

ผลทางไซโตจีนิติกของน้ำยาย้อมสีผมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง

พิมพรรัตน์ ชาญปรีชญา ศิริลักษ์ เยี่ยมธรรม และ นฤพร เพ็ชรกลาง*

The Cytogenetics Effects of Hair Dyes on Human Lymphocytes Culture

Pimrutt Chanpreechaya, Siriluck Iamtham and Naruporn Pedklang*

สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140

Department of Genetics, Faculty of Liberal Art and Science, Kasetsart University, Kamphaengsaen campus, Nakompratom 73140, Thailand.

*Corresponding author. E-mail address: faasnpp@ku.ac.th (N. Pedklang)

Received 6 June 2008; accepted 17 August 2009

บทคัดย่อ

การศึกษาผลทางไซโตจีนิติกของน้ำยาย้อมสีผมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง โดยให้เซลล์ได้รับสารเคมีในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ 4 ระดับ เป็นเวลานาน 5 ชั่วโมง ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์เมื่อครบ 72 ชั่วโมง แล้วตรวจอัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการหักของโครโมโซม พบว่าน้ำยาย้อมสีผมที่ระดับความเข้มข้น 0.05 0.075 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร มีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง และมีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งอัตราการแบ่งเซลล์ที่ลดลงนี้จะแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของน้ำยาย้อมสีผมที่เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ น้ำยาย้อมสีผมสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหักของโครโมโซมแบบ structural chromosome aberration ตามลักษณะการหักเป็น 4 แบบ คือ single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks และ isochromatid breaks โดยความผิดปกติของโครโมโซมของกลุ่มทดลองจะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้น สารเคมีที่ประกอบเป็นน้ำยาย้อมสีผมนี้จึงจัดเป็นสารประเภท ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม (clastogen) จึงสรุปได้ว่าน้ำยาย้อมสีผมมีผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในอาหารเพาะเลี้ยงได้

คำสำคัญ: ผลทางไซโตจีนิติก; เพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว; น้ำยาย้อมสีผม

Abstract

Hair dyes were chosen to study the cytogenetics effect on human lymphocytes culture. At the beginning of the last five hours of the overall harvesting cell's time (72 hours), the lymphocytes cell in culture were treated with 4 distinguish samples concentration. Considering about mitotic index and chromosome breaking, it was observed that the treatment of cells with various concentration of the hair dyes (0.05 0.075 0.1 and 0.25 mL/mL) led to the reduction of the mitotic index. The differences in the mitotic index of all treatments with the hair dyes were statistically significant when compared with the control samples. The decreasing of mitotic index depended on the increasing of the hair dyes concentration. In addition, the hair dyes could induce the structural chromosome aberration. The four types of chromosome aberration, single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks and isochromatid breaks, were found. The differences in the chromosome aberration of all treatments with the hair dyes were statistically significant when compared with the control samples. The chemical agents in the hair dyes were classified into clastogen, that causes fragmentation of chromosomes. In conclusion, the hair dyes could change chromosome in cell culture.

Keywords: Cytogenetics effects; Lymphocytes culture; Hair dyes

บทนำ

การเกิดโรคมะเร็งใช้เวลานาน ๆ ของมนุษย์ มีสาเหตุสำคัญประการหนึ่ง จากสารเคมีที่มีอยู่ทั่วไปในสิ่งแวดล้อมรอบตัว ในอาหารที่รับประทาน ในของใช้ที่ใช้ในชีวิตประจำวัน สารบางชนิดเป็นสิ่งที่อยู่ในธรรมชาติ แต่บางชนิดมนุษย์สังเคราะห์ขึ้นมาภายหลัง สารเคมีหลายชนิด เมื่อเราได้รับเข้าไปในขนาดมากเกินไปจะทำให้เกิดอันตราย ต่อสุขภาพและเจ็บป่วยอย่างเฉียบพลัน แต่ยังมีสารเคมีอีกจำนวนมากที่มีพิษน้อย จะค่อย ๆ สะสมในร่างกายจนเกิดความเป็นพิษในภายหลัง อาจนานถึง 10-20 ปี กว่าจะปรากฏอาการของการได้รับสารพิษ จึงเป็นอันตรายต่อสุขภาพอย่างเรื้อรัง (จุไรรัตน์, 2537) ซึ่งในระยะเวลาเพียงไม่กี่ปีมานี้ ได้มีรายงานเป็นจำนวนมากเกี่ยวกับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และสารก่อกลายพันธุ์หรือ

ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของยีน (mutagen) จึงอาจกล่าวได้ว่าภัยจากสารเคมีนี้ มีผลโดยตรงต่อสุขภาพและชีวิตมนุษย์ (อมรา, 2546) ดังนั้น จึงควรที่จะมีการศึกษาความเป็นพิษของสารเคมีต่อสารทางพันธุกรรม เพื่อให้ได้มาซึ่งข้อมูลที่จะใช้ทำนายว่า สารนั้นมีสมบัติที่จะก่อให้เกิดอันตรายได้มากน้อยเพียงใด (สุมินทร์, 2527)

ในการทดลองนี้ ได้เลือกศึกษาสารเคมีที่ใช้ในชีวิตประจำวัน พบว่า ทำให้เกิดพิษในคนอยู่เสมอ เช่น เครื่องสำอางในกลุ่มควบคุมพิเศษ ได้แก่ น้ำยาย้อมสีผม ซึ่งพิษเฉียบพลันของผู้ที่แพ้ น้ำยาย้อมสีผมจะมีอาการ คือ ผิวหนังเห่อแดงเหมือนกับลมพิษ คัน ผิวหนังอักเสบอย่างรุนแรง หนองลอกเป็นแผ่น ตาบวม น้ำตาไหล ตาโปนผิดปกติ เยื่อตาขาวอักเสบอย่างรุนแรง ซึ่งในที่สุด อาจทำให้ตาบอดอย่างถาวรได้ ถ้าสูดดมสารพวกนี้เข้าไปจะทำให้เกิดอาการหอบหืด รู้สึกหัวหมุน ความดันเลือดสูง ภาวะอาหารอักเสบ ช่องต่าง ๆ

ภายในร่างกายมีน้ำเหลืองไหลออกมา ปอดบวม น้ำ เกิดเมทฮีโมโกลบิน (methaemoglobin) ในเลือด มีอาการสั้นกระตุก ชัก และโคมา (สุนทร, 2541) สำหรับพิษเรื้อรังของน้ำยาย้อมสีผสม มีรายงานความเป็นพิษของสีออกซิเดชัน โดยเฉพาะอย่างยิ่ง พาราฟีนีลีนไดอะมีน (para-Phenylenediamine, PPD) เกลิอ และอนุพันธ์ของสารนี้เป็นสารก่อกลายพันธุ์ โดยการทดสอบเอมส์ (Ames test) และอาจก่อให้เกิดมะเร็ง (Garrigue et al., 2006) แต่มีรายงานว่า ถ้าผสม พาราฟีนีลีนไดอะมีน ด้วยเรซอร์ซินอล (resorcinol) และไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ โดยบ่มร่วมกัน 30 นาที ที่ 37 องศาเซลเซียส ทำให้สารผสมไม่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์โดยการทดสอบเอมส์ขณะที่สารผสมปราศจากเรซอร์ซินอล จะทำให้เกิดการกลายพันธุ์และเกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ ซึ่งอาจเนื่องมาจากการสร้าง Brandrowski's base (Bracher et al., 1990)

น้ำสารเคมีที่ใช้ในชีวิตประจำวัน คือ น้ำยาย้อมสีผสมมาศึกษา ผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง ซึ่งเป็นวิธีที่สะดวกง่าย ใช้เวลาไม่มากนักในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารเคมี ใช้สารโมโนเมทิลีน-ซีเป็น positive control เนื่องจาก เป็นสารที่มีผลต่อโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (เสาวคนธ์, 2530) และนำผลที่ได้ใช้เป็นข้อมูลในการปรับปรุงชนิดและองค์ประกอบต่างๆ ของสารเคมีที่ไม่เป็นอันตรายมาแทนที่ เป็นประโยชน์ต่อวงการอุตสาหกรรมและการแพทย์เพื่อพัฒนาคุณภาพชีวิตที่ดีของคนไทยในอนาคต

วัตถุประสงค์และวิธีการ

การเตรียมเลือด

เจ้าหน้าที่ผู้ชำนาญดูดเลือด จากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขน ประมาณ 5 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดฉีดยาที่มีสารเฮปาริน (heparin) โดยใช้เฮปาริน 50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันการแข็งตัวของเลือด และเนื่องจากในการทดลองครั้งนี้ได้แบ่งออกเป็นหลายกลุ่มทดสอบ จึงเลือกวิธีการเลี้ยงเซลล์ แบบใช้เลือดปริมาณน้อย (whole blood microculture) โดยในการเลี้ยงจะใช้เลือดที่ดูดออกมาทั้งหมด

การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว

เตรียมขวดเลี้ยงเซลล์ ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ปลอดเชื้อแล้ว ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบด้วย RPMI medium 1640 ผสม L-glutamine 80 เปอร์เซ็นต์ และ fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์ แล้วใส่เลือดลงไป 0.2 มิลลิลิตร (ประมาณ 10 หยด) ในขั้นตอนสุดท้าย จึงใส่ phytohemagglutinin-m (PHA) 100 มิลลิลิตร เพื่อกระตุ้นการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาว ปิดจุกขวดให้สนิท เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน ก่อนเก็บไว้ในตู้บ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

เมื่อครบชั่วโมงที่ 67 หยดสารทดสอบ ตามความเข้มข้นในระดับต่าง ๆ 4 ระดับ ขวดละ 200 ไมโครลิตร ลงในกลุ่มทดลองหยดน้ำกลั่น แทนสาร ทดสอบ 200 ไมโครลิตรใน negative control และหยด ไมโนมัยซิน-ซี ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงใน positive

control ซึ่งจะให้น้ำสารเคมีสัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 5 ชั่วโมง ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อครบชั่วโมงที่ 71 หยดโคลซีมิด (colcemid) ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปทุกขวด ขวดละ 100 ไมโครลิตร ทุกขั้นตอนทำโดยวิธีปลอดเชื้อ (sterile technique) ตามแผนผังดังนี้

การเก็บเกี่ยวเซลล์

1. เมื่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดครบ 72 ชั่วโมง จะเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อทำการแยกเซลล์ออกจากอาหารเพาะเลี้ยง

2. เมื่อปั่นเหวี่ยงเซลล์จะตกลงมารวมกันอยู่ที่ก้นหลอดดูดเอาน้ำใสตอนบนทิ้งไปโดยให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร จากนั้น เขย่าหลอดเบา ๆ บนเครื่องเขย่า (vortex) เพื่อให้ตะกอนเซลล์กระจายตัว ไม่จับเป็นก้อน เติมน้ำสารละลาย hanks' balanced salt solution (HBSS) ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร ปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง เติมน้ำ HBSS ลงไปประมาณ 5 มิลลิลิตร อีกครั้ง นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที แล้วดูดเอาน้ำใสส่วนตอนบนทิ้งอีกครั้ง

3. เติมน้ำสารละลายโปรตีนซีเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ต่อลิตร (37 องศาเซลเซียส) 5 มิลลิลิตร ทิ้งไว้นาน 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง จากนั้น นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งแล้ว ทำเช่นนี้ซ้ำอีกครั้งหนึ่ง

4. ในขั้นตอนการคงสภาพเซลล์ โดยทำการเขย่าหลอดเบา ๆ บนเครื่องเขย่า (vortex) เมื่อเขย่าหลอดจนเซลล์กระจายตัวดีแล้ว จึงค่อย ๆ หยดน้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative) ซึ่งประกอบด้วย เมทานอล (methanol) 3 ส่วน และกรดอะซิติก (acetic acid) 1 ส่วน ลงไปในหลอดทดลองครั้งละ 1 หยด โดยตั้งหลอดค้ำไว้บน vortex เติมน้ำยาคงสภาพงานในหลอดมีสารละลาย ประมาณ 5 มิลลิลิตร นำไปปั่นด้วยความเร็ว 1,200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำใสส่วนตอนบนทิ้ง เติมน้ำยาคงสภาพลงไปใหม่ ทำเช่นเดิมอีก ประมาณ 2-3 ครั้ง จนพบว่า ตะกอนสีขาวที่ก้นหลอดทดลองสะอาดดี ซึ่งก็คือ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการศึกษา

การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม

นำสไลด์ไปแช่ในกรดอะซิติก 1-2 คืน เพื่อทำการขจัดคราบโปรตีนและสิ่งสกปรกออกจากสไลด์ จากนั้น ล้างกรดอะซิติกออกด้วยน้ำสะอาด แล้วนำสไลด์ไปแช่ต่อในเมทานอลความเข้มข้น 70-90 เปอร์เซ็นต์ 1 คืน แล้วนำสไลด์ที่ได้มาขัดด้วยผ้าขาวบางสะอาด

การหยดเซลล์ ทำโดยดูดน้ำยาคงสภาพออกจากหลอดจนเหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วจึงเติมน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดลงไป ประมาณ 0.5 มิลลิลิตร จากนั้น ใช้ฟลาสเจอร์ปิเปต (pasteur pipette) เป่าลมลงไปในหลอดเพื่อกระจายเซลล์ที่ก้นหลอดขึ้นมา เมื่อเซลล์กระจายดีแล้ว ดูดเซลล์มาหยดลงบนสไลด์ที่เตรียมไว้ 1 หยด ถ้าสไลด์สะอาดดี จะพบว่า เซลล์ที่หยดจะกระจายตัวออกเป็นวงกลมอย่างรวดเร็ว จากนั้น หยดน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดตามลงไปอีก 1-2 หยด เพื่อช่วยให้เซลล์

กระจายตัวดีขึ้น แล้วตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry technique)

การย้อมสีโครโมโซม

นำสไลด์ที่แห้งดีแล้วไปย้อมสีโครโมโซม โดยใช้สีกิมซา (Giemsa) ความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffered saline pH 7.2 นานประมาณ 7-10 นาที แล้วนำมาผ่านน้ำไหลเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

การเลือกเซลล์เพื่อตรวจนับและรายงานผลการศึกษาโครโมโซม

นำสไลด์ตัวอย่างที่ย้อมสีแล้ว ไปศึกษาโครโมโซมภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจนับและบันทึกภาพความผิดปกติต่างๆ ของโครโมโซม เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมของกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม โดยเซลล์ที่จะนับควรมีจำนวนโครโมโซม ไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 48 โครโมโซม และทำการตรวจนับเซลล์ ไม่น้อยกว่า 2,000 เซลล์ ในแต่ละซ้ำของการทดลอง ยกเว้นกรณี ที่ไม่อาจหาเซลล์ที่ทำการแบ่งมากไปกว่านี้ได้

1. กรณีสารทดสอบอาจก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดไมโทซิส

โดยวัดค่าอัตราการแบ่งเซลล์ไมโทซิส (Mitotic Index; MI) ซึ่งได้จากการสุ่มตรวจดูเซลล์เม็ดเลือดขาว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์เมทาเฟสใน 2,000 เซลล์ของแต่ละกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์เมทาเฟสในจำนวน 2,000 เซลล์ของกลุ่มควบคุม ดังนี้

$$\text{Mitotic index (\%)} = (A/B) \times 100$$

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่มทดลอง

B = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่มควบคุม

2. กรณีสารทดสอบอาจก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม

ศึกษาจากเซลล์ระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายดี และแต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซม 46 แท่ง ถ้ามีจำนวนขาดหรือเกินจะอยู่ในจำนวน 46 1 แท่งเท่านั้น แล้วศึกษาผลที่มีต่อโครโมโซมด้วยวิธีการนับจำนวนหัก (break หรือ b) ของโครโมโซม จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกชนิดของการหัก และนับจำนวนหักตามชนิดการหัก ดังนี้

2.1 Single chromatid gap (SG) ความผิดปกติจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในโครมาทิด (chromatid) แท่งใดแท่งหนึ่ง แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาทิน (chromatin) ยึดให้เห็นเป็นเส้นบางๆ ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

2.2 Isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างขึ้นในส่วน ของโครมาทิดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้ อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาทิน ยึดให้เห็นบางๆ การนับจำนวนหักจะนับเป็น 2 หักต่อ 1 ISCG

2.3 Single chromatid breaks (SB) เป็นความผิดปกติที่มีโครมาทิดแท่งหนึ่งเกิดการหัก หรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง

และแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การนับจำนวนหักจะนับจำนวนที่หักเป็น 1 หักต่อ 1 SB

2.4 Isochromatid breaks (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาทิดทั้งสองแท่งเกิดการหัก หรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การนับจำนวนหักจะนับจำนวนที่หักเป็น 2 หักต่อ 1 ISCB

2.5 Translocation เป็นความผิดปกติที่มีการหักและต่อสลับของโครโมโซมต่างคู่กัน นับจำนวนหักเป็น 4 หักต่อ 1 translocation

2.6 Deletion คือการที่มีเนื้อโครโมโซมขาดหายไปจากแขนข้างใดข้างหนึ่ง ซึ่งจะนับเป็น 1 หักต่อ 1 deletion

ในการคำนวณจำนวนหักต่อเซลล์ (break per cell หรือ b/c) จะนับจำนวนหักทั้งหมดคำนวณหาค่าเฉลี่ยต่อเซลล์ในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา และนำเสนอโดยใช้ค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษาในทั้งสามซ้ำ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

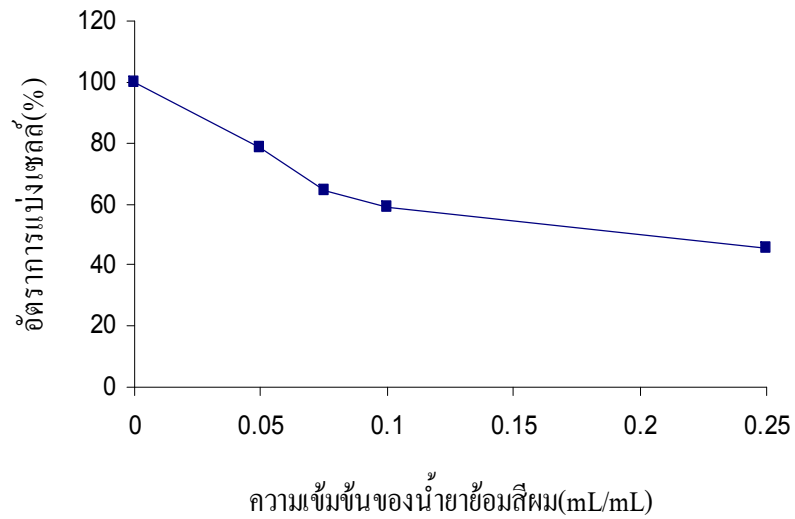
ผลการศึกษา และอภิปรายผลการศึกษา

จากการทดลองเบื้องต้นเพื่อทดสอบหาระดับความเข้มข้นของสารทดสอบ คือ น้ำยาย้อมสีผสมที่เหมาะสม เพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในหลอดทดลอง พบว่าควรใช้น้ำยาย้อมสีผสมที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 มิลลิตรต่อมิลลิตร และใช้สารไมโดมัยซิน-ซี ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร เป็น positive control โดยหดยดสารละลายในความเข้มข้นต่างๆ ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 5 ชั่วโมง เมื่อครบ 72 ชั่วโมง แล้วศึกษาเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟสเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งการศึกษาได้ผลดังนี้

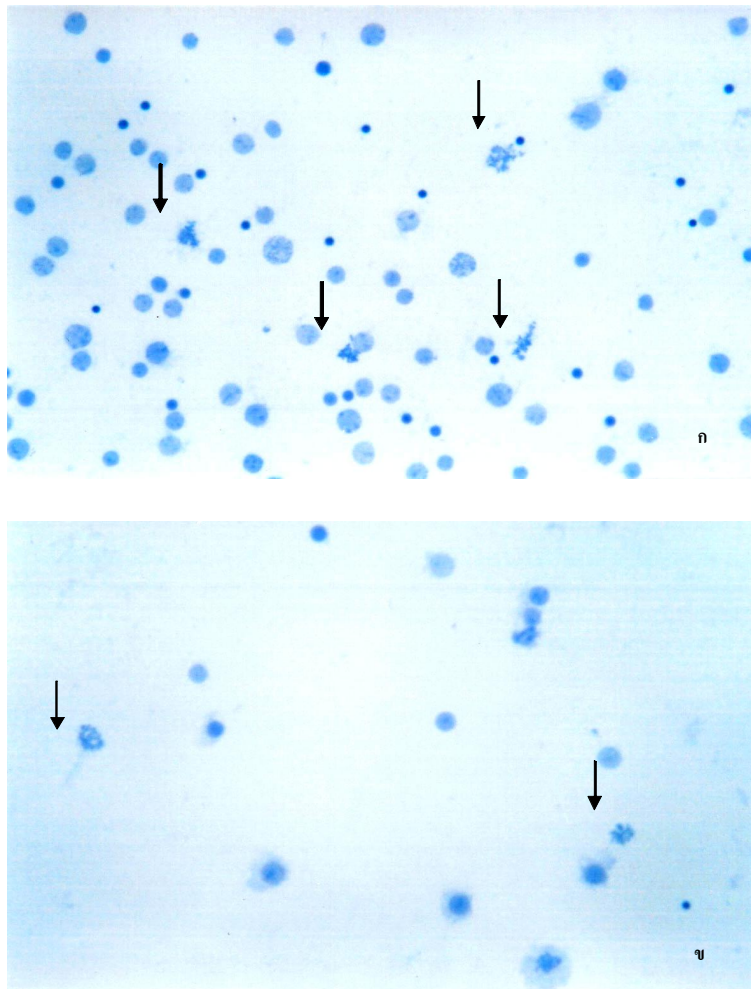
ผลของน้ำยาย้อมสีผสมที่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงอัตราการเกิดไมโทซิส โดยวิธีวัดค่าอัตราการแบ่งเซลล์

จากการศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2,000 เซลล์ในกลุ่มทดลองเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม พบว่า น้ำยาย้อมสีผสมสามารถทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารเคมีที่เพิ่มขึ้น โดยกลุ่ม ควบคุมมีอัตราการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มที่ทดลอง ด้วยน้ำยาย้อมสีผสมที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 มิลลิตรต่อมิลลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 78.59, 64.54, 58.70 และ 45.89 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ดังรูปที่ 1 และ แสดงตัวอย่างภาพเซลล์ระยะเมทาเฟสที่ใช้ในอัตรา การแบ่งเซลล์ ดังรูปที่ 2 ส่วนกลุ่ม positive control โดยใส่สาร ไมโดมัยซิน-ซีที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีค่าเฉลี่ยของอัตราการแบ่งเซลล์ เท่ากับ 53.37 เปอร์เซ็นต์ ดังรายละเอียดในตารางที่ 1

เมื่อนำค่าอัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลอง ทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเป็นรายคู่ พบว่า กลุ่มที่ทดลองด้วยน้ำยาย้อมสีผสมในทุกระดับความเข้มข้น และกลุ่ม positive control ซึ่งใส่สารไมโดมัยซิน-ซี ให้ค่าแตกต่างจากกลุ่ม negative control อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95



รูปที่ 1 ความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของน้ำยาหัยอัมสึมกับอัตราการแบ่งเซลล์คิดเป็นเปอร์เซ็นต์



รูปที่ 2 ปริมาณเซลล์ในระยะเมทาเฟส

ก. กลุ่มควบคุม (negative control)

ข. กลุ่มทดลองของน้ำยาหัยอัมสึมระดับความเข้มข้น 0.25 มิลลิตรต่อมิลลิตร
กำลังขยาย 200 เท่า (บริเวณที่ลูกศรชี้คือเซลล์ในระยะเมทาเฟส)

ตารางที่ 1 ค่าอัตราการแบ่งเซลล์เนื่องจากผลของน้ำยาย้อมสีผสมในระดับความเข้มข้นต่างๆ ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง

สารเคมี	ชนิดของกลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น (mL/mL)	mitotic index (%)			เฉลี่ย
			จำนวนซ้ำ			
			1	2	3	
น้ำยาย้อม สีผสม	negative control	0	100.00	100.00	100.00	100.00 ^a
	positive control	0.5 (µg/mL)	57.37	50.46	52.29	53.37 ^{de}
	กลุ่มทดลอง	0.05	76.72	84.32	74.74	78.59 ^b
		0.075	73.15	66.35	54.13	64.54 ^c
		0.1	60.67	64.97	50.46	58.70 ^{cd}
		0.25	41.47	47.00	49.19	45.89 ^c

หมายเหตุ.

ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วยการวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบ DMRT
ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลของน้ำยาย้อมสีผสมที่มีต่อการหักของโครโมโซม โดยวัดอัตราการหักของโครโมโซมคิดเป็นจำนวน break/cell (b/c)

สารเคมีที่ใช้ในชีวิตประจำวัน น้ำยาย้อมสีผสม ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมได้ เมื่อเทียบกับโครโมโซมมนุษย์ปกติ คือพบการหักของโครโมโซมได้ 4 แบบ คือ SG, ISCG, SB และ ISCB (รูปที่ 3) โดยอัตราการหักของโครโมโซมในกลุ่มควบคุม มีจำนวน break/cell เป็น 0.006 และกลุ่มทดลองที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีจำนวน break/cell เป็น 0.08, 0.10, 0.11 และ 0.13 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่ม positive control ซึ่งใส่สารไมโทมิซิน-ซี ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีการหักโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ คือ SB, SG และ ISCG (รูปที่ 4) โดยอัตราการหักของโครโมโซมเนื่องจาก ผลของไมโทมิซิน-ซี มีจำนวน break/cell เป็น 0.20 ดังข้อมูลในตารางที่ 2

เมื่อนำค่าเฉลี่ยอัตราการหักของโครโมโซมของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเป็นรายคู่ พบว่า กลุ่มที่ทดลองด้วยน้ำยาย้อมสีผสมในทุกระดับความเข้มข้น ให้ค่าอัตราการหักของโครโมโซมแตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

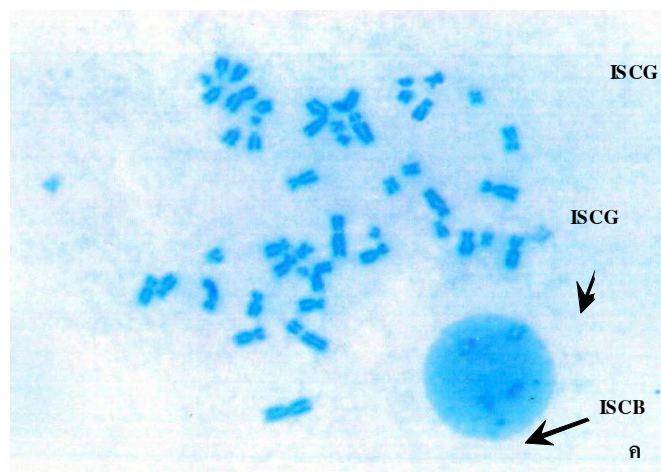
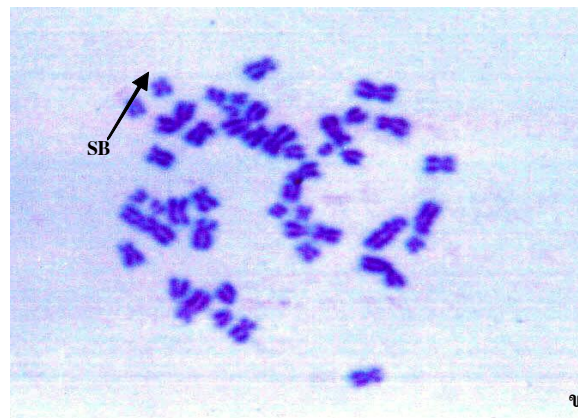
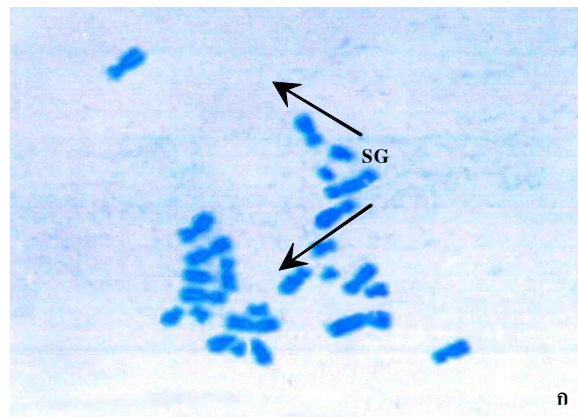
จากการทดสอบความเป็นพิษของ น้ำยาย้อมสีผสม ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่า เมื่อเซลล์เม็ดเลือดขาวได้รับน้ำยาย้อมสีผสมที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 5 ชั่วโมง ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่า อัตราการแบ่งเซลล์จะลดลง แปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารเคมีที่เพิ่มขึ้น ทั้งนี้ อาจเกิดจากในระดับความเข้มข้นและช่วงเวลาดังกล่าว การเจริญของเซลล์ภายหลังถูกกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ ถูกขัดขวางโดยปฏิกิริยาของสารเคมี และในลักษณะเดียวกันความผิดปกติของโครโมโซมก็จะเพิ่มขึ้น เมื่อได้รับสารเคมีในปริมาณที่สูงขึ้น โดยความผิดปกตินี้จะแสดงอยู่ในรูปของการหักของโครโมโซม พบว่าจากการทดลองนี้ สารเคมีที่ใช้น้ำยาย้อมผสม สามารถชักนำให้โครโมโซมเกิดการหักได้ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยของ Cho et al.

(2003) ที่ตรวจพบความเสียหายของโครโมโซมในการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ซึ่งวิเคราะห์โดยวิธีโคเมท (Comet assay) จากผู้ทดสอบที่ได้รับ การย้อมสีผสม 20 คน นอกจากนี้ ยังมีรายงานถึง การเป็นสารก่อกลายพันธุ์ของสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบในน้ำยาย้อมสีผสม โดยการทดสอบเอมส์ และจากการศึกษาผู้ทดสอบที่ได้รับการย้อมผสมพบว่า 6 คน ในผู้ทดสอบ 14 คน แสดงการเพิ่มของ อัตราการแลกเปลี่ยนโครมาติด (Sister-chromatid exchanges, SCE) หลังจากได้รับยาผสมผสมนาน 6 ชั่วโมง (Kirkland et al., 1981)

การหักของโครโมโซมที่พบในการทดลองนี้ พบได้เป็น 4 แบบ คือ single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks และ isochromatid breaks ซึ่งความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้นนี้ Andersson และ Kihlman (1989) ได้กล่าวว่า อาจเป็นผลมาจากการที่เซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมที่ทำให้ผิดปกติ ถ้าเกิดขึ้นในช่วง G₁ ของวัฏจักรเซลล์อันเป็นระยะก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ โครโมโซมในช่วงนี้ยังเป็นเส้นเดี่ยว จะเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome type aberrations แต่ถ้าเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมในช่วง S และ G₂ จะเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromatid type aberrations ได้

สรุปผลการศึกษา

จากการศึกษาผลของสารเคมีที่ใช้ในชีวิตประจำวัน น้ำยาย้อมสีผสม ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ โดยใช้น้ำยาย้อมสีผสมที่ระดับความเข้มข้น 0.05, 0.075, 0.1 และ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะ 5 ชั่วโมง ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ เมื่อครบ 72 ชั่วโมง พบว่า น้ำยาย้อมสีผสมมีผลทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงซึ่งแปรผันโดยตรงกับความเข้มข้นของสารเคมีในน้ำยาย้อมสีผสมที่เพิ่มขึ้น และเมื่อนำค่าอัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเป็นรายคู่ พบว่ากลุ่มที่ทดลองด้วยน้ำยาย้อมสีผสมในทุกระดับความเข้มข้น ให้ค่าอัตราการแบ่งเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

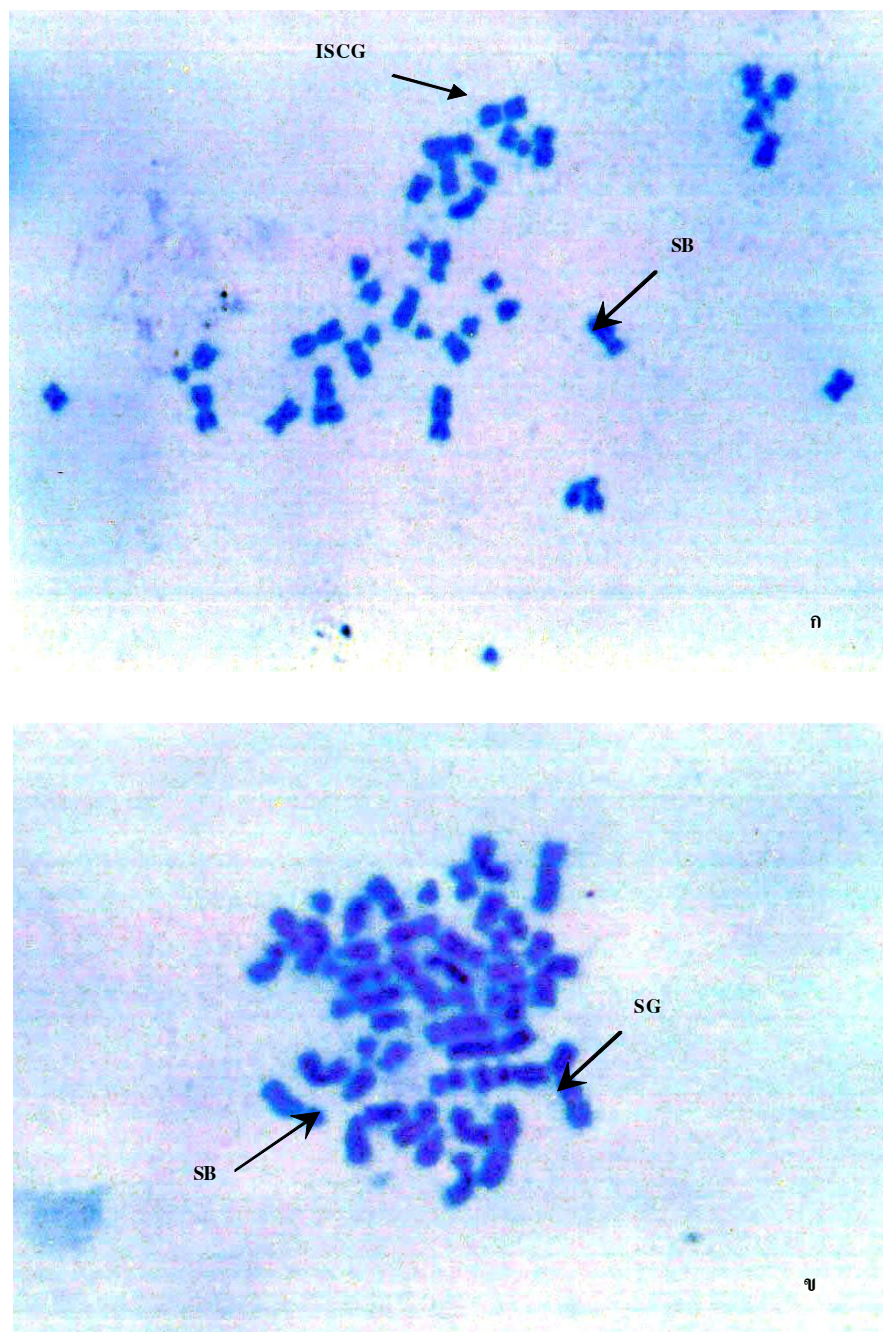


รูปที่ 3 ลักษณะของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสที่ผิดปกติซึ่งเป็นผลมาจากน้ำยาอ้อมสีผสม (บริเวณที่ลูกศรชี้ คือบริเวณที่มีความผิด)

ก. ความผิดปกติแบบ Single chromatid gap (SG) จากระดับความเข้มข้น 0.05 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม

ข. ความผิดปกติแบบ Single chromatid break (SB) จากระดับความเข้มข้น 0.1 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม

ค. ความผิดปกติแบบ Isochromatid gap (ISCG) และ Isochromatid breaks (ISCB) จากระดับความเข้มข้น 0.075 มิลลิกรัมต่อมิลลิกรัม



รูปที่ 4 ลักษณะของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสที่ผิดปกติ ซึ่งเป็นผลมาจากไมโทมัยซิน-ซี ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร (บริเวณที่ลูกศรชี้คือบริเวณที่มีความผิดปกติ)

ก. ความผิดปกติแบบ Isochromatid gap (ISCG) และ Single chromatid breaks (SB)

ข. ความผิดปกติแบบ Single chromatid gap (SG) และ Single chromatid breaks (SB)

ตารางที่ 2 อัตราการหักของโครโมโซมเนื่องจากผลของน้ำยาย้อมสีผสม ในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ คิดเป็นจำนวน break/cell โดยนับจำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ต่อแต่ละหน่วยทดลอง

สารเคมี	ชนิดของกลุ่มทดลอง	ความเข้มข้น (mL/mL)	อัตราการหักของโครโมโซม (b/c)			
			จำนวนซ้ำ			เฉลี่ย
			1	2	3	
น้ำยาย้อม	negative control	0	0	1	0	0.006 ^a
สีผสม	positive control	0.5 (µg/mL)	10	13	7	0.20 ^c
	กลุ่มทดลอง	0.05	2	5	5	0.08 ^b
		0.075	6	4	5	0.10 ^b
		0.1	7	4	6	0.11 ^b
		0.25	7	6	7	0.13 ^b

หมายเหตุ.

ค่าเฉลี่ยตามด้วยตัวอักษรที่เหมือนกันตามแนวตั้งไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติด้วยการวิเคราะห์เปรียบเทียบแบบ DMRT ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การศึกษาความผิดปกติของโครโมโซม พบว่า น้ำยาย้อมสีผสม สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการหักของโครโมโซมแบบ structural chromosome aberration ตามลักษณะการหักเป็น 4 แบบ คือ single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks และ isochromatid breaks โดยความผิดปกติของโครโมโซมจะเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์ได้รับสารเคมีในน้ำยาย้อมสีผสมที่ความเข้มข้นสูงขึ้น และเมื่อนำค่าเฉลี่ยอัตราการหักของโครโมโซมของกลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองทุกระดับความเข้มข้นไปวิเคราะห์ความแตกต่างทางสถิติเป็นรายคู่ พบว่า กลุ่มที่ทดลองด้วยน้ำยาย้อมสีผสมในทุกระดับความเข้มข้น ให้ค่าแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ดังนั้นสารเคมีที่ใช้ในชีวิตประจำวันชนิดนี้ จึงจัดเป็นสารประเภท clastogen คือ ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซมได้ และส่งผลทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของโครโมโซมในอาหารเพาะเลี้ยงได้

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสถาบันวิจัยและพัฒนาแห่งมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้ทุนอุดหนุนในการดำเนินงานวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

จุไรรัตน์ เกิดดอนแฝก. (2537). *ภัยมืดจากสารพิษ*. กรุงเทพฯ: เค. ยู. บุ๊คเซ็นเตอร์.

สุนทรี สิงหบุตร. (2541). *พิษรอบตัว การรักษาและการแก้พิษ*. กรุงเทพฯ: บริษัท เอ. ที. แอนด์ เอ็น อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด.

สุนันท์ สมุทคุปดี. (2527). *สิ่งก่อกลายพันธุ์ในสิ่งแวดล้อม*. กรุงเทพฯ: เอกสารประกอบการสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 4. ชมรมพันธุศาสตร์แห่งประเทศไทย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

เสาวคนธ์ ธนสมบัติ. (2530). *การเปรียบเทียบผลของ Mitomycin*

-c ที่มีผลต่อโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนปกติ และคนที่ เป็นมะเร็งตับในหลอดทดลอง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

อมรา คัมภีรานนท์. (2546). *พันธุศาสตร์ของเซลล์*. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Andersson, H. C. & Kihlman, B. K. (1989). Carcinogenesis. *Oxford Journal*, 10, 123-130.

Bracher, M., Faller, C., Grotzsch, W., Marshall, R., & Spengler, J. (1990). Studies on the potential mutagenicity of p-phenylene-diamine in oxidative hair dye mixtures. *Mutation Research*, 241, 313-323.

Cho, J. A., Oh, E., Lee, E., & Sul, D. (2003). Effects of hair dyeing on DNA damage in human lymphocytes. *Journal of Occupational Health*, 45, 376-381.

Garigue, J. C., Ballantyne, M., Kumaravel, T., Lloyd, M., Nohynek, G. J., Kirkland, D., et al. (2006). In vitro genotoxicity of para-phenylenediamine and its N-monoacetyl or N, N -diacetyl metabolites. *Mutation Research*, 608, 58-71.

Kirkland, D. J., Honeycombe, J. R., Lawler, S. D., Venitt, S., & Crofton-Sleigh, C. (1981). Sister-chromatid exchanges before and after hair dyeing. *Mutation Research*, 90, 279-286.