บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมา และความสำคัญของปัญหา

ปัจจุบันประชากรมีจำนวนเพิ่มมากขึ้น และส่งผลทำให้เกิดมลพิษในแหล่งน้ำ ซึ่งการปนเปื้อนของสารเคมีในกลุ่มที่รบกวนการทำงานของฮอร์โมนเอสโตรเจนในสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้น พบว่าเป็นปัญหาหลักที่ทุกประเทศทั่วโลกกำลังเผชิญอยู่ในขณะนี้ (Castro, Meloa, Guillot, Mendesb, Queir, Lima, Reis-Henriques, & Santos, 2007) สารในกลุ่มเอสโตรเจน (xenoestrogens) มีมากมายหลายชนิด สารในกลุ่มนี้มีอิทธิพลโดยเปลี่ยนแปลงการทำงานของระบบต่อมไร้ท่อในสัตว์โดยเฉพาะกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Matozzo & Marin, 2008) เช่นตัวอย่างที่ทำการศึกษาในครั้งนี้คือ 17β-estradiol (E_2) เป็นสารเอสโตรเจนในกลุ่มสเตียรอยด์ฮอร์โมนที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ทางธรรมชาติของระบบสืบพันธุ์มีความสำคัญต่อการพัฒนาการเจริญเติบโต และการสร้างระบบสืบพันธุ์ภายในเซลล์ของสัตว์มีกระดูกสันหลัง (Curieux-Belfond, et al., 2005) แต่ในสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังการสร้างของสเตรียรอยด์และความสัมพันธ์กับระบบสืบพันธุ์นั้นยังไม่ชัดเจน ในปัจจุบันมีการนำฮอร์โมน E_2 มาเป็นองค์ประกอบหลักของยาเม็ดคุมกำเนิด เพื่อใช้ในการควบคุมจำนวนประชากรมนุษย์และในทางปศุสัตว์ก็นำมาใช้ในการเจริญเติบโตของสัตว์อีกด้วย ดังนั้นทั้งมนุษย์และสัตว์ก็จะมีการปลดปล่อยของเสียต่าง ๆ ที่มีฮอร์โมน E_2 ปนเปื้อนอยู่สู่สิ่งแวดล้อมรวมไปถึงโรงงานอุตสาหกรรมที่ใช้ฮอร์โมนชนิดนี้อีกด้วย ดังเช่นรายงานของ Duong et al. (2010) ได้ทำการตรวจสอบปริมาณการปนเปื้อนของสารในกลุ่มเอสโตรเจนในทวีปเอเชีย พบว่าประเทศไทยมีปริมาณการปนเปื้อนของสารในกลุ่ม estradiol เฉลี่ยประมาณ 14.4 ng/L ซึ่งมีความเป็นพิษต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำได้ เนื่องจาก E_2 มีค่าครึ่งชีวิต (half-life) ในน้ำประมาณ 5-10 วัน (Lucas & Jones, 2006) จึงส่งผลทำให้มีการตกค้างในน้ำเสียเป็นระยะเวลาหลายวัน ดังนั้นถ้ามีระบบบำบัดน้ำเสียจากแหล่งต่าง ๆ ที่ไม่ได้มาตรฐานก็จะส่งผลให้สาร E_2 นั้นไปมีผลกระทบต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำได้

ปัจจุบันตัวชี้วัดการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำนั้นนิยมใช้สัตว์มีกระดูกสันหลังโดยเฉพาะในกลุ่มปลา เช่น ปลา gilt-head seabream (*Sparus aurata*) ถูกนำมาใช้ในการศึกษาระดับการแสดงออกของยีน transthyretin และ vitellogenin โดยเปรียบเทียบระหว่างสภาวะปกติและสภาวะที่มี E_2 ปนเปื้อน (Funkenstein, Bowman, Denslow, Cardinali, & Carnevali, 2000) สำหรับสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังนิยมใช้หอยหลายชนิดมาเป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของสาร

เอสโตรเจนในแหล่งน้ำ เช่น หอยนางรม หอยแมลงภู่ เป็นต้น เนื่องจากมีจำนวนประชากรมาก มีขนาดเล็ก จึงง่ายที่จะนำมาทดลองศึกษาในห้องปฏิบัติการ (Canesi, Ciacci, Betti, Lorusso, Marchi, Burattini, Falcieri, & Gallo, 2004) และตัวชี้วัดทางชีวภาพที่ใช้กับกลุ่มสิ่งมีชีวิตกลุ่มนี้ที่นิยมศึกษานั้นเป็น vitellogenin-like protein ที่มีโครงสร้างทางเคมีคล้ายกับ vitellogenin ที่พบในปลา (Blaise, Gagne, Pellerin, & Hansen, 1999) แต่กลไกการสังเคราะห์ของสัตว์ทั้งสองกลุ่มนั้นแตกต่างกัน คือ การสังเคราะห์ vitellogenin ในกลุ่มสัตว์มีกระดูกสันหลังนั้นถูกควบคุมโดย estrogen receptor แต่การสังเคราะห์ vitellogenin-like protein ในหอยสองฝานั้นถูกควบคุมโดย 17β-estradiol และ neuropeptide (Osada, Takamura, Sato, & Mori, 2003) จากการสืบค้นรายงานการศึกษาในประเทศไทยนั้น ในกลุ่มสัตว์ไม่มีกระดูกสันหลังที่ใช้เป็นตัวชี้วัดการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำมีน้อยมาก โดยเฉพาะในหอยฝาเดียวยังไม่มีรายงานการศึกษาแต่อย่างใด

หอยเจดีย์ (*Cerithidea cingulata*) เป็นหอยฝาเดียวขนาดเล็ก แพร่กระจายอยู่ตามหาดโคลนแนวชายฝั่ง กินพวกสารอินทรีย์ขนาดเล็ก แพลงก์ตอนพืชและแบคทีเรียที่อยู่ตามพื้นดินเป็นอาหาร จัดเป็นสัตว์ที่ไม่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจ แต่พบแพร่กระจายอยู่ทั่วไปโดยเฉพาะในแหล่งน้ำที่ค่อนข้างสกปรก ปัจจุบันก่อให้เกิดปัญหากับการเพาะเลี้ยงกุ้ง โดยสามารถเพิ่มจำนวนและมีการเจริญเติบโตที่เร็วมาก ส่งผลกระทบต่อคุณภาพน้ำและการเจริญเติบโตของกุ้งโดยตรง รวมทั้งมีการแพร่กระจายลงในแหล่งน้ำธรรมชาติ หอยเจดีย์ที่มีแหล่งอาศัยตามหาดโคลนนี้จึงมีโอกาสได้รับผลกระทบจากการปนเปื้อนของสารเอสโตรเจนในแหล่งน้ำโดยตรง (Kim & Lee, 2009)

การศึกษาในครั้งนี้ต้องการค้นหายีนเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ที่ตอบสนองต่อสาร 17β-estradiol โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP ที่มีขั้นตอนไม่ยุ่งยากและประหยัดค่าใช้จ่ายมากกว่าวิธีอื่นๆ และเพื่อยืนยันประสิทธิภาพของเครื่องหมายดังกล่าวโดยวิธีวัดระดับการแสดงออกของยีนเมื่อหอยเจดีย์ได้รับสาร 17β-estradiol ที่ระดับความเข้มข้น 10 และ 100 ng/L ที่ระยะเวลา 7, 14 และ 30 วัน เพื่อที่จะสามารถพัฒนาใช้เป็นดัชนีชี้วัดการปนเปื้อนของสาร 17β-estradiol ในสิ่งแวดล้อมได้

1.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

1. เพื่อค้นหายีนเครื่องหมายทางชีวโมเลกุลในหอยเจดีย์ที่ตอบสนองต่อสาร E_2 โดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP

2. ศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่สืบค้นได้ในหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร E_2 ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

1.3 สมมติฐานการวิจัย

หอยเจดีย์เมื่อได้รับสาร E_2 กับที่ไม่ได้รับ E_2 มีระดับการแสดงออกของยีนบางยีนแตกต่างกันสามารถตรวจหาและคัดเลือกยีนที่แตกต่างนั้นได้ด้วยวิธี cDNA-AFLP

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย

1. ได้เครื่องหมายทางชีวภาพสำหรับตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมโดยใช้เทคนิค cDNA-AFLP

2. ใช้เครื่องหมายทางชีวภาพที่สืบค้นได้มาใช้ในการตรวจสอบการปนเปื้อนของสาร E_2 ในสิ่งแวดล้อมได้

3. ใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้เทคนิค semi-quantitative PCR ในการตรวจสอบการปนเปื้อนสารในกลุ่มเอสโตรเจนชนิดอื่น ๆ ได้

1.5 ขอบเขตการวิจัย

เก็บตัวอย่างหอยเจดีย์ตัวเต็มวัยจากแหล่งธรรมชาติบริเวณหาดจ้าวหลาว ตำบลคลองขุด อำเภอท่าใหม่ จังหวัดจันทบุรี จากนั้นคัดแยกหอยออกตามเพศแล้วนำไปเลี้ยงในตู้ปลาเป็นเวลา 2 สัปดาห์ เพื่อปรับสภาพ จากนั้นนำมาทดสอบให้ได้รับสาร 17β-estradiol โดยการแช่ ที่ความเข้มข้นต่ำ (10 ng/L) และ ความเข้มข้นสูง (100 ng/L) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (น้ำทะเล และน้ำทะเล+ 0.08% DMSO) เมื่อครบกำหนดเวลาจึงเก็บตัวอย่างทำการสกัด mRNA แล้วเปลี่ยนเป็น cDNA จากนั้นใช้เทคนิค cDNA-AFLP ทำการคัดเลือกเครื่องหมายทางชีวภาพและทดสอบยืนยันผลโดยศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่คัดเลือกดังกล่าวกับหอยเจดีย์ที่ได้รับสาร 17β-estradiol ที่ระดับความเข้มข้นต่ำและสูงดังกล่าว

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University