บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

การศึกษาผลของแคปไซซินต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงจากเหงือกของคน ในห้องปฏิบัติการครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงทดลองซึ่งประกอบด้วยการทดลอง 3 ส่วน ดังนี้

1. การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับค่าการดูดกลืนแสง (optical density)

2. การทดสอบและเปรียบเทียบผลของแคปไซซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์

3. การศึกษาผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ และกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

ประชากรและตัวอย่าง

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเหงือกปกติของผู้ป่วยที่มารับการรักษาด้วยวิธีศัลยปริทันต์ (periodontal surgery) ที่ภาควิชาปริทันตวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย โดยเนื้อเยื่อเหงือกที่นำมาศึกษานี้เป็นเนื้อเยื่อปกติและเป็นส่วนที่เกิน หรือไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของช่องปาก เช่นเหงือกที่งอกเกิน หรือเหงือกที่ยึดกับตัวฟันในระดับที่สูงกว่าปกติ จำเป็นต้องตัดออก ชิ้นเนื้อเยื่อได้จากผู้ป่วยจำนวน 4 ราย

วัสดุอุปกรณ์และสารเคมีที่ใช้ในการทดลอง

1. ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์
   - 1.1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, USA)
   - 1.2 DMEM without phenol red (Gibco BRL, USA)
   - 1.3 Antibiotic – antimycotic solution (Gibco BRL, USA)
   - 1.4 L- glutamine (Gibco BRL, USA)
   - 1.5 Fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)
   - 1.6 Normal saline solution
   - 1.7 Trypsin – EDTA (Gibco BRL, USA)
   - 1.8 Trypsin – inhibitor (Sigma, USA)

2 วัสดุที่ใช้ในการศึกษาด้วย MTT assay

2.1 สาร MTT (3-(4,5- dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenylte trazolium bromide) (Sigma, USA)

2.2 Dimethyl sulfoxide (Sigma, USA)

3 วัสดุที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

3.1 Osmium tetroxide (EMS, USA)

3.2 Glutaraldehyde (EMS, USA)

3.3 Phosphate buffer

3.4 Ethanol

4 สารที่ใช้ทดสอบ

4.1 แคปไซซิน (Synthite Industrial Chemicals , India)

5 เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

5.1 ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow unit; MDH Ltd, England)

5.2 24 well plate (Falcon, USA)

5.3 Tissue culture plate ขนาด 35 และ 60 มิลลิเมตร (Falcon, USA)

5.4 Cuvette ขนาด 2.5 มิลลิลิตร (Bibby sterilin, EU)

5.5 เครื่องชั่งน้ำหนัก (Metler Toledo, Switzerland)

5.6 เครื่องเหวี่ยงแบบ Bench-top centrifuge (Hermle Z320, Germany)

5.7 กล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ (Olympus ck2, Japan)

5.8 ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator; Shel Lab, USA)

5.9 Spectrophotometer (Ultrospec 3000, USA)

5.10 กล้องจุลทรรศ์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด (Jeol รุ่น JSM-5410 LV, Japan)

วิธีการทดลอง

1. การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ประกอบไปด้วย

DMEM 1X	ร้อยละ	88
Antibiotic – antimycotic solution	ร้อยละ	1
L- glutamine	ร้อยละ	1
Fetal bovine serum	ร้อยละ	10

นำส่วนประกอบของน้ำยาเลี้ยงเซลล์มาผสมกันตามอัตราส่วนดังกล่าวภายในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำใช้ในการทดลอง

2. การเตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกปกติของผู้ป่วยด้วยการนำเนื้อเยื่อที่ได้มาเพาะเลี้ยงโดยมีขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

2.1 ล้างเนื้อเยื่อให้สะอาดปราศจากเลือดและน้ำลายด้วย normal saline solution จากนั้นนำมาแช่ใน DMEM ที่มี antibiotic - antimycotic solution ร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

2.2 ตัดเนื้อเยื่อเหงือกเป็นชิ้นเล็ก ๆ วางในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ให้ท่วมชิ้นเนื้อเหล่านั้น

2.3 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีชิ้นเนื้อเยื่อและน้ำยาเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด

2.4 เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวัน ศึกษาลักษณะและพฤติกรรมการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อที่เพาะเลี้ยงทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

2.5 ประมาณวันที่ 3 ถึง 7 ของการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ พบว่าเริ่มมีเซลล์คืบคลานออกจากชิ้นเนื้อ (ภาพที่ 1A) เซลล์ที่ออกมานี้ประกอบด้วยเซลล์หลายชนิด เช่น เซลล์เยื่อบุผิว (epithelial cell) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์กล้ามเนื้อเรียบ และเซลล์เอ็นโดธีเลียม (endothelial cell) เมื่อมีเซลล์ออกมาอยู่นอกชิ้นเนื้อจนหนาแน่นแล้วทำ subculture ซึ่งเป็นการย้ายเซลล์ที่หนาแน่นเหล่านี้ไปยังจานเพาะเลี้ยงใหม่ในจำนวนที่น้อยลง การย้ายเซลล์เช่นนี้นอกจากเป็นการลดความหนาแน่นของเซลล์เพื่อให้ได้รับอาหารเพียงพอแล้วยังเป็นการกำจัดเซลล์ชนิดอื่นที่มิใช่เซลล์ไฟโบรบลาสต์ออกด้วย โดยอาศัยหลักการว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวของจานเพาะเลี้ยงได้เร็วกว่าเซลล์ชนิดอื่น

2.6 การทำ subculture ทำได้โดยการย่อยโปรทีนที่ช่วยในการยึดเกาะของเซลล์ด้วยเอนไซม์ trypsin-EDTA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 5-10 นาที เมื่อการยึดเกาะของเซลล์ถูกทำลาย เซลล์ที่ถูกย่อยจะลอยตัวขึ้นจากจานเพาะเลี้ยง จากนั้นหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ด้วย trypsin inhibitor กรองเซลล์ที่ได้ด้วยกระดาษเช็ดเลนส์ (lens paper) แล้วทำให้เซลล์ตกตะกอนด้วยเครื่องเหวี่ยงที่ 2,000 g หลังจากนั้นดูดน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าที่มีเอ็นไซม์ผสมอยู่ทิ้งและเปลี่ยนเป็นน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ นับจำนวนเซลล์ที่ได้ด้วย hemocytometer เพื่อใช้ในการคำนวณปรับความหนาแน่นของเซลล์ จากนั้นใส่เซลล์ลงในจานเพาะเลี้ยงใหม่โดยให้มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 20,000 เซลล์ในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใหม่ใส่ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์และเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกวันจนเซลล์หนาแน่นแล้วจึงทำ subculture ซ้ำอีก การทำ subculture หลายครั้งพบว่าทำให้ได้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ล้วนในรอบที่ 4 หรือ 5 ของการทำ subculture (ภาพที่ 1B) เซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้ได้จากการทำ subculture รุ่นที่ 5

3. การเตรียมแคปไซซิน

แคปไซซินที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เตรียมจากแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 6.6 (น้ำหนัก/ปริมาตร) นำมาเจือจางในน้ำยาเลี้ยงเซลล์จนได้ความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003, 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 เก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เพื่อใช้ในการทดลอง

4. การสร้างกราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ของค่าการดูดกลืนแสงกับจำนวนเซลล์

การศึกษาครั้งนี้เป็นการศึกษาผลของสารแคปไซซินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยใช้การวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย MTT กับเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิตด้วย MTT assay ซึ่งดัดแปลงจากวิธีการของ Mosmann[38] และของ Kasugai และคณะ[39] วิธีการดังกล่าวเป็นการวัดจำนวนเซลล์โดยอ้อมซึ่งมีขั้นตอนดังนี้

4.1 เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากการทำ subculture รุ่นที่ 5 นำไปใช้ในการทดลอง โดยนำเซลล์ที่ได้ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม จำนวน 1 จาน ด้วยความหนาแน่นของเซลล์ในแต่ละหลุมดังต่อไปนี้ 2500, 5,000, 10,000, 15,000, 20,000, 25,000, 30,000, 35,000, 40,000, 45,000 และ 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร โดยใน 1 จานทำซ้ำ 3 หลุมของแต่ละความหนาแน่นของเซลล์ หลังจาก

นั้นเก็บจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด ให้เซลล์ยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์ และเติบโตเต็มที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง

4.2 เตรียมสารละลาย MTT โดยละลายผง MTT ในสารละลาย phosphate buffer saline ด้วยปริมาณ 5 มิลลิกรัมต่อ 1 มิลลิลิตร แล้วกรองสารละลายด้วยเยื่อกรองขนาด 0.22 ไมโครเมตร นำเซลล์ที่เตรียมไว้ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ตามข้อ 4.1) มาย้อมด้วยสารละลาย MTT โดยดูดน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้ง ใส่สารละลาย MTT 50 ไมโครลิตร และน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM ชนิดไม่มี phenol red 300 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุม ห่อจานเพาะเลี้ยงเซลล์ด้วยอลูมินัมฟอยล์ (aluminum foil) เพื่อป้องกันแสง แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

4.3 ดูดน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีสารละลาย MTT ทิ้ง เติม dimethyl sulfoxide (DMSO) จำนวน 1000 ไมโครลิตร ลงไปในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก MTT formazan ที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย MTT กับ mitochondrial dehydrogenases ในเซลล์ได้สารละลายสีม่วง นำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทันที หาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสง โดยใช้การวิเคราะห์ถดถอย (regression analysis) เพื่อหาสมการความสัมพันธ์ที่จะใช้เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับค่าการดูดกลืนแสง

5. การทดสอบผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์

5.1 เตรียมเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้จากการทำ subculture รุ่นที่ 5 ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม จำนวน 7 จาน ด้วยความหนาแน่น 15,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร หลุมละ 1 มิลลิลิตร นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไปไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเพื่อให้เซลล์มีการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์และมีการเติบโตเต็มที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง

5.2 เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ใหม่ที่มีส่วนผสมของสารแคปไซซินที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003, 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 (น้ำหนัก/ปริมาตร) โดยแต่ละความเข้มข้นจะใช้จำนวน 3 หลุมใน 1 จาน (ภาพที่ 2) สำหรับกลุ่มควบคุมเป็นกลุ่มที่เติมน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว การศึกษาผลของแคปไซซินที่มีต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะศึกษาที่ระยะเวลาดังต่อไปนี้ 6, 12, 24, 48, 72, 96 และ 120 ชั่วโมง

5.3 ศึกษาจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีชีวิตในแต่ละความเข้มข้นของแคปไซซินโดยใช้ MTT assay ซึ่งมีขั้นตอนเช่นเดียวกับการทำ MTT assay ในการทำกราฟมาตรฐาน หลังจากนั้นนำสารละลายที่ได้ไปวัดด้วย spectrophotometer ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทันที แล้วนำค่าที่วัดได้

$$\text{ร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{ค่าการดูดซับแสงของกลุ่มตัวอย่าง}}{\text{ค่าการดูดซับแสงของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

5.4 ศึกษาผลของแคปไซซินในแต่ละความเข้มข้นที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ที่ระยะเวลาต่าง ๆ ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

6. การทดสอบผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์โดยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

การเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์โดยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดทำโดยเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ที่ใส่แผ่น cover slip ไว้ที่ก้นจานเพาะเลี้ยงเพื่อให้เป็นที่ยึดเกาะของเซลล์ โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ กลุ่มควบคุม และกลุ่มทดลองที่ทดสอบด้วยแคปไซซิน เซลล์ที่ใช้เป็นเซลล์ที่ได้จากการทำ subculture รุ่นที่ 5 นำเซลล์ที่ได้ใส่ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ที่มีแผ่น cover slip ด้วยความหนาแน่น 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร จานละ 1 มิลลิลิตร เก็บจานเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ใน ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด ให้เซลล์มีการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์และมีการเติบโตเต็มที่ซึ่งใช้เวลาประมาณ 12 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนด 12 ชั่วโมง เปลี่ยนน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์โดยในกลุ่มควบคุมใส่น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว แต่ในกลุ่มทดลองที่จะศึกษาผลของแคปไซซินใช้น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแคปไซซินร้อยละ 0.020 โดยในแต่ละจานเพาะเลี้ยงเซลล์ใส่น้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ 1 มิลลิลิตร เมื่อครบกำหนด 2, 3, และ 6 ชั่วโมงของการเพาะเลี้ยงเซลล์บนแผ่น cover slip นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีแผ่น cover slip ไปล้างด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.2 (PB) 2 ครั้ง แล้วแช่ด้วยน้ำยา glutaraldehyde ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน PB เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ล้างด้วย PB ก่อนที่จะแช่ใน osmium tetroxide ความเข้มข้นร้อยละ 1 ใน PB เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วย PB อีกครั้งก่อนทำการกำจัดน้ำออก (dehydration) ด้วยการแช่ใน ethanol ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 35, 50, 70, 95, 100 และ 100 ตามลำดับ โดยใช้เวลาแช่นาน 15 นาทีในแต่ละความเข้มข้นของ ethanol นำตัวอย่างบนแผ่น cover slip ไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying) ก่อนนำแผ่น cover slip ไปยึดติดบนแท่นทองเหลือง (specimen stub) และเคลือบผิวตัวอย่าง (coat) ด้วยอนุภาคทอง

ไปทำให้แห้งที่จุดวิกฤติ (critical point drying) ก่อนนำแผ่น cover slip ไปยึดติดบนแท่นทองเหลือง (specimen stub) และเคลือบผิวตัวอย่าง (coat) ด้วยอนุภาคทอง (gold particles) โดยวิธีสปัตเตอร์ (sputtering) ด้วยกระแสไฟฟ้า 15 mA เคลือบนาน 3.5 นาที จากนั้นศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด ที่ 15 kV ด้วยกำลังขยาย 100, 1,000, 3,500, 5,000 และ 10,000 เท่า เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์

7. สถิติที่ใช้วิเคราะห์

7.1 การหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์และค่าการดูดซับแสงใช้การวิเคราะห์สหสัมพันธ์ (correlation analysis) และความถดถอยเชิงเส้นตรง (linear regression) เพื่อหาสมการความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสง

7.2 การศึกษาผลของแคปไซซินที่มีต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variance) เพื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ตามระยะเวลาที่ศึกษา โดยใช้ระดับความเชื่อมั่นที่ 95 %