บทที่ 2

ระเบียบวิธีวิจัย

ศึกษาผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ในปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ เพื่อต้องการพิสูจน์สมมติฐานว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระดับความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์มีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ โดยศึกษาผลกระทบต่อการสร้างไฟโบรเนกติน และเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

การศึกษาครั้งนี้ประกอบด้วยการทดลอง 3 ส่วน ดังนี้

1. วัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ณ เวลาเริ่มต้น และที่เวลาต่าง ๆ เพื่อหาเสถียรภาพของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

2. ทดสอบผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เพื่อหาความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์

3. ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ เพื่อศึกษาผลกระทบต่อการสร้างไฟโบรเนกติน และเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประชากรและตัวอย่าง

ใช้ฟันกรามซี่ที่ 3 จากขากรรไกรบนหรือขากรรไกรล่างที่ถอนด้วยเหตุผลทางทันตกรรมจัดฟัน หรือด้วยเหตุผลอื่น ๆ เป็นฟันที่มีสภาพสมบูรณ์ปกติ ไม่มีโรคฟันผุ ไม่มีโรคของเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ไม่มีการอักเสบของอวัยวะปริทันต์ จากผู้ป่วยอายุ 18-23 ปี ที่มารับการรักษา ณ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยแจ้งให้ผู้ป่วยทราบ และขออนุญาตนำฟันมาใช้ในการศึกษา จำนวนฟันอย่างน้อย 2 ซี่ จากผู้ป่วยที่ไม่ใช่บุคคลเดียวกัน

วัสดุและอุปกรณ์การทดลอง

ฮอร์สแรดิชเพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase: HRP) ความสามารถ 200 หน่วยเพอร์พูรอแกลลิน/มิลลิกรัม (purpurogallin unit/mg) ลิวโคคริสตอลไวโอเลต (leuco-crystal violet: LCV) กรดแอสคอร์บิก (L-ascorbic acid) แผ่นไนโตรเซลลูโลส (nitrocellulose membrane) สารละลายเออีซี (3-Amino-9-Ethylcarbazole: AEC) โซเดียมโดเดซิลซัลเฟต (sodium dodecylsulfate: SDS) จากบริษัท Sigma chemical ประเทศสหรัฐอเมริกา ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide: H_2O_2) กรดไฮโดรคลอริก (37% hydrochloric acid: HCl) และกรดอะซิติก (99.8 % acetic acid) จากบริษัท Riedel-de Haen ประเทศเยอรมันนี อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอมอีเอม (Dulbecco' s Modified Eagle Medium: DMEM) ชนิดที่มีฟีนอลเรด (phenol red) และชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด ซีรัม (fetal calf serum: FCS) เพนนิซิลิน (penicillin) สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) ฟังจิโซน (fungizone) แอลกลูตามีน (L-glutamine) เอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ (0.25 % trypsin-EDTA) จากบริษัท Gibco BRL ประเทศสหรัฐอเมริกา ภาชนะเลี้ยงเซลล์ (35-mm culture dish, 24-well plate) จากบริษัท Nunc ประเทศเยอรมันนี เครื่องนับจำนวนเซลล์ (haemocytometer) แผ่นกรองมิลลิพอร์ (Millipore) ขนาด 0.22 ไมครอนจากบริษัท Gelman น้ำกลั่นบริสุทธิ์ชนิดกลั่น 2 ครั้ง ชนิดที่ปราศจากอิออน สีเมทิลีนบลู (methylene blue) จากบริษัท Unilab ประเทศออสเตรเลีย เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ (UV/Visible spectrophotometer) รุ่น ultrospec 3000 จากบริษัท Pharmacia Biotech ประเทศสหรัฐอเมริกา กล้องถ่ายภาพ (Olympus) ประเทศญี่ปุ่น เครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ชนิดลำแสงคู่ (UV/VIS Spectrophotometer) รุ่น 7800 จากบริษัท Jasco ชุดวัดโปรตีน, เครื่องดอทบลอท (Dot-blot apparatus) รุ่น Bio-Dot และเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ (densitometer) จากบริษัท Bio-Rad เครื่องอิเลคโตรโฟรีซิส (electrophoresis) รุ่น EC 570 จากบริษัท EC apparatus สีแสดงน้ำหนักโมเลกุล (molecular marker) และสารละลายบัฟเฟอร์ (sample buffer) จากบริษัท Biolabs ประเทศอังกฤษ โปรตีนมาตรฐานของไฟโบรเนกตินและโปรตีนมาตรฐานของเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

แอนติบอดีต่อไฟโบรเนกตินของมนุษย์ที่สกัดจากหนู (mouse anti-human fibronectin IgG) จากบริษัท Vector ประเทศอังกฤษ แอนติบอดีต่อเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ของมนุษย์ ที่สกัดจากหนู (mouse anti-human type I collagen IgG) แอนติบอดีต่ออิมมูโนโกลบูลินของหนูที่สกัดจากกระต่าย (Biotin-Rabbit anti-mouse IgG1) เพอร์ออกซิเดส (horseradish peroxidase-streptavidin) จากบริษัท Zymed ประเทศสหรัฐอเมริกา

วิธีการทดลอง

1. การวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์

ใช้ปฏิกิริยาของเพอร์ออกซิเดสวิเคราะห์หาปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ตามวิธีที่เสนอโดย Mottola และคณะในปี 1970 โดยใช้สารตั้งต้นที่ไม่มีสีคือลิวโคคริสตอลไวโอเลต ภายหลังจากปฏิกิริยาจะได้สารละลายที่มีสีม่วง นำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 596 นาโนเมตร วิธีนี้เป็นที่ยอมรับและถูกนำมาใช้อย่างกว้างขวาง เนื่องจากเป็นวิธีที่สะดวก วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้หาได้ง่าย มีความเที่ยงตรงถูกต้อง มีความไวสูง โดยสามารถวิเคราะห์หาปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในระดับที่น้อยกว่าไมโครกรัมได้ และที่สำคัญเป็นปฏิกิริยาที่มีความจำเพาะสูง รายงานการศึกษาที่ผ่านมาเลือกใช้วิธีนี้ในการวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ได้แก่ การศึกษาของ Bowles และ Ugwuneri (1987), Adibfa และคณะ (1992), Cooper และคณะ (1992) และ Hanks และคณะ (1993) มีการประยุกต์ใช้ปริมาตรของสารละลายชนิดต่าง ๆในปฏิกิริยาน้อยลง โดยยังคงสัดส่วนสารละลายที่สำคัญของสารตั้งต้นและเอนไซม์ตามเดิม

การวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในการวิจัยครั้งนี้ใช้สารเคมีชนิดสำหรับเพื่อการวิเคราะห์ และใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดที่ปราศจากฟีนอลเรด เนื่องจากผลการพิสูจน์หาความยาวคลื่นแสงที่ฟีนอลเรดมีการดูดกลืนมากที่สุด (maximum absorption, λ_{max}) พบว่าฟีนอลเรดรบกวนการอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสงในช่วงระหว่าง 590-600 นาโนเมตร (แสดงในภาคผนวก ก.) ซึ่งในปฏิกิริยาการหาปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์โดยวิธีสเปคโตรโฟโตเมทรีย์นั้น วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารผลผลิตที่มีสีม่วงที่ค่าความยาวคลื่นแสง 596 นาโนเมตร

ทำการวัดปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ เพื่อหาเสถียรภาพของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ณ เวลาเริ่มต้น และเมื่อเวลาผ่านไป 2, 4, 6, 8, 10 และ 16 ชั่วโมง โดยเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 4.0 ไมโครกรัม ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ 250 ไมโครลิตร ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม ทำการทดสอบซ้ำจำนวน 3 หลุม เตรียมในลักษณะอย่างเดียวกัน จำนวน 7 ชุด และเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์เป็นกลุ่มควบคุมทำควบคู่กันในทุกชุดของการทดลอง โดยชุดที่ 1 วัดหาปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ทันที (ณ เวลาเริ่มต้น) ชุดที่ 2-7 นำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C และมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ในอากาศ สำหรับชุดการทดลองที่ 2-7 นำมาวัดหาปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ เมื่อครบกำหนดในแต่ละช่วงเวลา ที่ระบุข้างต้น

1.1 การสร้างกราฟมาตรฐาน

เพื่อศึกษาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ตั้งแต่ 0.5 ไมโครกรัม ถึง 5.0 ไมโครกรัม โดยเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 และ 5.0 ไมโครกรัม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 250 ไมโครลิตร เติมสารละลายลิวโคคริสตอลไวโอเลตความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร สารละลายฮอร์สแรดิชเพอร์ออกซิเดสความเข้มข้น 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร จำนวน 50 ไมโครลิตร สารละลายอะซีเตตบัพเฟอร์ความเข้มข้น 2 โมลาร์ จำนวน 25 ไมโครลิตร แล้วเติมน้ำกลั่นบริสุทธิ์ 2575 ไมโครลิตร จะได้สารละลายที่มีปริมาตรรวมเป็น 3 มิลลิลิตร การเติมสารละลายแต่ละชนิดให้ทำตามลำดับ และผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม (vortex) ทุกครั้ง ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ที่ความยาวคลื่นแสง 596 นาโนเมตร เทียบกับสารละลายที่ไม่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ทำการทดลองอย่างเดียวกันซ้ำ 3 ครั้ง ในแต่ละค่าความเข้มข้นดังกล่าว

1.2 การวัดปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เวลาต่าง ๆ

เตรียมสารละลายที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ปริมาณ 4.0 ไมโครกรัม ละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ นำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลานาน 2, 4, 6, 8, 10 และ 16 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดระยะเวลาดังกล่าว นำอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ในแต่ละชุดวัดปริมาณของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ (จากในหลุมของจานเพาะเลี้ยง) 250 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายอื่น ๆ ตามลำดับ ตามวิธีปฏิบัติที่กล่าวแล้วในข้างต้น แล้วจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ทั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มควบคุมซึ่งปราศจาก

ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ทำปฏิกิริยากับสารละลายที่กล่าวข้างต้นด้วยวิธีปฏิบัติเดียวกัน โดยกำหนดให้เป็นสารละลายเปรียบเทียบ (blank) ของการทดลอง

2. การทดสอบผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยในปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์

2.1 การเตรียมเซลล์

เตรียมเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของฟันกรามซี่ที่ 3 วิธีการเก็บฟันตัวอย่างและการเพาะเลี้ยงเซลล์จากเนื้อเยื่อในโพรงฟัน ดัดแปลงจากวิธีปฏิบัติของ Nakashima (1991), Young และคณะ (1995) และ Moule (1995) ดังนี้

1. เก็บฟันตัวอย่างที่มีคุณสมบัติและอยู่ในเงื่อนไขที่จะนำมาใช้ในการศึกษา จำนวนฟันอย่างน้อย 2 ซี่ ถอน เก็บฟันที่ถอนในภาชนะที่ผ่านขบวนการทำให้ปลอดเชื้อโดยบริษัทผู้ผลิตและมีฝาเกลียวปิดสนิทบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอมอีเอมที่มีซีรัม 10%, เพนนิซิลิน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน 200 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ฟังจิโซน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, แอลกลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ นำส่งห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อทันที นำซี่ฟันล้างในสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate-buffered saline: PBS) 3-4 ครั้ง จากนั้นใช้หัวกรอกากเพชรที่ปราศจากเชื้อกรอผ่าฟันตามแนวใกล้กลาง-ไกลกลาง ในสภาวะที่ปลอดเชื้อมากที่สุด โดยไม่ตัดลึกจนถึงโพรงในตัวฟัน ใช้ปลายเครื่องมือสะอาดที่มีลักษณะเป็นโลหะแบน แยกฟันทั้งสองส่วนออกจากกันตามแนวที่กรอไว้ หยิบเนื้อเยื่อในโพรงฟันออกด้วยคีมจับเนื้อเยื่อที่ปลอดเชื้อใส่ในภาชนะที่บรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ ใช้มีดสะอาดตัดชิ้นเนื้อให้มีขนาดประมาณ 1-2 ลูกบาศก์มิลลิเมตร วางเรียงในจานเพาะเลี้ยง ระยะห่างกัน 4-5 มิลลิเมตร เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์วันเว้นวัน จนกระทั่งได้เซลล์เต็มจานเพาะเลี้ยง

2. นำเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง ด้วยเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ โดยใช้ปิเปตที่ปลอดเชื้อนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออกจากจานเพาะเลี้ยง หยดเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอให้พอท่วมชั้นของเซลล์ ปิดฝาแล้วเอียงจานเพาะเลี้ยง 2-3 ครั้ง เพื่อให้เอนไซม์สัมผัสเซลล์ที่เรียงตัวแผ่เต็มพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงทั่วทุกบริเวณ จากนั้นนำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 30 วินาที ตรวจดูลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อติดตามผลของเอนไซม์ทริพซิน-อีดีทีเอ จะพบว่าเซลล์มีรูปร่างหดสั้นลง ทำให้ความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์กับผิวจานเพาะเลี้ยงลดลง เซลล์จะเป็นอิสระจากเซลล์ข้างเคียงและสารที่อยู่ระหว่างเซลล์ เมื่อเซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยง เซลล์จะมี

รูปร่างกลม จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอมอีเอมที่มีซีรัม 10 %, เพนนิซิลิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, สเตรปโตมัยซิน 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร, ฟังจิโซน 20 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร และแอลกลูตามีน 2 มิลลิโมลาร์ (องค์ประกอบดังกล่าวนี้ เป็นอาหารที่ใช้เลี้ยงเซลล์ตามวิธีปฏิบัติพื้นฐาน และการศึกษาครั้งนี้ใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าว นอกจากจะระบุไว้เป็นอย่างอื่น) จากนั้นใช้พาสเตอร์ปิเปตปลอดเชื้อดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ ชะล้างเซลล์ที่ยังเกาะติดที่ผิวจานเพาะเลี้ยงให้หลุดออก แล้วนับจำนวนเซลล์ด้วยเครื่องนับเซลล์ จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงชุดใหม่ที่ความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ $5x10^4$ เซลล์/ตารางเซนติเมตร เมื่อเซลล์มีจำนวนมากขึ้นและมีการเรียงตัวหนาแน่นในจานเพาะเลี้ยง จึงทำการหว่านเซลล์ใหม่ทุก 5-7 วัน จนกระทั่งได้เซลล์มากพอ และใช้เซลล์ รุ่นที่ 3-8 สำหรับการทดลอง

2.2 การตอบสนองของเซลล์ต่อไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างการตอบสนองของเซลล์ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ โดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 24 และ 48 ชั่วโมง เพื่อหาความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มากที่สุดที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์

2.2.1 การเตรียมเซลล์สำหรับการทดลอง

เพาะเลี้ยงเซลล์สร้างเส้นใยที่นำมาจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ เตรียมเซลล์จำนวน $10 x10^4$ เซลล์/หลุม ในจานเลี้ยงเซลล์ที่มี 24 หลุม นำไปเพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C และมีกาซคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีองค์ประกอบพื้นฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวันรุ่งขึ้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่เป็นอาหารที่มีปริมาณซีรัมต่ำ คือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2%, กรดแอสคอร์บิก 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร องค์ประกอบอื่นๆ คงปริมาณเดิม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 ชั่วโมง โดยในครั้งที่ 3 จะเติมไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นระหว่าง 0.1 ไมโครโมลาร์ ถึง 1.0 มิลลิโมลาร์ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ซึ่ง Hanks และคณะ (1993) ได้รายงานว่า การเตรียมสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นในช่วงดังกล่าวนี้ ไม่พบการเปลี่ยนแปลงค่าความเป็นกรด-ด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งคงอยู่ที่ระดับ 7.2 ถึง 7.6 เพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปจนครบกำหนดเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง จึงนำไปวัดผลการทดลอง

หอสมุดกลาง สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.2.2 วัดผลการตอบสนองของเซลล์ต่อไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการวัดผลการทดลอง 2 วิธีการ คือ *1. การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์* เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงของรูปร่างเซลล์ และ *2. การนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต* โดยการย้อมเซลล์ที่มีชีวิตด้วยสีเมทิลีนบลู ประยุกต์จากวิธีการของ Oliver และคณะ (1989) ดังนี้คือ ล้างเซลล์ 1 ครั้งด้วยสารละลาย PBS คงสภาพเซลล์ด้วยสารละลายฟอร์มัลดีไฮด์ความเข้มข้น 4% เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง แล้วล้างอีก 1 ครั้ง ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ความเข้มข้น 0.01 โมลาร์ ที่มีค่าความเป็นกรด-ด่างเท่ากับ 8.5 ย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลูความเข้มข้น 0.1 % เป็นเวลา 30 นาที ล้างสีส่วนเกินออกด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ อย่างน้อย 4 ครั้ง หรือจนกระทั่งสีส่วนเกินออกหมด ละลายสีที่ติดผิวเยื่อหุ้มของเซลล์ ด้วยสารละลายที่มีส่วนผสมของสารละลายกรดไฮโดรคลอริก และเอทานอลในอัตราส่วน 1:1 เขย่าให้สีของเมทิลีนบลูเข้ากันกับสารละลายจะได้สารละลายที่มีสีฟ้า จากนั้นจึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องสเปคโตรโฟโตมิเตอร์ ที่ความยาวคลื่นแสง 667 นาโนเมตร ค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จะนำไปเทียบกับค่าที่ได้จากกราฟมาตรฐาน ซึ่งการทดลองทั้งหมดของการทดสอบเซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยรายที่ 1 จะทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง และทำการทดลองซ้ำด้วยวิธีเดียวกันโดยใช้เซลล์ที่ได้จากผู้ป่วยรายที่ 2

2.2.3 การสร้างกราฟมาตรฐาน

หว่านเซลล์ที่ทราบปริมาณในจานเพาะเลี้ยง $25.5x10^3$, $51.0x10^3$, $102x10^3$ และ $204x10^3$ เซลล์ นำเข้าตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง แล้ววัดปริมาณเซลล์โดยวิธีการย้อมเซลล์ด้วยสีเมทิลีนบลู (ตามที่กล่าวแล้วในข้อ 2.2.2) เพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนเซลล์ ที่มีความสัมพันธ์แบบกราฟเส้นตรง และมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เข้าใกล้ค่า 1

3. ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการสร้างไฟโบรเนกติน และเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

ทดสอบหาความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ที่อาจมีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ โดยเลือกใช้ไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 3 ระดับ คือ ความเข้มข้นที่มากที่สุดที่ไม่มีผลต่อการตายของทุกเซลล์ทดสอบที่ความเข้มข้น 6.25 ไมโครโมลาร์ และเลือกใช้ความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ครอบคลุมช่วงความเข้มข้นที่ไม่ก่อให้เกิดการ

ตายของเซลล์ทดสอบที่ได้จากผู้ป่วย 2 ราย จากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง คือ ที่ระดับความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25ไมโครโมลาร์

ซึ่งการศึกษาวิจัยครั้งนี้ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้นดังกล่าว แล้วศึกษาผลกระทบของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่มีผลต่อการสร้างโปรตีน 2 ชนิด คือ ไฟโบรเนกติน และเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

3.1 การเตรียมเซลล์สำหรับการทดลองเพื่อศึกษาผลกระทบของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการสร้างโปรตีน

หว่านเซลล์จำนวน $50x10^4$ เซลล์ ในจานเพาะเลี้ยงขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร (ที่ความหนาแน่นของเซลล์ $5x10^4$ เซลล์/ตารางเซนติเมตร) เพาะเลี้ยงในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ 37 °C และมีคาร์บอนไดออกไซด์ในอากาศ 5% ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์พื้นฐานเป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในวันรุ่งขึ้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณซีรัมต่ำ คืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2%, กรดแอสคอร์บิก 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร องค์ประกอบอื่นๆ คงปริมาณตามเดิม เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ 3 ครั้ง ห่างกันครั้งละ 3 ชั่วโมง โดยในครั้งที่ 3 อาหารเลี้ยงเซลล์ดังกล่าวจะมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ ซึ่งครอบคลุมช่วงของความเข้มข้นที่ไม่มีผลต่อการตายของเซลล์ (ทำการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ในผู้ป่วยรายเดียวกัน และทำการทดลองด้วยวิธีการอย่างเดียวกัน ในผู้ป่วยรายที่ 2)

3.1.1 ชุดการทดลองที่ 1: วิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง เนื่องจากการวัดหาเสถียรภาพของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ (ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของงานวิจัยในครั้งนี้) พบว่าเมื่อเวลาผ่านไปปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีปริมาณลดน้อยลง โดยจะไม่พบไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 12 ชั่วโมงเป็นต้นไป จึงทำการวัดผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ในวันแรก ซึ่งเป็นช่วงที่ยังคงมีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ 12 ชั่วโมงแรก จากนั้นจึงติดตามผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อไปในวันที่ 2 เพื่อที่จะทราบถึงผลกระทบของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ภายหลังจากสลายตัวแล้ว

3.1.2 ชุดการทดลองที่ 2: วิเคราะห์ปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่ปราศจากไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ และในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่ความเข้มข้น 25, 12.5 และ 6.25 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 7 วัน ประยุกต์จากวิธีปฏิบัติของ Tipton และคณะ (1995a , 1995b)

3.2 การวัดปริมาณโปรตีน

3.2.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟโบรเนกติน ด้วยวิธีอิเลคโตรโฟรีซีส , เวสเทิร์นบลอท และปฏิกิริยาของวิทยาภูมิคุ้มกัน

เมื่อครบกำหนดระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง สกัดโปรตีนด้วยสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% แล้วนำไปวัดหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (1951) โดยใช้ชุดวัดโปรตีนของบริษัทไบโอแรด ทำการวัดปริมาณโปรตีนตามที่บริษัทแนะนำโดยปิเปตโปรตีนสกัด 40 ไมโครลิตร ใส่ลงในหลอดทดลองที่มีสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% ปริมาตร 160 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลายเอที่ผสมด้วยสารละลายเอส (ในสัดส่วน 50:1) จำนวน 100 ไมโครลิตร แล้วเติมสารละลายบี 800 ไมโครลิตร ทำตามลำดับและผสมสารละลายให้เข้ากันโดยใช้เครื่องผสม จากนั้นบ่มปฏิกิริยาที่อุณหภูมิห้อง 15 นาที แล้วจึงนำสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นแสง 750 นาโนเมตร ค่าที่ได้จะนำไปเปรียบเทียบกับค่าโปรตีนที่ทราบค่าของอัลบูมิน (แสดงในภาคผนวก ค.)

จากนั้นทำการวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกติน ดังนี้คือ ใช้ไมโครปิเปตดูดโปรตีนสกัดจากเซลล์ 30 ไมโครลิตร ใส่ในสารละลายบัฟเฟอร์ที่มีฟีนอลเรด 15 ไมโครลิตร นำไปต้มในน้ำเดือด 100 °C เป็นเวลา 5 นาที ใช้ไมโครปิเปตดูดสารละลายโปรตีนสกัดจากเซลล์ บรรจุในหลุมของแผ่นเจลเพื่อแยกชนิดของโปรตีนตามน้ำหนักโมเลกุล ปฏิบัติตามวิธีที่แนะนำโดยบริษัทไบโอแรด ทำพร้อมกับสารแสดงสีน้ำเงินของโบรโมฟีนอลบลูที่ทราบค่าของน้ำหนักโมเลกุล ซึ่งมองเห็นได้ชัดเจนขณะที่มีการเคลื่อนของโปรตีนที่เหนี่ยวนำโดยกระแสไฟฟ้า จนกระทั่งสารแสดงสีน้ำเงินตัวแรกที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อยที่สุด (แถบล่างสุด) เคลื่อนลงมาเกือบถึงขอบล่างของแผ่นเจล

จากนั้นใช้กระแสไฟฟ้า ที่มีความต่างศักย์คงที่ 15 โวลท์ ย้ายโปรตีนที่แยกได้ลงบนแผ่นไนโตรเซลลูโลสตามวิธีปฏิบัติของเวสเทิร์นบลอท เป็นเวลา 90 นาที นำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้แช่ในสารละลายที่มีซีรัม 10% เป็นเวลา 30 นาที เพื่อป้องกันปฏิกิริยาที่อาจรบกวนการย้อมโปรตีนที่ต้องการ จากนั้นจึงวิเคราะห์ปริมาณไฟโบรเนกตินด้วยวิธีการทางวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ในสารละลายที่มีแอนติบอดีต่อไฟโบรเนกของมนุษย์ที่สกัดจากหนู (ความเข้มข้น 1: 2000 ส่วน) เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที แล้วย้อมต่อด้วยแอนติบอดีต่อภูมิคุ้มกันโกลบูลินของหนูที่สกัดจากกระต่าย (ที่ความเข้มข้น 1:4000 ส่วน) นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที ย้อมด้วยสารละลายฮอร์สแรดิชเพอร์ออกซิเดส (ความเข้มข้น 1: 500 ส่วน) เป็นเวลา 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เตรียมสารละลายที่มีส่วนผสมของโซเดียมอะซิเตตความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ จำนวน 19 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายเออีซี 1 มิลลิลิตร แล้วหยดสารละลายไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้น 30% จำนวน 10 หยดลงในสารละลาย เขย่าให้สารละลายเข้ากันแล้วเทลงในภาชนะที่มีแผ่นไนโตรเซลลูโลส วางภาชนะบนเครื่องเขย่านาน 15 นาที สารละลายดังกล่าวจะทำปฏิกิริยากับเพอร์ออกซิเดสเกิดแถบสีน้ำตาลแดงในตำแหน่งที่มีไฟโบรเนกติน ล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง ใช้กระดาษกรองซับแผ่นไนโตรเซลลูโลสให้แห้ง แล้วจึงนำไปอ่านค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ เปรียบเทียบค่าที่ได้จากกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุมโดยนำค่าของทั้ง 2 กลุ่มไปเทียบกับค่าอ้างอิงของโปรตีนมาตรฐานก่อนนำมาเปรียบเทียบกัน

3.2.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยเครื่องดอทบลอท และปฏิกิริยาของวิทยาภูมิคุ้มกัน

เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะดังกล่าวครบกำหนดระยะเวลา 7 วัน สกัดโปรตีนด้วยสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% แล้วนำไปวัดหาปริมาณโปรตีนตามวิธีของ Lowry (1951) โดยใช้ชุดวัดโปรตีนตามวิธีการที่แนะนำโดยบริษัทผู้ผลิต (ตามที่กล่าวแล้วในข้อ 3.2.1) จากนั้นทำการวัดหาปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 โดยนำโปรตีนจากเซลล์มาเจือจาง 5 ครั้ง ในสารละลาย SDS ความเข้มข้น 5% ลดปริมาณโปรตีนสกัดครั้งละครึ่งเท่า (serial dilution) ใส่ลงในหลุมของเครื่องดอทบลอทโปรตีนจะอยู่ด้านบนของแผ่นไนโตรเซลลูโลส วิเคราะห์ปริมาณเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 ด้วยวิธีทางวิทยาภูมิคุ้มกัน โดยแช่แผ่นไนโตรเซลลูโลสในสารละลายที่มีแอนติบอดีต่อเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นย้อมต่อด้วยแอนติบอดีต่อภูมิคุ้มกันโกลบูลินของหนูที่สกัดจากกระต่าย ทำตามลำดับขั้นต่อไปด้วยวิธีการเดียวกันจะเกิดสีน้ำตาลแดงเป็นรูปวงกลมในตำแหน่งที่มีเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ล้างด้วยน้ำสะอาด 1 ครั้ง แล้วใช้กระดาษกรองซับแผ่น

ไนโตรเซลลูโลสให้แห้ง แล้วนำไปอ่านค่าความเข้มของสีด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ เปรียบเทียบค่าที่ได้จากกลุ่มทดสอบกับกลุ่มควบคุม โดยนำค่าของทั้ง 2 กลุ่มเทียบกับค่าอ้างอิงของโปรตีนมาตรฐานก่อนนำมาเปรียบเทียบกัน

3.3 การสร้างกราฟมาตรฐานของไฟโบรเนกตินและเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1

เตรียมสารละลายที่มีปริมาณโปรตีนมาตรฐานไฟโบรเนกติน หรือเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 โดยละลายโปรตีนมาตรฐาน 10 มิลลิกรัม ในสารละลายกรดอะซิติกความเข้มข้น 0.1 โมลาร์ 10 มิลลิลิตร (1 ไมโครกรัม/ ไมโครลิตร) จากนั้นปิเปตโปรตีนที่ทราบค่าใส่ในหลุมของเครื่องดอทบลอท ทำการเจือจางเท่าตัวเริ่มต้นที่ 60 ไมโครลิตร เป็นหลุมแรก หลุมต่อไปลดปริมาณลงครึ่งหนึ่งเป็น 30, 15 ไมโครลิตร ต่อ ๆ ไป จนกระทั่งได้ 5 หลุมที่มีปริมาณโปรตีนลดลงทีละครึ่งจากหลุมแรก จากนั้นย้อมโปรตีนที่อยู่บนแผ่นไนโตรเซลลูโลสด้วยแอนติบอดีต่อโปรตีน ด้วยวิธีการทางภูมิคุ้มกันวิทยา (ลำดับขั้นตอนตามวิธีปฏิบัติที่กล่าวแล้วในข้อ 3.2) จากนั้นนำแผ่นไนโตรเซลลูโลสที่ได้ตรวจวัดค่าความเข้มของสีที่เกิดขึ้นด้วยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่าโปรตีนมาตรฐาน (ไมโครกรัม) กับค่าความเข้มของสีที่อ่านโดยเครื่องเดนซิโตมิเตอร์ ที่มีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (r) เข้าใกล้ค่า 1 (แสดงในภาคผนวก ค.)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย