บทที่ 2
เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เอนไซม์ไซโตโครม P-450 (Cytochrome P-450; CYP)

เอนไซม์ไซโตโครม P-450 หมายถึง กลุ่มของเอนไซม์ที่ประกอบด้วยฮีม ซึ่งอยู่ที่บริเวณเมมเบรนของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม ทำหน้าที่เกี่ยวข้องในขั้นตอนสุดท้ายของการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของ Mix Function Oxidase System ไซโตโครม P-450 จะช่วยเร่งขบวนการเมทาบอลิซึมของสารประกอบทั้งจากภายในและภายนอกร่างกาย ตัวอย่างเช่น ปฏิกิริยา Hydroxylation, Heteroatom Oxygenation, Dealkylation และ Epoxidation เป็นต้น นอกจากนี้ ไซโตโครม P-450 ยังเกี่ยวข้องในปฏิกิริยารีดักชันด้วย เมตาบอไลท์ที่เกิดขึ้น จะมีความสามารถในการละลายน้ำได้มากกว่าสารประกอบตั้งต้นและสามารถขับออกจากร่างกายได้ แต่พบว่าหลังเกิดปฏิกิริยาแล้วอาจเกิดเมตาบอไลท์ที่สามารถทำปฏิกิริยากับ Cellular Nucleophiles ผลคืออาจเกิดความเป็นพิษหรือเป็นสารก่อมะเร็งได้ (ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล, 2540) เอนไซม์ไซโตโครม P-450 จึงเป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ได้รับการศึกษาอย่างมากเนื่องจากมีบทบาทสำคัญในเมทาบอลิซึมของสารเคมีต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ภายในและภายนอกสิ่งมีชีวิต ดังนั้นจึงกล่าวได้ว่าไซโตโครม P-450 เป็นตัวเร่งทางชีวภาพ (Biological Catalyst) ที่มีความหลากหลายมากที่สุดและมักกระจายอยู่ทั่วไปภายในเซลล์เกือบทุกชนิดของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ ทั้ง คน สัตว์ พืช แมลง ยีสต์ และแบคทีเรีย เป็นต้น (มณี ชะนะมา, 2546)

2.1.1 การตั้งชื่อเอนไซม์

ในอดีตได้มีการตั้งชื่อของเอนไซม์ตามสิ่งมีชีวิตที่เป็นแหล่งผลิตเอนไซม์หรือตามสับสเตรทจำเพาะที่ถูกเมตาบอไลท์โดยเอนไซม์ชนิดนั้น ๆ ดังนั้นจึงกำหนดให้ใช้ P-450 แทนไซโตโครม P-450 แล้วห้อยท้ายด้วยชื่อของสิ่งมีชีวิตหรือตามสับสเตรทจำเพาะที่ถูกเมตาบอไลซ์ดังที่กล่าวข้างต้น ตัวอย่างเช่น $P\text{-}450_{BM\ 3}$ เป็น P-450 ที่ได้มาจากเชื้อ *Bacillus megaterium* Strain3

การตั้งชื่อดังกล่าวทำให้เอนไซม์ชนิดเดียวกันถูกเรียกโดยชื่อที่ต่างกันซึ่งทำให้เกิดความสับสนในการอ่าน ตัวอย่างเช่น $P\text{-}450_{dbl}$ และ $P\text{-}450_{Bufl}$ เป็นเอนไซม์ตัวเดียวกัน ซึ่งปัจจุบันเรียกว่า CYP2D6

ต่อมาได้มีการนำระบบการจำแนกมาใช้ โดยแบ่งเอนไซม์และยีนที่กำหนดการสร้างเอนไซม์ออกเป็น Family และ Subfamily มีคำนำหน้าด้วย CYP แทนไซโตโครมP-450 ในทุก

สปีชีส์ทั้งหมดยกเว้นยีนของหนูเมาส์ให้ใช้ Cyp แทน และกำหนดกลุ่ม Family โดยใช้เลขอารบิค ดังตัวอย่างเช่น CYP2 สมาชิกทุกตัวใน Family เดียวกันต้องมีความหมายเหมือนกัน และให้ใช้ตัวอักษรภาษาอังกฤษตัวใหญ่เพื่อแสดงความแตกต่างของ Subfamily ตัวอย่างเช่น CYP2 มี Subfamily ต่าง ๆ คือ CYP2C, CYP2D และ CYP2E เอนไซม์แต่ละตัวใน Subfamily หนึ่ง ๆ จะถูกกำหนดโดยตัวเลขอารบิค เช่น CYP2D6

2.1.2 หน้าที่ของไซโตโครม P-450

โดยปกติไซโตโครม P-450 มีหน้าที่หลักเกี่ยวข้องกับการขจัดพิษ (Detoxification) ในสิ่งมีชีวิต เช่นในร่างกายของมนุษย์ถ้าปราศจากเอนไซม์เหล่านี้ร่างกายก็จะเต็มไปด้วยสารพิษ (Pollutants) ต่าง ๆ จากสิ่งแวดล้อม สารมลพิษดังกล่าวส่วนใหญ่ได้แก่ Benzo[a]Pyrene ซึ่งพบในควันบุหรี่และเนื้อย่าง Polycholorinated BiphenyIs (PCBs) ซึ่งถูกใช้ในการทำวัสดุฉนวน (Insulating Materials) และ Dioxins (2,3,7,8,-Tetrachiorodibenzo-*p*-Dioxin หรือ TCDD) ซึ่งเป็นผลพลอยได้ (By-Product) จากการเผาไหม้ทั่วไป นอกจากนี้สารพิษชนิดอื่น ๆ ที่สามารถถูกเมตาบอไลซ์ (Metabolized) โดยไซโตโครม P-450 ได้แก่ยาชนิดต่าง ๆ รวมทั้งยาปฏิชีวนะ สารต่อต้านตัวออกซิไดซ์ และสารกำจัดศัตรูพืช (Pesticides) เป็นต้น ตัวอย่างในการกำจัดสารแปลกปลอม ออกจากร่างกายของไซโตโครม P-450 เช่น การเมทาบอลิซึมของยา การตอบสนองของคนต่อยาชนิดใดชนิดหนึ่งนั้นขึ้นอยู่กับปริมาณของเอนไซม์ไซโตโครม P-450 ที่จำเพาะต่อยานั้น ๆ ว่ามีอยู่ในร่างกายของคน ๆ นั้นมากน้อยเพียงใด ในบางคนอาจจะขาดเอนไซม์ไซโตโครม P-450 ที่จำเพาะต่อยาดังกล่าวทำให้คนเหล่านั้นไม่สามารถกำจัดสารชนิดนั้น ๆ ออกจากร่างกายได้และจะสะสมไว้อย่างต่อเนื่องจนส่งผลให้เกิดความรุนแรงขึ้น (มณี ชะนะมา, 2546)

นอกจากนี้ไซโตโครม P-450 ยังมีบทบาทสำคัญในการเมทาบอลิซึมของสารที่สร้างขึ้นเองภายในสิ่งมีชีวิต (Endogonous Substance) (Guengerich, 1991) หน้าที่สำคัญมากที่สุดอันดับหนึ่งคือการเกิด Hydroxylation ของสเตอรอยด์ (Steroid) กรดน้ำดี (Bile Acid) และวิตามิน (Vitamin) ความบกพร่องเนื่องจากการขาดเอนไซม์มีความสำคัญต่อโรคทางพันธุกรรม

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.3 การแบ่งกลุ่มของไซโตโครม P-450

ในปัจจุบันมีการศึกษาค้นพบเอนไซม์ไซโตโครม P-450 ถึง 20 Families ซึ่งมี 10 Families พบในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (ตารางที่ 2-1) 1 Families พบในแมลง 1 Families ในหอย 1 Families ในพืช และอีก 6 Families ในแบคทีเรีย ไซโตโครม P-450 ที่มีหน้าที่ในการสังเคราะห์สเตียรอยด์และเมตาบอไลซ์คอเลสเตอรอล ประกอบด้วย Families 7, 17, 19, 21 และ 29 ซึ่งมีรูปแบบเดียวใน Families 11 เท่านั้นที่ประกอบด้วย 2 Subfamilies คือ CYP11A และ CYP11B ซึ่ง A นั้นมี 1 Form แต่ B ประกอบด้วย 2 Form นอกจากหน้าที่หลักในการสังเคราะห์สเตียรอยด์แล้ว พบว่ายังมีหน้าที่สำคัญในการเมตาบอไลซ์สาร Xenobiotics ต่าง ๆ กลุ่มของเอนไซม์ไซโตโครม P-450 ทั้งสองกลุ่มนี้อาจเกี่ยวข้องกันโดยเริ่มจากการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อเปลี่ยนแปลงสารเคมีที่ขับออกยาก ๆ ให้เป็นสารประกอบที่ละลายน้ำได้ง่ายขึ้น

ตารางที่ 2-1 เอนไซม์ไซโตโครม P-450 Families ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม
(ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล, 2540)

ไซโตโครม P-450	จำนวน Subfamilies	จำนวน Form	ปฏิกิริยา
CYP1	1	2	Xenobiotic Metabolism
CYP2	8	57	Xenobioticand Steroid Metabolism
CYP3	2	10	Xenobioticand Steroid Metabolism
CYP4	2	10	Fatty Acid and Hydroxylation
CYP7	1	1	Cholesterol 7α-Hydroxylase
CYP11	2	3	Steroid 11 ß-Hydroxylase
CYP17	1	1	Steroid 17 ß-Hydroxylase
CYP19	1	1	Aromatase
CYP21	1	1	Steroid 21 Hydroxylase
CYP29	1	1	Cholesterol 27 Hydroxylase

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.4 กลุ่มของไซโตโครม P-450

1. CYP1A Subfamily

CYP1A จัดเป็นตัวชี้วัดชีวภาพที่มีการศึกษากันอย่างกว้างขวางเนื่องจาก CYP1A เป็นตัวที่ตอบสนองต่อสารพิษที่มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อม ซึ่งสารพิษที่ตอบสนองต่อ CYP1A ได้แก่สารในกลุ่ม PAHs โดยสาร BaP ถูกจัดว่าเป็นสารก่อมะเร็งและจัดเป็นสารที่มีอันตรายที่สุดในกลุ่มของ PAHs (Carlson et al., 2004) นอกจากนี้ยังสามารถถูกชักนำโดย PCBs และ Dioxins

1.1 CYP1A1 เป็นเอนไซม์ที่คงลักษณะเดิมไว้มากที่สุด โดยความสามารถในการออกฤทธิ์และความสามารถในการถูกเหนี่ยวนำจะมีความเหมือนกันในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ไก่ และปลา แสดงว่าเอนไซม์นี้มีความจำเป็นต่อหน้าที่หรือการทำงานต่าง ๆ ในร่างกาย ซึ่งต่างจาก CYP2 Family ที่จะมีวิวัฒนาการตามอาหารหรือปัจจัยจากสิ่งแวดล้อมในสัตว์ที่สูงขึ้น

1.2 CYP1A2 เป็นเอนไซม์ที่มีการอนุรักษ์ไว้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมแต่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ต่างกันไป โดยเป็นเอนไซม์ที่พบในตับ แม้ว่าจะไม่มีสารมากระตุ้นก็ตาม บทบาทสำคัญของ CYP1A2 นี้คือการเมทาบอไลซ์สารพวก Aflatoxin B1, Heterocyclic Amine Carcinogen, Promutagen และ Procarcinogen

2. CYP2A Subfamily

มีการศึกษาเอนไซม์นี้ในหนูขาวและหนูถีบจักร ในหนูขาวจะประกอบด้วย CYP2A1, CYP2A2 (มีลำดับของกรดอะมิโนคล้ายกับ CYP2A1 แต่มีความแตกต่างของความจำเพาะเจาะจงต่อ Testosterone Hydroxylation) และ CYP2A3 ซึ่งพบที่ปอด ในหนูถีบจักรประกอบด้วย CYP2A4 และ CYP2A5 ซึ่งคล้ายกับ CYP2A3 ในหนูขาว

3. CYP2B Subfamily

เป็นเอนไซม์ที่สำคัญที่ถูกเหนี่ยวนำหลังได้รับ Phenobarbital ซึ่งเริ่มทำการศึกษาในหนูขาว พบว่าหนูขาวที่ได้รับ Phenobarbital จะตรวจพบ CYP2B1 และ CYP2B2 ซึ่ง CYP2B2 สามารถพบในหนูขาวที่ไม่ได้ถูกเหนี่ยวนำด้วย Phenobarbital

4. CYP2E Subfamily

เป็นเอนไซม์ตัวหนึ่งที่มีความสำคัญในแง่ของการเกิดพิษ เอนไซม์ใน Subfamily นี้ที่สำคัญและมีการศึกษากันมากคือ CYP2E1 มีบทบาทสำคัญในการเมทาบอไลซ์ การเปลี่ยนสารซึ่งมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำให้เป็นเมทาบอไลท์ ที่มีความสามารถในการออกฤทธิ์ดีกว่าสารตั้งต้น สารซึ่งอาศัยเอนไซม์นี้ในการถูกเมทาบอไลซ์ ส่วนใหญ่เป็นสารพิษรวมทั้งสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ เช่น Carbontetrachloride, Enflurance และ Alcohol เป็นต้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

5. CYP3A Subfamily

เป็นไซโตโครม Subfamily สุดท้ายที่มีการศึกษาและเกี่ยวข้องในการเมทาบอลิซึมยาที่ตับ เป็นเอนไซม์ส่วนใหญ่ของไซโตโครม P-450 พบประมาณร้อยละ 30 ของไซโตโครม P-450 ทั้งหมดที่ตับ มีความเกี่ยวข้องในการเมทาบอลิซึมสารหลายชนิดทั้งสารที่มีผลการรักษาทางคลินิค และการศึกษาในแง่พิษวิทยา CYP3A ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารหลายชนิด เช่น สเตียรอยด์ ยาปฏิชีวนะในกลุ่ม Macrolide ยาต้านเชื้อราในกลุ่ม Imaidazole และ Phenobarbital เป็นต้น (ศรีสมบัติ นวนพรัตน์สกุล, 2540)

ตารางที่ 2-2 ขนาดและจำนวนแถบโปรตีนของ CYP ในสัตว์น้ำจากการวิเคราะห์ด้วยเทคนิค Western Blot

สิ่งมีชีวิต	แอนติบอดี	CYP subfamily	จำนวนแถบโปรตีน	ขนาดโมเลกุล (kDa)	อ้างอิง
หอยแมลงภู่ *Mytilus edulis*	Rabbit - *Perca fluviatilis* CYP1A	CYP1A	2	49,43	
	Goat anti Rat CYP2B	CYP2B	3	53,48,44	
	Goat anti Rat CYP2E	CYP2E	2	55,48	
	Rabbit-*Oncorhynchus mykiss* CYP3A	CYP3A	3	67,53,45	
	Sheep anti Rat CYP4A	CYP4A	3	51,44	Peter et al. (1998)
ปลา *Oreochromis niloticus*	PAb to Scup CYP2B	CYP2B	3	53,54,56	
	PAb to Trout CYP3A	CYP3A	1	45	Bainy et al. (1999)
Apocryptes bato	MAb FA-1 to Scup CYP1A	CYP1A	1	58	Al-Arabi et al. (2002)
Ictalurus punctatus	PAb anti CYP2K	CYP2K	2	51,47	Perkins and Schlenk (1998)
เต่า *Chrysemeys picta picta*	MAb 1-12-3 anti Scup CYP1A	CYP1A	1	59	Yawetz et al. (1998a)
จระเข้ *Alligator missisipiensis*	Rabbit anti Scup CYP2B	CYP2B	3	49,51,53	Ertl et al. (1999)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ

สารพิษส่วนใหญ่ที่ถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายนั้นอยู่ในรูปที่ไม่แตกตัวเป็นไอออนซึ่งสามารถละลายได้ดีไขมันทำให้สารพิษถูกดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ง่ายและเร็ว หลังจากถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะเข้าไปในเซลล์ตับ ไต ปอด และม้าม จากนั้นจะมีขั้นตอนเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง 2 ขั้นตอน คือ

1. ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงระยะที่ 1 มี 2 กลไก คือ

1.1 กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ใช้เอนไซม์โดยตรง เอนไซม์เหล่านี้อยู่ในไซโตพลาสซึมและอยู่ในไมโตคอนเดรีย โดยเอนไซม์เหล่านี้จะทำให้สารพิษมีโครงสร้างใหม่ขึ้นได้

1.2 กลไกการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างที่ใช้เอนไซม์ในไมโครโซม เอนไซม์นี้เป็นเอนไซม์ที่องค์ประกอบพิเศษที่เรียกว่า Cytochrome P-450 ร่วมในการทำงานด้วย

ขั้นตอนการเปลี่ยนแปลงระยะที่ 1 นี้จะทำให้สารพิษที่เข้ามามีฤทธิ์รุนแรงขึ้นหรือทำให้สารพิษหมดฤทธิ์ต่อเซลล์ด้วยกลไกดังกล่าว

2. ขั้นตอนการจับตัวระยะที่ 2 สารพิษทั้งที่ยังไม่ถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างหรือที่เปลี่ยนแปลงโครงสร้างแล้วจับตัวกับสารที่มีอยู่ภายในเซลล์จนได้เป็นสารที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้นเพื่อง่ายต่อการขับออกจากร่างกาย (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีระยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และปัญญา เต็มเจริญ, 2539)

สรุปได้ว่าไซโตโครม P-450 มีหน้าที่หลักอยู่สองประการ

1. เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องเกี่ยวกับระบบการกำจัดสารพิษในสิ่งมีชีวิต ช่วยกำจัดสารเคมีให้ออกไปจากร่างกาย

2. เอนไซม์มีบทบาทที่สำคัญและจำเพาะในเมตาบอลิซึมของสารเคมีที่สร้างขึ้นเองภายในสิ่งมีชีวิต

2.1.6 อวัยวะที่ทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษ

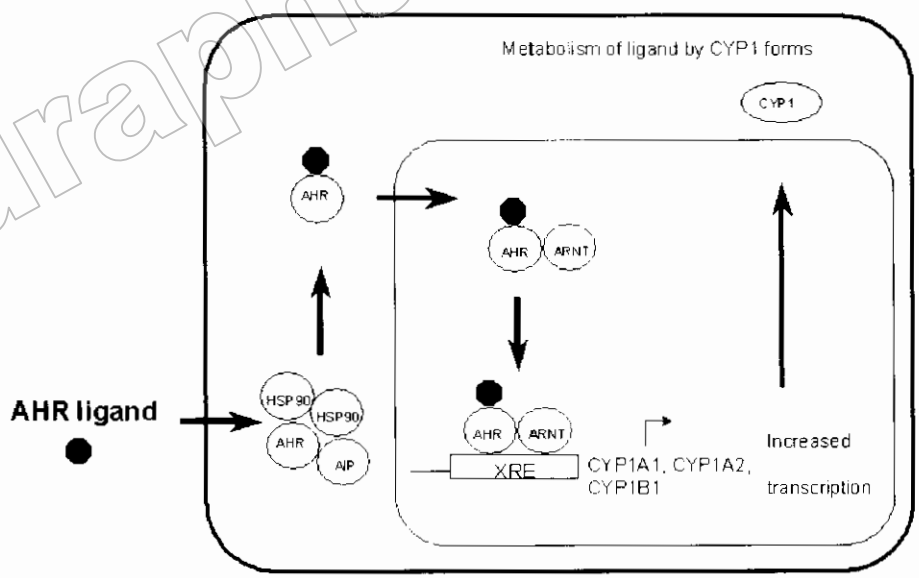
สารพิษเมื่อถูกดูดซึมเข้าสู่กระแสโลหิตแล้วจะกระจายไปยังอวัยวะต่าง ๆ เพื่อการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของการออกฤทธิ์ และการขับออกจากร่างกายสำหรับอวัยวะที่จะทำหน้าที่ในการขับสารพิษออกจากร่างกายนั้น ได้แก่ ตับ ไต ปอด และม้าม ขณะเดียวกันอวัยวะต่าง ๆ เหล่านี้ ก็จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสารพิษด้วยเช่นกัน (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว และคณะ, 2539) ตับเป็นอวัยวะที่สำคัญอย่างยิ่งในกระบวนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างและขับสารพิษออกจากร่างกาย และตับจะทำหน้าที่เปลี่ยนสภาพสารที่เป็นพิษให้สามารถละลายน้ำได้ดีขึ้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

โดยเฉพาะเอนไซม์ไซโตโครม P450 (มลิวรรณ บุญเสนอ, 2544) ดังนั้นในการที่จะเก็บตัวอย่างตับเพื่อที่จะนำมาวิเคราะห์ควรจะทำการเก็บตับทันทีเมื่อได้ตัวอย่างสัตว์น้ำมาเพื่อป้องกันการทำลายตับโดยกิจกรรมของเอนไซม์ (Flammarion et al., n.d. cited in Lagalic, Caquet, Amiard, & Ramade, 2000)

2.1.7 การสร้างไซโตโครม P-4501A (CYP1A)

การชักนำการสร้าง CYP1A จะเกิดขึ้นเมื่อมีสารแปลกปลอมซึ่งทำหน้าที่เป็นลิแกนด์เข้าสู่เซลล์และจับกับโดยรีเซปเตอร์ที่เรียกว่า Aryl Receptor (Ah-Receptor; AHR) ซึ่งสารที่สามารถจับกับ Ah-Receptor และชักนำการสร้าง CYP1A ได้คือสารในกลุ่ม PAHs, PCBs และ Dioxin โดยเมื่อมีการจับกันของ Ah-Receptor กับลิแกนด์จะมีการปล่อย Heat Shock Protein (Hsp 90) ออกมาด้วย และจากนั้นจะมี Translocating Protein ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่บริเวณไซโตพลาสซึมมาจับเพื่อให้ Complex ของลิแกนด์ Ah-Receptor และ Translocating Protein สามารถเข้าสู่นิวเคลียสได้ เมื่อเข้าสู่นิวเคลียสก็จะเข้าทำปฏิกิริยาที่บริเวณ Xenobiotic Response Elements (XREs) กระตุ้น CYP1A Gene ให้เริ่มมีสร้าง CYP1A mRNA และสังเคราะห์โปรตีน จากนั้น Apoprotein จะจับกับฮีม และส่งออกมาบริเวณเมมเบรนของเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม เพื่อทำหน้าที่เมตาบอลิซึมสารพิษต่อไป



ภาพที่ 2-1 กระบวนการสังเคราะห์ CYP1A ที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ (Hukkanen, 2000)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.1.8 สารพิษที่ตอบสนองต่อ ไซโตโครม P-450 ชนิดต่าง ๆ

กลุ่มของไซโตโครม P-450 ประกอบด้วยเอนไซม์หลาย Subfamily ซึ่งมีการตอบสนองต่อสารพิษแต่ละชนิดแตกต่างกันไป โดยก่อนทำการตรวจหาการตอบสนองของไซโตโครม P-450 จะต้องทราบว่าสารพิษชนิดใดที่เป็นตัวบ่งชี้ทำให้ไซโตโครม P-450 มีการตอบสนองต่อการกำจัดสารพิษออกจากร่างกายและในการตรวจสอบไซโตโครม P-450 จะต้องใส่สารซึ่งทำปฏิกิริยาโดยเอนไซม์ (Substrate) เข้าไป (Goksøyr & Husøy, 1998) ซึ่งจำเพาะต่อไซโตโครม P-450 แต่ละ Subfamily ด้วยเช่นกัน ดังแสดงในตารางที่ 2-3

ตารางที่ 2-3 สารพิษชนิดต่าง ๆ ที่ส่งผลต่อกระทบต่อ CYP ชนิดต่าง ๆ (Goksøyr & Husøy, 1998)

Subfamily	Prominent inducers	Common substrates
CYP1A	PAHs, BNF, Planar PCBs, Dioxins, Furans, Drugs	PAHs, Ethoxyresorufin
CYP2B	Barbiturates, Non-Planar PCBs, DDT	Barbiturates, Steroids, Ethylmorphine
CYP3A	PCN,Glucocorticoids	Steroids (6ß-Hydroxylase)
CYP4A	Clofibrate, Phthalates	Lauric Acid, Arachidonic

2.2 สารพีเอเอช (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons; PAHs)

PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons) เป็นกลุ่มสารเคมีที่โครงสร้างโมเลกุลประกอบด้วยวงอะโรมาติก (Aromatic Ring) ตั้งแต่ 2 วงเชื่อมต่อกัน (Fused) ลักษณะการเชื่อมต่อกันคือวงอะโรมาติก 2 วงที่อยู่ติดต่อกันต้องใช้คาร์บอน 2 อะตอมร่วมกัน วงอะโรมาติกอาจมีคาร์บอน 5 หรือ 6 อะตอมก็ได้ PAHs จัดเป็นกลุ่มของสารเคมีที่ละลายได้ดีในไขมัน มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมในลักษณะของสารปนเปื้อนก่อให้เกิดมลพิษ แต่มักจะมีอยู่ในปริมาณที่น้อยมากในระดับของไมโครกรัมต่อกิโลกรัม หรือนาโนกรัมต่อลูกบาศก์เมตร (พรชัย สิทธิศรัณย์กุล, 2545) ประกอบด้วยสารที่มีสูตรโครงสร้างหลักแตกต่างกัน 35 ชนิด และแต่ละสูตรโครงสร้างหลักประกอบด้วยอนุพันธ์ต่าง ๆ (Derivative) PAHs มีปรากฏอยู่ในธรรมชาติ เช่น น้ำมันดิบ ถ่านหิน รวมทั้งปรากฏอยู่ในควันจากภูเขาไฟ (กองจัดการสารอันตรายและกากของเสีย, 2543)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตัวอย่างสารในกลุ่ม PAHs ได้แก่แนฟทาลีน (Naphthalene) ฟีแนนทรีน (Phenanthrene) เบนโซ[เอ]แอนทราซีน (Benzo[a]Anthracene) และเบนโซ[เอ]ไพรีน (Benzo[a]Pyrene) เป็นต้น แนฟทาลีนเป็นสารที่สกัดจากผงถ่านมีลักษณะเป็นเกล็ดสีขาว เดิมใช้เป็นลูกเหม็น ปัจจุบันใช้มากในอุตสาหกรรมสีย้อม ในขณะที่เบนโซ[เอ]แอนทราซีนและเบนโซ[เอ]ไพรีน ซึ่งเกิดจากการเผาไหม้จะมีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง (มลิวรรณ บุญเสนอ, 2545)

2.2.1 การแพร่กระจายของ PAHs ในสิ่งแวดล้อม

PAHs สามารถเข้าสู่สิ่งแวดล้อมได้หลายทาง ทั้งจากธรรมชาติและจากการกระทำของมนุษย์ PAHs ที่เกิดจากธรรมชาติเช่น การซึมของน้ำมันดิบจากแหล่งน้ำมันใต้ดินทำให้เกิดการปนเปื้อนของ PAHs ทั้งในน้ำเค็มและน้ำจืด (Reynaud & Deschaux, 2006) ไฟไหม้ป่า และภูเขาไฟระเบิด ส่วนที่เกิดจากการกระทำของมนุษย์ที่สำคัญคือ กิจกรรมที่มีการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์ การเผาไหม้ในสภาวะที่มีออกซิเจนจำกัด มีผลทำให้สารประกอบคาร์บอนอินทรีย์ไม่ถูกออกซิไดซ์เป็นคาร์บอนไดออกไซด์จนหมด ซึ่งการเผาไหม้แบบไม่สมบูรณ์นี้ทำให้เกิด PAHs แตกต่างกัน ทั้งนี้ขึ้นกับวัสดุที่นำมาเผาไหม้

PAHs ที่แพร่กระจายในสิ่งแวดล้อมโดยทั่วไปคือปิโตรเลียมหรือที่เรียกกันว่าน้ำมันดิบ (Crude Oil) เป็นสารประกอบไฮโดรคาร์บอนที่เกิดขึ้นในธรรมชาติจากการทับถมของซากอินทรีย์ภายใต้พื้นผิวโลกเป็นเวลาหลายล้านปีและมี PAHs เป็นองค์ประกอบที่สำคัญ และเป็นแหล่งกำเนิดที่สำคัญของ PAHs ที่สะสมอยู่ในตะกอน ดังนั้นกิจกรรมใดที่มีการใช้ปิโตรเลียม และผลิตภัณฑ์จากปิโตรเลียมมาก โอกาสที่ PAHs จะปนเปื้อนสู่สิ่งแวดล้อมย่อมมีมากขึ้นตามไปด้วย สาเหตุสำคัญที่ทำให้ PAHs แพร่กระจายสู่สิ่งแวดล้อมได้แก่

1. การขนส่งโดยเรือบรรทุกน้ำมันซึ่งมีโอกาสสูญเสียน้ำมันขณะที่ขนถ่าย
2. อุบัติเหตุเรือบรรทุกน้ำมันชนกันหรืออับปางรวมทั้งการรั่วของถังน้ำมัน
3. ปฏิบัติการนอกชายฝั่งเช่น การขุดเจาะน้ำมันหรือแก๊สธรรมชาติ การแตกรั่ว หรือการชำรุดของท่อส่งน้ำมันใต้ทะเล
4. โรงกลั่นน้ำมัน น้ำทิ้งจากโรงน้ำมันซึ่งมีคราบน้ำมันบางส่วนปนอยู่ หรือกรณีถังน้ำมันสำรองบริเวณชายฝั่งชำรุด หรือเกิดอุบัติเหตุทำให้มีน้ำมันรั่วไหลออกมา
5. การล้างทำความสะอาดถังน้ำมัน
6. น้ำทิ้งจากโรงงานอุตสาหกรรมที่ตั้งอยู่บริเวณชายฝั่ง
7. น้ำทิ้งจากชุมชน รวมทั้งการชะล้างคราบน้ำมัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.2.2 เบนโซ[เอ]ไพรีน (Benzo[a]Pyrene; BaP)

เบนโซ[เอ]ไพรีนเป็นสารในกลุ่ม PAHs ที่สามารถเกิดได้จากธรรมชาติและจากกิจกรรมต่าง ๆ ของมนุษย์ในธรรมชาติ เบนโซ[เอ]ไพรีนเกิดจากไฟป่า และภูเขาไฟระเบิด ที่เกิดจากการกระทำของคนส่วนใหญ่เป็นการเผาไหม้ไม่สมบูรณ์ เช่น การเผาฟืน การเผาถ่านในบ้านเรือน การเผาขยะ ควันบุหรี่ ไอเสียรถยนต์ (กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ก)

2.2.3 การของเปลี่ยนแปลงเบนโซ[เอ]ไพรีนในสิ่งแวดล้อม

เบนโซ[เอ]ไพรีนเป็นสารที่ไม่ชอบน้ำ ดังนั้นจึงสะสมในสิ่งมีชีวิตได้เป็นอย่างดี ค่า Bioconcentration Factor (BCF) ของเบนโซ[เอ]ไพรีนของสิ่งมีชีวิตในน้ำแต่ละสปีชีส์มีความแตกต่างมาก คือ BCF ในหอย Clam (*Rangia cuneata*) มีค่าเท่ากับ 9 ในขณะที่ Water Flea (*Daphnia pulex*) มีค่าสูงถึง 134,248 (U.S. DHHS, 1995 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ก)

Rice, Myer, Willis, Frence, and Casillas, 2000 ได้ทำการทดลองใน Polychaetes ที่ได้รับสารเบนโซ[เอ]ไพรีน และ Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) พบว่าทำให้ Polychaetes มีอัตราการเจริญเติบโตลดลง และยังส่งผลให้ปลาที่กิน Polychaetes ที่ได้รับสารทั้งสองเป็นอาหารมีอัตราการเจริญเติบโตต่ำลงเช่นกัน นอกจากนี้สามารถตรวจพบ CYP1A ในเนื้อเยื่อของปลาทั้งบริเวณ ตับ ลำไส้ เหงือก และ หลอดเลือด แสดงให้เห็นว่าสารพิษเหล่านี้มีผลกระทบการดำรงชีวิตต่อสัตว์น้ำและยังสามารถสะสมผ่านห่วงโซ่อาหาร (Biomagnification) เป็นอันตรายต่อผู้บริโภคในลำดับสูงขึ้นไปได้อีกด้วย

2.2.4 เมตาบอลิซึมของเบนโซ[เอ]ไพรีน

ปฏิกิริยาแรกของการเกิดเมตาบอลิซึม เบนโซ[เอ]ไพรีน ถูกเมตาบอไลซ์ด้วยเอนไซม์ในกลุ่ม Microsomal Cytrochrome P-450 ได้เป็น Arene Oxides หลายชนิดคือ 4,5-Benzo[a]Pyrene Oxide, 7,8- Benzo[a]Pyrene Oxide และ 9,10- Benzo[a]Pyrene Oxide ซึ่ง Arene Oxides เหล่านี้จะมีการเปลี่ยนแปลงอย่างรวดเร็วและหลายแบบ (IARC, 1983 อ้างถึงในกรมควบคุมมลพิษ, 2542 ก) คือมีการจัดโครงสร้างใหม่ภายในโมเลกุลได้เมตาบอไลท์จำพวกฟีนอล เกิดปฏิกิริยาไฮเดรชันที่ตำแหน่งต่าง ๆ ได้ เมตาบอไลท์เป็นพวก Transdihydrodiols และทำปฏิกิริยา Conjugation กับ Glutathione

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

เมตาบอไลท์ของสารเบนโซ[เอ]ไพรีน เกิดขึ้นได้ในอวัยวะต่าง ๆ คือ ตับ ปอด เยื่อบุทางเดินหายใจ กระเพาะปัสสาวะ และผิวหนัง ชนิดและปริมาณของเมตาบอไลท์ที่ได้จากปฏิกิริยาต่าง ๆ ในขบวนการเมตาบอลิซึมต่างกันไปในเนื้อเยื่อแต่ละชนิด เอนไซม์ที่สำคัญและจำเป็นในการเปลี่ยนเบนโซ[เอ]ไพรีนไปเป็นสารก่อมะเร็ง Benzo[a]Pyrene-7,8-Diol-9,10-Epoxide คือเอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครม P-450 และ Epoxide Hydrolases เอนไซม์นี้อยู่ในส่วนไมโครโซมของเซลล์ในอวัยวะต่าง ๆ คือ ตับ (ซึ่งมีเอนไซม์ทั้งสองในปริมาณสูง) ปอด เยื่อบุทางเดินหายใจ เยื่อบุลำไส้ และอวัยวะอื่น ๆ ด้วย การเปลี่ยนแปลงการทำงานของเอนไซม์ในกลุ่มไซโตโครม P-450 มีผลต่อการเป็นสารก่อมะเร็งของเบนโซ[เอ]ไพรีน

2.3 สารพีซีบี (Polychlorinated Biphenyls; PCBs)

PCBs เป็นสารที่ไม่ได้เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แต่ได้จากการสังเคราะห์ขึ้น ตั้งแต่ปี ค.ศ. 1930 จากปฏิกิริยา Chlorination ของ Biphenyl กับ Anhydrous Chlorine โดยมี Iron Filing หรือ Ferric Chlorine เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา PCBs เป็นของเหลวที่มีคลอรีน ไฮโดรเจน คาร์บอนเป็นองค์ประกอบที่สำคัญลักษณะที่ปรากฏคล้ายกับ Mineral Oils คุณสมบัติของ PCBs ที่เด่นและสำคัญเหมาะสำหรับนำไปใช้ในกิจการอุตสาหกรรม คือ นำความร้อนสม่ำเสมอและคงที่ เฉื่อยต่อปฏิกิริยาออกซิเดชัน และไม่ทำปฏิกิริยากับกรด ด่างหรือสารเคมีอื่น ๆ รวมทั้งเป็นฉนวนไฟฟ้าที่ดีมาก นอกจากนี้คุณสมบัติเฉพาะของ PCBs เองยังทำให้เป็นสารที่มีอันตรายเมื่อมีการรั่วไหลลงสู่สิ่งแวดล้อม เนื่องจากคุณสมบัติของ PCBs ที่สามารถละลายน้ำได้น้อย และยิ่งละลายน้ำได้น้อยลงเมื่อสารนั้นมีปริมาณคลอรีนเพิ่มมากขึ้น เช่น Aroclor 1242 ละลายน้ำได้ 200 ppb และ Aroclor 1248 ละลายน้ำได้ 100 ppb รวมถึงยังมีความคงตัวและสลายตัวได้ยาก ระเหยได้ยาก และไม่ไวไฟ

PCBs เป็นสารที่รู้จักกันแพร่หลายในชื่อทางการค้าของแต่ละประเทศที่เป็นผู้ผลิตเช่น Aroclor (สหรัฐอเมริกา) Phenoclor (ฝรั่งเศส) Clophen (เยอรมัน) Kanoclor (ญี่ปุ่น) Santoterm (ญี่ปุ่น) Fenclor (อิตาลี) Sovol (รัสเซีย)

2.3.1 การใช้ประโยชน์จาก PCBs

PCBs ใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ ดังนี้

1. ใช้เป็น Dielectric Fluid ในการผลิตอุปกรณ์ไฟฟ้า เช่นตัวเก็บประจุไฟฟ้า (Capacitor) และหม้อแปลงไฟฟ้า (Transformer)

2. ใช้เป็น Industrial Fluid ใน Hydraulic System, Gas Turbine และปั๊มสุญญากาศ

3. ใช้ในระบบถ่ายเทความร้อน (Heat Transfer)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. ใช้ผสมในน้ำมันหล่อลื่น (Lubricating and Cutting Oil) และสารเคมีป้องกันกำจัดศัตรูพืชและสัตว์ (Pesticide)

5. ใช้เป็น Plasticizer ในสี กาว สารกันรั่วซึม และพลาสติก เป็นต้น

2.3.2 วิธีการแพร่กระจายของ PCBs เข้าสู่สิ่งแวดล้อม

1. การแพร่กระจายในบรรยากาศ การแพร่กระจายของ PCBs เข้าสู่บรรยากาศจากกระบวนการผลิต PCBs นั้นมักไม่เกิดขึ้น แต่จะเกิดภายหลังจากการใช้และการทำลายหรือกำจัดทิ้ง โดยที่แพร่กระจายมาจาก

- การระเหยของ PCBs Plasticized Resin โดยเฉพาะพวกที่มีปริมาณคลอรีนต่ำ ๆ
- การเผาขยะหรือของเหลือใช้จากอุตสาหกรรม และบ้านเรือน ซึ่งเตาเผาขยะส่วนใหญ่ไม่มีประสิทธิภาพดีพอที่จะทำลาย PCBs
- การระเหยจากดินและจากกากตะกอนของระบบกำจัดน้ำทิ้ง (Sewage Sludge)

2. การรั่วไหลและการกำจัดของเหลือใช้ของสาร PCBs จากอุตสาหกรรม การแพร่กระจายในลักษณะนี้ จะมีผลต่อปัญหามลภาวะในสิ่งแวดล้อมโดยเฉพาะต่อห่วงโซ่อาหาร

2.3.3 ปริมาณความเข้มข้นของ PCBs ในสิ่งแวดล้อม

PCBs ได้แพร่กระจายไปอย่างกว้างขวางในสิ่งแวดล้อม เช่น ในบรรยากาศ แหล่งน้ำ ดิน และตะกอนดิน

1. ในอากาศ จากรายงานของ U.S. EPA ปริมาณความเข้มข้นของ PCBs ในอากาศมีค่าในช่วง 1-50 ng/m^3 (กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

2. ในดินและตะกอนดิน การสำรวจของสถาบันเทคโนโลยีแห่งเอเชีย (1979 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2541) ตรวจพบ PCBs ในตะกอนดินแม่น้ำเจ้าพระยามีค่า Non-Detectable-0.152 ดินจากแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่าง 0.3-2.9 ug/kg

3. ในน้ำ ปริมาณ PCBs ในแหล่งน้ำที่ได้รับการปนเปื้อนมาก (Heavily Fresh Water) โดยทั่วไปจะมีค่าต่ำ (น้อยกว่า 0.0005 ug/l) เมื่อเทียบกับปริมาณ PCBs ละลายน้ำได้หลายเท่าตัว เนื่องจากสารแขวนลอยในน้ำจะดูดซับ PCBs ไว้ (Duke et al., 1970 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2541)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

4. ในสิ่งมีชีวิตปริมาณ PCBs ที่ตรวจพบในสิ่งมีชีวิตมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับสิ่งมีชีวิตที่ตรวจนั้นอยู่ในบริเวณที่มีมลพิษเนื่องจาก PCBs หรือไม่ ปริมาณไขมันในเนื้อเยื่อและ Tropic Level ของสิ่งมีชีวิตในวงจรอาหารจากรายงานของ Payomyam (1976 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2541) พบว่าปลาและหมึกจากแม่น้ำเจ้าพระยาตอนล่างมีค่า PCBs 5.3-106.2 ug/kg และ 58.7-69.0 ug/kg ตามลำดับ

2.4 สารไดออกซิน (Dioxins)

ไดออกซิน (Dioxins) คือ สารประกอบทางเคมีชนิดหนึ่งมีลักษณะเป็นผลึกสีขาวรูปเข็ม ไม่ละลายน้ำ ละลายได้เล็กน้อยในตัวทำละลายอินทรีย์ เช่น Acetone หรือ Methyl alcohol โครงสร้างประกอบด้วยวงแหวนคาร์บอน 2 โมเลกุล และออกซิเจน 2 อะตอม เมื่อเกิดปฏิกิริยาทางเคมี คลอรีนจะเข้าไปแทนที่ไฮโดรเจนในวงแหวนของโมเลกุล ทำให้เกิดอนุพันธ์ของไดออกซิน หรือเรียกโดยทั่วไปว่า ไดออกซิน จากสูตรโครงสร้างทางเคมีอะตอมของคลอรีนสามารถมีได้ตั้งแต่ 1-8 อะตอม และสามารถจับโมเลกุลที่ตำแหน่งต่าง ๆ ตั้งแต่ 1-4 และ 6-9 ทำให้เกิดไอโซเมอร์ (Isomer) ได้มากมายแต่อนุพันธ์ที่มีพิษมากที่สุดคือ 2, 3, 7, 8–Tetrachlorodibenzo-*p*-Dioxin (TCDD) (กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)

ไดออกซิน เป็นสารที่ละลายได้ดีในไขมัน มีความคงตัวทางเคมีสูง สลายตัวได้ยาก ค่าครึ่งชีวิต (Half Life) เฉลี่ยประมาณ 7 ปี สามารถสะสมปนเปื้อนอยู่ในห่วงโซ่อาหาร (Food Chain) และตรวจพบในร่างกายมนุษย์และสัตว์ได้ เมื่อสัตว์ได้รับไดออกซิน จะเกิดการทำลายที่ตับ (Liver Damage) ลูกพิการ (Tetratogenic) อาการพิษต่อลูกในท้อง (Fetotoxic) ระบบการสืบพันธุ์ผิดปกติ ภูมิคุ้มกันลดลง สูญเสียไขมันในร่างกาย (Loss of Body Fat) เนื้องอกและมะเร็ง จากการทดลองพบว่า TCDD มีค่า LD 50 = 0.022 mg/kg ในหนูตัวผู้ (Male Rat) โดยทั่วไป เมื่อสัตว์ได้รับ TCDD ในขนาด 1-100 mg/kg ทำให้สัตว์ตายได้ เมื่อคนได้รับไดออกซินจะทำให้เกิดสิว (Chloracne) ลักษณะคล้ายสิวหัวช้างบริเวณจมูก แก้ม คอ หลังใบหู หน้าอก หลัง อวัยวะสืบพันธุ์ ขา ทำให้เกิดผื่นคันตามผิวหนัง (Skin Rash) รอยไหม้บนผิวหนัง (Burn-Like Skin Lesions) ปวด (Pain) อ่อนเพลีย (Weakness) ทำให้เดินหรือเคลื่อนไหวลำบาก ปวดข้อ (Arthritis) อาการแพ้ง่าย (Hyperirritability) การนอนหลับผิดปกติ (Sleep Disorder) ความต้องการทางเพศลดลง อาการทางจิต (Psychiatric Pathology) อาการผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน ระบบฮอร์โมน ระบบประสาท ระบบสืบพันธุ์ เนื้องอก มะเร็ง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ไดออกซิน พบอยู่ทั่วไปในโลกโดยสามารถพบได้ในน้ำ ดิน อากาศ อาหาร เป็นต้น ไดออกซินมีอาจเกิดจากธรรมชาติ เช่น ภูเขาไฟระเบิด ไฟไหม้ป่า และเกิดจากมนุษย์ เช่น การฟอกกระดาษ การถลุงแร่ การผลิตสารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ เช่น สารกำจัดศัตรูพืช พลาสติก น้ำยารักษาเนื้อไม้ การเผาขยะที่มีสารอินทรีย์ และมีคลอรีนที่อุณหภูมิไม่สูงมาก (น้อยกว่า 700 °C) การสูบบุหรี่ การเผาไหม้ของเชื้อเพลิงในรถยนต์ อุบัติเหตุต่าง ๆ เช่น การเกิดระเบิดของโรงงานที่ผลิตสารเคมีที่มีคลอรีนเป็นองค์ประกอบ การเกิดไฟไหม้โกดังเก็บสารเคมี โดยอุตสาหกรรมที่มีการใช้สารไดออกซินมากได้แก่ โรงงานแปรรูปไม้และอุตสาหกรรมบำบัดที่มีการใช้สาร Chlorophenol และโรงงานผลิตยาปราบวัชพืช เช่น 2,4-D และ 2,4,5-T (สุวัจน์ ธัญรส, 2549) นอกจากนี้ยังพบไดออกซินได้จากการนำไขมันใช้แล้วที่ปนเปื้อนด้วยสารไดออกซินในปริมาณสูงมาผสมกับส่วนประกอบอื่นแล้วผลิตเป็นอาหารสัตว์ ดังเช่นที่เกิดขึ้นในประเทศเบลเยี่ยมเมื่อปี พ.ศ. 2542 การทำสงครามโดยใช้สารเคมีเป็นอาวุธ เช่น สงครามเวียดนามที่ใช้สาร 2,4-D และ 2,4,5 -T ซึ่งมีไดออกซินปนเปื้อนอยู่ เป็นเหตุให้เกิดการขุดพบไดออกซิน ซึ่งเหลือจากการใช้เป็นอาวุธสงครามที่สนามบินบ่อฝ้าย จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ เมื่อปี พ.ศ. 2542 (กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)

2.4.1 การเปลี่ยนแปลงของไดออกซินในสิ่งแวดล้อม

ไดออกซินเป็นสารไม่ชอบน้ำ (Hydrophobic) มีค่า *n*-Octanol-Water Partition Coefficient (K_{ow}) สูงถึง 1,400,000 สามารถสะสมได้ดีในสัตว์น้ำ มีค่าการสะสมในสิ่งมีชีวิตเมื่อเทียบกับตัวกลางที่สิ่งมีชีวิตนั้นอาศัยอยู่ (Bioconcentration Factor; BCF) ที่สูงมาก

