



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การสำรวจความหลากหลายและชนิดของโปรตีนในหอยนางรมบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก
ของอ่าวไทยเพื่อการใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านสิ่งแวดล้อมทางทะเล

(Biodiversity and identification of proteins in oyster inhabited in the East coast
of the Gulf of Thailand and its application in marine environmental research)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง
คณะผู้วิจัย: ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์
ดร.ปฐมฤกษ์ อิงสันเทียะ
นางสาวดารณี โชคชัยชำนาญกิจ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561
มหาวิทยาลัยบูรพา

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการวิจัยเรื่อง

การสำรวจความหลากหลายและชนิดของโปรตีนในหอยนางรมบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก
ของอ่าวไทยเพื่อการใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านสิ่งแวดล้อมทางทะเล
(Biodiversity and identification of proteins in oyster inhabited in the East coast
of the Gulf of Thailand and its application in marine environmental research)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.สุทิน กิ่งทอง¹
¹ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัย
บูรพา

คณะผู้วิจัย: ดร.จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์²
ดร.ปฐมฤกษ์ อิงสันเทียะ³
นางสาวดารณี โชคชัยชำนาญกิจ²
²ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
³ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2561 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 9/2561

ขอขอบคุณภาคีวิชาชีพวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรีที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและเทคโนโลยีด้านการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ ดร.กิตติยา เขียร์แมน และ คุณนิตยา สุตศิริ ห้องปฏิบัติการวิเคราะห์อินทรีย์เคมี ฝ่ายมาตรวิทยาเคมีและชีวภาพ ที่ช่วยให้วิเคราะห์สารประกอบออร์แกโนทิน

ขอขอบคุณ นางสาวสุภัททา เฉื่อยฉ่ำ นางสาวกุลนิษฐ์ ถนอมจิตร นางสาวปาริชาติ สิงห์โตทอง นายชนพพล กลิ่นกลบ และสมาชิกห้องปฏิบัติการหอยนางรมทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และร่วมมือกันทำงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กุมภาพันธ์ 2562

คณะผู้วิจัย

การสำรวจความหลากหลายและชนิดของโปรตีนในหอยนางรมบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของอ่าวไทยเพื่อการใช้ประโยชน์สำหรับงานวิจัยด้านสิ่งแวดล้อมทางทะเล

บทคัดย่อ

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลกระทบของสารเคมีที่มีการปนเปื้อนในบริเวณชายฝั่งทะเลต่อหอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* โดยทำการศึกษาพิษวิทยาของสารดีดีที (DDT, Dichlorodiphenyltrichloroethane) ซึ่งเป็นสารในกลุ่มออร์แกโนคลอรีน โดยได้ออกแบบการทดสอบในห้องปฏิบัติการเพื่อประเมินผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อน และต่อตัวเต็มวัย และศึกษาโปรตีนโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลและโปรตีนโอมในเมือกของหอยนางรมปากจีบ เพื่อศึกษาผลกระทบการทำงานของเซลล์และเนื้อเยื่อเมื่อสัมผัสสารดีดีที นอกจากนี้ยังหาตัวชี้วัดทางชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) ในการรับสัมผัสสารดีดีที โดยใช้เทคนิคภูมิคุ้มกันวิทยา และ โปรตีนโอมิกส์ ผลการศึกษาพบว่า สารดีดีทีที่มีความเป็นพิษที่รุนแรงต่อตัวอ่อนระยะแกสตรูลา ระยะโทรโคพอร์ และระยะเวลิเจอร์ ทำให้ตัวอ่อนในแต่ละระยะเกิดความผิดปกติขึ้นแม้ว่าจะได้รับความเข้มข้นสารต่ำเพียง 0.25 µg/L ผลการทดสอบในตัวเต็มวัยพบว่าสารดีดีทีที่มีผลต่ออัตราการตายและมีค่า LC50 ณ เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 891.25 µg/L ผลการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อพบว่าสารดีดีทีที่มีผลต่อโครงสร้างของเนื้อเยื่อในหอยนางรมกลุ่มทดสอบที่ได้รับความเข้มข้นของสาร 10 และ 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบการอักเสบของเนื้อเยื่อ กระตุ้นการแบ่งเซลล์ในเนื้อเยื่อเหงือก กระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้น และส่งผลกระทบต่อโครงสร้างเซลล์ในต่อมย่อยอาหาร ซึ่งระดับความรุนแรงของสารดีดีทีต่อตัวอ่อนและตัวเต็มวัยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นและระยะเวลาการทดสอบ ผลการศึกษาโปรตีนโอมพบว่าสารดีดีทีที่มีผลต่อปริมาณโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน การสร้างโปรตีน โปรตีนโครงสร้าง โปรตีนขนส่ง โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับความเครียด และการแลกเปลี่ยนก๊าซ ผลที่ได้จากการศึกษาคั้งนี้เป็นการรายงานพิษวิทยาของสารดีดีทีในระดับโมเลกุลและกลไกการทำงานของเซลล์ในหอยนางรมปากจีบ และผู้วิจัยได้เสนอตัวชี้วัดทางชีวภาพระดับโปรตีน (potential protein biomarker) ไว้ด้วย นอกจากนี้โครงการวิจัยนี้ยังได้ขยายการศึกษาเพื่อทำการตรวจวัดการปนเปื้อนของสารสารประกอบบิวทิลทิน (butyltin) ซึ่งเป็นสารกลุ่มออร์แกโนทินที่มีการปนเปื้อนในบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก โดยทำการวิเคราะห์ในหอยแมลงภู่ชนิด *Perna viridis* ผลการศึกษาพบว่า พบการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อจากหอยที่เก็บตัวอย่างจากบริเวณชายฝั่งภาคจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด พบมีค่าเฉลี่ยค่าเท่ากับ 1.04, 5.98 และ 0.95 ng/g dry weight ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคิดเป็นหน่วยในน้ำหนักสดจะเทียบเท่ากับ 0.23, 0.10 และ 0.15 ng/g wet weight ตามลำดับ แม้ว่ายังคงพบการปนเปื้อนสารประกอบบิวทิลทินในสิ่งมีชีวิตมีแนวโน้มการปนเปื้อนลดลง อย่างไรก็ตามก็ควรมีการตรวจวัดเพิ่มเติมอย่างต่อเนื่องในอนาคต เนื่องจากสารกลุ่มนี้เป็นสารที่มีการสะสมยาวนาน persistent organic pollutants (POPs) จึงอาจมีการสะสมในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนาน

คำสำคัญ: ดีดีที, โปรตีนโอม, พยาธิวิทยา, ตัวชี้วัดทางชีวภาพ, LC-50

Biodiversity and identification of proteins in oyster inhabited in the East coast of the Gulf of Thailand and its application in marine environmental research

Abstract

Current research project aimed to investigate the effect of environmental pollutant to oyster *Saccostrea cucullata*. DDT (dichlorodiphenyltrichloroethane), an organotin compound, was used to assess its toxicological effect to oyster. Experimental exposures were carried out to assess DDT effect to larva development, adult oyster and its tissues. Proteome analyses were performed in order to explore molecular basis of proteome response in both mantle tissue and secreted mucus after DDT exposures. Additionally, protein biomarkers of DDT exposure were also investigated. Histological techniques and proteome technology were used in current work. Results showed that DDT highly affected early life stages of oyster larva including gastrula, trochophore and D-shape veliger even in the lowest treated group as 0.25 µg/L. In adults, DDT caused mortality effect with LC50 at 96 hours of 891.25 µg/L. Histological results revealed that DDT impacted on tissue structure of DDT treated groups including 10 and 100 µg/L at 96 hours of exposure. Tissue inflammations were generally found. DDT also particularly induced hyperplasia in gills, induced mucous cell production in mantle and affected epithelium structure of digestive glands. Severity of particular symptoms were according to dose and time of exposures. Proteome results showed that DDT affected proteins in various groups including energy metabolism, protein production, cytoskeletons, ion transport, stress response and gas-exchange. Results obtained from current work revealed molecular basis of cellular response against DDT exposure in the oyster. Additionally, potential protein biomarkers of DDT exposure were also proposed in this study. This research project also extended the study to the measurement of butyltin compounds, organotin compounds, which have been reported as pollutants in the east coast. Tissues of the Green mussel *Perna viridis* was used for butyltin analyses. Results showed that butyltin compounds were measured in mussels with mean accumulation level of 2.66 ng/g dry weights which was equivalent to 0.49 ng/g wet weights. The mean bioaccumulation levels of mussel collected from Chonburi, Rayong and Trat Provinces were 1.04, 5.98 and 0.95 ng/g dry weight in which equivalent to 0.23, 1.10 and 0.15 ng/g wet weight basis. Our results indicated that bioaccumulations of butyltin compounds in mussels were extremely decreased comparing to previous reports. However, the monitoring should be further investigated because these compounds are persistent organic pollutants (POPs) and could be persist in environment for long period of time.

Keywords: DDT, proteome, histopathological effect, biomarker, LC-50

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
ภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญภาพ	ฉ
สารบัญตาราง	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	2
1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย	3
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.1 หอยนางรมปากจีบ (<i>Saccostrea cucullata</i>)	4
2.2 โพรทีโอไมกส์	4
2.3 การศึกษาโพรทีโอไมในหอยนางรมโดยใช้เทคนิคโพรทีโอไมกส์	6
2.4 สารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน	7
2.5 การกำหนดค่าความเป็นพิษของสาร DDT	13
2.6 สารประกอบบิวทิลทิน (Butyltin compounds; BTs)	14
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	16
3.1 การคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ	16
3.2 ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย	18
3.3 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย	19
3.4 การวิเคราะห์โพรทีโอไมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ	20
3.5 การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโพรทีโอไมของเมือกหอยนางรมปากจีบ	22
3.6 การตรวจวัดสารประกอบบิวทิลทินในหอยแมลงภู่	23
บทที่ 4 ผลการวิจัย	26
4.1 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ	26
4.2 ผลกระทบของสารออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย	31

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
4.3 ผลกระทบของสารของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย	33
4.4 การวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب	38
4.5 ผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีนในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب	40
4.6 การหาตัวชี้วัดชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในหอยนางรมปากจیب	47
4.7 การศึกษาผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีนของเมือกหอยนางรมปากจیب	52
4.8 การศึกษาการปนเปื้อนของประกอบบิวทิลทินบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก	57
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผล	62
อภิปรายผล	
5.1 ผลกระทบของสารของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب (larva developmental biology)	62
5.2 ผลกระทบของสารของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیبตัวเต็มวัย	62
5.3 ผลกระทบของสารของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย	63
5.4 การวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب	64
5.5 การวิเคราะห์โปรตีนและผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีนเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب	64
5.6 การหาตัวชี้วัดชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในหอยนางรมปากจیب	69
5.7 ผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจیب	70
5.8 การศึกษาการปนเปื้อนของประกอบบิวทิลทินบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก	74
สรุปผลการวิจัย	76
บรรณานุกรม	79
ประวัติคณะผู้วิจัย	86

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า	
2-1	ขั้นตอนการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์	7
2-2	โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT	9
2-3	โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT เมื่อถูกเปลี่ยนรูปให้เป็นอนุพันธ์ DDD และ DDE	9
3-1	การเตรียมเซลล์สืบพันธุ์หอยนางรมปากจیبและการปฏิสนธิ	17
3-2	ตัวอย่างภาพตัดตามขวาง (cross section) ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیب	19
3-3	ขั้นตอนการกำจัดเกลือ ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices	23
3-4	แผนที่จุดเก็บตัวอย่างในการศึกษาครั้งนี้ (ดัดแปลงจากโปรแกรม QGIS)	24
4-1	การปฏิสนธิของหอยนางรมปากจیب <i>Saccostrea cucullata</i>	28
4-2	ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب <i>Saccostrea cucullata</i>	29
4-3	ผลกระทบของสาร DDT ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب	30
4-4	ผลกระทบของสาร DDT ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیبตัวเต็มวัย	32
4-5	ผลกระทบของสาร DDT ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب	35
4-6	ผลกระทบของสาร DDT ต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจیب	36
4-7	ผลกระทบของสาร DDT ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจیب	37
4-8	Proteome reference map of oyster mantle in <i>Saccostrea cucullata</i>	38
4-9	ผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีโอมของเนื้อเยื่อแมนเทิลหอยนางรมปากจیب	42
4-10	การวิเคราะห์ภาพถ่าย 2D-PAGE เพื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนด้วย ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software	43
4-11	โปรตีนที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)	44
4-12	โปรตีนที่มีแนวโน้มเป็น Potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในกลุ่ม Dose-dependent up-regulated protein	48
4-13	โปรตีนที่มีแนวโน้มเป็น Potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในกลุ่ม Dose-dependent down-regulated protein	51
4-14	ผลการวิเคราะห์โปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจیبด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ	53
4-15	ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software	55
4-16	โครมาโตแกรมของสารประกอบบิวทิลทินที่ผ่านกระบวนการ derivatization	58
4-17	Mass spectra ของ MBT DBT และ TBT ที่ทำการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ในโหมด Scan	59

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า	
2-1	ค่าความเป็นพิษของสาร DDT ต่อสัตว์ทดลอง	13
3-1	พิกัดสถานที่เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่นิวชนิด <i>Perna viridis</i> และน้ำหนักเนื้อเยื่อสด และน้ำหนักแห้งหลังจากทำแห้งแบบเยือกแข็ง	24
4-1	การระบุชนิดของโปรตีนจาก protein spot ในภาพที่ 4-8 โดย LC-MS/MS	39
4-2	การระบุชนิดของ differential protein ($P < 0.05$) ด้วย LC-MS/MS	46
4-3	จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (differential protein) ในตัวอย่างเมือกจากหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม	54
4-4	การระบุชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม	56
4-5	ไอออนและ Retention time ของสารประกอบบิวทิลทิน และ internal standard Tripropyltin (TPrT)	60
4-6	ค่าคุณลักษณะของวิธีการวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ ($n=3$)	60
4-7	ปริมาณสารประกอบบิวทิลทินที่ตรวจพบการสะสมในหอยแมลงภู่นิวชนิด <i>P. viridis</i> น้ำหนักแห้ง มีหน่วยเป็น ng/g dry weight	60
4-8	ปริมาณสารประกอบบิวทิลทินที่ตรวจพบการสะสมในหอยแมลงภู่นิวชนิด <i>P. viridis</i> น้ำหนักสด หน่วยเป็น ng/g wet weight	61

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาการศึกษาโปรตีโอม (proteome; โปรตีนทั้งหมดที่สร้างขึ้นจากจีโนม) ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ มีบทบาทอย่างมากในการศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) และได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการศึกษาการแสดงออกและหน้าที่ของโปรตีนเป็นการบ่งชี้หน้าที่ของยีนได้ใกล้เคียงมากกว่าการศึกษาที่ระดับยีนหรือระดับทรานสคริปโตม (RNA) เพียงอย่างเดียว (Aebersold and Mann, 2003; Domon and Aebersold, 2006) เนื่องจากโปรตีนที่สร้างขึ้นในเซลล์หรือเนื้อเยื่อ ณ ขณะใดขณะหนึ่ง จะขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมภายในและภายนอกเซลล์ ในสภาวะที่มีสิ่งเร้าแตกต่างกัน เช่น ในขณะที่ได้รับยา สารเคมี หรือสิ่งแปลกปลอม หรือมีระดับฮอร์โมนต่างกัน เซลล์ก็จะผลิตโปรตีนเพื่อตอบสนองต่อสิ่งเร้าแตกต่างกันออกไป ขึ้นอยู่กับกลไกการตอบสนองของยีน เพื่อรักษาสมดุลของเซลล์ หลักการดังกล่าวได้ถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวางในการหาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) สำหรับตรวจสอบโรคในระยะเริ่มต้น เช่น โรคมะเร็ง โดยทำการเปรียบเทียบโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติระหว่างผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งและคนปกติ หากสามารถค้นพบโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค ก็สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพได้ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในงานด้านชีวภาพหลายด้าน ทั้งในด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม การเกษตรกรรม การประมง ด้านพิษวิทยา เป็นต้น สำหรับงานด้านพิษวิทยา มีการศึกษาเพื่อหาตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนสารเคมี (biomarker of exposure) ในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีชนิดในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น นอกจากนี้การศึกษาระดับโปรตีโอมยังมีข้อดีประการ เช่น เป็นการศึกษาความหลากหลายและชนิดของโปรตีนได้คราวละมาก ๆ (high throughput technology) ทำให้เห็นภาพรวมของโปรตีนทั้งหมด ข้อมูลโปรตีโอมที่ได้เป็นลักษณะเฉพาะของสิ่งมีชีวิตชนิด (species) นั้น ๆ ซึ่งสามารถใช้เป็นข้อมูลความผิดปกติของพันธุกรรมอีกรูปแบบหนึ่ง และสามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้หลายด้าน เช่น ใช้ในการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันมาก (species identification) ใช้แสดงความแตกต่างของโปรตีโอมของประชากรสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่มีถิ่นอาศัยต่างกัน (population proteomics) ใช้ศึกษาผลกระทบของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อสภาวะเครียดและความเป็นพิษต่อเซลล์ (Ecotoxicology) เป็นต้น

บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของอ่าวไทยเป็นพื้นที่ที่มีการใช้ประโยชน์หลากหลาย เช่น ใช้เป็นพื้นที่สำหรับการประมงเพราะเลี้ยงสัตว์ทะเล พื้นที่การท่องเที่ยว และ พื้นที่อุตสาหกรรม เป็นต้น กิจกรรมดังกล่าวทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีลงสู่แหล่งน้ำและอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่ง นอกจากนี้สารเคมีบางชนิดอาจมีการวัดปริมาณได้ยากทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงได้ ทีมวิจัยมีความสนใจต้องการหาโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะกับสารเคมีปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนในการติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เนื่องจากโปรตีนบางกลุ่มจะมีการกระตุ้นให้สร้างในสภาวะเครียดจากสารเคมีหรือการปนเปื้อนของสารบางกลุ่ม เราจึงใช้แนวคิดนี้เพื่อตรวจสอบหาโปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ระดับโปรตีน โดยใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ โดยจะใช้หอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) เป็น

สิ่งมีชีวิตต้นแบบ เนื่องจากมีคุณสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ เป็นหอยนางรมที่พบได้ทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย มีการดำรงชีวิตแบบติดอยู่กับที่ภายหลังจากที่ตัวอ่อนลงเกาะกับวัตถุ เป็นสัตว์กรองกิน ซึ่งจะกรองอาหารที่ติดมากับน้ำผ่านเหงือกและระบบย่อยอาหาร ดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำ ก็จะสัมผัสตัวหอยได้โดยตรง ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นแบบสำหรับการศึกษากการปนเปื้อนของสารพิษ หรือสารเคมีในระบบนิเวศทางทะเล (Goldberg et al., 1978; Kingtong et al., 2007) ข้อมูลเหล่านี้ใช้เป็นพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพที่จะเกิดกับสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร รวมถึงมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้ายจากการกินอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนสารเคมีอีกด้วย

นอกจากการวิเคราะห์โปรตีนของหอยนางรมที่มีแหล่งอาศัยตามธรรมชาติแล้ว ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารเคมีที่มีการปนเปื้อนในบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก ต่อการตอบสนองของโปรตีนของหอยนางรมในห้องปฏิบัติการโดยต้องการทดสอบผลของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีน ซึ่งสามารถพบรายงานการปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก หากพบโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อสารเคมีที่ใช้ในการทดสอบก็เป็นประโยชน์อย่างมากในการพัฒนาระบบติดตามตรวจสอบ และเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารเคมีในเขตชายฝั่งของประเทศไทยและในภูมิภาคอาเซียนอีกด้วย

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อตัวอ่อนหอยนางรมชนิด *Saccostrea cucullata* โดยทำการทดสอบผลของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในห้องปฏิบัติการ
2. ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายหอยนางรมตัวเต็มวัย โดยทำการทดสอบผลของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในห้องปฏิบัติการ
3. ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมตัวเต็มวัย โดยทำการทดสอบผลของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในห้องปฏิบัติการ
4. การสำรวจความหลากหลายและระบุชนิดของโปรตีนที่พบในหอยนางรมปากจีบ
5. ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อโปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลหอยนางรม
6. ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อโปรตีโอมในเมือกหอยนางรม
7. ศึกษาการปนเปื้อนของสารออร์แกโนทินบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของไทย

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

สำรวจและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ตัวเต็มวัยที่มีขนาด 5-7 เซนติเมตรจากถิ่นอาศัยในพื้นที่บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของอ่าวไทย ได้แก่ชายฝั่งจังหวัดชลบุรี จากนั้นนำมาทดสอบผลกระทบของสารปนเปื้อนสิ่งแวดล้อมในห้องปฏิบัติการ โดยเลือกสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีน ในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้คือ สาร DDT (dichlorodiphenyl trichloroethane) ซึ่งเป็นสารที่ตกค้างในสิ่งแวดล้อมเป็นระยะเวลายาวนาน การทดสอบความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อใช้เทคนิคมิวชีววิทยา การศึกษาระดับโปรตีนจะใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (proteomics) โดยใช้เทคนิคการสกัดและแยกโปรตีนโดยใช้ระบบเจลอิเล็กโทรโฟรีซิสสองมิติ (two dimensional gel electrophoresis) ระบุชนิดของโปรตีนโดยใช้เครื่อง LC-MS/MS ร่วมกับเทคโนโลยีชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) การเปรียบเทียบระดับการแสดงออกหรือปริมาณของโปรตีนบนเจลอะคริลามัดสองมิติ ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนทินบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทยโดยในครั้งนี้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินและอนุพันธ์ของไตรบิวทิลทิน ได้แก่ ไตบิวทิลทิน และ โมโนบิวทิลทิน

1.4 ทฤษฎี สมมติฐาน และกรอบแนวความคิดของการวิจัย

จากการเพิ่มขึ้นของประชากรในประเทศที่กำลังพัฒนา เช่น ประเทศไทยในปัจจุบัน ก่อให้เกิดปัญหามลพิษสิ่งแวดล้อมทางน้ำรวมถึงระบบนิเวศชายฝั่ง และส่งผลกระทบต่อประชากรสัตว์น้ำทะเลเป็นอย่างมาก ก่อความเสียหายต่อระบบนิเวศ และต่อระบบการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำบริเวณชายฝั่งเป็นอย่างมาก สำหรับหอยนางรมซึ่งเป็นสัตว์เศรษฐกิจที่มีการเพาะเลี้ยงบริเวณเขตน้ำขึ้นน้ำลงในประเทศไทยก็ได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารเคมีในแหล่งน้ำเช่นกัน ส่งผลให้ผลผลิตลดลงและทำให้ระบบการเพาะเลี้ยงยากขึ้น เป็นข้อมูลที่การสะท้อนถึงปัญหาการปนเปื้อนของสารเคมีในบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกเฉียงใต้ การศึกษาครั้งนี้จะใช้เทคนิคโปรตีนโอมิกส์เพื่อสำรวจโปรตีนของหอยนางรมปากจีบว่ามี การตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมในถิ่นที่อยู่อย่างไร โดยใช้แนวคิดพื้นฐานที่ว่า โปรตีนที่สร้างขึ้นในจะตอบสนองต่อปัจจัยกระตุ้นหรือสารเคมีปนเปื้อนแตกต่างกัน เป็นกลไกการตอบสนองของยีนเพื่อรักษาคุณภาพของเซลล์ ดังนั้นหากหอยนางรมในแต่ละพื้นที่ได้รับอิทธิพลจากสารเคมีปนเปื้อนในทะเลต่างกันก็ย่อมมีการตอบสนองต่อการปนเปื้อนแตกต่างกัน ซึ่งจำทำให้เซลล์สร้างโปรตีนออกมาแตกต่างกันทั้งชนิด และปริมาณ ดังนั้นหากผู้วิจัยติดตามการแสดงออกของโปรตีนก็จะทำให้ทราบสถานะภาพของเซลล์ได้ การสำรวจโปรตีนของหอยนางรมจึงสามารถศึกษาผลกระทบของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อสภาวะเครียดและความเป็นพิษต่อเซลล์ได้ ซึ่งข้อมูลที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้จะนำไปสู่การหาโปรตีนจำเพาะที่ทำหน้าที่เป็น protein biomarker เพื่อพัฒนาไปสู่การตรวจสอบสถานะภาพการปนเปื้อนสารเคมีบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกเฉียงใต้ และเป็นต้นแบบในการศึกษาพิษวิทยาของสารเคมีปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งทะเลต่อสัตว์ทะเลได้

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 หอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*)

หอยนางรมปากจیب จัดเป็นหอยเศรษฐกิจเนื่องจากเป็นอาหารทะเลที่นิยมบริโภคกันอย่างแพร่หลาย และเป็นอาหารที่จัดได้ว่ามีคุณค่าทางโภชนาการสูง ลักษณะทั่วไปของหอยนางรม เป็นหอยทะเลกาบ 2 ฝา มี กาบหนาแข็ง ซึ่งฝาทั้งสองมีขนาดไม่เท่ากัน กาบบนจะใหญ่และแบนกว่า กาบล่าง ส่วนกึ่งกลางที่มีลักษณะโค้ง เว้า และเป็นด้านที่ยึดติดกับวัตถุแข็ง เช่น ก้อนหิน ไม้หลัก หรือเปลือกหอยที่จมอยู่ในทะเล มักจะอยู่รวมกัน เป็นกลุ่มๆ ตั้งแต่ชายฝั่งถึงระดับน้ำลึก 5 เมตร เปลือกซ้ายหรือเปลือกล่างยึดติดกับหินหรือวัสดุยึดเกาะมี ลักษณะลึกลงเป็นแอ่ง เปลือกขวาแบนและยาวขนานไปกับเปลือกล่าง มีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ (adductor muscle) ทำหน้าที่ยึดเปลือกทั้งสองให้ยึดแน่นติดกัน หากชำบดบริเวณกล้ามเนื้อนี้ออกจะเห็นเป็นรอย กล้ามเนื้อ (muscle scar) มีรูปร่างคล้ายไตและปรากฏแถบสีน้ำตาลสลับเหลือง ซึ่งลักษณะของรอย กล้ามเนื้อนี้มีความแตกต่างกันในแต่ละชนิด จึงใช้ประกอบการจำแนกสปีชีส์หอยนางรมได้อีกทางหนึ่ง ที่ชอบ เปลือกด้านในจะพบลักษณะปุ่มเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือก ส่วนเปลือกอีกด้านหนึ่งจะพบแอ่งเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือกเช่นกัน เมื่อหอยปิดเปลือกปุ่มเล็ก ๆ เหล่านี้จะประกบเข้ากับแอ่งเล็ก ๆ พอดีทำให้หอยปิดฝาเปลือกได้แข็งแรงมากขึ้น เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดประมาณ 5-7 ซม. หอยชนิดนี้มีถิ่นอาศัย กระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งทะเลประเทศไทย (Yoosukh and Duangdee, 1999) และเป็นหอยที่มีการ ปรับตัวให้เข้ากับการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมได้ดี นอกจากนี้หอยนางรมปากจیبยังมีความสำคัญทาง เศรษฐกิจ เนื่องจากเป็นชนิดที่นิยมเพาะเลี้ยงในเขตชายฝั่งภาคตะวันออกอีกด้วย

หอยนางรมปากจیبมีความเหมาะสมสำหรับการศึกษาด้านสิ่งแวดล้อมหลายประการ ได้แก่ เป็นหอย ที่พบได้ทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของอ่าวไทย มีการดำรงชีวิตแบบอยู่กับที่ภายหลังจากที่ตัว อ่อนลงเกาะกับวัตถุแล้วจะไม่เคลื่อนที่ตลอดชีวิต (sessile life) เป็นสัตว์กรองกิน (filter feeder) ซึ่งจะกรอง อาหารที่ติดมากับน้ำผ่านเหงือกและระบบย่อยอาหารดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำ ก็จะสัมผัส หอยได้โดยตรงเนื่องจากหอยนางรมไม่สามารถเคลื่อนที่หนีไปได้ มีความคงทนต่อการเปลี่ยนแปลง สภาพแวดล้อมสูง จึงเหมาะสำหรับใช้เป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษ หรือสารเคมีใน ระบบนิเวศทางทะเล (Goldberg et al., 1978; Kingtonget al., 2007)

2.2 โพรทีโอมิกส์

ในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมาเทคโนโลยีที่เกี่ยวข้องกับการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโพรทีโอมิกส์ มีบทบาท อย่างมากในการศึกษาชีววิทยาระดับโมเลกุล (Molecular biology) และได้รับการพัฒนาอย่างรวดเร็วทั่วโลก เนื่องจากการศึกษาการแสดงออกและหน้าที่ของโปรตีนเป็นการบ่งถึงหน้าที่ของยีนได้ใกล้เคียงมากกว่า การศึกษาที่ระดับยีนหรือระดับทรานสคริปต์ (RNA) เพียงอย่างเดียว เนื่องจากการทำงานของยีนจากการลอก รหัส DNA จนถึงขั้นตอนการสร้างโปรตีน ต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน ได้แก่ RNA processing เพื่อสร้าง mRNA ที่จำเพาะเพื่อสร้างโปรตีน เมื่อสร้างโปรตีนแล้วยังมีกระบวนการตัดแปลงโปรตีนเพื่อให้อยู่ในรูปที่ใช้ งานได้ เช่น การทำให้โปรตีนหรือโพลีเพปไทด์สายยาวจัดเรียงตัวอยู่ในรูปแบบสามมิติ (protein

conformation) จึงจะสามารถทำหน้าที่ได้ โปรตีนบางชนิดต้องมีการเติมหมู่ฟอสเฟต (phosphorylation) การเติมโมเลกุลของน้ำตาล (glycosylation) การเติมหมู่เมทิล (methylation) ลงไปบนกรดอะมิโนบางตำแหน่งบนสายพอลิเปปไทด์ก่อนจึงจะทำหน้าที่ได้ เรียกกระบวนการเหล่านี้ว่า protein modification ดังนั้นการศึกษาระดับโปรตีนจึงเป็นการบ่งถึงหน้าที่ที่ใกล้เคียงกว่า ประกอบกับมีการพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ที่มีประสิทธิภาพสูง และมีฐานข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิตเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว ทำให้โปรตีโอมิกส์เป็นศาสตร์ที่ได้รับการยอมรับและมีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เรียกได้ว่าเป็นเทคโนโลยีแห่งยุคหลังจีโนม (post-genomics era) (Aebersold and Mann, 2003; Domon and Aebersold, 2006)

การศึกษาโปรตีโอมของสิ่งมีชีวิตจะทำให้ทราบข้อมูลสถานะของเซลล์ว่าในสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ เซลล์ทำหน้าที่อะไรโดยสังเกตได้จากการแสดงออกของโปรตีนในขณะนั้น ๆ เนื่องจากโปรตีนทำหน้าที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของสิ่งมีชีวิต ดังนั้นหากโปรตีนมีการแสดงออกที่ผิดปกติไปจากเดิมก็จะกระทบกลไกการทำงานของเซลล์โดยตรง หลักการนี้ได้นำมาใช้ในการศึกษาเปรียบเทียบกลไกการทำงานของเซลล์ เมื่อสิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะที่แตกต่างกันย่อมส่งผลต่อการทำงานของเซลล์โดยมีการกระตุ้นการทำงานของยีนที่แตกต่างกัน ซึ่งมีผลต่อการสร้างโปรตีนเพื่อตอบสนองต่อสภาวะนั้น ๆ หลักการดังกล่าวนำมาใช้ในการศึกษาเพื่อหาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) สำหรับตรวจสอบโรคในระยะเริ่มต้น เช่น โรคมะเร็ง โดยทำการเปรียบเทียบโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติระหว่างผู้ป่วยเป็นโรคมะเร็งและคนปกติ หากสามารถค้นพบโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรค ก็สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพได้ ในปัจจุบันมีการประยุกต์ใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ในงานด้านชีวภาพหลายด้าน ทั้งในด้านการแพทย์ ด้านสิ่งแวดล้อม การเกษตรกรรม การประมง ด้านพิษวิทยา เป็นต้น ตัวอย่างที่สำคัญของการประยุกต์ใช้งานโปรตีโอมิกส์ เช่น การศึกษาโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการเกิดโรคมะเร็งเพื่อค้นหา biomarker สำหรับการตรวจคัดกรองผู้มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคมะเร็ง สำหรับงานด้านการจำแนกชนิดของสิ่งมีชีวิต (Taxonomy) มีการใช้เทคนิค 2D-gel electrophoresis proteomics สำหรับจำแนกสิ่งมีชีวิตที่มีความใกล้เคียงกันทางด้านสัณฐานวิทยา โดยใช้รูปแบบการแสดงออกของโปรตีน (Protein profile) ด้านพิษวิทยา มีการศึกษาเพื่อหาตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนสารเคมี (biomarker of exposure) ในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้ตรวจสอบการปนเปื้อนของสารเคมีชนิดนั้น ๆ ในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น

ข้อได้เปรียบสำหรับการศึกษาหน้าที่ของเซลล์ในระดับโปรตีนเมื่อเทียบกับการศึกษาระดับยีนหรือทรานสคริปโตม คือ โปรตีนที่สร้างขึ้นภายในเซลล์สามารถบ่งบอกหน้าที่ของยีนได้ใกล้เคียงกว่า mRNA เนื่องจากการทำงานของยีนในสภาวะต่าง ๆ นั้น ต้องผ่านกระบวนการหลายขั้นตอน ตั้งแต่การลอกรหัส DNA (Transcription) ก่อนเพื่อให้ได้ mRNA จากนั้นจึงจะเกิดกระบวนการสังเคราะห์โปรตีน (Translation) นอกจากนี้ยังมีกระบวนการ Post-translational modification ซึ่งเป็นกลไกการตกแต่งโปรตีนที่สร้างขึ้นให้สามารถทำหน้าที่ได้ เช่น อาจมีการเติมหมู่ฟอสเฟตในบางตำแหน่งของกรดอะมิโน (Phosphorylation) หรืออาจมีการเติมโมเลกุลของน้ำตาล (Glycosylation) ซึ่งทำให้โปรตีนสามารถทำงานได้ ดังนั้นการศึกษาระดับโปรตีนจึงบ่งหน้าที่ของยีนได้ใกล้เคียงมากขึ้น

ปัจจุบันเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ได้เข้ามามีบทบาทต่อการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากการศึกษาโดยใช้โปรตีโอมิกส์ทำให้ศึกษาโปรตีนในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้จำนวนมากในคราวเดียว ทำให้มองภาพรวมกลไกการทำงานของเซลล์ในระดับโปรตีนได้ โดยการแสดงออกของโปรตีนขึ้นอยู่กับปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม ระดับฮอร์โมน และปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อมและสารเคมีที่สิ่งมีชีวิตได้รับ ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของยีนซึ่งมีการแสดงออกผ่านโปรตีน เพื่อตอบสนองต่อปัจจัยหรือสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ หลักการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการศึกษาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีน (protein

biomarker) ได้เพื่อใช้สำหรับบ่งชี้การปนเปื้อนของสารพิษหรือสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยการค้นหาชนิดโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อสารนั้น ๆ หากโปรตีนใดที่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงจำเพาะต่อระดับของสารปนเปื้อนนั้น ๆ ก็สามารถใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนได้ แต่ต้องมีการทดสอบความจำเพาะในสภาพแวดล้อมจริงก่อนการนำไปใช้ การศึกษาโปรตีโอมของหอยนางรมโดยเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์มีขั้นตอนคร่าว ๆ ดังแสดงในภาพที่ 1 ประกอบด้วยขั้นตอนย่อย ๆ คือ การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อ จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการ แล้วแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ (Two-dimensional gel electrophoresis) บนเจลพอลิอะคริลาไมด์ มิติที่หนึ่ง (First dimension) แยกโปรตีนตามประจุสุทธิ (pI) มิติที่สอง (second dimension) นำโปรตีนที่แยกได้จากมิติที่หนึ่งมาแยกตามขนาดของโปรตีนหรือมวลโมเลกุล แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมสีเพื่อให้เห็นโปรตีนที่ถูกแยกบนเจล จากนั้นทำการวิเคราะห์รูปภาพโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เช่น ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) ซึ่งจะทำหน้าที่เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง ทำให้เราทราบว่าโปรตีนทั้งหมดเท่าใด และมีโปรตีนใดบ้างที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อสัมผัสกับสารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเราจะเลือกโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพื่อไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินให้ได้เปปไทด์ขนาดที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยใช้เครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS ข้อมูลโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์จะถูกแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนหรือดีเอ็นเอในระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอและ/หรือโปรตีนโดยใช้เทคนิคด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) ซึ่งจะช่วยให้เราระบุชนิดของโปรตีนที่กำลังศึกษาได้ (Anderson and Anderson, 1998; Aebersold and Mann, 2003) ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านโปรตีโอมิกส์มีการพัฒนาอย่างรวดเร็ว เนื่องจากการพัฒนาของเครื่องมือวิเคราะห์ เทคนิคการสกัดและแยกโปรตีน โปรแกรมวิเคราะห์ และฐานข้อมูลจีโนมที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา

2.3 การศึกษาโปรตีโอมในหอยนางรมโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์

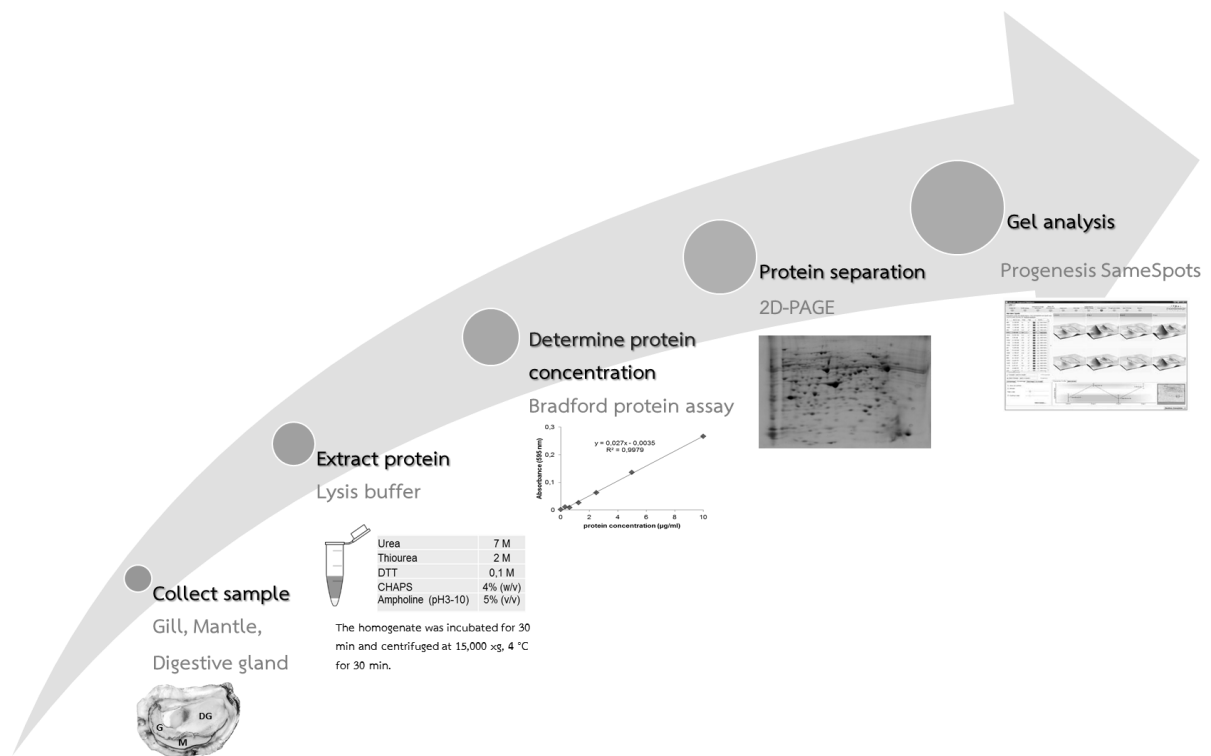
โปรตีโอมิกส์เป็นหนึ่งในเทคนิคที่ใช้ศึกษางานที่เกี่ยวข้องกับโปรตีน ส่วนใหญ่ใช้ศึกษาการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตโดยมุ่งเน้นในส่วนของโครงสร้างและหน้าที่ของโปรตีน ด้วยลักษณะเด่นที่สามารถศึกษาโปรตีนได้จำนวนมากในเวลาเดียวกัน จึงทำให้เทคนิคนี้เป็นที่น่าสนใจทั้งการพัฒนารวดเร็วและต่อเนื่องหลังจากการพัฒนาระบบข้อมูลจีโนมของสิ่งมีชีวิต เหตุที่เป็นเช่นนั้นเนื่องจากการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์ต้องอาศัยข้อมูลที่ได้รับจากการศึกษาในส่วนของดีเอ็นเอและโปรตีน เพื่อนำมาใช้เปรียบเทียบกับโปรตีนที่สนใจ ดังนั้นหากฐานข้อมูลชีวภาพมีแนวโน้มและมีการพัฒนาที่สูงขึ้นก็เอื้อประโยชน์ให้กับการศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์ให้มีการพัฒนาเพิ่มมากขึ้นตามไปด้วย เช่นการศึกษาเกี่ยวกับโปรตีนในเมือก ซึ่งมีการศึกษากันอย่างกว้างขวางในสิ่งมีชีวิต เนื่องด้วยเมือกนั้นถือเป็นปรากฏการณ์แรกในการป้องกันของระบบภูมิคุ้มกันจากการติดเชื้อ เช่นการศึกษาโปรตีนในเมือกของหอย มีรายงานถึงการวิเคราะห์การแสดงออกของ C-type lectin ในเมือกของหอยนางรมฝั่งตะวันออก (*Crassostrea virginica*) โดย lectin ทำหน้าที่สำคัญในการจดจำสิ่งแปลกปลอม ซึ่งตรวจพบว่ามีหน้าที่เกี่ยวข้องในทางกายภาพ เช่น การจับอาหาร และภูมิคุ้มกันเยื่อเมือก (Jing, Espinosa, Perrigault, & Allam, 2011) ด้วยเหตุนี้เมือกจึงมีความสำคัญต่อการดำรงชีวิตของหอยนางรม และการศึกษาถึงชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมที่มีบทบาทในเชิงของกลไกการป้องกันตัวจึงเป็นประเด็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่ง การศึกษาทางด้านโปรตีโอมิกส์นั้น มีหลายขั้นตอนด้วยกันโดยแต่ละขั้นตอนยังมีความหลากหลายทางด้านวิธีการขึ้นอยู่กับลักษณะสิ่ง

สนใจหรือความเหมาะสมในการศึกษาจึงทำให้มีขอบเขตในการศึกษาที่ค่อนข้างกว้าง โดยขั้นตอนการศึกษามีดังนี้ (ภาพที่ 2-1)

1. การเตรียมตัวอย่างและการสกัดโปรตีน
2. การวัดปริมาณโปรตีน
3. การแยกโปรตีนโดยวิธีอิเล็กโตรโฟรีซิส
4. การเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนในกลุ่มตัวอย่าง
5. การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ และการวิเคราะห์เปปไทด์ด้วยแมสสเปคโตรมิเตอร์

ชนิด Liquid chromatography Mass spectrometry (LC-MS/MS)

6. การระบุชนิดของโปรตีนด้วยเทคโนโลยีชีวสารสนเทศศาสตร์



ภาพที่ 2-1 ขั้นตอนการศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

2.4 สารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน

เนื่องจากในปัจจุบันการปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนมีแหล่งที่มาหลัก ๆ จากภาคการเกษตรและตกค้างในสิ่งแวดล้อมซึ่งไหลลงสู่แม่น้ำและทะเลในที่สุด กลายเป็นปัญหาสำคัญที่หลายประเทศทั่วโลกกำลังให้ความสนใจ และเนื่องจากประเทศไทยเป็นรัฐภาคีหนึ่งที่อยู่ในอนุสัญญาสต็อกโฮล์มว่าด้วยสารมลพิษที่ตกค้างยาวนานในสิ่งแวดล้อม ซึ่งเกี่ยวข้องกับสารมลพิษจากสารเคมีทางการเกษตรและอุตสาหกรรม ที่มีผลกระทบต่อสิ่งแวดล้อมและห่วงโซ่อาหาร การปนเปื้อนของสารกำจัดศัตรูพืชในสิ่งมีชีวิตทางทะเล มีสาเหตุหลัก ๆ มาจากการใช้สารเคมีในบริเวณพื้นที่ทำการเกษตรใกล้กับแหล่งน้ำ และน้ำไหลบ่าหน้าดินผ่านบริเวณพื้นที่ที่มีการใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชก่อนลงสู่แหล่งน้ำ โดยอัตราการไหลบ่าของน้ำหน้าดินจะขึ้นอยู่กับปริมาณน้ำฝนและระยะเวลาที่ฝนตก น้ำไหลบ่าหน้าดินจะพัดพาเอาอนุภาคของดินที่ดูดซับ

สารเคมีไว้ให้ไหลไปกับน้ำลงสู่สิ่งแวดล้อม โดยเฉพาะในฤดูฝนจะพบว่าปริมาณความเข้มข้นของสารเคมีในน้ำค่อนข้างสูง เนื่องจากสารเคมีที่ฉีดพ่นยังไม่ถูกดูดซับโดยอนุภาคดิน และเมื่อลงสู่แหล่งน้ำจึงทำให้เกิดการสะสมของสารเคมีในน้ำและตะกอนดินใต้ท้องน้ำ อันมีผลให้เกิดการสะสมของสารเคมีในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำ ซึ่งจะพบว่าสามารถสะสมสารพิษได้ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่อาศัยอยู่ในบริเวณนั้น เช่น หอยนางรม เป็นต้น ซึ่งสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่มีการสะสมของสารเคมีนี้ จะมีความสำคัญต่อระบบห่วงโซ่อาหารให้แหล่งน้ำ เพราะเป็นอาหารของสัตว์น้ำต่อไป หากได้รับสารเคมีในปริมาณที่ไม่มากพอที่จะก่อให้เกิดการตายในสัตว์ แต่สารเคมีนั้นก็ยังสามารถไปสะสมอยู่ในเนื้อเยื่ออวัยวะต่าง ๆ ของสิ่งมีชีวิต การสะสมของสารเคมีในห่วงโซ่อาหาร สารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดนี้ไม่ได้คงอยู่เฉพาะในบริเวณพื้นที่การเกษตร แต่มักจะแพร่กระจายออกไปในสิ่งแวดล้อม เพราะน้ำที่ไหลผ่านแปลงเกษตร ที่มีการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช จะไหลลงไปสู่แหล่งน้ำธรรมชาติ ทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในระบบนิเวศอย่างกว้างขวาง สิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอาจได้รับผลกระทบโดยตรงจากสารเคมีเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ นอกจากนี้สารเคมีเหล่านี้ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในกลุ่มออร์แกโนคลอรีน ซึ่งย่อยสลายช้า อาจจะไปสะสมอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ และถ่ายทอดไปยังสิ่งมีชีวิตที่อยู่ด้านบนของห่วงโซ่อาหาร เกิดการสะสมของสารพิษในปริมาณที่เข้มข้นขึ้น (biological magnification)

2.4.1 ดีดีที: DDT (Dichlorodiphenyl trichloroethane)

ประวัติความเป็นมาของสาร DDT

DDT ถูกสังเคราะห์ขึ้นครั้งแรกในปี พ.ศ. 2416 โดย Othmar Zeidler ชาวเยอรมัน ซึ่งในขณะนั้นยังไม่ทราบว่าดีดีทีที่มีคุณสมบัติสามารถฆ่าแมลงได้ดี ต่อมา Paul Muller ชาวสวิสเซอร์แลนด์ เป็นผู้ศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติในการฆ่าแมลงของ DDT และมีการผลิตออกสู่ตลาดในปี พ.ศ. 2485 ในชื่อทางการค้า คือ เกซารอล (Gesaral) เพื่อใช้ในการเกษตร และในชื่อทางการค้าอีกชื่อ คือ นีโอซิด (Neocid) เพื่อใช้ในด้านสาธารณสุข DDT เป็นสารฆ่าแมลงที่มีการใช้อย่างแพร่หลายทั่วโลก ในช่วงระยะเวลากว่า 20 ปี นับตั้งแต่ที่เริ่มมีการผลิตออกขายในช่วงเวลาดังกล่าว DDT ยังได้รับการยกย่องว่าเป็นสารฆ่าแมลงสมบูรณ์แบบ เนื่องด้วยเหตุผลหลายประการ คือ มีพิษต่อแมลงมากชนิด มีความคงทนสามารถออกฤทธิ์ได้นาน มีพิษเฉียบพลันต่อคนและสัตว์เลือดอุ่นค่อนข้างต่ำ (จัดอยู่ในพิษระดับปานกลาง) และมีราคาถูกเพราะต้นทุนการผลิตต่ำ ในช่วงสงครามโลกครั้งที่สอง DDT ได้ถูกนำมาใช้ในการควบคุมโรคไข้รากสาดใหญ่ (Typhus) ต่อมาทางองค์การอนามัยโลก (World Health Organization; WHO) แนะนำการใช้ DDT เพื่อกำจัดยุงซึ่งเป็นพาหะของโรคไข้มาลาเรีย ปริมาณการใช้ DDT เริ่มลดลงภายในปี พ.ศ. 2514 เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีพิษ และค่อนข้างสลายตัวช้าก่อให้เกิดปัญหามลภาวะในสิ่งแวดล้อม จึงมีประกาศห้ามใช้ DDT ในประเทศที่พัฒนาแล้วหลายประเทศ รวมทั้งสหรัฐอเมริกา ซึ่งมีการประกาศห้ามใช้ DDT ภายในประเทศ แต่ยังมีผลิตเพื่อส่งขายออกสู่ประเทศกำลังพัฒนา เพื่อใช้ในการควบคุมโรคมาลาเรีย และแมลงเบียนภายนอก เช่น หมัด และเหา ซึ่งในประเทศไทยเองก็มีการห้ามใช้ DDT ในภาคการเกษตร แต่ยังคงอนุญาตให้สามารถใช้ได้ในด้านสาธารณสุข

โครงสร้างและคุณสมบัติทางเคมีของสาร DDT

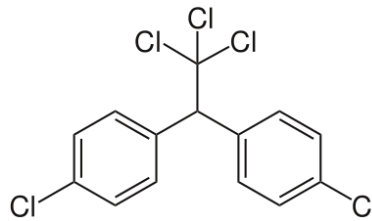
DDT เป็นสารเคมีในกลุ่มออร์แกโนคลอรีน (Organochlorine) ที่มีธาตุไฮโดรเจน คาร์บอน และคลอรีนเป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 2-2) มีลักษณะเป็นผลึกละเอียด สีขาว จุดหลอมเหลว 108.5 ถึง 109 องศาเซลเซียส ความดันไอ 1.9×10^{-7} มิลลิเมตรปรอทที่ 20 องศาเซลเซียส การเปลี่ยนรูปของ DDT เกิดขึ้นได้โดย 3 ปฏิกิริยา ดังต่อไปนี้

1. ปฏิกิริยาไฮโดรคลอรีเนชัน (dehydrochlorination) เป็นการนำหมู่คลอไรด์ออกจากโมเลกุล ซึ่งจะเห็นได้ทั่วไปจากยาฆ่าแมลงชนิดต่าง ๆ เช่น DDT เป็นต้น ซึ่งผลจากการเกิดปฏิกิริยาทำให้ได้สาร DDE ซึ่ง DDT จะถูกเมทาบอลิท์โดยเอนไซม์ DDT-dehydrochlorinase (DDTase) จากแมลงและสัตว์ให้กลายเป็น DDE (ภาพที่ 2-3) สะสมอยู่ในเนื้อเยื่อไขมันของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารเข้าไป

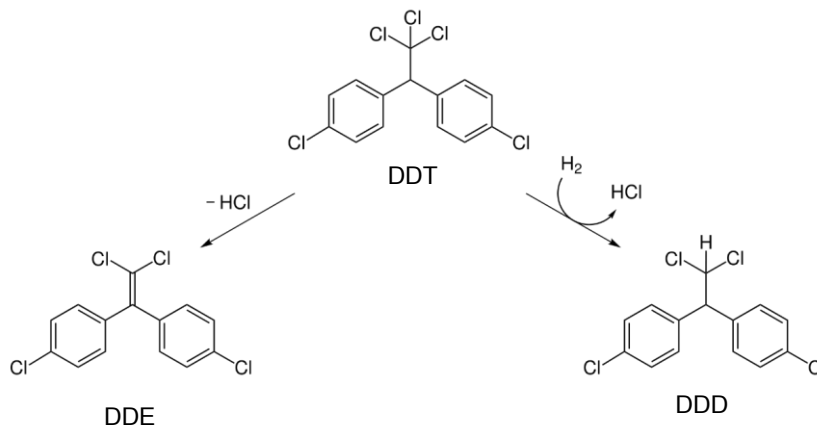
2. ปฏิกิริยารีดักทีฟดีคลอรีเนชัน (reductive dechlorination) เกิดขึ้นโดยจุลินทรีย์บางชนิดที่อยู่ในสิ่งแวดล้อม ผลจากปฏิกิริยาทำให้ได้สาร DDD

3. ปฏิกิริยาออกซิเดชัน (oxidation) เมื่อแมลงศัตรูพืชได้รับสาร DDT เข้าสู่ร่างกาย จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของสารโดยปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยอาศัยระบบเอนไซม์โมโนออกซิจีเนส (Monooxygenase system) ได้เป็น dicofol ซึ่งสามารถเปลี่ยนรูป DDT ให้เป็น DDA (2,2-bis (p-chlorophenyl) acetic acid; DDA) และดีบีพี (dichloro-benzo-phenone; DBP) ซึ่งมีคุณสมบัติเป็นสารกำจัดไร (acaricide) และแมลงศัตรูพืช (insecticide)

ดังนั้นด้วยคุณสมบัติของ DDT ว่าเป็นโมเลกุลที่ไม่มีขั้ว (nonpolar molecule) จึงทำให้มีความสามารถในการละลายในน้ำได้น้อย แต่จะละลายได้ดีในไขมัน (Lipophilic) จากคุณสมบัติในการละลายได้ดีในไขมัน จึงทำให้เกิดการสะสมในไขมันของสิ่งมีชีวิตและถูกถ่ายทอดตามลำดับห่วงโซ่อาหารมาสู่ผู้บริโภคชั้นสูงได้ ในรูปแบบการสะสมสารพิษที่เรียกว่าการเพิ่มขยายทางชีวภาพ (Bioaccumulation) ซึ่งสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษตกค้างจะถูกสะสมไว้ตลอดอายุขัย ซึ่งสารพิษที่ถูกสะสมไว้นี้จะมีความเข้มข้นมากยิ่งขึ้น เนื่องจากสิ่งมีชีวิตยังคงดำรงชีวิตอยู่ในสภาพแวดล้อมแบบเดิม



ภาพที่ 2-2 โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT (Barker & Morrison, 1964)



ภาพที่ 2-3 โครงสร้างโมเลกุลของสาร DDT เมื่อถูกเปลี่ยนรูปให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ DDD และ DDE (Barker & Morrison, 1964)

การสลายตัวของสาร DDT

จากการสลายตัวของสารกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีน พบว่า DDT จะมีความเสถียรมากในดินที่มีความชื้น มีกระบวนการหายใจคืออยู่ในสภาวะที่มีออกซิเจน (aerobic conditions) ส่วนดินที่อยู่ในสภาวะขาดออกซิเจน (anaerobic conditions) เช่น ในกรณีที่มีน้ำท่วมขัง การสลายตัวของดีดีทีให้กลายเป็น DDD จะเกิดได้เร็วขึ้น แต่การสลายตัวของ DDT ให้กลายเป็น DDE จะช้าลงในสภาพที่มีการระบายอากาศดี ซึ่งการสลายตัวของ DDT เพื่อเกิดเป็นสารตัวใหม่ (minor metabolites) เช่น DDA, dicofol, DBP, BA, dicofol like compounds นั้นเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์หลายกลุ่ม เช่น *Enterobacter aerogenes* (Barker & Morrison, 1964), *Trichoderma viride*, *Fusarium oxysporium*, *Aerobacter aerogenes* จากข้อมูลดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการสลายตัวของ DDT เกิดเป็นสารประกอบตัวใหม่นั้นเกิดได้หลายกระบวนการ (different metabolic pathways) ซึ่งแต่ละกระบวนการจะเกี่ยวข้องกับจุลินทรีย์ที่แตกต่างกัน

ผลกระทบของสาร DDT ต่อสิ่งแวดล้อม

ศาสตราจารย์ เดวิด พิเมนเทล แห่งมหาวิทยาลัยคอร์เนล ประเทศสหรัฐอเมริกา ได้อธิบายไว้ว่าร้อยละ 99.9 ของสารกำจัดศัตรูพืชจะปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม มีเพียงร้อยละ 0.1 ที่จะถูกส่งไปถึงศัตรูพืชที่เป็นเป้าหมายภายหลังการฉีด พ่น หยดหรือหว่าน สารเคมีกำจัดศัตรูพืชจะถูกดูดซึมเข้าไปในพืชและอยู่บนต้นพืชบางส่วน และที่เหลือจะปลิวไปในอากาศหรือรอเวลาที่น้ำจากแปลงเกษตรจะชะล้างสารเคมีลงสู่ดินหรือแหล่งน้ำใกล้เคียง หากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชสามารถสลายตัวได้อย่างรวดเร็วปัญหาด้านสิ่งแวดล้อมอาจลดลง แต่ทว่าอัตราการสลายตัวหรือค่าครึ่งชีวิต มีความแตกต่างกันตามชนิดและสภาพแวดล้อม ทั้งนี้การใช้สารกำจัดศัตรูพืชนั้นส่วนใหญ่ไม่สามารถใช้ให้มีผลเฉพาะต่อศัตรูที่ต้องการเท่านั้น จึงทำให้เกิดผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตอื่นๆ และสิ่งแวดล้อม (Pimentel, 1995)

แม้ว่าปัจจุบันจะมีการณรงค์ส่งเสริมให้มีการปลูกพืชที่ปลอดสารพิษ แต่คงปฏิเสธไม่ได้ว่าเกษตรกรส่วนใหญ่ยังคงใช้สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกันอย่างแพร่หลาย จนกลายเป็นปัญหามลพิษทางสิ่งแวดล้อมในปัจจุบัน ซึ่งส่งผลร้ายต่อสุขภาพ ของทั้งเกษตรกร ผู้บริโภค และสัตว์เลี้ยง เนื่องจากผลผลิตทางการเกษตรที่นำบริโภคนั้นมีสารพิษตกค้างเกินมาตรฐาน โดยมีฤทธิ์ตกค้างยาวนานนับปีและเพิ่มระดับการตกค้างมากขึ้นเรื่อยๆ กล่าวคือเมื่อเกษตรกรนำสารเคมีกำจัดศัตรูพืช เช่น DDT ไปใช้ฉีดผักหรือข้าวก็จะเกิดเป็นสารพิษสะสมอยู่ในต้นพืช รวมไปถึงการตกค้างในดินและน้ำด้วย เมื่อคนรับประทานเข้าไปสารเคมีก็จะเข้าสู่ร่างกายคนโดยที่ไม่สามารถกำจัดออกมาได้ และเมื่อรับประทานเข้าไปมากๆ เป็นระยะเวลาหลายๆ จะเกิดการสะสมของสารเคมีภายในร่างกาย จนกระทั่งถึงจุดที่ร่างกายหมดภูมิต้านทาน จึงจะแสดงอาการป่วยใช้ในรูปแบบต่างๆ ซึ่งยากต่อการรักษา การใช้สารเคมีจึงกลับกลายเป็นการผลัดภาระของผลกระทบไปสู่ระบบนิเวศ ทำให้ไม่สามารถรักษาความสมดุลในธรรมชาติและส่งผลกระทบต่อแนวโน้มการระบาดของศัตรูพืชที่นับวันจะทวีความรุนแรงที่มากขึ้น จากการศึกษาพบว่า การได้รับพิษในปริมาณน้อยแต่เรื้อรังของปลาอาจส่งผลร้ายแรงกว่าพิษเฉียบพลัน เพราะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของพฤติกรรม และกระบวนการทำงานของอวัยวะต่างๆ ซึ่งสร้างความเสียหายต่อความอยู่รอดและการเจริญพันธุ์ การใช้สารกำจัดศัตรูพืชนั้น มีเพียงส่วนน้อยที่มีผลต่อศัตรูพืชที่ต้องการกำจัด แต่ส่วนมากจะกระจายไป ซึ่งมักจะตกลงบนดินและในน้ำก่อนที่บางส่วนจะสลายไป (Kegley et al., 1999)

2.4.2 การใช้สาร DDT ในประเทศไทยสู่การปนเปื้อนระบบนิเวศชายฝั่งทะเล

ประเทศไทยมีประกาศห้ามใช้ DDT ในปี พ.ศ. 2526 เนื่องจากเป็นสารเคมีที่มีพิษและมีความคงทนในสิ่งแวดล้อมสูง เพราะค่อนข้างสลายตัวช้า สามารถละลายได้ในไขมัน ทำให้พบว่ามีสารตกค้างในห่วงโซ่อาหาร และสะสมในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อม ซึ่งต่อมาตรวจพบการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์แกโนคลอรีนจากการสุ่มตรวจอาหารเพื่อหาสารปนเปื้อนและจุลินทรีย์ก่อโรคในอาหารของสาธารณสุขจังหวัด ตั้งแต่ปี พ.ศ. 2551-2553 พบว่าแนวโน้มของสารปนเปื้อนที่ผสมอยู่ในอาหารมีเพิ่มมากขึ้น และในสิ่งแวดล้อมยังคงมีการสะสมตัวของสารกลุ่มดังกล่าว และถูกปลดปล่อยจากแหล่งสะสมตัวเช่น ดิน พื้นที่ทำการเกษตร ลงสู่แม่น้ำลำคลอง แล้วไหลลงสู่ทะเล ในปี พ.ศ. 2547 มีการศึกษาเพื่อหาชนิดและปริมาณสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในดินตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออก ตั้งแต่ปากแม่น้ำบางปะกง จังหวัดฉะเชิงเทราจนถึงปากแม่น้ำตราด จังหวัดตราด โดยเก็บตัวอย่างในเดือนมีนาคมและสิงหาคม ปี พ.ศ. 2547 พบว่าปริมาณรวมของสารฆ่าแมลงในกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในฤดูฝนมีการสะสมสูงกว่าฤดูแล้งมีค่าเฉลี่ย 205.31 ± 23.16 และ 152.73 ± 10.35 ng/g น้ำหนักแห้ง ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบการสะสมของสารฆ่าแมลงในแต่ละพื้นที่การใช้ประโยชน์พบว่าในแหล่งอุตสาหกรรมมีค่าสูงกว่าแหล่งเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำ โดยพบค่าเฉลี่ยปริมาณรวมของสารฆ่าแมลงในพื้นที่อุตสาหกรรมมีค่า 223.72 ± 32.47 ng/g ส่วนในพื้นที่การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำมีค่า 187.56 ± 33.49 ng/g น้ำหนักแห้งตามลำดับ (ศรีวิไลศ และ ใจดี, 2547)

2.4.3 ความเป็นพิษของสาร DDT ต่อสิ่งมีชีวิต

มีรายงานการศึกษาการเกิดมะเร็งต่อสารกำจัดแมลงในมนุษย์พบว่า มีความสัมพันธ์กันในการเกิดมะเร็งเต้านมของผู้หญิงกับสาร DDT ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของสเตรอยด์ฮอร์โมน เนื่องจากสารดีดีทีอาจจะไปกระตุ้นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมของสารก่อมะเร็ง (Cohn et al., 2007) ความเป็นพิษของ DDT ยังส่งผลให้เกิดความผิดปกติต่อระบบทางเดินอาหาร โดยจะมีอาการเบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน และเกิดอาการกล้ามเนื้ออ่อนแรง พบว่าเมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสาร DDT เป็นระยะเวลานานนั้นอาจก่อให้เกิดมะเร็งได้ ซึ่งมีผู้รายงานว่าสาร DDT เป็นสารที่ก่อให้เกิดมะเร็งตับ มะเร็งเม็ดเลือดขาว และโลหิตจาง (Thuy, 2015)

สำหรับการปนเปื้อนของสารเคมีที่มีพิษในน้ำนั้น องค์การคุ้มครองสภาพแวดล้อมของสหรัฐอเมริกาได้กำหนดความเข้มข้นสูงสุดของยาฆ่าแมลง ชนิดต่างๆ ในน้ำที่เลี้ยงปลาไว้ในระดับต่างๆ โดยที่ระดับความเข้มข้นของ DDT ต้องมีไม่เกิน 0.003 ppb ในกุ้งขาว (*Penaeus vannamei*) ขนาด 4-13 มิลลิเมตร ที่สัมผัสกับ DDT ความเข้มข้น 0.13 ppb เป็นระยะเวลา 7 วัน พบว่าทำให้กุ้งมีความผิดปกติทางพันธุกรรม การคงสภาพ โดยที่ค่าครึ่งชีวิตของ DDT นั้นขึ้นอยู่กับองค์ประกอบสิ่งแวดล้อม ซึ่ง DDT จะสามารถคงสภาพอยู่ได้เป็นระยะเวลานานในเขตหนาว ส่วนในเขตร้อนนั้น DDT จะถูกสลายและเปลี่ยนแปลงได้เร็วกว่า ทั้งนี้เพราะแบคทีเรียในดินมีกิจกรรมสูงขึ้นเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น และมีรายงานว่า DDT จะมีครึ่งชีวิตประมาณ 10-12 ปี

(Spencer et al., 1996) มีการรายงานถึงปัจจัยของการกินอาหารที่มีผลต่อการสะสมสาร DDT ภายในปลาสายพันธุ์หนึ่ง ชนิดปลาซีกเดียว (Flitfishes) บริเวณอ่าวมอนเทอร์เรย์ และสัตว์หน้าดินบริเวณเขตน้ลึก (Sablefish and Roughscale rattail) ปลาหิมะและปลาหางหนู พบสาร DDT และสารเมตาบอลิทในปริมาณค่อนข้างสูง ในอวัยวะภายในตัวปลาที่อาศัยอยู่ในบริเวณนี้ สูงกว่าปลาที่อาศัยอยู่บริเวณผิวน้ำ (Zylstra, 1972) จากผลการทดลองที่ผ่านมาได้ตั้งข้อสังเกต โดยพิจารณาที่ระดับความลึกของน้ำที่เท่ากัน ชนิดพันธุ์ที่อาศัยอยู่ตามหน้าดินบริเวณท้องน้ำ พบการสะสมสารพิษภายในร่างกายในระดับที่สูงกว่าชนิดพันธุ์

ที่อาศัยอยู่ในบริเวณผิวน้ำ แสดงให้เห็นว่าปริมาณความเข้มข้นของ DDT ที่สะสมอยู่ในสัตว์หน้าดินบริเวณท้องน้ำสูงกว่าสัตว์ชนิดที่อาศัยอยู่ในบริเวณผิวน้ำ (Brun et al., 2000) ทั้งนี้ NOAA หรือ National Oceanic and Atmospheric Administration ซึ่งเป็นหน่วยงานด้านการพยากรณ์อากาศของสหรัฐอเมริกาได้ทำการวิจัย โดยเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ (*Mytilus edulis*) ในแต่ละพื้นที่ของอ่าวมอนเทอร์เรย์มาตรวจสอบ พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณของสาร DDT ที่สะสมอยู่ในหอยแมลงภู่ ที่เก็บมาจากเมืองซานตาครูซ (Santa Cruz) ซึ่งตั้งอยู่ทางตอนบนของอ่าว มีแนวโน้มการสะสมสารพิษคล้ายกับตัวอย่างหอยแมลงภู่ที่เก็บมาจากเมืองมอสส์ แลนดิง (Moss Landing) ในขณะที่ตัวอย่างที่เก็บมาจากเมืองแปซิฟิกโกรฟ (Pacific Grove) ซึ่งตั้งอยู่ทางตอนใต้ของอ่าว พบปริมาณการสะสมของสารพิษในเนื้อเยื่อของหอยแมลงภู่ ในระดับที่แตกต่างจากทั้ง 2 เมืองที่กล่าวมาข้างต้น คือ พบในระดับที่น้อยกว่า ซึ่งผลที่ได้นี้ออกมาสอดคล้องกับงานวิจัยที่ระบุถึงเส้นทางการกระจายตัวของสาร โดยผ่านการขนส่งสารจากทางตอนใต้ขึ้นสู่ทางตอนเหนือของอ่าว ซึ่งตัวแปรสำคัญคือการได้รับอิทธิพลจากกระแสลม (Ian Hartwell, 2004)

มีรายงานผลกระทบของการสะสมสาร DDT ในห่วงโซ่อาหาร ที่เริ่มจากการปนเปื้อนของสาร DDT ในน้ำในอัตราส่วนเพียง 0.000003 ppm ต่อสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กที่อาศัยอยู่ในน้ำ เช่น ไรแดง หนอนแดง พบว่ามีการสะสมของสาร DDT ในสัตว์เหล่านี้เพิ่มขึ้นเป็น 0.04 ppm และในปลาที่กินสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเหล่านี้เป็นอาหาร จะมีการสะสมของสาร DDT ในตัวปลามากถึง 2 ppm และเมื่อถึงนกที่กินปลาเป็นอาหาร จะมีสาร DDT สะสมอยู่ในตัวได้มากถึง 25 ppm และแม้ว่านกจะมีการสะสมของสาร DDT ในตัวค่อนข้างมาก แต่การสะสมนี้อาจไม่ได้ทำให้นกตายลงทันที แต่สามารถส่งผลกระทบต่อด้านอื่นๆ ได้ เช่น สาร DDT ที่สะสมอยู่ในตัวนกจะทำให้เปลือกไข่บางลง ส่งผลให้ไข่แตกขณะที่นกกำลังฟักไข่ ส่งผลให้ประชากรของนกลดลงได้อย่างรวดเร็ว (Edwards, 2004) ดังนั้นการสะสมของสารดีดีทีในห่วงโซ่อาหารไม่ได้ถูกจำกัดเฉพาะในบริเวณพื้นที่การเกษตร แต่มักจะแพร่กระจายออกไปในสิ่งแวดล้อมด้วย เนื่องจากน้ำที่ไหลผ่านแปลงเกษตรที่มีการฉีดพ่นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช จะไหลลงไปสู่แหล่งน้ำตามธรรมชาติในที่สุด จึงทำให้เกิดการปนเปื้อนของสารเคมีในระบบนิเวศอย่างกว้างขวาง โดยสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำอาจได้รับผลกระทบจากสารเคมีเหล่านี้ได้โดยตรง โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของสัตว์น้ำ ทำให้สัตว์น้ำเป็นโรคต่างๆ ได้ง่ายขึ้น

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

จากข้อมูลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า เทคนิคมิวทิพยา สามารถนำมาใช้ในการศึกษาลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และเทคนิคโปรตีโอมิกส์ สามารถนำมาใช้ในการศึกษาโปรตีนในเมือกของสัตว์ได้เป็นอย่างดี และช่วยระบุชนิดของโปรตีนที่พบได้หลายชนิดในคราวเดียว อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบันยังไม่มีรายงานถึงลักษณะโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือก และชนิดของโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ

(*S. cucullata*) ซึ่งเป็นสัตว์น้ำที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจของไทย และมีแนวโน้มได้รับการปนเปื้อนสารเคมีจากสิ่งแวดล้อมทางทะเลเพิ่มขึ้น ผู้วิจัยจึงต้องการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีที่ตกค้างในน้ำ โดยทำการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบบริเวณอวัยวะพาเลียล ประกอบด้วย เหงือก แมนเทิล และแผ่นปาก ด้วยเทคนิคภูมิพยาธิวิทยา วิธี H&E staining และทำการศึกษาถึงผลกระทบของสารดีดีทีต่อชนิดของโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจีบ ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

2.5 การกำหนดค่าความเป็นพิษของสารดีดีที

การจะทราบค่าความเป็นพิษของสารได้ เราจำเป็นต้องนำสารเหล่านั้นมาทดสอบความเป็นพิษกับสัตว์ทดลอง การทดสอบเมื่อให้สารที่ความเข้มข้นต่างๆกับสัตว์ทดลอง จากนั้นวัดเปอร์เซ็นต์การตายของสัตว์ทดลองหลังรับสารพิษในช่วงระยะเวลาหนึ่งๆ แล้วนำไปหาค่าต่างๆที่ใช้แสดงระดับความเป็นพิษ ผลจากการได้รับสารแปลกปลอมในช่วงระยะ Toxicokinetic phase จะจัดเป็นระยะที่สารแปลกปลอมมีแนวโน้มเป็นสารที่อาจแสดงความเป็นพิษหรือไม่ก็ได้ แต่หลังจากเกิดกิจกรรมภายในร่างกายของสิ่งมีชีวิต ซึ่งบางส่วนอาจถูกกำจัดออกนอกร่างกาย และบางส่วนอาจมีผลต่อระบบต่างๆของสิ่งมีชีวิต ระยะดังกล่าวนี้ จะเรียกว่า Toxicodynamic phase ในการศึกษาทางพิษวิทยา มีค่าที่ใช้ในการบ่งชี้ความเป็นพิษในระยะ Toxicodynamic phase คือ Median Lethal Concentration (LC50) ซึ่ง LC50 หมายถึง ค่าความเข้มข้นของสารพิษซึ่งทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตเป็นจำนวนครึ่งหนึ่งของจำนวนสัตว์ที่นำมาทดลองทั้งหมดภายในระยะเวลาที่กำหนด ใช้หน่วยเป็น ppm (part per million), มิลลิกรัม/ ลิตร มิลลิกรัม/ กรัม หรือแม้กระทั่งใช้เป็นอัตราส่วนเจือจางจากสารละลายมาตรฐาน เช่น 1:1000 และ 1:10,000 เป็นต้น ซึ่งการประเมินค่า LC นี้จะไม่รู้ว่าสัตว์ทดลองแต่ละตัวได้รับสารพิษในปริมาณเท่าใด แต่รู้ว่าสัตว์ทดลองได้รับสารพิษที่มีความเข้มข้นเท่าใด ซึ่งค่านี้จะได้โดยทำการทดลองกับสัตว์ทดลองกับสารที่หลายๆความเข้มข้น (อาจจะประมาณ 3-5 ความเข้มข้น) แล้ววัดอัตราการเสียชีวิตของสัตว์ทดลองที่อยู่ในช่วงระหว่าง 10 ถึง 90 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำผลการทดลองมาทำกราฟ โดยให้แกน X เป็นค่า log ของความเข้มข้น และแกน Y เป็นค่าเปอร์เซ็นต์การเสียชีวิต จากนั้นทำการวัดเปอร์เซ็นต์การเสียชีวิตที่ 50 เปอร์เซ็นต์ ว่าตรงกับความเข้มข้นที่เท่าไร แล้วนำมาหาค่า antilog ก็จะได้ทราบปริมาณที่ทำให้สัตว์ทดลองตายที่ 50 เปอร์เซ็นต์ นั่นก็คือค่า LC50 นั่นเอง ทั้งนี้หากค่า LC50 มีค่าตัวเลขที่สูงก็แสดงว่าสารเคมีนั้นๆ จะมีอันตรายน้อย เนื่องจากต้องได้รับในปริมาณมากจึงจะทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตไปครึ่งหนึ่งของกลุ่มสัตว์ที่ทำการทดลอง ในขณะที่ค่าตัวเลขต่ำจะแสดงความเป็นพิษที่รุนแรงสูงคือได้รับสารเพียงเล็กน้อยก็สามารถทำให้สัตว์ทดลองเสียชีวิตไปครึ่งหนึ่ง ซึ่งค่าความเป็นพิษของสารดีดีทีที่แสดงในตารางที่ 2-1

ตารางที่ 2-1 ค่าความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อสัตว์ทดลอง

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

2.6 สารประกอบบิวทิลทิน (Butyltin compounds; BTs)

สารประกอบบิวทิลทิน (Butyltin compounds; BTs) เป็นสารประกอบที่มีโมเลกุลประกอบด้วยธาตุดีบุก (Sn) และหมู่บิวทิล ($-C_4H_9$) ซึ่งสารที่เป็นที่รู้จักกันดีในกลุ่มนี้คือสารไตรบิวทิลทิน (Tributyltin, TBT) เนื่องจากมีการรายงานการปนเปื้อนและผลกระทบของสาร TBT ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลเป็นจำนวนมาก สาร TBT นี้ถูกใช้ในสีทาเรือเพื่อป้องกันการเกาะบนผิวเรือของเพรียงและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็ก แต่อย่างไรก็ตามสารนี้สามารถละลายออกมาจากผิวเรือและปนเปื้อนในระบบนิเวศชายฝั่งทะเลและส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตเป็นอย่างมาก จนถือได้ว่าเป็นสารพิษที่มีความร้ายแรงมากที่สุดชนิดหนึ่งในระบบนิเวศทางทะเล โดยผลกระทบที่เป็นที่รู้จักกันดีของสารประกอบบิวทิลทินคือ ทำให้หอยฝาเดียวในกลุ่ม Neogastropod เกิดการเปลี่ยนแปลงจากเพศเมียเป็นเพศผู้ (imposex) ซึ่งมีผลกระทบต่อโครงสร้างของประชากรหอยฝาเดียวในพื้นที่และอาจทำให้ประชากรหอยฝาเดียวลดลง สำหรับหอยสองฝาพบว่าส่งผลกระทบต่อพัฒนาการและการเจริญของตัวอ่อน และในหอยนางรมตัวเต็มวัยพบว่าทำให้หอยนางรมมีการสร้างเปลือกผิดปกติทำให้ผลผลิตต่ำ ซึ่งส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงหอยนางรมเป็นอย่างมาก นอกจากนี้สารไตรบิวทิลทินยังสามารถสะสมในห่วงโซ่อาหารรวมถึงผู้บริโภคอันดับสุดท้าย เช่น มนุษย์ และอาจส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันทำให้สุขภาพอ่อนแอลงอีกด้วย การปนเปื้อนของสาร TBT นอกจากจะพบในรูปของ TBT แล้วยังพบว่าการปนเปื้อนของสารบิวทิลทินที่เกิดจากการสลายตัวของ TBT เป็นอนุพันธ์ Dibutyltin (DBT), Monobutyltin (MBT) ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลในทุกภูมิภาคของโลก ทั้งในน้ำทะเล ดินตะกอน และสิ่งมีชีวิต เช่น สาหร่าย กล้วยทะเล หอยทะเล ครัสเตเชียน และปลา เป็นต้น

จากรายงานการปนเปื้อนและผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศดังที่กล่าวมาแล้วทำให้หลายประเทศกำหนดมาตรการห้ามใช้สาร TBT ในสีทาเรือ ต่อมาองค์การทางทะเลระหว่างประเทศ International Maritime Organization (IMO) จึงได้มีข้อกำหนดห้ามผลิตสีทาเรือที่มีส่วนผสมของสาร TBT ในปี ค.ศ. 2003 และห้ามใช้สีทาเรือที่มีองค์ประกอบของสาร TBT ในปี ค.ศ. 2008 เป็นต้นมา ทำให้สถานการณ์การปนเปื้อนของสารประกอบบิวทิลทินในหลายประเทศมีแนวโน้มที่ลดลง อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถตรวจพบสารกลุ่มนี้ได้ ทั้งในน้ำทะเล ดินตะกอน และสิ่งมีชีวิต เนื่องจากสารประกอบบิวทิลทินจัดเป็นสารที่มีความคงทนและสลายตัวช้า (persistent organic pollutants; POPs) จึงสามารถปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนาน โดยค่าครึ่งชีวิตในน้ำทะเล ดินตะกอน และหอยสองฝาอยู่ที่ 0.78, 2.89 และ 1.12 ปี ตามลำดับ นอกจากนี้ยังมีปัจจัยเสี่ยงที่อาจทำให้การปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้สู่สิ่งแวดล้อมอย่างต่อเนื่อง เนื่องจากภายใต้ข้อกำหนดของ IMO ยังอนุญาตให้ใช้สาร TBT ในสีทาเรือ สำหรับเรือที่มีขนาดใหญ่เกิน 25 เมตร และนอกจากสีทาเรือแล้ว สารอนุพันธ์ DBT และ MBT ยังมีการใช้อย่างแพร่หลายในภาคอุตสาหกรรม เช่น ใช้ป้องกันเชื้อราในระบบหล่อเย็น ใช้ในอุตสาหกรรมทอผ้า ใช้ในการถนอมอาหาร ใช้ป้องกันเชื้อราในโรงไม้ เป็นต้น ดังนั้นจึงควรมีการติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารบิวทิลทินอย่างต่อเนื่อง

แม้ว่าภายหลังจากการประกาศห้ามใช้สารประกอบบิวทิลทินในสีทาเรือส่งผลให้สถานการณ์การปนเปื้อนของสารประกอบบิวทิลทินในสิ่งมีชีวิตเริ่มมีแนวโน้มลดลงในหลายพื้นที่ทั่วโลก อย่างไรก็ตามก็ปัจจุบันยังสามารถตรวจพบการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ในปริมาณมากและยังไม่มีแนวโน้มว่าจะลดลงในบางภูมิภาคของโลก สำหรับประเทศไทยมีการตรวจวัดการปนเปื้อนของสารบิวทิลทินในสิ่งมีชีวิตน้อย โดยพบรายงานการศึกษาในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ก่อนที่มีการประกาศห้ามใช้สารประกอบบิวทิลทินในสีทาเรือ โดยในปี ค.ศ. 1994-1995 พบปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่บริเวณชายฝั่งทะเลประเทศไทยเฉลี่ย 49 ng/g ของน้ำหนักสด โดยจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด พบปริมาณอยู่ที่ 32, 73 และ 16 ng/g ของน้ำหนักสด ตามลำดับ และ ในปี ค.ศ. 2004 พบปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่บริเวณ

ชายฝั่งทะเลอ่าวไทยตอนบนเฉลี่ย 35 ng/g ของน้ำหนักสด โดยจังหวัดชลบุรีพบปริมาณอยู่ที่ 70 ng/g ของน้ำหนักสด อย่างไรก็ตามยังไม่พบรายงานการปนเปื้อนของสารประกอบกลุ่มนี้ในสิ่งมีชีวิตบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทยภายหลังประกาศห้ามใช้สารกลุ่มนี้ในสีทาเรือ ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อตรวจวัดการปนเปื้อนของสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิตบริเวณชายฝั่งทะเล โดยทำการศึกษาในหอยแมลงภูชนิด *Perna viridis* มีถิ่นอาศัยบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออกของประเทศไทย เช่น จังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด เป็นต้น ซึ่งเป็นจังหวัดในภูมิภาคที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ มีเขตอุตสาหกรรมที่สำคัญ และเป็นพื้นที่ยุทธศาสตร์การลงทุน อีกทั้งพื้นที่บริเวณชายฝั่งทะเลตะวันออกยังเป็นเป้าหมายสำคัญสำหรับเป็นฐานการผลิตอุตสาหกรรมหลักของประเทศในอนาคต และการพัฒนาท่าเรือ จึงมีความเสี่ยงสูงต่อการปนเปื้อนสารเคมีสู่สิ่งแวดล้อมรวมถึงสารกลุ่มบิวทิลทิน

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

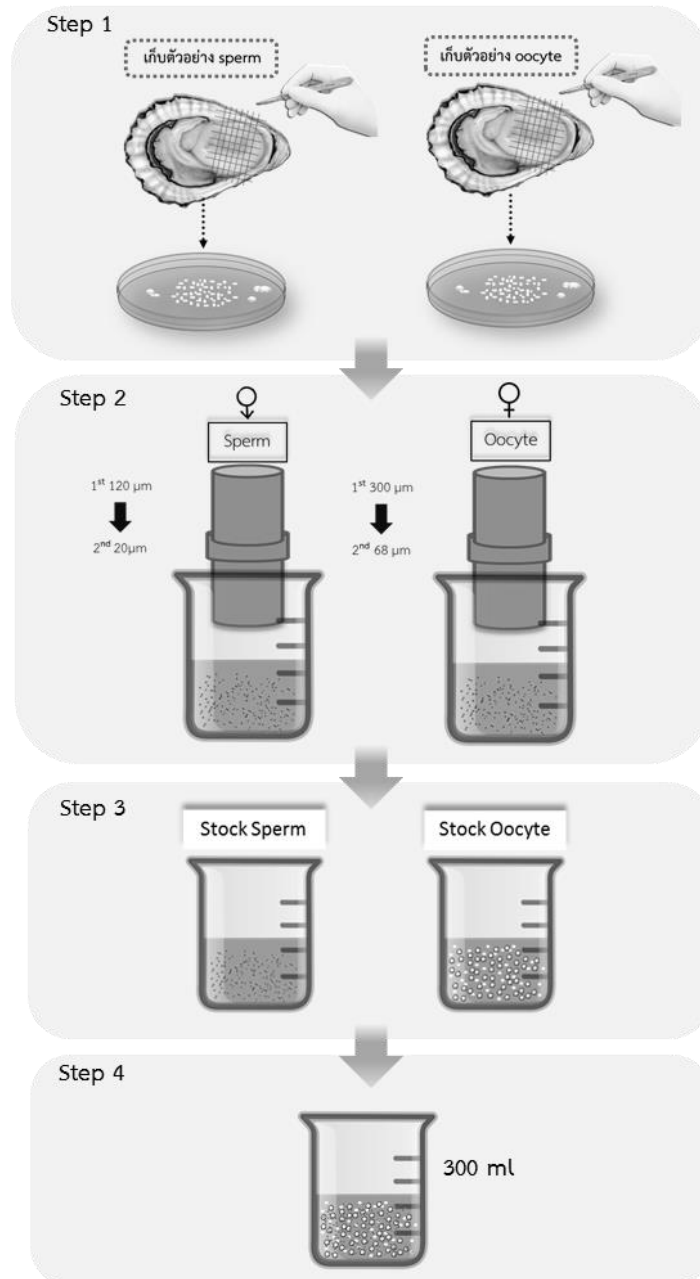
3.1 การคัดเลือกเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ

สุ่มคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์จากหอยนางรมที่เลี้ยงปรับสภาพไว้ในห้องปฏิบัติการ โดยเลือกตัวที่มีขนาดใกล้เคียงกันคือประมาณ 6-7 เซนติเมตร แกะเปลือกหอยออกและใช้มีดผ่าตัดเขี้ยวตรงบริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ (gonad) นำเซลล์สืบพันธุ์ไปตรวจสอบเพศภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อแยกเพศของหอยนางรม และคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์ที่สมบูรณ์ที่สุด หลังจากนั้นทำการ Stripping ด้วยมีดผ่าตัด (ภาพที่ 3-1) บริเวณอวัยวะสร้างเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรม นำเซลล์สืบพันธุ์ที่ได้ใส่บีกเกอร์ ที่บรรจุน้ำทะเลความเค็ม 30 ppt โดยแยกเพศ เพศละบีกเกอร์

หลังจากนั้นจึงนำมากรองเซลล์สืบพันธุ์เพศเมียด้วยตะแกรงไนลอน ขนาดรูกรอง 300 μm เพื่อกรองเอาเศษเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการออก กรองครั้งที่ 2 ด้วยขนาดรูกรอง 68 μm เพื่อกรองเอาเซลล์ที่มีขนาดเล็ก เนื่องจากเซลล์ไข่ของหอยนางรมปากจีบมีขนาดประมาณ 30-60 μm จึงสามารถผ่านรูกรองลงมาได้ แล้วจึงทำการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศเมีย แยกในภาชนะต่างหาก ส่วนเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้จะถูกนำมากรองด้วยตะแกรงไนลอน ขนาดรูกรอง 120 μm เพื่อกรองเอาเศษเนื้อเยื่อขนาดใหญ่ที่ไม่ต้องการออก กรองครั้งที่ 2 ด้วยขนาดรูกรอง 20 μm อีกครั้ง เพื่อให้เซลล์ที่มีขนาดเล็กที่สามารถผ่านรูกรอง ขนาด 120 μm ออกมาได้ ติดอยู่บนตะแกรงไนลอนนี้ สเปิร์มของหอยนางรมปากจีบมีขนาดเซลล์ประมาณ 3-5 μm จึงสามารถผ่านรูกรองลงมาได้ ทำการเก็บเซลล์สืบพันธุ์เพศผู้ แยกในภาชนะต่างหาก

3.1.1 ขั้นตอนการผสมเทียมและการปฏิสนธิ

การผสมเทียมเซลล์สืบพันธุ์ของหอยนางรมปากจีบ ในการศึกษาครั้งนี้ ปรับปรุงมาจากวิธีของ Song et al. (2009) โดยใช้ Hemocytometer ในการนับเซลล์ไข่และเซลล์สเปิร์ม ใช้สัดส่วนเซลล์ไข่ต่อเซลล์สเปิร์ม ในอัตราส่วน 1/400 คิดเป็นเซลล์ไข่ 40,000 ฟอง/น้ำทะเลเทียม 100 ml และใช้น้ำทะเลเทียม 300 ml



ภาพที่ 3-1 การเตรียมเซลล์สืบพันธุ์หอยนางรมปากจیبและการปฏิสนธิ

3.1.2 การทดสอบผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب (larva developmental biology)

ในการทดสอบผลกระทบของสารสารเคมีที่ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیبในครั้งนี้ทางผู้วิจัยเลือกทดสอบในสารสารเคมีที่จัดเป็นสารที่มีความเป็นพิษเฉียบพลันค่อนข้างสูงในสัตว์น้ำ ถูกประกาศห้ามไม่ให้การผลิต การนำเข้า การส่งออก หรือการมีไว้ในครอบครองทางการเกษตร เป็นสารมลพิษที่ตกค้างยาวนาน (Persistent Organic Pollutants: POPs) ซึ่งทำให้ยังมีรายงานว่าพบการปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมอยู่ การทดสอบผลกระทบของสารเคมีที่ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب เพื่อหาค่า LC50 ทำได้โดยการปฏิสนธิตัวอ่อนแล้วให้สัมผัสกับสาร DDT ในน้ำทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25,

0.5, 1, และ 10 µg/L และทำการตรวจสอบผลกระทบต่อนิวรณ์ในระยะ gastrula, trochophore และ D-shape veliger บันทึกผลการทดลอง โดยจะใช้ค่า LC50 ในการบ่งบอกระดับความเป็นพิษของสารดีดีทีต่อตัวอ่อนของหอยนางรมปากจีบ

3.1.3 การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ ระยะ gastrula

การทดสอบผลกระทบต่อนิวรณ์ของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบระยะ Gastrula ทำการตรวจสอบผลที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมจะเข้าสู่ระยะ gastrula ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนสร้างเนื้อเยื่อ 3 ชั้น จากนั้นจึงทำการสุ่มตัวอย่างจากทุกความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 1, และ 10 µg/L มาทำการตรวจสอบความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.1.4 การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ Trochophore

การทดสอบผลกระทบต่อนิวรณ์ของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบระยะ trochophore ทำการตรวจสอบที่ระยะเวลา 7 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมจะเข้าสู่ระยะ trochophore ซึ่งเป็นระยะที่ตัวอ่อนว่ายน้ำได้ เนื่องจากมีการสร้าง cilia ล้อมรอบตัวอ่อน จากนั้นจึงทำการสุ่มตัวอย่างจากทุกความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 1, และ 10 µg/L มาทำการตรวจสอบความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.1.5 การทดสอบผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ ระยะ D-shape veliger

การทดสอบผลกระทบต่อนิวรณ์ของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบระยะ D-shape veliger ทำการตรวจสอบที่ระยะเวลา 18 ชั่วโมง ซึ่งเป็นช่วงเวลาที่ตัวอ่อนในกลุ่มควบคุมจะเข้าสู่ระยะ D-shape veliger เรียบร้อยแล้ว ระยะนี้เป็นระยะที่ตัวอ่อนสร้างเปลือกแข็งรูปคล้ายอักษร D จากนั้นจึงทำการสุ่มตัวอย่างจากทุกความเข้มข้น ได้แก่ 0, 0.25, 0.5, 1, และ 10 µg/L มาทำการตรวจสอบความผิดปกติภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

3.2 ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย

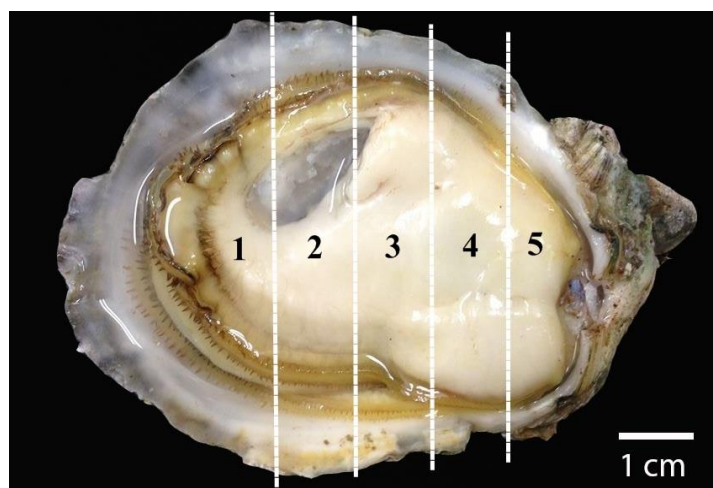
ทดสอบความเป็นพิษของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนในห้องปฏิบัติการ ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ โดยในการทดสอบความเป็นพิษครั้งนี้ทางผู้วิจัยเลือกทดสอบในสารดีดีที ซึ่งเป็นสารที่พบว่ายังมีรายงานว่าตรวจพบอยู่ในสิ่งแวดล้อม โดยจะทดสอบที่ความเข้มข้น 1, 10, 50, 100, 500 และ 1,000 ไมโครกรัมต่อลิตร เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม ทำการทดลองทั้งหมด 3 ซ้ำ ก่อนจะนำมาทดสอบกับสารดีดีที จำเป็นต้องเลี้ยงปรับสภาพในห้องปฏิบัติการ โดยสุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร นำมาเลี้ยงปรับสภาพ เป็นเวลาสองสัปดาห์ก่อนทำการทดลอง ให้อาหารเป็นแพลงก์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. ความเข้มข้น 1% v/v ของแพลงก์ตอนหัวเชื้อ 2×10^7 cells/ml. (Kingtong et al., 2007)

3.2.1 การทดสอบความเป็นพิษเพื่อหาค่า LC50

ศึกษาผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย เพื่อหาค่า LC50 โดยจะใช้หอยนางรมจำนวน 30 ตัว ต่อตู้ เลี้ยงในน้ำทะเล 30 ลิตร ให้อาหารและเปลี่ยนน้ำทะเลทุกวัน ทำการสำรวจอัตราการตายและการรอดชีวิต ที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และบันทึกผล เพื่อนำมาคำนวณหาค่า LC50 (Lethal concentrations for 50% mortality) โดยจะใช้ค่า LC50 ในการบ่งบอกระดับความเป็นพิษของสารดีดีทีในหอยนางรมชนิดนี้

3.3 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย

การศึกษาผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย ทำได้โดยใช้เทคนิคมิถุนวิทยา โดยนำชิ้นเนื้อเยื่อตัวอย่างที่แช่สารละลายบูแองส์จากข้างต้นมาตัดให้เป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดความยาวประมาณ 1 เซนติเมตร โดยชั้นที่ 1-3 ได้แมนเทิลและเหงือก ชั้นที่ 4 ได้ต่อมย่อยอาหารและอวัยวะสืบพันธุ์ และชั้นที่ 5 ได้เลเบียลพัลพ์ ดังแสดงในภาพที่ 3-2 แล้วจึงนำมาล้างด้วยเอทานอลที่ความเข้มข้น 70% จนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง จากนั้นนำเนื้อเยื่อมาผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration) ในเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำไปยังเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง โดยเริ่มจากเอทานอลที่มีความเข้มข้น 80% 90% และ 95% ตามลำดับ ขั้นตอนละหนึ่งครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วจึงนำมาแช่ในเอทานอล 100% จำนวน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำไปแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง นำเนื้อเยื่อมาแช่ในพาราฟลาสต์ 3 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส แล้วจึงนำมาฝังเนื้อเยื่อลงในพาราฟลาสต์ ตัดเนื้อเยื่อด้วยเครื่อง Microtome (Microtome รุ่น HESTION ERM 3000, Hestion, Australia) ความหนา 6 ไมโครเมตร นำเนื้อเยื่อที่ตัดแล้วมาติดลงบนแผ่นสไลด์โดยใช้เจลาตินเป็นตัวช่วยให้เนื้อเยื่อติดลงบนแผ่นสไลด์ นำสไลด์ที่ติดชิ้นเนื้อเยื่อแล้วมาวางให้แห้งบนเครื่องอุ่นแผ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำมาย้อมด้วยสีฮีมาทอกไซลินและสีอีโอซิน (Haematoxylin and Eosin) และศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง



ภาพที่ 3-2 ตัวอย่างภาพตัดตามขวาง (cross section) ของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบ

3.4 การวิเคราะห์โปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ

ทางผู้วิจัยจึงเลือกทำการศึกษาร่วมกับการวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ (Proteomic) เพื่อศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีที่ต่อกลไกการทำงานของเซลล์ เพื่อติดตามระดับการแสดงออกของโปรตีนภายในเซลล์ การควบคุมการแสดงออกของยีน เนื่องจากโปรตีนเป็นสารชีวโมเลกุลที่ทำหน้าที่สำคัญต่าง ๆ ภายในเซลล์ การวิเคราะห์ทางโปรตีโอมิกส์ ยังเป็นเทคนิคที่ช่วยระบุ Potential biomarker of exposure โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ ในการติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อมทางทะเล การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในครั้งนี้ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนละเอียดหลายขั้นตอน เพื่อให้ง่ายต่อความเข้าใจ จึงได้สรุปขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.4.1 การสกัดโปรตีน

นำเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ มาบดด้วยเครื่องบด Tissue Homogenizer ในสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ประกอบด้วย 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1mM EDTA และ 1 mM cocktail protease inhibitor) นำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้เศษเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันตกตะกอน แล้วจึงดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีน โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น standard protein

3.4.2 การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ (Two-dimensional gel electrophoresis)

นำตัวอย่างโปรตีนที่สกัดแล้วมา 100 ไมโครกรัมต่อตัวอย่าง ผสมกับ rehydration buffer ซึ่งประกอบด้วย Urea 7 M DTT 0.1 M CHAPS 4% IPG buffer 0.2% แล้วจึงนำมาไหลลงใน Isoelectric focusing gel (IEF) strip pH3-10, non-linear ขนาด 7 ซม. ของ GE Healthcare Life Science ที่ตั้งไว้ข้ามคืนเพื่อให้สารละลายทั้งหมดซึมเข้าไปภายในเจล เมื่อตั้งไว้ข้ามคืนแล้วจึงทำการโฟกัสโปรตีน หลังจากนั้น นำ IEF strip ที่โฟกัสโปรตีนเรียบร้อยแล้วมาแช่ในสารละลาย equilibration buffer 1 (6 M urea, 50 mM Tris (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 1% (w/v) DTT) เป็นเวลา 15 นาที ตามด้วย equilibration buffer 2 (6 M urea, 50 mM Tris (pH 6.8), 2% (w/v) SDS, 30% (v/v) glycerol, 2.5 % (w/v) iodoacetamide เป็นเวลา 15 นาที ทำการแยกโปรตีนด้วยเทคนิค two-dimensional gel electrophoresis โดยมีมิติที่หนึ่งจะแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าตามค่า Isoelectric focusing ของโปรตีน เครื่องมือที่ใช้คือ IPGPhor3 จากนั้น ในมิติที่สองจะแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) หลังจากกระบวนการ electrophoresis นำเจลที่ได้มาย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และล้างสีด้วย destain solution

3.4.3 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม

ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden)

นำเจลที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วไปสแกนเพื่อสร้างแผนที่อ้างอิงโปรตีน (Reference map) สำหรับข้อมูลโปรตีนในหอยนางรม และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนจากหอยนางรมที่ได้จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์แผ่นเจล ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) โดยโปรแกรมจะทำหน้าที่เปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนและวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนบนเจล พร้อมทั้งคำนวณค่าความเชื่อมั่น ($p=0.05$) จากนั้น

เราสามารถเลือกโปรตีนที่มีความแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นโปรตีนเป้าหมาย เพื่อใช้เป็น Potential biomarker สำหรับการปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีนได้ จากนั้นจึงทำการระบุชนิดของโปรตีนให้ได้ก่อนโดยการตัดจุดโปรตีนที่สนใจเพื่อย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin และนำไปวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ต่อไป

3.4.4 การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Trypsin

เริ่มจากการตัดจุดโปรตีนที่สนใจจะวิเคราะห์ นำมาย่อยด้วยเอนไซม์ Trypsin ให้เป็นเปปไทด์สายสั้นลง เอนไซม์ Trypsin จะจดจำตำแหน่งและเข้าไปทำการตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่ง Arginine และ Lucien ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดประมาณสายละ 10 กรดอะมิโน ซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS มีขั้นตอนดังนี้ นำเจลมาล้างด้วยสารละลาย 50% acetonitrile (ACN), 25 mM ammonium bicarbonate ($\text{NH}_4 \text{HCO}_3$) 2 ครั้ง ครั้งละ 200 ไมโครลิตร ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายออกแล้วเติม 100% acetonitrile 200 ไมโครลิตร แล้วทิ้งไว้ประมาณ 15 นาที หรือจนกว่าเจลจะมีสีขาวแล้วจึงดูดสารละลายออก หลังจากนั้นนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินเพื่อให้สายเปปไทด์สั้นลง โดยการเติมสารละลายเอนไซม์ทริปซินที่เจือจางอัตราส่วน 0.006 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ปริมาณ 10-15 ไมโครลิตร ลงในหลอดต่างๆ โดยใช้อุณหภูมิ 37 องศา เซลเซียส เป็นเวลา 3-5 ชั่วโมง

3.4.5 การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS

นำเปปไทด์ซึ่งถูกย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินที่ได้จากขั้นตอนข้างต้น มาละลายใน 0.1% formic acid in H_2O วิเคราะห์ต่อด้วยเทคนิค LC-MS/MS (AmaZon™ speed ETD mass spectrometer, Bruker Billerica, MA, USA) มีขั้นตอนการวิเคราะห์โดยสังเขป ดังต่อไปนี้ นำ Tryptic peptide มาแยกด้วย nanoACQUITY system (Waters Corporation, Milford, MA, USA) โดยฉีดผ่าน nanoACQUITY UPLC column (1.7 μm BEH, 75 μm × 200 mm C18) ปรับค่า flow rate ให้เป็น 300 nL/min ที่อุณหภูมิ 40°C การวิเคราะห์จะประกอบไปด้วยส่วนของ liquid chromatography และส่วนของ electrospray ionization (ESI)/ ion trap mass spectrometer ซึ่งผลที่ได้จะออกมาเป็น Chromatogram แล้วจึงนำผลที่ได้ไปวิเคราะห์ต่อเพื่อหาชนิดของโปรตีนโดยการสืบค้นในฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เช่น MASCOT (www.matrixscience.com) โดยตั้งค่าพารามิเตอร์ (parameters) ดังนี้ ค่า peptide tolerant คือ ± 1.2 Da ค่า MS/MS tolerant คือ ± 0.6 Da เลือกเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ตรงส่วนของ peptide charge เลือกเป็น +1 +2 และ +3 เลือกไฟล์ชนิด .mgf ในส่วนของ Data format เลือก mascot generic และชนิดเครื่องมือวิเคราะห์ เลือก ESI-TRAP ตามลำดับ

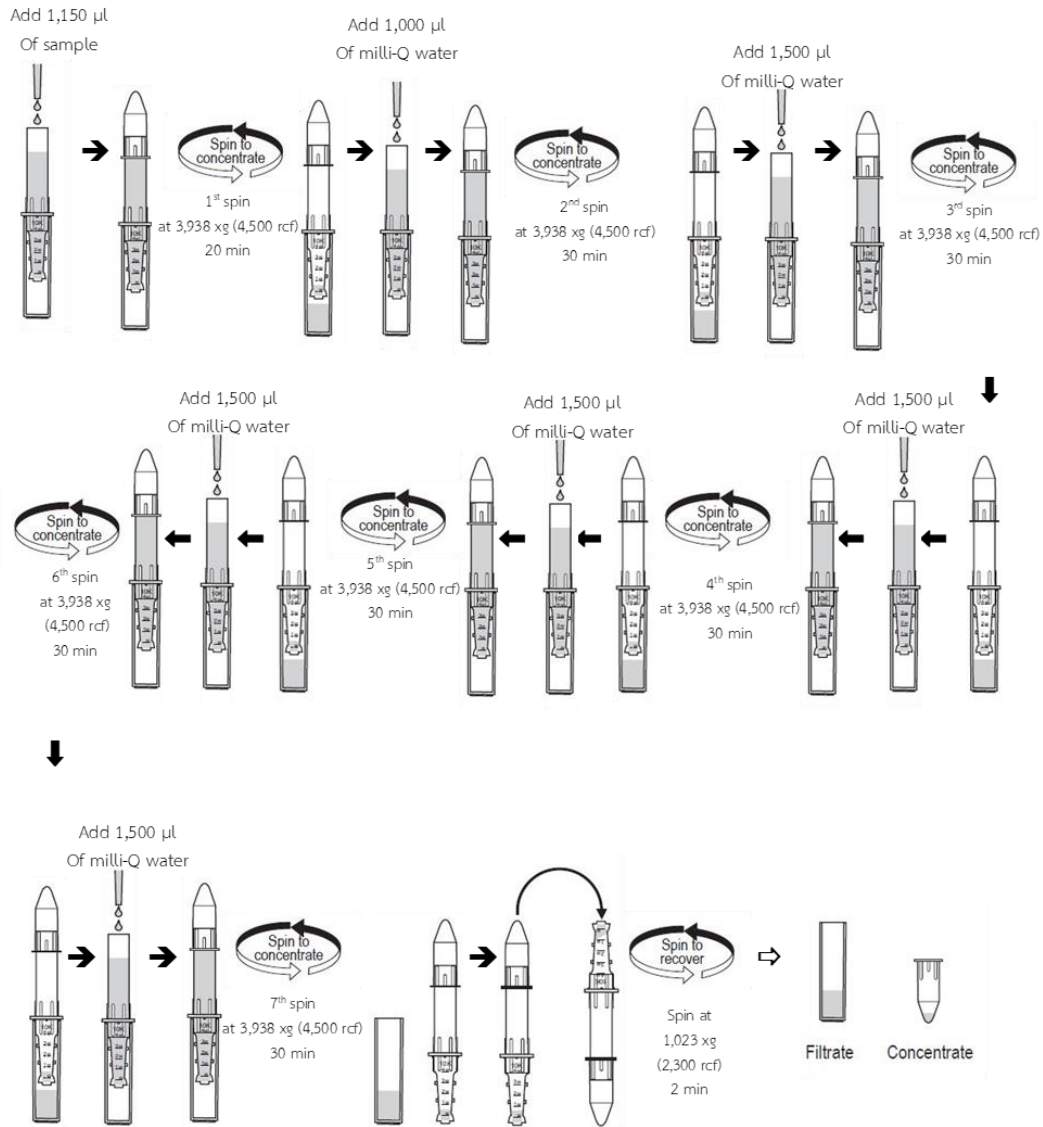
3.4.6 วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein biomarker

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีแนวโน้มสูงที่จะเป็น protein biomarker สำหรับสารดีดีทีที่เกณฑ์การเปรียบเทียบจะใช้โปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันสองเท่าขึ้นไประหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ด้วยความเชื่อมั่น 95% ซึ่งนิยมใช้ในงานวิจัย (Kingtong et al., 2013) โดยคาดว่าหลังจากศึกษาด้วยเทคนิคนี้แล้วจะได้โปรตีนที่มีแนวโน้มจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพต่อไป

3.5 การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีโอมของเมือกหอยนางรมปากจیب

ทำการเก็บตัวอย่างเมือกของหอยนางรมปากจیبจากทั้งกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีที 100 µg/L มาทำการศึกษาและวิเคราะห์โปรตีน ซึ่งจะต้องทำบนน้ำแข็ง (on ice) และต้องใช้ความเร็วเพื่อป้องกันไม่ใหตัวอย่างโปรตีนได้รับความเสียหายจากเอนไซม์โปรทีเอส โดยมีขั้นตอนดังนี้ ตัดเปลือกที่อยู่ด้านบนของหอยนางรมปากจیبออกประมาณหนึ่งในสามส่วนด้วยความระมัดระวัง เพื่อไม่ให้ adductor muscle ขาดหรือฉีก หลังจากนั้นล้างด้วยน้ำทะเลเทียม เพื่อกำจัดสิ่งสกปรก แล้วจึงค่อยๆ ใช้ cotton tip ขนาดเล็กที่ผ่านการฆ่าและแช่อยู่ในน้ำทะเลเทียมมาถู (swab) บริเวณเปลือกฮอร์แกน (Espinosa, Perrigault, Ward, Shumway, & Allam, 2009) เมือกที่เก็บได้จะติดอยู่บนคอตตอนทิป หลังจากนั้นจึงนำคอตตอนทิปนี้มาแกว่งในน้ำทะเลเทียมที่มีอุณหภูมิต่ำ ซึ่งอยู่ในหลอดเซนต์ปีฟวแบบมีฝาปิด (centrifuge tube) ขนาด 15 ml เพื่อทำให้เมือกที่เก็บได้หลุดออกจากคอตตอนทิปก่อนที่จะนำตัวอย่างเมือกที่เก็บได้ไปผ่านการกรองเอาสิ่งสกปรกออกด้วย syringe filter ขนาด 0.22 µm หลังจากนั้นนำตัวอย่างเมือกมาทำการตกตะกอนตัวอย่างโปรตีนด้วยอะซิโตน (acetone precipitation) เพื่อกำจัดเกลือจากน้ำทะเลเทียม จากนั้นจึงนำตัวอย่างเมือกที่ทำการตกตะกอนด้วย - 20 °C acetone นำมาละลายน้ำ แล้วทำการกำจัดเกลืออีก (Desalting) ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices ดังแสดงในภาพที่ 3-3 แล้วจึงนำตัวอย่างโปรตีนที่ได้มาผสมกับ lysis buffer ในขั้นตอนการสกัดโปรตีนต่อไป โดยเริ่มจากการเตรียมตัวอย่างโปรตีนจากเมือกของหอยนางรมปากจیب โดยการเติม lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 ซึ่งมีส่วนประกอบ ได้แก่ 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1 mM EDTA และ 1 mM cocktail protease inhibitor) ลงไปในเมือกของหอยนางรมปากจیب จากนั้นจึงนำไปปั่นเหวี่ยง (centrifuge) ที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อช่วยให้เซลล์แตกตะกอน แล้วจึงดูเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ด้านบนซึ่งเป็นโปรตีนจากเมือกของหอยนางรมปากจیب ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี Bradford protein assay โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น standard protein ทั้งนี้เมือกของหอยนางรมอาจมีน้ำทะเลติดมาด้วย ซึ่งอาจมีผลต่อการแยกโปรตีนในขั้นถัดไป จึงอาจเพิ่มขั้นตอนการทำโปรตีนให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นก่อนการแยกโปรตีนต่อไป

จากนั้นจึงเข้าสู่ขั้นตอนการแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ แล้วจึงนำมาเปรียบเทียบแผ่นเจลโดยใช้โปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) นำมาย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ Trypsin แล้วจึงทำการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS โดยขั้นตอนการวิเคราะห์จะอ้างอิงตามตามการศึกษาโปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیبข้างต้น



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

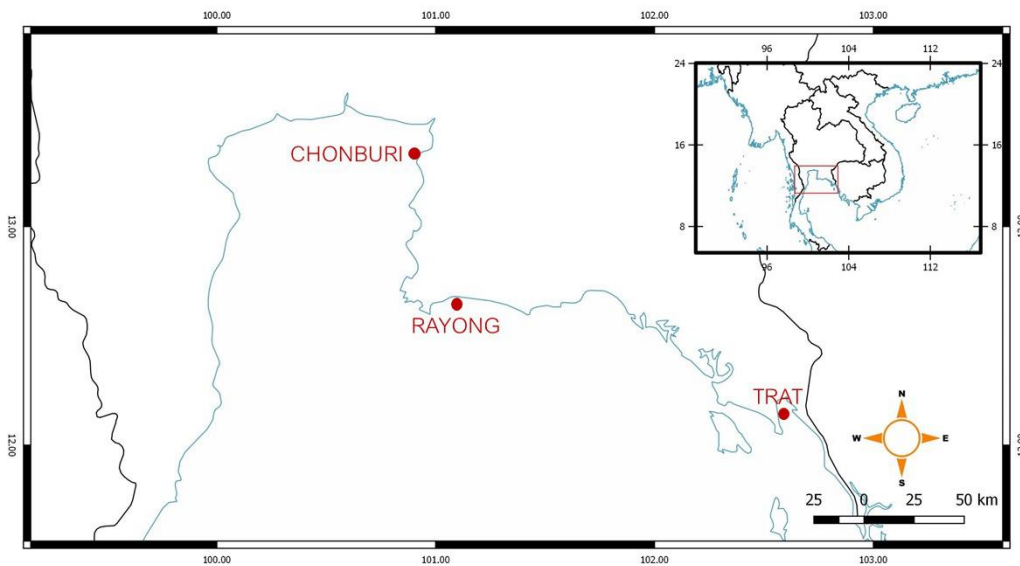
3.6 การตรวจวัดสารประกอบบิวทิลทินในหอยแมลงภู

1. พื้นที่ศึกษาและการเก็บตัวอย่าง

พื้นที่ศึกษาประกอบด้วยบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก 3 จังหวัด ได้แก่ จังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ตาม พิกัดในตารางที่ 3-1 และ ภาพที่ 3-4 ทำการเก็บตัวอย่างหอยแมลงภูชนิด *Perna viridis* จากพื้นที่ศึกษา ในการเก็บตัวอย่างทำการสุ่มเก็บหอยแมลงภูที่มีขนาดตั้งแต่ 5 เซนติเมตรขึ้นไป ให้น้ำหนักรวมเปลือกประมาณ 1 กิโลกรัม และเน้นการเก็บตัวอย่างให้ครอบคลุมพื้นที่มากที่สุดตามระเบียบวิธีวิจัยซึ่งได้ผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการสัตว์ทดลองของมหาวิทยาลัยแล้ว หลังจกเก็บตัวอย่างแล้ว แช่เย็นในน้ำแข็งทันทีเพื่อขนย้ายไปยังห้องปฏิบัติการ ทำการแกะเปลือกเพื่อนำเอาเนื้อเยื่อสดรวมกันและทำการบดให้ละเอียด แล้วชั่งเนื้อเยื่อให้น้ำหนัก 150 กรัม แล้วจึงนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (freeze-drying) เก็บเนื้อเยื่อที่แห้งแล้วในขวดแก้วที่บดแสงและเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส เพื่อทำการวิเคราะห์ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3-1 พิกัดสถานที่เก็บตัวอย่างหอยแมลงภู่นิวต *Perna viridis* และน้ำหนักเนื้อเยื่อสดและน้ำหนักแห้งหลังจากทำแห้งแบบเยือกแข็ง

Location	Coordinates	Wet weight (g)	Dry weight (g)
Chonburi	13.329327N/100.904132E	150	29.26
Rayong	12.666802N/101.167804E	150	27.49
Trat	12.131474N/102.570505E	150	23.55



ภาพที่ 3-4 แผนที่จุดเก็บตัวอย่างในการศึกษานี้ (ดัดแปลงจากโปรแกรม QGIS)

2. สารเคมีและการเตรียมสารมาตรฐาน

สารมาตรฐาน (Standard) บิวทิลทินที่ใช้ในการศึกษานี้ประกอบด้วย Monobutyltin chloride ($[\text{CH}_3\text{CH}_2]_3\text{SnCl}_3$, 95%, Sigma-Aldrich), Dibutyltin chloride ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_2\text{SnCl}_2$, 96%, Sigma-Aldrich) และ Tributyltin chloride ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_3\text{SnCl}$, 96%, Sigma-Aldrich) นอกจากนี้ยังใช้สาร Tripropyltin (TPrT) ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{SnCl}$, 99%, Sigma-Aldrich) สำหรับเป็น Internal standard และใช้สาร Sodium diethyldithiocarbamate ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NS}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Sigma-Aldrich) สำหรับกระบวนการ derivatization

เตรียมสารมาตรฐาน Monobutyltin chloride ($[\text{CH}_3\text{CH}_2]_3\text{SnCl}_3$, 95%), Dibutyltin chloride ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_2\text{SnCl}_2$, 96%), Tributyltin chloride ($[\text{CH}_3(\text{CH}_2)_3]_3\text{SnCl}$, 96%) ในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 1 g/L และเตรียม internal standard Tripropyltin (TPrT) ($(\text{CH}_3\text{CH}_2\text{CH}_2)_3\text{SnCl}$, 99%) ในเมทานอลให้ได้ความเข้มข้น 10 mg/L สารละลายมาตรฐานทั้งหมดเก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จนกว่าจะทำการวิเคราะห์ เตรียมสารละลาย Organotin catching โดยใช้ Sodium diethyldithiocarbamate ($\text{C}_5\text{H}_{10}\text{NS}_2\text{Na}\cdot 3\text{H}_2\text{O}$) 6% ในเอทานอล และเตรียม Acetate buffer pH 4.5 ± 0.3 โดยใช้ Sodium acetate ($\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$)

3. การสกัดตัวอย่างและปฏิกิริยา

การสกัดสารบิวทิลทินจากตัวอย่างเนื้อเยื่อในการศึกษาครั้งนี้ดัดแปลงจากงานวิจัย [22] โดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ Solid-Liquid Extraction (SLE) นำตัวอย่างหอยแมลงภู่งูที่ทำแห้งแบบเยือกแข็ง โดยชั่งตัวอย่างแห้ง 2 กรัม ใส่ในหลอดทดลองฝาเกลียวขนาด 50 mL เติมน้ำ Ultrapure deionized ($18.2 \text{ M}\Omega/\text{cm}$) ปริมาตร 5 mL ตั้งทิ้งไว้ 30 นาที จากนั้นเติมสารละลาย Tripropyltin (TPRT) ความเข้มข้น 10 mg/L ปริมาตร $100 \mu\text{L}$ นำไป sonicate นาน 30 นาที เติมน้ำ Acetone ปริมาตร 10 mL และสารละลาย Sodium diethyldithiocarbamate 6% ปริมาตร $100 \mu\text{L}$ นำไป sonicate อีก 20 นาที จากนั้นเติม Acetate Buffer pH 4.5 ปริมาตร 10 mL เขย่านาน 1 นาที จากนั้นเติม Sodium tetraethylborate ($\text{NaB}(\text{Et})_4$) ปริมาตร $100 \mu\text{L}$ เติมน้ำลงในหลอดสกัดก่อนหน้านี้ ทำการเขย่านาน 30 นาที และเติม Hexane ปริมาตร 5 mL เขย่านาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $3,500 \text{ rpm}$ นาน 10 นาที ดูดสารละลายชั้น Hexane มาใส่ในหลอดทดลองอันใหม่ ทำการสกัดซ้ำอีกครั้งโดยเติม Hexane ปริมาตร 5 mL เขย่านาน 10 นาที นำไปปั่นเหวี่ยงที่ความเร็ว $3,500 \text{ rpm}$ นาน 10 นาที และดูดสารละลาย Hexane ขึ้นมาใส่ในหลอดทดลองก่อนหน้านี้ และนำไปประเหยด้วยก๊าซไนโตรเจน ให้เหลือปริมาตร 1 mL ทำความสะอาดสารสกัดที่ได้ด้วย Florisil column จากนั้นนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS ต่อไป ค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืน (Recovery) ในการวิจัยครั้งนี้ใช้วิธีการเติมสารละลายมาตรฐานที่รู้ความเข้มข้นที่แน่นอนใส่ลงไปในตัวอย่างเป็น (spike) จากนั้นทำการสกัดและวิเคราะห์ผลเหมือนกันกับขั้นตอนการสกัดตัวอย่าง ซึ่งค่าที่ได้จะแสดงเป็นร้อยละ

4. ขั้นตอนการวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS

การวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทินในครั้งนี้นี้ดัดแปลงจากงานวิจัยของ Yáñez et al. (2016) โดยนำสารสกัดปริมาตร $2 \mu\text{L}$ มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography (GC) รุ่น Agilent 5975C, Agilent Technologies (USA) โดยใช้คอลัมน์ชนิด HP-5MS 5% phenyl ที่เคลือบด้วย methyl siloxane 95% ขนาด $30 \text{ m} \times 0.25 \mu\text{m} \times 0.25 \text{ mm}$ ยี่ห้อ Agilent Technologies และให้อุณหภูมิคงที่ๆ 50 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1.5 นาที จากนั้นเพิ่มอุณหภูมิ 20 องศาเซลเซียส ทุกๆ 1 นาที จนถึงอุณหภูมิ 190 องศาเซลเซียสและคงที่เป็นเวลา 1 min และเพิ่มอุณหภูมิอีก 30 องศาเซลเซียส ทุกๆ 1 นาที จนถึงอุณหภูมิ 300 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 4 นาทีอุณหภูมิ inlet 250 องศาเซลเซียส อัตราการไหลของก๊าซตัวพา 1.0 mL/min โดยมีก๊าซฮีเลียม (He) เป็นตัวนำพาสารที่อัตรา 50 mL/min เข้าสู่คอลัมน์ และใช้ตัวตรวจวัด (Detector) คือ Mass spectrometer (MS) ทำการวิเคราะห์หาสารประกอบบิวทิลทินที่อยู่ในเนื้อเยื่อตัวอย่างโดยเทียบกับปริมาณสารมาตรฐาน สารมาตรฐานที่ใช้คือ ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ ไดบิวทิลทินคลอไรด์ และโมนอบิวทิลทินคลอไรด์ สามารถทำการวิเคราะห์ได้โดยเปรียบเทียบเวลาที่สารตัวอย่างถูกชะออกจากคอลัมน์กับ Retention Time (Rt) และการยืนยันด้วยมวลโมเลกุล (molecular mass) ของสารแต่ละชนิด แล้วทำการหาปริมาณตัวอย่างโดยสร้างกราฟมาตรฐานของสารมาตรฐานที่ความเข้มข้นต่าง ๆ 5 จุด ($0.1, 0.5, 1, 50$ และ $100 \mu\text{g/L}$) แล้วเปรียบเทียบระหว่างค่าความเข้มข้นของสารมาตรฐานกับสัดส่วนพื้นที่ใต้พีค (peak area ratio) ของสารมาตรฐานกับ internal standard แล้วใช้ความสัมพันธ์เชิงเส้นที่ได้มาคำนวณความเข้มข้นของตัวอย่าง โดยหน่วยของสารประกอบบิวทิลทินที่ตรวจพบมีหน่วยเป็นนาโนกรัมต่อกรัมในน้ำหนักแห้ง (ng/g dry weight)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

4.1 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ (larva developmental biology)

4.1.1 ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ

ในการศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ อันดับแรกผู้วิจัยได้ทำการศึกษาชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนก่อน โดยทำการคัดเลือกพ่อแม่พันธุ์เพื่อกรีดเอาเซลล์สืบพันธุ์จากอวัยวะสืบพันธุ์ที่อยู่ในอวัยวะสืบพันธุ์เพื่อทำการผสมเทียมปฏิสนธิในสภาพที่เหมาะสม โดยใช้อัตราส่วนระหว่างไข่กับอสุจิ คือ 1:400 (Song et al., 2009) ทำให้เกิดการปฏิสนธิของเซลล์สืบพันธุ์และเจริญตัวอ่อนระยะต่างๆ ซึ่งประกอบด้วยการเจริญของตัวอ่อนในระยะต่างๆ ดังนี้

1. ระยะปฏิสนธิ การปฏิสนธิเกิดขึ้นภายในเวลา 10-15 นาที หลังจากการผสมเทียม สังเกตได้จากเซลล์ไข่จะมีการเปลี่ยนแปลงโดยเกิด first polar body ขึ้น ในหอยนางรมเพศเมียนั้นเซลล์ไข่ที่อยู่ภายในอวัยวะสืบพันธุ์ จะมีการสะสม yolk ภายในไซโทพลาซึมทำให้ไข่มีขนาดใหญ่และอยู่ในระยะ Primary oocyte ซึ่งเป็นระยะที่พร้อมสำหรับการปฏิสนธิ หากเซลล์ไข่ได้รับการปฏิสนธิเซลล์ไข่จะมีการแบ่งเซลล์แบบไมโอซิสครั้งที่ 1 (meiosis I) ทำให้ได้เซลล์ใหม่ 2 เซลล์ คือ Secondary oocyte (เซลล์ขนาดใหญ่) และ first polar body (เซลล์ขนาดเล็ก) เกิดขึ้นที่ด้านใดด้านหนึ่ง (ภาพที่ 4-1) จากนั้น Secondary oocyte จึงจะแบ่งเซลล์แบบ ไมโอซิสครั้งที่ 2 (meiosis II) และรวมนิวเคลียสกับนิวเคลียสของเซลล์อสุจิได้เป็นเซลล์ไซโกต (zygote) และแบ่งเซลล์ต่อไป

2. ระยะ cleavage เป็นระยะที่ไข่ที่ได้รับการผสมแล้วมีการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็วทำให้ตัวอ่อนมีจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น แต่ขนาดของตัวอ่อนไม่เปลี่ยนแปลง ด้านที่แบ่งเซลล์ได้เร็วกว่าทำให้เซลล์มีขนาดเล็กกว่าคือด้าน animal pole ส่วนนี้จะเจริญไปเป็นส่วนหลังของสัตว์ ส่วนด้านตรงข้ามพบเซลล์ขนาดใหญ่กว่าเรียกว่า vegetal pole ส่วนนี้จะเจริญไปเป็นด้านท้องของสัตว์ (ภาพที่ 4-2A)

3. ระยะ blastula เป็นระยะที่ตัวอ่อนที่มีการแบ่งตัวเพิ่มขึ้นและมีการเรียงตัวของเซลล์ชั้นเดียวเกิดช่องว่างขึ้นภายในตัวอ่อน เรียกช่องนี้ว่า blastocoel สำหรับในตัวอ่อนหอยนางรม พบว่าช่อง blastocoel มีขนาดเล็กสังเกตเห็นได้ยาก (ภาพที่ 4-2B) ในหอยนางรมปากจีบพบว่าตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิประมาณ 3 ชั่วโมงขึ้นไป

4. ระยะ gastrula เป็นระยะที่เกิดเนื้อเยื่อสามชั้นขึ้นในตัวอ่อน เนื่องจากเกิดการเคลื่อนที่และเรียงตัวใหม่ของกลุ่มเซลล์ภายในตัวอ่อน เนื่องจากเซลล์ด้าน animal pole แบ่งเซลล์ได้เร็วกว่าด้าน vegetal pole ทำให้เซลล์แผ่ลงมาคลุมทับด้าน vegetal pole เกิดการม้วนตัวของแผ่นเซลล์เข้าไปข้างในตัวอ่อน (ภาพที่ 4-2C) อาจสังเกตเห็นช่อง blastopore ได้จากภายนอก ในหอยนางรมเนื่องจากช่อง blastopore เป็นร่องขนาดเล็กและไม่เว้าลึกเข้าไปในตัวอ่อน จึงอาจเรียกได้ว่าเป็นช่อง pseudoblastopore ในหอยนางรมปากจีบพบว่าตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิประมาณ 4 ชั่วโมงขึ้นไป

5. ระยะ Trochophore เป็นระยะที่ตัวอ่อนที่เริ่มสร้างอวัยวะ (organogenesis) ตัวอ่อนมีการพัฒนาโครงสร้างที่ทำหน้าที่เฉพาะขึ้น เช่น มีการพัฒนา velum ซึ่งมีลักษณะเป็นแผงซิเลียที่ล้อมรอบตัว

อ่อน ทำให้ตัวอ่อนสามารถว่ายน้ำได้ (ภาพที่ 4-2C) ตัวอ่อนในระยะนี้มีการพัฒนาระบบทางเดินอาหารแล้ว ดังนั้นจึงสามารถกินอาหารได้ ในหอยนางรมปากจیبพบว่าตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิ ประมาณ 7 ชั่วโมงขึ้นไป ในระยะนี้เหมาะสำหรับการให้อาหารหอยนางรม ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับนำพลังงานไปใช้ในการเจริญเติบโตและการสร้างเปลือกต่อไป

6. ระยะ veliger เป็นระยะที่ตัวอ่อนมีการสร้างเปลือก เนื่องจากหอยนางรมเป็นหอยสองฝา (Class Bivalvia) จึงพบว่าตัวอ่อนเริ่มสร้างเปลือก 2 อัน ลูมลำตัว ตัวอ่อนในระยะที่เริ่มมีการสร้างเปลือกนี้ เมื่อมองด้านข้างจะเห็นตัวอ่อนมีลักษณะคล้ายตัวอักษร D จึงเรียกตัวอ่อนในระยะนี้ว่า D-shape veliger (ภาพที่ 4-2D) ในหอยนางรมปากจیبพบว่าตัวอ่อนจะเข้าสู่ระยะนี้ภายหลังการปฏิสนธิประมาณ 18 ชั่วโมงขึ้นไป หลังจากระยะ D-shape veliger แล้ว หอยนางรมปากจیبก็จะพัฒนาเข้าสู่ระยะ pediveliger หรือระยะที่ตัวอ่อนมีการเท่า (pedi หมายถึง ส่วนเท้า หรือ foot) ระยะนี้ของตัวอ่อนจะอาศัยชีวิตในน้ำทะเลลอยและว่ายน้ำ (planktonic larva) จนกว่าจะลงเกาะกับที่ ซึ่งเมื่อหอยลงเกาะกับที่บนตำแหน่งที่เป็นของแข็ง เช่น ก้อนหิน รากต้นไม้ หรือวัสดุแข็งอื่น ๆ ในน้ำแล้ว หอยนางรมก็จะสร้างเปลือกด้านหนึ่งยึดติดกับวัสดุนั้นๆ และเจริญเป็นตัวเต็มวัยโดยไม่เคลื่อนที่อีกตลอดชีวิต (sessile life)

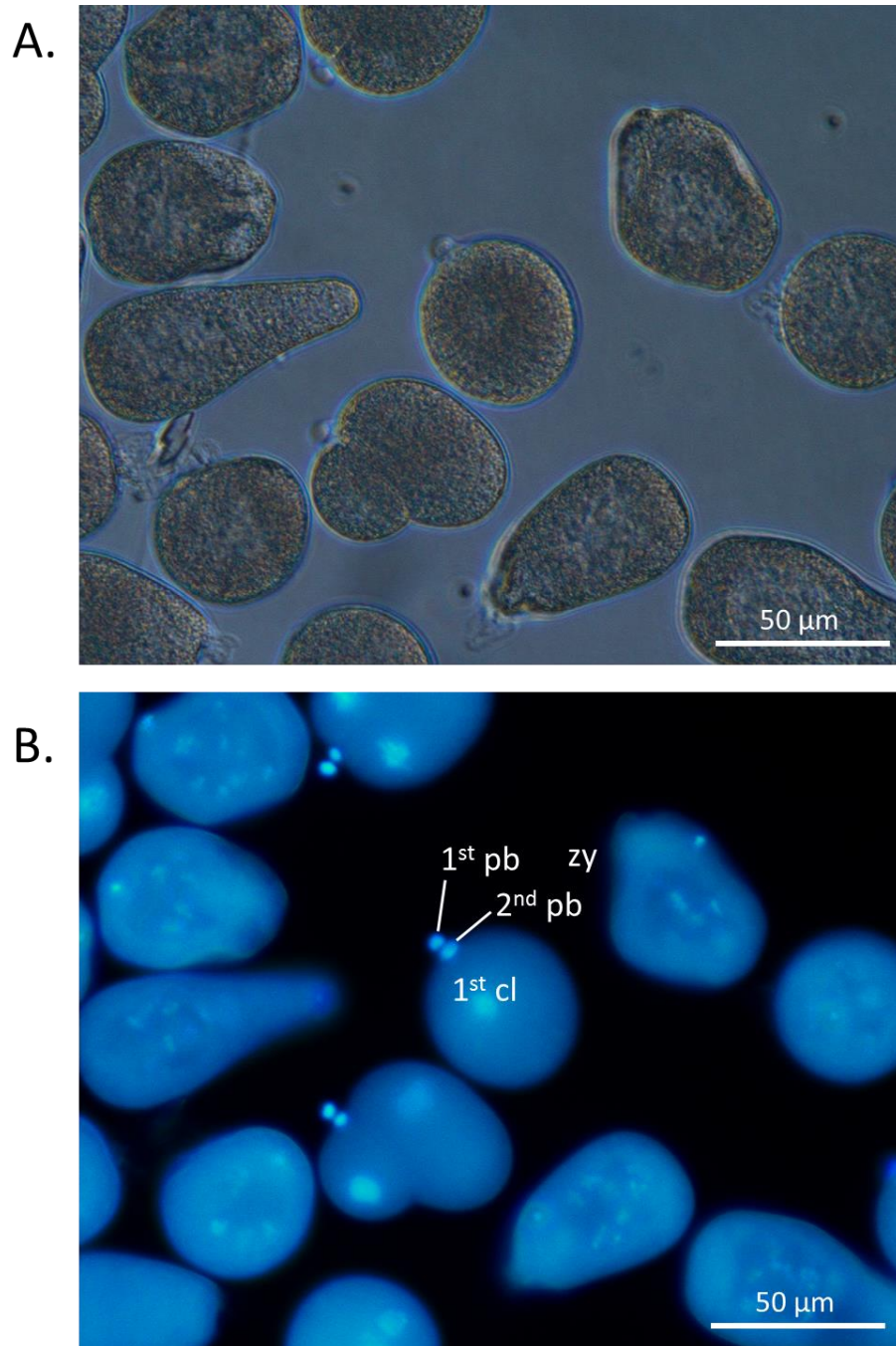
4.1.2 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีน (DDT) ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب

การทดสอบในห้องปฏิบัติการโดยทำการปฏิสนธิตัวอ่อนแล้วให้สัมผัสกับสาร DDT ในน้ำทะเลที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.25, 0.5, 1, และ 10 $\mu\text{g/L}$ พบว่าในกลุ่มควบคุม (0 $\mu\text{g/L}$) ตัวอ่อนมีการพัฒนาปกติเข้าสู่ D-shape veliger larva ทั้งหมด (100%) ในกลุ่มทดสอบพบว่าสาร DDT ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.25-10 $\mu\text{g/L}$ ไม่ทำให้ตัวอ่อนตาย แต่ส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจیب ทำให้ตัวอ่อนพัฒนาการผิดรูปไปจากเดิมโดยมีจำนวนตัวอ่อนที่ผิดปกติแปรผันตามความเข้มข้นของสารทดสอบ ดังภาพที่ 4-3 การศึกษาครั้งนี้ทำการสำรวจผลกระทบต่อตัวอ่อนในระยะ gastrula, trochophore และ D-shape veliger เมื่อพิจารณาตัวอ่อนแต่ละระยะพบผลกระทบดังนี้

ระยะ gastrula (สำรวจ ณ เวลา 4 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) พบว่าสาร DDT ทำให้ตัวอ่อนระยะ gastrula ผิดปกติ ดังภาพที่ 4-3A โดยกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 0.25 $\mu\text{g/L}$ ไม่พบความผิดปกติ แต่เริ่มสังเกตความผิดปกติได้ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร DDT ตั้งแต่ความเข้มข้น 0.5 $\mu\text{g/L}$ ขึ้นไป และพบอัตราผิดปกติมากถึง 64.29% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$

ระยะ trochophore (สำรวจ ณ เวลา 7 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) พบว่าสาร DDT ทำให้ตัวอ่อนระยะ trochophore ผิดปกติเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 4-3B ไม่พบความผิดปกติในกลุ่มควบคุม แต่สามารถพบความผิดปกติได้ในทุกกลุ่มทดสอบ โดยความผิดปกติเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร DDT ที่ได้รับ และพบอัตราผิดปกติสูงถึง 72.22% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ โดยอาการผิดปกติที่พบได้มากคือ ตัวอ่อนมีการ velum ได้ช้า ทำให้ตัวอ่อนยังไม่เคลื่อนที่ และอาจพบตัวอ่อนที่มีรูปร่างผิดปกติไปจากกลุ่มควบคุม

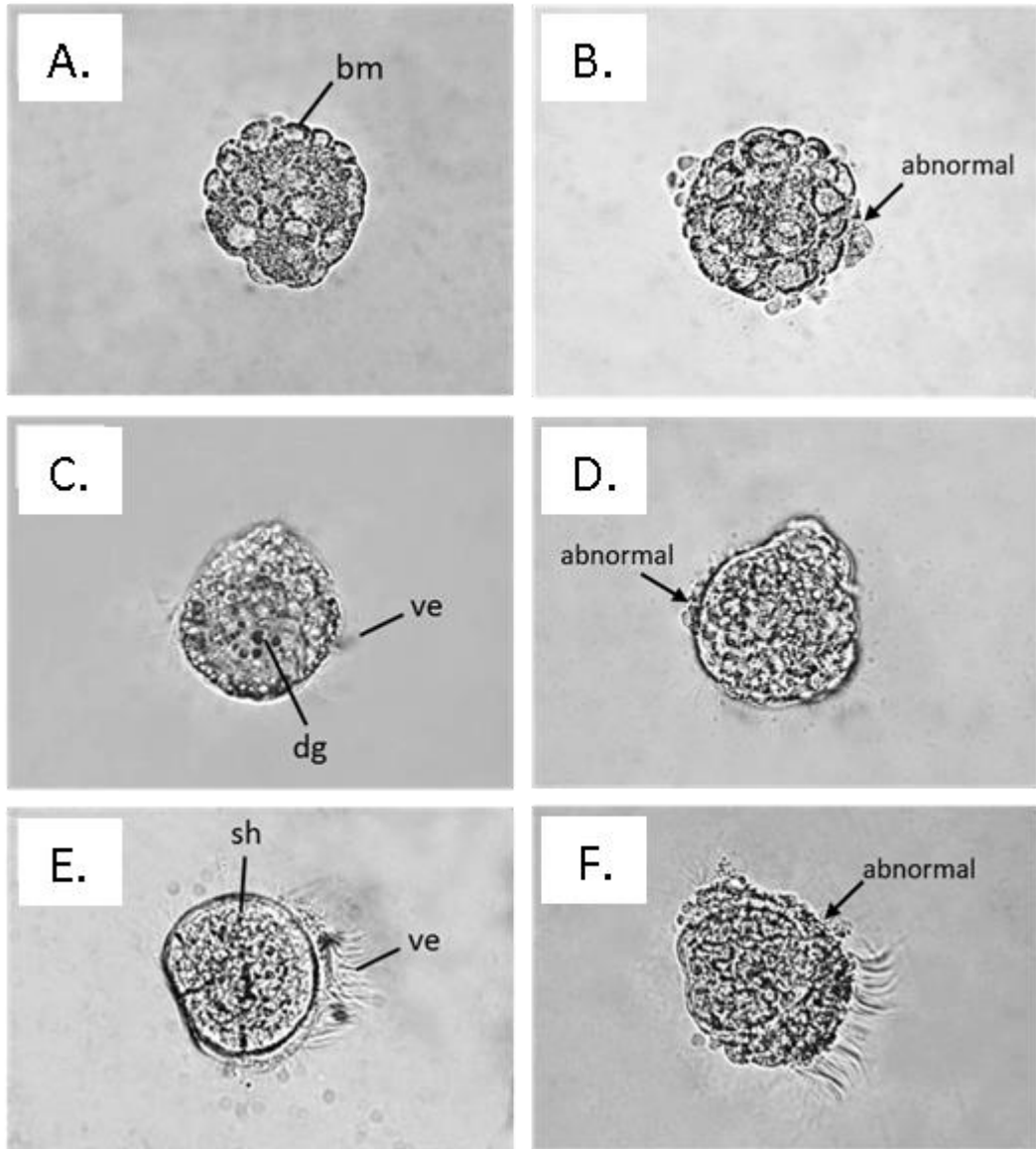
ระยะ D-shape veliger (สำรวจ ณ เวลา 18 ชั่วโมงหลังการปฏิสนธิ) พบว่าสาร DDT ทำให้ตัวอ่อนระยะ D-shape veliger ผิดปกติเพิ่มขึ้น ดังภาพที่ 4-3C ไม่พบความผิดปกติในกลุ่มควบคุม แต่สามารถพบความผิดปกติได้ในทุกกลุ่มทดสอบ โดยความผิดปกติเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร DDT ที่ได้รับ และพบอัตราผิดปกติสูงถึง 91.67% ในกลุ่มทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ โดยอาการผิดปกติที่พบได้มากคือ ตัวอ่อนมีการสร้างเปลือกมีการเจริญผิดรูปและสร้างเปลือกได้ช้ากว่ากลุ่มควบคุม



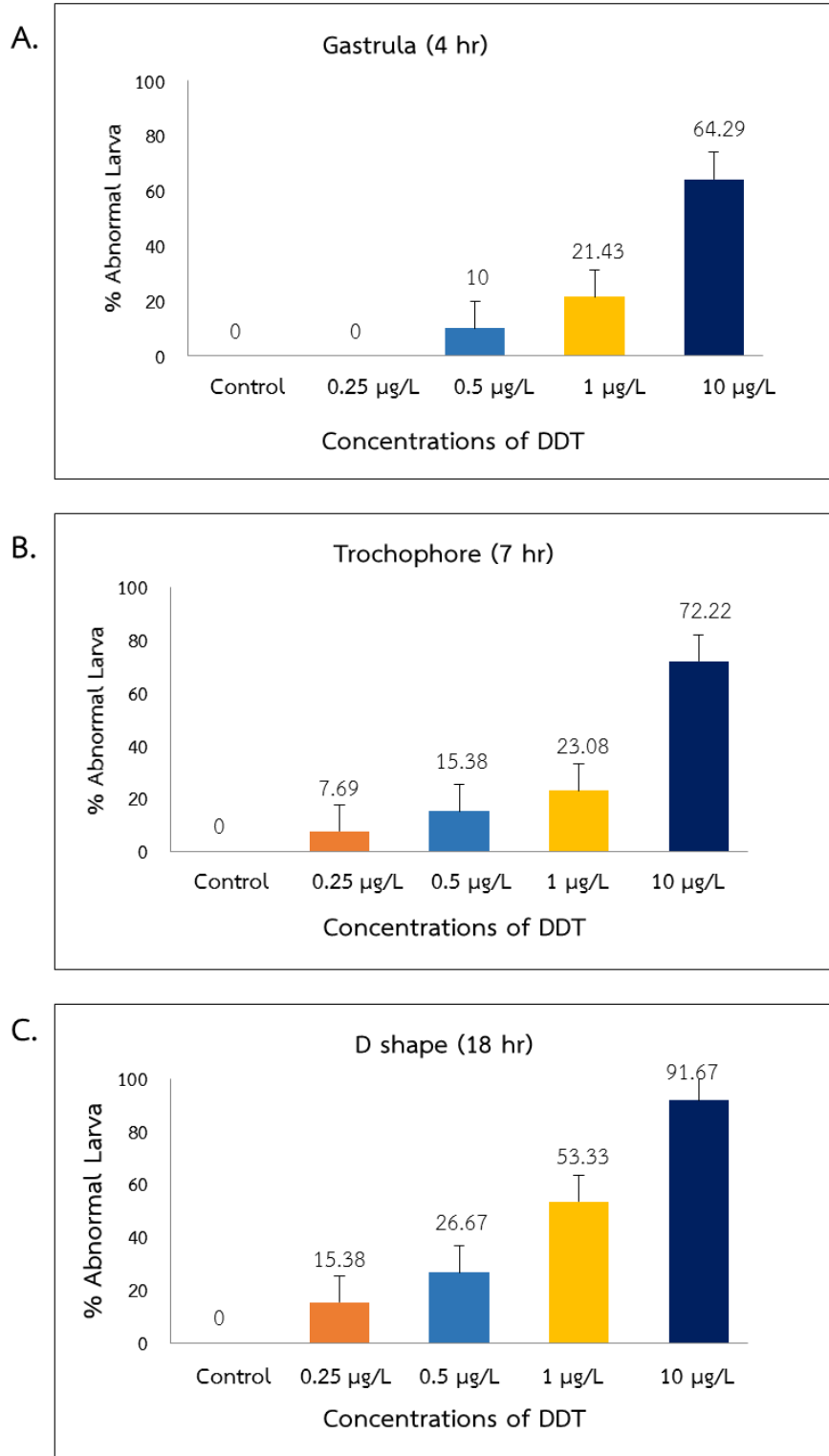
ภาพที่ 4-1 การปฏิสนธิของหอยนางรมปากจیب *Saccostrea cucullata*

A. ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง

B. ภาพถ่ายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงเมื่อย้อมเซลล์ด้วยสี Hoechst 33342 ซึ่งจะย้อมติดนิวเคลียสชัดเจน ทำให้สังเกตเห็น first polar bodr และ second polar body
สัญลักษณ์ pb=polar body



ภาพที่ 4-2 ชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ *Saccostrea cucullata* ปกติและผิดปกติเมื่อได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ
A. ระยะ gastrula ปกติ B. ระยะ gastrula ที่ผิดปกติ C. ระยะ trochophore ปกติ D. ระยะ trochophore ผิดปกติ E. ระยะ D-shape veliger ปกติ F. ระยะ D-shape veliger ผิดปกติ
สัญลักษณ์ ap=animal pole, vp=vegetal pole, bm=blastomere, dg=digestive glands, ve=velum, sh=shell



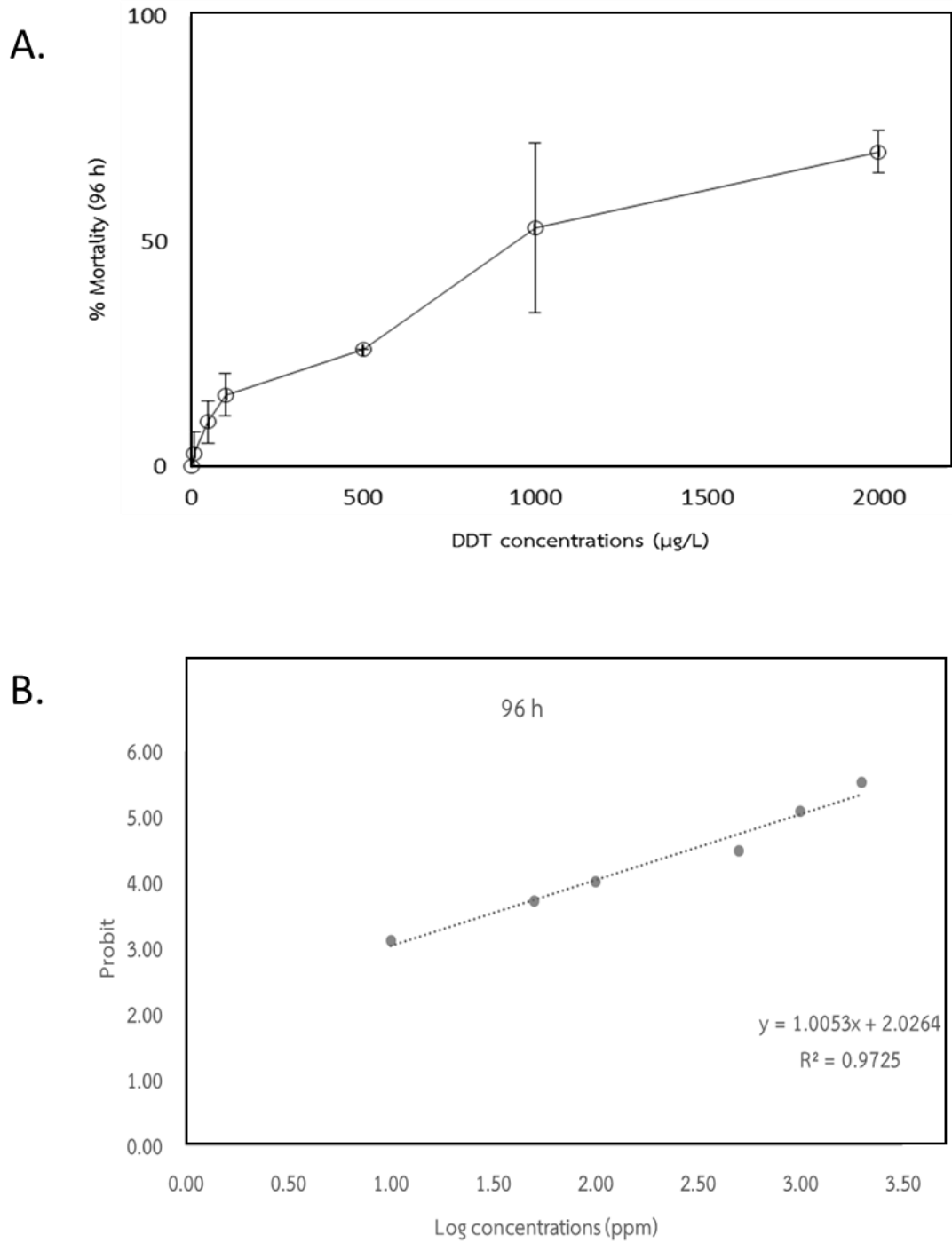
ภาพที่ 4-3 ผลกระทบของสาร DDT ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบในระยะต่างๆ

- A. ผลกระทบของสาร DDT ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในระยะ Gastrula
- B. ผลกระทบของสาร DDT ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในระยะ Trochophore
- C. ผลกระทบของสาร DDT ต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนในระยะ D-shape veliger

4.2 ผลกระทบของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจับตัวเต็มวัย

จากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร DDT ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจับตัวเต็มวัยขนาดประมาณ 5-7 เซนติเมตร มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 0, 10, 50, 100, 500, 1,000 และ 2,000 $\mu\text{g/L}$ โดยทำการเปลี่ยนน้ำและให้อาหารทุก 24 ชั่วโมง เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง จากนั้นบันทึกสถิติการตายสะสม (% Cumulative mortality) ที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่า ในกลุ่มควบคุมไม่พบอัตราการตายของหอยนางรมปากจับตลอดระยะเวลาที่ใช้ทดสอบและสามารถตอบสนองต่อสิ่งเร้าคือการสั่นสะเทือนจากการเคาะตู้กระจกที่ใช้เลี้ยงทดสอบได้เป็นอย่างดี โดยจะปิดเปลือกทันทีที่ผู้วิจัยเคาะกระจกตู้ สำหรับกลุ่มทดสอบพบว่า อัตราการตอบสนองต่อการเคาะกระจกจะลดลงและพบอัตราการตายของหอยนางรมซึ่งมีแนวโน้มเพิ่มสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นของสาร DDT ที่ใช้ทดสอบ (ภาพที่ 4-4A) และทันทีที่มีการใส่สารทดสอบในกลุ่มทดสอบจะพบว่าหอยนางรมมีการเปิดเปลือกทันที ซึ่งต่างจากกลุ่มควบคุมที่จะเปิดเปลือกเพื่อกรองกินแพลงก์ตอนที่ไหลไปเพื่อเป็นอาหารอาหาร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง แม้ว่าจะยังไม่พบการตายของหอยนางรมในทุกระดับความเข้มข้น แต่พบว่าหอยนางรมในกลุ่มทดสอบมีสาร DDT จะมีการตอบสนองต่อแรงสั่นสะเทือนลดลง มีการปิดเปลือกช้าลง โดยสามารถสังเกตเห็นชัดเจนในกลุ่มทดสอบที่มีความเข้มข้นของสาร DDT สูง ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป เริ่มพบอัตราการตายของหอยนางรม โดยพบว่าอัตราการตายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ DDT และระยะเวลาที่ทดสอบ ดังนี้ เมื่อทำการทดสอบครบ 96 ชั่วโมง พบอัตราการตายสะสมในแต่ละกลุ่มทดสอบดังนี้ ในกลุ่มทดสอบสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ พบว่าหอยนางรมปากจับมีอัตราการตายร้อยละ 3.33 ± 4.71 ในกลุ่มทดสอบสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 50 $\mu\text{g/L}$ พบว่าหอยนางรมปากจับมีอัตราการตายร้อยละ 10.00 ± 4.71 ในกลุ่มทดสอบสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ พบว่าหอยนางรมปากจับมีอัตราการตายร้อยละ 16.67 ± 4.71 ในกลุ่มทดสอบสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/L}$ พบว่าหอยนางรมปากจับมีอัตราการตายร้อยละ 26.67 ± 0.00 ในกลุ่มทดสอบสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/L}$ พบว่าหอยนางรมปากจับมีอัตราการตายร้อยละ 53.33 ± 18.86 ในกลุ่มทดสอบสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 2,000 $\mu\text{g/L}$ พบว่าหอยนางรมปากจับมีอัตราการตายร้อยละ 70.00 ± 4.71

ทำการวิเคราะห์หาค่า LC50 (50% lethal concentration) หรือค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้สัตว์ทดลองตายลงครึ่งหนึ่ง ด้วยสมการ Probit analysis ได้กราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่าง log ของความเข้มข้น (X) และ ค่า Probit (Y) ที่เวลา 96 ชั่วโมง (ภาพที่ 4-4B) สามารถคำนวณหาค่า LC50 ณ เวลา 96 ชั่วโมง ของสาร DDT จากสมการได้เท่ากับ 891.25 $\mu\text{g/L}$ ซึ่งหมายความว่า เมื่อหอยนางรมปากจับได้รับสัมผัสสารที่ระดับความเข้มข้น 891.25 $\mu\text{g/L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะทำให้หอยนางรมปากจับตายลงครึ่งหนึ่ง



ภาพที่ 4-4 ผลกระทบของสาร DDT ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیبตัวเต็มวัย
A. อัตราการตายของหอยนางรมปากจیبตัวเต็มวัยเมื่อทดสอบด้วยสาร DDT
B. การหาค่า LC50 โดยใช้สมการ Probit

4.3 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย

4.3.1 การศึกษาลักษณะเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب

เนื้อเยื่อแมนเทิล (mantle)

เนื้อเยื่อแมนเทิลเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่ปกคลุมตัวหอยทั้งหมด มีหน้าที่หลักในการสร้างเปลือกและมีกลไกในการสร้างเมือก (mucous cell) มาปกคลุมร่างกายเพื่อป้องกันตนเอง เมื่อถูกรบกวนจากสิ่งแวดล้อมภายนอกที่อาศัยอยู่ (defensive mechanism) จากการศึกษาเนื้อเยื่อโดยใช้เทคนิคมิวชันวิทยา พบว่าเนื้อเยื่อแมนเทิลประกอบด้วยเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียว ตั้งอยู่บนเยื่อฐาน มีโครงสร้างไม่ซับซ้อน พบกล้ามเนื้อหลอดเลือด และระบบประสาท ใต้เยื่อฐานพบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันซึ่งเป็นเซลล์ขนาดใหญ่ซึ่งมีช่องว่างเป็นแอ่งเลือดขนาดเล็ก (blood sinus) กระจายอยู่ทั่วไป ดังแสดงในภาพที่ 4-2 แมนเทิลมีหน้าที่หลักในการสร้างเปลือกและช่วยในการสร้าง Ligament นอกจากนี้ยังมีบทบาทสำคัญอื่น ๆ เช่น เป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการรับสัมผัส ทำงานร่วมกับระบบประสาทเพื่อช่วยในการปล่อยและกระจายเซลล์สืบพันธุ์ในช่วงฤดูผสมพันธุ์ มีส่วนช่วยในการหายใจโดยมีการแลกเปลี่ยนแก๊สระหว่างผิวหน้าของอวัยวะกับน้ำรอบ ๆ รวมถึงยังทำหน้าที่ในการเก็บสะสมสาร ได้แก่ โกลโคเจน และลิพิด เป็นต้น (Galtsoff, 1964)

พบว่าตัวอย่างหอยนางรมปากจیبที่ได้รับสาร DDT พบเซลล์สร้างเมือก (Mucous cell) จำนวนมากบริเวณเยื่อบุผิว (Epithelium) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การที่หอยนางรมมีการสร้างเมือกออกมาสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของจำนวน Mucocytes ตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นไปด้วย สามารถอธิบายได้ว่าในสภาวะที่หอยนางรมเกิดความเครียดจากการได้รับสารเคมี จะตอบสนองโดยการหลั่งเมือกออกมาเป็นจำนวนมากเพื่อป้องกันตัวเอง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Werner et al. (2004) ที่ทำการศึกษในหอยสองฝา (*Crenomytilus grayanus*) แสดงให้เห็นถึงความผิดปกติในหอยที่ได้รับการปนเปื้อนจาก DDT พบเซลล์สร้างเมือก (Mucous cell) กระจายอยู่ทั่วบริเวณเยื่อบุผิว พบเซลล์มีลักษณะที่คล้ายกันทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสาร DDT แต่มีจำนวนเซลล์สร้างเมือกเพิ่มมากขึ้นตามความเข้มข้นของสารที่เพิ่มขึ้น

เนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหาร (digestive gland)

ต่อมย่อยอาหารเป็นอวัยวะที่แทรกอยู่ในบริเวณเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน อยู่ล้อมรอบระหว่างกระเพาะอาหารและเนื้อเยื่อชั้นแมนเทิล โครงสร้างของต่อมย่อยอาหารจะประกอบด้วย ท่อแขนงขนาดเล็กที่แตกแขนงออกไป บริเวณปลายท่อต้นมีลักษณะเป็นกระเปาะ เรียกว่า digestive diverticulum หอยนางรมจัดเป็นสิ่งมีชีวิตที่มีการย่อยภายในเซลล์ (intracellular digestion) โดยจะทำหน้าที่สร้างน้ำย่อยเพื่อย่อยอาหารที่เข้าสู่กระเพาะอาหาร ต่อมย่อยอาหารจะแทรกอยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันโดยบริเวณปลายท่อจะมีลักษณะกลมตันคล้ายกระเปาะหรือถุง เรียกว่า digestive diverticulum (Galtsoff, 1964) ภายในถุงมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อบุผิวชั้นเดียวมีเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบ 2 แบบ ได้แก่ เซลล์ย่อยอาหาร (digestive cell) มีลักษณะเซลล์รูปทรงกระบอกสูง โดยจะพบนิวเคลียสที่บริเวณฐานของเซลล์ และเซลล์แบโซฟิลิก (basophilic cell) หรือเซลล์คริปท์ (crypt cell) เป็นเซลล์ที่มีลักษณะทรงเตี้ย โดยพบนิวเคลียสย้อมติดสีเบสหรือสีฮีมาทอกซิลิน ที่มีลักษณะเข้มกว่าเนื้อเยื่อบริเวณอื่น ๆ โดยกลุ่มเซลล์จะรวมตัวกันอยู่บนเยื่อฐาน (basement membrane) ดังแสดงในภาพที่ 4-6A

จากการศึกษาผลกระทบของสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจیب พบว่า DDT ส่งผลกระทบต่อหอยนางรมผ่านการอักเสบและการตายของเนื้อเยื่อ โดย

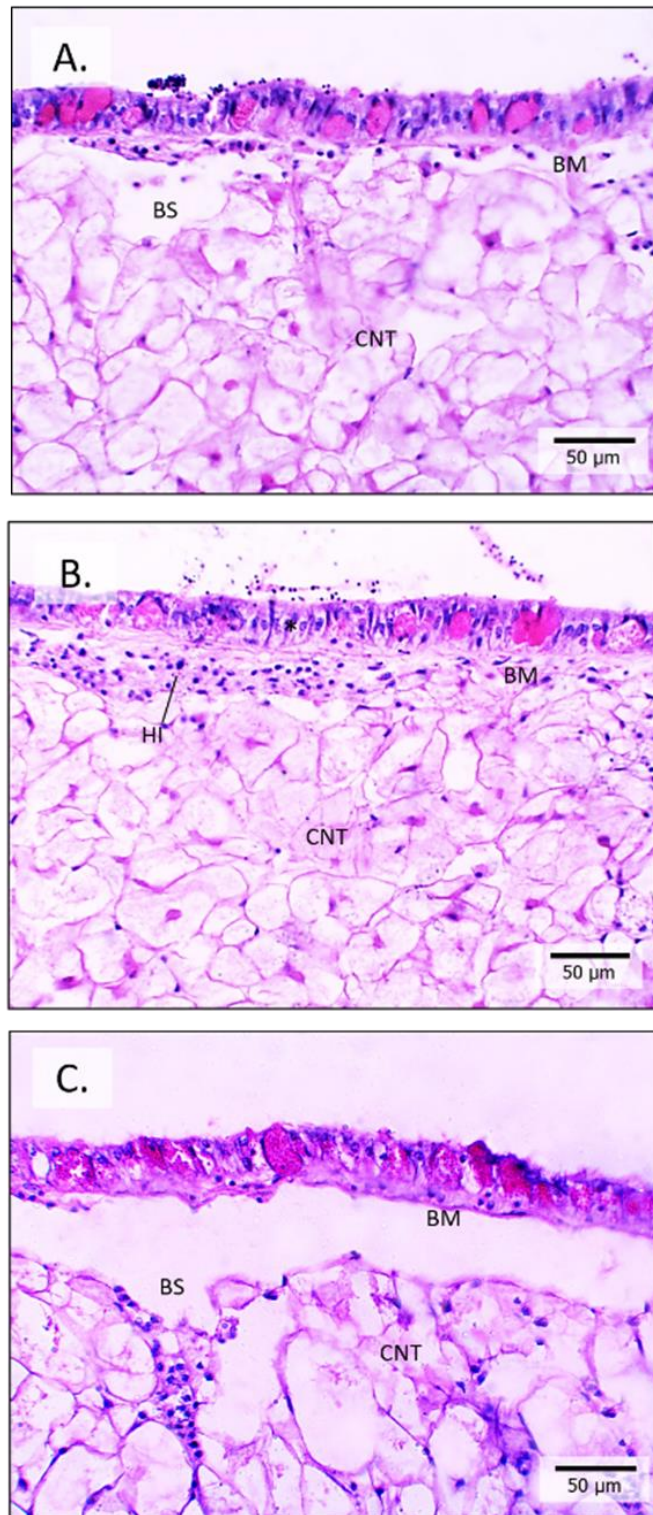
พบว่าความรุนแรงต่อเนื้อเยื่อจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของ DDT ที่ใช้ในการทดสอบ โดยในกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสาร DDT ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบเซลล์เยื่อบุผิวภายในท่อ digestive diverticulum บางลงจนนิวเคลียสชิดกับขอบของท่อ เกิดเป็นพื้นที่ว่างขนาดใหญ่กลางท่อ และพบ basophilic cell มีจำนวนเพิ่มขึ้นอย่างมาก ซึ่งลักษณะดังกล่าวนี้ สามารถบ่งชี้ถึงความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับระบบการสร้างเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยอาหารของหอยนางรมที่ได้รับสาร DDT โดยระดับความผิดปกติจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร

ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Usheva et al. (2006) ที่ทำการศึกษาในหอยสองฝา (*Crenomytilus grayanus*) ที่ได้รับสาร DDT ส่งผลให้เนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารได้รับผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์เยื่อบุผิวที่พบใน digestive diverticulum ของต่อมย่อยอาหารเกิดการอักเสบทำให้ความสูงของเยื่อบุผิวลดลง เนื่องจากเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเยื่อบุผิวบริเวณต่อมย่อยอาหารบางลง ทำให้เห็นบริเวณ lumen ภายในท่อมีขนาดที่กว้างขึ้น หอยนางรมที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ในระดับความเข้มข้นสูง สามารถสังเกตเห็นลักษณะของเยื่อบุผิวที่บางลงอย่างเห็นได้ชัด จนไม่สามารถเห็นลักษณะของแฉกที่บริเวณกลางท่อ

เนื้อเยื่อเหงือก (gill)

หอยนางรมปากจีบมีโครงสร้างเหงือกแบบ Pseudolamellibranch ประกอบด้วยแผ่นเหงือกจำนวน 4 แผ่น เชื่อมติดกับแมนเทิล โดยเหงือกของหอยนางรมมีหน้าที่หลักคือแลกเปลี่ยนก๊าซ (gas exchange) ระหว่างระบบหมุนเวียนเลือดภายในร่างกายกับน้ำบริเวณรอบ ๆ ที่มาไหลเวียนเข้ามายังเหงือก นอกจากนี้เหงือกยังมีหน้าที่สำคัญอื่น ๆ อีกหลายประการได้แก่ ทำหน้าที่ควบคุมการไหลของน้ำภายในตัวหอยนางรม ซึ่งจะช่วยกรองอาหารที่ติดมากับน้ำเพื่อส่งต่อไปยังแผ่นปากก่อนจะถูกส่งเข้าสู่ปาก ซึ่งจะช่วยในการกระจายเซลล์สืบพันธุ์ในขณะที่มีการปล่อยเซลล์สืบพันธุ์ออกจากร่างกาย

จากการศึกษาผลกระทบของสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบ พบว่า DDT ส่งผลกระทบต่อหอยนางรมกลุ่มที่ได้รับการสัมผัสสาร DDT ที่ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เกิดการกระตุ้นให้เกิดเซลล์สร้างเมือก (Mucous cell) เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 96 ชั่วโมง โดยจำนวนของเซลล์สร้างเมือกจะเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร

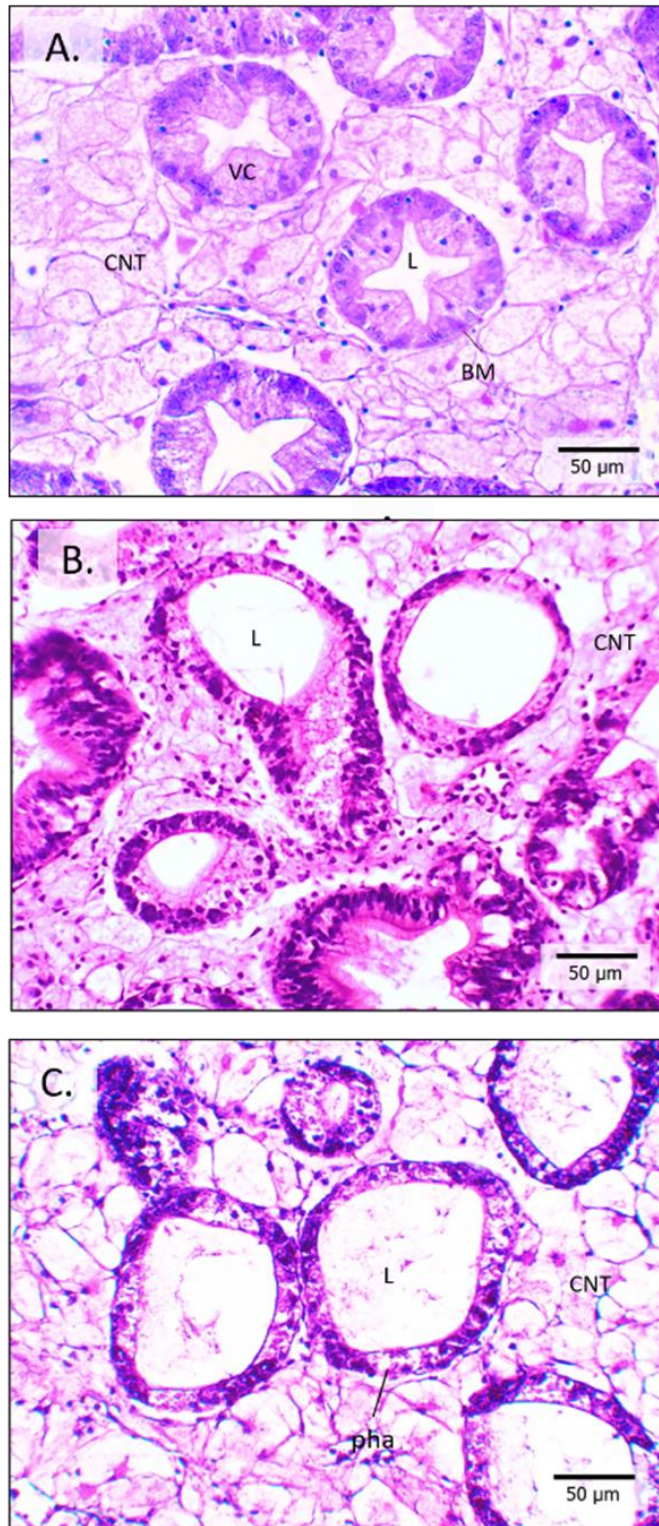


ภาพที่ 4-5 ผลกระทบของสาร DDT ต่อเนื้อเยื่อเยื่อเมือกของหอยนางรมปากจีบ

A. กลุ่มควบคุม (0 µg/L)

B. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L

C. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L

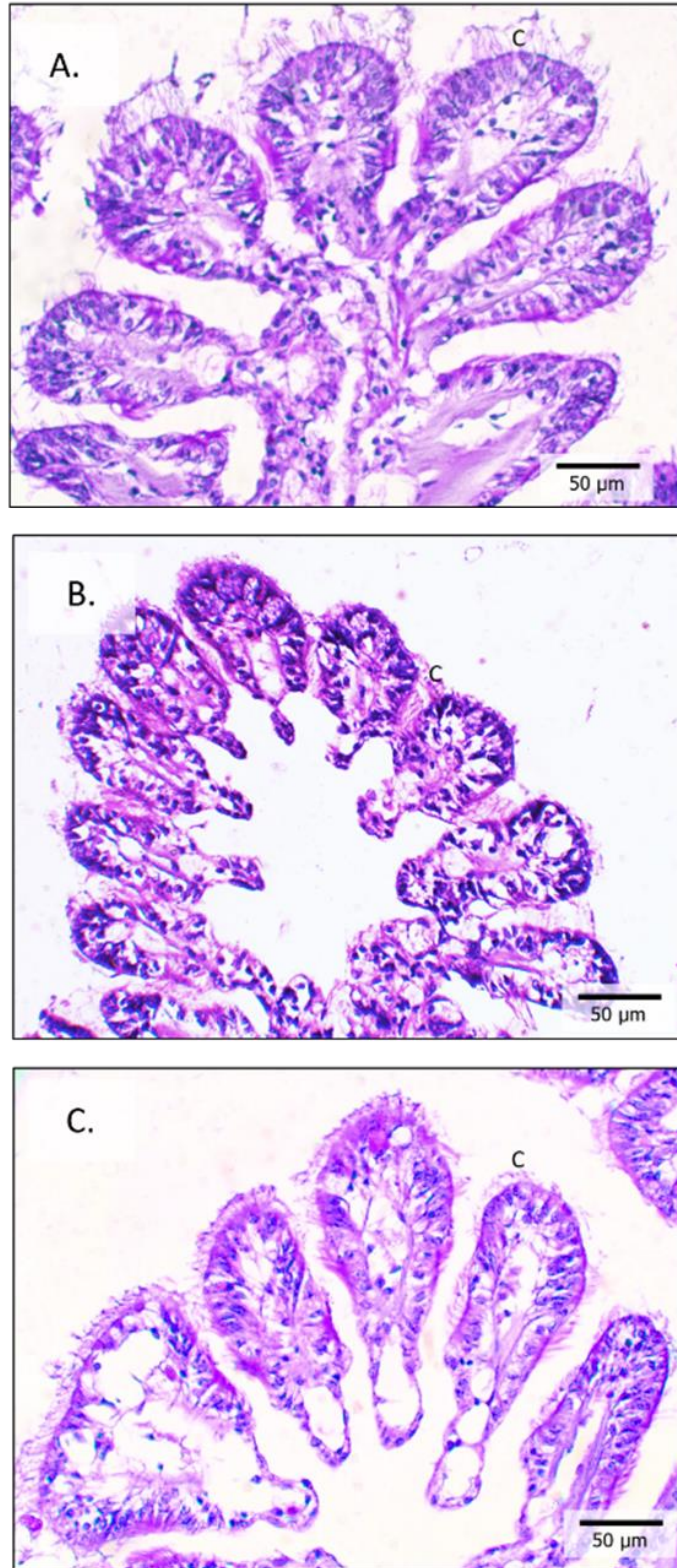


ภาพที่ 4-6 ผลกระทบของสาร DDT ต่อเนื้อเยื่อ digestive glands ของทอยนางรมปากจืบ

A. กลุ่มควบคุม (0 µg/L)

B. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L

C. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L



ภาพที่ 4-7 ผลกระทบของสาร DDT ต่อเนื้อเยื่อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ

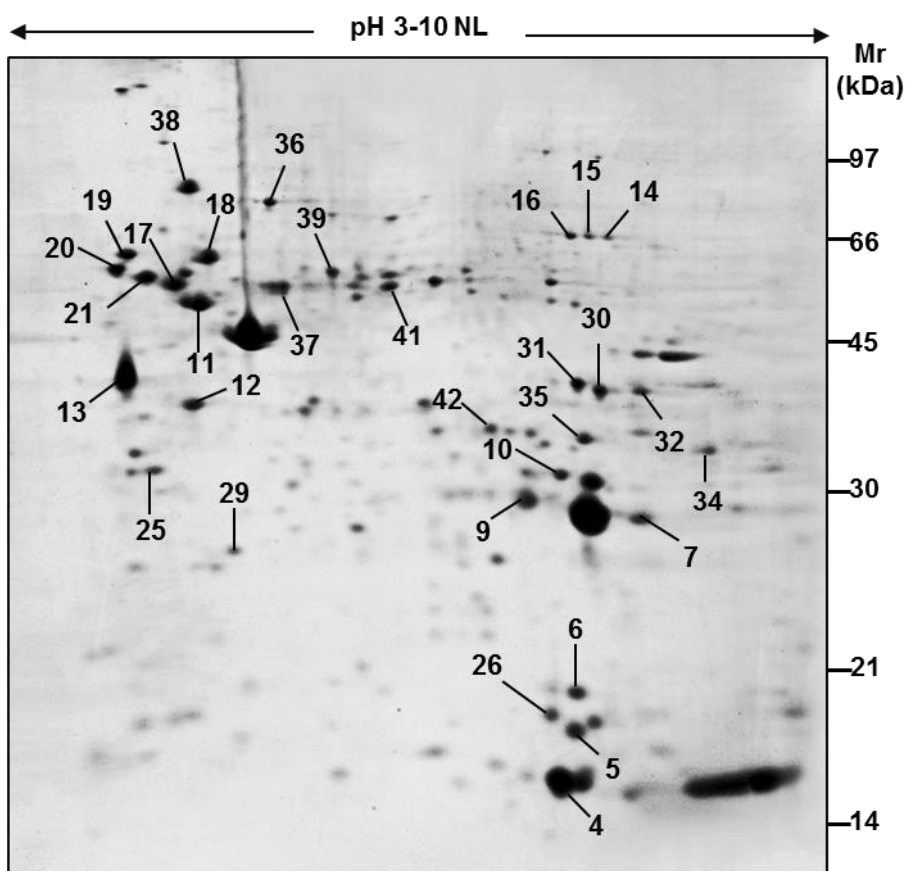
A. กลุ่มควบคุม (0 µg/L)

B. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L

C. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L

4.4 การวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบ

การวิเคราะห์โปรตีนในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบในครั้งนี้ ทำการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อแมนเทิล และแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแบบเจลสองมิติ (2D-gel electrophoresis) เมื่อย้อมด้วยสี Coomassie Blue แล้วใช้โปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) สามารถระบุ protein spot ได้ประมาณ 300 จุด ได้ผลดังภาพที่ 4-8 จากนั้นทำการตัด protein spot ตามภาพที่ 4-8 เพื่อระบุชนิดของโปรตีน ให้ได้โปรตีน โดยใช้เทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) จะได้ข้อมูล MS/MS ของเปปไทด์แต่ละชิ้น และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ทำให้ทราบว่าเปปไทด์นี้เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนชนิดใด ผลการระบุชนิดของโปรตีนพบว่าสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 31 ชนิด ดังรายละเอียดในตารางที่ 4-1



ภาพที่ 4-8 Proteome reference map of oyster mantle in *Saccostrea cucullata*. Total proteins 100 µg were separated on a 2-D gel. Protein was focused in the first dimension in a IEF strip pH3-10N. Focused strip was further separated in a 12.5% PAGE. Numbers are given for spot pick up and protein identification.

ตารางที่ 4-1 การระบุชนิดของโปรตีนจาก protein spot ในภาพที่ 4-8 โดย LC-MS/MS

Spot No.	AC	MW	Protein names	Score	Peptide	%coverage
4	P18982	15940	Hemoglobin subunit beta	79	1	8%
5	B0R061	110276	SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box	73	1	1%
6	P48155	20950	40S ribosomal protein S7	58	1	5%
7	Q91191	21963	Peroxiredoxin	65	1	5%
9	P51373	29070	Uncharacterized protein ycf23	47	2	4%
10	Q3V4T7	27772	Putative integrase ORF241	58	2	3%
11	P41339	41748	Actin, acrosomal process isoform	67	1	2%
12	P53470	41705	Actin1	399	21	34%
13	Q25145	32753	Tropomyosin	194	8	11%
14	P17336	57113	Catalase	147	6	7%
15	P17336	57113	Catalase	168	8	7%
16	P17336	57113	Catalase	57	2	7%
17	P02554	49829	Tubulin beta chain	63	3	8%
18	P18288	49962	Tubulin alpha 3 chain	180	29	17%
19	Q13748	49928	Tubulin alpha 3C/D chain	78	2	4%
20	A8L3W5	52349	ATP synthase subunit beta	60	1	2%
21	Q3MHM5	49799	Tubulin beta 4 B chain	132	13	19%
25	P41339	41765	Actin	57	2	6%
26	Q9CL00	18978	Uncharacterized protein PM1449	37	1	12%
29	P07836	41849	Actin, muscletype A1	73	3	10%
30	O15990	39077	Arginine kinase	262	6	5%
31	P04083	38690	Annexin A1	179	5	100%
32	B5DGM7	39531	Fructose-bisphosphate aldolase Aaldolase	208	8	4%
34	P68002	31600	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2	88	1	3%
35	O42248	35101	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1	55	1	2%
36	P47773	71296	Heat shock cognate 71 kDa protein	623	23	14%
37	O18480	53049	Dihydrolipoyl dehydrogenase	58	1	3%
38	Q16956	73653	Chaperone protein DnaK	264	4	5%
39	P48644	54771	Retinal dehydrogenase 1	118	5	5%
41	Q27640	54125	Aldehyde dehydrogenase	44	1	1%
42	Q9FBX1	30386	Putative S-adenosyl-L-methionine-dependent methyltransferase SCO7813	33	1	6%

4.5 ผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب

การศึกษาพิษวิทยาในระดับโมเลกุลและกลไกการทำงานของเซลล์ในระดับโปรตีน โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ ซึ่งจะทำให้การแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแบบเจลสองมิติ (2D-gel electrophoresis) มาศึกษาเกี่ยวกับการแสดงออกของโปรตีนที่เปลี่ยนแปลงไปเมื่อหอยนางรมปากจیبได้รับสาร DDT ผลการศึกษาโปรตีนในหอยนางรมปากจیب ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ โดยใช้วิธีการแยกโปรตีนแบบสองมิติ สามารถแยกโปรตีนจากเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสาร DDT และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร DDT ที่ความเข้มข้น 10 และ 100 $\mu\text{g/L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ได้ดังภาพที่ 4-9 ซึ่งแสดงภาพเจลในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 4-9A-B) กลุ่มทดสอบที่ความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ (ภาพที่ 4-9C-D) และ กลุ่มทดสอบที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ (ภาพที่ 4-9E-F) กลุ่มละ 2 เจล

เมื่อทำการวิเคราะห์เพื่อเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนในแต่ละจุด (protein spot) บนเจล โดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพเจล ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) หลังจากกระบวนการ normalization เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่เกิดจากความเข้มพื้นหลังของแผ่นเจลแล้ว สามารถระบุจุดโปรตีนบนเจลของแต่ละกลุ่มได้ใกล้เคียงกันคือประมาณประมาณ 300 จุด (ภาพที่ 4-10) เมื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนบนแผ่นเจลสองมิติในแต่ละกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยใช้ค่าเฉลี่ยของปริมาณโปรตีน ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง พบว่าสามารถระบุจุดโปรตีนที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (diferential protein) ทั้งหมด 49 จุด ($P < 0.05$) ผู้วิจัยได้ทำการตัด protein spot ทั้ง 49 จุด จากแผ่นเจลแล้วนำมาย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Promega™ Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega™ V5111) เพื่อทำการระบุชนิดของโปรตีน ในการศึกษาครั้งนี้ใช้เทคนิค liquid chromatography-mass spectrometry (LC-MS/MS) จะได้ข้อมูล MS/MS ของเปปไทด์แต่ละชิ้น และเมื่อนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI ทำให้ทราบว่าเปปไทด์นี้เป็นส่วนหนึ่งของโปรตีนชนิดใด ผลการระบุชนิดของโปรตีนพบว่าสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ทั้งหมด 25 ชนิด ดังภาพที่ 4-11 และตารางที่ 4-2 ซึ่งสามารถแบ่งรูปแบบการตอบสนองของโปรตีนต่อสารทดสอบที่ดีที่ออกเป็น 2 รูปแบบ ได้แก่

รูปแบบที่ 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 18 จุด

รูปแบบที่ 2 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 7 จุด

เมื่อทำการวิเคราะห์หน้าที่ของ diferentila protein แล้ว สามารถจัดกลุ่มโปรตีนออกเป็น 6 กลุ่มตามหน้าที่ ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Cytoskeleton

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) ได้แก่ tubulin beta chain (spot # 17) tubulin alpha 3 chain (spot # 18) tubulin alpha 3C/D chain (spot # 19) และ tubulin beta 4 B chain (spot # 21) และโปรตีนกลุ่ม actin ได้แก่ actin (spot # 25) และ actin, muscletype A1 (spot # 29)

โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein) ได้แก่ actin (Fragment) (spot # 11) และ tropomyosin (spot # 13)

กลุ่มที่ 2 Stress response

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) ได้แก่ catalase (spot # 14, 15 และ 16), annexin A1 (spot # 31), และ aldehyde dehydrogenase (spot # 36)

โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein) ได้แก่ Fructose-bisphosphate aldolase A (spot # 32) Heat shock cognate 71 kDa protein (spot # 36) Chaperone protein DnaK (spot # 38) และ Retinal dehydrogenase 1 (spot # 39)

กลุ่มที่ 3 Protein synthesis

โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein) ได้แก่ 40S ribosomal protein S7 (spot # 6)

กลุ่มที่ 4 Energy metabolism

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (*Dose-dependent up-regulated*) ได้แก่ SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A (spot # 5) และ ATP synthase subunit beta (spot # 20)

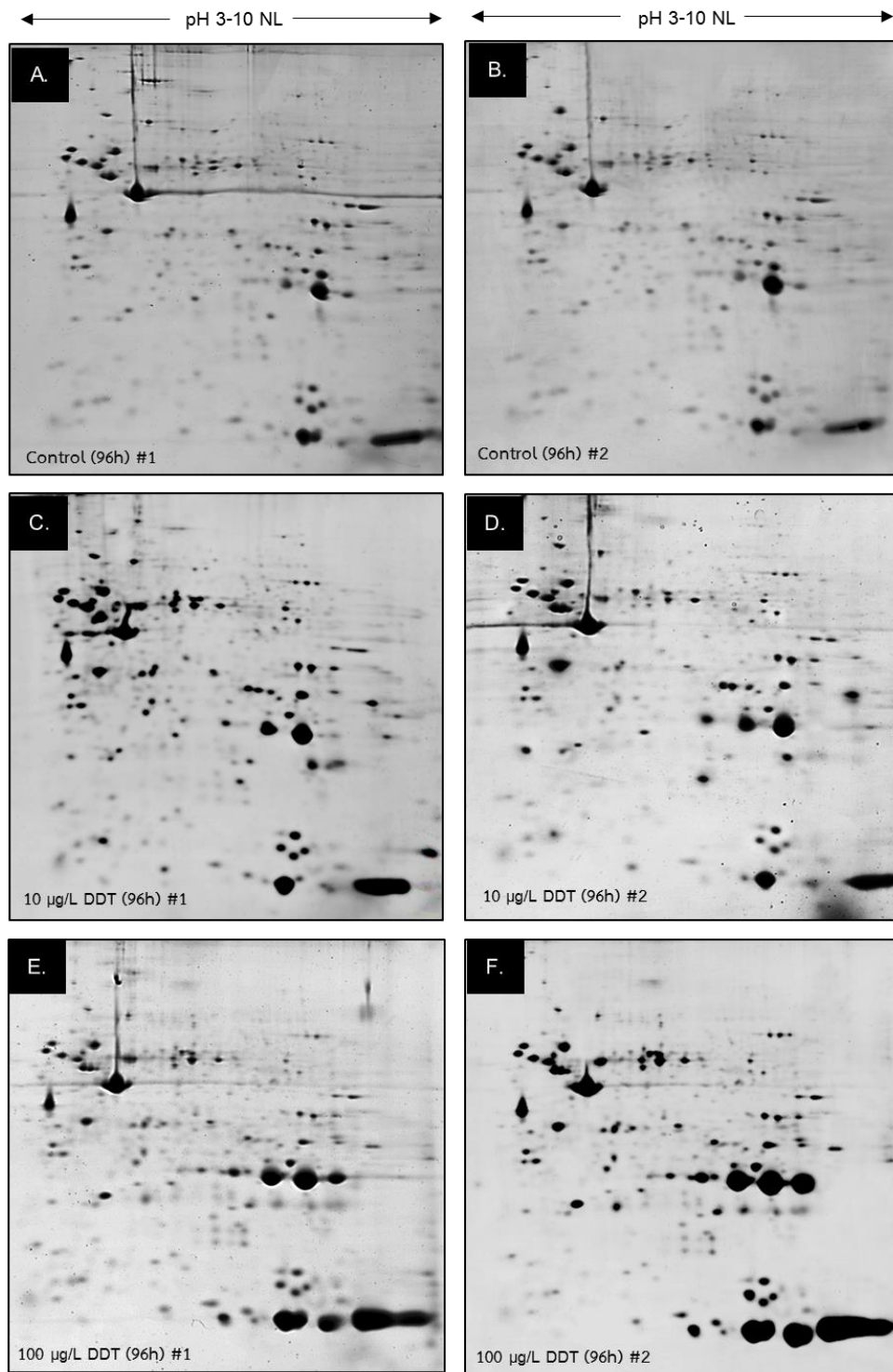
กลุ่มที่ 5 Ion transport

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) ได้แก่ voltage-dependent anion-selective channel protein 2 หรือ VDAC-2 (spot # 34) และ guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1) (spot # 35)

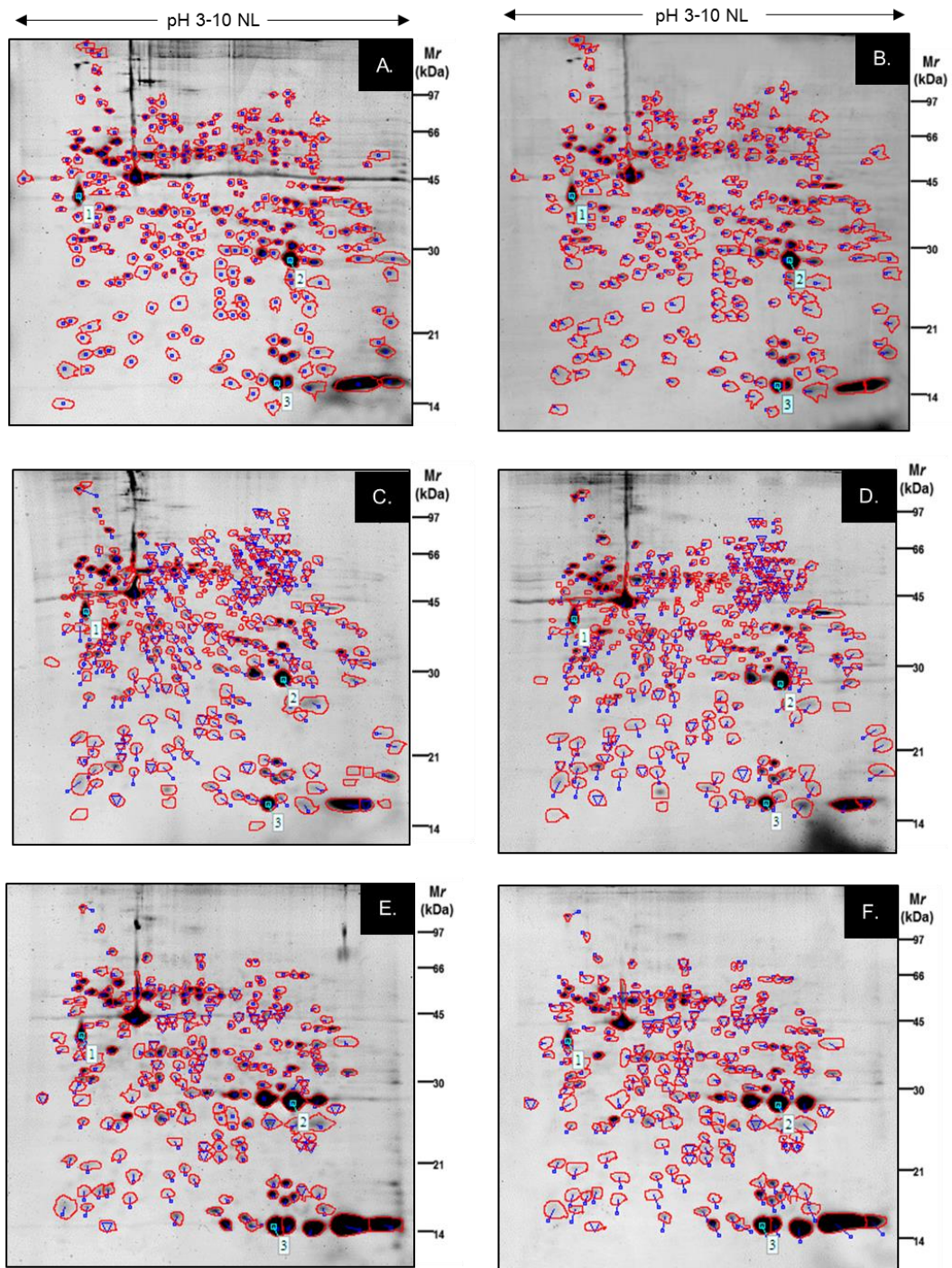
กลุ่มที่ 6 Gas exchange

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) ได้แก่ Hemoglobin subunit beta (spot # 4)

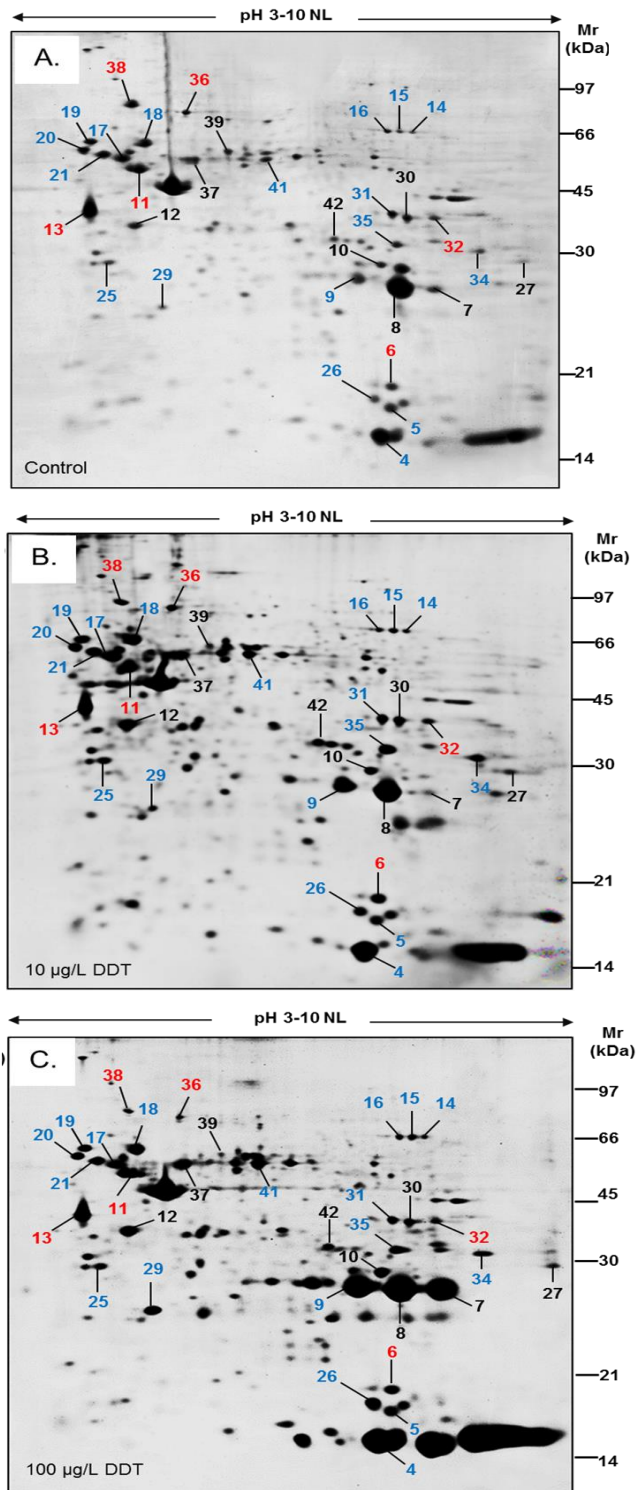
ผลการวิเคราะห์แผ่นเจล 2D-PAGE ภาพที่ 4-11 เพื่อแสดงโปรตีนชนิด Dose-dependent up-regulated protein (แสดงโดยลูกศรสีน้ำเงินในภาพที่ 4-11) และ Dose-dependent down-regulated protein (แสดงโดยลูกศรสีแดงในภาพที่ 4-11) นอกจากนี้แล้วยังพบว่าโปรตีนบางจุดมีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ทิศทางหรือรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารทดสอบ หรือมีปริมาณขึ้น ๆ ลง ๆ เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น โปรตีนกลุ่มนี้อาจเรียกได้ว่าเป็นกลุ่ม fluctuated protein (แสดงโดยลูกศรสีดำในภาพที่ 4-11)



ภาพที่ 4-9 ผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีโอมของเนื้อเยื่อแมนเทิลหอยนางรมปากจีบ
A-B. กลุ่มควบคุม (0 µg/L)
C-D. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L
E-F. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L



ภาพที่ 4-10 การวิเคราะห์ภาพถ่าย 2D-PAGE เพื่อเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนด้วย ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden)
A-B. กลุ่มควบคุม (0 µg/L)
C-D. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L
E-F. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L



ภาพที่ 4-11 โปรตีนที่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ลูกศรสีน้ำเงิน หมายถึง Dose-dependent up-regulated protein, ลูกศรสีแดง หมายถึง Dose-dependent down-regulated protein, ลูกศรสีดำ หมายถึง Fluctuated protein
A. กลุ่มควบคุม (0 µg/L)
B. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L
C. กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L

ตารางที่ 4-2 การระบุชนิดของ differential protein (P<0.05) ด้วย LC-MS/MS

#	Ac. No.	Protein names	Function	Fold change	p-Value
1. Cytoskeleton					
↑ Up-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
17	P02554	Tubulin beta chain	Microtubule-based movement	1/1.15/1.40	0.01
18	P18288	Tubulin alpha 3 chain	Microtubule-based movement	1/1.02/1.23	0.03
19	Q13748	Tubulin alpha 3C/D chain	Microtubule-based movement	1/1.02/1.23	0.01
21	Q3MHM5	Tubulin beta 4 B chain	Microtubule-based movement	1/1.15/1.40	0.03
25	P41339	Actin	Cellular structure and support	1/1.08/1.34	2.43E-04
29	P07836	Actin, muscle type A1	Chromosome movement and muscle contraction	1/1.53/3.16	0.02
↓ Down-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
11	P26183	Actin (Fragment)	cytoskeleton	1/0.86/0.37	0.02
13	Q25145	Tropomyosin	Muscle contraction	1/0.78/0.44	0.004
2. Stress response					
↑ Up-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
14	P17336	Catalase	Protect cells from the toxic effects of from oxidative damage	1/1.13/1.22	0.05
15	P17336	Catalase	Protect cells from the toxic effects of from oxidative damage	1/1.92/1.93	0.03
16	P17336	Catalase	Protect cells from the toxic effects of from oxidative damage	1/1.07/1.67	0.02
31	P04083	Annexin A1	Adaptive immune response	1/2.21/2.50	0.01
41	Q27640	Aldehyde dehydrogenase	Detoxification of generated aldehydes	1/1.14/1.32	0.05
↓ Down-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
32	B5DGM7	Fructose-bisphosphate aldolase A	Oxidative damage of the glycolytic enzymes	1/0.76/0.58	0.03
36	P47773	Heat shock cognate 71 kDa protein	Stress response	1/0.67/0.63	0.01
38	Q16956	Chaperone protein DnaK	heat shock protein binding	1/0.92/0.44	0.04
39	P48644	Retinal dehydrogenase 1	Oxidation-reduction process	1/0.75/0.33	1.54E-04

ตารางที่ 4-2 การระบุชนิดของ differential protein (P<0.05) ด้วย LC-MS/MS (ต่อ)

#	Ac. No.	Protein names	Function	Fold change	p-Value
3. Protein synthesis					
↓ Down-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
6	P48155	40S ribosomal protein S7	Ribosomal protein	1/0.86/0.61	0.02
Energy metabolism					
↑ Up-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
5	B0R061	SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A	ATP-dependent chromatin remodeling	1/1.14/2.87	0.01
20	A8L3W5	ATP synthase subunit beta	ATP binding	1/2.42/3.61	0.01
4. Gas exchange					
↑ Up-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
4	P18982	Hemoglobin subunit beta	Heme binding	1/1.55/1.68	0.03
5. Ion transport					
↑ Up-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
34	P68002	Voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2)	The anion transport activity	1/1.15/1.25	0.003
35	O42248	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1)	Receptor of activated protein kinase C	1/1.26/1.62	0.03
6. Others					
↑ Up-regulated protein in dose-dependent of DDT exposed oyster					
9	P51373	Uncharacterized protein ycf23	unknown	1/1.99/5.98	2.27E-04
26	Q9CL00	Uncharacterized protein PM1449	unknown	1/1.06/1.18	0.02

4.6 การหาตัวชี้วัดชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีทีในหอยนางรมปากจیب

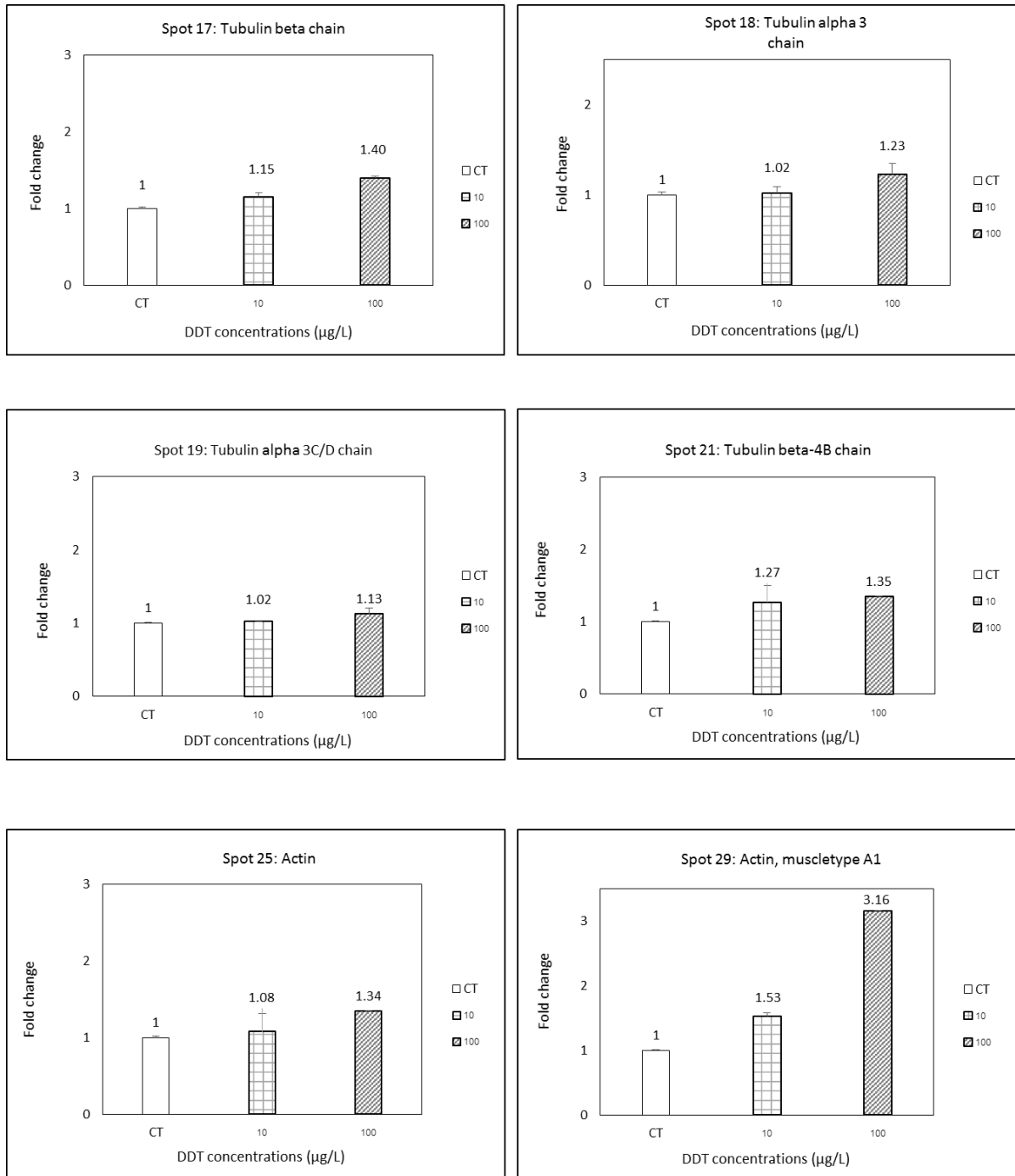
เนื่องจากการศึกษาครั้งนี้ทางผู้วิจัย สนใจที่จะศึกษากลุ่มโปรตีนที่มีแนวโน้มนำมาใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร DDT ในสิ่งแวดล้อม โดยใช้หอยนางรมปากจیبเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ซึ่งจะต้องเป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นและยับยั้งเมื่อได้รับความเข้มข้นของสาร DDT ที่เพิ่มขึ้น โปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และที่มีแนวโน้มการแสดงออกของโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารดีดีทีทั้งสิ้น 25 จุดโดยใช้เกณฑ์ตามหัวข้อที่ 4.5 พบว่าโปรตีนกลุ่มที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร DDT ในสิ่งแวดล้อม มี 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 18 จุด ดังภาพที่ 14-2

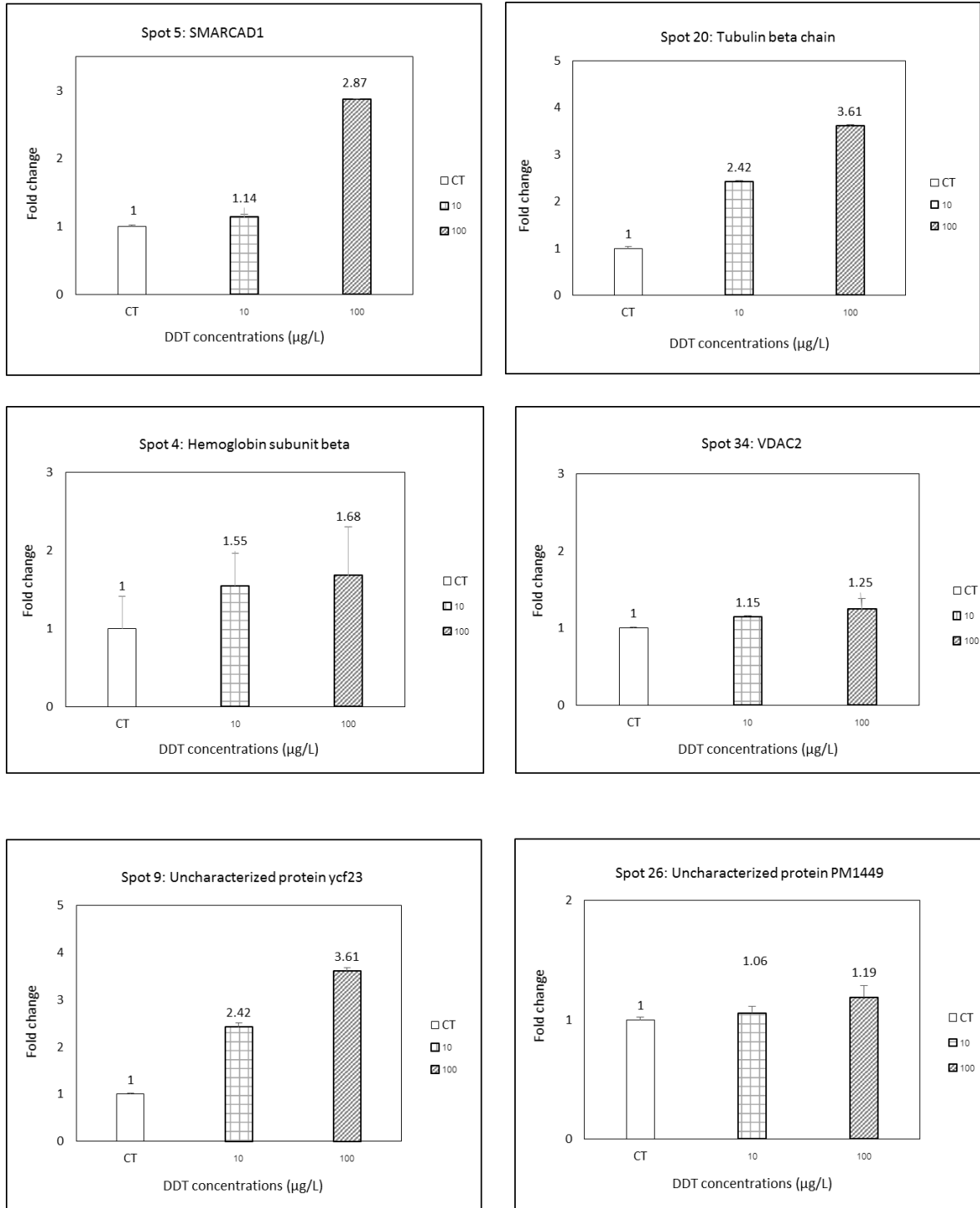
กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผกผันตามความเข้มข้นของสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 7 จุด ดังภาพที่ 14-3

ซึ่งโปรตีนดังกล่าวแสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนคิดเป็นจำนวน fold change ระหว่าง กลุ่มทดสอบดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ กลุ่มทดสอบดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ เปรียบเทียบกับ กลุ่มควบคุม (0 $\mu\text{g/L}$) โดยใช้ค่า %s spot volume ที่อ่านได้จากโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden)

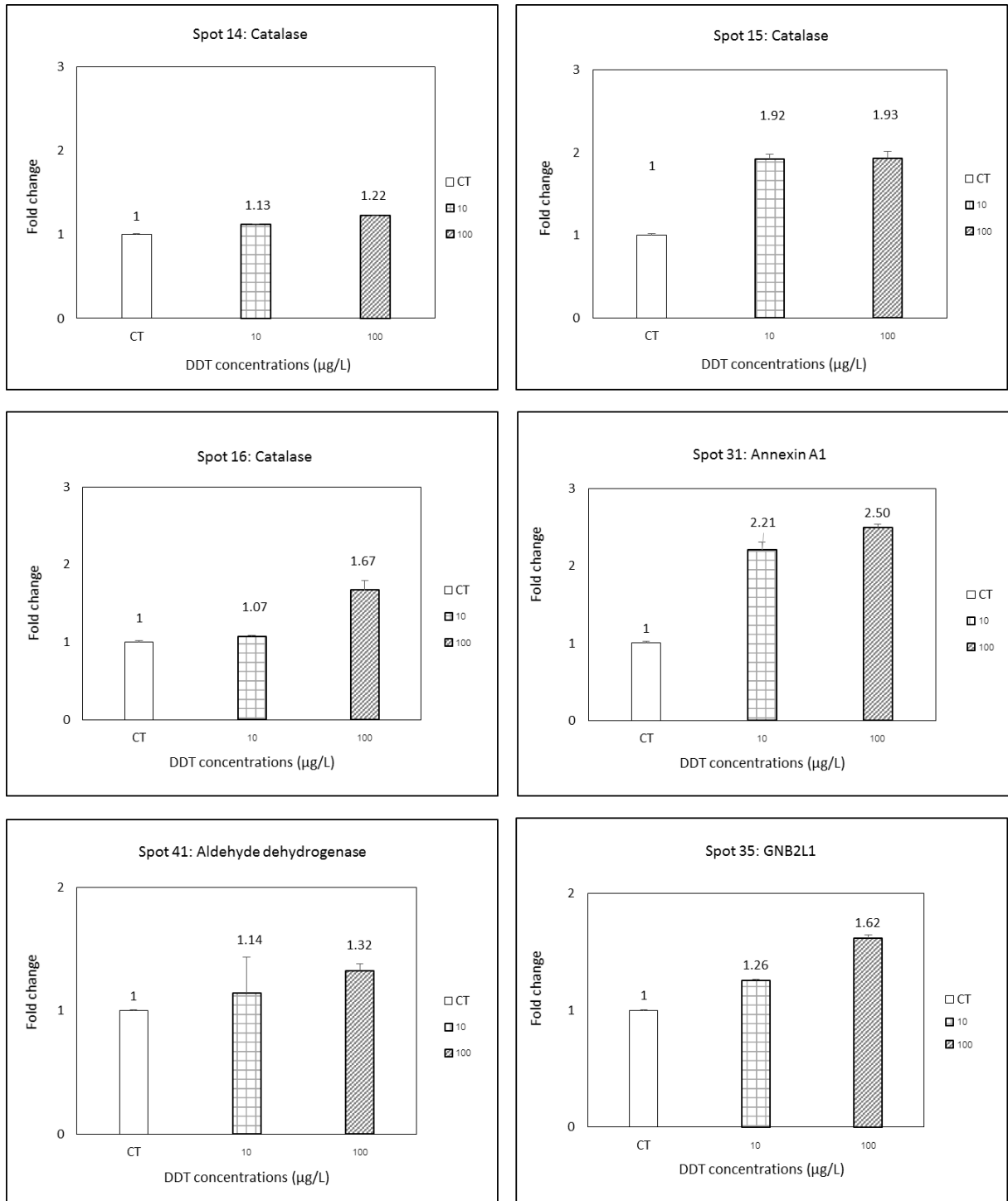
สำหรับโปรตีนบางจุดมีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ทิศทางหรือรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารทดสอบ (fluctuated protein) นั้นไม่ควรใช้เป็น potential protein biomarker เนื่องจากมีปริมาณขึ้น ๆ ลง ๆ เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น



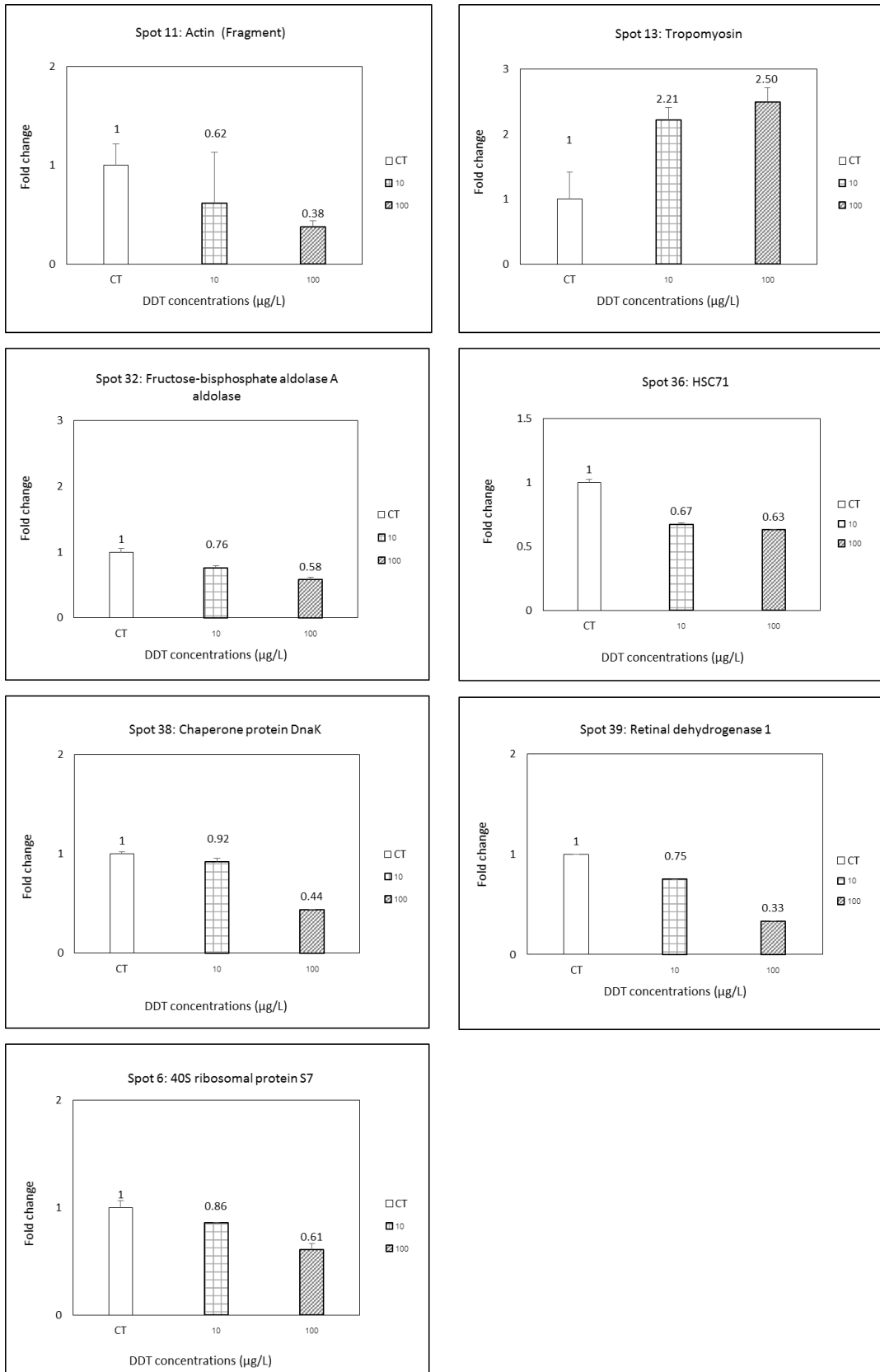
ภาพที่ 4-12 โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็น Potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในกลุ่ม Dose-dependent up-regulated protein



ภาพที่ 4-12 โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็น Potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในกลุ่ม Dose-dependent up-regulated protein (ต่อ 1)



ภาพที่ 4-12 โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็น Potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในกลุ่ม Dose-dependent up-regulated protein (ต่อ 2)



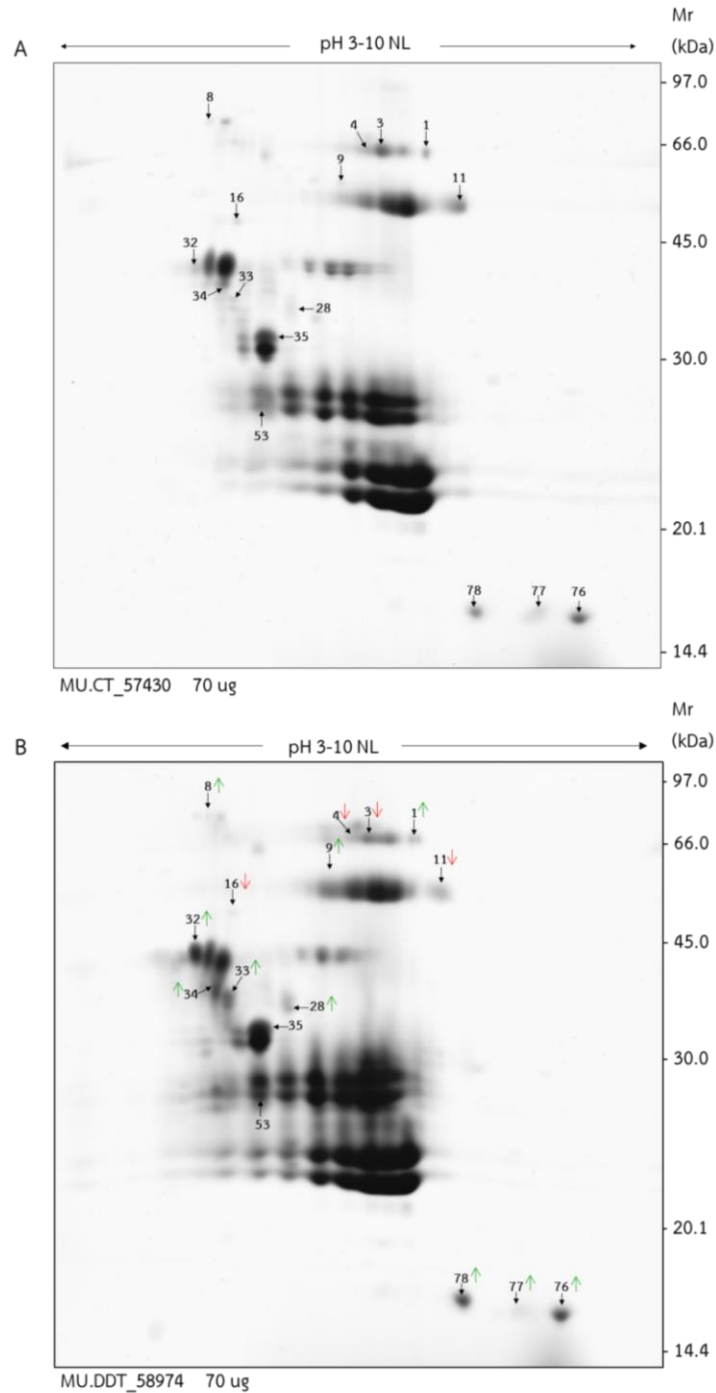
ภาพที่ 4-13 โปรตีนที่มีแนวโน้มสำหรับใช้เป็น Potential protein biomarker ในการบ่งชี้การปนเปื้อนของสาร DDT ในกลุ่ม Dose-dependent down-regulated protein

4.7 การศึกษาผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนโอเมกของเมือกหอยนางรมปากจیب

นอกจากการเปรียบเทียบผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีนโอเมกของเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจیبโดยการศึกษานเนื้อเยื่อแมนเทิล ดังหัวข้อที่ 4-5 แล้ว การศึกษาครั้งนี้ยังสนใจว่า สาร DDT มีผลกระทบต่อโปรตีนที่สร้างและหลั่งออกมาพร้อมกับเมือกของหอยนางรมหรือไม่ เพื่อตอบคำถามดังกล่าว จึงได้ทำการเปรียบเทียบโปรตีนโอเมกในเมือกของหอยนางรมปากจیب โดยทำการเปรียบเทียบโปรตีนจากเมือกของหอยนางรม 2 กลุ่ม ได้แก่ กลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม โดยในกลุ่มทดสอบ เลือกหอยนางรมกลุ่มที่ได้รับสารพิษ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวใกล้เคียงกับค่าร้อยละ 10 ของค่า LC-50 ณ เวลา 96 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นความเข้มข้นดังกล่าวไม่ทำให้ตัวอย่างสัตว์ทดสอบตาย และผลการศึกษาในระดับเนื้อเยื่อไม่พบการตายของเซลล์ (necrosis) แต่พบว่าสาร DDT ที่ความเข้มข้นนี้ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ผลการศึกษาโปรตีนโอเมกในเนื้อเยื่อแมนเทิลยังแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมกลุ่มทดสอบที่มีการสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L ส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนและส่งผลให้เกิดความเครียดระดับเซลล์ (cellular stress response)

การศึกษานี้ทำการเก็บเมือกจากผิวหนังของหอยนางรมจากหอยกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม แล้วนำมาตกตะกอนโปรตีนด้วย Acetone ที่อุณหภูมิ -20 °C และทำการกำจัดเกลือที่ติดมากับตัวอย่าง ด้วย Amicon Ultra-2 Centrifuge Filter Devices จากนั้นทำการแยกโปรตีนด้วยเจล 2 มิติ โดยในมิติที่ 1 ทำการแยกด้วย IEF strip pl 3-10 (non linear) และ มิติที่สองทำการแยกใน 12.5% SDS-PAGE โดยใช้ปริมาณโปรตีน 70 ไมโครกรัม/เจล แล้วทำการย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue ได้ผลดังแสดงในภาพที่ 4-14 และเมื่อทำการวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนแผ่นเจลด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) โดยใช้เกณฑ์การวิเคราะห์คือจุดโปรตีน (protein spot) ที่มี spot area มากกว่า 0.1 และมี spot intensity มากกว่า 350 และมี spot volume มากกว่า 70 ขึ้นไป จากเกณฑ์ดังกล่าวพบว่าสามารถระบุจำนวนจุดโปรตีนในกลุ่มควบคุมได้ 140.67±10.53 จุด (N=3) สำหรับกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง พบจำนวนจุดโปรตีน 111.67±18.45 จุด (N=3) โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยทำการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนโดยใช้ spot volume เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดสอบและกลุ่มควบคุม ดังตัวอย่างที่แสดงในภาพที่ 4-15 พบว่าสาร DDT ส่งผลต่อปริมาณโปรตีนที่พบในเมือกของหอยนางรมปากจیبอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ทั้งสิ้น 14 จุด (differential protein) ประกอบด้วยโปรตีนที่ปริมาณเพิ่มขึ้นด้วยสาร DDT (up-regulated protein) จำนวน 10 จุด และโปรตีนที่ปริมาณลดลงด้วยสาร DDT (down-regulated protein) จำนวน 4 จุด ดังภาพที่ 4-14 และ ตารางที่ 4-3

เมื่อเปรียบเทียบจุดของโปรตีนบนแผ่นเจลแล้ว ผู้วิจัยทำการระบุชนิดของโปรตีนที่มีความแตกต่างกัน (differential protein) ทั้ง 14 จุด โดยเริ่มจากการตัดจุดของโปรตีนในแผ่นเจลโพลีอะครีลาไมด์ออกจากแผ่นเจล และย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน (Promega™ Sequencing Grade Modified Trypsin, Promega™ V5111) หลังจากนั้นจึงนำตัวอย่างเพปไทด์ที่ย่อยแล้วไปวิเคราะห์ด้วย (LC-MS/MS) (Waters, amaZon™ speed ETD mass spectrometer, Bruker Daltonics, Bremen, Germany) และนำไปเปรียบเทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI โดยใช้โปรแกรมออนไลน์ MASCOT (www.matrixscience.com) ณ วันที่ 28 สิงหาคม พ.ศ. 2561 พบว่าสามารถระบุโปรตีนที่มีความแตกต่างกัน (differential protein) ได้ 4 จุด จากจำนวน 14 จุด ประกอบด้วย protein spot หมายเลข 8, 4, 32 และ 76 (ตารางที่ 4-4) นอกจากนี้ ผู้วิจัยยังได้สุ่มวิเคราะห์จุดโปรตีนที่มีขนาดใหญ่ที่พบในเมือกอีก 12 จุด พบว่าสามารถระบุชนิดได้เพียง 2 จุด ประกอบด้วย protein spot หมายเลข 35 และ 53 (ตารางที่ 4-4)

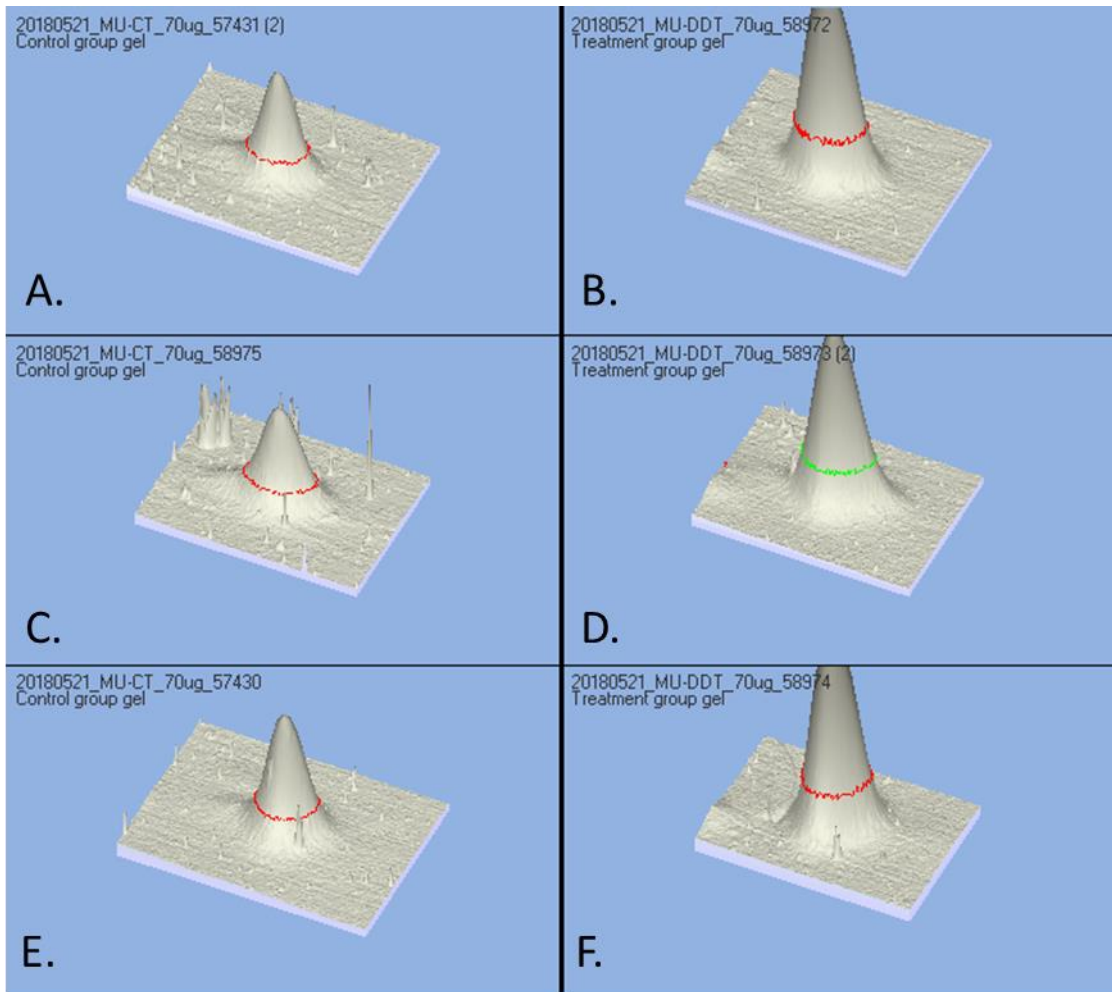


ภาพที่ 4-14 ผลการวิเคราะห์โปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ โดยในมิติที่ 1 ทำการแยกด้วย IEF strip (3-10 NL) และ มิติที่สองทำการแยกใน 12.5% SDS-PAGE โดยใช้ปริมาณโปรตีน 70 $\mu\text{g}/\text{gel}$ A คือ กลุ่มควบคุม และ B คือ กลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g}/\text{L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง
สัญลักษณ์ ลูกศรสีเขียว = Up-regulated proteins หมายถึง โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร ดีดีทีเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และ ลูกศรสีแดง = Down-regulated proteins หมายถึง โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4-3 จุดโปรตีนที่มีการแสดงออกที่แตกต่างกัน (differential protein) ในตัวอย่างเมื่อกจากหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม

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

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



ภาพที่ 4-15 ตัวอย่างผลการวิเคราะห์ภาพถ่ายโปรตีนด้วยโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden) ภายหลังจากแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจล 2 มิติแล้วทำการเปรียบเทียบความแตกต่างของค่า % spot volume ของจุดโปรตีนดังตัวอย่างในภาพเป็นจุดโปรตีนหมายเลข 76 ของกลุ่มควบคุม (A, C, E) และกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง (B, D, F)

ตารางที่ 4-4 การระบุชนิดของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจีบที่ได้รับสัมผัสสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L เป็นเวลา 96 ชั่วโมง เทียบกับกลุ่มควบคุม

Spot No.	SwissProt Accession	Score	Peptide Match	pI/Mr (KDa) theory	pI/Mr (KDa) experiment	Fold changes	Protein Identification
1. Up-regulated proteins							
8	P01834	121	1(1)	6.11/11.76	4.75/75.56	4.09	Immunoglobulin kappa constant
32	Q00214	69	1(1)	5.23/42.33	4.60/41.64	1.44	Actin, muscle
76	P86909	60	1(1)	9.62/8.42	8.90/15.66	1.35	Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)
2. Down-regulated proteins							
4	P02769	183	7(7)	5.82/69.25	6.45/64.52	-2.25	Serum albumin
3. Unchanged proteins							
35	P50417	76	1(1)	6.09/38.45	5.37/33.94	1.00	Haptoglobin
53	B0R061	66	1(1)	6.22/11.03	5.35/28.30	1.08	SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A

4.8 การศึกษาการปนเปื้อนของประกอบบิวทิลทินบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก

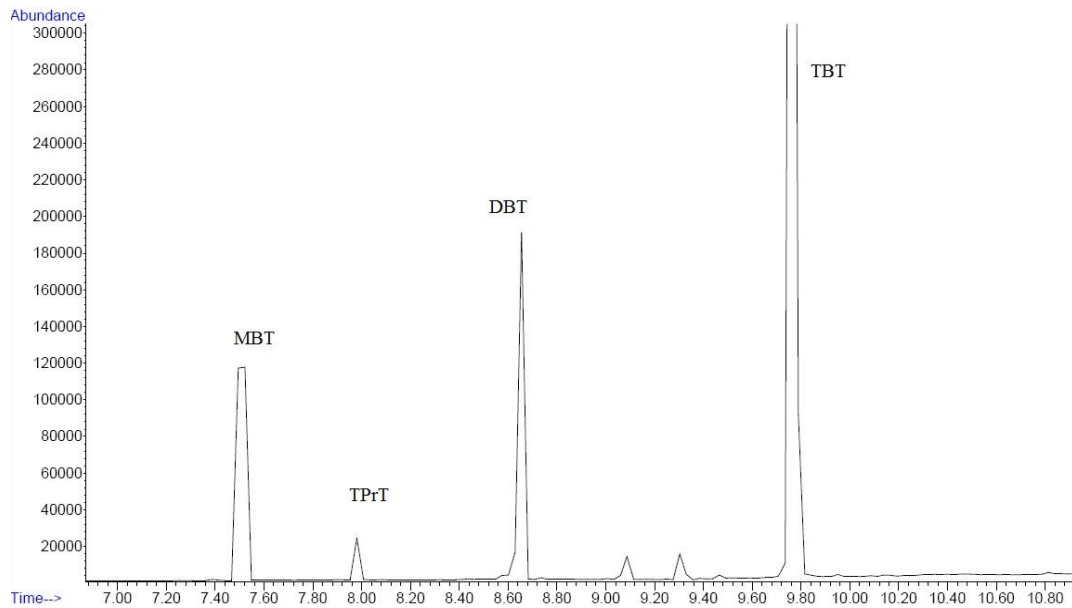
โครงการวิจัยในครั้งนี้นอกจากจะศึกษาผลกระทบของสาร DDT ในน้ำทะเลต่อหอยนางรมปากจีบในมิติต่าง ๆ แล้ว ยังมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการปนเปื้อนของสารเคมีบริเวณชายฝั่งทะเลของภาคตะวันออกอีกด้วย โดยได้ทำการศึกษาสารประกอบบิวทิลทิน ซึ่งเป็นการกลุ่มออร์แกโนทิน ที่พบได้ทั่วไปบริเวณชายฝั่ง เนื่องจากสารชนิดนี้มีการใช้ในสีทาเรือทั่วไป การศึกษาในครั้งนี้ผู้วิจัยได้ขยายการศึกษาไปในสัตว์ชนิดอื่น ได้แก่ หอยแมลงภู่ชนิด *Perna viridis* พบผลการศึกษาดังนี้

เมื่อวิเคราะห์ชนิดและปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในสารละลายมาตรฐานเทียบกับตัวอย่างด้วยเครื่อง GC-MS ในโหมด Scan และโหมด Selection ion monitoring (SIM) พบว่าสารประกอบบิวทิลทินแต่ละอนุพันธ์มี Ions (m/z) คือ โมโนบิวทิลทิน (MBT) 179-149-207 มี target ion 235 แสดงเวลาในโครมาโตแกรมที่ 7.52 นาที ไดบิวทิลทิน (DBT) 207-179-146 มี target ion 263 แสดงเวลาในโครมาโตแกรมที่ 8.65 นาที และไตรบิวทิลทิน (TBT) 207-177-151 มี target ion 291 แสดงเวลาในโครมาโตแกรมที่ 9.78 นาที (ภาพที่ 4-17) ช่วงเวลาที่แสดงในโครมาโตแกรมนั้นแตกต่างกันตามมวลและประจุของโมเลกุลแต่ละชนิด โดยมวลโมเลกุลของ MBT จะปรากฏออกมาในแผนภาพโครมาโตแกรมก่อน เนื่องจากสภาพการมีขั้วของ MBT ที่มีขั้วมากกว่า DBT และ TBT และในการวิจัยครั้งนี้ได้มีการเติม internal standards โดยใช้สารมาตรฐาน tripropyltin (TPrT) เพื่อชดเชยการสูญเสียสารมาตรฐานในขั้นตอนการสกัดจนถึงขั้นตอนการวิเคราะห์โดยจะแสดง Ion (m/z) ที่ 191-249-247 มี target ion 193 แสดงเวลาในโครมาโตแกรมที่ 7.98 นาที (ภาพที่ 4-16 และ ตารางที่ 4-5) ส่วนผลของการทำ recovery ของสาร TBT, DBT และ MBT อยู่ระหว่าง 120, 135 และ 112 % ตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการสกัดแบบ SLE และใช้ sodium tetraethylborate (NaB(Et)₄) เป็นตัวทำปฏิกิริยา สามารถทำการสกัดและวิเคราะห์ผลได้ทั้งในสารละลายมาตรฐานและสารที่อยู่ในตัวอย่างสิ่งมีชีวิต

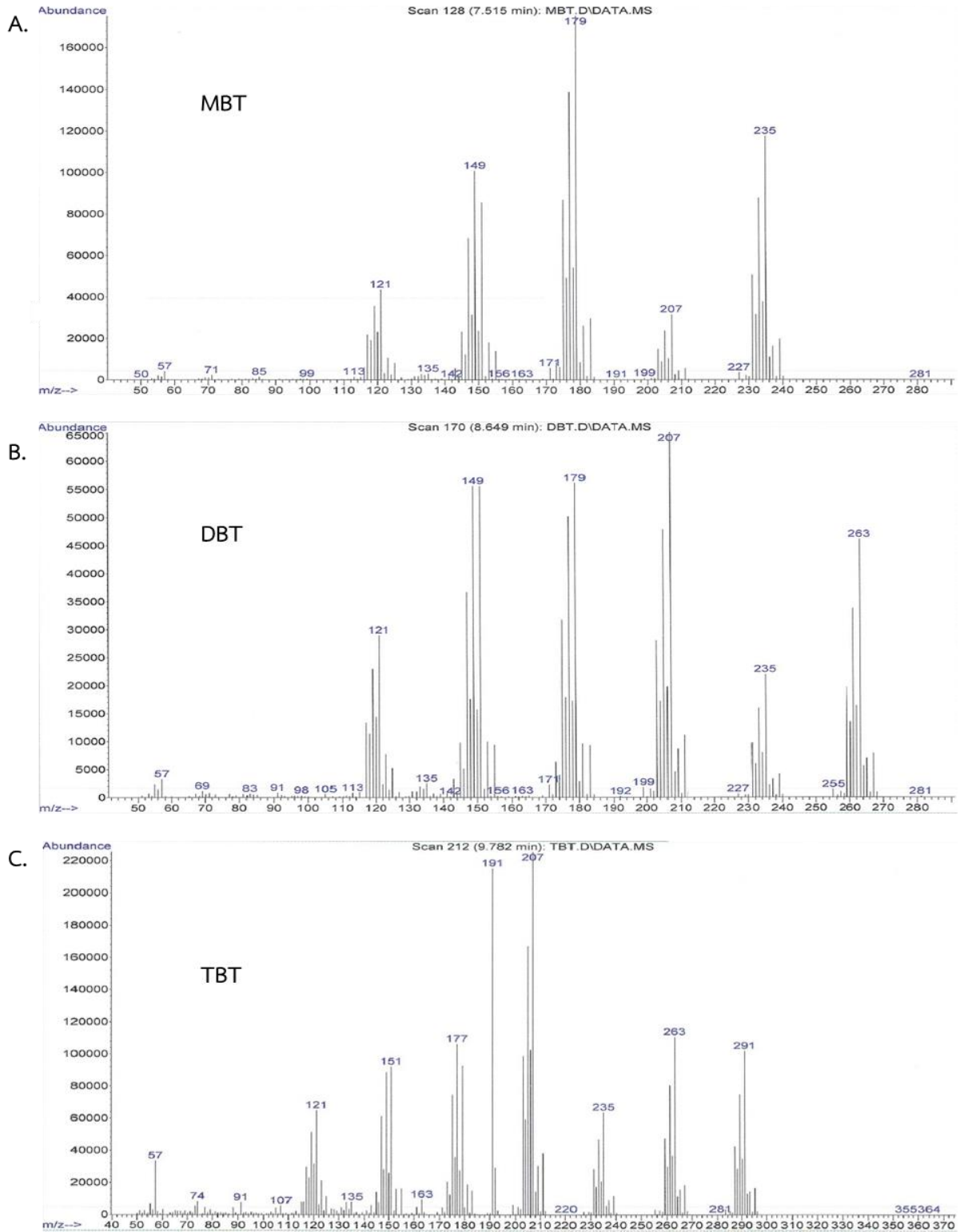
การวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทินในการศึกษาครั้งนี้ สามารถระบุค่าคุณลักษณะของวิธีการวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ได้ดังต่อไปนี้ (1) ขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (limit of quantification; LOQ) หรือ ความเข้มข้นระดับแรกที่ใช้ในการสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อการวิเคราะห์ตัวอย่างของสารประกอบบิวทิลทินทั้ง 3 อนุพันธ์มีค่า 0.1 ng/g (2) ขีดจำกัดของการตรวจวัด (limit of detection; LOD) หรือ ค่าความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดสัญญาณได้ในตัวอย่างของสารประกอบบิวทิลทินทั้ง 3 อนุพันธ์ มีค่า 0.5 ng/g และ (3) ความเที่ยงของการวิเคราะห์ (precision) เป็นเปอร์เซ็นต์ ซึ่งการหาค่าเปอร์เซ็นต์การกลับคืนในการวิจัยครั้งนี้ของไตรบิวทิลทิน ไดบิวทิลทิน และโมโนบิวทิลทินอยู่ที่ 120, 135 และ 112% ตามลำดับ ดังที่ได้กล่าวไปแล้ว (ตารางที่ 4-6)

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ชนิด *Perna viridis* บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด ในการศึกษาครั้งนี้ (ตารางที่ 4-7) พบปริมาณรวมของสารประกอบบิวทิลทิน (Σ BTs) ในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่มีค่า 1.04, 5.98 และ 0.95 ng/g dry weight ตามลำดับ มีค่าเฉลี่ยของทุกพื้นที่รวมกันเป็น 2.66 ng/g dry weight โดยพบปริมาณรวมของสารประกอบบิวทิลทินมากที่สุดในจังหวัดระยองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 5.98 ng/g dry weight โดยตรวจพบอนุพันธ์ DBT เพียงอย่างเดียว รองลงมาคือจังหวัดชลบุรีมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 1.04 ng/g dry weight ประกอบด้วยอนุพันธ์ TBT และ DBT 0.68 และ 0.36 ng/g dry weight ตามลำดับ ไม่พบ MBT ส่วนจังหวัดตราดมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 0.95 ng/g dry weight ตรวจพบอนุพันธ์ DBT ส่วนอนุพันธ์ TBT พบได้เล็กน้อยคือมีปริมาณมากกว่าขีดจำกัดของการวิเคราะห์ปริมาณ (LOQ; <0.10 ng/g dry weight) แต่มีปริมาณน้อยกว่าขีดจำกัดของการตรวจวัด (LOD; <0.50 ng/g dry weight) และไม่พบอนุพันธ์ MBT เนื่องจากการศึกษาในอดีตพบรายงาน

ปริมาณการสะสมของสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อในหน่วย ng/g ของน้ำหนักสด (wet weight) ดังนั้น เพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบ ผู้วิจัยจึงได้ทำการเปลี่ยนหน่วยจาก dry weight เป็นหน่วย wet weight โดยใช้ข้อมูลน้ำหนักสดและน้ำหนักแห้งของเนื้อหอยในตารางที่ 1 ทำให้ได้ข้อมูลเปรียบเทียบดังแสดงในตารางที่ 4-6 ซึ่งทำให้ปริมาณรวมของสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภูในพบบในจังหวัดชลบุรี ระยอง และ ตราด มีค่าเท่ากับ 0.23, 0.10 และ 0.15 ng/g wet weight ตามลำดับ และมีค่าเฉลี่ยของทุกพื้นที่รวมกัน เป็น 0.49 ng/g dry weight สามารถเทียบเป็นน้ำหนักแห้งได้ดังตารางที่ 4-8



ภาพที่ 4-16 โครมาโตแกรมของสารประกอบบิวทิลทินที่ผ่านกระบวนการ derivatization ด้วย $(\text{NaB}(\text{Et})_4)$ และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบ TIC chromatograms ของสารประกอบบิวทิลทินทั้ง 3 ชนิด ได้แก่ Monobutyltin (MBT), Dibutyltin (DBT) และ Tributyltin (TBT) ที่เวลา 7.52, 8.65 และ 9.78 นาทีตามลำดับ และ พบ internal standard Tripropyltin (TPrT) ที่เวลา 7.98 นาที



ภาพที่ 4-17 Mass spectra ของ MBT (A), DBT (B) and TBT (C) ที่ทำการวิเคราะห์ด้วย GC-MS ในโหมด Scan

ตารางที่ 4-5 ไอออนและ Retention time ของสารประกอบบิวทิลทิน และ internal standard Tripropyltin (TPrT)

Butyltin compounds	Ions (m/z)	Target ion	Retention time (min)
Monobutyltin (MBT)	233 - 179 - 177	235	7.52
Dibutyltin (DBT)	261 - 179 - 177	263	8.65
Tributyltin (TBT)	289 - 261 - 263	291	9.78
Tripropyltin (TPrT)	191 - 249 - 247	193	7.98

ตารางที่ 4-6 ค่าคุณลักษณะของวิธีการวัดด้วยเครื่องแมสสเปกโตรมิเตอร์ (n=3)

Butyltin compounds	LOD (ng/g)	LOQ (ng/g)	Precision (%RSD)	Recovery (%)	Linearity (r ²)
Monobutyltin (MBT)	0.10	0.50	13	112	0.991
Dibutyltin (DBT)	0.10	0.50	12	135	0.992
Tributyltin (TBT)	0.10	0.50	16	120	0.993

ตารางที่ 4-7 ปริมาณสารประกอบบิวทิลทินที่ตรวจพบการสะสมในหอยแมลงภู่น้ำจืด *P. viridis* น้ำหนักแห้ง มีหน่วยเป็น ng/g dry weight

Location	Tributyltin (TBT)	Dibutyltin (DBT)	Monobutyltin (MBT)	ΣBTs (TBT + DBT + MBT)
Chonburi	0.68 ± 0.14	0.36 ± 0.10	N.D.	1.04
Rayong	N.D.	5.98 ± 3.36	N.D.	5.98
Trat	<LOQ	0.95 ± 0.83	N.D.	0.95
Average	0.23	2.43	N.D.	2.66

N.D: below detection limit, LOQ: Limit of quantification

ตารางที่ 4-8 ปริมาณสารประกอบบิวทิลทินที่ตรวจพบการสะสมในหอยแมลงภู่น้ำจืด *P. viridis* น้ำหนักสด หน่วยเป็น ng/g wet weight

Location	Tributyltin (TBT)	Dibutyltin (DBT)	Monobutyltin (MBT)	ΣBTs (TBT + DBT + MBT)
Chonburi	0.13 ± 0.03	0.07 ± 0.02	0.03 ± 0.02	0.23
Rayong	N.D.	1.10 ± 0.62	N.D.	1.10
Trat	<LOQ	0.15 ± 0.13	N.D.	0.15
Average	0.05	0.44	N.D.	0.49

N.D: below detection limit, LOQ: Limit of quantification

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

อภิปรายผล

5.1 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบ (larva developmental biology)

การทดสอบในห้องปฏิบัติการในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาร DDT ในน้ำทะเลส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรม โดยพบว่าแม้ความเข้มข้นในน้ำทะเลต่ำเพียง 0.25 -10 µg/L หรือคิดเป็น 0.00025 ppm ก็ส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบได้ ความรุนแรงของผลกระทบแปรผันตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารดีดีที ซึ่งสาร DDT นี้ทำให้ตัวอ่อนระยะ gastrula ระยะ trochophore และ ระยะ D-shape veliger เจริญผิดปกติ และเข้าสู่ระยะต่าง ๆ ได้ช้าลง ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลที่ยืนยันให้เห็นว่าปริมาณของสาร DDT ในน้ำทะเลในระดับที่ต่ำมากก็สามารถส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร DDT ที่ปนเปื้อนในน้ำเพียง 0.25-10 µg/L อาจส่งผลกระทบต่อประชากรของหอยนางรมในสภาพแวดล้อมจริงได้ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับความเข้มข้นที่สามารถตรวจวัดได้ในแหล่งน้ำ จากการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารกลุ่มออร์แกโนคลอรีน บริเวณแม่น้ำเจ้าพระยา พบการปนเปื้อนในน้ำสูงถึง 90 µg/L (ชลีรัตน์ พะยอมแย้ม, 2519) ซึ่งผลการศึกษาในตัวอ่อนหอยนางรม ซึ่งเป็นสัตว์ทะเลชี้ให้เห็นว่า หากมีการปนเปื้อนในน้ำสูงถึง 90 µg/L ดังกล่าว อาจส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนของสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำนั้นได้ เนื่องจากสารกลุ่มนี้มาการสะสมในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนาน แม้จะมีการห้ามใช้แล้วแต่ควรมีการติดตามตรวจสอบสภาพการปนเปื้อนของสารกลุ่มนี้ด้วย

การทดสอบในห้องปฏิบัติการในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสาร DDT ในน้ำทะเลส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรม โดยพบว่าแม้ความเข้มข้นในน้ำทะเลต่ำเพียง 0.25 -10 µg/L หรือคิดเป็น 0.00025 ppm ก็ส่งผลกระทบต่อตัวอ่อนหอยนางรมปากจีบได้ ความรุนแรงของผลกระทบแปรผันตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสาร DDT ซึ่งสารดีดีทีนี้ทำให้ตัวอ่อนระยะ gastrula ระยะ trochophore และ ระยะ D-shape veliger เจริญผิดปกติ และเข้าสู่ระยะต่างๆ ได้ช้าลง ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้เป็นข้อมูลที่ยืนยันให้เห็นว่าปริมาณของสาร DDT ในน้ำทะเลในระดับที่ต่ำมากก็สามารถส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสาร DDT ที่ปนเปื้อนในน้ำเพียง 0.25-10 µg/L อาจส่งผลกระทบต่อประชากรของหอยนางรมในสภาพแวดล้อมจริงได้

5.2 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัย

ผลจากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร DDT ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบตัวเต็มวัยในครั้งนี้ พบว่าสาร DDT มีพิษต่อหอยนางรมปากจีบทำให้หอยในกลุ่มทดสอบตาย โดยอัตราการตายขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร DDT ที่ใช้ทดสอบ นอกจากนี้ยังมีผลต่อพฤติกรรมการตอบสนองของหอยนางรมอีกด้วย เมื่อทำการวิเคราะห์หาค่า LC50 (50% lethal concentration) สามารถคำนวณหาค่า LC50

ณ เวลา 96 ชั่วโมง ได้เท่ากับ 891.25 $\mu\text{g/L}$ ซึ่งหมายความว่า เมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสสารที่ระดับความเข้มข้น 891.25 $\mu\text{g/L}$ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง จะทำให้หอยนางรมปากจีบตายลงครึ่งหนึ่ง เมื่อทำการเปรียบเทียบกับปลาเพิร์ช (*Micrometrus minimus*) ซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลัง เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษเฉียบพลันของสาร DDT พบว่าค่า LC-50 ที่เวลาทดสอบ 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 26 $\mu\text{g/L}$ (Earnest & Benville, 1971) (Therapy & Support, 2002) แสดงให้เห็นว่า DDT มีผลกระทบต่อปลาเพิร์ชมากกว่าหอยนางรมปากจีบ ทั้งนี้อาจมาจากหอยนางรมมีเปลือกสามารถปิดเปลือกเพื่อป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมได้ ทำให้มีความทนทานต่อความเป็นพิษของสารเคมีมากกว่า

นอกจากนี้เมื่อเปรียบเทียบผลการศึกษาความเป็นพิษของสาร DDT กับสารปนเปื้อนบริเวณชายฝั่งชนิดอื่น เช่น สารทีบีที (TBT, tributyltin) ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนที่พบได้ทั่วไปในบริเวณชายฝั่ง พบว่าสาร DDT นี้มีระดับความเป็นพิษน้อยกว่าสาร TBT เนื่องจากมีค่า LC-50 ที่เวลาทดสอบ 96 ชั่วโมง ของสาร TBT มีเท่ากับ 59.69 $\mu\text{g/L}$ (Kingtong, 2009) ซึ่งทำการศึกษาในหอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* เช่นเดียวกับการศึกษาครั้งนี้

5.3 ผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัย

การศึกษาผลกระทบของสารของสารประกอบกลุ่มออร์แกโนคลอรีนต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมตัวเต็มวัยแสดงให้เห็นว่าสาร DDT สามารถส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจีบ โดยจะพบเซลล์สร้างเมือกบริเวณเนื้อเยื่อแมนเทิลเพิ่มมากขึ้น ซึ่งในสภาวะปกติเซลล์สร้างเมือกจะทำหน้าที่สร้างและหลั่งสารเมือกหรือมิวซินออกมาปกคลุมร่างกาย เพื่อป้องกันอวัยวะต่าง ๆ การหลั่งเมือกในสภาวะปกติจะพบการสร้างและหลั่งเมือกอยู่แล้ว โดยอาศัยการทำงานของ Cytoskeleton ลำเลียงแกรนูลเพื่อหลั่งเมือกออกนอกเซลล์ แต่ในสภาวะที่หอยนางรมถูกกระตุ้นจากการได้รับสารเคมี จะทำให้เกิดการสร้างเมือกออกมามากขึ้น ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นกลไกของสิ่งมีชีวิตในระดับสรีรวิทยา เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดจากการได้รับความเป็นพิษจากสารเคมี เช่นเดียวกันกับในเหงือกของหอยนางรม กลุ่มที่ได้รับสาร DDT ความเข้มข้น 10 และ 100 $\mu\text{g/L}$ พบว่ามีการจัดเรียงตัวของเซลล์บุผิวไม่เป็นระเบียบ และมีขนาดเซลล์ใหญ่ขึ้นในกลุ่มทดลองที่ได้รับสัมผัสจากสาร DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อประสิทธิภาพในการแลกเปลี่ยนแก๊สลดลง นอกจากนี้ยังพบอาการบวมบริเวณเซลล์เยื่อบุผิว รวมถึงมีการหลั่งเมือกเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม แสดงให้เห็นว่าในสภาวะที่สัตว์ทดลองเกิดความเครียดจากการได้รับสารเคมี จะมีการตอบสนองโดยการหลั่งเมือกออกมาเพื่อป้องกันตัวเอง (defensive organism) ซึ่งกิจกรรมดังกล่าวนี้โดยส่วนใหญ่พบได้มากในสิ่งมีชีวิตจำพวกปลา เช่นในปลาหมอสี (*Sarotherodon melanotheron*) ที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT แสดงให้เห็นถึงลักษณะที่โป่งพองของ lamellae และเส้น เกิดการขยายตัวที่หนาขึ้นของเยื่อบุผิว ซึ่งจะส่งผลให้เกิดการรวมตัวกันของเซลล์ที่อยู่ใกล้กัน ในส่วนของ Secondary lamellae พบเยื่อบุผิวมีบวมส่งผลทำให้แยกออกจากเยื่อฐาน (Basement membrane) อีกทั้งยังพบว่าการสร้างเมือกเป็นจำนวนมากซึ่งแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนจากสาร DDT (Riou et al., 2012) จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าหอยนางรมมีกลไกในการป้องกันตัวเองจากปัจจัยรบกวนภายนอกที่ได้รับ เช่น การปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม แต่ในขณะที่เดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับสัตว์น้ำในกลุ่มปลาซึ่งถึงแม้ว่าจะเป็นสัตว์ที่มีกระดูกสันหลัง แต่อาศัยในน้ำ ซึ่งมีแนวโน้มที่จะได้รับการปนเปื้อนเช่นเดียวกัน กลับพบว่าสาร DDT สามารถส่งผลกระทบต่อปลามากกว่าในหอยนางรม อาจเนื่องมาจากพฤติกรรมในการกรองกิน (filter feeder) รวมถึงการอยู่อาศัยโดยการเกาะอยู่กับที่ (sessile organism) และการมีเปลือกที่แข็งแรง ดังนั้นจึงทำให้มีกลไกการ

ปรับตัวด้านสรีรวิทยา (physiological adaptation) ที่ดีเพื่อความอยู่รอด โดยการสร้างเมือกออกมาเพื่อปกคลุมลำตัวเมื่อถูกรบกวนจากปัจจัยที่ทำให้เกิดความเครียดจากสิ่งแวดล้อมที่อาศัยอยู่ ซึ่งกลไกดังกล่าวที่กล่าวมานี้ อาจเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้หอยนางรมทนต่อความเป็นพิษของสารเคมีได้มากกว่ากลุ่มปลาที่ได้รายงานไปข้างต้น

5.4 การวิเคราะห์โปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب

การวิเคราะห์โปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیبในครั้งนี้ เมื่อทำการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อแมนเทิล และแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าแบบเจลสองมิติ และย้อมด้วยสี Coomassie Blue แล้วใช้โปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software สามารถระบุ protein spot ได้ประมาณ 300 จุด และระบุชนิดของโปรตีน 31 ชนิด ซึ่งผลการศึกษาในครั้งนี้จะเป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับการศึกษาโปรตีโอมในเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیبต่อไปในอนาคต

5.5 การวิเคราะห์โปรตีโอมและผลกระทบของสาร DDT ต่อโปรตีโอมเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب

การศึกษาด้านพิษวิทยาในระดับโมเลกุล (Molecular Toxicology) ในสิ่งมีชีวิต เป็นการศึกษาถึงการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยาภายในร่างกาย ซึ่งจะเป็นประโยชน์ต่อการนำมาใช้ประเมินผลกระทบจากสิ่งแวดล้อมที่เกิดขึ้น ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยมีความสนใจที่จะศึกษาการเปลี่ยนแปลงในระดับโปรตีนของกลุ่มตัวอย่างแมนเทิลของหอยนางรมที่ได้รับการสัมผัสกับสาร DDT เพื่อเปรียบเทียบกับแมนเทิลของหอยนางรมในกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการสัมผัสกับสาร DDT โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) ซึ่งเป็นการตรวจสอบโปรตีนที่มีการแสดงออกภายในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต โดยใช้หลักการที่ว่า การทำงานของเซลล์จะถูกควบคุมโดยยีนซึ่งการทำงานของยีนจะอาศัยการสร้าง mRNA เพื่อแปลรหัสให้กลายเป็นโปรตีน จากนั้นโปรตีนจึงจะทำหน้าที่ต่าง ๆ ภายในเซลล์ต่อไป ในกรณีที่สิ่งมีชีวิตได้รับผลกระทบจากปัจจัยภายนอก เช่น การปนเปื้อนของสารเคมีในสิ่งแวดล้อม ซึ่งจะส่งผลต่อการทำงานของเซลล์ โดยอาจส่งผลให้เกิดการกระตุ้นหรือยับยั้งการทำงานของยีน ซึ่งจะทำให้โปรตีนที่สร้างจากยีนนั้น ๆ มีระดับการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงไปจากระดับปกติ

การศึกษาในครั้งนี้ยังทำให้ทราบถึงผลกระทบของสาร DDT ว่ามีผลต่อการแสดงออกของโปรตีนหลายชนิด โดยภายหลังจากการได้รับสาร DDT ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 96 ชั่วโมง ยังส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีนในหลายกลุ่ม ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างและการเคลื่อนที่ของเซลล์ (Cytoskeleton and cellular movement) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไกการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (Energy metabolism) โปรตีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด (Stress response protein) โปรตีนที่ทำหน้าที่สร้างโปรตีนในเซลล์ (Protein synthesis) โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแลกเปลี่ยนก๊าซ (Gas exchange) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการขนส่งโมเลกุลของสาร (Ion transport) โดยสามารถสรุปเป็นประเด็น ได้ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Cytoskeleton

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein)

สาร DDT สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มโครงสร้างของเซลล์หรือ cytoskeleton เพิ่มขึ้น โดยพบทั้งโปรตีนกลุ่ม tubulin ได้แก่ tubulin beta chain (spot # 17) tubulin alpha 3 chain (spot # 18) tubulin alpha 3C/D chain (spot # 19) และ tubulin beta 4 B chain (spot # 21) และโปรตีนกลุ่ม actin ได้แก่ actin (spot # 25) และ actin, muscle type A1 (spot # 29)

โปรตีน tubulin เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้าง microtubule ซึ่งจำเป็นต่อการเคลื่อนย้ายของโครโมโซมในกระบวนการแบ่งเซลล์ การที่สาร DDT ครอบคลุมของโปรตีนโครงสร้างเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อได้ เนื่องจากโปรตีนในกลุ่มนี้เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกายโดยตรง โดยพบว่ามีรายงานในสัตว์กลุ่มหอยสองฝา มีรายงานว่าโปรตีนโครงสร้างจะถูกกระตุ้นเมื่อได้รับสัมผัสจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น หอยกาบ (*Chamaelea gallina*) ที่ได้รับ arsenic และ TBT (Rodríguez-Ortega et al., 2003) ทองแดง (Geret et al., 2004) bisphenol-A (Apraiz et al., 2006) และแคดเมียม (Jo et al., 2008) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาเนื้อเยื่อของหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อผิดปกติในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษากว่าคือดีดีทีจะเข้าไปกระตุ้นให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (hyperplasia) เมื่อสิ่งมีชีวิตได้รับสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein)

หอยนางรมที่ได้รับสาร DDT พบความผิดปกติของโครงสร้างเซลล์ เนื่องจากโปรตีน actin (Fragment) (spot # 11) ซึ่งเป็นองค์ประกอบสำคัญของโครงร่างเซลล์ (Cytoskeleton) ลดลง นอกจากนี้กิจกรรมการเคลื่อนที่ระดับเซลล์อาจลดลงเนื่องจากโปรตีน tropomyosin (spot # 13) ลดลง โปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่สำคัญในการเคลื่อนที่ระดับเซลล์ เช่น การเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อ เป็นต้น

สารดีดีทีสามารถยับยั้งการสร้างโปรตีนในกลุ่มโครงสร้างของเซลล์หรือ cytoskeleton โดยพบโปรตีน actin (fragment) (spot # 11) ถูกยับยั้งให้สร้างน้อยลง ซึ่งจะมีผลต่อการสร้างไมโครทิวบูล และส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์ เช่น ซิเลียหายไป นอกจากนี้ยังอาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมอื่น ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ microtubule เคยมีรายงานการศึกษาผลกระทบของสาร DDT ต่อโครงสร้างเหงือกของปลากระเบน (Dwivedi & Trombetta, 2006) และ หอยแมลงภู่นิวซีแลนด์ *Mytilus galloprovincialis* (Micić et al., 2001) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด งานวิจัยครั้งนี้เผยให้เห็นว่าสาเหตุที่โครงสร้างเหงือกถูกทำลาย เกิดจากการที่ดีดีทีไปยับยั้งการสร้าง microtubule นั้นเอง

กลุ่มที่ 2 Stress response

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein)

โปรตีนในกลุ่มนี้จะถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นเมื่อสิ่งมีชีวิตอยู่ในสภาวะเครียด ซึ่งเป็นกลไกของสิ่งมีชีวิตที่ถูกกระตุ้นเพื่อทำหน้าที่ป้องกันอันตรายจากผลกระทบอันเกิดจากความเครียดจากสารเคมีที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อม

ผลการศึกษาในครั้งนี้ชี้แจงให้เห็นว่าสาร DDT ทำให้เกิดความเครียดระดับเซลล์ในหอยนางรมปากจีบ เนื่องจากพบการกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการต้านความเครียดจากการได้รับสารเคมี

ที่เพิ่มขึ้น ได้แก่ โพรตีนต่อไปนี้ catalase (spot # 14, 15 และ 16), annexin A1 (spot # 31), และ aldehyde dehydrogenase (spot # 36)

Annexin A1 เกี่ยวข้องกับความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) เป็นสภาวะความเครียดในระดับเซลล์เมื่อร่างกายมีกลไกในการป้องกันจากผลกระทบหรือสิ่งแปลกปลอมอันมาจากการได้รับสารเคมี

Aldehyde dehydrogenase (ALDH) เป็นเอนไซม์ที่ช่วยกระตุ้นให้เกิดปฏิกิริยา aldehyde oxidation ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการกำจัดพิษของแอลดีไฮด์ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ เอนไซม์ catalase เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับกลไกการกำจัดพิษของแอลดีไฮด์ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ โดยจะเปลี่ยนปฏิกิริยา $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ซึ่งจะช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ และปกป้องเซลล์จากความเครียดที่เกิดจากสารเคมี นิยมใช้เป็นตัวดัชนีชี้วัดสภาวะความเครียดออกซิเดชันที่เกิดจากการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษและเกิดการเหนี่ยวนำให้สิ่งมีชีวิตเกิดความเครียด โดยปกติแล้วสารพิษจะเข้าไปชักนำ ให้มีการสร้างสารอนุมูลอิสระขึ้นได้แก่ Superoxide anion radical และ H_2O_2 ซึ่งเป็นสารที่มีความไวในการเกิดปฏิกิริยา และเป็นอันตรายต่อส่วนประกอบของเซลล์ ได้แก่ โพรตีน ไขมัน คาร์โบไฮเดรต และดีเอ็นเอ ร่างกายจึงจำเป็นต้องมีกลไกในการกำจัดสารอนุมูลอิสระนี้ (antioxidant defense system) ซึ่งเกิดจากการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระต่าง ๆ ตัวอย่างเช่น เอนไซม์ catalase เพื่อควบคุมอนุมูลอิสระต่าง ๆ ให้อยู่ในระดับสมดุล ในสัตว์กลุ่มหอยสองฝา มีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกกระตุ้นเมื่อได้รับสัมผัสจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น bisphenol-A (Apraiz et al., 2006) และแคดเมียม (Jo et al., 2008) ในภาพรวมจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการป้องกันผลกระทบต่อเซลล์ที่เกิดจากสาร DDT

โพรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein)

สาร DDT สามารถยับยั้งการสร้างโพรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการต้านความเครียด ได้แก่ โพรตีนต่อไปนี้ Fructose-bisphosphate aldolase A (spot # 32) Heat shock cognate 71 kDa protein (spot # 36) Chaperone protein DnaK (spot # 38) และ Retinal dehydrogenase 1 (spot # 39)

โพรตีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของโพรตีนในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากสภาวะความเป็นพิษจากสารเคมี เนื่องจากจะช่วยคืนสภาพและซ่อมแซมให้กับโพรตีนที่เกิดการเสียหาย เมื่อหอยนางรมถูกรบกวนจากสาร DDT จึงสามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของโพรตีนในกลุ่มนี้ ให้มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ลดลงได้ งานวิจัยที่ทำการศึกษาโพรตีนที่พบในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรม European oyster (*Ostrea edulis*) ที่ได้รับสารประกอบแคดเมียมคลอไรด์ พบการกระตุ้นการสร้างโพรตีนในกลุ่ม Hsp70 family (Piano et al., 2004) เช่นเดียวกับในหอยสองฝา *Ruditapes decussatus* มีรายงานพบว่าสาร DDT สามารถกระตุ้นการทำงานของโพรตีนในกลุ่ม heat shock (hsp; 60, 70 and 90 kDa) (Dowling et al., 2006) ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าสาร DDT สามารถยับยั้งการสร้างโพรตีนในกลุ่ม heat shock ได้แก่ Heat shock cognate 71 kDa protein ที่ลดลง อาจเป็นผลมาจากการที่เซลล์ต้องเผชิญกับสภาวะความเครียด อันเนื่องจากการได้รับสารเคมีจึงทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลง ซึ่งโพรตีนในกลุ่มนี้จะทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของโพรตีนในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายและช่วยคืนสภาพให้กับโพรตีนที่เสียหายจากสภาวะความเป็นพิษที่ได้รับจากสารเคมี

กลุ่มที่ 3 Protein synthesis

โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein)

สาร DDT สามารถยับยั้งการสร้างไรโบโซมหน่วยเล็ก หรือ 40S ribosomal protein S7 (spot # 6) ไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์สำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีน ทำหน้าที่แปลรหัสโคดอนบนสาย mRNA เพื่อสร้างเป็นโปรตีน การลดลงของไรโบโซมชี้ให้เห็นว่า กิจกรรมการสร้างโปรตีนภายในเซลล์อาจลดลง อันเป็นผลมาจากถูกรบกวนจากสารเคมี

ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาค้นคว้าการแสดงออกของโปรตีนในหอยแมลงภู (P. viridis) ที่ได้รับสารเคมีผสม ระหว่าง 2,4'-DDT และ benzo(a)pyrene พบว่าสารเคมีชนิดดังกล่าวส่งผลต่อการยับยั้งทำงานของโปรตีน 40S ribosomal protein S7 ให้มีประสิทธิภาพในการทำงานที่ (Song et al., 2016) อีกทั้งยังมีรายงานในหอยสองฝาชนิด *Ruditapes philippinarum* พบว่า โปรตีน 40S ribosomal protein S7 เพิ่มขึ้นเมื่อหอยได้รับ endosulfan (Tao et al., 2013) ซึ่งขัดแย้งกับผลการศึกษาค้นคว้าของสาร DDT ในสิ่งแวดล้อมในครั้งนี้

กลุ่มที่ 4 Energy metabolism

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein)

หอยนางรมที่ได้รับสาร DDT พบความผิดปกติเกี่ยวกับกลไกการสร้างพลังงาน โดยพบว่าโปรตีนสำคัญที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานภายในเซลล์ (energy metabolism) มีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นจำนวน 2 ชนิด คือ SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A (spot # 5) และ ATP synthase subunit beta (spot # 20) SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A เป็นโปรตีนที่ช่วยบ่งบอกว่าเซลล์มีความต้องการพลังงานเพิ่มมากขึ้นในการทำกิจกรรมต่าง ๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีวิตและความอยู่รอด ตลอดจนการเพิ่มจำนวนเซลล์การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของโปรตีนชนิดนี้ในแมนเทิลเมื่อหอยนางรมปากจیبได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่ระดับ 10 และ 100 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง บ่งบอกว่าเซลล์มีความต้องการพลังงานสูงมาก จึงมีการแสดงออกของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงานออกมาเพิ่มขึ้น การกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน ATP synthase subunit beta แสดงให้เห็นว่าเซลล์มีความต้องการในการใช้พลังงานมากขึ้น พลังงานที่สร้างขึ้นนี้อาจถูกนำมาใช้สำหรับรักษาเสถียรภาพของเซลล์ให้ปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่ทำการศึกษาในหอยแมลงภู (*Perna viridis*) พบโปรตีนในเหงือกของหอยแมลงภูที่ได้รับสาร Benzo(a)pyrene ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อลิตร เป็นเวลา 7 วัน มีการกระตุ้นให้เกิดการสร้างโปรตีน ATP synthase subunit beta ที่เพิ่มขึ้น (Song et al., 2016)

กลุ่มที่ 5 Ion transport

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein)

โปรตีนกลุ่มนี้ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกับการขนส่งโมเลกุลของสาร ซึ่งพบว่าสาร DDT สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มนี้ได้แก่ voltage-dependent anion-selective channel protein 2 หรือ VDAC-2 (spot # 34) และ guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1) (spot # 35) ซึ่งเป็นโปรตีนสมาชิกในกลุ่ม VDAC ประกอบไปด้วย VDAC1, VDAC2 และ VDAC3 โปรตีน

เหล่านี้จะรวมตัวกันเป็น ion channel มีหน้าที่ควบคุมไอออนและโมเลกุลขนาดเล็กต่าง ๆ รวมถึง Ca^{2+} ที่ผ่านเข้าออกระหว่างไมโทคอนเดรียและไซโทพลาซึม (Rizzuto et al., 2009)

มีรายงานในหอยแมลงภู่ (*M. galloprovincialis*) ที่ได้รับสาร 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE 47) ซึ่งเป็นสารเคมีที่ถูกนำมาใช้ในอุตสาหกรรมผลิตแผงวงจรอิเล็กทรอนิกส์ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการลัดวงจร มีความคงทนสูง ย่อยสลายยากในสิ่งแวดล้อม มีการกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีนในเหงือกหอยแมลงภู่ ซึ่งเป็นโปรตีนในกลุ่ม Ion transport ได้แก่ VDAC-2 เป็นโปรตีนที่พบในไมโทคอนเดรีย สอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่พบว่าสาร DDT สามารถกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของโปรตีน VDAC-2 ซึ่งจัดว่าเป็นโปรตีนกลุ่มที่มีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ หากโปรตีน VDAC ถูกรบกวนอาจทำให้เสียสมดุลภายในเซลล์และทำให้เกิดการตายของเซลล์ได้ ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าหากโปรตีน VDAC เสียสมดุลก็จะส่งผลกระทบต่อควบคุมเมแทบอลิซึมของ Ca^{2+} ซึ่งมีความสำคัญต่อระบบการสร้างเปลือกของหอยนางรม เนื่องจากเปลือกหอยนางรมเกิดจากการสร้างแคลเซียมคาร์บอเนตที่ตกลงไปบนเปลือกเดิม โดยอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างเปลือก ได้แก่ แมนเทิล ดังนั้นหากกลไกการควบคุม แคลเซียมไอออนถูกรบกวน ก็จะส่งผลกระทบต่อกระบวนการสร้างเปลือกของหอยนางรมโดยตรง (Shoshan-Barmatz et al., 2017)

Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1) จีโปรตีน หรือ guanine nucleotide-binding proteins เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่เป็นสวิตช์โมเลกุลภายในเซลล์ มีหน้าที่ในการส่งผ่านสัญญาณจากสิ่งเร้าในรูปแบบต่าง ๆ นอกเซลล์เข้าสู่ภายในเซลล์ จีโปรตีนจะควบคุมกลไกต่าง ๆ รวมทั้งเอนไซม์ ช่องไอออน โปรตีนขนส่ง และกลไกการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ซึ่งเป็นการควบคุมการถอดรหัสยีนที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ การหดเกร็ง (contractility) รวมถึงการหลั่งสาร เช่น กระตุ้นให้เกิดการหลั่งเมือกของหอยนางรมที่เพิ่มขึ้น เป็นกลไกการป้องกันตัวเอง (defensive mechanism) เมื่อได้ผลกระทบจากสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย (Pales et al., 2016)

กลุ่มที่ 6 Gas exchange

โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein)

สาร DDT สามารถกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแลกเปลี่ยนแก๊ส ได้แก่ Hemoglobin subunit beta (spot # 4) Hb เป็นโปรตีนที่สำคัญในเม็ดเลือดแดง ทำหน้าที่ในการขนส่งออกซิเจนไปยังส่วนต่าง ๆ ภายในร่างกาย โครงสร้างประกอบด้วย 4 subunits โดยแต่ละ subunit ประกอบด้วย heme และ globin chain รวมกันเป็น quaternary structure โดยปกติแล้วเลือดของสัตว์จำพวกหอยสองฝาจะพบฮีโมไซยานิน (haemocyanin) ทำหน้าที่เป็นโปรตีนตัวพา หรือช่วยสะสมออกซิเจนในเลือด ฮีโมไซยานินจะมีโลหะทองแดง (Cu) จับกับโมเลกุลของโปรตีนในเลือด ซึ่งฮีโมไซยานินมีคุณสมบัติในการจับกับออกซิเจนได้น้อยกว่าฮีโมโกลบิน (hemoglobin) (Chen et al., 2017) เมื่อหอยนางรมได้รับสาร DDT เข้าสู่ร่างกาย จะทำให้ประสิทธิภาพในการทำงานลดลงหรือไม่สามารถขนส่งออกซิเจนไปยังส่วนต่าง ๆ ของร่างกายได้ ดังนั้นถ้าร่างกายได้รับโปรตีนไม่เพียงพอ จะทำให้ไม่มีฮีโมโกลบินไปจับกับฮีโม เม็ดเลือดแดงที่ได้จะมีความผิดปกติ และนำมาซึ่งสาเหตุของเลือดจาง แต่ยังมีหอยสองฝบบางชนิดที่สามารถพบฮีโมโกลบินได้ เช่น หอยแครง Arca (*Anadara satowi*) เป็นต้น (Ohnoki et al., 1973)

5.6 การหาตัวชี้วัดชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารดีดีทีในหอยนางรมปากจืบ

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ามีโปรตีนที่น่าสนใจและมีแนวโน้มที่ดีสำหรับ นำมาใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร DDT ในสิ่งแวดล้อม โดยใช้หอยนางรมปากจืบเป็นตัวชี้วัดทางชีวภาพ ซึ่งจะต้องเป็นโปรตีนที่ถูกกระตุ้นและยับยั้งเมื่อได้รับความเข้มข้นของสาร DDT ที่เพิ่มขึ้น โปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) และจากการศึกษาในครั้งนี้พบว่ามีโปรตีนที่มีแนวโน้มการแสดงออกของโปรตีนสัมพันธ์กับความเข้มข้นของสาร DDT ทั้งสิ้น 25 จุด มีแนวโน้มที่ดีสำหรับใช้เป็น potential biomarker ซึ่งโปรตีนดังกล่าวแสดงการเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนคิดเป็นจำนวน fold change ระหว่าง กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/L}$ กลุ่มทดสอบ DDT ที่ระดับความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/L}$ เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (0 $\mu\text{g/L}$) โดยใช้ค่า %s spot volume ที่อ่านได้จากโปรแกรม ImageMaster™ 2D Platinum 7.0 software (GE Healthcare, Sweden)

โปรตีนทั้ง 25 ชนิดที่มีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม มี 2 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสาร DDT (Dose-dependent up-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 18 ชนิด ได้แก่ hemoglobin subunit beta (spot #4), SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A (spot #5), uncharacterized protein ycf23 (spot #9), catalase (spot # 14, 15 และ 16), tubulin beta chain (spot #17), tubulin alpha 3 chain (spot # 18), tubulin alpha 3C/D chain (spot #19), ATP synthase subunit beta (spot # 20), tubulin beta 4 B chain (spot #21), actin (spot #25), uncharacterized protein PM1449 (spot #26), actin, muscletype A1 (spot #29), annexin A1 (spot #31), voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (spot #34), guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1) (spot #35), aldehyde dehydrogenase (spot #41),

กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผกผันตามความเข้มข้นของสาร DDT (Dose-dependent down-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้น โปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ 40S ribosomal protein S7 (spot #6), tropomyosin (spot #13), fructose-bisphosphate aldolase A (spot #32), actin (Fragment) (spot #34), heat shock cognate 71 kDa protein (spot #36), chaperone protein DnaK (spot #38), retinal dehydrogenase 1 (spot #39)

ส่วนโปรตีนบางจุดมีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) แต่ทิศทางหรือรูปแบบการเปลี่ยนแปลงปริมาณไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้นของสารทดสอบ (fluctuated protein) นั้นไม่ควรใช้เป็น potential protein biomarker เนื่องจากมีความแปรปรวนต่อปริมาณสารทดสอบ

5.7 ผลกระทบของสารดีดีทีต่อโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ

ผลการเปรียบเทียบระดับการแสดงออกของจุดโปรตีนในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจีบ เมื่อหอยนางรมปากจีบได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่ระดับ 100 µg/L เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง พบว่า DDT มีผลต่อปริมาณโปรตีนในเมือกของหอยนางรม ในกลุ่มทดสอบที่มีปริมาณแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจำนวนทั้งสิ้น 14 จุด ($P < 0.05$) โดยพบว่าสาร DDT กระตุ้นให้สร้างโปรตีนในเมือกเพิ่มขึ้นจำนวน 10 จุด และยับยั้งการสร้างโปรตีนทำให้ปริมาณโปรตีนในเมือกลดลงจำนวน 4 จุด เมื่อทำการระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มนี้ สามารถระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มที่มีการกระตุ้น 3 ชนิด ได้แก่ 1. Immunoglobulin kappa constant 2. Actin และ 3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) และสามารถระบุโปรตีนในกลุ่มที่มีการยับยั้งได้ 1 ชนิด คือ Serum albumin แสดงให้เห็นว่าสาร DDT มีผลต่อการสร้างและหลั่งโปรตีนที่พบในเมือก นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการสุ่มวิเคราะห์โปรตีนที่มีปริมาณมากและสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ 2 ชนิด คือ 1. Haptoglobin และ 2. SWI/SNF-related matrix-associated actin-dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A

โปรตีนที่ถูกเพิ่มปริมาณด้วยสาร DDT

1. Immunoglobulin kappa constant (P01834, จุดโปรตีนหมายเลข 8) MW = 11.76 KDa โปรตีน Immunoglobulin kappa constant เป็นส่วนประกอบของ Immunoglobulin หรือ แอนติบอดี โครงสร้างของ Immunoglobulin หรือ แอนติบอดี ประกอบด้วย พอลิเพปไทด์ 4 สาย เชื่อมกันด้วยพันธะไดซัลไฟด์ พอลิเพปไทด์ทั้ง 4 สาย ประกอบด้วยสายยาวหรือสายหนัก (heavy chain) 2 และสายสั้นหรือสายเบา (light chain) 2 สาย ทั้งสายหนักและสายเบา ประกอบด้วย 2 บริเวณ คือ บริเวณที่พบลำดับกรดอะมิโนมีการเปลี่ยนแปลงได้มาก (variable region) กับบริเวณที่พบลำดับกรดอะมิโนคงที่ (constant region) โดยโปรตีน Immunoglobulin kappa constant (P01834) ที่ระบุได้ในครั้งนี้ตรงกับบริเวณที่พบลำดับกรดอะมิโนคงที่ (constant region) ในสายยาวของ Immunoglobulin ซึ่งจะถูกระตุ้นให้มีการหลั่งเพิ่มขึ้นในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสาร DDT เนื่องจากโปรตีน Immunoglobulin เป็นแอนติบอดีที่สร้างจากเม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocytes จึงพบโปรตีนชนิดนี้ภายนอกเซลล์ เช่น พบในน้ำเลือด หรือ บริเวณ extracellular matrix ของเนื้อเยื่อ โดย Immunoglobulin kappa constant เป็นโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immune defense) ทำหน้าที่เป็น immune system process (Janardhan et al., 2014)

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

การศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบโปรตีน Immunoglobulin ชนิด IgGf-binding protein ในเมือกของหอยนางรมตะวันออก (*Crassostrea virginica*) (Pales et al., 2016) ยืนยันได้ว่าในเมือกของหอยนางรมมีแอนติบอดีอยู่ด้วย ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าที่พบการแสดงออกของโปรตีน Immunoglobulin kappa constant ที่เพิ่มขึ้นในกลุ่มทดสอบ คาดว่ามาจาก hemocyte แสดงให้เห็นว่าเมื่อหอยนางรมดำรงชีวิตอยู่ภายใต้สภาวะเครียดจากสาร DDT ที่เจือปนอยู่ในน้ำ อาจไปกระตุ้นหอยนางรม

ให้กำจัดหรือทำลายสิ่งแปลกปลอมที่ร่างกายไม่ต้องการให้สร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเพื่อตอบสนองต่อสาร DDT ที่ได้รับเป็นเวลา 96 ชั่วโมง เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงการตอบสนองต่อภาวะเครียดทางชีวภาพ

2. Actin (Q00214, จุดโปรตีนหมายเลข 32) MW = 42.33 KDa โปรตีน Actin เป็นโปรตีนชนิดรูปร่างกลม (Globular protein หรือ G-actin) ในภาวะที่ถูกกระตุ้น Globular actin จะเกิดการรวมตัวเป็นเกลียวคู่ (actin polymerization) ได้อย่างรวดเร็ว เกิดเป็นโครงสร้างใหม่เรียกว่า Double-helical filaments หรือ F-actin ซึ่งโปรตีน Actin มักอยู่ใต้ชั้นของเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) โปรตีน Actin มีการทำงานที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ exocytosis ของเซลล์ที่ต้องการขนส่งสารที่เซลล์นั้น ๆ สร้างขึ้นและถูกบรรจุไว้ในถุง vesicle ออกไปนอกเซลล์ (Porat-Shliom et al., 2013) โดยโปรตีน Actin (Q00214) ที่ระบุได้ในครั้งนี้พบมากขึ้นในเมือกหอยนางรมปากจیبที่ได้รับสัมผัสกับสาร DDT ที่ความเข้มข้น 100 µg/L

การศึกษาในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบว่าโปรตีน Actin (Q00214) เกี่ยวข้องกับผลกระทบทางพิษวิทยาของสารผสมระหว่าง DDT และ BaP ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L ตามลำดับ เป็นระยะเวลา 7 วัน บริเวณเหงือกในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ระบุว่ามีการเปลี่ยนแปลงของ Actin แสดงถึงการเกิดกระบวนการ apoptosis และ ความเครียดของเซลล์ต่อสารผสมระหว่าง DDT และ BaP (Song et al., 2016) ดังนั้นการศึกษานี้ที่พบการแสดงออกของ Actin ที่เพิ่มสูงขึ้นในกลุ่มทดสอบ บ่งบอกว่าร่างกายของหอยนางรมปากจیبมีความพยายามในการหลั่งเมือกที่อยู่ในรูปแบบของมิวซินแกรนูลออกมา มากขึ้น ด้วยกระบวนการ exocytosis แบบ apocrine ภายหลังจากการสัมผัสกับสาร DDT ซึ่งกระบวนการหลั่งเมือกที่อยู่ในรูปแบบของมิวซินแกรนูลออกจากเซลล์สร้างเมือกนี้เองจะทำให้มีโปรตีน Actin หลุดออกมาด้วย ซึ่งตรงกับผลการศึกษาทางมิวซิวิทยาถึงผลกระทบของสาร DDT ต่อโครงสร้างของเซลล์สร้างเมือกในหอยนางรมปากจیبที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น คือ สาร DDT มีผลไปกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเมือก ทำให้หอยนางรมปากจیبหลั่งเมือกออกมามากขึ้นภายหลังจากที่หอยนางรมปากจیبได้รับสัมผัสกับสาร DDT

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

โครงสร้างของ Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ประกอบด้วยตำแหน่ง EF-hand motif หรือ calcium-binding motif ที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียมไอออน (Ca^{2+}) สิ่งมีชีวิตมีกลไกในการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม โดยสิ่งมีชีวิตจะอาศัยสัญญาณที่ถูกสร้างขึ้นจากภายในเซลล์ เมื่อมีการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อม เช่น ความเค็ม ความแห้งแล้ง การเกิดบาดแผล การถูกโจมตีจากเชื้อโรค สารเคมีที่เป็นพิษ จะส่งผลให้เกิดการเพิ่มขึ้นของระดับแคลเซียมไอออนภายในไซโทซอล (cytosol) อย่างรวดเร็ว เมื่อระดับแคลเซียมไอออนเพิ่มสูงขึ้น จะทำให้เกิดการกระตุ้นโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม (Ca^{2+} sensor protein) เช่น โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) ซึ่งจะมีตำแหน่ง EF-hand motif หรือ calcium-binding motif ที่ทำหน้าที่ในการจับกับแคลเซียมไอออน เมื่อจับกับแคลเซียมไอออนแล้วจะเกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง จึงทำให้สามารถกระตุ้นโปรตีนเป้าหมาย เพื่อส่งผ่านสัญญาณต่อไปเป็นลำดับ จนกระทั่งถึงการแสดงออกของยีนที่สำคัญต่อการปรับตัวของสิ่งมีชีวิต เพื่อตอบสนองต่อการเปลี่ยนแปลงของสภาวะแวดล้อมต่างๆ ในระดับเซลล์ได้อย่างเหมาะสม ทั้งนี้ภายในไซโทซอลจะมีโปรตีนจำนวนมาก ที่อยู่ในกระบวนการส่งสัญญาณแคลเซียมนี้ แต่ตัวมันเองไม่สามารถจับกับแคลเซียมได้โดยตรง โปรตีนเหล่านี้จึงต้องอาศัยโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียม เช่น โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) มาเป็นโปรตีนรับสัญญาณแคลเซียมขั้นต้น จึงเรียกได้ว่า โปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) เป็นโปรตีนที่มีหน้าที่การ

ทำงานที่หลากหลาย เนื่องจากมีความสามารถในการกำหนด activity ของโปรตีนอื่นๆ โดยโปรตีน Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909) ที่ระบุได้ในครั้งนี้ถูกกระตุ้นให้มีการหลังเพิ่มขึ้นในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีดีที

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

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

โปรตีนที่มีปริมาณลดลงด้วยสารดีดีที

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

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

การศึกษาในมนุษย์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบว่าโปรตีน Serum albumin (P02769) เกี่ยวข้องกับระดับวิทยาของโรคมาเร็ง โดยพบการแสดงออกของโปรตีนชนิดนี้ในซีรัม (serum) ของผู้ป่วยโรคมาเร็งเยื่อบุโพรงมดลูก[71] (Kikuchi et al., 2007) และยังพบโปรตีนชนิดนี้ในรายงานการศึกษาโปรตีนที่พบในพลาสมาของผู้ป่วยโรคหลอดเลือดสมอง ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ [72] (Lopez et al., 2015) เนื่องจาก Serum albumin เป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ยึดจับกับสารต่างๆ เพื่อให้ร่างกายสามารถนำสารนั้นไปใช้ในการทำงานของเซลล์ได้ โปรตีนชนิดนี้ยังเกี่ยวข้องกับภาวะการติดเชื้อ และโปรตีนชนิดนี้จะค่อยๆ ถูกลดการแสดงออกลง หากเนื้อเยื่อเกิดการอักเสบเรื้อรัง ซึ่งโปรตีนชนิดนี้ยังทำหน้าที่เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ เมื่อสิ่งมีชีวิตต้องเผชิญกับสภาวะ oxidative stress (Prakash, 2017) ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าที่พบการแสดงออกของ Serum albumin ที่ลดลงในกลุ่มทดสอบ บ่งบอกว่าร่างกายของหอยนางรมปากจیبเกิดการตอบสนองต่อสภาวะเครียดหลังจากการสัมผัสกับสารดีดีที

ทั้งนี้ข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโปรตีนทั้ง 4 ชนิด ข้างต้น แสดงให้เห็นว่าสารดีดีทีมีผลต่อหอยนางรมปากจیب โดยทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของโปรตีนในเมือกของหอยนางรมปากจیب ได้แก่ โปรตีนที่แสดงออกเพิ่มขึ้นด้วยสารดีดีที (1. Immunoglobulin kappa constant (P01834), 2. Actin (Q00214) และ 3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment) (P86909) และโปรตีนที่

แสดงออกลดลงด้วยสารดีตีที (Serum albumin (P02769)) การแสดงออกของโปรตีนเหล่านี้บ่งบอกถึงการปรับตัวในร่างกายของหอยนางรมปากจีบ เพื่อตอบสนองต่อสภาวะแวดล้อมที่มีสารดีตีที โดยมีการตอบสนองพื้นฐานที่เกี่ยวกับการสร้างโปรตีนที่สำคัญ และระบบการทำลายโปรตีนที่เสียสภาพ ซึ่งสารดีตีทีน่าจะสามารถกระตุ้นให้มีการสร้างอนุมูลอิสระได้ สอดคล้องกับการพบโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการ oxidative stress response ในสภาวะแวดล้อมที่มีสารดีตีทีของหอยนางรมปากจีบ องค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษาในครั้งนี้สามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์หาตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarkers) ซึ่งใช้ติดตามการปนเปื้อนของดีตีทีในสิ่งแวดล้อม

โปรตีนที่มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลง (unchanged abundant proteins)

ในการศึกษาครั้งนี้สามารถระบุโปรตีนที่มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลงได้ 2 ชนิด ได้แก่

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

โครงสร้างของโปรตีน Haptoglobin ประกอบด้วย โปรตีนรูปร่างกลม (globular protein) บทบาททางชีววิทยาของ Haptoglobin มีหลายอย่าง แต่หน้าที่หลัก คือ การป้องกันการสูญเสียธาตุเหล็ก (iron) โดย Haptoglobin จะไปจับกับ hemoglobin เกิดเป็นโครงสร้างที่คงตัวที่เรียกว่า haptoglobin-haemoglobin complex โดยในสภาวะที่เกิดเม็ดเลือดแดงแตกในหลอดเลือด (intravascular hemolysis) โครงสร้างดังกล่าวนี้จะไม่ถูกรองผ่านไตเนื่องจากมีขนาดใหญ่ และยังเชื่อว่ามีบทบาทยับยั้งการเจริญของเชื้อแบคทีเรีย (bacteriostatic effect) โดย Haptoglobin จะไปจับกับ hemoglobin ทำให้มีเหล็กไม่เพียงพอที่แบคทีเรียบางชนิดนำไปใช้เพื่อการเจริญเติบโต เช่น *Escherichia coli* โดยโปรตีน Haptoglobin (P50417) ที่ระบุได้ในครั้งนี้มีปริมาณมากและไม่เปลี่ยนแปลงในเมือกหอยที่ได้รับสัมผัสสารดีตีที

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

การศึกษาในมนุษย์ด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์พบการแสดงออกของโปรตีน Haptoglobin (P50417) ระบุว่าผู้ป่วยที่มีความบกพร่องทางพันธุกรรมในการสร้างโปรตีน Haptoglobin มีความเสี่ยงต่อการเป็นโรคภูมิแพ้ (Ko et al., 2013) เนื่องจาก Haptoglobin เป็นไกลโคโปรตีน ทำหน้าที่หลักในการจับกับฮีโมโกลบินอิสระ เพื่อการกำจัดฮีโมโกลบินอิสระ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการทำลายความเสียหายจากการเกิดอนุมูลอิสระ (Shih et al., 2014) และ Haptoglobin ยังมีหน้าที่ป้องกันความเสียหายจากการเกิดกระบวนการ oxidative ในเนื้อเยื่อ จึงมีบทบาทสำคัญในการป้องกันสารต้านอนุมูลอิสระของร่างกาย (Yang et al., 2003) ดังนั้น การศึกษาครั้งนี้ที่พบ Haptoglobin ในเมือกของหอยนางรมปากจีบ บ่งบอกว่าหอยนางรมปากจีบมีการสร้างและหลังโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการป้องกันความเสียหายจากการเกิดกระบวนการ oxidative เพื่อตอบสนองต่อสภาวะเครียดต่างๆ ที่ได้รับจากสิ่งแวดล้อมออกมารวมกับการหลั่งเมือก ซึ่งเมือกที่หลั่งออกมานี้จะเคลือบทั่วลำตัวของหอยนางรม เมือกจึงเป็นปราการแรกในการป้องกันอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก

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

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

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

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

5.8 การศึกษาการปนเปื้อนของประกอบบิวทิลทินบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก

เมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาการสะสมของสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด จากการศึกษาในครั้งนี้กับในอดีตพบว่าปริมาณการสะสมของสารกลุ่มนี้ในหอยแมลงภู่ลดลงอย่างมาก โดยในอดีตที่มีการเก็บตัวอย่างในปี ค.ศ. 1994/1995 ที่พบปริมาณการสะสมของสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่ในจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราดเท่ากับ 32, 73 และ 16 ng/g wet weight ตามลำดับ (Kan-Atireklap et al., 1997) และในปี ค.ศ. 2004 ที่พบรายงานในจังหวัดชลบุรี 70 ng/g wet weight (Harino et al., 2006) ปัจจุบันลดลงเหลือ 0.23, 0.10 และ 0.15 ng/g wet weight ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าประกาศขององค์การทางทะเลระหว่างประเทศ (IMO) ที่ห้ามใช้สีทาเรือที่มีส่วนผสมของสาร TBT ในปี ค.ศ. 2008 มีผลทำให้ปริมาณการสะสมของสารบิวทิลทินในหอยแมลงภู่มีแนวโน้มลดลงในจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด

เมื่อพิจารณาตามมาตรฐานความปลอดภัยของสารปนเปื้อนในอาหาร พบว่าไม่มีการระบุเกณฑ์ขั้นต่ำของสารประกอบบิวทิลทินในอาหาร เนื่องจากสารกลุ่มนี้ไม่พบข้อมูลความเป็นพิษที่แน่นอนต่อมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แต่มีผลกระทบต่อสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์กลุ่มหอย (mollusk) แต่เนื่องจากสารประกอบบิวทิลทินมีดีบุก หรือ Tin (Sn) เป็นองค์ประกอบ เมื่อพิจารณาตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขฉบับที่ 98 พ.ศ. 2529 (ค.ศ. 1986) เรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อน

กำหนดให้ตรวจพบปริมาณดีบุกได้ไม่เกิน 250 มิลลิกรัม/อาหาร 1 กิโลกรัม หรือเท่ากับ 250,000 ng/g wet weight (Ministry of Public Health, 1986) ดังนั้นเมื่อเทียบกับปริมาณที่พบในงานวิจัยครั้งนี้จึงไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่ระบุไว้ในมาตรฐานข้างต้น อย่างไรก็ตามแม้ว่าปริมาณการสะสมของสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยแมลงภู่จะอยู่ในระดับที่ปลอดภัยต่อผู้บริโภค แต่ก็ควรติดตามตรวจสอบต่อไปเนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพประชากรของหอยแมลงภู่รวมถึงสัตว์น้ำชนิดอื่น ในระยะยาวอาจส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของประชากรได้ ซึ่งควรทำการศึกษาต่อไปในอนาคต

เมื่อพิจารณาสถานการณ์การปนเปื้อนของสารประกอบบิวทิลทินทั่วโลก ภายหลังจากที่ IMO ประกาศห้ามใช้สีทาเรือที่มีส่วนผสมของสารประกอบบิวทิลทินในปี ค.ศ. 2008 พบว่า ได้มีการเฝ้าระวังและติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนสารประกอบบิวทิลทินที่สะสมและแพร่กระจายในระบบนิเวศต่างๆ อย่างต่อเนื่องทั้งในมวลน้ำ สิ่งมีชีวิต และตะกอนดิน ซึ่งทำให้ทราบถึงแนวโน้มการสะสมสารประกอบบิวทิลทินอย่างต่อเนื่อง การศึกษาในปัจจุบันพบว่าสถานการณ์การปนเปื้อนสารประกอบบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมมีแนวโน้มลดลงในหลายประเทศ ยกตัวอย่าง เช่น ประเทศเกาหลีใต้ ในปี ค.ศ. 2008/2009 ตรวจพบปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในน้ำทะเลเฉลี่ย 2 ng/L ซึ่งลดลงอย่างมาก เมื่อเทียบกับปี ค.ศ. 1995/1997 ที่พบปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในน้ำทะเลเฉลี่ย 34 ng/L และพบปริมาณสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยนางรมลดลงประมาณ 4 เท่า คือจาก 714 ng/g dry weight ในปี ค.ศ. 1995/1997 ลดลงเป็น 158 ng/g dry weight ในปี ค.ศ. 2008/2009 อย่างไรก็ตามปริมาณการสะสมของสารประกอบบิวทิลทินในดินตะกอนไม่มีแนวโน้มลดลงอย่างมีนัยสำคัญ กล่าวคือพบการสะสมของสารประกอบบิวทิลทินในตะกอนดินเฉลี่ย 284 ng/g dry weight ในปี ค.ศ. 1995/1997 และ 256 ng/g dry weight ในปี ค.ศ. 2008/2009 (Shim et al., 1998; Kim et al., 2014) อย่างไรก็ตามบางประเทศยังสามารถตรวจพบสารประกอบบิวทิลทินได้ในปริมาณสูง เช่น ประเทศชิลี มีการตรวจวัดในเนื้อเยื่อของหอยฝาเดียว 3 ชนิด ได้แก่ *Acanthina monodon*, *Xanthochorus cassidiformis* และ *Oliva peruviana* บริเวณชายฝั่งทะเลตอนกลางของประเทศ พบการปนเปื้อนในเนื้อเยื่อสูง และในบางพื้นที่พบได้สูงที่สุดถึง 600 ng/g ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวอาจส่งผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศชิลีได้ อีกทั้งปริมาณการสะสมในตะกอนดินยังไม่มีแนวโน้มลดลงเมื่อเทียบกับอดีต (Batista et al., 2016) และปริมาณดังกล่าวสอดคล้องกับประเทศอื่นๆ ที่อยู่ในภูมิภาคเดียวกัน เช่น เปรู (Castro et al., 2018) เนื่องจากประเทศชิลีและเปรูไม่ได้ลงนามในข้อตกลงของ IMO จึงทำให้แนวโน้มการปนเปื้อนยังมีปริมาณสูงอยู่

สรุปผลการวิจัย

1. สารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 0.25 -10 µg/L ในน้ำทะเล ส่งผลกระทบต่อชีววิทยาการเจริญของตัวอ่อนหอยนางรม ความรุนแรงของผลกระทบแปรผันตามระยะเวลาและความเข้มข้นของสารทดสอบ โดยสารดีดีทีนี้ทำให้ตัวอ่อนระยะ gastrula ระยะ trochophore และ ระยะ D-shape veliger เจริญผิดปกติ และมีพัฒนาการช้าลง

2. ผลจากการศึกษาความเป็นพิษเฉียบพลันของสารดีดีทีต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจیبตัวเต็มวัย พบว่าสารดีดีทีที่มีพิษต่อหอยนางรมปากจیبทำให้หอยในกลุ่มทดสอบตาย และมีค่า LC50 (50% lethal concentration) ณ เวลา 96 ชั่วโมง เท่ากับ 891.25 µg/L

3. สารดีดีทีที่ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อแมนเทิล เหงือก และ ต่อมย่อยอาหาร ของหอยนางรมปากจیبในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 µg/L

4. สารดีดีทีที่ส่งผลกระทบต่อโปรตีนของเนื้อเยื่อแมนเทิลหอยนางรมปากจیبโดยในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 µg/L โดยมีผลต่อโปรตีนในกลุ่ม cytoskeleton, stress response, energy metabolism, protein synthesis, ion transport และ gas exchange

5. โปรตีนที่มีแนวโน้มเหมาะสมสำหรับใช้เป็น potential biomarker เพื่อตรวจสอบการปนเปื้อนของสารดีดีทีในสิ่งแวดล้อม มี 25 ชนิด แบ่งเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่

5.1 กลุ่มที่ 1 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสารดีดีที (Dose-dependent up-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่ถูกกระตุ้นให้สร้างเพิ่มขึ้นในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปโปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 18 ชนิด ได้แก่ hemoglobin subunit beta (spot #4), SWI/SNF related matrix associated actin dependent regulator of chromatin subfamily A containing DEAD/H box 1A (spot #5), uncharacterized protein ycf23 (spot #9), catalase (spot # 14, 15 และ 16), tubulin beta chain (spot #17), tubulin alpha 3 chain (spot # 18), tubulin alpha 3C/D chain (spot #19), ATP synthase subunit beta (spot # 20), tubulin beta 4 B chain (spot #21), actin (spot #25), uncharacterized protein PM1449 (spot #26), actin, muscletype A1 (spot #29), annexin A1 (spot #31), voltage-dependent anion-selective channel protein 2 (VDAC-2) (spot #34), guanine nucleotide-binding protein subunit beta-2-like 1 (GNB2L1) (spot #35) และ aldehyde dehydrogenase (spot #41),

5.2 กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่มีการแสดงออกแปรผันตามความเข้มข้นของสารดีดีที (Dose-dependent down-regulated protein) หมายถึงโปรตีนกลุ่มที่มีการสร้างลดลงในหอยนางรมที่ได้รับสัมผัสกับสารดีดีทีที่มีระดับความเข้มข้นสูงขึ้นไปโปรตีนในกลุ่มนี้มีจำนวน 7 ชนิด ได้แก่ 40S ribosomal protein S7 (spot #6), tropomyosin (spot #13), fructose-bisphosphate aldolase A (spot #32), actin (Fragment) (spot #34), heat shock cognate 71 kDa protein (spot #36), chaperone protein DnaK (spot #38) และ retinal dehydrogenase 1 (spot #39)

6. สารดีดีทีที่ส่งผลกระทบต่อโปรตีนของเมือกหอยนางรมปากจیبโดยในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสัมผัสสารดีดีทีที่ระดับความเข้มข้น 100 µg/L โดยสารดีดีทีที่สามารถเพิ่มความเครียดภายในเซลล์สร้างเมือกได้ โดยที่สารดีดีทีที่มีผลไปเพิ่มการแสดงออกของโปรตีน 3 ชนิด ในเมือกที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์สร้างเมือกของหอยนางรมปากจیب คือ 1. Immunoglobulin kappa constant 2. Actin, muscle และ 3. Sarcoplasmic calcium-binding protein (Fragment)

7. การวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบบิวทิลทินโดยเทคนิคการสกัดแบบ solid-liquid extraction และใช้สาร Sodium tetraethylborate (NaB(Et)₄) ในการสกัดของสารประกอบทิน และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) ในครั้งนี้ สามารถวิเคราะห์สารประกอบบิวทิลทินในหอยแมลงภู่ชนิด *Perna viridis* บริเวณชายฝั่งภาคจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด พบมีค่าเฉลี่ยค่าเท่ากับ 1.04, 5.98 และ 0.95 ng/g dry weight ตามลำดับ ซึ่งเมื่อคิดเป็นหน่วยในน้ำหนักสดจะเทียบเท่ากับ 0.23, 0.10 และ 0.15 ng/g wet weight ตามลำดับ แม้ว่ายังคงพบการปนเปื้อนสารประกอบบิวทิลทินในสิ่งมีชีวิต แต่มีแนวโน้มการปนเปื้อนลดลงอย่างมากเมื่อเทียบกับการรายงานการปนเปื้อนสารประกอบบิวทิลทินในอดีต และเมื่อพิจารณาตามมาตรฐานความปลอดภัยของสารปนเปื้อนใน ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุขเรื่องมาตรฐานอาหารที่มีสารปนเปื้อนพบว่าไม่เกินเกณฑ์มาตรฐานที่ระบุไว้ นอกจากนี้ผลจากการศึกษาในครั้งนี้และในรายงานจากประเทศอื่น ๆ แสดงให้เห็นว่ามาตรการที่ IMO ประกาศใช้เป็นผลทำให้การปนเปื้อนลดลงในหลายพื้นที่ทั่วโลก รวมถึงในพื้นที่ชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด อย่างไรก็ตามก็ยังสามารถพบการสะสมของสารกลุ่มนี้สูงในบางประเทศโดยเฉพาะประเทศที่ไม่มีกฎหมายควบคุมการใช้สารกลุ่มนี้โดยตรง นอกจากนี้การศึกษานี้ทำการวิเคราะห์ในตัวอย่างสัตว์เท่านั้น และทำการเก็บตัวอย่างจากพื้นที่สามจังหวัด ดังนั้นจึงควรมีการตรวจวัดเพิ่มเติมอย่างต่อเนื่องในอนาคต โดยควรทำการตรวจวัดในมวลน้ำและในดินตะกอนเปรียบเทียบกับ ซึ่งจะทำให้เห็นแนวโน้มการปนเปื้อนได้ชัดเจนขึ้น เนื่องจากสารกลุ่มนี้เป็นสารที่มีการสะสมยาวนาน persistent organic pollutants (POPs) จึงอาจมีการสะสมในสิ่งแวดล้อมได้ยาวนาน

ผลผลิต (Output)

1. ผลผลิตจากโครงการวิจัยดังกล่าวมีเป้าหมายเผยแพร่ผลการศึกษาดังนี้

1.1 เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับนานาชาติในฐานข้อมูล ISI 1 เรื่อง ดังนี้

Effect of DDT on proteome profile of oyster tissue and potential biomarker of DDT exposure ในวารสาร Proteomics โดยมีคณะผู้วิจัย ได้แก่ Supatta Chuey Cham, Chantragran Srisomsap, Daranee Chokchaichamnankit, Jisnuson Svasti, Sutin Kingtong*

1.2 เผยแพร่ในวารสารวิจัยระดับชาติในฐานข้อมูล TCI 2 เรื่อง ดังนี้

1. ปาริชาติ สิงห์โตทอง สุภัททา ฉ่อยฉำ และ สุทิน กิ่งทอง. 2561. ผลกระทบของดีดีทีต่อเซลล์สร้างเมือกจากหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*). Veridian E-Journal, Science and Technology Silpakorn University, 5(4), 82-95. **(published)**
2. ชนพพล กลิ่นกลบ กิตติยา เขียร์แมน นิตยา สุตศิริ อาภาพร บุญมี และ สุทิน กิ่งทอง. 2562. สารประกอบบิวทิลทินในหอยแมลงภู่ชนิด *Perna viridis* บริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี ระยอง และตราด. วารสาร มทร. อีสาน **(accepted)**

1.3 เผยแพร่ในงานประชุมนานาชาติ 1 เรื่อง

ในงานประชุมวิชาการ PROTEOMIC FORUM 2019, March 24–28, 2019, Germany)
เรื่องที่ นำเสนอ คือ “Effect of DDT on proteome profile of oyster tissue and potential biomarker of DDT exposure” (Supatta Chuey Cham, Chantragran Srisomsap, Daranee Chokchaichamnankit, Jisnuson Svasti, Sutin Kingtong*)
โดย นางสาวสุภัททา ฉ่อยฉำ ได้รับเชิญให้เป็นผู้นำเสนอผลงานประเภทโปสเตอร์ในงานประชุมดังกล่าว และจะเดินทางเข้าร่วมงานประชุมวิชาการและนำเสนอผลงานเรื่องดังกล่าว ณ เมืองเบอร์ลิน ประเทศเยอรมันระหว่างวันที่ 22 มีนาคม – 5 เมษายน พ.ศ. 2562

2. ได้แผนที่อ้างอิงโปรตีน (proteome reference map) สำหรับการศึกษาโปรตีโอมในเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบในอนาคต

บรรณานุกรม

- ชลีรัตน์ พยอมรัมย์ (2519). การศึกษาการกระจายของ ดีดีที และ พีซีบี ในบริเวณแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง. วิทยานิพนธ์วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทางทะเล, คณะวิทยาศาสตร์, จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.
- ปิยะวรรณ ศรีวิลาส และกานดา ใจดี. (2547). การปนเปื้อนของสารฆ่าแมลงกลุ่มออร์กาโนคลอรีนในดิน ตะกอนบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก. สถาบันวิทยาศาสตร์ทางทะเล, มหาวิทยาลัยบูรพา, ชลบุรี.
- Aebersold, R., & Mann, M. (2003). Mass Spectrometry-Based Proteomics. *Nature*, 422, 198–207.
- Al, W., & Nairan, N. (2016). Gender Differences: Motivations for performing physical exercise among adults in Shah Alam. *Procedia - Social and Behavioral Sciences*, 202, 522–530.
- Alzieu, C. L., Sanjuan, J., Deltreil, J. P., & Borel, M. (1986). Tin contamination in Arcachon Bay: Effects on oyster shell anomalies. *Marine Pollution Bulletin*, 17(11), 494–498.
- Antizar-Ladislao, B. (2008). Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. *Environment International*, 34(2), 292–308.
- Apraiz, I., Mi, J., & Cristobal, S. (2006). Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Molecular & Cellular Proteomics*, 5, 1274–1285.
- Barker, P. S., & Morrison, F. O. (1964). Break down of DDT to DDD in mouse tissue. *Canadian Journal of Zoology*, 42, 324–325.
- Batista, R. M., Castro, I. B., & Fillmann, G. (2016). Imposex and butyltin contamination still evident in Chile after TBT global ban. *Science of the Total Environment*, 566, 446–453.
- Brun, N. T., Ross, N. W., & Boghen, A. D. (2000). Changes in the electrophoretic profiles of gill mucus proteases of the eastern oyster *Crassostrea virginica* in response to infection by the turbellarian *Urastoma cyprinae*. *Journal of Invertebrate Pathology*, 75(2), 163–170.
- Bryan, G. W., Gibbs, P. E., Hummerstone, L. G., & Burt, G. R. (1986). The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South West England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *Journal of the Marine Biological Association of the United Kingdom*, 66(3), 611–640.
- Castro, Í. B., Iannacone, J., Santos, S., & Fillmann, G. (2018). TBT is still a matter of concern in Peru. *Chemosphere*, 205, 253–259.
- Ceciliani, F., Ceron, J.J., Eckersall, D., & Sauerwein, H. (2012). Acute phase proteins in ruminants. *Journal of proteomics*, 75, 4207–4231.
- Champ, M. A. (2000). A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Science of the Total Environment*, 258(1-2), 21–71.

- Chen, C. W., Chen, C. F., Ju, Y. R., & Dong, C. Di. (2016). Assessment of the bioaccumulation and biodegradation of butyltin compounds by *Thalamita crenata* in Kaohsiung Harbor, Taiwan. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *113*, 97–104.
- Chen, Y., Li, C., Zhu, J., Xie, W., Hu, X., Song, L., Zi, J., & Yu, R. (2016). Purification and characterization of an antibacterial and anti-inflammatory polypeptide from *Arca subcrenata*. *International Journal of Biological Macromolecules*, *96*, 177–184.
- Choi, M., Moon, H. B., Yu, J., Eom, J. Y., & Choi, H. G. (2009). Butyltin contamination in industrialized bays associated with intensive marine activities in Korea. *Archives of environmental contamination and toxicology*, *57*(1), 77–85
- Cohn, B. A., Wolff, M. S., Cirillo, P. M., & Sholtz, R. I. (2007). DDT and breast cancer in young women: new data on the significance of age at exposure. *Environmental Health Perspectives*, *115*, 1406–1414.
- Cole, R. F., Mills, G. A., Parker, R., Bolam, T., Birchenough, A., Kröger, S., & Fones, G. R. (2015). Trends in the analysis and monitoring of organotins in the aquatic environment. *Trends in Environmental Analytical Chemistry*, *8*, 1–11.
- Domon, B., & Aebersold, R. (2006). Mass Spectrometry and Protein Analysis. *Science*, *312*, 212–217.
- Dowling, V., Hoarau, P. C., Halloran, J. O., Pelt, F. Van, Brien, N. O., & Sheehan, D. (2006). Protein carbonylation and heat shock response in *Ruditapes decussatus* following *p*, *p*-dichlorodiphenyldichloroethylene (DDE) exposure: A proteomic approach reveals that DDE causes oxidative stress. *Aquatic Toxicology*, *77*, 11–18.
- Dwivedi, J., & Trombetta, L. (2006). Acute toxicity and bioaccumulation of Tributyltin in tissues of *Urolophus jamaicensis* (Yellow Stingray). *Journal of toxicology and environmental health. Part A*, *69*, 1311–1323.
- Earnest, R. D., & P. E. Benville, J.r. (1971). Correlation of DDT and lipid levels for certain San Francisco Bay fish. *Pesticides Monitoring Journal*, *5*(3), 235–241.
- Edwards, J. G. (2004). DDT: a case study in scientific fraud. *Journal of American Physicians and Surgeons*, *9*(3), 83–88.
- Fent, K. (1996). Ecotoxicology of organotin compounds. *Critical Reviews in Toxicology*, *26*(1), 3–117.
- Galtsoff, P.S. (1964) The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. *Fishery Bulletin*, *64*, 1–480.
- Geng, X., Wei, H., Shang, H., Zhou, M., Chen, B., Zhang, F., Zang, X., & Li, P., Sun, J., & Che, J., Zhang, Y., & Xu, C. (2015). Proteomic analysis of the skin of Chinese giant salamander (*Andrias davidianus*). *Journal of Proteomics*, *3*, 196–208.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., & Bebianno, M.J. (2004). Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Marine Environmental Research*, *54*(3–5), 413–417.

- Goldberg, E. D. (1986). TBT: an environmental dilemma. *Environment Science and Policy for Sustainable Development*, 28(8), 17–44.
- Goldberg, E. D., Bowen, V. T., Farrington, J. W., Harvey, G., Martin, J. H., Parker, P. L., Risenborough, R. W., Robertson, W., Schneider, E., & Gamble, E. (1978). The mussel watch. *Environmental Conservation*, 5, 101–125.
- Horiguchi, T., Kojima, M., Hamada, F., Kajikawa, A., Shiraishi, H., Morita, M., & Shimizu, M. (2006). Impact of tributyltin and triphenyltin on ivory shell (*Babylonia japonica*) populations. *Environmental Health Perspectives*, 114(1), 13–19.
- Harino, H., Ohji, M., Wattayakorn, G., Arai, T., Rungsupha, S., & Miyazaki, N. (2006). Occurrence of antifouling biocides in sediment and green mussels from Thailand. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 51(3), 400–407.
- Hartwell, Ian. (2004). Distribution of DDT in sediments off the central California coast. *Marine pollution bulletin*, 49, 299–305.
- International Maritime Organization (IMO). (2001). International convention on the control of harmful anti-fouling systems on ships. Access (August, 2018). Available ([http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-on-the-Control-of-Harmful-Anti-fouling-Systems-on-Ships-\(AFS\).aspx](http://www.imo.org/en/About/Conventions/ListOfConventions/Pages/International-Convention-on-the-Control-of-Harmful-Anti-fouling-Systems-on-Ships-(AFS).aspx))
- Issaq, J.H., & Veenstra, T. (2008). Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2D-PAGE): Advances and perspectives. *BioTechniques*, 44, 697–698.
- Janardhan, A., Kumar, A.P., Viswanath, B., Saigopal, D.V., & Narasimha, G. (2014). Production of Bioactive Compounds by Actinomycetes and Their Antioxidant Properties. *Biotechnology Research International*, 217030, 1–8.
- Jensen, H. F., Holmer, M., & Dahllöf, I. (2004). Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. *Marine Pollution Bulletin*, 49(7-8), 564–573.
- Jo, P.G., Choi, Y.K., & Choi, C.Y. (2008). Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure. *Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology*, 147, 460–469.
- Kan-Atireklap, S., Tanabe, S., Sanguansin, J., Tabucanon, M. S., & Hungspreugs, M. (1997). Contamination by butyltin compounds and organochlorine residues in green mussel (*Perna viridis*, L.) from Thailand coastal waters. *Environmental Pollution*, 97(1-2), 79–89.
- Kegley, S. (1999). *Disrupting the Balance, Ecological Impacts of Pesticides in California*. California: USA.
- Khondee, P., Srisomsap, C., Chokchaichamnankit, D., Svasti, J., Simpson, R. J., & Kingtong, S. (2016). Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata*. *Environmental Pollution*, 218, 855–862.

- Kikuchi, T., & Carbone, D. (2007). Kikuchi T, Carbone DP.. Proteomics analysis in lung cancer: challenges and opportunities. *Respirology* 12: 22-28. *Respirology*, 12, 22–28.
- Kim, N. S., Hong, S. H., Yim, U. H., Shin, K. H., & Shim, W. J. (2014). Temporal changes in TBT pollution in water, sediment, and oyster from Jinhae Bay after the total ban in South Korea. *Marine Pollution Bulletin*, 86(1-2), 547–554.
- Kim, T., Jeon, S., Hong, S., Song, S. J., Kwon, B. O., Ryu, J., & Khim, J. S. (2017). Spatiotemporal distributions of butyltin compounds in various intertidal organisms along the Samcheok and Tongyeong coasts of Korea. *Chemosphere*, 172, 268–277.
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., & Janvilisri, T. (2007). ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquatic Toxicology*, 85, 124–32.
- Kingtong, S., Kellner, K., Bernay, B., Goux, D., Sourdain, P., & Berthelin, C.H. (2013). Proteomic identification of protein associated to mature spermatozoa in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *Proteomics Journal*, 82, 81–91.
- Ko, X. H., Mrcic-flogel, T. D., & Hofer, S. B. (2014). Emergence of Feature-Specific Connectivity in Cortical Microcircuits in the Absence of Visual Experience, 34(29), 9812–9816.
- López, A. M., Noriega, L. G., Diaz, M., Torres, N., & Tovar, A. R. (2015). Plasma branched-chain and aromatic amino acid concentration after ingestion of an urban or rural diet in rural Mexican women. *BMC Obesity*, 2(1), 4–9.
- Macek, K. J., & McAllister, W. A. (1970). Insecticide Susceptibility of Some Common Fish Family Representatives. *Transactions of the American Fisheries Society*, 99(1), 20–27.
- Mattos, Y., Stotz, W. B., Romero, M. S., Bravo, M., Fillmann, G., & Castro, Í. B. (2017). Butyltin contamination in Northern Chilean coast: Is there a potential risk for consumers. *Science of the Total Environment*, 595, 209–217.
- Micić, M., Bihari, N., Labura, Ž., Müller, W., & Batel, R. (2001). Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquatic Toxicology*, 55, 61–73.
- Ministry of Public Health. (1986). Prescribing standards of contaminated substances. No. 98. (in Thai).
- Niksirat, H., Andersson, L., James, P., & Kouba, A. (2014). Proteomic profiling of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* egg and spermatophore Proteomic profiling of the signal crayfish *Pacifastacus leniusculus* egg and spermatophore. *Animal Reproduction Science*, 149(3–4), 335–344.
- Oehlmann, J., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, U., & Bauer, B. (1998). Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Strm, 1768) (*Prosobranchia*, *Stenoglossa*). *Aquatic Toxicology*, 43(4), 239–260.
- Ohji, M., Arai, & T., Miyazaki, N. (2005). Acute toxicity of tributyltin to the Caprellidea (*Crustacea: Amphipoda*). *Marine Environmental Research*, 59(3), 197–201.

- Ohnoki, S., Ii, H., & Arca, A. (1973). Heterogeneity of Hemoglobin from Arca (*Anadara satowi*) Molecular Weights and Oxygen Equilibria of Area Hb I and II. *Journal of Biochemistry*, 73(4), 717–725.
- Pales, E., Koller, A., & Allam, B. (2016). Proteomic characterization of mucosal secretions in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Journal of Proteomics*, 132, 63–76.
- Pedra, J. H. F., Festucci-Buselli, R. A., Sun, W., Muir, W. M., Scharf, M. E., & Pittendrigh, B. R. (2005). Profiling of abundant proteins associated with dichlorodiphenyltrichloroethane resistance in *Drosophila melanogaster*. *Proteomics*, 5(1), 258–269.
- Piano, A., Valbonesi, P., & Fabbri, E. (2004). Expression of cytoprotective proteins, heat shock protein 70 and metallothioneins, in tissues of *Ostrea edulis* exposed to heat and heavy metals. *Cell stress & chaperones*, 9, 134–42.
- Pimentel, D. (1995). Amounts of pesticides reaching target pests: Environmental impacts and ethics. *Journal of Agricultural and Environmental Ethics*, 8, 17–29.
- Porat-Shliom, N., Milberg, O., Masedunskas, A., & Weigert, R. (2013). Multiple roles for the actin cytoskeleton during regulated exocytosis. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70, 2099–2121.
- Post, G., & Schroeder, T. R. (1971). The Toxicity of Four Insecticides to Four Salmonid Species. *Bulletin of Environmental Contamination & Toxicology*, 6(2), 114–117.
- Prakash, S. (2017). Role of Human Serum Albumin and Oxidative Stress in Diabetes. *Journal of Applied Biotechnology & Bioengineering*, 3(1), 3–8.
- Riou, V., & Ndiaye, A., & Budzinski, H., & Dugué, R., & Le Ménach, K., & Combes, Y., & Bossus, M., & Durand, J.D., & Guy, C., & Lorin-Nebel, C. (2012). Impact of environmental DDT concentrations on gill adaptation to increased salinity in the tilapia *Sarotherodon melanotheron*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C Toxicology & Pharmacology*, 156(1), 7–16.
- Rizzuto, R., Marchi, S., Bonora, M., Aguiari, P., Bononi, A., De Stefani, D., Giorgi, C., Leo, S., Rimessi, A., Siviero, R., Zecchini, E., & Pinton, P. (2009). Ca²⁺ transfer from the ER to mitochondria: When, how and why. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1787(11), 1342–1351.
- Rodríguez-Ortega, M.J., Grøsvik, B.E., RodríguezAriza, A., Goksøyr, A., & López-Barea, J. (2003). Changes in protein expression profiles in bivalve molluscs (*Chamaelea gallina*) exposed to four model environmental pollutants. *Proteomics*, 3, 1535–1543.
- Shih, A. W. Y., Mcfarlane, A., & Verhovsek, M. (2014). Haptoglobin testing in hemolysis: Measurement and interpretation. *American Journal of Hematology*, 89(4), 443–447.
- Shim, W. J., Oh, J. R., Kahng, S. H., Shim, J. H., & Lee, S. H. (1998). Accumulation of tributyl and triphenyltin compounds in Pacific oyster *Crassostrea gigas* from the Chinhae Bay System, Korea. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 35(1), 41–47.

- Shoshan-Barmatz, V., De, S., & Meir, A. (2017). The Mitochondrial Voltage-Dependent Anion Channel 1, Ca²⁺ Transport, Apoptosis, and Their Regulation. *Frontiers in Oncology*, 7, 1–12.
- Sidharthan, M., Young, K. S., Woul, L. H., Soon, P. K., & Shin, H. W., (2002). TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Marine Pollution Bulletin*, 45(1-12), 177–180.
- Song, Q., Chen, H., Li, Y., Zhou, H., Han, Q., & Diao, X. (2016). Toxicological effects of benzo(a)pyrene, DDT and their mixture on the green mussel *Perna viridis* revealed by proteomic and metabolomic approaches. *Chemosphere*, 144, 214–224.
- Song, Y.P., Suquet, M., Quéau, I., & Lebrun, L. (2009). Setting of a procedure for experimental fertilisation of Pacific oyster (*Crassostrea gigas*) oocytes. *Aquaculture*, 287, 311–314.
- Spencer, W. F., Singh, G., Taylor, C. D., LeMert, R. A., Cliath, M. M., & Farmer, W. J. (1996). DDT Persistence and Volatility as Affected by Management Practices after 23 Years. *Journal of Environmental Quality*, 25(4), 815–821.
- Tao, Y., Pan, L., Zhang, H., & Liu, N. (2013). Identification of genes differentially expressed in clams *Ruditapes philippinarum* in response to endosulfan after different exposure time. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 89, 108–116.
- Thuy, T. T. (2015). Effects of DDT on environment and human health. *Journal of Education and Social Sciences*, 2, 108–114.
- Usheva, L. N., Vaschenko, M. A., & Durkina, V. B. (2006). Histopathology of the Digestive Gland of the Bivalve Mollusk *Crenomytilus grayanus* (Dunker, 1853) from Southwestern Peter the Great Bay, Sea of Japan. *Russian Journal of Marine Biology*, 32(3), 166–172.
- Werner, I., Teh, S. J., Datta, S., Lu, X., & Young, T. M. (2004). Biomarker responses in *Macoma nasuta* (Bivalvia) exposed to sediments from northern San Francisco Bay. *Marine Environmental Research*. Vol. 58. pp. 299–304.
- Yáñez, J., Riffo, P., Mansilla, H. D., Bravo, M., Quiroz, W., & Santander, P. (2016). Speciation analysis of organotin compounds (OTCs) by a simultaneous hydride generation-liquid/liquid extraction and GC-MS determination. *Microchemical Journal*, 126, 460–465.
- Yang, F., Haile, D. J., Berger, F. G., Herbert, D. C., Beveren, E. V. A. N., Ghio, A. J., & Andrew, J. (2015). Haptoglobin reduces lung injury associated with exposure to blood, *AJP Lung Cellular and Molecular Physiology*, 284, 402–409.
- Yoosukh, W., & Duangdee, T. (1999). Living oysters in Thailand. *Phuket Marine Biological Center Special Publication*, 19, 363–370.

- Zhang, J., Zuo, Z., Chen, Y., Zhao, Y., Hu, S., & Wang, C. (2007). Effect of tributyltin on the development of ovary in female cuvier (*Sebastiscus marmoratus*). *Aquatic Toxicology*, 83(3), 174–179.
- Zylstra, U. (1972). Histoehemistry and uhrastrueture of the epidermis and the subepidermal gland cells of the freshwater snails *lymnaea stagnalis* and *Biomphalaria pfeifferi*. *Z. Zellforsch*, 93–134.