็นโครงสร้างใหม่เรียกว่า Double-helical filaments หรือ F-actin ซึ่งโปรตีน Actin มักอยู่ใต้ชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โปรตีน Actin มีการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ exocytosis ของเซลล์ที่ต้องการขนส่งสารที่เซลล์นั้น ๆ สร้างขึ้นและถูกบบรรจุไว้ในถุง vesicle ออกไปนอกเซลล์ (Porat-Shliom et al., 2013) โดยโปรตีน Actin (Q00214) ที่ระบุได้ในครั้งนี้พบมากขึ้นในเมือกหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที

การศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบว่าโปรตีน Actin (Q00214) เกี่ยวข้องกับผลกระทบทางพิษวิทยาของสารผสมระหว่างดีดีที และ BaP ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 7 วัน บริเวณเหงือกในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ระบุว่าการเปลี่ยนแปลงของ Actin แสดงถึงการเกิดกระบวนการ apoptosis และ ความเครียดของเซลล์ต่อสารผสมระหว่างดีดีที และ BaP (Song et al., 2016)

ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของ Actin ที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มทดสอบ บ่งบอกว่าร่างกายของหอยนางรมปากจีบมีความพยายามในการหลั่งเมือกที่อยู่ในรูปของมิวซินแกรนูลออกมามากขึ้น ด้วยกระบวนการ exocytosis แบบ apocrine ภายหลังจากการสัมผัสกับสารดีดีที ซึ่งกระบวนการหลั่งเมือกที่อยู่ในรูปของมิวซินแกรนูลออกจากเซลล์สร้างเมือกนี้เองจะทำให้มีโปรตีน Actin หลุดออกมาด้วย ซึ่งตรงกับผลการศึกษาทางมิญชวิทยาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น คือ สารดีดีทีมีผลไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเมือก ทำให้หอยนางรมปากจีบหลั่งเมือกออกมามากขึ้นภายหลังจากที่หอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสารดีดีที

3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909, จุดโปรตีนหมายเลข 76) MW = 8.42 KDa โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) เป็นหนึ่งในกลุ่มของโปรตีนที่มีหน้าที่จับกับแคลเซียม (calcium binding proteins)

โครงสร้างของ Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ประกอบด้วยตำแหน่ง EF-hand motif หรือ calcium-binding motif ที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) สิ่งมีชีวิตมีกลไกในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยสิ่งมีชีวิตจะอาศัยสัญญาณที่ถูกสร้างขึ้นจากภายในเซลล์ เมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็ม ความแห้งแล้ง การเกิดบาดแผล การถูกโจมตีจากเชื้อโรค สารเคมีที่เป็นพิษ จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมไอออนภายในไซโทซอล (cytosol) อย่างรวดเร็ว เมื่อระดับแคลเซียม

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ไอออนเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม (Ca^{2+} sensor protein) เช่น โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ซึ่งจะมีตำแหน่ง EF-hand motif หรือ calcium-binding motif ที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียมไอออน เมื่อจับกับแคลเซียมไอออนแล้ว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จึงทำให้สามารถกระตุ้นโปรตีนเป้าหมาย เพื่อส่งผ่านสัญญาณต่อไปเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการปรับตัวของสิ่งมีชีวิต เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในระดับเซลล์ได้อย่างเหมาะสม ทั้งนี้ภายในไซโทซอลจะมีโปรตีนจำนวนมาก ที่อยู่ในกระบวนการส่งสัญญาณแคลเซียมนี้ แต่ตัวมันเองไม่สามารถจับกับแคลเซียมได้โดยตรง โปรตีนเหล่านี้จึงต้องอาศัยโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม เช่น โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) มาเป็นโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมขั้นต้น จึงเรียกได้ว่า โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่การทำงานที่หลากหลาย เนื่องจากมีความสามารถในการกำหนด activity ของโปรตีนอื่นๆ โดยโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909) ที่ระบุได้ในครั้งนี้ถูกกระตุ้นให้มีการหลั่งเพิ่มขึ้นในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที

การศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบการแสดงออกของโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909) ใน spermatophore ของกุ้ง crayfish (*Pacifastacus leniusculus*) ในการทำแผนที่โปรตีน ระบุว่าการพบโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909) แสดงถึงบทบาทของแคลเซียมในการกระตุ้น spermatozoon เกี่ยวข้องกับการเกิด acrosome reaction (Niksirat et al., 2014)

ยังพบโปรตีนชนิดนี้ในรายงานการศึกษาโปรตีนที่พบในเมือกบริเวณแมนเทิล เหงือก และแผ่นปากในหอยนางรมตะวันออก (*Crassostrea virginica*) ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ แบบเจล 1 มิติ (Espinosa et al., 2016) เนื่องจาก Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางเคมีที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ เช่น การส่งสัญญาณของ Ca^{2+} (Gao et al., 2006) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของ Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มทดสอบ บ่งบอกว่าร่างกายของหอยนางรมปากจีบเกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีภายในเซลล์ภายหลังจากการสัมผัสกับสารดีดีที ซึ่งอาจเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการ exocytosis ขณะที่หอยนางรมหลั่งเมือกออกมา

โปรตีนที่มีปริมาณลดลงด้วยสารดีดีที

1. Serum albumin (P02769, จุดโปรตีนหมายเลข 4) โปรตีน Serum albumin เป็นโปรตีนในกลุ่มของ plasma protein

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

โครงสร้างของ Serum albumin ประกอบด้วย โปรตีนรูปร่างกลม (globular protein) ชนิด simple protein มี polar group และประจุลบสุทธิมากจึงละลายน้ำได้ดี หน้าที่ของ Serum albumin คือ การขนส่งสารต่างๆในเลือด ทำหน้าที่เป็น buffer และรักษาระดับ pH ของเลือด โดยสามารถจับกับ H^+ ที่เกิดขึ้นในร่างกาย จึงช่วยลดความเป็นกรดในเลือดได้ โดยการเปลี่ยนแปลงระดับของ Serum albumin นี้จะบ่งชี้ถึงภาวะทางโภชนาการของร่างกายในระยะยาว โดยโปรตีน Serum albumin (P02769) ที่ระบุได้ในครั้งนี้ถูกยับยั้งให้มีการหลั่งน้อยลงในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที

การศึกษาในมนุษย์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบว่าโปรตีน Serum albumin (P02769) เกี่ยวข้องกับระบาดวิทยาของโรคมะเร็ง โดยพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในซีรัม (serum) ของผู้ป่วยโรคมะเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก (Kikuchi et al., 2007) และยังพบโปรตีนชนิดนี้ในรายงานการศึกษาโปรตีนที่พบในพลาสมาของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ (Lopez et al., 2015) เนื่องจาก Serum albumin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับกับสารต่างๆ เพื่อให้ร่างกายสามารถนำสารนั้นไปใช้ในการทำงานของเซลล์ได้ โปรตีนชนิดนี้ยังเกี่ยวข้องกับภาวะการติดเชื้อ และโปรตีนชนิดนี้จะค่อยๆ ถูกลดการแสดงออกลง หากเนื้อเยื่อเกิดการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เมื่อสิ่งมีชีวิตต้องเผชิญกับสภาวะ oxidative stress (Prakash, 2017) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบการแสดงออกของ Serum albumin ที่ลดลงในกลุ่มทดสอบ บ่งบอกว่าร่างกายของหอยนางรมปากจีบเกิดการตอบสนองต่อสภาวะเครียดภายหลังจากการสัมผัสกับสารดีดีที

ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีมีผลต่อหอยนางรมปากจีบ โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบ ได้แก่ โปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นด้วยสารดีดีที (1. Immunoglobulin kappa constant (P01834), 2. Actin (Q00214) และ 3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909) และโปรตีนที่แสดงออกลดลงด้วยสารดีดีที (Serum albumin (P02769)) การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้บ่งบอกถึงการปรับตัวในร่างกายของหอยนางรมปากจีบ เพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่มีสารดีดีที โดยมีการตอบสนองพื้นฐานที่เกี่ยวกับการสร้างโปรตีนที่สำคัญ และระบบการทำลายโปรตีนที่เสียสภาพ ซึ่งสารดีดีทีน่าจะสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระได้ สอดคล้องกับการพบโปรตีนที่เกี่ยวกับกระบวนการ oxidative stress response ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารดีดีทีของหอยนางรมปากจีบ องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) ซึ่งใช้ติดตามการปนเปื้อนของดีดีทีในสิ่งแวดล้อม

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

โปรตีนที่มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลง (unchanged abundant proteins)

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถระบุโปรตีนที่มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลงได้ 2 ชนิด ได้แก่

1. Haptoglobin (P50417, จุดโปรตีนหมายเลข 35) โปรตีน Haptoglobin เป็นโปรตีนประเภท glycoprotein

โครงสร้างของโปรตีน Haptoglobin ประกอบด้วย โปรตีนรูปร่างกลม (globular protein) บทบาททางชีววิทยาของ Haptoglobin มีหลายอย่าง แต่หน้าที่หลัก คือ การป้องกันการสูญเสียธาตุเหล็ก (iron) โดย Haptoglobin จะไปจับกับ hemoglobin เกิดเป็นโครงสร้างที่คงตัวที่เรียกว่า haptoglobin-haemoglobin complex โดยในสภาวะที่เกิดเม็ดเลือดแดงแตกในห ลอดเลือด (intravascular hemolysis) โครงสร้างดังกล่าวนี้จะไม่ถูกรองผ่านไตเนื่องจากมีขนาดที่ใหญ่ และยังเชื่อว่ามีบทบาทยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic effect) โดย Haptoglobin จะไปจับกับ hemoglobin ทำให้มีเหล็กไม่เพียงพอที่แบคทีเรียบางชนิดนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต เช่น *Escherichaia coli* โดยโปรตีน Haptoglobin (P50417) ที่ระบุได้ในครั้งนี้มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลงในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที

การศึกษาในสัตว์มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบการแสดงออกของโปรตีน Haptoglobin (P50417) ระบุว่าในโคที่มีสุขภาพปกติจะมีระดับของ Haptoglobin ในกระแสเลือดต่ำกว่า 0.1g/L เมื่อโคมีการติดเชื้อพบว่าระดับของ Haptoglobin จะเพิ่มขึ้นมากกว่า 1.62±0.47 g/L (Mean±SEM) ภายในระยะเวลา 2 วัน (Ceciliani et al., 2012)

การศึกษาในมนุษย์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบการแสดงออกของโปรตีน Haptoglobin (P50417) ระบุว่าผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน Haptoglobin มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคภูมิแพ้ (Ko et al., 2013)

เนื่องจาก Haptoglobin เป็นไกลโคโปรตีน ทำหน้าที่หลักในการจับกับฮีโมโกลบินอิสระเพื่อการกำจัดฮีโมโกลบินอิสระ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายความเสียหายจากการเกิดอนุมูลอิสระ (Shih et al., 2014) และ Haptoglobin ยังมีหน้าที่ป้องกันความเสียหายจากการเกิดกระบวนการ oxidative ในเนื้อเยื่อ จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย (Yang et al., 2003) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบ Haptoglobin ในเมือกของหอยนางรมปากจีบ บ่งบอกว่าหอยนางรมปากจีบมีการสร้างและหลั่งโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันความเสียหายจากการเกิดกระบวนการ oxidative เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ ที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมออกมาพร้อมกับการหลั่งเมือก ซึ่งเมือกที่หลั่งออกมานี้จะเคลือบทั่วลำตัวของหอยนางรม เมือกจึงเป็นปราการแรกในการป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

2. SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A (B0R061, จุดโปรตีนหมายเลข 53) โดยโปรตีน SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A (B0R061) ที่ระบุได้ในครั้งนี้มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลงในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที

พบโปรตีนชนิดนี้ในรายงานการศึกษาโปรตีนที่พบในเมือกบริเวณแมนเทิล เหงือก และแผ่นปากในหอยนางรมตะวันออก (*Crassostrea virginica*) ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์แบบเจล 1 มิติ (Pales Espinosa et al., 2016) เนื่องจาก SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (energy synthesis) พบโปรตีนชนิดนี้ได้ในเซลล์ที่มีความต้องการพลังงานในการดำเนินกิจกรรมต่างๆ ที่จำเป็นต่อการอยู่รอด และการเพิ่มจำนวนเซลล์ (Al Kubaisy et al., 2016) ดังนั้นการศึกษาครั้งนี้ที่พบ SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A บ่งบอกว่าโปรตีนชนิดนี้ควรทำงานภายในเซลล์ ดังนั้นถ้าพบในเมือกอาจไม่เกี่ยวข้องกับหน้าที่สร้างพลังงาน

นอกจากโปรตีนที่สามารถระบุชนิดได้ดังกล่าวแล้ว ยังมีจุดโปรตีนหลายจุดที่ไม่สามารถวิเคราะห์ได้ในการศึกษาครั้งนี้ ซึ่งอาจเกิดสาเหตุจากหลายประการ เช่น องค์ประกอบของเมือกที่มีไกลโคโปรตีนเป็นองค์ประกอบหลักซึ่งเป็นอุปสรรคต่อการวิเคราะห์โปรตีน LC-MS/MS ทำให้การระบุโปรตีนทำได้ยาก (Pales Espinosa et al., 2016) ประเด็นสำคัญอีกประการหนึ่งคือปัญหาในการวิเคราะห์ เนื่องจากข้อจำกัดด้านฐานข้อมูล และเมือกมีองค์ประกอบหลังคือไกลโคโปรตีน ดังนั้นทำให้การระบุชนิดของโปรตีนทำได้ยากขึ้น นอกจากนี้อาจเกิดจากเทคนิคของผู้วิจัย เนื่องจากการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์นั้น มีขั้นตอนการศึกษาที่ซับซ้อนจึงอาจเกิดข้อผิดพลาดระหว่างขั้นตอนการศึกษาได้

ข้อจำกัดอีกประการหนึ่งของเทคนิคเจล 2 มิติ คือปริมาณโปรตีนที่จะวิเคราะห์ต้องมีปริมาณมากพอ ซึ่งในทางปฏิบัติมักจะทำการตัดจุดโปรตีนที่สามรถมองเห็นด้วยตาเปล่าสำหรับการวิเคราะห์ ซึ่งโปรตีนที่มีปริมาณน้อยเกินไปอาจไม่เหมาะสำหรับการศึกษา และนอกจากนี้ไม่สามารถใช้ได้กับโปรตีนที่มีน้ำหนักมากหรือน้อยเกินไป หรือโปรตีนที่มีค่า pI สูงหรือต่ำกว่าที่กำหนดในเจล (Issaq & Veenstra, 2008) ดังนั้นในการศึกษาครั้งต่อไปจึงควรนำเทคนิคเจล 1 มิติ มาวิเคราะห์ร่วมด้วย ซึ่งอาจช่วยให้สามารถระบุชนิดของโปรตีนได้เพิ่มขึ้น

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

5.2 สรุปผลการวิจัย

5.2.1 โครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

จากการศึกษาโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคมิญชวิทยาและมิญชวิทยาเคมี พบว่าเซลล์สร้างเมือกเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ รูปร่างไม่แน่นอน แต่ส่วนใหญ่มีรูปร่างค่อนข้างกลมคล้ายคลึงกับถ้วยหรือแก้วไวน์ พบนิวเคลียสอยู่บริเวณฐานของเซลล์ (basal side) ซึ่งติดสีม่วงของสีย้อม Hematoxylin และพบถุงขนาดเล็กหรือแกรนูล (secretory granules/ mucin granules) จำนวนมากอยู่ภายในเซลล์สร้างเมือกติดกับด้านบนของเซลล์ (apical side) ซึ่งติดสีแดงอมชมพูของสีย้อม Eosin และพบเซลล์สร้างเมือกย้อมติดสีได้ 2 รูปแบบ คือ กลุ่มที่ติดสีแดงของสี Periodic acid–Schiff (PAS) จะสร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และกลุ่มที่ติดสีน้ำเงินของสี Periodic acid–Schiff และ Alcian blue pH 2.5 (PAS/AB 2.5) ซึ่งเซลล์สร้างเมือกที่พบส่วนใหญ่ติดสีย้อมนี้ จะสร้างเมือกที่มีคุณสมบัติเป็นกลาง และเป็นกรดภายในเซลล์เดียวกัน การย้อมด้วยสี PAS/AB 2.5 ทำให้สามารถยืนยันได้ว่าเซลล์สร้างเมือกที่พบในเนื้อเยื่อบริเวณแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ ทำหน้าที่สร้างและหลั่งมิวซิน ซึ่งเป็นสารประกอบประเภทไกลโคโปรตีน

5.2.2 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบ

ค่า LC50 ของสารดีดีทีต่อหอยนางรมปากจีบที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 1,000 µg/L และจากการศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางพยาธิสภาพของเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ พบเซลล์สร้างเมือกมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น มีขนาดของเซลล์ใหญ่ขึ้น และมี secretory granules มากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที

5.2.3 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ

สารดีดีทีสามารถเพิ่มความเครียดภายในเซลล์สร้างเมือกได้ โดยที่สารดีดีทีมีผลไปเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน 3 ชนิด ในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ คือ 1. Immunoglobulin kappa constant 2. Actin, muscle และ 3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ทั้งนี้สารดีดีทียังมีผลไปลดการแสดงออกของโปรตีน 1 ชนิด ในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ คือ Serum albumin ซึ่งการเปลี่ยนแปลงปริมาณของโปรตีนเหล่านี้ เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพ บ่งบอกว่าร่างกายของหอยนางรมปากจีบมีความพยายามในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันเพื่อต่อต้านสารดีดีที

ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้ถึงโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคทางมิญชวิทยา และมิญชวิทยาเคมี

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

รวมถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ ให้ผลที่สอดคล้องกัน โดยเมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสารดีดีที ซึ่งเป็นสารพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อม มีผลไปกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเมือก ทำให้หอยนางรมปากจีบเกิดการหลั่งเมือกออกมามากขึ้น เมื่อทำการวิเคราะห์ชนิดของโปรตีนที่พบในเมือกนี้ พบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหลั่งเมือก และพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากสารเคมีที่หอยนางรมปากจีบได้รับ ซึ่งโปรตีนที่พบในเมือกจากการศึกษาในครั้งนี้ ก่อให้เกิดฐานข้อมูลที่มีประโยชน์ต่อการศึกษาวิจัยในอนาคตเกี่ยวกับ biomarker ต่อสารเคมีที่เป็นพิษชนิดนี้

5.3 ข้อเสนอแนะ

5.3.1 ควรศึกษาลักษณะของเซลล์สร้างเมือกเพิ่มในอวัยวะอื่นที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการกรองกิน เช่น เหงือก แผ่นปาก เป็นต้น

5.3.2 ควรใช้เจลขนาดใหญ่ขึ้น เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการแยกโปรตีน

5.3.3 ควรทดสอบคุณสมบัติของเกลือและแป้ง ในตะกอนที่เหลือจากขั้นตอนกำจัดเกลือ

5.3.4 ควรมีการทดสอบเพื่อยืนยันการแสดงออกของโปรตีนแต่ละชนิดที่ได้ด้วยเทคนิค Western Blot

5.3.5 ควรหาความสัมพันธ์ของโปรตีนแต่ละชนิดเพื่อคาดเดากลไกการทำงานของสารดีดีที

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ทุนโครงการส่งเสริมการผลิตครูที่มีความสามารถพิเศษทางวิทยาศาสตร์และคณิตศาสตร์ (สควค.) ที่ให้ทุนสนับสนุนการวิจัย

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

บรรณานุกรม

ปิยวรรณ ศรีวิลาศ และ กานดา ใจดี. (2547). การปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก.

Al Kubaisy, E., Arafat, K., De Wever, O., Hassan, A. H., & Attoub, S. (2016). SMARCAD1 knockdown uncovers its role in breast cancer cell migration, invasion, and metastasis. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, *20*(9), 1035–1043. https://doi.org/10.1080/14728222.2016.1195059

Allam, B., & Espinosa, E. P. (2015). *Mucosal immunity in mollusks*. *Mucosal Health in Aquaculture*. Elsevier Inc. https://doi.org/10.1016/B978-0-12-417186-2.00012-1

Arrighetti, F., Teso, V., & Penchaszadeh, P. E. (2015). Ultrastructure and histochemistry of the digestive gland of the giant predator snail *Adelomelon beckii* (Caenogastropoda: Volutidae) from the SW Atlantic. *Tissue and Cell*, *47*(2), 171–177. https://doi.org/10.1016/j.tice.2015.01.002

Authimoolam, S. P., & Dziubla, T. D. (2016). Biopolymeric mucin and synthetic polymer analogs: their structure, function and role in biomedical applications. *Polymers*, *8*(3). https://doi.org/10.3390/polym8030071

Barker, P. S., & Morrison, F. O. (1965). The metabolism of TDE by proteus vulgaris. *Canadian journal of zoology*, *43*(261), 1962–1964.

Barnard, R. D. (1961). Connective Tissue. In *British Medical Journal* (Vol. 2, pp. 833–834). https://doi.org/10.1136/bmj.2.5255.833-a

Bavington, C. D., Lever, R., Mulloy, B., Grundy, M. M., Page, C. P., Richardson, N. V., & McKenzie, J. D. (2004). Anti-adhesive glycoproteins in echinoderm mucus secretions. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *139*(4), 607–617. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2004.07.008

Benhamed, S., Guardiola, F. A., Mars, M., & Esteban, M. Á. (2014). Pathogen bacteria adhesion to skin mucus of fishes. *Veterinary Microbiology*, *171*(1–2), 1–12. https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2014.03.008

Beninger, P. G., & Veniot, A. (1999). The oyster proves the rule: mechanisms of pseudofeces transport and rejection on the mantle of *Crassostrea virginica* and *C. gigas*. *Marine Ecology*

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Progress Series, *190*, 179–188. https://doi.org/10.3354/meps190179

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *254*, 248–254. https://doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3

Brun, N. T., Ross, N. W., & Boghen, A. D. (2000). Changes in the electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma cyprinae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *75*(2), 163–170. https://doi.org/10.1006/jipa.1999.4917

Ceciliani, F., Ceron, J. J., Eckersall, P. D., & Sauerwein, H. (2012). Acute phase proteins in ruminants. *Journal of Proteomics*, *75*(14), 4207–4231. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2012.04.004

Choi, H. J., Hwang, J. Y., Choi, D. L., Huh, M. Do, & Park, M. A. (2012). A study of diagnostic methods for *Marteilioides chungmuensis* infections in the pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Journal of Invertebrate Pathology*, *111*(1), 27–32. https://doi.org/10.1016/j.jip.2012.05.004

Cohn, B. A., Wolff, M. S., Cirillo, P. M., & Scholtz, R. I. (2007). DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environmental Health Perspectives*, *115*(10), 1406–1414. https://doi.org/10.1289/ehp.10260

Duritis, I., & Mugurevics, A. (2016). Distribution and characterisation of goblet cells in the large intestine of ostriches during the pre- and post-hatch period. *Journal of Veterinary Medicine Series C: Anatomia Histologia Embryologia*, *45*(6), 457–462. https://doi.org/10.1111/ahe.12221

Easy, R. H., & Ross, N. W. (2009). Changes in Atlantic salmon (*Salmo salar*) epidermal mucus protein composition profiles following infection with sea lice (*Lepeophtheirus salmonis*). *Comparative Biochemistry and Physiology - Part D: Genomics and Proteomics*, *4*(3), 159–167. https://doi.org/10.1016/j.cbd.2009.02.001

Edwards, J. G. (2004). DDT: a case study in scientific fraud. *Journal American Physicians and Surgeons*, *9*(3), 83.

Emmanuelle, P. E., Mickael, P., Evan Ward, J., Shumway, S. E., & Bassem, A. (2009). Lectins associated with the feeding organs of the oyster *crassostrea virginica* can mediate particle selection. *Biological Bulletin*, *217*(2), 130–141. https://doi.org/217/2/130 [pii]

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Ferguson, H. W., Morrison, D., Ostland, V. E., Lumsden, J., & Byrne, P. (1992). Responses of mucus-producing cells in gill disease of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Journal of Comparative Pathology*, *106*(3), 255–265. https://doi.org/10.1016/0021-9975(92)90054-X

Fisher, W. S. (1992). Occurrence of agglutinins in the pallial cavity mucus of oysters. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *162*(1), 1–13. https://doi.org/10.1016/0022-0981(92)90121-P

Fudge, D. S. (2005). Composition, morphology and mechanics of hagfish slime. *Journal of Experimental Biology*, *208*(24), 4613–4625. https://doi.org/10.1242/jeb.01963

Galtsoff, P. S. (1964). *The american oyster Crussostrea virginica gmelin*. Washington, D. C.: United States Government Printing Office.

Gao, Y., Gillen, C. M., & Wheatly, M. G. (2006). Molecular characterization of the sarcoplasmic calcium-binding protein (SCP) from crayfish *Procambarus clarkii*. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2006.04.007

Geng, X., Wei, H., Shang, H., Zhou, M., Chen, B., Zhang, F., … Xu, C. (2015). Data from proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Journal of Proteomics*, *3*(119), 99–102. https://doi.org/10.1016/j.dib.2015.02.010

Giari, L., Dezfuli, B. S., Lanzoni, M., & Castaldelli, G. (2012). The impact of an oil spill on organs of bream *Abramis brama* in the po river. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, *77*, 18–27. https://doi.org/10.1016/j.ecoenv.2011.10.014

Gómez, D., Bartholomew, J., & Sunyer, J. O. (2014). Biology and mucosal immunity to myxozoans. *Developmental and Comparative Immunology*, *43*(2), 243–256. https://doi.org/10.1016/j.dci.2013.08.014

Grabowski, J. H., Brumbaugh, R. D., Conrad, R. F., Keeler, A. G., Opaluch, J. J., Peterson, C. H., … Smyth, A. R. (2012). Economic valuation of ecosystem services provided by oyster reefs. *BioScience*, *62*(10), 900–909. https://doi.org/10.1525/bio.2012.62.10.10

Greistorfer, S., Klepal, W., Cyran, N., Gugumuck, A., Rudoll, L., Suppan, J., & von Byern, J. (2017). Snail mucus — glandular origin and composition in *Helix pomatia*. *Zoology*, *122*, 126–138. https://doi.org/10.1016/j.zool.2017.05.001

Huertas, V., & Bellwood, D. R. (2017). Mucus-secreting lips offer protection to suction-feeding

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

corallivorous fishes. *Current Biology*, *27*(11), R406–R407. https://doi.org/10.1016/j.cub.2017.04.056

Ian Hartwell, S. (2004). Distribution of DDT in sediments off the central California coast. *Marine Pollution Bulletin*, *49*(4), 299–305. https://doi.org/10.1016/j.marpolbul.2004.02.016

Iguchi, S. M. M., Aikawa, T., & Matsumoto, J. J. (1982). Antibacterial activity of snail mucus mucin. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Physiology*, *72*(3), 571–574. https://doi.org/10.1016/0300-9629(82)90123-2

Issaq, H. J., & Veenstra, T. D. (2008). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *BioTechniques*, *44*(5), 697–700. https://doi.org/10.2144/000112823

Itoh, N., Xue, Q. G., Schey, K. L., Li, Y., Cooper, R. K., & La Peyre, J. F. (2011). Characterization of the major plasma protein of the eastern oyster, *Crassostrea virginica*, and a proposed role in host defense. *Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology*, *158*(1), 9–22. https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2010.06.006

J.D. & Tucker, C. L. O. control of cell function using engineered photoreceptors P. G. P. V. (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Biology of the Cell*, *70*(12), 2099–2121. https://doi.org/10.1007/s00018-012-1156-5.Multiple

Janardan, P. P., Emily, Kistner-Griffin Laurel, B., Aryan, M. Namboodiri Motoki, I., Kasuga, Y., & Gerson, S. Hamada Shoichiro, T. (2014). IGKC and FcR genotypes and humoral immunity to HER2 in breast cancer. *Immunobiology Jou*, *219*, 113–117. https://doi.org/10.1016/j.imbio.2013.08.005

Jang, Y. H., Subramanian, D., Won, S. H., & Heo, M. S. (2017). Immune response of olive flounder (*Paralichthys olivaceus*) infected with the myxosporean parasite *Kudoa septempunctata*. *Fish and Shellfish Immunology*, *67*, 172–178. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2017.06.019

Jing, X., Espinosa, E. P., Perrigault, M., & Allam, B. (2011). Identification, molecular characterization and expression analysis of a mucosal C-type lectin in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Fish and Shellfish Immunology*, *30*(3), 851–858. https://doi.org/10.1016/j.fsi.2011.01.007

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Jo, R., Galindo, G., & Alejandra, J. (1996). Physiological and biochemical changes in shrimp larvae (*Penaeus vannamei*) intoxicated with organochlorine pesticides. *Marine Pollution Bulletin*, *32*(12), 872–875.

Jurado, J., Fuentes-Almagro, C. A., Guardiola, F. A., Cuesta, A., Esteban, M. Á., & Prieto-Álamo, M. J. (2015). Proteomic profile of the skin mucus of farmed gilthead seabream (*Sparus aurata*). *Journal of Proteomics*, *120*, 21–34. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.02.019

Kegley, S., Neumeister, L., & Martin, T. (1990). *Disrupting the balance ecological impacts of pesticides in california*.

Khondee, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Svasti, J., Simpson, R. J., & Kingtong, S. (2016). Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata*. *Environmental Pollution*, *218*, 855–862. https://doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.011

Kikuchi, S., Honda, K., Handa, Y., Kato, H., Yamashita, K., Umaki, T., … Yamada, T. (2007). Serum albumin-associated peptides of patients with uterine endometrial cancer. *Cancer Science*. https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2007.00458.x

Kingtong, S., Chitramvong, Y., & Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*, *85*(2), 124–132. https://doi.org/10.1016/j.aquatox.2007.08.006

Ko, D.-H., Chang, H. E., Kim, T. S., Song, E. Y., Park, K. U., Song, J., & Han, K. S. (2013). A review of haptoglobin typing methods for disease association study and preventing anaphylactic transfusion reaction. *BioMed Research International*, 1–6. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1155/2013/390630

Lavatelli, F., Brambilla, F., Valentini, V., Rognoni, P., Casarini, S., Di Silvestre, D., … Merlini, G. (2011). A novel approach for the purification and proteomic analysis of pathogenic immunoglobulin free light chains from serum. *Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*. https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2010.12.012

Leknes, I. L. (2015). Goblet cells and mucus types in the digestive intestine and respiratory intestine in bronze Corydoras (Callichthyidae: Teleostei). *Journal of Veterinary Medicine*

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

Series C: Anatomia Histologia Embryologia, *44*(5), 321–327. https://doi.org/10.1111/ahe.12140

Li, M., Feng, D. Y., Ren, W., Zheng, L., Zheng, H., Tang, M., & Cao, Y. (2004). Expression of immunoglobulin kappa light chain constant region in abnormal human cervical epithelial cells. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*. https://doi.org/10.1016/j.biocel.2004.03.017

Lopez, M. F., Krastins, B., Sarracino, D. A., Byram, G., Vogelsang, M. S., Prakash, A., … Ning, M. (2015). Proteomic signatures of serum albumin-bound proteins from stroke patients with and without endovascular closure of PFO are significantly different and suggest a novel mechanism for cholesterol efflux. *Clinical Proteomics*. https://doi.org/10.1186/1559-0275-12-2

Macek, K. J., & Mcallister, W. A. (1970). Insecticide susceptibility of some common fish family representatives. *Transactions of the American Fisheries Society*, *72*(5), 275–281. https://doi.org/10.1577/1548-8659(1970)99

Moraes, T. B., Ribas Ferreira, J. L., Da Rosa, C. E., Sandrini, J. Z., Votto, A. P., Trindade, G. S., … Monserrat, J. M. (2006). Antioxidant properties of the mucus secreted by *Laeonereis acuta* (Polychaeta, Nereididae): A defense against environmental pro-oxidants? *Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology*, *142*, 293–300. https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.10.017

Niksirat, H., Andersson, L., James, P., Kouba, A., & Kozák, P. (2014). Proteomic profiling of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* egg and spermatophore. *Animal Reproduction Science*, *149*(3–4), 335–344. https://doi.org/10.1016/j.anireprosci.2014.07.024

Pales Espinosa, E., Koller, A., & Allam, B. (2016). Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Proteomics*, *132*, 63–76. https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.018

Patel, D. M., & Brinchmann, M. F. (2017). Skin mucus proteins of lumpsucker (*Cyclopterus lumpus*). *Biochemistry and Biophysics Reports*, *9*(January), 217–225. https://doi.org/10.1016/j.bbrep.2016.12.016

Pedra, J. H. F., Festucci-Buselli, R. A., Sun, W., Muir, W. M., Scharf, M. E., & Pittendrigh, B. R. (2005). Profiling of abundant proteins associated with dichlorodiphenyltrichloroethane

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

resistance in *Drosophila melanogaster*. *Proteomics*, *5*(1), 258–269. https://doi.org/10.1002/pmic.200400914

Phelps, C. F., & Dphil, M. (1978). Biosynthesis of mucus glycoprotein. *British Medical Bulletin*, *34*(1), 43–48.

Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, *8*(1), 17–29. https://doi.org/10.1007/BF02286399

Post, G., & Schroeder, T. R. (1971). The toxicity of four insecticides to four salmonid species. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, *6*(2), 144–155. https://doi.org/10.1007/BF01540097

Prakash, S. (2017). Role of human serum albumin and oxidative stress in diabetes. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, *3*(1), 1–5. https://doi.org/10.15406/jabb.2017.03.00057

Qiu, X., Zhu, X., Zhang, L., Mao, Y., Zhang, J., Hao, P., … Zhang, Y. (2003). Human epithelial cancers secrete Immunoglobulin G with unidentified specificity to promote growth and survival of tumor cells. *Cancer Research*, *63*, 6488–6495.

Reel, K. R., & Fuhrman, F. A. (1981). An acetylcholine antagonist from the mucous secretion of the dorid nudibranch, *Doriopsilla albopunctata*, *68*, 49–53. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/0306-4492(81)90036-8

Remily-Wood, E. R., Benson, K., Baz, R. C., Chen, Y. A., Mohamad Hussein, M. A. H.-B., Sprung, R., … Koomen, J. M. (2014). Quantification of peptides from immunoglobulin constant and variable regions by LC-MRM MS for assessment of multiple myeloma patients. *Proteomics Clinical*, *8*, 783–795. https://doi.org/doi: 10.1002/prca.201300077

Schmidt, M., Hellwig, B., Hammad, S., Othman, A., Lohr, M., Chen, Z., … Hengstler, J. G. (2012). A comprehensive analysis of human gene expression profiles identifies stromal immunoglobulin κ C as a compatible prognostic marker in human solid tumors. *Clinical Cancer Research*, *18*(9), 2695–2703. https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-11-2210

Schumacher, U., Adam, E., Hauser, F., Probst, J. C., & Hoffmann, W. (1994). Molecular anatomy of a skin gland: Histochemical and biochemical investigations on the mucous glands of *Xenopus laevis*. *Journal of Histochemistry and Cytochemistry*, *42*(1), 57–65.

BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

https://doi.org/10.1177/42.1.7903329

Shih, A. W. Y., McFarlane, A., & Verhovsek, M. (2014). Haptoglobin testing in hemolysis: measurement and interpretation. *American Journal of Hematology*, *89*(4), 443–447. https://doi.org/10.1002/ajh.23623

Song, Q., Chen, H., Li, Y., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2016). Toxicological effects of benzo(a)pyrene, DDT and their mixture on the green mussel *Perna viridis* revealed by proteomic and metabolomic approaches. *Chemosphere Journal*, *144*, 214–224. https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.08.029

Sze, P. W. C., & Lee, S. Y. (1995). The potential role of mucus in the depuration of copper from the mussels *Perna viridis* (L.) and *Septifer virgatus* (Wiegmann). *Marine Pollution Bulletin*, *31*(4–12), 390–393. https://doi.org/10.1016/0025-326X(95)00140-I

Thuy, T. T. (2015). Effects of DDT on environment and human health. *Journal of Education and Social Sciences*, *2*, 108–114. https://doi.org/10.14502/Tekstilec2015.58.4-22

Ueha, R., Ueha, S., Kondo, K., Nito, T., Fujimaki, Y., Nishijima, H., … Yamasoba, T. (2017). Laryngeal mucus hypersecretion is exacerbated after smoking cessation and ameliorated by glucocorticoid administration. *Toxicology Letters*, *265*, 140–146. https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.023

Uthamka, M., Supatta Chueycham, K. T., & Kingtong, S. (2017). Anatomy and histology of digestive diverticula in the Hooded- oyster, *Saccostrea cucullata* (Born , 1778). *Journal of Research Unit on Science, Technology and Environment for Learning*, *8*(1), 18–26.

Uttakleiv Ræder, I. L., Paulsen, S. M., Smalås, A. O., & Willassen, N. P. (2007). Effect of fish skin mucus on the soluble proteome of *Vibrio salmonicida* analysed by 2-D gel electrophoresis and tandem mass spectrometry. *Microbial Pathogenesis*, *42*(1), 36–45. https://doi.org/10.1016/j.micpath.2006.10.003

Ward, J. E., & Shumway, S. E. (2004). Separating the grain from the chaff: particle selection in suspension- and deposit-feeding bivalves. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, *300*(1–2), 83–130. https://doi.org/10.1016/j.jembe.2004.03.002

Yang, F., Haile, D. J., Berger, F. G., Herbert, D. C., Beveren, E. Van, & Andrew J. Ghio. (2003). Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology*, *284*, L402–L409.

2717058923 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

https://doi.org/10.1152/ajplung.00115.2002

Yashpal, M., Kumari, U., Mittal, S., & Mittal, A. K. (2007). Histochemical characterization of glycoproteins in the buccal epithelium of the catfish, *Rita rita*. *Acta Histochemica*, *109*(4), 285–303. https://doi.org/10.1016/j.acthis.2007.03.002

Yashpal, M., & Mittal, A. K. (2014). Serous goblet cells: The protein secreting cells in the oral cavity of a catfish, *Rita rita* (Hamilton, 1822) (Bagridae, Siluriformes). *Tissue and Cell*, *46*(1), 9–14. https://doi.org/10.1016/j.tice.2013.08.001

Zheng, H., Li, M., Ren, W., Zeng, L., Liu, H. dan, Hu, D., … Cao, Y. (2007). Expression and secretion of immunoglobulin alpha heavy chain with diverse VDJ recombinations by human epithelial cancer cells. *Molecular Immunology*. https://doi.org/10.1016/j.molimm.2006.11.010

Zhu, X., Li, C., Sun, X., Mao, Y., Li, G., Liu, X., … Abstract: (2008). Immunoglobulin mRNA and protein expression in human oral epithelial tumor cells. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, *16*(3), 232–238. https://doi.org/10.1097/PAI.0b013e31814c915a

Zylstra, U. (1972). Histoehemistry and uhrastrueture of the epidermis and the subepidermal gland cells of the freshwater snails *Lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Zeitschrift Fur Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, *130*(1), 93–134.

27170589 23 BUU iThesis 59910280 thesis / recv: 21022562 13:51:06 / seq: 11

ต้นฉบับไม่ปรากฏ

ภาคผนวก