ผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อระดับของไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม
(*CLARIAS MACROCEPHALUS* VS. *CLARIAS GARIEPINUS*)

นางสาว ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2538

ISBN 974-631-480-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF METHYL PARATHION AND TRIBUTYLTIN ON THE LEVEL OF CYTOCHROME P-450 IN CROSSBREED CATFISH (*CLARIAS MACROCEPHALUS* VS. *CLARIAS GARIEPINUS*)

Miss Prapussorn Tantipongvivat

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science
Inter-Department of Pharmacology
Graduated School
Chulalongkorn University
1995

ISBN 974-631-480-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อระดับของไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม (*CLARIAS MACROCEPHALUS* VS. *CLARIAS GARIEPINUS*)

โดย นางสาว ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์

ภาควิชา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา

อาจารย์ที่ปรึกษา ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์
อาจารย์ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(รองศาสตราจารย์ ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ดร. พรเพ็ญ เปรมโยธิน)

....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ น.สพ. ดร. จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์)

....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพ. ดร. ประเสริฐ ทรงกิตติคุณ)

....กรรมการ
(อาจารย์ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ : ผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อระดับของไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม (*CLARIAS MACROCEPHALUS* VS. *CLARIAS GARIEPINUS*) (EFFECT OF METHYL PARATHION AND TRIBUTYLTIN ON THE LEVEL OF CYTOCHROME P-450 IN CROSSBREED CATFISH (*CLARIAS MACROCEPHALUS* VS. *CLARIAS GARIEPINUS*)) อ.ที่ปรึกษา : ผศ.ดร.สุพัตรา ศรีไชยรัตน์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : รศ. น.สพ. ดร. จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และ ดร. สุเทพ เรืองวิเศษ, 99 หน้า. ISBN 974-631-480-7

เมททิลพาราไธออน (0.1-1.0 mM) สามารถยับยั้งไซโตโครมพี 450 ที่แยกจากตับปลาดุกพันธุ์ผสม ความสามารถในการยับยั้งนี้สูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออน แต่ไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาของการ incubate เมททิลพาราไธออนในขนาด 1 mM สามารถลดระดับของไซโตโครมบี 5 ได้เช่นเดียวกัน ไตรบิวทิลทินออกไซด์ (0.1-1.0 mM) ไม่มีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 แต่สามารถลดระดับของไซโครมบี 5 ได้ในขนาด 0.5 และ 1.0 mM ผลของการศึกษาครั้งนี้แสดงถึงการมีสมรรถนะของเอนไซม์ในปลาดุกพันธุ์ผสม ซึ่งอาจใช้เป็นดัชนีชี้วัดสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษได้

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา	ลายมือชื่อนิสิต
สาขาวิชา เภสัชวิทยา	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ปีการศึกษา 2537	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

##C645595 : MAJOR PHARMACOLOGY
KEY WORD: CYTOCHROME P-450/ METHYL PARATHION/ TRIBUTYLTIN/ CROSSBREED CATFISH
PRAPUSSORN TANTIPONGVIVAT : EFFECT OF METHYL PARATHION AND TRIBUTYLTIN ON THE LEVEL OF CYTOCHROME P-450 IN CROSSBREED CATFISH *(CLARIAS MACROCEPHALUS* VS. *CLARIAS GARIEPINUS)* THESIS ADVISOR : ASST. PROF. SUPATRA SRICHIRAT, Dr.rer.nat., THESIS CO-ADVISOR : ASSOC. PROF. DR.JIRASAK TANGTRONGPIROS, Ph.D., DVM. AND DR. SUTHEP RUANGWISES, Ph.D. 99 pp. ISBN 974-631-480-7

Methyl parathion (0.1-1.0 mM) inhibited hepatic cytochrome P-450 isolated from crossbreed catfish. This inhibitory effect was depended upon concentrations of methyl parathion not the time of incubation. At the dose of 1 mM, methyl parathion also inhibited cytochrome b5. Tributyltin oxide (0.1-1.0 mM) had no effect on cytochrome P-450 but inhibited cytochrome b5 at the doses of 0.5 and 1 mM. Results of the present investigations showed that the availability of cytochrome P-450 and associated enzymes in crossbreed catfish may be used as the biomarkers associated with the exposure to contaminated aquatic environment.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยา ลายมือชื่อนิสิต

สาขาวิชา เภสัชวิทยา ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. สุพัตรา ศรีไชยรัตน์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ น.สพ.ดร.จิรศักดิ์ ตั้งตรงไพโรจน์ และอาจารย์ ดร.สุเทพ เรืองวิเศษ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ซึ่งท่านได้กรุณาให้ความรู้ คำแนะนำตลอดจนข้อคิดเห็นต่าง ๆที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยเสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ สพ.ญ.ดร.วรา พานิชเกรียงไกร หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอนุญาตให้ผู้วิจัยได้ใช้สถานที่ เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ ของภาควิชาในการทำวิจัย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.พรเพ็ญ เปรมโยธิน หัวหน้าภาควิชาเภสัชวิทยา คณะเภสัชศาสตร์ รองศาสตราจารย์ ทพ.ดร.ประเสริฐ ทรงกิตติคุณ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ รองศาสตราจารย์ จันทนี อิทธิพานิชพงศ์ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ และรองศาสตราจารย์ ดร.เพ็ญศรี ทองนพเนื้อ อาจารย์ประจำภาควิชาเภสัชเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติม

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์บัณฑิตศึกษา สหสาขาวิชาเภสัชวิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความรู้และคำแนะนำตลอดระยะเวลาที่ศึกษาในระดับมหาบัณฑิต

ขอขอบพระคุณ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้กรุณาให้ทุนอุดหนุนในการทำวิทยานิพนธ์ครั้งนี้

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา-มารดา ซึ่งสนับสนุนในด้านการเงินและเป็นกำลังใจให้แก่ผู้วิจัยเสมอมาและขอขอบคุณบุคคลอื่น ๆ ที่มีส่วนช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์เล่มนี้ให้สำเร็จสมบูรณ์

ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ญ
สารบัญรูปภาพ	ฎ
คำอธิบายสัญญลักษณ์และคำย่อ	ฐ
บทที่	
1. บทนำ	
วงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450	5
ชนิดของไซโตโครมพี 450 ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป	6
ชนิดของไซโตโครมพี 450 ในสัตว์น้ำ	10
สับสเตรทของไซโตโครมพี 450	11
ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไซโตโครมพี 450	13
เมททิลพาราไธออน	19
- คุณสมบัติทั่วไป	19
- คุณสมบัติทางกายภาพและเคมี	19
- กลไกการออกฤทธิ์	20
- ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา	22
- ผลกระทบของออร์กาโนฟอสเฟตต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ	24
- การดูดซึม การเปลี่ยนแปลงในร่างกายและการขับออก	26
ไตรบิวทิลทิน	28
- ไตรบิวทิลทินออกไซด์	28
- ประโยชน์	29
- ผลกระทบของออร์กาโนทินต่อสิ่งมีชีวิตทั่วไป	29
- ผลกระทบของออร์กาโนทินต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ	31
- การดูดซึมการเปลี่ยนแปลงในร่างกายและการขับออก	36
- การสลายตัวในธรรมชาติ	38
ปลาดุกพันธุ์ผสม	40
- สรีรวิทยาของปลาดุก	40
- ปลาดุกอุย	43

สารบัญ (ต่อ)

- ปลาดุกรัสเซีย.. 43

2. อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

สัตว์ทดลอง.. 47

เครื่องมือ.. 47

สารเคมี.. 47

การเตรียมสารเคมี.. 48

การเตรียมไมโครโซม.. 50

การวัดปริมาณโปรตีน.. 51

วิธีการวัดระดับไซโตโครมพี 450.. 52

วิธีการวัดระดับไซโตโครมบี 5.. 53

วิธีการทดลอง

- ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี5.. 54
- ประเมินค่าความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5........... 54
- การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน กับระดับไซโตโครมพี450.. 54
- การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม.. 55
- การศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม.. 55

สถิติที่ใช้ในการวิจัย.. 56

3. ผลการทดลอง

ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี450 และไซโตโครมบี5... 57

ประเมินค่าความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5............. 58

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน กับระดับไซโตโครมพี 450.. 59

การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม.. 64

- ผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม.. 64
- ผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม...64

การศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม.. 73

สารบัญ (ต่อ)

- ผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม....... 73
- ผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม........... 73

4. อภิปรายและสรุปผลการทดลอง.. 82

รายการอ้างอิง.. 89

ประวัติผู้เขียน... 99

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

1. แสดงไซโตโครมพี 450 ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ.................................... 6
2. แสดงไซโตโครมพี 450 ที่พบในปลาชนิดต่าง ๆ... 10
3. แสดงยาที่เป็นสับเสตรทของไซโตโครมพี 450.. 12
4. แสดงสารก่อมะเร็งชนิดต่าง ๆ ที่เป็นสับสเตรทของไซโตโครมพี 450............... 13
5. แสดงสารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซโตโครมพี 450................................. 14
6. แสดงสารที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครมพี 450...................................... 16
7. แสดงค่า LC50 ของออร์กาโนทินต่อปลาชนิดต่าง ๆ...................................... 35
8. แสดงข้อแตกต่างระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซีย.................................... 44
9. แสดงการเตรียมไตรบิวทิลทินสำหรับการศึกษาผลของไตรบิวทิลทิน ต่อระดับ ไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม............................ 49
10. แสดงการเตรียมเมททิลพาราไธออนสำหรับการศึกษาผลของเมททิลพาราไธออน ต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม............... 50
11. แสดงการเตรียม standard protein โดยใช้ bovine serum albumin................ 51
12. แสดงค่าความแม่นยำของการวัดระดับไซโตโครมพี 450.............................. 57
13. แสดงค่าความแม่นยำของการวัดระดับไซโตโครมบี 5.................................. 58
14. แสดงค่าความคงตัวของระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม............. 59
15. แสดงค่าความคงตัวของระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม.................. 59
16. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับระดับไซโตโครมพี 450............ 60
17. แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ............................ 65
18. แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ ผสมหลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ 66
19. แสดงระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุก พันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที.. 66
20. แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ..................................... 74
21. แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ............................. 75
22. แสดงระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของ ปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น และระยะ เวลาต่าง ๆ นาน 30 นาที.. 75

สารบัญรูปภาพ

รูปที่ หน้า

1. แสดงโครงสร้างภายในเซลล์........ 3
2. แสดงไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในเอ็นโดพลาสมิคเร็ทติคิวรัม........ 4
3. แสดงวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450........ 5
4. แสดงการยับยั้งวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450........ 16
5. แสดงโครงสร้างทางเคมีของเมทิลพาราไธออน........ 19
6. แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสกับสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต........ 21
7. แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของเมทิลพาราไธออนในร่างกาย........ 27
8. แสดงโครงสร้างทางเคมีของไตรบิวทิลทินออกไซด์........ 28
9. แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของหอยน้ำจืด (Anodonta anatina) ในภาวะที่ขาดออกซิเจน........ 33
10. แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของหอยน้ำจืด (Anodonta anatina) ในภาวะที่ได้รับ DBTC........ 34
11. แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของไตรบิวทิลทินออกไซด์ในปลาและปู........ 37
12. แสดงลักษณะของปลาดุกบิ๊กอุย........ 42
13. แสดงความคงตัวของระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม........ 61
14. แสดงความคงตัวของระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม........ 62
15. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับปริมาณโปรตีนในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม........ 63
16. แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ........ 67
17. แสดงผลของเมทิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450........ 68
18. แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 5, 10, 20 และ 30 นาที........ 69
19. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของเมทิลพาราไธออนโดยใช้ระยะเวลาในการ incubate นาน 5 นาที........ 70
20. แสดงระดับไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ........ 71
21. แสดงผลของเมทิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมบี 5........ 72
22. แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ........ 76
23. แสดงผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450........ 77

สารบัญรูปภาพ (ต่อ)

รูปที่ หน้า

24. แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 5, 10, 20 และ 30 นาที................. 78
25. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของไตรบิวทิลทิน โดยใช้ระยะเวลาในการ incubate นาน 5 นาที............................. 79
26. แสดงระดับไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทิน นาน 30 นาที.. 80
27. แสดงผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมบี 5... 81

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ACh	=	acetylcholine
AChE	=	acetylcholinesterase
NADPH	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate
NADP	=	reduced nicotinamide adenine dinucleotide
ATP	=	adenosine triphosphate
rpm	=	revolution per minute
μM	=	micromole or micromolar
mM	=	millimole or millimolar
ml	=	milliliter
nM	=	nanometer
μg	=	microgram
min	=	minute
CO	=	carbon monoxide
°C	=	degree celsius
%	=	percent
/	=	per

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ปัจจุบันมีการนำสารเคมีมาใช้เป็นจำนวนมากทั้งทางด้านเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีประโยชน์อย่างมากแต่ก็มีโทษในการทำให้เกิดพิษได้ด้วย มนุษย์และสัตว์มีโอกาสได้สัมผัสกับสารเคมีเหล่านี้อยู่ตลอดเวลาในรูปของอาหาร อากาศ และน้ำ สารเคมีเหล่านี้เมื่อเข้าไปในร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่ละลายในน้ำได้และถูกขับออกจากร่างกาย กระบวนการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นกับสารเคมีในร่างกายสิ่งมีชีวิตนั้นเราเรียกว่า การเปลี่ยนแปลงสารเคมีในสิ่งมีชีวิต (biotransformation) (Sipes and Gandolfi, 1986) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของสารเคมีในสิ่งมีชีวิตกรณีที่เป็นสารพิษ นอกจากจะทำให้ได้สารที่มีคุณสมบัติในการละลายน้ำได้ดีขึ้นแล้ว ยังมีผลต่อการออกฤทธิ์ของสารพิษชนิดนั้นด้วย กล่าวคือสารพิษบางชนิดสามารถออกฤทธิ์ได้ด้วยตัวเอง เมื่อถูกเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแล้วจะมีฤทธิ์น้อยลง หรือไม่มีฤทธิ์เลย (detoxification) แต่สารพิษบางชนิดจำเป็นจะต้องมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเสียก่อนจึงจะออกฤทธิ์ได้ (toxification) (ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว และคณะ, 2536)

การเปลี่ยนแปลงสารเคมีด้วยเอนไซม์ในสิ่งมีชีวิตนั้นประกอบด้วยเอนไซม์หลายระบบ ไซโตโครมพี 450 ก็เป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญมากที่สุดตัวหนึ่งในระบบเอนไซม์ของไมโครโซมเป็นเอนไซม์ที่อยู่ในส่วนเอ็นโดพลาสมิกเรติคิวลัมส่วนเรียบ (SER) ดังแสดงในรูปที่ 1 ซึ่งเมื่อแยกออกจากเซลล์ด้วยวิธีการเหวี่ยงแยก (centrifuge) จะเรียกว่า ไมโครโซม ดังนั้นเอนไซม์นี้จึงอาจเรียกว่า ไมโครโซมัลเอนไซม์ (microsomal enzyme)

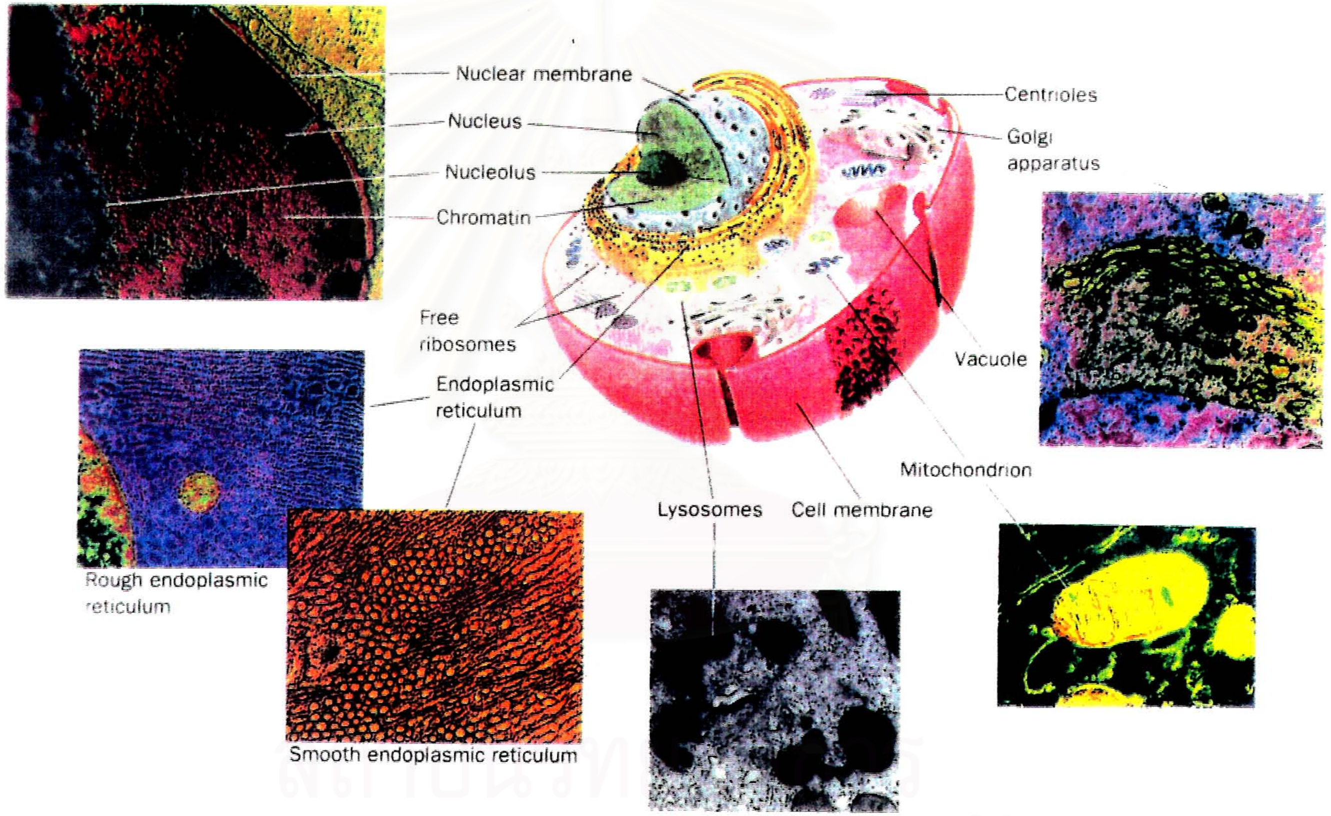
ไซโตโครมพี 450 พบมีมากในส่วนไมโครโซมและไมโตคอนเดรียของเซลล์ตับ และเซลล์เปลือกต่อมหมวกไต (adrenal cortex) นอกนั้นพบมีบ้างในลำไส้เล็ก ปอด กล้ามเนื้อ รก สมอง ไมโตคอนเดรียของ corpus luteum และหน่วยไต (nephron) ของส่วน proximal convoluted tubule จากการศึกษาของ Stegeman, Binder และ Orren (1979) ในปลา Stenotomus vesicolor พบว่ามีไซโตโครมพี 450 ปริมาณมากที่สุดในตับ รองลงมาคือ หัวใจ ลำไส้ ไต อัณฑะ และเหงือก ซึ่งได้ผลเช่นเดียวกับการศึกษาในปลาน้ำจืด 4 ชนิด คือ ปลา vendace (Coregonus albula) ปลา perch (Perca fluviatilis) ปลา roach (Rutulis rutilus) และปลา rainbow trout (Salmo gairdneri) ซึ่งทำการศึกษาโดย Lindstrom, Koivusaan และ Hanninen (1981)

ไซโตโครมพี 450 เป็น multienzyme system มีส่วนประกอบเป็น hemoprotein ทำหน้าที่เป็น oxidase ตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของยา reduced form ของมันเมื่อรวมตัวกับ carbon monoxide (CO) จะให้ complex ซึ่งมี absorption peak ที่ 450 นาโนเมตร ดังนั้นเราจึงเรียกว่าไซโตโครมพี 450 (cytochrome P-450) (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2536)

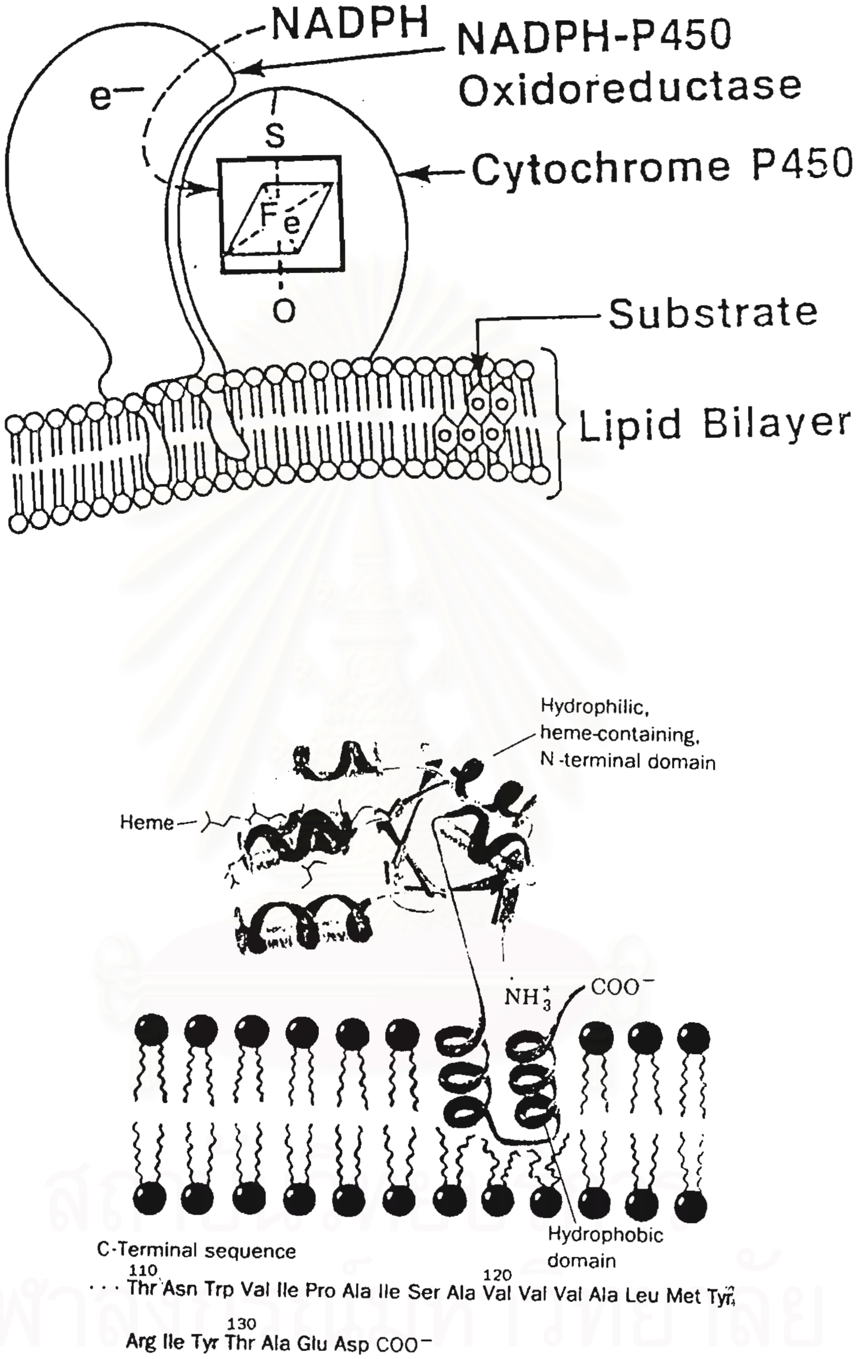
ไมโครโซมัลเอนไซม์ทั้งที่อยู่ในไมโครโซมและในไมโตคอนเดรียนั้นมีองค์ประกอบที่เหมือนกันกล่าวคือ จะประกอบด้วยลูกโซ่การหายใจ (respiratory chain) ลูกโซ่การหายใจจะทำหน้าที่เคลื่อนย้ายอีเล็คตรอนจาก NADPH เพื่อนำไปใช้ในการกระตุ้นไซโตโครมพี 450 การเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอนนี้เรียกว่า ระบบการเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอน (electron transfer system) ลูกโซ่การหายใจในไมโครโซมจะเป็นคนละลูกโซ่กับในไมโตคอนเดรียที่ให้ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นและฟอสฟอริเลชั่นเพื่อการสร้างพลังงานเอทีพี (ATP synthesis) (สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย, 2527) ไซโตโครมพี 450 ในไมโตคอนเดรียจะรับอีเล็คตรอนมาจากโปรตีน adrenodoxin (โดยผ่าน NADPH-adrenodoxin oxidoreductase) (Gonzalez, 1990) สำหรับระบบการเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอนในไมโครโซมจะอาศัยองค์ประกอบดังนี้

1. อีเล็คตรอนที่ถูกจับและนำเข้าสู่ระบบการเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอนโดย NADPH
2. ฟลาโวโปรตีนซึ่งเป็นเอนไซม์ที่เรียกว่า NADPH-cytochrome c reductase
3. โปรตีนพิเศษที่ไม่มีฮีม (non-heme protein)
4. ไซโตโครมพี 450
5. เอนไซม์ออกซิเดสต่าง ๆ ที่ร่วมอยู่ในปฏิกิริยานี้
7. โมเลกุลของออกซิเจน ซึ่งได้รับจากอากาศแล้วมีการนำไปยังเซลล์ต่าง ๆ โดยอาศัยระบบหายใจและระบบไหลเวียนโลหิต

การเคลื่อนย้ายอิเล็คตรอนในไมโครโซมนั้น นอกจากไซโตโครมพี 450 จะได้รับอีเล็คตรอนมาจาก NADPH แล้วยังอาจได้รับอีเล็คตรอนมาจาก NADH โดยส่งผ่านมาที่ไซโตโครมบี5 ซึ่งเป็นไซโตโครมอีกเพียงชนิดเดียวที่พบในเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัมหรือไมโครโซม (ซึ่งเป็นตัวแสดงสีแดงเข้มในไมโครโซม) เป็นไซโตโครมที่ถูกรีดิวส์ได้ด้วยเอนไซม์ NADH-cytochrome b5 reductase ปริมาณไซโตโครมบี 5 นี้เพิ่มขึ้นได้เมื่อสัตว์ทดลองได้รับการกระตุ้นด้วยสารหรือยาเช่น phenobarbital โครงสร้างของไซโตโครมบี 5 จะประกอบด้วยสองส่วนคือ ส่วนที่ละลายน้ำได้ (hydrophilic region) ซึ่งจะเป็นส่วนที่จับอยู่กับฮีม มีหน้าที่เกี่ยวกับการรับและส่งอีเล็คตรอน อีกส่วนจะเป็นส่วนที่ไม่ละลายน้ำ (hydrophobic region) จะเป็นส่วนที่ฝังตัวอยู่ในผนังเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัม (Abeles, Frey and Jacks, 1992 ; Voet and Voet, 1990) ดังแสดงในรูปที่ 2



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างภายในเซลล์ (Voet and Voet, 1990)



รูปที่ 2 แสดงไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัม

ภาพบน แสดงไซโตโครมพี 450 ในเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัม

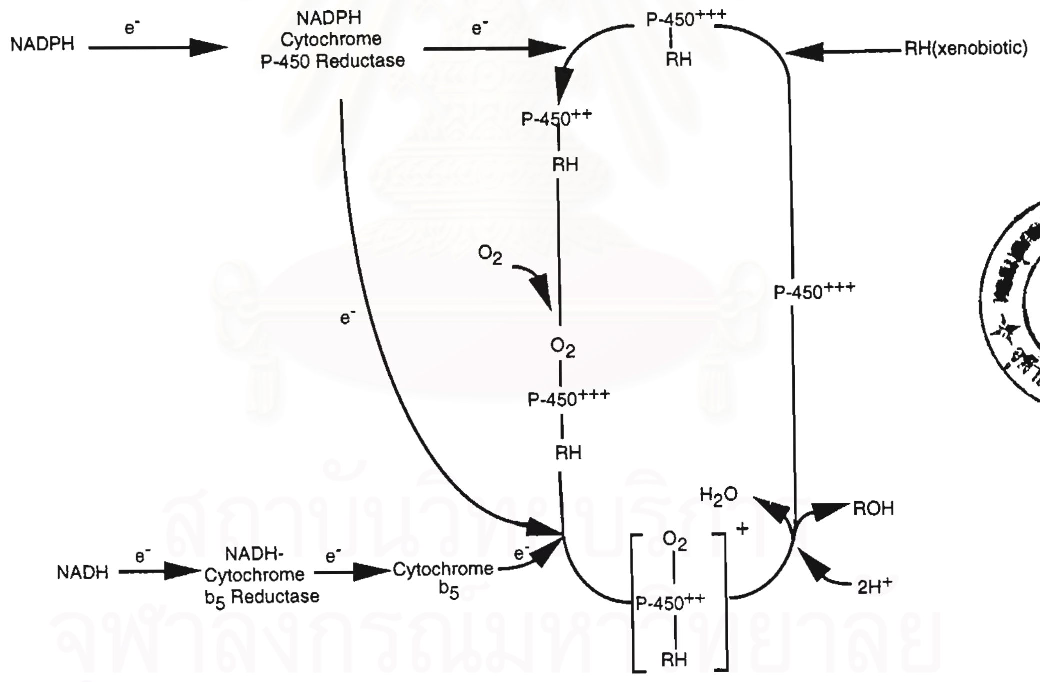
ภาพล่าง แสดงไซโตโครมบี 5 ในเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัม

(Voet and Voet, 1990)

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450

ในปฏิกิริยาที่เร่งด้วยไซโตโครมพี 450 นั้นตัวถูกย่อยซึ่งมีรีดอกโพเทนเชียลต่ำ (ในรูป RH) จะจับตัวกับไซโตโครมพี 450 ในรูปที่มีเหล็กถูกออกซิไดซ์ (Fe^{+3}) จากนั้นสารที่รวมตัวกันจะได้รับอีเล็คตรอนจาก NADPH (ของเอนไซม์ NADPH-P450-oxidoreductase) ซึ่งเป็นการลดรีดอกโพเทนเชียลของเหล็กจาก +3 เป็น +2 จากนั้นสารที่รวมตัวกันจะรับออกซิเจนโมเลกุล ก่อนที่จะได้รับอีเล็คตรอนอีกตัวจาก NADPH ที่มีแหล่งต่างจากแหล่งแรก อีเล็คตรอนตัวที่สองนี้อาจมาจาก NADH ของไซโตโครมบี 5 จากนั้นอีเล็คตรอนจะถูกถ่ายไปยังโมเลกุลออกซิเจน ทำให้ออกซิเจนมีพลังงานสูงขึ้นและไม่เสถียร จนทำให้อะตอมหนึ่งของออกซิเจนถูกส่งเข้าสู่โมเลกุลของตัวถูกย่อย ในขณะที่อีกอะตอมรวมตัวกับไฮโดรเจนในสภาวะแวดล้อมเกิดเป็นน้ำ ตัวถูกย่อยที่ถูกเติมออกซิเจนซึ่งมีขั้วประจุไฟฟ้าสูงขึ้นแล้วจะแยกตัวออกไปได้ไซโตโครมพี 450 กลับคืนมาทำงานใหม่ ดังแสดงในรูปที่ 3



รูปที่ 3 แสดงวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450

(modified from Sipes and Gandolfi, 1986)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

โดยที่ระบบเอนไซม์นี้ต้องการทั้ง NADPH และออกซิเจน จึงมีผู้เรียกระบบนี้ว่า Mixed function oxidase และ monooxygenase (Miura and Nagai, 1988)

ชนิดของไซโตโครมพี 450 ในสิ่งมีชีวิตทั่วไป

นอกจากจะพบไซโตโครมพี 450 ในคนและสัตว์แล้วยังสามารถพบได้ในสิ่งมีชีวิตชั้นต่ำ เช่น ส่า (yeast) แบคทีเรีย และ พืชชั้นสูง แต่ไซโตโครมพี 450 ที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความแตกต่างกันทั้งในด้านหน้าที่และส่วนโครงสร้างย่อยทางเคมีของตัวมันเอง(Juchau, 1990) ไซโตโครมพี 450 ที่พบในแบคทีเรีย Pseudomonas putida จะแตกต่างจากไซโตโครมพี 450 ในสิ่งมีชีวิตอื่นคือ เป็นเอนไซม์ที่ไม่ได้จับอยู่กับผนังเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัม แต่มีลักษณะเป็น soluble enzyme และมีโครงสร้างเป็นผลึก (crystal) นอกจากนี้การรับอีเล็คตรอนจะรับมาจากโปรตีน putidaredoxin (โดยผ่าน flavoprotein putidaredoxin reductase) ซึ่งการรับอีเล็คตรอนจะมีลักษณะคล้ายกับไซโตโครมพี 450 ในไมโตคอนเดรียของ สิ่งมีชีวิตทั่วไป และยังพบว่าไซโตโครมพี 450 อีกชนิดหนึ่งที่แยกได้จากแบคทีเรีย (Bacillus megaterium) มีลักษณะเป็น self-contained monooxygenase system การทำงานของเอนไซม์ดังกล่าวไม่อาศัยกระบวนการขนส่งอีเล็คตรอน สำหรับไซโตโครมพี 450 ในพืชนั้นมักเกี่ยวข้องกับกระบวนการสังเคราะห์สี (pigment) และสารอัลคาลอยด์ต่าง ๆ (Gonzalez, 1990)

Gonzalez (1990) ได้รวบรวมชนิดของไซโตโครมพี 450 ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงไซโตโครมพี 450 ที่พบในสิ่งมีชีวิตชนิดต่าง ๆ

ไซโตโครมพี 450	trivial name	สิ่งมีชีวิตที่พบ
IA1	c	หนู rat
	P_1	หนู mouse
	P_1	คน
	form 6	กระต่าย
IA2	d	หนู rat
	P_3	หนู mouse, คน
	P_2	หนู mouse
	form 4	คน
	LM4	กระต่าย

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไซโตโครมพี 450	trivial name	สิ่งมีชีวิตที่พบ
IIA1	A1	หนู rat
IIA2	A2	หนู rat
IIA3	A3	หนู rat
	15β	หนู mouse
	P-450 (1)	คน
	IIA3	คน
IIB1	b	หนู rat
IIB2	e	หนู rat
IIB3	IIB3	หนู rat
IIB4	LM2	กระต่าย
	b15	กระต่าย
	b54	กระต่าย
	B0	กระต่าย
	B1	กระต่าย
IIB5	HP1	กระต่าย
	b52	กระต่าย
	B2	กระต่าย
IIB6	LM2	คน
IIB7	hIIB1	คน
IIB8	hIIB2	คน
IIB9	pF26	หนู mouse
IIB10	pF3/46	หนู mouse
IIC1	PBc1	กระต่าย
IIC2	PBc2,K	กระต่าย
	pHP2	กระต่าย
IIC3	PBc3	กระต่าย
	3b	กระต่าย
IIC4	PBc4	กระต่าย
	1-88	กระต่าย
IIC5	form 1	กระต่าย
IIC6	PB1	หนู rat

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไซโตโครมพี 450	trivial name	สิ่งมีชีวิตที่พบ
IIC7	f	หนู rat
	pTF1	หนู rat
IIC8	form 1	คน
	IIC2	คน
	mp-12	คน
IIC9	mp-4	คน
	IIC1	คน
IIC10	mp-8	คน
IIC11	h,16x	หนู rat
	i,15β	หนู rat
IIC13	g	หนู rat
IIC14	pHP3	กระต่าย
IIC15	b32-3	กระต่าย
IID1	db1	หนู rat
IID6	db1	คน
	16x	หนู mouse
IID2	db2	หนู rat
IID3	db3	หนู rat
IID4	db4	หนู rat
IID5	db5	หนู rat
IID7		คน
IID8		คน
IIE1	j	คน
		หนู rat
	3a	กระต่าย
IIE2	gene2	กระต่าย
IIF1		คน
IIG1	olf1	หนู rat
IIH1	PB15	ไก่
IIIA1	pcn1	หนู rat
IIIA2	pcn2	หนู rat

ตารางที่ 1 (ต่อ)

ไซโตโครมพี 450	trivial name	สิ่งมีชีวิตที่พบ
IIIA3	HLp	คน
IIIA4	nf	คน
	pcn1	คน
IIIA5	hpcn3	คน
IIIA6	3c	กระต่าย
IVA1	$LA_{\omega}1$	หนู rat
IVA2	$LA_{\omega}2$	หนู rat
IVA3	$LA_{\omega}3$	หนู rat
IVA4	p-2	กระต่าย
IVB1	isozyme 5	กระต่าย
	IVB1	คน
VIA1		แมลงวัน
XIA1	11β	วัว
XIB2	scc	คน
		วัว
XVIIA1	17α	วัว
		คน
XIXA1	arom	คน
XXIA1	c21A	หนู mouse
	c21	วัว
	c21	หมู
XXIA1P		คน
XXIA2	c21B	คน
XXIA2P		หนู mouse
XXVI	26-OH	กระต่าย
LI	14DM	ยีสต์ (<u>Saccharomyces cerevisiae</u>)
		ยีสต์ (<u>Candida tropicalis</u>)
LII	alk	ยีสต์ (<u>Candida tropicalis</u>)
CI	cam	แบคทีเรีย (<u>Pseudomonas putida</u>)
CII	BM-3	แบคทีเรีย (<u>Bacillus subtilis</u>)

สำหรับในพืชนั้นสามารถพบไซโตโครมพี 450 ในพืชชนิดต่างๆ เช่น ละหุ่ง ข้าวโพด ข้าวฟ่าง หัวผักกาด และกะหล่ำดอก(cauliflower) เป็นต้น ซึ่งส่วนที่พบไซโตโครมพี 450 คือ หัว ราก เมล็ด และดอก (Miura and Nagai, 1988)

ชนิดของไซโตโครมพี 450 ในสัตว์น้ำ

ไซโตโครมพี 450 นอกจากจะพบในสิ่งมีชีวิตต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นแล้ว ยังสามารถพบเอนไซม์นี้ได้ในสัตว์น้ำชนิดต่างๆด้วย จากการศึกษาของ Lee (1985) ในปลา Leistomus canthurus ปู Callinectes sapidus และในหอย Crassostrea virginica พบว่ากระบวนการเมตาบอลิสมในสัตว์น้ำเหล่านี้ต้องอาศัย cytochrome P-450 dependent mixed-function oxygenase system โดยมี แมกนีเซียม ออกซิเจน และ NADPH ร่วมในปฏิกิริยานี้ด้วย

จากการศึกษาของ Stegeman, Binder และ Orren (1979) โดยทำการศึกษาในปลา Stenotomus vesicolor พบไซโตโครมพี 450 ปริมาณมากที่สุดในตับ รองลงมาคือ หัวใจ ลำไส้ อัณฑะ และเหงือก นอกจากนี้ยังพบว่าการทำงานของไซโตโครมพี 450 ต้องอาศัยออกซิเจน NADPH และ NADPH-dependent cytochrome P-450 reductase ร่วมในปฏิกิริยาด้วย

James (1990) ทำการศึกษาในกุ้ง Spiny lobster (Panulirus argus) พบว่าการนำไมโครโซมของกุ้งมาทำการแยกส่วนประกอบโดยใช้วิธี DEAE - cellulose chromatography สามารถแยกได้เป็น 3 ส่วน คือ D1, D2 และ D3 โดยมีระดับไซโตโครมพี 450 ในแต่ละส่วนไม่เท่ากัน

Goksoyr และ Forlin (1992) ได้รวบรวมชนิดของไซโตโครมพี 450 ที่พบในปลาชนิดต่างๆ ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 แสดงไซโตโครมพี 450 ที่พบในปลาชนิดต่าง ๆ

ชนิดของปลา	ไซโตโครมพี 450	Family/subfamily
rainbow trout (Oncorhynchus mykiss)	P-450LM1	-
	P-450LM2	CYP2B
	P-450LM3	-
	P-450LM4a	CYP1A
	P-450LM4b	CYP1A
	P-450LMC1	CYP2B
	P-450LMC2	CYP2B

ตารางที่ 2 (ต่อ)

ชนิดของปลา	ไซโตโครมพี 450	Family/subfamily
rainbow trout	P-450LMC3	-
(Oncorhynchus mykiss)	P-450LMC4	-
	P-450LMC5	CYP3A
	P-450con	CYP2
	P-450KM1	-
	P-450KM2	-
scup	P-450A	-
(Stenotomus chrypsops)	P-450B	CYP2B
	P-450C	-
	P-450D	-
	P-450E	CYP1A
cod	P-450a	-
(Gadus morhua)	P-450b	CYP2
	P-450c	CYP1A
	P-450d	-
perch	P-450V	CYP1A
(Perca fluviatilis)		

สับสเตรทของไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450 เป็นเอนไซม์ที่มีสับสเตรท (substrate) ที่เป็นทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกาย (endobiotic) เช่น คีโตน กรดไขมัน พรอสต้าแกรนดิน เสตียรอยด์ และสารที่ร่างกายได้รับจากภายนอก (xenobiotic) เช่น ยา และพวกสารก่อมะเร็งต่างๆ เป็นต้น (Gonzalez,1989) ไซโตโครมพี 450 แต่ละชนิดจะมีสับเสตรทได้มากกว่า 1 ชนิด และแม้ว่าสับเสตรทของไซโตโครมพี 450 จะแตกต่างกันแต่ทุกตัวก็มีคุณสมบัติละลายได้ดีในไขมัน ดังนั้นไซโตโครมพี 450 จึงมีความสำคัญในการที่จะเปลี่ยนแปลงยาหรือสารที่เป็น lipophilic ให้เป็นสารประกอบที่มี polar มากขึ้น ทำให้ถูกขับออกจากร่างกายได้รวดเร็ว Gonzales และ Idle (1994) ได้รวบรวมสับสเตรทของไซโตโครมพี 450 ที่เป็นยาและสารก่อมะเร็ง ดังแสดงในตารางที่ 3 และ 4 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 แสดงยาที่เป็นสับสเตรทของไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450	สับสเตรท
CYP1A2	imipramine, caffeine, phenacetin, verapamil
CYP2C8, CYP2C9, CYP2C18	benzphetamine, diazepam, diclophenac, hexobarbital, ibuprofen, imipramine, oxicam, anti-inflammatory drugs, proguanil, propranolol, retinoic acid, S-warfarin, naproxen, tolbutamide,tetrahydrocannabinol
CYP2C19	S-mephenytoin, omeprazole
CYP2D6	antiarrhythmic agent, antihypertentives, β-blockers, monoamine oxidase inhibitors, morphine derivatives, antipsychotic, tricyclic antidepressants
CYP2E1	chlorzoxazone
CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5	aldrin, benzphetamine, cyclosporin, erythromycin, lidocaine (lignocaine), lovastatin, midazolam, quinidine, 17α-ethynylestradiol, terfenadine, triazolam, various 1,4-dihydropyridines, nifedipine
CYP4A11	leukotriene receptor antagonists (long chain fatty acid hydroxylase)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 4 แสดงสารก่อมะเร็งชนิดต่าง ๆ ที่เป็นสับสเตรทของไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450	สับสเตรท
CYP1A1	polycyclic aromatic hydrocarbons
CYP1A2	aflatoxins
CYP2A6	nitrosamines
CYP2B6	cyclophosphamide, ifosfamide
CYP2E1	acrylonitrile, benzene, nitrosamines, vinyl halides
CYP3A3, CYP3A4, CYP3A5, CYP3A7	aflatoxins, nitroaromatic hydrocarbon

ปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงของไซโตโครมพี 450

1. สารเหนี่ยวนำเอนไซม์ (enzyme inducer)

enzyme inducer คือสารที่สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ ซึ่งอาจเกิดเนื่องมาจากการไปเพิ่มปริมาณเอนไซม์หรือเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเอนไซม์ ทำให้มี enzyme activity เพิ่มขึ้น ลักษณะของสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ดีคือ สามารถละลายได้ดีในไขมันและมีค่าครึ่งชีวิตยาว สารเหนี่ยวนำเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสร้างเอนไซม์มากขึ้นมักจะเกิดขึ้นในขั้นตอนของการ transcription หรือ translation ของการสังเคราะห์โปรตีน สำหรับการเพิ่ม enzyme activity นั้นอาจเกิดจากการเพิ่ม affinity ของเอนไซม์ต่อสับสเตรท (Park and Brecken, 1981)

มีสารหรือยาจำนวนมากที่มีคุณสมบัติเป็นสารเหนี่ยวนำเอนไซม์ ซึ่งอาจแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มคือ

ก. กลุ่มยาที่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์เหมือนฟีโนบาร์บิทอล(phenobarbital) ซึ่งพบว่าการให้ฟีโนบาร์บิทอลแก่สัตว์ทดลองจะทำให้ตับขยายตัวใหญ่ขึ้น มีการเพิ่มของโปรตีนในไมโครโซม และการเพิ่มปริมาณของเอ็นโดพลาสมิกเร็ทติคิวรัมชนิดเรียบ ระบบการสร้างโปรตีนและไขมันจะถูกเหนี่ยวนำให้มากขึ้นเช่นเดียวกับการสร้าง NADPH-cytochrome P-450 reductase และไซโตโครมพี 450 ซึ่งเชื่อว่าการกระตุ้นให้มีการสร้างเอนไซม์มากขึ้นนั้นเกิดจากการเหนี่ยวนำให้มีการเพิ่มปริมาณของ mRNA (Sipes and Gandolfi, 1986)

ข.กลุ่มยาที่มีฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำเอนไซม์เหมือน polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) สารในกลุ่มนี้เช่น benzo(a)pyrene และ 3-methylcholanthrene พบว่าการให้ PAH แก่สัตว์ทดลองจะทำให้มีการเพิ่มขึ้นของไซโตโครมพี 448 โดยมีการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักตับ การสร้างโปรตีน ไขมันฟอสโฟลิปิด และ NADPH cytochrome P-450 reductase เพียงเล็กน้อย สำหรับกลไกในการเหนี่ยวนำเอนไซม์นั้นเชื่อว่าเหมือนกับ TCDD (2,3,7,8 tetrachorodibenzo-p-dioxin) โดยสารนี้จะไปจับกับโปรตีนตัวรับ (receptor protein) ในไซโตพลาสซึมก่อน จากนั้นจะผ่านเข้าสู่นิวเคลียส ไปจับกับโครโมโซมที่หน่วยพันธุกรรมเฉพาะซึ่งเป็นบริเวณที่ควบคุมการอ่านเบสที่เป็นข้อมูลในการสร้าง mRNA และการแปรรหัสบน mRNA ไปเป็นไซโตโครมพี 448 (Sipes and Gandolfi, 1986) สำหรับสารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์นั้น ได้รวบรวมไว้ในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงสารที่เป็นตัวเหนี่ยวนำเอนไซม์ไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450	สารเหนี่ยวนำเอนไซม์	reference
IA1	polycyclic aromatic hydrocarbon	Guengerich, 1992
	2-(4-chlorophenyl)benzothiazole	Karenlampi et al., 1989
IA2	3-methylcholanthrene	Beaune et al., 1990
IIB1, IIB2	phenobarbital	Gonzalez, 1989
IIC8, IIC9	barbiturates	Guengerich, 1992
IIC10	phenobarbital	Guengerich, 1992
	rifampicin	Beaune et al., 1990
IIE1	ethanol	Guengerich, 1992
IIIA	rifampicin	Beaune et al., 1990
IIIA4	barbiturate	Guengerich, 1992
	dexamethazone	Guengerich, 1990

2. สารยับยั้งเอนไซม์ (enzyme inhibitor)

enzyme inhibitor เป็นสารหรือยาที่ไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ สำหรับไซโตโครมพี 450 ส่วนใหญ่จะเป็นการยับยั้งแบบ competitive antagonists โดยยาจะไปแย่งกันจับที่ cytochrome P-450 ทำให้ความสามารถของเอนไซม์ในการเปลี่ยนแปลงยาหรือสารต่าง ๆ ลดลง นอกจากนี้ยังอาจเกิดจากการลดปริมาณการผลิตเอนไซม์ เพิ่มการทำลายเอนไซม์ ขัดขวางการเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอนหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างทางกายภาพของเอนไซม์ เช่น การยับยั้งการสร้างพอร์ไฟรินของไซโตโครมพี 450 โดย 3-amino-1,2,3-triazole หรือการลดความเข้มข้นของไซโตโครมพี 450 เนื่องจากโคบอลท์คลอไรด์ที่ไปลดการสร้างฮีมพร้อมกับเร่งการทำงานของฮีมออกซีจีเนส ซึ่งเปลี่ยน hemoprotein ไปเป็นบิลิเวอร์ดิน ส่งผลต่อการลดระดับไซโตโครมพี 450

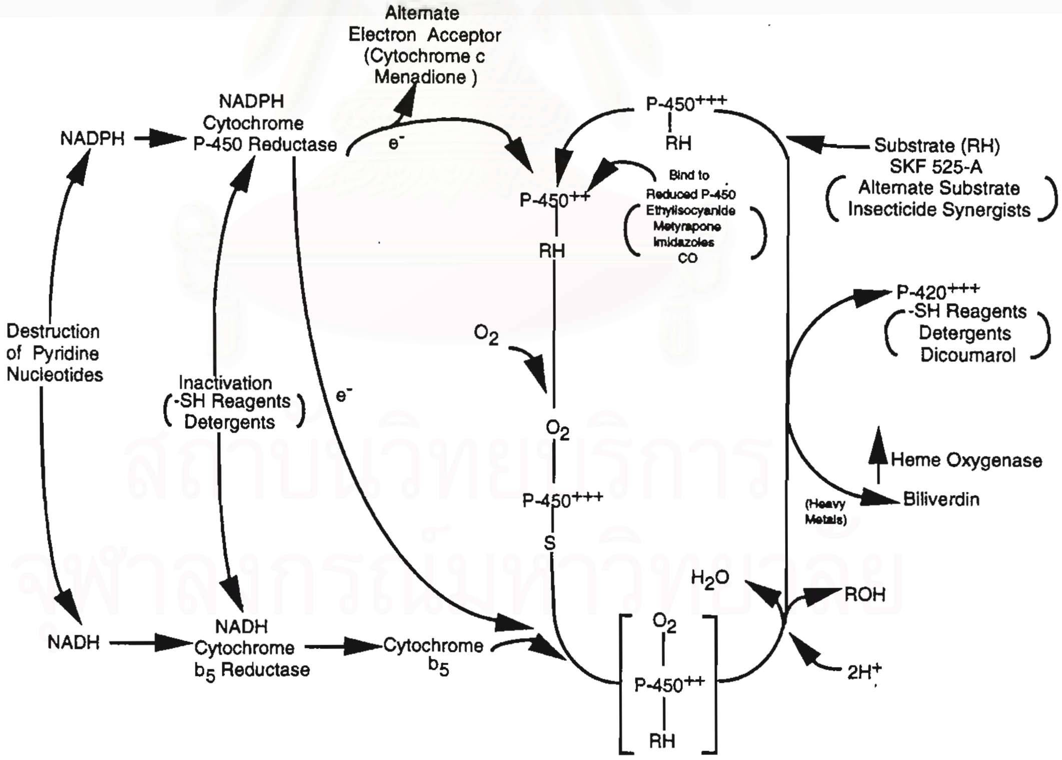
นอกจากนี้ยังมีสารบางชนิดที่ยับยั้งเอนไซม์ในลักษณะที่เรียกว่า การยับยั้งแบบฆ่าตัวตาย (suicide inhibition) เช่นการจับตัวระหว่างไซโตโครมพี 450 กับสารเคมีบางประเภทจนเกิดการเปลี่ยนแปลงได้เมตาบอไลท์ที่ไม่แยกตัวออกจากไมโครโซม แต่กลับสร้างพันธะโควาเลนท์กับไนโตรเจนของฮีม ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้เช่น คาร์บอนเตตระคลอไรด์ ไวนิลคลอไรด์ และ ไตรคลอโรเอทิลีน เป็นต้น (Sipes and Gandolfi, 1986)

สำหรับการยับยั้งเอนไซม์โดยตรงนั้นมีตัวอย่างที่แสดงให้เห็นได้ชัดเจนเช่น กรณีของคาร์บอนมอนนอกไซด์ ซึ่งสามารถจับตัวได้อย่างดีกับไซโตโครมพี 450 ทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ ความสามารถในการยับยั้งขึ้นอยู่กับความสามารถในการจับกับ binding site ของเอนไซม์ และไซโตโครมพี 450 แต่ละชนิดก็มีความไวต่อตัวยับยั้งที่ต่างกัน เช่น 7,8-benzoflavone มีคุณสมบัติเป็น competitive inhibitor ที่จำเพาะต่อไซโตโครมพี 448 ในขณะที่สาร SKF 525-A จะมีความจำเพาะในการยับยั้งไซโตโครมพี 450 นอกจากนี้ยังพบว่าผลไม้บางชนิดเช่น องุ่น สามารถยับยั้ง CYP3A4 โดยการจับกับพอร์ไฟรินของไซโตโครมพี 450 ซึ่งมีผลทำให้เกิดการยับยั้งกระบวนการเมตาบอลิสมของ nifedipine (Guengerich, 1992)

สำหรับสารที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ได้แสดงไว้ในตาราง ที่ 6 และรูปที่ 4

ตารางที่ 6 แสดงสารที่เป็นตัวยับยั้งเอนไซม์ไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450	สารยับยั้งเอนไซม์	reference
IA2	fluvoxamine	Brosen et al., 1992
IID6	quinidine perphenazine thioridazine	Brosen et al., 1992
IIIA4	17-β estradiol progesterone	Guengerich, 1990
IIE1	dimethylsulfoxide	Hyland et al., 1992



รูปที่ 4 แสดงการยับยั้งวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450

(modified from Sipes and Gandolfi, 1986)

3. ชนิดสายพันธุ์และระบบพันธุกรรม

ไซโตโครมพี 450 ที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดหรือแม้แต่ชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ ก็พบมีความแตกต่างกันทั้งในด้านของโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ (Guengerich, 1992) ความแตกต่างที่เกิดระหว่างสายพันธุ์ในสัตว์ชนิดเดียวกัน ซึ่งเป็นลักษณะที่เรียกว่า เภสัชพันธุกรรม (pharmacogenetic) เกิดขึ้นเนื่องจากหน่วยพันธุกรรมที่แตกต่างกันเพียงเล็กน้อย แต่ทำให้การตอบสนองต่อสารเคมีต่างกัน เช่น พบว่า 7-9% ของคนอังกฤษขาดเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ที่ใช้ในการเปลี่ยนแปลง debrisoquine ปรากฏการณ์นี้จะเห็นได้ชัดเจนในหนู rat พันธุ์ต่าง ๆ เช่น Spraque-Dawley, Holtzman และ Wistar ซึ่งพบว่ามีระยะเวลาในการนอนหลับไม่เท่ากันเมื่อได้รับฟีโนบาร์บิทอลขนาดเท่ากัน สำหรับในคนได้มีการศึกษาความแตกต่างของค่าครึ่งชีวิตของยา propranolol, phenytoin และphenacetin ในเด็กแฝดพบว่าเด็กแฝดที่เป็น identical twin จะมีค่าครึ่งชีวิตของยาเหล่านี้ใกล้เคียงกัน แต่ในเด็กแฝดที่เป็น fraternal twin จะมีค่าครึ่งชีวิตของยาแตกต่างกัน (Sipes and Gandolfi, 1986)

4. เพศ

ความแตกต่างระหว่างสัตว์ตัวผู้และตัวเมียนั้นมีตัวอย่างที่เห็นชัดเจนเช่น หนูตัวเมียจะหลับได้นานกว่าหนูตัวผู้ที่ได้รับยาเฮ็กโซบาร์บิทอลในขนาดที่เท่ากัน นอกจากนี้ยังพบว่าหนูตัวเมียมีโอกาสเกิดพิษจากการได้รับพาราไธออนมากกว่าหนูตัวผู้ ซึ่งอธิบายได้ว่าการกำจัดสารพิษโดยเอนไซม์ในตับของหนูตัวเมียน้อยกว่าในหนูตัวผู้ และระดับไซโตโครมพี 450, NADPH-cytochrome P-450 reductase ในตับของหนูตัวผู้มากกว่าหนูตัวเมีย (Sipes and gandolfi, 1986)

จากการศึกษาของ Forlin (1980) โดยทำการศึกษาในปลา rainbow trout พบว่าระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาตัวผู้มากกว่าปลาตัวเมีย นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่าการเพิ่มขึ้นของไซโตโครมพี 450 จะควบคู่ไปกับการเพิ่มขึ้นของระดับฮอร์โมน androgen ในปลาตัวผู้ และในขณะที่มีการเพิ่มระดับฮอร์โมน testosterone และ estradiol ในปลาตัวเมีย จะพบว่ามีการลดลงของไซโตโครมพี 450 (Stegeman, Pajor and Thomas, 1982)

5. อายุ

โดยทั่วไปสัตว์แรกเกิดจะมีเอนไซม์ในระดับที่ต่ำกว่าสัตว์ที่โตกว่า แต่จะมีช่วงหนึ่งของอายุที่ระดับของเอนไซม์จะลดลงเรื่อย ๆเช่นหนูที่เกิดใหม่จะมีระดับเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ต่ำมาก และเพิ่มสูงสุดเมื่ออายุ 30 วัน จากนั้นจะเริ่มลดลงจนเมื่ออายุได้ 2 ปี พบว่าจะมีระดับเอนไซม์เพียง50-60%ของที่เคยสูงสุด สำหรับในคนจะพบมีเอ็นโดพลาสมิคเร็ทติคิวรัมส่วนเรียบ

ในเซลล์ตับ เมื่ออายุครรภ์ได้ 3 เดือน ซึ่งเป็นเวลาเดียวกับที่พบไซโตโครมพี 450 (Sipes and Gandolfi, 1986)

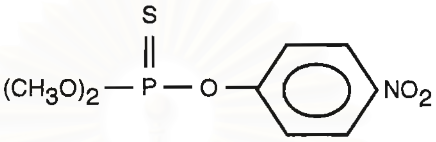
6. อาหาร

อาหารประเภทไขมันเช่น ไขมันชนิดไม่อิ่มตัว (polyunsaturated fat) จะลดระดับไซโตโครมพี 450 เนื่องจากจะมีผลในการเพิ่มกระบวนการ lipid peroxidation ซึ่งมีผลทำให้เยื่อหุ้มเซลล์ถูกทำลาย ทำให้เกิดการทำลายไซโตโครมพี 450 มากขึ้น แต่การขาดแคลเซียม ทองแดง เหล็ก สังกะสี แมกนีเซียม และพวกวิตามินต่าง ๆ เช่น วิตามินบี อี และบีคอมเพล็กซ์ จะมีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง เช่นเดียวกับการขาดอาหารประเภทโปรตีน สำหรับการอดอาหารถ้าเป็นการอดอาหารเพียงช่วงสั้น ๆ ประมาณ 12-16 ชั่วโมง จะมีผลทำให้เพิ่มการดูดซึมของทางเดินอาหาร และเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ต่าง ๆ ในระบบทางเดินอาหาร รวมทั้งการเพิ่มขึ้นของไซโตโครมพี 450 แต่การอดอาหารนานกว่า 48 ชั่วโมง กลับพบว่ามีผลตรงกันข้าม และระดับของไซโตโครมพี 450 ลดลง (Sipes and Gandolfi, 1986)

นอกจากปัจจัยทั้งหมดที่กล่าวมาข้างต้นแล้ว สำหรับในสัตว์น้ำพบว่ายังมีปัจจัยที่สำคัญอีกประการหนึ่งคือ อุณหภูมิของน้ำที่สัตว์เหล่านั้นอาศัยอยู่ จากการศึกษาของ Carpenter และคณะ (1990) โดยทำการศึกษาในปลา rainbow trout พบว่าที่อุณหภูมิ 18 $^{\circ}$C ปลาจะมีระดับ P450 4b น้อยกว่าที่อุณหภูมิ 10 $^{\circ}$C นอกจากนั้นยังพบว่าความสามารถของเอนไซม์ในการจับกับสับสเตรทลดลงเมื่ออุณหภูมิสูงขึ้น แต่จากการศึกษาของ Andersson และ Koivusaari (1985) ทำการศึกษาโดยการกระตุ้นไซโตโครมพี 450 ด้วย enzyme inducer 2 ชนิด คือ PAH และ βNF พบว่าการเพิ่มขึ้นของระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 5 $^{\circ}$C จะช้ากว่าในปลาซึ่งเลี้ยงที่อุณหภูมิ 17 $^{\circ}$C

เมททิลพาราไธออน (Methyl parathion)

ชื่อทางเคมี O,O-dimethyl-O-(4-nitrophenyl) thiophosphate
ชื่อการค้า Paratop, Unidol M50, Folitox, Ecodol, etc.
สูตรโมเลกุล $C_8H_{10}O_5NSP$
สูตรโครงสร้าง



รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของเมททิลพาราไธออน

คุณสมบัติทั่วไป

เมททิลพาราไธออนเป็นสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต (organophosphate) ที่มีกลุ่ม methyl อยู่ในโมเลกุลดังแสดงในรูปที่ 5 และเมททิลพาราไธออนยังจัดอยู่ในกลุ่ม thiophosphorus derivatives ละลายน้ำได้น้อยแต่ละลายได้ดีในไขมัน มีความเป็นพิษน้อยกว่าพาราไธออน (parathion) 3-4 เท่า สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตดีกว่าสารปราบศัตรูพืชกลุ่มคลอรีนเนตเตดไฮโดรคาร์บอนมาก ในแง่ที่ว่ามันไม่มีพิษสะสมหรือพิษเรื้อรังในร่างกายและในธรรมชาติ เพราะมันถูกไฮโดรไลท์ด้วย nonspecific esterase ได้ง่าย ได้ฟอสเฟตอินทรีย์และสารที่ไม่เป็นพิษ การสลายตัวของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในสิ่งแวดล้อมก็เป็นไปได้เร็วกว่าพวกสารดีดีที ปัญหาเกิดจากพิษตกค้างในสิ่งแวดล้อมจึงมีน้อยกว่า อย่างไรก็ตามสถิติการตายของคนไทยเนื่องจากสารปราบศัตรูพืชประเภทนี้ค่อนข้างสูงมาก คงมาจากสาเหตุการใช้อย่างไม่ถูกต้องของเกษตรกร เช่น ใช้ยามากเกินขนาด การได้รับสารพิษโดยตรงจากการฉีดพ่น หรือขณะผสม หรือการเก็บผลไม้หลังฉีดยาก่อนกำหนด ยาประเภทนี้สลายตัวหมดหลังฉีดพ่นในระยะเวลา 1-2 สัปดาห์

คุณสมบัติทางกายภาพและทางเคมี

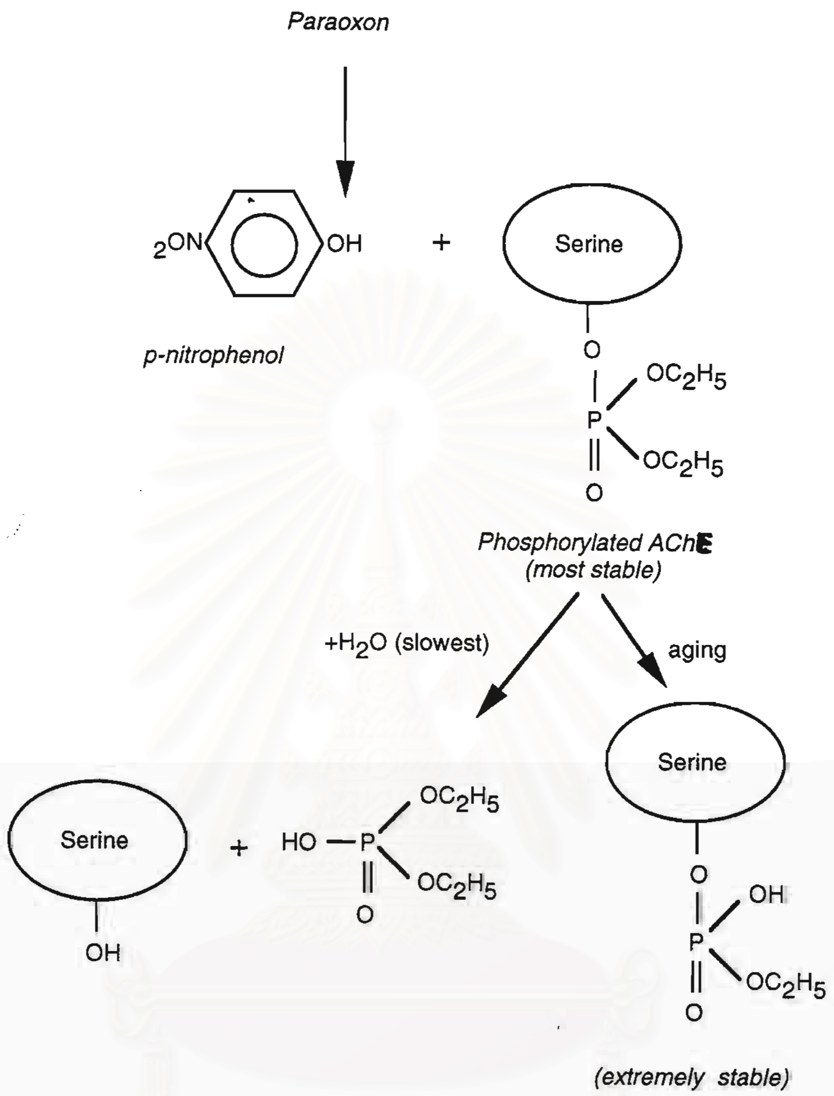
สถานะทางกายภาพ สารบริสุทธิ์ เป็นผลึกไม่มีสี ผลิตภัณฑ์และสารเจือปนเป็นของเหลวลื่นคล้ายน้ำมัน สีน้ำตาลแดง มีกลิ่นเหม็นเล็กน้อย

น้ำหนักโมเลกุล	263.22
จุดหลอมเหลว	35-36 °C
จุดหลอมเหลว	109 °C ที่ความดัน 0.04 มม. ของปรอท หรือ 160 °C ที่ความดัน 1 มม. ของปรอท
การละลาย	ละลายในน้ำได้เล็กน้อย (55-60 มิลลิกรัม/ลิตร) แต่ละลายได้ดีในสารละลายอินทรีย์ทุกชนิด ยกเว้น alkanes
เสถียรภาพ	เสถียรในสภาพสารละลายที่เป็นกลางและกรด ที่อุณหภูมิปกติ

กลไกการออกฤทธิ์

การเกิดพิษของเมทิลพาราไธออน และสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตอาจเกิดจากการได้รับสารโดยการหายใจ ทางผิวหนัง หรือการรับประทาน ซึ่งสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส (cholinesterase) ทั้ง acetylcholinesterase (true cholinesterase) และ pseudocholinesterase ผลการยับยั้งทำให้เกิดการสะสมของ acetylcholine (ACh) ที่บริเวณ cholinoceptive site และก่อให้เกิดผลจากการทำงานของ acetylcholine คือกระตุ้นการทำงานของ cholinergic fiber อย่างต่อเนื่อง

เมทิลพาราไธออนและสารปราบศัตรูกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเมื่อเข้าสู่ร่างกายพบว่าจะไม่รวมกับเอนไซม์โดยตรง แต่จะต้องถูกเปลี่ยนแปลงให้อยู่ในรูปที่สามารถรวมตัวกับเอนไซม์ได้ เช่น เมทิลพาราไธออนจะต้องถูกเปลี่ยนเป็นเมทิลพาราออกซอน (methyl paraoxon) ซึ่งจะทำปฏิกิริยากับเอนไซม์โฆลีนเอสเตอเรส ที่ตำแหน่ง esteratic site ดังแสดงในรูปที่ 6 ได้เป็นสารเชิงซ้อนระหว่างตัวยับยั้งกับเอนไซม์ เรียกว่า phosphorylated enzyme ที่อยู่ได้ถาวร ไม่ปล่อยให้เอนไซม์เป็นอิสระอีกครั้ง (irreversible cholinesterase inhibitors) จะมีเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสได้อีกก็ต่อเมื่อถูกสร้างขึ้นมาใหม่ในร่างกาย



รูปที่ 6 แสดงขั้นตอนการเกิดปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสกับสารปราบศัตรูพืชกลุ่ม ออร์กาโนฟอสเฟต (modified from Doull, Klaassen and Amdur, 1980)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา

สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตรวมตัวกับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส ทำให้เกิดการสะสมของ ACh บริเวณ cholinoceptive site โดยที่การรวมตัวนี้จะเป็นแบบถาวร (irreversible) สำหรับอาการพิษที่เกิดขึ้นมีดังนี้

1. อาการพิษเฉียบพลัน

1.1 อาการพิษแบบมัสคารินิค เป็นการกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาธิติคโดยการกระตุ้นที่ muscarinic receptor ซึ่งพบส่วนใหญ่บริเวณกล้ามเนื้อเรียบ หัวใจ และต่อมมีท่อ อาการที่เกิดขึ้นคือ เบื่ออาหาร คลื่นไส้ อาเจียน ท้องเดิน น้ำตาไหล เหงื่อออก ม่านตาหดตัว หัวใจเต้นช้าลง ความดันโลหิตต่ำ กลั้นอุจจาระและปัสสาวะไม่ได้ การเกร็งของหลอดลม หลอดลมมีเมือก และเสมหะมาก

1.2 อาการพิษแบบนิโคตินิค มีผลจากการกระตุ้นที่ nicotinic receptor เป็นการกระตุ้นระบบประสาทซิมพาเธติคและกล้ามเนื้อลาย ทำให้มีฤทธิ์ตรงข้ามกับการกระตุ้นระบบประสาทพาราซิมพาเธติค ซึ่งอาการของผู้ได้รับพิษที่แสดงอาการทางซิมพาเธติคคือ มีอาการหัวใจเต้นเร็ว รูม่านตาขยาย ความดันโลหิตสูง มีการกระตุกของกล้ามเนื้อบริเวณเปลือกตา ใบหน้าและคอ กล้ามเนื้ออ่อนแรง โดยที่ในระยะแรกจะแสดงอาการเด่นทางซิมพาเธติค แต่ต่อมาจะแสดงอาการเด่นทางพาราซิมพาเธติค ส่วนการกระตุ้นกล้ามเนื้อลายที่ motor end plate ทำให้กล้ามเนื้ออ่อนแรง ในที่สุดจะเกิดอัมพาตโดยเฉพาะกล้ามเนื้อที่ใช้ในการหายใจ

1.3 อาการทางสมอง เนื่องจากความผิดปกติของระบบประสาทส่วนกลางอาการที่พบได้แก่ ปวดศรีษะ กระสับกระส่าย ตื่นตกใจง่าย อารมณ์พลุ่งพล่าน พูดไม่ชัด ไม่มีปฏิกิริยาโต้ตอบต่อสิ่งกระตุ้น มีการกระตุกของกล้ามเนื้อ ถ้าอาการมากอาจชักและหมดสติได้ ผู้ป่วยที่มีอาการมากจะถึงตายได้เนื่องจากระบบการหายใจล้มเหลว ซึ่งอาจเกิดขึ้นได้จากหลอดลมตีบ กล้ามเนื้อของระบบการหายใจเป็นอัมพาต และศูนย์ควบคุมการหายใจในสมองหยุดทำงาน ในรายที่มีอาการไม่รุนแรงนัก อาการจะดีขึ้นใน 2-3 วัน แต่จะอ่อนเพลีย ไม่มีแรงเป็นเวลานาน

2. อาการพิษเรื้อรัง

สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต อาจก่อให้เกิดอาการเป็นพิษทางระบบประสาท ซึ่งเกิดขึ้นหลังจากช่วงเวลาหนึ่ง (delayed neurotoxic effects) อาการพิษดังกล่าวเริ่มเกิดขึ้นที่ส่วนปลายประสาทของขาก่อน ต่อมาจะมีอาการเดินโซเซ เสียความรู้สึก และกล้ามเนื้ออ่อนแรง อาการจะรุนแรงมากขึ้น และเริ่มเป็นตามแขนด้วย ลักษณะทางพยาธิวิทยาที่พบจะเป็น

ลักษณะการทำลายซึ่งเกิดขึ้นที่เซลล์แอคซอน (axon) ตามด้วยการทำลายไมอีลิน (myelin) ซึ่งเข้าใจว่าการทำลายเซลล์ดังกล่าวเกิดขึ้นเนื่องจากการรบกวนกระบวนการเมตาบอลิสมของเซลล์ประสาทไขสันหลัง การขาดการสังเคราะห์สารบางชนิดจึงทำให้เส้นประสาทแอคซอนที่มีความยาวมาก ซึ่งอยู่ไกลเป็นอันตรายก่อน กระบวนการนี้เรียกว่า กระบวนการ "dying back" หลังจากเกิดอาการพิษนี้แล้วประมาณ 2-3 วัน หรืออาจถึง 2 สัปดาห์ อาการจะดีขึ้นช้าๆ แต่อาการพิษอาจไม่หายไปหมด

สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส ผลการยับยั้งทำให้เกิดการสะสมของ ACh บริเวณ cholinoceptive site และเกิดอาการผิดปกติต่างๆ ตามมา จากการศึกษาในหนู ที่ได้รับ sarin ขนาด 120 ไมโครกรัม / กิโลกรัม พบว่าเกิดอาการกระตุกของกล้ามเนื้อ ชัก อุณหภูมิร่างกายลดต่ำลง (Fernando, 1985) จากการศึกษาในนกกระจอก (Passer domesticus) ที่ได้รับ phosphamidon พบว่าจะเกิดการสะสมของ ACh มากบริเวณกล้ามเนื้อ ตับและสมอง ทำให้เกิดอาการสั่นกระตุกของกล้ามเนื้อ การเคลื่อนไหวผิดปกติ หายใจลำบาก ชัก และตายจากระบบการหายใจล้มเหลว (Saxena and Bhatnagar, 1986) นอกจากนี้ยังพบว่าการให้สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตคือ phenyl saligenin phosphate 2.5 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ฉีดเข้ากล้ามเนื้อไก่ ทำให้เกิดการทำลายเยื่อ myelin ที่หุ้มเส้นประสาท sciatic nerve ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของ nerve conduction (Lidsky, Manetto and Ehrich, 1990)

สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตนอกจากจะมีผลทำให้เกิดความผิดปกติต่อระบบประสาทแล้วยังพบว่าทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutagenicity) จากการศึกษาของ Velazquez et al. (1990) พบว่า methyl parathion และ triazophos รบกวนกระบวนการแบ่งเซลล์ (meiotic process) ของแมลงหวี่ Drosophila melanogaster โดยทำให้เกิดการเพิ่มขึ้นของโครโมโซมเพศ และเมทิลพาราไธออนยังชักนำให้เกิด DNA breaks ในส่วน plasmid ของ Escherichia coli (Griffin and Hill, 1983)

ระดับความเป็นพิษของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตต่อสิ่งมีชีวิตขึ้นอยู่กับชนิด ขนาดที่ได้รับ ช่วงเวลาที่สัมผัส สภาพแวดล้อม ความไวต่อสาร และชนิดกับอายุของสัตว์ (Eliser, 1970) จากการศึกษาของ Coppage และ Matthews (1974) พบว่าเมทิลพาราไธออนและพาราไธออน มีระดับความเป็นพิษต่อหนูใกล้เคียงกัน แต่เมทิลพาราไธออนจะมีระดับความเป็นพิษต่อปลา Lepomis gibbosus น้อยกว่าพาราไธออน นอกจากนี้ยังพบว่าสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิดจะมีความไวต่อสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตไม่เท่ากัน หนูจะมีความเป็นพิษต่อพาราไธออน และพาราออกซอนมากกว่าปลาแต่ปลาจะมีความไวต่อการเป็นพิษของมาลาไธออนและมาลาออกซอนมากกว่าหนู (Johnson and Wallace, 1987)

ความเป็นพิษของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตอาจเพิ่มขึ้นหรือลดลงได้เมื่อให้ร่วมกับสารอื่น เช่นเดียวกับผลการศึกษาของ Bursian และ Lehning (1989) ซึ่งพบว่า β-naphthoflavone (βNF) สามารถป้องกันการเกิดความผิดปกติทางระบบประสาทในไก่ที่ได้รับ tri-O-totyl phosphate (TOTP) โดยเชื่อว่า βNF ป้องกันการเปลี่ยน TOTP ไปเป็น active metabolite คือ TSP (O-totyl saligenin phosphate) นอกจาก βNF แล้วยังมีการศึกษาพบว่าในไก่ที่ได้รับ phenylmethane sulfonyl fluoride (PMSF) ก่อนได้รับ diisopropyl phosphorofluoridate (DEP) จะสามารถป้องกันการเกิด OPIDP (organophosphate-induced delayed polyneuropathy) แต่ถ้าให้ PMSF หลังได้รับ DEP จะส่งเสริมให้เกิดภาวะ OPIDP มากขึ้น เนื่องจาก PMSF ไปยับยั้ง NTE (neuropathy target esterase) ซึ่งการยับยั้ง NTE จะเป็นการส่งเสริมให้เกิดภาวะ OPIDP (Lotti et al., 1991)

ผลกระทบของออร์กาโนฟอสเฟตต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

ระดับความเป็นพิษของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีความแตกต่างกันในสัตว์แต่ละชนิด ขึ้นอยู่กับชนิด อายุ และความไวของสัตว์ต่างๆต่อสาร เช่น ในปลาดุกอุยค่า LC_{50} ของเมททิลพาราไธออนใน 96 ชั่วโมง เท่ากับ 2.8 ppm. (Palawski, Buckler and Mayer, 1983) ในปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซีย ค่า LC_{50} ของเมททิลพาราไธออนใน 96 ชั่วโมง เท่ากับ 38 ppm. (วรา พานิชเกรียงไกร และคณะ, 1993) ในปู ค่า LC_{50} ของเมททิลพาราไธออนใน 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1 ppm. (Nagarathnamma, 1982) ในกุ้ง <u>Metapenaeus</u> <u>monoceros</u> ค่า LC_{50} ของเมททิลพาราไธออนใน 48 ชั่วโมง เท่ากับ 1.2 ppm. (Reddy and Rao, 1990)

พิษของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เกิดจากการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส และพบว่าระดับของเอนไซม์ที่ลดลงมีความสัมพันธ์กับความเป็นพิษของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตในปลา (Lockhart et al., 1985) นอกจากนี้ระดับเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสยังใช้บอกถึงการทำงานของเส้นประสาทและกล้ามเนื้อด้วย (Skau and Brimijoin, 1978) นอกจากสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตจะมีผลต่อการลดลงของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสแล้ว ยังมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิสมพื้นฐานอีกด้วย Reddy, Bhagylakshmi และ Ramamurthi (1986) ได้ทำการศึกษาในปูน้ำจืดพบว่า เมททิลพาราไธออนรบกวนขบวนการเมตาบอลิสมของคาร์โบไฮเดรต โดยทำให้ปริมาณคาร์โบไฮเดรตทั้งหมดและปริมาณไกลโคเจนใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อลดลง ส่วนปริมาณแลคเตทใน hepatopancreas และกล้ามเนื้อกลับเพิ่มขึ้น ระดับเอนไซม์ phosphorylase a เพิ่มขึ้น แต่ phosphorylase b ลดลง ทั้งใน hepatopancreas และในกล้ามเนื้อ เอนไซม์ adolase เพิ่มขึ้น เอนไซม์ lactate dehydrogenase และ succinate dehydrogenase ลดลงทั้งใน hepatopancreas

และกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ยังพบว่ามีการเปลี่ยนแปลงของไนโตรเจนเมตาบอลิสมในกุ้ง Penaeus indicus ที่ได้รับเมททิลพาราไธออน ในขนาดความเข้มข้น 0.03 ppm. นาน 72 ชั่วโมง โดยที่ปริมาณแอมโมเนีย ยูเรีย กลูตามิน และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้อง เช่น AMP-deaminase, glutamine synthetase, arginase และ adenosine deaminase ใน hepatopancreas กล้ามเนื้อและเหงือกเพิ่มขึ้น ส่วนเอนไซม์ glutamate dehydrogenase ใน hepatopancreas ลดลง แต่กลับเพิ่มขึ้นในกล้ามเนื้อและเหงือก ผลจากการเพิ่มขึ้นของ AMP-deaminase และ adenosine deaminase มีผลทำให้เกิดปฏิกิริยา catabolism ของ purine และกรดอะมิโนอื่นๆมากขึ้น แล้วทำให้เกิดการสร้างแอมโมเนียเพิ่มขึ้น แอมโมเนียที่เพิ่มขึ้นมีผลทำให้เกิดพิษต่อเซลล์ (Reddy et al., 1988) นอกจากนี้การที่มีปริมาณ glutamate dehydrogenase เพิ่มขึ้น แสดงว่าเมททิลพาราไธออนทำให้ปฏิกิริยา glutamate oxidation เพิ่มขึ้น มีผลทำให้เกิดการสร้างแอมโมเนียมากขึ้น (Vijayalakshmi, 1987) ส่วนผลต่อลิปิดเมตาบอบิสมที่ได้ทำการทดลองในกุ้งตะกาด (Metapenaeus monoceros) ที่ได้รับเมททิลพาราไธออน 0.04 ppm. นาน 72 ชั่วโมง แล้วทำการวัดปริมาณลิปิด และกลีเซอรอล ใน hepatopancreas กล้ามเนื้อ และเหงือก Reddy และ Rao (1989) พบว่าปริมาณลิปิดทั้งหมดและกลีเซอรอลลดลง ส่วนเอนไซม์ lipase เพิ่มขึ้น กรดไขมันอิสระ และปริมาณคลอเรสเทอรอลทั้งหมดเพิ่มขึ้น

นอกจากมีผลต่อกระบวนการเมตาบอลิสมต่างๆ ของร่างกายดังกล่าวแล้วเมททิลพาราไธออนยังมีผลรบกวนการหายใจของสัตว์ (Rao, Sahiban and Rao, 1985) ทำให้สัตว์หายใจลำบาก โดยที่ใน 12 ชั่วโมงแรกที่ได้รับเมททิลพาราไธออนร่างกายมีการใช้ออกซิเจนมากขึ้น ต่อมาจะค่อยๆ ลดลง เชื่อว่าการที่มีความต้องการใช้ออกซิเจนมากขึ้นในช่วงแรกนั้น เกิดจากการปรับตัวของปลาและสิ่งมีชีวิตอื่นๆ โดยจะไปเพิ่ม oxidative metabolism ในการตอบสนองต่อสารพิษ หลังจากนั้นมีการใช้ออกซิเจนลดลง (Rao et al., 1985) เป็นผลให้เกิดการขาดออกซิเจน (asphyxiation) สัตว์หายใจลำบากมีการรบกวนศูนย์ควบคุมการหายใจในสมอง สำหรับในเนื้อเยื่อพบว่าปริมาณเอนไซม์ succinate dehydrogenase, malate dehydrogenase และ cytochrome c oxidase ซึ่งมีผลต่อ oxidative metabolism ลดลง นอกจากนี้การเปลี่ยนกลับของ ATP ก็ลดลงด้วย ผลการทดลองของ Rao และคณะ (1985) ตรงกับการทดลองของ Reddy และคณะ (1986) ซึ่งทำการศึกษาในปูพบว่าในภาวะที่ได้รับเมททิลพาราไธออน ระดับเอนไซม์ lactate dehydrogenase และ succinate dehydrogenase ลดลงเช่นกัน Rao และคณะ (1985) ยังพบว่าเซลล์ต่างๆ มีการใช้ออกซิเจนลดลง และมีการหายใจแบบไม่ใช้ออกซิเจนมากขึ้น นอกจากนี้เมททิลพาราไธออนยังทำให้เอนไซม์ acid phosphatase มีมากขึ้น เนื่องจากเอนไซม์ acid phosphatase เป็น lysosomal enzyme มีหน้าที่ย่อยทำลายเซลล์ที่ตายแล้ว ซึ่งปูที่ได้รับเมททิลพาราไธออนจะมีการทำลายโครงสร้างของเซลล์จึงทำให้มีการหลั่งเอนไซม์ acid phosphatase ออกมามากขึ้น

นอกจากนี้ยังพบว่า สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตมีผลต่อระบบการสร้างเม็ดเลือดด้วย จากการศึกษาในปลาดุก พบว่าปริมาณเม็ดเลือดแดงเพิ่มขึ้น แต่ปริมาณเม็ดเลือดขาวกลับลดลง ระดับน้ำตาลในเลือดสูงขึ้น (Reddy and Rao, 1990) และผลการตรวจทางพยาธิวิทยายังแสดงให้เห็นว่าเกิดการตายของเซลล์เหงือกและตับของปลาที่ได้รับมาลาไธออน ทั้งนี้เพราะมาลาไธออนมีผลไปทำลายเซลล์เยื่อบุผิว และหลอดเลือดบริเวณซี่เหงือกของปลาโดยไปเกาะที่เยื่อบุผิวชั้น thick mucosa (Nagarathnamma, 1982)

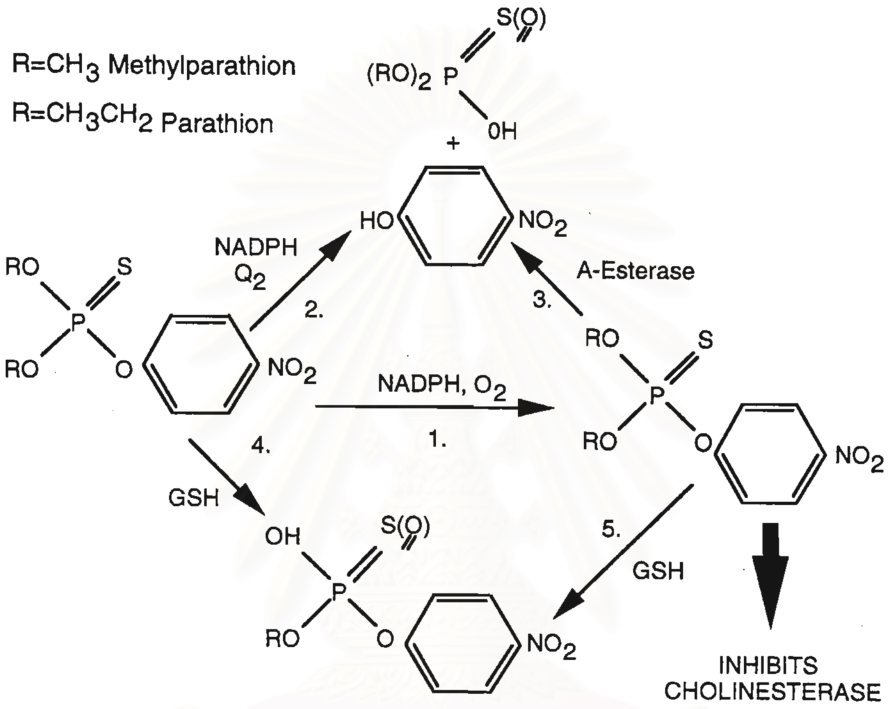
การดูดซึม การเปลี่ยนแปลงในร่างกายและการขับออก

ออร์กาโนฟอสเฟตส่วนใหญ่ละลายในไขมันได้ดี มี vapor pressure สูง แม้ในอุณหภูมิปกติ ตัวที่นิยมเอามาใช้เป็นสารปราบศัตรูพืชมักเป็นสารที่ระเหยเป็นไอได้ยาก โดยทำในรูปละอองลอย (aerosol) หรือ ฝุ่น (dust) สารประกอบออร์กาโนฟอสเฟตในรูปของเหลวดูดซึมเข้าสู่ร่างกายได้ทุกทางรวมทั้งทางเดินอาหาร ผิวหนัง เยื่อบุ และเมื่ออยู่ในรูปของไอระเหยก็สามารถดูดซึมผ่านเข้าสู่ปอดได้ เมททิลพาราไธออนเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะมีการแพร่กระจายไปที่สมอง ตับ ไต หัวใจ และเนื้อเยื่อที่มีสารพวก mucopolysaccharide เช่น กระดูกอ่อน (cartilage) และหมอนรองกระดูกไขสันหลัง (intervertebral disc) เป็นต้น (Garrigue et al., 1990) และจากการศึกษาของ Ligtenstein และ Kossen (1983) พบว่าเมททิลพาราไธออนสามารถผ่านเข้าสู่สมองได้ปริมาณมากที่สุดใน 2 นาที หลังได้รับเมททิลพาราไธออน Benke และ Murphy (1975) รายงานว่าสามารถตรวจวัดการดูดซึมของเมททิลพาราไธออนโดยดูจากปริมาณฟอสเฟตของ para-nitrophenol ในปัสสาวะ สารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตส่วนใหญ่จะถูกขับออกจากร่างกายทางปัสสาวะในรูปของ hydrolysis product

สำหรับเมททิลพาราไธออน กระบวนการเมตาบอลิสมในร่างกายอาศัย 5 กระบวนการด้วยกัน ดังแสดงในรูปที่ 7 กระบวนการที่ 1 และ 2 เป็นกระบวนการเมตาบอลิสมที่ต้องอาศัยทั้ง NADPH และออกซิเจน โดยกระบวนการที่ 1 จะได้เมตาบอไลท์คือ เมททิลพาราออกซอนซึ่งมีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส แต่ในกระบวนการที่ 2 จะได้เมตาบอไลท์ที่ไม่มีผลในการยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส สำหรับกระบวนการที่ 3, 4 และ 5 เป็นกระบวนการเมตาบอลิสมที่ต้องอาศัยเอนไซม์ glutathione-S-alkyl transferase และ aryl transferase จากตับในการเปลี่ยนแปลงเมททิลพาราไธออนไปเป็นเมตาบอไลท์ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส (Benke et al., 1974)

Sultatos (1986) ได้ทำการศึกษาในหนู พบว่าสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต เช่น พาราไธออน อาศัยเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในการเปลี่ยนพาราไธออนให้เป็นเมตาบอไลท์ต่าง ๆทั้งเมตาบอไลท์ที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสคือ p-nitrophenol (PNP), p-nitrophenyl sulfate (PNPS), p-nitrophenyl glucuronide (PNPG)

และเมตาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสคือ paraoxon สำหรับผลของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตต่อกระบวนการเมตาบอลิสม พบว่าพาราไธออนสามารถยับยั้งเอนไซม์ NADH-cytochrome c reductase และ NADPH-cytochrome c reductase ในหนูได้ (Neskovic, Vitorovic and Plesnicar, 1973) นอกจากนี้ยังพบว่า พาราไธออนทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ในตับหนูลดลง (Halpert, Hammond and Neal, 1980)



รูปที่ 7 แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของเมทิลพาราไธออนในร่างกาย
(modified from Benke, 1974)

ไตรบิวทิลทิน (Tributyltin)

ไตรบิวทิลทินเป็นสารประกอบในกลุ่มออร์กาโนทิน (organotin) ซึ่งมีความสำคัญมากในการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรม โดยใช้เป็นสารปราบศัตรูพืช ใช้รักษาเนื้อไม้ หรือเป็นสารทำให้เสถียรใน พี.วี.ซี. (PVC) ป้องกันการสลายตัวและทำให้ผลิตภัณฑ์โปร่งใสน่าใช้ สีคงทน ไม่หมองมัว พี.วี.ซี. เป็นพลาสติกที่ใช้กันมากในอุตสาหกรรมก่อสร้าง (ทำพื้น รั้ว และท่อประปา) และในอุตสาหกรรมบรรจุหีบห่ออาหาร (ขวดพลาสติกและฟิล์มพลาสติก เป็นต้น)

ในปี 1950 เริ่มมีการใช้ออร์กาโนทินในการเป็นสารกำจัดเชื้อรา (fungicide) ทางเกษตรกรรม และ bactericide ในทางอุตสาหกรรม ในรูปของ triphenyltin hydroxide และ triphenyltin acetate เพื่อป้องกันการเกิดโรคใบเป็นจุด (potato blight) ในพืชผักต่าง ๆ นอกจากนี้ยังมีการนำมาใช้เป็นสารปราบศัตรูพืชพวกหนอนต่าง ๆ ตลอดจนกำจัดแมลงสาปและยุงตามบ้านเรือนด้วย

ช่วงต้นปี 1960 มีการนำออร์กาโนทิน 2 ตัว ในรูปของ tributyltin oxide และ tributyltin fluoride ในการกำจัดหอยทากน้ำจืดซึ่งเป็น intermediate host ของหนอน genus <u>Schistosoma</u> ในการแพร่เชื้อโรคพยาธิใบไม้ในตับ (schistosomiasis) สู่มนุษย์ และเป็นจุดเริ่มต้นในการใช้ไตรบิวทิลทินเป็นสารกันเพรียงในสีทาเรือ

ไตรบิวทิลทินที่ใช้เป็นสารกันเพรียงในสีทาเรือ จะมีอะตอมของดีบุก (Sn) จับอยู่กับ butyl group (C_4H_9-) 3 group จับกันด้วยพันธะ covalent bond เช่น

ไตรบิวทิลทินออกไซด์ (tributyltin oxide)

ชื่อทางเคมี Bis(tri-n-butyltin)oxide

สูตรโมเลกุล $[(n\text{-}C_4H_9)_3Sn]_2O$

สูตรโครงสร้าง

$$[CH_3(CH_2)_3]_2Sn\text{-}CH_2CH_2CH_2CH_3$$

$$|$$

$$O$$

$$|$$

$$[CH_3(CH_2)_3]_2Sn\text{-}CH_2CH_2CH_2CH_3$$

รูปที่ 8 แสดงโครงสร้างทางเคมีของไตรบิวทิลทินออกไซด์ (modified from Lee, 1985)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประโยชน์

มีการใช้สารประกอบออร์กาโนทินในการเกษตรกรรมและอุตสาหกรรมดังนี้

1. ใช้เป็นสารกำจัดหมัดไร (acaricides) และ สารกำจัดเชื้อรา (fungicides)

2. ใช้ในสีทาเรือป้องกันการเกาะของเพรียง (antifouling agent) ซึ่งสีทาเรือส่วนใหญ่จะประกอบด้วย tributyltin และ triphenyltin อยู่ประมาณ 20 % ซึ่งสารประกอบออร์กาโนทินละลายน้ำได้น้อย ดังนั้นจึงสามารถใช้ได้นานประมาณ 1-2 ปี (Blunden and Chapman, 1986)

3. ใช้เป็นสารรักษาเนื้อไม้แทนสารหนู เช่น การใช้ tributyltin oxide รักษาเนื้อไม้ยางพารา

4. ใช้เป็นยาฆ่าเชื้อโรค (disinfectants)

5. เป็นสารที่ใช้ในการเร่งปฏิกิริยาในการผลิต silicones และ polyurethane foams

6. ใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตแก้วและฟิล์ม

7. ใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ ซึ่งมีการศึกษาพบว่าสามารถใช้ di-n-butyltin oxide ในการถ่ายพยาธิตัวแบน (Eubothrium crassum) ในปลา rainbow trout (Salmo gairneri) ได้ผลการรักษาภายใน 1 สัปดาห์ (Hnath, 1970)

8. ใช้ผสมในพี.วี.ซี. โดยทำหน้าที่เป็นสารทำให้เสถียรป้องกันการสลายตัวและทำให้ผลิตภัณฑ์โปร่งใส

ผลกระทบของออร์กาโนทินต่อสิ่งมีชีวิตทั่วไป

ระดับความเป็นพิษของออร์กาโนทินจะแตกต่างกันไปในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด เช่น trimethyltin มีความเป็นพิษสูงต่อแมลง triethyltin มีความเป็นพิษสูงต่อสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม tripropyltin มีความเป็นพิษสูงต่อแบคทีเรียแกรมลบ และ tributyltin มีความเป็นพิษสูงต่อแบคทีเรียแกรมบวก ปลา และเชื้อรา (Smith, 1978, quoted in Blunden and Chapman, 1986)

Blunden and Chapman (1986) กล่าวสรุปผลของออร์กาโนทินต่อไมโตคอนเดรียไว้ดังนี้

1. ทำให้เกิดการบวมของเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย

2. รบกวนการแลกเปลี่ยนคลอไรด์และไฮดรอกไซด์อิออนผ่านเยื่อหุ้มไมโตคอนเดรีย

3. ยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation และการสร้างพลังงาน

4. ใน chloroplasts ออร์กาโนทินยับยั้งกระบวนการ photosynthetic phosphorylation

จากการศึกษาของ Henry และ Byington (1976) พบว่า triethyltin chloride มีผลยับยั้ง glutathione-S-aryltransferase ในตับหนู นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถใช้ 2,3-dimercaptopropanol (BAL) ในการป้องกันความเป็นพิษดังกล่าวได้

Rosenberg และ Drummond (1983) ได้ทำการศึกษาผลของ tributyltin oxide (TBTO) ต่อเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนู โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 4 กลุ่ม กลุ่มที่ 1 ให้ sodium phenobarbital ขนาด 80 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง วันละครั้ง นาน 3 วัน กลุ่มที่ 2 ให้ β-naphthoflavone ขนาด 40 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง วันละครั้ง นาน 3 วัน กลุ่มที่ 3 ให้ 3-methylcholanthrene ขนาด 25 มิลลิกรัม / กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง ที่เวลา 48 และ 72 ชั่วโมง ก่อนฆ่าหนู กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มควบคุมให้สารละลายน้ำเกลือ ขนาด 1 มิลลิลิตร / กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง หลังจากการให้สารครั้งสุดท้ายในทุกกลุ่มนาน 16 ชั่วโมง นำหนูทุกกลุ่มมาฆ่าและแยกตับออกมาเตรียมเป็นไมโครโซม นำไมโครโซมมา incubate ด้วย TBTO ขนาด 0.2 mM ที่อุณหภูมิ 26, 32, 37 และ 38 $^{\circ}$C โดยใช้ระยะเวลาในการ incubate ทั้งหมด 60 นาที แล้วนำมาวัดระดับไซโตโครมพี 450 ไซโตโครมบี 5 และฮีม ผลการศึกษาพบว่า TBTO ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง โดยเปลี่ยนไปเป็นไซโตโครมพี 420 การเกิดไซโตโครมพี 420 เป็นลักษณะของ time and temperature dependent และการเกิดไซโตโครมพี 420 นี้จะแตกต่างกันในแต่ละกลุ่ม คือ ไมโครโซมของหนูที่ได้รับ β-naphthoflavone และ 3-methylcholanthrene จะเกิดไซโตโครมพี 420 มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ phenobarbital และกลุ่มควบคุม ที่เวลาและอุณหภูมิเดียวกัน แต่จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าที่อุณหภูมิ 37 $^{\circ}$C ระดับไซโตโครมพี 450 ในกลุ่มควบคุมซึ่ง incubate ด้วยเอธานอลแทน TBTO มีการลดลงของไซโตโครมพี 450 อย่างน้อย 10 % และพบว่า TBTO ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 และฮีม

Dean, Murray และ Ward (1986) ได้กล่าวถึงผลของ triphenyltin acetate ต่อระบบภูมิคุ้มกันร่างกายของหนูไว้ว่า triphenyltin acetate มีผลทำให้เกิดการฝ่อของต่อมน้ำเหลืองและ

กดการสร้าง antibody นอกจากนี้ยังพบว่า DOTC และ DBTC จะกดการทำงานของต่อมไธมัสในหนู มีความผิดปกติของประสาทไขสันหลัง (myelotoxicity) และลดการตอบสนองของ T-cell

ผลกระทบของออร์กาโนทินต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ

ปัญหามลภาวะของออร์กาโนทินในทะเลส่วนใหญ่มีความสัมพันธ์อย่างยิ่งกับอู่ต่อเรือ ซึ่งใช้สีทากันเพรียงที่มีไตรบิวทิลทินเป็นองค์ประกอบอยู่ด้วย และท่าเทียบเรือขนาดใหญ่ต่าง ๆ ที่ใช้สีทากันเพรียงประเภทดังกล่าวจอดเทียบอยู่ โดยพบการสะสมของไตรบิวทิลทินในน้ำ ในตะกอนดิน และในสัตว์น้ำที่อาศัยอยู่ในบริเวณดังกล่าวสูงกว่าค่าที่พบในบริเวณอื่น ทั้งนี้เนื่องจากมีการละลายออกมา (leach) ของไตรบิวทิลทินจากสีที่ใช้ทาท้องเรือป้องกันเพรียงนั่นเอง ซึ่งจากการตรวจหาปริมาณไตรบิวทิลทินในน้ำบริเวณท่าเรือต่าง ๆ ในประเทศฝรั่งเศส พบว่ามีการปนเปื้อนของไตรบิวทิลทิน 0.002-0.833 ppb. ทั้งนี้เนื่องจากมีการใช้ไตรบิวทิลทินกันมากในรูปของสารกันเพลียงในสีทาเรือ (Alzieu et al., 1989) นอกจากนี้ยังพบมีการปนเปื้อนของไตรบิวทิลทินในน้ำทิ้ง (wastewater) จากท่อระบายน้ำ โดยจากการศึกษาในประเทศสวิตเซอร์แลนด์ พบมีการปนเปื้อนของไตรบิวทิลทิน 0.173 ppb. (Fent, 1989) ซึ่งจากการปนเปื้อนของไตรบิวทิลทินในน้ำย่อมมีผลทำให้เกิดการตกค้างของไตรบิวทิลทินในสัตว์น้ำได้ โดยจากการศึกษาในประเทศสหรัฐอเมริกา พบว่ามีการตกค้างของไตรบิวทิลทินในปลา chinook salmon (Oncorhynchus tshawytscha) ปริมาณ 0.081-0.2 μg TBT/g fish (Short and Thrower, 1986) และพบมีการตกค้างในหอยแมลงภู่ (Mytilus edulis) ปริมาณ 5-1,560 ng TBT/g fish (Wade, Romero and Brooks, 1988)

ผลกระทบของออร์กาโนทินต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำ สามารถสรุปได้ดังนี้

1. ผลต่อการเจริญเติบโต

จากการศึกษาของ Wong และคณะ (1987) พบว่าออร์กาโนทินมีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของสาหร่ายทะเล ออร์กาโนทินแต่ละชนิดมีความเป็นพิษแตกต่างกัน โดยพบว่า trialkyl จะมีความเป็นพิษมากกว่า dialkyl และ monoalkyl

Batley, Scammell และ Brockbank (1992) พบว่าไตรบิวทิลทินมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตของหอยมุก (Saccostrea commercialis) โดยทำให้หอยเจริญเติบโตช้ากว่าปกติ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดความผิดปกติของเปลือกหอยอีกด้วย

กัลยา วัฒยากร (2531) กล่าวสรุปไว้ว่า ไตรบิวทิลทินมีผลกระทบต่อการเจริญเติบโตทำให้อัตราการเจริญเติบโตช้าลงกว่าปกติ สำหรับสาหร่ายทะเลพบว่าระดับความเข้มข้นที่เกิดความผิดปกติเท่ากับ 0.1 ppb กรณีของ crustacean ในตัวอ่อนของกุ้ง lobster (Homarus americarus) ที่ระดับ 1.0 ppb และในกุ้ง mysid (Acanthomysis sculpta) ที่ระดับ 0.25 ppb หอยสองฝา (Ostrea edulis) และ (Crassostrea gigas) ที่ระดับ 0.02-0.06 ppb ส่วนในหอยแมลงภู่ (Mytilus edulis) ที่ระดับ 0.24 ppb ในปลา rainbow trout (Salmo gairdneri) ที่ระดับ 0.02 ppb

2. ผลต่อความผิดปกติของร่างกายและระบบสืบพันธุ์

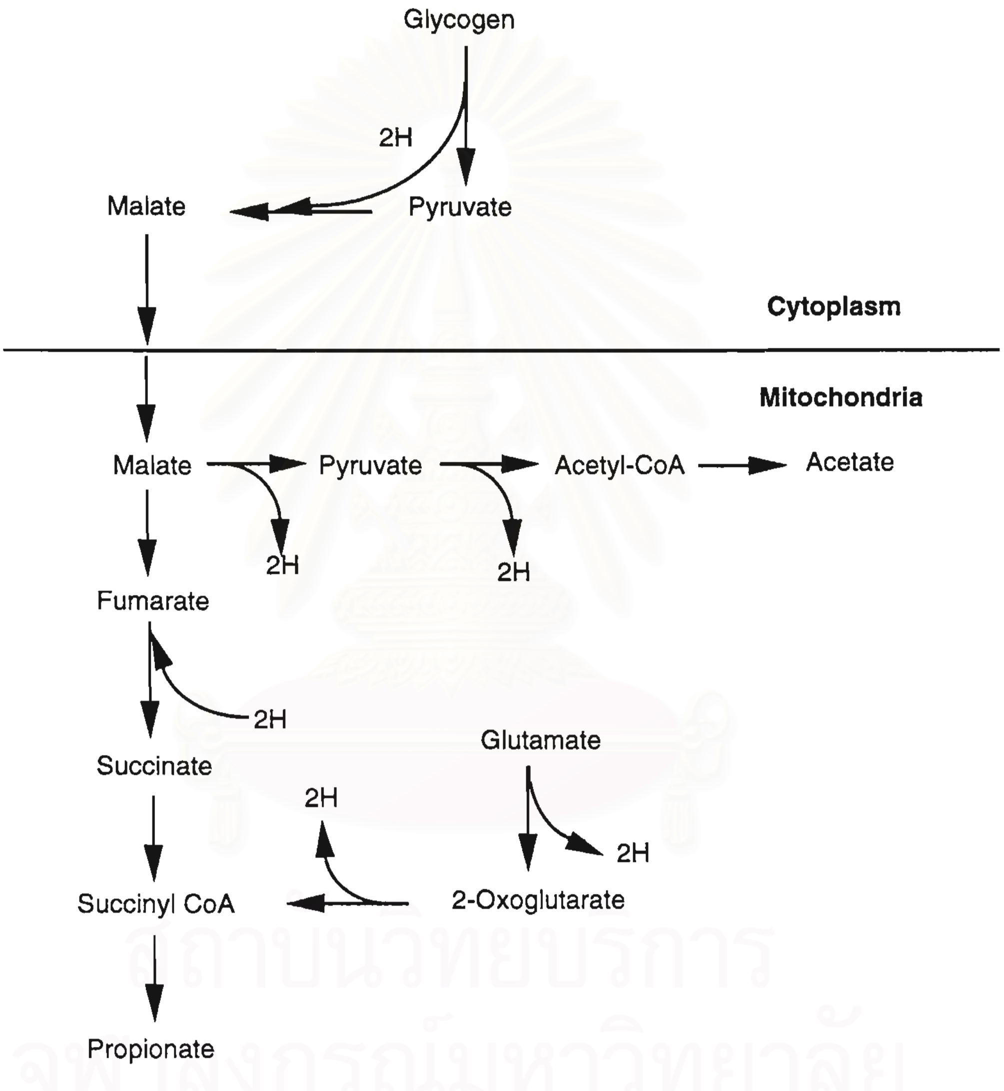
Short และคณะ (1989) ได้ทำการศึกษาโดยใช้ Alumacide ซึ่งเป็นสีทากันเพรียงที่มีไตรบิวทิลทินผสมอยู่ด้วย ทาเปลือกหอย Nucella lima หลังจากนั้นประมาณ 1 เดือน พบว่าไตรบิวทิลทินทำให้เกิดความผิดปกติของอวัยวะสืบพันธุ์ โดยทำให้ค่า RPS และ VDS เพิ่มขึ้น RPS เท่ากับ $(\text{mean female penis length})^3 : (\text{mean male penis length})^3 \times 100$ และ VDS หมายถึง vas deferens sequence-index เป็นการวัดความยาวของอวัยวะเพศ

กัลยา วัฒยากร (2531) กล่าวสรุปไว้ว่า ไตรบิวทิลทินทำให้เกิดความผิดปกติของร่างกายและระบบสืบพันธุ์ โดยใน crustacean พบว่าไตรบิวทิลทินมีผลต่อการลอกคราบของปู mud crab (Rhithroponopeus harrisii) ภายหลังจาก expose กับไตรบิวทิลทินที่ระดับ 10 ppb ในปูก้ามดาบ (Uca pugilator) ที่ได้รับไตรบิวทิลทินเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความผิดปกติของการ regenerate ของส่วนขาในหอยสองฝาในธรรมชาติในหลาย ๆ แห่งที่มีการเพาะเลี้ยงกันในประเทศยุโรปและอเมริกาพบว่าลูกหอยนางรม (Crassostrea gigas) มีฝาบนที่หนาผิดปกติที่ระดับความเข้มข้น 0.15 ppb และหอยนางรม (Ostrea edulis) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของวงจรการสืบพันธุ์ที่ระดับความเข้มข้น 0.24 ppb

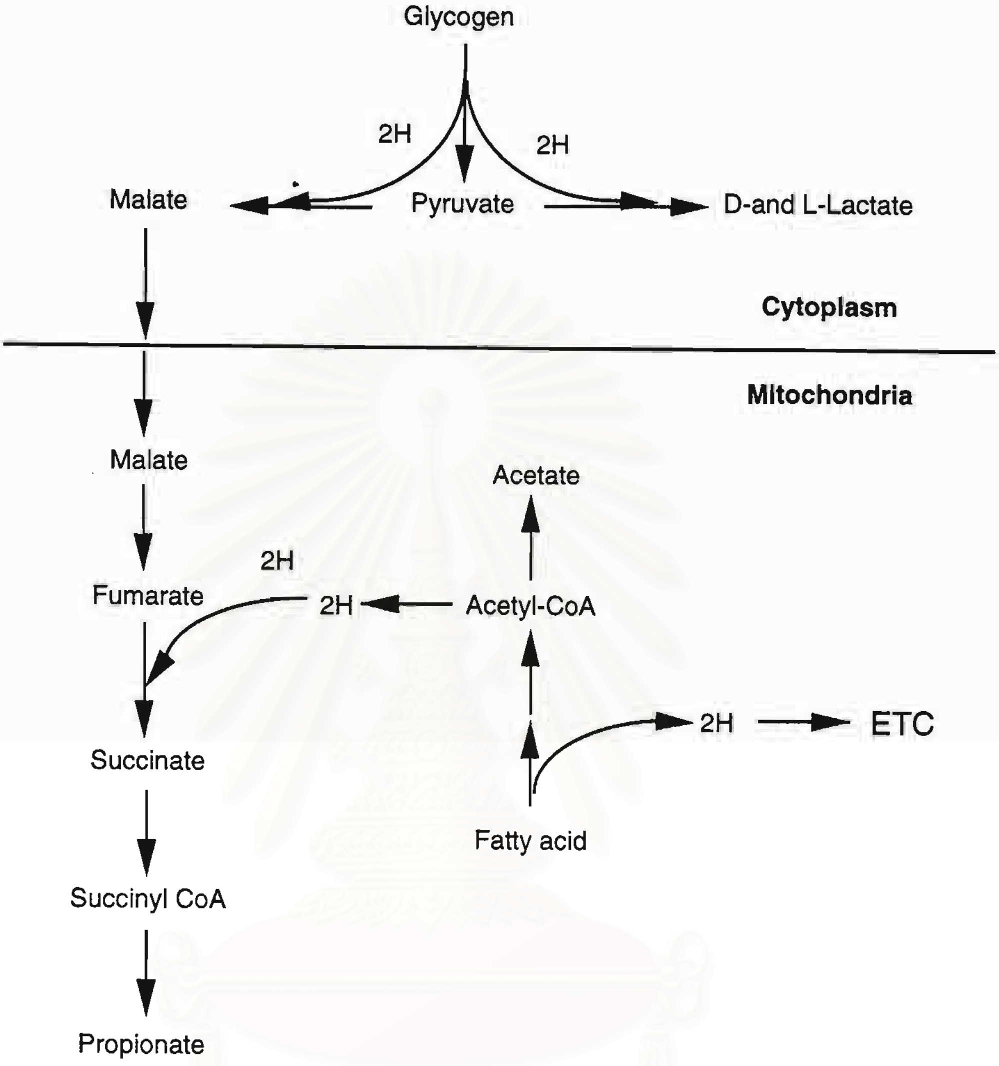
3. ผลต่อกระบวนการเมตาบอลิสม

จากการศึกษาของ Holwerda และ Herwig (1986) พบว่าการให้ dibutyltin dichloride (DBTC) 0.125 μM กับหอยน้ำจืด (Anodonta anatina) นาน 7 เดือน จะมีผลทำให้เกิดความผิดปกติกับกระบวนการเมตาบอลิสม โดยพบว่ามีปริมาณคาร์โบไฮเดรตใน hemolymph และในเนื้อเยื่อลดลง ปริมาณไขมันในเนื้อเยื่อลดลง ระดับไกลโคเจนลดลง มีการใช้พลังงานมากขึ้น โดยพบว่ามี anaerobic end product เพิ่มขึ้น เช่น lactate (D-and L-), succinate, volatile fatty acid, acetate และ propionate ซึ่งปกติในภาวะที่ร่างกายขาดออกซิเจน จะไม่มีการสร้าง lactate โดยในไซโตพลาสซึมจะมีการเปลี่ยนไกลโคเจนไปเป็น malate จากนั้น malate ผ่านเข้าไปในไมโตคอนเดรียและถูกเปลี่ยนเป็น succinate, propionate และ acetate ดังแสดงในรูปที่ 9

แต่ในสภาวะที่ได้รับ DBTC พบว่า DBTC จะยับยั้งกระบวนการ oxidative phosphorylation และยับยั้งการเปลี่ยน pyruvate ไปเป็น acetyl-CoA โดยไกลโคเจนจะถูกเปลี่ยนไปเป็น D- และ L-lactate , succinate และ propionate ดังแสดงในรูปที่ 10 ซึ่งจะเห็นว่า fumarate จะได้รับไฮโดรเจนมาจากกระบวนการ fatty acid oxidation และจะทำให้เกิดการสะสมของ acetate มากขึ้น



รูปที่ 9 แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของหอยน้ำจืด (Anodonta anatina) ในภาวะที่ขาดออกซิเจน (modified from Holwerda and Herwig, 1986)



รูปที่ 10 แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของหอยน้ำจืด (Anodonta anatina) ในภาวะที่ได้รับ DBTC (modified from Holwerda and Herwig, 1986)

Fent และ Stegeman (1991) ได้ทำการศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อ microsomal monooxygenase system ในตับของปลา (Stenotomus chrysops) โดยให้ β-napthoflavone (βNF) ขนาด 20 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal) 2 ครั้ง ในเวลาห่างกัน 3 วัน ในวันที่ 7 หลังการให้ βNF ครั้งสุดท้าย จะจับปลาขึ้นมาเพื่อแยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม จากนั้นนำไมโครโซมดังกล่าวมา incubate ด้วย ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ ในความเข้มข้นและระยะเวลาที่แตกต่างกัน ผลการศึกษาพบว่าไตรบิวทิลทินสามารถยับยั้ง

ไซโตโครมพี 450 และ EROD activity (7-ethoxyresorufin O-deethylase) ได้ โดยไม่มีผลต่อไซโตโครมบี 5 และ NADPH-cytochrome c reductase activity แต่มีผลทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ NADH-cytochrome c reductase activity

สำหรับการศึกษาพิษเฉียบพลันของออร์กาโนทินต่อปลาชนิดต่าง ๆ แสดงเป็นค่า LC_{50} สามารถสรุปได้ดังแสดงในตารางที่ 7

ตารางที่ 7 แสดงค่า LC_{50} ของออร์กาโนทิน ต่อปลาชนิดต่าง ๆ

ชนิดของปลา	สาร	LC_{50}	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	reference
Chinook salmon	tributyltin oxide	1.5 ppb	96	Short and Thrower, 1987
Rainbow trout (Salmo gairdneri)	tributyltin oxide	9.4 ppb 4.2 ppb 3.9 ppb	24 48 96	Brooke et al., 1986
Channel catfish (Ictalurus punctatus)	tributyltin oxide	14 ppb 11 ppb 5.5 ppb	24 48 96	Brooke et al., 1986
Fathead minnow (Pimephales promelas)	tributyltin oxide	5.5 ppb 4.0 ppb 2.6 ppb	24 48 96	Brooke et al., 1986
Golden orfe (Leuciscus idus melanotus)	tributyltin oxide	0.05 ppm	48	Blunden and Chapman, 1986
Bleak (Alburnus alburnus)	tri-n-butyltin-fluoride	0.06 ppm	96	Blunden and Chapman, 1986

ตารางที่ 7 (ต่อ)

ชนิดของปลา	สาร	LC_{50}	ระยะเวลา (ชั่วโมง)	reference
Golden orfe (Leuciscus idus malenotus)	tetra-n-butyltin	10 ppm	48	Blunden and Chapman, 1986
Golden orfe (Leuciscus idus malenotus)	di-n-butyltin-dichloride	1 ppm	48	Blunden and Chapman, 1986
	mono-n-butyltin-trichloride	>45 ppm	48	
Rainbow trout (Salmo gairdneri)	triphenyltin hydroxide	0.015ppm	96	Blunden and Chapman, 1986
Bleak (Alburnus alburnus)	triphenyltin fluoride	0.40 ppm	96	Blunden and Chapman, 1986
Large mouth bass (Microterus salmonoides)	tricyclohexyl hydroxytin	0.06 ppm	24	Blunden and Chapman, 1986

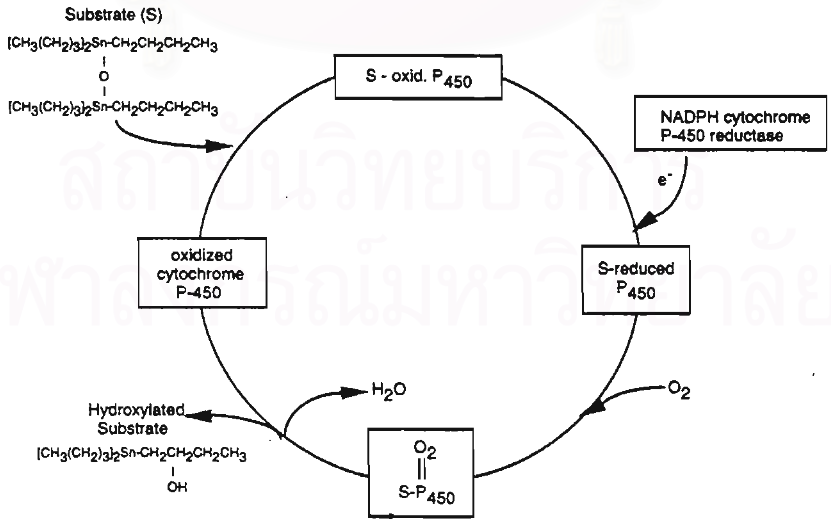
การดูดซึม การเปลี่ยนแปลงในร่างกายและการขับถ่าย

ออร์กาโนทินเป็นสารประกอบที่สามารถละลายได้ดีในไขมัน จึงสามารถดูดซึมผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ได้ดี และมีการสะสมอยู่ในร่างกายได้นาน (Blunden and Chapman, 1986) จากการศึกษาของ Fish, Kimmel และ Casida (1976) พบว่าไตรบิวทิลทินออกไซด์จะถูกเปลี่ยนแปลงโดยเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 ในตับหนู โดยอาศัยกระบวนการ hydroxylation ได้เมตาบอไลท์คือ α-, β-, γ- และ δ-hydroxybutyldibutyltin

Bridges, Davies และ William ได้ทำการศึกษาในปี 1967 พบว่าในกรณีของไตรบิวทิลทินนั้น α- และ β-hydroxybutyldibutyltin มักถูกเปลี่ยนแปลงโดยกระบวนการ debutylation ได้เมตาบอไลท์ตัวสุดท้ายคือ monobutyltin

จากการศึกษาในปลา rainbow trout พบว่าไตรบิวทิลทินเมื่อเข้าสู่ร่างกายแล้วจะมีการกระจายในลักษณะของ three-compartment model โดย compartment แรกคือ ไขมันบริเวณหน้าท้อง (peritoneal fat) compartment ที่ 2 คือ ไต ตับ และถุงน้ำดี สำหรับ compartment ที่ 3 คือ เนื้อเยื่อในอวัยวะอื่นๆ นอกจากนี้ยังพบว่าไตรบิวทิลทินจะถูกเปลี่ยนแปลงในตับได้เมตาบอไลท์ คือ dibutyltin และ monobutyltin ซึ่งจะถูกขับออกทางน้ำดี (biliary-fecal excretion) (Martin et al.,1989)

Lee (1985) ได้ทำการศึกษาในปู (Callinectes sapidus) ในปลา (Leistomus canthurus) และ ในหอย (Crassostrea virginica) โดยให้ ^{14}C-TBTO ในอาหารและน้ำที่ใช้เลี้ยงสัตว์ทดลอง ผลการศึกษาพบว่ามีการสะสมของ ^{14}C-TBTO ส่วนใหญ่ในเหงือกและตับ แต่พบปริมาณน้อยในไต สำหรับเมตาบอไลท์ของไตรบิวทิลทินออกไซด์ (TBTO) พบมากในถุงน้ำดี กระบวนการเมตาบอลิสมของปลาและปูจะเร็วกว่าในหอยและพบว่าขบวนการเมตาบอลิสมของ TBTO ในปลาและปูอาศัยเอนไซม์ไซโตโครมพี 450 โดยมีแมกนีเซียม ออกซิเจนและ NADPH ร่วมในปฏิกิริยานี้ด้วย ดังแสดงในรูปที่ 11 เมตาบอไลท์ของ TBTO ส่วนใหญ่จะเป็น β-hydroxybutyldibutyltin ซึ่งจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยการ debutylation ได้เมตาบอไลท์ตัวสุดท้าย คือ monobutyltin ซึ่งละลายน้ำได้และถูกขับออกจากร่างกายทางน้ำดี



รูปที่ 11 แสดงกระบวนการเมตาบอลิสมของไตรบิวทิลทินออกไซด์ในปลาและปู (modified from Lee, 1985)

การสลายตัวในธรรมชาติ

ไตรบิวทิลทินสลายตัวได้ในธรรมชาติโดยอาศัยกระบวนการ debutylation ซึ่งอาจเกิดเพราะแสงอุลตราไวโอเลต (UV) หรือจุลินทรีย์ก็ได้

$$Bu_3Sn^{+} \rightarrow Bu_2Sn^{2+} \rightarrow BuSn^{3+} \rightarrow Sn^{4+}$$

ความเป็นพิษของออร์กาโนทินต่อสิ่งมีชีวิตในน้ำจะเพิ่มขึ้นตามจำนวนของ butyl group จากหนึ่งไปหาสาม แต่ความเป็นพิษจะลดลงเมื่อเพิ่ม butyl group ที่สี่เข้าไป หรือเมื่ออยู่ในรูปของ inorganic เช่น tinoxide จะเฉื่อยไม่เป็นพิษ

การสลายตัวของออร์กาโนทินในธรรมชาติเกิดจากการทำลายพันธะระหว่างดีบุกกับคาร์บอน (Sn-C bond) สำหรับปัจจัยที่มีผลต่อการสลายตัวของออร์กาโนทินในธรรมชาติมีดังนี้

1. แสงอุลตราไวโอเลต (ultraviolet irradiation)

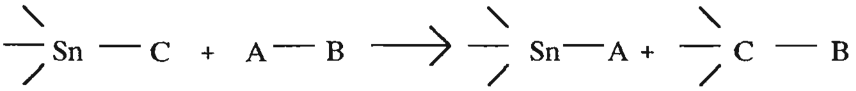
จากการศึกษาของ Klotzer ในปี 1976 (guoted in Blunden and Chapman, 1986) พบว่าแสงอุลตราไวโอเลตมีผลทำให้เกิดการสลายตัวของ tributyltin chloride และ bis(tributyltin)oxide ในอัตราที่ใกล้เคียงกัน แต่ dibutyltin dichloride มีอัตราการสลายตัวได้เร็วกว่า dibutyltin oxide

2. เชื้อจุลินทรีย์ (biological cleavage)

จากการศึกษาของ Barug และ Vonk ในปี 1980 (quoted in Blunden and Chapman, 1986) พบว่าแบคทีเรียแกรมลบ (Pseudomonas aerugenosa) และ (Alcaligenes faecalis) ทำให้เกิดการสลายตัวของ bis(tributyltin)oxide ในดิน การสลายตัวของ bis(tributyltin)oxide, tributyltin fluoride และ triphenyltin fluoride ในดิน มักจะเกิดในภาวะที่มีออกซิเจนมากกว่าในภาวะที่ขาดออกซิเจน สำหรับการสลายตัวของ bis(tributyltin)oxide ในเนื้อไม้พบว่าเกิดจากเชื้อราหลายชนิดเช่น Coniophora puteana, Coriolus vesicolor, Chaetomium globosum และ Aureobasidium pullulant.

3. สารเคมี (Chemical cleavage)

พันธะระหว่างดีบุกกับคาร์บอน (Sn-C bond) อาจถูกทำลายโดยการจับกับ nucleophilic และ electrophilic reagents ทำให้เกิดปฏิกิริยาดังนี้



สาร A- B อาจเป็น mineral acid, carboxylic acid หรือ alkali เป็นต้น

4. รังสีแกมม่า (gamma irradiation)

รังสีแกมม่ามีบทบาทน้อยมากต่อการสลายตัวของออร์กาโนทินในธรรมชาติ เนื่องจากพบว่ารังสีแกมม่ามีปริมาณน้อยบนพื้นโลก แต่ในปัจจุบันมีการใช้รังสีแกมม่ามากขึ้นในการถนอมอาหาร ซึ่งหีบห่อที่ใช้ในการบรรจุอาหารนั้นมักมีส่วนประกอบของออร์กาโนทินซึ่งใช้เป็นสารทำให้เสถียรใน พี.วี.ซี.

5. อุณหภูมิ (temperature cleavage)

อุณหภูมิมีผลน้อยมากต่อการสลายตัวของออร์กาโนทินในธรรมชาติ ทั้งนี้เนื่องจากพบว่าแม้อุณหภูมิที่สูงกว่า 200 °C ก็ไม่สามารถทำลายพันธะระหว่างดีบุกกับคาร์บอน (Sn-C bond)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปลาดุกพันธุ์ผสม (Crossbreed catfish)

ปลาดุกจัดอยู่ในครอบครัว Clariidae เป็นปลาไม่มีเกล็ดของเมืองไทยที่พบมากที่สุด และเป็นปลาที่มีความสำคัญทางเศรษฐกิจมากที่สุดชนิดหนึ่ง นอกจากนี้ยังเป็นที่นิยมรับประทานของคนไทยทั่วไป ในปัจจุบันมีการเลี้ยงปลาดุกเป็นอุตสาหกรรมในเขต จังหวัดสมุทรปราการ ปทุมธานี สุพรรณบุรี และนครปฐม นอกจากนี้ยังมีรายงานว่าพบปลาชนิดนี้ในหลายประเทศ อาทิบริเวณประเทศอินเดีย พม่า มาเลเซีย อินโดนีเซีย ฟิลิปปินส์ และประเทศต่าง ๆในอัฟริกา โดยจะพบปลาชนิดนี้อาศัยอยู่ตาม แม่น้ำ ลำคลอง ทะเลสาป บ่อ หนอง บึง และแอ่งน้ำ

ปลาดุกเป็นปลาไม่มีเกล็ด มีผิวหนังเปลือยเปล่าไม่มีเกล็ด หัวค่อนข้างแบน ลำตัวค่อนข้างกลม ท้องแบน มีอวัยวะพิเศษที่ช่วยในการหายใจอยู่ส่วนบนของก้านซี่เหงือก อวัยวะนี้ช่วยให้ปลาหายใจจากอากาศได้โดยตรง

สรีรวิทยาของปลาดุก

ผิวหนัง

ผิวหนังของปลาโดยทั่วไปจะเป็นแบบ unkeratinized mucous membrane ผิวหนังของปลาดุกประกอบด้วย 3 ชั้น คือ epidermis, dermis และในบางบริเวณพบชั้น hypodermis (subcutaneous หรือ subcutis)

ระบบกล้ามเนื้อ

กล้ามเนื้อในปลาดุกสามารถแบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด คือ

1. กล้ามเนื้อลาย (skeletal หรือ striated muscle) เป็นกล้ามเนื้อที่พบได้ทั่วไปตามลำตัว ช่วยในการเคลื่อนไหว มีระบบการทำงานอยู่ภายใต้การควบคุมของจิตใจ

2. กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle) ในปลาดุกพบกล้ามเนื้อเรียบได้ที่ผิวหนังของอวัยวะภายใน เช่น ผนังทางเดินอาหาร เส้นเลือด ถุงน้ำดี ท่อน้ำดี กระเพาะปัสสาวะ ถุงลม และอวัยวะสืบพันธุ์ มีระบบการทำงานอยู่นอกอำนาจจิตใจ กล้ามเนื้อเรียบไม่มีลายตามขวางเหมือนกล้ามเนื้อลาย และขนาดของเซลล์เล็กกว่าเซลล์กล้ามเนื้อลาย กล้ามเนื้อเรียบจะมีการหดตัวได้ช้ากว่ากล้ามเนื้อลาย และกล้ามเนื้อหัวใจ

3. กล้ามเนื้อหัวใจ (cardiac muscle) พบได้ที่ผนังของหัวใจเท่านั้นมีระบบการทำงานอยู่ภายใต้การควบคุมของจิตใจ กล้ามเนื้อหัวใจประกอบด้วยเซลล์รูปทรงกระบอกยาว มีลายตามขวางคล้ายคลึงกับกล้ามเนื้อลาย แต่ไม่เด่นชัดเท่ากับกล้ามเนื้อลาย

ระบบย่อยอาหาร

ปลาดุกจัดอยู่ในกลุ่มปลาที่กินทั้งพืชและสัตว์เป็นอาหาร (omnivorous) มีระบบย่อยอาหารประกอบด้วยส่วนที่เป็นช่องทางเดินอาหาร (alimentary canal) ได้แก่ ช่องปาก คอหอย หลอดอาหาร กระเพาะอาหาร และลำไส้ อีกส่วนหนึ่งเป็นอวัยวะที่เกี่ยวข้องกับการย่อยอาหาร (accessory digestive organs) ได้แก่ ตับ ตับอ่อน และถุงน้ำดี สำหรับตับของปลาดุกจะอยู่ด้านหน้าสุดในช่องท้อง โดยอยู่ติดกับแนวกระดูกสันหลัง (vertebral column) และมีบางส่วนที่อยู่ใกล้กับไตส่วนต้น (anterior kidney) ชั้นเยื่อบุผิวที่ปกคลุมตับเป็นพวก simple squamous epithelium (mesothelium) ตับปลาดุกมีลักษณะเป็นพูที่ตอนท้าย จะแยกออกเป็นสองส่วนแต่ไม่ชัดเจนนัก เซลล์ตับมีลักษณะเป็นรูปหลายเหลี่ยม มีนิวเคลียสรูปกลมอยู่กลางเซลล์ หรืออาจถูกดันไปอยู่ด้านข้างของเซลล์ในกรณีที่มีไขมันสะสมอยู่ในเซลล์มาก พบ sinusoid แทรกระหว่างเซลล์ตับได้ทั่วไปบริเวณส่วนต้นของตับจะพบ hepatic portal vein และจะแยกออกเป็นแขนงเล็กๆ เลือดทั้งหมดจากแขนงของ hepatic portal vein และ hepatic artery จะผ่าน sinusoids แล้วไหลเข้าสู่ central vein และ hepatic vein จากนั้นจะส่งเลือดไปยังหัวใจ โดยทะลุผ่าน transverse septum

ระบบขับถ่าย

ระบบขับถ่ายของเสียออกจากร่างกายและระบบการควบคุมสมดุลย์ของอิออนต่างๆในร่างกาย (osmoregulation) จะมีอวัยวะหลายอย่างมาเกี่ยวข้อง ได้แก่ ผิวหนัง เหงือก ไต และช่องทางเดินอาหาร สำหรับการรักษาปริมาณของน้ำในร่างกายให้สมดุลย์กับสภาพแวดล้อม จะมีไตทำหน้าที่ขับน้ำที่เข้ามาทางเหงือกและทางเดินอาหารออกไป และรักษาปริมาณอิออนต่างๆ เช่น แคลเซียม แมกนีเซียม และโปตัสเซียมไว้ ส่วนเหงือกก็ทำหน้าที่ขับของเสียที่อยู่ในรูปสารประกอบไนโตรเจน ได้แก่ แอมโมเนีย และยูเรีย แต่ถ้าระดับอิออนต่างๆ ในร่างกายของปลามีน้อยกว่าปกติ ปลาก็จะทำการดูดซึมจากอาหารโดยผ่านระบบทางเดินอาหารและจากน้ำโดยผ่านทางเหงือก

สำหรับปลาดุกที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยเพศเมียกับปลาดุกรัสเซียเพศผู้ เป็นปลาดุกที่สามารถเพาะขยายพันธุ์ได้ดี ลูกที่ได้มีอัตราการเจริญเติบโตรวดเร็ว ทนทานโรคสูง มีลักษณะใกล้เคียงกับปลาดุกอุย ปลาดุกพันธุ์ผสมนี้กรมประมงให้ชื่อว่า ปลาดุกอุย-เทศ แต่โดยทั่วไปชาวบ้านเรียกกันว่า บิ๊กอุย หรืออุยบ่อ ดังแสดงในรูปที่ 12

รูปที่ 12 แสดงลักษณะของปลาดุกบิ๊กอุย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปลาดุกอุย (Clarias macrocephalus)

ปลาดุกอุยเป็นปลาพื้นบ้านของไทยชนิดไม่มีเกล็ด รูปร่างเรียวยาว มีหนวด 4 คู่ ที่ริมฝีปาก ผิวหนังมีสีน้ำตาล เนื้อมีสีเหลือง รสชาติอร่อยนุ่มนวลสามารถนำมาปรุงแต่งเป็นอาหารชนิดต่าง ๆ ได้มากมาย ในประเทศไทยมีพันธุ์ปลาดุกอยู่จำนวน 5 ชนิด แต่ที่เป็นที่รู้จักทั่ว ๆไปคือ ปลาดุกอุยและปลาดุกด้าน (Clarias batrachus)

ปลาดุกรัสเซีย (Clarias gariepinus)

ปลาดุกรัสเซียอยู่ในตระกูล African catfish สามารถมีอายุยืนได้ถึงประมาณ 50 ปี มีถิ่นกำเนิดเดิมในทวีปอัฟริกา ชาวรัสเซียนำมาแพร่พันธุ์ในประเทศลาว คนไทยนำจากประเทศลาวเข้ามาประเทศไทย การเจริญเติบโตในเขตร้อนจะเจริญเติบโตได้ดีกว่าในเขตหนาว ปลาดุกรัสเซียมีชื่อเรียกหลายชื่อ เช่น ปลาดุกเทศ ปลาดุกอะเมซอน ปลาดุกคองโก ปลาดุกอัฟริกา หรือแม้แต่จะเรียกว่าปลาดุกคอมมิวนิสต์ก็ตาม ลักษณะรูปร่างเป็นปลาดุกที่ตัวโต ลำตัวยาวมีครีบ 2 ครีบ ใกล้ท้ายทอย ติดกันเป็นพืดใหญ่คล้ายครีบปลาช่อน ลำตัวมีลายตกกระคล้ายหินอ่อน หางคล้ายพัดเหมือนหางปลาช่อน โคนหางมีลายพาดขาว 1 เส้น หนังหนา บางชนิดผิวสีเทาค่อนข้างดำ รอยกระไม่เด่นชัด ท้องขาว เพศผู้จะมีติ่งหรือเดือยซึ่งเป็นอวัยวะเพศอยู่ใต้ทวาร กึ่งกลางระหว่างปลายครีบใต้ท้อง ลำตัวเรียวยาว ส่วนเพศเมียจะมีอวัยวะเพศกลมมน อยู่ใต้ทวารกึ่งกลางปลายครีบด้านข้างลำตัว ลำตัวจะอ้วนสั้น ท้องจะป่องกว่าตัวผู้ ปลาดุกรัสเซียเป็นปลาดุกที่มีการเจริญเติบโตรวดเร็วมาก สามารถกินอาหารได้แทบทุกชนิด มีความต้านทานโรคและสภาพแวดล้อมสูง แต่ปลาดุกชนิดนี้มีเนื้อเหลวและมีสีซีดขาวไม่น่ารับประทาน

ในปัจจุบันนี้อาจกล่าวได้ว่าปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซีย หรือบิ๊กอุยนั้น เป็นที่นิยมเลี้ยงของเกษตรกร เนื่องจากเลี้ยงง่าย มีการเจริญเติบโตรวดเร็ว อีกทั้งทนทานต่อโรคและสภาพแวดล้อมได้ดี และเป็นที่นิยมบริโภคของประชาชน เนื่องจากมีรสชาติดีและราคาถูก จังหวัดที่มีพื้นที่เลี้ยงกันมากใน 3 อันดับแรก ได้แก่ ฉะเชิงเทรา มีพื้นที่เลี้ยง 761 ไร่ กรุงเทพฯ 341.5 ไร่ และอ่างทอง 187 ไร่ และเมื่อพิจารณาถึงผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่นั้นพบว่า สตูลเป็นจังหวัดที่ให้ผลผลิตเฉลี่ยต่อไร่สูง คือ 13.3 ตัน และรองลงมาได้แก่ ฉะเชิงเทรา 9.6 ตันต่อไร่ ราชบุรีและนนทบุรีได้ 5.7 ตันต่อไร่ ส่วนกรุงเทพฯ ได้ 4.6 ตันต่อไร่ (กรมประมง,ม.ป.ป.) สำหรับความแตกต่างระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซียแสดงไว้ในตารางที่ 8

ตารางที่ 8 แสดงข้อแตกต่างระหว่างปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซีย

ลักษณะ	ปลาดุกอุย	ปลาดุกรัสเซีย
หัว	เล็กค่อนข้างรีไม่แบนกระโหลกจะลื่น มีรอยบุ๋มตรงกลางเล็กน้อย	ใหญ่และแบนกระโหลกจะเป็นตุ่ม ๆ ไม่เรียบ มีรอยบุ๋มตรงกลางเล็กน้อย
ใต้คาง	มีสีคล้ำไม่ขาว	สีขาว
หนวด	มี 4 คู่ โคนหนวดเล็ก	มี 4 คู่ โคนหนวดใหญ่
กระโหลกท้ายทอย	โค้งมน	หยักแหลม มี 3 หยัก
ปาก	ไม่ป้านค่อยข้างมน	ป้าน แบนหนา
ครีบหู	มีเงี่ยงเล็กสั้นแหลมคมมากครีบแข็งยื่นยาวเกินหรือเท่ากับครีบอ่อน	มีเงี่ยงใหญ่ สั้นนิ่มไม่แหลมคม และส่วนของครีบอ่อนหุ้มถึงปลายครีบแข็ง
ครีบหลัง	ปลายครีบสีเทาปนดำ	ปลายครีบสีแดง
ครีบหาง	กลมไม่ใหญ่มากนัก สีเทาปนดำ	กลมใหญ่ สีเทา ปลายครีบมีสีแดง และมีแถบสีขาวลาดบริเวณคอดหาง
สัดส่วนระหว่าง หัว : ตัว	1 : 4	1 : 3
สีของลำตัว	ดำ น้ำตาลปนดำที่บริเวณด้านบนของลำตัว	เทา เทาอมเหลือง
จุดที่ลำตัว	ขณะที่ปลามีขนาดเล็กจะปรากฏจุดขาวเรียงขวางเป็นทางประมาณ 9-10 แถว เมื่อปลามีขนาดใหญ่ จุดจะเลือนหายไป	ไม่มีจุด เมื่อปลาโตขึ้นจะปรากฏลายคล้ายหินอ่อนอยู่ทั่วตัว
ผนังท้อง	มีสีขาวถึงเหลืองเฉพาะบริเวณอก	ผนังท้องมีสีขาวตลอดจนถึงโคนหาง

แนวเหตุผลและสมมติฐานในการศึกษา

เป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าสิ่งมีชีวิตทุกชนิดไม่ว่าจะเป็นคน หรือสัตว์ย่อมต้องมีกลไกในการป้องกันตนเองจากสิ่งแปลกปลอมที่เข้าไปในร่างกาย ไซโตโครมพี 450 ก็เป็นส่วนประกอบหลักที่สำคัญมากที่สุดตัวหนึ่งในระบบเอนไซม์ของไมโครโซม ทำหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงยาและสารต่าง ๆ ในร่างกาย (สินธ์ชัย แก้วกิติชัย, 2527) ซึ่งการเปลี่ยนแปลงดังกล่าวอาจเป็นในด้านของการลดความเป็นพิษของสารลง หรือในทางกลับกันอาจทำให้ได้สารที่มีความเป็นพิษมากขึ้นรวมทั้งที่เป็นสารก่อมะเร็งด้วย ในปัจจุบันมีการศึกษากันมากเกี่ยวกับผลของสารที่ปนเปื้อนอยู่ในสิ่งแวดล้อมต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของไซโตโครมพี 450 สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับสารปนเปื้อนในน้ำมักนิยมทำการศึกษาในปลา โดยอาศัยการเปลี่ยนแปลงระดับของไซโตโครมพี 450 ในปลาเป็นดัชนีชี้วัดสภาพของน้ำ (Andersson and Forlin, 1992) โดยที่การเปลี่ยนแปลงระดับของไซโตโครมพี 450 มีได้ทั้งในด้านของการเพิ่มขึ้น (induction) และการลดลง (inhibition) (Gonksoyr and Forlin, 1992) การเปลี่ยนแปลงระดับของไซโตโครมพี 450 ย่อมมีผลทำให้เกิดความผิดปกติขึ้นในร่างกายได้หลายประการ เช่น การขาด P-450 21A2 จะทำให้เกิดโรค salt-wasting syndrome การขาด P-450 2D6 ซึ่งเกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงยาจำนวนมาก ย่อมทำให้เกิดการเป็นพิษจากยาได้ง่ายขึ้น นอกจากนี้ไซโตโครมพี 450 หลายชนิดที่มีสับสเตรทเป็นพวก pro-carcinogens เช่น P-450 IA1, P-450 IA2, P-450 IIE1 และ P-450 IIIA4 ดังนั้นหากมีการเพิ่มขึ้นของไซโตโครมพี 450 เหล่านี้ย่อมทำให้โอกาสของการเกิดโรคมะเร็งมีมากขึ้นด้วย (Guengerich, 1992)

การเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำเป็นอาชีพที่มีความสำคัญอาชีพหนึ่ง ซึ่งสามารถให้ผลผลิตที่ทำรายได้ให้กับประเทศปีละมาก ๆ และปัญหาที่สำคัญอันหนึ่งของการเพาะเลี้ยงสัตว์น้ำคือ การเปลี่ยนแปลงคุณภาพน้ำไปในทางที่ไม่เอื้ออำนวยต่อการดำรงชีพของสัตว์น้ำ โดยเฉพาะอย่างยิ่งเกิดจากการปนเปื้อนของสารปราบศัตรูพืชและสารเคมีต่าง ๆ สารปนเปื้อนต่าง ๆ เหล่านี้จะมีผลต่อสัตว์น้ำชนิดต่าง ๆ ทั้งปลา กุ้ง และหอย ทั้งที่อาศัยอยู่ในแหล่งน้ำธรรมชาติ และในบ่อเลี้ยงที่ต้องอาศัยน้ำจากธรรมชาติ (วิทย์ ธารชลานุกิจ, 2531)

สารปราบศัตรูพืชและสารเคมีที่จะทำการศึกษาครั้งนี้ คือ เมททิลพาราไธออน และออร์กาโนทิน (ไตรบิวทิลทินออกไซด์) เมททิลพาราไธออนเป็นสารปราบศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตซึ่งได้รับความนิยมใช้แพร่หลายมากที่สุดในระยะ 20 กว่าปีที่ผ่านมา ส่วนออร์กาโนทินก็เป็นสารเคมีที่นิยมใช้กันมากในรูปของสารกันเพรียงในสีทาเรือ และพบมีการปนเปื้อนในน้ำมาก

เมททิลพาราไธออนเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลงโดยไซโตโครมพี 450 ให้เป็นเมททิลพาราออกซอน ซึ่งเป็นสารที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส (Benke et al., 1974) ไตรบิวทิลทินออกไซด์ก็เช่นเดียวกันเมื่อเข้าสู่ร่างกายจะถูกเปลี่ยนแปลง

โดยไซโตโครมพี 450 ได้เมตาบอไลท์ที่ละลายน้ำได้ดี สามารถขับออกจากร่างกายได้ง่ายขึ้น (Lee, 1985)

โดยที่ไซโตโครมพี 450 มีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการเมตาบอลิสมและความเป็นพิษของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทิน ซึ่งสารทั้งสองนี้มักพบมีการปนเปื้อนอยู่ในสภาวะแวดล้อมโดยเฉพาะอย่างยิ่งในแหล่งน้ำ ระดับไซโตโครมพี 450 ที่เปลี่ยนแปลงไปไม่ว่าจะลดลงหรือเพิ่มขึ้นเนื่องจากสารเคมีดังกล่าวย่อมส่งผลกระทบต่อการตอบสนองของสิ่งมีชีวิตในแหล่งน้ำต่อสารพิษในสภาวะแวดล้อม ซึ่งอาจใช้เป็นแนวทางในการทดสอบสารพิษโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ (biomarkes) การศึกษาครั้งนี้จึงเน้นที่ผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อระดับของไซโตโครมพี 450 ร่วมกับการศึกษาผลของสารทั้งสองต่อระดับไซโตโครมบี 5 ซึ่งเป็นไซโตโครมอีกตัวที่มีส่วนประกอบเป็น hemoprotein และพบในเอ็นโดพลาสมิคเร็ทติคิวรัมส่วนเรียบ ทำหน้าที่เป็นตัวส่งผ่านอีเล็คตรอนให้กับไซโตโครมพี 450 สาเหตุที่เลือกทำการศึกษาในปลาดุกพันธุ์ผสมนั้นเนื่องจากปลาดุกพันธุ์ผสมเป็นปลาเศรษฐกิจที่เพาะเลี้ยงกันทั่วไปในประเทศไทย นอกจากนี้ยังไม่พบรายงานการศึกษาดังกล่าวในประเทศไทย การศึกษาครั้งนี้จึงเป็นจุดเริ่มต้นของการศึกษาถึงกระบวนการเมตาบอลิสมของพันธุ์ปลาในประเทศไทยที่ตอบสนองต่อสารพิษในสภาวะแวดล้อม และใช้ผลการศึกษาครั้งนี้เป็นแนวทางในการทดสอบสารพิษโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ (biomarkers)

วัตถุประสงค์การวิจัย

เพื่อศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมที่แยกจากตับปลาดุกพันธุ์ผสม

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ได้ทราบถึงผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อการเปลี่ยนแปลงระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

2. สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการทดสอบสารพิษ โดยใช้วิธีการทางชีวภาพ (biomarker) ซึ่งอาศัยดัชนีบ่งชี้ความเป็นพิษคือ ระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ที่เปลี่ยนแปลงไป

บทที่ 2

อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

2.1 สัตว์ทดลอง

ปลาที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่าง ปลาดุกอุยกับปลาดุกรัสเซีย น้ำหนักประมาณ 400 - 500 กรัม ซื้อจากตลาด ขณะที่ยังมีชีวิตอยู่ นำมาแช่ในช่องทำน้ำแข็งให้สลบทันที ก่อนทำการแยกตับเพื่อใช้ในการเตรียมไมโครโซม

2.2 เครื่องมือ

2.2.1 UV - visible recording spectrophotometer (UV-160A, Shimadzu)

2.2.2 Tissue homogenizer (Thomas type NSI - 12)

2.2.3 High - speed centrifuge (IBM - 22M)

2.2.4 Water bath (EYELA SB - 35, Tokyo Rikakikai Co., Ltd)

2.2.5 Standard pH meter (EA 920, Orion research)

2.2.6 เครื่องชั่งละเอียด (A 200S, Sartorious)

2.2.7 Vortex mixer (Torika mixer MA-1)

2.3 สารเคมี

2.3.1 Potassium chloride (Riedel - de Haen AG.)

2.3.2 Potassium dihydrogen phosphate (Merck)

2.3.3 Di-sodium hydrogen phosphate (Merck)

2.3.4 Glycerine (Farmitalia Carlo erbar)

2.3.5 1,4-Dithio-DL-threitol (Fluka chemical)

2.3.6 β-nicotinamide adenine dinucleotide (β-NADH) (Sigma chemical company)

2.3.7 Ethanol (J.J. Baker)

2.3.8 Bio-Rad protein assay reagent (Bio-Rad Inc.)

2.3.9 Bovine-serum albumin (Bio-Rad Inc.)

2.3.10 Sodium dithionite (Fluka chemical)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.11 Tris[hydroxymethyl]-aminomethane hydrochloride (TRIZMA) (Sigma chemical company)

2.3.12 Methyl parathion (J.J. baker) (Technical grade 92.4%)

2.3.13 Bis (tri-n-butyltin) oxide (Fluka chemical) (Technical grade 97%)

2.3.14 Gas carbon monoxide (Thai industrial gas)

2.4 การเตรียมสารเคมี

2.4.1 1.15% potassium chloride

เตรียมโดยการชั่ง KCl 11.5 กรัม แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 1 ลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.2 TRIZMA 0.1 M, pH 5

เตรียมโดยการชั่ง TRIZMA 1.576 กรัม แล้วนำมาละลายในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.3 β-NADH solution (5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

เตรียมโดยการชั่ง β-NADH 5 มิลลิกรัม แล้วนำมาละลายใน TRIZMA 0.1 M จำนวน 1 มิลลิลิตร เก็บสารละลายนี้ไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.4 Bovine serum albumin (1.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร)

นำขวดซึ่งบรรจุ bovine serum albumin (Bio - Rad Inc.) มาเติมน้ำกลั่นจำนวน 20 มิลลิลิตร จะได้ protein standard solution ที่มีความเข้มข้น 1.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และสามารถเก็บไว้ได้ที่อุณหภูมิ -20 °C นาน 6 เดือน

2.4.5 การเตรียม Bio - Rad protein assay regent

นำ dye reagent (Bio - Rad Inc.) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 จากนั้นนำมากรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1 สารละลายนี้สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4°C นาน 2 สัปดาห์

2.4.6 สารละลายบัฟเฟอร์ A, pH 7.4

เตรียมโดยการชั่ง potassium dihydrogen phosphate จำนวน 2.6810 กรัม, di-sodium hydrogen phosphate จำนวน 11.3994 กรัม และ KCl จำนวน 11.1800 กรัม นำสารทั้งหมดมาผสมเข้าด้วยกัน แล้วละลายในน้ำกลั่นจำนวน 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 สารละลายบัฟเฟอร์นี้เก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.7 สารละลายบัฟเฟอร์ B, pH 7.4

เตรียมโดยการชั่ง potassium dihydrogen phosphate จำนวน 2.6810 กรัม, di-sodium hydrogen phosphate จำนวน 11.3994 กรัม, dithiothreitol จำนวน 0.1543 กรัม และ glycerine จำนวน 200 มิลลิลิตร นำสารทั้งหมดมาผสมเข้าด้วยกัน แล้วละลายในน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1 ลิตร จากนั้นปรับ pH ให้เท่ากับ 7.4 สารละลายบัฟเฟอร์นี้สามารถเก็บไว้ในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4 °C

2.4.8 การเตรียมไตรบิวทิลทิน

2.4.8.1 การเตรียม tributyltin stock solution

นำ bis(tri - butyltin)oxide (97 %) จำนวน 1.31 มิลลิลิตร มาเติมเอธานอลจนได้ปริมาตรรวมเป็น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ stock solution ของไตรบิวทิลทินที่มีความเข้มข้น 10 mM

2.4.8.2 การเตรียมไตรบิวทิลทินสำหรับการศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยการเตรียมไตรบิวทิลทินความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 9

ตารางที่ 9 การเตรียมไตรบิวทิลทินสำหรับการศึกษาผลของไตรบิวทิลทิน ต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

ความเข้มข้นของไตรบิวทิลทิน (mM)	ปริมาณไตรบิวทิลทินจาก stock solution (ml)	ปริมาณเอธานอล (ml)
0.1	0.03	2.97
0.2	0.06	2.94
0.5	0.15	2.85
1.0	0.30	2.70

2.4.9 การเตรียมเมทิลพาราไธออน

2.4.9.1 การเตรียม methyl parathion stock solution

นำเมทิลพาราไธออน (92.4 %) จำนวน 525 ไมโครลิตร มาเติมเอธานอลจนได้ปริมาตรรวมเป็น 5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน จะได้ stock solution ของเมทิลพาราไธออนที่มีความเข้มข้น 10 mM

2.4.9.2 การเตรียมเมทิลพาราไธออนสำหรับการศึกษาผลของ เมทิลพาราไธออนต่อระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยการเตรียมเมทิลพาราไธออนความเข้มข้นต่าง ๆ ดังแสดงในตารางที่ 10

ตารางที่ 10 การเตรียมเมทิลพาราไธออนสำหรับการศึกษาผลของเมทิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

ความเข้มข้นของเมทิลพาราไธออน (mM)	ปริมาณเมทิลพาราไธออนจาก stock solution (ml)	ปริมาณเอธานอล (ml)
0.1	0.03	2.97
0.2	0.06	2.94
0.5	0.15	2.85
1.0	0.30	2.70

2.5 การเตรียมไมโครโซม

นำปลาดุกพันธุ์ผสมน้ำหนักประมาณ 400 - 500 กรัม จำนวน 5 ตัว มาทำให้สลบด้วยการแช่แข็ง แล้วนำไปที่ห้องปฏิบัติการเพื่อแยกเอาเฉพาะส่วนตับออกมาชั่งน้ำหนัก แล้วล้างหลาย ๆ ครั้งด้วยสารละลายโปตัสเซียมคลอไรด์ที่แช่เย็น (ice cold 1.15% KCl) ก่อนนำไปปั่นและบด (homogenize) ในบัฟเฟอร์ A จำนวน 20 มิลลิลิตร จากนั้นนำไป centrifuge ที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที แล้วเทส่วน suppernatant ที่ได้ ออกมา centrifuge ซ้ำอีกครั้งที่ 10,000 rpm นาน 10 นาที หลังจากนั้นเทส่วน suppernatant ออกมา centrifuge ที่ 20,000 rpm นาน 2 ชั่วโมง จะได้ pelleted microsomal fraction นำ pellet ที่ได้มา suspend ในบัฟเฟอร์ B โดยใช้บัฟเฟอร์ B จำนวน 5 มิลลิลิตร ต่อตับปลา 1 กรัม เก็บไมโครโซมที่ได้นี้ไว้ในตู้แช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 $^{\circ}$C จนกว่าจะนำมาทำการศึกษา

2.6 การวัดปริมาณโปรตีน

วัดปริมาณโปรตีนจากไมโครโซมที่เตรียมไว้โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Bradford (1976) มีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.6.1 เตรียม dye reagent โดยเจือจาง dye reagent concentrate ด้วยน้ำกลั่นในอัตราส่วน 1:4 แล้วกรองด้วยกระดาษกรองเบอร์ 1

2.6.2 เตรียม standard protein โดยใช้ bovine serum albumin (1.35 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร) มาทำให้เจือจางด้วยน้ำกลั่นจนได้ปริมาตรรวมเป็น 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลอง โดยทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นของโปรตีนดังแสดงในตารางที่ 11

ตารางที่ 11 การเตรียม standard protein โดยใช้ bovine serum albumin (1.35 mg/ml)

ปริมาณ bovine serum albumin (ml)	ปริมาณน้ำกลั่น (ml)	ความเข้มข้นของโปรตีน (µg/ml)
0.15	0.85	202.50
0.30	0.70	405.00
0.50	0.50	675.00
0.60	0.40	810.00

2.6.3 ปิเปต standard protein ที่เตรียมไว้ในข้อ 2 จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน standard tube

2.6.4 ปิเปตไมโครโซมจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงใน sample tube

2.6.5 เตรียม blank สำหรับ standard tube โดยปิเปตบัฟเฟอร์ B จำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6.6 เตรียม blank สำหรับ sample tube โดยปิเปตน้ำกลั่นจำนวน 100 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.6.7 เติม dye reagent ที่เตรียมไว้ในข้อ 1 จำนวน 5 มิลลิลิตร ลงในทุกหลอดที่ต้องการวัดปริมาณโปรตีน แล้วนำไปปั่นด้วย vortex mixture

2.6.8 ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องนานอย่างน้อย 10 นาที

2.6.9 นำสารละลายใน standard tube และ blank ใส่ลงใน cuvettes แล้วนำ cuvettes ทั้งสองมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 595 นาโนเมตร (nm)

2.6.10 นำสารละลายใน sample tube และ blank ใส่ลงใน cuvettes แล้วนำ cuvettes ทั้งสองมาวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ 595 นาโนเมตร ซึ่งควรวัดให้เสร็จภายในเวลา 1 ชั่วโมง หลังใส่ dye reagent

2.6.11 นำค่าการดูดกลืนแสงที่วัดได้ในข้อ 2.6.9 มาเขียนกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นของโปรตีน (แกน x) กับค่าการดูดกลืนแสง (แกน y)

2.6.12 คำนวณความเข้มข้นของโปรตีนใน sample tube โดยใช้กราฟมาตรฐาน (calibration curve) ในข้อ 2.6.11

2.7 วิธีการวัดระดับไซโตโครมพี 450

วัดระดับไซโตโครมพี 450 จากไมโครโซมที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Stegeman, Binder และ Orren(1979) ซึ่งมีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.7.1 นำไมโครโซมจำนวน 2 มิลลิลิตร ใส่ลงในหลอดทดลอง

2.7.2 เติมสารละลาย β - NADH (5 mg/ml) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไป จากนั้นผสมให้เข้ากันดี

2.7.3 แล้วนำไปเติมก๊าซคาร์บอนมอนอกไซด์ (CO)

2.7.4 แบ่งสารละลายในข้อ 2.7.3 ใส่ลงใน cuvettes 2 อัน ปิดฝากำหนดให้เป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.7.5 วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 400 - 500 นาโนเมตร

2.7.6 เติม sodium dithionite จำนวน 2 - 3 มิลลิกรัม ลงใน sample cuvette จากนั้นผสมให้เข้ากันดี แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 - 500 นาโนเมตร

2.7.7 คำนวณปริมาณไซโตโครมพี 450 ได้จากสูตร

$$\underset{(nmol/mg)}{\text{Total cytochrome P-450}} = \frac{\Delta \text{ABS (450-490)} \times 1,000}{91 \times \text{protein concentration}}$$

โดยใช้ค่า extinction coefficient ของไซโตโครมพี 450 เท่ากับ91 $mM^{-1}.cm^{-1}$

ABS (450-490) = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 450 และ 490 นาโนเมตร

protein concentration = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมที่นำมาวัด โดยมีหน่วยเป็น มิลิลิกรัม/มิลลิลิตร

2.8 วิธีการวัดระดับไซโตโครมบี 5

วัดระดับไซโตโครมบี 5 จากไมโครโซมที่เตรียมไว้ โดยประยุกต์ใช้วิธีการของ Stegeman และคณะ (1979) ซึ่งมีขั้นตอนการวัดดังนี้

2.8.1 นำไมโครโซมจำนวน 2 มิลลิลิตร มาแบ่งใส่ลงใน cuvettes 2 อัน ที่มีค่าการดูดกลืนแสงเท่ากัน โดยแบ่งเป็น reference cuvette และ sample cuvette

2.8.2 นำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 - 500 นาโนเมตร

2.8.3 เติมสารละลาย β - NADH (5 mg/ml) จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงใน sample cuvette ผสมให้เข้ากันดี แล้ววัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 400 - 500 นาโนเมตร

2.8.4 คำนวณปริมาณไซโตโครมบี 5 ได้จากสูตร

$$\underset{(nmol/mg)}{\text{Cytochrome b5}} = \frac{\Delta \text{ABS (425-410)} \times 1,000}{185 \times \text{protein concentration}}$$

โดยใช้ค่า extinction coefficient ของไซโตโครมบี5 เท่ากับ 185 $mM^{-1}.cm^{-1}$

ABS (425-410) = ผลต่างของค่าการดูดกลืนแสงที่ 425 และ 410 นาโนเมตร

protein concentration = ค่าความเข้มข้นของโปรตีนในไมโครโซมที่นำมาวัด โดยมีหน่วยเป็น มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.9 วิธีการทดลอง

2.9.1 ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 2 ตัว แยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม แล้ว suspend ไมโครโซมทั้งหมดในบัฟเฟอร์ B จำนวน 30 มิลลิลิตร จากนั้นวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ทั้งหมด 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน

2.9.2 ประเมินค่าความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 5 ตัว แยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม แล้ว suspend ไมโครโซมที่ได้จากปลา 1 ตัว ในบัฟเฟอร์ B จำนวน 15 มิลลิลิตร จากนั้นวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ตามระยะเวลาดังนี้ คือ 0, 1, 2, 4 และ 7 วัน

2.9.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีน กับระดับไซโตโครมพี 450

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 3 ตัว แยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม แล้วนำไมโครโซมที่ได้จากปลา 1 ตัว มา suspend ในบัฟเฟอร์ B จำนวน 6 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจางดังนี้

ขั้นที่ 1 นำไมโครโซมที่เตรียมไว้จำนวน 3 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ B จำนวน 3 มิลลิลิตร

ขั้นที่ 2 นำไมโครโซมที่เตรียมได้ในขั้นที่ 1 จำนวน 3 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ B จำนวน 3 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันดี

ขั้นที่ 3 นำไมโครโซมที่เตรียมได้ในขั้นที่ 2 จำนวน 3 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ B จำนวน 3 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันดี

ขั้นที่ 4 นำไมโครโซมที่เตรียมได้ในขั้นที่ 3 จำนวน 3 มิลลิลิตร มาเติมบัฟเฟอร์ B จำนวน 3 มิลลิลิตร จากนั้นผสมให้เข้ากันดี

นำไมโครโซมที่ได้จากการเจือจางในแต่ละขั้นตอน มาวัดปริมาณโปรตีนและระดับไซโตโครมพี 450

2.9.4 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ครั้ง แต่ละครั้งมีขั้นตอนการทำดังนี้

2.9.4.1 นำไมโครโซมที่เตรียมไว้มาทำการทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้ 2% ethanol
กลุ่มที่ 2 ให้เมททิลพาราไธออน 0.1 mM
กลุ่มที่ 3 ให้เมททิลพาราไธออน 0.2 mM
กลุ่มที่ 4 ให้เมททิลพาราไธออน 0.5 mM
กลุ่มที่ 5 ให้เมททิลพาราไธออน 1.0 mM

ในแต่ละกลุ่มใช้ไมโครโซมจำนวน 10 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 5 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร หลอดที่ 1 ของทุกกลุ่มจะนำไปวัดระดับของไซโตโครมพี 450 โดยไม่ต้อง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออน ที่เหลืออีก 4 หลอด เติมเมททิลพาราไธออนในความเข้มข้นที่เท่ากันจำนวน 40 ไมโครลิตร ก่อนนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยแต่ละหลอดจะใช้ระยะเวลาในการ incubate ที่แตกต่างกันคือ 5, 10, 20 และ 30 นาที

2.9.4.2 นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจหาการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมพี 450 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ยกเว้นในหลอดที่ incubate นาน 30 นาที ของทุกกลุ่มให้นำมาตรวจหาการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมบี 5 ด้วย

2.9.5. การศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 6 ครั้ง แต่ละครั้งมีขั้นตอนการทำดังนี้

2.9.5.1 นำไมโครโซมที่เตรียมไว้มาทำการทดลอง โดยแบ่งการทดลองออกเป็น 5 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม ให้ 2% ethanol
กลุ่มที่ 2 ให้ไตรบิวทิลทิน 0.1 mM

กลุ่มที่ 3 ให้ไตรบิวทิลทิน 0.2 mM
กลุ่มที่ 4 ให้ไตรบิวทิลทิน 0.5 mM
กลุ่มที่ 5 ให้ไตรบิวทิลทิน 1.0 mM

ในแต่ละกลุ่มใช้ไมโครโซมจำนวน 10 มิลลิลิตร แบ่งเป็น 5 หลอด หลอดละ 2 มิลลิลิตร หลอดที่ 1 ของทุกกลุ่มจะนำไปวัดระดับไซโตโครมพี 450 โดยไม่ต้อง incubate ด้วยไตรบิวทิลทิน ที่เหลืออีก 4 หลอด ให้ใส่ไตรบิวทิลทินในความเข้มข้นที่เท่ากัน จำนวน 40 ไมโครลิตร ก่อนนำไป incubate ใน water bath ที่อุณหภูมิ 30 °C โดยแต่ละหลอดจะใช้ระยะเวลาในการ incubate ที่แตกต่างกันคือ 5, 10, 20 และ30 นาที

2.9.5.2 นำตัวอย่างที่ได้มาตรวจหาการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมพี 450 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ยกเว้นในหลอดที่ incubate นาน 30 นาที ของทุกกลุ่ม ให้นำมาตรวจหาการเปลี่ยนแปลงระดับไซโตโครมบี 5 ด้วย

สถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์

1. ใช้ ANOVA ชนิด one way และเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยโดยวิธี Duncan's new multiple range test (เติมศรี ชำนาญกิจ, 2531)

2. หาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของสารเคมีโดยใช้สมการถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) $y = a + b\text{Log}(x)$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการทดลอง

3.1 ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 2 ตัว แยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม แล้ว suspend ไมโครโซมทั้งหมดในบัฟเฟอร์ B จำนวน 30 มิลลิลิตร จากนั้นวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ทั้งหมด 10 ครั้ง แล้วหาค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน แสดงผลการวัดในตารางที่ 12 และ 13

ตารางที่ 12 แสดงค่าความแม่นยำของการวัดระดับของไซโตโครมพี 450

ลำดับการวัด	ระดับของไซโตโครมพี 450 (nmol/mg)
1	0.404
2	0.404
3	0.404
4	0.425
5	0.425
6	0.404
7	0.404
8	0.404
9	0.404
10	0.404

$\overline{X}$ = 0.408

S.D = 0.009

%CV = 2.17

ตารางที่ 13 แสดงค่าความแม่นยำของการวัดระดับไซโตโครมบี 5

ลำดับการวัด	ระดับของไซโตโครมบี 5 (nmol/mg)
1	0.109
2	0.122
3	0.122
4	0.122
5	0.122
6	0.109
7	0.122
8	0.122
9	0.122
10	0.122

$\overline{X}$ = 0.119

S.D = 0.005

%CV = 4.60

3.2 ประเมินค่าความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 5 ตัว แยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม แล้ว suspend ไมโครโซมที่ได้จากปลา 1 ตัว ในบัฟเฟอร์ B จำนวน 15 มิลลิลิตร จากนั้นวัดระดับไซโตโครมพี 450 ตามระยะเวลาดังนี้ คือ 0, 1, 2, 4 และ 7 วัน แสดงผลการวัดในตารางที่ 14, 15 และรูปที่ 13, 14

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงค่าความคงตัวของระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยทำการศึกษานาน 1 สัปดาห์

วันที่	ระดับไซโตโครมพี 450 (nmol/mg)				
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5
0	0.469	0.500	0.519	0.568	0.872
1	0.443	0.519	0.491	0.515	0.866
2	0.466	0.498	0.516	0.572	0.860
4	0.441	0.517	0.542	0.547	0.841
7	0.469	0.525	0.494	0.586	0.785
$\overline{X}$	0.458	0.485	0.494	0.506	0.845
S.E.	0.014	0.031	0.031	0.037	0.035

ตารางที่ 15 แสดงค่าความคงตัวของระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม โดยทำการศึกษานาน 1 สัปดาห์

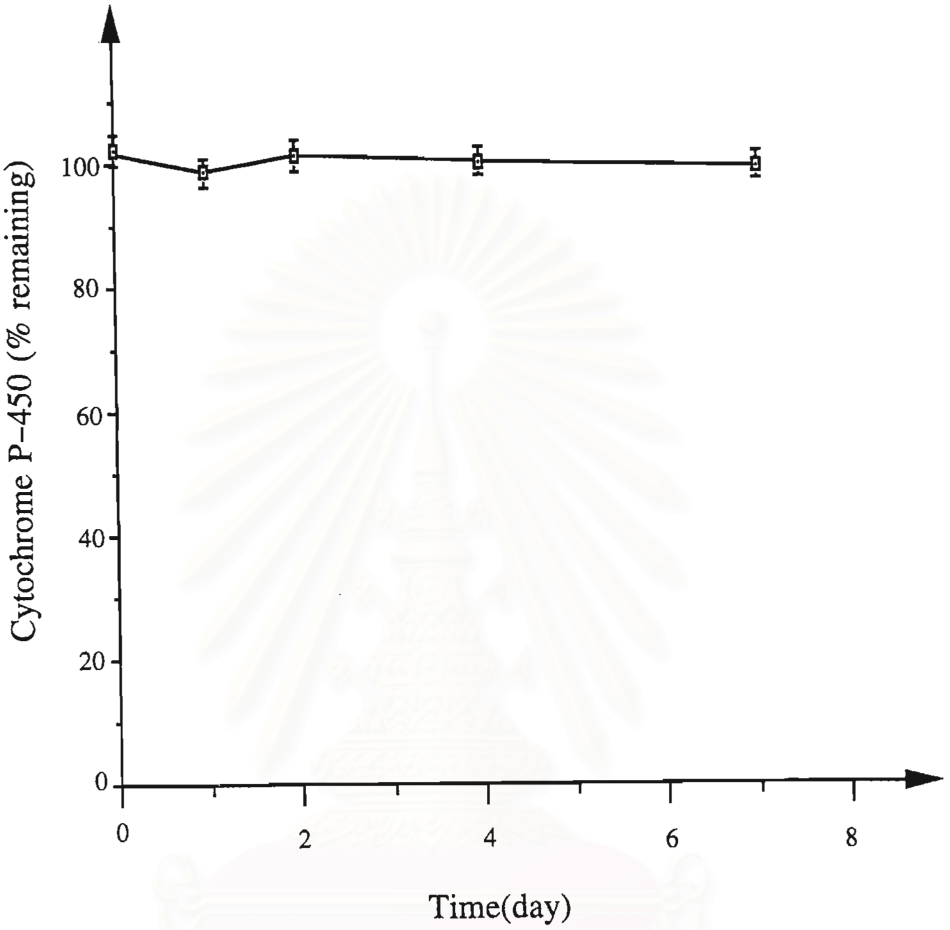
วันที่	ระดับไซโตโครมบี 5 (nmol/mg)				
	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2	ตัวอย่างที่ 3	ตัวอย่างที่ 4	ตัวอย่างที่ 5
0	0.231	0.159	0.209	0.210	0.266
1	0.226	0.155	0.218	0.200	0.270
2	0.221	0.153	0.228	0.201	0.258
4	0.225	0.154	0.240	0.183	0.252
7	0.223	0.144	0.224	0.202	0.251
$\overline{X}$	0.225	0.153	0.224	0.199	0.260
S.E.	0.002	0.003	0.005	0.004	0.004

