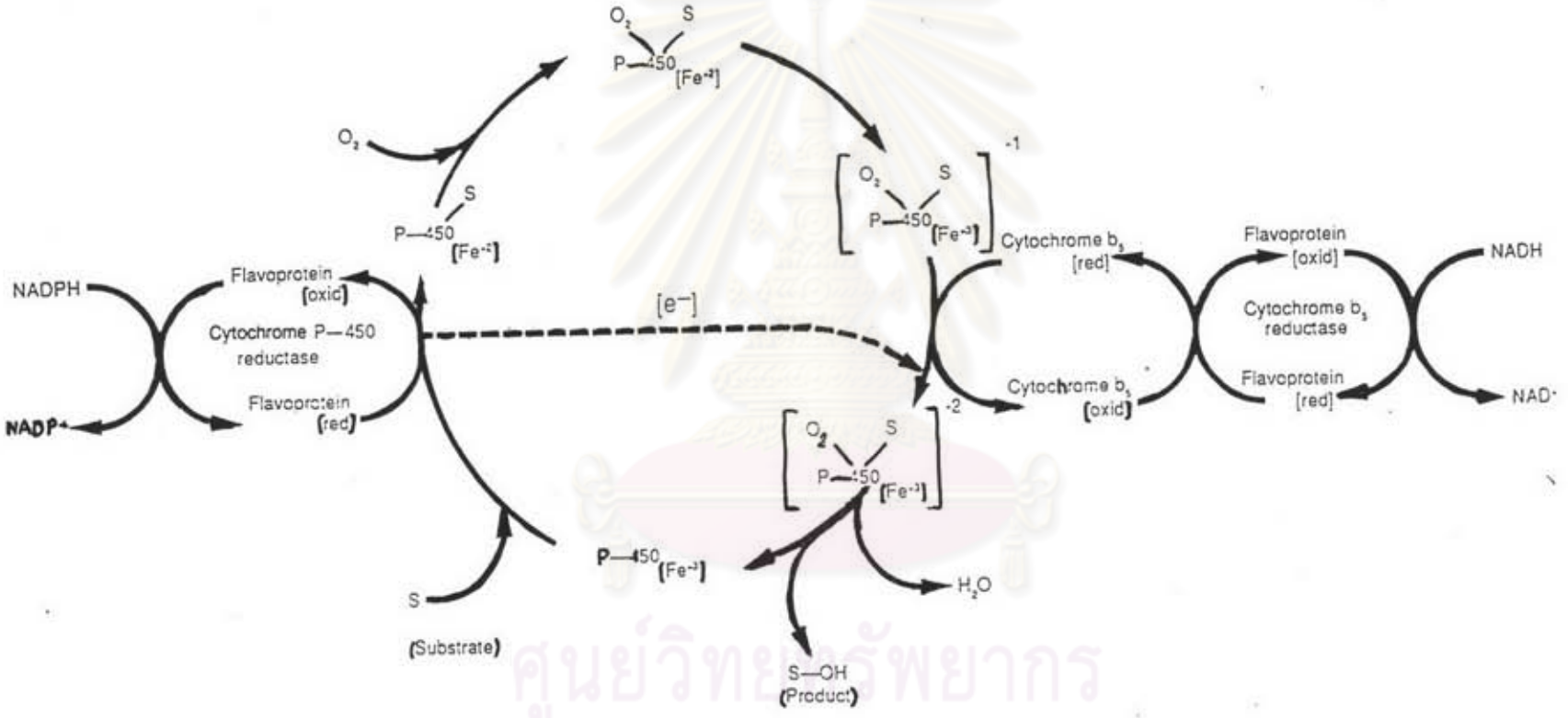
บทที่ 1

บทนำ

คนและสัตว์ได้รับการสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมที่ปนเปื้อนสารพิษเข้าสู่ร่างกายเป็นประจำทั้งจากอาหาร อากาศ และน้ำ ร่างกายของสิ่งมีชีวิตทั่วไปโดยเฉพาะอย่างยิ่งสิ่งมีชีวิตชั้นสูง มีกระบวนการป้องกันความเป็นพิษจากสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นโดยการเปลี่ยนแปลงสารเคมีภายในร่างกาย (biotransformation) ในกรณีที่สารพิษเป็นสารกลุ่มที่ละลายน้ำได้ดีนั่นคือเป็นสารที่มีการแสดงขั้วประจุไฟฟ้าสูงมีการดูดซึมกลับน้อย การขับถ่ายออกจากร่างกายเกิดขึ้นได้อย่างรวดเร็ว และในทางตรงกันข้ามถ้าเป็นสารที่มีการแสดงขั้วไฟฟ้าต่ำการดูดซึมกลับมักเกิดได้ดีแต่การขับถ่ายออกจากร่างกายนั้นจะเกิดได้ยาก ดังนั้นร่างกายของสัตว์จึงต้องมีกระบวนการทำให้สารพิษที่อาจสะสมในร่างกายนั้นถูกเปลี่ยนแปลงไปเป็นสารที่มีประจุไฟฟ้าสูงขึ้น เป็นการเร่งให้เกิดการขับถ่ายสารนั้นออกจากร่างกายและลดการดูดซึมกลับ กระบวนการเปลี่ยนแปลงสารเคมีภายในร่างกายสิ่งมีชีวิตนี้เป็นการเปลี่ยนแปลงที่มีลักษณะของการใช้กระบวนการทางชีวเคมีที่มีเอ็นไซม์เป็นตัวเร่ง สามารถแบ่งเอ็นไซม์เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ เอ็นไซม์ในวัฏภาคที่1 และเอ็นไซม์ในวัฏภาคที่2 ลักษณะการทำงานในวัฏภาคที่1 คือการเติมหรือปรับเปลี่ยนส่วนสำคัญของโครงสร้างเคมี เอ็นไซม์ในกลุ่มนี้เป็นเอ็นไซม์ที่ทำหน้าที่เกี่ยวกับการออกซิเดชั่น รีดักชั่น ไฮโดรไลซิส การสร้างอนุพันธ์ในวัฏภาคที่1 ช่วยให้โมเลกุลของสารเคมีเหมาะสมกับการเปลี่ยนแปลงในวัฏภาคที่2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการสังยุค (synthetic reaction)สารเคมีนั้นๆ โดยอาศัยสารสังยุคที่มีอยู่ในร่างกายของสิ่งมีชีวิต

เอ็นไซม์ที่รับผิดชอบในการเปลี่ยนแปลงสารเคมีที่แปลกปลอมนั้นส่วนใหญ่เกิดขึ้นในตับ เนื่องจากตับเป็นอวัยวะแรกที่รับเลือดที่มีสารเคมีที่ดูดซึมมาจากทางเดินอาหารก่อนที่จะแพร่กระจายไปสู่ส่วนต่าง ๆ ของร่างกาย อย่างไรก็ตามยังมีอวัยวะอีกหลายส่วนของร่างกายที่มีเอ็นไซม์ที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงสารเคมี เช่น ปอด ไต ต่อมอดรีนัล และอัณฑะ เอ็นไซม์ในวัฏภาคที่1ซึ่งเป็นด่านแรกที่สารเคมีต้องผ่านก่อนนั้นอยู่ในส่วนของเซลล์ที่เรียกว่าเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม (endoplasmic reticulum) ซึ่งเป็นผนัง 2 ชั้นที่ประกอบด้วยไขมันและโปรตีน ส่วนที่เป็นไขมันนั้นมีความจำเป็นอย่างมากเนื่องจากสารเคมีที่เป็นพิษส่วนใหญ่จะละลายได้ดีในไขมัน ส่วนนี้ช่วยให้สารเคมีแปลกปลอมซึมเข้าไปได้และเจอกับเอ็นไซม์ที่ช่วยทำลายสารพิษ (แก้ว กังสดาลอำไพ,2537)

การศึกษาเกี่ยวกับเอ็นไซม์ทำลายสารพิษโดยทั่วไปนิยมศึกษาในวัฏภาคที่ 1 ซึ่งเป็นกระบวนการเปลี่ยนแปลงสารพิษโดยที่เป็นทั้งทำลายและกระตุ้นสารพิษทั้งนี้ขึ้นกับชนิดและ



รูปที่1 แสดงวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450

(Bethizy and Hayes,1994)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปริมาณของสารพิษ โดยที่ระบบเอ็นไซม์ที่สำคัญที่สุดในวัฏภาคที่1 คือ ระบบโมโนออกซิจิเนส (monooxygenase) ที่มีไซโตโครมพี 450 เป็นองค์ประกอบ

จากวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450ในรูปที่1 แสดงให้เห็นว่า สับสเตรทที่มีรีดอกโพเทนเชียลต่ำจะรวมตัวกับไซโตโครมพี 450 (Fe^{+3}) มีการส่งผ่านอิเลกตรอนจาก NADH มาทางฟลาโวโปรตีน (ออกซิไดส์) โดยอาศัยเอ็นไซม์ไซโตโครมพี 450 รีดักเตส เปลี่ยนเหล็ก +3 ไปเป็น +2 จากนั้นสารที่รวมตัวกันนี้จะรับออกซิเจนอีก 1 โมเลกุลก่อนที่จะได้รับอิเลกตรอนจาก NADH ที่ส่งผ่านฟลาโวโปรตีนออกซิไดส์และไซโตโครมบี 5 ซึ่งอาศัยเอ็นไซม์ไซโตโครมบี 5 รีดักเตส จากนั้นอิเลกตรอนจะถูกถ่ายไปยังโมเลกุลออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนมีพลังงานสูงขึ้นและไม่เสถียร อะตอมหนึ่งของออกซิเจนถูกส่งเข้ายังโมเลกุลของสับเสตรทและอีกอะตอมหนึ่งของออกซิเจนรวมกับไฮโดรเจนเกิดเป็นน้ำ
(Bethizy and Hayes ,1994)

คุณสมบัติทั่วไปของไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450 (CYP) มีอยู่ทั่วไปในสิ่งมีชีวิตและเนื้อเยื่อทุกชนิด ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแบ่งออกเป็น 2 ระดับ ซึ่งขึ้นอยู่กับตำแหน่งที่เกาะอยู่ภายในเซลล์ ได้แก่ *ไมโครโซมัลไซโตโครมพี 450* ซึ่งจับกับเมมเบรนของเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม และ *ไมโตคอนเดรียไซโตโครมพี 450* ซึ่งจับกับด้านในเมมเบรนของไมโตคอนเดรีย ไซโตโครมพี 450ที่ไมโตคอนเดรียแตกต่างจากไซโตโครมพี450ที่ไมโครโซมคือ ใช้ iron sulfur protein adrenoxin และ ฟลาโวโปรตีน โดยมี NADPH-adrenoxin oxidoreductase เป็นเอ็นไซม์ที่ให้อิเลกตรอน ถึงแม้ว่าการเปลี่ยนแปลงสารพิษในสิ่งมีชีวิตด้วยไซโตโครมพี 450 เกิดขึ้นโดยการใส่อะตอมของออกซิเจนจากบรรยากาศเข้าไป 1 อะตอม ปฏิกิริยาที่แตกต่างกันออกไปนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสับสเตรทและสารเคมีที่สร้างขึ้นในระหว่างนั้น ปฏิกิริยาเหล่านี้ยังรวมถึง hydroxylation , epoxidation , deamination , sulphoxidation , dehalogenation และ reduction ในบางครั้ง

เป็นที่ทราบกันดีว่าไซโตโครมพี 450 ไม่ได้สร้างมาจากยีนเพียงยีนเดียว แต่เป็นยีนซุป-เปอร์แฟมิลี่ ซึ่งแต่ละยีนกำหนดเป็นไอโซฟอร์มที่แยกออกจากกันได้ การค้นหาว่ามีความหลากหลายของไซโตโครมพี 450 เกิดขึ้นจากความแตกต่างกันระหว่างชนิดที่กระบวนการเมตาบอลิสม (metabolism) และคุณสมบัติเหนี่ยวนำที่จำเพาะตลอดจนการยับยั้งเมตาบอลิสมของยาได้ด้วยสารเคมีที่จำเพาะเจาะจง เทคนิคที่ทันสมัยทางโครมาโตกราฟีช่วยทำให้มีการแยกไอโซฟอร์มของไซโตโครมพี 450 ออกมาได้ทั้งในคนและสัตว์ ในช่วง 10 ปีที่ผ่านมาได้มีการนำเทคนิค DNA recombination มาใช้ทำให้งานวิจัยด้านนี้กว้างขวางขึ้น

สนับสนุนถึงความหลากหลายของไซโตโครมพี 450 ตลอดจนบทบาทหน้าที่ต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิต เนื่องจากความหลากหลายของไซโตโครมพี 450 จึงมีการเรียกเพื่อง่ายต่อการเข้าใจ โดยมีการนำเลขโรมันมาเป็นตัวแทนยีนแฟมิลี่ (gene family) ใช้พยัญชนะตัวใหญ่แทนสับแฟมิลี่ (subfamily) และตัวเลขอาระบิกแทนยีนในสับแฟมิลี่ ในปัจจุบันยีนแฟมิลี่ของสัตว์ต่าง ๆได้จำแนกออกได้ดังสรุปไว้ในตารางที่1

ไซโตโครมพี 450 มีหน้าที่และบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารที่อยู่ภายในร่างกาย (endogenous substrate) อันได้แก่ สเตียรอยด์ กรดไขมัน ไอโคซานอยด์ (eicosanoids) เรทตินอยด์ (retinoids) รวมถึงสารไขมันอื่น ๆ ในร่างกาย และสารที่อยู่ภายนอกร่างกาย (exogenous substrate) เช่น ยารักษาโรค สารเคมีต่าง ๆ สารเคมีกำจัดศัตรูพืช ที่มาจากแหล่งต่าง ๆ เช่น โรงงานอุตสาหกรรม บ้านเรือน เรือกสวนไร่นา เนื่องจากสารที่ไซโตโครมพี 450 รับผิดชอบในการเปลี่ยนแปลงมีมากมาย ดังนั้นจึงมีการหาความเฉพาะเจาะจงของ ไซโตโครมพี 450 ในแต่ละไอโซฟอร์ม (isoform) ในการเปลี่ยนแปลงสารเหล่านั้น (Jachau,1990) จากการศึกษาพบว่ายีนแฟมิลี่ I,II,III และ IV ซึ่งเป็นไซโตโครมพี 450 ที่อยู่ทั้งภายในตับและนอกตับ นั้นจะเกี่ยวข้องกับการแปรสภาพของสารภายในร่างกายในวัฏภาคที่1 (phase1 biotransformation) ส่วนยีนแฟมิลี่ XI, XVII, XIX เป็นไซโตโครมพี 450 นอกตับ และ มีความเกี่ยวข้องกับการสังเคราะห์สเตียรอยด์ฮอร์โมนภายในร่างกาย พบว่าในสัตว์ต่าง ๆชนิดกัน เช่น สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แมลง สัตว์บก สัตว์น้ำ มีไอโซฟอร์มของไซโตโครมพี 450 ที่เฉพาะเจาะจงต่อสารที่มันเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันไป ในสัตว์ต่าง ๆ แล้วยังพบได้ใน พืช รา และ แบคทีเรีย (Gonzalez and Lee,1996) Jachau (1990) ได้สรุปชนิดและบทบาทของยีนแฟมิลี่ต่าง ๆ ของไซโตโครมพี 450 ตลอดจนไอโซฟอร์มของแต่ละยีนแฟมิลี่ที่ตรวจพบไว้ดังนี้ คือ

CYPI

เป็นยีนแฟมิลี่ที่มีอยู่ 1 สับแฟมิลี่ที่แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ CYPIA1 และ CYPIA2 ทั้ง 2 ชนิดนี้พบได้ในคน หนูขาว หนูถีบจักร และกระต่าย (Sipes and Gandolfi , 1986)

CYPII

CYPII เป็นแฟมิลี่ที่ใหญ่ที่สุดมีทั้งหมด 8 สับแฟมิลี่ คือ IIA IIB IIC IID IIE IIF IIG และ IIH ในสับแฟมิลี่ IIC มีถึง 16 ไอโซฟอร์ม CYPII นี้จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษจากสิ่งแวดล้อมที่เข้ามาสัมผัสกับร่างกาย เปรียบเสมือนอาวุธของพืชและสัตว์ที่ใช้ต่อสู้กับสารแปลกปลอม

CYPIII

ไอโซฟอร์มของมันมีหน้าที่โดยส่วนใหญ่ในการเปลี่ยนแปลงสเตียรอยด์โดยปฏิกิริยาออกซิเดชั่น ในเนื้อเยื่อมนุษย์มี CYPIIIA มาก รวมถึงตับของทารก มีการศึกษาพบว่า rifampicin เป็นตัวเหนี่ยวนำ CYPIIIA ที่มีประสิทธิภาพมากที่สุด

CYPIV

สามารถกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของ 2-aminofluorene , carbon tetrachloride 4-ipomeanol และ aflatoxin โดยพบว่าในสัตแฟมิลี่ CYPIVA มีหน้าที่ในปฏิกิริยา ω-oxidation ของ long - chain fatty acid เช่น laurate , palmitate และ arachidonate รวมถึง eicosanoid เช่น prostaglandins , prostacyclins , thromboxanes และ leukotrienes มีส่วนร่วมในการเปลี่ยนแปลง fatty acid โดยเฉพาะในช่วงที่ร่างกายอดอาหาร ภาวะเบาหวาน ภาวะคีโตซิส (ketosis) และภาวะขาดเอ็นไซม์ acyl CoA dehydrogenase นอกจากนี้มีส่วนร่วมในการเปลี่ยนแปลงอราชิโดเนท (arachidonate) ตามวิถีของ epoxygenase ทำให้เกิดการสร้าง active metabolite เช่น cis-epoxyeicosatrienoic acid (EETs) และ dehydroxy eicosatrienoic acid (DIHETEs) ซึ่งมีผลในการกระตุ้นปฏิกิริยาที่สัมพันธ์กันของเซลล์ต่าง ๆที่ ต่อมไร้ท่อ ไต ตา และ ต่อมคัดหลั่งนอกจากนี้ CYPIVAยังกระตุ้นการทำงานของเอ็นไซม์ที่สังเคราะห์ prostacyclin (PGI_2) และ thromboxane A_2 (TXA_2) จาก prostaglandin endoperoxide (PGH_2) CYPIVA1 สามารถถูกเหนี่ยวนำได้โดย ยาในกลุ่มที่ลดระดับไขมันในเลือด เช่น clofibrate

CYPVI

พบว่าไอโซฟอร์ม VIA1 แยกได้จากท้องของแมลงวันที่ถูกเหนี่ยวนำด้วย phenobarbital พบว่าแมลงที่มีความต้านทานต่อยาฆ่าแมลงสูงมีระดับ CYPVIA1 สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า CYPVIA มีบทบาทในแมลงคือสามารถเพิ่มการเปลี่ยนแปลงสารภายในร่างกายรวมถึงการสร้างฮอร์โมนและฟีโรโมน (pheromone) ไอโซฟอร์มต่าง ๆ ของ CYPVIA ในแมลงมีบทบาทมากทั้งการเปลี่ยนแปลงสารภายในและภายนอกร่างกายเช่น ยาฆ่าแมลง การเพิ่มขึ้นของ CYPVIA1 นั้นอาจอันเป็นผลทำให้แมลงเกิดการดื้อต่อยาฆ่าแมลงได้

CYPXI

มี 2 สับแฟมิลี่ คือ CYPXIA1 อีกชื่อหนึ่งคือ CYP11β และ CYPXIB1 อีกชื่อหนึ่งคือ CYPssc พบมากที่ผนังด้านในของไมโตคอนเดรีย (mitochondria) และพบน้อยที่เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ทำหน้าที่รับอิเลกตรอนจาก adrenodoxin ซึ่งเป็น non-heme iron protein มากกว่ารับจากฟลาโวโปรตีน (flavoprotein) โดยพบว่าในเนื้อเยื่อสัตว์มีกระดูกสันหลังมันมีหน้าที่ สังเคราะห์ฮอร์โมนสเตียรอยด์ และ การสังเคราะห์กลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoid) และ มินเนอร์โรคอติคอยด์ (minerocorticoid) โดยกระบวนการ hydroxylation ส่วน CYPXIB2 พบทั่วไปในอวัยวะที่สังเคราะห์สเตียรอยด์ เช่นที่ ลูกอัณฑะ รังไข่ เป็นต้น หน้าที่แรกคือ เปลี่ยนคอเรสเตอรอล (cholesterol) ไปเป็นเพรกเนโนโลน (pregnenolone) และควบคุมอัตราการเปลี่ยนคอเรสเตอรอลไปเป็นฮอร์โมนสเตียรอยด์

CYPXVII

ไอโซฟอร์มหนึ่ง คือ CYPXVIIA1 มีชื่อเรียกอีกชื่อว่า CYP17α-hydroxylation of steroid hormone มีหน้าที่สำคัญในการสังเคราะห์ ฮอร์โมนเพศ และ คอร์ติซอล (cortisol) มีการศึกษาหน้าที่สำคัญในการกระตุ้นปฏิกิริยาการเปลี่ยน 17α-hydroxypregnenolone และ 17α-hydroxyprogesterone ไปเป็น dehydro-epiandosterone และ androstenedione ตามลำดับ ส่วนในคนพบว่า CYPXVII สามารถกระตุ้นปฏิกิริยา 16α-hydroxylation ของ progesterone ได้ด้วย

CYPXIX

ไอโซฟอร์ม CYPXIXA1ของไก่และของคน มี cDNA ที่คล้ายกันมาก คือมักถูกอ้างเป็นเสมือน aromatase โดยพบในสัตว์มีกระดูกสันหลังทั่วไปไม่เพียงแต่พบในเนื้อเยื่อระบบสืบพันธุ์เพศเมียเท่านั้น แต่สามารถพบได้ในเนื้อเยื่ออัณฑะ เนื้อเยื่อไขมัน สมอง และผิวหนัง โดยไอโซฟอร์มนี้จะกระตุ้นปฏิกิริยา hydroxylation เปลี่ยนที่ C-19 ของสเตียรอยด์ ไปเป็นเอสโตรเจน

CYPXXI

ไอโซฟอร์มในแฟมิลี่นี้มีหน้าที่กระตุ้นปฏิกิริยา 21-hydroxylation ของ สเตียรอยด์ที่ C-21 ซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์กลูโคคอติคอยด์ และ ฮอร์โมนมินเนอโรคอร์ติคอยด์

การขาด CYPXXI ตั้งแต่กำเนิดอันเกิดเนื่องจากมีอาการ adrenal hyperplasia ทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบการเปลี่ยนแปลงสารในมนุษย์ CYPXXI ที่อยู่บริเวณ adrenal cortex มีความเฉพาะเจาะจงต่อปฏิกิริยา C21-hydroxylation ของ โปรเจสเตอโรน(progesterone) และ 17α—hydroxyprogesterone ซึ่งอยู่ในวิธีที่นำไปสู่การสังเคราะห์อัลโดสเตอโรน (aldosterone) และ คอร์ติซอล (cortisol)

CYPXXVI

ไอโซฟอร์มของแฟมิลี่นี้กระตุ้นปฏิกิริยา 26-hydroxylation ของ 5β-cholestane 3α , 7α,12α-triol ซึ่งเป็นขั้นแรกของปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (oxidation) ในปฏิกิริยาการสังเคราะห์กรดน้ำดี (bile acid) ไอโซฟอร์มนี้แยกได้จากไมโตคอนเดรีย ของตับกระต่าย มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงคอเรสเตอรอล และ มีผลต่อระดับคอเรสเตอรอล

CYPLI

อีกชื่อหนึ่งคือ CYP_{DM} และ $CYP14_{DM}$ ซึ่งได้จากตับของหนูขาวและจากเชื้อราบางชนิด เช่น *Saccharomyces cerevisiae* และ *Candida albican* โดยที่ CYPLI กระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชั่น และ ดีเมททิลเลชั่น ของ 24,25-dihydrolanosterol ไปเป็น 4,4-dimethyl-5α-cholesta-8 14-diene-3β-ol และกรดฟอร์มิก (Formic acid)

CYPLII

เป็นไอโซฟอร์มที่ถูกเหนี่ยวนำได้โดยอัลเคน (alkane) จึงมีชื่อเรียกอีกชื่อหนึ่งคือ CYPalk มีบทบาทกระตุ้นปฏิกิริยา (ω) hydroxylation ของอัลเคนและกรดไขมัน

CYPCI

เรียกอีกชื่อหนึ่งคือ CYPcam แยกได้จากแบคทีเรีย *(Pseudomonas putida)*

CYPCII

มีบทบาทในการกระตุ้นปฏิกิริยา hydroxylation ของ กรดไขมันที่มีสายยาวไปเป็น ω-1 , ω-2 , ω-3ของกรดไฮดรอกซี

ตารางที่1 ยีนแฟมิลี่ของไซโตโครมพี 450 ในสัตว์ต่าง ๆ

CYPยีนแฟมิลี่/ สับแฟมิลี่	สารหนี่ยวนำ	ปฏิกิริยาจำเพาะ	
IA	polycyclic aromatic hydrocarbons	benzo[a]pyrene hydroxylation	(a)
IA1	polycyclic aromatic hydrocarbon		(d)
IA2	smoking		(d)
IIA		steroid hydroxylation	(a)
IIA6			(d)
IIA7			(d)
IIB	phenobarbital	benzphetamine demethylation	(a)
IIB6		barbiturates	(d)
IIB7			
IIC		steroid hydroxylation	(a)
IIC1			(c)
IIC2			(c)
IIC4			(c)
IIC6			(b,c)
IIC8	barbiturates		(b,c)
IIC9	barbiturates		(b,c)
IIC10	barbiturates		(b,c)
IIC11			(b)
IIC16			(c)
IIC17			(d)
IIC18			(d)
IICI19			(d)
IIC_{MP-1}	barbiturates		(d)
IIC_{MP-2}		barbiturates	(d)
IID		debrisoquine hydroxylation	(a)
IID5			(b,e)
IID6	debrisoquine		(b,d)
IID7,IID8	(Psuedogenes,not expressed)		(d)
IIE	ethanol	ethanol oxidation	(a)
IIE1	ethanol		(b,d)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่1(ต่อ) ยีนแฟมิลี่ในสัตว์ต่าง ๆ

CYPยีนแฟมิลี่/	สารเหนี่ยวนำ	ปฏิกิริยาจำเพาะ	
IIF			(c)
IIF1			(b,d)
IIG			(c)
IIH	phenobarbital , alkyllisopropyl-		
	acetamide		(c)
IIIA	steroids	steroid hydroxylation	(a)
IIIA3			(d)
IIIA4		barbiturates	(d)
IIIA5			(d)
IIIA7			(d)
IVA	hypolipidemic agents	lauric acid hydroxylation	(a)
IVA9			(d)
IVB			(a,d)
IVB1			(d)
VIA(insect)	endogenous substrate	hormone and pheromone	
		biosynthesis	(c)
VII			(a,d)
VIIA1			(e)
XIA		cholesterol side chain clevage	(a,c)
XIA1			(c,d)
XIB		deoxycortisol 11β-hydroxylation	(c,d)
XIB1			(c,d)
XIIB2			(c,d)
XVII		pregnenolone 17α-hydroxylation	(d)
XVIIA(CYP17$_\alpha$)	sex steroid and cortisol	17α-hydroxylation of steroid	(c)
XIX		androgen conversion to estrogens	(a)
XIXA	C-19 steroids	estrogens hydroxylation	(c)
XXI		progesterone 21-hydroxylation	(a)
XXIA1(Pseudogene, not expressed)			(c,d)
XXIA2			(d)
XXVI	steroids	bile acid biosynthesis	(a)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่1 (ต่อ) ยีนแฟมิลี่ในสัตว์ต่าง ๆ

CYPยีนแฟมิลี่/ ซับแฟมิลี่	สารเหนี่ยวนำ	ปฏิกิริยาจำเพาะ	
LI(CYP_{DM})	estrogen and chlolesterol	demethylation	(c)
LII(CYP_{alk})	alkenes and fatty acid	(ω) hydroxylation	(c)
CI(CYP_{cam})			(c)
CIIA1($CYP_{BM\ 3}$)	saturated and unsaturated fatty acid	monooxygenation	(c)

a ; (Sipes and Gandolfi,1986) b ; (Gonzalez,1989) c ; (Jachau,1990)
d ; (Guemreich,1992) e ; (Gonzalez and Lee,1996)

ระบบไซโตโครมพี 450 ในปลา

ระบบไซโตโครมพี 450 โมโนออกซิจิเนสมีหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ รวมทั้งสารมลพิษในสิ่งแวดล้อมด้วย ในบรรดาสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำ นิยมศึกษาระบบไซโตโครมพี 450 ในปลามากที่สุด อัตราและปริมาณการเปลี่ยนแปลงสิ่งแปลกปลอมรวมทั้งสารมลพิษของปลาต่างชนิดกัน มีความหลากหลายอย่างมาก แม้ว่าจะเป็นปลาชนิดเดียวกันก็ตามก็ยังมีความแตกต่างกันในแต่ละตัว การเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ ในสิ่งมีชีวิตโดยมากจะเป็นการศึกษาในตับซึ่งมีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารเคมี และสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย สำหรับการศึกษาในปลา ซึ่งเป็นสัตว์มีกระดูกสันหลังชั้นต่ำ นอกจากตับแล้วยังศึกษาในอวัยวะอื่นที่พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ เพื่อขับถ่ายออกจากร่างกาย เช่น ไต ทางเดินอาหาร เหงือก เช่นเดียวกับสัตว์ชั้นสูงชนิดอื่น ๆ ที่ระบบไซโตโครมพี 450 เป็นระบบเอ็นไซม์ที่มีบทบาทในการเปลี่ยนแปลงสารเคมี และสิ่งแปลกปลอมในปลาด้วย อาศัยเทคนิคทางชีวโมเลกุล ทำให้มีการแยกไซโตโครมพี 450 แต่ละฟอร์มออกมา มีการเรียงลำดับโปรตีนโมเลกุล ตัวอย่างของไซโตโครมพี 450 ได้มีการศึกษาและเรียงลำดับโปรตีนโดยใช้คุณลักษณะของ cDNA คือ CYPIA1 ในปลาเทราท์ พบว่าลำดับกรดอะมิโน 57-59% คล้ายกับ CYPIA1 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม และเช่นเดียวกับ CYPIA1 ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมที่ CYPIA1ของปลาถูกเหนี่ยวนำได้โดย สารเคมีที่เป็นสิ่งแปลกปลอมต่อร่างกาย เช่น β - naphthoflavone (BNF)

polyaromatic hydrocarbon (PAH) และ polychlorinated biphenyls (PCBs) โปรตีนของไซโตโครมพี 450 ตัวอื่น ๆ ที่พบในปลาดังสรุปในตารางที่2 (Andersson and Forlin,1992)

ตารางที่2 โปรตีนของไซโตโครมพี 450ในปลาชนิดต่าง ๆ ที่แยกได้จากการทดลองเปรียบเทียบกับการได้รับสารกระตุ้น BNF (β naphthoflavone) และไม่ได้รับ (Andersson and Forlin,1992)

อวัยวะของปลาต่าง ๆ/การทดลอง	โปรตีนของไซโตโครมพี 450	สับสเตรท
ตับปลาเรนโบว์เทราท์/BNF	P450LM4b	ER , BP
	P4501A1	
	P450LM2	AFB1 , LA
ตับปลาเรนโบว์เทราท์/กลุ่มควบคุม	P450LMC1	LA
	P450LMC2	LA,AFB1, progesterone ,estradiol
	P450LMC5	progesterone , testosterone
ไตปลาเรนโบว์เทราท์/ตัวผู้เต็มวัย	P450KM2	
ตับปลาสคับ/กลุ่มควบคุม	P450A	EC,BP,testosterone,estradiol
	P450E	ER,EC,BP
	P4501A	
ตับปลาคอต/BNF	P450c	ER,BP
	P4501A	
ตับปลาเพิช/BNF	P450V	
	P4501A	

ER ; ethoxyresorufin BP ; benzo(a)pyrene AFB1 ; aflatoxinB1 LA ; lauric acid
EC ; ethoxycoumarin

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปัจจัยที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450

มีปัจจัยหลายประการที่มีผลต่อการทำงานของเอ็นไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450 ปัจจัยเหล่านี้ได้แก่

(ก) สิ่งแปลกปลอมและสารเคมีต่าง ๆ

มีสิ่งแปลกปลอมและสารเคมีมากมายที่มีผลเหนี่ยวนำระบบไซโตโครมพี 450 ได้ การเหนี่ยวนำของระบบไซโตโครมพี 450 โดยสารแปลกปลอมของร่างกาย เป็นคุณสมบัติพิเศษของระบบเอ็นไซม์นี้ ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม แบ่งสารเหนี่ยวนำระบบไซโตโครมพี 450 ออกเป็น 2 แบบ คือ PAH - type inducer และ phenobarbital (PB)- type inducer (Sipes and Gandolfi,1986) อย่างไรก็ตามมีสารหลายตัวที่กระตุ้นให้มีโปรตีนของไซโต-โครมพี 450 ที่จำเพาะเจาะจง ปัจจุบันตัวเหนี่ยวนำแบ่งออกตามแฟมิลี่ หรือสับแฟมิลี่ของไซโตโครมพี 450 ที่มันไปกระตุ้นดังตารางที่3 การเหนี่ยวนำโดยสิ่งแปลกปลอม หรือสารเคมีนั้นอาจเกิดขึ้นโดยการกระตุ้นอัตราการเพิ่มปริมาณ มีผลทำให้ระดับ mRNA และการสังเคราะห์โปรตีนของไซโตโครมพี 450 เพิ่มขึ้น แม้ว่าการศึกษาในอดีตถึงการเหนี่ยวนำสมรรถนะของเอ็นไซม์ในปลาจะยังคงไม่ชัดเจนนัก แต่ได้มีการศึกษาที่พบว่าสมรรถนะของเอ็นไซม์ในปลาหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับระบบ MFO ถูกเหนี่ยวนำให้สูงขึ้นภายหลังสัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมและสารเคมีเช่นเดียวกับสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม โดยที่เอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ CYPIA1 เป็นกลุ่มที่มีการศึกษามากที่สุด เอ็นไซม์เหล่านี้ได้แก่ ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD), arylhydrocarbon hydroxylase (AHH) และ 7- ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) (Andersson and Forlin,1992) Veld และคณะ (1988) ทำการศึกษาแบบภายในร่างกาย โดยให้ปลาได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของ PAH (polycyclic aromatic hydrocarbon) หลังจากนั้นนำตับปลามาผ่านการเตรียมไมโครโซม แล้วนำมาหาระดับไซโตโครมพี 450 EROD และ AHH ผลการศึกษาพบว่า ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของ PAH มีระดับของ EROD, AHH และไซโตโครมพี 450 สูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมหลายเท่า นอกจากนี้ในการศึกษาเดียวกัน ปลาที่ได้รับอาหารที่มีส่วนผสมของBP (benzo[a] pyrene) มีสมรรถนะของ EROD เพิ่มสูงขึ้น นอกจากการนำปลามาศึกษาแบบให้อาหารที่มีส่วนผสมของสารเคมีแล้ว ยังมีการศึกษาที่นำปลาที่อาศัยและหากินในแหล่งที่มีการปนเปื้อนสารเคมีมาทำการศึกษาหาระดับไซโตโครมพี 450 และหาสมรรถนะของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้อง Veld และคณะ (1991) ได้ทำการศึกษาในปลาทะเลจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนสารประกอบ PAH โดยทำการเก็บตัวอย่างปลาในที่ที่มีการปนเปื้อนมากและที่มีการปนเปื้อนน้อย ผลการศึกษาพบว่าปลาที่อาศัยในแหล่งที่มีการปนเปื้อนมาก มีระดับไซโตโครมพี 450 และ EROD ในตับและในทางเดินอาหารสูงกว่าปลาที่จับได้จากบริเวณที่มีการปนเปื้อนน้อยกว่า

ในปี 1991 Nasci และคณะ ได้ตรวจพบว่า ปลาในแหล่งน้ำธรรมชาติ มีโอกาสสัมผัสสารพิษมากมาย ซึ่งรวมถึง Aroclor 1254 (3,4,3,4-tetrachlorobiphenyl) ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดแมลงตัวหนึ่งอยู่ในกลุ่ม PCBs (polychlorinated biphenyls) ทำการศึกษาในปลาน้ำเค็ม โดยนำปลามาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนสารพิษอย่างต่ำๆ เมื่อให้ปลาสัมผัสกับสารพิษจนครบที่เวลาต่างๆ วันที่ 0 , 7, 14 และ 30 แล้วนำมาหาระดับไซโตโครมพี 450 และขนาดของตับ จากการศึกษาพบว่าขนาดของตับปลาโตขึ้น และระดับไซโตโครมพี 450 มีแนวโน้มสูงขึ้นด้วย นอกจากสารเคมีกำจัดแมลงแล้ว สารเคมีที่ได้จากอุตสาหกรรมปิโตรเลียมยังมีผลต่อระดับไซโตโครมพี450 เช่นกัน

ตารางที่3 การแบ่งไซโตโครมพี 450 ตามชนิดของสารเหนี่ยวนำและ สมรรถนะของเอ็นไซม์โมโนออกซิจิเนสที่เกี่ยวข้อง (Goksoyr and Forlin,1992)

ไซโตโครมพี 450 สับแฟมิลี่	สารเหนี่ยวนำ	สมรรถนะเอ็นไซม์
1A	Aromatic hydrocarbons, β-naphthoflavone, chlorinated dibenzo-*p*-dioxins และ dibenzofurans, (planar)PCBs	EROD , AHH , ECOD
2B	phenobarbital (non-planar)PCBs	PROD , EMND , APND , AE
3A	pregnenolone-16a-carbonitrile glucocorticoids	EMND , T6H
4A	clofibrate,phthalate esters 2,4,5,-T	FAH

EROD ; 7-ethoxyresorufin *O*-deethylase , AHH ; aryl hydrocarbon hydroxylase , ECOD ; 7-ethoxycoumarin *O*-deethylase , PROD ; pentoxyresorufin *O*-dealkylase , EMND ; ethylmorphine *N*-demethylase , APND ; aminopyrine *N*-demethylase , AE ; aldrin epoxidase , T6H ; testosterone 6β-hydroxylase , FAH ; fatty acid ω-hydroxylase

(ข) อายุ

โดยทั่วไปสัตว์แรกเกิดมีเอ็นไซม์ในระดับที่ต่ำกว่าสัตว์โตเต็มวัย และจะลดลงเรื่อย ๆ เมื่ออายุมากขึ้น สำหรับปลาแล้วพบว่าในระยะแรกของช่วงชีวิตเป็นช่วงที่ไวต่อสารพิษมากที่สุดซึ่งนำมาใช้ทดสอบสารก่อมะเร็งได้เป็นอย่างดี (Andersson and Forlin,1992) พบว่าตัวอ่อนของปลาเรนโบว์เทราท์สามารถเปลี่ยนสารพิษหลายชนิด เช่น อะฟลาทอกซินB และ dimethyl-nitrosamine โดยใช้เอ็นไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450 ได้สารออกฤทธิ์และจับกับ DNA ทำให้เกิดมะเร็งในตับ (Hendricks et al.,1980) ในช่วงแรกของการพัฒนาร่างกายของสัตว์โดยทั่วไปนี้ นับว่าเป็นช่วงสำคัญ เพราะเป็นช่วงที่มีการสร้างอวัยวะต่าง ๆ เช่นในระบบประสาท ระบบหัวใจและหลอดเลือด รวมถึงระบบสืบพันธุ์ ถ้าในช่วงนี้สัตว์ได้รับการสัมผัสกับสารพิษอันอาจผ่านมากับแม่หรือจากน้ำที่ล้อมรอบจะทำให้เกิดความผิดปกติขึ้นได้

จากการฉีดสารประกอบเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ในระบบ MFO เช่น สารประกอบ PCB เข้าไปจนครบ 2 สัปดาห์แก่ลูกปลา ผลการตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่าเซลล์ตับ , ไมโตคอนเดรีย , เอนโดพลาสมิกเรติคิวลัม ถูกทำลาย นอกจากนี้การฉีด PCB ในถุงไข่ปลาเรนโบว์เทราท์ มีผลทำให้เกิดการเหนี่ยวนำของระบบเอ็นไซม์ไซโตโครมพี 450 เมื่อปลาโตเต็มวัย (Norrgren,Andersson and Bjork,1993) Vigano และคณะ (1995) ได้ศึกษาตัวอ่อนที่ออกมาจากไข่เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ที่ได้รับการสัมผัสกับสารพิษ พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงสารพิษขึ้นในตัวอ่อนได้ โดยที่ตัวอ่อนปลาเรนโบว์เทราท์ซึ่งสัมผัสกับสารพิษจากตะกอนดินที่ก้นแหล่งน้ำ มีระดับเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษสูงกว่ากลุ่มตัวอ่อนที่ไม่ได้สัมผัสสารพิษ การศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า สมรรถนะเอ็นไซม์หลายตัวในระบบ MFO ที่พบว่ามีอยู่ในปลาเรนโบว์เทราท์ตั้งแต่ยังเป็นตัวอ่อน วัยอ่อน และ วัยโตเต็มวัย ถูกเหนี่ยวนำให้เพิ่มได้เมื่อสัมผัสกับตะกอนดินที่ปนเปื้อนสารพิษแม้ในช่วงเวลาสั้น ๆ

(ค) เพศ

การเปลี่ยนแปลงสารพิษต่าง ๆ มีความแตกต่างกันในสัตว์เพศผู้และเพศเมีย กล่าวคือในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนูขาวเพศผู้มีสมรรถนะของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษมากกว่าหนูขาวเพศเมีย ในขณะที่ระดับของโปรตีนหรือไซโตโครมพี 450ปกติในปลาเรนโบว์เทราท์ มีความแตกต่างของระดับไซโตโครมพี 450 และระดับของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษเนื่องจากเพศเช่นเดียวกัน โดยที่ในปลาเพศผู้มีระดับและระดับสมรรถนะเอ็นไซม์สูงกว่าปลาเพศเมีย (Stegman and Chevion,1980) การพัฒนาเซลล์สืบพันธุ์ที่มีความผิดปกติไป เนื่องจากสารพิษมีผลต่อวงจรหรือรอบการสืบพันธุ์ และการวางไข่ เช่น ในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสารประกอบดีบุก พบว่าสัตว์ประเภทหอยที่อาศัยในเขตนั้นมีความผิดปกติของระบบ

สืบพันธุ์ กล่าวคือ อวัยวะสืบพันธุ์ของเพศเมียจะมี penis ไม่มีการเปิดของท่อนำไข่ ไม่สามารถวางไข่และออกไข่ได้ (Evans,Leksono and Mckinnell,1995) จากการศึกษาในระบบไซโตโครมพี 450 และเอ็นไซม์ในแต่ละช่วงระยะการสืบพันธุ์ของปลาบรุคเทราท์และเรนโบว์เทราท์ในวัยเจริญพันธุ์ และก่อนวัยเจริญพันธุ์ โดยที่ปลาเพศเมียก่อนวัยเจริญพันธุ์มีอัตราส่วนของตับต่อน้ำหนักตัวมากกว่าเพศผู้ ในขณะที่เซลล์สืบพันธุ์มีอัตราส่วนต่อน้ำหนักตัวของเพศผู้และเพศเมียไม่ต่างกัน ในปลาบรุคเทราท์เพศผู้ และเพศเมียมีสมรรถนะของเอ็นไซม์ไม่แตกต่างกัน แต่ในปลาเรนโบว์เทราท์กลับตรงกันข้าม คือปลาเพศผู้มีสมรรถนะของเอ็นไซม์สูงกว่าปลาเพศเมีย (Stegman and Chevion,1980) นอกจากนี้ ไซโตโครมพี 450 ที่ไตของปลาเทราท์เพศผู้ยังสูงกว่าปลาเพศเมีย แต่สมรรถนะของเอ็นไซม์ alkoxycoumarin-o-dealkylase และสมรรถนะของEROD กลับต่ำกว่าเพศเมีย โดยทั่วไปแล้วการเปลี่ยนแปลงสารประเภท endogenous substrate โดยระบบไซโตโครมพี 450 ที่ไตในปลาเพศผู้จะสูงกว่าปลาเพศเมีย (Lorenzana,Hedstrom and Buhler,1988;Andersson and Forlin,1992)

ในช่วงการแพร่พันธุ์ของปลามีการเปลี่ยนแปลงระดับฮอร์โมนในเลือด โดยที่ฮอร์โมนนั้นมีผลต่อความแตกต่างของสมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ทั้งเพศผู้และเพศเมีย จากการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ ในช่วงการแพร่พันธุ์ปลาเพศผู้จะมีระดับของฮอร์โมนแอนโดรเจนเพิ่มสูงขึ้นในขณะเดียวกันที่สมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ที่ตับก็เพิ่มสูงขึ้นเช่นเดียวกัน แต่ในขณะที่ระดับฮอร์โมนเอสตราไดออล และเทสโทสเตอโรนในเลือดของปลาเพศเมียเพิ่มขึ้นในช่วงหลังของระยะการแพร่พันธุ์พบว่าสมรรถนะของไซโตโครมพี 450 กลับต่ำลง อาจเป็นไปได้ที่เอสตราไดออลมีผลยับยั้งระบบไซโตโครมพี 450 ที่ตับ ในการที่จะทราบปัจจัยที่ควบคุมไซโตโครมพี 450 ในระหว่างระยะการแพร่พันธุ์ จำเป็นต้องใช้เทคนิคพิเศษในการตรวจสอบ คือการใช้แอนติบอดีต่อไอโซไซม์ของไซโตโครมพี 450 นั้นๆ (Andersson and Forlin,1992) การเปลี่ยนแปลงและการพัฒนาของระบบสืบพันธุ์ ไม่เพียงแต่ส่งผลต่อรูปแบบของไซโตโครมพี-450 เท่านั้น ยังมีผลต่อการเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 โดยสารเคมี เช่น PAH , PCB โดยพบว่าเอสตราไดออลกดสมรรถนะของเอ็นไซม์ EROD และลดปริมาณของไซโตโครมพี-450 การทดลองในปลาเทราท์ก่อนวัยเจริญพันธุ์กลับพบว่า EROD ไม่ได้รับผลกระทบจากสารพิษเหล่านั้น มีความแตกต่างกันในปลาต่างชนิดกัน ดังเช่น ในปลาคิลฟิชที่ได้รับเอสตราไดออลมีสมรรถนะของERODลดลง อันเนื่องจากมีการลดระดับของปริมาณโปรตีนCYPIA นอกจากนี้ยังพบว่า ปลาในแหล่งที่มีการปนเปื้อนและมีระดับไซโตโครมพี 450สูง มีอัตราการปฏิสนธิต่ำกว่าปลาที่มีระดับไซโตโครมพี 450ปกติ (Andersson and Forlin,1992)

(ง) อุณหภูมิ

สัตว์เลือดเย็นมีอุณหภูมิของร่างกายเปลี่ยนแปลงไปตามอุณหภูมิสภาพแวดล้อม ดังนั้นจึงพบว่าสภาพอุณหภูมิของสิ่งแวดล้อมมีผลต่อการทำงานของร่างกาย ซึ่งต่างจากสัตว์เลี้ยงลูก

ด้วยนมซึ่งเป็นสัตว์เลือดอุ่นและอุณหภูมิของร่างกายจะไม่ปรับเปลี่ยนไปตามสภาพแวดล้อม (Montz and Kirkpatrick,1985) ปลาซึ่งถือเป็นสัตว์เลือดเย็นชนิดหนึ่งอาศัยอยู่ในทุกสภาพอากาศ โดยจะพบว่า ในทุกระดับความลึกของน้ำจะพบปลาอาศัยอยู่ต่างชนิดกัน ตั้งแต่ก้นพื้นน้ำถึงใต้ผิวน้ำ ปลาสามารถปรับตัวเองให้เข้ากับสภาพแวดล้อมของน้ำได้ ซึ่งจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางชีวโมเลกุลและทำให้สภาพทางสรีรวิทยาเปลี่ยนไป อาจจะเกิดกลไกการชดเชยในระดับโมเลกุล และอาจรวมถึงการเปลี่ยนแปลงในระดับเอ็นไซม์ นอกจากนั้นยังอาจมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงสารพิษและสิ่งแปลกปลอมในร่างกาย (Andersson and Forlin,1992 ; Goksoyr and Forlin,1992) จากการศึกษาของ Sleiderink และคณะ (1995) ถึงผลของอุณหภูมิของน้ำและสารประกอบประเภท PAHs ต่อระดับ CYPIA ในสัตว์น้ำ พบว่าปลาที่อาศัยในบริเวณน้ำลึกที่มีอุณหภูมิต่ำกว่าจะมีระดับ CYPIA สูงกว่าปลาที่อาศัยในบริเวณน้ำตื้นที่มีอุณหภูมิสูงกว่า และพบว่าระดับสารประกอบ PAHs ในน้ำลึกมีความเข้มข้นสูงกว่า สมรรถนะของไซโตโครมพี 450ในปลาตอบสนองต่ออุณหภูมิของสภาพแวดล้อม โดยที่ไซโตโครมพี 450 ของปลาในน้ำที่อุณหภูมิต่ำกว่าจะสูงกว่าปลาที่อาศัยในน้ำอุณหภูมิสูงกว่า

(จ) อาหาร

ในสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารที่มีสารอาหารต่างกัน ย่อมมีความแตกต่างกันของระดับเอ็น-ไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450 เช่น สัตว์ทดลองที่ขาดแร่ธาตุ แคลเซียม ทองแดง เหล็ก แมกนีเซียม และสังกะสีที่เกี่ยวข้องให้เกิดปฏิกิริยา ออกซิเดชั่น รีดักชั่น ที่มีระบบไซโตโครมพี 450 เป็นตัวกระตุ้นลดลง แต่เมื่อให้สัตว์ทดลองได้รับอาหารที่มีระดับแร่ธาตุปกติ สมรรถนะของเอ็นไซม์ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษกลับมาในสภาพเดิม นอกจากนี้ในสัตว์ทดลองที่ได้รับอาหารที่ขาดวิตามินซี อี บีรวม มีอัตราการเปลี่ยนแปลงสารพิษและสิ่งแปลกปลอมลดลงเช่นเดียวกัน เมื่อให้อาหารที่มีวิตามินครบ การเปลี่ยนแปลงสารพิษและสิ่งแปลกปลอมก็กลับมาสภาพเดิม (Sipes and Gandolfi,1986) ผลอันเดียวกันนี้พบได้จากการทดลองกับหนู Syrain Hamster ที่รับอาหารที่มีปริมาณโปรตีนต่าง ๆกัน พบว่าปริมาณโปรตีนในไมโครโซมเพิ่มมากขึ้น เมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีนในอาหาร นอกจากนี้สมรรถนะของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษ คือ hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณโปรตีน และยังคงอยู่สูงสุดเมื่อให้โปรตีนในปริมาณจำกัด คือไม่มากหรือน้อยเกินไป (Birt , Hruza and Baker,1983) ในการเปรียบเทียบอาหารสำเร็จรูปและอาหารธรรมชาติที่ให้แก่ปลาเลี้ยง ปลาที่ได้รับอาหารธรรมชาติจะมีขนาดตัวที่เล็กกว่า แต่มีความแข็งแรงเนื่องจากมีอายุยืนกว่าปลาที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียว ปลาที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปเพียงอย่างเดียว มีปริมาณโปรตีนในไมโครโซมต่ำกว่าปลาที่ได้รับอาหารจากธรรมชาติและอาหารสำเร็จรูปควบคู่กันไป นอกจากนี้ยังพบว่า จำนวนเซลล์ตับของปลาที่ได้รับอาหารสำเร็จรูปลดลง ในขณะที่ปลาที่ได้รับอาหารธรรมชาติและอาหารสำเร็จรูปควบคู่กันมีขนาดตับใหญ่ขึ้น ปริมาณ DNA และ RNA ในก็ตับเพิ่มขึ้น (Rafael and Braunbeck,1988)

ความสัมพันธ์ของระบบไซโตโครมพี 450 ในปลากับสภาวะแวดล้อมทางน้ำ

ในปัจจุบันแหล่งน้ำในโลกเราถูกคุกคามจากกิจกรรมต่าง ๆของมนุษย์ ทำให้แหล่งน้ำต่าง ๆได้รับการปนเปื้อนสารพิษต่าง ๆ มากมายทำให้สัตว์ที่อาศัยในแหล่งน้ำนั้น ๆ ได้รับผลกระทบจากสารพิษที่ปนเปื้อนเหล่านั้น ซึ่งผลกระทบนั้นแสดงออกได้หลายระบบ เช่น หอยมีระบบสืบพันธุ์ ที่ผิดปกติเนื่องจากสารจำพวกออกาโนติน (Stewart and Thompson,1994) สารไนไตรท์ ทำให้เรดินาของปลาเทราท์เกิดเนื้อตาย (Hofer and Gatumu,1994) ดังนั้นจึงพบว่าปลาซึ่งเป็นสัตว์ที่มีปริมาณมากที่สุด เมื่อเทียบกับสัตว์อื่นก็มีโอกาสสัมผัสกับสารพิษได้มากกว่าสัตว์อื่นเช่นกัน สัตว์มีการจัดการกับสารพิษเพื่อลดความเป็นพิษ และขับถ่ายสารพิษออกจากร่างกาย ดังนั้นจึงพบว่า ในปัจจุบันมีการนำระบบไซโตโครมพี 450 ในปลามาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพเพื่อดูสภาพความเป็นพิษของน้ำขึ้นเรื่อย ๆ เนื่องจากสารเคมีที่พบในแหล่งน้ำมีมากกว่า 60,000 ชนิดที่สามารถวิเคราะห์ได้ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจศึกษาถึงความสัมพันธ์ของระดับการปนเปื้อนกับผลทางชีววิทยาที่แสดงออก (Goksoyr and Forlin,1992)

การเปลี่ยนแปลงของไซโตโครมพี 450 และการศึกษาสภาวะแวดล้อม

ระบบไซโตโครมพี 450 มีความสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารพิษ ในสิ่งมีชีวิตเนื่องจากสารพิษในแหล่งน้ำมีมากมาย อีกทั้งผลของสารพิษต่อระบบมีทั้งการยับยั้ง และการเหนี่ยวนำ ดังนั้นจึงมีผู้สนใจนำผลของการเหนี่ยวนำระบบไซโตโครมพี 450 มาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อสภาพความเป็นพิษของน้ำเป็นจำนวนมาก ตัวอย่างของสารพิษที่นำมาศึกษา มักเป็นสารที่พบปริมาณมากและพบบ่อย Vindimian และคณะในปี 1991 ได้นำปลา 3 ชนิด จากแม่น้ำสายหนึ่งในฝรั่งเศสที่มีการปนเปื้อนของสารพิษมาศึกษาหาระดับเอ็นไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450 พบว่าปลาในแหล่งที่อยู่ตอนใต้การไหลของน้ำจากโรงงานสารเคมี มีการเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 และการเหนี่ยวนำนั้นแตกต่างกันตามชนิดของปลาที่จับมาศึกษา ปัจจัยของความแตกต่างนั้นเนื่องมาจากนิสัยการกินของปลา นั่นคือปลาที่กินพืชเป็นอาหารมีการเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 มากกว่าปลาอีกสองชนิด คาดว่าปลาที่กินพืชเป็นอาหารมีสารเหนี่ยวนำมาจากธรรมชาติคือ indole-3 carbino หรือ flavonoid นอกจากนี้ความแตกต่างของไซโตโครมพี 450 ยังขึ้นอยู่กับเพศ และสภาพของแม่น้ำในช่วงที่จับปลามาทำการศึกษาซึ่งพบว่า ในปลาเพศผู้มีการเหนี่ยวนำมากกว่า นอกจากนี้ในช่วงที่แห้งแล้งน้ำในแม่น้ำน้อยทำให้มีการเหนียวนำของเอ็นไซม์ในปลามากกว่าปลาในช่วงน้ำหลาก การนำ CYPIAและสมรรถนะของเอ็นไซม์ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษ เพื่อดูสภาพน้ำเสียจากโรงงานกระดาษ และ โรงงานผลไม้ซึ่งน้ำนั้นยังไม่ได้รับการบำบัด และมีการปนเปื้อนของสารประกอบซัลไฟท์ ทำการศึกษาโดยจับปลากะพงที่อาศัยอยู่บริเวณนั้นมาตรวจดู พบว่าปลาในแหล่งที่มีการปนเปื้อนของน้ำเสียมากจะมีค่าสมรรถนะของเอ็นไซม์สูงกว่า นอกจากนี้ฤดูกาลก็มีส่วนด้วย คือ ในฤดูหนาว และฤดูใบไม้ร่วง ก็เป็นปัจจัยส่งเสริมให้ค่าสมรรถนะของเอ็นไซม์สูงขึ้น

ผลของน้ำเสียจากโรงงานยังทำให้เกิดผลทางสรีรวิทยาต่างๆ เช่น ทำให้ขนาดตับใหญ่ขึ้น ทำให้ปลาถึงวัยเจริญพันธุ์ช้าลง เป็นต้น (Huuskonen and Seppa,1995) Eggens และคณะ (1995) ได้นำ CYPIA มาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อการสัมผัสต่อการปนเปื้อน ซึ่งศึกษาในปลาสองชนิดจากบริเวณทะเลในประเทศเนเธอแลนด์ ที่มีการปนเปื้อนของสารประกอบประเภท PCBs และ PAHs ปลาทั้ง2ชนิดอาศัยในแหล่งที่อยู่ต่างกัน คือ ปลาฟลาวเดอร์อาศัยในเขตชายฝั่งและบริเวณปากแม่น้ำ ในขณะที่ปลาเพลสอาศัยบริเวณนอกชายฝั่ง จากการศึกษาพบว่าCYPIA1ของปลาเพลสสูงกว่าปลาฟลาวเดอร์ อาจเป็นไปได้ว่าในบริเวณที่ปลาเพลสอาศัยเป็นบริเวณนอกชายฝั่งออกไปมีอุณหภูมิต่ำกว่าบริเวณชายฝั่ง และบริเวณนอกชายฝั่งมีสัตว์ประเภทกุ้งซึ่งเป็นอาหารของปลาชนิดนี้อาศัยอยู่มาก มีการปนเปื้อนสารพิษมากกว่า ทำให้ CYPIA1 สูงกว่าปลาเพลสที่อาศัยบริเวณชายฝั่ง จากการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้สรุปไว้ว่า CYPIA ที่สูงขึ้นเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพของปลาที่มีต่อสารประกอบประเภท PCBs และ PAHsได้ ผลการศึกษาทำนองเดียวกันยังพบได้ในการศึกษาเปรียบเทียบของตัวอ่อนของปลาเทราท์ที่สัมผัสกับตะกอนจากก้นแหล่งน้ำที่อยู่บริเวณมีการปนเปื้อนสารพิษนานเป็นเวลา 7 วัน กับตัวอ่อนของปลาจากบริเวณที่ไม่มีการปนเปื้อนบริเวณเหนือต้นน้ำ พบว่าสมรรถนะของเอ็นไซม์ในตัวอ่อนของปลาเทราท์ที่สัมผัสกับตะกอนดินของแหล่งน้ำบริเวณใต้น้ำสูงที่สุด (Vigano et al.,1995) นอกจากการนำไซโตโครมพี 450 และสมรรถนะเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับระบบนี้ของปลาจากแหล่งที่มีการปนเปื้อนมาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อสารประกอบที่ปนเปื้อนแล้ว ยังมีการศึกษาในห้องปฏิบัติการที่สนับสนุนความคิดดังกล่าว โดยการนำสารพิษที่ระบุว่ามีการตรวจพบในแหล่งน้ำทั่วๆไป เช่น PCBs มาทดลองให้กับปลาในห้องปฏิบัติการได้สัมผัส พบว่าระดับไซโตโครมพี 450 โดยเฉพาะอย่างยิ่งสมรรถนะของเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับ CYPIA เช่น EROD สูงกว่าปลาในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ทำให้มีแนวโน้มที่จะนำเอาสมรรถนะของเอ็นไซม์ในปลามาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพถึงสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษของแหล่งน้ำได้เป็นอย่างดี (Brumley et al.,1995)

<u>สารมลพิษที่มีผลกระทบต่อปลา</u>

สารพิษที่ทำให้เกิดมลพิษแก่น้ำและส่งผลกระทบต่อปลาสามารถจำแนกได้คือ สารอินทรีย์ เช่น เชื้อโรคต่างๆ น้ำมัน สี ฟีนอล และ สารอนินทรีย์ เช่น กรด ด่าง คลอรีน ฟอสเฟต ไนเตรท โลหะหนัก สารแขวนลอยต่างๆ เป็นต้น (สสวท.,2531) สารเคมีกำจัดศัตรูพืชจัดว่าเป็นสารอนินทรีย์ที่มีผลกระทบต่อปลามากที่สุด สำหรับประเทศไทยเป็นประเทศเกษตรกรรม น้ำจากบริเวณเพาะปลูกไหลลงสู่แหล่งน้ำ นำพาเอาสารเคมีกำจัดศัตรูพืชลงมาด้วย พบการปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชอยู่โดยทั่วไปโดยเฉพาะสารเคมีกำจัดศัตรูพืชที่สลายตัวยากและคงสภาพอยู่ได้นานในแหล่งน้ำ โดยที่การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในแหล่งน้ำมีผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำโดยตรง รวมทั้งทรัพยากรการประมงและต่อผู้บริโภค สัตว์น้ำมีการสะสมสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในเนื้อเยื่อ

นอกจากนี้การปนเปื้อนของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชยังมีผลกระทบต่อคุณภาพของน้ำ และทำให้มีการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบของระบบนิเวศน์ในน้ำ

นอกจากสารเคมีกำจัดศัตรูพืชแล้ว โลหะหนักก็เป็นสารพิษที่มีการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำเป็นจำนวนมาก ส่วนใหญ่มาจากแหล่งที่มีการทำอุตสาหกรรม โดยมีการปล่อยสารพวกโลหะหนักออกมากับน้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมบางประเภท เมื่อปล่อยลงสู่แม่น้ำโดยตรงไม่มีการบำบัดก่อนจะทำให้มีโลหะชนิดต่าง ๆกระจายเป็นบริเวณกว้าง นอกจากนี้โลหะบางชนิด เช่น ดีบุกยังเป็นส่วนผสมของสีทาท้องเรือเดินสมุทร ทำให้มีการปนเปื้อนสู่แหล่งน้ำโดยตรง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เมททิลพาราไธออน (Methyl parathion)

เมททิลพาราไธออนเป็นยาปราบศัตรูพืชกลุ่มออกาโนฟอสเฟต มีฤทธิ์ยับยั้งเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรส (anticholinesterase)

เมททิลพาราไธออนกระจายสู่สิ่งแวดล้อม โดยการฉีดพ่นทำให้เกิดการฟุ้งของผงฝุ่น เมื่อมีการใช้แก่พืชที่เพาะปลูก มีการกระจายตัวไปในดินและในน้ำโดยการชะล้างของฝนและน้ำที่ไหลผ่าน เมื่อลงสู่แหล่งน้ำแล้วสามารถสลายตัวได้ในเวลา 7 เดือน เมื่อ pH ของน้ำที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เมททิลพาราไธออนมีค่าครึ่งชีวิตในธรรมชาติลดลง นอกจากนี้เมททิลพาราไธออนสามารถถูกย่อยสลายได้ด้วยแสงแดด เมื่อเมททิลพาราไธออนเข้าไปในร่างกายของแมลง สัตว์ รวมทั้งคนจะถูกออกซิไดส์เป็นการลดกำมะถันที่มีอยู่ในโครงสร้างของเมททิลพาราไธออน โดยอาศัยเอ็นไซม์ในระบบไซโตโครมพี 450 ในการเปลี่ยนแปลงดังแสดงไว้ในแผนผังดังนี้

Methylparathion $\xrightarrow{NADPH + O_2 (MFO)}$ Methylparaoxon

Binding to Acetylcholinesterase

เมททิลพาราไธออนถูกเปลี่ยนแปลงเป็น methylparaoxon ซึ่งเป็น active metabolite ออกฤทธิ์จับกับเอ็นไซม์โมลีนเอสเทอเรส (cholinesterase) ยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์ที่ไฮโดรไลส์สารอะเซทธิลโมลีน (acetylcholine) ซึ่งเป็นสารสื่อประสาทในระบบประสาทอัตโนมัติ

ผลกระทบของเมททิลพาราไธออนต่อปลา

ผลกระทบของเมททิลพาราไธออนที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำจะก่อให้เกิดผลกระทบที่เป็นอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตที่อาศัยในน้ำนั้น ๆโดยเฉพาะปลา ระดับความรุนแรงของอันตรายขึ้นอยู่กับปัจจัยต่าง ๆ เช่น ระดับความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออน ความต้านทานของสิ่งมีชีวิต ผลกระทบร่วมของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชชนิดอื่นกับเมททิลพาราไธออน ซึ่งอาจมีฤทธิ์เสริมหรือต้านกันและความกระด้างของน้ำเป็นต้น ปัจจัยที่สำคัญที่สุดคือ ความเข้มข้นในแหล่งน้ำ โดยที่ปลาอาจได้รับเมททิลพาราไธออนในระดับความเข้มข้นสูงจนทำให้ปลาตาย (lethal effect) ผลที่เกิดขึ้นเป็นไปอย่างรุนแรงและรวดเร็ว นอกจากนั้นยังมี ผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของปลา

และสัตว์น้ำอื่น ๆ (sublethal effect) เมื่อปลาได้รับเมททิลพาราไธออนในขนาดต่ำที่ไม่ทำให้ปลาตายแต่ยังคงเป็นอันตรายต่ออวัยวะและระบบต่าง ๆของร่างกาย ผลกระทบต่อความเป็นอยู่ตลอดช่วงชีวิตของปลาดังเช่น การอพยพย้ายถิ่น พฤติกรรม การพัฒนาของร่างกาย การเจริญเติบโต ขบวนการทางสรีรวิทยา และพันธุกรรม เป็นต้น โดยที่ผลกระทบต่อความเป็นอยู่ของสัตว์น้ำจะมีลักษณะค่อยเป็นค่อยไป ต้องใช้เวลานานพอควรจึงจะแสดงอาการ มีการศึกษาฤทธิ์ของเมททิลพาราไธออนต่อเนื้อเยื่อที่ใช้ในการหายใจของปลาน้ำจืด Tilapia mossambica (Peter) โดยให้ปลาได้รับการสัมผัสกับเมททิลพาราไธออนจนครบ 12 ชั่วโมง พบว่าอัตราการใช้ออกซิเจนของเนื้อเยื่อปลาเพิ่มขึ้น เนื่องจากมีการเพิ่มออกซิเดทีฟเมตาบอลิ-สม (oxidative metabolism) ซึ่งเป็นการตอบสนองต่อเมททิลพาราไธออนในทันที อัตราการใช้ออกซิเจนที่เพิ่มขึ้นนี้สามารถบอกได้ถึงอาการเริ่มแรกของการได้รับพิษ แต่หลังจากนั้น 48 ชั่วโมง อัตราการใช้ออกซิเจนก็ลดลง ซึ่งรวมถึงการใช้ออกซิเจนของเนื้อเยื่อสมอง ที่อาจมีสาเหตุจากร่างกายขาดออกซิเจน และมีการเพิ่มขึ้นของคาร์บอนไดออกไซด์ ทำให้ปลาตายเนื่องจากร่างกายขาดออกซิเจน และกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจเป็นอัมพาต (Rao, Sahib and Rao,1985)

การปนเปื้อนของเมททิลพาราไธออนในแหล่งน้ำที่เพาะเลี้ยงปลา มีผลทำให้แหล่งน้ำนั้น ๆไม่เหมาะสมกับการเพาะเลี้ยงอีกต่อไป เนื่องจากมีการสะสมของเมททิลพาราไธออนในตะกอนดินสูง รวมทั้งมีการสะสมเมททิลพาราไธออนในเนื้อเยื่อปลา ถ้ามีปริมาณมากก็จะทำให้เกิดอันตรายแก่ผู้บริโภค (สุธรรม สิทธิชัยเกษม,2529)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ไตรบิวทิลติน (Tributyltin)

ไตรบิวทิลตินเป็นสารออกาโนติน ซึ่งมีส่วนประกอบของดีบุก มีการใช้กันอย่างกว้างขวางทั้งในทางอุตสาหกรรมและในทางเกษตรกรรม ที่นิยมใช้ไตรบิวทิลตินกันมากคือ อุตสาหกรรมต่อเรือโดยมีการนำไตรบิวทิลตินมาผสมในสีเพื่อทาท้องเรือป้องกันท้องเรือถูกทำลายจากเพรียง นอกจากนั้นยังมีการใช้ทากันเชื้อราที่ทำลายไม้แปรรูปในอุตสาหกรรมการทำไม้ เป็นยาปราบศัตรูพืช เช่น ในการฆ่าหอยที่ทำลายพืช เป็นยาฆ่าแมลงและฆ่าปรสิต นอกจากนี้ยังมีการใช้ในอุตสาหกรรมพีวีซี โฟม และอื่น ๆอีกมากมาย เนื่องจากมีการใช้กันอย่างกว้างขวางจึงพบว่ามีการปนเปื้อนไตรบิวทิลตินในแหล่งน้ำจืดและน้ำเค็ม รวมทั้งโคลนดินของเสียที่ขับออกจากแหล่งชุมชนต่าง ๆ ผลจากการปนเปื้อนของไตรบิวทิลตินส่งผลกระทบต่อสัตว์น้ำและปลาที่อาศัยในแหล่งน้ำต่าง ๆ(Zucker et al.,1988;Celander et al.,1989;Fent and Stegman,1993)

สัตว์น้ำที่ได้รับผลกระทบจากไตรบิวทิลตินมากที่สุด คือ สัตว์น้ำประเภทหอยที่เรียกว่า dogwhelk ที่เป็นเพศเมียจะมีอาการ imposex มีลักษณะของเพศผู้กล่าวคือที่อวัยวะเพศเมียมีองคชาติ และ vas deferens ที่ vas deferens มีการเปิดของท่อนำไข่ทำให้ไม่สามารถออกไข่ได้ ทำให้ประชากรของ dogwhelk ไม่เพิ่มขึ้นและลดลงในที่สุดเพราะไม่สามารถสืบพันธุ์และแพร่พันธุ์ได้ (Evans,Leksono and Mckinnell,1995) เนื่องจากไตรบิวทิลตินมีการปนเปื้อนในแหล่งน้ำดังนั้นจึงมีผลต่อสัตว์น้ำต่าง ๆ ในฟาร์มเลี้ยงหอยนางรม รวมทั้งหอยนางรมที่อาศัยในแหล่งน้ำธรรมชาติ ตัวอ่อนของหอยนางรมมีความผิดปกติของระบบสืบพันธุ์ อีกทั้งมีปริมาณหอยตายเป็นจำนวนมาก ทำความเสียหายแก่ฟาร์มเลี้ยงและการประมงหอย (Stewart and Thompson,1994)

ปลาก็เป็นสัตว์น้ำชนิดหนึ่งที่มีปริมาณมาก ทำให้ได้รับผลกระทบจากไตรบิวทิลตินได้เช่นเดียวกัน จากการศึกษาในปลาเรนโบว์เทราท์ไตรบิวทิลตินทำให้ปลามีน้ำหนักขึ้นน้อยมีพิษต่อระบบประสาทกล่าวคือ ปลาว่ายน้ำเร็วเป็นระยะทางยาว ว่ายไม่มีทิศทางแน่นอน และมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าลดลง (Triebskorn et al.,1994) มีการศึกษาพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันของสารนี้ในปลาดุก (Channel catfish) ไตรบิวทิลตินทำให้ปลามีค่าฮีมาโตคริตต่ำ กดระบบภูมิคุ้มกัน ปริมาณเม็ดเลือดขาว neutrophile monocyte และ lymphocyte ในเลือดมากขึ้น (Rice,Banes and Ardelt,1995) ไตรบิวทิลตินมีผลต่อตัวอ่อนของสัตว์น้ำมากกว่าตัวโตเต็มวัย ทำให้ตัวอ่อนของปลามินโนว์ที่ยังไม่ได้ฟักเป็นตัว ไม่สามารถฟักเป็นตัวได้เนื่องจากหางมีการเคลื่อนไหวที่อ่อนแรงหรือในบางตัวหางเป็นอัมพาตหรือเมื่อฟักตัวออกมาแล้วมีอัตราการตายสูงกว่าลูกปลาที่ไม่ได้สัมผัสไตรบิวทิลติน ลูกปลาที่ฟักตัวออกมาไม่เคลื่อนไหว ลำตัวบวม ตาขุ่น ลูกปลาที่ได้รับการสัมผัสกับไตรบิวทิลตินภายหลังฟักตัวออกมาแล้วโดยมากจะตายทั้งหมดและอัตราการตายจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของไตรบิวทิลติน ลูกปลาที่รอด

มาได้มีการว่ายน้ำที่ผิดปกติ หางแอ่น และในลูกปลาที่สัมผัสกับไตรบิวทิลตินมากที่สุดตาจะขุ่น (Fent and Meier,1992)

นอกจากสัตว์น้ำอย่าง กุ้ง ปลา หอยแล้ว ไตรบิวทิลตินยังมีผลต่อสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำอีกด้วย Laughlin,Nordlund และ Linden (1984) ได้ทำการศึกษาให้ตัวอ่อนของสัตว์ครึ่งบกครึ่งน้ำชนิดหนึ่ง (Gammarus oceanius) สัมผัสกับไตรบิวทิลตินเวลาหนึ่ง ตัวเต็มวัยที่ได้รับการสัมผัสภายใน 1 สัปดาห์โดยที่ 50% จะตายภายใน 3 วัน เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม กลุ่มควบคุมจะมีอายุยืนกว่า ตัวอ่อนที่ได้รับการสัมผัสไตรบิวทิลตินมีจำนวนรอดน้อยกว่าตัวอ่อนที่อยู่ในกลุ่มควบคุมเกือบครึ่ง การเจริญเติบโตของตัวอ่อนที่สัมผัสกับไตรบิวทิลตินลดลง เห็นได้จาก ขนาดความยาวและน้ำหนักน้อยกว่าในกลุ่มควบคุม พฤติกรรมการว่ายน้ำของตัวอ่อนที่สัมผัสกับไตรบิวทิลตินแตกต่างกับกลุ่มควบคุม กล่าวคือในกลุ่มที่สัมผัสกับไตรบิวทิลตินตัวอ่อนจะว่ายน้ำมากขึ้น หลังจากนั้นจะว่ายมาที่ผิวน้ำ ในกลุ่มควบคุมจะอยู่นิ่งๆ และว่ายน้ำน้อยมากในเวลากลางวัน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แนวเหตุผลและสมมุติฐานในการศึกษา

ในปัจจุบันสิ่งแวดล้อมมีการเปลี่ยนแปลงไป เนื่องจากมีการปนเปื้อนสารพิษ ทำให้สิ่งมีชีวิตไม่ว่าเป็นคนหรือสัตว์ต้องสัมผัสกับสารพิษเป็นประจำ ไม่ว่าจะมากับ อาหาร น้ำ และอากาศ (แก้ว กังสดาลอำไพ,2537)

ระบบไซโตโครมพี 450 เป็นระบบเอ็นไซม์ที่สำคัญในวัฏภาคที่1 ในการเปลี่ยนแปลงสารพิษโดยที่สารต่าง ๆ นั้นอาจทำให้มีการเพิ่มหรือทำให้มีการลดลงของระดับไซโตโครมพี 450 แล้วแต่ชนิดของสารนั้นว่าเป็นสารเหนี่ยวนำเอ็นไซม์หรือสารยับยั้งเอ็นไซม์ มีสารเคมีและยาเป็นจำนวนมากที่ทำให้มีการเพิ่มการทำงานของเอ็นไซม์ทำให้มีสมรรถนะของเอ็นไซม์เพิ่มขึ้น ผลของการเหนี่ยวนำเอ็นไซม์ทำให้มีการเพิ่มปริมาณโปรตีนในไมโครโซม การเพิ่มปริมาณของเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมชนิดเรียบเป็นต้น ทำให้มีระดับไซโตโครมพี 450 เพิ่มขึ้น (Sipes and Gandolfi,1986)ในทางกลับกันมีสารเคมีหรือยาบางอย่างที่ไปยับยั้งการทำงานของเอ็นไซม์เรียกสารเหล่านี้ว่า enzyme inhibitor โดยที่สารเหล่านั้นอาจไปรบกวนการจับกันของสับ-สเตรทกับไซโตโครมพี 450 หรือรบกวนการขนส่งอิเลกตรอนแก่ไซโตโครมพี 450 เป็นต้น ส่งผลให้การทำงานของไซโตโครมพี 450 ลดลง (Murray and Reidy,1990)

ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำไซโตโครมพี 450 มาใช้ในการตรวจวัดความเป็นพิษของสารเคมีและยาต่าง ๆต่อสิ่งมีชีวิตและสิ่งแวดล้อม โดยดูจากระดับไซโตโครมพี 450 ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลง ในการตรวจวัดความเป็นพิษของยาหรือสารเคมีต่าง ๆ ในน้ำ นิยมใช้ปลาในการศึกษามากที่สุด (Andersson and Forlin,1992) เนื่องจากปลาเป็นสัตว์น้ำที่มีปริมาณมากที่สุดเมื่อเทียบกับสัตว์น้ำอื่น ทำให้มีโอกาสสัมผัสกับสารพิษต่าง ๆ ได้มากกว่า (Goksoyr and Forlin,1992) ยกตัวอย่างเช่น การศึกษาผลของการปนเปื้อนสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่ม PCBs ในแหล่งน้ำต่อระดับไซโตโครมพี 450 ในปลา (Rozemeijer et al.,1995) นอกจากนั้นยังพบว่า นิยมใช้ปลาเป็นตัวอย่างในการศึกษาการปนเปื้อนของสารประเภท PAHs ในแหล่งน้ำ โดยวัดจากการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาเช่นเดียวกัน (Eggen et al.,1995)

สำหรับสัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้คือปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยเพศเมียและปลาดุกอาฟริกันเพศผู้ ปัจจุบันมีการเลี้ยงกันมาก ด้วยเหตุที่บ่อที่ใช้เลี้ยงปลาอยู่ใกล้บริเวณที่ทำการเกษตร อีกทั้งปลาดุกเป็นปลาที่ไม่มีเกล็ดและชอบหากินตามตะกอนดินบริเวณท้องน้ำ จึงมีโอกาสสัมผัสสารพิษ เช่น เมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลตินที่ตกค้างอยู่ตามตะกอนดินได้มากกว่าปลาชนิดอื่น

จากการทดลองที่ผ่านมาของ ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538) ที่ทำการศึกษาแบบภายนอกร่างกายถึงผลของเมททิลพาราไธออน และไตรบิวทิลติน ต่อการทำงานของไซโตโครม-พี 450 และไซโตโครมบี 5 พบว่าเมททิลพาราไธออนมีผลทำให้การทำงาน และระดับไซโต-โครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ลดลง ส่วนไตรบิวทิลตินมีผลต่อไซโตโครมบี 5 เท่านั้น การศึกษาครั้งนี้จึงสนใจที่จะทำการศึกษาภายในร่างกายเพื่อเปรียบเทียบกับการทดลองแบบภายนอกร่างกาย เพื่อใช้เป็นแนวทางในการใช้สมรรถนะเอ็นไซม์เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษเนื่องจากสารเคมีดังกล่าว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลตินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ภายในและภายนอกร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1) ได้ทราบถึงผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลตินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และ ไซโตโครมบี 5 ภายในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมในขณะที่มีชีวิตอยู่เทียบกับการศึกษาภายนอกร่างกาย

2) สามารถใช้เป็นแนวทางในการทดสอบความเป็นพิษที่อยู่ในสิ่งแวดล้อมและสิ่งมีชีวิตนั้นๆ อาศัยอยู่ โดยอาศัยระดับไซโตโครมพี 450 และ ไซโตโครมบี 5 ที่เปลี่ยนแปลงไปเป็นดัชนีบ่งชี้ความเป็นพิษ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย