# บทที่ 4

# อภิปรายและสรุปผลการทดลอง

## 4.1 ประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

จากการศึกษาผลการประเมินความแม่นยำในการวัดระดับไซโตโครมพี 450 และไซโต-โครมบี 5 พบว่าการกระจายของข้อมูลไม่กว้าง สามารถคำนวณค่าร้อยละของ CV ของไซโต-โครมพี 450 ได้เท่ากับ 1.135 และมีค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานได้เท่ากับ 0.001 ร้อยละของ CV ของไซโตโครมบี 5 เท่ากับ 0.087 ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.008 ถือว่าข้อมูลมีความแม่นยำดีและอยู่ในเกณฑ์ที่ยอมรับได้

## 4.2 ประเมินความคงตัวของไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

ในการศึกษาเกี่ยวกับระบบไซโตโครมพี 450 ในช่วงการแยกและเก็บ microsomal pellet นั้น งานวิจัยส่วนใหญ่มักเก็บในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ 20% glycerol และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาศึกษา (Vigano et al.,1995; Brumley et al.,1995) บางการศึกษามีการเก็บที่แตกต่างกันไป กล่าวคือเก็บในไนโตรเจนเหลวที่ -80 องศาเซลเซียส (Vindimian and Garric,1989 ; Sleiderink et al.,1995) บางรายเก็บในรูปที่ยังไม่เป็น microsomal pellet โดยเก็บในไนโตรเจนเหลว ที่อยู่บนน้ำแข็งแห้ง อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส โดยการเก็บตัวอย่างทั้งตัวโดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงที่ -20 องศาเซลเซียส สามารถเก็บข้ามฤดูกาลเป็นเวลา 7 เดือนได้ (Eggens et al.,1995) สำหรับการเก็บที่ไม่ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี5เปลี่ยนแปลงที่ระบุระยะเวลาการเก็บแน่นอนคือเก็บเย็น microsomal pellet ในสารละลายที่มีส่วนประกอบของ 10 % glycerol เก็บที่ -70 องศาเซลเซียส เก็บได้นานกว่า 3 สัปดาห์ (Birt et al.,1983) นอกจากนี้ในการศึกษาของ Forlin และ Andersson (1985) เก็บเย็น microsomal pellet ในสารละลายที่มี 20% glycerol ไว้ที่ -80 องศาเซลเซียสได้นาน 1 ปี สำหรับการศึกษาครั้งนี้ เก็บ microsomal pellet ในสารละลายที่มีส่วนผสมของ 10% glycerol ที่-70 องศาเซลเซียสได้นานถึง 1 สัปดาห์ โดยไม่ทำให้ระดับไซโตครมพี 450 เปลี่ยนแปลง จนกว่ามีเวลาเหมาะสมที่จะนำไมโครโซมมาวัดระดับไซโตโครมพี 450 และ ไซโตโครมบี 5 ได้

## 4.3 การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนกับระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5

การศึกษาความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนในไมโครโซม กับระดับไซโตโครมพี 450 และความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณโปรตีนในไมโครโซม กับระดับไซโตโครมบี5 สอดคล้องกับการศึกษาของ Stegman,Binder และ Orren,(1979) กล่าวคือเมื่อความเข้มข้นของปริมาณโปรตีนลดลงระดับไซโตโครมพี 450 ก็ลดลงด้วย และเมื่อความเข้มข้นของโปรตีนลดลงระดับไซโตโครมบี 5 ก็ลดลงด้วยเช่นกัน

## 4.4 การศึกษาผลของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ภายในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมหลังสัมผัสนาน 96 ชั่วโมง

เมททิลพาราไธออนตั้งแต่ความเข้มข้น 1.0 ppm มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม ขณะเดียวกันก็พบว่ามีระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้น โดยที่ระดับไซโตโครมพี 450 ที่ลดลงและระดับไซโตโครมพี 420 ที่เพิ่มขึ้นแปรผันตามความเข้มข้นของเมททิลพาราไธออนที่เพิ่มขึ้น ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับงานวิจัยของ Sipes และ Gandolfi (1986) ที่แสดงไว้ว่า หนูวีสตาร์ที่ได้รับการสัมผัสกับสารเคมีกำจัดศัตรูพืช ในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟต และคาร์บาเมตมาก่อนมีระยะเวลาในการหลับนานขึ้นหลังจากการได้รับhexobarbital เนื่องจากความสามารถในการเปลี่ยนแปลงสารเคมีลดลง การที่สมรรถนะเอ็นไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการลดลงนี้ อาจเกิดขึ้นเนื่องจากเกิดการรวมตัวอย่างถาวรของไซโตโครมพี 450กับสับ-สเตรทที่เป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืช และการที่ไซโตโครมพี 450ถูกทำลายไป เหตุผลที่สนับสนุนข้อแรก ได้จากการศึกษาภายนอกร่างกายของหนูถีบจักร และหนูขาวของ Steven (1974) ที่พบว่ามาลาไธออนและ พาราไธออน ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตเช่นเดียวกันกับเมททิลพาราไธออน รวมทั้งเมตาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ของสารทั้ง 2 ชนิด คือ มาลาออกซอน และ พาราออกซอน ทำให้เกิดการดูดกลืนแสงที่ 421 nm ขึ้น Steven คาดว่าการเปลี่ยนแปลงของการดูดกลืนแสง (absorbance) นี้เป็นผลจากการรวมตัวอย่างถาวรของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชกับไซโตโครมพี 450 ที่อยู่ในรูปทั้งออกซิไดส์ และ รีดิวส์ แต่มีผลกับไซโตโครมพี 450 รีดิวส์ฟอร์มมากกว่า โดยที่ผลดังกล่าวนี้เมททิลพาราไธออนมีฤทธิ์มากกว่าพาราไธออน ซึ่งให้การดูดกลืนแสงของการรวมตัวที่ 420 nm จากวงจรการทำงานของไซโตโครมพี 450 จะเห็นได้ว่า ในระยะแรกเกิดการรวมตัวของสับสเตรทกับไซโตโครมพี-450 อยู่มากมายที่เอนโดลาสมิกเรติคิวลัม อีกทั้งยังขึ้นอยู่กับสภาวะแวดล้อมและสรีรวิทยาของออกานิสม เป็นที่ทราบกันดีว่าบริเวณที่มีการรวมตัว (active site) นี้เป็นส่วนที่ไม่ชอบน้ำ (hydrophobic) ซึ่งสารที่ละลายได้ดีในไขมันน่าจะรวมตัวได้ดีที่จุดนี้ เมททิลพาราไธออนซึ่งมีคุณสมบัติดังกล่าวน่าจะเกิดการรวมตัวกับไซโตโครมพี 450 และเกิดการปรับโครงสร้างที่มี

ความจำเพาะภายใน active site นี้ การรวมตัวของสับสเตรทกับฮีโมโปรตีน มีผลทำให้เอ็นไซม์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งส่งผลถึงประสิทธิภาพในการทำงาน (catalytic activity) ของเอ็นไซม์ทำให้ไซโตโครมพี 450 รีดิวส์ต่อไปด้วยไซโตโครมพี 450 รีดักเตส การรวมตัวกับสับสเตรทที่ active site ทำให้ absorption spectrum ของไซโตโครมพี 450 เปลี่ยนแปลงไปได้ และจากการศึกษาของ Halpert,Hammond และ Neal (1980) พบว่าพาราไธออน ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตตัวหนึ่ง เปลี่ยนไปเป็นเมตาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ โดยการรวมตัวกับไซโตโครมพี 450 โดยที่สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไปจับกับฮีโมโปรตีนได้ Ferric ($Fe^{3+}$) hemocytochrome P-450 substrate complex ซึ่งถูกรีดิวส์ต่อไปเป็น ferous ($Fe^{2+}$) hemocytochrome P-450 substrate complex โดยอาศัยอิเลกตรอนจาก NADPH และ NADPH-cytochrome P-450 reductase สำหรับเมททิลพาราไธออนก็เหมือนกับยาและสารเคมีทั่วไป ที่มีการเปลี่ยนแปลงโดย mixed function oxidases ก่อนและเมททิลพาราไธออนเองมีผลยับยั้ง ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไซโตโครมพี 450 การยับยั้งนี้เป็นแบบไม่ย้อนกลับ (irreverse inhibition) ด้วยเนื่องจากเกิดการจับอย่างแน่นหนา (covalent binding) ของซัลเฟอร์กับไมโครโซมทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของไมโครโซม นอกจากนี้สารประกอบเชิงซ้อนถาวรที่เกิดขึ้นนี้ ยังมีผลเป็นพิษอย่างรุนแรง เช่น carcinogenesis , mutagenesis , cellular necrosis , hemolytic anemia, hypersensivity reaction เป็นต้น ( พรเพ็ญ เปรมโยธิน , 2529 ; Areechon and Plumb , 1990 ; Koyama , 1996 ; Halpert,Hammond and Neal, 1980 ; Norman et al ., 1973 ; Palawski et al ., 1983 ; Steven , 1974 ) สมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ที่ลดลง อาจเนื่องจากการสลายตัวของไซโตโครมพี 450 ได้โดยตรง เพราะว่าไซโตโครมพี 420 ซึ่งทราบดีว่าเป็น denatured form ของไซโตโครมพี 450ที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับเมททิลพาราไธออน อาจมีสาเหตุมาจากการที่เมททิลพาราไธออนเอง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับปลาได้โดยตรง (ภัทรา หาญจริยกูล,2536) ทั้งยังสามารถละลายได้ดีในไขมัน จึงสามารถ penetrate ผ่านเข้าเซลล์ตับไปยังไมโครโซม และ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮีโมโปรตีนภายในไมโครโซมไซโตโครมพี 450 ซึ่งเป็น heamoprotein ที่ลดลง อาจเกิดจากการสลายตัวของไซโตโครมพี 450 ให้กลายเป็นไซโตโครมพี 420 ในที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ซึ่งสอดคล้องการศึกษาแบบภายนอกร่างกายของหนูถีบจักร และ หนูขาว (Rosenberg and Drummond,1983) แสดงให้เห็นว่าเมททิลพาราไธออนไม่ได้มีผลต่อระบบขนส่งอิเลกตรอน เนื่องจากไม่มีผลต่อไซโตโครมบี 5 แต่ไปมีผลโดยตรงต่อปริมาณไซโตโครมพี 450 ที่ลดลงเนื่องจากสลายตัวไปเป็นไซโตโครมพี 420

ความจำเพาะภายใน active site นี้ การรวมตัวของสับสเตรทกับฮีโมโปรตีน มีผลทำให้เอ็นไซม์เปลี่ยนแปลงไปซึ่งส่งผลถึงประสิทธิภาพในการทำงาน (catalytic activity) ของเอ็นไซม์ทำให้ไซโตโครมพี 450 รีดิวส์ต่อไปด้วยไซโตโครมพี 450 รีดักเตส การรวมตัวกับสับสเตรทที่ active site ทำให้ absorption spectrum ของไซโตโครมพี 450 เปลี่ยนแปลงไปได้ และจากการศึกษาของ Halpert,Hammond และ Neal (1980) พบว่าพาราไธออน ซึ่งเป็นสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตตัวหนึ่ง เปลี่ยนไปเป็นเมตาบอไลท์ที่มีฤทธิ์ โดยการรวมตัวกับไซโตโครมพี 450 โดยที่สารเคมีกำจัดศัตรูพืชไปจับกับฮีโมโปรตีนได้ Ferric ($Fe^{3+}$) hemocytochrome P-450 substrate complex ซึ่งถูกรีดิวส์ต่อไปเป็น ferous ($Fe^{2+}$) hemocytochrome P-450 substrate complex โดยอาศัยอิเลกตรอนจาก NADPH และ NADPH-cytochrome P-450 reductase สำหรับเมททิลพาราไธออนก็เหมือนกับยาและสารเคมีทั่วไป ที่มีการเปลี่ยนแปลงโดย mixed function oxidases ก่อนและเมททิลพาราไธออนเองมีผลยับยั้ง ปฏิกิริยาออกซิเดชั่นของไซโตโครมพี 450 การยับยั้งนี้เป็นแบบไม่ย้อนกลับ (irreverse inhibition) ด้วยเนื่องจากเกิดการจับอย่างแน่นหนา (covalent binding) ของซัลเฟอร์กับไมโครโซมทำให้เกิดการทำลายโครงสร้างของไมโครโซม นอกจากนี้สารประกอบเชิงซ้อนถาวรที่เกิดขึ้นนี้ ยังมีผลเป็นพิษอย่างรุนแรง เช่น carcinogenesis , mutagenesis , cellular necrosis , hemolytic anemia, hypersensivity reaction เป็นต้น ( พรเพ็ญ เปรมโยธิน , 2529 ; Areechon and Plumb , 1990 ; Koyama , 1996 ; Halpert,Hammond and Neal, 1980 ; Norman et al ., 1973 ; Palawski et al ., 1983 ; Steven , 1974 ) สมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ที่ลดลง อาจเนื่องจากการสลายตัวของไซโตโครมพี 450 ได้โดยตรง เพราะว่าไซโตโครมพี 420 ซึ่งทราบดีว่าเป็น denatured form ของไซโตโครมพี 450ที่เกิดขึ้นหลังจากได้รับเมททิลพาราไธออน อาจมีสาเหตุมาจากการที่เมททิลพาราไธออนเอง มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับปลาได้โดยตรง (ภัทรา หาญจริยกูล,2536) ทั้งยังสามารถละลายได้ดีในไขมัน จึงสามารถ penetrate ผ่านเข้าเซลล์ตับไปยังไมโครโซม และ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของฮีโมโปรตีนภายในไมโครโซมไซโตโครมพี 450 ซึ่งเป็น heamoprotein ที่ลดลง อาจเกิดจากการสลายตัวของไซโตโครมพี 450 ให้กลายเป็นไซโตโครมพี 420 ในที่สุด

ในการศึกษาครั้งนี้ พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกความเข้มข้น ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ซึ่งสอดคล้องการศึกษาแบบภายนอกร่างกายของหนูถีบจักร และ หนูขาว (Rosenberg and Drummond,1983) แสดงให้เห็นว่าเมททิลพาราไธออนไม่ได้มีผลต่อระบบขนส่งอิเลกตรอน เนื่องจากไม่มีผลต่อไซโตโครมบี 5 แต่ไปมีผลโดยตรงต่อปริมาณไซโตโครมพี 450 ที่ลดลงเนื่องจากสลายตัวไปเป็นไซโตโครมพี 420

**4.5 การศึกษาผลภายนอกร่างกายของเมททิลพาราไธออนต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5ในไมโครโซมของปลาดุกพันธุ์ผสมภายหลังการ incubate นาน 30 นาที**

การศึกษาครั้งนี้ พบว่าเมททิลพาราไธออนตั้งแต่ความเข้มข้น 0.2 mM ขึ้นไป ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ผลของการศึกษาครั้งนี้สอดคล้องกับการศึกษาผลภายในร่างกาย และ ผลภายนอกร่างกายของสารเคมีกำจัดศัตรูพืชในกลุ่มออร์กาโนฟอสเฟตด้วยกัน คือมาลาไธออนและพาราไธออนในหนูถีบจักรและหนูขาว (Steven,1974) เมื่อเปรียบเทียบกับงานวิจัยลักษณะเดียวกับที่ศึกษาโดย ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538) ที่พบว่าเมททิลพาราไธออนที่ขนาดตั้งแต่ 0.1 mM มีผลทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติได้เช่นกัน แต่การเกิดไซโตโครมพี 420 น้อยกว่าและระดับไซโตโครมบี 5 ลดลงเมื่อความเข้มข้น 1 mM

แต่การศึกษาครั้งนี้พบว่าเมททิลพาราไธออนทุกระดับความเข้มข้นในการศึกษา (0.1-5.0 ppm) ไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 และการเกิดไซโตโครมพี 420 มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาดังกล่าวของ ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538) ความแตกต่างนี้อาจเนื่องมาจากที่มาของปลาดุกที่นำมาศึกษา โดยที่ปลาดุกของการศึกษาของประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538) นำมาจากตลาดไม่ใช่เป็นปลาที่ได้จากอ่างโดยตรง อีกทั้งยังเป็นปลาที่มีขนาดใหญ่และแข็งแรงกว่าการศึกษาครั้งนี้มาก จึงคาดว่าอายุของปลาเหล่านั้นคงมากกว่าปลาดุกที่ศึกษาครั้งนี้ อันเป็นสาเหตุของสภาพระบบไซโตโครมพี 450 ต่างกัน เนื่องจากสัตว์ที่อายุน้อยยังไม่โตเต็มวัยมีระบบการเปลี่ยนแปลงสารต่างๆ โดยระบบ mixed function oxidase ยังไม่สมบูรณ์ อีกทั้งยังถูกกดโดยเมททิลพาราไธออนที่ได้รับอีกด้วย นอกจากนั้นอาจมาจากสาเหตุจากอาหารและสภาพแวดล้อมที่ปลาได้รับอีกด้วย ปลาที่นำมาศึกษามีความเครียดจากสภาพที่อยู่อาศัย โดยที่ปลาเหล่านั้นเปลี่ยนจากการเลี้ยงดูในบ่อดินมาอยู่ในตู้กระจกที่มีขนาดจำกัด ทำให้ปลาที่นำมาศึกษากินอาหารได้น้อย ปลาจึงอยู่ในสภาพที่ไม่สมบูรณ์เท่ากับปลาที่ใช้ในการศึกษาของ ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538)

## 4.6 การศึกษาผลของไตรบิวทิลตินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5 ภายในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสมสัมผัสนาน 96 ชั่วโมง

สำหรับการศึกษาครั้งนี้ พบว่าไตรบิวทิลตินที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0.1 ppb ขึ้นไป ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุมและพบว่ามีระดับไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.1 ppb ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Fent และ Stegman (1993) ที่ทำการศึกษาในปลาทะเล โดยที่ระดับไซโตโครมพี 420 ที่เพิ่มขึ้น แปรผันตามความเข้มข้นของไตรบิวทิลตินที่เพิ่มขึ้น คาดว่าไตรบิวทิลตินมีผลทำให้ไซโตโครมพี 450 ถูกทำลาย(denatured ) กลายเป็นไซโตโครมพี 420 Fent และ Stegman พบว่าการฉีดไตร-บิวทิลตินเพียง 1 dose เข้าทางหน้าท้องของปลาสคับ นานเพียง 24 ชั่วโมง เกิดไซโตโครมพี 420 เกิดขึ้นพร้อมกับการลดลงของไซโตโครมพี 450 โดยที่การเกิดไซโตโครมพี 420 เพิ่มขึ้นตามขนาดไตรบิวทิลตินที่ให้ พบว่าขนาดของไตรบิวทิลตินที่มีขนาดสูงสุด (16.3mg/kg) จะมีไซโตโครมพี 420 มากกว่าไซโตโครมพี 450 ถึง 30 % ผลที่เกิดขึ้นนี้เนื่องจากไตรบิวทิลตินที่ซึ่งรู้จักกันว่าเป็น "membrane toxicant" (Gray et al.,1987) ทำให้มีการทำลายผนังเซลล์ของไมโครโซม นอกจากนี้ไตรบิวทิลตินยังจัดว่า เป็นสารที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ได้อย่างกว้างขวาง (General cytotoxic effects) (Gray et al., 1987) ดังนั้นออร์กาโนตินซึ่งละลายได้ดีในไขมันสามารถ penetrate เข้าผนังเซลล์แล้วมันทำให้เกิดความเสียหายต่อไซโตโครมพี 450 ให้เป็นไซโตโครมพี 420 การศึกษาที่ผ่านมาแสดงให้เห็นว่า ออกาโนตินมีผลทำให้ EROD ซึ่งเป็นไอโซไซม์หนึ่งของ CYPIA1 นั้นลดลง โดยที่ EROD ซึ่งเป็นโปรตีนในไมโครโซมถูกทำลายซึ่งแสดงให้เห็นด้วยวิธีการ Immunoblotting analysis นอกจากนั้นพบว่าแถบที่จางที่สุด คือ ปริมาณโปรตีนถูกทำลายมากที่สุด พบในกลุ่มปลาที่ได้รับสารมากที่สุด (Fent and Stegman,1993) ผลการศึกษาเช่นเดียวกับของ Fent และ Bucheli (1994) ที่ศึกษาผลของไตรบิวทิลตินและไตรฟีนิลตินในปลาน้ำจืด 3 ชนิด ก็สนับสนุนว่าออกาโนตินทั้ง 2 ชนิดยับยั้งไซโตโครมพี 450 และ NADPH cytochrome c reductase (Cytochrome P-450 reductase)

จากการศึกษาครั้งนี้พบว่า ออร์กาโนตินก็มีผล ทำให้ไซโตโครมพี 450 ลดลง แต่ไตรบิวทิลตินทุกความเข้มข้นที่ทดลองไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 แม้ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของไตรบิวทิลตินเท่าใดก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Fent และ Stegman (1993) ซึ่งทำการศึกษาในปลาทะเล ทำให้เชื่อว่าไตรบิวทิลตินไม่ได้มีผลกระทบต่อระบบขนส่งอิเลกตรอนในระบบ mixed function oxidase

## 4.7 การศึกษาผลภายนอกร่างกายของไตรบิวทิลตินต่อระดับไซโตโครมพี 450 และไซโตโครมบี 5ในไมโครโซมปลาดุกพันธุ์ผสมภายหลังการ incubate นาน 30 นาที

การศึกษาครั้งนี้ พบว่าไตรบิวทิลตินตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 0.1 mM ทำให้ระดับไซโตโครมพี 450 ต่ำกว่ากลุ่มควบคุม และ พบว่าระดับไซโตโครมพี 420เพิ่มขึ้นโดยที่การลดลงของไซโตโครมพี 450 และการเพิ่มขึ้นของไซโตโครมพี 420 นั้น เป็นไปตามความเข้มข้นของไตรบิวทิลตินที่เพิ่มขึ้น ซึ่งการศึกษาของ Fent และ Stegman (1991) พบว่าระดับไซโตโครมพี 450 ลดลงอย่างมาก แต่ในการศึกษาครั้งนี้ไม่ลดลงมากนัก และการเพิ่มขึ้นของไซโตโครมพี 420 ก็ไม่มากเท่า ทั้งที่ขนาดความเข้มข้นของไตรบิวทิลตินเหมือนกัน อาจมาจากชนิดของปลาที่นำมาศึกษาแตกต่างกัน จากการศึกษาภายนอกร่างกายหากลไกความเป็นพิษของไตรบิวทิลตินก็พบว่าไตรบิวทิลตินทำให้เซลล์บวม และมีการคั่งของโซเดียมคลอไรด์ จากการศึกษาของ Virkki และ Nikinmaa (1993)พบว่าไตรบิวทิลตินมีผลไปลดการแลกเปลี่ยน $Na^+$ /$H^+$ ของเม็ดเลือดแดงในปลาเรนโบว์เทราท์ และขัดขวางการทำงานของเอนไซม์ $Na^+$ /KATPase ที่เหงือกของปลา

ผลของไตรบิวทิลตินทุกความเข้มข้นที่ศึกษาไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 ไม่ว่าจะเพิ่มความเข้มข้นของไตรบิวทิลตินให้สูงขึ้นก็ตาม ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาภายนอกร่างกายที่ศึกษาในหนู Sprargue-Dawley rats (Rosenberg and Drummond,1983) ในปลาสคับ (Fent and Stegman,1991) และในปลาน้ำจืด 3 ชนิด (Fent and Bucheli,1994) แต่ไม่สอดคล้องกับ งานของ ประภัสสร ตันติพงศ์วิวัฒน์ (2538) ที่ศึกษาในปลาชนิดเดียวกันอาจเป็นเพราะแหล่งของปลาที่นำมาใช้ และสภาพก่อนการทดลองแตกต่างกันดังที่กล่าวมาแล้ว

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สรุปและข้อเสนอแนะ

ผลการศึกษาครั้งนี้พบว่าทั้งเมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลตินมีผลต่อไซโตโครมพี 450 และทำให้เกิดการดูดกลืนแสงของไซโตโครมพี 420 ซึ่งเป็นไซโตโครมพี 450 ที่ถูกทำลายโดยไม่มีผลกับไซโตโครมบี 5 ทั้งภายนอกและภายในร่างกายปลาดุกพันธุ์ผสม ผลที่ได้เหมือนกันทั้งการศึกษาภายนอกและภายในร่างกาย จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สามารถนำไซโตโครมพี 450 มาเป็นตัวบ่งชี้ทางชีวภาพต่อการปนเปื้อนของสารเคมีทั้ง 2 ชนิด ต่อแหล่งน้ำได้ การที่สารเคมีทั้ง 2 ชนิดไม่มีผลต่อระดับไซโตโครมบี 5 แสดงว่าสารเคมีทั้ง 2 ไม่ได้มีผลยับยั้งไซโตโครมพี 450 ทั้งระบบ การยับยั้งอาจเป็นผลเนื่องมาจากการถูกทำลายของไซโตโครมพี 450 ซึ่งแสดงให้เห็นด้วย ไซโตโครมพี 420 ที่เกิดขึ้นตามความเข้มข้นของสารเคมีที่ปนเปื้อนอยู่ในแหล่งน้ำ สารเคมีที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ตับ เช่น เมททิลพาราไธออนและไตรบิวทิลตินซึ่งเป็นพิษต่อเซลล์เมมเบรน มีผลทำให้ไซโตโครมพี 450 ถูกทำลายไปเป็นไซโตโครมพี 420 ที่แสดงให้เห็นได้แม้ในขนาดที่ไม่ทำให้ปลาตาย ผลการศึกษาภายนอกสนับสนุนว่าการทำลายของไมโครโซมนั้นเกิดขึ้นได้โดยตรง เนื่องจากไซโตโครมพี 420 เกิดขึ้นทันทีหลังจากได้รับสารเคมีดังกล่าว การเกิดไซโตโครมพี 420 แสดงถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ตับของเมททิลพาราไธออน และไตรบิวทิลตินเนื่องจากเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมของตับไวต่อการถูกทำลายโดยสารเคมีอยู่แล้ว การที่ตับถูกทำลายแสดงให้เห็นได้จากการที่สมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ที่อยู่บริเวณเมมเบรนของเอนโดพลาสมิกเรติคิวลัมลดลง การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาเบื้องต้น และหาสมรรถนะของไซโตโครมพี 450 ทั้งระบบ ไม่มีการแยกชนิดของไซโตโครมพี 450 ที่ถูกกระตุ้น หรือยับยั้ง ดังงานวิจัยส่วนใหญ่ที่นิยมทำกันในปัจจุบัน ทั้งนี้การหาปริมาณไซโตโครมพี 450 ทั้งหมดเป็นวิธีการที่รวดเร็ว และประหยัดกว่ามาก ไม่ว่าไอโซฟอร์มของไซโตโครมพี 450ตัวใดที่ถูกกระตุ้น หรือยับยั้งก็ตามระดับไซโตโครมพี450 ทั้งหมดย่อมเปลี่ยนแปลงไปด้วยเช่นกัน โดยเหตุที่ว่าสารมลพิษทางน้ำบางชนิด เช่น สารเคมีกำจัดศัตรูพืชกลุ่มออร์กาโนคลอรีนมีผลในทางกลับกันคือมีการกระตุ้นมากกว่าการยับยั้ง อีกทั้งสภาพของปลายังอาจทำให้ผลที่ได้แตกต่างออกไป ดังที่พบในการศึกษาแบบภายนอก ทำให้น่าจะมีการศึกษาสภาพความเป็นจริงในธรรมชาติอีกต่อไป