บทที่ 5
อภิปรายผลงานวิจัย

งานวิจัยนี้ได้ทำการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน เนื่องจากปัญหาการตรวจสอบการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในแหล่งน้ำธรรมชาติซึ่งยังไม่มีการใช้เทคนิคทางชีวภาพ ส่วนใหญ่จะใช้วิธีทางเคมีในการตวจสอบ

5.1 การพัฒนากระบวนการใช้เซลล์บางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

การพัฒนากระบวนการใช้เซลล์มะเร็งบางชนิดในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน รายละเอียดจากผลการพัฒนาดังนี้

5.1.1 การคัดเลือกเซลล์มะเร็งบางชนิดเป็นโมเดลในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

จากผลการทดลองในการคัดเลือกเซลล์มะเร็ง 3 เชื้อสายเพื่อใช้เป็นโมเดลในการทดสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน โดยได้คัดเลือก MCF-7 (มะเร็งเต้านมมนุษย์) และคัดทิ้ง HeLa (มะเร็งปากมดลูกมนุษย์) และ MDA-MB-231(มะเร็งเต้านมมนุษย์) ด้วยเหตุผลดังที่ได้ระบุในผลการทดลองว่าเซลล์ MCF-7 มีความชัดเจนในการตอบสนองต่อการกระตุ้นของ 17β-estradiol (E2) มากกว่าเซลล์อีกสองเชื้อสายนั้น ในที่นี้มีประเด็นในการพิจารณาการคัดเลือกบางประเด็นที่ต้องการยกมากล่าวเพื่อให้เกิดความเข้าใจ คือ ความไม่ชัดเจนของการตอบสนองของ HeLa และ MDA-MB-231 ต่อ E2 นั้นมีสาเหตุจากอะไรและแตกต่างจาก MCF-7 อย่างไร และเป็นไปได้หรือไม่ที่ความเข้มข้นของ E2 ที่ใช้ในการทดลองนี้ อาจเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้ HeLa และ MDA-MB-231 ไม่แสดงการตอบสนองต่อฮอร์โมนชนิดนี้ในลักษณะเดียวกับ MCF-7 และ E2 แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เชื้อสายมะเร็งทั้งสามชนิดโดยออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (anti-proliferation) ได้อย่างไรทั้งที่มีคุณสมบัติเป็นฮอร์โมนที่ไปเร่งการแบ่งตัวเพิ่ม

จำนวนเซลล์เป้าหมายในร่างกายของมนุษย์และสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมโดยทั่วไป ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวรายละเอียดสังเขปโดยรวม ดังนี้

หากพิจารณาผลของ E2 ที่มีต่อ HeLa และ MDA-MB-231 ในการทดลองนี้แสดงแนวโน้มของการตอบสนองไปในลักษณะคล้ายกัน คือ เมื่อใช้ความเข้มข้นของ E2 มากขึ้นจนทำให้จำนวนเซลล์ลดลง นั่นคือความเข้มข้นของ E2 ที่ใช้ในการทดลองนี้ในช่วง 10^{-18} ถึง 10^{-5} มีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ทั้งนี้ได้มีข้อมูลที่แน่ชัดจาก ATCC (American Type Culture Collection) ว่าทั้งเซลล์ HeLa และ MDA-MB-231 เป็นเซลล์ที่ไม่มีตัวรับเอสโตรเจน (ER-negative) ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงไม่น่าแปลกใจที่การตอบสนองของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้เป็นไปในทิศทางเดียวกันนั่นคือเป็นปฏิกิริยาที่ไม่ผ่านตัวรับเอสโตรเจน ซึ่งมีรายงานวิจัยที่อธิบายว่า ลักษณะเช่นนี้เกิดขึ้นเนื่องจากผลของการเข้าทำปฏิกิริยาการยับยั้งที่ไม่จำเพาะ ที่เรียกว่า non-specific inhibitory effect ของ E2 ต่อเซลล์ทั้งสองชนิดโดยอาจมีกลไกผ่าน tyrosine kinase (Akiyama *et al.*, 1987) อย่างไรก็ตามมีบางรายงานที่กล่าวถึงวิถีการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนที่ออกฤทธิ์ต่อ HeLa ว่าอาจผ่านวิถีที่เป็นอิสระจากตัวรับเอสโตรเจนอื่น ๆ (ER-independent pathway) ซึ่งเกี่ยวข้องกับโปรแกรมการตายของเซลล์ apoptosis (Obrero *et al.*, 2002) ดังนั้นจึงเป็นที่น่าสนใจว่าการถูกยับยั้งไม่ให้แบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ทั้งสองชนิดนี้มีส่วนเกี่ยวข้องกับการตายแบบ apoptosis ของเซลล์ทั้งสองนี้หรือไม่ ซึ่งควรมีการทำงานวิจัยต่อไปในอนาคต สำหรับ MCF-7 นั้นได้รับการยอมรับว่ามีตัวรับเอสโตรเจนภายในเซลล์ทั้งจาก ATCC และจากงานวิจัยอีกจำนวนหนึ่ง (Guthrie *et al.*, 1997; Hsieh *et al.*, 1998) และเซลล์นี้สามารถตอบสนองต่อการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนหรือสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่หลากหลายรูปแบบ โดยสารเหล่านี้มีผลไปกระตุ้นทำให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์มากขึ้น และมีการพิสูจน์โดยวิธีการทางอณูชีววิทยาว่าเป็นการออกฤทธิ์โดยผ่านตัวรับเอสโตรเจนคือ ERα ภายในเซลล์ทั้งสิ้น (Benz *et al.*, 1992; So *et al.*, 1997; Bartucci *et al.*, 2001; Maggiolini *et al.*, 2001) ในกรณีของ E2 ที่ออกฤทธิ์ต่อ MCF-7 มีข้อพิจารณาในประเด็นนี้อีกประการหนึ่งคือ มีลักษณะการออกฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic activities) คือด้านหนึ่งกระตุ้นส่วนอีกด้านหนึ่งยับยั้ง (Nussey and Whitehead, 2001) โดยที่ ความเข้มข้นน้อยจะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ในขณะที่หากเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะไปยับยั้ง ซึ่งสอดคล้องกับที่ได้มีรายงานไว้โดย Katzenllenbogan *et al.* (1987) ได้ทำการทดสอบ E2 ต่อเซลล์ MCF-7

พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 10^{-12} ถึง 10^{-17} M จะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ตามลำดับความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้น แต่ในขณะที่ความเข้มข้น > 10^{-7} M จะยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ ซึ่งจะเห็นว่าที่ความเข้มข้น 10^{-7} M เป็นจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ด้านใดด้านหนึ่ง ซึ่งคล้ายกับการทดลองนี้ที่มีลักษณะการออกฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic activity) เหมือนกัน เมื่อพิจารณาข้อแตกต่างระหว่างงานวิจัยนี้กับการงานวิจัยของ Katzenllenbogan *et al.* (1987) แล้วพบว่าความเข้มข้นของจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาของการออกฤทธิ์ไปด้านใดด้านหนึ่งมีความแตกต่างกันเท่านั้น นอกจากนี้ยังได้สอดคล้องกับที่มีรายงานไว้โดย Maggiolini *et al.* (2001) ทำการทดสอบ E2 ต่อเซลล์ MCF-7 พบว่า ความเข้มข้นที่ $\leq 10^{-6}$ M จะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ ในขณะที่ $\geq 10^{-6}$ M จะยับยั้ง ซึ่งจะเห็นว่า ค่าความเข้มข้น 10^{-6} M นี้เป็นจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไปด้านใดด้านหนึ่ง ซึ่งความเข้มข้นนี้ต่างจากการทดลองนี้ซึ่งมีค่าเป็น 10^{-12} M นั่นคือการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของ E2 น้อยกว่าของ Katzenllenbogan *et al.* (1987) และ ของ Maggiolini *et al.* (2001) ถึงประมาณ 1 ล้านเท่า ข้อแตกต่างอีกประการหนึ่งคือ ในงานวิจัยของ Maggiolini *et al.* (2001) เซลล์ HeLa มีการตอบสนองในลักษณะเป็นสองด้านเช่นเดียวกับ MCF-7 โดยความเข้มข้นที่ยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มีค่าเท่า ๆ กันอีกด้วย ในขณะที่ในการทดลองนี้ HeLa ตอบสนองต่อ E2 เพียงด้านเดียวคือด้านของการยับยั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ ความแตกต่างนี้เป็นเรื่องที่อธิบายความเป็นไปได้ในสองแนวทาง ประการแรก ในการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นของ E2 ในช่วง 10^{-18} ถึง 10^{-5} M ซึ่งอาจเป็นความเข้มข้นที่มากเกินไปสำหรับการแสดงฤทธิ์ของ E2 ในอีกด้านหนึ่งของ biphasic activities ซึ่งก็คือการกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ต่อเซลล์ทั้งสองเชื้อสาย นั่นแสดงว่าความเข้มข้นที่เป็นจุดเปลี่ยนของการออกฤทธิ์ไปด้านใดด้านหนึ่งของเซลล์ HeLa และ MDA-MB-231 ในการทดลองนี้ต่างจากของเซลล์ MCF-7 และต่างจากที่ระบุในการทดลองของ Maggiolini *et al.* (2001) นอกจากนี้ ในประการที่สอง อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์ทั้งสองเชื้อสาย (คือ MCF-7 และ HeLa) ที่ใช้ในกระบวนการทดลองนี้สูญเสียความสามารถในวิถีของการตอบสนองต่อสาร E2 ในขั้นตอนใดขั้นตอนหนึ่งหรือหลายขั้นตอน (Alberts *et al.*, 2002) จนทำให้ไม่สามารถรับการตอบสนองในการกระตุ้นให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้นมาได้ และ/หรืออาจได้รับอิทธิพลที่มากกว่าของการกระตุ้นในวิถีที่ทำให้มีการตายของเซลล์ (Zachary, 2003) ทำให้เซลล์ตายและมีจำนวนเซลล์ลดลง การอธิบายเรื่องนี้เป็นการคาดเดาตามสมมุติฐานที่

ตั้งขึ้นใหม่ทั้งหมดในงานวิจัยนี้และต้องมีการทดลองสนับสนุน ซึ่งอยู่นอกเหนือขอบเขตของงานวิจัยนี้ ดังนั้นจึงควรเป็นแผนการวิจัยในอนาคตต่อไป นอกจากนี้ประเด็นพิจารณาในเรื่องของการใช้เซลล์เชื้อสายที่มีชื่อเดียวกัน ในงานวิจัยนี้กับที่ระบุใน Katzenllenbogan *et al.* (1987) และ Maggiolini *et al.* (2001) คือ MCF-7, HeLa หรือแม้แต่ MDA-MB-231 แต่ให้ผลแตกต่างกัน ซึ่งมีความเป็นไปได้ว่าสภาพการเลี้ยงและความแตกต่างของอาหารและวิธีการวิจัยสามารถทำให้ได้ผลที่แตกต่างกันมาก (Freshney, 2010) โดยเฉพาะอย่างยิ่งความแตกต่างดังกล่าวที่เห็นได้ชัดเจนอันหนึ่งคือ ในกระบวนการทดลองของงานวิจัยนี้ มีการทำให้เซลล์เชื้อสายที่ใช้ทดลองได้รับอิทธิพลจากฮอร์โมนในซีรัมน้อยที่สุด ซึ่งเป็นขั้นตอนสำคัญในการลดบทบาทของฮอร์โมนจากภายนอกเซลล์นั้น คือ การใช้ผงถ่าน (dextran coated charcoal strip) ดูดซับเอาฮอร์โมนแทบทั้งหมดทุกชนิดออกไปจากซีรัม แต่ยังคงเหลือสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) ส่วนใหญ่ที่อยู่ในซีรัมไว้ (Counihan *et al.*, 1991) ทำให้เมื่อนำซีรั่มนี้ไปเติมในสารอาหารและนำไปเลี้ยงเซลล์ ในขณะทำการทดลองเซลล์ยังคงดำรงชีวิตอยู่ได้โดยไม่ได้รับอิทธิพลของฮอร์โมนแต่ยังได้รับการกระตุ้นจากสารกระตุ้นการเจริญให้คงความมีชีวิตอยู่และไม่ตายในขณะที่ทำการทดลอง แต่งานวิจัยของ Maggiolini *et al.* (2001) ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่ใส่ซีรั่มเลย (serum free) ซึ่งแน่นอนว่าความมีชีวิตของเซลล์จะได้รับผลกระทบจากการขาดสารกระตุ้นการเจริญที่ควรจะได้รับจากซีรั่มด้วย ซึ่งอาจมีอิทธิพลทำให้เกิดความแตกต่างในลักษณะนี้ขึ้นได้ นอกจากนี้ในการทดลองนี้ ยังใช้การประเมินจำนวนเซลล์มีชีวิต ด้วยวิธีการที่เรียกว่า colorimetric assay โดยใช้สี sulforhodamine B (SRB) ซึ่งมีความแม่นยำสูงกว่าการนับด้วย haemocytometer ตามวิธีการของ Maggiolini *et al.* (2001) สิ่งเหล่านี้เป็นรายละเอียดทางเทคนิคที่ทำให้เกิดความแตกต่างของผลการทดลองได้ทั้งสิ้น และล้วนเป็นผลต่อการนำเซลล์เชื้อสายไปใช้งานในกระบวนการที่พัฒนาขึ้น ดังนั้นการนำเซลล์และกระบวนการทดสอบเข้าสู่การทดสอบกับสารมาตรฐานที่ออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนเป็นขั้นตอนที่จำเป็น ซึ่งจะได้กล่าวถึงต่อไป

จะเห็นว่าการคัดเลือกใช้ MCF-7 ในการทดลองนี้ เป็นไปด้วยเหตุผลของความชัดเจนในการตอบสนองต่อฮอร์โมนมาตรฐานคือ E2 ซึ่งการตอบสนองนี้สอดคล้องกับงานวิจัยอื่น ๆ ที่ได้รายงานลักษณะของเซลล์เชื้อสายที่มีโปรตีนตัวรับเอสโตรเจนอยู่ภายในเซลล์ (ER-positive) และมีการแสดงคุณสมบัติการตอบสนองเป็นสองด้าน (biphasic) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่จำเป็นในการใช้เซลล์เพื่อประเมินวิถีของการออกฤทธิ์ของสารเอสโตรเจน

หรือสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนหรือสารพิษอื่น ๆ สำหรับเซลล์ HeLa และ MDA-MB-231 ที่ไม่สามารถแสดงฤทธิ์ในลักษณะสองด้านได้ในการทดลองนี้จึงไม่ได้ถูกเลือกมาใช้ในงานวิจัยนี้ แต่ทั้งนี้มิได้หมายความว่าจะไม่สามารถใช้ประโยชน์จากเซลล์ทั้งสองเชื้อสายนี้ในการประเมินฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์ขัดขวางการทำงานของต่อมไร้ท่ออื่นๆ (endocrine disruptors) ได้ โดยได้มีตัวอย่างการนำ HeLa และ MDA-MB-231 ไปดัดแปลงเป็นเซลล์รายงาน (reporter cells) โดยการใส่ยีนรายงานที่เกี่ยวข้องกับการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน (Berry *et al.*, 1989; Legler *et al.*, 1999; Cosnefroy *et al.*, 2009; Bae *et al.*, 2010; Arao *et al.*, 2011; Wolf *et al..*, 2011) ซึ่งเป็นกระบวนการวิจัยที่น่าสนใจเพราะมีการใช้เทคโนโลยีระดับสูงแต่มีขอบเขตการวิจัยที่อยู่นอกเหนืองานวิจัยนี้

5.1.2 การทดสอบเซลล์ด้วยสารมาตรฐาน

ในการเลือก aldrin และ endrin เป็นสารทดสอบมาตรฐานด้วยเหตุผลที่ว่าเป็นสารที่หาได้ในรูปสารบริสุทธิ์ และมีองค์ประกอบทางเคมีไม่เปลี่ยนแปลงสามารถสั่งซื้อจากบริษัทผู้ผลิตได้ เมื่อนำมาทดสอบกับเซลล์จะสามารถบอกได้ว่าเป็นสารออกฤทธิ์ของสารนี้จริงๆ ไม่ใช่เกิดจากผลของความไม่บริสุทธิ์เจือปนอย่างอื่นนอกจากนี้ยังมีรายงานจำนวนมากที่ได้รายงานว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจน (Bolger *et al.*, 1999; Kajima *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2002) ซึ่งเป็นสารรบกวนฮอร์โมนหรือเป็นสารแปลกปลอมจากภายนอกที่เข้าไปขัดขวางการทำงานของฮอร์โมน (Hormone blockers) สารกลุ่มนี้จะไปแย่งจับกับตัวรับของฮอร์โมนตัวจริง มีรายงานวิจัยที่พบว่าสารเคมี ในกลุ่ม organochlorine รวมทั้ง aldrin และ endrin ที่อยู่ในกลุ่มนี้ด้วย มีผลต่อการทำงานของฮอร์โมนในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ ในขณะที่กลุ่มประเทศที่พัฒนาแล้ว เช่น สหรัฐอเมริกา (Danish EPA, 2003) กำลังศึกษาปัญหาการรบกวนฮอร์โมนในสิ่งแวดล้อมและสำรวจหาข้อมูลพื้นฐานของสารเหล่านี้ในสิ่งมีชีวิตเพื่อใช้เป็นตัวบงชี้ทางชีวภาพ (biomarker) และปริมาณของสารที่สร้างปัญหาต่อสุขภาพที่สำคัญ คือวิธีวิเคราะห์ จึงเป็นเรื่องที่น่าสนใจ ที่จะนำสารมาตรฐานตัวใดตัวหนึ่งหรือมากกว่ามาทำการทดสอบต่อเซลล์ MCF-7 เพื่อเป็นตัวชี้วัดว่าสารดังกล่าวสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนจริง ในระดับความเข้มข้นที่เท่าไร

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

อีกประการหนึ่งการทดสอบเซลล์ MCF-7 ด้วยสารมาตรฐาน aldrin และ endrin ด้วยเหตุผลที่ว่าเป็นสารที่ถูกนำมาเป็นวัตถุดิบในการผลิตยาฆ่าแมลงบางชนิด (Mark *et al.*, 1997; Mckinlay *et al.*, 2007) ทำให้เกิดการปนเปื้อนในพืชผักผลไม้และในแหล่งน้ำธรรมชาติ ส่งผลต่อมนุษย์และสัตว์ ผลที่เกิดขึ้นในมนุษย์ เช่น ผลกระทบที่อาจเกิดขึ้นกับระบบสืบพันธุ์ ทำให้คุณภาพของน้ำอสุจิลดลง เพิ่มอัตราการแท้งตามธรรมชาติ และเพิ่มอัตราความผิดปกติของพัฒนาการของระบบสืบพันธุ์เพศชาย (Mckinlay *et al.*, 2007) ผลที่เกิดขึ้นในสัตว์ คือความผิดปกติส่วนใหญ่เกิดขึ้นที่ระบบสืบพันธุ์ เนื่องจากความไม่สมดุลของฮอร์โมน ส่งผลต่อความสมบูรณ์ของระบบสืบพันธุ์ ซึ่งมีผลโดยตรงต่อจำนวนประชากรที่ลดลงของสัตว์นั้น ๆ และสัตว์ชนิดอื่นในระบบนิเวศที่เกี่ยวข้อง (วรางคณา, 2553) เช่นในกรณีที่เกิดขึ้นกับปลา โดยสารกลุ่มหนึ่งที่ขัดขวางการทำงานของฮอร์โมนที่ผลิตโดยต่อมไร้ท่อ ซึ่งปนเปื้อนอยู่ในน้ำทิ้งอุตสาหกรรม ทำให้เกิดปลาสองเพศ ในตัวเดียวกัน เนื่องจากสภาวะบางอย่างที่แสดงถึงวัยเจริญพันธุ์ผิดจากการสร้าง vitellogenin ในไข่แดงไม่สมดุลซึ่งการสร้างชนิดนี้ถูกควบคุมด้วยฮอร์โมน (Okoumassoun *et al.*, 2002; Dang *et al.*, 2011; Merry, 1994)

หากพิจารณาผลของ aldrin และ endrin ที่มีต่อ MCF-7 ในการทดลองนี้แสดงแนวโน้มของการตอบสนองไปในลักษณะคล้ายกัน คือเมื่อใช้ความเข้มข้นของสารทั้ง 2 ชนิด มากขึ้นส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน โดยลักษณะการออกฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic activity) คล้ายกับการแสดงออกของ E2 โดยที่ความเข้มข้นน้อยจะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์ในขณะที่เพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะไปยับยั้ง (Nussey and Whitehead, 2001) ซึ่งสอดคล้องกับที่มีรายงานไว้โดย Kojima *et al.* (2004) ทำการทดสอบ aldrin และ endrin ต่อเซลล์ MCF-7 พบว่า aldrin ที่ความเข้มข้น $\leq 7.8\times10^{-6}$ M จะกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์ และ $\geq 7.8\times10^{-6}$ M จะยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งคล้ายกับการทดลองนี้ที่มีการออกฤทธิ์เป็นสองด้านเช่นกัน คือ ในกรณีที่เซลล์ได้รับ aldrin ที่ความเข้มข้น $\leq 2.5\times10^{-7}$ M จะกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ แต่ในขณะเดียวกันที่ความเข้มข้น $\geq 2.5\times10^{-7}$ M เซลล์กลับมีแนวโน้มลดลง ในกรณีของ endrin ก็เป็นไปในทิศทางเดียวกันคือ มีจุดเปลี่ยนของความเป็นสองด้าน ที่ความเข้มข้น 1×10^{-6} M นั่นคือถ้าน้อยกว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวน ถ้ามากกว่าเซลล์กลับมีจำนวนลดลง ซึ่งข้อแตกต่างของ aldrin และ endrin ในการทดลองนี้คือ ความเข้มข้นของสารที่ทำให้เกิดจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ออกฤทธิ์

ต่อเซลล์ไปด้านใดด้านหนึ่งที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์มีจำนวนเพิ่มขึ้นสูงสุดเท่านั้น เมื่อพิจารณาข้อแตกต่างของงานวิจัยนี้กับที่ได้มีรายงานไว้โดย Kojima *et al.* (2004) จะเห็นว่าความแตกต่างกันประการแรกก็คือ จุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ ซึ่งต่างกับการทดลองครั้งนี้เพียงประมาณ 10 เท่า นอกจากนี้ Cossette *et al.* (2002) ได้ทดสอบ endosulfan ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม organochlorine เช่นเดียวกับ aldrin และ endrin ต่อเซลล์ MCF-7 พบว่าความเข้มข้นที่ 10^{-7} M เป็นจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาและความเข้มข้นที่กระตุ้นการแบ่งเซลล์อยู่ในช่วง 10^{-10} – 10^{-7} M ซึ่งต่างจากงานวิจัยนี้ นอกจากนี้ Andersen *et al.* (2002) ยังได้นำสารกลุ่ม organochlorine หลายชนิดมาทดสอบในเซลล์ MCF-7 ได้แก่ dieldrin , endosulfan, fenarimol, prochloraz และ chlorothalonil พบว่าสารดังกล่าวสามารถออก์ฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic) เช่นเดียวกัน โดยพบว่าจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนหรือยับยั้งที่ความเข้มข้น 25×10^{-6}, 25×10^{-6} 50×10^{-6}, 25×10^{-6} และ 5×10^{-6} M ของสาร dieldrin endosulfan, fenarimol, prochloraz และ chlorothalonil ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า สารในกลุ่มเดียวกันแต่ต่างชนิดกันแสดงจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไปด้านใดด้านหนึ่งที่แตกต่าง ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ที่ aldrin และ endrin มีจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ต่างกัน นอกจากนี้ Tully *et al.* (1999) ได้ทำการทดสอบ aldrin และ endrin ในเซลล์ HeLa ที่ระดับความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1 และ 10 nM พบว่าสารดังกล่าวไม่สามารถออกฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic) ได้ คือไม่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้และไม่ยับยั้งการเพิ่มของจำนวนของเซลล์เช่นกันเมื่อเปรียบเทียบกับชุดควบคุมที่ไม่ได้รับสารดังกล่าวโดยให้เหตุผลว่า เนื่องจากเซลล์ HeLa ไม่มีตัวรับเอสโตรเจนภายในเซลล์ ซึ่งแสดงให้เห็นข้อแตกต่างของการทดลองนี้ที่ใช้เซลล์ MCF-7 มาทดสอบสารมาตรฐานส่งผลให้เกิดการออกฤทธิ์เป็นสองด้านได้

5.1.3 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

เอสโตรเจนมีบทบาทสำคัญในกระบวนการเจริญเติบโต การเจริญพัฒนา การสืบพันธุ์ และรวมถึงการรักษาสภาวะสมดุลต่าง ๆ มากมายของเนื้อเยื่อของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมรวมทั้งมนุษย์ ผลต่อสรีรภาพของเอสโตรเจนได้รับการส่งสัญญาณผ่านตัวรับเอสโตรเจนที่อยู่ภายในเซลล์ (intracellular estrogen receptor, ERs) (Kato *et al.*, 1995; Shiau *et al.*, 1998) ซึ่งไปควบคุมกระบวนการลอกรหัสยีนเป้าหมายโดยจับกับลำดับของดีเอ็นเอ

เป้าหมายนั้น ERs ทำหน้าที่ในการประสานงานอย่างเป็นจังหวะทั้งต่อการลอกรหัสยีนและในส่วนของการทำหน้าที่ของโปรตีนบางกลุ่มที่ไม่เกี่ยวข้องกับการสั่งการจากยีนโดยตรง เพื่อตอบสนองต่อการกระตุ้นที่มาจากโมเลกุลของเอสโตรเจนและสารคล้ายเอสโตรเจน และยังมีสัญญาณที่กระจายออกมาจากวิถีการส่งสัญญาณของสารกระตุ้นการเจริญอื่น ๆ (growth factor signaling pathways) (Pardee, 1989) การออกฤทธิ์ที่ส่งผลได้หลายทิศทาง และมีความจำเพาะต่อเนื้อเยื่อเป้าหมายของเอสโตรเจนเช่นนี้ เป็นการส่งสัญญาณไปยัง ERs แบบย่อย 2 แบบ คือ ERα และ ERβ กับโมเลกุลที่ทำหน้าที่ร่วม (coregulators) (Brandenger *et al.*, 1997; Ogawa *et al.*, 1998; Katzenllenbogen and Katzenllenbogen, 2000) หากมีปฏิกิริยาที่มากเกินไปของโปรตีนที่เกี่ยวข้องกับ ER จะทำให้มีการเปลี่ยนหน้าที่ของ ER ทั้งในการกระตุ้นและยับยั้งกระบวนการลอกรหัสยีน การทำงานร่วมกันของวิถีสัญญาณต่างๆ ภายในเซลล์ และการควบคุมวัฏจักรของเซลล์ ERs แบบย่อยทั้งสองแบบมีการกระจายอยู่ในเซลล์ในร่างกายของมนุษย์และสัตว์ทั้งสองเพศ ERα มีปริมาณมากในเซลล์มดลูกและต่อมน้ำนม และส่วน ERβ มีบทบาทสำคัญมากในระบบประสาทส่วนกลาง ระบบหัวใจหลอดเลือด และระบบภูมิต้มกัน ซึ่งรวมถึงเซลล์ที่ประกอบเป็นท่อขับถ่ายและสืบพันธุ์ กระดูก ไตและปอด (Kuiper *et al.*, 1997; Kuiper *et al.*, 1998; Gronemeyer *et al.*, 2004) โดยปกติแล้วทั้ง ERα และ ERβ พบกระจายในไซโตพลาสซึมและนิวเคลียส แต่อาจพบในปริมาณน้อย (2%) ที่เข้าไปเกี่ยวข้องสัมพันธ์กับเยื่อหุ้มเซลล์ (Kelly and Levin, 2001)

ERs ทั้งสองแบบของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยน้ำนมมีลักษณะเฉพาะทางโครงสร้างที่จัดเป็นกลุ่มของตัวรับของนิวเคลียส (nuclear receptor) โดยมีส่วนทำหน้าที่ (functional domains) 3 ส่วนที่เป็นอิสระต่อกัน แต่ทำหน้าที่ด้วยกัน (Kumar *et al.*, 1987) ส่วนแรกเรียกว่า NH2-terminal transcriptional AF1 (activation function-1) domain ส่วนที่สองเรียก DNA-binding domain และส่วนที่สามเรียก ligand-binding domain ที่มีส่วนประกอบเป็น ligand-dependent transcriptional AF2 (activation function-2) domain (Mishra *et al.*, 2003) ERs จะเข้าทำปฏิกิริยากับสัญญาณหลากหลายรูปแบบ ทั้งจากสัญญาณอิสระ (ligands) และสัญญาณจากวิถีที่มีขึ้นภายในเซลล์ เพื่อทำหน้าที่ในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม โครงสร้างที่เป็นเครือข่ายต่างๆ ของอวัยวะ เช่น เนื้อเยื่อที่เกี่ยวข้องกับระบบสืบพันธุ์ กระดูก ตับ และสมองเป็นเป้าหมายสำคัญของการเข้าทำปฏิกิริยาของเอสโตรเจน โดยผ่าน

ช่องทางที่รวดเร็วซึ่งไม่ผ่านกระบวนการควบคุมยีน (nongenomic effects) และ/หรือ ผ่านช่องทางของวิถีที่เป็นที่ทราบกันดีแต่เดิม (classical pathway) นั่นคือเกี่ยวข้องกับการควบคุมการทำงานโดยยีน (genomic effects) ที่ต้องมีการควบคุมยีนเกี่ยวข้องกับ ERs (Driggers and Segars, 2002; Segars and Driggers, 2002) วิถีที่รู้จักกันดีแต่เดิมนี้ เอสโตรเจนต้องเข้าทำปฏิกิริยาโดยตรงกับตัวรับ ERs ที่อยู่ในนิวเคลียส และเมื่อเข้าทำปฏิกิริยาแล้วได้เป็น สารประกอบที่เรียก ER complex สามารถที่จะเข้าไปช่วยทำให้เกิดการลอกรหัสยีนหรืออาจจะเข้าจับทำปฏิกิริยากับ transcription factors ทำหน้าที่ควบคุมการทำงานของยีนได้ สำหรับวิถีที่ไม่ใช่รู้จักกันดีแต่เดิม (nonclassical pathway) ซึ่งทำงานได้เร็วกว่า (Syed *et al.,* 2005) และขึ้นอยู่กับความสามารถของเอสโตรเจนที่เข้าทำปฏิกิริยากับตัวรับฮอร์โมนที่ไม่ใช่สเตอรอยด์ (nonsteroid hormone receptors) หรือ ตัวรับฮอร์โมนที่เป็นสเตอรอยด์ (steroid hormone receptors) ที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ วิถีที่ไม่รู้จักกันดีแต่เดิมทั้งสองนี้จะไปกระตุ้นโปรตีนในกลุ่ม kinases ซึ่งจะส่งสัญญาณไปควบคุมการลอกรหัสยีนบางตัว (Driggers and segars, 2002; Lorenzo, 2003; Safe and Kim, 2008)

ในกลไกของวิถีที่เป็นที่รู้จักกันดีแต่เดิมของสเตอรอยด์ฮอร์โมนนี้ จะเกี่ยวข้องกับการมีปฏิกิริยาของตัวรับภายในเซลล์และในนิวเคลียส (Jayachadran and Miller, 2002) การที่ฮอร์โมนเข้าจับกับ ER จะเป็นการปล่อย ER ให้เป็นอิสระจากตัวยับยั้งที่เรียก HSPs (heat shock proteins) (Voss *et al.,* 2003) ที่รวมตัวเป็นสารประกอบในขณะที่ไม่ทำงาน และเริ่มกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของโมเลกุลจนทำให้ ER สามารถเข้าจับกับ responsive elements บน promoters ของยีนเป้าหมายได้ (Knoblauch and Garabedian, 1999) ต่อจากนั้นส่วนประกอบระหว่าง receptor-ligand จะเข้ารวมกับ RER (estrogen responsive element) ที่มีตำแหน่งอยู่บน promoters ของยีนเป้าหมาย และกระตุ้นให้มีการลอกรหัสยีน การมีปฏิกิริยาสูงสุดในการลอกรหัสยีนจะมีขึ้นได้ก็ต่อเมื่อต้องมีการเข้าทำปฏิกิริยาอย่างแข็งแรงระหว่าง AF1 กับ AF2 นอกจากนี้ยังมีส่วนที่เกี่ยวข้องด้วยกับการลอกรหัสคือ cofactors ที่ประกอบด้วย สารประกอบที่ควบคุมการเปลี่ยนแปลงโครมาติน (chromatin-remodeling complexs) สารที่ช่วยกระตุ้น (coactivators) สารที่ช่วยยับยั้ง (corepressors) สำหรับสารที่ช่วยกระตุ้นมักจะไม่เข้าไปจับกับดีเอ็นเอแต่จะเข้าไปร่วมในส่วนของ promoters ของยีนเป้าหมายโดยผ่านอันตระกิริยาระหว่างโปรตีนกับ ER ตัวอย่างของสารที่ช่วยกระตุ้น ER เช่น สารที่เป็นสมาชิกในกลุ่ม p160/SRC (steroid receptor coactivator)

(Batsch *et al.*, 2005) ได้แก่ SRC1/NCoA1 (nuclear receptor coactivator-1) (Girault *et al.*,2006), NCoA2 (Lo and Matthews, 2010), NCoA3/AIB1/TRAM1/RAC3 (Urruticoechea, 2007), สารที่เป็น cointegrators ได้แก่ CBP (CREB-binding protein) และ p300 (Chakravarti *et al.*, 1996; Goodman and Smolik, 2000) นอกจากนี้ยังมีโปรตีนในตระกูล CITED (CBP/P300-interacting transactivator with Glu/Asp-rich carboxy-terminal domain) สำหรับโปรตีนที่เป็น corepressors เช่น NCoR (nuclear receptor co-repressor) (Baek *et al.*, 2002) และ MTA1 (metastasis associated-1) (Kumar *et al.*, 2002) เป็นกลุ่มที่เกี่ยวข้องในการทำให้ยีนหยุดทำงานโดยหยุดการลอกรหัส (transcriptional silencing) มีสารบางตัวที่ทำหน้าที่ได้ 2 อย่าง คือเป็นทั้ง coactivators และ corepressors ของ ER คือ PELP1 (proline glutamic acid-rich nuclear protein) ซึ่งเรียกเป็น bifunctional coregulators (Mishra *et al.*, 2003) ในวิถีที่เป็นที่รู้จักกันดีแต่เดิมนี้จะสามารถเริ่มต้นการตอบสนองต่อการกระตุ้นของฮอร์โมนได้ก็ต่อเมื่อมีความสมดุลย์ของโปรตีนทั้งหลายที่ทำหน้าที่เป็น receptors, coactivators และ orepressors เหล่านี้ ความเข้มข้นของโมเลกุลเหล่านี้มีลักษณะความเฉพาะเจาะจงต่อเซลล์ จึงเป็นกระบวนการที่ต้องใช้เวลาพอสมควรอาจเป็นชั่วโมงหรือหลายชั่วโมง ฮอร์โมนเพศที่เป็นสารสเตอรอยด์สามารถมีหน้าที่ได้แตกต่างกันหลากหลายมากในเนื้อเยื่อต่างกันของสิ่งมีชีวิตแต่ละตัว กลไกอันที่สองของการมีปฏิกิริยาในวิถีที่รู้จักกันดีแต่เดิมนี้เกี่ยวข้องกับอัตระกิริยาระหว่างโปรตีน ซึ่งเกิดโดยการที่มีสารประกอบระหว่าง ER-ligand เข้าทำปฏิกิริยากับ transcription factors เช่น NF-KappaB (nuclear factor-KappaB), activator protein-1 และ SP1 (specific protein-1) ทำให้มีผลต่อการลอกรหัสยีน (Moggs and Orphanides, 2001)

ER ที่มีตำแหน่งอยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์และไซโตพลาสซึม ยังมีส่วนเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ nongenomic effects ของเอสโตรเจน ซึ่งโดยปกติจะเกิดเร็วมากจนไม่สามารถนำมาเทียบกับการสั่งการโดยการลอกรหัสยีนและการสร้างโปรตีน (Simoncini *et al.*, 2003) และมักจะเกิดขึ้นโดยใช้เวลาเป็นวินาทีถึงไม่กี่นาที การส่งสัญญาณเป็นเครือข่ายเหล่านี้ใช้ตัวสัญญาณระดับที่สอง (secondary messengers) คือ NO (nitric oxide) (Haynes et al., 2000), RTKs (receptors tyrosine kinases), GPCRs (G-protien-coupled receptors) และ protein kinases ได้แก่ *PI3K* (phosphatidyl-inositol-3-kinase), serine-threonine kinase เช่น *Akt* (Lee *et al.*, 2005; Guo *et al.*, 2006), โปรตีนในกลุ่ม *MAPK* (mitogen-activated

protein kinase) (Song *et al.*, 2002) และ *PKA* และ *PKC* (protein kinase) (Vasudevan *et al.*, 2001) นอกจากนี้ estrogen ยังมีบทบาทต่อต้านการตายแบบ apoptosis โดยผ่านการกระตุ้น GPCRs ผ่านลำ *Akt* pathway การกระตุ้นเครือข่าย *MAPK* (Borgeest *et al.*, 2002; Prossnitz *et al.*, 2007) จะทำให้เกิดปฏิกิริยาที่ตามมามากมายในไซโตพลาสซึม หรืออาจเป็นการลอกรหัสที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาของ AF1 (Lorenzo, 2003) หลังจากมีการรวมตัวกับ ligands แล้ว ER จะชักนำให้มีการ phoshorylaion ต่อโมเลกุลของ adaptor proteins เช่น Src และ SHC (SH2 containing protein) ทำให้มีสารประกอบของ SHC-GRB2-SOS (GRB2= growth factor receptor binding protein-2) ซึ่งต่อมาก็จะไปกระตุ้น Ras, Raf และ MAPKs (ได้แก่ ERK1/2 (extracellular signal regulated kinases), JNK (c-Jun N terminal kinase) และ p38) แล้วมีการเคลื่อนตัวเข้าไปอยู่ภายในนิวเคลียส และเข้าไปมีบทบาทในการลอกรหัสยีน นอกจากนี้ MAPKs ยังสามารถช่วยเร่งการเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ serine 118 ของ ER โดยตรง (Rayala *et al.*, 2006) และทำให้เพิ่มประสิทธิภาพการลอกรหัสยีนของ ER สำหรับ RSK (p90 ribosomeal-S6-kinase) ซึ่งเป็นเป้าหมายทางปฏิกิริยาต่อเนื่องของ MAPK ก็สามารถเติมหมู่ฟอสเฟตให้แก่ ER ด้วยเช่นกัน แต่เป็นที่ในตำแหน่ง serine-167 (Yamashita *et al.*, 2005) ซึ่งก็ส่งผลต่อประสิทธิภาพการลอกรหัสยีนแก่ ER เช่นกัน ในเซลล์มะเร็งเต้านมและมะเร็งต่อมลูกหมาก การให้เอสโตรเจนจะไปกระตุ้นวิถี Src-Ras-ERK ทำให้เซลล์ดำเนินไปในวัฏจักรเซลล์ (Wong *et al.*, 2002) ERs ที่ได้รับการกระตุ้นจะส่งสัญญาณไปยัง *PI3K* และ *Akt* ให้เข้าไปกระตุ้น eNOS (nitric oxide synthase) ซึ่งจะไปเร่งให้มีการปล่อย NO ออกมา ผลต่อร่างกายของสิ่งมีชีวิตก็คือทำให้มีการคลายตัวของเส้นเลือดในบริเวณนั้น (Hisamoto *et al.*, 2001) ซึ่งในกรณีที่เป็นเส้นเลือดที่มีสุขภาพดี การหลั่ง NO ก็เป็นการป้องกันการเส้นเลือดนั่นเอง (Iwakura *et al.*, 2003) นอกจากนี้ *Akt* ยังสามารถเติมหมู่ฟอสเฟตโดยตรงให้แก่ ER ได้ ผลก็คือไปเร่งให้มีการลอกรหัสยีนที่เป็นอิสระจากลิแกน (ligand-independent transcription) ของยีนที่ตอบสนองต่อเอสโตรเจน (Simoncini *et al.*, 2003)

เอสโตรเจนมีบทบาทด้านหลักในการสืบพันธุ์ และมักจะได้รับการอ้างถึงว่าเป็นฮอร์โมนเพศหญิงหรือเพศเมียที่ทำให้มีการเจริญของเด็กหญิงไปเป็นสาววัยรุ่นที่เจริญพันธุ์ได้ ปัจจุบันนี้เอสโตรเจนไม่ได้รับการชี้ชัดว่าเป็นเพียงฮอร์โมนของเพศหญิงเท่านั้น แต่ยังได้รับความสนใจว่าเป็นฮอร์โมนประเภทสเตอรอยด์ที่สามารถทำหน้าที่ได้ทั้งในเพศหญิง

และเพศชาย นอกจากบทบาทด้านหลักในการสืบพันธุ์แล้ว เอสโตรเจนยังมีฤทธิ์ต่อหัวใจ หลอดเลือด กระดูก ระบบภูมิคุ้มกัน และระบบประสาท และยังมีบทบาทในการกระตุ้นให้มีการเริ่มต้นและการดำเนินไปของมะเร็งเต้านมและโรคกระดูกพรุน (Driggers and Segars, 2002) ผลต่อหน้าที่เหล่านี้เป็นไปได้ทั้งโดยผ่าน เอสโตรเจนภายใน (endogenous estrogens) ได้แก่ E1 (estrone), E2 (estrdiol/17-beta estradiol) และ E3 (estriol) กับเอสโตรเจนในรูปแบบสังเคราะห์อื่นๆ (synthetic estrogen) การเจริญที่ได้รับ E2 จากภายนอกในปริมาณสูงจะชักนำให้เกิดความซับซ้อนของการเจริญของโครงสร้างและความผิดปกติของหน้าที่ต่อต่อมที่ช่วยในระบบสืบพันธุ์ต่าง ๆ ซึ่งรวมถึงการลดลงของขนาดของต่อม การแบ่งตัวเพิ่มจำนวนเซลล์มากเฉพาะแห่งของเยื่อบุของต่อม (hyperplasis) การแพร่กระจายออกไปของเซลล์ (metaplasia) และการฝ่อไปของต่อม (dysplasis) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงความไวต่อการกระตุ้นของฮอร์โมน เปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ ERs และ AR (androgen receptor) เปลี่ยนแปลงการเจริญและหน้าที่ของเซลล์ที่ประกอบเป็นเนื้อเยื่อ รบกวนระบบการส่งสัญญาณของ TGF-beta (transforming growth factor beta) ชักนำการทำหน้าที่ของ proto-oncogenes ต่าง ๆ และทำให้เกิดการอักเสบ ในอีกด้านหนึ่ง การได้รับ E2 ในปริมาณน้อยทำให้มีการเพิ่มขนาดของต่อมลูกหมากในผู้ใหญ่ (Mogg and Orphanides, 2001) การให้ความสนใจในระดับกลไกที่ซับซ้อนของการควบคุมโดยยีนที่เกี่ยวข้องกับเอสโตรเจน ทำให้มีแนวทางที่เป็นไปได้มากมายในการพัฒนายารักษาประกอบตัวยาที่เป็นการออกฤทธิ์แบบเสริมฤทธิ์ (agonists) หรือการออกฤทธิ์แบบต้านฤทธิ์ (antagonists) ในรูปของสารบริสุทธิ์หรือสารผสม ที่รู้จักกันในชื่อ SERM (selective estrogen receptor modulators) (Michael *et al.,* 2007; Signh *et al.*, 2008) ตัวยาที่ต่อต้านเอสโตรเจน เช่น tamoxifen ใช้สำหรับยารักษาและป้องกันมะเร็งเต้านมตัวยานี้ได้รับการเชื่อถือว่าทำหน้าที่ต่อต้านเนื้องอกโดยการเข้าไปยับยั้งปฏิกิริยาของ ER ในเซลล์มะเร็ง (Paech *et al.,* 1997)

สำหรับยีน *SULT1E1* และ *TFRC* มีรายละเอียดสังเขปซึ่งขอนำมาแสดงในที่นี้ คือ *SULT1E1* เป็นยีนที่เข้ารหัสเอนไซม์ estrogen sulfotransferase (Bernier *et al.,* 1994) ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่มที่เป็นตัวเร่ง ให้มีการเข้าจับของหมู่ซัลเฟตกับฮอร์โมนหลายชนิด สารสื่อประสาท ยาและสารประกอบที่เป็น xenobiotic เอนไซม์กลุ่มนี้พบในไซโตพลาสซึมของเซลล์ และมีความจำเพาะของชนิดที่กระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อต่างๆ และมีความจำเพาะต่อสาร

ตั้งต้นอีกด้วย โครงสร้างของยีน (คือจำนวนและความยาวของแอคซอน) นั้นมีความใกล้เคียงกันในเอนไซม์กลุ่มนี้ ยีนนี้เข้ารหัสเอนไซม์ที่นำส่วนที่เป็นซัลโฟ (sulfo) เข้าสู่หรือออกจากส่วน estrone ดังนั้นจึงมีส่วนในการควบคุมระดับของ estrogen receptors (Weinshilboum *et al.,* 1997; Glatt *et al.*, 2001) สำหรับ *TFRC* เป็นยีนที่เข้ารหัสโปรตีนตัวรับ transferring receptor (หรืออาจเรียก TfR) มีหลายตัวที่รู้จักกันในปัจจุบัน (Kawabata *et al.,* 2000) เช่น TfR1 และ TfR2 สำหรับ TfR1 หรือ CD71 (cluster of differentiation) เป็นโปรตีนที่แทรกตัวบนเยื่อหุ้มเซลล์ สามารถเข้าทำปฏิกิริยากับโปรตีนสองกลุ่มคือ transferring (Tf) และ hemochromatosis ซึ่งเกี่ยวข้องกับการลำเลียงเหล็กของเซลล์ (Lawrence *et al.,*1999; Bennett *et al.*, 2000) และเหล็กเป็น cofactors ที่สำคัญสำหรับเอนไซม์ ribonucleotide reductase ที่เซลล์ใช้ในการเปลี่ยน ribonucleotide ไปเป็น deoxyribonucleotides ซึ่งมีความจำเป็นสำหรับการแบ่งตัวของเซลล์ การแสดงออกของ TFRC เพิ่มขึ้นในเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนทั้งในเซลล์ปกติและเซลล์มะเร็ง (Chitambar *et al.*, 1983) การแสดงออกที่มากกว่าปกติพบในเซลล์มะเร็งหลายๆ แบบ เช่น มะเร็งของเซลล์ประสาท เซลล์ตับอ่อน และเซลล์ลำไส้ใหญ่ (Szekeres *et al.,* 2002; Ryschich *et al.*, 2004) ดังนั้นจะเห็นว่า *TFRC* ไม่ได้เกี่ยวข้องโดยตรงกับการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจน แต่อาจเป็นส่วนหนึ่งของการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนได้หากการออกฤทธิ์นั้นเป็นผลทำให้มีการแบ่งเซลล์

นอกจากนี้สารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนยังสามารถไปกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนเช่นเดียวกัน โดยการยับยั้ง Epidermal growth factor receptor (EGFR) เป็น receptor tyrosine protein kinase (RTK) ที่มีความสำคัญในการควบคุมการเจริญเติบโตของเซลล์ (cell growth) และการอยู่รอดของเซลล์ (survival) (Zhao *et al.,* 2008; Shah and Faridi, 2011) EGFR เป็นตัวรับกลุ่ม *ErbB* ประกอบด้วย *Her1, Her2, Her3* และ *Her4* สามารถถูกกระตุ้นได้ด้วยตัวกระตุ้นหลายชนิด คือ epidermal growth factor (EGF), transforming growth factor-α (TGF-α), heparin-binding EGF, amphiregulin, betacellulin, epiregulin และ neuregulin สารหรือฮอร์โมนเหล่านี้กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็งผ่านทางหลายวิถีสัญญาณ เช่น phosphoinositide 3-kinase (*PI3K*)-*Akt,* mitogen-activated protein kinase (*MAPK*) (วีรพล และคณะ, 2552) ดังที่ได้กล่าวมาข้างต้นในการทดลองครั้งนี้จึงได้ทำการเลือกที่จะศึกษายีน *PI3K* และ *Akt* ด้วยเหตุผลที่ว่าถ้าหากสารมาตรฐานที่นำมาทดสอบไม่

มีการแสดงออกโดยผ่าน estrogen receptor แล้วจะมีการแสดงออกโดยผ่านวิถี EGFR หรือไม่ เนื่องจาก EGF เมื่อเข้ามาจับกับ receptor จะเกิด dimerization ตามด้วย autophosporylation ของส่วนเอนไซม์ใน cytoplasm เอนไซม์จะทำการ phosphorylation เอนไซม์ที่มีโครงสร้าง SH-2 domain โดยผ่านวิถี *PI3K* และ *Akt* หรืออาจผ่านวิถีอื่น *MAPK* เกี่ยวกับการอยู่รอดและแบ่งตัวของเซลล์ ถ้าหากผ่านวิถีนี้ (Nakamura *et al.*, 2003) ทั้งนี้การอยู่รอดของเซลล์ขึ้นอยู่กับการแสดงออกของยีน *PI3K* และ *Akt* ที่นำมาศึกษาว่าเมื่อได้รับสารตัวอย่างแล้วจะมีระดับการแสดงออกของยีนมากหรือน้อย นอกจากนี้ยีน *TFRC* ยังเกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์ที่ส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์หรือการอยู่รอดของเซลล์ โดยมีหน้าที่หลักเกี่ยวกับการส่งสัญญาณภายในเซลล์การแบ่งตัว รวมทั้งการกระตุ้น oncoprotein ให้ทำงานด้วย เช่น *p-53, Her2* และ *BcrAbI* ให้ทำงาน (Prouillac and Lecoeur, 2010) โดยส่วนใหญ่แล้วมีรายงานวิจัยจำนวนมากที่พยายามศึกษาการยับยั้งของยีน *TFRC* เนื่องจากเป็นวิธีที่สามารถยับยั้งการเติบโตของเซลล์มะเร็งได้ (Kapoor and Sheng, 2007) แต่ในงานวิจัยนี้มีแนวคิดที่แตกต่างจากงานรายงานดังกล่าว เนื่องจากสารที่นำมาทดสอบเป็นสารที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโตของเซลล์ได้ ดังนั้นถ้าหากมีการแสดงออกของยีนนี้มากแสดงให้เห็นว่ามีสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวน

กล่าวโดยสรุปสำหรับยีนที่ใช้ในงานวิจัยนี้ คือ *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เพื่อตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน สามารถแยกออกเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มแรก *ERα* และ *SULT1E1* แสดงฤทธิ์เมื่อมีการกระตุ้นผ่าน ER ของเซลล์โดยตรง แต่ไม่สามารถบอกได้ว่าการกระตุ้นนั้นจะส่งผลผ่านไปทางกลไกการออกฤทธิ์ใดๆ ภายในเซลล์ กลุ่มที่สอง คือ *ERα, Akt* และ *PI3K* แสดงการกระตุ้นของเอสโตรเจนหรือสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ผ่าน ER ไปในวิถีที่ไม่ใช่รู้จักกันดีแต่เดิม (nonclassical pathway) ซึ่งก็คือวิถีที่ไม่ผ่านกระบวนการควบคุมของยีน (nongenomic effects) นั่นเอง และโดยปกติแล้วเมื่อมีการกระตุ้นผ่าน ER แล้ว *Akt* และ *PI3K* มักจะแสดงออก (คือเพิ่มขึ้นหรือลดลง) ไปในลักษณะเดียวกัน และสุดท้ายคือกลุ่ม *Akt, PI3K* และ *TFRC* มีการแสดงออกได้แม้ว่าจะไม่มีการกระตุ้นผ่าน ER ก็ตาม ดังนั้นเพื่อให้กระชับและสามารถเข้าใจได้ง่าย การวิจารณ์ผลงานวิจัยนี้จะพิจารณาประเด็นตามกลุ่มของการแสดงฤทธิ์ของยีนทั้งสามกลุ่มนี้ (ดังภาพ 5.1)

ด้วยข้อสรุปและเหตุผลที่ได้กล่าวไว้เบื้องต้นดังนั้นในการตรวจสอบการแสดงออก (expression) ของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของสารมาตรฐาน E2, aldrin และ endrin ที่นำมาตรวจสอบการออกฤทธิ์ในเซลล์ MCF-7 โดยยีนที่นำมาศึกษามีข้อพิจารณาตามกลุ่มของการแสดงออกของยีน คือ กลุ่มแรกเป็นยีนที่แสดงออกโดยผ่านวิถีเอสโตรเจน (estrogen pathway) ที่มีตัวรับเอสโตรเจน (estrogen receptor; ER) (Wang and Phang, 1995; Cui *et al.*, 2004) ได้แก่ *ERα* และ *SULT1E1* ถ้าหากมีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้สูงกว่า *β*-actin แสดงว่าสารดังกล่าวมีการออกฤทธิ์โดยการกระตุ้นผ่าน ER ของเซลล์โดยตรงส่งผลให้เซลล์แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น ในส่วนของกลุ่มที่สอง ได้แก่ ยีน *ERα, Akt* และ *PI3K* ถ้าหากมีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้มากก่ว่า *β*-actin แสดงให้เห็นสารที่นำมาทดสอบการออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนโดยผ่านไปในวิถีที่ไม่ผ่านกระบวนการควบคุมของยีน (nongenomic effects) แล้วส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน และในกลุ่มสุดท้าย คือ ถ้าหากมีการแสดงออกของยีน *Akt, PI3K และ TFRC* ถ้าหากมีการแสดงออกของยีนกลุ่มนี้สูงกว่า *β*-actin แสดงให้เห็นว่าอาจไม่มีการออกฤทธิ์ของสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบโดยผ่าน ER (Zhao *et al.*, 2008)

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เมื่อเปรียบเทียบกับยีน *β*-actin ที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนและ ยีนที่ไม่ได้ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนดังที่ได้กล่าวไปแล้วเบื้องต้น เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของสารมาตรฐาน E2, aldrin และ endrin ที่นำมาตรวจสอบการออกฤทธิ์ในเซลล์ MCF-7 เมื่อพิจารณาการออกฤทธิ์ของสารทั้ง 3 ชนิด แล้วพบว่า มีการแสดงออกของยีนใดยีนหนึ่งที่สูงกว่า *β*-actin จึงจะถือว่าเป็นการแสดงออกของยีนที่มากกว่าปกติ (วีรพลและคณะ, 2552; Shah and Faridi, 2011)

จากการตรวจสอบยืนยันผลการออกฤทธิ์ของ aldrin ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 250 nM โดยใช้เทคนิค semiquantitative reverse transcriptase PCR พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ERα* และ *Akt* สูงกว่า *β*-actin แสดงให้เห็นว่ามีการส่งสัญญาณผ่าน classical pathway โดยไม่ผ่านวิถีของ EGFR อาจเป็นไปได้ว่าในการทดลองครั้งนี้การที่คงเหลือสารกระตุ้นการเจริญอยู่ในซีรั่มจึงส่งผลให้ยีน *Akt* มีการแสดงออกสูงกว่า *β*-actin อีกด้วย แต่เมื่อนำมาวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติแล้วการแสดงออกของยีน *Akt* กับ *β*-actin ไม่มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ในขณะเดียวกันก็มีการแสดงออกของยีน

SULT1E1 ที่ต่ำกว่า β-actin แสดงให้เห็นว่า การออกฤทธิ์ของ aldrin ในเซลล์ MCF-7 โดยผ่านวิถี serine/threonin protein kinase แทนที่จะผ่านวิถี sulfotransferase แล้วกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวน อาจจะเป็นไปได้ว่าอาจจะผ่าน estrogen receptor แล้วส่งสัญญาณบางอย่างให้เกิดการแสดงออกของยีน *Akt* ทำงานร่วมกันส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวนก็เป็นไปได้ (Skeen *et al.*, 2006) นอกจากนี้ในการทดลองครั้งนี้ยังมีระดับการแสดงออกของยีน *PI3K* ที่น้อยกว่า β-actin ซึ่งเป็นผลที่ช่วยยืนยันได้ว่า aldrin ไม่ได้มีการออกฤทธิ์โดยผ่าน EGFR (Chang *et al.*, 2009)

จากการตรวจสอบยืนยันผลการออกฤทธิ์ของ endrin ต่อเซลล์ MCF-7 ที่ระดับความเข้มข้น 1,000 nM พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ERα* และ *Akt* สูงกว่า β-actin แสดงให้เห็นว่ามีการแสดงฤทธิ์ผ่านวิถี classical pathway เช่นเดียวกับ aldrin โดยไม่ผ่าน EGFR บนผิวเซลล์ โดยมีการแสดงของทุกยีนในระดับที่คล้ายกับ aldrin เกือบทุกยีนยกเว้น *TFRC* ที่มีระดับการแสดงออกของยีนสูงกว่า *SULT1E1* ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Kapoor and Sheng, (2007) ที่ได้ศึกษาการแสดงออกของยีน *TFRC* และ *SULT1E1* ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากแล้วพบว่า เมื่อมีการแสดงออกของยีน *TFRC* สูงขึ้นกลับมีการแสดงออกของยีน *SULT1E1* ลดลงส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน อาจจะเป็นไปได้ว่าในการแสดงออกของยีน *TFRC* จะเพิ่มสูงขึ้นนั้น อาจจะผ่าน receptor อื่นแล้วส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน (Bulayeva and Watson, 2004)

จากการตรวจสอบยืนยันผลการออกฤทธิ์ของ E2 ต่อเซลล์ MCF-7 ซึ่งเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนชนิดหนึ่ง พบว่า เมื่อเซลล์ได้รับ E2 ที่ความเข้มข้น 10^{-4} M ส่งผลให้มีระดับการแสดงออกของยีน *ERα* สูงกว่า β-actin แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์ของ E2 โดยผ่านวิถีแบบ classical pathway โดยเข้าไปจับกับ receptor ที่อยู่ภายในเซลล์เป็นการเริ่มต้นของกระบวนการส่งสัญญาณให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวน ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chang *et al.* (2009) ที่พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ERα* ในเซลล์ MCF-7 เมื่อทดสอบด้วย E2 โดยมีระดับการแสดงออกของยีนผ่าน estrogen receptor (ER) ซึ่งมวลโมเลกุลของ E2 จะไปจับกับ ER เกิดเป็น E2-ER complex จากนั้นส่งสัญญาณให้การถอดรหัส (transcription) และแปลรหัส (translation) ของ ER mRNA ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้น นอกจากนี้ระดับการแสดงออกของยีน *PI3K* ของการทดลองนี้ก็ สูงกว่า β-actin เพียงแค่ 0.14 เท่านั้นซึ่งไม่ถือว่าแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งถือว่าระดับการแสดงออกของยีนนี้อยู่ในระดับ

ปกติ นอกจากยีน *PI3K* แล้วยังมียีน *Akt* และ *TFRC* ที่มีระดับการแสดงออกของยีนที่ต่ำกว่า β-actin แสดงให้เห็นการออกฤทธิ์ของ E2 ไม่ผ่าน EGFR (Chan *et al.*, 2005; Hennessy *et al.*, 2005)

5.2 การตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ

หลังจากที่ได้พัฒนากระบวนการใช้เซลล์บางชนิดแล้ว จึงนำกระบวนการที่พัฒนาได้มาตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล รายละเอียดผลการตรวจสอบดังนี้

5.2.1 การศึกษาความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำธรรมชาติ

จากผลการทดสอบเซลล์ MCF-7 ด้วยตัวอย่างน้ำทิ้งฟาร์มสุกรน้ำทิ้งฟาร์มวัว, น้ำทิ้งฟาร์มกบ และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยเหตุผลที่ว่าฟาร์มดังกล่าวมีการปล่อยน้ำทิ้งลงสู่แหล่งน้ำโดยตรงส่งผลให้เกิดการปนเปื้อนของน้ำทิ้งเหล่านี้ลงสู่แหล่งน้ำ ซึ่งงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเก็บตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มโดยตรง แทนที่จะเก็บตัวอย่างในแหล่งน้ำ ด้วยเหตุผลที่ว่า ถ้าหากเก็บตัวอย่างน้ำมาจากแหล่งน้ำโดยตรงอาจจะมีปริมาณสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่น้อยมาก จนไม่สามารถวัดการออกฤทธิ์ในเซลล์ได้ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงเลือกตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ในน้ำทิ้งฟาร์มปศุสัตว์โดยตรง ซึ่งคาดว่าจะมีความเข้มข้นที่สูง เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นเพียงการพัฒนากระบวนการ เพื่อนำไปสู่การพัฒนาในลำดับขั้นต่อไปในอนาคต ซึ่งในที่นี้จะขอกล่าวรายละเอียดพอสังเขปดังนี้

หากพิจารณาผลของน้ำทิ้งจากฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว และ ฟาร์มกบ ที่มีต่อเซลล์ MCF-7 ในการทดลองนี้แสดงให้เห็นแนวโน้มของการตอบสนองไปในลักษณะคล้ายกัน คือเมื่อได้รับความเข้มข้นของตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว และ ฟาร์มกบ ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน โดยมีการออกฤทธิ์เป็นด้านเดียว กระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนที่ความเข้มข้น 10 ถึง 10^{-10} µl/ml แต่อาจเป็นไปได้ว่าหากใช้ความเข้มข้นมากกว่า 10 µl/ml อาจมีการออกฤทธิ์ของตัวอย่างน้ำดังกล่าวเป็นแบบสองด้าน (biphasic) ซึ่งในการทดลองครั้งนี้ได้มีแนวคิดในตอนเริ่มต้นว่าต้องการความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ของสารพิษอื่นที่

ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์ ด้วยเหตุผลดังกล่าวจึงได้เริ่มความเข้มข้นเริ่มต้น 10 µl/ml ซึ่งผลปรากฏว่าไม่แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ จึงมีความเป็นไปได้ว่า สารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในน้ำทิ้งจากฟาร์มสุกร, ฟาร์มวัว และ ฟาร์มกบ มีความเข้มข้นของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่น้อย จนไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ซึ่งต่างจากน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ซึ่งแสดงความเป็นพิษที่ระดับความเข้มข้น 10 µl/ml ดังนั้นหากต้องการศึกษาความเป็นพิษของตัวอย่างน้ำฟาร์มปศุสัตว์ ควรเพิ่มความเข้มข้นให้มากกว่า 10^{-4} µl/ml ควรมีงานวิจัยต่อไปในอนาคต แต่ในกรณีของน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลที่มีการออกฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic) โดยค่าความเข้มข้น 10^{-4} µl/ml เป็นจุดเปลี่ยนปฏิกิริยาที่ออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไปด้านใดด้านหนึ่ง อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานวิจัยที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับการออกฤทธิ์ของตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในเซลล์ MCF-7 หรือเซลล์อื่น ๆ ว่าสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจน โดยส่วนใหญ่แล้วงานวิจัยจำนวนมากได้รายงานถึงการตรวจหาปริมาณเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในแหล่งน้ำของประเทศต่าง ๆ โดยใช้วิธีทางเคมี ได้แก่ Barronti *et al.* (2000) ได้ตรวจพบระดับการปนเปื้อนของเอสโตรน (E1) เอสตร้าไดออล (E2) และเอสไตรออล (E3) มีค่าประมาณ 52, 12 และ 80 ng/L ตามลำดับ ในประเทศอิตาลี Ternes *et al.* (1999) ได้ตรวจพบระดับการปนเปื้อนของเอสโตรเจนในน้ำทิ้งที่เข้าสู่ระบบบำบัดน้ำเสียแห่งหนึ่งในประเทศบราซิลพบว่าความเข้มข้นของเอสโตรน (E1) และเอสตร้าไดออล (E2) มีค่าประมาณ 40 และ 21 ng/L ตามลำดับ นอกจากนี้ Nasu *et al.* (2000) ได้ตรวจพบปริมาณเอสโตรเจนในน้ำทิ้งก่อนเข้าระบบบำบัดน้ำเสียในประเทศญี่ปุ่น พบว่าความเข้มข้นของ เอสตร้าไดออล (E2) ในน้ำมีค่าประมาณ 30 ถึง 90 นาโนกรัมต่อลิตรในฤดูใบไม้ร่วง และประมาณ 20 ถึง 94 ng/L ในฤดูร้อน จากรายงานวิจัยดังที่ได้กล่าวไว้เบื้องต้นยังไม่มีรายงานวิจัยใดที่ได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในระดับเซลล์

5.2.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในฟาร์มปศุสัตว์และ

น้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ในที่นี้ขอกล่าวรายละเอียดพอสังเขปดังนี้

จากการตรวจสอบยืนยันผลการออกฤทธิ์ของน้ำทิ้งฟาร์มสุกรและฟาร์มกบ ต่อเซลล์ MCF-7 พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *ERα* สูงกว่า β-actin แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์โดยผ่านวิถีเป็นแบบ classical pathway ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน แต่ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *PI3K, Akt* และ *TFRC* มีระดับการแสดงออกของยีนที่ต่ำกว่า β-actin แสดงให้เห็นถึงการออกฤทธิ์การออกฤทธิ์ของน้ำทิ้งฟาร์มสุกรโดยไม่ผ่านวิถี nonclassical pathway ในกรณีการออกฤทธิ์ของน้ำทิ้งฟาร์มวัว มีระดับการแสดงออกของยีน *Akt* สูงกว่า β-actin (วีรพลและคณะ, 2552) และในขณะเดียวที่ระดับการแสดงออกของยีน *ERα, SULT1E1, TFRC* และ *PI3K* ต่ำกว่า β-actin แสดงให้เห็นว่ามีการออกฤทธิ์ที่ไม่ใช่ ER แล้วส่งสัญญาณให้ *Akt* ส่งผลเซลล์เพิ่มจำนวน และการออกฤทธิ์ของน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ต่อเซลล์ MCF-7 โดยการวัดแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* ทั้งยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนและยีนที่ไม่ได้ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนดังที่ได้กล่าวไว้แล้วเบื้องต้น พบว่าการออกฤทธิ์ของสารที่ปนเปื้อนในน้ำเสียบ่อบำบัด ที่ความเข้มข้น 10 µl/ml พบว่าส่งผลให้มีระดับการแสดงออกของยีน *TFRC* สูงกว่า β-actin แสดงให้เห็นว่าการออกฤทธิ์โดยผ่านวิถี transferring receptor ที่เป็นแบบกลุ่มยีนที่ออกฤทธิ์โดยไม่ผ่าน ER ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน (Kapoor and Sheng, 2007; Martin *et al.*, 2005) ในขณะที่มีการแสดงออกของยีน *ERα* และ *SULT1E1* ที่ต่ำกว่า β-actin แสดงให้เห็นว่าไม่มีการออกฤทธิ์ผ่าน estrogen receptor ในการทดลองนี้ (ดังภาพ 5.1)

5.3 การตรวจสอบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด

หลังจากที่ได้พัฒนากระบวนการใช้เซลล์บางชนิดแล้ว จึงนำกระบวนการที่พัฒนาได้มาตรวจสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด ในที่นี้ขอกล่าวรายละเอียดพอสังเขปดังนี้

5.3.1 การศึกษาความเข้มข้นของผลิตภัณฑ์ที่ใช้อุปโภคบริโภคในชีวิตประจำวันบางชนิด

จากผลการทดสอบเซลล์ MCF-7 ด้วยสมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดกวาวเครือขาว น้ำใบบัวบก และ น้ำมะพร้าวอ่อน ด้วยเหตุผลที่ว่าตัวอย่างเหล่านี้เป็นเครื่องใช้อุปโภคบริโภคที่ใช้ในชีวิตประจำวัน หากมีการปนเปื้อนของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในปริมาณอาจส่งผลต่อสุขภาพของมนุษย์โดยตรง เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นให้ตระหนักถึงสารออกฤทธิ์นี้ ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมีแนวคิดว่าควรเลือกตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่มีการใช้กันเป็นประจำมาทดสอบสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในเซลล์ MCF-7 ซึ่งในที่นี้ขอกล่าวรายละเอียดสังเขปโดยรวมดังนี้

หากพิจารณาผลของสมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดกาวเครือขาว และน้ำมะพร้าวอ่อน ในการทดลองนี้แสดงแนวโน้มการตอบสนองไปในลักษณะคล้ายกันแสดงการออกฤทธิ์เป็นสองด้าน (biphasic) ยกเว้นตัวอย่างน้ำใบบัวบกที่มีการออกฤทธิ์เพียงด้านเดียว แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ คือเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นเซลล์มีจำนวนลดลง ในกรณีของสารสกัดกวาวเครือขาวสอดคล้องกับงานวิจัยของ Wichai *et al.* (2008) ที่พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดกวาวเครือขาวที่ระดับความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 100 และ 1000 µg/ml สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ โดยการออกฤทธิ์เป็นแบบด้านเดียว ซึ่งต่างจากการทดลองนี้ที่มีการออกฤทธิ์เป็นแบบสองด้าน (biphasic) อาจจะเป็นเพราะงานวิจัยของ Wichai *et al.* (2008) ใช้ช่วงของความเข้มข้นที่แคบ ส่งผลให้เห็นการออกฤทธิ์เพียงด้านเดียว ซึ่งต่างจากการทดลองนี้ที่ใช้ช่วงของความเข้มข้นที่กว้าง ทำให้สามารถเห็นแนวโน้มการออกฤทธิ์เป็นสองด้าน นอกจากนี้ ปริชาติ, (2547) ได้ศึกษาผลของสารสกัดกวาวเครือขาวต่อประสิทธิภาพการผลิตระดับฮอร์โมน E2 ในซีรั่มและต่อม้ามของไก่กระทง พบว่าการให้กวาวเครือขาวมีผลต่อประสิทธิภาพการผลิต ระดับฮอร์โมน E2 ในซีรัมและต่อม้ามของไก่กระทง แต่การใช้กวาวเครือขาวในขนาดไม่เกิน 300 ppm จะเห็นได้ว่างานวิจัยดังกล่าวได้ศึกษาในสัตว์ทดลองแสดงให้เห็นว่าการรับปริมาณของสารสกัดกาวเครือขาวที่เหมาะสมสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจน นอกจากนี้ยังมีรายงานวิจัยที่ได้ศึกษาองค์ประกอบของสารสกัดกวาวเครือขาวที่มีฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน ได้แก่ Chansakaow *et al.* (2000) ได้ทำการทดสอบความแรงในการออกฤทธิ์เอสโตรเจนของสารบริสุทธิ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากกวาวเครือขาว โดยวิธี HPLC และนำสารบริสุทธิ์มาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเปรียบเทียบความแรงกับสารเอสโตรเจนมาตรฐาน E2

พบว่า สารบริสุทธิ์แต่ละชนิดในกวาวเครือขาวมีความแรงของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยมีค่าความแรงของการออกฤทธิ์ของสารแต่ละชนิดเมื่อเทียบ E2 พบว่ามีมีค่าความแรงของการออกฤทธิ์ของสารตามลำดับ จากค่าความแรงมากไปน้อยดังนี้ E2 มีการออกฤทธิ์ ($>10^{-12}$ M) > deoxymiroestrol (ระหว่าง 10^{-10}-10^{-9} M) > miroestrol (10^{-8} M) > coumestrol และ genistein (10^{-7} M) > daidzein และ kwakhurin (10^{-6}) เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดแบบหยาบ (crude) ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8}-10^{-4} µg/ml กับสารบริสุทธิ์ที่สกัดมาจากกวาวเครือขาวพบว่า สามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนเช่นเดียวกัน ในกรณีของตัวอย่างน้ำใบบัวบก, สมุนไพรบำรุงกำลัง และ น้ำมะพร้าวอ่อน ยังไม่มีรายงานใดที่ได้ทำการศึกษาการออกฤทธิ์ของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนในเซลล์ ในก่ารศึกษาต่อไปในอนาคตควรศึกษาองค์ประกอบของสารตัวอย่างดังกล่าวด้วย เพื่อประสิทธิภาพในการทดลองต่อไปในอนาคต ในกรณีการออกฤทธิ์ของตัวอย่างน้ำมะพร้าวอ่อนที่สามารถออกฤทธิ์เป็นด้านเดียวกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนในการทดลองนี้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ นิซาอูดะห์และคณะ, 2549 ได้ทำการศึกษาผลของน้ำมะพร้าวอ่อน ซึ่งประกอบด้วย phytoestrogen และฮอร์โมนอื่นๆ ต่อหนูที่ทำการตัดรังไข่ออก พบว่าในน้ำมะพร้าวมีฤทธิ์ antagonist effect โดยแย่งจับกับ estrogen receptor ที่ความเข้มข้น 100 มล./กก./วัน มีอัตราแผลหายเร็วกว่าปกติ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยนี้ตรงที่ว่าสามารถแย่งจับกับตัวรับเอสโตรเจนได้แล้วส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวน แต่สิ่งที่แตกต่างก็คือ ระดับความเข้มข้นและสิ่งที่ใช้ในการทดสอบการออกฤทธิ์

5.3.2 การตรวจสอบการแสดงออกของยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจน

จากการตรวจสอบการแสดงออกของยีน *ERα, Akt, PI3K, TFRC* และ *SULT1E1* เพื่อยืนยันการออกฤทธิ์ของผลิตภัณฑ์อุปโภคบริโภคบางชนิด ได้แก่ สมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดกวาวเครือขาวและน้ำมะพร้าวอ่อน ที่นำมาตรวจสอบการออกฤทธิ์ในเซลล์ MCF-7 โดยจะมีการแสดงออกของยีนใดนั้นขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่นำมาทดสอบ

จากผลการแสดงออกของยีนในตัวอย่างสมุนไพรบำรุงกำลัง ต่อเซลล์ MCF-7 ทั้งยีนที่ทำหน้าที่ในวิถีเอสโตรเจนและยังที่ไม่ได้ทำหน้าที่ในวิถีของยีนที่นำมาศึกษา ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่าอาจมีการแสดงออกผ่านวิถีอื่นที่อยู่นอกเหนืองานวิจัยนี้ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปในอนาคตควรศึกษายีนที่เกี่ยวข้องการออกฤทธิ์ในวิถีเอสโตรเจนเพิ่มเติมและใน

กรณีของสารสกัดกวาวเครือขาวที่ความเข้มข้น 10^{-4} µg/ml พบว่ามีระดับการแสดงออกของยีน *ERα* สูงกว่า *β*-actin แสดงให้เห็นว่ามีการออกฤทธิ์โดยผ่านวิถี แบบ classical pathway ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวนมากว่าปกติ ในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Akt, TFRC, SULT1E1* และ *PI3K* มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำกว่า *β*-actin ในกรณีที่ระดับการแสดงออกของยีน *Akt, TFRC* และ *PI3K* ระดับการแสดงออกของยีนต่ำกว่า *β*-actin แสดงให้เห็นว่าไม่มีการแสดงออกของยีนโดยผ่านวิถี EGFR (Smuc and Rizner, 2009; Trowbride and Omary, 1987) โดยการแสดงออกผ่านวิถี estrogen receptor (ER) โดยเข้าไปจับกับ receptor ที่อยู่ภายในเซลล์เป็นการเริ่มต้นของกระบวนการการส่งสัญญาณ อันนำไปสู่การสังเคราะห์โปรตีนและการเพิ่มจำนวนเซลล์ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Chansakaow *et al.* (2000) ได้ทำการทดสอบความแรงในการออกฤทธิ์เอสโตรเจนของสารบริสุทธิ์ต่าง ๆ ที่แยกได้จากกวาวเครือขาว โดยวิธี HPLC และนำสารบริสุทธิ์มาเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ ในเซลล์มะเร็งเต้านม MCF-7 และเปรียบเทียบความแรงกับสารเอสโตรเจนมาตรฐาน E2 พบว่า สารบริสุทธิ์แต่ละชนิดในกวาวเครือขาวมีความแรงของสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนที่แตกต่างกัน โดยมีค่าความแรงของการออกฤทธิ์ของสารแต่ละชนิดเมื่อเทียบ E2 พบว่ามีค่าความแรงของการออกฤทธิ์ของสารตามลำดับ จากค่าความแรงมากไปน้อยดังนี้ E2 มีการออกฤทธิ์ (>10^{-12} M) > deoxymiroestrol (ระหว่าง 10^{-10}-10^{-9} M) > miroestrol (10^{-8} M) > coumestrol และ genistein (10^{-7} M) > daidzein และ kwakhurin (10^{-6}) เมื่อเปรียบเทียบสารสกัดแบบหยาบ (crude)ที่ระดับความเข้มข้น 10^{-8}-10^{-4} µg/ml กับสารบริสุทธิ์ที่สกัดมาจากกวาวเครือขาว พบว่า สามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนแสดงให้เห็นว่าควรศึกษาองค์กระกอบในกวาวเครือด้วยซึ่งอยู่นอกเหนือขอบเขตงานวิจัยนี้และการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของน้ำมะพร้าวอ่อน พบว่ามีการแสดงออกของยีน *ERα* สูงกว่า *β*-actin แสดงให้เห็นว่ามีการออกฤทธิ์โดยผ่านวิถีแบบ classical pathway ส่งผลให้เซลล์เพิ่มจำนวนในขณะที่ระดับการแสดงออกของยีน *Akt, SULT1E1* และ *PI3K* มีระดับการแสดงออกของยีนต่ำกว่า *β*-actin ในกรณีที่ระดับการแสดงออกของยีน *Akt* และ *PI3K* ระดับการแสดงออกของยีนต่ำกว่า *β*-actin แสดงให้เห็นว่าไม่มีการออกฤทธิ์โดยผ่านวิถี serine/theonin kinase หรือ phophoinositide 3-kinase เมื่อพิจารณาระดับการแสดงออกของยีน *TFRC* ที่สูงกว่า *β*-actin

แสดงให้เห็นว่าในน้ำมะพร้าวอ่อนอาจจะมีสารกระตุ้นการเจริญ (growth factor) บางชนิดที่ส่งผลมีการแสดงออกของยีนเพิ่มขึ้น (Martin *et al.,* 2005; Maggioli *et al*., 2001)

เมื่อเปรียบเทียบการออกฤทธิ์ในการยับยั้งการเพิ่มจำนวน ของ E2 กับตัวอย่าง aldrin, endrin, สมุนไพรบำรุงกำลัง, สารสกัดกวาวเครือขาว, น้ำมะพร้าว, น้ำทิ้งฟาร์มสุกร, น้ำทิ้งฟาร์มวัว, น้ำทิ้งฟาร์มกบ, น้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาล พบว่าสามารถออกฤทธิ์ได้คล้าย E2 ถึงแม้ว่าจะผ่านวิถีการออกฤทธิ์ที่แตกต่างกันก็ตาม ซึ่งเป็นฮอร์โมนเอสโตรเจนมาตรฐานที่ได้จากการสังเคราะห์ แต่ออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนในระดับความเข้มข้นที่ต่างกันถึงแม้ว่าสารตัวอย่างจะสามารถออกฤทธิ์ได้คล้ายเอสโตรเจนในการกระตุ้นให้เซลล์เพิ่มจำนวนได้ในระดับความเข้มที่เหมาะสมในแต่ละตัวอย่าง แต่เนื่องจากความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่นำมาทดสอบต่อเซลล์นั้นมีหน่วยของความเข้มข้นที่ต่างกัน เนื่องจากตัวอย่างมาจากแหล่งที่ต่างกันและเป็นสารที่ต่างกลุ่มกัน เช่น ตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่ ที่มีสารที่ปะปนอยู่ในน้ำทิ้งที่ค่อนข้างจะหลากหลาย แต่เราสามารถที่จะประยุกต์ใช้การตรวจสอบการออกฤทธิ์ไปควบคู่กับวิธีการทางเคมีเนื่องจากวิธีการทางเคมีจะสามารถบอกได้ว่ามีปริมาณเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนอยู่ในตัวอย่างน้ำได้ เพื่อให้งานวิจัยมีประสิทธิภาพยิ่งขึ้น

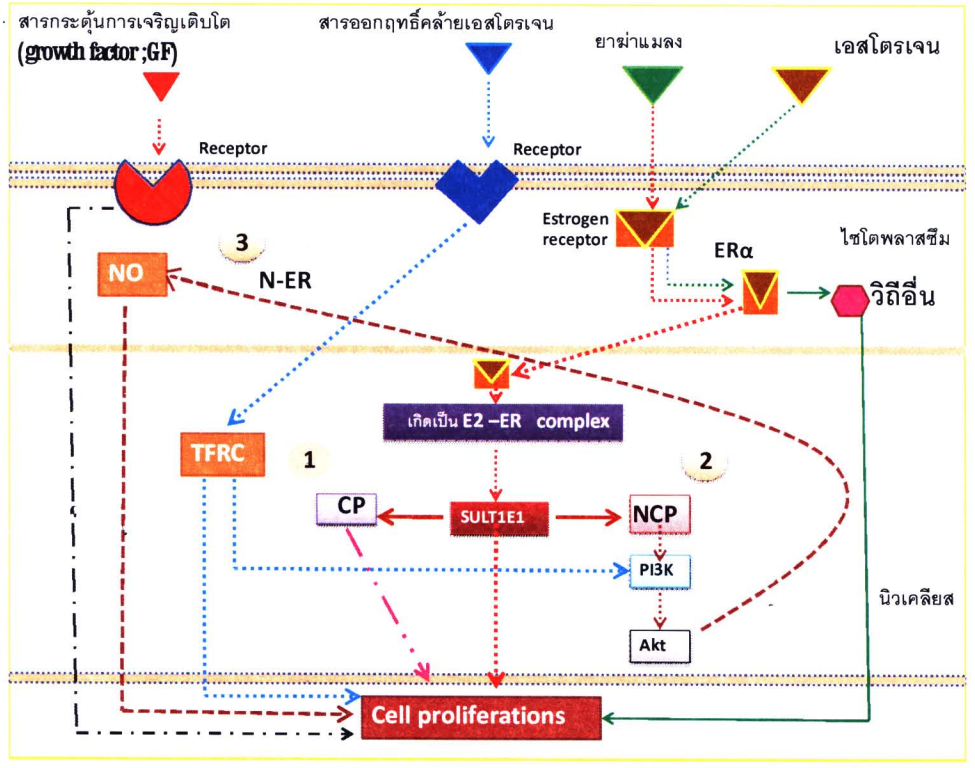
5.4 คุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมีของตัวอย่างน้ำจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลในจังหวัดเชียงใหม่

จากผลการตรวจวัดคุณภาพน้ำของตัวอย่างน้ำทิ้งจากฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัดโรงพยาบาลแห่งหนึ่งในจังหวัดเชียงใหม่ ด้วยเหตุผลที่ว่า คุณภาพน้ำบางประการอาจมีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนที่ปนเปื้อนในฟาร์มปศุสัตว์และน้ำเสียบ่อบำบัด

เมื่อพิจารณาค่าความเป็นกรดด่างของตัวอย่างน้ำทั้งหมดจะอยู่ในช่วง 7.00-8.00 อาจเป็นไปได้ว่าตัวอย่างน้ำที่เก็บมาอาจจะมีการสลายตัวไปบางส่วนแต่ไม่ได้ทั้งหมด ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ วีณา, (2550) ได้ศึกษาได้ศึกษาผลของค่าความเป็นกรดด่างที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจน (E2) ในสารละลายพบว่าเอสโตรเจนสลายตัวได้ต่ำสุดที่ค่าความเป็นกรดด่างเท่า 5 แสดงให้เห็นว่าถ้าความเป็นกรดด่างมากกว่าหรือน้อยกว่า 5 อาจเป็นไปได้ว่าเอสโตรเจนจะสามารถสลายตัวได้สูง นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความเข้มแสงที่มีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนพบว่าความเข้มแสงที่เพิ่มขึ้นจะเป็นการเพิ่มจำนวนโฟตรอนให้มากขึ้นทำให้เกิดปฏิกิริยามากขึ้นแสดงให้เห็นว่า เมื่อ

แสงเพิ่มขึ้นอาจจะส่งผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนได้ ดังนี้ในงานวิจัยนี้จึงได้เก็บตัวอย่างน้ำไว้ในขวดสีชาและทำการทดสอบตัวอย่างทันทีหลังจากการเตรียมตัวอย่างในตู้ปลอดเชื้อแล้ว แต่เมื่อเปรียบเทียบกับอุณหภูมิของทุกตัวอย่างในการทดลองนี้ก็อยู่ในช่วง 28- 30 °C ซึ่งไม่มีความแตกต่างกันมากนัก นอกจากนี้การเปลี่ยนแปลงของอุณหภูมิและปริมาณของออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นในแหล่งน้ำจะส่งผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจนเพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามค่าความต้องการออกซิเจนทางชีวเคมี, ไนเตรท-ไนโตรเจน, แอมโมเนีย-ไนโตรเจน และ ออร์โธฟอสเฟต ยังไม่มีรายงานใดที่ได้ศึกษาว่ามีผลต่อการสลายตัวของเอสโตรเจน ดังนั้นในงานวิจัยครั้งนี้จึงเป็นแนวทางเบื้องต้นที่ทำให้เกิดการพัฒนาเซลล์ในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจน

ดังนั้นในการพัฒนากระบวนการใช้เซลล์ในการตรวจสอบการออกฤทธิ์ของเอสโตรเจนและสารออกฤทธิ์คล้ายเอสโตรเจนควรเก็บตัวอย่างน้ำมาวัดคุณภาพน้ำทางกายภาพและเคมี พร้อมทั้งควรใช้เทคนิคทางเคมีในการตรวจสอบควบคู่ไปด้วยและควรเก็บตัวอย่างจากแหล่งเดียวกันเพื่อให้ง่ายต่อการเปรียบเทียบ



ภาพ 5.1 แสดงการออกฤทธิ์ของสารโดยผ่านวิถีที่เป็นทราบกันดีแล้วแต่เดิม (classical pathway; CP), วิถีที่ไม่ใช่รู้จักกันดีแต่เดิม (nonclassical pathway; NCP) และกลุ่มที่อาจมีการแสดงออกได้โดยไม่ผ่าน ER (non-estrogen receptor; N-ER)

(กำหนดให้หมายเลข 1 สอดคล้องกับงานวิจัย Driggers and Segar, 2002; Segars and Driggers, 2002, หมายเลข 2 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Lorenzo, 2003; Driggers and Segar, 2002; Segars and Driggers, 2002 และ หมายเลข 3 สอดคล้องกับงานวิจัยของ Syed *et al.*, 2005)