

EVALUATION OF POSTMORTEM INTERVAL USING ENZYME ACTIVITY IN PIG ABDOMINAL SKIN UNDER A CLOSED-SYSTEM SIMULATION WITH FLUORESCENCE SPECTROSCOPY

Phakhamon SUWANMEK¹ and Sirirat CHOOSAKOONKRIANG²

1 Forensic Science Program, Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand;

Vsuwannamek@gmail.com

2 Department of Chemistry, Faculty of Science, Silpakorn University, Thailand; sirath157@gmail.com

ARTICLE HISTORY

Received: 1 September 2025

Revised: 22 September 2025

Published: 7 October 2025

ABSTRACT

Estimation of the postmortem interval (PMI) is a critical process in forensic science. This study aimed to investigate enzymatic changes in porcine abdominal skin under a closed-system simulation using fluorescence spectroscopy. Enzyme activities of protease, lipase, and esterase were analyzed at 10, 29, 53, 58, 76, 82, 103, 168, 178 and 226 hours postmortem. Data were statistically evaluated using Spearman's rank correlation and the Kruskal-Wallis test to compare activity levels across early, middle, and late PMI. The results demonstrated that protease activity became distinctly detectable after 30 hours and exhibited a moderate positive correlation with PMI ($\rho = 0.45$). Esterase activity progressively decreased over time, showing a moderate negative correlation with PMI ($\rho = -0.42$). Lipase activity remained consistently elevated up to 226 hours postmortem, with a weak correlation to PMI ($\rho = 0.22$). The Kruskal-Wallis test revealed no significant differences among the PMI groups ($p > 0.05$). These findings suggest that protease and esterase may serve as potential biochemical indicators for PMI estimation in forensic investigations, whereas lipase shows limited applicability due to its sustained activity regardless of time.

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

CITATION INFORMATION: Suwanmek, P., & Choosakoonkriang, S. (2025). Evaluation of Postmortem Interval Using Enzyme Activity in Pig Abdominal Skin under a Closed-System Simulation with Fluorescence Spectroscopy. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(10), 43

การประเมินระยะเวลาหลังการเสียชีวิตจากเอนไซม์บนผิวหนังสุกรโดยฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี

ภคมน สุวรรณเมฆ¹ และ ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง²

1 โครงการนิติวิทยาศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; Vsuwannamek@gmail.com

2 ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร; sirath157@gmail.com

บทคัดย่อ

การประเมินช่วงเวลาหลังการเสียชีวิต (PMI) เป็นกระบวนการที่สำคัญในทางนิติวิทยาศาสตร์ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงเอนไซม์ภายหลังการเสียชีวิตบริเวณผิวหนังสุกรในระบบปิด โดยใช้เทคนิค Fluorescence Spectroscopy จากการทดลองเก็บตัวอย่างเพื่อศึกษากิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase บนผิวหนังสุกรที่เวลา 10, 29, 53, 58, 76, 82, 103, 168, 178 และ 226 ชั่วโมงภายหลังการเสียชีวิต และทำการวิเคราะห์ข้อมูลด้วย Spearman's Rank Correlation และ Kruskal-Wallis Test เพื่อเปรียบเทียบค่ากิจกรรมในช่วง Early, Middle และ Late PMI ผลของการทดลองพบว่า เอนไซม์ Protease แสดงกิจกรรมอย่างชัดเจนภายหลัง 30 ชั่วโมง โดยมีความสัมพันธ์ทางบวกระดับปานกลางกับ PMI ($p = 0.45$) Esterase มีแนวโน้มลดลงเมื่อเวลาผ่านไป โดยมีความสัมพันธ์ทางลบระดับปานกลางกับ PMI ($p = -0.42$) ส่วน Lipase มีค่าแนวโน้มที่เพิ่มขึ้นคงที่และสูงต่อเนื่องแม้จะผ่านไปแล้วหลัง 226 ชั่วโมง แต่ความสัมพันธ์กับเวลาอยู่ในระดับต่ำ ($p = 0.22$) การวิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่มช่วงเวลา ($p > 0.05$) จากผลการศึกษาชี้ว่าเอนไซม์ Protease และ Esterase อาจใช้เป็นตัวชี้วัดในการประเมิน PMI ได้ในระดับหนึ่งในทางนิติวิทยาศาสตร์

คำสำคัญ: กิจกรรมของเอนไซม์ (โปรตีเอส, ไลเปส, เอสเทอเรส) ในผิวหนัง, Tryptophan, เวลาหลังการตาย (PMI), Fluorescence Spectroscopy

ข้อมูลการอ้างอิง: ภคมน สุวรรณเมฆ และ ศิริรัตน์ ชูสกุลเกรียง. (2568). การประเมินระยะเวลาหลังการเสียชีวิตจากเอนไซม์บนผิวหนังสุกรโดยฟลูออเรสเซนซ์สเปกโทรสโกปี. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 3(10), 43

บทนำ

การประมาณเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI) เป็นประเด็นสำคัญในนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากช่วยในการสืบสวนและการชันสูตรพลิกศพ วิธีดั้งเดิม เช่น การแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อ การลดอุณหภูมิร่างกาย และการสลายของเนื้อเยื่อ มักมีข้อจำกัดจากปัจจัยสิ่งแวดล้อมและความแตกต่างระหว่างบุคคล (Buras, 2006; Cockle & Bell, 2015) เมื่อเข้าสู่กระบวนการย่อยสลายตัวเอนไซม์จะแบ่งเป็น 2 กระบวนการหลักๆ ได้แก่ Autolysis (การย่อยสลายตัวเองของเซลล์) เกิดจากเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ (Lysozymes) ถูกปล่อยออกมาเมื่อเซลล์ขาดออกซิเจน ทำให้เกิดการสลายของโครงสร้างเซลล์และเยื่อหุ้มเซลล์โดยมีเอนไซม์หลักที่เกี่ยวข้อง เช่น Protease, Lipase และ Esterase หลังจากเกิด Autolysis แล้วจะเกิด Putrefaction (การเน่าเปื่อยโดยจุลินทรีย์) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่แบคทีเรียเป็นตัวปล่อยออกมา (Cockle & Bell, 2015) งานวิจัยของ Wang และคณะ ในปี 2017 ได้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางเคมีของกระดูกมนุษย์หลังการตาย พูดึงกระบวนการย่อยสลายโปรตีนและไขมัน โดยมีเอนไซม์ Lipase และ Esterase มาเกี่ยวข้องงานวิจัยวิเคราะห์ข้อมูลทางเคมี (Wang et al., 2017) การใช้ Fluorescence Spectroscopy ในการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ผิวหนัง เป็นวิธีใหม่ที่ไม่ทำลายตัวอย่างและสามารถตรวจวิเคราะห์องค์ประกอบทางชีวเคมีที่เปลี่ยนแปลงไปหลังการตายได้ เพราะมีความไวสูงและเหมาะสำหรับการตรวจเอนไซม์โดยเฉพาะ (Gruszczynska et al., 2024) Schmidt et al. (2024) ศึกษาตัวอย่างเนื้อเยื่อจากสัตว์ทดลอง วัดกิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสหลังการเสียชีวิต ใช้ Fluorescence spectroscopy พบว่ากิจกรรมของเอนไซม์โปรตีเอสมีความสัมพันธ์กับเวลาหลังการเสียชีวิต (PMI) (Schmidt et al., 2024) และแนะนำการใช้เครื่องมือทางสเปกโตรสโกปีในงานด้านนี้ นอกจากนี้ ยังมีการใช้ตัวแทนเชิงชีวภาพ เช่น ผิวหนังหมู ซึ่งมีลักษณะใกล้เคียงกับผิวหนังมนุษย์ในการศึกษาทดลองเพื่อจำลองสถานการณ์จริง (McIntyre et al., 2016) อย่างไรก็ตาม แม้จะมีหลักฐานสนับสนุนจากการศึกษาหลายชิ้น แต่การประยุกต์ใช้เอนไซม์และเทคนิค Fluorescence Spectroscopy ในการประเมิน PMI ยังมีข้อจำกัดบางประการ โดยเฉพาะการขาดข้อมูลการทดสอบในสภาวะที่ใกล้เคียงกับการเกิดจริงมากที่สุด (closed-system simulation) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์ เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์ผิวหนังในช่วงเวลาหลังการตาย (PMI) ภายใต้ระบบปิด โดยใช้ผิวหนังหมูและเทคนิค Fluorescence Spectroscopy เพื่อประเมินศักยภาพของเอนไซม์ในการเป็นตัวบ่งชี้เวลาเสียชีวิต เป็นเทคนิคที่ง่าย สะดวก สามารถทำได้อย่างรวดเร็วและใช้วางรากฐานสำหรับการพัฒนาเครื่องมือช่วยประเมิน PMI อย่างแม่นยำในอนาคตและเป็นข้อมูลสนับสนุนการพัฒนาแนวทางใหม่ในการตรวจสอบทางนิติวิทยาศาสตร์ต่อไป

การทบทวนวรรณกรรม

หลังการเสียชีวิตร่างกายเข้าสู่การเปลี่ยนแปลงหลายขั้นตอน ได้แก่ autolysis ซึ่งเกิดจากเอนไซม์ภายในเซลล์ทำให้เนื้อเยื่อแตกสลายอย่างรวดเร็ว และ putrefaction ซึ่งเกิดจากจุลินทรีย์ เช่น *Clostridium spp.* และ *Bacteroides spp.* ที่ย่อยโปรตีนและปลดปล่อยก๊าซ เกิดการบวมและกลิ่นเหม็น โดยอัตราการเน่าเปื่อยขึ้นกับสภาพแวดล้อม เช่น อุณหภูมิและความชื้น (Dettmeyer, 2018; Tumer et al., 2013) เอนไซม์หลายชนิดมีความสัมพันธ์โดยตรงกับการเปลี่ยนแปลงหลังการตาย ได้แก่ protease ที่ย่อยสลายโปรตีน, lipase ที่สลายไขมัน และ esterase ที่สลายพันธะเอสเทอร์ ระดับกิจกรรมเหล่านี้มีการเปลี่ยนแปลงตามเวลา โดยเพิ่มขึ้นในระยะแรกและลดลงในช่วงปลาย ทำให้สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางชีวเคมีของ PMI ได้ (Paczkowski & Schütz, 2011; Kaur et al., 2021) เอนไซม์ Esterase รั่วไหลออกจากเซลล์และยังคงทำงานในระยะหนึ่งหลังความตาย ขณะที่ Protease มีส่วนในการย่อยสลายโปรตีนและปล่อยสารประกอบอย่าง indole และ skatole ซึ่งใช้เป็นตัวบ่งชี้ PMI ได้ ส่วน Lipase ทำงานต่อหลังความตาย โดยเฉพาะในสิ่งแวดล้อมที่ชื้น อาจก่อให้เกิด adipocere หรือการเปลี่ยนไขมันเป็นสบู่ (Salhi et al., 2020; Long & Cravatt, 2011; Khalil et al., 2024) Tryptophan เป็นกรดอะมิโนที่เรืองแสงได้และโครงสร้างของมันอ่อนไหวต่อการเปลี่ยนแปลงของโปรตีน

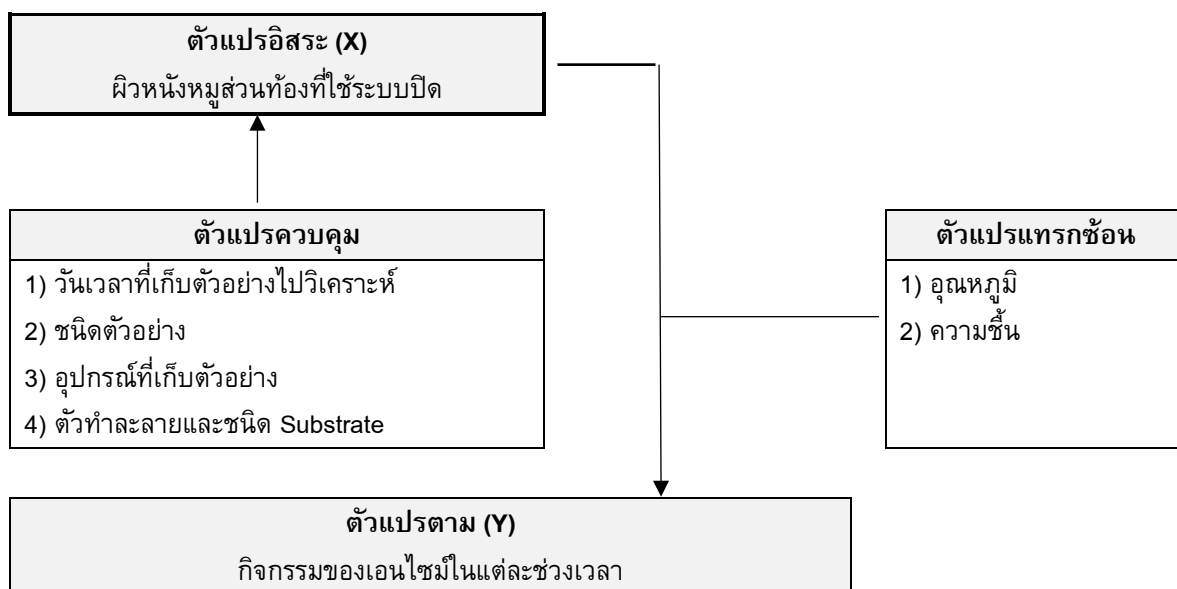
บทบาทของเอนไซม์แบคทีเรียหลังการตาย ร่างกายเสียชีวิต เอนไซม์จากร่างกายมนุษย์ (เช่น protease, esterase) จะค่อยๆ สูญเสีย Activity ตามเวลา PMI เช่น Protease และ Esterase จะสูญเสียกิจกรรมภายใน 96 ชม. (Pittner et al., 2020) จากนั้นแบคทีเรียในลำไส้และผิวหนัง เช่น *Clostridium spp.* และ *Pseudomonas spp.* เคลื่อนเข้าสู่อวัยวะ (bacterial translocation) และเริ่มผลิตเอนไซม์ของตนเอง (protease, lipase, glycosidase, nuclease) เร่งการเน่าเปื่อย และอาจทำให้ระดับเอนไซม์เพิ่มขึ้นอีกครั้ง อธิบายได้ด้วยแนวคิด “การเคลื่อนย้ายของแบคทีเรียหลังความตาย (bacterial translocation)” สภาพแวดล้อมที่ไม่มีออกซิเจน ที่เกิดจากแบคทีเรียบางชนิด อาจพบในช่วง 48-240 ชั่วโมง และอาจตรวจพบมากขึ้นเรื่อยๆ เนื่องจากเป็นแบคทีเรียที่ย่อยสลายเนื้อเยื่อ (Abdoun et al., 2023) แนวคิด Thanatobiome อธิบายว่า จุลินทรีย์เหล่านี้เข้ามาแทนที่เอนไซม์ host และมีบทบาทสำคัญต่อการประมาณ PMI (Javan et al., 2016).

ผิวหนังสุกรมักถูกใช้เป็นแบบจำลองในการวิจัยนิติวิทยาศาสตร์ เนื่องจากมีความใกล้เคียงกับมนุษย์ทั้งทางกายวิภาคและสรีรวิทยา ได้แก่ โครงสร้างชั้นผิวหนัง (epidermis, dermis, hypodermis) และองค์ประกอบคอลลาเจนอีลาสตินใกล้เคียงมนุษย์ (Hong et al., 2023) คุณสมบัติเชิงกล (elastic modulus, viscoelasticity) คล้ายมนุษย์ (Shergold et al., 2006) ในการศึกษาเกี่ยวกับกิจกรรมเอนไซม์ด้วยเทคนิค Fluorescence Spectroscopy ใช้รังสี UV กระตุ้นโมเลกุลให้ปล่อยแสงเรือง (fluorescence) และสามารถวิเคราะห์กิจกรรมของเอนไซม์ได้อย่างจำเพาะ โดยไม่ทำลายตัวอย่าง (Valeur, 2001) Substrates ที่ใช้บ่อย 4-MU butyrate ตรวจ lipase/esterase (Gilham & Lehner, 2005). FDA ตรวจการมีชีวิตของเซลล์ผ่าน esterase activity (Dive et al., 1988) Tryptophan fluorescence ใช้เป็นตัวบ่งชี้โครงสร้างโปรตีนและการย่อยสลายหลังตาย (Ghisaidoobe & Chung, 2014) การประยุกต์ในนิติวิทยาศาสตร์ ใช้ fluorescence intensity ของเอนไซม์และโปรตีนในการประมาณ PMI ได้แม่นยำและไม่ทำลายตัวอย่าง (Gruszczynska et al., 2024).

สมมติฐานการวิจัย

- 1) กิจกรรมของเอนไซม์ Protease, Lipase และ Esterase บนผิวหนังมีการเปลี่ยนแปลงแตกต่างกันตามช่วงเวลาหลังการตาย (PMI)
- 2) ค่าการเรืองแสงจาก Substrate (FDA, 4-MU butyrate, Tryptophan) มีความสัมพันธ์กับระดับกิจกรรมของเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลา
- 3) การเปลี่ยนแปลงของกิจกรรมเอนไซม์สามารถใช้เป็นตัวบ่งชี้เบื้องต้นสำหรับการประมาณเวลาหลังการตาย (PMI) ได้

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด

วิธีดำเนินการวิจัย

วัสดุและสารเคมี

อุปกรณ์ประกอบด้วย เครื่องหมุนเหวี่ยง (Centrifuge), กระดาษทิชชูที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, สำลีก้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, หลอดทดลอง Sterile Falcon Tubes หรือหลอด Eppendorf ที่ผ่านการฆ่าเชื้อ, ถุงมือยาง และ แอลกอฮอล์ 70% สำหรับการฆ่าเชื้อ สารเคมีจะประกอบด้วย Fluorescein diacetate (FDA) ซึ่งใช้เป็นสารตั้งต้นเพื่อประเมินกิจกรรมของ Esterase, และ 4-methylumbelliferyl butyrate (4-MU butyrate) สำหรับตรวจสอบกิจกรรมของ Lipase นอกจากนี้ยังใช้ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (DMSO) เป็นตัวทำละลาย และ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลิน (PBS) ที่ pH 7.2-7.4 เพื่อรักษาสภาพการทำงานของเอนไซม์ในระหว่างการเตรียมตัวอย่าง

การเก็บตัวอย่างและการออกแบบการทดลอง

การทดลองนี้ใช้ผิวหนังติดเนื้อหมูส่วนท้อง เป็นแบบจำลองเนื้อเยื่อชีวภาพ และใช้กระเปาะเดินทางขนาดเล็ก เพื่อสร้างสภาพแวดล้อมแบบระบบปิด (closed-system) ซึ่งจำลองสถานการณ์ทางนิติวิทยาศาสตร์ที่ยับยั้งการล่าอาณานิคมของแมลง การออกแบบการทดลองดัดแปลงจาก de Vos et al. (2023) โดยนำผิวหนังหมูที่ติดเนื้อใส่ไว้ในกระเปาะเดินทาง และเก็บรักษาที่อุณหภูมิห้อง การเก็บตัวอย่างดำเนินการในเวลา 10, 29, 53, 58, 76, 82, 103, 168, 178 และ 226 ชั่วโมงหลังการตายสำหรับแต่ละช่วงเวลา ใช้สำลีก้านที่ผ่านการฆ่าเชื้อชุบด้วย PBS หมาดๆ ปาดและหมุนก้านสำลีบริเวณผิวหนังหมูขนาด 5 × 5 ซม. เป็นเวลา 60 วินาที จากนั้นนำสำลีก้านไปใส่ในหลอดบรรจุ PBS เพื่อสกัดเอนไซม์แต่ละช่วงเวลาดำเนินการซ้ำสามครั้งต่อจุดตัวอย่าง เพื่อให้มั่นใจถึงความสามารถในการทำซ้ำของผลการทดลอง

การเตรียมสารตั้งต้น

การเตรียมสารตั้งต้นดัดแปลงมาจาก (Lanka & Latha, 2015; Kasana et al., 2011; Albani, 2007) สำหรับการตรวจหา กิจกรรม Esterase สารละลาย FDA 80.08 mg ถูกละลายใน DMSO 2 mL เพื่อให้ได้สารละลายสต็อก 50 mM จากนั้นเจือจางใน PBS จนได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้งานได้ 100-50 μ M สำหรับการตรวจหา กิจกรรม Lipase สารละลาย 4-MU butyrate 4 mg ถูกละลายใน DMSO 2 mL เพื่อเตรียมสารละลายสต็อก 5 mM และเจือจางด้วย PBS 1 mL เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายที่ใช้งานได้ระหว่าง 50-0.5 μ M ตัวอย่างสารตั้งต้นควบคุม (Substrate Control) ประกอบด้วย PBS ที่ผสมกับสารตั้งต้นที่เกี่ยวข้อง ในขณะที่ตัวอย่างสารควบคุมลบ (Negative Control) ประกอบด้วย PBS ที่ผสมกับสารสกัดจากเอนไซม์โดยไม่มีสารตั้งต้น

การสกัดและการประมวลผลเอนไซม์

หลังจากเก็บตัวอย่างแล้วการสกัดเอนไซม์ดำเนินการตามโปรโตคอลที่ปรับปรุงจาก (Gruszczynska et al., 2024; Bätz et al., 2013) โดยไม่พันสำลีแต่ละอันจะหมუნในหลอดที่มี PBS ปริมาตร 500 μ L จากนั้นบีบให้เหลือเพียงของเหลวและทำการ วอร์เท็กซ์เบาๆ เพื่อปล่อยเอนไซม์ลงในสารละลาย ต่อมานำหลอดตัวอย่างไปปั่นเหวี่ยงที่อัตรา 10,000 × g เป็นเวลา 10 นาที และเก็บส่วนของเหลวใส่ไว้เป็นสารสกัดเอนไซม์ จากนั้นตัวอย่างปริมาตร 50-100 μ L จะถูกใส่ลงในหลอดสะอาดและ เจือจางด้วย PBS ปริมาตร 200-500 μ L บ่มด้วย substrate ที่เหมาะสม (FDA หรือ 4-MU butyrate) ปริมาตร 200-400 μ L เป็นเวลา 30-60 นาที สารละลายถูกผสมเบาๆ ด้วยการปิเปตและห่อด้วยกระดาษฟอยล์เพื่อป้องกันแสง จากนั้นนำไปวิเคราะห์การเรืองแสงทันที

การวัดกิจกรรมของเอนไซม์

ใช้ Fluorescence Spectroscopy (Fluorescence Spectrometer: Perkin Elmer Luminescence Spectrometer รุ่น LS-55) ตามแนวทางของ Estracanhalli (2009) และ Lanka and Latha (2015) ก่อนการวิเคราะห์ตัวอย่าง มีการวัด 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

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์ข้อมูลทั้งหมดดำเนินการโดยใช้ Python ในการประมวลผล เพื่อประเมินความสัมพันธ์ระหว่างกิจกรรมของเอนไซม์กับช่วงเวลาหลังการตาย (Postmortem Interval: PMI) ใช้ Spearman's rank correlation ซึ่งเหมาะสมกับข้อมูลที่ไม่ได้มีการกระจายแบบพาราเมตริก เพื่อประเมินทิศทางของความสัมพันธ์ระหว่างตัวแปร นอกจากนี้ เนื่องจากชุดข้อมูลมีการกระจายไม่เป็นแบบปกติ จึงใช้ Kruskal-Wallis test ในการตรวจสอบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของระดับกิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตายหรือไม่

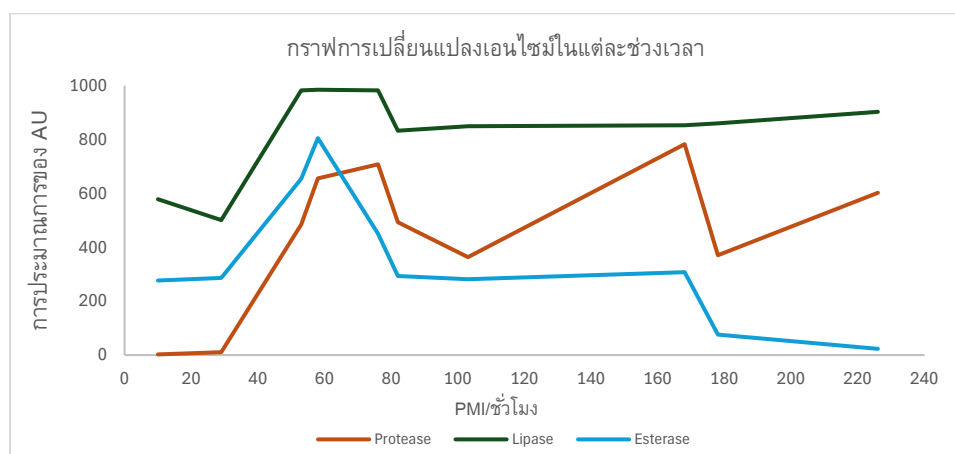
ผลการวิจัย

การศึกษากิจกรรมของเอนไซม์บนผิวหนังหมูส่วนท้องในช่วงเวลาหลังการตาย ใช้เทคนิค Fluorescence Spectroscopy เป็นเครื่องมือหลักในการตรวจวัด โดยใช้ตัวบ่งชี้เฉพาะสำหรับเอนไซม์แต่ละชนิด ได้แก่ Tryptophan fluorescence ใช้เป็นตัวชี้วัดทางอ้อมของ Protease ผ่านการวัดระดับโปรตีนรวมที่มีกรดอะมิโน ซึ่งสะท้อนการปล่อยโปรตีนจากกระบวนการย่อยสลายเนื้อเยื่อหลังการตาย 4-MU butyrate ใช้เป็น substrate สำหรับตรวจวัดกิจกรรมของ Lipase ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายไขมัน และ FDA ใช้เป็นตัวชี้วัดกิจกรรมของ Esterase ซึ่งทำหน้าที่ย่อยพันธะเอสเทอร์ในไขมันเมื่อเซลล์ตาย

เอนไซม์เหล่านี้ทำงานร่วมกันในการย่อยสลายเยื่อหุ้มเซลล์และเนื้อเยื่อ ส่งผลให้เกิดการแตกตัวของไขมันเป็นกรดไขมันและสารประกอบที่มีกลิ่นเฉพาะ ซึ่งเป็นลักษณะสำคัญของกระบวนการเน่าเปื่อย (putrefaction) การใช้ substrate และตัวบ่งชี้เฉพาะเหล่านี้ช่วยให้สามารถติดตามการเปลี่ยนแปลงกิจกรรมเอนไซม์ในแต่ละช่วงเวลาหลังการตายได้อย่างแม่นยำและเหมาะสมสำหรับการศึกษาทางนิติวิทยาศาสตร์

ผลการวิเคราะห์ในรูปแบบของกราฟเพื่อดูแนวโน้ม

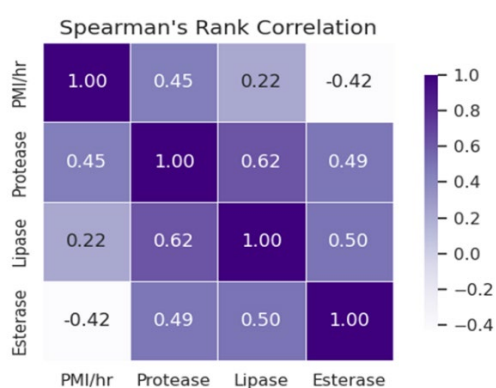
ค่าความเข้มของเอนไซม์ Lipase ที่วัดโดย Fluorescence Spectroscopy มีค่าสูงจนเกือบถึงขีดจำกัดของเครื่องมือ (AU 999.99) อย่างไรก็ตาม ข้อมูลดังกล่าวยังสามารถนำมาวิเคราะห์ในเชิงแนวโน้มการเปลี่ยนแปลงได้ พบว่า กิจกรรมของ Lipase เพิ่มขึ้นอย่างชัดเจนจนถึงช่วงประมาณ 48-72 ชั่วโมงหลังการตาย ก่อนลดลงเล็กน้อยที่ราว 76 ชั่วโมง และคงที่ต่อเนื่องในช่วงเวลาที่เหลือหลังจากนั้น



ภาพที่ 2 การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ต่อช่วงเวลาหลังการตาย

จากภาพที่ 2 พบว่า ค่า Lipase มีระดับสูงตั้งแต่ช่วง 58 ชั่วโมงหลังการตาย และยังคงระดับสูงต่อเนื่องไปจนถึงประมาณ 240 ชั่วโมง สะท้อนถึงความสามารถสูงของเอนไซม์ดังกล่าว หรืออาจเกิดจากการผลิตต่อเนื่องของเอนไซม์จากจุลินทรีย์หลังการตาย แสดงให้เห็นว่า Lipase อาจไม่ได้มาจากร่างกายโดยตรง (host enzyme) แต่มีส่วนร่วมจากเอนไซม์แบคทีเรียร่วมด้วย ส่วน ค่า Esterase พุ่งสูงขึ้นในช่วงประมาณ 58 ชั่วโมงหลังการตาย ก่อนจะลดลงอย่างต่อเนื่องหลัง 72 ชั่วโมง แสดงถึงการย่อยสลายแบบเฉียบพลันและเริ่มเสื่อมสภาพ ทำให้ Esterase อาจเป็นตัวบ่งชี้ PMI ในระยะเริ่มต้น ในขณะที่ ค่า Protease เริ่มปรากฏชัดหลังประมาณ 30 ชั่วโมง มีพีคหลายจุด สลับสูง-ต่ำ โดยพีคเด่นอยู่ในช่วง 60-80 ชั่วโมง และ 160-170 ชั่วโมงหลังการตาย ซึ่งอาจสะท้อนทั้งการสลายจากเอนไซม์ของ host และการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการกระตุ้นของจุลินทรีย์ร่วม

วิเคราะห์แบบ Spearman's Rank correlation

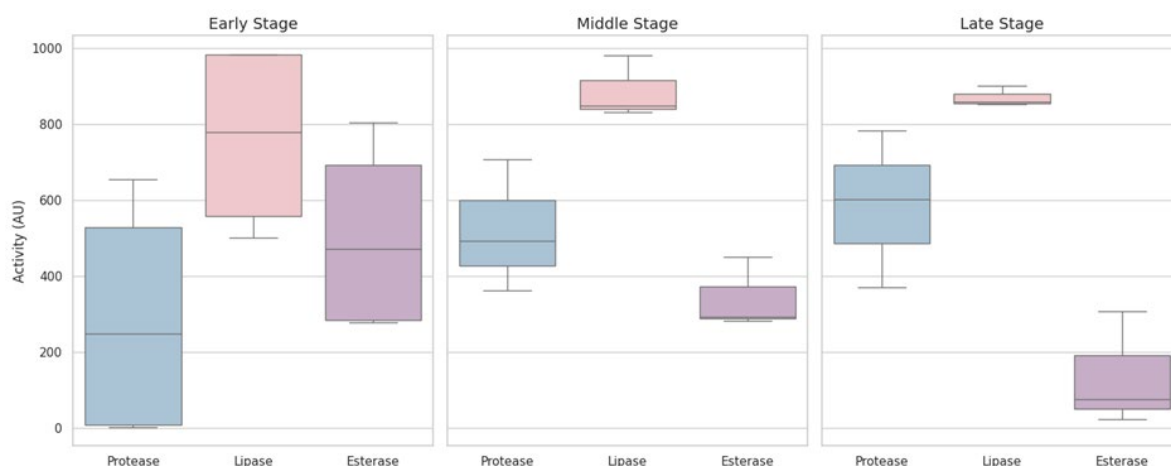


ภาพที่ 3 Heatmap แสดง Spearman's rank correlation ระหว่าง PMI และสัญญาณฟลูออเรสเซนส์จากตัวแทนของเอนไซม์ Tryptophan ใช้เป็นตัวบ่งชี้ทางอ้อมของการมีอยู่ของโปรตีนที่อาจรวมถึง Protease แต่ไม่ได้วัด activity โดยตรง ในขณะที่ 4-MU butyrate และ FDA ใช้ประเมินกิจกรรมของ Lipase และ Esterase โดยตรงผ่านการย่อย substrate จำเพาะ

ผลการวิเคราะห์ Spearman's rank correlation Protease มีความสัมพันธ์ทางบวกปานกลางกับ PMI ($p = 0.45$) ซึ่งหาก PMI เพิ่มขึ้น Protease เพิ่มขึ้น ขณะที่ Esterase มีความสัมพันธ์ทางลบปานกลาง ($p = -0.42$) ซึ่งหมายถึง หาก PMI เพิ่มขึ้น Esterase จะลดลง แสดงถึงแนวโน้มที่อาจใช้เอนไซม์ทั้งสองชนิดนี้ในการประมาณเวลาเสียชีวิตได้ในระดับหนึ่ง ในทางกลับกัน เอนไซม์ Lipase มีความสัมพันธ์ในระดับต่ำ ($p = 0.22$) จึงอาจไม่เหมาะสำหรับใช้ประเมินเวลาเสียชีวิต

วิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test

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



ภาพที่ 4 การวิเคราะห์ Kruskal-Wallis Test เพื่อเปรียบเทียบกิจกรรมเอนไซม์ระหว่างช่วงเวลาหลังการตายแต่ละช่วง

จากผลการศึกษาพบว่า ในช่วง Early stage กิจกรรมของ Protease มีค่าต่ำและกระจายกว้าง Lipase เริ่มมีค่า Activity เพิ่มขึ้น ขณะที่ Esterase มีค่าปานกลางและกระจายกว้างกว่า Lipase ในช่วง Middle stage กิจกรรมของ Protease เพิ่มขึ้นจากช่วง Early, Lipase ยังคงสูงแต่ลดลงเล็กน้อย และ Esterase ลดลงอย่างชัดเจน ส่วนในช่วง Late stage กิจกรรมของ Protease ยังคงเพิ่มขึ้นต่อเนื่องตามเวลา, Lipase คงที่หรือลดลงเล็กน้อย และ Esterase ลดลงอย่างชัดเจนมาก อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ด้วย Kruskal-Wallis Test ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มเวลา ($p > 0.05$) โดยค่าเฉพาะของเอนไซม์แต่ละชนิดมีดังนี้: Protease ได้ค่า $H = 1.8000$, $p = 0.4066$ (ไม่สำคัญ), Lipase ได้ค่า $H = 0.1636$, $p = 0.9214$ (ไม่สำคัญ), และ Esterase ได้ค่า $H = 2.3000$, $p = 0.3166$ (ไม่สำคัญ)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้มุ่งเน้นการวิเคราะห์ การเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์บนผิวหนังหลังตาย ในช่วงเวลาต่างๆ โดยใช้เทคนิค Fluorescence Spectroscopy เพื่อประเมินกิจกรรมเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการย่อยสลายเนื้อเยื่อและเปรียบเทียบความสัมพันธ์กับ Postmortem Interval (PMI) ในสภาวะแบบปิด แม้ Tryptophan fluorescence จะใช้แทน Protease เป็นตัวชี้วัดทางอ้อมของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงของค่า Tryptophan จึงไม่ได้สะท้อนกิจกรรม Protease โดยตรง เช่นเดียวกับ Lipase และ Esterase ที่ใช้ substrate จำเพาะ แต่ทั้งสามเอนไซม์แสดงรูปแบบการเปลี่ยนแปลงต่างกันตามช่วงเวลา ผลการศึกษาพบว่า Esterase สามารถระบุช่วง PMI 0-72 ชั่วโมงได้ ขณะที่ Lipase มีค่าคงที่สูงต่อเนื่อง อาจสะท้อนความคงตัวของเอนไซม์หรือการผลิตจากจุลินทรีย์ร่วมหลังการตาย และ Protease มีค่าค่อยๆ เพิ่มขึ้น สอดคล้องกับกระบวนการ autolysis และกิจกรรมของจุลินทรีย์ร่วม งานวิจัยชี้ให้เห็นศักยภาพของการใช้เอนไซม์เป็นตัวบ่งชี้ชีวภาพสำหรับการประมาณค่า PMI

การตรวจพบสัญญาณ Fluorescence อย่างต่อเนื่อง อาจบ่งชี้ว่าเอนไซม์เหล่านี้ไม่ได้มีที่มาจาก host เพียงอย่างเดียว แต่อาจเกิดจากแบคทีเรีย (Saprophytic) ที่เข้ามาแทนที่และปล่อยเอนไซม์เพื่อย่อยสลายซาก เป็นระยะ Active decay ของการย่อยสลายซาก (Abdoun et al., 2023) หากหลัง 96 ชั่วโมงเริ่มมีการผลิตเอนไซม์เพิ่มขึ้นอาจจะเป็นไปได้ว่าแบคทีเรียในกลุ่ม Firmicutes (*Clotridium*) มักพบมากที่สุด 48 ชั่วโมง ขึ้นไปและจะเด่นชัดตั้งแต่ 96 ชั่วโมงเป็นต้น มีส่วนช่วยสร้างแก๊สกลิ่นเหม็นย่อยโปรตีนและไขมัน (Jangid et al., 2023). และการศึกษาของ Oktaviana et al. (2025) ได้ศึกษาผิวหนังหมูและดินพบว่าเมื่อเวลาผ่านไป 3-48 วัน แบคทีเรียไม่ต้องการออกซิเจนมีมากขึ้นซึ่งเหล่านี้อาจผลิต Lipase ได้ การที่ Lipase เพิ่มขึ้นอย่างเสถียรและคงที่ก็มีความเป็นไปได้ที่เกิดจากเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรีย เช่นการศึกษาของ Fatimah et al. (2019) ทำการติดตามกิจกรรม Lipase และ Protease ที่ผลิตออกมาจากแบคทีเรีย *serratia* ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่พบได้บนผิวหนัง รายงานว่ากิจกรรม Lipase สูงสุดที่ 16 ชั่วโมง และ Protease

ถูกพบเพิ่มหลัง 48 ชั่วโมง และมีรายงานบอกว่าแบคทีเรีย *Pseudomonas* และ *Bacillus* ผลิตเอนไซม์ Lipase เมื่อเวลาผ่านไป แบคทีเรียทั้งสองตัวเป็นแบคทีเรียที่พบได้บนผิวหนัง เมื่อเกิดการตายผิวหนังเปื่อยขึ้นมักจะเจริญอย่างรวดเร็วและสามารถพบได้ในดินและฝุ่น *Pseudomonas* เริ่มขึ้นในช่วง 48-96 ชั่วโมง (Gupta et al., 2004)

อย่างไรก็ตาม การวิเคราะห์ทางสถิติยังไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างช่วงเวลา ($p > 0.05$) ทำให้ยังไม่สามารถยืนยันความชัดเจนของการใช้เอนไซม์เหล่านี้ได้

ข้อเสนอแนะที่ได้รับจากการวิจัย

ผู้วิจัยเห็นว่า การขยายขอบเขตของการศึกษา เช่น การเพิ่มชนิดของเอนไซม์หรือ substrate ที่ใช้ การเพิ่มจำนวนตัวอย่าง การทดลองในสภาพแวดล้อมที่ใกล้เคียงกับธรรมชาติมากขึ้น หรือการพิจารณาร่วมกับตัวแปรด้านจุลชีพและสิ่งแวดล้อมอื่นๆ จะช่วยเพิ่มความแม่นยำและความเชื่อมั่นของผลลัพธ์ และอาจนำไปสู่การประยุกต์ใช้ในงานนิติวิทยาศาสตร์ได้ในอนาคต

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

- 1) ควรศึกษาแหล่งกำเนิดของเอนไซม์เพิ่มเติม เนื่องจากอาจมีเอนไซม์บางส่วนที่ไม่ได้มาจาก host แต่เป็นเอนไซม์ที่ผลิตจากแบคทีเรียหลังการตาย โดยเฉพาะเมื่อพบว่าค่าของเอนไซม์ยังสูงแม้เวลาผ่านไปมากกว่า 96 ชั่วโมง จึงควรมีการควบคุมหรือแยกแหล่งกำเนิด (เช่น การใช้ยาปฏิชีวนะ หรือศึกษาการเปลี่ยนแปลง microbiome ร่วมด้วย)
- 2) ควบคุมความเข้มข้นของสารตั้งต้น (Substrate) ให้สม่ำเสมอในทุกช่วงเวลา เพื่อป้องกันการเกิดค่า Fluorescence เกินขีดจำกัด ($AU > 999.99$) อันอาจทำให้การวิเคราะห์เชิงปริมาณในสถิติเกิดข้อผิดพลาดได้ โดยแนะนำให้ใช้ความเข้มข้นที่ทดลองแล้วเหมาะสม เช่น FDA ที่ 10-5 μM และ 4-MU butyrate ที่ 0.5 μM
- 3) เพิ่มจำนวนช่วงเวลาในการเก็บตัวอย่าง เพื่อให้ได้แนวโน้มการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์หลังการตายอย่างต่อเนื่อง
- 4) ควรเลือกใช้ภาชนะและสภาพแวดล้อมในการเก็บตัวอย่างที่สม่ำเสมอ เช่น เลือกใช้กระเป๋าดำเดินทางแบบปิดหรือกล่องพลาสติกชนิดเดียวกัน เนื่องจากจากการทดลองพบว่าสภาพแวดล้อมในการเก็บส่งผลต่อระดับเอนไซม์ เช่น ความชื้น และการระบายอากาศที่ต่างกันอาจกระทบต่อการเจริญของแบคทีเรียและการเปลี่ยนแปลงของเอนไซม์ หรือศึกษาปัจจัยจากสภาพแวดล้อมในการเก็บตัวอย่างเพิ่มเติม

เอกสารอ้างอิง

- Abdoun, A., Amir, N., & Fatima, M. (2023). Thanatobiome in forensic medicine. *New Microbiologica*, 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. *Journal of fluorescence*, 17(4), 406-417.
- Bätz, F. M., Klipper, W., Korting, H. C., Henkler, F., Landsiedel, R., Luch, A., ... & Schäfer-Korting, M. (2013). Esterase activity in excised and reconstructed human skin—biotransformation of prednicarbate and the model dye fluorescein diacetate. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 84(2), 374-385.
- Buras, K. L. (2006). *Are enzymes accurate indicators of postmortem interval?: a biochemical analysis*. Louisiana State University and Agricultural & Mechanical College.
- Cockle, D. L., & Bell, L. S. (2015). Human decomposition and the reliability of a 'Universal' model for post mortem interval estimations. *Forensic science international*, 253, 136-e1.
- de Vos, J., Otto, R. E., Achetib, N., Gasser, A., Aalders, M. C., & van Dam, A. (2023). Analysis of the fluorescent properties of vaginal fluid upon ageing. *Methods and applications in fluorescence*, 12(1), 015007.

- Dettmeyer, R. B. (2018). Histothanatology: Autolysis, putrefaction, and mummification. In *Forensic histopathology: Fundamentals and perspectives* (pp. 503-518). Cham: Springer International Publishing.
- Estracanhalli, É. S., Kurachi, C., Vicente, J. R., Campos de Menezes, P. F., Júnior, O. C. E. S., & Bagnato, V. S. (2009). Determination of post-mortem interval using in situ tissue optical fluorescence. *Optics express*, 17(10), 8185-8192.
- Fatimah. F., Fitri, R. D., Illavi, G., Renjana, E., Pratiwi, I. A., Ni'matuzahroh, N., & Sumarsih, S. (2019). Cell Wall Response of Bacteria *Serratiamarcescens* L161–Lipase and Protease Enzymes Producer–In Gram Staining. *Ecology, Environment and Conservation*, 26(Suppl.), S76-S80.
- Gupta, R., Gupta, N., & Rathi, P. (2004). Bacterial lipases: an overview of production, purification and biochemical properties. *Applied microbiology and biotechnology*, 64(6), 763-781.
- Gilham, D., & Lehner, R. (2005). Techniques to measure lipase and esterase activity in vitro. *Methods*, 36(2), 139-147.
- Gruszczyńska, E., Lewkowicz, A., Czarnomska, M., Koczur, J., Walczewska-Szewc, K., Kaliszan, M., ... & Bojarski, P. (2024). Spectroscopic analysis of Tryptophan as a potential optical biomarker for estimating the time of death. *International Journal of Molecular Sciences*, 25(23), 12915.
- Ghisaidoobe, A. B., & 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.
- Hong, Z. X., Zhu, S. T., Li, H., Luo, J. Z., Yang, Y., An, Y., ... & Wang, K. (2023). Bioengineered skin organoids: from development to applications. *Military Medical Research*, 10(1), 40.
- Jangid, C., DAIAI, J., & Kumari, K. (2023). Deciphering the microbial signature of death: advances in post-mortem microbial analysis. *Problems of Forensic Sciences*, 134, 95-115.
- Javan, G. T., Finley, S. J., Abidin, Z., & Mulle, J. G. (2016). The thanatomicrobiome: a missing piece of the microbial puzzle of death. *Frontiers in microbiology*, 7, 1-7.
- Kasana, R. C., Salwan, R., & Yadav, S. K. (2011). Microbial proteases: detection, production, and genetic improvement. *Critical reviews in microbiology*, 37(3), 262-276.
- 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 Science of Animal Resources*, 41(4), 589-607.
- 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.
- Lanka, S., & Latha, J. N. L. (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(5), 207-219.
- Long, J. Z., & Cravatt, B. F. (2011). The metabolic serine hydrolases and their functions in mammalian physiology and disease. *Chemical reviews*, 111(10), 6022-6063.
- 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.

- Paczkowski, S., & Schütz, S. (2011). Post-mortem volatiles of vertebrate tissue. *Applied microbiology and biotechnology*, 91(4), 917-935.
- Pittner, S., Bugelli, V., Weitgasser, K., Zissler, A., Sanit, S., Lutz, L., ... & Amendt, J. (2020). A field study to evaluate PMI estimation methods for advanced decomposition stages. *International journal of legal medicine*, 134(4), 1361-1373.
- Oktaviana, F. R., Gultom, F. P., Pasaribu, R. S., & Auerkari, E. I. (2025). Estimation of Time of Death through Observation of Microbiota Changes in the Oral Cavity. *e-GiGi*, 13(1), 89-98.
- Salhi, A., Amara, S., Mansuelle, P., Puppo, R., Lebrun, R., Gontero, B., ... & Carriere, F. (2020). Characterization of all the lipolytic activities in pancreatin and comparison with porcine and human pancreatic juices. *Biochimie*, 169, 106-120.
- Schmidt, V. M., Zelger, P., Wöss, C., Fodor, M., Hautz, T., Schneeberger, S., ... & Pallua, J. D. (2024). Handheld hyperspectral imaging as a tool for the post-mortem interval estimation of human skeletal remains. *Heliyon*, 10(4), 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.
- Tumer, A. R., Karacaoglu, E., Namli, A., Keten, A., Farasat, S., Akcan, R., ... & Odabaşı, A. B. (2013). Effects of different types of soil on decomposition: An experimental study. *Legal medicine*, 15(3), 149-156.
- Valeur, B. (2001). *Molecular Fluorescence Principles and Applications*. Wiley-VCH Verlag GmbH.
- Wang, Q., Zhang, Y., Lin, H., Zha, S., Fang, R., Wei, X., ... & Wang, Z. (2017). Estimation of the late postmortem interval using FTIR spectroscopy and chemometrics in human skeletal remains. *Forensic Science International*, 281, 113-120.
- 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. *Journal of Zhejiang University-Science B*, 19(8), 630-642.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2025 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).