****

**แบบทดสอบ Take Home Examination**

**รอบที่ 1 หัวข้อ**

**1. บรรยาย: Chemical Carcinogenesis**

**2. บรรยาย: Free Radicals and Cell Injury**

**3. บรรยาย: Cell Death and Apoptosis**

**4. บรรยาย: Toxic Responses of the Immune System**

**จัดทำโดย**

**นางสาวภรทิชา จันทร์งาม**

**รหัส 623150015-8 ภาคสมทบ**

**เสนอ**

**อ.ศักดา ดาดวง**

**วิชา PS114319 พิษวิทยา (Toxicology)**

**ภาคการศึกษาปลาย การศึกษา 2566**

**คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น**

**1. หัวข้อ Chemical Carcinogenesis**

**คำสั่ง จงเขียนตอบคำถามต่อไปนี้**

1. เพื่อวัดความเข้าใจในเนื้อหาเรื่อง Chemical Carcinogenesis จงบรรยายหรือเล่าเรื่องนี้มาให้ได้ครอบคลุมมากที่สุด โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ

Chemical carcinogen คือสารก่อมะเร็ง โดยจะทำให้ transform cell (เซลล์มะเร็ง) เมื่อเจริญเต็มที่ จะยังคงแบ่งตัวต่อไป ไม่มีการหยุด จนพัฒนากลายเป็น tumor cell (เซลล์มะเร็งอยู่กับที่ ไม่กระจายไปทั่วร่างกาย) หรือ cancer cell (เซลล์มะเร็งกระจายไปทั่วร่างกาย) ตัวอย่างของ carcinogen เช่น Arsenic, Coal tar, X-ray, Uranium, Asbestos (สารที่ใช้ทำเพดาน ฝ้า) หรือการเคี้ยวหมาก เป็นต้น โดยกลไกลการเกิด carcinogens แบ่งได้ 2 ประเภท คือ 1. Genotoxins จะเข้าไปจับกับ DNA แบบไม่สามารถผันกลับได้ ทำให้ส่งผลกระทบโดยตรงต่อ DNA ไม่มีระดับที่แน่นอนในการเกิดมะเร็ง อีกทั้งขึ้นอยู่กับปริมาณการได้รับ หากได้รับในปริมาณมาก โอกาสในการเกิดมะเร็งก็มากตามไปด้วย เช่น Alkylating agent, Aromatic amine, Inorganic carcinogens หรือ Heavy metals 2. Non-genotoxins (Epigenetic) จะไม่มีผลกระทบโดยตรงต่อ DNA สามารถผันกลับได้ แต่จะมีปัจจัยอื่นๆเข้ามาเกี่ยวข้อง เช่น BHT, DDT, Pesticides, Estradiol, Cyclosporin A หรือ Asbestos ซึ่งจะมีระดับที่แน่นอนในการเกิดมะเร็ง อีกทั้งขึ้นอยู่กับปริมาณการได้รับ เช่นเดียวกับ Genotoxins

กลไกของ Chemical carcinogen คือต้องมีคุณสมบัติในการเป็น electrophile (มี N,O ในโครงสร้าง) เช่น Carbonium ions, Free radicals, Epoxides เป็นต้น เมื่อเข้าไปในร่างกาย จะทำปฏิกิริยากับ DNA,RNA และ Protein ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น nucleophile ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) แต่ก็มีสารบางชนิดที่จะเปลี่ยนเป็น electrophile เมื่อผ่านกนะบวนการ metabolism เช่น Aflatoxin ในถั่วลิสง เมื่อผ่านการ metabolism จะได้ Aflatoxin epoxide ไปทำปฏิกิริยากับ DNA ต่อไป ซึ่งกลไกลการเกิดการกลายพันธุ์ของยีน หรือ mutation นั้นมี 2 กลไก คือ 1. Oncogene เนื่องจากในร่างกายคนเราจะมีเซลล์ที่ก่อให้เกิดมะเร็งอยู่แล้ว เพียงแต่ว่าอยู่แบบสงบ แต่ถ้าหากเซลล์นั้นถูกกระตุ้นจากสารเคมีหรือสิ่งแวดล้อม ก็จะทำให้เกิดการ mutation และกลายเป็นมะเร็ง (เมื่อถูกกระตุ้นซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง) 2. Tumor suppressor genes เช่น p53, BRCA1 ที่จะคอยตรวจจับความผิดปกติของยีน เพื่อที่จะยับยั้งการเกิดมะเร็งได้ทัน ซึ่งถ้าหากยีนเหล่านี้เกิดการ mutation การตรวจจับต่างๆก็จะหายไป ทำให้เซลล์ปกติกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ โดยสามารถตรวจสอบได้ว่าสาร carcinogen นั้นๆสามารถทำให้เกิด mutation ได้หรือไม่ ด้วยการทำ Ames test กับเชื้อ เชื้อ *Salmonella typhimurum* ชนิด His-

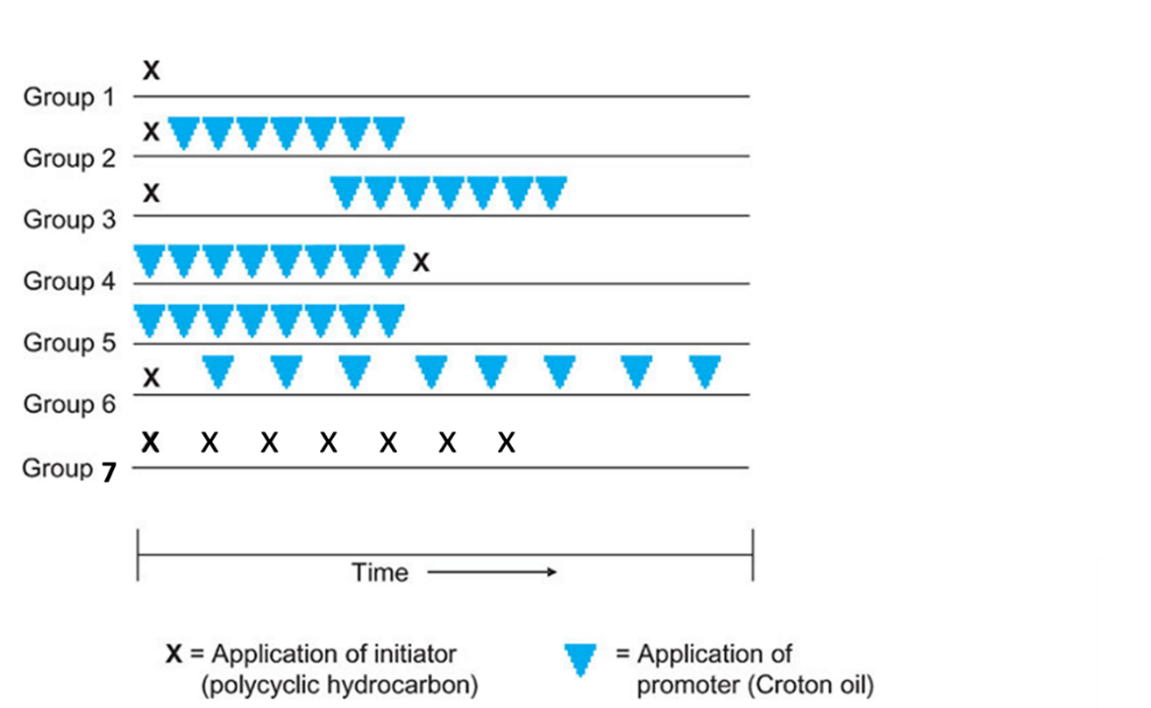
กระบวนการของ Carcinogenesis แบ่งเป็น 3 กระบวนการ ดังนี้ 1. Initiation จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับ/สัมผัสกับ carcinogen โดยเป็นกระบวนการไม่สามารถย้อนกลับได้ เกิดขึ้นเพียงครั้งเดียว เช่น Benzopyrene เป็นต้น 2. Promotion เป็นกระบวนการที่ทำให้เซลล์ที่ผ่านกระบวนการ Initiation เกิดการเพิ่มจำนวนขึ้น แต่จำเป็นต้องกระตุ้นด้วย promotor แบบซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง ซึ่ง promotor ไม่จัดเป็น carcinogen เพียงแต่ช่วยเสริม carcinogen ให้การทำงานมากขึ้น โดยกระบวนการนี้สามารถย้อนกลับได้ หากนำ promotor ออก ก็จะไม่เกิดมะเร็ง 3. Progression เป็นกระบวนการที่เพิ่มจำนวนของ transform cell ให้พัฒนากลายเป็น tumor หรือมะเร็ง

2. เพื่อวัดความสามารถในเชิงความคิดสร้างสรรค์ และความสามารถในเชิงวิเคราะห์ สังเคราะห์ นักศึกษาคิดว่า ความรู้ในเรื่อง Chemical Carcinogenesis จะสามารถนำประยุกต์ใช้ได้อย่างไรบ้าง ด้วยสาเหตุหรือเหตุผลอะไร อย่างไร โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ จากความรู้ในเรื่อง Chemical Carcinogenesis ในเรื่องของกระบวนการของ Carcinogenesis ที่แบ่งเป็น 3 กระบวนการ ได้แก่ 1. Initiation 2. Promotion และ 3. Progression ซึ่งการที่ transform cell จะพัฒนากลายเป็น tumor หรือ cancer cell ได้นั้นต้องผ่าน 3 กระบวนการข้างต้น คือต้องมีการกระตุ้นผ่านกระบวนการ Initiation หนึ่งครั้ง และถูกกระตุ้นผ่านกระบวนการ Promotion ด้วย promotor ซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง จึงจะมีแนวโน้มในการเกิดมะเร็งสูง ดังนั้นเมื่อทราบกระบวนการแล้ว ก็จะสามารถสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในพัฒนายา หรือควบคุมไม่ให้เกิด Carcinogenesis ได้ ซึ่งอาจจะเป็นการควบคุมไม่ให้เกิดกระบวนการ Promotion อย่างต่อเนื่อง ความหมายคือ ไม่ให้ promotor ซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง หรือไม่ให้มีกระบวนการ Promotion เกิดขึ้นเลย ส่วนในเรื่องของกลไกการกลายพันธุ์ของยีน (mutation) ก็สามารถที่จะคิดค้นหรือพัฒนายาเพื่อที่จะไม่ทำให้ Tumor suppressor genes เกิดการกลายพันธุ์ ซึ่งหากทำได้ กระบวนการตรวจจับความผิดปกติของยีนก็จะสามารถดำเนินต่อไป โอกาสการเกิดมะเร็งก็จะน้อยลงหรือไม่มีเลย หรือจะเป็นการค้นหา Tumor suppressor genes อื่นๆที่สามารถตรวจจับความผิดปกติของการแบ่งตัวของเซลล์ ซึ่งอาจจะทำให้เกิดการ mutation ในภายหลัง ซึ่งถ้าหากเรามีการทดสอบ หรือtest ต่างๆเพื่อตรวจหา Tumor suppressor genes เหล่านี้ได้ โอกาสที่เซลล์ที่ผิดปกติจะพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็งก็จะลดลง เนื่องจากเราค้นพบสาเหตุหรือต้นตอของปัญหาแล้ว

3. จากข้อ 3.1 ถึง 3.3 จงเลือกตอบเพียงข้อเดียว

3.3 นี่เป็นแผนภูมิแสดงการให้ initiator และ promotor แก่สัตว์ทดลอง แล้วตรวจการเกิด tumor ของสัตว์ทดลอง จงคาดเดาเหตุการณ์แต่ละสถานการณ์ว่า จะมีแนวโน้มในการเกิด tumor ได้มากน้อยแค่ไหน เพราะเหตุใด



ตอบ จากแผนภูมิแสดงการให้ initiator และ promotor แก่สัตว์ทดลอง แล้วตรวจการเกิด tumor ของสัตว์ทดลอง ซี่งเป็นกระบวนการของ Carcinogenesis (Initiation, Promotion และProgression) โดยที่ X คือ การให้ initiator ในกระบวนการ Initiation ที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วเมื่อได้รับ Carcinogen และ Y คือ การให้ promotor ในกระบวนการ Promotion ที่ทำให้เซลล์ที่ผ่านกระบวนการ Initiation เกิดการเพิ่มจำนวนมากขึ้นน ซึ่งหากได้รับการกระตุ้นด้วย promotor ซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง จะทำให้แนวโน้มการเกิด Tumor สูงมากๆ

Group 1 : แนวโน้มการเกิด Tumor ต่ำ เนื่องจากได้รับแค่ Initiator เพียงอย่างเดียว

Group 2 : แนวโน้มการเกิด Tumor สูง เนื่องจากมีการกระตุ้นผ่านกระบวนการ Initiation และได้รับการกระตุ้นด้วย promotor ซ้ำๆ อย่างต่อเนื่อง

Group 3 : แนวโน้มการเกิด Tumor สูง เนื่องจากมีการกระตุ้นผ่านกระบวนการ Initiation และได้รับการกระตุ้นด้วย promotor ซ้ำๆ อย่างต่อเนื่อง แม้ว่าช่วงระหว่างการให้ initiator และ promotor จะห่างกัน

Group 4 : ไม่เกิด Tumor เนื่องจากการที่จะเกิด Tumor ได้นั้นต้องผ่านกระบวนการ initiation และการกระตุ้นด้วย promotor ซ้ำๆ แต่ใน Group 4 เกิดกระบวนการ Initiation ภายหลัง ดังนั้นจึงไม่มีโอกาสในการเกิด Tumor

Group 5 : ไม่เกิด Tumor เนื่องจากได้รับเพียง promotor อย่างเดียว

Group 6 : ไม่เกิด Tumor แม้ว่าจะผ่านกนะบวนการ Initiation แต่การกระตุ้นด้วย promotor ไม่ได้เกิดขึ้นแบบซ้ำๆอย่างต่อเนื่อง

Group 7 : ไม่เกิด Tumor เนื่องจากเกิดแค่กระบวนการ Initiation เพียงอย่างเดียว

4. จงอธิบายหลักการของวิธีการตรวจ Carcinogenicity Assessmentของสารหรือโมเลกุลใด ๆ (ให้เลือกตอบเพียงข้อเดียว)

4.1 Ames test

ตอบ Ames test หรือ The Ames *Salmonella* mutation test เป็นวิธีการตรวจ Carcinogenicity Assessmentของสารหรือโมเลกุลใด เพื่อทดสอบความเป็นพิษที่ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ซึ่งให้ผลการทดลองได้ในเวลาอันรวดเร็ว โดยจากชื่อของการทดสอบ The Ames *Salmonella* mutation test หมายความว่าในการทดสอบจะนิยมใช้เชื้อ *Salmonella typhimurum* ชนิด His- ซึ่งจะไม่สามารถสังเคราะห์ histidine ได้เอง คือการที่เชื้อจะโตได้ จะต้องเลี้ยงในที่ที่มี histidine เท่านั้น โดยถ้าหากอยากทราบว่า carcinogen มีความสามารถในการก่อกลายพันธุ์หรือไม่ จะทำการนำ carcinogen ไป incubate กับเชื้อ หากใน plate ที่ทดสอบมี colony เกิดขึ้น แปลผลได้ว่า carcinogen มีความสามารถในการก่อกลายพันธุ์

**References**

เอกสารประกอบการสอน วิชา PS114319 พิษวิทยา (Toxicology) ภาคการศึกษาปลาย การศึกษา 2566 **เรื่อง Chemical Carcinogenesis**; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

เอกสารประกอบการสอน วิชา PS114319 พิษวิทยา (Toxicology) ภาคการศึกษาปลาย การศึกษา 2566 **ปฏิบัติการที่ 1 เรื่อง Micropipette technique และ Bacterial Reverse Mutation Test (Ames test)**; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**2. Free radicals and Cell injury**

**คำสั่ง จงเขียนตอบคำถามต่อไปนี้**

1. เพื่อวัดความเข้าใจในเนื้อหาเรื่อง Free radicals and Cell injury จงบรรยายหรือเล่าเรื่องนี้มาให้ได้ครอบคลุมมากที่สุด โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ

Free radical หรืออนุมูลอิสระ หมายถึง อะตอม โมเลกุลหรือไอออน ที่มีอิเล็กตรอนโดดเดี่ยว ซึ่งคืออิเล็กตรอนวงนอกสุดที่ไม่มีคู่ ไม่มีความเสถียร ว่องไวต่อปฏิกิริยา ทำให้เกิดปฏิกิริยากับโมเลกุลรอบๆอย่างรวดเร็ว ด้วยการให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลข้างเคียง ตัวมันเองจึงจะเสถียร โดยโมเลกุลข้างเคียงที่รับอิเล็กตรอนก็จะเป็น free radical และเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อเนื่องกันไป นอกจากนี้ยังมี haft-life ที่สั้นมาก จึงต้องใช้วิธีการตรวจหาที่เหมาะสม ตัวอย่างเช่น Reactive oxygen species (free radical ที่เกิดจากออกซิเจน โดยที่ free radical mได้ อาจจะเป็น Peroxide, Superoxide หรือ Hydroxyl radical ซึ่งมีว่องไวต่อปฏิกิริยามาก) , Derivatives of nitrogen เป็นต้น

กลไกลการเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ของอนุมูลอิสระ แบ่งออกเป็น 3 ขั้นตอน ดังนี้ 1. Initiation คือการที่โมเลกุลปกตินั้นถูกกระตุ้นด้วยปัจจัยต่างๆ เช่น แสง ความร้อน UV กลายเป็น free radical 2. Propagation คือการที่ free radical เกิดเกิดปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อเนื่องกันไป จนเกิดอันตรายต่อร่างกาย 3. Termination คือการสิ้นสุดของปฏิกิริยาเมื่อ free radical 2 ตัวมาจับกัน จนได้เป็นสารที่มีความสเถียร

Free radical เกิดขึ้นได้จากทั้งกลไกลภายในร่างกาย และจากสิ่งแวดล้อม โดยที่การเกิดจากกลไกภายในร่างกาย ได้แก่ 1. การที่มีอิเล็กตรอนรั่วไหลจากกระบวนการในการสร้าง ATP คือ ในการสร้างพลังงาน จะผ่านการ Glycolysis และ Krebs cycle ซึ่งจะได้ผลิตภัณฑ์ทั้ง NADH และ FADH2 แต่ NADH จะเข้าสู่ช่วง e- transport chain ส่งอิเล็กตรอนให้กับออกซิเจน โดยในขั้นนี้จะมีออกซิเจนบางส่วนกลายเป็น free radical

2. เอนไซม์ เช่น aldehyde oxidase, xanthine oxidase และ3. Macrophage เช่น การล้างแผลด้วย hydrogen peroxide ซึ่งเป็น free radical mให้เชื้อที่แผลนั้นตาได้ ส่วนการเกิด free radical จากสิ่งแวดล้อม คือ การได้รับยาบางอย่าง, UV, X-ray, การสูบบุหรี่ หรือการดื่มแอลกอฮอล์

Endogenous free radical ได้แก่ Superoxide, Hydrogen peroxide, Hydroxyl radical, Singlet oxygen, Hydroperoxy radical, Lipid peroxide radical, Nitric oxide, Peroxynitrite, Hypochlorous acid, Transition metal ions ส่วน Exogenous free radical ได้แก่ ยา, รังสี, การสูบบุหรี่, Asbestos, Ozone หรือแม้แต่การเป็นไข้ ก็สามารถเกิด free radical ได้

โดยการที่มี free radical จำนวนมากในร่างกาย จะส่งผลให้เกิดการทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย

ซึ่งถ้าหากไม่สามารถสร้างอนุมูลอิสระ (Antioxidant) ในร่างกาย

การวิเคราะห์หา Antioxidant ทำได้หลายวิธี ได้แก่ Hydrogen atom transfer (HAT), Single electron transfer (SET), Oxygen radical absorbance capacity (ORAC), Total radical-trapping antioxidant parameter (TRAP), Ferric reducing antioxidant power (FRAP), Copper reduction assay (CUPRAC), ABTS assay, DPPH assay เป็นต้น

2. เพื่อวัดความสามารถในเชิงความคิดสร้างสรรค์ และความสามารถในเชิงวิเคราะห์ สังเคราะห์ นักศึกษาคิดว่า ความรู้ในเรื่อง Free radicals and Cell injury จะสามารถนำประยุกต์ใช้ได้อย่างไรบ้าง ด้วยสาเหตุหรือเหตุผลอะไร อย่างไร โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ ความรู้ในเรื่อง Free radicals and Cell injury จะสามารถนำประยุกต์ใช้ในการหาสารต้านอนุมูลอิสระที่มีอยู่ตามธรรมชาติ ไม่ว่าจะเป็นการสกัดจากสมุนไพร ผักหรือผลไม้ ยกตัวอย่างเช่นงานวิจัย “การประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โยเกิร์ต Application of Antioxidants from Roselle Extract in Yogurt” ซึ่งแสดงผลการศึกษาว่า สารสกัดกระเจี๊ยบแดงมีศักยภาพในการนำมาประยุกต์ใช้เป็นแหล่งของสารต้านอนุมูลอิสระในโยเกิร์ตได้ โดยที่พบว่าส่วนกลีบดอกของกระเจี๊ยบแดง มีสารประกอบ phenolic และ anthocyanin ซึ่งมีคุณสมบัติเป็น antioxidant และจากการที่เราทราบว่า ปกติร่างกายจะมีการสร้าง Endogenous antioxidants เช่น Superoxide dismutase (SOD), Catalase และGlutathione peroxidase แต่ถ้าหากร่างกายสร้างไม่พบ ก็ต้องได้รับจาก Exogenous antioxidant เช่น Vit.E, Vit.A, Provitamin A, Vit.C และ Glutathione หรือสารในกลุ่ม Polyphenol, Isoflavone ซึ่งพบได้ในพืชสมุนไพรมากมาย เช่น Isoflavone ในถั่วเหลือง ที่มีคุณสมบัติเป็น antioxidant ช่วยป้องกันการเกิดมะเร็งบางชนิดได้ หรือที่สามารถหารับประทานได้ง่าย มีราคาถูก คือ ส้ม ซึ่งมี antioxidant ประเภท flavone ค่อนข้างมาก สามารถช่วยป้องกันมะเร็งลำไส้ได้ โดยเมื่อเราทราบคุณสมบัติเหล่านี้แล้ว ก็สามารถที่จะคิดค้นวิธีการสกัด antioxidant เหล่านี้ออกมาให้เยอะมากที่สุด เพื่อนำไปพัฒนายารักษามะเร็งต่อไป เนื่องจากปัจจุบันยารักษามะเร็งยังคงเป็นที่ต้องการของตลาดค่อนข้างมาก หากเภสัชกรสามารถคิดค้น พัฒนายา ที่สกัดมาจากสารธรรมชาติ ก็จะทำให้มียารักษามะเร็งจากธรรมชาติเพิ่มมากขึ้น ทั้งยังอาจทำให้คนไข้ไว้ใจ และให้ความร่วมมือที่จะใช้ยา

3. จากข้อ 3.1 ถึง 3.2 จงเลือกตอบเพียงข้อเดียว

3.2 จงให้คำจำกัดความและคุณสมบัติ รวมทั้งกลไกการทำงานของ antioxidant ทั้งนี้ต้องกล่าวถึงความสามารถในเป็นตัวออกซิไดซ์ หรือเป็นตัวรีดิวซ์ของ antioxidant ด้วย

ตอบ Antioxidant หรือสารต้านอนุมูลอิสระ เป็นสารที่ทำหน้าที่เป็น reducing agent คือให้อิเล็กตรอนแก่โมเลกุลอื่นๆ โดยจะเข้าทำปฏิกิริยากับ free radical ทำให้ช่วยยับยั้งการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ free radical ผ่านกลไก ได้แก่ การดักจับอนุมูลอิสระ, การยับยั้งการทำงานของออกซิเดชันที่ขาดอิเล็กตรอน, การจับกับโลหะที่สามารถเร่งปฏิกิริยาออกซิเดชัน, การหยุดปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ และการเสริมฤทธิ์การยับยั้งการทานของเอนไซม์ที่เร่งปฏิกิริยาอนุมูลอิสระ ซึ่ง antioxidant จะแบ่งเป็น Endogenous antioxidants ได้แก่ 1.Superoxide dismutase (SOD) 2. Catalase และ3. Glutathione peroxidase โดยจะเปลี่ยน H2O2 กลายเป็น H2O และ Exogenous antioxidants ได้แก่ 1. Lipid-soluble vitamins (Vit.E, Vit.A, Provitamin A) 2. Water-soluble vitamin (Vit.C) และ 3. Glutathione (GSH) โดยการที่จะเป็น antioxidant ที่ดีนั้นจะต้องสามารถที่จะทำให้ตัว antioxidant ไม่กลายเป็น free radical ด้วยการเปลี่ยนเป็น dimer form

4. จงอธิบายหลักการของวิธีการตรวจวิเคราะห์ antioxidant capacity ของสารหรือโมเลกุลใด ๆ ต่อไปนี้ (เลือกตอบเพียงข้อเดียว)

4.6 DPPH assay

ตอบ DPPH assay (Diphenylpicryhydrazyl radical scavenging assay) เป็นวิธีการทดสอบทางเคมี โดยใช้ DPPH radical เป็น free radical ซึ่งสารนี้เป็น free radical ที่มีความคงตัว สามารถใช้เพื่อทดสอบได้เลย ไม่จำเป็นต้องได้รับการกระตุ้น โดยสารนี้จะเป็นสารสีม่วง (deep purple color) ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 515 nm วัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer แต่ต้องตั้งทิ้งไว้ในที่มืด 30 นาที เพื่อให้เกิดปฏิกิริยา ซึ่ง DPPH จะทำปฏิกิริยากับ antioxidant ที่ละลายด้วย ethanol หากมีปฏิกิริยาเกิดขึ้นสีม่วงจะจางลง กลายเป็นสีเหลือง (DPPH-H) หมายความว่าสารที่ทดสอบนั้นมีฤทธิ์ antioxidant โดยที่ความเข้มข้นของสีม่วงจะแปรผกผันกับปริมาณของ antioxidant

**References**

ปวีณา พันทอง. (2559). **การพัฒนาวิธีการวิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี CUPRAC โดยใช้อุปกรณ์ ตรวจวัดแบบกระดาษ.** สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2566. จาก http://digital\_collect.lib.buu.ac.th/dcms/files/56920133.pdf

สุภาพ นนทะสันต์. (มปป). **การประยุกต์ใช้สารต้านอนุมูลอิสระจากสารสกัดกระเจี๊ยบแดงในผลิตภัณฑ์โย เกิร์ต Application of Antioxidants from Roselle Extract in Yogurt.** สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2566. จาก file:///C:/Users/Lenovo/Downloads/DigitalFile\_103345.pdf

เอกสารประกอบการสอน วิชา PS114319 พิษวิทยา (Toxicology) ภาคการศึกษาปลาย การศึกษา 2566 **เรื่อง Free radicals and Cell injury**; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**3. Cell Death and Apoptosis**

**คำสั่ง จงเขียนตอบคำถามต่อไปนี้**

1. เพื่อวัดความเข้าใจในเนื้อหาเรื่อง **Cell Death and Apoptosis** จงบรรยายหรือเล่าเรื่องนี้มาให้ได้ครอบคลุมมากที่สุด โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ

Cell death เกิดได้จาก การเน่า (Necrosis) และเซลล์ตายตามโปรแกรม (Programmed cell death) ซึ่งก็แบ่งได้เป็นอีก 3 แบบ คือ Apoptosis (เกิดเป็นส่วนใหญ่), Atrophy และTerminal differentiation

การเน่า (Necrosis) เป็นการนำไปสู่เซลล์ตาย ซึ่งมาทั้งปัจจัยภายใน (เช่น Complement) และปัจจัยภายนอก (เช่น การยับยั้งกระบวนการ Oxidative phosphorylation) ซึ่ง Necrosis นี้จะไม่มีการใช้พลังงาน (Passive process) โดยที่ปัจจัยภายนอกจะเป็นสิ่งกระตุ้นหลัก Cell membrane ถูกทำลาย ร่างกายจะตอบสนองด้วยการอักเสบ (Inflammation)

เซลล์ตายตามโปรแกรม (Programmed cell death) จะมีการแสดงออกของยีนที่จำเพาะ โดแบ่งออกได้ดังนี้ 1.การฝ่อของเซลล์ (Atrophy) เป็นการที่ขนาดของเซลล์ลดลง เช่น Thymus atrophy, ผุ้ป่วยติดเตียงที่ไม่ได้ใช้กล้ามเนื้อเป็นเวลานานๆ กล้ามเนื้อก็จะฝ่อลง แต่ถ้าหากมีการกลับมาใช้งานของกล้ามเนื้อ กล้ามเนื้อก็จะขยายใหญ่ขึ้นอีกครั้ง 2.Terminal differentiation เป็นการที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงรูปแบบไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น จนไม่สามารถพัฒนาต่อได้อีก เช่น การหลุดลอกของหนังกำพร้า 3.Apoptosis เป็นการที่คุณสมบัติของเซลล์เปลี่ยนไป จนในที่สุดเซลล์ก็ตาย ซึ่งเกิดขึ้นด้วยหลายกระบวนการ เช่น Cell blebbing, Cell shrinkage, Nuclear fragmentation, Chromatin condensation, Chromosomal DNA fragmentation และGlobal mRNA decay เป็นต้น ซึ่งการ Apoptosis จะเกิดขึ้นในระยะพัฒนาการ embryo และfetal เช่น Development of digits, Development of nerve cell, Metamorphosis pf tadpole, การได้รับยาบางชนิด, การได้รับรังสี หรือการติดเชื้อไวรัส เป็นต้น

The Stage of Apoptosis แบ่งเป็น 9 stages ดังนี้ 1.เซลล์หดตัว แยกออกจากเซลล์ข้างเคียง 2.เซลล์ลักษณะเป็นตะปุ่มตะป่ำ 3.เกิดถุงน้ำภายในเซลล์ 4.นิวเคลียร์เมมเบรนลักษณะเป็นตะปุ่มตะป่ำ 5.โครมาตินหดตัว แยกออกจากกัน 6.เซลล์และนิวเคลียร์แตกออกเป็นชิ้นเล็ก 7.เซลล์และนิวเคลียร์พัฒนากลายเป็น apoptotic bodies 8.Apoptotic bodies ถูกทำลาย และ9.Apoptotic bodies ถูกย่อยด้วย lysosome

ยีนหลักๆที่เกี่ยวข้องการ Apoptosis ได้แก่ 1.Caspase’s คือ Cysteine protease ใช้ตัดสายโปรตีน 2.BCL-2 ยับยั้งการเกิด Apoptosis หากมีมาก แสดงว่าลดโอกาสการเกิด Apoptosis 3.Bax กระตุ้นการเกิด Apoptosis หากมีมาก แสดงว่าเพิ่มโอกาสการเกิด Apoptosis 4.p53 เป็น Tumor suppressor gene ทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของ BCL-2 และBAX โดยผลคือกระตุ้นให้เกิด Apoptosis และ5.Cytochrome C หากพบมากในไซโทพลาสซึม แสดงว่าโอกาสการเกิด Apoptosis จะมากขึ้น ซึ่งก็จะมีการวิเคราะห์การเกิด Apoptosis ได้มากมายหลายวิธี เช่น การสังเกตรูปสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์, TUNEL assay, Caspase enzyme assay, ตรวจสอบ DNA fragmentation ด้วย electrophoresis gels เป็นต้น

2. เพื่อวัดความสามารถในเชิงความคิดสร้างสรรค์ และความสามารถในเชิงวิเคราะห์ สังเคราะห์ นักศึกษาคิดว่า ความรู้ในเรื่อง **Cell Death and Apoptosis** จะสามารถนำประยุกต์ใช้ได้อย่างไรบ้าง ด้วยสาเหตุหรือเหตุผลอะไร อย่างไร โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ ความรู้ในเรื่อง Cell Death and Apoptosis จะสามารถนำประยุกต์ใช้ในเรื่องการคิดค้นวิธิเคราะห์หรือการตรวจสอบการ Apoptosis อย่างมีความจำเพาะ ที่จะสามารถวิเคราะห์ได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ เพื่อที่จะมีประโยชน์ในการบ่งชี้การเกิด Apoptosis และอธิบายกลไก กระบวนการ หรือวิธีการเกิด Apoptosis ซึ่งจะนำไปสู่การนำไปใช้เพื่อตรวจวินิจฉัยโรคที่เกี่ยวข้องกับการ Apoptosis เช่น การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้ง

การแบ่งตัวของเซลล์ และฤทธิ์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ HepG2 (wild type p53) และ Hep3B (delete p53) เมื่อรับสารสกัดเมทานอลจากไมซีเลีย (MEM) ของเชื้อรา Antrodia camphorata (Polyporaceae, Aphyllophorales) ทำการตรวจยืนยัน Apoptosis โดยการตรวจ fragmented DNA ด้วยวิธี TUNEL (Song Ty.,et al. 2005) อีกทั้งยังสามารถประยุกต์ใช้ในเรื่องของการลดหรือเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ Apoptosis เช่นการลดการแสดงออกของ BAX เนื่องจากยีนนี้จะเป็นการกระตุ้นให้เกิด Apoptosis มากขึ้น หากสามารถที่จะคิดวิธีการที่จะลดการแสดงออกของยีนนี้ได้ โอกาสในการเกิด Apoptosis ก็จะลดลง หรือเป็นการเพิ่มการแสดงออกของ BCL-2 ที่ทำหน้าที่ยับยั้งการเกิด Apoptosis เมื่อยีนนี้มาก โอกาสการเกิด Apoptosis ก็จะลดลงได้เช่นเดียวกัน แต่ในทางกลับกันหากพัฒนายาที่มีความเป็น tumor suppressor gene ที่จำเพาะต่อเซลล์มะเร็ง การที่เกิด Apoptosis ก็จะส่งผลในทางบวก เพราะเป็นการทำให้เซลล์มะเร็งนั้นตายไป โดยหลักการนี้ก็นำไปใช้กับการคิดค้นยารักษามะเร็งในปัจจุบัน

3. จากข้อ 3.1 ถึง 3.3 จงเลือกตอบเพียงข้อเดียว

3.2 จงอธิบายความแตกต่างของกระบวนการ apoptosis และ necrosis โดยอาจแสดงตารางเปรียบเทียบ หรือแสดงตัวอย่างเปรียบเทียบก็ได้

ตอบ

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
|  | Apoptosis | Necrosis |
| Stimulus | Physiologic หรือ Pathologic stimuli | Pathologic stimuli |
| Process | Active process (ใช้พลังงาน) | Passive process (ไม่ใช้พลังงาน) |
| Pathology | -Chromatin condensation  -Fragmentation of cells  -Apoptotic bodies | -Membrane disruption  -Cytoplasmic eosinophilia |
| Inflammatory Response | No | Yes |
| Size | Cellular shrinkage | Cellular swelling |
| Uptake | By neighboring cells | By macrophages |
| Cell membrane | Membrane blebbing | Ruptured |
| Mitochondria | Intact | Loss |
| Production of ROI | Moderate | High |
| Inhibition by BCL-2 | Yes | Yes |
| Requires caspases | Yes | No |
| Duration | Hours | Days |
| Result | Apoptotic bodies | Scar |

4. วิธีการทดลองเพื่อการทดสอบการเกิดการตายแบบ apoptosis มีหลากหลายวิธี จงยกตัวอย่างมาสัก 1 วิธีที่นักศึกษาเข้าใจมากที่สุด อธิบายหลักการของวิธีนั้น ๆ อย่างสั้น ๆ และบอกวิธีการแปลผลการทดสอบด้วยอย่างสั้น ๆ

ตอบ การทดสอบการเกิดการตายแบบ apoptosis ด้วยการสังเกตรูปสัณฐานของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์ฟลูออเรสเซนต์ เพื่อสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงของนิวเคลียส และโครงสร้างของ apoptotic body โดยที่มีหลักการมาจาก เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะสุดท้ายจะมีรูปลักษณะที่ผิดเพี้ยนไป คือ มีการหดตัว ผนังเซลล์โป่งพอง โครมาตินจับตัวกันแน่น และมีการแยกย่อยของ DNA ซึ่งวิธีการคือ จะนำเซลล์เพาะเลี้ยง (ไม่ต้อง fix ด้วย formaldehyde และwax-embebed) ย้อมด้วยสารเรืองสี เช่น DAPI, Hoechst 33258, Hoechst 33342, Acridine orange, Ethidium bromide และPropidium iodide เป็นต้น โดยที่จะจำแนกการตายของเซลล์ได้จากลักษณะสีที่ติดบน DNA หรือRNA การแปรผลคือ ส่วนใหญ่จะไม่พบสารเรืองแสงติดอยู่ที่เซลล์ หมายความว่าเซลล์นั้นยังมีชีวิตอยู่ เนื่องจากเซลล์ที่เกิด apoptosis จะยอมให้สารเรืองแสงแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์

**References**

ปกป้อง ประยงค์, นาถธิดา วีระปรียากูร และสหพัฒน์ บรัศว์รักษ์. (2007). **อะพอพโทซิส: วิถีและการ ตรวจวัด.** สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2566. จาก https://www.thaiscience.info/journals/Article/JHRE/10893593.pdf

เอกสารประกอบการสอน วิชา PS114319 พิษวิทยา (Toxicology) ภาคการศึกษาปลาย การศึกษา 2566 **เรื่อง Cell Death and Apoptosis**; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

Bioninja. (มปป). **Cell Death.** สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2566. จาก https://ib.bioninja.com.au/standard- level/topic-1-cell-biology/16-cell-division/cell-death.html

David J McConkey. (1998). **Biochemical determinants of apoptosis and necrosis.** สืบค้นเมื่อ 13 กุมภาพันธ์ 2566. จาก https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378427498001556

**4. Toxic response of the immune system**

คำสั่ง จงเขียนตอบคำถามต่อไปนี้

1. เพื่อวัดความเข้าใจในเนื้อหาเรื่อง **Toxic response of the immune system** จงบรรยายหรือเล่าเรื่องนี้มาให้ได้ครอบคลุมมากที่สุด โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ

Toxic response of the immune system หรือการตอบสนองพิษต่อระบบภูมิคุ้มกัน ซึ่งส่งผลให้เกิดโรคต่างๆตามมาได้ โดยชนิดของภูมิคุ้มที่พูดถึงมี 2 ชนิด คือ 1. Humoral immunity เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ใช้สารน้ำ (Humor หรือBody fluids) เช่น Antibody, Complement, Proteins หรือAntimicrobial peptides เป็นต้น 2. Cell mediated immunity เป็นการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ เมื่อมีเชื้อโรคเข้าในร่างกาย จะมีเซลล์ Macrophage มาจับกินเซลล์ ละทำหน้าที่เป็น Antigen presenting cell เพื่อกระตุ้นให้ Helper T-cell ทำงาน หลั่งสาร Cytokines ออกมา ทำให้การกำจัดเชื้อโรคทำได้ดียิ่งขึ้น แต่การตอบสนองแบบนี้จะไม่สามารถถ่ายทอดทาง Serum ได้เหมือนกับ Humoral immunity หรือว่าจะแบ่งชนิดภูมิคุ้มกันเป็น Innate immune system และ Acquired or adaptive immune system ซึ่งล้วนเกี่ยวข้องกับ Antigen, Antibody, Complement, B-cell, T-cell หรือPlasma

Toxic response of the immune system จะเกี่ยวข้องในเรื่องของ 1.Immunosuppression (การกดภูมิคุ้มกัน ทำให้การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายลดลง ส่งผลต่ออาการไม่พึงประสงค์ต่างๆตามมา ซึ่งก็จะเกี่ยวข้องกับยากดภูมิคุ้มกันด้วย), 2.Hypersensitivity (ภูมิไวเกิน โดยแบ่งออกเป็น 4 ชนิด ได้แก่ 1.Type I Anaphylactic or Immediate type Hypersensitivity 2.TypeII Cytotoxic or Cytolytic type Hypersensitivity 3.Type III Immune Complex or Arthus type Hypersensitivity 4.Type IV Delayed type Hypersensitivity) และ3.Autoimmune คือระบบการตอบสนองภูมิคุ้มกันของสิ่งมีชีวิตต่อเซลล์ เนื้อเยื่อ และส่วนประกอบอื่นๆของร่างกาย ซึ่งหากใครที่แพ้ต่อภูมิคุ้มกันตนเอง ก็จะนำไปสู่โรค Autoimmune disease หรือที่เรียกว่าโรคภูมิคุ้มกันทำลายตนเองได้ แต่ทั้งนี้ก็มียาที่ทำให้ตอบสนองต่อระบบภูมิคุ้มได้ เช่น โมเลกุลของยา Penicillin ที่ทำให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางด้าน Hypersensitivity หรือโมเลกุล Isoniazid ที่ทำให้ร่างกายเกิดการตอบสนองทางด้าน Autoimmunity ส่วนในเรื่องของ Immune modulation by xenobiotics คือ การปรับภูมิคุ้มกันของร่างกายด้วยสารเคมีที่พบในสิ่งมีชีวิต ที่สิ่งมีชีวิตนั้นไม่ได้ผลิตหรือสร้างขึ้น เช่น ยา, สารก่อมะเร็ง, สารป้องกันกำจัดศัตรูพืช เป็นต้น โดยบทบาทหลักๆที่กล่าวถึงคือการกดภูมิคุ้มกัน (Immune suppression) และเรื่องของวิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับภูมิคุ้มกันมีหลายเทคนิค เช่น ELISA เป็นการวิเคราะห์โดยใช้ Antibody และการเปลี่ยนของสีในการวิเคราะห์หรือหาตัวตนของสาร, Flow cytometry เป็นเทคนิคที่ใช้วัดความหลากหลายของลักษณะเซลล์แต่ละเซลล์ มีการพัฒนาร่วมกับเทคโนโลยีด้าน monoclonal antibody และสารเรืองแสง เป็นต้น

2. เพื่อวัดความสามารถในเชิงความคิดสร้างสรรค์ และความสามารถในเชิงวิเคราะห์ สังเคราะห์ นักศึกษาคิดว่า ความรู้ในเรื่อง **Toxic response of the immune system** จะสามารถนำประยุกต์ใช้ได้อย่างไรบ้าง ด้วยสาเหตุหรือเหตุผลอะไร อย่างไร โดยคำตอบขอให้ได้อย่างน้อยครึ่งหน้ากระดาษเอสี่ ตัวอักษร Angsana new หรือ Cordia หรือ Thai Sarabun ขนาดตัวอักษร 16 ใช้ line space = 1.0

ตอบ ความรู้ในเรื่อง Toxic response of the immune system จะสามารถนำประยุกต์ใช้ในเรื่องของการคิดค้นวิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับของภูมิคุ้มกันจากพืชสมุนไพรที่มีอยู่ตามธรรมชาติ หาได้ง่าย เนื่องจากการที่คัดเลือกสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน มีข้อดี ข้อได้เปรียบมากกว่าวิธีคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีพิษต่อจุลินทรีย์ หรือเซลล์เป้าหมาย เพราะสารที่มีพิษต่อจุลินทรีย์ หรือเซลล์เป้าหมายเหล่านี้ นอกจากจะทำลายเซลล์ที่เราไม่ต้องการแล้ว ยังทำลายเซลล์ปกติของร่างกายด้วย อีกทั้งยังมีกลไกลที่ปรับตัวกับร่างกาย ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ได้ ดังนั้นการตรวจสอบและคัดเลือกพืชพันธุ์สมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงเป็นที่น่าสนใจอย่างยิ่ง หรือให้ความรู้เรื่อง Hypersensitivity ที่เราอาจจะมองข้าม ว่าก็แค่การแพ้ธรรมดา แต่แท้จริงแล้วอันตรายมากกว่านั้น ปัจจุบันมีวิธีการทดสอบ Hypersensitivity ที่เป็นที่รู้จักกันอย่างแพร่หลาย ได้แก่ Skin prick test (การทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนัง) โดยเป็นการนำน้ำยาสกัดจากการก่อภูมิแพ้ ทดสอบที่ผิวหนังของผู้ป่วย สามารถทราบผลได้ภายในวันที่ทดสอบเลย และทดสอบภูมิแพ้ทางผิวหนังได้มากกว่า 100 ชนิด ซึ่งถ้าหากสามารถพัฒนาการทดสอบนี้ให้ดีขึ้น เช่น เวลาในการรอผลทดสอบเร็วขึ้น อาจจะเป็น ทดสอบแล้ว 15 นาที รู้ผลการทดสอบ หรือทำให้สามารถทดสอบภูมิแพ้ได้หลายชนิดมากกว่าเดิม สามารถพกพาได้สะดวก อยากทดสอบตอนไหนก็สามารถทำได้ ซึ่งก็จะส่งผลดีต่อผู้ใช้งาน อัตราผู้ป่วยที่เกิดพิษจากภูมิคุ้มกันก็อาจจะลดลง เนื่องจากรู้เท่าทันสิ่งที่ตนเองแพ้

3. จากข้อ 3.1 ถึง 3.3 จงเลือกตอบเพียงข้อเดียว

3.1. จงอธิบายความรู้พื้นฐานต่อไปนี้

3.1.1 Humoral immunity และ Cell mediated immunity

ตอบ Humoral immunity และ Cell mediated immunity จัดเป็นการตอบสนองที่จำเพาะต่อภูมิคุ้มกัน (Specific immune response) โดยที่ Humoral immunity เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่ใช้สารน้ำ (Humor) ซึ่งก็คือ Antibody ที่ส่วนใหญ่จะพบอยู่มากในซีรั่ม โดยการตอบสนองดังกล่าวจะมีเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด B lymphocytes ทำหน้าที่รับผิดชอบการตอบสนองนี้ อีกทั้งยังมี Plasma cell ที่เปลี่ยนแปลงมาจาก B-cell เพื่อทำการหลั่ง Antibody ชนิดต่างๆที่จำเพาะต่อ Antigen ชนิดนั้นๆ หรือที่เรียกว่า Immunoglobulin (IgG, IgA, IgM, IgD และIgE) ส่วน Cell mediated immunity เป็นการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ เมื่อมีเชื้อโรคเข้าในร่างกาย จะมีเซลล์ Macrophage มาจับกินเซลล์ ละทำหน้าที่เป็น Antigen presenting cell เพื่อกระตุ้นให้ Helper T-cell ทำงาน หลั่งสาร Cytokines ออกมา ทำให้การกำจัดเชื้อโรคทำได้ดียิ่งขึ้น

3.1.2 hypersensitivity type 1 และ hypersensitivity type 4

ตอบ Hypersensitivity type 1 (Anaphylactic) เป็นการที่ร่างกายได้สัมผัสสารก่อภูมิแพ้ เช่น ฝุ่น เกสรดอกไม้ ยา หรือขนสัตว์ ผ่านทางการสัมผัส กิน ฉีด หรือการหายใจ ซึ่งการแพ้ชนิดที่ 1 จะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็ว เช่น หากเราแพ้ฝุ่นหรือเกสรดอกไม้ เราก็จะมีอาหารจามทันที ส่วน Hypersensitivity type 4 (Delayed type hypersensitivity) เป็นการที่ถ้าเราได้รับสารก่อภูมิแพ้มา อาการแพ้จะไม่ได้เกิดขึ้นทันที ณ ตอนนั้น แต่จะเกิดช้าออกไปหลังจากที่เราได้รับสารก่อภูมิแพ้ โดยทั่วไปแล้วจะเกิดขึ้นหลังจาก 12 ชั่วโมงผ่านไปแล้ว เช่น แมลงกัดหรือต่อย เราจะไม่ได้เห็นอาการบวม แดง หรือแผลในตอนที่โดนกัด แต่ผ่านไปสักพักจึงจะเห็นอาการแพ้เกิดขึ้น

4. จงอธิบายหลักการและวิธีการตรวจวิเคราะห์ระดับของภูมิคุ้มกันด้วยเทคนิคต่อไปนี้ มาพอเข้าใจ (เลือกตอบเพียงข้อเดียว)

4.1 enzyme linked immunosorbent assay (ELISA)

ตอบ Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) เป็นการใช้ AntigenหรือAntibody เคลือบที่ผิวของ ELISA plate ที่เป็น Solid phase ซึ่งจะมีการติดฉลากเอนไซม์ที่สารเรืองแสงลงบน AntigenหรือAntibody จากนั้นเติม Substate ให้ทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ เพื่อให้สามารถ Detect ได้ด้วยเครื่อง Microplate reader ซึ่งจะสามารถตรวจสอบได้ทั้งเชิงคุณภาพและเชิงปริมาณ โดยสามารถแบ่งวิธีทดสอบได้ 4 แบบ คือ

1.Direct ELISA เป็นการตรึง Antigen บน Solid phase จากนั้นทำการล้างส่วนเกินออก แล้วเติม Antibodyที่ต่อกับ Antigen ติดฉลากด้วยเอนไซม์ จากนั้นล้าง จากนั้นเติม Substrate และสารที่ทำให้เกิดสี ซึ่งการเปลี่ยนแปลงของ Substrate เป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ Antigen ที่ตรวจหา

2.Indirect ELISA เป็นการใช้ Antibody ที่ต้องการตรวจสอบทำปฏิกิริยากับ Antigen ที่ทราบชนิด ที่เคลือบบน Solid phase จากนั้นจะมีการติดฉลากด้วยเอนไซม์กับ Anti-human immunoglobulin การแปรผลจะขึ้นกับความเข้มสี โดยที่ความเข้มสีจะขึ้นกับปริมาณ Antibody ที่ต้องการตรวจหา

3.Competitive ELISA เป็นการเคลือบ Antibody บน Solid phase แล้วตรึง Antigen ลงไกป แล้วทำปฏิกิริยากับ Antigen ที่ต้องการตรวจ และAntigen ที่ติดฉลากด้วยเอนไซม์ จากนั้นล้าง เติม Substrate และสารที่ทำให้เกิดสี

4.Sandwich ELISA เป็นการตรึง Antibody ตรึงบน Solid phase แล้วเติมสารที่ต้องการตรวจหาที่มี Antigen ทำปฏิกิริยากับ Antibody ที่ตรึงอยู่ จากนั้นล้าง แล้วเติม Antibody ที่จำเพาะต่อ Epitope ของ Antigen บริเวณต่างจากที่ Antibody ตัวแรกจับอยู่ จากนั้นก็ติดฉลากด้วยเอนไซม์ ล้าง และเติม Substrate และสารที่ทำให้เกิดสี

**References**

เบญจมาศ จิตรสมบูรณ์. (2020). **รายงานการวิจัยการพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อ ประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน.** สืบค้นเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2566. จาก http://sutir.sut.ac.th:8080/jspui/bitstream/123456789/3746/2/Fulltext.pdf

ชนินันท์ สนธิไชยและคณะ. (มปป). **การตอบสนองโดยการใช้สารน้ำและการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์.** สืบค้นเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2566. จาก http://guruvaccine.com/elearn/1-5-การตอบสนองโดยการใช้ สารน้ำและการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์/

ภาณุ อดกลั้น. (มปป). **ภูมิไวเกิน (Hypersensitivity).** สืบค้นเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2566. จาก http://110.164.51.230/manage/Research\_pic/20121111035242.pdf

เอกสารประกอบการสอน วิชา PS114319 พิษวิทยา (Toxicology) ภาคการศึกษาปลาย การศึกษา 2566 **เรื่อง Toxic response of the immune system**; คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

PANITSARA.S. (2020). **รู้จักงานด้าน ELISA.** สืบค้นเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2566. จาก https://www.anhsci.com รู้จักงานด้าน ELISA  - ANH (anhsci.com)

NewGen Diagnostics. (มปป). **Flow Cytometry.** สืบค้นเมื่อ 14 กุมภาพันธ์ 2566. จาก https://www.ngd.co.th/flow-cytometry/