



ไนเตรทก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนแบบซีสเตอร์โครมาตในโครโมโซมของหนูเมาส์

นาง มาลีณี พงศ์เลวี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษิตตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-760-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

NITRATE INDUCES SISTER CHROMATID EXCHANGE IN MOUSE CHROMOSOME

MRS. MALINEE PONGSAVEE

A Thesis submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

For the Degree of Master of Science

Department of Medical Science

Graduate School

Chulalongkorn University

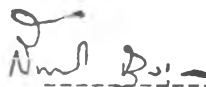
1994

ISBN 974-584-760-7



หัวข้อวิทยานิพนธ์ โนโคเรทก้อให้เกิดการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติด
ในโครโมโซมของหนูเมาส์
โดย นางมาลินี พงศ์เสวี
ภาควิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ชัชวาล พรหมชัยนันท์

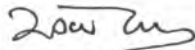
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้
เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต



คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย


(รองศาสตราจารย์ดร. นันท์ บุญสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์



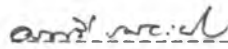
ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงบังอร ชมเดช)



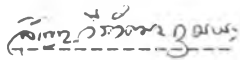
กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ชัชวาล พรหมชัยนันท์)



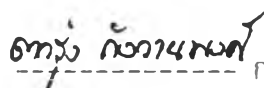
กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงอรศรี รมยะนันท์)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา วิจารณ์เกษมพะ)



กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวรุ่ง กิ่งวานพงศ์)



มาลินี พงศ์เสวี : ไนเตรทก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดในโครโม-
โซมของหนูเม้าส์ (NITRATE INDUCES SISTER CHROMATID EXCHANGE IN
MOUSE CHROMOSOME) อ.ที่ปรึกษา : รศ.นสพ.ชินวาร์ พรหมชัยนันท์,
126 หน้า. ISBN 974-584-760-7

ไนเตรทเป็นสารกันบูดซึ่งนิยมใส่ลงในอาหารประเภทเนื้อสัตว์เพื่อถนอมการเจริญเติบโต
ของ เชื้อคลอสทริเดียม โบทูลินัม ไนเตรทหลังจากเข้าไปในร่างกายจะเกิดการเปลี่ยนแปลง โดย
อาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีในร่างกายได้เป็นสารไนโตรซามีน ไนโตรซามีนเป็นสารก่อมะเร็ง สารก่อ
มะเร็งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่เอ็นเอของโครโมโซมได้ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงทำ
การศึกษาผลของ ไนเตรทต่อการเกิดการแลกเปลี่ยนเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกัน
ใช้หนูเม้าส์เพศผู้น้ำหนัก 45-50 กรัม จำนวน 24 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม
ได้แก่กลุ่มที่ได้รับ ไนเตรททางปาก โดยใช้ท่อใส่กระเพาะอาหาร และกลุ่มที่ได้รับ ไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้า
ช่องท้อง แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มควบคุม, กลุ่มที่ได้รับ ไนเตรทปริมาณทั้งหมด
80, 160 และ 320 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หนูแต่ละกลุ่มย่อยเมื่อได้รับไนเตรทครบ 20 วัน
แล้วนำมาทำเทคนิคการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติด และศึกษาการเกิดการแลกเปลี่ยนเอ็นเอ
ระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันจากโครโมโซมของไฮดรอกซียูเรเชียภายใต้กล้องจุลทรรศน์
ธรรมดา พบว่ากลุ่มย่อยที่ได้รับไนเตรททางปากมีค่าเฉลี่ยความถี่ของการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์
โครมาติดที่เกิดขึ้นเท่ากับ $182 \pm 7.21, 187 \pm 6.00, 284 \pm 9.64, 587 \pm 18.68$ และค่าเฉลี่ยการ
แลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดต่อเซลล์เท่ากับ $3.64 \pm 0.14, 3.74 \pm 0.12, 5.66 \pm 0.17, 11.72 \pm 0.37$
ตามลำดับ ส่วนกลุ่มย่อยที่ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องมีค่าเฉลี่ยความถี่ของการแลกเปลี่ยน
แบบซิสเตอร์โครมาติดที่เกิดขึ้นเท่ากับ $184 \pm 2.00, 186 \pm 4.58, 226 \pm 8.89, 499 \pm 21.93$ และค่าเฉลี่ย
การแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดต่อเซลล์เท่ากับ $3.68 \pm 0.04, 3.71 \pm 0.08, 4.50 \pm 0.16,$
 9.96 ± 0.43 ตามลำดับ เมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณสูง (160 และ 320 มิลลิกรัม
ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) พบว่ากลุ่มที่ได้รับทางปากมีการเกิดการแลกเปลี่ยนเอ็นเอระหว่าง
โครมาติดของโครโมโซมเดียวกันมากกว่าวิธีฉีดเข้าช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$
จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่า ไนเตรทก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนเอ็นเอระหว่างโครมาติด
ของโครโมโซมเดียวกันในหนูเม้าส์ทั้ง 2 กลุ่มนอกจากนี้ยังพบมีการเกิดการแลกเปลี่ยนเอ็นเอระหว่าง
โครมาติดของโครโมโซมเดียวกันเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของไนเตรท

ภาควิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2537

ลายมือชื่อนิติต ภากรณ์ พงศ์เสวี
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาพร้อม

** C445031 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORD: NITRATE/POTASSIUM NITRATE/MOUSE CHROMOSOME/SISTER CHROMATID EXCHANGE(SCE)

MALINEE PONGSAVEE : NITRATE INDUCES SISTER CHROMATID EXCHANGE IN MOUSE CHROMOSOME. THESIS ADVISOR:

ASSO.PROF.CHINVORN PROMCHAINANT,D.V.M.,M.S 126 PP.

ISBN 974-584-760-7

Nitrate is the food preservative which added in the meat to prevent the growth of Clostridium botulinum. After nitrate is absorbed in the body, it changed to be the form of nitrosamine by metabolic activation of the body. Nitrosamine is the carcinogen. The carcinogen can change DNA in the chromosomes so the purpose of this study was to determine the effect of nitrate for inducing sister chromatid exchange (SCE). Twenty four adult male mice weighing 45-50 grams were divided into 2 groups by the difference routes of administration. The first group was treated nitrate orally by stomach tube, while the second group by intraperitoneal injection. Each group was divided into four subgroups: control, treated nitrate dose 80, 160 and 320 mg/kg.bw. After 20 days each mice subgroup was processed with sister chromatid exchange technic and observed chromosomes from mouse bone marrow under light microscope. The means SCE frequency of the oral subgroups were 182 ± 7.21 , 187 ± 6.00 , 284 ± 9.64 , 587 ± 18.68 points and the means SCE/CELL were 3.64 ± 0.14 , 3.74 ± 0.12 , 5.66 ± 0.17 , 11.72 ± 0.37 respectively. The means SCE frequency of the intraperitoneal injection subgroups were 184 ± 2.00 , 186 ± 4.58 , 226 ± 8.89 , 499 ± 21.93 points and the means SCE/CELL were 3.68 ± 0.04 , 3.71 ± 0.08 , 4.50 ± 0.16 , 9.96 ± 0.43 respectively. Comparing the groups which treated higher dose of nitrate (160 and 320 mg/kg.bw.), the mean SCE formation in oral group was higher than intraperitoneal injection group with statistically significant at $p < 0.01$ between the oral and intraperitoneal injection group. The result of this study may indicate that nitrate induces SCE in mouse chromosome of the both groups. In addition the SCE formation is increased by the raising doses of nitrate.

ภาควิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์

สาขาวิชา..... วิทยาศาสตร์การแพทย์

ปีการศึกษา..... 2537

ลายมือชื่อนิสิต..... ภาควิชา วิทยาศาสตร์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... 

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของ
รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์
และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงอรศรี รมยะนันท์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์
ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด ผู้เขียนขอ
กราบขอบพระคุณมา ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงบังอร ชมเดช, ผู้ช่วย
ศาสตราจารย์แพทย์หญิงอรศรี รมยะนันท์, รองศาสตราจารย์ดร.สุกัญญา วีระวิมล กุมพะ ,
รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวรุ่ง กังวานพงศ์ ที่ได้ร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์
และ ได้เสนอแนะทางแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณวิชุน สอาดสุด, คุณบังอร ฉางทรัพย์ ที่ได้ช่วยเหลือการทำ
วิจัยและให้คำแนะนำต่างๆ ของการวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัย เสมอมา
จนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	๗
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	๘
กิตติกรรมประกาศ.....	๙
สารบัญตาราง.....	๑๑
สารบัญรูป.....	๑๑
คำอธิบายคำย่อ.....	๑๓
บทที่	
1 บทนำ.....	1
2 วารสารปริทัศน์.....	7
2.1 ไนเตรท.....	7
2.2 ไนโตรซามีน.....	10
2.3 ความเป็นพิษของ ไนเตรท, ไนไตรท์ และ ไนโตรซามีน.....	13
2.4 ความเป็นพิษเชิงชีวเคมีของสารพิษ.....	19
2.5 การเกิดมะเร็งจากสารเคมี.....	26
2.6 Mouse Chromosomes.....	30
2.7 Sister Chromatid Exchange (SCE).....	32
3 วิธีทำการทดลอง.....	42
3.1 วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง.....	42
3.2 วิธีการทดลอง.....	44
3.3 การรวบรวมข้อมูล.....	51
3.4 การวิเคราะห์ข้อมูล.....	51

4	ผลการทดลอง.....	52
5	อภิปรายผลการทดลอง.....	94
	สรุปและข้อเสนอแนะ.....	112
	รายการอ้างอิง.....	113
	ภาคผนวก ก.....	123
	ภาคผนวก ข.....	125
	ประวัติผู้เขียน.....	126

สารบัญตาราง, แผนภูมิ

ตารางที่	หน้า
1. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE และค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก.....	54
2. แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก.....	57
3. แสดงค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก.....	61
4. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE และค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วยวิธี ฉีดเข้าช่องท้อง.....	70
5. แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....	73
6. แสดงค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....	77
7. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE และค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์ เดียวกันในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....	85

ตารางที่

หน้า

8. แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....88
9. แสดงค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากันแต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....91

1	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....	55
2	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่ง ในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....	56
3.	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นใน แต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....	58
4	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่ม ได้รับไนเตรททางปาก.....	62
5	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE ใน แต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....	71
6	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่ง ในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....	72
7	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นใน แต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....	74
8	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่ม ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....	78
9	เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE ในแต่ละ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....	86

แผนภูมิที่

หน้า

- 10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....87
- 11 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นใน แต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากันแต่ต่างตรงวิธีที่ได้รับ.....89
- 12 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรท ปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....92

สารบัญรูป

รูปที่	หน้า
1	แสดงวิถีทางที่สารพิษเข้าสู่ร่างกาย และอวัยวะสำคัญ.....20
2	แสดงกลไกการแทนที่เบสในดีเอ็นเอ (base-pair substitution mutation).....23
3	แสดงกลไกการเคลื่อนที่ของรหัสพันธุกรรม (frame-shift mutation).....24
4	แสดง mouse chromosomes ย้อมด้วย Giemsa x100.....31
5	แสดงโครงสร้างทางเคมีของ thymine และ 5-Bromodeoxy uridine (5 BrdU).....35
6	แสดงการเกิด SCE ของเซลล์ที่เลี้ยงใน media ที่มี 5 BrdU เป็นช่วงเวลา 2 รอบของการแบ่งเซลล์.....35
7	แสดงการเกิด SCE ใน human chromosomes ที่เลี้ยงใน media ซึ่งมีสาร 5 BrdU x100.....37
8	แสดงการเกิด SCE ใน human chromosomes ที่ถูกกระตุ้นด้วย nitrogen mustard x100.....38
9	แสดงการเกิด SCE ใน Chinese hamster ovary chromosomes ที่ถูกกระตุ้นด้วย mitomycin c X100.....38
10	แสดงการเกิด multiple SCE ใน Chinese hamster ovary chromosomes ที่ถูกกระตุ้นด้วย 8-methoxypsoralen x100.....39
11	แสดงวิธีให้หนูเมาส์กินด้วย stomach tube.....46
12	แสดงวิธีฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) หนูเมาส์.....46

รูปที่	หน้า
13	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มควบคุม ที่ได้รับไนเตรททางปาก $\times 100$64
14	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก ปริมาณ 80 mg/kg.bw $\times 100$65
15	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก ปริมาณ 160 mg/kg.bw $\times 100$66
16	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก ปริมาณ 320 mg/kg.bw $\times 100$67
17	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มควบคุมที่ได้รับ ไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง $\times 100$80
18	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วย วิธีฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 80 mg/kg.bw $\times 100$81
19	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วย วิธีฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 160 mg/kg.bw $\times 100$82
20	แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเม้าส์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วย วิธีฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 320 mg/kg.bw $\times 100$83



อธิบายคำย่อ

๐ช	=	องคาเซลเซียส
มก./กก.	=	มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม
cyclic GMP	=	guanosine 3,5 -cyclic monophosphate
DNA	=	Deoxyribonucleic acid
g	=	gram
g/L	=	gram per litre
mg	=	milligram
ml	=	millilitre
mg/kg.bw	=	milligram per kilogram body weight (มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม)
NADP ⁺	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (oxidized form)
NADPH	=	nicotinamide adenine dinucleotide phosphate (reduced form)
SCE	=	sister chromatid exchange
μg	=	microgram