บทที่ 5
อภิปรายและสรุปผล

การศึกษาผลกระทบของ LAS ต่อการตอบสนองระดับเซลล์ของปูม้าเพศผู้ เพื่อใช้การตอบสนองดังกล่าว เป็นดัชนีชี้วัดต่อสภาวะมลพิษที่มี LAS ปนเปื้อนอยู่ ประกอบด้วยการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ได้แก่ เอนไซม์คะตะเลส เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส และเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ในเลือด ตับอ่อน และเหงือก ของปูม้า การเปลี่ยนแปลงเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม และปริมาณฮีโมไซยานินในเลือดของปูม้า เมื่อได้รับ LAS ที่ความเข้มข้น และเวลาต่างกัน สืบเนื่องจากในแต่ละปีมีปริมาณการใช้ LAS ที่เพิ่มสูงขึ้น นิยมใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดต่าง ๆ เช่น ผงซักฟอก น้ำยาล้างจาน น้ำยาทำความสะอาด เป็นต้น จากปริมาณการใช้ดังกล่าว เป็นผลให้ LAS ปนเปื้อนออกสู่สิ่งแวดล้อม ในลักษณะเจือปนกับน้ำเสียเป็นจำนวนมาก

การปนเปื้อนของ LAS ในสิ่งแวดล้อมย่อมส่งผลกระทบโดยตรงกับสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในบริเวณนั้น ๆ ดังเช่น LAS มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติการเป็นเยื่อเลือกผ่านไลโซโซม การทำงานของเอนไซม์ และโครงสร้างของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต (Moreno-Garrido, Hampel, Lubian, & Blasco, 2003) นอกจากนั้น LAS ยังสามารถจับตัวกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น แป้ง โปรตีน เปปไทด์ ดีเอ็นเอ หรือเข้าจับกับโมเลกุลของเยื่อหุ้ม เป็นเหตุให้สูญเสียสภาพหน้าที่ไป (Cserhati et al., 2002) ดังเช่น ตัวอย่างผลกระทบของ LAS ต่อสัตว์น้ำ เช่น เกิดการสะสมตัว และทำลายโครงสร้างเหงือกในปลา ในสัตว์กลุ่มครัสตาเชียน พบว่ามีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์สูญเสียหน้าที่ไป และมีผลต่อเยื่อหุ้มไลโซโซม โดยจะแทรกตัวเข้าไปภายในเยื่อหุ้ม และละลายองค์ประกอบที่เป็นไขมัน และโปรตีน ทำให้เยื่อหุ้มถูกรบกวน (Hansen et al., 1997) จากผลดังกล่าวสามารถนำมาใช้วัดถึงการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตเมื่อได้รับสารพิษสามารถนำมาใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ หรือเพื่อติดตามตรวจสอบการปนเปื้อนของ LAS ในแหล่งน้ำนั้น ๆ โดยทั่วไปแล้วในการใช้ ดัชนีชี้วัดคุณภาพนั้น นิยมใช้การตรวจวัดที่ระดับ Molecular และ Cellular เพราะเป็นการตอบสนองในระยะเริ่มแรกของสิ่งมีชีวิต เมื่อสัมผัสกับมลพิษ (Domouhtsidou, Dailianis, Kaloyianni, & Dimitriadis, 2004) แต่ในการใช้การตอบสนองระดับเซลล์ของสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ ในการติดตามตรวจสอบคุณภาพในสิ่งแวดล้อมนั้น ควรเริ่มทดสอบในห้องปฏิบัติการ เพื่อนำข้อมูลที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานสำหรับใช้ในการสำรวจสิ่งแวดล้อมในภาคสนามต่อไป เนื่องจากการทดสอบในห้องปฏิบัติการ สามารถควบคุมปัจจัยต่าง ๆ ที่อาจมีผลจึงทำให้ทราบถึงผลกระทบของ LAS ต่อสิ่งมีชีวิตโดยแท้จริง

ในการทดสอบก่อนการทำวิจัยถึงระยะการพักปรับสภาพสัตว์ทดลอง เพื่อดูถึงผลของระยะเวลาที่ใช้ในการปรับสภาวะ ไม่พบความแตกต่างกันระหว่างระยะพักที่ 0 และ 3 วัน แต่ในการทำการวิจัยนั้น เลือกระยะการปรับสภาพปูม้าที่ 3 วันนั้น เนื่องจากเพื่อเป็นการช่วยลดผลของของเสียที่เกิดจากปูม้าขับถ่ายออกมาในระหว่างการทดลอง เพราะของเสียที่ถูกขับถ่ายออกมาอาจไปมีผลรบกวนทำให้ปูม้าอยู่ในสภาวะเครียด และนอกจากนั้นยังช่วยปรับสภาพให้ปูม้ามีความสมบูรณ์ ลดการตายที่อาจเกิดขึ้นในระหว่างการทดลอง

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในปูม้า เพศผู้

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในเลือด

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในเลือดปูม้าเพศผู้ไม่สามารถตรวจวัดได้ในทุกระดับความเข้มข้นของ LAS และทุกระยะเวลาการได้รับ อาจเนื่องจากในเลือดของปูม้าเพศผู้ มีปริมาณเอนไซม์คะตะเลสต่ำ อีกทั้งวิธีที่ใช้วัดมีความละเอียดไม่เพียงพอ จึงทำให้ไม่สามารถวัดการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในเลือดของปูม้าได้ และอาจเป็นไปได้ว่า ในการทดลองจำเป็นต้องเจือจางเลือด ด้วยสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด จึงอาจมีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์คะตะเลสมีน้อยลง จนไม่สามารถวัดการทำงานได้ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Bell and Smith (1994) ซึ่งศึกษาเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระในเลือดของปู *Carcinus maenas* โดยแบ่งเลือดออกเป็นส่วน Hyaline Cell, Granular Cell และ ส่วน Plasma ซึ่งสามารถวัดการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสได้เฉพาะใน Hyaline Cell เท่านั้น และจากการศึกษาต่อพบว่า ในเลือดมีปริมาณของ Hyaline Cell เพียง 12-16% เท่านั้น นอกจากนั้นยังมีรายงานการวิจัยที่เกี่ยวข้องกับเอนไซม์คะตะเลส ในเลือดของสิ่งมีชีวิตกลุ่มครัสตาเชียน (Crustacean) มีน้อยมาก

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในตับอ่อน

หลังจากปูม้าได้รับ LAS เป็นระยะเวลา 6 ชั่วโมง จะสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลสในตับอ่อนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อเทียบกับชุดควบคุม ตั้งแต่ความเข้มข้นของ LAS 30 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลสในตับอ่อน อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเมื่อปูม้าได้รับสาร LAS แล้วจะมีการผลิต Reactive Oxygen Species หรือ ROS เพิ่มขึ้น จากกระบวนการย่อยสลาย LAS ในร่างกายของสิ่งมีชีวิตเอง ซึ่ง ROS ดังกล่าวจะไปมีผลกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสให้เพิ่มสูงขึ้น โดยมีรายงานว่าตับอ่อนของสัตว์จำพวกครัสตาเชียนจะมีหน้าที่สำคัญในกระบวนการผลิต ROS จึงทำให้สามารถพบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ได้อย่างชัดเจนในตับอ่อน

โดยปกติสิ่งมีชีวิตที่ดำรงชีวิตโดยใช้ออกซิเจนในขบวนการหายใจนั้น จะทำให้เกิดการผลิต Reactive Oxygen Species หรือ ROS ขึ้นมา ได้แก่ O^{2-}, OH^- และ H_2O_2 เป็นต้น ซึ่ง ROS

เหล่านี้มีผลต่อการทำลายองค์ประกอบของเซลล์ และเนื้อเยื่อ สุดท้ายอาจทำให้สิ่งมีชีวิตนั้นเสียชีวิตในที่สุด (Carolina, Ansaldo & Lovrich, 2006) โดยปริมาณการบริโภคออกซิเจนทั้งหมดจะมีการผลิต ROS ประมาณ 2-3 เปอร์เซ็นต์ (Livingstone, 2001) แต่อย่างไรก็ตามร่างกายสิ่งมีชีวิตมีกลไกในการป้องกัน และทำลาย ROS ดังกล่าว ได้แก่ เอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระ เช่น เอนไซม์ซุปเปอร์ออฟไซด์ ดิสมิวเทส (Superoxide Dismutase, SOD) เอนไซม์คะตะเลส เป็นต้น นอกจากนั้น มลภาวะหรือสารพิษต่าง ๆ สามารถทำให้เกิดการผลิต ROS ที่เพิ่มสูงขึ้น เช่น สารประกอบอินทรีย์ โลหะหนัก เป็นต้น ร่างกายสิ่งมีชีวิตจำเป็นต้องใช้กลไกการทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวในการปรับให้อยู่ในภาวะสมดุล (Sole et al., 1995)

LAS เป็นสารประกอบอินทรีย์ ที่ประกอบด้วยสายอัลคิว หมู่ซัลเฟต และวงเบนซีน ปกติสัตว์น้ำจะมีการย่อยสลาย สารกลุ่มไฮโดรคาร์บอนด้วยกระบวนการขจัดสารพิษ หรือ Phases I ซึ่งทำหน้าที่ในการขจัดสารพิษหรือลดความเป็นพิษของสารพิษนั้น กลไกดังกล่าวมักเกิดบริเวณตับของสิ่งมีชีวิต จากกลไกดังกล่าวจะทำให้เกิดการผลิต ROS เพิ่มขึ้น จึงทำให้เกิดการกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ต้านอนุมูลอิสระให้เพิ่มขึ้น เอนไซม์คะตะเลส ทำหน้าที่ในการกำจัด H_2O_2 ที่ถูกผลิตขึ้นมาให้กลายเป็น H_2O และ O_2 แต่เมื่อมีปริมาณ H_2O_2 ที่เพิ่มสูงขึ้น จึงทำให้เอนไซม์คะตะเลส มีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นตาม เนื่องจากเอนไซม์คะตะเลส จัดเป็น Inducible Enzyme คือในสภาวะปกติของสิ่งมีชีวิตจะมีการสร้างในปริมาณต่ำ แต่เมื่ออยู่ในสภาวะถูกกระตุ้นหรือเหนี่ยวนำ จะทำให้มีปริมาณเอนไซม์คะตะเลส เพิ่มสูงขึ้น ในระยะเวลาการได้รับ LAS ที่ 3 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เนื่องจาก ปริมาณ H_2O_2 ที่เกิดจากกลไกของ Phasee I นั้นยังไม่มากพอที่จะกระตุ้นให้เกิดการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เพิ่มขึ้น แต่เมื่อระยะเวลาการได้รับ LAS ที่เพิ่มมากขึ้น ที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จึงทำให้เกิด H_2O_2 มากพอที่จะกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เพิ่มสูงขึ้นตาม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Sun et al. (2006) ศึกษาในปลา *Carassius auratus* ซึ่งอยู่ในสภาวะที่มีฟีแนฟทาลีน (Phenanthrene) พบว่าปลา *C. auratus* เมื่อได้รับฟีแนฟทาลีน เป็นเวลา 6 ชั่วโมง มีการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เพิ่มสูงที่สุด เมื่อเทียบกับชุดควบคุมและ Carolina et al. (2006) ในปู ชนิด *Paralomis granulose* ในสภาวะที่มีความเครียดเมื่อสัมผัสกับอากาศ พบว่า การทำงานของเอนไซม์ คะตะเลส ในตับอ่อน มีการทำงานเพิ่มสูงขึ้นที่ระยะเวลาที่ 3, 6 และ 12 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับชุดควบคุมที่ 0 ชั่วโมง เช่นเดียวกับ Funes, Alhama, Navas, Lopez -Barea, and Peinado (2006) ได้ติดตามตรวจสอบคุณภาพสิ่งแวดล้อมบริเวณ Spanish South Atlantic โดยใช้การตอบสนองของหอยนางรม *Crassostrea angulata* ต่อสารปนเปื้อน พบว่า บริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารพิษ จะมีการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส สูงกว่า เมื่อเทียบกับบริเวณอ้างอิงซึ่งเป็นบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนของสารพิษ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสในเหงือก

เมื่อปูม้าได้รับ LAS เป็นระยะเวลา 6 จะพบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลสในเหงือกเพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ความเข้มข้นของ LAS ตั้งแต่ 20 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง จะพบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลสในเหงือก เพิ่มสูงขึ้น ตั้งแต่ความเข้มข้นของ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ตามลำดับ ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวสามารถเห็นได้รวดเร็วกว่าในตับอ่อน แต่เมื่อเวลาผ่านไปการได้รับ LAS นานขึ้น ที่ 24 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างของการทำงานเอนไซม์คะตะเลสในเหงือก

เหงือกเป็นอวัยวะสำคัญในการหายใจของปูม้าและสัตว์น้ำส่วนใหญ่ โดยอาศัยหลักการผ่านเข้าออกของน้ำ ทำให้เกิดการแลกเปลี่ยนก๊าซเกิดขึ้น เหงือกจึงเป็นอวัยวะที่มีโอกาสในการสัมผัสกับสารพิษ หรือ LAS ที่เจือปนมากับน้ำ มากกว่าอวัยวะอื่น ๆ (Lau, Wong, & Garrigues, 2004) ประกอบกับเหงือกมีพื้นที่ผิวมาก จึงทำให้มีความไวต่อสารพิษ มากกว่าอวัยวะอื่น ๆ (Sandbacka, Christianson, & Isomaa, 2000) จากการแลกเปลี่ยนก๊าซ จึงทำให้เกิดการผลิตอนุมูลอิสระ (Free Radical) เกิดขึ้น แต่เนื่องจากในร่างกายของสิ่งมีชีวิตมีกลไกการต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant Defense) ทำหน้าที่ในการป้องกันอันตรายที่เกิดจากอนุมูลอิสระดังกล่าว ซึ่งเป็นกลไกเช่นเดียวกับที่เกิดขึ้นในตับอ่อน แต่เนื่องจากเหงือกของปูม้า มีโอกาสสัมผัสกับสารพิษได้เป็นอวัยวะแรก จึงมีโอกาสได้รับ LAS ก่อน ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงได้ชัดเจนกว่าในตับอ่อน จากผลการทดลองพบว่าที่ 3 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เนื่องจากเป็นระยะเวลาการได้รับที่เร็วเกินกว่าการกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระจึงทำให้ไม่พบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลส แต่เมื่อที่เวลาการได้รับ LAS ที่ 6 ชั่วโมง กลับพบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์คะตะเลส ตั้งแต่ความเข้มข้น LAS 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร เนื่องจากเหงือกเป็นอวัยวะที่มีความไวต่อสารพิษมากกว่าอวัยวะส่วนอื่น ๆ และยังมีพื้นที่ผิวสัมผัสมาก จึงทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการทำงานเอนไซม์คะตะเลส ที่ LAS ความเข้มข้นต่ำ แต่เมื่อระยะเวลาการได้รับ LAS ที่ 12 ชั่วโมง การตอบสนองของการทำงานของเอนไซม์คะตะเลสกลับลดลง จนเมื่อระยะเวลาการได้รับ LAS ที่ 24 ชั่วโมง ไม่พบการเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ คะตะเลส อาจเกิดจากความเข้มข้นของ LAS ที่มีอยู่ลดลง เนื่องจาก LAS สามารถถูกย่อยสลายได้ในสภาวะที่มีออกซิเจน และนอกจากนั้นปูม้าเริ่มปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่มี LAS เจือปนอยู่และที่ 24 ชั่วโมง LAS อาจถูกย่อยสลายลงไป ทำให้ความเข้มข้นของ LAS ที่มีอยู่ลดน้อยลง

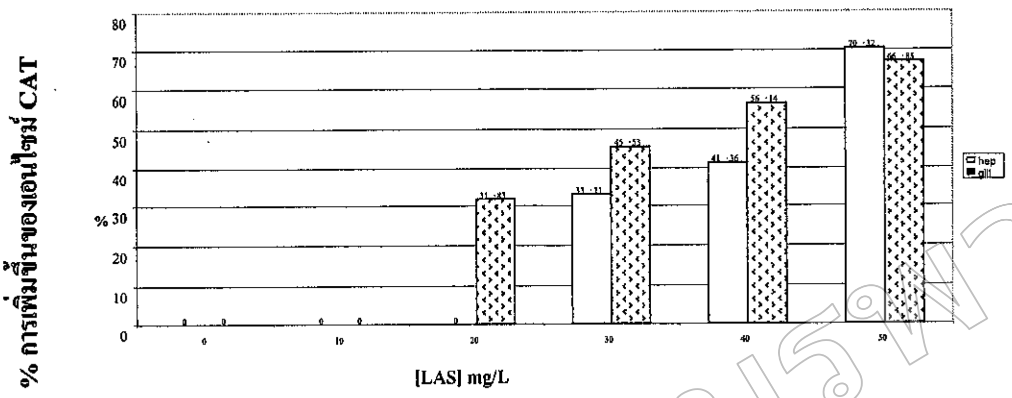
ผลการศึกษาดังกล่าวสอดคล้องกับการศึกษาของ Jifa et al. (2005) ซึ่งศึกษาถึงผลของ Sodium Dodecylbenzene Sulfonate (SDBS) ต่อการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในปลา

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

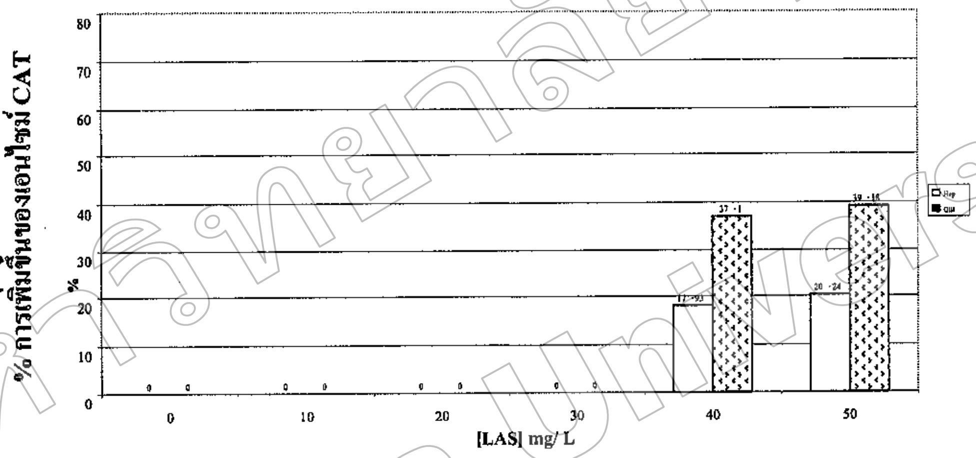
Lateolabrax japonicus พบว่า เมื่อปลา *L. japonicus* ได้รับ SDBS เป็นเวลา 12 วัน พบว่าการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เพิ่มมากที่สุด แต่หลังจากนั้นการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ลดลงเมื่อได้รับ SDBD 18 วัน นอกจากนี้ Carolina et al. (2006) ศึกษาในปู ชนิด *P. granulose* ในสภาวะที่มีความเครียดเมื่อสัมผัสกับอากาศ พบว่า การทำงานของเอนไซม์คะตะเลส ในเหงือก มีแนวโน้มการทำงานเพิ่มสูงขึ้น โดยมีระยะเวลาการสัมผัสกับอากาศ ที่ 3 และ 6 ชั่วโมง แต่เมื่อระยะเวลาผ่านไป 12 ชั่วโมง การทำงานของเอนไซม์คะตะเลส เริ่มลดลง จนไม่มีความแตกต่างกับชุดควบคุม (0 ชั่วโมง)

จากเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์คะตะเลส ดังกล่าว จะพบว่าที่ความเข้มข้นของ LAS เท่ากัน ในเหงือกจะมีเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของการทำงานเอนไซม์คะตะเลส สูงกว่าในตับอ่อน และยังพบว่าเหงือกสามารถตอบสนองต่อ LAS ที่ความเข้มข้นต่ำกว่าในตับอ่อน ทั้งนี้เนื่องมาจากเหงือกเป็นอวัยวะแรกที่สัมผัสกับสาร LAS นอกจากนั้นเหงือกยังมีการตอบสนองต่อสารพิษหรือสารแปลกปลอมได้ดีกว่าอวัยวะส่วนอื่น ๆ ถึงแม้ว่าบริเวณตับอ่อน เป็นบริเวณที่มีการผลิตอนุมูลอิสระ จำนวนมาก แต่กลับพบการทำงานของเอนไซม์คะตะเลส น้อยกว่าบริเวณเหงือก อาจเนื่องมาจาก บริเวณดังกล่าว มีเอนไซม์อื่นที่มีผลต้านอนุมูลอิสระอยู่ (Arun & Subramanian, 1998) แต่เมื่อระยะเวลาได้รับ LAS เพิ่มสูงขึ้นจะเห็นได้ว่าเปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์คะตะเลส กลับลดลง ทั้งนี้สืบเนื่องมาจาก LAS สามารถถูกย่อยสลายได้ง่ายในสภาวะที่มีออกซิเจน จึงทำในช่วงระยะเวลาการได้รับ LAS ที่ 12 และ 24 ชั่วโมง LAS เริ่มถูกย่อยสลายไปทำให้มีปริมาณ LAS คงเหลือลดน้อยลงกว่าเดิม อีกทั้งปูม้าสามารถปรับตัวให้อยู่ในสภาวะที่มีความเครียดจาก LAS ได้

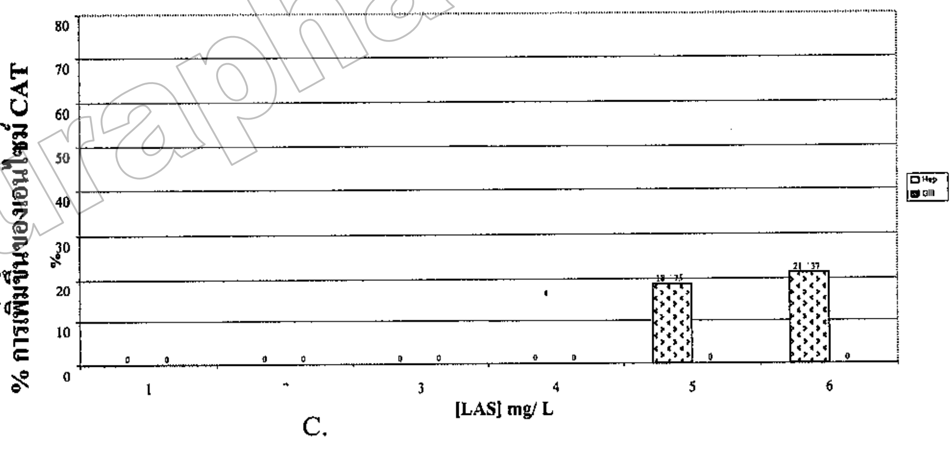
มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University



A.



B.



C.

หมายเหตุ A = ในสภาวะที่มี LAS 6 ชั่วโมง, B = ในสภาวะที่มี LAS 12 ชั่วโมง

C = ในสภาวะที่มี LAS 24 ชั่วโมง

ภาพที่ 46 เปอร์เซ็นต์การเพิ่มขึ้นของเอนไซม์คะตะเลส ในตับอ่อน และเหงือก ของปูม้าในสภาวะที่มี LAS

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส

การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ในปูม้า เมื่อได้รับ LAS ที่ความเข้มข้น 0, 10, 20, 30, 40 และ 50 มิลลิกรัมต่อลิตร ที่ระยะเวลาการได้รับที่ 6, 12 และ 24 ชั่วโมง พบว่า ที่ทุก ๆ ความเข้มของ LAS และทุกระยะเวลาการได้รับ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติของการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ทั้งในเลือด ตับอ่อน และเหงือก แต่การทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ที่พบมีปริมาณ ตับอ่อน>เหงือก>เลือด ตามลำดับ

เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส เป็นกลุ่มของไอโซเอนไซม์ที่จัดอยู่ในกลุ่มของ Phases II นิยมใช้เป็น ดัชนีชี้วัดทางชีวภาพ หรือ Biomarker ต่อการตรวจวัดการปนเปื้อนของสาร จำพวก Anthropogenic Organic และ สารอินทรีย์ ต่าง ๆ (Borkovic et al., 2005) เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ทำหน้าที่หลักในการกำจัดสารแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกายของสิ่งมีชีวิต โดยเกิดการคอนจูเกชั่น (Conjugation) ระหว่างสารแปลกปลอมกับ รีดิวซ์ กลูธาไทโอน (Reduce Glutathione) โดยมีเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (Menezes, Soares, Guilhermino, & Peck, 2006) จากกลไกดังกล่าว สุดท้ายได้เป็นสารเมอร์แคปทูนิค ซึ่งเป็นสารที่ละลายน้ำได้ดี ง่ายต่อการขับถ่ายออกจากร่างกาย โดยทั่วไปเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส มักพบอยู่ในเนื้อเยื่อส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย เช่น เหงือก ลำไส้เล็ก แต่บริเวณที่พบมากที่สุด ได้แก่ ตับ (Bainy, Saito, Carvalho, & Junqueira, 1996)

เนื่องจาก LAS ถูกย่อยสลายในร่างกายได้ง่าย และละลายน้ำได้ดี จึงทำให้ถูกกำจัดออกจากร่างกายของสิ่งมีชีวิตได้อย่างรวดเร็ว จึงไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ซึ่งสอดคล้องกับ Nunes et al. (2005) ศึกษาผลของ Sodium Dodecylsulphate (SDS) ต่อการทำงานของของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ใน *Artemia parthenogenetica* พบว่า ไม่พบความแตกต่างกันระหว่าง *A. parthenogenetica* ที่ได้รับ SDS ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 4.08, 4.90, 5.88, 7.05 และ 8.46 มิลลิกรัมต่อลิตร เมื่อเทียบกับชุดควบคุม และ Jifa et al. (2005) ศึกษาถึงผลของ Sodium Dodecylbenzene Sulfonate (SDBS) ต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ในปลา *Lateolabrax japonicus* พบว่า SDBS ไม่มีผลต่อการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส ผลของสารพิษต่อสิ่งมีชีวิตนั้น มักจะขึ้นอยู่กับชนิดของสารพิษและสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษ เช่น เอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรส อาจมีปริมาณเพิ่มสูงขึ้นในปูที่ได้รับทองแดง (Cu) และ ตะกั่ว (Cd) แต่ในทางตรงกันข้าม ปูชนิดเดียวกัน กลับมีการทำงานของเอนไซม์กลูตาไธโอนเอสทรานเฟอเรสลดลง เมื่อได้รับสารกลุ่มยาฆ่าแมลง (Astley et al., 1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ผลของ LAS ต่อการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส

เอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่สำคัญในการ Hydrolyses สารสื่อประสาท Acetycholine ใน Cholinergic Synapas ให้กลายเป็นโคลีน (Choline) และกรดอะซิติก (Acetic Acid) สามารถพบได้ทั้งในสัตว์ที่มีกระดูกสันหลังและสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลัง (Brown et al., 2004) โดยปกติเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส สามารถถูกยับยั้งการทำงานจากสารในกลุ่มยาฆ่าแมลงพวกออแกนโนฟอสเฟต (Organophosphate) และคาร์บอเมต (Carbamate) ที่ความเข้มข้นต่ำ จึงนิยมใช้เป็น Specific Biomarker ของสารจำพวกนั้น แต่นอกจากนั้นยังมีรายงานการถูกยับยั้งของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส โดยโลหะไอออนบางตัว เช่น Hg^{2+}, Cd^{2+} และ Zn^{2+} เป็นต้น (Guilhermino, Lacerda, Nogucira, & Soares, 2000)

จากการศึกษาในครั้งนี้จะพบว่า LAS สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ได้ทั้งในเลือด และเหงือก โดยในเลือดจะมีการทำงานเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส สูงขึ้นอย่างชัดเจน ที่ระยะเวลาการได้รับ LAS 12 และ 24 ชั่วโมง ที่ตั้งแต่ความเข้มข้น LAS 40 มิลลิกรัมต่อลิตร ส่วนในเหงือก จะเริ่มพบการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส อย่างมีนัยสำคัญ ที่ระยะเวลาการได้รับ LAS เท่ากับ 24 ชั่วโมง ความเข้มข้นของ LAS ตั้งแต่ 40 มิลลิกรัมต่อลิตร เป็นต้นไป

การทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส เพิ่มสูงขึ้นอาจอธิบายได้ว่า เนื่องจาก LAS สามารถไปมีผลกระตุ้นหรือเพิ่มการทำงานของเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ให้สูงขึ้น LAS เป็นสารในกลุ่ม Anion Surfactant มีส่วนประกอบที่เป็นประจุลบ จึงมีความสามารถในการจับกับเอนไซม์ได้เป็นอย่างดี ซึ่งจะมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเอนไซม์ดังกล่าว เป็นผลให้เอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส มีความสามารถในการ Hydrolyses สารอะซิทิลโคลีนเพิ่มสูงขึ้นตาม (Jifa et al., 2005) นอกจากนั้นยังพบว่า สารลดแรงตึงผิวมีผล ต่อการทำงานของเอนไซม์ พบว่าสารดังกล่าว ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโมเลกุลของเอนไซม์ และเมื่อโปรตีนจับกับโมเลกุลของสารลดแรงตึงผิว ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นจะทำให้เกิดการรบกวนโปรตีนเยื่อหุ้ม จะทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างโปรตีน มีผลทำให้การทำงานของเอนไซม์เปลี่ยนไป สามารถพบเอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส ในเลือดของสัตว์จำพวกครัสตาเชียนจำนวนมาก (Rickwood & Galloway, 2004)

ผลของ LAS ต่อความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม

หลังจากปูม้าได้รับ LAS ที่ระยะเวลา 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จะเริ่มตรวจวัดการเปลี่ยนแปลงความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซมได้ ตั้งแต่ความเข้มข้น LAS ที่ 10 มิลลิกรัมต่อลิตร

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เป็นต้นไป ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อ LAS ที่ความเข้มข้นระดับต่ำสุด ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า LAS มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเยื่อหุ้มไลโซโซม โดยที่ LAS สามารถแทรกตัวผ่านเข้าไปในเยื่อหุ้ม และละลายองค์ประกอบที่เป็นไขมันและโปรตีน ทำให้เยื่อหุ้มถูกรบกวน และสูญเสียเสถียรภาพไปในที่สุด (Hansen et al., 1997)

ไลโซโซมซึ่งเป็นออแกนเนลล์ ที่ภายในบรรจุด้วยเอนไซม์ไฮโดรไลติก จำนวนมาก มีหน้าที่สำคัญในการย่อยอาหาร ขจัดสารพิษ และเป็นระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ เป็นต้น (Nicholson, 2001) นอกจากนั้น ไลโซโซมยังทำหน้าที่ในการสะสมของสารปนเปื้อนต่าง ๆ ทั้งโลหะหนัก และสารไฮโดรคาร์บอน ซึ่งสารดังกล่าวมีผลทำให้เยื่อหุ้มไลโซโซมสูญเสียสภาพไปได้ อีกทั้งความเครียดยังส่งผลต่อการทำลายเยื่อหุ้มไลโซโซม ทำให้มีการปล่อยเอนไซม์ไฮโดรไลติก ออกสู่ไซโตปลาสซึมอีกด้วย (Da Ros, Menegetti, & Nasci, 2002) การตอบสนองของเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม ใช้เป็น Non-Specific Biomarker คือ ไม่สามารถบอกชี้ชัดถึงชนิดของสารพิษได้ หากแต่สามารถใช้ดูถึงสุขภาพของสิ่งมีชีวิตที่ได้รับสารพิษนั้น ๆ (Stien et al., 1998)

ในการพิจารณาถึงการเปลี่ยนแปลงเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซมสามารใช้วิธี Neutral Red Retention Time ซึ่งใช้วัดถึงการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของการยอมให้ผ่านเข้าออกของเยื่อหุ้มไลโซโซม เป็นวิธีที่สามารถใช้เป็นดัชนีชี้วัดต่อคุณภาพสิ่งแวดล้อมได้ อีกทั้งยังเป็นวิธีที่มีความไวต่อการชี้ถึงความสมบูรณ์ของชั้นเยื่อหุ้มชนิดไขมัน (Lipid Membrane) ของไลโซโซมจากการปนเปื้อนของสารพิษหรือความเครียด (Hauton, Hawkins, & Hutchinson, 1998) และยังเป็นวิธีที่สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้จริง ใช้เวลาน้อยในการวัด ประหยัด มีค่าใช้จ่ายต่ำ (Nicholson, 2001)

จากผลของ LAS ต่อเยื่อหุ้มไลโซโซม ผลที่ได้รับคือ ที่ระยะเวลาการได้รับ LAS ที่ 3 ชั่วโมง ยังเป็นเวลาการสัมผัสที่น้อยเกินกว่าจะเห็นการเปลี่ยนแปลงได้ แต่เมื่อระยะเวลาได้รับ LAS ที่นานขึ้นเป็น 6, 12 และ 24 ชั่วโมง จะพบว่า ระยะเวลาของ Retention Time การเก็บกักสีภายในไลโซโซม มีเวลาน้อยลง ชี้ให้เห็นว่าการเป็นเยื่อเลือกผ่านของ เยื่อหุ้มของไลโซโซม เกิดการสูญเสียสภาพไป โดยที่ LAS ซึ่งเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ประจุเป็นลบ มีความสามารถในการจับกับเยื่อหุ้มได้ดี จึงมีผลทำให้เยื่อหุ้มเสียสภาพไป แต่ในการทดลอง ในที่ความเข้มข้นของ LAS ที่เท่ากัน แต่ระยะเวลาการได้รับที่ต่างกัน ไม่พบความแตกต่างของค่า Retention Time ที่ได้ สามารถบอกได้ว่า ระยะเวลาที่ได้รับสารพิษ ไม่มีผลต่อการสูญเสียสภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซมซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Lowe et al. (1995) ศึกษาถึงผลของ Fluranthene ต่อเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม ในหอยองฝา *Mytilus edulis* พบว่า หอย *M. edulis* เมื่อได้รับ Fluranthene เป็นระยะเวลา 1 วัน และ 7 วัน มีค่า NRR ลดต่ำลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับชุดควบคุม นอกจากนั้นยังพบว่าระยะเวลาการสัมผัส Fluranthene ที่แตกต่างกัน ค่า NRR ไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

นอกจากใช้การทดสอบ NRR ในห้องปฏิบัติการแล้ว ยังนิยมใช้ในการติดตามตรวจสอบคุณภาพสิ่งแวดล้อมในธรรมชาติอีกด้วย เช่น Fernley, Moore, Lowe, Donkin, and Evans (2000) วัด NRR ในหอยที่ดำรงชีวิตอยู่บริเวณ South Wales เพื่อใช้ชี้วัดถึงคุณภาพสิ่งแวดล้อมบริเวณนั้น ซึ่งพบว่าหอยที่อาศัยอยู่บริเวณที่มีน้ำมันปนเปื้อนจะมีค่า NRR ลดต่ำลง เมื่อเทียบกับหอยที่ดำรงชีวิตอยู่ไกลจากการปนเปื้อน สอดคล้องกับการศึกษาของ Castro, Santos, Monteiro, and Vieira (2004) วัด NRR ในหอยที่ดำรงชีวิตอยู่บริเวณ Portuguese Coast ซึ่งพบว่า หอยที่อาศัยอยู่บริเวณใกล้เมืองอุตสาหกรรมและเขตชุมชน จะมีค่า NRR ต่ำสุด เมื่อเทียบกับบริเวณสะอาด ซึ่งค่า NRR และมลภาวะมีความสัมพันธ์ในเชิงผกผัน คือบริเวณที่มีมลภาวะสูงจะมีค่า NRR ต่ำกว่าบริเวณที่มีมลภาวะน้อย ที่มีค่า NRR สูง

ผลของ LAS ต่อความเข้มข้นของฮีโมไซยานิน และแบบแผนในเลือดปูม้า

ฮีโมไซยานิน เป็นโปรตีนที่มีทองแดงเป็นองค์ประกอบ ทำหน้าที่คล้ายกับฮีโมกลอบินในสิ่งมีชีวิตชั้นสูง คือทำหน้าที่ในการลำเลียงออกซิเจน ส่วนมากจะพบในสิ่งมีชีวิตในกลุ่มครัสตาเชียน ปริมาณของฮีโมไซยานินในเลือด จะขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายอย่าง เช่น ความเค็ม ปริมาณออกซิเจนละลายในน้ำ ระยะการลอกคราบ และ สารพิษที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อม เป็นต้น (Engel et al., 2001)

ในการศึกษาวัดปริมาณฮีโมไซยานิในเลือดได้โดย การวัดจากค่าการดูดกลืนแสงของฮีโมไซยานิน และสามารถทราบขนาดน้ำหนักโมเลกุลด้วย วิธี เอสดีเอส โพลีอะคริลาไมด์ เจล อิเลคโตรโฟรีซีส พบว่า LAS ไม่มีผลต่อปริมาณฮีโมไซยานิน โดยมีปริมาณความเข้มข้นของฮีโมไซยานิน 8.31-12.44 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันในเชิงสถิติ อาจเกิดจากระยะเวลาในการสัมผัสกับ LAS เป็นช่วงที่สั้นเกินกว่าจะพบความเปลี่ยนแปลงของปริมาณฮีโมไซยานิน อีกทั้งผลการศึกษาส่วนใหญ่ จะศึกษาในเชิงสำรวจ เช่น Engel et al. (1993) ศึกษาปริมาณความเข้มข้นฮีโมไซยานินในปู ที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการปนเปื้อนของสารมลพิษ เช่น สารไฮโดรคาร์บอน และโลหะหนัก เป็นต้น เทียบกับบริเวณที่ไม่ได้รับการปนเปื้อนจากมลพิษ พบว่าปูที่อาศัยอยู่ในบริเวณที่มีการปนเปื้อน มีปริมาณฮีโมไซยานิน สูงกว่า ปูจากบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อน ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าปูที่อาศัยอยู่ในบริเวณมีการปนเปื้อนตั้งแต่เกิด จะได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนดังกล่าว ทำให้สามารถเห็นผลที่เกิดขึ้น แต่ในการทดลองครั้งนี้ระยะเวลาที่ได้รับสาร สูงสุดที่ 24 ชั่วโมง เท่านั้น จึงยากที่จะเห็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณฮีโมไซยานิน และจากการนำตัวอย่างเลือดมาทำ Electrophoresis พบว่าไม่มีความแตกต่างกันระหว่างแถบโปรตีนที่ทุกความเข้มข้น ซึ่งสอดคล้องกับการวัดฮีโมไซยานินด้วยวิธีวัดค่าการดูดกลืนแสง และเมื่อคำนวณน้ำหนักโมเลกุลที่ได้ อยู่ในช่วง ประมาณ 75 kDa ซึ่งแบนดังกล่าวมีขนาดใกล้เคียงกับ

น้ำหนักโมเลกุลของฮีโมไซยานินของปู King Crab (*Paralithodes camtschatiae*) (Molon et al. (2000)

จากการทดลองดังที่กล่าวมาทั้งหมด พบว่า การวัดการทำงานของ เอนไซม์คะตเลส เอนไซม์อะซิทิลโคลีนเอสเทอเรส และความเสถียรภาพของเยื่อหุ้มไลโซโซม ในปูม้า เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพ และเหมาะสมในการใช้ตรวจวัดการปนเปื้อน LAS ในแหล่งน้ำ เนื่องจาก LAS มีผลกระทบต่อการทำงานดังกล่าว อีกทั้งสามารถตรวจพบการเปลี่ยนแปลงได้หลังจากปูม้าได้รับ LAS ในระยะเวลาอันสั้น และยังสามารถเห็นการตอบสนองที่ความเข้มข้นระดับต่ำ แต่อย่างไรก็ตามในการตรวจวัดการปนเปื้อน LAS ในสิ่งแวดล้อม ควรใช้หลายวิธีประกอบกัน เช่น การวัดการตอบสนองระดับเซลล์ดังกล่าว ร่วมกับการวิเคราะห์ทางเคมี เพื่อให้มีประสิทธิภาพในการตรวจวัดเพิ่มสูงขึ้น

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมถึงปัจจัยทางสภาวะแวดล้อม ที่อาจส่งผลต่อความเป็นพิษของ LAS ต่อสิ่งมีชีวิต
2. ควรศึกษาเพิ่มเติมถึงการเสริมฤทธิ์ของสารต่าง ๆ กับ LAS

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University