บทที่ 1

บทนำ

1.1 ชีวเคมีและนิติเวชศาสตร์

นิติเวชศาสตร์ เป็นวิชาซึ่งแต่เดิมจัดเป็นแขนงหนึ่งของแพทยศาสตร์ที่เกี่ยวข้องกับกฎหมาย (ถวัลย์ อาศนะเสน, 1979) ซึ่งหมายความถึง ในเรื่องคดีความต่าง ๆ ถ้าเกิดปัญหาซึ่งทางกฎหมายต้องการความเห็น การยืนยันตามหลักวิชาการแพทย์สำหรับเป็นเครื่องช่วยในการวินิจฉัยหรือคลี่คลายปัญหาทางคดี ตัวอย่างของการใช้นิติเวชศาสตร์ในคดีอาญามีอยู่อย่างกว้างขวาง เช่น การให้ความเห็นในเรื่องบาดแผลว่าเกิดจากอาวุธใด เกิดจากผู้อื่นกระทำหรือไม่ ใช้ช่วยนำไปวินิจฉัยหรือคลี่คลายในเรื่องที่เกี่ยวกับความผิดทางเพศ หรือปัญหาที่เกิดจากการอ้างสิทธิ์ของการเป็นพ่อ-แม่-ลูก

ปัจจุบันเมื่อเทคนิคทางชีวเคมีเป็นที่นิยมใช้กันอย่างแพร่หลายในงานทางชีวภาพทั่วไป โดยเฉพาะทางด้านเทคนิคการแพทย์ จึงมีผู้พัฒนาเทคนิคนี้ให้ใช้ในงานด้านนิติเวชศาสตร์ด้วย

สำหรับการพิสูจน์บุคคลในงานนิติเวชศาสตร์นั้น นอกจากหลักฐานทางสรีระ ตลอดจนถึงพิมพ์ลายนิ้วมือแล้ว กล่าวได้ว่า วัตถุพยานทางชีววิทยาเป็นวัตถุพยานอีกประเภทหนึ่งที่สามารถให้ข้อมูลในงานพิสูจน์บุคคลได้มาก (สุกัญญา สุนทรส, 2530) วัตถุพยานเหล่านี้ได้แก่ โลหิต เส้นผม และของเหลวทางสรีระอื่น ๆ ในเชิงชีวเคมีตัวบ่งชี้ที่สำคัญในวัตถุพยานเหล่านี้คือ โปรตีนและเอนไซม์ โดยเฉพาะไอโซไซม์หรือไอโซเอนไซม์ (isozymes or isoenzymes)

1.2 ไอโซไซม์ (Isozymes) และโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ (Polymorphic enzymes)

ตามบัญญัติของ IUPAC - IUB เรื่อง The Commission on Biological Nomenclature (IUPAC-IUB, 1977) ไอโซเอนไซม์ (Isoenzymes) หมายความถึง รูปแบบโมเลกุลที่แตกต่างกันของเอนไซม์หนึ่ง ๆ (ภายใน species หนึ่ง ๆ) ซึ่งเป็นผลจากยีนโครงสร้างมากกว่าหนึ่ง (multiple structural gene) ในที่นี้ multiple gene อาจหมายถึง multiple gene loci หรือ multiple alleles ด้วย (Moss, 1982) ยิ่งกว่านั้นไอโซไซม์ยังรวมความถึงรูปแบบต่าง ๆ กันของเอนไซม์ที่เกิดจากการรวมตัว (association) ของโปรตีนหน่วยย่อยซึ่งเกิดจากยีนโครงสร้างที่แตกต่างกันด้วย นั่นคือไอโซเอนไซม์อาจเกิดจากสาเหตุต่อไปนี้ (Moss, 1982)

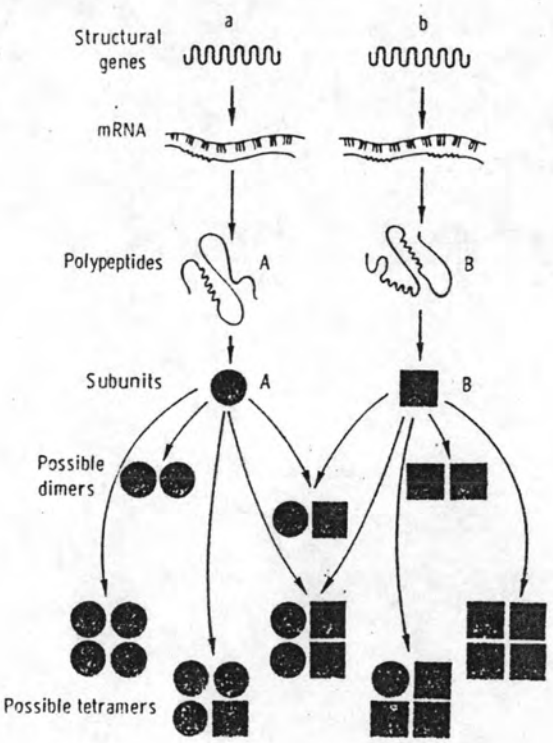
1.2.1 ไอโซเอนไซม์ที่เกิดจากหลาย gene loci (multiple gene loci) เช่น ไอโซเอนไซม์ของ lactate dehydrogenase, aldolase ซึ่งเกิดจากยีน 3 loci และไอโซเอนไซม์ที่เกิดจาก 2 loci ได้แก่ creatine kinase

Multiple gene loci ที่กำหนดส่วนของโครงสร้างในเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ที่คล้ายกันเป็นผลมาจากการจำลอง (duplication) ของยีนในระหว่างที่มีวิวัฒนาการ แล้วเกิดมิวเตชันของ loci ที่ duplicate ขึ้นนั้น หรือยีนเกิดการแยกกันในตอนเริ่มต้นแล้วมารวมกันเมื่อเกิดมิวเตชันหลาย ๆ ครั้ง อย่างต่อเนื่องกันเป็นผลให้เอนไซม์เหล่านี้มีหน้าที่ในการเร่งปฏิกิริยาที่คล้าย ๆ กัน

1.2.2 ไอโซเอนไซม์ที่เกิดจากหลาย alleles (multiple alleles) พบว่ามีเอนไซม์ จำนวนมากที่มีรูปแบบโมเลกุลมากกว่าหนึ่ง (multiple molecular forms) ซึ่งเกิดจากการเปลี่ยนแปลงใน genes หรือ alleles ที่ตำแหน่งบนโครโมโซม (chromosomal loci) ดังนั้น ไอโซเอนไซม์ที่เกิดจาก allelic genes จึงเรียกอีกอย่างหนึ่งว่า "allelozymes" หรือ "allozymes" และจากการศึกษาการถ่ายทอดทางกรรมพันธุ์พบว่า รูปแบบของไอโซเอนไซม์เหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานได้เป็นไปตามกฎของเมนเดล (Mendelian laws) พบว่าในกลุ่มประชากรหนึ่งๆ allozymes อาจมีหลายรูปแบบจึงเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ (polymorphic enzymes) ซึ่งได้แก่ เอนไซม์ที่มีลักษณะโมเลกุลหลายรูปแบบ และแตกต่างกัน

ไปในแต่ละบุคคล แต่มีหน้าที่ทางชีวเคมีอันเดียวกัน (สุกัญญา สุนทรส, 2530)

1.2.3 ไอโซเอนไซม์ที่เป็น hybrid isoenzymes เป็นไอโซเอนไซม์ที่เกิดจากการรวมตัว (association) ของโปรตีนหน่วยย่อยที่เกิดจากยีนโครงสร้างที่แตกต่างกัน ซึ่งโปรตีนหน่วยย่อยที่ต่างกันนี้เกิดจาก gene loci ที่ต่างกันหรือเกิดจาก allelic genes ที่ locus เดียวกัน ดังรูปที่ 1



รูปที่ 1 กำเนิดของไอโซเอนไซม์ ที่เกิดจากการรวมตัว (association) ของโปรตีนหน่วยย่อย (A, B) ที่เกิดจากยีนโครงสร้างที่แตกต่างกัน (a, b) (Moss, 1982)

จำนวนชนิดของ hybrid isoenzymes ที่เกิดจากการรวมตัวของ protomers ที่ไม่เหมือนกันนี้ ขึ้นอยู่กับจำนวนของโปรตีนหน่วยย่อยในโมเลกุลของเอนไซม์ที่สมบูรณ์ถ้าให้จำนวนของโปรตีนหน่วยย่อยที่แตกต่างกันเป็น s และโมเลกุลของไอโซเอนไซม์ที่เกิดจากการรวมตัวของโปรตีนหน่วยย่อยจำนวนเท่ากับ n ดังนั้นจำนวนของไอโซเอนไซม์ที่แตกต่างกันเท่ากับ (s+n-1) /n (s-1) จากการที่รูปแบบของไอโซเอนไซม์เหล่านี้สามารถถ่ายทอดไปยังลูกหลานตามกฎของเมนเดล ดังนั้นการวิเคราะห์รูปแบบของโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์เหล่านี้จึงสามารถใช้เป็นพยานในงานพิสูจน์หลักฐานในคดีต่าง ๆ เพื่อยืนยันตัวผู้กระทำผิด (Murch & Budowle, 1986) หรือในการตรวจพิสูจน์ พ่อ-แม่-ลูก (paternity testing) ดังนั้นนักนิติเวชวิทยาทางเซโรโลยี (Forensic serologists) จึงมีความสนใจที่จะพัฒนาวิธีวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคโปรตีนและเอนไซม์จากของเหลวในร่างกาย

1.3 อิเล็กโทรโฟริซิส (Electrophoresis) และไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Isoelectric focusing)

เมื่อประมาณ 20 ปีที่ผ่านมา ได้มีผู้เริ่มนำเอา อิเล็กโทรโฟริซิส (Electrophoresis) ซึ่งเป็นเทคนิคทางชีวเคมีมาใช้ในการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิกเอนไซม์เหล่านี้ (Murch & Budowle, 1986) และกลายเป็นที่นิยมกันในห้องปฏิบัติการและเป็นที่ยอมรับในทางนิติเวชศาสตร์ในประเทศที่พัฒนาแล้วทั่วโลก ปัจจุบันเทคนิคทางอิเล็กโทรโฟริซิสได้มีการพัฒนาขึ้นอย่างรวดเร็ว ทั้งในแง่ที่ให้ความสะดวก รวดเร็ว (rapidity) ให้ความไวสูงขึ้น (sensitivity) ให้ความเชื่อมั่นสูง (reproducibility) ค่าใช้จ่ายต่ำ (economic) และให้ข้อมูลมากที่สุดจากสารตัวอย่างปริมาณน้อยมาก การใช้เทคนิคนี้ทางนิติเวชศาสตร์สำหรับประเทศไทยจึงควรได้รับการพัฒนาขึ้นด้วย

อิเล็กโทรโฟริซิส (Murch & Budowle, 1986) เป็นการแยกสารที่มีประจุในสนามไฟฟ้า โดยอาศัยหลักที่ว่าสารจะเคลื่อนที่ไปยังขั้วที่มีประจุตรงกันข้ามกับประจุของสารนั้น ซึ่งขึ้นอยู่กับขนาดประจุของสารและความเป็นกรด-ด่างของสิ่งแวดล้อมขณะนั้น รวมทั้งรูปร่างและขนาดโมเลกุลของสารนั้น ๆ ด้วย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตัวค้ำจุน (stabilizing media) ที่ใช้ในงานอิเล็กโทรโฟริซิส มีหลายชนิด เช่น แป้ง (starch), เซลลูโลสอะซิเตต (cellulose acetate), อะกาโรส (agarose), โพลีอะคริลาไมด์ (polyacrylamide) เป็นต้น ตัวค้ำจุนแต่ละชนิดมีความเหมาะสมต่อการวิเคราะห์โปรตีนและเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน และในการเลือกตัวค้ำจุนสำหรับเอนไซม์ที่จะใช้ในด้านการพิสูจน์ยังต้องคำนึงถึงปัจจัยอื่นอีกหลายอย่าง (Grunbaum, 1981) เช่น การแพร่ของสารตัวอย่าง (diffusion), ความสามารถในการแยก (resolution), ความไว (sensitivity) ความยากง่ายในการเตรียมเจล, เวลาที่ใช้ในการวิเคราะห์และปริมาณสารตัวอย่าง ดังนั้น การเลือกตัวค้ำจุนที่เหมาะสมจึงเป็นความจำเป็นอย่างยิ่งในการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคโปรตีน และเอนไซม์

ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง (Isoelectric focusing, IEF) เป็นเทคนิคการแยกโปรตีนและเอนไซม์อีกวิธีหนึ่งที่พัฒนาขึ้นเมื่อไม่นานนี้ (Murch & Budowle, 1986) มีความไวสูง อำนาจการจำแนกสูง และสามารถทำได้ในเวลาอันสั้น ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงต่างจากอิเล็กโทร-โฟริซิสแบบดั้งเดิม โดยที่ตัวค้ำจุนของระบบจะมี pH อยู่ในช่วงหนึ่ง ๆ และการจัดตัวของ pH บนตัวค้ำจุนมีลักษณะเป็น gradient แต่อิเล็กโทรโฟริซิสแบบเดิมนั้น บนตัวค้ำจุนที่ใช้แยกโปรตีนจะมี pH ที่คงที่ ดังนั้น ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงจึงสามารถจำแนกโปรตีน และเอนไซม์ต่าง ๆ ออกจากกันโดยอาศัยความแตกต่างในค่า isoelectric point (pI) ของโปรตีนและเอนไซม์แต่ละชนิด ซึ่งเป็นหลักการที่ต่างจากการจำแนกด้วยระบบอิเล็กโทรโฟริซิสแบบเดิม โดยที่ในระหว่างการทำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง โปรตีนจะเคลื่อนที่ไปในแผ่นเจล ไปยังบริเวณที่มี pH เท่ากับ pI ของโปรตีนนั้น

การจัดตัวแบบ gradient ของ pH ในไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เกิดจากการเติมสารสังเคราะห์ที่เรียกว่าแคร์เออร์ แอมโฟไลท์ (carrier ampholytes) (Svensson, 1961) แอมโฟไลท์เป็น polyamino-polycarboxylic acids ที่มีคุณสมบัติเหมือนโปรตีน โดยสารเหล่านี้จะมีประจุบวกหรือลบเมื่ออยู่ในสิ่งแวดล้อมที่มี pH ต่ำหรือสูงกว่า pI ของตัวเอง ตามลำดับ แอมโฟไลท์นี้จะไม่รบกวนต่อการเคลื่อนที่ และความสามารถในการเร่งปฏิกิริยาของเอนไซม์ในสนามไฟฟ้า

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

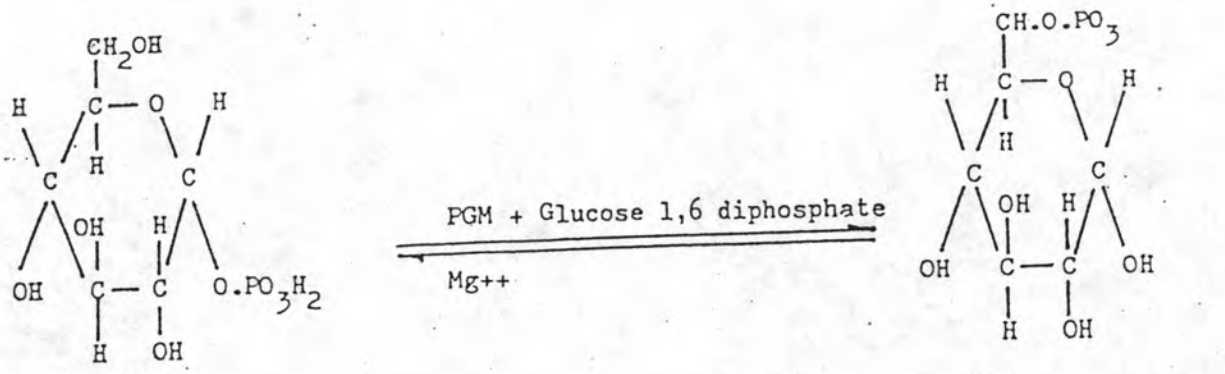
ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงเองก็ได้รับการพัฒนาขึ้นไปอีก ภายในช่วงเวลาไม่นานมานี้ เช่น ลดความหนาของเจลลงจากเดิม 1-2 มม. เป็น 0.40 มม. (ultra thin layer gels) ทำให้อัตราส่วนของพื้นที่ผิวต่อปริมาตรมากกว่าเจลหนา จึงมีประสิทธิภาพของการกระจายความร้อนที่ดีกว่า (Rodola, 1980) สามารถใช้ได้กับศักดาไฟฟ้าที่สูงขึ้น ช่วยลดเวลาในการทำงาน และยังลดค่าใช้จ่ายอีกด้วย

ระบบอิเล็กโทรโฟริซิสและไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง แต่ละระบบล้วนมีความเหมาะสมกับการวิเคราะห์โพลิมอร์ฟิคเอนไซม์แต่ละชนิดต่างกัน ขึ้นกับความแตกต่างของไอโซไซม์ในโพลิมอร์ฟิคเอนไซม์นั้น ในงานทางนิติเวชศาสตร์ของประเทศไทย มีปัจจัยที่ต้องนำเข้ามาประกอบในการพิจารณาหลายอย่าง นอกเหนือจาก resolution ของระบบ ได้แก่ ความง่าย และค่าใช้จ่ายของระบบจำแนก เช่น เจลขนาดเล็กที่แยกใน Vertical midget chamber อาจให้ resolution ต่ำกว่า gel ขนาดใหญ่ที่แยกด้วย Horizontal chamber แต่มีราคาถูก ไม่ต้องใช้ระบบทำความเย็น ใช้สารเคมีและในทางปฏิบัติอาจไม่ต้องใช้ผู้เชี่ยวชาญเฉพาะทาง การประเมินเครื่องมือดังกล่าว จึงจะมีประโยชน์มากสำหรับงานนี้

1.4 ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Phosphoglucomutase, PGM)

เอนไซม์ที่มีศักยภาพสูงในงานนิติเวชศาสตร์ชนิดหนึ่ง และนิยมใช้ในห้องปฏิบัติการทางนิติเวชศาสตร์ในต่างประเทศคือ ฟอสโฟกลูโคมิวเตส (Phosphoglucomutase, PGM, E.C. 2.7.5.1) ซึ่งเป็นโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ที่มีน้ำหนักโมเลกุลเท่ากับ 74,000 ดาลตัน (Paul และคณะ, 1962) สามารถเร่งปฏิกิริยาการย้ายอนุมูลฟอสเฟตในโมเลกุลของกลูโคส จากคาร์บอนตำแหน่งที่ 1 ไปยังคาร์บอนตำแหน่งที่ 6 (Harris, 1971) ดังสมการที่ 1 มีความสำคัญในขบวนการเมตาโบลิสมของคาร์โบไฮเดรท

ในมนุษย์พบเอนไซม์นี้ได้ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ เช่นเม็ดเลือดแดง (erythrocyte), เม็ดเลือดขาว (leucocyte), ตับ (liver), ไต (kidney), กล้ามเนื้อหัวใจ (heart muscle), สมอง (brain), ผิวหนัง (skin) และรก (placenta) (Alber และคณะ, 1968)



Glucose-1-phoshate

Glucose-6-phosphate

สมการที่ 1 ปฏิกิริยาที่คะตะไลซ์ด้วยฟอสโฟกลูโคมิวเตส (PGM)

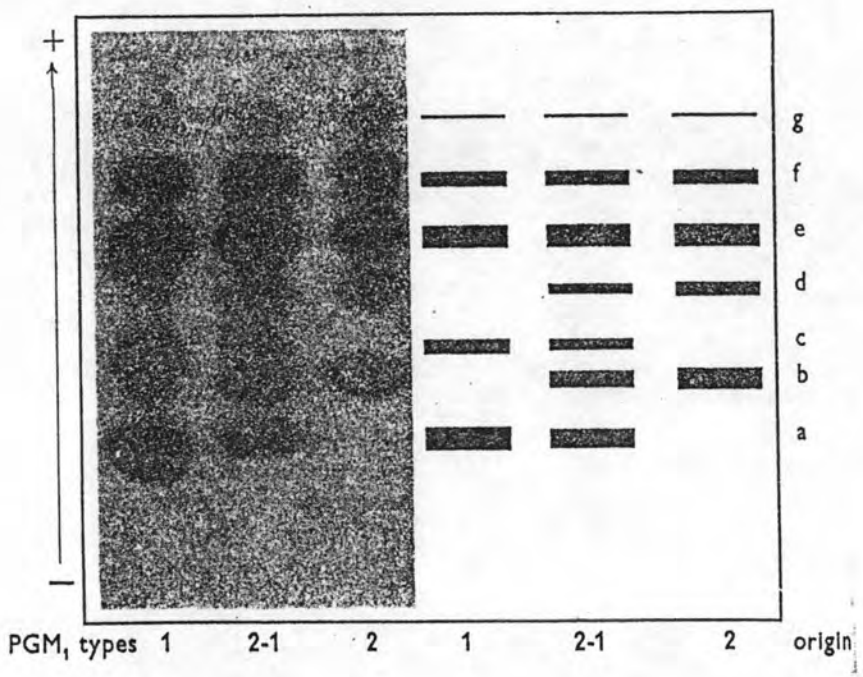
การสร้าง PGM ถูกควบคุมด้วย gene 3 loci คือ PGM_1, PGM_2 และ PGM_3 เฉพาะ PGM_1 เท่านั้นที่มีความเป็นโพลีมอร์ฟิสมสูงที่สุด จึงมีความสำคัญทางนิติเวชศาสตร์สูงกว่า loci อื่น ๆ (Paul และคณะ, 1962)

ในปี 1964 Spencer และคณะ (1964) เป็นนักวิทยาศาสตร์กลุ่มแรกที่ศึกษาและรายงานคุณสมบัติความเป็นโพลีมอร์ฟิสมของ PGM ในมนุษย์ ต่อมา Nguyen และคณะ (1971) ได้รายงานว่า PGM ทั้ง 3 loci คือ PGM_1, PGM_2 และ PGM_3 อยู่บนโครโมโซมเส้นที่ 1,4 และ 6 ตามลำดับ รายงานนี้ได้รับการยืนยันโดย Douglas และคณะ, 1973, Jongsma และคณะ, 1973 และ McAlpine และคณะ, 1975 ด้วย

ในเนื้อเยื่อส่วนใหญ่ของมนุษย์พบว่า 80-95% ของแอคติวิตี้ของPGM เป็นของ locus 1 (PGM_1) (Harris, & Hopkinson, 1976) ในขณะที่ในเม็ดเลือดแดงพบว่ามีแอคติวิตี้ของ PGM locus 2 (PGM_2) มากกว่า PGM locus 1 (PGM_1) แต่ไม่พบแอคติวิตี้ของ PGM locus 3 (PGM_3) ซึ่งจะพบในปริมาณสูงใน placenta เท่านั้น (Quick, 1974)

Spencer และคณะ (1964) เป็นคนแรกที่ศึกษาและรายงานคุณสมบัติความเป็น

โพลีมอร์ฟิสมของ PGM_1 โดยการใช้เทคนิคอิเล็กโทรโฟริซิสที่มีแป้งเป็นตัวค้ำจุน สามารถจำแนกรูปแบบของ PGM_1 ได้เป็น 3 รูปแบบ คือ $PGM_1 1$, $PGM_1 2$ และ $PGM_1 2\text{-}1$ โดยที่ PGM_1 จะพบไอโซไซม์ a และ c แต่ $PGM_1 2$ จะพบไอโซไซม์ b และ d และ $PGM_1 2\text{-}1$ จะพบทั้งสี่ไอโซไซม์ (Spencer, 1964) ดังรูปที่ 2 โดยที่รูปแบบทั้งสามนี้ ถูกกำหนดโดย 2 autosomal alleles คือ $PGM_1{}^1$ และ $PGM_1{}^2$ (Spencer 1964)



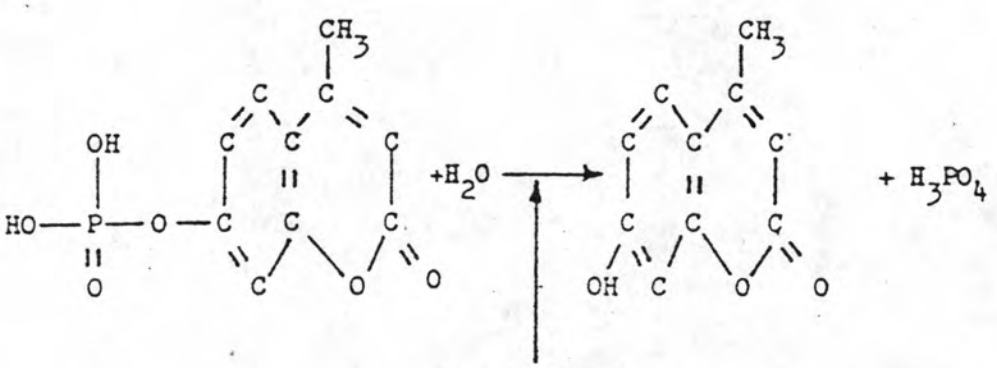
รูปที่ 2 ไดอะแกรมแสดงการจำแนก PGM_1 ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนแป้ง (Spencer และคณะ, 1964)

ในปี 1976 Bark และคณะ (1976) ได้ใช้ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงจำแนก PGM_1 ออกได้ถึง 10 รูปแบบ คือ 1+,1−, 1+1−, 2+,2−,2+2−, 1+2+, 1+2−, 1−2+ และ 1−2− และเสนอแนะว่า PGM_1 น่าจะถูกควบคุมด้วย Common alleles ถึง 4 ชุดด้วยกัน คือ $PGM_1{}^{1+}$, $PGM_1{}^{1-}$, $PGM_1{}^{2+}$, และ $PGM_1{}^{2-}$ ต่อมาก็ได้มีผู้อื่นทำการจำแนกรูปแบบของ PGM_1 โดยวิธีไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิง เช่น Kuhnl และคณะ (1977) ได้ทำการศึกษา และจำแนก

รูปแบบของ PGM_1 ใน leucolysates และ sperm extracts นอกจากนี้ Sutton และคณะ (1979) ยังใช้ไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงในการจำแนกรูปแบบของ PGM จากแหล่งอื่น ๆ เช่น รากผม, คราบเลือด และ อสุจิ อย่างไรก็ตามระบบไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงที่ใช้ในห้องปฏิบัติการต่าง ๆ ก็แตกต่างกันไป และผลการทดลองที่ได้ก็มีความชัดเจนแตกต่างกันด้วย

1.5 <u>แอซิดฟอสฟาเตส (Acid phosphatase, EAP)</u>

แอซิดฟอสฟาเตส (acid phosphatase, E.C. 3.1.3.2) เป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์ orthophosphate monoester ดังสมการที่ 2 (Harris, 1971) นอกจากนี้ยังสามารถเร่งปฏิกิริยาการเคลื่อนย้ายอนุมูลฟอสเฟต (phosphotransferase) ไปยังตัวรับเช่น glycerol, methanol ได้ด้วย เอนไซม์นี้จะทำงานได้ดีเมื่ออยู่ในสภาวะที่เป็นกรด



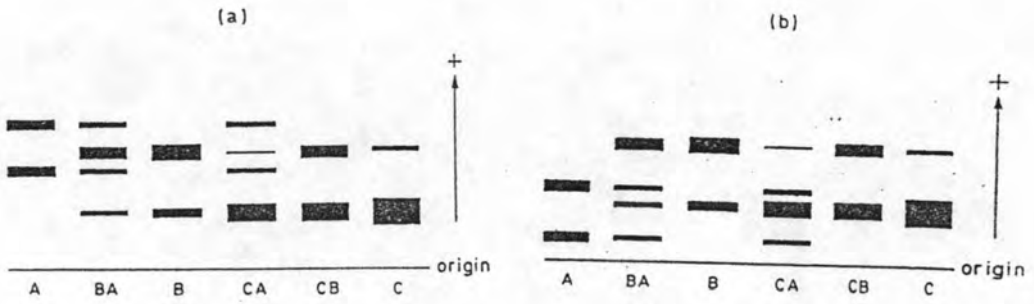
4-Methylumbelliferyl phosphate

4-Methylumbelliferone

<u>สมการที่ 2</u> ปฏิกิริยาที่คะตะไลซ์ด้วยแอซิดฟอสฟาเตส

ในมนุษย์แอซิดฟอสฟาเตสพบได้ในซีรั่ม (blood serum), ต่อมลูกหมาก (prostate gland), เม็ดเลือดแดง (erythrocyte) โดยที่แอซิดฟอสฟาเตสในต่อมลูกหมากจะต่างจากในเม็ดเลือดแดง (Eloise R. Giblett, 1969) ในแง่ของความจำเพาะต่อสับสเตรท คือ แอซิดฟอสฟาเตสในเม็ดเลือดแดงจะถูกยับยั้งโดย formalin แต่ไม่ถูกยับยั้งด้วย D(+) tartrate แอซิดฟอสฟาเตสที่แตกต่างกันนี้สังเคราะห์มาจาก genetic loci ที่แตกต่างกัน (Hans Ulrich Bergmeyer) แอซิดฟอสฟาเตสในเม็ดเลือดแดง (erythrocyte acid phosphatase, EAP) เป็นโพลิมอร์ฟิกเอนไซม์ จึงมีความสำคัญในงานด้านนิติเวชศาสตร์

ในปี 1963 Hopkinson และคณะ (Hopkinson, 1963) เป็นคนแรกที่ทำการศึกษาสมบัติความเป็นโพลีมอร์ฟิสมของ EAP โดยใช้ อิเล็กโทรโฟริซิสบนสตาร์ชเจล และพบว่า EAP มี 5 รูปแบบ (A,BA,B,CA,CB) การอ่านโพลีมอร์ฟิสมนี้ นอกจากใช้ตำแหน่ง (position) ของไอโซไซม์บนเจลแล้ว ยังต้องสังเกตุความเข้มของแถบไอโซไซม์ (intensity) ด้วย สมบัติความเป็นโพลีมอร์ฟิสมนี้ควบคุมโดย 3 codominant alleles (A,B,C) ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าเอนไซม์อาจมีถึง 6 รูปแบบ นอกจากสตาร์ชเจลแล้วมีผู้ใช้อะกาโรส (Sovensen, 1974) โพลีอะคริลาไมด์ (Hennig และคณะ, 1968), เซลลูโลสอะซิเตต (Grumbaum & Zajac, 1978) และเซลโลเจล (Cellogel) (Brinkmann & Bruns, 1979) เป็นตัวค้ำจุนในการวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิสมของ EAP โดยอิเล็กโทรโฟริซิสได้ด้วย การแพร่กระจาย (diffusion) ที่เกิดขึ้นบนตัวค้ำจุนเหล่านี้ทำให้ยากต่อการอ่านรูปแบบของ EAP โดยเฉพาะรูปแบบของ EAP ชนิด B,CB และ C ซึ่งรูปแบบทั้งสามจะต่างกันที่ความเข้มและตำแหน่งของไอโซไซม์



รูปที่ 3 ไดอะแกรมแสดงการจำแนก EAP ด้วยอิเล็กโทรโฟริซิสบนสตาร์ช (Hepkinson & Harris, 1969) (a) ใน citrate-phosphate buffer pH 6.0
(b) ใน phosphate buffer pH 6.0

จนกระทั่งปี 1977 ได้มีผู้เริ่มนำไอโซอิเล็กทริกโฟกัสซิงเข้ามาใช้ในการวิเคราะห์โพลี-มอร์ฟิสมของ EAP (Burdett & Whitehead, 1977, Budowle, 1984, Randall และคณะ, 1980) แต่ระบบการวิเคราะห์และผลของแต่ละห้องปฏิบัติการยังแตกต่างกันอยู่บ้าง

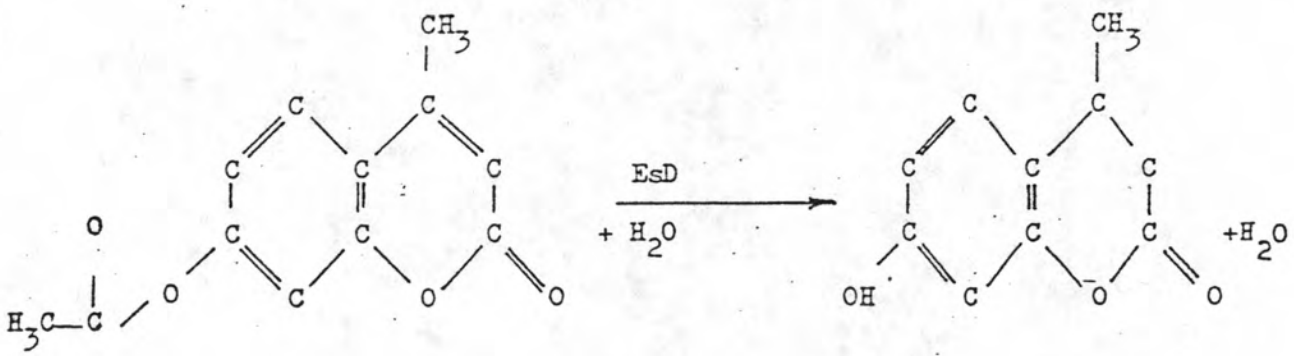
ในปี 1966 Scott (1966) ได้ทำการ purified แอซิดฟอสฟาเตสชนิด A และ B จากเม็ดเลือดแดงโดยวิธีตกตะกอนด้วยแอมโมเนียมซัลเฟต และใช้คอลัมน์โครมาโตกราฟฟีชนิด DEAE cellulose แล้วนำไปศึกษาคุณสมบัติของไอโซไซม์ทั้งสองชนิดพบว่ามีพื้นฐานทางโมเลกุลเหมือนกันเมื่อทำการทดสอบกับสับสเตรท กล่าวคือที่ pH 6.05 และอุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส แอคติวิตี้ของ EAP จะลดลงเมื่อทำการทดสอบกับ phenolphthalein diphosphate, p-nitrophenyl phosphate, riboflavin 5'-phosphate, phenyl phosphate โดยมีแอคติวิตี้จะยิ่งลดต่ำลงไปอีกเมื่อใช้ glycerophosphate, ribose -5-phosphate และ 3-phosphoglycerate เป็นสับสเตรทและตรวจไม่พบแอคติวิตี้เลยเมื่อใช้ adenosine

5'-phosphate, glycerophosphate, glucose-1-phosphate และ glucose-6-phosphate เป็นสับสเตรท

ทางด้านจลน์ศาสตร์ (kinetic) พบว่ามีความแตกต่างกันบ้างระหว่างไอโซไซม์ A และ B กล่าวคือ ไอโซไซม์ B จะถูกยับยั้งโดย ฟอสเฟตอนินทรีย์ (inorganic phosphate) น้อยกว่า ไอโซไซม์ A อีกทั้งยังพบว่าค่า Km ของเอนไซม์ทั้งสองต่างกัน

1.6 เอสเทอเรสดี (Esterase D, EsD)

เอสเทอเรสเป็นกลุ่มของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์เอสเทอร์ ดังสมการที่ 3



methylumbelliferyl acetate Methylumbelliferone

สมการที่ 3 ปฏิกิริยาที่คะตะไลซ์ด้วย Esterase D

โดยทั่วไปสามารถแบ่งเอสเทอเรส ออกเป็น 4 กลุ่ม ตามความจำเพาะต่อสับสเตรท คือ arylesterase หรือ esterase A, aliesterase หรือ esterase B, cholinesterase หรือ esterase C และกลุ่มสุดท้ายคือ esterase D หรืออาจเรียกได้ว่า non specific esterase ตรวจพบได้เฉพาะเมื่อใช้ fluorogenic substrate แต่ไม่พบเมื่อใช้ azo-dye couplic technique เช่น เอสเทอเรสกลุ่มอื่น หน้าที่ทางสรีระของเอนไซม์ชนิดนี้ยังไม่รู้ชัดเจนเพียงแต่พบว่าเอนไซม์นี้สามารถเร่งปฏิกิริยาการไฮโดรไลซ์กรดไขมันขนาดเล็ก เช่น อะซิเตต และบิวไทเรทได้ดี (Berg และคณะ, 1976) EsD เป็นเอนไซม์ชนิดเดียวเท่านั้นที่มีสมบัติเป็นโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ สามารถจำแนกรูปแบบ โดยอิเล็กโทรโฟริซิสได้ 3 รูปแบบ คือ 1, 2-1 และ 2 (Murch & Budowle, 1986) ซึ่งรูปแบบที่แตกต่างกันนี้ถูกควบคุมโดย 2 autosomal codominant alleles คือ EsD^{1} และ EsD^{2}

1.7 ความเสถียร (stability) ของเอนไซม์และอำนาจการจำแนก (Discriminating power, DP)

ถึงแม้ว่าการใช้โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ในงานพิสูจน์หลักฐานจะเป็นที่ยอมรับและใช้กันอย่างแพร่หลาย ปัจจัยที่เป็นตัวกำหนดศักยภาพของแต่ละเอนไซม์คือ ความเสถียร และ discriminating power ของมัน เช่น adenylate kinase และ peptidase สามารถให้ผลอ่านได้ชัดเจน แม้มีอายุในสภาพคราบโลหิตถึง 30 วัน ในขณะที่ glucose-6-phosphate dehydrogenase ไม่สามารถให้ผลอ่านได้แล้ว แม้อายุเพียง 15 วัน (วิโรจน์ ไวยวุฒิ, 1984) ดังนั้นเอนไซม์ที่มีความเสถียรสูง จะมีศักยภาพของการใช้เอนไซม์นั้นในการตรวจพิสูจน์สูงกว่า

Jones (Whitehead, 1985) ได้สร้างสมการการคำนวณค่าอำนาจการจำแนก หรือ discriminating power เพื่อระบุศักยภาพของแต่ละเอนไซม์ในงานตรวจพิสูจน์ได้ว่า

$$DP = 1 - \sum_{i=1}^{n} Pi^2$$

เมื่อ DP = อำนาจในการจำแนก (Discriminating power)

n = จำนวน phenotype ของเอนไซม์หนึ่ง ๆ

Pi = ความถี่ของการตรวจพบแต่ละ phenotype เอนไซม์นั้นในประชากรหนึ่ง

ดังกล่าวแล้วในเบื้องต้นว่าข้อมูลเหล่านี้จะใช้ในการระบุตัวผู้กระทำผิดในคดี แต่จะใช้ได้เพียงเป็นความเห็น การยืนยันตามหลักวิชาเท่านั้น ค่า DP จึงมีประโยชน์มากในการใช้ช่วยสนับสนุน เพื่อเพิ่มความเชื่อมั่นของผลการตรวจสอบ

จากสมการของ Jones จะเห็นได้ว่า Discriminating power (DP) นอกจากจะขึ้นกับจำนวน phenotype (n) ของเอนไซม์หนึ่ง ๆ แล้ว ยังขึ้นกับความถี่ของการตรวจพบแต่ละ phenotypes (phenotype frequency, Pi) ในประชากรหนึ่ง ๆ ด้วย n เป็นตัวแปรที่นอกจากจะขึ้นกับโพลีมอร์ฟิสมของเอนไซม์เองแล้ว การจะให้จำนวน phenotype ได้มากหรือน้อยเพียงไร ยังขึ้นกับความสามารถของระบบอิเล็กโทรโฟริซิสที่ใช้อีกด้วย ดังนั้นการเลือกระบบอิเล็ก-โทรโฟเรซิสจึงมีความสำคัญอย่างยิ่ง

ในต่างประเทศ phenotype frequency ได้รับการศึกษาอย่างแพร่หลายด้วยสาเหตุหลัก 2 ประการ คือ ใช้ในการคำนวณ DP ดังกล่าวแล้วข้างต้นประการหนึ่ง และใช้ในการศึกษาพันธุกรรมของประชากร (population genetic) อีกประการหนึ่ง

1.8 ประชากรพันธุศาสตร์ (Population genetics)

Population คือ กลุ่มหรือสังคมของสิ่งมีชีวิตที่อยู่ในสายพันธุ์ (Species) เดียวกัน มีความสัมพันธ์กัน และสามารถสืบพันธุ์ได้ (N. Pasteur และ Cr. Pasteur-, 1988)

Population genetics หมายถึง วิชาที่ว่าด้วยการกระจายของยีนในประชากร

และเหตุผลในการที่ความถี่ของยีน (gene frequency) ต่าง ๆ มีค่าคงที่หรือเปลี่ยนไป (วิจารณ์ พานิช และ สรรใจ แสงวิเชียร, 1981)

ในปี 1908, G.H. Hardy นักคณิตศาสตร์ชาวอังกฤษ และ W. Weinberg แพทย์ชาวเยอรมัน (George, 1971) เป็นผู้เสนอแนวคิดทางคณิตศาสตร์เพื่ออธิบายถึงความสมดุลย์ทางพันธุศาสตร์ (genetic equilibrium) กฎนี้คือ Hardy-Weinberg Law ซึ่งใช้เป็นหลักการพื้นฐานทางประชากรพันธุศาสตร์ (Population geneties) ซึ่งมีใจความว่า อัตราความถี่ของยีน (gene frequency) และความถี่ของ genotype (genotype frequency) จะคงที่ตลอดไปทุก generation ของประชากรที่มีจำนวนมาก (infinitely large population) ที่มีการแต่งงานแบบสุ่ม (random) และไม่มี selection, migration และ mutation ในภาวะการณ์ที่เหมาะสมดังกล่าว ถ้ายีน A และ B เป็น allele กัน และให้ gene frequency ของ A=p, B=q; p+q ย่อมเท่ากับ 1 และ genotype frequency AA, AB, BB ย่อมเท่ากับ p^2, 2pq, q^2 ตามลำดับตลอดไปทุก generation และ gene frequency p และ q ก็จะคงที่ตลอดไป และ $p^2+2pq+q^2=1$ เสมอ

1.9 <u>วัตถุประสงค์ของงานวิจัย</u>

เนื่องจาก PGM, EAP และ EsD เป็นเอนไซม์ที่น่าจะมีศักยภาพสูงในงานด้านนิติเวชศาสตร์ แต่เป็นที่น่าเสียดายว่า ในประเทศไทยมีผู้นำเอาเทคนิคทางชีวเคมีไปใช้ในงานด้านนี้น้อยมาก โครงการวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ดังนี้

1. หาวิธีการทางอิเล็กโทรโฟริซิสที่เหมาะสมที่สุด เพื่อวิเคราะห์โพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ทั้งสาม ในแง่การตรวจพิสูจน์บุคคลจากโลหิต (blood individualization) ในงานนิติเวชศาสตร์

2. ศึกษาศักยภาพของโพลีมอร์ฟิคเอนไซม์ทั้งสามชนิด ในงานนิติเวชศาสตร์สำหรับประเทศไทย

2.1 ศึกษารูปแบบการกระจายของเอนไซม์ในประชากรไทยจำนวน 250 ตัวอย่าง เพื่อนำไปคำนวณหาอำนาจในการจำแนก (discriminating power)

019202

2.2 ศึกษาความเสถียรของเอนไซม์ในสภาวะแวดล้อมที่จะยังคงเป็นตัวบ่งชี้ได้

3. นอกเหนือจากวัตถุประสงค์ในเชิงนิติเวชศาสตร์แล้ว ยังจะนำข้อมูลที่ได้ในข้อ 2.1 ไปวิเคราะห์หา gene frequency เพื่อเป็นข้อมูลพื้นฐานทาง population genetics ของประเทศไทยด้วย