ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

นางสาวเกษรา ปัทมพันธุ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก
บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-454-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

I 40026Q

THE EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS *IN VITRO*

Miss Kassara Pattamapun

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Sciences in Oral Biology
Graduate School
Chulalongkorn University
Academic year 1998

ISBN 974-331-454-7

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์
โดย	นางสาวเกษรา ปัทมพันธุ์
สาขาวิชา	ชีววิทยาช่องปาก
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. ไพฑูรย์ สังวรินทะ
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพ. ดร. รัตน์ เสรีนิราช)

.....อาจารย์ที่ปรึกษา
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. ไพฑูรย์ สังวรินทะ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย)

.....กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ ทพ. ดร. จีรศักดิ์ นพคุณ)

.....กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เกษรา ปัทมพันธุ์ : ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ (THE EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS *IN VITRO*) อ.ที่ปรึกษา : ผ.ศ. ทพ. ดร. ไพฑูรย์ สังวรินทะ, อ.ที่ปรึกษาร่วม: ร.ศ. ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย; 84 หน้า. ISBN 974-331-454-7.

งานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการสร้างไฟโบรเนกติน และเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ของเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาในช่วงแรกเป็นการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่ำกว่าหรือเท่ากับ 6.25 ไมโครโมลาร์ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นดังกล่าว และทำการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินที่เซลล์สร้างในเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าเซลล์เพิ่มการสร้างไฟโบรเนกตินขึ้น 2-5 เท่าในเวลา 24 ชั่วโมง ($p<0.05$) เมื่อเทียบกับปริมาณที่สร้างในกลุ่มควบคุม แต่ไม่เห็นผลที่ชัดเจนเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ($p>0.05$) และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะอย่างเดียวกันเป็นเวลา 7 วัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) จึงมีความเป็นไปได้ว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในความเข้มข้นต่ำที่ไม่ทำให้เซลล์ตายอาจมีผลเปลี่ยนแปลงการทำหน้าที่ของเซลล์ ภายในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรกภายหลังจากเซลล์ได้รับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา .....
สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก
ปีการศึกษา 2541

ลายมือชื่อนิสิต .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา .....
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม .....

พิมพ์ต้นฉบับบทคัดย่อวิทยานิพนธ์ภายในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

C865015 : MAJOR ORAL BIOLOGY
KEY WORD: : BLEACHING / HYDROGEN PEROXIDE / FIBROBLAST / CELL- RESPONSE / FIBRONECTIN / TYPE I COLLAGEN

KASSARA PATTAMAPUN : THE EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS *IN VITRO*. THESIS ADVISOR : ASSIST. PROF. PAITOON SANVARINDA, Ph.D. THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF. EM-ON BENJAVONGKULCHAI, Ph.D. 84 pp. ISBN 974-331-454-7.

The purpose of this study was to determine the effects of H_2O_2 on human dental pulp fibroblasts *in vitro*. Cultured cells were exposed to various concentrations of H_2O_2 for 24 and 48 hours. It was found that H_2O_2 has no lethal effect on cultured cells at concentrations 6.25 μM or less than. The concentration of H_2O_2 which does not significantly affect vital-cell staining (*Scheffe test*) is regarded as a non-lethal level. Quantitative analysis of the production of fibronectin and type I collagen in cultured cells which were exposed to non-lethal concentrations of H_2O_2 were performed. It revealed that under such condition H_2O_2 had upregulated the production of fibronectin at 24 hours, 2-5 times of control ($p<0.05$), but there was no significant difference ($p>0.05$) at 48 hours. When the cultured cells were exposed to H_2O_2 under the same condition for 7 days, no significant difference in type I collagen production ($p>0.05$) was found. It may be possible that H_2O_2, at sub-lethal concentrations, could alter certain function of the cells after 24 hours of exposure to H_2O_2.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาควิชา..... ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชา ชีววิทยาช่องปาก ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2541 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดียิ่งของ คณาจารย์หลายท่าน ประกอบด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทญ. ดร. วิสาขะ ลิ่มวงศ์ ซึ่งท่านเป็นผู้จัดตั้งหลักสูตรชีววิทยาช่องปากด้วยความมุ่งมั่น ตั้งใจ เสียสละ และทุ่มเทกับงานการเรียนการสอนของหลักสูตรในระดับบัณฑิตศึกษามาโดยตลอด การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. ไพฑูรย์ สังวรินทะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร เบญจวงศ์กุลชัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม และได้รับความกรุณาช่วยเหลือดูแลให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่องานศึกษาวิจัยในส่วนของปฏิบัติการอย่างดียิ่งจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทพ. ดร. ประสิทธิ์ ภวสันต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทญ. ทัศนีย์ ดรงค์สุวรรณ อีกทั้งยังได้รับการสนับสนุนร่วมมือเป็นอย่างดี จากคณาจารย์และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชากายวิภาคศาสตร์ ภาควิชาเภสัชศาสตร์ คลินิกบูรณะช่องปากและใบหน้า ภาควิชาทันตกรรมประดิษฐ์ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากที่ได้กรุณาจัดเก็บเนื้อเยื่อสำหรับงานวิจัย ทั้งยังเอื้ออำนวยความสะดวกในการเตรียมสารเคมีและการดำเนินงานในส่วนของปฏิบัติการด้วยน้ำใจที่ดีงามมาโดยตลอด ผู้วิจัยจึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณท่านคณาจารย์ทุกท่าน ตลอดจนผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกท่านที่มิได้กล่าวในที่นี้ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ ทพ. ชาญชัย โห้สงวน ที่ท่านกรุณาให้คำแนะนำด้านสถิติที่ใช้สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงใคร่ขอกราบขอบพระคุณมา ณ ที่นี้ด้วย

ท้ายนี้ผู้วิจัยใคร่ขอกราบขอบพระคุณคณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ที่ให้การสนับสนุนการศึกษาต่อในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิดา-มารดา ตลอดจนญาติผู้ใกล้ชิดทุกท่านที่ได้กรุณาให้การสนับสนุนด้านการเงิน และมอบกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย ..... ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ ..... จ
กิตติกรรมประกาศ ..... ฉ
สารบัญ ..... ช
สารบัญรูป ..... ฌ
บทที่
1 บทนำ 1
1.1 ความเป็นมา 1
1.2 ความสำคัญของปัญหา 7
1.3 สมมติฐานการวิจัย 11
1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย 12
1.5 ขอบเขตการวิจัย 12
1.4 ข้อตกลงเบื้องต้น 13
1.7 คำสำคัญ 13
1.8 รูปแบบการวิจัย 13
1.9 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย 14
2 ระเบียบวิธีวิจัย 15
2.1 ประชากรและตัวอย่าง 16
2.2 วัสดุและอุปกรณ์การทดลอง 16
2.3 วิธีทดลอง 17
2.3.1 การวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 17
2.3.2 การทดสอบผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ในปฏิบัติการ 19
2.3.2.1 การเตรียมเซลล์ 19
2.3.2.2 การตอบสนองของเซลล์ 20
2.3.3 การทดสอบผลต่อการสร้างโปรตีน 21
2.3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟโบรเนกติน 23
2.3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 24
2.3.4 การสร้างกราฟมาตรฐานไฟโบรเนกตินและเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 25

หน้า

3 ผลการทดลอง 26
3.1 ปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 26
3.2 ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ในปฏิบัติการ 26
3.2.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ 26
3.2.2 ผลการย้อมสีเมทิลีนบลู 30
3.3 ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการสร้างโปรตีน 36
3.3.1 ผลต่อการสร้างไฟโบรเนกติน 36
3.3.2 ผลต่อการสร้างเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 42
4 อภิปรายผลการทดลองข้อเสนอแนะ และสรุปผลการทดลอง 45
4.1 อภิปรายผลการทดลอง 45
4.2 ข้อเสนอแนะ 51
4.3 สรุปผลการทดลอง 54
รายการอ้างอิง 55
ภาคผนวก 62
ภาคผนวก ก 63
ภาคผนวก ข 67
ภาคผนวก ค 74
ประวัติผู้วิจัย 84

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญรูป

หน้า

รูปที่ 1 เสถียรภาพของ H_2O_2ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....27

รูปที่ 2 ภาพถ่ายชิ้นเนื้อ ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์.....28

รูปที่ 3 (ก) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 (กลุ่มควบคุม).....29

(ข) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี H_2O_2 1.0 μM.....29

(ค) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี H_2O_2 10 μM ที่กำลังขยาย 40 เท่า.....29

(ง) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มี H_2O_2 10 μM ที่กำลังขยาย 100 เท่า.....29

รูปที่ 4 กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และในสภาวะที่มี H_2O_2 0.1 μM-1.0 mM.....31

รูปที่ 5 กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2และในสภาวะที่มี H_2O_2 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 μM

(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1* (ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*.....33

รูปที่ 6 กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และในสภาวะที่มี H_2O_2 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 μM

(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1* (ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*..... 35

รูปที่ 7 ภาพถ่ายผลการย้อมไฟโบรเนกติน ที่ได้จากเวสเทิร์นบลอท และการวิเคราะห์ทางวิธีภูมิคุ้มกันวิทยา เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และในสภาวะที่มี H_2O_2 25, 12.5 และ 6.25 μM

(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1* (ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*..... 37

หน้า

รูปที่ 8 ภาพถ่ายผลการย้อมไฟโบรเนกตินที่ได้จากเวสเทริน์บลอท และการวิเคราะห์ทางวิธีภูมิคุ้มกันวิทยา เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2และในสภาวะที่มี H_2O_2 25, 12.5 และ 6.25 μM
(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1* (ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2* 38

รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟโบรเนกตินที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และในสภาวะที่มี H_2O_2 25, 12.5 และ 6.25 μM ของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2
(ก) *เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง* (ข) *เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง*.....41

รูปที่ 10 ภาพถ่ายผลการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยเครื่องดอทบลอท และวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และในสภาวะที่มี H_2O_2 25, 12.5 และ 6.25 μM
(ก) *ผู้ป่วยรายที่ 1* (ข) *ผู้ป่วยรายที่ 2*.....43

รูปที่ 11 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่ปราศจาก H_2O_2 และในสภาวะที่มี H_2O_2 25,12.5 และ 6.25 μM เพาะเลี้ยง 7 วัน ของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2 44

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย