สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131

ผลของ bisphenol A ต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ (*Cerithidea* (*Cerithideopsilla*) *cingulata* (Gmelin, 1791))

รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์

16 ส.ค. 2554
291552
เริ่มบริการ
24 พ.ย. 2554

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
กรกฎาคม 2554

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของ รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.จตุรงค์ พุทธพรทิพย์)

..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชูตา บุญภักดี)

..... กรรมการ
(ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ปภาศิริ บาร์เนท)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อุษาวดี ตันติวรานุรักษ์)
วันที่ 4 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2554

ประกาศคุณูปการ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงได้ด้วยความกรุณาจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ชูตา บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก ที่กรุณาให้คำปรึกษาและแนะนำแนวทางในการทำงานวิจัย ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในงานวิจัยด้วยความละเอียดถี่ถ้วนและเอาใจใส่ด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. จาตุรงค์ พุทธพรทิพย์ ดร. ถนอมศักดิ์บุญภักดี อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม และ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ปภาศิริ บาร์เนท ที่กรุณาสละเวลาร่วมฟังการสอบ แก้ไขจุดบกพร่องและให้ข้อเสนอแนะในงานวิจัยครั้งนี้เพื่อพัฒนางานวิจัยในลำดับต่อไป

ขอกราบขอบพระคุณท่าน ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อัมพร ทองกู้เกียรติกูล สำหรับคำแนะนำดี ๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยตลอดจนความอนุเคราะห์และอำนวยความสะดวกในเรื่องของเครื่องมือและอุปกรณ์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณท่าน รองศาสตราจารย์ ดร.คเชนทร เฉลิมวัฒน์ ที่กรุณาให้คำปรึกษาเรื่องเกี่ยวกับความรู้ทางด้านสังขวิทยา

เนื่องจากงานวิจัยครั้งนี้ส่วนหนึ่งได้รับเงินอุดหนุนในการทำวิจัยจาก โครงการบัณฑิตศึกษา ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอานามัย พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพาจึงขอขอบคุณมาในที่นี้ด้วย

ขอกราบขอบพระคุณคุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจเสมอมา ขอขอบคุณพี่ ๆ เพื่อน และน้อง ๆ ที่ช่วยในการเก็บตัวอย่างเพื่อทำการศึกษาครั้งนี้

คุณค่าและประโยชน์ใดของวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบเป็นกตัญญูกตเวทิตาแด่บุพการี บูรพาจารย์ และผู้มีพระคุณที่ให้ข้าพเจ้ามีความรู้และประสบความสำเร็จ

รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์

51910483: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; วท.ม. (วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)
คำสำคัญ: หอยเจดีย์ /หอยขี้นก/ Potamididae/ BPA/ bisphenol A/ *Cerithidea*

รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์: ผลของ bisphenol A ต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ (*Cerithidea* (*Cerithideopsilla*) *cingulata* (Gmelin, 1791)) (EFFECTS OF BISPHENOL A ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF THE HORN SNAIL (*CERITHIDEA* (*CERITHIDEOPSILLA*) *CINGULATA* (GMELIN, 1791)) คณะกรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์: ชูตา บุญภักดี, Ph.D., ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc. 72 หน้า. ปี พ.ศ. 2554.

Bisphenol A (BPA) เป็นสารเคมีองค์ประกอบหลักที่ใช้ในการผลิตอุตสาหกรรมพลาสติกชนิดโพลิคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน จัดเป็นสารปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมที่สำคัญชนิดหนึ่งโดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ งานวิจัยนี้ศึกษาผลของ BPA ที่มีต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ (*Cerithidea* (*Cerithideopsilla*) *cingulata*) ตัวเต็มวัยเพศผู้และเพศเมีย เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสัมผัสสารละลาย BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 100 mg/l เป็นเวลา 4 วัน ผลการศึกษาทางกายวิภาคระบบสืบพันธุ์ไม่พบลักษณะฟีโนไทป์ "super-female" เมื่อศึกษามิญชวิทยาพบว่าหอยเจดีย์เพศเมียมีจำนวนเซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic (vitellogenic) เพิ่มขึ้นมีความสัมพันธ์เชิงบวกกับระดับความเข้มข้นของสาร BPA ในขณะที่หอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l พบว่าจำนวนเซลล์อสุจิ อสุจิ และอซินัสลดลง และที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l พบเซลล์อสุจิอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์พบว่าเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 mg/l เป็นเวลา 5 วัน ในทุกระดับความเข้มข้นทำให้หอยเจดีย์เพศเมียมีจำนวนเซลล์ไข่ในระยะ pre-vitellogenic (oogonium) ลดลง แต่จำนวนเซลล์ไข่ระยะ post-vitellogenic เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA (น้ำทะเล และน้ำทะเล + 20% DMSO) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) และเมื่อได้รับ BPA เป็นระยะเวลากระจายอยู่ตามขอบ อซินัส การศึกษาผลของ BPA ต่อติดต่อกัน 10 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ทั้งระยะ pre-vitellogenic และ post-vitellogenic ลดลงแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) จากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ BPA ในระดับความเข้มข้นเดียวกันเป็นระยะเวลา 5 วัน ส่วนหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับสาร BPA ในทุกระดับความเข้มข้นเป็นระยะเวลา 5 วัน พบจำนวนอซินัสและเซลล์อสุจิลดลงและไม่พบการพัฒนาของอสุจิ และเมื่อได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลา 10 วัน ในทุกระดับความเข้มข้นพบว่าเซลล์เกิดภาวะ necrosis

51910483: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; M.Sc. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORDS: HORN SNAIL/ MUD SNAIL/ POTAMIDIDAE/ BPA/ BISPHENOL A/ *Cerithidea cingulata*

RUNGWIT CHAIJIRAWONG: EFFECTS OF BISPHENOL A ON THE REPRODUCTIVE SYSTEM OF THE HORN SNAIL (*CERITHIDEA* (*CERITHIDEOPSILLA*) *CINGULATA* (GMELIN, 1791)). ADVISORY COMMITTEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph. D, THANOMSAK BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc. 72 P. 2011.

Bisphenol A (BPA) is a chemical used primarily for the production of industrial polycarbonate plastic and epoxy resins, and is an important environmental contaminant, particularly in the aquatic environment. In this study, microscopic anatomy of reproductive system and histopathology of gonadal tissues of horn snail (*Cerithidea* (*Cerithidea*) *cingulata*) adult exposed to aqueous solutions of BPA at different concentrations were investigated. Both male and female adult of BPA-exposed horn snails at concentrations of 30 and 100 mg/l for 4 days, "super-female" phenotype was not found. Histopathological evaluation of the gonadal tissues of the BPA-exposed snails at concentrations of 30 and 100 mg/l for 4 days revealed positive correlation between number of oocytes in post-vitellogenic (vitellogenic) phase and BPA concentrations in females. In male BPA-exposed snails at concentration of 30 mg/l indicated toxic effects of BPA on gonadal tissues, reducing the number of acinar cells, spermatocytes and spermatozoa in the acini lumen. The BPA-exposed snails at concentration of 100 mg/l revealed decreasing number of spermatocytes, where finely dispersed at marginal of acini lumen in male. The snails exposed to BPA at concentrations of 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10 and 100 mg/l for 5 and 10 days were also examined. In females, at all levels of the BPA exposure for 5 days, significantly reduced the number of oocytes (oogonium) in pre-vitellogenic phase compared to the unexposued control groups (sea water, sea water+20%DMSO) ($P<0.05$) was revealed, whereas the amount of oocytes in post-vitellogenic phase was significantly increased ($P<0.05$). After 10 days of exposure, the

amount of oocytes in pre-vitellogenic and post-vitellogenic phases in females were significantly reduced compared with controls and with that of the same levels of exposure for 5 days ($P<0.05$). In male snails, at all levels of BPA exposure for 5 days resulted in toxic effects on gonadal tissues by reducing the number of acini, spermatocytes and development of spermatozoa. Exposure of the males to all concentrations of BPA for 10 days, acinar cells nercosis was observed.

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ฌ

สารบัญภาพ..... ญ

บทที่

1 บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา..... 1

วัตถุประสงค์ของการวิจัย..... 3

สมมุติฐานการวิจัย..... 3

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 3

ขอบเขตของการวิจัย..... 3

2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และค่าสัมประสิทธิการแตกตัว (partition coefficient) ของ BPA..... 5

การปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ..... 5

กลไกการออกฤทธิ์ของ BPA..... 6

ผลกระทบของ BPA ต่อสรีรวิทยา พยาธิสภาพและการเจริญของสัตว์..... 9

ชีววิทยาของหอยเจดีย์..... 13

การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว..... 14

ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว..... 16

กลไกการทำงานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ในหอยฝาเดียว..... 16

3 วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาเบื้องต้นผลของ BPA ต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์..... 20

การศึกษาผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงเป็นเวลา 4 วันต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์..... 21

สารบัญ (ต่อ)

บทที่		หน้า
	ศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกายวิภาคและอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์	22
	การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสาร BPA ต่อจำนวนเซลล์ไข่	25
4	ผลการวิจัย	
	ผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์	27
	ผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกายวิภาคและอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์	36
	ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสาร BPA ต่อจำนวนเซลล์ไข่	45
5	อภิปรายและสรุปผล	
	การศึกษาผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์	55
	การศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกายวิภาคและอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์	56
	การศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ต่อจำนวนเซลล์ไข่	58
	สรุปผลการศึกษา	60
	ข้อเสนอแนะ	61
รายการอ้างอิง		62
ภาคผนวก		70
ประวัติย่อของผู้วิจัย		72

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งตัวของ BPA.....	5
2.2	ผลกระทบของ BPA ต่อสรีรวิทยาของสัตว์.....	12
4.1	จำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ (total) เซลล์ไข่ช่วง pre-vitellogenic และเซลล์ไข่ช่วง post-vitellogenic ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสัมผัส BPA เป็นเวลา 5 และ 10 วัน.....	38
4.2	อัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ และดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ของหอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน.....	46
4.3	ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้เมื่อได้รับBPA.....	51

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
2.1	โครงสร้างของสาร bisphenol A (BPA; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane).....	4
2.2	กลไกการทำงานออกฤทธิ์โดยตรง (direct pathway or genomic pathway) และการออกฤทธิ์ผ่านตัวสื่อสัญญาณ (alternative pathway or nongenomic pathway) จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งในหนูและเซลล์ของหอยแมลงภู่.....	8
2.3	ลำดับขั้นการตอบสนองในสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารแปลกปลอม (xenobiotics).....	9
2.4	สัณฐานวิทยาของหอยเจดีย์ (*Cerithidea scalariformis*).....	14
2.5	แผนภาพการควบคุมการทำงานของฮอร์โมนต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยในกลุ่ม Basommatophora.....	19
3.1	แหล่งเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์บริเวณหาดกัปตันยุทธ.....	20
3.2	แหล่งเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์บริเวณหาดเจ้าหลาว.....	23
3.3	ช่วงการทดสอบความเป็นพิษเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสัมผัสสาร BPA.....	24
4.1	ลักษณะสัณฐานภายนอกและภายในของหอยเจดีย์.....	28
4.2	เซลล์ไข่ระยะต่าง ๆ ของหอยเจดีย์.....	31
4.3	พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียในการศึกษาเบื้องต้น.....	34
4.4	พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้ในการศึกษาเบื้องต้น.....	35
4.5	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไข่กับระดับความเข้มข้นของ BPA เมื่อหอยเจดีย์ได้รับเป็นเวลา 5 วัน.....	39
4.6	ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไข่กับระดับความเข้มข้นของ BPA เมื่อหอยเจดีย์ได้รับเป็นเวลา 10 วัน.....	40

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
4.7	พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียเมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 5 วัน	41
4.8	พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียเมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 10 วัน	43
4.9	อัตราส่วนของจำนวนเซลล์ไข่ (ER) ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน	47
4.10	ดัชนีความสมบูรณ์ของจำนวนเซลล์ไข่ (%MI) ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน	48
4.11	พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้เมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 5 วัน	52
4.12	พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้เมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 10 วัน	54

บทที่ 1
บทนำ

ที่มาและความสำคัญของปัญหา

ระบบนิเวศปากแม่น้ำ (estuary ecosystem) เป็นระบบนิเวศรอยต่อระหว่างระบบนิเวศทางบกและระบบนิเวศทางทะเล ดังนั้นจึงได้รับสารอาหารและมลสารจากทั้งสองระบบนิเวศ ระบบนิเวศปากแม่น้ำแต่ละแหล่งจะมีความเฉพาะตัวและแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับปัจจัยทางกายภาพหลายประการ เช่น เวลาการรับน้ำจากพื้นที่ชายฝั่ง กระแสน้ำที่พัดพาเข้าสู่ชายฝั่ง การเคลื่อนที่ของมวลน้ำ เป็นต้น สารพิษเช่น สารในกลุ่มพวกโลหะหนัก กลุ่มสารที่ไม่มีขั้ว (hydrophobic) สารแปลกปลอมทางชีวภาพ (xenobiotic) และสารกำจัดศัตรูพืช เป็นต้นจึงมีโอกาสสะสมได้มากในระบบนิเวศบริเวณนี้ สารเหล่านี้เมื่อเข้าสู่ระบบนิเวศแล้วจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับต่าง ๆ ต่อสมาชิกที่อาศัยอยู่ในระบบนิเวศแหล่งนั้น เช่น มีการเปลี่ยนแปลงของช่วงเวลาการดำเนินชีวิต (life histories) เกิดอัตราการแปรผันของสัดส่วนเพศในกลุ่มประชากรของสัตว์ และการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชาคมของสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในบริเวณปากแม่น้ำบริเวณนั้น

ปัจจุบันอุตสาหกรรมพลาสติกมีการพัฒนาและเพิ่มปริมาณการผลิตให้เพียงพอกับความต้องการของผู้บริโภคที่ต้องการใช้พลาสติกทดแทนวัสดุธรรมชาติ ทั้งนี้ในกระบวนการผลิตพลาสติกกลุ่มโพลีคาร์บอเนต (polycarbonate plastic) และอีพอกซ์ไซด์เรซิน (epoxide resin) มีการใช้สาร bisphenel A (BPA) เป็นวัตถุดิบในการขึ้นรูปพลาสติกร่วมกับสารเคมีชนิดอื่นเพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้แก่วัสดุภัณฑ์ จากรายงานพบว่ามีการเล็ดลอดของสาร BPA ปะปนมากับน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตพลาสติกในโรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงการปะปนในน้ำเสียจากบ้านเรือนและจากผลิตภัณฑ์ที่มี BPA เป็นองค์ประกอบหลักออกสู่สิ่งแวดล้อม เช่น ท่อน้ำพลาสติก PVC ขวดน้ำพลาสติก บรรจุภัณฑ์พลาสติกทนความร้อน เป็นต้น (Yamamoto & Yashuhara, 1999)

BPA จัดเป็นสารละลายน้ำได้ปานกลาง จึงสามารถพบได้ในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งบริเวณปากแม่น้ำ เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสาร BPA สารจะไปรบกวนการทำงานของระบบฮอร์โมนเพศ (endocrine disruptor) โดยออกฤทธิ์คล้ายฮอร์โมนเอสโตรเจนเข้าจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนที่อยู่ในไซโทพลาสซึมของเซลล์ กระตุ้นการสร้างฮอร์โมนเพศออกมามากกว่าสภาวะปกติ ส่งผลต่อกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gametogenesis) และโครงสร้างของทางเดินสืบพันธุ์ (reproductive tract) ในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลัง (Schirling et al.,

2006; Sone et al., 2004) ความผิดปกติของระบบฮอร์โมนเพศที่เกิดขึ้นภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับประชากร (population) เช่น การเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนระหว่างเพศ (sex ratio) และอัตราฟักของไข่ที่ได้รับการผสมลดลง จากการศึกษาทางมิญชวิทยาในหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) ที่ได้รับสารเป็นเวลา 3 สัปดาห์ที่ระดับความเข้มข้น 1 µg/l พบว่าในเพศเมียเกิดการสลายตัวของเยื่อทางเดินสืบพันธุ์ พบเซลล์ไข่มีจำนวนน้อยลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนในเพศผู้พบการลดลงของจำนวนตัวอสุจิอย่างเห็นได้ชัดเมื่อสังเกตด้วยตาเปล่า (Aarab, Unruh, Hansen, Anderson, & Narbonne, 2006) ซึ่งอาจส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศ (ecosystem)

ในประเทศญี่ปุ่นมีรายงานพบ BPA ปนเปื้อนในแหล่งน้ำที่ความเข้มข้นเฉลี่ย 0.013-17.2 mg/l ส่วนในประเทศไทย (ในลำน้ำสาขาของแม่น้ำโขง) ในปี 2007-2008 พบ BPA เข้มข้นประมาณ 0.0024 mg/l (Duong et al., 2010) แต่ในปัจจุบันอุตสาหกรรมพลาสติกมีจำนวนเพิ่มขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งในนิคมอุตสาหกรรมหลายแห่ง เช่น นิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยองมีจำนวนโรงงานอุตสาหกรรมพลาสติกเพื่อผลิต epoxyresin มีกำลังผลิต 31,800 ตัน/ปี และ speciality epoxy product มีกำลังการผลิตประมาณ 7,000 ตัน/ปี (http://www.gururayong.com/?page_id=407 เข้าถึงเมื่อวันที่ 13 มิถุนายน 2554) ดังนั้นสาร BPA มีโอกาสปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมได้มากขึ้น แต่การตรวจสอบทางเคมีทำได้ยากเนื่องจากโครงสร้างของสาร BPA สามารถสลายได้ด้วยแสง (photolysis) ได้ง่ายและใช้เวลาน้อยกว่า 15 วัน ที่อุณหภูมิ 25 °C (Dorn,1987; Kang, Aasi, & Katayama, 2007) แต่เนื่องอุณหภูมิเฉลี่ยของประเทศไทยสูงกว่า 25 °C ประกอบกับช่วงเวลาการปลดปล่อยน้ำทิ้งของโรงงานทำให้ค่าที่ได้จากการวิเคราะห์ทางเคมีอาจคลาดเคลื่อนและบ่งบอกผลกระทบได้ไม่ชัดเจน

ในงานวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของ BPA ต่อการเปลี่ยนแปลงอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ (*Cerithidea* (*Cerithideopsilla*) *cingulata*) ที่ได้รับสัมผัส BPA โดยวิธีการแช่ ซึ่งหอยชนิดนี้สามารถพบได้ทั่วไปตามบริเวณปากแม่น้ำ มีพฤติกรรมเกาะและคืบคลาน อาศัยรวมตัวกันเป็นกลุ่มอย่างหนาแน่นตามพื้นทราย ขูดกินสาหร่ายและเศษซากอินทรีย์ตามพื้นเป็นอาหารพร้อมกับตะกอนดิน จึงจัดได้ว่าหอยเจดีย์เป็นทั้งผู้บริโภคอันดับที่ 1 และผู้ย่อยอินทรีย์สารในระบบนิเวศปากแม่น้ำ หอยชนิดนี้จึงมีโอกาสได้รับสารพิษจากน้ำ การบริโภคสาหร่ายและตะกอนดินที่มีการปนเปื้อนสาร BPA ที่ปะปนมากับน้ำ ผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อและพัฒนาการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ จะสามารถนำไปคาดการณ์สถานการณ์ที่

เกิดขึ้นกับระบบนิเวศที่มีการเปื้อนของ BPA และเพื่อเป็นการเฝ้าระวังและติดตามผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตรวมถึงมนุษย์ต่อไปได้

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลของ BPA ต่อโครงสร้างระบบสืบพันธุ์และลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ในหอยเจดีย์

2. ศึกษาระดับความเข้มข้นและช่วงเวลาของหอยเจดีย์ที่สัมผัสสาร BPA แล้วส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์

สมมุติฐานการวิจัย

เมื่อหอยเจดีย์ได้สัมผัส BPA ที่ระดับความเข้มข้นและเป็นระยะเวลานานต่างกันจะก่อให้เกิดความผิดปกติที่โครงสร้างของระบบทางเดินสืบพันธุ์ และเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ทราบผลกระทบที่เกิดขึ้นต่อการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ เมื่อได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

2. ทราบระดับความเข้มข้นของ BPA ที่มีผลต่อการพัฒนาการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์

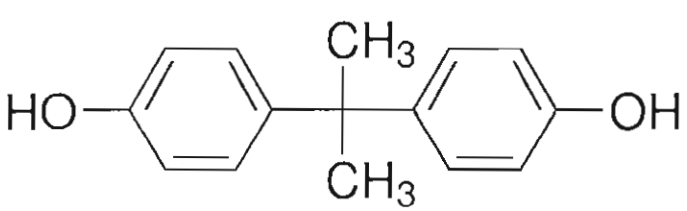
3. สามารถนำผลการศึกษาไปคาดการณ์ผลกระทบของ BPA ที่อาจจะเกิดขึ้นกับสิ่งมีชีวิตชนิดอื่น ๆ และมนุษย์ได้เมื่อมีการปนเปื้อนของ BPA ในระบบนิเวศแหล่งน้ำ

ขอบเขตของการวิจัย

ทำการศึกษาผลกระทบของ BPA ที่เกิดขึ้นกับโครงสร้างของระบบสืบพันธุ์และเนื้อเยื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียเก็บจากหาดเจ้าหลาว จังหวัดจันทบุรี โดยให้หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ด้วยวิธีการแช่ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างกัน ทำการตรวจวัดผลกระทบที่เกิดจากสาร BPA โดยศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของโครงสร้างระบบสืบพันธุ์และการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์

บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

โครงสร้างของ bisphenol A หรือ BPA (2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane) ประกอบด้วย วงแหวนฟีนอล (phenol ring) จำนวน 2 วงเชื่อมต่อกัน และเมทธิล 2 หมู่เชื่อมอยู่ระหว่างสะพาน (ภาพที่ 2.1) BPA จัดเป็นวัตถุดิบหลักในการขึ้นรูปพลาสติกโพลีคาร์บอเนต (polycarbonate) ร่วมกับ phosgene และกระบวนการผลิตอีพอกซี่เรซิน (epoxy resins) นอกจากนี้ยังพบการใช้ BPA ในอุตสาหกรรมพลาสติกอีกหลายชนิด เช่น วัสดุทนไฟ แว่นตา หัวอ่านแผ่นซีดี และพลาสติกพีวีซี (polyvinyl chloride) เป็นต้น (Staple, Dorn, Klecka, Block, & Harris, 1998) ในปัจจุบันอุตสาหกรรมพลาสติกมีการพัฒนาอย่างรวดเร็วทำให้มีการใช้พลาสติกทดแทนวัสดุธรรมชาติมากขึ้น และมักพบว่าสาร BPA จากกระบวนการผลิตพลาสติกต่างๆ รวมถึงของเสียหรือน้ำที่ถูกชะจากผลิตภัณฑ์พลาสติกที่มี BPA เป็นองค์ประกอบหลักสามารถเล็ดลอดออกมาปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม จากการศึกษาพบว่าเมื่อสัตว์ได้รับสาร BPA เพียงปริมาณ 1 µg/l สารจะไปรบกวนระบบการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disruptor) ที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ เช่น ปลาข้าวสารญี่ปุ่น (*Oryzias latipes*; Japanese Medaka) พบว่า BPA จะไปมีผลเหนี่ยวนำเช่นเดียวกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ผลิตขึ้นในร่างกายให้ผลิตมากกว่าปกติ (Kang, Yokota, Oshima, Tsuruda, Oe, & Imada, 2002)



ภาพที่ 2.1 โครงสร้างของสาร bisphenol A (BPA; 2,2-bis (4-hydroxyphenyl) propane)
ที่มา: (Cousins, Staples, Klecka, & Mackay, 2002)

คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และค่าสัมประสิทธิการแบ่งตัว (partition coefficient) ของ BPA

BPA มีลักษณะเป็นเกล็ดแข็ง สีขาว มีจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิ 155 °C จากการศึกษาของ Staples et al. (1998) และ Mackay and Fraser (2000) ได้รายงานคุณสมบัติและค่าสัมประสิทธิ์ของสาร BPA ไว้ดังตารางที่ 2.1 BPA เป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ มีค่าสัมประสิทธิ์การแบ่งตัวระหว่างออคทานอล (octanol) กับน้ำ (K_{ow}) เท่ากับ $10^{3.4}$ ละลายน้ำได้ปานกลางประมาณ 300 g/m^3 จากการศึกษาพฤติกรรมของสารโดยใช้แบบจำลองพบว่า BPA ละลายตัวอยู่ในน้ำประมาณร้อยละ 30.5 ค่าสัมประสิทธิ์การระเหยตัวระหว่างน้ำกับอากาศ (K_{aw}) มีค่าเท่ากับ 10^{-9} แสดงว่ามีการระเหยตัวต่ำประมาณร้อยละ 2.48^{-5} (Staples, Dorn, Klecka, O'Block, & Harris,1998; Mackay, & Fraser, 2000; Cousins et al., 2002)

ตารางที่ 2.1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์และค่าสัมประสิทธิ์การแตกตัว (partition coefficient) ของ BPA (Cousins et al., 2002)

พารามิเตอร์ (parameter)	ค่าสัมประสิทธิ์ (value)	ค่าสัมประสิทธิ์ความเชื่อมั่น (confidence factor)
น้ำหนักโมเลกุล	228.29 g/mol	-
จุดหลอมเหลว	155 °C	-
ค่าการละลายตัวในน้ำ	300 g/m^3	2
ค่าความดันไอ	5.3×10^{-6} Pa	2
Log K_{ow}	3.40	1.1
Henry's law constant	4.03 $Pa.m^3/mol$	-
Log K_{aw} (K_{aw}= H/RT)	-9.01	-
pKa	9.59-11.30	-

การปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ

BPA เป็นสารเคมีที่มีการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทั่วโลก จากการศึกษาของ Cousins et al. (1996) พบการปลดปล่อย BPA ออกสู่สิ่งแวดล้อมประมาณ $1.62X10^9$ กิโลกรัม โดยเก็บตัวอย่าง 3 แหล่งแล้วทำการประเมินสัดส่วนเปอร์เซ็นของการปลดปล่อยสาร BPA พบว่า ประเทศสหรัฐอเมริกามีการปลดปล่อย BPA จำนวน 48% ประเทศต่าง ๆ ทางตะวันตกของยุโรปประมาณ 32% และประเทศญี่ปุ่น 20% ซึ่ง 65% ของการปลดปล่อยมาจากกระบวนการผลิตพลาสติกกลุ่ม

โพลีคาร์บอเนตที่มีการใช้ BPA เป็นองค์ประกอบร่วมในการผลิต 28% มาจากกระบวนการผลิตอีพอกซีเรซินที่ใช้ BPA เป็นตัวร่วมในกระบวนการ และอีก 7% มาจากกระบวนการผลิตอื่น ๆ ที่มีการใช้ BPA เป็นตัวร่วมในปฏิกิริยา นอกจากนี้ยังพบการปนเปื้อนของ BPA จากวัสดุที่มีการใช้ BPA เป็นส่วนประกอบหลัก และน้ำเสียที่เกิดจากกระบวนการผลิตรวมถึงน้ำทิ้งจากบ้านเรือนที่ถูกปล่อยเข้าระบบบำบัดน้ำเสีย หรืออาจปล่อยลงสู่แหล่งน้ำโดยตรง ซึ่งทำให้ BPA ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางน้ำ สามารถสรุปได้ 3 ทางหลัก (Cousins et al., 2002) คือ

1. น้ำเสียที่ปลดปล่อยออกจากบ้านเรือน (domestic sewage) เป็นเส้นทางที่ไม่ทราบแหล่งที่มา (non-point source) ส่วนใหญ่ถูกชะล้างออกมาจากผลิตภัณฑ์พลาสติก ท่อพลาสติก เนื่องจากบางแหล่งปล่อยน้ำทิ้งโดยไม่ได้ผ่านการบำบัดจึงพบ BPA ปนเปื้อน Yamamoto and Yashuhara (1999) ทำการศึกษาในประเทศญี่ปุ่น พบว่ามี BPA ปนเปื้อนในน้ำทิ้งที่ผ่านท่อน้ำที่ทำจากพลาสติกพีวีซีอยู่ในช่วงความเข้มข้นระหว่าง 4-1,730 µg/l

2. น้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสีย (effluent from wastewater treatment) จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าระบบบำบัดน้ำเสียไม่มีระบบการกำจัดสารชนิดนี้ได้อย่างสมบูรณ์ แต่พบการปนเปื้อนในระดับที่ค่อนข้างต่ำ จากรายงานที่ผ่านมาพบว่า น้ำเสียที่ถูกปล่อยออกจากโรงบำบัดน้ำเสียที่รับน้ำจากชุมชนเมืองทางตอนใต้ของประเทศออสเตรียสามารถลดปริมาณของ BPA อยู่ในช่วงร้อยละ 37-94 ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่น้ำอยู่ในระบบบำบัด (Fuerhacker, Scharf, & Weber, 2000; Lee, & Peart, 2000)

3. น้ำทิ้งจากกระบวนการฝังกลบขยะ (effluent from landfill sites) ศึกษาการปนเปื้อนของสาร BPA จากน้ำชะขยะในกระบวนการฝังกลบในประเทศญี่ปุ่นช่วงฤดูร้อนปี 1996 และวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่ามีการปนเปื้อนของสาร BPA อยู่ในช่วงระหว่าง 1.3 – 17,200 µg/l เฉลี่ยประมาณ 269 µg/l แต่ขึ้นอยู่กับฤดูกาล (Yamamoto et al., 2001)

กลไกการออกฤทธิ์ของ BPA

สิ่งมีชีวิตอาจได้รับสัมผัสสาร BPA จากสิ่งแวดล้อมได้หลายทาง เช่น การรับสัมผัสผ่านผิวหนัง BPA จะเข้าสู่กระแสเลือดและเข้าสู่เซลล์ในที่สุด กลไกการออกฤทธิ์ของสาร BPA มีด้วยกัน 2 ประเภทหลักคือ 1) ออกฤทธิ์ต่อเซลล์โดยตรง (genomic pathway) 2) ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ผ่านตัวสื่อสัญญาณ (non-genomic pathway) กลไกออกฤทธิ์ต่อเซลล์โดยตรงเป็นเส้นทางหลักของการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มสเตรียรอยด์เมื่อสารเข้าสู่เซลล์จะมีคุณสมบัติเลียนแบบฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen mimic) โดยจะเข้าจับกับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen-receptor) ภายในไซโทพลาสซึม เกิดเป็นสารเชิงซ้อนของเอสโตรเจนกับตัวรับสัญญาณ (estrogen

receptor complex) จากนั้นจะรวมตัวกันเป็นไดเมอร์ของเอสโตรเจนกับตัวรับสัญญาณ (estrogen receptor dimer) แล้วเข้าจับกับโปรโมเตอร์ของยีนที่สังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศมากขึ้น (ภาพที่ 2.2 A)

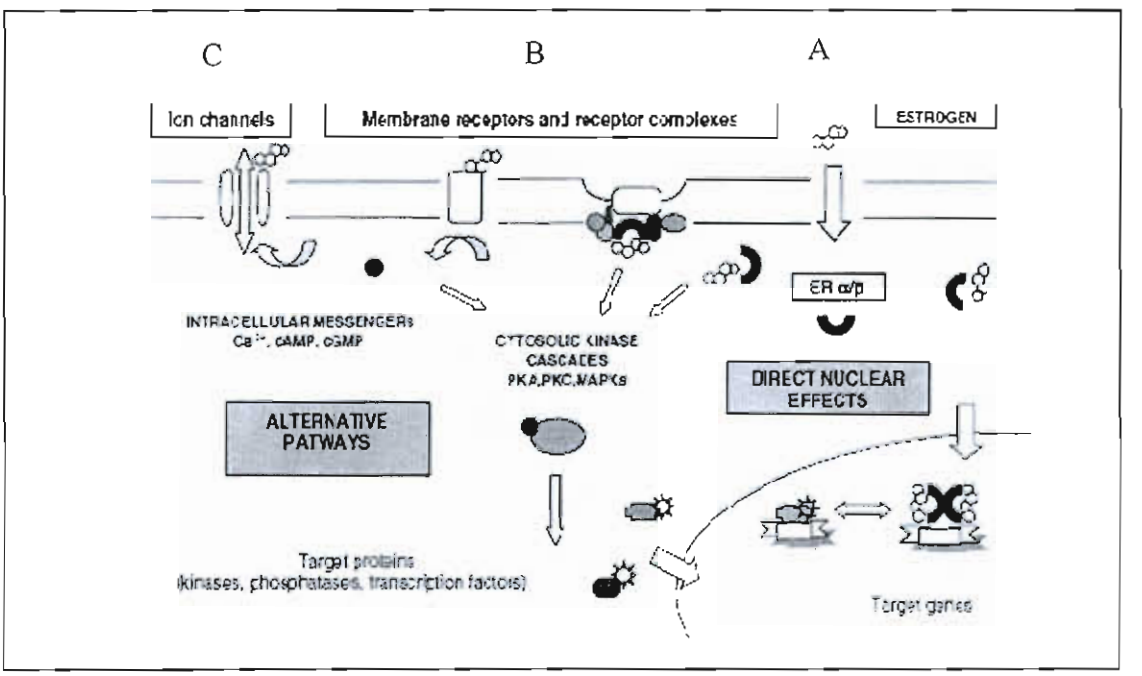
กลไกการออกฤทธิ์ต่อเซลล์ผ่านตัวสื่อสัญญาณ (second messenger) เกิดในสภาวะที่ได้รับสารในปริมาณน้อย ซึ่งกลไกการออกฤทธิ์ของ BPA คล้ายกับการออกฤทธิ์ของสารในกลุ่มสเตรียรอยด์ทั่วไปคือ

1. ออกฤทธิ์ผ่าน G-protein ผลการศึกษาในเซลล์ Seminoma (JKT-1) ซึ่งเป็นเซลล์ที่จะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากพบได้ทั่วไปใน germinal epithelium และ seminiferous tubule เมื่อเซลล์ seminoma ได้รับสาร BPA ในระดับต่ำ (10^{-9}-10^{-12}) แล้วเกิดการกระตุ้น cAMP-dependent protein kinase (PKA) และ cGMP-dependent protein kinase (PKG) โปรตีนทั้งสองชนิดนี้เป็นปัจจัยในการกระตุ้น cAMP response-element-binding protein (CREB) และเกิดการเจริญของเซลล์ JKT-1 (Bouskine, Nebout, Brucker-Davis, Benahmed, & Fenichel, 2009) ผลการศึกษาใน PC12 (pheochromocytoma) ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกิดที่จะเปลี่ยนไปเป็น neuroendocine tumor ที่ไตของหนู พบว่า BPA สามารถจับกับ G-protein ทำให้ cAMP กระตุ้นร่วมกับ PKA ก่อให้เกิดกระบวนการ phosphorylation ของ N-type Ca^{2+} channel และการสะสมของ ca^{2+} ที่ Ryanodine จึงทำให้เกิด calcium-induce calcium release (CICR) และการปลดปล่อย dopamine (Yoneda, Hiroi, Osada, Asada, & Funae, 2003) (ภาพที่ 2.2 B)

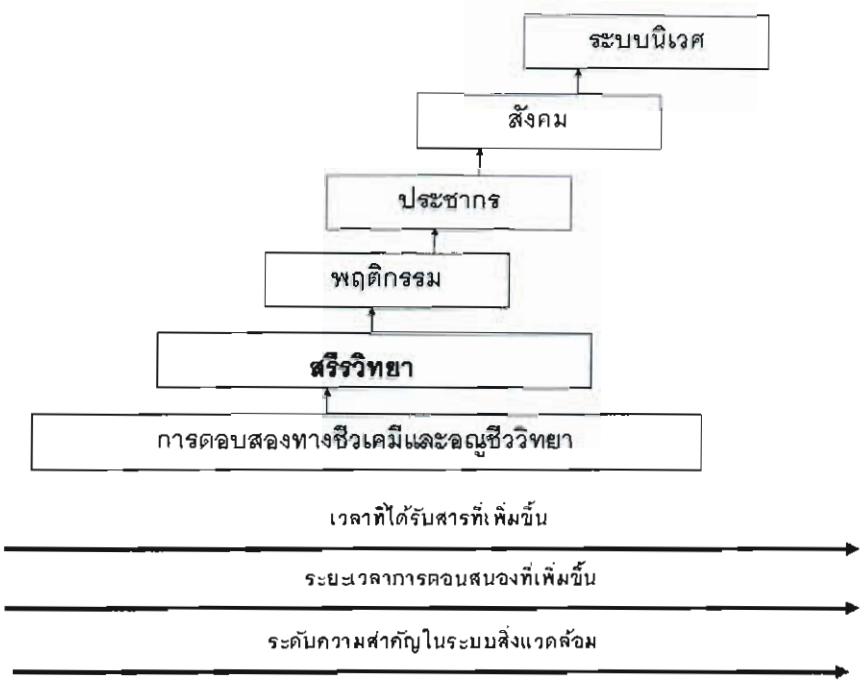
2. ออกฤทธิ์ผ่านตัวสื่อสัญญาณในกลุ่ม tyrosine kinase-mediated จากการศึกษาในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) เมื่อรับสัมผัสสาร BPA ที่ความเข้มข้น 50 µg/l (โดยการฉีด) เป็นเวลา 6, 12, 24 ชั่วโมงพบความเข้มข้นของ BPA ในเลือด 25 nM และสามารถกระตุ้น mitogen activated protein kinase (MAPKs) และ signal transducer and activator of transcription (STAT) เป็นผลให้เกิด CREB-like transcription factor (cAMP-responsive element binding protein) เพิ่มขึ้น (Canesi, Betti, Lorusso, Ciacci, & Gallo, 2005) (ภาพที่ 2.2 C)

การศึกษาในปลาหลายชนิด เช่น ปลาม้าลาย (zebra fish; *Danio rerio*) และ ปลาค็อดแอตแลนติก (Atlantic cod; *Gadus morhua*) เป็นต้น พบว่าเมื่อสัมผัสสาร BPA เป็นเวลาอย่างน้อย 3 เดือนเกิดการเหนี่ยวนำการผลิตโปรตีน vitellogenin (VTG) เพิ่มขึ้นด้วย (Crain et al., 2007) ดังรายงานที่สอดคล้องกันในปลาข้าวสารที่พบว่าโปรตีน VTG ในระบบเลือดเพิ่มขึ้นเนื่องจากระดับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ จะทำให้เกิดการตอบสนองทางสรีรวิทยา

(physiological response) ได้แก่ เกิดความผิดปกติของอวัยวะสืบพันธุ์ช่วงก่อนวัยเจริญพันธุ์และในระยะเจริญพันธุ์ จำนวนตัวอสุจิและอัตราการเจริญเติบโตลดลง (Jabling et al., 2004) ซึ่งอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างประชากร (populations structure change) เช่น ลดอัตราการรอดของประชากร ลดอัตราการรอดหลังจากการฟักไข่ เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับสังคมของสิ่งมีชีวิต (community response) และท้ายที่สุดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงของระบบนิเวศ ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวจะเป็นไปตามลำดับขั้น ดังภาพที่ 2.3 (Walker, Hopkin, Sibly, & Peakall, 2006)



ภาพที่ 2.2 กลไกการทำงานออกฤทธิ์โดยตรง (direct pathway or genomic pathway) และการออกฤทธิ์ผ่านตัวสื่อสัญญาณ (alternative pathway or nongenomic pathway) จากการศึกษาในเซลล์มะเร็งในหนูและเซลล์ของหอยแมลงภู่ (Porte et al., 2006)



ภาพที่ 2.3 ลำดับขั้นการตอบสนองในสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารแปลกปลอม (xenobiotics) (ดัดแปลงจาก Walker et al., 2006)

ผลกระทบของ BPA ต่อสรีรวิทยา พยาธิสภาพและการเจริญของสัตว์

ผลกระทบของ BPA ต่อสรีรวิทยาระบบสืบพันธุ์ของสัตว์สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะด้วยกันคือ 1) ความผิดปกติช่วงการแบ่งตัวเพื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ 2) ความผิดปกติในช่วงการแบ่งเซลล์สืบพันธุ์ และ 3) เกิดการเหนี่ยวนำให้ผลิต vitellogenin ที่ตับในสัตว์มีกระดูกสันหลังและผลิต vitellin ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Crain et al., 2007) มีตัวอย่างผลการศึกษาในกบ (*Xenopus laevis*) เมื่อได้รับ BPA เกินกว่า 5.7 mg/l เกิดความผิดปกติของการขดตัวของอวัยวะในระบบทางเดินอาหาร รวมถึงมีการเจริญของอวัยวะผิดปกติและลำตัวสั้นกว่าปกติ (Sone et al., 2004) ในจระเข้ caiman (*Caiman crocodilus*) เมื่อได้รับ BPA มากกว่า 140 ppm จะทำให้เกิดความผิดปกติของท่อ mullerian และความผิดปกติของอสุจิ รวมถึงมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราส่วนเพศในช่วงการฟักไข่ (Stok, Rey, Rodriguez, Romos, & Larriera, 2003)

สัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง

สัตว์ในกลุ่มไนดาเรียนเมื่อได้รับ BPA พบว่ามีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์และการเจริญเติบโตรวมถึงการพัฒนาของโพลิป เช่น การศึกษาในไฮดรา (*Hydra vulgaris*) ที่ได้รับสาร

BPA ที่ความเข้มข้นมากกว่า 0.46 mg/l เป็นเวลามากกว่า 72 ชั่งโมง มีผลต่อโครงสร้างทางเดินอาหารของช่องว่างกลางลำตัวและสรีรวิทยาของโพลิปรวมถึงยับยั้งการเจริญเติบโต (Pascoe, Carroll, Karntanut, & watts, 2002) และใน *Hydra oligactis* เมื่อได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 1 mg/l เป็นเวลา 35 วันพบว่ามีผลยับยั้งการสร้างอัณฑะ (testis) แต่มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการสืบพันธุ์แบบไม่อาศัยเพศโดยการแตกหน่อ (budding) แต่จะพบการสืบพันธุ์แบบแตกหน่อลดลงที่ความเข้มข้น 2 และ 3 mg /l (Fukhori, Kitano, & Kimura, 2005)

สัตว์ในกลุ่มอาร์โทพอดเมื่อได้รับ BPA พบว่ามีผลต่อการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์รวมถึงการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกกำจัดสารพิษ เช่นในแอมฟิพอด (*Gammarus fossarum*) ได้รับ BPA ในระบบลำธารจำลองที่ระดับความเข้มข้น 0.00024, 0.0024 และ 0.0241 mg/l ซึ่งเป็นค่าระดับความเข้มข้นที่เกิดผลกระทบ (effective concentration) ที่ 10%, 20%, 50% ตามลำดับ พบว่าเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 103 วัน โดยเก็บตัวอย่างจำนวน 3 ครั้งคือวันที่ 34, 96 และ 103 พบเซลล์ไข่ระยะ early-vitellogenic ลดจำนวนลงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และพบค่า maturity Index ลดลง และโปรตีน hsp 70 เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นผลมาจาก BPA มีบทบาทสำคัญต่อการส่งสัญญาณของฮอร์โมนเพศ (sex steroid signal transduction) ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Schirling et al., 2006)

หอยเป็นสัตว์ในกลุ่มมอลลัสกาที่นิยมนำมาใช้ทดสอบสารที่รบกวนฮอร์โมนเพศทั้งนี้จากการทดสอบเปรียบเทียบกับปลาพบว่า หอยมีความไวต่อการตอบสนองมากกว่า (Jobling et al., 2004) เช่นการทดลองของ Oehlmann et al. (2000) ในหอย ramshon (*Marisa conurietis*) ซึ่งเป็นหอยน้ำจืดเมื่อได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.0001 และ 0.001 mg/l เป็นเวลา 6 เดือน จะพบเซลล์ไข่ในระยะ post- vitellogenic และเกิดการสลายของโยค์ล (yolk) ซึ่งไม่พบในกลุ่มควบคุม เนื่องจากเซลล์ไข่ของหอยจะไม่มีพัฒนาการนอกฤดูการวางไข่ ส่วนในเพศผู้เมื่อได้รับสาร BPA ทั้ง 2 ความเข้มข้นดังกล่าวแล้วทำให้พัฒนาการของตัวอสุจิ (spermatogenesis) ลดลงและบริเวณที่มีการสร้างอสุจิเกิดการสลาย (Oehlmann et al., 2000; Oehlmann et al., 2006; Kümmerer, 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อหอย ramshon ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1mg/l เป็นเวลา 5 วันส่งผลให้อัตราเต้นของหัวใจลดลง (Schirling et al., 2006)

การศึกษาชีววิทยาระบบสืบพันธุ์ตลอดช่วงชีวิต (LC-test) ของหอย ramshorn เมื่อได้สัมผัสสาร BPA ที่ระดับ 0.001, 0.005, 0.025 และ 0.1 mg/l พบว่าจำนวนไข่หลังจากการวางไข่ครั้งแรกเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ทุกความเข้มข้นโดยพบว่าอวัยวะในทางเดินสืบพันธุ์คือต่อมสร้างเปลือกไข่ (albumen gland) และต่อมสร้างสารเมือก (capsule gland) จะขยายตัวใหญ่

(hypertrophy) ซึ่งเรียกปรากฏการณ์นี้ว่า "superfemale" และมีการผลิตไข่มากกว่าเมื่อเทียบกับชุดควบคุมจนเป็นเหตุให้เกิดการฉีกขาดของทางเดินสืบพันธุ์ระหว่างต่อมสร้างเปลือกกับท่อนำไข่ และหอย ramshorn รุ่น F_1 เมื่อได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/l จะหยุดการตอบสนองต่อสาร มีการแสดงออกของตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนลดต่ำลง (down-regulate) การเปลี่ยนแปลงการตอบสนองภายใน (endogenous) ของสารเอนโดรเจนที่ระดับความเข้มข้นนี้จึงเกิดภาวะ Imposex ซึ่งพบว่าค่าของ VDSI เพิ่มขึ้น (Oehlmann et al., 2000)

ในหอย dogwhelk (*Nucella lapillus*) ซึ่งเป็นหอยทะเลเมื่อได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.025 และ 0.1 mg/l เป็นเวลา 3 เดือนพบว่าเกิดภาวะ superfemale และมีเซลล์ไข่มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ไม่พบการการฉีกออกของทางเดินสืบพันธุ์ (Oehlmann et al., 2000) การศึกษาในหอยฝาเดียวที่มีการสืบพันธุ์ต่างกันออกไปคือ *Potamapyrgus antipodarum* ที่มีการสืบพันธุ์แบบพาร์ทีโนจีนีซิส (parthenogenesis) และ *Valvata pincinalis* (เป็นกระเทย) เมื่อได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.01 และ 0.1 mg/l เป็นเวลา 14 และ 28 วันพบว่า ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอย *P. antipodarum* แต่ใน *V. pincinalis* กลุ่มที่ได้รับสารที่ความเข้มข้นต่ำเยื่อบุเซลล์สืบพันธุ์ (germinal epithelium) จะหนาตัวขึ้นและเซลล์ไข่เกิดภาวะ necrosis ของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้น และจำนวนเซลล์ไข่ลดลง และที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/l เซลล์สร้างอสุจิจะตายและเกิดการสลายของท่อนำอสุจิ (Gagnair et al., 2009) ผลทางสรีรวิทยาของ *P. antipodarum* เมื่อได้รับสัมผัสกับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01-0.1 µg/l พบว่าเกิดการขยายตัวของอวัยวะในระบบสืบพันธุ์และมีน้ำหนักมากขึ้น รวมถึงจำนวนไข่เพิ่มมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Jobling et al., 2003; Dulf, Schmitt, Bachmann, Brandelik, Schulte-Oehlmann, & Oehlmann, 2007)

การศึกษาพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในกลุ่มหอยสองฝาพบว่า BPA มีผลต่อการสลายตัวของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) เช่นเดียวกับในกลุ่มหอยฝาเดียว เช่น ในหอยแมลงภู่ (*Mytilus edilus*) ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์ส่งผลให้มีการแสดงออกของฟอสโฟโปรตีน (phosphoprotein) เพิ่มมากขึ้นจากกลุ่มควบคุมในทั้งสองเพศ ฟอสโฟโปรตีนเป็นส่วนประกอบของ VTG-like ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังซึ่งที่มีส่วนในการพัฒนาและเจริญของเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย ในสภาวะธรรมชาติจะพบปริมาณของ vitellin ในตัวเมียสูงกว่าตัวผู้ นอกจากนี้ยังส่งผลต่อพยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์โดยจะลดขนาดและจำนวนของเซลล์ไข่ลงประมาณ 50% ของพื้นที่แมนเทิล (mantle) ที่ทำการตัด section ศึกษา

ส่วนพื้นที่เหลือจะพบเซลล์ไข่ในระยะ artetic ส่วนในเพศผู้พบว่าจำนวนของเซลล์อสุจิลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Aarab et al., 2006)

ตารางที่ 2.2 ผลกระทบของ BPA ต่อสรีรวิทยาของสัตว์

ชนิดของสัตว์	ระยะเวลาที่ได้รับสารBPA	ผลกระทบ	* NOEC (µg/l)
ฟองน้ำ (sponge)	9 วัน	การเจริญเติบโต	1600
ไนดาเรียน (cnidarian)	6 สัปดาห์	การเจริญเติบโต	42
โรติเฟอร์ (rotifer)	48 ชั่วโมง	การเจริญพันธุ์	1800
หอย (mollusk)	5 เดือน	การเจริญพันธุ์	0.015
ครัสเตเชียน (crustacean)	42 วัน	การเจริญพันธุ์	490
แมลง (insect)	28 วัน	การเจริญเติบโต	100
ปลา (fish)	2 ชั่วรุ่น	การสร้างอสุจิ	1.0
สัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำ (amphibian)	12 สัปดาห์	อัตราส่วนเพศ	2.23

* NOEC: non observe effected concentration

ที่มา: อ้างตาม Oehlmann et al. (2008)

ชีววิทยาของหอยเจดีย์

การจัดลำดับทางอนุกรมวิธาน

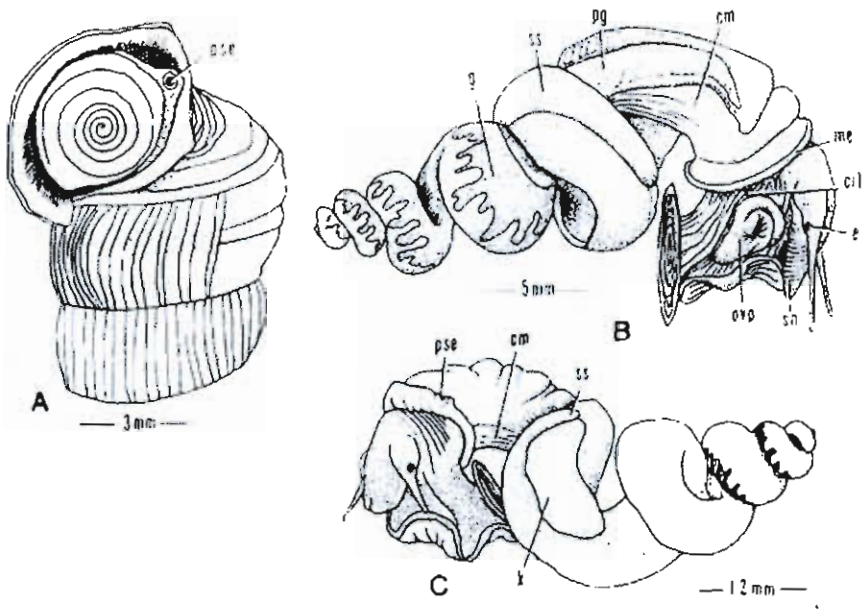
หอยเจดีย์ (*Cerithidea* (*Cerithideopsilla*) *cingulata* (Gmelin, 1970) มีชื่อสามัญว่า Horn snail, Creeper snail หรือ Sand creeper snail จัดเป็นหอยฝาเดี่ยวใน Class Gastropoda ชั้นย่อย (Subclass) Probranschia อันดับ (Order) Mesogastropoda วงศ์ (Family) Potamididae สกุล (Genus) *Cerithidea* เป็นกลุ่มที่มีความหลากหลายของสัณฐานวิทยาของเปลือกมากเนื่องจากมีถิ่นอาศัยแตกต่างกันออกไป หอยวงศ์นี้กระจายอยู่ในเขตร้อนตามแนวเส้นศูนย์สูตรและตามเขตใต้เส้นศูนย์สูตร จากการศึกษาทางกายวิภาคเปรียบเทียบ หอยเจดีย์จึงถูกจัดอยู่ในวงศ์ย่อย (subgenus) *Cerithideopsilla*

สัณฐานวิทยาของเปลือก

หอยเจดีย์มีเปลือกทรงเจดีย์ (turreted) ค่อนข้างบางเมื่อเปรียบเทียบกับสมาชิกวงศ์เดียวกัน ผิวเปลือกเป็นตุ่ม (nodule) ร่องเปลือกลึก เปลือกมีหลายวง (whorl) ตามแต่ขนาดซึ่งมีความสัมพันธ์กับถิ่นที่อาศัย ปริมาณสารอินทรีย์ และกระแสน้ำ ผิวของเปลือกมีแถบสีน้ำตาลคาดอยู่ระหว่างวงเปลือก ปากเปิดเปลือกบาง ในสกุล *Cerithidea* ขนาดเปลือกของตัวเมียใหญ่กว่าตัวผู้ วงยอดแรกเกิดของเปลือก (protoconch) เรียบและจะกร่อนเมื่อโตเต็มที่แล้ว ฝาปิดเปลือกเป็นสารประกอบพวกไคตินมีลักษณะบางค่อนข้างใส (Houbrick,1948)

สัณฐานวิทยาภายใน

Houbrick (1948) ทำการศึกษากายวิภาคเปรียบเทียบทางเดินระบบสืบพันธุ์ใน *C. scalariformis* พบว่า มีเพศแยก (dioecous) ตัวผู้มีขนาดของเปลือกเล็กกว่าตัวเมียอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ตอนกลางของหัวด้านขวาของตัวเมียจะมีลักษณะเป็นช่องลึก (ciliated groove) เชื่อมต่อกับกับช่องเปิดทางเดินสืบพันธุ์ (genital opening) ตอนปลายอีกข้างหนึ่งโป่งออกเป็นตุ่มสีขาวเหลืองเป็นอวัยวะสำหรับวางไข่ (ovipositor) ส่วนในตัวผู้จะไม่มีอวัยวะสำหรับการวางไข่ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีสีเหลืองขาววางพาดอยู่เหนือต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) ไตเป็นสีเขียวสามารถมองเห็นจากภายนอกเนื่องจากผนังของแมนเทิลบาง หายใจด้วยเหงือกที่ลดรูปเหลือเพียงข้างเดียว มีฟันครูดกินอาหารแบบเทนิโลฮกลอสซา (taenioglosate radula) เป็นกลุ่มหอยกินซาก (detritivores) ในประเทศไทยพบหอยชนิดนี้แพร่กระจายตามนิเวศปากแม่น้ำ และป่าชายเลนทั้งในอ่าวไทยและทะเลอันดามัน



ภาพที่ 2.4 สัณฐานวิทยาของหอยเจดีย์ (*Cerithidea scalariformis*)

A) ปากเปิดเปลือก B) ลักษณะกายวิภาคของตัวเมีย C) ลักษณะกายวิภาคของตัวผู้ (ag= albumen gland, bm= baccal mass, c=crop, cg= capsule gland, cil=ciliated groove, cm= columellar muscle, e=eye, g=gonad, k=kidney, me=mantle edge, ovp=ovipositor, pg= pallial gonoguct, pse=pallial siphonal eye, sn=snout, ss=style sac) (Houbrick,1948)

การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว

การพัฒนาของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ของหอยฝาเดียวกลุ่ม prosobranch สามารถจำแนกการเจริญได้เป็น 2 ประเภท คือ

1. การเจริญของอสุจิแบบปกติ (normal spermatogenesis) เป็นการเจริญที่สามารถพบได้ทุกกลุ่มของหอยฝาเดียว ซึ่งสามารถจำแนกได้เป็น 4 ระยะหลักได้แก่

- spermatogonium ในระยะนี้เซลล์จะมีขนาดเล็ก ย้อมติดสีเบส (basophilic) ของ haematoxylin ตลอดทั้งเซลล์ โครโมโซมยังไม่มีการหดเข้าเห็นเป็นเส้นใยภายในนิวเคลียส

- spermatocyte I เป็นระยะเริ่มต้นของการแบ่งตัวเพื่อสร้างอสุจิ เซลล์จะมีการขยายขนาดของไซโทพลาสซึม สีเบสย้อมติดที่นิวเคลียส มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโครโมโซม เยื่อหุ้มนิวเคลียสเริ่มขยายออกจนเห็นไม่ชัดเจน

- spermatocyte II เป็นระยะที่มีการแบ่งตัวแบบไมโอซิสอย่างชัดเจน นิวเคลียสมีการปรับเปลี่ยนรูปร่าง โครโมโซมจะเริ่มเด่นชัดขึ้น ไซโทพลาสซึมจะค่อยลด เพื่อมีการเปลี่ยนแปลงเข้าสู่ระยะต่อไป

- spermiogenesis เป็นการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่ผ่านระยะไมโอซิสเป็นตัวอสุจิ โดยในขั้นแรกจะมีไซโทพลาสซึมลดลง และพบการสร้างออร์กาเนลที่จำเป็นต่อการปฏิสนธิ เช่น ไมโทคอนเดรีย (mitochondia) เป็นต้น ซึ่งส่วนประกอบของอสุจิจะแบ่งออกเป็น 3 ส่วนได้แก่ ส่วนหัว (head) จะมีส่วนของ acosome ซึ่งทำหน้าที่ในการผลิตเอนไซม์ในการย่อยเปลือกไข่ และจะแตกต่างกันออกไปขึ้นอยู่กับชนิดของหอย ส่วนลำตัว (middle piece) ในช่วง spermiogenesis จะมีการรวมตัวของไมโทคอนเดรีย ทำให้รูปร่างของส่วนลำตัวแตกต่างกันออกไปในแต่ละกลุ่มหอย และส่วนหาง (tail) เป็นส่วนของแฟลกเจลลัมที่มีการเจริญต่อจากส่วนไมโทคอนเดรีย

2. การเจริญของอสุจิแบบผิดปกติ (abnormal spermatogenesis) เป็นการเจริญที่พบในหอยบางกลุ่มเท่านั้น เช่น ในชั้นย่อย Archaeogastropod, Mesogastropod และ Neogastropod จะมีขนาดใหญ่กว่าอสุจิปกติ และตัวอสุจิที่เจริญแบบผิดปกติจะรวมตัวกับอสุจิที่มีนิวเคลียส (euspermatozoa) เรียกว่า spermatozeugma เพื่อเอื้ออำนวยต่อการเคลื่อนที่ของอสุจิในกลุ่มของหอยที่มีการปฏิสนธิภายใน

การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียของหอยฝาเดียวกลุ่ม prosobranch สามารถแบ่งออกเป็น 3 ช่วงดังนี้

1. Permeiotic nuclear growth นิวเคลียสจะมีขนาดใหญ่ ไซโทพลาสซึมยังไม่มีการเพิ่มขนาด เซลล์จะติดสีเบสตลอดทั้งเซลล์

2. Cytoplasmic growth เป็นระยะที่มีการขยายขนาดของเซลล์ เซลล์ยังติดอยู่กับผนังรังไข่ ในระยะนี้สามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ระยะ (Kim & Lee, 2009)

- ระยะ Initial vitellogenic นิวเคลียสเริ่มมีการขยายใหญ่ขึ้น นิวคลีโอลัสแบ่งตัวเป็นจำนวนมากภายในนิวเคลียส ในระยะนี้ยังไม่มีการสะสมไกลโคเจน

- ระยะ early active vitellogenic ในระยะนี้ยังสามารถพบนิวเคลียสได้ แต่มีขนาดเล็กลง เริ่มมีการสะสมไกลโคเจนทำให้เซลล์ติดสีกรด (eosinophilic)

- ระยะ lately active vitellogenic ในระยะนี้ เซลล์จะมีการสะสมไกลโคเจนเป็นจำนวนมากเพื่อช่วยในการสร้างเปลือกไข่ และการเจริญของไข่ เซลล์จะติดสีกรดตลอดทั้งเซลล์ และสังเกตนิวเคลียสได้ยาก

3. ระยะ maturation เซลล์จะมีการหลุดออกจากก้านยึดไข่ (peduncle) ออกสู่ทางเดินสืบพันธุ์ ในระยะนี้จะเห็นเซลล์ไข่ที่มีนิวเคลียสขนาดเล็กแต่เซลล์มีไซโทพลาสซึมขนาดใหญ่ภายในมีเม็ดรงควัตถุ สะสมอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญของตัวอ่อน (Cronin, Myers, & Riordan, 2000)

ฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียว

การทำงานของฮอร์โมนเพศในหอยฝาเดียวเกิดจากการควบคุมของฮอร์โมนจากระบบประสาท (neurohormone) ที่ผลิตจากปมประสาท ได้แก่ ปมประสาทสมอง (cerebral ganglia) ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนเกี่ยวกับการตอบสนองทางสรีรวิทยา ปมประสาทเท้า (pedal ganglia) ทำหน้าผลิตฮอร์โมนเกี่ยวกับการเหนี่ยวนำการเกิดและการสลายของ penis เรียกว่า Penis Morphogenic Factor (PMF) ปมประสาทส่วนลำตัว (pleural ganglia) ทางเชื่อมปมประสาทสมอง (cerebropleural connective area) และปมประสาทตัว ทำหน้าที่ผลิตฮอร์โมนที่มีเกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และอวัยวะทางเดินสืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมีย ปมประสาทเหล่านี้เรียกว่า gonadotropic center มีหน้าที่หลั่งเปปไทด์ฮอร์โมน (peptide hormone) ซึ่งจะมีผลต่อการหลั่งฮอร์โมนจากแหล่งผลิตฮอร์โมนอื่น เช่น ฮอร์โมนจากอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ การตอบสนองทางสรีรวิทยา รวมถึงการพัฒนาและการเปลี่ยนแปลงเพศในหอยกลุ่มที่พบชีววิทยาการสืบพันธุ์แบบ hermaphroditic และ protandric (Croll & Van Minnen, 1992; Nolte, Koolman, Dorlöchter, & Straub, 1986) นอกจากนี้ยังพบการสร้างฮอร์โมนจากอีกหลายอวัยวะ ได้แก่ อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เป็นแหล่งสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของเซลล์สืบพันธุ์และกิจกรรมของอวัยวะในระบบทางเดินสืบพันธุ์ และเป็นกลไกการควบคุมย้อนกลับ (feedback control) ต่อ gonadotropic centers รวมถึงพฤติกรรมการสืบพันธุ์ด้วย จากการศึกษาพบว่าในเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีการสร้างสารในกลุ่มสเตียรอยด์จากเซลล์เซอโทไล (sertoli cell) optic tentacle เป็นอีกบริเวณที่มีการหลั่งสารที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาลักษณะเพศผู้ มาเก็บไว้ในส่วนของช่องว่าง (heme lacuna) ใกล้กับบริเวณที่จะเกิดอวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (de Jong-Brink, & Geraerts, 1982)

กลไกการทำงานของฮอร์โมนในระบบสืบพันธุ์ในหอยฝาเดียว

การทำงานของฮอร์โมนจากระบบประสาทสมองของหอยฝาเดียวส่วนใหญ่ศึกษาใน *Lymnea stagnalis* พบว่าการทำงานของฮอร์โมนส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ปมประสาทสมองจากการศึกษาพบเซลล์ประสาททั้งสิ้น 3 ชนิดได้แก่ light green cell (LGC) ทำหน้าที่เกี่ยวของกับการผลิตเปปไทด์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญเติบโต caudo-dorsal cell (CDC) และ dorsal

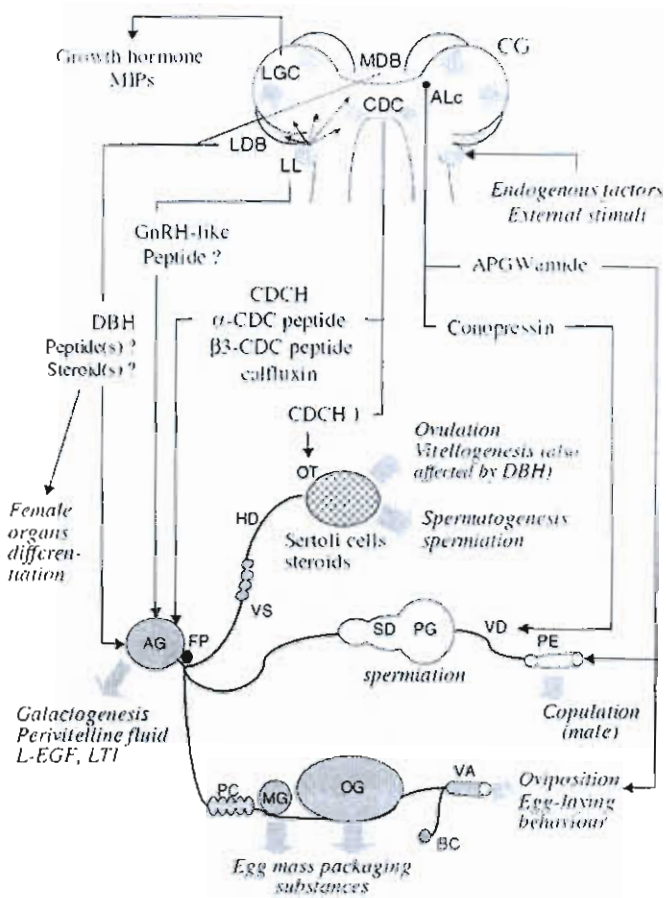
bodies (DB) เป็นเซลล์ค้ำจุนเซลล์ประสาท ทำหน้าที่ควบคุมและผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องการสืบพันธุ์ DB มีอยู่ 2 ตำแหน่งคือ lateral dorsal bodies (LDB) และ median dorsol bodies (MDB) ทั้งสองบริเวณผลิตฮอร์โมนเกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะในระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศเมีย ไวเทลโลเจนนิซิส (vitellogenesis) ในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ไข่ในระยะ maturation และการสังเคราะห์กาแลกโตเจน (galactogen) ที่ต่อมสร้างเปลือกไข่ (albumen gland) (Wijdenes, van Elk, & Joosse, 1983) CDC สามารถผลิตเปปไทด์ฮอร์โมนหลายชนิด เช่น CDCH, α-CDC peptide, β3-CDC peptide และ calfluxin มีบทบาทควบคุมในช่วงการวางไข่ (ter Maat, Pieneman, Goldschmeding, Smelik, & Ferguson, 1989) โดย CDCH มีหน้าที่ในการกระตุ้นให้เกิดการตกไข่จากการศึกษาพบว่ามีการแสดงออกของยีน 3 ยีนได้แก่ CDCH-1, CDCH-2 และ CDCH-3 ซึ่งยีน CDCH1 มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการวางไข่และการเคลื่อนที่ของเซลล์ไข่ ซึ่งถูกยับยั้งได้ด้วยฮอร์โมนจากปมประสาทเท้า นอกจากนี้พบฮอร์โมนกระตุ้นให้ปมประสาทเท้าผลิตเปปไทด์ฮอร์โมน ß3-CDC ในช่วงที่มีพฤติกรรมผสมพันธุ์ (turning stage) (Hermann, de Lange, Pieneman, ter Maat, & Jansen, 1997) calfluxin เป็นฮอร์โมนที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างและหลั่ง perivitelline ออกมาจากต่อมสร้างเปลือกไข่ เป็นฮอร์โมนสำคัญในกระบวนการเจริญของตัวอ่อน (Dictus, de Jong-Brink, & Boer, 1987; Nagle et al., 2001) จากการศึกษาพบว่าการหลั่ง perivitelline มีความเกี่ยวข้องกับ dopamine การศึกษาของ Mukai, Kiehn, and Saleuddin (2004) พบ dopamine D-1 receptor ที่ต่อมสร้างเปลือกไข่ นอกจากนี้ยังพบฮอร์โมนอีกหลายชนิด เช่น FMRFamide ที่หลั่งจากบริเวณปมประสาทสมองที่มีผลต่อการวางไข่และการเต้นของหัวใจรวมถึงอัตราการหายใจ เป็นต้น

การเจริญของอวัยวะในระบบทางเดินสืบพันธุ์เพศผู้ (accessory sex organ: ASO) ได้แก่ อวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้ (penis) ท่อนำอสุจิ (sperm duct) ถุงเก็บอสุจิ (seminal vesicle) ร่องนำอสุจิ (external sperm groove) และเซลล์อสุจิ (spermatocyte) โดยฮอร์โมน APGWamide จะนำเปปไทด์ฮอร์โมนที่สร้างจากปมประสาทเท้าใกล้กับอวัยวะสืบพันธุ์และท่อนำอสุจิ มาสะสมที่ช่องว่างบริเวณหนวดที่ทำหน้าที่เป็น PMF ปัจจัยสำคัญต่อการเจริญของอวัยวะสังวาส (penis) หลังจากพ้นช่วงฤดูผสมพันธุ์ฮอร์โมนชนิดนี้จะลดลงทำให้ ASO ในเพศผู้มีขนาดลดลงด้วย (Golen, Li, Lange, Kesteren, Schors, & Geraerts, 1995)

พฤติกรรมการสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียวเพศเมียอยู่ภายใต้การควบคุมของ lateral lobes (LL) ร่วมกับปัจจัยเร้าภายในและภายนอกร่างกาย การศึกษาใน *Halisoma trivolvis* พบว่าบริเวณใกล้กับ LL มีเซลล์ที่สามารถสร้าง gonadotropin-releasing hormone (GnRH) family มีหน้าที่

ควบคุมกระบวนการสืบพันธุ์ นอกจากนี้ยังพบว่า LL มีผลต่อการควบคุมการผลิตเปปไทด์ฮอร์โมนของเซลล์ค้ำจุนประสาท DB และ CDC ซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโต ควบคุมเมตาบอลิซึม และมีผลยับยั้ง LGC (Joosse, 1988; Geraerts, 1992; Goldberg, Garofalo, Price, & Chang, 1993) อย่างไรก็ตามการศึกษาระบบฮอร์โมนที่ควบคุมจากสมองของหอยฝาเดียวมีรายงานการศึกษาน้อยและมักทำการศึกษาในกลุ่มหอยน้ำจืดที่มีชีววิทยาการสืบพันธุ์เป็นแบบกระเทย

รายงานวิจัยในหอยสองฝานิยมศึกษาในหอยเชลล์ (*Pecten* spp.) และหอยแมลงภู่ (*Mytilus* spp.) พบว่ามีการผลิตสารสเตรียรอยด์ เช่น 17ß-estradiol ซึ่งมีผลในการกระตุ้นปมประสาทสมองและปมประสาทเท้าให้หลั่ง vitellogenin-like (VTG-like) และ serotonin จาก follicle cells ซึ่งฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่และการสะสมโยล์ค ซึ่งเป็นอาหารสะสมที่จำเป็นสำหรับการเจริญของตัวอ่อน (Wahli, 1988; Li, Osada, Suzuki, Sato, & Mori, 1998; Osada, Takamura, Sato, & Mori, 2003)



ภาพที่ 2.5 แผนภาพการควบคุมการทำงานของฮอร์โมนต่อระบบสืบพันธุ์ของหอยในกลุ่ม Basommatophora AG= albumen gland, ALc= cell of the cerebral ganglia anterior lobes BC= bursa copulatrix, CDC= caudodorsal cell, CDCH= caudodorsal cell hormone, CG= cerebral ganglia, DBH dorsal body hormone, FP=fertilization pocket, GnRH= gonadotropin-releasing hormone HD= hermaphrodite duct, LDB= lateral dorsal body, L-EGF= *Lymnaea* epidermal growth factor, LGC= light green cell, LL= lateral Lobes, LTI= *Lymnaea* trysin inhibitor, MDB= median dorsal bodies, MG= muciparous gland, MIP= molluscan insulin-like peptide, OG =oothecal Gland, OT=ovotestis, PC=pars contorta, PE= penis, PG=prostate gland, SD= sperm duct, VA= vagina gland, VD= vas deferens, VS= vesiculae Seminales (Lagadic, Coutellec, & Caquet, 2007)

บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 การศึกษาเบื้องต้นผลของ BPA ต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์

ตัวอย่างหอยเจดีย์

เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียที่มีจำนวนวงเปลือกมากกว่า 5 วง จากหาดกัปตันยุทธ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี (ภาพที่ 3.1) ช่วงเดือนมกราคม พ.ศ. 2552 ประมาณ 200 ตัวอย่าง คัดเลือกหอยเจดีย์ที่มาทดสอบทางพิษวิทยาเบื้องต้นเพื่อใช้เลือกความเข้มข้นของสาร BPA ที่มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างแล้วนำมาคัดเลือกเพศผู้ที่มีความยาวเปลือกเท่ากับ 18.96±0.8 มิลลิเมตร มีจำนวนวงเปลือกเท่ากับ 5-6 วง ส่วนเพศเมียมีความยาวเปลือกเท่ากับ 23.17±0.94 มิลลิเมตรมีจำนวนวงเปลือกเท่ากับ 5-7 วง จากนั้นนำหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยมาศึกษากายวิภาคและเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ และระยะของเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิ

ภาพที่ 3.1 แหล่งเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์บริเวณหาดกัปตันยุทธ ตำบลบางพระ อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี (http://maps.google.co.th/)

เตรียมสัตว์ทดลอง

นำหอยเจดีย์ที่คัดเลือกได้ มาปรับสภาพในพื้นที่ทดลอง (ห้องปฏิบัติการ) เป็นเวลา 2 สัปดาห์ ในตู้กระจกขนาด 100X70X100 ลูกบาศก์เซนติเมตร ที่บรรจุน้ำทะเลปริมาตร 10 ลิตร โดยน้ำทะเลนำมาจากช่องแสมสาร ตำบลแสมสาร อำเภอสัตหีบ จังหวัดชลบุรี แล้วนำมาพักในบ่อกักเก็บน้ำเค็มของภาควิชาวาริชศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา (รายงานของกรมควบคุมมลพิษปี 2552 ในสถานีตรวดวัดช่องแสมสาร พบว่าน้ำทะเลมีคุณภาพดี) ความเค็ม 27-30 ppt. อุณหภูมิเฉลี่ย 27-30 °C ให้อากาศด้วยหัวทรายตลอดเวลา และให้สาหร่ายสีเขียว (*Tretaspora* sp.) ขนาดเล็กเป็นอาหารทุกวัน ๆ 1 ครั้ง ให้หอยเจดีย์อดอาหารเป็นเวลา 2 วันก่อนเริ่มทำการทดลอง

การเตรียมสารเคมี

เตรียมสารละลายตั้งต้น (stock solution) ของ BPA (sigma-Aldrich cat no. 239658) ให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 2,000 mg/l ในตัวทำลาย 20% Dimethyl sulfoxide (DMSO-C_6H_6OS, Ricdel-deHaën) ที่เตรียมจากน้ำกลั่น จากนั้นปิเปตปริมาตรที่ต้องใช้ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 10, 30 และ 100 mg/l

3.1.1 การศึกษาผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงเป็นเวลา 4 วันต่อลักษณะกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์

ใช้หอยเจดีย์เพศผู้และเพศเมียอย่างละ 5 ตัวเลี้ยงรวมกันในแต่ละกลุ่มทดสอบ ที่มีทั้งหมด 5 กลุ่มคือ กลุ่มก่อนการทดสอบ (กลุ่มที่ 1) กลุ่มควบคุม (2 และ 3) และกลุ่มที่ได้รับสาร BPA (4 และ 5) แต่ละกลุ่มแยกเลี้ยงในตู้กระจกขนาด 30x30x30 ลูกบาศก์เซนติเมตรที่บรรจุน้ำทะเล 1 ลิตร และแบ่งการทดสอบให้หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ดังนี้

กลุ่มที่ 1 นำหอยเจดีย์ไปกะเทาะเปลือกแล้วแยกออกเป็น 2 ส่วน คือ 1) ส่วนลำตัว (ทุกส่วนยกเว้น g, ภาพที่ 2.4 B) นำไปศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของอวัยวะสืบพันธุ์ (ข้อที่ 3.1.1.1) และ 2) อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (g, ภาพที่ 2.4 B) นำไปศึกษามิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (3.1.1.2) ก่อนนำไปทดสอบการได้รับสัมผัสสาร BPA

กลุ่มที่ 2 หอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับสาร BPA เลี้ยงในน้ำทะเล เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนำไปศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 3 หอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับสาร BPA เลี้ยงในน้ำทะเล + 20%DMSO เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนำไปศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 4 หอยเจดีย์เลี้ยงในน้ำทะเลและได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l โดยวิธีการแช่ เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนำไปศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

กลุ่มที่ 5 หอยเจดีย์เลี้ยงในน้ำทะเลและได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l โดยวิธีการแช่ เป็นระยะเวลา 4 วัน แล้วนำไปศึกษาเช่นเดียวกับกลุ่มที่ 1

3.1.1.1 ศึกษาลักษณะกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์

นำส่วนลำตัวของหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมารักษาสภาพโดยแช่ในสารละลาย formol-alcohol แล้วนำมาศึกษาลักษณะกายวิภาคภายนอกของระบบสืบพันธุ์และตำแหน่งของอวัยวะสืบพันธุ์ภายใต้กล้อง stereo SMZ-U จากนั้นทำการบันทึกภาพ

3.1.1.2 ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

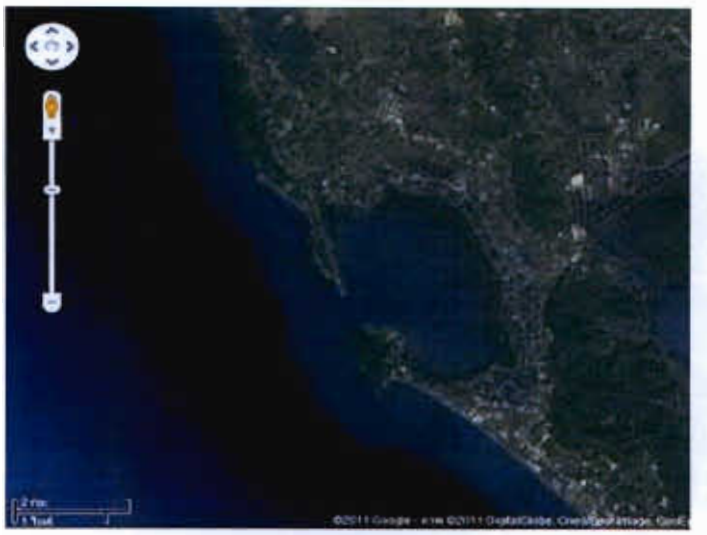
นำอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ในข้อ 3.1.1.1 แช่ในสารละลาย Bouin เป็นเวลา 12 ชั่วโมง แล้วย้ายแช่ลงใน 70% Ethanol และเปลี่ยน 70% Ethanol ใหม่จนกว่าสีเหลืองของสารละลาย Bouin จะหมด จากนั้นทำการ embedding ชิ้นเนื้อเยื่อใน paraplast นำมาตัดด้วยเครื่องตัดเนื้อเยื่อ (microtome) ให้มีความหนา 7 ไมครอน คัดเลือก 8 จาก 16 แผ่นของชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดต่อเนื่องกัน (section series) จนกว่าจะหมดชิ้นเนื้อเยื่อ จากนั้นย้อมสีด้วย Haematoxylin (H) & Eosin (E) (Kim, & Lee, 2009) แล้วทำการคัดเลือกชิ้นเนื้อเยื่อมาศึกษา 2 ชิ้นต่อหนึ่งสไลด์ และสังเกต 3 บริเวณต่อหนึ่งชิ้นเนื้อเยื่อ (60 บริเวณ) ศึกษาเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อของเซลล์สืบพันธุ์ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ BPA และกลุ่มที่ไม่ได้รับ BPA ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus BX50)

3.2 ศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อลักษณะกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ตัวอย่างหอยเจดีย์

เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียจำนวนวงเปลือกมากกว่า 5 วง จากบริเวณหาดเจ้าหลาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (ภาพที่ 3.2) จำนวนเพศละประมาณ 800 ตัวอย่าง ในช่วงเดือนเมษายน พ.ศ. 2553 นำมาศึกษาผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ติดต่อกันเป็นเวลา 5 และ 10 วัน จากนั้นคัดเลือกสัตว์ทดลอง เตรียมหน่วยทดลอง และสารเคมีเช่นเดียวกับข้อ 3.1

สำนักหอสมุด มหาวิทยาลัยบูรพา
ต.แสนสุข อ.เมือง จ.ชลบุรี 20131



ภาพที่ 3.2 แหล่งเก็บตัวอย่างหอยเจดีย์บริเวณหาดเจ้าหลาว อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี (http://maps.google.co.th/)

3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษของ BPA ที่ระดับความความเข้มข้นต่างๆ ต่อกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์

นำหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยเพศละ 10 ตัวอย่างต่อ 1 ระดับความเข้มข้นนำไปทดสอบสาร BPA โดยการแช่ที่ 6 ระดับความเข้มข้นคือ ความเข้มข้นต่ำ (0.001 และ 0.01 mg/l), ความเข้มข้นระดับกลาง (0.1 และ 1 mg/l) และความเข้มข้นระดับสูง (10 และ 100 mg/l) ติดต่อกันเป็นระยะเวลานาน 5 และ 10 วันเช่นเดียวกับที่รายงานโดย Oehlmann et al., (2000); Kummerer (2004); Oehlmann et al., (2006); Aarab et al., (2006) ที่ทำการศึกษาในหอย ramshorn และหอยแมลงภู่ จากนั้นนำมาจัดชุดการทดลองโดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่ม (ภาพที่ 3.3) คือ

1) กลุ่มควบคุมไม่ได้รับ BPA (0 mg/l) กลุ่มควบคุมที่ 1 เลี้ยงหอยเจดีย์ในน้ำทะเล (CSW) และ กลุ่มควบคุมที่ 2 เลี้ยงหอยเจดีย์ในน้ำทะเล + 20%DMSO

2) กลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัส BPA แบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ได้แก่

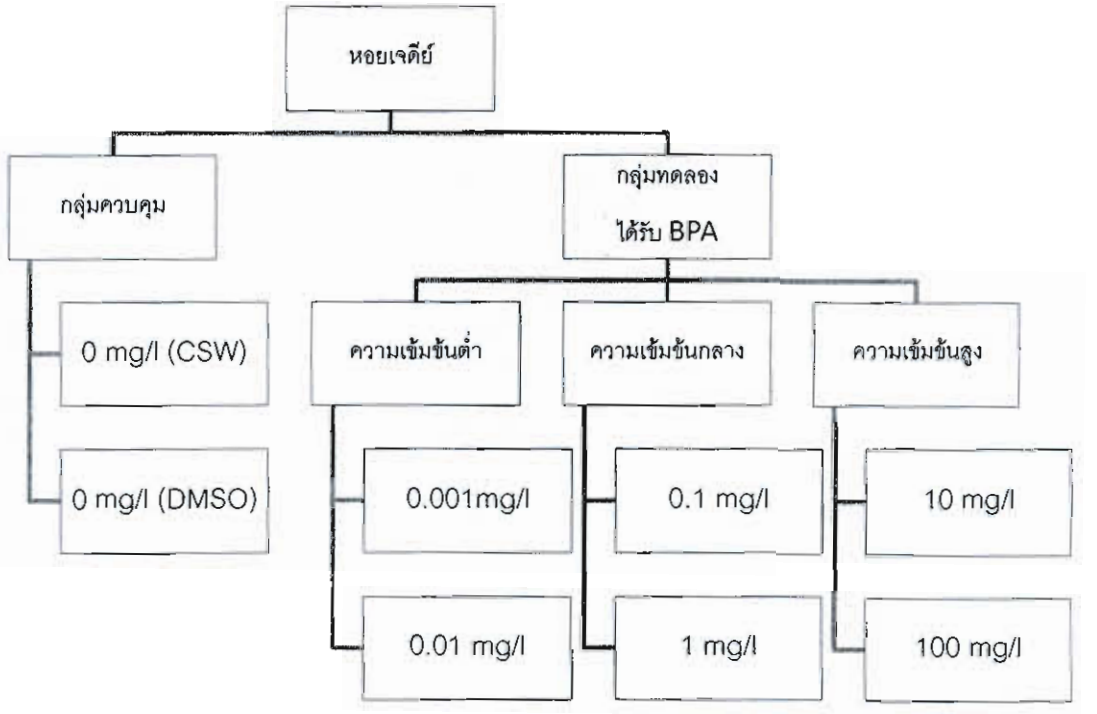
2.1) กลุ่มที่ได้รับสารความเข้มข้นต่ำ (0.001 และ 0.01 mg/l)

2.2) กลุ่มที่ได้รับสารความเข้มข้นปานกลาง (0.1 และ 1 mg/l)

2.3) กลุ่มที่ได้รับสารความเข้มข้นสูง (10 และ 100 mg/l)

ทำการเปลี่ยนน้ำทะเลและสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นดังกล่าวใหม่ปริมาตร 1 ลิตร ทุก ๆ 4 วัน และนำหอยออกทันทีที่พบหอยตาย เมื่อครบกำหนดเวลา 5 และ 10 วัน เก็บตัวหอยเจดีย์แต่ละชุดทดลองเพศละ 5 ตัว นำไปศึกษาดังข้อที่ 3.2.2

363.7394
ร635ผ
ฉ.2
291552



ภาพที่ 3.3 ช่วงการทดสอบความเป็นพิษเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสัมผัสสาร BPA

หมายเหตุ CSW=กลุ่มควบคุม (น้ำทะเล) DMSO=กลุ่มควบคุม (น้ำทะเล+20%DMSO)

3.2.2 การศึกษาลักษณะกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

วิธีการศึกษาลักษณะกายวิภาคและขั้นตอนการศึกษาพยาธิสภาพทำเช่นเดียวกับข้อ 3.1.1

3.2.3 การศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย

สุ่มสไลด์ในข้อที่ 3.2.2 ที่ย้อมด้วยสี H&E (จำนวน 60 บริเวณ) มาศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus BX 50) ที่กำลังขยาย 200x บันทึกภาพแล้วนับจำนวนเซลล์ไข่โดยใช้โปรแกรม Image J จำแนกเซลล์ไข่ตามลักษณะการย้อมติดสีและลักษณะของเซลล์แบ่งเป็น 4 ระยะได้แก่

1) ระยะก่อนสร้างโยล์ค (pre-vitellogenic) เซลล์จะย้อมติดสีม่วงน้ำเงินของ Haematoxylin ซึ่งประกอบด้วยระยะ premiotic, chromatin-nucleolus และ pre-vitellogenic

2) ระยะที่มีการสะสมโยล์ค (vitellogenic) เป็นระยะที่เซลล์ไข่มีการสะสมโยล์ค เซลล์จะย้อมติดสีน้ำเงิน ได้แก่ระยะ vitellogenic และ mature

3) ระยะ mature เป็นระยะที่เซลล์ไข่เจริญเต็มที่สังเกตนิวเคลียสไม่ชัดเจน

4) ระยะ atretic follicles เป็นระยะที่เซลล์ไข่เกิดการสลายของ germinal vesicle (GVBD)

3.2.4 การวิเคราะห์ความเป็นพิษของสาร BPA ต่อจำนวนเซลล์ไข่

การวิเคราะห์ความเป็นพิษทำโดยนับจำนวนเซลล์ไข่ซึ่งแบ่งออกเป็น 2 ระยะคือ 1) ช่วง pre-vitellogenic ประกอบด้วยเซลล์ oogonium และระยะ meiotic และ 2) ช่วง post vitellogenic ประกอบด้วย vitellogenic และระยะ mature วิเคราะห์โดยแบ่งเซลล์ไข่ออกเป็น 2 ช่วงศึกษา เนื่องจากมีรายงานพบว่า ปริมาณโยล์คที่สะสมในเซลล์ไข่มีความสัมพันธ์กับการออกฤทธิ์ของสาร BPA (Schirling et al., 2006)

1) นับจำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ เซลล์ไข่ระยะ pre-vitellogenic และระยะ post-vitllogenic นำมาสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไข่กับความเข้มข้นของ BPA เพื่อจะทราบแนวโน้มว่าเซลล์ไข่เพิ่มหรือลดลง จากนั้นนำผลไปวิเคราะห์ทางสถิติแบบแจกแจงทางเดียว (one-way ANOVA)

2) นับจำนวนเซลล์ไข่ระยะ pre-vitellgenic และระยะ post-vitellogenic นำมาคำนวณค่าอัตราส่วนเซลล์ไข่ (egg ratio) ตามสูตรข้างล่าง แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BPA กับอัตราส่วนเฉลี่ยของเซลล์ไข่จากนั้นวิเคราะห์ผลทางสถิติแบบแจกแจงทางเดียว (one-way ANOVA) (Schirling et al., 2006)

$$\text{Egg Ratio (ER)} = \frac{\text{post-vitellogenic}}{\text{pre-vitellogenic}}$$

3) นับจำนวนเซลล์ไข่ในระยะ maturity กับจำนวนเซลล์ไข่ที่พบทั้งหมดคำนวณค่าดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ (% Egg Maturity Index) ตามสูตรด้านล่าง แล้วสร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ BPA กับดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ วิเคราะห์ผลทางสถิติแบบแจงแจงทางเดียว (one-way ANOVA)

$$\text{\% Egg Maturity Index (\%EMi)} = \frac{\text{mature}}{\text{total}} \text{ X100}$$

4) ศึกษาปัจจัยระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA แล้วส่งผลต่อจำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ ระยะ pre-vitellogenic และระยะ post-vitellogenic เพื่อให้ทราบแนวโน้มการเพิ่มและ

การลดลงของจำนวนเซลล์ไข่ จากนั้นนำจำนวนเซลล์ไข่ที่นับได้ไปวิเคราะห์ทางสถิติเปรียบเทียบเป็นคู่ด้วย student t-test

3.2.5 ศึกษาพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์เพศผู้

ทำการสุ่มเนื้อเยื่อมาศึกษาเช่นเดียวกับการศึกษาพยาธิสภาพในเพศเมีย (ข้อ 3.2.3) และวิเคราะห์การก่อพิษของ BPA โดยพิจารณาจากจำนวนของเซลล์และรูปร่างของอซินัส (acinus) โดยแบ่งออกเป็น 4 ระยะ คือ

ระยะ 1 เซลล์เจริญปกติ พบเซลล์อสุจิได้ทั้ง 4 ระยะ ได้แก่ spermatogonium, spermatocyte I, spermatocyte II และ spermatozoa

ระยะ 2 พบ spermatocyte เพียงเล็กน้อยภายในช่องว่างอซินัส (acini lumen) และพบเซลล์เกิดภาวะ necrosis

ระยะ 3 เกิดการสลายของเซลล์และช่องว่างอซินัสตีบตัน แต่พบ spermatocyte

ระยะ 4 เซลล์อสุจิเกิดภาวะ necrosis ช่องว่างอซินัสตีบตัน และเซลล์เกิดภาวะสลายตัว (cell lysis)

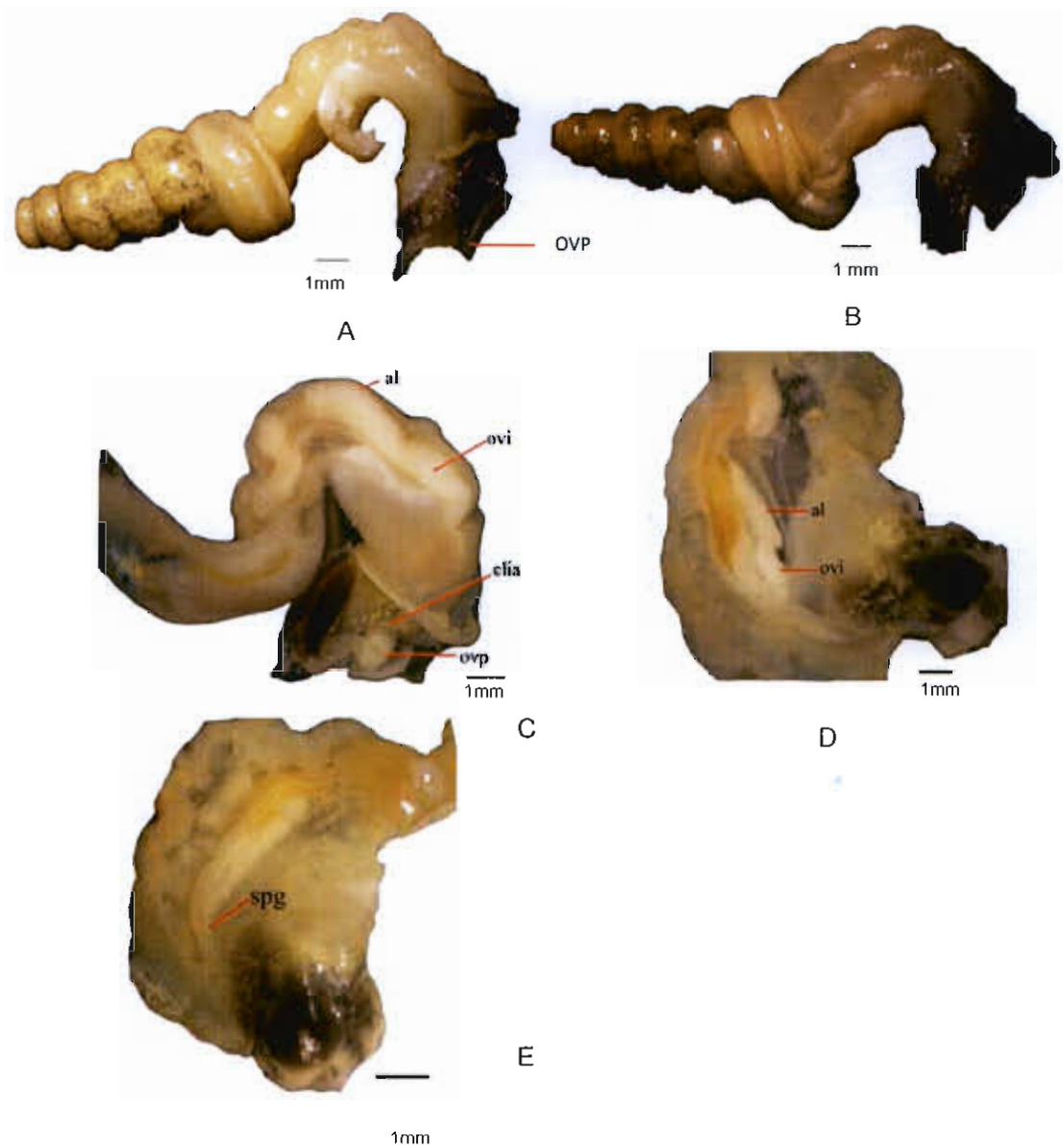
บทที่ 4
ผลการวิจัย

4.1 ผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์

4.1.1 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และพยาธิสภาพของหอยเจดีย์ก่อนได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงเป็นระยะเวลานาน 4 วัน

ลักษณะทางกายวิภาคของหอยเจดีย์ก่อนทดสอบได้รับสาร BPA

ใช้หอยเจดีย์ตัวเต็มวัยจากหาดกัปตันยุทธ (กลุ่มที่ 1 ข้อที่ 3.1.1.1) มาศึกษาพบว่าลักษณะสัณฐานวิทยาภายนอกของระบบสืบพันธุ์สามารถแยกเพศออกจากกันได้อย่างชัดเจน เพศเมียจะมีอวัยวะวางไข่ (ovipositor) และ ciliated groove อยู่ทางด้านขวาของหัวติดกับเท้า เป็นร่องที่ต่อจากท่อนำไข่ที่อยู่ติดกับผนังของแมนเทิล (ภาพที่ 4.1 A และ C) ตอนบนของท่อนำไข่จะพบต่อมสร้างเปลือกไข่ (albumen gland) และจะพบท่อเชื่อมติดไปกับทางเดินอาหารเข้าไปสู่ต่อมสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย (ภาพที่ 4.1 D) ส่วนในเพศผู้ทางด้านขวาของส่วนหัวจะเรียบ มีเม็ดสีเมนลานิน กระจายทั่วไปตลอดส่วนหัวมากกว่าเพศเมีย (ภาพที่ 4.1 B) เมื่อทำการเปิดแมนเทิลออกพบร่องนำอสุจิสีส้มออกครีมซึ่งสามารถแยกความแตกต่างจากเยื่อหุ้มแมนเทิลได้อย่างชัดเจน ทางด้านบนพบ spermatheca หน้าที่สำหรับเก็บรวบรวมอสุจิ (ภาพที่ 4.1 E) อวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียมีความยาวประมาณ ½ ของลำตัวยึดติดอยู่เหนือต่อมย่อยอาหารด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน เมื่อศึกษาด้วยดาเปล่าสีของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์มีความต่างกัน กล่าวคือ ในเพศเมียอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จะมีสีขาวครีมมีลักษณะเป็นกลุ่มวางตัวอยู่เหนือต่อมย่อยอาหารซึ่งมีสีดำ ส่วนในเพศผู้ต่อมสร้างเซลล์สืบพันธุ์เมื่อมีการพัฒนาของตัวอสุจิจะมีสีเหลืองส้ม



ภาพที่ 4.1 ลักษณะสัณฐานภายนอกและภายในของหอยเจดีย์ (*Cerithidea* (*Cerithidopsilla*) *cingulata*)

A) สัณฐานวิทยาภายนอกของหอยเจดีย์เพศเมีย

B, C) สัณฐานวิทยาภายนอกหอยเจดีย์เพศผู้

D) สัณฐานวิทยาภายในหอยเจดีย์เพศเมีย

E) สัณฐานวิทยาภายในหอยเจดีย์เพศผู้

al = albumen gland, clia = ciliated groove, ovi = oviduct, ovp = ovipositor

spg = sperm gutter (scale bar = 50 µm)

ลักษณะมิญชวิทยาของเซลล์สืบพันธุ์ก่อนทดสอบได้รับสาร BPA

เซลล์ไข่

เซลล์ไข่ของหอยเจดีย์มีการเจริญเป็นกลุ่ม ๆ และมีการเจริญแบบไม่พร้อมกันพบเซลล์ไข่ในช่วง pre-vitellogenic เจริญรอบเซลล์ไข่ระยะ atretic oocytes ที่สลายตัว (atresia) เซลล์ไข่ย้อมติดสีน้ำเงินของ haematoxylin ตลอดทั่วทั้งเซลล์ ซึ่งสามารถแบ่งเซลล์ไข่ได้เป็น 3 ระยะดังนี้

1. ช่วง pre-vitellogenic เป็นระยะก่อนที่ไข่จะมีการสะสมไข่แดงในช่วงระยะนี้เซลล์จะมีการขยายขนาดใหญ่ขึ้น สามารถแบ่งออกย่อยเป็นระยะต่าง ๆ ดังนี้

- ระยะ oogonium เซลล์ไข่มีขนาดเล็ก กระจายอยู่ตามขอบของเซลล์ atretic oocytes มีลักษณะกลม นิวเคลียสใหญ่เกือบเต็มเซลล์ขนาดประมาณ 25 ไมครอน บางเซลล์มีลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมผืนผ้าเซลล์ขนาดประมาณ 28.3 x 35.6 ไมครอน เซลล์ในระยะนี้มีขนาดเล็กเมื่อเทียบกับระยะอื่นแต่มีนิวเคลียสขนาดใหญ่เซลล์ย้อมติดสีน้ำเงินตลอดทั้งเซลล์ (ภาพที่ 4.2 A)

- ระยะ meiotic ระยะนี้เซลล์ไข่เพิ่มปริมาณไซโทพลาสซึมอย่างรวดเร็ว เซลล์มีขนาดใหญ่กว่าระยะ oogonium เซลล์มีการสังเคราะห์โปรตีนขึ้นภายในนิวเคลียส จากผลการศึกษาพบว่าเซลล์ไข่มีการสร้าง nucleolus เพียงหนึ่งอันต่อเซลล์เท่านั้น เซลล์ไข่มีลักษณะกลมค่อนไปทางรูปไข่มีขนาดประมาณ 46.3 ไมครอน ย้อมติดสีน้ำเงินตลอดทั่วทั้งเซลล์ สัดส่วนพื้นที่เซลล์ระหว่างนิวเคลียสและไซโทพลาสซึมต่ำ (ภาพที่ 4.2 A และ B)

2. ช่วง post-vitellogenic เป็นระยะที่เซลล์ไข่สะสมโยล์ค เซลล์เพิ่มขนาดอย่างรวดเร็ว

2.1 ระยะ vitellogenic ระยะนี้เซลล์ไข่พัฒนาเต็มที่ มีการขยายขนาดเพิ่มมากขึ้นกว่าในระยะก่อนเกือบหนึ่งเท่าตัวเนื่องจากภายมีการสะสมโยล์ค ซึ่งสามารถแบ่งย่อยออกเป็น 3 ระยะได้แก่

- ระยะ initial active vitellogenic เริ่มพบการสะสมของโยล์ค ภายในนิวเคลียสยังพบนิวคลีโอลัสและ germinal vesicle ได้อย่างชัดเจน ไซโทพลาสซึมของเซลล์ย้อมติดสีน้ำเงินของ haematoxylin ปนกับสีแดงของ eosin เซลล์มีลักษณะกลมรีขนาดประมาณ 47 ไมครอน (ภาพที่ 4.2 C และ D)

- ระยะ early active vitellogenic ระยะนี้ไซโทพลาสซึมย้อมติดสีแดงของ eosin เพียงอย่างเดียว เซลล์ขยายขนาดใหญ่กว่าระยะ pre-vitellgenin เกือบหนึ่งเท่าตัว ระยะนี้ภายในนิวเคลียสยังพบนิวคลีโอลัส มีลักษณะค่อนข้างกลมขนาดประมาณ 76 ไมครอน (ภาพที่ 4.1 E)

- lately active vitellogenic ภายไซโทพลาสซึมมีไข่แดงสะสมอยู่มากจนเกือบบังนิวเคลียสทำให้รูปร่างของนิวเคลียสเปลี่ยนแปลง ระยะนี้ไม่พบนิวคลีโอลัสอยู่ภายในนิวเคลียส (ภาพที่ 4.2 F)

2.2. ระยะ mature เซลล์ไข่ในระยะนี้จะมีการสะสมโยล์คมาก และมาบดบังจึงทำให้มองเห็นนิวเคลียสได้ยาก เซลล์ไข่ในระยะนี้สังเกตเห็นชั้น viletelline ที่ขอบของเซลล์ germinal vesicle แยกจากเยื่อหุ้มเซลล์ได้ไม่ชัด ตอนปลายของระยะนี้เซลล์ไข่จะถูกปล่อยไปตามท่อทางเดินสืบพันธุ์ (ภาพที่ 4.2 G)

3. ระยะ atretic oocytes เป็นระยะของไข่ที่ไม่ได้ถูกผสม ในระยะแรกโยล์คจะลดลงและรวมตัวกันจนทำให้เห็นนิวเคลียสมีรูปร่างหลายเหลี่ยมขนาดใหญ่ภายในไม่มีนิวคลีโอลัสและ germinal vesicle สลาย เซลล์มีลักษณะกลมมนหรือยืดยาวออกและเชื่อมกับกลุ่มเซลล์ไข่อื่น เซลล์มีขนาดประมาณ 100 ไมครอน (ภาพที่ 4.2 H)

เซลล์อสุจิ

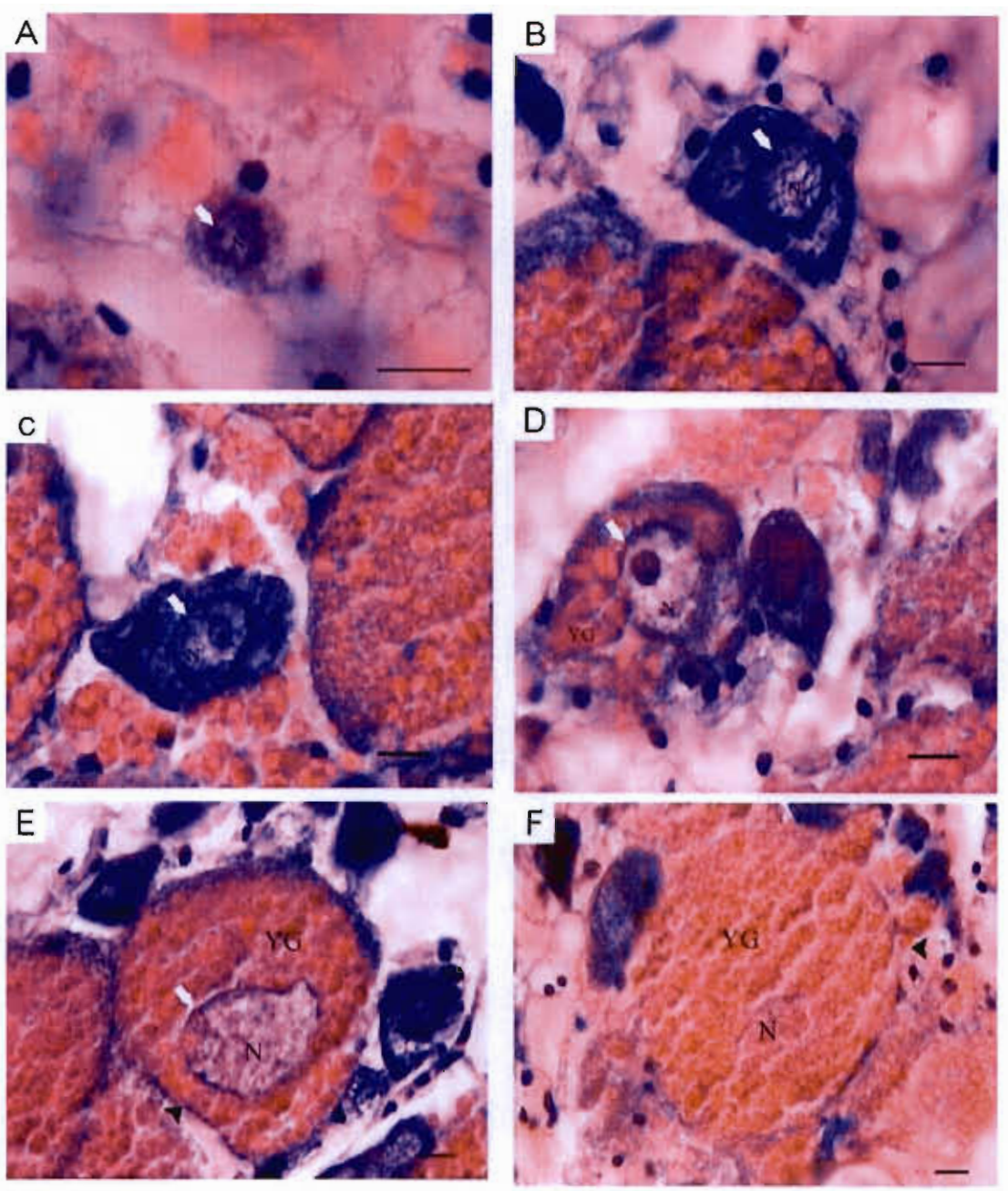
บริเวณที่มีการสร้างเซลล์อสุจิของหอยเจดีย์จะอยู่เหนือทางเดินอาหาร โดยจะเจริญอยู่ภายในอซินัส (acinus) จากขอบผนังถึงกลางช่องว่างอซินัส (acinus lumen) แบ่งเป็น 3 ระยะ

1. ระยะ spermatogonium ระยะนี้เซลล์มีขนาดเล็กมาก ย้อมติดสีน้ำเงินของ haematoxylin เรียงอยู่บน basement membrane มองเห็นชิดอยู่กับขอบผนังของช่องว่างอซินัส เซลล์จะเรียงตัวอยู่เป็นกลุ่มเพียงชั้นเดียว นิวเคลียสมีขนาดค่อนข้างใหญ่ สัดส่วนระหว่างนิวเคลียสกับไซโทพลาสซึมต่ำ เซลล์มีรูปร่างกลมขนาดประมาณ 0.34 ไมครอน

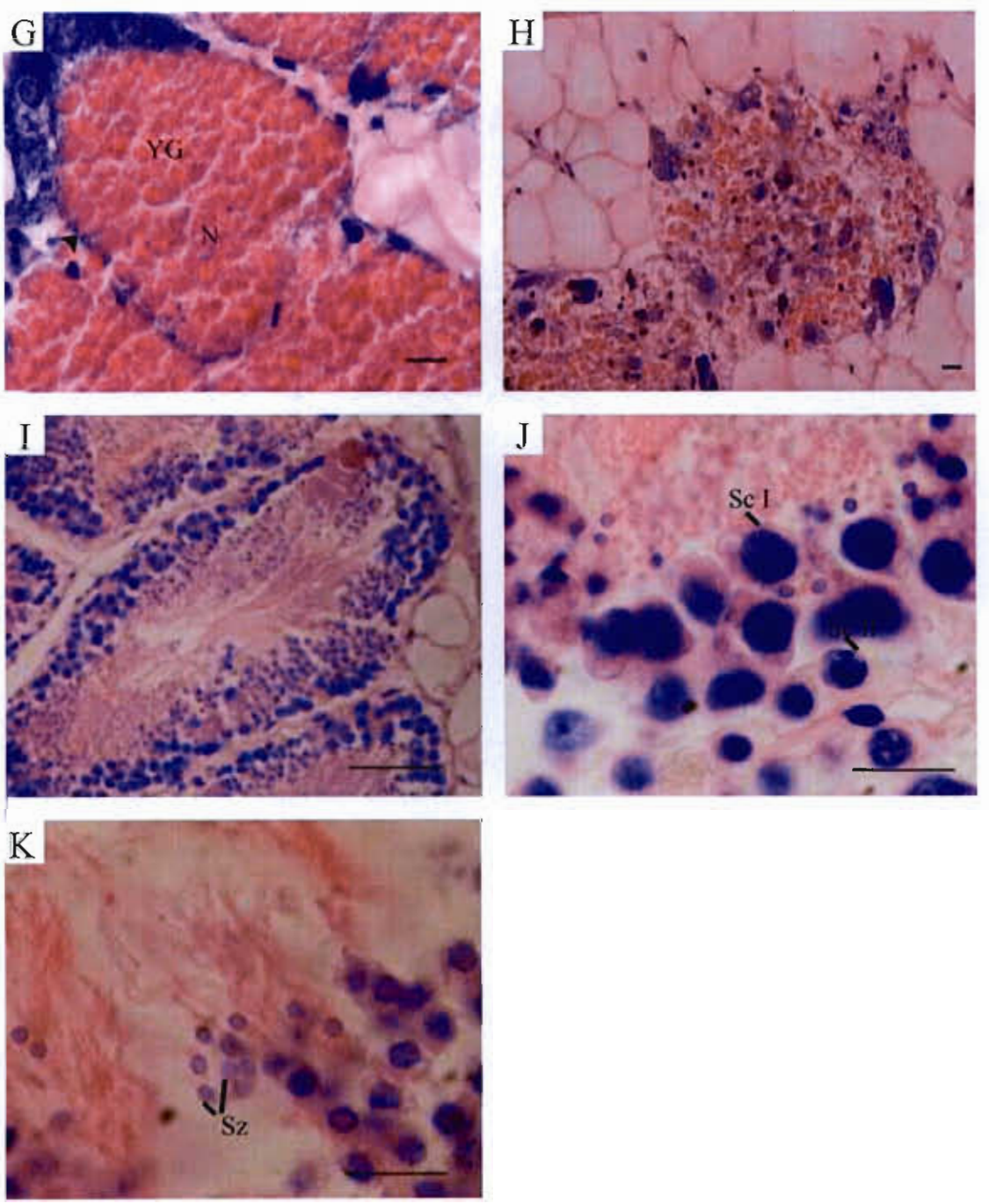
2. ระยะ spermatocyte I เซลล์อสุจิในระยะนี้จะมีปริมาณไซโทพลาสซึมเพิ่มมากขึ้น นิวเคลียสของเซลล์ระยะนี้เห็นเส้นใยโครมาติน ติดสีน้ำเงินของ haematoxylin จางลง เรียงตัวกันประมาณ 1-2 ชั้น เซลล์ระยะนี้จะอยู่ถัดจากระยะ spermatogonium ออกมาภายในช่องว่างอซินัส เซลล์มีรูปร่างกลม ขนาดประมาณ 0.45 ไมครอน (ภาพที่ 4.2 I)

3. ระยะ spermatocyte II เซลล์อสุจิในระยะนี้จะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง เริ่มพบการยืดออกทำให้บางเซลล์มีรูปร่างเป็นวงรี ภายในนิวเคลียสพบโครมาตินหดสั้นรวมตัวกันเป็นกลุ่มอยู่ทางด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ ไซโทพลาสซึมมีปริมาณลดลงเพื่อเข้าสู่กระบวนการพัฒนาของตัวอสุจิ (spermatogenesis) (ภาพที่ 4.2 J)

4. ระยะ spermatozoa เป็นระยะที่เซลล์อสุจิมีการพัฒนาของแฟลกเจลลัม ในหอยเจดีย์จะพบเซลล์อสุจิอยู่ภายในช่องว่างอซินัส (ภาพที่ 4.1 K)



ภาพที่ 4.2 เซลล์ไข่และเซลล์อสุจิระยะต่างๆ ของหอยเจดีย์ A) oogonium, B และ C) meiotic oocyte, D) initial active vitellogenic oocyte และ E) early vitellogenic oocyte F) lately H) atretic oocyte I) acinus J) spermatocyte I และ II* K) spermatozoa* vitellogenic oocyte, ⇨= เยื่อหุ้มนิวเคลียส, ➤= เยื่อหุ้มเซลล์, ✱ = นิวคลีโอลัส, N= นิวเคลียส, Sc I= spermatocyte I, Sc II= spermatocyte II, Sz= spermatozoa YG = โยล์คกรานูล (Scale bar= 50 µm)



ภาพที่ 4.2(ต่อ)

4.1.2 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์และพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์หลังได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูง

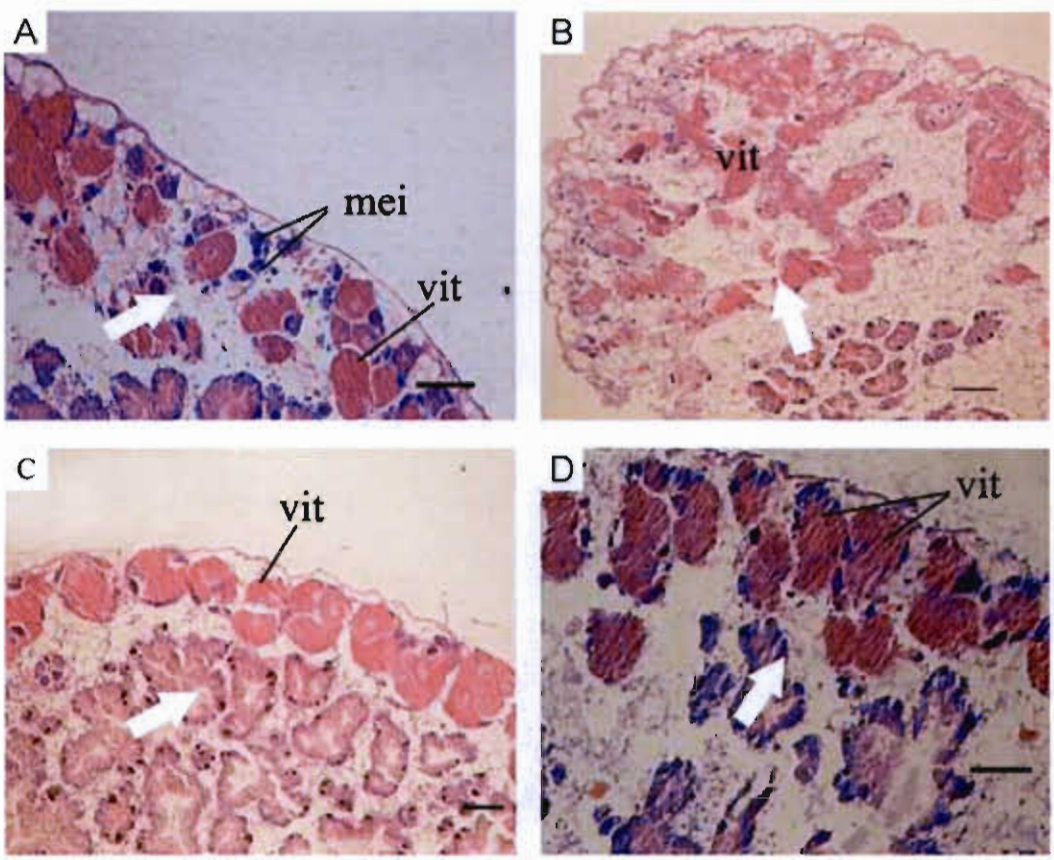
ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์หลังทดสอบได้รับสัมผัสสาร BPA

เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA โดยวิธีการแช่ที่ระดับความเข้มข้นสูง 3 ระดับ คือ 0, 30 และ 100 mg/l เป็นเวลา 4 วันตามการทดลองในตอนที่ 3.1.1 ไม่พบอัตราการตายระหว่างการทดสอบ แต่พบว่าหอยเจดีย์คืบคลานลดลงและหดตัวอยู่แต่ในเปลือก แต่ยังพบการเปิดฝาปิดเปลือกและหายใจผ่านทาง pallial siphonal eye ที่อยู่บริเวณ incurrent siphon canal

เมื่อหอยเจดีย์ในกลุ่มที่ 4 และ 5 ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 100 mg/l เป็นเวลา 4 วัน ตามลำดับ ไม่พบภาวะ superfemale คือการขยายออกของท่อนำไข่และต่อมสร้างเปลือกไข่ในเพศเมีย และไม่พบความผิดปกติในเพศผู้

พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ภายหลังทดสอบได้รับสาร BPA

ไม่พบความแตกต่างของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียระหว่างกลุ่มที่ 2 (น้ำทะเล) และกลุ่ม 3 (20 % DMSO + น้ำทะเล) ที่ไม่ได้รับ BPA โดยในเพศเมียทั้งสองกลุ่มมีเซลล์ไข่ระยะ pre-vitellogenic และระยะ post-vitellogenic ในปริมาณใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 4.3 A และ B ตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ส่วนเพศผู้พบเซลล์ที่สร้างอสุจิหลายอซินัส ภายในอซินัสพบเซลล์ได้ทั้ง 2 ระยะคือเซลล์อสุจิ (spermatocyte) และตัวอสุจิ (spermatozoa) (ภาพที่ 4.4 A และ B ตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ในหอยเจดีย์เพศเมียที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 30 mg/l จะพบเซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic เพิ่มขึ้นมากกว่าระยะ pre-vitellogenic (ภาพที่ 4.3 C ตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ส่วนเพศผู้พบจำนวนอซินัสลดลงอย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.4 ตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ส่วนเพศเมียที่ได้รับ BPA ที่มีความเข้มข้น 100 mg/l จะมีจำนวนเซลล์ไข่ลดลงและเซลล์ไข่ที่พบส่วนใหญ่เป็น atretic oocytes (ภาพที่ 4.3 D อักษร a ในภาพ) และในเพศผู้ภายในช่องว่างอซินัส (acinus lumen) พบเซลล์อสุจิเพียงเล็กน้อยอยู่ชิดกับขอบผนังของอซินัสและพบแต่ส่วนหางเท่านั้น (ภาพที่ 4.4 D*) กระจายไม่หนาแน่นอยู่ภายในช่องว่างอซินัส (ภาพที่ 4.4 D ตำแหน่งปลายลูกศรชี้)



ภาพที่ 4.3 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียในการศึกษาเบื้องต้น

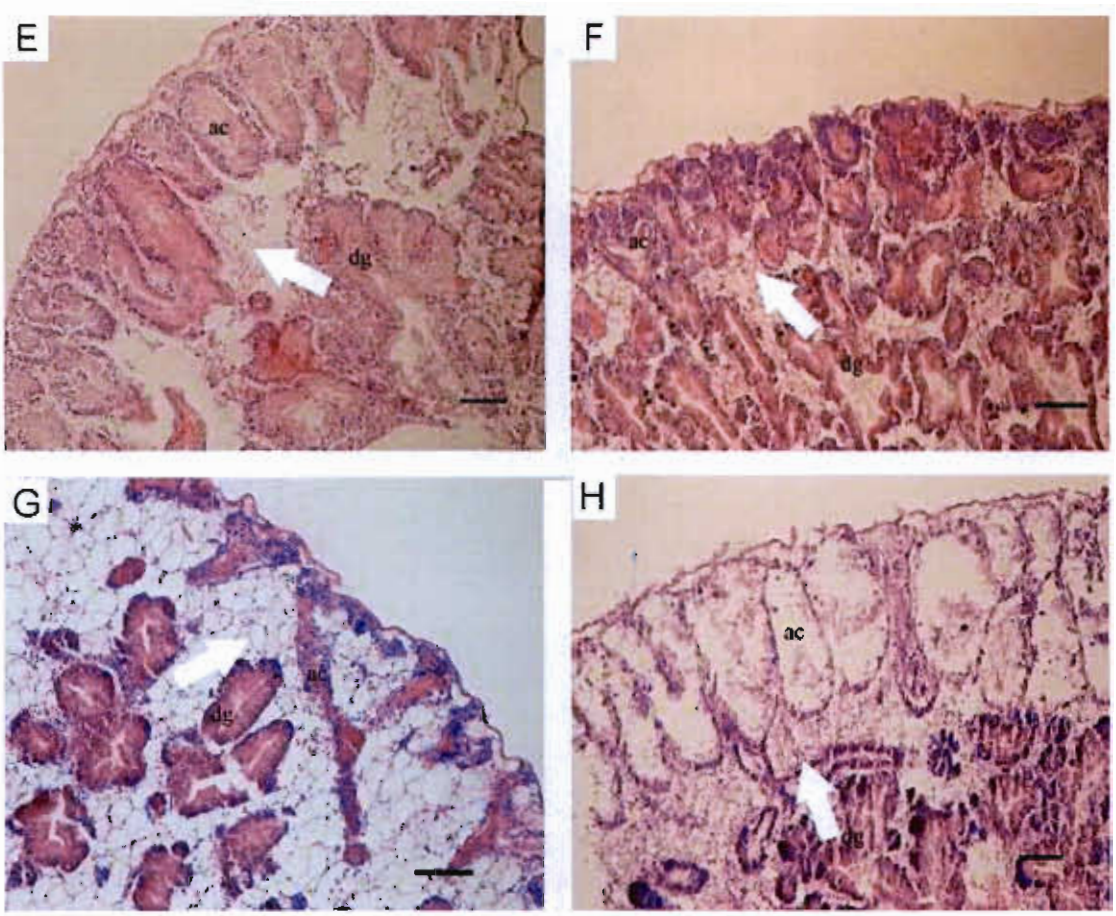
A) กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) ไม่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 4 วัน

B) กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล + 20%DMSO) ไม่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 4 วัน

C) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l เป็นเวลา 4 วัน

D) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l เป็นเวลา 4 วัน

mei = meiotic oocyte, vit = vitellogenic oocyte (scale bar = 10 µm)



ภาพที่ 4.4 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้ในการศึกษาเบื้องต้น

E) กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) ไม่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 4 วัน

F) กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล + 20%DMSO) ที่ไม่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 4 วัน

G) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l เป็นเวลา 4 วัน

H) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l เป็นเวลา 4 วัน

dc = digestive cell, dg =digestive gland, mei = meiotic oocyte

(scale bar = 10 µm)

4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์

4.2.1 ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

จากการศึกษาในข้อ 3.2.2 พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 5 และ 10 วัน ไม่พบการขยายตัวหรือความผิดปกติที่เกิดกับต่อมสร้างเปลือกไข่และท่อนำไข่ภายในทางเดินสืบพันธุ์ของเพศเมียหรือภาวะ superfemale จากการสังเกตด้วยตาเปล่า

4.2.2 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

4.2.2.1 ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์และจำนวนเซลล์ไข่

หอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับ BPA (กลุ่มควบคุม)

ผลการศึกษาพยาธิสภาพของหอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับ BPA พบว่ากลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) และกลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล + 20% DMSO) เมื่อทำการทดลองเป็นเวลา 5 และ 10 วัน พบเซลล์ไข่ทั้ง 3 ช่วง แบ่งออกเป็น 5 ระยะ คือ 1) ช่วง pre-vitellogenic ได้แก่ระยะ oogonium และระยะ meiotic 2) ช่วง post-vitellogenic ได้แก่ระยะ vitellogenic และระยะ mature 3) ระยะ atretic oocytes (จำนวนของเซลล์ไข่แสดงดังภาคผนวกที่ 1 และภาพ ผ1-1) เซลล์ไข่ในระยะ meiotic พบเจริญตามอยู่ขอบของเซลล์ไข่ระยะ atetic oocytes มีรูปร่างค่อนข้างกลมไม่ยืดออก เหมือนกลุ่มควบคุมที่ 2 และกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ภายในเซลล์ไข่ระยะ atretic oocytes มีโยล์คกรานูล (yolk glanule) ที่ย้อมติดสีอีโอซินกระจายอย่างเบาบาง (ภาพที่ 4.7 และ 4.8 A และ B แสดงอักษร a ในภาพ) จำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ (total) เซลล์ไข่ช่วง pre-vitellogenic และช่วง post-vitellogenic ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ 1 (ตารางที่ 4.1) แต่ในกลุ่มควบคุมมีจำนวนเซลล์ไข่ในช่วง pre-vitellogenic มากกว่าระยะ post-vitellogenic (ภาพที่ 4.5 และ 4.6 ตำแหน่งปลายลูกศรชี้)

หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ

หอยเจดีย์ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (0.001, 0.01 mg/l) เป็นเวลานาน 5 และ 10 วัน พบเซลล์ไข่ทั้ง 3 ช่วงแบ่งออกเป็น 5 ระยะเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม (จำนวนเซลล์ไข่แสดงดังภาคผนวกที่ 1 และภาพ ผ1-1) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 วัน เซลล์ไข่ในระยะ atretic oocytes ยืดยาวและพบโยล์คกลานูลกระจายอย่างหนาแน่นแต่น้อยกว่า

กลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.7 C และ D ดังแสดงอักษร a ในภาพและตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 10 วัน พบโยล์คกลานูลกระจายน้อยกว่ากลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 วัน นอกจากนี้ยังพบจำนวนเซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cells) เพิ่มขึ้นกระจายแทรกภายในกลุ่มเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนา (ภาพที่ 4.8 C และ D ในพื้นที่วงกลม)

หอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 mg/l ติดต่อกันเป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ (total) จำนวนเซลล์ไข่ช่วง pre-vitellogenic และจำนวนเซลล์ไข่ช่วง post-vitellogenic ระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับ BPA ไม่มีความแตกต่างกัน (ภาพที่ 4.5) แต่กลุ่มที่ได้รับ BPA เป็นเวลานาน 10 วัน พบว่าเซลล์ไข่ทุกระยะ และเซลล์ไข่ช่วง pre-vitellogenic มีจำนวนลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่ไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (ภาพที่ 4.6)

หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับกลาง

หอยเจดีย์ที่ได้รับสัมผัส BPA ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (0.1 และ 1 mg/l) เป็นระยะเวลานาน 5 วัน พบกลุ่มเซลล์ไข่และโยล์คกรานูลกระจายหนาแน่นกว่ากลุ่มควบคุมทั้งสองกลุ่ม (ภาพที่ 4.7 E และ F อักษร a) ในขณะที่หอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA เป็นเวลานาน 10 วัน พบกลุ่มเซลล์ที่มีการพัฒนาของโยล์คกรานูลกระจายเบาบางกว่ากลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลานาน 5 วัน (ภาพที่ 4.8 E และ F แสดงอักษร a ในภาพและตำแหน่งปลายลูกศรชี้)

หอยกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/l เป็นระยะเวลานาน 10 วัน พบว่าเซลล์ไข่ทุกระยะและช่วง pre-vitellogenic มีจำนวนลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 4.5 และ 4.6) (จำนวนเซลล์ไข่แสดงในตารางที่ 4.1)

หอยเจดีย์กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับสูง

หอยเจดีย์ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูง (10 และ 100 mg/l) พบเซลล์ไข่ทั้ง 3 ช่วงเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม (จำนวนเซลล์ไข่แสดงดังภาคผนวกที่ 1 และภาพ ผ1-1) ในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l เป็นเวลานาน 5 วัน พบโยล์คกรานูลกระจายหนาแน่นมาก (ภาพที่ 4.7 G และ H อักษร a ในภาพและตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 10 วัน พบเซลล์ไข่ที่กำลังพัฒนามีการเสื่อมสลาย (ภาพที่ 4.8 G และ H อักษร a ในภาพและตำแหน่งปลายลูกศรชี้) และพบเซลล์ฟอลลิเคิลเป็นจำนวนมากเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4.8 G และ H ภายในพื้นที่วงกลม) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 mg/l เป็นระยะเวลานาน 10 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญ

ทางสถิติ (P<0.05) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l เป็นระยะเวลานาน 5 และ 10 วัน มีจำนวนเซลล์ไข่ช่วง pre-vitellogenic ลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ระดับต่ำและระดับกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 mg/l เป็นระยะเวลานาน 5 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ช่วง post- vitellogenic เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05 และ P<0.01 ตามลำดับ) (ภาพที่ 4.5 และ 4.6)

ตารางที่ 4.1 จำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ (total) เซลล์ไข่ช่วง pre-vitellogenic และ เซลล์ไข่ช่วง post-vitellogenic ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสัมผัส BPA เป็นเวลา 5 และ 10 วัน

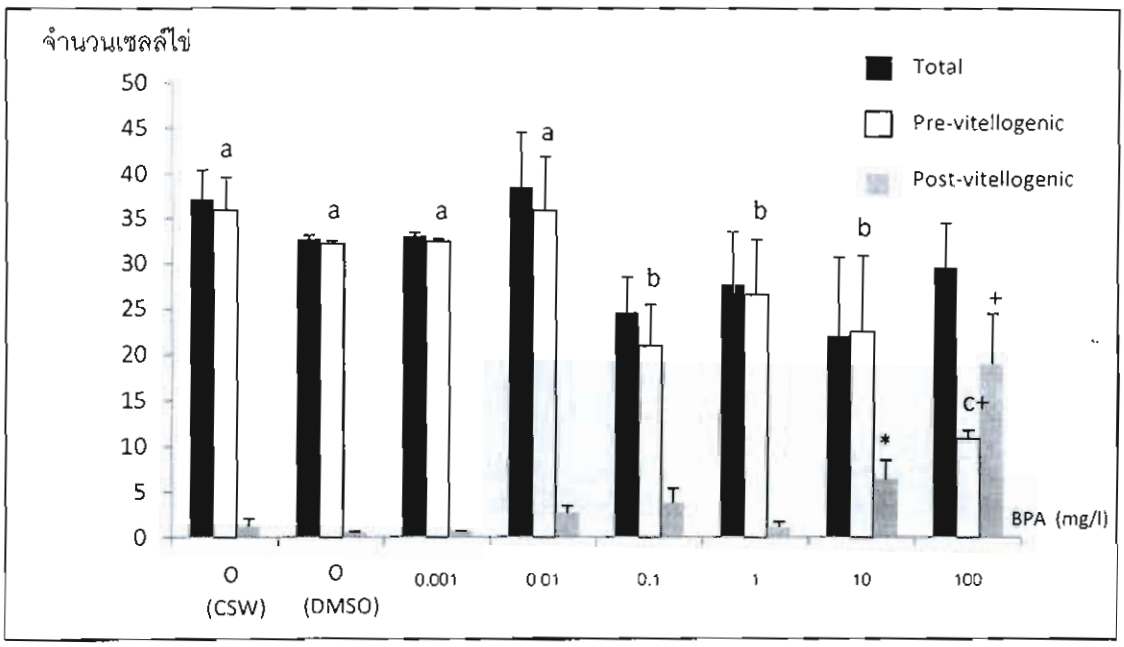
BPA (mg/l)	จำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ (total) (เฉลี่ย)		จำนวนเซลล์ไข่ระยะ Pre-vitellogenic(เฉลี่ย)		จำนวนเซลล์ไข่ระยะ Post-vitellogenic(เฉลี่ย)	
	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน
0 (CSW)	37.18±3.27	35.53±7.59^{a}	35.93±3.7^{a}	33.93±7.97^{a}	1 24±0 82	1.60±2.24
0 (DMSO)	32.75±0.41	40.07±11.18^{a}	32.18±0.35^{a}	39.07±11.14^{a}	0.57±0.66	1.00±0.24
0.001	33.06±0.36	29.35±1.34^{ab}	32.43±0.3^{a}	29.15±1.29^{ab}	0.61±0.05	0.30±0.30
0.01	38.53±5.98	16.47±1.64^{b}+	35.86±6.0^{a}	15.73±1.60^{b}	2.67±0.76	0.73±0.49
0.1	24.6±3.87	15.87±3.37^{b}	20.86±4.55^{b}	15.20±3.42^{b}+	3 73±1.6	0.67±0.71
1	27.67±5.82	17.20±2.05^{b}	26.53±6.12^{b}	16.67±2.18^{b}	1 13±0.56	0.80±1.02
10	22.85±8.75	14.92±2.94^{b}	22.5±8.83^{b}	14.17±3.01^{b}	6.33±2.08*	0.75±1.11 +
100	29.6±4.86	8.46±2.21^{c}+	10.73±0.92^{c}	6.15±0.54^{c}	18 86±5.58**	0.44±0.27 +

+ = เปรียบเทียบความแปรปรวนระหว่างวันที่ 5 และ 10 ของการทดลอง, * = p<0.05,

** = p<0.01

CSW = กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล)

DMSO = กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20%DMSO)



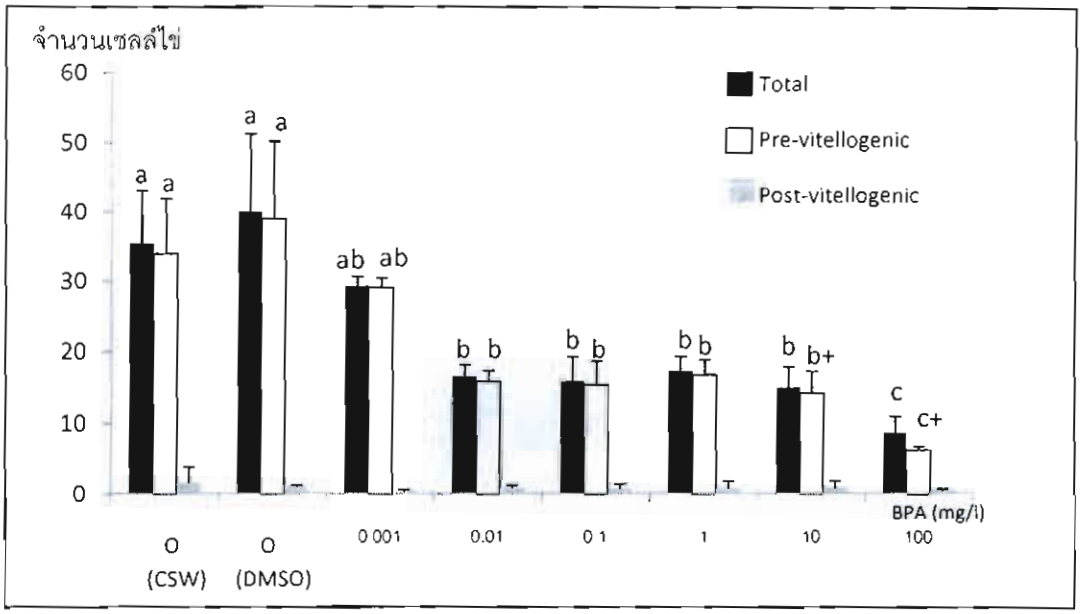
ภาพที่ 4.5 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไข่กับระดับความเข้มข้นของ BPA เมื่อหอยเจดีย์ได้รับเป็นเวลา 5 วัน

a, b, c,* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

\+ = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)

CSW = กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล)

DMSO = กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล + 20%DMSO)



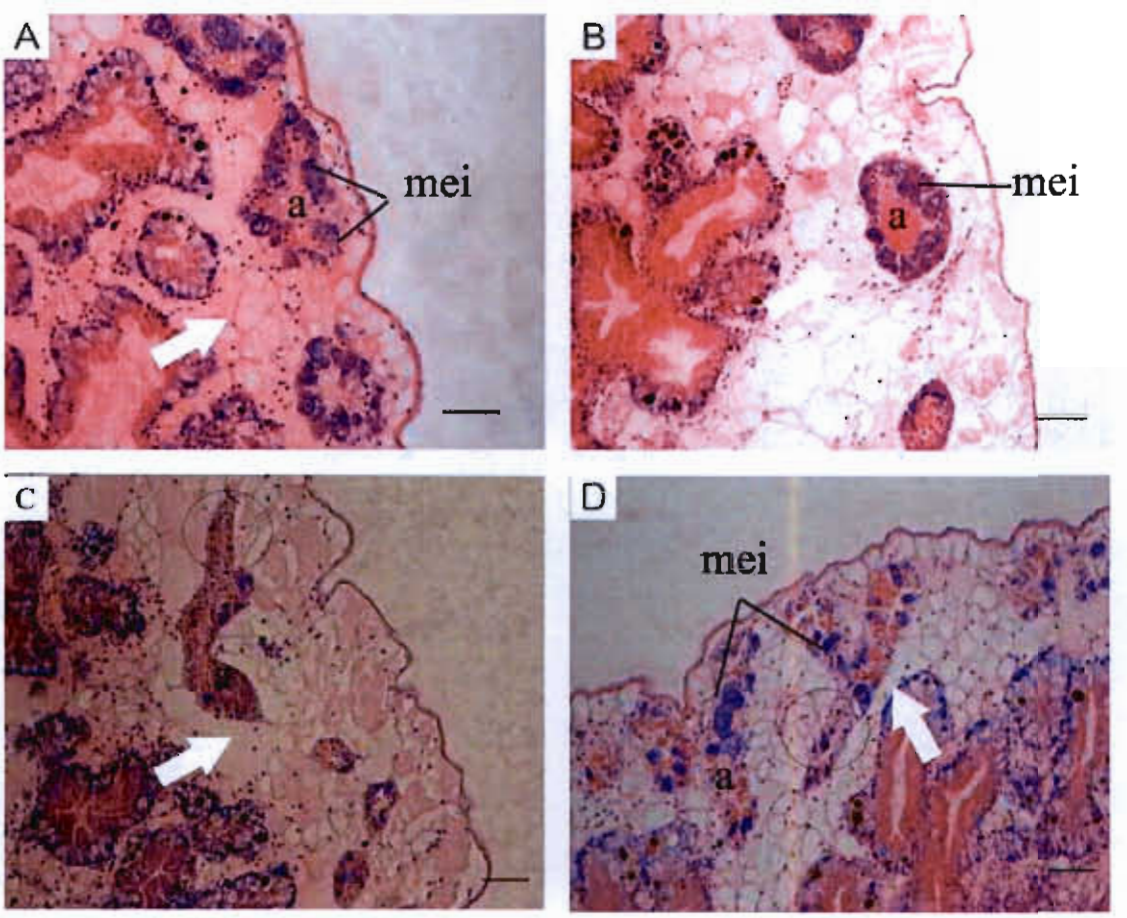
ภาพที่ 4.6 ความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไข่กับระดับความเข้มข้นของ BPA เมื่อหอยเจดีย์ได้รับเป็นเวลา 10 วัน

a, b, c,* = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$)

\+ = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.01$)

CSW = กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล)

DMSO = กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20%DMSO)



ภาพที่ 4.7 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียเมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 5 วัน

A) กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) ไม่ได้รับสาร BPA

B) กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล + 20% DMSO) ไม่ได้รับสาร BPA

C) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 mg/l

D) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/l

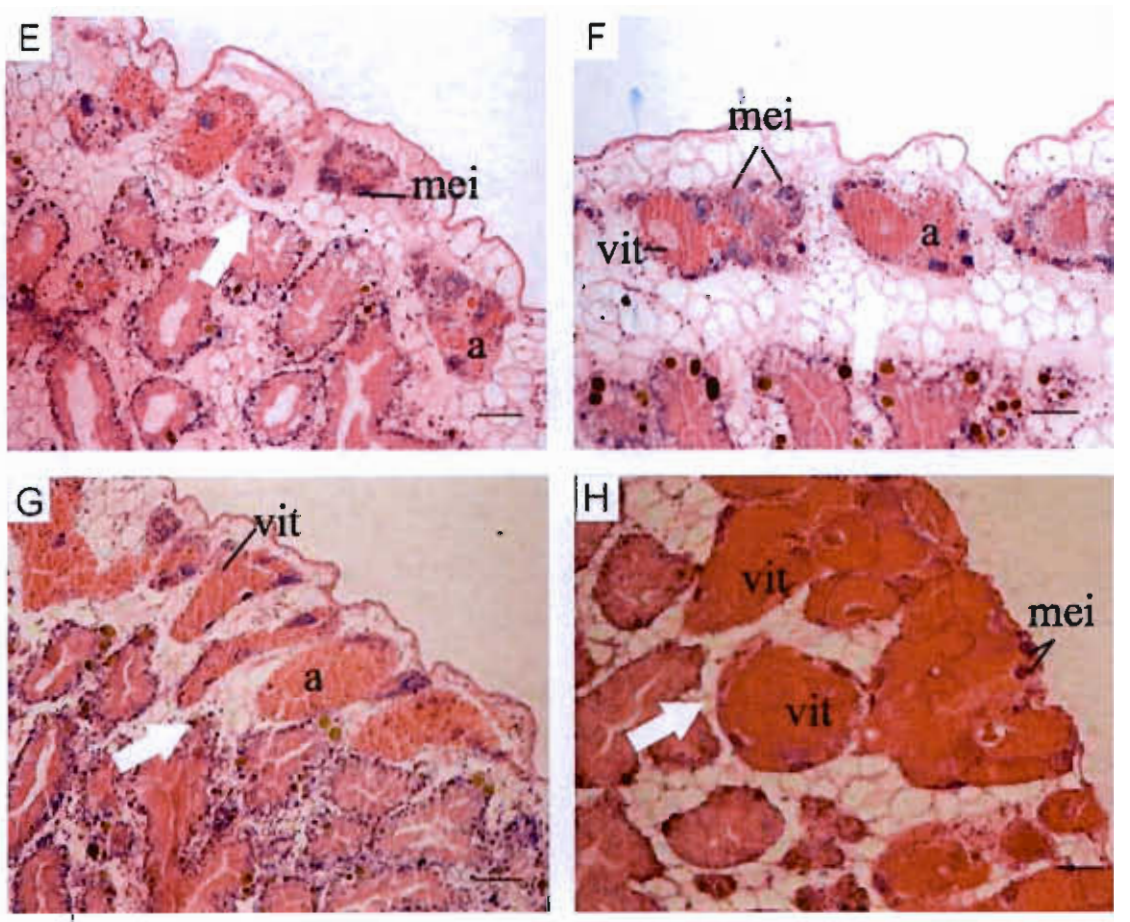
E) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l

F) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l|

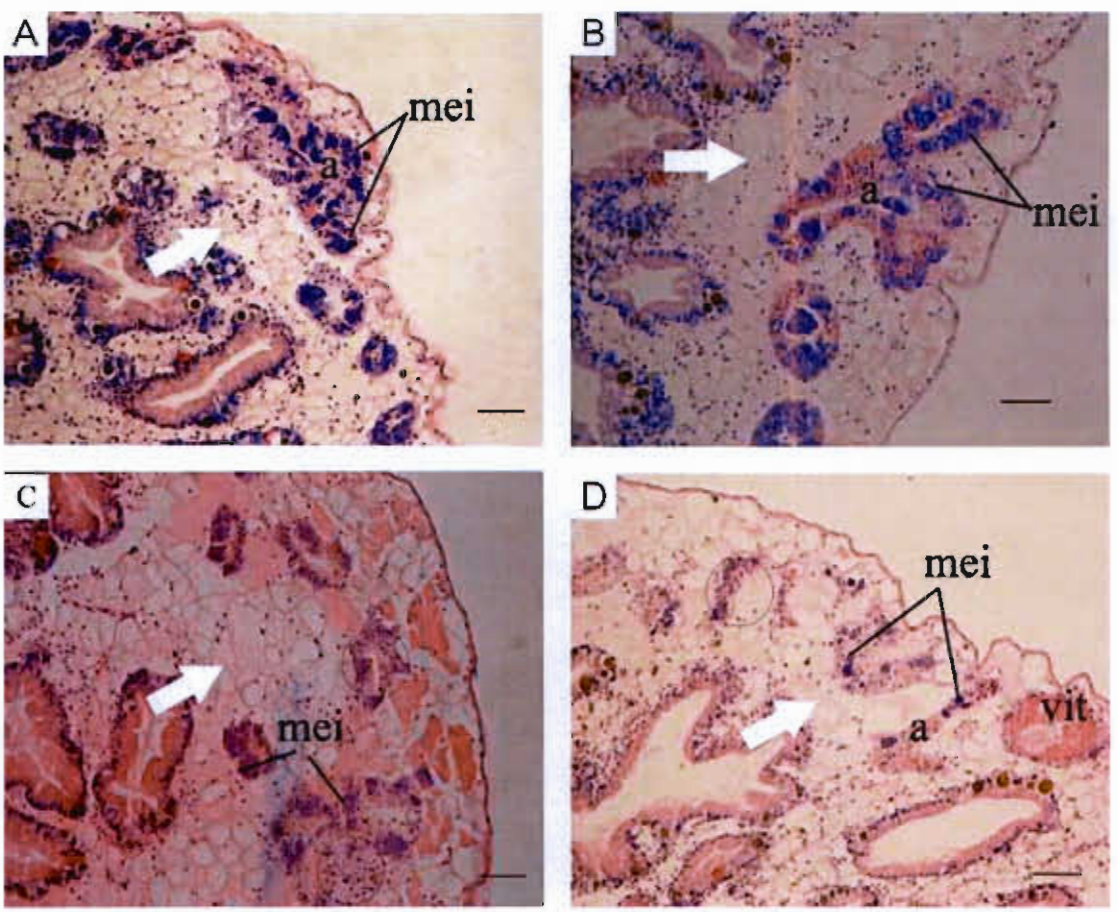
G) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l

H) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

a = atretic area, mei = meiotic oocyte (scale bar = 50 µm)



ภาพที่ 4.7(ต่อ)



ภาพที่ 4.8 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียเมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 10 วัน

A) กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) ไม่ได้รับสาร BPA

B) กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20% DMSO) ไม่ได้รับสาร BPA

C) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 mg/l

D) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/l

E) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l

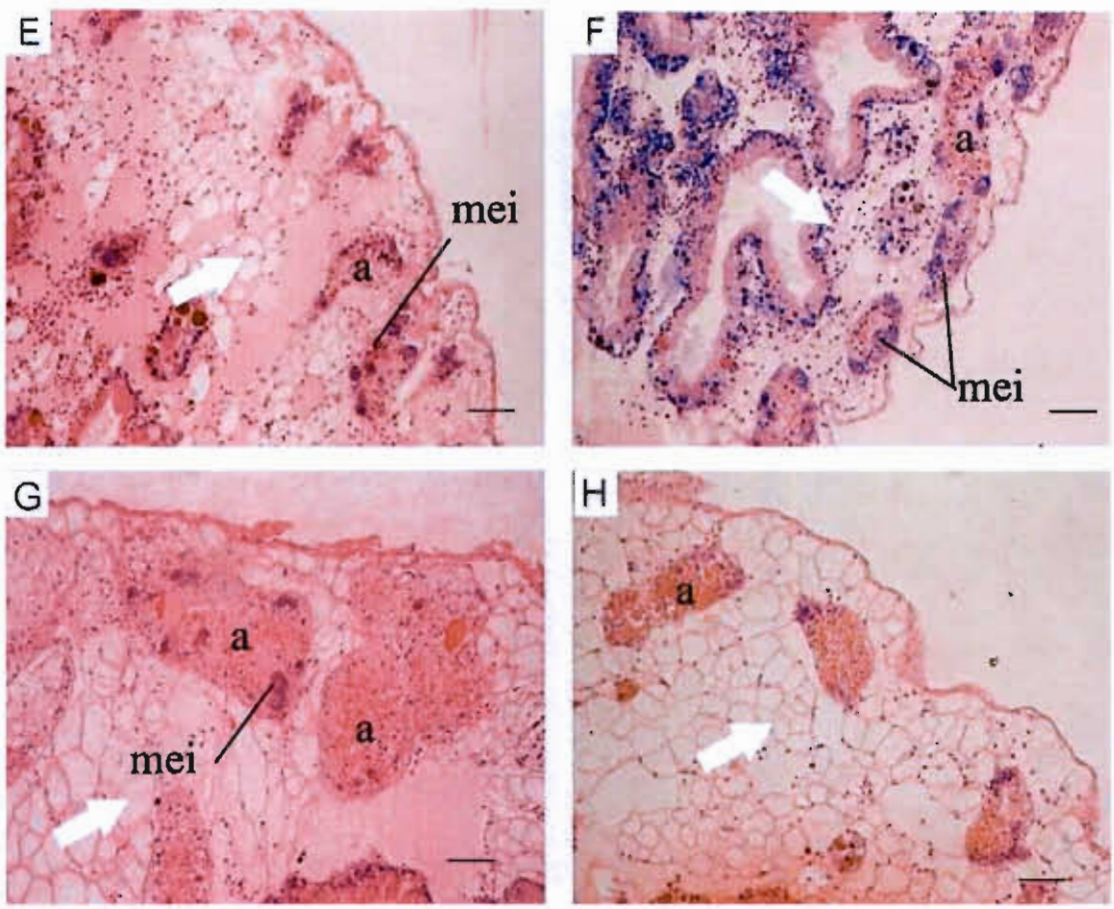
F) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l

G) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l

H) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

a = atretic area, mei = meiotic oocyte, vit = vitellogenic oocyte

(scale bar = 50 μm)



ภาพที่ 4.8(ต่อ)

ผลการวิเคราะห์ความเป็นพิษของสาร BPA ต่อจำนวนเซลล์ไข่

อัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่

จากการวิเคราะห์อัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ที่คำนวณจากจำนวนเซลล์ไข่ในระยะ vitellogenic ต่อจำนวนเซลล์ไข่ในช่วง pre-vitellogenic พบว่ากลุ่มที่ได้รับ BPA เป็นระยะเวลานาน 5 วัน มีค่าอัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) และเพิ่มสูงสุดที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l การที่ค่าอัตราส่วนของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นเนื่องจากจำนวนเซลล์ไข่ในระยะ pre-vitellogenic ลดลงแต่เซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic เพิ่มขึ้น ส่วนในกลุ่มที่ได้รับ BPA ติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน พบว่าอัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ลดลงไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม เนื่องจากในวันที่ 10 เซลล์ไข่ทั้งสองระยะมีจำนวนลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลาติดต่อกันนาน 5 วัน และที่ระดับ 100 mg/l มีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) (ตารางที่ 4.2 และภาพที่ 4.9)

ดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่

จากการวิเคราะห์ดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ พบว่าดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ในกลุ่มที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูง (10 และ 100 mg/l) ติดต่อกันเป็นเวลา 5 วัน มีค่าเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุมและแตกต่างจากกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้นต่ำและกลางอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.01$)

หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 mg/l ติดต่อกันเป็นเวลานาน 10 วัน ดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ต่ำแต่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม และหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 mg/l ติดต่อกันเป็น 10 วัน ต่ำกว่ากลุ่มที่ได้รับสารติดต่อกันเป็นเวลา 5 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$ และ $P<0.01$ ตามลำดับ) (ตารางที่ 4.2 และ ภาพที่ 4.10)

ตารางที่ 4.2 อัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ และดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ของหอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน

BPA (mg/l)	อัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ (ER)		ดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ (%MI)	
	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน
0 (CSW)	0.04±0.067	0.07±0.05	2.37±1.06[a]	2.37±1.06
0 (DMSO)	0.02±0.003	0.03±0.01	1.63±0.41[a]	1.63±0.41
0.001	0.01±0.003	0.01±0	0.43±0.26[a]	0.43±0.26
0.01	0.077±0.054	0.05±0.02	2.25±1.38[a]	2.25±1.38
0.1	0.18±0.173	0.06±0.04	1.10±0.74[a]	1.10±0.74
1	0.056±0.063	0.04±0.04	1.33±1.33[a]	1.33±1.33
10	0.226±0.020	0.07±0.04	2.15±1.65[b]**	2.15±1.65 +
100	1.075±0.849**	0.08±0.03 +	1.85±1.15[b]**	1.85±1.15 ++

a, b, c, * = เปรียบเทียบความแปรปรวนภายในวันทดลองเดียวกัน, * = $p<0.05$,

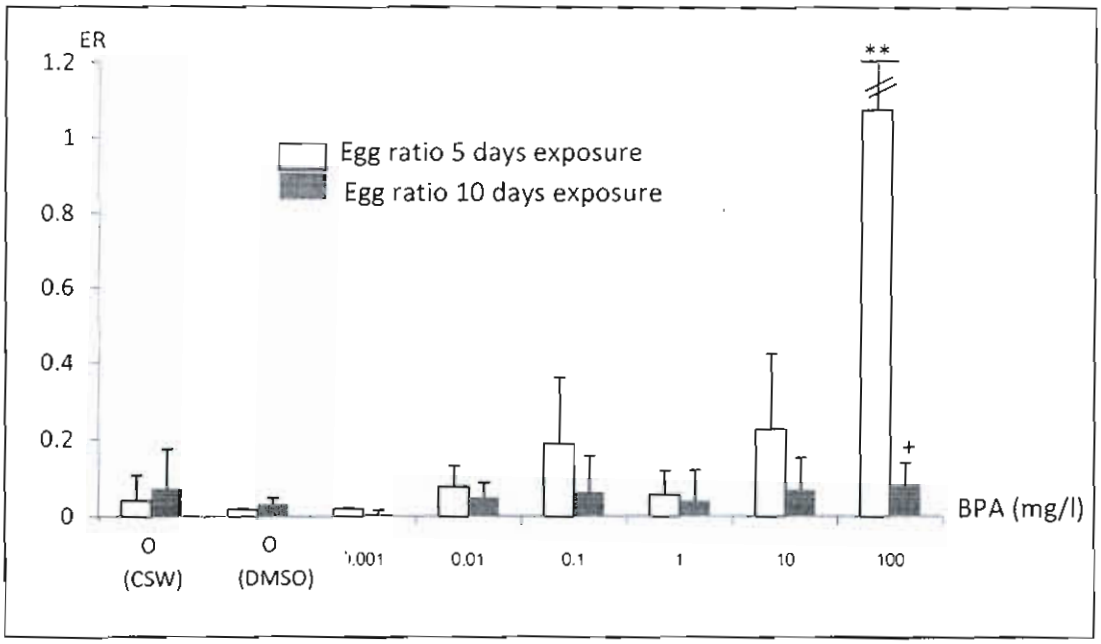
** = $p<0.01$

+ = เปรียบเทียบความแปรปรวนระหว่างวันที่ 5 และ 10 ของการทดลอง, + = $p<0.05$,

++ = $p<0.01$

CSW = กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล)

DMSO = กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20%DMSO)



ภาพที่ 4.9 อัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ (ER) ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน

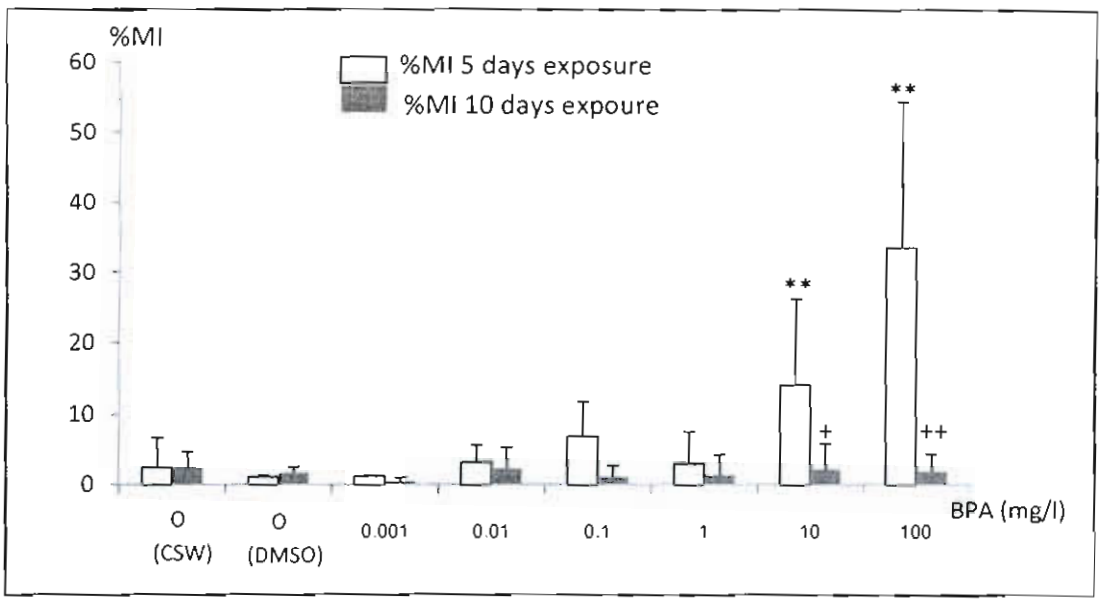
* = เปรียบเทียบความแปรปรวนภายในวันทดลองเดียวกัน, ** = $p<0.01$

\+ = เปรียบเทียบความแปรปรวนระหว่างวันที่ 5 และ 10 ของการทดลอง

\+ =$p<0.05$

CSW = กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล)

DMSO = กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20%DMSO)



ภาพที่ 4.10 ดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ (%MI) ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน

* = เปรียบเทียบความแปรปรวนภายในวันทดลองเดียวกัน, ** = $p<0.01$

+ = เปรียบเทียบความแปรปรวนระหว่างวันที่ 5 และ 10 ของการทดลอง

+ = $p<0.05$,

CSW = กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล)

DMSO = กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20%DMSO)

4.2.2.2 พยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

หอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับสาร BPA (กลุ่มควบคุม)

ในหอยเจดีย์เพศผู้กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) และกลุ่มที่ 2 (น้ำทะเล+20%DMSO) เมื่อทำการทดสอบเป็นเวลา 5 และ 10 วัน พบว่าภายในอซินัส ไม่มีการเปลี่ยนแปลงโดยพบเซลล์อสุจิทั้ง 3 ระยะคือ spermatogonia ตามขอบผนังของอซินัส เป็นเซลล์ขนาดเล็ก เซลล์อสุจิ (spermatocyte) ระยะ I และระยะ II อยู่ถัดออกมาจากเซลล์ในระยะแรก และตัวอสุจิ (spermatozoa) อยู่กลางช่องว่างอซินัส (ภาพที่ 4.15 ตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ในกลุ่มควบคุมที่ 2 อซินัสมีลักษณะยืดยาวออกแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ 1 ที่อซินัสมีลักษณะกลมรี แต่ทั้งสองกลุ่มเซลล์มีการพัฒนาตามปกติ (ตารางที่ 4.3)

หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำ

หอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้นระดับต่ำ (0.001 และ 0.01 mg/l) เป็นระยะเวลานาน 5 วัน ไม่พบตัวอสุจิอยู่ภายในช่องว่างอซินัส แต่พบจำนวนเซลล์อสุจิประมาณ 1-2 เซลล์ กระจายชิดขอบของอซินัส ภายในอซินัสเห็นเป็นช่องว่างได้อย่างชัดเจน (ภาพที่ 4.11 C และ D ตำแหน่งปลายลูกศรชี้) ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลา 10 วันพบเซลล์อสุจิกระจายเบาบางกว่ากลุ่มที่ได้รับ BPA เป็นเวลา 5 วัน และไม่พบตัวอสุจิ และเซลล์เกิดภาวะ necrosis ตามขอบช่องว่างอซินัส (ภาพที่ 4.12 C และ D, ✱) (ตารางที่ 4.3)

หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับกลาง

หอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้นระดับกลาง (0.1 และ 1 mg/l) พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l เมื่อได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าอซินัสเริ่มสลายตัว เซอโทไลเซลล์รวมตัวในบริเวณที่มีการพัฒนาของเซลล์อสุจิ (ภาพที่ 4.11 E และ F พื้นที่ภายในวงกลมและตำแหน่งปลายเข็มชี้) ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลา 10 วัน พบอซินัสน้อยกว่ากลุ่มที่ได้รับ BPA ติดต่อกันเป็นเวลานาน 5 วัน โดยที่ภายในอซินัสพบเซลล์อสุจิรวมตัวอยู่บริเวณขอบของอซินัสและพบเซลล์เกิดภาวะ necrosis (ภาพที่ 4.11 E ✱)

กลุ่มที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l พบอซินัสกระจายเบาบางกว่ากลุ่มที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l ส่วนกลุ่มที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l เป็นเวลา 10 วัน พบว่าช่องว่างอซินัสตีบตัน และอซินัสมีขนาดเล็กลงกว่ากลุ่มที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า และกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ในความเข้มข้นเดียวกันเป็นเวลา 5 วัน (ภาพที่ 4.12 E และ F ตำแหน่งปลายลูกศรชี้)

หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้นระดับสูง

หอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้นระดับสูง (10 และ 100 mg/l) ติดต่อกันเป็นเวลา 5 และ 10 วัน พบอซินัสเสื่อมและสลายตัว บริเวณที่เคยเป็นช่องว่างอซินัสพบเซลล์เซโทไลเป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 4.11 และ 4.12 G และ H ภายในพื้นที่วงกลม) ไม่พบเซลล์อสุจิ และภายในช่องว่างอซินัสพบเซลล์เกิดภาวะ necrosis และเซลล์สลายตัว (cell lysis) (ภาพที่ 4.11 และ 4.12 G และ H✱ และแสดงอักษร L ในภาพ) (ตารางที่ 4.3 และภาพที่ 4.19) (ภาพที่ 4.11 และ 4.12 G และ H ตำแหน่งปลายลูกศรชี้)

ตารางที่ 4.3 ลักษณะพยาธิสภาพของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้เมื่อได้รับ BPA

ระดับความเข้มข้น (mg/l)	เซลล์อสุจิ				ลักษณะการเกิดพิษของอซินัส	
	เซลล์อสุจิ		ตัวอสุจิ			
	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน
0 (CSW)	+++	+++	+++	+++	I	I
0 (DMSO)	+++	+++	+++	+++	I	I
0.001	+	+, *	-	-	II	III
0.01	-	+, *	-	-	II	III
0.1	-, 0	+, *, 0	-	-	III	III
1	-,0	+, *,0	-	-	II	III
10	+,L,*	+, *,0	-	-	IV	IV
100	+, *, L	-, 0	-	-	IV	IV

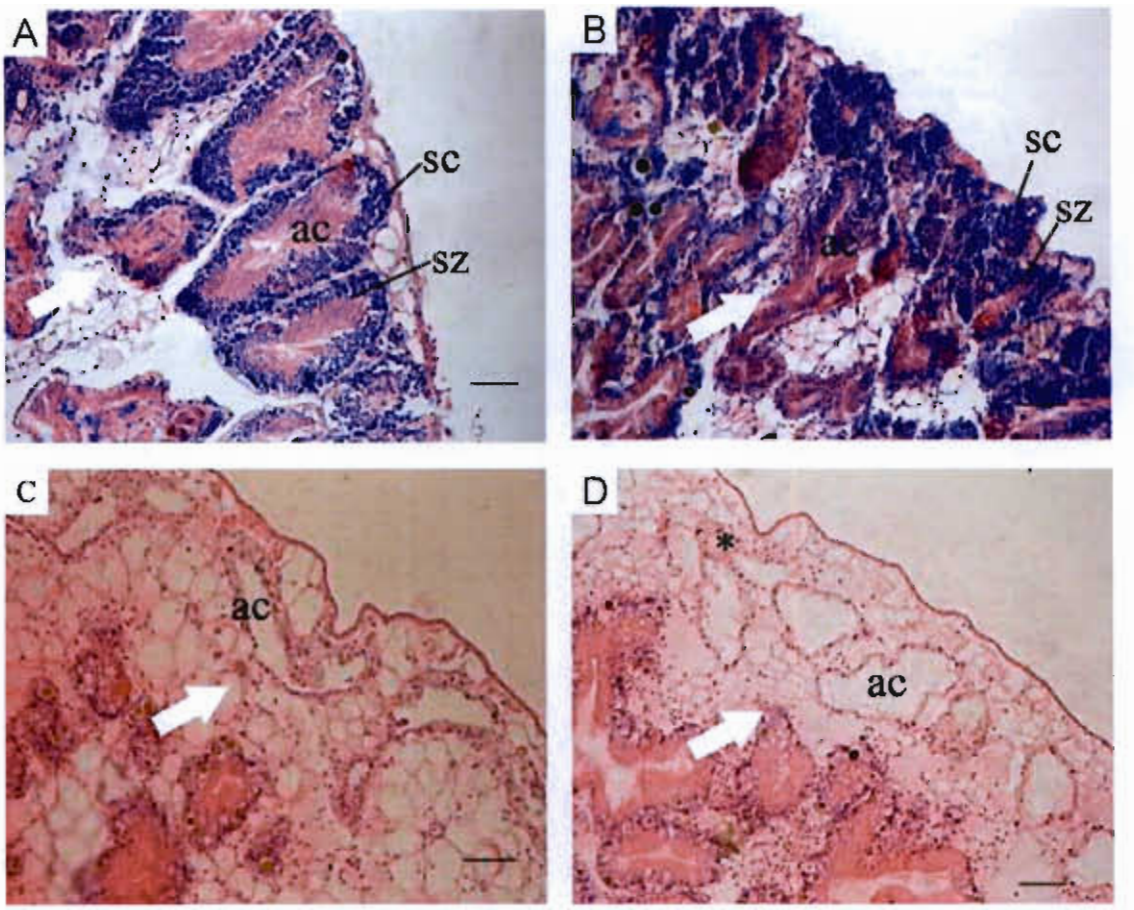
+++ = จำนวนเซลล์มาก, ++ = จำนวนเซลล์ปานกลาง, + = จำนวนเซลล์น้อย, - = ไม่พบเซลล์ ✱ = พบเซลล์เกิดภาวะ necrosis, 0 = พบอซินัสเสื่อมและสลายตัว, L = เซลล์ภายในอซินัสสลายตัว (cell lysis)

I = เซลล์เจริญปกติ พบเซลล์อสุจิได้ทั้ง 4 ระยะ ได้แก่ spermatogonium, spermatocyte I, spermatocyte II และ spermatozoa

II = พบ spermatocyte เพียงเล็กน้อยภายในช่องว่างอซินัส (acini lumen) และพบเซลล์เกิดภาวะ necrosis

III = เกิดการสลายของเซลล์ตามช่องว่างอซินัส แต่พบ spermatocyte

IV = เกิดการภาวะ necrosis ของเซลล์ไม่พบช่องว่างอซินัส และเกิดภาวะสลายตัวของเซลล์ (cell lysis)



ภาพที่ 4.11 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้เมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 5 วัน

A) กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) ไม่ได้รับสาร BPA

B) กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20% DMSO) ไม่ได้รับสาร BPA

C) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 mg/l

D) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/l

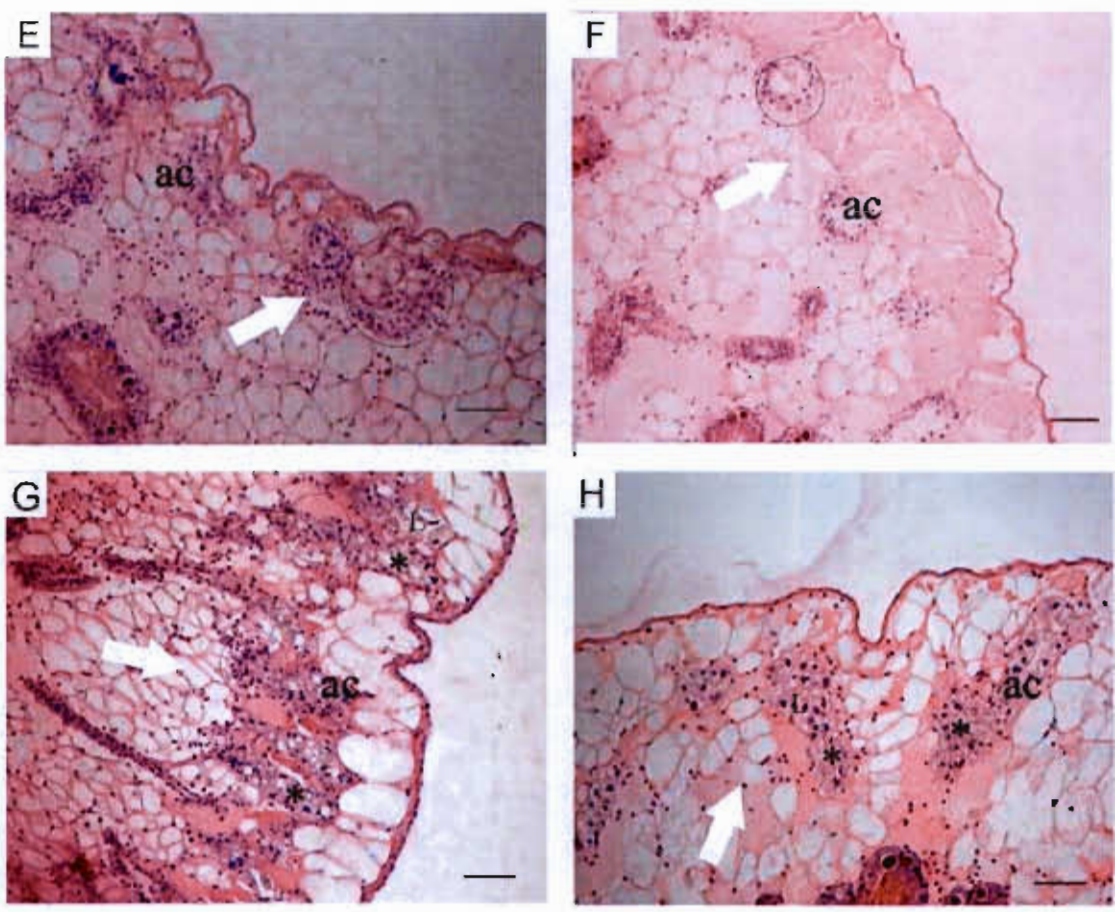
E) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l

F) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l

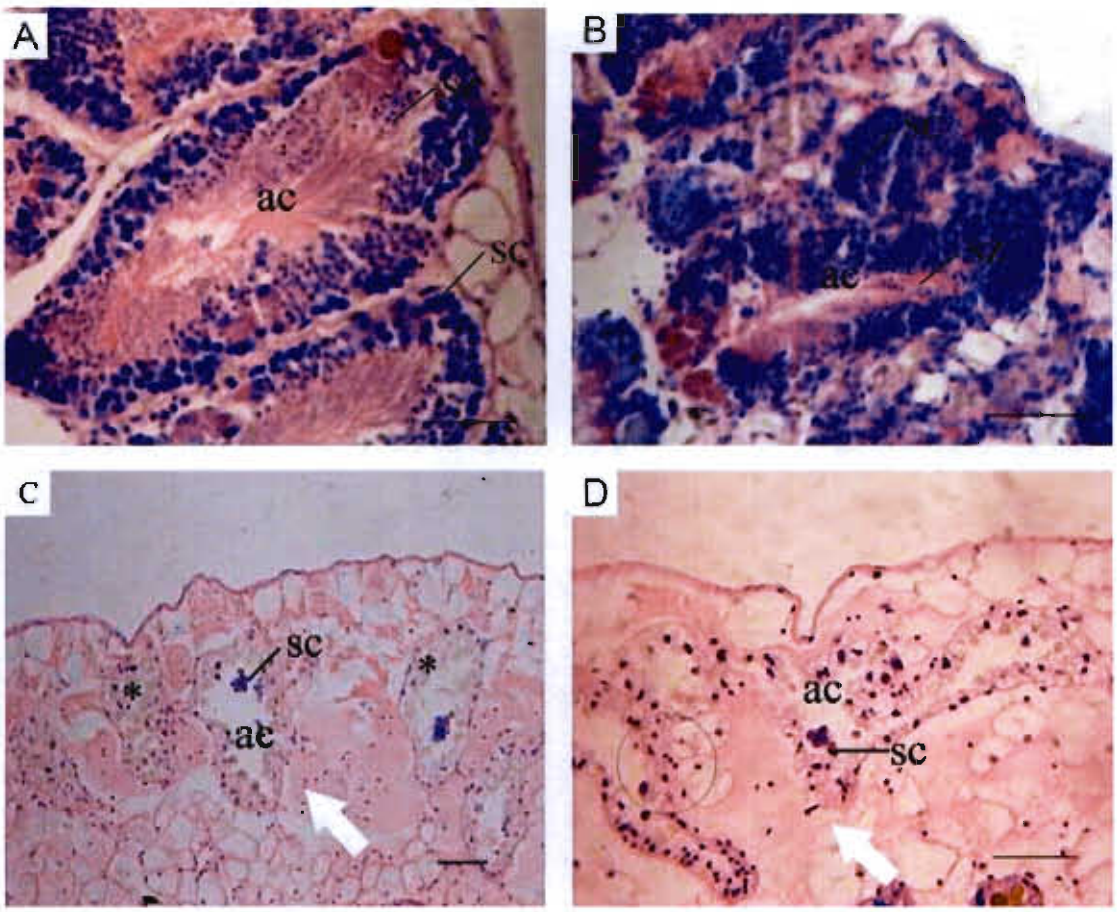
G) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l

H) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

ac = acinus, sc = spermatocyte, sz = spermatozoa และ * = cell necrosis พื้นที่วงกลมคือ sertoli cell (scale bar= 50μm)



ภาพที่ 4.11(ต่อ)



ภาพที่ 4.12 พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้เมื่อได้รับ BPA เป็นเวลา 10 วัน

A) กลุ่มควบคุมที่ 1 (น้ำทะเล) ไม่ได้รับสาร BPA

B) กลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล+20% DMSO) ไม่ได้รับสาร BPA

C) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001 mg/l

D) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01 mg/l

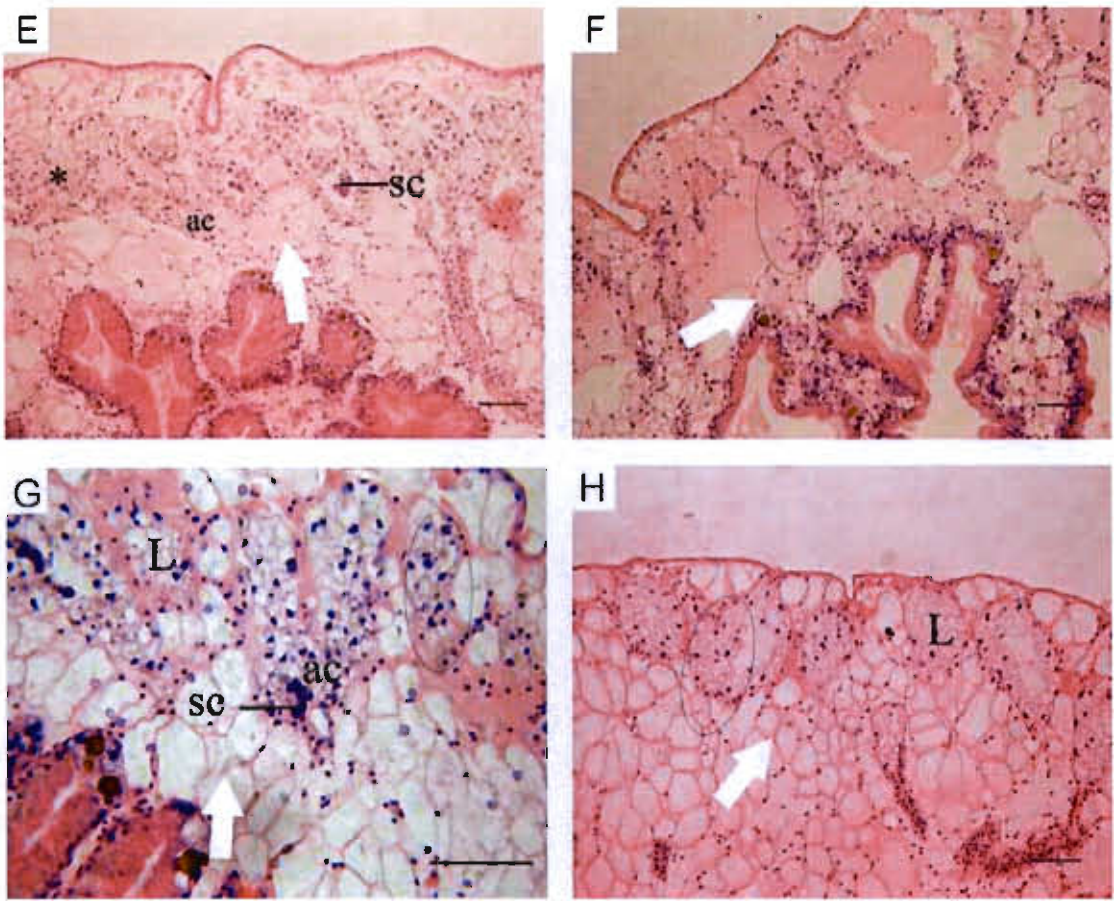
E) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l

F) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 1 mg/l

G) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l

H) กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

ac = acinus, sc = spermatocyte, sz = spermatozoa และ ✱ = cell necrosis พื้นที่วงกลมคือ sertoli cell (scale bar = 50 µm)



ภาพที่ 4.12(ต่อ)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

5.1 การศึกษาผลของ BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูงต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์

ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์หลังได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูง

จากการศึกษาลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยที่นำมาจากหาดกัปตันยุทธ ต.บางพระ อ.ศรีราชา จ.ชลบุรี พบว่าไม่เกิดปรากฏการณ์ superfemale ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบจากรายงานของ Sanpanich et al. (2008) ในหอยขี้นก (*Littoraia pallescens*) บริเวณหาดหินใน ต.อ่างศิลา อ.เมือง จังหวัดชลบุรี พบว่าฤดูวางไข่ (spawning) แบ่งออกเป็น 2 ช่วงคือ ช่วงเดือนสิงหาคม-กันยายน และช่วงเดือนมกราคม-กุมภาพันธ์ ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่น้ำทะเลขึ้นสูงในเวลากลางวัน ทำให้ตัวอ่อนมีอัตราการรอดสูง และพบว่าหอยฝาเดียวในวงศ์ Littorinidae ในฤดูวางไข่จะพบเซลล์ในระยะ post-vitellogenic เพิ่มมากขึ้นกว่านอกฤดูวางไข่ (Sanpanich, Well, & Chitramvong, 2008; Cronin, Myers, & Riordan, 2000) ดังนั้นหอยที่เก็บมาจากหาดกัปตันยุทธ ที่นำมาศึกษาเบื้องต้นน่าจะอยู่ในช่วงวางไข่ ซึ่งผลการวิจัยคาดว่าจะพบปรากฏการณ์ superfemale กับหอยเจดีย์ แต่กลับไม่พบอาจเนื่องมาจากระยะเวลาที่หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA สั้นที่ระดับความเข้มข้นสูง ซึ่งน่าจะก่อให้เกิดพิษแบบเฉียบพลันเมื่อเปรียบเทียบกับผลการศึกษาในหอย ramshorn (*Marisa cornuarietis*) ที่ได้รับสาร BPA ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.005, 0.025 และ 0.1 mg/l เป็นเวลา 5 เดือน แล้วเกิดปรากฏการณ์ superfemale (Oelamann et al., 2000)

พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศเมียภายหลังได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูง

การศึกษาพิษวิทยาเบื้องต้นของสาร BPA ที่มีต่ออวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ที่เก็บจากหาดกัปตันยุทธ พบว่าหอยเจดีย์ที่นำมาทำการทดลองเบื้องต้นอยู่ในช่วงเวลาวางไข่ เนื่องจากพบเซลล์ไข่ช่วง vitellogenic เป็นจำนวนมาก และเมื่อได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 4 วัน ทำให้เซลล์ไข่ในระยะ post-vitellgenic มีจำนวนเพิ่มมากขึ้น ซึ่งน่าจะเกิดจากการเสริมฤทธิ์กันระหว่างฮอร์โมนที่ผลิตขึ้นเองตามธรรมชาติกับสาร BPA ที่ได้รับเข้าไปแล้วไปกระตุ้นการทำงาน

ของปมประสาททำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ฮอร์โมนมากกว่าปกติ ทำให้เซลล์ไข่พัฒนาเข้าสู่ช่วงระยะที่มีการสะสมโยล์ค จึงพบเซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic มากขึ้นกว่าในกลุ่มควบคุม เช่นเดียวกับการศึกษารายงานการศึกษาในหอยแมลงภู่ (Aarab et al., 2006)

พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยเจดีย์เพศผู้ภายหลังได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นสูง

เมื่อหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยเพศผู้ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l พบว่ามีจำนวนเซลล์อสุจิลดลง ส่วนในกลุ่มที่ได้รับสาร 100 mg/l พบจำนวนเซลล์อสุจิกระจายอย่างเบาบางภายในช่องว่างของอซินัส ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่พบเซลล์อสุจิมีพัฒนาการอยู่ที่ขอบของช่องว่างอซินัสติดกับ basement membrane และสังเกตเห็นช่องว่างของอซินัสอย่างชัดเจน แสดงว่าการลดลงของจำนวนอสุจิมีความสัมพันธ์กับระดับความเข้มข้นของ BPA ทั้งนี้อาจเกิดจากภายในตัวหอยเจดีย์มีการผลิตฮอร์โมนบางชนิด เช่น vitellin, VTG-like เป็นต้น ที่เกี่ยวข้องกับการเจริญทางเพศของเพศเมีย ทำให้ cholesterol เปลี่ยนไปเป็นฮอร์โมนเพศเมียมากขึ้นส่งผลทำให้ฮอร์โมนเพศผู้มีการผลิตได้น้อยลง เนื่องจากการผลิตฮอร์โมนทั้งสองเพศใช้กลไกเดียวกัน (Janer, & Port, 2006) จนเป็นเหตุให้จำนวนและพัฒนาการลงของอสุจิลดลง

5.2 การศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อกายวิภาคระบบสืบพันธุ์และมิญชวิทยาของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์

ลักษณะทางกายวิภาคของระบบสืบพันธุ์

เมื่อใช้หอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียที่เก็บมาจากหาดเจ้าหลาว จ. จันทบุรี ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.001-100 mg/l พบว่า BPA ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงระบบสืบพันธุ์ของหอยเจดีย์ จากผลการศึกษาลักษณะทางมิญชวิทยาชี้ให้เห็นว่าหอยเจดีย์ที่เก็บมาจากหาดเจ้าหลาวไม่อยู่ในระยะที่มีการวางไข่เนื่องจากพบเซลล์ไข่ในระยะ pre-vitellogenic จำนวนมากกว่าเซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาความสัมพันธ์ของเซลล์ไข่กับวงจรชีวิตของหอยขึ้นกดังที่กล่าวมาแล้ว (Sanpanich et al., 2008; Cronin, Myers, & Riordan, 2000) ดังนั้นเมื่อนำหอยเจดีย์มาทดสอบให้ได้รับสาร BPA ที่ทุกระดับความเข้มข้น เป็นระยะเวลานาน 5 และ 10 วัน จึงไม่เกิดปรากฏการณ์ superfemale อาจเนื่องมาจากหอยเจดีย์ที่นำมาทำการศึกษานี้อยู่นอกฤดูวางไข่ จึงผลิตฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการเจริญของอวัยวะสืบพันธุ์จาก dorsal body น้อย จึงไม่พบการขยายออกของท่อนำไข่และต่อมสร้างเปลือกไข่ ประกอบกับ

ระยะเวลาที่ใช้ทดสอบสาร BPA ในครั้งนี้สั้นกว่าการทดลองในหอย ramshorn ที่ทำการศึกษาเป็นระยะเวลานาท 5 เดือน (Oelamann et al., 2000)

พยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทางเดินสืบพันธุ์เพศเมียที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เมื่อให้ตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยเพศเมียจากหาดเจ้าหลาว กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 3 ระดับ 1) ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.001 และ 0.01 mg/l) 2) ระดับความเข้มข้นกลาง (0.0 และ 1 mg/l) และ 3) ระดับความเข้มข้นสูง (10 และ 100 mg/l) เป็นเวลานาน 5 วัน พบว่าสาร BPA ทุกระดับความเข้มข้นมีผลต่อการพัฒนาและการเจริญของเซลล์ไข่ ทำให้เซลล์ไข่ทุกระยะ และระยะ pre-vitellogenic มีจำนวนลดลงแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่พบว่าเซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic เพิ่มจำนวนมากขึ้นในกลุ่มที่ได้รับเป็นเวลานาน 5 วัน อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ในทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงว่าสาร BPA มีผลต่อการสะสมตัวของโยล์ค จะมีผลทำให้เซลล์ไข่ส่วนใหญ่อยู่ในช่วงระยะ vitellogenic ซึ่งอาจเกิดจากสาร BPA ประพฤติตัวเลียนแบบเช่นเดียวกับสาร 17ß-eatraiol (E_2) เร่งให้เกิดการสังเคราะห์ lipoprotein ในอวัยวะทางเดินสืบพันธุ์และระบบประสาทได้แก่ ต่อมสร้างเปลือกไข่ และอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เป็นต้น ซึ่ง lipoprotein ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังจะทำหน้าที่คล้าย vitellogenin ในกระบวนการสะสมโยล์คในเซลล์ไข่ นอกจากนี้มีรายงานที่พบการกระตุ้นระบบประสาทบริเวณ caudodorsol (CDC) ที่อยู่ระหว่างทางเชื่อมของปมประสาทสมอง ให้มีการผลิต caudodorsal hormone (CDCH) ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการพัฒนาของเซลล์ไข่และพฤติกรรมการวางไข่ของหอยฝาเดียวสกุล *Lymnea* (Lagadic, Coutellec, & Caquet, 2007) และจากการศึกษาระบบฮอร์โมนเพศในหอยเชลล์ (*Pecten maxima* และ *P. yessoensis*) พบ ER-like Receptor ที่นิวเคลียสของเซลล์ไข่ที่กำลังอยู่ในช่วงการพัฒนา ดังนั้น ER-like น่าจะมีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ด้วย นอกจากนี้ยังพบการสร้าง ERß -like และ ERα-like ในหอยแมลงภู่ซึ่งพบการสร้างฮอร์โมนทั้งสองชนิดนี้ที่ปมประสาทเท้า (pedal ganglia) (Osada, 2003; Stefano, Zhu, Mantione, Jones, Salamon, Cho, & Cadet, 2003) และยังพบว่าการได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 µM ร่วมกับ serotonin มีผลทำให้เกิดการตกไข่ และพบว่าจำนวนเซลล์ไข่เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับระดับของ E_2 (Manger, Li, Christensen, & Yostino, 1996; Wang & Croll, 2003) ดังนั้นเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสัมผัสสาร BPA เป็นระยะเวลานาน 5 วัน BPA มีผลออกฤทธิ์เช่นเดียวกับฮอร์โมนเพศ (เช่น E_2) ไปกระตุ้นปมประสาททำให้เกิดการหลั่งนิวโรเปปไทด์ฮอร์โมน (neuropeptide hormone) ทำให้เกิดการผลิต serotonin ร่วมด้วยส่งผลให้เกิดการสะสมของโยล์คในกลุ่มที่ได้รับสารเป็นเวลา 5 วัน

การศึกษาในหอยสองฝาหลายชนิดพบว่า E_2 มีส่วนช่วยกระตุ้นการผลิต serotonin และการพัฒนาของเซลล์ไข่ในฟอลลิเคิลให้อยู่ในระยะ mature (Kadam, Segal, & Koide, 1991; Osada, Nakata,Matsumoto, & Mori, 1998) และพบว่าหอยที่ได้รับสัมผัส E_2 จะเกิดการกระตุ้นให้ผลิต serotonin ที่มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ และมีการสะสมตัวของ vitellin มากขึ้นใน hemolymph (Osada et al., 1998; Mapara et al., 2008) ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุทำให้พบไข่ในระยะ vitellogenic นอกจากนี้ยังพบว่า serotonin มีผลยับยั้ง progesterone และการทดสอบในปลาแซลมอน (*Salmo gairdneri*) เมื่อได้รับสัมผัสสาร pentachlorphenol (PCP) ที่ 0.0125, 0.025 และ 0.05 mg/l เป็นเวลา 18 วัน พบเซลล์ไข่ atretic oocytes อยู่ในภาวะ atresia (Nagler, Aysola, & Ruby, 1986) และในปลาแซลมอน (*Salmo trutta*) เมื่อได้รับสัมผัสกับสาร E_2 และ BPA 0.005 mg/l และ 0.05 mg /l ตามลำดับ ทำให้รังไข่พัฒนามากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมในช่วงอายุเดียวกัน (Bjerregaard, Lindholst, Korsgaard, & Bjerregaard, 2008)

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่า เซลล์ไข่ในระยะ post-vitellgenic ของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลานาน 10 วันมีจำนวนลดลง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลานาน 5 วันในระดับความเข้มข้นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบในหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) เพศเมียที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 0.05 mg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์พบว่า รังไข่ของหอยแมลงภู่เพศเมียจะฝ่อ (atresia) และพบจำนวนเซลล์ไข่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Aarab et al., 2006) และผลการศึกษาในหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยเมื่อได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 0.05 mg/l พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ระยะ mature ลดลงและปริมาณ serotonin ลดลงด้วย (Leon et al., 2010) การที่จำนวนเซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic ลดลง อาจเนื่องร่างกายของหอยเกิดมีกลไกการควบคุมย้อนกลับของฮอร์โมนโดยสาร BPA อาจยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนจาก cholesterol เป็นฮอร์โมนเพศผู้ (Janer & Porte, 2007)

การศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA ต่อจำนวนเซลล์ไข่

เมื่อศึกษาความเป็นพิษของสาร BPA จากอัตราส่วนเซลล์ไข่ของช่วง post-vitellogenic และ pre-vitellogenic (ER) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 และ 10 วัน (ข้อที่ 3.3.2) พบว่าอัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่มีค่าเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 วัน และลดลงในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 10 วัน เช่นเดียวกับดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ (MI) ซึ่งจากการนับจำนวนเซลล์ไข่พบว่า หอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 วัน เซลล์ไข่ในระยะ post-vitellogenic มีจำนวนเพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม โดยเฉพาะที่ระดับ

10 และ 100 mg/l อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$ และ $P<0.01$ ตามลำดับ) แต่เซลล์ไข่ในระยะ pre-vitellogenic มีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ส่วนหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 10 วันพบว่าอัตราส่วนจำนวนเซลล์ไข่ ระยะ vitellogenic ลดลงจากกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลานาน 5 วัน และลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$) ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 mg/l แสดงว่าสาร BPA ไม่มีผลต่อของการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไข่โดยตรง แต่น่าจะมีผลต่อกระบวนการสะสมโยล์ค ดังนั้นจึงพบเซลล์ไข่ในช่วง post-vitellgenic ซึ่งจากรายงานการศึกษาในหอยแมลงภู่และหอยนางรม (*Mytilus* spp., *Saccrosstrea* spp.) สาร BPA ออกฤทธิ์ที่ปมประสาทแล้วกระตุ้นให้ผลิตฮอร์โมนเพศ เช่น vitellin, serotonin, progesterone และ CDCH เป็นต้น (Osada et al., 1988; Nagle et al., 2001) ซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวมีผลต่อการพัฒนา และสะสมโยล์คของเซลล์ไข่ จากการศึกษาในสิ่งมีชีวิตหลายชนิดในสัตว์มีกระดูกสันหลัง เช่น ในปลาแซลมอนและปลาเทราว์ (Nagler et al., 1986; Bjerregaard et al., 2008) พบว่าเมื่อได้รับสารที่รบกวนฮอร์โมนเพศจะเกิดการผลิต vitellogenin และในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น แอมฟิพอด (*Gammarus fossarum)* พบระดับการแสดงออกของ 70kD stress protein family (hsp 70) ซึ่งเป็นโปรตีนที่สามารถถูกกระตุ้นจากภาวะเครียดจากสิ่งแวดล้อม เช่น เมื่อได้รับสารพิษ อุณหภูมิเปลี่ยนแปลง เป็นต้น ซึ่งมีความสอดคล้องกับดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ที่มีค่ามากขึ้น และพบระยะ atretic oocytes ลดลง สัมพันธ์กับเวลาและความเข้มข้นของสาร BPA ที่แอมฟิพอดได้รับสัมผัส เช่นเดียวกับในหอยแมลงภู่ที่พบปริมาณของ vitellogenin เพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสัมผัสสาร E_2 และ BPA (Aarab et al., 2006)

พยาธิสภาพของอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

เมื่อหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับสาร BPA ทุกระดับความเข้มข้นเป็นเวลา 5 วัน พบว่า BPA มีผลต่อการพัฒนาของเซลล์อสุจิ โดยที่ระดับความเข้มข้นต่ำ (0.001 และ 0.01 mg/l) พบเพียงเซลล์อสุจิ แต่ไม่พบการสลายของอซินัสทั้งกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 5 แต่พบว่าเซลล์ในอซินัสเกิดภาวะ necrosis ในหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA เป็นเวลา 10 วัน หอยเจดีย์กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้นระดับกลาง (0.1 และ 1 mg/l) เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่าเซลล์เกิดภาวะ necrosis และภายในช่องว่างอซินัสเริ่มตีบตัน และที่ความเข้มข้นระดับสูง (10 และ 100 mg/l) เกิดการสลายตัวของอซินัสและเซลล์อสุจิทั้งในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลา 5 วัน และ 10 วัน ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้สอดคล้องกันการทดสอบความเป็นพิษในหอยแมลงภู่ ที่พบว่าปริมาณอสุจิลดลง เมื่อได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 µg /l เป็นระยะเวลา 3 สัปดาห์ แต่เมื่อทำ

การวิเคราะห์ทางชีวเคมีพบว่าสาร phosphopotein ไม่ลดลง (Aarab et al., 2006) และเช่นเดียวกันกับในหอย *Potamopyrgus antipodarum* เมื่อได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.1 mg/l ติดต่อกันเป็นเวลา 28 วัน เกิดการสลายของท่อนำอสุจิและเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินสืบพันธุ์ (Gagnaire et al., 2009) และพบว่าหอยที่ได้รับสัมผัส E_2 จะเกิดการกระตุ้นให้ผลิต serotonin และมีการสะสมของ vitellin มากขึ้นใน hemolymph (Osada et al., 1998; Mapara et al., 2008) ซึ่ง serotonin มีผลยับยั้งการทำงานของฮอร์โมนเพศผู้ และสาเหตุดังกล่าวอาจส่งผลต่อการสร้างอสุจิ (Wang & Croll, 2003)

สรุปผลการวิจัย

เมื่อทำการทดสอบหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยที่เก็บมาจากหาดกัปตันยุทธ จังหวัดชลบุรี ให้ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลานาน 4 วัน ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 100 mg/l ในเพศเมียส่งผลให้เซลล์ไข่ระยะ vitellogenic เพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุม ส่วนในเพศผู้ BPA มีผลทำให้จำนวนของเซลล์อสุจิและอสุจิลดลง และไม่พบอสุจิในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 mg/l

การศึกษาพยาธิสภาพหอยเจดีย์ที่เก็บมาจากหาดเจ้าหลาว จังหวัดจันทบุรี พบว่าเมื่อหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยเพศเมียได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.1, 1, 10 และ 100 mg/l เป็นระยะเวลานาน 5 วัน มีจำนวนเซลล์ไข่ในช่วง post-vitellogenic เพิ่มขึ้นมากกว่าเซลล์ไข่ระยะ pre-vitellogenic ในขณะที่หอยเจดีย์ที่ไม่ได้รับสาร BPA มีจำนวนเซลล์ไข่ในระยะ pre- vitellogenic มากกว่าระยะ post-vitellogenic ดังนั้นค่าอัตราส่วนเซลล์ไข่และดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่เพิ่มขึ้น และในหอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA ติดต่อกันเป็นเวลา 10 วัน พบว่าจำนวนเซลล์ไข่ทุกระยะ เซลล์ไข่ระยะ pre-vitellogenic และ post-viellogenic ลดลง ดังนั้นค่าอัตราส่วนเซลล์ไข่และดัชนีความสมบูรณ์ของเซลล์ไข่ลดลง

ในหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับสาร BPA เป็นระยะเวลานาน 10 วัน ทุกระดับความเข้มข้นก่อให้เกิดผลอย่างรุนแรงต่อเนื้อเยื่อทางเดินสืบพันธุ์ คือ ไม่พบการพัฒนาของตัวอสุจิ และเซลล์เกิดภาวะ necrosis อยู่ภายในอซินัส แต่ในหอยเจดีย์ที่ได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำเป็นเวลา 5 วัน เซลล์ไม่เกิดภาวะ necrosis ในขณะที่หอยเจดีย์ที่ได้รับความเข้มข้นระดับกลาง เป็นระยะเวลา 5 และ 10 วัน จะเกิดการตีบตันของอซินัส ส่วนกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ในระดับความเข้มข้นสูงเป็นเวลา 5 และ 10 วัน ทำให้เซลล์เกิดภาวะ necrosis และอซินัส สลายตัว

ข้อเสนอแนะ

1. ควรวัดปริมาณ BPA ด้วยวิธีทางเคมีหรือ ELISA ในช่วงเวลาที่ทำการศึกษาร่วมกับการศึกษาลักษณะทางมิญชวิทยาของเนื้อเยื่ออวัยวะสืบพันธุ์

2. ควรทำการทดสอบให้หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่านี้ เช่น ระดับ 1 และ 10 ng/l และเป็นระยะเวลานานมากกว่า 10 วัน

3. ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบกับตัวอย่างหอยเจดีย์ที่พบในสิ่งแวดล้อมที่คาดว่ามีการปนเปื้อนหรือมีรายงานการปนเปื้อนของ BPA

4. ควรทำการศึกษาในหอยเจดีย์ช่วงอายุอื่น ๆ เพิ่มเติมนอกเหนือจากระยะตัวเต็มวัย

รายการอ้างอิง

Aarab, N.S., Lemaire-Gony, E. Unruh, P.D., Hansen, B.K., Larsen, O.K., Andersen, A., & Narbonne, J.R. (2006). Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology*, (78S), S86-S92.

Alexander, H.C., Dill, D.C., Smith, L.W., Guiney, P.D., & Dorn, P.B. (1988). Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental Toxicology Chemistry*, *7*, 19-26.

Bjerregaard, L.B., Lindholst, C., Korsgaard, B., & Bjerregaard, P. (2008). Sex hormone concentrations and gonad histology in brown trout (*Salmo trutta*) exposed to exposed to 17ß-estradiol and bisphenol A. *Ecotoxicology*, *17*, 252-263.

Bouskine, A., Nebout, N., Brücker-Davis, F., Benahmed, M., & Fenichel, P. (2009). Low dose of bisphenol A promote humen seminoma cell proliferation by activation PKA and PKG via a membrane G-protein-coupled estrogen receptor. *Environmental Health Perspectives*, *117*(7), 1053-1058.

Canesi, L., Betti, M., Lorusso, L.C., Ciacci, C., & Gallo, G. (2005). "In vivo" effects of Bisphenol A in *Mytilus* hemocytes: modulation of kinase-mediated signaling pathways. *Aquatic Toxicology*, *71*, 73-84.

Croll, R. P., & Van Minnen, J. (1992). Distribution of the peptide Ala-Pro-Gly-Trp-NH_2 (APGWamide) in the nervous system and periphery of the snail *Lymnaea stagnalis* as revealed by immunocytochemisty and in situ hybridization. *Journal of comparative neurology*, *324*, 567-574.

Cornin, M.A., Myers, A.A., & O'Riordan, R.M. (2000). The reproductive cycle of the intertidal gastropod on the west and south coasts of Ireland. *Biology and environment: Processing of the royal Irish academy*, *2*, 97-106.

Cousins, I.T., Staples, C.A., Klecka, G.M., & Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environment fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, *8*(5), 1107-1135.

Crain, A.D., Eriksen, M., Igcchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G.A., Guillette, Jr., & Louis, J. (2007). An ecological assessment of bisphenol A: Evidence comparative biology. *Reproductive Toxicology*, *24*, 225-239.

de Jong-Brink, M., & Geraerts, W.P.M. (1982). Oogenesis in gastropods. *Malacologia*, *22*,145–149.

Delgado, M., & Camacho, P.E. (2005). Histology study of gonadal development of *Ruditapes decussatus* (L.) (Mollusca: bivalvia) and its relationship with available food. *Scientia Marina*, *69*(1), 87-97.

Dictus, W.J.A.G., de Jong-Brink, M., & Boer, H.H. (1987). A neuropeptide (calfluxin) is involved in the influx of calcium into mitochondria of the albumen gland of the freshwater snail *Lymnaea stagnalis*. *General Comparative Endocrinology*, *65*, 439–450.

Dreon, M., Lavarias, S., Garin, C.F., Heras, H., & Pollero, R.J. (2002). Synthesis, distribution and levels of an egg lipoprotein from the apple snail *Pomacea canaliculata* (Mollusca: Gastropoda). *Journal of experimental Zoology*, *292*, 323-330.

Dulf, M., Schmitt, C., Bachmann, J., Brandelik, C., Schulte-Oehlmann, U., & Oehlmann, J. (2007). Prosobranch snails as test organisms for the assessment of endocrine Active chemicals-an overview and a guideline proposal for a reproduction test with the freshwater mudsnail *Potamopyrgus antipodarum*. *Ecotoxicology*, *16*, 169-182.

Duong, C.N., Ra, J.S., Cho, J., Kim, S.D., Choi, H.K., Park, J., Wim, K.W., Inam, E., & Kim, S.D. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemoshere*, *78*, 286-293.

Fukhori, N., Kitano, M., & Kimura, H. (2005). Toxic effects of bisphenol A on sexual and asexual reproduction in *Hydra oligactis*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *48*, 495-500.

Furhacker, M., Scharf, S., & Weber, H. (2000). Bisphenol A: emissions from point sources. *Chemosphere*, *41*, 751-756.

Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier, M.H., & Garric, J. (2009). Devlopment of biomarker of stress related to endocrine disruption in gastropod: Alkali-labile phosphate. Protein-bond lipids and vitellogenin-like proteins. *Aquatic toxicology*, *92*, 155-167.

Geraerts, W.P.M. (1992). Neurohormonal control of growth and carbohydrate metabolism by the light green cells in *Lymnaea stagnalis*. *General Comparative Endocrinology*, *86*, 433–444.

Giese, A.C., & Pearse, J.S. (1977). *Reproductive of marine invertebrates* (4th ed.). New York, England: Academic Press.

Goldberg, J.I., Garofalo, R., Price, C.J., & Chang, J.P. (1993). Presence and biological activity of a GnRH-like factor in the nervous system of Helisoma trivolvis. *Journal Comparative Neurology*, *336*, 571–582.

Hamed, S.S., Addelmeguied, N.E., Essawy, A.E., Raddwan, M.A., & Hegazy, A.E. (2007). *Journal of Biological Sciences*, *7*(6), 1017-1037.

Hermann, P.M., de Lange, R.P.J., Pieneman, A.W., ter Maat, A., & Jansen, R.F. (1997). Role of neuropeptides encoded on CDCH-1 gene in the organization of egg-laying behavior in the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Journal Neurophysiology*, *78*, 2859–2869.

Houbrick, R.S. (1984). Revision of higher taxa in genus *Cerithidea* (mesogastopod: Potamididae) based on comparative morphology and biology data. *American Malacology Bullrtin*, *2*, 1-20.

Janer, G., & Port, C. (2006). Sex steroids and potential mechanisms of non-genomic endocrine disruption in invertebrates. *Ecotoxicology*, *16*, 145-170.

Jobling, S., Casey, D., Oehlmamm, J., Schulte-Oehlmann, U., Pawlowski, S., Baunbeck, Turner, A.P., & Tyler, C.R. (2004). Comparative response of mollusks and fish to environmental estrogen and an estrogenic effluent. *Aquatic Toxicology*, *66*, 207-222.

Joosse, J. (1988). The hormones of molluscs. In Laufer, H., & Downer, RGH. (Eds.), *Endocrinology of selected invertebrate types, invertibrate endocrinolgy, vol 2* (pp. 89–140) Alan R. Liss, New York.

Kang, J.H., Aasi, D., & Katayama, Y. (2007). Bisphenol A in aquatic environment and Its endocrine-disruptive effects on aquatic organisms. *Critical Reveiws in Toxicology*, *37*, 607-625.

Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, T., & Imada, N. (2002). Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*, 2394–4000.

Kim, E.K., & Lee, J.S. (2009). Ultrastructural description on oogenesis of the Melania snail, *Semisulcospira libertina libertina* (Gastropoda: Pleuroceridae). *Korean Journal Malacology*, *25*(2), 145-151.

Lagadic, L., Coutellec, M., & Caquet, T. (2007). Endocrine disruptor in aquatic pulmonate molluscs: few evidences, many challenges. *Ecotoxicology*, *16*, 45-59.

Lee, H.B., & Peart, T.E. (2000). Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. *Water Quality Research Journal of Canada*, *35*, 283-298.

Li, Q., Osada, M., Suzuki, T., Sato, M., & Mori, K. (1998). Degradation of vitellin during embryonic and larval development in the pacific oyster *Cressostrea gigas*. *Invertebrate Reproductive Development*, *33*, 1-9.

Mackay, D., & Fraser, A. (2000). Bioaccumulation of persistent organic chemicals: mechanisms and models. *Environmental Pollution*, *110*, 375-391.

Manger, P., Li, J., Christesan, B.M., & Yostino, T.P. (1996). Biogenic monoamines in the freshwater snail *Biomphalaria glabrata*: influence of infection by the human blood fluke, *Schistosoma mansoni*. *Comparative Biochemistry Physiology A*, *114*, 277-234.

Marcial, H.A., & Snell, TW. (2003). Estrogenic compound affect development of hapaticoid copepod *Tigripus japonicus*. *Environmental Toxicology Chemical*, *22*(12), 3025-3030.

Mu, X.R.C., Hwang, G.S., Hoy, H., & Leblanc, G.A. (2005). Signal disruption: anti-ecdysteroidal activity of bisphenol A involve cross talk between signaling pathways. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *24*, 146-152.

Mukai, S.T., Kiehn, L., & Saleuddin, A.S.M. (2004). Dopamine stimulates snail albumen gland glycoprotein secretion through the activation of a D1-like receptor. *Journal Experimental Biology*, *207*, 2507–2518.

Nagle, G.T., de Jong-Brink, M., Painter, S.D., & Li, K.W. (2001). Structure, localization and potential role of a novel molluscan trypsin inhibitor in *Lymnaea*. *Europe Journal Biochemistry*, *268*, 1213–1221.

Nagler, J.J., Aysola, P., & Ruby, S.M. (1986). Effect of sublethal pentachlorophenol on early oogenesis in matyring female rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Archives of Environmental Contamination*, *15*, 549-535.

Nolte, A., Koolman, J., DorlÖchter, M., & Straub, H. (1986) Ecdysteroids in the dorsal bodies of pulmonates (Gastropoda): synthesis and release of ecdysone. *Comparative Biochemical Physiology*, *84*, 777–782.

Oehlmann, J., Oetken, M., & Schulte-Oehlmann, U. (2008). A critical evaluation of the Environment risk assessment for plasticizer in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruptor. *Environmental Reseach*, *108*, 140-149.

Oehlmann, J., Schulte-Oehmann, U., Bachmann, J., Oetken, K., Lutz, I., Kloas, W., & Ternes, T.A. (2000). *Marisa conuarietis* (Gastropod: Prosobranchia) at Environmentally relevant concentration. *Environmental Health Perspectives*, *114*(1), 127-133.

Osada, M., Takamura, T., Sato, H., & Mori, K. (2003). Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17ß and the central nervous system. *Journal of experimental zoology*, *299A*, 172-179.

Porte, C., Janer, G., Lorusso, L.C., Ortiz-Zarragoittia, M., Carjaraville, M.P., Fossi, M.C., & Canesi, L. (2006). Endocrine disruptor in marine organism. *Approaches and perspectives, 143(part C)*, 303-315.

Pascoe, D., Carroll, K., Karntanut, W., & Watts, M.M. (2002). Toxicity of 17 α-ethinylestraoadiol and bisphenol A to the freshwater Cnidarian *Hydra vulgaris*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, *43*, 56-63.

Purchon, R.D. (1977). *The biology of the mollusca*. New York: Pergamon Press.

Saleuddin, A.S.M., & Wilbur, K.M. (1983) *The Mollusca: Physiology Part 1* (4th ed.) New York, London: Academic Press.

Sanpanich, K., Well, F.E. & Chitramvong, Y. (2008). Reproductive and growth of *Littoraria* (Gastropoda: Littorinidae) at Ang Sila, Thailand. *The Reffles Bulletin of Zoology*, *18*, 225-233.

Schirling, M., Jungmann, D., Ladewig, V., Ludwichowski, K., Nagel, R., Kohler, H., & Triebskorn, R. (2005). Bisphenol A in artificial indoor streams: II. Stress response and gonad histology in *Gammarus fossaram* (Amphipod). *Ecotoxicology*, *15*, 143-156.

Schulte-Oehmann, U., Oetken, M., Bachmann, J., & Oehlmann, J. (2004). *Phamaceutuical in the environment: Sources, Fate Effect and Risk*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Sone, K., Hinago, M., Kitayama, A., Morokuma, J., Ueno, N., Watanabe, H., & Iguchi, T. (2004). Effects of 17ß-estradiol, nonylphenol, and bisphenol-A on developing *Xenopus laevis* embryos. *General comparative endocrinology*, *138*, 228-236.

Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T., & Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, *10*, 2149–2173.

Stefano, G.B., Zhu, W., Mantione, K., Jones, D., Salamon, E., Cho, J.J., & Cadet, P. (2003). 17ß-estradiol downregulates ganglionic microglial cells via nitric oxide release: presence of an estrogen receptor ß transcript. *Neuroendocrinology*, *24*, 130–136.

Stoker, C., Rey, F., Rodriguez, H., Romos, J.G., & Larriera, A. (2003). Sex reversal effect on *Caiman latirostris* expose to environmentally relevant doses of the xenoestrogen bisphenol A. *General Comparative Endocrinology*, *133*, 278-296.

ter Maat, A., Pieneman, A.W., Goldschmeding, J.T., Smelik, W.F.E., & Ferguson, G.P. (1989). Spontaneous and induced egg-laying behavior of the pond snail, *Lymnaea stagnalis*. *Journal Comparative Physiology A*, *164*, 673–683.

Tatarazako, N., Takao, Y., Kishi, K., Onikura, N., Arizono, K., & Iguchi, T. (2002). Styrene dimmer and trimers effect reproductive of daphnid *(Ceriodaphnia dubia)*. *Chemosphere*, *48*, 597-691.

Verdonk, N.H. (1983) The Mollusca: Development (3rd ed.).In K.M., Wilber (Ed.), *The Mollusca* (pp 1-80).New York London: Academic Press.

Valdés, P., García-alcázar, A., Abdel, I., arizcun, M., Suárez, C., & Abellán, E. (2004). Seasonal changes on gonadosomatic index and maturation stages in common pandora *Pagellus erythrinus* (L.). *Aquaculture International*, *12*, 333–343.

van Golen, F.A., Li, K.W., de Lange, R.P.J., van Kesteren, R.E., van der Schors, R.C., & Geraerts, W.P.M. (1995). Co-localized neuropeptides conopressin and Ala-Pro- Gly-Trp-NH2 have antagonistic effects on the vas deferens of *Lymnaea*. Neuroscience, *69*, 1275–1287.

Wahli, W. (1988) Evolution and expression of vitellogenin gene. *Trends Genetic*, *4*, 227-232.

Walker, C.H., Hopkin, S.P., Sibly, R.M., & Peakall, D.B. (2006). *Principle of Ecotoxicology* (3rd ed.). Crc Press.

Wijdenes, J., van Elk, E., & Joosse, J. (1983). Effects of two gonadotropic hormones on polysaccharides synthesis in the albumen gland of *Lymnaea stagnalis*, studied with the organ culture technique. *General Comparative endocrinology*, *51*, 263–273.

Wang, C., & Croll, R.P. (2003). Effects of sex steroid on *in vitro* gamete release in the sea scallop *Placopecten magellanicus. Invertebrate Reproduction and Development*, *4*, 2-3.

Yamamoto, T., & Yasuhara, A. (1999). Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. *Chemosphere*, *38*, 2569-2576.

Yamamoto, T., Yasuhara, A., Shiraishi, H., & Nakasigi, O. (2001). Bisphenol A in hazardous waste Landfill leachates. *Chemophere*, *42*, 415-418.

Yoneda, T., Hiroi, T., Osada, M., Asada, A., & Funae, Y. (2003). Non-genomic modulation of dopamine release by bisphenol A in PC12 cell. *Journal of Neurochemistry*, *87*, 1499-1508.

ภาคผนวก

ตารางที่ ผ1.1 จำนวนเซลล์ไข่ในระยะต่าง ๆ

BPA (mg/l)	จำนวนเซลล์ไข่ระยะ Pre-vitellogenic				จำนวนเซลล์ไข่ระยะ Post-vitellogenic			
	oogonium		meiotic		vitellogenic		mature	
	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน
0(CSW)	35.2±4 10	32.26±7.0	0.73	1.67±0.96	0 44±0.24	0.93±0.85	0.80±0 58	0.66±0 23
0(DMSO)	32.24±0.32	36.06±9.5	1.61	3.00±2.00	0.31±0.01	0.46±0.81	0 56±0.02	0.53±.0 13
0.001	32.72±0.20	26.98±1.38	1.47	2.16±1.19	0 33±0.00	0.07±0.06	0.59±001	0.13±0.08
0.01	22.00±2.10	15.60±1.6	13.8±4.7[b]	0.13±0,13	1.60±0.55	0.40±0.12	1 06±0.32	0.33±0 18
0.1	14.46±1.75	15.20±3.41	6.40±3.2[a]	0	0.46±0.30	0.33±2.5	1.53±0.53	0.13±0.08
1	14.80±2.4	16.67±2.17	11.73±4.2[b]	0	0.46±0.30	0.53±0.4	0.66±0.45	0.20±0.20
10	18.67±4.73	13.08±2.49	12.20±4.5[b]	1.08±0.83	1.4±0.60	0.41±0.24	4.86±1.83*	0.11±0 06
100	6.27±0 81	8 20±2.33	4.46±1.25[a]	0	1.77±0 45*	0.33±0.10.	2.69±0.84*	0.11±0.06

ตารางที่ ผ1-2 ค่าพิสัยจำนวนเซลล์ไข่ในช่วง pre-vitellogenic และ post-vitellogenic

BPA (mg/l)	ค่าพิสัยของจำนวนเซลล์ไข่							
	Pre-vitellogenic				Post-vitellogenic			
	oogonium		meiotic		vitellogenic		mature	
	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน	5 วัน	10 วัน
0(CSW)	55-14	68-11	6-0	11-0	3-0	6-0	5-0	1-0
0(DMSO)	61-14	70-14	7-0	22-0	1-0	1-0	2-0	0
0.001	33-10	42-0	3-0	19-0	2-0	1-0	2-0	2-0
0.01	35-5	24-0	41-2	2-0	6-0	2-0	4-0	3-0
0.1	26-8	34-5	20-0	0	8-0	3-0	4-0	3-0
1	36-4	27-7	31-0	0	3-0	2-0	4-0	4-0
10	46-4	25-1	34-0	8-0	6-0	3-0	13-0	4-0
100	12-0	20-3	13-0	0	19-0	1-0	39-0	1-0

พยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ภายหลังการสัมผัสสาร bisphenol A

(Histopathology of mud snail (*Cerithidea (Cerithideopsilla) cingulata*) after exposure to bisphenol A)

รุ่งวิทย์ ชัยจิรวงศ์[1,2], **ชูตา บุญภักดี**[1,2,3], อัมพร ทองกู้เกียรติกูล[3], คเชนทร เฉลิมวัฒน์[4]

Rungwit Chaijirawong[1,2] Chuta Boonphakdee[1,2,3] Amporn Thongkukiatkul[3] and Kashane Chalermwat[4]

บทคัดย่อ

การศึกษาพยาธิวิทยาของเนื้อเยื่อโกแนดของหอยเจดีย์ (*Cerithidea (Cerithideopsilla) cingulata*) เมื่อได้รับ bisphenol A (BPA) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่าในหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับ BPA ความเข้มข้น 30 mg/l มีผลทำให้จำนวน spermatocyte และ spermatozoa รวมถึงจำนวนของ acini ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ลดลง และที่ความเข้มข้น 100 mg/l ทำให้เกิดความเป็นพิษ โดยจำนวนเซลล์อสุจิในระยะ spermatocyte และระยะ spermatozoa เล็กน้อยกระจายอย่างไม่หนาแน่นตามขอบผนังของ acinus lumen และตามขอบผนังของ acinus เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (20% DMSOละลายในน้ำทะเล) ในขณะที่หอยเจดีย์เพศเมียเมื่อได้รับ BPA ความเข้มข้น 30 mg/l พบเซลล์ไข่ระยะ vitellogenic จำนวนมาก แต่ที่ BPA ความเข้มข้น 100 mg/l ทำให้จำนวนเซลล์ไข่ลดลงและพบเซลล์อยู่ในระยะ atretic จากการศึกษาพบว่าสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l และ 100 mg/l ก่อให้เกิดความเป็นพิษแบบกึ่งเฉียบพลัน ซึ่งมีผลต่อระยะการพัฒนาตัวของเซลล์ไข่และการลดจำนวนลงของ spermatozoa ในหอยเจดีย์

คำสำคัญ: เซลล์สืบพันธุ์, พิษแบบกึ่งเฉียบพลัน, หอยเจดีย์, bisphenol A, BPA

ABSTRACT

The histopathology of mud snail (*Cerithidea (Cerithideopsilla) cingulata*) exposed to bisphenol A (BPA) for 96 hours was investigated. In male, exposure to BPA at concentration of 30 mg/l resulted in toxic effect on gonads, reducing the number of acini, spermatocyte and spermatozoa in the acinar lumen. Exposure to BPA at concentration of 100 mg/l BPA, decreasing number of spermatocytes and spermatozoa which where finely dispersed at the marginal of acinar lumen compared to the control groups (snails exposed to seawater and 20% DMSO in seawater). In female, exposure to BPA at concentration of 30 mg/l resulted in development of the follicular cells by increasing number of oocytes in the vitellgenic phase. In contrast, exposure to BPA at 100 mg/l resulted in decreased the number of oocytes in the ovaries and atretic oocytes were found In conclusion, this study investigated that BPA at concentration of 30 mg/l and 100 mg/l effected to sub-chronic resulted to the oocyte development and decreased spermatozoa in mud snails.

Key words: bisphenol A, BPA, *Cerithidea (Cerithideopsilla) cingulata*, subchronic toxic effect

e-mail address: chutagene@yahoo.com

[1] นิสิตหลักสูตรวิทยาศาสตรดุษฎีบัณฑิต มหาวิทยาลัยบูรพา จันทบุรี

[2] Graduate School Program, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

[3] ศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการจัดการเคมีภัณฑ์

[4] Center of Excellence on Environment Health, Toxicology and Management of Chemical

[3] ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จันทบุรี Department of Biology, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

[4] ภาควิชาวารีศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา จันทบุรี Department of Aquatic Science, Faculty of Science, Burapha University, Chonburi

คำนำ

Bisphenol A (BPA) เป็นองค์ประกอบสำคัญต่อกระบวนการขึ้นรูปพลาสติกในกลุ่มพลาสติกโพลีคาร์บอนเนต (polycarbonate plastic) เช่น PVC พลาสติกทนความร้อน และการผลิตอีพ็อกซีเรซิน (epoxy resin) (Staples *et al*, 1998) BPA สามารถปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมจากกระบวนการผลิตพลาสติกและอีพ็อกซี เรซินในโรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงน้ำเสียจากบ้านเรือน ซึ่งกระบวนการบำบัดน้ำเสียไม่สามารถกำจัดสาร BPA ออกได้อย่างสมบูรณ์เนื่องจากไม่มีระบบบำบัดที่กำจัดสารในกลุ่มที่มีหมู่ phenol จึงยังคงพบการปนเปื้อนของ BPA ในสิ่งแวดล้อมได้ ซึ่งการตรวจวัดทางเคมีทำได้ค่อนข้างยากและได้ค่าความเข้มข้นไม่คงที่ (Yamamoto and Yasuhara (1999); Furhacker, *et al.*, 2000; Lee and Peart, 2000; มีรายงานว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับ BPA จะมีผลรบกวนการทำงานของฮอร์โมนเอสโทรเจน โดยจับกับตัวรับเอสโทรเจน (estrogen receptor) ทำให้เซลล์เกิดการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศมากกว่าปกติ รวมถึงเกิดการสังเคราะห์ฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสืบพันธุ์ เช่น vitellogenin (VTG) เพิ่มขึ้นด้วย (Kang *et al.*, 2002; Matozzo *et al.*, 2008) แต่ยังไม่มีปรากฏรายงานถึงผลกึ่งเฉียบพลันของสาร BPA ต่อเซลล์สืบพันธุ์ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้จึงใช้หอยเจดีย์ (*Cerithidea (Cerithideopsilla) cingulata*) ซึ่งเป็นหอยที่พบแพร่กระจายโดยทั่วไปมีพฤติกรรมคืบคลานอยู่กับหาดทรายปนโคลน จึงมีโอกาสสัมผัสกับสาร BPA ได้มาก เป็นตัวแทนในการศึกษาครั้งนี้

อุปกรณ์และวิธีการ

เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยขนาดความยาวเปลือกประมาณ 2.2 เซนติเมตร จากบริเวณชายหาดกัปตันยุทธ จังหวัดชลบุรี ระหว่างเดือนมกราคม พ.ศ.2553 และนำมาปรับสภาพในห้องทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์ก่อนการทดลอง ใช้หอยเพศผู้และหอยเพศตัวเมียอย่างละ 10 ตัวต่อระดับความเข้มข้น เลี้ยงในตู้กระจก ให้หอยเจดีย์ได้รับสาร BPA (ละลายใน 20% DMSO) โดยการแช่ ที่ความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 30 และ100 mg/l และชุดควบคุม 2 ชุด คือชุดควบคุมที่ 1 (DMSO 20% ซึ่งใช้เป็นตัวทำละลายสาร BPAในน้ำทะเล) และกลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล) เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นสุ่มตัวอย่างหอยเจดีย์เพศละ 3 ตัวต่อหนึ่งชุดการทดสอบ (ทำซ้ำ 2 ครั้ง) กะเทาะเปลือกแล้วนำเนื้อเยื่อของอวัยวะสืบพันธุ์ (gonad) แช่ในสารละลาย Bouin หลังจากนั้นทำการดึงน้ำออก (dehydration) และทำตามขั้นตอนเทคนิคทางพาราพลาส (paraplast) แล้วตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง microtome ที่ความหนา 7 ไมครอน คัดเลือก 8 จาก 16 แผ่นของชิ้นเนื้อเยื่อที่ตัดต่อเนื่องกัน (section series) จนกว่าจะหมดชิ้นเนื้อเยื่อ นำมาย้อมสี Hematoxylin and Eosin สังเกตลักษณะของเซลล์สืบพันธุ์ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (Olympus BX50) และบันทึกภาพ ในการศึกษาครั้งนี้แบ่งการพัฒนาของเซลล์ไข่ออกเป็น 3 ระยะคือ 1) ระยะ pre-vitellogenic (เซลล์จะย้อมติดสี basophilic ของ hematoxylin ตลอดทั้งเซลล์) 2) ระยะ vitellogenic (เซลล์ไข่ติดสี acidophilic ของ eosin) และ 3) ระยะ atretic (ไข่แดงรวมตัวกันเป็น

yolk plate) ส่วนในเซลล์อสุจิจะแบ่งออกเป็น 2 ระยะ คือ 1) ระยะ spermatocyte (ไม่มีพัฒนาของแฟลกเจลลัมที่เป็นส่วนหาง) และ 2) ระยะ spermatozoa (มีการพัฒนาของแฟลกเจลลัม)

ผลการทดลอง

เมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร BPA โดยวิธีการแช่ที่ระดับความเข้มข้น 2 ระดับ คือ 30 และ 100 mg/l เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ไม่พบอัตราการตายระหว่างการทดสอบ แต่พบว่าหอยเจดีย์เคลื่อนที่ลดลงและหดตัวอยู่แต่ในเปลือก แต่ยังพบการเปิดฝาปิดเปลือกและหายใจผ่านทาง pallial siphonal eye ที่อยู่บริเวณ incurrent siphon canal ในกลุ่มที่ได้รับ BPA ทั้งสองความเข้มข้น เมื่อครบ 96 ชั่วโมงทำการศึกษาทางมิชญวิทยาของอวัยวะสืบพันธุ์ไม่พบความแตกต่างของเซลล์สืบพันธุ์ทั้งเพศผู้และเพศเมียระหว่างกลุ่มควบคุมที่ 1 (ได้รับ 20 % DMSOละลายในน้ำทะเล) และกลุ่มควบคุมที่ 2 (น้ำทะเล) ที่ไม่ได้รับ BPA โดยในเพศเมียทั้งสองกลุ่มมีเซลล์ไข่ระยะ pre-vitellogenic และระยะ vitellogenic ในปริมาณใกล้เคียงกัน (Figure 1 A และ B) ส่วนเพศผู้พบหลาย acinus ภายในพบเซลล์อสุจิได้ทั้ง 3 ระยะคือ spermatogonia spermatocyte และ spermatozoa (Figure 2 A และ B) ในกลุ่มที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 30 mg/l เพศเมียจะพบไข่ในระยะ vitellogenic เพิ่มขึ้นมากกว่าระยะ pre-vitellogenic (Figure 1C) ส่วนเพศผู้เมื่อได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 30 mg/l พบการลดจำนวนของ acini spermatocyte และ spermatozoa อย่างเห็นได้ชัดเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Figure 2C) เพศเมียที่ได้รับ BPA ที่มีความเข้มข้น 100 mg/l จะมีจำนวนเซลล์ไข่ลดลงและไข่ที่พบส่วนใหญ่อยู่ในระยะ atretic (Figure 1D) และในเพศผู้ภายใน acinus lumen พบเซลล์ในระยะ spermatocyte เพียงเล็กน้อยติดกับขอบผนัง acinus และไม่พบเซลล์ระยะ spermatozoa ที่สมบูรณ์พบเพียงเศษของหางซึ่งย้อมติดสีน้ำเงินกระจายอย่างเบาบางอยู่ภายใน acinus lumen (Figure 2D)

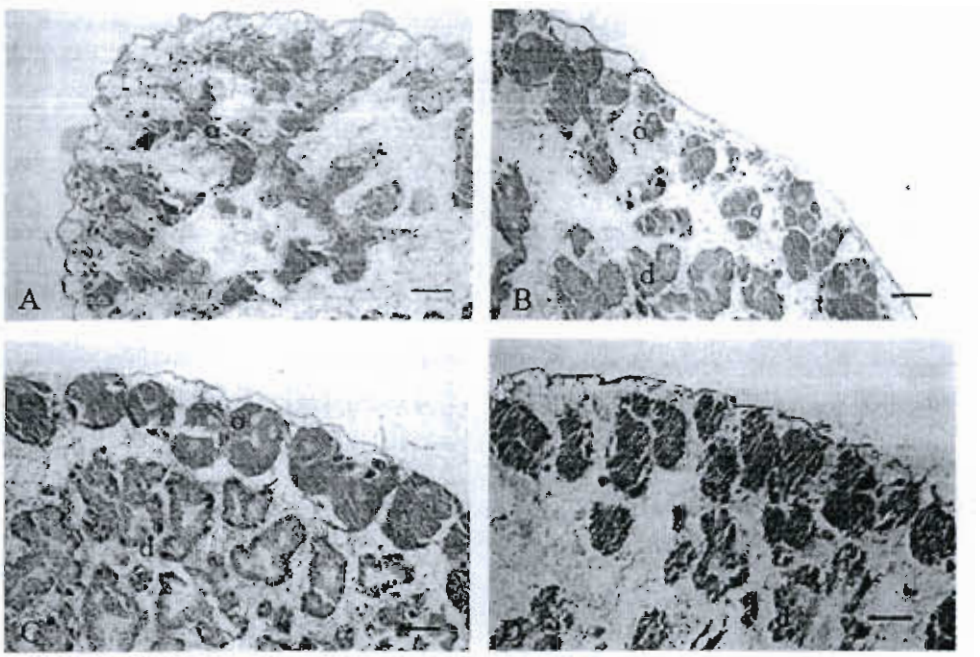


Figure 1 Histological observations of gonad of female mud snail,
A = control I (20 % DMSO in seawater), B = control II (seawater),
C = exposure to BPA 30 mg/l ,D = exposure to BPA 100 mg/l,
O = oocyte d= digestive gland (scale bar = 10 µm)

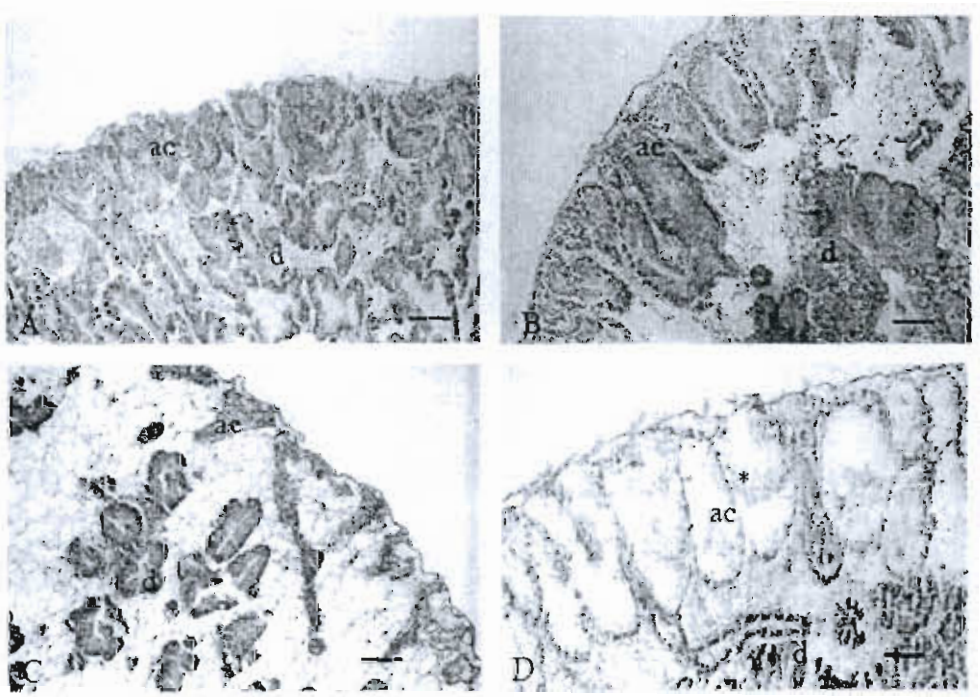


FIgure 2 Histological observations of gonad of male mud snail,
A = control I (20 % DMSO in seawater), B = control II (seawater),
C = exposure to BPA 30 mg/l, D = exposure to BPA 100 mg/l,
* = spermatozoa d= digestive gland ac= acini (scale bar = 10 µm)

วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลทางพิษวิทยาเบื้องต้นของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 100 mg/l เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า BPA มีผลต่อการพัฒนาและการเจริญของเซลล์ไข่และเซลล์อสุจิ เนื่องจากสาร BPA มีการออกฤทธิ์คล้ายเอสโทรเจนซึ่งสามารถก่อให้เกิดการกระตุ้นการสร้างฮอร์โมนที่เกี่ยวข้องกับการสะสมของ yolk granule และอาจเป็นผลให้เกิดการเสียสมดุลของการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ ในเพศผู้จึงพบการลดจำนวนลงของอสุจิ เช่นเดียวกับการทดสอบทางพยาธิสภาพของเนื้อเยื่อทางเดินสืบพันธุ์ในหอยหลายชนิดที่ได้รับ BPA และ 17β-estradiol (E_2) (Jobling *et al.*, 2004; Aarab *et al.*, 2006; Ganaire *et al.*, 2009) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสัมผัสสาร BPA เป็นเวลานาน 96 ชั่วโมง พบว่าหอยเจดีย์เพศผู้ที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 30 mg/l มีการลดจำนวนลงของ acini ส่วนเพศผู้ที่ได้รับ BPA ที่ความเข้มข้น 100 mg/l พบระยะ spermatocyte กระจายตามขอบของ acinus และพบระยะ spermatozoa ที่ไม่สมบูรณ์เพียงเล็กน้อยกระจายอย่างไม่หนาแน่น แตกต่างจากผลการทดสอบในหอยแมลงภู่ (*Mylilus edulis*) เพศเมียที่รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 50 µg/l เป็นเวลา 3 สัปดาห์พบว่า รังไข่ของหอยแมลงภู่เพศเมียจะฝ่อ (atretic) และพบจำนวนเซลล์ไข่ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (Aarab *et al.*, 2006) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะนี้ช่วงเวลาที่หอยได้รับสารในหอยเจดีย์ครั้งนี้สั้นเกินไป ส่วนในเพศผู้ให้ผลการศึกษาสอดคล้องกันคือ ปริมาณอสุจิลดลง (Aarab *et al.* 2006) เช่นเดียวกันกับการศึกษาทางมิชญวิทยาของระบบสืบพันธุ์ในหอย *Potamopyrgus antipodarum* เมื่อได้รับ BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/l ติดต่อกันเป็นเวลา 28 วันก่อให้เกิดการเสื่อมสลายของท่อนำอสุจิและเนื้อเยื่อบริเวณทางเดินสืบพันธุ์ (Gagnaire *et al*, 2009) และการทดสอบในหอย ramshorn (ramshorn; *Marisa cornuarietis*) ที่ได้รับสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 1 µg/l เป็นเวลา 3 เดือน พบว่าเซลล์ไข่ในระยะ vitellogenic จะหลุดออกจากก้านยึดไข่ที่ติดผนังของรังไข่ซึ่งถือว่าเป็นความผิดปกติของการเจริญของเซลล์ไข่ เพราะในการเจริญตามปกติไข่จะหลุดออกจากก้านยึดไข่เมื่อไข่อยู่ในระยะสมบูรณ์ (maturity stage) (Kümmerer, 2004) และจากการศึกษาปริมาณโปรตีน vitellogenin-like ในกลุ่มหอยฝาเดียวและหอยสองฝาหลายชนิดเมื่อได้รับสัมผัสกับ E_2 และ bisphenol A ด้วยวิธี alkali labile method พบว่ากลุ่มที่ได้รับสารทั้ง 2 ชนิดมีการเพิ่มขึ้นของปริมาณ vitellogenin-like เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร ซึ่งการตอบสนองของหอยดังกล่าวต่อ E_2 ดีกว่า BPA เนื่องจาก E_2 มีความสามารถจับกับ estrogen- like receptor ได้ดีกว่า BPA (Jobing *et al.*, 2004; Aarab *et al.*, 2006; Gagnaire *et al.*, 2009) และพบว่าหอยได้ที่รับสัมผัส E2 จะเกิดการกระตุ้นให้ผลิต serotonin มีผลต่อการเจริญของเซลล์ไข่ และมีการสะสมตัวของโปรตีน vitellogenin-like มากขึ้นใน hemolymph (Osada *et al.*, 1998; Mapara *et al.*, 2008) ซึ่งน่าจะเป็นสาเหตุทำให้พบไข่ในระยะ vitellogenic มากขึ้นในระยะที่ทดสอบสารช่วงแรก เนื่องจากมีการกระตุ้นให้มีการผลิต serotonin มากขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า serotonin มีผลยับยั้ง progesterone ซึ่งสาเหตุดังกล่าวอาจส่งผลต่อการสร้างอสุจิ (Wang and Croll, 2003) ดังนั้นเมื่อ

ทดสอบการกับหอยเจดีย์ให้ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของเซลล์ไข่และการลดลงของเซลล์อสุจิจึงอาจมีสาเหตุเช่นเดียวกับหอยได้รับสัมผัส E_2 ดังกล่าวมาแล้วแต่อย่างไรก็ตามการกลไกทำงานของฮอร์โมนยังไม่ทราบแน่ชัดยังคงต้องทำการศึกษาต่อไป

อนึ่งการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในระดับความเข้มข้นสูงกว่าการศึกษาที่ผ่านมาในหอยชนิดอื่นเนื่องจากยังไม่มีรายงานการเกิดความเป็นพิษในหอยเจดีย์ จึงต้องทำการศึกษาความเข้มข้นสูงเพื่อให้ทราบผลของ BPA ต่อพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นกับหอยเจดีย์ก่อน เพื่อดูแนวโน้มการเกิดความเป็นพิษและลักษณะการก่อเกิดพิษของสาร เพื่อเป็นแนวทางกำหนดความเข้มข้นในการศึกษาครั้งต่อไป การทดลองนี้ทำการสุ่มตัวอย่างมาทดสอบเพียงเพศละ 3 ตัวอย่างดังนั้นจึงควรมีการสุ่มจำนวนตัวอย่างทำการศึกษาต่อเพื่อที่นำมาศึกษาทางมิญชวิทยาเพิ่มในคราวต่อไปเพื่อยืนยันผลให้ชัดเจนยิ่งขึ้น และควรทำการศึกษาผลของ BPA ในระดับความเข้มข้นที่ต่ำกว่าเพิ่มเติม

สรุป

หอยเจดีย์ตัวเต็มวัย กลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในเพศเมียมีเซลล์ไข่ระยะ vitellogenic เพิ่มขึ้นในขณะที่กลุ่มที่ได้รับสาร BPA 100 mg/l ในระยะเวลาเท่ากัน มีจำนวนของเซลล์ไข่ลดลงและพบการฝ่อของเซลล์ไข่ด้วย ส่วนในเพศผู้ที่ได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 mg/l มีการลดลงของกลุ่มเซลล์สืบพันธุ์และจำนวนของ acini ลดลงอย่างเห็นได้ชัด ในกลุ่มที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 100 mg/l พบระยะ spermatocyte กระจายตามขอบของ acinus และพบระยะ spermatozoa เพียงเล็กน้อยกระจายอย่างเบาบาง แสดงว่า สาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 30 และ 100 mg/l ก่อให้เกิดพิษแบบกึ่งเฉียบพลันต่อหอยเจดีย์ทั้งเพศผู้และเพศเมียตัวเต็มวัยที่ทำการทดสอบ

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณศูนย์ความเป็นเลิศด้านอนามัยสิ่งแวดล้อม พิษวิทยา และการบริหารจัดการสารเคมี และคณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่ให้ทุนอุดหนุนส่วนหนึ่งในการทำวิจัยครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

Aarab N., S. Lemaire-Gony, E. Unruh, P. D. Hansen, B. K. Larsen, O. K. Andersen, and Narbonne, J. R. 2006. Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. **Aquatic Toxicology** (78S), S86-S92.

291552

Furhacker, M., Scharf, S., and Weber, H. 2000. Bisphenol A: emissions from point sources. **Chemosphere** (41): 751-756.

Gagnaire, B., Gagné, F., André, C., Blaise, C., Abbaci, K., Budzinski, H., Dévier, M. H., Garric, J. 2009. Devlopment of biomarker of stress related to endocrine disruption in gastropod: Alkali-labile phosphate. Protein-bond lipids and vitellogenin-like proteins. **Aquatic toxicology** (92): 155-167.

Jobling, S., Casey, D., Oehlmamm, J., Schulte-Oehlmann. U.. Pawlowski, S., Baunbeck, Turner, A.P. and Tyler, C.R. 2004. Comparative response of mollusks and fish to environmental estrogen and an estrogenic effluent. **Aquatic Toxicology** (66): 207-222.

583

Kang, I.J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, T. and Imada, N. 2002. Effects of bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). **Environmental Toxicology and Chemistry** (21), 2394–4000.

Kümmerer, K. (ed.) 2004. **Pharmaceutical in the environment. Sources, Fate, Effect and Risks.** 2nd ed. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Lee, H.B. and Peart, T.E. 2000. Bisphenol A contamination in Canadian municipal and industrial wastewater and sludge samples. **Water Quality Research Journal of Canada** (35): 283-298.

Mapara, S., Parries, S., Quarrington, C., Ahn, K. C, Gallin, W. J. and Goldberg, J. I. 2008. Identification, molecular structure and expression of two cloned serotonin receptors from the pond snail, *Helisoma trivolvis*. **Journal of Experimental Biology** (211) 900-910.

Matazzo, V., Gagné, F., Marin, M.G., Ricciardi, F., Blaise C., 2008. Vitellogenin as a biomarker of expose to estrogenic compounds in aquatic invertrebrates. A review. **Environment International** (34): 531-545.

Oehlmann, J., Schulte-Oehmann, U., Bachmann, J., Oetken, K., Lutz, I., Kloas, W. and Ternes, T.A. 2000. *Marisa conuarietis* (Gastropod: Prosobranchia) at environmentally relevant concentration. **Environmental Health Perspectives** 114 (1): 127-133.

Osada, M., Nakata A., Matsumoto T., and Mori, K. 1998. Pharmacological characterization of

serotonin receptor in the oocyte membrane of bivalve molluscs and its formation during oogenesis. **Journal of Experimental Zoology** (281) 124-131.

Staples, C.A., Dorn, P.B., Klecka, G.M., O'Block, S.T. and Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects, and exposures of bisphenol a. **Chemosphere** (10): 2149–2173.

Wang C. D. and Croll R. P. 2003. Effects of sex steroids on *in vitro* gamete release in the sea scallop, *Placopecten magellanicus*. **Invertebrate reproduction and development** (44): 89-100.

Yamamoto, T. and Yasuhara, A. (1999). Quantities of bisphenol A leached from plastic waste samples. **Chemosphere** (38): 2569-2576.