3.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับระดับไซโตโครมพี 450

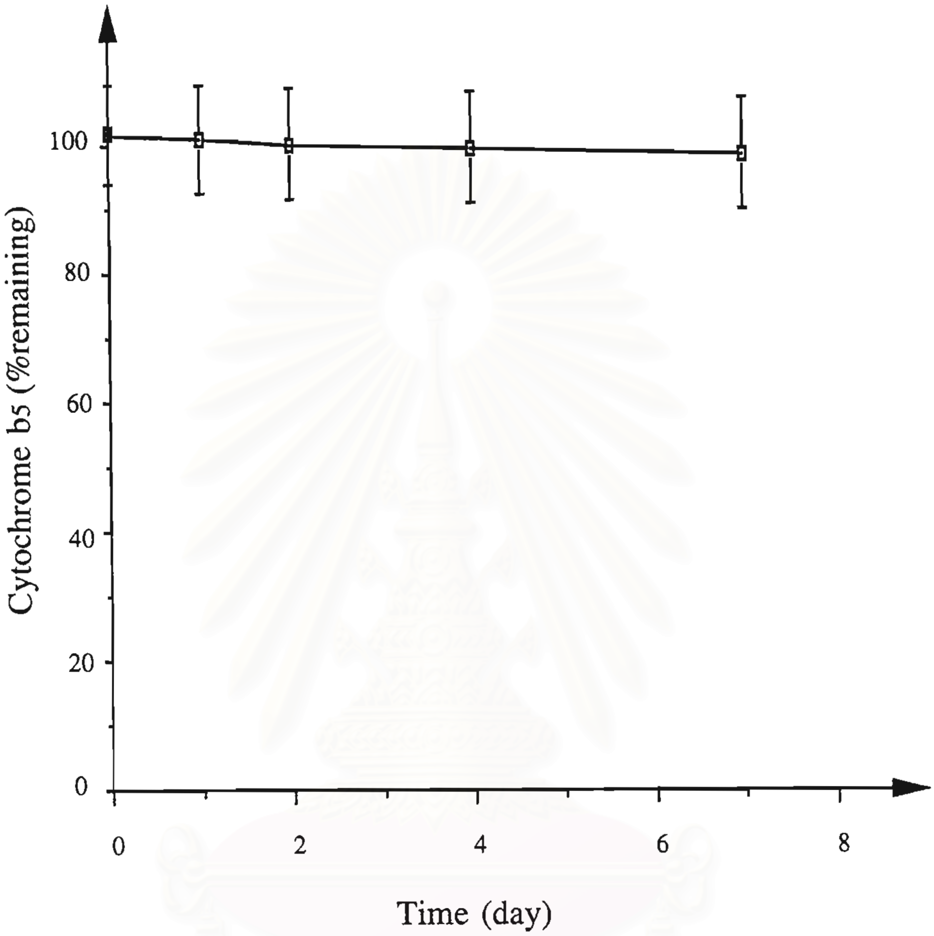
ใช้ปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 3 ตัว แยกเอาตับออกมาผ่านการเตรียมเป็นไมโครโซม แล้วนำไมโครโซมที่ได้จากปลา 1 ตัว มา suspend ในบัฟเฟอร์ B จำนวน 6 มิลลิลิตร จากนั้นทำการเจือจาง 4 ขั้นตอน ตามวิธีที่กล่าวไว้ในบทที่ 2 ข้อ 2.9.3 แสดงผลการศึกษาในตารางที่ 16 และรูปที่ 15

ตารางที่ 16 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับระดับไซโตโครมพี 450

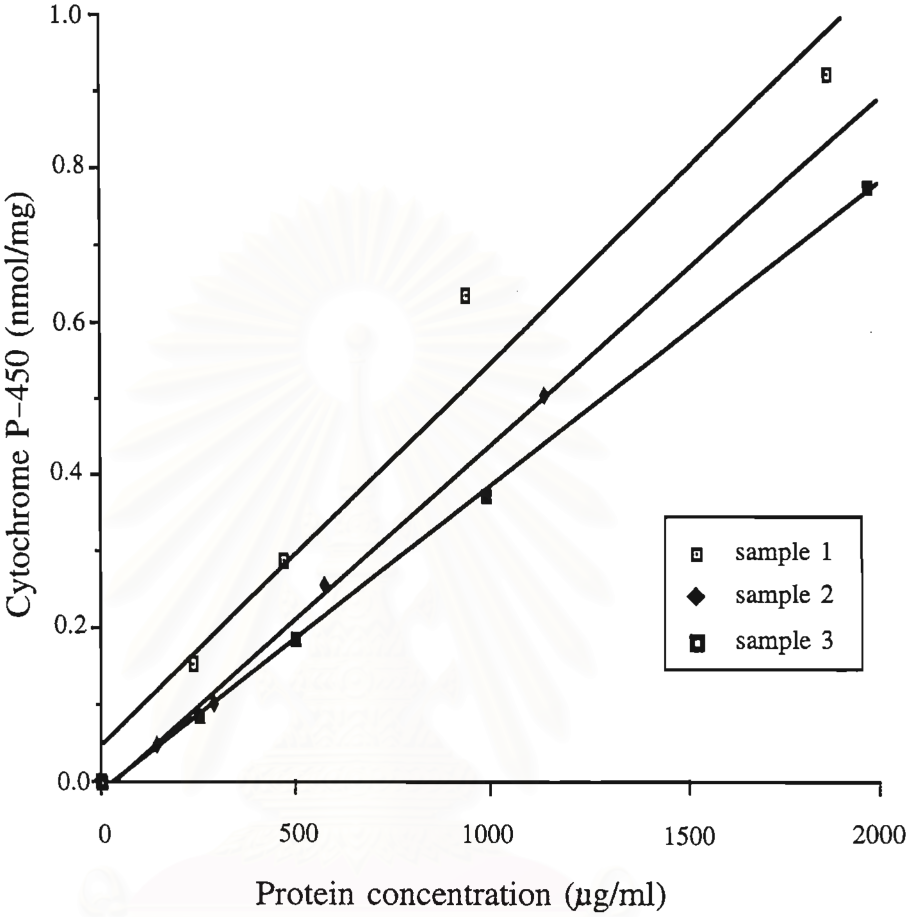
ขั้นที่	ตัวอย่างที่ 1		ตัวอย่างที่ 2		ตัวอย่างที่ 3	
	cytochrome P-450 (nmol/mg)	protein concentration (μg/ml)	cytochrome P-450 (nmol/mg)	protein concentration (μg/ml)	cytochrome P-450 (nmol/mg)	protein concentration (μg/ml)
1	0.923	1,873.52	0.505	1,145.90	0.780	1,974.00
2	0.637	936.76	0.253	572.95	0.374	987.00
3	0.286	468.38	0.099	286.48	0.187	493.50
4	0.154	234.19	0.044	143.24	0.088	246.75



รูปที่ 13 แสดงความคงตัวของระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสมโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ระดับของเอนไซม์เทียบกับการวัดครั้งแรก แต่ละจุดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน จาก 5 การทดลอง



รูปที่ 14 แสดงความคงตัวของระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสมโดยคิดเป็นเปอร์เซนต์ระดับของเอนไซม์เทียบกับการวัดครั้งแรก แต่ละจุดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน จาก 5 การทดลอง



รูปที่ 15 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับปริมาณโปรตีนในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมจำนวน 3 ตัวอย่าง โดยตัวอย่างที่ 1 $y = 0.0005x + 0.051$; $R^2 = 0.963$ ตัวอย่างที่ 2 $y = 0.00045x - 0.014$; $R^2 = 0.997$ และตัวอย่างที่ 3 $y = 0.0004x - 0.008$; $R^2 = 0.999$

3.4 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

3.4.1 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถยับยั้งไซโตโครมพี 450 โดยทำให้ระดับของไซโตโครมพี 450 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ ความสามารถในการยับยั้งไซโตโครมพี 450 จะสูงขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออน และไซโตโครมพี 450 จะถูกยับยั้งอย่างสมบูรณ์ในไมโครโซมที่ incubate ด้วยเมททิลพาราไธออน 1 mM นอกจากนี้ยังพบว่า ความสามารถในการยับยั้งไซโตโครมพี 450 ของเมททิลพาราไธออนจะไม่เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มระยะเวลาในการ incubate (ดังแสดงในตารางที่ 17, 18 และรูปที่ 16, 17, 19)

จากการสังเกตพบว่าเมื่อใส่เมททิลพาราไธออนลงไปในไมโครโซม จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เห็นชัดเจนคือ เมททิลพาราไธออนจะทำให้เกิดการขุ่นขึ้นทันที ซึ่งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงนี้ได้อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้น 1 mM

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออน โดยใช้ระยะเวลาในการ incubate นาน 5 นาที พบว่าเมื่อความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนเพิ่มขึ้นจะทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง คำนวณค่า correlation coefficient (R^2) เท่ากับ 0.942 ดังแสดงในรูปที่ 18

3.4.2 ผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

เมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 1 mM มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่าระดับไซโตโครมบี 5 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ สำหรับเมททิลพาราไธออนความเข้มข้น 0.1, 0.2 และ 0.5 mM ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 (ดังแสดงในตารางที่ 19 และรูปที่ 20, 21)

ตารางที่ 17 แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

เมททิลพาราไธออน (mM)	ระดับไซโตโครมพี 450ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (nmol/mg)				
	0 นาที	5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
กลุ่มควบคุม (2% ethanol)	0.473±0.020	0.479±0.023	0.469±0.025	0.474±0.023	0.490±0.027
0.1	0.487±0.030	0.318±0.024*❀	0.308±0.025*❀	0.322±0.029*❀	0.325±0.031*❀
0.2	0.477±0.023	0.247±0.018*❀	0.265±0.027*❀	0.268±0.016*❀	0.276±0.024*❀
0.5	0.492±0.026	0.167±0.028*❀	0.166±0.017*❀	0.176±0.022*❀	0.187±0.026*❀
1.0	0.478±0.067	ND	ND	ND	ND

*ที่เวลาเดียวกัน : แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

❀ที่ความเข้มข้นเดียวกัน : แตกต่างจากจุดเริ่มต้น (0 นาที) อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

ND : not detectable

ตารางที่ 18 แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ที่เวลาต่าง ๆ จาก 6 การทดลอง

เมททิลพาราไธออน (mM)	เปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ที่เวลาต่าง ๆ (%)				
	0 นาที	5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
กลุ่มควบคุม (2%ethanol)	100	101.00	99.15	100.21	103.59
0.1	100	65.30	63.24	66.12	66.74
0.2	100	51.78	55.56	56.18	57.86
0.5	100	33.94	33.74	35.77	38.00
1.0	100	00.00	00.00	00.00	00.00

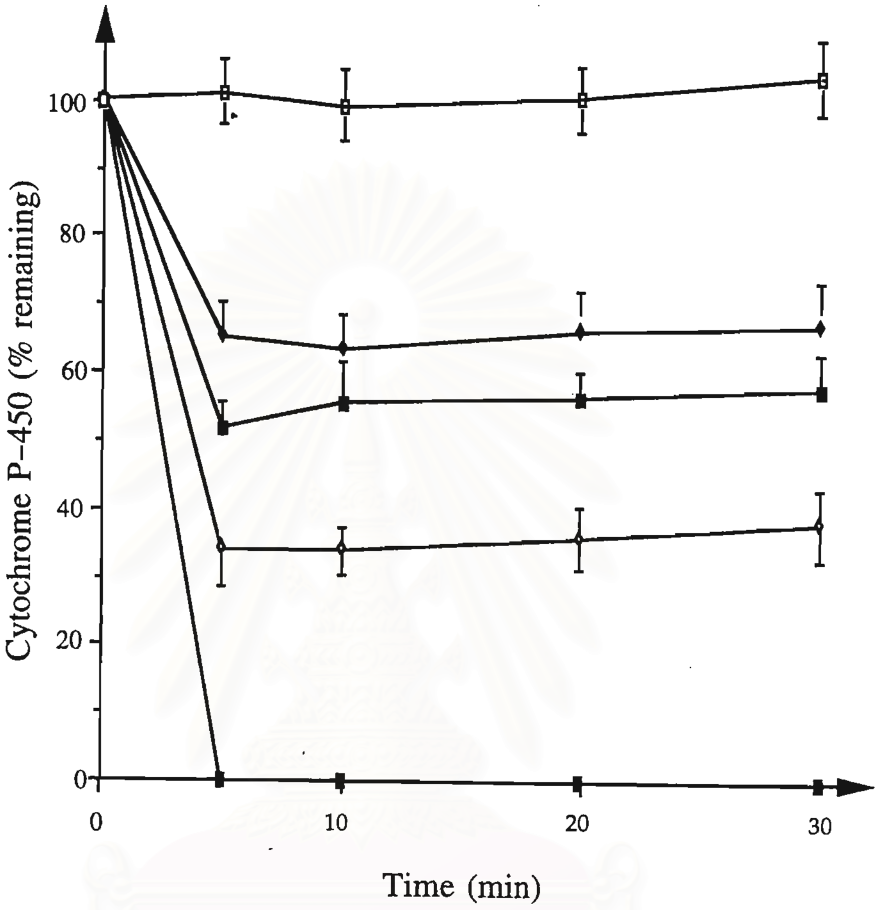
ตารางที่19 แสดงระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

เมททิลพาราไธออน (mM)	ไซโตโครมพี 450 (nmol/mg)	ไซโตโครมบี 5 (nmol/mg)
กลุ่มควบคุม (2% ethanol)	0.490 ± 0.027	0.088 ± 0.005
0.1	0.325 ± 0.031 *	0.080 ± 0.005
0.2	0.276 ± 0.024 *	0.085 ± 0.005
0.5	0.187 ± 0.026 *	0.080 ± 0.004
1.0	ND	0.048 ± 0.007 *

* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

ND : not detectable

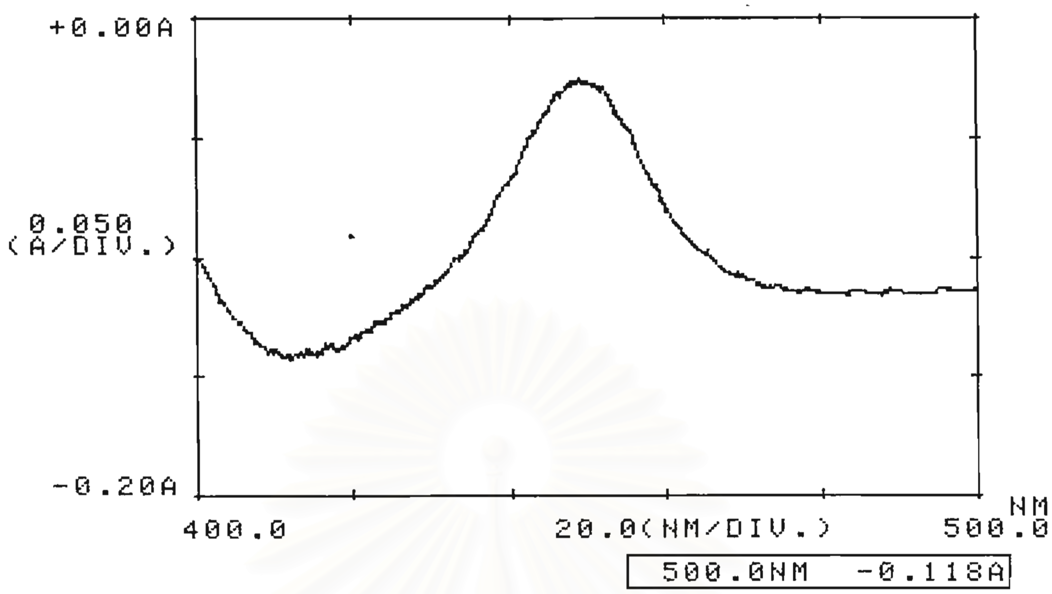
หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

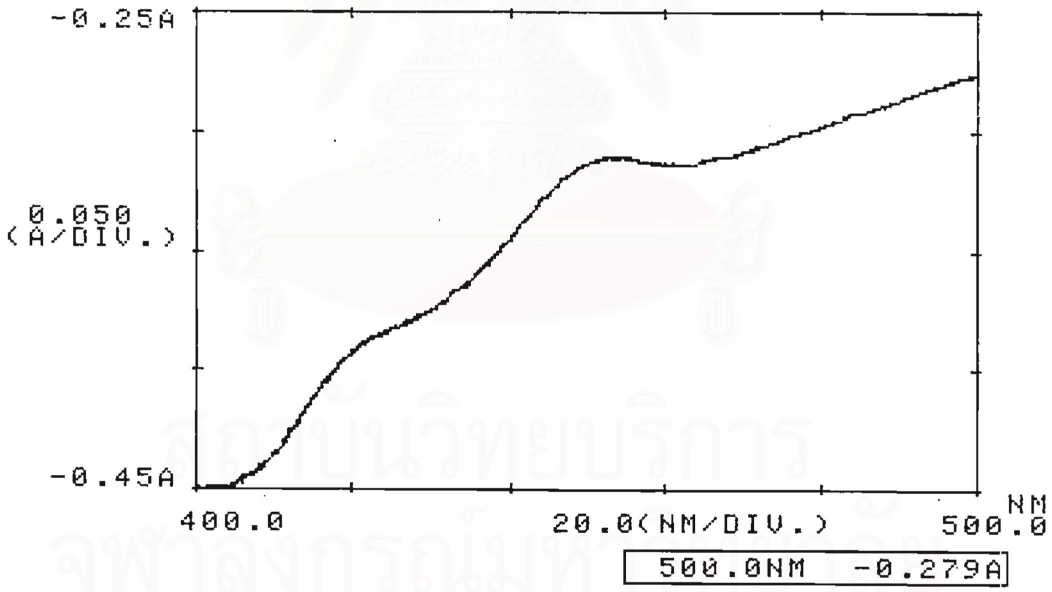


รูปที่ 16 แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ แต่ละจุดแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

- 2 % ethanol
- 0.1 mM
- 0.2 mM
- 0.5 mM
- 1.0 mM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

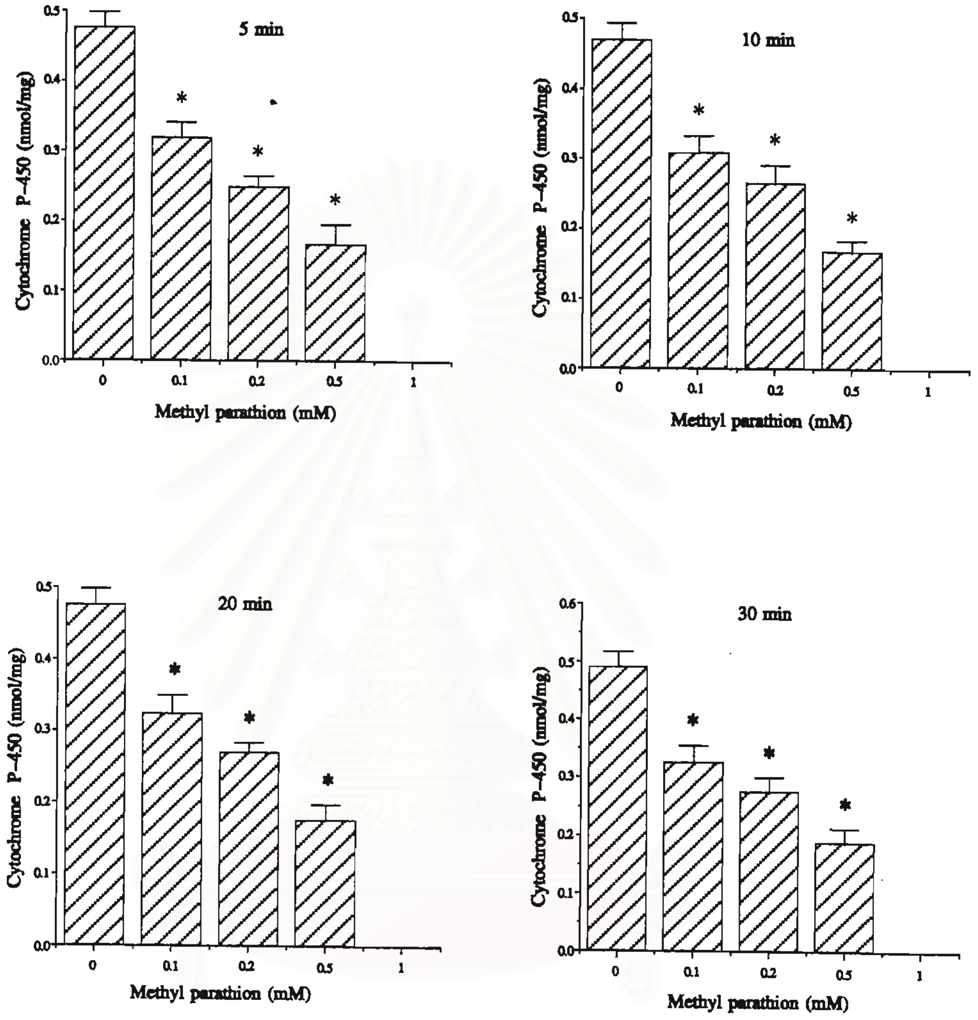




รูปที่ 17 แสดงผลของเมทิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450

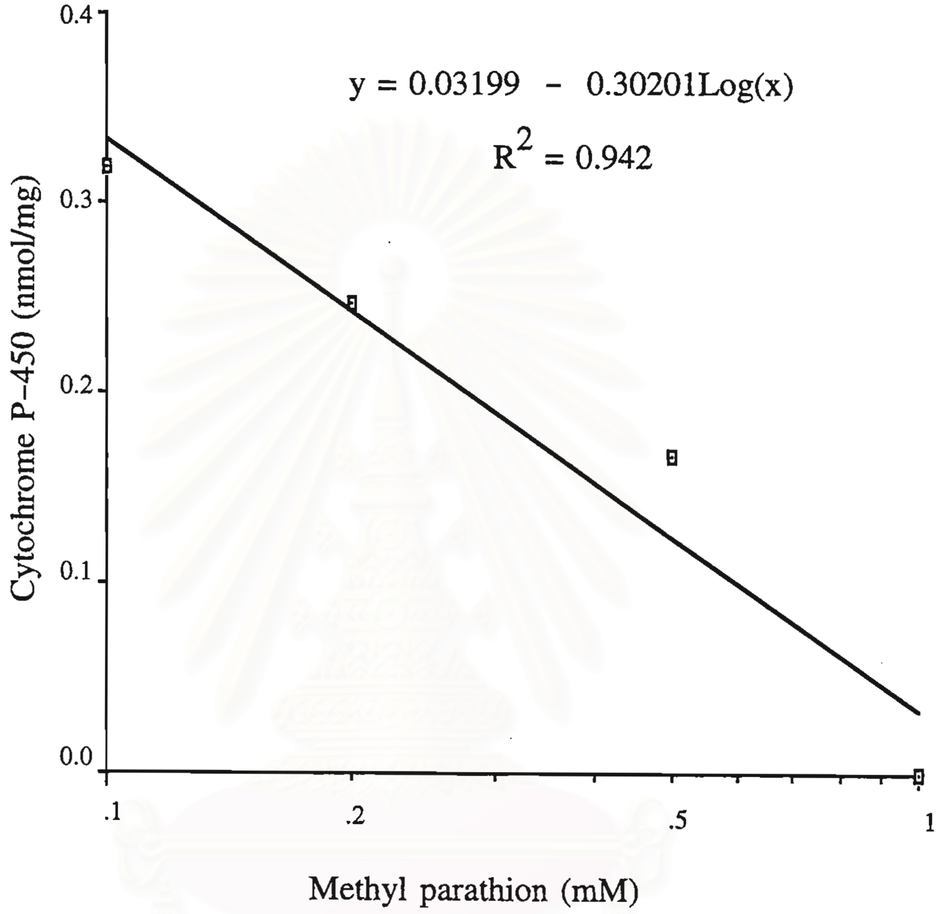
รูปบน แสดงผลในกลุ่มควบคุม

รูปล่าง แสดงผลในกลุ่มที่ได้รับการ incubate ที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยเมทิลพาราไธออน 1.0 mM นาน 30 นาที

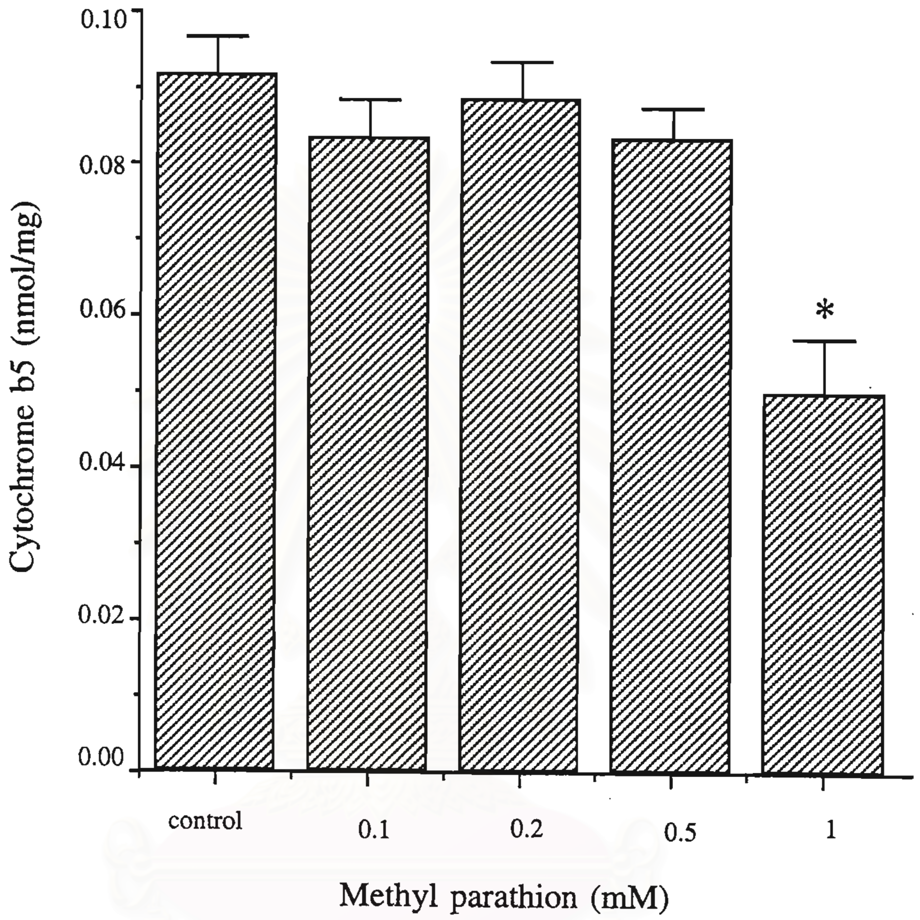


รูปที่ 18 แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 5, 10, 20 และ 30 นาที แต่ละจุดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$

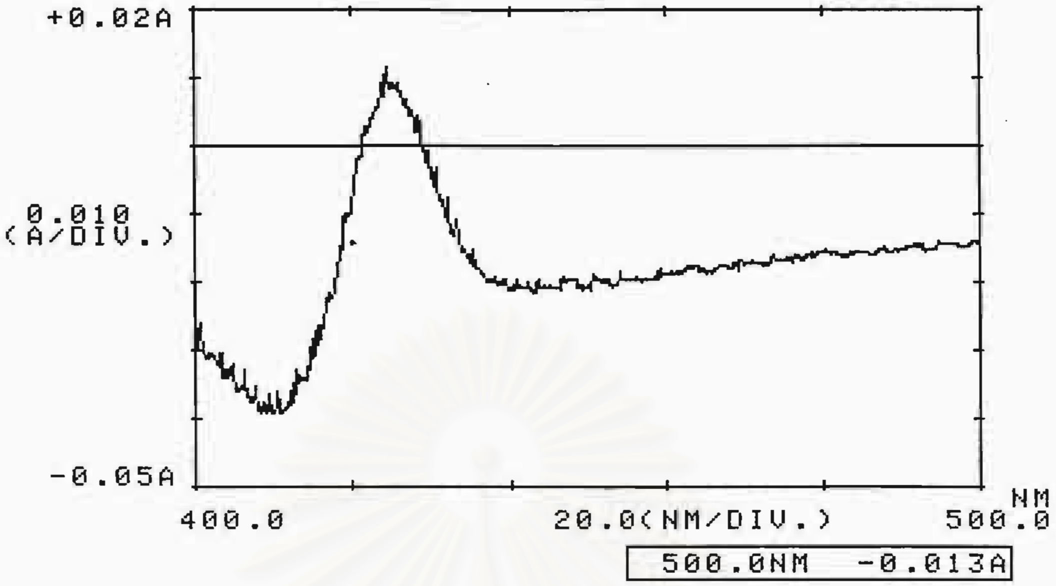


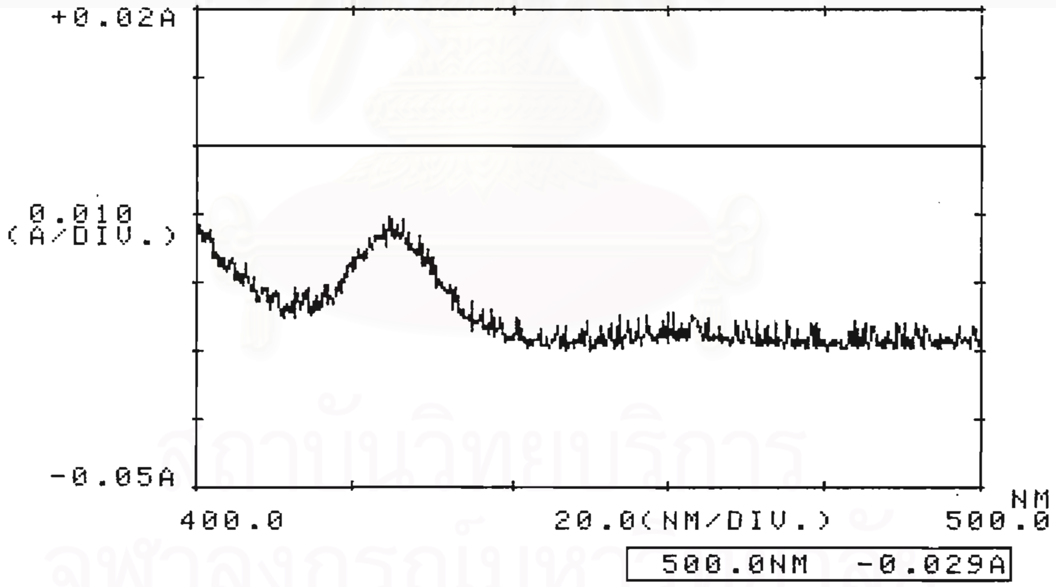
รูปที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของเมทิลพาราไธออน โดยใช้ระยะเวลาในการ incubate นาน 5 นาที



รูปที่ 20 แสดงระดับไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยเมทิลพาราไธออนที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที แต่ละจุดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$





รูปที่ 21 แสดงผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมบี 5

รูปบน แสดงผลในกลุ่มควบคุม

รูปล่าง แสดงผลในกลุ่มที่ได้รับการ incubate ที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยเมททิลพาราไธออน 1.0 mM นาน 30 นาที

3.5 การศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

3.6.1 ผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

พบว่าไตรบิวทิลทินในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมพี 450 (ดังแสดงผลในตารางที่ 20, 21 และรูปที่ 22, 23, 24) และจากการสังเกตพบว่าเมื่อใส่ไตรบิวทิลทินลงไปในไมโครโซมจะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เห็นชัดเจนคือ ไตรบิวทิลทินจะทำให้เกิดการขุ่นขึ้นทันที ซึ่งจะเห็นการเปลี่ยนแปลงนี้ได้อย่างชัดเจนที่ความเข้มข้น 1 mM

สำหรับการศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของไตรบิวทิลทิน โดยใช้ระยะเวลาในการ incubate นาน 30 นาที สามารถคำนวณค่า correlation coefficient (R^2) ได้เท่ากับ 0.841 (ดังแสดงในรูปที่ 25)

3.5.2 ผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

ไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM มีผลทำให้ระดับไซโตโครมบี 5 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$ และพบว่าไตรบิวทิลทิน 1 mM สามารถยับยั้งไซโตโครมบี 5 ได้อย่างสมบูรณ์ สำหรับไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 0.1 และ 0.2 mM ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 (ดังแสดงในตารางที่ 22 และรูปที่ 26, 27)

ตารางที่ 20 แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมหลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ยจาก 6 การทดลอง

ไตรบิวทิลทิน (mM)	ระดับไซโตโครมพี 450 ที่ระยะเวลาต่าง ๆ (nmol/mg)				
	0 นาที	5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
กลุ่มควบคุม (2% ethanol)	0.400±0.022	0.390±0.029	0.400±0.025	0.389±0.034	0.385±0.027
0.1	0.397±0.022	0.364±0.026	0.351±0.028	0.364±0.017	0.352±0.028
0.2	0.387±0.027	0.360±0.028	0.337±0.023	0.354±0.029	0.363±0.029
0.5	0.390±0.028	0.347±0.044	0.356±0.038	0.348±0.030	0.369±0.021
1.0	0.375±0.035	0.312±0.023	0.322±0.030	0.353±0.041	0.332±0.022

ตารางที่ 21 แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นและระยะเวลาต่าง ๆ ค่าที่แสดงเป็นเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ที่เวลาต่าง ๆ จาก 6 การทดลอง

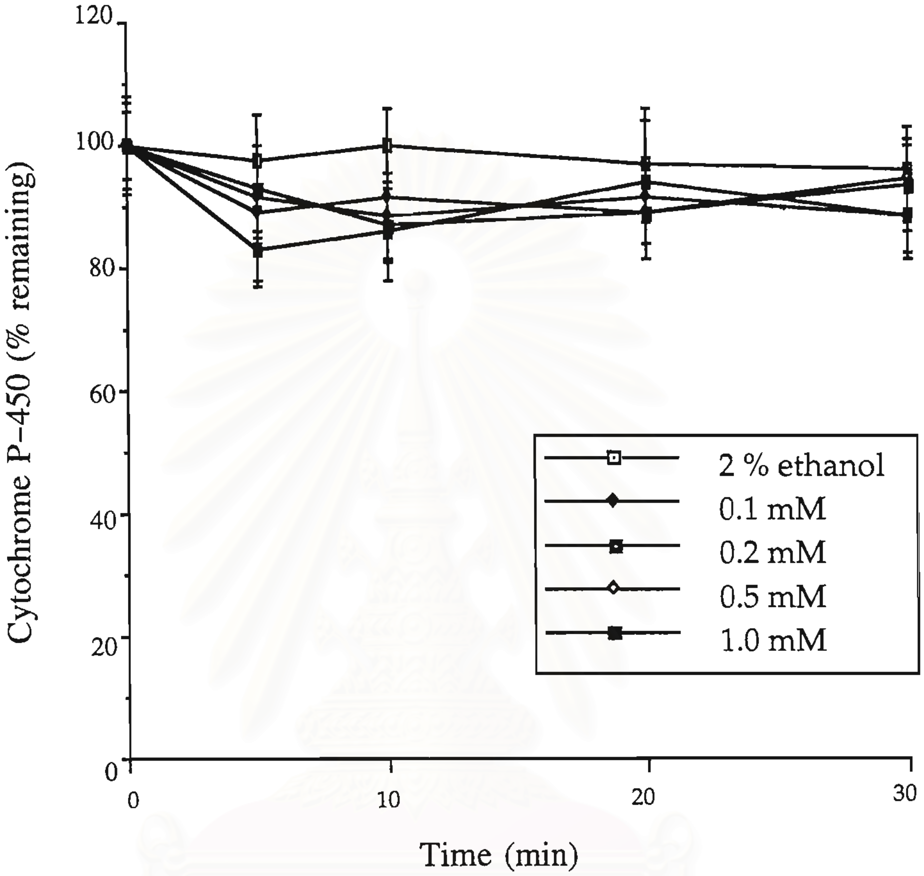
ไตรบิวทิลทิน (mM)	เปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ที่เวลาต่าง ๆ (%)				
	0 นาที	5 นาที	10 นาที	20 นาที	30 นาที
กลุ่มควบคุม (2% ethanol)	100	97.50	100	97.25	96.25
0.1	100	91.73	88.45	91.73	88.7
0.2	100	92.88	86.95	89.2	93.65
0.5	100	88.97	91.28	89.23	94.61
1.0	100	83.20	85.87	94.13	88.53

ตารางที่ 22 แสดงระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

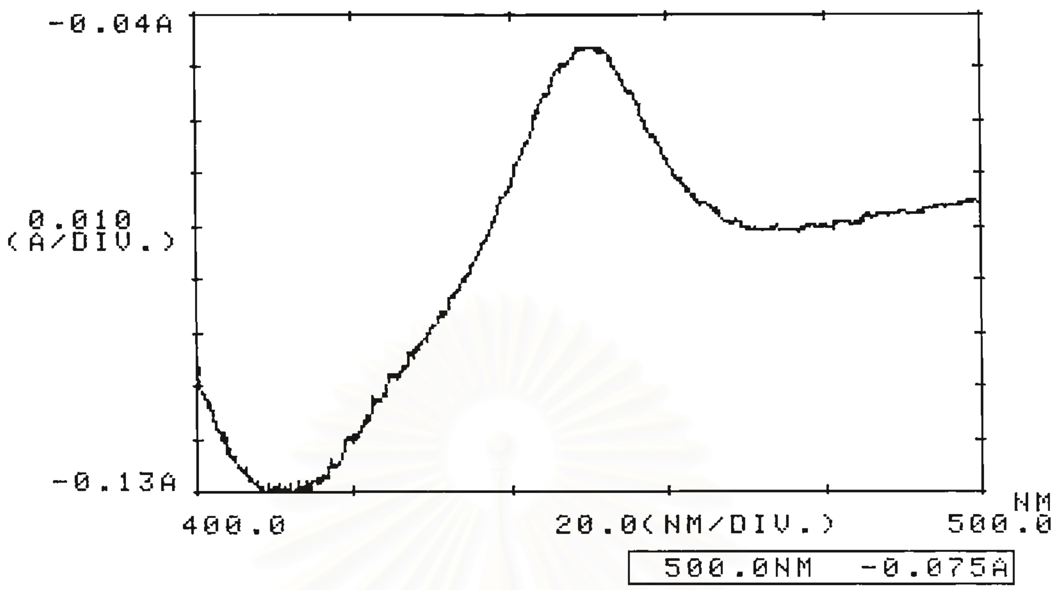
ไตรบิวทิลทิน (mM)	ไซโตโครมพี 450 (nmol/mg)	ไซโตโครมบี 5 (nmol/mg)
กลุ่มควบคุม (2% ethanol)	0.385 ± 0.027	0.122 ± 0.006
0.1	0.352 ± 0.028	0.121 ± 0.009
0.2	0.363 ± 0.029	0.108 ± 0.007
0.5	0.369 ± 0.021	0.084 ± 0.010 *
1.0	0.332 ± 0.022	ND

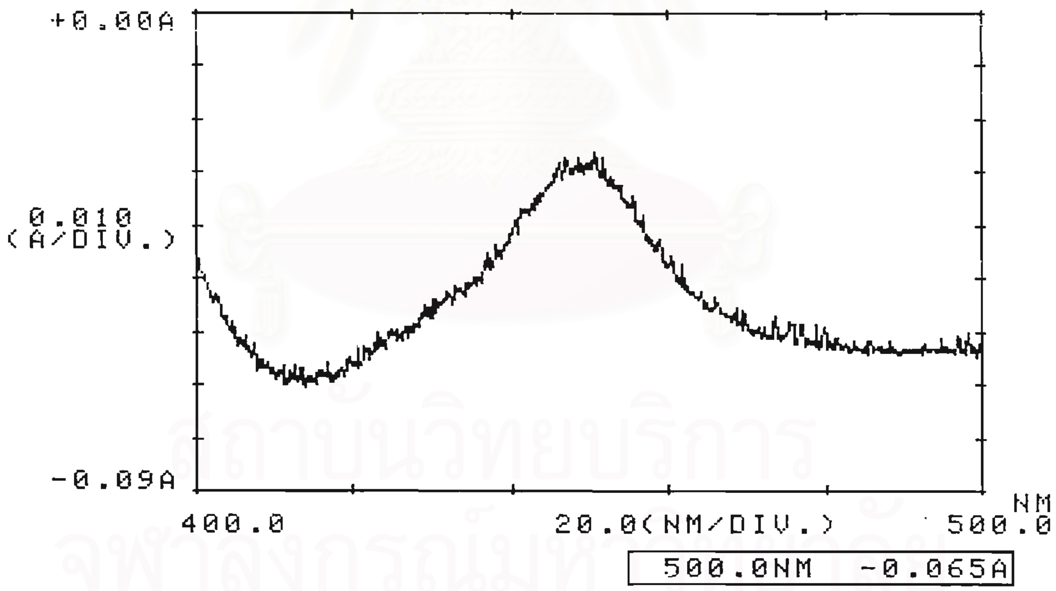
* แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ND : not detectable



รูปที่ 22 แสดงเปอร์เซนต์ไซโตโครมพี 450 ที่เหลืออยู่ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น และระยะเวลาต่าง ๆ แต่ละจุดแสดงเป็น ค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

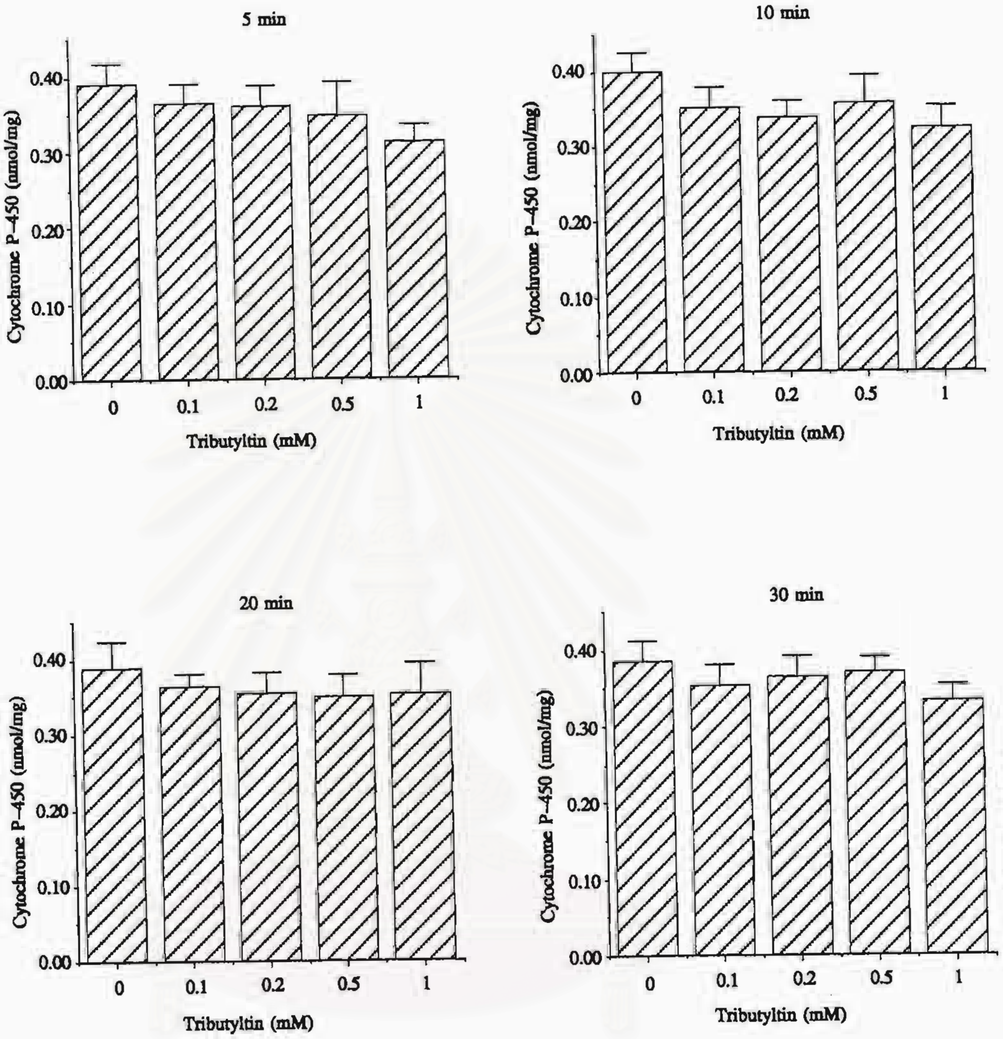




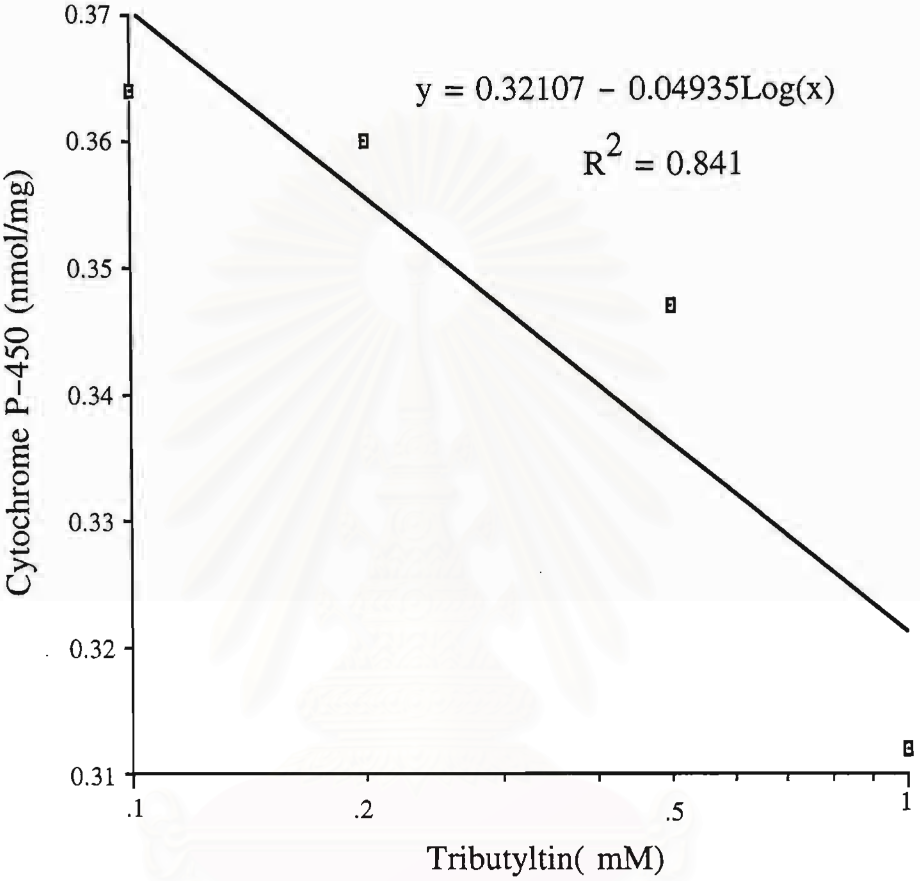
รูปที่ 23 แสดงผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450

รูปบน แสดงผลในกลุ่มควบคุม

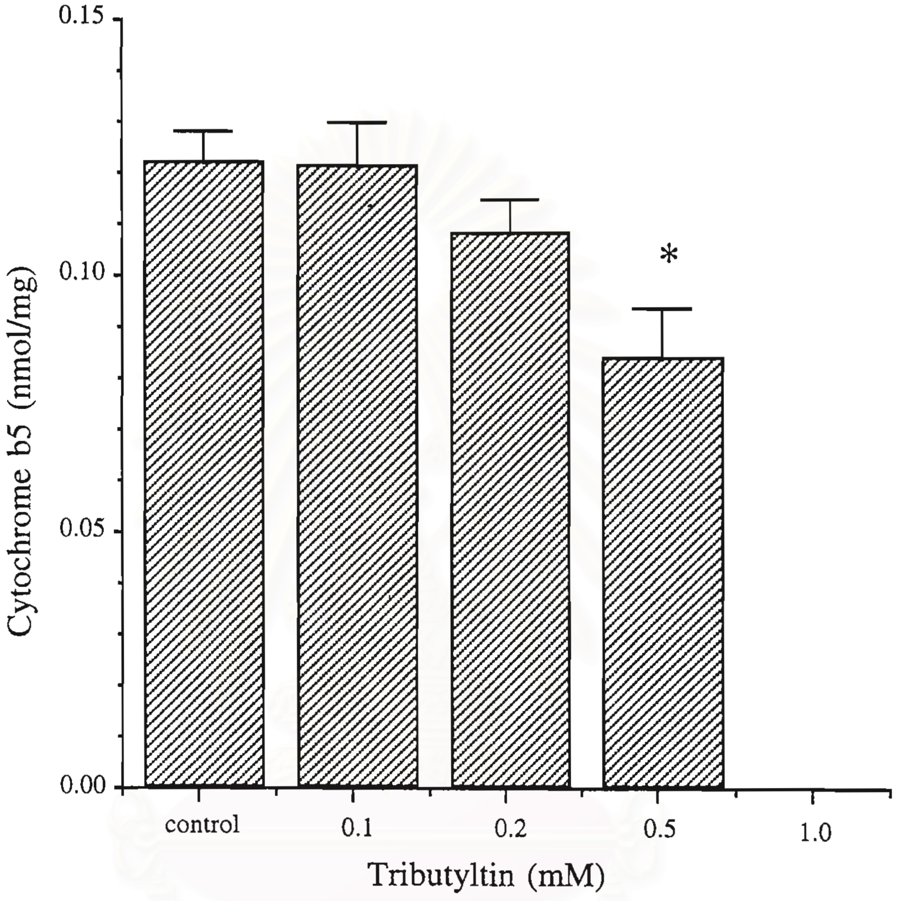
รูปล่าง แสดงผลในกลุ่มที่ได้รับการ incubate ที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยไตรบิวทิลทิน 1.0 mM นาน 30 นาที



รูปที่ 24 แสดงระดับไซโตโครมพี 450 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นต่างๆ นาน 5, 10, 20 และ 30 นาที แต่ละจุดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

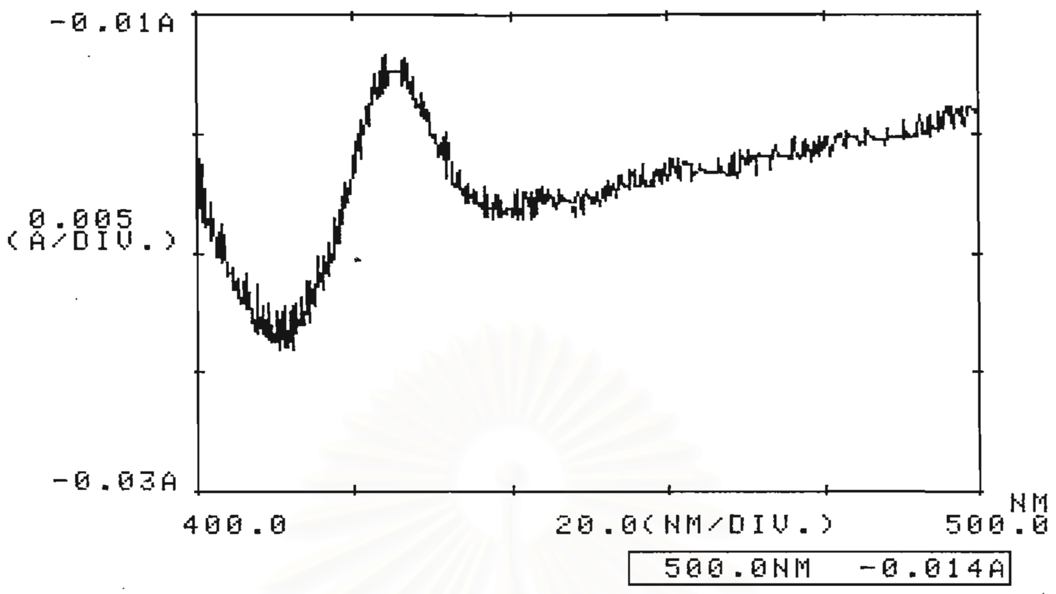


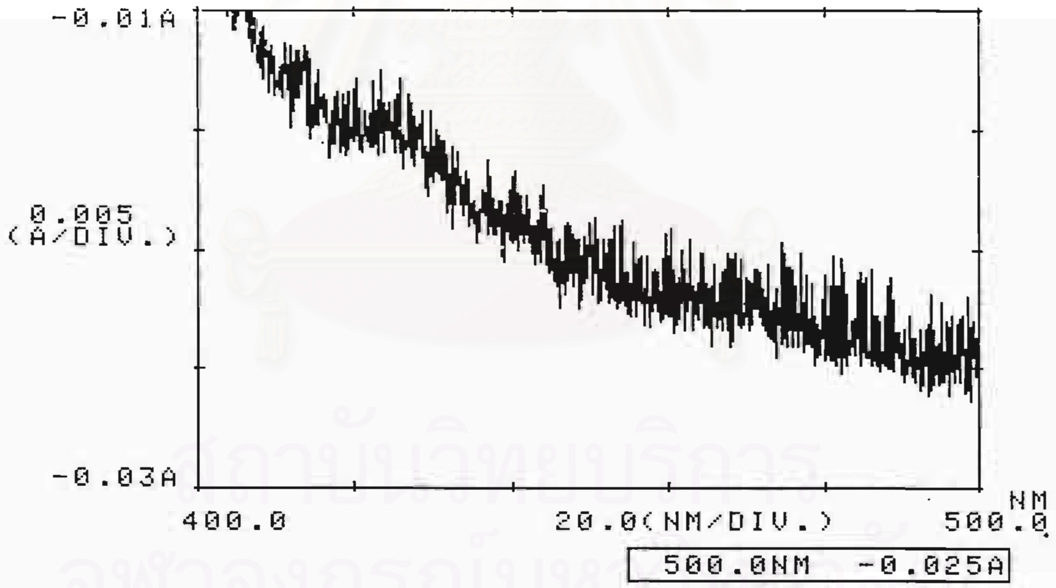
รูปที่ 25 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับไซโตโครมพี 450 กับความเข้มข้นของไตรบิวทิลทิน โดยใช้ระยะเวลาในการ incubate นาน 5 นาที



รูปที่ 26 แสดงระดับไซโตโครมบี 5 ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสม หลัง incubate ด้วยไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้นต่าง ๆ นาน 30 นาที แต่ละจุดแสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย จาก 6 การทดลอง

* แสดงถึงความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p<0.05$





รูปที่ 27 แสดงผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมบี 5

รูปบน แสดงผลในกลุ่มควบคุม

รูปล่าง แสดงผลในกลุ่มที่ได้รับการ incubate ที่อุณหภูมิ 30 °C ด้วยไตรบิวทิลทิน 1.0 mM นาน 30 นาที

[library stamp]

บทที่ 4

อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

4.1 ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

การศึกษาเกี่ยวกับไซโตโครมพี 450 ในปลานั้น นิยมทำการศึกษาในตับมากกว่าในอวัยวะอื่นๆ ทั้งนี้เนื่องจากตับเป็นอวัยวะที่มีหน้าที่ในการเปลี่ยนแปลงยาและสารต่างๆ (Stegeman, Binder and Orren, 1979) แต่อย่างไรก็ตามยังมีการศึกษาพบว่ามีไซโตโครมพี 450 ในอวัยวะอื่นๆ เช่น หัวใจ ลำไส้ ไต และเหงือก แต่จะพบในปริมาณที่น้อยกว่าในตับ (Kaminsky and Fasco, 1992 ; Linstrom, Koivussaan and Hanninen, 1981)

ไซโตโครมบี 5 เป็นองค์ประกอบหนึ่งในเอ็นโดพลาสมิคเร็ทติคิวรัมหรือไมโครโซม พบได้ในอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ตับอ่อน ไต ต่อมหมวกไต รังไข่ และลำไส้ (Strittmatter, 1967) และไซโตโครมบี 5 สามารถถูกรีดิวส์ได้ด้วยเอนไซม์ NADH-cytochrome b5 reductase (Matsubara et al., 1974 ; Abeles, Frey and Jencks, 1992)

วิธีการวัดระดับไซโตโครมพี 450 ที่ได้รับการยอมรับทั่วไป 2 วิธี คือ วิธีการของ Omura และ Sato (1964) และวิธีการของ Stegeman, Binder และ Orren (1979) สำหรับการศึกษาครั้งนี้ประยุกต์ใช้วิธีการของ Stegeman และคณะ (1979) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการวัดไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลา (Van Veld, 1990 ; Stegeman, Teng and Snowberger, 1987 ; Fent and Bucheli, 1994) ผลที่ได้จากการประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 คำนวณค่า %CV ได้เท่ากับ 2.17 และ 4.6 ตามลำดับ ซึ่งอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้ นอกจากนี้ในขั้นตอนของการวัดระดับไซโตโครมพี 450 นั้นมีการใส่ β-NADH ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 10 ไมโครลิตร ลงไปในไมโครโซมเพื่อป้องกันการสลายตัวของไซโตโครมพี 450 ไปเป็นไซโตโครมพี 420 (Fent and Bucheli, 1994) ซึ่งนอกจาก NADH แล้ว ยังพบว่า NADPH ก็สามารถใช้ในการป้องกันการเกิดไซโตโครมพี 420 ได้เช่นเดียวกัน (Stevens, 1974)

4.2 ประเมินค่าความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

การศึกษาเกี่ยวกับไซไตโครมพี 450 ในปลา พบว่ามีปริมาณน้อยกว่าในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) และสลายตัวได้ง่ายในระหว่างการเตรียม (Goksoyr et al., 1987) ในการ

เตรียมไมโครโซมควรเตรียมในอุณหภูมิประมาณ 0-4 °C (Zhang et al., 1991) ปัจจุบันนิยมใช้การวัดระดับไซโตโครมพี 450 ในปลาเป็นดัชนีชี้วัดสภาพแวดล้อมในน้ำ (Andersson and Forlin, 1992 ; Goksoyr, Larsen and Husoy, 1991 ; Goksoyr and Solberg, 1987 ; Forlin and Celander, 1993) ดังนั้นจึงมักพบปัญหาเกี่ยวกับการเก็บรักษาตัวอย่างในระหว่างทำการศึกษา

สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าสามารถเก็บไมโครโซมโดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80°C ได้นาน 1 สัปดาห์ โดยไม่มีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงระดับของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 โดยที่ไมโครโซม suspend อยู่ในบัฟเฟอร์ B ซึ่งประกอบด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.4, 1 mM dithiothreitol และ 20% glycerol ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Forlin และ Andersson (1985) ที่พบว่าสามารถเก็บตัวอย่างไว้ในสภาพที่เป็นไมโครโซม suspend อยู่ในบัฟเฟอร์ที่มี 20% glycerol ได้นาน 1 ปี โดยการแช่แข็งที่อุณหภูมิ -80 °C นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถเก็บตัวอย่างไว้ในสภาพที่ยังเป็นเนื้อตับได้ในไนโตรเจนเหลวนาน 3 วัน โดยจะต้องตัดตับให้มีขนาดประมาณ 0.2-0.4 เซนติเมตร หรือหนักประมาณ 1 กรัม แต่การเก็บเนื้อตับไว้ในน้ำแข็งแห้ง (dry ice) พบว่าระดับไซโตโครมพี 450 จะลดลงอย่างรวดเร็ว

4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับระดับไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450 เป็นส่วนประกอบที่สำคัญมากที่สุดตัวหนึ่งในระบบเอนไซม์ของไมโครโซมมีหน้าที่เกี่ยวกับการเปลี่ยนแปลงยาและสารต่าง ๆ ทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกายและสารที่ได้รับจากภายนอกร่างกาย (Gonzalez, 1989 ; สินธ์ชัย แก้วกิติชัย, 2527) ไซโตโครมพี 450 เป็น multienzyme system มีส่วนประกอบเป็น hemoprotein ทำหน้าที่เป็น oxidase ตัวสุดท้ายในปฏิกิริยาออกซิเดชั่น (พรเพ็ญ เปรมโยธิน, 2536)

สำหรับผลการศึกษาพบว่าปริมาณโปรตีนมีความสัมพันธ์กับระดับไซโตโครมพี 450 โดยในตัวอย่างเดียวกันพบว่าเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนเพิ่มขึ้นระดับไซโตโครมพี 450 ก็จะเพิ่มขึ้นด้วย ในทำนองเดียวกันถ้าความเข้มข้นของโปรตีนลดลงระดับไซโตโครมพี 450 ก็จะลดลงเช่นกัน และพบว่าความเข้มข้นของโปรตีนที่สามารถวัดระดับไซโตโครมพี 450 ได้ผลชัดเจนอยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาของ Stegeman และคณะ (1979) ซึ่งทำการศึกษาในปลา scup (Stenotomus versicolor) พบว่าค่าโปรตีนที่เหมาะสมในการวัดไซโตโครมพี 450 อยู่ในช่วงความเข้มข้น 0.25-2.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

4.4 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ในปลาดุกพันธุ์ผสม

4.4.1 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450

ไซโตโครมพี 450 เป็นเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงสารและยาต่างๆ รวมทั้งสารก่อมะเร็ง ซึ่งพบว่าไซโตโครมพี 450 หลายชนิดเช่น CYP1A1, CYP1A2, CYP2A6, CYP2B6, CYP2D6 และ CYP2E1 มีบทบาทอย่างมากในการเปลี่ยนแปลงสารก่อมะเร็งเช่น aflatoxin B1 ให้เป็นเมตาบอไลท์ที่มีผลในการทำลายเซลล์ (cytotoxicity) และทำให้เกิดมะเร็งในอวัยวะต่างๆ (Crespi et al., 1993) นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตโครมพี 450 สามารถถูกเหนี่ยวนำและยับยั้งได้ด้วยสารหลายชนิด (Miura and Nagai, 1988) โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสัตว์น้ำนั้นพบว่าสารปนเปื้อนที่มีบทบาทสำคัญมากในการเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 คือ polycyclic aromatic hydrocarbon (Van veld et al., 1990) ซึ่งในปัจจุบันมีการศึกษากันมากเกี่ยวกับผลของสารปนเปื้อนในสิ่งแวดล้อมต่อการเปลี่ยนแปลงของไซโตโครมพี 450 สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับสารปนเปื้อนในน้ำนั้นมักนิยมทำการศึกษาในปลาโดยใช้ไซโตโครมพี 450 เป็นดัชนีชี้วัดสภาพของน้ำได้ (Andersson and Forlin, 1992 ; Goksoyr, Larsen and Husoy, 1991 ; Goksoyr and Solberg, 1987 ; Forlin and Celander, 1993)

สำหรับผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้สามารถยับยั้งไซโตโครมพี 450 และความสามารถในการยับยั้งจะเพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออน ซึ่งผลการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Stevens (1974) ซึ่งทำการทดลองในหนูขาว (rat) แบบ in vitro และพบว่าสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตคือ พาราไธออนและมาลาไธออนนั้นสามารถยับยั้งไซโตโครมพี 450 ได้ โดยพบว่าสารทั้งสองชนิดมีผลต่อ reduced form ของไซโตโครมพี 450 มากกว่า oxidized form ทั้งพาราไธออนและมาลาไธออนทำให้ไซโตโครมพี 450 ถูกทำลายและเปลี่ยนเป็นไซโตโครมพี 420 และมีการศึกษาพบว่ากลไกการยับยั้งไซโตโครมพี 450 เกิดขึ้นเนื่องจากในระหว่างกระบวนการเมตาบอลิสมของสารเหล่านี้มีการปล่อยอะตอมซัลเฟอร์ออกมาจับกับ amino acid residue ตรงตำแหน่ง active site ของไซโตโครมพี 450 ทำให้เกิดการทำลายไซโตโครมพี 450 ซึ่งเป็นลักษณะของ irreversible inhibition (Walker and Johnston, 1993 ; Halpert, Hammond and Neal, 1980) ลักษณะการยับยั้งนี้ไม่เหมือนกับผลการศึกษาครั้งนี้ที่พบว่าเมททิลพาราไธออนทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลง โดยไม่มีการเปลี่ยนไปเป็นไซโตโครมพี 420 แสดงว่าเมททิลพาราไธออนไม่มีผลในการทำลายไซโตโครมพี 450 แต่น่าจะมีผลในการแย่งจับกับ binding site ของไซโตโครมพี 450 กับก๊าซคาร์บอนมอนนอกไซด์ จึงวัดระดับไซโตโครมพี 450 ได้น้อยลง ลักษณะการยับยั้งที่แตกต่างกันนี้ อาจเนื่องจากว่าแม้เมททิลพาราไธออนจะเป็นสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเช่นเดียวกับพาราไธออนและมาลาไธออนก็ตาม แต่การยับยั้ง

ไซโตโครมพี 450 โดยสารต่างชนิดกันย่อมมีโอกาสให้ผลที่แตกต่างกันได้ (Sasame and Stripp, 1973) และการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในปลาย่อมมีโอกาสให้ผลการศึกษาที่ต่างจากการศึกษาในหนูได้ เนื่องจากไซโตโครมพี 450 ที่พบในสิ่งมีชีวิตแต่ละชนิด หรือแม้แต่ชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็พบว่ามีความแตกต่างกันทั้งในด้านโครงสร้างและหน้าที่ของเอนไซม์ (Guengerich, 1992) มีการศึกษาพบว่าหนู mice สายพันธุ์ DBA2 ไม่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วย 3-methylcholanthrene ในขณะที่หนู mice สายพันธุ์ C57 จะถูกเหนี่ยวนำให้มีไซโตโครมพี 450 สูงขึ้น เมื่อได้รับสารดังกล่าว (Sipes and Gandolfi, 1986) และความแตกต่างที่เห็นชัดเจนอีกประการหนึ่งคือ มีชนิดของไซโตโครมพี 450 ที่แตกต่างกัน (Guengerich, 1992 ; Juchau, 1990 ; Gonzalez, 1989) และไซโตโครมพี 450 แต่ละชนิดจะไว (sensitive) ต่อสารยับยั้งเอนไซม์แตกต่างกัน (Sipes and Gandolfi, 1986)

ไซโตโครมพี 450 มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงสารปราบศัตรูพืชใน 2 ลักษณะคือ 1. การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างแล้วทำให้ได้สารที่มีฤทธิ์น้อยลงหรือไม่มีฤทธิ์เลย (detoxification) และ 2. เป็นการเปลี่ยนแปลงแล้วทำให้ได้เมตาบอไลท์ที่มีความเป็นพิษหรือสามารถออกฤทธิ์ได้ (activation) (Hodgson et al., 1993) และไซโตโครมพี 450 แต่ละชนิดจะมีผลต่อ activation และ detoxification ไม่เท่ากัน จากการศึกษาของ Sultatos (1986) พบว่าการเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 ด้วยฟีโนบาร์บิทอลในหนูถีบจักร (mouse) มีผลทำให้มีการเพิ่มเมตาบอไลท์ของพาราไธออนที่ไม่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส คือ p-nitrophenylsulfate, p-nitrophenol และ p-nitrophenyl glucuronide โดยไม่มีผลในการเพิ่มพาราออกซอน ซึ่งแสดงให้เห็นว่าฟีโนบาร์บิทอลมีผลเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 ที่มีบทบาทต่อ detoxification เท่านั้น ดังนั้นจากผลการศึกษาครั้งนี้ซึ่งพบว่าเมทิลพาราไธออนยับยั้งไซโตโครมพี 450 นั้น ก็ไม่สามารถสรุปได้ว่าการยับยั้งไซโตโครมพี 450 นี้จะเป็นผลดีในด้านของการช่วยลดความเป็นพิษของเมทิลพาราไธออน โดยการยับยั้งการเปลี่ยนเป็นเมทิลพาราออกซอนซึ่งเป็นเมตาบอไลท์ที่มีผลในการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรส ทั้งนี้เนื่องจากยังขาดข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของไซโตโครมพี 450 ที่ถูกเมทิลพาราไธออนยับยั้ง และไซโตโครมพี 450 ชนิดนั้นมีผลต่อ activation หรือ detoxification ของเมทิลพาราไธออน

4.4.2 การศึกษาผลของเมทิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมบี 5

ไซโตโครมบี 5 เป็นไซโตโครมอีกเพียงชนิดเดียวที่พบในเอ็นโดพลาสมิคเร็ทติคิวรัมหรือไมโครโซม (ซึ่งเป็นตัวแสดงสีแดงเข้มในไมโครโซม) เป็นไซโตโครมที่ถูกรีดิวส์ได้ด้วยเอนไซม์ NADH-cytochrome b5 reductase ต่อจากนั้นจะส่งอีเล็คตรอนให้กับไซโตโครมพี 450 (Abeles, Frey and Jencks, 1992)

ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนที่ความเข้มข้น 1 mM เท่านั้นที่มีผลทำให้ระดับไซโตโครมบี 5 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $P<0.05$ ซึ่งการศึกษาเกี่ยวกับผลของเมททิลพาราไธออนต่อไซโตโครมบี 5 นั้นยังไม่พบรายงานการศึกษามาก่อน สำหรับการศึกษาผลของสารปราบศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเช่น พาราไธออนต่อระบบการเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอน (electron transfer system) พบว่าพาราไธออนมีผลในการยับยั้ง NADPH-cytochrome c reductase และ NADH-cytochrome c reductase (Neskovic, Vitorovic and Plesnicar, 1973)

4.5 การศึกษาผลของไตรบิลทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

4.5.1 การศึกษาผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450

การศึกษาเกี่ยวกับไซโตโครมพี 450 ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม (mammal) นั้น เป็นที่นิยมทำการศึกษากันมาก (Beaune et al., 1985 ; Buters, Schiller and Chou, 1993 ; Matsubara et al., 1974 ; Shimada, Misono and Guengerich, 1986) และเป็นที่ทราบกันดีแล้วว่าไซโตโครมพี 450 มีบทบาทต่อการเปลี่ยนแปลงสารต่าง ๆ ทั้งสารที่มีอยู่ในร่างกาย (endogenous) และสารจากภายนอก (exogenous) (Gonzalez, 1989) นอกจากนี้ยังพบว่าไซโตโครมพี 450 แต่ละชนิดจะมีคุณสมบัติเฉพาะที่แตกต่างกันเช่น การตอบสนองต่อสารต่าง ๆ ที่มีผลในการเหนี่ยวนำหรือยับยั้งเอนไซม์ ชนิดของสับสเตรท คุณสมบัติในการดูดกลืนแสง น้ำหนักโมเลกุล และการเรียงตัวของกรดอะมิโน (Guengerich, 1979) สำหรับการศึกษาเกี่ยวกับไซโตโครมพี 450 ในปลานั้นเริ่มมีการศึกษาในปี 1979 โดย Bend และคณะ และจากการเปรียบเทียบคุณสมบัติของไซโตโครมพี 450 ในปลากับในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมพบว่า P-450 LM4b ในปลา rainbow trout , P-450E ในปลา scup และ P-450c ในปลา athlantic cod พบว่ามีคุณสมบัติหลายประการที่คล้ายคลึงกับ P-450LM4b ในกระต่าย, P-450c ในหนู rat และ P_1-450 ในหนู mouse (Goksoyr et al., 1986) แต่คุณสมบัติที่แตกต่างกันประการหนึ่งคือไซโตโครมพี 450 ในปลาจะไม่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยสารฟีโนบาร์บิทอล (Kleinow, Melancon and Lech, 1987 ; Elskus and Stegeman, 1989)

สำหรับการศึกษาครั้งนี้พบว่าไตรบิวทิลทินในทุกความเข้มข้นที่ทำการศึกษา ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมพี 450 แต่จากการศึกษาของ Rosenberg และ Drummond (1983) ในหนู rat ที่ได้รับการเหนี่ยวนำไซโตโครมพี 450 ด้วย enzyme inducer สามชนิด คือ phenobarbital, β-napthoflavone และ 3-methylcholanthrene พบว่าไตรบิวทิลทินออกไซด์มีผลทำให้ไซโตโครมพี 450 ลดลง และเปลี่ยนเป็นไซโตโครมพี 420 นอกจากนี้การให้สารเหนี่ยวนำทั้งสามชนิดดังกล่าวมาแล้วนั้นทำให้มีไซโตโครมพี 450 บางชนิดถูกเหนี่ยวนำผลทำให้ไตรบิวทิลทินสามารถยับยั้งไซโตโครมพี 450 ในแต่ละกลุ่มได้แตกต่างกัน และแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับ

การเหนี่ยวนำด้วยสารใดๆ ทั้งนี้เนื่องจากไซโตโครมพี 450 แต่ละชนิดจะไว (sensitive) ต่อสารยับยั้งเอนไซม์แตกต่างกัน (Sipes and gandolfi, 1986) สำหรับการศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาในปลาดุกที่ไม่ได้รับการเหนี่ยวนำด้วยสารใดๆ และผลการศึกษาที่แตกต่างกันนี้อาจเนื่องมาจากความแตกต่างของสิ่งมีชีวิตที่ทำการศึกษา หรือแม้แต่ในสิ่งมีชีวิตชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์ก็สามารถให้ผลการศึกษาที่แตกต่างกันได้ (Guengerich, 1992) เช่นการศึกษาที่พบว่าไซโตโครมพี 450 ในปลาจะไม่ตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำด้วยสารฟีโนบาร์บิทอลดังกล่าวมาแล้วข้างต้น นอกจากนี้อุณหภูมิที่ใช้ในการ incubate นั้นก็มีความสำคัญมาก การศึกษาของ Rosenberg และ Drummond (1983) ที่กล่าวมาข้างต้น พบว่าการ incubate ที่อุณหภูมิ 37 °C นั้น แม้แต่กลุ่มควบคุมซึ่ง incubate ด้วยเอธานอลก็พบว่ามีระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงไม่น้อยกว่า 10 % และการศึกษาในสัตว์น้ำนั้นมีการศึกษาพบว่าการ incubate ที่อุณหภูมิ 30 °C จะทำให้ไซโตโครมพี 450 มี activity สูงสุด และอุณหภูมิที่มากกว่า 30 °C มีผลทำให้ enzyme activity ลดลง (Stegeman, Binder and Orren, 1979 ; Monod, Devaux and Riviere, 1987) นอกจากนี้การศึกษาผลของสารต่างๆ ต่อไซโตโครมพี 450 นั้น ควรต้องคำนึงถึงอายุ และเพศของสัตว์ทดลองด้วย (Forlin, 1980) นอกจากนี้ชนิดของสารที่ทำการศึกษาก็มีความสำคัญในการทำให้ได้ผลการศึกษาที่แตกต่างกัน จากการศึกษาของ Fent และ Bucheli (1994) โดยทำการศึกษาผลของสารประกอบออร์กาโนทินสองชนิดคือ ไตรบิวทิลทินและไตรฟีนิวทินในปลาน้ำจืดสามชนิด พบว่าไตรฟีนิวทินสามารถยับยั้งไซโตโครมพี 450 และ NADPH-cytochrome c reductase ได้มากกว่าไตรบิวทิวทิน นอกจากนี้ยังพบว่าผลการยับยั้งนี้จะแตกต่างกันในปลาแต่ละชนิด

สำหรับการศึกษาที่พบว่าไตรบิวทิลทินทำให้เกิดการขุ่นขึ้นทันทีที่ใส่ลงไปในไมโครโซม เนื่องจากไตรบิวทิลทินทำให้เกิดการเสียสภาพของโปรตีน (Fent and Bucheli, 1994)

4.5.2 การศึกษาผลของไตรบิลทิลทินต่อระดับไซโตโครมบี 5

ไตรบิวทิลทินที่ความเข้มข้น 0.5 และ 1.0 mM มีผลทำให้ระดับไซโตโครมบี 5 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ p<0.05 และพบว่าไตรบิวทิลทิน 1 mM สามารถยับยั้งไซโตโครมบี 5 ได้อย่างสมบูรณ์ ซึ่งผลการศึกษานี้ต่างจากการศึกษาในออร์กาโนทินสองชนิดคือ ไตรบิวทิลทินคลอไรด์ และไตรฟีนิวทินคลอไรด์ ซึ่งพบว่าไม่มีผลต่อไซโตโครม บี 5 (Fent and Bucheli, 1994 ; Fent and Stegeman, 1993) ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของสารที่ใช้ในการศึกษาและสัตว์ทดลองที่ใช้ต่างสายพันธุ์กัน ทำให้ได้ผลการทดลองที่แตกต่างกันได้ (Guengerich, 1992 ; Sasame and Stripp, 1973) สำหรับผลของออร์กาโนทินต่อระบบการเคลื่อนย้ายอีเล็คตรอน (electron transfer system) พบว่าไตรบิวทิลทินคลอไรด์มีผลยับยั้ง NADH-cytochrome b5 reductase และไตรฟีนิวทินคลอไรด์มีผลยับยั้ง NADPH-cytochrome P-450 reductase (Fent and Bucheli, 1994 ; Fent and Stegeman, 1991) แต่จากการศึกษา

ของ Fent and Stegeman (1991) ในปลา scup (Stenotomus chrysops) พบว่าไตรบิวทิลทินคลอไรด์ทำให้มีการเพิ่มขึ้นของ NADH-cytochrome b5 reductase.

สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนมีผลในการยับยั้งไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ซึ่งจากผลการศึกษานี้สามารถนำไปใช้เป็นแนวทางในการทดสอบสารพิษโดยใช้วิธีการทางชีวภาพ (biomarker) ร่วมกับการตรวจหาความเป็นพิษของเมททิลพาราไธออนในการยับยั้งเอนไซม์โฆลีนเอสเทอเรสในสมองและกล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นดัชนีชี้วัดที่สำคัญในการศึกษาความเป็นพิษของเมททิลพาราไธออน สำหรับผลของไตรบิวทิลทินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 นั้น จากการศึกษาครั้งนี้พบว่าไตรบิวทิลทินไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมพี 450 แต่มีผลยับยั้งไซโตโครมบี 5 โดยที่การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลทินต่อระดับของไซโตโครมพี 450 เท่านั้น ทำให้ขาดข้อมูลเกี่ยวกับชนิดของไซโตโครมพี 450 ที่ถูกยับยั้ง นอกจากนี้ยังมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษาถึงผลของสารทั้งสองต่อ enzyme activity ของไซโตโครมพี 450 ซึ่งจะทำให้ได้ผลการศึกษาที่ชัดเจนและครอบคลุมมากขึ้น และการศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาโดยการแยกตับออกมาทำการศึกษาภายนอกร่างกาย (in vitro) ซึ่งผลการศึกษาที่ได้จะมีความเหมือนหรือแตกต่างอย่างไรกับการศึกษาโดยการให้ปลาได้สัมผัสกับสารทั้งสองในขณะที่ปลายังมีชีวิตอยู่(in vivo) ยังไม่พบรายงานการศึกษาด้วยวิธีการดังกล่าวนี้ในปลาดุกพันธุ์ผสมระหว่างปลาดุกรัสเซียกับปลาดุกอุยซึ่งเป็นปลาที่นิยมเลี้ยงกันมากในประเทศไทย ดังนั้นจึงมีความน่าสนใจที่จะทำการศึกษา ต่อไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กัลยา วัฒยากร. ผลกระทบจากการใช้สารเคมี (น้ำมันดิบและดีบุกอินทรีย์) ต่อระบบนิเวศน์ทางทะเล. ใน การประชุมวิชาการประจำปี 2531 ของสมาคมพิษวิทยา แห่งประเทศไทย เรื่อง พิษวิทยาทางอุตสาหกรรมและสิ่งแวดล้อม. หน้า 171-178. กรุงเทพมหานคร : ธัญญะการพิมพ์, 2531.

แก้ว กังสดาลอำไพ. พิษวิทยา : หลักการเบื้องต้น ประยุกต์อาหารและโภชนาการ. นครปฐม : สำนักพิมพ์สถาบันวิจัยโภชนาการ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2537.

ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ธีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และ ปัญญา เต็มเจริญ. หลักการทางพิษวิทยา. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาสรีรวิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, 2536.

เติมศรี ชำนาญกิจ. สถิติประยุกต์ทางการแพทย์. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2531.

บราลี ทุมกานนท์. การเพาะเลี้ยงและอนุบาลปลาดุกยักษ์, 2533. (ม.ป.ท.)

ประมง, กรม. การเพาะเลี้ยงปลาดุกบิ๊กอุย. กรุงเทพมหานคร : โรงพิมพ์ชุมชนสหกรณ์การเกษตรแห่งประเทศไทยจำกัด. (ม.ป.ป.)

ภัทรา หาญจริยากูล. การศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษในขนาดที่ไม่ทำให้ตายของเมทิลพาราไธออนต่อปลากระพงขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.

พรเพ็ญ เปรมโยธิน. เภสัชวิทยา (pharmacokinetics). กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาชีววิทยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2536.

วิทย์ ธารชลานุกิจ. การเพาะเลี้ยงปลากระพงขาว. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สำนักพิมพ์ช่องนนทรี, 2531.

วิทูร อัตถโน และไพโรจน์ อุ่นสมบัติ. พิษวิทยาคลีนิค : ยาปราบศัตรูพืช. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : เรือนแก้วการพิมพ์, 2529.

วรา พานิชเกรียงไกร และคณะ. ผลของเมทิลพาราไธออนต่อระดับโฆลีนเอสเทอเรสในซีรัมปลาดุก. เวชสารสัตวแพทย์. 23 (2536) : 203-211.

สถาพร สุวรรณรักษ์. การศึกษาพิษเฉียบพลันของเมทิลพาราไธออนต่อกุ้งกุลาดำ. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535.

สินธุ์ชัย แก้วกิติชัย. ชีวเภสัชศาสตร์ เรื่อง เภสัชชีวภาพ. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพมหานคร : ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2527.

ภาษาอังกฤษ

Abeles, R. H., Frey, P. A., and Jencks, W. P. Biochemistry. London : Jones and Bartlett Publishers, 1992.

Alzieu, C., et al. Monitoring and assessment of butyltins in Atlantic waters. Mar. Poll. Bull. 20 (1989) : 22-26.

Anders, G., and Solberg, T. S. Cytochrome P-450 in fish larvae : immunochemical detection of responses to oil pollution. Sarsia. 72 (1987) : 405-407.

Andersson, T., and Koivusaari, U. Influence of environmental temperature on the induction of xenobiotic metabolism by β-naphthoflavone in rainbow trout, Salmo gairdneri. Toxicol. Appl. Pharmacol. 80 (1985) : 43-50.

Andersson, T., and Forlin, L. Regulation of cytochrome P450 enzyme system in fish. Aquat. Toxicol. 24 (1992) : 1-20.

Batley, G. E., Scammell, M. S., and Brockbank, C. I. The impact of tributyltin-based antifouling paints on the Sydney rock oyster, Saccostrea commercialis. Sci Total Environ. 122 (1992) : 301-314.

Beaune, P., Flinois, J. P., Kiffel, L., Kremers, P., and Leroux, J. P. Purification of a new cytochrome P-450 from human liver microsomes. Biochem. Biophys. Act. 840 (1985) : 364-370.

Beaune, P., et al. Expression of cytochrome P-450 enzymes in cultured human hepatocytes. Eur. J. Biochem. 191 (1990) : 437-444.

Benke, G. M., Cheever, K. L., Mirer, F. E., and Murphy, S. D. Comparative toxicity anticholinesterase action and metabolism of methyl parathion and parathion in sunfish and mice. Toxicol. Appl. Pharmacol. 28 (1974) : 97-109.

_______, and Murphy, S. D. The influence of age on the toxicology and metabolism of methyl parathion and parathion in male and female rats. Toxicol. Appl. Pharmacol. 31 (1975) : 254.

Blunden, S. J., and Chapman, A. Organotin compounds in the environment. In P.J. Craig. Organometallic Compounds in Environment. pp. 111-159. (n.p.),1986.

Brosen, Kim., et al. Fluvoxamine is a potent inhibitor of cytochrome P450IA2. Clin. Pharmacol. Ther. 52 (1992) : 6-9.

Bradford, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72 (1976) : 248-254.

Bridges, J. W., Davies, D. S., and Williams, R. T. The fate of ethyltin and derivatives in the rat. Biochem. J. 105 (1967) : 1261-1267.

Brook, L. T., et al. Acute toxicity and chronic effects of bis(tri-n-butyltin)oxide to several species of freshwater organisms. Partial Fulfillment of Work Assignment, December. pp. 1-20. Battelle Memorial Research Institute. 1986.

Bursian, S. J., and Lehning, E. J. Effect of β-naphthoflavone on o-tolyl saligenin phosphate-induced delayed neuropathy in two lines of chickens. J. Toxicol. Environ. Health. 28 (1989) : 461-471.

Buters, J. T. M., Schiller, C. D., and Chou, R. C. A highly sensitive tool for the assay of cytochrome P450 enzyme activity in rat, dog and man. Biochem. Pharmacol. 46 (1993) : 1577-1584.

Carpenter, H. M., Fredrickson, L. S., Williams, D. E., Buhler, D. R., and Curtis, L. R. The effect of thermal acclimation in the activity of arythydrocarbon hydroxylase in rainbow trout (Oncorhynchus mykiss). Comp. Biochem. Physiol. 97C (1990) : 127-132.

Crespi, C. L., et al. Genetic toxicology using human cell lines expressing human P-450. J. biochem. soc. Trans 21 (1993) : 1023-1028.

Coppage, D. L., and Matthews, E. Short-term effect of organophosphate pesticides on) : inesterases of estuarine fishes and pink shrimp. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 11 (1974) : 483-488.

Dean, J. H., Murray, M. J., and Ward, E. C. Systemic toxicology. In C. D. Klaassen, M. O. Amdur and J. Doull (eds.) Casarett and Doull's Toxicology : The Basic Science of Poison. 3 rd ed. p. 276. New York : Macmillan Publishing Company, 1986.

Doull, J., Klaassen, C. D., and Amdur, M. O. Carsarett and Doull's Toxicology, The Basic Science of Poisons. 2 nd ed. New York : Macmillan Publishing Co., Inc, 1980.

Eliser, R. Acute toxicities of insecticides to marine decapod crustacean. Crustaceana. 16 (1970) : 302-310.

Elskus, A. A., and Stegeman, J. J. Further consideration of phenobarbital effects on cytochrome P-450 activity in the killifish, Fundulus heteroclitus. Comp. Biochem. Physiol. 92C (1989) : 223-230.

Fent, K. Organotin speciation in municipal wastewater and sewade sludge : ecotoxicological consequences. Mar. Environ. Res. 28 (1989) : 477-483.

_______, and Bucheli, T. D. Inhibition of hepatic microsomal monooxygenase system by organotins in vitro in freshwater fish. Aquat. Toxicol. 28 (1994) : 107-126.

_______, and Stegeman, J. J. Effects of tributyltin chloride in vitro on the hepatic microsomal monooxygenase system in the fish (Stenotomus chrysops). Aquat. Toxicol. 20 (1991) : 159-168.

_______, and Stegeman, J. J, Effects of tributyltin in vivo on hepatic cytochrome P-450 forms in marine fish. Aquat. Toxicol. 24 (1993) : 219-240.

Fernando, J. C. R., Lim, D. K., Hoskins, B., and Ho, I. K. Variability of neurotoxicity of and lack of tolerance to the anticholinesterases soman snd sarin in the rat. Res. Com. Chem. Path. Pharm. 3 (1985) : 415-427.

Fish, R. H., Kimmel, E. C., and Casida, J. E. Bioorganotin chemistry : reactions of tributyltin derivatives with a cytochrome P-450 dependent monooxygenase enzyme system. J. Organomet. Chem. 118 (1976) : 41-54.

Forlin, L. Effects of clophen A50, 3-methylcholanthrene, progesterone-16α-carbonitrile and phenobarbital on the hepatic microsomal cytochrome P-450 dependent monooxygenase system in rainbow trout, Salmo gairdneri, of different age and sex. Toxicol. Appl. Pharmacol. 54 (1980) : 420-430.

_______, and Andersson, T. Storage conditions of rainbow trout liver cytochrome P-450 and conjugating enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 803 (1985) : 569-572.

_______, and Celander, M. Induction of cytochrome P4501A in teleosts : environmental monitoring in swedish fresh, brackish and marine waters. Aquat. Toxicol. 26 (1993) : 41-56.

Garrigue, H., et al. Disposition and metabolism of two acetylcholinesterase reactivators, pyrimidoxime and H16, in rats submitted to organophosphate poisoning. Xenobiotica. 20 (1990) : 699-709.

Goksoyr, A., and Forlin, L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. Aquat. Toxicol. 22 (1992) : 287-312.

_______, Andersson, T., Hansson, T., Klungsoyr, J., Zhang, Y. S., and Forlin, L. Species characteristics of the hepatic xenobiotic and steroid biotransformation system of two teleost fish, atlantic cod (Gadus morhua) and rainbow trout (Salmo gairdneri). Toxicol. Appl. Pharmacol. 89 (1987) : 347-360.

_______, Larsen, H. E., and Husoy, A. M. Application of a cytochrome P-450 IA1-ELISA in environmental monitoring and toxicological testing of fish. Comp. Biochem. Physiol. 810 (1991) : 157-160.

_______, and Solberg, T. S. Cytochrome P-450 in fish larvae : immunochemical detection of responses to oil pollution. Sarsia. 72 (1987) : 405-407.

Goksoyr, A., et al. An immunological comparison of microsomal β-naphthoflavone-inducible cytochrome P-450 isozymes in different fish species. Aquat. Toxicol. 11 (1986) : 432-433.

Gonzalez, F. J. Molecular genetics of the P-450 superfamily. Pharmacol. Ther. 45 (1990) : 1-38.

_______, The molecular biology of cytochrome P-450s. Pharmacol. Rev. 40 (1989) : 243-287.

_______, and Idle, J. Pharmacogenetic phenotyping and genotyping present status and future potential. Clin Pharmacokinet. 26 (1994) : 59-70.

Griffin, G., and Hill, N. Methylparathion. IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risk of Chemicals to Humans. 1983.

Guengerich, F. P. Human cytochrome P-450 enzymes. Life Sci. 50 (1992) : 1471-1478.

_______, Inhibition of oral contraceptive steroid-metabolizing enzymes by steroids and drugs. Am. J. Obstet. Gynecol. 163 (1990) : 2159-2163.

_______, Isolation and purification of cytochrome P-450 and the existence of municiple forms. Pharmcol. Ther. 6 (1979) : 99-121.

Halpert, J., Hammond, D., and Neal, R. A. Inactivation of purified rat liver cytochrome P-450 during the metabolism of parathion (Diethyl p-nitrophenyl phosphorothionate). J. Biol. Chem. 255 (1980) : 1080-1089.

Henry, R. A., and Byington, K. H. Inhibition of glutathione-S-aryltransferase from rat liver by organogermanium, lead and tin compounds. Biochem. Pharmacol. 25 (1976) : 2291-2295.

Hnath, J. G. Di-n-butyl tin oxide as a vermifuge on Eubothrium crassum. (Bloch, 1779) in rainbow trout. Progressive Fish-Culturist. January (1970) : 47-50.

Hodgson, E., et al. Insect cytochrome P-450 : metabolism and resistance to insecticides. Biochem. Soc. Trans. 21 (1993) : 1060-1065.

Holwerda, D. A., and Herwig, H. J. Accumulation and metabolic effects of di-n-butyltin dichloride in the freshwater clam, Anodonta anatina. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36 (1986) : 756-762.

Hyland, R., et al. Metabolic oxidation and toxification of N-methyl formamind catalyzed by the cytochrome P450 isozyme CYP2E1. Mol. Pharmacol. 41 (1992) : 259-266.

James, M. O. Isolation of cytochrome P450 from hepatopancreas microsomes of the spiny lobster, Panulirus argus, and determination of catalytic activity with NADPH cytochrome P450 reductase from vertebrate liver. Arch. Biochem. Biophys. 282 (1990) : 8-17.

Johnson, J. A., and Wallace, K. B. Species-related differences in the inhibition of brain acetyl cholinesterase by paraoxon and malaoxon. Toxicol. Appl. Pharmacol. 88 (1987) : 234-241.

Juchau, M. R. Substrate specificities and functions of the P450 cytochrome. Life Sci. 47 (1990) : 2385-2394.

Kaminsky, L. S., and Fasco, M. J. Small intestine cytochrome P-450. Critical Reviews in Toxicology. 21 (1992) : 407-422.

Karenlampi, S., et al. 2-(4'-chlorophenyl)benzothiazole is a potent inducer of cytochrome P-450IA1 in a human and a mouse cell line. Eur. J. Biochem. 181 (1989) : 143-148.

Kleinow, K. M., Melancon, M. J., and Lech, J. J. Biotransformation and induction : implications for toxicity, bioaccumulation and monitoring of environmental xenobiotics in fish. Environ. Health Perspect. 71 (1987) : 105-119.

Lee, R. F. Metabolism of tributyltin oxide by crabs, osters and fish. Mar. Environ. Res. 17 (1985) : 145-148.

Lidsky, T. L., Manetto, C., and Ehrich, M. Nerve conduction studies in chickens given phenyl saligenin phosphate and corticosterone. J. Toxicol. Environ. Health. 29 (1990) : 65-75.

Ligtenstein, D. A., and Kossen, S. P. Kinetic profile in blood and brain tissue of the cholinesterase reactivating oxime H16 after intravenous administration to the rat. Toxicol. Appl. Pharmacol. 71 (1983) : 177-183.

Lindstrom, S. P., Koivusaari, U., and Hanninen, O. Extrahepatic xenobiotic metabolism in north European freshwater fish. Comp. Biochem. Physiol. 69C (1981) : 259-275.

Lockhart, W. T., Metner, B. A., Ward, F. J., and Swanson, G. M. Population and cholinesterase responses in fish exposed to malathion sprays. Pest. Biochem. Physiol. 24 (1985) : 12-18.

Lotti, M., Caroldi, S., Capodicasa, E., and Angelo, M. Promotion of organophosphate-induced delayed polyneuropathy by phenylmethanesulfonyl fluoride. Toxicol. Appl. Pharmacol. 108 (1991) : 234-241.

Martin, R. C., Dixon, D. G., Maguire, R. J., Hodson, P. V., and Tkacz, R. J. Acute toxicity, uptake, depuration and tissue distribution of tri-n-butyltin in rainbow trout, Salmo gairdneri. Aquat. Toxicol. 15 (1989) : 37-52.

Matsubara, T., Prough, R. A., Burke, M. D., and Estabrook, R. W. The preparation of microsomal fractions of rodent respiratory tract and their characterization. Cancer Res. 34 (1974) : 2196-2203.

Miura, Y., and Nagai, T. Molecular properties and physiological functions of cytochrome P-450. Kitasato. Arch. Exp. Med. 61 (1988) : 111-125.

Miyake, Y., Gaylor, J. L., and Morris, H. P. Abnormal microsomal cytochromes and electron transport in morris hepatomas. J. Biol. Chem. 249 (1974) : 1980-1987.

Monod, G., Devaux, A., and Riviere, J. L. Characterization of some monooxygenase activities and solubilization of hepatic cytochrome P-450 in two species of freshwater fish, the nase (Chondrostoma nasus) and the roach (Rutilus rutilus). Comp. Biochem. Physiol. 88C (1987) : 83-89.

Nagarathnama, R. Effect of organophosphate pesticide on the physiology of freshwater fish (Cprinus carpio) exposed to an organophosphate. Pesticide Curr. Sci. 51 (1982) : 668-669.

Neskovic, N., Vitorovic, S., and Plesnicar, M. The role of liver microsomal enzymes in the metabolism of parathion. Biochem. Pharmacol. 22 (1973) : 2943-2946.

Omura, T., and Sato, R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. evidence for its hemoprotein nature. J. Biol. Chem. 239 (1964) : 2370-2378.

Palawski, D., Buckler, D. R., and Mayer, E. L. Survival and condition of rainbow trout (Salmo gairdneri) after acute exposure to methyl parathion, triphenyl phosphate, and DEF. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 30 (1983) : 614-620.

Park, B. K., and Brecken, A. M. Clinical implications of enzyme induction and enzyme inhibition. Clin. Pharmacokinet. 6 (1981) : 1-24.

Philippe, B., Flinois, J. P., Kiffel, L., Kremers, P., and Leroux, J. P. Purification of a new cytochrome P-450 from human liver microsomes. Biochem. Biophys. Acta. 840 (1985) : 364-370.

Rao, K. S. P., Sahib, I. K. A., and Rao, K. V. R. Methyl parathion (O-O-Dimethyl O-4-nitrophenyl thiophosphate) effect on whole body and tissue respiration in Teleost, Tilapia mossambica (peters). Ecotoxicol. Environ. Safety. 9 (1985) : 339-345.

Reddy, M. S., and Rao, K. V. R. Methylparathion-induced alterations in the acethylcholinesterase and phosphates in a penaeid prawn, Metapenaeus monoceros. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 45 (1990) : 452-458.

_______, and Rao, K. V. R. Modulathion of carbohydrate metabolism in the selected tissue of marine prawn, Penaeus indicus under phophamidon induced stress. Ecotoxicol. Environ. Safety. 15 (1988) : 212-220.

_______, Bhagylakshmi, A., and Ramamurthi, R. Carbohydrate metabolism in tissue of fresh water crab (Oziotelphusa senex) exposed to methyl parathion. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36 (1986) : 204-210.

Rosenberg, D. W., and Drummond, G. S. Direct in vitro effects of bis(tri-n-butyltin)oxide on hepatic cytochrome P-450. Biochem. Pharmacol. 32 (1983) : 3823-3829.

Sasame, J. G. H., and Stripp, B. Mechanisms of inhibition of drug metabolic reactions. Drug Metab. Dispos. 1 (1973) : 164-175.

Saxena, P. N., and Bhatnagar, P. Gas chromatographic evaluation of phosphamidon intoxication in sparrows. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 36 (1986) : 47-51.

Shimada, T., Misono, K. S., and Guengerich, F. P. Human liver microsomal cytochrome P-450 mephenytoin 4-hydroxylase, a prototype of genetic polymorphism in oxidative drug metabolism. J. Biol. Chem. 261 (1986) : 909-921.

Short, J. W., Rice, S. D., and Strickle, W. B. Occurrence of tri-n-butyltin-caused imposex in the north pacific marine snail (Nucella lima) in Auke bay, Alaska. Mar. Biol. 102 (1989) : 291-297.

_______, and Thrower, F. P. Accumulation of butyltins in muscle tissue of chinook salmon reared in sea pens treated with tri-n-butyltin. IEEE Oceans'86 Conference Proceedings, Sept. 23-25, pp. 1177-1180. Washington, D.C., 1986.

Sipes, I. G., and Gandolfi, J. Biotransformation of toxicants. In C. D. Klaassen, M. O. Amdur and J. Doull (eds.) Casarett and Doull's Toxicology : the Basic Science of Poisons. 3 rd ed. pp. 83-93. New York : Macmillian Publishing Company, 1986.

Skau, L., and Brimijoin, M. Evaluation of organophosphate. JMPR. 2 (1978) : 22.

Stegeman, J. J., Binder, R. L., and Orren, A. Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed-function oxygenases in the marine fish (Stenotomus versicolor). Biochem. Pharmcol. 28 (1979) : 3431-3439.

_______, Pajor, A. M., and Thomus, P. Influence of estradiol and testosterone on cytochrome P-450 in fish and monooxygenase activity in immature brook trout, Salvelinus fontinalis. Biochem. Pharmacol. 31 (1982) : 3979-3989.

_______, Teng, F. Y., and Snowberger, E. A. Induced cytochrome P450 in winter flounder (Pseudopleuronectes americanus) from coastal Massachusetts evaluated by catalytic assay and monoclonal antibody probes. Can J. Fish. Aquat. Sci. 44 (1987) : 1270-1277.

Stevens, J. T. The role of binding in inhibition of hepatic microsomal metabolism by parathion and malathion. Life Sci. 14 (1974) : 2215-2229.

Strittmatter, P. Cytochrome b5. In R. W. Estrabrook and M. E. Pullman. (eds.), Methods in Enzymology, pp. 553-556. New York : Academic Press, 1967.

Sultatos, L. G. The effects of phenobarbital pretreatment on the metabolism and acute toxicology of the pesticide parathion in the mouse. Toxicol. Appl. Pharmacol. 86 (1986) : 105-111.

Van veld, P. A. Absorption and metabolism of dietary xenobiotics by the intestine of fish. Crit. Rev. Aquat. Sci. 2 (1990) : 185-203.

Van veld, P. A., et al. Induced cytochrome P-450 in intestine and liver of spot (Leiostomus xanthurus) from a polycyclic aromatic hydrocarbon contaminated environment. Aquat. Toxicol. 17 (1990) : 119-132.

Velazquez, A., Xamena, N., Creus, A., and Marcos, R. Mutagenic evaluation of the organophosphorus insecticides methyl parathion and triazophos in Drosophila Melanogaster. J. Toxicol. Environ. Health. 31 (1990) : 313-325.

Vijayalakshmi, P. Studies on some metabolic and physiological responses in *Metapenaeus monoceros* (Fabricius) under sublethal phosphamidon exposure with emphasis on nitrogen metabolism. PhD. thesis, submitted to SV University, Tirupati India, 1987.

Voet, D., and Voet, J. G. Biochemistry. New York : John Wiley & Sons, 1990.

Wade, T. L., Romero, B. G., and Brooks, J. M. Tributyltin contamination in bivalves from United Stated Coastal Estuaries. Environ. Sci. & Tech. 22 (1988) : 1488-1493.

Walker, C. H., and Johnston, G. O. Potentiation of pesticide toxicity in birds : role of cytochrome P-450. Biochem. Soc. Trans. 21 (1993) : 1066-1068.

Wong, P. T. S., Chau, Y. K., Kramar, O., and Bengert, G. A. Structure-toxicity relationship of tin compounds on algae. Can. J. Fish Aquat. Sci. 39 (1987) : 483-488.

Zhang, Y. S., Goksoyr, A., Andersson, T., and Forlin, L. Initial purification and characterization of hepatic microsomal cytochorme P-450 from BNF-treated perch (Perca fluviatilis). Comp. Biochem. Physiol. 98B (1991) : 97-103.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียน

นางสาวประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 18 เมษายน พ.ศ. 2513 ที่อำเภอเมือง จังหวัดภูเก็ต สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีพยาบาลศาสตรบัณฑิต เกียรตินิยมอันดับหนึ่ง จากวิทยาลัยพยาบาลสภากาชาดไทย เมื่อปีการศึกษา 2535 เข้าทำงานในตำแหน่งพยาบาลวิชาชีพ ที่โรงพยาบาลภูเก็ตรวมแพทย์ เป็นเวลา 1 ปี จึงลาออกมาศึกษาต่อในระดับปริญญาโท หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตสหสาขาวิชาเภสัชวิทยา จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2536

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย