

การทดสอบไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6

ด้วยสิ่งก่อการกลาย

Micronucleus and Chromosome Aberration Assays in TK6 Cells by Mutagens

คำนำ

การทำลายสารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอ (DNA damage) ภายในเซลล์ อาจเกิดจากการได้รับอันตรายจากปัจจัยทางกายภาพ (physical agent) ได้แก่ รังสี แสงอัลตราไวโอเลต และปัจจัยทางเคมี (chemical agent) ได้แก่ สารพิษที่มีผลต่อดีเอ็นเอ (genotoxin) อันเป็นสาเหตุสำคัญของการเปลี่ยนแปลงสารพันธุกรรมในนิวเคลียส และมีผลโดยตรงต่อความผิดปกติหรือการทำลายของสารพันธุกรรมโดยเฉพาะเซลล์ยูแคริโอติก นอกจากนี้ genotoxin ยังเป็นสาเหตุของความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome abnormality) เช่น การแตกหักของโครโมโซม (chromosome fragment) การจัดเรียงตัวใหม่ของโครโมโซม (chromosome rearrangement) หรือการสูญหายของโครโมโซม (chromosome loss) เป็นต้น รวมทั้งเกิดจากความผิดปกติของเส้นใยสปินเดิล (spindle fiber) และเซนโทรเมียร์ (centromere) ซึ่งความผิดปกติดังกล่าวเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคมะเร็งหรือการชราภาพ (aging) ของเซลล์ (Fenech, 2000)

Heddle (1973) และ Schmid (1975) ศึกษาโครโมโซมที่ถูกทำลาย โดยประเมินผลจากการเกิดไมโครนิวเคลียส (micronucleus) ในเซลล์ไขกระดูกและเม็ดเลือดแดงจากหลอดเลือดในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ต่อมาได้พัฒนาวิธีการมาทดสอบในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงนอกร่างกาย (*in vitro*)

ไมโครนิวเคลียสเกิดจากชิ้นส่วนที่เสียหายของดีเอ็นเอหรือชิ้นส่วนโครโมโซมที่แตกหัก หรืออาจเกิดจากโครมาติดที่สูญหายเนื่องจากความผิดปกติของเส้นใยสปินเดิล ทำให้โครโมโซมบางส่วนไม่ถูกดึงไปรวมกับกลุ่มอื่น ๆ ที่แต่ละขั้วของเซลล์ขณะที่เซลล์กำลังแบ่งตัวในระยะแอนาเฟส เมื่อผ่านระยะนี้ไปแล้วชิ้นส่วนของดีเอ็นเอหรือแท่งโครโมโซมที่แตกหักดังกล่าวจะถูกห่อหุ้มด้วยเยื่อบางๆ คล้ายก้อนนิวเคลียส และปรากฏอยู่ในไซโทพลาซึมของเซลล์แต่มีขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลัก (main nucleus) ของเซลล์มาก จึงเรียกว่า ไมโครนิวเคลียส (micronucleus) และใช้เป็นตัวบ่งชี้การเกิดการทำลายโครโมโซม (Fenech and Morley, 1985a; 1985b)

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมใน TK6 cell line (ATCC CRL-8015) ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์แล้วเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ mitomycin C (MMC), methyl methanesulfonate (MMS) และ etoposide (VP-16) ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาต่างๆ กัน โดยตรวจและวิเคราะห์ผลการเกิดไมโครนิวเคลียสจากเซลล์ระยะที่เป็น binucleated cell ด้วยวิธี cytokinesis-block และการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมตรวจวิเคราะห์ผลในเซลล์ระยะเมทาเฟส จากนั้นเปรียบเทียบความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส และอัตราความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้น

การศึกษาไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมในห้องปฏิบัติการนานาชาติมักใช้ V79 cell line เพราะได้รับการยอมรับจาก Guideline for testing of chemicals (OECD) ในขณะที่ TK6 cell line ได้รับการระบุให้เป็นเซลล์มาตรฐานใช้สำหรับการทดสอบความเป็นพิษต่อดีเอ็นเอด้วยวิธี Single cell gel electrophoresis (SCGE) หรือ Comet assay (international workshop on genotoxicity testing; IWGT) (Thailand Institute of Scientific and Technological Research, 2005) ซึ่งผลจากการศึกษาในครั้งนี้จะได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ในการพิจารณาเลือกใช้ TK6 cell line เป็นทางเลือก (alternative) ในการทดสอบความเป็นพิษต่อดีเอ็นเอด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมด้วย

วัตถุประสงค์

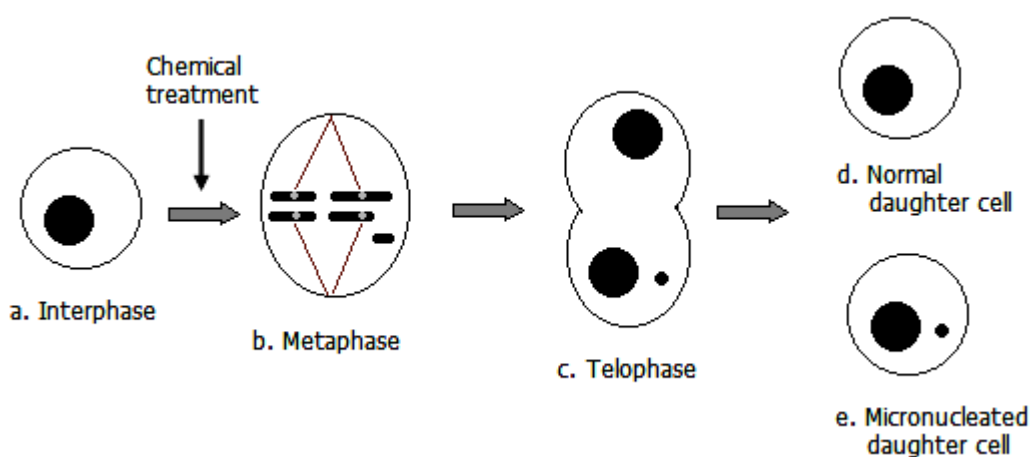
ศึกษาผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ TK6 เพื่อพิจารณาเลือกใช้เซลล์ชนิดนี้ในการทดสอบสารพิษต่อ
ดีเอ็นเอ โดย

1. เปรียบเทียบอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำของสารเคมี
ที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ต่างกัน
2. เปรียบเทียบอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำ
ของสารเคมีที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ต่างกัน
3. เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของ
โครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำของสารเคมีที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาดังกัน

การตรวจเอกสาร

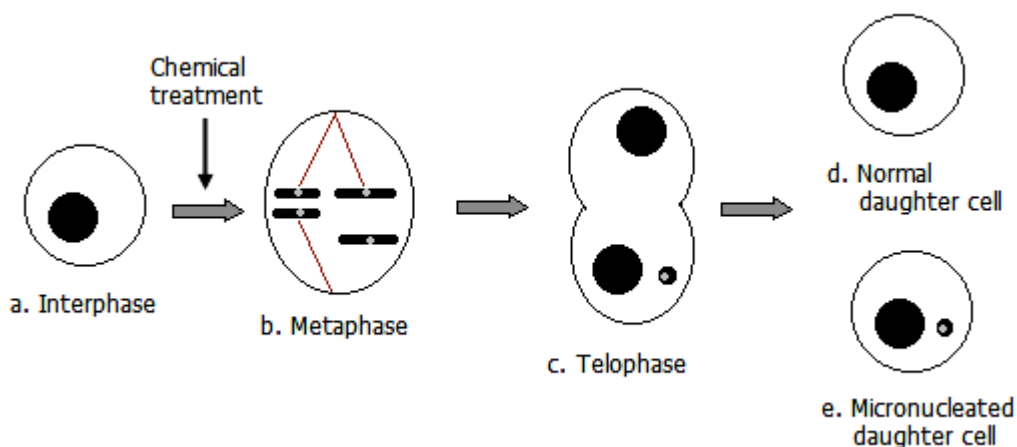
1. การเกิดไมโครนิวเคลียส

ไมโครนิวเคลียส คือ นิวเคลียสขนาดเล็กที่แยกตัวออกมาจากนิวเคลียสหลักของเซลล์ ไมโครนิวเคลียสจะเกิดขึ้นขณะที่เซลล์เข้าสู่ระยะเทโลเฟสของการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสและไมโอซิส เมื่อโครโมโซมมีความเสียหาย เช่น เกิดการแตกหักเป็นชิ้นสั้นๆ แบบ acentric fragment (ภาพที่ 1) หรืออาจเป็นโครโมโซมทั้งแท่งที่ไม่ถูกดึงไปรวมที่ขั้วใดขั้วหนึ่งของเซลล์ในระยะแอนาเฟส เมื่อเข้าสู่ระยะเทโลเฟสจะมีการสร้างเยื่อหุ้มนิวเคลียส รวมทั้งสร้างเยื่อหุ้มรอบชิ้นส่วนที่หัก และโครโมโซมที่แยกออกไป ปรากฏเป็นก้อนนิวเคลียสขนาดเล็ก ดังภาพที่ 2 (Aardema and Volders, 2001)



ภาพที่ 1 การเกิดไมโครนิวเคลียสแบบ acentric fragment a. เซลล์เกิดอันตรายในระยะอินเตอร์เฟส b. การแตกหักและสูญหายของชิ้นส่วนโครโมโซมแบบ acentric fragment ในระยะเมทาเฟส c. เกิดนิวเคลียสขนาดเล็กในเซลล์ระยะเทโลเฟส d. เซลล์ใหม่ที่ปกติ e. เซลล์ใหม่ที่มีไมโครนิวเคลียส

ที่มา: Aardema and Volders (2001)



ภาพที่ 2 การเกิดไมโครนิวเคลียสจากการสูญหายของดีเอ็นเอแบบโครโมโซมทั้งแท่งไม่ถูกดึงไปรวมกลุ่ม a. เซลล์เกิดอันตรายในระยะอินเตอร์เฟส b. เส้นใยสปินเดิลเกิดอันตรายทำให้โครโมโซมบางแท่งไม่ถูกดึงแยกไปสู่ขั้วของเซลล์ c. เกิดนิวเคลียสขนาดเล็กในเซลล์ระยะเทโลเฟส d. เซลล์ใหม่ที่ปกติ e. เซลล์ใหม่ที่มีไมโครนิวเคลียสที่มีเซนโทรเมียร์

ที่มา: Aardema and Volders (2001)

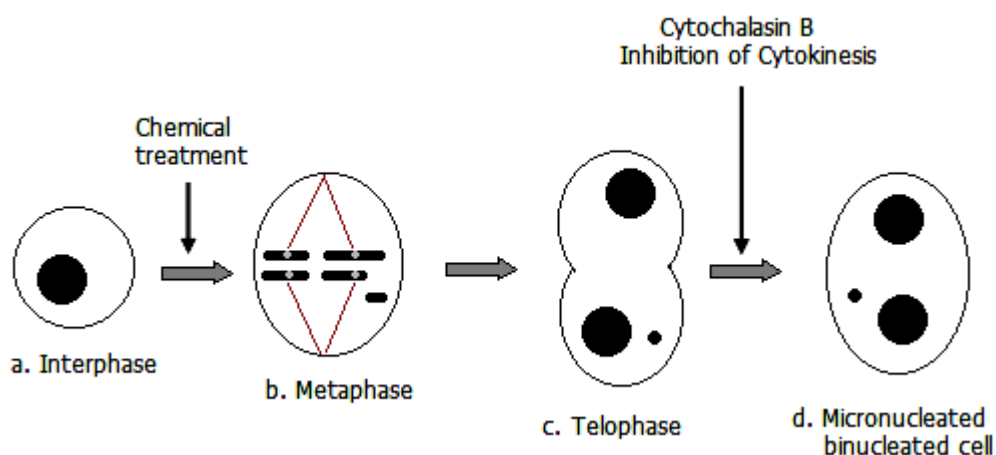
ลำดับขั้นตอนการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์มีบทบาทสำคัญต่อการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม เมื่อไมโครนิวเคลียสนั้นมียับยั้งการเกิดมะเร็ง (tumor suppressor gene) รวมอยู่ด้วย จะทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของ tumor suppressor gene และถ้าไมโครนิวเคลียสนั้นสูญหายไป ก็จะนำไปสู่การเปลี่ยนแปลงของเซลล์และถือเป็นจุดเริ่มต้นของการเข้าสู่กระบวนการเกิดมะเร็ง (carcinogenesis) แต่อย่างไรก็ตามถ้าเซลล์ที่เกิดไมโครนิวเคลียสนั้นยังไม่ตาย หรือมีการซ่อมแซมโครมาตินที่เสียหายใหม่ หรือถ้าโครมาตินในไมโครนิวเคลียสนั้นเกิดกระบวนการทรานสคริปชัน (transcription) ได้ง่าย การเกิดไมโครนิวเคลียสอาจไม่นำไปสู่การเกิดมะเร็งก็ได้ ส่วนการทดสอบการกลายพันธุ์เนื่องจากการเกิดไมโครนิวเคลียสสามารถเกิดได้เองไม่เกี่ยวกับการเกิดเนื้องอกหรือการเกิดมะเร็ง (Stopper and Muller, 1997)

ปัจจัยที่มีผลต่ออัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส

อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสศึกษาได้จากเซลล์ที่จะเข้าสู่ระยะเทโลเฟสวิธีการนี้ง่ายและไม่ซับซ้อน โดยใช้เทคนิคประเมินผลจากการเกิดไมโครนิวเคลียส ในระยะแรกเริ่มศึกษาในสัตว์ทดลองโดยนำเซลล์ในไขกระดูกและเซลล์เม็ดเลือดจากหลอดเลือดมาใช้ หลังจากนั้นทดลองใช้

เซลล์ชนิดอื่นมาทดสอบด้วยวิธีการเดียวกัน จนในที่สุดได้มีการพัฒนามาทดสอบกับเซลล์
เพาะเลี้ยงภายนอกร่างกาย (Heddle, 1973; Schmid, 1975)

การศึกษาการเกิดไมโครนิวเคลียสภายนอกร่างกาย จำเป็นต้องตรวจวิเคราะห์ผลเฉพาะ
เซลล์ที่มีการแบ่งเซลล์เท่านั้น เพราะจะสังเกตเห็นไมโครนิวเคลียสได้ภายหลังการแบ่งเซลล์ ซึ่ง
ต่างจากการศึกษาการเกิดไมโครนิวเคลียสภายในร่างกายที่ตรวจวิเคราะห์ผลในเซลล์ที่มีการแบ่ง
เซลล์และเจริญเติบโต พร้อมทั้งเซลล์อาจมีการเปลี่ยนสภาพไปจากเดิม (cell differentiation) ใน
เซลล์เพาะเลี้ยงก็อาจเกิดขึ้นได้เช่นเดียวกัน ดังนั้น Fenech and Morley (1985a; 1985b) จึงใช้
เทคนิคยับยั้งการเกิดไซโทไคเนซิส (cytokinesis) โดยใช้สารเคมี คือ ไซโทคาลาซิน บี (cytochalasin
B) ซึ่งเป็นเมแทบอไลต์ของเชื้อรา *Helminthosporium denmatioideum* สารนี้ไม่มีผลต่อการแบ่ง
นิวเคลียสของเซลล์ แต่จะมีผลยับยั้งการแบ่งไซโทพลาซึมออกเป็นเซลล์ใหม่สองเซลล์ เซลล์จึงมี
สองนิวเคลียสภายในเซลล์เดียวกัน เรียกเซลล์แบบนี้ว่า binucleated cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ใช้ในการ
วิเคราะห์อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส (ภาพที่ 3) แต่ถ้าเซลล์ไม่ถูกแบ่งมาก่อนเซลล์จะมีนิวเคลียส
เดียว (mononucleated cell) และถ้าเกิดการแบ่งเซลล์หลายครั้งเซลล์จะมีหลายนิวเคลียส
(multinucleated cell) (Aardema and Volders, 2001)



ภาพที่ 3 การเกิดไมโครนิวเคลียสใน binucleated cell จากการเติมไซโทคาลาซิน บี ลงไปในเซลล์
ที่เกิดอันตราย a. เซลล์เกิดอันตรายในระยะอินเทอร์เฟส b. โครโมโซมแตกหักแบบ
acentric fragment ในระยะเมทาเฟส c. เซลล์ในระยะเทโลเฟสได้รับไซโทคาลาซิน บี
d. เซลล์มีไมโครนิวเคลียส

ที่มา: Aardema and Volders (2001)

2. การนับ binucleated cell

การนับ binucleated cell ที่มีไมโครนิวเคลียสเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญมากเพราะใช้ในการพิจารณาว่ามีการทำลายสารพันธุกรรมของเซลล์มากน้อยเพียงใด มีเกณฑ์การนับเซลล์ดังนี้ (Fenech *et al.*, 2003)

2.1 นับ binucleated cell อย่างน้อย 1,000 เซลล์ต่อหนึ่งความเข้มข้นของสารที่ทดสอบ

2.2 แยก binucleated cell ที่มีไมโครนิวเคลียสตั้งแต่ 0, 1 หรือมากกว่า 1 ไมโครนิวเคลียสออกจากกัน

2.3 หาจำนวน binucleated cell ที่มีไมโครนิวเคลียสต่อ 1,000 binucleated cell

2.4 นับเซลล์ที่เป็น mononucleated, binucleated, trinucleated และ tetranucleated cell ต่อ 1,000 เซลล์

3. หลักเกณฑ์การคัดเลือกและนับเซลล์เพื่อประเมินผลเทคนิคไมโครนิวเคลียส

หลักเกณฑ์การคัดเลือกเซลล์เพื่อใช้ประเมินผลเทคนิคไมโครนิวเคลียส มีรายละเอียดดังนี้ (Fenech *et al.*, 2003)

3.1 เกณฑ์การคัดเลือก binucleated cell

เทคนิคไมโครนิวเคลียสที่ใช้เทคนิค cytokinesis-blocked cell มาช่วยนั้นต้องนับไมโครนิวเคลียสที่เกิดในเซลล์ดังนี้ (ภาพที่ 4)

3.1.1 ต้องเป็นเซลล์ที่มี 2 นิวเคลียส

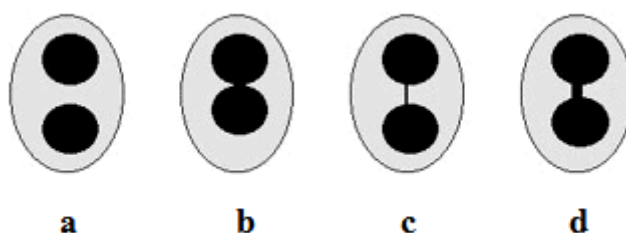
3.1.2 ทั้ง 2 นิวเคลียสต้องอยู่ภายในขอบเขตของไซโทพลาซึมเดียวกัน

3.1.3 ทั้ง 2 นิวเคลียสต้องมีขนาดเท่าๆ กัน และมีความเข้มของการติดสีเข้มเท่าๆ กันด้วย

3.1.4 ระหว่างนิวเคลียสทั้งสองอาจเกิดบริเวณที่เชื่อมต่อกันเป็นสะพานเรียกว่า nucleoplasmic bridge ซึ่งมีความกว้างไม่เกินหนึ่งในสี่ของนิวเคลียสภายในเซลล์

3.1.5 นิวเคลียสทั้งสองอาจสัมผัสกันได้แต่ไม่ซ้อนทับกัน หรือถ้าซ้อนทับกันจะนับเป็น binucleated cell ได้ก็ต่อเมื่อเห็นขอบเขตของนิวเคลียสแต่นิวเคลียสแยกออกจากกันอย่างชัดเจน

3.1.6 ขอบเขตของไซโทพลาซึมหรือเยื่อหุ้มเซลล์ของ binucleated cell ต้องแยกออกจากเซลล์ที่อยู่ใกล้เคียงกันอย่างชัดเจน



ภาพที่ 4 เกณฑ์การเลือก binucleated cell ในการทำ cytokinesis - block micronucleus assay

a. binucleated cell ที่ดี b. binucleated cell ที่นิวเคลียสทั้งสองสัมผัสกัน c. binucleated cell ที่มี nucleoplasmic bridge d. binucleated cell ที่มี nucleoplasmic bridge กว้างกว่า c

ที่มา: Fenech *et al.* (2003)

3.2 เกณฑ์การคัดเลือกไมโครนิวเคลียส

ไมโครนิวเคลียสมีรูปร่างและขนาดเล็กกว่านิวเคลียสหลักของเซลล์ที่อยู่ภายในเซลล์เดียวกัน ดังภาพที่ 5 และบางเซลล์มีโครงสร้างคล้ายกับไมโครนิวเคลียสแต่มิฉะนั้นเป็นไมโครนิวเคลียส ดังภาพที่ 6 โดยไมโครนิวเคลียสมีลักษณะดังนี้

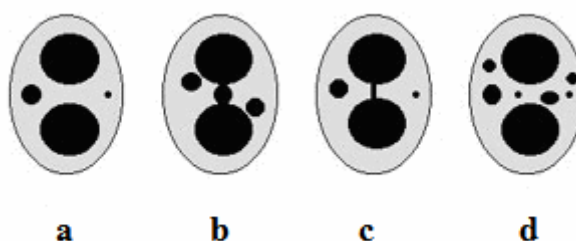
3.2.1 มีขนาดอยู่ระหว่างหนึ่งในสิบหกถึงหนึ่งในสามของนิวเคลียสหลักของ binucleated cell เดียวกัน

3.2.2 ไมโครนิวเคลียสต้องต่างจากรอยจุดที่เกิดจากการย้อมสี (artifact)

3.2.3 ไมโครนิวเคลียสต้องไม่เชื่อมติดหรือต่อเนื่องกับนิวเคลียสหลักของ binucleated cell

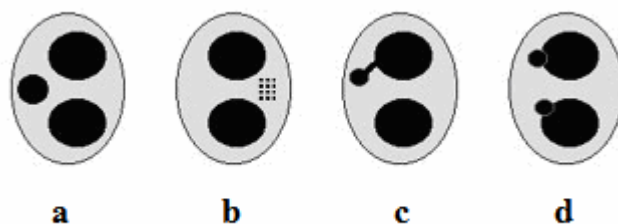
3.2.4 ไมโครนิวเคลียสอาจสัมผัสกับนิวเคลียสหลักของเซลล์ได้แต่ต้องไม่ซ้อนทับกัน และมีขอบเขตของนิวเคลียสแต่ละนิวเคลียสแยกจากกันอย่างชัดเจน

3.2.5 ไมโครนิวเคลียสควรติดสีเข้มกว่าหรือเท่ากับนิวเคลียสหลักของ binucleated cell



ภาพที่ 5 ไมโครนิวเคลียสที่พบใน binucleated cell a. เซลล์ที่มี 2 ไมโครนิวเคลียส มีขนาดตั้งแต่หนึ่งในเก้าถึงหนึ่งในสามเมื่อเทียบกับนิวเคลียสหลักของเซลล์ b. ไมโครนิวเคลียสที่สัมผัสกับนิวเคลียสหลักแต่ไม่ซ้อนทับกัน c. nucleoplasmic bridge ระหว่างนิวเคลียสหลัก และมีไมโครนิวเคลียส 2 ไมโครนิวเคลียส d. ไมโครนิวเคลียสขนาดแตกต่างกัน 6 ไมโครนิวเคลียส

ที่มา: Fenech *et al.* (2003)



ภาพที่ 6 binucleated cell ที่มีโครงสร้างคล้ายไมโครนิวเคลียสแต่ไม่นับเป็นไมโครนิวเคลียส
 a. เซลล์ที่มี 3 นิวเคลียส นิวเคลียสที่มีขนาดเล็กที่สุดใหญ่กว่าหนึ่งในสามเมื่อเทียบกับนิวเคลียสอื่นในเซลล์เดียวกัน b. การเกิดเป็นจุดในไซโทพลาซึม c. นิวเคลียสโป่งออกคล้ายไมโครนิวเคลียสและมี nucleoplasmic bridge เชื่อมต่ออยู่กับนิวเคลียสหลัก
 d. นิวเคลียสที่โป่งออกและเชื่อมติดกับนิวเคลียสหลัก

ที่มา : Fenech *et al.* (2003)

4. ความผิดปกติของโครโมโซม (chromosome aberration)

ความผิดปกติของโครโมโซมอาจแบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2539) คือ

4.1 ความผิดปกติของโครโมโซมทางด้านจำนวน (numerical aberration) หมายถึง จำนวนโครโมโซมที่เบี่ยงเบนหรือผิดไปจากจำนวนโครโมโซมของคนปกติ (เซลล์ทั่วไปของคนปกติมีโครโมโซม 46 แท่ง หรือ $2n$ เรียกว่า diploid และเซลล์สืบพันธุ์มีจำนวนโครโมโซม 23 แท่ง หรือ $1n$ เรียกว่า haploid) ความผิดปกติของโครโมโซมทางด้านจำนวน ได้แก่

4.1.1 aneuploidy หมายถึงการที่เซลล์มีจำนวนโครโมโซมเพิ่มขึ้นหรือลดลงจากจำนวนปกติ เช่น $2n-1$ (monosomy) สูญเสียโครโมโซมไป 1 แท่ง หรือ $2n+1$ (trisomy) มีโครโมโซมเพิ่มมา 1 แท่ง เป็นต้น

4.1.2 euploidy หมายถึงความผิดปกติที่มีจำนวนโครโมโซมเกินหรือขาดทั้งชุด เช่น $3n$ (triploid) มีโครโมโซมเกินมา $1n$ หรือ $4n$ (tetraploid) มีโครโมโซมเกินมา $2n$ เป็นต้น

4.2 ความผิดปกติของโครโมโซมทางด้านรูปร่างและโครงสร้าง (structural aberration) เป็นความผิดปกติที่เกิดขึ้นหลังจากที่โครโมโซมมีการแตกหักหรือหลุดออก และเมื่อมีการเชื่อมชิ้นส่วนเข้ามาใหม่แต่ไม่สมบูรณ์ หรือมีการเรียงตัวกันใหม่ หรืออาจเชื่อมชิ้นส่วนของโครโมโซมคู่ที่ต่างกัน ทำให้โครโมโซมที่เกิดขึ้นนี้มีรูปร่างและโครงสร้างที่ผิดไปจากเดิม การแตกหักของโครโมโซมนี้อาจเกิดขึ้นเอง หรือเป็นผลโดยตรงจากสารเคมี (ชัยวัฒน์ และคณะ, 2539) โดยสามารถแบ่งความผิดปกติของโครโมโซมทางด้านรูปร่างและโครงสร้างได้เป็น 2 ประเภท (นาถนภิส, 2540) คือ

4.2.1 ความผิดปกติแบบโครโมโซม (chromosome type aberration) แบ่งออกเป็น 7 แบบ คือ

- 1) acentric fragment เกิดจากส่วนปลายของโครโมโซมชนิดที่ไม่มีเซนโทรเมียร์ขาดออกเป็นท่อน
- 2) minutes เป็นความผิดปกติที่คล้ายกับ acentric fragment แต่มีขนาดเล็กกว่า
- 3) acentric ring เป็นลักษณะที่โครโมโซมขาดเป็นวงแหวนส่วนที่เป็นวงแหวนไม่มีเซนโทรเมียร์รวมอยู่ด้วย
- 4) centric ring เป็นลักษณะที่โครโมโซมขาดเป็นวงแหวนคล้ายกับ acentric ring แต่ส่วนที่เป็นวงแหวนมีเซนโทรเมียร์รวมอยู่ด้วย ความผิดปกติของโครโมโซมแบบวงแหวนนี้เกิดจากโครโมโซมขาดพร้อมๆ กันที่ปลายทั้ง 2 ข้าง ปลายส่วนที่เหลือเหนียวและมีโอกาสย้อนมาติดเป็นวงแหวน เรียกว่า โครโมโซมแบบวงแหวน (ring chromosome) (Levinton and Montagu, 1978)
- 5) pericentric inversion เกิดจากการแตกหักของโครโมโซมแล้วมีการสลับที่โดยมีเซนโทรเมียร์รวมอยู่ด้วย
- 6) reciprocal translocation เกิดจากการแตกหักของโครโมโซมทั้ง 2 คู่ ชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ขาดออกจากกัน ไปต่อกับอีกโครโมโซมหนึ่งโดยสลับคู่กัน

7) dicentric chromosome และ acentric chromosome เป็นโครโมโซมแบบสองเซนโทรเมียร์ซึ่งเกิดจากโครโมโซมสองแท่งที่ไม่ใช่คู่กันแตกหักที่ส่วนปลาย (terminal deletion) ทำให้เกิดปลายเหี่ยวที่แขนของโครโมโซมทั้งสองแท่ง ต่อมาแขนด้านปลายเหี่ยวของโครโมโซมทั้งสองแท่งมาเชื่อมต่อกันเป็นโครโมโซมที่มีสองเซนโทรเมียร์ และโครมาทิดส่วนปลายที่แตกหักมาอยู่คู่กันเป็นสองโครมาทิดโดยไม่มีเซนโทรเมียร์ (Herskowitz, 1977)

4.2.2 ความผิดปกติแบบโครมาทิด (chromatid type aberration) แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1) chromatid break เป็นการแตกหักของโครมาทิดที่อาจเกิดจากสิ่งก่อการกลายเข้าไปเกาะกับดีเอ็นเอตรงตำแหน่งคือออกซีกัวโนซีน (deoxyguanosine) ทำให้เกิดอันตรายต่อสายดีเอ็นเอ และเป็นสาเหตุให้แท่งโครมาทิดแตกหัก (Goldberg, 1965) หรือแท่งโครมาทิดแตกหักเนื่องจากสิ่งก่อการกลายหรือสารก่อมะเร็งเข้าไปรวมตัวกับหมู่ฟอสเฟตในดีเอ็นเอทำให้แขนของพันธะเอสเทอร์ระหว่างฟอสเฟตกับน้ำตาลคือออกซีไรโบส (deoxyribose) แตกหักออกจากกัน (Clayson, 1972)

2) gap เป็นการแตกหักของแท่งโครมาทิดแท่งใดแท่งหนึ่ง หรือทั้งสองแท่งที่ได้รับรังสีหรือสารเคมี เมื่อสิ้นสุดระยะแอนาเฟสจะไม่พบชิ้นส่วนของโครโมโซมที่ไม่มีเซนโทรเมียร์

3) chromatid interchange เป็นการแตกหักที่บริเวณตำแหน่งเดียวกันของโครโมโซมที่เป็นคู่กัน และมีลักษณะสมมาตรกัน (symmetry) มีการแลกเปลี่ยนเชื่อมไขว้กัน

นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติแบบ satellite association คือ โครโมโซมชนิดอะโครเซนทริก (acrocentric chromosome) ที่มี satellite อยู่ชิดกัน ซึ่งดีเอ็นเอบริเวณ satellite เหล่านี้มีคุณสมบัติเหนียวเหนียวมากจึงมีโอกาสจับติดกันได้ง่าย ทำให้ไม่แยกคู่ออกจากกัน อาจมีการสลับที่เมื่อเซลล์แบ่งตัว และบริเวณที่มี satellite association จะอยู่ตรงตำแหน่งที่มีนิวคลีโอไลอัสมาเกาะบนโครโมโซม ซึ่งตำแหน่งดังกล่าวมีการยึดตัวมากกว่าปกติทำให้มีโอกาสแตกหักได้ง่าย (วิทยา, 2522)

กลไกการซ่อมแซม DNA บนโครโมโซม

Herskowitz (1977) สรุปว่าสารพันธุกรรมเปลี่ยนแปลงเนื่องจากสารก่อการกลาย หรือ สารก่อมะเร็งนั้นมีผลต่อดีเอ็นเอโดยตรง เพราะดีเอ็นเอเป็นเป้าหมายหลักของสารก่อการกลาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารเคมีที่เข้าไปทำปฏิกิริยากับดีเอ็นเอทำให้ลำดับเบสบนดีเอ็นเอผิดไปจากเดิม โดยทั่วไปเซลล์ของสิ่งมีชีวิตมีกลไกบางอย่างที่พยายามรักษาลำดับเบสในดีเอ็นเอเพื่อรักษาลักษณะ พันธุกรรมไว้ให้มากที่สุด ภายในเซลล์มีน้ำภูมิคุ้มกัน (antibody) และสารบางอย่างเพื่อป้องกันไม่ให้สารเคมีรวมตัวกับดีเอ็นเอ และมีกระบวนการซ่อมสร้างตัดต่อเพิ่มเติมโมเลกุลของดีเอ็นเอใหม่ ให้เหมือนเดิม กลไกการซ่อมแซมตัวเองของดีเอ็นเอบนโครโมโซม แบ่งออกเป็น 3 แบบ คือ

1. การซ่อมแซมดีเอ็นเอแบบใช้แสงเป็นกลไก (photo repair) โดยอาศัยเอนไซม์ทำหน้าที่เร่งการฟื้นตัวของเซลล์ด้วยการเปลี่ยน T-T dimer มาเป็นเบสคู่ T=A อย่างเดิม ทั้งนี้อาศัยแสงสว่างธรรมดา

2. การซ่อมแซมโดยการตัดต่อ (excision repair) อาศัยเอนไซม์เอนโดนิวคลีเอสเข้าไปตัดบางส่วนของสายโพลีนิวคลีโอไทด์ที่ผิดปกติออกจากสายดีเอ็นเอ จากนั้นเอนไซม์ดีเอ็นเอโพลีเมอเรสจะนำเบสที่เข้าคู่มาเชื่อมต่อกัน และมีเอนไซม์ดีเอ็นเอไลเกสเข้าไปทำหน้าที่เชื่อมสายดีเอ็นเอจนเสร็จสมบูรณ์

3. การซ่อมแซมหลังการจำลองดีเอ็นเอ (post-replication repair) สายดีเอ็นเอที่เสียหายที่ยังไม่มีการซ่อมแซม ถ้าสายดีเอ็นเอที่จำลองใหม่ไม่สมบูรณ์ เช่น มีช่องว่างบนสายโพลีนิวคลีโอไทด์ การซ่อมสร้างนี้เกิดขึ้นโดยการนำดีเอ็นเอสายใหม่ทั้งสองสายมารวมกัน (recombination) แต่ละสายจะทำหน้าที่เป็นแม่แบบซึ่งกันและกัน เพื่อเติมเบสที่ขาดหายไปให้ครบ แต่ถ้าดีเอ็นเอถูกทำลายแล้วจะไม่สามารถจำลองตัวเองได้อีก (ธวัช และทวีพร, 2536)

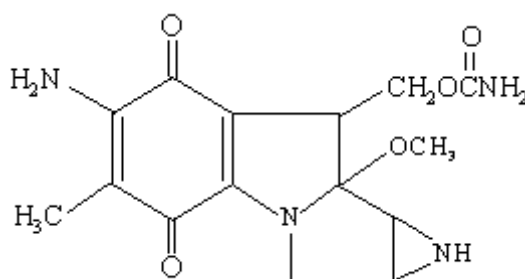
5. สิ่งก่อการกลายและสารก่อมะเร็ง

สิ่งก่อการกลาย (mutagen) มีความหมายใกล้เคียงกับสารก่อมะเร็ง (carcinogen) และเป็นตัวบ่งชี้การเป็นสารก่อมะเร็ง สิ่งก่อการกลาย หมายถึง สารที่มีคุณสมบัติเปลี่ยนสายพันธุ์ (strain) ของแบคทีเรียจากสายพันธุ์หนึ่งเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งได้ หรือหมายถึงสารที่มีคุณสมบัติเปลี่ยน

โครโมโซมให้ผิดไปจากเดิม โดยทั่วไป 80 เปอร์เซ็นต์ของสิ่งก่อการกลายเปลี่ยนสารก่อมะเร็ง ในขณะเดียวกันสารก่อมะเร็งทุกชนิดต้องเป็นสิ่งก่อการกลายเสมอ การตรวจสอบสารก่อมะเร็งต้องตรวจว่าสารนั้นเป็นสิ่งก่อการกลายหรือไม่ ซึ่งวิธีการตรวจสอบสิ่งก่อการกลายที่นิยม คือ Ames test ใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* ซึ่งปกติสังเคราะห์ histidine ไม่ได้ แต่ถ้าสารใดทำให้ *S. typhimurium* สามารถสังเคราะห์ histidine ได้แสดงว่าแบคทีเรีนี้อาจกลายเป็นอีกสายพันธุ์หนึ่งแล้ว สารนั้นจึงจัดเป็นสิ่งก่อการกลาย ตรวจสอบได้โดยการหาความผิดปกติของโครโมโซมจากเซลล์ในหลอดทดลองหรือทดสอบในสัตว์ทดลอง ถ้าสารใดทำให้เกิดมะเร็งในสัตว์ทดลองได้สารนั้นก็ น่าจะทำให้เกิดมะเร็งในมนุษย์ได้เช่นกัน (มาลิน, 2527)

5.1 mitomycin C (MMC)

เป็นสารแอนติไบโอติกสกัดจากเชื้อรา ชื่อ *Streptomyces caespitosus* โดยการแยกเชื้อจากดิน การสกัดในครั้งแรกได้สาร mitomycin A และ mitomycin B ต่อมาจึงได้ mitomycin C ซึ่งมีประสิทธิภาพในการต้านการเจริญของแบคทีเรียและเนื้องอกได้ดีกว่าสองชนิดแรก (Shiba, 1958) MMC เริ่มนำมาใช้ครั้งแรกในสหรัฐอเมริกาเมื่อปลายปี ค.ศ. 1960 โดย MMC มีคุณสมบัติเป็น alkylating agent สามารถจับกับดีเอ็นเอเกิด cross-link แล้วยังมีผลยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ และวัฏจักรเซลล์โดยไม่จำเพาะต่อระยะของวัฏจักรเซลล์ (Cancer Care Ontario Formulary, 2003a) MMC ถูกนำมาใช้เป็นยาปฏิชีวนะ ยารักษาเนื้องอก และโรคมะเร็ง มีลักษณะเป็นผงสีขาว มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{15}H_{18}N_4O_5$ น้ำหนักโมเลกุล 334.341 สามารถละลายน้ำได้ดี (Sigma-Aldrich, 2004) มีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 7



ภาพที่ 7 สูตรโครงสร้างของ mitomycin C ($C_{15}H_{18}N_4O_5$)

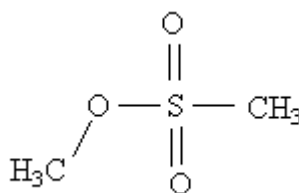
ที่มา: จันทรเพ็ญ (2530)

กลไกการทำงานของ MMC ศึกษาในแบคทีเรียพบว่ายับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอและทำลายดีเอ็นเอ แต่ไม่มีผลต่อการสังเคราะห์อาร์เอ็นเอ (RNA) และโปรตีน โดย MMC เข้าไปเกาะกับกรดดีออกซีไซซีดีลิก (deoxycytidylic acid) บนสายดีเอ็นเอ (Tomasz *et al.*, 1987) จึงใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งหลายชนิด ได้แก่ มะเร็งต่อมน้ำเหลือง (lymphoma) มะเร็งเม็ดเลือดขาว (leukemia) (Dipalma, 1971)

ในแมลงหวี่ MMC สามารถชักนำให้โครโมโซม X ขาดหายไป ทำให้โครโมโซม Y หักและเกิด translocation ระหว่างโครโมโซม ตลอดจนชักนำให้มีการแยกตัวของโครโมโซมคู่ซ้ำของเซลล์ จากการทดลองในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์รายงานว่า MMC ที่ระดับความเข้มข้น 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 24 ชั่วโมงก่อนเก็บเกี่ยว สามารถชักนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนชิ้นส่วนของโครโมโซม ส่งผลให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ dicentric, quadriradial, acentric fragment และ nullisomy (Shaw and Cohen, 1964) นอกจากนี้ยังสามารถชักนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนโครมาทิด (sister-chromatid exchange) ในโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์อีกด้วย (Latt, 1974; Ishii and Bender, 1978)

5.2 methyl methanesulfonate (MMS)

เป็น alkylating agent และเป็นสารก่อมะเร็งที่ปอด สมอง และ ไต (New Jersey Department of Health and Senior Services, 2000) MMS มีลักษณะเป็นของเหลวใส ไม่มีสี สามารถละลายได้ในน้ำ dimethyl formamide, propylene glycol, ethanol, ether และละลายได้เล็กน้อยในตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (Hazardous Substances Data Bank, 2001; National Toxicology Program, 2004) MMS ใช้ในการวิจัยทางเคมีและใช้เป็นตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ในการสังเคราะห์สารเคมี นอกจากนี้ยังนำมาทดสอบการรักษาโรคมะเร็งด้วยเคมีบำบัด (chemotherapeutic) และใช้ในการทดสอบการกลายพันธุ์ (mutation) มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_2H_6O_3S$ น้ำหนักโมเลกุล 110.13 และมีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 8 (International Agency for Research on Cancer, 1974; 1999; Merck, 1989; Hazardous Substances Data Bank, 2001)



ภาพที่ 8 สูตรโครงสร้างของ methyl methanesulfonate ($C_2H_6O_3S$)

ที่มา: Hazardous Substances Data Bank (2001)

MMS มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็ง มีการทดสอบให้หนูถีบจักร (mouse) กินน้ำที่ผสม MMS พบว่าเกิดเนื้องอกที่ปอดและเกิดมะเร็งที่ต่อมน้ำเหลือง ส่วนการทดสอบในหนูขาวใหญ่ (rat) เพศผู้ โดยการสูดหายใจเข้าไปพบว่าก่อให้เกิดเนื้องอกที่จมูกในอัตรา 47 ตัวต่อหนูทั้งหมด 80 ตัว ที่ได้รับสาร MMS เมื่อทดสอบโดยการฉีดเข้าใต้ผิวหนังพบการเนื้อมันทำให้เกิดเนื้องอก และเมื่อฉีดเข้าในช่องท้อง (intraperitoneal) ก็ให้ผลคล้ายกัน (International Agency for Research on Cancer, 1999)

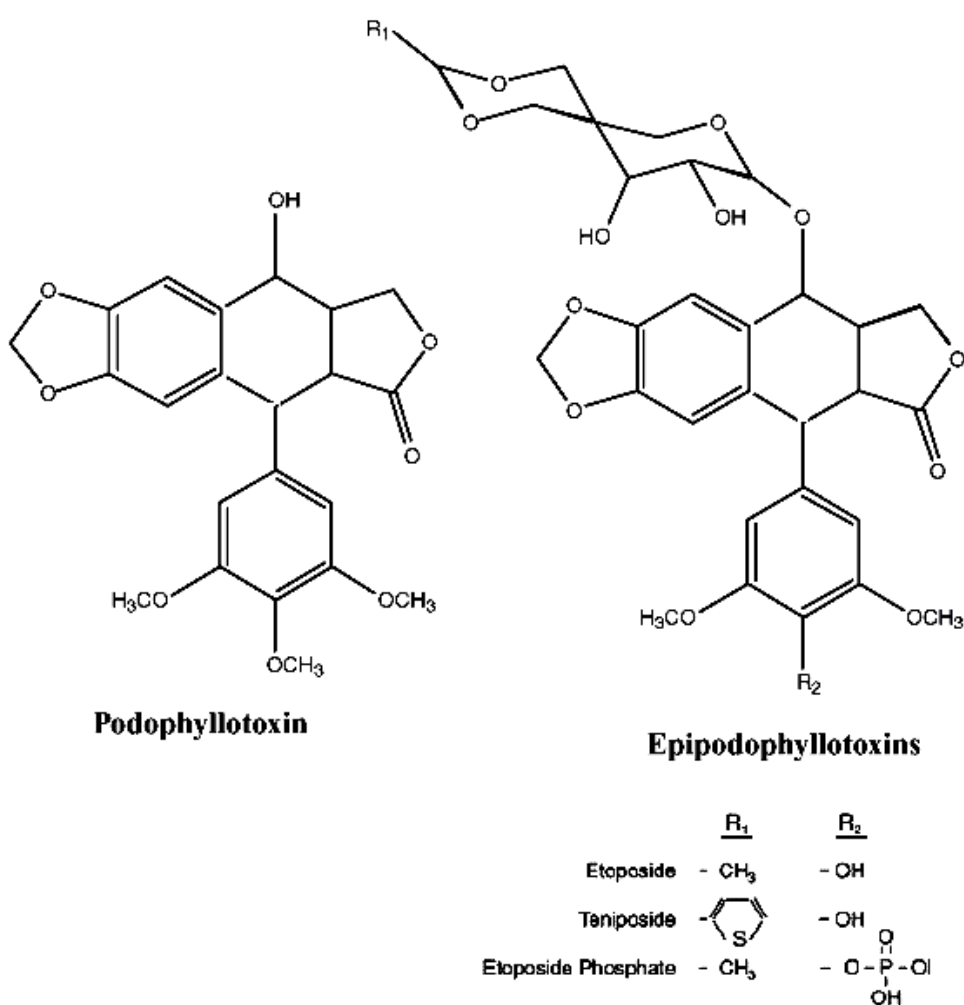
การแพร่กระจายของ MMS มักถูกจำกัดอยู่เพียงในช่องปฏิบัติการ ดังนั้นผู้ที่ได้รับ MMS มากที่สุดคือเจ้าหน้าที่ในช่องปฏิบัติการ แต่ถ้ามมีการแพร่กระจายออกสู่สิ่งแวดล้อมจะถูก hydrolyze อย่างรวดเร็ว และถ้าอยู่ในสภาวะแก็สจะมีค่าครึ่งชีวิต (half-life) 69 วัน (Hazardous Substances Data Bank, 2001)

5.3 etoposide (VP-16)

etoposide มีชื่ออื่น ได้แก่ VP-16, VP-16-213, EPEG, demethylepipodophyllotoxin – ethyleneglucoopyranoside, EPE, epipodophyllotoxin (ภาพที่ 9) มีชื่อทางการค้าคือ Vepeside และ Etopophos (etoposide phosphate) เป็นสารกึ่งสังเคราะห์ของ podophyllotoxin ที่ได้จากราก *Podophyllum peltatum* ซึ่งเป็นพืชพวก May apple หรือ Mandrake โดย VP-16 เป็นสารก่อให้เกิดการแตกหักของสายดีเอ็นเอโดยมีผลยับยั้ง topoisomerase II และกระตุ้นการเกิดปฏิกิริยา oxidation reduction ทำให้เกิดอนุพันธ์เข้าจับกับสายดีเอ็นเอได้โดยตรง โดยปกติแล้ว topoisomerase II เป็นเอนไซม์ที่ช่วยเชื่อมต่อชิ้นส่วนของดีเอ็นเอที่หักให้เหมือนเดิม นอกจากนี้มีผลต่อการทำงานในระยะ S และ G₂ ในวัฏจักรของเซลล์ด้วย (Cancer Care Ontario Formulary, 2003b; British Columbia

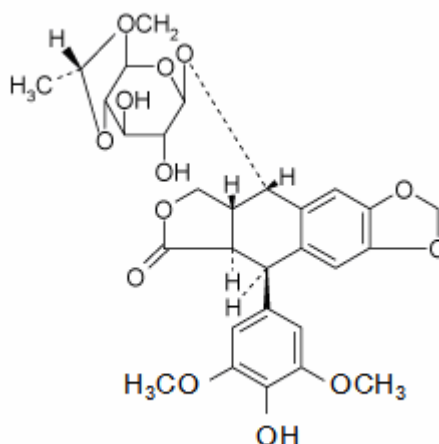
Cancer Agency, 2006) VP-16 มีสูตรโมเลกุลเป็น $C_{29}H_{32}O_{13}$ มีน้ำหนักโมเลกุล 588.56 (Gensia sicor pharmaceuticals, 1998)

VP-16 ถูกนำมาใช้เป็นยารักษามะเร็งมานานกว่า 20 ปี เช่น มะเร็งปอด เนื้องอกของเซลล์สร้างเซลล์สืบพันธุ์ (germ cell tumor) มะเร็งต่อมน้ำเหลือง และมะเร็งเม็ดเลือดขาว เป็นต้น (Hande, 1998) VP-16 มีสูตรโครงสร้าง ดังภาพที่ 10



ภาพที่ 9 โครงสร้างของ podophyllotoxin, epipodophyllotoxin และอนุพันธ์ คือ etoposide, teniposide และ etoposide phosphate

ที่มา: Hande (1998); Eric and Hait (2006)



ภาพที่ 10 โครงสร้างของ etoposide ($C_{29}H_{32}O_{13}$)

ที่มา: Gensia sicor pharmaceuticals (1998)

6. การเพาะเลี้ยงเซลล์ TK6

เซลล์ TK6 (ATCC CRL-8015) เป็นเซลล์ลิมโฟพลาสต์ของคนเพศชาย (XY) อายุ 5 ปี ลักษณะของเซลล์เป็นชนิดแขวนลอย (suspension cell) เป็นอนุพันธ์จากเซลล์ WIL-2 ที่มีเฮเทอโรไซกัส (heterozygous) ที่ตำแหน่ง thymidine kinase (*TK*) locus ซึ่งใช้บอกตำแหน่งความรุนแรงของการกลายพันธุ์ได้ 3 ตำแหน่ง และเป็นเซลล์ที่ถูกใช้ในการทดสอบ TK gene mutation (Liber and Thilly, 1982) และนอกจากนี้ยังเป็นเซลล์ที่มีการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำจากสารเคมีที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อดีเอ็นเอหลายชนิด โดยต้องใช้เวลาดำเนินการอย่างน้อย 4 ชั่วโมง เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแสดงออกของยีน p53 (Islaih *et al.*, 2005)

เซลล์ TK6 เจริญเติบโตในอาหาร RPMI 1640 ที่มี L-glutamine 2 มิลลิโมลาร์ HEPES 25 มิลลิโมลาร์ และ horse serum (HS) หรือ fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่มี CO_2 5 เปอร์เซ็นต์ อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดย subculture เซลล์ใส่อาหารใหม่ทุกๆ 2-3 วัน (American Type Culture Collection: ATCC, 2004)

อุปกรณ์และวิธีการ

1. การวางแผนการทดลอง

แบ่งการทดลองออกเป็น 2 วิธี คือ การทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียส และการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม แต่ละการทดลองประกอบด้วย 3 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มควบคุมที่ 1 กลุ่มควบคุมที่ 2 และกลุ่มทดลองวางแผนการทดลองแบบ randomized complete block design จำนวน 3 ซ้ำ โดยสุ่มจากเซลล์ TK6 1,000 เซลล์ สำหรับการทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียส และ 100 เซลล์ สำหรับการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมในแต่ละความเข้มข้นและช่วงเวลาที่ได้รับสาร โดยแบ่งเซลล์ที่นำมาทดสอบออกเป็น 3 กลุ่มย่อย คือ

กลุ่มควบคุมที่ 1 เพาะเลี้ยงเซลล์ TK6 โดยใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อแทนสารเคมีที่ทดสอบ และเลี้ยงควบคู่ไปกับกลุ่มทดลองเพื่อใช้เป็นกลุ่มมาตรฐานเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วย DMSO

กลุ่มควบคุมที่ 2 เพาะเลี้ยงเซลล์ TK6 โดยใช้ DMSO (Sigma) ความเข้มข้น 1 เปอร์เซ็นต์แทนสารเคมีที่ทดสอบ และเลี้ยงควบคู่ไปกับกลุ่มทดลองเพื่อใช้เป็นกลุ่มเปรียบเทียบกับกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุมด้วยน้ำกลั่น

กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มทดสอบ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ TK6 ให้ได้รับสารเคมีระดับความเข้มข้นต่างๆ กันดังนี้ mitomycin C (Sigma) ระดับความเข้มข้นที่ 1.00, 3.00 และ 5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร methyl methanesulfonate (Sigma) ระดับความเข้มข้นที่ 3.00, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ etoposide (Sigma) ระดับความเข้มข้นที่ 0.10, 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ละความเข้มข้นใช้เวลาเลี้ยงนาน 4 และ 24 ชั่วโมง

2. การเพาะเลี้ยงเซลล์ TK6

นับเซลล์ TK6 จากขวดเลี้ยงเซลล์ เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย RPMI 1640 (Gibco) ที่มี L-glutamine 2 มิลลิโมลาร์ HEPES 25 มิลลิโมลาร์ และ horse serum (HS) หรือ fetal bovine serum (Gibco) 10 เปอร์เซ็นต์ มีค่า pH เท่ากับ 7.2 ให้มีความหนาแน่นของเซลล์ที่ 2×10^5

เซลล์ต่อมิลลิตร จากนั้นดูดเซลล์แบ่งใส่ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ 5 มิลลิตรต่อจานเพาะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้เลี้ยงเซลล์ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ 60 เปอร์เซ็นต์ และมีแก๊สคาร์บอนไดออกไซด์ในบรรยากาศ 5 เปอร์เซ็นต์ เลี้ยงไว้นาน 1-2 ชั่วโมง เพื่อให้เซลล์ปรับสภาพกับอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ จากนั้นเติมสารเคมีที่ใช้ทดสอบ คือ mitomycin C, methyl methane sulfonate และ etoposide ที่ความเข้มข้น 3 ระดับ และบ่มเลี้ยงไว้นาน 4 และ 24 ชั่วโมง สำหรับกลุ่มควบคุมทั้ง 2 กลุ่ม ใช้น้ำกลั่นปลอดเชื้อ และ DMSO แทนตามลำดับ ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ 18 ชั่วโมง เติมน้ำกลั่นละลายไซโทคาลาซิน บี (Sigma) ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร สำหรับการทดสอบไมโครนิวเคลียสเพื่อยับยั้งการเกิดไซโทไคนีซิส และเติมน้ำกลั่นละลาย Colcemid (Gibco) ความเข้มข้น 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ก่อนเก็บเกี่ยวเซลล์ 2 ชั่วโมง สำหรับการตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซมเพื่อให้เซลล์หยุดการแบ่งตัวไว้ที่ระยะเมทาเฟสเมื่อครบ 24 ชั่วโมงจึงเก็บเกี่ยวเซลล์

3. ขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์

3.1 การทดสอบไมโครนิวเคลียส

- 1) นำเซลล์ TK6 ที่เลี้ยงครบตามกำหนดแล้วมาเขย่าเบาๆ แล้วถ่ายเซลล์พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลอด และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
- 2) ดูดสารละลายตอนบนทิ้งแล้วเติมน้ำกลั่นละลาย PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงไป 5.00 มิลลิตร เขย่าเซลล์ให้เข้ากัน และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที
- 3) ดูดสารละลายตอนบนทิ้ง และทำซ้ำข้อ 2 อีกครั้ง
- 4) เติมน้ำกลั่นละลายเซลล์ที่ไม่มีซีรัมประมาณ 0.50-1.00 มิลลิตร เพื่อเจือจางเซลล์และเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน

5) คัดสารละลายตัวอย่างเซลล์ 100 ไมโครลิตร ของแต่ละความเข้มข้นและช่วงเวลา นำไปปั่นเหวี่ยงเซลล์ให้ตกบนสไลด์ที่สะอาดด้วยเครื่อง Cytocentrifuge (Shandon รุ่น Cytospin 3) ใช้ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 3 นาที แต่ละความเข้มข้นทำอย่างน้อย 3 สไลด์

6) ตากแผ่นสไลด์ให้แห้งในอากาศประมาณ 1-2 นาที แล้วนำไปคงสภาพใน absolute methanol ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นาน 10 นาที

7) ตากแผ่นสไลด์ให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง

3.2 การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม

1) นำเซลล์ TK6 ที่เลี้ยงครบตามกำหนดแล้วมาเขย่าเบาๆ แล้วถ่ายเซลล์พร้อมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ลงในหลอด และนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

2) คัดสารละลายตอนบนทิ้งแล้วเติมสารละลาย PBS pH 7.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ลงไป 5.00 มิลลิตร เขย่าเซลล์ให้เข้ากันและนำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,500 รอบต่อนาที นาน 3 นาที

3) คัดสารละลายตอนบนทิ้ง และทำซ้ำข้อ 2 อีกครั้ง

4) เติมสารละลายโปแตสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยหยดทีละหยดพร้อมกับเขย่าเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติมจนครบ 5 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน

5) นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที และคัดสารละลายตอนบนทิ้ง

6) เติมสารละลายคงสภาพ (methanol : glacial acetic acid 3:1 v/v) ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส โดยหยดทีละหยดพร้อมกับเขย่าเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัว เติมจนครบ 5.00 มิลลิตร เขย่าให้เข้ากัน

- 7) นำไปปั่นตกตะกอนที่ความเร็ว 1,200 รอบต่อนาที นาน 10 นาที
- 8) ดูดสารละลายตอนบนทิ้งให้เหลือประมาณ 0.50 มิลลิลิตร เขย่าเบาๆ ให้เซลล์กระจายตัวให้ดี
- 9) หยดสารละลายเซลล์ในข้อ 8 ลงบนแผ่นสไลด์ที่สะอาด 1 หยด เมื่อเซลล์แผ่ออกให้หยดสารละลายคงสภาพ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตามลงไปอีก 1 หยด
- 10) ตากแผ่นสไลด์ไว้ให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง

4. การย้อมสีตัวอย่าง

ย้อมตัวอย่างด้วยสี Giemsa (Gibco) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ในสารละลาย Giemsa buffer (Gibco) (ภาคผนวก) pH 6.8 นาน 20 นาที แล้วนำมาล้างออกด้วยสารละลาย Giemsa buffer ก่อน จากนั้นจึงล้างด้วยการผ่านน้ำไหลช้าๆ และล้างด้วยน้ำกลั่นอีกครั้งก่อนตากสไลด์ให้แห้งในอากาศที่อุณหภูมิห้อง

5. การตรวจสอบผลการทดลอง

5.1 การตรวจนับไมโครนิวเคลียส

นำแผ่นสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 20x และ 40x ตรวจ นับเซลล์ที่มีไมโครนิวเคลียส โดยสุ่มตัวอย่าง binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ต่อหนึ่งความเข้มข้นต่อหนึ่งช่วงเวลา จากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส

5.2 การตรวจนับโครโมโซม

นำแผ่นสไลด์ที่ย้อมสีแล้วมาตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100x ในการตรวจนับโครโมโซมเลือกเฉพาะเซลล์ที่อยู่ในระยะเมทาเฟส โดยสุ่มตัวอย่างเซลล์จำนวน 100 เซลล์ต่อ

ความเข้มข้นต่อช่วงเวลา จากการทดลอง 3 ซ้ำ เพื่อศึกษาเปรียบเทียบอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม และศึกษารูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดขึ้น

6. สถิติที่ใช้ในการวิจัย

6.1 สถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสใช้วิธี Bonferroni test และ Mann-Whitney test (Phelps *et al.*, 2002; Garriott *et al.*, 2002)

6.2 สถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมใช้วิธี LSD test และ T-test (หนามเตย, 2529; เสาวคนธ์, 2530; Bassi *et al.*, 2002)

6.3 สถิติที่ใช้ในการเปรียบเทียบอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมใช้วิธี T-test

7. การบันทึกภาพ

บันทึกภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ที่ต่อกับอุปกรณ์โปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Olympus, Dp70 microscope digital camera)

8. การเตรียมโครโมโซมเพื่อทำคาริโอไทป์

เลือกเซลล์ตัวอย่างจากกลุ่มควบคุมที่มีโครโมโซมในระยะเมทาเฟสที่ชัดเจนที่สุดและมีจำนวนครบชุด บันทึกภาพ อัดขยาย แล้วนำไปตัดรูปโครโมโซม จัดคู่และเรียงตามขนาดของโครโมโซม โดยใช้ตำแหน่งเซนโทรเมียร์เป็นเกณฑ์ในการจัดเรียง

9. สถานที่และระยะเวลาทำการวิจัย

9.1 ห้องปฏิบัติการพันธุพิษวิทยา (Genetic Toxicology Laboratory) ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ตำบลคลอง 5 อำเภอกลองหลวง จังหวัดปทุมธานี

9.2 ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร
จังหวัดกรุงเทพมหานคร

10. ระยะเวลาทำการวิจัย

เริ่มตั้งแต่เดือนพฤษภาคม 2547 ถึง เดือนกันยายน 2548

ผลและวิจารณ์

1. อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6

1.1 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC

การทดสอบไมโครนิวเคลียสโดยเติม MMC ความเข้มข้น 1.00, 3.00 และ 5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง ทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีไมโครนิวเคลียสจาก binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ ได้ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 1 ภาพที่ 11, 15 และ 16 ตามลำดับ

ตารางที่ 1 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวน MNC ต่อ 1,000 BNC ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 (control)	6.00 ± 1.00	7.67 ± 1.53
1.00 ^b	$34.00 \pm 3.00^*$	$40.33 \pm 1.53^*$
3.00 ^b	$43.00 \pm 2.00^*$	$47.00 \pm 2.00^*$
5.00	$51.33 \pm 3.06^*$	$58.67 \pm 5.86^*$

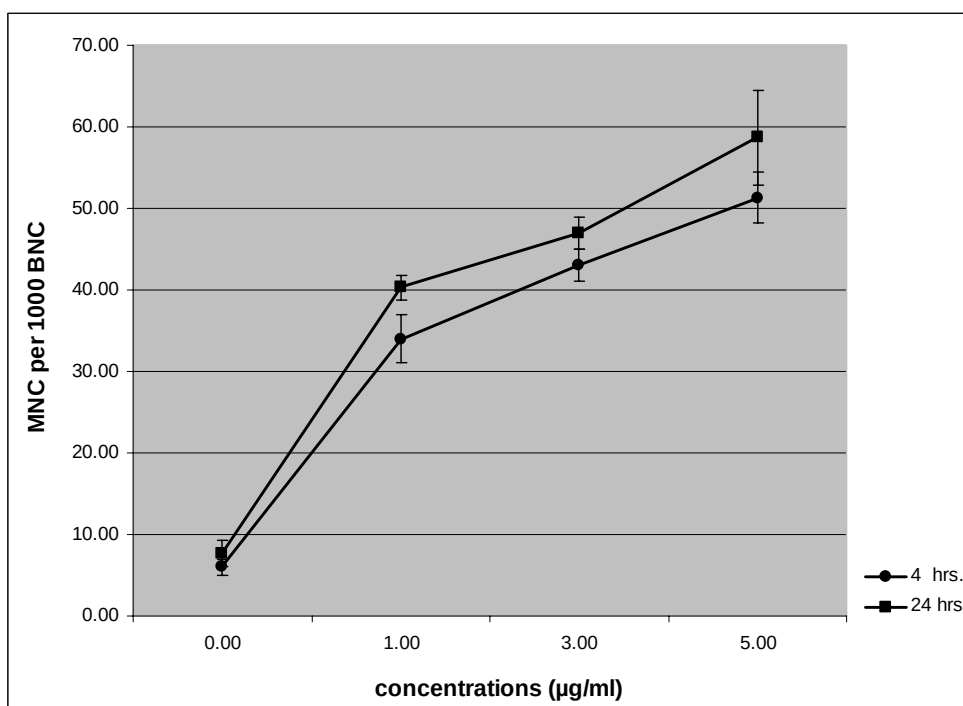
หมายเหตุ ^a ค่า Mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

^{*} มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (Bonferroni test)

^b มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ระหว่างกลุ่ม 4 ชั่วโมง และกลุ่ม 24 ชั่วโมง (Mann-Whitney test)

MNC : Micronucleated cell

BNC : Binucleated cell



ภาพที่ 11 อัตราการเกิด MNC ต่อ 1,000 BNC ของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่า MMC มีผลก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียส โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย Bonferroni test พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อทดสอบทางสถิติของระยะเวลาที่ทดสอบด้วยวิธี Mann-Whitney test พบว่าที่ความเข้มข้น 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาทดสอบที่ 4 และ 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่กลุ่มควบคุมและกลุ่มความเข้มข้น 5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ระยะเวลาที่ทดสอบไม่มีผลต่ออัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส

1.2 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMS

การทดสอบไมโครนิวเคลียสโดยเติม MMS ที่ระดับความเข้มข้น 3.00, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีไมโครนิวเคลียสจาก binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ ได้ผลค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 2 ภาพที่ 12, 15 และ 16 ตามลำดับ

ตารางที่ 2 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMS ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

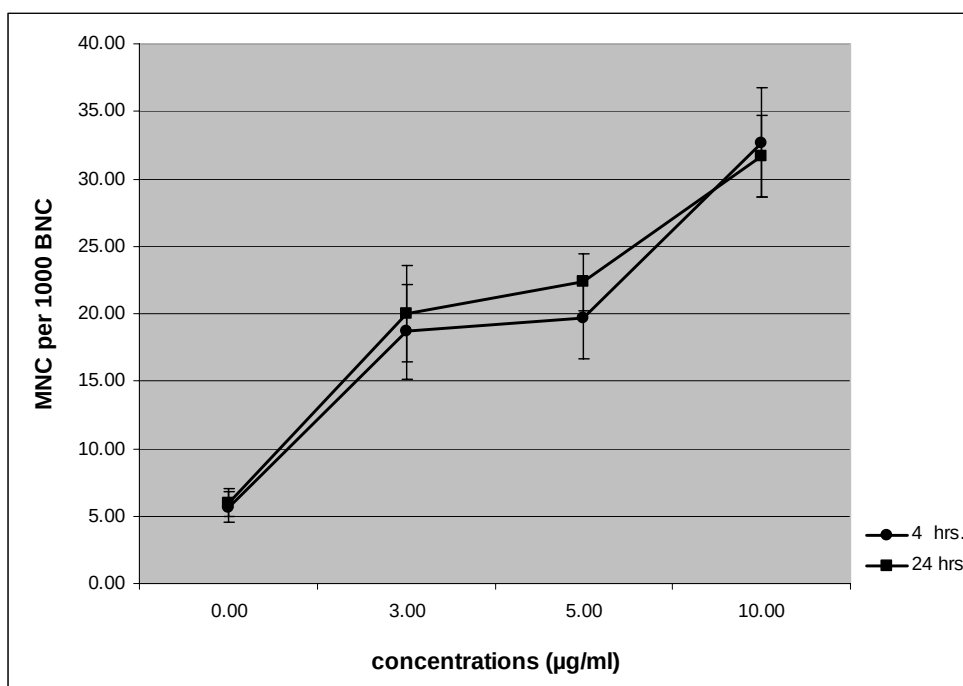
ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวน MNC ต่อ 1,000 BNC ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 (control)	5.67 ± 1.15	6.00 ± 1.00
3.00	$18.67 \pm 3.51^*$	$20.00 \pm 3.61^*$
5.00	$19.67 \pm 3.06^*$	$22.33 \pm 2.08^*$
10.00	$32.67 \pm 4.04^*$	$31.67 \pm 3.06^*$

หมายเหตุ ^a ค่า Mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (Bonferroni test)

MNC : Micronucleated cell

BNC : Binucleated cell



ภาพที่ 12 อัตราการเกิด MNC ต่อ 1,000 BNC ของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMS ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่า MMS มีผลก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียส โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Bonferroni test พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 3.00, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อทดสอบทางสถิติของระยะเวลาที่ทดสอบด้วยวิธี Mann-Whitney test พบว่าอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสที่ทุกความเข้มข้นระยะเวลาทดสอบที่ 4 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

1.3 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย VP-16

การทดสอบไมโครนิวเคลียสโดยการ VP-16 ที่ระดับความเข้มข้น 0.10, 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง เมื่อตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีไมโครนิวเคลียสจาก binucleated cell จำนวน 1,000 เซลล์ ได้ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 3 ภาพที่ 13, 15 และ 16 ตามลำดับ

ตารางที่ 3 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย VP-16 ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวน MNC per 1,000 BNC ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 (control)	6.00 ± 1.00	9.00 ± 2.00
0.10	$12.00 \pm 2.65^{\text{ns}}$	$17.00 \pm 4.00^{\text{ns}}$
1.00	$16.33 \pm 2.52^*$	$21.33 \pm 4.51^*$
3.00	$25.00 \pm 2.00^*$	$27.00 \pm 4.00^*$

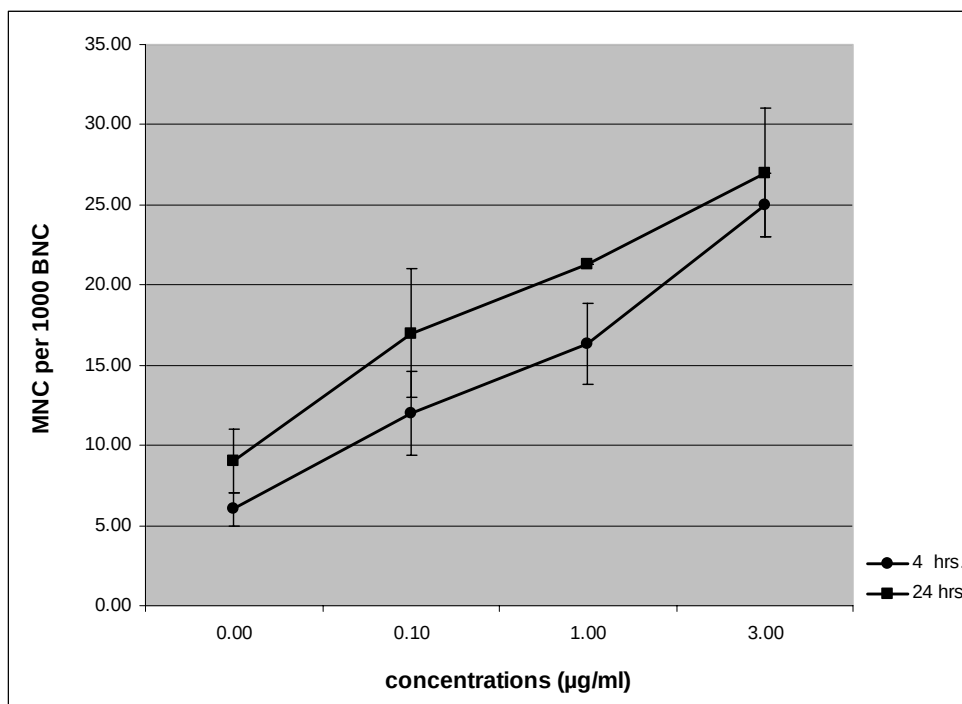
หมายเหตุ ^a ค่า Mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (Bonferroni test)

^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) (Bonferroni test)

MNC : Micronucleated cell

BNC : Binucleated cell



ภาพที่ 13 อัตราการเกิด MNC ต่อ 1,000 BNC ของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย VP-16 ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่า VP-16 มีผลก่อให้เกิดไมโครนิวเคลียสโดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วยวิธี Bonferroni test พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 0.10, 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และเมื่อทดสอบทางสถิติของระยะเวลาที่ทดสอบด้วยวิธี Mann-Whitney test พบว่าอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสที่ทุกความเข้มข้นที่ใช้ระยะเวลาทดสอบที่ 4 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

1.4 เปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC, MMS และ VP-16 ที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เมื่อนำอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ MMC, MMS และ VP-16 มาเปรียบเทียบกับที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลดังตารางที่ 4 และภาพที่ 14 ตามลำดับ

ตารางที่ 4 อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC, MMS และ VP-16 ที่ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ชนิดสารเคมี	จำนวน MNC per 1000 BNC ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
MMC	43.00 ± 2.00 ^b	47.00 ± 2.00 ^b
MMS	18.67 ± 3.51 ^{ns}	20.00 ± 3.61 ^{ns}
VP-16	25.00 ± 2.00 ^{ns}	27.00 ± 4.00 ^{ns}

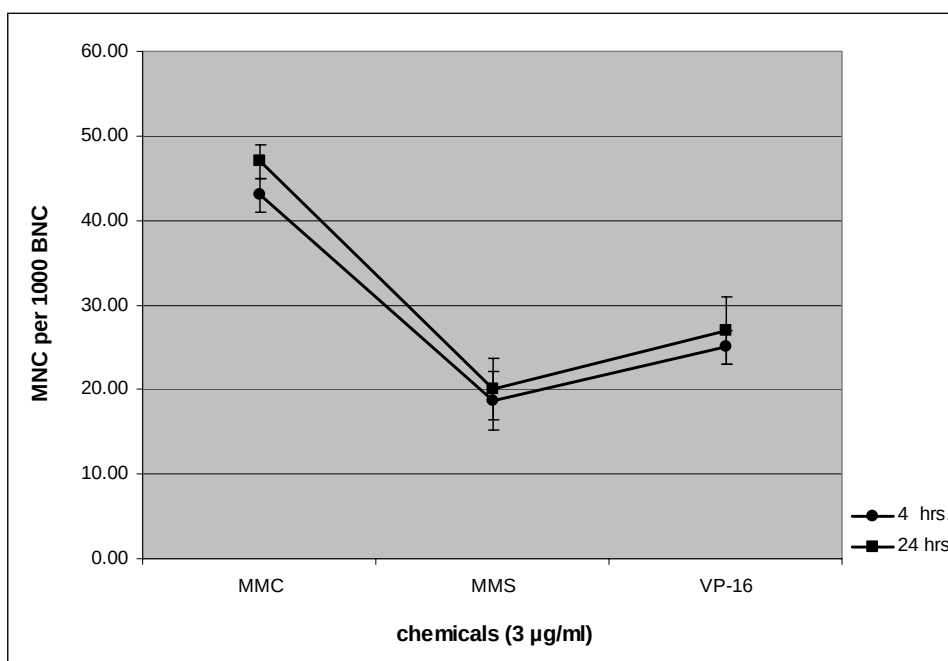
หมายเหตุ ^a ค่า Mean ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

^b มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (Bonferroni test)

^{ns} ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ระหว่างกลุ่ม 4 ชั่วโมงและกลุ่ม 24 ชั่วโมง (Bonferroni test)

MNC : Micronucleated cell

BNC : Binucleated cell



ภาพที่ 14 ความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำของ MMC, MMS และ VP-16 ที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบพบว่าสารเคมีทั้ง 3 ชนิด มีผลทำลายสารพันธุกรรมภายในเซลล์ เมื่อนำอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส มาเปรียบเทียบกันและทดสอบด้วยวิธี Bonferroni test พบว่าความสัมพันธ์ระหว่างกลุ่ม MMC กับ MMS และ VP-16 มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง MMS กับ VP-16 พบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

นอกจากพบการเกิดไมโครนิวเคลียสจากการเหนี่ยวนำด้วย MMC, MMS และ VP-16 แล้ว ยังพบเซลล์ที่เกิดการตายเนื่องจากการเกิด apoptosis ซึ่งพบการตายของเซลล์แบบนี้ได้จากการทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสทั้ง 3 การทดลอง โดยพบอัตราการตายแบบ apoptosis นี้เกิดขึ้นในการทดสอบการเกิดไมโครนิวเคลียสด้วยการเหนี่ยวนำจาก VP-16 มากที่สุด รองลงมาคือ MMS และ MMC

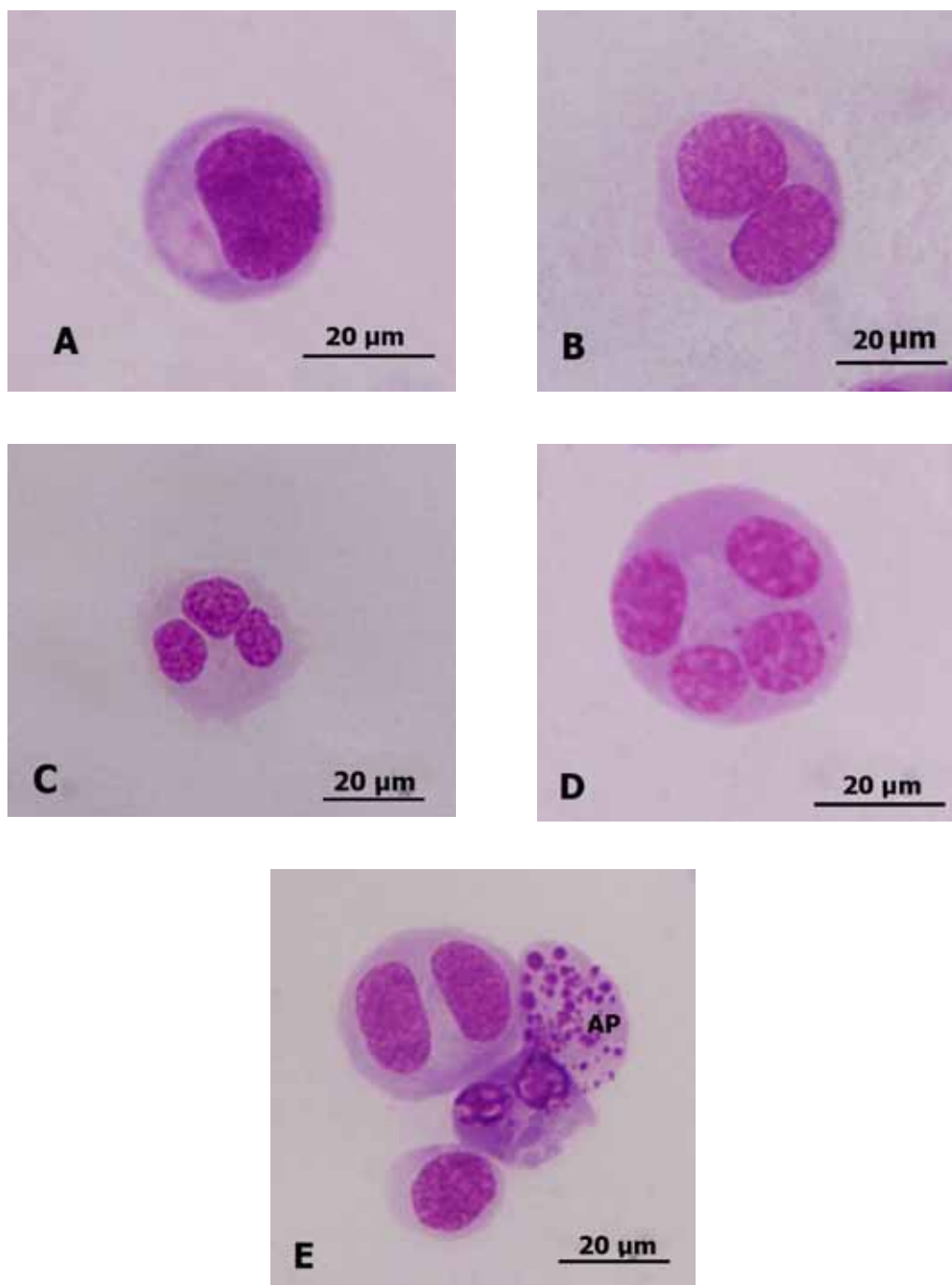
ทั้งนี้สามารถสรุปผลการทดสอบอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำของสาร MMC, MMS และ VP-16 ได้ว่าเซลล์ TK6 มีอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสมาก

ที่สุดจากการเหนี่ยวนำด้วย MMC ซึ่งเป็นสารเคมีที่แสดงผลเป็น positive ต่อการทำลายสารพันธุกรรม มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมสอดคล้องกับการทดสอบในเซลล์ V79 และ L5178Y ที่การเหนี่ยวนำมีผลทำให้เกิดความผิดปกติให้ผลเป็น positive เช่นกัน (Zhang *et al.*, 1995) ส่วนการเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่าง MMS และ VP-16 เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมก็แสดงผลเช่นเดียวกับ MMC คือมีความแตกต่างกันอย่างมีนัย ($p \leq 0.05$) จึงเป็นการยืนยันได้ว่าเซลล์ TK6 สามารถนำมาใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่คาดว่า จะมีผลต่อการทำลายสารพันธุกรรมของมนุษย์ได้ รวมทั้งสามารถที่จะนำมาปรับใช้ในการทดสอบสารเคมีอื่นๆ หรือสารสกัดต่างๆ ที่ต้องการทราบผลต่อการทำลายดีเอ็นเอด้วยวิธีการทดสอบไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 ซึ่งได้ผลดีเช่นเดียวกับการทดสอบด้วยวิธีอื่น เช่น วิธี single cell gel electrophoresis (SCGE) เป็นต้น

ทั้งนี้จากการที่ MMC เป็นสารที่เหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสมากที่สุด เนื่องมาจากกลไกการออกฤทธิ์ของ MMC ไม่มีความจำเพาะต่อระยะใด ๆ ของวัฏจักรของเซลล์ ดังนั้นจึงมีผลก่อให้เกิดอันตรายต่อดีเอ็นเอได้มากกว่า MMS และ VP-16 ซึ่งสารทั้ง 2 ชนิดนี้มีกลไกก่อให้เกิดอันตรายต่อดีเอ็นเอของเซลล์ในช่วงระยะ S และ G₂ ของวัฏจักรเซลล์ (Horton *et al.*, 2005; Fox and Fox, 1967; Cancer Care Ontario Formulary, 2003b; British Columbia Cancer Agency, 2006) เพราะเหตุที่ MMS และ VP-16 มีข้อจำกัดในการออกฤทธิ์ต่อดีเอ็นเอนี้เองจึงทำให้ผลของอัตราในการเกิดไมโครนิวเคลียสในเซลล์ TK6 ที่เหนี่ยวนำด้วยสารทั้ง 2 ชนิดเกิดขึ้นน้อยกว่าผลที่เกิดจาก MMC

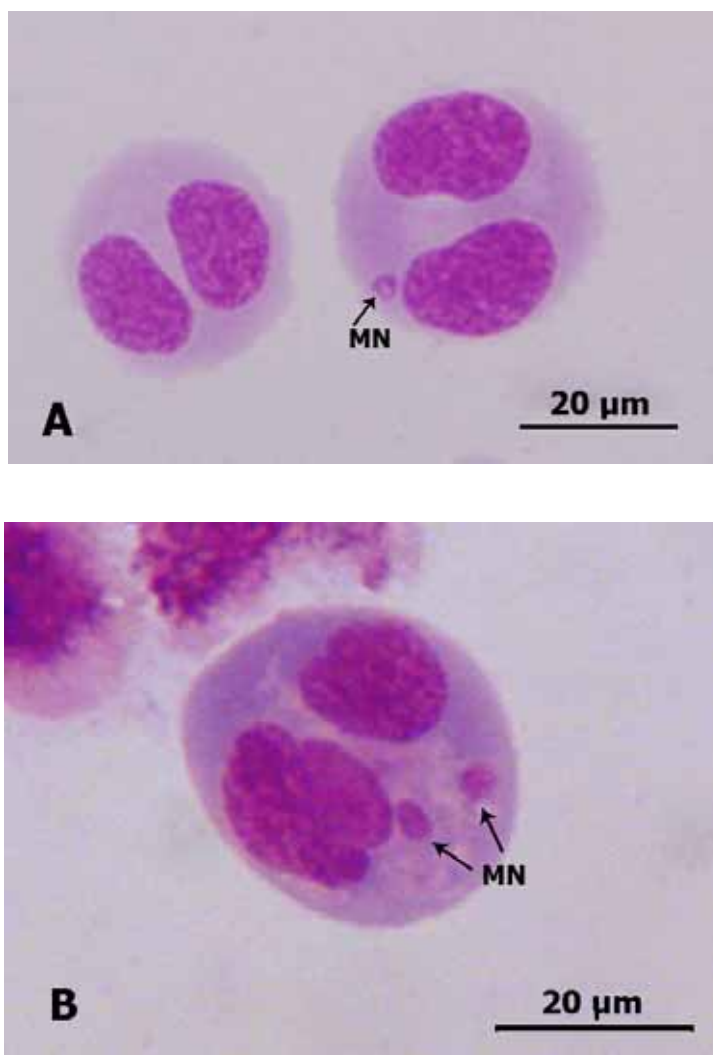
จากผลการทดสอบที่พบเซลล์ที่เกิดการตายแบบ apoptosis ในทุกความเข้มข้นและทุกช่วงเวลาโดยเกิดขึ้นในการทดสอบด้วย VP-16 มากที่สุด (ภาพที่ 15) การที่เซลล์ตายแบบ apoptosis เนื่องมาจากคุณสมบัติของสารเคมีทั้ง 3 ชนิดนี้มีผลต่อการทำงานของยีน p53 ซึ่งควบคุมวัฏจักรของเซลล์และการซ่อมแซมดีเอ็นเอ (Islaih *et al.*, 2005) และการตายแบบ apoptosis เกิดขึ้นได้เมื่อดีเอ็นเอได้รับอันตรายจากสารเคมีตั้งแต่ 2 ชั่วโมงเป็นต้นไป จึงส่งผลให้พบการตายของเซลล์กลุ่มทดสอบที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงมากกว่า 4 ชั่วโมง เพราะเซลล์มีโอกาสดำรงชีวิตได้รับอันตรายจากสารเคมีนานกว่า ถึงแม้ว่าจะมีการซ่อมแซมดีเอ็นเอส่วนที่เกิดความเสียหายแต่ก็ยังคงสัมผัสกับสารเคมีอยู่ตลอดเวลา โดยคุณสมบัติของสารเคมีแต่ละชนิดมีกลไกการออกฤทธิ์หรือมีผลต่อดีเอ็นเอที่แตกต่างกันออกไป กล่าวคือ VP-16 มีผลก่อให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ topoisomerase II ที่จะเข้าจับกับดีเอ็นเอที่เกิดความเสียหายเพื่อทำการซ่อมแซม เมื่อ topoisomerase II ไม่สามารถ

ทำงานได้จึงทำให้เกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ และเมื่อเกิดมากขึ้นก็จะนำไปสู่การตายของเซลล์ (Calabresi and Chabner, 1996; Joel, 1996; Ferguson and Baguley, 1996; Bassi *et al.*, 2002) ส่วนสาร MMS เป็นสารกลุ่ม DNA alkylating agent ซึ่งเมื่อได้รับติดต่อกันเป็นเวลานานก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอและเหนี่ยวนำให้เกิดการก่อกลายพันธุ์ในเซลล์ (Beranek, 1990; Sarkar *et al.*, 2005) และเกิดการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอ (Lundin *et al.*, 2005) เมื่อไม่สามารถซ่อมแซมได้จึงนำไปสู่การตายของเซลล์ (Friedberg *et al.*, 2004; Sancar *et al.*, 2004) และสาร MMC นอกจากมีคุณสมบัติในการเหนี่ยวนำให้เกิดไมโครนิวเคลียสมากที่สุดแล้ว MMC ยังมีความเป็นพิษต่อเซลล์ก่อให้เกิดดีเอ็นเอ cross-link และเกิดการแตกหักของดีเอ็นเอ (Lawn *et al.*, 1976) และเมื่อมีการแตกหักของชิ้นส่วนดีเอ็นเอมากขึ้นในที่สุดเซลล์ก็จะเข้าสู่การตายแบบ apoptosis (Clarke *et al.*, 2004) แต่การที่ MMC ก่อให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis น้อยที่สุด อาจเนื่องมาจากการออกฤทธิ์ของ MMC ไม่จำเพาะต่อช่วงเวลาใดของวัฏจักรเซลล์ และกลไกของวัฏจักรเซลล์ซึ่งมีการตรวจสอบหาจุดผิดพลาดอันเกิดจากความเสียหายที่ได้รับสารเหนี่ยวนำที่มีจุดตรวจสอบอยู่ 3 จุด คือ G₀/G₁ point, G₁/S point และ G₂/M point (Beth, 1998) จึงทำให้กลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วย MMC มีการตรวจสอบและมีการแก้ไขมากกว่ากลุ่มเซลล์ที่ทดสอบด้วย MMS และ VP-16 ซึ่งมีการออกฤทธิ์ต่อระยะ S และ G₂ ซึ่งผ่านจุดตรวจสอบความผิดพลาดน้อยกว่า



ภาพที่ 15 ลักษณะของเซลล์ TK6 ที่พบในการทดสอบด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส

A. mononucleated cell B. binucleated cell ซึ่งไม่มีไมโครนิวเคลียส
C.-D. multi-nucleated cells E. เซลล์ที่ตายแบบ apoptotic (AP)



ภาพที่ 16 ลักษณะของเซลล์ TK6 ในการทดสอบด้วยวิธีไมโครนิวเคลียส A. Binucleated cell ที่พบหนึ่งไมโครนิวเคลียส (MN) B. Binucleated cell ที่พบสองไมโครนิวเคลียส (MN)

2. ความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6

2.1 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC

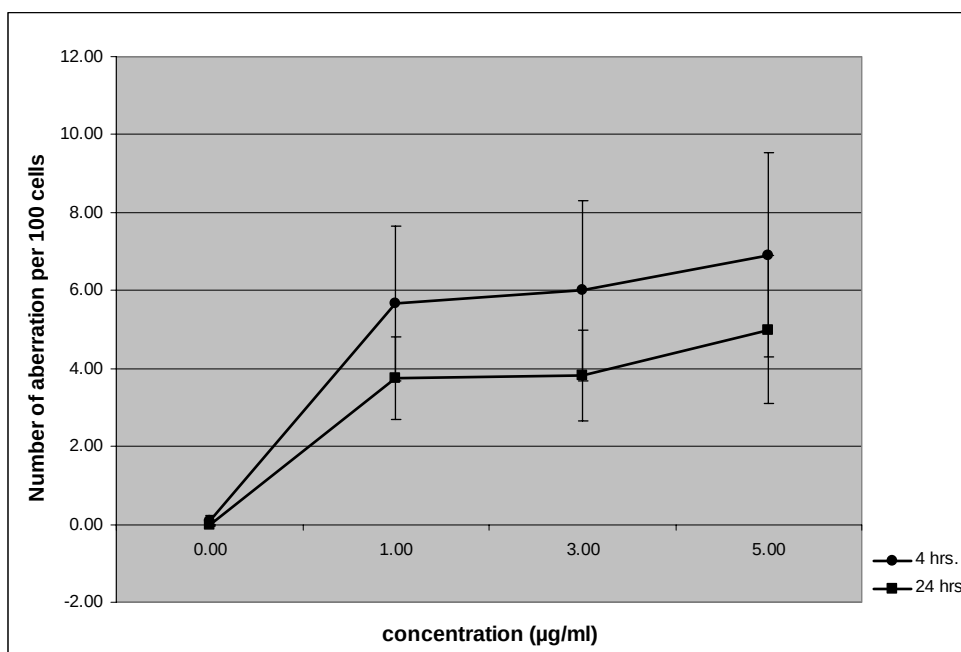
ทดสอบการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC ที่ระดับความเข้มข้น 1.00, 3.00 และ 5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจำนวน 100 เซลล์ต่อหนึ่งความเข้มข้น ได้ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ ดังตาราง ที่ 5 ภาพที่ 17, 24, 25 และ 26 ตามลำดับ

ตารางที่ 5 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย MMC ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซมต่อ 100 เซลล์ ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 (control)	0.08 ± 0.14	0.00 ± 0.00
1.00	5.67 ± 1.99	3.75 ± 1.05
3.00	$6.00 \pm 2.30^*$	$3.83 \pm 1.16^*$
5.00	$6.92 \pm 2.63^*$	$5.00 \pm 1.92^*$

หมายเหตุ ^a ค่า Mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (LSD test)



ภาพที่ 17 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย MMC ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่า MMC มีผลก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เมื่อทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วย LSD test พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทั้งที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แต่ที่ระดับความเข้มข้น 3.00 และ 5.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ทั้งที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

จากการเหนี่ยวนำเซลล์ TK6 ให้เกิดความผิดปกติด้วย MMC พบว่าเซลล์ TK6 เกิดความผิดปกติของโครโมโซม โดยตรวจพบการเกิด gap และ break มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติแบบ dicentric และ exchange บ้างเล็กน้อย ซึ่งผลการทดสอบนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ Bakshi *et al.* (1998) ที่รายงานว่า MMC มีผลเป็น positive ในการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ลิมโฟไซต์ของมนุษย์ และผลการศึกษาของ Natarajan and Schmid (1971); Brogger and Johnsen (1972); Satoh *et al.* (2002) ที่พบว่า MMC มีผลก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆ ได้แก่ การเกิด break และการเกิด exchange ที่เหนี่ยวนำให้เกิดได้ทั้งเซลล์รังไข่ของ Chinese hamster และเซลล์ลิมโฟไซต์ของมนุษย์

2.2 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMS

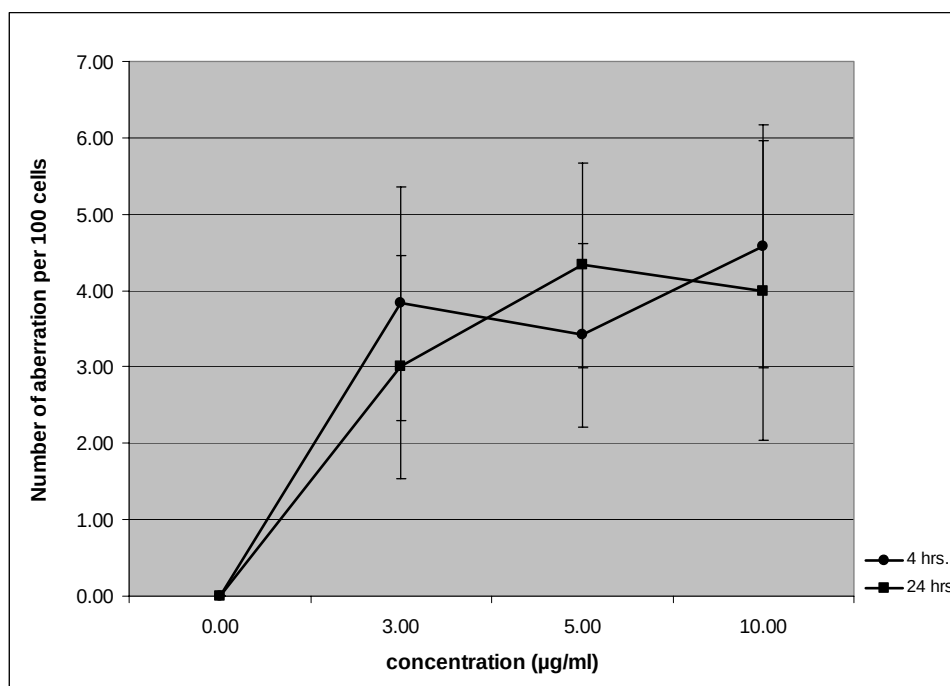
ทดสอบการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMS ที่ระดับความเข้มข้น 3.00, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจำนวน 100 เซลล์ ต่อหนึ่งความเข้มข้น ได้ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 6 ภาพที่ 18, 24, 25 และ 26 ตามลำดับ

ตารางที่ 6 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย MMS ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซมต่อ 100 เซลล์ ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 (Control)	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
3.00	$3.83 \pm 1.53^*$	$3.00 \pm 1.46^*$
5.00	$3.42 \pm 1.21^*$	$4.33 \pm 1.34^*$
10.00	$4.58 \pm 1.59^*$	$4.00 \pm 1.96^*$

หมายเหตุ ^a ค่า Mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (LSD test)



ภาพที่ 18 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย MMS ที่ความเข้มข้นต่างกันเป็นเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่า MMS มีผลก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และเมื่อทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุม ด้วย LSD test พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 3.00, 5.00 และ 10.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

ผลการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมที่เหนี่ยวนำด้วย MMS (ตาราง ที่ 6) พบว่าทุกระดับความเข้มข้นที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งผลที่เกิดขึ้นสอดคล้องกับผลอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียส (ตารางที่ 2) แต่เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ระหว่างช่วงเวลาแล้ว ระยะเวลาที่ทดสอบ 4 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$)

2.3 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย VP-16

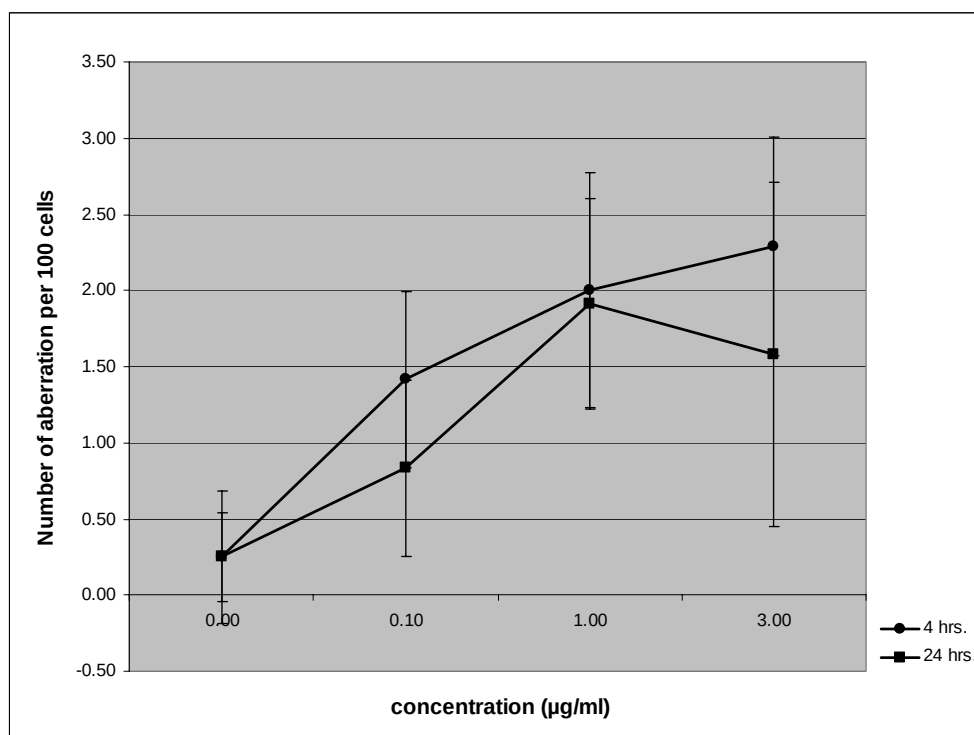
ทดสอบการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย VP-16 ที่ระดับความเข้มข้น 0.10, 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร บ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ เมื่อนำมาตรวจนับจำนวนเซลล์ที่มีความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเมทาเฟสจำนวน 100 เซลล์ต่อหนึ่งความเข้มข้น ได้ค่าเฉลี่ยทั้ง 3 ซ้ำ ดังตารางที่ 7 ภาพที่ 19, 24, 25 และ 26 ตามลำดับ

ตารางที่ 7 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย VP-16 ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ความเข้มข้น ($\mu\text{g/ml}$)	จำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซมต่อ 100 เซลล์ ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
0 (control)	0.25 ± 0.43	0.25 ± 0.29
0.10	1.42 ± 0.58	0.83 ± 0.58
1.00	2.00 ± 0.78	$1.92 \pm 1.13^*$
3.00	2.29 ± 0.72	$1.58 \pm 1.13^*$

หมายเหตุ ^a ค่า Mean $\pm$ SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ

* มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม (LSD test)



ภาพที่ 19 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย VP-16 ที่ความเข้มข้นต่างกันในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

จากการทดสอบพบว่า VP-16 มีผลก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 โดยมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้น และเมื่อทดสอบทางสถิติเทียบกับกลุ่มควบคุมด้วย LSD test พบว่าที่ระดับความเข้มข้น 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) และที่ระดับความเข้มข้น 0.10, 1.00 และ 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง และความเข้มข้น 0.10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม

จากผลการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 ที่เหนี่ยวนำด้วย VP-16 แสดงให้เห็นความแตกต่างของทั้ง 2 ช่วงเวลา คือ กลุ่มทดสอบที่ระยะเวลา 4 ชั่วโมง แต่ละความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) จากกลุ่มควบคุม แต่กลุ่มทดสอบที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) จากกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดสอบของ Bassi (2002) ที่แสดงให้เห็นว่าการเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมด้วย VP-16 ที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีความผิดปกติของโครโมโซมเพิ่มขึ้นโดย

เกิด dicentric, ring, exchange และการแตกหักของชิ้นส่วนโครโมโซม และถ้าเกิดขึ้นมากๆ ก็มีผลเหนี่ยวนำให้เกิดการตายของเซลล์แบบ apoptosis ได้เช่นกัน (Filipski *et al.*, 1990; Walker *et al.*, 1994)

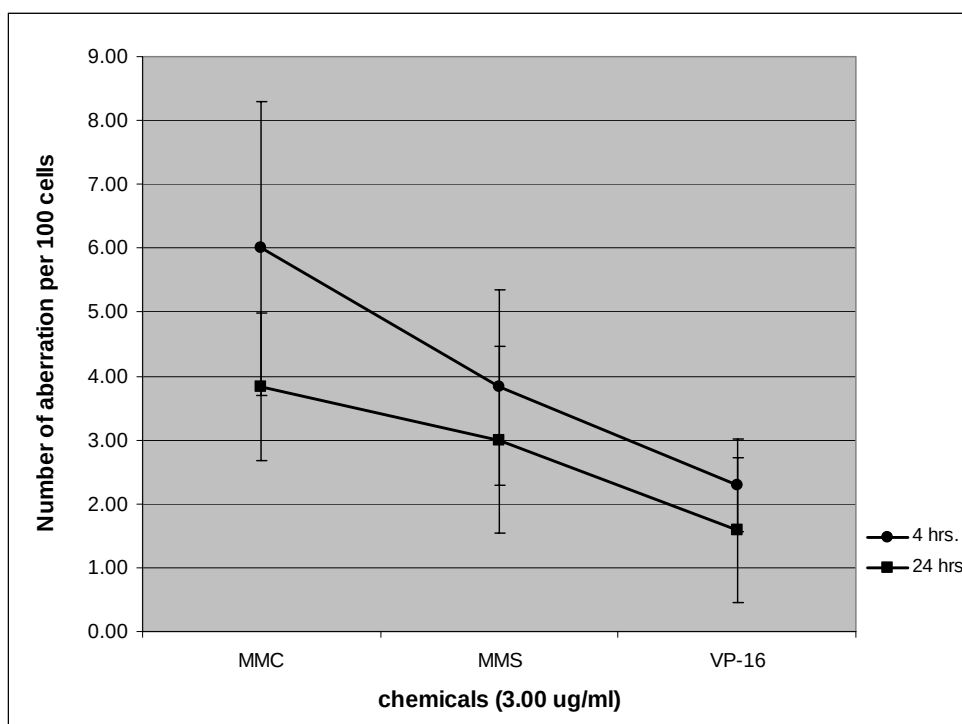
2.4 ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำของ MMC, MMS และ VP-16 ที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการทดสอบอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ MMC, MMS และ VP-16 นำผลอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 ที่เกิดขึ้นมาเปรียบเทียบกันที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงผลดังตารางที่ 8 ภาพที่ 20

ตารางที่ 8 อัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการทดลอง 3 ซ้ำ ที่เหนี่ยวนำด้วย MMC, MMS และ VP-16 ที่ความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง

ชนิดสารเคมี	จำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซมต่อ 100 เซลล์ ^a	
	4 ชั่วโมง	24 ชั่วโมง
MMC	6.00 ± 2.30	3.83 ± 1.16
MMS	3.83 ± 1.53	3.00 ± 1.46
VP-16	2.29 ± 0.72	1.58 ± 1.13

หมายเหตุ ^a ค่า Mean ± SD จากการทดลอง 3 ซ้ำ



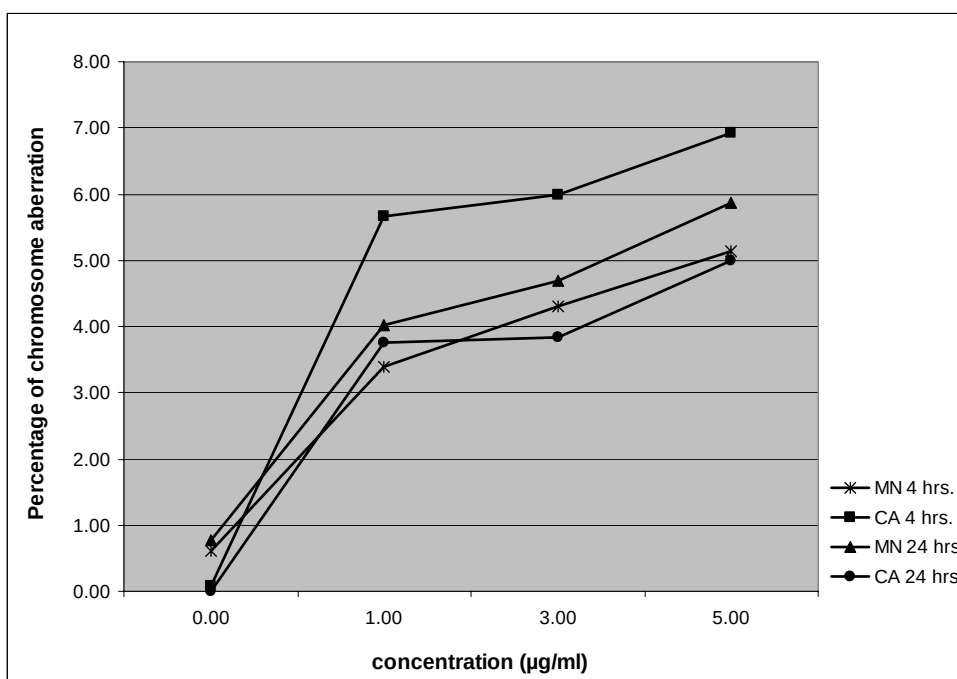
ภาพที่ 20 ความสัมพันธ์ของอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำของ MMC, MMS และ VP-16 ที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

การทดสอบอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 พบว่าสารเคมีทั้ง 3 ชนิด เหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรมภายในเซลล์ เมื่อนำอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม ที่ระดับความเข้มข้น 3.00 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากการเหนี่ยวนำของสารทั้ง 3 ชนิด มาเปรียบเทียบกันโดยทดสอบด้วยวิธี T-Test พบว่าระหว่างกลุ่มของ MMS กับ MMC และ VP-16 ที่ระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) แต่เมื่อเปรียบเทียบระหว่าง MMC กับ VP-16 พบว่ามีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทั้งนี้สามารถสรุปได้ว่าอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6 ที่เกิดจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร MMC มีอัตราการเกิดความผิดปกติมากที่สุด และมีแนวโน้มที่จะเพิ่มขึ้น เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วพบว่ามี ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$)

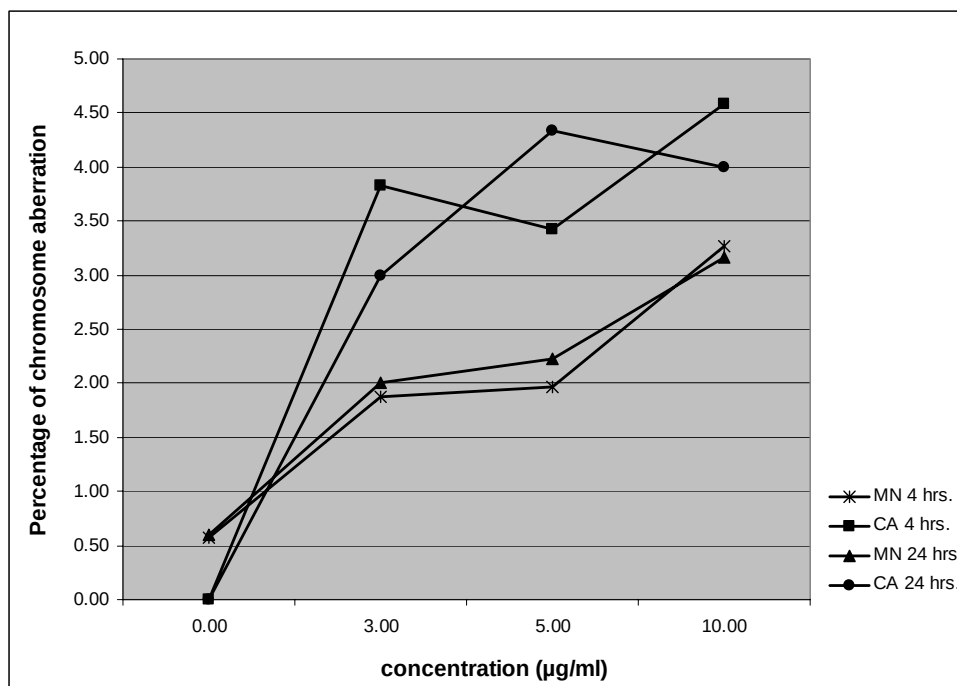
จากผลการทดสอบความผิดปกติของโครโมโซมที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมีทั้ง 3 ชนิด คือ MMC, MMS และ VP-16 ให้ผลเป็นที่ชัดเจนว่าสารทั้ง 3 ชนิด มีผลก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในรูปแบบต่าง ๆ ในเซลล์ TK6 รูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมที่พบในการทดสอบนี้ คือ การเกิด chromatid gap และ break ซึ่งถูกพบมากที่สุด chromosome gap และ break พบรองลงมา และยังมีความผิดปกติอื่นๆ ที่พบบ้างเล็กน้อย ได้แก่ การเกิด dicentric, ring และการเกิด chromatid exchange ที่พบในการเหนี่ยวนำด้วย VP-16 แต่ถึงอย่างไรก็ตามความผิดปกติของโครโมโซมแบบ gap และ break ก็เป็นความผิดปกติที่พบได้ในทุกกลุ่มการทดสอบ

3. ศึกษาเปรียบเทียบความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6

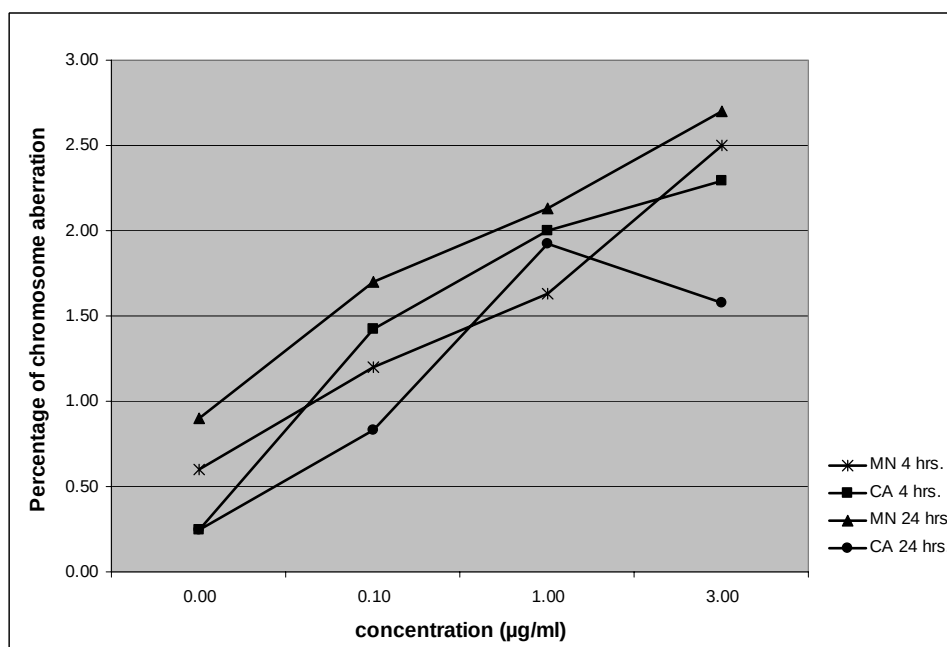
จากการศึกษาความผิดปกติของเซลล์จากสิ่งก่อการกลายด้วยการทดสอบไมโครนิวเคลียส และการหาความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6 ที่เหนี่ยวนำด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ MMC, MMS และ VP-16 เมื่อนำข้อมูลที่ได้จากการทดสอบทั้งสองวิธีมาสร้างกราฟแสดงความสัมพันธ์กันโดยเทียบข้อมูลจากการทดสอบทั้งสองวิธีเป็นเปอร์เซ็นต์ ได้กราฟดังภาพที่ 21, 22 และ 23



ภาพที่ 21 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMC



ภาพที่ 22 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย MMS

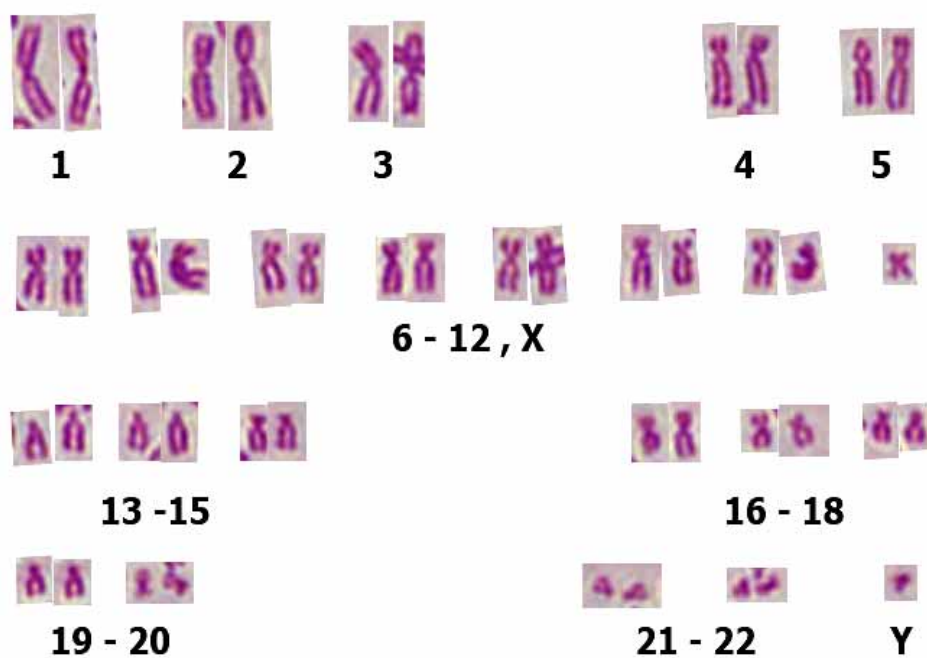
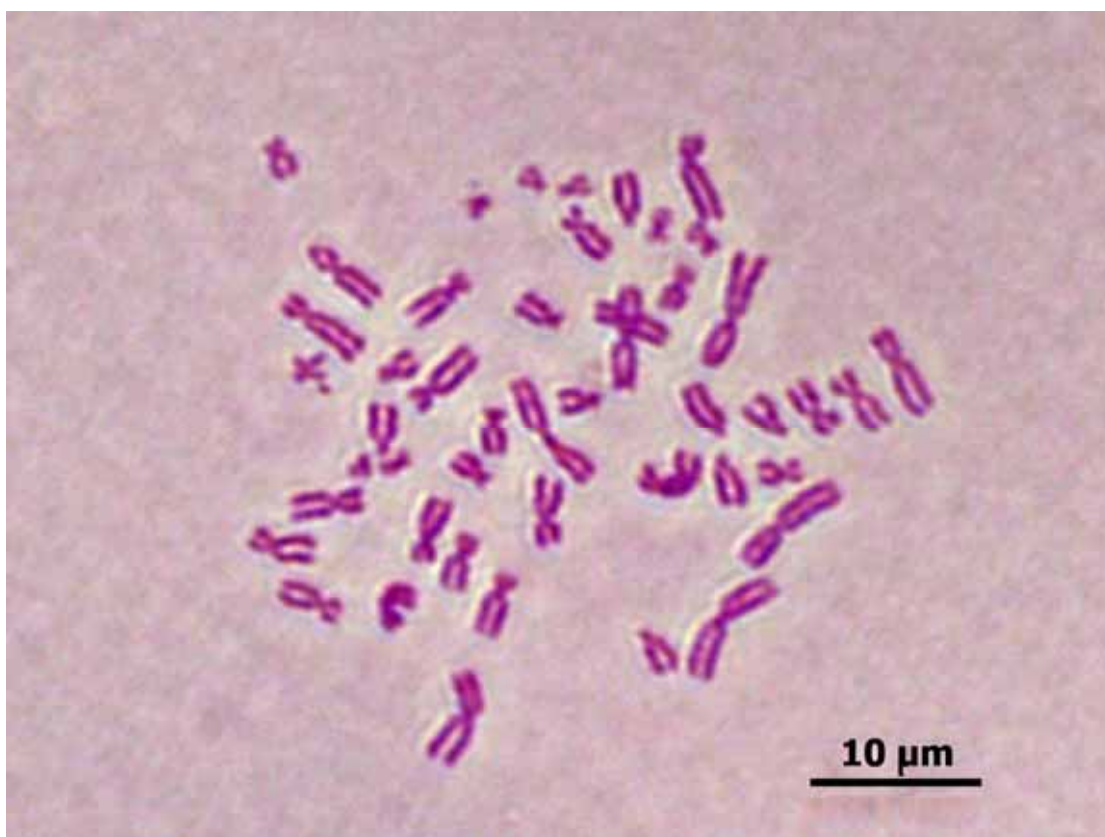


ภาพที่ 23 ความสัมพันธ์ระหว่างการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ TK6 จากการเหนี่ยวนำด้วย VP-16

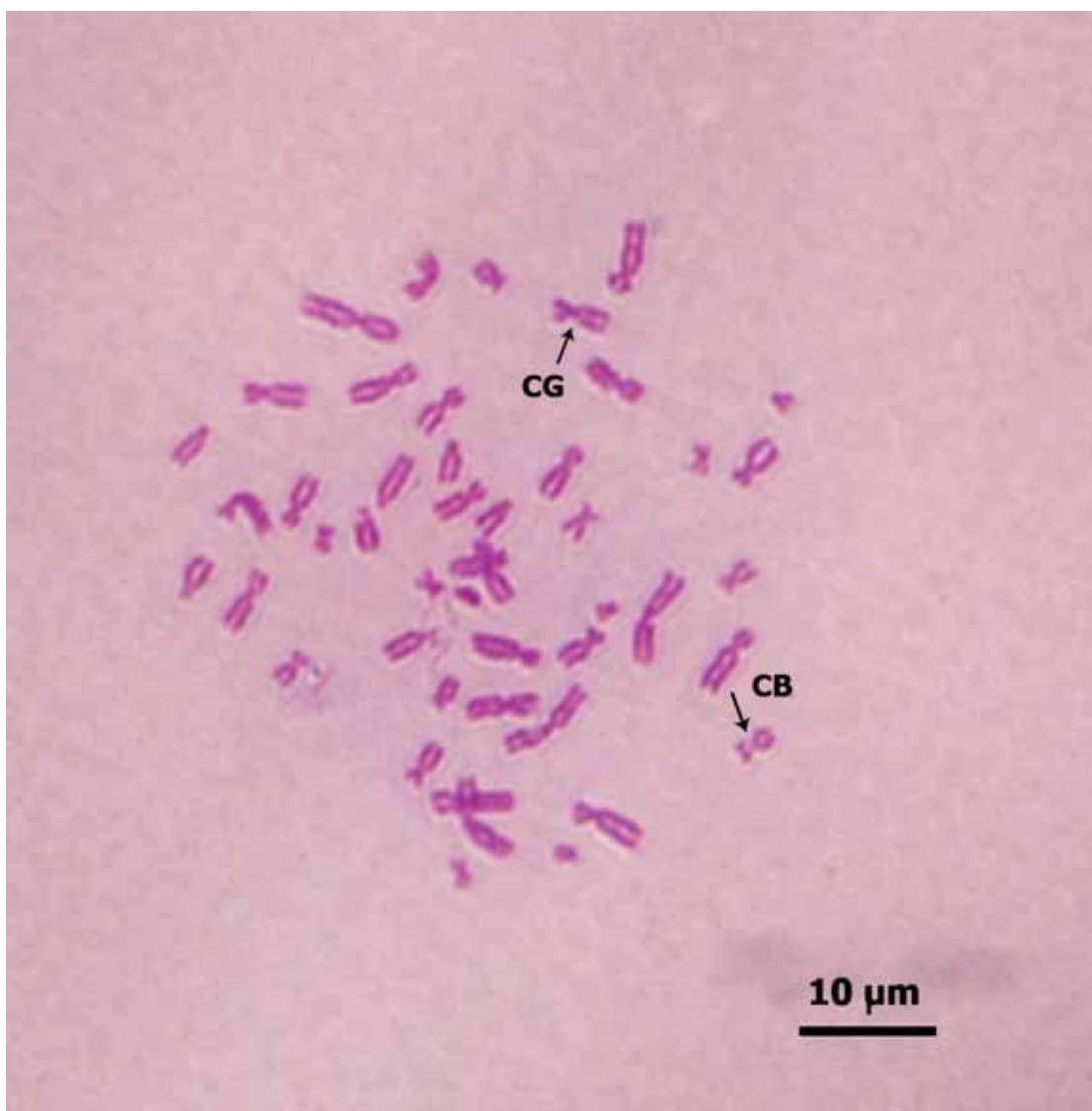
จากภาพที่ 21, 22 และ 23 แสดงความสัมพันธ์ขึ้นต้น สามารถสรุปได้ว่าแนวโน้มของการเกิดความผิดปกติทั้งการเกิดไมโครนิวเคลียสและการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6 มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันกล่าวคือ ในขณะที่อัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมก็เพิ่มขึ้นด้วย เมื่อเปรียบเทียบทางสถิติระหว่างอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสและอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร MMS มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดยมีอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมมากกว่าอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสอย่างชัดเจน และจากการเหนี่ยวนำด้วยสาร MMC และ VP-16 แสดงผลที่คล้ายกันคือไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ($p \geq 0.05$) ระหว่างอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสและอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซม

จากผลการทดสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมโดยการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมีที่เป็นสิ่งก่อการกลายทั้ง 3 ชนิดจะเห็นว่าผลการทดสอบระหว่างกลุ่มทดสอบที่ระยะเวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ไม่เกิดความแตกต่างกันซึ่งอาจจะเกิดขึ้นเนื่องจากความแตกต่างของช่วงระยะความห่างของระดับความเข้มข้นอาจน้อยเกินไปจึงทำให้ผลการทดสอบระหว่างช่วงเวลาที่ได้ไม่แตกต่างกัน

จากการทดสอบการเหนี่ยวนำเซลล์ TK6 ให้เกิดความผิดปกติด้วยสิ่งก่อการกลายโดยการทดสอบด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซม ผลของการทดสอบที่ได้เป็นสิ่งที่บ่งชี้ได้ว่าเซลล์ TK6 มีคุณสมบัติที่ดีในการใช้ทดสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมด้วยสิ่งก่อการกลาย หรือสารเคมีอื่น ๆ ที่คาดว่าจะเป็นสิ่งก่อการกลายหรือสารก่อมะเร็ง นอกจากผลการทดสอบที่ได้นี้จะมีความแตกต่างกันอย่างชัดเจนแล้ว คุณสมบัติเฉพาะของเซลล์ TK6 ซึ่งเป็นเซลล์ที่เจริญเติบโตรวดเร็ว มีวิธีการเก็บเกี่ยวง่าย และลักษณะเฉพาะของตำแหน่งของยีนที่ถูกปรับเปลี่ยนให้มีความเหมาะสมต่อการทดสอบด้วยสารที่เป็นสิ่งก่อการกลายและสารก่อมะเร็งต่างๆ ได้หลายชนิด และยังเพาะเลี้ยงได้ง่าย จึงทำให้เซลล์ TK6 น่าจะเป็นเซลล์ที่ถูกเลือกใช้ในการทดสอบทางด้านนี้มากขึ้นไม่ว่าจะเป็นการทดสอบด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสหรือความผิดปกติของโครโมโซม หรือการทดสอบด้วยวิธีอื่นๆ ก็ตาม

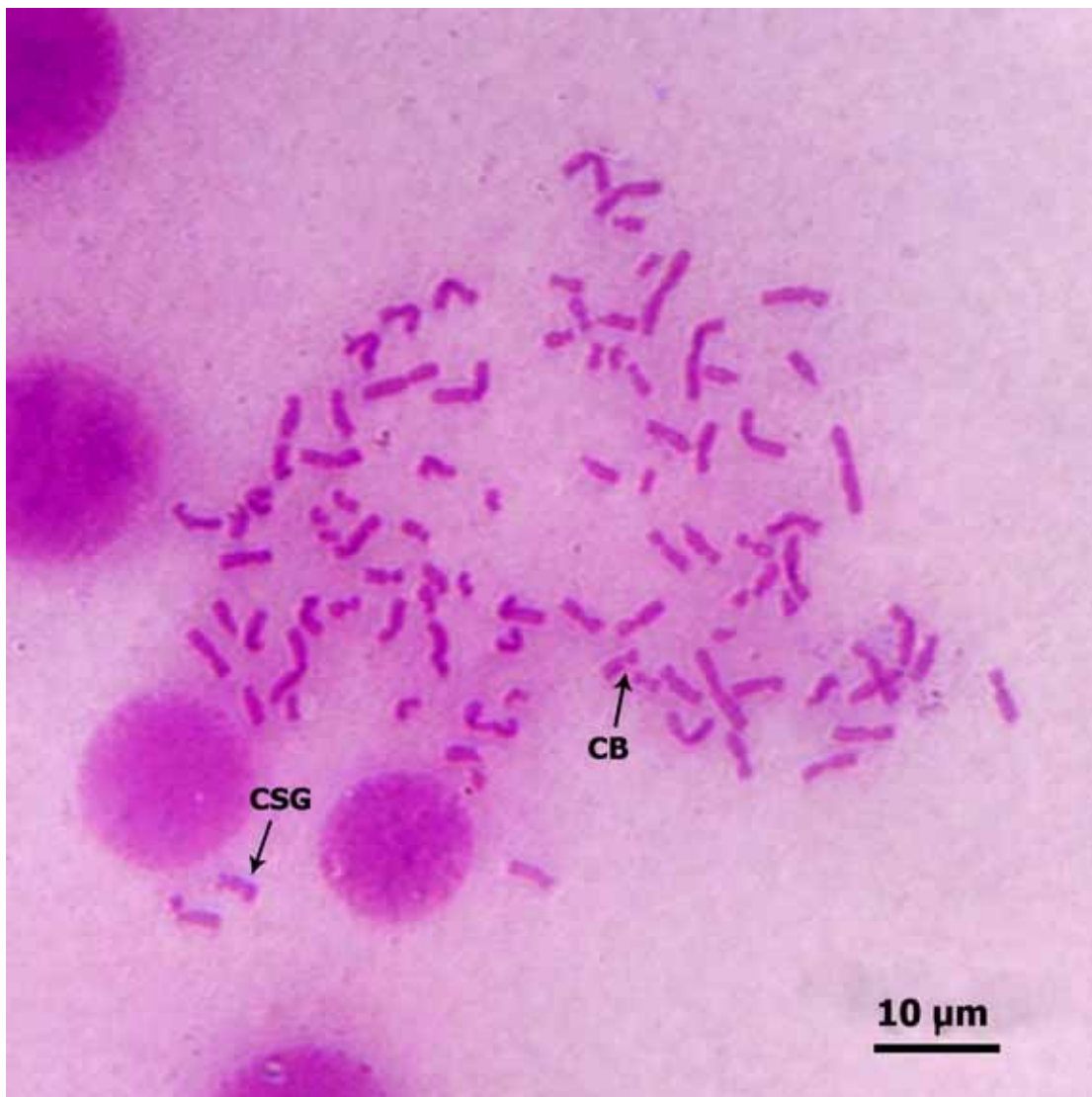


ภาพที่ 24 คาริโอไทป์ (karyotype) ของเซลล์ลิ้มโพลาสต์ของมนุษย์ชนิด TK6 (46, XY)



ภาพที่ 25 ความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ลิมโฟบลาสต์ของมนุษย์ชนิด TK6

(CB = chromatid break, CG = chromatid gap)



ภาพที่ 26 ความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์ลิมโฟบลาสต์ของมนุษย์ชนิด TK6
(CB = chromatid break , CSG = chromosome gap)

สรุปผลการทดลอง

ในการทดสอบการเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี 3 ชนิด คือ MMC, MMS และ VP-16 ด้วยวิธีไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ลิมโฟบลาสต์ของมนุษย์ชนิด TK6 ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ กัน และใช้เวลาบ่มเลี้ยงในสารทดสอบนาน 4 และ 24 ชั่วโมง สามารถสรุปผลการทดลองได้ดังนี้

1. MMC, MMS และ VP-16 มีอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสของเซลล์ TK6 ที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) มีแนวโน้มการเกิดความผิดปกติเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบมากขึ้น โดย MMC มีอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสมากที่สุด รองลงมาคือ VP-16 และ MMS ตามลำดับ

2. MMC, MMS และ VP-16 ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6 ที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) โดย MMC ก่อให้เกิดความผิดปกติมากที่สุด รองลงมาคือ MMS และ VP-16 ตามลำดับ โดยรูปแบบความผิดปกติของโครโมโซมที่พบส่วนใหญ่เป็นแบบ chromatid gap และ break และ chromosome gap และ break โดยมีแนวโน้มของความผิดปกติเพิ่มมากขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบมากขึ้น

3. MMC, MMS และ VP-16 มีแนวโน้มของอัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสและความผิดปกติของโครโมโซมในเซลล์ TK6 ไปในทิศทางเดียวกันโดยเมื่ออัตราการเกิดไมโครนิวเคลียสเพิ่มขึ้นอัตราการเกิดความผิดปกติของโครโมโซมก็เพิ่มขึ้นด้วย

จากการวิจัยครั้งนี้ยืนยันได้ว่าเซลล์ TK6 สามารถนำไปใช้ในการทดสอบสารเคมีที่ก่อให้เกิดอันตรายต่อดีเอ็นเอได้ และมีคุณสมบัติที่ดีในการทดสอบความผิดปกติของสารพันธุกรรมด้วยสิ่งก่อการกลายหรือสารเคมีอื่นๆ ที่คาดว่าจะเป็นสิ่งก่อการกลายหรือสารก่อมะเร็ง

ข้อเสนอแนะ

1. การเพาะเลี้ยงเพื่อทดสอบสารอาจเกิดปัญหาในการเจริญเติบโตของเซลล์แต่ละครั้งที่ทำการทดสอบไม่เท่ากัน อันเนื่องมาจากสภาวะแวดล้อม หรือเทคนิควิธีการ จึงต้องใช้เวลาในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อให้เซลล์ได้ปรับสภาวะให้คงที่ก่อนนำเซลล์มาทดสอบ
2. ในการทดสอบความเป็นพิษของสารเคมีที่มีต่อสารพันธุกรรมเพื่อให้ผลการทดสอบเป็นที่ยอมรับได้ ควรจะต้องมีการทดสอบด้วยวิธีต่างๆ กัน เพื่อเป็นการยืนยันและเปรียบเทียบผลการทดสอบ
3. ในการทดสอบด้วยสารหลายชนิดซึ่งบางชนิดอาจมีความสามารถในการละลายในตัวทำละลายที่ต่างกัน ดังนั้นในกลุ่มควบคุมจึงต้องเพิ่มสารที่เป็นตัวทำละลายนั่นในการทดสอบด้วย
4. ในขั้นตอนการเก็บเกี่ยวเซลล์เพื่อเตรียมสไลด์ต้องควบคุมการใช้เวลาในแต่ละขั้นตอนอย่างรวดเร็ว เพราะเซลล์ถูกหยุดการทำงานชั่วขณะเท่านั้น หากทิ้งไว้นานกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์จะทำงานและอาจเป็นผลทำให้เซลล์ตาย
5. ควรเพิ่มระยะห่างของระดับความเข้มข้นของสารทดสอบที่ใช้เพื่อให้เห็นความแตกต่างที่ชัดเจนมากขึ้น
6. ก่อนทดสอบสารเคมีแต่ละชนิดต้องทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ที่ใช้ทดสอบก่อนทุกครั้ง (cytotoxicity test) เพื่อหาค่า LD_{50} ของสารและใช้ในการคำนวณหาช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

- จันทร์เพ็ญ เมฆาภิรักษ์. 2530. ผลทางไซโตจินิกของบลีโอมัยซิน เจนเขียนไวโอเลต และ
ไมโตมัยซิน-ซี ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- ชัยวัฒน์ ต่อสกุลแก้ว, ชีรยุทธ กลิ่นสุคนธ์ และปัญญา เต็มเจริญ. 2539. หลักการทางพิษวิทยา.
ภาควิชาสรีรวิทยาและภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดลและ
มหาวิทยาลัยรังสิต, กรุงเทพฯ.
- ธวัช ขนบดี และทวีพร สิทธิธำ. 2536. การเพาะเลี้ยงเซลล์และเนื้อเยื่อสัตว์. เอกสารการอบรม.
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ. อ้างถึงใน นานนภิส ประทีป ณ ถลาง. 2540.
ความผิดปกติของโครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคนภายหลังได้รับอบเชยฉนวน. วิทยานิพนธ์
ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- นานนภิส ประทีป ณ ถลาง. 2540. ความผิดปกติของโครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคนภายหลัง
ได้รับอบเชยฉนวน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- มาลิน จุลศิริ. 2527. สิ่งก่อกลายพันธุ์และสิ่งก่อมะเร็งในสิ่งแวดล้อม: ยาและสารผสมในอาหาร
สัตว์, น. 42-60. ใน ประกอบการสัมมนาวิชาพันธุศาสตร์ ครั้งที่ 4, 21-24 พฤศจิกายน
2527. มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.
- วิทยา เมฆนันท์. 2522. เซลล์ในพันธุศาสตร์ในเวชปฏิบัติ. โครงการตำราศิริราช, มหาวิทยาลัย
มหิดล, กรุงเทพฯ. อ้างถึงใน นานนภิส ประทีป ณ ถลาง. 2540. ความผิดปกติของ
โครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคนภายหลังได้รับอบเชยฉนวน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- เสาวคนธ์ ธนสมบัติ. 2530. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ mitomycin C ที่มีต่อโครโมโซมของ
เม็ดเลือดขาวของคนปกติ และคนที่เป็มะเร็งตับในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท,
มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

หนามเตย มีเมสกุล. 2529. ฟีนobarbิโทลเหนี่ยวนำโครโมโซมให้เกิดความผิดปกติในลิมโฟไซต์
ของคน. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Aardema, M.J. and M.K. Volders. 2001. The in vitro micronucleus assay. pp. 163-186. *In* W.N.
Choy, eds. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. Marcel Dekker, Inc.,
New York.

American Type Culture Collection (ATCC). 2004. **Cell line catalogues: ATCC CRL 8015**.
Available Source: <http://www.atcc.org/SearchCatalogs/longview.cfm>, August 16, 2004

Bakshi, S.R., R.K. Patel, S.K. Roy, P. Alladi, A.H. Trivedi, J.M. Bhatavdekar, D.D. Patel, P.M.
Shah and U.M. Rawal. 1998. Mitomycin C induced chromosomal aberrations in yong
cancer patients. **Mutat Res.** 422: 223-228.

Bassi, L., M. Carloni, E. Fonti, N.P. Peña, R. Meschini and F. Palitti. 2002. Pifithrin- α , an
inhibitor of p53, enhances the genetic instability induced by etoposide (VP-16) in human
lymphoblastoid cells treated *in vitro*. **Mutat Res.** 499: 163-176.

Beranek, D.T. 1990. Distribution of methyl and ethyl adducts following alkylation with
monofunctional alkylating agents. **Mutat Res.** 231: 11-30.

Beth, A.M. 1998. **Mutation, Mutagens and DNA repair outline: Human Genetics**. 5th ed.
Division of Biology, Kansas State University, Manhattan.

British Columbia Cancer Agency. 2006. **Drug Index (Professional)-Etoposide**. Available
Source: <http://www.bbccancer.bc.ca/HPI/DrugDatabase/DrugIndexPro/Etoposide.htm>,
may 19, 2006.

Brogger, A. and J. Johnsen. 1972. A model for the production of chromosome damage by mitomycin C. **Chromosoma**. 38: 95-104. *Cited* Satoh, T., M. Hatanaka, K. Yamamoto, M. Kuru-o and T. Sofuni. 2002. Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes. **Mutat Res**. 504: 57-65.

Calabresi, P. and B.A. Chabner 1996. Chemotherapy of neoplastic disease: introduction. pp. 1225-1232. *In* P.B. Molinoff, R.W. Ruddon, eds. **Goodman & Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics**. 9th ed. The McGraw-Hill, Inc, New York.

Cancer Care Ontario (CCO) Formulary. 2003a. **Mitomycin**. Available Source: <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/MITOMYCIN.pdf>, July 20, 2004.

_____. 2003b. **Etoposide**. Available Source: <http://www.cancercare.on.ca/pdfdrugs/ETOPOSIDE.pdf>, July 20, 2004.

Clarke, A.A., F.M. Gibson, J. Scott, N. Myatt and T.R. Rutherford. 2004. Fanconi's anemia cell lines show distinct mechanisms of cell death in response to mitomycin C or agonistic anti-Fas antibodies. **Haematologica**. 89: 11-20.

Clayson, D.B. 1972. **Chemical Carcinogenesis**. Little, Brown and Company, Boston.

Dipalma, R.J. 1971. **Drill's Pharmacology in Medicine**. McGraw-Hill Book Co. New York.
อ้างอิงใน จันทรเพ็ญ เมฆาภิรักษ์. 2530. ผลทางไซโตจินิกของบลิโอมัยซิน เจนเขียน ไวโอเลต และไมโตมัยซิน-ซี ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.

Eric, H.R. and W.N. Hait. 2006. **Anthracyclines and DNA intercalators/Epipodophyllotoxins/DNA Topoisomerase**. Available Source: <http://www.bcdecker.com>, May 25, 2006.

- Fenech, M. 2000. The in vitro micronucleus technique. **Mutat Res.** 455: 81-95.
- _____, and A. Morley. 1985a. Solutions to the kinetic problem in the micronucleus test. **Cytobios.** 43: 233-246.
- _____, _____. 1985b. Measurement of micronuclei in lymphocytes. **Mutat Res.** 148: 99-105.
- _____, W.P. Chang, M.K.Volders, N. Holland, S. Bonassi and E. Zeiger. 2003. HUMAN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutat Res.** 534: 65-75.
- Ferguson, L.R. and B.C. Baguley. 1996. Mutagenicity of anticancer drugs that inhibit topoisomerase enzyme. **Mutat Res.** 335: 91-101.
- Filipski, J., J. Leblanc, T. Youdale, M. Sikorska and P.R. Walker. 1990. Periodicity of DNA folding in higher order chromatin structure. **EMBO J.** 9: 1319-1327.
- Fox, M.A. and B.W. Fox. 1967. Effect of methyl methanesulfonate on the growth of P388 lymphoma cells in vitro and on their rate of progress through the cell cycle. **Cancer Res.** 27: 1895-1812.
- Friedberg, E.C., L.D. McDaniel and R.A. Schultz. 2004. The role of endogenous and exogenous DNA damage and mutagenesis. **Curr. Opin. Genet. Dev.** 14: 5-10.
- Garriott, M.L., J.B. Phelps and P.H. Wherly. 2002. A protocol for the in vitro micronucleus test I. Contributions to the development of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 16 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutat Res.** 517: 123-134.

- Gensia Sicor Pharmaceuticals. 1998. **Etoposide injection**. Available Source: <http://patient.cancerconsultants.com/druginserts/etoposide.pdf>, July 20, 2004.
- Goldberg, I.H. 1965. Mode of action of antibiotic, drugs affecting nuclei acid and protein synthesis. **Amer. J. Med.** 36(6): 22-52.
- Hande, K.R. 1998. Etoposide:for decades of development of a topoisomerase II inhibitor. **Eur J Cancer.** 34(10): 1514-1521.
- Hazardous Substances Data Bank. 2001. **Online database produced by the National Library of Medicine. methyl methanesulfonate**. Available Source: <http://toxnet.nlm.nih.gov/cgi-bin/sis/htmlgen?HSDB>, July 20, 2004.
- Heddle, J.A. 1973. A rapid in vivo test for chromosome damage. **Mutat Res.** 18: 187-192.
- Herskowitz, I.H. 1977. **Principle of Genetics**. 2nd ed. Macmillan Publishing Co. Inc., New York.
- Horton, J.K., D.F. Stefanick, J.M. Naron, P.S. Kedar and S.H. Wilson. 2005. Poly(ADP-ribose) polymerase activity prevents signaling pathways for cell cycle arrest after DNA methylating agent exposure. **BIO. CHEM.** 280(16): 15773-15785.
- International Agency for Research on Cancer. 1974. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: some anti-thyroid and related substances, nitrofurans and industrial chemicals. Lyon, France: **IARC**. 7: 326.
- _____. 1999. IARC Monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to man: re-evaluation of some organic chemicals, hydrazine, and hydrogen peroxide. Lyon, France: **IARC**. 71: 1589.

- Ishii, Y. and M.A. Bender. 1978. Factors influencing the frequency of mitomycin-C induce sister chromatid exchanges in culture. **Mutat Res.** 51: 411-418. อ้างถึงใน จันทรเพ็ญ เมฆา อภิรักษ์. 2530. ผลทางไซโตจินิกของบลิโอมัยซิน เจนเชียนไวโอเลต และไมโตมัยซิน-ซี ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Islaih, M., W.H. Bartley, A.K. Ibrahim, L. Baohui, J.L. Reid-Hubbard, L.F. Flick, L.A. Julie, D. Thom, K.M. David, K.N. Ronald and E.W. David. 2005. Relationships between genomic, cell cycle and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. **Mutat Res.** 578: 100-116.
- Joel, S. 1996. The clinical pharmacology of etoposide: an update. **Cancer Treatment Rev.** 22: 179-221.
- Latt, S.A. 1974. Sister chromatid exchanges, induces of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin-C. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 71: 3162-3166. อ้างถึงใน จันทรเพ็ญ เมฆา อภิรักษ์. 2530. ผลทางไซโตจินิกของบลิโอมัยซิน เจนเชียนไวโอเลต และไมโตมัยซิน-ซี ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Lawn, J.W., A. Begleiter and D. John. 1976. Studies relating to antitumour antibodies; Part V: reactions of mitomycin C with DNA examined by ethidium fluorescence assay. **Canadian Journal of Biochemistry.** 54: 110. Cited Wiravan Kumvan. 2002. Clastogenic and anticlastogenic potentials of dietary seaweeds *Porphyra SPP.* And *Gracilaria SPP.* Using erythrocyte micronucleus assay in the mouse and their nutritive value. M.S. Thesis, Mahidol University.
- Levinton, M. and A. Montagu. 1978. **Text Book of Human Genetics.** 2nd ed. Oxford University Press, London.

- Liber, H.L. and W.G. Thilly. 1982. Mutation assay at the thymidine kinase locus in diploid human lymphoblasts. **Mutat Res.** 94: 467-485.
- Lundin, C., M. North, K. Erixon, K. Walters, D. Jenssen, A.S.H. Goldman and T. Helleday. 2005. Methyl methanesulfonate (MMS) produces heat-labile DNA damage but no detectable *in vitro* DNA double-strand breaks. **Nucleic Acid Research.** 33: 3799-3811.
- Merck. 1989. **The Merck Index**, 11th ed. Merck&Co. Inc., Rahway, New Jersey.
- Natarajan, A.T. and W. Schmid. 1971. Differential response of constitutive and facultative heterochromatin in the manifestation of mitomycin induced chromosome aberrations in Chinese hamster cells *in vitro*. **Chromosoma.** 33: 48-62.
- National Toxicology Program. 2004. **Chemical repository: methyl methanesulfonate.** Available Source: <http://ntp-server.niehs.nih.gov>, July 20, 2004.
- New Jersey Department of Health and Senior Services. 2000. **Hazardous Substance Fact Sheet; Methyl methanesulfonate.** Available Source: <http://www.state.nj.us/health/eoh/odisweb>, July 20, 2004.
- Phelps, J.B., M.L. Garriott and P.H. Wherly. 2002. A protocol for the in vitro micronucleus test II. Contributions to the validation of a protocol suitable for regulatory submissions from an examination of 10 chemicals with different mechanisms of action and different levels of activity. **Mutat Res.** 521: 103-112
- Sancar, A., L.A.L. Boltz, K.U. Kacmaz and S. Linn. 2004. Molecular mechanisms of mammalian DNA repair and the DNA damage check-points. **Ann.Rev. Biochem.** 73: 39-85.

- Sarkar, N., S. Lemaire, D.W. Scharf, E.I. Bourguet and H. Cerutti. 2005. Functional specialization of *Chlamydomonas reinhardtii* cytosolic thioredoxin h1 in the response to alkylation-induced DNA damage. **Eukaryotic Cell**. 4: 262-273.
- Satoh, T., M. Hatanaka, K. Yamamoto, M. Kuru-o and T. Sofuni. 2002. Application of mFISH for the analysis of chemically-induced chromosomal aberrations: a model for the formation of triradial chromosomes. **Mutat Res**. 504: 57-65.
- Schmid, W. 1975. The micronucleus test. **Mutat Res**. 31: 9-15.
- Shaw, M.W. and M.M. Cohen. 1964. Chromosome exchanges in human leukocytes induced by mitomycin-C. **Genetics**. 51: 181-190. อ้างถึงใน จันทรพีญ เมฆาภิรักษ์. 2530. ผลทางไซโตจีนิติกของบลิโอมัยซิน เจนเชียนไวโอเลต และไมโทมัยซิน-ซี ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Shiba, S. 1958. The mode of action of mitomycin C. pp. 1-8. อ้างถึงใน เสาวคนธ์ ชนสมบัติ. 2530. การศึกษาเปรียบเทียบผลของ mitomycin C ที่มีต่อโครโมโซมของเม็ดเลือดขาวของคนปกติ และคนที่เป็นมะเร็งตับในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์.
- Sigma-aldrich. 2004. **Mitomycin C**. Available Source: <http://www.sigma-aldrich.com>, September 15, 2004.
- Stopper, H. and S.O. Müller. 1997. Micronuclei as a biological end-point for genotoxicity. **minirev. Toxicology In vitro**. 11: 661-667.
- Thailand Institute of Scientific and Technological Research. 2005. **Research and development on safety evaluation of genotoxins by the short-term tests**. Grant (E) Res. Project No. 46-07/ Rep. No. 1 (Final Rep.)

Tomasz, M., R. Lipman, D. Chowdary, J. Pawlak, G.L. Verdine, K. Nakanishi. 1987. Isolation and structure of a covalent cross-link adduct between mitomycin C and DNA. **Science**. 235: 1204-1208.

Walker, P.R., V.M. Weaver, B. Lach, J. Leblanc and M. Sikorska. 1994. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. **Exp. Cell Res.** 213: 100-106.

Zhang, L.S., M. Honma, M. Hayashi, T. Suzuki, A. Matasuoka and T. Sofuni. 1995. A comparative study of TK6 human lymphoblastoid and L5178Y mouse lymphoma cell lines in the in vitro micronucleus test. **Mutat Res.** 347: 105-115.

ภาคผนวก

การเตรียมสารละลาย

1. สารละลายที่ใช้ทดสอบ

1.1 สารละลาย mitomycin C เตรียมโดยใช้ mitomycin C (Sigma) ชนิดผง ขนาดบรรจุ 2 mg ต่อ 1 ขวด เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 ml จะได้สารละลาย mitomycin C ที่มีความเข้มข้น 200 µg/ml

1.2 สารละลาย methyl methanesulfonate เตรียมโดยใช้ methyl methanesulfonate (Sigma) ชนิดผง ขนาดบรรจุ 10 mg ต่อ 1 ขวด เติมน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว 10 ml จะได้สารละลาย methyl methanesulfonate ที่มีความเข้มข้น 1,000 µg/ml

1.3 สารละลาย etoposide เตรียมโดยใช้ etoposide (Sigma) ชนิดผง ขนาดบรรจุ 25 mg ต่อ 1 ขวด ละลายด้วย DMSO 10 ml จะได้สารละลาย etoposide ที่มีความเข้มข้น 2,500 µg/ml

2. สารละลายที่ใช้ในการตรวจสอบ

2.1 สารละลายโพแทสเซียมคลอไรด์ 0.075 M (hypotonic solution) ใช้โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl) 5.59 g ละลายด้วยน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร

2.2 สารละลายน้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative solution) ใช้ absolute methanol ผสมกับ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 โดยเตรียมใหม่เสมอเมื่อต้องการจะใช้

2.3 สารละลาย phosphate buffer solution (PBS)

NaCl	8.00 g
KCl	0.20 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
H ₂ KPO ₄	0.24 g

ละลายในน้ำกลั่น แล้วปรับปริมาตรให้เป็น 1 ลิตร และปรับค่า pH เป็น 7.4 จากนั้นนำไปนิ่งมาเชื้อด้วยความดันไอน้ำ หรือใช้ PBS tablets (Sigma) 1 เม็ด ละลายในน้ำกลั่น 200 ml และปรับค่า pH เป็น 7.4 และนำไปนิ่งมาเชื้อด้วยความดันไอน้ำ

2.4 สารละลาย Giemsa buffer สำหรับเจือจางสี Giemsa โดยใช้ Gurr buffer tablets (Gibco) 1 เม็ด ละลายน้ำกลั่น 1 ลิตร และปรับค่า pH เป็น 6.8

2.5 สารละลาย Cytochalasin B เตรียมโดยใช้ Cytochalasin B (Sigma) ชนิดผง ขนาดบรรจุ 5 mg ต่อ 1 ขวด ละลายด้วย DMSO 5 ml จะได้สารละลาย Cytochalasin B ความเข้มข้น 1,000 $\mu\text{g/ml}$

ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ –นามสกุล	นางสาวน้ำทิพย์ เทียงตรง
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 21 สิงหาคม 2523
สถานที่เกิด	สุพรรณบุรี
ประวัติการศึกษา	กศ.บ. (ชีววิทยา) มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ (2545)
ตำแหน่งหน้าที่การงานปัจจุบัน	ผู้ช่วยนักวิชาการ
สถานที่ทำงานปัจจุบัน	ฝ่ายเกษตรและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย
ผลงานดีเด่นและรางวัลทางวิชาการ	-
ทุนการศึกษาที่ได้รับ	-