



รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในพื้นที่ชายฝั่งประเทศไทย
และการหาตัวบ่งชี้ชีวภาพโปรตีนสำหรับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน
(Tributyltin contamination in the coast of Thailand
and proteomic biomarkers of tributyltin contamination)

หัวหน้าโครงการ: ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง
คณะผู้วิจัย: ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชัยอนุสรณ์ สวัสดิวัตน์
ดร. จันทรกานต์ ศรีสมทรัพย์
ดร. อาภาพร บุญมี
นางสาวดารณี โชคชัยชำนาญกิจ

โครงการวิจัยประเภทงบประมาณเงินรายได้
จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน)
ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. ๒๕๕๘
มหาวิทยาลัยบูรพา

รหัสโครงการ 173029
สัญญาเลขที่ 77/2558

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ: สถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในพื้นที่ชายฝั่งประเทศไทย
และการหาตัวบ่งชี้ชีวภาพโปรตีนสำหรับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน
(Tributyltin contamination in the coast of Thailand
and proteomic biomarkers of tributyltin contamination)

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุทิน กิ่งทอง
ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา

กันยายน 2559

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับทุนสนับสนุนการวิจัยจากงบประมาณเงินรายได้จากเงินอุดหนุนรัฐบาล (งบประมาณแผ่นดิน) ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2558 มหาวิทยาลัยบูรพา ผ่านสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ เลขที่สัญญา 77/2558

ขอขอบคุณภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา บางแสน จังหวัดชลบุรีที่ได้ให้ความอนุเคราะห์สถานที่ในการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ห้องปฏิบัติการชีวเคมี ที่ให้ความอนุเคราะห์เครื่องมือและเทคโนโลยีด้านการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในการวิจัยครั้งนี้

ขอขอบคุณ Professor Dr.Richard Simpson อาจารย์ประจำ La Trobe Institute for Molecular Science (LIMS), La Trobe University, Bundoora Victoria 3086, Australia สำหรับคำแนะนำด้านการวิเคราะห์โปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

ขอขอบคุณสมาชิกห้องปฏิบัติการหยอนางรมทุกคนที่ให้ความช่วยเหลือ สนับสนุน และร่วมมือกันทำงานจนสำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

กันยายน 2559

คณะผู้วิจัย

สถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในพื้นที่ชายฝั่งประเทศไทยและการหาตัวบ่งชี้ชีวภาพโปรตีนสำหรับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน

บทคัดย่อ

สารประกอบไตรบิวทิลทิน (tributyltin; TBT) เป็นสารพิษที่มีการสะสมในระบบนิเวศทางทะเลและมีพิษต่อสิ่งมีชีวิตสูงมาก แม้ว่าการศึกษาการปนเปื้อนและพิษวิทยาของสารประกอบชนิดนี้จะมีให้รายงานอย่างต่อเนื่องแต่กลไกการเกิดพิษยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด งานวิจัยครั้งนี้ศึกษาการปนเปื้อนสารประกอบ TBT ในเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบในเขตชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย นอกจากนี้ยังทำการศึกษาพิษวิทยาต่อระบบเนื้อเยื่อและโปรทีโอไมคของหอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* โดยนำหอยนางรมมาทดสอบในห้องปฏิบัติการแล้วทดสอบกับสารประกอบ TBT ที่ระดับความเข้มข้นแบบ sub-lethal concentrations 10, 50 และ 150 µg/l เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสารประกอบ TBT มีความเป็นพิษต่อเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก โดยสังเกตผลกระทบได้ในทั้งอวัยวะภายในและอวัยวะภายนอก ได้แก่ เนื้อเยื่อแมนเทิล เหงือก ภาวะอาหาร และ ต่อมน่อมอาหาร สารประกอบ TBT กระตุ้นการสร้างเซลล์สร้างเมือกที่เยื่อหุ้มเพื่อป้องกันการทำลายของ TBT และกระตุ้นการอักเสบของเนื้อเยื่อ การเกาะกลุ่มของเซลล์เม็ดเลือด ในกลุ่มทดสอบที่ได้รับความเข้มข้นสูง จะพบการตายของเซลล์ (cell necrosis) เกิดขึ้น ความรุนแรงของผลกระทบเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่ใช้ในการทดสอบ ผลการวิเคราะห์โปรทีโอไมคในกลุ่มทดสอบเทียบกับกลุ่มควบคุมโดยใช้เทคนิคโปรทีโอไมคส์พบว่า มีโปรตีนที่มีปริมาณการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) รวม 32 จุด เมื่อวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ร่วมกับวิธีชีวสารสนเทศสามารถระบุชนิดของโปรตีนในกลุ่มนี้ได้ 17 จุด โดยพบสารประกอบ TBT กระตุ้นโปรตีน 14 ชนิด ได้แก่ โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับกลไก defensive mechanism (HSP-78, HSP-70, aldehyde dehydrogenase and catalase), calcium homeostasis (VDAC-3), cytoskeleton และโปรตีนในกลุ่มของ cytoskeleton-associated proteins, energy metabolism และ amino acid metabolism นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ TBT ยับยั้งโปรตีน 3 ชนิดที่เกี่ยวข้องกับโครงสร้างของเซลล์ ได้แก่ tubulin-alpha และ tubulin-beta ผลการศึกษานี้เผยให้เห็นว่าสารประกอบ TBT รบกวน calcium homeostasis โดยรบกวนการทำงานของโปรตีน VDAC-3 ในแมนเทิลซึ่งอาจเป็นกลไกสำคัญในการควบคุมกลไกระดับโมเลกุลในการสร้างเปลือกของหอยนางรมและทำให้เกิดการสร้างเปลือกผิดปกติ จากผลการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยเสนอให้ใช้โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับสารประกอบ TBT ในครั้งนี้เพื่อเป็น potential biomarker สำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารประกอบ TBT ในสิ่งแวดล้อมทางทะเลโดยใช้หอยนางรมต่อไป

คำสำคัญ : ไตรบิวทิลทิน โปรทีโอไมคส์ ตัวบ่งชี้ชีวภาพ หอยนางรม พิษวิทยา

Tributyltin contamination in the coast of Thailand and proteomic biomarkers of tributyltin contamination

Abstract

Tributyltin (TBT), an environmental pollutant in marine ecosystems, is toxic to organisms. Although contamination by and bioaccumulation and toxicity of this compound have been widely reported, its underlying molecular mechanisms remain unclear. In the present study, we investigated TBT contamination level in the east coast of Thailand. Also, we exposed the Hooded oyster *Saccostrea cucullata* to TBT to investigate histopathological effects and proteome stress response. Animals were exposed to three TBT sub-lethal concentrations, 10, 50 and 150 $\mu\text{g/l}$ for 48 hours. TBT produced stress leading to histopathological changes in oyster tissues including mantle, gill, stomach and digestive diverticula. TBT induced mucocyte production in epithelia and hemocyte aggregation in connective tissue. Cell necrosis occurred when exposure dosages were high. Comparative proteome analyses of mantle protein of oysters exposed to 10 $\mu\text{g/l}$ and control animals were analyzed by a 2-DE based proteomic approach. In total, 32 protein spots were found to differ ($p < 0.05$). Of these, 17 proteins were identified which included 14 up-regulated and 3 down-regulated proteins. TBT induced the expression of proteins involved in defensive mechanisms (HSP-78, HSP-70, aldehyde dehydrogenase and catalase), calcium homeostasis (VDAC-3), cytoskeleton and cytoskeleton-associated proteins, energy metabolism and amino acid metabolism. Our study revealed that TBT disturbs calcium homeostasis via VDAC-3 protein in mantle and this probably is the key molecular mechanism of TBT acting to distort shell calcification. Moreover, proteins involved in cell structure (tubulin-alpha and tubulin-beta) and protein synthesis were reduced after TBT exposure. Additionally, differential proteins obtained from this work will be useful as potential TBT biomarkers.

Key word: Tributyltin, Proteomics, Biomarker, Oyster, Toxicology

Abbreviations: TBT, tributyltin; VDAC, voltage-dependent anion channel, HSP; heat shock protein, 2-DE; two-dimensional gel electrophoresis, LC-MS/MS; liquid chromatography equipped with double mass spectrometer, LC50; 50% lethal concentration; CBR-250, Coomassie Brilliant Blue R-250.

Keyword: Tributyltin, Proteomics, Biomarker, Oyster, Toxicology

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	ก
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ค
สารบัญ.....	ง
สารบัญตาราง.....	จ
สารบัญภาพ.....	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	14
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	21
บทที่ 5 อภิปรายผลและสรุปผล.....	40
บรรณานุกรม.....	45
ภาคผนวก.....	50
ประวัตินักวิจัยและคณะ พร้อมหน่วยงานสังกัด.....	65

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
2-1 โครงสร้างโมเลกุลของสารไตรบิวทิลทิน	5
2-2 ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่มาเกาะตามผิวเรือ	5
2-3 การสะสมของสารประกอบไตรบิวทิลทินในหอยแมลงภู่	7
2-4 ขั้นตอนการศึกษาโปรตีนด้วยเทคโนโลยีโพรทีโอมิกส์	11
4-1 โครมาโทแกรมของสารประกอบ TBT ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS	22
4-2 การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน TBT	23
4-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน TBT	24
4-4 อัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ (<i>Saccostrea cucullata</i>)	25
4-5 สัณฐานของหอยนางรมปากจีบ (<i>Saccostrea cucullata</i>)	26
4-6 ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของ TBT	29
4-7 ลักษณะเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของ TBT	30
4-8 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของ TBT	31
4-9 ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของ TBT	32
4-10 โปรตีนจากแมนเทิลของหอยนางรมกลุ่มควบคุม (0 µg/l) และกลุ่มทดสอบ (10 µg/l)	33
4-11 จำนวนจุดโปรตีนบนเจลสองมิติโดยใช้โปรแกรม SameSpot Analysis (Progenesis)	34
4-12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนเจลสองมิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพเจล	35
4-13 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในกลุ่มควบคุม A (0 µg/l TBT) และกลุ่มทดสอบ B (10 µg/l TBT) ที่เวลา 48 ชั่วโมง	36

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
3-1 คุณสมบัติของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ	15
4-1 ปริมาณ TBT ในเนื้อเยื่อหอยนางรมที่เก็บจากพื้นที่บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก	24
4-2 ชนิดของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.5$)	37

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญ และที่มาของปัญหา

ไตรบิวทิลทิน (Tributyltin) เป็นสารประกอบออร์แกนอทิน (organotin compound) ที่ปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เนื่องจากมีการใช้ไตรบิวทิลทินอย่างแพร่หลายในสีทาเรือ เพื่อป้องกันไม่ให้เพรียงหินและสิ่งมีชีวิตขนาดเล็กเกาะบนผิวเรือ เพราะสารนี้มีประสิทธิภาพสูงในการป้องกันเพรียงทำให้เป็นที่นิยมในอุตสาหกรรมสีทาเรือเป็นอย่างมาก ภายหลังพบว่าสารชนิดนี้สามารถละลายออกมาจากผิวเรือและปนเปื้อนในระบบนิเวศชายฝั่งทั่วโลก และถูกจัดให้เป็นสารพิษที่มีความร้ายแรงมากที่สุดในระบบนิเวศทางทะเล (Goldberg, 1986) ผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่งมีการรายงานอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอยทะเลทั้งหอยฝาเดียวและหอยสองฝา ผลกระทบที่เห็นได้เด่นชัดของสารไตรบิวทิลทินคือ ทำให้หอยฝาเดียวในกลุ่ม Neogastropod เกิดการเปลี่ยนเพศโดยเปลี่ยนจากเพศเมียเป็นเพศผู้ (imposex) เนื่องจากสารไตรบิวทิลทินมีผลรบกวนระบบฮอร์โมนเพศในหอยฝาเดียวโดยทำให้ฮอร์โมนเทสโทสเทอโรนเพิ่มสูงขึ้นในหอยเพศเมีย ส่งผลให้เกิดการพัฒนาลักษณะเพศผู้ออกมาในหอยเพศเมีย และก่อให้เกิดการแท้งของหอยเพศเมีย ในบางกรณีอาจทำให้ประชากรหอยฝาเดียวในกลุ่ม Neogastropod สูญหายไปจากพื้นที่ที่มีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินอย่างหนัก (Bryan and Gibbs, 1991; Horiguchi *et al.*, 1994) สำหรับหอยสองฝา มีรายงานว่าสารไตรบิวทิลทินส่งผลกระทบต่อการพัฒนาของตัวอ่อนของหอยสองฝา และยังสามารถส่งผลกระทบต่อการสร้างเปลือกในหอยนางรม ทำให้เปลือกผิดปกติ และการเจริญของตัวหอยลดลงส่งผลกระทบต่ออุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงหอยนางรมเชิงพาณิชย์เป็นอย่างมาก (Alzieu *et al.*, 1986; Bryan and Gibbs, 1991) เพราะเปลือกหอยผิดปกติไม่เป็นที่ต้องการของผู้บริโภค นอกจากนี้สารไตรบิวทิลทินยังสามารถสะสมในห่วงโซ่อาหารรวมถึงผู้บริโภคอันดับสุดท้าย เช่น มนุษย์ และอาจส่งผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ทำให้สุขภาพอ่อนแอลงอีกด้วย (Antizar-Ladislao, 2008) จากผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศดังที่กล่าวมาแล้วทำให้องค์กรระหว่างประเทศ International Maritime Organization (IMO) ประกาศให้เลิกใช้สารไตรบิวทิลทินในสีทาเรือทั่วโลกในวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2551 อย่างไรก็ตามภายหลังจากนี้ ยังพบว่ามีการใช้สารไตรบิวทิลทินผสมในสีทาเรือในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ เนื่องจากบางประเทศไม่ได้เข้าร่วมเป็นสมาชิก IMO ระเบียบนี้จึงไม่มีผลบังคับโดยตรง และบางประเทศยังมีการลักลอบใช้อย่างต่อเนื่อง (Antizar-Ladislao, 2008) ด้วยเหตุนี้สถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมชายฝั่งทะเลของหลายประเทศยังไม่มีที่ท่าว่าจะลดลง ด้วยสาเหตุหลายประการ ได้แก่ (1) ภายใต้อำนาจของ IMO ยังอนุญาตให้ใช้สารไตรบิวทิลทินสำหรับเรือที่มีขนาดใหญ่เกิน 25 เมตร (2) นอกจากสีทาเรือแล้วไตรบิวทิลทินยังมีการใช้อย่างแพร่หลายในภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากสารชนิดนี้สามารถควบคุมจุลชีพในระบบอุตสาหกรรม เช่น ใช้ป้องกันเชื้อราในระบบหล่อเย็น ใช้ในอุตสาหกรรมทอผ้า ใช้ในการถนอมอาหาร เป็นต้น (Fent, 1996; Champ, 2000) และ (3) สารไตรบิวทิลทินมีอัตราการสลายตัวต่ำในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะเมื่อสะสมในดินตะกอนใต้ท้องทะเล

รายงานผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินมีอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในสัตว์กลุ่มหอย (mollusks) ดังที่กล่าวไปแล้ว โดยเฉพาะในหอยฝาเดียวและหอยสองฝาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยพัด (scallop) เนื่องจากเป็นหอยที่คนนิยมบริโภค และได้รับผลกระทบโดยตรงจาก

สถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน อย่างไรก็ตาม การศึกษาที่ผ่านมาเน้นการศึกษาการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ผลกระทบต่ออัตราการตาย ผลกระทบด้านสรีรวิทยาทั้งในแง่ของการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพิษ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของสารชนิดนี้ต่อโครงสร้างจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์สิ่งมีชีวิต อีกทั้งกลไกการเกิดพิษยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และการศึกษาการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินเป็นเรื่องที่ทำได้ยากเนื่องจากข้อจำกัดด้านเครื่องมือและวิธีการในการวัด ดังนั้นในการศึกษาค้นคว้าครั้งนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อต้องการหาตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน (proteomic biomarker of TBT contamination) สำหรับใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมทางทะเล

ข้อจำกัดของการวิเคราะห์สารไตรบิวทิลทินในตัวอย่างดิน น้ำ และสิ่งมีชีวิต สรุปได้ดังนี้ ประการแรกคือเครื่องมือและวิธีการวัด เนื่องจากการวัดปริมาณสารไตรบิวทิลทินต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น GC-MS (gas chromatography-mass spectrometer) หรือ LC-MS (liquid chromatography-MS) (Bekri *et al.*, 2006) และ GC-PFPD (gas chromatography-pulsed flame photometric detection) (Bravo *et al.*, 2005) และต้องใช้วิธีการสกัดที่ซับซ้อนหลายขั้นตอนจากตัวอย่าง อีกทั้งใช้ระยะเวลาานาน ผลที่ได้มักมีความแปรปรวนสูง เนื่องจากการสกัดเพื่อให้ได้สารไตรบิวทิลทินในรูปที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้น ต้องอาศัยเทคนิคและวิธีการสกัดที่มีความจำเพาะ และประสบการณ์ของผู้วิจัย ทำให้ยากต่อการศึกษา ประการที่สองคือ คุณสมบัติของสารไตรบิวทิลทินเอง เนื่องจากโมเลกุลของสารไตรบิวทิลทินละลายในน้ำได้น้อยมาก (hydrophobicity) ดังนั้นเมื่อตรวจสอบปริมาณสารไตรบิวทิลทินในน้ำมักพบค่าที่วัดได้ต่ำกว่าค่าความสามารถที่เครื่องมือจะวัดได้ (ต่ำกว่าค่า detection limit) เมื่อโมเลกุลหลุดออกจากสีทาเรือที่ฉาบผิวเรือแล้วจะละลายอยู่ในน้ำได้ไม่นานจากนั้นจะจมลงสู่พื้นผิวทะเล และสะสมในดินตะกอนหรือทรายท้องทะเล และสามารถละลายกลับขึ้นมาในน้ำทะเลและสะสมในสิ่งมีชีวิตได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากทำการวัดปริมาณของสารไตรบิวทิลทินในน้ำโดยตรงอาจไม่พบการสะสม เนื่องจากมีสารไตรบิวทิลทินละลายอยู่น้อยเกินกว่าค่า detection limit ของเครื่องมือวัดที่ได้กล่าวไปแล้ว และบางครั้งกระแสน้ำก็มีอิทธิพลต่อการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน เนื่องจากปริมาณสารที่มีอาจจะถูกกระแสน้ำพัดพาไปในช่วงจังหวะที่มีการสุ่มเก็บตัวอย่าง ทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงได้ ผู้วิจัยมีความสนใจต้องการหาโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อการรับสัมผัสสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อม เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนเพื่อใช้ติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมทางทะเล การหาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนดังกล่าวจะใช้เทคโนโลยีด้านโปรตีโอมิกส์ เพื่อค้นหาโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน โดยจะใช้ต้นแบบในการศึกษาคือหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*) เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ เป็นหอยนางรมที่พบได้ทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทย สามารถนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหรือโรงเพาะเลี้ยงได้ง่าย เป็นหอยที่อยู่กับที่ ภายหลังจากที่ตัวอ่อนลงเกาะกับวัตถุแล้วจะไม่เคลื่อนที่ตลอดชีวิต เป็นสัตว์กรองกิน (filter feeder) ซึ่งจะกรองอาหารที่ติดมากับน้ำผ่านเหงือกและระบบย่อยอาหารดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำ ก็จะสัมผัสหอยได้โดยตรงเนื่องจากหอยนางรมไม่สามารถเคลื่อนที่หนีไปได้หากเกิดการปนเปื้อนของสารเคมี ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นต้นแบบที่ดีที่สุดสำหรับการศึกษาการปนเปื้อนของสารพิษ หรือสารเคมีในระบบนิเวศทางทะเล (Kingtong *et al.*, 2007) โดยขั้นแรกจะทำการศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกในหอยนางรม จากนั้นทำการทดสอบผลของสารไตรบิวทิลทินต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เนื้อเยื่อของหอยนางรมเพื่อหาชนิดของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการสัมผัสสารไตรบิวทิลทินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ขั้นต่อมาคือการยืนยันความจำเพาะของสารไตรบิวทิลทินกับโปรตีนนั้น ๆ ทั้งในห้องปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อมจริงโดย

ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนชนิดนั้น ๆ ต่อไป นอกจากนี้แล้วทีมผู้วิจัยยังสนใจศึกษาผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อเนื้อเยื่อหอยนางรม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านพิษวิทยาต่อระบบนิเวศชายฝั่งทะเลต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลชนิดของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการสัมผัสสารไตรบิวทิลทินแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังทำให้ทราบข้อมูลผลกระทบต่อเซลล์และเนื้อเยื่อ กลไกการออกฤทธิ์ของสารไตรบิวทิลทินในระดับเซลล์และระดับโปรตีนอีกด้วย ข้อมูลเหล่านี้ใช้เป็นพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพที่จะเกิดกับสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร รวมถึงมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้ายที่ได้รับสารไตรบิวทิลทินจากการกินอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทิน

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

วัตถุประสงค์หลักของการศึกษานี้ คือ

1. เพื่อวิเคราะห์ปริมาณการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในตัวอย่างหอยนางรม บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย
2. ศึกษาผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อการแสดงออกของโปรตีนในหอยนางรม *S. cucullata* โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์
3. เพื่อระบุชนิดของโปรตีนที่มีการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมชายฝั่งทะเล
4. ทดสอบความเป็นพิษของสารไตรบิวทิลทินต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* (50% lethal concentration; LC_{50})
5. ศึกษาผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ

ขอบเขตของการวิจัย

กลุ่มผู้วิจัยจะทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจีบ *S. cucullata* จากถิ่นอาศัยในพื้นที่ชายฝั่งทะเลของประเทศไทย เพื่อสำรวจสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในประเทศไทย โดยเก็บตัวอย่างในพื้นที่ที่เคยมีการรายงานเมื่อปี พ.ศ. 2536 (Kan-Atireklap *et al.*, 1997) จากนั้นทำการทดสอบผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อหอยนางรมในห้องปฏิบัติการโดยทำการเก็บตัวอย่างหอยนางรมจากพื้นที่ชายฝั่งในเขตจังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราดภาคตะวันออก เนื่องจากเป็นพื้นที่ที่มีรายงานการปนเปื้อนต่ำ (Kan-Atireklap *et al.*, 1997) ทำการทดสอบความเป็นพิษของสารไตรบิวทิลทินในห้องปฏิบัติการโดยทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ และหาค่าความเข้มข้นของสารที่ทำให้อัตราการตายเฉลี่ยครึ่งหนึ่งของประชากร (50% lethal concentration; LC_{50}) จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างจุลภาคของเซลล์ ทำการสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อแมนเทิล เพื่อศึกษาการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินโดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์ เพื่อหาโปรตีนที่มีความสัมพันธ์กับระดับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินเพื่อใช้เสนอเป็นทางเลือกสำหรับใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับช่วยในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อม โดยคาดว่าจะสามารถหาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีน อันจะเป็นประโยชน์ในการบ่งบอกการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมทางทะเล เพื่อเป็นการตรวจสอบและเฝ้าระวังการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมทางทะเลต่อไปในอนาคต และยังทำให้ทราบกลไกการตอบสนองระดับเซลล์ ทราบผลกระทบต่อเซลล์ ทราบข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ของสารไตรบิวทิลทิน อันจะเป็นประโยชน์ต่อการประเมินความเป็นพิษของสารไตรบิวทิลทินในห่วงโซ่อาหารต่อไป

ทฤษฎี สมมติฐาน และหรือกรอบแนวความคิดของการวิจัย

เนื่องจากสารไตรบิวทิลทินมีความเป็นพิษร้ายแรงต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ โดยเฉพาะในหอยทะเล นอกจากสารไตรบิวทิลทินจะเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศทางทะเลแล้ว ยังสะสมในห่วงโซ่อาหารและอาจเป็นอันตรายต่อสุขภาพของคนที่ได้รับประทานอาหารทะเล แม้จะมีข้อบังคับให้ยกเลิกการใช้สารชนิดนี้ไปแล้วในปี วันที่ 1 มกราคม 2551 แต่พบว่ายังมีการใช้สีทาเรืออย่างต่อเนื่องในหลายประเทศ โดยเฉพาะประเทศในเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมทั้งประเทศไทย (Antizar-Ladislao, 2008) ดังนั้นจึงต้องมีการตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน โดยทั่วไปการวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินจะมีความซับซ้อนและต้องอาศัยเครื่องมือที่มีราคาแพง และใช้ระยะเวลาานาน ผลที่ได้มักมีความแปรปรวนสูงขึ้นอยู่กับปัจจัยของทิศทางการหมุนเวียนของน้ำบริเวณนั้น ๆ ที่จะพาน้ำเข้าและออกจากแหล่งที่มีการปนเปื้อน และบางครั้งระดับการปนเปื้อนอาจต่ำกว่าที่เครื่องมือจะตรวจสอบได้ ดังนั้นในการวิจัยครั้งนี้ทีมผู้วิจัยจึงมีแนวคิดใช้สัตว์ที่มีถิ่นอาศัยในระบบนิเวศทางทะเลเป็นตัวบ่งบอกการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน และได้เลือกหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) เป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ เป็นหอยนางรมที่พบได้ทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทย และประเทศในภูมิภาคตะวันออกเฉียงใต้ เป็นหอยที่อยู่กับที่ภายหลังจากที่ตัวอ่อนลงเกาะกับวัตถุแล้วจะไม่เคลื่อนที่ตลอดชีวิต เป็นสัตว์กรองกิน (filter feeder) ซึ่งจะกรองอาหารที่ติดมากับน้ำผ่านเหงือกและระบบย่อยอาหารดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำ ก็จะสัมผัสหอยได้โดยตรงเนื่องจากหอยนางรมไม่สามารถเคลื่อนที่หนีไปได้หากเกิดการปนเปื้อนของสารเคมี และสามารถนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหรือโรงเพาะเลี้ยงเพื่อใช้ในการทดสอบสารเคมีได้ง่าย ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นโมเดลที่ดีสำหรับการศึกษาคาร์บอนของสารพิษหรือสารเคมีในระบบนิเวศทางทะเล (Kingtong *et al.*, 2007) ดังนั้นหอยนางรมที่ได้รับการสัมผัสกับสารพิษหรือสารเคมีก็จะมีกลไกการตอบสนองทางสรีรวิทยาผ่านการทำงานของยีนและโปรตีนที่จำเพาะต่อสารเคมีชนิดนั้น ๆ

ดังนั้นทีมผู้วิจัยจึงต้องการค้นหาโปรตีนของหอยนางรมที่ตอบสนองจำเพาะต่อการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในธรรมชาติ โดยใช้เทคนิคโปรตีโอมิกส์เข้ามาตรวจสอบระดับการแสดงออกของโปรตีนทั้งหมดในเนื้อเยื่อหอยนางรมภายหลังการทดสอบกับสารไตรบิวทิลทินในห้องปฏิบัติการที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นจะเลือกโปรตีนเป้าหมายเพื่อไปทดสอบความจำเพาะในการตอบสนองต่อสารไตรบิวทิลทินต่อไป ซึ่งท้ายที่สุดจะได้ผลลัพธ์เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนที่จำเพาะต่อสารไตรบิวทิลทิน ซึ่งมีความจำเพาะสูงและทำให้ลดระยะเวลาและต้นทุนในการตรวจสอบโดยใช้การวิเคราะห์ทางเคมีเป็นอย่างมาก

แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมายเมื่อสิ้นสุดการวิจัย

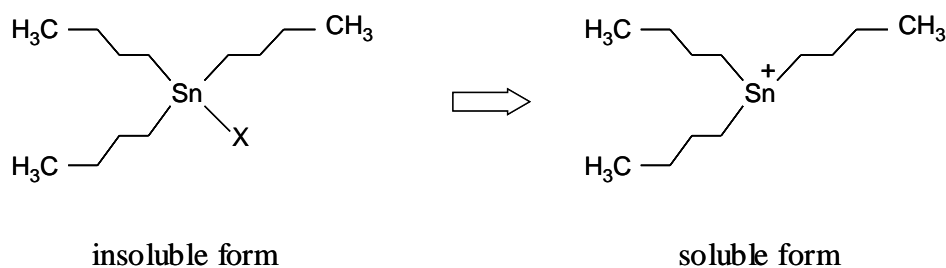
เมื่อสำเร็จงานวิจัยตามเป้าหมายแล้ว กลุ่มผู้วิจัยจะนำเสนอผลงานวิจัยที่ได้ในการประชุมวิชาการทั้งระดับชาติ และระดับนานาชาติ และเผยแพร่ในรูปวารสารวิชาการทั้งระดับชาติและระดับนานาชาติ และเผยแพร่ในรูปรายงานการวิจัย รวมถึงการถ่ายทอดเทคโนโลยีและผลงานวิจัยที่ได้ผ่านทางเผยแพร่ผ่านสื่อต่างๆ เช่นรายการวิทยุเพื่อประชาชน และวารสารต่างๆ

บทที่ 2

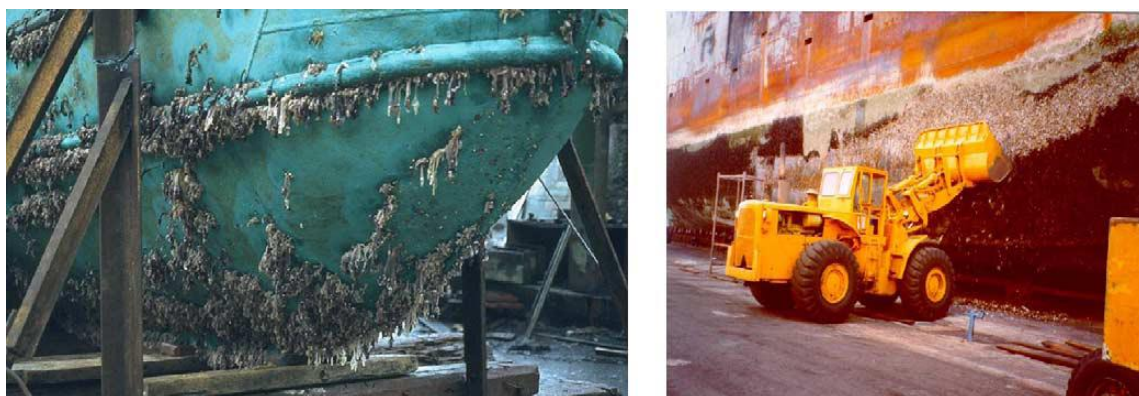
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 สารประกอบไตรบิวทิลทิน (Tributyltin; TBT)

ไตรบิวทิลทินเป็นสารประกอบในกลุ่มออร์แกโนทิน (organotin compound) โครงสร้างโมเลกุลของสารไตรบิวทิลทินประกอบด้วยอะตอมของดีบุก (Tin) เป็นแกนกลาง สร้างพันธะโคเวเลนต์กับหมู่บิวทิล (C_4H_9) 3 หมู่ และมีพันธะไอออนิกหนึ่งพันธะ สารประกอบไตรบิวทิลทินนี้สามารถพบได้หลายอนุพันธ์ขึ้นอยู่กับอะตอมที่มีประจุบวกที่เป็นองค์ประกอบ ดังแสดงในภาพที่ 2-1 เมื่อละลายน้ำจะมีมวลโมเลกุลเฉลี่ย 209.06 ดอลตัน (Langston and Pope, 1987)



ภาพที่ 2-1 โครงสร้างโมเลกุลของสารไตรบิวทิลทิน (X คือ anion เช่น chloride (Cl^-), bis-oxide (O^{2-}), acetate (CH_3COO^-), hydroxide (OH^-) and fluoride (F^-))



ภาพที่ 2-2 ตัวอย่างสิ่งมีชีวิตที่มากเกาะตามผิวเรือ (ที่มา: Yebra *et al.*, 2004)

การใช้สารไตรบิวทิลทินในสีทาเรือและการปนเปื้อนระบบนิเวศชายฝั่ง

เนื่องจากสารไตรบิวทิลทินมีความเป็นพิษต่อเซลล์เป็นอย่างมากจึงได้มีการใช้สารนี้ผสมในสีทาเรือเพื่อกำจัดสิ่งมีชีวิตที่มากเกาะตามผิวเรือ (fouling) เช่น เพรียงหิน จุลชีพ และสาหร่ายต่าง ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2-2 ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายในการทำมาสะอาดและการซ่อมบำรุงผิวเรือเพิ่มขึ้นและยังทำให้เรือใช้น้ำมัน

เชื้อเพลิงเพิ่มขึ้น จึงมีการผสมสารเคมีในสีทาเรือเพื่อป้องกันการเกาะของสิ่งมีชีวิตดังกล่าว ในปี ค.ศ.1960 เริ่มมีการใช้สารไตรบิวทิลทินผสมในสีทาเรือ และพบว่าสารไตรบิวทิลทินเป็นสารที่ให้ประสิทธิภาพสูงสุดในบรรดา สุธรรสีที่มีทั้งหมดในท้องตลาด จึงทำให้สารไตรบิวทิลทินได้รับความนิยมเป็นอย่างมากและได้นำมาใช้ใน อุตสาหกรรมสีทาเรือทั่วโลก (Laughlin and Linden, 1985) แต่ภายหลังการใช้เพียงไม่กี่ปีพบว่าสารชนิดนี้ สามารถหลุดออกจากผิวเรือและปนเปื้อนระบบนิเวศทางทะเล ปริมาณการปนเปื้อนมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ กิจกรรมของเรือ บริเวณที่มีกิจกรรมการเดินเรือมาก เช่น บริเวณท่าเรือและบริเวณอู่ต่อเรือก็จะมีสารปนเปื้อน สูง ด้วยเหตุนี้สารไตรบิวทิลทินจึงกลายเป็นสารปนเปื้อนที่พบได้ทั่วไปในระบบนิเวศชายฝั่งทะเลทั่วโลก และ ถูกจัดให้เป็นสารพิษที่มีความร้ายแรงมากที่สุดอย่างหนึ่งในระบบนิเวศทางทะเล (Goldberg, 1986) จาก รายงานการวิจัยพบว่าการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมอย่างแพร่หลายในระบบนิเวศทาง ทะเลทั้งในดิน น้ำ และสิ่งมีชีวิต เช่น สาหร่าย (Sidharthan *et al.*, 2002) กล้วยทะเล (Jensen *et al.*, 2004) หอยทะเล (Oehlmann *et al.*, 1998; Horiguchi *et al.*, 2006) ครัสเตเชียน (Ohji *et al.*, 2005) ปลา (Zhang *et al.*, 2007) และสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ มีการประเมินกันว่ามีสารไตรบิวทิลทินปนเปื้อนในน้ำทะเลปีละ ประมาณ 91 ตัน (Chau, 1992) ซึ่งสารนี้มีความเป็นพิษต่อสัตว์น้ำสูงมาก ที่ระดับความเข้มข้นเพียง 1 ng/l สามารถทำให้หอยฝาเดียวบางสปีชีส์เปลี่ยนแปลงเพศได้ (Antizar-Ladislao, 2008) ซึ่งที่ระดับความเข้มข้นต่ำเช่นนี้ ไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือ แต่สามารถใช้หอยเป็นตัวบ่งชี้ได้

สำหรับสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในประเทศไทยนั้นเคยมีการรายงานในปี พ.ศ. 2538 (Kan-Atireklap *et al.*, 1997) ดังแสดงในภาพที่ 2-3 โดยการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินมี ความสัมพันธ์กับกิจกรรมการเดินเรือในพื้นที่นั้น ๆ

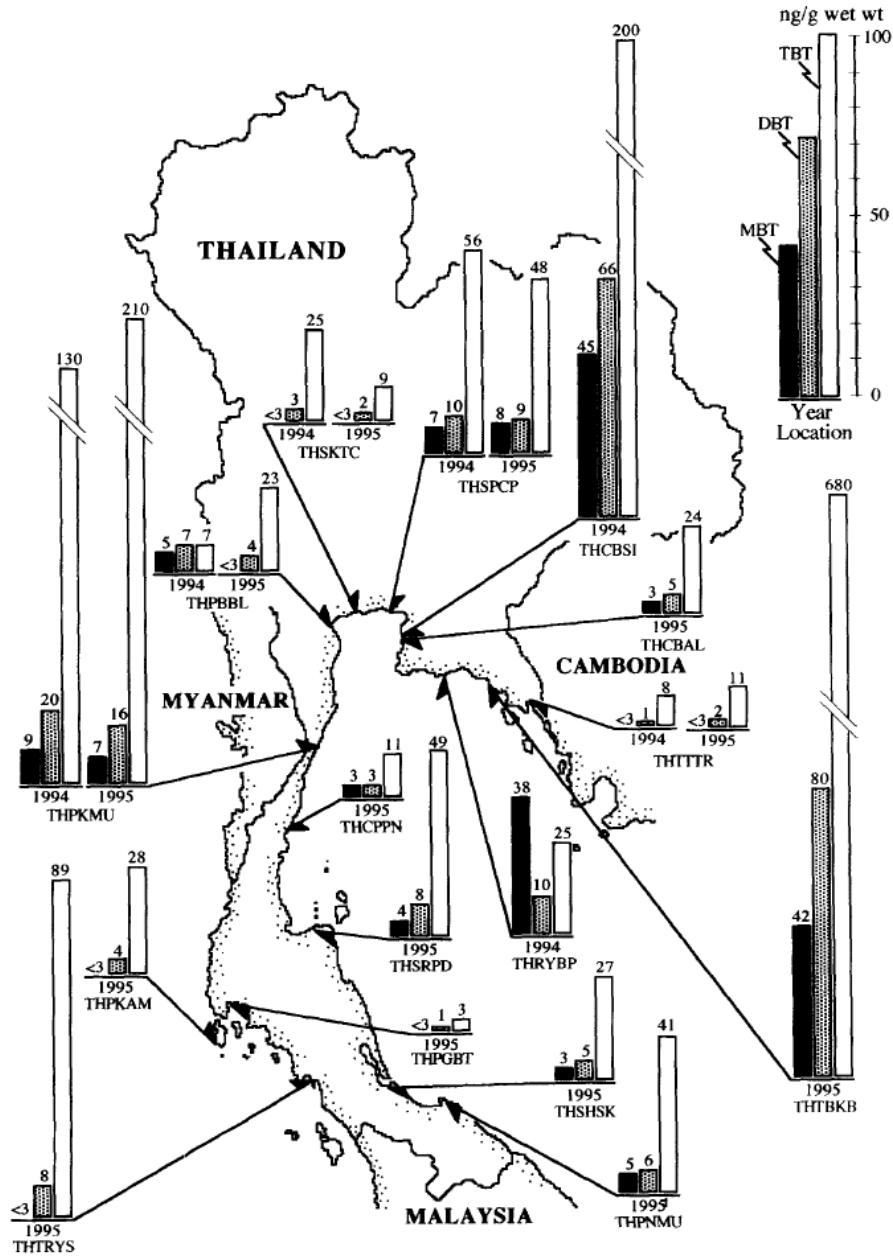
2.2 พิษและผลกระทบของสารไตรบิวทิลทิน

ผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศชายฝั่งมีการรายงานอย่างต่อเนื่อง โดยเฉพาะอย่างยิ่งในหอยทะเลทั้งหอยฝาเดียวและหอยสองฝา ผลกระทบที่เห็นได้เด่นชัดของสารไตรบิวทิลทิน คือ ทำให้หอยฝาเดียวในกลุ่ม Neogastropod เกิดการเปลี่ยนแปลงเพศโดยเปลี่ยนจากเพศเมียเป็นเพศผู้ (imposex) เนื่องจากสารไตรบิวทิลทินมีผลรบกวนระบบฮอร์โมนเพศในหอยฝาเดียวโดยทำให้ฮอร์โมนเทสโท สเทอโรนเพิ่มสูงขึ้นในหอยเพศเมีย ทำให้เกิดการพัฒนาลักษณะเพศผู้ออกมา Imposex ยังก่อให้เกิดการแท้ง ในหอยฝาเดียวและอาจทำให้เกิดการสูญพันธุ์ของประชากรหอยในกลุ่ม Neogastropod ในบางพื้นที่ (Bryan *et al.*, 1986; Horiguchi *et al.*, 1996) สำหรับหอยสองฝา มีรายงานว่าสารไตรบิวทิลทินส่งผลกระทบต่อ การพัฒนาของตัวอ่อนของหอยสองฝา และยังส่งผลกระทบต่อ การสร้างเปลือกในหอยนางรม ทำให้เปลือกผิด รูป และการเจริญของตัวหอยลดลง (Alzieu *et al.*, 1986; Bryan and Gibbs, 1991) ส่งผลกระทบต่อ อุตสาหกรรมเพาะเลี้ยงหอยนางรมเชิงพาณิชย์เป็นอย่างมาก เช่น บริเวณอ่าวอาร์กาซง (Arcachon Bay) ซึ่งเป็นพื้นที่เลี้ยงหอยนางรมที่สำคัญของประเทศฝรั่งเศส

2.3 ข้อห้ามการใช้สารไตรบิวทิลทินในสีทาเรือและสถานการณ์การปนเปื้อน

จากผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศดังที่กล่าวมาแล้วทำให้องค์กรระหว่างประเทศ International Marine Organization (IMO) ประกาศให้เลิกใช้สารไตรบิวทิลทินในสีทาเรือทั่วโลกในวันที่ 1 มกราคม พ.ศ. 2551 (Antizar-Ladislao, 2008) อย่างไรก็ตามภายหลังจากนี้ ยังพบการใช้สารไตรบิวทิลทินในสีทาเรือในหลายประเทศโดยเฉพาะในภูมิภาคเอเชียตะวันออกเฉียงใต้รวมถึงประเทศไทย เนื่องจากบาง ประเทศไม่ได้เข้าร่วมเป็นสมาชิก IMO ระเบียบเหล่านี้จึงไม่มีผลบังคับโดยตรง และบางประเทศยังมีการ

ลักลอบใช้อย่างต่อเนื่อง (Antizar-Ladislao, 2008) ด้วยเหตุนี้สถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมชายฝั่งทะเลของหลายประเทศยังมีที่ท่าว่าจะไม่ลดลงนักด้วยสาเหตุหลายประการ ได้แก่ (1) ภายใต้ประกาศของ IMO ยังอนุญาตให้ใช้สารไตรบิวทิลทินสำหรับเรือที่มีขนาดใหญ่เกิน 25 เมตร (2) นอกจากสีทาเรือแล้วไตรบิวทิลทินยังมีการใช้อย่างแพร่หลายในภาคอุตสาหกรรม เนื่องจากสารชนิดนี้สามารถควบคุมจุลชีพในระบบอุตสาหกรรม เช่น ใช้ป้องกันเชื้อราในระบบหล่อเย็น ใช้ในอุตสาหกรรมทอผ้า ใช้ในการถนอมอาหาร เป็นต้น (Fent, 1996; Champ, 2000) และ (3) สารไตรบิวทิลทินมีอัตราการสลายตัวต่ำในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะเมื่อสะสมในดินตะกอนใต้ท้องทะเล



ภาพที่ 2-3 การสะสมของสารประกอบไตรบิวทิลทินในหอยแมลงภู่ (*Perna viridis*) ที่เก็บจากชายฝั่งทะเลของประเทศไทย (ที่มา: Kan-Atireklap et al., 1997)

2.4 แนวคิดการใช้สิ่งมีชีวิตเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ

รายงานผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินมีอย่างแพร่หลายโดยเฉพาะในสัตว์กลุ่มหอย (mollusks) โดยเฉพาะในหอยฝาเดียว และหอยสองฝาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ และหอยพัด (scallop) เนื่องจากเป็นหอยที่คนนิยมบริโภค และได้รับผลกระทบโดยตรงจากสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน อย่างไรก็ตามการศึกษาที่ผ่านมาเน้นการศึกษาการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในเนื้อเยื่อของสิ่งมีชีวิต ผลกระทบต่ออัตราการตาย ผลกระทบด้านสรีรวิทยาทั้งในแง่ของการแสดงออกของยีนและโปรตีนที่คาดว่าจะเกี่ยวข้องกับกระบวนการเกิดพิษ แต่ยังไม่มีการศึกษาผลกระทบของสารชนิดนี้ต่อโครงสร้างจุลภาค (ultrastructure) ของเซลล์สิ่งมีชีวิต อีกทั้งกลไกการเกิดพิษยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด และการศึกษาการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินเป็นเรื่องที่ทำได้ยากเนื่องจากข้อจำกัดด้านเครื่องมือและวิธีการในการวัด ดังนั้นในการศึกษารุ่นนี้ ผู้วิจัยจึงมีวัตถุประสงค์หลักเพื่อต้องการหาตัวบ่งชี้การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน (proteomic biomarker of TBT contamination) สำหรับใช้ในการตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมทางทะเล

ข้อจำกัดของการวิเคราะห์สารไตรบิวทิลทินในตัวอย่างดิน น้ำ และสิ่งมีชีวิต สรุปได้ดังนี้ ประการแรกคือเครื่องมือและวิธีการวัด เนื่องจากการวัดปริมาณสารไตรบิวทิลทินต้องอาศัยเครื่องมือที่ซับซ้อนและมีราคาแพง เช่น GC-MS (gas chromatography-mass spectrometer) หรือ LC-MS (liquid chromatography-MS) (Bekri *et al.*, 2006) และ GC-PFPD (Gas chromatography-pulsed flame photometric detection) (Bravo *et al.*, 2005) และต้องใช้วิธีการสกัดที่ซับซ้อนหลายขั้นตอนจากตัวอย่าง อีกทั้งใช้ระยะเวลาานาน ผลที่ได้มักมีความแปรปรวนสูง เนื่องจากการสกัดเพื่อให้ได้สารไตรบิวทิลทินในรูปแบบที่สามารถวิเคราะห์ได้นั้น ต้องอาศัยเทคนิคและวิธีการสกัดที่มีความจำเพาะ และประสบการณ์ของผู้วิจัย ทำให้ยากต่อการศึกษา ประการที่สองคือ คุณสมบัติของสารไตรบิวทิลทินเอง เนื่องจากโมเลกุลของสารไตรบิวทิลทินละลายในน้ำได้น้อยมาก (hydrophobicity) ดังนั้นเมื่อตรวจสอบปริมาณสารไตรบิวทิลทินในน้ำมักพบค่าที่วัดได้ต่ำกว่าค่าความสามารถที่เครื่องมือจะวัดได้ (ต่ำกว่าค่า detection limit) เมื่อโมเลกุลหลุดออกจากสีทาเรือที่ฉาบผิวเรือแล้วจะละลายอยู่ในน้ำได้ไม่นานจากนั้นจะจมลงสู่พื้นผิวทะเล และสะสมในดินตะกอนหรือทรายท้องทะเล และสามารถละลายกลับขึ้นมาในน้ำทะเลและสะสมในสิ่งมีชีวิตได้อย่างต่อเนื่อง ดังนั้นหากทำการวัดปริมาณของสารไตรบิวทิลทินในน้ำโดยตรงอาจไม่พบการสะสม เนื่องจากมีสารไตรบิวทิลทินละลายอยู่น้อยเกินกว่าค่า detection limit ของเครื่องมือวัดที่ได้กล่าวไปแล้ว และบางครั้งกระแสน้ำก็มีอิทธิพลต่อการสุ่มเก็บตัวอย่างเพื่อตรวจสอบการปนเปื้อน เนื่องจากปริมาณสารที่มีอาจจะถูกกระแสน้ำพัดพาไปในช่วงจังหวะที่มีการสุ่มเก็บตัวอย่าง ทำให้ผลที่ได้คลาดเคลื่อนไปจากความเป็นจริงได้ จึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยในครั้งนี้ ซึ่งทีมผู้วิจัยจึงมีความสนใจต้องการหาโปรตีนที่มีการแสดงออกจำเพาะต่อการรับสัมผัสสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อม เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนเพื่อใช้ติดตามตรวจสอบและเฝ้าระวังสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งแวดล้อมทางทะเล การหาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนดังกล่าวจะใช้เทคโนโลยีด้านโปรทีโอมิกส์ เพื่อค้นหาโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินโดยใช้ต้นแบบในการศึกษาคือหอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) เนื่องจากคุณสมบัติเด่นหลายประการ ได้แก่ เป็นหอยนางรมที่พบได้ทั่วไปในเขตชายฝั่งทะเลของประเทศไทย สามารถนำมาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการหรือโรงเพาะเลี้ยงได้ง่าย เป็นหอยที่อยู่กับที่ภายหลังจากที่ตัวอ่อนลงเกาะกับวัตถุแล้วจะไม่เคลื่อนที่ตลอดชีวิต เป็นสัตว์กรองกิน (filter feeder) ซึ่งจะกรองอาหารที่ติดมากับน้ำผ่านเหงือกและระบบย่อยอาหารดังนั้นหากมีการปนเปื้อนของสารเคมีในน้ำ ก็จะสัมผัสหอยได้โดยตรงเนื่องจากหอยนางรมไม่สามารถเคลื่อนที่หนีไปได้หากเกิดการปนเปื้อนของสารเคมี ดังนั้นจึงมีความเหมาะสมสำหรับใช้เป็นสิ่งมีชีวิตต้นแบบที่ดี สำหรับการศึกษาการ

ปนเปื้อนของสารพิษหรือสารเคมีในระบบนิเวศทางทะเล (Kingtong *et al.*, 2007) โดยขั้นแรกจะทำการศึกษาโปรตีนที่มีการแสดงออกในหอยนางรม จากนั้นทำการทดสอบผลของสารไตรบิวทิลทินต่อการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์เนื้อเยื่อของหอยนางรมเพื่อหาชนิดของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการสัมผัสสารไตรบิวทิลทินที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ขั้นต่อมาคือการยืนยันความจำเพาะของสารไตรบิวทิลทินกับโปรตีนนั้น ๆ ทั้งในห้องปฏิบัติการและสิ่งแวดล้อมจริงโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะกับโปรตีนชนิดนั้น ๆ ต่อไปนอกจากนี้แล้วทีมผู้วิจัยยังสนใจศึกษาผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อเนื้อเยื่อหอยนางรม เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานด้านพิษวิทยาต่อระบบนิเวศชายฝั่งทะเลต่อไป นอกจากนี้ข้อมูลชนิดของโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการสัมผัสสารไตรบิวทิลทินแล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังจะทำให้ทราบข้อมูลกลไกการออกฤทธิ์ของสารไตรบิวทิลทินในระดับเซลล์และระดับโปรตีนอีกด้วย ข้อมูลเหล่านี้ใช้เป็นพื้นฐานในการประเมินความเสี่ยงด้านสุขภาพที่จะเกิดกับสิ่งมีชีวิตในห่วงโซ่อาหาร รวมถึงมนุษย์ซึ่งเป็นผู้บริโภคอันดับสุดท้ายที่ได้รับสารไตรบิวทิลทินจากกรกินอาหารทะเลที่มีการปนเปื้อนสารไตรบิวทิลทิน

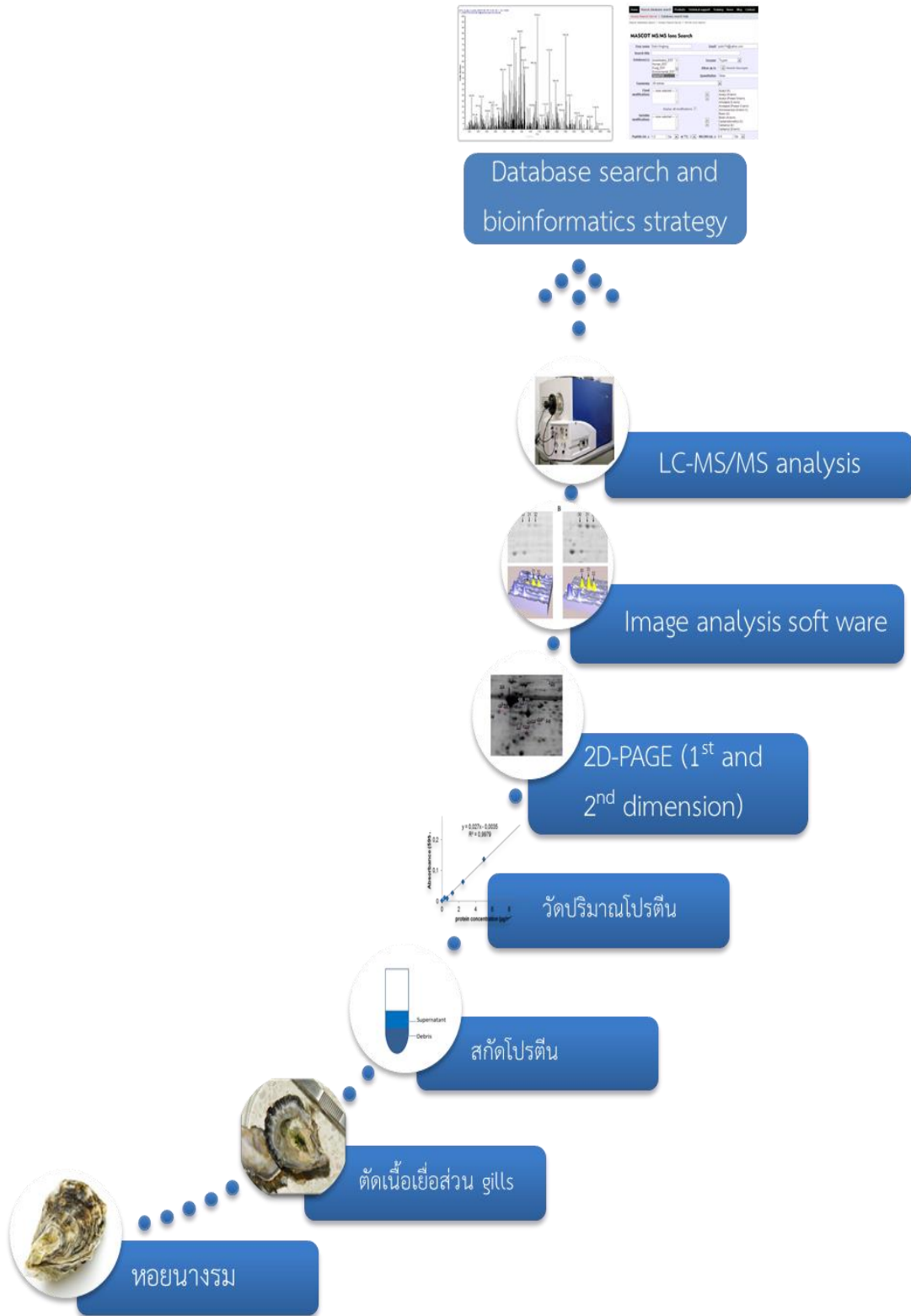
2.5 โปรตีโอมิกส์

ปัจจุบันเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ (Proteomics) ได้เข้ามามีบทบาทต่อการศึกษาชีววิทยาของเซลล์เป็นอย่างมาก เนื่องจากการศึกษาโดยใช้โปรตีโอมิกส์ทำให้ศึกษาโปรตีนในเซลล์สิ่งมีชีวิตได้จำนวนมากในคราวเดียว ทำให้มองภาพรวมกลไกการทำงานของของเซลล์ในระดับโปรตีนได้ โดยการแสดงออกของโปรตีนขึ้นอยู่กับปัจจัยภายใน เช่น พันธุกรรม ระดับฮอร์โมน และปัจจัยภายนอก เช่น สภาพแวดล้อมและสารเคมีที่สิ่งมีชีวิตได้รับ ปัจจัยดังกล่าวมีผลต่อการทำงานของยีนซึ่งมีการแสดงออกผ่านโปรตีน เพื่อตอบสนองต่อปัจจัยหรือสภาพแวดล้อมหนึ่ง ๆ หลักการดังกล่าวสามารถนำไปใช้ในการศึกษาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีน (protein biomarker) ได้ เพื่อใช้สำหรับบ่งชี้การปนเปื้อนของสารพิษหรือสารเคมีในสิ่งแวดล้อม โดยการค้นหาชนิดโปรตีนที่มีการตอบสนองจำเพาะต่อสารนั้น ๆ หากโปรตีนใดที่มีการเพิ่มขึ้นหรือลดลงจำเพาะต่อระดับของสารปนเปื้อนนั้น ๆ ก็สามารถใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายสำหรับใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนได้ แต่ต้องมีการทดสอบความจำเพาะในสภาพแวดล้อมจริงก่อนการนำไปใช้ การศึกษาโปรตีโอมิกส์ของหอยนางรมโดยเทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์มีขั้นตอนคร่าว ๆ ดังแสดงในภาพที่ 2-4 ประกอบด้วยขั้นตอนย่อย ๆ คือ การสกัดโปรตีนจากเนื้อเยื่อ จากนั้นวัดปริมาณโปรตีนให้ได้ตามจำนวนที่ต้องการ แล้วแยกโปรตีนด้วยกระแสไฟฟ้าสองมิติ (Two-dimensional gel electrophoresis) บนเจลพอลิอะคริลามิเด มิติที่หนึ่ง (First dimension) แยกโปรตีนตามประจุสุทธิ (pI) มิติที่สอง (second dimension) นำโปรตีนที่แยกได้จากมิติที่หนึ่งมาแยกตามขนาดของโปรตีนหรือมวลโมเลกุล แล้วนำเจลที่ได้ไปย้อมสีเพื่อให้เห็นโปรตีนที่ถูกแยกบนเจล จากนั้นทำการวิเคราะห์รูปภาพโดยใช้โปรแกรมสำเร็จรูป เช่น SameSpot Analysis Program ซึ่งจะทำหน้าที่เปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนในแต่ละตัวอย่าง ซึ่งจะช่วยให้เราทราบว่าโปรตีนทั้งหมดเท่าใด และมีโปรตีนใดบ้างที่มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นหรือลดลงเมื่อสัมผัสกับสารที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ จากนั้นเราจะเลือกโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญเพื่อไปย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินให้ได้เปปไทด์ขนาดที่เหมาะสม แล้ววิเคราะห์ชนิดของโปรตีนโดยใช้เครื่องแมสสเปกโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS ข้อมูลโครมาโทแกรมที่ได้จากเครื่องแมสสเปกโทมิเตอร์จะถูกแปลงเป็นลำดับกรดอะมิโน ลำดับกรดอะมิโนที่ได้นี้จะถูกนำไปเปรียบเทียบกับข้อมูลโปรตีนหรือดีเอ็นเอในระบบฐานข้อมูลดีเอ็นเอและ/หรือโปรตีนโดยใช้เทคนิคด้านชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics) ซึ่งจะช่วยให้เราระบุชนิดของโปรตีนที่กำลังศึกษาได้ (Anderson and Anderson, 1998; Aebersold and Mann, 2003) ดังแสดงในภาพที่ 2-4 ปัจจุบันเทคโนโลยีด้านโปรตีโอมิกส์มีการพัฒนาอย่าง

รวดเร็ว เนื่องจากการพัฒนาของเครื่องมือวิเคราะห์ เทคนิคการสกัดและแยกโปรตีน โปรแกรมหิวเคราะห์ และฐานข้อมูลจีโนมที่เพิ่มขึ้นอย่างมากในช่วงไม่กี่ปีที่ผ่านมา

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยต้องการประยุกต์ใช้เทคนิคโปรทีโอมิกส์เพื่อใช้หาตัวบ่งชี้รับสัมผัส (Biomarker of exposure) ของสารไตรบิวทิลทิน ซึ่งเป็นสารปนเปื้อนที่สำคัญและก่อให้เกิดผลเสียต่อระบบนิเวศอย่างมาก อีกทั้งสารชนิดนี้มีความเป็นพิษสูงมาก มีรายงานว่าไตรบิวทิลทินที่ระดับความเข้มข้นต่ำกว่าสิบในล้านล้านส่วน (part per trillion; ppt) ก็สามารถส่งผลกระทบต่อหอยฝาเดียวในทะเลได้ (Antizar-Ladislao, 2008) ซึ่งในระดับความเข้มข้นดังกล่าวไม่สามารถตรวจวัดได้ด้วยเครื่องมือดังที่กล่าวมาแล้ว ด้วยเหตุนี้ผู้วิจัยจึงมีความต้องการศึกษาโปรตีนที่มีความจำเพาะต่อการสัมผัสสารไตรบิวทิลทิน เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ (Biomarker) สำหรับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทิน เพื่อเป็นการติดตามและเฝ้าระวังการปนเปื้อนของสารชนิดนี้ในระบบนิเวศทางทะเลและในห่วงโซ่อาหารต่อไป อีกทั้งยังสามารถวิเคราะห์หา potential biomarker ระดับโปรตีนสำหรับสารพิษได้อีกด้วย ข้อมูลโปรตีนที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้นอกจากจะสามารถใช้บ่งชี้ถึงชนิดโปรตีนที่อาจจะเกี่ยวข้องในกลไกการทำงานของสารไตรบิวทิลทินแล้วยังเป็นต้นแบบในการศึกษาในอนาคตอีกด้วย

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังมุ่งเน้นศึกษาพิษวิทยาของสารไตรบิวทิลทินในหอยนางรม เพราะในอดีตที่ผ่านมาพบการรายงานการสะสมของสารไตรบิวทิลทินในสัตว์ทะเลเป็นจำนวนมาก แต่ข้อมูลผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อโครงสร้างจุลวิภาคของเซลล์ยังมีน้อยมาก อีกทั้งกลไกการเกิดพิษในสิ่งมีชีวิตยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นเพื่อให้เข้าใจกลไกการเกิดพิษของสารไตรบิวทิลทินในสิ่งมีชีวิต จึงมุ่งเน้นศึกษาผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อโครงสร้างของเซลล์เพื่อเป็นข้อมูลด้านผลกระทบต่อเนื้อเยื่อและการประเมินผลเสียต่อสุขภาพของสิ่งมีชีวิตในระบบนิเวศ ซึ่งผลกระทบนี้อาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างประชากรของสิ่งมีชีวิตและส่งผลกระทบต่อระบบนิเวศเสียสมดุลในที่สุด



ภาพที่ 2-4 ขั้นตอนการศึกษาโปรตีนด้วยเทคโนโลยีโพรตีโอมิกส์

2.6 หอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

หอยนางรมปากจีบ (*S. cucullata*) เป็นหอยสองฝาที่อาศัยอยู่บริเวณชายฝั่งหรือตามป่าชายเลน โดยจะยึดตัวติดกับก้อนหินหรือรากต้นไม้ในป่าชายเลน เปลือกซ้ายหรือเปลือกกลางยึดติดกับหินหรือวัสดุยึดเกาะมีลักษณะลึกลงเป็นแอ่ง เปลือกขวาแบนและยาวขนานไปกับเปลือกกลาง มีกล้ามเนื้อขนาดใหญ่ (adductor muscle) ทำหน้าที่ยึดเปลือกทั้งสองให้ยึดแน่นติดกัน หากชำุดบริเวณกล้ามเนื้อนี้ออกจะเห็นเป็นรอยกล้ามเนื้อ (muscle scar) มีรูปร่างคล้ายไตและปรากฏแถบสีน้ำตาลสลับเหลือง ซึ่งลักษณะของรอยกล้ามเนื้อนี้มีความแตกต่างกันในแต่ละสปีชีส์ จึงใช้ประกอบการจำแนกสปีชีส์หอยนางรมได้อีกทางหนึ่ง ที่ชอบเปลือกด้านในจะพบลักษณะปุ่มเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือก ส่วนเปลือกอีกด้านหนึ่งจะพบแอ่งเล็ก ๆ เรียงเป็นแถวตามสันเปลือกเช่นกัน เมื่อหอยปิดเปลือกปุ่มเล็ก ๆ เหล่านี้จะประกบเข้ากับแอ่งเล็ก ๆ พอดีทำให้หอยปิดฝาเปลือกได้แข็งแรงมากขึ้น เมื่อโตเต็มที่จะมีขนาดกว้างและยาวประมาณ 4 และ 7 ซม. ตามลำดับ สาเหตุที่เลือกหอยชนิดนี้เป็นต้นแบบสิ่งมีชีวิตสำหรับการศึกษาตัวบ่งชี้ชีวภาพระดับโปรตีนที่จำเพาะต่อการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในครั้งนี้อยู่ เนื่องจากเหตุผลหลายประการดังต่อไปนี้ ประการแรก หอยสองฝาเป็นดัชนีชีวภาพที่ดีสำหรับตรวจวัดปริมาณสารปนเปื้อนในทะเล เนื่องจากมีถิ่นอาศัยกว้างขวาง เกาะนิ่งไม่เคลื่อนที่เก็บตัวอย่างได้ง่าย ทนต่อสภาพความเค็มที่เปลี่ยนแปลงได้ดี และมีความสามารถในการสะสมสารต่างๆ ในเนื้อเยื่อได้ดี (Goldberg *et al.*, 1986) ประการที่สอง หอยชนิดนี้มีถิ่นอาศัยกระจายอยู่ทั่วไปตามชายฝั่งประเทศไทย (Yoosukh and Duangdee, 1999) รวมถึงบริเวณที่เคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในปริมาณที่สูง (Kan-Atireklap *et al.*, 1997) แสดงถึงความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสิ่งแวดล้อมรวมทั้งสิ่งปนเปื้อนได้ดี ประการที่สาม หอยชนิดนี้เป็นแหล่งอาหารที่สำคัญของคนในพื้นที่และยังใช้ในอุตสาหกรรมอาหาร เช่น การผลิตซอสหอยนางรม ซึ่งอาจได้รับสารไตรบิวทิลทินปนเปื้อนในปริมาณหนึ่งและอาจส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้

2.7 การวิเคราะห์สารไตรบิวทิลทิน

ไตรบิวทิลทินเป็นสารประกอบในกลุ่มไตรออร์แกโนทิน ซึ่งความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตมากที่สุดในบรรดาออร์แกโนทินทุกกลุ่ม ดังนั้นการตรวจวิเคราะห์เพื่อหาปริมาณที่แน่นอนของไตรออร์แกโนทินในสารตัวอย่างจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่ง เพื่อจะนำไปสู่การประเมินความเป็นพิษ และความเสี่ยงต่อการได้รับพิษจากไตรบิวทิลทินที่อาจเกิดขึ้นต่อประชาชนทั้งทางตรงโดยผ่านการบริโภคอาหารหรือทางอ้อมโดยผ่านทางระบบห่วงโซ่อาหาร ซึ่งการวิเคราะห์สารออร์แกโนทินโดยทั่วไปนั้นประกอบด้วยสามขั้นตอนหลัก คือ การเตรียมสารตัวอย่าง การแยกออร์แกโนทิน และการตรวจวิเคราะห์

สำหรับขั้นตอนแรกคือการเตรียมสารตัวอย่างนั้นเนื่องจากปริมาณของไตรบิวทิลทินที่ค่อนข้างน้อยจึงมีความจำเป็นอย่างยิ่งที่ต้องเพิ่มความเข้มข้นของไตรบิวทิลทินในสารตัวอย่างก่อนเข้าสู่กระบวนการแยกและตรวจวิเคราะห์ ซึ่งเทคนิคหนึ่งที่มีการพัฒนาขึ้นอย่างต่อเนื่องในสารกลุ่มออร์แกโนทินคือ เทคนิคการลอกแบบโมเลกุล (Molecular imprinting, MIP) (Gallego-Gallegos *et al.*, 2006; Gallego-Gallegos *et al.*, 2010; Zhua *et al.*, 2013) เทคนิคนี้มีหลักการที่เลียนแบบการจับจำเพาะของแอนติเจนและแอนติบอดี (Haupt *et al.*, 2000) โดยสร้างโมเลกุลที่มีลักษณะเป็นพอลิเมอร์ให้มีบริเวณจับจำเพาะ (Active site) กับโมเลกุลต้นแบบที่ต้องการศึกษาซึ่งวิธีการสังเคราะห์พอลิเมอร์ลอกแบบนี้จะสามารถทำได้โดยการนำมอนอเมอร์มาจับกับโมเลกุลต้นแบบด้วยพันธะโคเวเลนต์ (covalent) หรือนอนโคเวเลนต์ (Non-covalent) หลังจากนั้นทำให้เกิดกระบวนการพอลิเมอร์ไรเซชัน (polymerization) ขึ้นระหว่างมอนอเมอร์และตัวเชื่อม (Cross linker) เกิดเป็นพอลิเมอร์ล้อมรอบโมเลกุลต้นแบบ และเมื่อทำการชะล้างโมเลกุลต้นแบบออกไปจะทำให้

ให้เกิดช่องว่างขึ้นภายในพอลิเมอร์ ซึ่งช่องว่างนี้จะเป็นช่องว่างที่มีขนาดเฉพาะและมีบริเวณจับอย่างจำเพาะกับโมเลกุลต้นแบบ เทคนิค MIP นี้ได้มีการนำมาประยุกต์ใช้ในการวิเคราะห์สารในกลุ่มออร์แกโนทินและสารอื่นอีกหลายชนิดทั้งในอาหาร (Wang *et al.*, 2007) ยา (Shekarchi *et al.*, 2013) ผลผลิตทางเกษตร (Yi *et al.*, 2013) และสิ่งแวดล้อม (Hiratsuka *et al.*, 2013)

ขั้นตอนที่สองคือขั้นของการแยกออร์แกโนทิน โดยวิธีการแยกที่นิยมใช้มีด้วยกันสองแบบคือเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี หรือ GC (Gas chromatography) และ เทคนิคลิควิดโครมาโทกราฟี หรือ LC (Liquid chromatography) สำหรับเทคนิค GC นั้นผลที่ได้จากการแยกค่อนข้างดีแต่มีข้อจำกัดหลายประการอาทิเช่น สารออร์แกโนทินบางชนิดไม่เสถียรต่อความร้อนที่เกิดขึ้นในการแยกด้วย GC ทำให้สารเกิดการสลายตัวในระหว่างกระบวนการแยก นอกจากนี้สารออร์แกโนทินส่วนใหญ่มักเป็นสารที่ระเหยได้ยากจึงต้องทำให้อยู่ในรูปอนุพันธ์ของออร์แกโนทิน (Organotin derivatives) ก่อนแล้วจึงนำไปแยกด้วย GC ซึ่งขั้นตอนของการสังเคราะห์อนุพันธ์ออร์แกโนทินนี้อาจทำได้โดยใช้ปฏิกิริยา Grignard หรือการทำ Ethylation โดยใช้โซเดียมเตตระเอทิลโบเรต (Et_4BNa) หรือทำให้อยู่ในรูปไฮไดรด์ โดยใช้โซเดียมโบโรไฮไดรด์ (NaBH_4) ซึ่งปฏิกิริยาเหล่านี้ต้องทำในสภาวะที่ปราศจากความชื้นซึ่งค่อนข้างยุ่งยาก อันตรายและอาศัยเวลา ในขณะที่แบบที่สองคือการใช้เทคนิค LC นั้นสามารถตรวจวิเคราะห์สารออร์แกโนทินได้โดยตรงโดยไม่จำเป็นต้องเปลี่ยนสารประกอบออร์แกโนทินให้อยู่ในรูปของอนุพันธ์ก่อน เทคนิคนี้จึงสามารถลดขั้นตอนในการตรวจวิเคราะห์และลดโอกาสการสูญเสียออร์แกโนทินที่อยู่ในสารตัวอย่างลงได้ (Ebdon *et al.*, 1998)

สำหรับขั้นตอนสุดท้ายก็คือการตรวจวิเคราะห์ออร์แกโนทิน เนื่องด้วยข้อจำกัดของปริมาณออร์แกโนทิน ดังนั้นเครื่องมือที่ใช้ในการตรวจวัดปริมาณสารออร์แกโนทินจึงต้องมีความไวในการตรวจวิเคราะห์สูงซึ่งเทคนิคหนึ่งที่ใช้กันคือ แมสสเปกโตรเมทรี (MS, Mass spectrometry) ที่อาศัยการตรวจวัดมวลของสาร และสามารถยืนยันโครงสร้างของสารได้โดยอาศัยการแตกโมเลกุลของสาร เทคนิคแมสสเปกโตรเมทรีที่ใช้ในงานวิเคราะห์ออร์แกโนทินมีหลายประเภท เช่น GC-MS (Miki *et al.*, 2011), CE-ICP-MS (Sun *et al.*, 2012), LC-MS/MS (Zhu *et al.*, 2013) สำหรับงานวิจัยนี้คณะผู้วิจัยจะเลือกวิธีการตรวจวิเคราะห์ที่ไตรบิวทิลทิน โดยจะใช้เทคนิค MIP ร่วมกับ LC-MS/MS เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพในการตรวจวิเคราะห์ให้มีความถูกต้องแม่นยำมากยิ่งขึ้น

บทที่ 3

วิธีการทดลอง

การวิจัยในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อตรวจสอบสถานการณ์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในบริเวณชายฝั่งทะเลของประเทศไทย โดยจะเก็บตัวอย่างหอยนางรม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การปนเปื้อน จากนั้นจะทำการทดสอบการตอบสนองของโปรตีนในหอยนางรมต่อสารไตรบิวทิลทินในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง เพื่อค้นหาโปรตีนที่ตอบสนองจำเพาะต่อสารไตรบิวทิลทิน โดยจะใช้ตัวอย่างหอยนางรมจากบริเวณชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรี และจังหวัดตราด เนื่องจากเคยมีรายงานว่ามีการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินน้อยที่สุด และเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาผลกระทบของสารไตรบิวทิลทินต่อเนื้อเยื่อ และจุลกายวิภาคของเซลล์ต่อไป

3.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจیبบริเวณชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก

ในการศึกษาวิเคราะห์การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในระบบนิเวศชายฝั่งต้องเก็บตัวอย่างสิ่งมีชีวิตมาวิเคราะห์ จะเริ่มเก็บตัวอย่างจากพื้นที่ชายฝั่งเริ่มจากชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก โดยยึดสถานที่ที่เคยมีรายงานในปี 2536 (Kan-Atireklap *et al.*, 1997) เป็นหลัก โดยเก็บตัวอย่างจาก

1. หาดเจ้าหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี
2. อ่างศิลา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
3. แหลมแท่น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี
4. เกาะลอย อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี
5. อ่าวคุ้งกระเบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี

การเก็บตัวอย่างจะใช้วิธีสุ่มเก็บตัวอย่างแล้วทำการแช่แข็ง จากนั้นนำกลับมายังห้องปฏิบัติการเพื่อทำการแกะเปลือก เพื่อเก็บเนื้อเยื่อสด ชั่งน้ำหนักให้ได้ 150 กรัม โดยทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งที่อุณหภูมิ -100 องศาเซลเซียส โดยใช้เวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการเก็บตัวอย่างในหลอดทดลองที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ตลอดการเก็บรักษา

3.2 การวิเคราะห์สารไตรบิวทิลทิน

ทำการสกัดสารประกอบบิวทิลทินในเนื้อเยื่อหอยนางรมโดยใช้เทคนิคการสกัดแบบ Solid – Liquid extraction (SLE) ทำการบดเนื้อเยื่อหอยนางรมที่ผ่านการทำให้แห้งแบบแช่เยือกแข็งมาแล้ว ปริมาณ 0.5 กรัม ต่อการทดลองแต่ละครั้ง เติมนเมทานอล และ ฟอสเฟตบัพเฟอร์ อย่างละ 1 มิลลิลิตร จากนั้นเติมนสารละลายโซเดียมโบโรไฮไดรด์ 4% ในสารละลาย โซเดียมไฮดรอกไซด์ 1% ปริมาตร 6.25 มิลลิลิตร เพื่ออาศัยปฏิกิริยา Hydride generation เพื่อให้เกิดอนุพันธ์ของสารประกอบบิวทิลทินเกิดขึ้น เติมหะเสนปริมาตร 1 มิลลิลิตร เขย่านาน 30 นาที จากนั้นตั้งทิ้งไว้ 12 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ทำการดูดของเหลวในชั้นออร์แกนิกปริมาตร 200 ไมโครลิตร และนำไปวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS)

3.3 หอยนางรมที่ใช้สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง

สำหรับการทดสอบในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง ผู้วิจัยจะเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจیب *S. cucullata* จากถิ่นอาศัยในเขตชายฝั่งทะเลภาคตะวันออก ได้แก่ ชายฝั่งทะเลจังหวัดชลบุรีและจังหวัดตราด โดยจะสุ่มเก็บตัวอย่างหอยนางรมตัวเต็มวัยที่มีขนาดประมาณ 5-7 ซม. หอยทั้งหมดจะถูกนำกลับมาปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลาสองสัปดาห์ก่อนทำการทดลอง โดยจะเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีคุณลักษณะตามที่กำหนดในตารางที่ 3-1 ให้อาหารเป็นแพลงค์ตอนชนิด *Nannochloropsis* sp. และ *Isochysis* sp. ที่ความเข้มข้น 1% v/v ของแพลงค์ตอนหัวเชื้อ 2×10^7 cells/ml. (Kingtong et al., 2007)

ตารางที่ 3-1 คุณลักษณะของน้ำทะเลที่ใช้สำหรับเลี้ยงหอยนางรมในห้องปฏิบัติการ

คุณลักษณะของน้ำทะเล	หน่วย
อุณหภูมิ	อุณหภูมิห้อง (26-32 °C โดยประมาณ)
ความเค็ม	30 ppt
pH	7.5-8.2
Dissolved oxygen (DO)	7.0-7.3 mg/l

3.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารไตรบิวทิลทิน

เตรียม stock solution ของสารไตรบิวทิลทิน

เตรียม stock solution ของสารไตรบิวทิลทิน ที่ความเข้มข้น 1×10^7 µg/l โดยละลาย 0.10 กรัม tributyltin chloride ในเอทานอล 10 มล.

การหาช่วงของความเป็นพิษเบื้องต้น

หลังจากให้หอยนางรมปรับสภาพในห้องปฏิบัติการเป็นเวลา 2 สัปดาห์ จะทำการทดสอบความเป็นพิษเบื้องต้นโดยนำหอยนางรมไปเลี้ยงในน้ำทะเลที่มีความเข้มข้นของสารไตรบิวทิลต่างกัน ดังนี้ 1, 10, 100, 500, 1,000 µg/l (ppb; part per billion) จากนั้นตรวจสอบจำนวนหอยที่ตาย ณ เวลาที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชม. และบันทึกผล เพื่อวิเคราะห์หาช่วงที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้ทดสอบจริง ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลองทำการเปลี่ยนน้ำทะเลและสารไตรบิวทิลทินใหม่ทุกวันและให้อาหารทุกวันตลอดการทดลอง

การทดสอบความเป็นพิษเพื่อหาค่า LC₅₀

หลังจากได้ข้อมูลจากการทดลองหาค่าความเป็นพิษเบื้องต้นแล้ว ค่าความเข้มข้นที่จะใช้ทดลองจะถูกปรับใหม่ให้เหมาะสม จากนั้นทำการทดลองในกลุ่มทดลอง โดยจะใช้หอยนางรมจำนวน 30 ตัว ต่อตู้ เลี้ยงในน้ำทะเล 30 ลิตร และให้อาหารและเปลี่ยนน้ำทะเลและสารไตรบิวทิลทินทุกวัน ทำการสำรวจอัตราการตายและการรอดชีวิต ณ เวลาที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชม. และบันทึกผล จากนั้นใช้โปรแกรม SPSS คำนวณหาค่า LC₅₀ (Lethal concentrations for 50% mortality) โดยจะใช้ค่า LC₅₀ ในการบ่งบอกระดับความเป็นพิษของสารไตรบิวทิลทินในหอยนางรมชนิดนี้

การเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อที่ทดสอบด้วยสารไตรบิวทิลทิน

ทำการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยนางรมจากทุกความเข้มข้นและทุกช่วงเวลา (ณ เวลาที่ 0, 24, 48, 72 และ 96 ชม.) เพื่อใช้สำหรับการศึกษา Proteomics, Histology และ ultrastructure (TEM) โดยตัวอย่างที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค Proteomics ให้เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส และตัวอย่างที่ต้องการศึกษาด้วยเทคนิค Histology ให้เก็บแช่ในสารละลายบูแองส์ เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อไม่ให้ถูกทำลาย การตัดเก็บ

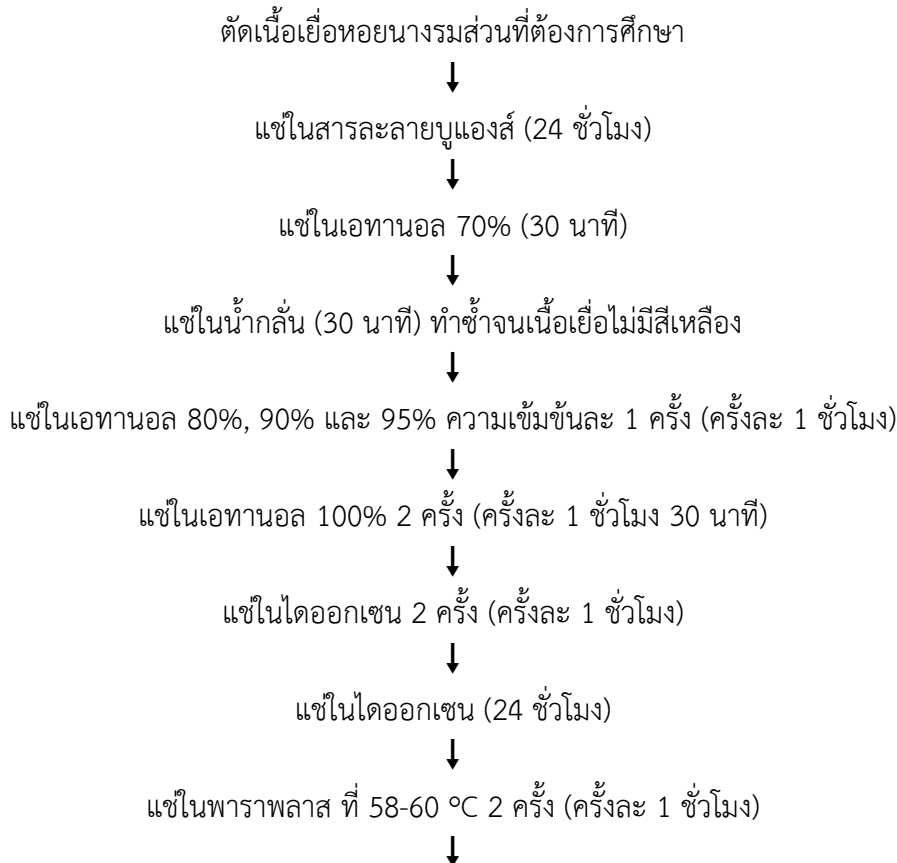
เนื้อเยื่อต้องทำบดน้ำแข็งและต้องใช้ความรวดเร็ว เพื่อป้องกันไม่ให้เนื้อเยื่อได้รับความเสียหายจากเอนไซม์โปรทีเอส

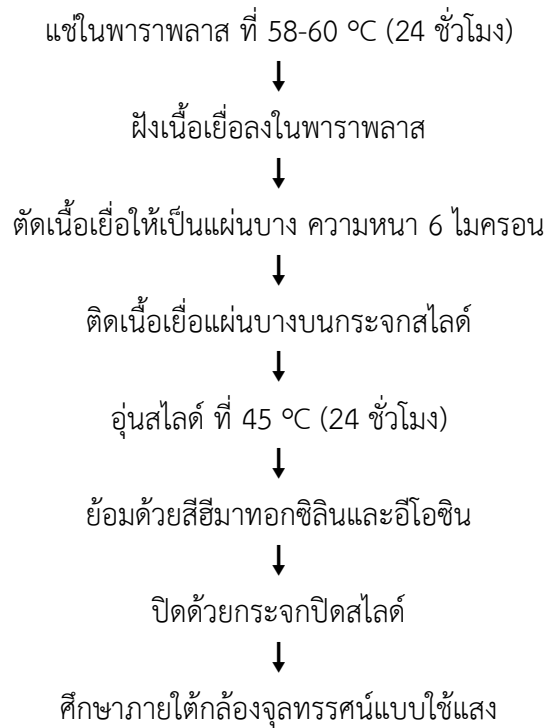
3.5 การศึกษาเนื้อเยื่อด้วยเทคนิค histology

การศึกษาเนื้อเยื่อจะทำการศึกษาโดยใช้วิธี paraffin-embedded section แล้วตัดเนื้อเยื่อให้บาง 6 μm แล้วย้อมด้วยสี H&E (Hematoxylin and Eosin) เพื่อให้เห็นสัณฐานวิทยาของเซลล์ชัดเจน การศึกษาด้วยเทคนิคนี้จะเห็นรูปร่างของเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบของเนื้อเยื่อ ข้อมูลเหล่านี้จะเป็นประโยชน์ในการประเมินผลกระทบของสารไตรบิวทิลทิน ความรุนแรงของสารนี้ และโอกาสในการเกิดพิษต่อสิ่งมีชีวิตอื่น ๆ ในระบบนิเวศ

นำเนื้อเยื่อแช่ในสารละลายยูแอนส์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วแช่ในเอทานอล 70% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นแช่ในน้ำกลั่น เป็นเวลา 30 นาที ทำซ้ำหลายครั้งจนกระทั่งเนื้อเยื่อไม่มีสีเหลือง แล้วแช่ในเอทานอล 80%, 90% และ 95% ความเข้มข้นละ 1 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง ตามลำดับ จากนั้นแช่ในเอทานอล 100% 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง 30 นาที แล้วแช่ในไดออกเซน 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง จากนั้นแช่ในไดออกเซนทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง ตามด้วยแช่ในพาราฟลาส ที่อุณหภูมิ 58-60 องศาเซลเซียส 2 ครั้ง ๆ ละ 1 ชั่วโมง แล้วแช่ในพาราฟลาสทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง จากนั้นฝังเนื้อเยื่อในพาราฟลาส ตัดเนื้อเยื่อให้มีความหนา 6 ไมครอน แล้วติดเนื้อเยื่อลงบนกระจกสไลด์ อุ่นสไลด์ที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำสไลด์มาย้อมด้วยสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน

สรุปขั้นตอนการเตรียมตัวอย่างเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยเทคนิค histology

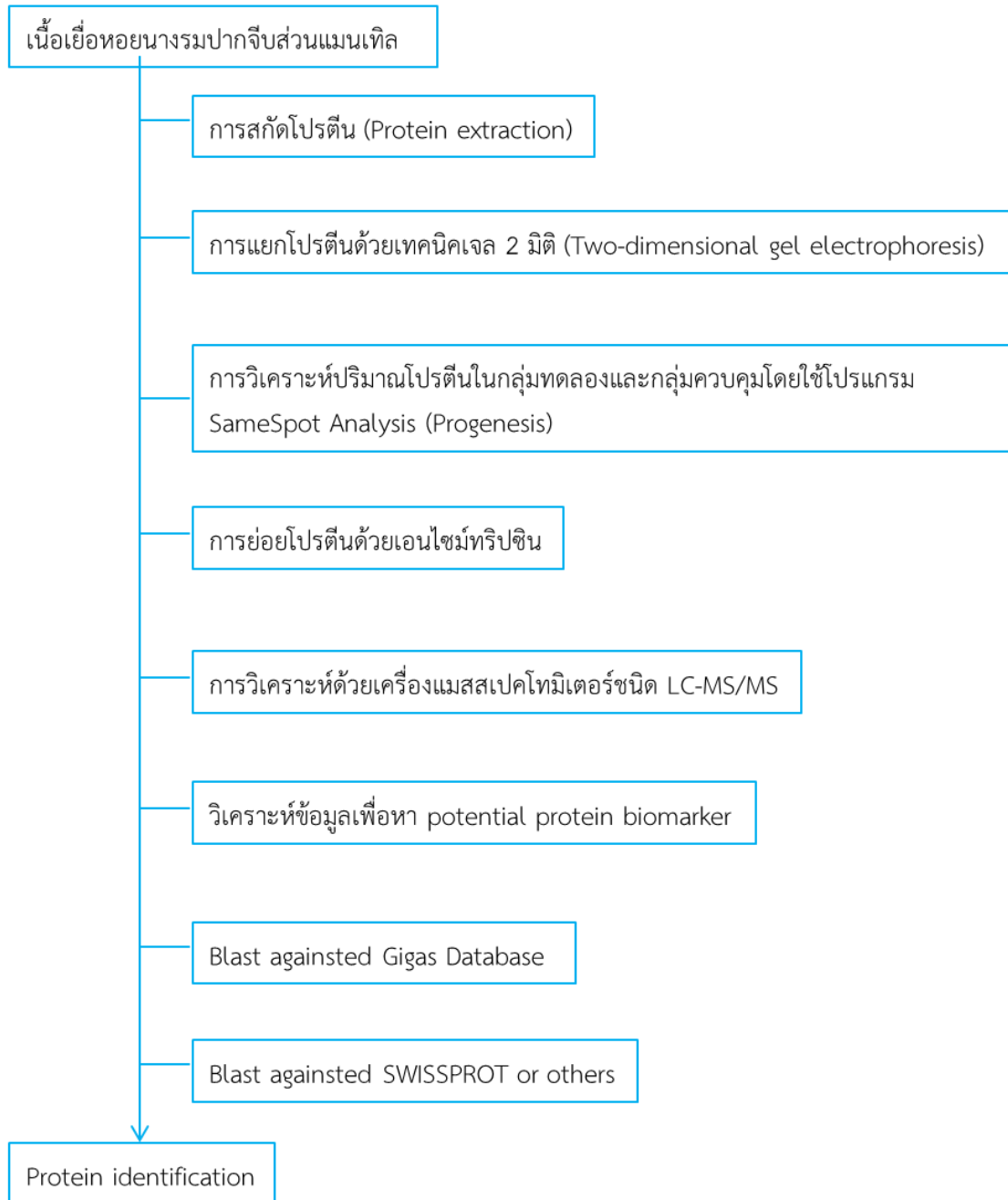




การย้อมสีด้วยสีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน เป็นการย้อมสีเนื้อเยื่อเพื่อให้เห็นความแตกต่างของเซลล์และเนื้อเยื่อชัดเจนขึ้น โดยสี (Dye) หรือสารเคมีแต่ละอย่างจะย้อมสีติดองค์ประกอบต่าง ๆ ของเซลล์และเนื้อเยื่อแตกต่างกันออกไป ซึ่งเป็นประโยชน์แก่การศึกษาทางด้านเนื้อเยื่อวิทยา สีย้อมที่นิยมใช้กันทั่วไป ได้แก่ อีมาทอกซิลินและอีโอซิน โดยอีมาทอกซิลินมีสภาพเป็นด่าง ชอบรวมตัวกับส่วนของเซลล์ที่มีสภาพเป็นกรด เช่น นิวเคลียส นิวคลีโอลัส ซึ่งจะติดสีน้ำเงินหรือม่วง ส่วนอีโอซินมีสภาพเป็นกรดจึงย้อมติดองค์ประกอบที่เป็นเบส เช่น ไซโทพลาซึม

3.6 การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์

การศึกษาโปรตีนด้วยเทคนิคโปรตีโอมิกส์ในครั้งนี้ เป็นวิธีที่มีขั้นตอนละเอียดหลายขั้นตอน เพื่อให้ง่ายต่อความเข้าใจ จึงได้สรุปขั้นตอนดังต่อไปนี้



การสกัดโปรตีน

นำเนื้อเยื่อที่เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส มาบดด้วยเครื่องบด Tissue Homogenizer ในสารละลาย lysis buffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.2 containing 150 mM NaCl, 0.5% Triton-X100, 1mM EDTA and 1 mM cocktail protease inhibitor) จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 15,000 x g เป็นเวลา 30 นาที ที่ 4 องศาเซลเซียส เพื่อให้เศษเซลล์หรือเนื้อเยื่อเกี่ยวพันตกตะกอน แล้วดูดเอาเฉพาะส่วนใส (supernatant) ไปวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนด้วยวิธี BioRad protein DC assay (BioRad, Herts, UK) โดยใช้ bovine serum albumin (BSA) เป็น standard protein เนื่องจากเนื้อเยื่อหอยนางรมอาจมีน้ำทะเลติดมาด้วย อาจมีผลต่อการแยกโปรตีนในขั้นต่อไป เพื่อกำจัดปัญหาดังกล่าวจึงต้องเพิ่มความบริสุทธิ์ของโปรตีนที่จะใช้สำหรับการวิเคราะห์ขั้นต่อไปโดยใช้ 2D-clean up kit (GE Healthcare Life Science) เพื่อช่วยให้ตัวอย่างโปรตีนบริสุทธิ์ขึ้น

การแยกโปรตีนด้วยเทคนิคเจล 2 มิติ (Two-dimensional gel electrophoresis)

ใช้โปรตีน 250 µg ต่อตัวอย่างผสมกับ rehydration buffer ที่ประกอบด้วยยูเรีย 7 M DTT 0.1 M CHAPS 4% IPG buffer 0.2% แล้วโหลดลงใน Isoelectric focusing gel (IEF) strip pH3-10, non-linear ขนาด 7 ซม. (GE Healthcare Life Science) IEF strip ที่ไว้ข้ามคืนเพื่อให้สารละลายทั้งหมดซึมเข้าไปในเจล เมื่อทิ้งไว้ข้ามคืนแล้วให้ทำการโฟกัสโปรตีนตามคู่มือการใช้ หลังจากนั้นนำ 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 โดยมิติที่หนึ่งจะแยกโปรตีนด้วยไฟฟ้าตามค่า Isoelectric focusing ของโปรตีน เครื่องมือที่ใช้คือ IPGPhor3 จากนั้น ในมิติที่สองจะแยกโปรตีนตามมวลโมเลกุลโดยใช้ SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) (NuPAGE® Novex 4-12% Bis-Tris Gel 1.0 mm, 2D well) หลังจากกระบวนการ electrophoresis จะนำเจลที่ย้อมด้วยสี Coomassie Brilliant Blue G-250 และ ล้างสีด้วย Destained solution

การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรม SameSpot Analysis (Progenesis)

นำเจลที่ย้อมสีเรียบร้อยแล้วไปสแกนเพื่อสร้าง Reference map สำหรับข้อมูลโปรตีนในหอยนางรม และทำการเปรียบเทียบการแสดงออกของโปรตีนจากหอยนางรมที่ได้จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ SameSpot Analysis (Progenesis) โดยโปรแกรมจะทำหน้าที่เปรียบเทียบความเข้มของจุดโปรตีนบนเจลแล้ววิเคราะห์ผลเทียบความแตกต่างพร้อมทั้งคำนวณค่าความเชื่อมั่น ($p=0.05$) ให้กับโปรตีนแต่ละจุดที่วิเคราะห์ ทำให้ทราบข้อมูลโปรตีนที่มีการแสดงออกแตกต่างกันโดยนัยสำคัญ จากนั้นเราสามารถเลือกโปรตีนที่มีความแตกต่างกันเพื่อใช้เป็นโปรตีนเป้าหมายเพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับการปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินได้ แต่ต้องระบุชนิดของโปรตีนให้ได้ก่อนโดยการตัดจุดโปรตีนที่สนใจเพื่อย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซินและวิเคราะห์ด้วย LC-MS/MS ต่อไป

การย่อยโปรตีนด้วยเอนไซม์ทริปซิน

ทำการตัดจุดโปรตีนที่สนใจจะวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ ซึ่งต้องทำการย่อยโปรตีนสายยาวให้เป็นเปปไทด์สายสั้นลง โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน เอนไซม์ชนิดนี้จะจดจำตำแหน่งและทำการตัดกรดอะมิโนหลังตำแหน่ง Arginine และ Lucien ทำให้ได้เปปไทด์ที่มีขนาดประมาณสายละ 10 กรดอะมิโน ซึ่งเหมาะสมต่อการวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS

การวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS

นำเปปไทด์ที่ผ่านกระบวนการย่อยด้วยทริปซิน มาวิเคราะห์ด้วยเครื่องแมสสเปคโทมิเตอร์ชนิด LC-MS/MS (Q-TOF micromass, UK) โดยมีกระบวนการสังเขปดังนี้ นำ Tryptic peptide ฉีดผ่าน 75 μ m ID x 150 mm C18 PepMap column (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) เพื่อกำจัดเกลือในสารละลาย จากนั้นฉีดตัวอย่างโปรตีน 6 μ l เข้าสู่ LC-MS/MS ซึ่งเครื่องจะทำให้เปปไทด์แตกตัวในลักษณะต่าง ๆ กันและบันทึกผลลักษณะเอกลักษณ์ของเปปไทด์นั้น ๆ เป็นโครมาโทแกรม เมื่อนำผลโครมาโทแกรมที่ได้เปรียบเทียบกับฐานข้อมูลชีวสารสนเทศ เช่น ฐานข้อมูลจีโนม หรือ ฐานข้อมูลโปรตีน ก็จะสามารถระบุชนิดของโปรตีนได้ โดยจะใช้โปรแกรม ProteinLynx (LC Packings, Amsterdam, The Netherlands) และ Mascot ของ Matrix Science (<http://www.matrixscience.com>) เทียบกับฐานข้อมูลโปรตีนของ SWISS-PROT และฐานข้อมูลจีโนมของ NCBI

วิเคราะห์ข้อมูลเพื่อหา potential protein biomarker

นำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์หาโปรตีนที่มีแนวโน้มสูงที่จะเป็น protein biomarker สำหรับสารไตรบิวทิลทิน เภณธ์การเปรียบเทียบจะใช้โปรตีนมีการแสดงออกแตกต่างกันสองเท่าขึ้นไประหว่างกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม ด้วยความเชื่อมั่น 95% โดยคาดว่าหลังจากศึกษาด้วยเทคนิคนี้แล้วจะได้โปรตีนที่มีแนวโน้มจะใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพหลายตัว (multiple-biomarker)

บทที่ 4

ผลการศึกษา

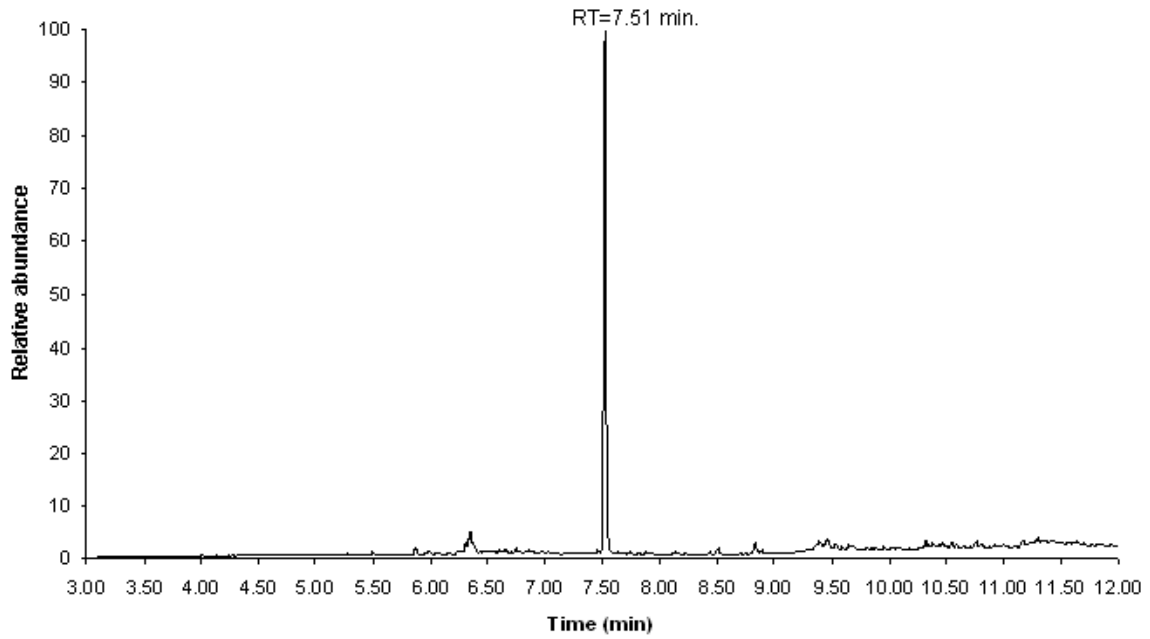
4.1 การสะสมของ TBT ในเนื้อเยื่อหอยนางรมบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออกของประเทศไทย

ผลการตรวจสอบปริมาณการสะสมของสาร TBT ในเนื้อเยื่อหอยนางรมที่เก็บจากบริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก ด้วยเทคนิคการสร้างอนุพันธ์กับสารประกอบ hexyl magnesium bromide โดยใช้ปฏิกิริยา grignad reation และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS พบว่าในสารละลายมาตรฐาน TBT หลังทำปฏิกิริยากับ hexyl magnesium bromide แล้วจะตรวจพบอนุพันธ์ของ TBT ในนาที่ที่ 7.51 (Retention time = 7.51) ดังภาพที่ 4-1 A และ พบโครมาโทแกรมการแตกตัวของอนุพันธ์ดังภาพที่ 4-1 B ซึ่งประกอบด้วยพีคเด่น ได้แก่ 179 291 319 347 และ 375

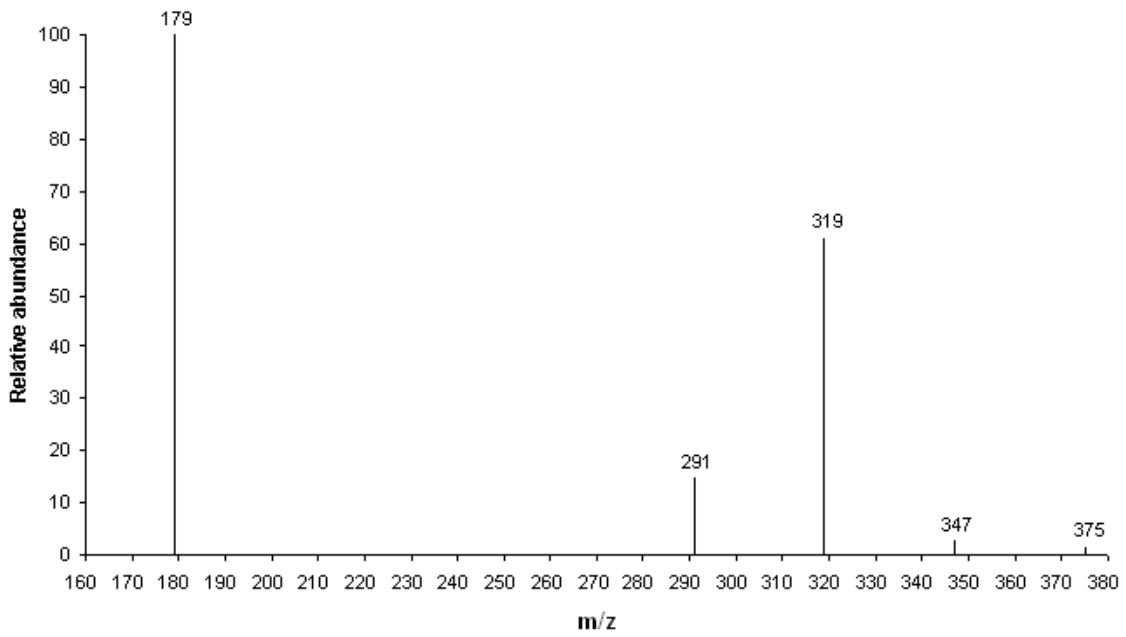
การวิเคราะห์หาปริมาณ TBT ในเนื้อเยื่อ จะใช้วิธีเทียบกับสารละลาย TBT มาตรฐาน โดยใช้สารละลายมาตรฐานที่ความเข้มข้น 30 240 และ 480 $\mu\text{g/g}$ เทียบกับตัวทำละลาย hexane ตามลำดับดังภาพที่ 4-2 และ กราฟมาตรฐานดังภาพที่ 4-3

ผลการวิเคราะห์ปริมาณสารประกอบ TBT ในเนื้อเยื่อหอยนางรมสด พบการปนเปื้อนของสาร TBT ในเนื้อเยื่อของหอยนางรมในทุกพื้นที่ที่มีการศึกษา ดังแสดงในตารางที่ 4-1

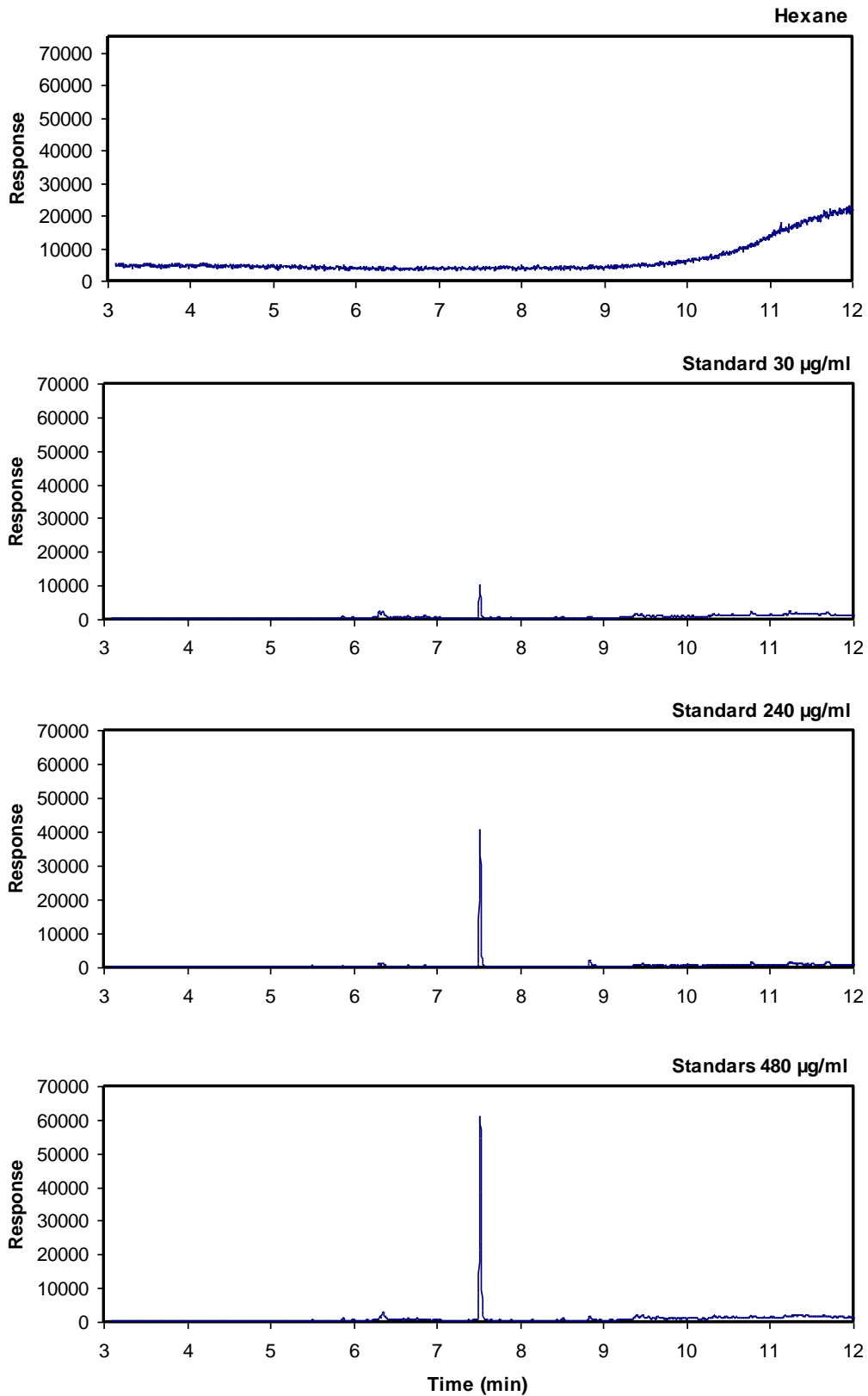
A



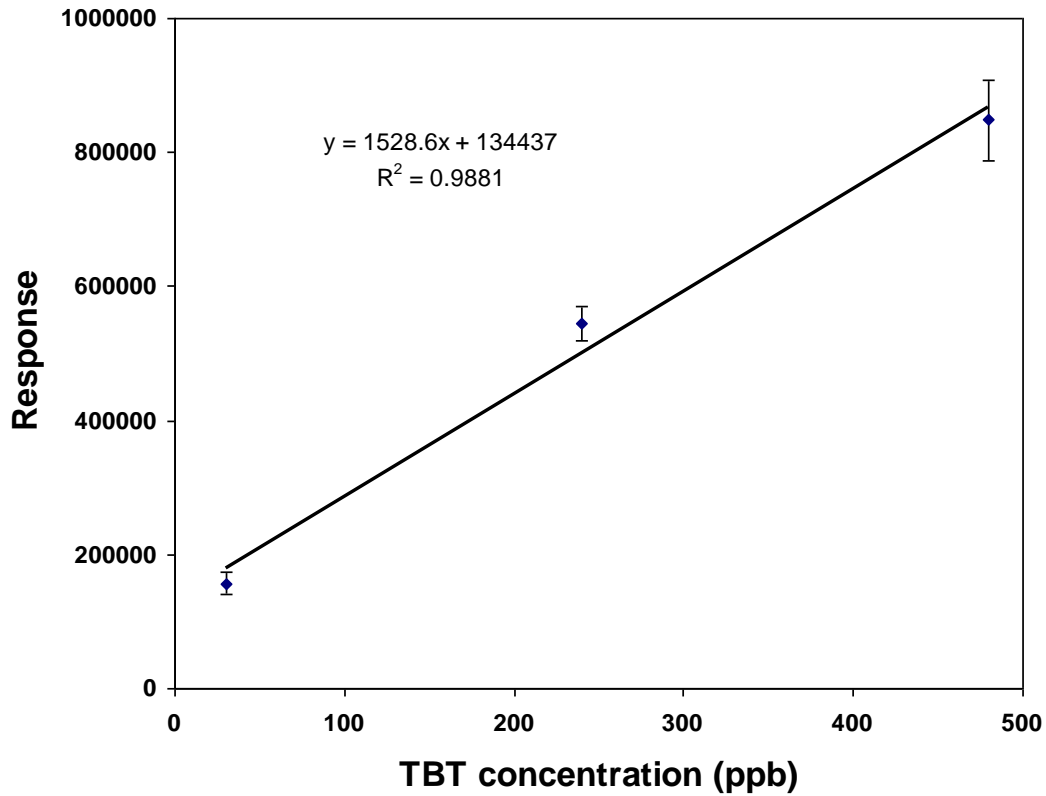
B



ภาพที่ 4-1 โครมาโทแกรมของสารประกอบ TBT ที่วิเคราะห์ด้วยเครื่อง GC-MS A) Retention time ที่เวลา 7.51 นาที B) การแตกตัวของอนุพันธ์ประกอบด้วยพีคเอกลักษณ์ที่ m/z 179 291 319 347 และ 375



ภาพที่ 4-2 การวิเคราะห์สารละลายมาตรฐาน TBT ที่ความเข้มข้น 30 240 และ 480 µg/g โดยทำปฏิกิริยากับ Hexyl magnesium bromide และวิเคราะห์ด้วย GC-MS



ภาพที่ 4-3 กราฟมาตรฐานของสารละลายมาตรฐาน TBT ที่ความเข้มข้น 30 240 และ 480 $\mu\text{g/g}$ โดยทำปฏิกิริยากับ Hexyl magnesium bromide และวิเคราะห์ด้วย GC-MS

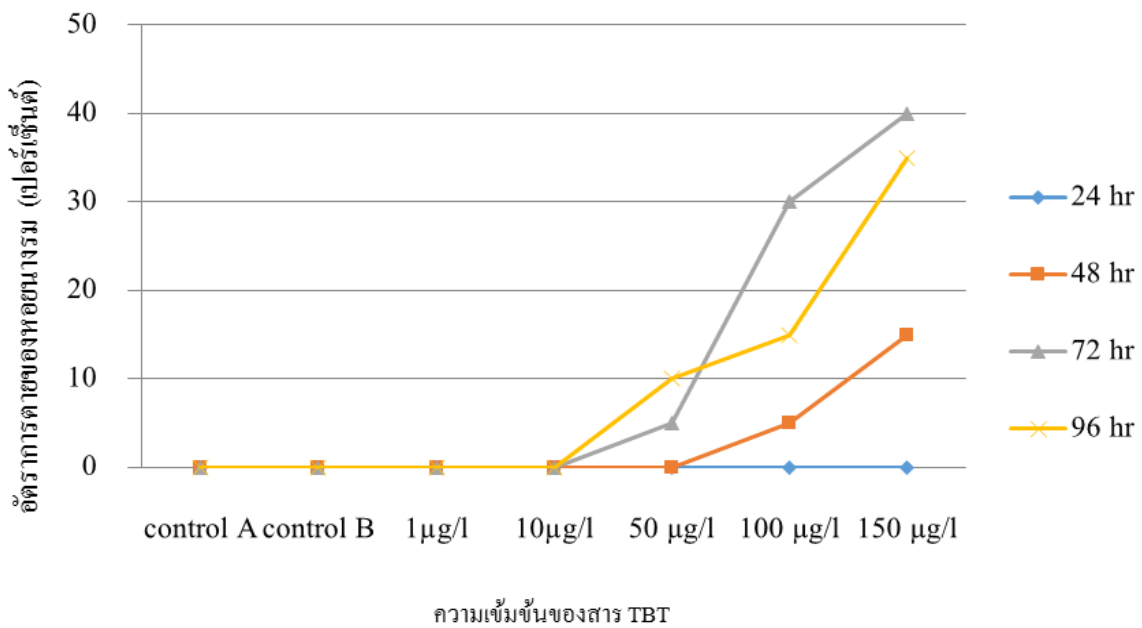
ตารางที่ 4-1 ปริมาณ TBT ในเนื้อเยื่อหอยนางรมที่เก็บจากพื้นที่บริเวณชายฝั่งภาคตะวันออก

สถานที่	ชื่อย่อ	ค่าเฉลี่ยปริมาณ TBT ในเนื้อเยื่อสด (ng/g) Mean \pm SD
1. หาดเจ้าหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี	เจ้าหลาว	4.44 \pm 1.32
2. อ่างศิลา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	อ่างศิลา	6.03 \pm 0.72
3. แหลมแท่น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี	แหลมแท่น	7.95 \pm 1.51
4. เกาะลอย อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	เกาะลอย	16.54 \pm 2.00
5. อ่าวคู้กระเบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี	คู้กระเบน	54.73 \pm 11.12

4.2 ผลกระทบของสาร TBT ต่ออัตราการตายของหอยนางรม

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ต่ออัตราการตายของหอยนางรมเมื่อเก็บตัวอย่างหอยนางรมปากจیب มาเลี้ยงในห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยง แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100 และ 150 $\mu\text{g/l}$ ในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ทำการเก็บสุมตัวอย่างทุก ๆ 24 ชั่วโมง ทุกความเข้มข้น เป็นระยะเวลา 96 ชั่วโมง ปรากฏผลดังนี้

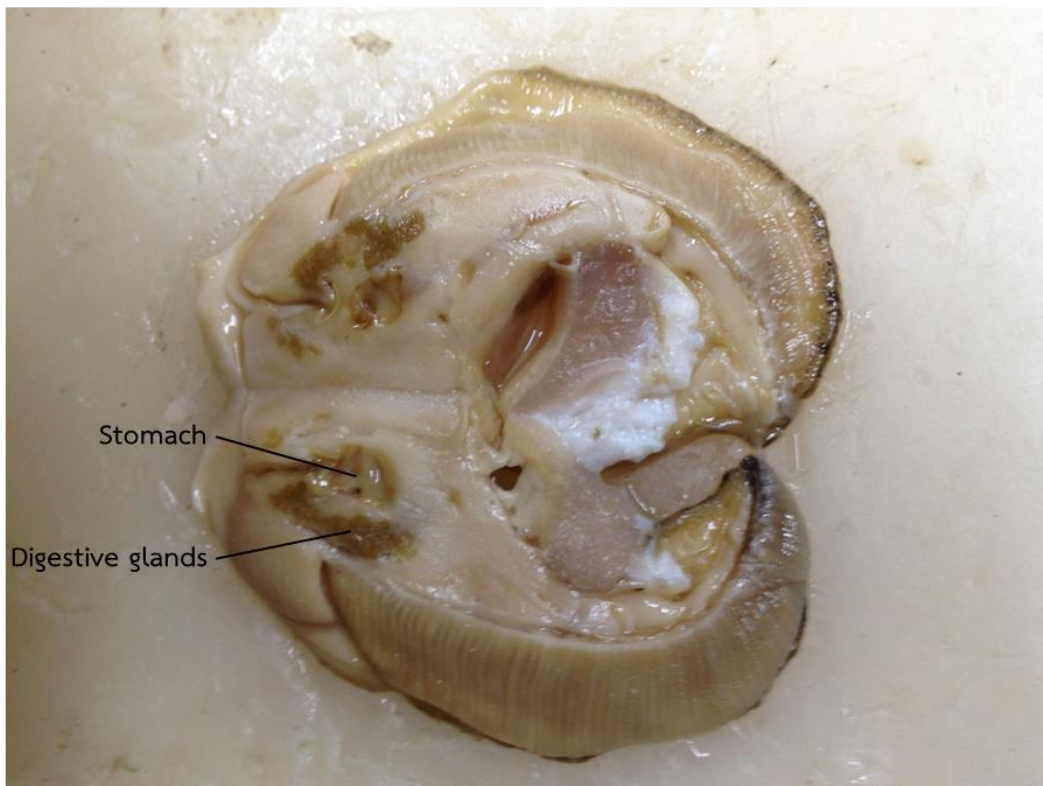
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ที่ระดับความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100 และ 150 $\mu\text{g/l}$ ดังแสดงในภาพที่ 4-4 โดยพบว่า เมื่อครบเวลา 24 ชั่วโมง ยังไม่มีอัตราการตายของหอยนางรมปากจیب และสามารถเห็นอัตราการตายของหอยนางรมเมื่อทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป โดยพบว่าอัตราการตายมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสาร TBT และระยะเวลาทดสอบ



ภาพที่ 4-4 อัตราการตายของหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) จากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ความเข้มข้น 0, 1, 10, 50, 100 และ 150 $\mu\text{g/l}$ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ

4.3 ผลกระทบของสาร TBT ต่อเนื้อเยื่อหอยนางรมปากจีบ

การศึกษาผลกระทบของสาร TBT ต่อเนื้อเยื่อหอยนางรม ทำการสังเกตในอวัยวะ 4 ส่วน ประกอบด้วย อวัยวะภายนอก 2 ส่วน คือ แมนเทิล (mantle) และเหงือก (gill) อวัยวะภายใน 2 ส่วน ได้แก่ ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) และ กระเพาะอาหาร (stomach) ดังภาพที่ 4-5



ภาพที่ 4-5 สัณฐานของหอยนางรมปากจีบ (*Saccostrea cucullata*)

ผลกระทบของสาร TBT ต่อต่อมย่อยอาหาร

ลักษณะทั่วไปของกระเพาะอาหารของหอยนางรมมีลักษณะเป็นท่อกลวงขนาดใหญ่ถูกล้อมรอบด้วยต่อมสร้างน้ำย่อย (digestive gland) กระเพาะอาหารของหอยนางรมประกอบด้วยเนื้อเยื่อต่าง ๆ ดังต่อไปนี้ เนื้อเยื่อฐาน (basement membrane) เป็นเนื้อประสานที่รองรับเนื้อผิว มีหน้าที่ เป็นตัวเชื่อมระหว่างโครงสร้าง เช่น แผ่นเซลล์เนื้อผิว กับเนื้อประสานที่อยู่ใต้เนื้อผิว ซีเลีย (cilia) เป็นลักษณะขนสั้น ๆ ยื่นออกมาจากเซลล์บริเวณด้านที่ติดกับท่อ (lumen) อยู่บริเวณด้านในของกระเพาะอาหาร โดยยึดติดกับเนื้อเยื่อผิว (epithelium cell) ทำหน้าที่พัดโบกอาหาร เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ลักษณะสำคัญ ลักษณะสำคัญของเนื้อเยื่อชนิดนี้ คือประกอบด้วยเซลล์จำนวนไม่มากนัก และมีสารภายนอก เซลล์ล้อมรอบอยู่เป็นจำนวนมาก สารภายนอกเซลล์เหล่านี้ประกอบด้วยเส้นใย (fiber) เล็ก บางคล้ายเส้นด้าย กระจายอยู่ทั่วไปในสารประกอบพวกพอลิแซ็กคาไรด์ ซึ่งมีลักษณะเป็นเจล (gel) บาง ๆ หลังจากเซลล์ ซึ่งเรียกว่า เมทริกซ์ (matrix) ทำหน้าที่สำคัญ คือ เป็นตัวเชื่อมหรือประสานระหว่างเนื้อเยื่ออื่น ๆ ในร่างกาย ช่วยค้ำจุนร่างกายหรือโครงสร้างต่าง ๆ และป้องกันอวัยวะที่อยู่ข้างใต้ โดยเกือบทุกอวัยวะในร่างกายจะต้องมีเนื้อเยื่อเกี่ยวพันเป็นร่างแหค้ำจุน ช่วยทำหน้าที่คล้ายกันชน หรือหมอนกันกระเทือน ต่อมย่อยอาหาร (digestive gland) เป็นต่อมมีท่อทำหน้าที่สร้างเอนไซม์ในระบบย่อยอาหารและหลั่งน้ำย่อยอาหารเข้าไปในทางเดินอาหาร ท่อทางเดินอาหาร (digestive tract) มีลักษณะเป็นท่อกลวง (two-hole tube) เป็นทางเดินอาหารที่มีช่องเปิด 2 ช่อง โดยช่องหนึ่งทำหน้าที่เป็นทางเข้าของอาหาร และอีกช่องหนึ่งทำหน้าที่เป็นทางออกของกากอาหาร ช่องว่างภายในกระเพาะอาหาร (lumen) เป็นที่กักเก็บของอาหารและเป็นบริเวณที่มีการย่อยและดูดซึมอาหาร เนื้อเยื่อผิว (epithelium cell) กลุ่มเซลล์ที่เรียกว่า เซลล์บุผิว (epithelial cell) จำนวนมากมาเรียงตัวอยู่ชิดติดกันเป็นชั้น ชั้นเดียวหรือหลายชั้น ซึ่งเซลล์ที่เรียงติดชิดกันจะยึดอยู่ด้วยกันได้ โดยโครงสร้างพิเศษที่เปลี่ยนแปลงมาจากเยื่อหุ้มเซลล์ มีหน้าที่ต่าง ๆ ย่อยอาหาร ดูดซึมสารอาหารและทำหน้าที่สร้างเมือก (mucous) เพื่อหล่อลื่นและป้องกันเนื้อเยื่อกระเพาะอาหาร ไม่ให้สัมผัสกับน้ำย่อยจากต่อมสร้างเอนไซม์ย่อยอาหาร เซลล์สร้างเมือก (mucous cell) มีหน้าที่สร้างน้ำเมือกมีลักษณะคล้ายวุ้นมีฤทธิ์เป็นเบส ทำหน้าที่เคลือบผิวชั้นในของกระเพาะ ชนิดเซลล์ของกระเพาะอาหารเป็นแบบ pseudostratified columnar epithelium ประกอบด้วยเซลล์ชั้นเดียวเรียงตัวบน Basement membrane โดยผิวทางด้านล่างของเซลล์ทุกเซลล์ วางอยู่บน basement membrane แต่ความสูงของเซลล์จะไม่เท่ากัน จึงเห็นนิวเคลียสอยู่ต่างระดับกับคล้าย stratified epithelium ผิวทางด้าน free surface มักมีการตัดแปลงตัวไปเป็น cilia จึงเรียกว่า pseudostratified ciliated columnar epithelium

การทดสอบผลกระทบต่อนเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจับติดตั้งแสดงในภาพที่ 4-6 ซึ่งแสดงส่วนของกระเพาะอาหารภายหลังจากที่ทำการทดสอบเป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จะเห็นได้ชัดว่า TBT ที่ระดับความเข้มข้นสูงขึ้นจะกระตุ้นให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อในกระเพาะอาหาร ซึ่งในกลุ่มที่ได้ความการสัมผัสกับ TBT ที่ระดับ 50 µg/L ขึ้นไป จะพบการตายของเซลล์เกิดขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นความเป็นพิษของ TBT ต่อนเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก

ในกลุ่มควบคุมพบการจัดเรียงตัวของเซลล์ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารมีการจัดเรียงตัวของเซลล์อย่างเป็นระเบียบ เซลล์เรียงตัวชั้นเดียวแบบ pseudostratified columnar epithelium บนเยื่อฐาน (basement membrane) เซลล์สร้างเมือก (mucous cell) มีจำนวนน้อย เมื่อเทียบกับกลุ่มทดสอบ TBT ที่เวลา 48 ชั่วโมง ปรากฏผลดังแสดงในภาพที่ 4-7 ผลการทดสอบผลกระทบของสารประกอบ TBT ต่อนเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/L พบว่ามีเซลล์สร้างเมือกเพิ่มขึ้น และเซลล์มีขนาดใหญ่ขึ้น ภายในประกอบแกรนูลขนาดเล็กจำนวนมากย้อมติดสีแดงของสียโอซิน มีการเรียงตัวแทรกอยู่ระหว่างเซลล์

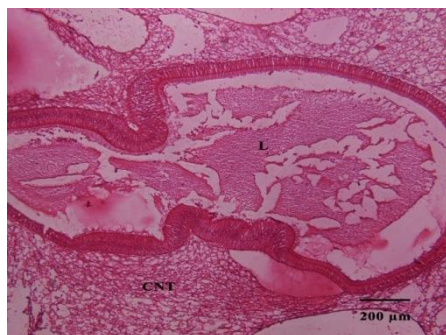
pseudostratified columnar epithelium ของเนื้อเยื่อของกระเพาะอาหาร ไม่พบการตายของเซลล์ (necrosis) ที่ระดับความเข้มข้นของของสาร TBT 50 µg/l พบว่า pseudostratified columnar epithelium ซึ่งเป็นเซลล์พื้นฐานของกระเพาะอาหาร มีลักษณะแบนลงเมื่อเทียบกับตัวอย่างเนื้อเยื่อหอยนางรมในกลุ่มควบคุม การจัดเรียงตัวของเซลล์เกิดมีช่องว่างภายในเซลล์ คาดว่าจะเป็นเซลล์สร้างเมือก แต่ไม่ติดสีแดงของอิโอซินเหมือนในกลุ่มควบคุม อาจเกิดจากเทคนิคการย้อมสี หรืออาจเกิดจากเซลล์ดังกล่าวหลุดลอกขณะที่ผ่านกระบวนการย้อมสี เนื้อเยื่อฐานมีลักษณะแบนบาง พบการตายของเซลล์ (necrosis)

ในกลุ่มที่ทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของของสาร TBT 100 µg/l พบว่าการจัดเรียงตัวของเซลล์มีช่องว่างภายในเซลล์เป็นจำนวนมาก คาดว่าจะเป็นเซลล์สร้างเมือก ที่ไม่ติดสีของอิโอซิน เซลล์พื้นฐานของกระเพาะอาหารมีลักษณะเหี่ยวแบนเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม เยื่อฐานมีลักษณะเหี่ยวแบนเห็นขอบของกระเพาะอาหารไม่ชัดเจน พบลักษณะของ cilia เรียงตัวไม่เป็นระเบียบ พบการตายของเซลล์ (necrosis) เพิ่มขึ้น ในภาพรวมพบว่าจำนวนของเซลล์สร้างเมือกจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อได้รับสาร TBT ความเข้มข้นสูงขึ้นไป และในกลุ่มทดสอบที่ได้รับสาร TBT สูงสุด (100 µg/l) พบว่า cilia มีลักษณะผิดปกติ

ผลกระทบของสาร TBT ต่อเนื้อเยื่อแมนเทิล เนื้อเยื่อเหงือก และต่อมย่อยอาหาร

นอกจากนี้ผลการทดสอบในเนื้อเยื่อแมนเทิล เหงือก และต่อมย่อยอาหารดังภาพที่ 4-7, 4-8 และ 4-9 ตามลำดับ พบผลกระทบที่คล้ายกันคือ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจะพบว่าหอยนางรมปากจیبที่ได้รับการสัมผัสสาร TBT ที่ระดับ 10 µg/l จะแสดงอาการเครียด โดยสังเกตจากการสร้างเมือกขึ้นมาคลุมอวัยวะ แต่ไม่พบอัตราการตายของเซลล์ ในกลุ่มที่ได้ความการสัมผัสกับ TBT ที่ระดับ 50 µg/l ขึ้นไป และจะพบการตายของเซลล์เกิดขึ้น ซึ่งแสดงให้เห็นความเป็นพิษของ TBT ต่อเนื้อเยื่อเป็นอย่างมาก

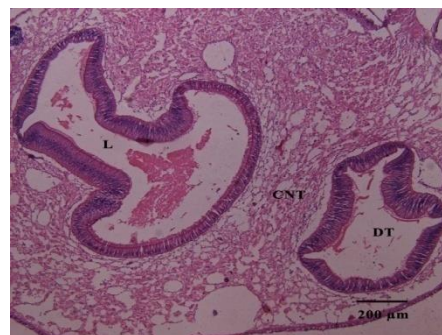
ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาผลกระทบของสาร TBT ต่อการทำงานของโปรตีน โดยเลือกกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับสัมผัส TBT ที่ระดับ 10 µg/l เนื่องจากยังไม่พบอัตราการตายของเซลล์ แต่มีความเครียดเกิดขึ้น โดยผู้วิจัยเลือกตัวอย่างเนื้อเยื่อแมนเทิล เนื่องจากเป็นอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างเปลือกหอยนางรม และสาร TBT มีรายงานอย่างกว้างขวางว่า เป็นตัวการที่ทำให้เกิดการสร้างเปลือกผิดปกติในหอยนางรม (Alzieu, 2000) แต่ยังไม่เคยมีการรายงานกลไกการสร้างเปลือกผิดปกติดังกล่าว ดังนั้นงานวิจัยในครั้งนี้จึงต้องการค้นหากลไกการที่ทำให้เกิดการสร้างเปลือกผิดปกติดังกล่าว โดยใช้เทคโนโลยีโปรตีโอมิกส์ช่วยในการค้นหาโปรตีนที่มีปริมาณผิดปกติในกลุ่มทดสอบ เทคนิคโปรตีโอมิกส์นี้จะช่วยค้นหาโปรตีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติ และระบุชนิดได้ (Kingtong et al, 2007; Sarkar et al., 2006)



A. กำลังขยาย 100x



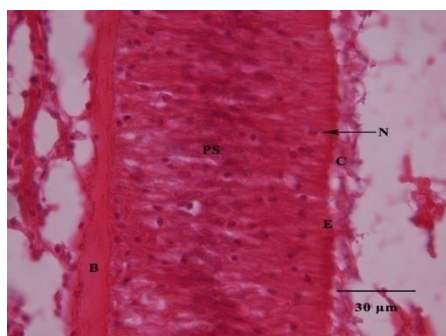
B. กำลังขยาย 100x



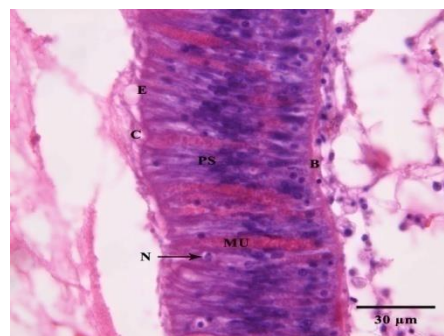
C. กำลังขยาย 100x



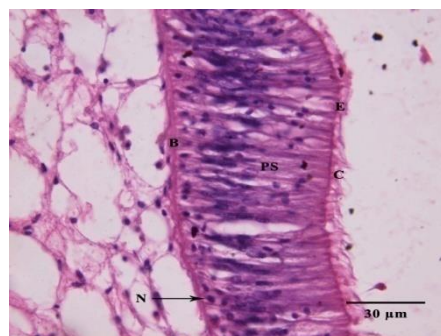
D. กำลังขยาย 100x



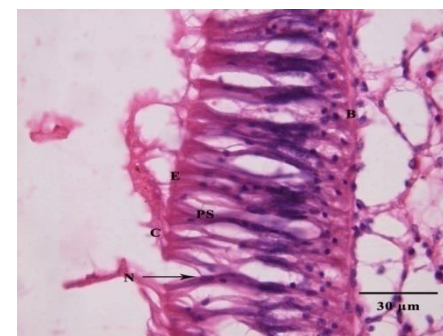
E. กำลังขยาย 1000x



F. กำลังขยาย 1000x



G. กำลังขยาย 1000x



H. กำลังขยาย 1000x

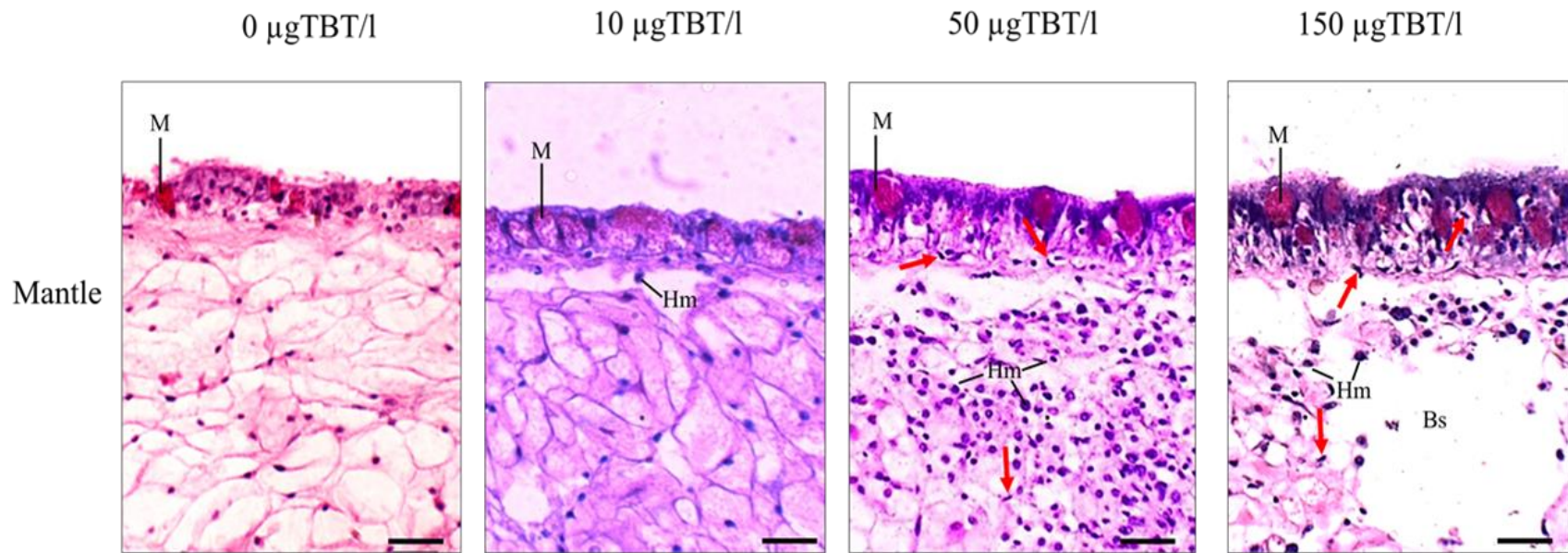
ภาพที่ 4-6 ลักษณะเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง

A. และ E. คือ เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของกลุ่มควบคุม

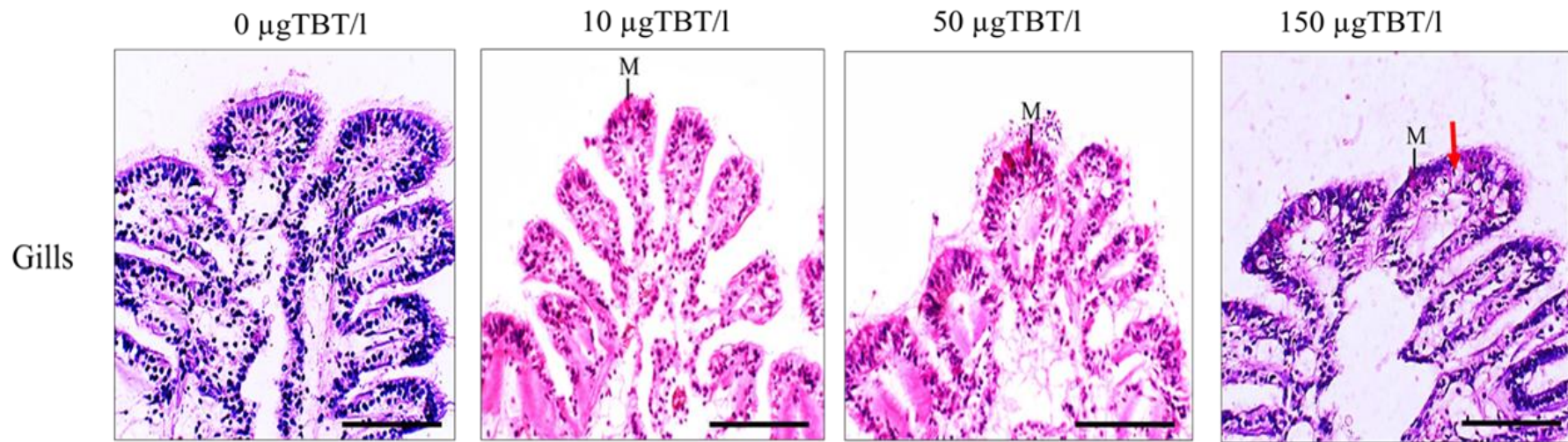
B. และ F. คือ เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 10 μg/l

C. และ G. คือ เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 50 μg/l

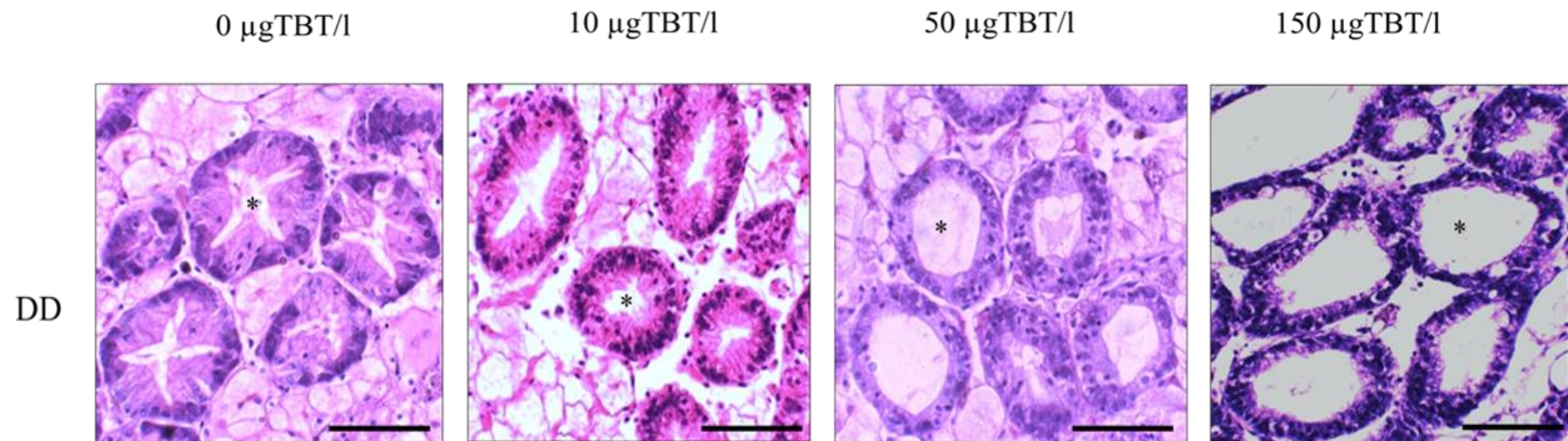
D. และ H. คือ เนื้อเยื่อกระเพาะอาหารจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 100 μg/l



ภาพที่ 4-7 ลักษณะเนื้อเยื่อแมนเทิลของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



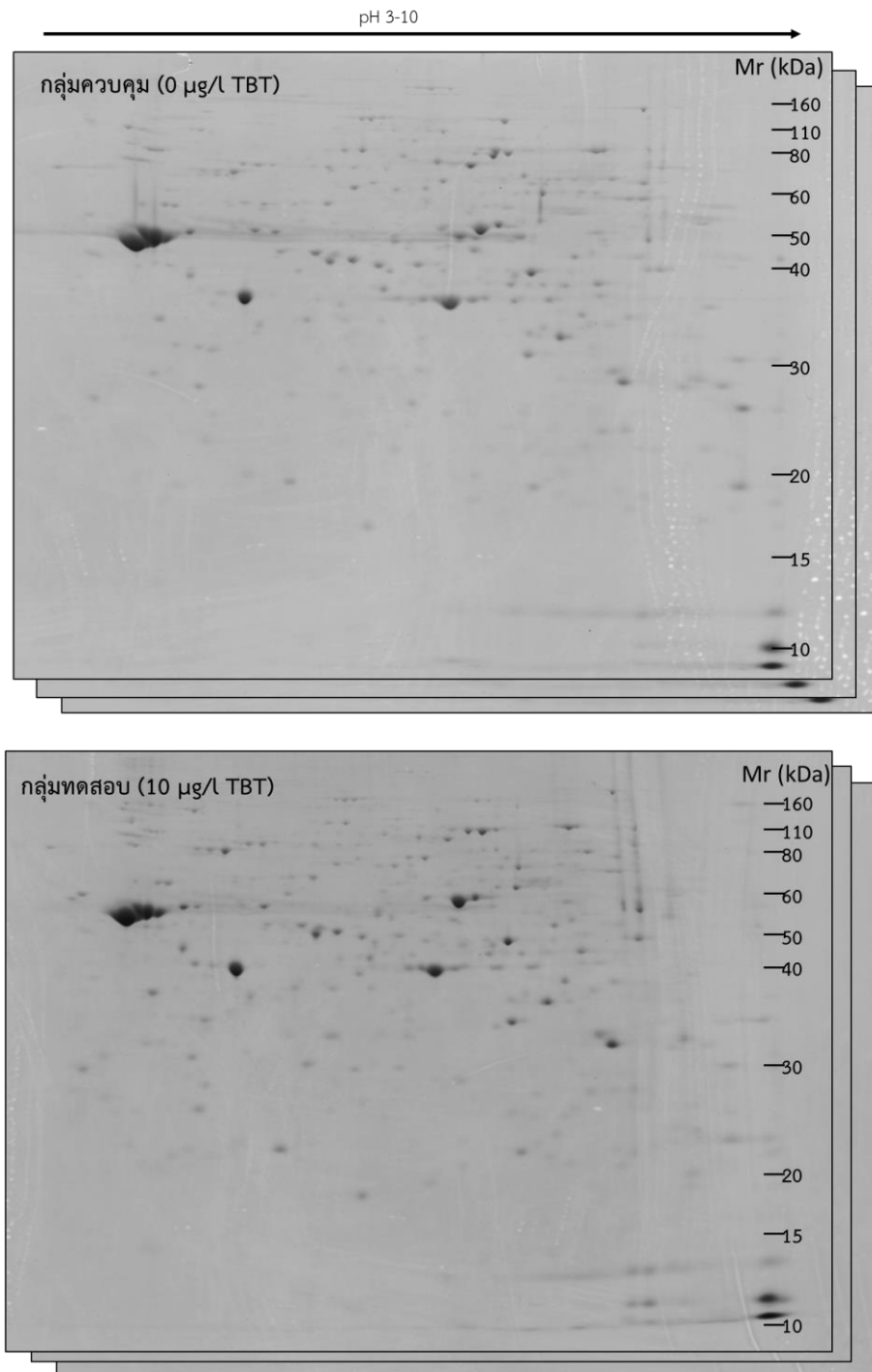
ภาพที่ 4-8 ลักษณะเนื้อเยื่อเหงือกของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง



ภาพที่ 4-9 ลักษณะเนื้อเยื่อต่อมย่อยอาหารของหอยนางรมปากจีบจากการทดสอบความเป็นพิษของสาร TBT ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.4 การวิเคราะห์โปรตีนและผลกระทบของสาร TBT ต่อโปรตีนของหอยนางรมปากจیب

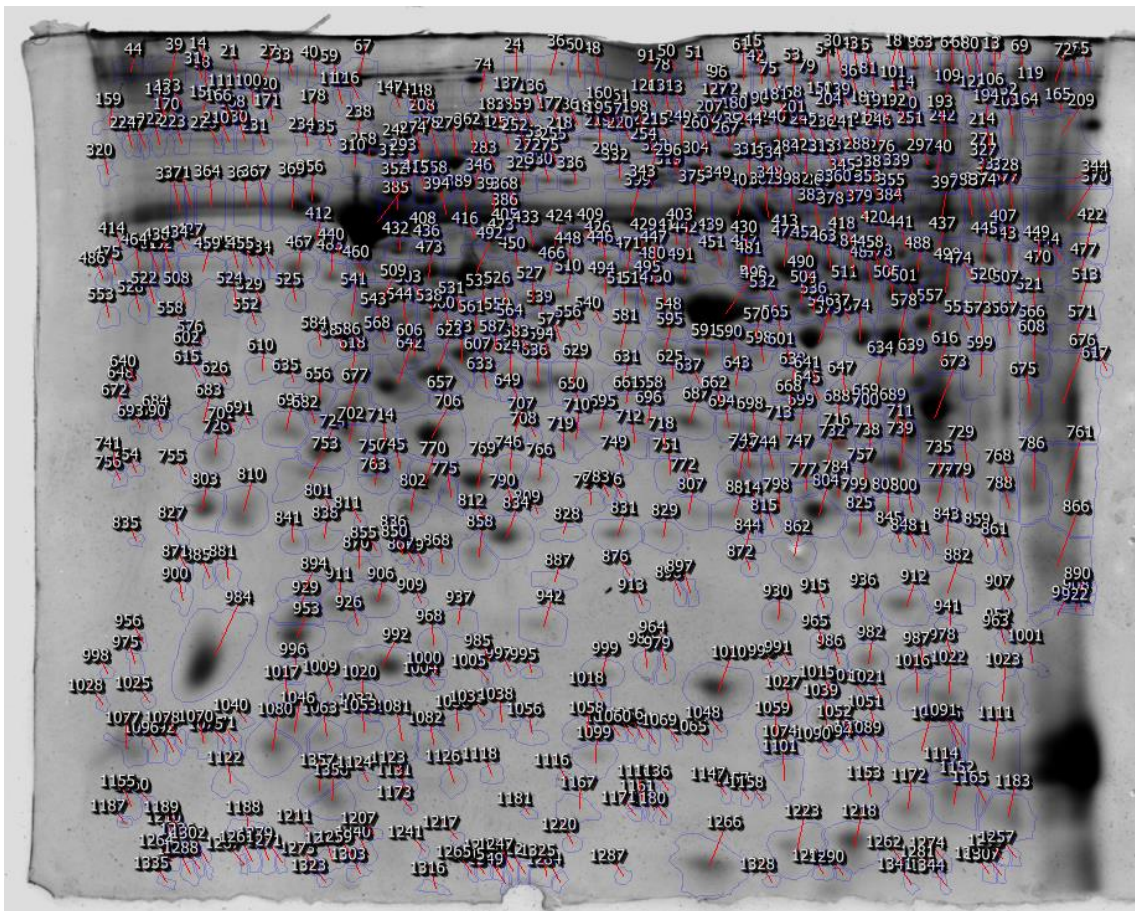
ผลการศึกษาโปรตีนในหอยนางรมปากจیبด้วยเทคนิคโปรตีนโอมิกส์ โดยใช้วิธีการแยกโปรตีนแบบสองมิติ สามารถแยกโปรตีนจากแมนเทิลของกลุ่มควบคุม (0 $\mu\text{g}/\text{l}$) และกลุ่มทดสอบ (10 $\mu\text{g}/\text{l}$) ที่เวลา 48 ชั่วโมง (N=3) ได้ดังภาพที่ 4-10



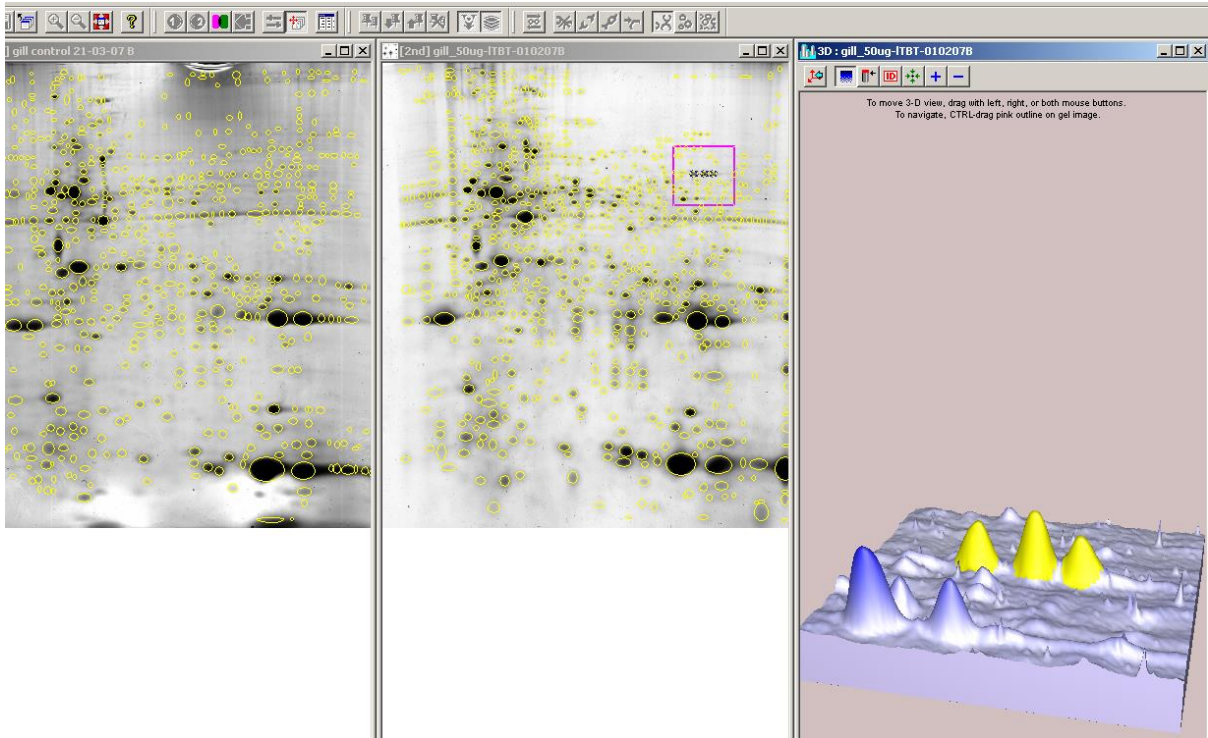
ภาพที่ 4-10 โปรตีนจากแมนเทิลของหอยนางรมกลุ่มควบคุม (0 $\mu\text{g}/\text{l}$) และกลุ่มทดสอบ (10 $\mu\text{g}/\text{l}$) ที่เวลา 48 ชั่วโมง (N=3)

เมื่อโปรแกรมวิเคราะห์ภาพเจส Samespot Analysis (Progenesis) ตรวจสอบจำนวนจุดโปรตีน สามารถตรวจสอบลักษณะจุดโปรตีนบนเจลได้ประมาณ 1300 จุด ดังแสดงในภาพที่ 4-11 เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณของโปรตีนแต่ละจุดในกลุ่มควบคุม (0 µg/L) และกลุ่มทดสอบ (10 µg/L) ที่เวลา 48 ชั่วโมง สามารถระบุได้ว่ามีโปรตีนแตกต่างกันอย่างน้อยมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสิ้น 32 จุด ($P < 0.5$) ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วย TBT 25 จุด และ โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วย TBT 7 จุด

ตัวอย่างการทำงานของโปรแกรมเปรียบเทียบปริมาณโปรตีนบนเจล 2 มิติ ดังแสดงในภาพที่ 4-12 ซึ่ง จะเห็นการเปรียบเทียบโปรตีนระหว่างกลุ่มตัวอย่าง และแสดงผลเป็นพื้นที่ของโปรตีนเปรียบเทียบกับกัน ซึ่งใช้ เจลทั้งหมด 3 เจลต่อ 1 ตัวอย่าง โดยโปรแกรมจะทำหน้าที่วิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยปริมาณโปรตีน ระหว่างกลุ่มตัวอย่าง ที่ระดับนัยสำคัญ 0.05

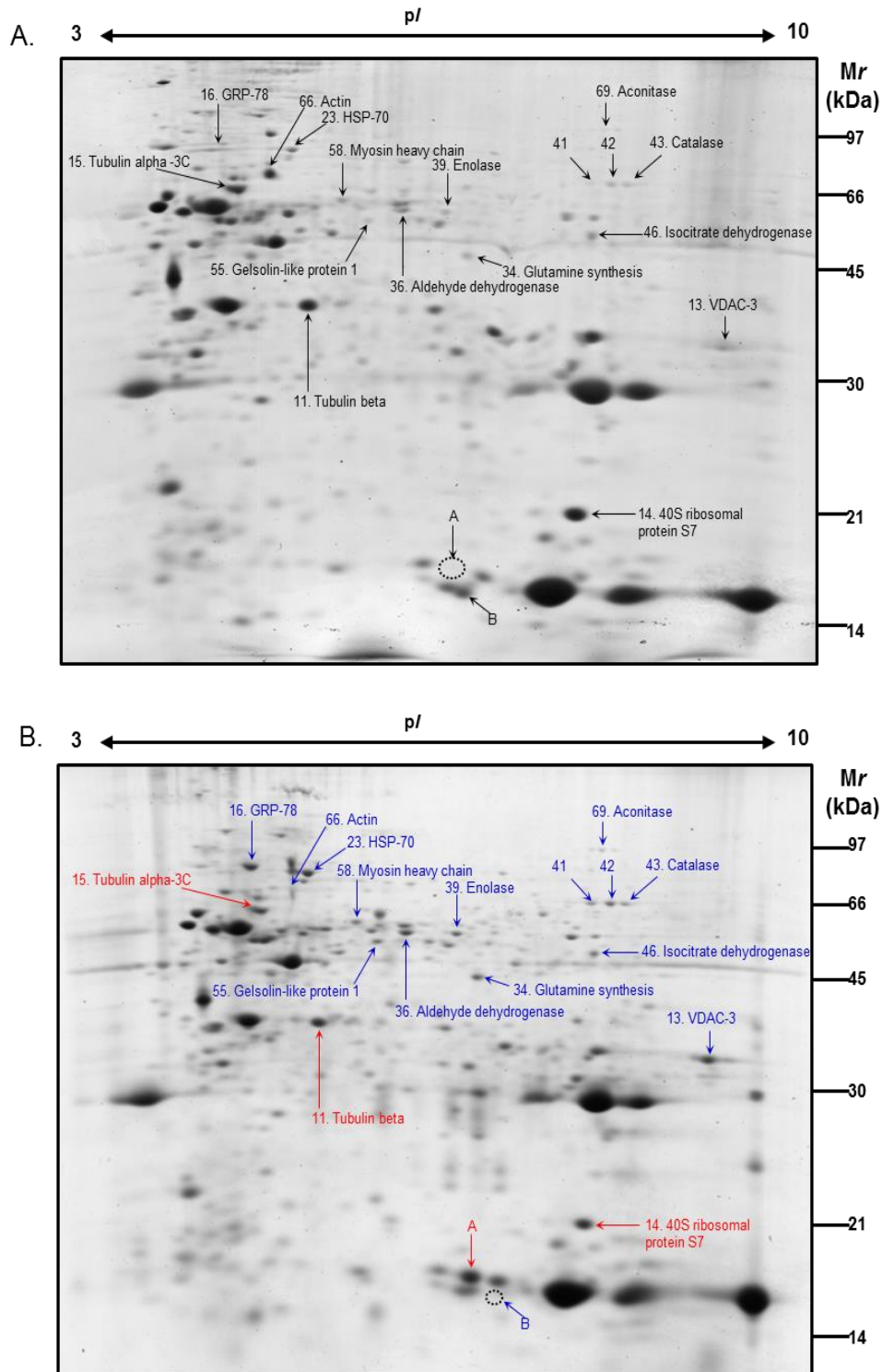


ภาพที่ 4-11 จำนวนจุดโปรตีนบนเจลสองมิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพเจส Samespot Analysis (Progenesis)



ภาพที่ 4-12 การวิเคราะห์ปริมาณโปรตีนบนเจลสองมิติโดยใช้โปรแกรมวิเคราะห์ภาพเจล Samespot Analysis (Progenesis)

เมื่อทำการวิเคราะห์โปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสิ้น 32 จุด โดยการตัดเจลเพื่อย่อยด้วยเอนไซม์ทริปซิน และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง LC-MS/MS ร่วมกับเทคโนโลยีสารสนเทศน์ พบว่า ระบุชนิดของโปรตีนได้ 17 ชนิด ซึ่งประกอบด้วยโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้น 14 ชนิด และโปรตีนที่อยู่ในกลุ่มยับยั้ง 3 ชนิดดังภาพที่ 4-13 และรายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้แสดงในตารางที่ 4-2



ภาพที่ 4-13 ผลการเปรียบเทียบความแตกต่างของปริมาณโปรตีนในกลุ่มควบคุม A (0 µg/l TBT) และกลุ่มทดสอบ B (10 µg/l TBT) ที่เวลา 48 ชั่วโมง โดยใช้โปรตีนจากแมนเทิลของหอยนางรมปากจیب (*Saccostrea cucullata*) โปรตีนที่มีแตกต่างกันที่ระดับนัยสำคัญ $P < 0.05$ แสดงโดยลูกศร โดยลูกศรสีฟ้าหมายถึงกลุ่มที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TBT และลูกศรสีแดงหมายถึงกลุ่มที่มีปริมาณลดลงเมื่อถูกกระตุ้นด้วย TBT รายละเอียดของโปรตีนที่ระบุชนิดได้แสดงในตารางที่ 4-2

ตารางที่ 4-2 ชนิดของโปรตีนที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($P < 0.5$) ระหว่างหอยนางรมในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดสอบตามภาพที่ 4-13 ที่สามารถระบุชนิดได้

Spot number	Swiss Prot Accession number	Protein names	Function	Experimental pI/Mr (kDa)	Theoretical pI/MW (kDa)	Fold Change	p-Value
Up-regulated protein in TBT exposed oyster							
<i>Oxidative stress</i>							
16	Q16956	78 kDa glucose-regulated protein (GRP-78)	Stress response	4.29/118.31	4.78/71.12	1.66	1.10E-02
23	P11147	Heat shock 70 kDa protein cognate 4	Stress response	5.01/77.81	5.35/71.13	2.10	4.00E-03
36	P05091	Aldehyde dehydrogenase	Detoxification of generated aldehydes	5.82/56.10	5.69/54.44	3.10	2.74E-04
41	P17336	Catalase	Protecting the cell from oxidative damage	7.29/63.75	8.39/57.15	3.74	8.00E-03
42	P17336	Catalase	Same as above	7.49/63.78	8.39/57.15	2.61	3.00E-03
43	P17336	Catalase	Same as above	7.63/63.78	8.39/57.15	1.67	2.20E-02
<i>Ion transport</i>							
13	Q9R1Z0	VDAC-3 (Voltage-dependent anion-selective channel protein 3)	Anion transport	8.83/29.57	8.91/30.80	1.54	3.00E-02
<i>Cytoskeleton</i>							

Spot number	Swiss Prot Accession number	Protein names	Function	Experimental pI/Mr (kDa)	Theoretical pI/MW (kDa)	Fold Change	p-Value
55	Q7JQD3	Gelsolin-like protein 1 (Actin-modulator)	Actin binding	5.6/53.71	6.08/41.64	2.08	2.18E-04
58	Q90339	Myosin heavy chain, fast skeletal muscle	Actin-based motility	5.42/58.32	5.56/221.60	1.59	1.50E-02
66	P53463	Actin	Cellular structure and support	4.87/65.15	5.30/41.51	1.66	1.10E-02
<i>Energy metabolism</i>							
39	O02654	Enolase	Glucose metabolism (Glycolysis)	6.19/56.27	5.78/47.43	2.08	4.00E-03
46	Q8LPJ5	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	Glucose metabolism (Citric acid cycle)	7.34/51.66	6.00/47.25	1.74	4.40E-02
69	P20004	Aconitate hydratase (Aconitase)	Glucose metabolism (Tricarboxylic acid cycle)	7.41/98.85	7.16/82.40	1.60	1.80E-02
<i>Other</i>							
34	G0WX16	Glutamine synthetase	Amino acid metabolism	6.35/45.85	5.63/41.35	1.92	4.33E-04
B	Unidentified	-		6.63/16.69	-	2.89	1.51E-06

Spot number	Swiss Prot Accession number	Protein names	Function	Experimental pI/Mr (kDa)	Theoretical pI/MW (kDa)	Fold Change	p-Value
Down-regulated protein in TBT exposed oyster							
<i>Cytoskeleton</i>							
11	P11833	Tubulin-beta	Microtubule-based movement	5.11/38.03	4.73/50.05	1.53	4.90E-02
15	Q13748	Tubulin-alpha 2	Same as above	4.09/83.22	4.98/49.96	1.78	4.79E-02
<i>Other</i>							
14	P48155	40S ribosomal protein S7	Translation	7.22/20.95	9.82/21.87	1.51	4.28E-02
A	Unidentified	-		6.42/17.24	-	6.62	6.41E-06

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผล

5.1 การปนเปื้อนของสารไตรบิวทิลทินในหอยนางรมปากจีบ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่ายังพบการปนเปื้อนของสารประกอบ TBT ในตัวอย่างหอยนางรมที่สุ่มเก็บจากทุกพื้นที่การศึกษา โดยพื้นที่ที่พบการสะสมมากที่สุดคือ บริเวณอ่าวคุ้งกระเบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี รองลงมาคือเกาะลอย อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ส่วนพื้นที่อื่น ๆ ได้แก่ บริเวณอ่างศิลา ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรี และ หาดเจ้าหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี และ แหลมแท่น ตำบลแสนสุข อำเภอเมือง จังหวัดชลบุรียังสามารถพบการสะสมได้ แต่ 7 ในปริมาณที่ต่ำมาก อย่างไรก็ตาม เมื่อเทียบกับผลการศึกษาของ Kan-atireklap et al (1997) พบว่า ระดับการสะสมของสารประกอบ TBT มีปริมาณลดลงอย่างมาก เช่นในพื้นที่อ่าวคุ้งกระเบน ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี เคยมีการสะสมของสาร TBT ในเนื้อหอยแมลงภู่ 680 ng/g (น้ำหนักสด) ในการศึกษาปริมาณการสะสมของสาร TBT ในเนื้อหอยนางรมครั้งนี้ลดลงเหลือ 54.73 ± 11.12 ng/g (น้ำหนักสด) ซึ่งมีแนวโน้มการลดลงที่ดี ภายหลังจากที่มีการประกาศยกเลิกใช้สีทาเพรียงที่มี TBT เป็นองค์ประกอบแบบถาวร (IMO, 2001)

5.2 ผลกระทบของสารประกอบ TBT ต่ออัตราการตายของหอยนางรมปากจีบ

จากการทดลองพบว่าในกลุ่มควบคุมไม่พบการตายของหอยนางรมตลอดการทดสอบ ส่วนในกลุ่มทดลอง จะพบการตายของหอยนางรมเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการทดสอบ อย่างไรก็ตาม อัตราการตายที่พบในกลุ่มทดลองทุกกลุ่มน้อยกว่าร้อยละ 50 ทำให้ไม่สามารถความนวนค่า LC50 ได้ จากการทดลองครั้งนี้ ดังนั้นหากต้องการหาค่า LC50 ในการศึกษาครั้งต่อไป ควรเพิ่มความเข้มข้นของสาร TBT ขึ้นมากกว่า 150 $\mu\text{g/l}$ เมื่อเปรียบเทียบกับอัตราการตายในแต่ละกลุ่มจะพบว่าที่ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 10 $\mu\text{g/l}$ จะไม่พบอัตราการตายตลอดระยะเวลาที่ทำการทดสอบ (96 ชั่วโมง) ในทดสอบที่ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 50 $\mu\text{g/l}$ ขึ้นไปจึงจะพบอัตราการตายของหอยนางรม

เมื่อเปรียบเทียบการศึกษากับหอยสองฝาชนิดอื่น ๆ พบว่า หอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* นี้ มีความทนต่อสาร TBT ที่สูงมาก จากรายงานค่า LC50 ในหอยนางรม European oyster *Ostrea edulis*, Pacific oyster *Crassostrea gigas* และ Eastern oyster *Crassostrea virginica* พบว่าค่า LC50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 210, 290 และ 560-1000 $\mu\text{g/l}$ ตามลำดับ (Hall and Pinkney, 1985) และรายงานใน *Saccostrea forskali* พบว่าค่า LC50 ที่เวลา 96 ชั่วโมง มีค่าเท่ากับ 54.5 $\mu\text{g/l}$ (kingtong et al., 2007) ซึ่งข้อมูลเหล่านี้ชี้ให้เห็นว่าหอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* นี้ ทนต่อการปนเปื้อนของสารประกอบ TBT ได้สูงมาก อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองระดับเนื้อเยื่อและโปรตีนในการศึกษาครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่า แม้หอยนางรมปากจีบจะไม่ตายที่ระดับความเข้มข้นของ TBT ต่ำ ที่ 10 $\mu\text{g/l}$ แต่สามารถสร้างผลกระทบต่อเนื้อเยื่อและการแสดงออกของโปรตีนในเซลล์ได้เป็นอย่างมาก

5.3 ผลกระทบของสารประกอบ TBT ต่อเนื้อเยื่อของหอยนางรมปากจیب

จากการศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารของหอยนางรมโดยทดสอบความเป็นของสาร TBT ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เวลา 48 ชั่วโมง พบว่า ในกลุ่มควบคุมมีลักษณะเนื้อเยื่อปกติคือมีการจัดเรียงตัวของเซลล์ในเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารมีการจัดเรียงตัวของเซลล์อย่างเป็นระเบียบบนเนื้อเยื่อฐาน เมื่อทดสอบผลกระทบของสารประกอบ TBT ที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/l}$ พบว่าเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารมีการสร้างต่อมสร้างเมือก (mucous cell) มากขึ้น แต่ไม่พบการตายของเซลล์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 50 $\mu\text{g/l}$ การจัดเรียงตัวของเซลล์เกิดมีช่องว่างภายในเซลล์ เซลล์มีลักษณะเหี่ยวและพบการตายของเซลล์แบบ necrosis เกิดขึ้น ผลกระทบมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารประกอบ TBT ในกลุ่มทดสอบ นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์บางตำแหน่งมีอาการบวมเกิดขึ้น ซึ่งการบวมดังกล่าว คล้ายกับมีช่องว่างในเซลล์ขนาดใหญ่เกิดขึ้นเป็นจำนวนมาก ซึ่งช่องว่างภายในเซลล์ที่เกิดขึ้นอาจเป็นแควคิวโอลหรือแกรนูลในเนื้อเยื่อบุผิวของกระเพาะอาหารแต่เนื่องจากการศึกษานี้ไม่ได้ใช้สีลักษณะพิเศษย้อมเพื่อศึกษาแควคิวโอลหรือแกรนูลจึงทำให้ไม่สามารถมองเห็นแควคิวโอลหรือแกรนูลชัดเจน ซึ่งมีลักษณะคล้ายกับผลการศึกษาของ สรียา เสนิงค์ ณ อยุธยา (สรียา เสนิงค์ ณ อยุธยา, 2548) ที่ศึกษาผลกระทบของสาร TBT ต่อการรอดชีวิตและต่อเนื้อเยื่อของอวัยวะในระบบย่อยอาหารและระบบสืบพันธุ์ของหอยฝาเดียวชนิด *Littoraria melanostoma* ซึ่งรายงานพบว่าแควคิวโอลในเนื้อเยื่อบุผิวของหอยฝาเดียวมีจำนวนและขนาดเพิ่มขึ้น ภายหลังจากทดสอบด้วยสารประกอบ TBT ที่ระดับความเข้มข้น 10 ng/l เป็นเวลา 20 วัน ซึ่งมีผลทำให้เซลล์เนื้อเยื่อบุผิวแตก

ผลการศึกษาในอวัยวะอื่น ๆ ก็ให้ผลคล้ายกัน คือเมื่อทดสอบผลกระทบของสารประกอบ TBT ที่ระดับความเข้มข้น 10 $\mu\text{g/l}$ พบว่าเนื้อเยื่อกระเพาะอาหารมีการสร้างต่อมสร้างเมือกมากขึ้น แต่ไม่พบการตายของเซลล์ ที่ระดับความเข้มข้นของสาร TBT 50 $\mu\text{g/l}$ การจัดเรียงตัวของเซลล์เกิดมีช่องว่างภายในเซลล์ เซลล์มีลักษณะเหี่ยวและพบการตายของเซลล์แบบ necrosis เกิดขึ้น ผลกระทบมีความรุนแรงเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารประกอบ TBT

5.4 ผลกระทบของสารประกอบ TBT ต่อโปรตีนในหอยนางรมปากจیب

5.4.1 โปรตีนที่ถูกกระตุ้นด้วยสารประกอบ TBT

กลุ่มที่ 1 เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับความเครียด

ผลการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารประกอบ TBT ทำให้เกิดความเครียดระดับเซลล์ในหอยนางรมปากจیب เนื่องจากกระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่มที่เกี่ยวข้องกับการต้านความเครียดจากสารเคมีเพิ่มขึ้น ได้แก่ โปรตีนต่อไปนี้ GRP-78 (spot # 16), heat shock 70 kDa protein cognate 4 (spot # 23), aldehyde dehydrogenase (spot # 36) และ catalase (spot # 41, 42 and 43)

GRP-78 และ Heat shock 70 kDa protein cognate 4 (HSP-70) เป็นโปรตีนในกลุ่ม HSP70 family (Little et al., 1994). โปรตีนในกลุ่มนี้ทำหน้าที่สำคัญในการรักษาสภาพของโปรตีนในเซลล์ไม่ให้ถูกทำลายจากสภาวะความเป็นพิษจากสารเคมี เนื่องจากจะช่วยคืนสภาพให้กับโปรตีนที่เสียสภาพ (misfolded หรือ misassembled protein) ได้ (Little et al., 1994; Cribb et al., 2005; Vos et al., 2008). การศึกษาในปลากระเบน Yellow stingray *Urolophus jamaicensis* (Dwivedi and Trombetta, 2006). และหอยสองฝา marine clams *Ruditapes decussata* (Solé et al., 2000) ยังพบว่าสารประกอบ TBT กระตุ้นการทำงานของโปรตีนในกลุ่ม HSP-70 ด้วย ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาครั้งนี้ ดังนั้น HSP-70 และ

GRP-78 จึงมีแนวโน้มที่ดีในการใช้เป็น biomarker สำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของสารประกอบ TBT ในสิ่งแวดล้อม

เอนไซม์ aldehyde dehydrogenase (ALDH) และ catalase ก็มีปริมาณเพิ่มขึ้นเช่นกัน โดย ALDH เป็นสมาชิกในกลุ่มเอนไซม์ที่กระตุ้นปฏิกิริยา aldehyde oxidation ซึ่งเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาชีวเคมีที่หลากหลายรวมไปถึงกลไกการกำจัดพิษของแอลดีไฮด์ทั้งภายนอกและภายในเซลล์ (detoxification of exogenously and endogenously generated aldehydes) ซึ่งจะทำหน้าที่ปกป้องเซลล์จากภาวะเครียดจากสารเคมีโดยตรง (Singh et al., 2013) สำหรับเอนไซม์ catalase มีเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนปฏิกิริยา $2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ ซึ่งจะช่วยลดความเป็นพิษของสารประกอบไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ ในสัตว์กลุ่มหอยสองฝา มีรายงานว่าเอนไซม์กลุ่มนี้จะถูกกระตุ้นเมื่อได้รับสัมผัสจากสารพิษจากสิ่งแวดล้อม เช่น bisphenol-A (Apraiz et al., 2006) ทองแดง (Geret et al., 2004) chloramphenicol (Monari et al., 2008) และ แคดเมียม (Jo et al., 2008) ในภาพรวมจะเห็นได้ว่าเอนไซม์ในกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการป้องกันผลกระทบต่อเซลล์ที่เกิดจากสารประกอบ TBT

กลุ่มที่ 2 โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ Ion transport

สารประกอบ TBT กระตุ้นการแสดงออกของโปรตีนในไมโทคอนเดรียที่ชื่อว่า voltage-dependent anion-selective channel protein 3 หรือ VDAC-3 (spot # 13) ซึ่งเป็นโปรตีนสมาชิกในกลุ่ม VDAC ประกอบด้วย VDAC1, VDAC2 และ VDAC3 (Pedersen, 2008) โปรตีนเหล่านี้จะรวมตัวเป็น ion channel มีหน้าที่ควบคุมไอออนและโมเลกุลขนาดเล็กต่าง ๆ รวมถึง Ca^{2+} ที่ผ่านเข้าออกระหว่างไมโทคอนเดรียและไซโทพลาซึม (Colombini, 2005) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมพบว่าโปรตีนกลุ่มนี้มีความสำคัญต่อการรักษาสมดุลของ Ca^{2+} ภายในเซลล์ หากโปรตีน VDAC ถูกรบกวนจะกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ได้ (Shimizu et al., 2001)

ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้แสดงให้เห็นว่าหากโปรตีน VDAC เสียสมดุลก็จะส่งผลกระทบต่อควบคุมเมแทบอลิซึมของ Ca^{2+} ซึ่งมีความสำคัญอย่างยิ่งต่อระบบการสร้างเปลือกหอยของหอยนางรม เนื่องจากเปลือกหอยนางรมเกิดจากการสร้างสารประกอบแคลเซียมคาร์บอเนตทับลงไปบนเปลือกเดิม โดยอวัยวะที่ทำหน้าที่สร้างเปลือก ได้แก่ แมนเทิล ดังนั้นหากกลไกการควบคุม แคลเซียมไอออนถูกรบกวนก็จะส่งผลกระทบต่อสร้างเปลือกของหอยนางรมโดยตรง

ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้เสนอว่าการที่สาร TBT มีผลกระทบต่อการสร้างเปลือกในหอยนางรม เกิดจากกลไกการทำงานที่ผิดปกติของโปรตีน VDAC นั่นเอง

กลุ่มที่ 3 Cytoskeleton and cytoskeleton-associated proteins

สารประกอบ TBT กระตุ้นการสร้างโปรตีนในกลุ่ม cytoskeleton เพิ่มขึ้น ได้แก่โปรตีน actin (spot # 66) และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง ได้แก่ Gelsolin-like protein 1 (actin-modulator; spot # 55) และ myosin heavy chain (spot # 58) การที่สารประกอบ TBT รบกวนสมดุลของโปรตีนโครงสร้างเหล่านี้จะส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อได้และจะเกี่ยวข้องกับการเคลื่อนไหวของร่างกายโดยตรง (Kabsch and Vandekerckhove, 1992; Silacci et al., 2004; Cima et al., 1998; Micić et al., 2001) ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับผลการศึกษาเนื้อเยื่อของหอยนางรม เพราะสารประกอบ TBT ส่งผลกระทบต่อเนื้อเยื่อทำให้โครงสร้างเนื้อเยื่อผิดปกติในทุกอวัยวะที่ทำการศึกษา

กลุ่มที่ 4 Energy metabolism

สารประกอบ TBT กระตุ้นการสร้างโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างพลังงาน โดยพบว่าโปรตีน enolase (spot # 39) มีปริมาณเพิ่มขึ้น โปรตีนนี้เกี่ยวข้องกับการสลายโมเลกุลของน้ำตาลกลูโคสในกระบวนการไกลโคไลซิส และกระตุ้นโปรตีน isocitrate dehydrogenase [NADP] (spot # 46) และ aconitate hydratase (spot # 69) ซึ่งเป็นโปรตีนใน tricarboxylic acid cycle ดังนั้นการที่โปรตีนกลุ่มนี้มีการสร้างเพิ่มขึ้นแสดงให้เห็นว่า TBT เกี่ยวข้องกับระบบการสร้างพลังงานในสัตว์ทดลอง พลังงานที่สร้างเพิ่มนี้อาจเกี่ยวข้องกับกิจกรรม defensive mechanism

กลุ่มที่ 5 โปรตีนอื่นที่ถูกกระตุ้น

เอนไซม์ Glutamine synthetase (spot # 34) ก็เป็นโปรตีนอีกชนิดหนึ่งที่เพิ่มขึ้นอย่างมากเมื่อหอยนางรมสัมผัสกับ TBT เอนไซม์ Glutamine synthetase มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับ nitrogen metabolism และ glutamine synthesis เคยมีรายงานว่า การเพิ่มขึ้นของ RNA ของยีนสร้างเอนไซม์ Glutamine synthetase เป็นกลไกการตอบสนองที่เกิดขึ้นในหอยนางรมเมื่อได้รับสัมผัสยาฆ่าแมลง (Tanguy et al., 2005) ดังนั้น เอนไซม์ Glutamine synthetase อาจมีหน้าที่สำคัญในการปกป้องเซลล์จากการถูกทำลายของสารพิษในสิ่งแวดล้อมรวมถึง TBT ด้วย

5.4.2 โปรตีนที่ถูกยับยั้งด้วยสารประกอบ TBT

กลุ่มที่ 1 Cytoskeleton

สารประกอบ TBT ยับยั้งโปรตีนในกลุ่มโครงสร้างของเซลล์หรือ cytoskeleton โดยพบว่าทั้ง tubulin-alpha (spot # 15) และ tubulin-beta (spot # 11) ถูกยับยั้งให้สร้างน้อยลง ซึ่งจะมีผลต่อการสร้างไมโครทิวบูล และส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของเซลล์ เช่น เสียหายไป นอกจากนี้ยังอาจส่งผลกระทบต่อกิจกรรมอื่นๆ ที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ microtubule เช่น mitosis cytokinesis และ vesicle transport เคยมีรายงานการศึกษาผลกระทบของ TBT ต่อโครงสร้างเหงือกของปลากระเบนชนิด *U. jamaicensis* (Dwivedi and Trombetta, 2006) และ หอยแมลงภู่ชนิด *Mytilus galloprovincialis* (Micić et al., 2001) แต่ยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด งานวิจัยครั้งนี้เผยให้เห็นว่าสาเหตุที่โครงสร้างเหงือกถูกทำลาย เกิดจากการที่ TBT ยับยั้งการสร้าง microtubule นั้นเอง

กลุ่มที่ 2 โปรตีนอื่นที่ถูกยับยั้ง

นอกจากนี้ยังพบว่าสารประกอบ TBT ยับยั้งการสร้างไรโบโซมหน่วยเล็ก หรือ 40S ribosomal protein S7 (spot # 14) ไรโบโซมเป็นออร์แกเนลล์สำคัญในกระบวนการสร้างโปรตีน ทำหน้าที่แปลรหัสโคดอนบนสาย mRNA เพื่อสร้างเป็นโปรตีน การลดลงของไรโบโซมชี้ให้เห็นว่า กระบวนการสร้างโปรตีนอาจลดลง การศึกษาในหอยสองฝาชนิด *Ruditapes philippinarum* พบว่า โปรตีน 40S ribosomal protein S7 เพิ่มขึ้นเมื่อหอยได้รับ endosulfan (Tao et al., 2013) ซึ่งตรงข้ามกับผลการศึกษาผลกระทบของสารพิษในสิ่งแวดล้อม TBT ในครั้งนี้

ข้อมูลจากการศึกษาในครั้งนี้ช่วยให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับกลไกการเกิดพิษของสาร TBT ในสิ่งมีชีวิตมากขึ้น นอกจากนี้โปรตีนที่ถูกกระตุ้นและยับยั้งทั้งหมดที่พบในการศึกษาครั้งนี้ยังมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการใช้เป็น potential biomarker เพื่อใช้เป็นตัวตรวจสอบปริมาณสาร TBT ในสิ่งแวดล้อม (TBT monitoring program) โดยใช้หอยนางรมปากจیب

จากผลการวิจัยครั้งนี้ผู้วิจัยเสนอให้ใช้โปรตีนเหล่านี้เป็น potential biomarker สำหรับตรวจสอบสารประกอบ TBT ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้หอยนางรมปากจีบชนิด *Saccostrea cucullata* ได้แก่ GRP-78, heat shock 70 kDa protein cognate 4, aldehyde dehydrogenase, catalase, VDAC-3, Gelsolin-like protein 1, myosin heavy chain, enolase, isocitrate dehydrogenase, aconitate hydratase and glutamine synthase, tubulin-beta, tubulin-alpha 2 และ 40S ribosomal protein S7

อย่างไรก็ดี potential biomarker ที่เสนอแนะในครั้งนี้จะต้องได้รับการทดสอบในสิ่งแวดล้อมจริงก่อน จึงจะสามารถใช้เป็น biomarker ที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบการปนเปื้อนของสารประกอบ TBT ในสิ่งแวดล้อมได้

บรรณานุกรม

- Aebersold, R., Mann, M., 2003. Mass spectrometry-based proteomics. *Nature* 422, 198-207.
- Allam, B., Espinosa, E.P., 2015. Mucosal immunity in mollusks, in: *Mucosal Health in Aquaculture*. pp. 325–370. doi:10.1016/B978-0-12-417186-2.00012-1
- Alzieu, C., 2000. Impact of tributyltin on marine invertebrates. *Ecotoxicology* 71–76. doi:10.1023/A:1008968229409
- Anderson, N.L., Anderson, N.G., 1998. Proteome and proteomics: new technologies, new concepts, and new words. *Electrophoresis* 19, 1853-1861.
- Antizar-Ladislao, B., 2008. Environmental levels, toxicity and human exposure to tributyltin (TBT)-contaminated marine environment. a review. *Environ. Int.* 34, 292–308. doi:10.1016/j.envint.2007.09.005
- Apraiz, I., Mi, J., Cristobal, S., 2006. Identification of proteomic signatures of exposure to marine pollutants in mussels (*Mytilus edulis*). *Mol. Cell. Proteomics* 5, 1274–1285. doi:10.1074/mcp.M500333-MCP200
- Bekri, K., Saint-Louis, R., Pelletier, E., 2006. Determination of tributyltin and 4-hydroxybutyldibutyltin chlorides in seawater by liquid chromatography with atmospheric pressure chemical ionization-mass spectrometry. *Anal Chim Acta* 578, 203-212.
- Bravo, M., Lespes, G., De Gregori, I., Pinochet, H., Gautier, M.P., 2005. Determination of organotin compounds by headspace solid-phase microextraction-gas chromatography-pulsed flame-photometric detection (HS-SPME-GC-PFPD). *Anal Bioanal Chem* 383, 1082-1089.
- Bryan, G.W., Gibbs, P.E., Hummerstone, L.G., Burt, G.R., 2009. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around South-West England: evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. *J. Mar. Biol. Assoc. United Kingdom* 66, 611. doi:10.1017/S0025315400042247
- Champ, M.A., 2000. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits. *Sci. Total Environ.* 258, 21–71. doi:10.1016/S0048-9697(00)00506-4
- Chau, Y.K., Zhang, S., Maguire, R.J., 1992. Occurrence of butyltin species in sewage and sludge in Canada. *Sci Total Environ* 121, 271-281.
- Cima, F., Ballarin, L., Bressa, G., Burighel, P., 1998. Cytoskeleton alterations by tributyltin (TBT) in tunicate phagocytes. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 40, 160–5. doi:10.1006/eesa.1998.1657
- Colombini, M., 2005. VDAC: the channel at the interface between mitochondria and the cytosol. *Mol. Cell. Biochem.* 256-257, 107–15.

- Cribb, A.E., Peyrou, M., Muruganandan, S., Schneider, L., 2005. The endoplasmic reticulum in xenobiotic toxicity. *Drug Metab. Rev.* 37, 405–42.
doi:10.1080/03602530500205135
- Dwivedi, J., Trombetta, L.D., 2006. Acute toxicity and bioaccumulation of tributyltin in tissues of *Urolophus jamaicensis* (yellow stingray). *J. Toxicol. Environ. Health. A* 69, 1311–23. doi:10.1080/15287390500356800
- Ebdon, L., Hill, S. J., Rivas, C. Organotin compounds in solid waste: a review of their properties and determination using high-performance liquid chromatography. *Trends in analytical chemistry*, 17(1998) 277-288.
- Fent, K., 1996. Ecotoxicology of organotin compounds. *Crit. Rev. Toxicol.* 26, 1–117.
doi:10.1080/03602530500205135
- Furuhashi, T., Schwarzingler, C., Miksik, I., Smrz, M., Beran, A., 2009. Molluscan shell evolution with review of shell calcification hypothesis. *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.* 154, 351–71. doi:10.1016/j.cbpb.2009.07.011
- Gallego-Gallegos, M., Liva Garrido, M., Muñoz Olivas, R., Baravalle, P., Baggiani, C., Cámara, C. A new application of imprinted polymers: speciation of organotin compounds. *Journal of Chromatography A* , 1217(2010) 3400-7.
- Galtsoff, P.S., 1964. The American oyster *Crassostrea virginica* Gmelin. Washington, D.C.: United States Government Printing Office.
- Geret, F., Serafim, A., Barreira, L., Bebianno, M.J., 2004. Response of antioxidant systems to copper in the gills of the clam *Ruditapes decussatus*. *Mar. Environ. Res.* 54, 413–7. doi:10.1016/j.ecoenv.2003.07.002
- Gibbs, P.E., Pascoe, P.L., Bryan, G.W., 1991. Tributyltin-induced imposex in stenoglossan gastropods: Pathological effects on the female reproductive system. *Comp. Biochem. Physiol. Part C Comp. Pharmacol.* 100, 231–235. doi:10.1016/0742-8413(91)90159-Q
- Goldberg, E.D., 1986. TBT: an environmental dilemma. *Environment* 28, 17-44.
- Goldberg, E.D., Bowen, V.T., Farrington, J.W., Harvey, G., Martin, J.H., Parker, P.L., Risebrough, R.W., Robertson, W., Schneider, E., Gamble, E., 2009. The Mussel Watch. *Environ. Conserv.* 5, 101. doi:10.1017/S0376892900005555
- Haupt, K. and Mosbach, K., 2000. Molecularly Imprinted Polymers and Their Use in Biomimetic Sensors. *Chem. Rev.*, 100, 2495-2504.
- Hiratsuka, Y., Funaya, N., Matsunaga, H., Haginaka, J., 2013. Preparation of magnetic molecularly imprinted polymers for bisphenol A and its analogues and their application to the assay of bisphenol A in river water. *J Pharm Biomed Anal*, 75, 180-185.

- 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. *Environ Health Perspect* 114 Suppl 1, 13-19.
- IMO, 2001. International Convention on the Control of Harmful Anti-Fouling Systems on Ships. Afs/Conf/26 1-28.
- Jensen, H.F., Holmer, M., Dahllöf, I., 2004. Effects of tributyltin (TBT) on the seagrass *Ruppia maritima*. *Mar Pollut Bull* 49, 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. *Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.* 147, 460-9.
doi:10.1016/j.cbpc.2008.02.001
- Kabsch, W., Vandekerckhove, J., 1992. Structure and function of actin. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 21, 49-76. doi:10.1146/annurev.bb.21.060192.000405
- 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. *Environ. Pollut.* 97, 79-89.
doi:10.1016/S0048-9697(99)00488-X
- Kingtong, S., Chitramvong, Y., Janvilisri, T., 2007. ATP-binding cassette multidrug transporters in Indian-rock oyster *Saccostrea forskali* and their role in the export of an environmental organic pollutant tributyltin. *Aquat. Toxicol.* 85, 124-32.
doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.006
- Kingtong, S., Kellner, K., Bernay, B., Goux, D., Sourdaire, P., Berthelin, C.H., 2013. Proteomic identification of protein associated to mature spermatozoa in the Pacific oyster *Crassostrea gigas*. *J. Proteomics* 82, 81-91.
doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.jprot.2013.02.009
- Langston, W.J., Pope, N.D., 1995. Determinants of TBT adsorption and desorption in estuarine sediments. *Mar Pollut Bull* 31, 32-43.
- Laughlin, R.B., Linden, O., 1985. Fate and effects of organotin compounds. *Ambio* 14, 88-94.
- Little, E., Ramakrishnan, M., Roy, B., Gazit, G., Lee, A.S., 1994. The glucose-regulated proteins (GRP78 and GRP94): functions, gene regulation, and applications. *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* 4, 1-18. doi:10.1016/j.aquatox.2007.08.006
- Micić, M., Bihari, N., Labura, Z., Müller, W.E., Batel, R., 2001. Induction of apoptosis in the blue mussel *Mytilus galloprovincialis* by tri-n-butyltin chloride. *Aquat. Toxicol.* 55, 61-73.
- Miki, S., Ikeda, K., Oba, Y., Satone, H., Honda, M., Shimasaki, Y., Onikura, N., Arakawa, O., Oshima, Y., 2011. Tributyltin in blood of marine fish collected from a coastal area of northern Kyushu, Japan. *Marine Pollution Bulletin* 62, 2533-2536

- Monari, M., Foschi, J., Cortesi, P., Rosmini, R., Cattani, O., Serrazanetti, G.P., 2008. Chloramphenicol influence on antioxidant enzymes with preliminary approach on microsomal CYP1A immunopositive-protein in *Chamelea gallina*. *Chemosphere* 73, 272–80. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.06.033
- Oehlmann, J., Stroben, E., Schulte-Oehlmann, U., Bauer, B., 1998. Imposex development in response to TBT pollution in *Hinia incrassata* (Ström, 1768) (Prosobranchia, Stenoglossa). *Aquat Toxicol* 43, 239-260.
- Ohji, M., Arai, T., Miyazaki, N., 2005. Acute toxicity of tributyltin to the Caprellidea (Crustacea: Amphipoda). *Mar Environ Res* 59, 197-201.
- Pedersen, P.L., 2008. Voltage dependent anion channels (VDACs): a brief introduction with a focus on the outer mitochondrial compartment's roles together with hexokinase-2 in the "Warburg effect" in cancer. *J. Bioenerg. Biomembr.* 40, 123–6. doi:10.1007/s10863-008-9165-7
- Roberts, M.H., 1987. Acute toxicity of tributyltin chloride to embryos and larvae of two bivalve mollusks, *Crassostrea virginica* and *Mercenaria mercenaria*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 39, 1012–1019. doi:10.1007/BF01689592
- Sarkar, A., Ray, D., Shrivastava, A.N., Sarker, S., 2006. Molecular biomarkers: their significance and application in marine pollution monitoring. *Ecotoxicology* 15, 333–40. doi:10.1007/s10646-006-0069-1
- Shekarchi, M., Pourfarzib, M., Akbari-Adergani, B., Mehramizi, A., Javanbakht, M., Dinarvand, R., 2013. Selective extraction of lamivudine in human serum and urine using molecularly imprinted polymer technique. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 931, 50-5.
- Shimizu, S., Matsuoka, Y., Shinohara, Y., Yoneda, Y., Tsujimoto, Y., 2001. Essential role of voltage-dependent anion channel in various forms of apoptosis in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 152, 237–50. doi:10.1007/s10646-006-0069-1
- Sidharthan, M., Young, K.S., Woul, L.H., Soon, P.K., Shin, H.W., 2002. TBT toxicity on the marine microalga *Nannochloropsis oculata*. *Mar Pollut Bull* 45, 177-180.
- Silacci, P., Mazzolai, L., Gauci, C., Stergiopoulos, N., Yin, H.L., Hayoz, D., 2004. Gelsolin superfamily proteins: key regulators of cellular functions. *Cell. Mol. Life Sci.* 61, 2614–23. doi:10.1007/s00018-004-4225-6
- Singh, S., Brocker, C., Koppaka, V., Chen, Y., Jackson, B.C., Matsumoto, A., Thompson, D.C., Vasiliou, V., 2013. Aldehyde dehydrogenases in cellular responses to oxidative/electrophilic stress. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 89–101. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2012.11.010
- Solé, M., Morcillo, Y., Porte, C., 2000. Stress-protein response in tributyltin-exposed clams. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64, 852–858. doi:10.1007/s001280000081

- Sun, J., He, B., Liu, Q., Ruan, T., Jiang, G., 2012. Characterization of interactions between organotin compounds and human serum albumin by capillary electrophoresis coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry. *Talanta* 93, 239–244
- Tanguy, A., Boutet, I., Laroche, J., Moraga, D., 2005. Molecular identification and expression study of differentially regulated genes in the Pacific oyster *Crassostrea gigas* in response to pesticide exposure. *FEBS J.* 272, 390–403. doi:10.1111/j.1742-4658.2004.04479.x
- 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. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 89, 108–16. doi:10.1016/j.ecoenv.2012.11.018
- Vos, M.J., Hageman, J., Carra, S., Kampinga, H.H., 2008. Structural and functional diversities between members of the human HSPB, HSPH, HSPA, and DNAJ chaperone families. *Biochemistry* 47, 7001–11. doi:10.1021/bi800639z
- Wang, S., XU, Z., FANG, G., DUAN, Z., Zang, Y. and Chen, S., 2007. Synthesis and Characterization of a Molecularly Imprinted Silica Gel Sorbent for the On-Line Determination of Trace Sudan I in Chilli Powder through High-Performance Liquid Chromatography *J. Agric. Food Chem* 55, 3869-3876
- Yebra, D.M., Kiil, S.r., Dam-Johansen, K., 2004. Antifouling technology-past, present and future steps towards efficient and environmentally friendly antifouling coatings. *Progress in Organic Coatings* 50, 75-104.
- Yi, L.X., Fang, R., Chen G.H., 2013. Molecularly imprinted solid-phase extraction in the analysis of agrochemicals. *J Chromatogr Sci* 51, 608-18
- Yoosukh, W., Duangdee, T., 1999. Living oysters in Thailand. *Phuket Mar Biol* 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*). *Aquat Toxicol* 83, 174-179.
- Zhua, S., Hua, F., Yangc, T., Ganb, N., Pana, D., Caob, Y., Wub, D., 2013. Synthesis and characterization of a molecularly imprinted polymer for the determination of trace tributyltin in seawater and seafood by liquid chromatography–tandem mass spectroscopy. *Journal of Chromatography B* 921, 21– 26.

ภาคผนวก

ภาคผนวก 1

การระบุชนิดของโปรตีนโดยวิธี MS/MS ร่วมกับวิธีชีวสารสนเทศ

ตัวอย่าง Mascot search results

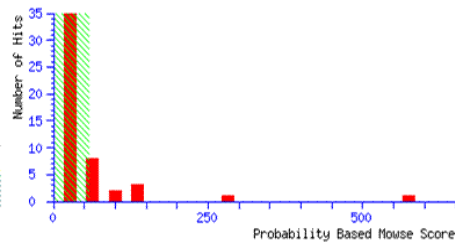
```

User       : Sutin Kingtong
Email      : sutin11k@yahoo.com
Search title :
MS data file : MU_Sutin-GT13_14_3_07R1.pkl
Database    : NCBInr 20090725 (9330197 sequences; 3196564765 residues)
Timestamp   : 30 Jul 2009 at 07:45:53 GMT
Protein hits :
  gi|148717311 voltage-dependent anion channel [Crassostrea gigas]
  gi|7331218   keratin 1 [Homo sapiens]
  gi|4159806   type II keratin subunit protein [Mus musculus]
  gi|12859782  unnamed protein product [Mus musculus]
  gi|136429    RecName: Full=Trypsin; Flags: Precursor
  gi|57012352  keratin 75 [Rattus norvegicus]
  gi|435476    cytokeratin 9 [Homo sapiens]
  gi|148747492 keratin 2 [Sus scrofa]
  gi|4558732   voltage dependent anion channel [Rattus norvegicus]
  gi|224099135 PREDICTED: similar to cytokeratin type II [Taeniopygia guttata]

```

Probability Based Mowse Score

Ions score is $-10 \cdot \log(P)$, where P is the probability that the observed match is a random event. Individual ions scores > 57 indicate identity or extensive homology ($p < 0.05$). Protein scores are derived from ions scores as a non-probabilistic basis for ranking protein hits.



Peptide Summary Report

Format As: Peptide Summary [Help](#)

Significance threshold $p < 0.05$ Max. number of hits: AUTO

Standard scoring: MudPIT scoring Ions score or expect cut-off: 0 Show sub-sets: 0

Show pop-ups: Suppress pop-ups Sort unassigned: Decreasing Score Require bold red:

Select All Select None Search Selected Error tolerant

1. [gi|148717311](#) Mass: 30310 Score: 574 Queries matched: 12 emPAI: 1.28
voltage-dependent anion channel [Crassostrea gigas]

Check to include this hit in error tolerant search

Query	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta Miss	Score	Expect	Rank	Peptide
<input checked="" type="checkbox"/> 42	502.7842	1003.5538	1003.5550	-0.0011	0	31	32	1 K.GIISGSLETK.Y
<input checked="" type="checkbox"/> 47	1016.4633	1015.4560	1015.4399	0.0161	0	9	5.4e+03	2 K.GYNYGEWK.L
<input checked="" type="checkbox"/> 48	508.8055	1015.5964	1015.5914	0.0051	0	54	0.17	1 K.LTLSALVDGK.N
<input checked="" type="checkbox"/> 57	522.2725	1042.5304	1042.5335	-0.0031	0	50	0.44	1 K.YSDLGLTFK.E
<input checked="" type="checkbox"/> 138	770.8806	1539.7466	1539.7569	-0.0103	0	96	6.4e-06	1 K.LEFNFSFAPQTGK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 145	788.8752	1575.7358	1575.7028	0.0331	0	84	0.00011	1 K.GWLGQYQMSFDTSK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 146	789.3730	1576.7314	1575.7028	1.0287	0	(29)	33	1 K.GWLGQYQMSFDTSK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 165	556.9231	1667.7475	1667.7275	0.0200	0	(69)	0.003	1 K.TDSGVEFTTGSMSDK.G
<input checked="" type="checkbox"/> 167	834.8931	1667.7716	1667.7275	0.0441	0	98	3.5e-06	1 K.TDSGVEFTTGSMSDK.G
<input checked="" type="checkbox"/> 179	880.4371	1758.8596	1758.8326	0.0271	0	68	0.004	1 K.NFNAGGHQLGLDFEA.-
<input checked="" type="checkbox"/> 194	920.0095	1838.0044	1837.9574	0.0470	1	64	0.0095	1 K.GLKLFFNFSFAPQTGK.S
<input checked="" type="checkbox"/> 212	740.7457	2219.2153	2219.1474	0.0679	0	22	1e+02	1 K.WNTSNVLFTEIAIEDQLVK.G

ตัวอย่างรายละเอียดของโปรตีนที่ได้จากระบบฐานข้อมูลโดยใช้โปรแกรม Mascot

Match to: [gi|148717311](#) Score: 574
voltage-dependent anion channel [*Crassostrea gigas*]
Found in search of MU_Sutin-GT13_14_3_07R1.pk1

Nominal mass (M_r): 30310; Calculated pI value: 8.24
NCBI BLAST search of [gi|148717311](#) against nr
Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Crassostrea gigas](#)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P
Sequence Coverage: 42%

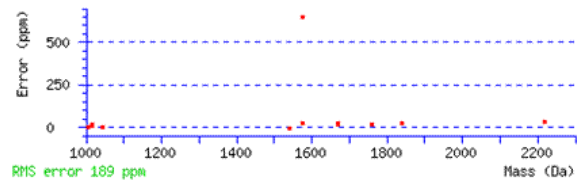
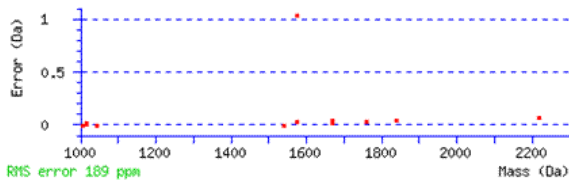
Matched peptides shown in **Bold Red**

1 MAPPTYGDLG KAAKDIFSKG **YNYGEWKLEA** KTKTDSGVEF **TTTGSMSDKG**
51 **IISGSLETKY** KYSDLGLTFK ERWNTSNVLF **TEIAIEDQLV** KGLKLEFNLS
101 **FAPQTGKSG** KIKTSYKMDY LNLGCDVDFV FAGPTINAAA VLGYK**GWLGG**
151 **YQMSFDTSKS** KLTKNNFAVG YEASDFTIHT NVNDGAEYCG SIYHKIRKDL
201 EGGVKLSWSS AKSTALELGT KYKIDSDDSSV SAKVDSNSRV GLGYTTKLRD
251 **GVKLTLSALV** **DGNMNFAGGH** **QLGLGLDFEA**

Show predicted peptides also

Sort Peptides By Residue Number Increasing Mass Decreasing Mass

Start - End	Observed	Mr(expt)	Mr(calc)	Delta	Miss Sequence
20 - 27	1016.4633	1015.4560	1015.4399	0.0161	0 K.GYNYGEWK.L (Ions score 9)
34 - 49	556.9231	1667.7475	1667.7275	0.0200	0 K.TDSGVEFTTTGSMSDK.G (Ions score 69)
34 - 49	834.8931	1667.7716	1667.7275	0.0441	0 K.TDSGVEFTTTGSMSDK.G (Ions score 98)
50 - 59	502.7842	1003.5538	1003.5550	-0.0011	0 K.GIISGSLETK.Y (Ions score 31)
62 - 70	522.2725	1042.5304	1042.5335	-0.0031	0 K.YSDLGLTFK.E (Ions score 50)
73 - 91	740.7457	2219.2153	2219.1474	0.0679	0 K.WNTSNVLFTEIAIEDQLVK.G (Ions score 22)
92 - 108	920.0095	1838.0044	1837.9574	0.0470	1 K.GLKLEFNLSFAPQTGK.S (Ions score 64)
95 - 108	770.8806	1539.7466	1539.7569	-0.0103	0 K.LEFNLSFAPQTGK.S (Ions score 96)
146 - 159	788.8752	1575.7358	1575.7028	0.0331	0 K.GWLGYYQMSFDTSK.S (Ions score 84)
146 - 159	789.3730	1576.7314	1575.7028	1.0287	0 K.GWLGYYQMSFDTSK.S (Ions score 29)
254 - 263	508.8055	1015.5964	1015.5914	0.0051	0 K.LTLSALVDGK.N (Ions score 54)
264 - 280	880.4371	1758.8596	1758.8326	0.0271	0 K.MNFAGGHQLGLGLDFEA.- (Ions score 68)



LOCUS BAF63641 280 aa linear INV 06-JUN-2007
 DEFINITION voltage-dependent anion channel [*Crassostrea gigas*].
 ACCESSION BAF63641
 VERSION BAF63641.1 GI:148717311
 DBSOURCE accession [AB262088.1](#)
 KEYWORDS .
 SOURCE *Crassostrea gigas* (Pacific oyster)
 ORGANISM [Crassostrea gigas](#)
 Eukaryota; Metazoa; Mollusca; Bivalvia; Pteriomorpha; Ostreoida;
 Ostreoidae; Ostreidae; *Crassostrea*.
 REFERENCE 1
 AUTHORS Yokoyama, Y.
 TITLE cDNA cloning and expression of oyster voltage-dependent anion channel
 JOURNAL Unpublished
 REFERENCE 2 (residues 1 to 280)
 AUTHORS Yokoyama, Y.
 TITLE Direct Submission
 JOURNAL Submitted (05-JUN-2006) Yoshihiro Yokoyama, Fukui Prefectural University, Department of Marine Bioscience, Faculty of Biotechnology; Gakuencho1-1, Obama, Fukui 917-0003, Japan (E-mail:yokoyama@fpu.ac.jp, Tel:81-770-52-6300, Fax:81-770-52-6003)
 FEATURES Location/Qualifiers
 source 1..280
 /organism="Crassostrea gigas"
 /db_xref="taxon:29159"
 Protein 1..280
 /product="voltage-dependent anion channel"
 Region 3..279
 /region_name="Porin3_VD&C"
 /note="Voltage-dependent anion channel of the outer"

ลักษณะของ MS/MS spectrum จากเครื่อง LC/MS-MS แสดงตัวอย่างการแตกตัวของ peptide

Peptide View

MS/MS Fragmentation of **TDSGVFETTTGSHSDK**

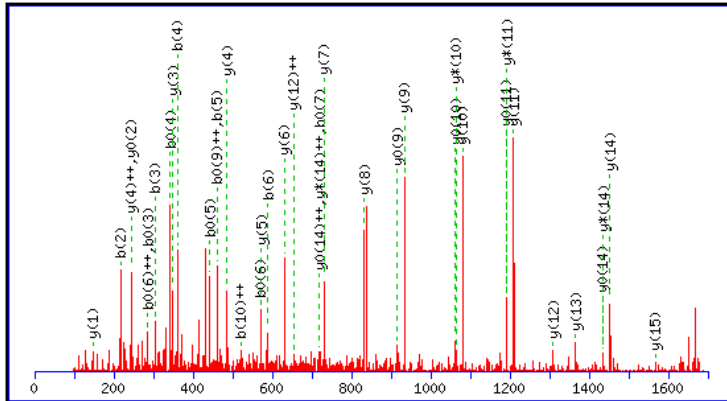
Found in **gi148717311**, voltage-dependent anion channel [*Crassostrea gigas*]

Match to Query 167: 1667.771648 from(834.893100,2+) intensity(1155.9531)

Data file MU_Sutin-GT13_14_3_07R1.pkl

Click mouse within plot area to zoom in by factor of two about that point

Or, to Da

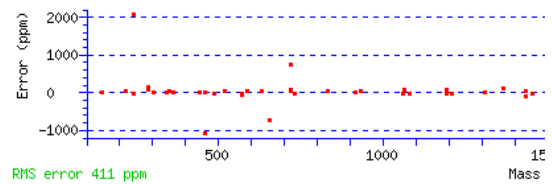
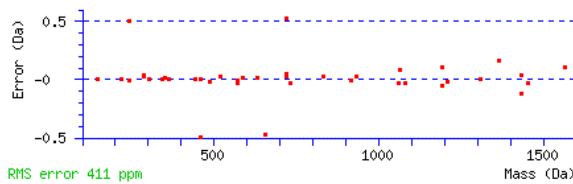


Monoisotopic mass of neutral peptide Mr(calc): 1667.7275

Ions Score: 98 Expect: 3.5e-06

Matches (Bold Red): 39/148 fragment ions using 73 most intense peaks

#	b	b ⁺⁺	b ⁰	b ⁰⁺⁺	Seq.	y	y ⁺⁺	y ⁺	y ⁺⁺⁺	y ⁰	y ⁰⁺⁺	#
1	102.0550	51.5311	84.0444	42.5258	T							16
2	217.0819	109.0446	199.0713	100.0393	D	1567.6871	784.3472	1550.6605	775.8339	1549.6765	775.3419	15
3	304.1139	152.5606	286.1034	143.5553	S	1452.6601	726.8337	1435.6336	718.3204	1434.6496	717.8284	14
4	361.1354	181.0713	343.1248	172.0661	G	1365.6281	683.3177	1348.6016	674.8044	1347.6175	674.3124	13
5	460.2038	230.6055	442.1932	221.6003	V	1308.6066	654.8070	1291.5801	646.2937	1290.5961	645.8017	12
6	589.2464	295.1268	571.2358	286.1216	E	1209.5382	605.2727	1192.5117	596.7595	1191.5277	596.2675	11
7	736.3148	368.6610	718.3042	359.6558	F	1080.4956	540.7515	1063.4691	532.2382	1062.4851	531.7462	10
8	837.3625	419.1849	819.3519	410.1796	T	933.4272	467.2172	916.4007	458.7040	915.4167	458.2120	9
9	938.4102	469.7087	920.3996	460.7034	T	832.3795	416.6934	815.3530	408.1801	814.3690	407.6881	8
10	1039.4578	520.2326	1021.4473	511.2273	T	731.3319	366.1696	714.3053	357.6563	713.3213	357.1643	7
11	1096.4793	548.7433	1078.4687	539.7380	G	630.2842	315.6457	613.2576	307.1325	612.2736	306.6404	6
12	1183.5113	592.2593	1165.5008	583.2540	S	573.2627	287.1350	556.2362	278.6217	555.2522	278.1297	5
13	1320.5703	660.7888	1302.5597	651.7835	H	486.2307	243.6190	469.2041	235.1057	468.2201	234.6137	4
14	1407.6023	704.3048	1389.5917	695.2995	S	349.1718	175.0895	332.1452	166.5763	331.1612	166.0842	3
15	1522.6292	761.8182	1504.6187	752.8130	D	262.1397	131.5735	245.1132	123.0602	244.1292	122.5682	2
16					K	147.1128	74.0600	130.0863	65.5468			1



ภาคผนวก 2

วารสารที่ได้รับตอบรับการตีพิมพ์

ผลงานวิจัยในวารสารนานาชาติ ที่อยู่ในฐาน ISI ควบไทม์ที่ 1 (impact factor ปี 2015 = 4.839) จำนวน 1 เรื่อง ได้แก่

Phattirapa Khondee, Chantragan Srisomsap, Daranee Chokchaichamnankit, Jisnuson Svastib, Richard J. Simpson, **Sutin Kingtong***. 2016. Histopathological effect and stress response of mantle proteome following TBT exposure in the Hooded oyster *Saccostrea cucullata*. In Press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.envpol.2016.08.011>.

ประวัติคณะผู้วิจัย

1. หัวหน้าโครงการ

ตำแหน่งปัจจุบัน	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุติน กิ่งทอง
หน่วยงาน	Assist Prof Sutin Kingtong, Ph.D
ที่อยู่	ผู้ช่วยศาสตราจารย์
โทรศัพท์	ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา
โทรสาร	169 ถ. ลงหาดบางแสน ต. แสนสุข อ. เมืองฯ จ. ชลบุรี 20131
อีเมลล์	038-103-127
ประวัติการศึกษา	038-393-489
2554-2555	sutin@buu.ac.th
2552	Postdoctoral fellows, Department of Biology of Marine Mollusk and Ecosystem, University of Basse-Normandie, Caen, Normandie, France
2544	ปร.ด. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยมหิดล, ประเทศไทย
สาขาวิชาการที่ชำนาญ	วท.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยบูรพา, ประเทศไทย
	โปรทีโอมิกส์ พิษวิทยาสิ่งแวดล้อม ชีววิทยาหอยสองฝา

2. ผู้ร่วมงานวิจัย

ตำแหน่งปัจจุบัน	ศาสตราจารย์ ดร. ม.ร.ว. ชินนุสรณ์ สวัสดิวัตน์
หน่วยงาน	Prof. M.R. Jisnuson Svasti, PhD
สถานที่ติดต่อ	ศาสตราจารย์ หัวหน้าห้องปฏิบัติการชีวเคมี
อีเมลล์	สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์
ประวัติการศึกษา	ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถ.วิภาวดี เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ 10210
ค.ศ. 1972	jisnuson.sva@mahidol.ac.th
ค.ศ. 1972	Ph.D, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge University, U.K.
ค.ศ. 1968	M.A., Natural Sciences, Cambridge University, U.K.
สาขาวิชาการที่ชำนาญ	B.A. (Hons) Natural Sciences (Biochemistry), Cambridge University, U.K.
	Protein structure and function; Enzymology

ดร. จันทรกานต์ พิภพมงคล (ศรีสมทรัพย์)

ตำแหน่งปัจจุบัน
สถานที่ติดต่อ

Chantragarn Srisomsap, Ph.D.

Research Scientist 2 (นักวิจัยชำนาญการเทียบเท่า รศ.)

ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถ.วิภาวดี เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ
10210

อีเมลล์

chantragarn@cri.or.th

ประวัติการศึกษา

1986-1989

Postdoctoral Fellow with 3 publications, Cell Biology and
Anatomy Department, University of Alabama at Birmingham,
Alabama 35249, U.S.A.

1987

Ph.D. (Biochemistry), Auburn University, Alabama 36830, U.S.A.
Thesis title: Structural Studies on Thermal Poly-amino-acids.

1978

สาขาวิชาการที่ชำนาญ

B.Sc. (Chemistry), Kasetsart University, Bangkok
Proteomics, Biomarker Discovery, Enzymology

ดร. อาภาพร บุญมี

ตำแหน่งปัจจุบัน
สถานที่ติดต่อ

Apaporn Boonmee, Ph.D

อาจารย์

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยราชภัฏรำไพ
พรรณี 41 หมู่ 5 ต. ท่าช้าง อ. เมือง จ.จันทบุรี 22000

อีเมลล์

apaporn.bm@gmail.com

ประวัติการศึกษา

2556

Postdoctoral fellows, Department of Biology of Marine
Mollusk and Ecosystem, University of Basse-Normandie, Caen,
Normandie, France

2554

วท.ด. (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

2549

วท.ม. (เคมี) จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ประเทศไทย

2547

สาขาวิชาการที่ชำนาญ

วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

เคมีอินทรีย์ โพรทีโอมิกส์

ตำแหน่งปัจจุบัน
สถานที่ติดต่อ

อีเมลล์
ประวัติการศึกษา

2545

2536

สาขาวิชาการที่ชำนาญ

นางสาวดารณี โชคชัยชำนาญกิจ

Daranee Chockchaichamnankit, M.Sc.

นักวิจัย

ห้องปฏิบัติการชีวเคมี สถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ ถ.วิภาวดี เขตหลักสี่ กรุงเทพฯ
10210

daranee@cri.or.th

วท.ม. (เคมี) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ประเทศไทย

วท.บ. (เคมี) มหาวิทยาลัยรามคำแหง ประเทศไทย

เคมีวิเคราะห์ โพรทีโอเมิกส์