# ผลความเป็นพิษต่อเซลล์ และความเป็นพิษต่อยีนของครีมกำจัดขนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง

# Cytotoxicity and Genotoxicity Effect of Hair Removal Cream on Human Lymphocytes Culture

**นิภาพร คงเดช[1]และ ศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรม[1,2,3]***

**Nipaporn Kongdech[1]and Siriluck Iamtham[1,2,3]***

*[1]สาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140*

*[2]ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ กรุงเทพฯ 10900*

*[3]หน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อและเทคโนโลยีการผลิตพืชเศรษฐกิจ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม 73140*

*[1]Division of Genetics, Faculty of Liberal Arts and Science, Kasetsart University, KamphaengSaen Campus, NakhonPathom 73140, Thailand*

*[2]Center for Advanced Studies in Tropical Natural Resources, NRU-KU, Kasetsart University, Bangkok 10900, Thailand*

*[3]Research unit of Tissue Culture and Production Technology for Economic Plants, Faculty of Liberal Arts and Science ,Kasetsart University, KamphaengSaen campus, NakhonPathom 73140, Thailand*

**Corresponding author: faassli@ku.ac.th*

## บทคัดย่อ

จุดมุ่งหมายของการศึกษาครั้งนี้เพื่อศึกษาผลความเป็นพิษต่อระดับเซลล์ และความเป็นพิษต่อยีนของครีมกำจัดขนต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง โดยศึกษาจากตัวอย่างเลือดของคนที่มีสุขภาพดีจำนวน 3 คน โดยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวได้รับสารทดสอบความเข้มข้นที่แตกต่างกัน เป็นเวลา 12 ชั่วโมง ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ แล้วจึงตรวจสอบค่าอัตราการแบ่งเซลล์ และความผิดปกติของโครโมโซมในระยะเมทาเฟส จากการทดลองพบว่าสารละลายครีมกำจัดขนจะส่งผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mL มีผลไปยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงเท่ากับ 81.31, 71.49, 61.76 และ 45.52 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ สารละลายจากครีมกำจัดขนจะชักนำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลงเมื่อความเข้มข้นของครีมกำจัดขนเพิ่มขึ้น นอกจากนี้ยังพบความผิดปกติของโครโมโซม 5 แบบคือ singlechromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks, isochromatid breaks และ dicentric chromosome และยังพบความผิดปกติของโครโมโซมแบบเกาะกลุ่ม ไม่คงรูป และหดสั้น จากผลการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารละลายของครีมกำจัดขนจะแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ และยีนของโครโมโซมเซลล์เม็ดเลือดขาวในมนุษย์ และการทดลองในทุกทรีตเมนต์มีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม

## ABSTRACT

The present study aims to investigate the possible cytotoxicity and genotoxicity effects of hair removal cream on human lymphocytes. Human peripheral blood cultured from the three healthy volunteers were exposed to the hair removal cream solution at different concentrations, then harvested after 12 hrs. subjection. The mitotic index and chromosome aberrations in metaphase cells were used to examine for the alteration in the lymphocytes. The results showed that hair removal cream solution at 0.01, 0.025, 0.05 and 0.075 g/mL

found to react as mitotic poison by reducing mitotic division to 81.31, 71.49, 61.76 and 45.52% respectively.The hair removal cream solution-induced decrease in the mitotic index depend on the increasing of the hair removal cream concentrations. The result also indicated the presence of 5 types ofchromosome aberrations.These included single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks, isochromatid break and dicentric chromosome. The sticky, unstable and short chromosome, were also found in the treatment. These are the indications of both cytotoxicity and genotoxicity of hair removal cream solution on human lymphocytes culture *in vitro*. All the parameters obtained from the experiment were statistically significant when compared to that of controls.

**คำสำคัญ**: ครีมกำจัดขน; ความเป็นพิษระดับเซลล์; โครโมโซมผิดปกติ

**Keywords:** hair removal cream; cytotoxicity; chromosome aberrations

## บทนำ

ปัจจุบันมีการใช้เครื่องสำอางหลายประเภททั้งในสตรีและบุรุษ เพื่อใช้เสริมสร้างรูปร่าง หน้าตา ผิวพรรณให้เกลี้ยงเกลาของผู้ใช้เพื่อให้บุคลิกภาพดีขึ้น มีผลต่อการใช้ชีวิตในสังคมและเป็นที่ดึงดูดเพศตรงข้าม เครื่องสำอางเหล่านี้ส่วนใหญ่มีสารเคมีเป็นส่วนประกอบ แต่บางผลิตภัณฑ์มีทางเลือกให้ผู้ใช้โดยใช้สารที่มาจากธรรมชาติแทนซึ่งเชื่อว่าน่าจะมีความปลอดภัยมากกว่า สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยาของสหรัฐ (FDA) ได้ให้คำจำกัดความของเครื่องสำอางคือสิ่งที่ใช้กับร่างกายมนุษย์ เพื่อทำให้เกิดความสะอาด ความสวยงาม หรือเสริมสร้างเสน่ห์ดึงดูด หรือการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยไม่มีผลต่อโครงสร้างและหน้าที่ของร่างกาย ในการทดลองนี้สนใจทดสอบยากำจัดขนที่เป็นที่นิยมใช้กันมากในปัจจุบันนอกจากผู้หญิงที่จะดูแลเรื่องความสวยความงามผู้ชายบางกลุ่มก็ให้ความสนใจที่จะดูแลใบหน้าให้เกลี้ยงเกลา จึงเกิดการกำจัดขนในบริเวณต่างๆ ซึ่งการกำจัดขนมีด้วยกันหลายวิธี เช่น การโกน การถอน การใช้สารเคมีและการจี้ด้วยไฟฟ้า เป็นต้น ยากำจัดขน มีส่วนประกอบของสารเคมีที่ใช้ในการกำจัดขนจากผิวหนังทั่วร่างกาย ซึ่งส่วนใหญ่ประกอบด้วย calcium thioglycolate หรือ potassium thioglycolate ซึ่งสารเหล่านี้จะไปสลายพันธะไดซัลไฟด์ในเคราตินและผลจาก osmotic pressure จะทำให้เส้นขนบวมและหลุดออกจากผิวหนัง โดยนิยมใช้ร่วมกับสารอื่น เช่น สารลดแรงตึงผิว สารยึดเกาะ สารปรับสภาวะให้เป็นด่าง และสารที่ทำให้แกนผมพองตัว เป็นต้น (สุวิดา และคณะ, 2555) ปฏิกิริยาการสลายนี้เป็นผลมาจาก calcium hydroxide หรือpotassium hydroxide ปฏิกิริยาการรวมตัวของ calcium hydroxide หรือ potassium hydroxide และ thioglycolic acid กลายเป็น calcium thioglycolate (CaTG) หรือ potassium thioglycolate (KTG) ตามลำดับ calcium hydroxide หรือ potassium hydroxide มีปริมาณมากเกินพอที่จะทำให้ thioglycolic acid ไปทำปฏิกิริยากับกรดอะมิโน cysteine ที่เป็นองค์ประกอบอยู่ในโครงสร้างโปรตีนของผม ทำให้ขนอ่อนตัวและขาดร่วงได้ง่าย พื้นผิวร่างกายอุดมไปด้วยเคราติน อาจทำให้ผิวหนังได้รับการระคายเคืองหรือบอบบางต่อปฏิกิริยาเคมีเหล่านี้ถ้าทิ้งไว้นานเกินไปยากำจัดขนส่วนใหญ่ใช้บริเวณแขน หรือขา ไม่ควรใช้กำจัดขนบนผิวหน้าเนื่องจากมีความบอบบาง ยากำจัดขนมีได้หลายรูปแบบ เช่นเป็นเจล ครีม โลชัน ลูกกลิ้งหรือแป้งและมีรายงานว่า สารเคมีที่เป็นด่างและเป็นพิษบางอย่างที่พบในผลิตภัณฑ์ที่ใช้กำจัดขนที่มีหน้าที่สลายเคราตินและเส้นขนสามารถทำให้เกิดอาการบวม เป็นผื่นแดง ก่อให้เกิดการแพ้ในผู้ที่มีผิวหนังบอบบาง และผู้ผลิตต้องคำนึงถึงปริมาณสารเป็นพิษเหล่านั้นในผลิตภัณฑ์กำจัดขนโดยต้องไม่เกินมาตรฐานที่องค์การอนามัยโลก (WHO) กำหนด ซึ่งถ้ามีปริมาณสารพิษต่างๆ มากเกินไปหรือใช้เป็นเวลานานอาจก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนัง หรือความผิดปกติของฮอร์โมนได้ (Ui-Ain and Bukhari, 2013)

เนื่องจากยากำจัดขนเป็นสารเคมีที่ต้องสัมผัสกับตัวผู้ใช้โดยตรง พบว่าทำให้เกิดการระคายเคืองต่อผิวหนัง เกิดผื่นแดง ในผู้ใช้บางคนเนื่องจากสารมีฤทธิ์เป็นด่างแต่ยังไม่มีการทดสอบความเป็นพิษของครีมกำจัดขนดังกล่าวดังนั้นจึงมีความสนใจที่จะประเมินความ

เป็นพิษต่อเซลล์จากการพิจารณาค่าอัตราการแบ่งเซลล์และความเป็นพิษต่อยีนโดยพิจารณาจากความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆของยากำจัดขนโดยรวมว่าจะมีผลต่อมนุษย์โดยการทดสอบในการเลี้ยงเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในสารทดสอบที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ เพื่อศึกษาอัตราการแบ่งเซลล์และตรวจสอบความผิดปกติรูปแบบต่างๆ ของโครโมโซม ในการทดลองจะทำการทดสอบโดยใช้เลือดจากอาสาสมัครซึ่งมีสุขภาพดีไม่ดื่มแอลกอฮอล์และปลอดบุหรี่ มาเลี้ยงเซลล์และใส่สารทดสอบ ซึ่งสารทดสอบในที่นี้จะใช้ยากำจัดขน ซึ่งผลการทดลองที่ได้จะทราบข้อมูลในการตรวจสอบความเป็นพิษในระดับเซลล์ของยากำจัดขน ซึ่งจะมีประโยชน์ต่อผู้บริโภคโดยการใช้ยากำจัดขนในปริมาณที่ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษและตระหนักถึงผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการใช้ยาชนิดนี้

## อุปกรณ์และวิธีการ

### การทดลองเบื้องต้น เพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความเป็นพิษของครีมกำจัดขน

เป็นการทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาระดับความเข้มข้นของครีมกำจัดขนที่เหมาะสมต่อการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยงโดยการเตรียมสารละลายครีมโดยใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย จนได้ความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mL โดยดูดสารละลาย 100 µL ลงในตัวอย่างเลือดที่เลี้ยงในอาหารเพาะเลี้ยงก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 12 และ 24 ชั่วโมง แล้วนับเซลล์ทั้งหมด 2000 เซลล์ วิเคราะห์เปรียบเทียบหาค่า Mitotic index เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว

### การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และโครโมโซมของครีมกำจัดขน

#### *การเตรียมเลือด*

เจ้าหน้าที่ชำนาญการดูดเลือดจากเส้นเลือดดำบริเวณท้องแขนของอาสาสมัครที่มีสุขภาพดีทั้งเพศหญิงและชายจำนวน 3 คน ประมาณ 5 มิลลิลิตรใส่ลงในหลอดฉีดยาที่มีสารเฮปาริน (heparin) โดยจะใช้สารเฮปาริน (heparin) 50 I.U. ต่อเลือด 1 มิลลิลิตร เพื่อป้องกันไม่ให้เลือดเกิดการแข็งตัว หมุนหลอดเบา ๆ เพื่อให้เลือดกับเฮปารินเข้ากันและในการทดลองครั้งนี้แบ่งออกเป็นหลายกลุ่มทดสอบ ดังนั้นจึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือดปริมาณน้อย (whole blood microculture) ซึ่งจะทำการเลี้ยงโดยใช้เลือดที่ดูดออกมาทั้งหมดต่างจากวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือดปริมาณมาก (whole blood macroculture) จะต้องทำให้เลือดเกิดการแยกชั้นระหว่างเม็ดขาวและเม็ดเลือดแดง ดูดเฉพาะเซลล์ของเม็ดเลือดขาวที่มีลักษณะเป็นน้ำใสมาทำการเพาะเลี้ยงซึ่งจะต้องใช้เลือดปริมาณมาก เพื่อให้ได้เม็ดเลือดขาวเพียงพอต่อการทดสอบ ดังนั้นการทดลองจะใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเลือดปริมาณน้อย ที่มีความเหมาะสมมากกว่า

#### *การเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว*

เตรียมขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ทำการปลอดเชื้อแล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ (complete media) ปริมาตร 5 มิลลิลิตร ซึ่งประกอบไปด้วย RPMI medium 1640 with L- glutamine 80 เปอร์เซ็นต์และ fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นจึงใส่เลือด 0.2 มิลลิลิตร (ประมาณ 10 หยด) ใส่ phytohemagglutinin – m (PHA) 100 ไมโครลิตร เพื่อกระตุ้นให้เกิดการแบ่งเซลล์ของเม็ดเลือดขาว ปิดขวดเขย่าเบา ๆ แล้วนำเก็บไว้ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ37องศาเซลเซียส ในระหว่างการเพาะเลี้ยงควรเขย่าขวดเลี้ยงเซลล์อย่างน้อยวันละสองครั้งเพื่อเพิ่มปริมาณเมทาเฟสให้มากขึ้น

เมื่อครบชั่วโมงที่ 48 หรือ 60 (ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 24 หรือ12 ชั่วโมง ตามลำดับ) หยดสารที่ใช้ทำการทดสอบที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 กรัมต่อมิลลิลิตร ขวดละ 100 ไมโครลิตร ลงในกลุ่มทดลอง หยดน้ำกลั่น 100 ไมโครลิตร ลงในขวด (negative control) แทนสารทดสอบ และหยดไมโตมัยซิน-ซี ที่ความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงในขวด (positive control) เพื่อให้สารเคมีสัมผัสกับเซลล์เพาะเลี้ยงนาน 24 หรือ12 ชั่วโมง ก่อนที่จะทำการเก็บเกี่ยวเซลล์

เมื่อครบชั่วโมงที่ 71 ทำการหยดสารโคลซิมิด (colcemid) ขวดละ100ไมโครลิตรลงในขวดเลี้ยงเซลล์ โดย colcemid จะช่วยยับยั้งการสร้าง spindle fiber ของเซลล์ ทำให้เซลล์ที่แบ่งไมโทซิสจะหยุดอยู่ในระยะเมทาเฟส (อมรา, 2540) ทุกขั้นตอนจะทำโดยวิธีปลอดเชื้อ

***การเก็บเกี่ยวเซลล์***

เมื่อเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวครบ 72 ชั่วโมง ทำการเก็บเกี่ยวเซลล์ โดยนำขวด ที่ทำการเลี้ยงเซลล์แล้วเทในหลอดตกตะกอน นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา10 นาที เซลล์จะแยกออกจากอาหารเพาะเลี้ยง

การปั่นเหวี่ยง เซลล์จะตกลงมาที่ก้นหลอด ดูดเอาน้ำใสตอนบนทิ้งโดยให้เหลือประมาณ 1 มิลลิลิตร เขย่าหลอดเบา ๆ โดยใช้เครื่องเขย่า (vortex) เพื่อให้ตะกอนกระจายตัวไม่จับเป็นก้อน เติมสารละลาย hanks' balanced salt solution (HBSS) ประมาณ 5 มิลลิลิตร ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดเอาน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง เติมสารละลาย hanks' balanced salt solution (HBSS) ประมาณ 5 มิลลิลิตรอีกครั้ง ปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำตอนบนทิ้งอีกครั้ง

เติมสารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ความเข้มข้น 0.075 โมลาร์ ลงไป 5 มิลลิลิตร นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที โดยสารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์จะทำให้เซลล์มีสภาวะเป็น hypotonic solution จะช่วยทำให้เซลล์เกิดการพองตัวและโครโมโซมภายในเซลล์จะกระจายออก แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว1200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา10 นาที เพื่อแยกสารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ทิ้ง จากนั้นดูดน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งไป เติมสารละลายโปแทสเซียมคลอไรด์ลงไป 5 มิลลิลิตร อีกครั้ง นำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อวินาที เป็นเวลา 1 นาทีจากนั้นดูดน้ำส่วนใสตอนบนทิ้ง

ขั้นตอนนี้จะเป็นการคงสภาพเซลล์ จะต้องทำอย่างระมัดระวังโดยเขย่าหลอดเบา ๆ บนเครื่องเขย่า (vortex) แล้วหยดน้ำยาคงสภาพเซลล์ (fixative) ซึ่งประกอบไปด้วยเมทานอล (methanol) 3 ส่วน และกรดอะซิติก (acetic acid) 1 ส่วน ลงในหลอดทดลอง 1 หยด ตั้งหลอดค้างไว้บนเครื่องเขย่า (vortex) เติมน้ำยาคงสภาพลงในหลอดจนมีสารละลายประมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยความเร็ว 1200 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที ดูดน้ำส่วนใสตอนบนทิ้งทำเช่นเดิมอีกประมาณ 2-3 ครั้งจนได้ตะกอนสีขาวที่สะอาด คือเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ต้องการศึกษา

***การเตรียมสไลด์เพื่อศึกษาโครโมโซม***

นำสไลด์ไปแช่กรดอะซิติก 1-2 คืนเพื่อทำการขจัดคราบโปรตีน และสิ่งสกปรกออกจากสไลด์ จากนั้นล้างกรดอะซิติกออกด้วยน้ำสะอาด นำสไลด์แช่ในเมทานอลความเข้มข้น 70-90 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 1 คืน

การหยดเซลล์ ทำการดูดน้ำยาคงสภาพจากหลอดให้เหลือประมาณ 0.5 มิลลิลิตร แล้วเติมน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัดลงไปประมาณ 0.5 มิลลิลิตร ใช้พาสเจอร์ปิเปต (Pasteur pipette) เป่าลมในหลอดเพื่อให้เซลล์ที่ก้นหลอดเกิดการกระจายตัวขึ้นมาจากนั้นจึงดูดเซลล์หยดบนสไลด์ที่เตรียมไว้ 1 หยด และน้ำยาคงสภาพที่เตรียมใหม่และเย็นจัด 1-2 หยด เพื่อทำให้เซลล์เกิดการกระจายตัวได้เร็วขึ้น ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง (air dry technique)

***การย้อมสีโครโมโซม***

นำสไลด์ที่หยดเซลล์ และแห้งแล้วไปย้อมสีโครโมโซม โดยใช้สีกิมซ่า (Giemsa) ความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์ ใน phosphate buffered saline pH 6.8 ประมาณ 10 -15 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดโดยปล่อยให้น้ำผ่านเบาๆ ตั้งทิ้งไว้ให้แห้ง

***การตรวจสอบ mitotic index***

นำสไลด์ตัวอย่างที่ทำการย้อมสีแล้ว ไปศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์ โดยตรวจนับเซลล์ไม่น้อยกว่า 2000 เซลล์ ในแต่ละซ้ำของการทดลอง ยกเว้นกรณีที่ไม่อาจหาเซลล์ที่กำลังแบ่งไปมากกว่านี้ได้ และบันทึกความผิดปกติของโครโมโซม เปรียบเทียบลักษณะโครงสร้างของโครโมโซมในกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม เซลล์ที่นับควรมีจำนวนโครโมโซมไม่น้อยกว่า 45 และไม่เกิน 48 โครโมโซม

วัดค่าอัตราการแบ่งตัวของเซลล์ไมโทซิส (Mitotic Index; MI) (Bulla *et al*.,2014) จากการสุ่มตรวจดูเซลล์เม็ดเลือดขาว คิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของจำนวนเมทาเฟสใน 2000 เซลล์ของแต่ละกลุ่มทดลองต่อจำนวนเซลล์เมทาเฟสในจำนวน 2000 เซลล์ของกลุ่มควบคุมดังนี้

Mitotic Index (%) = (A/B) x 100

เมื่อ A = จำนวนเซลล์ในระยะเมทาเฟสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2000 เซลล์ในกลุ่มทดลอง

B = จำนานเซลล์ในระยะเมทาเพสจากเซลล์เม็ดเลือดขาว 2000 เซลล์ในกลุ่มควบคุม

***การตรวจสอบความผิดปกติของโครโมโซม***

ศึกษาจากโครโมโซมในระยะเมทาเฟสที่มีโครโมโซมกระจายตัวดีและแต่ละเซลล์มีจำนวนโครโมโซม 46 แท่ง ถ้ามีจำนวนขาดหรือเกินจะอยู่ในจำนวน 46 ± 1 แท่ง แล้วทำการศึกษาผลที่มีต่อโครโมโซมด้วยวิธีการนับจำนวนหัก (break หรือ b) ของโครโมโซม (Khalandar and Vasudev, 2015) จากเซลล์ระยะเมทาเฟสจำนวน 50 เซลล์ จดบันทึกการหัก และนับจำนวนการหักตามชนิดการหักดังนี้

Single chromatid gap (SG) ความผิดปกติจากการมีช่องว่างเกิดขึ้นในโครมาติด(chromatid) แท่งใดแท่งหนึ่งแต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาทิดยังอยู่ในแนวเดียวกัน อาจเป็นเพราะว่ามีเส้นใยโครมาติน (chromatin) ยึดให้เห็นเป็นบางส่วน ให้นับเป็น 1 หักต่อ 1 SG

Isochromatid gap (ISCG) เป็นความผิดปกติที่เกิดจากการมีช่องว่างขึ้นในส่วนของโครมาติดทั้งสองแท่งของโครโมโซมเดียวกัน แต่ไม่ถึงกับขาดออกจากกัน และแนวปลายหักทั้งสองของโครมาติดยังอยู่ในแนวเดียวกัน ทั้งนี้อาจเป็นเพราะยังมีเส้นใยโครมาตินยึดให้เห็นบาง ๆ การนับจำนวนการหักจะนับเป็น 2 หักต่อ 1ISCG

Single chromatid breaks (SB) เป็นความผิดปกติที่มีโครมาติดแท่งหนึ่งเกิดการหัก หรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิง และแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การนับจำนวนหักจะนับจำนวนหักเป็น 1 หัก ต่อ 1 SB

Isochromatid breaks (ISCB) เป็นความผิดปกติที่จะมีโครมาติดทั้งสองแท่งเกิดการหัก หรือขาดออกจากกันโดยสิ้นเชิงและแนวของปลายที่หักไม่อยู่ในแนวเดียวกัน การนับจำนวนหักจะนับจำนวนที่หักเป็น 2 หัก ต่อ 1 ISCB

Translocation เป็นความผิดปกติที่มีการหักและต่อสลับของโครโมโซมต่างคู่กัน นับจำนวนหักเป็น 4 หักต่อ 1 translocation

Deletion คือการที่มีเนื้อโครโมโซมขาดหายไปจากแขนข้างใดข้างหนึ่งซึ่งจะนับเป็น 1 หักต่อ 1 deletion

การคำนวณการหักต่อเซลล์ (break per cell หรือ b/c) จะนับจำนวนการหักทั้งหมดทำการคำนวณหาค่าเฉลี่ยต่อเซลล์ในแต่ละกลุ่มที่ศึกษา และนำเสนอโดยค่าเฉลี่ยที่ได้จากการศึกษาในทั้งสามซ้ำโดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

**การวิเคราะห์ผลทางสถิติ**

การทดลองครั้งนี้เป็นการทดสอบ เพื่อศึกษาผลของครีมกำจัดขนที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวโดยแบ่งการทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม ดังนี้

กลุ่มที่ 1 Negative control หรือ untreated control จะใช้น้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อปริมาตร 100 ไมโครลิตร แทนสารทดสอบ เพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3

กลุ่มที่ 2 Positive control จะใช้สารไมโตมัยซิน-ซี (mitomycin – c) ที่ระดับความเข้มข้น 0.5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (นฤพร, 2546) แทนสารทดสอบซึ่งสารไมโตรมัยซิน - ซี เป็นสารที่ได้รับการวิจัยแล้วว่าก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมประเภท clastogenเพื่อใช้ในการเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ 3

กลุ่มที่ 3 กลุ่มทดสอบ จะใช้ครีมกำจัดขน ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 กรัมต่อมิลลิลิตร

ในการทดลองวิเคราะห์ผล ใช้วิธีการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบสุ่มสมบูรณ์ภายในบล็อก ( Randomized Complete Block Design , RCBD) จะให้คนเป็นจำนวนซ้ำทำทั้งหมด 3 ซ้ำโดย 1 คน คือ 1 ซ้ำ แต่ละกลุ่มจะทำ 3 ซ้ำ และจะทดสอบความแตกต่างของค่าเฉลี่ย โดยวิธี Duncan' s new multiple range test (DMRT)

## ผลการทดลอง

**การทดสอบเบื้องต้นเพื่อหาสภาวะที่เหมาะสมในการทดสอบความเป็นพิษของครีมกำจัดขน**

จากการทดสอบสารตัวอย่างที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mLก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 24 ชั่วโมง แล้วนับเซลล์ทั้งหมด 2000 เซลล์ วิเคราะห์หาค่า Mitotic index เพื่อหาระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวพบว่าความเข้มข้นทุกระดับเซลล์มีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสน้อย และระดับความเข้มข้น 0.075 g/mL พบว่าเซลล์ตาย ดังนั้นจะทำการทดลองโดยลดช่วงเวลาในการสัมผัสสารทดสอบ (ครีมกำจัดขน) โดยทำการหยดสารทดสอบก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 12 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นเดิมพบว่าเซลล์สามารถแสดงความผิดปกติให้พบได้และเซลล์สามารถรอดชีวิตได้ จึงเลือกใช้ความเข้มข้นของสารทดสอบที่ 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mL และทำการหยดสารทดสอบก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 12 ชั่วโมงในการทดลองขั้นต่อไป

**การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และโครโมโซมของครีมกำจัดขน**

จากการทดลองใช้สารทดสอบ คือครีมกำจัดขนกับโครโมโซมในเม็ดเลือดขาวของคนที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mLโดยให้สารทดสอบที่ 60 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ พบว่าค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) เฉลี่ยเท่ากับ 81.31, 71.49, 61.76 และ 45.52 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะมีค่าลดลงเมื่อความเข้มข้นของสารทดสอบเพิ่มขึ้น โดยกลุ่มควบคุมด้วยน้ำกลั่นมีค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) เท่ากับ 100 เปอร์เซ็นต์ ส่วนในกลุ่ม positive control (MMC) มีค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) เฉลี่ย 52.78 เปอร์เซ็นต์ (Table1) จากการทดลองแสดงให้เห็นว่าความเข้มข้นของครีมกำจัดขนจะแปรผกผันกับอัตราการแบ่งเซลล์(mitotic index) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวในระยะเมทาเฟส และจำนวนเมทาเฟสที่พบในกลุ่ม negative control จะมีจำนวนมากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มทดสอบ ในกลุ่ม positive control (MMC) จะพบการเกิดความความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหักรูปแบบต่างๆ คือ single chromatid break (SB), single chromatid gap (SG), isochromatid gap (ISCG), isochromatid break (ISCB) และ dicentric chromosome ดังแสดงใน Figure 1A

**Table1** The mitotic index on human lymphocytes culture induced by hair removal solution at different concentration for 12 h.

| Treatment | Concentration | mitotic index % | | | Mean* |
|---|---|---|---|---|---|
| | g/mL | 1 | 2 | 3 | |
| Negative control (Distilled water) | 0.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00 | 100.00$^{f}$ |
| Positive control (MMC) | 0.50 | 53.33 | 50.00 | 55.00 | 52.78$^{b}$ |
| Hair removing cream | 0.010 | 82.22 | 81.70 | 80.00 | 81.31$^{e}$ |
| | 0.025 | 72.22 | 71.43 | 70.83 | 71.49$^{d}$ |
| | 0.050 | 61.11 | 62.5 | 61.67 | 61.76$^{c}$ |
| | 0.075 | 44.44 | 44.62 | 47.50 | 45.52$^{a}$ |

*Values are given as means of three experiments in each group. Values not sharing a common marking (a,b,c,…) differ significantly at $P$<0.05 (DMRT's test).

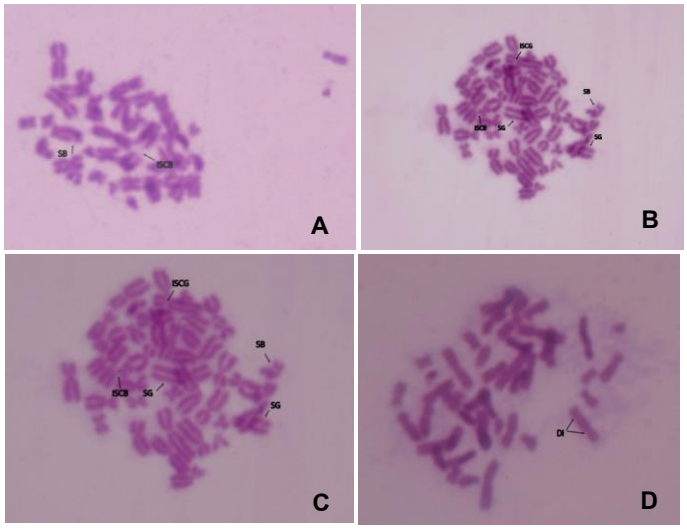


**Figure 1** The chromosome aberration effects of Mytomycin C (0.50 µL/mL,A) and hair removalsolution (0.01 g/mL,B,C,D) on metaphase cells of human lymphocyte culture (1000X). SG = Single chromatid gap ; ISCB = Isochromatid breaks ; SB =Single chromatid breaks; Di = dicentricchromosome ; ISCG =Isochromatid breaks (the arrows point to the chromosome aberration).

เมื่อนำค่าอัตราการแบ่งเซลล์ของกลุ่มควบคุมด้วยน้ำกลั่น (negative control) กลุ่ม positive control และกลุ่มทดสอบในทุกระดับความเข้มข้นมาวิเคราะห์หาค่าความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี DMRTที่ $\alpha$= 0.05 พบว่าครีมกำจัดขนทุกความเข้มข้น และ positive control ให้ค่าอัตราการแบ่งเซลล์แตกต่างจากกลุ่มควบคุมด้วยน้ำกลั่นอย่างมีนัยสำคัญ และครีมกำจดขนทุกความเข้มข้นให้ค่าอัตราการแบ่งเซลล์แตกต่างจาก positive control (MMC) อย่างมีนัยสำคัญ

จากการทดลองเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ได้รับสารทดสอบคือ ครีมกำจัดขนในระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mL พบว่าทุกระดับความเข้มข้นก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหัก ความผิดปกติของโครโมโซมแบบไม่คงรูปคือโครโมโซมที่มีลักษณะไม่เสถียร โครโมโซมแบบเกาะกลุ่มคือโครโมโซมที่ไม่กระจายตัวออกเกาะกลุ่มเป็นก้อน (Figure 2) และพบการแตกหัก ของโครโมโซม 5 แบบคือ single chromatid break (SB), single chromatid gap (SG), isochromatid gap (ISCG), isochromatid break (ISCB) และ dicentric chromosome (Figure 1B, C, D) ค่าเฉลี่ยความผิดปกติของโครโมโซมที่ก่อให้เกิดการแตกหัก คือ 0.11, 0.15, 0.19 และ 0.23 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 2 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม negative control และกลุ่ม positive control โดยนำไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี DMRT ที่ $\alpha$= 0.05 พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของครีมกำจัดขนแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติโดยพบว่าครีมกำจัดขนทำให้เกิดการแตกหักของโครโมโซมในรูปแบบต่างๆมากกว่า negative controlแต่น้อยกว่า ไมโตไมซิน-ซี ที่ใช้เป็น positive control ซึ่งความผิดปกติของโครโมโซมที่พบมากที่สุดจากการทดสอบด้วยครีมกำจัดขนคือชนิด ISCG โดยพบจำนวนมากถึง 6.33 ตำแหน่งจากครีมกำจัดขนความเข้มข้น 0.075 g/mL และความผิดปกติของโครโมโซมชนิดที่พบน้อยที่สุดคือ SG คือ 0.67 ตำแหน่งจากครีมกำจัดขนความเข้มข้น 0.075 g/mL

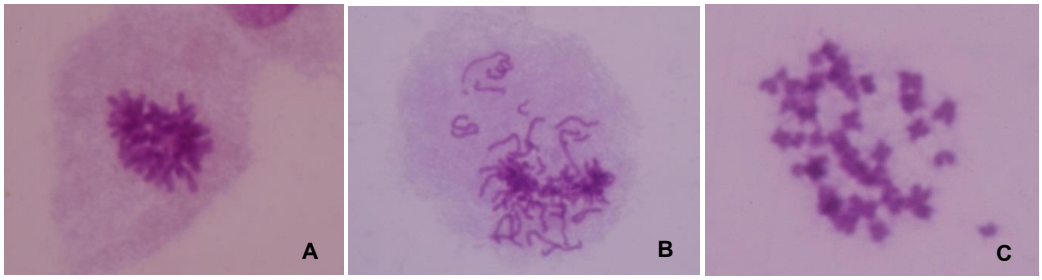


**Figure 2** The chromosome aberration effects of hair removalsolution (0.01 g/mL (A) 0.075 g/mL(B) 0.025 g/mL (C) on metaphase cells of human lymphocyte culture (1000X). A: The sticky chromosomes, B: The unstable of chromosomes, and C: The short chromosome

ส่วนค่าเฉลี่ยความผิดปกติของโครโมโซมแบบเกาะกลุ่ม คือ 11.00, 13.33, 13.67 และ 15.33 ค่าเฉลี่ยความผิดปกติของโครโมโซมแบบไม่คงรูป คือ 3.00, 4.00, 3.00 และ 4.33 ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยความผิดปกติโครโมโซมแบบหดสั้นคือโครโมโซมที่มีลักษณะหดสั้นผิดปกติ คือ 2.33, 2.33, 1.33 และ 1.33 ตามลำดับ ดังแสดงใน Table 3 จากผลการทดลองพบว่าเมื่อความเข้มข้นของครีมกำจัดขนเพิ่มมากขึ้นความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหัก แบบเกาะกลุ่มและแบบไม่คงรูปจะพบเพิ่มมากขึ้น แต่ความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้นจะมีแนวโน้มลดลงเมื่อนำจำนวนเซลล์ที่เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหัก แบบเกาะกลุ่ม และแบบไม่คงรูป ของกลุ่มทดสอบด้วยครีมกำจัดขนทุกระดับความเข้มข้น กลุ่ม negative control และกลุ่ม positive control ไปวิเคราะห์ความแตกต่างเป็นรายคู่โดยวิธี DMRT ที่ $\alpha$= 0.05 พบว่าทุกระดับความเข้มข้นของครีมกำจัดขน แสดงความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหัก เกาะกลุ่มเหนียว แบบไม่คงรูป และหดสั้น แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกลุ่ม negative control (น้ำกลั่น)

**Table 2** The number of each type of chromosome aberration in 50 metaphase cells of human lymphocyte culture exposed to hair removal solution for 12 h.

| Treatment | Concentration g/mL | Chromosome aberration (means of three experiments) | | | | | Total Break | break /cell* |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| | | SG | ISCG | SB | ISCB | Di | | |
| Negative control (Distilled water) | 0.00 | 0.00 | 0.33 | 0.33 | 0.00 | 0.00 | 0.66 | 0.01[a] |
| Positive control(MMC) | 0.50 µL/mL | 1.33 | 12.00 | 1.33 | 2.33 | 0.33 | 17.33 | 0.35[d] |
| Hair removing cream | 0.010 | 0.67 | 2.00 | 1.00 | 1.00 | 1.00 | 5.67 | 0.11[b] |
| | 0.025 | 1.00 | 3.00 | 1.00 | 1.33 | 1.00 | 7.33 | 0.15[bc] |
| | 0.050 | 0.67 | 4.00 | 1.33 | 2.00 | 1.67 | 9.67 | 0.19[bc] |
| | 0.075 | 0.67 | 6.33 | 1.67 | 2.00 | 1.00 | 11.67 | 0.23[c] |

* Values not sharing a common marking (a,b,c,…) differ significantly at $P<0.05$ (DMRT's test). SG = Single chromatidgap ;ISCB = Isochromatid breaks ; SB =Single chromatid breaks; Di = dicentric chromosome ; ISCG =Isochromatidgaps

**Table 3** Chromosome aberration on 50 metaphase cells of human lymphocyte culture exposed to hair removal solution for 12 h.

| Treatment | Concentration g/mL | Type ofchromosome aberrations * | | |
|---|---|---|---|---|
| | | sticky | unstable | short |
| Negative control (Distilled water) | 0.00 | 0.00[a] | 0.00[a] | 0.33[a] |
| Positive control(MCC) | 0.50 µL/mL | 23.67[c] | 4.33[b] | 2.33[b] |
| Hair removing cream | 0.010 | 11.00[b] | 3.00[b] | 2.33[b] |
| | 0.025 | 13.33[b] | 4.00[b] | 2.33[b] |
| | 0.050 | 13.67[b] | 3.00[b] | 1.33[b] |
| | 0.075 | 15.33[b] | 4.33[b] | 1.33[b] |

* Values are given as means of three experiments in each group. Values not sharing a common marking (a,b,c,…) differ significantly at $P<0.05$ (DMRT's test).

ส่วนความเข้มข้นของครีมกำจัดขนทุกระดับความเข้มข้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม positive control (MMC) พบว่าความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหักและเกาะกลุ่มแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความผิดปกติของโครโมโซมแบบไม่คงรูป และแบบหดสั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และเมื่อเปรียบเทียบภายในกลุ่มทดลองพบว่า ความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหักที่ระดับความเข้มข้นที่ 0.01 และ 0.025 g/mL มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับความเข้มข้นที่ 0.075 g/mL ส่วนความผิดปกติของโครโมโซมแบบเกาะกลุ่ม แบบไม่คงรูป และแบบหดสั้นไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งค่าเฉลี่ยความผิดปกติของโครโมโซมที่พบมากที่สุดจากการทดสอบด้วยครีมกำจัดขนคือโครโมโซมชนิด sticky โดยพบจำนวนมากถึง 15.33 เซลล์จากครีมกำจัดขนความเข้มข้น 0.075 g/mL และค่าเฉลี่ยความผิดปกติของโครโมโซมชนิดที่พบน้อยที่สุดคือชนิด shortโดยพบ 1.33 เซลล์จากครีมกำจัดขนความเข้มข้น 0.075 g/mL

## วิจารณ์ผลการทดลอง

จากการศึกษาผลของครีมกำจัดขนในเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mLโดยให้เซลล์เม็ดเลือดขาวได้สัมผัสสารทดสอบเป็นระยะเวลา 12 ชั่วโมงก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์

โดยใช้ตัวอย่างเลือดจาก 3คน พบว่าครีมกำจัดขนส่งผลต่อค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) เมื่อความเข้มข้นของครีมกำจัดขนเพิ่มมากขึ้นอัตราการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสจะลงลด เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (น้ำกลั่น) จะมีค่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ครีมกำจัดขน จึงจัดเป็นสารชนิด mitotic poison เมื่อคำนวณค่าอัตราการแบ่งเซลล์พบว่าการแบ่งเซลล์ลดลงแปรผกผันกับปริมาณความเข้มข้นของครีมกำจัดขนที่เพิ่มมากขึ้น ซึ่งสารเคมีในครีมกำจัดขนจะมีสารในกลุ่ม thioglycolate มีประสิทธิภาพในการทำลายพันธะ disulfide ของ cysteine และพบว่าครีมกำจัดจะส่งผลต่อการระคายเคืองต่อบริเวณผิวหนังที่มีการใช้ครีมกำจัดขน (สุวิดา และคณะ, 2555) และการศึกษาค่าอัตราการแบ่งเซลล์ในงานวิจัยที่มีการทดลองผลิตภัณฑ์ประเภทต่าง ๆ เช่น น้ำยาย้อมสีผม (พิมพ์รัตน์ และคณะ, 2552) ผงซักฟอก (อมรา และเลิศชัย, 2535) ยาคุมกำเนิด (นฤพร, 2546) เป็นต้น กับเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง พบว่ามีผลที่ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง และจัดเป็นสารประเภทmitotic poison อัตราการแบ่งเซลล์ที่แตกต่างกันอาจเป็นผลมาจาก การควบคุมกระบวนการต่างๆในการแบ่งเซลล์ ซึ่งได้แก่ checkpoint ต่างๆ ใน cell cycle และการที่ค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (mitotic index) ลดลงอาจเป็นเพราะสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบมีผลไปยับยั้งการแบ่งเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ Bai และคณะ (2012) ที่ศึกษาสารเคมีที่เป็นองค์ประกอบของยาย้อมผมคือ ρ–Aminophenol และ ρ–paraphenylenediamine พบว่าสารทั้งสองนี้ไปยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงของมนุษย์ (HK-2) และยังพบการบาดเจ็บและเซลล์ถูกทำลาย (apoptosis) เพิ่มมากขึ้นกว่าปกติเมื่อเซลล์ได้รับสารทั้งสองนี้ และพบปริมาณ caspase-3 เพิ่มขึ้นซึ่งอาจมีบทบาทที่สำคัญในการก่อให้เกิดพิษและทำลายเซลล์โดยการชักนำของสารทั้งสองชนิดนี้ และจากงานวิจัยของ Zanoni และคณะ (2014) ที่ศึกษา Red51 ซึ่งเป็นยาย้อมผมกึ่งถาวรชนิดหนึ่งพบว่ามีความเป็นพิษในระดับเซลล์ต่อเซลล์ผิวหนังมนุษย์ โดยทดสอบกับ keratinocytes ของคน (HaCaT) โดยไปลดการแสดงออกของ *p21*และ ยาย้อมผมนี้ชักนำให้เกิด apotosis ในเซลล์ และสามารถหยุดวัฏจักรเซลล์ให้อยู่ที่ระยะ G2 และจากการทำแบบจำลองสามมิติของเซลล์ HaCaT เพื่อดูการทำปฏิกิริยากับสารพบว่ายาย้อมผมนี้ชักนำให้เกิดการบาดเจ็บของเซลล์ นิวเคลียสเสียหายและเซลล์ถูกทำลาย (apotosis) ในที่สุด เนื่องมาจากยาย้อมผมนี้ชักนำให้เกิด reactive oxygen species (ROS) ทำให้มีการเพิ่มระดับของสาร 8-oxo-dG

การศึกษาผลของครีมกำจัดขนต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่า ความเข้มข้นของครีมกำจัดขนทุกระดับ ก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม 5 แบบคือ single chromatid gap, isochromatid gap, single chromatid breaks, isochromatid breaks (ความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหัก) และ dicentric chromosome และยังพบความผิดปกติของโครโมโซมแบบเกาะกลุ่ม ไม่คงรูป และหดสั้น โดยพบความผิดปกติของโครโมโซมแบบแตกหัก และแบบเกาะกลุ่มมากที่สุด ความเข้มข้นของครีมกำจัดขนที่สูงขึ้นจะพบจำนวนความผิดปกติของโครโมโซมมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ จำนวนโครโมโซมแบบไม่คงรูป และแบบหดสั้นที่พบเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยเป็นรายคู่ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุม positive control (MMC) อย่างมีนัยสำคัญ

ความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดจากสารทดสอบอาจเป็นเพราะสารเคมีในผลิตภัณฑ์มีโครงสร้างเป็น alkyl group จะไปจับกับ sulfur, nitrogen, oxygen หรือ phosphorus ที่เป็นส่วนประกอบในสาย DNA ทำให้เกิดการแตกหักของสาย DNA (DNA strand break) ถ้าไม่มีการซ่อมแซมจะทำให้เซลล์เกิดการตายในที่สุด (โรงพยาบาลราชวิถี, ม.ป.ป.)ความผิดปกติของโครโมโซมที่เกิดจากการหัก อาจเป็นผลมาจากการที่เซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมที่ส่งผลให้เกิดความผิดปกติ โดยถ้าเกิดในช่วง $G_1$ ของวัฏจักรเซลล์ เป็นระยะก่อนที่จะมีการสังเคราะห์ DNA โครโมโซมยังมีหนึ่งเส้นจะทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromosome type aberrations แต่ถ้าเซลล์ได้รับสิ่งแปลกปลอมในช่วง S และ $G_2$ จะเกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบ chromatid type aberrations ได้ (Andersson andKihlman, 1989) นอกจากนั้นสารประเภท mitotic poison จะไปยับยั้งการทำงานของ mitotic apparatus เช่น centrioles, spindle fiber, microtubules และ kinetochore ผลดังกล่าวจะทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมชนิด nondisjunction

และมีผลทำให้เซลล์ลูกที่แบ่งได้มีความผิดปกติของโครโมโซม เพราะโครโมโซมไม่สามารถเคลื่อนที่ไปยังขั้วของเซลล์ได้อย่างสมบูรณ์ในขณะที่มีการแบ่งเซลล์ทำให้เซลล์ลูก (daughter cell) ที่ได้จากการแบ่งเซลล์ ได้รับสารพันธุกรรมไม่เท่ากัน (Hsu *et al*., 1986)

จากงานวิจัยที่มีการศึกษายาสลบชนิดสูดดม Diethyl ether, Halothane และ Isoflurane ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบขดตัว หรือความผิดปกติของโครโมโซมแบบเกาะกลุ่ม และหดสั้น (นฤพร, 2546) และจากการศึกษา สเปรย์ระงับกลิ่นกาย สบู่เหลวอนามัย ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้น โครโมโซมแบบเกาะกลุ่มเหนียว และโครโมโซมแบบไม่คงรูป (มุนินทร์, 2551; กมลทิพย์, 2550) เช่นเดียวจากงานวิจัยที่มีการศึกษาผลของสารกำจัดวัชพืช อะลาคลอร์ต่อการแบ่งเซลล์ของหอมหัวใหญ่ พบความผิดปกติของโครโมโซมแบบขดตัว (มณทินี และ จันทณี, 2553) ความผิดปกติของโครโมโซมที่พบแบบเกาะกลุ่ม หรือแบบขดตัว ความผิดปกติของโครโมโซมแบบไม่คงรูป และความผิดปกติของโครโมโซมแบบหดสั้น อาจเกิดจากการที่สารเคมีในผลิตภัณฑ์ส่งผลกระทบต่อโครมาตินที่เกิดจากการรวมตัวกันของ DNA กับ histone protein (H2A, H2B, H3 และH4) และ nonhistone (อมรา, 2540; sumner, 2003)ทำให้การประกอบตัวของ DNA กับโปรตีนเพื่อให้ได้แท่งโครโมโซมเกิดความผิดปกติซึ่งส่งผลให้ได้ลักษณะของโครโมโซมที่ผิดปกติ(El-Ghamery*et al.,* 2003) ทำให้โครโมโซมในระยะเมทาเฟสมีลักษณะหดสั้น หนาขึ้นรวมทั้งขดตัวกันแน่น (มณทินี และจันทณี 2553; Ambulkar*et al*., 2009)

สารเคมีในครีมกำจัดขนประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดเช่น calcium thioglycolateหรือ potassium thioglycolate มีรายงานแสดงว่าสาร Potassium bromate ร่วมกับสาร thioglycolate ซึ่งเป็นองค์ประกอบในน้ำยาดัดผมมีความเป็นพิษต่อโครงสร้างประสาทที่ควบคุมการเคลื่อนไหวของตา vestibule ocular reflex (VOR) system ของหนูตะเภาและในมนุษย์ โดยมีการตอบสนองที่ผิดปกติซึ่งมีผลมาจากกลไกการควบคุมที่ผิดปกติของสมองส่วนซีรีเบลลัมซึ่งเป็นสมองส่วนท้ายที่ควบคุมการเคลื่อนไหวของกล้ามเนื้อและการทรงตัวโดยพบว่ามีกิจกรรมที่ลดลง (Young, *et al.,* 2001) สาร thioglycolate สามารถแทรกซึมเข้าไปในผิวหนังและกระจายไปยังตับไต ลำไส้เล็กและไขสันหลังและอาจขับออกทางปัสสาวะ สารประกอบนี้แสดงความเป็นพิษเล็กน้อยเมื่อทดสอบความเป็นพิษในหนู อาจทำให้เกิดการระคายเคืองของผิวหนังในหนูทดลองแต่ไม่พบผลข้างเคียงต่อการสืบพันธุ์และการพัฒนาของหนูที่ได้รับสารthioglycolate ปริมาณ 100 มก./กก.ต่อวัน (Christina, *et al*., 2009) แต่จากรายงานการทดสอบสารammonium thioglycolate และ sodium thioglycolate ที่ศึกษาโดยวิธีเอมส์โดยใช้แบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* TA98, TA100, TA1535 and TA1537 โดยใช้ความเข้มข้นสารทดสอบที่ 5000 µg/จานเลี้ยงเชื้อ สำหรับ ammonium thioglycolate และ1000 µg/จานเลี้ยงเชื้อ สำหรับsodium thioglycolate ทำการศึกษาความเป็นพิษในระดับเซลล์โดยกระตุ้นและไม่ได้กระตุ้นด้วย S9 จากตับหนูพบว่า ammonium thioglycolate และ sodium thioglycolate ไม่แสดงผลเป็นสารชักนำให้เกิดการกลายพันธุ์ย้อนกลับของแบคทีเรียทั้งการทดลองที่กระตุ้นและไม่ได้กระตุ้นด้วย S9 เมื่อเทียบกับการทดลองควบคุม (Thompson, 2003; Zeiger, 1987) นอกจากนี้ยังมีการตรวจสอบความผิดปกติของ thioglycolic acid ที่ความเข้มข้น 0 ถึง 300 µg/mL โดยไม่ได้รับการกระตุ้นด้วย S9 mix จากตับหนูและที่ความเข้มข้น 0 ถึง1000 µg/mL ที่ได้รับการกระตุ้นด้วย S9 mix ในเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์โดยให้เซลล์สัมผัสสารทดสอบ 24 และ 48 ชั่วโมงโดยปราศจากการกระตุ้นจาก S9 mix และ 2 ชั่วโมงโดยมีสารกระตุ้น S9 mix พบว่า thioglycolic acid ไม่สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ที่มีโครโมโซมที่ผิดปกติเปรียบเทียบกับการทดลองควบคุม (Molinier, 1994) แม้ว่าจากรายงานข้างต้นพบว่าเกลือของ thioglycolate จะไม่ได้แสดงฤทธิ์เป็นสารก่อกลายพันธุ์ในการทดลองกับแบคทีเรีย *Salmonella typhimurium* หลายสายพันธุ์ เนื่องจากการทดลองดังกล่าวใช้ตัวอย่างในการทดสอบปริมาณน้อย เมื่อพิจารณาจากข้อกำหนดของกองควบคุมเครื่องสำอาง ที่กำหนดให้ครีมกำจัดขนที่มี calcium thioglycolate เป็นองค์ประกอบจัดอยู่ในกลุ่มเครื่องสำอางควบคุมพิเศษโดยกำหนดให้อัตราส่วนสูงสุดที่ให้ใช้ผลิตภัณฑ์ประเภทที่ทำให้ขนร่วงคือ 9.0% ที่ pH 9-12.5 ส่วนครีมกำจัดขนที่มี Zinc sulfide เป็นองค์ประกอบ

กำหนดให้มีอัตราส่วนสูงสุดที่ให้ใช้ คือ 40.0%(กองควบคุมเครื่องสำอาง, 2545) ในการทดลองนี้ได้ทำการทดลองเบื้องต้นและพบว่าปริมาณสารทดสอบที่เหมาะสมในการศึกษาคือที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mL จึงใช้เพิ่มปริมาณสารมากขึ้นใกล้เคียงค่ามาตรฐานขั้นต่ำที่กำหนดไว้และจากผลการทดลองแสดงว่าครีมกำจัดขนทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมแบบต่างๆ ดังกล่าวแล้ว อีกประการหนึ่งครีมกำจัดขนยังประกอบด้วยสารเคมีชนิดอื่นๆ เช่น สารลดแรงตึงผิว สารยึดเกาะ สารปรับสภาวะให้เป็นด่าง สารที่ทำให้แกนผมพองตัว รวมทั้ง ประกอบด้วยสาร propylene glycol ซึ่งมีรายงานว่าถ้าได้รับสารนี้ในปริมาณมากจะเป็นสารที่มีอันตรายต่อตับและหัวใจรวมทั้งระบบประสาทส่วนกลางนอกจากนี้ยังมีผลทำให้เลือดเกิดภาวะเป็นกรดได้อย่างรวดเร็ว (อรพรรณ และวิวัฒน์, 2555) และยังมีสารกันเสียที่ใส่ในครีมกำจัดขน จะทำให้เกิดการแพ้ ผื่นแดงและผิวหนังอักเสบ จากการศึกษาสารกันเสียในกลุ่มพาราเบน พบว่า สารตัวนี้มีส่วนเพิ่มอัตราเสี่ยงต่อการเป็นมะเร็งในผู้หญิง โดยเฉพาะ มะเร็งเต้านม เพราะร่างกายสามารถดูดซึมเข้าสู่กระแสเลือดได้อย่างรวดเร็ว เมื่อสารตัวนี้เข้าสู่ร่างกายจะทำงานเหมือนฮอร์โมนเอสโตรเจนที่ร่างกายผลิต ทำให้ร่างกายทำงานไม่สมดุล (Marianne, 2010) นอกจากสารเคมีในครีมกำจัดขนที่ส่งผลให้เกิดความเป็นพิษจึงทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซม ค่า pH (ค่าความเป็นกรด-ด่าง) ของครีมกำจัดขนอาจจะเป็นส่วนที่ทำให้เกิดความเป็นพิษในเลือด เพราะ pH ใน ร่างกายของคนจะมีค่าเท่ากับ 7.4 ซึ่งเมื่อเซลล์ได้รับครีมกำจัดขนจะทำให้pHในเลือดเกิดการเปลี่ยนแปลง โดยทำให้ pH ในเลือดสูงมากผิดปกติ (อมรา และเลิศชัย, 2528)

จากผลการทดลองนี้พบว่าครีมกำจัดขนก่อให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมได้ถ้าใช้ในปริมาณมากเกินไปและให้สัมผัสผิวเป็นเวลานานเกินไปซึ่งแสดงได้จากผลของการทดลองเบื้องต้นที่ใส่สารทดสอบ(ครีมกำจัดขน)ที่ระดับความเข้มข้น 0.01, 0.025, 0.05 และ 0.075 g/mL ก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมงพบว่าความเข้มข้นทุกระดับมีการแบ่งเซลล์ในระยะเมทาเฟสน้อย และระดับความเข้มข้น 0.075 g/mL พบว่าเซลล์ตาย จึงลดช่วงเวลาที่เซลล์สัมผัสสารทดสอบ โดยทำการหยดสารทดสอบก่อนการเก็บเกี่ยวเซลล์ 12 ชั่วโมง โดยใช้ความเข้มข้นเดิมพบว่าเซลล์สามารถแสดงความผิดปกติให้พบได้และเซลล์สามารถรอดชีวิตได้ แต่ครีมกำจัดขนที่มี thioglycolate เป็นองค์ประกอบหลักต้องใช้เวลานานกว่าในการที่จะทำให้ขนหลุดลอกออกมา เมื่อเทียบกับครีมกำจัดขนที่มีซัลไฟด์เป็นองค์ประกอบดังนั้นช่วงเวลาที่ใช้สัมผัสกับครีมกำจัดขนที่เป็นเวลานานน่าจะมีส่วนในการทำให้เกิดความผิดปกติของโครโมโซมและลดอัตราการแบ่งเซลล์ได้ดังนั้นการใช้งานต้องอ่านฉลากยาให้เข้าใจวิธีการใช้ตามคำแนะนำของครีมแต่ละชนิดที่มีองค์ประกอบต่างกันควรใช้ในปริมาณที่พอเหมาะและไม่ควรทาเกินเวลาที่กำหนดไว้ในคู่มือ การใช้และรีบล้างออกด้วยน้ำอุ่น และไม่ควรใช้ติดต่อกันเป็นระยะเวลานานเพื่อความปลอดในการใช้ และไม่ควรใช้ในบริเวณที่มีผิวหนังบอบบางเช่น ใบหน้า

## กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบพระคุณสาขาวิชาพันธุศาสตร์ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสนนครปฐม ศูนย์วิทยาการขั้นสูงด้านทรัพยากรธรรมชาติเขตร้อน ม.เกษตรศาสตร์ เขตจตุจักร กรุงเทพฯ 10900 ประเทศไทย และหน่วยวิจัยการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อกล้วยไม้และพืชเศรษฐกิจ คณะศิลปศาสตร์และวิทยาศาสตร์ ม.เกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน นครปฐม

## เอกสารอ้างอิง

กมลทิพย์ ดอกประทุม (2550) ผลของสบู่เหลวอนามัยที่มีต่อโครโมโซมเม็ดเลือดขาวของคน.ปัญหาพิเศษปริญญาตรีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

กรมควบคุมเครื่องสำอาง สำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา(2535) แนวทางการปฏิบัติงาน เกี่ยวกับพระราชบัญญัติเครื่องสำอาง พ.ศ. 2535. สำนักงานกิจการโรงพิมพ์องค์การสงเคราะห์ทหารผ่านศึก. กรุงเทพฯ.

นฤพร เพ็ชร์กลาง (2546) ผลทางไซโตจินิติคของยาสลบชนิดสูดดม Diethy ether Halothanและ Isofluraneต่อ

เซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง. วิทยานิพนธ์ปริญญาโท มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ.

พิมพ์รัตน์ชาญปรีชญาศิริลักษณ์ เอี่ยมธรรมนฤพร เพ็ชร์กลาง (2552)ผลทางไซโตจินิติคของน้ำยาย้อมสีผมต่อเซลล์ เม็ดเลือดขาวของมนุษย์ในอาหารเพาะเลี้ยง. วารสารมหาวิทยาลัยนเรศวร 17(2): 151-156.

มุนินทร เปรมปรีดิ์(2551) ผลทางไซโตจินิติคของสเปรย์ระงับกลิ่นกายชนิดน้ำต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเพาะเลี้ยง.ปัญหาพิเศษปริญญาตรีมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์วิทยาเขตกำแพงแสน. นครปฐม.

มณทินีธีรารักษ์จันทณี สนธิ (2553)ผลของสารกำจัดวัชพืช อะลาคลอร์ ต่อกิจกรรมการแบ่งเซลล์ของหอมหัวใหญ่วารสารเกษตรพระจอมเกล้า28 (2): 83-89.

โรงพยาบาลราชวิถี (ม.ป.ป.)กลไกการออกฤทธิ์ของยาเคมีบำบัด.แหล่งที่มา: http://110.164.68.234/chemo/images/files/chemical1.pdf(17 พฤษภาคม 2558)

สุวิดา เลาหภัทรพันธุ์ศรัณย์ ตันตะราวงศา ธวัชชัย แพชะมัด (2555)การกำจัดขนชั่วคราวด้วยสารเคมี(Temporary Chemical Depilation) วารสารไทยเภสัชศาสตร์ และวิทยาการสุขภาพ 7(2): 106-110.

อมรา คัมภิรานนท์ (2540)พันธุศาสตร์ของเซลล์ สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์กรุงเทพฯ

อมรา คัมภิรานนท์ เลิศชัย เจริญธัญรักษ์ (2535) ผงซักฟอกชนิดฮาร์ดและซอฟท์ดีเทอเจนท์ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในอาหารเลี้ยงเซลล์รายงานการประชุมทางวิชาการของมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ครั้งที่ 30, มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์. กรุงเทพฯ.น. 755-762.

อรพรรณ ชัยมณี วิวัฒน์ เอกบูรณะวัฒน์ (2555) Propylene glycol. แหล่งที่มา: http://www.summacheeva.org/index_thaitox_propylene_glycol.htm (14 มกราคม 2558)

Ambulkar PS, Ghosh SK, Ingole IV, Pal AK (2009) Genotoxic and cytotoxic effects of antibacterial drug, ciprofloxacin, on human lymphocytes *in vitro*. Nepal Med Coll J 11(3): 147-151.

Andersson HC, Kihlman BK (1989) Carcinogenesis. Oxford J 10: 123-130.

Bai YH, Peng YM, Yin WQ, Liu H, Liu FY, Duan SB, Xiao P (2012) ρ–Aminophenol and ρ–paraphenylenediamineinduce injury and apotosis of human HK-2 proximal tubular epithetilial cells. J Nephrol 25:481-489.

BullaLMC, AmbrosioEP, MartinsABT, DellaRosa VA (2014) Viability of lymphocyte culture,at different times after blood collection,for karyotype analysis. J Bras Patol Med Lab 50:124-130.

Christina L, Burnett, BS, Wilma FB, Donald VB, Curtis DK , James GM Jr, Ronald CS, Thomas JS, Paul WS, Andersen FA (2009) Final amended report on the safety assessment of ammonium thioglycolate, butyl thioglycolate, calcium thioglycolate, ethanolamine thioglycolate, ethyl thioglycolate, glyceryl thioglycolate, isooctyl thioglycolate, isopropyl thioglycolate, magnesium thioglycolate, methyl thioglycolate, potassium thioglycolate, sodium thioglycolate, and thioglycolic acid. Int J Toxicol 28(4S): 68-113.

El-Ghamery AA, El-Kholy MA, Abou El, Yousser MA (2003) Evaluation of cytological effects of Zn2+ in relation to germination and growth of *Nigella sativa* L. and *Triticum aestivum* L. Mutation Res 537: 29-41.

Hsu TC, Jan CL, Kanitha HL (1986) Cytogenetics assays for mitotic poisons using aromatic animal cells. Chem Mut 10: 155-181.

Khalandar BBD, Vasudev V (2015) Differential response of biochemical parameters to EMS and MMS treatments and their dose effect relationship on chromosomes in induced diabetic mouse. Egypt J Med Human Genet 16:301-312.

Marianne M (2010) Parabens and breast cancer. Natural Med J.2 (10): 1-8.

Molinier B (1994) *In vitro* mammalian cytogenetic test in cultured human lymphocytes, 2-thioglycolic acid. CIT study No. 10279 MLH (Elf Atochem SA, unpublished report).

Sumner AT (2003) Chromosomes Organization. Blackwell Publishing, North Berwick.

Thompson PW (2003) Ammonium Thioglycolate 71%: Reverse Mutation Assay "Ames test" using*Salmonella typhimurium*. Safepharm Laboratories Ltd., study no. 1158/039 (Bruno Bock ChemischeFabrik GmbH & Co KG unpublished report.

Ul-Ain Q, Bukhari IH (2013) Determination and toxicological effects of metals on human skin by using hair removing creams and lotions by spectroscopic techniques. Int Res J Pharm App Sci 3(4): 9-11.

Young YH, Chuu JJ, Liu SH, Lin-Shiau SY (2001) Toxic effects of potassium bromated and thioglycolate on vestibuloocular reflex systems of Guinea pigs and humans. Toxicol Appl Pharmacol 177:103-111.

Zanoni TB, Tiago M, Faiao-Flores F, de Moraes Barros SB, Bast A, Hageman G, de Oliveira DP, Maria-Engler SS (2014) Basic Red 51, a permitted semi-permanent hair dye, is cytotoxic to human skin cells: Studies in monolayer and 3D skin model using human keratinocytes (HaCaT). Toxicol Lett 227:139-149.

Zeiger E, Anderson B, Haworth S, Lawlor T, Mortelmans K, Speck W (1987) *Salmonella* mutagenicity tests: III. Results from the testing of 255 chemicals. Environ Mutagen 9(suppl.9), 1-109.