

การใช้หอยแมลงภู (Perna viridis) เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพการปนเปื้อนของสาร Bisphenol A ใน  
บริเวณชายฝั่งทะเล

หยาดเพชร โอเจริญ

คุณฉันทิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาคุณฉันทิพนธ์  
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม  
คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา  
มิถุนายน 2561  
ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยบูรพา

คณะกรรมการควบคุมคุษฎีนิพนธ์และคณะกรรมการสอบคุษฎีนิพนธ์ ได้พิจารณา  
คุษฎีนิพนธ์ของ หยาดเพชร โอเจริญ ฉบับนี้แล้ว เห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรปรัชญาคุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพาได้

คณะกรรมการควบคุมคุษฎีนิพนธ์

..... อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุษณภักดิ์)  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร.ธนอมศักดิ์ บุษณภักดิ์)  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ดร.สมพร มุลมั่งมี)

คณะกรรมการสอบคุษฎีนิพนธ์

..... ประธาน  
(ศาสตราจารย์ ดร.สันศักดิ์ ศิริอนันต์ไพบูลย์)  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานันท์ บุษณภักดิ์)  
..... กรรมการ  
(ดร.ธนอมศักดิ์ บุษณภักดิ์)  
..... กรรมการ  
(ดร.สมพร มุลมั่งมี)  
..... กรรมการ  
(ดร.กาญจนา หริ่มเพ็ง)

คณะวิทยาศาสตร์อนุมัติให้รับคุษฎีนิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตาม  
หลักสูตรปรัชญาคุษฎีบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม ของมหาวิทยาลัยบูรพา

..... คณบดีคณะวิทยาศาสตร์  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เอกรัตน์ ศรีสุข)

วันที่ 13 เดือน สิงหาคม พ.ศ. 2561

## กิตติกรรมประกาศ

การทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาจากผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ชุตานุกติ อาจารย์ที่ปรึกษา ดร.ถนอมศักดิ์ บุญภักดี และดร.สมพร มุลมั่งมี ที่ให้โอกาสและกรุณาสละเวลาอันมีค่าเพื่อให้คำแนะนำ ตลอดจนเป็นที่ปรึกษาในการแก้ไขข้อบกพร่องต่าง ๆ ในการทำวิจัย เป็นกำลังใจ และเป็นแรงผลักดันให้ข้าพเจ้าได้มีแรงบันดาลใจจัดทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ให้มีความถูกต้องสมบูรณ์ทั้งในด้านเนื้อหาและองค์ความรู้ ข้าพเจ้ารู้สึกซาบซึ้งเป็นอย่างยิ่ง และขอขอบพระคุณท่านเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้

ขอกราบขอบพระคุณ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ที่สนับสนุนสถานที่ในการทำวิจัยแก่ข้าพเจ้าในครั้งนี้

ขอขอบพระคุณ คุณพ่อณัฐพงษ์ โอเจริญ คุณแม่ คุณจิตอารีย์ โอเจริญ ที่เป็นกำลังใจ พร้อมทั้งสนับสนุนส่งเสริมการศึกษามาสำเร็จการศึกษาด้วยดีตลอดมา

ขอขอบคุณ เพื่อน ๆ และน้อง ๆ ทั้งในห้องปฏิบัติการชีวโมเลกุล BS-3109 ทุกคนที่คอยให้คำแนะนำ และให้ความช่วยเหลือในการทำวิจัยและวิทยานิพนธ์ฉบับนี้

คุณค่าและประโยชน์ของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ ข้าพเจ้าขอมอบให้แทนกตัญญูกตเวทิตาแด่ บพการี คณาจารย์ และผู้มีพระคุณทุกท่านในอดีตและปัจจุบันที่ทำให้ข้าพเจ้าเป็นผู้มีการศึกษา และประสบความสำเร็จมาจนตราบเท่าทุกวันนี้

หยาดเพชร โอเจริญ

55810020: สาขาวิชา: วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม; ปร.ค.(วิทยาศาสตร์สิ่งแวดล้อม)

คำสำคัญ: 17 $\beta$ -estradiol/ Bisphenol A/ ตัวชี้วัดทางชีวภาพ/ หอยแมลงภู

หยาดเพชร โอเจริญ: การใช้หอยแมลงภู (*Perna viridis*) เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพต่อสาร Bisphenol A ในบริเวณชายฝั่งทะเล (THE USE OF GREEN MUSSELS (*Perna viridis*) AS A BIOMARKER FOR BISPENOL A IN COASTAL AREA) คณะกรรมการควบคุมคุณภาพน้ำ:  
ชุตตา บุญภักดี, Ph.D., ถนอมศักดิ์ บุญภักดี, D.Agr.Sc., สมพร มุลมั่งมี, Ph.D. 111 หน้า. ปี พ.ศ. 2561.

Bisphenol A (BPA) และ 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) เป็นสารในกลุ่มรบกวนการทำงานของต่อมไร้ท่อ (endocrine disrupting chemicals; EDCs) ที่มีผลต่อกระบวนการเมแทบอลิซึมและระบบสืบพันธุ์ของสัตว์ งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA และ E<sub>2</sub> ในแหล่งน้ำรวมทั้งหอยแมลงภู (*Perna viridis*) ที่เลี้ยงในฟาร์มใกล้เขตอุตสาหกรรมและชุมชนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก จังหวัดชลบุรี จังหวัดระยอง และจังหวัดตราด ระหว่างเดือนธันวาคม ปี พ.ศ. 2559-มกราคม ปี พ.ศ. 2560 ผลการวิเคราะห์ตัวอย่างน้ำจืดที่เก็บมาจากคลองชากหมากซึ่งเป็นพื้นที่รองรับน้ำเสียจากโรงงานอุตสาหกรรมมาตาพุด จังหวัดระยองพบสาร BPA ในปริมาณสูงสุดเท่ากับ 50.7 ng/L และในน้ำทะเลที่เก็บมาจากหาดวอนภาจังหวัดชลบุรีซึ่งใกล้เขตชุมชนเทศบาลเมือง ตำบลแสนสุข มีค่าเท่ากับ 37.13 $\pm$ 2.70 ng/L ส่วนสาร E<sub>2</sub> พบปนเปื้อนสูงสุดเท่ากับ 62.99 $\pm$ 5.03 ng/L ที่คลองสังเขป จังหวัดชลบุรี ซึ่งเป็นลำน้ำไหลผ่านชุมชนเมือง และพบปริมาณสาร BPA และ E<sub>2</sub> ปนเปื้อนสูงสุดในตัวอย่างหอยแมลงภูตัวเต็มวัยที่เก็บมาจากฟาร์มในพื้นที่ใกล้เขตอุตสาหกรรมมาตาพุดจังหวัดระยองโดยมีค่าเท่ากับ (mean $\pm$ SD) 109.97 $\pm$ 14.80 ng/L และ 152.80 $\pm$ 18 ng/L ตามลำดับโดยพบการสะสมของสารทั้งสองในหอยแมลงภูตัวเต็มวัยมากกว่าวัยอ่อนแตกต่างกันมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) เมื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน *cytochrome P450 4 family (cyp4)* และยีน *vitellogenin (vtg)* ในหอยแมลงภูด้วยเทคนิค Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (biomarker) โดยให้หอยแมลงภูวัยอ่อนได้รับสัมผัสสาร BPA ด้วยวิธีการแช่ที่ความเข้มข้น 100 ng/L เป็นระยะเวลา 0 (กลุ่มควบคุม), 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงพบว่าหอยแมลงภูมีระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และยีน *vtg* สูงสุดเท่ากับ 35.47 $\pm$ 0.77 และ 7.89 $\pm$ 0.71 ตามลำดับที่เวลา 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุม (1.0 $\pm$ 0.3 และ 1.0 $\pm$ 0.1ตามลำดับ) เมื่อทดสอบให้หอยแมลงภูได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10ng/L เป็นเวลานาน 0 (กลุ่มควบคุม), 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมงพบว่าระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และยีน *vtg* สูงสุดที่ได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> นาน 12 ชั่วโมง เท่ากับ 2.87 $\pm$ 0.11 และ 130.16 $\pm$ 4.80

ตามลำดับแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $1.0 \pm 0.21$  และ  $1.0 \pm 0.19$  ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และเมื่อหอยแมลงภู่ได้รับสัมผัสสาร BPA+E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาเท่ากับที่ทดสอบการได้รับสารแยกชนิด พบว่าสาร BPA+E<sub>2</sub> มีผลยับยั้งระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* โดยมีค่าลดลงต่ำสุด ( $0.04 \pm 0.01$ ) ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $1 \pm 0.21$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) และทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *vtg* ลดลงต่ำสุด ( $0.02 \pm 0.01$ ) ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมงเช่นกัน การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าแหล่งที่มาหลักของการปนเปื้อนสาร BPA และ E<sub>2</sub> ในสิ่งแวดล้อมบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยมาจากโรงงานอุตสาหกรรมและแหล่งหลักของ E<sub>2</sub> มาจากแหล่งชุมชน

55810020: MAJOR: ENVIRONMENTAL SCIENCE; Ph. D. (ENVIRONMENTAL SCIENCE)

KEYWORD: 17 $\beta$ -ESTRADIOL/ BIOMARKER/ BISPHENOL A/ GREEN MUSSEL

YHARDPETH OCHAROEN: THE USE OF GREEN MUSSELS (*Perna viridis*) AS A BIOMARKER FOR BISPHENOL A IN COASTAL AREA. ADVISORY COMITEE: CHUTA BOONPHAKDEE, Ph.D., THANOMSAK BOONPHAKDEE, D.Agr.Sc., SOMPORN MOONMANGMEE, Ph.D. 111 P. 2018.

BisphenolA (BPA) and 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) are endocrine disrupting chemicals (EDCs), which affect animal metabolism and reproductive system. The aim of this work was to quantify BPA and E<sub>2</sub> in coastal water and cultured green mussel (*Perna viridis*) collected from the farms located near industrial and urban areas of the eastern coast of Thailand (Chonburi, Rayong and Trat provinces) during December 2016 to January 2017. The result of BPA analysis of freshwater collected from Charkmak canal, Rayong Province where supply wastewater from Mapthaphut industrial estate was highest at 50.7 ng/L and seawater collected from Wonapha beach where located near Saeansook municipal area, Chonburi Province was highest at 37.13  $\pm$  2.70 ng/L. The highest level of E<sub>2</sub> was found at Sankheap canal sampling site near urban areas (62.99 $\pm$ 5.03 ng/L) in Chonburi Province. The highest BPA and E<sub>2</sub> was found in mature green mussels collected near Charkmak canal Rayong Province which was 109.97 $\pm$ 14.80 (mean $\pm$ SE) and E<sub>2</sub> was found at 152.8 $\pm$ 14.80 (mean $\pm$ SE) ng/g and significantly different ( $p < 0.05$ ) compared to the tested juvenile bivalves. Furthermore, *cytochrome P450 4 family (cyp4)* and vitellogenin (*vtg*) gene expression levels of those exposed juvenile animals were investigated by Reverse transcription quantitative real-time PCR (RT-qPCR) to use as biomarker of BPA and E<sub>2</sub> contamination. The mussels exposed to BPA at concentration of 100 ng/L for 0 (control), 12, 24, 36 and 48 hours were examined. The results showed that the highest level of *cyp4* and *vtg* gene expressions at 48 hours were 35.47 $\pm$ 0.77 and 7.89 $\pm$ 0.71 significantly different ( $p < 0.05$ ), compared to the control groups (1.0 $\pm$ 0.3 and 1.0 $\pm$ 0.1, respectively). The mussels exposed to E<sub>2</sub> at concentration of 10 ng/L for 0 (control), 12, 24, 36 and 48 hours were also investigated. The highest expression of *cyp4* and *vtg* genes at 12 hours were 2.87 $\pm$ 0.11 and 130.16 $\pm$ 4.80, respectively and significantly different ( $p < 0.05$ ) from the control groups (1.0 $\pm$ 0.21 and 1.0 $\pm$ 0.19, respectively). Furthermore, the mussels exposed to the BPA+E<sub>2</sub> mixture at the same concentrations and time intervals as those of the separate chemicals exposure were examined. The BPA+E<sub>2</sub> mixture highly repressed

the expression levels of the *cyp4* ( $0.04\pm 0.01$ ) and *vtg* ( $1\pm 0.21$ ) genes at 12 hours exposure, significantly different ( $p < 0.05$ ) from the exposed control mussels. This study demonstrated that both industrial and domestic wastewater might be important sources of BPA, but domestic waste is a major source for E<sub>2</sub> contamination in the eastern coast of Thailand.

## สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฐ
บทที่	
1 บทนำ.....	1
ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์งานวิจัย.....	3
สมมติฐานงานวิจัย.....	3
ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
ขอบเขตงานวิจัย.....	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
สารรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting Chemicals; EDCs).....	5
สาร BisphenolA (BPA).....	7
สาร 17 $\beta$ -estradiol (E <sub>2</sub> ).....	15
วิธีการตรวจสอบสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> ในสิ่งแวดล้อม.....	22
ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarkers).....	28
หอยแมลงภู่.....	30
3 วิธีดำเนินงานวิจัย.....	32
วัสดุและอุปกรณ์.....	32
สารเคมี.....	33
การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำและ หอยแมลงภู่.....	34
ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่.....	43
การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน.....	44



## สารบัญ (ต่อ)

บทที่

4 ผลการวิจัย.....	51
การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำและหอยแมลงภู่	51
ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่.....	57
การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน.....	59
ผลของสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> และผลของสารผสม BPA+E <sub>2</sub> ที่มีต่อระดับการ แสดงออกของยีน <i>cyp4</i> และ <i>vtg</i> .....	64
5 อภิปรายและสรุปผล.....	69
การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำทะเลน้ำจืดและ หอยแมลงภู่ในจังหวัดชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก.....	69
ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่.....	72
การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน.....	73
สรุปผลการวิจัย.....	77
ข้อเสนอแนะ.....	78
บรรณานุกรม.....	79
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก.....	100
ภาคผนวก ข.....	104
ประวัติย่อของผู้วิจัย.....	111

## สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
2-1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร BPA.....	8
2-2 ระดับชั้นความเป็นพิษในสัตว์น้ำ.....	10
2-3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ในสัตว์น้ำ.....	11
2-4 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในแหล่งน้ำจืด.....	13
2-5 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในชายฝั่งทะเล.....	14
2-6 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในสัตว์น้ำ.....	15
2-7 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน ( $E_2$ ).....	16
2-8 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร $E_2$ ในสัตว์น้ำ.....	19
2-9 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร $E_2$ ในแหล่งน้ำจืด.....	21
2-10 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร $E_2$ ในชายฝั่งทะเล.....	21
3-1 รายละเอียดพิภักจุดเก็บตัวอย่างและคุณภาพน้ำในแต่ละสถานี.....	36
3-2 สภาวะของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร $E_2$ .....	40
3-3 โปรแกรมที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-qPCR.....	45
3-4 ส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-qPCR.....	46
4-1 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) ของ สารมาตรฐาน BPA และ $E_2$ .....	53
4-2 ค่าร้อยละของการคืนกลับ และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสาร BPA และสาร $E_2$ .....	53
4-3 ปริมาณสาร BPA และสาร $E_2$ ที่ตรวจพบในแหล่งน้ำ.....	54
4-4 ปริมาณสาร BPA และสาร $E_2$ ที่ตรวจพบจากตัวอย่างน้ำทะเล.....	55
4-5 ค่า $LC_{10}$ , $LC_{50}$ และ $LC_{90}$ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % ของสาร BPA ในหอยแมลงภู่.....	58
4-6 ค่า $R^2$ ของกราฟมาตรฐานและ PCR efficiency (%E).....	61
ข-1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>vtg</i> เมื่อ หอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	105

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
ข-2 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>vtg</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD.....	105
ข-3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>vtg</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ E <sub>2</sub> (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	106
ข-4 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>vtg</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ E <sub>2</sub> (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD.....	106
ข-5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>vtg</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA+E <sub>2</sub> (100+10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	107
ข-6 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>vtg</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA+E <sub>2</sub> (100+10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD.....	107
ข-7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	108
ข-8 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD.....	108
ข-9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ E <sub>2</sub> (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	109

## สารบัญตาราง (ต่อ)

ตารางที่	หน้า
<p>ข-10 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ E<sub>2</sub> (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD.....</p>	109
<p>ข-11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA+ E<sub>2</sub> (100+10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....</p>	110
<p>ข-12 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA (100+10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD.....</p>	110

## สารบัญญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 กลไกการทำงานของฮอร์โมนและสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อผ่านตัวรับสัญญาณภายในเซลล์.....	6
2-2 กลไกการทำงานของสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อในมนุษย์.....	7
2-3 โครงสร้างทางเคมีของสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> .....	9
2-4 ความสามารถในการจับกับตัวรับสัญญาณชนิดต่าง ๆ ของสาร BPA ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง.....	9
2-5 โครงสร้างทางเคมีของฮอร์โมนเอสโตรเจน (E <sub>1</sub> , E <sub>2</sub> และ E <sub>3</sub> ).....	16
2-6 กลไกการสังเคราะห์ E <sub>2</sub> ในปลา.....	17
2-7 กลไกการสังเคราะห์ E <sub>2</sub> ในหอยสองฝา.....	17
2-8 กลไกแบบผ่านยีน (genomic pathway) และกลไกแบบไม่ผ่านยีน (non-genomic pathway) ของสาร E <sub>2</sub> .....	18
2-9 วิธีการตรวจสอบสาร EDCs ในสิ่งแวดล้อม.....	22
2-10 การเข้าจับ DNA สายคู่ของ SYBR-Green ในปฏิกิริยา RT-qPCR.....	25
2-11 วงจรชีวิตของหอยแมลงภู่.....	31
3-1 แผนที่สถานีเก็บตัวอย่างน้ำทะเล น้ำจืด (ลำคลอง/แม่น้ำ) และหอยแมลงภู่บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก.....	37
3-2 ขั้นตอนการสกัดสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> ด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction (SPE)).....	39
3-3 แผนการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่.....	44
3-4 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร BPA ต่อระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงในหอยแมลงภู่.....	47
4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลาย BPA และ E <sub>2</sub> .....	52
4-2 โคโรมาโตรแกรมของสารละลายมาตรฐาน BPA, E <sub>2</sub> และสารละลายมาตรฐาน BPA+ E <sub>2</sub> .....	52
4-3 ปริมาณสาร BPA และสาร E <sub>2</sub> ในตัวอย่างหอยแมลงภู่.....	56
4-4 ความสัมพันธ์ของการตอบสนองกับปริมาณพิษที่ได้รับ (Dose-response relationships) ของหอยแมลงภู่ที่ได้รับ BPA ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง.....	58

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-5 ผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-qPCR.....	59
4-6 ผลการวิเคราะห์ค่า Melting temperature ( $T_m$ ) ของยีนที่ศึกษา.....	60
4-7 โปรแกรม Normfinder วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแปรปรวน (stability value; SV) ของยีนอ้างอิงที่ศึกษาคือ ยีน 28S <i>rRNA</i> , 18S <i>rRNA</i> และ $\beta$ - <i>actin</i> .....	62
4-8 โปรแกรม BestKeeper วิเคราะห์เปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของยีนอ้างอิงที่ศึกษาคือ ยีน 28S <i>rRNA</i> , 18S <i>rRNA</i> และ $\beta$ - <i>actin</i> .....	62
4-9 วิธี $\Delta C_t$ วิเคราะห์เปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของยีน อ้างอิงที่ศึกษา คือ ยีน 28S <i>rRNA</i> , 18S <i>rRNA</i> และ $\beta$ - <i>actin</i> .....	63
4-10 การแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 28S <i>rRNA</i> , 18S <i>rRNA</i> และ $\beta$ - <i>actin</i> ของหอยแมลงภู่ที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 10 ng/g dw เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง.....	63
4-11 การแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S <i>rRNA</i> ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/L เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	65
4-12 การแสดงออกของยีน <i>vfg</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S <i>rRNA</i> ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/L เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	66
4-13 การแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S <i>rRNA</i> ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร $E_2$ ความเข้มข้น 0 และ 10 ng/L เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	66
4-14 การแสดงออกของยีน <i>vfg</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S <i>rRNA</i> ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร $E_2$ ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/L เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	67
4-15 การแสดงออกของยีน <i>cyp4</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S <i>rRNA</i> ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA+ $E_2$ ความเข้มข้น 0 และ 100+10 ng/L เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	67

## สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
4-16 การแสดงออกของยีน <i>vfg</i> เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S <i>rRNA</i> ของหอยแมลงภู่วัยอ่อน ที่ได้รับสารผสม BPA+E <sub>2</sub> ความเข้มข้น 0 และ 100+10 ng/L เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง.....	68

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ชายฝั่งทะเลเป็นพื้นที่เสี่ยงด้านมลพิษเนื่องจากเป็นพื้นที่รองรับของเสียและมลสารจากพื้นที่การเกษตร โรงงานอุตสาหกรรม รวมถึงแหล่งชุมชน ของเสียและมลสารที่พบในน้ำทิ้ง เช่น สาร bisphenol A (BPA) เป็นส่วนประกอบสำคัญของพลาสติกพอลีคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน ดังนั้นน้ำทิ้งจาก โรงงานอุตสาหกรรม และขยะพลาสติกเหล่านี้เมื่อย่อยสลายในธรรมชาติ ทำให้สาร BPA ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำผิวดินและชายฝั่งทะเล (Fromme et al., 2002) สาร BPA ถูกจัดอยู่ในกลุ่มสารรบกวนฮอร์โมนเอสโตรเจน (Endocrine disrupting chemicals; EDCs) เช่นเดียวกับสาร 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) ที่รบกวนการทำงานของระบบฮอร์โมนต่อมไร้ท่อ เลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งเป็นฮอร์โมนที่ร่างกายผลิตขึ้นได้เองตามธรรมชาติทำให้มีผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ในมนุษย์และสัตว์จนเกิดการเปลี่ยนแปลงและมีความผิดปกติได้ (Flint, Markle, Thompson, & Wallace, 2012)

เมื่อสาร BPA หรือสาร E<sub>2</sub> เข้าสู่ภายในร่างกายของสัตว์ จะถูกเปลี่ยนโครงสร้างทางเคมีโดยเอนไซม์ cytochrome P450 (CYP) ซึ่งควบคุมการสังเคราะห์โดยยีน *cyp* เอนไซม์นี้สำคัญในกระบวนการเมแทบอลิซึมที่พบมากในตับเพื่อกำจัดสารแปลกปลอมออกจากร่างกาย (Nebert & Dalton, 2006) โดยพบว่าสาร BPA ส่งผลต่อการชักนำหรือยับยั้งการสร้างเอนไซม์ CYP หรือโปรตีน CYP หลายชนิด (Niwa et al., 2001; Zhang et al., 2011) จึงมีการประยุกต์ใช้เอนไซม์และยีน *cyp* เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร EDCs ในแหล่งน้ำ นอกจากนี้สาร BPA ยังส่งผลต่อระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตของปลากระดูกแข็ง (Sohoni et al., 2001) และพบว่าสามารถชักนำการสังเคราะห์โปรตีนและยีนไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; VTG) ซึ่งเป็นโปรตีนตั้งต้นของโปรตีนไข่แดง (yolk) ของตัวอ่อน โปรตีน VTG จะมีการสังเคราะห์ในสัตว์เพศเมียวัยเจริญพันธุ์เท่านั้นแต่ไม่พบในสัตว์น้ำเพศผู้และสัตว์น้ำวัยอ่อน (Mills et al., 2003) อย่างไรก็ตามเมื่อได้รับสาร EDCs เช่น สาร BPA ชักนำให้สัตว์น้ำเพศผู้และสัตว์น้ำวัยอ่อนสังเคราะห์โปรตีน VTG ได้ (Park et al., 2003; Virk, Al-Sakran, & Elobeid, 2014) ทำให้ปลาเปลี่ยนเพศ (Kang et al., 2002) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวส่งผลกระทบต่อระดับโครงสร้างของประชากรได้ในอนาคต (Crain et al., 2007)



รายงานคุณภาพน้ำในประเทศต่าง ๆ พบว่าสาร BPA มีแนวโน้มปนเปื้อนสูงมากในแหล่งน้ำบริเวณที่อยู่ใกล้เขตที่มีโรงงานอุตสาหกรรมหรือชุมชนหนาแน่นมากกว่าในบริเวณที่ไม่มีโรงงานอุตสาหกรรมหรือนอกเขตชุมชน (Kassotis et al., 2015) นอกจากนี้รายงานการสำรวจคุณภาพน้ำที่บริเวณใกล้โรงบำบัดน้ำเสียรอบเขตกรุงเทพมหานครพบสาร BPA ปนเปื้อนเฉลี่ยสูงกว่า 100 ng/l (Pookpoosa, Jindal, Morknoy, & Tantrakarnapa, 2014) และยังพบสาร BPA สะสมอยู่ในสิ่งมีชีวิต เช่น หอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจ มีแหล่งเพาะเลี้ยงหลักในพื้นที่ชายฝั่งทะเล หอยแมลงภู่จึงถูกใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของสารหลายชนิด (Isobe et al., 2007) และแม้ว่าปริมาณสาร BPA ที่สะสมในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่จะไม่มากนัก แต่อย่างไรก็ตามสาร BPA สามารถสะสมในร่างกายของสิ่งมีชีวิตและเพิ่มมากขึ้นตามลำดับชั้นของโซ่อาหารซึ่งส่งผลกระทบต่อผู้บริโภคลำดับสุดท้ายคือมนุษย์ได้ (Staniszewska et al., 2014)

ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีวิธีการตรวจวัดการปนเปื้อนในแหล่งน้ำเพื่อเป็นการเฝ้าระวังผลกระทบที่มีทั้งวิธีตรวจสอบสารโดยตรงจากสิ่งแวดล้อม (Asimakopoulos, Thomaidis, & Koupparis, 2012) และการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพซึ่งสามารถบ่งชี้ถึงผลกระทบของสาร BPA ภายในร่างกายของสัตว์ได้ และสามารถตรวจวัดได้หลายระดับตั้งแต่ระดับสูงในระบบนิเวศ จนถึงระดับต้น เช่น ระดับยีน หรือ messenger RNA ในเซลล์ซึ่งจะเกิดขึ้นก่อนการแปลรหัสเป็นโปรตีน (Walker, Sibly, Hopkin, & Peakall, 2005) โดยสามารถวัดได้อย่างรวดเร็วด้วยเทคนิค Reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR) (Bustin et al., 2009) ทั้งวัดแบบโดยตรง (absolute quantification) หรือการวัดแบบปริมาณสัมพัทธ์ (relative quantification) ซึ่งวิธีหลังจำเป็นต้องใช้ยีนอ้างอิง (reference gene) ที่มีระดับการแสดงออกคงที่ ( $\beta$ -actin, 18S rRNA และ 28S rRNA) มาวิเคราะห์เปรียบเทียบ (Kozera & Rapacz, 2013) แต่เนื่องจากการแสดงออกของยีนขึ้นอยู่กับหลายปัจจัย ทั้งปัจจัยสิ่งแวดล้อม เช่น ชนิดของสารเคมี ระยะเวลาและเส้นทางที่ได้รับสัมผัส รวมถึงปัจจัยภายใน เช่น ชนิด อายุ และเพศของสัตว์ เป็นต้น (Nicot, Hausman, Hoffmann, & Evers, 2005; Vandesompele et al., 2002) ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงจำเป็นต้องมีการทดสอบยืนยัน (validation) ความเหมาะสมของยีนอ้างอิงที่จะถูกเลือกใช้ในปฏิกิริยา RT-qPCR ว่าเป็นยีนชนิดใดอีกด้วย

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมีจุดประสงค์ที่จะใช้ยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพของสาร BPA โดยขั้นตอนแรกทำการวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่อาจพบปนเปื้อนในแหล่งเดียวกันในแหล่งน้ำธรรมชาติรวมถึงพื้นที่ใกล้เขตอุตสาหกรรมและฟาร์มเลี้ยงหอยแมลงภู่ในพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย คือ จังหวัดระยอง จังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราด ซึ่งค่าความเข้มข้นของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่พบจะถูกนำมาใช้เพื่อทดสอบกับหอยแมลงภู่ที่ได้รับสัมผัสสารในระดับห้องปฏิบัติการ โดยศึกษาความเป็นพิษ

เทียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่ และวัดผลการตอบสนองในระดับการแสดงออกของยีน (*cyp4* และ *vtg*) ซึ่งการทดลองขั้นที่สองนี้ใช้หอยแมลงภู่วัยอ่อนให้ได้รับสัมผัสสาร BPA และสาร  $E_2$  แยกทดสอบ โดยวิธีแช่ที่ความเข้มข้นระดับสูงสุดที่พบในแหล่งน้ำข้างต้น แต่มีช่วงเวลาที่ได้รับสัมผัสสารนาน 5 ช่วงเวลา (0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง) รวมถึงให้หอยแมลงภู่ได้รับสัมผัสสารผสม BPA+ $E_2$  ด้วยเพื่อยืนยันผลและพัฒนาใช้ยีน *cyp4* และ *vtg* และหอยแมลงภู่วัยอ่อนบ่งชี้ถึงการมีสาร BPA และสาร  $E_2$  ปนเปื้อนในบริเวณชายฝั่งทะเลต่อไปได้ในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์งานวิจัย

1.2.1 เพื่อหาปริมาณสาร BPA และสาร  $E_2$  ในแหล่งน้ำและในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย จังหวัดระยอง จังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราด

1.2.2 เพื่อหาค่าความเป็นพิษเทียบพลันของสาร BPA ในหอยแมลงภู่

1.2.3 เพื่อศึกษาผลของสาร BPA สาร  $E_2$  และสารผสมของ BPA+ $E_2$  ต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่ที่ได้รับสัมผัสสารดังกล่าวด้วยวิธีแช่

## 1.3 สมมติฐานงานวิจัย

1.3.1 พบความเข้มข้นของสาร BPA ระดับสูงในแหล่งน้ำและในตัวอย่างของหอยแมลงภู่ที่เก็บมาจากแหล่งพื้นที่ใกล้เขตอุตสาหกรรม ส่วนสาร  $E_2$  พบความเข้มข้นสูงในแหล่งน้ำและในตัวอย่างของหอยแมลงภู่ที่เก็บมาจากแหล่งพื้นที่ใกล้เขตชุมชน

1.3.2 ค่าความเป็นพิษเทียบพลันของสาร BPA ต่ำสุดเมื่อหอยแมลงภู่ได้รับสัมผัสสาร BPA เป็นระยะเวลาสั้นที่สุดของช่วงเวลาที่ทดสอบ (96 ชั่วโมง)

1.3.3 สาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/l มีผลชกนาระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสาร BPA

1.3.4 สาร  $E_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l มีผลชกนาระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสาร  $E_2$

1.3.5 สารผสมของ BPA+ $E_2$  มีผลชกนาระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่เพิ่มสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ได้รับสัมผัสสาร BPA หรือสาร  $E_2$  แยกทดสอบ

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.4.1 ทราบถึงปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในแหล่งน้ำและในตัวอย่าง หอยแมลงภู่ที่เก็บจากพื้นที่ชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

1.4.2 ทราบถึงความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC<sub>50</sub>) ของสาร BPA ในหอยแมลงภู่

1.4.3 ทราบถึงผลของสาร BPA สาร E<sub>2</sub> และสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ที่มีต่อระดับการ แสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่

1.4.4 สามารถประยุกต์ใช้ยีนที่ควบคุมการสังเคราะห์ CYP4 และ VTG เป็นดัชนีชี้วัดการ ปนเปื้อนของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ได้

## 1.5 ขอบเขตงานวิจัย

### 1.5.1 วิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่ปนเปื้อนในน้ำและหอยแมลงภู่

ทำการเก็บตัวอย่างน้ำ และหอยแมลงภู่ที่เลี้ยงในฟาร์มจากจังหวัดระยอง จังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราด รวมทั้งหมด 7 สถานีแล้วนำตัวอย่างมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC)

### 1.5.2 ทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของ BPA ในหอยแมลงภู่

ใช้หอยแมลงภู่วัยอ่อนอายุประมาณ 2-3 เดือน น้ำหนักเฉลี่ย 1.7±0.7 กรัม จากฟาร์มเลี้ยง อำเภอกลองใหญ่ จังหวัดตราดจำนวนทั้งหมด 150 ตัว เป็นตัวอย่างอ้างอิงนำมาทดสอบให้ได้รับ สัมผัสสาร BPA ด้วยวิธีการแช่ ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 50 mg/l เป็นระยะเวลา 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกอัตราการตายของหอยแมลงภู่แล้ววิเคราะห์ค่าความเป็นพิษเฉียบพลัน (LC<sub>50</sub>) ด้วยวิธี probit analysis

### 1.5.3 ศึกษาผลของสาร BPA สาร E<sub>2</sub> และสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ที่มีต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในหอยแมลงภู่

ใช้หอยแมลงภู่วัยอ่อนที่มาจากแหล่งเดียวกับการทดสอบข้อ 1.5.2 จำนวน 240 ตัว แยก ทดสอบให้ได้รับสัมผัสสาร BPA ด้วยวิธีแช่ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/l และสาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความ เข้มข้น 10 ng/l และสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้นเดียวกัน (100+10 ng/l) เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสารที่เวลาเดียวกัน จากนั้น วัดระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* ในเนื้อเยื่อ hepatopancreas ของหอยแมลงภู่ด้วย เทคนิค RT-qPCR แล้ววิเคราะห์เปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ทดสอบด้วยวิธี one way-ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) แล้วนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างของ ค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม (Post hoc) ด้วยวิธี Tukey's HSD

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 สารรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ (Endocrine disrupting Chemicals; EDCs)

สารรบกวนการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อ หรือ Endocrine Disrupting Chemicals; EDCs เป็นกลุ่มสารที่ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนซึ่งผลิตโดยต่อมไร้ท่อ (endocrine gland) ทำให้ระบบหรืออวัยวะต่าง ๆ ในร่างกายที่ทำงานภายใต้การควบคุมของฮอร์โมนเกิดความผิดปกติ โดยเริ่มแรกสาร EDCs ถูกให้คำจำกัดความว่าเป็นกลุ่มสารที่ส่งผลกระทบต่อระบบสืบพันธุ์ และเกี่ยวข้องกับฮอร์โมนเอสโตรเจน (estrogen hormone) แต่ในปัจจุบันสารกลุ่มนี้ถูกให้คำจำกัดความครอบคลุมถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นกับฮอร์โมนที่ผลิตจากระบบต่อมไร้ท่อทั้งหมด (Diamanti-Kandarakis et al., 2009; Kanno et al., 2000) โดยองค์กร Institute of Environmental and Health (IEH) ได้แบ่งเป็น 6 กลุ่ม

ตามประเภทของการใช้งาน (Institute of Environment and Health, 2005) ได้แก่

- 1) กลุ่มสารเคมีสังเคราะห์ (Anthropogenic) เป็นกลุ่มสารที่ถูกสังเคราะห์ขึ้น ใช้ในกระบวนการอุตสาหกรรมส่วนใหญ่ เช่น สารประกอบฟีนอลรวมถึงสาร BPA
- 2) สารกลุ่มชีวฆาต (biocide) เป็นกลุ่มสารเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิต เช่น สาร Glyphosate, สาร Organocholine, สาร Organophosphate เป็นต้น
- 3) กลุ่มผลิตภัณฑ์ที่ได้จากสิ่งมีชีวิตหรือกระบวนการทางชีวภาพ (biogenic) เป็นกลุ่มสารฮอร์โมน เช่น สาร E<sub>2</sub>, Testosterone เป็นต้น
- 4) กลุ่มสารอนินทรีย์ หรือ โลหะ (Inorganic/Organo-metalic substance) เป็นกลุ่มสารโลหะหนัก เช่น ปรอท แคดเมียม เป็นต้น
- 5) กลุ่มสารทางเภสัชกรรม (pharmaceutical) เป็นกลุ่มที่ใช้เป็นยา เช่น ฮอร์โมนสังเคราะห์ Ethinyl-oestradiol (EE<sub>2</sub>) เป็นต้น
- 6) สารกลุ่มผลิตภัณฑ์บริโภค (Consumer product) เป็นกลุ่มสารเคมีที่ใช้ในเครื่องสำอาง เช่น Homosalate เป็นต้น

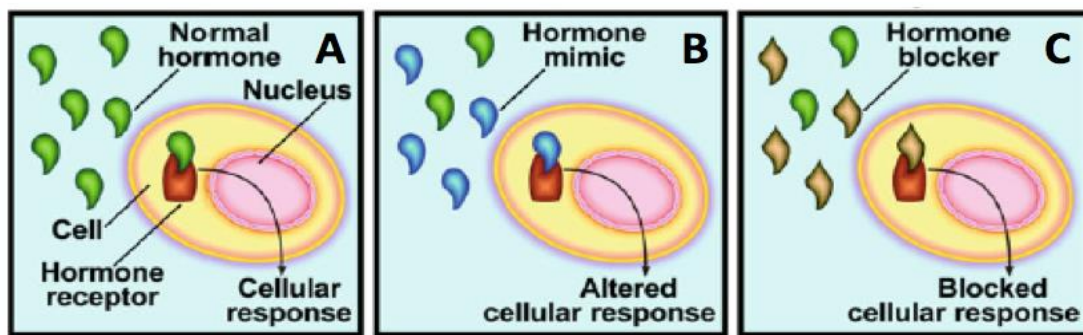
เมื่อสาร EDCs เข้าสู่ร่างกายของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมถึงมนุษย์ จะเข้าสู่กระแสเลือด และเข้าสู่เซลล์เป้าหมายในที่สุด โดยมีกลไกเลียนแบบหรือขัดขวางการทำงานของฮอร์โมน

เอสโตรเจน โดยสาร EDCs จับเข้ากับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนเอสโตรเจน (nuclear estrogen receptor; ER) ภายในนิวเคลียสเกิดเป็นสารประกอบเชิงซ้อนของเอสโตรเจนกับตัวรับสัญญาณ (estrogen receptor complex) จากนั้นจะรวมเป็นไดเมอร์ของสารประกอบเชิงซ้อนกับตัวรับสัญญาณ (estrogen receptor dimer) แล้วเข้าจับกับบริเวณ โพรโมเตอร์ของยีนที่สังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์หรือยับยั้งการสังเคราะห์ฮอร์โมนเพศ (ภาพที่ 2-1) โดยกลไกการออกฤทธิ์ของสาร EDCs มี 3 แบบตามรายงานของ Scsukova, Rollerova, and Mlynarcikova (2016) แสดงรายละเอียดดังภาพที่ 2-2 คือ

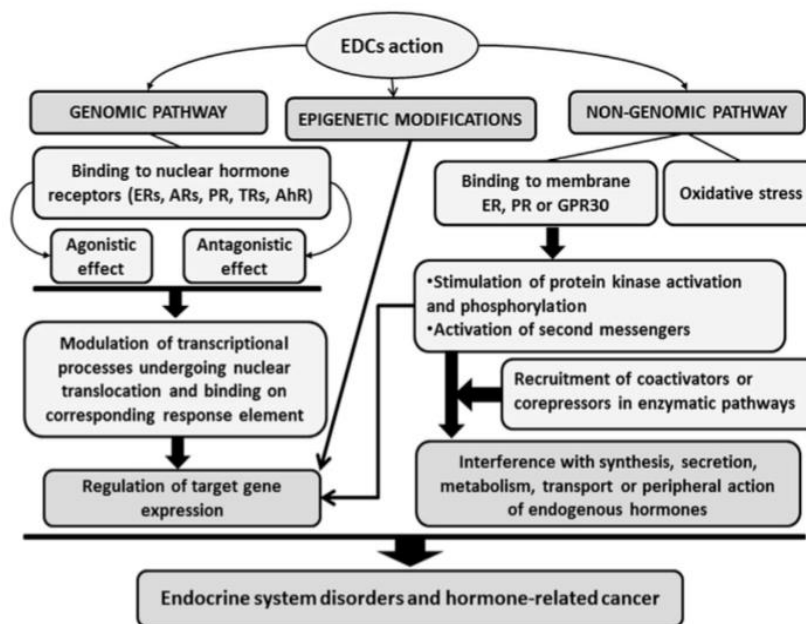
1) Genomic pathway คือกลไกผ่านยีน เป็นการจับกับตัวรับสัญญาณฮอร์โมน (hormone receptors) ภายในนิวเคลียสหรือแย่งจับกับตัวรับสัญญาณฮอร์โมนและขัดขวาง (Blocking) ไม่ให้ฮอร์โมนในร่างกายทำงานได้

2) Epigenetic pathway คือการเปลี่ยนแปลงกระบวนการสร้างและทำลายฮอร์โมนในร่างกาย

3) Non-genomic pathway คือกลไกที่ไม่ผ่านยีน เป็นกลไกเกี่ยวข้องกับการทำงานของตัวรับสัญญาณบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์หรือตัวรับสัญญาณอื่น ๆ เช่น G-protein couple receptor (GPR30)



ภาพที่ 2-1 กลไกการทำงานของฮอร์โมนและสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อผ่านตัวรับสัญญาณภายในเซลล์; การทำงานของฮอร์โมนผ่านตัวรับสัญญาณ (2-1A), การทำงานของสารเลียนแบบการทำงานของฮอร์โมนผ่านตัวรับสัญญาณ (2-1B) และการทำงานของสารขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนผ่านตัวรับสัญญาณ (2-1C) (Grzes'kowiak, Czarczyn'ska-Gos'lin'ska, & Zgoła-Grzes'kowiak, 2018)



ภาพที่ 2-2 กลไกการทำงานของสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อในมนุษย์ (Scsukova et al., 2016)

## 2.2 สาร Bisphenol A (BPA)

สาร BPA เป็นสารประกอบอินทรีย์ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นในปี ค.ศ.1891 ถูกใช้เป็นวัตถุดิบสำคัญในกระบวนการผลิตพลาสติกพอลีคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน (Lokensgard, 2009; Selig & Crossman, 1971) ซึ่งนิยมใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์เพื่อการอุปโภคและบริโภคต่าง ๆ เช่น พลาสติกพีวีซี บรรจุภัณฑ์อาหารและน้ำดื่ม (Tyl, 2014) เป็นต้น สาร BPA เป็นสารที่มีการผลิตมากเป็นอันดับต้น ๆ ของโลกและมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นอย่างต่อเนื่องตามการขยายตัวของตลาดอุตสาหกรรมพลาสติก (Flint et al., 2012; Huang & Sedlak, 2001; ICIS, 2011)

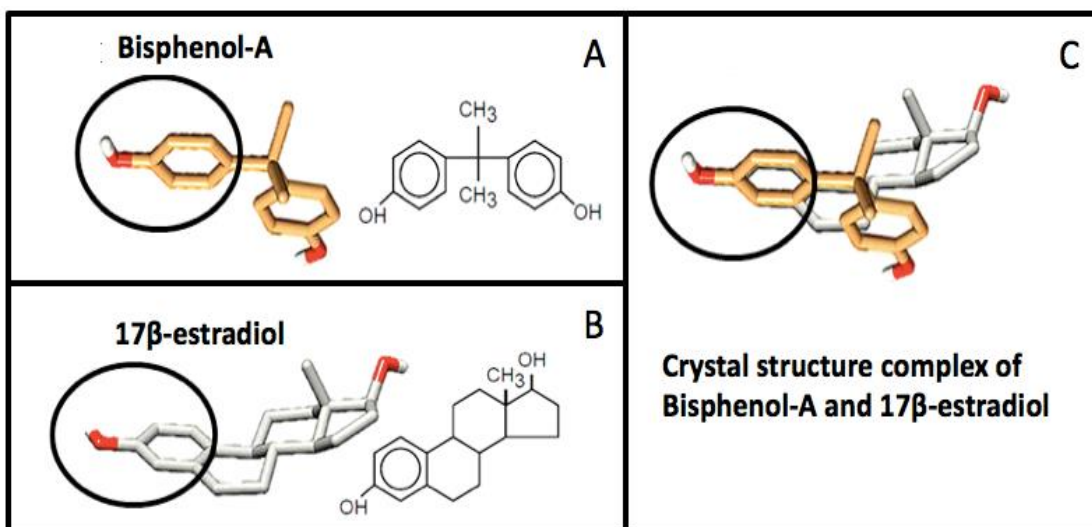
สาร BPA ( $C_{15}H_{16}O_2$ ) มีสูตรโครงสร้างคือ 2, 2-bis (4-hydroxyphenyl) propane และถูกสังเคราะห์ขึ้นได้ครั้งแรกจากการทำปฏิกิริยาระหว่างฟีนอล 2 โมเลกุล กับ อะซีโตน 1 โมเลกุล ทำให้โครงสร้างของสาร BPA ประกอบด้วยวงแหวนฟีนอล (Phenol ring) จำนวน 2 วง มีหมู่เมทิลเชื่อมระหว่างวงแหวนฟีนอล (ภาพที่ 2-3A) ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับโครงสร้างของสาร  $E_2$  (ภาพที่ 2-3B) ทำให้สาร BPA มีโครงสร้างบางส่วนคล้ายกับสาร  $E_2$  ที่ตำแหน่งฟีนอลกับหมู่ไฮดรอกซิล (OH group) (ในภาพที่ 2-3C) (Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998; Tyl, 2014) สาร BPA มีคุณสมบัติเป็นของแข็งสีขาวที่อุณหภูมิห้อง ละลายน้ำได้เล็กน้อย โดยมีค่าคงที่การละลาย ( $\log K_{ow}$ ) ที่ความเค็ม 0 psu เท่ากับ 3.44 และเพิ่มขึ้นเป็น 3.52 ที่ความเค็ม 29 psu ทำให้สาร BPA ละลายในน้ำทะเลได้มากกว่าในน้ำจืด (Borrirukwisitsak, Keenan, & Gauchotte-Lindsay, 2012) สาร BPA ถูกย่อยสลาย

ทางชีวภาพ (biodegradation) ได้ในเวลา 4 สัปดาห์ และสาร BPA มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในน้ำเฉลี่ย 2.5 ถึง 4 วัน (Staples et al., 1998) คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร BPA แสดงในตารางที่ 2-1 และแม้สาร BPA จะถูกย่อยสลายในธรรมชาติได้ในระยะเวลาสั้น แต่ก็ยังสามารถพบสาร BPA ในน้ำที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรมและน้ำชะจากกองขยะพลาสติกจากชุมชนทำให้สาร BPA เกิดการตกค้างและปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้ (Flint et al., 2012; Staples et al., 2000)

เมื่อสัตว์ได้รับสาร BPA เข้าสู่ระบบเลือดในร่างกาย ก็จะเข้าสู่เซลล์เป้าหมายในที่สุด สาร BPA มีลักษณะโครงสร้างคล้ายคลึงกับฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ร่างกายสังเคราะห์ จึงมีความสามารถในการจับกับตัวรับสัญญาณชนิดต่าง ๆ ของฮอร์โมนในสัตว์มีกระดูกสันหลัง (ภาพที่ 2-4) เช่น ตัวรับสัญญาณเอสโตรเจน (ER) รวมถึงตัวรับสัญญาณฮอร์โมนอื่น ๆ เช่น แอนโดรเจน (AR) ตัวรับสัญญาณไทรอยด์ (TR) เป็นต้น (Cooke, Simon, & Denslow, 2013; Teng et al., 2012) แต่อย่างไรก็ตามสาร BPA มีความสามารถในการจับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนสองชนิด คือ ER $\alpha$  และ ER $\beta$  ในเซลล์มะเร็งมดลูก (MCF-7 cell) ต่ำกว่าสาร E<sub>2</sub> 1,000 เท่า จึงจัดสาร BPA ว่าเป็นสารที่ออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างอ่อน (weak estrogenic activity) (Iso, Watanabe, Iwanamoto, Shimamoto, & Furuichi, 2006)

ตารางที่ 2-1 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร BPA (Oehlmann Oetken, & Schulte-Oehlmann, 2008; Staple et al., 1998)

Parameter	Value
Molecular weight	228.3 g/mol
Melting point	156°C
Boiling point	220°C
Specific gravity	1.09-1.19 gm/cm <sup>3</sup>
Water solubility	301 mg/l
Vapor pressure	5.3 x 10 <sup>-6</sup> Pa
Log Kow	3.40
Log Koc	715
Henry law constants	4.03 x 10 <sup>-6</sup> Pa/M <sup>3</sup> /mol

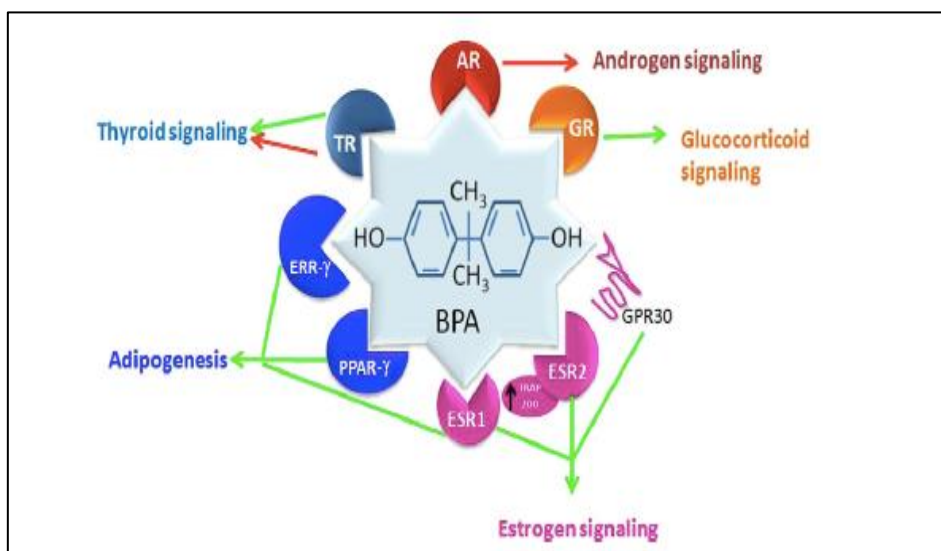


ภาพที่ 2-3 โครงสร้างทางเคมีของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub>

(A) โครงสร้างวงแหวนฟีนอลของสาร BPA และ (B) สาร E<sub>2</sub>

(C) โครงสร้างผลึกเชิงซ้อน (Crystal structure complex) ของสาร BPA

และสาร E<sub>2</sub> (ดัดแปลงจาก Ben-Jonathan & Steinmetz, 1998; Lafee, 2012)



ภาพที่ 2-4 ความสามารถในการจับกับตัวรับสัญญาณชนิดต่าง ๆ ของสาร BPA ในสัตว์  
มีกระดูกสันหลัง (Cooke et al., 2013)



สาร BPA มีผลทำให้สิ่งมีชีวิตเกิดการตอบสนองในชั้นชีววิทยาระดับโมเลกุลและชีวเคมี ในระดับเซลล์ โดยเกิดการเปลี่ยนแปลงทั้งระดับการแสดงออกของยีนระดับ โปรตีน หรือฮอร์โมน ภายในร่างกาย และส่งผลต่อการตอบสนองทางสรีรวิทยา เช่น ความผิดปกติของการพัฒนาในระบบสืบพันธุ์และทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับประชากรในที่สุด (Walker et al., 2005)

ความเป็นพิษของสาร BPA จัดอยู่ในกลุ่มมีความเป็นพิษปานกลางในสัตว์น้ำโดยการกำหนดของ United States Environmental Protection Agency (US EPA) (ตารางที่ 2-2) โดยมีรายงานระดับค่า LC<sub>50</sub> หรือ Median Lethal concentration คือค่าความเข้มข้นของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตาย 50% ในระยะเวลาที่กำหนดที่ 24 ถึง 96 ชั่วโมง ของสาร BPA ในสัตว์น้ำ อยู่ในช่วง 1.0-10 mg/l เช่น จากการศึกษาในปลาหม้อลาย (*Danio rerio*) วิจัยพบว่าสาร BPA มีค่า LC<sub>50</sub> เท่ากับ 6.67 และหอย *Marisa cornuarietis* มีค่า LC<sub>50</sub> เท่ากับ 2.24 mg/l (Mihaich et al., 2009; Thi, Kim, Lan, & Phi, 2016; Wen-juan et al., 2017) ซึ่งตัวอย่างการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลัน (Acute toxicity) ในสัตว์น้ำรวบรวมไว้ในตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-2 ระดับชั้นความเป็นพิษในสัตว์น้ำ (US EPA, 2008)

LC <sub>50</sub> (mg/l)	ระดับความเป็นพิษ
<0.1	ความเป็นพิษสูงมาก
>0.1-1	ความเป็นพิษสูง
>1-10	ความเป็นพิษปานกลาง
>10-100	ความเป็นพิษต่ำ
>100	ไม่เป็นพิษ

ตารางที่ 2-3 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ในสัตว์น้ำ

Species	Time (hours)	LC <sub>50</sub> (mg/l)	95% confident	Reference
<i>Chironomus tentans</i>	96	2.7	2.1-3.2	Mihaich et al. (2009)
<i>Pimephales promelas</i>	96	4.7	4-5.5	Alexander, Dill, Smith, Guiney and Dorn (1988)
<i>Menidia menidia</i>	96	9.4	8.3-11	Alexander et al. (1988)
<i>Etroplus maculatus</i>	96	6.48	4.67-7.75	Asifa and Chitra (2015)
<i>Ctenopharyngodon Idella</i> (fry)	96	3.44	2.96-3.72	Faheem et al. (2013)
<i>Danio rerio</i> (larvae)	96	6.67	5.65-7.61	Thi et al. (2016)
<i>Danio rerio</i> (adult)	96	8.09	7.21-9.08	Wen-juan et al. (2017)
<i>Cirrhinus mrigala</i> (fingerlings)	96	3.67	NA	Faheem and Lone (2013)
<i>Oryzias latipes</i>	48	9.9	8.4-10.4	Li et al. (2017)
<i>Mysidopsis bahia</i>	96	1.1	0.92-1.2	Alexander et al. (1988)
<i>Marisa cornuarietis</i>	96	2.24	1-5 mg/l	Mihaich et al. (2009)

นอกจากผลความเป็นพิษเฉียบพลันแล้วยังพบว่าสาร BPA มีผลระยะยาวต่อสรีรวิทยาของระบบสืบพันธุ์และการเจริญเติบโตที่มีฮอร์โมนเป็นตัวควบคุมในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด (Canesi & Fabbri, 2015; Pinto, Estêvão, & Power, 2014) เช่น มีผลต่อการสร้างไข่และยืดระยะเวลาการตกไข่ในปลาเทราต์ (*Salmo trutta f. fario*) เพศเมีย ส่วนเพศผู้สร้างสเปิร์มลดลงและมีอัตราการตายสูงขึ้นเมื่อได้รับสัมผัสสาร BPA เท่ากับ 1.75 และ 2.40 µg/l เป็นระยะเวลา 2 เดือน (Lahnsteiner, Berger, Kletzl, & Weismann, 2005) และมีผลยับยั้งการพัฒนาไข่และอวัยวะ รวมทั้งการสร้างไข่และสเปิร์มของปลา Fathead minnow (*Pimephales promelas*) ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 640 µg/l นาน 164 วัน (Sohoni et al., 2001) อีกทั้งยังกระตุ้นความผิดปกติของการเจริญเติบโตของปลาแซลมอน (*Salmo salar m. sebago*) วัยอ่อน เช่น ตกเลือด (haemorrhage) บริเวณเหงือก และอาการบวมน้ำ (oedema) ของถุงไข่แดง (Honkanen, Holopainen, & Kukkonen, 2004) อีกทั้งยังส่งผลต่อการเหนี่ยวนำการสังเคราะห์โปรตีน VTG หรือ ยีน vtg ในปลา Fathead minnow (*Pimephales promelas*) ปลาคอด (*Gardu moruha*) ปลาเทราต์

(*Oncorhynchus mykiss*) และปลา Swordtail (*Xiphophorus helleri*) เมื่อได้รับสาร BPA ในระยะเวลา 96 ชั่วโมง ถึง 2 สัปดาห์ (Brian et al., 2005; Kwak et al., 2001; Larsen et al., 2006; Lindholst, Pedersen, & Pedersen, 2000; Olsvika, Lie, Sturve, Hasselberg, & Andersen 2009; Rankouhi et al., 2004)

ในกรณีของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง สาร BPA มีผลเหนี่ยวนำการเกิด Superfeminization ในหอยน้ำจืด (*Marisa cornuarietis*) ซึ่งสังเกตจากการเพิ่มขนาดของต่อมเพศ ความผิดปกติของท่อทางเดินไข่ ขนาดและจำนวนไข่เพิ่มขึ้น รวมถึงหอยมีอัตราการตายสูงขึ้น เมื่อได้รับสาร BPA ต่ำกว่า 1 µg/l (Oehlmann et al., 2006; Oehlmann et al., 2009) อีกทั้งมีผลต่อการสร้างเซลล์สืบพันธุ์ เช่น เซลล์ฟอลลิเคิล (follicle cells) และเซลล์ไข่พัฒนาผิดปกติ และอัตราการฟักเป็นตัวลดลงในหอยแมลงภู่มะนิลา (*Mytilus edulis*) เพศเมีย (Aarab et al., 2006) และยังมีผลต่อการพัฒนาตัวอ่อนในหอยฝาเดียว (*Haliothis diversicolor supertexta*) (Zhou, Zhu, & Cai, 2011) เช่นกัน

สาร BPA ที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำกลายเป็นปัญหาสิ่งแวดล้อมที่ทั่วโลกตระหนัก จากการสำรวจพบว่าน้ำทิ้งในกระบวนการผลิตพลาสติกพอลิคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน เป็นสาเหตุหลักต่อการปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมสูงถึง 93% รวมถึงน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียและน้ำทิ้งจากชุมชน เป็นแหล่งที่ปลดปล่อยสาร BPA สู่อากาศ (Cousins, Stapple, Klecka, & Mackay, 2002; Flint et al., 2012; Jagnytsch, Opitz, Lutz, & Kloas, 2006) ในแหล่งน้ำที่ตั้งอยู่ใกล้เขตอุตสาหกรรมมักเป็นบริเวณที่พบว่าการปนเปื้อนของสาร BPA สูง เช่น แม่น้ำ Jiulongjiang โดยพื้นที่ใกล้จุดปล่อยน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมพบสาร BPA ปนเปื้อนในน้ำสูงสุดเท่ากับ 4,686.7 ng/l (Zhang, Zhang, Zhang, Luo, & Yan, 2012) และแม่น้ำ Shijing ตรวจพบสาร BPA ปริมาณสูงสุดเท่ากับ 1,030 ng/l โดยแม่น้ำ Shijing เป็นแหล่งน้ำที่รองรับน้ำทิ้งจากชุมชนเมืองซึ่งยังขาดระบบการจัดการน้ำเสียที่มีประสิทธิภาพอีกทั้งยังเป็นแม่น้ำที่รองรับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยแต่ละปีแม่น้ำ Shijing ต้องรองรับปริมาณน้ำเสียมากกว่า 100 ล้านตันซึ่งส่วนใหญ่เป็นน้ำทิ้งจากชุมชน (Zhao et al., 2009)

ตัวอย่างการสำรวจปริมาณสาร BPA บริเวณชายฝั่งทะเลจาก 7 ประเทศ ได้แก่ สหรัฐอเมริกา แคนาดา บราซิล จีน อิตาลี กรีซ และ สิงคโปร์ พบว่าสาร BPA ที่ปนเปื้อนมีปริมาณต่ำกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกรปนเปื้อนในน้ำจืด โดยพบปริมาณปนเปื้อนเฉลี่ยน้อยกว่า 200 ng/l โดยปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในชายฝั่งทะเลแสดงในตารางที่ 2-5

ส่วนในประเทศไทยยังมีรายงานการปนเปื้อนของสาร BPA ในสิ่งแวดล้อมไม่มากนัก จากการสำรวจในแม่น้ำโขง บริเวณจังหวัดอุบลราชธานี ในปี ค.ศ. 2007 พบสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นเฉลี่ย 2.4±0.5 ng/l และรายงานการตรวจสอบปริมาณสาร BPA จากแม่น้ำน่าน ที่ไหลผ่าน

บริเวณจังหวัดพิษณุโลก ซึ่งเป็นพื้นที่ชุมชนขนาดกลางและห่างไกลเขตอุตสาหกรรม พบปริมาณสาร BPA สูงสุดเท่ากับ 51.86 ng/l (Deemoon, Sarin, Gou-Ying, Kritsunankul, & Sriprang, 2016; Duong et al., 2010) แต่จากรายงานการศึกษาของ Pookpoosa et al. (2014) พบว่าสาร BPA ในน้ำทิ้งหลังการบำบัดจากโรงงานบำบัดน้ำเสียรอบเขตกรุงเทพมหานครเท่ากับ 57.5-257 ng/l แต่อย่างไรก็ตาม ประเทศไทยยังไม่มีข้อกำหนดถึงมาตรฐานน้ำเสีย สำหรับมาตรการการควบคุมการใช้สาร BPA ในประเทศไทยในปัจจุบัน มีเพียงการกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุที่ทำจากพลาสติกให้มีสาร BPA ในเนื้อพลาสติกได้ไม่เกิน 500 mg/kg และแพร่กระจายได้ไม่เกิน 2.5 mg/dm<sup>3</sup> จึงไม่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพ (กระทรวงสาธารณสุข, 2548) ในประเทศไทยจึงยังขาดการจัดการสาร BPA ที่เหมาะสมอีกทั้งระบบจัดการน้ำเสียยังไม่สามารถกำจัดสาร BPA ทำให้สาร BPA ปนเปื้อนลงสู่แหล่งน้ำ (Pookpoosa et al., 2014)

ตารางที่ 2-4 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในแหล่งน้ำจืด

Country	Freshwater	BPA (ng/l)	Reference
China	Jiulongjiang river	<0.50-4,686.7	Zhang et al. (2012)
China	River in southern Jiangsu	48.24-725.94	Yuan, Tianyuan, Zhou, , & Zhao (2014)
China	Taizhu Lake	9.15-34.42	Lu, Yan, Wang, and Chen (2011)
China	Some river in China	2.2-1,030	Zhao et al. (2009)
Brazil	Some river in Brazil	84	Sodre', Locatelli, and Jardim (2010)
Portugal	Mondego River	<6.6-880	Ribeiro et al. (2009)
Netherland	Freshwater	8.8-1,000	Vethaak et al. (2005)
Thailand	Khong River	2.4±0.5	Duong et al. (2010)
Thailand	Nan River	9.04-51.86	Deemoon et al. (2016)

ตารางที่ 2-5 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในชายฝั่งทะเล

Country	Marine water	BPA (ng/l)	Reference
Brazil	Santos Bay	<3.30-76.8	Lisboa et al. (2013)
Canada	Halifax harbor	<2.60-32.4	Robinson, Hui, Soo, and Hellou (2009)
China	South China Sea	12-138	Xu, Yan, Huang, Miao, & Zhong. (2014)
Italy	Venice Lagoon	2.6-136	Pojana, Gomiero, Jonkers, and Marcomini (2007)
USA	Florida	4.4-190	Singh et al. (2010)
Greece	Thermaikos Gulf	10.6-52.3	Arditsoglou and Voutsas (2012)
Singapore	Singapore Coastal	40-190	Basheer, Lee, and Tan (2004)

สาร BPA เมื่อลงสู่แหล่งน้ำสามารถสะสมตัวอยู่กับตัวกลาง เช่น ดินตะกอน หรือละลายอยู่ในน้ำ ส่วนสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในน้ำสามารถรับเอาสาร BPA เข้าสู่ร่างกายผ่านทางน้ำโดยตรงผ่านเหงือกหรือผิวหนัง และการกินอาหาร สัตว์น้ำส่วนใหญ่รับสารเคมีโดยการกินอาหารที่มีลักษณะต่างกันตามชนิดของสัตว์กลุ่มหอยสองฝาจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่พบการสะสมของสารเคมีค่อนข้างมาก (Isobe et al., 2007) เนื่องจากเป็นสัตว์ที่กินอาหารด้วยการกรองสารอินทรีย์ซึ่งแขวนลอยอยู่ในน้ำรวมถึงแพลงก์ตอนพืชและสัตว์ที่สามารถเก็บสะสมสาร BPA เคลื่อนย้ายจากน้ำทะเลไปสู่สิ่งมีชีวิตในระดับที่สูงกว่าในโซ่อาหาร ปริมาณของสารเคมีในสัตว์น้ำขึ้นกับชนิดของสิ่งมีชีวิต สภาพแวดล้อมในแต่ละพื้นที่รวมถึงพฤติกรรมดำรงชีวิตของสัตว์ชนิดนั้น ๆ (Goldberg & Bertine, 2000) เช่น หอยสองฝาที่ลงเกาะแล้วจะไม่เคลื่อนที่หากเลี้ยงในพื้นที่ซึ่งปนเปื้อนมลพิษทำให้หอยไม่สามารถหลีกเลี่ยงการสะสมสารพิษได้ (Rajagopal, Venugopalan, Nair, van der Velde, & Jenner, 2006)

การสะสมของสาร BPA ในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ จะมีปริมาณที่แตกต่างกันส่วนใหญ่

ซึ่งพบว่าแปรผันตามปริมาณของสาร BPA ในน้ำและอาหาร และบทบาทของสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร เช่น สัตว์ที่เป็นผู้ล่าในห่วงโซ่อาหารจะมีการสะสมของสาร BPA สูงกว่าหอยที่กรองกิน (Filter Feeding) สารอินทรีย์ และแพลงก์ตอน ตัวอย่างของการสะสมสาร BPA ในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ แสดงในตารางที่ 2-6

เมื่อเปรียบเทียบปริมาณสาร BPA ที่สะสมในหอย *Mytilus edulis trossulus* กับปลา *Platichthys flesus* ที่เก็บจากบริเวณอ่าว Gdańsk ในประเทศโปแลนด์ พบว่าในหอยซึ่งเป็นผู้บริโภคชั้นต้นมีปริมาณสาร BPA สะสมในเนื้อเยื่อน้อยที่สุด คือ 68-197.2 ng/g ขณะที่พบสูงสุดในปลา *Platichthys flesus* ซึ่งเป็นผู้ล่า มีการสะสมสาร BPA สูงสุดคือ 755.7 ng/g บ่งชี้ว่าสาร BPA สามารถสะสมในสัตว์น้ำเพิ่มขึ้นตามลำดับขั้นของการกินตามห่วงโซ่อาหาร (Biomagnification) (Staniszewska et al., 2014)

ตารางที่ 2-6 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในสัตว์น้ำ

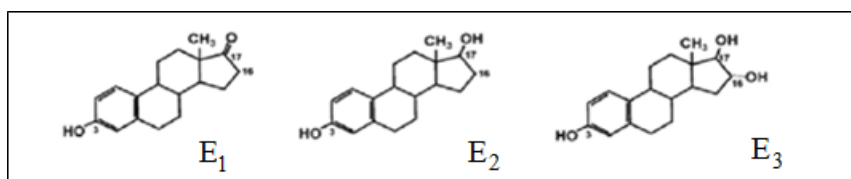
Country	Species	BPA (ng/g)	References
China	Wild fish	83.5	Liu et al. (2011)
Poland	<i>Mytilus edulis trossulus</i>	68-197.2	Staniskwa et al. (2014)
	<i>Platichthys flesus</i>	98.3-755.7	Staniskwa et al. (2014)
	<i>Clupea harengus</i>	19.7-440.1	Staniskwa et al. (2014)
Greece	<i>Mytilus galloprovincialis</i>	342.8-611.9	Gatidou, Vassalou, and Thomaidis (2010)
	<i>Venus gallina</i>	298.1-626.3	Gatidou et al. (2010)
	<i>Madiola barbatus</i>	209.2-515.2	Gatidou et al. (2010)
Thailand	Wild fish	9.04-44.12	Deemoon et al. (2016)
Thailand	<i>Perna viridis</i>	0.96-4.54	Isobe et al. (2007)

### 2.3 สาร 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>)

สาร 17 $\beta$ -estradiol หรือ E<sub>2</sub> (C<sub>18</sub>H<sub>24</sub>O<sub>2</sub>) มีสูตรโครงสร้างคือ (17 $\beta$ )-estra-1,3,5(10)-triene-3,17-diol เป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดหนึ่งในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมน เป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญต่อการเจริญเติบโตและระบบสืบพันธุ์ในสัตว์มีกระดูกสันหลัง แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่

estrone ( $E_1$ ),  $E_2$  และ estriol ( $E_3$ ) (ภาพที่ 2-5) สตรีโมนเอสโตรเจนมีหน้าที่สำคัญคือเป็นสารสื่อกลางโดยมีตัวรับสัญญาณคือตัวรับสัญญาณเอสโตรเจนได้แก่  $ER\alpha$  และ  $ER\beta$

สาร  $E_2$  มีคุณสมบัติเป็นของแข็งสีขาวที่อุณหภูมิห้อง ละลายน้ำได้เล็กน้อยโดยมีค่าคงที่การละลาย ( $\log K_{ow}$ ) เท่ากับ 3.94 มีค่าครึ่งชีวิตในน้ำเฉลี่ย 2 ถึง 3 วัน (Yin, Kookana, & Ru, 2002) ทั้งนี้คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสาร  $E_2$  แสดงไว้ในตารางที่ 2-7



ภาพที่ 2-5 โครงสร้างทางเคมีของสตรีโมนเอสโตรเจน ( $E_1$ ,  $E_2$  และ  $E_3$ ) (คัดแปลงจาก Adeel et al., 2017)

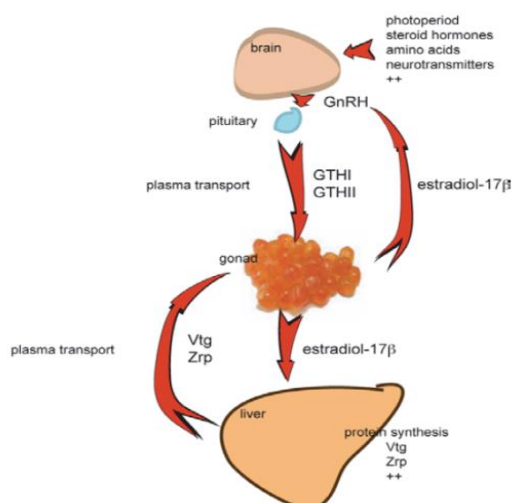
ตารางที่ 2-7 คุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของสตรีโมนเอสโตรเจน ( $E_2$ ) (Adeel et al., 2017)

Parameter	Value
Molecular weight	270.4 g/mol
Melting point	178-179°C
Water solubility	13 mg/l
Vapor pressure	$3 \times 10^{-8}$ Pa
Log Kow	3.94

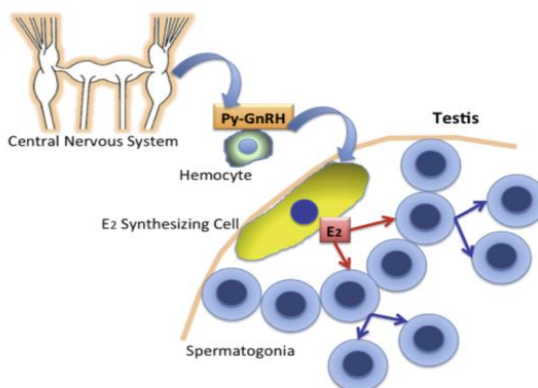
กลไกการสังเคราะห์สตรีโมน  $E_2$  ในปลา (ภาพที่ 2-6) ควบคุม โดยสตรีโมนโกนาโดโทรปิน (gonadotropin; GTH) จากต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ซึ่งถูกควบคุมโดยสตรีโมนโกนาโดโทรปินรีลีสซิ่ง (gonadotropin releasing hormone; GnRH) จะกระตุ้นให้รังไข่สังเคราะห์  $E_2$  จากนั้น  $E_2$  จะถูกส่งต่อผ่านทางกระแสเลือดและกระตุ้นให้ตับสังเคราะห์โปรตีน VTG และลำเลียงมาสะสมภายในเซลล์ไข่ ในกรณีที่อยู่ในร่างกายมีระดับของสตรีโมน  $E_2$  สูงเกินไปจะกลับไปยับยั้งการสังเคราะห์สตรีโมน  $E_2$  (Arukwe & Goksoyr, 2003)

ในกรณีของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง ระบบการควบคุมสตรีโมนซับซ้อนน้อยกว่าในสัตว์

มีกระดูกสันหลัง (Lafont, 2000) โดยระบบต่อมไร้ท่อเริ่มปรากฏในสัตว์กลุ่มหอยและจะถูกควบคุมโดยการทำงานร่วมกันของระบบประสาทส่วนกลาง ต่อมไร้ท่อและสารสื่อสัญญาณ (Treen et al., 2012) กลไกการสังเคราะห์  $E_2$  ในหอยสองฝา (*Pecten yessoensis*) อธิบายดังภาพ 2-7 โดยที่ฮอร์โมน Py-Gonadotrophin releasing hormone (Py-GnRH) จะถูกสร้างจากบริเวณส่วนหน้าของระบบประสาทส่วนกลาง (anterior lobe of Cerebral ganglia of CNS) และอาจถูกขนส่งไปทั่วร่างกายในระบบเลือดโดยเซลล์เม็ดเลือดขาว ฮอร์โมน Py-Gonadotrophin releasing hormone จะถูกขนส่งมาสู่อวัยวะเป้าหมาย และกระตุ้นเซลล์สังเคราะห์  $E_2$  ( $E_2$  synthesizing cells) เพื่อให้มีการสังเคราะห์  $E_2$  จากนั้น  $E_2$  จะกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้โดยระบบต่อมไร้ท่อในหอยสองฝา อธิบายดังภาพที่ 2-7 (Osada & Treen, 2013)



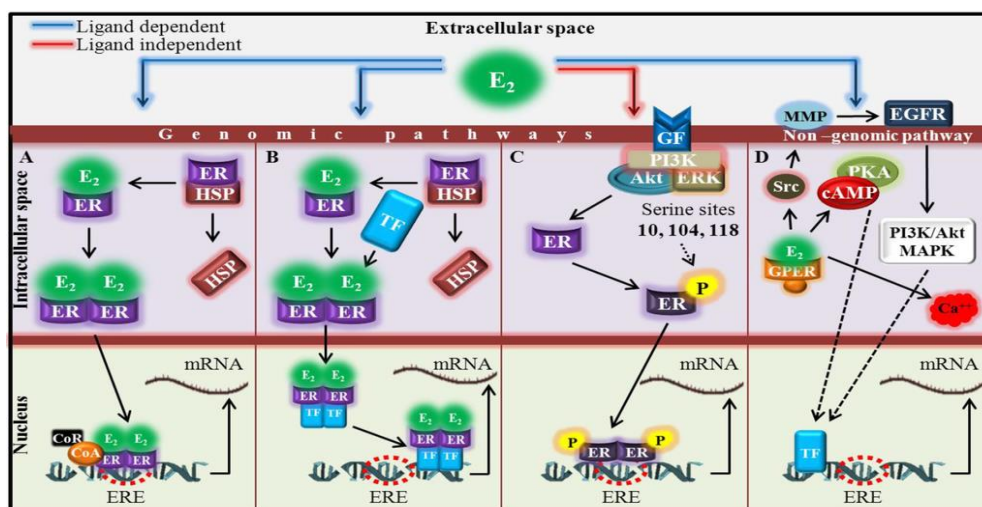
ภาพที่ 2-6 กลไกการสังเคราะห์  $E_2$  ในปลา (Arukwe & Goksoyr, 2003)



ภาพที่ 2-7 กลไกการสังเคราะห์  $E_2$  ในหอยสองฝา (Osada & Treen, 2013)



การทำงานของสาร  $E_2$  ประกอบด้วยกลไกหลักคือ กลไกแบบผ่านยีน (genomic pathway) และกลไกแบบไม่ผ่านยีน (non-genomic pathway) (ภาพที่ 2-8) โดยสาร  $E_2$  ออกฤทธิ์ผ่านตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนเพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมาย ในปัจจุบันจำแนกตัวรับเอสโตรเจนออกเป็น 2 กลุ่มตามตำแหน่งที่แสดงออกคือ 1) ตัวรับเอสโตรเจนภายในนิวเคลียส (nuclear ER) และ 2) ตัวรับเอสโตรเจนบริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane ER) เมื่อสาร  $E_2$  จับกับ nuclear ER ภายในเซลล์ nuclear ER จะเคลื่อนที่เข้าสู่ นิวเคลียสของเซลล์เป้าหมายเพื่อกระตุ้นกระบวนการถอดรหัส (Transcription) เป็น mRNA โดยจับบริเวณของยีนที่เรียกว่า estrogen response element เพื่อทำการสังเคราะห์ mRNA และแปลรหัส (Translation) เป็นโปรตีนคือกลไกแบบผ่านยีน (genomic pathway) แต่ในกรณีที่สาร  $E_2$  ออกฤทธิ์ผ่าน membrane ER จะกระตุ้นกลไกผ่านสารสื่อสัญญาณภายในเซลล์ (cell signaling pathway) เพื่อควบคุมการทำงานของเซลล์เป้าหมายอย่างรวดเร็ว กลไกการออกฤทธิ์ดังกล่าวเรียกว่ากลไกแบบไม่ผ่านยีน (non-genomic pathway) (Heger et al., 2014)



ภาพที่ 2-8 กลไกแบบผ่านยีน (genomic pathway) และกลไกแบบไม่ผ่านยีน (non-genomic pathway) ของสาร  $E_2$  (Heger et al., 2014)

ความเป็นพิษของสาร  $E_2$  จัดอยู่ในกลุ่มมีความเป็นพิษปานกลางในสัตว์น้ำโดยการกำหนดของ United States Environmental Protection Agency (US EPA) (ตารางที่ 2-1) โดยมีรายงานระดับค่า  $LC_{50}$  หรือ Median Lethal concentration หรือค่าความเข้มข้นของสารพิษที่ทำให้สัตว์ทดลองตายร้อยละ 50 ในระยะเวลาที่กำหนด ที่ 24 ถึง 96 ชั่วโมง มีรายงานถึงค่า  $LC_{50}$  ของสาร

E<sub>2</sub> ในสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ อยู่ในช่วง 1.0-10 mg/l ตัวอย่างของความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร E<sub>2</sub> ในสัตว์น้ำ แสดงในตารางที่ 2-8

ตารางที่ 2-8 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร E<sub>2</sub> ในสัตว์น้ำ

Species	Time (hours)	LC <sub>50</sub> (mg/l)	95% confident	Reference
<i>Oryzias latipes</i> (adult)	72	3.5	2.7-4.4	Kashiwada, Ishikawa, Miyamoto, Ohnishi, and Magara (2002)
<i>Oryzias latipes</i> (embryo)	72	0.46	0.35-0.59	Kashiwada et al. (2002)
<i>Oryzias latipes</i> (egg)	72	0.47	0.36-0.58	Kashiwada et al. (2002)
<i>Daphnia magna</i>	48	2.97	2.76-4.11	Hirano et al. (2004)
<i>Americanmysis</i> <i>bahia</i>	48	1.69	1.37-2.25	Hirano et al. (2004)
<i>Dugesia japonica</i>	48	2.6	2.5-2.7	Li (2014)

สาร E<sub>2</sub> มีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของตัวอ่อน ระบบสืบพันธุ์ และระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังบางชนิด เช่น กระตุ้นให้ตัวอ่อนของปลา clearhead icefish (*Protosalanx hyalocranius*) มีพัฒนาการผิดปกติ หรือ teratogenesis เพิ่มขึ้น 30% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสาร E<sub>2</sub> (Hu et al., 2017) พบการสร้างเซลล์ไข่ (oocytes) ในอวัยวะของปลาข้าวสาร (*O. latipes*) เพศผู้ซึ่งได้รับสาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 55.7 ng/l เป็นระยะเวลา 25 วันและเมื่อได้รับสาร E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 463 ng/l เป็นระยะเวลา 25 วัน พบเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) เจริญแทนที่เนื้อเยื่อภายในอวัยวะ (testicular tissue) ส่งผลให้ยับยั้งกระบวนการสร้างเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ (Kang et al., 2002) ปลา fathead minnows (*P. promelas*) มีจำนวนไขลดลงเมื่อได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 120 ng/l เป็นระยะเวลานาน 19 วัน (Kramer, Miles-Richardson, Pierens, & Giesy, 1998) หรือมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนเพศของ

ปลา common snook (*Centropomus undecimalis*) เพศเมียจาก 68.42% ในกลุ่มควบคุมเป็นเพศเมีย 90% ในกลุ่มที่ได้รับสาร E<sub>2</sub> (Carvalho, Passini, Costa, Vieira, & Cerqueira, 2014)

ในกรณีของสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ได้รับสาร E<sub>2</sub> เช่น หอยสองฝา *Mya arenaria* โดยวิธีการฉีดที่ระดับความเข้มข้นที่ 10 nM เป็นระยะเวลา 2 วันพบว่าสาร E<sub>2</sub> มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของเซลล์เม็ดเลือดขาวซึ่งส่งผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Gauthier-Clerc, Pellerin, Fournier, & Amiard, 2006) เช่นเดียวกันกับหอย *Corbicula fluminea* ซึ่งได้รับสาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 ng/l เป็นระยะเวลานาน 15 วัน พบว่ายับยั้งกระบวนการ phagocytosis ของเม็ดเลือดขาวเช่นกัน (Champeau & Nabonne, 2006)

จากผลกระทบที่กล่าวมาทำให้การปนเปื้อนสาร E<sub>2</sub> ในแหล่งน้ำกลายเป็นปัญหาที่สำคัญในหลายประเทศ โดยพบว่าน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์ แหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำรวมทั้งน้ำทิ้งจากโรงบำบัดน้ำเสียซึ่งมีสารคัดหลั่งจากร่างกายของมนุษย์ซึ่งเป็นสเตียรอยด์ฮอร์โมน เป็นแหล่งหลักที่ปล่อยสาร E<sub>2</sub> ลงสู่สิ่งแวดล้อมทางน้ำ ปัจจุบันข้อมูลการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ใน 6 ประเทศพบการปนเปื้อนอยู่ในช่วง <1-7,988.2 µg/l (ตารางที่ 2-9) โดยพบการปนเปื้อนสูง คือ แม่น้ำไนล์บริเวณที่ไหลผ่านกรุงไคโรประเทศอียิปต์พบสาร E<sub>2</sub> ในน้ำเท่ากับ 265.13-7,988.2 µg/l (Afifi et al., 2016) ในขณะที่มีรายงานปริมาณการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ในชายฝั่งทะเล (ตารางที่ 2-10) ได้แก่ ที่ประเทศบราซิล แคนาดา คูเวต สหรัฐอเมริกา และกรีซ พบสาร E<sub>2</sub> ปริมาณค่อนข้างต่ำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0-18.2 ng/l ทั้งนี้อาจเป็นเพราะบริเวณชายฝั่งทะเลอยู่ห่างจากแหล่งกำเนิดน้ำทิ้งจากชุมชนจึงทำให้ตรวจพบสาร E<sub>2</sub> ปริมาณน้อยกว่าในน้ำจืด ยกเว้นทะเลสาบเวนิซ (Venice Lagoon) ประเทศอิตาลีซึ่งมีลักษณะเป็นทะเลสาบปิดส่งผลให้เกิดการสะสมของสาร E<sub>2</sub> ในปริมาณที่สูงกว่าบริเวณอื่น (Pojana et al., 2007)

ส่วนรายงานการสำรวจในประเทศไทยตรวจพบการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ในแม่น้ำเจ้าพระยา ในปี ค.ศ. 2010-2011 อยู่ในช่วง 1,380-2,010 ng/l ซึ่งเป็นแม่น้ำที่รองรับน้ำเสียจากบ้านเรือนและชุมชนขนาดใหญ่ จึงพบการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ในปริมาณสูง (Ruchiraset & Chinwetkitwanich, 2014)

เมื่อสาร E<sub>2</sub> ลงสู่แหล่งน้ำสามารถละลายอยู่ในน้ำได้ปานกลาง แต่ละลายในไขมันได้ดี สาร E<sub>2</sub> ที่เข้าไปนี้จะสะสมอยู่ในเนื้อเยื่อของสัตว์น้ำซึ่งสาร E<sub>2</sub> เหล่านี้สัตว์น้ำอาจรับสัมผัสโดยตรงผ่านเหงือกหรือผิวหนัง หรือจากลักษณะการกินอาหาร และสามารถถ่ายทอดไปยังโซ่อาหารทำให้ สาร E<sub>2</sub> เพิ่มขึ้นตามลำดับการบริโภคจากตัวอย่างรายงานการสะสมของสาร E<sub>2</sub> ในสัตว์น้ำ เช่น ในปลาจากธรรมชาติ ในทะเลสาบ Dianchi ประเทศจีนพบสะสมในเนื้อเยื่อ <11.2 ng/g

ขณะที่มีรายงานการสะสมของสาร E<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่อหอยสองฝา *Dreissena polymorpha* จากแม่น้ำของประเทศสหรัฐอเมริกาและฝรั่งเศสพบว่ามีสาร E<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่อ 8.8-316.2 ng/g และในหอยสองฝา *Mytilus edulis* ที่ชายฝั่งทะเลประเทศสหรัฐอเมริกาพบสาร E<sub>2</sub> สะสมในเนื้อเยื่อ 116-219 ng/g (Liu et al., 2011; Peck, Labadie, Minier, & Hill, 2007; Zhu et al., 2003)

ตารางที่ 2-9 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ในแหล่งน้ำจืด

Country	Location	E <sub>2</sub> (ng/l)	Reference
China	Jiulongjiang river	<2.50-74.4	Zhang et al. (2012)
China	River in southern Jiangsu	0-52.71	Yuan et al. (2014)
China	Taizhu Lake	<0.13-10.75	Lu et al. (2011)
China	The Pearl River	<1.0-7.5	Zhao et al. (2009)
Brazil	Some river in Brazil	7.3	Sodre' et al. (2010)
Portugal	Mondego River	<3.0	Ribeiro et al. (2009)
Netherland	Freshwater	0.8-1	Vethaak et al. (2005)
Egypt	Freshwater	265.13-7,988.2 †	Afifi et al. (2016)
Thailand	Choapraya River	1,380-2,010	Ruchiraset and Chinwetkitwanich (2014)

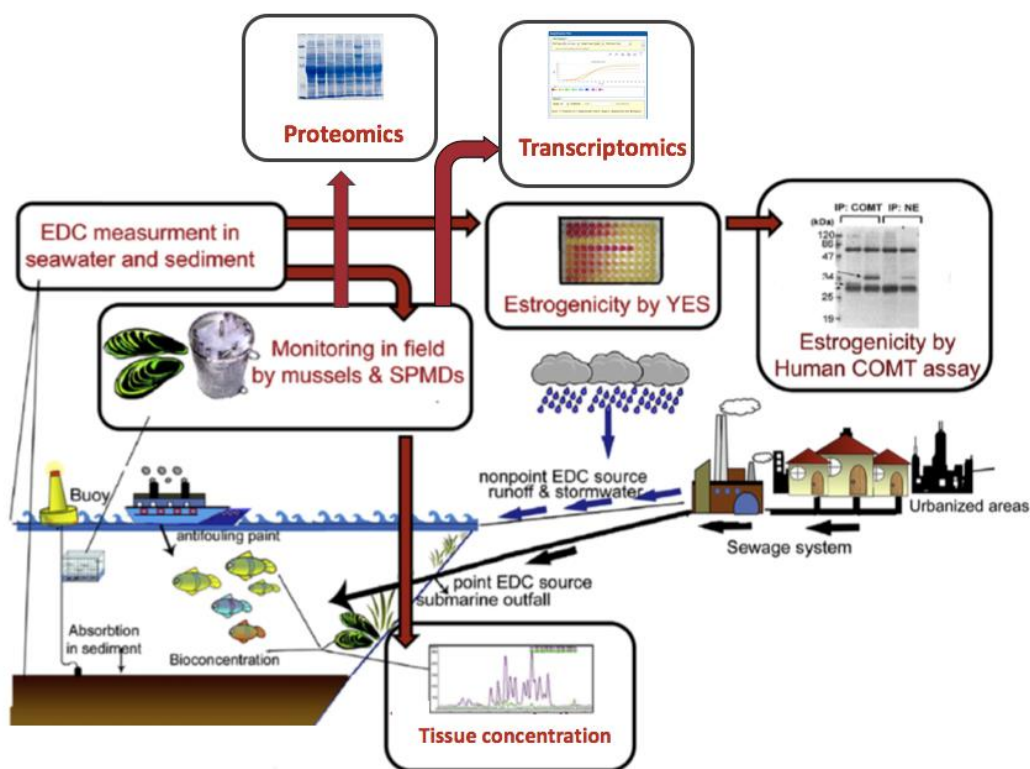
† = µg/l

ตารางที่ 2-10 ปริมาณการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ในชายฝั่งทะเล

Country	Location	E <sub>2</sub> (ng/l)	Reference
Brazil	Santos Bay	<3.00-18.2	Lisboa et al. (2013)
Canada	Halifax harbor	<0.57-5.3	Robinson et al. (2009)
Kuwait	Arabian Gulf	0-6.6	Saeed et al. (2017)
Italy	Venice Lagoon	<1-175	Pojana et al. (2007)
USA	Florida	0-1.8	Singh et al. (2010)
Greece	Thermaikos Gulf	<5	Arditsoglou and Voutsas (2012)

## 2.4 วิธีการตรวจสอบสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในสิ่งแวดล้อม

วิธีการตรวจสอบสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในสิ่งแวดล้อม (ภาพที่ 2-9) สามารถทำได้โดยการวัดปริมาณสารปนเปื้อนคือ 1) วิธีวิเคราะห์ทางเคมี (Chemical based assays) โดยตรงในสิ่งแวดล้อม เช่น น้ำ ดิน ดินตะกอน อากาศหรือวัดปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในสิ่งมีชีวิต (Pojana, Bonfa, Buseti, Collarin, & Marcomini, 2004) หรือ 2) การใช้ Biologically based assays (Asimakopoulose, Thomaidis, & Koupparis, 2012) เช่น การศึกษาการแสดงออกในระดับยีน (Transcriptomics) หรือ โปรตีน (Proteomics) เพื่อใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarker) สำหรับบ่งชี้ถึงผลกระทบของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในสิ่งแวดล้อม (Lam & Gray, 2003)



ภาพที่ 2-9 วิธีการตรวจสอบสาร EDCs ในสิ่งแวดล้อม ดัดแปลงจาก (Xu, Ho, Tse, Ho, & Leung, 2016)

ในการตรวจวัดสารในกลุ่ม EDCs ในปัจจุบันเทคนิคทางเคมีวิเคราะห์ต่าง ๆ ถูกนำมาประยุกต์ใช้ในการศึกษา เช่น High performance liquid chromatography (HPLC), Gas Chromatography (GC), Liquid Chromatography (LC) หรือนำเทคนิคข้างต้นพัฒนาใช้ร่วมกับ Mass

Spectrometry (MS) เช่น Gas Chromatography Mass Spectrometry (GC-MS) เป็นต้น โดยมีตัวอย่างการศึกษาดังนี้

การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS (Gas chromatography coupled with ion trap mass spectrometry) ในการวัดปริมาณสาร EDCs ได้แก่ Octylphenol, Nonylphenol, BPA, E<sub>1</sub>, E<sub>2</sub> และ E<sub>3</sub> ในน้ำทะเล ดินตะกอน และสิ่งมีชีวิต เช่น หอย มีค่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ (Limit of detection; LOD) หรือ ปริมาณสาร E<sub>2</sub> ที่เครื่องมือวิเคราะห์ได้ต่ำที่สุดเท่ากับ <5 ng/l ขณะที่ E<sub>1</sub> มีค่าเท่ากับ <9 ng/l (Arditsoglou & Voutsas, 2012) และสาร BPA มีค่าเท่ากับ <6.30 ng/l เป็นต้น (Basheer et al., 2004) ส่วน Pookpusa et al. (2014) มีการใช้ HPLC และรายงานขีดจำกัดของการวัดปริมาณสาร BPA มีค่า LOD เท่ากับ 1.3 µg/l

จะเห็นได้ว่าวิธีการตรวจวัดทางเคมีโดยตรงนั้นมีข้อจำกัดของเครื่องมือในการวิเคราะห์อีกทั้งไม่สามารถบ่งชี้ถึงผลกระทบของสารต่อสิ่งมีชีวิตได้ (Heisterkamp, Gandrass, & Ruck, 2004) ดังนั้นวิธีการทางชีวภาพ จึงเป็นวิธีการอีกทางเลือกที่ใช้งบงชี้ถึงผลกระทบในสิ่งมีชีวิตซึ่งสามารถตรวจสอบได้หลายวิธี ได้แก่

1) เทคนิคทางแอนติบอดี (Antibody techniques) เป็นการตรวจสอบในระดับโปรตีนโดยใช้หลักการทำงานของ แอนติเจน-แอนติบอดี ที่มีความไวสูง สามารถวิเคราะห์ผลของปฏิกิริยาได้ทั้งในเชิงคุณภาพและปริมาณ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้ตรวจสอบการแสดงออกของโปรตีน VTG หรือเอนไซม์ แต่ทั้งนี้วิธีการนี้จำเป็นต้องใช้แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งมีชีวิตชนิดนั้น ๆ จึงเป็นข้อจำกัดของการวิเคราะห์ด้วยวิธีนี้ (Jonsson, Schiedek, Grøsvik, & Goksøyr, 2006)

2) การวัดปริมาณอัลคาไลน์ เลบายฟอสฟอรัส เป็นวิธีการตรวจสอบโปรตีน VTG ทางอ้อมโดยวิธีการตรวจวัดฟอสฟอรัสที่เป็นส่วนประกอบสำคัญของโปรตีน VTG ในร่างกายสิ่งมีชีวิต เช่น น้ำเลือด (plasma) (Kramer et al., 1998)

3) การวัดการออกฤทธิ์ของฮอร์โมนเอสโตรเจน เช่น วิธีการ YES assay (Xu et al., 2016)

4) การตรวจสอบในระดับโปรตีน เช่น เทคนิค SDS-PAGE, COMT assay (Xu et al., 2016)

5) การตรวจสอบโดยเทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล ได้แก่ การวัดระดับการแสดงออกของยีน การตรวจหาการเปลี่ยนแปลงของตัวชี้วัดทางชีวภาพ ด้วยเทคนิคต่าง ๆ เช่น reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) หรือ reverse transcription quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR) เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงระดับการแสดงออกของยีน เป็นต้น

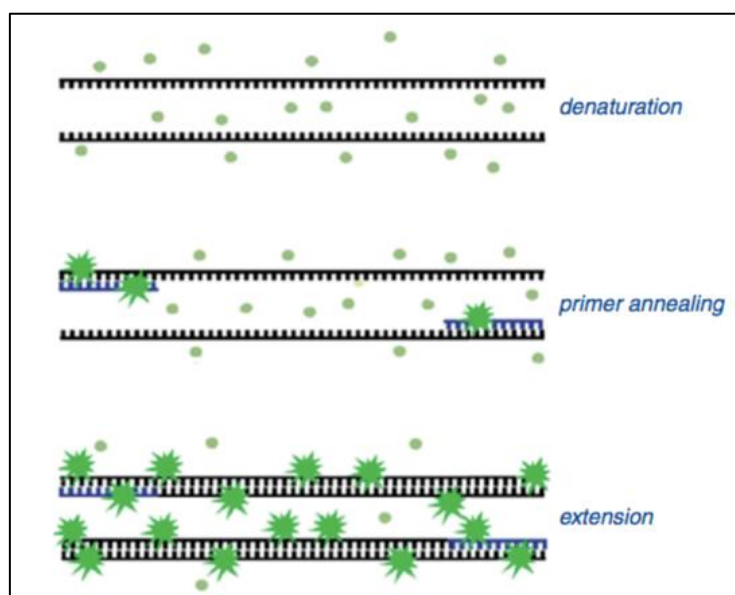
#### 2.4.1 เทคนิคทางชีววิทยาระดับโมเลกุล

วิธีการ Polymerase Chain Reaction (PCR) ถูกพัฒนาโดย Kary Mullis ในปี ค.ศ. 1980 สำหรับใช้เพิ่มจำนวน DNA ต้นแบบในหลอดทดลองโดยอาศัยหลักการทำงานของ DNA polymerase เพื่อสังเคราะห์ DNA สายใหม่ เมื่อปฏิกิริยาสิ้นสุดจะทำให้ได้ DNA จำนวนมาก ซึ่งวิธีการ PCR นี้เป็นวิธีการพื้นฐานทางชีวโมเลกุลที่สำคัญ (Pray, 2008) ปัจจุบันวิธีการที่พัฒนาจากวิธีการ PCR พื้นฐานเรียกว่า Reverse Transcription quantitative PCR (RT-qPCR) ถูกพัฒนาให้มีความไว และความจำเพาะเพิ่มสูงขึ้น โดยการคิดสารเรืองแสงทำให้สามารถวิเคราะห์ผลได้ในขณะทำปฏิกิริยา เพื่อลดเวลาและการปนเปื้อนในการตรวจสอบขั้นตอนสุดท้าย โดยใช้การตรวจวิเคราะห์ melting temperature ( $T_m$ ) ของยีนที่มีเอกลักษณ์จำเพาะ โดยไม่จำเป็นต้องวิเคราะห์ผลด้วย Electrophoresis อีกครั้ง ทำให้วิธีการ RT-qPCR ถูกนำมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลาย รวมถึงใช้ประเมินความเสี่ยงของสารพิษในสิ่งมีชีวิต (Arya et al., 2005; Heid, Stevens, Livak, & Williams, 1996; Valasek & Repa, 2005)

เนื่องจากปฏิกิริยา RT-qPCR เป็นปฏิกิริยาที่มีความไวและความจำเพาะสูง ใช้ปริมาณตัวอย่างการตรวจน้อย ช่วงการวัดปริมาณกว้าง (wide dynamic range) สามารถใช้เทคนิคการตรวจตามผลผลิต PCR ได้ เช่น การใช้สี SYBR-Green (ภาพที่ 2-10) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารเรืองแสงเข้าจับที่บริเวณ minor group ของ DNA สายคู่ เมื่อ SYBR-Green เกาะกับ DNA สายคู่และถูกกระตุ้น (excite) ด้วยแสงซึ่งความยาวคลื่นที่เหมาะสมจะคายพลังงาน (emission) ออกมาในรูปของคลื่นแสงทำให้สามารถตรวจจับได้ด้วยตัวรับสัญญาณ ในขั้นตอนของการ annealing และ extension จะเกิดการจับของสารสี ทำให้การเรืองแสงเพิ่มขึ้นสูงสุดในช่วง extension และเมื่อเข้าสู่ขั้นตอน denaturation สาย DNA จะแยกจากกันทำให้สี SYBR-Green ถูกปลดปล่อยจากสาย DNA ส่งผลให้การเรืองแสงลดลงซึ่งปริมาณความเข้มแสงจะแปรผันตามปริมาณผลผลิตของปฏิกิริยาที่เพิ่มขึ้นในระหว่างการทำปฏิกิริยา ข้อมูลจะถูกประมวลผลและแสดงออกมาเป็นกราฟการเพิ่มจำนวนของผลผลิต (amplification curve) ซึ่งแสดงระดับความเข้มแสงที่เปลี่ยนแปลงในปฏิกิริยาแต่ละแบบสภาพจริง ณ เวลาจริง โดยตัวอย่างที่ให้ผลบวกมีค่าความเข้มแสงสูงเกินระดับค่าพื้นหลัง (background) โดยบอกเป็นรอบของปฏิกิริยาที่ค่าความเข้มแสงมีค่าเกินพื้นหลังเรียกว่า Cycle threshold (Ct) ดังนั้นตัวอย่างที่มีค่า Ct ต่ำแสดงว่ามีปริมาณของ DNA เป้าหมายมากกว่าตัวอย่างที่มีค่า Ct สูง ดังนั้นจึงสามารถใช้ค่า Ct เป็นตัวเปรียบเทียบการเพิ่มจำนวนของ DNA เป้าหมายได้

แต่อย่างไรก็ตามการจับของ SYBR-Green กับ DNA สายคู่เป็นการจับแบบไม่จำเพาะ กล่าวคือสามารถจับได้ทั้งผลผลิต PCR ที่จำเพาะและไม่จำเพาะรวมถึงสามารถจับกับไพโรเมอร์

ไดเมอร์ทำให้ต้องใช้วิธีการแยกสัญญาณการเรืองแสงที่เกิดจากผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะหรือไพรมเมอร์ไดเมอร์ โดยใช้การเปรียบเทียบค่าอุณหภูมิที่หลอมเหลวหรือ melting temperature ( $T_m$ ) ซึ่งเป็นค่าอุณหภูมิที่ทำให้สาย DNA สายคู่แยกจากกัน 50% โดยเป็นค่าอุณหภูมิที่เป็นเอกลักษณ์ของแต่ละ DNA สายคู่แต่ละชิ้นและแปรผันโดยตรงกับลำดับนิวคลีโอไทด์ ปริมาณ % CG และความยาวของ DNA สายคู่ นั้นซึ่งสามารถใช้แยกไพรมเมอร์ไดเมอร์และผลผลิต PCR ที่ไม่จำเพาะออกจากผลผลิต PCR ที่ต้องการ ได้ (วีระพงษ์ ลulitanนท์, 2557)



ภาพที่ 2-10 การเข้าจับ DNA สายคู่ของ SYBR-Green ในปฏิกิริยา RT-qPCR (Fraga, Meulia, & Fenster, 2014)

แต่อย่างไรก็ตามการปรับสภาวะของปฏิกิริยา RT-qPCR ให้เหมาะสมเป็นจุดสำคัญที่ช่วยให้การทำ RT-qPCR ได้ผลที่ถูกต้องโดยวัตถุประสงค์หลักเพื่อให้ได้ความจำเพาะ ความไว และประสิทธิภาพ (efficiency) ที่บ่งชี้ถึงประสิทธิภาพของปฏิกิริยาในการเพิ่มจำนวน DNA ต้นแบบซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากประสิทธิภาพการเพิ่มขยายปริมาณ DNA มาตรฐานประมาณ 5 ระดับความเข้มข้น จากนั้นนำมาทำปฏิกิริยา RT-qPCR และนำข้อมูลมาสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างค่า  $\log_{10}$  ของความเข้มข้น กับค่า  $C_t$  เพื่อหาค่าความชันของกราฟ (Slope) ซึ่งค่าความชันที่ได้มา สามารถนำมาหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-qPCR (Efficiency; E) (Brankatschk, Bodenhausen, & Bürgmann, 2012) จากสมการ

$$E = 10^{(-1/\text{Slope})}$$



ค่า E ที่ยอมรับได้ในปฏิกิริยา RT-qPCR โดยทั่วไปคือ 90-110% (Broeders et al., 2014) ในกรณีที่ค่า E มีค่าต่ำกว่า 90% บ่งชี้ว่ามีประสิทธิภาพต่ำ เช่น สารในปฏิกิริยาไม่เหมาะสม อุณหภูมิ และเวลาของปฏิกิริยาไม่เหมาะสม ปริมาณของ cDNA ต้นแบบที่ไม่มีคุณภาพหรือไม่เพียงพอในการทำปฏิกิริยา เป็นต้น ในทางตรงกันข้ามหากค่า E สูงกว่า 100% บ่งชี้ว่ามีการเพิ่มจำนวน DNA ในปฏิกิริยาแบบไม่จำเพาะทำให้เกิดผลผลิตของปฏิกิริยาที่ไม่เหมาะสม จึงจำเป็นต้องวิเคราะห์หาสาเหตุเพื่อแก้ไข (Bustin et al., 2009)

ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนโดยใช้ RT-qPCR นิยมใช้วิธีการหาปริมาณการแสดงออกแบบสัมพัทธ์ (Relative quantification) โดยศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในตัวอย่างหลายตัวอย่างที่มีสถานะการทดลองที่แตกต่างกัน ซึ่งตัวอย่างแต่ละตัวอย่างนั้นแตกต่างกันทั้งในด้านปริมาณและคุณภาพ เช่น ปริมาณและคุณภาพของ RNA จากตัวอย่าง รวมถึงประสิทธิภาพของการสังเคราะห์ cDNA เป็นต้น เพื่อให้สามารถวิเคราะห์เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในแต่ละตัวอย่างจึงจำเป็นต้องใช้วิธีการเปรียบเทียบ โดยหาอัตราส่วนการแสดงออกของยีนเป้าหมายที่สนใจศึกษาต่อยีนอ้างอิง (reference gene) ซึ่งเป็นการปรับค่าทำให้เป็นบรรทัดฐานเพื่อลดความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ หรือที่เรียกว่า Normalization ซึ่งสามารถนำอัตราส่วนนี้มาเปรียบเทียบระหว่างตัวอย่างได้ ยีนอ้างอิงโดยทั่วไปจะใช้ยีนในกลุ่มที่เรียกว่า housekeeping gene หรือยีนที่มีการแสดงออกคงที่สม่ำเสมอตลอดเวลาในสิ่งมีชีวิตเพื่อดำรงหน้าที่พื้นฐานของเซลล์ และมีการแสดงออกในทุกเซลล์ของสิ่งมีชีวิตทุกสภาวะ (Kozera & Rapacz, 2013; Vandesompele et al., 2012) ดังนั้นปัจจัยสำคัญในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนแบบสัมพัทธ์คือการหา ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมสำหรับเปรียบเทียบกับยีนเป้าหมายที่สนใจศึกษา เนื่องจากยีนอ้างอิงที่ไม่เหมาะสมจะส่งผลกระทบต่อความถูกต้องแม่นยำก่อให้เกิดความคลาดเคลื่อนของการวิเคราะห์ผลได้ ตัวอย่างของยีนอ้างอิง เช่น ยีนที่ทำหน้าที่สังเคราะห์องค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์ ได้แก่ ยีน *β-actin* ทำหน้าที่เกี่ยวกับการสร้างส่วนประกอบของ cytoskeleton ยีน *ribosomal rRNA* สังเคราะห์โปรตีนไรโบโซมที่สำคัญในกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น อย่างไรก็ตามปัจจุบันพบว่ายีนเหล่านี้มีการควบคุมการแสดงออกทำให้มีระดับการแสดงออกไม่เท่ากันเมื่ออยู่ในสถานะที่ต่างกัน ด้วยเหตุนี้การคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมมีเกณฑ์การพิจารณาที่สำคัญคือ ยีนอ้างอิงที่เลือกจะไม่ถูกควบคุมในสถานะที่ใช้ในการทดลอง ดังนั้นจึงควรทดสอบว่าภายใต้สภาวะที่ทำการทดลอง การแสดงออกของยีนอ้างอิงมีการเปลี่ยนแปลงหรือไม่ (วีระพงศ์ ลulitanนท์, 2557; Radonic et al., 2004) ซึ่งในการศึกษาครั้งนี้ที่คัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุดจากยีน 3 ยีน คือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ *β-actin*

ความแม่นยำของการวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเกิดจากการนำยีนอ้างอิงมาเทียบเคียงกับยีนเป้าหมายในแต่ละปฏิกิริยาซึ่งมีความแตกต่างกันทั้งปัจจัยของสารตั้งต้น ได้แก่ ปริมาณและคุณภาพของ DNA ต้นแบบ ปริมาณและคุณภาพของสารในปฏิกิริยารวมถึงปัจจัยการศึกษาที่แตกต่างกันทั้งในเรื่องของเซลล์เนื้อเยื่อสิ่งมีชีวิตและสภาพแวดล้อม การใช้ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจึงมีความจำเป็น (Radonić et al., 2004) ปัจจุบันมีการพัฒนาวิธีการเพื่อใช้คัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมต่าง ๆ เช่น การใช้โปรแกรมทางคณิตศาสตร์ เช่น โปรแกรม Normfinder โปรแกรม Bestkeeper หรือการใช้หลักการทางคณิตศาสตร์ เช่น การวิเคราะห์ค่า  $\Delta Ct$  ของยีนอ้างอิง เป็นต้น แต่อย่างไรก็ตามวิธีการวิเคราะห์หานั้นเป็นเพียงวิธีการขั้นต้นในการคัดเลือกยีน ดังนั้นจึงควรใช้หลายวิธีร่วมกันวิเคราะห์ เพื่อให้ได้ผลที่คลาดเคลื่อนน้อยที่สุด (Andersen, Jensen, & Ørntoft, 2004; Pfaffl, Tichopad, Prgomet, & Neuvians, 2004; Pisamai, Rungsipipat, Kalpravidh, & Suriyaphol, 2016; Silver, Best, Jiang, & Thein, 2006) โดยแต่ละวิธีมีหลักการดังนี้

1) Normfinder เป็นวิธีการวิเคราะห์ค่าความคงที่ของระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มการทดลองซึ่งวิเคราะห์ค่าระดับการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์หรือ Relative quantity (RQ) สามารถคำนวณได้จากสมการข้างล่าง

$$RQ \text{ (Relative quantification)} = E^{(\min Ct - \text{Sample Ct})}$$

เมื่อ  $E = \text{PCR efficiency}$  หรือค่าประสิทธิภาพของยีนในปฏิกิริยา RT-qPCR  
 $\min Ct = \text{ค่า Cycle threshold (Ct) ต่ำสุดของยีนอ้างอิงแต่ละยีน}$   
 $\text{Sample Ct} = \text{ค่า Ct ของยีนอ้างอิงแต่ละตัวอย่าง}$

เป็นการใช้หลักการพื้นฐานทางสถิติ (two-way ANOVA) โปรแกรมนี้สามารถวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (stability value; SV) ระหว่างกลุ่มของระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงหรือความแปรปรวนภายในกลุ่มได้ ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุดคือยีนที่มีค่า SV น้อยที่สุด หรือมีค่าความแปรปรวนของการแสดงออกของยีนที่ต่ำที่สุด (Andersen et al., 2006)

2) Bestkeeper เป็นโปรแกรมที่ใช้คัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมโดยการใช้พื้นฐานทางสถิติของ Pearson correlation coefficient ( $r$ ), ความแปรปรวน standard deviation (SD) a coefficient of variance (CV) ยีนอ้างอิงที่มีค่า Pearson correlation coefficient ( $r$ ) และมีค่าความแปรปรวนต่ำจะถูกคำนวณรวมกันแล้วเรียกว่าค่า Bestkeeper index (BKI) สามารถวิเคราะห์จากค่าระดับการแสดงออกของยีน (Ct) ในกรณียีนอ้างอิงมีค่า Pearson correlation coefficient ( $r$ ) ค่า

standard deviation (SD) หรือค่า Bestkeeper index (BKI) จะพิจารณาว่าเป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุด (Pfaffl et al., 2004)

3)  $\Delta Ct$  เป็นวิธีการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกสัมพัทธ์ของคู่ยีนในแต่ละตัวอย่างเพื่อใช้คัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสม โดยมีหลักการว่าหากค่า  $\Delta Ct$  ระหว่างยีนมีระดับการแสดงออกที่คงที่ในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างนั้นหมายถึงคู่ยีนนั้นมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ต่ำ แสดงถึงยีนนั้นมีระดับการแสดงออกคงที่ระหว่างตัวอย่าง ในการคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมคือมีการแสดงออกที่คงที่หรือยีนอ้างอิงที่มี SD ของ  $\Delta Ct$  ที่ต่ำที่สุด (Silver et al., 2006)

เมื่อคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมแล้วสามารถนำยีนอ้างอิงดังกล่าวมาวิเคราะห์หาระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย ในการวิจัยนี้คือยีน *cyp4* และ *vtg* แบบสัมพัทธ์โดยวิธี  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001)

## 2.5 ตัวชี้วัดทางชีวภาพ (Biomarkers)

Biomarkers หรือตัวชี้วัดทางชีวภาพ เป็นเครื่องมือที่สำคัญใช้เป็นตัวชี้วัด ซึ่งสามารถตรวจได้ภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารมลพิษแปลกปลอมในสิ่งแวดล้อมเข้าสู่ร่างกาย ตัวชี้วัดทางชีวภาพนำมาใช้ประโยชน์ในการประเมินสถานการณ์การปนเปื้อนของสารพิษในสิ่งแวดล้อม ซึ่งตัวบ่งชี้ทางชีวภาพสามารถวัดได้จากของเหลวภายในร่างกายสิ่งมีชีวิต เซลล์หรือเนื้อเยื่อ การเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นในระดับเซลล์ ที่ตอบสนองทางชีวเคมีที่สำคัญในสิ่งมีชีวิตซึ่งได้รับสัมผัสสารมลพิษแปลกปลอม โดยทั่วไปตัวชี้วัดทางชีวภาพแบ่งออกเป็น 3 ชนิดคือ (Gil & Pla, 2001)

- 1) ตัวชี้วัดทางการสัมผัสทางชีวภาพ (Biomarkers of exposure) คือตัวชี้วัดที่หาปริมาณการสัมผัสเป็นการวัดสารเคมีโดยตรงหรือการตรวจหาสารเมแทบอไลต์ภายในสิ่งมีชีวิต
- 2) ตัวชี้วัดผลกระทบทางชีวภาพ (Biomarkers of effect) คือการตรวจการตอบสนองต่อร่างกายสิ่งมีชีวิตที่เกิดขึ้นในอวัยวะหรือเซลล์เป้าหมาย
- 3) ตัวชี้วัดทางชีวภาพของความไว (Biomarkers of susceptibility) คือการตอบสนองของร่างกายหรือพันธุกรรมในสิ่งมีชีวิตที่ตอบสนองต่างกันเมื่อได้รับพิษจากสารเคมี

สำหรับการศึกษาโดยใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ศึกษาในระดับชีวโมเลกุลจึงถูกนำมาใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีต่าง ๆ ในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสามารถตรวจสอบได้รวดเร็ว แม้มีการปนเปื้อนของสารมลพิษในปริมาณน้อย ดังนั้นการศึกษาในระดับชีวโมเลกุลจึงเป็นวิธีการที่รวดเร็ว การประเมินผลของสารพิษในสิ่งแวดล้อม (Walker et al., 2005) ปัจจุบันมีงานวิจัยที่รายงานถึงตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> รวมถึงสารในกลุ่ม EDCs

ทั้งในสัตว์มีกระดูกสันหลังและไม่มีกระดูกสันหลังหลายชนิด เช่น เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYP) และ โพรตีนไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; VTG) เป็นต้น

### 2.5.1 เอนไซม์ Cytochrome P450

เอนไซม์ Cytochrome P450 (CYP) เป็นเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึม เป็นกลุ่มเอนไซม์ขนาดใหญ่สามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตทุกชนิดตั้งแต่แบคทีเรีย รา พืช สัตว์ รวมถึงมนุษย์ เอนไซม์ CYP ซึ่งถูกควบคุมการสังเคราะห์โดยยีน *cyp* มีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับวิถีการสังเคราะห์และการสลาย (biosynthesis และ catalysis) ของสารจำเป็นภายในร่างกายและยังเกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของสารแปลกปลอมภายนอกในร่างกาย (exogenous compounds หรือ xenobiotics) เช่น สาร BPA (Sasaki, Akahira, Oshiman, Tsuchido, & Matsumura, 2005; Uno, Ishizuka, & Itakura, 2012; Zanette, Goldstone, Bairy, & Stegeman, 2011) การควบคุมการสังเคราะห์โดยยีน *cyp* ของเอนไซม์ CYP ส่วนใหญ่สังเคราะห์ภายในตับแต่สามารถพบในอวัยวะอื่นเช่นกัน ได้แก่ สมอง ปอด ลำไส้ใหญ่ เป็นต้น จากรายงานการศึกษาเอนไซม์ CYP พบว่าในสัตว์มีกระดูกสันหลังมีเอนไซม์ CYP หลายกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับเมแทบอลิซึมของสาร BPA เช่น CYP1, CYP2, CYP3, CYP4, CYP17 และ CYP19 ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ (Niwa et al., 2001; Zhang et al., 2011) จากรายงานการศึกษาพบว่าเอนไซม์ CYP4 มีบทบาทในการเมแทบอลิซึมของสารกลุ่ม EDCs หลายชนิด เช่น สาร E<sub>2</sub>, biocide tributyltin (TBTO) รวมถึงสาร BPA (Martínez-Paz, Morales, Martínez-Guitarte, & Morcillo, 2012) และในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง เช่น ในหอยฝาเดียวและหอยสองฝาพบว่าสารในกลุ่ม EDCs เช่นสาร either tributyltin chloride (TBT) และสาร E<sub>2</sub> ในหอย Abalone และสาร diethylhexylphthalate (DEHP) สามารถชักนำการแสดงออกของยีน *cyp4* ในหอยน้ำจืด (*Unio tumidus*) และ Benzo(a)pyrene ส่งผลต่อการแสดงออกของยีน *cyp4* ในหอย *Ruditapes philipinarum* (Chaty, Rodius, & Vasseur, 2004; Martínez-Paz et al., 2012; Pan, Liu, Xu, & Miao, 2011; Wan, Whang, Choi, Lee, & Lee, 2011) นักวิจัยจึงศึกษาระดับการแสดงออกของยีนในสัตว์น้ำมาประยุกต์ใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพติดตามการปนเปื้อนของสาร EDCs ในแหล่งน้ำอย่างแพร่หลาย

### 2.5.2 โพรตีนไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; VTG)

ไวเทลโลเจนิน (vitellogenin; VTG) เป็นโปรตีนตั้งต้นของโปรตีนไข่แดง (yolk) ซึ่งพบในสัตว์ที่ออกลูกเป็นไข่ กระบวนการสังเคราะห์ VTG ในสัตว์มีกระดูกสันหลังจะถูกควบคุมโดย E<sub>2</sub> ซึ่งเป็นฮอร์โมนในกลุ่มสเตียรอยด์ที่ถูกสังเคราะห์ในร่างกาย โดย E<sub>2</sub> จะจับกับตัวรับสัญญาณเอสโตรเจน (estrogen receptor; ER) และกระตุ้นให้ยีน *vlg* ถอดรหัส (transcription) เป็น mRNA

และจะถูกแปลรหัส (translation) เป็น โปรตีน VTG สะสมในบริเวณเซลล์ไข่แล้วสร้างเป็นโปรตีนไข่แดงเพื่อทำหน้าที่เป็นอาหารสะสมของตัวอ่อนต่อไป (Arukwe, 2001)

ในหอยสองฝาพบว่า VTG ถูกสังเคราะห์จากการควบคุมของระบบประสาทส่วนกลาง และ  $E_2$  ในช่วงการสร้างเซลล์ไข่ของเพศเมียวัยเจริญพันธุ์เท่านั้น แต่พบน้อยมากในสัตว์เพศผู้และสัตว์วัยอ่อน (Gagné, Blaise, Pellerin, & Gauthier-Clerc, 2002; Osada, Takamura, Sato, & Mori, 2003) แต่อย่างไรก็ตามสัตว์เพศผู้หรือสัตว์วัยอ่อนสามารถสังเคราะห์ VTG ได้เมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารในกลุ่ม EDCs จึงมีการศึกษาการแสดงออกในระดับ โปรตีน และระดับยีนในสัตว์น้ำหลายชนิด (Kinnberg, Korgaard, Bjerregard, & Jespersen, 2000) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอยสองฝาและนำมาประยุกต์ใช้ติดตามการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม EDCs ในแหล่งน้ำ (Shi et al., 2015) เช่นกัน

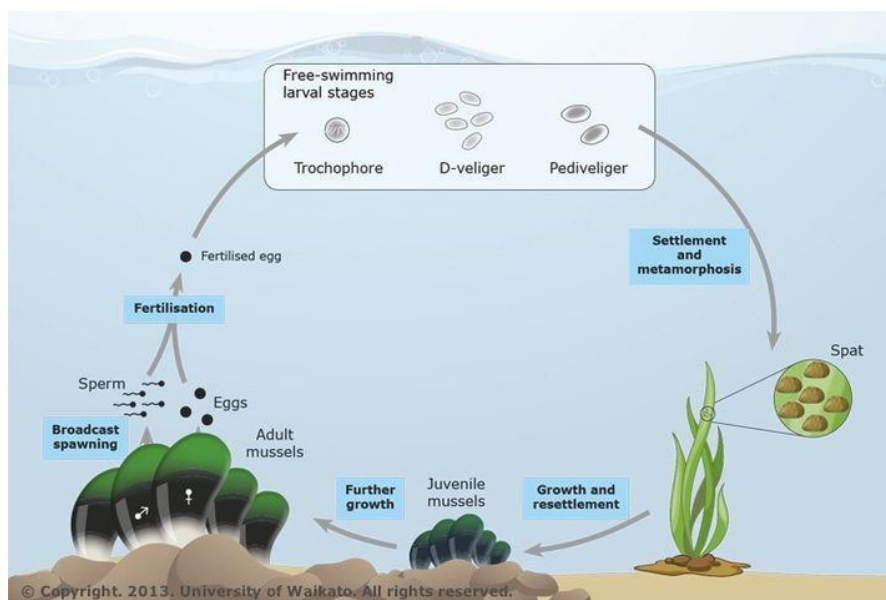
## 2.6 หอยแมลงภู่

หอยแมลงภู่มีชื่อวิทยาศาสตร์ว่า *Perna viridis* (Siddull, 1980) มีชื่อสามัญว่า green mussel เป็นหอยสองฝาที่มีคุณค่าทางเศรษฐกิจและนิยมนำบริโภคอย่างแพร่หลายมีการแพร่กระจายและเพาะเลี้ยงทั่วไปในแถบประเทศเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทยมีการเพาะเลี้ยงอย่างแพร่หลายบริเวณชายฝั่งทะเลอ่าวไทยโดยประเทศไทยพบหอยแมลงภู่ *P. viridis* เพียงชนิดเดียวโดยจัดอยู่ในวงศ์ Mytilidae สกุล *Perna* (Siddull, 1980)

หอยแมลงภู่เป็นหอยสองฝามีลักษณะเท่ากันแบบสมมาตร (bilateral symmetry) เปลือกหอยมีสีเขียวเข้มและน้ำตาล ผิวด้านในเปลือกมีลักษณะสีขาวมันวาว เปลือกทั้งสองด้านยึดติดกันด้วยเส้นเอ็น (ligament) ที่อยู่ด้านใน มีลำตัวอยู่ภายในเปลือกที่ประกอบด้วยเยื่อหุ้มลำตัว (mantle) ซึ่งอยู่ติดกับฝาทั้งสองข้างระหว่างเยื่อหุ้มลำตัวเป็นอวัยวะภายในต่าง ๆ มีเหงือก (gill) ทำหน้าที่หายใจแลกเปลี่ยนก๊าซ และกรองอาหาร บริเวณฐานส่วนเท้าจะมีต่อมสร้างเส้นใย (byssal gland) ที่ใช้ยึดเกาะกับหินหรือเสาไม้ (Gosling, 2003)

วงจรชีวิตของหอยแมลงภู่ (ภาพที่ 2-11) เมื่อหอยแมลงภู่ถึงวัยเจริญพันธุ์จะปล่อยไข่และน้ำเชื้อออกมาเพื่อผสมพันธุ์ภายนอก (external fertilization) ไข่ที่ได้รับการผสมจะพัฒนาโดยเริ่มการแบ่งเซลล์เพิ่มพัฒนาเป็นตัวอ่อน (embryo) และพัฒนาสู่ระยะว่ายน้ำที่เรียกว่า Trochophore มีขนาดประมาณ 0.045-0.055 mm โดยใช้ระยะเวลาประมาณ 12-16 ชั่วโมงจากนั้นจะพัฒนารูปร่างและเจริญสู่ระยะ D-hinge veliger ซึ่งจะมีลักษณะคล้ายตัวอักษร D มีขนาดประมาณ 0.055-0.100  $\mu\text{m}$  จะพัฒนาสู่ระยะที่เรียกว่า pediveliger larvae เมื่ออายุประมาณ 3 สัปดาห์และเมื่อลูกหอยมีอายุ 4 สัปดาห์จะมีขนาดประมาณ 0.5-0.8 mm เข้าสู่ระยะเริ่มลงเกาะและพัฒนาสู่ระยะ juvenile

เมื่อลูกหอยมีอายุประมาณ 45 วันจะมีความยาวเปลือกประมาณ 5-10 mm ลูกหอยจะมีลักษณะเหมือนพ่อแม่ทุกประการ เริ่มมีการปล่อยเส้นใยเหนียวเพื่อยึดเกาะกับวัสดุและเจริญเติบโตต่อไป (Soon & Ransangan, 2014)



ภาพที่ 2-11 วงจรชีวิตของหอยแมลงภู่มะพร้าว (University of Waikato, 2013)

ช่วงหนึ่งของวงจรชีวิตจะเกาะนิ่งอยู่กับวัสดุ เช่น เสาหลัก เชือก อาศัยในบริเวณปากแม่น้ำเขตน้ำขึ้นน้ำลง กินอาหาร ได้แก่ แพลงก์ตอนพืชและแพลงก์ตอนสัตว์ขนาดเล็กที่ลอยอยู่ในน้ำโดยกรองจากน้ำ (filter-feeding) (Gosling, 2003; Rajagopal et al., 2006; Soon & Ransangan, 2014)

ปัจจุบันมีการใช้หอยแมลงภู่มะพร้าวประเมินมลพิษในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เช่น โลหะหนัก สารปิโตรเลียม รวมถึงสาร EDCs เนื่องจากหอยสามารถทนรับสารเคมีต่าง ๆ และสะสมสารเคมีได้โดยไม่ตายอีกทั้งยังเป็นสัตว์ที่เคลื่อนที่ช้า หรือเกาะนิ่งจึงเก็บตัวอย่างได้ง่าย (Goldberg & Bertine, 2000; Isobe et al., 2007) จากคุณสมบัติข้างต้นนักวิจัยจึงนิยมนำเอาหอยแมลงภู่มะพร้าวมาใช้ในการบ่งชี้มลภาวะในบริเวณชายฝั่งทะเลอย่างแพร่หลาย (Isobe et al, 2007; Yap, Cheng, Karami, & Ismail, 2016; Yap, Shahbazi, & Zakaria, 2012)

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินงานวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

- 1) Sep-pak (C18) column (Water, USA)
- 2) Alliance e2695 with UV detector (Water, USA)
- 3) ถังพลาสติก PP สำหรับเลี้ยงหอยแมลงภู่น้ำจืดขนาด 20x32x20 cm
- 4) อุปกรณ์ผ่าตัด
- 5) ปากกิลิป
- 6) ปิเปต ขนาด 10, 20, 200, 1000  $\mu$ L
- 7) ทิปและทิปกรอง ขนาด 10, 20, 200, 1000  $\mu$ L
- 8) หลอดไมโครเซนติฟิวส์ ขนาด 0.2, 0.6, 1.5 และ 2 mL
- 9) เครื่อง Cool-Hotter day bath incubator (Major science, USA)
- 10) เครื่อง Vortex (Disruptor Gene, USA)
- 11) เครื่องชั่งน้ำหนักรุ่น MXX-612 (Denver Instrument, USA)
- 12) เครื่องชั่งน้ำหนัก (Tanita, Japan)
- 13) Parafilm (Pechiney Plastic Packaging, USA)
- 14) ตู้แช่แข็ง (-20 °C) (Hitachi, Japan)
- 15) เครื่องปั่นเหวี่ยงรุ่น LM-60 (Lio Fuge, Thailand)
- 16) Nanodrop 2000/2000c spectrophotometer (Thermo Scientific, USA)
- 17) เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (Autoclave) รุ่น SA-232X (Gemmy, Taiwan)
- 18) อ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิ (Water bath) รุ่น Ultratherm Bwt-U (Biosan, USA)
- 19) เครื่อง Electrophoresis รุ่น EPS 3500 (Pharmacia Biotech, USA)
- 20) เครื่อง Realtime PCR รุ่น StepOne plus (Thermo Fisher Scientific, UK)
- 21) อุปกรณ์ถ่ายภาพเจล In genius gel documentation system (Syngene, UK)
- 22) อุปกรณ์ multiple probe YSI185 conductivity (YSI, Yellow Springs, USA)
- 23) กระดาษกรอง (Watchman, USA)
- 24) กระดาษกรอง GF/F (Watchman, USA)
- 25) Kitahara-type water sampler (Japan)

### 3.2 สารเคมี

- 1) Methanol HiPerSolv CHROMANORM (VWR Chemicals, USA)
- 2) BisphenolA (BPA) purity >99% (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- 3) 17 $\beta$ -estradiol (E<sub>2</sub>) purity >98% (Sigma-Aldrich, Switzerland)
- 4) Dimethyl sulfoxide (Vivantis, USA)
- 5) Trizol reagent (Invitrogen, USA)
- 6) Chloroform (VWR Chemicals, USA)
- 7) Isopropanol (VWR Chemicals, USA)
- 8) Absolute ethanol (VWR Chemicals, USA)
- 9) Nuclease free water (GIBBO, USA)
- 10) iScript Reverse Transcription Supermix for RT-qPCR (Biorad, USA)
- 11) RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, USA)
- 12) Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master mix (2X) (Thermo scientific, USA)
- 13) Ethidium bromide (Invitrogen, USA)
- 14) Nitrogen gas
- 15) DNase I (Thermo Scientific, USA)
- 16) Agarose gel (Vivantis, USA)
- 17) Primers (Biodesign, Thailand)
- 18) Gene ruler 100 bp plus DNA ladder (Vivantis, USA)



### 3.3. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำและ หอยแมลงภู่

#### 3.3.1 พื้นที่ศึกษา

การทำวิจัยครั้งนี้ได้เลือกพื้นที่เก็บตัวอย่างในบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกเฉียงใต้ในจังหวัด ชลบุรี จังหวัดระยอง และจังหวัดตราด โดยกำหนดจุดเก็บตัวอย่างทั้งหมด 7 สถานี แสดง รายละเอียดพิภพจุดเก็บตัวอย่างและคุณภาพน้ำเบื้องต้นในตารางที่ 3-1 โดยดำเนินการเก็บตัวอย่าง ในช่วงเดือน ธันวาคม พ.ศ.2559-มกราคม พ.ศ.2560 แบ่งเป็น

1) ตัวอย่างน้ำจืด 3 สถานี คือบริเวณแหล่งอุตสาหกรรม ได้แก่ คลองซากหมาก (R2) จังหวัดระยอง บริเวณแหล่งชุมชน ได้แก่ คลองสังเขป (C1) จังหวัดชลบุรี และคลองพูน (R1) จังหวัดระยอง

2) ตัวอย่างน้ำทะเล 4 สถานี คือบริเวณแหล่งอุตสาหกรรม ได้แก่ มาบตาพุด (R3, R4) จังหวัดระยอง บริเวณแหล่งชุมชนและแหล่งท่องเที่ยว ได้แก่ หาดวอนนภา (C2) จังหวัดชลบุรี และ อ่าวตราด (T) จังหวัดตราด

3) ตัวอย่างหอยแมลงภู่ 3 สถานี คือ ฟาร์มเลี้ยงหอยแมลงภู่จากแหล่ง อุตสาหกรรมในบริเวณใกล้สถานีคลองซากหมาก (R2) จังหวัดระยอง และบริเวณแหล่งชุมชน ได้แก่ หาดวอนนภา (C2) จังหวัดชลบุรี และอ่าวตราด (T) จังหวัดตราด โดยมีรายละเอียดแผนที่จุด เก็บตัวอย่างดังภาพที่ 3-1 ดังนี้ (สำนักจัดการคุณภาพน้ำ, 2556)

คลองสังเขป (C1) เป็นคลองที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี เป็นคลองที่ รองรับน้ำเสียจากชุมชนเทศบาลบางทรายและมีรายงานจากสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 พบว่า คุณภาพน้ำจัดอยู่ในประเภทเสื่อมโทรมมาก

หาดวอนนภา (C2) เป็นชายฝั่งทะเลตั้งอยู่บริเวณตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี มีชุมชนหาดวอนนภา มีการทำประมงขนาดเล็กและเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ อีกทั้งยังเป็นแหล่ง รองรับน้ำทิ้งจากระบบบำบัดน้ำเสียเทศบาลแสนสุขได้

คลองพูน (R1) เป็นคลองระบายน้ำธรรมชาติ ที่ตั้งอยู่ในพื้นที่ตำบลบ้านฉาง จังหวัด ระยอง คลองนี้เป็นคลองที่ไหลผ่านชุมชนเทศบาลเมืองบ้านฉางและเทศบาลตำบลบ้านฉาง ซึ่ง ระบายน้ำลงสู่ทะเลบริเวณหาดพูนและหาดน้ำริน โดยมีรายงานจากสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 พบว่าคุณภาพน้ำจัดอยู่ในประเภทที่ 4-5 (เสื่อมโทรม-เสื่อมโทรมมาก)

คลองซากหมาก (R2) เป็นคลองตั้งอยู่ทางทิศตะวันออกของนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด บริเวณปากคลองมีชุมชนประมงขนาดเล็ก มีการเพาะเลี้ยงหอยแมลงภู่ในปากคลองบริเวณชายฝั่ง ทะเล คลองซากหมากเป็นคลองที่รองรับน้ำทิ้งที่ระบายออกจากนิคมอุตสาหกรรม นอกจากนี้ยังรับ

น้ำจากคลองน้ำดำซึ่งเป็นคลองสาธารณะ มีปริมาณน้ำมาก โดยมีรายงานจากสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 พบว่าคุณภาพน้ำจัดอยู่ในประเภทที่ 4-5 (เสื่อมโทรม-เสื่อมโทรมมาก)

อ่าวมาบตาพุด 1 (R3) เป็นชายฝั่งทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดโดยห่างออกจากชายฝั่ง 2 กิโลเมตร โดยมีรายงานจากสำนักงานสิ่งแวดล้อมภาคที่ 13 พบว่าคุณภาพน้ำในบริเวณนี้จัดอยู่ในประเภทที่ 4-5 (เสื่อมโทรม-เสื่อมโทรมมาก)

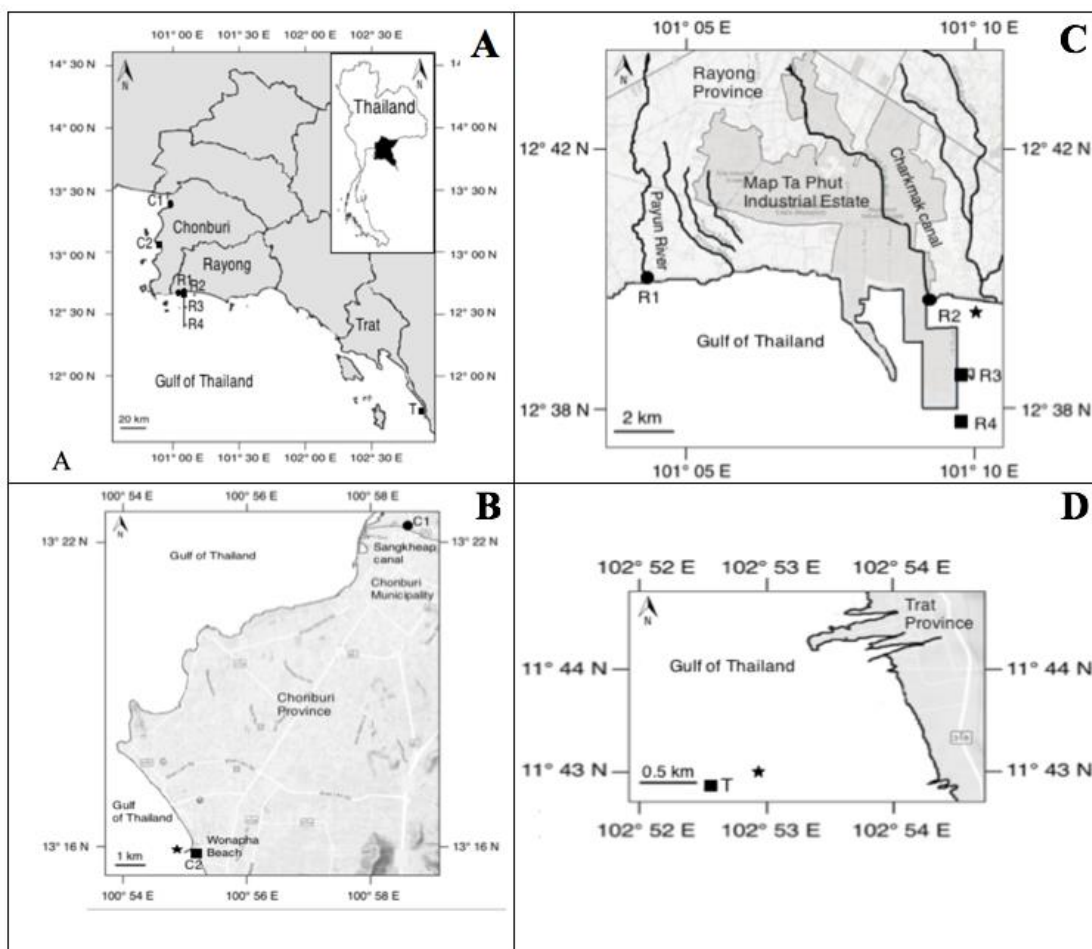
อ่าวมาบตาพุด 2 (R4) เป็นทะเลบริเวณนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดโดยห่างจากชายฝั่งประมาณ 5 กิโลเมตร พบว่าคุณภาพน้ำในบริเวณนี้จัดอยู่ในประเภทที่ 4 (เสื่อมโทรม)

อ่าวตราด (T) เป็นชายฝั่งทะเลตั้งอยู่ในอำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราดเป็นบริเวณที่ห่างไกลจากโรงงานอุตสาหกรรม โดยมีรายงานว่าคุณภาพน้ำจัดอยู่ในประเภทที่ 3 เพื่อการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ

ตารางที่ 3-1 รายละเอียดพิกัดจุดเก็บตัวอย่างและคุณภาพน้ำในแต่ละสถานี

Site	Sampling site			Water parameters				
	Location	Category	North Latitude	East Longitude	pH	Temperature (°C)	Salinity	DO (mg/l)
<b>Chonburi</b>								
C1	Sangkhep canal	Municipality wastewater	13.22.28.8	100.59.10.0	7.8	29.8	0.5	9.72
C2	Wonapha beach	coastal water, green mussel	13.16.07.9	100.55.21.8	8.0	26.9	28.9	NA
<b>Rayong</b>								
R1	Payun canal	freshwater	12.40.32.5	101.09.26.9	7.0	32.1	0.1	6
R2	Chak- mak canal	freshwater, green mussel	12.40.35.6	101.04.12.6	7.0	32.9	0.3	5.5
R3	MTP1	coastal water	12.38.54.0	101.10.06.4	7.8	25.7	29.4	6.05
R4	MTP2	coastal water	12.38.07.8	101.10.06.6	8.1	25.9	29.6	6.59
<b>Trat</b>								
T	Reference	coastal water, green mussel	11.43.05.8	102.53.07.0	8.0	29.6	29.0	5.78

NA = not available, MTP1, MTP2 = Map Ta Phut industrial estate



ภาพที่ 3-1 แผนที่สถานีเก็บตัวอย่างน้ำทะเล น้ำจืด (ลำคลอง/แม่น้ำ) และหอยแมลงภู่ บริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก; (A) แผนที่ภาคตะวันออก, (B) สถานีเก็บตัวอย่างในจังหวัดชลบุรี, (C) สถานีเก็บตัวอย่างในจังหวัดระยอง และ (D) สถานีเก็บตัวอย่างในจังหวัดตราด (เมื่อ ■ = สถานีเก็บตัวอย่างน้ำทะเล; ● = สถานีเก็บตัวอย่างน้ำจืด และ ★ = บริเวณฟาร์มเลี้ยงหอยแมลงภู่)

### 3.3.2 การเก็บตัวอย่างน้ำและหอยแมลงภู่

#### 3.3.2.1 ตัวอย่างน้ำจืดและน้ำทะเล

เก็บตัวอย่างน้ำจืดและน้ำทะเลที่ระดับความลึกจากผิวน้ำ 0.5 เมตร โดยเก็บน้ำปริมาตร 10 ลิตร (n=3) ด้วยกระบอกเก็บน้ำแบบ Kitahara-type water sampler (Japan) ซึ่งตัวอย่างน้ำจะถูกเก็บไว้ในขวดแบบพลาสติกโพลีเอทิลีนขนาด 15 ลิตรที่ล้างด้วยน้ำกลั่นและเมทานอล (HPLC grade) อย่างน้อย 3 ครั้ง ก่อนที่จะล้างด้วยน้ำตัวอย่างอีกครั้งและเก็บภาชนะบรรจุรักษาตัวอย่างน้ำ

ทั้งหมดแช่ในน้ำแข็งแล้วขนส่งมาที่ห้องปฏิบัติการภายใน 6 ชั่วโมง เก็บรักษาที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  จนกระทั่งนำไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร  $\text{E}_2$  ด้วยวิธีการ HPLC

### 3.3.2.2 ตัวอย่างหอยแมลงภู่

เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่ทั้งหมด 3 สถานีคือ สถานีหาดวอนนภา (C1) สถานีคลองซากหมาก (R2) และสถานีอ่าวตราด (T) จากฟาร์มหอยแมลงภู่ซึ่งมีข้อมูลการเพาะเลี้ยงที่ชัดเจน หอยมีลักษณะสมบูรณ์แข็งแรง มีน้ำหนักใกล้เคียงกัน จำนวนสถานีละ 18 ตัว โดยสุ่มเก็บจากสายเลี้ยงจำนวน 3 สาย ตัวอย่างหอยแมลงภู่แบ่งออกเป็น 2 กลุ่มตามขนาดคือขนาดใหญ่ (ตัวเต็มวัย) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 5-7 cm และขนาดเล็ก (วัยอ่อน) มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 1-2 cm บรรจุตัวอย่างลงในถุงซิปล็อกใสในกล่องใส่น้ำแข็งและขนส่งมาศึกษาที่ห้องปฏิบัติการ ทุกสถานีที่เก็บตัวอย่างจะบันทึกข้อมูลคุณภาพน้ำด้วยเครื่องวัด multiple probe YSI 85 (YSI, Yellow Springs, USA) ได้แก่ ปริมาณออกซิเจนในน้ำ (DO) อุณหภูมิ ความเค็ม (Salinity) และค่าความเป็นกรด-ด่าง (pH)

### 3.3.3 การเตรียมตัวอย่าง

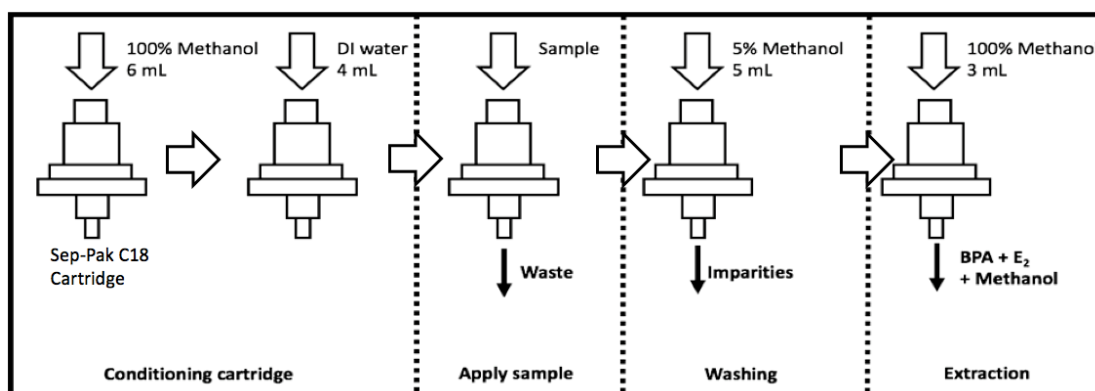
#### 3.3.3.1 การเตรียมตัวอย่างน้ำจืดและน้ำทะเล

กรองน้ำตัวอย่างผ่านกระดาษกรอง Whatman เบอร์ 1 จากนั้นจึงกรองผ่านชั้นตอนด้วย Glass fiber filters (Whatman, GF/F) อีกครั้ง จากนั้นทำการสกัดแยกสาร BPA และสาร  $\text{E}_2$  ในน้ำโดยใช้วิธีสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction; SPE) โดยใช้ Sep-Pak C18 cartridges อัตราการไหลผ่านของของเหลวเท่ากับ 5-10 mL/นาที ที่ดัดแปลงวิธีการของ Friesen, Chapman, and Aubin-Horth (2012) ดังขั้นตอนในภาพที่ 3-2 โดยสรุปวิธีทำดังนี้

1) เติม 100% เมทานอล ปริมาตร 6 mL ลงใน C18 cartridges อัตราการไหลเท่ากับ 5-10 mL/นาที จนหมด แล้วเติม DI water ปริมาตร 4 mL ให้ไหลผ่าน C18 cartridges ในอัตราเท่าเดิมจน DI water ผ่าน C18 cartridges จนหมด จากนั้นนำตัวอย่างน้ำ ปริมาตร 10 L มาผ่าน C18 cartridges จนครบปริมาตรจากนั้นทำ C18 cartridges ให้แห้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนเป็นเวลาประมาณ 5 นาที

2) ล้าง C18 cartridges ด้วย 5% เมทานอล ปริมาตร 5 mL โดยมีอัตราการไหลเท่าเดิม จนครบปริมาตร แล้วชะ (elute) โดยการเติม 100% เมทานอลปริมาตร 3 mL ลงใน C18 cartridges ใช้อัตราการไหลเท่าเดิมแล้วเก็บสารละลายที่ผ่าน C18 cartridges ลงในหลอดทดลอง

3) ตัวอย่างที่ได้จากข้อ 2) นำมาทำให้แห้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจนและเติมสารละลาย 75% เมทานอลจนได้ปริมาตรสุดท้าย 1 mL จึงนำตัวอย่างไปวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร  $\text{E}_2$  ด้วยวิธีการ HPLC



ภาพที่ 3-2 ขั้นตอนการสกัดสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ด้วยวิธีการสกัดด้วยเฟสของแข็ง (Solid Phase Extraction; SPE) (ดัดแปลงจาก Friesen et al., 2012)

### 3.3.3.2 การเตรียมตัวอย่างหอยแมลงภู

การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA สาร E<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภูทำโดยนำตัวอย่างทิ้งเปลือกชั้นน้ำหนัก วัดความยาวเปลือกก่อนนำมาตัดแยกใช้เฉพาะเนื้อเยื่อ hepatopancreas จากนั้นชั่งน้ำหนักเนื้อเยื่อปริมาณ 1 กรัม นำมาบดให้ละเอียดและสกัดตามวิธีการของ Gatidou et al. (2010) สรุปเป็นขั้นตอนได้ดังนี้

เติม 100% เมทานอล ปริมาตร 5 mL และน้ำกลั่น ปริมาตร 3 mL ลงในเนื้อเยื่อที่บดละเอียด แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 50 °C เป็นระยะเวลา 30 นาที เมื่อครบเวลาทำการปั่นแยกเนื้อเยื่อแล้วดูดสารละลายส่วนใสขึ้นบนใส่ในหลอดทดลองใหม่ปรับปริมาตรด้วยน้ำกลั่นจนครบ 100 mL แล้วนำไปสกัดด้วยวิธี SPE (ข้อ 3.3.3.1) เมื่อเสร็จสิ้น ทุกตัวอย่างจะถูกทำให้แห้งโดยเป่าด้วยก๊าซไนโตรเจน และเติมสารละลาย 75% เมทานอล จนได้ปริมาตรสุดท้าย 1 mL แล้วนำตัวอย่างไปวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ด้วยเทคนิค HPLC

### 3.3.4 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

ตัวอย่างน้ำและหอยแมลงภูจากข้อ 3.3.3.1 และ 3.3.3.2 จะถูกนำมาวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ด้วยเครื่อง HPLC ยี่ห้อ Waters Alliance รุ่น e2695 โดยวิเคราะห์แบบ isocratic ใช้ injection valve loop ที่ 10 µl และจับสัญญาณด้วย ยูวี-วิส ดีเทคเตอร์ (UV-vis detector) ที่ความยาวคลื่นแสงเท่ากับ 280 nm สภาวะในการวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ดัดแปลงวิธีวิเคราะห์ของ Card, Chin, Lee, and Khan (2012) และ Zhou, Wu, and Huang (2014) ใช้เฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ในอัตราส่วนของเมทานอล:น้ำ DI (75:25) อัตราการไหล (flow rate) ที่ 1.0 ml/นาที ฉีดตัวอย่างเข้าเครื่อง HPLC ปริมาตร 10 µl ในคอลัมน์ Sunfire C18 (Waters,

Ireland) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 3.5  $\mu\text{M}$  (4.6 mm  $\times$  150 mm) ให้สารผ่านคอลัมน์โดยใช้ระยะเวลา 20 นาที ซึ่งสถานะของการวิเคราะห์แสดงใน ตารางที่ 3-2

ตารางที่ 3-2 สถานะของเครื่อง HPLC ในการวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub>

Parameter	HPLC analysis
HPLC system	Waters Alliance e2695 Separations Module
Column	SunFire C18 reversed phase column (Waters, Ireland)
Detector	UV detection ความยาวคลื่น 280 nm
Column Temperature	30 °C
Mobile phase	Methanol (75%): deionized water (25%)
Flowrate	1 mL/min
Runtime	20 min
Injection volume	10 $\mu\text{L}$

#### 3.3.4.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์

เนื่องจากผู้วิจัยนำวิธีการของ Card et al. (2012) และ Zhou et al. (2014) มาประยุกต์ใช้วิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> กับตัวอย่างน้ำทะเล น้ำจืดและหอยแมลงภู่ ซึ่งวิธีการเดิมใช้กับตัวอย่างน้ำจืดและดิน ดังนั้นเพื่อให้วิธีการตรวจวิเคราะห์มีความถูกต้อง น่าเชื่อถือ และป้องกันความผิดพลาดที่อาจเกิดจากสารรบกวนการวิเคราะห์ในตัวอย่างแต่ละประเภท จึงต้องทดสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์ก่อนจะนำมาใช้หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างน้ำและหอยแมลงภู่ต่อไป โดยศึกษาช่วงการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง (Working range and linearity) ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (Limit of detection; LOD) ค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้ (Limit of Quantification) ค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% Relative Standard Deviation, %RSD) ดังนี้

### 1) การทดสอบความเป็นเส้นตรงและช่วงของการวิเคราะห์

นิตสารละลายมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> (แยกทดสอบ) เข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้น 100 ng/mL (วิธีการเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ก) เพื่อให้ได้โครมาโตแกรมที่แสดงค่าระยะเวลาที่สารแต่ละตัวเดินทางผ่านคอลัมน์นับตั้งแต่เวลาเริ่มต้นของการนิตสารจนเดินทางมาถึงเครื่องตรวจวัด (Retention time) โดยสารแต่ละชนิดจะใช้เวลาเดินทางไม่เท่ากัน จากนั้นนิตสารละลายมาตรฐานผสม BPA+E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 50 ng/mL (วิธีการเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ก) เข้าเครื่อง HPLC เพื่อให้ได้โครมาโตแกรมที่แสดงค่า Retention time เพื่อเปรียบเทียบค่า Retention time ของสารละลายมาตรฐานผสม BPA+E<sub>2</sub> กับค่า Retention time ของการนิตสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> แบบแยกทดสอบ

นิตสารละลายมาตรฐานผสม BPA+E<sub>2</sub> เข้าเครื่อง HPLC ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ng/mL (วิธีการเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ก) แล้วสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณสาร BPA หรือสาร E<sub>2</sub> และค่าพื้นที่ใต้พีค หรือ peak area ที่ได้จากโครมาโตแกรมแล้วคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (Correlation coefficient; r) เพื่อนำสมการเส้นตรงไปใช้ในการคำนวณหาความเข้มข้นของสาร BPA หรือสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างน้ำจืด น้ำทะเล และหอยแมลงภู่ซึ่งควรมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ไม่ต่ำกว่า 0.995

### 2) การทดสอบค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้

นิตสารละลายมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> เข้าเครื่อง HPLC โดยใช้ความเข้มข้นชนิดละ 10 ng/mL (แยกชนิดทดสอบ) (วิธีการเตรียมสารแสดงในภาคผนวก ก) เพื่อวิเคราะห์ปริมาณสารทำซ้ำจำนวน 7 ซ้ำ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ค่า LOD และ LOQ โดยคำนวณได้จากสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ (นันทนา กัญยานุวัฒน์ และ นุชนาท นาคำ, 2555; Li, Hu, Yin, & Hu, 2015)

$$\text{LOD} = 3.14\text{SD} \quad (1)$$

$$\text{LOQ} = 10\text{SD} \quad (2)$$

### 3) การหาค่าร้อยละของการคืนกลับ และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

เตรียมตัวอย่างน้ำทะเลสังเคราะห์ (Sample blank) ปริมาตร 1 L เติมสารละลายมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> (แยกทดสอบสารแต่ละชนิด) ให้มีความเข้มข้น 1,000 ng/l ทำซ้ำจำนวน 3 ครั้ง โดยเตรียมตัวอย่างหอยแมลงภู่ทะเลเถียด ปริมาณ 1 กรัม แล้วเติมสารละลายมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> (แยกทดสอบสารแต่ละชนิด) ให้มีความเข้มข้น 100 ng/g (จำนวน 3 ซ้ำ)



ส่วนการเตรียมการทดสอบหาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่อทำโดยนำตัวอย่างทั้งหมดผ่านกระบวนการเตรียมตัวอย่างดังข้อ 3.3.3 และวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> จำนวนค่าร้อยละของการคืนกลับ (% recovery) และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ (% RSD) ซึ่งควรอยู่ในช่วงร้อยละ 60-115 จึงยอมรับได้และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ไม่ควรเกินร้อยละ 20 โดยคำนวณได้จากสมการ (1) และ (2) ตามลำดับ (นันทนา กันยานุวัฒน์ และนุชนา นาคำ, 2555) (ทำการทดสอบ 3 ซ้ำ)

$$\% \text{ Recovery} = \frac{(C[\text{sample spike}] - C[\text{sample blank}])}{C[\text{spike}]} \times 100 \quad (1)$$

เมื่อ C[sample spike] = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่เติมสารมาตรฐาน  
 C[sample blank] = ความเข้มข้นของตัวอย่างที่ไม่เติมสารมาตรฐาน  
 C[spike] = ความเข้มข้นของสารมาตรฐาน

$$\% \text{ RSD} = \frac{\text{SD}}{\text{Mean}} \times 100 \quad (2)$$

เมื่อ SD = ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน  
 Mean = ค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นสารตัวอย่างทั้งหมด

#### 4) วิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

ในการหาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> จากตัวอย่างน้ำและหอยแมลงภู่ที่เก็บจากสถานที่กำหนด (ข้อ 3.3) ทำในช่วงระหว่างเดือนธันวาคม พ.ศ. 2559 ถึงเดือนมกราคม พ.ศ. 2560 รวม 69 ตัวอย่าง แบ่งเป็นน้ำจืด 3 ตัวอย่าง น้ำทะเล 12 ตัวอย่าง หอยแมลงภู่วัยอ่อนและตัวเต็มวัย อย่างละ 27 ตัวอย่าง ทำการเตรียมตัวอย่างตามวิธีข้อที่ 3.3.3 แล้วนำไปวิเคราะห์หาพื้นที่ใต้พีคเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่ได้จากข้อ 3.3.4.1 โดยค่าปริมาณของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่วิเคราะห์ได้จะนำมาใช้ทดสอบผลของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่มีต่อระดับการแสดงออกของยีนในหอยแมลงภู่ในห้องปฏิบัติการต่อไป (ข้อที่ 3.5)

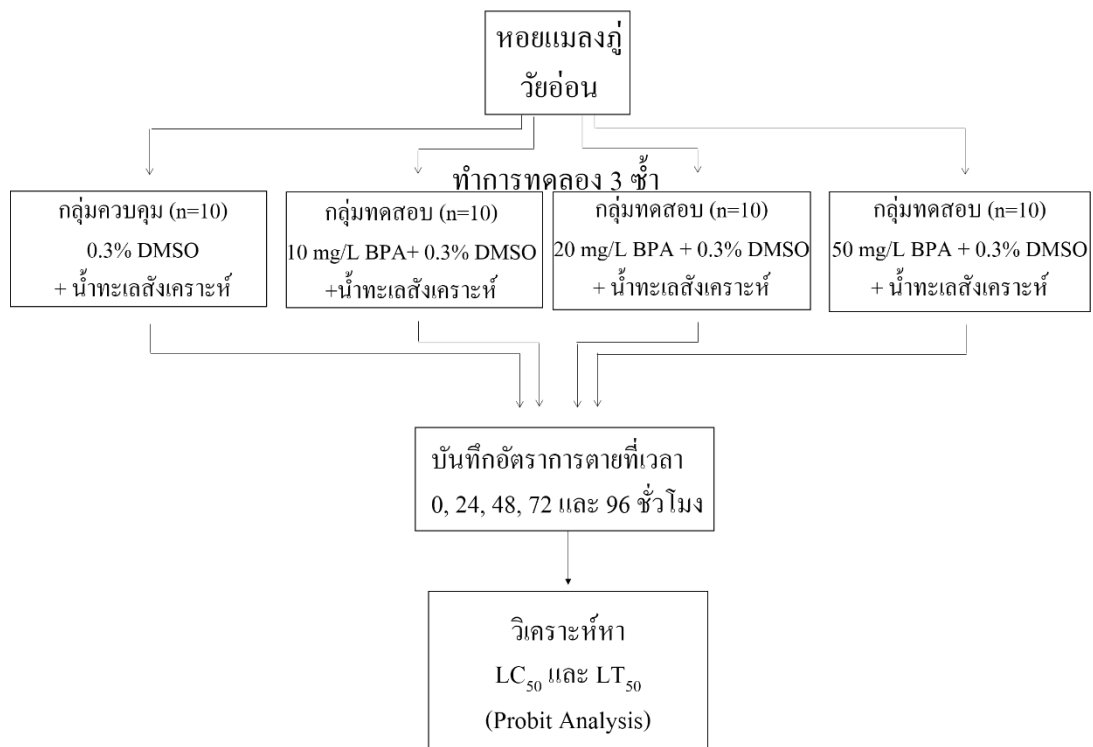
### 3.4. ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู

ใช้หอยแมลงภูวัยอ่อนน้ำหนักเฉลี่ย  $1.71 \pm 0.74$  กรัม ที่นำมาจากฟาร์มเลี้ยงอำเภอคลองใหญ่ จังหวัดตราด ก่อนการทดลองนำมาเลี้ยงในถังไฟเบอร์ที่บรรจุน้ำทะเลสังเคราะห์เพื่อให้หอยได้ปรับตัวกับสภาพแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ โดยให้อากาศตลอดเวลาผ่านหัวทรายใต้น้ำ ให้แพลงตอนก่พีชชนิด *Chaetoceros* sp. เป็นอาหารวันละ 2 ครั้ง

การทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันใช้วิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (Static bioassay) โดยจัดระดับความเข้มข้นของสารละลาย BPA ออกเป็น 4 ความเข้มข้นคือ 0 (กลุ่มควบคุม), 10, 20 และ 50 mg/l โดยเลือกใช้ความเข้มข้นสูงสุดตามความเข้มข้นของ Mihaich et al. (2009) ทดสอบ 3 ชั่วโมง จำนวนหอยแมลงภูทั้งหมด 120 ตัว ทดสอบแต่ละความเข้มข้นใช้หอยแมลงภูจำนวน 10 ตัว (ภาพที่ 3-3) บันทึกจำนวนหอยแมลงภูที่ตายทุก 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง เมื่อพบหอยแมลงภูตายจะเก็บตัวที่ตายออกจากภาชนะทันที คำนวณอัตราการตาย (Mortality rate) โดยคำนวณได้จากสมการ

$$\text{อัตราการตาย (Mortality rate)} = \frac{\text{จำนวนสัตว์ทดลองที่ตาย}}{\text{จำนวนสัตว์ทดลองทั้งหมด}} \times 100$$

ทำการวิเคราะห์หาระดับความเข้มข้นที่ทำให้หอยแมลงภูตายร้อยละ 10 ( $LC_{10}$ ), 50 ( $LC_{50}$ ) และ 90 ( $LC_{90}$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แล้ววิเคราะห์หาเวลาที่ทำให้หอยแมลงภูตายร้อยละ 50 ( $LT_{50}$ ) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ด้วยการวิเคราะห์แบบโพรบิท (probit analysis) โดยผลความเข้มข้นที่ได้จะนำมาใช้กำหนดความเข้มข้นของสาร BPA เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนในหอยแมลงภูที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ต่อไป



ภาพที่ 3-3 แผนการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่วัยอ่อน

### 3.5 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

#### 3.5.1 การออกแบบไพรเมอร์

ทำการออกแบบไพรเมอร์สำหรับใช้ในปฏิกิริยา RT-qPCR โดยใช้ยีนเป้าหมาย *cyp4* และ *vtg* และยีนอ้างอิง 3 ชนิด คือ  *$\beta$ -actin*, *18S rRNA* และ *28S rRNA* ทั้งนี้ผลผลิต PCR ของแต่ละยีนมีขนาดเท่ากับ 207, 267, 213, 157 และ 116 bp ตามลำดับ รายละเอียดการออกแบบไพรเมอร์แสดงดังตารางที่ 3-3

ตารางที่ 3-3 ไพรมเมอร์ที่ใช้ในปฏิกิริยา RT-qPCR

Genes	Nucleotide sequences (5'-3')	sizes (bp)	Accession No.
<i>cyp4</i>	L: GAC CAG TGC AAT GAC TTG GA R: GAC GCC TGT CTA CCG ATG AT	207	EU429566
<i>vtg</i>	L: CAG CGT TGT TGG RGA DTG TG R: TGT CWC TCT SCT ACT GCA CT	267	FJ646565
<i><math>\beta</math>-actin</i>	L: AGA TCT TGC AGG ACG TGA CC R: GTG ATT ACT TGC CCG TCA GG	213	EU381234
18S <i>rRNA</i>	L: AAG GGC ACC ACC AGG AGT R: AAC CAG ACA RAT CRC TCC AC	157	KY081324
28S <i>rRNA</i>	L: CGA AGC CAG AGG AAA ATC TG R: GAA ACT TCG GAG GGA ACC A	116	JQ62201

### 3.5.2 การเพิ่มบางส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-qPCR

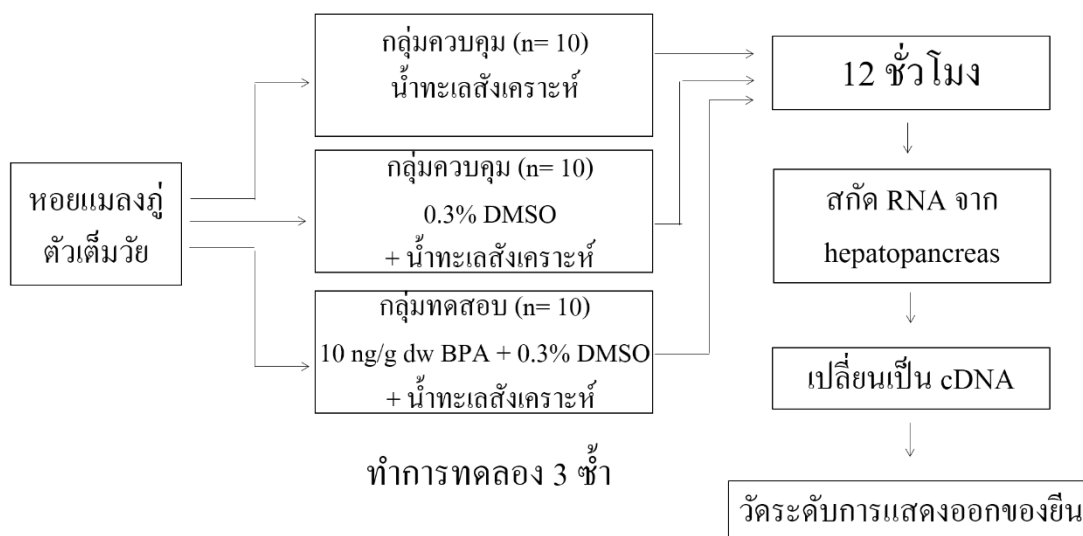
การเพิ่มปริมาณในส่วนของยีน *cyp4*, *vtg*,  *$\beta$ -actin*, 18S *rRNA* และ 28S *rRNA* ด้วยปฏิกิริยา RT-qPCR โดยมีส่วนผสมแสดงในตารางที่ 3-4 และขั้นตอนของปฏิกิริยามีดังนี้ pre-denature ที่ 95 °C นาน 10 นาที ก่อนเข้าสู่รอบปฏิกิริยาขั้นตอน denaturing ที่ 94 °C นาน 15 วินาที และ annealing ที่ 60 °C นาน 45 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งสิ้น 40 รอบ เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยานำผลผลิตไปวิเคราะห์ค่า melting temperature ( $T_m$ ) ของแต่ละยีน และวิเคราะห์ผลด้วย 1% Agarose electrophoresis โดยนำผลผลิต PCR จำนวน 3 ไมโครลิตร เคลื่อนที่ใน 1% agarose ใน 1X SB buffer ภายใต้กระแสไฟฟ้า ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลานาน 45 นาที ย้อม agarose gel ด้วย ethidium bromide และส่องภายใต้แสง UV ด้วย gel documentation (Syngene, USA)

ตารางที่ 3-4 ส่วนผสมของปฏิกิริยา RT-qPCR

Chemical	Volume ( $\mu$ L)				
	<i>cyp4</i>	<i>vtg</i>	<i>18S rRNA</i>	<i>28S rRNA</i>	$\beta$ - <i>actin</i>
2x SYBR Green/ROX	7.5	7.5	7.5	7.5	7.5
qPCR mastermix					
10 $\mu$ M Primer L/R	0.2	0.3	0.2	0.2	0.2
nuclease free water	6.1	5.9	6.1	6.1	6.1
cDNA template	1	1	1	1	1
Total	15	15	15	15	15

### 3.5.3 การเตรียมตัวอย่างหอยแมลงภูเพื่อคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-qPCR

ในการคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาผลของสาร BPA ในหอยแมลงภู่นั้นทำโดย นำตัวอย่างหอยแมลงภูจากแหล่งทำการประมง ตำบล หาดเล็ก อำเภอ คลองใหญ่ จังหวัดตราด ในเดือนมกราคม ปี พ.ศ. 2560 โดยใช้ระยะตัวเต็มวัยขนาดความยาวเปลือก  $5.0 \pm 0.5$  เซนติเมตร จำนวน 90 ตัว นำตัวอย่างมาพักและเลี้ยงในน้ำทะเลสังเคราะห์ความเค็ม 30 ppt เพื่อปรับสภาพ จากนั้นนำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด  $20 \times 32 \times 20$  cm<sup>3</sup> ที่บรรจุน้ำทะเลสังเคราะห์ความเค็ม 30 ppt 20 ลิตร ตู้ละ 10 ตัว แบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มควบคุมที่ไม่ฉีดสาร กลุ่มควบคุมที่ฉีดสารละลาย DMSO 0.3% (ตัวทำละลายของ BPA) ในน้ำทะเลสังเคราะห์ 100  $\mu$ l และกลุ่มทดสอบฉีดสารละลาย BPA จำนวน 10 ng/g dw/ตัว (BPA 10 ng ละลายในน้ำทะเลสังเคราะห์ 100  $\mu$ l และ DMSO 0.3%) จากนั้นทำการสุ่มเก็บหอยแมลงภูในแต่ละช่วงเวลาที่ได้รับสาร BPA คือที่เวลา 0 และ 12 ชั่วโมงดังภาพที่ 3-4 (ทำการทดลอง 3 ซ้ำ)



ภาพที่ 3-4 แผนการทดลองการศึกษาผลของสาร BPA ต่อระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงในหอยแมลงภู่วิวตัวเต็มวัย

### 3.5.4 การสกัด RNA และสังเคราะห์ cDNA

ตัวอย่างหอยแมลงภู่วิวตัวเต็มวัยแต่ละกลุ่มการทดลอง จะถูกนำมาวัดขนาดและชั่งน้ำหนัก ผ่าเปิดเพื่อตรวจสอบเพศและแยกเพศศึกษา จากนั้นตัดแยกเนื้อเยื่อที่ hepatopancreas ใช้น้ำหนัก 0.2 กรัม/ตัว แล้วนำมาสกัด RNA โดยวิธี TRIzol-Chloroform จากนั้นวัดปริมาณและคุณภาพของ RNA ด้วยเครื่อง Nanodrop 2000/2000c spectrophotometer แล้วทำ RNA ให้บริสุทธิ์ด้วย DNase I ตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัท Thermo Scientific (USA) จากนั้นนำ RNA ปริมาณ 1,000 ng มาสังเคราะห์เป็น cDNA ในปริมาตรสุทธิ 20  $\mu$ l ด้วยชุดสังเคราะห์ cDNA สำเร็จรูป iScript Reverse Transcription Super-Mix for RT-qPCR Kit (Bio Rad Laboratories, USA) แล้วเก็บรักษา cDNA ที่สังเคราะห์ได้ไว้ที่อุณหภูมิ  $-20^{\circ}\text{C}$  รอการศึกษาต่อไป

### 3.5.5 ทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-qPCR

ทำการสร้างกราฟมาตรฐานความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นและค่า Ct โดยใช้ cDNA ของหอยแมลงภู่วิวตัวเต็มวัย จาก 5 ลำดับความเข้มข้น โดยกราฟมาตรฐานที่ได้จากยีนเป้าหมาย *cyp4* และ *vtg* ทำโดยเจือจาง cDNA ของหอยแมลงภู่วิวตัวเต็มวัยให้มีปริมาณเท่ากับ 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1 และ 1 ng และ ยีนอ้างอิง 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin* ใช้ความเข้มข้นของ cDNA เท่ากับ 20, 25, 50, 100 และ 200 ng ส่วนผสมในการทำปฏิกิริยาและขั้นตอนการเพิ่มปริมาณ cDNA ทำเช่นเดียวกับข้อที่ 3.5.2.1 และขั้นตอนของปฏิกิริยามีขั้นตอน pre-denature ที่  $95^{\circ}\text{C}$  นาน 10 นาที

ก่อนเข้าสู่รอบปฏิกิริยา denaturing ที่ 95 °C นาน 15 วินาที และ annealing ที่ 60 °C นาน 45 วินาที ทำปฏิกิริยาทั้งหมด 40 รอบ นำค่า Cycle threshold (Ct) ของแต่ละยีน ไปสร้างกราฟมาตรฐาน ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของ cDNA และค่า Ct ของแต่ละยีน แล้วคำนวณหาค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ซึ่งควรมีค่าไม่ต่ำกว่า 0.99 จึงนำค่าความชันของกราฟ (slope) ของสมการเส้นตรง ไปใช้คำนวณหาค่าประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-qPCR (efficiency; E) ของแต่ละยีนที่คำนวณได้จากสมการที่ (1) ซึ่งควรมีค่าระหว่าง 1.90-2.10 และคำนวณค่า %E ดังสมการ (2) (Carolan et al., 2014)

$$E = [10^{(-1/\text{slope})}] \quad (1)$$

$$\%E = (E-1) \times 100 \quad (2)$$

### 3.5.6 การวิเคราะห์หาอินอ้างอิงที่เหมาะสม

นำ cDNA ของตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่ได้รับสาร BPA ข้อ 3.5.3 มาวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงทั้ง 3 ยีน คือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin* การคัดเลือกยีนที่เหมาะสมซึ่งยีนดังกล่าวจะมีระดับการแสดงออกที่คงที่พิจารณาโดยใช้โปรแกรม Normfinder (Andersen et al., 2004), Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004) และวิธี  $\Delta$ Ct (Silver et al., 2006) รายละเอียดดังนี้

1) Normfinder (Andersen et al., 2004) เป็นวิธีการวิเคราะห์ค่าความคงที่ของระดับการแสดงออกของยีนในแต่ละกลุ่มการทดลองซึ่งวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนสัมพัทธ์หรือ Relative quantity (RQ) โดยสามารถคำนวณได้จากสมการ

$$RQ \text{ (Relative quantification)} = E^{(\text{min Ct} - \text{Sample Ct})}$$

เมื่อ  $E = \text{PCR efficiency}$  หรือ ค่าประสิทธิภาพของยีนในปฏิกิริยา RT-qPCR  
 $\text{min Ct} = \text{ค่า Cycle threshold (Ct) ต่ำสุดของยีนอ้างอิงแต่ละยีน}$   
 $\text{Sample Ct} = \text{ค่า Ct ของยีนอ้างอิงแต่ละตัวอย่าง}$

โปรแกรม Normfinder นี้สามารถวิเคราะห์ค่าความแปรปรวน (stability value; SV) ระหว่างกลุ่มของระดับการแสดงออกของยีนอ้างอิงและความแปรปรวนภายในกลุ่มได้ ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุดคือยีนที่มีค่าความแปรปรวนน้อยที่สุด

2) Bestkeeper (Pfaffl et al., 2004) ใช้คัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมโดยการใช้พื้นฐานทางสถิติของ Pearson correlation coefficient ( $r$ ), ความแปรปรวน standard deviation (SD) coefficient of variance (CV) ยีนอ้างอิงที่มีค่า Pearson correlation coefficient ( $r$ ) สูงและมีค่า SD ต่ำ จะถูกคำนวณรวมกันแล้วเรียกว่า “ค่า Bestkeeper index (BKI)” สามารถใช้วิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนจากค่า Cycle threshold (Ct) ในกรณีที่ยีนอ้างอิงมีค่า BKI แสดงว่ามีระดับการแสดงออกคงที่พิจารณาว่าเป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมที่สุด

3)  $\Delta Ct$  หรือ delta Ct (Silver et al., 2006) คือความแตกต่างของค่า Ct ของยีนแต่ละยีนในตัวอย่างเดียวกันทำโดยการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกสัมพัทธ์ของยีนเพื่อคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจากสมการ

$$\Delta Ct (\text{delta Ct}) = Ct (\text{reference gene 1}) - Ct (\text{reference gene 2})$$

เมื่อ  $\Delta Ct$  (delta Ct) = ความแตกต่างของค่า Ct ของยีนจากตัวอย่างเดียวกัน  
 $Ct$  (reference gene 1) = ค่า Ct ของยีนอ้างอิง 1 ของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง  
 $Ct$  (reference gene 2) = ค่า Ct ของยีนอ้างอิง 2 ของตัวอย่างแต่ละตัวอย่าง

โดยมีหลักการว่าหากค่า  $\Delta Ct$  ระหว่างยีนมีระดับการแสดงออกที่คงที่ในตัวอย่างแต่ละตัวอย่างหมายถึงยีนนั้นมีส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ต่ำ แสดงว่ายีนนั้นมีระดับการแสดงออกคงที่ระหว่างตัวอย่างค่าการแสดงออกที่คงที่หรือยีนอ้างอิงที่มีค่า SD ต่ำที่สุด

การวิเคราะห์หาอ้างอิงที่เหมาะสมในปฏิกิริยา RT-qPCR วัดระดับการแสดงออกของยีนครั้งนี้พิจารณาจาก 2 ปัจจัยคือ 1) ปัจจัยเพศ (ระหว่างเพศผู้และเพศเมีย) 2) ปัจจัยการได้รับสาร BPA

### 3.5.7 การศึกษาผลของสาร BPA สาร $E_2$ และสารผสม BPA+ $E_2$ ที่มีต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg*

#### 3.5.7.1 การเตรียมตัวอย่าง

นำตัวอย่างหอยแมลงภู่วัยอ่อนจากแหล่งเลี้ยงเดียวกับข้อ 3.4 จำนวน 240 ตัว หลังจากหอยแมลงภู่อุปรับสภาพแล้วด้วยวิธีข้างต้น แบ่งตัวอย่างหอยแมลงภู่นำมาเลี้ยงในตู้กระจกขนาด  $20 \times 32 \times 20 \text{ cm}^3$  ที่บรรจุน้ำทะเลสังเคราะห์ความเค็ม 30 ppt จำนวน 20 ลิตร ตู้ละ 20 ตัว แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 4 กลุ่ม คือ

1) กลุ่มควบคุมมี DMSO 0.3% (ตัวทำละลายของ BPA)



- 2) กลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ความเข้มข้น 100 ng/l
- 3) กลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10 ng/l
- 4) กลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารผสม BPA+E<sub>2</sub> (ความเข้มข้น 100 ng/l กับ 10 ng/l ผสมกัน)

ภายหลังที่หอยแมลงภู่น้ำจืดได้รับสัมผัสสารทำการสุ่มเก็บหอยแมลงภู่น้ำจืดที่เวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง กลุ่มละ 3 ตัว (ทดลอง 3 ซ้ำ) นำตัวอย่างทดลองไปแช่ในน้ำหนักรัดความยาวเปลือก จากนั้นแยกเนื้อเยื่อ hepatopancreas นำไปสกัด RNA เช่นเดียวกับข้อที่ 3.5.4 ในขั้นตอนต่อไป ส่วนน้ำทะเลสังเคราะห์ที่เหลือจากเลี้ยงหอยแมลงภู่น้ำจืดทิ้งไว้ 10 วันเพื่อให้สาร BPA และสาร E<sub>2</sub> สลายหมดก่อนปล่อยลงสู่น้ำทิ้ง

### 3.5.7.2 การวัดระดับการแสดงออกของยีน

ทำการสกัด RNA จากหอยแมลงภู่น้ำจืดผ่านการทดสอบให้ได้รับสัมผัสสาร BPA, สาร E<sub>2</sub> และสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ในข้อ 3.5.7.1 แล้วเปลี่ยนเป็น cDNA โดยปฏิบัติเช่นเดียวกับข้อ 3.5.4 แล้วนำมาเพิ่มปริมาณยีนเป้าหมาย *cyp4* ด้วยปฏิกิริยา RT-qPCR โดยใช้คู่ไพรเมอร์ที่จำเพาะต่อยีน *cyp4 vtg* และ 18S *rRNA* ที่ออกแบบจากข้อ 3.5.1 โดยปฏิกิริยา RT-qPCR ทำในปริมาตรรวม 15  $\mu$ L ที่ประกอบด้วย cDNA จำนวน 1  $\mu$ L, 2x SYBR Green/ROX qPCR mastermix จำนวน 7.5  $\mu$ L ไพรเมอร์ 10  $\mu$ M L/R อย่างละ 0.2  $\mu$ l และ nuclease free water จำนวน 6.1  $\mu$ l ปฏิกิริยา RT-qPCR มีขั้นตอน pre-denature ที่ 95 °C นาน 10 นาที ก่อนเข้าสู่รอบปฏิกิริยา denaturing ที่ 94 °C นาน 15 วินาที และ annealing ที่ 60 °C นาน 45 วินาที ทำปฏิกิริยาจำนวนทั้งหมด 40 รอบ ในขณะเดียวกัน cDNA ตัวอย่างเดียวกันที่ใช้เพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมาย *cyp4* ก็จะถูกนำมาเพิ่มปริมาณของยีนเป้าหมาย *vtg* และยีนอ้างอิง 18S *rRNA* โดยมีองค์ประกอบ ขั้นตอนและสภาวะการทำปฏิกิริยา เช่นเดียวกับยีน *cyp4* แต่เปลี่ยนคู่ไพรเมอร์จำเพาะต่อยีน *vtg* และยีนอ้างอิง 18S *rRNA* อย่างละ 0.3 และ 0.2  $\mu$ l ตามลำดับ

เมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยา RT-qPCR ของแต่ละยีน จะทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้ค่า Ct มาหารระดับการแสดงออกด้วยวิธี  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  method (Livak & Schmittgen, 2001) แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างทดสอบด้วยวิธี one way-ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ( $p < 0.05$ ) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่ม (Post hoc) ด้วยวิธี Tukey's HSD

## บทที่ 4

### ผลการวิจัย

#### 4.1. การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำและ หอยแมลงภู่

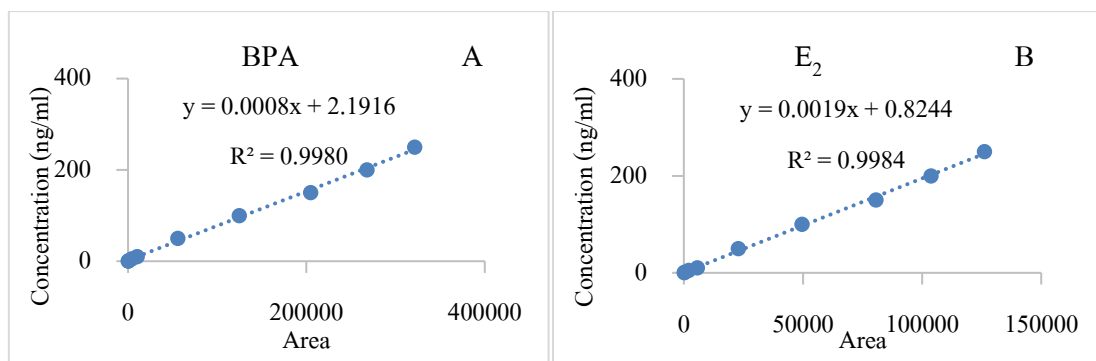
##### 4.1.1 การตรวจสอบความถูกต้องของวิธีวิเคราะห์ (Method validation)

###### 1) การทดสอบช่วงของการวิเคราะห์และความเป็นเส้นตรง

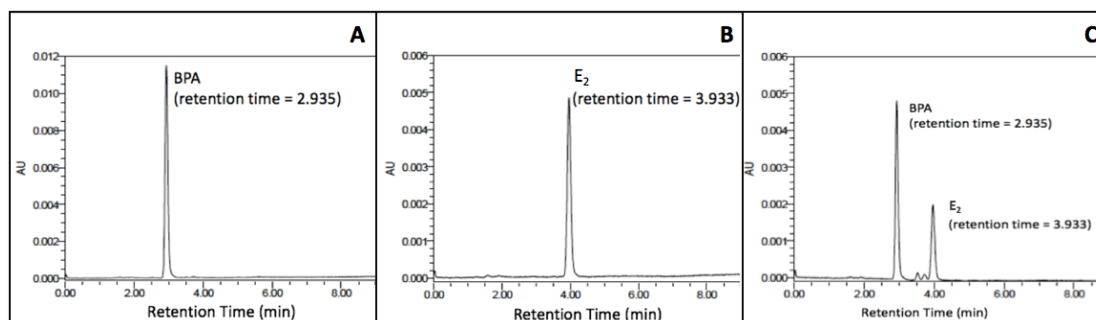
เมื่อนิ็ดสารละลายมาตรฐานซึ่งประกอบด้วย BPA และ E<sub>2</sub> เข้าเครื่อง HPLC จะได้โครมาโตแกรมของสารทั้งสองชนิด โดย โครมาโตแกรมจะแสดงค่า retention time ของสารแต่ละชนิดต่างกันดังนี้ retention time ของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> มีค่าเท่ากับ 2.935 นาที และ 3.933 นาที ตามลำดับ (ภาพที่ 4-1C) เมื่อเปรียบเทียบกับโครมาโตแกรมของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> แยกนิ็ดสารเข้าเครื่อง HPLC พบว่ามีค่า retention time ตรงกัน (ภาพที่ 4-1A และ 4-1B) เมื่อนิ็ดสารละลายมาตรฐานผสมของ BPA + E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ng/l ในเครื่อง HPLC แล้ว นำค่าพื้นที่ใต้พีคมาสร้างกราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าพื้นที่ใต้พีค (peak area) กับค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐาน พบว่าได้สมการเส้นตรงของสาร BPA คือ  $y = 0.0008x + 2.1916$  และสาร E<sub>2</sub> คือ  $y = 0.0019x + 0.8244$  และคำนวณค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) ของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> เท่ากับ 0.9980 และ 0.9984 ตามลำดับ (ภาพที่ 4-2A และ 4-2B)

###### 2) การทดสอบค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้

เมื่อใช้สารละลายมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10 ng/mL ได้ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> เท่ากับ 1.21 และ 1.02 ng/l ตามลำดับ โดยค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ได้เท่ากับ 3.90 และ 3.30 ng/l ตามลำดับและมีค่าร้อยละการคืนกลับของสารมาตรฐานสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> อยู่ในช่วง 80.67-91.92 และ 101.36-111.76 และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์เท่ากับ 4.47 และ 3.06 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-1)



ภาพที่ 4-1 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน BPA (A) และ E<sub>2</sub> (B) โดยใช้สารมาตรฐานเข้มข้น 0.5, 1, 5, 10, 50, 100, 150, 200 และ 250 ng/mL



ภาพที่ 4-2 โครมาโตแกรมของสารละลายมาตรฐาน BPA (A), E<sub>2</sub> (B) และสารผสม BPA+E<sub>2</sub> (C) ที่ 280 nm นีดปริมาตร 10 µl อัตราการไหล 1.0 ml/นาที

### 3) การหาค่าร้อยละของการคืนกลับและร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์

เมื่อนำตัวอย่างน้ำทะเลสาบสงขลา ปริมาตร 1 ลิตร เติมสารละลายมาตรฐานของ BPA และ E<sub>2</sub> ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 1,000 ng/l แล้วทำการสกัดด้วยวิธี SPE (ข้อ 3.3.3.1) แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่าค่าร้อยละของการคืนกลับและร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์จากตัวอย่างน้ำทะเลสาบสงขลาของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> มีค่า 98.38±3.29 และ 103.54±2.30 ตามลำดับ และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างน้ำทะเลสาบสงขลา มีค่าเท่ากับ 3.35 และ 2.22 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2)

ในตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่มิมาณ 1 กรัม ที่นำมาเติมสารละลายมาตรฐาน BPA และสาร E<sub>2</sub> ให้มีความเข้มข้น 100 ng/g และจากการเตรียมตัวอย่างและสกัดด้วยวิธี SPE (ข้อ 3.3.3.2) แล้วฉีดเข้าเครื่อง HPLC พบว่าร้อยละของการคืนกลับของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ใน

หอยแมลงภู่มีค่าเท่ากับ  $90.63 \pm 3.29$  และ  $95.56 \pm 6.45$  ตามลำดับ และพบว่าร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในหอยแมลงภู่มีค่าเท่ากับ 6.02 และ 6.67 ตามลำดับ (ตารางที่ 4-2) ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

ตารางที่ 4-1 ค่าต่ำสุดที่ตรวจพบ (LOD) และค่าต่ำสุดที่วิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) ของสารมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub>

Test No.	Concentration (ng/mL)	
	BPA	E <sub>2</sub>
1	8.73	10.59
2	9.02	10.14
3	8.46	10.66
4	9.19	10.71
5	8.44	10.33
6	8.45	10.64
7	8.07	11.18
Mean	8.62	10.61
Standard deviation (SD)	0.39	0.33
LOD (3.14SD)	1.21	1.02
LOQ (10SD)	3.86	3.25
% Recovery	80.67-91.92	101.36-111.77
% RSD	4.47	3.07

ตารางที่ 4-2 ค่าร้อยละของการคืนกลับ และร้อยละค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานสัมพัทธ์ของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub>

Sample	% Recovery (%RSD)	
	BPA	E <sub>2</sub>
artificial seawater	$98.38 \pm 3.29$ (3.35)	$103.54 \pm 2.30$ (2.22)
green mussel	$90.63 \pm 5.46$ (6.02)	$95.56 \pm 6.45$ (6.67)

#### 4.1.2 วิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

##### 1) น้ำจืด

จากการศึกษาหาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในน้ำจืดที่เก็บมาจากบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกเฉียง จากสถานีเก็บตัวอย่าง 3 สถานี คือ คลองพยุคน (R1) และคลองชากหมาก (R2) ในจังหวัดระยอง และคลองสังเขป (C1) ในจังหวัดชลบุรี เมื่อวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ได้ผลดังนี้

ปริมาณสาร BPA ในน้ำจืดทุกสถานีมีค่าอยู่ในช่วง <math><1.2-50.67 \mu</math> โดยพบปริมาณสาร BPA สูงสุดที่สถานีคลองชากหมาก (R2) (บริเวณปากคลอง) เท่ากับ 50.67 ng/l คลองชากหมากเป็นลำน้ำที่ไหลผ่านนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุด ซึ่งรองรับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมหลายแห่ง ดินตะกอนสีน้ำตาลมีกลิ่นเหม็น ส่วนปริมาณสาร BPA ในสถานีคลองพยุคน (R1) ซึ่งเป็นลำน้ำที่ไหลผ่านชุมชน ตลาดบ้านฉาง จังหวัดระยองและคลองสังเขป (C1) ซึ่งเป็นคลองที่รองรับน้ำเสียจากเทศบาลบางทรายจังหวัดชลบุรีทั้ง 2 สถานี ตรวจพบสาร BPA ในปริมาณที่ต่ำกว่า 1.2 ng/l ที่เป็น lower detection limit

ส่วนผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร E<sub>2</sub> ตรวจพบได้มีค่าอยู่ในช่วง <math><1.02-62.98 \text{ ng/l}</math> โดยสถานีคลองสังเขป (C1) พบปริมาณสาร E<sub>2</sub> สูงสุดเท่ากับ 62.98 ng/l และพบค่าต่ำรองลงมาที่สถานีคลองพยุคน (R1) เท่ากับ 35.53 ng/l ในขณะที่สถานีคลองชากหมาก (R2) ตรวจพบสาร E<sub>2</sub> ต่ำกว่าค่าต่ำสุดที่ตรวจพบในปริมาณที่ต่ำกว่า 1.02 ng/l ที่เป็น lower detection limit

ตารางที่ 4-3 ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่ตรวจพบในแหล่งน้ำ

Site	Location	BPA (ng/l)	E <sub>2</sub> (ng/l)
Chonburi			
C1	Sangkhep canal	<1.21	62.98
Rayong			
R1	Payun canal	<1.21	35.53
R2	Chark-mak canal	50.67	<1.02

## 2) น้ำทะเล

จากการศึกษาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในน้ำทะเลบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก จากสถานีเก็บตัวอย่าง 4 สถานี คือบริเวณแหล่งอุตสาหกรรมได้แก่ อ่าวมาบตาพุด 1 และ 2 (R3, R4) จังหวัดระยอง บริเวณแหล่งชุมชนและแหล่งท่องเที่ยว ได้แก่ หาดวอนนภา (C2) จังหวัดชลบุรี และ อ่าวตราด (T) จังหวัดตราด พบสาร BPA ในตัวอย่างน้ำทะเลทุกสถานีมีค่าอยู่ในช่วง 1.21-37.13 ng/l และพบสูงสุดที่จังหวัดชลบุรีในสถานีหาดวอนนภา (C2) พบสาร BPA มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $37.13 \pm 2.70$  ng/l ซึ่งสถานีหาดวอนนภาเป็นแหล่งชุมชนและแหล่งท่องเที่ยวที่สำคัญของจังหวัดชลบุรี และที่สถานีอ่าวตราด (T) จังหวัดตราดซึ่งเป็นชุมชนขนาดเล็กมีฟาร์มเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบ้างไม่มากนัก พบสาร BPA เฉลี่ยต่ำสุดเท่ากับ  $1.21 \pm 0.01$  ng/l และจังหวัดระยองที่สถานีอ่าวมาบตาพุด 1 (R3) และสถานีอ่าวมาบตาพุด 2 (R4) พบการปนเปื้อนของสาร BPA เฉลี่ย  $3.21 \pm 0.08$  และ  $2.49 \pm 0.01$  ng/l ตามลำดับรายละเอียดแสดงในตารางที่ 4-4

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร E<sub>2</sub> ทุกสถานีพบว่ามีค่าต่ำอยู่ในช่วง  $<1.02 \pm 3.52$  ng/l และที่สถานีอ่าวมาบตาพุด 1 (R3) และอ่าวมาบตาพุด 2 (R4) จังหวัดระยองเป็นสถานีที่พบปริมาณสาร E<sub>2</sub> สูงสุดมีค่าเฉลี่ย  $3.52 \pm 0.79$  และ  $1.31 \pm 0.96$  ng/l ตามลำดับ ในขณะที่สถานีหาดวอนนภา (C2) จังหวัดชลบุรีและสถานีอ่าวตราด (T) จังหวัดตราดตรวจพบสาร E<sub>2</sub> อยู่ในช่วง  $<1.02$  ng/l (ตารางที่ 4-4)

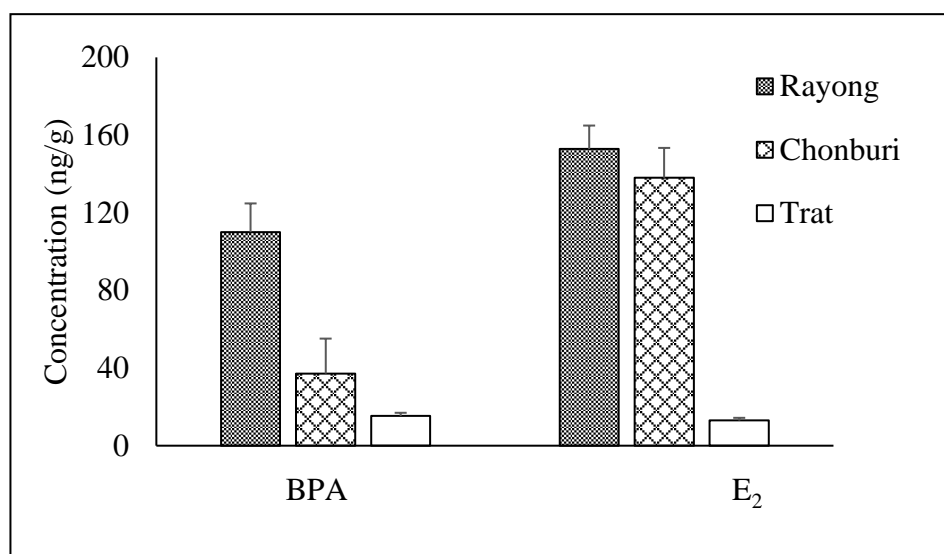
ตารางที่ 4-4 ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่ตรวจพบจากตัวอย่างน้ำทะเล

Site	Location	BPA (ng/l)	E <sub>2</sub> (ng/l)
Chonburi			
C2	Wonapha beach	$37.13 \pm 2.70$	$<1.02$
Rayong			
R3	Maptaphut 1	$3.23 \pm 0.08$	$3.52 \pm 0.79$
R4	Maptaphut 2	$2.49 \pm 0.01$	$1.31 \pm 0.96$
Trat			
T	Trat Bay	$1.21 \pm 0.01$	$<1.02$

### 3) หอยแมลงภู่

จากการศึกษาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่เก็บจากฟาร์มเลี้ยงบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกทั้งหมด 3 สถานี คือจากฟาร์มเลี้ยงหอยแมลงภู่บริเวณแหล่งอุตสาหกรรมใกล้สถานีคลองชากหมาก (R2) จังหวัดระยองและบริเวณแหล่งชุมชน ได้แก่หาดวอนนภา (C2) จังหวัดชลบุรี และอ่าวตราด (T) จังหวัดตราด รวมทั้งหมด 54 ตัวอย่าง พบปริมาณสาร BPA ในตัวอย่างหอยแมลงภู่วัยอ่อนใกล้สถานีคลองชากหมาก (R2) จังหวัดระยองเท่ากับ 13.09±0.77 ng/g (Mean±SE) โดยที่ตัวอย่างที่เก็บจากสถานีหาดวอนนภา (C2) จังหวัดชลบุรี และอ่าวตราด (T) จังหวัดตราด พบปริมาณสาร BPA ต่ำกว่า 1.21 ng/g ผลการวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยที่เก็บจากสถานี R2 พบสาร BPA สูงสุดเท่ากับ 109.97±14.80 ng/g (Mean±SE) และพบปริมาณสาร BPA เฉลี่ยในตัวอย่างหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยจากสถานี C2 และ T เท่ากับ 37.15±12.08 และ 15.30±0.61 ng/g (Mean±SE) ตามลำดับ (ภาพที่ 4-3)

พบสาร E<sub>2</sub> ในหอยแมลงภู่วัยอ่อนพบว่าทุกสถานีที่เก็บตัวอย่างนั้นในหอยแมลงภู่วัยอ่อนมีปริมาณต่ำกว่า 1.02 ng/g ส่วนในตัวเต็มวัยที่เก็บจากสถานี R2 และ C2 มีสาร E<sub>2</sub> เฉลี่ยสูงถึง 152.8±18.00 และ 138±15.33 ng/g (Mean±SE) ตามลำดับ แต่ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยจากสถานี T (จังหวัดตราด) พบสาร E<sub>2</sub> ต่ำสุดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 12.96±0.69 ng/g (ภาพที่ 4-3)



ภาพที่ 4-3 ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*)

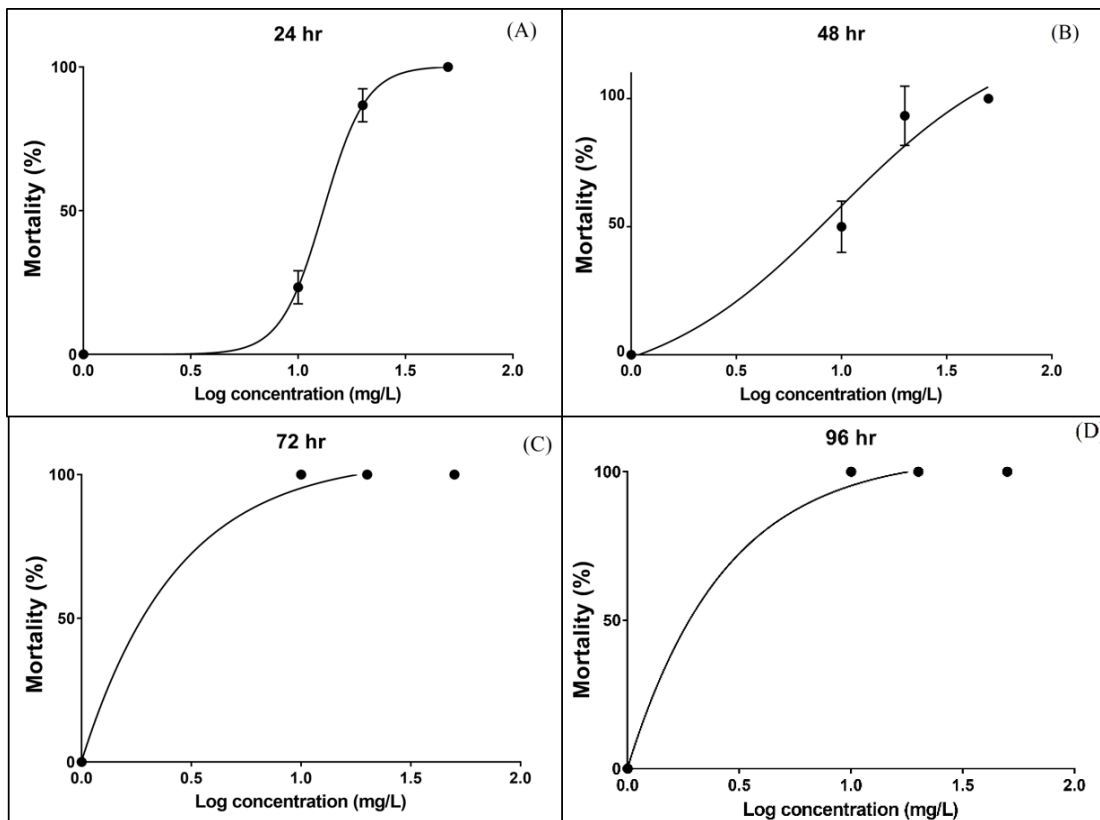
## 4.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA โดยวิธีชีววิเคราะห์แบบน้ำนิ่ง (static bioassay) เป็นระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง พบว่าหอยแมลงภู่แสดงอาการเป็นพิษอันเนื่องมาจากได้รับสัมผัสสาร BPA คือมีการขับเปิดเปลือกช้าลง ไม่ยึดเกาะกับวัสดุและตายในที่สุด

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ในรูปแบบอัตราการตายสะสมของหอยแมลงภู่ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20 และ 50 mg/l ณ เวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง แสดงในภาพที่ 4-4 A-D ตามลำดับ พบว่าหอยแมลงภู่มีปริมาณการตายเพิ่มมากขึ้นเมื่อสาร BPA ที่หอยแมลงภู่รับสัมผัสมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นในทุกช่วงเวลาการศึกษา กล่าวคือเมื่อเวลาผ่านไป 24 ชั่วโมง ที่ BPA ความเข้มข้น 10 mg/l พบว่าหอยแมลงภู่มีอัตราการตายเท่ากับ  $23.33 \pm 5.77\%$  และอัตราการตายเพิ่มเป็น 50 และ 100% ที่ความเข้มข้น 20 และ 50 mg/l ตามลำดับ เมื่อระยะเวลาเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง หอยแมลงภู่มีการตายเท่ากับ  $86.67 \pm 5.77$ ,  $93.33 \pm 11.54$  และ 100% ที่ความเข้มข้น 10, 20 และ 50 mg/l ตามลำดับ เมื่อคำนวณหาค่า  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  และ  $LC_{90}$  (ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%) โดยวิธี Probit Analysis (ตารางที่ 4-5) พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมง ค่า  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  และ  $LC_{90}$  มีค่าสูงที่สุดเท่ากับ 8.125 (7.652-8.575), 17.086 (16.547-17.643) และ 35.930 (34.024-38.174) mg/l ตามลำดับ และเวลา 48 ชั่วโมงมีค่า  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  และ  $LC_{90}$  เท่ากับ 0.725 (0.376-1.145) 3.061 (2.167-3.908) และ 12.933 (11.829-14.063) ตามลำดับ แต่ในช่วงเวลาที่ 72 และ 96 ชั่วโมงหอยแมลงภู่มีการตายทั้งหมดจึงไม่สามารถวิเคราะห์ค่า Lethal concentration ได้ แสดงให้เห็นว่าค่า  $LC_{10}$ ,  $LC_{50}$  และ  $LC_{90}$  มีค่าลดลงเมื่อหอยแมลงภู่มีระยะเวลาในการรับสัมผัสสาร BPA เพิ่มขึ้น

ผลการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA แสดงให้เห็นว่าหอยแมลงภู่ตายเพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป เมื่อคำนวณหาค่า  $LT_{50}$  (เวลาที่ทำให้หอยแมลงภู่ตาย 50%) ของสาร BPA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยวิธี Probit Analysis พบว่าค่า  $LT_{50}$  มีค่าลดลงเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของสาร BPA โดยที่สาร BPA ความเข้มข้นเท่ากับ 10 mg/l มีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 33.45 ชั่วโมง ในขณะที่สาร BPA ความเข้มข้นเท่ากับ 20 mg/l มีค่า  $LT_{50}$  เท่ากับ 24.17 ชั่วโมง





ภาพที่ 4-4 ความสัมพันธ์ของการตอบสนองกับปริมาณพิษที่ได้รับ (Dose-response relationships) ของหอยแมลงภู่งูที่ได้รับ BPA ที่ระยะเวลา 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง (A-D ตามลำดับ)

ตารางที่ 4-5 ค่า LC<sub>10</sub>, LC<sub>50</sub> และ LC<sub>90</sub> ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ของสาร BPA ในหอยแมลงภู่งู

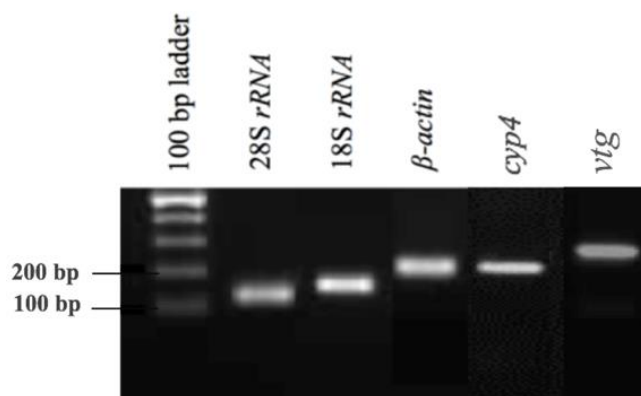
เวลา (ชั่วโมง)	LC <sub>10</sub> (95% confident) (mg/l)	LC <sub>50</sub> (95% confident) (mg/l)	LC <sub>90</sub> (95% confident) (mg/l)
24	8.125 (7.652-8.575)	17.086 (16.547-17.643)	35.930 (34.024-38.174)
48	0.725 (0.376-1.145)	3.061 (2.167-3.908)	12.933 (11.829-14.063)
72	NA	NA	NA
96	NA	NA	NA

NA = Not Available

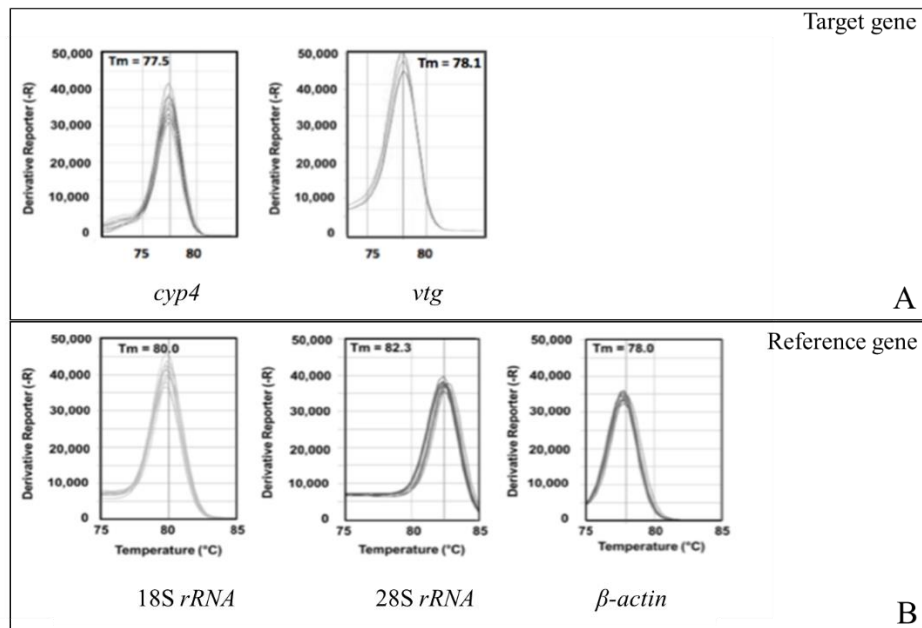
### 4.3 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

#### 4.3.1 การเพิ่มบางส่วนของยีนด้วยปฏิกิริยา RT-qPCR

หลังจากเพิ่มปริมาณ cDNA ในปฏิกิริยา RT-qPCR บริเวณยีนเป้าหมาย *cyp4* และ *vtg* รวมทั้งยีนควบคุม  $\beta$ -actin, 18S rRNA และ 28S rRNA ของหอยแมลงภู่ ผลการวิเคราะห์ขนาดผลผลิต PCR ของ cDNA โดยวิธี Agarose gel electrophoresis พบว่าได้แถบของ DNA ใกล้เคียงกับขนาดที่คาดไว้เมื่อออกแบบไพรเมอร์คือ 207, 267, 213, 157 และ 116 คู่เบส สำหรับแต่ละยีนตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ DNA มาตรฐาน 100 bp ladder (ภาพ 4-5) และเมื่อสิ้นสุดปฏิกิริยาวิเคราะห์ Melting curve analysis พบว่าแต่ละยีนมีค่า  $T_m$  เท่ากับ 77.5, 78.1, 78.0, 80.0 และ 82.3 °C ตามลำดับ (ภาพที่ 4-6)



ภาพที่ 4-5 ผลผลิต PCR ที่ได้จากปฏิกิริยา RT-qPCR หลังทำ 1% agarose gel electrophoresis ที่ความต่างศักย์ 80 โวลต์เป็นเวลานาน 45 นาที แล้วย้อมเจลด้วย ethidium bromide โดยยีน 28S rRNA, 18S rRNA,  $\beta$ -actin, *cyp4* และ *vtg* มีขนาด 116, 157, 213, 207 และ 267 bp ตามลำดับ



ภาพที่ 4-6 ผลการวิเคราะห์ค่า Melting temperature (T<sub>m</sub>) ของยีนที่ศึกษา

(A) ยีนเป้าหมาย *cyp4* และ *vtg*

(B) ยีนอ้างอิง 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin*

#### 4.3.1 การทดสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-qPCR

ผลจากการสร้างกราฟมาตรฐานของยีนเป้าหมาย *cyp4* และ *vtg* และยีนอ้างอิง 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin* เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของปฏิกิริยา RT-qPCR พบว่าสมการเส้นตรงของกราฟมาตรฐานมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (R<sup>2</sup>) มากกว่า 0.99 และมีค่าความชัน (Slope) เท่ากับ -3.334, -3.309, -3.395, 3.318 และ -3.479 ตามลำดับ แล้วเมื่อนำค่าความชันของกราฟมาคำนวณค่า %E จากสมการ  $E = 10^{(-1/\text{Slope})}$  และคำนวณด้วยสมการ  $\%E = (E - 1) \times 100$  จะได้เท่ากับ 100, 99.5, 97, 100 และ 94% ของยีน *cyp4*, *vtg*, 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin* ตามลำดับ (ตารางที่ 4-6)

ตารางที่ 4-6 ค่า  $R^2$  ของกราฟมาตรฐาน และ PCR efficiency (%E)

Gene	Amplicons size (bp)	PCR efficiency (%)	$R^2$ value
<i><math>\beta</math>-actin</i>	213	94	0.99
18S rRNA	157	97	0.99
28S rRNA	116	100	0.99
<i>cyp4</i>	207	100	0.99
<i>vtg</i>	267	99.5	0.99

#### 4.3.3 ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-qPCR

การคัดเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-qPCR เปรียบเทียบจาก 3 ยีน คือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  *$\beta$ -actin* เพื่อนำมาใช้ศึกษาการแสดงผลการออกของยีนในหอยแมลงภู่มิฉะนั้นในการพิจารณาเลือกยีนที่มีค่าความแปรปรวน (SD) ต่ำสุด เมื่อปัจจัยทดสอบแตกต่างกัน 2 ปัจจัยคือ 1) เพศ และ 2) ที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 10 ng/g dw เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง โดยวิเคราะห์ด้วย 3 โปรแกรม Normfinder, Bestkeeper และ  $\Delta Ct$  ได้ผลคือ

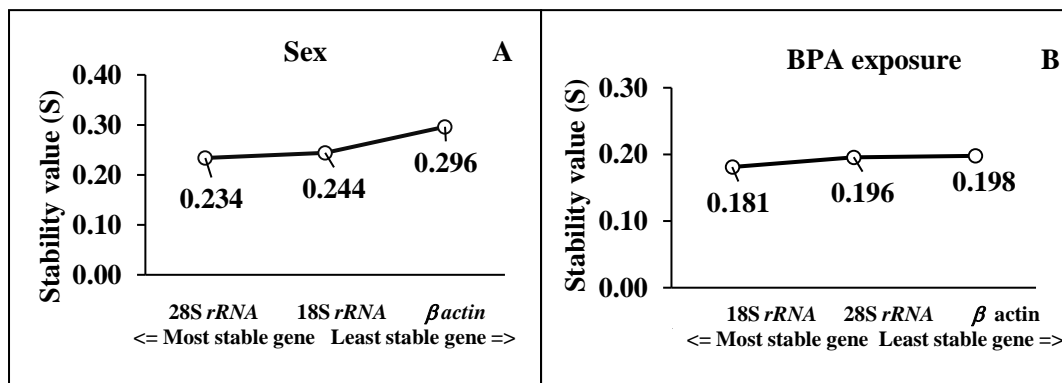
ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในกลุ่มทดสอบที่มีเพศแตกต่างกัน (เพศผู้/เพศเมีย) พบว่าลำดับยีนอ้างอิงที่เหมาะสมมาก  $\rightarrow$  น้อย คือ 28S *rRNA*, 18S *rRNA* และ  *$\beta$ -actin* ตามลำดับ (Normfinder (ภาพที่ 4-7A), Bestkeeper (ภาพที่ 4-8A) และ  $\Delta Ct$  (ภาพที่ 4-9A))

ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในกลุ่มหอยแมลงภู่มิที่ได้รับสาร BPA (10 ng/g dw) ที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับหอยแมลงภู่มิที่ไม่ได้รับสาร BPA พบว่ายีน 28S *rRNA* เป็นยีนอ้างอิงที่มีความเหมาะสมมากที่สุดและ 18S *rRNA* และ  *$\beta$ -actin* เป็นลำดับรองลงมา (Bestkeeper (ภาพที่ 4-8B) และ  $\Delta Ct$  (ภาพที่ 4-9B)) แต่เมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Normfinder ลำดับยีนอ้างอิงที่เหมาะสมเรียงลำดับมาก  $\rightarrow$  น้อย คือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  *$\beta$ -actin* ตามลำดับ โดยแสดงในภาพที่ 4-7B

ผลการคัดเลือกยีนอ้างอิงที่มีความเหมาะสมโดยวัดการแสดงผลการออกของยีนเป้าหมาย *cyp4* แล้วเทียบกับยีนอ้างอิงแต่ละยีน ในหอยแมลงภู่มิที่ได้รับสารกับไม่ได้รับสาร BPA 10 ng/g dw เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง พบว่าการใช้ยีนอ้างอิงทั้ง 3 ยีน คือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  *$\beta$ -actin* นั้นให้ผลการทดลองที่สอดคล้องกัน คือ ระดับการแสดงผลการออกของยีน *cyp4* ลดลง เท่ากับ  $0.36 \pm 0.06$ ,  $0.65 \pm 0.1$  และ  $0.48 \pm 0.11$  ตามลำดับ

จะเห็นได้ว่าเมื่อพิจารณาค่าความแปรปรวน (SD) ของยีนอ้างอิงจากน้อย  $\rightarrow$  มาก คือ

18S *rRNA*,  $\beta$ -*actin* และ 28S *rRNA* ตามลำดับ จากผลการทดสอบดังกล่าวข้างต้นจึงคัดเลือกยีน 18S *rRNA* เป็นยีนที่มีค่าความแปรปรวนต่ำที่เหมาะสมสำหรับใช้ในการศึกษาวิเคราะห์ระดับการ แสดงออกของยีนต่อไป

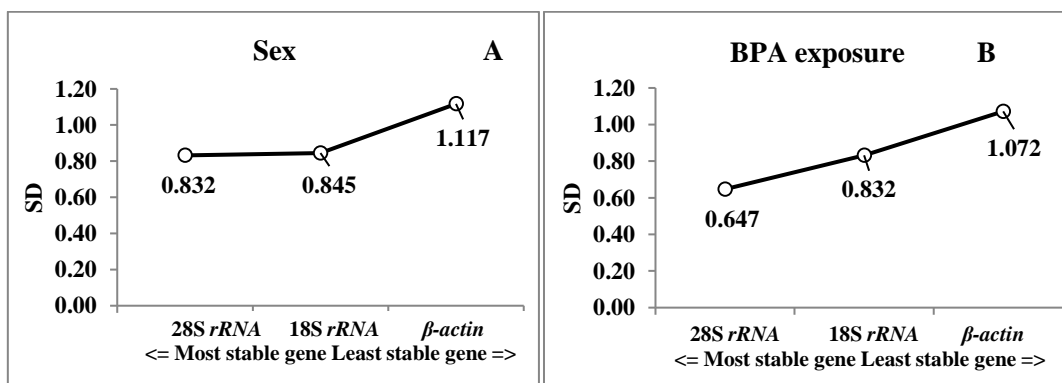


ภาพที่ 4-7 โปรแกรม Normfinder วิเคราะห์เปรียบเทียบค่าความแปรปรวน (stability value; SV)

ของยีนอ้างอิงที่ศึกษาคือ ยีน 28S *rRNA*, 18S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin*

(A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเพศผู้และเพศเมีย

(B) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับสาร BPA (0 และ 10 ng/g dw) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

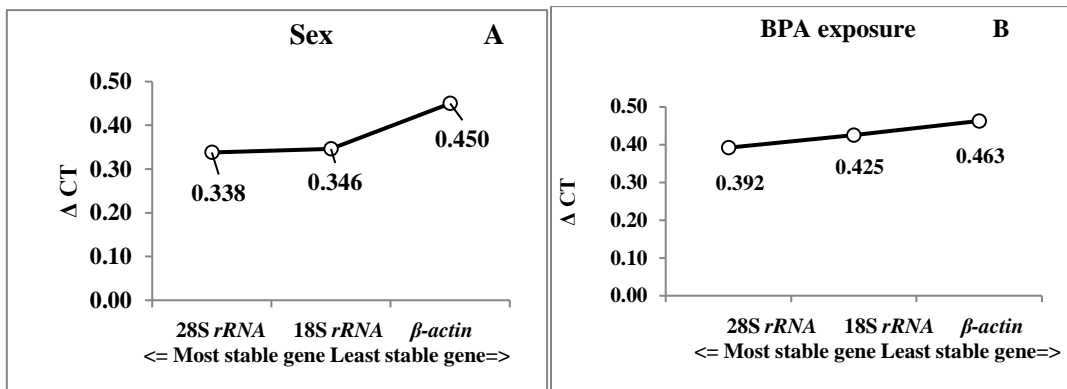


ภาพที่ 4-8 โปรแกรม BestKeeper วิเคราะห์เปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของยีน

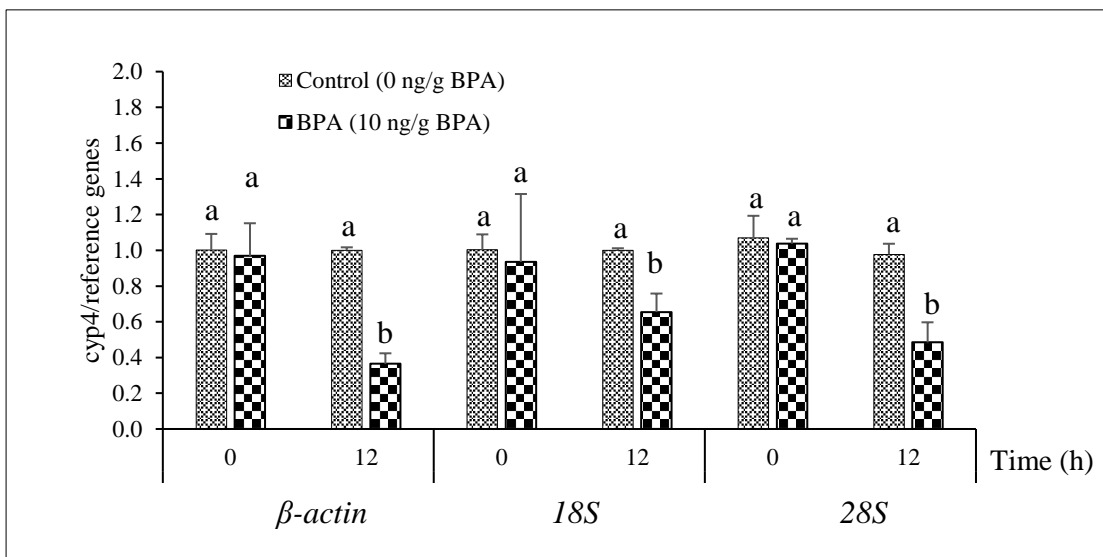
อ้างอิงที่ศึกษา คือยีน 28S *rRNA*, 18S *rRNA* และ  $\beta$ -*actin*

(A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเพศผู้และเพศเมีย

(B) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับสาร BPA (0 และ 10 ng/g dw) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-9 วิธี  $\Delta Ct$  วิเคราะห์เปรียบเทียบส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ของยีน อ้างอิงที่ศึกษา คือยีน 28S rRNA, 18S rRNA และ  $\beta$ -actin  
 (A) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มเพศผู้และเพศเมีย  
 (B) ระหว่างกลุ่มที่ไม่ได้รับและได้รับสาร BPA (0 และ 10 ng/g dw) เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-10 การแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 28S rRNA, 18S rRNA และ  $\beta$ -actin ของหอยแมลงภู่ที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 10 ng/g dw เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )

#### 4.4 ผลของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> และผลของสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ที่มีต่อระดับการ แสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg*

##### 4.4.1 ผลของสาร BPA

เมื่อวิเคราะห์ห้ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ใน  
หอยแมลงภู่วัยอ่อน (n=9) ที่แช่สาร BPA ที่ความเข้มข้น 100 ng/l เป็นระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48  
ชั่วโมงเปรียบเทียบกับกลุ่มหอยแมลงภู่วัยอ่อนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร BPA (0.3% DMSO) ใน  
หอยแมลงภู่วัยอ่อนกลุ่มที่แช่สาร BPA เป็นระยะเวลา 36 และ 48 ชั่วโมงพบว่าสาร BPA มีผลชักนำ  
ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เท่ากับ  $9.31 \pm 1.09$  และ  $35.47 \pm 0.77$  สูงขึ้นมากกว่าจากกลุ่ม  
ควบคุม ( $1.0 \pm 2.9$  และ  $1.0 \pm 0.3$  ตามลำดับ) แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ที่เวลา 12  
และ 24 ชั่วโมง ( $1.63 \pm 0.22$  และ  $1.31 \pm 0.72$ ) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $1.0 \pm 0.21$  และ  
 $1.0 \pm 0.1$ ) ( $p > 0.05$ )

เมื่อวิเคราะห์ห้ระดับการแสดงออกของยีน *vtg* พบว่าหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสาร BPA  
ที่ความเข้มข้น 100 ng/l เป็นระยะเวลานาน 48 ชั่วโมง ชักนำระดับการแสดงออกของยีนสูงขึ้น  
เท่ากับ  $7.89 \pm 0.71$  แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $1.0 \pm 0.09$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ที่เวลา 12, 24  
และ 36 ชั่วโมง ( $0.76 \pm 0.84$ ,  $0.81 \pm 1.0$  และ  $0.94 \pm 0.01$ ) ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $1.0 \pm 0.19$ ,  
 $1.0 \pm 0.25$ , และ  $1.0 \pm 0.56$ ) ( $p > 0.05$ )

##### 4.4.2 ผลของสาร E<sub>2</sub>

เมื่อวิเคราะห์ห้ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ใน  
หอยแมลงภู่วัยอ่อน (n=9) ที่แช่สาร E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 10 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48  
ชั่วโมง เปรียบเทียบกับหอยแมลงภู่วัยอ่อนกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้แช่สาร (0.3% DMSO) พบว่าหอยแมลงภู่วัย  
อ่อนกลุ่มที่ได้รับสาร E<sub>2</sub> เป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง มีผลชักนำระดับการแสดงออกของยีน  
*cyp4* สูงสุดเท่ากับ  $2.87 \pm 0.11$  แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ( $1.0 \pm 0.21$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  
( $p < 0.05$ ) แต่ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมงระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ระหว่างกลุ่มที่ได้รับ  
สาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l ไม่แตกต่าง ( $p > 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ

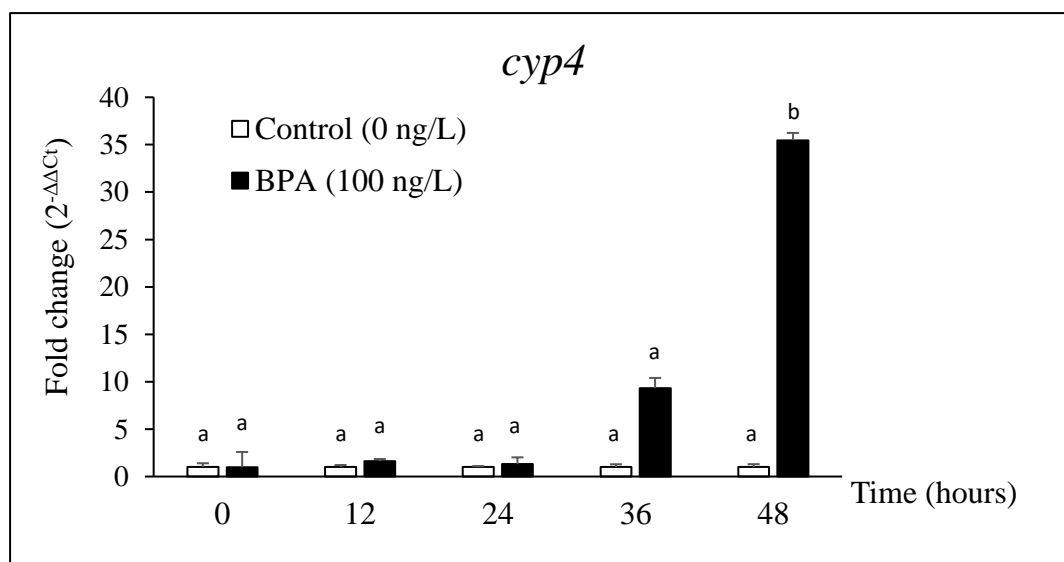
เมื่อวิเคราะห์ห้ระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เทียบเคียงกับยีน 18S *rRNA* พบว่าหอย  
แมลงภู่วัยอ่อนที่แช่สาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l ชักนำระดับการแสดงออกของยีน *vtg*  
ทุกช่วงเวลาเท่ากับ  $130.16 \pm 4.80$ ,  $72.78 \pm 4.07$ ,  $75.42 \pm 10.44$  และ  $78.95 \pm 36.30$  ที่เวลา 12, 24, 36  
และ 48 ชั่วโมงตามลำดับ ( $p < 0.05$ ) แตกต่างกับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ  $1.0 \pm 0.19$ ,  $1.0 \pm 0.25$ ,  
 $1.0 \pm 0.56$  และ  $1.0 \pm 0.09$  ตามลำดับ

#### 4.4.3 ผลของสารผสม BPA+E<sub>2</sub>

เมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ในหอยแมลงภู่วัยอ่อน (n=9) ที่แช่สารผสม BPA+E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 100+10 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับหอยแมลงภู่อีกกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสัมผัสสารพบว่า หอยแมลงภู่วัยอ่อนกลุ่มที่ได้รับสารผสม BPA+E<sub>2</sub> เป็นระยะเวลานาน 12 ชั่วโมง มีผลยับยั้งระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เท่ากับ  $0.04 \pm 0.01$  แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ( $1.0 \pm 0.21$ ) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) แต่ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ที่เวลา 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ( $0.59 \pm 0.1$ ,  $0.53 \pm 0.09$  และ  $2.08 \pm 0.46$ ) ไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุม ( $p > 0.05$ )

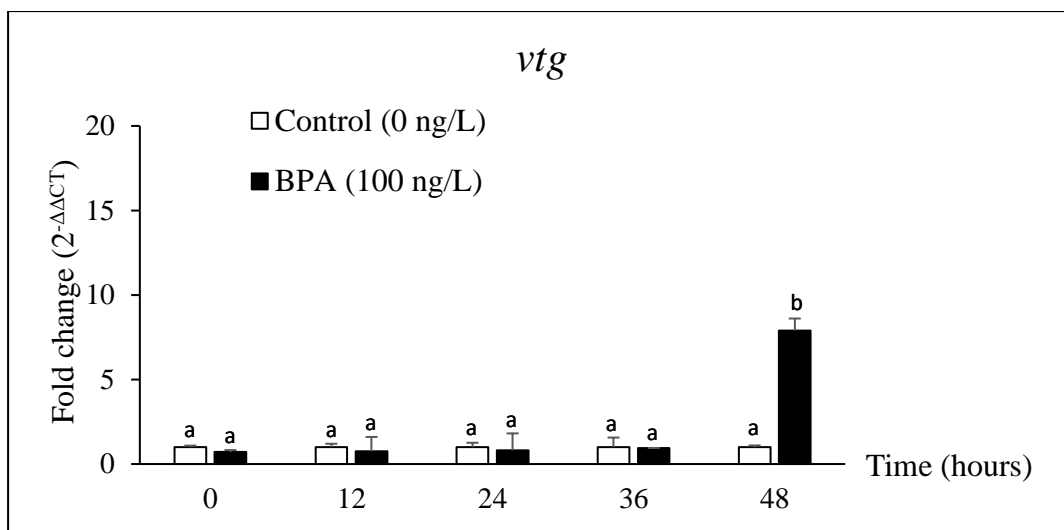
เมื่อวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน *vtg* พบว่าหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสารผสม BPA+E<sub>2</sub> (100+10 ng/l) มีการแสดงออกของยีน *vtg* ลดลงเท่ากับ  $0.02 \pm 0.01$ ,  $0.05 \pm 0.01$ ,  $0.12 \pm 0.04$  และ  $0.04 \pm 0.01$  ตามลำดับ เป็นเวลานาน 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) กับกลุ่มควบคุมซึ่งมีค่าเท่ากับ  $1.0 \pm 0.19$ ,  $1.0 \pm 0.25$ ,  $1.0 \pm 0.56$  และ  $1.0 \pm 0.09$  ตามลำดับ

เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนได้รับสัมผัสสาร BPA หรือสาร E<sub>2</sub> ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* เพิ่มขึ้น ในขณะที่เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนได้รับสัมผัสสารผสม BPA+E<sub>2</sub> จะยับยั้งการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg*

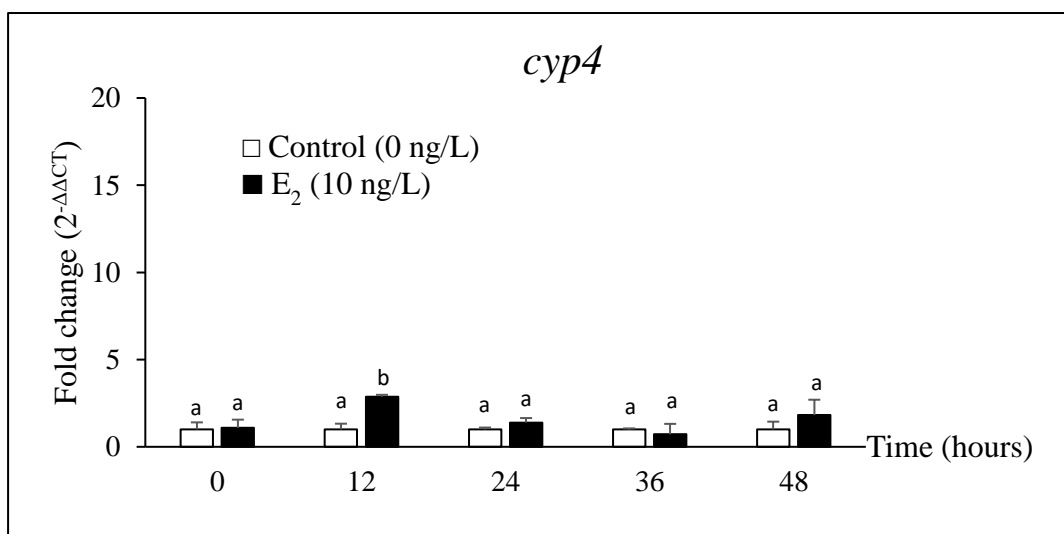


ภาพที่ 4-11 การแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/l เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (ตัวอักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )

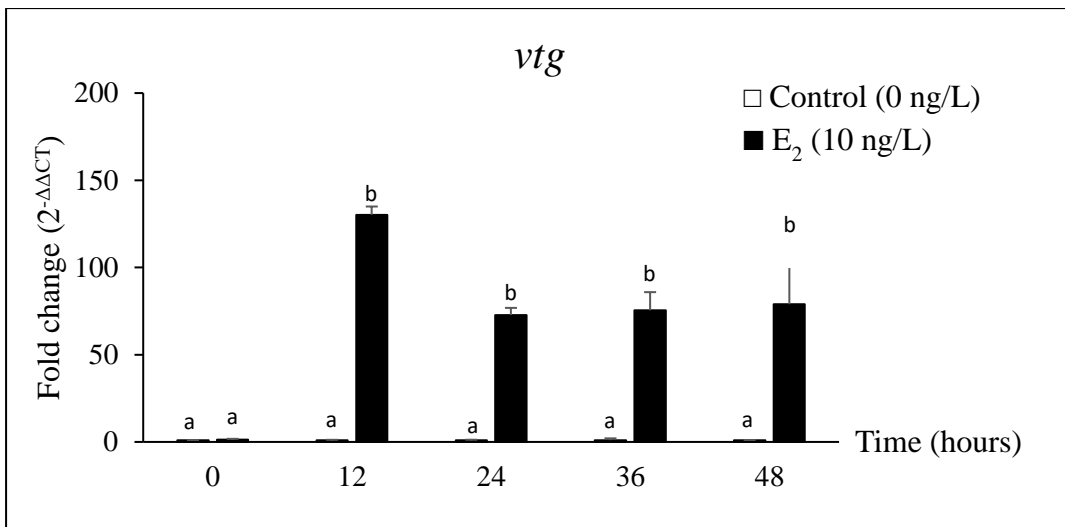




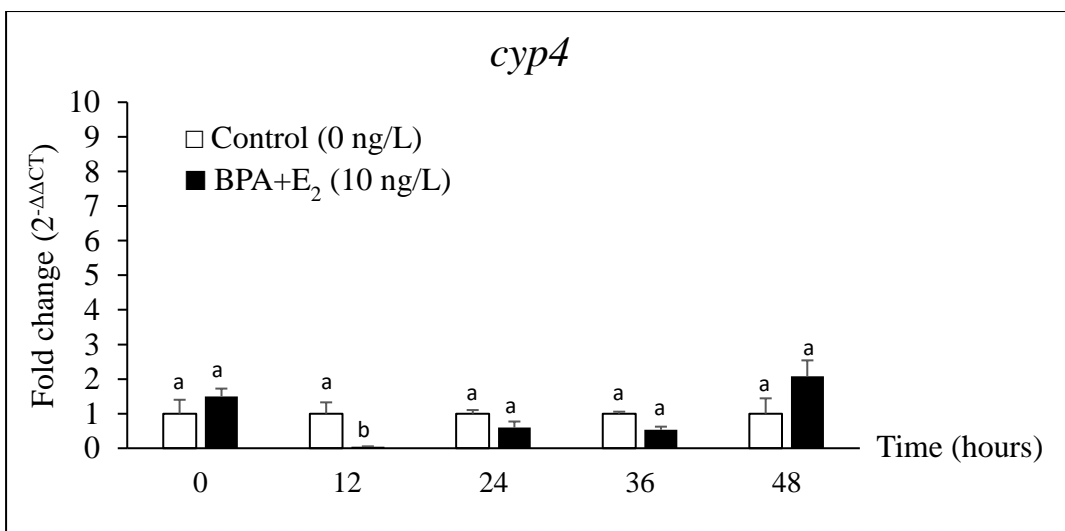
ภาพที่ 4-12 การแสดงออกของยีน *vtg* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (อักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )



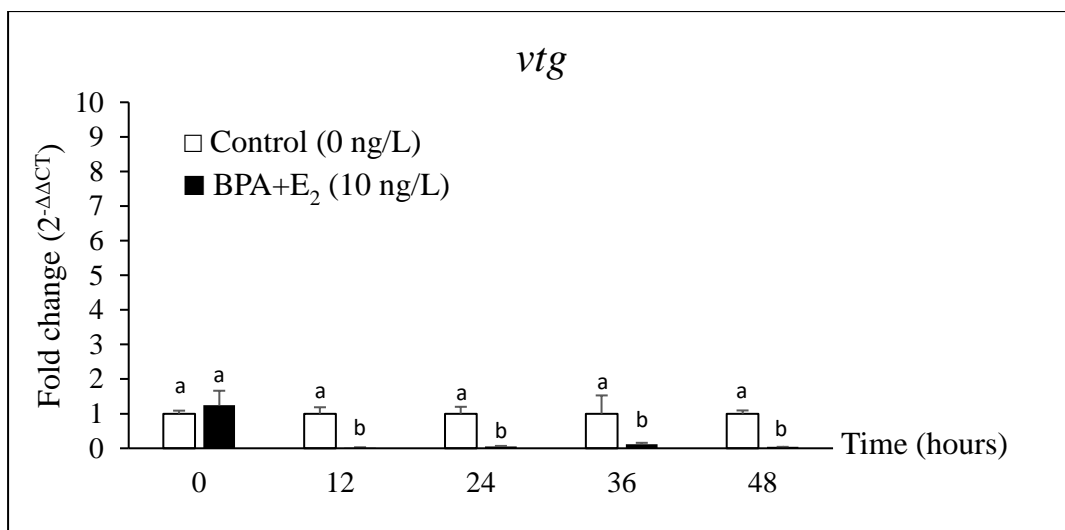
ภาพที่ 4-13 การแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (อักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )



ภาพที่ 4-14 การแสดงออกของยีน *vtg* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ของหอยแมลงภู่วัยอ่อน ที่ได้รับสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0 และ 100 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (อักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )



ภาพที่ 4-15 การแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ของหอยแมลงภู่วัยอ่อน ที่ได้รับสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0 และ 100+10 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (อักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )



ภาพที่ 4-16 การแสดงออกของยีน *vtg* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ของหอยแมลงภู่วัยอ่อน ที่ได้รับสารผสม BPA+ E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 0 และ 100 +10 ng/l เป็นระยะเวลานาน 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (อักษรภาษาอังกฤษต่างกัน = แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$ )

## บทที่ 5

### อภิปรายและสรุปผล

#### 5.1 การวิเคราะห์หาปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ปนเปื้อนในตัวอย่างน้ำทะเล น้ำจืด และหอยแมลงภูในจังหวัดชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

##### 5.1.1 การวิเคราะห์ตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

ผลการตรวจสอบความถูกต้องของวิธีการวิเคราะห์พบว่าค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ของกราฟเส้นตรง (linearity; R<sup>2</sup>) ของสารมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> ได้ R<sup>2</sup> เท่ากับ 0.9980 และ 0.9984 ตามลำดับ ผลการวิเคราะห์ค่าความแม่นยำ (%RSD) ของสารมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> มีค่า 4.47 และ 3.07 ตามลำดับซึ่งมีค่าไม่เกิน 5 จัดได้ว่าเป็นค่าที่ยอมรับได้ (น้ำหนัก กัญชากัญชง และนุชนา นาคำ, 2555) สำหรับค่าความถูกต้อง (accuracy) ของการวิเคราะห์จะรายงานเป็น % Recovery หรือ การคืนกลับของสารในการทดลองนี้พบว่าวิธีการวิเคราะห์ของสาร BPA ในตัวอย่างน้ำและตัวอย่าง หอยแมลงภูมี % Recovery เท่ากับ 98±3.29 และ 90.36±5.46 ng/g ตามลำดับ และสาร E<sub>2</sub> มี % Recovery เท่ากับ 103.54±2.30 และ 95.56±5.46 ng/g ตามลำดับ ในการศึกษาครั้งนี้ % Recovery ของสาร BPA มีค่าสูงกว่าวิธีการวิเคราะห์ของ Gatidou et al. (2010) ซึ่งรายงานในหอย 3 ชนิดคือ หอยแมลงภูเมดิเตอร์เรเนียน (*Mytilus galloprovincialis*) หอย stripped venus (*Venus gallina*) และ หอย bearded horse (*Modiola barbua*) มีค่าเท่ากับ 90±9 ng/g

ในการศึกษานี้การทดสอบค่าต่ำสุดของสาร BPA ที่ตรวจพบ (LOD) และค่าต่ำสุดที่ วิเคราะห์ปริมาณได้ (LOQ) เท่ากับ 1.21 ng/l และ 3.86 ng/l ตามลำดับ ซึ่งมีค่าต่ำกว่าวิธีการ วิเคราะห์ของ Basheer and Lee (2014) ที่ทำการศึกษาสาร BPA ในตัวอย่างน้ำทะเลซึ่งมีค่าต่ำสุดที่ ตรวจพบและปริมาณต่ำสุดที่วิเคราะห์ได้เท่ากับ 14 ng/l และ 24 ng/l ขณะที่สาร E<sub>2</sub> ในการศึกษาครั้งนี้ เท่ากับ 1.02 ng/l และ 3.25 ng/l ตามลำดับ และมีค่าน้อยกว่ากับค่าต่ำสุดที่ตรวจพบสาร E<sub>2</sub> ใน ตัวอย่างน้ำจืด ซึ่งเท่ากับ 1.5 ng/l (Vethakk et al., 2005) ดังนั้นวิธีการวิเคราะห์การสกัดและวิธีการ วิเคราะห์นี้จึงสามารถใช้วิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างน้ำและหอยแมลงภูได้

##### 5.1.2 การวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างด้วยเทคนิค HPLC

###### 1) สาร BPA

ผลการวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA ในน้ำจืดพบสาร BPA ปนเปื้อน สูงที่สุดในสถานีคลองซากหมากที่ระดับความเข้มข้นเท่ากับ 50.67 ng/l ขณะที่สถานีคลองสังเขป และคลองพูนตรวจพบสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่า 1.21 ng/l ทั้งนี้อาจมีสาเหตุมาจาก

คลองชากหมากเป็นคลองที่รองรับน้ำจากอุตสาหกรรมโดยตรงจึงพบการปนเปื้อนของสาร BPA สูงที่สุดเนื่องจากในนิคมอุตสาหกรรมมีโรงงานอุตสาหกรรมหลายแห่งที่ใช้หรือเกี่ยวข้องกับสาร BPA และพลาสติกพอลีคาร์บอเนตและอีพอกซีเรซิน (PTT Global Chemical, 2016) จากข้อมูลปริมาณการผลิตของสาร BPA ในนิคมอุตสาหกรรมมาบตาพุดซึ่งเป็นพื้นที่ที่มีการผลิตสาร BPA สูงที่สุดในประเทศไทยคือ 150,000 ตัน/ปี จากปริมาณการผลิตสาร BPA ทั้งหมดในประเทศไทย 160,000 ตัน/ปี (Jiao, Sun, & Pang, 2008) โดย Huang et al. (2012) ได้รายงานถึงแหล่งที่มาของการปนเปื้อนของสาร BPA ในประเทศจีนว่ามีแหล่งที่มาจากโรงงานอุตสาหกรรมผลิตพลาสติกพอลีคาร์บอเนต สูงถึง 95% ในขณะที่ 5% มาจากกระบวนการผลิตอื่น ๆ นอกจากนี้รายงานการวิเคราะห์สาร BPA ในน้ำทิ้งจากโรงงานรีไซเคิลกระดาษจำนวน 8 แห่งในประเทศญี่ปุ่น พบว่ามีสาร BPA ในน้ำทิ้งอยู่ในช่วง 8-370  $\mu\text{g}/\text{l}$  แสดงให้เห็นว่าการบำบัดน้ำเสียของโรงงานอุตสาหกรรมไม่มีประสิทธิภาพเพียงพอในการกำจัดสาร BPA ได้ (Fukazawa, Hishino, Shiozowa, Matsushita, & Terao, 2001) ดังนั้นแหล่งน้ำใกล้เขตอุตสาหกรรมจึงมีโอกาสปนเปื้อนสาร BPA สูง เช่น แม่น้ำ Crooked ในสหรัฐอเมริกาที่อยู่ในพื้นที่ใกล้โรงงานอุตสาหกรรมที่ปลดปล่อยสาร BPA และโรงบำบัดน้ำเสีย พบว่ามีสาร BPA สูงสุดเท่ากับ  $320 \pm 95 \text{ ng}/\text{l}$  เมื่อเปรียบเทียบกับแม่น้ำ Missouri ซึ่งอยู่บริเวณทางเหนือของแม่น้ำ Crooked และอยู่ห่างไกลจากพื้นที่เขตอุตสาหกรรม พบสาร BPA เพียง  $35 \pm 16 \text{ ng}/\text{l}$  (Kassotis et al., 2015) ดังการศึกษาครั้งนี้ที่ตรวจไม่พบสาร BPA ปนเปื้อนในสถานีคลองพูน ซึ่งแม่น้ำดังกล่าวอยู่ห่างจากเขตอุตสาหกรรม และสอดคล้องกับรายงานของ Doung et al. (2010) ได้วิเคราะห์คุณภาพน้ำนอกเขตชุมชนเมืองบริเวณลำน้ำสาขาของแม่น้ำโขงพบสาร BPA ปนเปื้อนในน้ำมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ  $2.4 \text{ ng}/\text{l}$

ผลจากการตรวจวัดปริมาณสาร BPA ในตัวอย่างน้ำทะเลพบสาร BPA ปนเปื้อนในทุกตัวอย่างโดยมีความเข้มข้นอยู่ในช่วง  $1.21-37.13 \text{ ng}/\text{l}$  โดยที่สถานีหาดวอนนภา จังหวัดชลบุรี เป็นสถานีที่พบสาร BPA ความเข้มข้นสูงสุดคือ  $37.13 \pm 2.70 \text{ ng}/\text{l}$  ทั้งนี้เนื่องมาจาก จุดเก็บตัวอย่างบริเวณหาดวอนนภาอยู่ใกล้ท่อน้ำทิ้งจากชุมชนของโรงบำบัดน้ำเสียแสนสุขใต้ และเป็นจุดเก็บตัวอย่างที่อยู่ใกล้ชายฝั่ง โดยมีระยะห่างจากชายฝั่งประมาณ 100 เมตร จากผลวิเคราะห์ปริมาณสาร BPA ในบริเวณสถานีอ่าวมาบตาพุด 1 และอ่าวมาบตาพุด 2 พบค่า  $3.23 \pm 0.08 \text{ ng}/\text{l}$  และ  $2.49 \pm 0.01 \text{ ng}/\text{l}$  ตามลำดับ ซึ่งทั้งสองสถานีนี้อยู่ในบริเวณที่ห่างจากสถานีคลองชากหมาก เป็นระยะทางประมาณ 2.5 และ 4 กิโลเมตร ตามลำดับ ผลการศึกษาครั้งนี้บ่งชี้ว่าในบริเวณที่ไกลจากแหล่งกำเนิดน้ำทิ้งจะพบความเสี่ยงในการปนเปื้อนของสาร BPA ลดลง เช่นเดียวกับรายงานการศึกษาของ Afifi et al. (2016) ที่รายงานว่าพบการปนเปื้อนของสารลดลงในบริเวณที่ห่างไกลจากแหล่งรองรับของเสีย ในงานวิจัยครั้งนี้พบสาร BPA ต่ำที่สุดที่อ่าวตราด จังหวัดตราด คือ  $1.21 \pm 0.01 \text{ ng}/\text{l}$  ที่เป็นพื้นที่

อ้างอิงเนื่องจากเป็นพื้นที่ห่างไกลจากเขตอุตสาหกรรมและเขตชุมชนเมือง สาร BPA ที่พบในการศึกษาครั้งนี้ใกล้เคียงกับการศึกษาจากชายฝั่งทะเลในหลาย ๆ ประเทศ อยู่ในช่วง <math>2.6-76.8 \text{ ng/l}</math> ในท่าเรือ Halifax ประเทศ แคนาดา (Robinson et al., 2009) อ่าว Themakos ประเทศกรีซ (Arditsoglou & Voutsas, 2012) และอ่าว Santos ประเทศบราซิล (Lisboa et al., 2013) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับปริมาณสาร BPA ซึ่งพบการปนเปื้อนของสาร BPA มากกว่า  $100 \text{ ng/l}$  ที่พบในทะเลสาบเวนิซ (Venice Lagoon) ในประเทศอิตาลี (Pojana et al., 2007) และสิงคโปร์ (Basheer et al., 2004)

ผลปริมาณสาร BPA ในหอยแมลงภู่วัยอ่อนและตัวเต็มวัยที่เก็บจากบริเวณปากคลองชากหมากในจังหวัดระยอง พบ BPA เท่ากับ  $<1.21-13.09 \pm 0.77 \text{ ng/g}</math> และ  $109.97 \pm 14.80 \text{ ng/g}</math> ซึ่งพบสาร BPA สูงสุดในหอยแมลงภู่วัยเต็มวัยจากจังหวัดระยองเช่นเดียวกัน ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณความเข้มข้นของสาร BPA ที่พบสูงสุดในสถานีคลองชากหมาก และพบการสะสมของสาร BPA ในหอยแมลงภู่ออกจากหาคอนนากา ซึ่งสอดคล้องกับปริมาณการพบสาร BPA ในน้ำของสถานีหาคอนนากาเช่นเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบปริมาณการสะสมของสาร BPA ในหอยแมลงภู่ว่าใกล้เคียงกับหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ เช่น หอยแมลงภู่วัย (*Mytilus edulis trossulus*) ในประเทศโปแลนด์ พบสาร BPA ในเนื้อเยื่อ  $68-197.2 \text{ ng/g}</math> และหอยแครง (*Anadara granosa*) ในประเทศสิงคโปร์ พบสาร BPA ในเนื้อเยื่อ  $56.5 \pm 40 \text{ ng/g}</math> เป็นต้น (Basheer et al., 2004; Stanisikwa et al., 2014)$$$$

## 2) สาร E<sub>2</sub>

สาร E<sub>2</sub> ในตัวอย่างน้ำจากสถานีคลองสังเขป จังหวัด ชลบุรี สถานีคลองพูน และสถานีคลองชากหมาก จังหวัดระยอง พบว่ามีปริมาณ  $62.98, 35.53$  และ  $<1.02 \text{ ng/l}</math> ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสถานีคลองสังเขปและคลองพูน มีการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> สูง ทั้งนี้อาจเป็นเพราะคลองสังเขป และคลองพูนนั้นรองรับน้ำเสียจากชุมชน โดยน้ำทิ้งจากชุมชนเป็นที่รวมของเสียที่มีสารคัดหลั่งจากร่างกายของมนุษย์ซึ่งเป็นสารในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนรวมถึงสาร E<sub>2</sub> ในปริมาณสูง (Bayen, Zhang, Desai, Ooi, & Kelly, 2013) เช่นเดียวกับในการศึกษาของ Afifi et al. (2016) ที่พบปริมาณการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> จากบริเวณแม่น้ำไนล์ ในกรุงไคโร ประเทศอียิปต์ โดยพบการปนเปื้อนสูง  $7,988.12 \pm 0.401 \text{ } \mu\text{g/l}</math> ซึ่งเป็นเพราะแม่น้ำไนล์เป็นที่รองรับน้ำเสียจำนวนมากจากชุมชนที่ไม่ได้ผ่านการบำบัด รายงานการศึกษาระดับนานาชาติเจ้าพระยา ในกรุงเทพมหานคร Ruchiraset and Chinwetkitwanich (2014) พบการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ในแม่น้ำเจ้าพระยามีปริมาณสูงถึง  $1,380-2,010 \text{ ng/l}</math> แสดงว่าแหล่งที่มาของการปนเปื้อนสาร E<sub>2</sub> หลักคือน้ำเสียจากบ้านเรือนและชุมชน$$$

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาร E<sub>2</sub> ตรวจพบในสถานีหาดวอนนภา จังหวัดชลบุรี สถานีอ่าวมาตาพุด 1 และ 2 จังหวัดระยอง และสถานีอ่าวตราด จังหวัดตราด ปริมาณต่ำ <1.02-3.52±0.79 ng/l โดยพบสูงสุดที่อ่าวมาตาพุด 1 จังหวัดระยอง เท่ากับ 3.52±0.79 ng/l โดยพบว่าแหล่งที่มาของ E<sub>2</sub> ในชายฝั่งทะเลน่าจะมาจากคลองอื่น ๆ ที่มีปากคลองลงสู่ทะเลชายฝั่งในบริเวณนี้ที่อาจไม่ใช่คลองชากหมาก (<1.21 ng/l) ผลจากการศึกษานี้พบว่าระดับการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> มีปริมาณใกล้เคียงกับการปนเปื้อนตามแนวชายฝั่งทะเลของหลายประเทศ เช่น บริเวณท่าเรือ Halifax ในประเทศแคนาดาพบสูงสุดเท่ากับ 5.3 ng/l (Robinson et al., 2009) อ่าว Arabian Gulf ประเทศคูเวต เท่ากับ 0-6.6 ng/l (Saeed et al., 2017) อ่าว Thermagos Gulf ในประเทศกรีซพบ <5 ng/l (Ardtsoglou & Voutsas, 2012) และบริเวณอ่าว Santos Gulf ในประเทศบราซิลพบสาร E<sub>2</sub> เท่ากับ <3-18.2 ng/l (Lisboa et al., 2013) บ่งชี้ว่าระดับการปนเปื้อนของสาร E<sub>2</sub> ที่พบในชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงของประเทศไทยใกล้เคียงกับที่พบในชายฝั่งทะเลประเทศอื่น

ปริมาณสาร E<sub>2</sub> ที่สะสมในหอยแมลงภู่จากการศึกษาครั้งนี้พบเท่ากับ 132-170 ng/g ซึ่งใกล้เคียงกับที่พบในหอยหลายชนิด เช่น หอย *Dreissena polymorpha* ที่มีปริมาณเท่ากับ 7.4-316.2 ng/g และหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) เท่ากับ 165-219 (Peck et al., 2007; Zhu et al., 2003) ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่ามีการสะสมของสาร E<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่อของหอยเป็นปริมาณค่อนข้างสูง

## 5.2 ความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ต่อหอยแมลงภู่

ผลการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันพบว่าหอยแมลงภู่วัยอ่อนมีการตอบสนองต่อผลความเป็นพิษของสาร BPA ในช่วงแรกจะสังเกตพบลูกหอยจะไม่สามารถยึดเกาะได้ และหอยแมลงภู่ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 mg/l เริ่มพบการตายในชั่วโมงที่ 24 โดยพบอัตราการตายเท่ากับ 23.33±5.77 % และเพิ่มขึ้นเป็น 86.67±5.77 % ในชั่วโมงที่ 48 และตายทั้งหมดในชั่วโมงที่ 72 ในขณะที่หอยแมลงภู่ที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 20 mg/l มีอัตราการตาย 50% และ 93.33% ในชั่วโมงที่ 24 และ 48 ตามลำดับ แต่ในชั่วโมงที่ 72 ทุกความเข้มข้นทำให้ลูกหอยตายทั้งหมด จากผลการทดสอบนี้บ่งชี้ได้ว่าเมื่อหอยแมลงภู่ได้รับสัมผัสสาร BPA เป็นระยะเวลาสั้นจะส่งผลต่อการตายหอยเพิ่มขึ้น และในขณะเดียวกันได้รับปริมาณสาร BPA มากขึ้น ส่งผลให้หอยมีอัตราการตายสูงขึ้นเช่นกัน โดยพบว่าในหอยแมลงภู่วัยอ่อนมีค่า LC<sub>50</sub> (95% confident) เท่ากับ 17.086 (16.547-17.643) mg/l ที่ 24 ชั่วโมง และ 3.061 (2.167-3.908) mg/l ที่ 48 ชั่วโมง ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความเป็นพิษเฉียบพลันในหอย *Marisa cornuarietis* พบว่ามีค่า LC<sub>50</sub> (95% confident) ของสาร BPA ที่ 2.24 (1-5) mg/l ที่เวลา 96 ชั่วโมง (Mihaich et al., 2009) แสดงให้เห็นว่าหอยแมลงภู่วัยอ่อนมีความไวต่อการตอบสนองต่อผลความเป็นพิษของสาร BPA สูง

กว่าหอย *M. cornuarietis* ทั้งนี้อาจเป็นเพราะปัจจัยของอายุของสัตว์ทดลอง โดย Thi et al. (2016) และ Wen-juen et al. (2017) รายงานถึงความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร BPA ในปลาหมึก (Danio rerio) สองช่วงอายุคือในวัยอ่อนและตัวเต็มวัยพบว่ามีค่า  $LC_{50}$  (95% confident) ที่เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 6.67 (5.65-7.61) และ 8.09 (7.21-9.08) mg/l ตามลำดับ ดังนั้นจากผลการศึกษานี้ บ่งชี้ว่าสัตว์น้ำวัยอ่อนมีความไวในการตอบสนองต่อสาร BPA มากกว่าในตัวเต็มวัย การใช้หอยแมลงภู่วัยอ่อนเป็นต้นแบบการศึกษาผลของสาร BPA และสาร  $E_2$  จึงมีความเหมาะสม

### 5.3 การศึกษาระดับการแสดงออกของยีน

#### 5.3.1 ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในการทำปฏิกิริยา RT-qPCR

เนื่องจากความถูกต้องของการวัดระดับการแสดงออกยีนด้วยวิธีการ qRT-PCR ขึ้นอยู่กับยีนอ้างอิงที่ใช้ ดังนั้นการเลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมจึงมีความสำคัญอย่างมาก ในการศึกษาครั้งนี้ได้เลือกยีนอ้างอิงที่เหมาะสมในหอยแมลงภู่วัย จำนวน 3 ยีนคือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -actin โดยการเปรียบเทียบจากปัจจัยเพศ (เพศผู้และเพศเมีย) และการได้รับสาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/g dw เป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมง

ในการศึกษาโดยการวิเคราะห์จากโปรแกรมทางสถิติในหอยแมลงภู่วัยระหว่างเพศผู้และเพศเมียพบว่ายีนอ้างอิงที่เหมาะสมเรียงลำดับจากมาก  $\rightarrow$  น้อย คือยีน 28S *rRNA* > 18S *rRNA* >  $\beta$ -actin ตามลำดับ สำหรับการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนระหว่างเพศเช่นเดียวกับมีรายงานว่ายีน ribosomal RNA ทั้ง 18S *rRNA* และ 28S *rRNA* เป็นยีนอ้างอิงที่เหมาะสมใน hepatopancreas ของหอย *Artica islandica* ตัวเต็มวัย (Philipp et al., 2012) และในอวัยวะของหอย *Pecten maximus* และในหอย *Nodipecten subnodosus* ที่มีสองเพศ (Hemaphrodite) ยีนอ้างอิงที่เหมาะสมคือยีน 18S *rRNA* (Llera-Herrera, García-Gasca, Abreu-Goodger, Huvet, & Ibarra, 2013; Mauriz, Maneiro, Pérez-Parallé, Sánchez, Pazos 2012) และ Ciocan et al. (2015) รายงานว่ายีน 28S *rRNA* เป็นยีนอ้างอิงที่ดีที่สุดในอวัยวะสืบพันธุ์ของหอย *Scrobicularia plana* ทั้งเพศผู้และเพศเมีย เนื่องจากยีน ribosomal RNA ทั้ง 18S *rRNA* และ 28S *rRNA* เป็นส่วนประกอบสำคัญของไรโบโซมที่มีจำนวนมากและเป็นหนึ่งในยีนอนุรักษ์ของทุกเซลล์ (Smit, Widmann, & Knight, 2007) และมีการแสดงออกอย่างคงที่เนื่องจากมีความจำเป็นต่อกระบวนการแปลรหัส (Translation) ของโปรตีน (Raska et al., 2004) การศึกษาที่ผ่านมารายงานว่า ยีน ribosomal RNA เป็นตัวเลือกที่ดีในหอยสองฝาเพื่อใช้เป็นยีนอ้างอิงเมื่อเปรียบเทียบกับยีนอื่น ๆ (Cubero-Leon, Ciocan, Minier, & Rotchell, 2011; Liera-Herrera et al., 2013)



ยีน  $\beta$ -actin เป็นหนึ่งในยีนที่นิยมใช้เป็นยีนอ้างอิงในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน (Huggett, Dheda, Bustin, & Zumla, 2005) โดยเฉพาะในหอย เช่น *Mytilus galloprovincialis* (Banni et al., 2011) และ หอยแมลงภู่ (*P. viridis*) (Jiang et al., 2017) อย่างไรก็ตาม มีรายงานว่ายีน  $\beta$ -actin สามารถมีระดับการแสดงออกของยีนเปลี่ยนแปลงได้เมื่อติดเชื้อแบคทีเรีย (Li & Shen, 2013) และในระยะวัยเจริญพันธุ์ของหอยแมลงภู่ ทั้งนี้เนื่องจากยีน  $\beta$ -actin มีความสำคัญในโครงร่างของเซลล์ (cytoskeleton) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการพัฒนาของสิ่งมีชีวิต (Cubero-Leon et al., 2012)

การศึกษาครั้งนี้พบว่าในหอยแมลงภู่ตัวเต็มวัยที่ได้รับสาร BPA 10 ng/g dw นั้นยีน 18S *rRNA* เป็นยีนที่ดีที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Normfinder ขณะที่ยีน 28S *rRNA* ดีที่สุดเมื่อวิเคราะห์ด้วย Bestkeeper และ  $\Delta Ct$  ซึ่งตรงกับรายงานการศึกษาของ Lui et al. (2016) ที่รายงานว่ายีน 18S *rRNA* เป็นยีนที่มีความเหมาะสมเมื่อเทียบกับยีน  $\beta$ -actin ในหอย *Bellamya aeruginosa* ที่ได้รับสาร  $E_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l เป็นระยะเวลา 24 และ 72 ชั่วโมง และตรงกับรายงานของ Cubero-Leon et al. (2011) ในหอย *Mytilus edulis* ที่ได้รับสาร  $E_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l เป็นระยะเวลา 10 วัน และในหอย *Ruditapes philippinarum* ที่ได้รับสาร BDE-47 ที่ระดับความเข้มข้น 5  $\mu$ g/l เป็นระยะเวลา 15 แต่อย่างไรก็ตามมีรายงานว่ายีน 18S *rRNA* เป็นยีนอ้างอิงที่ไม่เหมาะสมในหอย *Haliotis discus discus* ที่ได้รับสาร  $E_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 100  $\mu$ g/l เป็นระยะเวลา 7 วัน (Wan, Whang, Choi, Lee, & Lee, 2011)

การวัดระดับการแสดงออกของยีนเป้าหมาย *cyp4* เทียบเคียงระหว่างยีนอ้างอิงทั้ง 3 ยีนคือ 18S *rRNA*, 28S *rRNA* และ  $\beta$ -actin พบว่ากลุ่มหอยแมลงภู่ที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 10 ng/g มีการแสดงออกของยีน *cyp4* ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่า การวัดระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีน 18S *rRNA* มีความแปรปรวนต่ำที่สุด ขณะที่วัดระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีน  $\beta$ -actin พบว่ามีความแปรปรวนสูงที่สุด ดังนั้นหากใช้ยีนอ้างอิงที่ไม่เหมาะสมในการวัดระดับการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค qRT-PCR จะส่งผลให้ผลการวิเคราะห์สูงหรือต่ำเกินจริงได้ (Wan et al., 2011) เช่นเดียวกับการศึกษาของ Cubero-Leon et al. (2011) พบว่าการใช้ยีนอ้างอิงที่แตกต่างกันเทียบเคียงระดับการแสดงออกของยีน *estrogen receptor (ER)* ได้ผลแตกต่างกัน คือเมื่อใช้ยีนอ้างอิง *Elongation factor 1 (EF1)* ในหอยแมลงภู่ (*M. edulis*) ที่ได้รับสาร  $E_2$  ที่ระดับความเข้มข้น 50 ng/l เป็นระยะเวลา 10 วัน มีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน *ER* ( $p < 0.05$ ) แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อนำระดับการแสดงออกของยีน *ER* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง *DEAD-box RNA helicase* และ  $\beta$ -actin พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *ER* ในกลุ่มทดสอบเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.01$ )

เนื่องจากการศึกษายีนอ้างอิงที่เหมาะสมในหอยสองฝายังมีจำนวนน้อย (Araya et al., 2008; Lacroix, Coquillé, Guyomarch, Auffret, & Moraga, 2014; Mauriz et al., 2012; Wan, Whang, Choi, Lee, & Lee, 2011; Xin, Huang, Bai, & Wang, 2018) ในการเปรียบเทียบผลการศึกษาของหอยแต่ละชนิดจึงทำได้ยาก (Martínez-Escariáza, Lozano, Luz Pérez-Parallé, Pazos, & Sánchez, 2018) ดังนั้นการคัดเลือกยีนที่เหมาะสมในการศึกษาจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง

### 5.3.2 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีน

ในการศึกษานี้เลือกใช้สาร BPA ที่ระดับความเข้มข้น 100 ng/l และสาร E<sub>2</sub> ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l ซึ่งเป็นระดับของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ที่พบในชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียง การศึกษาครั้งนี้พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ในเนื้อเยื่อ hepatopancreas ในหอยแมลงภู่เมื่อได้รับสาร BPA ความเข้มข้น 100 ng/l พบว่าสาร BPA มีผลชักนำระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ที่ชั่วโมงที่ 36 และ 48 ( $9.31 \pm 1.09$  และ  $35.47 \pm 0.77$ ) สูงขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *cyp4a* ในหอยแมลงภู่เมดิเตอร์เรเนียน (*M. edulis*) ที่เป็นหอยสองฝาเมื่อได้รับสาร diethyl phthalate (DEHP) ซึ่งเป็นสารหนึ่งในกลุ่มสาร EDCs พบว่าการแสดงออกของยีน *cyp4a* (Chaty et al., 2004) มีแนวโน้มสูงขึ้น อีกทั้งยังมีรายงานในปลาหลายชนิด เช่น ปลา Mangrove killifish (*Kyptolebias marmoratus*) วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 600 µg/l เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง สาร BPA กระตุ้นระดับการแสดงออกของยีน *cyp2p16*, *cyp2p17* และ *cyp2p18* และในปลา *Rivulus marmoratus* วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA ความเข้มข้นเท่ากันแต่เป็นระยะเวลานาน 96 ชั่วโมง พบสาร BPA มีผลกระตุ้นระดับการแสดงออกของยีน *cyp19* เพิ่มขึ้นทั้งในสมองและอวัยวะสืบพันธุ์ (Lee Seo, Kim, Yoon, & Lee, 2006; Puthumana et al., 2017) เป็นต้น

นอกจากนี้ยังพบว่าสาร BPA ที่ความเข้มข้น 100 ng/l และให้ได้รับติดต่อกันนาน 48 ชั่วโมง ชักนำระดับการแสดงออกของยีน *vgt* เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับการศึกษาปลาคอด (*G. morhua*) ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 50 µg/l เป็นระยะเวลา 1 สัปดาห์ (Larsen et al., 2006) ปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ที่ได้รับสาร BPA เข้มข้น 80 µg/l เป็นระยะเวลานาน 1 สัปดาห์ (Lindholst, Wynne, Marriott, Pedersen, & Bjerregaard, 2003) และปลาคาร์พ (*C. carpio*) ได้รับสาร BPA ที่ความเข้มข้น 100 µg/l เป็นระยะเวลา 2 สัปดาห์ สาร BPA ชักนำระดับการแสดงออกของยีน *vgt* (Mandich et al., 2007; Virk et al., 2014)

ผลการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ในหอยแมลงภู่เมื่อได้รับสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 10 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าสาร E<sub>2</sub> ชักนำระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ในชั่วโมงที่ 12 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) แตกต่างกับ

รายงานการศึกษาการแสดงผลการแสดงออกของยีนในปลา Rainbow trout (*O. mykiss*) ว่ายอ่อนที่ได้รับการฉีดสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 3mg/kg พบว่าการแสดงออกของยีน *cyp2m1*, *cyp2k1* และ *cyp3a27* ถูกยับยั้งในตับ (Buhler et al., 2000)

การศึกษาในหอยสองฝา (*M. edulis*) ที่ได้รับสาร E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 200 ng/l เป็นระยะเวลา 10 วัน พบว่ามีผลยับยั้งการแสดงออกของยีน *cyp3* (Cubero-Leon et al., 2012) ซึ่งขัดแย้งกับการศึกษาครั้งนี้ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะระดับความเข้มข้นของสาร E<sub>2</sub> ที่หอยแมลงภู่ ของการศึกษาครั้งนี้มีความแตกต่างกัน 20 เท่าและแตกต่างจากในปลา Rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) ว่ายอ่อนถึง 300 เท่า จึงส่งผลให้การได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> เกิดกลไกการยับยั้งการทำงาน เมื่อวัดระดับการแสดงออกของยีน พบว่าระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมในทุกช่วงเวลาแตกต่างกับกลุ่มควบคุม ( $p < 0.05$ ) เช่นเดียวกับรายงานที่ศึกษาผลของสาร E<sub>2</sub> ในปลาข้าวสาร (*Oryzias latipes*) เพศผู้ซึ่งได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 100 ng/l เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง พบว่าสาร E<sub>2</sub> มีการชักนำระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เพิ่มขึ้นในเนื้อเยื่อตับ ขณะที่ปลาม้าลาย (*D. rerio*) เพศผู้พบว่าสาร E<sub>2</sub> ชักนำระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสัมผัสสาร E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 1,000 ng/l เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง (Tong et al., 2004)

ผลของสาร BPA ต่อการชักนำการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* พบว่าสาร BPA ชักนำระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ตั้งแต่ชั่วโมงที่ 36 และยีน *vtg* เมื่อเวลาผ่านไป 48 ชั่วโมง ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากแอนไจม์ P450 มีความสำคัญในกระบวนการกำจัดสารเคมีแปลกปลอม ทำให้สาร BPA กระตุ้นยีน *cyp4* สังเคราะห์โปรตีน CYP4 เพิ่มขึ้นเมื่อหอยแมลงภู่ได้รับสัมผัสสาร BPA เช่นเดียวกับที่พบว่าสาร BPA ปริมาณ 100 ppb ชักนำการสังเคราะห์โปรตีน CYP4 และ CYP2 เพิ่มขึ้นในหอยแมลงภู่ (Jonsson et al., 2006) ในขณะที่สาร E<sub>2</sub> ซึ่งเป็นฮอร์โมนหลักในการควบคุมกระบวนการสร้างโปรตีน VTG ส่งผลโดยตรงต่อตัวรับของฮอร์โมน (ER) ทำให้เกิดกระบวนการสังเคราะห์ VTG เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว เมื่อเปรียบเทียบกับสาร BPA ที่ถูกจัดเป็นสารออกฤทธิ์แบบฮอร์โมนเอสโตรเจนอย่างอ่อน (weak estrogenic activity) โดยพบว่า มีความสามารถจับกับตัวรับฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ต่ำกว่าสาร E<sub>2</sub> ประมาณ 1,000 เท่า (Iso et al., 2006) ทำให้สาร BPA ส่งผลต่อการชักนำการสังเคราะห์ VTG ต่ำกว่าสาร E<sub>2</sub>

สำหรับผลการศึกษาการแสดงผลการแสดงออกของยีน *cyp4* เทียบเคียงกับยีนอ้างอิง 18S *rRNA* ในเนื้อเยื่อ hepatopancreas ในหอยแมลงภู่เมื่อได้รับสารผสม BPA+E<sub>2</sub> ที่ความเข้มข้น 100+10 ng/l เป็นระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง พบว่าส่งผลการยับยั้งระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ในชั่วโมงที่ 12 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แต่ในเวลาอื่นไม่มีความแตกต่างของระดับการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p > 0.05$ ) ซึ่งพบว่าให้ผล

ตรงกันข้ามกับการทดสอบผลของสารผสม BPA และสาร E<sub>2</sub> เพียงชนิดเดียว แต่ให้ผลเช่นเดียวกับระดับการแสดงออกของยีน *vtg* ที่พบว่าสาร BPA+E<sub>2</sub> ยับยั้งระดับการแสดงออกของยีน *vtg* ในทุกช่วงเวลา ทั้งนี้ น่าจะเป็นผลจากผลร่วมกันของสาร BPA+E<sub>2</sub> เช่นในตัวอย่างการศึกษาในหอยแมลงภู่ (*M. galloprovincialis*) ที่ถูกฉีดสาร BPA ความเข้มข้น 3 ng/g และสาร E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 6.75 ng/g (แยกทดสอบ) กระตุ้นการแสดงออกของยีน *estrogen receptor (ER2)* สูงขึ้นแต่เมื่อได้รับสารผสม (ที่มี BPA ความเข้มข้น 88 ng/l ร่วมกับ E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 52 ng/l) พบว่าส่งผลยับยั้งการแสดงออกของยีน *ER2* ดังนั้นผลร่วมกันของ EDCs ทั้งสองสารอาจทำให้เกิดการยับยั้งของการแสดงออกของยีนได้ (Canesi et al., 2007; Canesi et al., 2008)

จากผลการศึกษาดังกล่าวจะเห็นได้ว่ายีน *cyp4* และยีน *vtg* ในหอยแมลงภู่ สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อการปนเปื้อนของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ได้อย่างเหมาะสม เนื่องจากเป็นหอยแมลงภู่ที่มีการเพาะเลี้ยงเป็นจำนวนมากในบริเวณชายฝั่งทะเลซึ่งเป็นบริเวณที่มีโอกาสรับสัมผัสและสะสมสารในกลุ่ม EDCs ไว้ในตัวได้ ซึ่งอาจก่อความเสี่ยงได้ในมนุษย์ผ่านการบริโภคต่อไป การเฝ้าระวังและติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> โดยตรงทำได้ยากและมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถบ่งชี้ถึงความเสี่ยงได้ แต่ในการใช้ตัวชี้วัดทางชีวภาพสามารถตรวจพบได้ในปริมาณน้อยจากการรับสัมผัสสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในหอยแมลงภู่ จะเป็นการเฝ้าระวังต่อผลความเสี่ยงในการปนเปื้อนของสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในแหล่งน้ำนั้น ๆ และอาจส่งผลกระทบต่อมนุษย์ผู้บริโภคสัตว์น้ำที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้นได้

#### 5.4 สรุปผลการวิจัย

1. พบปริมาณการปนเปื้อนของสาร BPA สูงสุดเท่ากับ 50.67 ng/l ในตัวอย่างน้ำจืดที่เก็บจากบริเวณใกล้เขตอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง ในขณะที่พบสาร E<sub>2</sub> สูงสุด 62.98 ng/l ในตัวอย่างที่เก็บจากคลองสังเขปเขตชุมชน
2. สาร BPA ปนเปื้อนสูงสุดเท่ากับ 37.13 ng/l ในตัวอย่างน้ำทะเลที่เก็บมาจากหาดวอนนภา ในเขตชุมชนของเทศบาลเมืองแสนสุข จังหวัดชลบุรี ส่วนสาร E<sub>2</sub> พบปริมาณต่ำ (3.52 ng/l)
3. ตรวจพบปริมาณสาร BPA สูงสุด 109.97 ng/l±14.80 (mean±SD) ng/l ในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ที่เก็บจากฟาร์มใกล้เขตอุตสาหกรรมมาบตาพุดส่วนปริมาณสาร E<sub>2</sub> ในเนื้อเยื่อของหอยไม่มีความแตกต่างกันในหอยที่เก็บจากบริเวณใกล้เขตอุตสาหกรรมมาบตาพุด จังหวัดระยอง และเขตชุมชนในสถานีหาดวอนนภา จังหวัดชลบุรี จากข้อมูลดังกล่าวนำปริมาณสาร BPA=100 ng/l และสาร E<sub>2</sub>=10 ng/l มาใช้ทดสอบการรับสัมผัสสาร BPA และสาร E<sub>2</sub> ในห้องปฏิบัติการ

4. ค่า  $LC_{50}$  (ระดับความเชื่อมั่นที่ 95%) ของหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ที่ 24 ชั่วโมงเท่ากับ 17.086 (16.547-17.643) และลดลงเท่ากับ 3.061 (2.167-3.908) ที่เวลา 48 ชั่วโมง และพบว่า  $LC_{50}$  มีค่าลดลงเมื่อเวลาในการรับสัมผัสสาร BPA เพิ่มขึ้นที่ 48 ชั่วโมง

5. การคัดเลือกยีนอ้างอิงสำหรับปฏิกิริยา RT-qPCR เพื่อวัดระดับการแสดงออกของยีนพบว่ายีน 28S *rRNA* และ 18S *rRNA* เป็นยีนที่ตีความเหมาะสม เมื่อใช้ในหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสาร BPA ด้วยวิธีการฉีดที่ความเข้มข้น 10 ng/g dw

6. พบว่าสาร BPA ที่ความเข้มข้น 100 ng/l มีผลทำให้ระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสารเป็นเวลานาน 36 (9.31±1.09) และ 48 (35.47±0.77) ชั่วโมง เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.0±0.29) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ ) ส่วนสาร BPA มีผลชักนำระดับการแสดงออกของยีน *vtg* ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง (7.89±0.72) เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.0±0.09) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p < 0.05$ )

7. สาร  $E_2$  ที่ความเข้มข้น 10 ng/l มีผลชักนำระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* ในหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสัมผัสสาร  $E_2$  เป็นเวลา 12 ชั่วโมง (2.87±0.11) เพิ่มขึ้นแตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.0±0.21) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) ขณะที่กระตุ้นระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เพิ่มขึ้นที่ระยะเวลา 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง (130.16±4.8, 72.78±4.07, 75.42±10.44 และ 78.95±38.30 ตามลำดับ) แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (1.0±0.19, 1.0±0.25, 1.0±0.56 และ 1.0±0.09 ตามลำดับ) อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ )

8. สารผสม BPA+ $E_2$  ที่ความเข้มข้น 100+10 ng/l มีผลยับยั้งระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* และ *vtg* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนได้รับสัมผัสสารผสมแตกต่างจากหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA หรือสาร  $E_2$  ที่แยกสารทดสอบ และแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญ ( $p < 0.05$ ) หอยแมลงภู่วัยอ่อนจึงเหมาะสมกับการใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพในการใช้ตรวจสอบและติดตาม สาร BPA หรือสาร  $E_2$  ปนเปื้อนในแหล่งน้ำได้

## 5.5 ข้อเสนอแนะ

1. ควรเพิ่มพื้นที่จุดเก็บตัวอย่างน้ำ ดินตะกอน และหอยแมลงภู่วัยอ่อน รวมถึงเก็บตัวอย่างแต่ละฤดูกาลด้วย

2. ควรเพิ่มช่วงเวลาในการศึกษาาระดับการแสดงออกของยีน โดยลดระยะเวลาให้หอยแมลงภู่วัยอ่อนได้รับสัมผัสสาร BPA ให้สั้นลง เช่น 1, 3 และ 6 ชั่วโมง เป็นต้น

3. ควรมีการศึกษาผลเพิ่มเติมของสารในกลุ่ม EDCs เช่น Nonylphenol หรือ Ethinyl estradiol เป็นต้น

## บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข. (2548). *ประกาศกระทรวงสาธารณสุข ฉบับที่ 295 เรื่องกำหนดคุณภาพหรือมาตรฐานของภาชนะบรรจุที่ทำจากพลาสติก*. เข้าถึงได้จาก [http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ\\_moph/P295.pdf](http://food.fda.moph.go.th/law/data/announ_moph/P295.pdf)
- นันทนา กัญยานุวัฒน์ และนุชนาท นาคำ. (2555). *แนวทางการตรวจสอบความใช้ได้ของวิธีทดสอบทางเคมี*. สำนักอุตสาหกรรมพื้นฐาน. เข้าถึงได้จาก <http://www.dpim.go.th/service/download?articleid=4110&F=7132>
- วีระพงศ์ ลุติตานนท์. (2557). *เทคนิคเรียลไทม์พีซีอาร์ (Real-time PCR)*. ขอนแก่น: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- สำนักจัดการคุณภาพน้ำ. (2556). *สถานการณ์คุณภาพน้ำและการดำเนินการแก้ไขปัญหามลพิษทางน้ำในเขตควบคุมมลพิษจังหวัดระยอง*. เข้าถึงได้จาก [http://www.pcd.go.th/info\\_serv/water\\_annual55.pdf](http://www.pcd.go.th/info_serv/water_annual55.pdf)
- Aarab, N., Lemaire-Gony, S., Unruh, E., Hansen, P. D., Larsen, B. K., Andersen, O. K., & Narbonne, J. F. (2006). Preliminary study of responses in mussel (*Mytilus edulis*) exposed to bisphenol A, diallyl phthalate and tetrabromodiphenyl ether. *Aquatic Toxicology*, 78, 86-92.
- Adeel, M., Song, X., Wang, Y., Francis, D., & Yang, Y. (2017). Environmental impact of estrogens on human, animal and plant life: A critical review. *Environment International*, 99, 107-119.
- Afifi, R., Elnwshy, N., Hannova, A., Hedstrom, M., Mattiason, B., Omran, H., Alhabi, O., & Imaran, A. (2016). SPE and HPLC Monitoring of 17- $\beta$  estradiol in Egyptian aquatic ecosystems. *Journal Liquid Chromatography & Related Technologies*, 39(8), 428-434.
- Alexander, H. C., Dill, D. C., Smith, L. W., Guiney, P. D., & Dorn, P. (1988). Bisphenol A: acute aquatic toxicity. *Environmental toxicology and Chemistry*, 7, 19-26.
- Andersen, C. L., Jensen, J. L., & Ørntoft, T. F. (2004). Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. *Cancer Research*, 64, 5245-5250.

- Arditsoglou, A., & Voutsas, D. (2012). Occurrence and partitioning of endocrine-disrupting compounds in the marine environment of Thermaikos Gulf, Northern Aegean Sea, Greece. *Marine Pollution Bulletin*, 64, 2443-2452.
- Araya, M. T., Siah, A., Mateo, D., Markham, F., McKenna, P., Johnson, G., & Berthe, F. C. (2008). Selection and evaluation of housekeeping genes for haemocytes of soft-shell clams (*Mya arenaria*) challenged with *Vibrio splendidus*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 99(3), 326-331.
- Arya, M., Shergill, I. S., Williamson, M., Gommersall, L., Arya, N., & Patel, H. R. (2005). Basic principles of real-time quantitative PCR. *Expert Review of Molecular Diagnosis*, 5(2), 209-219.
- Arukwe, A. (2001). Cellular and molecular responses to endocrine-modulators and the impact on fish reproduction. *Marine Pollution Bulletin*, 42(8), 643-655.
- Arukwe, A., & Goksøyr, A. (2003). Eggshell and egg yolk proteins in fish: hepatic proteins for the next generation: oogenetic, population, and evolutionary implications of endocrine disruption. *Comparative hepatology*, 6(2), 4. doi:10.1186/1476-5926-2-4
- Asifa, K. P., & Chitra, K. C. (2015). Evaluation of LC<sub>50</sub> and behavioral responses of bisphenol A in the cichlid fish *Etroplus maculatus*. *International Journal of Current Research*, 7(6), 16725-16729.
- Asimakopoulos, A. G., Thomaidis, N. S., & Koupparis, M. A. (2012). Recent trends in biomonitoring of bisphenol A, 4-t-octylphenol, and 4-nonylphenol. *Toxicology Letters*, 210(2), 141-154.
- Banni, M., Negri, A., Mignone, F., Boussetta, H., Viarengo, A., & Dondero, F. (2011). Gene expression rhythms in the mussel *Mytilus galloprovincialis* (Lam.) across an annual cycle. *PLoS ONE*, 6(5), e18904. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0018904>
- Basheer, C., & Lee, H. K. (2004). Analysis of endocrine disrupting alkylphenols, chlorophenols and bisphenol-A using hollow fiber-protected liquid-phase microextraction coupled with injection port-derivatization gas chromatography–mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 1057(1-2), 163-169.

- Basheer, C., Lee, H. K., & Tan, K. S. (2004). Endocrine disrupting alkylphenols and bisphenol-A in coastal waters and supermarket seafood from Singapore. *Marine Pollution Bulletin*, 48(11-12), 1161-1167.
- Bayen, S., Zhang, H., Desai, M. M., Ooi, S. K., & Kelly, B. C. (2013). Occurrence and distribution of pharmaceutically active and endocrine disrupting compounds in Singapore's marine environment: influence of hydrodynamics and physical-chemical properties. *Environmental Pollution*, 182, 1-8. doi: 10.1016/j.envpol.2013.06.028
- Ben-Jonathan, N., & Steinmetz, R. (1998). Xenoestrogens: the emerging story of bisphenol A. *Trends Endocrinology and Metabolism*, 9(3), 124-128.
- Borriukwisitsak, S., Keenan, H. E., & Gauchotte-Lindsay, C. (2012). Effects of salinity, pH and temperature on the octanol-water partition coefficient of bisphenol A. *International Journal of Environmental Science and Development*, 3(5), 460-464.
- Brankatschk, R., Bodenhausen, N., Zeyer, J., & Bürgmann, H. (2012). simple absolute quantification method correcting for quantitative PCR efficiency variations for microbial community samples. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(12), 4481-4489.
- Brian, J. V., Harris, C. A., Scholze, M., Backhaus, T., Booy, P., Lamoree, M., Pojana, G., Jonkers, N., Runnalls, T., Bonfà, A., Marcomini, A., & Sumpter, J. P. (2005). Accurate prediction of the response of freshwater fish to a mixture of estrogenic chemicals. *Environmental Health Perspective*, 113(6), 721-728.
- Broeders, S., Huber, I., Grohman, L., Berben, G., Tavernier, I., Mazzara, M., Roosens, N., & Morisset, D. (2014). Guidelines for validation of qualitative real-time PCR methods. *Trend in Food Science & Technology*, 37(2), 115-126.
- Buhler, D. R., Miranda, C. L., Henderson, M. C., Yang, Y., Lee, S., & Wang-Buhler, J. (2000). Effects of 17 $\beta$ -estradiol and testosterone on hepatic mRNA/protein levels and catalytic activities of CYP2M1, CYP2K1, and CYP3A27 in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Toxicology and Applied Pharmacology*, 168(2), 91-101.
- Bustin, S. A., Benes, V., Garson, J. A., Hellems, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M. W., Shipley, G. L., Vandesompele, J., & Wittwer, C. T. (2009).



- The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clinical Chemistry*, 55, 611-622.
- Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Lorusso, L. C., Vergani, L. Marcomini, A., & Poiana, G. (2008). Short-term effects of environmentally relevant concentrations of EDC mixtures on *Mytilus galloprovincialis* digestive gland. *Aquatic Toxicology*, 87(4), 272-279.
- Canesi, L., Borghi, C., Ciacci, C., Fabbri, R., Vergani, L., & Gallo, G. (2007). Bisphenol-A alters gene expression and functional parameters in molluscan hepatopancreas. *Molecular Cell Endocrinology*, 276(1-2), 36-44.
- Canesi, L., & Fabbri, E. (2015). Environmental effects of BPA: Focus on aquatic species. *Dose Response*, 13(3). doi: 10.1177/1559325815598304
- Card, M. L., Chin, Y., Lee, L. S., & Khan, B. (2012). Prediction and experimental evaluation of soil sorption by natural hormones and hormone mimics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60(6), 1480-1487.
- Carolan, L. A., Butler, J., Rockman, S., Guarnaccia, T., Hurt, A. C., Reading, P., Kelso, A., Barr, I., & Laurie, K. L. (2014). TaqMan real time RT-PCR assays for detecting ferret innate and adaptive immune responses. *Journal of Virological Methods*, 205, 38-52.
- Carvalho, C., Passini, G., Costa, W., Vieira, B. N., & Cerqueira, V. R. (2014). Effect of estradiol-17 $\beta$  on the sex ratio, growth and survival of juvenile common snook (*Centropomus undecimalis*). *Acta Scientiarum Animal Sciences*, 36(3), 239-245.
- Champeau, O., & Narbonne, J. F. (2006). Effect of tributyltin and 17 $\beta$  estradiol on immune and lysosomal systems of the Asian clam *Corbicula fluminea* (M.). *Environmental Toxicology*, 21(3), 323-330.
- Chaty, S., Rodius, F., & Vasseur, P. (2004). A comparative study of the expression of CYP1A and CYP4 genes in aquatic invertebrate and vertebrate. *Aquatic Toxicology (amsterdam)*, 69(1), 81-93.
- Ciocan, C. M., Cubero-Leon, E., Langston, W. J., Pope, N., Cornelius, K., Hill, E. M., Alvarez-Munoz, D., Indivieri, P., Lerebours, A., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2015). Intersex related gene expression profiles in clams *Scrobicularia plana*: molecular markers and environmental application. *Marine Pollution Bulletin*, 95, 610-617.

- Cooke, P. S., Simon, L., & Denslow, N. D. (2013). Endocrine disruptors. In W. M., Haschek, C. G. Rousseaux, M. A. Wallig, B. Bolon, R. Ochoa, & B. W., Mahler (Eds.), *Haschek and Rousseaux's handbook of toxicology* (pp. 1123-1154). Sandiago: Academic Press.
- Cousins, I. T., Staples, C. A., Klec̃ka, G. M., & Mackay, D. (2002). A multimedia assessment of the environmental fate of bisphenol A. *Human and Ecological Risk Assessment*, 8(5), 1107-1135.
- Crain, D. A., Eriksen, M., Iguchi, T., Jobling, S., Laufer, H., LeBlanc, G. A., & Guillette, L. J. Jr. (2007). An ecological assessment of bisphenol-A: evidence from comparative biology. *Reproductive Toxicology*, 24(2), 225-239.
- Cubero-Leon, E., Ciocan, C. M., Minier, C., & Rotchell, J. M. (2011). Reference gene selection for qPCR in mussel, *Mytilus edulis*, during gametogenesis and exogenous estrogen exposure. *Environmental Science and Pollution Research International*, 19, 2728-2733.
- Cubero-Leon, E., Puinean, A. M., Labadie, P., Ciocan, C., Itoh, N., Kishida, M., Osada, M., Minier, C., Hill, E. M., & Rotchell, J. M. (2012). Two CYP3A-like genes in the marine mussel *Mytilus edulis*: mRNA expression modulation following short-term exposure to endocrine disruptors. *Marine Environmental Research*, 74, 32-39.
- Deemoon, S., Sarin, C., Ying, G., Kritsunankul, C., & Sriprang, S. (2016). Occurrence of endocrine disrupting chemicals (EDCs) and estrogenic activity in the Nan River, Phitsanulok, Thailand. *Environmentasia*, 9(1), 84-91.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., Zoeller, R. T., & Gore, A. C. (2009). Endocrine-disrupting chemicals: An endocrine society scientific statement. *Endocrine Reviews*, 30(4), 293-342.
- Duong, C. N., Ra, J. S., Cho, J., Kim, S. D., Choi, H. K., Park, J., Kim, K. W., Inam, E., & Kim, S. D. (2010). Estrogenic chemicals and estrogenicity in river waters of South Korea and seven Asian countries. *Chemosphere*, 78(3), 286-293.
- Faheem, M., Kaleem, T., Javed, S., Ul-Ain, Q., Hussain, A., & Mirza, Z. S. (2013). Preliminary effect of sub-lethal dose of BPA on biochemical profile of Grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) fry. *Biologia (Pakistan)*, 59(2), 323-326.

- Faheem, M., & Lone, K. P. (2013). Acute toxicity and Behavioral response of *Cirrhinus mrigala* fingerlings to Bisphenol-A. *International Journal of Open Scientific Research IJOSR*, 1(6), 28-37.
- Flint, S., Markle, T., Thompson, S., & Wallace, E. (2012). Bisphenol A exposure, effects, and policy: A wildlife perspective. *Journal of Environmental Management*, 104, 19-34.
- Fraga, D., Meulia, T., & Fenster, S. (2014), Real-Time PCR. *Current Protocols Essential Laboratory Techniques*, 8, 10.3.1-10.3.40. doi:10.1002/9780470089941.et1003s08
- Friesen, C. N., Chapman, L. J., & Aubin-Horth, N. (2012). Holding water steroid hormones in the African cichlid fish *Pseudocrenilabrus multicolor victoriae*. *General and Comparative Endocrinology*, 179(3), 400-405.
- Fromme, H., Kuchler, T., Otto, T., Pilz, K., Muller, J., & Wenzel, A. (2002). Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 36, 1429-1438.
- Fukazawa, H., Hoshino, K., Shiozawa, T., Matsushita, H., & Terao, Y. (2001). Identification and quantification of chlorinated bisphenol-A in wastewater from wastepaper recycling plants. *Chemosphere*, 44, 973-979.
- Gagne, F., Blaise, C., Pellerin, J., & Gauthier-Clerc, S. (2002). Alteration of the biochemical properties of female gonads and vitellins in the clam *Mya arenaria* at contaminated sites in the Saguenay Fjord. *Marine Environmental Research*, 53, 295-310.
- Gatidou, G., Vassalou, E., & Thomaidis, N. S. (2010). Bioconcentration of selected endocrine disrupting compounds in the Mediterranean mussel, *Mytilus galloprovincialis*. *Marine Pollution Bulletin*, 60, 2111-2116.
- Gauthier-Clerc, S., Pellerin, J., Fournier, M., & Amiard, J. C. (2006). Immunological and biochemical responses in *Mya arenaria* (Mollusca Bivalvia) exposed in vivo to estradiol-17beta. *Comparative Biochemistry Physiological C: Toxicology & Pharmacology*, 14(3), 228-234.
- Gil, F., & Pla, A. (2001). Biomarkers as biological indicators of xenobiotic exposure. *Journal of Apply Toxicology*, 21, 245-255.
- Goldberg, E. D., & Bertine, K. K. (2000). Beyond the mussel watch-new directions for monitoring marine pollution. *Science and Total Environment*, 247(2-3), 165-174.
- Gosling, E. (2003). *Bivalve Molluscs: Biology, Ecology and Culture*. Oxford: Blackwell.

- Grzeškowiak, T., Czarczyńska-Goślińska, B., & Zgoła-Grzeškowiak, A. (2018). Biodegradation of Selected Endocrine Disrupting Compounds. In E. Bidoia, & R. Montagnolli (Eds.), *Toxicity and Biodegradation Testing Methods in Pharmacology and Toxicology* (pp. 1-27). USA: Humana Press.
- Heger, Z., Guran, R., Zitka, O., Beklova, M., Adam, V., & Kizek, R. (2014). *In vitro* interactions between 17 $\beta$ -estradiol and DNA result in formation of the hormone-DNA complex *in vitro* interactions between 17 $\beta$ -estradiol and DNA result in formation of the hormone-DNA Complexes. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 11(8), 7725-7739.
- Heid, C. A., Stevens, J., Livak, K. J., & Williams, P. M. (1996). Real time quantitative PCR. *Genome Research*, 6(10), 986-994.
- Heisterkamp, I., Gandrass, J., & Ruck, W. (2004). Bioassay-directed chemical analysis utilizing LC-MS: a tool for identifying estrogenic compounds in water samples?. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 378(3), 709-715.
- Hirano, M., Ishibashi, H., Matsumura, N., Nagao, Y., Watanabe, N., Watanabe, A., Onikura, N., Kishi, K., & Arizono, K. (2004). Acute toxicity responses of two crustaceans, *Americamysis bahia* and *Daphnia magna*, to endocrine disrupters. *Journal of Health Science*, 50(1), 97-100.
- Honkanen, J. O., Holopainen, I. J., & Kukkonen, J. V. K. (2004). Bisphenol A induces yolk-sac oedema and other adverse effects in landlocked salmon (*Salmo salar m. sebago*) yolk-sac fry. *Chemosphere*, 55(2), 187-196.
- Hu, S., Zhang, H., Shen, G., Yuan, Z., Xu, T., & Ji, R. (2017). Effects of 17 $\beta$ -estradiol and 17 $\alpha$ -ethinylestradiol on the embryonic development of the clearhead icefish (*Protosalanx hyalocranius*). *Chemosphere*, 176, 18-24.
- Huang, C. H., & Sedlak, D. L. (2001). Analysis of estrogenic hormones in municipal wastewater effluent and surface water using enzyme-linked immunosorbent assay and gas chromatography/tandem mass spectrometry. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 20(1), 133-139.

- Huang, Y. Q., Wong, C. K., Zheng, J. S., Bouwman, H., Barra, R., Wahlström, B., Neretin, L., & Wong, M. H. (2012). Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts. *Environment International*, *42*, 91-99.
- Huggett, J., Dheda, K., Bustin, S., & Zumla, A. (2005). Real-time RT-PCR normalisation; strategies and considerations. *Genes and Immunity*, *6*(4), 279-284.
- ICIS. (2011). Bisphenol A. *ICIS Chemical Business*, 43.
- Institute of Environment and Health. (2005). *Chemical purported to be Endocrine disruptors: A compilation of published list (Web report W20)*. Retrieved from <http://www.le.ac.uk/ieh>
- Iso, T., Watanabe, T., Iwanmoto, T., Shimamoto, A., & Furuichi, Y. (2006). DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, *29*(2), 206-210.
- Isobe, T., Takada, H., Kanai, M., Tsutsumi, S., Isobe, K. O., Boonyatumanond, R., & Zakaria, M. P. (2007). Distribution of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and phenolic endocrine disrupting chemicals in South and Southeast Asian mussels. *Environmental Monitoring and Assessment*, *135*(1-3), 423-440.
- Jagnytsch, O., Opitz, R., Lutz, I., & Kloas, W. (2006). Effects of tetrabromobisphenol A on larval development and thyroid hormone regulated biomarkers of the amphibian *Xenopus laevis*. *Environmental Research*, *101*, 340-348.
- Jiang, X., Tang, T., Zhao, H., Song, Q., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2017). Differential genes responses in embryo of green mussel *Perna viridis* exposed to dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT). *Toxicology Research*, *6*, 477-486.
- Jiao, F. R., Sun, X. J., & Pang, Z. T. (2008). Production and market analysis of Bisphenol A. *Chemical Industry*, *26*(9), 21-33.
- Jonsson, H., Schiedek, D., Grøsvik, B. E., & Goksøyr, A. (2006). Protein responses in blue mussels (*Mytilus edulis*) exposed to organic pollutants: A combined CYP-antibody/proteomic approach. *Aquatic Toxicology*, *78*(1), S49-S56.
- Kang, I. J., Yokota, H., Oshima, Y., Tsuruda, Y., Oe, T., Imada, N., Tadokoro, H., & Honjo, T. (2002). Effects of Bisphenol A on the reproduction of Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *21*, 2394-2400.

- Kanno, J., Onyon, L., Haseman, J., Fenner-Crisp, P., Ashby, J., & Owens, W. (2000). The OECD Program to validate the rat uterotrophic bioassay to screen compounds for in vivo estrogenic responses: Phase I. *Environmental Health Perspective*, *109*, 785-794.
- Kashiwada, S., Ishikawa, H., Miyamoto, N., Ohnishi, Y., & Magara, Y. (2002). Fish test for endocrine-disruption and estimation of water quality of Japanese rivers. *Water Research*, *36*(8), 2161-2166.
- Kassotis, C. D., Alvarez, D. A., Taylor, J. A., vom Saal, F. S., Nagel, S. C., & Tillitt, D. E. (2015). Characterization of Missouri surface waters near point sources of pollution reveals potential novel atmospheric route of exposure for bisphenol A and wastewater hormonal activity pattern. *Science of The Total Environment*, *15*(524-525), 384-393.
- Kinnberg, K., Korsgaard, B., Bjerregaard, P., & Jespersen, A. (2000). Effects of nonylphenol and 17beta-estradiol on vitellogenin synthesis and testis morphology in male platyfish *Xiphophorus maculatus*. *The Journal of Experimental Biology*, *203*, 171-181.
- Kozera, B., & Rapacz, M. (2013). Reference genes in real-time PCR. *Journal of Apply Genetics*, *54*, 391-406.
- Kramer, V. J., Miles-Richardson, S., Pierens, S. L., & Giesy, J. P. (1998). Reproductive impairment and induction of alkaline-labile phosphate, a biomarker of estrogen exposure, in fathead minnows (*Pimephales promelas*) exposed to waterborne 17 $\beta$ -estradiol. *Aquatic Toxicology*, *40*, 335-360.
- Kwak, H. I., Bae, M. O., Lee, M. H., Lee, Y. S., Lee, B. J., Kang, K. S., Chae, C. H., Sung, H. J., Shin, J. S., Kim, J. H., & Mar, W. C. (2001). Effects of nonylphenol, bisphenol A, and their mixture on the viviparous swordtail fish (*Xiphophorus helleri*). *Environmental Toxicology and Chemistry*, *20*, 787-795.
- Lacroix, C., Coquillé, V., Guyomarch, J., Auffret, M., & Moraga, D. (2014). A selection of reference genes and early-warning mRNA biomarkers for environmental monitoring using *Mytilus* spp. as sentinel species. *Marine Pollution Bulletin*, *86*(1-2), 304-313.
- Lafee, S. (2012). *BPA's real threat may be after it has metabolized: chemical found in many plastics linked to multiple health threats*. Retrieved from <http://ucsdnews.ucsd.edu>
- Lafont, R. (2000). The Endocrinology of Invertebrates. *Ecotoxicology*, *9*, 41. doi: <https://doi.org/10.1023/A:1008912127592>

- Lahnsteiner, F., Berger, B., Kletzl, M., & Weismann, T. (2005). Effect of bisphenol A on maturation and quality of semen and eggs in the brown trout, *Salmo trutta f. fario*. *Aquatic Toxicology*, 75(3), 213-224.
- Lam, P., & Gray, J. (2003). The use of biomarkers in environmental monitoring programmes. *Marine Pollution Bulletin*, 46(2), 182-186.
- Larsen, B. K., Bjørnstad, A., Sundt, R. C., Taban, I. C., Pampanin, D. M., & Andersen, O. K. (2006). Comparison of protein expression in plasma from nonylphenol and bisphenol A-exposed Atlantic cod (*Gadus morhua*) and turbot (*Scophthalmus maximus*) by use of SELDI-TOF. *Aquatic Toxicology*, 78S, 25-33.
- Lee, Y. M., Seo, J. S., Kim, I. C., Yoon, Y. D., & Lee, J. S. (2006). Endocrine disrupting chemicals (bisphenol A, 4-nonylphenol, 4-tert-octylphenol) modulate expression of two distinct cytochrome P450 aromatase genes differently in gender types of the hermaphroditic fish *Rivulus marmoratus*. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 345(2), 894-903.
- Li, D., Bi, R., Chen, H., Mu, L., Zhang, L., Chen, Q., Xie, H., Luo, Y., & Xie, L. (2017). The acute toxicity of bisphenol A and lignin-derived bisphenol in algae, daphnids, and Japanese medaka. *Environmental Science and Pollution Research International*, 24(30), 23872-23879.
- Li, M. (2014). Effects of bisphenol A, two synthetic and a natural estrogens on head regeneration of the freshwater planarians, *Dugesia japonica*. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 96(8), 1174-1184. doi: 10.1080/02772248.2015.1007988
- Li, R., & Shen, Y. (2013). An old method facing a new challenge: re-visiting housekeeping proteins as internal reference control for neuroscience research. *Life Sciences*, 92(13), 747-751.
- Li, X., Hu, J., Yin, D., & Hu, X. (2015). Solid-phase extraction coupled with ultra-high-performance liquid chromatography and electrospray tandem mass spectrometry for the highly sensitive determination of five iodinated X-ray contrast media in environmental water samples. *Journal of Separation Science*, 38(11), 1998-2005.
- Llera-Herrera, R., García-Gasca, A., Abreu-Goodger, C., Huvet, A., & Ibarra, A. M. (2013). Identification of male gametogenesis expressed genes from the *Scallop Nodipecten*

- subnodosus* by suppressive subtraction hybridization and pyrosequencing. *PLOS One*, 8(9), e73176. doi: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073176>
- Lindholst, C., Pedersen, K. L., & Pedersen, S. N. (2000). Estrogenic response of bisphenol A in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Aquatic Toxicology*, 48(2-3), 87-94.
- Lindholst, C., Wynne, P. M., Marriott, P., Pedersen, S.N., & Bjerregaard, P. (2003). Metabolism of bisphenol A in zebrafish (*Danio rerio*) and rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in relation to estrogenic response. *Comparative Biochemistry Physiological part C*, 135, 169-177.
- Lisboa, N. S., Fahning, C. S, Cotrim, G., dos Anjos, J. P., de Andrade, J. B., Hatje, V., & da Rocha, G. O. (2013). A simple and sensitive UFLC-fluorescence method for endocrine disrupters determination in marine water. *Talanta*, 15(117), 168-175.
- Liu, J., Wang, R., Huang, B., Lin, C., Wang, Y., & Pan, X. (2011). Distribution and bioaccumulation of steroidal and phenolic endocrine disrupting chemicals in wild fish species from Dianchi Lake, China. *Environmental Pollution*, 159(10), 2815-2822.
- Liu, Q., Lei, K., Ma, Q., Qiao, F., Li, Z. C, & An, L. H. (2016). Ribosomal protein L7 as a suitable reference gene for quantifying gene expression in gastropod *Bellamya aeruginosa*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 43, 120-127.
- Livak, K.J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using Real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta CT}$  method. *Methods*, 25, 402-408.
- Lokensgard, E. (2009). *Industrial Plastics: Theory and Applications*. New York: Delma cengage Learning.
- Lu, G., Yan, Z., Wang, Y., & Chen, W. (2011). Assessment of estrogenic contamination and biological effects in Lake Taihu. *Ecotoxicology*, 20, 974-981.
- Mandich, A., Bottero, S., Benfenati, E., Cevasco, A., Erratico, C., & Maggioni, S. (2007). In vivo exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A. *General Comparative Endocrinology*, 153, 15-24.
- Martínez-Paz, P., Morales, M., Martínez-Guitarte, J. L., & Morcillo, G. (2012). Characterization of a cytochrome P450 gene (CYP4G) and modulation under different exposures to xenobiotics (tributyltin, nonylphenol, bisphenol A) in *Chironomus riparius* aquatic



- larvae. *Comparative Biochemistry Physiological C: Toxicology & Pharmacology*, 155(2), 333-343.
- Martinez-escauriaza, R., Lozano, V., Luz Pérez-Parallé, M., J. Pazos, A. L., & Sánchez, J. (2018). Validation of reference genes in mussel *Mytilus galloprovincialis* tissues under the presence of okadaic acid. *Journal of Shellfish Research*, 37, 93-101.
- Mauriz, O., Maneiro, V., Pérez-Parallé, M. L., Sánchez, J. L., & Pazos, A. J. (2012). Selection of reference genes for quantitative RT-PCR studies on the gonad of the bivalve mollusc *Pecten maximus* L. *Aquaculture*, 370-371, 158-165.
- Mills, L. J., Gutjahr-Gobell, R. E., Horowitz, D. B., Denslow, N. D., Chow, M. C., & Zarogian G. E. (2003). Relationship between reproductive success and male plasma vitellogenin concentrations in cunner, *Tautoglabrus adspersus*. *Environmental Health Perspectives*, 111(1), 93-100.
- Mihaich, E. M., Friederich, U., Caspers, N., Hall, A. T., Klecka, G. M., Dimond, S. S., Staples, C. A., Ortego, L. S., & Hentges, S. G. (2009). Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5), 1392-1399.
- Nebert, D. W., & Dalton, T. P. (2006). The role of cytochrome P450 enzymes in endogenous signaling pathways and environmental carcinogenesis. *Nature Reviews Cancer*, 6, 947-960.
- Nicot, N., Hausman, J. F., Hoffmann, L., & Evers, D. (2005). Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2907-2914.
- Niwa, T., Fujimoto, M., Kishimoto, K., Yabusaki, Y., Ishibashi, F., & Katagiri, M. (2001). Metabolism and interaction of bisphenol A in human hepatic cytochrome P450 and steroidogenic CYP17. *Biological & Pharmaceutical Bulletin*, 24(9), 1064-1067.
- Oehlmann, J., Oetken, M., & Schulte-Oehlmann, U. (2008). A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption. *Environmental Research*, 108(2), 140-149.

- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Oetken, M., Bachmann, J., Lutz, I., Kloas, W., & Ternes, T. A. (2006). Effects of BPA in snails: Oehlmann et al. respond. *Environmental Health Perspectives*, *114*(6), A341-A342.
- Oehlmann, J., Schulte-Oehlmann, U., Kloas, W., Jagnytsch, O., Lutz, I., Kusk, K.O., Wollenberger, L., Santos, E. M., Paull, G.C., Van Look, K. J., & Tyler, C. R. (2009). A critical analysis of the biological impacts of plasticizers on wildlife. *Philosophical Transactions of the Royal Society B*, *364*, 2047-2062.
- Olsvika, P., Lie, K., Sturve, J., Hasselberg, L., & Andersen, O. K. (2009). Transcriptional effects of nonylphenol, bisphenol A and PBDE-47 in liver of juvenile Atlantic cod (*Gadus morhua*). *Chemosphere*, *75*(3), 360-367.
- Osada, M., Tawarayama, T., Sato, H., & Mori, K. (2003). Vitellogenin synthesis in the ovary of scallop, *Patinopecten yessoensis*: control by estradiol-17 $\beta$  and the central nervous system. *Journal of Experimental Zoology*, *299*, 172-179.
- Osada, M., & Treen, N. (2013). Molluscan GnRH associated with reproduction. *General Comparative and Endocrinology*, *15*(181), 254-258.
- Park, C., Kim, B., Na, O., Choi, Y., Lee, Y., Baek, H., Kim, H., & Takemura, A. (2003). Induction of in vitro vitellogenin synthesis by bisphenol, nonylphenol and octylphenol in Chinese minnow (*Phoxinus oxycephalus*) hepatocytes. *Korean Journal of Biological Sciences*, *7*, 227-235.
- Peck, M. R., Labadie, P., Minier, C., & Hill, E. M. (2007). Profiles of environmental and endogenous estrogens in the zebra mussel *Dreissena polymorpha*. *Chemosphere*, *69*(1), 1-8.
- Pfaffl, M. W., Tichopad, A., Prgomet, C., & Neuvians, T. P. (2004). Determination of stable housekeeping genes, differentially regulated target genes and sample integrity: BestKeeper-Excel-based tool using pair-wise correlations. *Biotechnology letters*, *26*, 509-515.
- Philipp, E. E. R., Wessels, W., Gruber, H., Strahl, J., Wagner, A. E., Ernst, I. M. A., & Rosenstiel, P. (2012). Gene expression and physiological changes of different populations of the long-lived bivalve *Arctica islandica* under low oxygen conditions. *PLoS ONE*, *7*(9), e44621. doi: <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0044621>

- Pinto, P., Estêvão, M. D., & Power, D. M. (2014). Effects of estrogens and estrogenic disrupting compounds on fish mineralized tissues. *Marine Drugs*, *12*(8), 4474-4494.
- Pisamai, S., Rungsipat, A., Kalpravidh, C., & Suriyaphol, G. (2016). Selection of reference genes for real-time polymerase chain reaction in canine oral tumor and cancer. *The Thai Journal of Veterinary Medicine*, *46*(2), 295-304.
- Pojana, G., Bonfa, A., Buseti, F., Collarin, A., & Marcomini, A. (2004). Estrogenic potential of the Venice, Italy, lagoon waters. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *23*, 1874-1880.
- Pojana, G., Gomiero, A., Jonkers, N., & Marcomini, A. (2007). Natural and synthetic endocrine disrupting compounds (EDCs) in water, sediment and biota of a coastal lagoon. *Environment International*, *33*, 929-936.
- Pookpoosa, I., Jindal, R., Morknoy, D., & Tantrakarnapa, K. (2014). Occurrence of bisphenol A in some municipal wastewater treatment plants' effluents in Bangkok region. *Int'l Journal of Advances in Agricultural & Environmental Engineering*, *1*(1), 115-120.
- Pray, L. (2008). The Biotechnology Revolution: PCR and the Use of Reverse Transcriptase to Clone Expressed Genes. *Nature Education*, *1*(1), 94.
- PTT Global Chemical Public Company Limited. (2016). *A sustainable journey: annual report 2016*. Retrieved from <http://www.pttgcgroup.com/storage/download/cg-committee-report/20170315-pttgc-cg-committee-report2016-en.pdf>
- Puthumana, J., Kim, B. M., Jeong, C. B., Kim, D. H., Kang, H. M., Jung, J. H., Kim, I. C., Hwang, U. K., & Lee, J. S. (2017). Nine co-localized cytochrome P450 genes of the CYP2N, CYP2AD, and CYP2P gene families in the mangrove killifish *Kryptolebias marmoratus* genome: Identification and expression in response to B[ $\alpha$ ]P, BPA, OP, and NP. *Aquatic Toxicology*, *187*, 132-140.
- Radonić, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W., & Nitsche, A. (2004). Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *313*, 856-862.
- Rajagopal, S., Venugopalan, V. P., Nair, K. V. K., van der Velde, G., & Jenner, H. A. (2006). Greening of the coasts: a review of the *Perna viridis* success story. *Aquatic Ecology*, *40*, 273-297.

- Rankouhi, T. R., Sanderson, J. T., van Holsteijn, I., van Leeuwen, C., Vethaak, A. D., & van den Berg, M. (2004). Effects of natural and synthetic estrogens and various environmental contaminants on vitellogenesis in fish primary hepatocytes: comparison of bream (*Abramis brama*) and carp (*Cyprinus carpio*). *Toxicological Sciences*, *81*(1), 90-102.
- Raska, I., Koberna, K., Malínský J., Fidlerová H., & Masata, M. (2004). The nucleolus and transcription of ribosomal genes. *Biology of the Cell*, *96*(8), 579-594.
- Ribeiro, C., Pardal, M. A., Martinho, F., Margalho, R., Tiritan, M. E., Rocha, E., & Rocha, M. J. (2009). Distribution of endocrine disruptors in the Mondego River estuary, Portugal. *Environmental Monitoring and Assessment*, *149*(1-4), 183-193.
- Robinson, B. J., Hui, J. P., Soo, E. C., & Hellou, J. (2009). Estrogenic compounds in seawater and sediment from Halifax Harbour, Nova Scotia, Canada. *Environmental Toxicology and Chemistry*, *28*(1), 18-25.
- Ruchiraset, A., & Chinwetkitvanich, S. (2014). Occurrence of estrogen in wastewater treatment plants and freshwater in Bangkok area, Thailand. *Advanced Materials Research*, *931-932*, 721-726.
- Saeed, T., Al-Jandal, N., Abusam, A., Taqi, T., Al-Khabbaz, A., & Zafar, J. (2017). Source and level of endocrine disrupting compounds (EDCs) in Kuwait's coastal areas. *Marine Pollution Bulletin*, *118*(1-2), 407-412.
- Sasaki, M., Akahira, A., Oshiman, K., Tsuchido, T., & Matsumura, Y. (2005). Purification of cytochrome P450 and ferredoxin, Involved in bisphenol A degradation, from *Sphingomonas* sp. Strain AO1. *Applied and Environmental Microbiology*, *71*(12), 8024-8030.
- Scsukova, S., Rollerova, E., & Bujnakova, M. A. (2016). Impact of endocrine disrupting chemicals on onset and development of female reproductive disorders and hormone-related cancer. *Reproductive Biology*, *16*(4), 243-254.
- Selig, W., & Crossman, G. L. (1971). Estimation of the cure rate of epichlorohydrin/bisphenol a type epoxy resins. *Fresenius' Zeitschrift für analytische Chemie*, *253*, 279-283.
- Shi, J., Jiao, Z., Zheng, S., Li, M., Zhang, J., Feng, Y., Yin, J., & Shao, B. (2015). Long-term effects of Bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-

- pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring. *Chemosphere*, 128, 252-257.
- Silver, N., Best, S., Jiang, J., & Thein, S. L. (2006). Selection of housekeeping genes for gene expression studies in human reticulocytes using real-time PCR. *BMC molecular biology*, 7, 33.
- Siddull, S. E. (1980). A clarification of the genus *Perna* (Mytilidae). *Bulletin of Marine Science*, 30(4), 858-870.
- Singh, S. P., Azua, A., Chaudhary, A., Khan, S., Willett, K. L., & Gardinali, P. R. (2010). Occurrence and distribution of steroids, hormones and selected pharmaceuticals in South Florida coastal environments. *Ecotoxicology*, 19(2), 338-350.
- Smit, S., Widmann, J., & Knight, R. (2007). Evolutionary rates vary among rRNA structural elements. *Nucleic Acids Research*, 35, 3339-3354.
- Sodré, F. F., Locatelli, M. A., & Jardim, W. F. (2010). Occurrence of emerging contaminants in brazilian drinking waters: a sewage-to-tap issue. *Water, Air & Soil Pollution*, 206(1), 55-67.
- Sohoni, P., Tyler, C. R., Hurd, K., Caunter, J., Hetheridge, M., Williams, T., Woods, C., Evans, M., Toy, R., Gargas, M., & Sumpter, J. P. (2001). Reproductive effects of long term exposure to bisphenol A in the fathead minnow (*Pimephales promelas*). *Environmental Science and Technology*, 35, 2917-2925.
- Soon, T., & Ransangan, J. (2014). A review of feeding behavior, growth, reproduction and aquaculture site selection for green-lipped mussel, *Perna viridis*. *Advances in Bioscience and Biotechnology*, 5, 462-469.
- Staniszewska, M., Falkowska, L., Grabowski, P., Kwaśniak, J., Mudrak-Cegiołka, S., Reindl, A. R., Sokołowski, A., Szumiło, E., & Zgrundo, A. (2014). Bisphenol A, 4-tert-Octylphenol, and 4-Nonylphenol in The Gulf of Gdańsk (Southern Baltic). *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 67(3), 335-347.
- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., Branson, D. R., O'Block, S. T., & Harris, L. R. (1998). A review of the environmental fate, effects and exposures of bisphenol A. *Chemosphere*, 36, 2149-2173.

- Staples, C. A., Dorn, P. B., Klecka, G. M., O'Block, S. T., Branson, D. R., & Harris, L. R. (2000). Bisphenol A concentrations in receiving waters near US manufacturing and processing facilities. *Chemosphere*, *40*, 521-525.
- Teng, C., Goodwin, B., Shockley, K., Xia, M., Huang, R., Norris, J., Merrick, B. A., Jetten, A. M., Austin, C. P., & Tice, R. R. (2013). Bisphenol A affects androgen receptor function via multiple mechanisms. *Chemico-Biological Interactions*, *203*(3), 556-564.
- Thi, N. M., Kim, N. V. T., Lan, C. D. H., & Ph, N. L. (2016). Acute toxicity of bisphenol A induced phenotypic changes on zebrafish (*Danio rerio*) during early development. *Journal of Science and Technology* *54*(2A), 71-77.
- Tong, Y., Shan, T., Poh, Y. K., Yan, T., Wang, H., Lam, S. H., & Gong, Z. (2004). Molecular cloning of zebrafish and medaka vitellogenin genes and comparison of their expression in response to 17 $\beta$ -estradiol. *Gene*, *328*, 25-36.
- Treen, N., Itoh, N., Miura, H., Kikuchi, I., Ueda, T., Takahashi, K. G., Ubuka, T., Yamamoto, K., Sharp, P. J., Tsutsui, K., & Osada, M. (2012). Mollusc gonadotropin-releasing hormone directly regulates gonadal functions: a primitive endocrine system controlling reproduction. *General and Comparative Endocrinology*, *172*(2), 167-172.
- Tyl, R. W. (2014). Abbreviated assessment of bisphenol A toxicology literature. *Seminar in Fetal Neonatal Medicine*, *19*(3), 195-202.
- Uno, T., Ishizuka, M., & Itakura, T. (2012). Cytochrome P450 (CYP) in fish. *Environmental toxicology and pharmacy*, *34*(1), 1-13.
- United State Environmental Protection Agency. (2008). *Risks of naled use to federally threatened California Red Legged frog (Rana aurora draytonii)*. Retrieved from <https://www3.epa.gov/pesticides/endanger/litstatus/effects/redleg-frog/naled/appendix-i.pdf>
- University of Waikato. (2013). *Mussel life cycle*. Retrieved from <https://www.sciencelearn.org.nz/images/815-mussel-life-cycle>
- Valasek, M. A., & Repa, J. J. (2005). The power of real-time PCR. *Advances in Physiology Education*, *29*(3), 151-159.

- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., & Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biology*, 3(7). Retrieved from <http://genomebiology.com/2002/3/7/research/0034>
- Vethaak, A. D., Lahr, J., Schrap, S. M., Belfroid, A. C, Rijs, G. B., Gerritsen, A., de Boer, J., Bulder, A. S., Grinwis, G., Kuiper, R. V., Legler, J., Murk, T. A., Peijnenburg, W., Verhaar, H. J., & Voogt, P. (2005). An integrated assessment of estrogenic contamination and biological effects in the aquatic environment of the Netherlands. *Chemosphere*, 59, 511-524.
- Virk, P., Al-Sakran, A., & Elobeid, M. A. (2014). Effect of bisphenol a on the levels of vitellogenin and metallothionein in adult male carp, *Cyprinus carpio carpio* Linnaeus, 1758. *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, 13(7), 1107-1112.
- Walker, C. H., Sibly, R. M., Hopkin, S. P., & Peakall, D. B. (2005). *Principles of Ecotoxicology* (3<sup>rd</sup> ed.). NewYork: CRC Press.
- Wan, Q., Whang, I., Choi, C. Y., Lee, J. S., & Lee, J. (2011). Validation of housekeeping genes as internal controls for studying biomarkers of endocrine-disrupting chemicals in disk abalone by real-time PCR. *Comparative Biochemistry Physiological C: Toxicology & Pharmacology*, 153(3), 259-268.
- Wen-juan, R., Zhen, W., Xian-hai, W., Ji-ning, L., Qian, Y., Ying-wen, C., & Shu-bao, S. (2017). Acute toxicity effect of bisphenol A and its analogues on adult and embryo of zebrafish. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 33(4), 372-378.
- Xin, L., Huang, B., Bai, C., & Wang, C. (2018). Validation of housekeeping genes for quantitative mRNA expression analysis in OshV-1 infected ark clam, *Scapharca broughtonii*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1(155), 44-51.
- Xu, E. G., Ho, P. W., Tse, Z., Ho, S. L., & Leung, K. M. Y. (2016). Revealing ecological risks of priority endocrine disrupting chemicals in four marine protected areas in Hong Kong through an integrative approach. *Environmental Pollution*, 215, 103-112.
- Xu, W., Yan, W., Huang, W., Miao, L., & Zhong, L. (2014). Endocrine-disrupting chemicals in the Pearl River Delta and coastal environment: sources, transfer, and implications. *Environmental Geochemistry and Health*, 36(6), 1095-1104.

- Yap, C. K., Cheng, W. H., Karami, A., & Ismail, A. (2016). Health risk assessments of heavy metal exposure via consumption of marine mussels collected from anthropogenic sites. *Science of the Total Environment*, 553, 285-296.
- Yap, C. K., Shahbazi, A., & Zakaria, M. P. (2012). Concentrations of heavy metals (Cu, Cd, Zn and Ni) and PAHs in *Perna viridis* collected from seaport and non-seaport waters in the Straits of Johore. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 89(6), 1205-1210.
- Yin, G. G., Kookana, R. S., & Ru, Y. J. (2002). Occurrence and fate of hormone steroids in the environment. *Environment International*, 28(6), 541-551.
- Yuan, X., Tianyuan, L., Zhou, L., & Zhao, X. (2014). Characteristics and risk assessment of estrogenic compounds in rivers of Southern Jiangsu Province, China. *IERI Procedia*, 9, 176-184.
- Zanette, J., Goldstone, J. V., Bainy, A. C. D., & Stegeman, J. J. (2011). Identification of CYP genes in *Mytilus* (mussel) and *Crassostrea* (oyster) species: First approach to the full complement of cytochrome P450 genes in bivalves. *Marine Environmental Research*, 69S1, S1-S3. doi: 10.1016/j.marevres.2009.10.013
- Zhang, X., Chang, H., Wiseman, S., He, Y., Higley, E., Jones, P., Wong, C. K., Al-Khedhairi, A., Giesy, J. P., & Hecker, M. (2011). Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells. *Toxicological Science*, 121(2), 320-327.
- Zhang, X., Zhang, D., Zhang, H., Luo, Z., & Yan, C. (2012). Occurrence, distribution, and seasonal variation of estrogenic compounds and antibiotic residues in Jiulongjiang River, South China. *Environmental Science and Pollution Research*, 19(5), 1392-1404.
- Zhao, J. L., Ying, G. G., Wang, L., Yang, J., Yang, X. B., Yang, L. H., & Li, X. (2009). Determination of phenolic endocrine disrupting chemicals and acidic pharmaceuticals in freshwater of the Pearl Rivers in South China by gas chromatography-negative chemical ionization-mass spectrometry. *Science of the Total Environment*, 407, 962-974.
- Zhou, J., Zhu, X., & Cai, Z. (2011). The impacts of bisphenol A (BPA) on abalone. (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development. *Chemosphere*, 82(3), 443-450.



- Zhou, Q., Wu, W., & Huang Y. (2014). TiO<sub>2</sub> nanotube array micro-solid phase equilibrium extraction for the determination of bisphenol A, 4-n-nonylphenol, and 4-tert-octylphenol at trace levels with high-performance liquid chromatography. *Analytical Method*, 6, 8396-8402.
- Zhu, W., Mantione, K., Jobes, D., Salamon, E., Cho, J. J., Cadet, P., & Stefano, G. B. (2003). The present of 17 $\beta$  estradiol in *Mytilus edulis* gonadal tissue: Evidence of estradiol isoforms. *Neuro endocrinology Letters*, 24(3/4), 137-140.

ภาคผนวก

**ภาคผนวก ก**

วิธีการคำนวณความเข้มข้นของสารละลายมาตรฐาน

### การเตรียมสารละลายมาตรฐาน

การชั่งสารละลายมาตรฐาน BPA และ E<sub>2</sub> สามารถคำนวณได้จากความบริสุทธิ์ของสารแต่ละตัว ซึ่งค่าความบริสุทธิ์ของสารแต่ละตัวจะต่างกันเล็กน้อย

#### 1. วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน BPA 1,000 ng/mL

เตรียม BPA 99% ชั่งสารปริมาณ 0.0101 กรัม ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 mL

ผสมตัวอย่างที่ชั่งแล้วปรับปริมาตรด้วย 75% เมทานอลปริมาตร 10 mL

จะได้สารละลายมาตรฐาน BPA ความเข้มข้น 1,000 ng/mL

#### 2. วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐาน E<sub>2</sub>

เตรียม E<sub>2</sub> 98% ชั่งสารปริมาณ 0.0102 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 mL

ผสมตัวอย่างที่ชั่งแล้วปรับปริมาตรด้วย 75% เมทานอลปริมาตร 10 mL

จะได้สารละลายมาตรฐาน E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 1,000 ng/mL

#### 3. วิธีเตรียมสารละลายมาตรฐานผสม BPA และ E<sub>2</sub>

เตรียม BPA 99% ชั่งสารปริมาณ 0.0101 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 mL

เตรียม E<sub>2</sub> 98% ชั่งสารปริมาณ 0.0102 g ลงในบีกเกอร์ขนาด 5 mL

ผสมตัวอย่างที่ชั่งแล้วปรับปริมาตรด้วย 75% เมทานอลปริมาตร 10 mL

จะได้สารละลายมาตรฐานผสม BPA และ E<sub>2</sub> ความเข้มข้น 1,000 ng/mL

### การเตรียมสารละลายมาตรฐานเพื่อทำกราฟมาตรฐาน

#### 1. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 250 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 500  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,500  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

#### 2. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 200 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 400  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,600  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

#### 3. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 150 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 300  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,700  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

#### 4. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 100 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 200  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,800  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

#### 5. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 50 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 100  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,900  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

#### 6. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 10 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 20  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,980  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

#### 7. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 5 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 10  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,980  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

8. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 1 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 2  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,998  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

9. การเตรียมสารละลายความเข้มข้น 0.5 ng/mL

ปิเปตสารละลายมาตรฐานผสมความเข้มข้น 1,000 ng/mL ปริมาตร 1  $\mu$ L ลงในขวด vial จากนั้นเติม 75% เมทานอล 1,999  $\mu$ L เขย่าให้เข้ากันจะได้ปริมาตรสุดท้ายเท่ากับ 2,000  $\mu$ L

**ภาคผนวก ข**  
**ผลการวิเคราะห์ทางสถิติเพิ่มเติม**

ตารางภาคผนวก ข-1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน vtg  
เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36  
และ 48 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	130.565 <sup>a</sup>	9	14.507	82.897	0.00
Intercept	82.485	1	82.485	471.332	0.00
Treatment	12.13	1	12.13	69.31	0.00
Time	58.824	4	14.706	84.033	0.00
Treatment * Time	59.611	4	14.903	85.157	0.00
Error	3.5	20	0.175		
Total	216.55	30			
Corrected Total	134.065	29			

a= R Squared = .974 (Adjusted R Squared = .962)

ตารางภาคผนวก ข-2 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออก  
ของยีน vtg เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสาร BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา  
0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD

ระยะเวลาได้รับสาร BPA (ชั่วโมง)	N	Subset	
		1	2
0	6	0.86295	
12	6	0.95877	
24	6	1.00545	
36	6	1.00685	
48	6		4.45678
Sig.		0.974	1



ตารางภาคผนวก ข-3 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ  $E_2$  (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	59123.843 <sup>a</sup>	9	6569.316	24.913	0.00
Intercept	35392.721	1	35392.721	134.222	0.00
Treatment	33317.261	1	33317.261	126.351	0.00
Time	12903.55	4	3225.888	12.234	0.00
Treatment * Time	12903.031	4	3225.758	12.233	0.00
Error	5273.747	20	263.687		
Total	99790.311	30			
Corrected Total	64397.59	29			

a= R Squared = .918 (Adjusted R Squared = .881)

ตารางภาคผนวก ข-4 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ  $E_2$  (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD

ระยะเวลาได้รับสาร $E_2$ (ชั่วโมง)	N	Subset		
		1	2	3
0	6	1.18657		
12	6			65.61555
24	6		31.09422	65.61555
36	6		31.94962	
48	6		41.89202	41.89202
Sig.		1	0.778	0.123

ตารางภาคผนวก ข-5 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA+E<sub>2</sub> (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	7.549 <sup>a</sup>	9	0.839	18.769	0.00
Intercept	13.081	1	13.081	292.684	0.00
Treatment	3.931	1	3.931	87.953	0.00
Time	1.742	4	0.436	9.745	0.00
Treatment * Time	1.876	4	0.469	10.497	0.00
Error	0.894	20	0.045		
Total	21.524	30			
Corrected Total	8.443	29			

a=R Squared = .894 (Adjusted R Squared = .846)

ตารางภาคผนวก ข-6 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน *vtg* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับสารผสม BPA+E<sub>2</sub> (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD

ระยะเวลาได้รับสาร BPA+E <sub>2</sub> (ชั่วโมง)	N	Subset	
		1	2
0	6	0.86295	
12	6	0.95877	
24	6	1.00545	
36	6	1.00685	
48	6		4.45678
Sig.		0.974	1

ตารางภาคผนวก ข-7 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	3187.963 <sup>a</sup>	9	354.218	953.75	0
Intercept	883.92	1	883.92	2379.998	0
Treatment	582.238	1	582.238	1567.704	0
Time	1304.665	4	326.166	878.219	0
Treatment * Time	1301.06	4	325.265	875.793	0
Error	7.428	20	0.371		
Total	4079.31	30			
Corrected Total	3195.39	29			

a = R Squared = .998 (Adjusted R Squared = .997)

ตารางภาคผนวก ข-8 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA (100 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD

ระยะเวลาได้รับสาร BPA (ชั่วโมง)	N	Subset		
		1	2	3
0	6	1.17817		
12	6	1.19851		
24	6	1.3318		
36	6		5.17228	
48	6			18.25961
Sig.		0.992	1	1

ตารางภาคผนวก ข-9 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4*  
เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ  $E_2$  (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ  
48 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	10.553 <sup>a</sup>	9	1.173	9.069	0.00
Intercept	53.71	1	53.71	415.414	0.00
Treatment	2.984	1	2.984	23.083	0.00
Time	3.857	4	0.964	7.459	0.001
Treatment * Time	3.711	4	0.928	7.176	0.001
Error	2.586	20	0.129		
Total	66.849	30			
Corrected Total	13.139	29			

a= R Squared = .803 (Adjusted R Squared = .715)

ตารางภาคผนวก ข-10 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออก  
ของยีน *cyp4* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ  $E_2$  (10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12,  
24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD

ระยะเวลาได้รับสาร $E_2$ (ชั่วโมง)	N	Subset	
		1	2
0	6	1.10104	
12	6		1.95135
24	6	1.25329	
36	6	0.90863	
48	6	1.45788	1.45788
Sig.		0.974	1

ตารางภาคผนวก ข-11 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนของต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA+E<sub>2</sub> (100+10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง

Source	Type III Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Corrected Model	5.574 <sup>a</sup>	9	0.619	8.586	0.00
Intercept	23.69	1	23.69	328.4	0.00
Treatment	0.539	1	0.539	7.467	0.013
Time	2.63	4	0.657	9.113	0.00
Treatment * Time	2.406	4	0.601	8.337	0.00
Error	1.443	20	0.072		
Total	30.707	30			
Corrected Total	7.017	29			

a= R Squared = .794 (Adjusted R Squared = .702)

ตารางภาคผนวก ข-12 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของต่อระดับการแสดงออกของยีน *cyp4* เมื่อหอยแมลงภู่วัยอ่อนที่ได้รับ BPA+E<sub>2</sub> (100+10 ng/L) ที่ระยะเวลา 0, 12, 24, 36 และ 48 ชั่วโมง ด้วยวิธี Tukey HSD

ระยะเวลาได้รับสาร BPA+E <sub>2</sub> (ชั่วโมง)	N	Subset		
		1	2	3
0	6		1.16281	1.16281
12	6	0.5292		
24	6	0.71585	0.71585	
36	6	0.72544	0.72544	
48	6			1.30987
Sig.		0.714	0.062	0.874