บทที่ 2
วารสารบริทัศน์

2.1 ไนเตรท (Nitrate)

สูตรทางเคมีคือ NO_3 ประกอบด้วยไนโตรเจน 1 อะตอมและออกซิเจน 3 อะตอม สารพวกเกลือไนเตรทพบได้ทั่วไปในดิน น้ำ พืช และเนื้อสัตว์ (Fishbein et. al,1970) ในอากาศอาจมีไนเตรทบ้างเล็กน้อย บริเวณที่มีการเพาะปลูกและการใช้ปุ๋ยไนเตรท จะทำให้ดินและน้ำในบริเวณนั้นมีไนเตรทมากตามไปด้วย ผักใบเขียวที่ได้รับปุ๋ยไนเตรทมากเกินไปอาจมีไนเตรทตกค้างอยู่ด้วย เมื่อตอนเก็บเกี่ยว มูลสัตว์เช่น มูลวัว มูลควาย และมูลค้างคาว มีเกลือไนเตรทอยู่ในปริมาณมากพอที่จะทำความแปดเปื้อนให้แก่สิ่งแวดล้อมได้ ไนเตรทสามารถเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ได้จากการเปลี่ยนแปลงทางชีวภาพโดยแบคทีเรียบางชนิด(nitrifying bacteria) ด้วยปฏิกิริยารีดัคชัน (Lijinsky et.al, 1970) ดังนี้

$$NO_3^- + NADPH, H^+ \xrightarrow[\text{ในแบคทีเรีย}]{\text{nitrate reductase}} NO_2^- + NADP^+ + H_2O$$

ยารักษาโรคบางชนิดมีไนโตรท์เป็นองค์ประกอบ เช่น amyl nitrite, ethyl nitrite,nitroglycerine และโซเดียมไนโตรท์ เป็นต้น ผักที่มีเกลือไนเตรทเป็นองค์ประกอบเมื่อนำมาเก็บค้างคืนที่อุณหภูมิห้อง แบคทีเรียในผักอาจเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ (Mirvish, 1975) ผลไม้ เช่น กล้วยหอม และสตรอเบอรี่มีปริมาณไนเตรทสูงกว่าผลไม้ชนิดอื่น

ไนเตรทและไนไตรท์ นิยมใส่ลงในอาหารจำพวกเนื้อสัตว์ เบคอน แฮม ไส้กรอก กุนเชียง ปลากระป๋อง ปลาร้า รวมทั้งอาหารจำพวกผักดองชนิดต่าง ๆ

เรียกชื่อทั่วไปว่า ดินประสิว (โปตัสเซียมไนเตรท, KNO_3) สารไนเตรทและไนไตรท์ เป็นสารกันบูดและช่วยให้สีแดงของเนื้อคงอยู่ สารประกอบพวกไนไตรท์ (KNO_2, $NaNO_2$) สามารถใส่ลงในอาหารโดยตรงได้ แต่ถ้าเป็นสารประกอบพวกไนเตรท (KNO_3, $NaNO_3$) แบคทีเรียจะเปลี่ยนสารประกอบพวกไนเตรทเป็นไนไตรท์ สารประกอบพวกไนไตรท์ จะเปลี่ยนเป็นไนตริกออกไซด์ (NO) ไนตริกออกไซด์ทำปฏิกิริยากับไมโอโกลบิน (myoglobin) ในเนื้อเป็นไนโตรโซไมโอไกลบิน (nitroso-myoglobin) ซึ่งเป็นสารประกอบที่ไม่สลายตัวง่าย ทำให้เนื้อเปื่อยยุ่ย รวมทั้งทำให้เนื้อเป็นสีแดงอีกด้วย (Fishbein et.al,1970) สารพวกไนเตรท ไนไตรท์ที่ใส่ลงในอาหารยังสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ Clostridium botulinum และทำลายพิษของ botulinum ซึ่งพิษของสารพวกนี้จะไปยับยั้งการเก็บสะสมแคโรทีนและวิตามินเอในตับทำให้ร่างกายขาดวิตามินเอได้ (Fishbein et.al,1970)

ปริมาณของสารกันบูดที่กระทรวงสาธารณสุขกำหนดให้ใส่ลงในอาหารประเภทเนื้อสัตว์มีดังนี้ (กุลยา จันทร์อรุณ, 2533)

ชนิดของสารกันบูด	ชนิดอาหาร	ปริมาณสูงสุดที่ใช้ได้ (มิลลิกรัม/1 กิโลกรัมของเนื้อสัตว์)
โปตัสเซียมไนเตรท (KNO_3), โซเดียมไนเตรท ($NaNO_3$)	เนื้อสัตว์	500 (คำนวณจากโซเดียมไนเตรท)
โปตัสเซียมไนไตรท์ (KNO_2), โซเดียมไนไตรท์ ($NaNO_2$)	เนื้อสัตว์	200 (คำนวณจากโซเดียมไนไตรท์)

องค์ประกอบต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์

การเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ในอาหารเพิ่มขึ้นได้โดยขึ้นอยู่กับหลายองค์ประกอบ ได้แก่

ก. ปริมาณของไนเตรทที่มีอยู่ในอาหาร อาหารจำพวกผักที่ได้รับปุ๋ยไนเตรทเต็มที่หรือมากเกินไป ปริมาณไนเตรทที่ไม่ได้ถูกนำไปใช้ในการสังเคราะห์กรดอะมิโนหรือโปรตีนจะตกค้างในเซลล์ของผักมาก ดังนั้นการเลือกผักที่จะนำมาใช้รับประทานควรระมัดระวัง โดยเฉพาะผักที่นำมาใช้ต้มเป็นน้ำซุปให้แก่ทารกที่อายุต่ำกว่า 6 เดือน ถ้ามีปริมาณของไนเตรทตกค้างมากทำให้เป็นอันตรายต่อเด็กได้ง่าย คือทำให้มีเมธฮีโมโกลบินมากในเลือด (methemoglobinemia)

ข. อุณหภูมิและระยะเวลาการเก็บอาหาร อุณหภูมิห้องเป็นอุณหภูมิที่เหมาะสำหรับการเปลี่ยนไนเตรทเป็นไนไตรท์ได้ดีกว่าอุณหภูมิในตู้เย็น หรือที่ 4°ซ การแช่เย็นให้แข็งจะยับยั้งปฏิกิริยารีดัคชันได้ดีที่สุด การเก็บอาหารที่มีไนเตรทไว้ในตู้เย็น สามารถเก็บได้นานถึง 1 เดือน โดยเปลี่ยนเป็นไนไตรท์เพียงเล็กน้อย แต่ถ้าเก็บนอกตู้เย็นเพียง 3-4 วัน ไนไตรท์จะเพิ่มขึ้นอย่างชัดเจน เนื่องจากที่อุณหภูมิต่ำ ๆ แบคทีเรียพวก E.coli และ Pseudomonas ซึ่งมีเอนไซม์ nitrate reductase ทำงานได้น้อยลง

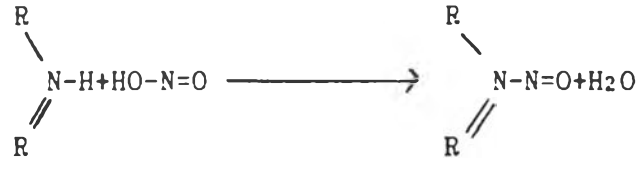
ค. ปริมาณออกซิเจน การเก็บอาหารไว้ในที่สูญญากาศจะลดการเปลี่ยนไนเตรทให้เป็นไนไตรท์ได้และระดับไนไตรท์ที่มีอยู่เดิมก็จะลดลงด้วย

ง. การใช้ภาชนะอลูมิเนียมในการปรุงอาหาร ทำให้ไนเตรทเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ได้มากขึ้น สารพวกไนเตรทมีพิษค่อนข้างต่ำ สารไนไตรท์มีพิษสูงกว่าไนเตรทมาก ไนเตรทและไนไตรท์ต่างก็เป็นตัวทำให้เกิดไนโตรซามีน ซึ่งเป็นสารก่อมะเร็งของระบบทางเดินอาหาร (Furihata et.al, 1986)

2.2 <u>ไนไตรซามีน</u> (Nitrosamine)

เกิดจากการรวมตัวทางเคมีระหว่างไนไตรท์ กับ secondary amines หรือ tertiary amines และอาจเกิดจากการรวมตัวระหว่างไนไตรท์กับสารที่มีหมู่ pyrrolidine เช่น proline, piperzaine และยาฆ่าแมลงพวกคาร์บาเมทปฏิกิริยาการรวมตัวนี้สามารถเกิดได้ในอาหารที่เก็บไว้นาน ๆ อาหารที่กำลังบรุงและอาหารที่ถูกบดย่อยในกระเพาะและลำไส้ หรือในอาหารหมักดอง (ไมตรี สุทธจิตต์, 2522)

ในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ที่มีการใส่ไนเตรทเป็นสารกันบูด ไนเตรทจะถูกเปลี่ยนเป็นไนไตรท์ และไนไตรท์ทำปฏิกิริยากับสารพวกเอมีนเป็น nitrosamine (Lijinsky et.al, 1970) ดังสมการ



secondary amine nitrite nitrosamine

สารพวก secondary amines พบได้ทั่วไปในอาหารประเภทเนื้อสัตว์, ข้าวสาลี, ชา, ยาสูบ, เนยแข็ง, ยา โดยเฉพาะในปลาพวกเอมีนเหล่านี้จะทำให้มีกลิ่นเหม็นคาว สภาวะที่เหมาะสมมากสำหรับการเกิดสาร nitrosamine คือ อาหารที่มีสภาวะเป็นกรดเล็กน้อย nitrosamine ตัวที่สำคัญและพบว่ามีพิษรุนแรงคือ Dimethylnitrosamine (DMN) ดังปฏิกิริยาต่อไปนี้ (Lijinsky et.al, 1970)

$NaNO_2 + HCl \rightleftharpoons HNO_2 + NaCl$

$2\ HNO_2 \rightleftharpoons N_2O_3 + H_2O$

$(CH_3)_2\ NH + N_2O_3 \longrightarrow (CH_3)_2\ N - N = O + HNO_2$

Dimethylamine N-Nitrosodimethylamine (DMN)

สาร nitrosamine มีความคงตัวต่อแสงสว่างและภาวะที่เป็นกรดได้ดี ถ้าหมู่ R เป็น alkyl nitrosamine นั้นจะละลายในน้ำได้ดี ถ้าหมู่ R เป็น phenyl มันไม่ละลายในน้ำ สาร nitrosamine บางชนิดมีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ จึงระเหยได้ง่ายในอากาศ เช่น N-methyl-N-nitrosomethylamine

<u>อิทธิพลของสารเคมีอื่นต่อปฏิกิริยาการเกิด nitrosamine</u>

มีสารหลายชนิดที่เร่งปฏิกิริยาการเกิดnitrosamine จาก secondary amines กับไนไตรท์ สารเหล่านี้ได้แก่ Cl^-, Br^-, I^-, SCN^-, H^+ มักพบสาร thiocyanate, I^-, Cl^-, Br^- ได้เสมอในน้ำลายและเมื่อถูกกลืนลงไปในกระเพาะอาหารซึ่งมี pH ประมาณ 1-2 ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสำหรับการเกิดปฏิกิริยา nitrosation และสารที่ใส่ลงไปเพื่อชูรสในอาหารประเภทเนื้อสัตว์ เช่น พริก, พริกไทย ลามารถเพิ่มการเกิด nitrosamine ได้ นอกจากนี้พบว่ายารักษาโรคบางชนิด เช่น oxytetracycline, aminopyrine, disulfiram, tolazamide และยาปราบศัตรูพืชบางชนิด เช่น atrazine, simazine, thiram สามารถรวมกับไนไตรท์แล้วทำให้เกิด nitrosamine ในปริมาณสูงมาก รวมทั้งสาร Chlorogenic acid ซึ่งเป็นส่วนประกอบอย่างหนึ่งของกาแฟ ลามารถเร่งปฏิกิริยา nitrosation ของ amine ได้ที่ pH 4 (Sen.N.P and Donaldson B.,1974)

สารที่เป็นตัวยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา nitrosation ได้แก่ tannin, sodium sulfite, phenol, cysteine, ascorbic acid และ isomers ของมันคือ erythorbic acid, propyl gallate โดย ascorbic acid หรือ

วิตามินซียับยั้งการเกิดปฏิกิริยา nitrosation ของ amines ได้ดีที่สุด (Mirvish, 1975) sodium sulfite ซึ่งเป็นสารรีดิวเซอร์ตัวหนึ่งสามารถยับยั้งปฏิกิริยา nitrosation ได้ ส่วน tannin และ phenol จะแย่งจับ secondary amines ไว้เป็นอนุพันธ์ nitroso ของ tannin และ phenol ตามลำดับก่อนที่จะมีโอกาสจับกับไนไตรท์ (Bogovski et.al, 1972)

อุณหภูมิ, pH, ความเข้มข้นของสารเคมีต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้อง มีส่วนทำให้การเกิด nitrosationเกิดมากหรือน้อยได้ ส่วนมากสภาพที่เหมาะสม คือ อุณหภูมิสูงของการย่าง การต้ม การทอด (Singer and Lijinsky, 1974) pH ที่ค่อนข้างเป็นกรด จะส่งเสริมการเกิด nitrosamine จากปฏิกิริยา nitrosation ได้ดีมาก

<u>metabolism ของไนเตรท, ไนไตรท์ และไนโตรซามีน</u>

มีการศึกษาเกี่ยวกับ metabolism ของไนเตรท, ไนไตรท์ และไนโตรซามีน (nitrosamine) โดยในปี ค.ศ.1971 Friedman et.al พบว่า 70-100% ของ nitrite ถูก absorb ที่กระเพาะอาหารของหนูได้หมดภายใน 30 นาที และจากการศึกษาเกี่ยวกับ metabolism ของ ^{14}C labelled Dimethylnitrosamine ในหนูพบว่า 65% ของ ^{14}C จะถูกขับออกมาทางลมหายใจในรูป $^{14}CO_2$ บางส่วนถูกขับออกมาทางปัสสาวะในรูปเดิม ที่เหลือจะกระจายอยู่ตามเนื้อเยื่อทั่วไป สาร metabolite ที่ขับออกทางปัสสาวะยังคงมีฤทธิ์ทำให้เกิดมะเร็งในกระเพาะปัสสาวะในสัตว์ทดลองได้ ใน in vivo นั้นปฏิกิริยา nitrosation นอกจากพบที่ stomach แล้วยังสามารถพบได้ที่ the infected urinary bladder, the infected vagina อีกด้วย (Sander et.al, 1972) สารไนเตรทหรือไนไตรท์ถูกดูดซึมผ่านชั้น mucosa ของกระเพาะอาหารได้ดี บางส่วนของไนเตรทจะผ่านเข้าสู่ลำไส้เล็กและถูกเปลี่ยนแปลงโดยแบคทีเรียหลายชนิดกลายเป็นไนไตรท์, N_2O_5, NO, NH_2OH และ NH_3 ส่วนสาร nitrosamine จะถูกดูดซึมผ่านกระเพาะอาหารได้เล็กน้อยแต่ส่วนใหญ่จะเข้าสู่ผนังลำไส้ได้รวดเร็ว

2.3 <u>ความเป็นพิษของไนเตรท, ไนไตรท์และไนไตรซามีน</u>

<u>ความเป็นพิษของไนเตรท, ไนไตรท์</u>

มีผู้ศึกษาความเป็นพิษของไนเตรทในสัตว์ทดลองชนิดต่างๆ อย่างกว้างขวาง พบว่าสาเหตุสำคัญที่ไนเตรททำให้เกิดพิษในคนและสัตว์ เนื่องมาจากการเกิดสารเมธฮีโมโกลบิน (methemoglobin) โดยการออกซิไดซ์ฮีโมโกลบินด้วยไนไตรท์ Fe^{2+} ในฮีมของฮีโมโกลบินเปลี่ยนเป็น Fe^{3+} ในเมธฮีโมโกลบิน ทำให้โมเลกุลของฮีมไม่สามารถจับกับออกซิเจนได้ การพาก๊าซออกซิเจนไปสู่เซลล์ลดลง ยิ่งมีเปอร์เซนต์ของเมธฮีโมโกลบินสูง ภาวะการขาดออกซิเจนในเซลล์ยิ่งรุนแรงมากขึ้น ถ้ามีปริมาณเมธฮีโมโกลบินเพิ่มมากกว่า 20% ของฮีโมโกลบินทั้งหมด จะทำให้มีอาการไม่สบายเนื่องจากการขาดออกซิเจน เช่นมีอาการตัวเขียว (cyanosis), อ่อนเพลีย, หายใจหอบถี่ ปวดศีรษะ หัวใจเต้นแรงและเร็วกว่าปกติ เป็นต้น อย่างไรก็ตามร่างกายพยายามปรับระดับฮีโมโกลบินให้สูงขึ้นโดยเปลี่ยนมาจากเมธ-ฮีโมโกลบินนั่นเอง โดยในเม็ดเลือดของผู้ใหญ่มีเอนไซม์ชนิดหนึ่งชื่อ NADH-methemoglobin reductase ซึ่งสามารถเปลี่ยนเมธฮีโมโกลบินให้กลับเป็นฮีโมโกลบินอย่างเดิมดังนี้

$$\text{Hemoglobin - } Fe^{2+} \underset{\text{NADH-Met Hb-reductase}}{\overset{NaNO_2}{\rightleftharpoons}} \text{Methemoglobin-} Fe^{3+}$$

ความเป็นพิษของไนเตรท และไนไตรท์ในร่างกาย ขึ้นอยู่กับปริมาณและการทำงานของ NADH-methemoglobin reductase ในเด็กที่อายุอ่อนกว่า 3 เดือน

เม็ดเลือดแดงยังไม่มี NADH-methemoglobin reductase และฮีโมโกลบินเอฟ (HbF)ในเด็กคลอดใหม่มีอยู่ถึง60-80% จะถูกออกซิไดซ์ด้วย $NaNO_2$ ได้ดีและง่ายกว่าฮีโมโกลบินเอ (HbA) ดังนั้นในเด็กพบว่าเมธฮีโมโกลบินจะเกิดขึ้นมากและมีความเป็นพิษรุนแรงกว่าในผู้ใหญ่ที่ได้รับไนเตรทหรือไนไตรท์ในอัตราส่วนต่อน้ำหนักร่างกายเท่ากันนอกจากนี้การเพิ่มปริมาณของเมธฮีโมโกลบิน ทำให้หัวใจต้องสูบฉีดโลหิตมากขึ้นเพื่อชดเชยภาวะการขาดออกซิเจน ความเป็นพิษของไนเตรทจึงก่อให้เกิดความเสียหายต่อการขนส่งออกซิเจนระหว่างเซลล์

ได้มีรายงานระบาดวิทยาเกี่ยวกับพิษไนเตรทที่ปะปนอยู่ในน้ำดื่มที่ เกิดขึ้นกับเด็ก เช่น ที่สหรัฐอเมริกา, อิสราเอล, เยอรมัน, รัสเซีย พบว่าทุกแห่งแสดงให้เห็นชัดถึงความสัมพันธ์ที่เพิ่มขึ้นของปริมาณไนเตรทในน้ำดื่มกับเปอร์เซนต์เมธฮีโมโกลบินในเด็กผู้ป่วย (Furihata et.al, 1986)

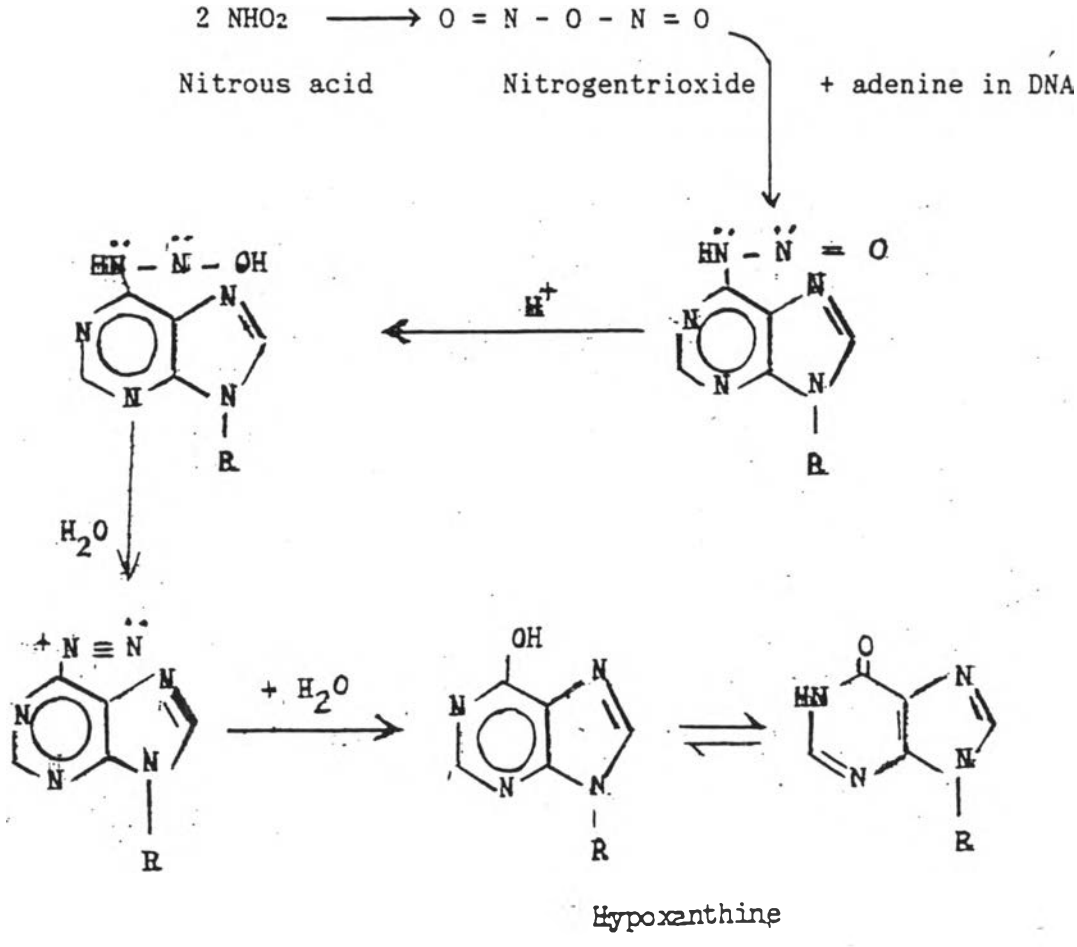
มีผู้ศึกษาเกี่ยวกับพิษของไนเตรทและไนไตรท์ในกระต่ายพบว่าทำให้ electrocardiogram ผิดปกติไป ช่วงคลื่น Q-T สั้นลง และความสูงของ T-wave ลดลงสำหรับพิษเรื้อรังของไนเตรทและไนไตรท์ที่มีต่อเส้นเลือด coronary ที่ไปเลี้ยงหัวใจ คือ ทำให้เส้นเลือด coronary มีผนังบางลงแต่ขยายขนาดให้ใหญ่ขึ้นมีกลุ่มเซลล์เกาะกินและเป็นพังผืดบนเนื้อเยื่อหัวใจ หลอดลมขยายและมีถุงลมโป่งพอง

ในปีค.ศ.1971Shogo et.al ได้ทำการทดลองเกี่ยวกับไนเตรทและไนไตรท์ พบว่าทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ตับของหนูไมซ์ที่ได้รับสารนี้เข้าไปโดยมีการเกิด centrilobular necrosis, sinusoidal and portal congestion, hemorrhage

ในปี ค.ศ. 1983 Ema et.al ได้ทำการวิจัยทดสอบพิษของโปตัสเซียมไนเตรทในหนูไมซ์ที่กำลังตั้งครรภ์พบว่าลูกหนูที่ออกมามีความผิดปกติ (malformations) หลายอย่างเช่นexencephaly,cleft lip and cleft palate, polydactyly และ Markel et.al (1989) ได้รายงานว่า ไนเตรททำให้เกิด

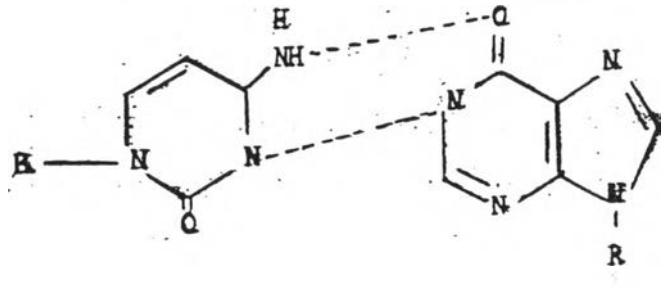
การเปลี่ยนแปลงที่ sensoro- motor development และพฤติกรรมเกี่ยวกับการเรียนรู้ในหนูแรท

ในปี ค.ศ. 1991 Grudzinski et.al ได้ทำการวิจัยดูผลของโบตัสเซียมไนเตรทต่อการดูดซึม D-xylose ที่ลำไส้ของหนูแรท และพบว่าการเพิ่มปริมาณของโบตัสเซียมไนเตรทจะลดการดูดซึมของ D-xylose ที่ลำไส้เล็ก นอกจากนี้กรดไนตรัสซึ่งเกิดจากเกลือกับกรด เป็นสารกลายพันธุ์ที่ร้ายแรงมากตัวหนึ่ง สามารถเปลี่ยนพันธุ์ของ E.coli, Salmonella typhimurium, yeast ชนิด Saccharomyces cerevisiae, เชื้อราพวก Aspergillus หลายชนิดรวมทั้งเชื้อไวรัสของใบยาสูบ (tobacco mosaic virus) ด้วยกรดไนตรัสทำปฏิกริยากับหมู่อะมิโน ($-NH_2$) ของ adenine, guanine, cytosine ในโมเลกุล DNA ของเชื้อจุลินทรีย์ โดยเฉพาะ adenine จะถูกกรดไนตรัสเปลี่ยนให้เป็น hypoxanthine ซึ่งจะจับคู่กับเบส cytosine แทนที่จะจับคู่เบสแบบ A=T อย่างเดิมจึงทำให้เชื้อจุลินทรีย์กลายพันธุ์ไปแบบ transition mutation (Lijinsky et.al 1970) ดังสมการ



Hypoxanthine

เมื่อมีขบวนการ DNA-replication จะได้การจับคู่เบสแบบใหม่ดังนี้



cytosine = hypoxanthine

ความเป็นพิษของไนโตรซามีน

จากการวิจัยในประเทศจีนเมืองหลินเสียน (Wang et.al,1979) พบว่าการบริโภคอาหารที่มีไนเตรทมากเกินไป มีปัจจัยเสี่ยงต่อการเปลี่ยนของเซลล์บริเวณเยื่อบุผนังหลอดอาหารอันนำไปสู่การเกิดมะเร็งหลอดอาหาร รายงานในประเทศไทยพบว่ามีอัตราการเกิดมะเร็งหลอดอาหารมากแถบภาคใต้ในผู้บริโภคอาหารที่มีไนเตรทสูง (อภินพ จันทร์วิทิน,2532) นอกจากนี้ในปี 1979 Hirayama ได้ทำการสำรวจในคนญี่ปุ่นที่มีการรับประทานอาหารที่มีไนเตรทผสมอยู่ด้วยเป็นระยะเวลานานๆพบว่าเป็นโรคมะเร็งกระเพาะอาหาร และมีอัตราการเกิดของโรคนี้สูงกว่าคนในแถบยุโรปและอเมริกา (Fine et.al, 1982) ทั้งนี้เนื่องจากอาหารที่ชาวญี่ปุ่นรับประทานส่วนใหญ่เป็นอาหารประเภทหมัก (fermented foods) และผลผลิตจากการหมักจะได้เป็นสารพวก nitrosamine ซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งกระเพาะอาหาร นอกจากนี้ nitrosamineยังทำให้เกิด liver damage และ jaundice ได้

มีรายงานว่าสาร nitrosamine กระตุ้นการสร้าง cyclic GMP ในเนื้อเยื่อต่างๆของหนูพุกขาว และ colonic mucosa ของคน ปรากฏว่า cyclic GMP เพิ่มมากที่สุดในเซลล์ของตับที่ได้รับ nitrosamine และมีความสัมพันธ์ร่วมกับการเกิดมะเร็งตับด้วย โดยที่ cyclic GMP นั้น เป็นสารที่มีคุณสมบัติเร่งการเจริญเติบโตของเซลล์และเร่งการเปลี่ยนแปลงเซลล์ปกติให้กลายเป็นเซลล์ผิดปกติ (ไมตรี สุทธจิตต์, 2522)

Sander et. al (1972) ได้ทดลองพิษของสาร nitrosamine ในหนูแรทพบว่าทำให้เกิด esophageal and hepatic tumors และในปี ค.ศ. 1971 Greenblatt et.al ได้ทำการวิจัยเกี่ยวกับพิษของสาร nitrosamine ต่อการเกิด lung adenomas ในหนูไมซ์ โดยให้หนูได้รับสารไนไตรท์เป็นระยะเวลานานพบว่าสามารถทำให้เกิด lung adenomas ได้

Asahina et. al (1971) ศึกษาผลของ Dimethylnitrosamine ในหนูแรท พบว่าเกิด liver necrosis ในหนู และ Newberne and Shank (1973) พบว่า nitrosamine ทำให้เกิด hepatomas ในหนูแรทด้วย

มีการวิจัยเกี่ยวกับพิษของไนโตรซามีนต่อหนูแรทและแฮมสเตอร์ (hamster) ที่กำลังตั้งครรภ์พบว่าทำให้เกิด hydrocephalusและ neurogenic tumor ทั้งในลูกหนูและลูกแฮมสเตอร์ (Rustia and Shubik et.al,1974)

จากการวิจัยทั้งในสัตว์ทดลองและในคน จึงเป็นที่ยืนยันได้ว่าสาร nitrosamine เป็นสารก่อมะเร็ง มะเร็งที่เป็นมากเนื่องจากสาร nitrosamine ได้แก่ มะเร็งที่หลอดอาหาร,กระเพาะอาหาร, ตับ ไต ระบบทางเดินหายใจ และกระเพาะปัสสาวะ

2.4 <u>ความเป็นพิษเชิงชีวเคมีของสารพิษ</u>

สารเคมีที่เข้าสู่ร่างกายทางใดทางหนึ่ง เมื่อเกิดปฏิกิริยาโดยระบบ metabolism เกิดเป็นสารตัวกลางที่ว่องไว สามารถรวมกับ protein หรือรวมกับ DNA ทำให้เกิดความผิดปกติในโครงสร้างของสารชีวโมเลกุลเหล่านี้และนำไปสู่ความผิดปกติในหน้าที่การทำงานของสารชีวโมเลกุลต่าง ๆ ก่อให้เกิดความผิดปกติต่อระบบชีวภาพ ซึ่งนำไปสู่ภาวะผิดปกติต่าง ๆ ในร่างกาย (อุษณีย์ วินิจเขตคำนาณ, 2535) ดังแสดง

สารพิษ (Toxicants) ⟶ สารตัวกลางที่ว่องไว (Reactive metabolites) ⟶ Protein adduct หรือ DNA adduct

↓

Biological effect เช่น

ความผิดปกติต่อโครโมโซม (chromosomal aberration)

การกลายของยีน (gene mutation)

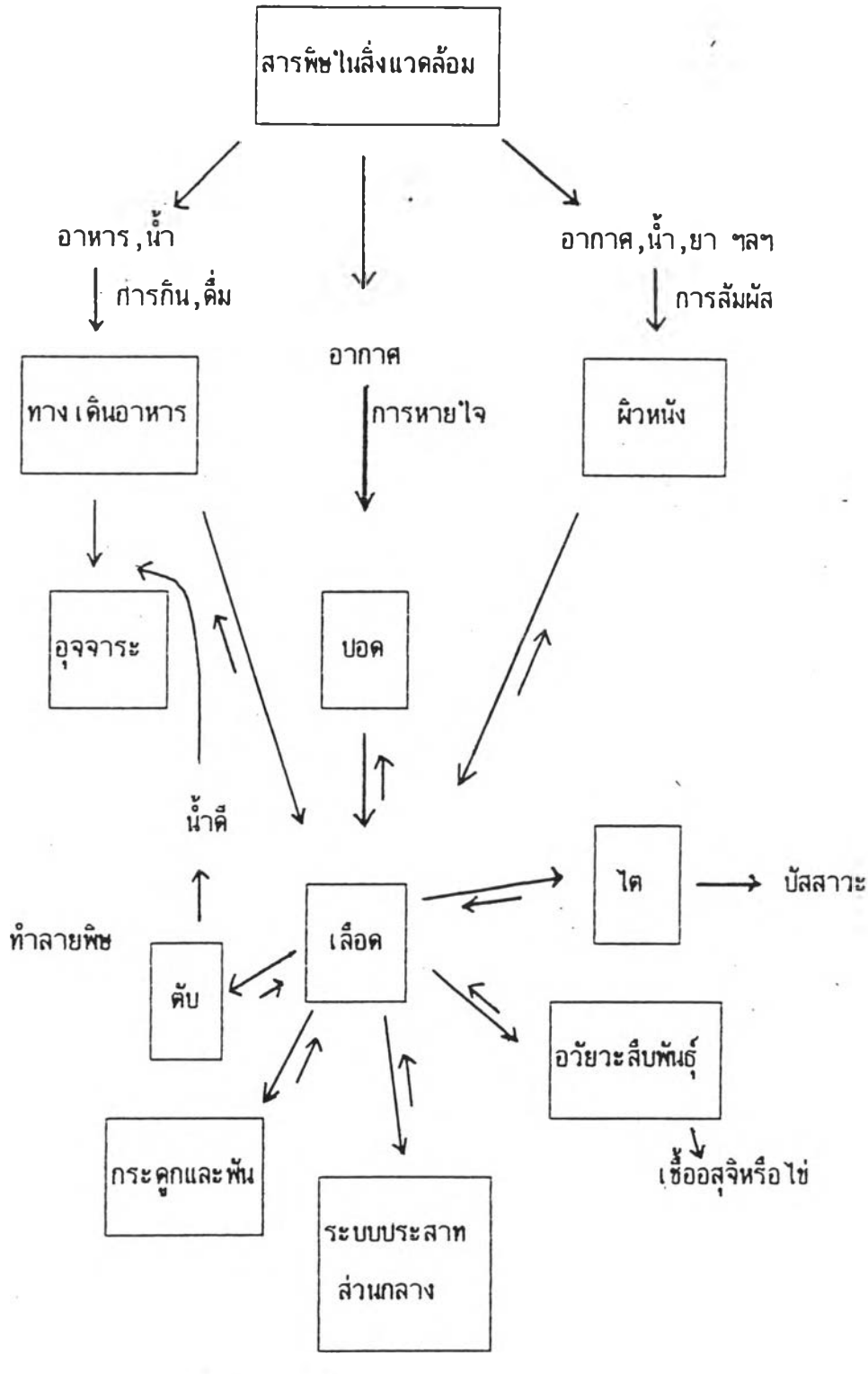
เกิดการกระตุ้นยีนมะเร็ง (oncogene activation)

↓

Preneoplastic lesion

↓

Clinical disease



รูปที่ 1 แสดงวิถีทางที่สารพิษเข้าสู่ร่างกายและอวัยวะสำคัญ

ความผิดปกติต่อดีเอ็นเอ

เนื่องจากดีเอ็นเอเป็นสารพันธุกรรมที่กำหนดโครงสร้างของโปรตีน การเปลี่ยนแปลงรหัสพันธุกรรมบนสายดีเอ็นเอ ทำให้มีการสร้างโปรตีนแตกต่างกันไป รหัสพันธุกรรมจะแตกต่างไปจากเดิมในกรณีที่มีการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของเบส ซึ่งการเปลี่ยนแปลงการเรียงตัวของเบสที่เกิดจากการแทนที่ของเบสต่างชนิดไปจากเดิม, การขาดหายไปของเบส, การเติมเบสเข้ามาในสายดีเอ็นเอ อาจเกิดจากการเหนี่ยวนำของสารเคมี (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2535)

การกลายของดีเอ็นเอ ก่อให้เกิดความผิดปกติดังนี้

1. การกลายของดีเอ็นเอของเซลล์ร่างกาย (somatic mutation) ผลที่เกิดขึ้นจะได้โปรตีนที่ผิดปกติไปจากเดิม เช่น มีการขาดหายไปของ enzyme บางชนิด การทำงานแบบผิดปกติของเอนไซม์ การควบคุมการถ่ายทอดของยีนแบบผิดปกติ

2. การกลายของดีเอ็นเอของเซลล์สืบพันธุ์ (germinal mutation) ผลที่เกิดขึ้น เช่น การแตกหักของโครโมโซม โครโมโซมไม่ครบจำนวน และความผิดปกติของตัวอ่อน

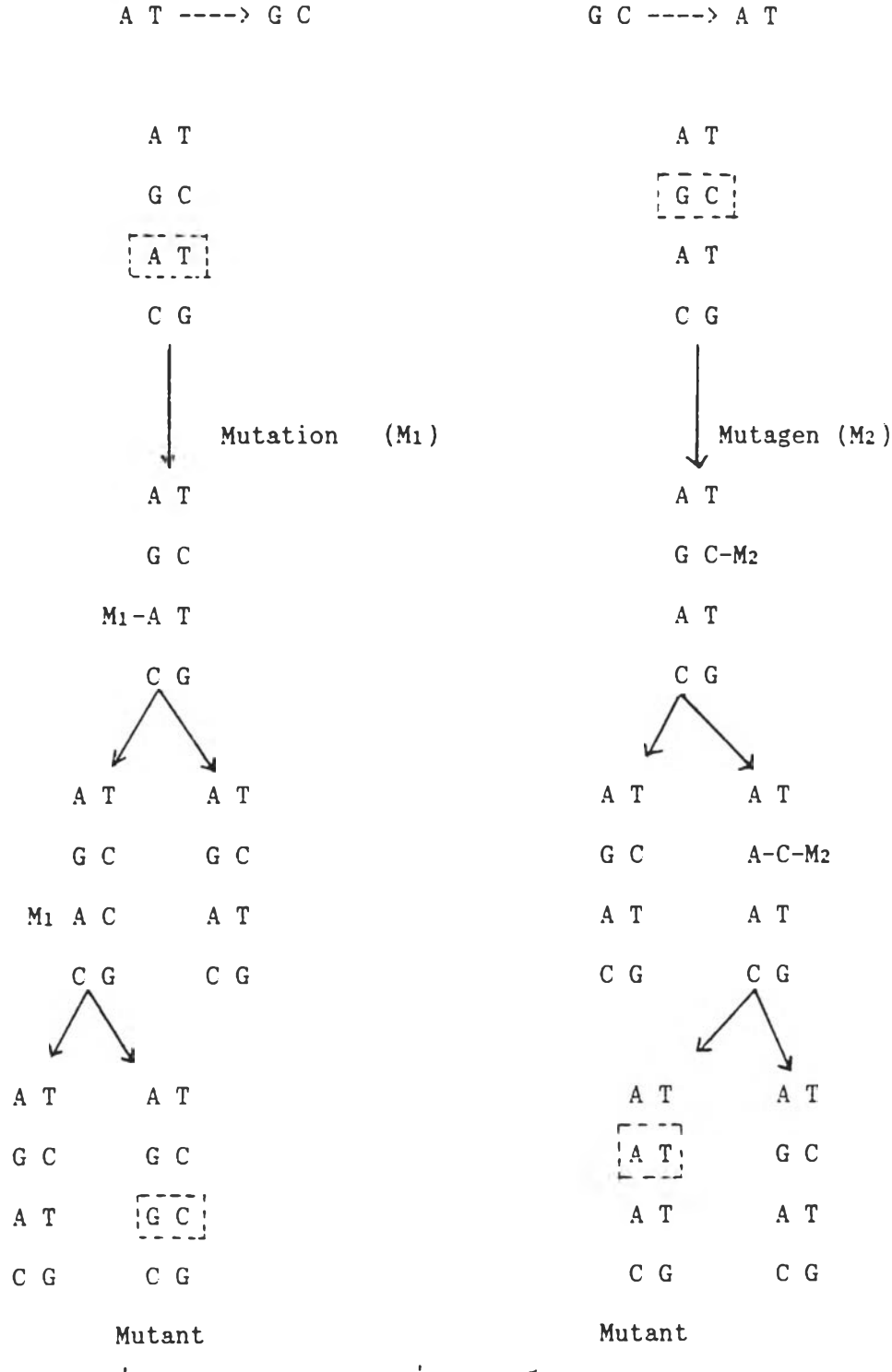
ดีเอ็นเอเสียหาย (damaged DNA) จำแนกความผิดปกติได้ 2 แบบ ดังนี้

1. ความผิดปกติแบบ macrolesion เกิดในระดับโครโมโซม เช่น โครงสร้างของโครโมโซมผิดปกติ โครโมโซมแตกหัก ความผิดปกติเช่นนี้ สามารถตรวจดูโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์

2. ความผิดปกติแบบ microlesion เป็นความผิดปกติที่เกิดกับเบสของดีเอ็นเอ เช่น การแทนที่ของเบส (base - pair substitution) หรือการเคลื่อนของรหัสพันธุกรรม (frame - shift mutation) เนื่องมาจากการขาดหายไปหรือการเพิ่มเข้ามาของเบสในสายดีเอ็นเอ

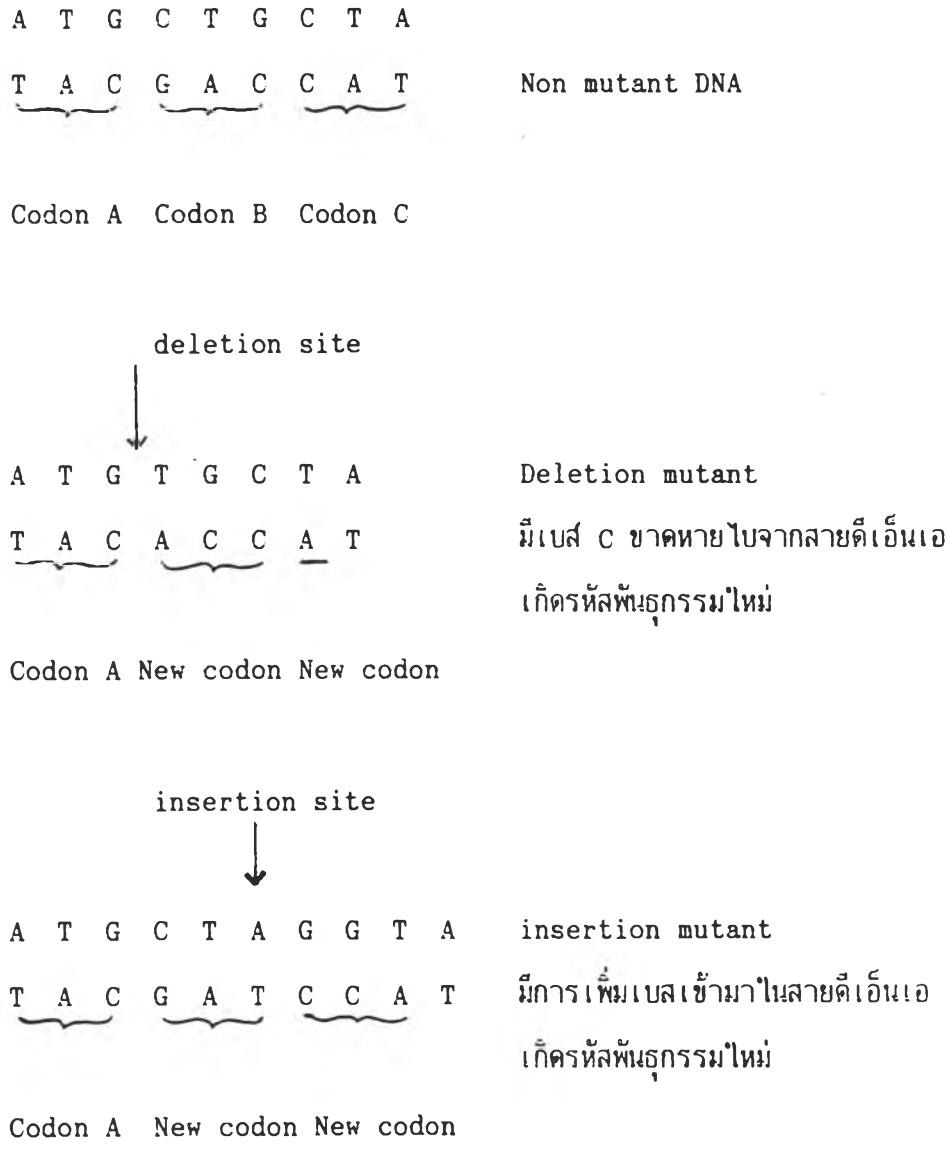
สารก่อมะเร็ง ก่อให้เกิดความผิดปกติแก่ดีเอ็นเอได้ทั้งแบบการแทนที่ของเบส (base - pair substitution mutation) และเกิดโดยการเคลื่อนที่ของรหัสพันธุกรรม (frame - shift mutation) (อุษณีย์ วินิจเขตคำนวณ, 2535)

กลไกการแทนที่เบสในดีเอนเอ (Base-pair substitution mutation)



รูปที่ 2 แสดงกลไกการแทนที่เบสในดีเอ็นเอ (base-pair substitution mutation)

กลไกการเกิด Frame-shift mutation



รูปที่ 3 แสดงกลไกการเคลื่อนที่ของรหัสพันธุกรรม (frame-shift mutation)

เมื่อดีเอ็นเอเกิดการเปลี่ยนแปลง ย่อมมีผลกระทบต่อการสร้างโปรตีน เพราะรหัสพันธุกรรมที่เปลี่ยนแปลงไปนำไปกอดรหัสได้กรดอะมิโนตัวใหม่ ทำให้เกิดโปรตีนชนิดใหม่ ซึ่งถ้าตำแหน่งของกรดอะมิโนที่เปลี่ยนไปนั้นเป็นตำแหน่งที่ทำหน้าที่ (functional site) ของโปรตีนนั้น โปรตีนที่ไม่เหมือนเดิม (mutant protein) ย่อมสูญเสียหน้าที่หรือความว่องไวต่อปฏิกิริยาไป และถ้าโปรตีนนั้นเป็นโปรตีนที่ทำหน้าที่ควบคุม (regulatory protein) ย่อมมีผลกระทบต่อร่างกาย อาจทำให้เกิดการควบคุมการถ่ายทอดของยีนแบบผิดปกติ, เกิดการกระตุ้นยีน มะเร็ง, ยับยั้งการทำงานของยีนกดมะเร็ง ทำให้มีโอกาสเกิดเซลล์มะเร็งได้

2.5 การเกิดมะเร็งจากสารเคมี

แบ่งตามปฏิกิริยารวมตัวกันระหว่างสารเคมีกับสารชีวโมเลกุลขนาดใหญ่ เช่น ดีเอ็นเอ, อาร์เอ็นเอ, โปรตีน ออกเป็น 3 พวก ได้แก่

1. สารก่อมะเร็งที่รวมกับสารชีวโมเลกุลได้โดยตรง (direct - acting carcinogen)

ส่วนใหญ่เป็นสารสังเคราะห์เพื่อใช้วิจัยในห้องปฏิบัติการ เช่น nitrogen mustard,diepoxybutane สารพวกนี้จะก่อมะเร็งได้มีประสิทธิภาพมากน้อยแค่ไหนขึ้นอยู่กับคุณสมบัติในการละลายของมัน, สูตรโครงสร้างทางเคมี, ปฏิกิริยาระหว่างสารกับน้ำ และการนำพาของสารไปยังเซลล์เป้าหมาย หรือไปยังโมเลกุลของดีเอ็นเอ

2. สารก่อมะเร็งที่รวมกับสารชีวโมเลกุลได้โดยทางอ้อม (indirect-acting carcinogen) สารก่อมะเร็งพวกนี้ต้องถูกกระตุ้น (activate) ด้วยปฏิกิริยาทางชีวเคมีหรือเอนไซม์ก่อน ทำให้โมเลกุลมีลักษณะเป็น electrophile ที่ว่องไวต่อปฏิกริยามากขึ้น หลังจากนั้นสารที่เกิดขึ้นนี้จะทำปฏิกิริยาต่อไปกับสารชีวโมเลกุลโดยเฉพาะกับสารดีเอ็นเอ ดังนั้นสารก่อมะเร็งกลุ่มนี้จึงจำเป็นต้องผ่านขบวนการ metabolism ก่อนการออกฤทธิ์เสมอ พบสารกลุ่มนี้ได้บ่อยในสิ่งแวดล้อม เพราะมีเสถียรภาพดีกว่าสารกลุ่มแรก จึงเป็นสาเหตุสำคัญของการเกิดมะเร็งในคน ตัวอย่างของสารกลุ่มนี้ ได้แก่ Aflatoxin B_1, vinyl chloride

3. สารกระตุ้นให้เกิดการก่อมะเร็ง (cocarcinogen) สารพวกนี้ตัวมันเองไม่ใช่สารก่อมะเร็ง แต่เมื่ออยู่รวมกับสารก่อมะเร็ง มันจะเสริมฤทธิ์ของสารก่อมะเร็งได้มากขึ้น บางทีเรียกสารพวกนี้ว่า promotor promotor อาจไม่ใช่สารเคมีก็ได้ แต่เป็น factor ทางฟิสิกส์ เช่น การทำลายเซลล์โดยทำให้เกิดบาดแผลและการระคายเคือง สาร promotor นี้เป็นสารที่เสริมฤทธิ์หรือกระตุ้นการเกิดมะเร็งภายหลังจากที่ร่างกายได้รับสารก่อมะเร็งเข้าไปแล้ว

<u>ทฤษฎีสองขั้นตอนของการเกิดมะเร็งโดยสารเคมี</u> (Two - staged theory of chemical carcinogenesis)

การเกิดมะเร็งมีสาเหตุมาจากการเปลี่ยนแปลงของดีออกซีไรโบนิวคลีอิคแอซิด (Deoxyribonucleic acid) หรือเรียกย่อ ๆ ว่าดีเอ็นเอ (DNA) ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตนี้ดีเอ็นเอเป็นที่อยู่ของยีนหลายชนิดภายในนิวเคลียสของเซลล์ ถ้ามีความผิดปกติขององค์ประกอบใดเพียงชนิดเดียว หรือหลายชนิดด้วยกันเกิดขึ้นในยีนใดยีนหนึ่ง ยีนนี้อาจจะผิดปกติเปลี่ยนแปลงหน้าที่เดิมของมัน และไม่ยอมอยู่ภายใต้การควบคุมการทำงานอย่างปกติของเซลล์อีกต่อไป เซลล์ที่มียีนที่ผิดปกตินั้นจะเริ่มเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งที่มีลักษณะเฉพาะ ของมันแตกต่างจากเซลล์ปกติเดิม สารเคมีหลายชนิดทำหน้าที่เป็นสารก่อมะเร็ง (carcinogen) ของเซลล์ปกติ ทำให้เกิดการกลายพันธุ์ในยีนปกติ ทำให้เซลล์นั้นกลายเป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด เซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นเมื่อได้รับการกระตุ้นจากสารเคมีอื่นบางชนิดร่วมด้วย จะสามารถแบ่งตัวและขยายตัวออกไปได้ง่ายจนกลายเป็นก้อนเนื้องอกขึ้นมา ดังนั้นการเกิดมะเร็งโดยสารเคมีจึงประกอบด้วย 2 ขั้นตอน ดังนี้

<u>ขั้นตอนที่ 1</u> กลไกการทำให้เกิดมะเร็งด้วยสารก่อตัว

ต้องมีสารเริ่มต้นหรือสารก่อตัว (initiation) ซึ่งสารเหล่านี้ส่วนมากเป็นสารพวกอิเลคโตรฟิลิค (electrophilic reactant) สารนี้จะเข้ารวมตัวทางเคมีกับสารพวกนิวคลีโอฟิลิค (nucleophilic reactant) ซึ่งได้แก่โมเลกุลพวกดีเอ็นเอ อาร์เอ็นเอ และโปรตีน เป็นปฏิกิริยาทางเคมีที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและไม่ย้อนกลับ (irreversible process) ทำให้โมเลกุลของดีเอ็นเอที่รวมกันกับสารก่อตัวเสียสภาพธรรมชาติ เกิดการแตกหักเสียหาย ดีเอ็นเอที่ถูกเปลี่ยนสภาพไป อาจเป็นที่อยู่ของยีนบางชนิด ทำให้ยีนเดิมซึ่งว่องไว กลายเป็นยีนที่ไม่ทำงาน หรือในทางตรงกันข้ามสารก่อตัวอาจไปเร่งเปิดการทำงานของยีนที่เคยถูกปกปิดไว้ให้มีการแสดงออกเกิดขึ้นซึ่งทำให้มีความระส่ำระลายขึ้นมาในกลุ่มเซลล์ ดี

เรียกเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลงของดีเอ็นเอว่า "เซลล์เริ่มต้น" (initiated cell) เซลล์เริ่มต้นเหล่านี้ไม่จัดว่าเป็นเซลล์มะเร็งที่สมบูรณ์ แต่เป็นเซลล์เตรียมพร้อม ซึ่งจะเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์มะเร็งเมื่อได้รับการกระตุ้นต่อไปในขั้นตอนที่สอง

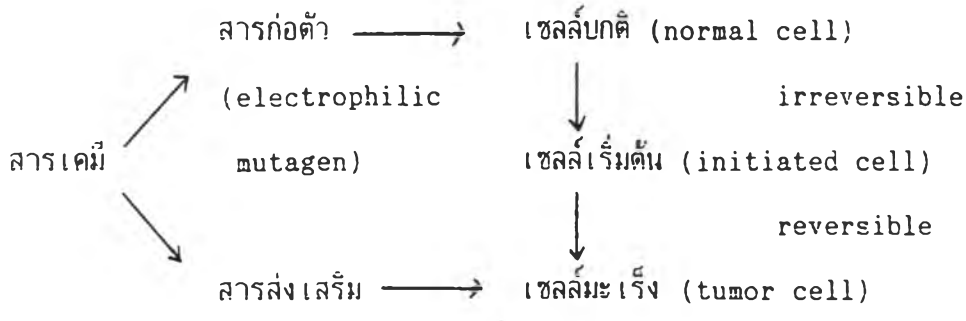
สารก่อตัวบางชนิดจำเป็นต้องมีการเปลี่ยนแปลงให้เป็นสารอื่นด้วยขบวนการ metabolism เสียก่อน ซึ่งจะมีฤทธิ์ก่อมะเร็งโดยรวมตัวกับโมเลกุลของดีเอ็นเอ ได้แก่ สารพวกอะโรมาติคไฮโดรคาร์บอน, N-nitrosamine, ethyl carbamate เป็นต้น อย่างไรก็ตามร่างกายมีกลไกการทำลายพิษโดยที่สารก่อตัวบางส่วนอาจทำปฏิกิริยาทางเคมีกับสารกลูตาไธโอน (glutathione) และกรดกลูโครูนิค(glucuronic acid) โดยขบวนการทางเคมีที่เรียกว่า "คอนจูเคชั่น" (conjugation) ผลิตผลที่ได้จะหมดความเป็นพิษ แล้วถูกขับออกมาร่วมกันทางน้ำดีและปัสสาวะ (พรงาม ลิ้มตระกูล, 2534)

ขั้นตอนที่ 2 กลไกการทำให้เกิดมะเร็งด้วยสารส่งเสริม

ขั้นตอนนี้เป็นขั้นตอนที่ใช้เวลานาน เซลล์เริ่มต้นต้องได้รับสารส่งเสริม (promotor) จำนวนหลายครั้งติดต่อกัน จนมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเนื้องอกชนิดไม่ร้ายแรง และชนิดร้ายแรงตามลำดับ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับระยะเวลาที่ได้รับสารส่งเสริมนั้น ขั้นตอนนี้เป็น reversible process

เราเรียกสารประเภทที่ก่อมะเร็งได้ด้วยตัวของสารนั้นเองว่าเป็น "สารก่อมะเร็งสมบูรณ์" (complete carcinogen) ส่วนสารก่อมะเร็งใดที่มีคุณสมบัติเป็นเฉพาะสารก่อตัวเท่านั้น จำเป็นต้องพึ่งพาสารส่งเสริมช่วยในการก่อมะเร็ง เรียกสารกลุ่มนี้ว่า "สารก่อมะเร็งที่ไม่สมบูรณ์" (incomplete carcinogen) ตัวอย่างของสารก่อมะเร็งที่ไม่สมบูรณ์ได้แก่ urethane เป็นต้น (พรงาม ลิ้มตระกูล, 2534)

แผนผังแสดงการเกิดมะเร็งโดยสารก่อตัว (initiator) และสารส่งเสริม (promotor) ตามขั้นตอนของทฤษฎีสองขั้นตอน



อาหารและโรคมะเร็ง

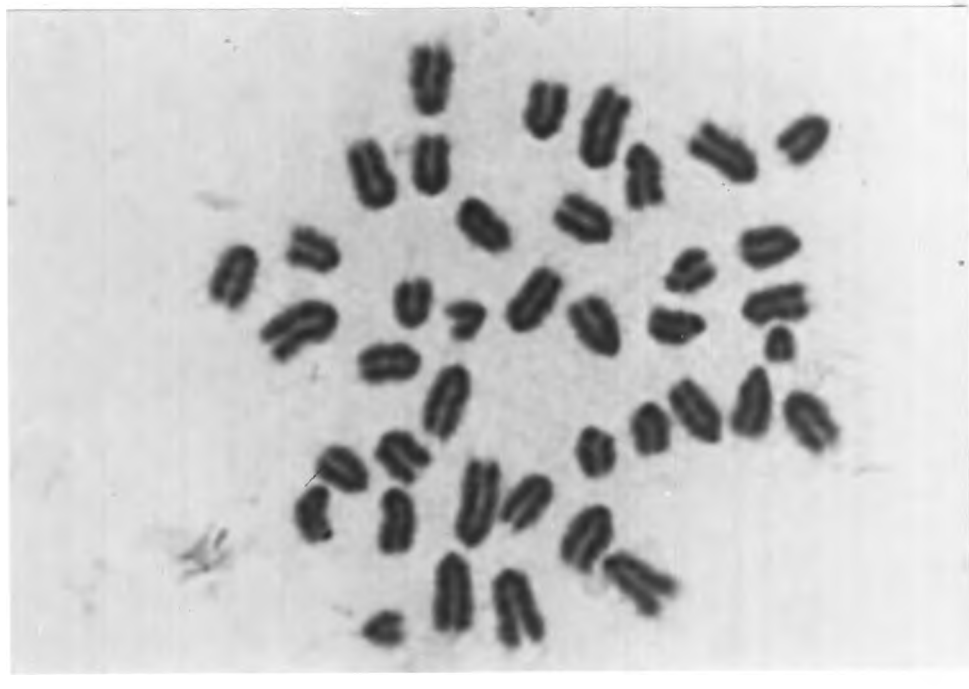
จากการวิจัยค้นคว้า พบว่าโรคมะเร็งเป็นโรคที่ควบคุมได้ โดยการลดหรือหลีกเลี่ยงปัจจัยสำคัญจากสิ่งแวดล้อมที่เป็นสาเหตุส่วนใหญ่ของการเกิด โรคมะเร็ง มีอาหารหลายชนิดที่พบว่ามีความสัมพันธ์กับการเกิดมะเร็ง

ผลของอาหารบางชนิดต่อการเกิดมะเร็ง

ชนิดของมะเร็ง	ชนิดของอาหาร
มะเร็งเต้านม	อาหารที่มีไขมันสูง
มะเร็งกระเพาะอาหาร	อาหารที่มี nitrosamine บนเปื้อน, อาหารหมักดอง
มะเร็งลำไส้ใหญ่	อาหารที่มีกากใยน้อย, อาหารที่มีไขมันสูง
มะเร็งตับ	อาหารที่บนเปื้อนด้วย Aflatoxin B_1
มะเร็งตับอ่อน	อาหารที่มีไขมันสูง
มะเร็งกระเพาะปัสสาวะ	อาหารที่ผสมสี
มะเร็งหลอดอาหาร	อาหารหมักดอง เหล้า กาแฟ

2.6 Mouse Chromosomes

ประกอบด้วยโครโมโซมทั้งหมด 40 ตัว (diploid number = 40) ลักษณะของโครโมโซมทุกตัวเป็น telocentric (โครโมโซมที่มีจุดเซนโตรเมียอยู่ตรงปลาย) (Schnedl W.,1971) การทำ banding techinc โดยใช้การย้อมด้วย quinacrine mustard หรือ quinacrine dihydrochloride แล้วดูด้วย fluorescence microscope หรือการใช้ denaturating and renaturating technic แล้วย้อมด้วยสี Giemsa ทำให้เห็น band บนตัวโครโมโซม สามารถช่วยในการตรวจหา โครโมโซมหนูเมาซ์ได้ ซึ่งการย้อมด้วยวิธีธรรมดาที่ใช้สี Giemsa หรือสี Orcein ไม่สามารถช่วยในการ identify ได้มาก autosome คู่ที่เล็กที่สุดและสามารถแยกได้จากโครโมโซมคู่อื่นคือโครโมโซมคู่ที่19 โครโมโซมคู่ที่19มีขนาดใกล้เคียงกับ Y Chromosome (V.G Dev et. al,1971) จากการศึกษาใน mouse tissue culture บางครั้งพบว่ามี การ fusion ของโครโมโซม 2 ตัว ลักษณะจึงดูคล้าย metacentric chromosome ทั้งนี้เนื่องจากมี protein association (Mary Lou Pardue, 1969) และจากการทำ banding technic โดยการย้อมด้วย quinacrine mustard พบว่า ทั้ง X และY chromosome เป็นโครโมโซมที่ให้สีแสงเรืองเข้มทั้งคู่ โดยเฉพาะที่บริเวณ centromeric ของ Y chromosome จะให้แสงเรืองเข้ม มากกว่าที่ distal part นอกจากนี้Jones (1970) พบว่าที่บริเวณ centromere ของโครโมโซมหนูเมาซ์จะย้อมติดสีเข้มเมื่อใช้ denaturating and renaturating technic แล้วย้อมด้วยสี Giemsa และบริเวณนี้มี repetitive DNA sequences เมื่อเปรียบเทียบปริมาณของ gene ที่อยู่ที่ X chomosome ของหนูเมาซ์กับ Drosophila พบว่าน้อยกว่า 5% ของ gene ทั้งหมดของหนูเมาซ์อยู่ที่ X chomosome ในขณะที่มากกว่า 20% ของ gene ทั้งหมดใน Drosophila พบที่ X chromosome ดังนั้นการเกิด mutation ที่ X chromosome ของหนูเมาซ์จึงไม่ค่อยสำคัญมากนัก (Fishbein et.al, 1970)



รูปที่ 4 แสดง mouse chromosomes ย้อมด้วย Giemsa X100

2.7 Sister Chromatid Exchange (SCE)

sister chromatids คือโครมาติดของโครโมโซมตัวเดียวกัน

sister chromatid exchange (SCE) คือการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกัน

sister chromatid exchange technic คือเทคนิคของการทดสอบสารมิวตาเจน (mutagen) และสาร คลาสโตเจน (clastogen ; สารทำลายโครโมโซมให้แตกหักเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ) โดยศึกษาจากการแลกเปลี่ยนดี-เอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกัน ซึ่งการแลกเปลี่ยนนี้เกิดจากการแตกหักของดีเอ็นเอแล้วเชื่อมต่อกันใหม่ (DNA breakage and reunion) ในช่วงระหว่าง DNA replication (Schvartzman et.al, 1979)

sister chromatid exchange (SCE) นี้ พบเป็นครั้งแรกโดย Taylor et.al ในปี 1959 โดย Taylor และคณะทำการศึกษาในต้นถั่วปากอ้า (Vicia faba) ในการศึกษานั้น Taylor ใช้ tritiated thymidine labelling และ autoradiography technic ซึ่งยังไม่ประสบความสำเร็จเท่าที่ควร ต่อมา Perry and Wolff (1974) ได้ปรับปรุงเทคนิคให้เห็นการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันชัดเจนขึ้น โดยใช้ Fluorescence plus Giemsa technic (FPG technic) (Peter E.Crossen et.al, 1977)

วิธีการศึกษา SCE

ทำโดยให้เซลล์แบ่งตัว ใน medium ที่มี 5 - bromodeoxyuridine (5 BrdU) สองรอบการแบ่งตัว เนื่องจาก 5 BrdU มีโครงสร้างของอณูคล้ายกับ thymine มาก เมื่อเกิด DNA replication จะเข้าไปอยู่ในสายดีเอ็นเอที่สร้างใหม่แทนที่ตำแหน่งของ thymine เมื่อย้อมพิเศษด้วย Hoechst 33258 และดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง สายดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่มี 5 BrdU อยู่ทั้ง 2 สายจะเรืองแสง

เมื่อถ่ายภาพขาวดำจะเห็นเป็นเส้นสีจาง และสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ที่มี 5-BrdU อยู่สายเดียวจะไม่เรืองแสง และเห็นเป็นเส้นสีดำทึบในภาพถ่ายขาวดำ จะเห็นว่าวิธีการศึกษา SCE คือวิธีการทำให้ sister chromatids แลดงลักษณะแตกต่างกันเพื่อให้เห็นการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดได้ วิธีศึกษา SCE ยังมีอีกหลายวิธี เช่นวิธี autoradiography และวิธีใช้ base analogue ชนิดอื่นที่ย้อม ติดสีพิเศษอย่างอื่นแตกต่างออกไป (ศุภฤกษ์ รุ่งเจิดพ้า, 2525)

วิธีการศึกษา SCE ทำได้ 2 แบบ คือ

1. In vivo SCE analysis

ใช้ศึกษาผลของสารต่างๆ เช่น drug,สารก่อมะเร็ง,สาร clastogen ที่มีต่อสารพันธุ์กรรมในสัตว์ทดลอง โดยสารที่ใช้ศึกษานี้ต้องอาศัยกลไกการกระตุ้น (metabolic activation) ในสัตว์ทดลองให้ได้สารที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อโครโมโซม การศึกษา SCE ในสัตว์ทดลองนี้ศึกษาได้ทั้งในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น หนู และสัตว์ที่ไม่เลี้ยงลูกด้วยนม เช่น Drosophila melanogaster (Gatti et.al,1979),Neanthes arenaceodentata ซึ่งเป็น หนอนทะเล

ในการทำ in vivo SCE analyse นี้ ต้องคำนึงถึง route of exposure, metabolic reactivity, the blood testis barrier, individual tissue metabolic, DNA-repair capabilities สัตว์ทดลองที่นิยมนำมาใช้ทดลองคือหนูmouse และตัวอย่างที่นิยมนำมาใช้ศึกษาคือ spermatogonia,bone marrow, spleen and thymus, fetal tissue, lung macrophage (Latt et.al, 1981)

สารที่นำมาทดลองสามารถให้แก่สัตว์โดยทางปาก, ทางช่องท้อง (intraperitoneal injection),สูดดม (inhalation),ฉีดเข้าเส้นเลือด และมีสารเคมีหลายชนิดที่มีการนำมาทดสอบด้วยพิษ ด้วยวิธี in vivo SCE analysis ได้แก่ Aflatoxin B_1, adriamycin, mitomycin c, cyclophosphamide,daunomycin ฯลฯ (Latt et.al,1981,Bauknecht et.al,1977)

2. In vitro SCE analysis

ใช้ศึกษาผลของสารต่างๆ ที่มีต่อสารพันธุกรรม เช่น สารก่อมะเร็ง ได้โดยตรงในหลอดทดลอง เซลล์ที่นำมาใช้ศึกษาได้แก่ Chinese hamster ovary (CHO) cell, human peripheral lymphocyte, mouse lymphoma cell, เซลล์ของ plants, insects, birds, fish, fibroblast cell, amniotic fluid cell ฯลฯ cell line ที่เหมาะในการทำ in vitro SCE analysis คือ Chinese hamster ovary cell

สิ่งที่ต้องคำนึงถึงในการทำ in vitro SCE analysis คือ

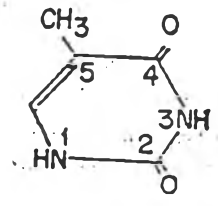
1 ปริมาณของ 5 BrdU ที่ใส่ลงในแต่ละหลอดต้องมีปริมาณแน่นอน เพราะถ้ามีปริมาณของ 5 BrdU มากเกินไปจะทำให้เซลล์ตาย

2 medium ที่ใช้ไม่ควรมี thymidine อยู่

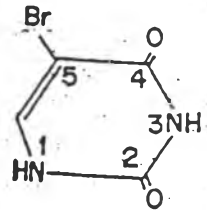
3 ต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ให้ cell expose ต่อสารที่ต้องการทดสอบอย่างน้อยที่สุด ต้องผ่านระยะ G_o และ S phase ใน cell cycle นอกจากนี้ต้องคำนึงถึงระยะเวลาที่ใช้ harvest ด้วย โดยต้องเลือกระยะเวลาในการ harvest ที่ทำให้ได้ optimal percentage of second devision metaphase

4 หลอดทดลองต้องหุ้ม aluminium foil บ้องกันไม่ให้ถูกแสง (Latt et.al, 1981)

I 17704594

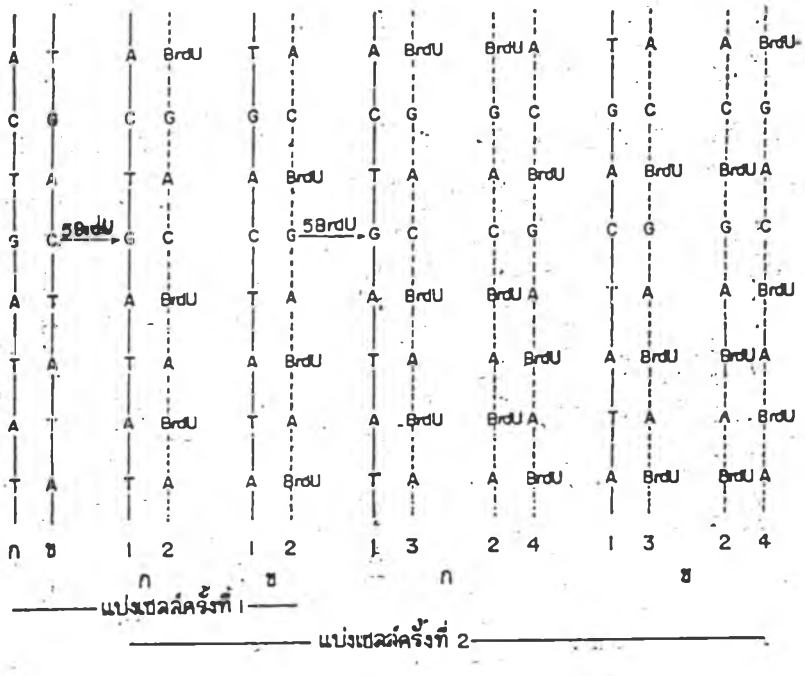


Thymine



5- bromodeoxyuridine (5 BrdU)

รูปที่ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ thymine และ 5-Bromodeoxyuridine (5 BrdU)



รูปที่ 6 แสดงการเกิด SCE ของเซลล์ที่เลี้ยงใน media ที่มี 5 BrdU เป็นช่วงเวลา 2 รอบของการแบ่ง cell สายดีเอ็นเอเกลียวคู่ ก$_{1, 3}$ และ ข$_{1, 3}$ มี 5 BrdU อยู่สายเดียว ส่วนสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ ก$_{2, 4}$ และ ข$_{2, 4}$ มี 5 BrdU อยู่ทั้งสองสาย

กลไกการเกิด SCE

กลไกการเกิด SCE ที่แท้จริงในปัจจุบันนี้นั้นยังไม่ทราบแน่นอน (Latt et.al, 1981) แต่จากงานวิจัยที่ค้นคว้ามาพอสรุปได้ว่า

1 การเกิด SCE จะเกิดบนสายดีเอ็นเอเกลียวคู่ และเกิดขณะที่มี DNA replication (Perry and Wolff, 1974)

2 SCE เกิดเมื่อมี DNA ถูกทำลายด้วยสารเคมีบางชนิด เช่น สารก่อมะเร็ง, รังสี ทำให้เกิดการแตกหักของ DNA แล้วเชื่อมต่อกันใหม่ในช่วงระยะ S Phase ใน DNA replication (Sheila et. al, 1977)

โอกาสของการเกิด SCE

1 โครโมโซมขนาดใหญ่มีโอกาสเกิด SCE ได้มากกว่าโครโมโซมขนาดเล็ก เช่น ในคนพบ SCE บนโครโมโซมขนาดใหญ่ (กลุ่ม A และ B) บ่อยกว่าบนโครโมโซมขนาดเล็ก (กลุ่ม E, F, G) (Peter E. Crossen,1977)

2 สามารถพบ SCE ได้ทั้งบริเวณที่เป็น euchromatic segment และ heterochromatic segment บนโครโมโซม (Joe. J. Hoo et.al, 1979) และรอยต่อระหว่าง euchromatic segment และ heterochromatic segment

ชนิดของ SCE

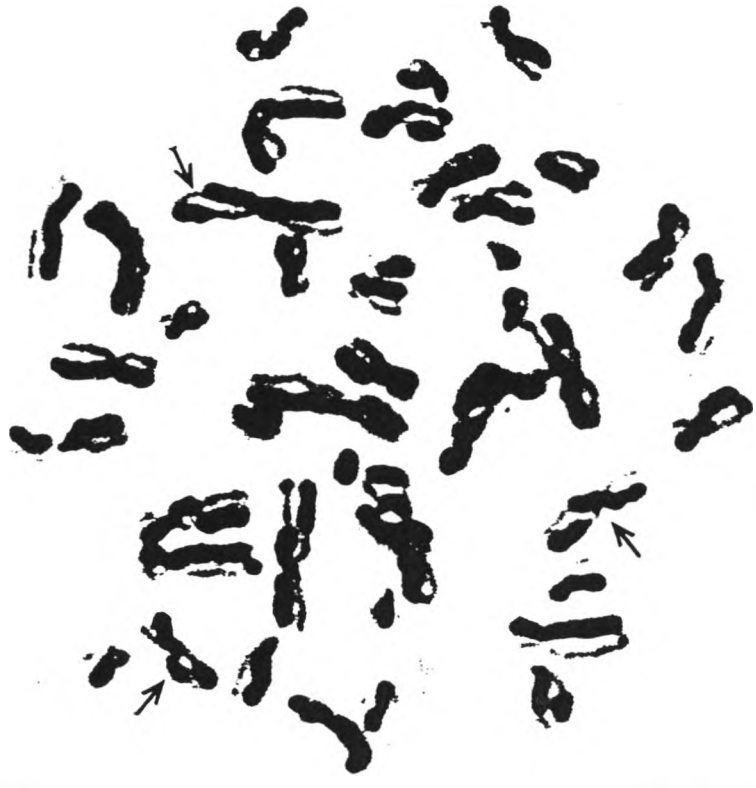
SCE แบ่งเป็น 2 ชนิด คือ

1. SCE ที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous SCE)

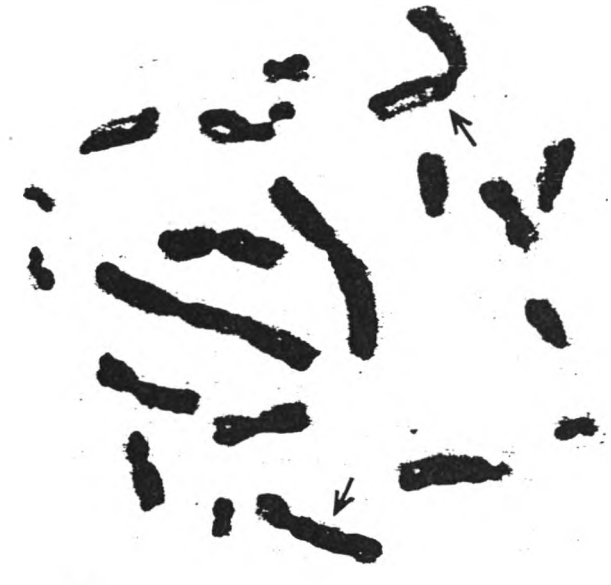
2. SCE ที่เกิดจากการกระตุ้น (induced SCE) SCE ที่เกิดจากการกระตุ้น เกิดโดยการเลี้ยงเซลล์ในสารก่อการกลาย (mutagen) แล้วจึงนำมาศึกษา SCE สารก่อการกลายที่นิยมนำมากระตุ้นให้เกิด SCE ได้แก่ methyl methane sulfonate (MMS), dimethlbenz (a)-anthrazene (DMBA), mitomycin c, maleic hydrazine, cyclophosphamide, nitrogen mustard, ethyl alcohol เป็นต้น รังสี x-ray, UV ก็ทำให้เกิด SCE ได้

SCE ที่เกิดจากการกระตุ้นจะเกิดขึ้นบนแท่งโครมาติดบริเวณเดียวกันกับ SCE ที่เกิดขึ้นเอง และการกระตุ้นด้วยสารก่อการกลาย (mutagen) นอกจากจะก่อให้เกิด SCE แล้วยังก่อให้เกิดการแตกหักของโครโมโซม (chromosome break, chromosome gap) ด้วย (ศุภฤกษ์ รุ่งเจิดฟ้า, 2525)

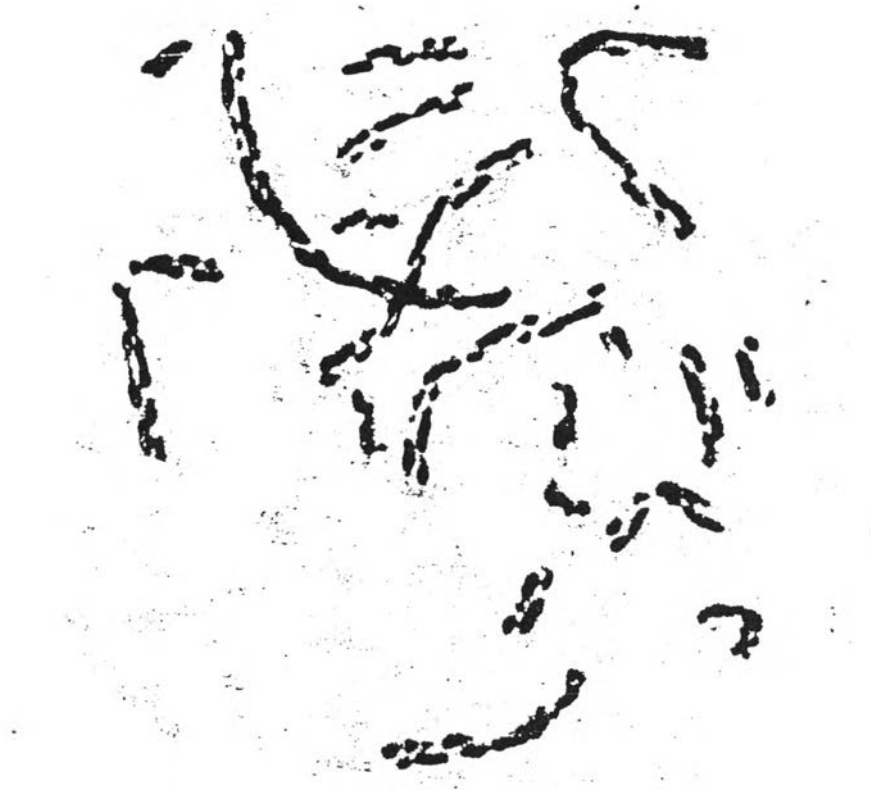
รูปที่ 7 แสดงการเกิด SCE ใน human chromosomes ที่เลี้ยงใน media ซึ่งมีสาร 5 BrdU ลูกศรชี้ = โครโมโซมที่เกิด SCE X100



รูปที่ 8 แสดงการเกิด SCE ใน human chromosomes ที่ถูกกระตุ้นด้วย nitrogen mustard (ความเข้มข้น 3 x 10^{-6}M) X100
ลูกศรชี้ = โครโมโซมที่เกิด SCE



รูปที่ 9 แสดงการเกิด SCE ใน Chinese hamster ovary chromosomes ที่ถูกกระตุ้นด้วย mitomycin c (ความเข้มข้น 3 x 10^{-6}M) X100
ลูกศรชี้ = โครโมโซมที่เกิด SCE



<u>รูปที่ 10</u> แสดงการเกิด multiple SCE ใน Chinese hamster ovary chromosomes ที่ถูกกระตุ้นด้วย 8-methoxypsorale (ความเข้มข้น 6 X 10^{-6}M) X100

ความสำคัญของการตรวจหา SCE

เนื่องจาก SCE เกิดจากการสับเปลี่ยนที่อยู่ (rearrangement) ของ DNA ระหว่าง sister chromatids การเกิด SCE ในอัตราที่สูงกว่าปกติ จึงเป็นดัชนีบ่งชี้ chromosomal injury แสดงว่าในกรณีนั้นโครโมโซมได้เกิดการสับเปลี่ยนที่อยู่ของ DNA ระหว่าง sister chromatids ในอัตราที่สูงกว่าปกติซึ่งบ่งชี้ว่าเซลล์ที่เรากำลังตรวจอาจไวต่อภยันอันตรายที่กระตุ้นให้เกิด SCE หรืออาจบ่งชี้ว่าเซลล์ที่เรากำลังตรวจได้เผชิญกับสารก่อมะเร็งมาก่อน แสดงถึงสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยใน เซลล์ปกติที่ไม่ได้เผชิญกับสารก่อมะเร็งมาก่อน จะเห็นโครโมโซมที่มีโครมาติดข้างหนึ่งเป็นเส้นสีจางอีกข้างหนึ่งเป็นสีดำ แต่ถ้าเซลล์นั้นได้เผชิญกับสารก่อมะเร็งมาก่อน จะเห็นโครมาติดทั้งสองข้างติดสีจาง และสีดำกระจายมากน้อยต่างกันบนตัวโครโมโซม(ศุภฤกษ์ รุ่งเจิดฟ้า, 2525) การวัดความถี่ของSCE ต่อจำนวนเซลล์(SCE/CELL) และ เปรียบเทียบค่าที่วัดได้ระหว่างสัตว์หรือเซลล์ทดลอง กับสัตว์หรือเซลล์ควบคุม จึงสามารถใช้เป็นการตรวจระยะแรกเพื่อหาสารก่อการกลาย และสารก่อมะเร็ง (screening assays for mutagen and carcinogens)ในคนและสัตว์ได้ (ไมตรี สุทธจิตต์, 2534) นอกจากนี้ SCE technic โดยเฉพาะ in vivo SCE analysis ยังใช้เป็น follow - up test ทดสอบสารพิษที่ให้ผลบวกใน Ames test ได้ด้วย (Latt et.al, 1981)

ประโยชน์ของ SCE

1 สามารถ นำ SCE ไปช่วยในการวินิจฉัย ว่าสารชนิดใดชนิดหนึ่ง มีคุณสมบัติเป็นสารก่อมะเร็งหรือไม่ และบอกให้ทราบว่าเซลล์ที่กำลังเผชิญกับสภาวะแวดล้อมที่เป็นพิษต่อสารพันธุกรรมนั้น ได้รับสารพิษดังกล่าวในระดับที่เป็นอันตรายหรือไม่

2 สามารถนำไปใช้ศึกษาในคนไข้ที่ได้รับสารพิษ หรือรังสี เช่น x-rays, ultraviolet ซึ่งในคนไข้เหล่านี้มักมีอัตราการเกิด SCE สูงกว่าคนปกติ

3 ใช้ในการวินิจฉัยคนไข้ที่เป็นโรค Bloom syndrome ซึ่งมีอัตราการเกิด SCE สูง (Thompson, 1980)

4 สามารถนำไปประยุกต์ในงานวิจัยเกี่ยวกับโรค Down syndrome และโรคลิ่วคีเมีย (Irene et. al, 1985)

5 สามารถนำเทคนิค SCE นี้ไปใช้ใน chorionic villi sampling เพื่อใช้เป็น prenatal diagnosis ศึกษาเกี่ยวกับ response ของ fetal tissue ต่อ mutagens ได้ (Lee et.al, 1991)