การประเมินระยะเวลาหลังการตายจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังสุกรในระบบปิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี

โดย
นางสาวภคมน สุวรรณเมฆ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

การประเมินระยะเวลาหลังการตายจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังสุกรในระบบปิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี

โดย
นางสาวภคมน สุวรรณเมฆ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์
มหาวิทยาลัยศิลปากร
ปีการศึกษา 2568
ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศิลปากร

POSTMORTEM INTERVAL ESTIMATION FROM ENZYMATIC CHANGES ON PORCINE SKIN IN A CLOSED SYSTEM USING FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

By

Miss Phakhamon SUWANMEK

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for Master of Science FORENSIC SCIENCE

Department of FORENSIC SCIENCE

Academic Year 2025

Copyright of Silpakorn University

หัวข้อ	การประเมินระยะเวลาหลังการตายจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังสุกรในระบบปิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี
โดย	นางสาวภคมน สุวรรณเมฆ
สาขาวิชา	นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก	อาจารย์ ดร. อรทัย เขียวพุ่ม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง

คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร ได้รับพิจารณาอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะวิทยาศาสตร์
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. กรกช ชั้นจิรกุล)

พิจารณาเห็นชอบโดย

.....ประธานกรรมการ
(อาจารย์ ดร. ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาหลัก
(อาจารย์ ดร. อรทัย เขียวพุ่ม)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ดร. ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง)

.....ผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก
(รองศาสตราจารย์ ดร. ยุภาพร สมีน้อย)

660720052 : นิติวิทยาศาสตร์ แผน ก แบบ ก 2
คำสำคัญ : กิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส, กิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส, กิจกรรมของเอนไซม์เอสเทอเรส, ทริปโตเฟน, เวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI), Fluorescence Spectroscopy

นางสาว ภคมน สุวรรณเมฆ: การประเมินระยะเวลาหลังการตายจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังสุกรในระบบปิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร. อรทัย เขียวพุ่ม

การศึกษาครั้งนี้มุ่งตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ protease, lipase และ esterase บนผิวหนังบริเวณหน้าท้องสุกรหลังการตาย โดยใช้เทคนิค fluorescence spectroscopy ภายใต้แบบจำลองระบบปิดที่ควบคุมสภาวะอย่างเหมาะสม ทั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อประเมินว่าการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์เหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ระยะเวลาหลังการตาย (PMI) ได้หรือไม่ และเพื่อสำรวจศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือทางนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคต

ผลการวิจัยพบว่าเอนไซม์แต่ละชนิดมีรูปแบบการเปลี่ยนแปลงหลังการตายที่แตกต่างกันอย่างชัดเจน โดยกิจกรรมของ protease เริ่มปรากฏอย่างชัดเจนหลังประมาณ 30 ชั่วโมง และมีความผันผวนหลายช่วง แต่โดยรวมมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นชัดเจนในระยะกลางถึงระยะปลาย ซึ่งอาจเกิดจากการสลายตัวของเนื้อเยื่อร่วมกับกิจกรรมของจุลชีพระหว่างกระบวนการเน่าเปื่อย ในทางตรงกันข้าม กิจกรรมของ esterase ลดลงต่อเนื่อง โดยเฉพาะหลัง 72 ชั่วโมง สะท้อนถึงกระบวนการเสื่อมสภาพของเอนไซม์หลังการตาย ขณะที่ lipase มีระดับค่าค่อนข้างคงที่และสูงต่อเนื่องแม้หลัง 96 ชั่วโมง ซึ่งอาจบ่งบอกถึงความเสถียรของเอนไซม์หรือการผลิตเพิ่มเติมโดยจุลชีพในระยะ decomposition

ผลการวิเคราะห์ทางสถิติสนับสนุนแนวโน้มดังกล่าว โดย Spearman's correlation แสดงความสัมพันธ์ทางบวกระดับปานกลางระหว่างกิจกรรม protease กับ PMI และความสัมพันธ์ทางลบระดับปานกลางสำหรับ esterase ส่วน lipase มีความสัมพันธ์ต่ำกับ PMI นอกจากนี้ ผลการทดสอบ Kruskal–Wallis ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลา Early, Middle และ Late แม้เช่นนั้น รูปแบบการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพที่ชัดเจนของ protease และ esterase ยังคงชี้ให้เห็นถึงศักยภาพในการใช้เป็นตัวบ่งชี้ PMI ในระบบปิด และเป็นแนวทางที่มีความเป็นไปได้สำหรับการประยุกต์ใช้ทางนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคต

660720052 : Major FORENSIC SCIENCE

Keyword : Postmortem Interval (PMI), Lipase, Esterase, Tryptophan, Protease, Enzyme Activity, Skin Decomposition, Fluorescence Spectroscopy

Miss Phakhamon SUWANMEK : Postmortem Interval Estimation from Enzymatic Changes on Porcine Skin in a Closed System Using Fluorescence Spectroscopy Thesis advisor : Dr. Orathai Kheawpum

This study investigated the temporal changes in the enzymatic activity of protease, lipase, and esterase on porcine abdominal skin after death using fluorescence spectroscopy within a controlled closed-system model. The aim was to determine whether these enzymatic variations could serve as potential biomarkers for estimating the postmortem interval (PMI) and to assess their applicability as an alternative tool in forensic investigations.

The results demonstrated that each enzyme exhibited a distinct postmortem pattern. Protease activity became evident after approximately 30 hours and showed multiple fluctuations, yet generally increased during the middle to late postmortem stages. These changes likely resulted from endogenous tissue degradation combined with microbial activity during decomposition. In contrast, esterase activity progressively declined over time, particularly after 72 hours, indicating continuous enzymatic degradation following death. Meanwhile, lipase activity remained relatively stable and consistently elevated even beyond 96 hours, which may reflect intrinsic enzyme stability or microbial production during later decomposition.

Statistical analyses further supported these trends. Spearman's rank correlation revealed a moderate positive association between protease activity and PMI, and a moderate negative association for esterase, whereas lipase exhibited only a weak relationship with PMI. Additionally, the Kruskal–Wallis test showed no statistically significant differences among the Early, Middle, and Late PMI groups. Despite the absence of statistical significance, the clear biological patterns observed especially in protease and esterase highlight their potential as PMI indicators within closed systems and point toward promising forensic applications in future research.

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยเรื่อง การประเมินระยะเวลาหลังการตายจากการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังสุกรในระบบปิดด้วยเทคนิคฟลูออเรสเซนส์สเปกโทรสโกปี สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี เนื่องจากได้รับความกรุณาและความช่วยเหลือจากหลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.อรทัย เขียวพุ่ม อาจารย์ที่ปรึกษางานวิจัย และอาจารย์ ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ที่ได้กรุณาให้คำแนะนำ แก้ไขข้อบกพร่องและให้คำปรึกษาอย่างใกล้ชิดด้วยความเอาใจใส่ตลอดการดำเนินงาน ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.ศุภชัย ศุภลักษณ์นารี ประธานกรรมการและผู้ทรงคุณวุฒิภายนอก อาจารย์ ดร.ยุภาพร สมีน้อย กรุณาให้แนวทางและข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ต่อการพัฒนางานวิจัย รวมทั้ง ขอขอบพระคุณ อ.ดร.ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง และคุณปิยาภา จันทร์มล เจ้าหน้าที่บัณฑิตวิทยาลัย ที่ได้ให้คำแนะนำเพิ่มเติมและตรวจสอบความถูกต้องของรายงานวิจัยให้มีความสมบูรณ์เพิ่มขึ้น

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ คณะกรรมการสอบทุกท่าน ที่กรุณาให้คำแนะนำเพิ่มเติมและตรวจสอบความถูกต้องของรายงาน ตลอดจนคณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี มหาวิทยาลัยศิลปากร ที่ให้ความอนุเคราะห์ด้านเครื่องมือ อุปกรณ์และสถานที่ในการดำเนินการวิจัย

ด้วยความเคารพอย่างสูง ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณ บิดา มารดาและครอบครัว ที่เป็นกำลังใจสำคัญและผู้สนับสนุนทุนให้สามารถก้าวผ่านอุปสรรคต่าง ๆ จนงานวิจัยนี้สำเร็จลุล่วง สุดท้ายนี้ ผู้วิจัยขอมอบผลสำเร็จของงานวิจัยนี้เป็นเครื่องแสดงความกตัญญูกตเวทีแด่ บิดา มารดา และคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้และหากงานวิจัยนี้มีข้อบกพร่องประการใด ผู้วิจัยขอน้อมรับคำแนะนำเพื่อนำไปปรับปรุงให้ดียิ่งขึ้นต่อไป

ภคมน สุวรรณเมฆ

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ

กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ

สารบัญ ..... ช

สารบัญตาราง ..... ญ

สารบัญรูปภาพ ..... ฎ

บทที่ 1 1

บทนำ 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 3

1.3 คำถามการวิจัย 4

1.4 ขอบเขตการวิจัย 4

1.5 คำศัพท์เฉพาะ 5

1.6 ตัวแปรที่ใช้ที่ใช้ในงานวิจัย 7

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ 7

บทที่ 2 8

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 8

2.1 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ 8

2.2 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับการประมาณเวลาการตาย 10

2.3 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับบทบาทที่เกี่ยวข้องของเอนไซม์หลังการตาย 11

2.4 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์แบคทีเรียที่เข้าแทนที่เอนไซม์ Host 14

2.5 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับผิวหนังหมูจำลองแทนมนุษย์ 16
2.6 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับเครื่องมือ Fluorescence Spectroscopy ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านนิติเวช 18
2.7 แนวคิดและทฤษฎีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง 22
2.8 กรอบแนวคิด 25
บทที่ 3 26
วิธีดำเนินการวิจัย 26
3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย 28
3.2 สารเคมีที่ใช้ 28
3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง 29
3.4 วิธีการทดลอง 29
3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ 31
3.6 แผนการทดลอง 32
บทที่ 4 33
ผลการศึกษา 33
4.1 ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบของกราฟเพื่อดูแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ของตัวอย่างที่ 1 ที่ได้จากโรงเชือด 35
4.2 วิเคราะห์แบบ Spearman’s Rank correlation 37
4.3 วิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test 38
บทที่ 5 39
สรุปผลการศึกษา อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 39
5.1 สรุปผลการศึกษา 39
5.2 อภิปรายผลการศึกษา 41
5.3 ข้อเสนอแนะ 45

รายการอ้างอิง 47

ภาคผนวก 56

ประวัติผู้เขียน 65

สารบัญตาราง

หน้า

ตารางที่ 1 ตารางสรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย โดยแสดงภาพรวมของงานวิจัยชื่อผู้วิจัย ปีที่พิมพ์ พร้อมหมายเลขอ้างอิง ข้อมูลตัวอย่างการศึกษา ผลการค้นพบและข้อจำกัดที่สังเกตได้ 24

ตารางที่ 2 ตารางเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างที่ 1 (ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ได้จากโรงเชือด) และตัวอย่างที่ 2 (ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ได้จากตลาด)..... 34

มหาวิทยาลัยศิลปากร

สารบัญรูปภาพ

หน้า

ภาพที่ 1 คลื่นความยาวสเปกตรัมเรืองแสงของเครื่อง Fluorescence Spectroscopy 2

ภาพที่ 2 ไมโครไบโอมหลังการเสียชีวิตของมนุษย์ ส่วนประกอบของไมโครไบโอมหลังการเสียชีวิตของมนุษย์ประกอบด้วย ธานาโตไมโครไบโอม (ไมโครไบโอมของอวัยวะภายในของศพ) และชุมชนจุลินทรีย์เอพิเนโครติก (ไมโครไบโอมบนพื้นผิวของซากศพที่เน่าเปื่อย) 16

ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการเกิดการเรืองแสงของ Fluorescein diacetate (FDA) เมื่อถูกย่อยโดยเอนไซม์ Esterase 26

ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการเกิดการเรืองแสงของ 4-methylumbelliferyl butyrate (4-MU butyrate) เมื่อถูกย่อยโดยเอนไซม์ Lipase 27

ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตายของตัวอย่างที่ 1 (จากโรงเชือด) 35

ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตายของตัวอย่างที่ 2 (จากตลาด) 36

ภาพที่ 7 Heatmap แสดง Spearman's rank correlation ระหว่าง PMI และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากตัวแทนของเอนไซม์ Tryptophan ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมของการมีอยู่ของโปรตีนที่อาจรวมถึง Protease แต่ไม่ได้วัด activity โดยตรง ในขณะที่ 4-MU butyrate และ FDA ใช้ประเมินกิจกรรมของ Lipase และ Esterase โดยตรงผ่านการย่อย substrate จำเพาะ 37

ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test เทียบกลุ่มเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลา 38

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญ

การกำหนดช่วงเวลาหลังการเสียชีวิตถือเป็นสิ่งสำคัญ โดยช่วงเวลาตั้งแต่เสียชีวิตจนถึงพบศพเรียกว่า “ช่วงเวลาหลังการเสียชีวิต” (Postmortem Interval: PMI) การกำหนด PMI ที่แม่นยำถือเป็นสิ่งสำคัญในการปรับปรุงความเข้าใจของเราเกี่ยวกับสาเหตุของการเสียชีวิตและพลวัตของการสลายตัว ปัจจุบันมีหลายวิธีที่ใช้ในการประมาณค่า PMI ซึ่งส่วนใหญ่ขึ้นอยู่กับการเปลี่ยนแปลงตามเวลา (Dell'Annunziata et al., 2021)

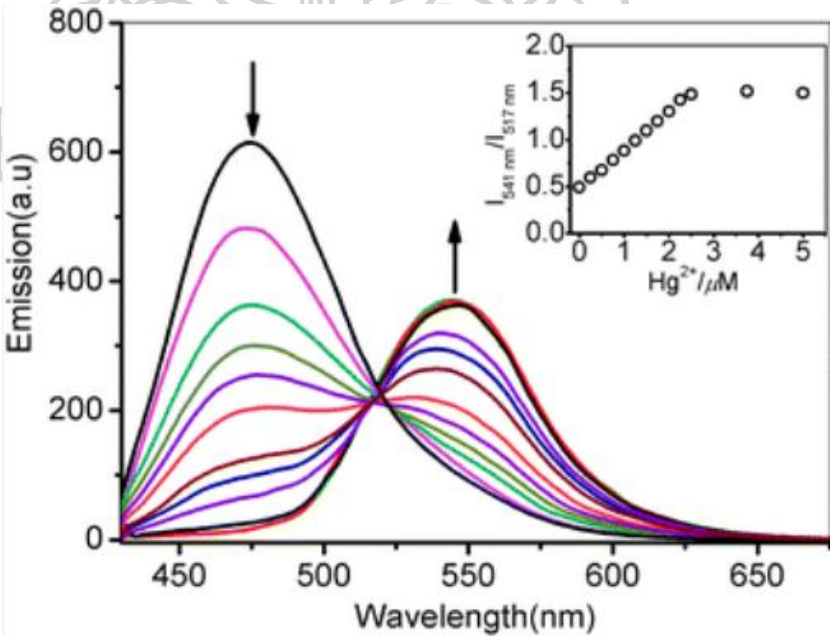
การประมาณเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI) เป็นหนึ่งในประเด็นที่สำคัญและยากที่สุดในนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากหลังการเสียชีวิตเนื้อเยื่อจะเริ่มเกิดการสลายตัว (Autolysis) รวมถึงชีวโมเลกุลต่างๆ ที่เสื่อมสภาพลงตามเวลา วิธีแบบดั้งเดิมในการประมาณ PMI มักพิจารณาจากปัจจัยต่างๆ เช่นกล้ามเนื้อ (rigor mortis) การเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิร่างกาย (Body cooling) และการสลายตัว (Zissler et al., 2020) การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลังการตาย สามารถใช้เป็นแนวทางที่น่าเชื่อถือได้ในการประมาณ PMI โดยเฉพาะเอนไซม์ ซึ่งเป็นโมเลกุลสำคัญที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญในร่างกายและเมื่อเซลล์เริ่มเสื่อมสลายหลังการตาย กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิดอาจจะลดลงหรือเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังการตาย (Sacco et al., 2022)

เอนไซม์มีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการ Autolysis (การสลายตัวของเซลล์โดยเอนไซม์ภายในเซลล์เอง) และกระบวนการ Putrefaction (การเน่าเปื่อยที่เกิดจากจุลินทรีย์) หลังการตาย ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์หลังการตายนี้จะเริ่มตั้งแต่ตายทันที เป็นระยะเริ่มต้นของ Autolysis (Buras, 2006)

ร่างกายเมื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายตัวเอนไซม์จะแบ่งเป็น 2 กระบวนการหลักๆ ได้แก่ Autolysis (การย่อยสลายตัวเองของเซลล์) เกิดจากเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์เอนไซม์ไลโซโซม (Lysosomal enzymes) ถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ขาดออกซิเจน ทำให้เกิดการสลายของโครงสร้าง

เซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้อง เช่น Protease, Lipase และ Esterase หลังจากเกิด Autolysis แล้วจะเกิด Putrefaction (การเน่าเปื่อยโดยจุลินทรีย์) เป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียเป็นตัวปล่อยออกมา (Cockle & Bell, 2015) งานวิจัยของ Wang et al. (2017) ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกระดูกมนุษย์หลังการตาย พูดถึงกระบวนการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน โดยมีเอนไซม์ Lipase และ Esterase มาเกี่ยวข้อง งานวิจัยวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมีด้วยวิธี Chemometrics ซึ่งได้แนะนำให้ใช้เทคนิค Fluorescence Spectroscopy ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ผิวหนัง เนื่องจากมีความไวสูงและเหมาะสมสำหรับการตรวจวิเคราะห์เอนไซม์โดยเฉพาะ (Wang et al., 2017)

การประมาณเวลาการตาย (PMI) เป็นหนึ่งในความท้าทายในนิติวิทยาศาสตร์ เทคนิคที่ใช้ปัจจุบัน เช่น การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย ยังมีข้อจำกัดและได้รับอิทธิพลจากปัจจัยภายนอก การใช้ Fluorescence Spectroscopy เป็นวิธีใหม่ที่ไม่ทำลายตัวอย่างและสามารถตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการตายได้ ทำให้มีศักยภาพในการประมาณ PMI ที่แม่นยำ และสามารถพัฒนาวิธีการประเมินในอนาคตได้ (Gruszczyńska et al., 2024)



ภาพที่ 1 คลื่นความยาวสเปกตรัมเรืองแสงของเครื่อง Fluorescence Spectroscopy (Jiang et.al., 2012)

ในปัจจุบัน การศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตายมีการศึกษาเพิ่มขึ้นอย่างแพร่หลายเพื่อหาการประมาณระยะเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval, PMI) เนื่องจากเอนไซม์มีกระบวนการเริ่มย่อยสลายตั้งแต่ขั้นแรก อย่างไรก็ตาม มีการวิจัยที่ใช้การเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีอื่น ๆ เพื่อช่วยในการประมาณ PMI เช่น pyknosis และหลังจาก 12 ชั่วโมงจะเกิด cytoplasm และ nuclear vacuolation ซึ่งการเปลี่ยนแปลงเหล่านี้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการประมาณระยะเวลาหลังการตายได้ในช่วง 6–12 ชั่วโมง (ปิยฉัตร พรหมเพชร, 2011) หรืองานวิจัยของ Emilia ได้ทำการศึกษาเอนไซม์ Tryptophan ที่มีความสัมพันธ์กับเอนไซม์ protease โดยใช้เครื่องมือ fluorescence spectroscopy (Gruszczyńska et al., 2024)

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ที่ผิวหนังในแต่ละช่วง PMI ภายใต้ระบบปิด โดยใช้ผิวหนังหมูแทนผิวหนังมนุษย์ เนื่องจากผิวหนังหมูมีความคล้ายคลึงกับผิวหนังมนุษย์ในแง่ของโครงสร้างทางกายวิภาคและชีวเคมีคล้ายกันจึงมีการนำมาจำลองแทนมนุษย์ในงานนิติวิทยาศาสตร์เป็นจำนวนมาก (McIntyre et al., 2016) และความคล้ายคลึงกันระหว่างหมูกับมนุษย์โดยเฉพาะบริบทของการศึกษาการย่อยสลาย (DeBruyn et al., 2021) เพื่อศึกษาเอนไซม์ที่ผิวหนังในการประมาณเวลาหลังการตาย วางรากฐานสำหรับการพัฒนาเครื่องมือวิเคราะห์ PMI ในอนาคต ช่วยเสริมสร้างข้อมูลใหม่ในการประเมิน PMI และสนับสนุนการสืบสวนในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase บนผิวหนังหมู หลังการตายในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค fluorescence spectroscopy
2. เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ที่เกี่ยวข้องกับการสลายตัวบนผิวหนังในช่วงเวลาหลังการตาย (PMI: Postmortem interval)

3. เปรียบเทียบความสัมพันธ์กิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase เป็นตัวชี้วัดสำหรับ PMI ในสภาวะแบบปิด เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการสนับสนุนและเป็นแนวทางใหม่ๆ ทางงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคต

1.3 คำถามการวิจัย

1. กิจกรรมเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase บนผิวหนังหมูหลังการตายมีการเปลี่ยนแปลงอย่างไรตามช่วงเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI)

2. ค่าความเข้มของการเรืองแสงจากสาร Substrate ได้แก่ FDA, 4-MU butyrate หรือ Tryptophan มีความสัมพันธ์กับกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตายหรือไม่?

3. การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เวลาหลังการตายได้อย่างมีประสิทธิภาพหรือไม่?

1.4 ขอบเขตการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูลของกิจกรรมเอนไซม์ โดยใช้ผิวหนังหมูแทนผิวหนังมนุษย์ (เนื่องจากผิวหนังหมูมีความคล้ายคลึงกับผิวหนังมนุษย์ทั้งในด้านโครงสร้างทางกายวิภาคและชีวเคมี) โดยมีการจำลองสถานการณ์ขึ้น และแบ่งขอบเขตการวิจัยออกเป็น 2 ส่วน

ขอบเขตด้านการทดลอง

1. ใช้ผิวหนังหมูส่วนท้องติดเนื้อเยื่อ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ที่พบในแต่ละช่วงเวลา จำลองสถานการณ์แบบระบบปิด โดยบรรจุตัวอย่างลงในกระเป๋าเดินทางขนาดเล็ก

2. นำส่วนที่ได้จากการ swab ผิวหนัง ซึ่งอยู่ในระยะการย่อยสลาย มาทำการสกัดเอนไซม์ (enzyme extract) และเก็บตัวอย่างใส่หลอดทดลองที่มีสารละลาย PBS เพื่อคงสภาพของเอนไซม์ โดยเก็บตัวอย่างตามช่วงเวลา 10, 29, 53, 58, 76, 82, 103, 178 และ 226 ชั่วโมง เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์หลังการตาย

ขอบเขตด้านเนื้อหา

1. วิเคราะห์เอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ที่พบในตัวอย่างแต่ละช่วงเวลา โดยใช้ Fluorescence Spectroscopy

2. ใช้การวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Spearman's correlation เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของกิจกรรมเอนไซม์ที่เปลี่ยนแปลงตามช่วงเวลาหลังการเสียชีวิต

3. วิเคราะห์ข้อมูลด้วย Kruskal–Wallis Test เพื่อทดสอบความแตกต่างของค่ากิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลา ว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหรือไม่

1.5 คำศัพท์เฉพาะ

การประมาณเวลาหลังการตาย (PMI) : ช่วงเวลาที่ผ่านไปหลังการเสียชีวิตของบุคคลจนถึงเวลาที่มีการตรวจพบศพ หรือเวลาที่มีการเก็บตัวอย่าง เป็นระยะเวลาตั้งแต่เสียชีวิตไปจนถึงช่วงเวลาทำการชันสูตรศพ โดยค่าดังกล่าวเป็นค่าที่ประมาณได้จากหลักฐานทางชีวภาพ กายภาพ หรือเคมี

Time Since Death (TSD) : เวลาที่ผ่านไปจริงนับตั้งแต่บุคคลเสียชีวิตจนถึงปัจจุบัน โดยใช้การเปลี่ยนแปลงหลังการตาย ซึ่งเป็นค่าที่ทราบแน่ชัดในกรณีการทดลองหรือการควบคุมตัวแปรทางห้องปฏิบัติการ

การสลายตัวโดยเอนไซม์อื่น (Enzymatic Degradation) : เอนไซม์บางชนิดอาจถูกย่อยสลายโดยเอนไซม์อื่น เช่น โปรตีเอส (Protease) ที่สามารถตัดพันธะเปปไทด์ของเอนไซม์เป้าหมาย ทำให้มันสูญเสียหน้าที่

การสลายตัวภายหลังการตาย (Post-Mortem Enzyme Degradation) : เมื่อสิ่งมีชีวิตตายลง กระบวนการเมตาบอลิซึมจะหยุดลง และเอนไซม์ต่าง ๆ จะเริ่มถูกย่อยสลายโดย Autolysis (การย่อยตัวเองของเซลล์) และกระบวนการ Putrefaction (การเน่าเปื่อยโดยแบคทีเรีย) เช่น Catalase, LDH (Lactate Dehydrogenase), Alkaline Phosphatase

เอนไซม์ Autolysis : เอนไซม์ที่ทำให้เซลล์เกิดการย่อยสลายตัวเองหลังจากสิ่งมีชีวิตตาย โดยไม่ต้องอาศัยจุลินทรีย์ กระบวนการนี้เกิดจากเอนไซม์ภายในเซลล์ เช่น ไลโซโซมเอนไซม์ (Lysosomal enzymes) ที่ย่อยสลายโปรตีน ไขมันและกรดนิวคลีอิก ส่งผลให้เซลล์แตกสลาย (Self-digestion)

Protease (โปรตีเอส) : หลังการตายโปรตีเอสจากไลโซโซมและอวัยวะภายในเริ่มย่อยโปรตีนภายในเซลล์ เปลี่ยนแปลงเนื้อเยื่อทำให้เกิดการสลายของเซลล์กล้ามเนื้อ ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการหลักของ Autolysis

Lipase (ไลเปส) : เป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยไขมันให้กลายเป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล หลังการตาย ไขมันในร่างกายเริ่มถูกไลเปสจากตับอ่อนและเซลล์ต่าง ๆ ย่อยสลาย ซึ่งอาจนำไปสู่การเกิดสารประกอบที่ทำให้เกิดกลิ่นเหม็น

Esterase (เอสเทอเรส) : เป็นเอนไซม์ที่ช่วยในการย่อยสลายสารประกอบเอสเทอร์ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์และกรด ทำให้เกิดการปล่อยกลิ่นเหม็นจากสารอินทรีย์ที่เน่าเปื่อย เช่น กลิ่นของศพเน่า

FDA (Fluorescein Diacetate Hydrolysis Assay) : เป็นสารตั้งต้นที่ใช้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ในเซลล์โดยเอนไซม์ esterase จะย่อยสลาย FDA และปล่อย fluorescein ซึ่งเป็นสารเรืองแสงออกมา

4-MU Butyrate (4-Methylumbelliferyl butyrate) : เป็นสารตั้งต้นเรืองแสงที่ใช้ในงานวิเคราะห์เอนไซม์ประเภท esterase และ lipase โดยเมื่อตัวเอนไซม์ย่อยสลายสารนี้ จะปล่อย 4-Methylumbelliferone (4-MU) ออกมา ซึ่งสามารถตรวจวัดได้ด้วย Fluorescence Spectroscopy

Tryptophan : เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างวง Indole ซึ่งสามารถถูกเปลี่ยนแปลงผ่านกระบวนการทางชีวเคมี

Spearman Correlation : เป็นวิธีหาความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปรสองตัวที่อยู่ในระดับการวัดแบบลำดับ (Ordinal Scale) โดยค่าความสัมพันธ์มีตั้งแต่ -1 ถึง +1 ค่าบวกแสดงถึงความสัมพันธ์ไปในทิศทางเดียวกัน ส่วนค่าลบหมายถึงตรงข้ามกัน หากค่าเป็น 0 แสดงว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน

สถิตินอนพาราเมตริก (Non-parametric statistics) : วิธีการทางสถิติที่ไม่ต้องอาศัยการแจกแจงของข้อมูลแบบปกติ ใช้ได้กับข้อมูลที่ไม่เป็นเชิงปริมาณหรือไม่เป็นไปตามสมมติฐานของสถิติพาราเมตริก

Kruskal-Wallis test : เป็นการทดสอบทางสถิติแบบไม่ใช้พารามิเตอร์ เพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มตัวอย่างอิสระตั้งแต่สองกลุ่มขึ้นไปว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

1.6 ตัวแปรที่ใช้ที่ใช้ในงานวิจัย

ตัวแปรต้น ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ใช้ระบบปิด

ตัวแปรตาม กิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ในแต่ละช่วงเวลา

ตัวแปรแทรกซ้อน อุณหภูมิและความชื้น

ตัวแปรควบคุม วันเวลาที่เก็บตัวอย่างไปวิเคราะห์ อุปกรณ์ที่เก็บตัวอย่าง การบรรจุผิวหนังหมูใส่ในกระเป๋า ตัวทำละลาย และชนิดของสารตั้งต้น (Substrate)

1.7 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ช่วงเวลาหลังการตาย (PMI) กรณีที่ไม่พบหลักฐานทางชีวภาพหรือสภาพแวดล้อมระบบปิด เช่น กระเป๋าเดินทางหรือตู้ที่ปิดมิดชิดจนแมลงวันไม่สามารถเข้าไปในสถานที่เกิดเหตุ เพื่อประเมินระยะเวลาการเสียชีวิต
2. เพิ่มขีดความสามารถในการประมาณค่า PMI ด้วยการใช้เอนไซม์และเทคนิค Fluorescence Spectroscopy ที่มีความไวสูง
3. ช่วยเพิ่มการสร้างแนวทางใหม่ในงานนิติวิทยาศาสตร์ โดยนำข้อมูลที่ได้มาประยุกต์ใช้เป็นเครื่องมือสนับสนุนการสืบสวนและการวิเคราะห์ PMI ในอนาคต

มหาวิทยาลัยศิลปากร

บทที่ 2

แนวคิด ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การวิจัยเรื่องนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำกิจกรรมเอนไซม์มาใช้ในการประมาณค่าช่วงเวลาหลังการตาย เพื่อประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ ในกรณีที่ไม่พบหลักฐานทางชีวภาพหรือแม้แต่หนอนดักแด้ โดยศึกษาค้นคว้าเอกสาร ทฤษฎี และงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการประยุกต์ใช้เอนไซม์ในงานนิติวิทยาศาสตร์และนิติเวช เพื่อเป็นแนวทางสนับสนุนการปฏิบัติงานของพนักงานสืบสวนต่อไป

จำแนกประเด็นที่มีความเกี่ยวข้อง ดังนี้

2.1 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2.2 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับการประมาณเวลาการตาย

2.3 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับบทบาทที่เกี่ยวข้องของเอนไซม์หลังการตาย

2.4 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์แบคทีเรียที่เข้าแทนที่เอนไซม์ Host

2.5 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับผิวหนังหมูจำลองแทนมนุษย์

2.6 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับเครื่อง Fluorescence Spectroscopy ที่ใช้ในการศึกษาทางนิติเวช

2.7 แนวคิดและทฤษฎีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.8 กรอบแนวคิด

2.1 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

2.1.1. ชีวิตหลังการตาย

ร่างกายของคนที่ยังมีชีวิต ระบบไหลเวียนโลหิตทำงานอย่างต่อเนื่องโดยการสูบฉีดของหัวใจ แต่เมื่อเสียชีวิตการไหลเวียนของเลือดจะหยุดลง เลือดจะไหลลงไปสะสมตามส่วนที่อยู่ต่ำสุดของร่างกายเนื่องจากแรงโน้มถ่วง ทำให้เกิดรอยจ้ำเลือดหลังการตาย (Postmortem Lividity หรือ Livor Mortis) ซึ่งมีลักษณะเป็น สีแดงอมม่วง (Reddish-Blue Staining) ในบริเวณที่ต่ำของ

ร่างกาย (Usumoto et al., 2019) การนี้จะเกิดขึ้นได้ภายใน 6-8 ชั่วโมงแรกหลังการตายเท่านั้น เพราะหลังจากนั้นเลือดจะเริ่มแข็งตัว (Coagulation) ทำให้รอยจ้ำเลือดคงที่หรือ “ค้าง” อยู่ในตำแหน่งเดิม ซึ่งเรียกว่า “การตรึงของรอยจ้ำเลือด” (Fixation of Postmortem Staining) ในกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์ เป็นกระบวนการทางชีวเคมีที่โมเลกุลของสารประกอบอินทรีย์ถูกทำลายลงโดยเอนไซม์ ทำให้สารนั้นเปลี่ยนรูปหรือแตกตัวเป็นหน่วยที่เล็กลง กระบวนการนี้มีบทบาทสำคัญทั้งในสิ่งมีชีวิตและการย่อยสลายของสิ่งมีชีวิตหลังการตาย (Heris, 2024)

2.1.2. กลไกของกระบวนการย่อยสลายด้วยเอนไซม์

- **Autolysis การสลายตัวด้วยเอนไซม์ของร่างกาย**

เป็นกระบวนการย่อยสลายที่เกิดขึ้นเองภายในเซลล์โดยอาศัยเอนไซม์ของเซลล์นั้นเอง โดยไม่เกี่ยวข้องกับแบคทีเรีย เอนไซม์เหล่านี้ถูกปล่อยออกมาจากไลโซโซม (lysosomes) ซึ่งทำให้เซลล์เริ่มแตกสลายเมื่อร่างกายขาดออกซิเจนและพลังงานหลังการเสียชีวิต กระบวนการนี้เกิดขึ้นเร็วมากโดยเฉพาะในอวัยวะที่มีเอนไซม์สูง เช่น ตับอ่อน (pancreas) ซึ่งสามารถสังเกตการสูญเสียสีย้อมของนิวเคลียสได้เร็วที่สุด ตับ (liver) และไต (kidney) ก็เป็นอวัยวะที่ได้รับผลกระทบจาก Autolysis อย่างรวดเร็วเช่นกัน Autolysis ยังทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงเริ่มเสื่อมสภาพและอาจนำไปสู่การแพร่กระจายของเอนไซม์ไปยังเนื้อเยื่อรอบข้าง การเปลี่ยนแปลงระดับจุลกายวิภาค (microscopic changes) อาจทำให้เกิดความสับสนในการวินิจฉัยนิติเวช เช่น การแยกแยะระหว่าง ischemic necrosis (เนื้อเยื่อตายจากขาดเลือด) กับ autolytic changes การวิเคราะห์การตายจากภาวะขาดออกซิเจนอาจถูกย่อยสลายก่อนตรวจพบ (Dettmeyer, 2018)

- **Putrefaction การเน่าเปื่อยจากแบคทีเรีย**

Putrefaction เป็นกระบวนการย่อยสลายที่เกิดจากแบคทีเรีย แตกต่างจาก Autolysis ที่อาศัยเอนไซม์ของเซลล์เอง กระบวนการนี้เริ่มขึ้นเมื่อร่างกายเริ่มสะสมแก๊สจากการเมแทบอลิซึมของจุลินทรีย์ ซึ่งส่วนใหญ่มาจากลำไส้และแพร่กระจายเข้าสู่เนื้อเยื่อต่าง ๆ ผ่านทางหลอดเลือดและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน Putrefaction ทำให้เกิด การสะสมแก๊สในอวัยวะ เช่น ฟองแก๊สในตับเรียกว่า (comb-like liver) อวัยวะที่ได้รับผลกระทบจาก putrefaction จะมีการสูญเสียโครงสร้างที่เป็นระเบียบ (organoid structure) เช่น ตับ (liver) กล้ามเนื้อหัวใจ (heart muscle) ปอด (lungs) (Tumer et al., 2013)

จุลชีพที่เกี่ยวข้องกับ putrefaction *Clostridium* spp. และ *Bacteroides* spp. เป็นตัวการหลักที่ทำให้เกิดการสร้างแก๊สและกลิ่นเหม็น แบคทีเรียอื่น ๆ ที่อาศัยอยู่ในลำไส้ก็มีบทบาทในการสร้างโปรตีเอสที่ช่วยย่อยโปรตีนในร่างกาย การสะสมแก๊สในอวัยวะต่าง ๆ อาจทำให้การวินิจฉัย air embolism (ภาวะอากาศในกระแสเลือด) ทำได้ยากขึ้น ปัจจัยที่ส่งผลต่ออัตราการเกิด putrefaction ได้แก่ อุณหภูมิ ความชื้น และการสัมผัสอากาศ โดยสภาพแวดล้อมที่ร้อนและชื้นเร่งให้กระบวนการนี้เกิดขึ้นเร็วขึ้น (Dettmeyer, 2018)

2.2 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ที่สัมพันธ์กับการประมาณเวลาการตาย

กิจกรรมของเอนไซม์ที่ใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย และการวิเคราะห์ระยะเวลาหลังการตาย (PMI)

2.2.1 บทบาทของเอนไซม์ในกระบวนการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย

หลังจากที่สิ่งมีชีวิตเสียชีวิต ระบบไหลเวียนโลหิตหยุดทำงานและเซลล์เริ่มเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายตนเอง (Autolysis) ซึ่งเกี่ยวข้องโดยตรงกับกิจกรรมของเอนไซม์ในร่างกาย โดยเฉพาะเอนไซม์ที่มีอยู่ในเซลล์และเอนไซม์ที่ปล่อยออกมาจากจุลินทรีย์ที่เข้ามาย่อยสลายซาก เอนไซม์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้ ได้แก่

- Protease (โปรตีเอส): ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนในเนื้อเยื่อให้กลายเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน
- Lipase (ไลเปส): ช่วยสลายไขมันให้เป็นกรดไขมันและกลีเซอรอล
- Esterase (เอสเทอเรส): มีบทบาทในการสลายพันธะเอสเทอร์ในสารชีวโมเลกุล

โดยเอนไซม์เหล่านี้ เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาหลังการตาย ทำให้สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดทางชีวเคมีเพื่อคาดการณ์ PMI ได้ (Cockle & Bell, 2015)

2.2.2 ความสัมพันธ์ของเอนไซม์กับระยะเวลาหลังการตาย (PMI)

2.2.2.1 ระดับกิจกรรมของเอนไซม์กับ PMI

- ช่วงแรกหลังการตาย : Autolysis เกิดขึ้นจากเอนไซม์ภายในที่ทำให้โครงสร้างเซลล์และเนื้อเยื่อเริ่มสลายตัว (Paczkowski & Schütz, 2011)

  - Protease เริ่มทำลายโปรตีนโครงสร้างของเนื้อเยื่อ
  - Lipase และ Esterase เริ่มทำงานในเซลล์ไขมัน

- ช่วงกลางของการย่อยสลาย : มีการเพิ่มขึ้นของจุลินทรีย์และการปล่อยเอนไซม์จากแบคทีเรีย (Zhou & Byard, 2011)

  - กิจกรรมของ Protease เพิ่มขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อเริ่มสูญเสียความคงตัว
  - Lipase และ Esterase เร่งการสลายของไขมันในชั้นผิวหนัง

- ช่วงปลายของการย่อยสลาย : กิจกรรมของเอนไซม์ลดลง เนื่องจากเนื้อเยื่อเริ่มแตกสลาย การเกิดก๊าซและการเปลี่ยนแปลงของค่า pH ทำให้การทำงานของเอนไซม์บางชนิดลดลง (Kaur et al., 2021)

2.2.2.2 การนำเอนไซม์มาใช้ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย เป็นการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์เพื่อใช้เป็นตัวบ่งชี้ PMI นักวิจัยได้อาศัยการเปลี่ยนแปลงของระดับเอนไซม์ในช่วงเวลาต่าง ๆ หลังการตาย ซึ่งสามารถทำได้โดยการตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ผ่าน fluorescence spectroscopy การวิเคราะห์ปริมาณเอนไซม์ในเนื้อเยื่อหรือของเหลวภายในร่างกาย (Muralidharan et al., 2021)

2.3 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับบทบาทที่เกี่ยวข้องของเอนไซม์หลังการตาย

2.3.1 หน้าที่ของเอนไซม์ Esterase, Protease และ Lipase ในร่างกายมนุษย์ขณะมีชีวิต

- **เอนไซม์ Esterase** เป็นกลุ่มเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ย่อยสลายเอสเตอร์ให้กลายเป็นแอลกอฮอล์และกรด มีบทบาทในกระบวนการต่าง ๆ เช่น การสลายสารสื่อประสาทบางชนิด และการเผาผลาญยาในร่างกาย ตัวอย่างได้แก่ Acetylcholinesterase (AChE) ทำหน้าที่สลายอะซิติลโคลีน (Acetylcholine) ที่ไซแนปส์ของระบบประสาท ช่วยให้การส่งสัญญาณประสาท

ทำงานเป็นปกติ Carboxylesterases: เกี่ยวข้องกับกระบวนการเผาผลาญยาและสารพิษในตับ Pancreatic esterases: ทำหน้าที่ย่อยไขมันในระบบทางเดินอาหาร (Pigaiani et al., 2020)

- **เอนไซม์ Protease** หรือ Peptidase เป็นเอนไซม์ที่ช่วยสลายโปรตีนให้กลายเป็นเปปไทด์และกรดอะมิโน มีความสำคัญในหลายกระบวนการทางสรีรวิทยาอื่น ๆ เช่น การย่อยอาหาร ที่มี Pepsin, Trypsin และ Chymotrypsin, การควบคุมการตายของเซลล์ (Apoptosis): Caspases เป็นกลุ่มโปรตีเอสที่เกี่ยวข้องกับการตายของเซลล์ตามโปรแกรม Caspases เป็นกลุ่มโปรตีเอสที่ควบคุมการตายของเซลล์ และ การซ่อมแซมเนื้อเยื่อและการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน: เช่น MMPs (Matrix Metalloproteases) ที่ช่วยย่อยสลายโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (Pigaiani et al., 2020)
- **เอนไซม์ Lipase** มีบทบาทในกระบวนการเผาผลาญไขมันและการส่งสัญญาณของเซลล์ โดยช่วยสลายไตรกลีเซอไรด์ให้เป็นกลีเซอรอลและกรดไขมันอิสระ ตัวอย่างได้แก่ Pancreatic Lipase และ Gastric Lipase: ช่วยย่อยไขมันจากอาหาร Lipoprotein Lipase (LPL): ช่วยเผาผลาญไขมันที่อยู่ในไลโปโปรตีน Hormone-Sensitive Lipase (HSL): ควบคุมการปล่อยพลังงานจากไขมันสะสมในร่างกาย (Zechner et al., 2012)

2.3.2 หน้าที่ของเอนไซม์ Esterase, Protease และ Lipase ในร่างกายมนุษย์หลังการตาย

- **เอนไซม์ Esterase หลังตาย** เมื่อเซลล์เริ่มสูญเสียความสมบูรณ์ของโครงสร้าง เอนไซม์ esterase จะรั่วไหลออกสู่ของเหลวในร่างกายและเริ่มกระบวนการ autolysis (การย่อยสลายตัวเองของเซลล์) เอนไซม์กลุ่มนี้ยังคงทำงานต่อได้ช่วงระยะเวลาหนึ่งหลังการตาย ก่อนจะค่อย ๆ ถูกย่อยสลายหรือสูญเสียสภาพ การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรม esterase จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ระยะเวลาหลังการตาย (PMI) ได้ เนื่องจากมีการเปลี่ยนแปลงอย่างเป็นระบบตามช่วงเวลา (Salhi et al., 2020); (Khalil et al., 2024)
- **เอนไซม์ Protease หลังตาย** Protease ยังคงทำงานได้ในระยะสั้นหลังความตาย และมีบทบาทสำคัญในการ autolysis โดยย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์ ทำให้เนื้อเยื่อสูญเสียความแข็งแรงและเกิดการอ่อนตัวของร่างกายหลังตาย เอนไซม์ Caspases จะหยุดทำงานเมื่อขาด ATP แต่ Lysosomal Protease เช่น Cathepsins ยังคงทำงานต่อไปและย่อยสลายโครงสร้างเซลล์ โปรตีนที่มี Tryptophan จะถูกตัดออกเป็นเปปไทด์ขนาดเล็ก ส่งผลให้กิจกรรมของ protease

เพิ่มขึ้นในช่วงต้นของการเน่าเปื่อย (Salhi et al., 2020) ; (Long & Cravatt, 2011) การสลายตัวของโปรตีนดังกล่าวทำให้สารอนุพันธ์ของ Tryptophan เช่น อินโดล (Indole) และสกาทอล (Skatole) เพิ่มขึ้น ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ PMI ได้ โดยอาศัยการตรวจวัดปริมาณเอนไซม์หรือผลิตภัณฑ์จากการสลายตัวในเนื้อเยื่อ (Hellmann & Schneider, 2019) ตัวบ่งชี้ PMI สามารถตรวจวัดได้จากปริมาณเอนไซม์ที่คงเหลืออยู่ในเนื้อเยื่อ (Salhi et al., 2020) ; (Long & Cravatt, 2011)

- **เอนไซม์ Lipase หลังตาย** Lipase ยังคงทำงานย่อยสลายไขมันในร่างกายหลังความตาย ซึ่งเป็นสาเหตุของการสลายตัวของไขมันในเนื้อเยื่อ หากร่างกายอยู่ในสภาวะแวดล้อมที่ชื้น Lipase อาจส่งผลให้เกิด “Adipocere” หรือภาวะไขมันกลายเป็นสบู่ ช่วยรักษาสภาพของร่างกายให้อยู่ได้นานขึ้น การตรวจวัดกิจกรรมของ Lipase จึงอาจใช้เป็นตัวบ่งชี้ PMI ได้ จากแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์เมื่อเวลาผ่านไป (Salhi et al., 2020) ; (Khalil et al., 2024)

งานวิจัยของ Szeremeta et al. (2022) แสดงให้เห็นว่าหลังการตายมีการเปลี่ยนแปลงของเมแทบอไลต์ในร่างกาย เกี่ยวข้องกับกิจกรรมของเอนไซม์ที่ยังคงทำงานในระยะต้น แม้งานดังกล่าวไม่ได้วิเคราะห์เอนไซม์โดยตรง แต่ผลการศึกษาชี้ให้เห็นว่าเอนไซม์มีบทบาทสำคัญในการเปลี่ยนแปลงของสารชีวเคมีหลังการตาย ดังนั้น การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ เช่น Protease, Lipases และ Esterases จึงอาจเป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการประมาณค่า PMI อย่างแม่นยำ

2.3.3 Tryptophan ในโครงสร้างของเอนไซม์และการมีส่วนร่วมหลังการตาย

Tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่มีโครงสร้างวงแหวนอะโรมาติก ซึ่งสามารถเกิดปฏิสัมพันธ์กับโมเลกุลอื่นผ่านแรง π–π stacking และพันธะไฮโดรเจน ช่วยให้เอนไซม์คงรูปและทำงานได้อย่างมีประสิทธิภาพ ทั้งยังเป็นส่วนสำคัญของโครงสร้างโปรตีนในเอนไซม์หลายชนิด Tryptophan มีคุณสมบัติเรืองแสงตามธรรมชาติ สามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างโปรตีนเมื่อเอนไซม์เกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพ เช่น การย่อยโปรตีนโดย Protease หรือการทำงานของ Esterase และ Lipase สภาพแวดล้อมของ Tryptophan ภายในเอนไซม์อาจเปลี่ยนไปหลังการตาย ส่งผลให้ความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) เปลี่ยนแปลง การวัด intrinsic fluorescence ของ Tryptophan จึงสามารถใช้ในการศึกษาการพับหรือคลายตัวของโปรตีนตลอดจนการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในสภาวะหลังการตาย (Hellmann & Schneider, 2019)

นอกจากนี้กิจกรรมของ Protease ที่ย่อยโปรตีนซึ่งมี Tryptophan อาจส่งผลให้ความเข้มของ fluorescence ของตัวอย่างเปลี่ยนแปลงการทำงานของ Esterase และ Lipase ก็อาจส่งผลต่อสภาพแวดล้อมของ Tryptophan ในโปรตีนโดยรอบ ทำให้สัญญาณ fluorescence เปลี่ยนไปได้เช่นกัน ดังนั้น การใช้คุณสมบัติการเรืองแสงของ Tryptophan ซึ่งสะท้อนถึงการทำงานร่วมของ Protease และเอนไซม์อื่นหลังการตาย จึงเป็นแนวทางที่มีศักยภาพในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังหลังการตาย(Yuan & Relue, 2008)

เอนไซม์ทั้งสามชนิดนี้ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของไขมันเป็นกรดไขมันและสารประกอบระเหยที่มีกลิ่นเฉพาะ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของกระบวนการเน่าเปื่อย (putrefaction) การใช้ substrate และตัวบ่งชี้เฉพาะเหล่านี้ ช่วยติดตามการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตายได้อย่างแม่นยำ เหมาะสมต่อการประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์

2.4 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับบทบาทของเอนไซม์แบคทีเรียที่เข้าแทนที่เอนไซม์ Host

หลังการเสียชีวิต เอนไซม์จากร่างกายมนุษย์ (เช่น Protease, Esterase) จะค่อย ๆ สูญเสียกิจกรรม (activity) ตามระยะเวลาหลังการตาย (post-mortem) เนื่องจากกระบวนการ autolysis และการเปลี่ยนแปลงของค่า pH (Vass et al., 2002) ; (Pittner et al., 2020) โดยทั่วไป เอนไซม์จาก host มักลดระดับลงและหมดฤทธิ์ภายในประมาณ 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นแบคทีเรียจะเริ่มเคลื่อนเข้าสู่อวัยวะภายในและเริ่มผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของตนเอง เช่น Protease, Lipase, Glycosidase และ nuclease เพื่อย่อยสลายเนื้อเยื่อและสารชีวภาพภายในร่างกาย กระบวนการนี้ช่วยเร่งการเน่าเปื่อย (putrefaction) และอาจทำให้ระดับเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้ง (Vass et al., 2002) ; (Pittner et al., 2020) กระบวนการนี้อธิบายได้ด้วยแนวคิด “การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียหลังความตาย” (bacterial translocation)

เมื่อเกิดสภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) ร่วมกับการหมักแบบไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic fermentation) แบคทีเรียบางชนิด เช่น *Clostridium* spp. จะเพิ่มจำนวนและเคลื่อนที่แพร่ไปยังอวัยวะอื่น โดยสามารถตรวจพบได้ในช่วงประมาณ 48–240 ชั่วโมงหลังการตาย กระบวนการนี้จะ

ปลดปล่อยสารอินทรีย์และก๊าซต่าง ๆ เช่น H_2S, CO_2 และ CH_4 ซึ่งเป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตโดยแบคทีเรียในกระบวนการย่อยสลาย แบคทีเรียเหล่านี้สามารถผลิตเอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญต่อการสลายเนื้อเยื่อ และอาจใช้เป็นตัวชี้วัดระยะเวลาหลังการตาย (PMI) ได้ เช่น *Clostridium* spp. ซึ่งยังสามารถตรวจพบได้ยาวนานถึง 240 ชั่วโมงหลังการตาย (Abdoun et al., 2023) นอกจากนี้ แบคทีเรียไม่ใช้ออกซิเจนบางชนิดยังสามารถผลิต lipase ได้ โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์จากแบคทีเรียมีความคงที่มากขึ้นเมื่อผ่านไปประมาณ 96 ชั่วโมงหลังความตาย (Alves et al., 2016) ; (Alrumman et al., 2018)

2.4.1 บทบาทของเอนไซม์แบคทีเรีย (Bacterial Enzymes)

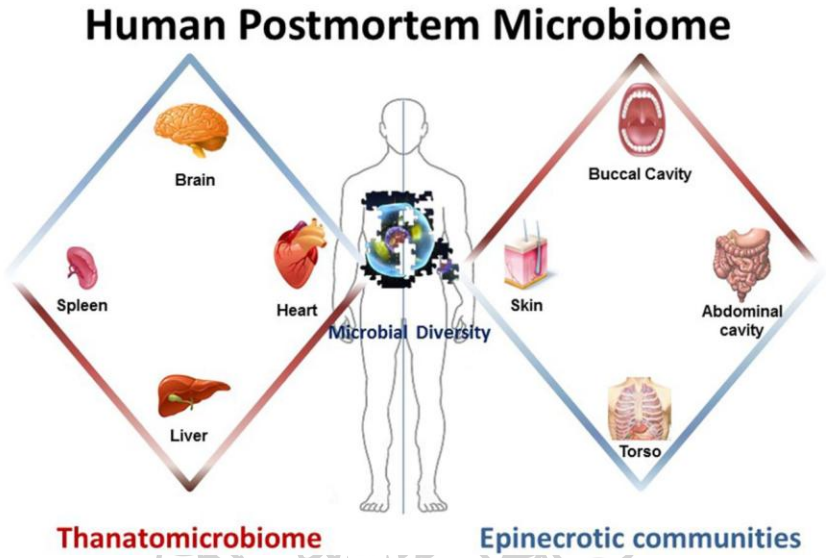
- Proteases ทำหน้าที่ย่อยสลายโปรตีนภายในเซลล์ รวมถึงกล้ามเนื้อและเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ผลิตโดยแบคทีเรียกลุ่ม *Clostridium* spp., *Bacteroides*, และ *Enterococcus* ซึ่งมีบทบาทสำคัญในช่วง active decay และ advanced decay (Abdoun et al., 2023)

- Lipases ย่อยสลายไขมันในเนื้อเยื่อ เช่น ผิวหนังและเยื่อหุ้มเซลล์ ผลิตโดย *Clostridium perfringens*, *Bacteroides fragilis* (Metcalf et al., 2016)

- Glycosidases / Nucleases ย่อยโพลีแซคคาไรด์ (เช่น glycoproteins ในเยื่อหุ้มเซลล์) และกรดนิวคลีอิก ซึ่งส่งผลให้เกิดการปล่อยกลิ่นและการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างเซลล์ (Metcalf et al., 2016)

แนวคิดของ Thanatomicrobiome (Javan et al., 2016) อธิบายว่า หลังการเสียชีวิต แบคทีเรียที่เคยอาศัยอยู่ในลำไส้จะเคลื่อนเข้าสู่อวัยวะที่ปกติปลอดเชื้อ และเริ่มผลิตเอนไซม์ย่อยสลายของตนเอง ทำหน้าที่แทนเอนไซม์ของ host ที่สูญเสียกิจกรรมไปตามเวลา post-mortem โดยมีรายงานว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* และ *Bacillus* สามารถผลิตเอนไซม์ Lipase และ Protease ได้เมื่อเวลาผ่านไป แบคทีเรียทั้งสองชนิดนี้มักพบได้บนผิวหนังและในสิ่งแวดล้อม เช่น ดิน หรือฝุ่นและจะเจริญได้ดีเมื่อผิวหนังของศพเริ่มเปียกชื้นโดย *Pseudomonas* มักเริ่มปรากฏในช่วง 48–96 ชั่วโมงหลังการตาย (Gupta et al., 2004) (Van Damme et al., 2021) รายงานของ Zhang et al. (2015) ระบุว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ Lipase และ Protease ได้ต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป อีกทั้ง *Pseudomonas* ยังสามารถผลิต Protease ที่มี activity สูงซึ่งย่อยสลายโปรตีน

ของผิวหนังและกล้ามเนื้อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Zhai et al., 2022) และยังมีความทนทานต่อความร้อนได้ดี (Yuan et al., 2018)



ภาพที่ 2 ไมโครไบโอมหลังการเสียชีวิตของมนุษย์ ส่วนประกอบของไมโครไบโอมหลังการเสียชีวิตของมนุษย์ประกอบด้วย ธานาโตไมโครไบโอม (ไมโครไบโอมของอวัยวะภายในของศพ) และชุมชนจุลินทรีย์เอพิเนโครติก (ไมโครไบโอมบนพื้นผิวของซากศพที่เน่าเปื่อย)

(Javan et al., 2016)

2.5 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับผิวหนังหมูจำลองแทนมนุษย์

คุณสมบัติเชิงกลของผิวหนังสุกรมีความใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ โดยเฉพาะในด้านพฤติกรรมทางกล (mechanical behavior) ซึ่งเป็นปัจจัยสำคัญที่ทำให้ผิวหนังสุกรถูกนำมาใช้เป็นแบบจำลอง (model organism) สำหรับการศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์และชีวกลศาสตร์ของผิวหนังมนุษย์

- **โครงสร้างทางกายภาพและองค์ประกอบทางชีวเคมี** ผิวหนังสุกรประกอบด้วยหนังกำพร้า หนังแท้ และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous fat) เช่นเดียวกับผิวหนังมนุษย์ โดยมีจำนวนรูขุมขนและต่อมไขมันในระดับใกล้เคียงกันมากกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่น เช่น หนูหรือกระต่าย ผิวหนังสุกรยังมีองค์ประกอบของคอลลาเจน (collagen) และอีลาสติน (elastin) ใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ ส่งผลให้มีความยืดหยุ่นและความแข็งแรงของเนื้อเยื่อในระดับที่เทียบได้ (Hong et al., 2023)

- **คุณสมบัติเชิงกล (Mechanical Properties)** ผิวหนังสุกรแสดงพฤติกรรมเชิงกลแบบไม่เป็นเชิงเส้น (nonlinear stress–strain behavior) ภายใต้แรงดึง (tensile loading) เช่นเดียวกับผิวหนังมนุษย์ งานของ Hong et al. (2023) รายงานว่า ผิวหนังสุกรมีค่าการกระจายแรง การยืดตัว และค่าความแข็ง (elastic modulus) อยู่ในช่วงเดียวกับของมนุษย์ ทั้งในการทดสอบแรงดึง แรงกด (compression) และการบิดตัว (torsion) (Hong et al., 2023)

- **ความสามารถในการคืนตัวและความยืดหยุ่น (Viscoelasticity)** ผิวหนังสุกรมีพฤติกรรมเชิงหน่วงเวลา (viscoelastic behavior) คล้ายกับผิวหนังมนุษย์ ซึ่งหมายถึงการเปลี่ยนแปลงของรูปทรงและการคืนตัวของผิวหนังภายใต้แรงกระทำ งานวิจัยของ Shergold et al. (2006) แสดงให้เห็นว่าผิวหนังสุกรมีการตอบสนองต่อแรงดึงและการคืนตัวของโครงสร้างคอลลาเจนในลักษณะเดียวกับมนุษย์

- **ใช้เป็นแบบจำลองในการทดลอง (Experimental model)** ผิวหนังสุกรได้รับการใช้เป็นแบบจำลองสำหรับการทดลองด้านชีวกลศาสตร์ นิติวิทยาศาสตร์ และการแพทย์ (Shergold et al., 2006) เช่น การทดสอบแรงดึงเพื่อศึกษาบาดแผล การฉีกขาดของผิวหนัง รวมถึงการศึกษารอยถลอกและรอยฟกช้ำในงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ (Barington et al., 2017)

2.5.1 ความคล้ายคลึงกันของผิวหนังสุกรและผิวหนังมนุษย์

- **โครงสร้างชั้นผิวหนัง** ผิวหนังของสุกรประกอบด้วยชั้นหนังกำพร้า หนังแท้ และชั้นไขมันใต้ผิวหนัง (subcutaneous fat) คล้ายกับผิวหนังมนุษย์ โดยมีจำนวนต่อมไขมันและรูขุมขนในระดับใกล้เคียงกันมากกว่าสัตว์ทดลองชนิดอื่น เช่น หนูหรือกระต่าย (Barington et al., 2017)

- **องค์ประกอบของคอลลาเจน** ผิวหนังสุกรและผิวหนังมนุษย์ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดเดียวกัน ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อความแข็งแรงเชิงกลของผิวหนัง จึงมีการใช้ผิวหนังสุกรในงานทางการแพทย์ เช่น การปลูกถ่ายผิวหนัง (skin grafts) และการรักษาผิวหนังไหม้ (Robertson, 2000)

- **องค์ประกอบทางชีวเคมี** ระบบภูมิคุ้มกันของสุกรมีลักษณะคล้ายมนุษย์ โดยเฉพาะในการตอบสนองต่อการติดเชื้อ จึงมีการใช้สุกรในงานวิจัยด้านไวรัส การปลูกถ่ายอวัยวะ และโรคติดเชื้อที่ส่งผลต่อมนุษย์ (Hong et al., 2023)

2.5.2 ข้อแตกต่างระหว่างผิวหนังสุกรและผิวหนังมนุษย์

- **องค์ประกอบของไขมันในผิวหนัง** ผิวหนังสุกรมีปริมาณไขมันใต้ผิวหนังสูงกว่าและมีสัดส่วนของกรดไขมันอิ่มตัวมากกว่ามนุษย์ ในขณะที่ผิวหนังมนุษย์มีกรดไขมันไม่อิ่มตัวมากกว่า (Miles et al., 2020)
- **อัตราการสลายตัวของเนื้อเยื่อ** ไขมันของสุกรสลายตัวได้เร็วกว่ามนุษย์ โดยมีองค์ประกอบของแร่ธาตุหลังการสลายตัวแตกต่างกัน เช่น ไขมันของมนุษย์มีโพแทสเซียมและโซเดียมสูงกว่า ในขณะที่ไขมันสุกรมีโพแทสเซียมและแมกนีเซียมมากกว่า
- **การตอบสนองต่อสิ่งแวดล้อมและแมลง** แมลงที่เจริญบนซากสุกรและมนุษย์มีความคล้ายคลึงกันในช่วงการเน่าสลายระยะแรก แต่เมื่อเข้าสู่ระยะเน่าเปื่อยขั้นลึก ผิวหนังสุกรมักสลายตัวสม่ำเสมอ ในขณะที่ผิวหนังมนุษย์มีโอกาสเกิดการแห้งค้าง (mummification) มากกว่า (Miles et al., 2020)

หมูมักถูกใช้เป็นตัวแทนของมนุษย์ ในงานวิจัยด้านการย่อยสลายในบริบทนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากหมูมีความคล้ายคลึงกับมนุษย์ในด้านกายวิภาคศาสตร์และสรีรวิทยา เช่น มวลร่างกาย ความมีขน และสีผิว หมูและมนุษย์เป็นสัตว์ที่มีระบบย่อยอาหารแบบ monogastric (กระเพาะเดี่ยว) และเป็น omnivores (กินทั้งพืชและสัตว์) ซึ่งมีความคล้ายคลึงกันในแง่ขององค์ประกอบของจุลินทรีย์ในลำไส้ (DeBruyn et al., 2021)

2.6 แนวคิดและทฤษฎีเกี่ยวกับเครื่องมือ Fluorescence Spectroscopy ที่ถูกนำมาใช้ในการศึกษาทางด้านนิติเวช

2.6.1 หลักการทำงานของเครื่อง Fluorescence Spectroscopy

เทคนิคฟลูออเรสเซนต์สเปกโตรสโคปี (Fluorescence Spectroscopy) เป็นเทคนิคที่ใช้วิเคราะห์คุณสมบัติของสารโดยอาศัยการเรืองแสงจากโมเลกุลภายหลังได้รับการกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเลต (UV) หรือแสงที่มีพลังงานสูง โมเลกุลของสารจะดูดซับพลังงานและเข้าสู่สถานะพลังงานสูง (Excited state) จากนั้นจะปลดปล่อยพลังงานกลับสู่สถานะพื้นฐาน (ground state) ในรูปของการคายโฟตอน (emission of photon) ซึ่งก่อให้เกิดสเปกตรัมเรืองแสง (fluorescence

spectrum) ที่มีลักษณะจำเพาะของสารแต่ละชนิด เทคโนโลยีของ fluorescence spectrometer ได้รับการพัฒนาให้มีความไวและความแม่นยำสูง จึงถูกนำมาใช้ในหลายสาขา เช่น วิทยาศาสตร์พื้นฐาน การแพทย์ พิษวิทยา รวมถึงการศึกษาปฏิกิริยาระหว่างเอนไซม์กับสารตั้งต้น (Sauer M, 2011)

1. **การกระตุ้น (Excitation)** อิเล็กตรอนในโมเลกุลของสารเรืองแสงดูดกลืนโฟตอนจากแหล่งกำเนิดแสง (เช่น Xenon lamp, Laser) แล้วถูกกระตุ้นไปยังสถานะพลังงานที่สูงขึ้น (Excited state)

2. **การปลดปล่อยพลังงาน (Emission)** เมื่ออิเล็กตรอนกลับสู่สถานะพลังงานพื้นฐาน (Ground state) จะปล่อยพลังงานออกมาในรูปของแสงเรือง (fluorescence) ที่มีความยาวคลื่นมากกว่าความยาวคลื่นของแสงที่กระตุ้น (เกิด Stokes shift)

3. **การลดระดับพลังงานก่อนปล่อยแสง (Non-Radiative Relaxation)** ก่อนปลดปล่อยพลังงาน อิเล็กตรอนอาจเสียพลังงานบางส่วนผ่านกระบวนการ เช่น Internal conversion หรือ Vibrational relaxation

4. **Fluorescence Spectrum** กราฟแสดงความเข้มของแสงเรืองตามความยาวคลื่น ซึ่งใช้วิเคราะห์โครงสร้างเคมี สภาพแวดล้อมของโมเลกุล หรือปริมาณของสารที่ต้องการศึกษา (Valeur, 2001)

องค์ประกอบหลักของเครื่อง fluorescence spectroscopy ได้แก่

- แหล่งกำเนิดแสง (Excitation source) เช่น Xenon lamp, Laser
- Monochromator สำหรับเลือกความยาวคลื่นของแสง
- Cuvette หรือ Sample holder สำหรับบรรจุตัวอย่าง
- ตัวตรวจจับแสง (Detector) เช่น Photomultiplier tube (PMT)

2.6.2 Substrate FDA, 4-MU Butyrate, casein-FiTC, DQ collagen ที่ใช้ในเครื่อง Fluorescence spectroscopy

fluorescence มีคุณสมบัติในการเรืองแสงเมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงความยาวคลื่นที่เหมาะสม (Bose et al., 2018)

2.6.2.1 4-MU Butyrate (4-Methylumbelliferyl Butyrate): สารนี้นิยมใช้ในการทดสอบกิจกรรมเอนไซม์ด้วย fluorescence spectroscopy เพราะสามารถถูกไฮโดรไลซ์ให้เป็น 4-Methylumbelliferone (4-MU) ซึ่งมีการเรืองแสงชัดเจน (Gilham & Lehner, 2005)

- ใช้ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ไลเปส (Lipase) และเอสเทอเรส (Esterase) ทำให้ได้สาร 4-Methylumbelliferone (4-MU) ซึ่งเป็นสารเรืองแสง
- ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength): ประมาณ 360-365 nm
- ความยาวคลื่นปล่อยแสง (Emission wavelength): ประมาณ 440-450 nm
- ใช้ในงานตรวจสอบเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน

2.6.2.2 Casein-FITC (Fluorescein Isothiocyanate Labeled Casein)

โปรตีน Casein ที่ถูกติดฉลากด้วย Fluorescein สามารถใช้ตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอส (Protease) ผ่านการเปลี่ยนแปลงของความเข้มการเรืองแสง เมื่อเอนไซม์ตัดสายเปปไทด์ของ Casein ที่มี FITC ติดอยู่ (Kasana et al., 2011)

- ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength): ประมาณ ~490 nm
- ความยาวคลื่นปล่อยแสง (Emission wavelength): ประมาณ ~520-530 nm
- ใช้ในงานวิเคราะห์การทำงานของเอนไซม์โปรตีเอส เช่น Trypsin, Pepsin และใช้ในการศึกษากลไกของเอนไซม์ที่ย่อยโปรตีนในระบบชีวภาพ

2.6.2.3 FDA (Fluorescein Diacetate) สารเรืองแสงที่ใช้ตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ (Cell Viability) เนื่องจากสามารถถูกเปลี่ยนโดยเอนไซม์เอสเทอเรสภายในเซลล์ให้เป็น Fluorescein ซึ่งเรืองแสงได้ (Dive et al., 1988)

- ใช้วิเคราะห์เซลล์ที่ยังมีชีวิต จะไม่สามารถเปลี่ยน FDA เป็นสารเรืองแสงได้
- ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength): ประมาณ ~490 nm
- ความยาวคลื่นปล่อยแสง (Emission wavelength): ประมาณ ~515-530 nm
- ใช้ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (Cell Viability Assay)

2.6.3 Tryptophan ที่ใช้ในเครื่อง Fluorescence Spectroscopy

Tryptophan (Trp) เป็นกรดอะมิโนที่มีสมบัติเรืองแสงในตัวเอง (Intrinsic Fluorescence) ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวชี้วัดการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างและสภาพแวดล้อมของ

โปรตีนได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อโปรตีนเกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้าง เช่น การคลายตัว การเสื่อมสภาพ หรือการสลายตัวหลังการตาย สภาพแวดล้อมรอบ ๆ หมู่ indole ring ของ Trp จะเปลี่ยนไป ส่งผลให้ค่าการเรืองแสง (fluorescence emission) ของ Trp เปลี่ยนแปลงตามไปด้วย (Gensch et al., 2004)

คุณสมบัติ Intrinsic fluorescence หมายถึง ความสามารถของโมเลกุลในการเรืองแสงได้ด้วยตัวเองตามธรรมชาติ โดยไม่จำเป็นต้องเติมสารเรืองแสง (fluorophore) ภายนอกเพิ่มเติม (Ghisaidoobe & Chung, 2014) สำหรับ Tryptophan มีค่าการเรืองแสงเกิดขึ้น ดังนี้

- ความยาวคลื่นกระตุ้น (Excitation wavelength): ประมาณ 280 nm
- ความยาวคลื่นปล่อยแสง (Emission wavelength): ประมาณ 350-360 nm

การเปลี่ยนแปลงของค่าความเข้มการเรืองแสง (fluorescence intensity) ของ Trp สามารถสะท้อนถึงการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมทางเคมีและโครงสร้างของโปรตีน จึงเป็นเทคนิคที่มีประโยชน์อย่างยิ่งในการติดตามกระบวนการสลายโปรตีน หรือศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อหลังการตาย โดยไม่จำเป็นต้องใช้สารติดฉลากเพิ่มเติม

2.6.4 Fluorescence Spectroscopy ในงานนิติเวช

ในการประมาณเวลาการตาย (PMI) เป็นหนึ่งในวิธีที่มีความท้าทายในทางนิติวิทยาศาสตร์ เทคนิคที่ใช้ในปัจจุบัน เช่น การสังเกตการเปลี่ยนแปลงของร่างกาย (algor mortis, rigor mortis, livor mortis) ยังคงมีข้อจำกัดและได้รับอิทธิพลจากปัจจัยแวดล้อมหลายประการ ดังนั้น งานวิจัยของ Gruszczyńska et al. (2024) จึงเสนอให้ใช้ fluorescence spectroscopy เป็นวิธีการใหม่ที่ไม่ทำลายตัวอย่าง (non-invasive method) และมีศักยภาพในการให้ค่าประมาณที่แม่นยำขึ้น (Gruszczyńska et al., 2024) นอกจากนี้ Ermida et al. (2022) ได้ศึกษาการเสื่อมสลายของคอลลาเจนในกระดูกโดยใช้เครื่อง UV-Fluorescence เพื่อวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของคอลลาเจน พบว่าคอลลาเจนมีการเสื่อมสลายตามเวลา ซึ่งสัมพันธ์กับระยะ PMI อย่างไรก็ตาม วิธีดังกล่าวยังมีความแม่นยำไม่สูงเพียงพอ จึงมีการเสนอให้เพิ่มการใช้เทคนิค fluorescence spectroscopy เพื่อช่วยเพิ่มความแม่นยำในการวิเคราะห์การเสื่อมสลายของคอลลาเจนสำหรับการประเมิน PMI (Sikora et al., 2015)

2.7 แนวคิดและทฤษฎีงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

(Ansari & Menon, 2017) ศึกษาการเรืองแสงของกรดอะมิโน tryptophan ในน้ำวุ้นใต้ตา (vitreous humor) เพื่อใช้ประเมินเวลาหลังการตาย (Time Since Death: TSD) โดยใช้ o-phthalaldehyde (OPA) ร่วมกับเทคนิค fluorescence spectroscopy จากตัวอย่างศพ 76 ราย (PMI 3–90 ชั่วโมง) พบว่าปริมาณ tryptophan เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการเสียชีวิต แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ในการทำนายเวลาเสียชีวิตได้

(Charlot et al., 2025) ศึกษากระบวนการย่อยสลายทางชีวเคมีของเนื้อเยื่อมนุษย์หลังการตายจากตัวอย่างมือที่ถูกฝังสูงสุด 24 วัน โดยวิเคราะห์ผิวหนัง ไขมัน และกล้ามเนื้อด้วย fluorescence spectroscopy เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของโปรตีนและผลิตภัณฑ์ออกซิเดชัน (PROT-FOX fluorescence) พบว่าระดับโปรตีนลดลง ในขณะที่ผลิตภัณฑ์ออกซิเดชันเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาการย่อยสลาย

(Estracanholli et al., 2009) ศึกษาผลของการแช่แข็งและการละลายต่อการย่อยสลายของเนื้อเยื่อมนุษย์ โดยเปรียบเทียบตัวอย่างมือแบบสดและแบบแช่แข็งก่อนฝังในดิน วิเคราะห์ด้วย fluorescence spectroscopy พบว่าเนื้อเยื่อสดมีค่า PROT ลดลง และค่า FOX เพิ่มขึ้นตามเวลา ขณะที่เนื้อเยื่อแช่แข็งมีรูปแบบการสลายที่แตกต่างกัน การศึกษานี้ชี้ว่า เนื้อเยื่อแช่แข็งไม่สามารถทดแทนเนื้อเยื่อสดได้ในการวิเคราะห์ทางนิติเวช

(Gruszczyńska et al., 2024) ศึกษาการใช้คุณสมบัติทางสเปกโทรสโกปีของ tryptophan เพื่อเป็นตัวบ่งชี้ในการประเมินเวลาหลังการตาย โดยจำลองสภาวะหลังการตายภายใต้ค่าพีเอชต่าง ๆ และเปรียบเทียบตัวอย่างผิวหนังจากอาสาสมัครกับผู้เสียชีวิต 24–48 ชั่วโมง พบว่าเอนไซม์ Protease โดยเฉพาะ cathepsin ถูกปลดปล่อยออกมาและย่อยสลายโปรตีน ส่งผลให้ระดับ tryptophan เพิ่มขึ้นตามเวลาหลังการตาย

(Ioan et al., 2017) ศึกษากระบวนการย่อยสลายของศพโดยเก็บตัวอย่างดินรอบศพมนุษย์และซากหมู ซึ่งถูกใช้แทนสรีรวิทยามนุษย์ได้ผลใกล้เคียง พบว่ามีการปล่อยสารระเหยและกรดไขมันแตกต่างกันตามระยะเวลา ทำให้สามารถใช้ข้อมูลเหล่านี้ช่วยประมาณ PMI ได้ โดยในระหว่างการ

สลายตัว เอนไซม์โปรตีเอสเริ่มทำงานก่อน ตามด้วยเอนไซม์ย่อยไขมัน เช่น ไลเปส และเอนไซม์เอสเทอเรส

(Ortiz-Herrero et al., 2021) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ในกระดูกเพื่อใช้ประเมิน PMI โดยเก็บตัวอย่างจากผู้เสียชีวิต 53 ราย (PMI 15–87 ปี) วิเคราะห์สเปกตรัมของสารชีวโมเลกุลที่เกี่ยวข้อง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ลดลงตามเวลาหลังการเสียชีวิต และมีความสัมพันธ์เชิงลบกับค่า PMI การศึกษานี้สนับสนุนการใช้การวิเคราะห์เอนไซม์ในกระดูกเพื่อการประมาณ PMI

(Nolan et al., 2020) วิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์และผิวหนังหลังการตาย โดยตรวจการเรืองแสงของโปรตีน (PROT) และผลิตภัณฑ์ออกซิเดชัน (FOX) พบว่าเอนไซม์ protease โดยเฉพาะ chymotrypsin มีค่าสูงสุดประมาณ 8 ชั่วโมงหลังการเสียชีวิต ก่อนลดลงอย่างรวดเร็ว ในขณะที่ lipase ลดลงภายใน 24 ชั่วโมงแรก และ esterase มีส่วนในการสร้างสารประกอบระเหย แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์เหล่านี้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีของ PMI ได้

(Schmidt et al., 2024) ใช้สัตว์ทดลองเพื่อประเมินกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสหลังการเสียชีวิตโดยใช้ fluorescence spectroscopy พบว่ากิจกรรมโปรตีเอสเพิ่มขึ้นในช่วงต้นหลังการเสียชีวิต และมีความสัมพันธ์กับ PMI แสดงให้เห็นว่าสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ชีวเคมีในการประมาณ PMI ได้

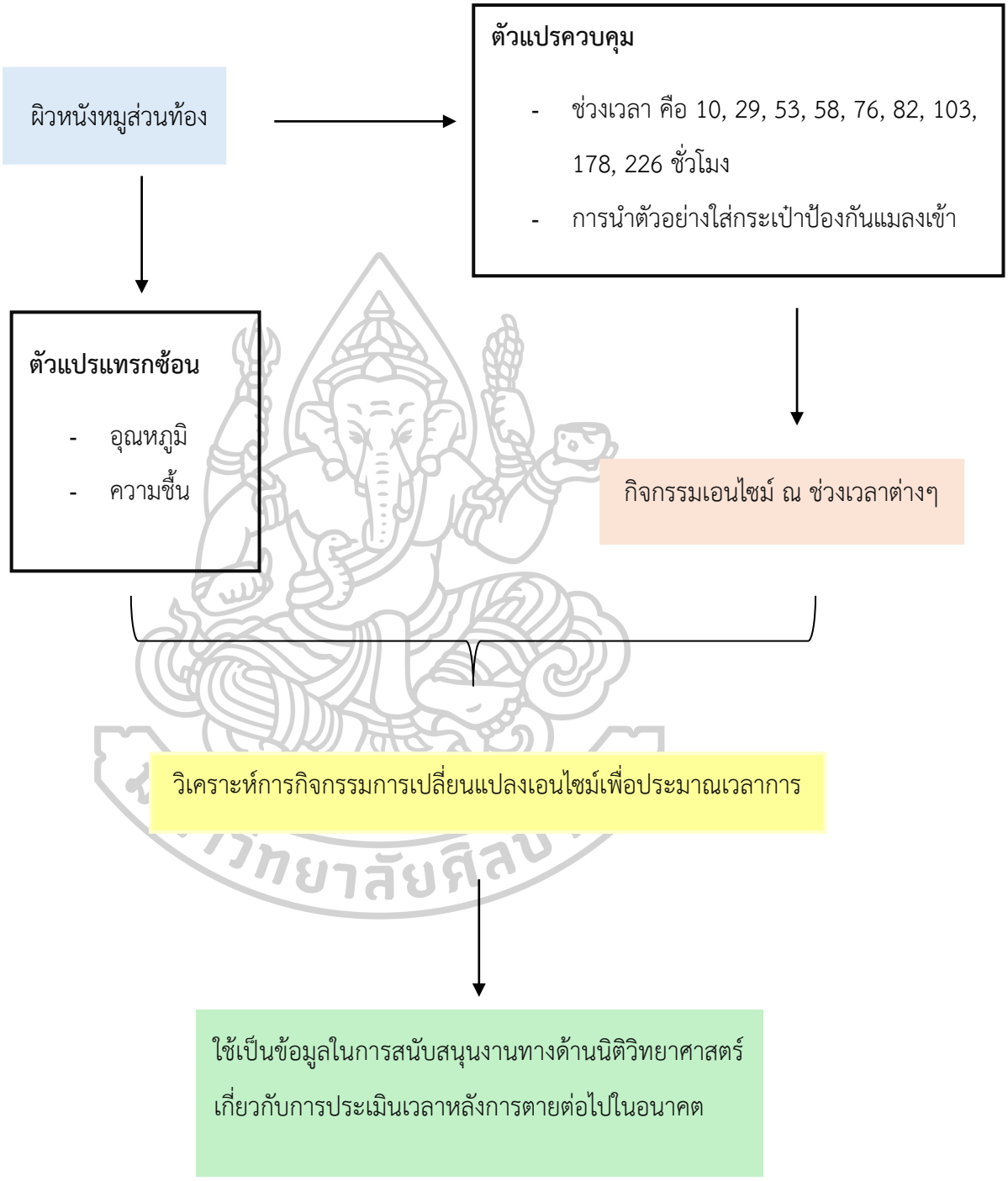
(Szeremeta et al., 2022) พัฒนารูปแบบสัตว์ทดลองในหลอดทดลองเพื่อใช้ในการประมาณ PMI โดยวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงของเมแทบอไลต์และกิจกรรมเอนไซม์ พบว่ามีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญกับช่วงเวลาหลังการตาย แสดงถึงศักยภาพของตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีต่อการประเมิน PMI

(Zhang et al., 2015) ได้ทบทวนข้อมูลเกี่ยวกับเอนไซม์ collagenase ที่สร้างโดยแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* ซึ่งเป็นจุลชีพที่พบได้ทั้งในสิ่งแวดล้อมและในลำไส้ของมนุษย์ โดยเอนไซม์ชนิดนี้สามารถย่อยสลายคอลลาเจนในเนื้อเยื่อได้ จึงมีบทบาทสำคัญทั้งในกระบวนการสลายซากสัตว์และการรุกรานเนื้อเยื่อในมนุษย์

ตารางที่ 1 ตารางสรุปงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย โดยแสดงภาพรวมของงานวิจัยชื่อผู้วิจัย ปีที่พิมพ์ พร้อมหมายเลขอ้างอิง ข้อมูลตัวอย่างการศึกษา ผลการค้นพบและข้อจำกัดที่สังเกตได้

ผู้วิจัย	ปีอ้างอิง	ตัวอย่างการศึกษา	ผลการค้นพบ
Estracanholli et al.	2009	เนื้อเยื่อผิวหนังหนูเพศผู้ เสื่อมสลายหลังตาย	สเปกโตรสโกปีฟลูออเรสเซนซ์เป็นเครื่องมือใหม่ที่มีศักยภาพในการประเมิน PMI
Andersen et al.	2017	โปรตีนกล้ามเนื้อหมูหลังการตาย	Tryptophan Fluorescence เปลี่ยนแปลงตามระดับ pH ซึ่งสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ PMI ได้
Ortiz-Herrero et al.	2021	เก็บตัวอย่างกระดูกผู้เสียชีวิตในช่วงเวลาต่างๆ	วิเคราะห์ด้วยสเปกโทรสโกปีรามัน กิจกรรมเอนไซม์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญหลังการเสียชีวิต โดยมีความสัมพันธ์กับ PMI สามารถประมาณ PMI โดยวัดกิจกรรมเอนไซม์
Gruszczynska et al.	2024	ผิวหนังของอาสาสมัครที่ยังมีชีวิต (15 คน) และ ผิวหนังของผู้เสียชีวิต (2 คน, ชายและหญิง) โดยเก็บตัวอย่างสารคัดหลั่งจากผิวหนังหลังเสียชีวิตที่ 24 และ 48 ชั่วโมง	เพื่อวิเคราะห์ความเข้มข้นและพฤติกรรมทางแสงของ Tryptophan (กรดอะมิโนจำเป็น) พบการเพิ่มขึ้นของ Tryptophan ที่ผิวหนังหลังการตาย ซึ่งสัมพันธ์กับ PMI และมีศักยภาพสูงเป็นเครื่องหมายชีวภาพ (Biomarker) ในการประมาณ PMI.
Ansari et al.	2017	ใช้ vitreous humor (VH) หรือ น้ำวุ้นในลูกตา จากศพมนุษย์จำนวน 76 ราย ช่วงเวลาหลังการตาย (TSD) แน่ชัดระหว่าง 3-90 hr.	ใช้ Fluorescence Spectroscopy พบว่าปริมาณ Tryptophan ในน้ำวุ้นตาเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญตามเวลา (TSD) จนถึง 90 ชั่วโมงหลังตาย
Zhang et al.	2015	ซากหมู (pig carcasses) จำนวน 6 ตัว ถูกปล่อยไว้ในสภาพแวดล้อมธรรมชาติ เพื่อศึกษากระบวนการย่อยสลายหลังการตาย	พบว่าแบคทีเรียในสกุล *Clostridium* สามารถสร้างเอนไซม์ collagenase ที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อได้ ซึ่งมีส่วนสำคัญต่อกระบวนการสลายตัวของซากสัตว์และอาจเชื่อมโยงกับการเปลี่ยนแปลงทางจุลชีววิทยาหลังการตาย

2.8 กรอบแนวคิด



บทที่ 3

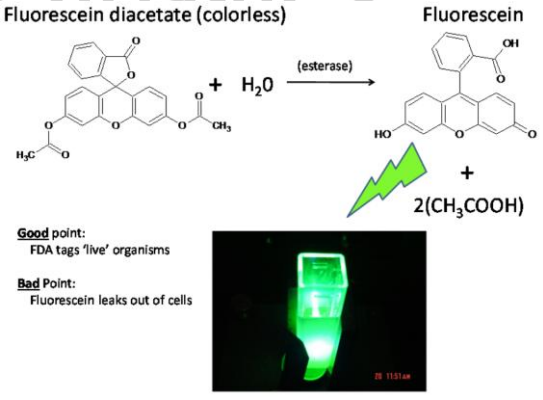
วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งวิเคราะห์กิจกรรมเอนไซม์เพื่อใช้ในการประเมินระยะเวลาหลังการตาย โดยทำการทดลองในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อผิวหนัง เพื่อค้นหาแนวทางใหม่สำหรับการสืบสวนทางนิติวิทยาศาสตร์ รวมทั้งสนับสนุนงานวิเคราะห์จุลชีววิทยาที่เกี่ยวข้องหลังการตาย

หลังการตาย เอนไซม์ภายในเนื้อเยื่อยังสามารถทำปฏิกิริยากับสารตั้งต้น (substrate) ได้ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ก่อนที่โครงสร้างโปรตีนของเอนไซม์จะเสื่อมสภาพและสูญเสียความสามารถในการทำงานอย่างสมบูรณ์ งานวิจัยนี้เลือกใช้สารตั้งต้นเรืองแสง (fluorogenic substrates) ได้แก่ fluorescein diacetate (FDA), 4-methylumbelliferyl butyrate (4-MU butyrate) และ tryptophan เพื่อศึกษาแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์บนผิวหนังหมูในช่วงเวลาหลังการตาย

เอนไซม์ Esterases ทำปฏิกิริยากับ Substrate FDA

Fluorescein diacetate (FDA) ใช้เป็น fluorogenic substrate สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ esterase โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ในโมเลกุล FDA ทำให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีสมบัติเรืองแสงคือ fluorescein และ acetate เป็นผลพลอยได้ ความเข้มของการเรืองแสง (Excitation 490 nm, Emission 515 nm) ใช้บ่งชี้ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ esterase (Green et al., 2006)



ภาพที่ 3 ปฏิกิริยาการเกิดการเรืองแสงของ Fluorescein diacetate (FDA) เมื่อถูกย่อยโดยเอนไซม์ Esterase

(Outinen et al., 2017)

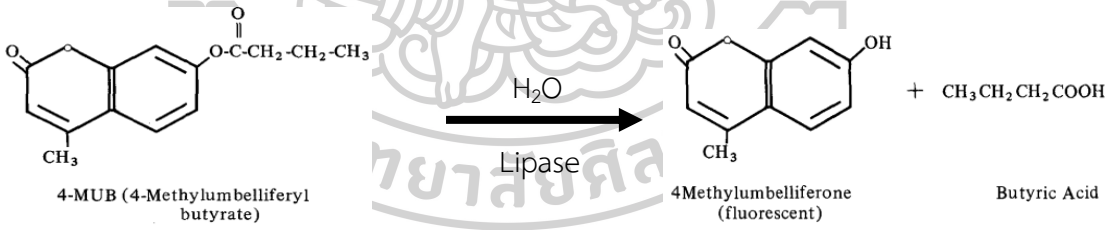
การเกิดปฏิกิริยานี้สามารถแสดงได้ดังสมการ:

$$\text{Fluorescein diacetate (FDA)} + 2H_2O \longrightarrow \text{Fluorescein} + 2\ \text{Acetate}$$

เอนไซม์ esterase จะตรึงโมเลกุลของ FDA เข้ากับ active site จากนั้นใช้น้ำในการตัดพันธะเอสเทอร์ทั้งสองตำแหน่งจนเกิด fluorescein ซึ่งเป็นสารเรืองแสง การเกิดเรืองแสงนี้จึงสามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้การทำงานของเอนไซม์ esterases ภายในเนื้อเยื่อได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Víteček et al., 2007)

เอนไซม์ Lipase ทำปฏิกิริยากับ Substrate 4-MU butyrate

4-methylumbelliferyl butyrate (4-MU butyrate) ใช้เป็น fluorogenic substrate สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ lipase โดยเอนไซม์จะเร่งปฏิกิริยาไฮโดรไลซิสของพันธะเอสเทอร์ ทำให้เกิด 4-methylumbelliferone (4-MU) ซึ่งมีสมบัติเรืองแสง (Excitation 365 nm, Emission 450 nm) และกรด butyric acid เป็นผลิตภัณฑ์รอง ความเข้มของการเรืองแสงสะท้อนระดับกิจกรรมของเอนไซม์ lipase



ภาพที่ 4 ปฏิกิริยาการเกิดการเรืองแสงของ 4-methylumbelliferyl butyrate (4-MU butyrate) เมื่อถูกย่อยโดยเอนไซม์ Lipase
(Green et al., 2006)

การเกิดปฏิกิริยานี้สามารถแสดงได้ดังสมการ:

$$\text{4-MU butyrate} + H_2O \xrightarrow{\text{Lipase}} \text{4-methylumbelliferone (4-MU)} + \text{butyric acid}$$

Tryptophan กับการเกิดปฏิกิริยาภายหลังการตาย

Tryptophan (Trp) เป็นกรดอะมิโนที่มีสมบัติเรืองแสงในตัวเอง (intrinsic fluorescence) โดยไม่ต้องใช้สารเรืองแสงเพิ่มเติม เนื่องจากมีวงแหวน indole ring ที่สามารถดูดซับพลังงานแสงและปล่อยแสงออกมาเมื่อกลับสู่สถานะพื้นฐาน การเรืองแสงของ tryptophan มักใช้เพื่อบ่งบอกถึงสภาพแวดล้อมหรือการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของโปรตีนในเนื้อเยื่อ (Bellmaine et al., 2020)

ภายหลังการตาย โปรตีนภายในเซลล์จะเริ่มสลายตัวจากการทำงานของเอนไซม์ภายใน (autolysis) และเอนไซม์จากจุลชีพ ทำให้ tryptophan ที่เคยฝังอยู่ภายในโครงสร้างโปรตีนถูกปลดปล่อยออกมา เมื่อถูกกระตุ้นด้วยแสงที่ความยาวคลื่นประมาณ 280 nm จะปล่อยแสงเรืองออกมาในช่วง 350–360 nm (Ghisaidoobe & Chung, 2014) ความเข้มของการเรืองแสงสะท้อนถึงระดับการสลายโปรตีนหรือการเปลี่ยนแปลงของสภาพเนื้อเยื่อหลังการตาย

3.1 วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

1. เครื่องปั่นเหวี่ยง (Centrifuge)
2. กระดาษทิชชู่ (Tissue paper)
3. ไม้พันสำลีปลอดเชื้อ
4. หลอดทดลองปลอดเชื้อ (Sterile Falcon Tubes) หรือ Eppendorf หลอดทดลอง
5. ถุงมือยางแบบใช้แล้วทิ้ง
6. แอลกอฮอล์ 70%
7. Fluorescence Spectroscopy (Fluorescence spectrometer: Perkin Elmer Luminescence spectrometer model LS-55)
8. กระเป๋าเดินทางขนาดเล็ก

3.2 สารเคมีที่ใช้

3.2.1 สารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

3.2.1.1 Fluorescein diacetate (FDA) (Substrate สำหรับวัดกิจกรรม Esterase รวม)

3.2.1.2 4-MU Butyrate (Substrate สำหรับ Lipase)

3.2.1.3 DMSO

3.2.1.4 PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7.2-7.4

3.3 ตัวอย่างที่ใช้ในการทดลอง

1. ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ซื้อมาจากโรงเชือด
2. ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ซื้อมาจากตลาด

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1. การออกแบบการทดลอง การเก็บตัวอย่างดัดแปลงมาจาก (de Vos et al., 2023)

การทดลองนี้นำผิวหนังติดเนื้อหมูส่วนท้อง เป็นแบบจำลองเนื้อเยื่อชีวภาพ และใช้กระเป๋าเดินทางขนาดเล็กเพื่อสร้างสภาพแวดล้อมแบบระบบปิด (closed-system) ซึ่งจำลองสถานการณ์ทางนิติวิทยาศาสตร์ที่ยับยั้งการล่าอาณานิคมของแมลง โดยนำผิวหนังหมูที่ติดเนื้อใส่ไว้ในกระเป๋าเดินทางและเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง การเก็บตัวอย่างดำเนินการที่เวลา 10, 29, 53, 58, 76, 82, 103, 168, 178 และ 226 ชั่วโมงหลังการตายสำหรับแต่ละช่วงเวลา ใช้ไม้พันสำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อชุบ PBS หมาด ๆ ปาดและหมุนก้านสำลีบริเวณผิวหนังหมูขนาดพื้นที่ 25 ตารางเซนติเมตร (cm^2) เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำสำลีก้านไปใส่ในหลอดบรรจุ PBS เพื่อสกัดเอนไซม์ แต่ละช่วงเวลาดำเนินการซ้ำสามครั้งต่อจุดตัวอย่าง เพื่อให้มั่นใจถึงความสามารถในการทำซ้ำของผลการทดลอง

3.4.2. การเตรียม Substrate ดัดแปลงมาจาก (Lanka S., 2015) (Kasana et al., 2011) (Albani, 2007)

1. การเตรียมสารละลาย (Reagent Preparation) Substrate

- Esterases : เตรียมสารละลาย FDA 80.08 mg ละลายใน DMSO 2 mL เพื่อให้ได้สารละลายสต็อก 50 mM จากนั้นเจือจางใน PBS จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้งานได้ 50–100 µM
- Lipases : เตรียมสารละลาย 4-MU Butyrate 4 mg ละลายใน DMSO 2 mL เพื่อเตรียมสารละลายสต็อก 5 mM และเจือจางด้วย PBS 1 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้งานได้ระหว่าง 0.5–50 µM

2. **สารตั้งต้นควบคุม** (Substrate Control) : ประกอบด้วย PBS ที่ผสมกับสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง
3. **สารควบคุมลบ** (Negative Control) : ประกอบด้วย PBS ที่ผสมกับสารสกัดจากเอนไซม์โดยไม่มีสารตั้งต้น

3.4.3. การสกัดและการประมวลผลเอนไซม์ ดัดแปลงจาก (Gruszczyńska et al., 2024) (Rizki Oktaviana et al., 2024); (Bätz et al., 2013)

1. หลังจากเก็บตัวอย่างแล้วการสกัดเอนไซม์ดำเนินการตามโปรโตคอลปรับปรุง โดยไม้พันสำลีแต่ละอันจะถูกหมุนวนในหลอดที่มี PBS ปริมาตร 500 µL จากนั้นบีบให้เหลือเพียงของเหลวและทำการวอร์เท็กซ์เบา ๆ เพื่อปล่อยเอนไซม์ลงในสารละลาย
2. นำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนของเหลวใสไว้เป็นสารสกัดเอนไซม์ จากนั้นตัวอย่างปริมาตร 50-100 µL จะถูกใส่ลงในหลอดสะอาดและเจือจางด้วย PBS ปริมาตร 200-500 µL
3. บ่มด้วย substrate ที่เหมาะสม (FDA หรือ 4-MU butyrate) ปริมาตร 200–400 µL เป็นเวลา 30-60 นาที สารละลายถูกผสมเบาๆ ด้วยการปิเปตและห่อด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเรืองแสงทันที

3.4.4. การวัดกิจกรรมเอนไซม์ ดัดแปลงการทดลองมาจาก (Estracanholli et al., 2009) (Lanka S., 2015)

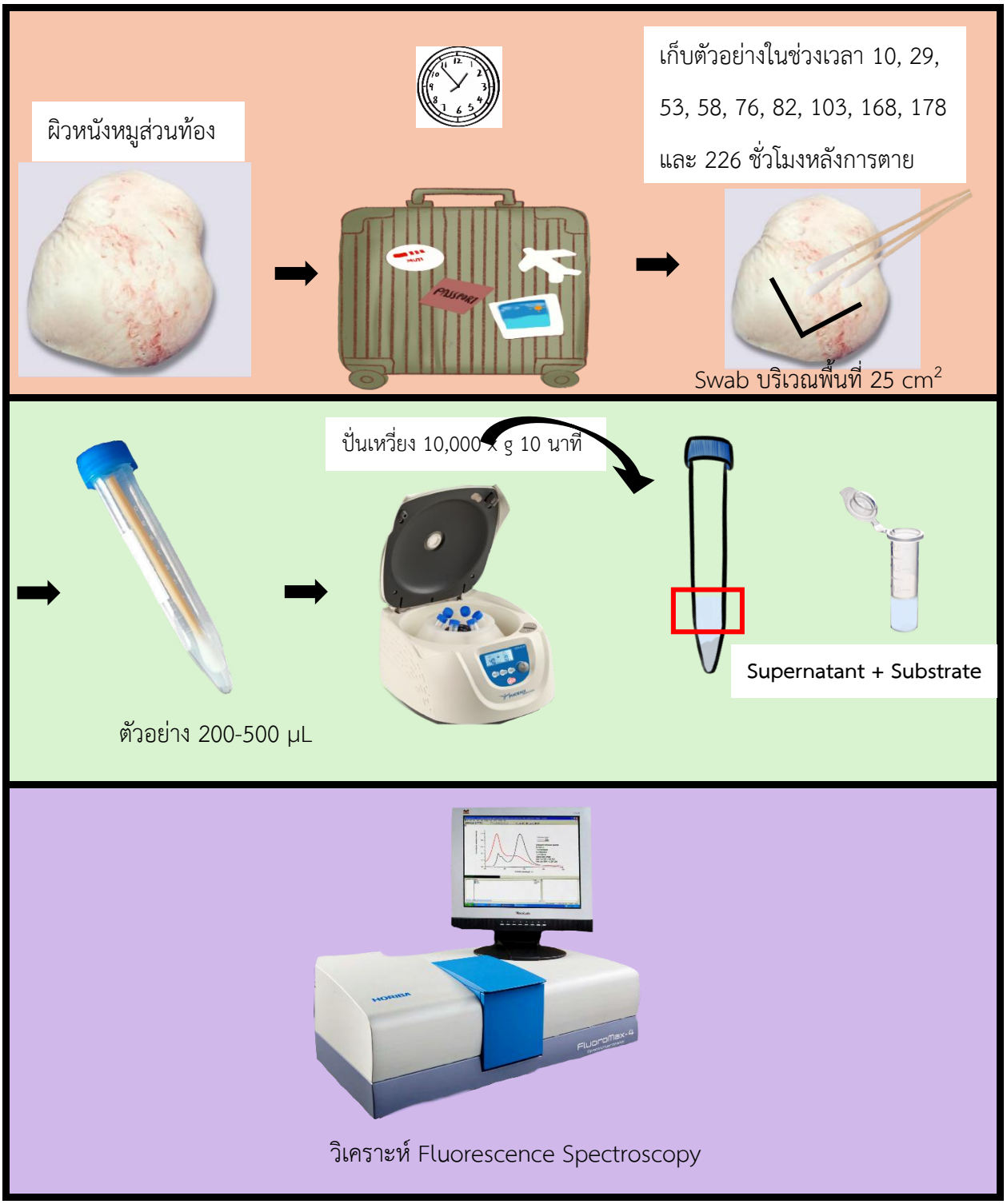
ใช้ Fluorescence Spectroscopy (Fluorescence Spectrometer: Perkin Elmer Luminescence Spectrometer รุ่น LS-55) ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง มีการวัดค่า blank และ negative control เพื่อประเมินค่าการเรืองแสงพื้นหลัง สำหรับการตั้งค่าการเรืองแสงแต่ละซับสเตรตได้ปรับให้เหมาะสมดังนี้

- **Fluorescein diacetate (FDA):** การกระตุ้น (Excitation) 490 นาโนเมตร; การเปล่งแสง (Emission) 500–600 นาโนเมตร
- **4-MU butyrate:** การกระตุ้น 360 นาโนเมตร; การเปล่งแสง 400–480 นาโนเมตร
- **Tryptophan / Negative control:** การกระตุ้น 280 นาโนเมตร; การเปล่งแสง 300–400 นาโนเมตร ความเข้มของการเรืองแสง (Fluorescence intensity) ถูกบันทึกในแต่ละช่วงเวลาและเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม เพื่อติดตามรูปแบบกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตาย

3.5 การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดดำเนินการโดยใช้ Python ในการประมวลผล เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับช่วงเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI) ใช้ Spearman's correlation ซึ่งเหมาะสมกับข้อมูลที่ไม่ได้มีการกระจายแบบพารามิเตอร์ เพื่อประเมินทิศทางของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร นอกจากนี้ เนื่องจากชุดข้อมูลมีการกระจายไม่เป็นแบบปกติ จึงใช้ Kruskal–Wallis test ในการตรวจสอบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับกิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตาย

3.6 แผนการทดลอง



บทที่ 4

ผลการศึกษา

การศึกษาครั้งนี้มุ่งเน้นการวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase, Esterase บนผิวหนังหมูส่วนท้องในช่วงเวลาหลังการตาย โดยใช้เทคนิค Fluorescence Spectroscopy เป็นเครื่องมือหลักในการตรวจวัด พร้อมใช้ตัวบ่งชี้เฉพาะสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ Tryptophan fluorescence ใช้เป็นตัวชี้วัดทางอ้อมของโปรตีนรวมที่มีกรดอะมิโน ซึ่งสะท้อนถึงการปล่อยโปรตีนจากกระบวนการย่อยสลายเนื้อเยื่อหลังการตาย 4-MU butyrate ใช้เป็น substrate สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน FDA (Fluorescein diacetate) ใช้เป็นตัวชี้วัดกิจกรรมของเอนไซม์ Esterase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยพันธะเอสเทอร์ในไขมันที่เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ตาย

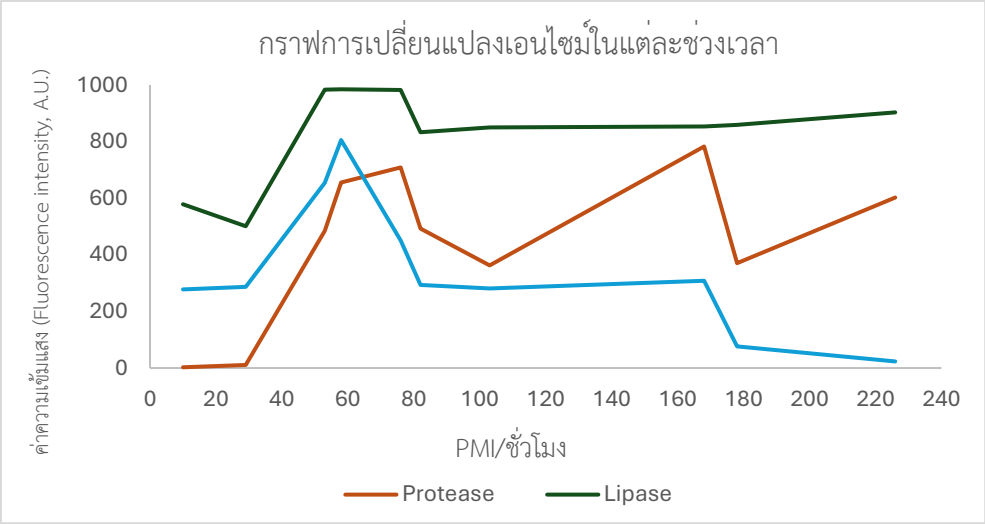
ในการทดลอง ผู้วิจัยได้นำตัวอย่างที่ 1 คือผิวหนังหมูส่วนท้องที่ได้จากโรงเชือด ซึ่งทราบเวลาการเสียชีวิตแน่นอน มาวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase อย่างไรก็ตาม ในการตรวจวัดกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase พบว่าค่าความเข้มแสง (Fluorescence intensity, AU) สูงกว่าขีดจำกัดของเครื่องมือ (>1,000 AU) จึงได้ทำการศึกษาซ้ำกับตัวอย่างที่ 2 ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ได้จากตลาด พร้อมปรับลดความเข้มข้นของ substrate เพื่อให้สามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างเหมาะสม ข้อมูลเปรียบเทียบผลการทดลองแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 ตารางเปรียบเทียบความแตกต่างของตัวอย่างที่ 1 (ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ได้จากโรงเชือด) และตัวอย่างที่ 2 (ผิวหนังหมูส่วนท้องที่ได้จากตลาด)

ประเด็น	ตัวอย่างที่ 1	ตัวอย่างที่ 2
การเก็บตัวอย่าง	เก็บไว้ในกระเป๋าเดินทาง	เก็บไว้ในกล่องพลาสติก ห่อด้วยกระดาษและผ้าและคลุมด้วยถุงดำ
การได้มาของตัวอย่าง	เชือดสด ล้างเลือด ซับน้ำออกสภาพค่อนข้างแห้งบนพื้นผิวและนำมาใช้ในเวลาต่อมา	ผิวหนังจากตลาด ลวกน้ำร้อน 60-65°C 3-4 นาทีก่อนถอนขน สภาพผิวเปียกเล็กน้อย
การถ่ายเทอากาศ	อากาศมีช่องระบายอากาศบางส่วน	อากาศน่าจะถ่ายเทน้อย
ความชื้นในระบบ	ค่อนข้างแห้ง (มีน้ำเหลืองเพียงเล็กน้อย)	ความชื้นสูง มีน้ำเหลืองออกมามาก
ผลของสภาพตัวอย่างต่อการย่อยสลาย	วันที่ 2 บวม มีน้ำเหลืองเล็กน้อยใสๆและเริ่มมีกลิ่น วันที่ 3 บวมเป่ง วันที่ 4 เริ่มมีหนอน ผิวหนังหลุด วันที่ 8 การบวมลดลงผิวเริ่มเหี่ยว	ระยะการย่อยสลายเร็วกว่า วันที่ 2 มีน้ำเหลืองมาก และวันที่ 3 ผิวหนังบวมและมีน้ำเหลืองมากอย่างต่อเนื่อง
ภาพตัวอย่างวันที่ 2 หลังใส่ในกระเป๋าและกล่องพลาสติก		
ภาพตัวอย่างวันที่ 3		ตัวอย่างที่ 2 ยังคงมีความน้ำเหลืองมากและบวม ผู้วิจัยได้สังเกตและจดบันทึกลักษณะของตัวอย่างที่ 2 ในวันที่ 3-4 ไว้ว่า ยังคงมีน้ำเหลืองและบวมมากกว่าวันก่อนหน้า แต่ มิได้ถ่ายภาพในวันดังกล่าวไว้ จึงไม่มีภาพประกอบในรายงานฉบับนี้
ภาพตัวอย่างวันที่ 4		
เอนไซม์ที่พบ	การเปลี่ยนแปลงชัดเจนตามเวลา	ค่าบางช่วงคงที่ผิดปกติ หรือขึ้นสูงตลอด
Protease	เพิ่มขึ้นชัดเจนในช่วงกลาง (60–150 hr)	เพิ่มขึ้นสม่ำเสมอแต่แปรปรวนช่วงต้น
Lipase	สูงมากตั้งแต่ต้น และคงตัวตลอด	สูงมากเช่นกัน และไม่ลดลงเหมือนที่ควร
Esterase	ลดลงตามเวลา (ตรงตามทฤษฎี)	ลดลงเร็วและค่อนข้างต่ำมากในช่วงหลัง
ความเข้มข้นของ Substrate ที่ใช้	ความเข้มข้นสุดท้าย FDA 100 µM ความเข้มข้นสุดท้าย 4-MU butyrate 50 µM	ความเข้มข้นสุดท้าย FDA 10 µM ความเข้มข้นสุดท้าย 4-MU butyrate 0.5 µM

จากการเปรียบเทียบตัวอย่างผิวหนังหมูส่วนท้องทั้งสองแหล่ง พบว่า ค่าความเข้มของสัญญาณเรืองแสงจากกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase ที่วัดด้วยเทคนิค Fluorescence Spectroscopy มีค่าใกล้ถึงขีดจำกัดของเครื่องมือ (ประมาณ 1000 AU) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำมาวิเคราะห์เชิงแนวโน้มได้

4.1 ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบของกราฟเพื่อดูแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ของตัวอย่างที่ 1 ที่ได้จากโรงเชือด



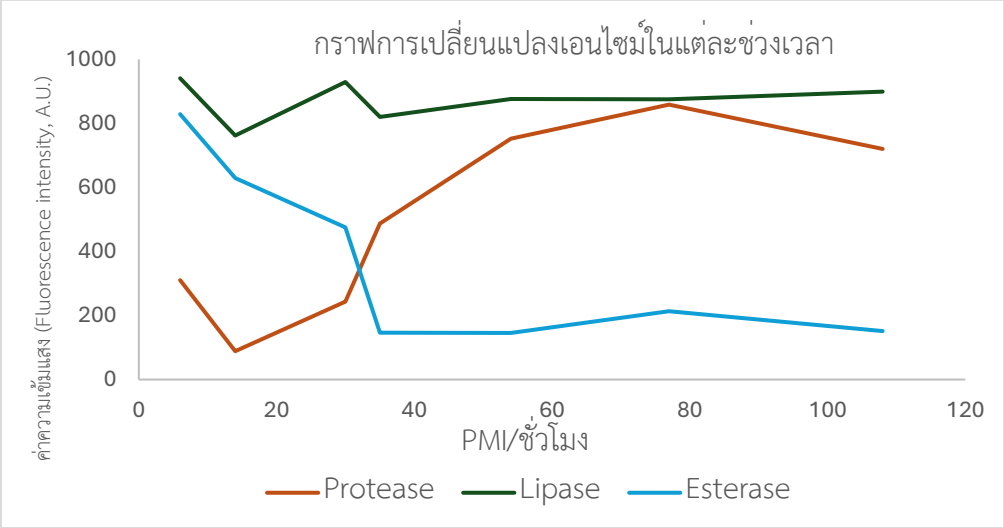
ภาพที่ 5 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตายของตัวอย่างที่ 1 (จากโรงเชือด)

พบว่าค่ากิจกรรมของ Lipase (เส้นสีเขียวเข้ม) มีระดับสูงมากตั้งแต่ช่วง ~60 ชั่วโมงหลังการตาย และคงอยู่ในระดับสูงต่อเนื่องจนถึง ~230 ชั่วโมง

ค่าของ Esterase (เส้นสีฟ้า) เพิ่มขึ้นเด่นชัดหลัง ~60 ชั่วโมง และลดลงต่อเนื่องหลังประมาณ ~76 ชั่วโมง

ค่าของ Protease (เส้นสีส้ม) เริ่มมีความเข้มเด่นชัดตั้งแต่ช่วง ~30 ชั่วโมง และมีค่าผันผวน โดยสังเกตได้ช่วงที่มีค่าสูงสลับกับช่วงที่ลดลง เช่นช่วงประมาณ ~60–80 ชั่วโมง และ ~160–170 ชั่วโมงหลังการตาย

เพื่อเปรียบเทียบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์เพิ่มเติมในตัวอย่างที่ 2 ที่ได้จากตลาด ผู้วิจัยได้ทำการวิเคราะห์ ข้อมูลรายละเอียดของความแตกต่างระหว่างทั้งสองตัวอย่าง เพื่อคัดเลือกไปวิเคราะห์ในขั้นตอนถัดไป ซึ่งข้อมูลผลเปรียบเทียบแสดงไว้ในตารางที่ 2



ภาพที่ 6 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตายของตัวอย่างที่ 2 (จากตลาด)

พบว่าค่ากิจกรรมของ Lipase (เส้นสีเขียวเข้ม) มีระดับสูงในช่วงต้น ~10–20 ชั่วโมงหลังการตาย ก่อนที่จะคงที่ต่อเนื่องไปจนถึงช่วงเวลาต่อมา

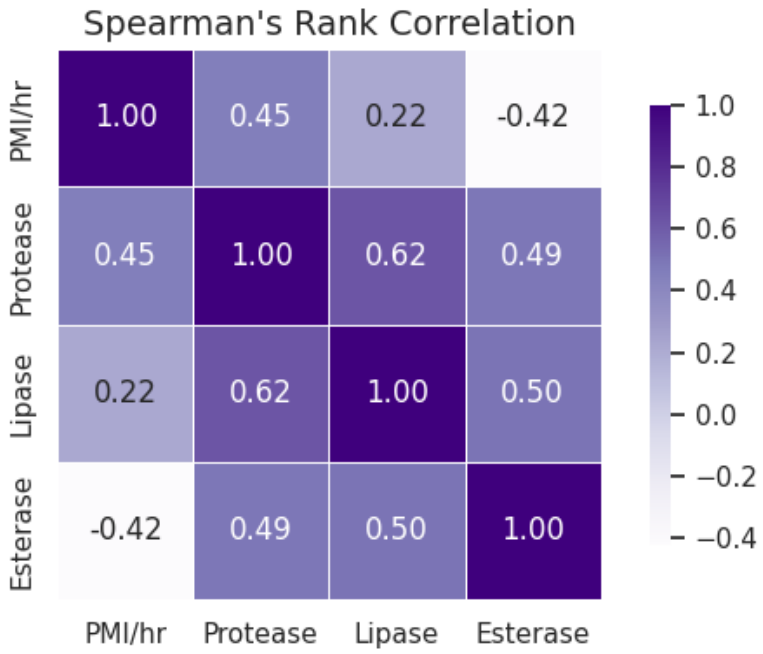
ค่าของ Esterase (เส้นสีฟ้า) มีระดับสูงในชั่วโมงแรกหลังการตาย และลดลงต่อเนื่องหลัง ~20 ชั่วโมง

ค่าของ Protease (เส้นสีส้ม) เริ่มปรากฏเด่นชัดหลัง ~30 ชั่วโมง และมีหลายจุดที่ค่าสูงสุด (peak) ประมาณ ~80 ชั่วโมง ก่อนเริ่มลดลง

จากผลการทดลองข้างต้น ผู้วิจัยเลือกใช้ตัวอย่างที่ 1 ซึ่งเป็นผิวหนังหมูส่วนท้องจากโรงเชือด เนื่องจากตัวอย่างนี้มีลักษณะทางกายภาพหลังการตายใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์มากที่สุด ได้แก่ การช้ำเลือด การบวม การเกิดหนอน และการหลุดลอกของผิวหนังชั้นนอก สำหรับการวิเคราะห์ทางสถิติแบบไม่อิงการแจกแจงปกติ เพื่อให้เหมาะสมกับลักษณะข้อมูลที่ไม่เป็นไปตามการกระจายแบบปกติ

4.2 วิเคราะห์แบบ Spearman's Rank correlation

จากผลการการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ของข้อมูล จึงดำเนินการโดยใช้สถิติแบบ Spearman's correlation เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับระยะเวลาหลังการตาย โดยใช้ค่าที่ได้จากตัวอย่างที่ 1 ซึ่งแสดงแนวโน้มและลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ได้ชัดเจนที่สุด และมีรายละเอียดผลการวิเคราะห์แสดงดังภาพที่ 5

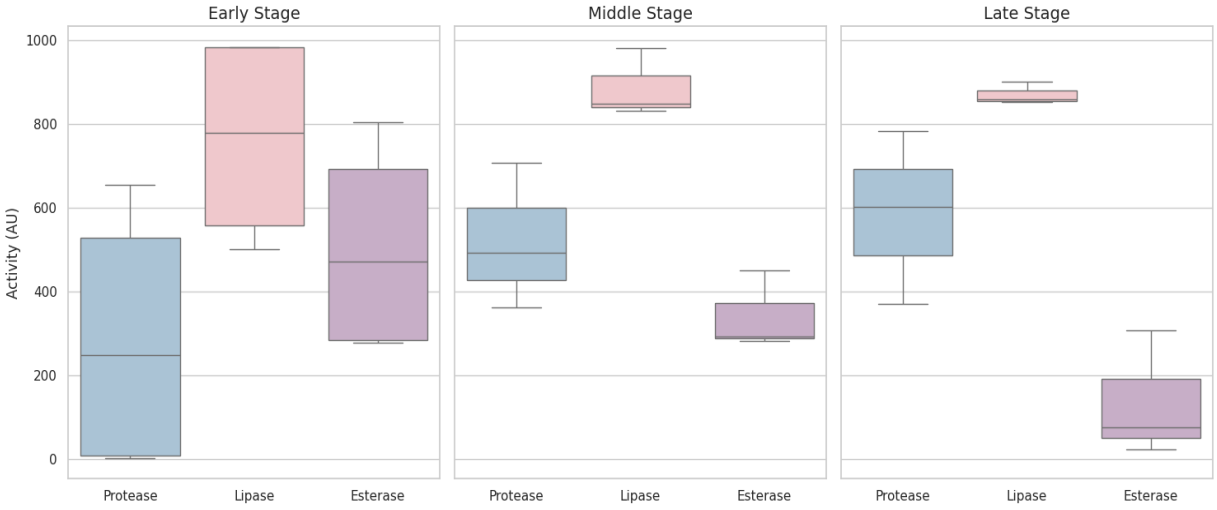


ภาพที่ 7 Heatmap แสดง Spearman's rank correlation ระหว่าง PMI และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากตัวแทนของเอนไซม์ Tryptophan ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมของการมีอยู่ของโปรตีนที่อาจรวมถึง Protease แต่ไม่ได้วัด activity โดยตรง ในขณะที่ 4-MU butyrate และ FDA ใช้ประเมินกิจกรรมของ Lipase และ Esterase โดยตรงผ่านการย่อย substrate จำเพาะ

ผลการวิเคราะห์ Spearman's correlation Protease มีความสัมพันธ์ทางบวกปานกลางกับ PMI (ρ = 0.45) ซึ่งหาก PMI เพิ่มขึ้น Protease จะเพิ่ม ขณะที่ Esterase มีความสัมพันธ์ทางลบปานกลาง (ρ = -0.42) ซึ่งหมายถึงหาก PMI เพิ่มขึ้น Esterase จะลดลง แสดงถึงแนวโน้มที่อาจใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในการประมาณเวลาเสียชีวิตได้ในระดับหนึ่ง ในทางกลับกันเอนไซม์ Lipase มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ (ρ = 0.22) จึงอาจไม่เหมาะสำหรับใช้ประเมินเวลาเสียชีวิต

4.3 วิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test

แบ่งช่วงเวลาหลังการตาย เป็น 3 ช่วงด้วยกัน ได้แก่ Early stage (ช่วงเริ่มต้นที่ 0-75 ชั่วโมงหลังตาย) ช่วง Middle (ช่วงกลางที่ 76-120 ชั่วโมงหลังตาย) และช่วง Late stage (ช่วงท้ายที่ 121-226 ชั่วโมงหลังการตาย)



ภาพที่ 8 การวิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test เทียบกลุ่มเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลา

จากผลการศึกษาพบว่า ในช่วง Early stage กิจกรรมของเอนไซม์ Protease มีค่าต่ำและกระจายกว้าง Lipase เริ่มมีค่า Activity เพิ่มสูงขึ้น ขณะที่เอนไซม์ Esterase มีค่าปานกลางและกระจายกว้างกว่า Lipase ในช่วง Middle stage กิจกรรมของ Protease เพิ่มขึ้นจากช่วง Early, Lipase ยังคงสูงแต่ลดลงเล็กน้อย ส่วนเอนไซม์ Esterase ลดลงอย่างชัดเจน ส่วนในช่วง Late stage กิจกรรมของ Protease ยังคงเพิ่มขึ้นต่อเนื่องตามเวลา, Lipase คงที่หรือลดเล็กน้อยและ Esterase ลดลงอย่างชัดเจนมาก

จากการวิเคราะห์ด้วย Kruskal-Wallis Test พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ในแต่ละช่วงเวลา (Early, Middle, Late) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) Protease ได้ค่า $H = 1.8000$, $p = 0.4066$ (ไม่มีนัยสำคัญ), Lipase ได้ค่า $H = 0.1636$, $p = 0.9214$ (ไม่มีนัยสำคัญ), และ Esterase ได้ค่า $H = 2.3000$, $p = 0.3166$ (ไม่มีนัยสำคัญ) ซึ่งแสดงว่าเวลาหลังการตายไม่มีผลชัดเจนต่อการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ทั้งสามชนิด ถึงแม้ว่าจะเห็นแนวโน้มความต่าง แต่ความแตกต่างนั้นไม่มากพอที่จะถือว่าเกิดจากเวลาแน่ชัด

บทที่ 5

สรุปผลการศึกษา อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ

การศึกษานี้มุ่งเน้นการประมาณเวลาหลังการตายโดยใช้เอนไซม์ร่วมกับเครื่องมือ Fluorescence Spectroscopy โดยใช้ผิวหนังหมูส่วนท้อง ที่มีความคล้ายคลึงกับผิวหนังมนุษย์ในแง่โครงสร้างทางกายภาพ เช่น ชั้นผิวหนัง ความหนาและต่อมเหงื่อ รวมถึงสมบัติทางกลซึ่งพบว่ามีโครงสร้างและกิจกรรมของเอนไซม์ใกล้เคียงมนุษย์ และผู้วิจัยตั้งใจทำให้คล้ายกับการจำลองในมนุษย์ จึงได้มีการเลือกตัวอย่างที่ 1 ผิวหนังหมูส่วนท้อง (ที่ได้จากโรงเชือด) ใช้เป็นตัวอย่างหลักในการวิเคราะห์ทางสถิติของงานวิจัยนี้ โดยมีวัตถุประสงค์ 3 ประการคือ 1. เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase บนผิวหนังหมู หลังการตายในช่วงเวลาต่าง ๆ โดยใช้เทคนิค Fluorescence spectroscopy 2. เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสลายตัวของผิวหนังหลังการตาย (PMI: Postmortem interval) 3. เปรียบเทียบความสัมพันธ์กิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase เป็นตัวชี้วัดสำหรับ PMI ในสภาวะแบบปิด เพื่อนำไปใช้ประโยชน์ในการสนับสนุนและเป็นแนวทางใหม่ๆ ทางงานด้านนิติวิทยาศาสตร์ในอนาคต

5.1 สรุปผลการศึกษา

- แม้ว่าค่าความเข้มฟลูออเรสเซนซ์ของ Tryptophan จะถูกใช้เป็นตัวแทนของ Protease เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อม การเปลี่ยนแปลงของค่า tryptophan จึงไม่ได้สะท้อนกิจกรรม Protease โดยตรง เช่นเดียวกับ Lipase และ Esterase ที่ใช้ substrate จำเพาะ ทั้งสามเอนไซม์แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงที่แตกต่างกันตามระยะเวลาหลังการตาย โดยสามารถสรุปได้ดังนี้

- Esterase สามารถระบุในช่วง PMI 0–72 ชั่วโมง ซึ่งสอดคล้องกับการย่อยพันธะเอสเทอร์ในระยะเริ่มต้นของการสลายเซลล์ ทำให้เอนไซม์ชนิดนี้เหมาะสำหรับใช้ระบุช่วงต้นหลังการตาย

- Lipase แสดงระดับคงที่สูง ซึ่งอาจสะท้อนความเสถียรของเอนไซม์ หรือการสร้างเพิ่มเติมจากจุลชีพหลังการตาย

- Protease มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างค่อยเป็นค่อยไปตามเวลา สอดคล้องกับกระบวนการ autolysis และกิจกรรมของจุลชีพร่วมที่ช่วยเร่งการสลายโปรตีนในระยะหลัง

โดยสรุป ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่าระดับกิจกรรมของเอนไซม์มีความสัมพันธ์กับช่วงเวลา PMI และสามารถใช้เอนไซม์บางชนิดเป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพ (biomarker) เพื่อช่วยในการประมาณระยะเวลาหลังการตายได้ โดยเฉพาะเอนไซม์ Esterase สำหรับช่วงต้นของกระบวนการย่อยสลาย

จากกราฟแนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ที่เปรียบเทียบกันระหว่างตัวอย่างทั้งสองแหล่ง

จากผลการวิเคราะห์เชิงแนวโน้ม พบความแตกต่างอย่างชัดเจนระหว่างตัวอย่างที่ 1 (ผิวหนังหมูจากโรงเชือด) และตัวอย่างที่ 2 (ผิวหนังหมูจากตลาดสด) ดังนี้

ตัวอย่างที่ 1 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์ Esterase มีแนวโน้มลดลงต่อเนื่องตามเวลา สอดคล้องกับการเสื่อมสภาพของโครงสร้าง cellular membrane หลังการตาย

ขณะที่ Protease เพิ่มขึ้นในช่วงต้นและลดลงในระยะหลัง ซึ่งอาจเกิดจากกระบวนการย่อยตัวเอง (autolysis) ในระยะแรก ตามด้วยกิจกรรมของจุลชีพที่ลดลงจากสภาพความชื้นที่ต่ำกว่า

สำหรับ Lipase มีค่าค่อนข้างคงที่ในระดับปานกลางถึงสูง สอดคล้องกับการสลายตัวของไขมันอย่างต่อเนื่องภายใต้สภาวะควบคุม แต่ไม่มีความชื้นมากพอที่จะเร่งการเจริญของจุลชีพอย่างรวดเร็ว

ตัวอย่างที่ 2 พบว่า กิจกรรมของเอนไซม์บางชนิด เช่น Lipase และ Protease ยังอยู่ในระดับสูงแม้เวลาผ่านไป ซึ่งแสดงให้เห็นว่าส่วนหนึ่งของเอนไซม์ที่ตรวจพบอาจไม่ได้มาจาก host โดยตรง แต่เป็นผลจากการเจริญของจุลชีพหรือเชื้อราที่เติบโตได้ดีในสภาวะที่มีความชื้นสูงกว่า จากลักษณะน้ำเหลืองและผิวหนังที่ถูกทำลายด้วยความร้อนก่อนถอนขน ทำให้เกิดการเจริญของจุลชีพได้เร็วขึ้น ส่งผลให้มีการสร้างเอนไซม์เพิ่มเติม (Javan et al., 2016)

ด้านความแตกต่างของความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate)

ในตัวอย่างที่ 2 ซึ่งผ่านการลวกน้ำร้อนก่อนถอนขน พบว่าความเข้มการเรืองแสงมีความแปรปรวนสูงมากในช่วงแรก แม้ว่าจะใช้ปริมาณตัวอย่างในความเข้มข้นที่ต่ำก็ตาม โดยให้ค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงกว่าตัวอย่างที่ 1 อย่างชัดเจน

ความผิดปกตินี้ไม่ได้เกิดจากผลของความเข้มข้นของ substrate แต่สอดคล้องกับลักษณะภายนอกของตัวอย่าง ซึ่งมีปริมาณน้ำเหลืองมากและมีสภาพผิวที่เสียหายจากความร้อน ทำให้เกิดการเจริญเพิ่มขึ้นของจุลชีพได้รวดเร็ว ส่งผลให้มีการผลิตเอนไซม์จากจุลชีพหรือเอนไซม์ที่ทนความร้อนหลงเหลืออยู่ในปริมาณสูง

เมื่อเวลาผ่านไป (ประมาณ 30–90 ชั่วโมงหลังการตาย) ค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในตัวอย่างที่ 2 ลดความแปรปรวนลงและมีแนวโน้มใกล้เคียงกับตัวอย่างที่ 1 แสดงให้เห็นว่าความแตกต่างในช่วงต้นมีสาเหตุจากสภาพผิวและความชื้นมากกว่าผลของความเข้มข้นของ substrate

5.2 อภิปรายผลการศึกษา

1. แนวโน้มกิจกรรมของเอนไซม์ Lipase, Protease และ Esterase หลังการตายตามช่วงเวลา

จากผลการทดลอง พบว่าค่าความเข้มแสงของกิจกรรมเอนไซม์ Lipase ที่วัดด้วยเครื่อง Fluorescence Spectroscopy สูงจนถึงขีดจำกัดของเครื่อง (AU 999.99) ถึงแม้จะไม่สามารถใช้ตัวเลขนั้นเป็นค่าปริมาณจริงได้ แต่ยังพอสังเกตเห็นแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ได้ชัดเจน โดยพบว่ากิจกรรมของเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นต่อเนื่องในช่วงแรก ก่อนจะเริ่มลดลงเล็กน้อยที่ช่วง ~76 ชั่วโมง แล้วคงที่หลังจากนั้น

ดังนั้นค่าความเข้มแสง (fluorescence intensity, A.U.) ในงานนี้จึงถูกใช้เพื่อวิเคราะห์แนวโน้มของกิจกรรมเอนไซม์ แทนการใช้เป็นค่าปริมาณเชิงปริมาณ ซึ่งยังมีความหมายทางชีวภาพต่อการตีความกระบวนการย่อยสลายหลังการตายในเชิงนิติวิทยาศาสตร์

เมื่อเปรียบเทียบตัวอย่างทั้งสอง พบว่าตัวอย่างที่ 2 ซึ่งผ่านกระบวนการลวกน้ำร้อนแสดงค่ากิจกรรมเอนไซม์สูงตั้งแต่ช่วงแรก แม้ว่าจะใช้ความเข้มข้นของตัวอย่างต่ำกว่าตัวอย่างที่ 1 ก็ตาม ลักษณะนี้คาดว่าไม่ได้สะท้อนกระบวนการย่อยสลายตามปกติหลังความตาย แต่เป็นผลจากจุลชีพที่ทนต่ออุณหภูมิสูง เช่น *Pseudomonas* หรือแบคทีเรียกลุ่มอื่นที่ยังคงอยู่บนผิวหนังหลังการลวก และสามารถผลิตเอนไซม์ออกมาได้ในปริมาณมาก ทำให้ค่าความเข้มแสงของกิจกรรมเอนไซม์สูงผิดปกติในช่วงแรก ก่อนที่แนวโน้มค่าจะกลับเข้าใกล้ตัวอย่างที่ 1 ในเวลาต่อมา (Yuan et al., 2018) ; (Duan et al., 2023)

รูปแบบการเปลี่ยนแปลงนี้สอดคล้องกับงานวิจัยที่รายงานว่า Esterase จะเริ่มเพิ่มขึ้นและสูงสุดประมาณ 24 ชั่วโมงก่อนจะลดลงหลังจากนั้น (Dachun & Jiazhen, 1992) และสอดคล้องกับการรายงานของ (Oesch et al., 2018) ที่นำหมูมาใช้เป็นสัตว์ทางเลือกแทนมนุษย์ พบว่าค่า esterase ของหมูมีความใกล้เคียงกับของมนุษย์มากที่สุด ซึ่งช่วยสนับสนุนว่าหมูเป็นโมเดลที่เหมาะสมสำหรับการศึกษาลักษณะเอนไซม์หลังการตาย ในขณะเดียวกันงานของ (Brown & Prahlow, 2018) พบว่าแม้ภายหลังการตาย 48 ชั่วโมง เอนไซม์ Lipase ยังคงมีกิจกรรมสูงอยู่ ให้ผลไปในทิศทางเดียวกันกับงานวิจัยของ (Howard et al., 2010) ว่าค่า Lipase เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญภายใน 9 วัน และ Protease เพิ่มสูงภายใน 7 วัน หรืออาจคงระดับเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องไปอีกหลายสัปดาห์

นอกจากนี้ งานของ (Ansari & Menon, 2017) ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ Tryptophan ในน้ำวุ้นใต้ตา ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมของกิจกรรม Protease พบว่าหลัง 90 ชั่วโมงหลังการตาย ค่าดังกล่าวยังคงเพิ่มขึ้นต่อเนื่องเมื่อเวลาผ่านไป เช่นเดียวกับงานวิจัยของ (Gruszczyńska et al., 2024) ที่ศึกษาลายนิ้วมือของมนุษย์หลังการตาย พบว่าเอนไซม์ Tryptophan มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องภายใน 48 ชั่วโมงแรกเช่นกัน

ผลที่ได้มีแนวโน้มสอดคล้องกับข้อสันนิษฐานของผู้วิจัยว่า กิจกรรมของเอนไซม์จาก host มีการเปลี่ยนแปลงตามระยะของการสลายตัว โดยเฉพาะในช่วง 48–72 ชั่วโมงหลังการตาย ซึ่งเป็นระยะที่กระบวนการ autolysis และการย่อยสลายของจุลชีพเริ่มชัดเจนขึ้น

2. บทบาทของแบคทีเรียในการผลิตเอนไซม์ในระยะการเน่าเปื่อย (Active decay stage)

ตัวอย่างที่ 2 ซึ่งเก็บจากตลาด พบว่าในวันที่สอง ผิวหนังหมูมีน้ำเหลืองออกมามากและมีลักษณะเปียกชื้นกว่าช่วงแรก ลักษณะนี้สอดคล้องกับรายงานของ Duan et al. (2023) ที่พบว่าในซากสุกรสามารถตรวจพบเอนไซม์ Lipase จากแบคทีเรีย แม้จะผ่านการลวกน้ำร้อนในระยะสั้น เอนไซม์ที่สร้างจากแบคทีเรียเหล่านี้ยังคงทำงานได้ในภายหลัง (Duan et al., 2023) การย่อยสลายโดยแบคทีเรียมักมีน้ำเหลืองหรือของเหลวเกิดขึ้นมากในช่วง Active decay ซึ่งเป็นระยะที่กิจกรรมของเอนไซม์ยังคงดำเนินต่อเนื่องและยาวนาน โดยเฉพาะในช่วงประมาณ 6–7 วันหลังการตาย แสดงให้เห็นว่าเอนไซม์ที่มีต้นกำเนิดจากแบคทีเรียมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการย่อยสลายในระยะนี้

กิจกรรมเอนไซม์ Lipase และ Protease จาก host เริ่มลดลงและเสื่อมสภาพเมื่อผ่านไปประมาณ 72–96 ชั่วโมงหลังการตาย อย่างไรก็ตาม การตรวจพบสัญญาณ fluorescence อาจสะท้อนเอนไซม์ที่ถูกสร้างขึ้นโดย แบคทีเรียซาโพรไฟต์ (saprophytic bacteria) ที่เข้ามาแทนที่และปล่อยเอนไซม์ออกมาย่อยสลายซาก (Abdoun et al., 2023)

งานศึกษาของ Oktaviana et al. (2025) พบว่าจำนวนแบคทีเรียไม่ต้องการออกซิเจนในดินรอบซากและบนผิวหนังหมูเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง 3–48 วัน ซึ่งบางชนิดสามารถผลิตเอนไซม์ Lipase ได้อย่างเสถียรหลังซากผ่านไปประมาณ 96 ชั่วโมง (Alves et al., 2016) (Alrumman et al., 2018) แบคทีเรียที่มักพบ เช่น *Bacillus* และ *Pseudomonas* มีความสามารถผลิต Lipase สำหรับย่อยไขมัน (Mehola et al., 2024) ขณะเดียวกัน Protease ก็สามารถผลิตโดยแบคทีเรียที่ย่อยคอลลาเจน เช่น *Clostridium* (Roy et al., 2021)

ทำให้ผลที่พบในตัวอย่างที่ 2 (จากตลาด) สะท้อนถึงอิทธิพลของจุลชีพภายนอกต่อการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตาย สนับสนุนข้อสันนิษฐานว่าปัจจัยด้านสภาพแวดล้อมและความชื้นมีผลต่อกิจกรรมเอนไซม์ที่ตรวจวัดได้

3. การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์จาก host เปรียบเทียบกับจากแบคทีเรีย

หลังจากผ่านไปประมาณ 96 ชั่วโมง พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์เริ่มเพิ่มขึ้นอีกครั้ง ซึ่งอาจมาจากแบคทีเรียในกลุ่ม Firmicutes โดยเฉพาะ *Clostridium* ซึ่งเด่นชัดหลัง 96 ชั่วโมง แบคทีเรียกลุ่ม

นี้มีบทบาทในการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน รวมถึงสร้างก๊าซที่มีกลิ่นระหว่างกระบวนการย่อยสลาย (Jangid et al., 2024)

ค่ากิจกรรมของ Lipase ที่เพิ่มขึ้นต่อเนื่องสอดคล้องกับการศึกษาของ Fatimah et al. (2019) ซึ่งติดตามกิจกรรมของ Lipase และ Protease จากแบคทีเรีย Serratia พบว่า Lipase สูงสุดในช่วง 16 ชั่วโมง ส่วน Protease เพิ่มขึ้นชัดเจนหลัง 48 ชั่วโมง (Fatimah et al., 2019) เช่นเดียวกันกับรายงานว่าของ (Gupta et al., 2004) ที่พบว่า *Pseudomonas* และ *Bacillus* สามารถผลิต Lipase ได้ต่อเนื่อง โดยเฉพาะ *Pseudomonas* เจริญเพิ่มในช่วง 48–96 ชั่วโมงหลังการตาย

เมื่อเปรียบเทียบกับแนวโน้มของผลทดลอง พบว่าค่ากิจกรรมเอนไซม์ที่เพิ่มขึ้นหลัง 96 ชั่วโมง สะท้อนบทบาทของแบคทีเรียย่อยสลาย ซึ่งสอดคล้องกับผลการตรวจวัด fluorescence ที่ยังคงพบได้ในระยะหลัง

4. ผลของการลวกน้ำร้อนต่อกิจกรรมของเอนไซม์

(Van Damme et al., 2021) รายงานว่าแบคทีเรียสามารถผลิตเอนไซม์ Lipase และ Protease เพิ่มขึ้นเมื่อเวลาผ่านไป มีค่ากิจกรรมสูง (Zhai et al., 2022) เช่นเดียวกับ *Pseudomonas* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้บ่อยหลังการตาย สามารถผลิตเอนไซม์ Lipase และ Protease ที่ทนความร้อนได้ดี (Yuan & Relue, 2008)

การเปลี่ยนแปลงนี้ชี้ให้เห็นว่าขั้นตอนการเตรียมตัวอย่าง เช่น การลวกน้ำร้อน มีผลต่อการคงอยู่ของเอนไซม์จาก host และอาจทำให้เอนไซม์ที่ตรวจพบในระยะหลังมาจากจุลชีพเป็นส่วนใหญ่

จากความคิดเห็นของผู้วิจัย จากการศึกษาครั้งนี้ แสดงให้เห็นแนวโน้มที่น่าสนใจของการใช้กิจกรรมเอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ระยะเวลาหลังการเสียชีวิต โดยเฉพาะเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase ซึ่งแสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมที่แตกต่างกันไปตามช่วงเวลา การตรวจวัดด้วยเทคนิค Fluorescence Spectroscopy โดยใช้ผิวหนังหมูส่วนท้องเป็นตัวแทนของผิวหนังมนุษย์ สามารถสะท้อนแนวโน้มของการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีหลังการตายได้ในระดับหนึ่ง

อย่างไรก็ตาม ผลการวิเคราะห์ทางสถิติยังไม่พบความแตกต่างของกิจกรรมเอนไซม์ระหว่างช่วงเวลาหลังการตายอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) กิจกรรมเอนไซม์หลังการตายไม่มีผลกับเวลา ถึงแม้ว่าจะเห็นแนวโน้มแต่ความแตกต่างนั้นไม่มากพอที่จะถือว่าเกิดจากเวลาแน่ชัด ซึ่งอาจเป็นผลมาจากจำนวนตัวอย่างที่ยังมีจำกัด หรือความแปรผันของสภาพแวดล้อมที่อาจมีผลต่อการทำงานของเอนไซม์

ผู้วิจัยเห็นว่าการขยายขอบเขตการศึกษา เช่น เพิ่มชนิดเอนไซม์หรือ substrate การเพิ่มจำนวนตัวอย่าง การทดลองในสภาพแวดล้อมใกล้เคียงธรรมชาติ และพิจารณาปัจจัยด้านจุลชีพร่วมด้วย จะช่วยเพิ่มความแม่นยำและความเชื่อมั่นของผลลัพธ์ และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้ในอนาคต

5.3 ข้อเสนอแนะ

ข้อเสนอแนะในงานวิจัย

การศึกษานี้พบแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์หลังการตายที่ไม่สม่ำเสมอ เป็นข้อจำกัดสำคัญ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมตัวแปรร่วม เช่น pH, ความชื้น, อุณหภูมิสิ่งแวดล้อม และใช้ตัวอย่างชีวภาพที่ใกล้เคียงมนุษย์มากขึ้น เพื่อพัฒนาแบบจำลอง PMI ให้แม่นยำขึ้น

ข้อเสนอแนะงานวิจัยในอนาคต

1. **ควรมีการศึกษาที่มาของเอนไซม์เพิ่มเติม** เนื่องจากเอนไซม์หลังการตายบางส่วนอาจมาจากแบคทีเรีย putrefactive bacteria ไม่ใช่เนื้อเยื่อของ host โดยตรง สามารถควบคุมหรือแยกแหล่งกำเนิด เช่น ใช้ยาปฏิชีวนะ หรือศึกษา microbiome ร่วมด้วย
2. **ควบคุมความเข้มข้น**ของ substrate ให้สม่ำเสมอ เพื่อป้องกัน fluorescence เกินขีดจำกัดของเครื่อง แนะนำ FDA 10 μM และ 4-MU butyrate 0.5 μM
3. **เพิ่มจำนวนช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง** เพื่อสังเกตแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์และพัฒนา PMI model

4. **เลือกใช้ภาชนะและสภาพแวดล้อมที่สม่ำเสมอ** เช่น กล่องพลาสติกหรือถุงชนิดเดียวกัน ควบคุมความชื้นและการระบายอากาศ เพราะสภาพแวดล้อมส่งผลต่อกิจกรรมเอนไซม์และการเจริญของแบคทีเรีย

5. **เพิ่มการเปรียบเทียบระหว่างระบบปิดและเปิด** เพื่อศึกษาความแตกต่างของอัตราการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์

6. **พิจารณาเปรียบเทียบตัวอย่างที่เตรียมต่างกัน** เช่น ลวกน้ำร้อน ชำแหละ หรือวิธีจัดเก็บ เพราะอาจส่งผลต่อโครงสร้างโปรตีนและการทำงานของเอนไซม์ รวมถึงความแม่นยำในการประเมิน PM

มหาวิทยาลัยศิลปากร

รายการอ้างอิง

Abdoun, A., Amir, N., & Fatima, M. (2023). Thanatomicrobiome in forensic medicine. *New Microbiol*, *46*(3), 236-245.

Albani, J. R. (2007). New insights in the interpretation of tryptophan fluorescence : origin of the fluorescence lifetime and characterization of a new fluorescence parameter in proteins: the emission to excitation ratio. *J Fluoresc*, *17*(4), 406-417. https://doi.org/10.1007/s10895-007-0183-3

Alrumman, S., Mostafa, Y. S. M., Al-Qahtani, S., & Taha, T. H. T. (2018). Hydrolytic Enzyme Production by Thermophilic Bacteria Isolated from Saudi Hot Springs. *Open Life Sci*, *13*, 470-480. https://doi.org/10.1515/biol-2018-0056

Alves, M. P., Salgado, R. L., Eller, M. R., Vidigal, P. M. P., & Fernandes de Carvalho, A. (2016). Characterization of a heat-resistant extracellular protease from Pseudomonas fluorescens 07A shows that low temperature treatments are more effective in deactivating its proteolytic activity. *Journal of Dairy Science*, *99*(10), 7842-7851. https://doi.org/https://doi.org/10.3168/jds.2016-11236

Ansari, N., & Menon, S. K. (2017). Determination of Time since Death using Vitreous Humor Tryptophan. *J Forensic Sci*, *62*(5), 1351-1356. https://doi.org/10.1111/1556-4029.13430

Barington, K., Jensen, H. E., & Skovgaard, K. (2017). Forensic aspects of gene expression signatures for age determination in bruises as evaluated in an experimental porcine model. *Forensic Sci Med Pathol*, *13*(2), 151-160. https://doi.org/10.1007/s12024-017-9869-2

Bätz, F. M., Klipper, W., Korting, H. C., Henkler, F., Landsiedel, R., Luch, A., von Fritschen, U., Weindl, G., & Schäfer-Korting, M. (2013). Esterase activity in excised and reconstructed human skin--biotransformation of prednicarbate and the model dye fluorescein diacetate. *Eur J Pharm Biopharm*, *84*(2), 374-385. https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2012.11.008

Bellmaine, S., Schnellbaecher, A., & Zimmer, A. (2020). Reactivity and degradation products of tryptophan in solution and proteins. *Free Radical Biology and*

Medicine, *160*, 696-718. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.freeradbiomed.2020.09.002

Bose, A., Thomas, I., Kavitha, G., & Abraham, E. (2018). Fluorescence spectroscopy and its applications: A Review. *International Journal of Pharmaceutical Chemistry*, *8*, 01-08.

Brown, T. T., & Prahlow, J. A. (2018). Postmortem Serum Amylase and Lipase Analysis in the Diagnosis of Acute Pancreatitis. *Acad Forensic Pathol*, *8*(2), 311-323. https://doi.org/10.1177/1925362118782071

Buras, K. L. (2006). *Are enzymes accurate indicators of postmortem interval?: a biochemical analysis* [Thesis, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College].

Charlot, E., Gasser, A., Oostra, R. J., Aalders, M. C. G., & Krap, T. (2025). Fluorescence of various buried fresh and fresh-frozen-thawed tissue types up until the point of active decay: a human taphonomy study. *Int J Legal Med*, *139*(2), 917-930. https://doi.org/10.1007/s00414-024-03387-w

Cockle, D. L., & Bell, L. S. (2015). Human decomposition and the reliability of a 'Universal' model for post mortem interval estimations. *Forensic Sci Int*, *253*, 136.e131-139. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2015.05.018

Dachun, W., & Jiazhen, Z. (1992). Localization and quantification of the nonspecific esterase in injured skin for timing of wounds. *Forensic Sci Int*, *53*(2), 203-213. https://doi.org/10.1016/0379-0738(92)90196-4

de Vos, J., Otto, R. E., Achetib, N., Gasser, A., Aalders, M. C. G., & van Dam, A. (2023). Analysis of the fluorescent properties of vaginal fluid upon ageing. *Methods Appl Fluoresc*, *12*(1). https://doi.org/10.1088/2050-6120/ad06dd

DeBruyn, J. M., Hoeland, K. M., Taylor, L. S., Stevens, J. D., Moats, M. A., Bandopadhyay, S., Dearth, S. P., Castro, H. F., Hewitt, K. K., Campagna, S. R., Dautartas, A. M., Vidoli, G. M., Mundorff, A. Z., & Steadman, D. W. (2021). Comparative Decomposition of Humans and Pigs: Soil Biogeochemistry, Microbial Activity and Metabolomic Profiles [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, *Volume 11 - 2020*. https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.608856

Dell'Annunziata, F., Martora, F., Pepa, M., Folliero, V., Luongo, L., Bocelli, S., Guida, F., Mascolo, P., Campobasso, C., Maione, S., Franci, G., & Galdiero, M. (2021). Post-mortem interval assessment by MALDI-TOF mass spectrometry analysis in murine cadavers. *Journal of Applied Microbiology*, *132*. https://doi.org/10.1111/jam.15210

Dettmeyer, R. (2018). Histothanatology: Autolysis, Putrefaction, and Mummification. In (pp. 503-518). https://doi.org/10.1007/978-3-319-77997-3_19

Dive, C., Cox, H., Watson, J. V., & Workman, P. (1988). Polar fluorescein derivatives as improved substrate probes for flow cytoenzymological assay of cellular esterases. *Mol Cell Probes*, *2*(2), 131-145. https://doi.org/10.1016/0890-8508(88)90035-7

Duan, X., Zhai, W., Li, X., Wu, S., Wang, Y., Wang, L., Basang, W., Zhu, Y., & Gao, Y. (2023). Preparation, purification, and biochemical of fat-degrading bacterial enzymes from pig carcass compost and its application. *BMC Biotechnol*, *23*(1), 48. https://doi.org/10.1186/s12896-023-00818-1

Estracanholli, E. S., Kurachi, C., Vicente, J. R., de Menezes, P. F., Castro e Silva Júnior, O., & Bagnato, V. S. (2009). Determination of post-mortem interval using in situ tissue optical fluorescence. *Opt Express*, *17*(10), 8185-8192. https://doi.org/10.1364/oe.17.008185

Fatimah, F., Fitri, R., Illavi, G., Renjana, E., Pratiwi, I., Ni'matuzahroh, N. m., & Sumarsih, S. (2019). Cell wall response of bacteria Serratia marcescens LII61 -lipase and protease enzymes producer -in gram staining. *Ecology, Environment and Conservation*, *25*, S76-S80.

Gensch, T., Hendriks, J., & Hellingwerf, K. J. (2004). Tryptophan fluorescence monitors structural changes accompanying signalling state formation in the photocycle of photoactive yellow protein. *Photochem Photobiol Sci*, *3*(6), 531-536. https://doi.org/10.1039/b401600a

Ghisaidoobe, A. B. T., & Chung, S. J. (2014). Intrinsic Tryptophan Fluorescence in the Detection and Analysis of Proteins: A Focus on Förster Resonance Energy

Transfer Techniques. *International Journal of Molecular Sciences*, *15*(12), 22518-22538. https://www.mdpi.com/1422-0067/15/12/22518

Gilham, D., & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, *36*(2), 139-147. https://doi.org/10.1016/j.ymeth.2004.11.003

Green, V. S., Stott, D. E., & Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: Optimization for soil samples. *Soil Biology and Biochemistry*, *38*(4), 693-701. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2005.06.020

Gruszczyńska, E., Lewkowicz, A., Czarnomska, M., Koczur, J., Walczewska-Szewc, K., Kaliszan, M., Balwicki, Ł., & Bojarski, P. (2024). Spectroscopic Analysis of Tryptophan as a Potential Optical Biomarker for Estimating the Time of Death. *Int J Mol Sci*, *25*(23). https://doi.org/10.3390/ijms252312915

Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Appl Microbiol Biotechnol*, *64*(6), 763-781. https://doi.org/10.1007/s00253-004-1568-8

Hellmann, N., & Schneider, D. (2019). Hands On: Using Tryptophan Fluorescence Spectroscopy to Study Protein Structure. *Methods Mol Biol*, *1958*, 379-401. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9161-7_20

Heris, Y. S. (2024). Bacterial biodegradation of synthetic plastics: a review. *Bulletin of the National Research Centre*, *48*(1), 87. https://doi.org/10.1186/s42269-024-01241-y

Hong, Z.-X., Zhu, S.-T., Li, H., Luo, J.-Z., Yang, Y., An, Y., Wang, X., & Wang, K. (2023). Bioengineered skin organoids: from development to applications. *Military Medical Research*, *10*(1), 40. https://doi.org/10.1186/s40779-023-00475-7

Howard, G., Duos, B., & Watson-Horzelski, E. (2010). Characterization of the soil microbial community associated with the decomposition of a swine carcass. *International Biodeterioration & Biodegradation*, *64*, 300-304. https://doi.org/10.1016/j.ibiod.2010.02.006

Ioan, B., Manea cas. Amariei, C., Hanganu, B., Statescu, L., Solovastru, L., & Manoilescu, I. (2017). The Chemistry Decomposition in Human Corpses. *Revista de Chimie*, *68*, 1450-1454. https://doi.org/10.37358/RC.17.6.5672

Jangid, C., Dalal, J., & Kumari, K. (2024). Deciphering the microbial signature of death: advances in post-mortem microbial analysis. *Problems of Forensic Sciences*, *2023*(134), 95-115. https://doi.org/10.4467/12307483pfs.23.006.19055

Javan, G. T., Finley, S. J., Abidin, Z., & Mulle, J. G. (2016). The Thanatomicrobiome: A Missing Piece of the Microbial Puzzle of Death. *Front Microbiol*, *7*, 225. https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00225

Kasana, R. C., Salwan, R., & Yadav, S. K. (2011). Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Crit Rev Microbiol*, *37*(3), 262-276. https://doi.org/10.3109/1040841x.2011.577029

Kaur, L., Hui, S. X., Morton, J. D., Kaur, R., Chian, F. M., & Boland, M. (2021). Endogenous Proteolytic Systems and Meat Tenderness: Influence of Post-Mortem Storage and Processing. *Food Sci Anim Resour*, *41*(4), 589-607. https://doi.org/10.5851/kosfa.2021.e27

Khalil, A. M. N., Hegazy, N. I., Abouhashem, A. A., Shaheen, M. A. G., & Hassan, N. M. (2024). From Death to Decay : An Overview of Postmortem Changes. *Zagazig University Medical Journal*, *30*(6), 2345-2355. https://doi.org/10.21608/zumj.2024.291002.3405

Lanka S., N. L. L. J. (2015). A Short Review on Various Screening Methods to Isolate Potential Lipase Producers: Lipases-the Present and Future Enzymes of Biotech Industry. *International Journal of Biological Chemistry*, *9*, 207-219. https://doi.org/10.3923/ijbc.2015.207.219

Long, J. Z., & Cravatt, B. F. (2011). The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chem Rev*, *111*(10), 6022-6063. https://doi.org/10.1021/cr200075y

McIntyre, M. K., Peacock, T. J., Akers, K. S., & Burmeister, D. M. (2016). Initial Characterization of the Pig Skin Bacteriome and Its Effect on In Vitro Models of Wound Healing. *PLOS ONE*, *11*(11), e0166176. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166176

Mehola, J. A., Setyaningsih, R., & Susilowati, A. (2024). Lipase activity and identification of lipolytic bacteria from leather industrial liquid waste in Magetan Small

Industrial Area, Indonesia. *Asian Journal of Tropical Biotechnology*, *21*. https://doi.org/10.13057/biotek/c210201

Metcalf, J. L., Xu, Z. Z., Weiss, S., Lax, S., Van Treuren, W., Hyde, E. R., Song, S. J., Amir, A., Larsen, P., Sangwan, N., Haarmann, D., Humphrey, G. C., Ackermann, G., Thompson, L. R., Lauber, C., Bibat, A., Nicholas, C., Gebert, M. J., Petrosino, J. F.,...Knight, R. (2016). Microbial community assembly and metabolic function during mammalian corpse decomposition. *Science*, *351*(6269), 158-162. https://doi.org/10.1126/science.aad2646

Miles, K. L., Finaughty, D. A., & Gibbon, V. E. (2020). A review of experimental design in forensic taphonomy: moving towards forensic realism. *Forensic Sci Res*, *5*(4), 249-259. https://doi.org/10.1080/20961790.2020.1792631

Nolan, A.-N. D., Mead, R. J., Maker, G., & Speers, S. J. (2020). A review of the biochemical products produced during mammalian decomposition with the purpose of determining the post-mortem interval. *Australian Journal of Forensic Sciences*, *52*(4), 477-488. https://doi.org/10.1080/00450618.2019.1589571

Oesch, F., Fabian, E., & Landsiedel, R. (2018). Xenobiotica-metabolizing enzymes in the skin of rat, mouse, pig, guinea pig, man, and in human skin models. *Arch Toxicol*, *92*(8), 2411-2456. https://doi.org/10.1007/s00204-018-2232-x

Ortiz-Herrero, L., Uribe, B., Armas, L. H., Alonso, M. L., Sarmiento, A., Irurita, J., Alonso, R. M., Maguregui, M. I., Etxeberria, F., & Bartolomé, L. (2021). Estimation of the post-mortem interval of human skeletal remains using Raman spectroscopy and chemometrics. *Forensic Sci Int*, *329*, 111087. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2021.111087

Paczkowski, S., & Schütz, S. (2011). Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Appl Microbiol Biotechnol*, *91*(4), 917-935. https://doi.org/10.1007/s00253-011-3417-x

Pigaiani, N., Bertaso, A., De Palo, E. F., Bortolotti, F., & Tagliaro, F. (2020). Vitreous humor endogenous compounds analysis for post-mortem forensic investigation. *Forensic Sci Int*, *310*, 110235. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2020.110235

Pittner, S., Bugelli, V., Weitgasser, K., Zissler, A., Sanit, S., Lutz, L., Monticelli, F., Campobasso, C. P., Steinbacher, P., & Amendt, J. (2020). A field study to evaluate

PMI estimation methods for advanced decomposition stages. *Int J Legal Med*, *134*(4), 1361-1373. https://doi.org/10.1007/s00414-020-02278-0

Rizki Oktaviana, F., Gultom, F., Pasaribu, R., & Auerkari, E. (2024). Estimation of Time of Death through Observation of Microbiota Changes in the Oral Cavity. *e-GiGi*, *13*, 89-98. https://doi.org/10.35790/eg.v13i1.54461

Robertson, G. (2000). FORENSIC ANALYSIS OF IMPRINT MARKS ON SKIN UTILIZING DIGITAL PHOTOGRAMMETRIC TECHNIQUES. *International Archives of Photogrammetry and Remote Sensing*.

Roy, D., Tomo, S., Purohit, P., & Setia, P. (2021). Microbiome in Death and Beyond: Current Vistas and Future Trends [Review]. *Frontiers in Ecology and Evolution*, *Volume 9 - 2021*. https://doi.org/10.3389/fevo.2021.630397

Sacco, M. A., Cordasco, F., Scalise, C., Ricci, P., & Aquila, I. (2022). Systematic Review on Post-Mortem Protein Alterations: Analysis of Experimental Models and Evaluation of Potential Biomarkers of Time of Death. *Diagnostics*, *12*(6), 1490. https://www.mdpi.com/2075-4418/12/6/1490

Salhi, A., Amara, S., Mansuelle, P., Puppo, R., Lebrun, R., Gontero, B., Aloulou, A., & Carrière, F. (2020). Characterization of all the lipolytic activities in pancreatin and comparison with porcine and human pancreatic juices. *Biochimie*, *169*, 106-120. https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.004

Sauer M, H. J., & Enderlein J. (2011). Basic Principles of Fluorescence Spectroscopy. In *Handbook of Fluorescence Spectroscopy and Imaging* (pp. 1-30). https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527633500.ch1

Schmidt, V.-M., Zelger, P., Wöss, C., Fodor, M., Hautz, T., Schneeberger, S., Huck, C. W., Arora, R., Brunner, A., Zelger, B., Schirmer, M., & Pallua, J. D. (2024). Handheld hyperspectral imaging as a tool for the post-mortem interval estimation of human skeletal remains. *Heliyon*, *10*(4), e25844. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e25844

Shergold, O. A., Fleck, N. A., & Radford, D. (2006). The uniaxial stress versus strain response of pig skin and silicone rubber at low and high strain rates. *International Journal of Impact Engineering*, *32*(9), 1384-1402. https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.ijimpeng.2004.11.010

Sikora, J., Cyrankiewicz, M., Wybranowski, T., Ziomkowska, B., Oś miałowski, B., Oboń ska, E., Augustyń ska, B., Kruszewski, S., & Kubica, J. (2015). Use of time-resolved fluorescence spectroscopy to evaluate diagnostic value of collagen degradation products. *J Biomed Opt*, *20*(5), 051039. https://doi.org/10.1117/1.Jbo.20.5.051039

Szeremeta, M., Samczuk, P., Pietrowska, K., Kowalczyk, T., Przeslaw, K., Sieminska, J., Kretowski, A., Niemcunowicz-Janica, A., & Ciborowski, M. (2022). In Vitro Animal Model for Estimating the Time since Death with Attention to Early Postmortem Stage. *Metabolites*, *13*(1). https://doi.org/10.3390/metabo13010026

Tumer, A. R., Karacaoglu, E., Namli, A., Keten, A., Farasat, S., Akcan, R., Sert, O., & Odabaşi, A. B. (2013). Effects of different types of soil on decomposition: an experimental study. *Leg Med (Tokyo)*, *15*(3), 149-156. https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2012.11.003

Usumoto, Y., Kudo, K., Tsuji, A., Ihama, Y., & Ikeda, N. (2019). Predictive equation to estimate post-mortem interval using spectrophotometric blood-colour values. *Med Sci Law*, *59*(1), 36-41. https://doi.org/10.1177/0025802418819611

Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH.

Van Damme, L., Cox, N., Callens, C., Dargatz, M., Flügel, M., Hark, S., Thiemann, F., Pelzer, S., Haesebrouck, F., Ducatelle, R., Van Immerseel, F., & Goossens, E. (2021). Protein Truncating Variants of colA in Clostridium perfringens Type G Strains. *Front Cell Infect Microbiol*, *11*, 645248. https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.645248

Vass, A. A., Barshick, S.-A., Sega, G., Caton, J., Skeen, J. T., Love, J. C., & Synstelien, J. A. (2002). Decomposition chemistry of human remains: a new methodology for determining the postmortem interval. *Journal of forensic sciences*, *47*(3), 542-553. http://europepmc.org/abstract/MED/12051334

Víteček, J., Petrlova, J., Adam, V., Havel, L., Kramer, K., Babula, P., & Kizek, R. (2007). A Fluorimetric Sensor for Detection of One Living Cell. *Sensors*, *7*, 222-238. https://doi.org/10.3390/s7030222

Wang, Q., Zhang, Y., Lin, H., Zha, S., Fang, R., Wei, X., Fan, S., & Wang, Z. (2017). Estimation of the late postmortem interval using FTIR spectroscopy and chemometrics in human skeletal remains. *Forensic Sci Int*, *281*, 113-120. https://doi.org/10.1016/j.forsciint.2017.10.033

Yuan, L., Sadiq, F. A., Liu, T. J., Li, Y., Gu, J. S., Yang, H. Y., & He, G. Q. (2018). Spoilage potential of psychrotrophic bacteria isolated from raw milk and the thermo-stability of their enzymes. *J Zhejiang Univ Sci B*, *19*(8), 630-642. https://doi.org/10.1631/jzus.B1700352

Yuan, Y., & Relue, P. (2008). Enzymatic degradation of human skin dermis revealed by fluorescence and reflectance spectroscopy. *Opt Express*, *16*(13), 9857-9868. https://doi.org/10.1364/oe.16.009857

Zechner, R., Zimmermann, R., Eichmann, T. O., Kohlwein, S. D., Haemmerle, G., Lass, A., & Madeo, F. (2012). FAT SIGNALS--lipases and lipolysis in lipid metabolism and signaling. *Cell Metab*, *15*(3), 279-291. https://doi.org/10.1016/j.cmet.2011.12.018

Zhai, W., Li, X., Duan, X., Gou, C., Wang, L., & Gao, Y. (2022). Development of a microbial protease for composting swine carcasses, optimization of its production and elucidation of its catalytic hydrolysis mechanism. *BMC Biotechnology*, *22*(1), 36. https://doi.org/10.1186/s12896-022-00768-0

Zhang, Y. Z., Ran, L. Y., Li, C. Y., & Chen, X. L. (2015). Diversity, Structures, and Collagen-Degrading Mechanisms of Bacterial Collagenolytic Proteases. *Appl Environ Microbiol*, *81*(18), 6098-6107. https://doi.org/10.1128/aem.00883-15

Zhou, C., & Byard, R. W. (2011). Factors and processes causing accelerated decomposition in human cadavers - An overview. *J Forensic Leg Med*, *18*(1), 6-9. https://doi.org/10.1016/j.jflm.2010.10.003

Zissler, A., Stoiber, W., Steinbacher, P., Geissenberger, J., Monticelli, F. C., & Pittner, S. (2020). Postmortem Protein Degradation as a Tool to Estimate the PMI: A Systematic Review. *Diagnostics (Basel)*, *10*(12). https://doi.org/10.3390/diagnostics10121014

ภาคผนวก

ภาคผนวก

ข้อมูลในงานวิจัย

ตารางระดับกิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase

ระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI) แสดงด้วยสัญลักษณ์ “+” เพื่อแทนค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence Intensity; FI) ซึ่งวัดได้จากเครื่อง Fluorescence Spectroscopy โดยหน่วยที่ใช้แสดงเป็น Arbitrary Unit (AU) หลังจากลบค่าของ blank และ substrate ออกแล้ว เพื่อให้สะท้อนเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์ที่ได้จากเครื่อง Fluorescence Spectroscopy หลังจากลบค่าของ blank ออกแล้ว

PMI/hr	Enzymes after death		
	Enzyme Protease	Enzyme lipase	Enzyme esterase
10	+	++	+
29	+	++	+
53	++	++++	+++
58	+++	++++	++++
76	++++	++++	++++
82	++	++++	+
103	++++	++++	+++
168	++++	++++	++
178	++	++++	+
226	++	++++	+

หมายเหตุ :

+++++ แทนค่า AU > 1000 ; ++++ แทนค่า AU 1000 – 700 ; +++ แทนค่า AU 700 – 500 ; ++ แทนค่า AU 500 – 300 ; + แทนค่า AU 300 – 0

ข้อมูลในตารางนี้ถูกนำไปใช้ในการวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่างเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval; PMI) กับระดับกิจกรรมของเอนไซม์ (Protease, Lipase และ Esterase) โดยใช้สถิติ Spearman’s Rank Correlation Coefficient เพื่อประเมินความสัมพันธ์การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์กับเวลา

ตารางข้อมูลดิบจากเครื่อง Fluorescence Spectroscopy

ค่าความเข้มแสงที่อยู่ในหน่วย Arbitrary Units (A.U.) หลังจากลบค่า blank และ substrate ออกแล้ว เพื่อให้สะท้อนเฉพาะค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตายของตัวอย่างที่ 1 (ผิวหนังหมูส่วนท้องจากโรงเชือด)

PMI/hr	AU-blank และ Substrate		
	Enzyme Protease	Enzyme Lipase	Enzyme Esterase
10	2.587589333	578.131333	277.2430263
29	10.29713	501.004447	286.5549627
53	485.01809	982.8439913	654.843224
58	655.8301937	984.727913	805.2710303
76	708.1545907	982.5149404	450.8038433
82	493.1391993	832.9185527	293.4696817
103	363.003655	849.824964	281.4158749
168	782.670019	853.156004	307.9815905
178	370.97764	859.5548749	75.83407053
226	602.7671037	902.63212	23.209282

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ตารางข้อมูลดิบจากเครื่อง Fluorescence Spectroscopy

ค่าความเข้มแสงที่อยู่ในหน่วย Arbitrary Units (A.U.) หลังจากลบค่า blank และ substrate ออกแล้ว เพื่อให้สะท้อนเฉพาะค่ากิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตายของตัวอย่างที่ 2 (ผิวหนังหมูส่วนท้องจากโรงตลาด)

PMI/hr	AU-blank และ Substrate		
	Enzyme Protease	Enzyme Lipase	Enzyme Esterase
6	310.697419	940.9268623	828.81691
14	88.65149367	762.1307407	629.1042097
30	243.321977	928.9148823	474.9357237
35	487.0749583	820.6471127	146.585124
54	751.9542903	876.4073763	145.5335437
77	858.5751683	875.6299597	213.8569777
108	720.3412783	898.7482562	151.6711037

หมายเหตุ:

- ค่าที่แสดงเป็นค่าความเข้มของสัญญาณฟลูออเรสเซนซ์ (Fluorescence intensity, A.U.) หลังจากลบค่าของ blank และ substrate เพื่อให้แสดงเฉพาะกิจกรรมของเอนไซม์
- สำหรับเอนไซม์ Lipase พบว่าค่าการเรืองแสงในบางช่วงมีค่าความเข้มแสง AU > 1000 ซึ่งอาจเกินขีดจำกัดของเครื่องวัด ทำให้ค่าที่ได้อาจมีความคลาดเคลื่อน
- ปริมาตรของตัวอย่างแต่ละช่วงเวลาหลังการตายมีความแตกต่างกัน โดยในช่วงแรกของการทดลองมีปริมาตรตัวอย่างน้อย ทำให้ความเข้มข้นของเอนไซม์สูงกว่า ขณะที่ช่วงหลังต้องมีการเจือจางมากขึ้น

- ดังนั้น ค่าที่ได้จึงไม่สามารถเปรียบเทียบเชิงปริมาณโดยตรงระหว่างแต่ละช่วงเวลาได้ ผู้วิจัยจึงใช้การวิเคราะห์เชิงแนวโน้ม (trend analysis) เพื่อประเมินการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ตามเวลาเท่านั้น
- เนื่องจากปริมาตรของตัวอย่างในแต่ละช่วงเวลาการตายแตกต่างกัน (ช่วงแรกมีปริมาตรน้อย ทำให้ความเข้มข้นสูง แต่ช่วงหลังมีปริมาตรมากจึงต้องเจือจางมากขึ้น) จึงไม่สามารถใช้เปรียบเทียบเชิงปริมาณตรงๆ ได้
- ผู้วิจัยจึงวิเคราะห์ข้อมูลนี้ในเชิง แนวโน้มเท่านั้น (trend) เพื่อดูว่ากิจกรรมเอนไซม์มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นหรือลดลง ตามเวลา แต่ไม่ได้ใช้ค่าดิบในการคำนวณเชิงปริมาณหรือเชิงสถิติโดยตรง

มหาวิทยาลัยศิลปากร

ภาคผนวก ข

ชุดข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการวิเคราะห์ทางสถิติ (Statistical Analysis)

การวิเคราะห์ข้อมูลใช้โปรแกรม SPSS เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างเวลาหลังการตาย (PMI; hr) กับกิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase โดยใช้สถิติแบบไม่อิงพารามิเตอร์ (Non-parametric statistics) ของตัวอย่างที่ 1

Nonparametric Correlations

Correlations

			ค่า PMI/hr	เอนไซม์โปรตีเอส	เอนไซม์ไลเปส	เอนไซม์เอสเทอเรส
Spearman's rho	ค่า PMI/hr	Correlation Coefficient	1.000	.455	.224	-.418
		Sig. (2-tailed)	.	.187	.533	.229
		N	10	10	10	10
	เอนไซม์โปรตีเอส	Correlation Coefficient	.455	1.000	.624	.491
		Sig. (2-tailed)	.187	.	.054	.150
		N	10	10	10	10
	เอนไซม์ไลเปส	Correlation Coefficient	.224	.624	1.000	.503
		Sig. (2-tailed)	.533	.054	.	.138
		N	10	10	10	10
	เอนไซม์เอสเทอเรส	Correlation Coefficient	-.418	.491	.503	1.000
		Sig. (2-tailed)	.229	.150	.138	.
		N	10	10	10	10

ผลการทดสอบ Spearman's correlation

พบว่าไม่มีความสัมพันธ์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างค่า PMI กับกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิด ($p > 0.05$) แม้ว่ากิจกรรมของ Protease และ Esterase จะมีแนวโน้มแสดงความสัมพันธ์ในระดับปานกลาง (Moderate correlation trend)

Descriptive Statistics

	N	Mean	Std. Deviation	Minimum	Maximum
Protease	10	447.44452	269.437340	2.588	782.670
Lipase	10	832.73091	166.416747	501.004	984.728
Esterase	10	345.66266	238.308245	23.209	805.271
Early 0-75=1, Middle 76-150=2, Late 151-226=3	10	1.90	.876	1	3

ผลการทดสอบ Kruskal–Wallis Test การเปรียบเทียบการกระจายของกิจกรรมเอนไซม์ระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย 3 ระยะ ได้แก่

ระยะ Early (0–75 ชั่วโมง) ระยะ Middle (76–150 ชั่วโมง) ระยะ Late (151–226 ชั่วโมง)

พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในกิจกรรมของเอนไซม์ทั้งสามชนิด ($p > 0.05$) ดังนั้น จึงไม่ปฏิเสธสมมติฐานศูนย์ (Retain the null hypothesis) หมายความว่าการกระจายของค่ากิจกรรมเอนไซม์ทั้งสามชนิดไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลาหลังการตาย

Kruskal-Wallis Test

Ranks

	Early 0-75=1, Middle 76-150=2, Late 151-226=3	N	Mean Rank
Protease	1	4	4.00
	2	3	6.00
	3	3	7.00
	Total	10	
Lipase	1	4	5.50
	2	3	5.00
	3	3	6.00
	Total	10	
Esterase	1	4	6.75
	2	3	6.00
	3	3	3.33
	Total	10	

Test Statistics[a,b]

	Protease	Lipase	Esterase
Chi-Square	1.800	.164	2.300
df	2	2	2
Asymp. Sig.	.407	.921	.317

a. Kruskal Wallis Test

b. Grouping Variable: Early 0-75=1, Middle 76-150=2, Late 151-226=3

Hypothesis Test Summary

	Null Hypothesis	Test	Sig.	Decision
1	The distribution of Protease is the same across categories of Early 0-75=1, Middle 76-150=2, Late 151-226=3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.407	Retain the null hypothesis.
2	The distribution of Lipase is the same across categories of Early 0-75=1, Middle 76-150=2, Late 151-226=3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.921	Retain the null hypothesis.
3	The distribution of Esterase is the same across categories of Early 0-75=1, Middle 76-150=2, Late 151-226=3.	Independent-Samples Kruskal-Wallis Test	.317	Retain the null hypothesis.

Asymptotic significances are displayed. The significance level is .05.

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ-สกุล ภคมน สุวรรณเมฆ

วุฒิการศึกษา ปริญญาตรี จบการศึกษาจาก สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้า เจ้าคุณทหารลาดกระบัง คณะวิทยาศาสตร์ สาขาเทคโนโลยีชีวภาพ