ไนเตรทก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนแบบซีสเตอร์โครมาติดในโครโมโซมของหนูเมาส์

นาง มาลินี พงศ์เลวี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
ภาควิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
พ.ศ. 2537

ISBN 974-584-760-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I17204598

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	ไนเตรทก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนแบบซีสเตอร์ไครมาติดในไครโมโซมของหนูเมาซ์
โดย	นางมาลินี พงศ์เสวี
ภาควิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันท์

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

---------- คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์ดร. สันติ ถุงสุวรรณ)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

---------- ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงบังอร ชมเดช)

---------- กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันท์)

---------- กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงอรศรี รมยะนันทน์)

---------- กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ)

---------- กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ดาวรุ่ง กังวานพงศ์)

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

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

ไนเตรทเป็นสารกันบูดซึ่งนิยมใส่ลงในอาหารประเภทเนื้อสัตว์เพื่อกันการเจริญเติบโตของเชื้อคลอสตริเดียม โบทูลินัม ไนเตรทหลังจากเข้าไปในร่างกายจะเกิดการเปลี่ยนแปลงโดยอาศัยปฏิกิริยาชีวเคมีในร่างกายได้เป็นสารไนโตรซามีน ไนโตรซามีนเป็นสารก่อมะเร็ง สารก่อมะเร็งสามารถทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่ดีเอ็นเอของโครโมโซมได้ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้จึงทำการศึกษาผลของไนเตรทต่อการเกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกัน ใช้หนูเมาซ์เพศผู้น้ำหนัก 45-50 กรัม จำนวน 24 ตัว โดยแบ่งกลุ่มการทดลองออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่กลุ่มได้รับไนเตรททางปาก โดยใช้ท่อใส่กระเพาะอาหาร และกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง แต่ละกลุ่มแบ่งออกเป็น 4 กลุ่มย่อยคือ กลุ่มควบคุม,กลุ่มได้รับไนเตรทปริมาณทั้งหมด 80,160 และ320 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม หนูแต่ละกลุ่มย่อยเมื่อได้รับไนเตรทครบ20วัน แล้วนำมาทำเทคนิคการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติด และศึกษาการเกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันจากโครโมโซมของไขกระดูกหนูเมาซ์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่ากลุ่มย่อยที่ได้รับไนเตรททางปากมีค่าเฉลี่ยความถี่ของการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดที่เกิดขึ้นเท่ากับ 182±7.21,187±6.00,284±9.64,587±18.68ที่ และค่าเฉลี่ยการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดต่อเซลล์เท่ากับ3.64±0.14,3.74±0.12,5.66±0.17,11.72±0.37 ตามลำดับ ส่วนกลุ่มย่อยที่ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้องมีค่าเฉลี่ยความถี่ของการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดที่เกิดขึ้นเท่ากับ184±2.00,186±4.58,226±8.89,499±21.93ที่และค่าเฉลี่ยการแลกเปลี่ยนแบบซิสเตอร์โครมาติดต่อเซลล์เท่ากับ 3.68±0.04,3.71±0.08,4.50±0.16, 9.96±0.43 ตามลำดับเมื่อเทียบระหว่างกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณสูง (160และ320 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม) พบว่ากลุ่มที่ได้รับทางปากมีการเกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันมากกว่าวิธีฉีดเข้าช่องท้องอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.01$ จากผลการทดลองนี้อาจกล่าวได้ว่าไนเตรทก่อให้เกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันในหนูเมาซ์ทั้ง2กลุ่มนอกจากนี้ยังพบมีการเกิดการแลกเปลี่ยนดีเอ็นเอ ระหว่างโครมาติดของโครโมโซมเดียวกันเพิ่มมากขึ้นเมื่อเพิ่มปริมาณของไนเตรท

ภาควิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต มาลินี พงศ์เสวี

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

** 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 80,160and320 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.Compairing 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 ลายมือชื่อนิสิต มาลินี พงศ์สวี

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา

ปีการศึกษา 2537 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีของรองศาสตราจารย์นายสัตวแพทย์ชินวร พรหมชัยนันท์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงอรศรี รมยะนันทน์ หัวหน้าภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ซึ่งท่านได้ให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่าง ๆ ของการวิจัยมาด้วยดีตลอด ผู้เขียนขอกราบขอบพระคุณมา ณ. ที่นี้

ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์แพทย์หญิงบังอร ชมเดช, ผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิงอรศรี รมยะนันทน์,รองศาสตราจารย์ดร.สุกัญญา วีรวัฒนะกุมพะ, รองศาสตราจารย์ ดร.ดารุ่ง กังวานพงศ์ ที่ได้ร่วมเป็นกรรมการสอบวิทยานิพนธ์และได้เสนอแนวทางแก้ไขปรับปรุงให้วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ดียิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณวิษณุ สอาดสุด, คุณบังอร ฉางทรัพย์ ที่ได้ช่วยเหลือการทำวิจัยและให้คำแนะนำต่างๆ ของการวิจัย

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ ที่ให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....ฆ
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....ง
กิตติกรรมประกาศ.....จ
สารบัญตาราง.....ช
สารบัญรูป.....ฎ
คำอธิบายคำย่อ.....ฑ
บทที่
1 บทนำ.....1
2 วารสารปริทัศน์.....7
2.1 ไนเตรท.....7
2.2 ไนไตรซามีน.....10
2.3 ความเป็นพิษของไนเตรท, ไนไตรท์ และไนไตรซามีน....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

หน้า

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 ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....54

2. แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....57

3. แสดงค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....61

4. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE และค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธี ฉีดเข้าช่องท้อง.....70

5. แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....73

6. แสดงค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....77

7. แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE และค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosome เกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์ เดียวกันในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....85

ตารางที่ หน้า

8. แสดงค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นในแต่ละกลุ่ม ที่ได้รับไนเตรทบริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....88
9. แสดงค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทบริมาณ เท่ากันแต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....91

แผนภูมิที่ หน้า

1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรททางปาก.....55

2 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosomeเกิด 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 chromosomeเกิด SCE มากกว่า 1 ตำแหน่งในเซลล์เดียวกัน ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....72

7 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยความถี่ (frequency) ของ SCE ที่เกิดขึ้นใน แต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่มได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....74

8 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ย SCE/CELL ในแต่ละกลุ่มย่อยของกลุ่ม ได้รับไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง.....78

9 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่เกิด SCE ในแต่ ละกลุ่มที่ได้รับไนเตรทปริมาณเท่ากัน แต่ต่างกันตรงวิธีที่ได้รับ.....86

แผนภูมิที่ หน้า

10 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ ที่ metaphase chromosomeเกิด 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 แสดงวิธีให้หนูเมาซ์กินด้วย stomach tube.....46
12 แสดงวิธีฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal injection) หนูเมาซ์.....46

รูปที่ หน้า

13 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มควบคุม
ที่ได้รับไนเตรททางปาก x100.....64
14 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก
ปริมาณ 80 mg/kg.bw x100.....65
15 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก
ปริมาณ 160 mg/kg.bw x100.....66
16 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรททางปาก
ปริมาณ 320 mg/kg.bw x100.....67
17 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มควบคุมที่ได้รับ
ไนเตรทด้วยวิธีฉีดเข้าช่องท้อง x100.....80
18 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วย
วิธีฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 80 mg/kg.bw x100.....81
19 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วย
วิธีฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 160 mg/kg.bw x100.....82
20 แสดงการเกิด SCE ในโครโมโซมหนูเมาซ์ กลุ่มที่ได้รับไนเตรทด้วย
วิธีฉีดเข้าช่องท้องปริมาณ 320 mg/kg.bw x100.....83

อธิบายคำย่อ

^{0}ซ	=	องศาเซลเซียส
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 from)
SCE	=	sister chromatid exchange
μg	=	microgram