Frakes et al. (1993 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข) ศึกษาการสะสมของไดออกซิน (*p*-dioxin) ในปลาชนิดต่าง ๆ ซึ่งจับได้จากแม่น้ำ 5 สายในมลรัฐ Maine สหรัฐอเมริกา บริเวณที่จับปลาเป็นบริเวณที่อยู่ใต้จากโรงงานกระดาษและเยื่อกระดาษที่ใช้คลอรีนในการฟอกสี พบค่า BCF ของ *p*-Dioxin อยู่ระหว่าง 11,500-24,600 ในปลา Smallmouth Bass และ 17,900-28,300 ในปลา Rainbrow Trout สำหรับปลา White Perch มีค่า 3,000-7,500 และ 78,500-106,000 ในปลา White Sucker ซึ่งมีค่าใกล้เคียงกับค่า BCF ในปลาสปีชีส์ต่าง ๆ ที่ได้จากการทดลองในห้องปฏิบัติการ ซึ่งแสดงในตารางที่ 2-4

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตารางที่ 2-4 Bioconcentration Factor (BCF) ของ Dioxins ในสัตว์น้ำ (กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)

สปีชีส์	อายุ/ขนาด	การทดลอง	ระยะเวลา (วัน)	ความเข้มข้นในน้ำ (ng/l)	ความเข้มข้นในเนื้อเยื่อ (ug/kg)	BCF	เอกสารอ้างอิง
Algae *Oedogonium cardiacum*	-	Static	7	2.4	5.0	2083	Yockim et cl. (1983 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)
Water flea *Daphia magna*	-	Static	7	2.4	17.1	7125	Yockim et el. (1983 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)
หอย *Physa sp.*	-	Static	7	2.4	5.0	2083	Yockim et el. (1983 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)
ปลา Fathead Minnow *Pimephales promeles*	juvenile	21-23° C	28	0.9	25.4	29,200	Adam et al. (1986 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)
Rainbow Trout *Oncorhynchus mykiss*	น้ำหนัก 35 g	12 ° C	6 ช.ม.	7.0	80.0	11,400	Branson et al. (1985 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)

2.4.2 การสะสมไดออกซินในร่างกาย (Bioconcentration)

การสะสมในเนื้อเยื่อร่างกายมีสัดส่วนต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ในพวกสัตว์กัดแทะ (Rodents) มักพบว่ามีการสะสมของไดออกซินในตับมากกว่าในไขมัน แต่ในคนมีการสะสมในตับและไขมันเท่า ๆ กัน (Leung et al., 1990 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข) จากการสำรวจในคนที่ทำงานในเขตอุตสาหกรรมและมีโอกาสได้รับไดออกซินมาก พบว่ามีการสะสมในไขมันสูงถึง

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2,500 pg/g โดยไม่แสดงอาการป่วย (Patterson et al., 1986 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข) หรืออาจมีอาการ Chloraone เกิดขึ้นชั่วคราว (Byard, 1987 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)

2.4.3 เมตาบอลิซึมของไดออกซิน (Metabolism)

ไดออกซินสามารถคงอยู่ในร่างกายของคนและสัตว์ได้เป็นเวลานาน แต่สารเหล่านี้ก็ถูกเมตาบอลิซึมภายในร่างกายได้สารเมตาบอไลท์หลายชนิด ซึ่งถูกขับออกทางปัสสาวะและน้ำดี ชนิดและปริมาณของสารเมตาบอไลท์ของไดออกซินแตกต่างกันไปในสัตว์แต่ละสปีชีส์

การศึกษาถึงความเป็นพิษของสารเมตาบอไลท์ของไดออกซินพบว่าสารเมตาบอไลท์ส่วนมากมีความเป็นพิษต่ำกว่าไดออกซินหรือบางชนิดก็ไม่มีความเป็นพิษเลย (Yoshimura et al., 1986 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข) แสดงว่าการเกิดเมตาบอลิซึมของไดออกซินในร่างกายเป็นไปในเชิงของการลดความเป็นพิษและเร่งการกำจัดสารพิษออกจากร่างกาย

เมตาบอลิซึมของไดออกซินเกิดขึ้นโดยเอนไซม์ในกลุ่ม Microsomal Cytochrome P-450 Monooxygenase (MFO) มีหลายรูปแบบและที่สำคัญในกระบวนการเมตาบอลิซึมของไดออกซิน คือ Cytochrome P-450 1A1 (CYP1A1) และ Cytochrome P-450 1A2 (CYP1A2) (Tai et al., 1993 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข) เนื่องจากมีหลักฐานแสดงว่าไดออกซินอาจเหนี่ยวนำเมตาบอลิซึมของตัวเองให้เกิดมากขึ้นได้ (Autoinduction Metabolism) การศึกษาในหนู rat ที่ได้รับไดออกซินฉีดเข้าช่องท้องก่อนการให้กิน Radiolabeled *p*-Dioxin พบว่าหนูเหล่านี้มีปริมาณสารกัมมันตรังสีที่ถูกขับออกทางน้ำดีมากกว่าหนูที่ไม่ได้รับการฉีด *p*-Dioxin ล่วงหน้าอย่างมีนัยสำคัญ (Poiger & Buser, 1984 อ้างถึงใน กรมควบคุมมลพิษ, 2542 ข)

2.5 ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน เป็นปฏิกิริยาระหว่างโมเลกุล 2 ชนิดคล้ายกับกรณีของปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสับเสตรท แต่มีข้อแตกต่างบางประการ ได้แก่ ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงทางเคมีอย่างถาวรต่อแอนติเจนหรือแอนติบอดี ปฏิกิริยาย้อนกลับได้ (Reversible) และปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนประกอบด้วยพันธะต่าง ๆ ยกเว้นพันธะโคเวเลนต์ (Noncovalent Interaction) ระหว่างอิพิโทป (Epitope) ของแอนติเจนกับบริเวณที่มีความแปรปรวนสูง (Hypervariable Region) หรือพาราโทป (Paratope) ของแอนติบอดี

ความจำเพาะระหว่างปฏิกิริยาของแอนติบอดีและแอนติเจนสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน (Immunoassay) รูปแบบต่าง ๆ ซึ่งสามารถใช้ได้ทั้งในการตรวจสอบแอนติบอดีหรือแอนติเจนก็ได้ สามารถใช้ในการวินิจฉัยโรคต่าง ๆ ตรวจระดับการ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ตอบสนองโดยการสร้างแอนติบอดี พิสูจน์ทราบโมเลกุลทางชีววิทยาหรือทางการแพทย์ที่ต้องการ Immunoassay รูปแบบต่าง ๆ จะมีความไว และความรวดเร็วแตกต่างกันไป บางชนิดใช้ตรวจในแง่คุณภาพ บางชนิดสามารถใช้วัดปริมาณได้ด้วย

2.5.1 ปฏิกิริยาปฐมภูมิระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน

ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจน (Ab-Ag) เป็นปฏิกิริยาที่ใช้พันธะต่าง ๆ ยกเว้นพันธะโคเวเลนต์ ประกอบด้วยพันธะไฮโดรเจน (Hydrogen Bond) พันธะไอออนิก (Ionic Bond) ปฏิกิริยาไฮโดรโฟบิก (Hydrophobic Interaction) และแรงวันเดอร์วาวล์ส เนื่องจากความแรงของปฏิกิริยานี้ค่อนข้างต่ำเมื่อเทียบกับพันธะโคเวเลนต์ (Covalent Bond) ดังนั้นปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจึงประกอบด้วยปฏิกิริยาต่าง ๆ จำนวนมากรวมกันก่อให้เกิดความแข็งแรงของปฏิกิริยาสูงพอและปฏิกิริยาจะต้องเกิดระหว่างโมเลกุลที่อยู่ชิดกันน้อยกว่า 1 แองสตรอม ดังนั้นปฏิกิริยาที่มีความแรงสูงส่วนของอิพิโทปจะต้องมีรูปร่างลักษณะพอเหมาะเข้ากับตำแหน่งที่จับแอนติเจน (Antigen Binding Site) หรือพาราโทปของแอนติบอดีพอดี ซึ่งจะก่อให้เกิดความจำเพาะของปฏิกิริยาของ Ab-Ag คล้ายกับการทำงานของลูกกุญแจและแม่กุญแจ

2.5.2 แรงจับของแอนติบอดี (Antibody Affinity)

ความแรงของพันธะต่าง ๆ ยกเว้นพันธะโคเวเลนต์ระหว่างพาราโทป 1 ตำแหน่งของแอนติบอดี กับอิพิโทป 1 ตำแหน่งบนแอนติเจนเรียกว่า Affinity ของแอนติบอดีกับอิพิโทปนั้น ๆ แอนติบอดีที่มี Affinity ต่ำจะจับกับแอนติเจนด้วยแรงอ่อน ๆ และมักจะแยกหลุดจากแอนติเจนได้ง่าย ในขณะที่แอนติบอดีที่มี Affinity สูงจะจับกับแอนติเจนอย่างแน่นหนาและจับอยู่ได้นาน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.5.3 แรงจับรวมของแอนติบอดี (Antibody Avidity)

Affinity ของ 1 ตำแหน่งที่จับระหว่างแอนติเจนกับแอนติบอดีไม่ได้สะท้อนถึงความแรงของปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนเสมอไป โดยเฉพาะกรณีที่แอนติเจนมีอิพิโทปซ้ำ ๆ กันหลายตำแหน่ง (Multivalent Antigen) การทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่มีตำแหน่งที่จับแอนติเจนหลายตำแหน่ง (Multivalent Antibody) ทำให้โอกาสของการทำปฏิกิริยาระหว่างแต่ละตำแหน่งที่จับแอนติเจนของแอนติบอดีกับแต่ละอิพิโทปบนแอนติเจนเพิ่มขึ้น ความแรงรวมที่เกิดจากปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีที่มีตำแหน่งจับหลายตำแหน่งและแอนติเจนที่มีอิพิโทปซ้ำ ๆ กันเรียกว่า Avidity

ซึ่งมักใช้เป็นมาตรการในการวัดความสามารถในการทำปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับองค์ประกอบทางชีววิทยาต่าง ๆ (เช่น แบคทีเรีย ไวรัส ซึ่งมีอิพิโทปซ้ำ ๆ กันมากมาย) มากกว่าในการวัด Affinity ของแต่ละตำแหน่งที่จับแอนติเจนซึ่งคุณสมบัติในแง่ Avidity สูงจะเป็นการชดเชยคุณสมบัติของแอนติบอดีที่มี Affinity ต่ำ ๆ ได้ เช่นกรณีของ IgM ซึ่งมักจะมี Affinity ต่ำกว่า IgG แต่คุณสมบัติในแง่ Avidity มีสูงกว่าเนื่องจากมีตำแหน่งที่จับกับแอนติเจนจำนวนมากกว่าทำให้ IgM สามารถจับกับแอนติเจนได้อย่างมีประสิทธิภาพ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.5.4 ปฏิกิริยาข้าม (Cross Reaction)

ถึงแม้ปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีและแอนติเจนจะมีความจำเพาะสูง บางครั้งแอนติบอดีที่ชักนำโดยแอนติเจนชนิดหนึ่งสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนอื่น ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องกันได้ ซึ่งปฏิกิริยาข้ามอาจจะเกิดได้ 2 กรณี คือกรณีที่แอนติเจนทั้งสองอาจมีอิพิโทปบางส่วนเหมือนกันหรือแอนติบอดีที่จำเพาะต่ออิพิโทปหนึ่ง ๆ อาจจะจับกับอิพิโทปอื่น ๆ ที่มีคุณสมบัติทางเคมีใกล้เคียงกัน ในกรณีหลัง Affinity ของแอนติบอดีกับอิพิโทปที่มีปฏิกิริยาข้ามมักต่ำกว่าอิพิโทปที่ใช้ชักนำการสร้างแอนติบอดี เช่น กรณีของแอนติบอดีต่อไวเทลลินของกุ้งตะกาดสามารถจับกับบางส่วนของไวเทลลินของกุ้งกุลาดำซึ่งเป็นกุ้งในวงศ์เดียวกัน แต่ไม่มีปฏิกิริยากับไวเทลลินของกุ้งต่างวงศ์ เช่น กุ้งก้ามกราม (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.6 การทดสอบโดยใช้แอนติบอดี

การจับของแอนติบอดีกับแอนติเจนเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง ดังนั้นจึงสามารถใช้แอนติบอดีในการตรวจสอบแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจงหรือในทางกลับกันอาจใช้แอนติเจนในการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นเองหรือเกิดขึ้นตามธรรมชาติ สามารถใช้ในการศึกษาวินิจฉัยด้านต่าง ๆ เพื่อพิสูจน์ทราบ ตรวจวัดปริมาณเชื้อ หรือหาตำแหน่งของแอนติเจนต่าง ๆ ด้วย ซึ่งการทดสอบด้วยแอนติบอดีประกอบด้วยหลากหลายวิธี ซึ่งมีรูปแบบและความไวต่างกัน (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.6.1 Western blotting

ในเทคนิค Immunoelectrophoresis เป็นการแยกสารผสมของแอนติเจนออกจากกันก่อนทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีชนิดต่าง ๆ แต่เนื่องจากระยะทางจำกัดและขนาดรูของวุ้นค่อนข้างมีขนาดใหญ่และค่า PL ของโปรตีนในสารผสมอาจมีค่าใกล้เคียงกัน ทำให้การแยกและตกตะกอนของโปรตีนเหล่านั้นแยกจากกันไม่สมบูรณ์ และยากต่อการพิสูจน์ทราบชนิดของโปรตีนเหล่านั้น

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ปัญหานี้สามารถแก้โดยการแยกโปรตีนผสมโดยการแยกโปรตีนผสมโดยวิธี Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) ซึ่งสามารถปรับขนาดช่องภายในเจลโดยการปรับความเข้มข้นของโพลีอะคริลาไมด์ (Polyacrylamide) เพื่อให้เหมาะสมกับขนาดของโปรตีน ทำให้การแยกโปรตีนมีความละเอียดสูง เมื่อโปรตีนถูกแยกเป็นแถบ ๆ ด้วยกระแสไฟฟ้าแล้วจะถูกย้ายลงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสโดยใช้กระแสไฟฟ้า จากนั้นมาทำปฏิกิริยากับแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนต่าง ๆ ซึ่งสามารถพิสูจน์ทราบโดยการติดฉลากแอนติบอดีด้วยสารกัมมันตภาพรังสี (Radioisotope) สารเรืองแสง (Fluorescence) หรือเอนไซม์ วิธีหนึ่งที่นิยมใช้คือ Indirect Immunoperoxidase Method ได้แก่การใช้ Goat anti-Mouse IgG H+L Peroxidase Conjugate (GAM-HRP) สำหรับจับกับแอนติบอดีตัวแรกซึ่งเป็น MAb ที่ผลิตได้จากหนูเมาส์ เพื่อตรวจดูความจำเพาะของ MAb แต่ละชนิด

2.6.2 Dot Blotting

Dot Blotting เป็นวิธีตรวจแอนติเจนในสารผสมที่ทำได้ง่าย และทราบผลรวดเร็วเพียงแต่นำสารที่ต้องการมาหยดบนไนโตรเซลลูโลสเมมเบรน (Nitrocellulose Membrane) เพื่อตรึงแอนติเจนติดกับเมมเบรน แล้วบ่มกับแอนติบอดีเช่นเดียวกับวิธี Western Blot แต่ไม่จำเป็นต้องแยกแอนติเจนก่อน วิธีนี้ยังสามารถใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่มีขนาดเล็กหรือเฮปเทน เช่นนิวโรเพบไทด์ขนาดเล็กซึ่งตามปกติไม่สามารถตรึงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสได้ โดยการผสมแอนติเจนกับโปรตีนต่าง ๆ เช่น BSA ก่อนนำมาหยดบนกระดาษไนโตรเซลลูโลส และทำปฏิกิริยาเชื่อมต่อแอนติเจนกับ BSA โดยใช้ไอของกลูตารัลดีไฮด์ เพื่อให้แอนติเจนยึดกับ BSA (Sithigorngul, Stretton, & Cowden, 1991) เพปไทด์จึงสามารถถูกตรึงบนกระดาษไนโตรเซลลูโลสได้ ก่อนนำไปผ่านกระบวนการทำปฏิกิริยากับแอนติบอดี ซึ่งวิธีนี้เป็นวิธีที่สะดวกในการตรวจสอบความจำเพาะของแอนติบอดีกับแอนติเจนต่าง ๆ เช่น กรณีทดสอบปฏิกิริยาข้ามของ MAb จำเพาะต่อแบคทีเรียชนิดต่าง ๆ

2.6.3 Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เป็นวิธีการตรวจสอบปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนโดยใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้แทนสารกัมมันตภาพรังสี หรือสารเรืองแสง วิธีนี้สามารถใช้ตรวจหาแอนติบอดีและแอนติเจนได้อย่างจำเพาะเจาะจง มีความไวสูง ง่าย และรวดเร็ว

การทดสอบโดยทั่วไปมักใช้วัสดุ (Solid Phase) เป็นตัวดูดซับแอนติเจนหรือแอนติบอดีไว้ก่อนและเมื่อปฏิกิริยาระหว่างแอนติบอดีกับแอนติเจนเกิดขึ้นแล้ว ล้างส่วนของแอนติบอดีหรือ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

แอนติเจนส่วนที่ไม่ทำปฏิกิริยาออกจึงทำได้สะดวก เพราะแอนติบอดีและแอนติเจนที่ทำปฏิกริยากันจะติดอยู่กับวัสดุ จากนั้นจึงเติมแอนติบอดีที่จำเพาะด้วยเอนไซม์ลงไป ซึ่งสามารถตรวจสอบได้จากการเปลี่ยนแปลงของสับสเตรทที่ใส่ลงไปภายหลัง ทำให้เกิดเป็นสารมีสีขึ้นเรียกการทดสอบว่า Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

เอนไซม์ที่นิยมใช้กันมากได้แก่ Alkaline Phosphatase หรือ Horseradish Peroxidase ส่วนวัสดุโดยทั่วไปมักใช้พลาสติกเช่น พอลิโพรไพลีน (Polypropylene) ซึ่งผ่านกระบวนการบางอย่างที่ทำให้พลาสติกเหล่านั้นดูดซับโปรตีนได้ดีขึ้น

ELISA มีหลายรูปแบบสามารถใช้ตรวจสอบแอนติบอดีหรือแอนติเจน โดยจะมีแนวทางปฏิบัติคล้าย ๆ กัน ซึ่งรูปแบบของ ELISA มีดังนี้

1. Indirect ELISA ใช้สำหรับตรวจสอบแอนติบอดีเช่น คัดเลือกไฮบริโดมาหรือตรวจแอนติบอดีต่อแอนติเจนในซีรัม วิธีนี้เหมาะสำหรับกรณีที่สามารถเตรียมแอนติเจนบริสุทธิ์หรือบริสุทธิ์บางส่วนในปริมาณน้อยระดับมิลลิกรัม เนื่องจากวิธีนี้มีความไวสูงสามารถตรวจสอบแอนติเจนได้ในระดับนาโนกรัม วิธีนี้เริ่มด้วยการตรึงแอนติเจนในหลุมจากนั้นบ่มแต่ละหลุมด้วยสารละลายที่มีแอนติบอดีที่ต้องการตรวจสอบและล้างแอนติบอดีที่ไม่จับทิ้งไป จากนั้นเติมแอนติบอดีที่ติดฉลากเอนไซม์ซึ่งจำเพาะต่อแอนติบอดีของสัตว์ที่ใช้ (เช่น แอนติบอดีตัวแรกมาจากหนู แอนติบอดีติดฉลากเอนไซม์จะเป็น Anti-Mouse Ig จากสัตว์ต่าง ๆ เช่น กระต่าย แพะ แกะ เป็นต้น) หรืออาจใช้ Protein A หรือ Protein G ติดฉลากด้วยเอนไซม์ด้วยก็ได้ หลังจากบ่มและล้าง เติมสารละลายสับสเตรท และสารหยุดปฏิกิริยา (Stop Solution) ความเข้มสีที่เกิดขึ้นจะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณแอนติบอดีตัวแรกที่จับกับแอนติเจนที่ถูกตรึงอยู่ที่หลุม

2. Indirect Competitive ELISA เป็นวิธีการที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนที่อยู่ในสารละลายสามารถวัดปริมาณได้ ถ้ามีแอนติเจนที่ทราบเป็นมาตรฐาน แนวทางปฏิบัติคล้าย Indirect ELISA เพียงแต่เติมแอนติเจนมาตรฐานความเข้มข้นต่าง ๆ หรือสารละลายแอนติเจนที่ต้องการหาปริมาณลงในหลุมที่มีการตรึงแอนติเจนไว้แล้ว พร้อมกับเติมแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนนั้นในความเข้มข้นที่เหมาะสม (แอนติบอดีที่ให้ค่าความเข้มข้น OD เกือบสูงสุด) และผ่านกระบวนการบ่มในแอนติบอดีติดฉลากเช่นเดียวกับ Indirect ELISA วิธีนี้ก่อให้เกิดการแข่งขันระหว่างแอนติเจนที่ตรึงอยู่ก้นหลุมกับแอนติเจนมาตรฐานในสารละลายที่เติมลงไปแยกจับกับแอนติบอดี ถ้าแอนติเจนในสารละลายมีมาก โอกาสที่แอนติบอดีจะจับกับแอนติเจนที่ตรึงอยู่ที่ก้นหลุมก็ลดลงตามสัดส่วนซึ่งสามารถนำมาสร้างกราฟมาตรฐานสำหรับเปรียบเทียบกับปริมาณแอนติเจนในสารละลายที่ต้องการตรวจหาได้

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

3. Indirect Sandwich ELISA เป็นวิธีที่ใช้ตรวจสอบแอนติเจนโดยตรง โดยทั่วไปจะมีความไวสูงกว่า Competitive ELISA เพราะแอนติเจนจะถูกรวบรวมจับโดยแอนติบอดี (Capture Antibody) ที่ตรึงอยู่ในหลุมก่อนที่จะมีการตรวจจับโดยแอนติบอดีอีกชุดหนึ่ง (แอนติบอดีตัวที่ 2 หรือ Detector Antibody) และตามด้วยแอนติบอดีตัวที่ 3 ติดฉลากด้วยเอนไซม์ (Reported Antibody) ซึ่งมีความจำเพาะต่อแอนติบอดีตัวที่ 2 วิธีนี้มีข้อจำกัดว่าแอนติบอดีตัวที่ 1 และแอนติบอดีตัวที่ 2 ต่างต้องมาจากสัตว์ต่างชนิดกันและแอนติบอดีตัวที่ 3 ต้องไม่มีปฏิกิริยาข้ามไปจับแอนติบอดีตัวที่ 1 ซึ่งถ้ามีแอนติเจนมาตรฐานก็สามารถใช้วิธีตรวจหาปริมาณแอนติเจนในตัวอย่างได้เช่นกัน โดยเปรียบเทียบกับกราฟมาตรฐานของแอนติเจน

2.7 โมโนโคลนอลแอนติบอดี (Monoclonal Antibody; MAb)

โมโนโคลนอลแอนติบอดี (MAb) เป็นการผลิตแอนติบอดีที่มีความจำเพาะสูงพัฒนาโดย Köhler และ Milstein พัฒนาขึ้นจากการหลอมรวมบีเซลล์จากหนูที่ตอบสนองต่อแอนติเจนกับเซลล์มะเร็งหรือไมอิโลมา (Myeloma) ได้เป็นเซลล์ลูกผสมไฮบริโดมา (Hybridoma) ภายหลังจากการโคลนจะสามารถหลั่งแอนติบอดีเพียงชนิดเดียวซึ่งมีความจำเพาะสูง สามารถผลิตได้ในปริมาณมากเท่าที่ต้องการ และนำไปใช้ประโยชน์ได้มากมาย นอกจากการใช้เป็นตัวตรวจสอบใน Immuno Assay รูปแบบต่าง ๆ แล้วยังสามารถเลือกแอนติบอดีที่มีสมบัติเป็นเอนไซม์หรือใช้ในการรักษาโรคได้ด้วย ข้อดีของการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดีอีกประการหนึ่งที่ได้เปรียบการผลิตแอนติซีรัมคือ แอนติเจนที่ใช้ปลูกภูมิคุ้มกันไม่จำเป็นต้องบริสุทธิ์ อาจมีแอนติเจนที่ต้องการอยู่เพียงส่วนน้อยเท่านั้น แต่ในกระบวนการคัดเลือกจะต้องสามารถที่จะหาวิธีคัดเลือกไฮบริโดมาที่ต้องการให้ได้ ลักษณะสำคัญอีกประการหนึ่งของโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่ดี คือแต่ละโคลนมีการสร้างแอนติบอดีชนิดเดียวที่มีความจำเพาะต่ออิพิโทปเพียงตำแหน่งเดียวบนแอนติเจน ทำให้สามารถศึกษาโปรตีนเชิงซ้อนที่ประกอบด้วยหน่วยย่อยต่าง ๆ ใช้ในการติดตามการแปรรูปแอนติเจนในขั้นตอนต่าง ๆ การประเมินปริมาณสารที่ต้องการ ตรวจสอบแอนติเจนหรือวินิจฉัยโรคทางการแพทย์และการวิจัยมากมาย

แต่อย่างไรก็ดีโมโนโคลนอลแอนติบอดีมีข้อเสียบางประการ เนื่องจากคุณสมบัติที่ประกอบด้วยแอนติบอดีจำเพาะต่ออิพิโทปชนิดเดียวบนแอนติเจน ดังนั้นโมโนโคลนอลแอนติบอดีส่วนใหญ่มักไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาตกตะกอนกับแอนติเจนส่วนใหญ่ที่ไม่มีอิพิโทปซ้ำ ๆ กัน และไม่สามารถกระตุ้นระบบคอมพลีเมนต์ให้ทำงานเนื่องจากมีความหนาแน่นของอิพิโทปน้อย ไม่มากพอที่จะทำให้เกิดปฏิกิริยาของแอนติบอดีกับแอนติเจนบริเวณใกล้ ๆ กันได้ และนอกจากนี้การ

เปลี่ยนแปลงทางเคมีของแอนติบอดีหรือแอนติเจนเพียงเล็กน้อยก็สามารถก่อให้เกิดผลลบปลอม และผลไม่สม่ำเสมอ (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

2.7.1 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (ไพศาล สิทธิกรกุล, 2548)

1. การฉีดกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันหนู

1.1 ปลูกภูมิคุ้มกันในหนูเมาส์ด้วยแอนติเจนที่ต้องการ 4 ครั้งทุก ๆ 2 สัปดาห์ ตรวจสอบการผลิตแอนติบอดีของหนูแต่ละตัว 1 สัปดาห์ หลังการฉีดครั้งที่ 4

1.2 ก่อนทำการผลิตไฮบริโดมา 1 สัปดาห์ ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์ P3X ใน RPMI-HT เสริมด้วย 10% FBS เลี้ยงเซลล์ให้อยู่ในระยะ Log Phase ในวันที่จะทำการผลิตไฮบริโดมา

1.3 ฉีดกระตุ้นหนูด้วยแอนติเจนไม่ต้องผสม Frund's Adjuvant ก่อนทำการผลิตไฮบริโดมา 3-4 วัน

1.4 เตรียมการเจาะเม็ดเลือดแดงจากหนูสำหรับใช้เป็นเซลล์ช่วยเหลือ (Feeder Cell) โดยใช้เลือดหนูผสมใน PBS 10 ml ปั่นล้างพลาสมาออกใน PBS ที่ 1500 g จำนวน 3 ครั้ง กระจายเซลล์และปรับความเข้มข้น RBC เป็น 0.5% ใน RPMI บ่มไว้ใน CO_2 Incubator 37° C ตรวจดูการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ก่อนนำมาใช้ ควรเตรียม 2-3 วัน ก่อนการผลิตไฮบริโดมา

2. การผลิตไฮบริโดมา

2.1 หลอมละลาย PEG (Polyethylene Glycol) 2 g ที่ 60° C เติม RPMI (37° C) ปริมาตร 3 ml เขย่าให้ผสมกันให้ทั่ว บ่มใน CO_2 Incubator ที่ 37° C

2.2 รวบรวมไมอิโลมา NS-1 จำนวน $2X10^7$ เซลล์ ใส่หลอดปั่นขนาด 50 ml บ่มรอผสมเซลล์จากม้ามใน CO_2 Incubator ที่ 37 ° C

2.3 ฆ่าหนูโดยดึงข้อต่อตรงคอ (อย่าสลบหนู เพื่อป้องกันการปนเปื้อนของยาสลบเข้าสู่กระแสโลหิตและปนใน Culture ซึ่งมีผลต่อการรอดชีวิตของเซลล์) ผ่าตัดม้าม เลาะตัดเนื้อเยื่อไขมันและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออก ล้างใน PBS 3 ครั้งก่อนย้ายลงใน RPMI 10 ml ในจานเลี้ยงเชื้อ ทำในสภาพปลอดเชื้อ

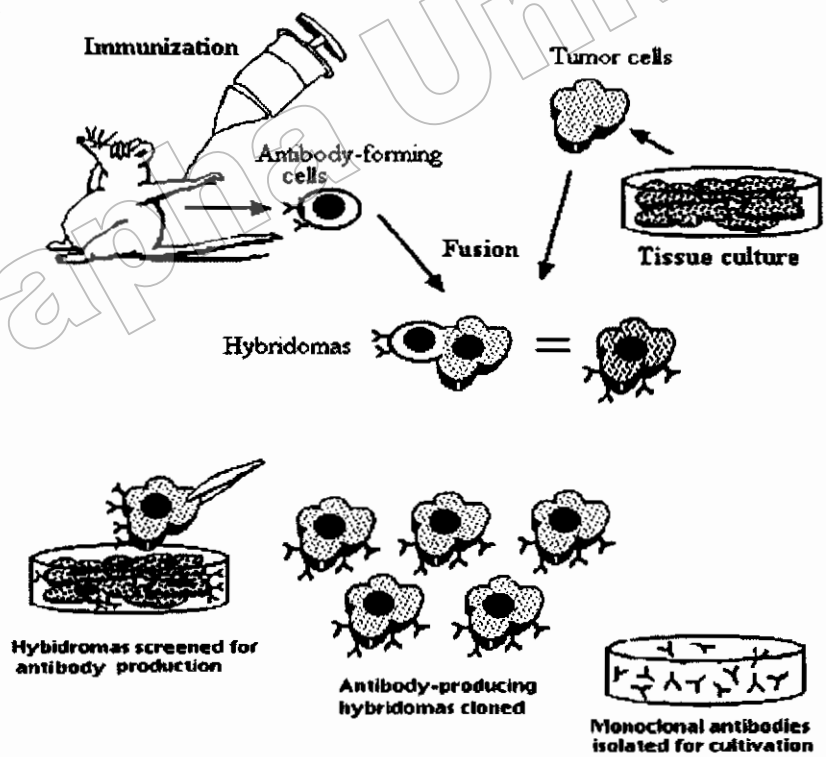
2.4 ใช้กรรไกรตัดผนังหุ้มม้ามหลาย ๆ จุด คีบม้ามวางบนแผ่นตะแกรง บดด้วยยางจากกระบอกฉีดยา ให้เซลล์ผ่านลอดตะแกรง ใช้ปิเปตดูดสารแขวนลอยของเซลล์พ่นผ่านตะแกรงประมาณ 5-10 ครั้ง ให้เซลล์กระจายแยกตัวออกสม่ำเสมอ

2.5 ดูดเซลล์จากม้ามผสมในไมอิโลมา P3X ให้เข้ากัน ปั่นแยกที่ 1500 g นาน 5 นาที เท RPMI ออก เติมสารละลาย PEG 1 ml ทีละน้อย ใช้นิ้วดีดก้นหลอดให้เซลล์ผสมกันทั่ว ค่อย ๆ เติม RPMI ลงข้างหลอดช้า ๆ ปริมาตร 30 ml ปั่นล้าง RPMI ที่ 1640 g

2.6 ปั่นแยกเซลล์ผสมที่ 1,500 g เป็นเวลา 5 นาที กระจายเซลล์ใน RPMI เสริมด้วย 20% HAT ของหนูเมาส์ปริมาตร 450 ml ดูดเซลล์ 0.15 ml ใส่ในถาดหลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลุมละ 200 µl จำนวน 12 ถาด บ่มใน CO_2 Incubator

2.7 ประมาณ 10-12 วันตรวจดูการเจริญของเซลล์ในหลุมต่าง ๆ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ถ้าโคโลนีของเซลล์มีขนาดใหญ่ ประมาณ 100 เซลล์ขึ้นไป ดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์มาทดสอบด้วยวิธีการต่าง ๆ เพื่อตรวจดูการสร้างแอนติบอดีที่มีความจำเพาะตามต้องการ วิธีที่ใช้โดยทั่วไปได้แก่ Indirect ELISA ซึ่งสะดวกและรวดเร็ว เหมาะสำหรับการคัดเลือกเซลล์จำนวนมาก หรืออาจต้องใช้หลายวิธีเพื่อเลือกเซลล์ที่มีลักษณะตามต้องการ เช่น Immunohistochemistry และ Western Blot เป็นต้น เมื่อพบแอนติบอดีที่ต้องการในหลุมใด ทำการโคลนซ้ำเพื่อให้แน่ใจว่าไฮบริโดมาจากหลุมที่เลือกมีต้นกำเนิดมาจากเซลล์เพียงเซลล์เดียว

2.8 ขยายเพิ่มจำนวนเซลล์โดยถ่ายเซลล์ไปเลี้ยงในถาดหลุมขนาด 24 และ 6 หลุม และจานเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ เมื่อได้เซลล์จำนวนมากพอ เก็บแช่แข็งเซลล์ในไนโตรเจนเหลว ส่วนน้ำยาเลี้ยงเซลล์รวบรวมไว้เพื่อหาไตเตอร์ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบรูปแบบต่าง ๆ



ภาพที่ 2-2 ขั้นตอนการผลิตโมโนโคลนอลแอนติบอดี (UCLA College of Letter and Science, n.d.)

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

2.8 ระดับปฏิกิริยา Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD)

ระดับปฏิกิริยา EROD เป็นวิธีการหนึ่งในการตรวจวัดเอนไซม์ Cytochrome P-450 ซึ่งพบมากที่บริเวณตับ โดยปฏิกิริยาการเปลี่ยนแปลงของสารพิษคือ

$$NADPH_2 + RH + O_2 \longrightarrow ROH + H_2O + NADP$$

RH = Xenobiotic

สารประกอบ PAHs หลังจากผ่านกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างทางชีวภาพแล้วจะมีลักษณะพิเศษคือ มีรูปร่างแข็งแรงและสามารถเรืองแสงได้ (Aas, Beyer, & Goysøyr, 1998) ฉะนั้นจึงนำเทคนิคฟลูออเรสเซนต์ (Fluorescence) ซึ่งเป็นเทคนิคที่ใช้ในการตรวจวัดจากการเรืองแสง โดยใช้หลักการจากการวัดการเรืองแสง ซึ่งมีลักษณะการทำงานแบบความยาวคลื่นคู่ นั่นคือความยาวคลื่นหนึ่งใช้ในการกระตุ้น (Excitation) และความยาวคลื่นหนึ่งใช้ในการดูดซับ (Emission) การเรืองแสงที่เกิดขึ้น โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า Fluorescence Spectrophotometer สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 แบบ คือแบบ Cuvette ซึ่งสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ทีละตัวอย่าง และแบบ Plate Reader สำหรับวัดค่าการดูดกลืนแสงได้หลาย ๆ ตัวอย่างพร้อมกันและสามารถแสดงผลออกมาได้พร้อมกันทั้งหมด

2.9 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Peter, Nasci, and Livingstone (1998) ใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CYP กลุ่มต่าง ๆ จากปลามาตรวจสอบใน หอยแมลงภู่ *M. edulis* จากบริเวณแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนและแหล่งน้ำสะอาด ด้วยเทคนิค Western Blot เพื่อศึกษารูปแบบของ CYP จากไมโครโซมและตัวอย่าง CYP บริสุทธิ์ พบปริมาณเอนไซม์ CYP1A, 2B และ 4A จากหอยในแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนสูงกว่าในแหล่งน้ำสะอาด และพบว่าเอนไซม์ CYP ชนิดเดียวกันจากตัวอย่างไมโครโซมและตัวอย่างสกัด CYP บริสุทธิ์มีจำนวนแถบโปรตีนต่างกัน มีเพียง CYP4A เท่านั้นที่มีจำนวนแถบโปรตีนตรงกัน โดยการสกัดตัวอย่างให้เหลือเฉพาะ CYP จะพบแถบโปรตีนน้อยกว่า เนื่องจากวิธีการสกัดตัวอย่าง CYP บริสุทธิ์จะสามารถกำจัดโปรตีนที่ไม่จำเพาะซึ่งอาจทำปฏิกิริยาข้ามกับแอนติเจนออกไปได้ ทำให้เหลือเฉพาะแถบโปรตีน CYP ที่จำเพาะต่อแอนติบอดีชนิดนั้น ๆ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

Rice, Schlenk, Ainsworth, and Goksøyr (1998) ทดสอบปฏิกิริยาข้ามของโมโนโคลนอลแอนติบอดีต่อ CYP1A จากปลา Rainbow Trout พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบการสร้าง CYP1A ในปลาชนิดอื่นได้เช่น Atlantic Cod, Atlantic Salmon, Pinfish, Killfish, Carp และ Channel Catfish ที่รับสาร PCBs และ PAHs ทำให้สามารถประยุกต์ใช้แอนติบอดีตัวนี้เพื่อทดสอบการสร้าง CYP1A ในปลาหลายชนิดที่รับสัมผัสมลพิษได้

Schlezinger, Parker, Zeldin, and Stegeman (1998) ได้ทดลองในปลา Scup เพศผู้และเพศเมีย โดยการฉีดสาร BaP (10 mg/kg) และ TCDD (1 µg/kg) หลังจากนั้นเป็นเวลา 3 วัน เก็บตับปลามาวิเคราะห์โปรตีน CYP1A โดยวิธี Western Blot และ EROD พบว่าปลาทั้งเพศผู้และเพศเมียที่ได้รับสาร BaP และ TCDD มีการสร้าง CYP1A สูงกว่าชุดควบคุมที่ฉีด Corn Oil (1 mg/kg) อย่างมีนัยสำคัญ แต่ปลาเพศเมียจะมีการสร้าง CYP1A น้อยกว่าปลาเพศผู้เนื่องจากในขณะที่ปลาเพศเมียมีการเจริญเติบโตเข้าสู่วัยเจริญพันธุ์จะมีการสร้างฮอร์โมน Estradiol ซึ่งมีผลยับยั้งการสร้างโปรตีน CYP1A

Yawetz, Woodin, and Stegeman (1998a) ศึกษาการเกิด CYP จากตับของเต่า *C. picta picta* ที่ได้รับสาร TCB, PCB, ß-Naphtholflavone (BNF), Aroclor 1254 และ Phenobarbital โดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CYP กลุ่มต่าง ๆ พบว่าเต่าที่ได้รับสาร TCB , BNF และ Aroclor สามารถชักนำให้เกิด CYP1A สูงเมื่อเทียบกับชุดควบคุม ผลทดสอบด้วยวิธี Western Blot โดยใช้ MAb anti Scup CYP1A 1-12-3 พบว่าสามารถใช้ตรวจสอบการสร้าง CYP1A ในเต่าชนิดนี้ได้ โดยมีขนาดโมเลกุลที่ 59 kDa ส่วนการใช้ PAb anti Scup CYP2B พบแถบโปรตีน CYP2B 3 Band โดยสารที่ชักนำให้มีการสร้าง CYP2B คือ TCB, Phenobarbital, BNF และ Aroclor

Yawetz, Zilberman, Woodin, and Stageman (1998b) ทำการทดลองในปลากระบอก (*Mugil capico*) โดยการฉีดสาร ß-Naphtoflavone (BNF) ความเข้มข้น 15, 30 และ 60 mg/kg และสาร Aroclor ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 mg/kg จากนั้น 5 วัน นำตัวอย่างตับและหัวใจของปลามาสกัดโปรตีนและตรวจสอบการสร้าง CYP1A ด้วยวิธี Western Blot และ EROD พบการสร้าง CYP1A เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารทั้งสองชนิด เมื่อตรวจสอบโดยวิธี EROD พบการสร้าง CYP1A ในตับมากกว่าหัวใจ ส่วนการตรวจสอบโดยวิธี Western Blot ไม่สามารถตรวจวัด CYP1A จากหัวใจได้

Bainy, Woodin, and Stegeman (1999) ศึกษารูปแบบของ CYP ในปลานิล *O. niloticus* จากอ่างเก็บน้ำ Billing นำมาตรวจสอบโดยวิธี Western Blot โดยใช้แอนติบอดีต่าง ๆ คือ MAb anti Scup CYP1A (1-12-3), PAb anti Scup P450B (CYP2B) และ PAb anti Trout CYP3A พบว่าแอนติบอดีทั้งสามสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับ CYP ในปลานิลได้ โดยปริมาณ CYP1A จากอวัยวะ

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University

ทั้งตับและไตของปลาที่ได้รับสารพิษสูงกว่าในแหล่งน้ำที่ไม่ได้รับสาร นอกจากนี้การวิเคราะห์ด้วยวิธี Immunohistochemical ยังพบการเกิด CYP1A ได้ในอวัยวะทุกส่วนทั้ง ตับ หัวใจ และเหงือก ส่วน CYP2B และ CYP3A นั้นมีการตรวจพบในปลาจากทั้ง 2 แหล่งซึ่งปลาในแหล่งที่ไม่ได้รับสารพิษนั้นเป็นปลาจากฟาร์มที่อาจจะได้รับสารเคมีที่ปนเปื้อนอยู่ในอาหารเม็ด และเปรียบเทียบการเกิด CYP2B ในปลาที่ได้รับสารพิษจากตับและไตพบว่าในตับจะมีแถบโปรตีน 3 แถบ ที่มีขนาดโมเลกุล 55.5, 53.9 และ 52.3 kDa ส่วนในไตมี 1 แถบที่ขนาด 53.9 kDa โดยการที่พบในตับมีแถบโปรตีนมากกว่าเนื่องมาจากการที่ตับเป็นอวัยวะที่มีการสร้าง CYP โดยตรง และมียีนที่คล้ายกับ CYP2B หลายตัวในปลานิล ทำให้สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกันได้

Nyman et al. (2000) ศึกษาการสร้าง CYP1A ในแมวน้ำ (Ringed Seals และ Grey Seals) จากแหล่งน้ำที่มีการปนเปื้อนของสารเคมีจากโรงงานอุตสาหกรรม จากการทดสอบโดยเทคนิค EROD พบว่ามีปริมาณ CYP1A สูงกว่าเมื่อเทียบกับแหล่งที่ไม่มีการปนเปื้อน เมื่อตรวจสอบโดยใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CYP กลุ่มต่าง ๆ พบว่า Anti-Peptide Antibodies Raised against Human CYP1A1และ CYP1A2 ไม่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับแมวน้ำทั้งสองชนิดนี้ได้ แสดงว่าแอนติบอดีนี้มีความจำเพาะสูงมาก ส่วนการใช้ MAb 1-7-1 Raised against Rat CYP1A1 และ CYP1A2 สามารถทำปฏิกิริยาข้าม CYP1A1 และ CYP1A2 ในแมวน้ำได้โดยพบ CYP1A มีขนาด 56 kDa

Al-Arabi and Goksøyr (2002) ศึกษาการตอบสนองของ CYP1A1 ในปลาเขตร้อนสองชนิดคือปลาดุกแม่น้ำ (*Rita rita*) และปลาทะเล Mudfish (*Apocryptes bato*) โดยการให้ปลาทั้งสองชนิดได้รับสาร ß-Naphtholflavone (BNF 50 mg/kg), PCB Mixer (Clophen A50 20 mg/kg) และ $CdCl_2$ (1 mg/kg) โดยศึกษาการสร้าง CYP1A หลังฉีดสารนำตับของปลามาสกัดและตรวจสอบโดยวิธี Western Blot ด้วยโมโนโคลนอลแอนติบอดีที่จำเพาะต่อ CYP1A จากปลา Scup พบว่าแอนติบอดีสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับปลาทั้งสองชนิดนี้ได้โดยปลาที่ได้รับ BNF และ Clophen A50 มีการสร้าง CYP1A สูงกว่าชุดควบคุม มีขนาดโมเลกุลเท่ากับ 58 kDa ในปลา Mudfish และ 49.5 kDa ในปลา Catfish

Carlson, Li, and Zelikoff (2004) ได้ศึกษาผลของสาร BaP ที่ทำให้เกิดให้เกิดความเป็นพิษต่อระบบภูมิคุ้มกันในปลา Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) โดยการใช้ MAb 1-12-3 ที่จำเพาะกับปลา Scup พบว่าสามารถทำปฏิกิริยาข้ามกับปลาหลายชนิดได้ และทำการศึกษา เพื่อดูว่า CYP1A สามารถพบได้ที่เนื้อเยื่อส่วนใดได้บ้าง ผลการทดลองพบว่า CYP1A สามารพบได้ทั้งในตับ ไต และม้าม หลังจากที่ได้รับสาร BaP 48 ชั่วโมง และพบว่า BaP สามารถไปกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในปลาได้โดยกระตุ้นการแบ่งตัวของ T และ B-Lymphocyte มีผลให้รับเชื้อโรคได้ง่ายขึ้น

Johnson, Schiedek, Goksøyr, and Grosvik (2006) ได้ศึกษาการแสดงออกของ Cytoskeleton Protein ที่สามารถทำปฏิกิริยาข้ามต่อ Anti-Fish CYP1A ต่อหอยแมลงภู่ (*Mytilus* sp.) ที่ได้รับการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์ โดยดูความเป็นไปได้ในการใช้องค์ประกอบใน Cytoskeleton เป็นดัชนีชี้วัดทางชีวภาพของการปนเปื้อนจากสารอินทรีย์มลพิษในโดยใช้โปรตีนจากส่วนที่เป็น Non-Muscular Actin และ Tropomyosin ทำปฏิกิริยากับ Anti-Fish CYP1A เพื่อดูการปนเปื้อนสารอินทรีย์และเปรียบเทียบกับการเกิด Heat Shock Protein (Hsp70) ซึ่งจะถูกสร้างขึ้นเมื่อปลาเกิดความเครียดจากการได้รับสารเคมี พบว่าหอยแมลงภู่ที่ได้รับสาร 2,2',4,4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47) 5 ppb มีปริมาณ Microsomal Actin มากกว่าในชุดควบคุมถึง 200% และปริมาณ Microsomal Actin ในหอยที่ได้รับน้ำมันดิบ น้ำมันดิบผสมอัลคิลฟีนอลและ PAHs กับชุดทดลองมีค่าไม่ต่างกัน

มหาวิทยาลัยบูรพา Burapha University