

การศึกษาผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอต่อทรานสคริปโตมและอินเทอร์แอคโตม
ของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอหิวาต์ในเซลล์ระบบประสาทของลูกหนู



นางสาวสุรางค์รัตน์ ทองกร

บทคัดย่อและแฟ้มข้อมูลฉบับเต็มของวิทยานิพนธ์ตั้งแต่ปีการศึกษา 2554 ที่ให้บริการในคลังปัญญาจุฬาฯ (CUIR)
เป็นแฟ้มข้อมูลของนิสิตเจ้าของวิทยานิพนธ์ ที่ส่งผ่านทางบัณฑิตวิทยาลัย

The abstract and full text of theses from the academic year 2011 in Chulalongkorn University Intellectual Repository (CUIR)
are the thesis authors' files submitted through the University Graduate School.

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ภาควิชาเคมีคลินิก

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2560

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Investigation of Bisphenol A Maternal Exposure Effects on Transcriptome
and Interactome of Genes associated with Autism Spectrum Disorder in Neural Cells
of Rat Offsprings

Miss Surangrat Thongkorn



A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Department of Clinical Chemistry

Faculty of Allied Health Sciences

Chulalongkorn University

Academic Year 2017

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การศึกษาผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอต่อทารกปโตมและอินเทอร์แอกโตมของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอหิซึมสเปกตรัมในเซลล์ระบบประสาทของลูกหนู
โดย	นางสาวสุรางค์รัตน์ ทองกร
สาขาวิชา	ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	อาจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์

คณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้บัณฑิตวิทยาลัยเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะสหเวชศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.पालนี อัมรานนท์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก
(อาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม
(อาจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร.รัชนา ศานติยานนท์)

..... กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เจตน์สว่าง)

สุรางค์รัตน์ ทองกร : การศึกษาผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอต่อทรานสคริปโตมและอินเทอร์แอคโตมของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมในเซลล์ระบบประสาทของลูกหนู (Investigation of Bisphenol A Maternal Exposure Effects on Transcriptome and Interactome of Genes associated with Autism Spectrum Disorder in Neural Cells of Rat Offsprings) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: อ. ดร.เทวฤทธิ์ สาระชนะ, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม: อ. ดร.เดกษา จินดาทิพย์, 105 หน้า.

โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder, ASD) คือ โรคทางพัฒนาการระบบประสาทที่พบในเพศชายมากกว่าเพศหญิงโดยไม่ทราบสาเหตุ สาเหตุการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดแต่การได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีความสัมพันธ์ต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในลูกหนู อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาแน่ชัดว่าการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือไม่ โดยเฉพาะเมื่อวิเคราะห์แบบแยกเพศ ในการศึกษาครั้งนี้ ทางคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษาลงของการได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องต่อการแสดงออกของยีนในสมองและความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมรวมถึงหน้าที่ของเซลล์ระบบประสาท ในการทำนายว่าการได้รับบิสฟีนอลเอสามารถเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนและมีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือไม่ ทางผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์แบบ meta-analysis โดยใช้ข้อมูลการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอที่ได้ตีพิมพ์ไปแล้วและใช้การวิเคราะห์แบบ hypergeometric distribution หาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนดังกล่าวกับรายชื่อยีนจากฐานข้อมูลโรคออทิซึมสเปกตรัมต่าง ๆ สำหรับการศึกษาถึงผลของการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องต่อการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมนั้น คณะผู้วิจัยได้นำสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมาวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์ด้วยเทคนิค RNA-seq และใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis วิเคราะห์อินเตอร์แอคโตมและบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติ ยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมถูกคัดเลือกเพื่อยืนยันด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR นอกจากนี้เซลล์ระบบประสาทที่แยกได้จากลูกหนูถูกนำมาเพาะเลี้ยงเพื่อศึกษาความยาวของสายใยประสาท การศึกษาพบว่า จากการวิเคราะห์ทาง meta-analysis ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับหน้าที่และโรคออทิซึมสเปกตรัม การวิเคราะห์ RNA-seq ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องพบว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติมีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่ากลุ่มยีนที่เคยมีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ *Auts2* *Foxp2* และ *Smarcc2* แสดงออกผิดปกติอย่างจำเพาะต่อเพศ การวิเคราะห์เชิงอินเตอร์แอคโตมพบว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอมีความเกี่ยวข้องกับอย่างมีนัยสำคัญกับบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เคยมีรายงานในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม การวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาทพบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอส่งเสริมความยาวของสายใยประสาทและการแตกแขนงของสายใยประสาทแต่ลดขนาดของตัวเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการศึกษาครั้งนี้พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อการแสดงออกที่ผิดปกติของยีนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและกลุ่มยีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและแสดงออกจำเพาะในแต่ละเพศประกอบกับการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งเสริมความยาวของสายใยประสาท การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งครรภ์อาจเป็นสาเหตุหรือเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคออทิซึมสเปกตรัมและอาจจะเป็นหลักฐานที่อธิบายถึงความชุกของโรคนี้ในเพศชายที่มากกว่าเพศหญิงซึ่งควรศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต

ภาควิชา เคมีคลินิก

ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา ชีวเคมีคลินิกและอณูทางการแพทย์

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาหลัก

ปีการศึกษา 2560

ลายมือชื่อ อ.ที่ปรึกษาร่วม

5876666737 : MAJOR CLINICAL BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR MEDICINE

KEYWORDS: AUTISM SPECTRUM DISORDER / BISPHENOL A / ENDOCRINE-DISRUPTING COMPOUND / TRANSCRIPTOME / INTERACTOME / GENE EXPRESSION / SEX DIFFERENCE / ENVIRONMENTAL FACTOR / PRENATAL EXPOSURE / NEURITE OUTGROWTH

SURANGRAT THONGKORN: Investigation of Bisphenol A Maternal Exposure Effects on Transcriptome and Interactome of Genes associated with Autism Spectrum Disorder in Neural Cells of Rat Offsprings. ADVISOR: TEWARIT SARACHANA, Ph.D., CO-ADVISOR: DEPICHA JINDATIP, Ph.D., 105 pp.

Autism spectrum disorder (ASD) is an early-onset neurodevelopmental disorder inexplicably biased towards males. The exact cause of ASD remains unclear, but prenatal exposure to bisphenol A (BPA) has been associated with ASD susceptibility in rat offsprings. However, it is still unclear whether prenatal BPA exposure dysregulates genes associated with ASD, especially when sex differences are considered. In this study, we therefore sought to investigate whether prenatal BPA exposure can cause disruptions in the brain expression of genes associated with ASD and neural cells function. To predict whether BPA exposure can alter the expression of genes associated with ASD, a meta-analysis of transcriptome profiling data previously published in NCBI GEO DataSets was conducted, and differentially expressed genes (DEGs) in response to BPA were identified. A hypergeometric analysis was then conducted to examine the association between the list of DEGs and three lists of ASD candidate genes obtained from different ASD databases. To further evaluate whether prenatal BPA exposure leads to dysregulation of genes associated with ASD, transcriptome profiling analysis of hippocampi isolated from neonatal pups prenatally exposed to BPA was then performed using RNA-seq analysis. Interactome and biological pathway analyses of the DEGs were conducted using Ingenuity Pathway Analysis (IPA) software. ASD-related genes were selected for further validation using quantitative RT-PCR analysis. Neural cells were isolated from pups prenatally exposed to BPA and neurite outgrowth was then performed. The meta-analysis of transcriptome profiling data and hypergeometric distribution analysis showed that BPA-responsive genes were significantly associated with ASD-related genes and functions. RNA-seq analysis of hippocampi isolated from neonatal rats prenatally exposed to BPA revealed a list of DEGs that were significantly associated with ASD. Interestingly, several ASD candidate genes, including *Auts2* and *Foxp2*, showed sex differences in response to BPA exposure. The interactome and pathway analyses also showed a significant association between the DEGs and neurological functions/disorders associated with ASD. Moreover, neurite outgrowth assay showed a significant increasing in total neurite length, primary dendrites, branching of dendrites and a significant impairment in cell body area in neural cells derived from pups prenatally exposed to BPA. Our findings indicate that prenatal BPA exposure disrupted genes significantly associated with ASD in the hippocampus, and several ASD candidate genes showed sex differences in expression in response to BPA as well as BPA enhanced the neurite length in neural cells exposed to BPA. This study strongly suggests that prenatal BPA exposure may cause or increase susceptibility to ASD and may be responsible for the sex bias of the disorder, which warrants further study.

Department: Clinical Chemistry

Student's Signature

Field of Study: Clinical Biochemistry and Molecular
Medicine

Advisor's Signature

Co-Advisor's Signature

Academic Year: 2017

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดีเนื่องด้วยความกรุณาจากอาจารย์ ดร.เทวฤทธิ์ สระชนะ ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาและอาจารย์ ดร.เดภิชา จินดาทิพย์ ที่กรุณาได้รับเป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พร้อมให้คำแนะนำแนวคิด วิธีการในการแก้ปัญหา รวมไปถึงข้อคิดต่าง ๆ ในการทำงานที่เป็นประโยชน์อย่างยิ่งในตลอดระยะเวลาที่ดำเนินการวิจัย ตลอดจนติดตามความก้าวหน้าและสนับสนุนเพื่อให้สำเร็จลุล่วงด้วยดี ผู้วิจัยขอขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้เป็นอย่างสูง

กราบขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.บัณฑิต เจตนสว่าง กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ภายนอกมหาวิทยาลัย รองศาสตราจารย์ ดร.รัชชา ศานติยานนท์ กรรมการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.เทวิน เทนคำเนา ประธานกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาสละเวลามาเป็นกรรมการในการสอบป้องกันวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. Valerie W. Hu จากมหาวิทยาลัยจอร์จ วอชิงตัน ประเทศสหรัฐอเมริกา ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออนุญาตให้ใช้โปรแกรมทางสารสนเทศศาสตร์ ในการวิเคราะห์ข้อมูลในการศึกษาครั้งนี้

ขอขอบพระคุณศาสตราจารย์ ดร. Noriko Osumi อาจารย์ Tatsuya Sato และอาจารย์ Takako Kikkawa จากมหาวิทยาลัย Tohoku ประเทศญี่ปุ่น สำหรับความช่วยเหลือและอนุเคราะห์โปรแกรมวิเคราะห์ความยาวและการแตกแขนงของเซลล์ระบบประสาท

ขอขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเคมีคลินิกที่อบรมสั่งสอน ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดระยะเวลาในการทำวิจัย

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการทำวิจัยจากโครงการพัฒนามหาวิทยาลัยวิจัยแห่งชาติ ประจำปี 2559 (NRU59-031- HR) ทุนพัฒนาศักยภาพในการทำงานวิจัยของอาจารย์รุ่นใหม่จากสำนักงานกองทุนสนับสนุนการวิจัย (MRG6080118) ทุนมูลนิธิกระจกอาชาสี (RES_60_341_37) และทุนอุดหนุนการศึกษาระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ 72 พรรษา ทุนสนับสนุนนิสิตระดับปริญญาเอกและโทไปทำวิจัยในต่างประเทศจากบัณฑิตวิทยาลัยและคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยและทุน 90 ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช (GCUGR1125601056M 53-2)

ขอขอบคุณนายทรงพล กัลยาประสิทธิ์ ที่คอยช่วยเหลือในการป้อนสารบิสฟีนอลเอและดูแลสัตว์ทดลอง ตลอดจนการแยกสมอง การสกัดอาร์เอ็นเอและการทำ quantitative RT-PCR ขอขอบคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร.อนุศักดิ์ กิจถาวรรัตน์ สัตวแพทย์หญิง ดร.นิธิรา อนุกุลและนายสัตวแพทย์ชูเพชร นิสกุลทองที่คอยช่วยเหลือและให้ความรู้ตลอดการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

สุดท้ายนี้กราบขอบพระคุณคุณแม่ คุณแม่ และครอบครัวที่ให้ความช่วยเหลือและเป็นกำลังใจในการทำวิจัยมาตลอด ความดีของการศึกษาและคุณค่าของวิทยานิพนธ์นี้ผู้วิจัยขออุทิศแต่บุรพจารย์และผู้มีพระคุณทุกท่าน

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ.....	ฉ
บทที่ 1	1
บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย (Rationale and Justification).....	1
1.2 คำถามงานวิจัย (Research Question).....	4
1.3 สมมุติฐาน (Hypothesis).....	4
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives).....	4
1.5 กรอบแนวคิดของงานวิจัย (Conceptual Framework).....	5
1.6 Experimental workflow	6
1.7 ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง (Variables).....	7
1.8 ขอบเขตของงานวิจัย (Scope and Limitation of the study).....	7
1.9 ประโยชน์ของงานวิจัย (Usefulness of the study).....	7
บทที่ 2	8
ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	8
2.1 โรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัมคืออะไร	8
2.2 การวินิจฉัยโรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัม.....	9
2.3 โรคอหิวาต์เทียมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีความชุกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและจัดเป็นปัญหา สาธารณสุขระดับโลก.....	9

2.4	พยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยาของโรคคอกทิจิมสเปกตรัม.....	11
2.5	บทบาทของสารเคมีในโรคคอกทิจิมสเปกตรัม	12
2.6	บิสฟีนอลเอคืออะไร	13
2.7	ผลของการได้รับบิสฟีนอลเอกับการทำงานของระบบประสาท	19
2.8	บทบาทของบิสฟีนอลเอในโรคคอกทิจิมสเปกตรัม	21
2.9	ต้นแบบที่ใช้ในการทดลอง.....	22
2.10	อินเทอร์แอคโตมิคส์คืออะไร	22
บทที่ 3	24
วิธีดำเนินการวิจัย	24
ตอนที่ 1	การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์.....	24
1.1	การรวบรวมและวิเคราะห์ผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิคส์จากฐานข้อมูล GEO datasets	24
1.2	การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกทางผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคคอกทิจิมสเปกตรัม.....	25
ตอนที่ 2	สัตว์ทดลอง	26
ตอนที่ 3	การป้อนบิสฟีนอลเอในสัตว์ทดลอง	26
ตอนที่ 4	การแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส	27
4.1	การแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสสำหรับการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิคส์	27
4.2	การแยกเซลล์ระบบประสาทสำหรับการวิเคราะห์ neurite outgrowth	27
ตอนที่ 5	การวิเคราะห์ Neurite outgrowth assay	30
ตอนที่ 6	การสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ mirVana miRNA isolation kit จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส.....	32
ตอนที่ 7	การวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิคส์โดยใช้เทคนิค RNA sequencing.....	33

ตอนที่ 8 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR.....	34
ตอนที่ 9 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศศาสตร์	35
ตอนที่ 10 การวิเคราะห์ทางสถิติ	35
บทที่ 4	36
ผลการศึกษาวิจัย.....	36
4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics analyses of BPA-responsive genes)	36
4.1.1 ผลการรวบรวมข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติเมื่อได้รับบิสฟีนอลเอ	36
4.1.2 รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติและมีนัยสำคัญทางสถิติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ.....	39
4.1.3 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคและโครงข่ายควบคุมยีน (biological functions, diseases/disorders and gene regulatory networks) ของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีนัยสำคัญทางสถิติกับยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในโรคออสติซึมสเปกตรัม	41
4.2 ผลการบ่อนบิสฟีนอลเอในสัตว์ทดลองและการแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส	44
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยใช้ Agilent Bioanalyzer 2100	44
4.4 ผลการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เทคนิค RNA-sequencing	48
4.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสกับยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากฐานข้อมูลของโรคออสติซึมสเปกตรัม.....	49
4.6 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่และ pathways ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาทในยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส	51
4.7 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคและโครงข่ายควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ทางระบบประสาทในยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส	53

4.8 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย quantitative RT-PCR.....	59
4.9 ผลการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับสายใยของเซลล์ระบบประสาท (neurite outgrowth assay).....	61
4.9.1 ผลการวิเคราะห์ความยาวรวม (Total neurite length) ของสายใยประสาท.....	61
4.9.2 ผลการวิเคราะห์การแตกแขนงของสายใยในเซลล์ระบบประสาท (neurite branching).....	63
4.9.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดพื้นที่ของตัวเซลล์ระบบประสาท (cell body area).....	70
บทที่ 5	73
อภิปรายผลการทดลอง.....	73
บทที่ 6	86
สรุปผลการทดลอง.....	86
รายการอ้างอิง	88
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์	105

สารบัญตาราง

ตารางที่ 1	รายละเอียดแสดงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลจากการได้รับบิสฟีนอลเอต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ชนิดต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GEO DataSets.....	37
ตารางที่ 2	ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย Hypergeometric distribution analysis ระหว่างกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากแต่ละการศึกษา กับกลุ่มยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม.....	40
ตารางที่ 3	รายชื่อโรคและหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA).....	42
ตารางที่ 4	คำอธิบายสัญลักษณ์จากการวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพ	43
ตารางที่ 5	ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอโดย Agilent bioanalyzer 2100..	45
ตารางที่ 6	ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย Hypergeometric distribution analysis ระหว่างกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสกับกลุ่มยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม	50
ตารางที่ 7	ผลการเปรียบเทียบบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและ canonical pathway ระหว่างการวิเคราะห์ในกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในทั้งสองเพศ ในเพศผู้และในเพศเมีย	52
ตารางที่ 8	ผลการเปรียบเทียบโรค/หน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทระหว่างการวิเคราะห์ในกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในทั้งสองเพศ ในเพศผู้และในเพศเมีย	55
ตารางที่ 9	ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ canonical pathway ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างจำเพาะในแต่ละเพศ	56

สารบัญรูปภาพ

รูปภาพที่ 1 ความชุกของโรคคอทิจิมสเปกตรัมซึ่งรายงานโดยของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรค
ของประเทศไทยอเมริกา 10

รูปภาพที่ 2 โครงสร้างของบิสฟีนอลเอ 14

รูปภาพที่ 3 ผลของบิสฟีนอลเอต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย..... 15

รูปภาพที่ 4 กระบวนการ glucuronidation ของบิสฟีนอลเอในหนูและในมนุษย์ 17

รูปภาพที่ 5 ความแตกต่างในการเมตาบอลิซึมบิสฟีนอลเอเนื่องจากวิธีการที่ได้รับบิสฟีนอลเอ 18

รูปภาพที่ 6 ภาพแสดงการวิเคราะห์การแตกแขนงของสายใยประสาทโดยการวิเคราะห์ Sholl
analysis..... 31

รูปภาพที่ 7 แผนภาพ Venn diagram ของรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากแต่ละการศึกษา 41

รูปภาพที่ 8 Gene regulatory network ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติ
จากการได้รับบิสฟีนอลเอและบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาท 43

รูปภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มควบคุมเพศ
ผู้ 46

รูปภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มควบคุม
เพศเมีย 46

รูปภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มที่ได้รับบิส
ฟีนอลเอเพศผู้ 47

รูปภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มที่ได้รับบิส
ฟีนอลเอเพศเมีย..... 48

รูปภาพที่ 13 Gene regulatory network ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออก
ผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูเพศผู้ที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องและ
บทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคคอทิจิมสเปกตรัม..... 57

รูปภาพที่ 14 Gene regulatory network ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออก
ผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูเพศเมียที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้อง
และบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคคอทิจิมสเปกตรัม 58

รูปภาพที่ 15	แผนภาพกล่อง (box plot) แสดงการแสดงออกของยีน Auts2 Foxp2 Smarcc2 และ Dicer1 ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส	60
รูปภาพที่ 16	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาทแบบรวมเพศ.....	62
รูปภาพที่ 17	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาทแบบแยกเพศ	63
รูปภาพที่ 18	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ primary neurites แบบรวมเพศ.....	64
รูปภาพที่ 19	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ primary neurites แบบแยกเพศ	65
รูปภาพที่ 20	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching แบบรวมเพศ	66
รูปภาพที่ 21	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching แบบแยกเพศ.....	67
รูปภาพที่ 22	กราฟเส้นแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching แบบรวมเพศโดยใช้ Sholl analysis.....	68
รูปภาพที่ 23	กราฟเส้นแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching ในเพศเมียโดยใช้ Sholl analysis.....	69
รูปภาพที่ 24	กราฟเส้นแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching ในเพศผู้โดยใช้ Sholl analysis.....	70
รูปภาพที่ 25	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ cell body area แบบรวมเพศ.....	71
รูปภาพที่ 26	กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ cell body area แบบแยกเพศ	72
รูปภาพที่ 27	รูปภาพแสดงเซลล์ระบบประสาท ณ วันที่ 7 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มได้รับ BPA (scale bar 50 μ m).....	72
รูปภาพที่ 28	ภาพแสดงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ของผลจากการแม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในสมอง.....	83
รูปภาพที่ 29	รูปภาพแสดงกลไกที่เป็นไปได้ในการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่จำเพาะในแต่ละเพศ.....	84

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย (Rationale and Justification)

โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder, ASD) คือ กลุ่มภาวะที่มีความผิดปกติเกี่ยวกับพัฒนาการทางสมอง โดยจะมีการแสดงออกที่ผิดปกติทางพฤติกรรม 2 ด้านได้แก่ มีความผิดปกติด้านการเข้าสังคมและปฏิสัมพันธ์กับบุคคลรอบข้างประกอบกับมีความบกพร่องด้านการสื่อสาร (social interaction and communication deficits) และมีการทำพฤติกรรมซ้ำ ๆ และความสนใจที่จำกัด (repetitive behaviors and restricted interests) ระดับอาการที่แสดงออกในผู้ป่วยจะมีตั้งแต่รุนแรงน้อยไปจนถึงรุนแรงมาก (Autism Speaks, 2012) ส่วนใหญ่จะสามารถสังเกตอาการของเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมได้อย่างเด่นชัดเมื่ออายุราว 18-30 เดือน (CDC, 2015c) ในปี ค.ศ. 2013 มีการตีพิมพ์คู่มือในการวินิจฉัยและสถิติสำหรับความผิดปกติทางจิตฉบับที่ 5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – the fifth edition) ของประเทศสหรัฐอเมริกา ซึ่งได้วินิจฉัยรวมไปถึงโรคคลาสสิกออทิสติก (autistic disorder) โรคแอสเปอร์เจอร์ (Asperger's syndrome) โรคซีดีดี (childhood disintegrative disorder) และโรคพีดีดีเอ็นโอเอส (pervasive developmental disorder-not otherwise specified) อย่างไรก็ตาม เนื่องจากอาการของแต่ละโรคมีความใกล้เคียงกัน ทำให้แยกออกจากกันได้ยาก (Autism Speaks, 2013)

โรคออทิซึมสเปกตรัมจัดเป็นโรคพัฒนาการทางระบบประสาทที่มีความชุก (prevalence) เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วในประเทศสหรัฐอเมริกา ล่าสุดในปี ค.ศ. 2018 ศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) ได้รายงานความชุกของการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในเด็กอเมริกาว่ามีอัตราส่วนเท่ากับ 1 ใน 59 คน (Baio et al., 2018) และมีการสำรวจความชุกของการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมพบว่ามีความชุกของการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในเพศชายมากกว่าเพศหญิงถึง 4 เท่า (Baio et al., 2018) สำหรับความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทยถูกรายงานไว้ในปี ค.ศ. 2010 ที่อัตราส่วน 6 ใน 1,000 คน (Department of Mental Health, 2015) เนื่องจากในประเทศไทยโรคออทิซึมสเปกตรัมยังไม่ค่อยเป็นที่รู้จักประกอบกับข้อจำกัดในการรักษาและขาดสำรวจข้อมูลใหม่ ๆ ทำให้อัตราส่วนที่รายงานอาจจะมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง แนวโน้มของอัตราการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทยในปัจจุบันน่าจะมีความถี่สูงขึ้นจากที่รายงานในปี ค.ศ. 2010 อีกทั้งโรคออทิซึมสเปกตรัมเป็น

โรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียทรัพยากรทั้งทรัพยากรมนุษย์และทรัพยากรทรัพยากรสิ้นในการพัฒนาประเทศ ปัจจุบันสาเหตุของการเกิดโรคร้อยละ 80-90 ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่เป็นที่เชื่อกันว่าโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมมีสาเหตุมาจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม รวมไปถึงการได้รับสารเคมีบางอย่างในขณะตั้งครรภ์

จากการศึกษาของ Kim และคณะในปี 2009 พบว่าการได้รับมลภาวะทางอากาศหรือสารเคมีที่เกิดจากอุตสาหกรรมโรงงาน เช่น ตะกั่ว (lead) แคดเมียม (cadmium) สารหนู (arsenic) รวมไปถึงสารเคมีที่รบกวนระบบต่อมไร้ท่อของร่างกาย (endocrine-disrupting compounds, EDCs) มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหรือเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม สารเคมีเหล่านี้ส่งผลกระทบต่อกระบวนการพัฒนาการของสมองในเด็กทารก กระบวนการสร้างเซลล์ประสาท การเรียนรู้ ความจำ และพฤติกรรมที่เกี่ยวข้องกับโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม (Itoh, Yaoi, & Fushiki, 2012; Kim et al., 2009)

บิสฟีนอลเอ (2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)propane, Bisphenol A, BPA) เป็นสารเคมีในกลุ่มที่มีบทบาทไปรบกวนระบบฮอร์โมนของร่างกายและเป็นสารเคมีที่ถูกใช้ในผลิตภัณฑ์พลาสติกโพลีคาร์บอเนต ผลิตภัณฑ์เรซินสังเคราะห์ ผิวที่เคลือบภายในกระป๋องอาหารและเครื่องดื่ม ขวดน้ำพลาสติกแบบแข็งรวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการอุดฟัน (FDA, 2014; Hoekstra & Simoneau, 2013) โดยบิสฟีนอลเอจะอยู่ในรูปโพลีเมอร์เพื่อเป็นการสร้างความแข็งแรงให้กับผลิตภัณฑ์เหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่ผลิตภัณฑ์นั้นได้รับความร้อน หรือสัมผัสอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรด-เบส โพลีเมอร์ของบิสฟีนอลเอจะเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส กลายเป็นบิสฟีนอลเอในรูปโมโนเมอร์ออกมาปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์เหล่านั้นได้ (Vom Saal & Hughes, 2005) เมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานบิสฟีนอลเอสามารถผ่านผนังทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด ไปยังระบบต่าง ๆ ของร่างกาย รวมทั้งผ่านแนวกันระหว่างเลือดและสมอง (blood-brain barrier) และเข้าสู่สมองส่วนต่าง ๆ ได้ (Nakamura et al., 2006; Thaddeus T Schug, Amanda Janesick, Bruce Blumberg, & Jerrold J Heindel, 2011) การได้รับบิสฟีนอลเอในสัตว์ระหว่างช่วงระยะเวลาดังต้องพบว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงพฤติกรรมหลายด้าน ได้แก่ พฤติกรรมความกลัว ความกังวล พฤติกรรมการเลี้ยงลูก พฤติกรรมด้านการเข้าสังคม ความก้าวร้าวและมีความบกพร่องในกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการรับรู้ซึ่งเป็นผลมาจากการสร้างเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) (Masuo & Ishido, 2011; Tiwari et al., 2014) จากการศึกษานี้ของ Kim และคณะในปี ค.ศ. 2013 พบว่าบิสฟีนอลเอเป็นสาเหตุหนึ่งที่ทำให้ยีนที่มีความสำคัญต่อการสร้างเซลล์ประสาทแสดงออกผิดปกติ ทำให้จำนวนของเซลล์ประสาทลดลง โดยการลดการเจริญเติบโต (proliferation) และการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ (differentiation) ของเซลล์ประสาท (neural cells) บิสฟีนอลเอยังมีบทบาทสำคัญในการ

ควบคุมยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวข้องกระบวนการส่งสัญญาณภายในเซลล์หลายกระบวนการ เช่น ERK JNK CREB p53 และ Wnt (Kim et al., 2007; Liu et al., 2013) ยีนที่เกี่ยวข้องกับ estrogen signaling pathway เช่น estrogen receptor α (Esr1) estrogen receptor β (Esr2) (Wolstenholme et al., 2012) รวมไปถึงยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม เช่น *MECP2* เป็นต้น (Yeo et al., 2013)

อย่างไรก็ตาม ในปัจจุบัน ความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับผลกระทบของการได้รับบิสฟีนอลเอต่อสารชีวโมเลกุลในสมองยังไม่ทราบแน่ชัด โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส อีกทั้งยังไม่เคยมีผู้ใดศึกษาว่าการได้รับบิสฟีนอลเอในระหว่างการตั้งครรภ์นั้นมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ทางระบบประสาทที่มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับหน้าที่ที่มีการรายงานว่าผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้น ในการศึกษาครั้งนี้ คณะผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลจากการได้รับบิสฟีนอลเอของแม่ในระหว่างตั้งครรภ์ต่อการแสดงออกของยีนทั้งหมดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสโดยการวิเคราะห์รูปแบบทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้ RNA-seq ที่มีประสิทธิภาพสูง และวิเคราะห์ความสัมพันธ์กับยีน/โปรตีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยใช้สมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งครรภ์ สำหรับการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์นั้น ได้ทำการศึกษาการแสดงออกของยีนทั้งหมด (global gene expression) โดยยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมได้ถูกคัดเลือกเพื่อนำไปวิเคราะห์ต่อยด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR เพื่อยืนยันผล อีกทั้งยังทำการศึกษาเพื่อดูผลของการได้รับบิสฟีนอลเอต่อการทำงานของเซลล์ระบบประสาท โดยทำการศึกษาความยาวของสายใยประสาท (neurite outgrowth assay) ของเซลล์ระบบประสาทกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอเทียบกับกลุ่มควบคุม นอกจากนี้ คณะผู้วิจัยยังได้ดำเนินการวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) เพื่อสร้างและวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพ (biological network and pathway analysis) โดยใช้รายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ อีกทั้งได้ดำเนินการวิเคราะห์แบบ meta-analysis โดยได้นำผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิกส์ซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อการแสดงออกของยีนในเนื้อเยื่อ/เซลล์ หรือเซลล์ไลน์ที่ถูกตีพิมพ์ไปแล้วมาวิเคราะห์ร่วมกับรายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญในโรคออทิซึมสเปกตรัม ทางคณะผู้วิจัยคาดว่ารายชื่อยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติเมื่อได้รับบิสฟีนอลเออาจนำไปใช้ในการทำนายการเกิดหรือเพิ่มความเสี่ยงของโรคออทิซึมสเปกตรัมได้ในอนาคต

1.2 คำถามงานวิจัย (Research Question)

การได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องของแม่หนูส่งผลต่อการแสดงออกที่ผิดปกติในรูปแบบทรานสคริปโตมในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนูหรือไม่ และกลุ่มยีนที่มีรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติเหล่านั้นมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือไม่

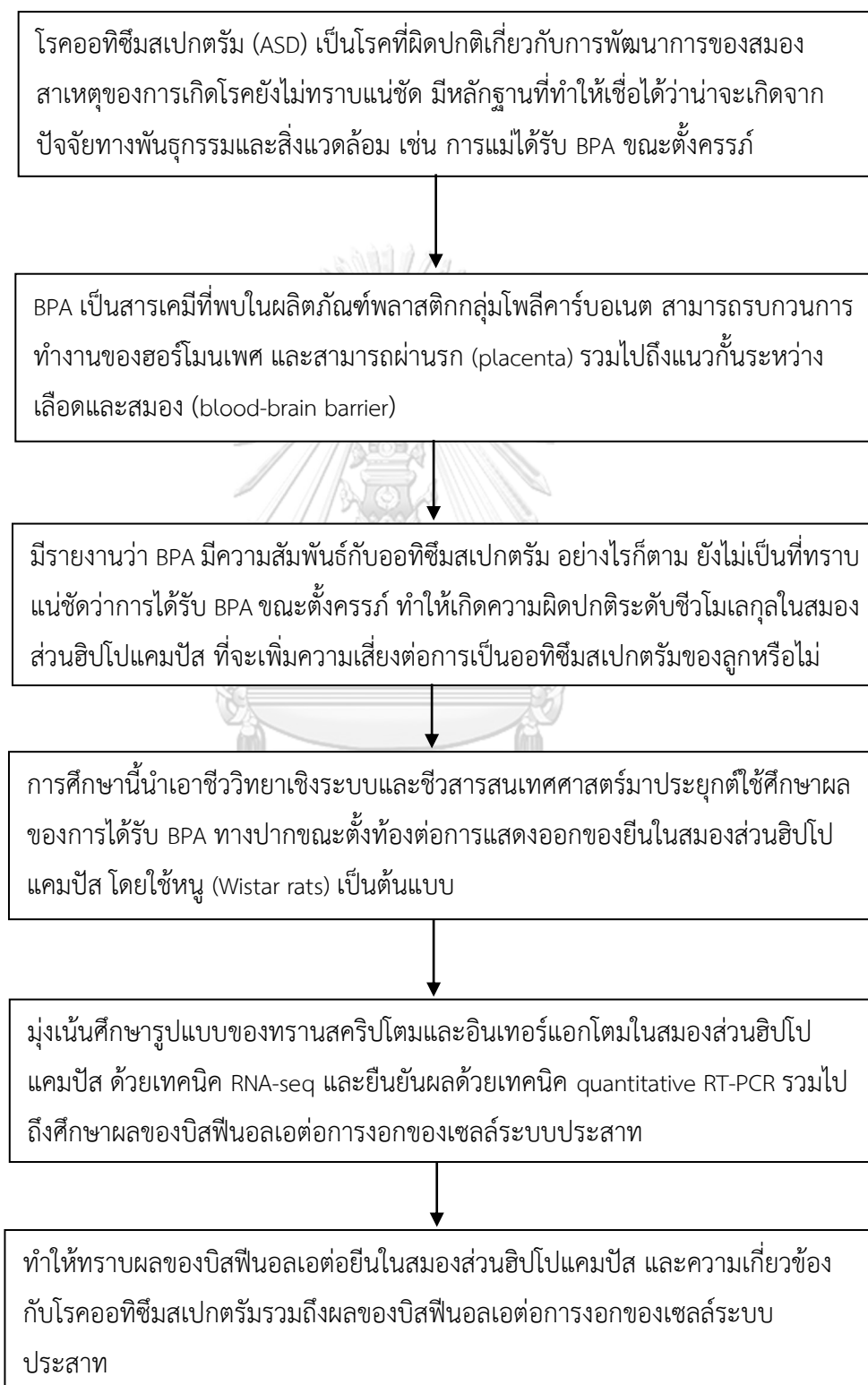
1.3 สมมุติฐาน (Hypothesis)

การได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องของแม่หนูส่งผลต่อการแสดงออกที่ผิดปกติในรูปแบบทรานสคริปโตมในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนู และกลุ่มยีนที่มีรูปแบบการแสดงออกที่ผิดปกติเหล่านั้นมีปฏิสัมพันธ์ระหว่างกันและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

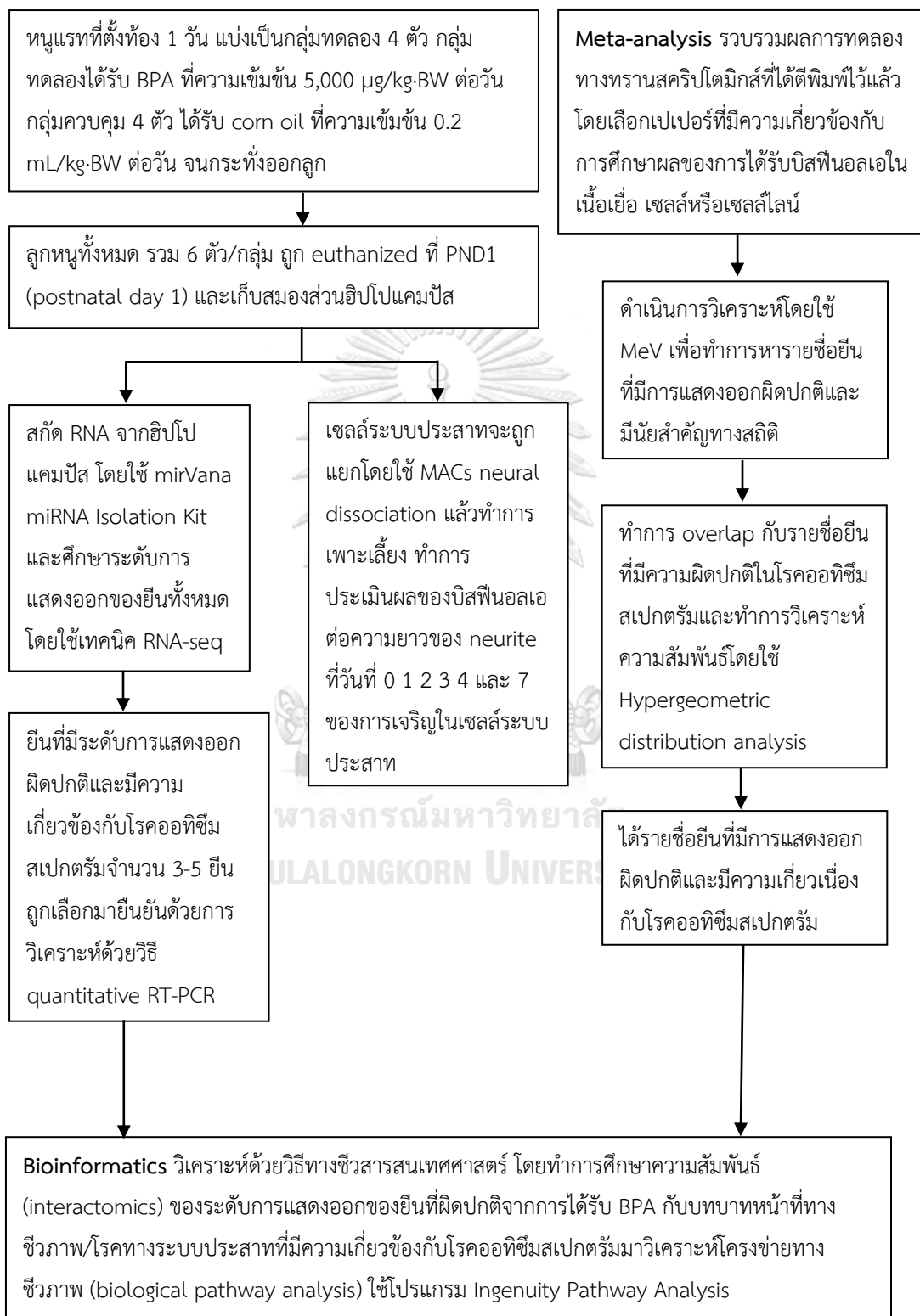
1.4 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objectives)

1. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์โดยใช้รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกที่ผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอที่รวบรวมจากการศึกษาทางทรานสคริปโตมิกส์ ซึ่งอาจส่งผลกระทบต่อ biological function and network ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม
2. เพื่อศึกษาผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้อง ต่อรูปแบบการแสดงออกของทรานสคริปโตมในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกเปรียบเทียบับกลุ่มที่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ
3. เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีระดับการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม และวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพ (อินเทอร์แอคโตม) จากรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอโดยใช้การวิเคราะห์ทางชีวสารสนเทศศาสตร์

1.5 กรอบแนวคิดของงานวิจัย (Conceptual Framework)



1.6 Experimental workflow



1.7 ตัวแปรที่เกี่ยวข้อง (Variables)

ตัวแปรต้น: การได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องของแม่หนู

ตัวแปรตาม: การเปลี่ยนแปลงของ neurite และการเปลี่ยนแปลงของระดับการแสดงออกของยีนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในกลุ่มลูกหนูที่ได้รับบิสฟีนอลเอ

ตัวแปรควบคุม: กลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองในทุกการทดลองถูกดำเนินการในสภาวะเดียวกันทั้งหมด

1.8 ขอบเขตของงานวิจัย (Scope and Limitation of the study)

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาแบบ experimental research design โดยทำการศึกษาระดับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนูโดยขณะที่แม่ตั้งท้องได้รับบิสฟีนอลเอตั้งแต่วันที่ 1 จนกระทั่งออกลูก โดยใช้การวิเคราะห์ด้วยเทคนิค RNA-seq เป็นการศึกษาลักษณะ *in vivo* model อีกทั้งยังทำอินเทอร์แอคโตมิกส์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติที่เป็นผลมาจากการได้รับบิสฟีนอลเอกับบทบาท/หน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องโรคออทิซึมสเปกตรัม รวมไปถึงการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อการงอกของสายใยประสาทโดยการวิเคราะห์ neurite outgrowth assay

1.9 ประโยชน์ของงานวิจัย (Usefulness of the study)

การศึกษานี้จะทำให้เกิดความรู้ความเข้าใจเกี่ยวกับผลจากการได้รับบิสฟีนอลเอของแม่ในระหว่างการตั้งท้องต่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส และระดับการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติไป รวมไปถึงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนเหล่านั้นกับยีนที่เคยมีรายงานว่าผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม ซึ่งจะเป็นหลักฐานสำคัญที่ทำให้ทราบว่าบิสฟีนอลเอน่าจะมีบทบาทต่อการเกิดหรือการเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคออทิซึมสเปกตรัมในระดับชีวโมเลกุลหรือไม่ อีกทั้งยังทำให้ทราบถึงผลของบิสฟีนอลเอต่อการงอกของเซลล์ระบบประสาทอีกด้วย นอกจากนี้ อาจจะนำรายชื่อของกลุ่มยีนที่ผิดปกติและมีความสัมพันธ์กับชีวพยาธิสภาพของโรคออทิซึมสเปกตรัมไปศึกษาต่อเพื่อศึกษากลไกการก่อความผิดปกติทางชีวภาพ ทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับชีวพยาธิสภาพของโรคออทิซึมสเปกตรัม และการพัฒนาหนทางในการป้องกันหรือลดผลกระทบจากการได้รับบิสฟีนอลเอในอนาคต โดยพัฒนาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพ (biomarker) ในเลือดในอนาคต

บทที่ 2

ผลงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 โรคออทิซึมสเปกตรัมคืออะไร

โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder, ASD) เป็นโรคที่มีความเกี่ยวข้องกับ ความผิดปกติของพัฒนาการของสมอง (neurodevelopmental disorder) โดยคำว่าสเปกตรัม หมายถึงความหลากหลายของอาการ (symptoms) และความสามารถ (skills) โรคออทิซึมสเปกตรัม จะมีความผิดปกติด้านพฤติกรรม 2 ด้านได้แก่ ด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและการสื่อสาร (social interaction and communication) และด้านการทำพฤติกรรมซ้ำ ๆ และมีความสนใจที่จำกัด (repetitive behaviors and restricted interests) เด็กที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัมจะประสบปัญหา ในการเข้าสังคมโดยจะมีความบกพร่องด้านการสื่อสารทางอารมณ์ ด้านการสื่อสารทั้งภาษาพูดและ ภาษากายซึ่งเป็นสิ่งที่ต้องใช้ในการปฏิสัมพันธ์กับผู้อื่น ผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมจะเข้ากับผู้อื่นได้ ยาก ไม่สนใจเข้าร่วมกลุ่ม รวมไปถึงการมีพฤติกรรมซ้ำ ๆ และความสนใจที่จำกัด เช่น การพูดประโยค เดิมซ้ำ ๆ ใช้สิ่งของชิ้นเดิม ๆ โดยพฤติกรรมทั้งหมดที่ได้กล่าวมาจะสามารถสังเกตเห็นถึงความผิดปกติ ได้ตั้งแต่อายุประมาณ 18-30 เดือนและพฤติกรรมเหล่านี้ส่งผลไปถึงการดำรงชีวิตประจำวันของเด็ก (National Institutes of Health, 2016) ตามเกณฑ์การวินิจฉัยภาวะออทิซึมสเปกตรัมจะใช้คู่มือใน การวินิจฉัยและสถิติสำหรับความผิดปกติทางจิตฉบับที่ 5 (Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders – the fifth edition, DSM-5) จัดทำโดยสมาคมจิตแพทย์ชาวอเมริกัน ประเทศ สหรัฐอเมริกา ซึ่งจะวินิจฉัยรวมถึงคลาสสิกออทิสติก (autistic disorder) โรคแอสเปอร์เกอร์ (Asperger’s syndrome) โรคซีดีดี (childhood disintegrative disorder) และโรคพีดีดีเอ็นโอเอส (pervasive developmental disorder-not otherwise specified) ซึ่งก็จะมี ความรุนแรงของโรค ที่แตกต่างกัน (Association, 2013) ยกตัวอย่าง ผู้ป่วยโรคแอสเปอร์เกอร์จัดอยู่ในกลุ่มที่มีความ รุนแรงน้อย เนื่องจากผู้ป่วยส่วนใหญ่ไม่มีความบกพร่องด้านภาษาและสติปัญญา ตรงกันข้ามอาจจะ มีระดับสติปัญญาสูงกว่าบุคคลทั่วไปอีกด้วย อย่างไรก็ตาม ผู้ป่วยโรคแอสเปอร์เกอร์ยังมีปัญหาด้าน ปฏิสัมพันธ์ทางสังคม ในขณะที่เดียวกันผู้ป่วยที่เป็นโรคคลาสสิกออทิสติกจัดอยู่ในกลุ่มที่มีความรุนแรง สูง โดยผู้ป่วยจะมีความบกพร่องด้านภาษา ซึ่งส่งผลให้ไม่สามารถพูดหรือสื่อสารได้ มีความสนใจในสิ่ง รอบตัวน้อยมากหรือไม่มีเลย หรืออาจจะมีพฤติกรรมทำร้ายตัวเองด้วย

2.2 การวินิจฉัยโรคออทิซึมสเปกตรัม

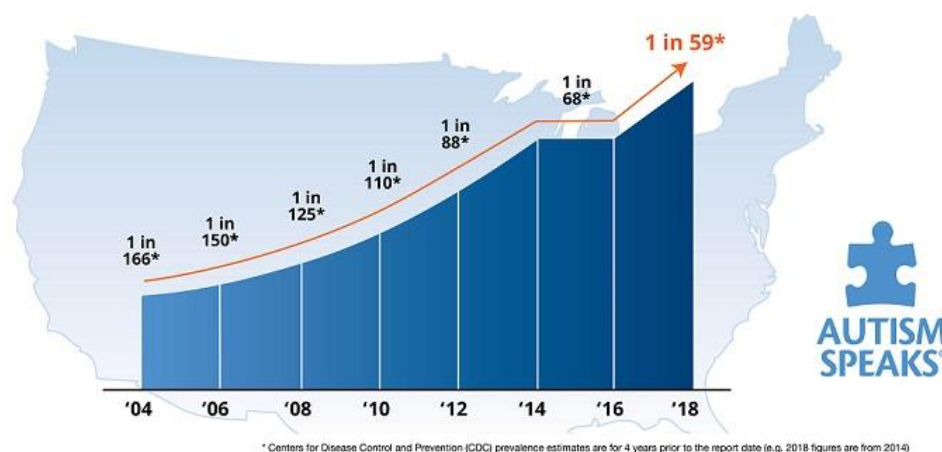
ปัจจุบันยังไม่มีการวินิจฉัยที่จำเพาะต่อโรคออทิซึมสเปกตรัม อาศัยเพียงการประเมินจากพฤติกรรมโดยแพทย์ผู้เชี่ยวชาญหรือนักจิตวิทยาที่ได้รับการอบรมแล้วเท่านั้น โดยทั่วไปแล้วผู้ปกครองสามารถสังเกตลักษณะทางพฤติกรรมที่ผิดปกติไปของบุตรหลาน ยกตัวอย่าง บุตรหลานของท่านจะไม่มี การสบตากับผู้ปกครอง เวลาเรียกชื่อจะขาดการตอบสนองหรือมีพฤติกรรมการเล่นของเล่นที่ผิดปกติไปจากเด็กทั่วไป ปัจจุบันมีเครื่องมือในการตรวจคัดกรองโรคออทิซึมสเปกตรัมหลากหลาย ชนิด ซึ่งโดยส่วนใหญ่จะเป็นแบบสอบถาม เช่น Ages and Stages Questionnaires (ASQ) เป็นแบบสอบถามที่ใช้คัดกรองความผิดปกติด้านการสื่อสาร การเคลื่อนไหว ความสามารถในการแก้ปัญหาและความสามารถ หรือใช้ Communication and Symbolic Behavior Scales (CSBS) เป็นเครื่องมือที่ใช้คัดกรองความผิดปกติด้านการสื่อสารและความสามารถของเด็กตั้งแต่เกิดถึง 2 ปี หรือใช้ Modified Checklist for Autism in Toddlers (MCHAT) เป็นแบบสอบถามที่เกี่ยวข้อง พฤติกรรมผิดปกติโดยสอบถามจากผู้ปกครองเพื่อที่จะระบุความเสี่ยง/ความน่าจะเป็นที่จะเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม ปัจจุบันได้มีการนำแบบสอบถามมาใช้ในการวินิจฉัยร่วมกับการวินิจฉัยจากแพทย์ผู้เชี่ยวชาญ ซึ่งการวินิจฉัยที่นิยมใช้มากที่สุดคือ Autism Diagnosis Interview – Revised (ADI-R) เป็นเครื่องมือทางคลินิกที่ใช้ในการประเมินผู้ป่วย ประกอบด้วยแบบสอบถามจำนวน 123 ข้อ โดยจะมุ่งเน้นไปที่ด้านพฤติกรรม 3 ด้าน ได้แก่ ด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคม ด้านการใช้ภาษาในการสื่อสารและด้านพฤติกรรมซ้ำ ๆ และความสนใจที่จำกัด ADI-R เป็นเครื่องมือที่เหมาะสมในการวินิจฉัยสำหรับเด็กผู้ใหญ่ที่มีอายุตั้งแต่ 18 เดือนขึ้นไป (CDC, 2015b) อย่างไรก็ตามการตรวจคัดกรองและการวินิจฉัยดังกล่าวยังเป็นเพียงแค่การใช้แบบสอบถามเท่านั้น โรคออทิซึมสเปกตรัมยังไม่มี การวินิจฉัยอย่างจำเพาะเจาะจง

2.3 โรคออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่มีความชุกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็วและจัดเป็นปัญหาสาธารณสุขระดับโลก

โรคออทิซึมสเปกตรัมจัดเป็นโรคทางพัฒนาการของระบบประสาทและสมองที่มีความชุกเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว จากการรายงานของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของประเทศสหรัฐอเมริกา (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) พบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกาความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมเพิ่มขึ้นจาก 1 ใน 150 คนในปี ค.ศ. 2000 เป็น 1 ใน 88 คนในปี ค.ศ. 2008 (CDC, 2015a) ใน ค.ศ. 2016 มีการรายงานความชุกของโรคดังกล่าวไว้ที่ 1 ใน 68 คน (Autism Speaks, 2016) และล่าสุดในปี ค.ศ. 2018 มีการรายงานความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมไว้ที่ 1 ใน 59 คน ซึ่งเป็นอัตราส่วนที่เพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว (Baio et al., 2018) **รูปภาพที่ 1** อีกทั้งมี

การสำรวจในเด็กชายและเด็กหญิงอายุ 8 ปี พบว่าโรคออทิซึมสเปกตรัมพบในเด็กผู้ชาย (1 ใน 42 คน) มากกว่าเด็กผู้หญิง (1 ใน 189 คน) ถึง 4.5 เท่า (Christensen et al., 2016)

Estimated Autism Prevalence 2018



รูปภาพที่ 1 ความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมซึ่งรายงานโดยของศูนย์ควบคุมและป้องกันโรคของประเทศสหรัฐอเมริกา (Baio et al., 2018)

สำหรับความชุกของโรคออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทยถูกรายงานไว้ในปี ค.ศ. 2005 ที่อัตราส่วน 1 ใน 1,000 คนและจากข้อมูลของสำนักงานสถิติแห่งชาติในปี ค.ศ. 2010 พบว่าประเทศไทยมีประชากรที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมเพิ่มขึ้นเป็น 6 ใน 1,000 คน (Department of Mental Health, 2015) อย่างไรก็ตาม ในประเทศไทยโรคออทิซึมสเปกตรัมยังไม่ค่อยเป็นที่รู้จักประกอบกับข้อจำกัดในการรักษาและขาดสำรวจข้อมูลใหม่ ๆ ทำให้อัตราส่วนที่รายงานอาจจะมีค่าต่ำกว่าความเป็นจริง แนวโน้มของอัตราการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในประเทศไทยในปัจจุบันจึงน่าจะมีอัตราส่วนที่สูงมากขึ้นจากที่เคยรายงานในปี ค.ศ. 2010 ถึงแม้โรคออทิซึมสเปกตรัมจะเป็นโรคที่ไม่ได้มีอันตรายถึงชีวิต แต่เป็นโรคที่ทำให้เกิดความสูญเสียทั้งทรัพยากรบุคคลและทรัพยากรที่ใช้ในการพัฒนา มหาศาล มีการสำรวจพบว่าในประเทศสหรัฐอเมริกา โรคออทิซึมสเปกตรัมทำให้เกิดการสูญเสียเงินกว่า 2 ล้านเหรียญสหรัฐฯ ในการดูแลผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัมต่อคน คิดเป็นจำนวนเงินรวมทั้งประเทศมากกว่า 200,000 ล้านเหรียญสหรัฐฯ (Buescher, Cidav, Knapp, & Mandell, 2014) และสาเหตุของการเกิดโรคออทิซึมร้อยละ 80-90 ยังไม่ทราบสาเหตุที่แน่ชัด แต่เป็นที่เชื่อกันว่าโรคออทิซึมสเปกตรัมมีสาเหตุมาจากทั้งปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยทางสิ่งแวดล้อม

2.4 พยาธิกำเนิดและพยาธิสรีรวิทยาของโรคออทิซึมสเปกตรัม

โรคออทิซึมสเปกตรัมเป็นโรคที่เกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมและสิ่งแวดล้อม มีความผิดปกติของหลายยีนและจัดเป็นโรคทางพัฒนาการทางระบบประสาทที่มีการถ่ายทอดทางพันธุกรรมสูงโรคหนึ่ง โดยมีการศึกษาในฝาแฝด พบว่าในฝาแฝดร่วมไข่ (monozygotic twin) ถ้าฝาแฝดคนหนึ่งเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมโอกาสที่อีกคนเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมสูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ (Rosenberg et al., 2009) ซึ่งเป็นหลักฐานที่บ่งบอกว่าพันธุกรรมมีความเกี่ยวข้องกับสาเหตุการเกิดและ/หรือเพิ่มความเสี่ยงของโรคออทิซึมสเปกตรัม อีกทั้งผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมยังพบความผิดปกติของสมองในหลาย ๆ ส่วน อย่างไรก็ตามก็ยังไม่ทราบถึงกลไกอย่างแน่ชัด มีหลาย ๆ การศึกษาพบว่า สมองส่วนคอร์เทกซ์กลีบหน้าผากส่วนหน้า (prefrontal cortex) สมองส่วนอะมิกดาลา (amygdala) สมองส่วนซีรีเบลลัม (cerebellum) และสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (hippocampus) มีความเกี่ยวข้องกับพยาธิกำเนิดของโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยมีการตรวจเอกซเรย์ด้วยคลื่นแม่เหล็กไฟฟ้า (Magnetic resonance imaging, MRI) ในสมองของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมเพศชาย พบว่าผู้ป่วยมีเนื้อสมองส่วนสีเทา (gray matter) เพิ่มขึ้นในสมองใหญ่ส่วนกลีบขมับ (temporal lobe) สมองกลีบหน้า (prefrontal lobe) และลดลงในสมองส่วนกลีบท้ายทอย (occipital lobe) และสมองกลีบข้าง (medial parietal regions) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยความผิดปกติที่สมองส่วนต่าง ๆ นั้นมีความเกี่ยวข้องกับความรุนแรงของอาการในโรคออทิซึมสเปกตรัม (Ecker et al., 2012) ในสมองของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมยังพบว่ามีการรบกวนการสร้างเซลล์ประสาทที่ผิดปกติ (dysregulation of neurogenesis) การเคลื่อนย้ายเซลล์ประสาท (neuronal migration) และการเจริญเติบโตของเซลล์ประสาท (neuronal maturation) (Wegiel et al., 2010) อีกทั้งยังมีหลายรายงานพบว่าในสมองของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีจำนวนเซลล์ประสาทชนิด Purkinje cells ลดลงในสมองส่วน cerebellum (Bailey et al., 1998) ความผิดปกติของสมองส่วนต่าง ๆ เหล่านี้เชื่อว่ามีส่งผลให้ผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีความผิดปกติด้านพฤติกรรมด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคม พฤติกรรมด้านการเรียนรู้และความจำรวมถึงด้านการเคลื่อนไหวอีกด้วย สมองส่วนฮิปโปแคมปัสเป็นสมองส่วนที่มีบทบาทในการสร้างความจำทั้งในระยะสั้นและระยะยาว การรับรู้เหตุการณ์ มีการรายงานในเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมพบว่าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสมีขนาดใหญ่ผิดปกติเมื่อเปรียบเทียบกับเด็กปกติ (Groen, Teluij, Buitelaar, & Tendolkar, 2010) นอกจากนั้นยังมีการศึกษาในสัตว์ทดลอง (*in vivo studies*) ในหนูทดลองที่ได้มีการ knockout ยีน *SHANK3* ซึ่งเป็นยีนที่ความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม พบว่าสมองของหนูมีรูปร่างที่ผิดปกติไปและมีการแสดงพฤติกรรมคล้ายกับผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม (X. Wang et al., 2016) สอดคล้องกับการศึกษาในปลาหม้อลาย (zebrafish) ที่มีการ knockout ยีน *SYNGAP1* และ *SHANK3* ซึ่งเป็นยีนที่เคยมีรายงานว่ามีความผิดปกติในโรค

ออทิซึมสเปกตรัม พบว่าปลาสมาลายมีการเคลื่อนไหวผิดปกติไปและมีอาการชัก ซึ่งอาการดังกล่าวเป็นอาการที่พบได้ในโรคออทิซึมสเปกตรัมเช่นเดียวกัน อีกทั้งยังมีการค้นพบว่าในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของหนูที่เป็นต้นแบบของโรคออทิซึมสเปกตรัมมีความผิดปกติของวิถีนำสัญญาณ (signaling pathway) ส่งผลทำให้มีการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการหลั่งสารสื่อประสาทผิดปกติ เช่น *GABRB3* เป็นต้น (Provenzano et al., 2015) การศึกษาในหนูที่เป็นต้นแบบของโรคออทิซึมสเปกตรัม (Valproic Acid Rat Model) พบว่าในหนูมีความบกพร่องด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคมและในสมองส่วนคอร์เทกซ์กลีบหน้าผากส่วนหน้าและฮิปโปแคมปัสมีการแสดงออกของโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการอักเสบในสมองทั้งสองส่วน โดยเป็นอาการที่พบได้ในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม (Codagnone, Podesta, Uccelli, & Reines, 2015) นอกจากการศึกษาดังกล่าวยังมีการศึกษาในหนูที่เป็นต้นแบบของโรคออทิซึมสเปกตรัมอีกหนึ่งชนิด (BTBR Mouse Model) โดยเป็นการศึกษาการแสดงออกในรูปแบบของทรานสคริปโตมต่อเนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่ามียีนที่มีการแสดงออกผิดปกติเมื่อเทียบกับหนูปกติ ได้แก่ *ADRA2C CADM3 NR4A2 NOS1AP* เป็นต้น ซึ่งยีนดังกล่าวมีรายงานถึงความเกี่ยวข้องในโรคออทิซึมสเปกตรัม (Daimon et al., 2015) อย่างไรก็ตาม ยังไม่มีการศึกษาผลของสารเคมีต่อการแสดงออกของยีนในรูปแบบของทรานสคริปโตมในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสซึ่งมีความสำคัญในการศึกษาสาเหตุของการเกิดและ/หรือความเสี่ยงที่ทำให้เกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม

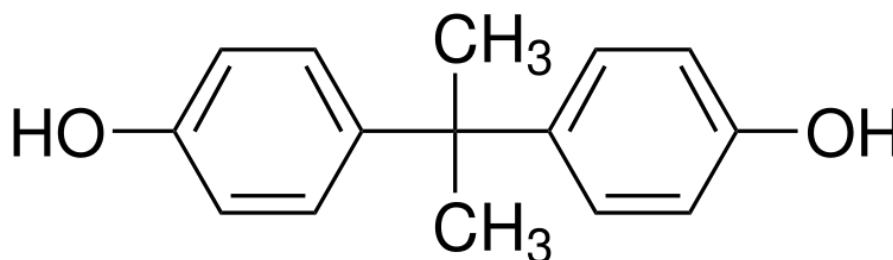
2.5 บทบาทของสารเคมีในโรคออทิซึมสเปกตรัม

มีการศึกษาพบว่าการได้รับสารเคมีในช่วงระหว่างการตั้งครรภ์อาจเป็นอีกสาเหตุที่ทำให้เกิดและ/หรือเพิ่มความเสี่ยงต่อโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยสารเคมีเหล่านี้เป็นสารเคมีที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมโรงงานและสามารถพบได้ในชีวิตประจำวัน สารเคมีเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อระบบประสาท การศึกษาผลของการได้รับสารพิษดังกล่าวต่อผลการแสดงออกด้านพฤติกรรมและจำนวนสารพิษที่ได้รับอย่างถูกต้องจึงยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด ดังนั้นทำให้ปัจจุบันการศึกษาความเสี่ยงในการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมจากการได้รับสารเคมีจึงมีเพิ่มมากขึ้นด้วย โดยพบว่าผู้ป่วยที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีกลุ่มยีนที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการกำจัดสารเคมีออกจากร่างกายทำงานผิดปกติ เช่น Glutathione S-transferase (GSTs) เป็นต้น จึงส่งผลให้มีระดับสารเคมีที่เป็นพิษต่อร่างกายสูงขึ้นเมื่อเทียบกับคนปกติ อีกทั้งมีการรายงานว่า การได้รับสารเคมีประเภทยาฆ่าแมลง (pesticide) ในขณะที่คุณแม่ตั้งครรภ์ โดยทำการศึกษาชนิดของยาฆ่าแมลงที่ได้รับ ระยะเวลาที่ได้รับ และระยะห่างของที่พักกับแหล่งที่ใช้ยาฆ่าแมลง พบว่าการได้รับยาฆ่าแมลงในช่วงระหว่างตั้งครรภ์ส่งผลต่อการพัฒนาเป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมในเด็กอย่างมีนัยสำคัญเปรียบเทียบกับเด็กที่ได้รับยาฆ่าแมลง

ปริมาณน้อยโดยวัดจากระดับยาฆ่าแมลงในพลาสมาจากสายสะดือ (umbilical cord plasma) ซึ่งจะทำการประเมินเด็กเหล่านั้นก่อนอายุ 36 เดือนโดยใช้แบบสอบถามที่ถูกประเมินจากผู้ปกครอง อีกทั้งยังพบว่าที่พักที่อยู่ในช่วง 500 เมตรของการใช้ยาฆ่าแมลงยังส่งผลให้เด็กที่เกิดมามีแนวโน้มที่จะเกิดโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมมากกว่าเด็กที่อาศัยอยู่ในที่พักที่ห่างออกไป นอกจากนี้ยาฆ่าแมลงยังพบว่ามีมลพิษทางอากาศ (air pollutants) โดยมีการศึกษาจากเด็กที่ป่วยเป็นโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมประกอบกับการใช้ข้อมูลที่ได้ทำการบันทึกไว้ตอนคลอดหรือใช้การสัมภาษณ์ข้อมูลจากผู้ปกครองเพื่อเป็นการประเมินความเสี่ยงในการได้รับมลพิษทางอากาศต่อการเกิดโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม ซึ่งข้อมูลจากการสำรวจพบว่า ในกลุ่มที่แม่มีลูกเป็นโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมมีในช่วงไตรมาสที่สามของการตั้งครรภ์ที่มีพักอยู่ในบริเวณถนนเมื่อเทียบกับเด็กปกติที่มีที่พักที่ไกลจากถนน เป็นการศึกษาที่แสดงให้เห็นว่าการได้รับมลพิษทางอากาศมีความสัมพันธ์กับโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม (Rossignol, Genuis, & Frye, 2014) จากหลักฐานที่กล่าวมาจะเห็นได้แล้วว่าการได้รับสารเคมีในช่วงระหว่างตั้งครรภ์อาจมีผลให้เกิดหรือเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมแต่การศึกษาในสารเคมีจำพวกสารที่รบกวนระบบฮอร์โมนในร่างกาย (endocrine disrupting compounds) ในผู้ป่วยโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัมยังมีการศึกษาไม่มากนัก โดยสารเคมีในกลุ่มนี้ที่มีความน่าสนใจ ได้แก่ บิสฟีนอลเอ (bisphenol-A)

2.6 บิสฟีนอลเอคืออะไร

บิสฟีนอลเอ (2,2'-bis(4-hydroxyphenyl)propane, Bisphenol-A; BPA) (รูปภาพที่ 2) เป็นสารเคมีในกลุ่มที่ไปรบกวนระบบควบคุมฮอร์โมนของร่างกาย เนื่องจากมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน โดยสามารถไปแย่งจับรีเซพเตอร์ (receptor) ของฮอร์โมนเอสโตรเจนได้ ทำให้ระบบฮอร์โมนในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป บิสฟีนอลเอเป็นสารเคมีที่ถูกใช้ในผลิตภัณฑ์พลาสติกโพลีคาร์บอเนต ผลิตภัณฑ์เรซินสังเคราะห์ ผิวน้ำที่เคลือบภายในกระป๋องอาหารและเครื่องดื่ม ขวดน้ำพลาสติกแบบแข็งรวมถึงผลิตภัณฑ์ที่ใช้ในการอุดฟัน (FDA, 2014) โดยบิสฟีนอลเอจะอยู่ในรูปโพลีเมอร์เพื่อเป็นการสร้างความแข็งแรงให้กับผลิตภัณฑ์เหล่านี้ อย่างไรก็ตาม ในสภาวะที่ผลิตภัณฑ์นั้นได้รับความร้อน หรือได้รับกับอาหารหรือเครื่องดื่มที่มีความเป็นกรด-เบส โพลีเมอร์ของบิสฟีนอลเอเกิดปฏิกิริยาไฮโดรไลซิส กลายเป็นบิสฟีนอลเอในรูปโมโนเมอร์ออกมาปนเปื้อนอยู่ในผลิตภัณฑ์เหล่านั้นได้ บิสฟีนอลเอจะเข้าสู่ร่างกายผ่านการรับประทานเป็นหลัก (National Institute of Environmental Health Sciences, 2016) โดยเมื่อเข้าสู่ร่างกายโดยการรับประทานบิสฟีนอลเอสามารถผ่านผนังทางเดินอาหารเข้าสู่กระแสเลือด ไปยังระบบต่าง ๆ ของร่างกาย รวมทั้งผ่านแนวกันระหว่างเลือดและสมอง (blood-brain barrier) และเข้าสู่สมองส่วนต่าง ๆ ได้

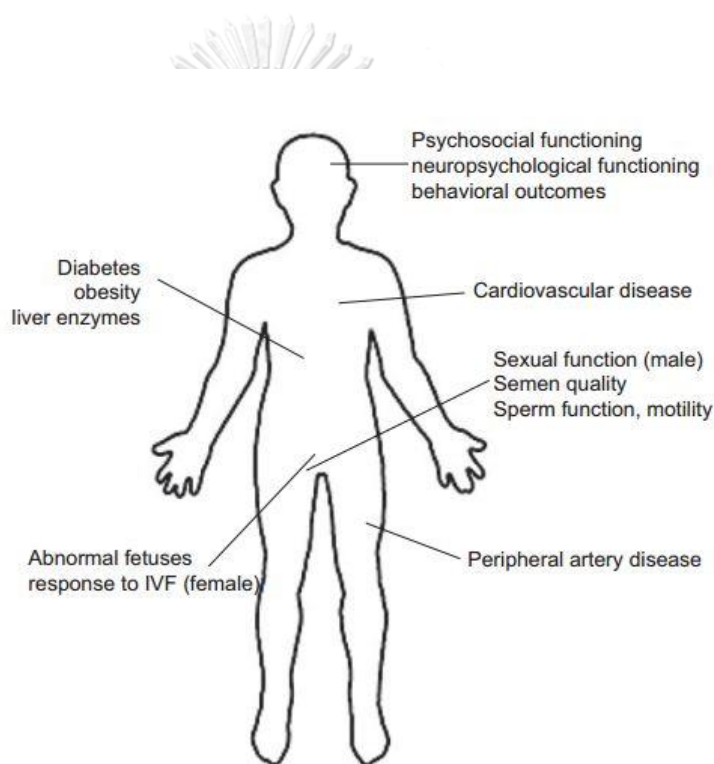


รูปภาพที่ 2 โครงสร้างของบิสฟีนอลเอ

(Bisphenol A - Bisphenol A Europe, 2013)

การตระหนักของการได้รับบิสฟีนอลเอในมนุษย์เริ่มมาตั้งแต่ปี ค.ศ. 2003 โดยศูนย์ควบคุม และป้องกันโรคของประเทศไทย (Centers for Disease Control and Prevention, CDC) ได้ทำการสำรวจและพบว่าสามารถตรวจพบระดับบิสฟีนอลเอในปัสสาวะของมนุษย์ในอายุตั้งแต่ 6 ปี ขึ้นไปถึง 93% ของจำนวนตัวอย่างปัสสาวะทั้งหมด อีกทั้งผู้ปกครองยังใส่ใจของการปนเปื้อนบิสฟีนอลเอในผลิตภัณฑ์ประเภทขวดนมมากขึ้น เนื่องจากมีการศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าบิสฟีนอลเอมีผลต่อทารกในครรภ์และเด็กแรกคลอด องค์การอาหารและยาประเทศไทย (Food and Drug Administration, FDA) สำนักงานปกป้องสิ่งแวดล้อมของประเทศไทย (The United State Environment Protection Agency) และองค์การความปลอดภัยของอาหารแห่งสหภาพยุโรป (The European Food Safety Authority, EFSA) ได้มีการกำหนดความเข้มข้นมาตรฐานที่ปลอดภัยของการได้รับบิสฟีนอลเอไว้ในทางเดียวกันคือ ปริมาณของบิสฟีนอลเอที่คนเราสามารถรับได้ในแต่ละวัน (tolerable daily intake, TDI) ได้กำหนดไว้ที่ 50 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันและมีการกำหนดระดับของการได้รับบิสฟีนอลเอที่ไม่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงทางชีววิทยาของร่างกาย (The no observed adverse effect level, NOAEL) ไว้ที่ 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ซึ่งค่ากำหนดทั้งสองได้มาจากการทดลองที่กระทำในสัตว์เท่านั้น อย่างไรก็ตามในปี ค.ศ. 2014 องค์การอาหารและยาประเทศไทย ได้มีการชี้แจงถึงการรับบิสฟีนอลเอในผลิตภัณฑ์บรรจุอาหารว่า จากหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ได้มีการอนุมัติให้ใช้บิสฟีนอลเอเป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์บรรจุอาหารและมีการระบุว่ามีความปลอดภัยกับผู้บริโภค จากการศึกษาภายใต้ศูนย์การวิจัยทางพิษวิทยาแห่งชาติโดยองค์การอาหารและยาประเทศไทย (FDA's National Center for Toxicological Research, NCTR) พบว่าในผลิตภัณฑ์บรรจุอาหารดังกล่าวมีบิสฟีนอลเอเป็นส่วนประกอบอยู่ในปริมาณที่น้อยกว่าจะเป็นอันตรายกับผู้บริโภคและจากการศึกษาในหนูทดลองที่

ทำการศึกษาการได้รับบิสฟีนอลเอในระยะเวลา ซึ่งแบ่งการทดลองออกเป็นการได้รับบิสฟีนอลเอในระดับความเข้มข้นต่ำ (2.5-2,700 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) และการได้รับบิสฟีนอลเอในระดับความเข้มข้นที่สูง (100,000-300,000 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน) พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นสูงจะส่งผลกระทบต่อระดับฮอร์โมนในซีรัม ส่วนประกอบต่าง ๆ ที่อยู่ภายในรังไข่และน้ำหนักรของหนูทดลอง (Delclos et al., 2014) อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังมีการศึกษาหลาย ๆ การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอในปริมาณน้อย ๆ หรือความเข้มข้นที่ต่ำกว่าความเข้มข้นที่ระบุว่าจะปลอดภัยต่อร่างกายมีผลต่อระบบต่าง ๆ ในร่างกายและมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของกลุ่มยีนในหลาย ๆ กลุ่ม (รูปภาพที่ 3)

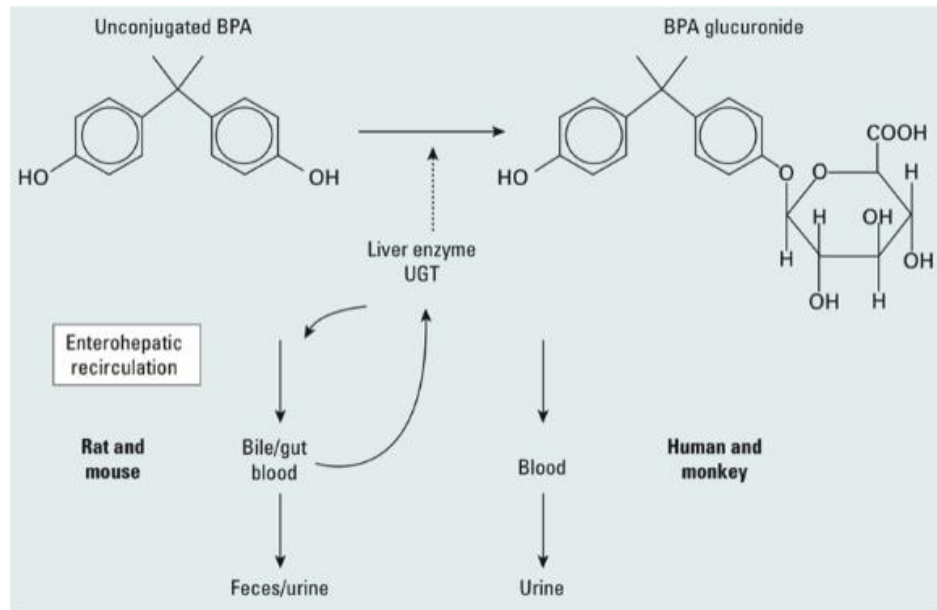


รูปภาพที่ 3 ผลของบิสฟีนอลเอต่อระบบต่าง ๆ ของร่างกาย

บิสฟีนอลเอมีผลกระทบต่อหลาย ๆ ระบบของร่างกาย โดยมีการศึกษาพบว่าบิสฟีนอลเอมีผลต่อ โรคเบาหวาน ความอ้วนและเอนไซม์ที่อยู่ในตับ มีผลต่อระบบสืบพันธุ์ ปริมาณและคุณภาพของเซลล์สืบพันธุ์ มีผลต่อระบบไหลเวียนเลือดและโรคหัวใจ มีผลต่อความผิดปกติของทารก รวมไปถึงความผิดปกติเกี่ยวกับสมองและพฤติกรรมที่แสดงออก (Vandenberg, Hunt, Myers, & Vom Saal, 2013)

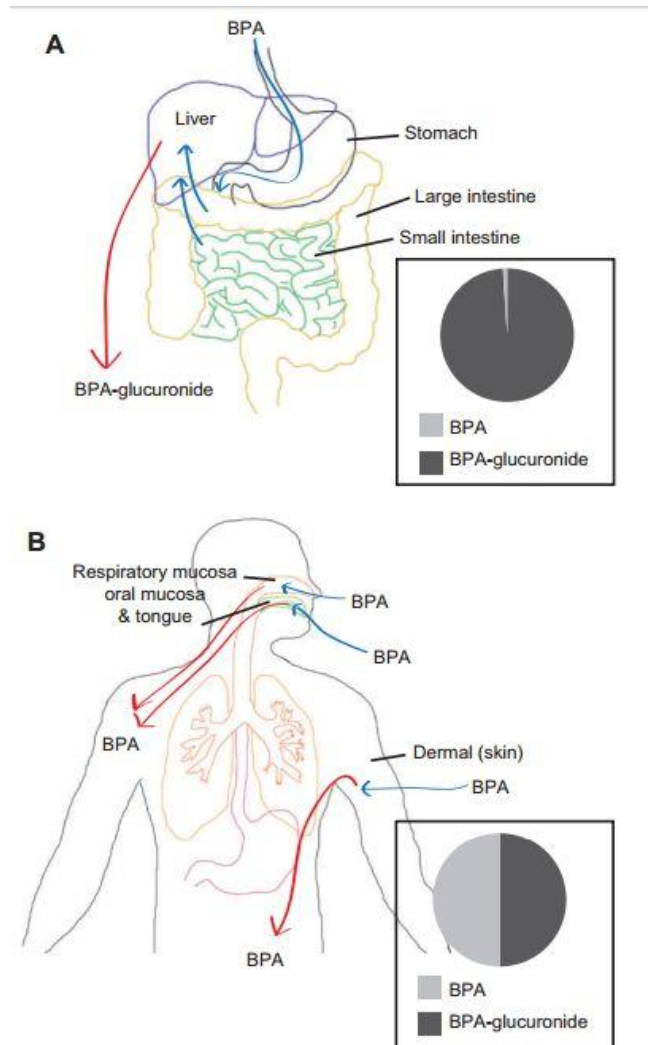
มีการสำรวจพบว่าในแต่ละวันร่างกายได้รับบิสฟีนอลเอจากแหล่งต่าง ๆ ประมาณ 34 นาโนกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันถึง 100 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวัน ซึ่งการศึกษาดังกล่าวเป็นการศึกษาในคนทั่วไป แต่พบว่ามีการศึกษาในคนที่ตั้งครรรภ์พบว่ามีระดับเมตาบอไลต์ของบิสฟีนอลเอสูงกว่าเมื่อเทียบ

กับคนปกติ (Braun et al., 2012) เมื่อบิสฟีนอลเอเข้าสู่ร่างกายจะถูกดูดซึมอย่างรวดเร็วที่ระบบทางเดินอาหารและจะถูกกำจัดออกอย่างรวดเร็ว โดยร่างกายสามารถกำจัดบิสฟีนอลเอได้หมดภายใน 24 ชั่วโมง บิสฟีนอลเอซึ่งเป็นสารพิษต่อร่างกายจะอยู่ในรูป active form ถูกเปลี่ยนให้อยู่ในรูปที่ทำให้เป็นพิษน้อยลง (detoxification) ผ่านกระบวนการ glucuronidation (รูปภาพที่ 4) กระบวนการ glucuronidation เป็นกระบวนการที่เกี่ยวข้องกับการกำจัดสารจำพวทยา สารพิษ มลพิษทางอากาศ ออกจากร่างกาย กระบวนการ glucuronidation เป็นการเติมกรดกลูคูโรนิก (glucuronic acid) อาศัยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGTs) การเติมกรดกลูคูโรนิกไปยังสารที่ต้องการกำจัดจะทำให้สารดังกล่าวมีคุณสมบัติละลายน้ำได้ดีขึ้นส่งผลให้กำจัดออกได้ง่ายขึ้นหรือทำให้สารดังกล่าวมีพิษน้อยลง สำหรับบิสฟีนอลเอเมื่อถูกเติมกรดกลูคูโรนิก จะกลายเป็นบิสฟีนอลเอกลูโคไซด์ (BPA-GA) และจะเข้าสู่กระบวนการกำจัดออกไป (Konieczna, Rutkowska, & Rachon, 2015) ในหนูทดลองกลุ่มเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดบิสฟีนอลเอส่วนใหญ่จะใช้ UDP-glucuronosyltransferase ไอโซฟอร์ม 2B1 ซึ่งจะแตกต่างกับไอโซฟอร์มที่ใช้ในการกำจัดบิสฟีนอลเอในมนุษย์ ซึ่งจะใช้อิโซฟอร์ม 2B15 ดังนั้นการศึกษาค้นคว้าความแตกต่างของเจเนติกส์ในเอนไซม์ที่ใช้ในการกำจัดบิสฟีนอลเอ จะทำให้มีความเข้าใจมากขึ้นเกี่ยวกับความแตกต่างของความสามารถในการกำจัดบิสฟีนอลเอออกจากร่างกาย อีกทั้งในหนูทดลองการกำจัดบิสฟีนอลเอออกจากร่างกายส่วนใหญ่จะถูกกำจัดออกผ่านทางน้ำดี (bile) เป็นหลักและในมนุษย์บิสฟีนอลเอจะถูกกำจัดออกผ่านเลือดและขับออกจากร่างกายผ่านทางปัสสาวะ



รูปภาพที่ 4 กระบวนการ glucuronidation ของบิสฟีนอลเอในหนูและในมนุษย์

กระบวนการ glucuronidation เป็นกระบวนการกำจัดบิสฟีนอลเอซึ่งเป็นสารพิษออกจากร่างกาย โดยเป็นการเติมกรดกลูคูโรนิก อาศัยเอนไซม์ UDP-glucuronosyltransferase (UGT) สำหรับในมนุษย์และสัตว์พวก primate จะมีการลำเลียงไปในกระแสเลือดและขับออกจากร่างกายในรูปปัสสาวะ สำหรับในหนูจะมีการกำจัดบิสฟีนอลเอออกจากร่างกายผ่านน้ำดีและขับออกจากร่างกายในรูปปัสสาวะและอุจจาระ (Taylor et al., 2011)



รูปภาพที่ 5 ความแตกต่างในการเมตาบอลิซึมของบิสฟีนอลเอเนื่องจากวิธีการที่ได้รับบิสฟีนอลเอ

ภาพเอ (A) แสดงถึงเมื่อบิสฟีนอลเอเข้าสู่ระบบทางเดินอาหาร (ลูกศรสีฟ้า) จะถูกดูดซึมเข้าสู่เส้นเลือดโดยผ่านเส้นเลือดที่อยู่ในระบบทางเดินอาหาร (mesenteric blood vessel) หลังจากนั้นจะถูกขนส่งไปยังตับ โดยกระบวนการเมตาบอลิซึมของบิสฟีนอลเอจากการได้รับบิสฟีนอลเอผ่านทางปากนั้น บิสฟีนอลเอสามารถถูกเมตาบอลิซึมได้เกือบทั้งหมดและถูกขนส่งไปยังกระแสเลือดในรูปของ BPA-glucuronide (ลูกศรสีแดง) ภาพบี (B) เมื่อบิสฟีนอลเอเข้าสู่ร่างกายโดยผ่านทางอื่น ๆ เช่น ทางการหายใจ ทางผิวหนัง บิสฟีนอลเอจะไม่สามารถถูกเมตาบอลิซึมได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยจะมีบิสฟีนอลเอในรูปแบบอิสระ (free form) ลอยอยู่ในกระแสเลือดในระยะเวลาและความเข้มข้นที่มากกว่า (ลูกศรสีแดง) (Vandenberg et al., 2013)

2.7 ผลของการได้รับบิสฟีนอลเอกับการทำงานของระบบประสาท

ปัจจุบันมีการศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบประสาทอย่างแพร่หลาย มีการศึกษาพบว่าทารกที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องจะส่งผลต่อการผลิตสารสื่อประสาทในสมอง การแสดงออกของยีนผิดปกติไป รวมไปถึงการแสดงออกด้านพฤติกรรมของลูก โดยทำการศึกษาในหนูทดลองพบว่า การที่หนูทดลองได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ แล้วทำการตรวจระดับสารสื่อประสาทในลูกหนูจำพวก โดปามีน (dopamine, DA) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่มีบทบาทสำคัญในโรคที่มีความเสื่อมของระบบประสาท (neurodegenerative disease) และซีโรโทนิน (serotonin) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการควบคุมอารมณ์ ความโกรธและความก้าวร้าว พบว่าในหนูทดลองกลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอจะส่งผลการหลังสารสื่อประสาทดังกล่าวมีความผิดปกติเมื่อเทียบกับหนูที่แม่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ (Honma et al., 2006) อีกทั้งมีการศึกษาโดยสมาคมทางวิชาการและทำข้อมูลเชิงลึกเกี่ยวกับพิษจากบิสฟีนอลเอ (CLARITY-BPA) พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอในขณะเกิดการพัฒนาระยะแรกของสมองจะสามารถเหนี่ยวนำให้มีการเปลี่ยนแปลงในระดับทรานสคริปโตมและการเปลี่ยนแปลงทางเอพิเจเนติกส์ในสมองส่วนไฮโปทาลามัสและฮิปโปแคมปัสรวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงทางด้านพฤติกรรมความกังวลของหนูในช่วงวัยรุ่นและวัยผู้ใหญ่ และมีระดับฮอร์โมนเพศแตกต่างกันไป นอกจากนี้ยังมีการพบว่าในหนูที่ได้รับบิสฟีนอลเอที่มีความเข้มข้น 2.5 และ 2,500 ไมโครกรัมต่อกิโลกรัมต่อวันมีระดับเมธิลเลชันของดีเอ็นเอและการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติไป (Heindel et al., 2015) บิสฟีนอลเอนับว่าเป็นสารที่เป็นพิษต่อระบบประสาทชนิดหนึ่ง พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอทำให้มีอนุมูลอิสระจำพวกซูเปอร์ออกไซด์ (superoxide) และเปอร์ออกไซด์ (peroxide) ซึ่งเป็น reactive oxygen species ชนิดหนึ่ง อีกทั้งตัวที่ช่วยในการกำจัดอนุมูลอิสระเหล่านี้ เช่น รีดิวส์กลูตาไธโอน (reduced glutathione) ลดลงอีกด้วย (Kabuto, Hasuike, Minagawa, & Shishibori, 2003) ส่งผลให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน (oxidative stress) ภายในเซลล์ประสาท (Babu, Uppu, Claville, & Uppu, 2013) และเป็นผลทำให้เกิดการทำลายของเซลล์ประสาทอีกด้วย ต่อมาหลายการศึกษาจึงให้ความสำคัญกับจำนวนเซลล์ประสาทที่มีความผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ มีการศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอกับจำนวนของเซลล์ประสาทและ glia cell ในสมองส่วน prefrontal cortex ของหนู ซึ่ง prefrontal cortex เป็นสมองส่วนที่มีความสำคัญในหลาย ๆ ด้าน เช่น ด้านการรับรู้ ความสนใจ ด้านการเข้าสังคม รวมไปถึงการเรียนรู้และความจำอีกด้วย ในมนุษย์มีการรายงานว่าความผิดปกติของสมองส่วน prefrontal cortex มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยทำการศึกษาในหนูทดลองพบว่า หนูที่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องที่ความเข้มข้น 400 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน ส่งผลถึงจำนวนเซลล์ประสาทและ glia cells มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเฉพาะในลูกหนูทดลองเพศผู้ (Sadowski, Wise,

Park, Schantz, & Juraska, 2014) อีกทั้งมีหลักฐานพบว่าในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมเพศชายมีจำนวนของเซลล์ประสาทและ glia cells เพิ่มมากขึ้นด้วย (Eric Courchesne et al., 2011; Edmonson, Ziats, & Rennert, 2014) การศึกษาผลของบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์ต้นกำเนิดประสาทโดยกระบวนการ autophagy ซึ่งเกิดผ่านการลดลงของการส่งสัญญาณในกระบวนการ AMPK และ mTOR (Agarwal et al., 2015) บิสฟีนอลเอยังส่งผลกระทบต่อรูปร่างของเซลล์ประสาทในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส นอกจากนั้นการได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องของแม่ต่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสพบว่าบิสฟีนอลเอมีผลทำให้พฤติกรรมด้านความจำของลูกหนูที่เกิดมา มีความบกพร่องไปซึ่งมีความเกี่ยวข้องกับการยับยั้งวิถีสัญญาณของ ERK/CREB/BDNF ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (C. Wang et al., 2016) การศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อรูปแบบของทรานสคริปโตมหรือโปรตีโอมยังเป็นการศึกษาที่มีปริมาณน้อยในปัจจุบัน พบว่า ในปี ค.ศ. 2011 มีการศึกษาการแสดงออกในรูปพีโนไทป์และรูปแบบของทรานสคริปโตมในปลาม้าลายที่ได้รับบิสฟีนอลเอในระยะการเจริญเติบโต ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า บิสฟีนอลเอมีผลทำให้การเจริญของเซลล์ประสาทตัวอ่อนมีความผิดปกติและมีการยับยั้งการแตกแขนงของเซลล์ประสาท อีกทั้งการศึกษาต่อรูปแบบของทรานสคริปโตมยังพบว่ากลุ่มยีนที่มีความผิดปกติเป็นกลุ่มยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการ synaptic long-term potentiation และ axonal guidance อีกทั้งยังพบยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการพัฒนาของสมองและเกี่ยวข้องกับพฤติกรรมที่แสดงออก (Lam et al., 2011) ซึ่งมีความเกี่ยวเนื่องกับโรคทางพัฒนาการระบบประสาทเป็นอย่างมาก นอกจากนั้นยังมีการศึกษาต่อรูปแบบของทรานสคริปโตมใน uterus ของลิงที่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้อง โดยพบว่าหากได้รับบิสฟีนอลเอในระยะไตรมาสที่สามของการตั้งท้องจะส่งผลถึงทารกที่อยู่ในท้องได้ (Calhoun et al., 2014) อีกทั้งยังมีการศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอต่อรูปแบบของทรานสคริปโตมในเนื้อเยื่อสมองแยกได้จากเอ็มบริโอของหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องพร้อมกับการศึกษาพฤติกรรมด้านปฏิสัมพันธ์ด้านสังคมในหนู พบว่าบิสฟีนอลเอส่งผลทำให้หนูมีพฤติกรรมการเข้าสังคมบกพร่องไป และยังแสดงถึงความรุนแรงมากขึ้นในหนูรุ่นถัด ๆ ไป อีกทั้งกลุ่มยีนที่มีความผิดปกติเช่น estrogen receptor oxytocin และ vasopressin (Wolstenholme et al., 2012) ส่วนการศึกษาต่อรูปแบบของโปรตีโอมจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองของปลาม้าลายพบว่า มีกลุ่มโปรตีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิซึมและกระบวนการขนส่งต่าง ๆ ผิดปกติไป (X. Wu et al., 2016) จะเห็นได้ว่าการที่ได้รับบิสฟีนอลเอมีผลต่อกระบวนการต่าง ๆ มากมายของร่างกายรวมถึงมีความเกี่ยวข้องอย่างมากในระบบประสาท ซึ่งอาจจะมีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม อย่างไรก็ตาม ปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในรูปแบบของทรานสคริปโตมที่มีความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมเพื่อสร้างความรู้ ความเข้าใจเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของบิสฟีนอลเอในระดับอณูชีววิทยากับการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในอนาคตต่อไป

2.8 บทบาทของบิสฟีนอลเอในโรคออทิซึมสเปกตรัม

การศึกษาความสัมพันธ์ของบิสฟีนอลเอกับโรคออทิซึมสเปกตรัมยังมีจำกัด ส่วนใหญ่ การศึกษาเกี่ยวกับบิสฟีนอลเอในโรคออทิซึมสเปกตรัมจะเป็นการศึกษาในเชิงสำรวจระดับของบิสฟีนอลเอในซีรัมหรือในปัสสาวะของเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมเทียบกับเด็กปกติ การศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอในระดับชีวโมเลกุลเพื่อหาว่าบิสฟีนอลเอเป็นหนึ่งในสาเหตุของการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมยังมีจำนวนไม่มากนัก มีการรายงานพบว่าบิสฟีนอลเอมีความสัมพันธ์โดยเป็นหนึ่งในปัจจัยที่ทำให้เกิดและ/หรือเพิ่มความเสี่ยงในการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยมีรายงานว่า การได้รับบิสฟีนอลเอมีผลต่อด้านพฤติกรรมที่บกพร่องด้านปฏิสัมพันธ์ทางสังคมในหนูทดลอง มีความบกพร่องของไมโทคอนเดรียในสมอง ซึ่งพบได้ในผู้ป่วยที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัม (Kalkbrenner, Schmidt, & Penlesky, 2014) มีการสำรวจระดับของบิสฟีนอลเอในปัสสาวะของเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 46 คน เปรียบเทียบกับเด็กปกติที่มีอายุใกล้เคียงกัน (aged-match control) พบว่าในเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีระดับบิสฟีนอลเอในปัสสาวะสูงกว่าเด็กปกติและในเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีการกำจัดบิสฟีนอลเอผ่านกระบวนการ glucuronidation ลดลงเมื่อเทียบกับเด็กปกติอีกด้วย (Stein, Schluter, Steer, Guo, & Ming, 2015) และการศึกษาในเชิงสำรวจระดับบิสฟีนอลเอในซีรัมของเด็กออทิซึมสเปกตรัมจำนวน 48 คน พบว่าในเด็กออทิซึมสเปกตรัมมีระดับบิสฟีนอลเอในเลือดสูงกว่าเมื่อเทียบกับเด็กปกติ (Kardas et al., 2016) จะเห็นได้ว่าในเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีระดับบิสฟีนอลเอสูงกว่าเด็กปกติทั้งในปัสสาวะและในซีรัม อีกทั้งในเด็กมีรายงานว่าเด็กที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัมยังพบว่ามีภาวะเครียดออกซิเดชันในเซลล์ประสาท (Chauhan & Chauhan, 2006) นอกจากนี้มีการศึกษาในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวที่พัฒนามาจากเด็กออทิซึมสเปกตรัมก็พบว่าเมื่อเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวที่ถูก treat ด้วยบิสฟีนอลเอด้วยความเข้มข้นต่าง ๆ ทำให้เกิดภาวะภาวะเครียดออกซิเดชันและเกิดการสูญเสียหน้าที่การทำงานของไมโทคอนเดรีย (Kaur, Chauhan, Gu, & Chauhan, 2014) อีกเหตุผลที่สนับสนุนว่าการที่มีเด็กที่เป็นโรคออทิซึมสเปกตรัมมีภาวะเครียดออกซิเดชันนั้นอาจจะเป็นผลมาจากการที่มีระดับสารที่เป็นอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระที่ผิดปกติไปจากคนปกติ (Kondolot et al., 2016) และมีการศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอกับกระบวนการทางเอพิเจเนติกส์พบว่าบิสฟีนอลเอมีผลทำให้เกิดการแสดงออกของยีน MECP2 เพิ่มมากขึ้น (Yeo et al., 2013) ซึ่งยีน MECP2 นี้เป็นยีนที่ความเกี่ยวข้องกับการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมและกระบวนการทางเอพิเจเนติกส์เป็นอย่างมาก โดยมีหลายการศึกษาพบว่าเด็กที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัมมีการกระบวนการเมธิเลชันของดีเอ็นเอซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการทางเอพิเจเนติกส์ผิดปกติไป อย่างไรก็ตาม การศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอในเซลล์ระบบประสาทที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมยังเป็นที่ไม่ทราบแน่ชัด ดังนั้นการศึกษาในครั้งนี้จะใช้ Wistar rat เป็นต้นแบบ

เพื่อศึกษาผลของการที่แม่หนูได้รับบิสฟีนอลเอต่อการแสดงออกที่ผิดปกติไปของยีนของลูกที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

2.9 ต้นแบบที่ใช้ในการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้จะใช้หนู Wistar rat เป็นต้นแบบในการทดลอง Wistar rat เป็นหนูที่นิยมนำมาใช้ในการศึกษาด้านประสาทวิทยาศาสตร์ (Neurosciences) มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Rattus norvegicus* ลักษณะจะเป็นสีขาว สำหรับข้อมูลพื้นฐานทางชีววิทยาของหนูชนิดนี้มีดังนี้ Wistar rat มีอายุขัยเฉลี่ย 2-3 ปี น้ำหนักเมื่อโตเต็มวัยสำหรับเพศผู้จะเท่ากับ 250-300 กรัมและเพศเมียจะเท่ากับ 180-220 กรัม โดยในเพศผู้และเพศเมียอายุที่เหมาะสมในการใช้ผสมพันธุ์คือ 8-10 สัปดาห์ มีวงจรการเป็นสัดเท่ากับ 4-5 วัน จะใช้เวลาตั้งท้อง 19-22 วัน ขนาดครอกจะประมาณ 9-11 ตัว ซึ่งอายุลูกหนูที่ย่านมจะอยู่ที่ 19-22 วัน ในหนูที่โตเต็มวัยปริมาณการกินอาหารจะเท่ากับ 15-30 กรัมต่อตัวต่อวันและปริมาณการกินน้ำจะเท่ากับ 20-45 มิลลิลิตรต่อตัวต่อวัน หนูเพศผู้จะมีน้ำหนักของสมองประมาณ 250 ถึง 350 กรัม ขนาดของสมองจะอยู่ที่ประมาณ 1-3 เซนติเมตร (NLAC mahidol, 2016) โดยสมองที่เลือกใช้ศึกษาจะเป็นสมองส่วนที่เรียกว่าฮิปโปแคมปัส ฮิปโปแคมปัสเป็นสมองส่วนที่มีความสำคัญในการเรียนรู้และความจำ การศึกษาเซลล์ประสาทที่แยกได้สมองส่วนฮิปโปแคมปัสจะทำให้ทราบถึงความรู้ความเข้าใจต่อผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องต่อการแสดงออกของยีนในเซลล์ประสาทของลูก อีกทั้งในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษาแบบอินเทอร์แอคโตมเพื่อดูความสัมพันธ์ระหว่างยีนอีกด้วย

2.10 อินเทอร์แอคโตมิกส์คืออะไร

อินเทอร์แอคโตมิกส์ (interactomics) เป็นการศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนกับยีน โปรตีนกับโปรตีนรวมถึงการศึกษาระหว่างยีนกับโปรตีน โดยใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์เป็นตัววิเคราะห์ การศึกษาปฏิสัมพันธ์ของยีนจะแสดงออกมาในรูปแบบของโครงข่ายทางชีวภาพ (biological network) เพื่อดูความสัมพันธ์ในภาพรวมของกลุ่มยีน บอกถึงหน้าที่ของยีนแต่ละตัวหรือยีนตัวใดบ้างที่มีบทบาทในการควบคุมยีนตัวอื่น ๆ ที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคที่สนใจ ทำให้มีประโยชน์ในการทดลองที่ตั้งสมมุติฐานโดยไม่มีอคติเอนเอียงไปที่ยีนหรือโปรตีนใดโปรตีนหนึ่ง ในการศึกษาครั้งนี้ การศึกษาเชิงอินเทอร์แอคโตมิกส์ถูกนำมาใช้เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่มีความผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอกับโรคออทิซึมสเปกตรัม อีกทั้งดูความสัมพันธ์โดยใช้รายชื่อยีนที่เคยมีการรายงานไว้แล้วว่ามีผลผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมและกลุ่มยีนที่มีความผิดปกติจากการได้รับบิส

ฟินอลเอ การศึกษาอินเทอร์เน็ตแอกโตมเป็นกระบวนการในการคัดเลือกยื่นที่มีความเหมาะสมที่สามารถพัฒนาไปเป็นสารบ่งชี้ทางชีวภาพได้ต่อไปในอนาคต



บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

ตอนที่ 1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์

1.1 การรวบรวมและวิเคราะห์ผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิกส์จากฐานข้อมูล GEO datasets

การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ในการศึกษาครั้งนี้ทำการรวบรวมผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิกส์ที่ได้ตีพิมพ์จากฐานข้อมูล GEO datasets (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gds/>) โดยทำการค้นงานวิจัยที่มีความเกี่ยวข้องกับการได้รับบิสฟีนอลเอ ในวันที่ 13 พฤษภาคม พ.ศ. 2560 ทางผู้วิจัยได้กำหนดเกณฑ์การเลือกดังนี้

1. ค้นหาในฐานข้อมูล GEO datasets โดยใช้คำค้นหา “Bisphenol-A”
2. เป็นงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการได้รับบิสฟีนอลเอโดยใช้หนูเมาส์ หนูแรท เซลล์เพาะเลี้ยงโดยตรงจากคนและสัตว์และเซลล์ไลน์เป็นต้นแบบในการทดลอง
3. หากเป็นงานวิจัยที่ศึกษาผลของสารเคมีหลายชนิดต่อการแสดงออกของยีน เวลานำมาวิเคราะห์เลือกเฉพาะผลการแสดงออกของยีนจากการได้รับบิสฟีนอลเอเท่านั้น
4. การออกแบบการทดลองต้องมีจำนวนตัวอย่างทั้งในกลุ่มทดลอง (experimental groups) และกลุ่มควบคุม (control group) มากกว่า 1 replicate ต่อกลุ่ม ($n > 1/\text{group}$)
5. ไฟล์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ต้องเป็นไฟล์ตามที่กำหนดไว้ดังนี้ .annot, .xlsx, .txt เท่านั้น
6. มีข้อมูล gene annotation ในฐานข้อมูล NCBI โดยสามารถดาวน์โหลดได้ใน <ftp://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/pub/geo/DATA/annotation/platforms>

เมื่อรวบรวมผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิกส์ที่มีความเกี่ยวข้องกับการได้รับบิสฟีนอลเอเรียบร้อยแล้ว ข้อมูลทั้งหมดถูกนำมาวิเคราะห์ใหม่ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศศาสตร์โดยใช้โปรแกรม Multiple Experiment Viewer (MeV) (<http://mev.tm4.org/>) (Saeed et al., 2003) เพื่อหารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติโดยมีนัยสำคัญทางสถิติ ข้อมูลทางทรานสคริปโตมทำการคัดกรองที่ 70% cut off โดยการคำนวณทางสถิติใช้ two-tailed t-test ($p\text{-value} < 0.05$) ในการวิเคราะห์หาเอ็นทีมีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ

1.2 การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกทางผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ และยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

รายชื่อยีนที่มีนัยสำคัญทางสถิติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในข้อมูลแต่ละชุดนำไป overlap กับรายชื่อยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมจากฐานข้อมูลที่แตกต่างกัน ได้แก่ SFARI (<https://gene.sfari.org/database/human-gene/>) AutDB (http://autism.mindspec.org/autdb/HG_Home.do) และ AutismKB (<http://autismkb.cbi.pku.edu.cn/>) เพื่อหารายชื่อกลุ่มยีนที่แสดงออกมากกว่า 1 กลุ่ม (reproducibility) โดยใช้ Venn diagram (<http://bioinfo.gp.cnb.csic.es/tools/venny/>) จากนั้นรายชื่อยีนที่มีนัยสำคัญทางสถิติจากแต่ละชุดของข้อมูลทางทรานสคริปโตมิกส์นำมาวิเคราะห์หาความสัมพันธ์กับรายชื่อยีนที่มีรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยการวิเคราะห์แบบ Hypergeometric Distribution Analysis ในโปรแกรม Hypergeometric Distribution Calculator ในระบบ Keisan Online Calculator package (<https://keisan.casio.com/exec/system/1180573201>) และเพื่อทำนายความเกี่ยวข้องระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม กลุ่มรายชื่อยีนดังกล่าวนำไปทำนายและวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพ (biological pathway and network analysis) โดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (<https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/>) การวิเคราะห์ทางสถิติที่ใช้จะใช้ Fisher's exact test

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีน ในการศึกษาครั้งนี้ใช้การวิเคราะห์แบบ Hypergeometric Distribution Analysis การวิเคราะห์แบบ Hypergeometric Distribution Analysis เป็นการวิเคราะห์การกระจายของความน่าจะเป็น (Probability Distribution) ในลักษณะที่เป็นข้อมูลไม่ต่อเนื่อง (Discrete Probability Distribution) โดยข้อมูลการกระจายในลักษณะนี้ จะต้องเป็นข้อมูลนับเท่านั้น โดยจะส่งกลับค่าความน่าจะเป็นของจำนวนตัวอย่างที่สำเร็จตามที่กำหนด ซึ่งมีตัวแปรต่าง ๆ ดังนี้ จำนวนครั้งที่สำเร็จจากตัวอย่าง ขนาดตัวอย่าง จำนวนครั้งที่สำเร็จจากประชากรและขนาดของกลุ่มประชากร ในการศึกษาครั้งนี้จำนวนครั้งที่สำเร็จจากตัวอย่างจะเป็นจำนวนรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีการแสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม (overlapping genes) ขนาดของตัวอย่างจะเป็นจำนวนรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในแต่ละการศึกษา จำนวนครั้งที่สำเร็จจากประชากรจะเป็นจำนวนยีนที่แสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม (ASD candidate genes) และขนาดของกลุ่มประชากรคือจำนวนยีนทั้งหมดที่ศึกษาในแต่ละการศึกษา

การวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้ Fisher's exact test ในโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis เป็นการวิเคราะห์ในกลุ่มตัวอย่างขนาดเล็กเพื่อทดสอบว่าประชากรทั้ง 2 กลุ่มมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญหรือไม่ โดยจะทำการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีน 2 กลุ่มได้แก่ ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออลิซิมสเปกตรัมที่รวบรวมโดยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis

ตอนที่ 2 สัตว์ทดลอง

Wistar-Furth rats เพศเมียอายุ 8 สัปดาห์ จากศูนย์สัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกนำมาผสมพันธุ์กับหนูเพศผู้ โดยนับวันที่หนูเพศเมียและเพศผู้อยู่ด้วยกันเป็นวันที่ตั้งท้องวันที่ 0 หนูเพศเมียที่ตั้งท้องวันที่ 1 จะถูกเลี้ยง ณ ศูนย์สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยในสภาวะที่มีการควบคุมอุณหภูมิและแสงสว่าง แบ่งเป็น 12 ชั่วโมงในช่วงที่มีแสงสว่างและ 12 ชั่วโมงในช่วงที่ไม่มีแสงสว่าง ในห้องเลี้ยงสัตว์ถูกควบคุมอุณหภูมิไว้ที่ 21 ± 1 องศาเซลเซียสและความชื้น 30-70 เปอร์เซ็นต์ สัตว์ทดลองจะได้รับอาหารและน้ำไม่จำกัด ซึ่งขั้นตอนและกระบวนการกระทำต่อสัตว์ทดลองได้ดำเนินการเรื่องจริยธรรมการวิจัยในสัตว์ทดลองผ่านคณะกรรมการบริหารศูนย์สัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตอนที่ 3 การป้อนบิสฟีนอลเอในสัตว์ทดลอง

การป้อนบิสฟีนอลเอดำเนินการตามวิธีที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้ว (Wang et al., 2014) Wistar-Furth rats ที่ตั้งท้องได้ 1 วันได้ถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่รับบิสฟีนอลเอ หนูจะได้น้ำมันข้าวโพด (corn oil) สำหรับกลุ่มควบคุมและได้รับบิสฟีนอลเอในกลุ่มทดลองตั้งแต่ตั้งท้องได้ 1 วันจนกระทั่งออกลูก หนูกลุ่มควบคุมได้รับน้ำมันข้าวโพด (corn oil) ที่ความเข้มข้น 0.2 mL/kg ต่อวัน หนูกลุ่มทดลองได้รับบิสฟีนอลเอโดยการเตรียมบิสฟีนอลเอสำหรับการป้อนหนูเตรียมจากสารละลายบิสฟีนอลเอตั้งต้นที่ความเข้มข้น 250 mg/mL ในสารละลาย absolute ethanol การเตรียมบิสฟีนอลเอสำหรับป้อนจะเตรียมจากสารละลายตั้งต้นให้ละลายอยู่ในน้ำมันข้าวโพดที่ความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}$ ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน และป้อนให้กับหนูทางปากโดยใช้เข็มฉีดยาสำหรับป้อนอาหาร (intra-gastric administration) ทุกวันจนกระทั่งหนูคลอด หนูทุกตัวถูกชั่งน้ำหนักทุกวันเพื่อเป็นการปรับขนาดของสารเคมีที่ใช้ เพื่อป้องกันการเกิด cross-contamination ของบิสฟีนอลเอแม่ หนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มบิสฟีนอลเอจะเลี้ยงแยกกรงและแยกชุดเข็มฉีดยาสำหรับป้อนอาหารระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มบิสฟีนอลเอ ลูกหนูที่คลอดออกมาในวันที่ 1 (postnatal day 1) ถูกการุณยฆาต

โดยการฉีด sodium pentobarbital บริเวณเยื่อช่องท้อง (intraperitoneal injection) ที่ความเข้มข้น 100 mg/kg และยืนยันการการุณยฆาตด้วยการตัดศีรษะ

ตอนที่ 4 การแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

สมองส่วนฮิปโปแคมปัสจะถูกแยกเพื่อไปทำการวิเคราะห์ 2 ส่วน ได้แก่ เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสสำหรับกระบวนการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์และเซลล์ประสาทที่แยกได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสสำหรับทำ neurite outgrowth assay

4.1 การแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสสำหรับการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์

สมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกแยกจากลูกหนูภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอ (stereo microscope) ตามวิธีที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้ว (Guo, Patzlaff, Jobe, & Zhao, 2012) โดยทางคณะผู้วิจัยทำการแยกเพศของลูกหนูก่อนทำการเก็บสมอง หลังจากแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสแล้วนั้นเนื้อเยื่อสมองจะเก็บไว้ใน RNAlater ที่ -80 องศาเซลเซียส ซึ่งจะช่วยคงสภาพสารพันธุกรรมจนกว่านำมาวิเคราะห์ในกระบวนการถัดไป

4.2 การแยกเซลล์ระบบประสาทสำหรับการวิเคราะห์ neurite outgrowth

4.2.1 การเตรียมสารเคมีสำหรับการแยกเซลล์ระบบประสาท (Guo et al., 2012)

- FGF-2 (Basal fibroblast growth factor-2) และ EGF (Epidermal growth factor) แยกเก็บสารเป็นหลอดละ 10 μ l ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml ที่ -80 องศาเซลเซียส การนำสารละลายมาใช้ต้องเติม Neurobasal medium ลงไปปริมาณ 90 μ l เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 100 μ g/ml สารละลายที่พร้อมใช้งานสามารถเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 สัปดาห์

- สารละลาย A สารละลาย A ประกอบด้วย สารละลาย 1X HBSS ที่มีส่วนผสมของกลูโคสที่ความเข้มข้น 30 mM HEPES 2 mM และ NaHCO₃ 26 mM โดยสารละลาย A สามารถเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน

- Initial Proliferation Medium (IPM) ผสม Neurobasal medium ปริมาตร 96 mL B27 serum-free supplement ปริมาตร 2 mL GlutaMAX ปริมาตร 1 mL antibiotic-antimycotic ปริมาตร 1 mL FGF-2 ที่ความเข้มข้น 20 ng/mL และ EGF ที่ความเข้มข้น 20 ng/mL เข้าด้วยกัน โดย IPM สามารถเก็บไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 2 อาทิตย์

- N2 medium N2 medium ประกอบด้วย DMEM and Ham's F-12 medium ที่อัตราส่วน 1:1 ปริมาตร 500 mL N2 supplement ปริมาตร 5 mL L-glutamine ปริมาตร 5 mL และ

antibiotic-antimycotic ปริมาตร 5 mL ก่อนที่จะทำการ passaging ใส่ FGF-2 และ EGF ลงใน N2 medium เพื่อให้ได้ความเข้มข้นที่ 20 ng/ml N2 medium สามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน

- Diluted B-mercaptoethanol ผสม B-mercaptoethanol 34.7 μ L ใส่ลงในน้ำ (sterile water) ที่มีปริมาตร 10 mL โดยจะต้องเตรียมสารละลายนี้ใหม่ทุกครั้งที่ทำกรแยกเซลล์ระบบประสาท

- Enzyme mix 1 สำหรับการแยกเซลล์ระบบประสาทจะต้องทำการผสม MACS solution 2 2 mL กับ MACS solution 1 50 μ L จาก MACS neural tissue dissociation kit พร้อมใส่ diluted B-mercaptoethanol ปริมาตร 2.5 μ L ในกรณีที่ต้องการแยกเซลล์ระบบประสาทจากหนู 2 ตัวให้เพิ่มสารแต่ละชนิดเป็น 2 เท่า

- Enzyme mix 2 สำหรับการแยกเซลล์ระบบประสาท ผสม MACS solution 3 ปริมาตร 20 μ L เข้ากับ MACS solution 4 ปริมาตร 10 μ L จาก MACS neural tissue dissociation kit ในกรณีที่ต้องการแยกเซลล์ระบบประสาทจากหนู 2 ตัวให้เพิ่มสารแต่ละชนิดเป็น 2 เท่า

- Percoll solution (ใช้ในกรณีที่ต้องการแยกเซลล์ระบบประสาทจากหนูมากกว่า 1 ตัว) Percoll ที่ปริมาตร 22.5 mL ใส่ 10X DPBS ปริมาตร 2.5 mL สามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 เดือน

- Trypsin inhibitor solution โดยเก็บที่ -20 องศาเซลเซียสในลักษณะเป็นหลอด โดยแต่ละหลอดมีปริมาตร 5 mL ที่ความเข้มข้น 2.5 mg/ml ละลายใน DPBS สำหรับสารที่จะใช้งานให้ทำการละลายสารใน stock solution ให้ได้ความเข้มข้นที่ 0.25 mg/ml ใน DPBS สารละลายสามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 6 เดือน

- RA (Retinoic acid) ละลาย RA ใน DMSO เก็บเป็นหลอดทดลองหลอดละ 0.5 mL ที่ความเข้มข้น 1 nM สารละลายสามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ปี

- FSK (Forskolin) ละลาย FSK ใน DMSO เก็บเป็นหลอดทดลองหลอดละ 0.5 mL ที่ความเข้มข้น 1 nM สารละลายสามารถเก็บไว้ได้ที่ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 ปี

- Differentiation medium สำหรับอาหารสำหรับการ differentiation ของเซลล์ระบบประสาทนั้นจะเป็น N2 medium ที่ผสม RA 1 μ M และ FSK 1 μ M ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

- Cryoprotectant medium เตรียมจาก N2 medium ในความเข้มข้น 10% (vol/vol) กับ DMSO ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

- Poly-L-ornithine solution ละลาย Poly-L-ornithine ในน้ำ Milli-Q และเก็บเป็นหลอดหลอดละ 0.5 ml ที่ความเข้มข้น 10 mg/ml สำหรับการใช้งานให้ละลายสารใน stock solution ในน้ำ Milli-Q ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 10 $\mu\text{g/ml}$ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้
- Laminin solution ละลาย laminin solution กับ sterile PBS ให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ 5 $\mu\text{g/ml}$ ควรเตรียมใหม่ทุกครั้งที่ใช้

4.2.2 การแยกเซลล์ระบบประสาทจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

4.2.2.1 เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกมาภายใต้กล้องจุลทรรศน์แบบสเตอริโอจะถูกนำไปใส่ในหลอด conical tube ขนาด 15 mL บรรจุด้วยสารละลายเย็น A ปริมาตร 10 mL

4.2.2.2 นำเนื้อเยื่อไปปั่นที่ความเร็วต่ำที่ 200g เป็นเวลา 1 นาทีที่อุณหภูมิห้อง (20-25 องศาเซลเซียส)

4.2.2.3 เมื่อปั่นเสร็จแล้ว นำ supernatant ออก แล้วใส่ enzyme mix 1 ปริมาตร 2 mL โดยจะต้องทำใน cell culture hood หลังจากนั้นนำไปหมุนโดย tube rotator ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 20 นาที

4.2.2.4 ใส่ enzyme mix 2 ปริมาตร 30 μL ลงในแต่ละหลอดทดลอง แล้วหมุนอีกเป็นเวลา 20 นาที

4.2.2.5 ใช้ fire-polished glass pipette บดเนื้อเยื่อให้ละเอียดโดยการปิเปตซ้ำขึ้น-ลง จำนวน 10-20 ครั้งจนไม่เห็นเนื้อเยื่อเป็นชิ้น ระวังอย่าให้เกิดฟองอากาศขณะบดเนื้อเยื่อและป็นขั้นตอนสำคัญที่ทำให้เซลล์แยกเป็นเซลล์เดี่ยว หลังจากนั้นใส่ N2 medium ปริมาตร 8 mL เพื่อเป็นการทำให้ enzyme เจือจางลง ทำให้เซลล์ตกโดยการปั่นที่ 200g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.2.2.6 ล้างเซลล์ 2 ครั้งด้วย N2 medium ปริมาตร 10 mL แต่ละครั้งให้ปั่นที่ 200g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.2.2.7 ในกรณีที่ต้องการแยกเซลล์จากหนูหลาย ๆ ตัว ให้ละลายเซลล์กับ N2 medium 5.5 mL พร้อมใส่ percoll ในสารละลาย PBS ปริมาตร 5.5 mL ทำให้เข้ากันโดยกลับหลอดไป-มา แล้วนำไปปั่นที่ 400g เป็นเวลา 15 นาทีที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นล้างเซลล์ 3 รอบด้วย N2 medium ปริมาตร 10 mL แล้วปั่นที่ 200g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง

4.2.2.8 ล้างเซลล์อีกครั้งโดยใช้ IPM ปริมาตร 8 mL

4.2.2.9 ละลายเซลล์ใน IPM ปริมาตร 2 mL แล้ว plate ลงใน well จำนวน 2 well ใน 24 tissue culture plate แล้วนำไป incubate ในตู้ที่มีสภาวะ 37 องศาเซลเซียสและมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

4.2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ระบบประสาท

4.2.3.1 หลังจาก incubate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ให้เปลี่ยน IPM ครึ่งหนึ่ง รั่มดระวังอย่า เซลล์หลุดออกไป หลังจากนั้น incubate ต่อไปอีก 7-14 วัน โดยเปลี่ยน IPM ทุก ๆ วัน

4.2.3.2 หลังจาก 7-14 วันของการเพาะเลี้ยง เก็บเซลล์ที่เกาะโดยอาศัยการปั่นที่ 200g เป็นเวลา 5 นาทีที่อุณหภูมิห้อง เซลล์ระบบประสาทจะตกตะกอนอยู่ที่ก้นหลอด

4.2.3.3 ประเมินการมีชีวิตของเซลล์โดยใช้ trypan blue ปริมาตร 10 μ l ผสมกับเซลล์ 90 μ l ใช้ hemocytometer เป็นตัวนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต

4.2.3.4 Plate เซลล์ลงใน dish ขนาด 35 mm แล้ว incubate ในตู้ที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสและระดับคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์

4.2.3.5 เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ครึ่งหนึ่งทุก ๆ วัน รั่มดระวังอย่าให้เซลล์หลุดออกขณะที่เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์

4.2.3.6 สามารถเก็บเซลล์ไว้ในไนโตรเจนเหลวสำหรับการทดลองต่อไปได้

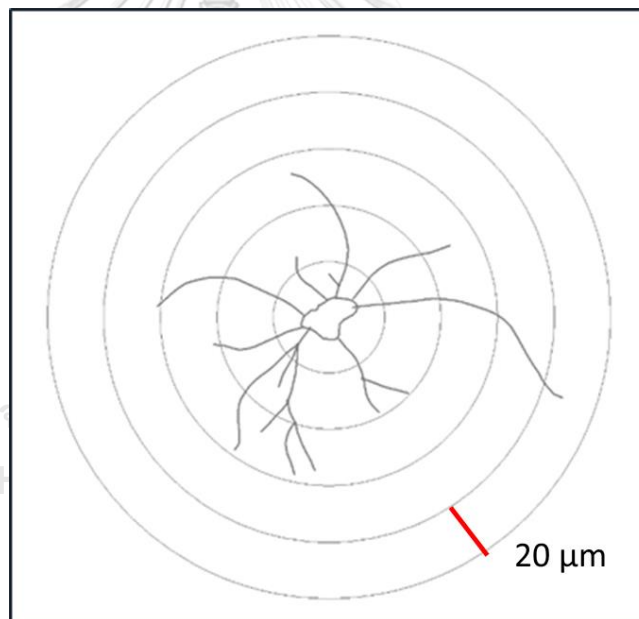
ตอนที่ 5 การวิเคราะห์ Neurite outgrowth assay

เซลล์ระบบประสาทที่ seed ลงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 mm โดยแต่ละหลุมมีเซลล์ระบบประสาทปริมาณ 3.0×10^4 การวิเคราะห์ความยาวของส่ายใยประสาท (neurite) จะดำเนินการในเซลล์ระบบประสาทที่แยกได้จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนูที่ขณะแม่ตั้งท้องได้รับบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 5,000 μ g/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวันจนกระทั่งออกลูก โดยเซลล์ประสาทจะถูกถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40 เท่า การถ่ายภาพดำเนินการที่วันที่ 0 1 2 3 4 และ 7 ของการเจริญของเซลล์ระบบประสาทในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ความยาวของส่ายใยประสาททั้งหมดจะประเมินโดยใช้โปรแกรม Neurolucida (<http://www.mbfbioscience.com/neurolucida>)

การวิเคราะห์ Neurite outgrowth assay จะทำการวัดพารามิเตอร์ต่าง ๆ ดังนี้

1. การวัดความยาวรวมของส่ายใยประสาท (Total neurite length) เซลล์ระบบประสาทที่นำมาเพาะเลี้ยง ณ วันที่ 0 1 2 3 4 และ 7 ถูกวัดความยาวรวมของส่ายใยประสาททุกเส้น

2. การวัดจำนวนของสายใยประสาทชนิดปฐมภูมิ (primary neurites) เซลล์ระบบประสาทที่เพาะเลี้ยง ณ วันที่ 7 นำมาวัดจำนวนของสายใยประสาทที่งอกจากตัวเซลล์โดยตรง (primary neurites)
3. การวัดจำนวนแขนของสายใยประสาท (neurite branching) เซลล์ระบบประสาทที่เพาะเลี้ยง ณ วันที่ 7 นำมาวัดจำนวนของสายใยประสาทตั้งแต่แขนที่สองขึ้นไป ($>1^{\circ}$ neurites)
4. การวิเคราะห์แบบ Sholl analysis เป็นการวิเคราะห์ทั้งด้านความยาวและการแตกแขนงของเซลล์ระบบประสาท โดยวัดจำนวนจุดตัดระหว่างแขนงเซลล์ระบบประสาทและรัศมีของวงกลม **รูปภาพที่ 6** ระยะห่างระหว่างของวงกลมในการศึกษารังนี้เท่ากับ $20\ \mu\text{m}$



รูปภาพที่ 6 ภาพแสดงการวิเคราะห์การแตกแขนงของสายใยประสาทโดยการวิเคราะห์ Sholl analysis

5. การวิเคราะห์ขนาดของตัวเซลล์ (cell body area) เซลล์ระบบประสาทที่เพาะเลี้ยง ณ วันที่ 0 1 2 3 4 และ 7 นำมาวัดขนาดของตัวเซลล์ โดยขนาดของตัวเซลล์ ณ วันที่ 1 2 3 4 และ 7 จะถูก normalization ด้วยขนาดของตัวเซลล์ที่วันที่ 0

ตอนที่ 6 การสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ mirVana miRNA isolation kit จากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

1. ขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง
 - 1.1 สมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่ถูกเก็บรักษาไว้ใน RNAlater ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส นำมาทำให้ละลายที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส
 - 1.2 นำไปปั่นตกด้วยความเร็วต่ำเพื่อให้เนื้อเยื่อตกตะกอน หลังจากนั้นดูด RNAlater ออกให้มากที่สุดหรือเอาเนื้อเยื่อออกไปในหลอดใหม่เพื่อกำจัด RNAlater ทิ้ง และเนื้อเยื่อจะต้องอยู่ในน้ำแข็งตลอดเวลาเพื่อรักษาสภาพของอาร์เอ็นเอ
 - 1.3 นำเนื้อเยื่อไปชั่งน้ำหนักเพื่อใช้ปรับปริมาตรของ lysis/binding buffer
 - 1.4 ใส่ lysis/binding Buffer ไปในปริมาตร 10 เท่าของน้ำหนักเนื้อเยื่อ หลังจากนั้นใช้ tissue grinder บดเนื้อเยื่อจนละเอียด
 - 1.5 ใส่ miRNA Homogenate Additive ในปริมาตร 1/10 ของปริมาตรรวมทั้งหมด เช่น ถ้าปริมาตรรวมทั้งหมด 300 ไมโครลิตร ต้องใส่ miRNA Homogenate Additive 30 ไมโครลิตร ผสมให้เข้ากันโดยใช้ vortex
 - 1.6 แช่ไว้บนน้ำแข็งเป็นเวลา 10 นาที
 - 1.7 ใส่ Acid-Phenol:Chloroform ให้เท่ากับปริมาตรสุดท้ายก่อนที่จะใส่ miRNA Homogenate Additive เช่น ถ้าปริมาตรสุดท้ายก่อนใส่ miRNA Homogenate Additive เท่ากับ 100 ไมโครลิตร ต้องใส่ Acid-Phenol:Chloroform 100 ไมโครลิตร ขณะดูด Acid-Phenol:Chloroform ต้องดูดจากก้นของขวด เนื่องจากชั้นบนจะเป็นส่วนของน้ำ
 - 1.8 ทำให้ผสมเข้ากันโดยใช้ vortex เป็นเวลา 30-60 วินาที
 - 1.9 หลังจากนั้นนำไปปั่นที่ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 5 นาทีเพื่อแยกชั้นที่เป็น aqueous phase และ organic phase
 - 1.10 ค่อย ๆ ดูดเอาชั้นบนสุดที่เป็นของเหลวสีใสออกไปใสในอีกหลอด ขณะดูดระวังอย่าดูดชั้นกลางหรือชั้นอื่นไปด้วย บันทึกปริมาตรที่ดูดออกไป
 - 1.11 ใส่ 100% ethanol ปริมาตร 1.25 เท่าของปริมาตรทั้งหมดที่ดูดออกมา ผสมให้เข้ากันโดยใช้ปิเปตต์ขึ้น-ลง
 - 1.12 วาง Filter Cartridge ลงบน Collection tube ที่เตรียมไว้
 - 1.13 ปิเปตต์สารในข้อ 1.11 ลงบน Filter Cartridge

- 1.14 นำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 15 วินาที
- 1.15 เทสารผสมทิ้ง และจะเข้าสู่ขั้นตอนการล้างอาร์เอ็นเอต่อไป
- 1.16 ใส่ miRNA Washing Solution I ปริมาตร 700 ไมโครลิตรลงบน Filter Cartridge นำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 วินาที หลังจากปั่นเสร็จให้เทสารผสมทิ้งและวาง Filter Cartridge ลงที่เดิม
- 1.17 ใส่ Washing Solution 2/3 ปริมาตร 500 ไมโครลิตร นำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 5-10 วินาที ทำซ้ำ 1 รอบ
- 1.18 เมื่อล้างครั้งสุดท้ายเสร็จเรียบร้อยแล้ว ปั่นอีกครั้งด้วยความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลาประมาณ 1 นาที
- 1.19 นำ Filter Cartridge ไปใส่ใน Collection tube หลอดใหม่ ใส่ Elution Solution ที่ทำให้อุ่นเป็นอุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสปริมาตร 50 ไมโครลิตร แล้ว incubate ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 นาที แล้วนำไปปั่นโดยใช้ความเร็ว 10,000g ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 นาที ทำซ้ำอีก 1 ครั้ง
- 1.20 วัดคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเอโดยใช้ Agilent Bioanalyzer 2100

ตอนที่ 7 การวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เทคนิค RNA sequencing

อาร์เอ็นเอที่สกัดได้นำมา treat ด้วยเอนไซม์ Dnase I เพื่อกำจัดดีเอ็นเอและ Oligo (dT) ตามลำดับ อาร์เอ็นเอที่ได้จะถูกนำมาแยกออกโดยใช้ fragmentation buffer จนได้เป็นอาร์เอ็นเอชิ้นเล็ก ๆ หลังจากนั้นจะสร้าง cDNA โดยใช้อาร์เอ็นเอที่แยกได้มาเป็นต้นแบบ อาร์เอ็นเอชิ้นเล็ก ๆ แต่ละชิ้นติดฉลากด้วย adaptor การวัดคุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอจะดำเนินการก่อนทำการวิเคราะห์ทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เครื่อง Agilent 2100 Bioanalyzer และ ABI StepOnePlus Real-Time PCR System อาร์เอ็นเอที่ผ่านการตรวจสอบคุณภาพจะถูกนำมาสร้าง sequencing library โดยใช้ Illumina HiSeq 4000 โดยบริษัท BGI Technology ฮ่องกง หลังจากกระบวนการ sequencing ข้อมูลดิบ (raw reads) ที่ได้จากการทำ sequencing จะถูกนำมากรองเพื่อให้ได้ข้อมูลที่มีคุณภาพ (clean reads) และจะนำไปเทียบกับ reference genome ขั้นตอนการกรองเพื่อให้ข้อมูลอาร์เอ็นเอที่มีคุณภาพต่ำหรือ adaptor ที่ไม่มีคุณภาพหรือมีจำนวนเบสที่อ่านไม่ได้สูง ข้อมูลดังกล่าวจะถูกนำออกก่อนที่จะนำไปวิเคราะห์ต่อไป กล่าวคืออาร์เอ็นเอดังกล่าวนำมาเอา adaptor ออก reads ที่อ่านไม่ได้มากกว่า 5 เบสหรือสั้นกว่าถูกนำเอาออกหรือจำนวน reads ที่ไม่มีคุณภาพ กล่าวคือ reads ที่มีเบสที่มีคุณภาพต่ำมากกว่า 20 เบสหรือสั้นต่อ 1 read หลังจากทำการคัดกรองแล้ว reads ทั้งหมดเรียกว่า Clean Reads และเก็บในรูปแบบ FASTQ หลังจากนั้น clean read

นำมาวิเคราะห์การทำนาย novel transcript SNP INDEL และ Gene expression analysis โดย clean reads นำมา map กับ reference genome โดยใช้ Bowtie2 software และคำนวณระดับการแสดงออกของยีนด้วย RSEM โดย RSEM เป็นโปรแกรมสำหรับประเมินการระดับการแสดงออกของยีนจากข้อมูล RNA-seq โดยคำนวณจำนวน reads ที่ครอบคลุมและกระจายอยู่ใน transcripts การวิเคราะห์ทางสถิติใช้ pearson correlation ระหว่างกลุ่มตัวอย่างโดยใช้ฟังก์ชัน cor ในโปรแกรม R การวิเคราะห์ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติ (Differentially Expression Gene) ใช้ Poisson distribution analysis (Audic & Claverie, 1997) ยีนที่มีค่านัยสำคัญทางสถิติที่มีค่า FDR < 0.05 และ p-value < 0.05 นำมาวิเคราะห์โดยใช้กระบวนการทางชีวสารสนเทศศาสตร์ต่อไป

ตอนที่ 8 การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนเชิงปริมาณด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR

ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์ด้วยเทคนิค RNA-sequencing ถูกเลือกนำมาวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยวิธี quantitative RT-PCR โดยอาร์เอ็นเอถูกเปลี่ยนเป็น cDNA โดยใช้ AccuPower® RT PreMix กล่าวโดยย่อ อาร์เอ็นเอปริมาณ 0.5 µg นำมาผสมกับ OligoT₁₈ primer ปริมาณ 0.5 ไมโครกรัมหรือ 100 pmole หลังจากนั้นเติม DEPC-treated water ให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 15 µl แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาทีและนำไปพักไว้บนน้ำแข็ง หลังจากนั้นสารผสมจำนวน 15 µl นำไปใส่หลอดทดลองที่มี AccuPower® RT PreMix แล้วใส่ DEPC-treated water จนได้ปริมาตร 20 µl ปฏิบัติการสังเคราะห์ cDNA ดำเนินการภายใต้การบ่มที่อุณหภูมิ 42 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 60 นาทีและที่อุณหภูมิ 94 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 5 นาที หลังจากนั้น cDNA ที่ได้นำไปเป็นต้นแบบสำหรับปฏิบัติการ quantitative RT-PCR นำมาละลายด้วย nuclease water ให้ได้ปริมาตร 50 µl

สำหรับปฏิบัติการ quantitative RT-PCR จะดำเนินการ 3 ซ้ำโดยใช้น้ำยา AccuPower® 2X GreenStar™ qPCR MasterMix กล่าวโดยย่อคือ cDNA จำนวน 1 µg นำไปผสมกับ 2X Greenstar Master mix และ primer ปรับปริมาตรให้ได้ 12.5 µl ด้วย nuclease water ปฏิบัติการ quantitative RT-PCR จะถูกบ่มใน Bio-rad CFX Connect Real-Time system (Biorad, USA) โดยประกอบด้วยขั้นตอนการ denaturing DNA ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 นาที หลังจากนั้นทำการ denaturing ต่อที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 วินาทีเป็นจำนวน 40 รอบ และขั้นตอน annealing/extension ต่อที่อุณหภูมิ 55 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 30 วินาที สำหรับยีนยีนผลิตภัณฑ์ที่เกิดขึ้นจะทำการวิเคราะห์แบบ melting curve ที่อุณหภูมิ 65-95 องศาเซลเซียส การวิเคราะห์ระดับการแสดงออกของยีนจะดำเนินการโดยใช้วิธี $2^{-\Delta\Delta Ct}$ และใช้ *Rn18s* เป็น endogenous control การออกแบบ primer ที่จำเพาะต่อยีนที่เลือกมาใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศ

เทศศาสตร์มาเป็นตัวช่วยในการออกแบบ primer โดยใช้โปรแกรม UCSC genome browser (<https://genome.ucsc.edu/>) Ensembl (<https://asia.ensembl.org/index.html>) และ primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) ซึ่งต้องเลือก exon สำหรับ forward และ reverse primer มาจับต้องห่างกัน เพื่อป้องกันการ contamination จาก genomic DNA การออกแบบ primer จะออกแบบให้จำเพาะกับยีน ได้แก่ *Auts2* *Foxp2* *Smarcc2* และ *Dicer1* ลำดับเบสของแต่ละ primer จะแสดงในภาคผนวก ตารางที่ 1

ตอนที่ 9 การวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศศาสตร์

การวิเคราะห์แบบ meta-analysis วิเคราะห์โดยนำผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิกส์ที่ตีพิมพ์ไปแล้วโดยเลือกงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลของบิสฟีนอลเอต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ชนิดต่าง ๆ และมีข้อมูลในฐานข้อมูล GEO datasets มาวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม MeV เพื่อหารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติโดยใช้การวิเคราะห์ทางสถิติชนิด two-tailed t-test ที่ระดับ p-value ที่ 0.05 รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติของแต่ละชุดข้อมูลนำไปวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและยีนที่การรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึม สเปกตรัมจากฐานข้อมูลด้วยการวิเคราะห์แบบ Hypergeometric distribution analysis รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญนำไปทำนายเพื่อหาโครงข่ายทางชีวภาพ (gene regulatory network) และบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทและโรคออทิซึมสเปกตรัม (biological functions related to neurological functions and ASD) โดยใช้โปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) (Qiagen Inc., USA, <https://www.qiagenbioinformatics.com/products/ingenuity-pathway-analysis/>) และยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสถูกทำนาย/วิเคราะห์เพื่อหาบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคทางระบบประสาทและ pathway ที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและสร้างโครงข่ายชีวภาพเพื่อดูปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนกับบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม (Interactome analysis)

ตอนที่ 10 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ทางสถิติดำเนินการภายใต้โปรแกรม SPSS เวอร์ชัน 16 สำหรับการวิเคราะห์แบบ 2 กลุ่มจะใช้ two-tailed student's t-test ที่ระดับนัยสำคัญ p-value < 0.05 สำหรับการวิเคราะห์มากกว่า 2 กลุ่มจะใช้การวิเคราะห์แบบ one-way ANOVA โดยใช้ pos hoc ชนิด Tukey HSD ที่ระดับนัยสำคัญ p-value < 0.05

บทที่ 4

ผลการศึกษาวิจัย

4.1 การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (Bioinformatics analyses of BPA-responsive genes)

4.1.1 ผลการรวบรวมข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติเมื่อได้รับบิสฟีนอลเอ

การวิเคราะห์ข้อมูลทางชีวสารสนเทศศาสตร์เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและยีนที่มีการรายงานว่ามีการแสดงออกผิดปกติในโรคอหิวาต์ซิมสเปกตรัม ทางคณะผู้วิจัยได้รวบรวมข้อมูลรูปแบบการแสดงออกของยีนจากผลการทดลองทางทรานสคริปโตมิกส์ที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้วจากฐานข้อมูล GEO DataSets สำหรับงานวิจัยดังกล่าว จะต้องผ่านเกณฑ์ที่ทางผู้วิจัยกำหนดไว้ ซึ่งมีจำนวนทั้งหมด 7 งานวิจัย โดยรายละเอียดของแต่ละงานวิจัยแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 รายละเอียดแสดงงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับผลจากการได้รับบิสฟีนอลเอต่อเนื้อเยื่อหรือเซลล์ชนิดต่าง ๆ จากฐานข้อมูล GEO DataSets

Title	Author and Year	Sample size	Sample type
Expression data from MCF7/BUS cell culture exposed to xenoestrogens (GSE5200)	Shioda et al., 2006 (Shioda et al., 2006)	24 samples	MCF7/BUS cells line
Transcriptomal profiling of C57BL/6 wild type and ER-alpha KO mice fetal mammary gland after fetal exposure to Bisphenol A (BPA) and 17alpha-ethynylestradiol (EE2) (GSE44387)	Wadia et al., 2013 (Wadia et al., 2013)	36 samples	Mouse mammary gland tissues
Toxicogenomics analysis of placenta samples from mice exposed to different doses of BPA (GSE63852)	Sabrina et al., 2014 (Tait, Tassinari, Maranghi, & Mantovani, 2015b)	11 samples	Mouse placenta tissues

Transgenerational Gene Expression Changes Caused by Exposing Fetal Germ Cells to Endocrine Disruptors (GSE58642)	Piroska et al., 2015 (Piroska, 2015)	32 samples	Mouse fetal germ cells
Transcriptome of human osteosarcoma (HOS) cells induced by bisphenol A, S and AF (GSE50527)	Fic et al., 2015 (Fic et al., 2015)	24 samples	Human osteosarcoma (HOS) cells line
Effects of bisphenol A on gene expression in adipocytes from lean children: association to metabolic disorders (GSE58516)	Menale et al., 2015 (Menale et al., 2015)	15 samples	Human adipocyte cells
Preferential Epigenetic Programming of	Jorgensen et al., 2016 (Jorgensen, Alderman, & Taylor, 2016)	10 samples	Mouse uterus tissues

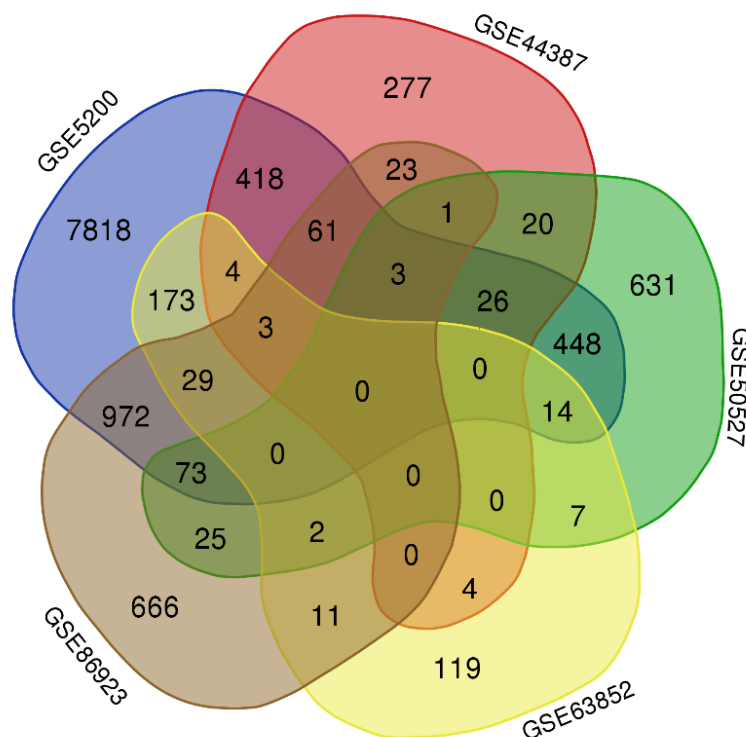
Estrogen Response after in utero xenoestrogen (bisphenol-A) exposure (GSE86923)			
---	--	--	--

4.1.2 รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติและมีนัยสำคัญทางสถิติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ

งานวิจัยที่รวบรวมได้จากฐานข้อมูล GEO DataSets นำมาวิเคราะห์เพื่อหารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจากการได้รับบิสฟีนอลเอโดยใช้โปรแกรม Multiple Experiment Viewer (MeV) สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ ทางผู้วิจัยใช้ two-tailed t-test (p -value < 0.05) โดยรายชื่อยีนที่มีนัยสำคัญทางสถิติจาก 7 งานวิจัยนำมาทำการวิเคราะห์เพื่อหาความสัมพันธ์/เกี่ยวข้องกับยีนที่มีการรายงานความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมจากฐานข้อมูลของโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ SFARI AutDB และ AutismKB โดย Hypergeometric distribution analysis พบว่ารายชื่อยีน 5 งานวิจัยจาก 7 งานวิจัยมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับรายชื่อยีนจากฐานข้อมูลโรคออทิซึมสเปกตรัมทั้ง 3 ฐานข้อมูล ($p < 0.05$) ซึ่งประกอบไปด้วยฐานข้อมูล GSE5200 GSE44387 GSE50527 GSE63852 และ GSE86923 ดังแสดงในตารางที่ 2 รายชื่อยีนจากทั้ง 5 งานวิจัยที่มีนัยสำคัญจะถูกนำมาคัดเลือกโดยใช้ venn diagram เพื่อหารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกอย่างน้อย 2 งานวิจัยจาก 5 งานวิจัยเพื่อแสดงให้เห็นว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอมีการแสดงออกที่ผิดปกติในตัวอย่างที่ต่างกัน (reproducibility) รูปภาพที่ 7 โดยยีนที่ถูกคัดเลือกเพื่อนำมาทำการวิเคราะห์ต่อไปมีจำนวนทั้งหมด 2,101 ยีน

ตารางที่ 2 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย *Hypergeometric distribution analysis* ระหว่างกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากแต่ละการศึกษากับกลุ่มยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

Overlap with	GSE5200	GSE44387	GSE50527	GSE58516	GSE58642	GSE63852	GSE86923
SFARI database (881 genes)	550	44	70	0	2	19	77
*p-value from hypergeometric distribution analysis	3.45E-26	5.17E-09	5.12E-16	1	0.21	2.11E-04	7.11E-10
AutDB database (845 genes)	522	41	62	0	2	19	74
*p-value from hypergeometric distribution analysis	2.04E-23	3.81E-08	8.18E-13	1	0.2	1.24E-04	1.40E-09
AutismKB database (3055 genes)	1733	142	168	7	3	76	289
*p-value from hypergeometric distribution analysis	3.63E-44	4.60E-24	1.36E-19	0.09	0.59	1.23E-17	5.23E-41



รูปภาพที่ 7 แผนภาพ Venn diagram ของรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากแต่ละการศึกษา

4.1.3 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคและโครงข่ายควบคุมยีน (biological functions, diseases/disorders and gene regulatory networks) ของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีนัยสำคัญทางสถิติกับยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

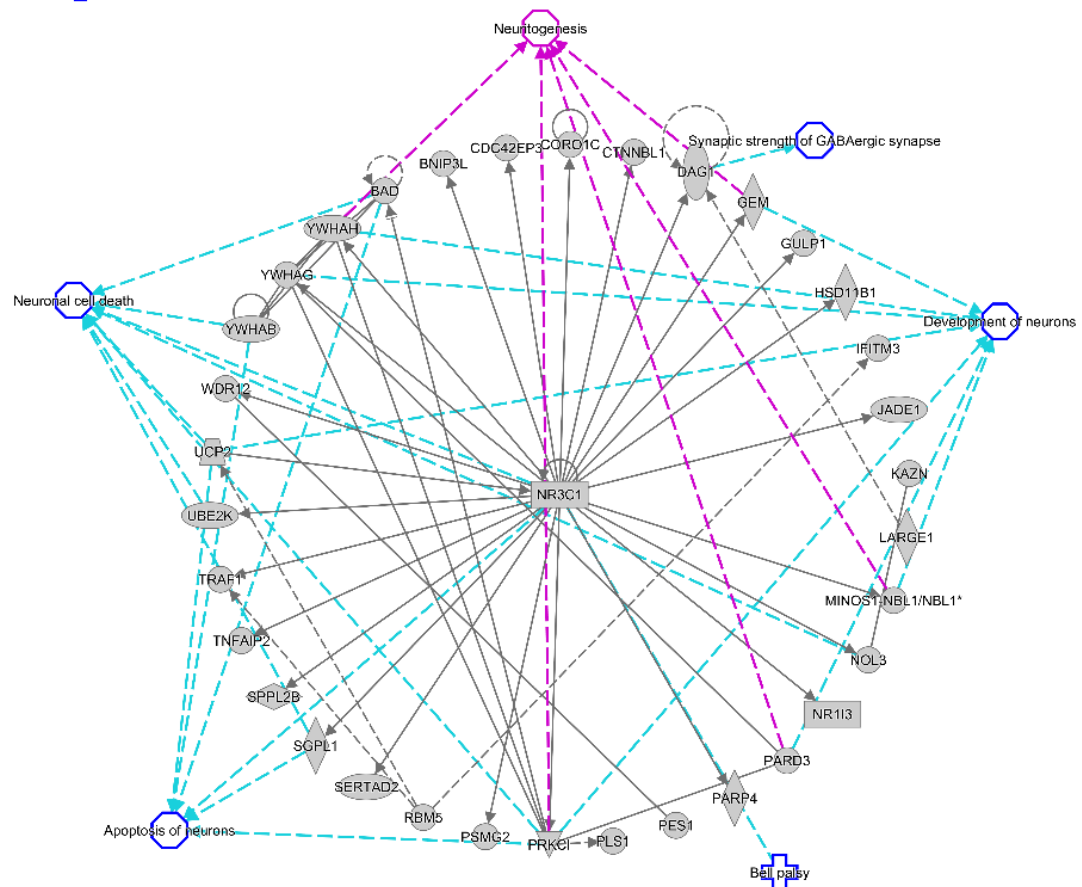
รายชื่อยีนจำนวน 2,101 ยีนนำมาวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA) เพื่อพิสูจน์ว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีนัยสำคัญทางสถิติกับยีนที่มีการรายงานในโรคออทิซึมสเปกตรัมต่อความสัมพันธ์ในบทบาททางชีวภาพและหน้าที่ทางระบบประสาทที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยจากการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางชีวสารสนเทศศาสตร์โดยโปรแกรม IPA ซึ่งการพิจารณานัยสำคัญทางสถิติจะใช้ Fisher's exact test พบว่ายีนดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความบกพร่องของสมรรถนะทางสมอง (Cognitive impairment) ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 2.25\text{E-}06$ โดยมียีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 98 ยีน อีกทั้งยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือความบกพร่องทางสติปัญญา (Autism or intellectual disability) ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 2.94\text{E-}06$ และมีจำนวนยีนที่

เกี่ยวข้องกับทั้งหมด 90 ยีน นอกจากนั้นรายชื่อยีนที่มีความผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอยังมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับโรคอัลไซเมอร์ (Alzheimer's disease) ภาวะบกพร่องทางสติปัญญา (Familial mental retardation, Mental retardation และ Recessive mental retardation) รวมไปถึงภาวะสมองเสื่อม (Dementia) ดังแสดงในตารางที่ 3

การวิเคราะห์โครงข่ายควบคุมยีน (Gene regulatory network) เพื่อหาปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติกับบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยแสดงในรูปภาพที่ 8 เห็นได้ว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ (พื้นหลังสีเทา) มีปฏิสัมพันธ์กับหน้าที่ทางระบบประสาท (พื้นหลังสีขาว) ได้แก่ การพัฒนาของเซลล์ประสาท (development of neurons) การสร้างสายใยประสาท (neuriteogenesis) การตายของเซลล์ประสาท (neuronal cell death) ความบกพร่องของสมรรถนะของสมอง (cognitive impairment) รวมไปถึงภาวะที่สามารถพบได้บ่อยในโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ ภาวะพร่องทางสติปัญญา (mental retardation) และ Familial syndromic intellectual disability

ตารางที่ 3 รายชื่อโรคและหน้าที่ทางชีวภาพของกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ จากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis (IPA)

Diseases or Functions Annotation	p-value	Number of Genes
Cognitive impairment	2.25E-06	98
Autism or intellectual disability	2.94E-06	90
Alzheimer's disease	7.04E-06	125
Familial mental retardation	1.18E-05	73
Mental retardation	1.54E-05	82
Dementia	1.86E-05	132
Recessive mental retardation	8.89E-05	42















รูปภาพที่ 8 Gene regulatory network ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาท

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 คำอธิบายสัญลักษณ์จากการวิเคราะห์โครงข่ายทางชีวภาพ

สัญลักษณ์	คำอธิบาย
○	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น complex
∇	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น cytokine หรือ growth factor
⊂	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น enzyme
⌣	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น G-protein coupled regulator
⊙	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น group/complex/other
⊞	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น transcription regulator
⌣	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น transmembrane receptor

	ลักษณะของยีนที่ทำหน้าที่เป็น transporter
	ลักษณะของยีนที่ไม่รู้หน้าที่ (unknown)
	ลักษณะของ microRNA
	ยีน A จับกับยีน B
	ยีน A ยับยั้งยีน B
	ยีน A มีผลต่อยีน B
	ยีน A มีผลต่อยีน B และยับยั้งยีน B
	ยีน A ทำให้เกิดยีน B
	ยีน A เคลื่อนที่/เปลี่ยนตำแหน่งกับยีน B
	ยีน A สามารถเกิดปฏิกิริยากับยีน B
	ยีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโดยตรง
	ยีนที่มีปฏิสัมพันธ์กับโดยทางอ้อม

4.2 ผลการป้อนบิสฟีนอลเอในสัตว์ทดลองและการแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

การป้อนบิสฟีนอลเอดำเนินการตามวิธีที่ได้ตีพิมพ์ไว้แล้ว (Wang et al., 2014) กล่าวโดยย่อคือ Wistar rats เพศเมียที่ตั้งท้องวันที่ 1 โดยนับวันที่จับอยู่กับเพศผู้เป็นวันที่ 0 ของการผสมพันธุ์ หนูเพศเมียที่ตั้งท้องได้ 1 วันถูกแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มคือกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอ แม่หนูได้รับน้ำมันข้าวโพด (corn oil) ในกลุ่มควบคุมและได้รับบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 5,000 µg/kg ต่อน้ำหนักตัวต่อวัน จนกระทั่งออกลูก ลูกหนูถูกนำมาแยกสมองส่วนฮิปโปแคมปัสเพื่อนำไปทำการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์และการวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาทต่อไป (neurite outgrowth assay)

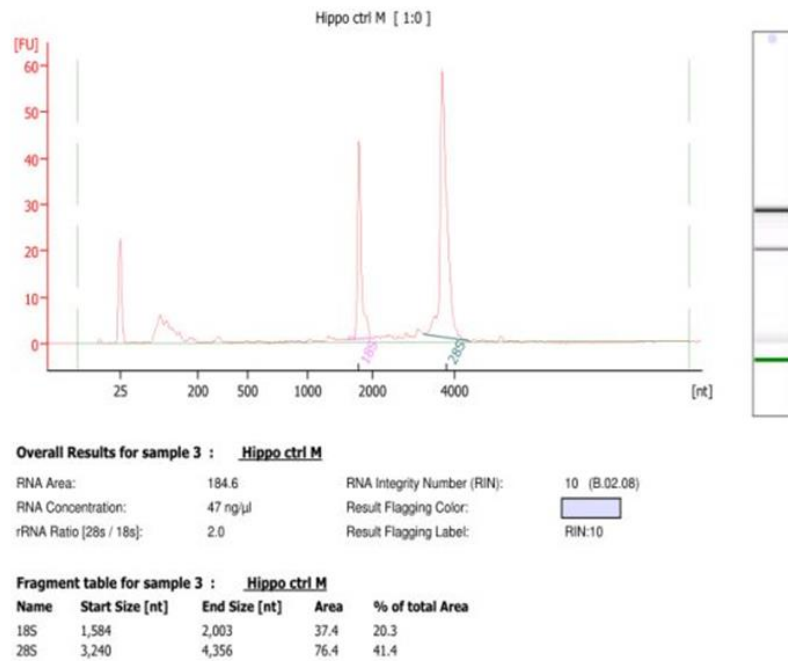
4.3 ผลการวิเคราะห์ปริมาณและคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยใช้ Agilent Bioanalyzer 2100

สมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูที่ขณะแม่ตั้งท้องได้รับบิสฟีนอลเอหรือได้รับน้ำมันข้าวโพดในกลุ่มควบคุม โดยเก็บสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในลักษณะแยกเพศผู้และเพศเมีย และนำมาสกัดอาร์เอ็นเอโดยใช้ mirVana miRNA isolation kit การวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอสำหรับการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เทคนิค RNA-sequencing ดำเนินการโดยบริษัท

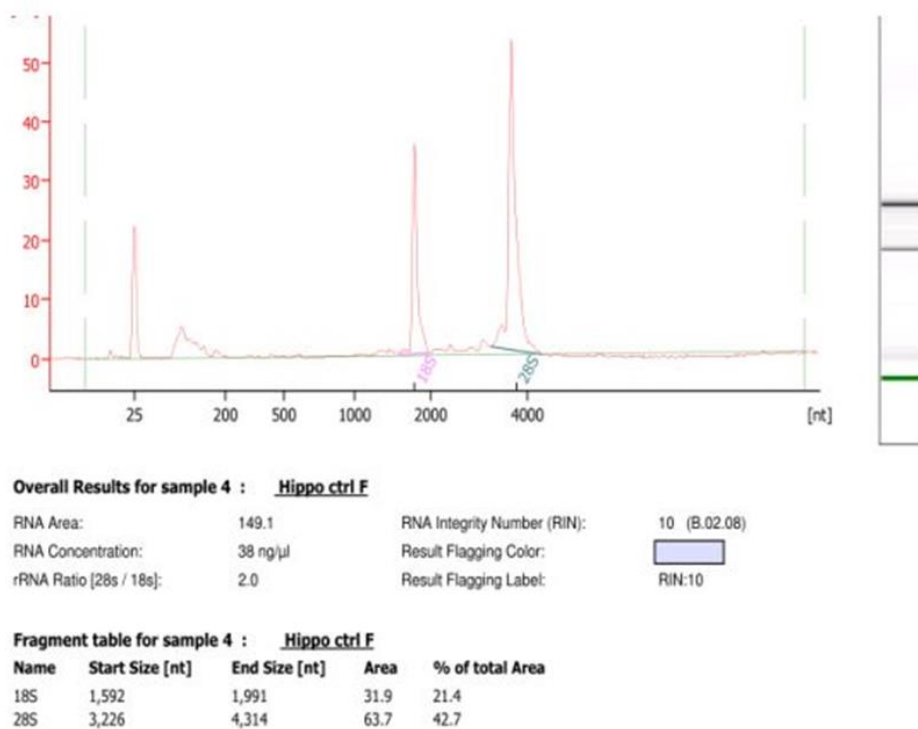
BGI ประเทศฮ่องกง ผลการวิเคราะห์แสดงรายละเอียดสรุปในตารางที่ 5 และรูปภาพที่ 9-12 เป็นรูปภาพแสดงกราฟการวิเคราะห์ด้วย Agilent bioanalyzer 2100

ตารางที่ 5 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอโดย Agilent bioanalyzer 2100 (Test Results A หมายถึง คุณภาพของตัวอย่างผ่านการตรวจคุณภาพและปริมาณตัวอย่างเพียงพอต่อการทำ library)

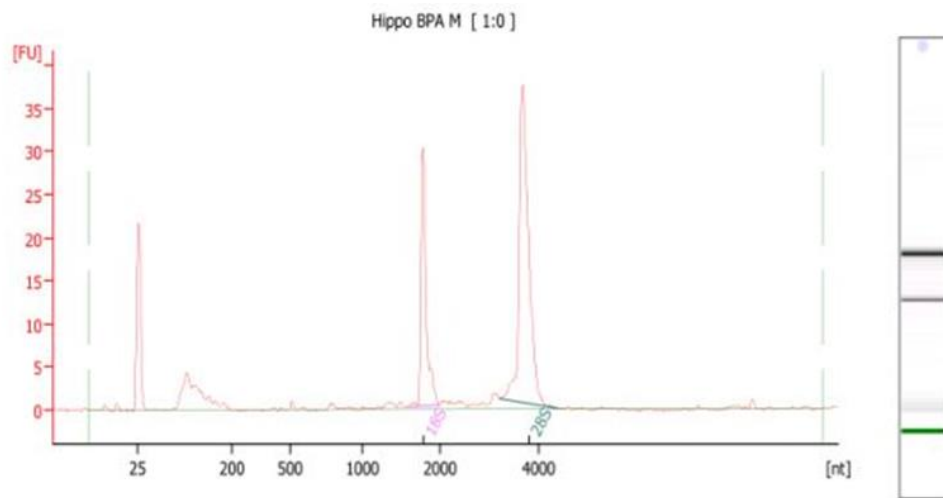
No.	Sample name	Concentration (ng/ μ l)	Volume (μ l)	RIN	28s/18s	Library Type	Test Results
1	Hippocampus control male	47	14	10	2.0	HiSeq Transcriptome	A
2	Hippocampus control female	38	17	10	2.0	HiSeq Transcriptome	A
3	Hippocampus BPA male	32	16	10	2.0	HiSeq Transcriptome	A
4	Hippocampus BPA female	34	15	10	1.8	HiSeq Transcriptome	A



รูปภาพที่ 9 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มควบคุมเพศผู้



รูปภาพที่ 10 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มควบคุมเพศเมีย



Overall Results for sample 5 : Hippo BPA M

RNA Area:	127.6	RNA Integrity Number (RIN):	10 (B.02.08)
RNA Concentration:	32 ng/ul	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	2.0	Result Flagging Label:	RIN:10

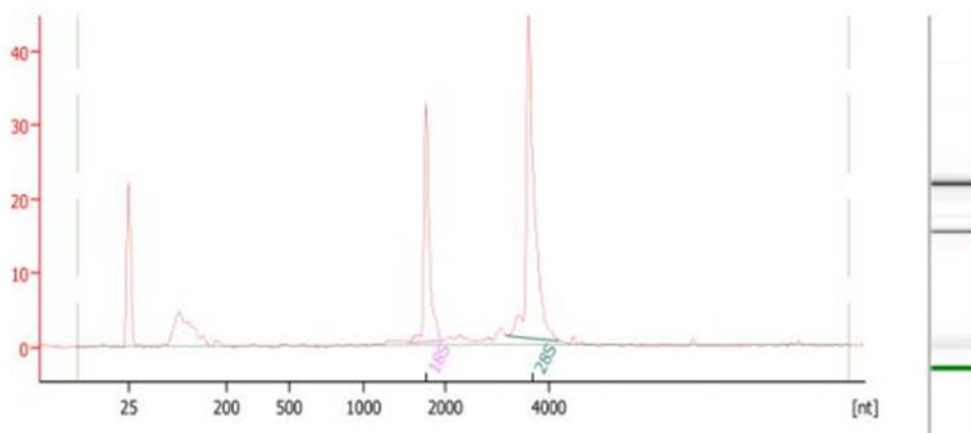
Fragment table for sample 5 : Hippo BPA M

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,571	1,990	27.7	21.7
28S	3,212	4,409	55.0	43.1

รูปภาพที่ 11 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มที่ได้รับบิส

ฟีนอลเอเพศผู้

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY



Overall Results for sample 6 : Hippo BPA F

RNA Area:	134.6	RNA Integrity Number (RIN):	10 (B.02.08)
RNA Concentration:	34 ng/ul	Result Flagging Color:	
rRNA Ratio [28s / 18s]:	1.8	Result Flagging Label:	RIN:10

Fragment table for sample 6 : Hippo BPA F

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	1,550	1,979	30.2	22.4
28S	3,198	4,215	55.0	40.9

รูปภาพที่ 12 ผลการวิเคราะห์คุณภาพและปริมาณของอาร์เอ็นเอในฮิปโปแคมปัสกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอเพศเมีย

4.4 ผลการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์โดยใช้เทคนิค RNA-sequencing

อาร์เอ็นเอที่สกัดและทำการตรวจวัดคุณภาพและปริมาณเรียบร้อยแล้วนำไปวิเคราะห์เพื่อหา ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส โดยใช้ next-generation sequencing รูปแบบ illumina HiSeq 4000 ยีนทั้งหมดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอนำมาเปรียบเทียบกับยีนทั้งหมดยีนใน กลุ่มที่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ เพื่อหารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติจาก การได้รับบิสฟีนอลเอ ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบเพื่อหารายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจาก การได้รับบิสฟีนอลเอเทียบกับกลุ่มควบคุม (N control = 6; N BPA treatment = 6) ด้วยโปรแกรม MeV software ทางคณะผู้วิจัยพบว่ามียีนจำนวน 4,525 ยีนที่มีแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (p value < 0.05, t-test with standard bonferroni correction)

4.5 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสกับยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากฐานข้อมูลของโรคออทิซึมสเปกตรัม

รายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอจำนวน 4,525 ยีนนำมา overlap กับฐานข้อมูลของโรคออทิซึมสเปกตรัมที่แตกต่างกัน 3 ฐานข้อมูล พบว่ามียีนจำนวน 263 ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล SFARI ยีนจำนวน 247 ยีนที่แสดงออกผิดปกติทั้งในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและอยู่ในฐานข้อมูล AutDB และยีนจำนวน 700 ยีนที่แสดงออกผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและอยู่ในฐานข้อมูล AutismKB นอกจากทำการวิเคราะห์แบบรวมเพศแล้วนั้น ทางคณะผู้วิจัยยังดำเนินการหารายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอแบบแยกเพศด้วย พบว่าเมื่อดำเนินการวิเคราะห์แบบแยกเพศแล้ว ในเพศผู้ พบว่ามียีนจำนวน 158 ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล SFARI ยีนจำนวน 146 ยีนที่แสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล AutDB ยีนจำนวน 322 ยีนที่แสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล AutismKB ในเพศเมีย พบว่ามียีนจำนวน 235 ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล SFARI ยีนจำนวน 218 ยีนที่แสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล AutDB ยีนจำนวน 562 ยีนที่แสดงออกผิดปกติและอยู่ในฐานข้อมูล AutismKB เห็นได้ว่ายีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและอยู่ในฐานข้อมูลของโรคออทิซึมสเปกตรัมในเพศเมียมีจำนวนมากกว่าในเพศผู้

เมื่อวิเคราะห์หาความสัมพันธ์โดยใช้ Hypergeometric distribution analysis พบว่ารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกจากการได้รับบิสฟีนอลเอแบบรวมเพศไม่มีความสัมพันธ์กับรายชื่อยีนจากฐานข้อมูลของโรคออทิซึมสเปกตรัมทั้งฐานข้อมูล SFARI (p-value = 0.07) ฐานข้อมูล AutDB (p-value = 0.152) และฐานข้อมูล AutismKB (p-value = 0.999) รายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับฐานข้อมูล SFARI (p-value = 1.03E-04) และฐานข้อมูล AutDB (p-value = 9.96E-04) อีกทั้งรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศเมียจากการได้รับบิสฟีนอลเอก็มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับฐานข้อมูล SFARI (p-value = 3.89E-03) และฐานข้อมูล AutDB (p-value = 3.89E-03) ดังแสดงในตารางที่ 6 เห็นได้ว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมจากฐานข้อมูลต่าง ๆ มากกว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศเมีย ถึงแม้ว่ายีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีจำนวนน้อยกว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศเมีย

ตารางที่ 6 ผลการวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดย *Hypergeometric distribution analysis* ระหว่างกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิลฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสกับกลุ่มยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม

Overlap with (number of genes)	DEGs in hippocampi of both sexes (4,525 DEGs)	DEGs in male hippocampus (2,078 DEGs)	DEGs in female hippocampus (3,522 DEGs)
SFARI database (881 genes)	263	158	235
*P-value from hypergeometric distribution analysis	0.07	1.03E-04	3.89E-03
AutDB database (845 genes)	247	146	218
*P-value from hypergeometric distribution analysis	0.152	9.96E-04	2.20E-02
AutismKB database (3,055 genes)	700	322	562
*P-value from hypergeometric distribution analysis	0.99	0.99	0.99

4.6 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่และ pathways ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาทในยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

รายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอทั้งแบบรวมเพศ แบบแสดงออกผิดปกติในเฉพาะเพศผู้และเพศเมีย ถูกนำมาวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่และ pathways ที่เกี่ยวข้องกับโรคทางระบบประสาท พบว่ารายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับบทบาทหน้าที่หลาย ๆ หน้าที่ เช่น “Nervous system development and function” “Inflammatory response” “Digestive system development and function” เป็นต้น และเมื่อศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีนที่มีความผิดปกติกับ pathway ที่เกี่ยวข้องในระบบประสาท เป็นที่น่าสนใจเป็นอย่างยิ่งว่า pathway ที่เกี่ยวข้องกับรายชื่อยีนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสอย่างมีนัยสำคัญของเพศผู้ เช่น “Glutamate Receptor Signaling” ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 5.86\text{E-}05$ มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 14 ยีน “Axonal Guidance Signaling” ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 1.39\text{E-}03$ มียีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 52 ยีน “Circadian Rhythm Signaling” ที่ระดับนัยสำคัญ $2.97\text{E-}03$ มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 8 ยีน ซึ่งผลการทดลองของเพศเมียก็เป็นไปตามทำนองเดียวกันกับของเพศผู้ กล่าวคือ pathway ที่เกี่ยวข้องได้แก่ “Axonal Guidance Signaling” ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 1.92\text{E-}07$ มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 97 ยีน “Glutamate Receptor Signaling” ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 1.39\text{E-}05$ มียีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 20 ยีนและ “Circadian Rhythm” ที่ระดับนัยสำคัญ $p\text{-value} = 6.31\text{E-}04$ มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 12 ยีน โดย pathway ดังกล่าวเป็น pathway ที่เคยมีการรายงานว่ามีความผิดปกติในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 ผลการเปรียบเทียบบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพและ *canonical pathway* ระหว่างการวิเคราะห์ในกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในทั้งสองเพศ ในเพศผู้และในเพศเมีย

Both sexes	Male	Female
Biological functions and pathways		
Physiological system development and function (P-values; number of molecules)		
Endocrine System Disorders (7.14E-07-3.55E-04; 436)	Endocrine System Disorders (4.35E-18-8.5E-03; 576)	Endocrine System Disorders (3.12E-28-1.43E-04; 379)
Connective Tissue Development and Function (3.37E-04 - 3.37E-04; 8)	Nervous System Development and Function (6.56E-03 - 1.12E-03; 37)	Cardiovascular System Development and Function (9.84E-05 - 1.06E-08; 153)
Skeletal and Muscular System Development and Function (3.37E-04 - 3.37E-04; 8)	Organismal Development (8.40E-03 - 1.12E-03; 50)	Organismal Development (1.56E-05 - 1.06E-08; 126)
Tissue Development (5.82E-03 - 3.37E-04; 16)	Tissue Development (7.67E-03 - 1.12E-03; 71)	Tissue Development (1.61E-04 - 2.31E-07; 116)
Digestive System Development and Function (7.30E-03 - 6.71E-04; 32)	Connective Tissue Development and Function (5.82E-03 - 1.84E-03; 36)	Organismal Survival (3.95E-06 - 2.50E-06; 108)
Reproductive System Development and Function (5.85E-03 - 1.42E-03; 19)	Inflammatory Response (5.83E-03-5.83E-03; 4)	Nervous System Development and Function (1.86E-05 - 1.86E-05; 11)
Top canonical pathways (P-values; number of molecules)		

Cholesterol Biosynthesis I (2.46E-04; 9)	Glutamate Receptor Signaling (5.86E-05; 14)	Axonal Guidance Signaling (1.92E-07; 97)
Cholesterol Biosynthesis II (via 24,25-dihydrolanosterol) (2.46E-04; 9)	Axonal Guidance Signaling (1.39E-03; 52)	Neuropathic Pain Signaling in Dorsal Horn Neurons (6.89E-07; 35)
Cholesterol Biosynthesis III (via Desmosterol) (2.46E-04; 9)	Amyotrophic Lateral Sclerosis Signaling (1.63E-03; 18)	Nitric Oxide Signaling in the Cardiovascular System (1.60E-06; 33)
Superpathway of Cholesterol Biosynthesis (3.89E-04; 14)	Circadian Rhythm Signaling (2.79E-03; 8)	Glutamate Receptor Signaling (1.39E-05; 20)
Ketogenesis (1.18E-03; 7)	Huntington's Disease Signaling (9.30E-03; 29)	Circadian Rhythm Signaling (6.31E-04; 12)

4.7 ผลการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคและโครงข่ายควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ทางระบบประสาทในยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัส

เพื่อที่จะศึกษาความสัมพันธ์ของรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอต่อบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ/โรคที่เกี่ยวกับการพัฒนาการของระบบประสาท พบว่า รายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติในกลุ่มรวมเพศนั้นมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับ “Autism or intellectual” ที่ระดับ $p\text{-value} = 5.19\text{E-}04$ โดยมียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 144 ยีน และเมื่อวิเคราะห์แบบแยกเพศก็พบว่ารายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติก็มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ “Autism or intellectual” ที่ระดับนัยสำคัญ $4.17\text{E-}16$ ในเพศผู้และ $9.30\text{E-}10$ ในเพศเมีย ตามลำดับ มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 97 ยีนและ 120 ยีนตามลำดับ อีกทั้งยีนที่มีความผิดปกติยังมีความสัมพันธ์กับ “Mental retardation” ซึ่งเป็นภาวะที่พบได้บ่อยว่าเกิดร่วมกับผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม ที่ระดับนัยสำคัญเมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศ เฉพาะในเพศผู้ เฉพาะในเพศเมียเท่ากับ $9.66\text{E-}04$ $1.49\text{E-}14$ และ $1.11\text{E-}09$ ตามลำดับ และมีจำนวนยีนที่เกี่ยวข้องเท่ากับ 133 89 และ 113 ยีนตามลำดับ เมื่อ

ศึกษาถึงบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ/โรคที่มีความสัมพันธ์จำเพาะกับเพศ พบว่า ในยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญโดยตรงกับ “Autism” ที่ระดับ p-value = 5.77E-03 โดยมียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 15 ยีน “Development of central nervous system” ที่ระดับนัยสำคัญ p-value = 4.06E-03 มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 21 ยีน “Development of neurons” ที่ระดับนัยสำคัญ p-value = 5.14E-03 Morphogenesis of neurons ที่ระดับนัยสำคัญ p-value = 4.18E-04 มียีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 19 ยีน “Neuritogenesis” ที่ระดับนัยสำคัญ p-value 9.01E-04 มียีนที่เกี่ยวข้องจำนวน 18 ยีนและ “Formation of brain” ที่ระดับนัยสำคัญ p-value = 1.60E-03 มียีนที่เกี่ยวข้องทั้งหมด 14 ยีน ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศและในเพศเมียไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ โดยบทบาทหน้าที่ดังกล่าวมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและมีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังแสดงในตารางที่ 8 โดยจะเห็นว่าบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพมีความสัมพันธ์อย่างมากกับยีนที่แสดงออกผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในเพศผู้ และเพื่อศึกษาเปรียบเทียบยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้และเพศเมียว่ามีความเกี่ยวข้องกับ pathway ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาท เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่ามี pathway เช่น “DNA methylation and transcriptional repression signaling” และ “4-aminobutyrate Degradation I” มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับเพศผู้ และ “IGF-1 signaling pathway” “Synaptic long-term potentiation” และ “Androgen signaling” มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญในเพศเมีย ซึ่ง pathway ดังกล่าวเป็น pathway ที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 8 ผลการเปรียบเทียบโรค/หน้าที่ที่เกี่ยวข้องกับระบบประสาทระหว่างการวิเคราะห์ในกลุ่ม ยีนที่แสดงออกผิดปกติในทั้งสองเพศ ในเพศผู้และในเพศเมีย

Diseases or Functions Annotation	P-values (number of genes)		
	Both sexes	Male	Female
Autism or intellectual disability	5.19E-04 (144)	4.71E-16 (97)	9.30E-10 (120)
Mental retardation	9.66E-04 (133)	1.49E-14 (89)	1.11E-09 (113)
Familial syndromic intellectual disability	6.51E-03 (84)	1.40E-10 (58)	3.09E-07 (73)
Disorder of stature	5.78E-03 (55)	5.05E-03 (25)	8.70E-06 (47)
Autism	NS	5.77E-03 (15)	NS
Global developmental delay	NS	4.40E-04 (4)	NS
Developmental delay	9.55E-04 (20)	NS	NS
Development of central nervous system	NS	4.06E-03 (21)	NS
Development of neurons	NS	5.14E-03 (21)	NS
Morphogenesis of neurons	NS	4.18E-04 (19)	NS
Neuritogenesis	NS	9.01E-04 (18)	NS
Formation of brain	NS	1.60E-03 (14)	NS
migration of neurons	NS	NS	1.83E-05 (11)

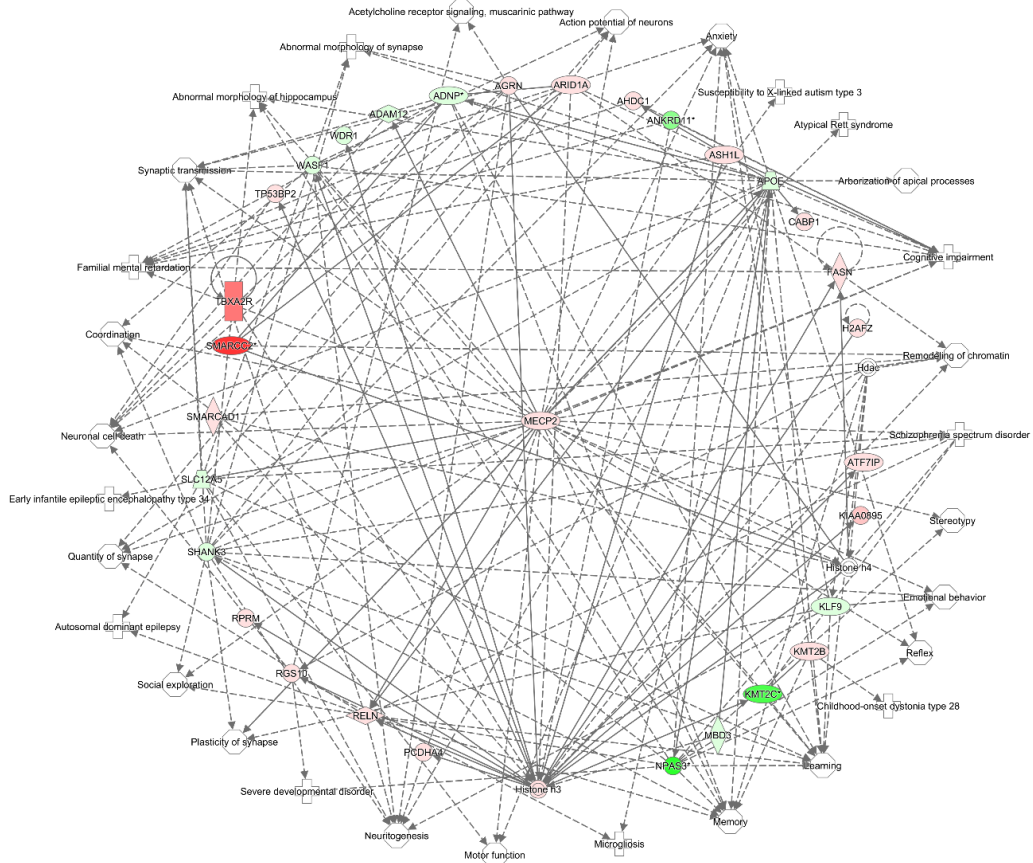
(NS หมายถึง Not Significant)

ตารางที่ 9 ผลการวิเคราะห์เปรียบเทียบ canonical pathway ที่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติอย่างจำเพาะในแต่ละเพศ

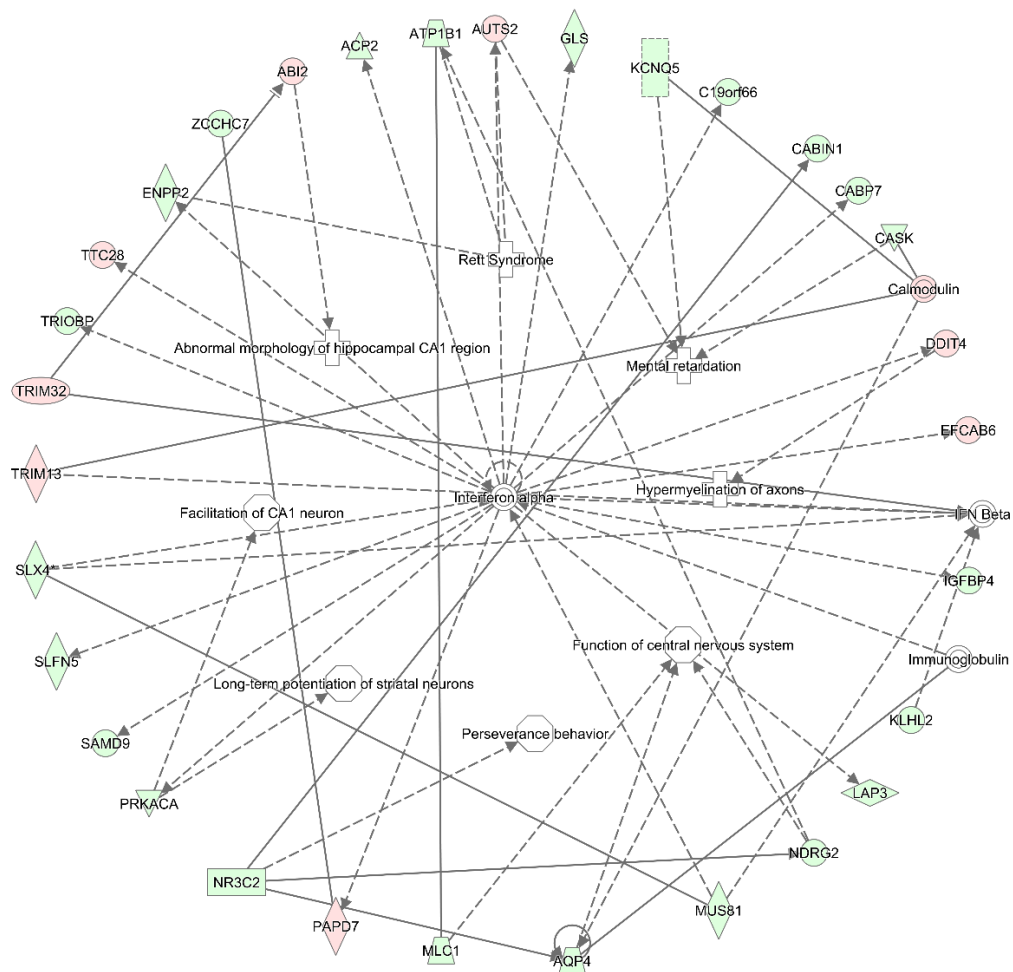
Ingenuity canonical pathways	Male	Female
DNA Methylation and Transcriptional Repression Signaling	0.015	0.264
4-aminobutyrate Degradation I	0.017	0.344
Docosahexaenoic Acid (DHA) Signaling	0.043	0.072
Amyloid Processing	NS	3.46E-05
IGF-1 Signaling	0.060	7.24E-05
Synaptic Long-Term Potentiation	0.116	2.34E-04
CREB Signaling in Neurons	0.066	3.72E-04
Netrin Signaling	1	9.77E-04
Wnt/ β -catenin Signaling	0.310	1.20E-02
Androgen Signaling	0.331	1.51E-02
eNOS Signaling	0.248	5.89E-03

(NS หมายถึง Not Significant)

เพื่อที่จะศึกษาโครงข่ายทางชีวภาพโดยใช้รายชื่อยีนที่แสดงผิดปกติในเพศผู้และเพศเมีย โครงข่ายทางชีวภาพจะศึกษาปฏิสัมพันธ์ระหว่างยีนและบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพที่จำเพาะต่อโรคทางพัฒนาการทางระบบประสาท ทางคณะผู้วิจัยพบว่าโครงข่ายทางชีวภาพหรืออินเทอร์แอคโตม ยีนที่แสดงออกผิดปกติเพศผู้เมื่อนำมาวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมพบว่ามีความสัมพันธ์/เกี่ยวข้องกับโรค หน้าที่ทางระบบประสาทและพฤติกรรม พบว่ากลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับ “mental retardation” “neuritogenesis” “social exploration” “learning” และ “motor function” แสดงดังรูปภาพที่ 13 และเมื่อวิเคราะห์กลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศเมื่อก็พบว่ามีความสัมพันธ์กับ “Rett syndrome” “perseverance” และ “mental retardation” แสดงดังรูปภาพที่ 14 โดยจะเห็นว่าโรค หน้าที่ทางระบบประสาทและพฤติกรรมนั้นมีส่วนเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้นการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนผิดปกติและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและ/หรือเพิ่มความเสี่ยงในโรคออทิซึมสเปกตรัม



รูปภาพที่ 13 Gene regulatory network ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูเพศผู้ที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องและบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

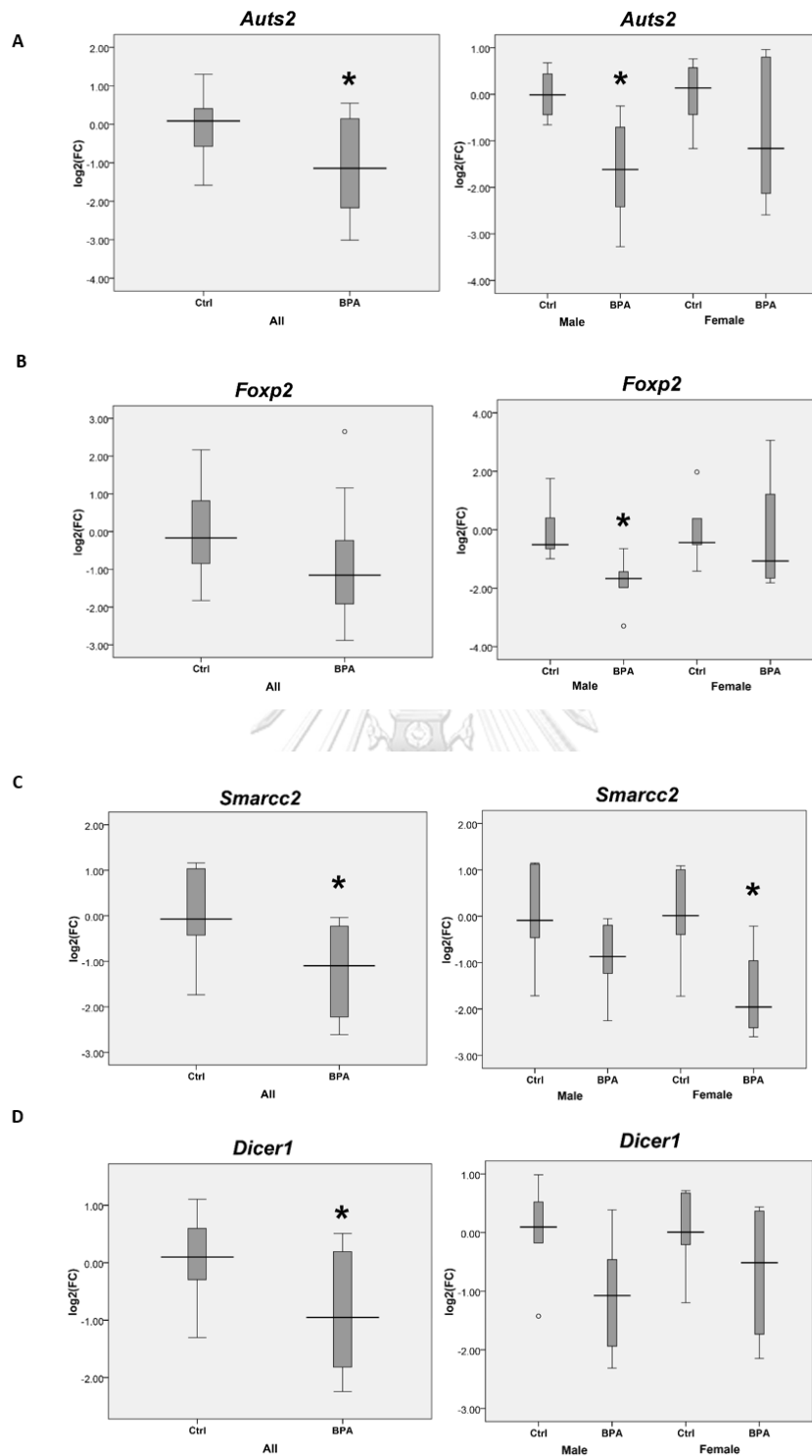


รูปภาพที่ 14 Gene regulatory network ที่แสดงปฏิสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูเพศเมียที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องและบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

เพื่อที่จะเลือกยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือภาวะพร่องทางสติปัญญาจากการวิเคราะห์ด้วยโปรแกรม IPA มีจำนวนทั้งหมด 144 ยีน กลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม (autism candidate genes) ถูกเลือกเพื่อนำมายืนยันการแสดงออกโดยใช้เทคนิค qRT-PCR ต่อไป ทางคณะผู้วิจัยได้เลือกยีนทั้งหมด 4 ยีน ได้แก่ *Auts2* *Foxp2* *Smarcc2* และ *Dicer1* โดยยีนทั้ง 4 ยีนเป็นยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (FDR < 0.05 และ p-value < 0.05) จากผลการวิเคราะห์ด้วย RNA-seq มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและมีการแสดงออกอย่างจำเพาะในแต่ละเพศอีกด้วย

4.8 ผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วย quantitative RT-PCR

เพื่อที่จะพิสูจน์ว่าการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลให้มีการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส ยีนจำนวน 4 ยีน ได้แก่ *Auts2* *Foxp2* *Smarcc2* และ *Dicer1* ที่มีการแสดงออกผิดปกติจากผลการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมิกส์ถูกนำมาวิเคราะห์โดยใช้เทคนิค quantitative RT-PCR โดยใช้เนื้อเยื่อสมองส่วนฮิปโปแคมปัส *Auts2* หรือ Autism susceptibility candidate 2 *Foxp2* หรือ Forkhead Box P2 *Smarcc2* หรือ SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin subfamily C member 2 และ *Dicer1* หรือ Dicer 1, Ribonuclease III ทางคณะผู้วิจัยพบว่าเมื่อวิเคราะห์การแสดงออกของทั้ง 4 ยีน แบบรวมเพศพบว่าการแสดงออกของยีน *Auts2* *Smarcc2* และ *Dicer1* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ สำหรับ *Foxp2* มีแนวโน้มที่จะมีการแสดงออกลดลงเช่นกันแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ และเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่าเมื่อวิเคราะห์แบบแยกเพศแล้วนั้น การแสดงออกของยีน *Auts2* และ *Foxp2* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในเพศผู้ ในขณะที่ยีน *Smarcc2* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะในเพศเมีย ดังแสดงในรูปภาพที่ 15 ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีผลให้เกิดการแสดงออกผิดปกติของยีนที่มีความจำเพาะต่อเพศ

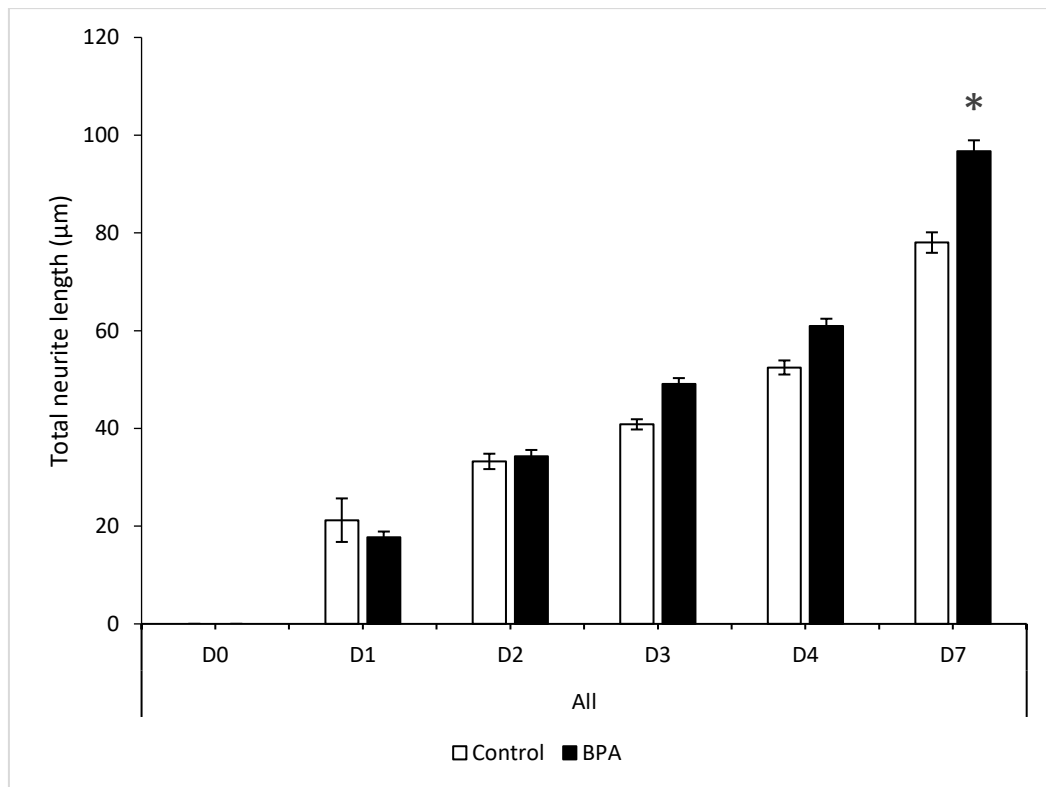


รูปภาพที่ 15 แผนภาพกล่อง (box plot) แสดงการแสดงออกของยีน *Aut2* *Foxp2* *Smarcc2* และ *Dicer1* ในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$)

4.9 ผลการวิเคราะห์ที่เกี่ยวข้องกับสายใยของเซลล์ระบบประสาท (neurite outgrowth assay)

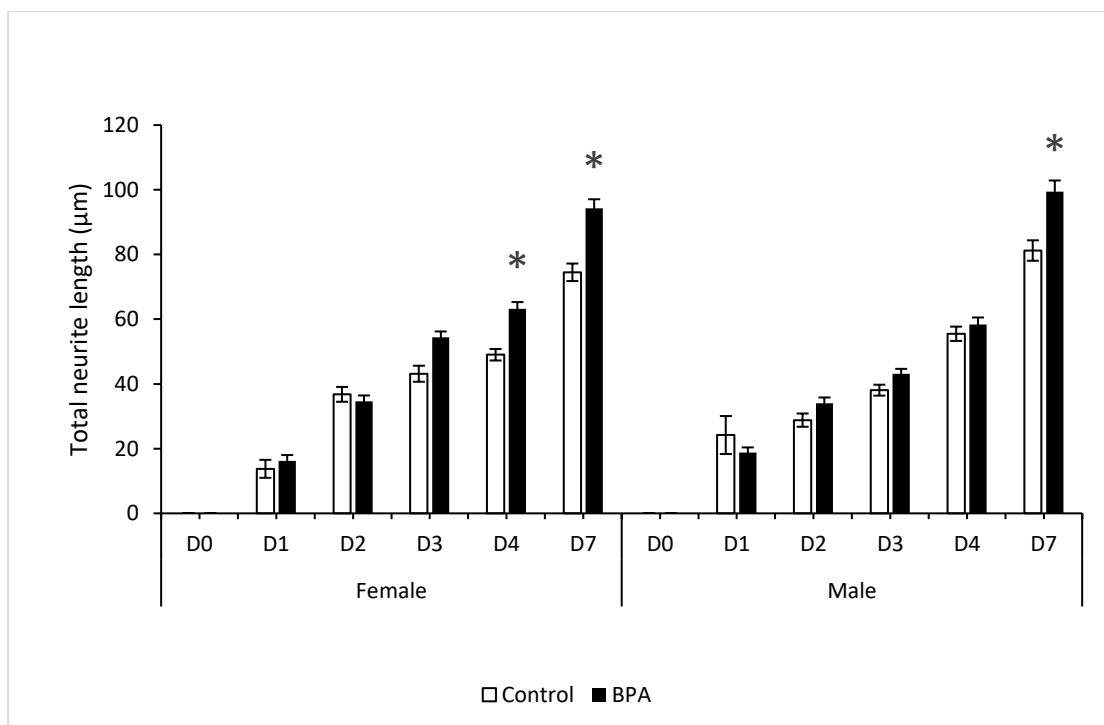
4.9.1 ผลการวิเคราะห์ความยาวรวม (Total neurite length) ของสายใยประสาท

จากผลการวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNA-seq และวิเคราะห์โดยใช้ IPA พบว่าการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องนอกจะส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมผิดปกติไปแล้ว ยังมียีนที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเซลล์ระบบประสาทที่แสดงออกผิดปกติไปด้วย เช่น *Lamb1 Slc9a6 Spast Tnik Nrp1* เป็นต้น ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงทำการศึกษารูปร่างที่เปลี่ยนไปของเซลล์ระบบประสาทโดยใช้การวิเคราะห์ neurite outgrowth assay เซลล์ระบบประสาทที่แยกได้จากลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องจากสมองส่วนฮิปโปแคมปัสโดยลูกหนูดังกล่าวจะมาจาก 3 ครอกที่แตกต่างกัน เซลล์ระบบประสาทถูกเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงและทำการวัดความยาวของสายใยประสาท (neurite) ที่วันที่ 0 1 2 3 4 และ 7 พบว่า เมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศความยาวรวมของสายใยประสาทมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ณ วันที่ 7 โดยพบว่าเซลล์ประสาทที่แยกจากลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีความยาวของสายใยประสาทมากกว่ากลุ่มควบคุม (รูปภาพที่ 16) หลังจากนั้นนำมาวิเคราะห์แบบแยกเพศพบว่า ในเพศเมียความยาวรวมของสายใยประสาทมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตั้งแต่วันที่ 4 และวันที่ 7 ในเพศผู้พบว่าความยาวรวมของสายใยประสาทมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะวันที่ 7 (รูปภาพที่ 17) ดังนั้นการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อการเพิ่มขึ้นของความยาวรวมของเซลล์ประสาทอย่างมีนัยสำคัญ



รูปภาพที่ 16 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาทแบบรวมเพศ

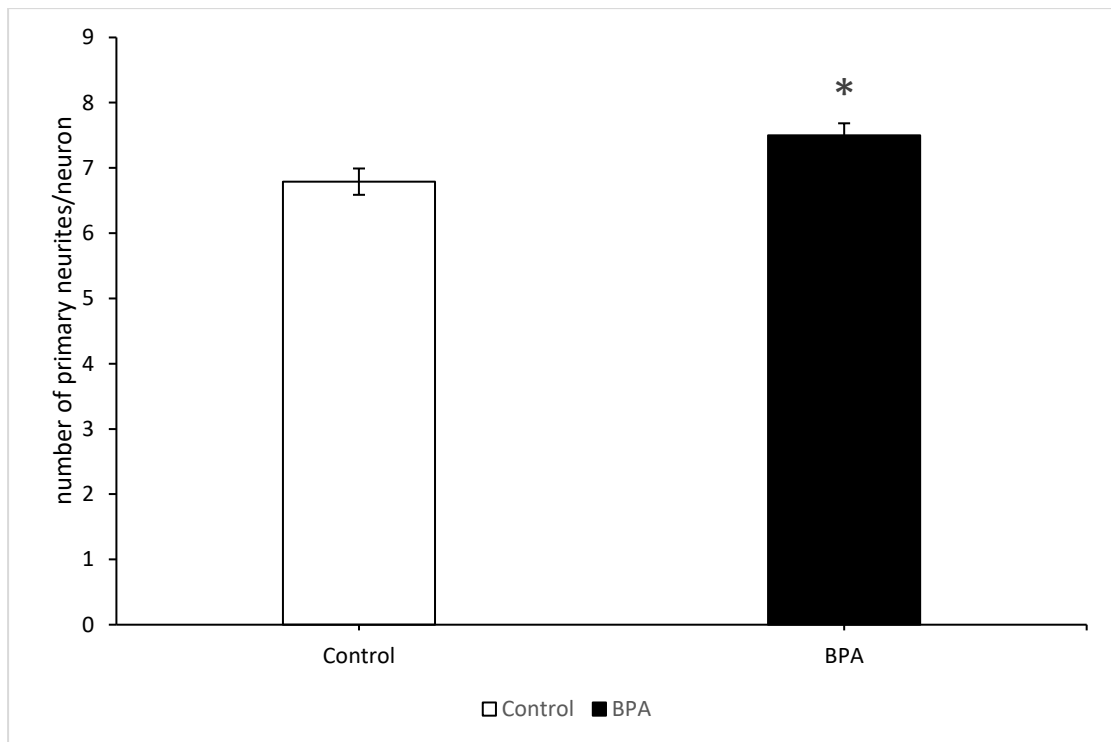
(* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)



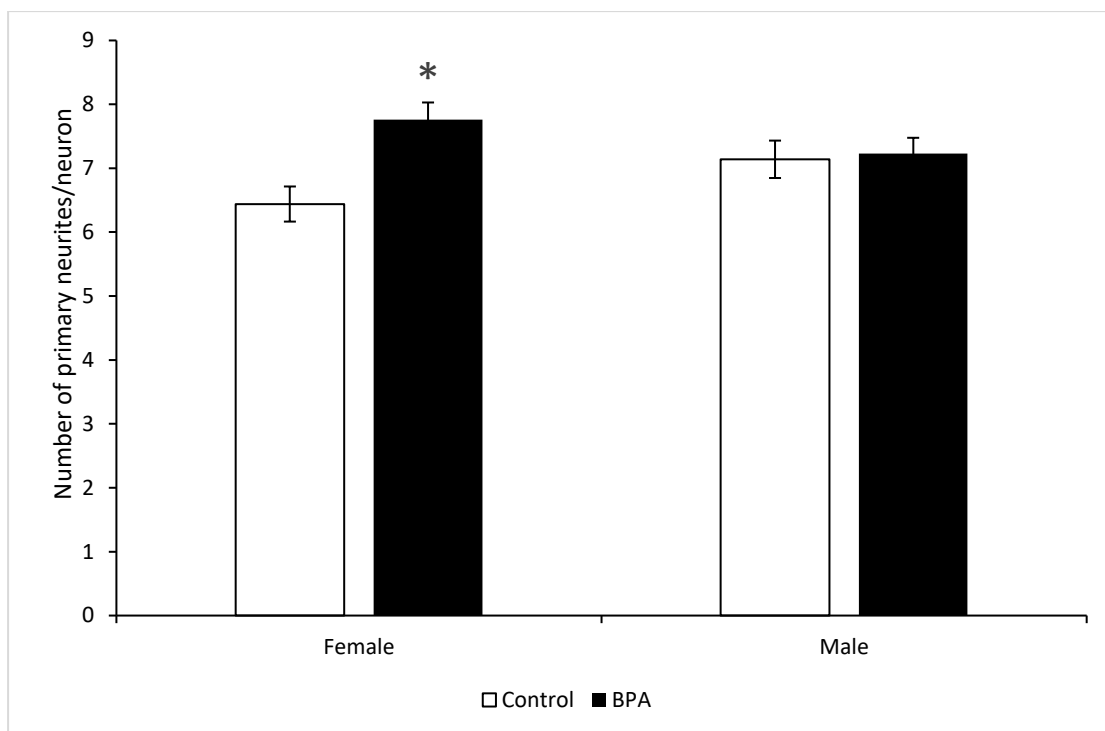
รูปภาพที่ 17 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาทแบบแยกเพศ (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)

4.9.2 ผลการวิเคราะห์การแตกแขนงของสายใยในเซลล์ระบบประสาท (neurite branching)

เพื่อศึกษาถึงการแตกแขนงของเซลล์ประสาท เซลล์ระบบประสาทดังกล่าวได้ถูกนำมาวิเคราะห์จำนวนแขนงของเซลล์ประสาทที่มาจากตัวเซลล์โดยตรง (primary neurites) จากผลการวิเคราะห์ความยาวรวมของสายใยประสาทพบว่า ณ วันที่ 7 ทั้งในเพศเมียและเพศผู้มีความยาวรวมของสายใยประสาทมากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ การวิเคราะห์จำนวนแขนงของเซลล์ประสาทจึงดำเนินการวัดความยาวรวมโดยใช้เซลล์ระบบประสาท ณ วันที่ 7 เมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศเซลล์ระบบประสาทที่แยกได้จากลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้อง พบว่าจำนวนของแขนงเซลล์ประสาทที่งอกโดยตรงจากตัวเซลล์เฉลี่ยต่อเซลล์มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปภาพที่ 18) และเมื่อวิเคราะห์แบบแยกเพศพบว่า เฉพาะในเพศเมียที่จำนวนแขนงของเซลล์ประสาทมีจำนวนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ในขณะที่จำนวนแขนงของเซลล์ประสาทในเพศผู้ไม่มีความแตกต่าง (รูปภาพที่ 19)

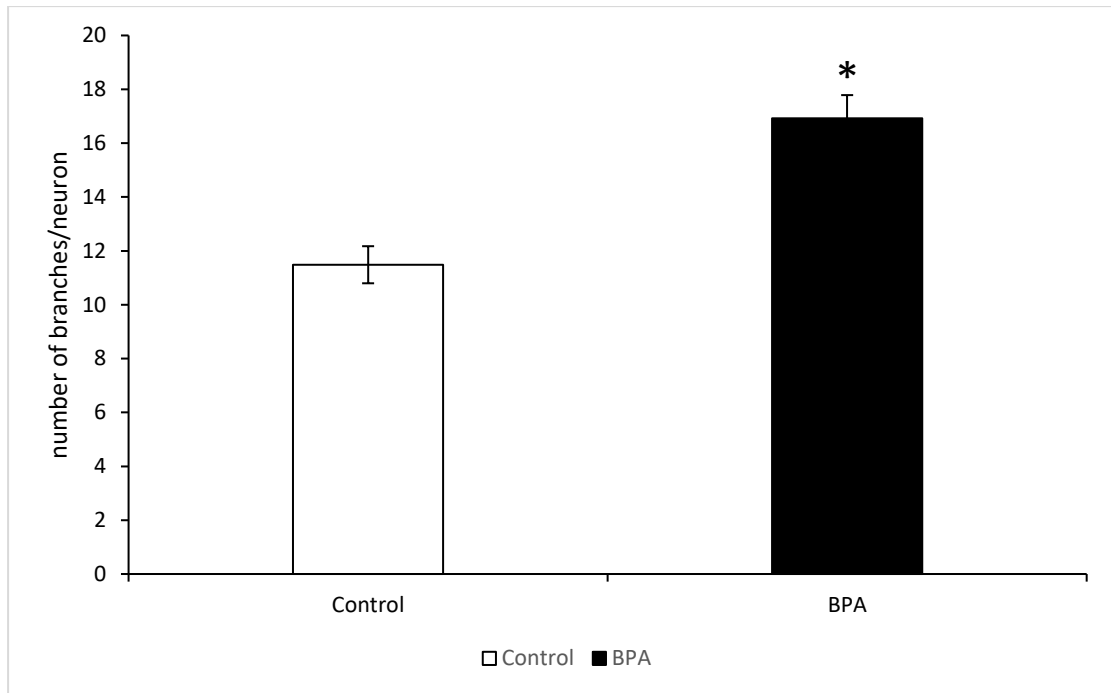


รูปภาพที่ 18 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ primary neurites แบบรวมเพศ
(* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)

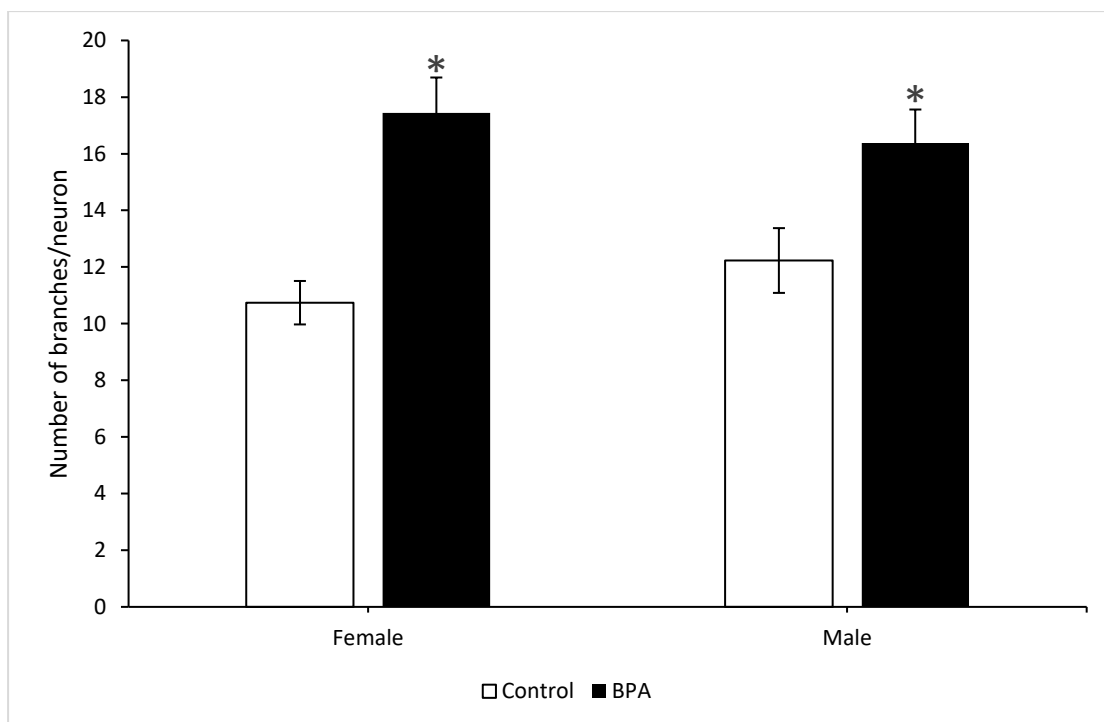


รูปภาพที่ 19 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ primary neurites แบบแยกเพศ
 (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)

นอกจากศึกษาจำนวนแขนงของเซลล์ระบบประสาทที่มาจากตัวเซลล์โดยตรง (primary neurites) แล้วนั้น ทางผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาจำนวนแขนงของเซลล์ระบบประสาท ($>1^\circ$ neurites) ทั้งหมด เมื่อวิเคราะห์แบบแยกเพศพบว่าจำนวนแขนงของเซลล์ประสาทเฉลี่ยต่อเซลล์ในกลุ่มลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีจำนวนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปภาพที่ 20) และเมื่อวิเคราะห์แบบแยกเพศพบว่า ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีจำนวนแขนงของเซลล์ระบบประสาทมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (รูปภาพที่ 21)

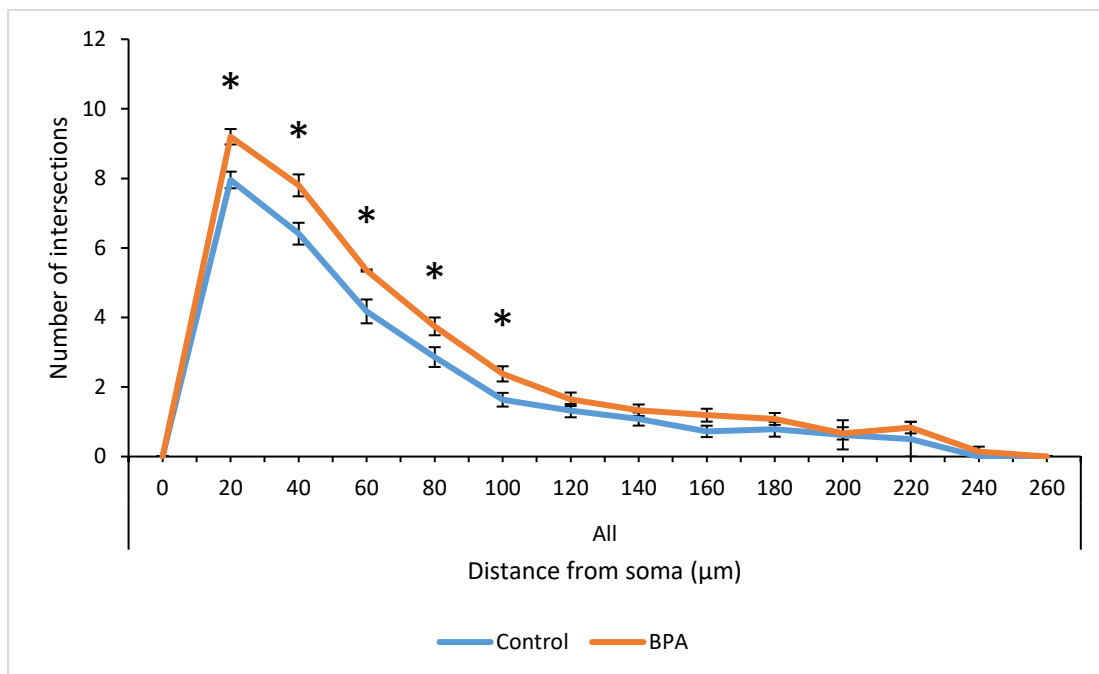


รูปภาพที่ 20 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching แบบรวมเพศ
(* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)



รูปภาพที่ 21 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching แบบแยกเพศ
 (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)

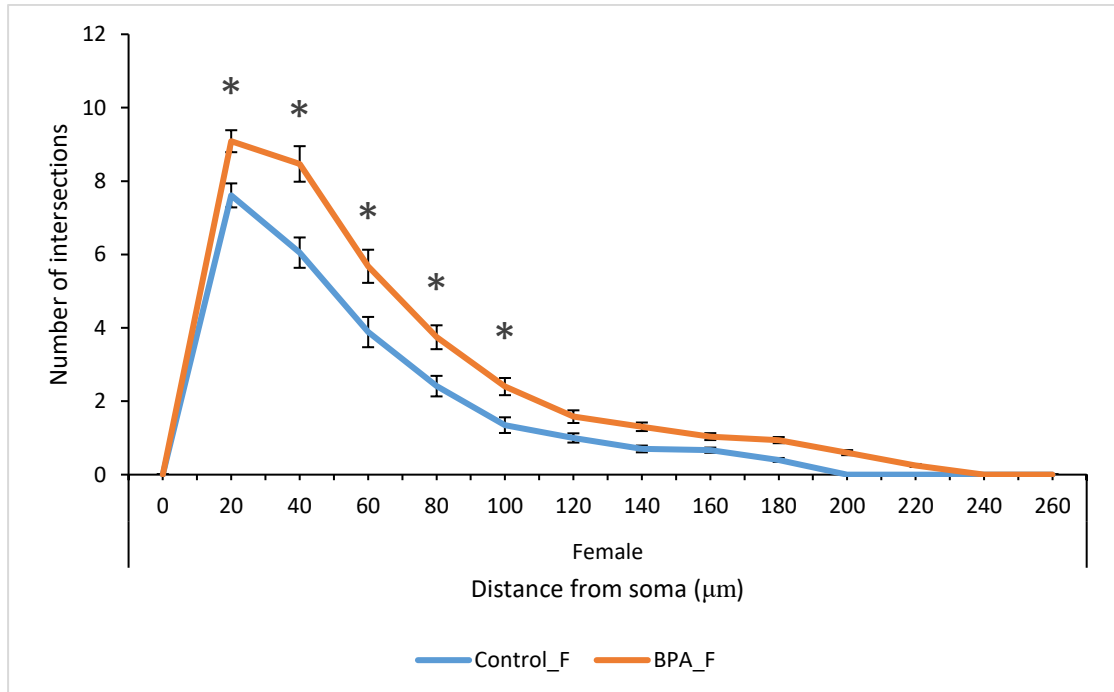
นอกจากการวัดจำนวนการแตกแขนงของเซลล์ระบบประสาทแล้วนั้น ทางคณะผู้วิจัยยังทำการประเมินการแตกแขนงของเซลล์ประสาทโดยใช้การวิเคราะห์แบบ Sholl analysis ณ วันที่ 7 ของการเลี้ยง ซึ่งจะทำการวัดจำนวนจุดตัด (intersection) ระหว่างแขนงของเซลล์ระบบประสาท (neurite branches) กับ เส้นวงกลมที่วัดออกมาจากตัวเซลล์โดยระยะห่างของเส้นวงกลมแต่ละเส้นจะเพิ่มขึ้นเท่า ๆ กัน โดยในการศึกษานี้จะใช้ระยะห่างจากตัวเซลล์เท่ากับ 20 μm และระยะห่างของแต่ละวงกลมก็เท่ากับ 20 μm เช่นกัน พบว่า เมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศพบว่าจำนวนจุดตัดเฉลี่ยของแขนงของเซลล์ระบบประสาทในกลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีค่าสูงสุดที่ระยะห่าง 20 μm จากตัวเซลล์และที่ระยะห่างจากตัวเซลล์ 40 60 80 และ 100 μm จำนวนจุดตัดเฉลี่ยมีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปภาพ 22)



รูปภาพที่ 22 กราฟเส้นแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching แบบรวมเพศโดยใช้ Sholl analysis

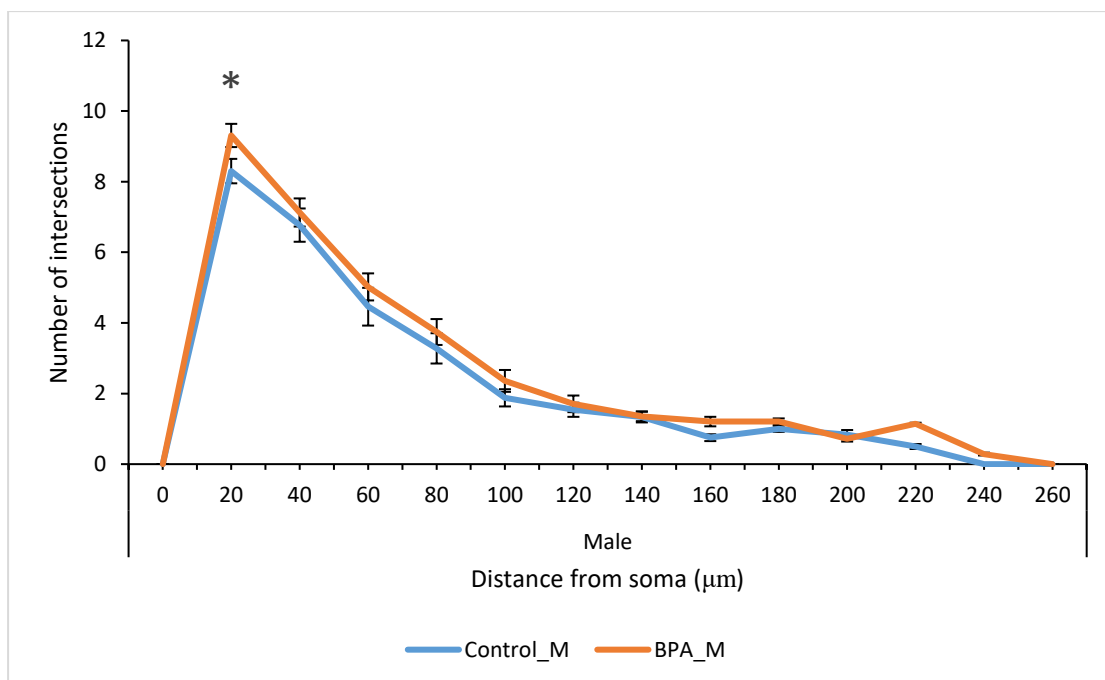
(* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)

การวิเคราะห์ Sholl analysis แบบแยกเพศถูกดำเนินการวิเคราะห์ในลักษณะเดียวกันกับการวิเคราะห์แบบรวมเพศ พบว่าในเพศเมียให้ผลเหมือนกับการวิเคราะห์แบบรวมเพศ คือ จำนวนจุดตัดเฉลี่ยในลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอมีจำนวนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ระยะ 20 40 60 80 และ 100 μm และจำนวนจุดตัดเฉลี่ยจะสูงสุดที่ระยะห่างที่ 20 μm จากตัวเซลล์ (รูปภาพ 23) และเมื่อวิเคราะห์ในเพศผู้จำนวนจุดตัดเฉลี่ยในลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอมีจำนวนมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและจำนวนจุดตัดเฉลี่ยสูงสุดที่เฉพาะระยะ 20 μm จากตัวเซลล์เท่านั้น (รูปภาพ 24)



รูปภาพที่ 23 กราฟเส้นแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching ในเพศเมียโดยใช้ Sholl analysis

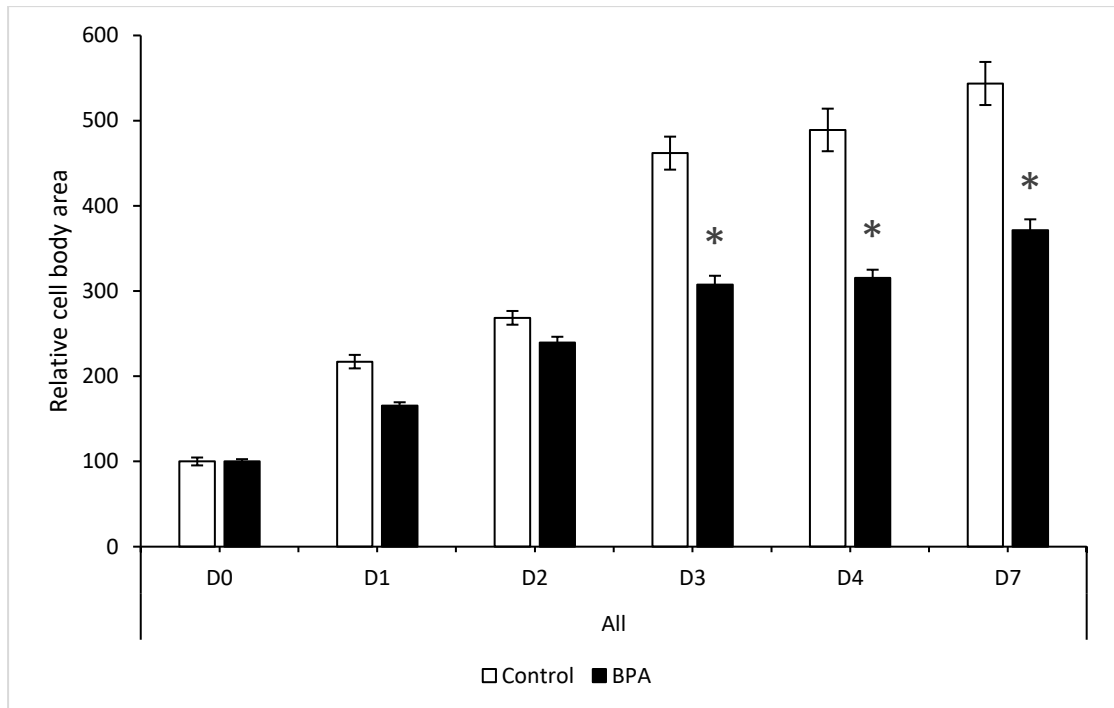
(* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)



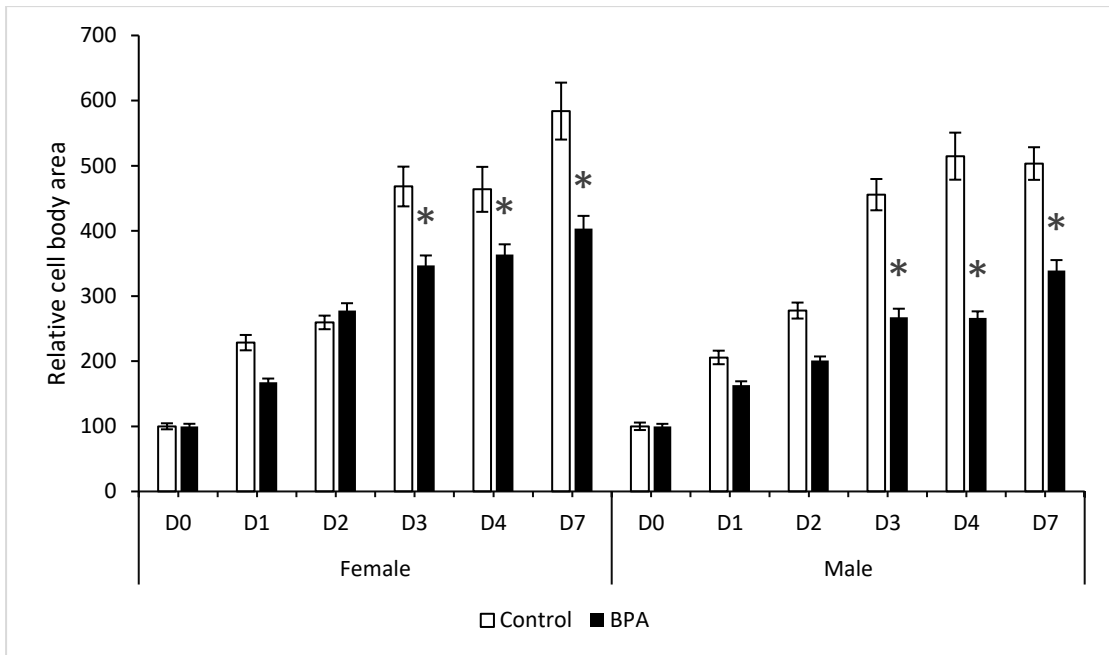
รูปภาพที่ 24 กราฟเส้นแสดงผลการวิเคราะห์ neurite branching ในเพศผู้โดยใช้ Sholl analysis (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)

4.9.3 ผลการวิเคราะห์ขนาดพื้นที่ของตัวเซลล์ระบบประสาท (cell body area)

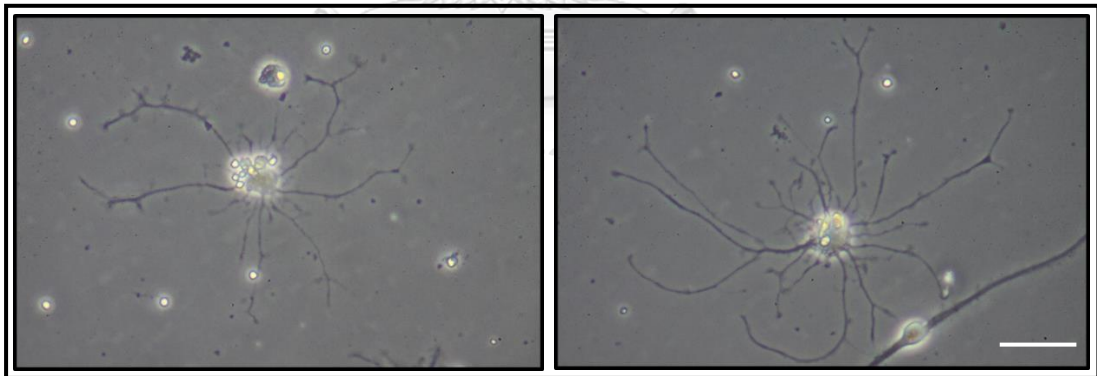
เพื่อศึกษาขนาดพื้นที่ของตัวเซลล์ระบบประสาท เซลล์ระบบประสาทจะถูกนำมาวัดขนาดของตัวเซลล์ ณ วันที่ 0 1 2 3 4 และ 7 ของการเลี้ยง การวัดขนาดของตัวเซลล์ระบบประสาทจะถูก normalization ขนาดของตัวเซลล์ ณ วันที่ 0 เมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศพบว่าขนาดของตัวเซลล์ในกลุ่มลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีขนาดเล็กกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ วันที่ 3 4 และ 7 (รูปภาพที่ 25) และเมื่อทำการวิเคราะห์แบบแยกเพศผลการทดลองสอดคล้องไปทางเดียวกัน คือ ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ขนาดพื้นที่ของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอมีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ณ วันที่ 3 4 และ 7 (รูปภาพที่ 26)



รูปภาพที่ 25 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ cell body area แบบรวมเพศ
 (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)



รูปภาพที่ 26 กราฟแท่งแสดงผลการวิเคราะห์ cell body area แบบแยกเพศ
 (* หมายถึง $p\text{-value} < 0.05$, error bar แสดงถึง S.E.M)



รูปภาพที่ 27 รูปภาพแสดงเซลล์ระบบประสาท ณ วันที่ 7 เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่ม
 ได้รับ BPA (scale bar 50 μm)

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

โรคออทิซึมสเปกตรัม (Autism Spectrum Disorder) เป็นโรคที่มีความผิดปกติด้านการพัฒนาการของสมอง สาเหตุของการเกิดโรคนี้อย่างไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดประกอบกับผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีอาการที่หลากหลายตั้งแต่รุนแรงน้อยไปจนถึงรุนแรงมาก มีหลายการศึกษาพบว่าสาเหตุของการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมเกิดจากปัจจัยทางพันธุกรรมและปัจจัยเหนือพันธุกรรม (epigenetics) (Saeliw et al., 2018; Sarachana, Zhou, Chen, Manji, & Hu, 2010) รวมไปถึงการที่แม่ได้รับสารเคมีขณะตั้งครรภ์ มีการรายงานว่าการได้รับสารเคมีขณะตั้งครรภ์ เช่น สารที่รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ (endocrine-disrupting compounds) (Moosa, Shu, Sarachana, & Hu, 2018) ตะกั่ว (Adams et al., 2013) ปรีอท (Geier, Audhya, Kern, & Geier, 2010) ยาฆ่าแมลง (Roberts et al., 2007) และควินบูทรี (Kalkbrenner et al., 2012) อาจจะเป็นสาเหตุและ/หรือเพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัม ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยมุ่งเน้นศึกษาไปที่สารที่รบกวนระบบต่อมไร้ท่อ โดยสารที่รบกวนระบบต่อมไร้ท่อเป็นสารที่ถูกเอามาใช้ในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ และสามารถพบได้ในชีวิตประจำวัน โครงสร้างของสารกลุ่มนี้จะลักษณะคล้ายกับกลุ่มฮอร์โมนเพศ โดยเฉพาะอย่างยิ่งฮอร์โมนเอสโตรเจน สารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อจะไปรบกวนระบบควบคุมฮอร์โมนในร่างกายได้ในหลายกระบวนการ เช่น กระบวนการผลิตฮอร์โมน การหลั่งฮอร์โมน การขนส่งฮอร์โมน เป็นต้น (Diamanti-Kandarakis et al., 2009) อีกทั้งฮอร์โมนเพศเป็นฮอร์โมนที่มีความสำคัญในกระบวนการรักษาสมดุลในร่างกาย กระบวนการผลิตและการพัฒนาการต่าง ๆ สารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อเกี่ยวข้องกับหลาย ๆ โรค รวมไปถึงโรคออทิซึมสเปกตรัม (Moosa et al., 2018; T. T. Schug, A. Janesick, B. Blumberg, & J. J. Heindel, 2011) และสารรบกวนระบบต่อมไร้ท่อที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ บิสฟีนอลเอ (Bisphenol A)

บิสฟีนอลเอเป็นสารที่พบมากในผลิตภัณฑ์พลาสติกชนิดโพลีคาร์บอเนต มีการศึกษาในหลอดทดลอง (*in vitro*) และในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของยีนในสมองและส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมของลูกหนู (Arambula, Belcher, Planchart, Turner, & Patisaul, 2016; Kundakovic et al., 2013) จากการศึกษาของ Stein ในปี 2015 การศึกษาของ Kardas และ Kondolot ในปี 2016 พบว่าระดับบิสฟีนอลเอในเลือดและในปัสสาวะของเด็กที่มีภาวะออทิซึมสเปกตรัมสูงกว่าในเด็กที่มีพัฒนาการปกติ (Kardas et al., 2016; Kondolot et al., 2016; Stein et al., 2015) ดังนั้นการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องของแม่อาจจะเป็นสาเหตุ/เพิ่มความ

เสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมของลูกได้ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่มีการศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องของแม่ต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในสมองและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยชิ้นแรกที่ศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องต่อการแสดงออกของยีนในสมองที่มีบทบาทหน้าที่มีการรายงานในโรคออทิซึมสเปกตรัมและมีการแสดงออกอย่างจำเพาะในแต่ละเพศโดยในส่วนของงานวิจัยนี้ผู้วิจัยได้รวบรวมงานวิจัยที่ได้ทำการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อเนื้อเยื่อ เซลล์หรือเซลล์ไลน์ต่อการแสดงออกของยีนทั้งหมดจากฐานข้อมูล GEO DataSets มีทั้งหมด 7 การศึกษา หลังจากนั้นใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์ (bioinformatics) โดยใช้โปรแกรม MeV (Multiple Experiment Viewer) เพื่อหารายชื่อยีนที่มีการแสดงออกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พบว่ามียีนจำนวน 2,101 ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในอย่างน้อย 2 การศึกษา จะใช้ยีนกลุ่มนี้ในการศึกษาความสัมพันธ์ต่อโรคออทิซึมสเปกตรัมต่อไป นอกจากนี้ทางผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างข้อมูลแต่ละชุดกับรายชื่อยีนในฐานข้อมูลโรคออทิซึมสเปกตรัมที่แตกต่างกันได้แก่ SFARI AutDB และ AutismKB โดยการใช้การวิเคราะห์แบบ Hypergeometric Distribution Analysis พบว่า 5 การศึกษาจาก 7 การศึกษามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับฐานข้อมูล SFARI และ AutDB เป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่งว่า 1 ในการศึกษาจาก 5 ศึกษาเป็นการศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องต่อการแสดงออกของยีนในรกของลูกหนู (placenta) (Tait et al., 2015b) โดยแม่หนูที่ตั้งท้องจะได้รับบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เอ็มบริโอที่อายุ 12 วันจะถูกการุณยฆาตและเก็บรกเพื่อทำการศึกษาต่อไป Tait และคณะพบว่า การได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อการพัฒนาของหลอดเลือดในรกและรูปร่างของรก โดยพบว่าบิสฟีนอลเอมีส่วนทำให้หลอดเลือดรอบ ๆ รกมีขนาดเล็กและส่งผลกระทบต่อโครงสร้างของศีรษะและการพัฒนาของขาหน้า (forelimb) ทำให้การไหลเวียนของโลหิตระหว่างแม่และลูกมีความผิดปกติ (Tait, Tassinari, Maranghi, & Mantovani, 2015a) ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาที่พบว่าแม่ที่มีการไหลเวียนของเลือดผิดปกติ (malperfusion) มีความเกี่ยวข้องอย่างมีนัยสำคัญกับการเกิดและเพิ่มความเสี่ยงของโรคออทิซึมสเปกตรัม (Straughen et al., 2017)

ยีนจำนวน 2,101 ยีนที่แสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอในการศึกษาอย่างน้อย 2 การศึกษาและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมถูกนำมาวิเคราะห์ต่อด้วยโปรแกรม Ingenuity Pathway Analysis เพื่อทำนายความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนดังกล่าวกับบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคและโครงข่ายควบคุมยีน พบว่ากลุ่มยีนดังกล่าวมีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและภาวะหรืออาการที่เกิดร่วมกับโรคออทิซึมสเปกตรัม (ASD-comorbid disorders and functions) ได้แก่ ภาวะ cognitive impairment (Brunsdon et al., 2015) ภาวะ

mental retardation (Noterdaeme & Wriedt, 2010) อีกทั้งโครงข่ายควบคุมยีนยังแสดงความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่มยีนกับหน้าที่ทางระบบประสาท เช่น GABAergic synapse (Harada et al., 2011) การสร้างสายใยประสาท (neuritogenesis) (Hashimoto et al., 2016) และการตายของเซลล์ประสาท (neuronal cell death) (E. Courchesne et al., 2007) ซึ่งจากการศึกษาเชิง meta-analysis นี้ทำให้พบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับหน้าที่ทางชีวภาพที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม

จากการศึกษาเชิง meta-analysis นำมาสู่การทดลองในสัตว์ทดลอง โดยผู้วิจัยได้ใช้หนูแรทสายพันธุ์ Wistar เป็นโมเดลในการศึกษาครั้งนี้ เนื่องจากเป็นสายพันธุ์ที่มีการศึกษาทางด้านประสาทวิทยาศาสตร์ (neuroscience) อย่างแพร่หลาย (Ellenbroek & Youn, 2016) ผู้วิจัยได้ศึกษาผลของการได้รับบิสฟีนอลเอต่อการแสดงออกของยีนทั้งหมดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนูโดยใช้เทคนิค RNA-sequencing จากผลการวิเคราะห์ทางทรานสคริปโตมพบว่า การได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลให้เกิดความแตกต่างของจำนวนยีนที่แสดงออกผิดปกติระหว่างเพศผู้และเพศเมีย โดยจำนวนยีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีจำนวนทั้งหมด 2,078 ยีนและจำนวนยีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศเมียมีจำนวน 3,522 ยีน การวิเคราะห์ความสัมพันธ์โดยใช้เครื่องมือทางชีวสารสนเทศศาสตร์เพื่อศึกษาว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมหรือไม่ ผลการวิเคราะห์โดยใช้ Hypergeometric Distribution Analysis พบว่ายีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติมากกว่ากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศเมีย ซึ่งรายชื่อยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอและมีการแสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมในเพศผู้จำนวนยีนน้อยกว่าเพศเมียแต่ให้ระดับนัยสำคัญที่มากกว่า แสดงให้เห็นว่ายีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมมากกว่าเมื่อเทียบกับเพศเมีย ในขณะที่เมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศไม่มีความสัมพันธ์ทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาในโรคออทิซึมสเปกตรัมที่พบว่าเป็นโรคที่มีความชุกในเพศชายมากกว่าเพศหญิงถึง 4 เท่า (Baio et al., 2018)

นอกจากนั้นการทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพ โรคและโครงข่ายควบคุมยีนโดยใช้กลุ่มยีนในเพศผู้ พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและภาวะ mental retardation การศึกษาถึง pathway พบว่ากลุ่มยีนทั้งในเพศผู้และเพศเมียมีความเกี่ยวข้องกับ Glutamate Receptor signaling Axonal Guidance Signaling และ Circadian Rhythm Signaling ซึ่ง pathway ทั้งหมดนั้นเป็น pathway ที่เคยรายงานว่าเกี่ยวกับโรคออทิซึมสเปกตรัม (Hu et al., 2009; Mejias et al., 2011; Suda et al., 2011) เมื่อศึกษาถึงโรคและบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้ กลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติเกี่ยวข้องกับ

Nervous System Development and function มีจำนวนมากกว่าในเพศเมีย อีกทั้งกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้ดังกล่าวนี้ยังมีความสัมพันธ์โดยตรงกับ Autism รวมไปถึง Global developmental delay สำหรับบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทกลุ่มยีนในเพศผู้มีความสัมพันธ์อย่างจำเพาะกับ Development of neurons Neuritogenesis และ formation of brain การศึกษาเปรียบเทียบ pathway ที่มีความสัมพันธ์อย่างจำเพาะในแต่ละเพศ พบว่า pathway ที่มีนัยสำคัญทางสถิติเฉพาะในเพศผู้ คือ DNA methylation and transcriptional repression signaling และ 4-aminobutyrate degradation ซึ่งทั้งสองกระบวนการนั้นมีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม (Fatemi, Reutiman, Folsom, & Thuras, 2009; Ladd-Acosta et al., 2014; Nardone, Sams, Zito, Reuveni, & Elliott, 2017; Nguyen, Rauch, Pfeifer, & Hu, 2010) การวิเคราะห์เพื่อทำนายบทบาทหน้าที่ทางชีวภาพก็เป็นอีกหลักฐานที่สนับสนุนว่ายีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมและหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมมากกว่าในเพศเมีย

หลังจากนั้นทางผู้วิจัยได้ทำการเลือกยีนจำนวน 4 ยีนเพื่อนำมายืนยันการแสดงออกด้วยเทคนิค quantitative RT-PCR โดย 4 ยีนที่เลือกมาได้แก่ *Auts2* *Foxp2* *Smarcc2* และ *Dicer1* ซึ่งเป็นยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่แยกได้จากลูกหนูโดยแม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องและมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม จากผลการทดลองพบว่าเมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศยีน *Auts2* *Smarcc2* และ *Dicer1* มีการแสดงออกที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับสมองลูกหนูที่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ อีกทั้งยีน *Foxp2* การแสดงออกของยีนมีแนวโน้มลดลงแต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่ายีนทุกยีนมีการแสดงออกที่ลดลงในสมองของลูกหนูที่ได้รับบิสฟีนอลเอ แต่เมื่อทำการวิเคราะห์แบบแยกเพศพบว่า มีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะในแต่ละเพศ พบว่า ยีน *Auts2* และยีน *Foxp2* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองของลูกหนูเพศผู้ที่ได้รับบิสฟีนอลเอ และยีน *Smarcc2* มีการแสดงออกลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสในลูกหนูเพศเมีย จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นถึงผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ลดลงในเพศผู้ที่แตกต่างจากในเพศเมีย

ยีน *Auts2* หรือมีชื่อเต็มว่า autism susceptibility candidate 2 เป็นหนึ่งในยีนที่มีการรายงานว่ามีผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม (autism candidate gene) ซึ่งจะมีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมและภาวะที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม เช่น ภาวะบกพร่องทางสติปัญญา (intellectual disability) และภาวะการพัฒนาล่าช้า (developmental delay) (Fan, Qiu, Wang, Gu, & Yu, 2016) ยีน *Auts2* เป็นยีนที่มีการแสดงออกมากในสมองที่กำลังพัฒนา และมีการแสดงออกเป็นอย่างมากในสมองส่วนฮิปโปแคมปัส สมองส่วนหน้า (prefrontal cortex)

และสมองส่วนท้าย (cerebellum) (Bedogni et al., 2010) ซึ่งส่วนของสมองดังกล่าวเป็นสมองที่มีการรายงานว่าผิดปกติในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม (Eric Courchesne et al., 2011) ปัจจุบันยังมีการศึกษาเกี่ยวกับบทบาทหน้าที่ของ *Auts2* ในโรคออทิซึมสเปกตรัมค่อนข้างจำกัด แต่มีการศึกษาพบว่าการ knockout ยีน *Auts2* ในปลาหมึกมีความสำคัญต่อการพัฒนาการของสมอง และพบว่าขนาดของซีรีเบลลัมในปลาที่ knockout มีขนาดเล็กกว่าสมองในกลุ่มที่ไม่ได้ knockout และอีกทั้งยังมีจำนวนของเซลล์ประสาทน้อยกว่าอีกด้วย (Oksenberg, Stevison, Wall, & Ahituv, 2013) ซึ่งเป็นบทบาทที่พบได้ในโรคออทิซึมสเปกตรัม อีกทั้งยังมีการศึกษาส่วนควบคุมของยีน *Auts2* (*Auts2* regulatory element) พบว่ามี enhancer จำนวน 23 enhancer และจำนวน 10 enhancer เป็น enhancer ที่ทำงานในสมอง ประกอบกับการค้นพบ enhancer ในสมองหนูที่มีความสัมพันธ์กับส่วนที่ขาดไปในสมองผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังจะแสดงให้เห็นว่ายีน *Auts2* เป็นยีนที่มีความสำคัญในกระบวนการพัฒนาการของสมองซึ่งมีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมโดยตรง (Konieczna et al., 2015)

ยีน *Foxp2* หรือชื่อเต็ม Forkhead Box P2 เป็นยีนที่จะเปลี่ยนเป็นโปรตีนในกลุ่มของ forkhead/winged-helix ที่ทำหน้าที่เป็น transcription factor และมีการรายงานว่ายีนนี้เป็นที่มีความสัมพันธ์กับการพัฒนาการด้านภาษา (Enard et al., 2002) ยีน *Foxp2* เป็นยีนที่มีการแสดงออกทั้งในสมองของทารกและผู้ใหญ่และมีความสำคัญต่อสมองที่ทำหน้าที่ในการพัฒนาการของการพูดและภาษาในช่วงการพัฒนาของเอ็มบริโอ (embryogenesis) การเกิดผ่าเหล่า (mutation) ของยีนนี้มีหลักฐานการรายงานในโรคที่มีความบกพร่องด้านภาษา (speech-language disorder 1, SPCH1) โดยอาการที่บกพร่องด้านการพูดและการสื่อสารนั้นเป็นอาการที่บ่งชี้ของโรคออทิซึมสเปกตรัม (Mody & Belliveau, 2013) อีกทั้งมีการรายงานว่าการพบ SNP ในยีน *Foxp2* นั้นยังมีความสัมพันธ์อาการบกพร่องด้านการเข้าสังคมในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม (Chien et al., 2017; Gong et al., 2004) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาในหนูทดลองที่บกพร่องยีน *Foxp2* พบมาหนูทดลองเกิดอาการเคลื่อนไหวที่ผิดปกติ มีการเปลี่ยนแปลงในการสื่อสารของหนูแรกเกิดเมื่อห่างจากแม่ (altered in ultrasonic vocalization) ซึ่งเป็นอาการบ่งชี้ถึงการสื่อสารในสังคมที่บกพร่องไป ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการบกพร่องในการทำหน้าที่ของยีน *Foxp2* นั้นทำให้เกิดอาการการสื่อสารและการเข้าสังคมที่ผิดปกติไป ซึ่งอาการดังกล่าวนี้ถูกจัดเป็นอาการที่บ่งชี้ในโรคออทิซึมสเปกตรัมที่สำคัญ (Shu et al., 2005)

ยีน *Smarcc2* หรือชื่อเต็ม SWI/SNF Related, Matrix Associated, Actin Dependent Regulator of Chromatin subfamily C member 2 เป็นยีนที่ทำหน้าที่เปลี่ยนไปเป็นโปรตีนในกลุ่ม SW1/SNW หน้าที่ของยีนนี้เกี่ยวข้องกับกระบวนการกระตุ้นการเกิด transcription และ repression

ของยีนผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงการจัดเรียงตัวของโครมาติน (chromatin remodeling process) (Kadam et al., 2000) ยีน *Smarcc2* เป็นยีนที่การแสดงออกสูงในสมอง มีบทบาทสำคัญในกระบวนการที่เปลี่ยนจากเซลล์ต้นกำเนิด (stem/progenitor cell) ไปเป็นเซลล์ประสาท (mature neural cells) ในขณะที่กระบวนการพัฒนาของระบบประสาท มีการศึกษาพบว่าการเกิดการผ่าเหล่าในยีน *Smarcc2* ส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครมาติน (alteration of chromatin remodeling complexes) ในผู้ป่วยออทิซึมสเปกตรัม (LaSalle, 2013) และการเกิด de novo splice-site ในยีนนี้ก็ยังพบในผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมด้วยเช่นกัน (Neale et al., 2012) จะเห็นได้ว่ายีน *Smarcc2* เป็นยีนที่มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมทั้งในแง่ของการเกิดการเปลี่ยนแปลงของโครมาตินซึ่งมีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมและยังมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการพัฒนาการของระบบประสาท

ยีน *Dicer1* หรือชื่อเต็ม Dicer 1, Ribonuclease III เป็นยีนที่ทำหน้าที่เปลี่ยนไปเป็นโปรตีนที่ยับยั้งการแสดงออกของยีน โดยโปรตีนดังกล่าวทำหน้าที่เป็น ribonuclease ซึ่งเป็นโปรตีนที่มีความจำเป็นต่อกระบวนการ RNA interference และการผลิต small temporal RNA (stRNA) ซึ่งเป็นส่วนสำคัญในกระบวนการการผลิต small RNA ที่เป็นส่วนสำคัญในกระบวนการยับยั้งการแสดงออกของยีนโดยเฉพาะในกระบวนการหลังการแปลรหัส (post-transcriptional mechanisms) มีการศึกษาพบว่ากระบวนการหลังการแปลรหัสมีความสัมพันธ์เป็นอย่างมากกับโรคออทิซึมสเปกตรัม การศึกษาล่าสุดพบว่ามี การแสดงออกที่ผิดปกติของอาร์เอ็นเอขนาดเล็ก (microRNAs) ในสมองของผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม (Wu, Parikshak, & Belgard, 2016) และในเซลล์ไลน์เม็ดเลือดขาวที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัม (Sarachana et al., 2010; Talebizadeh, Butler, & Theodoro, 2008) ดังนั้นการแสดงออกที่ผิดปกติของยีน *Dicer1* น่าจะส่วนที่เป็นสาเหตุทำให้เกิดหรือเพิ่มความเสี่ยงของโรคออทิซึมสเปกตรัม

อีกทั้งยังมีผู้ศึกษาถึงการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและไฮโปทาลามัสจากการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้อง โดยพบว่าการได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลให้เกิดความแตกต่างในการแสดงออกของยีนระหว่างเพศของลูกหนูในยีน $ER\alpha$ และ $ER\beta$ (*Esr1* และ *Esr2*) ในสมองส่วนไฮโปทาลามัสและการแสดงออกของยีน oxytocin (*Oxt*) ทั้งในสมองส่วนไฮโปทาลามัสและฮิปโปแคมปัส โดยพบว่ายีน *Esr2* มีการแสดงออกเพิ่มขึ้นและยีน *Oxt* มีการแสดงออกลดลงเฉพาะในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของผู้ (Arambula et al., 2016) นอกจากสมองส่วนไฮโปทาลามัสและสมองส่วนฮิปโปแคมปัสที่มีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะในแต่ละเพศ ยังมีการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อการแสดงออกของยีนที่จำเพาะในแต่ละเพศของสมองส่วนอะมิกดาลาด้วยเช่นกัน (Arambula, Jima, & Patisaul, 2018) จะเห็นได้ว่าการได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของ

ยีนที่จำเพาะในแต่ละเพศและส่งผลรุนแรงในเพศผู้มากกว่าเพศเมีย สอดคล้องกับการที่เกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในเพศชายมากกว่าเพศหญิง และการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อยีนที่แสดงออกผิดปกติในสมองยังเป็นอีกหลักฐานสำคัญที่บ่งชี้ว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมเป็นอีกหนึ่งปัจจัยที่เพิ่มความเสี่ยงต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมในเพศชายมากกว่าเพศหญิง

การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค RNA-seq และการทำนายบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เกี่ยวข้องกับยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอจะพบว่ากลุ่มยีนนี้มีความเกี่ยวข้องกับ Neuritogenesis หรือการงอกของเซลล์ระบบประสาทและมีกลุ่มยีนที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเซลล์ระบบประสาทแสดงออกผิดปกติด้วย ได้แก่ *Lamb1 Slc9a6 Spast Tnik Nrp1* เป็นต้น ดังนั้นนอกจากการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอในระดับยีนแล้วนั้นการศึกษาผลของบิสฟีนอลเอต่อการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ระบบประสาทในแง่ของการงอกของสายใยประสาท (neurite outgrowth) พบว่าการได้ที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทที่เปลี่ยนแปลงไป ทางคณะผู้วิจัยจึงได้ทำการวิเคราะห์ความยาวของสายใยประสาท (neurite outgrowth assay) ซึ่งสามารถเป็นตัวแทนของหน้าที่ของเซลล์ระบบประสาท ทางคณะผู้วิจัยได้ทำการวัดความยาวของสายใยประสาทในหลาย ๆ พารามิเตอร์ ได้แก่ ความยาวรวมของสายใยประสาท การแตกแขนงของสายใยประสาทที่มากจากตัวเซลล์โดยตรง (primary neurites) การแตกแขนงของสายใยประสาทลำดับที่สองขึ้นไป ($>1^\circ$ neurites) การแตกแขนงของเซลล์ประสาทโดยใช้ Sholl analysis และการวัดการเจริญของตัวเซลล์ ซึ่งก็มีการศึกษาที่พบว่าการมีความผิดปกติในแง่ของ neurite outgrowth มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัม (Hashimoto et al., 2016) จากการรายงานของ Hashimoto และคณะในปี 2016 เมื่อทำการ knockdown กลุ่มยีนที่เป็น autism candidate gene ในเซลล์ไลน์ระบบประสาทพบว่าการงอกของสายใยประสาทลดลงอย่างไรก็ตาม จากผลการทดลองในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมื่อวิเคราะห์การงอกของสายใยระบบประสาท โดยเมื่อวิเคราะห์แบบรวมเพศและแยกเพศพบว่าความยาวรวมของ neurite ในเซลล์ระบบประสาทที่แยกได้จากลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีความยาวมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยจะแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ณ วันที่ 7 ทั้งในเพศผู้และเพศเมีย หลังจากนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาการแตกแขนงของสายใยประสาทที่มาจากตัวเซลล์โดยตรง (primary neurites) และการแตกแขนงของสายใยประสาทลำดับที่สอง ($>1^\circ$ neurites) โดยศึกษาเซลล์ระบบประสาท ณ วันที่ 7 พบว่าจำนวนของ primary neurites ในกลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอมีมากกว่าอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะเพศเมียเท่านั้น และการแตกแขนงของสายใยประสาทลำดับที่สองขึ้นไป ($>1^\circ$ neurites) ทั้งในเพศเมียและเพศผู้ ซึ่งจะสอดคล้องกับการวิเคราะห์การแตกแขนงโดยใช้ Sholl analysis ที่เป็นการวิเคราะห์ทั้งด้านความยาวและการแตกแขนงของสายใยระบบ

ประสาท ดังนั้นจะเห็นได้ว่าการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อการเจริญของสายใยประสาทมากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับบิสฟีนอลเอ เนื่องจากบิสฟีนอลเอมีโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนเอสโตรเจน ซึ่งฮอร์โมนเอสโตรเจนเป็นฮอร์โมนที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการพัฒนาการของสมอง มีการศึกษาพบว่าการที่เซลล์ประสาทได้รับฮอร์โมนเอสโตรเจนจะส่งผลให้มีความยาวรวมของสายใยประสาทมากขึ้น (Beyer & Karolczak, 2000; Ferreira & Caceres, 1991; Kishi et al., 2005; Varshney et al., 2017) จึงสอดคล้องว่าในเซลล์ระบบประสาทในกลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอมีความยาวรวมของสายใยประสาทมากขึ้น แต่กลไกของบิสฟีนอลเอในส่วนที่ทำให้ความยาวรวมของสายใยประสาทยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัด นอกจากนั้นทางคณะผู้วิจัยได้ทำการวัดการเจริญของตัวเซลล์ (cell body area) โดยทำการวัดการเจริญของเซลล์ประสาทตั้งแต่วันที่ 1 ถึงวันที่ 7 พบว่าเซลล์ระบบประสาทในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอมีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 4 จากผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่านอกจากบิสฟีนอลเอมีผลต่อการพัฒนาของสายใยประสาทยังมีผลต่อการเจริญของตัวเซลล์ระบบประสาท เซลล์ระบบประสาทในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอจะมีการพัฒนาของสายใยประสาทมากกว่าแต่มีการเจริญของตัวเซลล์ต่ำกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ

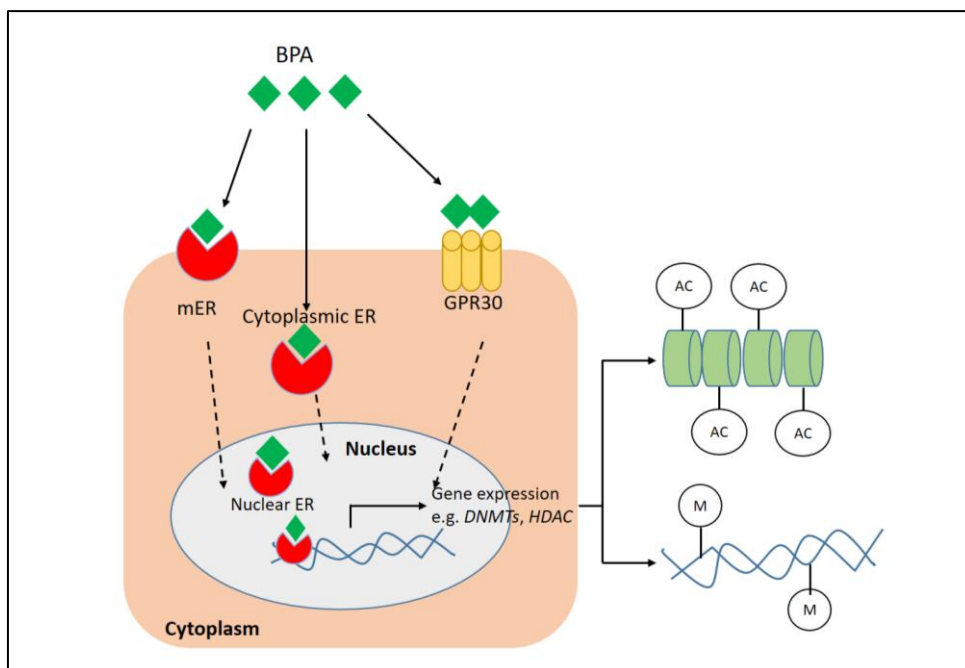
การที่ความยาวของสายใยในเซลล์ระบบประสาทเพิ่มขึ้นในกลุ่มที่รับบิสฟีนอลเอกับความเกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและโรคออทิซิมสเปกตรัม พบว่าในเด็กออทิซิมสเปกตรัมมีจำนวนของเซลล์ระบบประสาทในสมองและน้ำหนักของสมองมากกว่าในเด็กปกติ (Eric Courchesne et al., 2011) นอกจากนั้นมีการรายงานอีกว่าในสมองของเด็กที่เป็นโรคออทิซิมสเปกตรัมมีจำนวนไซแนปส์มากกว่าเด็กปกติ (Tang et al., 2014) การที่มีจำนวนไซแนปส์มากในสมองส่งผลให้เกิดการสื่อสารระหว่างเซลล์ระบบประสาทในขณะการพัฒนาของสมองที่ผิดปกติซึ่งมีความสัมพันธ์กับกระบวนการเรียนรู้ที่บกพร่องไป สำหรับกลไกของการที่มีจำนวนไซแนปส์ในสมองมากขึ้นส่งผลต่อพฤติกรรมการเรียนรู้ที่เปลี่ยนแปลงไปยังเป็นที่ยังไม่ทราบแน่ชัด จากการศึกษาของ Valnegri และคณะในปี 2017 พบว่าการลดลงของยีน RNF8 ซึ่งเป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการ ubiquitination ส่งผลทำให้มีจำนวนไซแนปส์เพิ่มมากขึ้น (Valnegri et al., 2017) ผลการศึกษาจะสอดคล้องกับการที่กลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีสายใยประสาทยาวกว่ากลุ่มควบคุม สายใยประสาทที่ยาวเพิ่มขึ้นอาจจะส่งผลทำให้มีจำนวนไซแนปส์เพิ่มขึ้นด้วย อีกทั้งทางผู้วิจัยยังพบว่าในกลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีขนาดของตัวเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม การที่มีขนาดของตัวเซลล์ลดลงนั้นอาจจะเป็นผลมาจากการที่มีเซลล์ระบบประสาทเป็นจำนวนมาก ซึ่งลักษณะดังกล่าวเป็นลักษณะที่พบได้ในโรคออทิซิมสเปกตรัม นอกจากการศึกษาจากสมองของเด็กออทิซติกโดยตรงแล้วนั้น มีการศึกษาในเซลล์ระบบประสาทที่เจริญมาจากเซลล์ผิวหนังของผู้ป่วยโรคออทิซิมสเปกตรัม (stem cell-derived neurons) ที่มีการมิวเตชันของยีน *SHANK3* พบว่าเซลล์

ระบบประสาทที่แยกได้จากผู้ป่วยโรคออทิซึมสเปกตรัมมีจำนวนของ primary neurites มากกว่ากลุ่มควบคุมและขนาดของตัวเซลล์เล็กกว่ากลุ่มควบคุม (Kathuria, Nowosiad, Jagasia, & Aigner, 2018) ซึ่งสอดคล้องกับการที่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องอาจจะส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีนที่มีความสัมพันธ์กับยีนที่มีผลต่อความยาวของสายใยระบบประสาท อย่างไรก็ตามอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมโดยการนับจำนวนเซลล์ระบบประสาทในเนื้อเยื่อสมองรวมไปถึงการทดสอบหน้าที่ของเซลล์ระบบประสาทดังกล่าวในด้านอื่นเพิ่มเติม เช่น การศึกษา synaptogenesis เป็นต้น

บทบาทหน้าที่ของยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสของลูกหนูที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องกับความสัมพันธ์ของการวิเคราะห์การงอกของเซลล์ระบบประสาทของลูกหนู พบว่ามีการศึกษาพบว่ายีน *Auts2* เป็นยีนที่มีการแสดงออกทั้งในนิวเคลียสและไซโตพลาสซึม (cytoplasm) โดย *Auts2* ที่แสดงออกในไซโตพลาสซึมจะทำหน้าที่เป็นตัวควบคุมการเคลื่อนที่ของโปรตีน actin ยีน *Auts2* เป็นยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับการงอกและการแตกแขนงของเซลล์ระบบประสาทผ่าน Rac1 signaling pathway นอกจากนี้การ knockout ยีน *Auts2* ในหนูทดลองพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของการงอกของเซลล์ระบบประสาท โดยการงอกของเซลล์ระบบประสาทลดลง (Hori et al., 2014) และในการศึกษาครั้งนี้พบว่ายีน *Auts2* ลดลงเฉพาะในเพศผู้และความยาวของสายใยประสาททั้งในเพศผู้และเพศเมียในกลุ่มที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอมีความยาวสายใยประสาทมากกว่ากลุ่มควบคุม แต่เมื่อพิจารณาระหว่างเพศในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอพบว่าในเพศผู้มีความยาวของสายใยประสาทรวมน้อยกว่าในเพศเมีย ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่ายีน *Auts2* มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการงอกของสายใยประสาทและมีการแสดงออกลดลงในเพศผู้ที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้อง การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างยีน *Foxp2* และการงอกของเซลล์ระบบประสาท พบว่ายีน *Foxp2* มีบทบาทในการควบคุมยีนที่เกี่ยวข้องกับ retinoic acid signaling และ neuronal differentiation นอกจากนี้ยีน *Foxp2* มีบทบาททำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ระบบประสาท โดยไปเพิ่มความยาวของของสายใยประสาทแต่ไปลดกระบวนการการเคลื่อนที่ของเซลล์ระบบประสาท (neuron migration) การเพิ่มขึ้นของสายใยประสาทจากยีน *Foxp2* อาจจะเป็นผลมาจาก retinoic acid signaling pathway (Devanna, Middelbeek, & Vernes, 2014) ซึ่งเป็น pathway สำคัญในกระบวนการพัฒนาของเซลล์ระบบประสาทและการงอกของเซลล์ระบบประสาท อีกทั้งการศึกษาในหนูที่ knockout ยีน *Dicer1* พบว่าโปรตีนเกี่ยวข้องกับการงอกของเซลล์ระบบประสาทได้แก่ Nefl (neurofilament light polypeptides) ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Dorval et al., 2012) ดังนั้นจะเห็นได้ว่ายีน *Dicer1* มีความเกี่ยวข้องกับการงอกของเซลล์ระบบประสาท จะเห็นได้ว่าการที่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลถึงการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับ

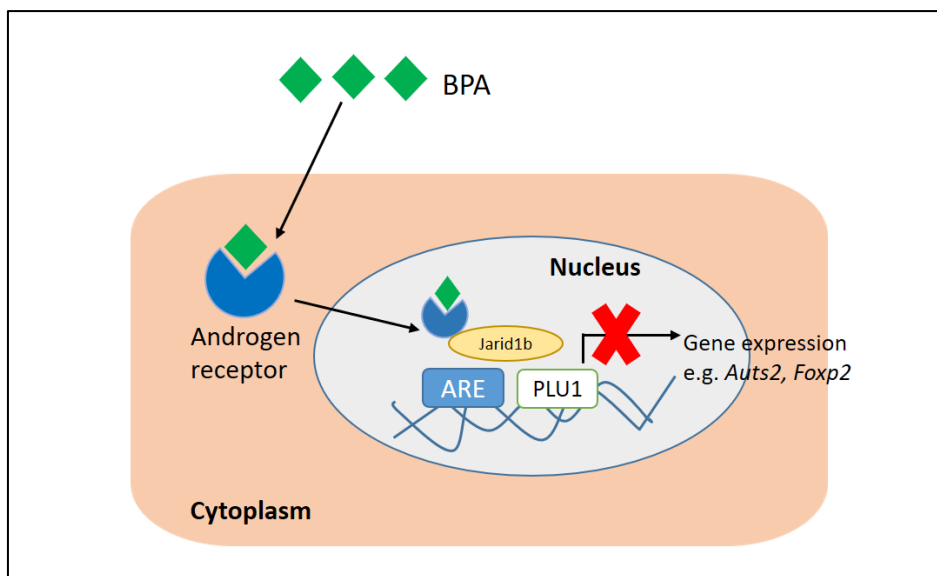
โรคอเทซิมสเปกตรัมผิดปกติไปและกลุ่มยีนดังกล่าวยังมีบทบาทที่เกี่ยวข้องกับการงอกของเซลล์ระบบประสาทอีกด้วย

สำหรับกลไกที่อาจเกิดขึ้นได้ในขณะที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับโรคอเทซิมสเปกตรัมแสดงออกลดลงในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสเนื่องจากบิสฟีนอลเอสามารถจับกับ estrogen receptor ได้ ซึ่งการที่บิสฟีนอลเอจับกับ estrogen receptor จะผ่านทั้ง 2 pathway คือ genomic pathway เป็นการที่บิสฟีนอลเอจับกับ receptor ที่อยู่ในนิวเคลียสหรืออยู่ใน cytoplasm แล้วเกิดกระบวนการ translocate ไปจับกับ estrogen responsive elements (EREs) หรือผ่าน non-genomic pathway บิสฟีนอลเอสามารถจับกับ estrogen receptor ที่ผิวเซลล์แล้วเกิดการส่งสัญญาณผ่าน pathway เช่น ERK signaling pathway ไปกระตุ้นการแสดงออกของยีน เช่น ยีน DNMTs ยีน HDAC ซึ่งเป็นยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเอพิเจเนติกส์ โดยยีน HDAC มีหน้าที่ทำให้หมู่ acetyl หลุดออกจากสายโครมาติน ทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ลดลงและยีน DNMTs มีหน้าที่เติมหมู่ methyl ที่สาย DNA และเกิดการยับยั้งการแสดงออกของยีนได้ (รูปภาพที่ 28) การที่ยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการทางเอพิเจเนติกส์ซึ่งอาจจะมีผลเกี่ยวเนื่องไปยังยีนที่บทบาทสำคัญในกระบวนการงอกของเซลล์ระบบประสาท เช่น *Lamb1 Slc9a6 Spast Tnik Nrp1* ที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอ แต่กลไกที่แน่ชัดของการได้รับบิสฟีนอลเอที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติไปและส่งผลต่อการงอกของเซลล์ระบบประสาทควรต้องทำการศึกษาวิจัยต่อไปในอนาคต



รูปภาพที่ 28 ภาพแสดงกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ของผลจากการแม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องที่ส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่ผิดปกติในสมอง

สำหรับการที่ได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันในระหว่างเพศอาจเนื่องจากในเพศชายมีปริมาณของ androgen receptor ในสมองที่มากกว่าในสมองเพศหญิง และบิสฟีนอลเอสามารถไปจับกับ androgen receptor ได้ด้วย ดังนั้นกลไกที่น่าจะเป็นไปได้ที่การได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันระหว่างเพศชายและเพศหญิงน่าจะเป็นผลมาจากการที่บิสฟีนอลเอจับกับ androgen receptor ซึ่งเป็น cofactor ของเอนไซม์ในกระบวนการ histone modification บิสฟีนอลเอสามารถจับกับ androgen receptor ได้แต่เป็นการจับที่ไม่สมบูรณ์จึงทำให้ androgen receptor ไม่สามารถเป็น cofactor ของกระบวนการ histone modification ส่งผลให้การแสดงออกของยีนซึ่งอาจจะเป็นยีน *Auts2* หรือยีน *Foxp2* แสดงออกลดลง (รูปภาพที่ 29) อย่างไรก็ตามกระบวนการที่การได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่แสดงออกอย่างจำเพาะในแต่ละเพศควรมีการศึกษาเพิ่มเติมในอนาคต



รูปภาพที่ 29 รูปภาพแสดงกลไกที่เป็นไปได้ในการที่ได้รับบิสฟีนอลเอส่งผลต่อการแสดงออกของยีนที่จำเพาะในแต่ละเพศ

ข้อจำกัดในการศึกษาครั้งนี้มีอยู่หลายประการ เนื่องจากในการทำ meta-analysis เพื่อหาความเกี่ยวข้องของการแสดงออกของยีนที่ได้รับบิสฟีนอลเอกับยีนที่แสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม รายชื่อยีนกลุ่มดังกล่าวนั้นมาจากหลาย ๆ เนื้อเยื่อหรือเซลล์ ซึ่งการแสดงออกของยีนนั้นมีความแตกต่างกันในเนื้อเยื่อหรือเซลล์ที่ต่างกัน สำหรับการเลือกความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอในการศึกษาครั้งนี้ ทางผู้วิจัยได้ศึกษาเกี่ยวกับกระบวนการ pharmacokinetic ของบิสฟีนอลเอในหนูแรทที่ตั้งท้องพบว่าเมื่อป้อนบิสฟีนอลเอที่ความเข้มข้น 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ จะทำให้ระดับของบิสฟีนอลเอในเอ็มบริโอหรือฟetusเท่ากับ 3.5 ng/ml (Domoradzki et al., 2003) ประกอบกับการศึกษาระดับบิสฟีนอลเอในเลือดเด็กออทิสติกพบว่ามีระดับบิสฟีนอลเอเฉลี่ยเท่ากับ 1.25 (Kardas et al., 2016) และ 2.17 ng/ml (Kondolot et al., 2016) ดังนั้นการศึกษานี้ต้องการสร้างโมเดลจำลองให้คล้ายคือต้องการให้ในเลือดของลูกมีระดับบิสฟีนอลเอที่ใกล้เคียงกับเด็กออทิสติก จึงได้ใช้ความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่ 5,000 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{BW}$ เป็นความเข้มข้นของบิสฟีนอลเอที่ให้ในแม่ แต่การตรวจวัดระดับบิสฟีนอลเอในเลือดของแม่หลังการป้อนและในเลือดของลูกยังต้องทำการศึกษาต่อไปโดยใช้เทคนิคที่เหมาะสมและน่าเชื่อถือต่อไป สำหรับการศึกษาด้านทรานสคริปโตมในการศึกษานี้อาร์เอ็นเอที่ใช้จะมาจากลูกหนูที่มาจากครอกที่ต่างกัน 3 ครอก ในการศึกษาต่อไปอาจจะต้องควรเพิ่มปริมาณของกลุ่มตัวอย่างมากขึ้นหรืออาจจะต้องทำการศึกษาที่ระดับบิสฟีนอลเอที่ต่ำกว่าหรือเป็นระดับที่มีการรายงานว่าได้รับต่อวัน สำหรับการวิเคราะห์ของเซลล์ระบบประสาทอาจจะสามารถ

ศึกษาต่อไปได้ถึงวันที่ 14 ของการเลี้ยงหรือนานกว่านั้นเพื่อที่จะสามารถดูได้ถึงการ degeneration ของเซลล์ระบบประสาทได้อีกด้วย

จากหลาย ๆ การศึกษาที่พบว่า การได้รับบิสฟีนอลเอในช่วงการตั้งท้องส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงหน้าที่ทางระบบประสาทรวมถึงการเจริญของเซลล์ประสาททั้งในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและไฮโปทาลามัสและจำนวนไซแนปส์ในสมอง นอกจากนี้การได้รับบิสฟีนอลเอยังส่งผลต่อพฤติกรรมการแสดงออกของลูกหนูที่บกพร่องไป เช่น พฤติกรรมการเรียนรู้และความจำ พฤติกรรมความหวาดกลัว พฤติกรรมด้านการเข้าสังคม เป็นต้น สำหรับการศึกษานี้ในอนาคตนั้นอาจจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมของบทบาทหน้าที่ของบิสฟีนอลเอถึงกลไกที่ทำให้ยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมลดลงหรือเพิ่มขึ้น รวมไปถึงบทบาทที่บิสฟีนอลเอทำให้ความยาวรวมของสายใยประสาทเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้ยังต้องมีการศึกษาถึงความสัมพันธ์ของการแสดงออกของยีนในกลุ่มดังกล่าวถึงกลไกที่ทำให้การเพิ่มขึ้นของสายใยประสาทในเซลล์ระบบประสาท นอกจากนี้การศึกษาที่พบว่ามี การเพิ่มขึ้นของสายใยประสาทในเซลล์ระบบประสาทกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเออาจจะต้องมีการศึกษาถึงผลของการได้รับบิสฟีนอลเอต่อบทบาทหน้าที่ของเซลล์ระบบประสาทอื่น ๆ เช่น การสร้างไซแนปส์ (synaptogenesis) การสร้างของเซลล์ประสาท (neurogenesis) เป็นต้น การศึกษาครั้งนี้พบว่า การได้รับบิสฟีนอลเอมีผลต่อการแสดงออกของยีนที่มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม ดังนั้น การศึกษาในเชิงพฤติกรรมของลูกหนู เช่น พฤติกรรมที่เกี่ยวกับการเข้าสังคม พฤติกรรมที่เกี่ยวกับการเรียนรู้และความจำ ที่เป็นพฤติกรรมที่ความสัมพันธ์โดยตรงกับโรคออทิซึมสเปกตรัมควรจะศึกษาเพิ่มเติมต่อไปในอนาคต

บทที่ 6

สรุปผลการทดลอง

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่า การที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอในขณะตั้งท้องส่งผลต่อการแสดงออกของยีนในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสและมีผลต่อการงอกของเซลล์ระบบประสาทมากขึ้น โดยจากการวิเคราะห์แบบ Meta-analysis พบว่ารายชื่อยีน 5 การศึกษาจาก 7 การศึกษามีความสัมพันธ์กับรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการได้รับบิสฟีนอลเอจากการรวบรวมการศึกษาทางทรานสคริปโตมิกส์และเป็นยีนที่แสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมมีสัมพันธ์กับบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทและโรคที่มีความเกี่ยวข้องและมีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ การศึกษาผลของการที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องต่อการแสดงออกของยีนทั้งหมดในสมองส่วนฮิปโปแคมปัสพบว่า มีกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและมีความสัมพันธ์กับรายชื่อยีนที่แสดงออกผิดปกติในโรคออทิซึมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยกลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความสัมพันธ์กับโรคออทิซึมสเปกตรัมที่ระดับนัยสำคัญสูงกว่าในเพศเมีย และเมื่อศึกษาถึงโรคและบทบาทหน้าที่ทางระบบประสาทพบว่ากลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความเกี่ยวข้องโดยตรงกับโรคออทิซึมสเปกตรัม กลุ่มยีนที่มีการแสดงออกผิดปกติจากการวิเคราะห์ด้วย RNA-seq และเป็นยีนที่มีการรายงานว่ามีความผิดปกติในโรคออทิซึมสเปกตรัม ได้แก่ *Auts2* *Foxp2* *Smarcc2* และ *Dicer1* นำมาวิเคราะห์การแสดงออกของยีนโดยใช้ qRT-PCR พบว่ายีน *Auts2* *Foxp2* มีการแสดงออกลดลงเฉพาะในเพศผู้และยีน *Smarcc2* แสดงออกลดลงในเพศเมีย แสดงให้เห็นว่าการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลต่อการแสดงออกของกลุ่มยีนในสมองผิดปกติไปและกลุ่มยีนดังกล่าวนี้มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัม โดยการได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลกระทบต่อแสดงออกของยีนทั้งในเพศผู้และเพศเมีย แต่ในกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติในเพศผู้มีความเกี่ยวข้องกับโรคออทิซึมสเปกตรัมที่ระดับนัยสำคัญที่สูงกว่าในเพศเมีย ซึ่งจะเป็นอีกหนึ่งหลักฐานที่ค้นพบว่าปัจจัยทางสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการเกิดโรคออทิซึมสเปกตรัมที่พบได้ในเพศชายมากกว่าเพศหญิง การที่มีกลุ่มยีนที่แสดงออกผิดปกติอาจจะส่งผลถึงลักษณะรูปร่างของเซลล์ระบบประสาท โดยพบว่า การที่แม่ได้รับบิสฟีนอลเอขณะตั้งท้องส่งผลทำให้ความยาวของสายใยประสาทเพิ่มขึ้น จำนวน primary neurites และ neurites branching มีจำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุมและในขณะที่ขนาดของตัวเซลล์ระบบประสาทในกลุ่มที่ได้รับบิสฟีนอลเอมีขนาดลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่ม

ควบคุม แสดงให้เห็นถึงผลของบิสฟีนอลเอต่อการสร้างและรูปร่างของเซลล์ระบบประสาทซึ่งสอดคล้องกับลักษณะของเซลล์ระบบประสาทที่พบได้ในโรคออทึมสเปกตรัม



รายการอ้างอิง

- Adams, J. B., Audhya, T., McDonough-Means, S., Rubin, R. A., Quig, D., Geis, E., . . . Lee, W. (2013). Toxicological status of children with autism vs. neurotypical children and the association with autism severity. *Biol Trace Elem Res*, 151(2), 171-180. doi: 10.1007/s12011-012-9551-1
- Agarwal, S., Tiwari, S. K., Seth, B., Yadav, A., Singh, A., Mudawal, A., . . . Chaturvedi, R. K. (2015). Activation of Autophagic Flux against Xenoestrogen Bisphenol-A-induced Hippocampal Neurodegeneration via AMP kinase (AMPK)/Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathways. *J Biol Chem*, 290(34), 21163-21184. doi: 10.1074/jbc.M115.648998
- Arambula, S. E., Belcher, S. M., Planchart, A., Turner, S. D., & Patisaul, H. B. (2016). Impact of Low Dose Oral Exposure to Bisphenol A (BPA) on the Neonatal Rat Hypothalamic and Hippocampal Transcriptome: A CLARITY-BPA Consortium Study. *Endocrinology*, 157(10), 3856-3872. doi: 10.1210/en.2016-1339
- Association, A. P. (2013). *Diagnostic and Statistical Manual of Mental Disorders (DSM-5®)*: American Psychiatric Pub.
- Audic, S., & Claverie, J. M. (1997). The significance of digital gene expression profiles. *Genome Res*, 7(10), 986-995.
- Autism Speaks. (2012). What Is Autism? Retrieved 7 May, 2015, from <https://www.autismspeaks.org/what-autism>
- Autism Speaks. (2013). Answers to Frequently Asked Questions about DSM-5. Retrieved 7 May, 2016, from <https://www.autismspeaks.org/dsm-5/faq>
- Autism Speaks. (2016). CDC update on autism shows gap between early concerns and evaluation. Retrieved 7 May, 2016, from <https://www.autismspeaks.org/news/news-item/cdc-update-autism-shows-gap-between-early-concerns-and-evaluation>
- Babu, S., Uppu, S., Claville, M. O., & Uppu, R. M. (2013). Prooxidant actions of bisphenol A (BPA) phenoxyl radicals: implications to BPA-related oxidative

- stress and toxicity. *Toxicol Mech Methods*, 23(4), 273-280. doi: 10.3109/15376516.2012.753969
- Bailey, A., Luthert, P., Dean, A., Harding, B., Janota, I., Montgomery, M., . . . Lantos, P. (1998). A clinicopathological study of autism. *Brain*, 121 (Pt 5), 889-905.
- Baio, J., Wiggins, L., Christensen, D. L., Maenner, M. J., Daniels, J., Warren, Z., . . . Dowling, N. F. (2018). Prevalence of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2014. *MMWR Surveill Summ*, 67(6), 1-23. doi: 10.15585/mmwr.ss6706a1
- Bedogni, F., Hodge, R. D., Nelson, B. R., Frederick, E. A., Shiba, N., Daza, R. A., & Hevner, R. F. (2010). Autism susceptibility candidate 2 (Aut2) encodes a nuclear protein expressed in developing brain regions implicated in autism neuropathology. *Gene Expr Patterns*, 10(1), 9-15. doi: 10.1016/j.gep.2009.11.005
- Beyer, C., & Karolczak, M. (2000). Estrogenic stimulation of neurite growth in midbrain dopaminergic neurons depends on cAMP/protein kinase A signalling. *J Neurosci Res*, 59(1), 107-116.
- Bisphenol A - Bisphenol A Europe. (2013). Bisphenol A - What Is Bisphenol A? Retrieved 7 May, 2016, from <http://www.bisphenol-a-europe.org/index.php?page=what-is-bisphenol-a>
- Braun, J. M., Smith, K. W., Williams, P. L., Calafat, A. M., Berry, K., Ehrlich, S., & Hauser, R. (2012). Variability of urinary phthalate metabolite and bisphenol A concentrations before and during pregnancy. *Environmental health perspectives*, 120(5), 739.
- Brunsdon, V. E., Colvert, E., Ames, C., Garnett, T., Gillan, N., Hallett, V., . . . Happe, F. (2015). Exploring the cognitive features in children with autism spectrum disorder, their co-twins, and typically developing children within a population-based sample. *J Child Psychol Psychiatry*, 56(8), 893-902. doi: 10.1111/jcpp.12362

- Buescher, A. V., Cidav, Z., Knapp, M., & Mandell, D. S. (2014). Costs of autism spectrum disorders in the United Kingdom and the United States. *JAMA Pediatr*, *168*(8), 721-728. doi: 10.1001/jamapediatrics.2014.210
- Calhoun, K. C., Padilla-Banks, E., Jefferson, W. N., Liu, L., Gerrish, K. E., Young, S. L., . . . Williams, C. J. (2014). Bisphenol a exposure alters developmental gene expression in the fetal rhesus macaque uterus. *PLoS one*, *9*(1), e85894.
- CDC. (2015a). Autism Spectrum Disorder (ASD); Data & Statistics. Retrieved 10 May, 2016, from <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/data.html>
- CDC. (2015b). Autism Spectrum Disorder; Screening and Diagnosis for Healthcare Providers. Retrieved 10 May, 2016, from <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/hcp-screening.html>
- CDC. (2015c). Screening and Diagnosis. Retrieved 10 May, 2016, from <http://www.cdc.gov/ncbddd/autism/screening.html>
- Chauhan, A., & Chauhan, V. (2006). Oxidative stress in autism. *Pathophysiology*, *13*(3), 171-181. doi: 10.1016/j.pathophys.2006.05.007
- Chien, Y. L., Wu, Y. Y., Chen, H. I., Tsai, W. C., Chiu, Y. N., Liu, S. K., & Gau, S. S. (2017). The central nervous system patterning gene variants associated with clinical symptom severity of autism spectrum disorders. *J Formos Med Assoc*, *116*(10), 755-764. doi: 10.1016/j.jfma.2016.11.015
- Christensen, D. L., Baio, J., Braun, K. V., Bilder, D., Charles, J., Constantino, J. N., . . . Yeargin-Allsopp, M. (2016). Prevalence and Characteristics of Autism Spectrum Disorder Among Children Aged 8 Years - Autism and Developmental Disabilities Monitoring Network, 11 Sites, United States, 2012. *MMWR Surveill Summ*, *65*(3), 1-23. doi: 10.15585/mmwr.ss6503a1
- Codagnone, M. G., Podesta, M. F., Uccelli, N. A., & Reines, A. (2015). Differential Local Connectivity and Neuroinflammation Profiles in the Medial Prefrontal Cortex and Hippocampus in the Valproic Acid Rat Model of Autism. *Dev Neurosci*, *37*(3), 215-231. doi: 10.1159/000375489
- Courchesne, E., Mouton, P. R., Calhoun, M. E., Semendeferi, K., Ahrens-Barbeau, C., Hallet, M. J., . . . Pierce, K. (2011). Neuron number and size in prefrontal cortex of children with autism. *Jama*, *306*(18), 2001-2010.

- Courchesne, E., Pierce, K., Schumann, C. M., Redcay, E., Buckwalter, J. A., Kennedy, D. P., & Morgan, J. (2007). Mapping early brain development in autism. *Neuron*, *56*(2), 399-413. doi: 10.1016/j.neuron.2007.10.016
- Daimon, C. M., Jasien, J. M., Wood III, W. H., Zhang, Y., Becker, K. G., Silverman, J. L., . . . Maudsley, S. (2015). Hippocampal Transcriptomic and Proteomic Alterations in the BTBR Mouse Model of Autism Spectrum Disorder. *Frontiers in physiology*, *6*.
- Delclos, K. B., Camacho, L., Lewis, S. M., Vanlandingham, M. M., Latendresse, J. R., Olson, G. R., . . . Thorn, B. T. (2014). Toxicity evaluation of bisphenol A administered by gavage to Sprague Dawley rats from gestation day 6 through postnatal day 90. *Toxicol Sci*, *139*(1), 174-197. doi: 10.1093/toxsci/kfu022
- Department of Mental Health, M. o. P. H. (2015). วันออทิสติกโลก. Retrieved 10 May, 2016, from http://www.klb.dmh.go.th/index.php?m=news&op=detail&news_id=797
- Devanna, P., Middelbeek, J., & Vernes, S. C. (2014). FOXP2 drives neuronal differentiation by interacting with retinoic acid signaling pathways. *Front Cell Neurosci*, *8*, 305. doi: 10.3389/fncel.2014.00305
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J. P., Giudice, L. C., Hauser, R., Prins, G. S., Soto, A. M., . . . Gore, A. C. (2009). Endocrine-Disrupting Chemicals: An Endocrine Society Scientific Statement. *Endocr Rev*, *30*(4), 293-342. doi: 10.1210/er.2009-0002
- Domoradzki, J. Y., Pottenger, L. H., Thornton, C. M., Hansen, S. C., Card, T. L., Markham, D. A., . . . Waechter, J. M., Jr. (2003). Metabolism and pharmacokinetics of bisphenol A (BPA) and the embryo-fetal distribution of BPA and BPA-mono-glucuronide in CD Sprague-Dawley rats at three gestational stages. *Toxicol Sci*, *76*(1), 21-34. doi: 10.1093/toxsci/kfg206
- Dorval, V., Smith, P. Y., Delay, C., Calvo, E., Planel, E., Zommer, N., . . . Hebert, S. S. (2012). Gene network and pathway analysis of mice with conditional ablation of Dicer in post-mitotic neurons. *PLoS one*, *7*(8), e44060. doi: 10.1371/journal.pone.0044060

- Ecker, C., Suckling, J., Deoni, S. C., Lombardo, M. V., Bullmore, E. T., Baron-Cohen, S., . . . Murphy, D. G. (2012). Brain anatomy and its relationship to behavior in adults with autism spectrum disorder: a multicenter magnetic resonance imaging study. *Arch Gen Psychiatry*, *69*(2), 195-209. doi: 10.1001/archgenpsychiatry.2011.1251
- Edmonson, C., Ziats, M. N., & Rennert, O. M. (2014). Altered glial marker expression in autistic post-mortem prefrontal cortex and cerebellum. *Molecular autism*, *5*(1), 1.
- Ellenbroek, B., & Youn, J. (2016). Rodent models in neuroscience research: is it a rat race? , *9*(10), 1079-1087.
- Enard, W., Przeworski, M., Fisher, S. E., Lai, C. S., Wiebe, V., Kitano, T., . . . Paabo, S. (2002). Molecular evolution of FOXP2, a gene involved in speech and language. *Nature*, *418*(6900), 869-872. doi: 10.1038/nature01025
- Fan, Y., Qiu, W., Wang, L., Gu, X., & Yu, Y. (2016). Exonic deletions of AUTS2 in Chinese patients with developmental delay and intellectual disability. *Am J Med Genet A*, *170a*(2), 515-522. doi: 10.1002/ajmg.a.37454
- Fatemi, S. H., Reutiman, T. J., Folsom, T. D., & Thuras, P. D. (2009). GABA(A) receptor downregulation in brains of subjects with autism. *J Autism Dev Disord*, *39*(2), 223-230. doi: 10.1007/s10803-008-0646-7
- FDA. (2014). Bisphenol A (BPA): Use in Food Contact Application. Retrieved 7 May, 2015, from  <http://www.fda.gov/NewsEvents/PublicHealthFocus/ucm064437.htm>
- Ferreira, A., & Caceres, A. (1991). Estrogen-enhanced neurite growth: evidence for a selective induction of Tau and stable microtubules. *J Neurosci*, *11*(2), 392-400.
- Fic, A., Mlakar, S. J., Juvan, P., Mlakar, V., Marc, J., Dolenc, M. S., . . . Masic, L. P. (2015). Genome-wide gene expression profiling of low-dose, long-term exposure of human osteosarcoma cells to bisphenol A and its analogs bisphenols AF and S. *Toxicol In Vitro*, *29*(5), 1060-1069. doi: 10.1016/j.tiv.2015.03.014
- Geier, D. A., Audhya, T., Kern, J. K., & Geier, M. R. (2010). Blood mercury levels in autism spectrum disorder: Is there a threshold level? *Acta Neurobiol Exp (Wars)*, *70*(2), 177-186.

- Gong, X., Jia, M., Ruan, Y., Shuang, M., Liu, J., Wu, S., . . . Zhang, D. (2004). Association between the FOXP2 gene and autistic disorder in Chinese population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, *127b*(1), 113-116. doi: 10.1002/ajmg.b.20162
- Groen, W., Teluij, M., Buitelaar, J., & Tendolkar, I. (2010). Amygdala and hippocampus enlargement during adolescence in autism. *J Am Acad Child Adolesc Psychiatry*, *49*(6), 552-560. doi: 10.1016/j.jaac.2009.12.023
- Guo, W., Patzlaff, N. E., Jobe, E. M., & Zhao, X. (2012). Isolation of multipotent neural stem/progenitor cells from both the dentate gyrus and subventricular zone of a single adult mouse. *Nat Protoc*, *7*(11), 2005-2012. doi: 10.1038/nprot.2012.123
- Harada, M., Taki, M. M., Nose, A., Kubo, H., Mori, K., Nishitani, H., & Matsuda, T. (2011). Non-invasive evaluation of the GABAergic/glutamatergic system in autistic patients observed by MEGA-editing proton MR spectroscopy using a clinical 3 tesla instrument. *J Autism Dev Disord*, *41*(4), 447-454. doi: 10.1007/s10803-010-1065-0
- Hashimoto, R., Nakazawa, T., Tsurusaki, Y., Yasuda, Y., Nagayasu, K., Matsumura, K., . . . Shintani, N. (2016). Whole-exome sequencing and neurite outgrowth analysis in autism spectrum disorder. *61*(3), 199-206. doi: 10.1038/jhg.2015.141
- Heindel, J. J., Newbold, R. R., Bucher, J. R., Camacho, L., Delclos, K. B., Lewis, S. M., . . . Schug, T. T. (2015). NIEHS/FDA CLARITY-BPA research program update. *Reprod Toxicol*, *58*, 33-44. doi: 10.1016/j.reprotox.2015.07.075
- Hoekstra, E. J., & Simoneau, C. (2013). Release of bisphenol A from polycarbonate—a review. *Critical reviews in food science and nutrition*, *53*(4), 386-402.
- Honma, T., Miyagawa, M., Suda, M., Wang, R. S., Kobayashi, K., & Sekiguchi, S. (2006). Effects of perinatal exposure to bisphenol A on brain neurotransmitters in female rat offspring. *Ind Health*, *44*(3), 510-524.
- Hori, K., Nagai, T., Shan, W., Sakamoto, A., Taya, S., Hashimoto, R., . . . Hoshino, M. (2014). Cytoskeletal regulation by AUTS2 in neuronal migration and neurogenesis. *Cell Rep*, *9*(6), 2166-2179. doi: 10.1016/j.celrep.2014.11.045

- Hu, V. W., Sarachana, T., Kim, K. S., Nguyen, A., Kulkarni, S., Steinberg, M. E., . . . Lee, N. H. (2009). Gene expression profiling differentiates autism case-controls and phenotypic variants of autism spectrum disorders: evidence for circadian rhythm dysfunction in severe autism. *Autism Res*, *2*(2), 78-97. doi: 10.1002/aur.73
- Itoh, K., Yaoi, T., & Fushiki, S. (2012). Bisphenol A, an endocrine-disrupting chemical, and brain development. *Neuropathology*, *32*(4), 447-457.
- Jorgensen, E. M., Alderman, M. H., 3rd, & Taylor, H. S. (2016). Preferential epigenetic programming of estrogen response after in utero xenoestrogen (bisphenol-A) exposure. *Faseb j*, *30*(9), 3194-3201. doi: 10.1096/fj.201500089R
- Kabuto, H., Hasuike, S., Minagawa, N., & Shishibori, T. (2003). Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues. *Environ Res*, *93*(1), 31-35.
- Kadam, S., McAlpine, G. S., Phelan, M. L., Kingston, R. E., Jones, K. A., & Emerson, B. M. (2000). Functional selectivity of recombinant mammalian SWI/SNF subunits. *Genes Dev*, *14*(19), 2441-2451.
- Kalkbrenner, A. E., Braun, J. M., Durkin, M. S., Maenner, M. J., Cunniff, C., Lee, L. C., . . . Daniels, J. L. (2012). Maternal smoking during pregnancy and the prevalence of autism spectrum disorders, using data from the autism and developmental disabilities monitoring network. *Environ Health Perspect*, *120*(7), 1042-1048. doi: 10.1289/ehp.1104556
- Kalkbrenner, A. E., Schmidt, R. J., & Penlesky, A. C. (2014). Environmental chemical exposures and autism spectrum disorders: a review of the epidemiological evidence. *Curr Probl Pediatr Adolesc Health Care*, *44*(10), 277-318. doi: 10.1016/j.cppeds.2014.06.001
- Kardas, F., Bayram, A. K., Demirci, E., Akin, L., Ozmen, S., Kendirci, M., . . . Per, H. (2016). Increased Serum Phthalates (MEHP, DEHP) and Bisphenol A Concentrations in Children With Autism Spectrum Disorder: The Role of Endocrine Disruptors in Autism Etiopathogenesis. *J Child Neurol*, *31*(5), 629-635. doi: 10.1177/0883073815609150

- Kathuria, A., Nowosiad, P., Jagasia, R., & Aigner, S. (2018). Stem cell-derived neurons from autistic individuals with SHANK3 mutation show morphogenetic abnormalities during early development. *23*(3), 735-746. doi: 10.1038/mp.2017.185
- Kaur, K., Chauhan, V., Gu, F., & Chauhan, A. (2014). Bisphenol A induces oxidative stress and mitochondrial dysfunction in lymphoblasts from children with autism and unaffected siblings. *Free Radic Biol Med*, *76*, 25-33. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.07.030
- Kim, K., Son, T. G., Kim, S. J., Kim, H. S., Kim, T. S., Han, S. Y., & Lee, J. (2007). Suppressive effects of bisphenol A on the proliferation of neural progenitor cells. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *70*(15-16), 1288-1295.
- Kim, K., Son, T. G., Park, H. R., Kim, S. J., Kim, H. S., Kim, H. S., . . . Lee, J. (2009). Potencies of bisphenol A on the neuronal differentiation and hippocampal neurogenesis. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, *72*(21-22), 1343-1351.
- Kishi, Y., Takahashi, J., Koyanagi, M., Morizane, A., Okamoto, Y., Horiguchi, S., . . . Hashimoto, N. (2005). Estrogen promotes differentiation and survival of dopaminergic neurons derived from human neural stem cells. *J Neurosci Res*, *79*(3), 279-286. doi: 10.1002/jnr.20362
- Kondolot, M., Ozmert, E. N., Asci, A., Erkekoglu, P., Oztop, D. B., Gumus, H., . . . Yurdakok, K. (2016). Plasma phthalate and bisphenol a levels and oxidant-antioxidant status in autistic children. *Environ Toxicol Pharmacol*, *43*, 149-158. doi: 10.1016/j.etap.2016.03.006
- Konieczna, A., Rutkowska, A., & Rachon, D. (2015). Health risk of exposure to Bisphenol A (BPA). *Rocz Panstw Zakl Hig*, *66*(1), 5-11.
- Kundakovic, M., Gudsruk, K., Franks, B., Madrid, J., Miller, R. L., Perera, F. P., & Champagne, F. A. (2013). Sex-specific epigenetic disruption and behavioral changes following low-dose in utero bisphenol A exposure. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(24), 9956-9961. doi: 10.1073/pnas.1214056110

- Ladd-Acosta, C., Hansen, K. D., Briem, E., Fallin, M. D., Kaufmann, W. E., & Feinberg, A. P. (2014). Common DNA methylation alterations in multiple brain regions in autism. *Mol Psychiatry*, *19*(8), 862-871. doi: 10.1038/mp.2013.114
- Lam, S. H., Hlaing, M. M., Zhang, X., Yan, C., Duan, Z., Zhu, L., . . . Gong, Z. (2011). Toxicogenomic and phenotypic analyses of bisphenol-A early-life exposure toxicity in zebrafish. *PLoS one*, *6*(12), e28273.
- LaSalle, J. M. (2013). Autism genes keep turning up chromatin. *OA Autism*, *1*(2), 14-.
- Liu, R., Xing, L., Kong, D., Jiang, J., Shang, L., & Hao, W. (2013). Bisphenol A inhibits proliferation and induces apoptosis in micromass cultures of rat embryonic midbrain cells through the JNK, CREB and p53 signaling pathways. *Food and Chemical Toxicology*, *52*, 76-82.
- Masuo, Y., & Ishido, M. (2011). Neurotoxicity of endocrine disruptors: possible involvement in brain development and neurodegeneration. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part B*, *14*(5-7), 346-369.
- Mejias, R., Adamczyk, A., Anggono, V., Niranjana, T., Thomas, G. M., Sharma, K., . . . Wang, T. (2011). Gain-of-function glutamate receptor interacting protein 1 variants alter GluA2 recycling and surface distribution in patients with autism. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *108*(12), 4920-4925. doi: 10.1073/pnas.1102233108
- Menale, C., Piccolo, M. T., Cirillo, G., Calogero, R. A., Papparella, A., Mita, L., . . . Mita, D. G. (2015). Bisphenol A effects on gene expression in adipocytes from children: association with metabolic disorders. *J Mol Endocrinol*, *54*(3), 289-303. doi: 10.1530/jme-14-0282
- Mody, M., & Belliveau, J. W. (2013). Speech and Language Impairments in Autism: Insights from Behavior and Neuroimaging. *N Am J Med Sci (Boston)*, *5*(3), 157-161.
- Moosa, A., Shu, H., Sarachana, T., & Hu, V. W. (2018). Are endocrine disrupting compounds environmental risk factors for autism spectrum disorder? *Horm Behav*, *101*, 13-21. doi: 10.1016/j.yhbeh.2017.10.003
- Nakamura, K., Itoh, K., Yaoi, T., Fujiwara, Y., Sugimoto, T., & Fushiki, S. (2006). Murine neocortical histogenesis is perturbed by prenatal exposure to low doses of bisphenol A. *Journal of neuroscience research*, *84*(6), 1197-1205.

- Nardone, S., Sams, D. S., Zito, A., Reuveni, E., & Elliott, E. (2017). Dysregulation of Cortical Neuron DNA Methylation Profile in Autism Spectrum Disorder. *Cereb Cortex*, *27*(12), 5739-5754. doi: 10.1093/cercor/bhx250
- National Institute of Environmental Health Sciences. (2016). Bisphenol A (BPA). Retrieved 7 May, 2016, from <http://www.niehs.nih.gov/health/topics/agents/sya-bpa/>
- National Institutes of Health. (2016). Autism Spectrum Disorder. Retrieved 10 May, 2016, from <http://www.nimh.nih.gov/health/topics/autism-spectrum-disorders-asd/index.shtml>
- Neale, B. M., Kou, Y., Liu, L., Ma'ayan, A., Samocha, K. E., Sabo, A., . . . Daly, M. J. (2012). Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*, *485*(7397), 242-245. doi: 10.1038/nature11011
- Nguyen, A., Rauch, T. A., Pfeifer, G. P., & Hu, V. W. (2010). Global methylation profiling of lymphoblastoid cell lines reveals epigenetic contributions to autism spectrum disorders and a novel autism candidate gene, RORA, whose protein product is reduced in autistic brain. *Faseb j*, *24*(8), 3036-3051. doi: 10.1096/fj.10-154484
- NLAC mahidol. (2016). สัตว์ทดลอง. Retrieved 6 June, 2016, from <http://www.nlac.mahidol.ac.th/acth/index.php/animals-biopproduct/animals/23-laboratory/animals-biopproduct/69-mlac-wr>
- Noterdaeme, M. A., & Wriedt, E. (2010). [Comorbidity in autism spectrum disorders - I. Mental retardation and psychiatric comorbidity]. *Z Kinder Jugendpsychiatr Psychother*, *38*(4), 257-266. doi: 10.1024/1422-4917/a000045
- Oksenberg, N., Stevison, L., Wall, J. D., & Ahituv, N. (2013). Function and regulation of AUTS2, a gene implicated in autism and human evolution. *PLoS Genet*, *9*(1), e1003221. doi: 10.1371/journal.pgen.1003221
- Piroska, S. (2015). Transgenerational Gene Expression Changes Caused by Exposing Fetal Germ Cells to Endocrine Disruptors. Retrieved 23 May, 2017, from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE58642>
- Provenzano, G., Sgado, P., Genovesi, S., Zunino, G., Casarosa, S., & Bozzi, Y. (2015). Hippocampal dysregulation of FMRP/mGluR5 signaling in engrailed-2 knockout

- mice: a model of autism spectrum disorders. *Neuroreport*, 26(18), 1101-1105. doi: 10.1097/wnr.0000000000000477
- Roberts, E. M., English, P. B., Grether, J. K., Windham, G. C., Somberg, L., & Wolff, C. (2007). Maternal residence near agricultural pesticide applications and autism spectrum disorders among children in the California Central Valley. *Environ Health Perspect*, 115(10), 1482-1489. doi: 10.1289/ehp.10168
- Rosenberg, R. E., Law, J. K., Yenokyan, G., McGready, J., Kaufmann, W. E., & Law, P. A. (2009). Characteristics and concordance of autism spectrum disorders among 277 twin pairs. *Archives of pediatrics & adolescent medicine*, 163(10), 907-914.
- Rossignol, D., Genuis, S., & Frye, R. (2014). Environmental toxicants and autism spectrum disorders: a systematic review. *Translational psychiatry*, 4(2), e360.
- Sadowski, R. N., Wise, L. M., Park, P. Y., Schantz, S. L., & Juraska, J. M. (2014). Early exposure to bisphenol A alters neuron and glia number in the rat prefrontal cortex of adult males, but not females. *Neuroscience*, 279, 122-131. doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.08.038
- Saeed, A. I., Sharov, V., White, J., Li, J., Liang, W., Bhagabati, N., . . . Quackenbush, J. (2003). TM4: a free, open-source system for microarray data management and analysis. *Biotechniques*, 34(2), 374-378.
- Saeli, T., Tangsuwansri, C., Thongkorn, S., Chonchaiya, W., Suphapeetiporn, K., Mutirangura, A., . . . Sarachana, T. (2018). Integrated genome-wide Alu methylation and transcriptome profiling analyses reveal novel epigenetic regulatory networks associated with autism spectrum disorder. *9*, 27. doi: 10.1186/s13229-018-0213-9
- Sarachana, T., Zhou, R., Chen, G., Manji, H. K., & Hu, V. W. (2010). Investigation of post-transcriptional gene regulatory networks associated with autism spectrum disorders by microRNA expression profiling of lymphoblastoid cell lines. *Genome Med*, 2(4), 23. doi: 10.1186/gm144
- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 127(3-5), 204-215. doi: 10.1016/j.jsbmb.2011.08.007

- Schug, T. T., Janesick, A., Blumberg, B., & Heindel, J. J. (2011). Endocrine disrupting chemicals and disease susceptibility. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology*, *127*(3), 204-215.
- Shioda, T., Chesnes, J., Coser, K. R., Zou, L., Hur, J., Dean, K. L., . . . Isselbacher, K. J. (2006). Importance of dosage standardization for interpreting transcriptomal signature profiles: evidence from studies of xenoestrogens. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *103*(32), 12033-12038. doi: 10.1073/pnas.0605341103
- Shu, W., Cho, J. Y., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G. A., . . . Buxbaum, J. D. (2005). Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the *Foxp2* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *102*(27), 9643-9648. doi: 10.1073/pnas.0503739102
- Stein, T. P., Schluter, M. D., Steer, R. A., Guo, L., & Ming, X. (2015). Bisphenol A Exposure in Children With Autism Spectrum Disorders. *Autism Res*, *8*(3), 272-283. doi: 10.1002/aur.1444
- Straughen, J. K., Misra, D. P., Divine, G., Shah, R., Perez, G., VanHorn, S., . . . Salafia, C. M. (2017). The association between placental histopathology and autism spectrum disorder. *Placenta*, *57*, 183-188. doi: 10.1016/j.placenta.2017.07.006
- Suda, S., Iwata, K., Shimmura, C., Kameno, Y., Anitha, A., Thanseem, I., . . . Mori, N. (2011). Decreased expression of axon-guidance receptors in the anterior cingulate cortex in autism. *Mol Autism*, *2*(1), 14. doi: 10.1186/2040-2392-2-14
- Tait, S., Tassinari, R., Maranghi, F., & Mantovani, A. (2015a). Bisphenol A affects placental layers morphology and angiogenesis during early pregnancy phase in mice. *J Appl Toxicol*, *35*(11), 1278-1291. doi: 10.1002/jat.3176
- Tait, S., Tassinari, R., Maranghi, F., & Mantovani, A. (2015b). Toxicogenomic analysis of placenta samples from mice exposed to different doses of BPA. *Genom Data*, *4*, 109-111. doi: 10.1016/j.gdata.2015.04.004
- Talebizadeh, Z., Butler, M. G., & Theodoro, M. F. (2008). Feasibility and relevance of examining lymphoblastoid cell lines to study role of microRNAs in autism. *Autism Res*, *1*(4), 240-250. doi: 10.1002/aur.33
- Tang, G., Gudsruk, K., Kuo, S. H., Cotrina, M. L., Rosoklija, G., Sosunov, A., . . . Sulzer, D. (2014). Loss of mTOR-dependent macroautophagy causes autistic-like

- synaptic pruning deficits. *Neuron*, 83(5), 1131-1143. doi: 10.1016/j.neuron.2014.07.040
- Taylor, J. A., Vom Saal, F. S., Welshons, W. V., Drury, B., Rottinghaus, G., Hunt, P. A., . . . VandeVoort, C. A. (2011). Similarity of bisphenol A pharmacokinetics in rhesus monkeys and mice: relevance for human exposure. *Environ Health Perspect*, 119(4), 422-430. doi: 10.1289/ehp.1002514
- Tiwari, S. K., Agarwal, S., Seth, B., Yadav, A., Ray, R. S., Mishra, V. N., & Chaturvedi, R. K. (2014). Inhibitory Effects of Bisphenol-A on Neural Stem Cells Proliferation and Differentiation in the Rat Brain Are Dependent on Wnt/ β -Catenin Pathway. *Molecular neurobiology*, 1-23.
- Valnegri, P., Huang, J., Yamada, T., Yang, Y., Mejia, L. A., Cho, H. Y., . . . Bonni, A. (2017). RNF8/UBC13 ubiquitin signaling suppresses synapse formation in the mammalian brain. *Nat Commun*, 8(1), 1271. doi: 10.1038/s41467-017-01333-6
- Vandenberg, L. N., Hunt, P. A., Myers, J. P., & Vom Saal, F. S. (2013). Human exposures to bisphenol A: mismatches between data and assumptions. *Rev Environ Health*, 28(1), 37-58. doi: 10.1515/reveh-2012-0034
- Varshney, M. K., Inzunza, J., Lupu, D., Ganapathy, V., Antonson, P., & Ruegg, J. (2017). Role of estrogen receptor beta in neural differentiation of mouse embryonic stem cells. *114(48)*, E10428-e10437. doi: 10.1073/pnas.1714094114
- Vom Saal, F. S., & Hughes, C. (2005). An extensive new literature concerning low-dose effects of bisphenol A shows the need for a new risk assessment. *Environmental health perspectives*, 926-933.
- Wadia, P. R., Cabaton, N. J., Borrero, M. D., Rubin, B. S., Sonnenschein, C., Shioda, T., & Soto, A. M. (2013). Low-dose BPA exposure alters the mesenchymal and epithelial transcriptomes of the mouse fetal mammary gland. *PLoS one*, 8(5), e63902. doi: 10.1371/journal.pone.0063902
- Wang, C., Li, Z., Han, H., Luo, G., Zhou, B., Wang, S., & Wang, J. (2016). Impairment of object recognition memory by maternal bisphenol A exposure is associated with inhibition of Akt and ERK/CREB/BDNF pathway in the male offspring hippocampus. *Toxicology*, 341-343, 56-64. doi: 10.1016/j.tox.2016.01.010

- Wang, C., Niu, R., Zhu, Y., Han, H., Luo, G., Zhou, B., & Wang, J. (2014). Changes in memory and synaptic plasticity induced in male rats after maternal exposure to Bisphenol A. *Toxicology*, *322*, 51-60.
- Wang, X., Bey, A. L., Katz, B. M., Badea, A., Kim, N., David, L. K., . . . Jiang, Y. H. (2016). Altered mGluR5-Homer scaffolds and corticostriatal connectivity in a Shank3 complete knockout model of autism. *Nat Commun*, *7*, 11459. doi: 10.1038/ncomms11459
- Wegiel, J., Kuchna, I., Nowicki, K., Imaki, H., Wegiel, J., Marchi, E., . . . Wisniewski, T. (2010). The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol*, *119*(6), 755-770. doi: 10.1007/s00401-010-0655-4
- Wolstenholme, J. T., Edwards, M., Shetty, S. R., Gatewood, J. D., Taylor, J. A., Rissman, E. F., & Connelly, J. J. (2012). Gestational exposure to bisphenol a produces transgenerational changes in behaviors and gene expression. *Endocrinology*, *153*(8), 3828-3838.
- Wu, X., Lu, C., Dong, X., Zhang, Z., Yang, M., & Xu, H. (2016). Proteomics analysis of zebrafish brain following chronically exposed to bisphenol A. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 1-13.
- Wu, Y. E., Parikshak, N. N., & Belgard, T. G. (2016). Genome-wide, integrative analysis implicates microRNA dysregulation in autism spectrum disorder. *19*(11), 1463-1476. doi: 10.1038/nn.4373
- Yeo, M., Berglund, K., Hanna, M., Guo, J. U., Kittur, J., Torres, M. D., . . . Liedtke, W. B. (2013). Bisphenol A delays the perinatal chloride shift in cortical neurons by epigenetic effects on the Kcc2 promoter. *Proc Natl Acad Sci U S A*, *110*(11), 4315-4320. doi: 10.1073/pnas.1300959110



ภาคผนวก

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
CHULALONGKORN UNIVERSITY

ตารางที่ 1 ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ที่ใช้ในการวิเคราะห์ quantitative RT-PCR

Gene	Forward primer (5'→ 3')	Reverse primer (5'→ 3')
<i>Auts2</i>	GTCCTCCAGGCCCTAGTCTC	CACACTGGGGCTATCCTTGT
<i>Foxp2</i>	CCACAAGTTTGGGCTATGGA	ACTGCTGTTCCCATTGCTGT
<i>Smarcc2</i>	GGCTGAAGGAAGTTGCAGAG	ATCTGGGTCTCCACCAACAG
<i>Dicer1</i>	ACGAGATGCAAGGAATGGAC	GTACACCTGCCAGACCACCT
<i>Rn18s</i>	CTGGATACCGCAGCTAGGAA	GAATTTCACCTCTAGCGGCG



จริยธรรมการวิจัย

การทดลองในสัตว์ทดลองในงานวิจัยครั้งนี้ได้รับการอนุมัติจากคณะกรรมการจรรยาบรรณ
การเลี้ยง การใช้และการผลิตสัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เลขที่
โครงการ 1773011



ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสุรางค์รัตน์ ทองกร เกิดเมื่อวันที่ 12 มีนาคม พ.ศ.2536 ที่จังหวัดเพชรบุรี จบการศึกษา วิทยาศาสตร์บัณฑิต (เทคนิคการแพทย์) จากคณะสหเวชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปี การศึกษา 2557 และเข้าศึกษาต่อในระดับปริญญาโทบริหารบัณฑิตหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาชีวเคมีคลินิกและอนุทางการแพทย์ ในปีการศึกษา 2558 โดยได้รับทุนอุดหนุนการศึกษา ระดับบัณฑิตศึกษาจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เพื่อเฉลิมฉลองวโรกาสที่ พระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวภูมิพลอดุลยเดชทรงเจริญพระชนมายุครบ ๗๒ พรรษา และ ทุน ๙๐ ปีจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

