บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

ในปัจจุบันพบว่ามีการปนเปื้อนสารในกลุ่มเอสโตรเจน (E_2) ในแหล่งน้ำเพิ่มขึ้น (Duong et al., 2010) ซึ่งมีแหล่งที่มาทั้งจากแหล่งชุมชนและโรงงานอุตสาหกรรม เนื่องจากการเพิ่มขึ้นของจำนวนประชากรจึงทำให้มีการใช้สาร E_2 มากขึ้นตามไปด้วย ตัวอย่างเช่น การใช้ยาคุมกำเนิด ซึ่งมี E_2 เป็นองค์ประกอบหลักในการควบคุมจำนวนประชากร ในทางปศุสัตว์ใช้ E_2 เพื่อเปลี่ยนเพศของสัตว์ให้เป็นเพศเมีย หรือเหนี่ยวนำให้เป็นสัด และใช้คุมกำเนิดสัตว์จำพวกวัว ควาย และหมู หลังจากการได้รับการผสมพันธุ์แล้ว (Lucas & Jones, 2006) ในชีวิตประจำวันของมนุษย์โดยเฉพาะเพศหญิงจะมีการปลดปล่อยสาร E_2 ปริมาณ 3-20 µg/คน/วัน และในสัตว์เพศเมียจะมีการปลดปล่อย E_2ปริมาณ 5 µg/ตัว/วัน (Zhang , Zhou, & Ning, 2007) ดังนั้นสาร E_2 จึงมีโอกาสปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำอย่างแน่นอน โดยเฉพาะถ้าในแหล่งชุมชนนั้นมีระบบบำบัดน้ำเสียที่ไม่ได้มาตรฐาน โดยไม่ได้กำจัดสาร E_2 ออกจากน้ำเสียนั้น เมื่อน้ำที่ได้รับการบำบัดแล้วถูกปล่องลงแหล่งน้ำธรรมชาติ สิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นก็จะได้รับผลกระทบจาก E_2 ได้อีกด้วย และสุดท้ายผลกระทบก็จะส่งมายังประชากรในที่สุด

สำหรับในประเทศไทย Duong et al. (2010) ได้ทำการศึกษาปริมาณการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม Estrogenic chemicals และ estrogenicity ในบริเวณผิวน้ำของแม่น้ำแม่กลอง ในปี ค.ศ. 2008 พบว่าในประเทศไทยมีปริมาณ E_2 ปนเปื้อนที่ระดับความเข้มข้น 7.5±0.5 ng/L นอกจากนี้ยังมีการศึกษาจากแหล่งน้ำที่สำคัญในด้านการเกษตรกรรม แหล่งอุตสาหกรรมและแหล่งน้ำบริโภคในประเทศลาว กัมพูชา เวียดนาม จีน อินโดนีเซีย มาเลเซีย และเกาหลีใต้ตรวจพบว่ามีการปนเปื้อนของ E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 4.6±0.3, 8.9±0.8, 10.2±1.4, 9.5±1.3, 6.2±0.8, 2.3±0.1 และ 5.6±0.7 ng/L ตามลำดับ ซึ่งจากรายการการปนเปื้อนของสาร E_2 ในแหล่งน้ำของประเทศไทยถึงแม้ว่าจะพบในปริมาณน้อย แต่มีรายงานการวิจัยหลายรายงานที่ทำศึกษาพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสาร E_2 ในปริมาณน้อยนั้นสามารถส่งผลต่อระดับชีวโมเลกุลของสิ่งมีชีวิตได้ ดังเช่นในรายงานการวิจัยของ Hansen et al. (1998) พบว่า E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 1 ng/L มีผลชักนำการพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์ในปลาเทราท์เพศผู้ให้มีการเจริญเต็มที่ก่อนวัยอันควร นอกจากนี้ Canesi et al. (2007) ทำการศึกษาในหอยแมลงภู่ (*Mytilus galloprovincialis*) พบว่า E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 5 pmol มีผลชักนำระดับการแสดงออกของ metallothionein (MT20) เพิ่มมากขึ้น และทำให้ระดับการแสดงออกของยีน p53 ลดลง ซึ่งยีน p53 นั้นมีความสำคัญในการยับยั้งการเกิดมะเร็งของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ว่าเมื่อ E_2 มีการปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำแล้วนั้นจะส่งผลต่อการเกิดมะเร็งในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้นได้

นอกจากนี้ยังพบว่า E_2 มีผลกระทบต่อหอยหลายชนิด ดังที่ Matozzo and Marin (2008) ได้ทำการศึกษาในหอย clam (*Tapes philippinarum*) ในตัวเต็มวัยเพศเมียที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 50 ng/L เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีระดับการแสดงออกของ vitellogenin-like proteins เพิ่มมากขึ้น เช่นเดียวกับที่ Li, Osada, Suzuki, and Mori (1998) ได้ฉีดสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 5 mg/L เข้าไปในบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonads) ของหอยนางรม (*Crassostrea gigas*) เพศเมีย พบว่าโอโอไซต์มีขนาดเพิ่มขึ้นและมีระดับการแสดงออกของยีน vitellins (Vn) เพิ่มมากขึ้นเช่นกัน จากการศึกษาดังกล่าวจึงพบว่า E_2 มีผลทำให้ระบบสืบพันธุ์ของหอยเพศเมียมีความผิดปกติได้ ดังนั้นจึงส่งผลต่อระบบการสืบพันธุ์และการขยายพันธุ์ของหอยบางกลุ่มที่ได้รับผลกระทบจาก E_2 ที่มีประสิทธิภาพลดลง ทำให้ประชากรในหอยกลุ่มนั้นลดลงหรืออาจจะสูญพันธ์ไปในที่สุดได้

ในการสืบค้นเครื่องหมายเพื่อพัฒนาใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสาร E_2 ในครั้งนี้ได้เลือกหอยเจดีย์เป็นต้นแบบ เนื่องจากหอยเจดีย์เป็นหอยฝาเดียวที่มีขนาดเล็กเป็นสัตว์ประจำท้องถิ่น มีการแพร่กระจายในบริเวณชายฝั่งที่อยู่ระหว่างน้ำขึ้นน้ำลง ปากแม่น้ำ และแนวป่าชายเลน (Richard, 1984) จึงจัดว่าเป็นสิ่งมีชีวิตในลำดับแรก ๆ ที่ได้รับสัมผัสกับน้ำเสียที่ปล่อยสู่แหล่งน้ำ โดยเฉพาะการปนเปื้อนของสารใน estrogenic compound ที่ปนมากับน้ำเสีย และหอยเจดีย์มีปริมาณมากและกระจายตัวอยู่ทั่วไป ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ ดังนั้นหอยเจดีย์จึงเหมาะสมในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในปัจจุบันเทคนิคต่าง ๆ ที่ใช้ในการศึกษากับตัวบ่งชี้ทางชีวภาพมีด้วยกันหลากหลายวิธี ทั้งทางเคมี ชีวโมเลกุล เป็นต้น แต่พบว่าเทคนิคทางชีวโมเลกุลนั้นสามารถตรวจสอบได้ไวกว่า คือวัดในระดับ mRNA โดยการทำ transcription ก่อนที่จะแปลรหัสเป็นโปรตีน หรือการเปลี่ยนแปลงในระดับเนื้อเยื่อ ปัจจุบันมีการพัฒนาการตรวจวัดตัวบ่งชี้ทางชีวภาพโดยใช้เทคนิคทางชีวโมเลกุลมากมายหลายเทคนิค เช่น การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค microarray, Real-time PCR และเทคนิค SAGE (Serial Analysis of Gene Expression) ซึ่งเทคนิคดังกล่าวเป็นเทคนิคที่มีค่าใช้จ่ายสูงและขั้นตอนการวิเคราะห์ซับซ้อน ดังนั้นการศึกษาในระดับ mRNA ด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ในครั้งนี้จึงมีความเหมาะสมที่ใช้ในการค้นหาเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลเพราะเป็นวิธีที่สะดวก และมีค่าใช้จ่ายน้อยกว่าวิธีอื่น (สุรินทร์ ปิยะโชคณากุล, 2545) นอกจากนี้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนนั้นจะต้องขึ้นอยู่กับระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่สิ่งมีชีวิตได้รับสารนั้น ๆ ด้วย

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

การค้นหาเครื่องหมายทางชีวภาพด้วยเทคนิค cDNA-AFLP เพื่อคัดเลือกเครื่องหมายชีวโมเลกุลที่ตอบสนองในระดับ mRNA ในครั้งนี้คัดเลือกแถบดีเอ็นเอที่มีขนาดเท่ากับ 400 คู่เบส เมื่อวิเคราะห์ลำดับนิวคลีโอไทด์โดยเทียบเคียงกับฐานข้อมูล GenBank (ณ วันที่ 22 กุมภาพันธ์ พ.ศ. 2555) พบว่าลำดับนิวคลีโอไทด์ของหอยเจดีย์ยังไม่ปรากฏในฐานข้อมูลแต่อย่างใด จึงระบุได้เพียงว่ามีความเหมือนสูงสุดที่ 46% กับยีน transposase ของปู Marbled crab (*Pachygrapsus marmoratus)* GenBank accession no. CAJ76996 จึงเรียกเครื่องหมายดีเอ็นเอที่ใช้ในการตรวจสอบการบ่งชี้ครั้งนี้ว่า "217_AFLP" เมื่อนำไปทดสอบศักยภาพที่จะใช้ในเทคนิค semi-quantitative RT-PCR จำเป็นต้องออกแบบไพรเมอร์ใหม่ที่จำเพาะมากขึ้นที่สามารถนำไปใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร E_2 ในเบื้องต้นพบว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP ในหอยเจดีย์มีความเหมาะสม เนื่องจากพบว่า E_2 มีผลชักนำให้มีการแสดงออกของ 217_AFLP เพิ่มขึ้นที่เนื้อเยื่อเท้าและสมองของหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยได้ทั้งเพศผู้และเมีย สำหรับในเนื้อเยื่อส่วนเท้าพบว่าระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่ทดสอบสามารถตรวจวัดได้ด้วยเทคนิค semi-quantitative RT-PCR คือ 10 ng/L ที่ระยะเวลานาน 7 วัน ซึ่ง E_2 มีผลชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ของเพศเมีย (1.45±0.06) และเพศผู้ (1.27±0.18) แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่เป็นที่น่าสังเกตว่าเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร E_2 เป็นระยะเวลานานมากกว่า 7 วัน การแสดงออกของ 217_AFLP กลับลดลงแต่ยังคงมีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP แตกต่างจากกลุ่มควบคุมทั้งนี้อาจเนื่องมาจากหอยเจดีย์มีการปรับตัวให้เข้ากับกับสภาวะที่มี E_2 หรืออาจเกิดจาก E_2 ก่อให้เกิดการเสียหายต่อการทำงานภายในระดับเซลล์แล้วจึงส่งผลให้ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP จึงลดลง แต่เมื่อทำการตรวจวัดในเนื้อเยื่อสมองพบว่าที่ระดับความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถตรวจวัดได้คือ 10 ng/L เมื่อหอยเจดีย์ได้รับ E_2 ติดต่อกันนาน 14 วัน และระดับการแสดงออกของ 217_AFLP ในเพศผู้และเพศเมีย (1.10±0.07 และ 0.86±0.04) ไม่มีความแตกต่างทางสถิติ ($p>0.05$) ดังนั้นการประยุกต์ใช้เพื่อตรวจวัดการปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมควรเลือกใช้เนื้อเยื่อเท้ามาใช้ในการตรวจสอบได้ดีกว่าเนื้อเยื่อสมอง เนื่องจากเนื้อเยื่อเท้าเป็นอวัยวะส่วนแรกที่รับสัมผัสกับ สาร E_2 ได้ไว และจากการศึกษาพบว่าในเนื้อเยื่อเท้าใช้ระยะเวลาในการตรวจสอบที่เร็วกว่าในเนื้อเยื่อสมอง สำหรับเพศของหอยเจดีย์ที่นำมาใช้เพื่อตรวจวัดนั้นสามารถใช้เพศใดก็ได้ เนื่องจากในระยะเวลาและความเข้มข้นของ E_2 เดียวกันทั้งเพศผู้และเพศเมียสามารถชักนำการแสดงออกของ 217_AFLP ได้

สำหรับในหอยเจดีย์วัยอ่อนเมื่อได้รับสาร E_2 ที่ความเข้มข้น 10 ng/L เป็นระยะเวลา 3 วัน พบว่ามีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 1.15±0.10 และระดับความเข้มข้นต่ำที่สุดที่ทดสอบคือ 1 ng/L เมื่อได้รับสารเป็นระยะเวลานานขึ้น 14 วัน พบว่ามีระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เท่ากับ 2.19±0.16 แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ดังนั้น

หอยเจดีย์วัยอ่อนเหมาะกับการนำมาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร E_2 ได้เช่นเดียวกันกับหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยหรืออาจจะมีความไวกว่าหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยถ้ามีการทดสอบเพิ่มเติมกับหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยที่ระยะเวลา 3 วันและที่ความเข้มข้นของสาร E_2 เท่ากันที่ 10 ng/L

เครื่องหมาย 217_AFLP พบว่ามีความใกล้เคียงกับยีน transposase (46% identities; 32/70) ของปู Marbled crab (*Pachygrapsus marmoratus*) ณ เดือนมีนาคม 2555 ดังนั้นเครื่องหมายที่ทำการสืบค้นได้นั้นยังไม่สามารถระบุได้ว่าเป็นยีนชนิดใด เนื่องจากในฐานข้อมูล GenBank มีข้อมูลของหอยเจดีย์น้อยมาก ถ้ามีการศึกษาในระดับจีโนมมากขึ้นและบันทึกไว้ในฐานข้อมูล GenBank ก็จะสามารถระบุได้ transposase เป็นยีนที่ทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ transposase ช่วยในการตัดคัดลอกและแทรกสอดชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่สามารถเคลื่อนที่จากตำแหน่งเดิมในโครโมโซม และแทรกเข้าไปอยู่ในตำแหน่งใหม่ของโครโมโซมเดียวกันหรือต่างกันได้เมื่อมีความผิดปกติของเซลล์ เรียกกระบวนการนี้ว่า transposition (Carpentier et al., 2011) ดังที่ Siah et al. (2011) ได้ทำการศึกษาไว้ว่าเมื่อยีน transposase มีระดับการแสดงออกเพิ่มขึ้นจะส่งผลให้เกิดโรค "Disseminated Neoplasis" คือมีการทำงานของเซลล์ที่ผิดปกติ มีการแสดงปริมาณดีเอ็นที่สูงกว่าปกติและเกิดกระบวนการ ไมโตซิสมากกว่าเซลล์ปกติ จึงส่งผลให้เกิดเนื้องอกโดยศึกษาจากปริมาณของ tetraploid hemocytes ที่มีอยู่ในหอยกาบ soft-shell (*Mya arenaria*) และมีความเป็นไปได้ที่อาจจะส่งผลกระทบต่อสัตว์ชนิดอื่น ๆ และไปถึงมนุษย์ได้อีกด้วย

จากผลการศึกษาดังที่กล่าวมาจะเห็นได้ว่าเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP และหอยเจดีย์ทั้งตัวเต็มวัยและวัยอ่อนมีความเหมาะสมในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เพื่อนำมาตรวจสอบการปนเปื้อนของกลุ่มสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมทางน้ำนั้นได้

สรุปผลการวิจัย

ทำการคัดเลือกเครื่องหมายบ่งชี้ทางชีวภาพด้วยเทคนิค cDNA-AFLP ในเนื้อเยื่อส่วนเท้าของหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 สามารถคัดเลือกเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP เมื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน ด้วยเทคนิค semi-quantitative PCR ในหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L นานเป็นระยะเวลา 3 วัน และในหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/L นานเป็นระยะเวลา 7 วัน มีการชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เพิ่มขึ้น แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) และระดับความเข้มข้นของสาร E_2 ต่ำสุดที่ทำการทดสอบคือ 1 ng/L ในหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ได้รับสาร E_2 เป็นระยะเวลา 14 วัน พบว่ามีการชักนำให้ระดับการแสดงออกของ 217_AFLP เพิ่มขึ้น แตกต่างจาก

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

กลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p<0.05$) ดังนั้นเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งสำหรับใช้ติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร E_2 ในแหล่งน้ำได้

ข้อเสนอแนะ

1. ควรทำการศึกษาระดับแสดงออกของ 217_AFLP ในหอยเจดีย์วัยอ่อนที่ระยะเวลาน้อยกว่า 3 วัน และ/หรือทำร่วมกับเทคนิค real-time PCR เพราะเป็นวิธีที่สามารถตรวจสอบระดับการแสดงออกได้ไวกว่าเทคนิค semi-quantitative PCR

2. ควรทดสอบให้หอยเจดีย์ตัวเต็มวัยได้รับสาร E_2 ในระยะเวลาสั้นกว่า 7 วัน เพื่อดูระดับการแสดงออกของยีนที่อาจจะสามารถนำไปตรวจวัดได้เร็วกว่าระดับที่ทำการศึกษาครั้งนี้

3. ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมในด้านเนื้อเยื่อวิทยาเพื่อช่วยอธิบายถึงผลของสาร E_2 ต่อเนื้อเยื่อของหอยเจดีย์ได้

4. ควรใช้ยีนควบคุมที่มากกว่า 1 ชนิด เพื่อนำมาใช้ในการเปรียบเทียบการแสดงออกของ 217_AFLP

5. ควรมีการนำหอยเจดีย์ไปทดสอบประสิทธิภาพของเครื่องหมายดีเอ็นเอ 217_AFLP ที่ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพในแหล่งน้ำทิ้งที่คาดว่ามีการปนเปื้อนของ E_2

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University