

ผลของกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ต่ำต่อการดำเนินวงจรของเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการแลกเปลี่ยน
ซิสเตอร์โครมาติคของลิมโฟไซต์ในหลอดทดลอง



นางสาว สุমন อิติโอฟาร

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์


คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2546

ISBN 974-17-4736-5

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF LOW-FREQUENCY AC-CURRENT ON CELL CYCLE PROGRESSION AND INDUCTION
OF SISTER CHROMATID EXCHANGES OF HUMAN LYMPHOCYTES IN VITRO



Miss Sumon Thitiorul

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science in Medical Science

Department of Anatomy
Faculty of Medicine
Chulalongkorn University
Academic Year 2003
ISBN 974-17-4736-5

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ผลของกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ต่ำต่อการดำเนินวงจรของเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการแลกเปลี่ยน ชีสเตอร์โครมาติดของลิมโฟซัยท์ในหลอดทดลอง

โดย นางสาว สุমন ธิติโอฟาร

ภาควิชา กายวิภาคศาสตร์

อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันท์

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันท์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์)

..... กรรมการ
(อาจารย์ นพ.วีรยุทธ ประพันธ์พจน์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงนพวรรณ จารุรักษ์)

สุมน ธิติโอฟาร์ : ผลของกระแสไฟฟ้าความถี่ต่ำต่อการดำเนินวงจรของเซลล์ และการเหนี่ยวนำให้เกิดการแลกเปลี่ยนซิสเทอริโครมาติดของลิมโฟไซต์ที่ในหลอดทดลอง. (EFFECTS OF LOW-FREQUENCY AC-CURRENT ON CELL CYCLE PROGRESSION AND INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES OF HUMAN LYMPHOCYTES IN VITRO) อ. ที่ปรึกษา : [รศ.นสพ.ชินวร พรหมชัยนันท์] , อ.ที่ปรึกษาร่วม : [รศ.ดร.มานะ ศรียุทธศักดิ์] จำนวนหน้า 60หน้า. ISBN 974-17-4736-5.

งานวิจัยนี้ศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 เฮิรท์ส (Hz) ขนาด 0 - 4 ไมโครแอมแปร์ ที่มีต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนจำนวน 10 คน ในด้านการกระตุ้นการดำเนินวงจรของเซลล์ และการกระตุ้นให้เกิดความผิดปกติของสารพันธุกรรม การศึกษาทำโดยการ synchronize เซลล์ด้วย methotrexate เป็นเวลา 17 ชั่วโมง แล้วจึงทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าเป็นเวลา 1 ชั่วโมง การศึกษาการดำเนินวงจรของเซลล์ทำการวิเคราะห์ปริมาณดีเอ็นเอด้วยฟลูออโรไซโตมิเตอร์ (flow cytometer) ทุกๆ 3 ชั่วโมงติดต่อกันเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ส่วนการศึกษาความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมทำโดยดูอัตราการแตกหักของโครโมโซมด้วยวิธี sister chromatid exchanges assay ผลการศึกษาพบว่ากระแสไฟฟ้ามีแนวโน้มกระตุ้นให้เซลล์มีการแตกหักของโครโมโซมเพิ่มขึ้นแต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม และพบว่ากระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 ไมโครแอมแปร์ มีแนวโน้มกระตุ้นให้เซลล์มีระยะเวลาของวงจรเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา.....กายวิภาคศาสตร์..... ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา.....วิทยาศาสตร์การแพทย์.. ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา.....2546..... ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

437 52744 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: AC CURRENT / CELL CYCLE / ELECTRICAL STIMULATION / LYMPHOCYTESX / SCEs

SUMON THITIORUL : EFFECTS OF LOW-FREQUENCY AC-CURRENTS ON CELL
CYCLE PROGRESSION AND INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGES
OF HUMAN LYMPHOCYTES IN VITRO. (THESIS TITLE) THESIS ADVISOR :
ASSOC.PROF.CHINVORN PROMCHAINANT , THESIS COADVISOR :
ASSOC.PROF.DR.MANA SRIYUDTHSAK , 60 pp. ISBN 974-17-4736-5.

The effects of 50 Hz-AC current, 0 - 4 microampere, were studied on human lymphocytes from 10 donors. Cell were synchronized by methotrexate for 17 hours then they were exposed to those currents for 1 hour. The cell cycle progression analysis was investigated by flow cytometer every 3 hours for 24 hours and the mutagenic capacity of these currents was investigated by the induction of sister chromatid exchanges assay (SCEs). There was no significant different between SCEs frequency in control group and the other groups with increasing current intensities. The results suggested that cell cycle duration was more reduced in 0.2 microampere exposure group when compare to the control group.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Department.....Anatomy..... Student's signature.....

Field of study.....Medical science..... Advisor's signature.....

Academic year2003.... Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของ รศ.นสพ. ชินวร พรหมชัยนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ และการจุดประกายความคิดเห็นในแง่มุมต่างๆของ รศ.ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

ขอขอบคุณ อาจารย์ นพ.วีรยุทธ ประพันธ์พจน์ และเจ้าหน้าที่ นักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการ cytogenetics lab แห่งโรงพยาบาลราชานุกูลและโรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ นายแสวง กายแก้ว , นางอัจฉรา พิทักษ์สังข์ , น.ส. วลัยวรรณ คงนาค , นางสุภาพ อรุณพันธ์ , น.ส.พิบูล ขำเจริญ สำหรับความช่วยเหลือในการทดลองทาง cytogenetics ด้วยดีโดยตลอด

ขอขอบคุณ รศ.พญ.วิไล ชินธเนศ , นางอติตยา แก้วเสมา สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย และความอนุเคราะห์การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ด้วยโปรแกรมวิเคราะห์ภาพ Image Proplus ของห้องปฏิบัติการประสาทกายวิภาคศาสตร์

ขอขอบคุณ ศ.พญ.นพวรรณ จารุรักษ์ สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆที่เป็นประโยชน์ในการวิจัย

ขอขอบคุณ รศ.นพ.เกียรติ รัชชรุ่งธรรม และคุณสุปราณี บุรณประดิษฐ์กุล สำหรับความช่วยเหลือ คำแนะนำ และเวลาอันมีค่าสำหรับเทคนิคทาง flow cytometry

ขอขอบคุณหน่วยจ่ายกลาง โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ ในการอบแก้วเพื่อทำให้ปราศจากเชื้อแก้วอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดลอง

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณกำลังใจสนับสนุนเสมอมาจากคุณพ่อและครอบครัว

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จได้ด้วยความช่วยเหลือของบุคคลต่างๆข้างต้น และอีกหลายท่านที่มีได้เอ่ยนามในที่นี้ ขอขอบคุณทุกท่านสำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือ ซึ่งทำให้งานวิจัยสามารถดำเนินไปได้โดยตลอด.

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญตาราง.....	ช
สารบัญภาพ.....	ฌ
บทที่	
1. บทนำ.....	1
2. Sister Chromatid Exchange (SCEs) assay.....	6
3. การศึกษาการดำเนินวงจรของเซลล์จากการวิเคราะห์ปริมาณ DNA.....	8
4. วิธีการดำเนินการวิจัย.....	12
ประชากร.....	12
Synchronization.....	14
Releasing และการกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า.....	14
การวิเคราะห์ปริมาณ DNA.....	14
วิธีการศึกษาและการวิเคราะห์ SCEs.....	15
5. ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล.....	17
5.1 การดำเนินวงจรของเซลล์.....	17
5.2 ผลการเหนี่ยวนำให้เกิด SCEs.....	29
6. สรุปผลการวิจัย.....	46
รายการอ้างอิง.....	48
ภาคผนวก.....	55
ภาคผนวก ก.....	56
ภาคผนวก ข.....	58
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	60

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
1. เวลาที่มีการซ้ำรูปแบบของกราฟกระจายสัดส่วนของ DNA จากช่วงเวลา 0-24 ชั่วโมงหลัง release เซลล์.....	22
2. ค่าเฉลี่ยของการเกิด SCEs ต่อเซลล์ จากการวิเคราะห์ด้วย repeated measurement ANOVA.....	29
2. จำนวน metaphase plate ที่มีความถี่ของการเกิด SCEs ตั้งแต่ 0-12 SCEs ต่อกลุ่มโครโมโซม.....	30
4. ค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด multibreak ต่อเซลล์ จากการวิเคราะห์ด้วย repeated measurement ANOVA.....	37
5. ค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs ต่อเซลล์ จากการวิเคราะห์ด้วย repeated measurement ANOVA.....	38
6. จำนวน SCEs รวม ที่ p-arm, centromere และ q-arm ในแต่ละกลุ่มโครโมโซม.....	40

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1. การแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่มตามปริมาณ DNA.....	8
2. การแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่มเพื่อวิเคราะห์การดำเนินวงจรของเซลล์.....	10
3. ตัวอย่างรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ซึ่งได้จากการวัดด้วย flow cytometer.....	11
4. ตัวอย่างกราฟสัดส่วนของเซลล์และกราฟสัดส่วนสะสมของเซลล์จากชั่วโมงที่ 0-24..	19
5. การซ้ำรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ใน 1 รอบวงจรเซลล์.....	21
6. กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ของคนที่ 3.....	24
7. กราฟค่าเฉลี่ยระยะเวลาของวงจรเซลล์ของเซลล์ลิมโฟไซต์และ MT-4.....	25
8. ตัวอย่างการเคลื่อนของเซลล์ระยะ mid S ไปสู่ระยะ G0/G1 และ early S ของรอบวงจรใหม่.....	27
9. ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มควบคุม.....	34
10. ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 μ A.....	34
11. ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.5 μ A.....	35
12. ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 1 μ A	35
13. ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 2 μ A	36
14. ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 4 μ A	36
15. กราฟช่วงความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs ที่เกิดขึ้นต่อเซลล์.....	38
16. กราฟช่วงความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs ต่อเซลล์.....	39
17. กราฟความสัมพันธ์ของจำนวน SCEs กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม.....	41
18. ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม และให้หน้าหนักแก่โครโมโซมตามกลุ่ม.....	41

ภาพประกอบ

หน้า

19. กราฟความสัมพันธ์ของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ
เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม..... 42
20. ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ
เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม และให้น้ำหนักแก่โครโมโซมตามกลุ่ม..... 43
21. ความสัมพันธ์ของกระแสไฟฟ้ากับกลุ่มโครโมโซม..... 44



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

ในปี 1979 มีการศึกษาโรคระบาดวิทยาซึ่งพบความสัมพันธ์ของการเกิด leukemia และ lymphoma เพิ่มขึ้นในเด็กที่อาศัยอยู่ใกล้สายไฟฟ้าแรงสูง [1] จากการศึกษาทำให้มีการศึกษาโรคระบาดวิทยา การศึกษาในหลอดทดลองและในสัตว์ทดลองตามมาอีกหลายชิ้นถึงผลกระทบของกระแสไฟฟ้าแม่เหล็กความถี่ต่ำ (Extremely low frequency electromagnetic field, ELF-EMF) ที่มีต่อสุขภาพ รวมถึงโอกาสเหนี่ยวนำให้เกิดอันตรายต่อสารพันธุกรรมขึ้น (genotoxic effect) [6] นอกจากนี้ยังมีการวัดค่า magnetic flux density บริเวณใกล้อุปกรณ์ไฟฟ้าในสำนักงาน พบว่าอุปกรณ์ไฟฟ้าส่วนใหญ่จะมี EMF ในช่วง 0.05-2.5 milliTesla (mT) ส่วนสายไฟบ้านจะมีค่า EMF ระหว่าง 0.01-1.0 microTesla (μ T) [2,3] งานวิจัยส่วนใหญ่จึงศึกษาผลของ ELF ในช่วงความถี่ 50-60 Hz ซึ่งเป็นความถี่ของไฟฟ้ากระแสสลับที่ใช้ในบ้านและสำนักงานทั่วไป และมีหน่วยทางสนามแม่เหล็กในช่วงขนาดดังกล่าว

ELF-EMF หมายถึง สนามไฟฟ้า, สนามแม่เหล็ก หรือสนามไฟฟ้าแม่เหล็กที่มีความถี่ต่ำกว่า 300 Hz สนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กมีความสัมพันธ์กัน ถ้ามีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านลวดตัวนำจะเกิดสนามแม่เหล็กรอบตัวนำนั้น ในทางกลับกันการเปลี่ยนแปลงสนามแม่เหล็ก (เช่น ด้วยการใช้อุปกรณ์ไฟฟ้ากระแสสลับ) จะเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้น ทั้งสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดกระแสไฟฟ้าขึ้นในตัวนำไฟฟ้าซึ่งรวมถึงร่างกายมนุษย์ด้วย ปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ถูกเหนี่ยวนำขึ้นนั้นแปรผันตามความถี่ (frequency) ของ EMF และปัจจัยอื่นๆที่ซับซ้อน เช่น โครงสร้าง รูปร่างและขนาดของสิ่งมีชีวิต ตำแหน่งของสิ่งมีชีวิตสัมพันธ์กับเส้นแรงสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็ก รวมถึงขนาดและตำแหน่งของแหล่งกำเนิด EMF สนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กที่อยู่ในระยะไกลจากแหล่งกำเนิด (far field) จะมีคุณสมบัติเป็นคลื่นรวมกันเรียกว่า คลื่นไฟฟ้าแม่เหล็ก (electromagnetic wave) ส่วนในระยะใกล้แหล่งกำเนิด (near field) EMF จะมีคุณสมบัติแยกกันเป็นสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็ก [14,18]

เนื่องจากกระบวนการทางชีวเคมีต่างๆในร่างกายจะมีการเคลื่อนที่ของอิออนต่างๆผ่านเข้า-ออกผนังเซลล์อยู่ตลอดเวลา รวมถึงภายในเซลล์เอง แม้แต่องค์ประกอบของ DNA ก็มีฟอสเฟตซึ่งเป็นโมเลกุลที่มีประจุเป็นตัวเชื่อมระหว่างคาร์บอนอะตอมของ 2 เบส การเกิด

ปฏิกิริยาเคมีนั้นโมเลกุลต่างๆจะมีการเคลื่อนที่แบบบราวเนียน (Brownian movement) และทำปฏิกิริยาต่อกันเมื่อมาเจอกันในเงื่อนไขที่เหมาะสม การเกิดกระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำในเซลล์จึงอาจมีผลกระทบต่อการทำงานของโปรตีนและเอนไซม์ต่างๆ รวมถึงอนุมูลอิสระซึ่งมีความสัมพันธ์กับการทำลายเซลล์ เนื่องจากเมื่ออิเล็กตรอนได้รับพลังงานเพิ่มขึ้น จะทำให้มันมีการเคลื่อนที่และมีการถ่ายทอดพลังงานระหว่างอิเล็กตรอนที่อยู่ติดกัน ซึ่งทำให้เกิดกระแสไฟฟ้า กลไกการควบคุมวัฏจักรของเซลล์เกิดจากการทำงานของโปรตีน cyclin และ เอนไซม์ cyclin-dependent protein kinases (CDKs) ได้เป็นสารประกอบ cyclin-CDK ที่ร่วมกันผลักดันกระบวนการถัดลงไป (downstream process) โดยการเติมฟอสเฟต (phosphorelation) ให้แก่โปรตีนเป้าหมาย [39] การที่โมเลกุลที่มีประจุเหล่านั้นได้รับพลังงานเพิ่มขึ้น ย่อมจะทำให้เกิดการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้น ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่การให้กระแสไฟฟ้าขนาดที่เหมาะสมจะกระตุ้นให้เซลล์มีทำงานได้ไวขึ้น แต่หากให้พลังงานแก่เซลล์เกินระดับที่เหมาะสมย่อมจะทำให้โปรตีนมีโครงสร้างหรือมีการทำงานผิดปกติรวมถึงการทำให้เกิดความผิดปกติ/หรือการแตกหักของสารพันธุกรรม

จากการศึกษาวิจัยผลของ EMF ต่อกระบวนการทางชีวภาพพบว่ามีการใช้ EMF กระตุ้นเซลล์ในขนาดที่แตกต่างกันออกไปในแต่ละงานวิจัย EMF ที่ให้แก่เซลล์ในการศึกษาเหล่านั้น มีทั้งที่ให้โดยเลี้ยงเซลล์อยู่ใน incubator ซึ่งมีแหล่งกำเนิดสนามแม่เหล็ก (เช่น Helmholtz's-coil system) อยู่ใน incubator นั้น หรือการให้กระแสไฟฟ้าโดยตรงแก่เซลล์โดยผ่านอิเล็กโทรดคู่ medium ที่ใช้เลี้ยงเซลล์ Miyakoshi, J. และคณะ ทำการศึกษาโดยให้ EMF ขนาด 50 Hz, 400 mT ซึ่งมีค่าสนามไฟฟ้าเหนี่ยวนำใน medium เป็น 7.66 แอมแปร์ต่อ ตารางเมตร (A/m^2) เป็นระยะเวลาต่างกันตั้งแต่ 0-20 ชั่วโมง ให้แก่เซลล์ MeWO (ซึ่งสร้างจากเซลล์ human malignant melanoma) แล้วพิจารณาการกลายพันธุ์ (mutation frequency) ของ *HPRT* gene ซึ่งเป็นยีนที่มีบทบาทในกระบวนการกู้คืนเบสเพียวรีน (salvage pathway) พบว่าเกิดการกลายพันธุ์ของ *HPRT* gene เพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่เซลล์ได้รับการกระตุ้น และเมื่อกระตุ้นเซลล์โดยเปลี่ยนแปลงค่าสนามไฟฟ้าเหนี่ยวนำจากสนามแม่เหล็กขนาด 400 mT ให้อยู่ในช่วง 0 - 7.66 A/m^2 แล้วทำการกระตุ้นเซลล์เป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าการกลายพันธุ์ของ *HPRT* gene เพิ่มขึ้นตามขนาดของสนามไฟฟ้าเหนี่ยวนำ [4] Tiwari, R. K. และคณะ ทำการศึกษาโดยให้ EMF ขนาด 50 Hz, 0.2-1 mT แก่เซลล์ลิมโฟซัยท์เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แล้วตรวจสอบการทำลาย DNA ด้วย comet assay โดยแบ่งระบบที่ศึกษาเป็น 5 ระบบคือ 1. ได้รับ EM, อยู่ใน incubator 2. ได้รับ EMF ซึ่งมี shielded box, อยู่ใน incubator 3. ไม่ได้รับ EM, อยู่ใน incubator 4. ไม่ได้รับ EMF, อยู่ใน thermos ที่รักษาระดับอุณหภูมิของน้ำไว้ที่ 37° C และ 5. กลุ่มควบคุม พบว่าเซลล์ที่ได้รับ EMF ขนาดสูงกว่ามีการทำลาย DNA มากกว่า และ

พบว่าการทำลาย DNA เพิ่มขึ้นตาม magnetic stress คือมีการทำลาย DNA ในระบบ $1 > 2 > 3 > 4 > 5$ [5] Lefebvre, M. และคณะทำการศึกษาโดยให้สนามแม่เหล็กขนาด 15 Hz, 0.1 mT แก่เซลล์ลิมโฟซัยท์ชนิด T และ B (ไม่ระบุเวลา), ให้แก่เซลล์ NK (Natural killer cell) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และให้แก่เซลล์ LAK (Lymphokine Activated killer cell) ในวันที่ 4-6 พบว่าสามารถกระตุ้นให้เซลล์ T และ B มีการใช้ tritium thymidine ในการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้น และกระตุ้นการทำหน้าที่ของเซลล์ LAK (วัดจากการหลั่ง chromium เพื่อใช้ในการทำลายเซลล์แปลกปลอม) แต่ไม่มีผลกับเซลล์ NK [6] Bersani, F. และคณะ ทำการศึกษาโดยให้ ELF-EMF ขนาด 50 Hz, 2.5 mT แก่เซลล์ลิมโฟซัยท์ 4 ชั่วโมง (ที่ชั่วโมงที่ 8-12 ภายหลังจากเซลล์ได้รับ PHA) หรือตลอดเวลาการเลี้ยงเซลล์ พบว่าทั้งสองกรณีเพิ่มการใช้ tritium thymidine และ IL-2 (growth factor) ของเซลล์ [7] Conti, P. และคณะ ทำการศึกษาโดยใช้ EMF ความถี่ 1, 3, 50 และ 200 Hz, 2.3-6.5 mT ซึ่งคำนวณได้กระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำประมาณ 10 mA/m^2 กระตุ้นเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่ทำให้เกิดการแบ่งตัว (blastogenesis) โดยใช้สาร mitogen แตกต่างกันคือ Phytohaemagglutinin (PHA), Concanavalin A (ConA) และ Pokeweed mitogen (PWM) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงตลอดการเลี้ยงเซลล์แล้วพิจารณาการใช้ Tritium thymidine ในการสังเคราะห์ DNA ของเซลล์ พบว่า EMF มีผลยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยเฉพาะที่ความถี่ 3 Hz กับเซลล์ที่ได้รับ PHA จึงทำการทดลองต่อโดยให้ EMF ความถี่ 3 Hz ที่ 12 ชั่วโมงแรก, 48 ชั่วโมงหลัง และ 6 ชั่วโมงหลังของการเลี้ยงเซลล์ และพบการยับยั้งการแบ่งเซลล์ในเซลล์ที่ได้รับ PHA และ ConA ซึ่งกระตุ้นด้วย EMF ความถี่ 3 Hz ที่ 12 ชั่วโมงแรกและ 48 ชั่วโมงหลังของการเลี้ยงเซลล์ จึงสรุปว่า EMF มีผลกระทบต่อเซลล์ที่ได้รับ mitogen ต่างกันเนื่องจากสาร mitogen ต่างชนิดมีปฏิกิริยาต่อเซลล์แตกต่างกัน โดย EMF มีได้รบกวนการจับสาร mitogen ที่ผิวเซลล์เนื่องจากผลการยับยั้งนั้นยังมีอยู่เมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วย EMF ที่ 48 ชั่วโมงหลัง แต่ EMF อาจมีผลกระทบต่อ การผ่านเข้าเซลล์ของแคลเซียม (calcium influx) เนื่องจากเมื่อเซลล์ได้รับการกระตุ้นด้วยสาร lectin ใน mitogen จะมีการนำเข้าแคลเซียมอย่างรวดเร็วในช่วงแรกและยังคงมีการนำเข้าแคลเซียมต่อไปอีก 18-72 ชั่วโมงเพื่อใช้ในการสังเคราะห์ DNA [8] Tetano, H. และคณะ ทำการศึกษาโดยให้ ELF-EMF ขนาด 50 Hz, 20 mT เป็นเวลา 2 ชั่วโมงกับน้ำเชื้ออสุจิของคนแล้วนำมาปฏิสนธิกับไข่ของหนู hamster จากนั้นพิจารณา structural chromosome aberration ของเซลล์ในระยะ first cleavage metaphase พบว่า EMF ที่ให้ไม่มี clastogenic effect ต่อเซลล์อสุจิของคน [9] Koyama, S. และคณะ ใช้กระแสไฟฟ้า 10 Hz, ขนาด +0.1 ถึง +0.4 V กระตุ้นเซลล์ astrocyte เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่าสามารถกระตุ้นการหลั่ง nerve growth factor เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม [10] Jiang, J. และคณะ ใช้แผ่น

+700 PTFE electret และ - 700 PTFE electret ปิดแผลบนหลังหนูเป็นเวลา 1-7 วัน แล้วพิจารณาพื้นที่ของบาดแผลและปริมาณ DNA ใน epithelial cell เทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งใช้ vaseline-oiled gauze พบว่าการใช้ PTFE electret สามารถกระตุ้นการรักษาแผลบนหลังหนูให้เร็วขึ้น [11] Anbulelvan, T. และคณะ ทำการศึกษาพบว่าให้กระแสไฟฟ้าขนาด 20 microampere(μ A) ตลอดเวลาที่บริเวณกระดูกที่หักสามารถลดเวลาการสมานกระดูกที่หักได้ [12] Simko, M. และคณะ ศึกษาพบว่าเมื่อให้ ELF-EMF ขนาด 50 Hz, 1 mT แก่เซลล์น้ำคร่ำของมนุษย์เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง สามารถเหนี่ยวนำให้เกิด micronucleus โดยขึ้นอยู่กับชนิดของระบบ EMF ที่ใช้กระตุ้น (ใช้ Helmholtz-coil system หรือ Meritt-coil system) และการจัดวางขดลวดของระบบที่ใช้กระตุ้น (vertical orientation หรือ horizontal orientation) [13] Yaguchi, H. และคณะ ศึกษาความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมของ EMF ขนาด 60 Hz, 5-400 mT ซึ่งให้แก่เซลล์ mouse m5S เป็นเวลา 42 ชั่วโมง พบว่า EMF ขนาด 400 mT เพิ่มการเหนี่ยวนำให้เกิด SCEs แก่เซลล์ [15] Koana, T. และคณะทำการศึกษาโดยให้ EMF ขนาด 50 Hz, 20 mT แก่ไข่ของ *Drosophila melanogaster* ซึ่งมีลักษณะบกพร่องในการซ่อมแซม DNA (repair deficiency mutant) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่ามีการกระตุ้นให้เกิด mutant spot ของแมลงที่เจริญมาจากไข่ที่อยู่รอบวงด้านนอกของจานเลี้ยงมากกว่าแมลงที่เจริญมาจากไข่ที่อยู่รอบวงด้านในของจานเลี้ยง จึงสรุปว่า mutant spot นั้นเกิดจากของกระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำมากกว่าจากสนามแม่เหล็ก [16] Khalil, M. และคณะให้ EMF ขนาด 50 Hz, 1.05 mT แก่เซลล์ลิมโฟซัยท์ เป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นทุกกลุ่มเพิ่มการเกิด chromosomal aberration และลด mitotic index และพบว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง จะเพิ่มการเกิด SCEs และลด proliferative rate index [17] ศุภชัย ฤทธิเจริญวัตถุ ศึกษาโดยให้ไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 50 Hz ขนาด 0.1- 5,000 μ A เป็นเวลา 24 ชั่วโมงแก่เซลล์กระดูก MG-63 พบว่ากระแสไฟฟ้าขนาด 0.5 μ A มีแนวโน้มกระตุ้นการแบ่งเซลล์ ขณะที่กระแสไฟฟ้าขนาดสูงกว่า 0.5 μ A มีแนวโน้มยับยั้งการแบ่งเซลล์ [55]

จะเห็นได้ว่างานวิจัยผลกระทบของ ELF ที่มีต่อสุขภาพมักสนใจศึกษาผลกระทบจากสนามแม่เหล็ก ทั้งนี้เนื่องมาจากที่ความถี่ 50 Hz สนามไฟฟ้าที่ผ่านร่างกายคน (penetration) จะมีการลดทอนค่าลง (attenuation) ทำให้สนามไฟฟ้าภายในร่างกายมีค่าต่ำกว่าสนามไฟฟ้าภายนอกในร่างกายประมาณ 1 ล้านเท่า ขณะที่สนามแม่เหล็กจะไม่มี การลดทอนค่าลงเมื่อผ่านร่างกายคน ทำให้สนามแม่เหล็กภายในและภายนอกในร่างกายมีขนาดใกล้เคียงกัน [14,18] แต่จากงานวิจัยของ Koana, T. และคณะพบว่าการเกิด mutant spot ของปีกแมลงขึ้นกับกระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำมากกว่าสนามแม่เหล็ก [16] จึงเป็นไปได้ว่ากระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

เป็นปัจจัยที่มีผลกระทบต่อสารชีวเคมีในเซลล์มากกว่าสนามไฟฟ้าหรือสนามแม่เหล็กโดยตรงซึ่งเป็นสิ่งกระตุ้นจากภายนอก

จากการทบทวนวรรณกรรมข้างต้นจะเห็นได้ว่างานวิจัยเหล่านี้มีความแตกต่างกันทั้งในด้านระบบที่ใช้ในการศึกษา ปริมาณ ELF-EMF ที่ให้ เซลล์ที่ใช้ในการศึกษา รวมถึงวิธีการศึกษา อย่างไรก็ตามทั้งหมดเป็นเสมือนภาพต่อที่แสดงให้เห็นผลกระทบของสนามไฟฟ้าและสนามแม่เหล็กความถี่ต่ำที่มีต่อกระบวนการทางชีวภาพ การที่เรามีความรู้เกี่ยวกับผลของกระแสไฟฟ้าต่อกระบวนการทางชีวภาพดีขึ้นย่อมทำให้เราสามารถประยุกต์ใช้กระแสไฟฟ้าให้เกิดประโยชน์ได้ ทั้งในทางกระตุ้นหรือยับยั้ง หรือแม้แต่เป็นหนทางป้องกันอันตรายต่อสุขภาพของผู้ที่ต้องอาศัยหรือทำงานใกล้ชิดกับแหล่งกำเนิด ELF-EMF นั้น แต่หากมีการกำหนดขนาด ELF-EMF ที่ให้แก่สิ่งมีชีวิตเพียงค่าหนึ่ง ผลกระทบจาก ELF ย่อมมีความแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเซลล์อันเนื่องมาจากความแตกต่างขององค์ประกอบภายในเซลล์ที่แตกต่างกัน และยังไม่มียานวิจัยใดทำการการศึกษาโดยใช้ ELF ที่มีแหล่งกำเนิดเดียวกันและขนาดความเข้มเดียวกันในการศึกษาเซลล์ต่างชนิดกันเพื่อแสดงผลกระทบที่อาจมีความแตกต่างกันนั้น งานวิจัยนี้จึงได้ทำการศึกษาผลกระทบของไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 50 Hz โดยใช้ระบบเดียวกับที่ได้ทำการศึกษาโดยศุภชัย ฤทธิ์เจริญวัตถุ ซึ่งศึกษาพบว่ากระแสไฟฟ้าขนาด 0.5 μA มีแนวโน้มกระตุ้นการแบ่งเซลล์กระดูก MG-63 [55] โดยในงานวิจัยนี้จะศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าที่มีต่อเซลล์ในระยะ S เนื่องจาก sister chromatid exchange เกิดขึ้นในระยะ S โดยทำการรวบรวมเซลล์ในอยู่ในระยะ S โดยการ synchronize เซลล์ด้วย Methotrexate.

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาผลของไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 50 Hz ขนาด 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA ที่มีต่อการดำเนินวงจรของเซลล์ลิมโฟไซต์ทีในหลอดทดลอง
2. เพื่อศึกษาความเป็นความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมของกระแสไฟฟ้าขนาดดังกล่าว

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบผลของไฟฟ้ากระแสสลับความถี่ 50 Hz ขนาด 0-4 μA ที่มีต่อเซลล์ลิมโฟไซต์ทีที่เพาะเลี้ยง เพื่อเป็นข้อมูลสำหรับการประยุกต์ใช้ประโยชน์ของกระแสไฟฟ้าหรือเป็นแนวทางในการป้องกันอันตรายจากกระแสไฟฟ้า

บทที่ 2

Sister Chromatid Exchanges (SCEs) assay

sister chromatid คือ โครโมโซมที่มี 2 โครมาติดอยู่ในแขน (arm) เดียวกัน

การศึกษา SCEs เริ่มเมื่อปี 1957 เมื่อ Taylor ใช้สาร radioisotope คือ tritium thymidine เพื่อติดตามการสังเคราะห์ DNA ในวงจรของเซลล์พืช แล้วพบการแลกเปลี่ยนระหว่าง sister chromatid แต่เนื่องจากความจำกัดทางรังสีวิทยาในด้านความละเอียดของการวิเคราะห์ , ความยุ่งยากในการใช้เครื่องมือและอันตรายจากสารรังสี จึงมีการพัฒนามาใช้สาร thymidine base analogue ซึ่งสารตัวหนึ่งที่ยอมรับใช้คือ 5-bromodeoxyuridine (BrdU) [21] โดย BrdU มีโครงสร้างคล้ายกับ deoxythymidine (dT) มาก ต่างกันเพียงหมู่แทนที่ (substituted group) ซึ่งของ dT เป็น $-CH_3$ ส่วนของ BrdU เป็น $-Br$ [20]

BrdU นั้นมีผลต่อการขดเกลียว (spiralisation pattern) ของโครโมโซม เซลล์ที่มีการใช้ BrdU ในการสังเคราะห์ DNA เมื่อผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์ จะได้โครโมโซมที่มีโครมาติดสองแบบ โครมาติดที่มี BrdU ทั้งสองสายของ polynucleotide (bifilarly substituted) จะขดเกลียวน้อยกว่าและมีการติดสี giemsa จางกว่าโครมาติดที่มี BrdU เพียงสายเดียวของ polynucleotide (monofilarly substituted) ทำให้เห็นโครโมโซมติดสีเข้มข้างจางข้าง เรียกโครโมโซมที่มีลักษณะการติดสีเช่นนี้ว่า harlequin chromosome เมื่อมีการหักและสลัที่กันระหว่าง sister chromatid จึงสามารถตรวจพบตำแหน่งการหักและสลัที่กันนั้นได้ โดย sister chromatid ที่มีการหักและสลัที่กันนั้นจะมีการติดสีไม่สม่ำเสมอเป็นสีจางสลัเข้มในแต่ละสายของโครมาติด และการแลกเปลี่ยนที่เกิดขึ้นนั้นจะอยู่บนตำแหน่งเดียวกันของทั้งสองโครมาติด [22,23]

การพัฒนาปรับปรุงเทคนิค SCEs ที่ดีขึ้น [24-26] ทำให้มีการใช้ SCEs assay อย่างแพร่หลายในการศึกษาสารหรือปัจจัยที่มีคุณสมบัติก่อการกลายพันธุ์ (mutagenicity), ก่อมะเร็ง (carcinogenicity) หรือมีผลกระทบต่อวงจรเซลล์ (cell cycle kinetic) [21, 27-29]

งานวิจัยที่มีการศึกษาเกี่ยวกับ SCEs ที่ผ่านมายังไม่ทราบกลไกการเกิด SCEs ที่แน่ชัด มีการศึกษาพบว่า การเหนี่ยวนำให้เกิด SCEs ต้องให้เซลล์ผ่าน S phase โดยพยาธิสภาพที่เกิดขึ้นในช่วง G2 phase จะไม่ทำให้เพิ่ม SCEs หากเซลล์ไม่แบ่งตัวและผ่าน S phase ในวงจรถัดไป [20]

แม้ว่าพยาธิสภาพบนโครโมโซมที่ทำให้เกิด SCEs จะไม่ทำให้เซลล์ถึงตาย [36] แต่พบว่าคนที่เป็นโรค Bloom syndrome, โรค Xeroderma pigmentosum อันเป็นโรคทางพันธุกรรมชนิดหนึ่ง ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มอาการ chromosome breakage syndrome นั้น จะมีความไม่เสถียรของโครโมโซม (chromosome instability) และมีความบกพร่องในการซ่อมแซมสาย DNA (defective DNA repair) กล่าวคือพบว่าคนที่เป็นโรคนี้จะมี baseline SCEs สูงกว่าปกติ และพบว่าคนที่เป็นโรคนี้จะมีความเสี่ยงต่อการเกิด leukemia และ solid tumor ในอัตราที่สูง [30,31]

มีงานวิจัยความสัมพันธ์ของการเกิด SCEs กับอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วยสาร Phytohemagglutinine (PHA) โดยพิจารณาจาก proliferative rate index (PRI) ($PRI = (M_1 + 2M_2 + 3M_3) / 100$; M_1, M_2 และ M_3 คือ เซลล์ที่อยู่ในระยะเมตาเฟสของวงจรที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ) พบว่าเซลล์ที่มีการแบ่งตัวช้ากว่าจะมีอัตราการเกิด SCEs สูงกว่า เนื่องจากการเพิ่มเวลาในระยะ S ทำให้เพิ่มโอกาสเกิดความผิดพลาดของ DNA fork displacement มากขึ้น [32-33] ส่วนงานวิจัยอัตราการเกิด SCEs โดยใช้สารที่ทราบว่ามีผลต่อการกลายพันธุ์ เช่น สาร mitomycin C (MMC), สาร styrene-7,8-oxide (SO), สาร N-methyl -N- nitro -N-nitrosoguanidine (MNNG) ให้แก่เซลล์ลิมโฟไซต์ พบว่าการเกิด SCEs มีความสัมพันธ์ในเชิงบวกกับปริมาณสารที่เซลล์ได้รับ ขณะที่ PRI มีความสัมพันธ์ในเชิงลบกับปริมาณสารที่เซลล์ได้รับ [19, 21, 34, 58, 59]

กล่าวโดยสรุป SCEs เป็นวิธีหนึ่งที่ใช้ศึกษาการกลายพันธุ์ และ cell cycle kinetic โดยพิจารณาจากรูปแบบการติดสีของโครโมโซมและความถี่ของการแลกเปลี่ยนระหว่าง sister chromatid ที่เกิดขึ้น SCEs จะเกิดขึ้นในระยะ S phase ในสภาวะทั่วไปเซลล์ที่มีการแบ่งตัวเร็วกว่าจะมีความถี่ของการเกิด SCEs น้อยกว่า แต่หากมีการให้ปัจจัยที่เป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมจะพบว่าอัตราการเกิด SCEs มีความสัมพันธ์เชิงบวกกับปริมาณของปัจจัยที่ก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ที่ให้แก่เซลล์

บทที่ 3

การศึกษาการดำเนินวงจรของเซลล์ จากการวิเคราะห์ปริมาณ DNA

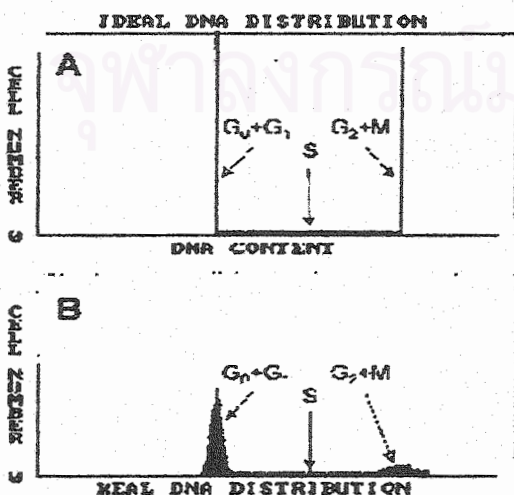
การดำเนินวงจรของเซลล์ (cell cycle progression) หมายถึง การดำเนินของเซลล์จากระยะหนึ่งไปอีกระยะหนึ่งในวงจรของเซลล์ การศึกษาว่าเซลล์หนึ่งๆ นั้นอยู่ในระยะใด ของวงจรเซลล์สามารถทำได้โดยการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ในเซลล์ด้วย flow cytometer กล่าวคือ ขณะที่เซลล์กำลังเจริญเติบโตและมีการแบ่งเซลล์อยู่ในระยะต่างๆ นั้น ปริมาณของ DNA จะมีความแตกต่างกันไป เมื่อแบ่งระยะของวงจรเซลล์ตามปริมาณ DNA ในเซลล์จะสามารถแบ่งเซลล์ได้เป็น 3 ระยะด้วยกัน (ดังแสดงในภาพที่ 1) คือ

ระยะ G₀/G₁ : ระยะ G₀ หมายถึง ระยะพัก คือเซลล์ไม่มีการแบ่งตัวแต่จะทำหน้าที่ตามปกติของเซลล์ ส่วนระยะ G₁ หมายถึง ระยะที่เซลล์มีการเตรียมตัวเพื่อเข้าสู่ช่วงการจำลองตัวเอง ทั้งระยะ G₀ และ ระยะ G₁ นี้เซลล์จะมีปริมาณ DNA เป็น 2n

ระยะ S : เป็นระยะที่โครโมโซมกำลังมีการจำลองตัวเอง ทำให้ปริมาณ DNA ค่อยๆ เพิ่มขึ้นเรื่อยๆ จนจำลองตัวเองเสร็จ ระยะนี้ปริมาณ DNA จะเพิ่มจาก 2n จนถึง 4n

ระยะ G₂/M : หมายถึง ระยะที่โครโมโซมมีการจำลองตัวเองเสร็จแล้ว มีการเตรียมตัวเข้าสู่ช่วงการแบ่งตัว และระยะที่เซลล์เข้าสู่ช่วงการแบ่งตัวตามลำดับ ขณะนี้เซลล์จะมีปริมาณ DNA เป็น 4n (ซึ่งหลังจากที่เซลล์แบ่งตัวเองเสร็จแล้วเซลล์จะกลับมามี ปริมาณ DNA เป็น 2n ดังเดิม และได้เซลล์ 2 เซลล์จากเดิม 1 เซลล์) [39]

ภาพที่ 1 : การแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่มตามปริมาณ DNA



ภาพบน (A) : กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ในอุดมคติ คอด้มน้แรก, กลางและสุดท้าย ในกราฟคือเซลล์ที่อยู่ในระยะ G₀/G₁ , S และ G₂/M ตามลำดับ

ภาพล่าง (B) : กราฟการกระจาย สัดส่วนของ DNA ในการทดลองจริง peakแรก, กลางและสุดท้ายในกราฟคือเซลล์ที่อยู่ในระยะ G₀/G₁ , S และ G₂/M ตามลำดับ

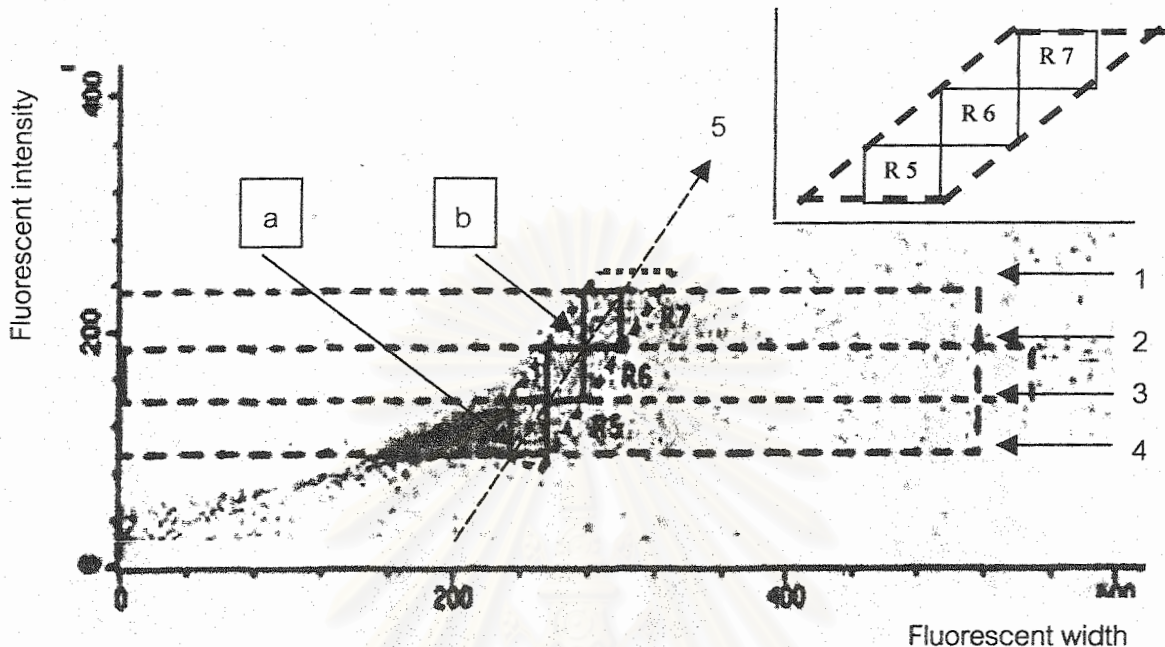
flow cytometer มีหลักการทำงานโดยให้เซลล์ (sample) ที่ต้องการวัด ไหลอยู่ใน laminar sheath fluid ผ่าน nozzle ซึ่งจากการปรับความดันอากาศของ sheath fluid reservoir และการปรับความดันอากาศของ sample chamber จะควบคุมความเร็วในการไหลของ sheath fluid และ sample ทำให้เซลล์ไหลผ่าน nozzle ตัดแสงเลเซอร์ เป็นแนวแถวเซลล์เดี่ยวๆ สัญญาณแสงที่เกิดจากเซลล์วิ่งตัดผ่านลำแสงเลเซอร์จะถูกบันทึกโดย photodetector ซึ่งจะเปลี่ยนสัญญาณแสงให้เป็นสัญญาณไฟฟ้า มีการขยายสัญญาณโดยวงจรขยายสัญญาณ (amplifier) จากนั้นโดยขบวนการของวงจรไฟฟ้าและการประมวลผลด้วยคอมพิวเตอร์ จะแปรสัญญาณแสดงเป็นกราฟและค่าทางสถิติ ค่าแสงที่วัดได้จากการที่เซลล์วิ่งตัดผ่านแสงเลเซอร์มี 2 ชนิด คือ scattering light เป็นเงาที่เกิดจากการสะท้อนและการกระเจิงของแสงเมื่อเซลล์วิ่งตัดผ่าน และ fluorescence ที่ปล่อยออกมาจากสาร fluorochrome ซึ่งใช้ย้อมเซลล์ scattering light แบ่งเป็น forward scattering ซึ่งแสดงขนาดของเซลล์ และ side scattering ซึ่งแสดง granularity ของเซลล์ ส่วน fluorescence ที่วัดได้มี 2 ค่า คือ pulse height ซึ่งแสดง fluorescent intensity ของเซลล์ และ pulse width ซึ่งแสดงเวลาที่เซลล์หนึ่งๆใช้ในการผ่านลำแสงเลเซอร์ [40]

การแบ่งกลุ่มเซลล์เพื่อวิเคราะห์การดำเนินวงจรของเซลล์ในการศึกษานี้(ภาพที่ 2) ทำโดยแบ่งกลุ่มเซลล์เป็น 3 กลุ่ม คือ เซลล์ในระยะ G0/G1,ระยะ S และระยะ G2/M โดยอาศัยหลักการ 2 ประการ คือ

1. ปริมาณของ DNA ในแต่ละเซลล์ : ซึ่งจะทราบได้จาก fluorescent intensity ดังที่ได้กล่าวแล้วว่าเซลล์ในระยะ G2/M จะมี ปริมาณ DNA เป็น 2 เท่าของระยะ G0/G1 จึงกล่าวได้ว่า fluorescent intensity ของระยะ G2/M จะเป็น 2 เท่าของระยะ G0/G1 เช่นกัน
2. ขนาดของเซลล์ : เนื่องจากเซลล์ในระยะ G2/M มีปริมาตรเป็น 2 เท่าของระยะ G0/G1 [41] จึงกล่าวได้ว่า เซลล์ในระยะ G2/M จะมีขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางเป็น 1.26 เท่าของระยะ G0/G1 (เมื่อปริมาตรของทรงกลม = $\frac{4}{3} \Pi r^3$; r เป็นรัศมีของทรงกลม)

ตัวอย่างของกราฟการกระจายสัดส่วน DNA และการพิจารณาระยะของเซลล์จากกราฟการกระจายสัดส่วน DNA แสดงในภาพที่ 3

ภาพที่ 2 : การแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่มเพื่อวิเคราะห์การดำเนินวงจรของเซลล์



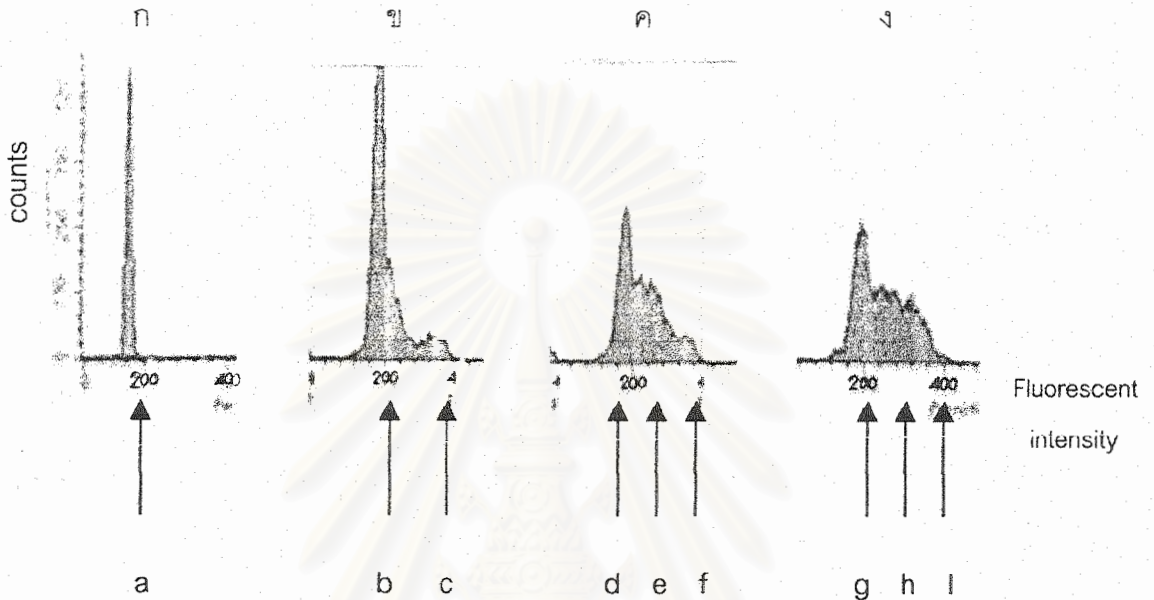
R5 คือ เซลล์ในระยะ G0/G1 , R6 คือ เซลล์ในระยะ S และ R7 คือ เซลล์ในระยะ G2/M

R7 มีความเข้มของแสง และมีความกว้างของเซลล์ประมาณ 1.7 เท่า และ 1.2 เท่า ของ R5 ตามลำดับ (คำนวณจากค่ามัธยฐานของความเข้มของแสงของ R7 หารด้วยค่ามัธยฐานของความเข้มของแสงของ R5 และค่ามัธยฐานของความกว้างของเซลล์ของ R7 หารด้วยค่ามัธยฐานของความกว้างของเซลล์ของ R5 ตามลำดับ)

ขั้นตอนการแบ่งกลุ่มเซลล์ (gating) ทำโดย

1. สร้างเส้นขนานกับแกนนอน 2 เส้นคลุมกลุ่มของเซลล์ (เส้นที่ 1 และ 4) แล้วแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่มเท่าๆกัน ด้วยเส้นที่ 2 และ 3 จะได้เซลล์ 3 กลุ่มที่มีปริมาณ DNA แตกต่างกัน
2. ลากเส้นทแยงมุม 1 เส้น (เส้นที่ 5) จะได้จุดตัดกับเส้นที่ 2 และ 4 เป็นจุด b และ a ตามลำดับ โดยจุดตัด b มี fluorescent width ประมาณ 1.26 เท่าของจุดตัด a
3. สร้างเส้นตั้งฉากกับแกนนอนเพื่อแบ่งเซลล์เป็น 3 กลุ่มเท่าๆกัน จะได้เซลล์ 3 กลุ่มที่มีความแตกต่างกันตามปริมาณ DNA และ ขนาดของเซลล์ ส่วนกลุ่มเซลล์ที่อยู่ทางซ้ายของ R5 คอเศษเซลล์ซึ่งจะมีปริมาณ DNA น้อยกว่าเซลล์ในระยะ Go/G1
4. เนื่องจากความแตกต่างของเวลาที่ใช้ในการย้อมเซลล์แต่ละครั้งทำให้การติดสีของเซลล์ และขนาดความบวมของเซลล์ที่ย้อมมีความไม่คงที่ในการวัดแต่ละครั้ง จึงต้องทำการ แบ่งกลุ่มเซลล์ (gating) ทุกครั้งที่มีการวัดครั้งใหม่ และเมื่อแบ่งกลุ่มเซลล์ (gaitng) แล้วจะใช้รูปแบบ (gating pattern) นั้นไปตลอดทุกตัวอย่างเซลล์ (sample) ในการวัดครั้งเดียวกันนั้น

ภาพที่ 3 : ตัวอย่างรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA (DNA distribution histogram) ซึ่งได้จากการวัดด้วย flow cytometer



ก : histogram ของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ยังไม่ถูกกระตุ้นให้แบ่งตัวด้วย PHA นั่นคือ เซลล์อยู่ในระยะ G0

ข - ง : histogram ของเซลล์ลิมโฟไซต์ภายหลังจาก release จาก methotrexate แล้วที่เวลาต่างๆ

a : G0 peak จะเห็นได้ว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ยังไม่ถูกกระตุ้นด้วย PHA ส่วนใหญ่อยู่ในระยะ G0

b : peak แรกของ histogram ข เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ G0/G1 และมีส่วนหนึ่งของประชากรที่เริ่มเข้าสู่ระยะ S (early S phase)

c : peak หลังของ histogram ข เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ G2/M

d : peak แรกของ histogram ค เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ G0/G1

e : peak ที่สองของ histogram ค เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ S

f : peak ที่สามของ histogram ค เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ G2/M

g : peak แรกของ histogram ง เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ G0/G1

h : peak ที่สองของ histogram ง เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ S

i : peak ที่สามของ histogram ง เป็นประชากรที่อยู่ในระยะ G2/M ซึ่งสังเกตได้ว่าจำนวนเซลล์ของระยะ S และ G2/M ของ histogram ง นี้ใกล้เคียงกัน แสดงถึง asynchrony ของเซลล์ที่เกิดขึ้น

บทที่ 4 วิธีดำเนินการวิจัย

ประชากร

เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวลิมโฟซัยท์เป็นเซลล์ที่มีการใช้อย่างแพร่หลายในการศึกษาหน้าที่ทางระบบภูมิคุ้มกันหรือผลกระทบในด้านความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรม และสามารถนำมากระตุ้นให้มีการแบ่งตัวได้ในหลอดทดลอง จึงเลือกใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวในการศึกษาครั้งนี้เพื่อเป็นตัวแทนของเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย ELF-EMF

การทดลองนี้มีการแบ่งกลุ่มประชากรเป็น 2 กลุ่มใหญ่ ได้แก่

กลุ่มควบคุม : คือเซลล์ที่ไม่ได้รับกระแสไฟฟ้าแต่เลี้ยงอยู่ในระบบเดียวกับกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น หรือกล่าวได้ว่าเป็นเซลล์ที่รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0 μA

กลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น : คือเซลล์ที่รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA

ซึ่งกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้น แบ่งได้เป็น 5 กลุ่มย่อย คือ กลุ่มที่ 1, 2, 3, 4 และ 5 หมายถึงเซลล์ที่รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA ตามลำดับ ดังนั้นในการทดลองนี้จึงแบ่งประชากรได้ทั้งหมด 6 กลุ่มย่อยเมื่อรวมกลุ่มควบคุมด้วย

การเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการศึกษาทำโดยนำ heparinized blood ซึ่งได้จากชายไทย 10 คน อายุระหว่าง 18-25 ปี คนละจำนวน 20 มิลลิลิตร นำมาแยกลิมโฟซัยท์โดยวิธี density gradient centrifugation (ด้วยน้ำยา Isoprep ซึ่งมีความถ่วงจำเพาะ = 1.077 g/litre) การจำกัดเพศและอายุนั้นเนื่องจาก เพศหญิงมีการแกว่งของระดับฮอร์โมนในร่างกายมากกว่าเพศชาย และลิมโฟซัยท์จากคนสูงอายุมักจะมีการตอบสนองต่อสาร mitogen (ซึ่งใช้กระตุ้นให้เซลล์ลิมโฟซัยท์เกิดการแบ่งตัว) น้อยกว่า [42-45]

การคัดแยกเซลล์ลิมโฟไซต์ ทำโดยขั้นตอนดังต่อไปนี้

- heparinized blood ผสมกับ RPMI 1640 medium ในอัตราส่วน 4/1 แล้วนำมา overlay บนน้ำยา Isoprep 8 มิลลิลิตร (มล.)
- นำมาปั่นด้วย centrifuge ที่ความเร็ว 2,200 rpm เป็นเวลา 20 นาที (no break) : หลังจากขั้นตอนนี้จะได้ของเหลว 4 ส่วน ส่วนบนสุดเป็นของเหลวใสสีเหลืองของ plasma และ platelet, ชั้นต่อมาเป็นชั้น buffy coat สีขุ่นขาวของ peripheral blood mononuclear cell (PBMC), ต่อจากนั้นเป็นชั้นของน้ำยา และชั้นล่างสุดเป็นชั้นของเหลวชั้นสีแดงของเม็ดเลือดแดงและเม็ดเลือดขาวชนิด granulocyte
- ดูดทิ้งส่วนบนสุดไป แล้วเก็บชั้น buffy coat ซึ่งมี PBMC ไว้ : PBMC นี้ประกอบด้วย T-cell 45.9 %, B-cell 15.1% และ monocyte 9-23 % [42, 44]
- ปั่นล้าง buffy coat ที่ได้ด้วย RPMI 1640 medium 10 มล. ที่ความเร็ว 1,800 rpm เป็นเวลา 10 นาที (low break), ทำขั้นตอนนี้ 2-3 ครั้ง
- นำเซลล์ที่ได้มาเลี้ยงโดยปรับปริมาณให้เป็น 1-2 ล้านเซลล์ต่อ 1 มล. ของ complete culture medium (CCM) ซึ่งมี 10% fetal bovine serum กระตุ้นเซลล์ให้เข้าสู่ mitosis ด้วย PHA-M ปริมาณ 0.2 มล./ 10 มล. CCM เลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 72 ชั่วโมงใน incubator ที่อุณหภูมิ 37° C, 5% CO₂

นอกจากเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนแล้ว ในส่วนของการทดลองเพื่อศึกษาการดำเนินวงจรของเซลล์ยังได้ใช้ MT-4 cell line เพื่อใช้เปรียบเทียบด้วย เนื่องจากเซลล์ที่ได้จากคน 10 คน อาจมีคุณลักษณะแตกต่างกันเนื่องมาจากความแตกต่างระหว่างบุคคล หากผลการทดลองมีความแตกต่างกันในแต่ละคนอาจเป็นไปได้ว่ามีสาเหตุมาจากความแตกต่างระหว่างบุคคล หรืออาจเกิดจากความไม่เที่ยงตรงของวิธีการทำการทดลอง แต่ cell line นั้นถือได้ว่าไม่มีความแตกต่างระหว่างเซลล์ จึงเป็นสิ่งที่ช่วยวัดความเที่ยงตรงของการทำการทดลองได้

MT-4 cell line นี้เป็น cell line ที่มีต้นกำเนิดจาก T lymphocyte ของมนุษย์ (human T-cell line transformed with HTLV-1)

Synchronization

หลังจาก 72 ชั่วโมงแล้ว เติม 10^{-5} M Methotrexate จำนวน 10 ไมโครลิตร/1 มล. CCM เป็นเวลา 17 ชั่วโมง

Releasing และ การกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้า

หลังจาก 17 ชั่วโมงของ synchronization แล้ว ทำการ release โดยนำเซลล์มาปั่นล้างด้วย RPMI 1640 medium ปริมาณ 10 มล. 1 ครั้ง ที่ความเร็ว 500 rpm, 10 นาที แล้วนำเซลล์มาเลี้ยงต่อใน CCM ซึ่งมี BrdU ที่ final concentration เป็น 2×10^{-5} M [62] แบ่งเซลล์ส่วนหนึ่งมาวัดปริมาณ DNA เซลล์ส่วนที่เหลือใส่หลุมเลี้ยงเซลล์ (ซึ่งเป็นอุปกรณ์จ่ายไฟฟ้ากระแสสลับให้แก่เซลล์) เพื่อจะทำการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าขนาดต่างกัน โดยใส่ CCM ให้มีปริมาตร 6 มล. ต่อหลุมเท่ากันทุกหลุม ทำการกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μ A (หนึ่งหลุมเลี้ยงเซลล์มีหนึ่งค่ากระแสไฟฟ้า รวมทั้งหมดเป็น 6 หลุมเลี้ยงเซลล์ต่อคน) พร้อมกันเป็นเวลา 1 ชั่วโมงจึงหยุดกระตุ้น ย้ายเซลล์จากหลุมเลี้ยงเซลล์ลงหลอดแก้วโดยแบ่งเซลล์แต่ละหลุมเป็น 9 หลอดแก้ว (สำหรับการเก็บเซลล์เพื่อวัดปริมาณ DNA 8 หลอดๆละ 0.5 มล. และการเก็บเซลล์เพื่อศึกษา SCEs 1 หลอดๆละ 2 มล.) แล้วจึงเลี้ยงต่อไปจนครบ 33 ชั่วโมง

การวิเคราะห์ปริมาณ DNA

เก็บเซลล์ตั้งแต่วินาที 0 ของการ release จนถึงวินาที 24 หลังการ release ทุกๆ 3 ชั่วโมง ทำการ fix cell โดยเติม 70% ice-cold Ethanol 1 มล. แล้วเก็บในตู้เย็นที่อุณหภูมิ 4° C เมื่อเก็บเซลล์ครบทุกชั่วโมงแล้วนำมาเตรียมเซลล์ก่อนการวิเคราะห์ด้วย flow cytometer โดยล้างเซลล์ 1 ครั้ง ด้วย PBS 1 มล. แล้วจึงย้อมเซลล์ด้วย Propidium iodide solution ปริมาณ 0.5 มล. เป็นเวลาอย่างน้อย 30 นาที จากนั้นจึงนำมาวิเคราะห์ด้วย flow cytometer โดยใช้แสงกระตุ้นที่ 488 นาโนเมตรและวิเคราะห์เซลล์จำนวน 30,000 เซลล์ต่อหลอดทดลอง

วิธีการศึกษาและการวิเคราะห์ SCEs

เซลล์ส่วนหนึ่งยังคงเลี้ยงต่อจนถึงชั่วโมงที่ 33 จึงนำเซลล์มาเตรียมสไลด์โดย

- เติม 0.001% Colchicine จำนวน 20 ไมโครลิตร/1 มล. CCM 30 นาที ก่อนถึงชั่วโมงที่ 33 เพื่อรวบรวมเซลล์ให้อยู่ในระยะ
- เมื่อครบ 30 นาทีแล้วเก็บเซลล์โดยปั่นที่ความเร็ว 500 rpm, 10 นาที
- ตะกอนเซลล์ที่ได้นำมาเติม prewarmed-hypotonic solution 3 มล. แล้วอุ่นใน water bath ที่อุณหภูมิ 37°C, 15 นาที
- ค่อยๆเติมสารละลาย fixative ลงไปจนครบ 1 มล. เป็นเวลา 5 นาที
- เก็บเซลล์โดยปั่นที่ความเร็ว 500 rpm, 10 นาที
- ปั่นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย fixative 3 มล. ที่ความเร็ว 500 rpm, 10 นาที อีก 3-4 ครั้ง
- resuspend pellet ด้วยสารละลาย fixative 0.5 มล แล้วหยดบนสไลด์ที่สะอาด ทิ้งสไลด์ให้แห้งอย่างน้อย 1-2 วัน
- ย้อมสไลด์ด้วย 10^{-4} M Hoechst 33258, 10 -15 นาที จุ่มล้างในน้ำสะอาดแล้วทิ้งสไลด์ให้แห้ง
- นำสไลด์ไปตากแดด 30 นาที โดยเรียงสไลด์ในถาดและแช่สไลด์ด้วยสารละลายบัฟเฟอร์ของ 0.16 M Sodium phosphate – 0.04 M Sodium citrate, pH 7.0 แล้วนำถาดสไลด์ซึ่งแช่ในสารละลายบัฟเฟอร์นั้นไปตากแดด คอยระวังไม่ให้สไลด์แห้งระหว่างเวลาที่ตากแดด
- จุ่มล้างสไลด์ในน้ำสะอาดแล้วทิ้งสไลด์ให้แห้ง
- นำสไลด์ไปย้อมด้วย 4% Giemsa 5 มล. ใน Sorensen Buffer 45 มล. เป็นเวลา 3-5 นาที
- จุ่มล้างสไลด์ในน้ำสะอาดแล้วทิ้งสไลด์ให้แห้ง จึง mount สไลด์
- จากนั้นนำสไลด์มาศึกษาลักษณะของโครโมโซมด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 100x ซึ่งติดตั้งเลนส์ขยาย 3x เพิ่มที่เลนส์ตาเพื่อช่วยเพิ่มกำลังขยายทำให้เห็นโครโมโซมชัดเจนขึ้น

หาความถี่ของการเกิด SCEs (โดยรวม SCEs ที่เกิดที่ centromere ด้วย) จาก 50 metaphase plate / 1 ค่ากระแส เปรียบเทียบกัน 6 ค่ากระแสภายในคน 1 คน จำนวนทั้งสิ้น 10 คน วิเคราะห์โดยใช้สถิติ repeated measurement ANOVA แล้วเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยคำนวณค่าประมาณแบบช่วงที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ถ้าพบว่ามี ความแตกต่างระหว่างกลุ่ม ($p\text{-value} < .05$) จึงทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแต่ละคู่ภายใน กลุ่ม (test of within-subjects effects) ด้วยการทดสอบ Bonferroni



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

ผลการทดลอง และการวิเคราะห์ข้อมูล

5.1 การดำเนินวงจรของเซลล์

เซลล์ลิมโฟไซต์ที่ผ่านการ synchronization ด้วย methotrexate เป็นเวลา 17 ชั่วโมง จะถูกล้างแล้วเลี้ยงต่อใน CCM ซึ่งมี BrdU อยู่ เซลล์จะได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 0-4 μA (0, 0.2, 0.5, 1, 2, และ 4 μA) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเลี้ยงต่อโดยไม่ได้รับกระแสไฟฟ้าอีก 23 ชั่วโมง รวมเป็น 24 ชั่วโมง

การเก็บเซลล์มาวิเคราะห์จะเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 0 คือหลังจาก release เซลล์จาก methotrexate แล้วเก็บเซลล์ทุกๆ 3 ชั่วโมงจนครบ 24 ชั่วโมง แต่เนื่องจากการใช้เวลานานขั้นตอนการเตรียมเซลล์หลังจาก release เพื่อแบ่งเซลล์ใส่หลอดเลี้ยงเซลล์นั้นใช้เวลาประมาณ 30 นาที ดังนั้นสัดส่วนของเซลล์ในชั่วโมงที่ 0 นั้น ตามความเป็นจริงจึงเป็นที่ 30 นาทีหลังจาก release เซลล์

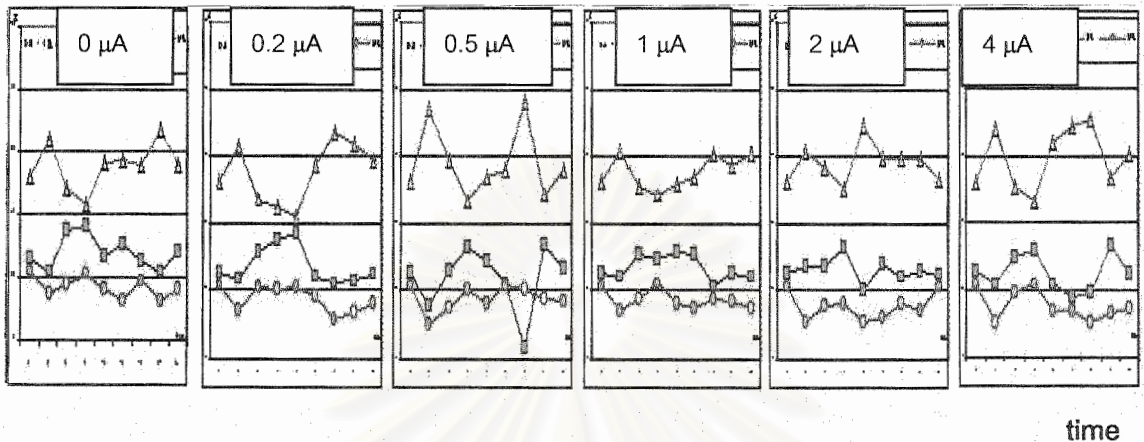
การทดลองชุดนี้ใช้ประชากร 2 ชนิด คือ เซลล์ลิมโฟไซต์จากคน 8 การทดลอง และ MT-4 cell line 2 การทดลอง รวมเป็น 10 การทดลอง แต่ละการทดลองแบ่งเป็น 6 กลุ่มย่อยตามค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้รับ รวมทั้งหมดเป็น 60 กลุ่มย่อย

จากการทดลองพบว่าค่าเฉลี่ยของสัดส่วนของเซลล์ที่ออกจาก blocking position ของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคน 8 การทดลองภายหลัง การ synchronization ด้วย methotrexate นั้น มีเซลล์ในระยะ $G0/G1 = 49.24 \pm 3.58\%$ ระยะ $S = 27.25 \pm 3.22\%$ และระยะ $G2/M = 23.46 \pm 1.62\%$ ส่วนของ MT-4 cell line ได้ค่าเฉลี่ยของสัดส่วนของเซลล์ในระยะ $G0/G1 = 71.80 \pm 0.28\%$ ระยะ $S = 14.70 \pm 0.42\%$ และระยะ $G2/M = 13.55 \pm 0.64\%$ จะเห็นว่า methotrexate มีประสิทธิภาพในการ synchronization cell line มากกว่าเซลล์ลิมโฟไซต์จากคนปกติ ทั้งนี้อาจเป็นเพราะว่า cell line นั้นไวต่อสาร methotrexate มากกว่าเซลล์ลิมโฟไซต์จากคน โดยใน cell line นั้นอาจมีโปรตีนบางตัวที่มีความแตกต่างจากเซลล์ปกติที่มีความจำเป็นต้องใช้ในการผลักดันให้มีการดำเนินวงจรของเซลล์ต่อไปในช่วงต้นๆของการผลักดันจากระยะ $G1$ สู่วัฏระยะ S และโปรตีนนั้นมีความไวต่อสาร methotrexate ทำให้สัดส่วนของเซลล์ MT-4 ภายหลังการ releasing มีเซลล์ที่อยู่ในระยะ $G0/G1$ มากกว่า

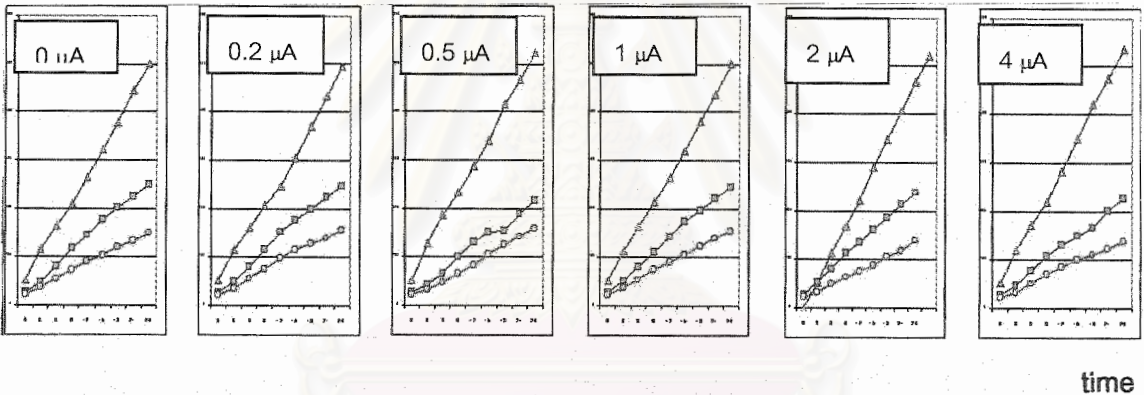
Lavoie และ Drouin ได้ทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ลิมโฟไซต์โดยกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วย PHA (ไม่ระบุปริมาณ) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น synchronize เซลล์ด้วย 0.1 μ M methotrexate เป็นเวลา 17 ชั่วโมง และได้สัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1 = 65% ระยะ S = 30% และระยะ G2/M = 5% (ได้เซลล์อยู่ในระยะ early S phase) [47] ปริมาณสัดส่วนของเซลล์หลังจาก releasing ที่ศึกษาโดย Lavoie และ Drouin แตกต่างจากปริมาณสัดส่วนของเซลล์ของผลการศึกษานี้แม้ว่าจะใช้ methotrexate ในปริมาณเดียวกัน ความแตกต่างนี้อาจมีสาเหตุจากการที่ Lavoie และ Drouin ใช้เซลล์ลิมโฟไซต์ที่กระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วย PHA เพียง 48 ชั่วโมง ซึ่งจะมีเซลล์ที่เกิดการแบ่งตัว (blastogenesis) น้อยกว่า กล่าวคือยังมีเซลล์ที่อยู่ในระยะพัก (resting stage, G0) มากกว่าทำให้ได้สัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1 เพิ่มขึ้น นอกจากนี้อาจเป็นเพราะความแตกต่างของจุดเวลาที่ทำการเก็บเซลล์เนื่องจากความล่าช้าทางเทคนิคของการศึกษานี้ดังกล่าวข้างต้นซึ่งในการศึกษานี้ได้ทำการ fix เซลล์ภายหลังจาก release เซลล์ไปแล้วเป็นเวลา 30 นาทีทำให้เซลล์เลื่อนออกจากจุด blocking ไปทางขวา กล่าวคือเลื่อนจากระยะ G1 มาอยู่ที่ระยะ S เพิ่มขึ้น

เนื่องจากภายหลังการแบ่งกลุ่มเซลล์ (gating) แล้ว จำนวนเซลล์ที่ได้ภายในกรอบที่ทำการแบ่งเซลล์มีจำนวนไม่เท่ากันซึ่งจะทำให้ไม่สามารถเปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ที่เวลาต่างๆได้ จึงปรับค่าโดยให้จำนวนเซลล์ทั้งหมดที่ได้จากการแบ่งกลุ่มเซลล์ทั้งสามกลุ่มเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ แล้วจึงเปรียบเทียบสัดส่วนของเซลล์ในเวลาที่ต่างๆ โดยทำการกราฟสัดส่วน(เปอร์เซ็นต์) ของเซลล์ในแต่ละเฟสเพื่อติดตามสัดส่วนของเซลล์ ณ จุดเวลาต่างๆที่ทำการเก็บเซลล์ และนำสัดส่วนของเซลล์ที่ได้นั้นมาทำเป็นกราฟสัดส่วนสะสมของเซลล์ (cumulative frequency curve) เพื่อพิจารณาภาพรวมของการเปลี่ยนแปลงสัดส่วนของเซลล์เมื่อเวลาผ่านไป(ภาพที่ 4) ซึ่งพบว่าเซลล์ทุกกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นในแต่ละการทดลองมีลักษณะกราฟสัดส่วนของเซลล์หรือกราฟสัดส่วนสะสมของเซลล์ใกล้เคียงกันเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการแบ่งกลุ่มของเซลล์ (gating) จะมีผลกระทบโดยตรงต่อจำนวนของเซลล์ในระยะ G0/G1 , S และ G2/M แต่เนื่องจากการแบ่งกลุ่มเซลล์โดยให้มีความแม่นยำ (accuracy) นั้นกระทำได้ยาก รวมถึงลักษณะของเซลล์ที่ออกจากจุด block เป็นไปโดยไม่พร้อมเพรียงกัน ดังนั้นการหาระยะของวงจรเซลล์โดยการใช้จากจุดสูงสุดของกราฟที่จุดเวลาหนึ่งไปยังจุดสูงสุดของกราฟอีกจุดเวลาหนึ่ง(peak to peak interval)โดยพิจารณาจากกราฟสัดส่วนของเซลล์(ภาพที่ 4)จึงกระทำได้ยาก

ภาพที่ 4 : ตัวอย่างกราฟสัดส่วนของเซลล์ และ กราฟสัดส่วนสะสมของเซลล์ จากชั่วโมงที่ 0-24 %



Cumulative %



จากซ้าย-ไป-ขวา : เซลล์ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0, 0.2, 0.5, 1, 2, และ 4 μA ตามลำดับ

แถวบน : กราฟสัดส่วนของเซลล์

แกนตั้ง : เปอร์เซ็นต์ ของ เซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 , S และ G2/M

แกนนอน : จุดเวลาที่เก็บเซลล์ คือ ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ตามลำดับ

แถวล่าง : กราฟสัดส่วนสะสมของเซลล์

แกนตั้ง : เปอร์เซ็นต์ สะสม ของ เซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1 , S และ G2/M

แกนนอน : จุดเวลาที่เก็บเซลล์ คือ ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ตามลำดับ

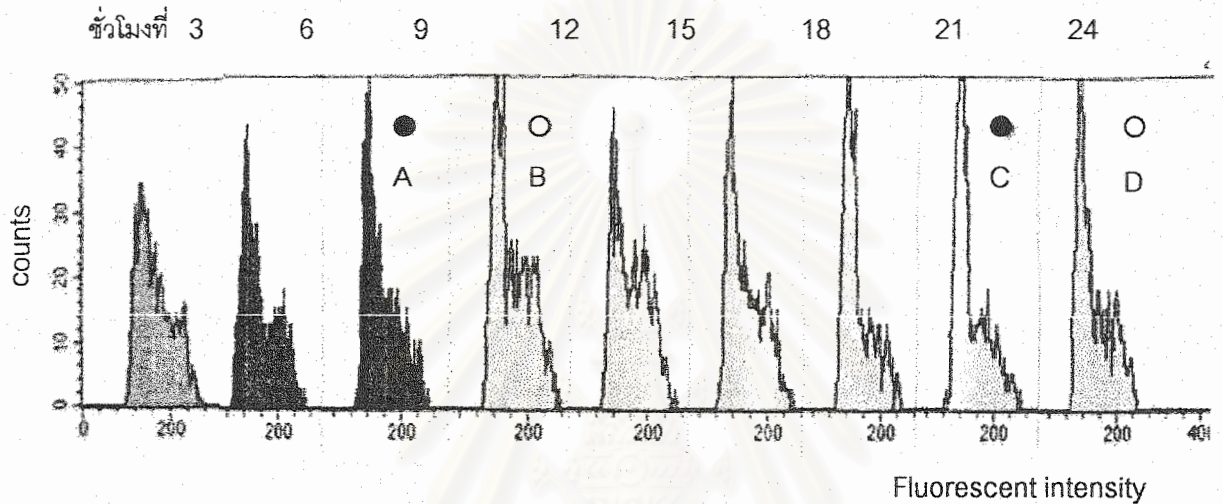
เส้นกราฟ Δ : เซลล์ที่อยู่ในระยะ G0/G1

\square : เซลล์ที่อยู่ในระยะ S

\circ : เซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M

จากผลการทดลองเมื่อพิจารณาสัดส่วนของเซลล์แต่ละเฟสจะเห็นว่าเซลล์มี asynchrony อย่างรวดเร็วภายหลังการ releasing กล่าวคือการดำเนินวงจรของเซลล์ไม่เลื่อนไปสู่ระยะต่างๆพร้อมๆกันทุกเซลล์ ซึ่งในการศึกษาจากลักษณะของโครโมโซมในระยเมตาเฟส (metaphase chromosome) โดยเทคนิค SCEs นั้น ก็พบว่าเซลล์ที่เก็บในช่วงที่ 33 นั้นมีทั้งเมตาเฟสโครโมโซมที่ผ่านมา 2 รอบวงจรเซลล์แล้ว (ซิสเตอร์โครมาติดิตติสต่างกัน) และเมตาเฟสโครโมโซมที่ผ่านมาเพียง 1 รอบวงจรเซลล์ (ซิสเตอร์โครมาติดิตติสเหมือนกัน) มีการศึกษาของ Staino-Coico, L. และคณะ พบว่าระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในการผ่าน S phase นั้นแปรผันตามปริมาณ RNA เซลล์ที่มีปริมาณ RNA มากกว่าในระยะ G1 จะใช้ระยะเวลาในระยะ S น้อยกว่า และพบว่าเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่ได้จากคนอายุน้อยกว่า 30 ปี ซึ่งคัดแยก PBMC แล้วเลี้ยงใน RPMI 1640 medium ที่มี 2 mM glutamine, 15% fetal calf serum กระตุ้นเซลล์ให้เกิดการแบ่งตัวด้วย 5 μ M PHA และsynchronize ด้วย mimosine มีช่วงเวลาของระยะ S เป็น 7.5-21.5 ชั่วโมง [44] สำหรับการทดลองนี้เซลล์ถูก synchronize ด้วย methotrexate ซึ่งจะไปยับยั้งการทำงานของ dihydrofolate reductase enzyme ที่จะไปสร้าง dihydrofolate และ tetrahydrofolate ซึ่งมีความสำคัญในการสังเคราะห์ purine DNA, RNA และโปรตีน รวมถึงการเปลี่ยน dUMP เป็น dTMP แม้ว่า จะ release เซลล์โดยการเติม BrdU ซึ่งเป็น Thymidine base analogue แต่เซลล์ที่ถูก block ตั้งแต่ช่วงแรกๆของการ synchronization อาจขาดสารจำเป็นที่จะใช้ในระยะเวลา S มากกว่าและทำให้ออกจาก blocking position ช้ากว่าภายหลังการ release เซลล์แล้ว การที่เซลล์มี asynchrony ทำให้การวิเคราะห์การดำเนินวงจรของเซลล์จากกราฟแสดงสัดส่วนของเซลล์แต่ละเฟส(ภาพที่ 4)ทำได้ยาก ในการศึกษานี้จึงใช้การวิเคราะห์ระยะเวลาของวงจรเซลล์จากรูปกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA (DNA distribution histogram) ซึ่งเป็นการวิเคราะห์เชิงคุณภาพ ภายใต้สมมุติฐานว่าเซลล์ที่ได้รับการ release นั้น แม้จะเกิด asynchrony เนื่องจากการออกจาก blocking position ไม่พร้อมกัน แต่เซลล์จะมีระยะเวลาของวงจรเซลล์เท่ากัน [44] ดังนั้นเมื่อพิจารณาระหว่างจุดเวลาที่ 1 และจุดเวลาที่ 2 ที่เซลล์ดำเนินไปครบ 1 รอบวงจรเซลล์ จะพบรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1, S และ G2/M ของจุดเวลาที่ 1 คล้ายกับรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1, S และ G2/M ของจุดเวลาที่ 2 (ภาพที่ 5) เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ในระยะต่างๆนั้นดำเนินไปจนมาสู่ระยะเดิมหลังจากใช้เวลาผ่านไป 1 รอบวงจรเซลล์แล้ว ซึ่งจะทำให้สามารถประมาณระยะเวลาของวงจรเซลล์จากเวลาทั้งสองได้ (ตารางที่ 1)

ภาพที่ 5 : การซ้ำรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ใน 1 รอบวงจรเซลล์ (โดยพิจารณาจากตำแหน่ง fluorescent intensity ของ S peak)



จากซ้าย-ไป-ขวา : กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA เรียงลำดับตามจุดเวลาที่เก็บเซลล์ คือ ชั่วโมงที่ 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ตามลำดับ

● A, ● C และ ○ B, ○ D : กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ที่มีการซ้ำรูปแบบกัน

โดย S peak ของ A และ C มี fluorescent intensity อยู่ประมาณช่วงที่ 160-200 เช่นเดียวกัน

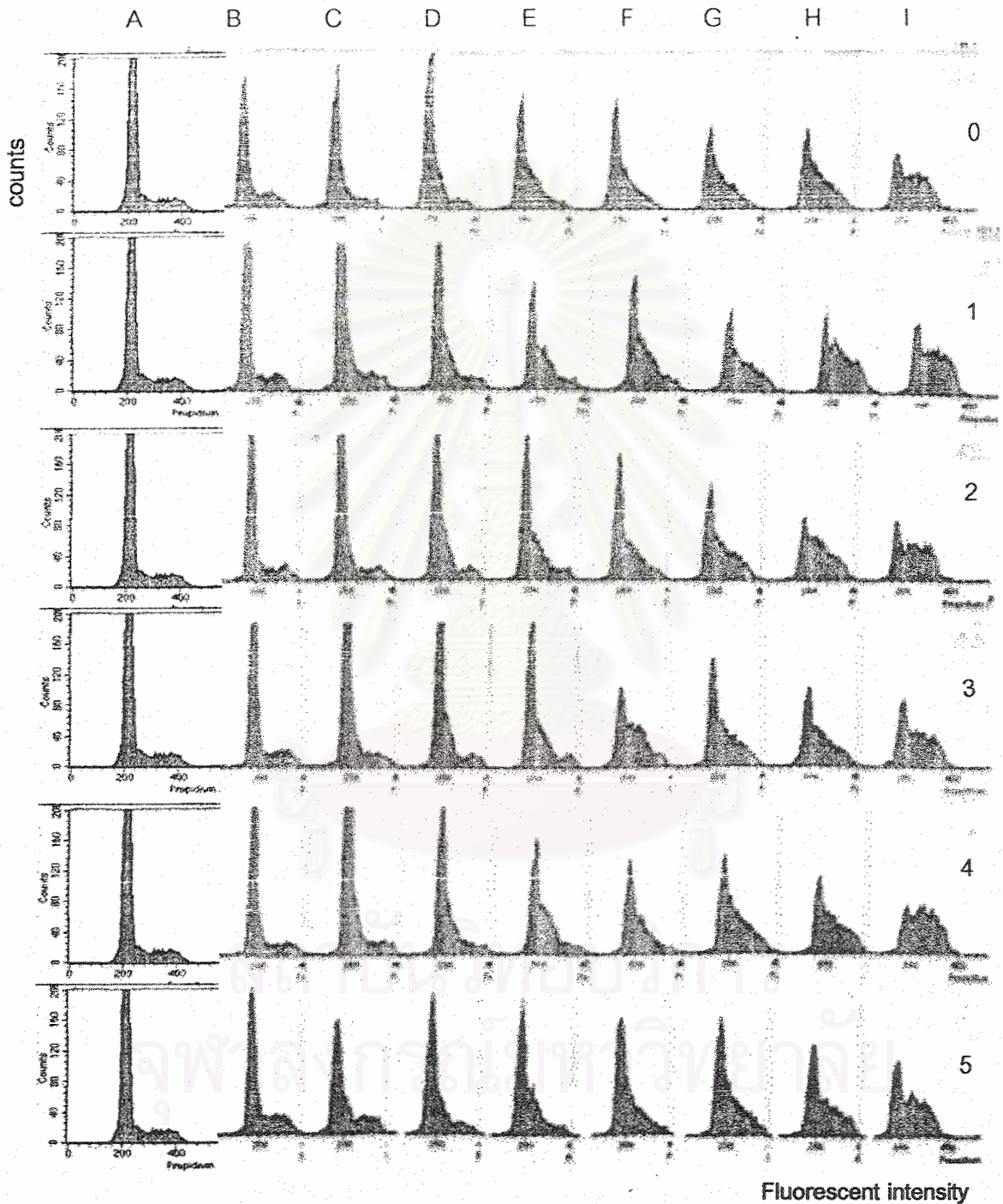
S peak ของ B และ D มี fluorescent intensity อยู่ประมาณช่วงที่ 160-240 เช่นเดียวกัน

ตารางที่ 1 : เวลาที่มีการซ้ำรูปแบบของ กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA จากช่วงเวลา 0 - 24 ชั่วโมงหลัง release เซลล์

	กระแสไฟฟ้า	เวลาที่เก็บเซลล์ (ชั่วโมง)										ช่วงเวลา (ชั่วโมง)		กระแสไฟฟ้า	เวลาที่เก็บเซลล์ (ชั่วโมง)										ช่วงเวลา (ชั่วโมง)
		0	3	6	9	12	15	18	21	24	0				3	6	9	12	15	18	21	24			
คนที่ 1	0 μ A			o							o	18	คนที่ 6	0 μ A			o						o	15	
	0.2 μ A	o						o				15	6	0.2 μ A	o							o		15	
	0.5 μ A	o							o			18	6	0.5 μ A			o					o		12	
	1.0 μ A		o								o	18	6	1.0 μ A			o						o	15	
	2.0 μ A			o								15	6	2.0 μ A			o						o	15	
	4.0 μ A				o							18	6	4.0 μ A	o						o			15	
คนที่ 2	0 μ A			o							o	18	คนที่ 7	0 μ A	o							o		18	
	0.2 μ A		o					o				12	7	0.2 μ A			o					o		15	
	0.5 μ A			o							o	18	7	0.5 μ A	o					o			15		
	1.0 μ A	o								o		18	7	1.0 μ A	o							o	18		
	2.0 μ A		o								o	18	7	2.0 μ A	o							o	18		
	4.0 μ A			o								15	7	4.0 μ A			o						o	15	
คนที่ 3	0 μ A										-	-	คนที่ 8	0 μ A			o					o	12		
	0.2 μ A										-	-	8	0.2 μ A			o				o		9		
	0.5 μ A										-	-	8	0.5 μ A	o				o			12			
	1.0 μ A										-	-	8	1.0 μ A		o					o		15		
	2.0 μ A										-	-	8	2.0 μ A			o					o	12		
	4.0 μ A										-	-	8	4.0 μ A			o					o	12		
คนที่ 4	0 μ A		o								o	18	MT-4	0 μ A			o					o	12		
	0.2 μ A		o								o	15	(1)	0.2 μ A	o				o			12			
	0.5 μ A	o									o	18	(1)	0.5 μ A	o					o		15			
	1.0 μ A			o							o	18	(1)	1.0 μ A	o					o		15			
	2.0 μ A			o							o	18	(1)	2.0 μ A	o			o			o	12			
	4.0 μ A	o									o	15	(1)	4.0 μ A	o				o			12			
คนที่ 5	0 μ A		o								o	15	MT-4	0 μ A			o					o	15		
	0.2 μ A		o								o	15	(2)	0.2 μ A	o				o			12			
	0.5 μ A			o							o	15	(2)	0.5 μ A				o			o	12			
	1.0 μ A	o									o	15	(2)	1.0 μ A		o				o		12			
	2.0 μ A		o								o	15	(2)	2.0 μ A		o					o	15			
	4.0 μ A	o									o	15	(2)	4.0 μ A	o				o			12			

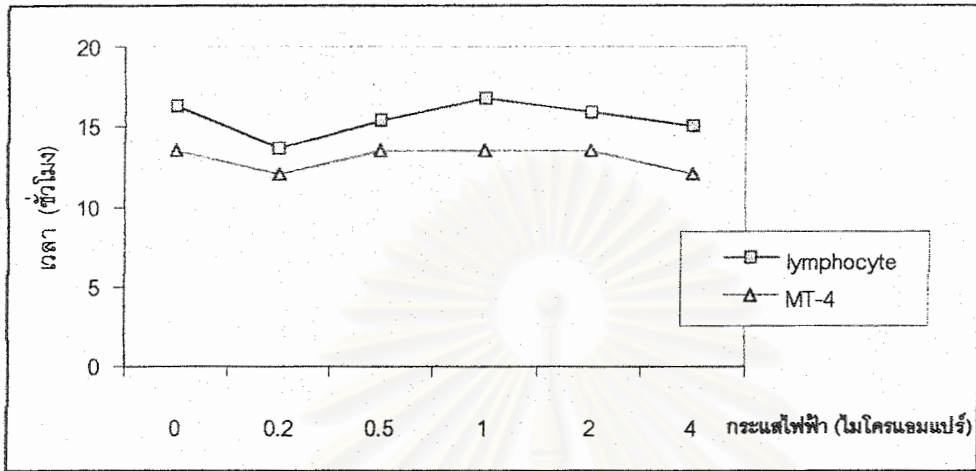
ในการศึกษานี้มีหนึ่งการทดลองจาก เซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที 3 ที่มีผลการทดลองแตกต่างจากการทดลองอื่นๆ (ภาพที่ 6) เซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที 3 นี้มีความล่าช้าในการดำเนินวงจรเซลล์ของทุกกลุ่มย่อย และไม่พบการซ้ำรูปแบบของกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ภายในช่วงเวลา 24 ชั่วโมง โดยที่ไม่ทราบถึงความแตกต่างของผลการทดลองที่ได้จากเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที 3 นี้มาจากสาเหตุใด หากเซลล์ของคนที 3 มีการตอบสนองในการแบ่งตัวจากการกระตุ้นด้วย PHA น้อยกว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนอื่นๆ แต่เซลล์ส่วนที่ตอบสนองต่อสาร PHA นั้นน่าจะเข้าสู่การแบ่งตัว (blastogenesis) โดยมีระยะเวลาที่เซลล์ใช้ในวงจรเซลล์ใกล้เคียงกับเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนอื่นๆ และเนื่องจากแหล่งของเซลล์ได้มาโดยวิธีการเดียวกันและอายุของผู้บริจาคอยู่ในช่วงใกล้เคียงกัน วิธีการเก็บเซลล์เพื่อมาใช้ในการทดลองและอายุของผู้บริจาคโลหิตจึงไม่ใช่สาเหตุของความแตกต่างนี้ นอกจากนี้สารและน้ำยาที่ใช้ในการทดลองมาจากการเตรียมในครั้งเดียวกันจึงไม่ใช่สาเหตุของความแตกต่างเช่นเดียวกัน แต่หากเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที 3 มีการดำเนินวงจรเซลล์เป็นปกติ อาจเป็นไปได้ว่าเซลล์มีการทยอยออกจาก blocking position ภายหลังจาก release จาก methotrexate ซ้ำมากทำให้มีการเพิ่มสัดส่วนของเซลล์ในระยะถัดจาก blocking position ที่ละน้อย จึงทำให้เห็นรูปแบบการกระจายสัดส่วนของเซลล์แตกต่างจากเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนอื่นๆ กล่าวคือเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที 3 อาจมีการตอบสนองต่อการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัว (blastogenesis) ของ PHA ได้ดี และมีการตอบสนองต่อ methotrexate ดีมาก เมื่อเซลล์ได้รับการ synchronize ให้หยุดอยู่ที่ระยะหนึ่งนานๆ ทำให้เซลล์มีการทำลายหรือการลดลงของสารจำเป็นในการผลักดันให้เซลล์เลื่อนจากระยะ G1 สู่วัฏ S มากกว่าเซลล์ของคนอื่นๆ เมื่อเซลล์ได้รับการ release จึงทำให้เซลล์ต้องใช้เวลาเพิ่มขึ้นในการเตรียมเซลล์ (สร้างสารจำเป็น) ให้พร้อมสู่การดำเนินวงจรเซลล์ต่อไป จึงเห็นเซลล์ชะงักอยู่ที่จุดที่ทำให้เกิด synchronize นานกว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนอื่นๆ เมื่อพิจารณาการเลื่อนสัดส่วนของเซลล์ไปยังระยะถัดไปของกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA พบว่าเซลล์กลุ่มที่ 3 คอลัมน์ F (เซลล์ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 1 μ A ณ ชั่วโมงที่ 15) มีการเลื่อนสัดส่วนของเซลล์ไปทางขวามากกว่ากล่าวคือเซลล์กลุ่มนี้มีการดำเนินวงจรของเซลล์เร็วกว่ากลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจาก histogram ทั้งหมดพบว่าประชากรทุกกลุ่มย่อยมีรูปแบบสัดส่วนของเซลล์ในชั่วโมงต่างๆ คล้ายกัน จึงกล่าวได้ว่ากระแสไฟฟ้าที่เซลล์ได้รับไม่มีผลกระทบต่อการดำเนินวงจรของเซลล์ในกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที 3

ภาพที่ 6 : กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA ของคนที่ 3



จากบน-ลง-ล่าง (0-5) : เซลล์ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA ตามลำดับ
 จากซ้าย-ไป-ขวา (A-I) : กราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA เรียงลำดับตามจุดเวลาที่เก็บเซลล์ คือ
 ชั่วโมงที่ 0, 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 และ 24 ตามลำดับ

ภาพที่ 7 : กราฟค่าเฉลี่ยระยะเวลาของวงจรเซลล์ (cell cycle duration) ของเซลล์ลิมโฟไซต์ และ เซลล์ MT-4



จากการทดลองพบว่า เซลล์ลิมโฟไซต์ของคนในกลุ่มควบคุมมีระยะเวลาของวงจรเซลล์โดยเฉลี่ยเป็น 16.29 ± 2.36 ชั่วโมง ส่วนกลุ่มควบคุมของ MT-4 cell line มีระยะเวลาของวงจรเซลล์โดยเฉลี่ยเป็น 13.5 ± 2.12 ชั่วโมง ระยะเวลาของวงจรเซลล์โดยเฉลี่ยของเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA เป็น 13.71 ± 2.36 ชั่วโมง, 15.43 ± 2.70 ชั่วโมง, 16.71 ± 1.60 ชั่วโมง, 15.86 ± 2.27 ชั่วโมง, และ 15.0 ± 1.73 ชั่วโมง ตามลำดับ (ภาพที่ 7) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 2 และ 4 μA นั้นมีระยะเวลาของวงจรเซลล์สั้นกว่าของกลุ่มควบคุม ขณะที่เซลล์ลิมโฟไซต์ของคนที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 1 μA มีระยะเวลาของวงจรเซลล์นานกว่าของกลุ่มควบคุม

ส่วนระยะเวลาของวงจรเซลล์โดยเฉลี่ยของ MT-4 cell line ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA เป็น 12.0 ± 0 ชั่วโมง, 13.5 ± 2.12 ชั่วโมง, 13.5 ± 2.12 ชั่วโมง, 13.5 ± 2.12 ชั่วโมง, และ 12.0 ± 0 ชั่วโมง ตามลำดับ ซึ่งแสดงให้เห็นว่า MT-4 cell line ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 และ 4 μA นั้น มีระยะเวลาของวงจรเซลล์สั้นกว่าของกลุ่มควบคุม ขณะที่ MT-4 cell line ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.5 และ 2 μA มีระยะเวลาของวงจรเซลล์เท่ากับของกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 7)

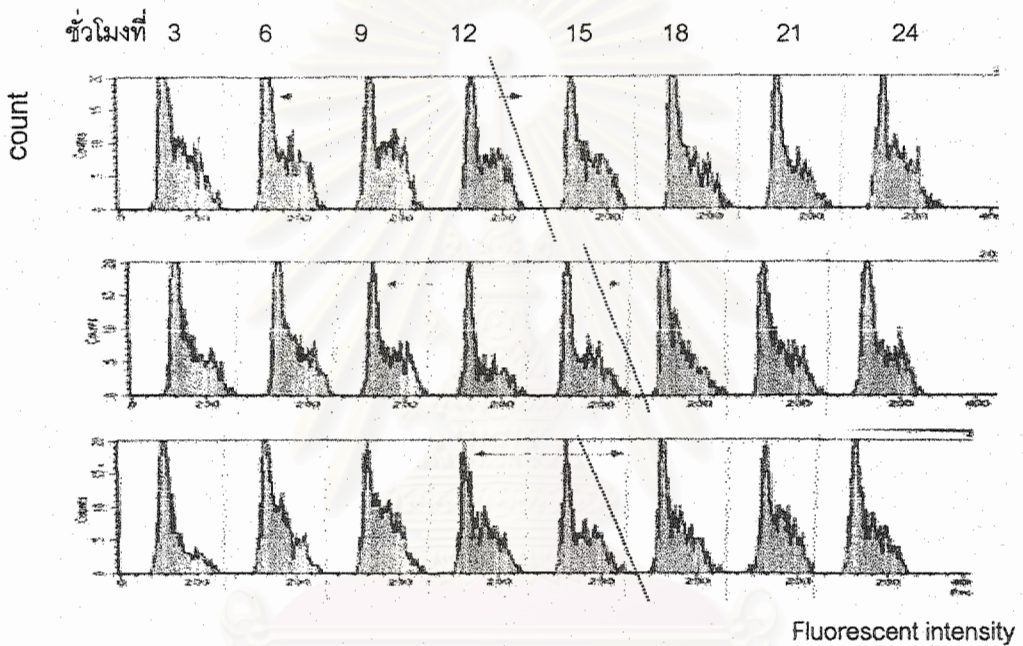
จากระยะเวลาของวงจรเซลล์ที่ได้ แสดงให้เห็นว่ากระแสไฟฟ้ามีแนวโน้มกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวเร็วขึ้น โดยในเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนนั้นกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 μA

มีระยะเวลาของวงจรเซลล์สั้นกว่ากลุ่มที่ได้รับกระแสขนาด 4, 0.5, 2, 0 และ 1 μA ตามลำดับ ส่วน MT-4 cell line นั้นกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 และ 4 μA มีระยะเวลาของวงจรเซลล์สั้นกว่ากลุ่มที่ได้รับกระแสขนาด 0.5, 1, 2 และ 0 μA การไม่พบความแปรผันโดยตรงของระยะเวลาของวงจรเซลล์กับปริมาณกระแสไฟฟ้าที่ให้แก่เซลล์อาจเนื่องมาจากการให้กระแสไฟฟ้าในช่วงเวลาเพียงสั้นๆ จึงทำให้ไม่เห็นผลกระทบจากกระแสไฟฟ้าที่แตกต่างกันอย่างชัดเจนในแต่ละขนาดกระแสไฟฟ้าที่ให้

จากการสังเกตพบว่าผลที่ได้จากการวิเคราะห์วงจรเซลล์ของเซลล์ลิมโฟซัยท์จากคนทุกคนนั้นมี G0/G1 peak สูงตลอดทุกชั่วโมงที่ทำการเก็บเซลล์ การที่ G0/G1 peak มีความสูงตลอดทุกชั่วโมงนั้นอาจเนื่องจากเซลล์ลิมโฟซัยท์จากคนภายหลังการกระตุ้นด้วย PHA ไป 72 ชั่วโมงและต่อไปอีก 17 ชั่วโมงในช่วงของ synchronization นั้น ยังมีประชากรจำนวนหนึ่งซึ่งยังไม่ออกจากระยะ G0 ซึ่งมีการวิจัยพบว่าเมื่อวัดสัดส่วนระหว่างเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่เกิดการแบ่งตัว (blastogenesis) กับเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่ไม่มีการแบ่งตัวเมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย 3.75% PHA ใน whole blood culture ที่เลี้ยงมานาน 72 ชั่วโมงนั้น มีเซลล์ที่เกิดการแบ่งตัวประมาณ 70% [43] ส่วน PBMC ที่กระตุ้นด้วย PHA 1.25 ไมโครกรัม/มล. ร่วมกับ 0.05% sRBC มีเซลล์ที่เกิดการแบ่งตัว 69.32 % [46] จากสองผลการศึกษาดังกล่าวนี้แสดงให้เห็นว่าเซลล์ลิมโฟซัยท์ที่ได้รับการกระตุ้นให้เกิดการแบ่งตัวด้วยสาร PHA นั้นยังไม่เข้าสู่วงจรเซลล์ทั้ง 100 เปอร์เซ็นต์เมื่อวัดหลังจากเลี้ยงเซลล์แล้วเป็นเวลา 72 ชั่วโมง ดังนั้นเซลล์ที่อยู่ใน G0/G1 peak ของ histogram จึงประกอบด้วยเซลล์ที่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PHA ที่อยู่ในระยะ G0 และระยะ G1 รวมถึงเซลล์ที่ไม่ตอบสนองต่อการกระตุ้นด้วย PHA ซึ่งอยู่ในระยะ G0 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจากสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1 ของ MT-4 cell line ก็พบว่ามี G0/G1 peak สูงตลอดทุกชั่วโมงที่ทำการเก็บเซลล์เช่นกัน จากการสังเกตรูปแบบกราฟการกระจายสัดส่วนของ DNA บางกราฟพบว่าเมื่อเซลล์ส่วนหนึ่งอยู่ในระยะ mid S แล้ว เซลล์จะดำเนินไปสู่ระยะ G0/G1 และระยะ early S ของรอบวงจรใหม่ภายใน 3 ชั่วโมงต่อมา (รูปที่ 8) นั่นคือระยะ G2/M มีช่วงเวลาสั้นมาก เซลล์จะเลื่อนจากระยะ mid S ผ่านระยะ G2/M จนเข้าสู่ระยะ G0/G1 และระยะ early S ของรอบวงจรใหม่ภายในเวลา 3 ชั่วโมง ซึ่งสัมพันธ์กับกราฟสัดส่วนของเซลล์ (รูปที่ 4) ที่พบว่าเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2/M มีสัดส่วนต่ำและไม่เห็นการเปลี่ยนแปลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับสัดส่วนของเซลล์ในระยะ G0/G1 และ ระยะ S ตลอดทุกชั่วโมงที่ทำการเก็บเซลล์ (ซึ่งพบลักษณะเช่นเดียวกันนี้ในการติดตามสัดส่วนของเซลล์ในระยะต่างๆของเซลล์ Chinese Hamster Ovary ภายหลังการ synchronize ด้วยวิธี mitotic detachment, centrifugal elutriation, central elutriation และ cell sorting [61]) ดังนั้นการที่ G0/G1 peak มีสัดส่วนสูงตลอดทุกชั่วโมงที่ทำการ

elutriation และ cell sorting [61]) ดังนั้นการที่ G0/G1 peak มีสัดส่วนสูงตลอดทุกชั่วโมงที่ทำการเก็บเซลล์อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากเซลล์เลื่อนจากระยะ G2/M ไปสู่ระยะ G0/G1 อย่างรวดเร็ว ขณะที่เซลล์จะใช้เวลาในระยะ G0/G1 นานกว่าระยะ G2/M

รูปที่ 8 : ตัวอย่างการเลื่อนของเซลล์ระยะ mid S ไปสู่ระยะ G0/G1 และ early S ของรอบวงจรใหม่



: เส้นแบ่งระหว่างวงจรเซลล์ที่ 1 และ วงจรเซลล์ที่ 2

ระยะเวลาของวงจรเซลล์ในเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนนั้นเคยมีการศึกษาโดยนักวิจัยหลายคนและหลายวิธีการศึกษา Sasaki, M. S. และคณะ ศึกษาจากสัดส่วนของ metaphase cell ที่มี tritium thymidine incorporation ของ PBMC (ไม่ระบุอายุผู้ให้) ที่เลี้ยงใน NCTC 109 medium, 10% autologous plasma, 10% inactivated fetal calf serum กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวด้วย PHA-M 40 µg/ml CCM แล้วศึกษาโดยวิธีทางรังสีวิทยา (autoradiography) พบว่า generation time ของเซลล์ลิมโฟไซต์เป็น 22 ชั่วโมง โดยมีระยะเวลาใน G1, S, G2 และ M ประมาณ 6, 11, 3 และ 2 ชั่วโมงตามลำดับ [50] Hefión, J. M. และคณะ ศึกษาโดยวิธีการเดียวกัน แต่เลี้ยง PBMC (ไม่ระบุอายุผู้ให้) ใน RPMI medium ซึ่งมี 20% inactivated human AB sera, 2mM L- glutamine กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวด้วย PHA-P 5 µg/ml CCM ได้ช่วงเวลาระหว่างจุดสูงสุดของ tritium thymidine incorporation เป็น 14-16 ชั่วโมง [45] Maur, P. A.

ระหว่างจุดสูงสุดของ tritium thymidine incorporation เป็น 14-16 ชั่วโมง [45] Maur, P. A. และคณะศึกษาจาก mitotic index ของ harlequin chromosome ที่ผ่าน 1, 2 และ 3 รอบวงจรเซลล์ จาก whole blood culture โดยใช้เลือด 0.2 มล. จากคนอายุ 23-24 ปี เลี้ยงใน Ham's F10 medium 3.6 มล., Fetal calf serum 0.6 มล. กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวด้วย PHA-P 0.2 มล. และใช้ BrdU 25 μ M พบว่าระยะเวลาของวงจรเซลล์เป็น 14.7 ชั่วโมง [51] Tice, R. R. และคณะ ศึกษาจาก harlequin chromosome ของ whole blood culture เช่นกัน โดยใช้เซลล์ที่ได้จากคนอายุ 19-23 ปี ให้ 3.75% PHA-M (ไม่ระบุ medium ที่ใช้) และใช้ BrdU 25 μ M และได้ระยะเวลาของวงจรเซลล์ เป็น 12.3 ชั่วโมง [43] จะเห็นได้ว่าระยะเวลาของวงจรเซลล์ที่ได้จาก 4 การศึกษาข้างต้นมีความแตกต่างกัน ความแตกต่างของระยะเวลาของวงจรเซลล์ที่ได้ในแต่ละการศึกษานั้นอาจเนื่องมาจากปัจจัยทางเทคนิคของการทำการทดลอง และวิธีการที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ เช่น ชนิดและปริมาณของ medium, serum, mitogen, อายุของผู้บริจาคเลือด หรือมาจากสาเหตุอื่นๆนอกเหนือไปจากที่ได้กล่าวมาแล้ว

การศึกษานี้ทำโดยการวิเคราะห์ปริมาณ DNA ด้วย flow cytometer ของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้จากคนอายุ 18-25 ปี เลี้ยงเซลล์ใน RPMI 1640 medium ที่มี 10% fetal calf serum กระตุ้นให้เซลล์แบ่งตัวด้วย 2% PHA-M เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ทำการ synchronize เซลล์ด้วย 10^{-7} M Methotrexate เป็นเวลา 17 ชั่วโมงจึง release เซลล์ แล้วเลี้ยงต่อใน CCM ที่มี 2×10^{-5} M BrdU พบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ของกลุ่มควบคุมมีระยะเวลาของ วงจรเซลล์โดยเฉลี่ย เป็น 16.29 ± 2.36 ชั่วโมง ระยะเวลาของวงจรเซลล์ที่ได้ในการศึกษานี้ไม่สามารถเปรียบเทียบกับ ระยะเวลาของวงจรเซลล์ที่ได้ในการศึกษาอื่นๆ เนื่องจากใช้วิธีการศึกษาต่างกัน รวมถึงระบบที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์แตกต่างกันดังกล่าว

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5.2 ผลการเหนี่ยวนำให้เกิด SCEs

การศึกษา genotoxic effect ของกระแสไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นเซลล์ ทำโดยให้กระแสไฟฟ้าขนาด 0.2-4 μA แก่เซลล์ลิมโฟซัยท์ของคน 10 คนที่อยู่ในระยะ early S phase เป็นเวลา 1 ชั่วโมง คนหนึ่งคนจะแบ่งเป็น 6 กลุ่มย่อยตามค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้รับ แล้วพิจารณาผลของกระแสไฟฟ้าต่อการเหนี่ยวนำให้เกิด SCEs โดยศึกษาจาก 50 metaphase plate ต่อ 1 กลุ่มย่อย รวมทั้งสิ้น 3,000 metaphase plate จากเซลล์ซึ่งเก็บที่ชั่วโมง 33 หลังการ release จาก methotrexate ผลการทดลองแสดงในตารางที่ 3 และตัวอย่างโครโมโซมที่เกิด SCEs แสดงในภาพที่ 9 - 14

จากการศึกษาพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs ทั้งหมดต่อเซลล์ในกลุ่มควบคุม เป็น 9.05 SCEs ต่อเซลล์ ส่วนกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA มีค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs ทั้งหมดต่อเซลล์ เป็น 9.32, 9.09, 9.80, 9.56 และ 9.57 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจากค่าเฉลี่ยของการเกิด SCEs ต่อเซลล์โดยเปรียบเทียบตามขนาดของกระแสไฟฟ้าที่ให้ระหว่างกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นกับกลุ่มควบคุมภายในคนคนเดียว พบว่าเซลล์ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาดสูงกว่าจะมีการเกิด SCEs สูงกว่ากลุ่ม ควบคุมเล็กน้อย แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P-value > .05) ดังแสดงในตารางที่ 2

ตารางที่ 2 : ค่าเฉลี่ยของการเกิด SCEs ต่อเซลล์ จากการวิเคราะห์ด้วย repeated measurement ANOVA

ความเข้มของกระแสไฟฟ้า	mean	SD.	N
0 μA	9.05	± 1.35	10
0.2 μA	9.32	± 1.71	10
0.5 μA	9.09	± 1.44	10
1 μA	9.80	± 1.62	10
2 μA	9.56	± 1.98	10
4 μA	9.57	± 1.80	10
P-value	=	.593	

ตารางที่ 3 : จำนวน metaphase plate ที่มีความถี่ของการเกิด SCEs ตั้งแต่ 0–12 SCEs ต่อ กลุ่มโครโมโซม (โดยจำแนกตามโครโมโซมกลุ่ม A-G)

กระแสไฟฟ้า	คนที่	จำนวน SCEs ต่อ กลุ่มโครโมโซม																												
		กลุ่ม A									กลุ่ม B						กลุ่ม C													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
0 μA	1	8	13	18	8	2	1				11	20	16		3			2	9	13	9	8	8			1				
	2	8	12	19	7	3		1			13	17	15	4	1			4	7	11	11	9	5	1	2					
	3	5	12	18	8	5	1	1			15	19	13	3				2	6	10	12	12	2	5			1			
	4	11	17	15	2	5					10	23	11	5	1			3	4	13	14	12	1	1	2					
	5	7	14	17	7	5					9	18	14	8	1			3	4	6	6	12	10	3	3	2	1			
	6	13	11	12	9	4	1				15	15	12	7	1				5	6	15	16	6				2			
	7	9	15	17	5	4					16	23	9	2					10	11	10	12	4	2	1					
	8	7	10	21	7	4		1			10	14	22	4					2	11	10	16	9	1	1					
	9	13	23	8	6						16	26	7	1				3	11	18	10	6	2							
	10	10	10	18	9	3					7	18	19	3	3			2	3	10	9	14	5	4	3					
0.2 μA	1	3	14	19	7	7					8	21	14	7			3	3	7	13	13	5	2	4						
	2	8	20	11	9	1	1				15	18	13	4			3	4	11	15	5	6	5	1						
	3	3	17	16	9	5					14	23	9	4			2	5	12	12	7	7	1	3		1				
	4	8	10	15	15	1	1				14	15	14	6	1		1	3	4	18	6	10	6	2						
	5	8	16	14	6	2	4				11	22	13	4			1	3	6	11	7	9	7	2	2	1	1			
	6	7	14	6	18	4	1				10	24	10	6			1	4	10	7	10	7	6	5						
	7	13	15	10	9	3					25	10	10	4			1	3	3	11	6	11	8	7	1					
	8	4	9	24	7	4	2				7	21	14	7	1			3	7	16	10	7	6	1						
	9	14	22	9	3	1	1				18	20	9	3				6	8	14	16	6								
	10	5	20	13	9	2	1				15	15	17	3			1	10	18	10	7	1	1	2						
0.5 μA	1	6	17	14	7	4	2				10	16	14	9	1		1	4	12	13	7	8	1	3	1					
	2	6	15	19	7	3					13	16	17	4			1	4	6	20	8	7	2	2						
	3	7	20	15	6	1		1			17	21	9	3			4	12	9	17	3	3	1		1					
	4	4	13	23	5	5					9	20	14	6	1		1	3	8	14	9	7	4	4						
	5	12	13	17	4	2	2				11	17	16	5	1		1	3	9	15	7	7	7	1						
	6	11	11	16	10	2					9	23	10	6	1	1		2		6	18	11	9	2	2					
	7	13	14	16	5	2					16	22	8	3	1			2	5	8	19	7	4	4	1					
	8	2	15	17	11	3	2				11	21	13	5				1	4	8	13	13	7	3	1					
	9	11	15	15	7	1	1				13	20	10	7				8	12	11	8	8	3							
	10	3	20	14	8	3	2				5	15	17	10	3			3		10	14	10	9	2	2					

ตารางที่ 2 (ต่อ) : จำนวน metaphase plate ที่มีความถี่ของการเกิด SCEs ตั้งแต่ 0–12 SCEs ต่อ
กลุ่มโครโมโซม (โดยจำแนกตามโครโมโซมกลุ่ม A-G)

กระแส ไฟฟ้า	คนที่	จำนวน SCEs ต่อ กลุ่มโครโมโซม																												
		กลุ่ม A									กลุ่ม B						กลุ่ม C													
		0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	0	1	2	3	4	5	6	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 μA	1	3	13	15	13	3	3				10	26	10	4				2	4	12	11	5	8	3	3		2			
	2	9	14	14	7	4		2			12	15	16	4	3			2	7	8	11	10	6	3	3					
	3	8	16	11	6	3	4	1		1	12	17	16	4	1			2	6	7	15	6	8	5				1		
	4	3	20	17	7	2	1				10	19	19	2				3	3	8	9	14	4	5	3	1				
	5	2	16	13	14	3	2				10	22	13	3	2			1	4	11	8	10	5	8		3				
	6	5	6	10	18	9	2				5	19	19	6	1			1	6	9	14	5	4	4	5	2				
	7	9	11	16	8	6					12	26	8	2	2				3	11	12	13	5	6						
	8	2	11	13	14	5	4	1			13	10	19	8				2	4	7	14	9	7	5	2					
	9	12	17	15	5	1					15	21	14					3	16	14	10	5	1	1						
	10	12	13	16	5	4					15	18	10	7					4	14	17	9	3	3						
2 μA	1	4	19	16	9	1	1				17	19	12	1	1			2	9	15	7	7	6	2	2					
	2	6	19	11	10	2	2				10	17	19	3	1			3	12	15	5	8	2	2	2	1				
	3	5	12	17	11	4	1				12	19	13	4	2			7	13	13	4	9	3		1					
	4	7	16	20	4	1	2				7	25	14	3	1			5	6	19	10	7	1	2						
	5	5	15	17	8	4	1				14	18	13	3	1	1		1	6	11	7	12	7	5	1					
	6	3	17	15	10	4				1	10	18	11	6	4		1	2	1	6	14	11	5	5	4	1	1			
	7	8	16	10	3	9	4				12	20	11	5	2			1	4	4	12	9	9	6	2		1	1		1
	8	5	17	23	2	2		1			13	16	18	3				1	8	13	10	13	1	3	1					
	9	7	20	14	5	2	2				21	18	8	2	1			3	6	18	16	4	3							
	10	8	17	19	3	3					17	19	11	3				2	6	14	13	8	3	2	1	1				
4 μA	1	6	11	20	6	5	2				9	19	15	7			1	3	4	19	10	7	3	1	1	1				
	2	7	14	19	7	3					7	20	18	5				1	3	13	9	10	5	8		1				
	3	6	12	15	9	6	2				8	15	16	10	1			2	4	14	9	9	8	4						
	4	4	21	13	6	4	2				13	16	17	4				1	1	12	13	10	5	6	1			1		
	5	4	11	16	13	5	1				7	14	18	9	2				3	6	9	16	11	2	1	2				
	6	6	12	21	9	2					7	24	14	5					4	8	7	11	7	10	2	1				
	7	7	13	20	6	2	1	1			15	25	6	3	1			4	5	13	12	6	6	3	1					
	8	5	7	25	7	4	2				10	11	22	4	3			1	6	8	15	8	5	7						
	9	5	24	14	5	2					20	17	10	3				6	7	15	16	4	2							
	10	8	22	11	8	1					16	20	11	2	1			2	3	11	18	11	4	1						

ตารางที่ 2 (ต่อ) : จำนวน metaphase plate ที่มีความถี่ของการเกิด SCEs ตั้งแต่ 0–12 SCEs ต่อ
กลุ่มโครโมโซม (โดยจำแนกตามโครโมโซมกลุ่ม A-G)

กระแสไฟฟ้า	คน	จำนวน SCEs ต่อ กลุ่มโครโมโซม																				
		กลุ่ม D					กลุ่ม E					กลุ่ม F					กลุ่ม G					
		0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	0	1	2	
0 μA	1	21	22	6		1		25	21	3	1			42	7	1			42	7	1	
	2	20	19	7	2	2		29	15	5	1			48	2				46	4		
	3	16	17	13	1	3		24	21	5				43	7				42	8		
	4	17	19	9	5			20	22	4	3		1	44	6				49	1		
	5	17	21	9	2		1	28	13	6	3			46	3	1			50			
	6	23	19	5	1	2		24	16	8	1	1		38	9	3			50			
	7	19	26	4	1			28	19	1	2			49	1				50			
	8	14	18	15	3			45	5					45	5				50			
	9	19	22	7	2			33	9	7	1			50					50			
	10	15	22	11	1	1		50						50					50			
0.2 μA	1	19	20	7	3	1		31	15	2	2			43	7				49	1		
	2	23	14	11	2			28	15	5	2			45	4	1			45	4	1	
	3	20	18	7	4	1		30	15	5				50					43	3	4	
	4	13	21	10	5	1		26	16	8				41	7	1	1		39	11		
	5	17	19	12	1	1		20	18	11	1			46	3	1			46	4		
	6	15	15	17	2	1		33	9	4	4			43	6	1			50			
	7	18	21	8	3			22	19	8	1			40	10				50			
	8	24	16	8	2			28	16	6				47	3				50			
	9	25	21	4				39	9	2				50					50			
	10	21	20	9				36	13	1				50					50			
0.5 μA	1	21	20	8	1			23	22	2	3			47	3				47	3		
	2	23	17	7	1	2		28	13	8	1			45	4	1			46	4		
	3	24	18	6	1	1		26	14	8	2			47	3				45	5		
	4	11	20	14	2	3		19	25	4	1	1		49	1				40	9	1	
	5	24	13	11	1	1		18	24	4	2	2		39	8	3			43	7		
	6	21	22	5	2			20	16	13	1			45	4	1			50			
	7	19	23	6	2			14	26	9	1			39	9	2			50			
	8	14	21	13	2			30	15	3	2			41	6	3			50			
	9	22	22	6				43	7					50					50			
	10	19	22	7	2			30	16	3	1			50					50			

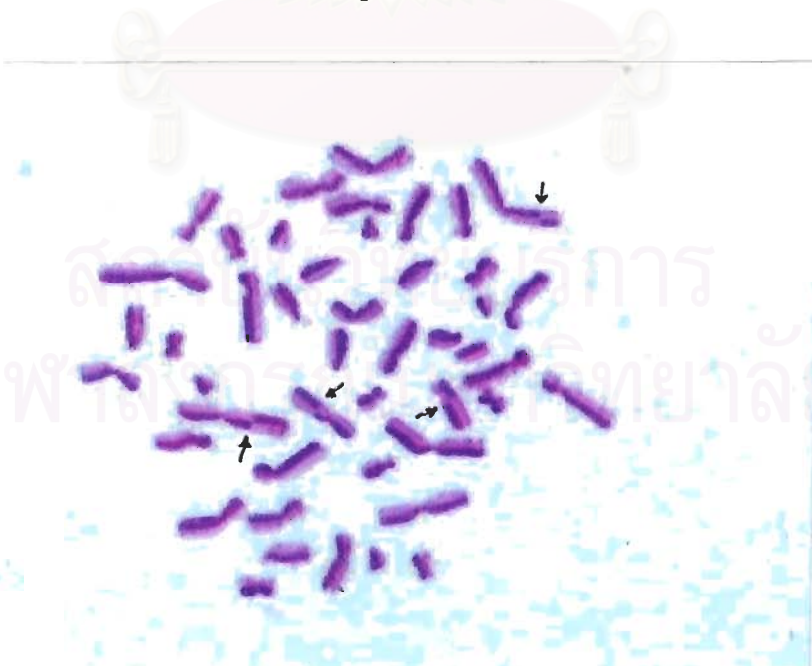
ตารางที่ 2 (ต่อ) : จำนวน metaphase plate ที่มีความถี่ของการเกิด SCEs ตั้งแต่ 0–12 SCEs ต่อกลุ่มโครโมโซม (โดยจำแนกตามโครโมโซมกลุ่ม A-G)

กระแสไฟฟ้า	คนที่	จำนวน SCEs ต่อ กลุ่มโครโมโซม																	
		กลุ่ม D					กลุ่ม E					กลุ่ม F				กลุ่ม G			
		0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	5	0	1	2	3	4	0
1 μA	1	20	11	11	7	1	29	16	2	3			45	5			47	3	
	2	17	22	7	2	2	27	16	7				47	3			46	3	1
	3	21	18	8	1	1	1	31	13	6			42	6	2		46	3	1
	4	18	23	5	4			28	13	6	2	1	47	3			45	5	
	5	19	17	11	1	1	1	29	13	7	1		46	3	1		45	4	1
	6	25	15	8	2			18	26	6			43	7			50		
	7	17	20	7	3	3		28	17	5			45	5			50		
	8	25	17	7	1			43	7				42	6	2		50		
	9	25	19	5	1			35	13	1	1		50				50		
	10	23	22	3	1	1		48	1	1			50				50		
2 μA	1	24	17	8	1		15	26	9			44	5	1		45	4	1	
	2	19	16	10	5		26	21	3			46	4			42	7	1	
	3	16	23	9	2			29	13	6	1	1	43	5	2		41	9	
	4	20	13	11	6			23	20	6	1		40	10			44	6	
	5	21	18	9	1	1		33	11	6			46	4			50		
	6	18	12	15	5			26	20	4			42	8			50		
	7	11	20	9	9		1	26	20	4			47	3			50		
	8	26	19	3	2			37	10	3			42	6	1	1	50		
	9	25	15	10				31	18	1			50				50		
	10	22	22	5	1			50					50				50		
4 μA	1	17	20	8	4		1	29	14	7			42	8			45	5	
	2	27	9	9	5			32	15	2	1		45	5			44	5	1
	3	18	14	13	5			26	19	4	1		36	10	4		42	8	
	4	20	9	15	5	1		25	18	6	1		41	9			49	1	
	5	14	19	11	6			25	18	6	1		41	6	3		50		
	6	19	20	8	3			24	18	6	2		39	11			50		
	7	24	18	7	1			30	17	3			47	3			50		
	8	21	17	11		1		40	6	4			42	7	1		50		
	9	26	17	5	2			29	18	3			50				50		
	10	21	15	13	1			50					50				50		

ภาพที่ 9 : ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มควบคุม (ลูกศรชี้ = ตำแหน่งที่เกิด SCEs)



ภาพที่ 10 : ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไป 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 μ A (ลูกศรชี้ = ตำแหน่งที่เกิด SCEs)



ภาพที่ 11 : ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไประหว่าง 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.5 μA (ลูกศรชี้ = ตำแหน่งที่เกิด SCEs)



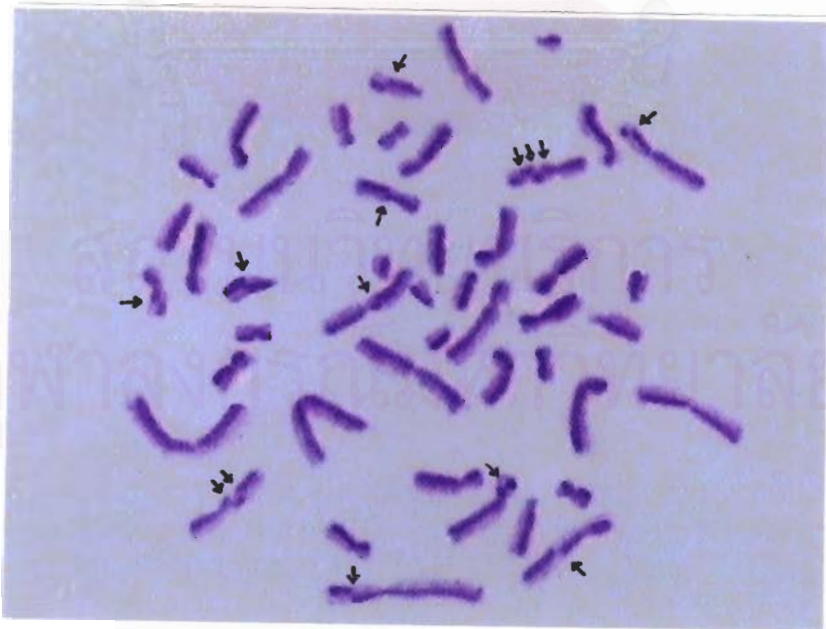
ภาพที่ 12 : ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไประหว่าง 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 1 μA (ลูกศรชี้ = ตำแหน่งที่เกิด SCEs)



ภาพที่ 13 : ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไประยะ 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 2 μA (ลูกศรชี้ = ตำแหน่งที่เกิด SCEs)



ภาพที่ 14 : ตัวอย่างการเกิด SCEs ในโครโมโซมที่ผ่านไประยะ 2 รอบวงจรเซลล์หลังจากได้รับ BrdU ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 4 μA (ลูกศรชี้ = ตำแหน่งที่เกิด SCEs)



ค่าเฉลี่ยการเกิด SCEs ในกลุ่มควบคุมของการศึกษาคั้งนี้เป็น 7.79 SCEs/เซลล์ ซึ่งมีค่าสูงกว่าค่าเฉลี่ยของการเกิด SCEs ที่ศึกษาโดยอมราและสุพัตรา ซึ่งศึกษาใน whole blood culture ของเซลล์ ลิมโฟซัยท์ที่ได้จากคนอายุระหว่าง 18-22 ปี โดยเลี้ยงเซลล์ใน RPMI 1640 medium ที่มี fetal calf serum (ไม่ระบุปริมาณ) และกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการแบ่งตัวด้วย PHA (ไม่ระบุปริมาณ) ใส่สาร BrdU 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ที่ช่วงเวลาที่ 24 หลังจากกระตุ้นเซลล์ด้วย PHA โดยไม่ทำการ synchronize เซลล์ และได้ baseline SCEs เป็น 5.46 ± 0.39 [52] เนื่องจากความแตกต่างของ medium ที่ใช้ , harvesting time , และปริมาณ serum นั้นจะมีผลต่อความถี่ของการเกิด SCEs [53] จึงเป็นไปได้ว่าค่า SCEs ที่แตกต่างกันนี้มาจากวิธีการเลี้ยงเซลล์ที่ต่างกัน โดยการแยกเลี้ยงเฉพาะ PBMC ทำให้เซลล์มีโอกาสสัมผัส BrdU มากกว่า จึงทำให้เซลล์มีความถี่ของการเกิด SCEs สูงกว่า

จากผลการทดลองพบว่ามีแนวโน้มที่เซลล์ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าที่มีความเข้มมากกว่าจะมีโครโมโซมที่เกิด multibreak (คือ มี SCEs มากกว่า 1 ตำแหน่งที่ p-arm หรือ q-arm ของโครโมโซมตัวหนึ่งๆ) มากกว่า แต่อย่างไรก็ตามไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของจำนวนโครโมโซมที่เกิด multibreak จากการเหนี่ยวนำด้วยกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆกับกลุ่มควบคุม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P-value > .05) ดังแสดงในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 : ค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด multibreak ต่อเซลล์ จากการวิเคราะห์ด้วย repeated measurement ANOVA

ความเข้มของกระแสไฟฟ้า	mean	SD.	N
0 μA	0.70	± 0.11	10
0.2 μA	0.72	± 0.25	10
0.5 μA	0.71	± 0.18	10
1 μA	0.78	± 0.28	10
2 μA	0.76	± 0.39	10
4 μA	0.77	± 0.27	10
P-value =	.950		

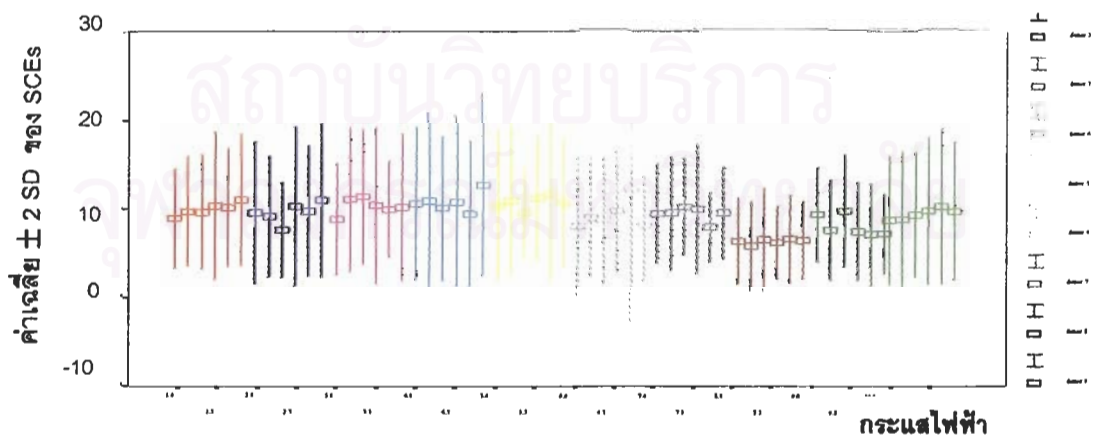
เมื่อพิจารณาจากผลของกระแสไฟฟ้าในด้าน จำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs ต่อเซลล์นั้น ไม่พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติระหว่างกลุ่มควบคุมกับกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 % (P-value > .05) ดังแสดงในตารางที่ 5

ตารางที่ 5 : ค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs ต่อเซลล์ จากการวิเคราะห์ด้วย repeated measurement ANOVA

ความเข้มของกระแสไฟฟ้า	mean	SD.	N
0 μA	7.79 \pm 1.09		10
0.2 μA	8.04 \pm 1.37		10
0.5 μA	7.86 \pm 1.31		10
1 μA	8.33 \pm 1.27		10
2 μA	8.12 \pm 1.34		10
4 μA	8.12 \pm 1.25		10
P-value =	.676		

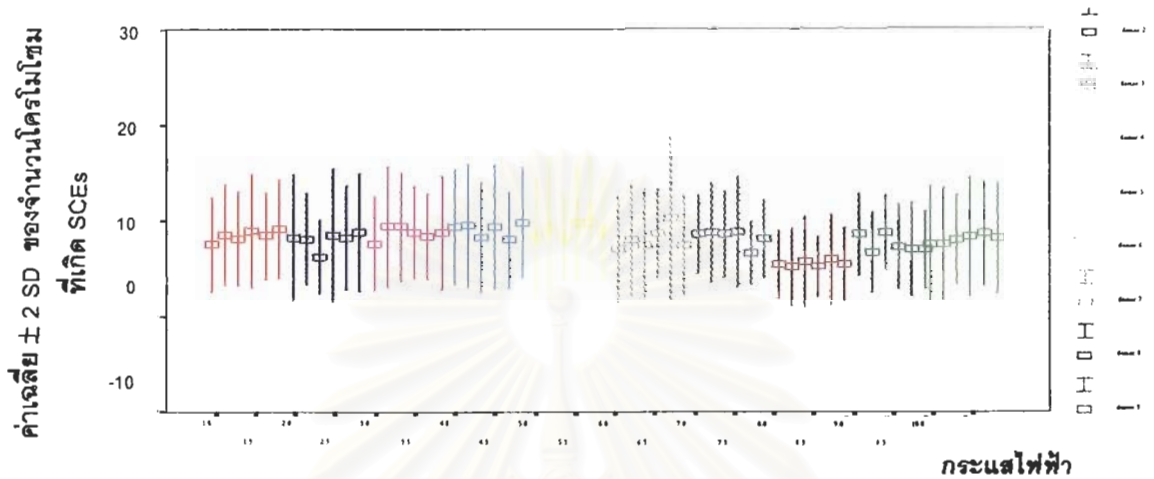
ผลจากตารางที่ 3 และ 5 สามารถแสดงเป็นกราฟช่วงความเชื่อมั่น ได้ดังภาพที่ 15 และ 16 จะเห็นว่าแผนภูมิทั้งสองมีรูปแบบคล้ายกันมาก การที่ค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs ที่เกิดขึ้นต่อเซลล์ และ ค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs ต่อเซลล์ มีค่าใกล้เคียงกันแสดงว่าการเกิด SCEs ส่วนใหญ่อยู่ระหว่าง 0-2 SCEs ต่อโครโมโซม

ภาพที่ 15 : กราฟช่วงความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs ที่เกิดขึ้นต่อเซลล์



แกนนอน : ประชากร จำแนกกลุ่มตามคน 10 คน โดยให้สีหนึ่งสีแทนคนหนึ่งคน ในแต่ละคนจำแนกเป็น 6 กลุ่มย่อยโดยเรียงลำดับกลุ่มย่อยตามค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้รับคือ 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA จากซ้ายไปขวาตามลำดับ

ภาพที่ 16 : กราฟช่วงความเชื่อมั่นของค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs ต่อเซลล์



แกนนอน : ประชากร จำแนกกลุ่มตามคน 10 คน โดยให้สีหนึ่งสีแทนคนหนึ่งคน ในแต่ละคนจำแนกเป็น 6 กลุ่มย่อยโดยเรียงลำดับกลุ่มย่อยตามค่ากระแสไฟฟ้าที่ได้รับคือ 0, 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA จากซ้ายไปขวาตามลำดับ

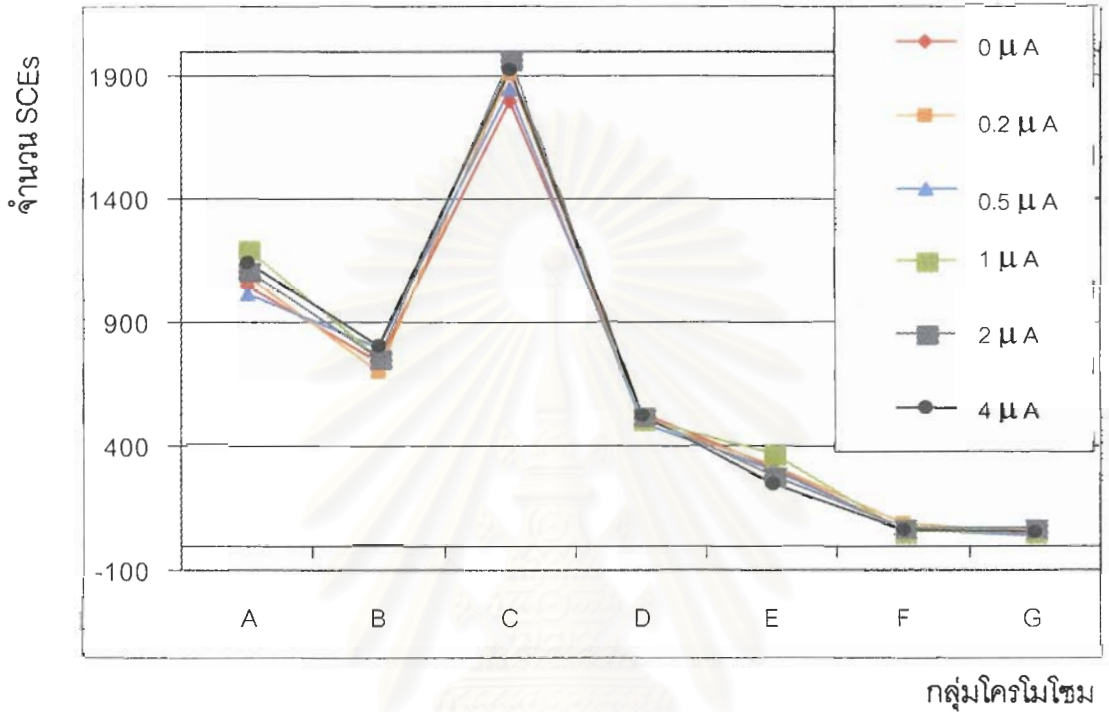
เมื่อพิจารณาตำแหน่งของการเกิด SCEs บนโครโมโซม(ตารางที่ 6) พบว่า SCEs มักเกิดที่แขนยาว(q-arm) มากกว่าแขนสั้น(p-arm) มากกว่า centromere ตามลำดับ โดย metaphase plate จำนวนทั้งสิ้น 3,000 plate นั้นเกิด SCEs ที่ q-arm ของ โครโมโซมกลุ่ม C มากที่สุด และเกิด ที่ q-arm ของ โครโมโซมกลุ่ม A เป็นลำดับรองลงมา แต่เมื่อวิเคราะห์โดยให้น้ำหนักแก่โครโมโซมตามกลุ่ม คือหาค่าผลรวมการเกิด SCEs ทั้งหมดที่เกิดขึ้นด้วยจำนวนโครโมโซมที่อยู่ในกลุ่มนั้นคือ จะพบว่า SCEs เกิดที่ q-arm ของ group B มากที่สุด และรองมาคือ q-arm ของ group A โดยเรียงลำดับความถี่ของการเกิด SCEs ในกลุ่มต่างๆ จากมากไปน้อยได้ว่า SCEs เกิดที่ Group B > A > C > D > E > F > G ตามลำดับ ซึ่งเป็นเช่นเดียวกับผลการวิจัยอื่นที่พบว่าความถี่ของการเกิด SCEs มีความสัมพันธ์กับความยาวของโครโมโซมโดยโครโมโซมที่มีขนาดยาวกว่าจะมีโอกาสเกิด SCEs ได้มากกว่า [22,30] แต่ในการทดลองนี้พบว่าโครโมโซมกลุ่ม B เกิด SCEs สูงกว่ากลุ่ม A การที่เป็นเช่นนั้นอาจเนื่องมาจากโครโมโซมกลุ่ม B มีตำแหน่งที่ไวต่อการเกิด SCEs เป็นพิเศษ จึงทำให้อัตราการเกิด SCEs ในกลุ่ม B ไม่เป็นไปตามความสัมพันธ์กับขนาดของโครโมโซม

ตารางที่ 6 : จำนวน SCEs รวม ที่ p-arm, centromere และ q-arm ในแต่ละกลุ่มโครโมโซม

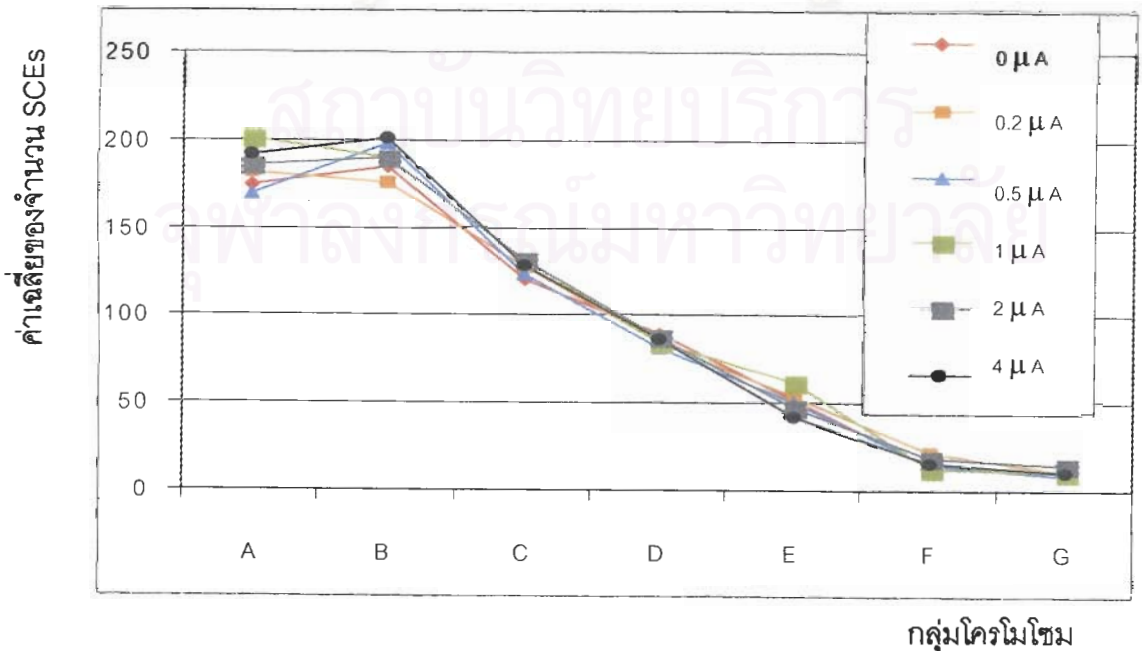
chromosome group	site	valid	missing	sum of SCEs	divided factor	sum of SCEs per chromosome
A	p-arm	3000	0	2290	6	381.67
	centromere	3000	0	349	6	58.17
	q-arm	3000	0	3976	6	662.67
B	p-arm	3000	0	808	4	202.00
	centromere	3000	0	253	4	63.25
	q-arm	3000	0	3486	4	871.50
C	p-arm	3000	0	2768	15	184.53
	centromere	3000	0	780	15	52.00
	q-arm	3000	0	7861	15	524.07
D	p-arm	3000	0	10	6	1.67
	centromere	3000	0	60	6	10.00
	q-arm	3000	0	2994	6	499.00
E	p-arm	3000	0	275	6	45.83
	centromere	3000	0	255	6	42.50
	q-arm	3000	0	1301	6	216.83
F	p-arm	3000	0	68	4	17.00
	centromere	3000	0	145	4	36.25
	q-arm	3000	0	177	4	44.25
G	p-arm	3000	0	2	5	0.40
	centromere	3000	0	28	5	5.60
	q-arm	3000	0	283	5	56.60

เมื่อพิจารณาความสัมพันธ์ของ ปริมาณกระแสไฟฟ้า กับ กลุ่มโครโมโซม ในด้าน จำนวนการเกิด SCEs ในแต่ละกลุ่มโครโมโซม พบว่าเซลล์กลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 0.5, 1, 2 และ 4 μA มีรูปแบบความสัมพันธ์ในด้าน ปริมาณกระแสไฟฟ้า กับ จำนวน SCEs ที่เกิด ในแต่ละกลุ่มโครโมโซมคล้ายกัน (ดังแสดงในภาพที่ 17) จึงสรุปได้ว่าปริมาณกระแสไฟฟ้าไม่มีความสัมพันธ์กับจำนวนการเกิด SCEs ในแต่ละกลุ่มโครโมโซม จากการทดลองพบว่ากลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าทุกกลุ่มมีการเกิด SCEs ที่โครโมโซมกลุ่ม C มากที่สุดเช่นเดียวกับกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามเมื่อวิเคราะห์โดยให้น้ำหนักแก่โครโมโซมตามกลุ่ม คือหารจำนวนการเกิด SCEs ในแต่ละกลุ่มโครโมโซมด้วยจำนวนโครโมโซมที่อยู่ในกลุ่มนั้น จะพบว่าโครโมโซมกลุ่ม B เป็นกลุ่มที่เกิด SCEs มากที่สุดในทุกกลุ่มที่ได้รับการกระตุ้นรวมถึงกลุ่มควบคุม โดยมีโครโมโซมกลุ่มที่เกิด SCEs รองลงมาคือ กลุ่ม A และเรียงลำดับความถี่ของการเกิด SCEs ในกลุ่มต่างๆจากมากไปน้อยได้ว่า SCEs เกิดที่ โครโมโซมกลุ่ม B > A > C > D > E > F > G (ดังแสดงในภาพที่ 18)

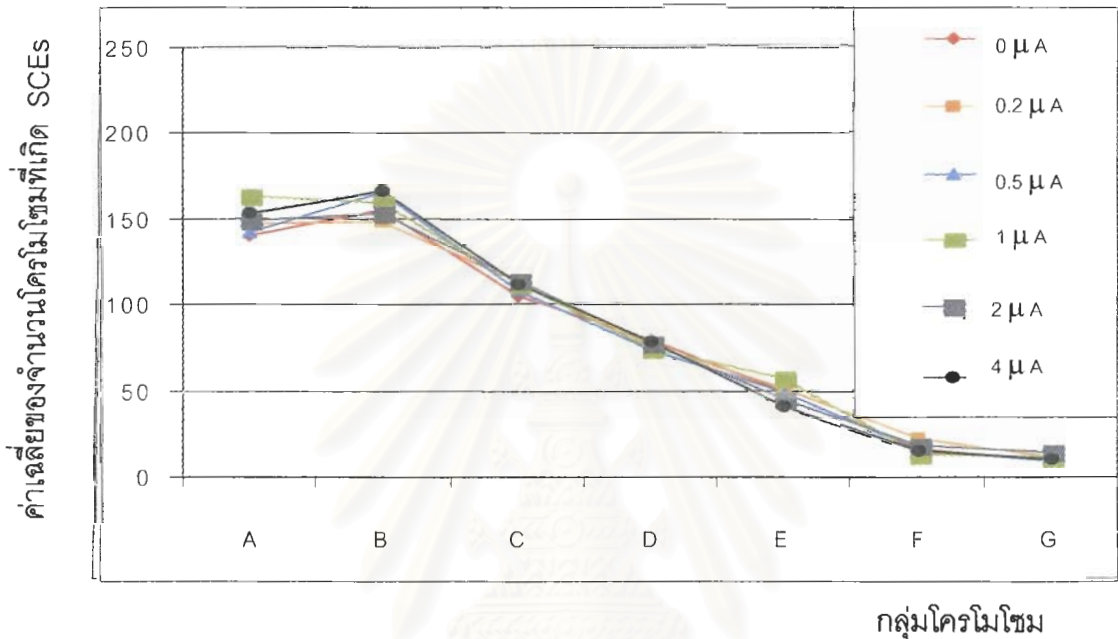
ภาพที่ 17 : กราฟความสัมพันธ์ของจำนวน SCEs กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม



ภาพที่ 18 : ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของจำนวน SCE กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่างๆ เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม และให้นำหนักแกโครโมโซมตามกลุ่ม



ภาพที่ 20 : ความสัมพันธ์ของค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCE กับกระแสไฟฟ้าขนาดต่าง ๆ เมื่อเปรียบเทียบตามกลุ่มโครโมโซม และให้นำหนักแกโครโมโซมตามกลุ่ม



ความสัมพันธ์ของกระแสไฟฟ้ากับกลุ่มโครโมโซม ในด้านจำนวนการเกิด SCEs ในแต่ละกลุ่มโครโมโซม และในด้านจำนวนโครโมโซมของแต่ละกลุ่มโครโมโซมที่เกิด SCEs แสดงโดยแยกกราฟตามกลุ่มโครโมโซมได้ดังภาพที่ 21

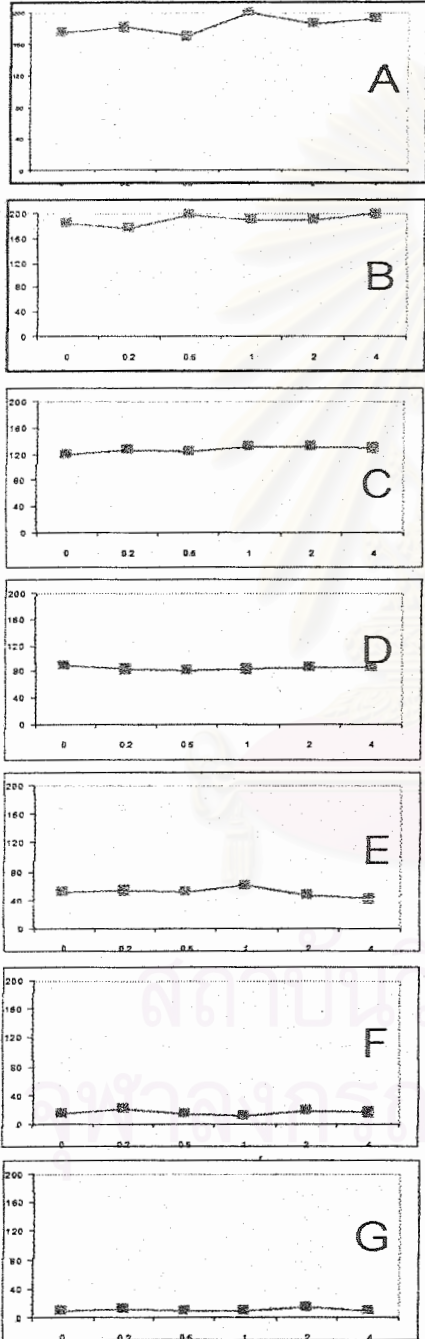
ผลจากการทดลองแสดงให้เห็นว่าการเกิด SCEs ในกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2-4 μA นั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มควบคุม แต่มีการศึกษาพบว่าเซลล์ลิมโฟไซต์ที่ได้รับ EMF ขนาด 50 Hz, 1.05 mT เป็นเวลา 72 ชั่วโมงมีการเกิด SCEs เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ [17] จึงเป็นไปได้ว่ากระแสไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นเซลล์ในการทดลองนี้มีขนาดไม่มากพอที่จะทำให้เกิดการทำลายสารพันธุกรรมขึ้น

ภาพที่ 21 : ความสัมพันธ์ของกระแสไฟฟ้ากับกลุ่มโครโมโซม (โดยให้น้ำหนักแกโครโมโซมตามกลุ่ม)

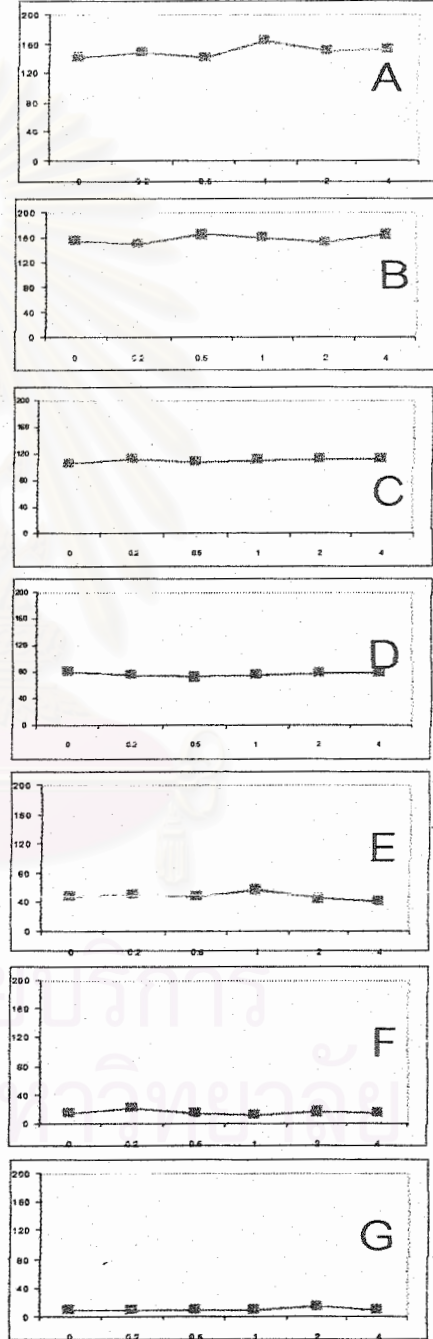
คอลัมน์ซ้าย : ค่าเฉลี่ยการเกิด SCEs
ต่อกลุ่มโครโมโซม

คอลัมน์ขวา : ค่าเฉลี่ยจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs
ต่อกลุ่มโครโมโซม

ค่าเฉลี่ยของจำนวน SCEs



ค่าเฉลี่ยของจำนวนโครโมโซมที่เกิด SCEs



0 0.2 0.5 1 2 4 กระแสไฟฟ้า

0 0.2 0.5 1 2 4 กระแสไฟฟ้า

(μA)

(μA)

จากการทดลองพบว่ากระแสไฟฟ้าไม่มีผลอย่างเฉพาะเจาะจงในการเหนี่ยวนำให้เกิด SCEs เพิ่มขึ้นในโครโมโซมกลุ่มใดกลุ่มหนึ่งโดยเฉพาะ การเกิด SCEs มีความสัมพันธ์กับขนาดของโครโมโซมโดยโครโมโซมที่มีขนาดโตกว่าจะมีโอกาสเกิด SCEs สูงกว่า เมื่อพิจารณาถึงกลไกการเกิด SCEs นั้นมีสมมุติฐานว่า SCEs เกิดจาก single strand breaks ซึ่งอาจเกิดขึ้นที่ prereplication DNA region ที่ใกล้กับ replication point แล้ว fork replication มีการเคลื่อนเข้าหาตำแหน่งนั้นก่อนที่จะมีการซ่อมแซม หรืออาจเกิด single strand breaks ที่ replication point แล้วสาย DNA ที่แตกหักนี้ไปจับคู่กับ discontinuously replicating DNA strand โดยสมมุติฐานนี้ตำแหน่งการสลับที่จึงอยู่แถว replication point [35] การพบความสัมพันธ์ของขนาดของโครโมโซมกับอัตราการเกิด SCEs จึงอาจมีสาเหตุมาจากการที่โครโมโซมที่มีขนาดมากกว่าจะใช้เวลาในการสังเคราะห์ DNA ในระยะ S มากกว่า จึงทำให้มีโอกาสเกิดความผิดพลาดในช่วงขณะที่กำลังมีการสังเคราะห์ DNA ได้มากขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 6

สรุปผลการวิจัย

1. งานวิจัยนี้ศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าขนาด 0 – 4 μA ที่ให้แก่เซลล์ลิมโฟซัยท์เป็นเวลา 1 ชั่วโมงภายหลังการ synchronize ด้วย methotrexate การศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าที่มีต่อการดำเนินวงจรของเซลล์นั้น พบว่ากระแสไฟฟ้ามีแนวโน้มกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวเร็วขึ้น โดยในเซลล์ลิมโฟซัยท์ของคนที่นั้นกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2 μA มีระยะเวลาของวงจรเซลล์สั้นกว่ากลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 4, 0.5, 2 μA , กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 1 μA ตามลำดับ (ระยะเวลาของวงจรเซลล์ของกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 0.2, 4, 0.5, 2 μA , กลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับกระแสไฟฟ้าขนาด 1 μA เป็น 13.71 ± 2.36 ชั่วโมง, 15.0 ± 1.73 ชั่วโมง, 15.42 ± 2.70 ชั่วโมง, 15.86 ± 2.27 ชั่วโมง, 16.29 ± 2.36 ชั่วโมง และ 16.71 ± 1.60 ชั่วโมง ตามลำดับ)

ในการศึกษาเรื่องการดำเนินวงจรของเซลล์โดยการวิเคราะห์ปริมาณของ DNA ด้วย flow cytometer นั้นได้ทำการแบ่งกลุ่มเซลล์โดยใช้ขนาดของเซลล์และปริมาณ DNA ของเซลล์เป็นเกณฑ์ในการแบ่งโดยวิธี manual gate ซึ่งจะแบ่งเซลล์ได้เป็น 3 กลุ่ม (คือ เซลล์กลุ่ม G_0/G_1 , S และ G_2/M) จากเซลล์ซึ่งได้รับการย้อม DNA ภายในเซลล์ด้วย propidium iodide โดยไม่ได้มีการย้อมสีเพื่อจำแนกเซลล์ในระยะใดระยะหนึ่งเป็นพิเศษ รวมทั้งลักษณะของเซลล์ซึ่งในการทดลองนี้พบว่าเซลล์มี asynchrony ค่อนข้างมากภายหลัง release จาก blocking position ดังนั้นการวิเคราะห์ระยะเวลาของวงจรเซลล์จากข้อมูลที่ได้โดยวิธีดังกล่าว จึงมีผลที่ไม่ชัดเจนนัก ดังนั้นเพื่อให้ได้ผลที่ชัดเจนยิ่งขึ้นควรมีการศึกษาต่อโดยใช้วิธีการย้อมเซลล์ที่มีความจำเพาะยิ่งขึ้น รวมถึงการใช้วิธีที่จะสามารถทำให้เซลล์มี synchrony ดีขึ้น การปรับปรุงให้เซลล์มี synchrony ดีขึ้นมักทำโดยวิธี double synchronization [47, 48] งานวิจัยนี้ใช้เซลล์ของมนุษย์ในการศึกษาซึ่งจะมีความจำกัดในการทำ double synchronization เนื่องจากจะมีโอกาสทำให้เซลล์ตายได้สูง การปรับปรุง synchrony ของเซลล์จึงอาจกระทำโดยเปลี่ยนแปลงขนาดของ methotrexate ที่ใช้หรือทดลองใช้สารอื่นในการ block เซลล์หรือเปลี่ยนมาใช้ cell line แทนเซลล์ของมนุษย์ในการศึกษา ซึ่งสามารถทำ double synchronization ได้ดีและทำให้เซลล์มี synchrony ดีขึ้น ซึ่งจะช่วยให้การศึกษาระยะเวลาของวงจรเซลล์ทำได้ง่ายขึ้น

2. การศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าในด้านความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมนั้น ไม่พบความแตกต่างของผลกระทบต่ออัตราการเกิด SCEs ระหว่างกลุ่มที่ได้รับกระแสขนาดต่างๆกับกลุ่มควบคุม ทำให้สรุปได้ว่ากระแสไฟฟ้าขนาด 0-4 μA ที่ให้แก่เซลล์ในระยะ S เป็นเวลา 1 ชั่วโมงนั้นไม่มีผลกระทบต่อเซลล์ลิมิโฟซัยท์ในด้านการทำให้เกิดอันตรายต่อ DNA แม้จะพบว่าเซลล์ที่ได้รับกระแสไฟฟ้าที่มีความเข้มสูงกว่าจะทำให้เกิด SCEs ต่อเซลล์สูงกว่ากลุ่มควบคุมเล็กน้อย และมีแนวโน้มว่าเซลล์ที่ได้รับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าขนาดความเข้มของกระแสสูงกว่าจะมีโครโมโซมที่เกิด multibreak มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติทั้งสองกรณี อย่างไรก็ตามไม่อาจสรุปได้ว่ากระแสไฟฟ้าจะไม่มีผลกระทบต่อเซลล์เนื่องจากการเปลี่ยนแปลงทางชีวเคมีอันเป็นผลจากกระแสไฟฟ้าเหนี่ยวนำจะเกิดขึ้นภายในเซลล์ นอกจากนี้ผลกระทบเหล่านี้อาจเปลี่ยนไปหากเปลี่ยนค่ากระแสไฟฟ้าที่ให้ หรือเพิ่มเวลาที่เซลล์ได้รับการกระตุ้น จึงต้องการการศึกษาเพื่อให้รู้ผลที่แน่ชัดต่อไป

ในงานวิจัยนี้ใช้วิธี SCEs assay ในการศึกษาความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมอันเนื่องมาจากกระแสไฟฟ้า ซึ่ง SCEs assay นั้นจัดว่าเป็นวิธีตรวจสอบที่มีความไวในระดับหนึ่งและเป็นที่ใช้โดยทั่วไปในการศึกษาความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมจากสารเคมีที่สงสัยว่ามีคุณสมบัติก่อมะเร็ง [21, 27-29] แต่ในการทดลองนี้สิ่งกระตุ้นที่ให้แก่เซลล์คือกระแสไฟฟ้าซึ่งจัดเป็นปัจจัยทางฟิสิกส์ จึงควรมีการศึกษความเป็นอันตรายต่อสารพันธุกรรมโดยวิธีการอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อให้เกิดความสมบูรณ์รอบด้านอันจะทำให้เกิดความแน่ใจในผลกระทบของกระแสไฟฟ้าที่มีต่อสารพันธุกรรมเพิ่มขึ้น

รายการอ้างอิง

1. Wertheimer, N., and Leeper, E. Electrical wiring configurations and childhood cancer. Am. J. of Epidemiol.109 (1979): 273-284. Cite in Levebvre, M., et al. Alteration of immune cell response in low frequency magnetic fields. Bioengineering Conference, 1992. Proceedings of the 1992 Eight Centh Annual. pp.59-60. Northeast, 1992.
2. Behari, J. Issues in electromagnetic fields and biointeractions. Indian Journal of Biochemistry and Biophysics. 36(1999): 352-360. Cite in Tiwari, R. K., et al. DNA integrity in vitro study of human peripheral blood leukocytes exposed to extremely-low-frequency electromagnetic fields using comet assay. Proceedings INCEMIC 2001-2002. pp. 311-315, 1992.
3. Nair, I., Morgan, M. G., and Florig, H. K. Biological effects of power frequency electric and magnetic fields-background power (OTA-BP-E-56). Office of technology assessment, U.S.government printing office, Washington, DC, 1989. Cite in Tateno, H., Iijima, S., Nakanishi, Y., Kamiguchi, Y., and Asaka, A. No induction of chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. Mutation Research 414(1998): 31-35.
4. Miyakoshi, J., Kitagawa, K., Yamagishi, Y., Kamiguchi, Y., and Asaka, A. Increase in mutations by exposure of mammalian cells to ELF magnetic fields. 18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. pp.1863-1864. Amsterdam, 1996.
5. Tiwari, R.K., et al. DNA integrity in vitro study of human peripheral blood leukocytes exposed to extremely-low-frequency electromagnetic fields using comet assay. Proceedings INCEMIC 2001-2002. pp. 311-315,1992.
6. Levebvre, M., et al. Alteration of immune cell response in low frequency magnetic fields. Bioengineering Conference, 1992. Proceedings of the 1992 Eight Centh Annual. pp.59-60. Northeast, 1992.

7. Bersani, F., et al. The effects of extremely low frequency pulsed electromagnetic fields (ELF) on human lymphocyte proliferation in vitro and DNA repair. Engineering in Medicine and Biology Society, 1998. Proceeding of the Annual International Conference of IEEE, 2(1998): 906-908.
8. Conti, P., et al. Reduced mitogenic stimulation of human lymphocytes by extremely low frequency electromagnetics fields. FEBS Letters162 (October1983): 156-159.
9. Tateno, H., Iijima, S., Nakanishi, Y., Kamiguchi, Y., and Asaka, A. No induction of chromosome aberrations in human spermatozoa exposed to extremely low frequency electromagnetic fields. Mutation Research 414(1998): 31-35.
10. Koyama, S., Haruyama, T., Kobatake, E., and Aizawa, M. Electrically stimulated NGF secretion by astroglial cells. 18th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society. pp.2061-2062. Amsterdam, 1997.
11. Jiang, J., et al. Study on healing effects on pig wound. Electret, 1996. (ISE 9), 9th International Symposium on 1996. pp.788-792. Available from: URL: <http://ieeexplore.ieee.org/iel3/4293/12359/00578208.pdf?isNumber=12359>.
12. Ambuselvan, T., et al. Bone growth stimulator. Engineering in Medicine and Biology Society, 1996 and 14th Conference of the Biomedical Engineering Society of India. An international Meeting, Proceedings of the first Regional Conference, IEEE, 1995,SPC13-SPC14.
13. Simko, M., Krichuber, R., and Lange, S. Micronucleus formation in human amnion cells after exposure to 50 Hz MF applied horizontally and vertically. Mutation Research 418(1998): 101-111.
14. Juutilainen, J., and Lange, S. Genotoxic, carcinogenic and teratogenic effects of electromagnetic fields. Mutation Research 387 (1997): 165-171.
15. Yoguchi, H., Yoshida, M., Ejima, Y., and Miyakoshi, J. Effect of high-density extremely low frequency magnetic field on sister chromatid exchanges in mouse m58 cells. Mutation Research 440(1999): 189-194.
16. Koana, T., Okaka, M. O., Takashima, Y., Ikeheta, M., and Miyakoshi, J. Involvement of eddy currents in the mutagenicity of ELF magnetic fields. Mutation Research 476(2001): 55-62.

17. Khalil, A. M., and Qassem, W. Cytogenetics effects of pulsing electromagnetic field on human lymphocytes in vitro: chromosome aberration, sister chromatid exchanges and cell kinetics. Mutation Research 247(1991): 141-146.
18. International Commission in Non-Ionizing Radiation Protection. Guidelines for limiting exposure to time-varying electric, magnetic, and electromagnetic fields (up to 300 GHz). Available from:
URL: http://www.lww.com/health_physics/04.98/494.pdf.
19. Murli, H., Galloway, S. M., Ivett, J., Parry, D. M., and Mulvihill, J. J. Repair of sister chromatid exchange-inducing lesions in mutagen-treated cultures of human whole blood and purified fresh or frozen lymphocytes. Mutation Research 202(1988): 125-132.
20. Gustashaw, K. M. Chromosome stains. In Barch, M. J., Knutsen, T., and Spurbeck, J.L. (eds.) The AGT cytogenetics laboratory manual, 3rd ed, pp.259-321. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
21. Deen, D. F., Morgan, W. F., Tofilon, P. J., and Barcellos-hoff, M. H. Measurement of sister chromatid exchanges and their relationship to DNA damage, repair and cell killing. Pharmar.Ther. 42(1989): 349-360.
22. Latt, A. A. Microfluorometric analysis of deoxyribonucleic acid replication kinetics and sister chromatid exchanges in human chromosomes. The Journal of Histochemistry and Cytochemistry 22(1974): 478-491.
23. Perry, P., and Wolff, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromtids. Nature 251(1989): 349-360
24. Goto, K., Akematsu, T., Shimazu, H., and Sugiyama, T. Simple differential Giemsa staining of sister chromatid exchanges after treatment with photosensitive dyes and exposure to light and the mechanism of staining. Chromosoma (Berl.) 53 (1975): 223-230.
25. Korenberg, J. R., and Freedlender, E. F. Giemsa technique for the detection of sister chromatid exchange. Chromosoma (Berl.) 48 (1974): 355-360.
26. Wolff, S., and Perry, P. Differential Giemsa staining of sister chromatids and the study of sister chromatid exchanges without autoradiography. Chromosoma (Berl.) 48 (1974): 341-353.

27. Perry, P., and Evans, H. J. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange. Nature 258 (November 1975): 121-125.
28. Carrano, A. V., Thomson, L. H., Lindl, P. A., and Minkler, J. L. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. Nature 271 (February 1975): 551-553.
29. Latt, S. A. Sister chromatid exchanges, indices of human chromosome damage and repair: detection by fluorescence and induction by mitomycin C. Proc.Nat.Acad.Sci.USA 71 (August 1974): 3162-3166.
30. Latt, S. A. Localization of sister chromatid exchanges in human chromosome. Science 185 (July 1974): 74-76.
31. Rachel. A. J., Sharma, T., and Menon, V. V. Harlequin banding and localization of sister chromatid exchanges. Mutation Research 264(1991): 71-80.
32. Snope, A. J., and Rary, J. M. Cell cycle duration and sister chromatid exchange frequency in culture human lymphocytes. Mutation Research 63(1979): 345-349.
33. Lamberti, L., Ponsetto, P. B., and Ardito, G. Cell kinetics and sister chromatid exchange in human lymphocytes. Mutation Research 120(1983): 193-199.
34. Corner, M. K., Luo, J. E., and Gotera, O. G. Induction and repair of sister chromatid exchanges in multiple murine tissues in vivo by diepoxybutane. Mutation Research 108(1983): 251-263.
35. Kato, H. Mechanism for sister chromatid exchanges and their relation to the production of chromosomal aberrations. Chromosoma (Berl.) 59 (1977):179-791.
36. Zeljezie, D., and Garaj-Vrhovac, V. Sister chromatid exchange and proliferative rate index in the longitudinal risk assessment of occupational exposure to pesticides. Chemosphere 46(2002): 295-303.
37. Atkin, N. B. Cytogenetic aspects of Malignant Transformation. Vol.5. S.Karger : Thur AG offsetdruk, 1996.
38. Mathur, R., Chowdhury, M. R., and Singh, G. Recent advances in chromosome breakage syndromes and their diagnosis. Indian Pediatrics 37(2000): 615-625.
39. นวพรรณ จารุรักษ์. วัฏจักรของเซลล์และการควบคุม. ใน นวพรรณ จารุรักษ์, วัฏจักรของเซลล์และอณูชีววิทยาของการเกิดมะเร็ง : Cell cycle and molecular biology of tumorigenesis, หน้า 1-23. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.

40. Carter, M. P., and Meyer, E. W. Introduction to the principles of flow cytometry. In Ormerod, M. G. (ed.) *Flow cytometry: A practical approach*, 2nd ed., pp.1-23. Oxford: IRL, 1994.
41. Gazitt, Y., Deitch, A. D., Marks, P. A., and Rifkind, R. A. Cell volume changes in relation to the cell cycle of differentiating erythroleukemic cells. *Experimental Cell Research* 117(1978): 413-420.
42. Fernandez, L. A., Macsween, J. M., and Langley, G. R. Lymphocyte response to phytohemagglutinin: age-related effects. *Immunology* 31(1976): 583-587.
43. Tice, R. R., Schneider, E. L., Kram, D., and Throe, P. Cytokinetic analysis of the impaired proliferative response of peripheral lymphocytes from aged humans to phytohemagglutinin. *J.Exp.Med.* 00 (May 1979): 1029-1041.
44. Staiano-Coico, L., Darzynkeiwicz, Z., Melamed, M., and Weksler, M.E. Immunological studies of aging: IX. Impaired proliferation of T lymphocytes detected in elderly human by flow cytometry. *The Journal of Immunology* 132(April 1984): 1788-1792.
45. Hefton, J. M., Darlington, G. J., Casazza, B. A., and Weksler, M. E. Immunological studies of aging: V. Impaired proliferation of PHA responsive human lymphocytes in culture. *The Journal of Immunology* 125(September 1980): 1007-1010.
46. Lyons, A. B. Analysing cell division in vivo and in vitro using flow cytometric measurement of CFSE dye dilution. *The Journal of Immunological Method* 243(2000): 147-154.
47. Lovie, J., and Drouin, R. Lymphoblasts already in the DNA synthesis phase of the cell cycle can be reversibly arrested at the R/G transition. *Chromosoma* 110 (December 2001): 501-510.
48. Lalande, M. A reversible arrest point in the late G1 phase of the mammalian cell cycle. *Experimental Cell Research* 186(1990): 332-339.
49. Abou-Eisha, A., Creus, A., and Marcos, R. Genotoxic evaluation of the antimicrobial drug, trimethoprim, in cultured human lymphocytes. *Mutation Research* 440(1999): 157-162.

50. Sasaki, M. S., and Norman, A. Proliferation of human lymphocytes in culture. Nature 210 (May 1966): 913-914.
51. Maur, P. A., and Berlincourt-Bohni, K. Human lymphocyte cell cycle: Studies with the use of BrUdR. Hum. Genet. 49 (1979): 209-215.
52. อัมรา คัมภีรานนท์ และ สุพัตรา โพธิ์เยี่ยม. การตรวจสอบความไม่มั่นคงของสารพันธุกรรมของกลุ่มคนโดยวิธีการวัดอัตราแลกเปลี่ยนซิสเทอริโครมาทิด (Sister chromatid exchanges for measuring genetic instability in humans). รายงานสัมมนาวิชาการพันธุศาสตร์ครั้งที่ 11: พันธุศาสตร์ช่วยชาติแก้วิกฤติ ปี 2542 : 17-22.
53. Morgan, W. F., and Crossen, P. E. Factors influencing sister chromatid exchange rate in cultured human lymphocytes. Mutation Research 81(1981): 395-402.
54. Lawce, H. J., and Brown M. G. Cytogenetics: An overview. In Barch, M. J., Knutsen, T., and Spurbeck, J. L. (eds.) The AGT cytogenetics laboratory manual, 3rd ed., pp.19-76. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
55. ศุภชัย ฤทธิ์เจริญวัตถุ. ผลของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูกในหลอดทดลอง. วิทยานิพนธ์ ปริญญาโทบริหารบัณฑิต สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2544.
56. Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. The Journal of Cell Biology 66(1975): 188-193.
57. Fried, J., Perez, A. G., and Clarkson, B. Flow cytofluorometric analysis of cell cycle distributions using propidium iodide. The Journal of Cell Biology 71(1976): 172-181.
58. Laffon, B., Pasaro, E., and Mendez, J. Genotoxic effects of styrene-7,8-oxide in human white blood cells: Comet assay in relation to the induction of sister chromatid exchanges and micronuclei. Mutation Research 491(2001): 163-172.
59. Giri, S., Giri, A., Sharma, G. D., and Prasad, S. B. Induction of sister chromatid exchanges by cypermethrin and carbodulfan in bone marrow cells of mice in vivo. Mutagenesis vol.8 no.1 (2003): 53-58.
60. Richardson, A. M. Chromosome analysis. In Barch, M. J., Knutsen, T., and Spurbeck, J. L. (eds.) The AGT cytogenetics laboratory manual, 3rd ed., pp.481-526. Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.

61. White, A. M., Grdina, D. J., Meistrich, M. L., Meyn, R. E., and Johnson, T. S. Cell Synchrony techniques II. Analysis of cell progress data. Cell Tissue Kinet. 17(1984): 237-245
62. Yunis, J. J. High resolution of human chromosomes. Science 191(1976): 1268-1270. Cite in Kokkonen, H. Genetic changes of chromosome region 15q11-q13 in Prader-Willi and Angelman syndromes in Finland. Available from: URL: <http://herkules oulu.fi/isbn9514270274/html/index.html>.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

RPMI 1640 medium

RPMI 1640 with L-glutamine without bicarbonate 1 ซองละลายในน้ำกลั่น 1 ล.
 เติม NaHCO_3 2 ก.
 เติม antibiotic 6 มล.

Complete Culture Medium (CCM)

นำ RPMI 1640 medium 90 มล. ผสมกับ Fetal bovine serum 10 มล.

10^{-5} M Methotrexate

ยาน้ำ methotrexate ขนาด 10 มก./มล. นำมา 50 ไมโครลิตร
 ผสมใน RPMI 1640 medium 100 มล.
 เวลาใช้ : ใส่ methotrexate solution 10 ไมโครลิตร / CCM 1 มล.

BrdU solution

ซังสาร BrdU 50 มก. ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.
 เวลาใช้ : ใส่ BrdU solution 10 ไมโครลิตร / CCM 1 มล.

0.001% Colchicine

ซังสาร Colchicine 0.001 ก. ละลายในน้ำกลั่น 100 มล.
 เวลาใช้ : ใส่ Colchicine solution 20 ไมโครลิตร / CCM 1 มล.

Hypotonic solution

ซังสาร KCl 5.6 ก. ละลายในน้ำกลั่น 1 ล. (เป็น stock solution)
 เวลาใช้ : ผสม stock solution 3 ส่วน ต่อ น้ำกลั่น 1 ส่วน

Fixative solution

ผสม Methanol 3 ส่วน ต่อ Gracial acetic acid 1 ส่วน (เตรียมสด)

10⁻⁴ M Hoechst dye

ซึ่่งสาร Hoechst 33258 0.005 ก. ละลายในน้ำกลั่่น 100 มล. ,เก็บให้่พ้นแสงสว่าง

Phosphate buffer

ซึ่่งสาร NaH₂PO₄ · 2H₂O 4.499 ก. ละลายในน้ำกลั่่น 20 มล.

ซึ่่งสาร C₆H₅Na₃O₇ · 2H₂O 11.764 ก. ละลายในน้ำกลั่่น 1000 มล.

นำ้สารทึ่่งสองมาผสมกัน โดยปรับสั้ดส่วนจนได้ pH 7.0

Giemsa stock solution

ซึ่่งสาร Giemsa powder 1.0 ก.

ละลายใน Glycerol 60 มล. และ Methanol 60 มล.

นำไปอู่่นด้วย water bath ที่อุณหภูมิ 66 °C เป็นเวลา 2 ซึ่่วโมง

กรอง แล้วเก็บให้่พ้นแสงสว่าง

Sorensen buffer

ซึ่่งสาร KH₂PO₄ 4.177 ก.

ซึ่่งสาร Na₂HPO₄ 4.752 ก.

ละลายในน้ำกลั่่น 860 มล.

Giemsa working solution

ผสม Giemsa stock solution 5 มล. กับ Sorensen buffer 45 มล.

Propidium iodide staining solution [56,57]

-ซึ่่งสาร Propidium iodide 0.01 ก. ละลายในน้ำกลั่่น 50 มล.

-ซึ่่งสาร RNase 0.005 ก. ละลายในน้ำกลั่่น 1 มล. แล้วนำไปอู่่นที่อุณหภูมิ 80°C, 30 นาที

-ซึ่่งสาร Na₂Citrate 0.25 ก. ละลายในน้ำกลั่่น 200 มล.

แล้วเติม Triton X-100 0.05 มล.

นำ้สารทึ่่งหมดมาผสมกัน ,เก็บให้่พ้นแสงสว่าง

ภาคผนวก ข

การแบ่งกลุ่มโครโมโซม

โครโมโซมที่อยู่ในระยะเมตาเฟส นั้นประกอบด้วย 2 โครมาติดที่มีจุดเชื่อมระหว่าง 2 โครมาติดที่ primary constriction (ซึ่งมักเรียกว่า centromere) การมี centromere ทำให้สามารถแบ่งส่วนของโครโมโซมได้เป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่อยู่เหนือ centromere เรียกว่า upper arm หรือ short arm หรือ p-arm และส่วนที่อยู่ใต้ centromere เรียกว่า lower arm หรือ long arm หรือ q-arm นอกจากนี้ยังสามารถแบ่งชนิดของโครโมโซมได้เป็น 3 ชนิด ตามตำแหน่งของ centromere บนโครโมโซม ได้แก่ metacentric chromosome คือ โครโมโซมที่มี centromere อยู่ที่กึ่งกลาง, submetacentric chromosome คือ โครโมโซมที่มี centromere อยู่ห่างจากกึ่งกลาง ทำให้เห็นแขนโครโมโซมด้านหนึ่งยาวกว่าอีกด้านหนึ่ง และ acrocentric chromosome คือ โครโมโซมที่มี centromere อยู่เกือบปลายสุดด้านหนึ่งของโครโมโซม

โครโมโซมบางโครโมโซมจะมี secondary constriction คือ ส่วนคอดของแขนโครโมโซม (tread-like portion) ซึ่งย้อมติดสี Giemsa เป็นสีจาง และมักพบอยู่บน short arm ของ acrocentric chromosome ต่อกับส่วน satellite ซึ่งเป็น DNA ช่วงสั้นๆ

โครโมโซมที่อยู่ในระยะเมตาเฟสมีหลายขนาด จากขนาดของโครโมโซมและตำแหน่งของ centromere ทำให้สามารถแบ่งโครโมโซมได้เป็น 7 กลุ่ม แต่ไม่สามารถแยกเป็น chromosome number ได้ การจะจำแนกโครโมโซมตาม chromosome number (คือ แยกเป็นโครโมโซมที่ 1-22 และ โครโมโซมเพศ) จำเป็นต้องอาศัยการย้อมพิเศษ เช่น G-banding ซึ่งจะให้เห็นโครโมโซมติดสีเป็นแถบมืด (dark band) และแถบสว่าง (light band) ตามลักษณะจำเพาะของโครโมโซมแต่ละตัว

โครโมโซม 7 กลุ่ม ได้แก่ โครโมโซมกลุ่ม A-G มีลักษณะดังนี้

กลุ่ม A : โครโมโซมขนาดใหญ่ที่สุด ประกอบด้วย โครโมโซมที่ 1 ซึ่งเป็น metacentric chromosome ขนาดใหญ่ที่สุด, โครโมโซมที่ 2 เป็น submetacentric chromosome ขนาดใหญ่ที่สุด และโครโมโซมที่ 3 ซึ่งเป็น metacentric chromosome ที่มีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่ม B

กลุ่ม B : ประกอบด้วย โครโมโซมที่ 4-5 ซึ่งไม่สามารถแยกจากกันได้โดยไม่ย้อมสีพิเศษ โครโมโซมกลุ่มนี้เป็น submetacentric chromosome ที่มี centromere ห่างจากจุดกึ่งกลางมาก และมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมกลุ่ม C

กลุ่ม C : เป็น submetacentric chromosome ขนาดกลาง ประกอบด้วยโครโมโซมที่ 6 -12 และโครโมโซม X โดยโครโมโซมที่ 6 มีขนาดใหญ่ที่สุดในกลุ่ม C โครโมโซมที่ 7 และโครโมโซม X มีขนาดรองลงมา แต่โครโมโซม X จะมี centromere ใกล้จุดกึ่งกลางมากกว่าโครโมโซมที่ 7, โครโมโซมที่ 11 มี centromere ใกล้จุดกึ่งกลางมากที่สุดในกลุ่ม C ขณะที่โครโมโซมที่ 8,10,12 มี centromere ห่างจากจุดกึ่งกลางค่อนข้างมากโดยที่โครโมโซมที่ 12 มี centromere ห่างจากจุดกึ่งกลางมากที่สุดในกลุ่ม C, ส่วนโครโมโซมที่ 9 นั้นจะมีขนาดไม่แน่นอนขึ้นกับการขดเกลียวบริเวณ heterochromatic ที่ด้านล่างของ centromere

กลุ่ม D : เป็น acrocentric chromosome ขนาดกลาง ประกอบด้วย โครโมโซมที่ 13-15 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันมาก และบางครั้งอาจมองเห็น short arm สั้นๆกับส่วน satellite

กลุ่ม E : เป็น submetacentric chromosome ขนาดเล็ก ประกอบด้วย โครโมโซมที่ 16-18 ซึ่งมีขนาดใกล้เคียงกับกลุ่ม D แต่สามารถมองเห็น short arm ได้ชัดเจนกว่า โครโมโซมที่ 16 จะมี centromere อยู่ใกล้จุดกึ่งกลางที่สุดในกลุ่ม E ขณะที่โครโมโซมที่ 18 จะมี centromere อยู่ห่างจากจุดกึ่งกลางที่สุดในกลุ่ม E

กลุ่ม F : เป็น metacentric chromosome ขนาดเล็ก ประกอบด้วย โครโมโซมที่ 19-20 ซึ่งมีลักษณะคล้ายกันมาก

กลุ่ม G : เป็น acrocentric chromosome ขนาดเล็ก ประกอบด้วย โครโมโซมที่ 21-22 และโครโมโซม Y โครโมโซมที่ 21-22 มักสามารถมองเห็น short arm สั้นๆกับส่วน satellite เหมือนกลุ่ม D ขณะที่โครโมโซม Y นั้นไม่มี satellite แต่อาจมี short arm ที่เห็นชัดเจนกว่าโครโมโซมที่ 21-22 และมีขนาดไม่แน่นอน บางครั้งอาจมีขนาดใหญ่กว่าโครโมโซมที่ 18 แต่จะยังคงเห็น short arm ได้ชัดเจนกว่าโครโมโซมที่ 21-22. [60]

เซลล์ลิมโฟไซต์ที่โดยปกติจะมีโครโมโซมจำนวน 46 ตัว แต่จำนวนโครโมโซมอาจมีความแปรผันได้ระหว่าง 45-49 ตัว ในการศึกษานี้จะทำการวิเคราะห์เฉพาะเซลล์ที่มีโครโมโซมจำนวน 46 ตัวเท่านั้น โดยพิจารณาการเกิด SCEs ตามกลุ่มโครโมโซมที่ตำแหน่ง p-arm, centromere, และ q-arm จำนวน 50 metaphase plate ต่อการทดลอง 1 กลุ่มย่อย.

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.ส. สุমন ธิติโอฬาร เกิดวันที่ 22 กันยายน พ.ศ. 2518 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต สาขากายภาพบำบัด จาก คณะแพทยศาสตร์ ม.มหิดล ในปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อ พ.ศ.2543



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย