การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Trypan blue

สุจินต์ อึ้งถาวร*

การศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของ trypan blue ในการทำให้เกิดความพิการแต่กำเนิดโดยการฉีด Tritium-labeled trypan blue เข้าไปในช่องท้องของหนูขาวในวันที่ 9 ของการตั้งครรภ์ เมื่อตัดชิ้นเนื้อซึ่งประกอบด้วย placental tissue และ embryonic tissue แล้วศึกษาโดย autoradiographic technique ผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า trypan blue ออกฤทธิ์โดยทางอ้อม

การศึกษาเกี่ยวกับความพิการแต่กำเนิดได้เริ่มอย่างจริงจัง หลังจากที่ Gregg[10] ได้รายงานเกี่ยวกับความพิการแต่กำเนิด อันเป็นผลเนื่องจาก German measle virus และ Plummer[17] Yamasaki[24] ได้รายงานผลอันเกิดจากระเบิดปรมาณูในญี่ปุ่นรวมทั้งรายงานของ Lenz[15] Mellin และ Katzenstein[16] เกี่ยวกับผลของยา Thalidomide

trypan-blue เป็น azo-dye ชนิดหนึ่งที่ใช้กันมากในการศึกษาเกี่ยวกับการเจริญผิดปกติ ทั้งนี้เนื่องจากมีคุณสมบัติที่ละลายน้ำได้ดี และให้ในสัตว์ทดลองได้ง่ายและชักนำให้เกิดความพิการแต่กำเนิดในสัตว์หลาย species เช่น rats[5,8,9,1,11,13,21] mice[7] hamster และ guinea pig[12] อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบแน่นอนถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของ trypan blue ที่ทำให้เกิดความพิการ

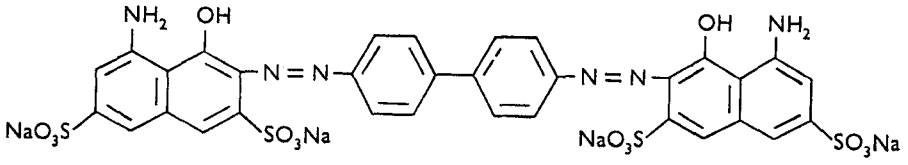
ดังนั้นการวิจัยนี้ จึงหวังที่จะศึกษากลไกในการออกฤทธิ์ของสารเคมีนี้ และเพื่อเป็นแนวทางสำหรับในการวิจัยกับสารเคมีอื่น ๆ เพราะถ้าเราทราบถึงกลไกในการออกฤทธิ์ของสารเคมีแต่ละชนิดแล้ว ก็จะเป็นแนวทางในการป้องกันและลดอัตราความพิการแต่กำเนิดได้

วัสดุและวิธีการ

สัตว์ทดลองที่ใช้คือ หนูขาว (Swiss mice) อายุประมาณ 10—12 สัปดาห์ การเลี้ยงและผสมพันธุ์หนู ได้จัดทำโดยจัดให้หนูตัวเมียอยู่รวมกัน 4 ตัว ในแต่ละกรง ทุกเช้า เวลา 9.00 น. เอาตัวผู้ใส่ลงไป 1 ตัว ปล่อยไว้จนถึงเวลา 16.00 น. จึงเอาตัวผู้ออก หลังจากนั้นจึงตรวจดู vaginal ในตัวเมียทุกตัว หนูตัวเมียที่มี vaginal plug จะถูกแยกไปอยู่อีกกรงหนึ่งต่างหาก และถือว่าเป็นหนูตัวเมียที่ถูกผสมแล้ว วันรุ่งขึ้นก็จะเริ่มนับว่าเป็นวันที่ 1 ของการตั้งครรภ์

* แผนกวิชากายวิภาคศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารเคมีที่ใช้คือ trypan blue ของ AlliedChemicals ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังนี้



$C_{32}H_{18}N_6Na_4O_{14}S_4$

trypan blue ที่ใช้นั้นเป็น H^3-labeled trypan blue โดยใช้ H^3-labeled trypan blue 1 กรัมผสมกับ 0.85 เปอร์เซ็นต์ saline solution จำนวน 100 มิลลิลิตร และฉีดเข้าช่องท้องของหนูขาวในวันที่ 9 ของการตั้งครรภ์ ขนาดของ trypan blue ที่ใช้คือ 100 มิลลิกรัมต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม

Autoradiographic techniques

1. การเตรียมชิ้นเนื้อ

หนูตัวเมียที่ตั้งครรภ์ และถูกฉีดด้วย H^3-labeled trypan blue จะถูกฆ่าในช่วงเวลา 4, 24 และ 48 ชั่วโมง หลังการฉีดอย่างละ 1 ตัว แล้วชำแหละมดลูก รก และตัวอ่อน เป็นก้อนรวมอยู่ด้วยกัน นำมา fix ด้วย Carnoy's fixative ซึ่งเป็นส่วนผสมของ absolute ethyl alcohol และ glacial acetic acid ในอัตราส่วน 3 : 1 การ fix จะใช้เวลานาน 2 ชั่วโมงหลังจากนั้นจึงล้างด้วย 70% alcohol แล้วตัดเป็นชิ้นเนื้อบางโดย histological technique ที่ใช้ทั่ว ๆ ไป เพียงแต่ว่า ในการตัดจะตัดชิ้นเนื้อบางเพียง 3 microns เท่านั้น ส่วนการย้อมเพื่อดูเนื้อเยื่อต่าง ๆ ใช้สี hematoxylin และ eosin

2. emulsification

1. นำสไลด์ที่มีชิ้นเนื้อซึ่งเตรียมเรียบร้อยแล้วจุ่มทิ้งไว้ใน xyline 2 ครั้ง ครั้งละ 10 นาที เพื่อล้าง paraffin ออก

2. วางสไลด์ทิ้งไว้ให้แห้ง

3. ปรับ water bath ในห้องมืดสนิทให้มีอุณภูมิ 41°c เท Nuclear Track Emulsion (Kodak NTB_2) จากขวดลงใส่ staining jar แล้วทิ้งไว้ใน water bath รอให้ละลายประมาณ 1 ชั่วโมง

4. เก็บสไลด์เข้ากล่องปิดให้มิดชิด โดยใช้เทปกาวพันโดยรอบ แล้วใช้ aluminum foil ห่อกล่องสไลด์เพื่อไม่ให้มีแสงผ่านเข้าได้ แล้วเก็บกล่องสไลด์ในตู้เย็น

3. developing the slides

หลังจากที่เก็บสไลด์ไว้ในตู้เย็นประมาณ 1 สัปดาห์ เพื่อให้ emulsion ได้ expose ต่อรังสี

ของ tritium นำสไลด์มาผ่านกรรมวิธีเช่นเดียวกับกรรมวิธีในการล้างฟิล์มถ่ายภาพ โดยใช้ Dektol ผสมกับน้ำกลั่นครึ่งต่อครึ่งเป็น developer

เมื่อแช่สไลด์ไว้ใน developer 2 นาที แล้วนำไป fix โดยใช้ Kodak rapid fixer หลังจากนี้จึงล้างสไลด์ให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น 10 นาที

นำสไลด์ผ่าน alcohol, xyline แล้วปิดชิ้นเนื้อด้วย coverglass

ตรวจดู silver grain ที่ชิ้นเนื้อโดยใช้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 100 เท่า และ 1000 เท่า

ผลการทดลอง

จากการดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ด้วยกำลังขยาย 100 x เป็นชิ้นเนื้อ ประกอบด้วย placenta tissue และ embryonic tissue บริเวณ neural tube (ภาพที่ 1) อยู่ชิดกัน และเมื่อดูด้วยกำลังขยาย 1000 x พบว่าที่ placental tissue มีจุดดำ (ภาพที่ 2 ตรงลูกศรชี้) กระจายอยู่เต็มไปหมด จุดดำนี้เป็น silver grains เกิดจากการที่ emulsion ถูก expose ด้วย radioactive tritium ซึ่งปะปนอยู่กับ trypan blue ส่วนที่ embryonic tissue คือที่ผนังของ neural tube ไม่ปรากฏว่ามี silver grain เลย (ภาพที่ 3) และผลการทดลองในหนูทั้ง 3 กลุ่มที่ถูกฆ่าในช่วงเวลาต่างกัน ให้ผลไม่แตกต่างกัน

วิจารณ์

กลไกในการออกฤทธิ์ของ teratogens ต่าง ๆ ที่ทำให้การเจริญผิดปกติ เข้าใจว่ามีอยู่ 3 ทาง ด้วยกันคือ

1. ออกฤทธิ์โดยตรงที่ตัวอ่อนขณะที่มีการเจริญ[18]

2. ออกฤทธิ์ที่ maternal tissue และทำให้ขาดสิ่งที่จำเป็นแก่การเจริญของตัวอ่อน เช่นขาดวิตามินหรือฮอร์โมน เป็นต้น[19,23]

3. ออกฤทธิ์ที่ placenta โดยรบกวนต่อการที่เลือดและอาหารผ่านจะไปเลี้ยงตัวอ่อน[19,23]

สำหรับ trypan blue ซึ่งใช้ในการทดลองนั้น ทราบกันแน่นอนแล้วว่า active principle ที่ไปออกฤทธิ์นั้นเป็นตัว azo-dye เอง ไม่ใช่สิ่งอื่นที่เป็นส่วนผสมอยู่ และนอกจากนั้นเมื่อเวลาให้ไปในสัตว์ทดลองแล้ว ยังไม่ถูกเปลี่ยนแปลงเป็นอย่างอื่น[2] ดังนั้นถ้า trypan blue ออกฤทธิ์โดยตรงที่ตัวอ่อนจะต้องพบสารนี้ที่ embryonic tissue แน่นอน

Ferm[6] ศึกษาเกี่ยวกับความพิการแต่กำเนิดอันเนื่องจากสารเคมีชนิดนี้ในกระต่าย พบว่าหลังการให้ trypan blue กับกระต่ายที่ตั้งครรภ์ blastocyst จะมีสีน้ำเงินจาง ๆ ซึ่งเป็นสีของ trypan blue อย่างไรก็ตาม Ferm ไม่สามารถสาธิตสารเคมีใน embryonic tissue ได้

Turbow[20] ศึกษาโดยใช้ trypan blue ฉีดไปที่ตัวอ่อนของหนูโดยตรงหลังจากมี implantation แล้วปรากฏว่าลูกหนูมีความพิการแต่กำเนิด Turbow จึงสรุปว่า trypan blue ออกฤทธิ์โดยตรงที่ตัวอ่อน แต่ก็มีข้อโต้แย้งว่าการเจริญผิดปกติของลูกหนูอาจจะเป็น irritant effect จากการฉีด ไม่ใช่เกิดจากสารเคมี

การศึกษาดังกล่าวแล้วนี้มุ่งหมายจะชี้ให้เห็นถึงการที่ trypan blue ไปออกฤทธิ์โดยตรงที่ตัวอ่อน และทำให้เกิดความพิการแต่กำเนิด แต่ก็มีผู้ที่ศึกษาและกล่าวถึงผลทางอ้อมอันเกิดจากสารเคมีนี้เหมือนกัน เช่น Gillman et al[9] ศึกษา metabolic pathway ของ trypan blue และบรรยายว่า trypan blue มีฤทธิ์กระตุ้นให้เกิด erythrophagocytosis ทำให้เกิด anemia จากเหตุนี้จึงทำให้ตัวอ่อนมี hypoxia และขัดขวางการเจริญ

Langman และ Van Drunen[14] เชื่อว่า trypan blue ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับของ serum protein ในแม่

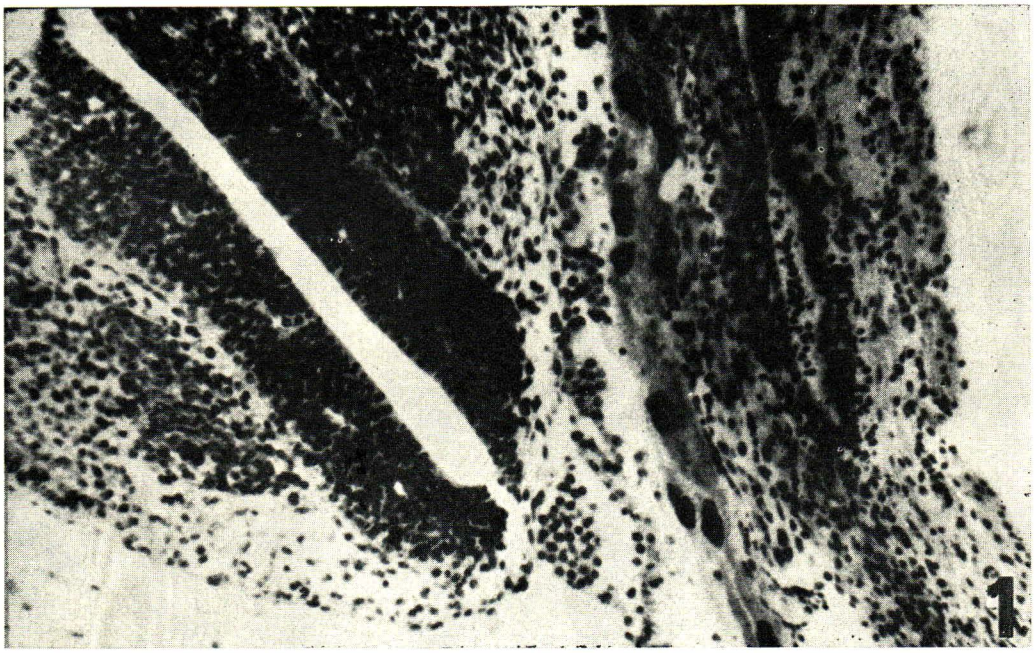
Beck *et al*[3,4] ได้ศึกษาใน chick blastoderm ที่ได้ trypan blue พบว่าที่ yolk sac epithelium ซึ่งเป็นบริเวณที่มี active phagocytosis จะมี lysosomal enzyme acid phosphatase คั่งมากจึงเชื่อว่า trypan blue ไป inhibit lysosomal enzyme ของ yolk sac ทำให้สิ่งต่างๆ ในแม่ที่มีโมเลกุลใหญ่ไม่สามารถจะ break down และผ่านไปสู่ตัวอ่อนได้

สรุป

การศึกษานี้แสดงว่าการชักนำให้เกิดความพิการแต่กำเนิดนั้นมิได้จากการที่ trypan blue ไปออกฤทธิ์โดยตรงที่ตัวอ่อน ทั้งนี้จากการที่ไม่พบ radioactivity ที่ตัวอ่อนเลย และสนับสนุนการศึกษาของ Wilson[22] ซึ่งใช้ C^{14}-labeled trypan blue แล้วไม่พบว่ามี radioactivity ในตัวอ่อนเช่นเดียวกัน

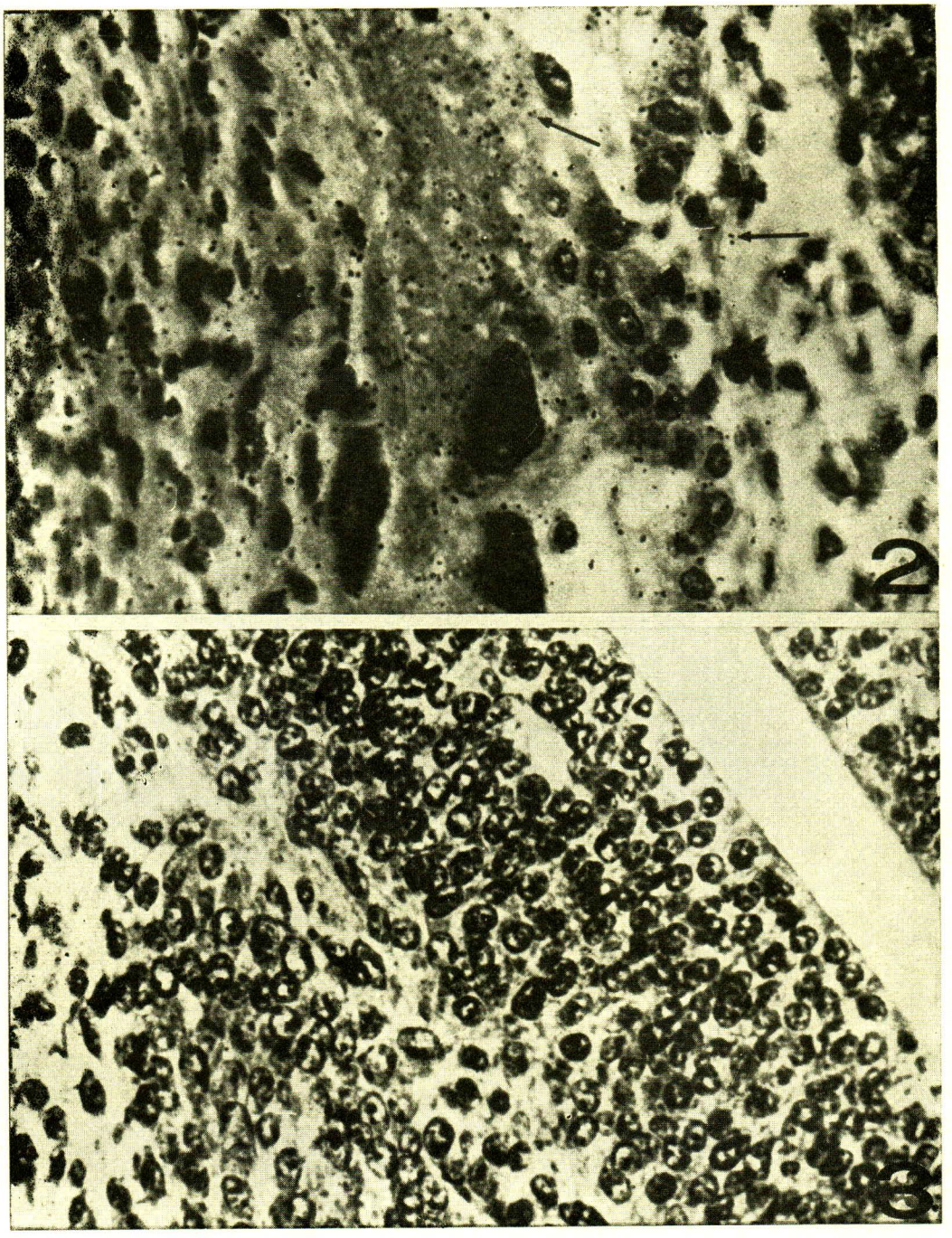
เอกสารอ้างอิง

1. Barber, AN and Geer, JC : Studies on the teratogenic properties of trypan blue and its components in mice. J Embryol Exp Morph 12: 1-14, 64
2. Beck, F, and Lloyd, JB : The preparation and teratogenic properties of pure trypan blue and its common contaminants. J Embryol Exp Morph 11 : 175-84, 63
3. Beck, F, and Lloyd, JB : The tertogenic effects of azodyes. Advances in Teratology 1 : 131-93, 66
4. Beck, F, Lloyd, JB and Griffiths, A : Lysosomal enzyme inhibition by trypan blue : a theory of teratogenesis
   Science 157 : 1180-82, 8 Sep 67
5. Christie, GA : The teratogenic activity of trypan blue, and its effect on the thyro-hypophuseal axis in the rat. J Anat 98 : 377-84, 64
6. Ferm, VH : Permeability of the rabbit blastocyst to trypan blue. Anat Rec 125 : 745-59, 56
7. Ferm, VH : Teratogenic effects of tyypan blue on hamster embryos. J Embryol Exp Morph 6 : 284-87, 58
8. Fish, M : Some cardiac anomalies in the embryos of trypan blue treated rats. Anat Rec 157 : 244, 67
9. Gillman, J, Gilbert, C, and Gillman, T, : Preliminary report on hydrocephalus, spina bifida and other congenital anomalies in rat produced by trypan blue, significance of these results in interpretation of congenital malformations following maternal rubella. South Afr JM Sc 13 : 47-90, 48
10. Gregg, NM : Congenital cataract following German measles in the mother. Tr Ophth Soc Australia (1941) 3 : 35-46, 42
11. Hamburgh, M : The embryology of trypan blue induced abnormalities in mice. Anat Rec 119 : 409-27, 54
12. Hoar, RM, and Salem, AJ Time of teratogenic action of trypan blue in guinea pigs. Anat Rec 141 : 173-81, 61
13. Joneja, M, and Ungthavorn, S : Chromosome aberrations in trypan blue induced teratogenesis in mice. Canad J Genet Cytol 10 : 91-8, 68



รูปที่ 1 *Paraffin section แสดง placental tissue และ embryonic tissue บริเวณ neural tube (100 ×)*

รูปที่ 2 *Paraffin section แสดง placental tissue มีจุดดำซึ่งเป็น silver grains (ลูกศรชี้) กระจายอยู่ทั่วไป (1000 x)*



รูปที่ 3 *paraffin section แสดง embryonic tissue บริเวณ neural tube ไม่มีจุดดำเลย (1000 ×)*

14. Langman, J, and Van Drumen, H : The effect of trypan blue upon maternal protein metabolism and ombryonic development. Anat. Rec. 133 : 513-25, 59

15. Lenz, W : Thai; domide and congenital abnormalities. Lancet 1 : 45. 62

16. Mellin, GW, and Katzenstein, M : The saga of thalidomide : Neuropathy to embryopathy, with case reports of congenital anomalies. New Eng J Med 267 : 1184-92, Contd, 6 Dec 62

17. Mellin, GW, and Katzenstein, M : The saga of thalidomide Neuropathy to embryopathy with case reports of congenital anomalies. New Eng J Med 267 : 1238-44, concl. 13 Dec 62

18. Plummer, G : Anomalies occurring in children exposed in utero to the atomic bomb in Hiroshima. Pediatrics 10 : 687-93, 52

19. Robson, JM, and Sullivan, FM : Mechanism of lethal action of 5-hydroxytryptamine on the foetus. J Endocr 25 : 553-54, 63

20. Robson, JM, Poulson, E, and Sullivan, FM : Pharmacological principles of teratogenesis. In : A symposium on embryopathic activity of drugs. J & A Churchill London pp. 21-35, 65

21. Turbow, MM : Teratogenic effect of trypan blue on rat embryos cultivated in vitro. Nature 206 : 637, 8 May 65

22. Waddington, CH, and Carter, TC : Abnormalities induced in mouse embryos by trypan blue. J Embryol Exp Morph. 1 : 167-80, 53

23. Wilson, JG, Shepard, TH, and Gennaro, JF. : Studies on the site of teratogenic action of C^{14} labeled trypan blue. Anat Rec 145 : 300, 63

24. Woollam, DH, and Millen, JW : The action of drugs of the embryo experimental mammalian teratology and the effects of drugs on the embryo. Proc Roy Soc Med 56 : 597-600, 63

25. Yamasaki, JN, Wright, SW, and Wright, PM : Outcome of pregnancy in women exposed to the atomic bomb in Nagasaki. AMAJ Dis Child 87 : 448-63, 54