บทที่ 3

ผลการทดลอง

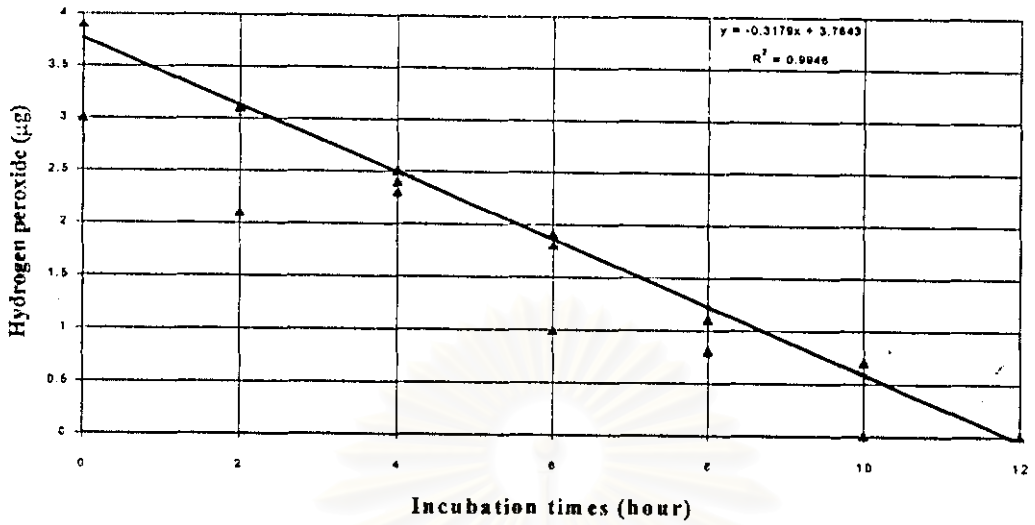
1. ปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ใช้ปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดส ที่มีลิวโคดริสตอลไวโอเลตเป็นสารตั้งต้น ทดสอบหาปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 596 นาโนเมตร นำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน

1.1 กราฟมาตรฐานแสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในช่วง 0.5 ถึง 5.0 ไมโครกรัม พบว่ามีความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) 0.9944 และมีการผันแปรของตัวแปรในลักษณะแปรตามกัน (แสดงในภาคผนวก ก.)

1.2 เสถียรภาพของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เวลาเริ่มต้น, 2, 4, 6, 8, 10 และ 16 ชั่วโมง แสดงในรูปที่ 1 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ พบว่ามีความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) 0.9973 และมีการผันแปรของตัวแปรในลักษณะแปรผกผันต่อกัน โดยพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีการสลายตัว 50% เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง และจะไม่พบไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 12 ชั่วโมง เป็นต้นไป

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 1 เสถียรภาพของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่เวลาต่าง ๆ

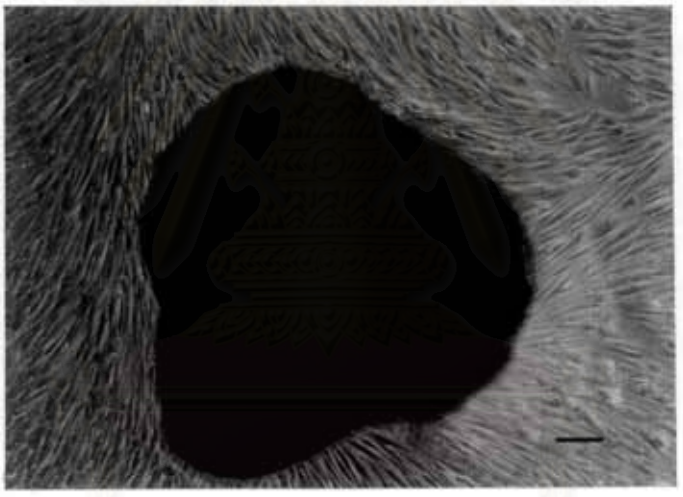
2. ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ในปฏิบัติการ

2.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ภาพถ่ายภายใต้กล้องจุลทรรศน์ แสดงในรูปที่ 2 ภาพถ่ายชิ้นเนื้อ ของเนื้อเยื่อในโพรงฟันที่กำลังขยาย 40 เท่า ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์จากการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 7 วัน พบว่ามีเซลล์สร้างเส้นใยเกาะยึดที่ผิวของจานเพาะเลี้ยงอยู่รอบ ๆ ของชิ้นเนื้อ เมื่อได้เซลล์ในรุ่นที่ 3-8 ในปริมาณที่มากพอสำหรับการทดลอง จึงทำการทดสอบผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์

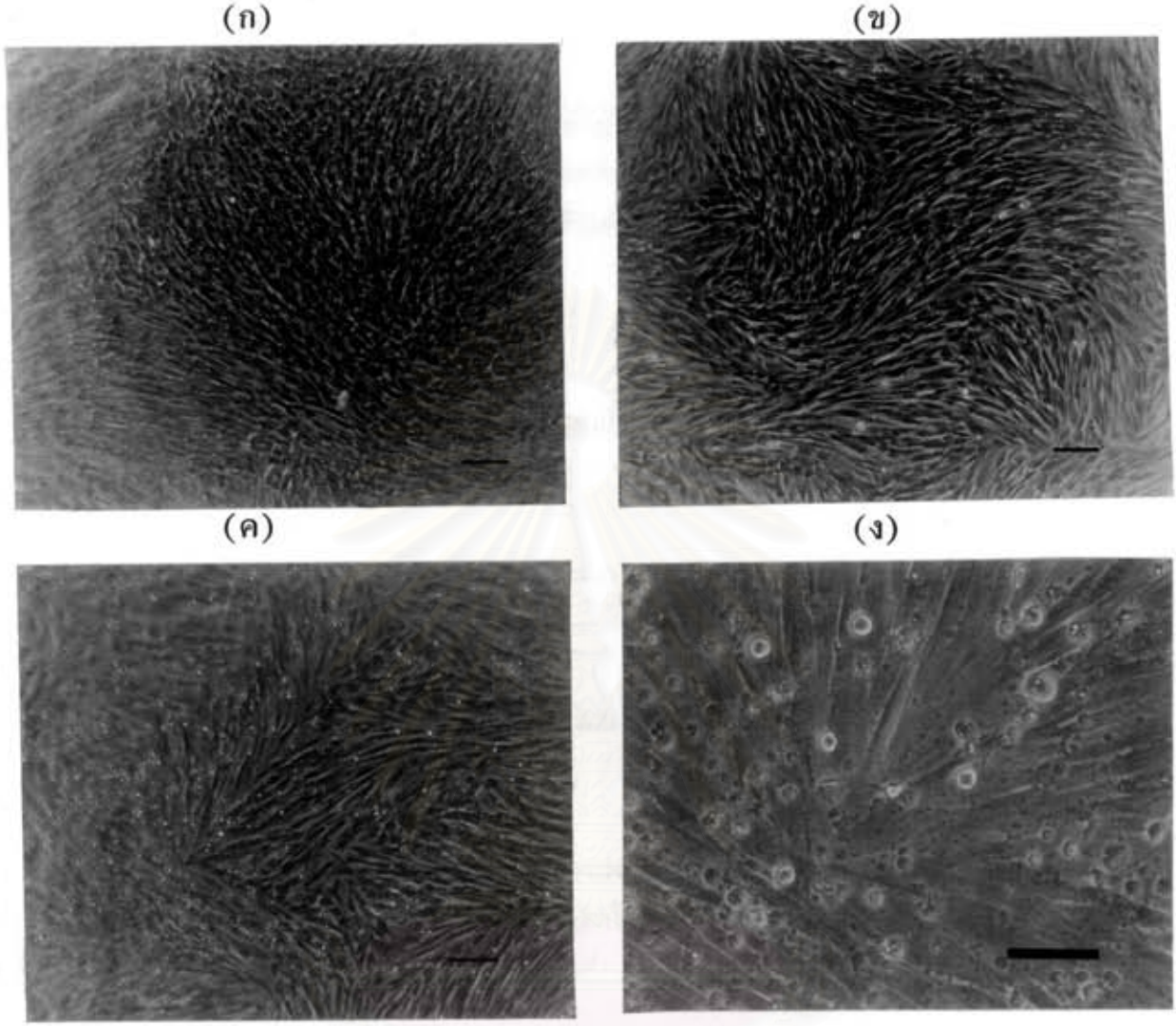
เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ พบว่าการตายของเซลล์ มีความสัมพันธ์กับปริมาณความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ดังในรูปที่ 3 (ก) แสดงภาพถ่ายลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เซลล์มีรูปร่างคล้ายกระสวย มีแขนงยื่นออกจากเซลล์ 2-3 แขนงตามแนวยาวของเซลล์สามารถเกาะยึดติดกับผิวของจานเพาะเลี้ยง เซลล์เรียงตัวเป็นชั้นเดียวเต็มพื้นผิวจานเพาะเลี้ยง รูปที่ 3 (ข) แสดงภาพถ่ายลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์ พบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ และเซลล์ยัง

คงมีลักษณะรูปร่างปกติ , รูปที่ 3 (ค) แสดงภาพถ่ายลักษณะการตายของเซลล์ที่กำลังขยาย 40 เท่า จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ และเมื่อตรวจสอบลักษณะรูปร่างของเซลล์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า ดังแสดงในรูปที่ 3 (ง) ลักษณะของเซลล์ที่ตาย จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ พบว่าส่วนหนึ่งของเซลล์ตายจากการแตกสลายของผนังของเซลล์ที่สูญเสียสภาพ ในขณะที่อีกส่วนหนึ่งพบว่าเซลล์มีลักษณะรูปร่างเป็นทรงกลม อยู่ในสภาพแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ เนื่องจากเซลล์ขาดความสามารถในการเกาะยึดกับผิวของจานเพาะเลี้ยง ทำให้เซลล์หลุดออกจากผิวของจานเพาะเลี้ยง นอกจากนี้พบว่าเซลล์ที่ยังสามารถเกาะยึดอยู่กับผิวของจานเพาะเลี้ยงบางเซลล์มีลักษณะรูปร่างผิดไปจากปกติ รูปร่างเซลล์หดสั้นลง ผนังของเซลล์มีลักษณะไม่เรียบ



รูปที่ 2 ภาพถ่ายชิ้นเนื้อ ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน เพาะเลี้ยง 7 วัน พบว่ามีเซลล์สร้างเส้นใยอยู่รอบ ๆ ชิ้นเนื้อ *(ขนาดเครื่องหมายบาร์ = 50 ไมโครเมตร)*

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 3 (ก) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (กลุ่มควบคุม)

(ข) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 1.0 ไมโครโมลาร์

(ค) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ที่กำลังขยาย 40 เท่า

(ง) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์ ที่กำลังขยาย 100 เท่า

(ขนาดเครื่องหมายบาร์ = 50 ไมโครเมตร)

2.2 ผลการย้อมสีเมทิลีนบลู

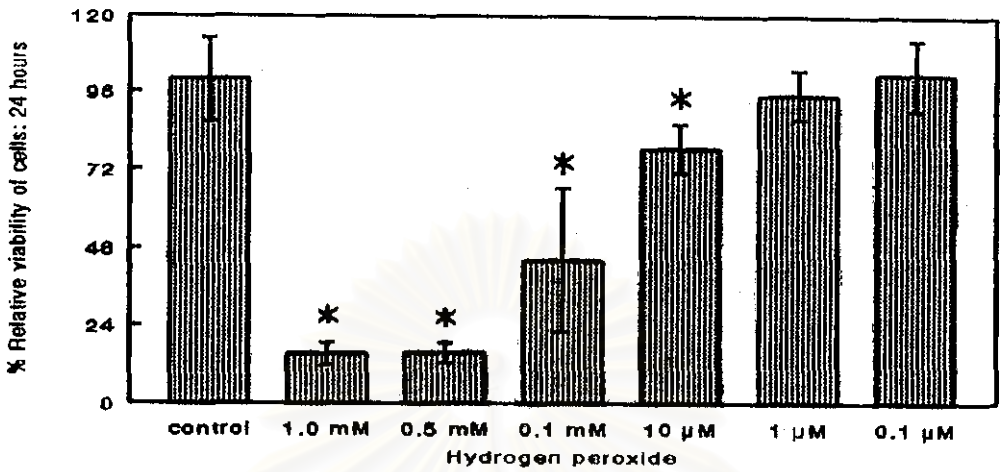
แสดงผลในเชิงปริมาณของเซลล์ที่ไม่ตายเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยเทียบค่าในกลุ่มควบคุมเป็น 100% สถิติวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้การทดสอบแบบ *Scheffe test* (One-Way Analysis Of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

2.2.1 กราฟมาตรฐาน

เนื่องจากการวัดปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายโดยการย้อมสีเซลล์ เป็นการวัดโดยทางอ้อม ต้องนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้เทียบกับกราฟมาตรฐาน (ตามขั้นตอนที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 2.2.3) ซึ่งพบว่าค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนเซลล์มีความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) 0.9957 และมีความผันแปรของตัวแปรในลักษณะแปรตามกัน (แสดงในภาคผนวก ข.)

2.2.2 ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ต่อเซลล์ในปฏิบัติการ

ผลการตอบสนองของเซลล์ จากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่าการตายของเซลล์มีความสัมพันธ์กับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ ดังแสดงในรูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่าง ๆ กัน ผลการทดลองที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่มีผลต่อการตายของเซลล์ทำให้ปริมาณเซลล์ที่คงอยู่เมื่อเทียบกับปริมาณเซลล์ที่ได้จากกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 10 ไมโครโมลาร์, 0.1 มิลลิโมลาร์, 0.5 มิลลิโมลาร์ และ 1.0 มิลลิโมลาร์ โดยพบว่ามีปริมาณเซลล์ที่ไม่ตาย 78.6 $\pm$ 7.4%, 44.3 $\pm$ 22.2%, 15.0 $\pm$ 3.0% และ 15.3 $\pm$ 3.4% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ทำให้ปริมาณเซลล์ที่คงอยู่เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ซึ่งได้แก่ เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 0.1 ไมโครโมลาร์ และ 1.0 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 101.7 $\pm$ 11.1% และ 95.2 $\pm$ 7.5% ตามลำดับ



รูปที่ 4 **กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ (*24 ชั่วโมง*)**

[* *หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Scheffe test ($p < 0.05$)*]

จากผลการศึกษาน่าร่องดังกล่าว นำไปสู่การทดสอบในขั้นต่อมา โดยเลือกใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในช่วงแคบและจำเพาะยิ่งขึ้น ดังนี้คือ 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นดังกล่าวเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มากที่สุดที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์

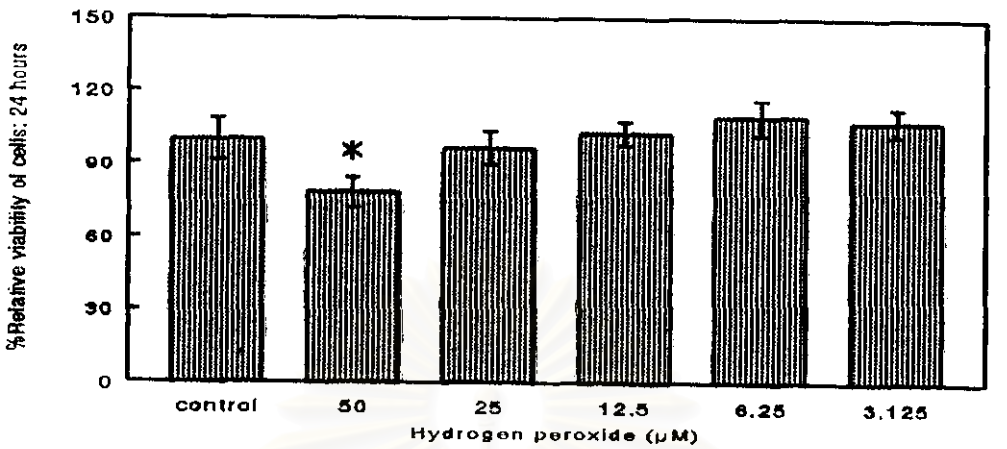
ผลการทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ใช้เซลล์จากผู้ป่วย 2 ราย มีดังนี้

รูปที่ 5 (ก) แสดงกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ เซลล์จากผู้ป่วยรายที่ 1 พบว่าในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย ทำให้ปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่ เมื่อเปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุม มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 50 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 78.1 ± 6.24% ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นในช่วง 3.125 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 3.125 ถึง 25 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์

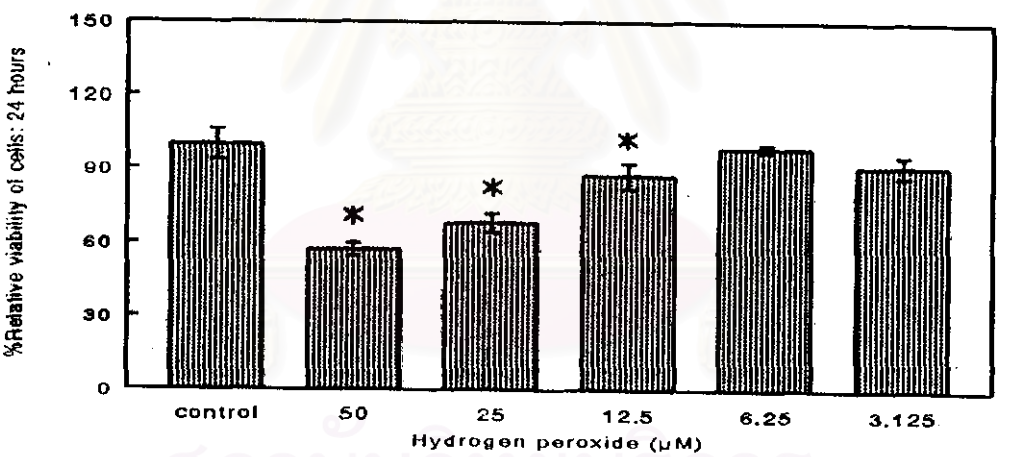
รูปที่ 5 (ข) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยรายที่ 2 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย และปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุม พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ 50 , 25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 57.3 ± 2.6% , 68.0 ± 4.0% และ 87.3 ± 5.2% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3.125 ถึง 6.25 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้น 3.125 ถึง 6.25 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์

เปรียบเทียบผลการตอบสนองของเซลล์ของผู้ป่วย 2 ราย *ที่ 24 ชั่วโมง* พิจารณาในส่วนของปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์*ที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์* ผู้ป่วยรายที่ 1 พบที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เซลล์ทดสอบของผู้ป่วยรายที่ 2 พบที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์

(ก)



(ข)



รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์

(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1*

(ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*

[* *หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Scheffe test ($p < 0.05$)*]

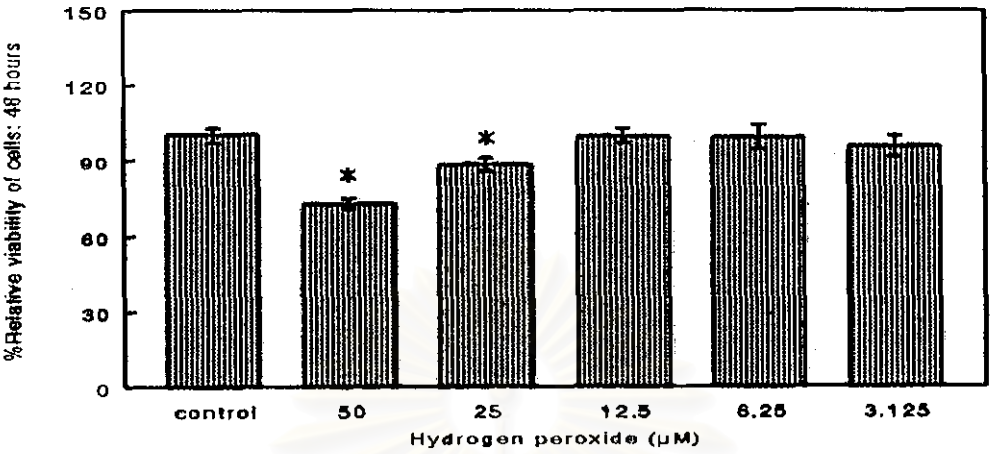
ผลการทดสอบเซลล์เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ใช้เซลล์จากผู้ป่วย 2 ราย มีดังนี้

รูปที่ 6 (ก) แสดงกราฟความสัมพันธ์ ระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ ผลจากการเพาะเลี้ยงเซลล์จากผู้ป่วยรายที่ 1 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย ทำให้ปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่เปรียบเทียบกับปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50 และ 25 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 72.7 ± 2.0% และ 88.1 ± 2.7% ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่กับปริมาณเซลล์ในกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 99.6 ± 2.9%, 99.2 ± 4.9% และ 95.60 ± 4.3% ตามลำดับ

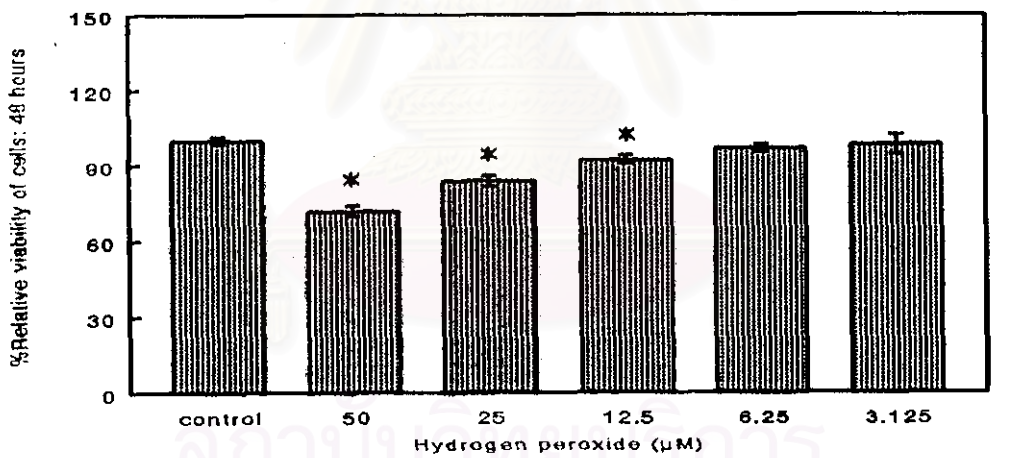
รูปที่ 6 (ข) แสดงกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ ซึ่งผลที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ของผู้ป่วยรายที่ 2 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย ทำให้ปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่เปรียบเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ การเพาะเลี้ยงที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ความเข้มข้น 50, 25 และ 12.5 ไมโครโมลาร์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 71.9 ± 2.2% , 83.9 ± 2.1% และ 92.2 ± 1.7% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ เมื่อเปรียบเทียบปริมาณเซลล์กับกลุ่มควบคุม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แสดงให้เห็นว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 3.125 ถึง 6.25 ไมโครโมลาร์ ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ โดยพบว่ามีเซลล์ที่ไม่ตาย 96.6 ± 1.6% และ 98.2 ± 3.9% ตามลำดับ

เปรียบเทียบผลการตอบสนองของเซลล์ของผู้ป่วย 2 ราย ***ที่ 48 ชั่วโมง*** พิจารณาในส่วนของปริมาณเซลล์ที่ยังคงอยู่จากการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เมื่อเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์***ที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์*** ผู้ป่วยรายที่ 1 พบที่ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์ ในขณะที่เซลล์ทดสอบของผู้ป่วยรายที่ 2 พบที่การเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์

(ก)



(ข)



รูปที่ 6 กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 ไมโครโมลาร์

(ก) ผู้ป่วยรายที่ 1

(ข) ผู้ป่วยรายที่ 2

[* *หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Scheffe test ($p < 0.05$)*]

ผลการทดสอบของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2 จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 24 และ 48 ชั่วโมง *ระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์* นำไปสู่การทดสอบขั้นต่อมา โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25 , 12.5 , และ 6.25 ไมโครโมลาร์ เพื่อศึกษาผลกระทบของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่อาจมีผลต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ในการสร้างโปรตีน 2 ชนิด คือ *ไฟโบรเนกติน* และ*เส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1*

3. ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการสร้างไฟโบรเนกติน และเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

3.1 ผลต่อการสร้างไฟโบรเนกติน

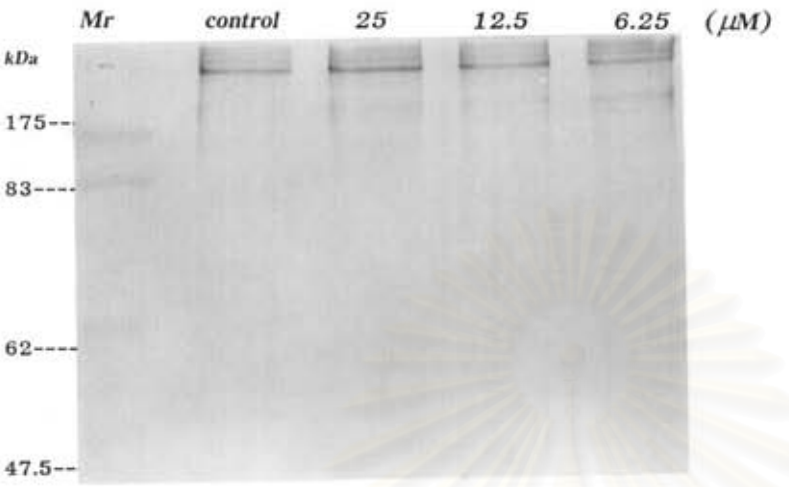
ใช้เซลล์สร้างเส้นใยที่ได้จากผู้ป่วยจำนวน 2 ราย โดยทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ ซึ่งครอบคลุมช่วงความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ทดสอบที่ได้จากผู้ป่วย 2 ราย เพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้จากเวสเทิร์นบลอท

3.1.1 ผลจากเวสเทิร์นบลอทและการวิเคราะห์ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

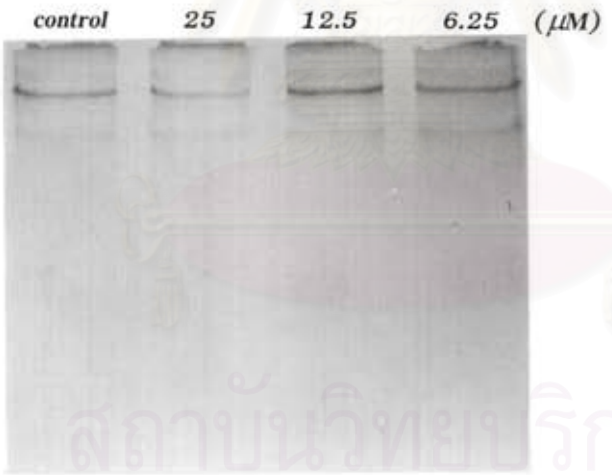
ภาพถ่ายผลการย้อมไฟโบรเนกตินของเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 7 ไฟโบรเนกตินจากเซลล์ทดสอบ (ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 และ (ข) ผู้ป่วยรายที่ 2

ภาพถ่ายผลการย้อมไฟโบรเนกตินของเซลล์เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ดังแสดงในรูปที่ 8 ไฟโบรเนกตินจากเซลล์ทดสอบ (ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 และ (ข) ผู้ป่วยรายที่ 2

(ก)



(ข)



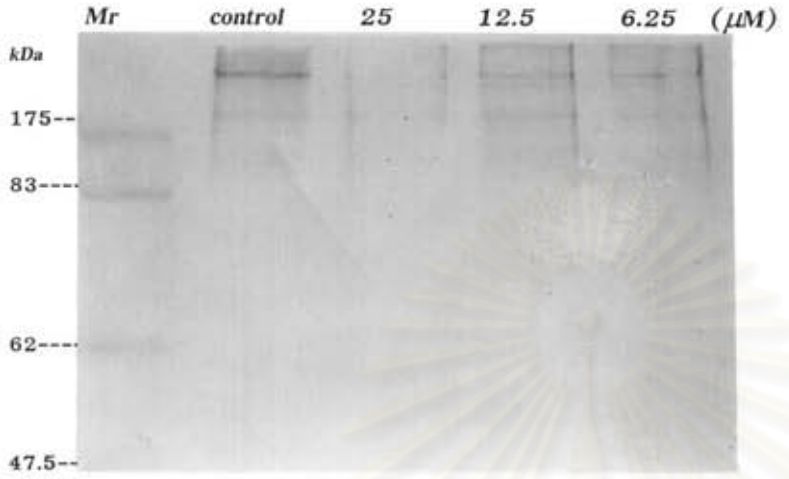
สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ภาพถ่ายผลการย้อมไฟโบรเนกตินที่ได้จากเวสเทิร์นบลอท และการวิเคราะห์ทางวิธีภูมิคุ้มกันวิทยาเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์

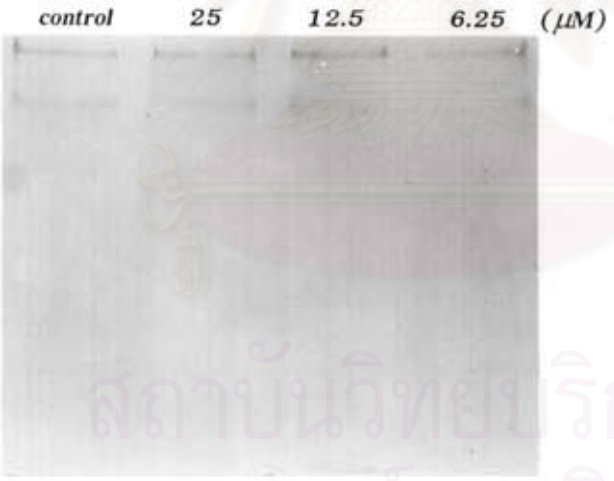
(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1*

(ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*

(ก)



(ข)



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 8 ภาพถ่ายผลการย้อมไฟโบรเนกตินที่ได้จากเวสเทิร์นบลอท และการวิเคราะห์ทางวิธีภูมิคุ้มกันวิทยาเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์

(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1*

(ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*

3.1.2 ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

กราฟมาตรฐาน

เตรียมปริมาณไฟโบรเนกตินที่ทราบค่า แล้วทำการวิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกันบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้จากเวสเทิร์นบลอท จากนั้นนำไปอ่านค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้น ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่าง ปริมาณไฟโบรเนกตินและค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้น (กราฟมาตรฐานของไฟโบรเนกติน แสดงในภาคผนวก ค.) ซึ่งพบว่ามีความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) 0.9924 และมีการผันแปรของตัวแปรในลักษณะแปรตามกัน

ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ เพาะเลี้ยงเซลล์ 24 ชั่วโมง

แสดงผลในเชิงปริมาณของไฟโบรเนกตินเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยเทียบค่าในกลุ่มควบคุมเป็น 100% สถิติวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้การทดสอบแบบ *Scheffe test* (One-Way Analysis Of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน ของเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วย 2 ราย จากการเพาะเลี้ยง *24 ชั่วโมง* แสดงใน รูปที่ 9 (ก) พบว่าเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 2 ราย ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระดับที่ไม่ก่อให้เกิดการตายของเซลล์ ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์มีผลกระตุ้นให้เซลล์สร้างไฟโบรเนกตินเพิ่มขึ้น โดยพบว่าในผู้ป่วยรายที่ 1 เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 12.5, 6.25 ไมโครโมลาร์ มีปริมาณของไฟโบรเนกตินมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่ามีปริมาณไฟโบรเนกติน 212.2 $\pm$ 8.9% และ 293.2 $\pm$ 13% ตามลำดับ ซึ่งมากเป็น 2 และ 3 เท่า ของกลุ่มควบคุม ซึ่งในผู้ป่วยรายที่ 2 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ สร้างไฟโบรเนกตินได้มากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) โดยพบว่ามีปริมาณไฟโบรเนกติน 363.0 $\pm$ 10.2%, 332.2 $\pm$ 9.2% และ 505.6 $\pm$ 2.9% ซึ่งปริมาณไฟโบรเนกตินมากเป็น 3- 5 เท่า ของกลุ่มควบคุม

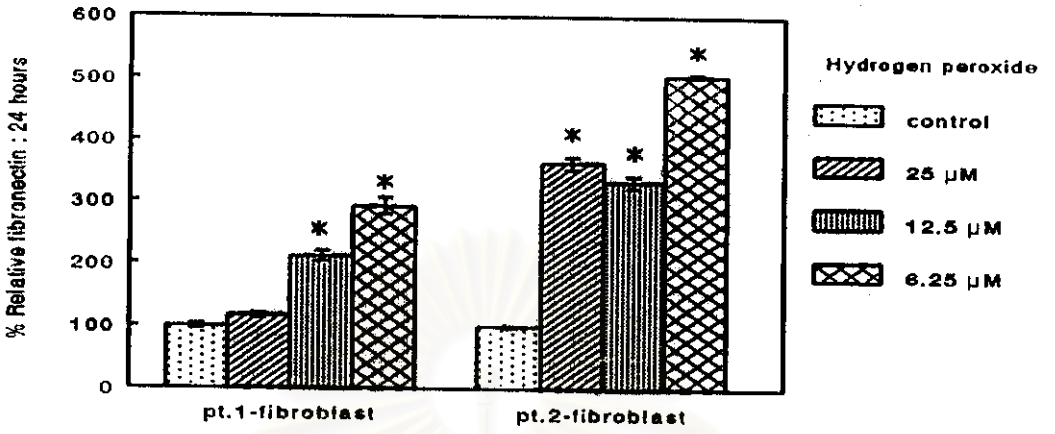
เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน ที่ได้จากเซลล์ของผู้ป่วย 2 ราย จากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง พบว่าผลที่ได้สอดคล้องและเป็นไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือ *เซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ทดสอบของผู้ป่วย 2 ราย มีผลกระตุ้นเซลล์สร้างไฟโบรเนกตินมากขึ้น*

ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเคนซิโตมิเตอร์ เพาะเลี้ยงเซลล์ 48 ชั่วโมง

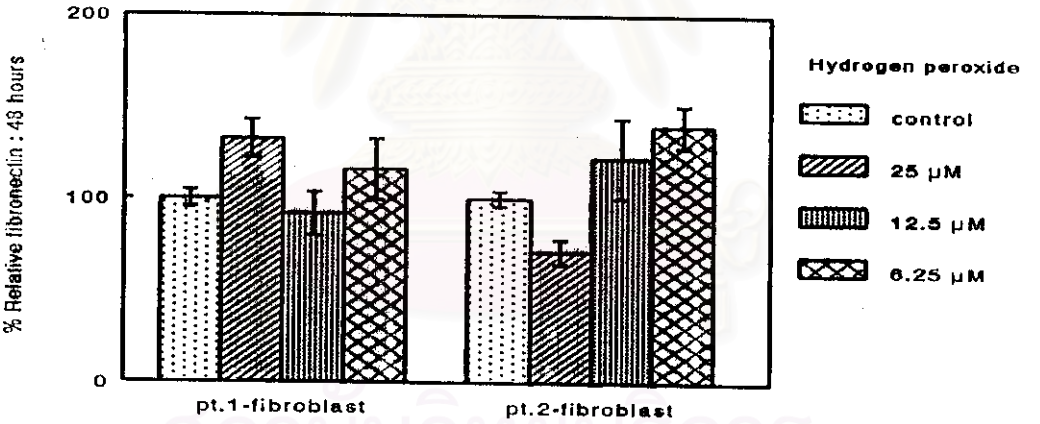
ดังแสดงใน รูปที่ 9 (ข) เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ พบว่าเซลล์ของผู้ป่วยรายที่ 1 เมื่อเพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ เซลล์สามารถสร้างไฟโบรเนกตินได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยเซลล์สร้างไฟโบรเนกตินได้ 132.6 ± 10.5%, 91.8 ± 11.9% และ 116.1 ± 16.5% ตามลำดับ และในผู้ป่วยรายที่ 2 พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ พบว่าเซลล์สามารถสร้างไฟโบรเนกตินได้ในปริมาณที่ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยพบว่าเซลล์สร้างไฟโบรเนกตินได้ 71.68 ± 6.8%, 122.3 ± 21.9% และ 139.7 ± 11.5% ตามลำดับ

เปรียบเทียบผลการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน ที่ได้จากผู้ป่วย 2 ราย พบว่าผลที่ได้สอดคล้องและเป็นไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือเซลล์เพาะเลี้ยงที่ *48 ชั่วโมง* ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ทดสอบจากผู้ป่วย 2 ราย ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการสร้างไฟโบรเนกตินอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

(ก)



(ข)



รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ ของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2

(ก) เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง

(ข) เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง

[* *หมายถึง มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Scheffe test ($p < 0.05$)*]

3.2 ผลต่อการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วย 2 ราย เป็นเวลา 7 วัน ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 25, 12.5, 6.25 ไมโครโมลาร์ ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ ทดสอบจากผู้ป่วย 2 ราย วัดปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยวิธีวิเคราะห์ของดอทบลอท ย้อมเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน อ่านค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

3.2.1 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องดอทบลอทและวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน

ภาพถ่ายผลการวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยเครื่องดอทบลอท และวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ดังแสดงในรูปที่ 10 (ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 (ข) ผลที่ได้จากการทดสอบอย่างเดียวกัน โดยใช้เซลล์ทดสอบที่ได้จากผู้ป่วยรายที่ 2

3.2.2 ผลการวิเคราะห์ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

กราฟมาตรฐาน

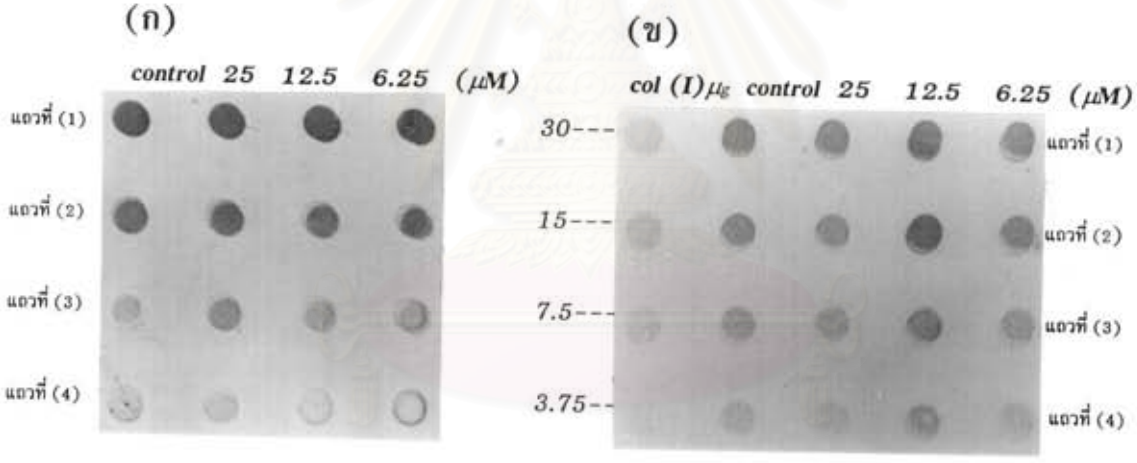
สร้างกราฟมาตรฐาน จากการเตรียมปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ที่ทราบค่าในเครื่องดอทบลอท แล้วย้อมเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ตามวิธีที่กล่าวในบทที่ 2 ข้อ 3.2.2 พบว่ากราฟมาตรฐานของเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 (แสดงในภาคผนวก ค.) มีความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรง มีค่าสัมประสิทธ์สหสัมพันธ์ (r) 0.9958 และมีการผันแปรของตัวแปรในลักษณะแปรตามกัน

ผลการวิเคราะห์เส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์

แสดงผลในเชิงปริมาณของเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน โดยเทียบค่าในกลุ่มควบคุมเป็น 100% สถิติวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้การทดสอบแบบ *Scheffe test* (One-Way Analysis Of Variance) ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 แสดงในรูปที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ของเซลล์ทดสอบที่ได้จากผู้ป่วย 2 ราย พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ สามารถสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ได้ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยพบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงของผู้ป่วยรายที่ 1 สร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ได้ 96.3 ± 5.8%, 92.8 ± 5.3% และ 93.0 ± 1.0% ตามลำดับ ในขณะที่เซลล์เพาะเลี้ยงของผู้ป่วยรายที่ 2 สร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ได้ 82.7 ± 3.6% , 127.9 ± 5.3% และ 100.2 ± 0.8% ตามลำดับ

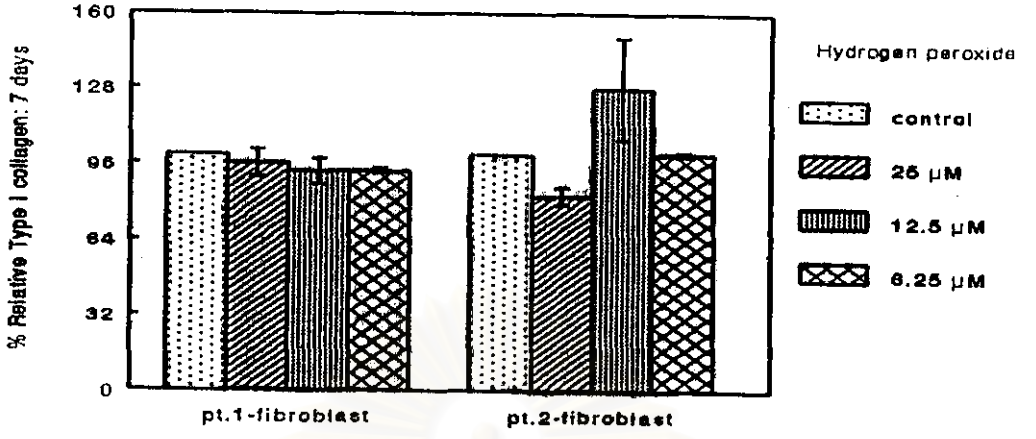
ผลการทดลองที่ได้จากผู้ป่วยทั้ง 2 ราย สอดคล้องและเป็นไปในแนวทางเดียวกัน กล่าวคือ ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จากการเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 7 วัน



รูปที่ 10 ภาพถ่ายผลการวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยเครื่องดอทบลอทและวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์

(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1* [ปริมาตรโปรตีนสกัดใน 5% SDS แถวที่ (1): 324, แถวที่ (2): 162, แถวที่ (3): 81, แถวที่ (4): 40.5 μl]

(ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2* [ปริมาตรโปรตีนสกัดใน 5% SDS แถวที่ (1): 252, แถวที่ (2): 126, แถวที่ (3): 63, แถวที่ (4): 31.5 μl]



รูปที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ ของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2 เพาะเลี้ยง 7 วัน

[ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ Scheffe test ($p > 0.05$)]

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย