

พิษของโลหะหนักต่อสารพันธุกรรม—II สังกะสี

Genetotoxicity of Heavy Metals—II Zinc

พรรณนา ศักดิ์สูง และ อมรา คัมภีรานนท์¹

Panapa Saksoong and Amara Campiranon¹

ABSTRACT

The toxicity of zinc to genetic material of lymphocyte culture was reported in this article. It acted as clastogen and mitotic poison. In clastogenic effect, both chromatid gaps and breaks were noted with a high incidence at 0.03 mg/ml dosage. The mitotic poison effect, indicated by the reduction in nuclear division, was first detected also at 0.03 mg/ml and was extremely exhibited with the increment of zinc. Zinc should, therefore, be declared a dangerous element from which genetoxic effects could not be estimated provided that tests are conducted in other systems as well.

คำนำ

สังกะสีเป็นโลหะที่มีบทบาทสำคัญในชีวิตประจำวันของมนุษย์ เพราะพบใช้ในอุตสาหกรรมต่าง ๆ มากมาย เช่น การชุบโลหะ การทำบรอนซ์ สีทาบ้านสีขาว ยาง น้ำมันเคลือบผิวไม้ ภาชนะโลหะเคลือบ กระดาษ น้ำยารักษาคุณภาพของไม้ ใช้ในผลิตภัณฑ์เครื่องสำอางและยารักษาโรค เช่น ผสมในโลชั่นบำรุงผิวพวกเอสตรเจนท์ แชมพูกันรังแค และยารักษาโรคผิวหนัง ยาฆ่าเชื้อโรค ทางด้านเกษตรกรรมอาจใช้คลุกเมล็ดพืชพันธุ์เพื่อกันเชื้อราได้

การทำงานของเอ็นไซม์ในร่างกายของมนุษย์หลายชนิดต้องการสังกะสีอยู่ด้วย เช่น carbonic dehydrogenase glutamic dehydrogenase lactic dehydrogenase และ alkaline phosphatase (Valee, 1959) ถ้าขาดสังกะสีจะทำให้ไม่เจริญเติบโตตามปกติ ร่างกายแคระแกร็น และขาดการเจริญของอวัยวะเพศ (Halsted *et al.*, 1974) แพทย์จึงต้องสังกะสีในรูปของเมล็ดยาให้แก่คนไข้

ในธรรมชาติพบสังกะสีอยู่ร่วมกับแคดเมียมในสภาพของซัลไฟด์ พบในสิ่งแวดล้อมทั่ว ๆ ไป ในปริมาณต่าง ๆ กัน ในอาหารพบปริมาณสูงใน อาหารทะเล เนื้อสัตว์ ผลิตภัณฑ์นม เมล็ดธัญพืช และพืช

ตระกูลถั่วทั้งหลาย ดังนั้น ปริมาณของสังกะสีที่ร่างกายมนุษย์รับเข้าไปในวันหนึ่ง ๆ จึงค่อนข้างสูง แหล่งสะสมสังกะสีในร่างกาย ได้แก่ กล้ามเนื้อ ดับตับอ่อน และไต ที่น่าสนใจ คือ พบสังกะสีในปริมาณสูงที่ระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศผู้ในสิ่งมีชีวิตหลายชนิด เช่น พบใน epididymis prostate gland และลูกอัณฑะ ในเลือดพบสะสมในเม็ดเลือดแดง และกระดูกด้วย นอกจากนี้ยังพบว่าในน้ำนมอีกด้วย (Hammond and Beliles, 1980)

โดยเหตุที่หลายประเทศที่กำลังพัฒนาได้พยายามปรับภาวะเศรษฐกิจ โดยการผลักดันเปลี่ยนจากกสิกรรมมาเป็นอุตสาหกรรม เพื่อหวังปรับระดับภาวะการครองชีพของประชาชนและลดดุลการค้าตามแบบอย่างของประเทศศิวิไลซ์ทั้งหลาย โดยไม่ได้คำนึงถึงผลกระทบต่อสภาวะแวดล้อมที่ประชาชนอาศัยอยู่ ได้มีรายงานเกี่ยวกับพิษของโลหะหนักต่อชีวิตมนุษย์อยู่บ้าง ทั้งในประเทศและต่างประเทศ เช่น ตะกั่วปรอทและแคดเมียม (Hammond, 1971; Bakir *et al.*, 1976; Chowdhury and Louria, 1976) สำหรับผลต่อสารพันธุกรรมได้เริ่มมีรายงานเกี่ยวกับพิษของนิเกิล (Waksvik and Boysen, 1982) การศึกษาเกี่ยวกับพิษของสังกะสี

¹ ภาควิชาพันธุศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

ต่อโครโมโซมและการแบ่งเซลล์จึงเป็นสิ่งจำเป็น เพื่อทราบถึงการใช้ให้ถูกต้องและเกิดความระมัดระวังต่อไปในอนาคต

อุปกรณ์และวิธีการ

สังกะสีที่ใช้ในการทดลองอยู่ในรูปของเกลือกอลไรด์ โดยทดสอบกับเซลล์ลิมโฟไซต์ของคนปกติที่เลี้ยงนาน 72 ชั่วโมง ในอาหาร RPMI 1640 ซึ่งเติม Fetal calf serum และ phytohaemagglutinin ในความเข้มข้น (mg/ml) ต่าง ๆ กันดังนี้ 0.01, 0.02, 0.03, 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 และ 0.6 โดยแยกการทดลองเป็น 2 ส่วน คือ

1. การศึกษาเกี่ยวกับผลของสังกะสีต่อโครโมโซม ใช้ความเข้มข้นของเกลือกอลไรด์ของสังกะสีในปริมาณต่ำ คือ 0.01, 0.02, 0.03, 0.06 และ 0.1 ระยะเวลาที่เซลล์ expose กับสังกะสีเพียง 5 ชั่วโมง คือ เริ่มใส่สารละลายของสังกะสีแก่เซลล์ที่ชั่วโมงการเลี้ยงที่ 67 แล้วเติมสารละลายโคลชิซินความเข้มข้น 0.02 mg/ml ให้กับเซลล์นาน 45 นาที ก่อนถึงชั่วโมงการเลี้ยงที่ 72 จากนั้นทำการเก็บเซลล์

2. การศึกษาเกี่ยวกับผลของสังกะสีต่ออัตราการแบ่งเซลล์ ใช้ความเข้มข้นของเกลือกอลไรด์ของสังกะสีในปริมาณสูง 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.6 ระยะเวลาที่เซลล์ expose กับสังกะสีนาน 24 ชั่วโมง โดยเริ่มใส่สารละลายของสังกะสีแก่เซลล์เมื่อเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง พอครบ 72 ชั่วโมงก็ทำการเก็บเซลล์

วิธีการเก็บเซลล์ จะแช่เซลล์ในสารละลาย hypotonic solution (KCI) แล้วจึงตรึงเซลล์ด้วยสารละลายแอลกอฮอล์ : กรดอะซิติก ในอัตราส่วน 3 : 1

เซลล์ที่เก็บแล้วนำมากระจายบนแผ่นกระจกสไลด์โดยวิธี air dried technique จากนั้นจึงย้อมด้วยสี Giemsa

วิธีการนับความผิดปกติของโครโมโซมใช้ตามแบบของ Brogger (1982) เซลล์ที่ใช้จะต้องมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 48 และจำนวนเซลล์ที่ตรวจดูโครโมโซมต้องไม่น้อยกว่า

100 เซลล์ ยกเว้นในกรณีที่ไม้อาจหาเซลล์ที่มีการแบ่งมากกว่านี้ได้

ใช้ Mitotic index (MI) เป็นดัชนีชี้ผลของสังกะสีต่อการแบ่งเซลล์ โดยคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่ง ในจำนวน 1,000 เซลล์ที่ expose กับสังกะสีต่อจำนวนเซลล์ที่มีการแบ่งใน 1,000 เซลล์ของ control

ผล

1. พิษของสังกะสีต่อโครโมโซม

รูปแบบของความผิดปกติของโครโมโซมแสดงไว้ในตารางที่ 1 พบทั้งแบบ single chromatid gap, single chromatid break, isochromatid gap, isochromatid break, deletion และ fragment (ภาพที่ 1) แต่โดยมากเป็น single chromatid gap และ single chromatid break ปริมาณการหักของโครโมโซมที่ความเข้มข้นของสังกะสี .01 mg/ml ไม่แตกต่างจาก control เมื่อเปรียบเทียบกัน แต่ที่ความเข้มข้น 0.02 และ .03 mg/ml พบว่าเกิดการหักของโครโมโซมต่อเซลล์เพิ่มมากขึ้นเป็น 5 และ 15 เท่า ตามลำดับ และจำนวนเซลล์ที่พบว่ามีความผิดปกติก็เพิ่มมากขึ้นด้วย คือ เป็น 36.3 และ 76.0% ตามลำดับ ในบางครั้งมีปริมาณการหักมากขึ้นถึง 10 break ต่อเซลล์ (ภาพที่ 2) ความสัมพันธ์กันระหว่างความเข้มข้นของสังกะสีและปริมาณเซลล์ที่เกิดความผิดปกติได้แสดงไว้ในภาพที่ 3 ที่ความเข้มข้น 0.03 mg/ml ยังพบว่าปริมาณเซลล์ที่แบ่งตัวลดลงด้วยถึง 83% ($MI = 17.0\%$) และที่ความเข้มข้นของสังกะสีสูงกว่านี้ ไม่อาจตรวจการหักของโครโมโซมได้ เนื่องจากไม่พบเซลล์ที่มีการแบ่ง

2. พิษของสังกะสีต่ออัตราการแบ่งเซลล์

จากตารางที่ 1 อัตราการแบ่งตัวของเซลล์เริ่มลดลงที่ความเข้มข้น 0.03 mg/ml ในช่วงระยะความเข้มข้น 0.06–0.3 พบว่า ถึงแม้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงมากเป็น 0 แต่ยังพบเซลล์ที่มีลักษณะบวมอยู่บ้าง แสดงว่าอาจมีเซลล์มีการแบ่งอยู่บ้าง แต่มีในปริมาณ

ตารางที่ 1 แสดงผลของสังกะสีที่มีต่อโครโมโซมและอัตราการแบ่งเซลล์ของลิมโฟไซต์

Dose (mg/ml)	%MI*	Percentage of abnormal cells	Numbers of chromatid aberrations				Deletion	Fragment	Total breaks	Breaks/cell
			SCG ^a	SCB ^b	iSCG ^c	iSCB ^d				
Control	100	10.0(10/100)	9	1	2	—	—	—	12	0.12
0.01	99.94	12.0(12/100)	10	2	1	1	—	—	16	0.16
0.02	91.0	36.3(37/102)	12	7	15	3	5	2	62	0.61
0.03	17.0	76.0(57/75)	43	34	17	14	—	—	139	1.85
0.06	0	—	—	—	—	—	—	—	—	MIn ^e
0.1	0	—	—	—	—	—	—	—	—	MIn
0.2	0	—	—	—	—	—	—	—	—	MIn
0.3	0	—	—	—	—	—	—	—	—	MIn
0.4	0	—	—	—	—	—	—	—	—	CMIn ^f
0.5	0	—	—	—	—	—	—	—	—	CMIn
0.6	0	—	—	—	—	—	—	—	—	CMIn

หมายเหตุ: * = Mitotic index = $\frac{\text{mitoses per 1,000 cells of treated}}{\text{mitoses per 1,000 cells of control}} \times 100$

a = Single chromatid gap

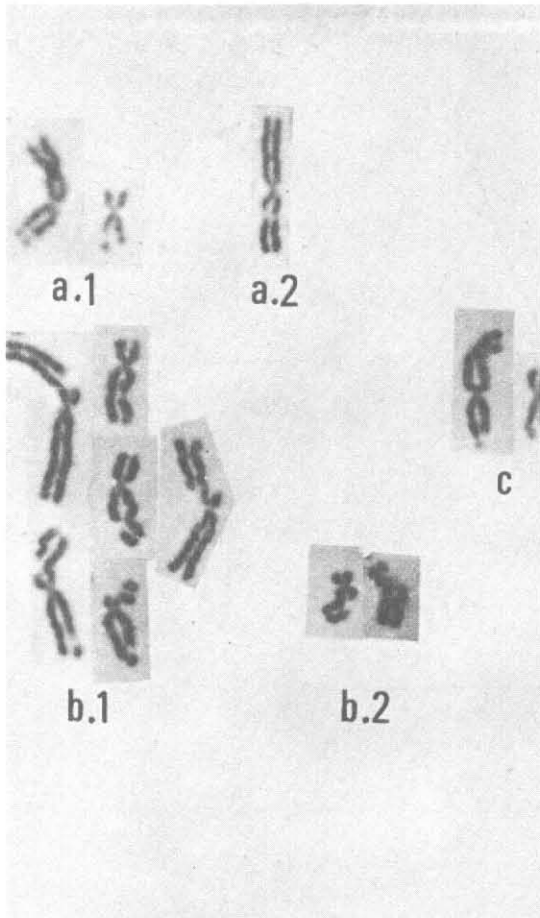
b = Single chromatid break

c = Isochromatid gap

d = Isochromatid break

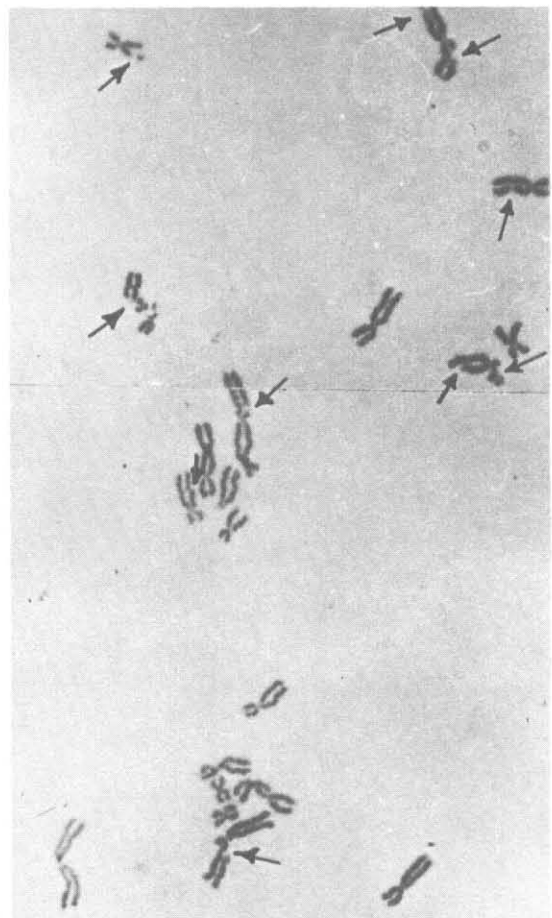
e = Mitotic inhibition

f = Complete Mitotic inhibition

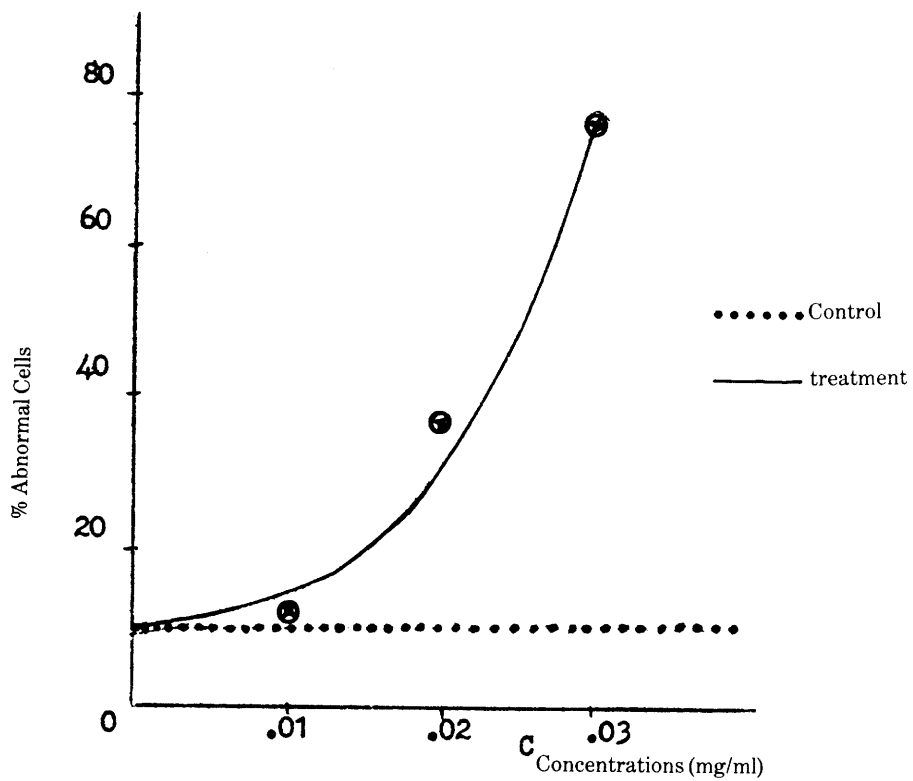


ภาพที่ 1 รูปแบบของความผิดปกติของโครโมโซมของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) เมื่อเหนี่ยวนำด้วยสังกะสี

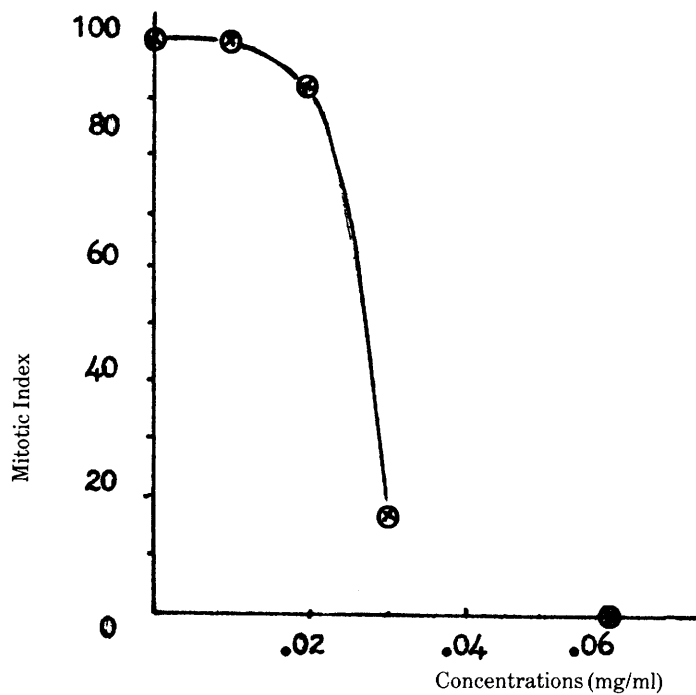
- a. chromatid gap
 - a.1 single chromatid gap
 - a.2 iso-chromatid gap
- b. chromatid break
 - b.1 single chromatid break
 - b.2 iso-chromatid break
- c. deletion



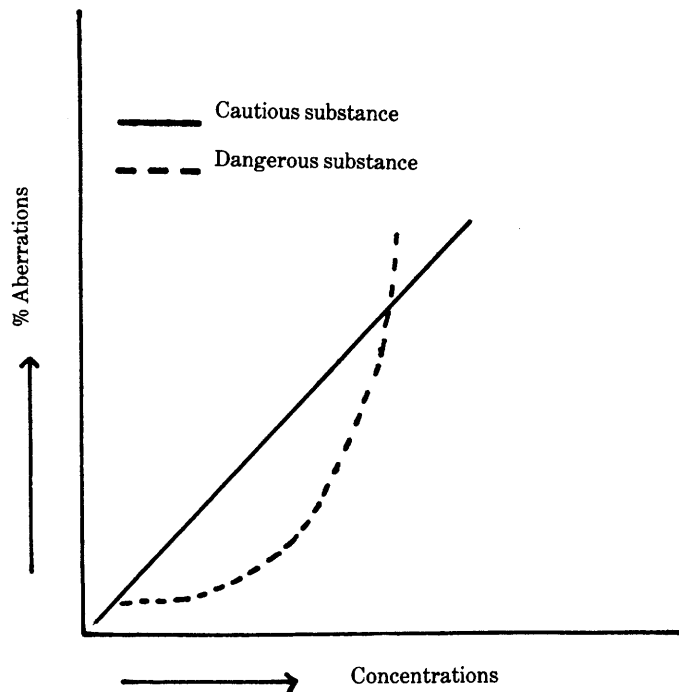
ภาพที่ 2 แสดงบางส่วน of โครโมโซมของเซลล์หนึ่งเซลล์ที่เกิดความผิดปกติอันเนื่องจากสังกะสีที่ความเข้มข้น 0.3 mg/ml (ถูกตรึง)



ภาพที่ 3 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสังกะสี (mg/ml) กับเปอร์เซ็นต์ของเซลล์ที่เกิดความผิดปกติ



ภาพที่ 4 ความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของสังกะสี (mg/ml) กับดัชนีการแบ่งเซลล์ (mitotic index)



ภาพที่ 5 ผลของสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม

น้อยมาก (Mitotic inhibition) แต่ที่ความเข้มข้น 0.4 mg/ml ขึ้นไป ไม่พบลักษณะของเซลล์ดังกล่าวข้างต้นเลย แสดงว่าไม่มีไมโทซิสเกิดขึ้น (complete mitotic inhibition)

ความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสังกะสี ต่ออัตราการแบ่งเซลล์แสดงในภาพที่ 4

สรุปและวิจารณ์

สารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติทาง cytogenetics นี้จำแนกออกได้เป็น 2 พวก คือ สารที่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซม (Clastogen) และสารที่ก่อให้เกิดความผิดปกติของการแบ่งเซลล์ (Mitotic poison) สารบางชนิดอาจก่อให้เกิดความผิดปกติเพียงอย่างใดอย่างหนึ่งหรือสองอย่างก็ได้ จากผลการทดลอง สังกะสีจึงจัดอยู่ในสารประเภทหลัง (Clastogen และ mitotic poison) สำหรับสารพิษนั้นแบ่งออกได้เป็น 2 อย่าง คือ สารที่ก่อให้เกิดอันตรายเมื่อใช้ (หรือมี) สารนั้นในปริมาณสูงขึ้นไป พิษของสารดังกล่าวนี้เป็นสิ่งที่มนุษย์อาจคาดการณ์ไว้ได้ล่วงหน้า

คือ ถ้าระวังไม่ใช้หรือไม่ให้สะสมสารมากเกินไป ก็จะปลอดภัยจากพิษของสารนั้น อาจเรียกสารเหล่านี้ว่า cautious substance ส่วนสารที่ก่อให้เกิดอันตรายอย่างเฉียบพลัน สารนี้ที่ dose หนึ่งนั้นยังไม่มีพิษมากนัก และเมื่อเพิ่ม dose มากขึ้นอีกนิดเดียวก็จะเกิด acute effect ทันที เรียกสารนี้ว่า dangerous substance (ภาพที่ 5) ดังเช่นกรณีของสังกะสี พบว่าในปริมาณต่ำ 0.01 mg/ml นั้นไม่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซมเลย แต่เมื่อเป็น 0.02 mg/ml และ 0.03 mg/ml ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซมสูงมากอย่างทันทีทันใด และจำนวนเซลล์ที่ผิดปกติก็เพิ่มมากขึ้นอย่างรวดเร็ว (ภาพที่ 3) พิษของสังกะสีไม่เพียงแต่ก่อให้เกิดการหักของโครโมโซมเท่านั้น ยังมีผลไปลดอัตราการแบ่งเซลล์อีกด้วย และลักษณะการยับยั้งการแบ่งเซลล์ก็เป็นไปอย่างเฉียบพลันเช่นกัน (ภาพที่ 4) สำหรับการลดลงของอัตราการแบ่งเซลล์อาจเนื่องมาจากความเสียหายที่เชื่อมุ่เซลล์อันเนื่องมาจากสังกะสี (กัญหาทรีย์และคณะ, 2525) เซลล์จึงไม่อาจแบ่งตัวได้ ผลการทดลองข้างต้นนี้แสดงให้เห็นถึงความ

จำเป็นในการระมัดระวังการใช้และทำลายสิ่งซึ่งสะสมได้ในร่างกาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งในระบบอวัยวะสืบพันธุ์ของเพศชาย เพื่อให้ระดับของสังกะสีในสถานะแวดล้อมให้อยู่ปริมาณต่ำ เนื่องจากไม่สามารถคะเนระดับของสังกะสีที่จะก่อให้เกิดอันตรายต่อสิ่งมีชีวิตและเผ่าพันธุ์ของสิ่งมีชีวิตในกายภาพหน้า วิธีป้องกันอีกทางหนึ่งก็คือ การจัดการเกี่ยวกับแหล่งที่อยู่อาศัยและเขตอุตสาหกรรมให้แยกออกจากกัน ซึ่งยังไม่ได้เข้มงวดกับการปฏิบัติมากนัก เป็นการลดช่วงระยะเวลาที่คนจะสัมผัสกับโลหะหนักเช่นสังกะสีลง อย่างไรก็ตาม การทดสอบความเป็นพิษของสารโดยระบบทางเซลล์พันธุศาสตร์โดยใช้ somatic cell นี้ แม้ว่าจะเป็นเครื่องบ่งชี้ได้อย่างหนึ่งถึงความ เป็นพิษของสาร ยังสมควรทดสอบในระบบการทดสอบอื่น ๆ ด้วย (Daoney, 1981)

เอกสารอ้างอิง

- กัณททริย์ ศรีพงศ์พันธุ์, พรพัฒน์ ปัทมะสังข์, สุชาติ อุปลัมภ์ และภิญโญ พานิชพันธ์. 2525. ผลกระทบของปรอทกลอไรด์และสังกะสี-ซัลเฟตต่อสาหร่ายสีเขียวเซลล์เดียวชนิด *Chlorella vulgaris* บทคัดย่อเสนอในที่ประชุมวิชาการเรื่องวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีเพื่อการพัฒนาประเทศ ครั้งที่ 8 2525
- Bakir, F., A. Al-khalidi, T.W. Clarkson, and R. Greenwood 1976. Clinical observations on treatment of alkylmercury poisoning in hospital patients : Conference on Intoxication due to Alkylmercury-treated seed. *Bull. W.H.O. (Suppl.)* 53 : 87-92.
- Brogger, A. 1982. The chromatid gap-a useful parameter in genotoxicology *Cytogenet. Cell Genet.* 33 : 14-19.
- Chowdhury, P. and D.B. Louria. 1976. Influence of cadmium and other trace metals on human α_1 -antitrypsin : an *in vitro* study. *Science.* 191 : 480-81.
- Dabney, B.J. 1981. The role of human genetic monitoring in the work place. *J. Occup. Med.* 23 : 626-631.
- Halsted, J.A., J.C. Smith, Jr. and M.I. Irwin. 1974. A conpectus of research on zinc requirements of man. *J. Nutr.* 104 : 345-78.
- Hammond, P.B. 1971. The effect of chelating agents on the tissue distribution and exertion of lead. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 18 : 296-310.
- Hammond, P.B. and H.P. Beliles. 1980. Metals. (In) *Toxicology* edited by J. Doull, D. Klassen, and M.O. Amdur. London : Macmillan Publishing Co., Inc.
- Valee, B.L. 1959. Biochemistry, physiology and pathology of zinc. *Physiol. Rev.* 39 : 443-90.
- Waksvik, H. and M. Boysen. 1982. Cytogenetic analyses of lymphocytes from nickel refinery workers. *Mutat. Res.* 103 : 185-190.