

การแสดงออกของยีน *HSP70*, *GADD45a* และ *PA2G4* ในเลือดภายหลังการตายของสิ่งมีชีวิต ในโมเดลหนูทดลองเพื่อประยุกต์ใช้ประมาณเวลาหลังตาย

จุฑามาศ แก้วคำมูล¹ ศุภกิจ คชอนันต์² สุธีรา นรากรศักดิ์³

¹สาขาวิชานิติวิทยาศาสตร์ บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

²ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

³ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

Received: August 26, 2024

Revised: October 1, 2024

Accepted: October 10, 2024

บทคัดย่อ

ปัจจุบันเครื่องมือที่ใช้ประมาณเวลาหลังตาย หรือ Post-mortem Interval มักสังเกตจากการเย็นตัวของศพ (algor mortis) การเกิดจ้ำเลือดภายหลังตาย (livor mortis) การแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) และปฏิกิริยาเหนือชีวิต (supravital reaction) ซึ่งเครื่องมือเหล่านี้อาจให้ความแปรปรวนได้จากการรบกวนของสภาพแวดล้อมรวมถึงสภาพของผู้เสียชีวิต ทำให้หลายการศึกษาพัฒนาเครื่องมือที่มีความแม่นยำมากขึ้น หนึ่งในนั้นคือการแสดงออกของยีนหลังตายที่พบว่ามี การแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงสัมพันธ์กับระยะเวลาหลังตาย ดังนั้นวัตถุประสงค์ของการวิจัยคือ เพื่อศึกษาการแสดงออกของยีนหลังการตายสำหรับการประยุกต์ใช้ประมาณเวลาหลังตาย เก็บตัวอย่างเลือดหนูทดลองจากบริเวณหัวใจที่ช่วงเวลา 0, 0.5, 1, 6, 12, 24 และ 48 ชั่วโมงหลังการตาย นำมาสกัดอาร์เอ็นเอและศึกษาการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction ผลการทดลองพบว่าตัวอย่างเลือดเก็บได้ในช่วงเวลา 0, 0.5 และ 1 ชั่วโมงหลังการตาย ค่าคุณภาพและปริมาณอาร์เอ็นเออยู่ในช่วง 2.04 - 2.23 และ 30.16 - 44.67 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมตามลำดับ พบการแสดงออกของยีน *HSP70* เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมงหลังตาย ในทางตรงข้ามการแสดงออกของยีน *GADD45a* ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมงหลังตาย นอกจากนั้นพบว่าการเปลี่ยนแปลงของระยะเวลาหลังตายมีอิทธิพลในการลดการเปลี่ยนแปลงยีน *HSP70* แต่ตรงข้ามมีอิทธิพลต่อการเพิ่มการเปลี่ยนแปลงของยีน *GADD45a* ดังนั้น เป็นไปได้ว่ายีนทั้งสองชนิด (*HSP70* และ *GADD45a*) อาจจะสามารถนำไปพัฒนาใช้ในการประมาณระยะเวลาหลังตายได้ อย่างไรก็ตาม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำมากขึ้น อาจจะต้องนำยีนดังกล่าวไปศึกษาเพิ่มเติมในศพผู้เสียชีวิต

คำสำคัญ: การประเมินระยะเวลาหลังตาย; การแสดงออกของยีน; โมเดลหนูทดลอง; ยีน *HSP70*; ยีน *GADD45a*

ผู้สนับสนุนประสานงาน:

ศุภกิจ คชอนันต์

ภาควิชานิติเวชศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่

110 ถนนอินทวิโรจ ตำบลศรีภูมิ อำเภอเมืองเชียงใหม่ เชียงใหม่ 50200

อีเมล: supakit.kh@cmu.ac.th

Blood RNA expression of *HSP70*, *GADD45a*, and *PA2G4* following somatic death in a mouse model for application in post-mortem interval estimation

Jutamas Kaewkhammoon¹, Supakit Khacha-Ananda², Suteera Narakornsok³

¹Forensic Science, Graduate School, Chiang Mai University

²Department of Forensic Medicine, Chiang Mai University

³Department of Anatomy, Chiang Mai University

Abstract

Current tools for post-mortem interval (PMI) estimation include algor mortis, livor mortis, rigor mortis, and supravital reactions. However, the accuracy of these methods can be influenced by external environmental factors and the characteristics of the deceased body. To enhance precision, several studies have explored gene expression-based tools, as specific genes may exhibit upregulation or downregulation correlated with the time since death. This study aimed to investigate the use of postmortem blood RNA expression for PMI estimation. Heart blood samples were collected at 0, 0.5, 1, 6, 12, 24, and 48 hours postmortem. Total RNA was extracted, and gene expression was analyzed using quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). Results revealed that RNA quality and quantity for samples collected at 0, 0.5, and 1 hour postmortem ranged from 2.04 to 2.23 (A260/A280) and 30.16 to 44.67 µg/ml, respectively. Notably, the expression of *HSP70* was significantly elevated at 0.5 hours postmortem, while the expression of *GADD45a* significantly decreased at 0.5 hours postmortem. Moreover, a significant association was observed between PMI and changes in delta cycle time for *HSP70* (increase) and *GADD45a* (decrease). These findings suggest that *HSP70* and *GADD45a* may serve as potential biomarkers for PMI estimation. However, further studies are required to validate the use of these genes in human postmortem samples for accurate and reliable PMI determination.

Keywords: post-mortem interval; gene expression; mouse model; *HSP70*; *GADD45a*

Corresponding Author:

Supakit Khacha-Ananda

Department of Forensic Medicine, Chiang Mai University

110 Inthawarorot Road, Sri Phum Sub-district, Muang District, Chiang Mai 50200, Thailand

E-mail: supakit.kh@cmu.ac.th

บทนำ

การประมาณระยะเวลาหลังตาย (Post-mortem Interval: PMI) มีความสำคัญอย่างมากในการตรวจสอบคดีทางกฎหมาย เพื่อช่วยให้เกิดความแม่นยำของการประมาณช่วงเวลาในการเกิดเหตุ โดยทั่วไปมีการใช้เทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงทางสรีรวิทยา เช่น มักสังเกตจากการเย็นตัวของศพ (algor mortis) การเกิดจ้ำเลือดภายหลังตาย (livor mortis) การแข็งเกร็งของกล้ามเนื้อ (rigor mortis) และปฏิกิริยาเหนือชีวิต (supravital reaction) มาใช้ประเมินระยะเวลาหลังตาย ซึ่งเทคนิคการประมาณเหล่านี้เป็นเพียงการคาดการณ์ระยะเวลาหนึ่งในการเสียชีวิตที่มีความแปรปรวนหรือคลาดเคลื่อนได้สูงจากปัจจัยภายนอก เช่น การสวมเสื้อผ้าของศพ ความชื้น จุลินทรีย์ แสง หรืออุณหภูมิในบรรยากาศ เป็นต้น¹ ในสถานะที่มีความชื้นหรือการเจริญของจุลินทรีย์ส่งผลให้ศพเน่าเร็วมากขึ้น จึงทำให้การประมาณเวลาหลังตายได้สั้นกว่าที่เป็นจริง ดังนั้น ในบางกรณีจึงเป็นการยากที่จะใช้เพียงการประมาณระยะเวลาหลังตายจากเทคนิคเหล่านี้เพียงอย่างเดียว ทำให้ปัจจุบันมีการศึกษาที่เกี่ยวข้องกับการแสดงออกของยีนที่เปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาหลังเสียชีวิต² โดยสามารถพบได้ทั้งการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้นหรือลดลงในช่วงเวลาหลังตายไปจนถึง 96 ชั่วโมงหลังตาย³ การศึกษาของ Dachtel และคณะ พบว่ายีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ประสาทมีการแสดงออกที่ลดลงแต่ตรงข้ามยีนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์มะเร็งมีการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นในช่วงเวลา 12 ชั่วโมงหลังตาย⁴ การศึกษาในปลาหมึกและหนูทดลอง พบการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียด เช่น ยีน *HSP70.3* ในปลาหมึก และ *Hspe1* ในหนูทดลองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญใน 12 ชั่วโมงแรกหลังตาย⁵

ภายหลังที่สิ่งมีชีวิตเสียชีวิต ระบบต่างๆ ของร่างกายจะหยุดการทำงานอย่างกะทันหันหรือที่เรียกว่า somatic death อย่างไรก็ตาม เซลล์บางชนิดจะยังสามารถดำเนินกิจกรรมของเซลล์ต่อไปได้ จนถึง

ระยะเวลาที่เซลล์ขาดออกซิเจนจึงเกิดการตายหรือที่เรียกว่า cellular death ทำให้สามารถพบการแสดงออกของยีนบางชนิด เพื่อตอบสนองต่อภาวะดังกล่าว¹ ภาวะที่เซลล์ขาดออกซิเจนและเลือดจะส่งผลให้เกิดความเครียดออกซิเดชัน และมีการตอบสนองด้วยการแสดงออกของยีน *Heat shock protein 70 (HSP70)* ที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อทำให้ยีนที่ควบคุมเซลล์ให้อยู่ในสถานะปกติ โดยโปรตีนที่ถูกสร้างจากยีนนี้จะยับยั้งกระบวนการย่อยสลายของไลโซโซมภายใต้ความเครียดจากปฏิกิริยาออกซิเดชัน เพื่อทำให้เยื่อไลโซโซมมีเสถียรภาพ⁶⁻⁸ ในทางตรงข้ามยีน *growth arrest and DNA damage inducible alpha (GADD45a)* และ *Proliferation-associated protein (PA2G4)* จะตอบสนองต่อเซลล์เมื่อเกิดความเสียหายและกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ ซึ่งตัวกระตุ้นหรือความเครียด เช่น รังสียูวี รังสีเอกซ์ สุนัขแม่เหล็กไฟฟ้าความถี่ต่ำ ภาวะขาดออกซิเจน อนุมูลอิสระเปอร์ออกซิไนไตรต์ และภาวะออสโมติก สามารถกระตุ้นการแสดงออกของยีน *GADD45a* ให้มีการแสดงออกของยีนที่เพิ่มขึ้น เพื่อควบคุมความสมดุลของการซ่อมแซมเซลล์ (DNA repair) และกำจัดเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis)¹⁰ ขณะที่ *PA2G4* เป็นยีนที่ควบคุมวิถีการตายของเซลล์และเกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีน ทั้งนี้เพื่อชดเชยการสูญเสียสถานะสมดุลหลังตายจึงอาจพบการแสดงออกที่เพิ่มมากขึ้นเพื่อตอบสนองต่อความเครียดที่เกิดขึ้น¹¹ ทั้งนี้การแสดงออกของยีน ถือเป็นเครื่องมือที่มีแนวโน้มที่ดีในด้านการประมาณระยะเวลาหลังตายเนื่องจากมีขนาดเล็กและมีความเสถียรภาพ แม้ว่าจะเกิดการเปลี่ยนแปลงสภาพของศพ ศักยภาพของการแสดงออกของยีนยังคงสามารถใช้สำหรับการประมาณระยะเวลาหลังตายร่วมกับเทคนิคที่ได้รับการยอมรับได้¹² แม้ว่าการประมาณระยะเวลาหลังตายจำเป็นต้องกระทำในศพมนุษย์เพื่อให้ได้ข้อมูลที่แม่นยำ อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Ehrenfellner และคณะ พบว่าโมเดลสัตว์ทดลองสามารถใช้เพื่อตรวจสอบโปรตีนที่แสดงออกภายหลังตายได้ เช่น โปรตีน Tropomyosin,

alpha actin และ alpha tubulin ที่พบว่าในมนุษย์ หมู หรือหนูทดลองไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹³ นอกจากนั้นในการทดสอบเครื่องมือประมาณระยะเวลาหลังตายโดยอาศัยการแสดงออกของยีนที่ได้จากโมเดลสัตว์ทดลองพบว่าได้ค่าการประมาณเวลาที่ค่อนข้างใกล้เคียงกับ PMI จริงในศพมนุษย์¹⁴ ดังนั้นจากเหตุผลดังกล่าวจึงสามารถอนุมานได้ว่าภาวะการขาดออกซิเจนและเลือดที่ทำให้เกิดการตายของเซลล์หลังสิ่งมีชีวิตเสียชีวิตอาจพบการแสดงออกของยีนบางชนิดที่เปลี่ยนแปลงไป และการศึกษาในสัตว์ทดลองจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำยีนที่สนใจไปศึกษาต่อในศพมนุษย์เพื่อประเมินระยะเวลาหลังตายได้

วัตถุประสงค์

เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงของยีน *HSP70*, *GADD45a* และ *PA2G4* หลังการตายของสิ่งมีชีวิตในโมเดลหนูทดลอง

วิธีการศึกษา

สภาวะการเลี้ยงหนูทดลอง

เลี้ยงหนูทดลองสายพันธุ์ BALB/cMlac อายุ 6 สัปดาห์ จากบริษัท Nomura Siam International ประเทศไทย โดยได้รับการอนุมัติให้ดำเนินการจากคณะกรรมการกำกับดูแลและการใช้สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ (เลขที่ 033/2021) ที่สภาวะห้องเลี้ยงสัตว์ทดลองเท่ากับ 21 ± 1 องศาเซลเซียส ค่าความชื้นสัมพัทธ์เท่ากับ $50 \pm 10\%$ ความเข้มของแสงเท่ากับ 325 ลักซ์ ช่วงกลางวัน 12 ชั่วโมงและช่วงกลางคืน 12 ชั่วโมง เสียงรบกวนไม่เกิน 85 เดซิเบล การให้อาหารแบบปกติที่ไม่มีการปนเปื้อน การให้น้ำสะอาดแบบไม่จำกัด วัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อย เมื่อครบอายุ 8 สัปดาห์ หนูทั้งหมดจำนวน 24 ตัวจะถูกการุณฆาตด้วยวิธีการ cervical dislocation ในเวลาเดียวกัน จากนั้นนำซากหนูทดลองวางไว้ที่อุณหภูมิ 26 - 27 องศาเซลเซียสและความชื้นสัมพัทธ์ที่ร้อยละ 83 - 84 และปราศจากการรบกวน

จากแมลงในสิ่งแวดล้อม โดยบรรจุไว้ในกล่องพลาสติกวางบริเวณปอดตอร่างอาจารย์ใหญ่ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ เก็บตัวอย่างเลือดจากหัวใจของหนูทดลองแต่ละตัวลงในหลอดเก็บเลือดที่มีสารกันเลือดแข็งชนิด EDTA ที่ช่วงเวลา 0, 0.5, 1, 6, 12, 24, 48 ชั่วโมงหลังตาย โดยในแต่ละจุดเวลาจะทำการทดลองในหนูจำนวน 3 ตัว ใช้เวลาที่ 0 ชั่วโมงเป็นตัวเปรียบเทียบกับเริ่มต้น ตัวอย่างเลือดจะถูกเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ก่อนนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ

การสกัดอาร์เอ็นเอ

สกัดอาร์เอ็นเอตามขั้นตอนของชุดสกัด RNA/Protein Purification Plus Kit (Norgen, Canada) จากนั้นตรวจวัดปริมาณอาร์เอ็นเอด้วยเครื่อง Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) ปรับปริมาณอาร์เอ็นเอเท่ากับ 150 นาโนกรัมแล้วนำไปสังเคราะห์สาย cDNA ด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป RevertAid first Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) และนำไปตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยชุดน้ำยาสำเร็จรูป Maxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) โดยเพิ่มปริมาณยีนจำนวน 4 ตำแหน่ง ได้แก่ *HSP70*, *PA2G4*, *GADD45a* และ β -actin ที่ใช้เป็นยีนอ้างอิง และตรวจวัดการแสดงออกของยีนด้วยเทคนิค quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT - PCR) สภาวะอุณหภูมิ ประกอบด้วยขั้นตอน pre-denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 10 นาที ขั้นตอน denaturation ที่อุณหภูมิ 95 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 15 วินาที ขั้นตอน annealing ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที และขั้นตอน extension ที่อุณหภูมิ 72 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 1 นาที โดยทำทั้งหมดจำนวน 40 รอบ คำนวณการแสดงออกของยีนด้วยสูตรคำนวณ $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ โดยที่ R คือ Relative gene expression มีหน่วยเป็นเท่า และ $\Delta\Delta Ct$ คือค่า [(Cycle time ของยีนที่สนใจ -

Cycle time ของยีน internal control) - ค่าเฉลี่ย ของ ΔCt ของเวลาเริ่มต้น]² ลำดับของไพรเมอร์ที่ใช้ ในการตรวจวัดการแสดงออกของยีนแสดงดังตารางที่ 1 (Table 1)

Table 1 The lists of primers for evaluating gene expression¹⁵⁻¹⁸

Gene	Sequencing primer
<i>HSP70</i>	F- CAGCGAGGCTGACAAGAAGAA R- GGAGATGACCTCCTGGCACT
<i>PA2G4</i>	F- AGAGCCTCTACAGTGTTTTGA R- CCTTTAATCCAGCACTCTGGAACG
<i>GADD45a</i>	F- GACGAATCCACATTCATCTC R- TTGATCCATGTAGCGACTT
β -actin	F- CATGTTTGAGACCTTCAACACCCC R- GCCATCTCCTGCTCGAAGTCTAG

การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้ การแสดงออกของยีน *HSP70*, *PA2G4* และ *GADD45a* จะแสดงในรูปแบบของค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐานของการทดลอง และเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนในแต่ละช่วงเวลา เทียบกับช่วงเวลาเริ่มต้นที่ 0 ชั่วโมง ด้วยสถิติ One-way Analysis of Variance และศึกษาการแสดงออกของยีนและระยะเวลาหลังตาย ด้วยการวิเคราะห์การถดถอยพหุคูณแบบขั้นตอน (multiple linear regression) โดยให้ตัวแปรต้นคือ ระยะเวลาหลังตาย และตัวแปรตามคือ ค่าความแตกต่างของ cycle time (deltaCt) โดยพิจารณาระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ผลการศึกษา

ตัวอย่างเลือดที่เก็บได้มีเพียงที่ช่วงเวลาเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) 0.5 และ 1 ชั่วโมงเท่านั้น ส่วนที่เวลาอื่น ตัวอย่างเลือดไม่สามารถเก็บได้หรือเก็บได้ในปริมาณที่น้อยไม่เพียงพอต่อการนำไปสกัดอาร์เอ็นเอ หลังจากสกัดอาร์เอ็นเอในช่วงเวลาที่สามารถเก็บได้แล้ว ปริมาณอาร์เอ็นเอที่สกัดได้มีค่าอยู่ในช่วง 30.16 ± 14.16 ถึง 44.67 ± 29.39 นาโนกรัมต่อไมโครลิตร ส่วนคุณภาพของอาร์เอ็นเอโดยการวัดอัตราส่วนค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 260 และ 280 อยู่ในช่วง 2.04 ± 0.22 ถึง 2.23 ± 0.16 ดังแสดงในตารางที่ 2 (Table 2)

Table 2 Quality and quantity of extracted RNA from blood of experimental mice at each time points after death

Time after death (hours)	Quality of RNA	Quantity of RNA (ng/mL)
0	2.04 ± 0.22	30.16 ± 14.16
0.5	2.17 ± 0.15	44.67 ± 29.39
1	2.23 ± 0.16	32.50 ± 18.92

พบการแสดงออกของยีน *HSP70* ที่ช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมงหลังตายประมาณ 4.046 ± 3.564 เท่า (ค่าน้อยสุด - ค่ามากที่สุด: 0.29 - 11.31) และในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงหลังตายพบการแสดงออกประมาณ 22.32 ± 8.594 เท่า (ค่าน้อยสุด - ค่ามากที่สุด: 0.40 - 84.45) การแสดงออกของยีนมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) เมื่อคำนวณทางสถิติพบว่า การแสดงออกของยีนที่ 0.5 ชั่วโมงหลังตายมีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนที่เวลา 0 ชั่วโมง ดังรูปที่ 1A (Figure 1A) การแสดงออกของยีน *PA2G4* ที่ช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมงหลังตายพบประมาณ 4.162 ± 1.664 เท่า (ค่าน้อยสุด - ค่ามากที่สุด: 0.06 - 13.83) และในช่วงเวลา 1 ชั่วโมงหลังตาย พบการแสดงออกประมาณ 7.582 ± 3.983 เท่า (ค่าน้อยสุด - ค่ามากที่สุด: 0.24 - 39.95)

การแสดงออกของยีนมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) แต่เมื่อคำนวณทางสถิติไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนที่เวลา 0 ชั่วโมง ดังรูปที่ 1B (Figure 1B) ในขณะที่การแสดงออกของยีน *GADD45a* ที่ช่วงเวลา 0.5 ชั่วโมงหลังตายพบการแสดงออกประมาณ 0.312 ± 0.071 เท่า (ค่าน้อยสุด - ค่ามากที่สุด: 0.02 - 0.88) และในช่วงเวลา 1 ชั่วโมง พบการแสดงออกประมาณ 0.958 ± 0.299 เท่า (ค่าน้อยสุด - ค่ามากที่สุด: 0.003 - 2.93) การแสดงออกของยีนมีการลดลงจากเวลาเริ่มต้น (ชั่วโมงที่ 0) และเพิ่มขึ้นที่ ชั่วโมงที่ 1 เมื่อคำนวณทางสถิติ การแสดงออกของยีนที่ 0.5 ชั่วโมงหลังตายมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับการแสดงออกของยีนที่เวลา 0 ชั่วโมง ดังรูปที่ 1C (Figure 1C)

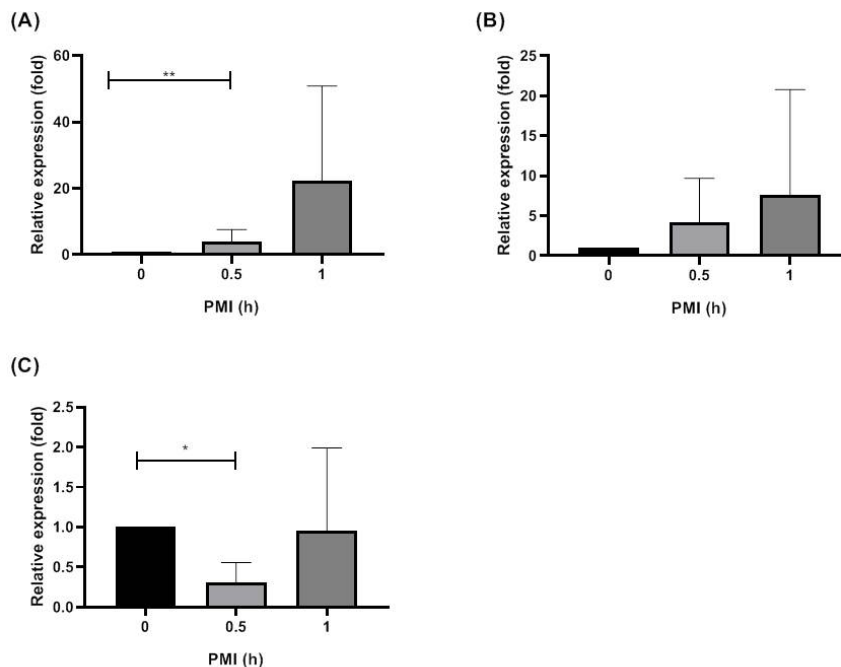


Figure 1 Gene expression of (A) *HSP70* (B) *PA2G4* and (C) *GADD45a* after death in mouse model, with the X-axis represents postmortem interval (h) and Y-axis represents relative expression (fold) calculated using the formula $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$, where * $p < 0.05$ and ** $p < 0.01$ indicate statistically significant differences at each time point after death compared to the initial time (0 hours).

ทั้งนี้ในสถานการณ์จริงการตรวจพบร่างของผู้เสียชีวิตไม่สามารถเก็บตัวอย่างเลือดได้ที่เวลาเริ่มต้นของการเสียชีวิตหรือที่ 0 ชั่วโมงได้ จึงไม่สามารถนำมาคำนวณการแสดงออกของยีนโดยใช้สูตร $R = 2^{-\Delta\Delta Ct}$ ดังนั้นทางผู้วิจัยจึงเปรียบเทียบการแสดงออกของยีนโดยคำนวณจากค่าผลต่างของจำนวน cycle time (deltaCt) ในแต่ละช่วงจุดเวลาซึ่งอ้างอิงมาจากการวิจัยของ Peng และคณะ¹⁹ ผลการวิเคราะห์พบว่าความแตกต่างของค่า cycle time (deltaCt) ของยีน *HSP70* ในแต่ละช่วงเวลามีแนวโน้มลดลง โดยเมื่อคำนวณทางสถิติพบว่าความแตกต่างของค่า cycle time ที่ระยะเวลาหลังตาย 0.5 และ 1 ชั่วโมงมีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างของค่า cycle time ที่ระยะเวลาหลังตาย

เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ดังรูปที่ 2A (Figure 2A) สำหรับยีน *PA2G4* พบว่าในแต่ละช่วงเวลามีแนวโน้มลดลงเช่นกัน แต่ไม่พบความแตกต่างของค่า cycle time ที่ระยะเวลาหลังตาย 0.5 และ 1 ชั่วโมงเมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างของค่า cycle time ที่ระยะเวลาหลังตาย เริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ดังรูปที่ 2B (Figure 2B) ส่วนยีน *GADD45a* นั้น ความแตกต่างของค่า cycle time ในแต่ละช่วงเวลามีแนวโน้มเพิ่มขึ้น ซึ่งต่างจากแนวโน้มของยีน *HSP70* และ *PA2G4* โดยพบความแตกต่างของค่า cycle time ที่ระยะเวลาหลังตาย 0.5 และ 1 ชั่วโมงมีค่าเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับความแตกต่างของค่า cycle time ที่ระยะเวลาหลังตายเริ่มต้น (0 ชั่วโมง) ดังรูปที่ 2C (Figure 2C)

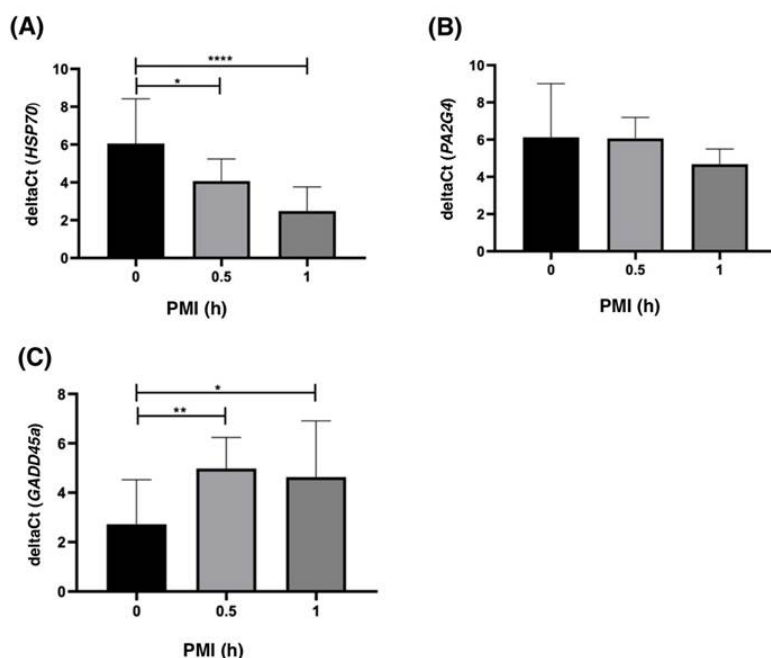


Figure 2 The deltaCt values for the (A) *HSP70*, (B) *PA2G4*, and (C) *GADD45a* genes were measured at different time points. The X-axis represents the post-mortem time in hours, while the Y-axis represents the difference in cycle time (deltaCt) values. The deltaCt values were calculated using the formula $\text{deltaCt} = \text{Ct}(\text{target gene}) - \text{Ct}(\text{reference gene or } \beta\text{-actin})$. The significance of the differences at each post-mortem time point compared to the initial time (0 hours) is indicated by * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$.

เพื่อพิสูจน์ว่าระยะเวลาหลังตายมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนใดหรือไม่ ผู้วิจัยจึงทดสอบการถดถอยเชิงพหุคูณแบบขั้นตอน (Multiple linear regression) โดยให้ตัวแปรต้นคือ ระยะเวลาหลังตาย และตัวแปรตามคือ ค่าความแตกต่างของ cycle time (deltaCt) ผลการวิเคราะห์พบว่า ค่าความแตกต่างของ cycle time (deltaCt) ของยีน *HSP70* จะลดลงเมื่อเวลาหลังตายเพิ่มขึ้น โดยที่พบการลดลงของความแตกต่างของ cycle time ประมาณ 0.109 เท่าเมื่อระยะเวลาหลังตายเพิ่มขึ้น 1 หน่วย

อย่างไรก็ตาม ค่าความแตกต่างของ cycle time (deltaCt) ของยีน *GADD45a* จะเพิ่มขึ้นเมื่อระยะเวลาหลังตายเพิ่มขึ้น โดยที่พบการเพิ่มขึ้นของความแตกต่างของ cycle time ประมาณ 0.081 เท่าเมื่อระยะเวลาหลังตายเพิ่มขึ้น 1 หน่วย ดังตารางที่ 3 (Table 3) ทั้งนี้ ยีน *PA2G4* ไม่ได้ถูกนำมาทดสอบการถดถอยเชิงพหุคูณแบบขั้นตอน เนื่องจากไม่พบนัยสำคัญทางสถิติของความสัมพันธ์ระหว่างค่า cycle time (deltaCt) และ ระยะเวลาหลังตาย

Table 3 The association between the deltaCt value and post-mortem interval (PMI) was analyzed by multiple linear regression

	Unstandardized Coefficients	Std. Error	Standardized Coefficients	t	p-value
(constant)	0.645	0.143		4.527	<0.001
Delta <i>HSP70</i>	-0.109	0.021	-0.626	-5.232	<0.001
Delta <i>GADD45a</i>	0.081	0.024	0.398	3.326	0.002

a Dependent Variable: PMI

อภิปรายผล

ปัจจุบันการประเมินระยะเวลาหลังตายโดยศึกษาการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อสภาวะต่างๆ มีแนวโน้มให้ความแม่นยำและความคลาดเคลื่อนที่น้อยกว่าการประมาณทางสรีรวิทยา¹ จากการรวบรวมข้อมูลในการศึกษาของ Scrivano และคณะ ทำให้ทราบว่า การแสดงออกของยีนมีการเปลี่ยนแปลงไปตามระยะเวลาหลังตาย โดยการตรวจสอบการแสดงออกของยีน มีความเสถียรภาพ มีความคงตัว แม้ว่าเกิดการเปลี่ยนแปลงของสภาพแวดล้อมหรือการเคลื่อนย้ายศพ ยังคงสามารถให้ค่าการประมาณระยะเวลาหลังตายได้แม่นยำมากกว่าระยะเวลาหลังตายที่ประมาณจากทางสรีรวิทยา²⁰ และเนื่องจากการประมาณทางสรีรวิทยาที่ใช้เป็นเครื่องมือประเมินในปัจจุบันนั้น สภาพแวดล้อมภายนอกอาจส่งผลต่อข้อจำกัดในการตรวจสอบช่วงเวลาหลังตาย อาทิเช่น

อุณหภูมิ แสงแดด ความชื้น และยังรวมถึงลักษณะทางบุคคล เช่น เพศ อายุ เป็นต้น²¹ ทำให้การศึกษาหรือค้นคว้าเครื่องมือที่แม่นยำสำหรับการประมาณระยะเวลาหลังตายเป็นที่น่าสนใจและท้าทาย ซึ่งในงานวิจัยนี้ ผู้วิจัยสนใจการแสดงออกของยีนหลังตายในโมเดลหนูทดลอง เนื่องจากการศึกษาการแสดงออกของยีนในศพมนุษย์นั้นเป็นไปได้ยาก เนื่องจากบางศพไม่สามารถทราบได้ถึงระยะเวลาเริ่มต้นของการเสียชีวิต รวมทั้งในบางศพไม่สามารถทราบระยะเวลาหลังตายที่แท้จริง จึงมีการเลือกใช้หนูทดลองเป็นตัวอย่างในการศึกษา เนื่องจากหนูทดลองสามารถกำหนดระยะเวลาหลังตาย และสามารถกำหนดปัจจัยต่างๆ ได้ นอกจากนั้น การศึกษาที่ผ่านมาของ Ma และคณะ พบว่า การใช้หนูทดลองสามารถกำหนดปัจจัยในเรื่องของอุณหภูมิ และสิ่งแวดล้อมภายนอกที่เข้ามามีผล²² รวมทั้งการนำหนูทดลองมาเป็นตัวอย่างในการประเมินระยะเวลา

หลังตายเป็นเครื่องมือที่มีประโยชน์ต่อการประมาณค่า PMI ส่วนการเลือกตัวอย่างเลือดมาศึกษาเนื่องจากเลือดเป็นตัวอย่างที่สามารถเก็บได้ง่ายที่สุด สามารถเก็บได้จากที่เกิดเหตุและส่งตรวจได้ทันที ทำให้ไม่เกิดการยี้ระยะเวลาหลังตายออกไป¹² โดยความชื้นในอากาศที่วางหนูทดลองหลังเสียชีวิต ทางผู้วิจัยได้จำลองสภาวะจริงในบรรยากาศหรือสภาพแวดล้อมทั่วไปของประเทศไทย โดยเป็นสภาวะบรรยากาศจริงในสภาพแวดล้อมที่ทำการทดลอง โดยวัดได้ประมาณร้อยละ 83 - 84 ซึ่งค่าความชื้นดังกล่าวนี้เกิดจากการทดลองที่เป็นช่วงฤดูฝนของประเทศไทย โดยความชื้นนั้นอาจส่งผลต่อสภาพภายนอกของซากสิ่งมีชีวิตภายหลังการตาย อย่างไรก็ตาม จากการศึกษาอื่นที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์ เช่น *HSP70* พบว่าความชื้นที่แตกต่างกันส่งผลต่อการแสดงออกของยีน²³

โดยหลังการตายพบว่าร่างกายจะหยุดการตอบสนองทันที ทำให้ระบบไหลเวียนโลหิตหยุดลง ส่งผลให้เซลล์เกิดภาวะขาดเลือดและออกซิเจน ส่งผลไปเร่งกระบวนการตายของเซลล์ และซึ่งภาวะดังกล่าวเป็นภาวะเครียดที่เซลล์จะตอบสนองโดยมีเพิ่มหรือลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการเหล่านี้¹⁹ เมื่อนุ้เสียชีวิตจะเกิดการตายสองส่วนคือ การตายของร่างกาย (somatic death) และการตายระดับเซลล์ (cellular death) ซึ่งการตายดังกล่าวเริ่มการตายของร่างกายที่ไม่สามารถนำออกซิเจนและเลือดไปเลี้ยงเซลล์ตายอวัยวะต่างๆ ได้ทำให้เกิดการตายของเซลล์ตามมาภายหลังในระยะเวลาที่แตกต่างกัน ขึ้นกับชนิดของเซลล์ที่ต้องการออกซิเจน²⁴ โดยยีนที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้พบว่าเกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์ที่อาจเกิดจากการขาดออกซิเจนหรือการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระ เป็นต้น ซึ่งภาวะเครียดเหล่านี้จะเพิ่มมากขึ้นในช่วงการตายแรกๆ และมีความสัมพันธ์ทางตรงกับระยะเวลาหลังตาย²⁵ อย่างไรก็ตาม หากระยะเวลาหลังตายเพิ่มมากขึ้นเซลล์อาจจะไม่สามารถตอบสนองต่อภาวะเครียดได้

จึงเกิดการเหนี่ยวนำการตายตามมา เมื่อเซลล์ขาดออกซิเจนและเลือดส่งผลให้เกิดการแสดงออกของยีนที่ตอบสนองต่อภาวะเครียด อาทิเช่น *HSP70* และ *PA2G4* ซึ่งพบว่ายีนดังกล่าวมีการแสดงออกเพิ่มมากขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตามระยะเวลา PMI ที่เพิ่มมากขึ้น โดยยีน *HSP70* จะสร้างโปรตีนในกลุ่ม *HSP70* โปรตีนทำหน้าที่ควบคุมให้เซลล์อยู่ในภาวะปกติ เมื่อเซลล์ได้รับความเสียหายหรือเกิดความผิดปกติ เช่น เกิดความเครียดออกซิเดชัน ยีน *HSP70* จะถูกกระตุ้นทำให้เกิดการแสดงออกของยีนที่สูงมากขึ้น *HSP70* ควบคุมกลไกการส่งสัญญาณของ apoptosis โดยตรงโดยการจับกับปัจจัยกระตุ้น apoptotic protease-activating factor-1 หรือ apoptosis-inducing factor จึงยับยั้งการทำงานของ caspase ที่เกิด apoptosis หรือการเปลี่ยนแปลงทางนิวเคลียสที่เกิดจากปัจจัยเหนี่ยวนำอะพอพโทซิส โดยเกิดขึ้นภายใน cytosol และ plasma membrane โดยการยับยั้ง caspase-mediated PCD ที่เกิดจาก *HSP70* ทำให้ Lysosomal proteases และ cathepsins ไม่ได้เคลื่อนที่จาก lysosomal lumen ไปยัง cytosol จึงไม่เกิดการตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นที่ก่อให้เกิดความตาย⁶ ขณะที่ยีน *PA2G4* จะสร้างโปรตีนทำหน้าที่ควบคุมวิถีการตายของเซลล์และเกี่ยวข้องกับการสลายโปรตีน โดยโปรตีนที่สร้างจากยีนนี้ทำหน้าที่ในการยับยั้งวัฏจักรของเซลล์ผ่านทางกรยับยั้งการถอดรหัสของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรเซลล์ เช่น E2F1, Cyclin D1 และ cyclin E นอกจากนี้ *PA2G4* ยังมีบทบาทในการควบคุมการมีชีวิตรอดของเซลล์ ภายใต้การควบคุมของ AKT signaling pathway¹⁶ ดังนั้น โปรตีนทั้งสองชนิดมีผลต่อการตอบสนองต่อการตาย ด้วยการกระตุ้นให้เกิดการปล่อยโปรตีนทั้งสองชนิด เพื่อทำให้เซลล์อยู่ในสภาพปกติ ดังนั้น ภายหลังการตาย ร่างกายเกิดภาวะการขาดเลือดและออกซิเจน ส่งผลให้เกิดความเครียดระดับเซลล์⁹ จึงจำเป็นต้องมีการแสดงออกของยีนบางชนิดเพื่อลดความเครียดของเซลล์และรักษาสภาพเซลล์ให้มีชีวิตรอดจึงอาจพบการแสดงออกของยีน

HSP70 และ PA2G4 มีการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้น โดยสอดคล้องกับการศึกษาของ Pozhikov และคณะ⁵ และ Sanoudou และคณะ⁹ แต่ในทางกลับกัน การศึกษาครั้งนี้พบการแสดงออกของยีน GADD45a ลดลงในช่วง 0.5 ชั่วโมงแรกของการตายและมีแนวโน้มเพิ่มมากขึ้นที่ชั่วโมงที่ 1 หลังการตาย โดยไม่สอดคล้องกับการศึกษาของ Kim และคณะ²⁶ และ Colitti และคณะ²⁵ ที่พบการแสดงออกของยีน GADD45a เพิ่มขึ้นในระยะเวลา 45 นาทีหลังการตาย ซึ่งอาจเป็นไปได้ว่า ยีน GADD45a ยีนที่ทำหน้าที่ควบคุมความสมดุลของการซ่อมแซมเซลล์ (DNA repair) และกำจัดเซลล์แบบอะพอพโทซิส (apoptosis)¹⁰ ซึ่งพบการแสดงออกที่ลดลงในช่วงเวลาแรกหลังตาย (0.5 ชั่วโมง) เป็นไปได้ว่า ช่วงระยะเวลาแรกหลังตาย ยังไม่พบความผิดปกติของการซ่อมแซมเซลล์ และยังไม่เกิดการกำจัดเซลล์แบบอะพอพโทซิส จึงทำให้การแสดงออกของยีน GADD45a มีการแสดงออกที่ลดลง²⁷ ในการวิจัยครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าการแสดงออกของยีน HSP70, PA2G4 และ GADD45a ในตัวอย่างเลือด สามารถตรวจสอบการแสดงออกของยีนได้ที่ 0 - 1 ชั่วโมงหลังตาย โดย ยีน HSP70 และ PA2G4 มีแนวโน้มการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาหลังตายที่เพิ่มขึ้น ขณะที่ยีน GADD45a พบการแสดงออกของยีนลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ 0.5 ชั่วโมงหลังตาย จากการแสดงออกของยีนที่แตกต่างกันแสดงให้เห็นว่าแต่ละยีนจะตอบสนองต่อสภาวะที่เกิดขึ้นหลังตายผ่านทางการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์และเร่งกระบวนการอะพอพโทซิสของเซลล์¹⁹ การที่ร่างกายของสิ่งมีชีวิตไม่สามารถมีปฏิสัมพันธ์และไม่ตอบสนองต่อสิ่งต่างๆ อาจเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความเครียดของเซลล์ ที่นำไปสู่กลไกต่างๆ เพื่อตอบสนองต่อสภาวะหลังตายที่เกิดขึ้น เช่น ตอบสนองต่อความร้อน ภาวะขาดออกซิเจน และภาวะเครียดออกซิเดชัน⁵ รวมถึงการควบคุมระดับโปรตีนให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสม⁹ ทำให้ยีนอาจถูกกระตุ้นให้เกิดการต่อต้านความเครียดและเพิ่มโอกาสในการอยู่รอดโดยที่ภาวะขาดเลือดและความเครียดในเซลล์เป็น

ตัวกระตุ้นให้เซลล์ตายอย่างต่อเนื่อง ออร์แกนเซลล์และดีเอ็นเอที่ได้รับความเสียหายโดยไม่มีการซ่อมแซมจะกระตุ้นให้เกิดโปรตีนโอสซิสส่งผลให้เซลล์ตายสอดคล้องกับงานวิจัยของ Sanoudou และคณะพบว่าหลังจากการตายของร่างกาย 46 ชั่วโมง อาจพบการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับวัฏจักรของเซลล์ การตายของเซลล์ โปรตีนสลายตัวสารต้านอนุมูลอิสระ และการซ่อมแซม DNA⁹

นอกจากนี้มีการศึกษาถึงการแสดงออกของยีนอื่นๆ ที่มีการตอบสนองหลังการตาย เช่น ยีนที่เกี่ยวข้องกับการตายแบบอะพอพโทซิส ได้แก่ *phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten (PTEN)* และ *Fas ligand (FasL)* ที่พบการแสดงออกของยีนสูงสุดที่ 6 ชั่วโมงหลังตาย²⁸ หรือการศึกษาของ Kim และคณะ แสดงให้เห็นถึงภาวะขาดเลือดและขาดออกซิเจนที่ส่งผลต่อเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อเวลาผ่านไป 45 นาที พบการแสดงออกของยีน GADD45b เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นการตายของเซลล์แบบอะพอพโทซิส²⁶ ในทางตรงข้ามยีนที่เกี่ยวข้องกับการควบคุมการเจริญของเซลล์ (*Cdc25b*) พบการแสดงออกสูงสุดในช่วง 24 ชั่วโมงแรกหลังตาย²⁹ การศึกษาของ Chang และคณะ แสดงให้เห็นว่าการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีน HSP70 มีการแสดงออกของยีนที่เพิ่มมากขึ้น เพื่อตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์ที่อาจมีความร้อน หรือภาวะขาดออกซิเจนเป็นตัวกระตุ้น³⁰ อีกทั้งการตอบสนองต่อความเครียดที่มีส่วนเกี่ยวข้องในการควบคุมการทำงานของเซลล์ รวมถึงการซ่อมแซมดีเอ็นเอ การวิเคราะห์การแสดงออกของยีนในสมองหลังตาย พบว่ามีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นของ GADD45 เพื่อควบคุมการเผาผลาญพลังงานภายใต้สภาวะเครียด²⁵ เพื่อตอบสนองต่อภาวะต่างๆ หลังตาย การแสดงออกของยีนจึงมีการแสดงออกที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงที่แตกต่างกันนั้นทำให้สามารถเป็นเครื่องมือที่ใช้ในการประเมินระยะเวลาหลังตาย

หลายการศึกษาที่ผ่านมาพบความแตกต่างของการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของยีนหลังตาย เช่น การศึกษาของ Bahar และคณะ พบการแสดงออกของยีน *RBP5* และ *SCD* หลังตายในกล้ามเนื้อโครงร่างของวัวได้มากที่สุด 22 วัน นอกจากนั้นที่เวลาหลังตาย 24 ชั่วโมงพบว่ายีนทั้งสองมีการแสดงออกสูงสุดในตับและเนื้อเยื่อไขมัน³¹ การศึกษาของ Seear และ Sweeney พบว่าที่เวลา 24 ชั่วโมงหลังตาย พบการแสดงออกของยีน *TRB* และ *18s* ในตัวอย่างไต ตับ สมอง และกล้ามเนื้อของปลาแซลมอน³² และการศึกษาของ Lv และคณะ ได้เปรียบเทียบการแสดงออกของยีนหลังตายระหว่างมนุษย์และหนูทดลอง พบว่าการแสดงออกของยีน *β-actin*, *GAPDH*, *18S rRNA*, *RPS29*, *miR-1*, *miR-133a*, และ *5R rRNA* มีการแสดงออกของยีนแตกต่างกันเมื่อระยะเวลาหลังตายเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่เมื่อเทียบการแสดงออกของยีนเดียวกันในทั้ง 2 โมเดลระหว่างมนุษย์และหนูทดลอง ไม่พบความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ¹⁴ และสำหรับองค์ความรู้ที่ได้จากการศึกษานี้คือ การพบยีนที่มีการแสดงออกหลังเสียชีวิตโดยเฉพาะยีนในกลุ่มที่ตอบสนองต่อความเครียดภายในเซลล์ ที่สามารถใช้ความสัมพันธ์นี้ในการช่วยในการประมาณระยะเวลาหลังตาย และสามารถนำมาพัฒนาในการประเมินระยะเวลาหลังตายให้มีประสิทธิภาพมากขึ้น

ข้อจำกัดสำหรับการศึกษาคือ โมเดลหนูทดลองที่มีน้ำหนักตัวและขนาดเล็กจึงไม่สามารถเก็บเลือดในช่วงระยะเวลาท้ายหลังเสียชีวิตได้ ดังนั้น หากงานวิจัยต้องการศึกษาระยะเวลาหลังเสียชีวิตที่ยาวนานมากขึ้น อาจเลือกใช้สัตว์ทดลองที่มีขนาดใหญ่ขึ้น เช่น หนู rat หรือสุกร เป็นต้น อย่างไรก็ตาม งานวิจัยนี้เป็นแนวทางเบื้องต้นว่ายีนที่เลือกมานั้นมีอิทธิพลต่อการแสดงออกของยีนตามระยะเวลาหลังตาย ซึ่งสามารถนำยีนดังกล่าวไปศึกษาเพิ่มเติมได้ในด้านการพัฒนาเครื่องมือที่ใช้ในการประมาณระยะเวลาหลังตาย หรือศึกษาเพิ่มเติมในด้านของเวลาหลังตายที่เพิ่มมากขึ้นของทั้ง 3 ยีนนี้

สรุปผล

จากผลการทดลองพบว่าการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับภาวะขาดเลือดและออกซิเจนในการศึกษานี้ มีการเปลี่ยนแปลงภายหลังการตาย โดยพบการแสดงออกของยีน *HSP70* ลดลงและยีน *GADD45a* เพิ่มขึ้น นอกจากนั้นเมื่อวิเคราะห์การถดถอยเชิงพหุคูณแบบขั้นตอนพบว่าระยะเวลาหลังตายมีอิทธิพลต่อการเปลี่ยนค่าความแตกต่างของ cycle time (deltaCt) ของยีนทั้งสองชนิด ซึ่งเป็นไปได้ว่ายีนทั้งสองชนิดอาจจะนำมาใช้เป็นโมเดลเพื่อศึกษาหรือประมาณระยะเวลาหลังตายได้ในร่างผู้เสียชีวิต การศึกษาในสัตว์ทดลองครั้งนี้จะเป็นข้อมูลเบื้องต้นที่สามารถนำยีนทั้งสองไปศึกษาต่อในศพมนุษย์เพื่อประเมินระยะเวลาหลังตายที่แม่นยำและตรงกับวัตถุประสงค์การใช้งานมากขึ้น

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณทุนสนับสนุนการวิจัยจากคณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ หมายเลขทุน 118-2565 ภาควิชานิติเวชศาสตร์ ห้องปฏิบัติการนิติพันธุศาสตร์ ห้องปฏิบัติการพิษวิทยา และศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ ที่เอื้อเฟื้อสถานที่ในการทำการทดลอง การทำหัตถการตลอดจนเครื่องมือในการทดลอง

เอกสารอ้างอิง

1. Mathur A, Agrawal Y. An overview of methods used for estimation of time since death. *Aust J Forensic Sci* 2011;43:275-85. doi:10.1080/00450618.2011.568970.
2. Noshay PA. Postmortem expression of apoptosis-related genes in the liver of mice and their use for estimation of the time of death. *Int J Legal Med* 2021;135:539-45. doi:10.1007/s00414-020-02419-5.

3. Kim JY, Kim Y, Cha HK, et al. Cell death-associated ribosomal RNA cleavage in postmortem tissues and its forensic applications. *Mol Cells* 2017;40:410-7. doi:10.14348/molcells.2017.0039.
4. Dachet F, Brown JB, Valyi-Nagy T, et al. Selective time-dependent changes in activity and cell-specific gene expression in human postmortem brain. *Sci Rep* 2021;11:6078. doi:10.1038/s41598-021-85801-6.
5. Pozhitkov AE, Neme R, Domazet-Lošo T, et al. Thanatotranscriptome: Genes actively expressed after organismal death. *BioRxiv* 2016:058305.
6. Nylandsted J, Gyrd-Hansen M, Danielewicz A, et al. Heat shock protein 70 promotes cell survival by inhibiting lysosomal membrane permeabilization. *J Exp Med* 2004;200:425-35. doi:10.1084/jem.20040531.
7. Albakova Z, Armeev GA, Kanevskiy LM, et al. HSP70 multi-functionality in cancer. *Cells* 2020;9:587. doi:10.3390/cells9030587.
8. Stetler RA, Gan Y, Zhang W, et al. Heat shock proteins: Cellular and molecular mechanisms in the central nervous system. *Prog Neurobiol* 2010;92:184-211. doi:10.1016/j.pneurobio.2010.05.002.
9. Sanoudou D, Kang PB, Haslett JN, et al. Transcriptional profile of postmortem skeletal muscle. *Physiol Genomics* 2004;16:222-8. doi:10.1152/physiolgenomics.00137.2003.
10. Moskalev AA, Smit-McBride Z, Shaposhnikov MV, et al. Gadd45 proteins: Relevance to aging, longevity and age-related pathologies. *Ageing Res Rev* 2012;11:51-66. doi:10.1016/j.arr.2011.09.003.
11. Stevenson BW, Gorman MA, Koach J, et al. A structural view of PA2G4 isoforms with opposing functions in cancer. *J Biol Chem* 2020;295:16100-12. doi:10.1074/jbc.REV120.014293.
12. Bauer M, Gramlich I, Polzin S, et al. Quantification of mRNA degradation as possible indicator of postmortem interval—a pilot study. *Leg Med (Tokyo)* 2003;5:220-7. doi:10.1016/j.legalmed.2003.08.001.
13. Ehrenfellner B, Zissler A, Steinbacher P, et al. Are animal models predictive for human postmortem muscle protein degradation? *Int J Legal Med* 2017;131:1615-21. doi:10.1007/s00414-017-1643-1.
14. Lv YH, Ma JL, Pan H, et al. Estimation of the human postmortem interval using an established rat mathematical model and multi-RNA markers. *Forensic Sci Med Pathol* 2017;13:20-7. doi:10.1007/s12024-016-9827-4.
15. Black AT, Hayden PJ, Casillas RP, et al. Regulation of Hsp27 and Hsp70 expression in human and mouse skin construct models by caveolae following exposure to the model sulfur mustard vesicant, 2-chloroethyl ethyl sulfide. *Toxicol Appl Pharmacol* 2011;253:112-20. doi:10.1016/j.taap.2011.03.015.

16. Zhang Y, Lu Y, Zhou H, et al. Alterations in cell growth and signaling in ErbB3 binding protein-1 (Ebp1) deficient mice. *BMC Cell Biol* 2008;9:69. doi:10.1186/1471-2121-9-69.
17. Hong L, Sun QF, Xu TY, et al. New role and molecular mechanism of Gadd45a in hepatic fibrosis. *World J Gastroenterol* 2016;22:2779-88. doi:10.3748/wjg.v22.i9.2779.
18. Han Y, Kang Y, Yu J, et al. Increase of Hspa1a and Hspa1b genes in the resting B cells of Sirt1 knockout mice. *Mol Biol Rep* 2019;46:4225-34. doi:10.1007/s11033-019-04876-7.
19. Peng D, Lv M, Li Z, et al. Postmortem interval determination using mRNA markers and DNA normalization. *Int J Legal Med* 2020;134:149-57. doi:10.1007/s00414-019-02199-7.
20. Scrivano S, Sanavio M, Tozzo P, et al. Analysis of RNA in the estimation of post-mortem interval: A review of current evidence. *Int J Legal Med* 2019;133:1629-40. doi:10.1007/s00414-019-02125-x.
21. Scott L, Finley SJ, Watson C, et al. Life and death: A systematic comparison of antemortem and postmortem gene expression. *Gene* 2020;731:144349. doi:10.1016/j.gene.2020.144349.
22. Ma J, Pan H, Zeng Y, et al. Exploration of the R code-based mathematical model for PMI estimation using profiling of RNA degradation in rat brain tissue at different temperatures. *Forensic Sci Med Pathol* 2015;11:530-7. doi:10.1007/s12024-015-9703-7.
23. Stucki D, Freitak D, Sundström L. Survival and gene expression under different temperature and humidity regimes in ants. *PLoS One* 2017;12:e0181137. doi:10.1371/journal.pone.0181137.
24. Payne-James J, Jones RM. *Simpson's forensic medicine*: CRC Press; 2019.
25. Coliță CI, Olaru DG, Coliță D, et al. Induced Coma, Death, and Organ Transplantation: A Physiologic, Genetic, and Theological Perspective. *Int J Mol Sci* 2023;24:5744. doi:10.3390/ijms24065744.
26. Kim MY, Seo EJ, Lee DH, et al. Gadd45 β is a novel mediator of cardiomyocyte apoptosis induced by ischaemia/hypoxia. *Cardiovasc Res* 2010;87:119-26. doi:10.1093/cvr/cvq048.
27. Antiga LG, Sibbens L, Abakkouy Y, et al. Cell survival and DNA damage repair are promoted in the human blood thanatotranscriptome shortly after death. *Sci Rep* 2021;11:16585. doi:10.1038/s41598-021-96095-z.
28. Zapico SC, Menéndez ST, Núñez P. Cell death proteins as markers of early postmortem interval. *Cell Mol Life Sci* 2014;71:2957-62. doi:10.1007/s00018-013-1531-x.
29. Tao L, Ma J, Han L, et al. Early postmortem interval estimation based on Cdc25b mRNA in rat cardiac tissue. *Leg Med (Tokyo)* 2018;35:18-24. doi:10.1016/j.legalmed.2018.09.004.

30. Chung U, Seo JS, Kim YH, et al. Quantitative analyses of postmortem heat shock protein mRNA profiles in the occipital lobes of human cerebral cortices: Implications in cause of death. *Mol Cells* 2012;34:473-80. doi:10.1007/s10059-012-0214-z.
31. Bahar B, Monahan FJ, Moloney AP, et al, Sweeney T. Long-term stability of RNA in post-mortem bovine skeletal muscle, liver and subcutaneous adipose tissues. *BMC Mol Biol* 2007;8:108. doi:10.1186/1471-2199-8-108.
32. Seear PJ, Sweeney GE. Stability of RNA isolated from post-mortem tissues of Atlantic salmon (*Salmo salar* L.). *Fish Physiol Biochem* 2008;34:19-24. doi:10.1007/s10695-007-9141-x.