รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาระดับเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและเนื้อปลาดุกด้าน

STUDY OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN SERUM AND MUSCLE OF THE CATFISH

โดย

วรา พานิชเกรียงไกร

จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

กุมภาพันธ์ 2539

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2532

ทก
๒๖-๑๐-๔๑

รายงานการวิจัย

เรื่อง

การศึกษาระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและเนื้อปลาดุกด้าน

STUDY OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN SERUM AND MUSCLE OF THE CATFISH

โดย

วรา พานิชเกรียงไกร
จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

กุมภาพันธ์ 2539

ทุนวิจัยงบประมาณแผ่นดินปี 2532

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อ	1
บทนำ	2
อุปกรณ์และวิธีการ	4
ผลการทดลอง	10
วิจารณ์	13
กิตติกรรมประกาศ	14
เอกสารอ้างอิง	15
Summary	17

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การศึกษาระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและเนื้อปลาดุกด้าน

วรา พานิชเกรียงไกร *
จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ **

บทคัดย่อ

ทำการศึกษาระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและเนื้อของปลาดุกด้านโดยวิธีของ Ellman et al (1961) พบว่าการทำงานของเอนไซม์มีความคงตัวเมื่อเก็บตัวอย่างไว้โดยการแช่แข็งที่ -10°C นาน 6 สัปดาห์ เปอร์เซ็นต์รีโคเวอรี่ (percent recovery) มีค่ามากกว่า 96% ค่าเฉลี่ยของการทำงานของเอนไซม์ในซีรั่มปลาดุก 120 ตัว มีค่า 0.8513±0.3109 ไมโครโมล/นาที/มิลลิลิตร และในเนื้อปลาดุกมีค่า 20.7812±4.7847 ไมโครโมล/นาที/กรัมเนื้อเยื่อ

คำสำคัญ : ค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส
ซีรั่ม
เนื้อ
ปลาดุกด้าน

---

* ภาควิชาเภสัชวิทยา
** ภาควิชาอายุรศาสตร์
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ถนนอังรี-ดูนังต์
กรุงเทพฯ 10330

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทนำ

อะซิทิลโฆลีนเอสเทอเรส (acetylcholinesterases, AChE) เป็นเอนไซม์ที่พบที่ปลายเส้นประสาทโฆลิเนอร์จิก (cholinergic nerve endings) ที่รอยต่อระหว่างเส้นประสาทและกล้ามเนื้อลาย (neuromuscular junctions) และที่ผนังของเม็ดโลหิตแดง ส่วนในสมอง ตับและพลาสม่าจะมีเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสที่เรียกว่าซูโดโฆลีนเอสเทอเรส (pseudocholinesterases, PChE) (Mosha, 1993) เอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มนี้นอกจากจะสามารถ hydrolyze substrates ที่เหมือนกัน คือ acetylcholine และ propinonylcholine ยังมี substrates เฉพาะของตนเองทำให้สามารถแยกแยะเอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มนี้ออกจากกันได้ โดยอะซิทิลโฆลีนเอสเทอเรสจะ hydrolyze acetyl-B-methylthiocholine และซูโดโฆลีนเอสเทอเรส จะ hydrolyze butyrylcholine และ bytyrylthiocholine (Osweiler et al., 1985)

เอนไซม์ทั้ง 2 กลุ่มถูกเรียกรวมว่าโฆลีนเอสเทอเรส (cholinesterases, ChE) เป็นที่ยอมรับว่าอะซีทิลโฆลีนเอสเทอเรสทำหน้าที่ในการ hydrolyze acetylcholine ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทที่สำคัญของ

1. ganglion ทั้งระบบพาราซิมพาเธติก (parasympathetic) และซิมพาเซติก (sympathetic)
2. ปลายประสาทพาราซิมพาเธติกไปยังกล้ามเนื้อเรียบ ต่อมต่าง ๆ และกล้ามเนื้อหัวใจ
3. ปลายประสาทโซมาติก (somatic) ที่ไปยังกล้ามเนื้อลาย
4. ปลายประสาทบางเส้นในระบบประสาทกลาง

ส่วนหน้าที่ที่แท้จริงของซูโดโฆลีนเอสเทอเรสหรือที่บางคนเรียกว่า ซีรั่มโฆลีนเอสเทอเรส (serum cholinesterases) (Vorhaus and Kark, 1953) ยังไม่เป็นที่ทราบกันดี แต่พบว่าสามารถ hydrolyze acetylcholine ได้ในสมองและพลาสม่า (Osweiler et al., 1985) จึงใช้เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงภาวะการได้รับสารพิษกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในคนและสัตว์

สารกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตเป็นสารที่ใช้ในการกำจัดแมลงที่เป็นศัตรูพืชและสัตว์รวมทั้งพยาธิภายนอกและภายในของสัตว์ เมื่อแมลง สัตว์หรือคนได้รับสารเหล่านี้เข้าไปจะทำให้เกิดอาการเป็นพิษขึ้นได้เนื่องจากออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตไปยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส แม้ว่าระดับของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเลือดที่ลดต่ำลงจะไม่ได้เป็นสาเหตุของการเกิดพิษ แต่ระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเลือดก็เป็นเครื่องบ่งชี้ถึงระดับอะซิทิลโฆลีนเอสเทอเรสในระบบประสาท (Khan et al., 1990 ; Plumlee et al., 1994)

ระดับของโฆลีนเอสเทอเรสในสัตว์แต่ละชนิดจะแตกต่างกันออกไปตามชนิดของสัตว์ เพศ พันธุ์ อายุ อาหารและฤดูกาล (วราและดานิศ, 1994 ; Munro et al., 1991 ; Panichkriangkrai and Subhachalat, 1995) และยังแตกต่างกันตามวิธีการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ (Harlin and Ross, 1990) Munro et al. (1991) ให้ความเห็นว่า ห้องปฏิบัติการแต่ละแห่งควรมีค่าปกติ (baseline value) ของตนเองสำหรับค่าโฆลีนเอสเทอเรสในเลือด

การวิจัยครั้งนี้เพื่อศึกษาค่าปกติของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มและเนื้อปลาดุกด้าน ซึ่งเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงเพื่อการบริโภคในประเทศไทย การทราบถึงค่าปกติจะทำให้ใช้เป็นตัวบ่งชี้ได้เมื่อเกิดความเป็นพิษของสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมตในปลา นอกจากนี้ยังได้ศึกษาความคงตัวของเอนไซม์และ percent recovery เมื่อใช้วิธีวิเคราะห์โดยวิธีของ Ellman et al (1961) ด้วย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

อุปกรณ์และวิธีการ

สัตว์ทดลอง : ปลาดุกโตเต็มวัย ขนาดความยาวประมาณ 25-30 เซนติเมตร

เครื่องมือ :

1. UV-visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadsu)
2. Standard pH meter (EA920, Orion Research)
3. Tissue homogenizer (Heidolph type 58120)
4. เครื่องชั่งละเอียด (A200S, Satorious)
5. Magnetic stirrer (Tokyo Rikakikai Co. Ltd)
6. Centrifuge
7. Freezer (-10^{0}C)

สารเคมี :

1. Acetylthiocholine Chloride (Sigma)
2. 5 : 5 dithiobis-(2-nitrobenzoic) acid (DTNB) (Sigma)
3. Bovine erythrocyte cholinesterase 0.44 unit/mg (Sigma)
4. Sodium bicarbonate (E.Merck)
5. Disodium hydrogen phosphate (May & Baker)
6. Monopotassium hydrogen phosphate (May & Baker)

เครื่องแก้ว :

1. ขวดรูปชมพู่ขนาด 10, 50, 500, 1000 มิลลิลิตร (Pyrex)
2. กระบอกตวงขนาด 100 มิลลิลิตร (Pyrex)
3. หลอดทดลองพลาสติกขนาด 13 x 100 มิลลิลิตร (Elkay Products, Inc)
4. Silica cuvette (pathlength 1 cm ; Shimadsu)
5. Automatic pipette (adjustable volume 1-1000 ul) (Gilson) พร้อม tips
6. Automatic pipette (adjustable volume 5-20 ul) (Eppendorf) พร้อม tips

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. Syringe แก้ว ขนาด 2 มิลลิลิตร (มล.)

8. เข็มฉีดยา #21, 1 นิ้ว

9. Pasteur pipette พร้อมลูกยางดูด

การเตรียม reagents :

1. สารละลาย phosphate buffer 0.1 M, pH 8.0

เตรียมโดยผสมสารละลาย Na_2HPO_4 0.1 M (14.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 475 มล. กับสารละลาย KH_2PO_4 0.1 M (13.6 กรัม/ลิตร) 25 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 8 โดยใช้สารละลาย KH_2PO_4 0.1M เก็บสารละลายบัฟเฟอร์นี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

2. สารละลาย phosphate buffer 0.1M, pH 7.0

นำสารละลาย Na_2HPO_4 0.1M (14.2 กรัม/ลิตร) จำนวน 5 มล. ใส่ลงไปในสารละลาย Na_2PO_4 0.1M (13.6 กรัม/ลิตร) 4 มล. ปรับ pH ให้เท่ากับ 7 โดยใช้สารละลาย KH_2PO_4 0.1M เก็บสารละลายบัฟเฟอร์นี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

3. Acetylthiocholine chloride substrate (1.096×10^{-4}M)

ละลาย acetylthiocholine chloride 21.67 มิลลิกรัม (มก.) ในน้ำกลั่น 1 มล.สารละลายนี้สามารถคงตัวอยู่ได้เมื่อเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C

4. Dithio bisnitrobenzoic acid (DTNB) 0.01M

ละลาย DTNB 39.6 มก. และ sodium bicarbonate 15 มก. ในสารละลาย phosphate buffer 0.1M, pH7 จำนวน 10 มล.

5. Bovine cholinesterase enzyme (0.44 units/มก.)

ชั่งเอนไซม์ bovine cholinesterase 2.27 มก. ละลายด้วยน้ำกลั่น 1 มล. จะได้ปริมาณเอนไซม์ 1 IU ต่อ 1 มล. นำไป dilute ต่อด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 0.5, 0.25 และ 0.125 IU ตามลำดับ

การเจาะเลือดและเก็บตัวอย่าง

นำปลามาวางบนผ้าที่ชุบน้ำจนเปียก ใช้ syringe ขนาด 2 มล. และเข็มเบอร์ 21 ความยาว 1 นิ้วที่แห้งและสะอาด เจาะด้าน ventral midline ของตัวปลา ตำแหน่งที่แทงเข็ม ห่างจากโคนหางประมาณ 1-1.5 นิ้ว เสียบเข็มเป็นมุมประมาณ 45 องศากับตัวปลา ลึกประมาณ 0.5 นิ้ว จนพบกระดูกกลาง ขยับเข็มเล็กน้อย ค่อย ๆ ดึง plunger ให้เลือดไหลเข้า syringe ประมาณ 2 มล. จึงถอนเข็มจากตัวปลา เก็บเลือดที่เจาะได้ในขวดขนาด 10 มล. วางเอียงทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานประมาณ1 ชั่วโมง จนเห็นมีซีรั่มใสออกมา ใช้ pasteur pipette ดูดซีรั่มใส่ในหลอด นำไปปั่นแยกด้วย centrifuge ความเร็ว 3,000 rpm นาน 5 นาที แล้วจึงดูดซีรั่มใส่ในหลอดพลาสติกปิดฝา เก็บไว้ในตู้แช่แข็งความเย็นประมาณ -10^{o}C

เก็บตัวอย่างเนื้อปลาโดยใช้มีดผ่าตัดเฉือนเนื้อปลา เลาะหนังออกนำเนื้อปลาไปชั่งให้ได้น้ำหนัก 80 มก. เก็บไว้ในฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 4 มล. บดให้ละเอียดโดยใช้ tissue homogenizer แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้แช่แข็งเช่นกัน

การวัดระดับเอนไซม์โมลีนเอสเทอเรสในซีรั่ม

ประยุกต์ใช้วิธีการของ Ellman et al (1961) ดังนี้

1. นำซีรั่มมาเจือจางด้วยน้ำกลั่น จากการศึกษาเบื้องต้นพบว่า อัตราส่วนที่เหมาะสมคือ ซีรั่ม : น้ำกลั่น เป็น 1:6 ดูดซีรั่มที่เจือจางแล้วจำนวน 0.4 มล. ใส่ใน cuvette 2 อัน กำหนดเป็น blank และ sample

2. เติมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH8 จำนวน 2.6 มล. ใน cuvette ทั้ง 2

3. ใส่ DTNB 100 ul

4. ใส่ acetylcholine substrate 20 ul. ลงใน sample cuvette เท่านั้น

วัดค่า O.D โดยใช้ spectrophotometer ความยาวคลื่นแสง 412 nm. นำค่า ΔA ที่ได้คำนวณหาค่า enzyme activity โดยใช้สูตร

$$R = \frac{\Delta A}{1.36} \times \frac{10^2}{(400/3120)Co}$$

เมื่อ R = อัตราการฮัยโดรลัยซิส หน่วยเป็น umoles/min/ml

Δ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงต่อนาที

Co = dilution factor

การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อ

ประยุกต์ใช้วิธีของ Ellman et al (1961)ดังนี้

1. นำฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH8 มา 4 มล. ใส่ในเนื้อปลาจำนวน 80 มก. บดละเอียดด้วย tissue homogenizer แต่จากการทดลองเบื้องต้นพบว่าส่วนผสมขนาดดังกล่าวมีความเข้มข้นของเอนไซม์สูงมาก จึงต้องเจือจางลง 5 เท่าด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์ pH8 เพื่อให้อยู่ในระดับที่สามารถวัดได้

2. ใส่ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 2.6 มล. ใน cuvette 2 cuvettes (blank และ sample)

3. ใส่เนื้อเยื่อบดละเอียด 0.4 มล.

4. ใส่ DTNB 100 ul

5. ใส่ acetylthiocholine substrate 20 ul. ลงใน sample cuvette เท่านั้น

วัดค่า O.D. โดยใช้ spectrophotometer ความยาวคลื่นแสง 412 nm นำค่า ΔA ที่ได้คำนวณหาค่า enzyme activity โดยใช้สูตร

$$R = \frac{\Delta A}{1.36} \times \frac{10^2}{(400/3120)Co}$$

$$= \frac{5.7 \times \Delta A \times 10^2}{Co}$$

เมื่อ R = อัตราการฮัยโดรลัยซิส หน่วยเป็น umoles/min/g tissue

Δ A = ค่าการดูดกลืนแสงที่เปลี่ยนแปลงต่อนาที

Co = ปริมาณเนื้อเยื่อที่ใช้ หน่วยเป็น mg/ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหา % recovery ในซีรั่ม

เตรียมหลอดทดลอง 2 หลอด ใส่สารเคมีต่อไปนี้

สารเคมี	blank	sample
phosphate buffer pH8	3.0 ml	2.6 ml
DTNB	100 ul	100 ul
acetylthiocholine iodide	20 ul	-

ปรับ absorbance ให้เท่ากับศูนย์ แล้วจึงใส่ซีรั่มที่เจือจางแล้วจำนวน 0.4 ml และ bovine erythrocyte ChE จำนวน 50 ul ในหลอด sample วัดการเปลี่ยนแปลงของ O.D. ที่เกิดขึ้น

ใช้ bovine erythrocyte ChE ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.125, 0.25, 0.50 และ 1 unit ตามลำดับ ส่วนที่ 0 unit ใส่น้ำกลั่นแทนในปริมาณ 50 ul

$$\% \text{ recovery} = \frac{\text{determined value}}{\text{theoretical value}} \times 100$$

การหา % recovery ในเนื้อเยื่อ

ทำคล้ายคลึงกับในซีรั่ม ดังนี้

สารเคมี	blank	sample
phosphate buffer pH8	3.0 ml.	2.6 ml.
DTNB	100 ul	100 ul
acetylthiocholine iodide	20 ul	20 ul

ปรับ absorbance ให้เท่ากับศูนย์ แล้วจึงใส่เนื้อเยื่อที่บดแล้วจำนวน 0.4 ml และ bovine erythrocyte ChE จำนวน 50 ul ในหลอด sample วัดการเปลี่ยนแปลงของ O.D ที่เกิดขึ้น

ความเข้มข้นของ bovine erythrocyte ChE ได้แก่ 0, 0.125, 0.25, 0.5 และ 1.0 unit

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การหาความคงตัว (stability) ของเอนไซม์ในเนื้อเยื่อและซีรั่ม

นำเนื้อเยื่อและซีรั่มจากปลาดุก 10 ตัว (pooled sample) มาเก็บใส่หลอดทดลองอย่างละ 6 ตัวอย่าง เก็บแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -10°C นำตัวอย่างมาวัดค่าการทำงานของเอนไซม์โซลีนเอสเทอเรส ในเนื้อเยื่อและซีรั่มทุกสัปดาห์ ตั้งแต่สัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 6 เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ตามเวลาที่ผ่านไป คิดค่าออกมาเป็นเปอร์เซ็นต์เทียบกับสัปดาห์ที่ 1

ทำซ้ำ 3 ครั้ง (replications)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการทดลอง

% recovery ในซีรั่ม

พบว่าวิธีการหาค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มโดยวิธีประยุกต์จาก Ellman et al (1961) มีค่า % recovery ตั้งแต่ 96.69 ± 2.09 ถึง 104.84 ± 3.75 (ตารางที่ 1) แสดงว่าสามารถใช้วิธีการนี้ในการหาค่าการทำงานของโฆลีนโฆลีนเอสเทอเรสในห้องปฏิบัติการได้

% recovery ในเนื้อเยื่อโฆลีนเอสเทอเรส

พบว่าวิธีการหาค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเนื้อเยื่อโดยวิธีประยุกต์จาก Ellman et al (1961) มีค่า % recovery ตั้งแต่ 96.38 ± 2.21 ถึง 102.15 ± 1.97 (ตารางที่ 1) แสดงว่าสามารถใช้วิธีการนี้ในการหาค่า ChE ในห้องปฏิบัติการได้

ตารางที่ 1 แสดงค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนจากปกติของ % recovery ในซีรั่มและในเนื้อเยื่อเมื่อเติมเอนไซม์ระดับต่าง ๆ กัน

ระดับเอนไซม์ที่เติมเข้าไป (unit)	% recovery	
	ในซีรั่ม	ในเนื้อเยื่อ
0.125	104.84±3.75	96±2.21
0.25	97.88±8.04	98.05±4.76
0.50	99.40±3.20	101.79±4.11
1.00	96.69±2.09	102.15±1.97

ความคงตัวในซีรั่มและในเนื้อเยื่อ

เมื่อเก็บตัวอย่างเนื้อปลาและซีรั่มจากปลาไว้ที่อุณหภูมิ -10°C และนำตัวอย่างมาหาระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสเป็นระยะจากสัปดาห์ที่ 1 ถึงสัปดาห์ที่ 6 พบว่าเอนไซม์มีค่าลดลงแต่ไม่แตกต่างจากสัปดาห์ที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในตารางที่ 2 และ 3

ตารางที่ 2 ค่าของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มปลาดุกด้านเมื่อเก็บตัวอย่างซีรั่มนาน 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -10°C

ตัวอย่าง	% เทียบกับสัปดาห์ที่ 1					
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6
ชุดรวม 1	100	94.11	91.58	87.88	87.49	88.49
ชุดรวม 2	100	97.06	96.58	96.22	96.42	96.03
ชุดรวม 3	100	96.93	95.44	95.05	93.89	94.08
$\bar{X} \pm$ SD	100	96.03±1.36	94.53±4.94	93.05±3.69	92.60±3.76	92.87±3.20

ตารางที่ 3 ค่าของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเนื้อปลาดุกด้านเมื่อเก็บตัวอย่างเนื้อปลาดุกนาน 6 สัปดาห์ ที่อุณหภูมิ -10°C

ตัวอย่าง	% เทียบกับสัปดาห์ที่ 1					
	สัปดาห์ที่ 1	สัปดาห์ที่ 2	สัปดาห์ที่ 3	สัปดาห์ที่ 4	สัปดาห์ที่ 5	สัปดาห์ที่ 6
ชุดรวม 1	100	97.48	95.40	95.79	95.68	95.69
ชุดรวม 2	100	100	100	99.22	98.80	97.81
ชุดรวม 3	100	98.30	98.41	98.67	98.10	97.66
$\bar{X} \pm$ SD	100	98.59±1.05	97.94±1.91	97.89±1.51	97.53±1.34	97.05±0.97

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ค่าเฉลี่ยของระดับ ChE ในเนื้อปลาดุกด้าน

จากการวัดหาค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเนื้อปลาดุกด้าน 120 ตัวอย่างพบว่าค่าเฉลี่ยของค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในเนื้อปลาดุกด้านมีค่า 20.7812±4.7847 umoles/min/g.tissue

ค่าเฉลี่ยของระดับ ChE ในซีรั่มปลาดุก

จากการวัดหาค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มปลาดุกด้าน 120 ตัวอย่าง พบว่าค่าเฉลี่ยของค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสมีค่า 0.8513±0.3109 umoles/min/ml.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิจารณ์

การหา % recovery เป็นการทดสอบวิธีการที่ใช้ว่าสามารถใช้วิธีเดียวกันในห้องปฏิบัติการต่างๆ กันได้หรือไม่ จากการทดลองครั้งนี้พบว่า % recovery มีค่าไม่ต่ำกว่า 96% ทั้งในซีรั่มและในเนื้อปลาดุกแสดงว่า ห้องปฏิบัติการของคณะสัตวแพทยศาสตร์สามารถนำวิธีการหาค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสทั้งในซีรั่มและเนื้อเยื่อมาใช้ปฏิบัติจริงได้ โดยสามารถตรวจพบค่าการทำงานของเอนไซม์ในระดับที่เชื่อถือได้

การทดสอบความคงตัวของเอนไซม์ในซีรั่มและเนื้อเยื่อเป็นสิ่งจำเป็นในกรณีที่ไม่สามารถทำการทดลองให้เสร็จภายในระยะเวลาอันสั้น และจำเป็นต้องเก็บตัวอย่างไว้ก่อน การทดลองครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสามารถเก็บตัวอย่างในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -10^{o}C ได้นานถึง 6 สัปดาห์ โดยระดับของเอนไซม์ อาจลดลงบ้าง แต่ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามหากเก็บไว้นานกว่านี้อาจทำให้ระดับของเอนไซม์ลดลงมากจนทำให้การแปลผลผิดพลาดได้ จึงเสนอแนะว่าหากจำเป็นอาจเก็บตัวอย่างแช่แข็งไว้ที่อุณหภูมิ -10^{o}C ได้ไม่เกินกว่า 6 สัปดาห์ แต่ถ้าเป็นไปได้ควรทำการวิเคราะห์ให้เร็วที่สุดเท่าที่จะทำได้ ได้มีรายงานหลายฉบับเกี่ยวกับความคงตัวของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส ตัวอย่างเช่น blood cholinesterases จะคงตัวได้หลายสัปดาห์ถ้าเก็บตัวอย่างที่ 0-5^{o}C และพลาสม่าจะเก็บได้นานหลายเดือนถ้าเก็บในช่องแข็ง (Osweiler et al., 1985) อย่างไรก็ตาม Plumlee et al. (1994) รายงานว่าหากเก็บตัวอย่างเลือดม้าในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 5^{o}C การทำงานของเอนไซม์จะคงที่อยู่ได้นานไม่เกิน 1 สัปดาห์แล้วจะลดลงจากค่าแรกเจาะอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ การทดลองครั้งนี้ยืนยันว่าสามารถเก็บซีรั่มที่ -10^{o}C ได้นาน 6 สัปดาห์ โดยไม่ทำให้การทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสแตกต่างจากค่าแรกเจาะ

การทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสมีค่าแตกต่างกันตามชนิดของสัตว์ เพศ พันธุ์ อายุ อาหารและฤดูกาล (วราและดานิศ, 1994 : Munro et al., 1991) รวมทั้งวิธีการวิเคราะห์ของแต่ละห้องปฏิบัติการ (Harlin and Ross, 1990) วราและดานิศ (1994) ทำการวัดค่าโฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มสัตว์ 10 ชนิด และพบความแตกต่างที่ทำให้สามารถแบ่งกลุ่มของสัตว์ออกเป็น 3 กลุ่ม ตามค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส กลุ่มที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ในซีรั่มสูง ได้แก่ ลิง ม้า สุนัข กลุ่มที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ในซีรั่มปานกลาง ได้แก่ เป็ด ไก่ สุกร กระต่าย กลุ่มที่มีค่าการทำงานของ

เอนไซม์ในซีรั่มต่ำ ได้แก่ แกะ โค กระบือ อย่างไรก็ตามวิธีการที่ใช้ครั้งนั้นแตกต่างจากรายงานครั้งนี้ โดยใช้ kit สำเร็จรูป แม้ว่าหลักการในการทำให้เกิดสีจะเหมือนกัน คือ ประยุกต์มาจากวิธีของ Ellman et al (1961) จากการประเมินค่าการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในซีรั่มปลาดุกครั้งนี้ ผู้วิจัยคิดว่าระดับของเอนไซม์ในซีรั่มปลาดุกค่อนข้างต่ำ จึงอาจจัดอยู่ในกลุ่มของสัตว์ที่มีค่าการทำงานของเอนไซม์ในซีรั่มต่ำ

ปัญหาที่อาจเกิดขึ้นเมื่อสัตว์ที่มีค่าเอนไซม์ในซีรั่มต่ำสัมผัสกับสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตหรือคาร์บาเมตก็คือ การวัดค่าการทำงานของเอนไซม์จะทำได้ยาก และแปลผลได้ยากกว่าสัตว์ที่มีค่าเอนไซม์ในซีรั่มสูง เนื่องจากบางครั้งสารกำจัดแมลงอาจกดการทำงานของเอนไซม์จนวัดค่าได้ต่ำมากหรือวัดไม่ได้เลย ดังนั้นการมีค่า baseline ของสัตว์แต่ละชนิดจึงจำเป็นสำหรับแต่ละห้องปฏิบัติการ เพื่อทำการตรวจสอบเมื่อสัตว์เกิดความเป็นพิษจากสารกำจัดแมลงกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตและคาร์บาเมต ขณะที่สัตว์ยังมีชีวิตอยู่ (biomonitoring) (Halbrook et al., 1992)

ประเทศไทยในปัจจุบันมีการใช้สารกำจัดแมลงอย่างมากมายเพื่อเพิ่มผลผลิตทางการเกษตร การปนเปื้อนของสารเหล่านี้ในดิน น้ำ และสิ่งแวดล้อมเป็นสิ่งที่หลีกเลี่ยงไม่ได้ ดังนั้นการทราบค่าว่าๆ ถึงระดับของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสัตว์ต่าง ๆ จึงยังเป็นสิ่งจำเป็นเพื่อเป็นแนวทางประกอบการวินิจฉัยโรคเมื่อเกิดปัญหา

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ คุณภัทรา หาญจริยากูล ที่ช่วยในการวิเคราะห์ทางห้องปฏิบัติการ และคุณอรนุช ศรีมณฑก ที่ช่วยในการพิมพ์ต้นฉบับ

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เอกสารอ้างอิง

วรา พานิชเกรียงไกร และดานิศ ทวีติยานนท์ 1994 (2537) ระดับของเอนไซม์โฆลีนโฆลีนเอสเทอเรส ในซีรั่มสัตว์ 10 ชนิด เวชชสารสัตวแพทย์ 24 (4)

Ellman, G.L., Courtney, K.D., Andres, V. and Featherstone, R.M. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. Biochem.Pharmacol. 7 : 88-95.

Halbrook, R.S, Shugart, L.R., Watson, A.P., Munro, N.B. and Linnabary, R.D. 1992. Characterizing biological variability in livestock blood cholinesterase activity for biomonitoring organophosphate nerve agent exposure J.A.V.M.A. 201(5) : 714-725.

Harlin, K.S. and Ross, P.F. 1990. Enzymatic spectrophotometric method for the determination of cholinesterase activity in whole blood : collaborative study. Assoc. Off. Anal. Chem. 73 : 616-621.

Khan, A.A., Coppock, R.W. Schuler, M.M., Lillie, L.E. 1990. Effects of dichlorvos on blood cholinesterase activities of cattle. Am. J. Vet. Res. 51 : 79-82.

Mosha, R.D. 1993. The toxicology of organophosphorus insecticides : a review. Vet. Bull. 63(11) : 1039-1050.

Munro, N.B., Shugart, L.R., Watson, A.P. and Halbrook R.S. 1991. Cholinesterase activity in domestic animals as a potential biomonitor for nerve agent and other organophosphate exposure. J.A.V.M.A. 199(1) : 103-115.

Osweiler, G.D., Carson, T.L., Buck, W.B. and Van Gelder, G.A. 1985. Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology. 3rd Ed. Kendall/Hunt Publishing Company, Dubuque, Iowa, U.S.A. pp. 298-317.

Panichkriangkrai, W. and Subhachalat, P. 1995. Concurrent studies of plasma and serum cholinesterase activity in six species of domestic animals. Abstracts (WVA Scientific Programme) XXV Congress of the World Veterinary Association. 3-9 September, 1995, Yokohama, Japan. P.264.

Plumlee, K.H, Richardson, E.R., Gardner, IA. and Galey, F.D. 1994. Effect of time and storage temperature on cholinesterase activity in blood from normal and organophosphorus insecticide treated horses. J. Vet. Diagn. Invest. 6 : 247-249.

Vorhaus, L.J. and Kark, R.M. 1953. Serum cholinesterase in health and disease. Am. J. Med. June. 707-719.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

STUDY OF CHOLINESTERASE ACTIVITY IN SERUM AND MUSCLE OF THE CATFISH

WARA PANICHKRIANGKRAI *

JIRASAK TANGTRONGPIROS **

SUMMARY

Cholinesterase activity in serum and muscle of the catfish was determined by colorimetric method. Cholinesterase activity was stable for up to 6 weeks after frozen at -10°C. Percent recovery was more than 96% in both tissues. Average enzyme activity from 120 fish was 0.8513±0.3109 umoles/min/ml in serum and 20.7812±4.7847 umoles/min/g tissue in muscle.

Keywords : cholinesterase activity
serum
muscle
catfish

* Department of Veterinary Pharmacology

** Department of Veterinary Medicine

Faculty of Veterinary Sciences, Chulalongkorn University,

Henri-Dunant Street, Bangkok 10330