

ผลของไกด์โรเจนเพอร์ออกไซด์ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์

นางสาวเกษรา ปักมพันธุ์



## สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต  
สาขาวิชาชีววิทยาช่องปาก

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2541

ISBN 974-331-454-7

ลิขสิทธิ์ของบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**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

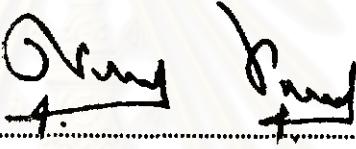
Academic year 1998

ISBN 974-331-454-7

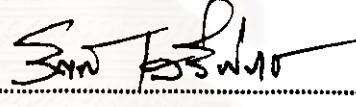
หัวขอวิทยานิพนธ์ ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อ  
โดย เยื่อในโพรงพื้นช่องมนุษย์  
สาขาวิชา นางสาวเกศรา ปักมพันธุ์  
อาจารย์ที่ปรึกษา ชีววิทยาช่องปาก  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ. ดร. ไพบูลย์ สังวินทะ  
รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร์ เบญจวงศ์กุลชัย

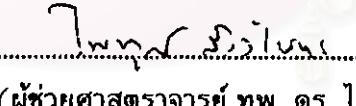
---

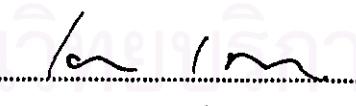
บันทึกวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น<sup>๑</sup>  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

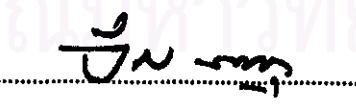
  
..... คณบดีบันทึกวิทยาลัย  
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ศุภวัฒน์ ชุติวงศ์)

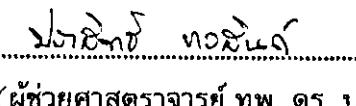
กรรมการสอบวิทยานิพนธ์

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

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ. ดร. ไพบูลย์ สังวินทะ)

  
..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร์ เบญจวงศ์กุลชัย)

  
..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ พ. ดร. จีรศักดิ์ นาพกุล)

  
..... กรรมการ  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ. ดร. ประเสริฐ ภาสันต์)

พิมพ์ต้นฉบับนักศึกษาอวิทยานิพนธ์ภาษาในกรอบสีเขียวนี้เพียงแผ่นเดียว

เงาะ ปัทมพันธุ์ : ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ (THE EFFECTS OF HYDROGEN PEROXIDE ON HUMAN DENTAL PULP FIBROBLASTS IN VITRO) อ.ที่ปรึกษา : พ.ศ. ๒๕๖๗ ไพบูลย์ สังวินทะ, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ร.ศ. ดร. เอมอร์ เบญจรงค์กุลชัย; ๘๔ หน้า. ISBN ๙๗๔-๓๓๑-๔๕๔-๗.

งานวิจัยครั้งนี้ต้องการศึกษาผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ต่อการสร้างไฟbroeneklin และเส้นใยcollagen ในชั้นที่ 1 ของเซลล์สร้างเส้นใยที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในโพรงฟันของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ การศึกษาในช่วงแรก เป็นการทดสอบหาระดับความเข้มข้นของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ที่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง ผลการทดลองพบว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นต่ำกว่าหรือเท่ากับ ๘.๒๕ มิโครโมลาร์ ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อทำการทดลองเลี้ยงเซลล์ในสภาวะที่มีไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ความเข้มข้นดังกล่าว และทำการวิเคราะห์ปริมาณไฟbroeneklin ที่เซลล์สร้างในเวลา 24-48 ชั่วโมง ผลปรากฏว่าเซลล์เพิ่มการสร้างไฟbroeneklin ขึ้น 2-5 เท่าในเวลา 24 ชั่วโมง ( $p<0.05$ ) เมื่อเทียบกับปริมาณที่สร้างในก่อนควบคุม และไม่เห็นผลที่ชัดเจนเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ( $p>0.05$ ) และเมื่อทำการวิเคราะห์ผลต่อการสร้างเส้นใยcollagen ชนิดที่ 1 จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ในสภาวะอย่างเดียวกันเป็นเวลา 7 วัน ไม่พบความแตกต่างของปริมาณการสร้างเส้นใยcollagen ชนิดที่ 1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ( $p>0.05$ ) จึงมีความเป็นไปได้ว่าไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในความเข้มข้นต่ำที่ไม่ทำให้เซลล์ตายอาจมีผลเปลี่ยนแปลงการทำงานที่ของเซลล์ ภายในช่วงเวลา 24 ชั่วโมงแรกภายหลังจากเซลล์ได้รับไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# # 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  $\mu M$  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.....

อาจารย์เชื่อมติด.....

สาขาวิชา..... ชีววิทยาของปักษ์.....

อาจารย์เชื่อมต่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... พญ. สุรัสวดี.....

ปีการศึกษา..... 2541

อาจารย์เชื่อมต่อ..... รย. นพ. ปรีดาภรณ์..... 1/2

ปีการศึกษา..... 2541



## กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลืออย่างดีอีกช่อง คณาจารย์หลักท่านประgonด้วย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทญ. ดร. วิสาหะ ลิ่มวงศ์ ซึ่งท่านเป็นผู้จัดตั้งหลักสูตรชีววิทยาของปัจจุบัน ความชุ่มชื้น ตั้งใจ เสียสละ และทุ่มเทกับงานการเรียนการสอนของหลักสูตรในระดับบัณฑิตศึกษามาโดยตลอด การศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้รับความกรุณา และความช่วยเหลืออย่างดีอีกช่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ. ดร. ไพฑูรย์ สั่วินทะ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร. เอมอร์ เบญจรงค์กุลชัย อาจารย์ที่ปรึกษา วิทยานิพนธ์ร่วม และได้รับความกรุณาช่วยเหลืออุดมให้คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็นต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ ต่องานศึกษาวิจัยในส่วนของปฏิบัติการอย่างดีอีกช่องจาก ผู้ช่วยศาสตราจารย์ พ. ดร. ประเสริฐ ภัสสันต์ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ทญ. ทศนีย์ ดวงคสุวรรณ อีกทั้งยังได้รับการสนับสนุนร่วมมือเป็นอย่างดี จากคณาจารย์ และเจ้าหน้าที่ทุกท่านของภาควิชาภาษาไทยศาสตร์ ภาควิชาเกล็ดศาสตร์ คลินิกบูรณะช่องปากและใบหน้า ภาควิชาหันตกรรมประดิษฐ์ ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากที่ได้กรุณาจัดเก็บเนื้อเรื่องสำหรับงานวิจัย ทั้งยังเอื้ออำนวยความสะดวกในการเตรียมสารเคมีและการดำเนินงานในส่วนของปฏิบัติการด้วยน้ำใจที่ดี งามมาโดยตลอด ผู้วิจัยจึงได้รับความช่วยเหลืออย่างดีอีกช่อง ตลอดจนผู้ที่มีส่วนช่วยเหลือทุกท่านที่มีได้ก่อสร้างในที่นี้ และขอกราบขอบพระคุณอาจารย์ พ. ดร. ชาญชัย ให้ส่วน ที่ท่านกรุณาให้คำแนะนำด้านสติ๊กที่ใช้สำหรับงานวิจัยครั้งนี้ และเนื่องจากทุนการวิจัยครั้งนี้ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัย คณะหันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงได้รับความช่วยเหลืออย่างดีอีกช่อง ที่ได้รับการสนับสนุนการศึกษาต่อในครั้งนี้ ขอกราบขอบพระคุณบิทา-มารดา ตลอดจนญาติผู้ใกล้ชิดทุกท่านที่ได้กรุณาให้การสนับสนุนด้านการเงิน และมอบกำลังใจที่ดีแก่ผู้วิจัยเสมอมาจนสำเร็จการศึกษา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## สารบัญ

หน้า

|  |           |
|--|-----------|
| บทคัดย่อภาษาไทย.....   | ๑         |
| บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....  | ๑         |
| กิตติกรรมประกาศ.....   | ๒         |
| สารบัญ.....  | ๓         |
| สารบัญรูป.....   | ๘         |
| <b>บทที่</b>   |           |
| <b>1 บทนำ.....</b>   | <b>1</b>  |
| 1.1 ความเป็นมา.....  | 1         |
| 1.2 ความสำคัญของปัจจุบัน.....  | 7         |
| 1.3 สมนติฐานการวิจัย.....  | 11        |
| 1.4 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....                                       | 12        |
| 1.5 ขอบเขตการวิจัย.....  | 12        |
| 1.6 ข้อตกลงเบื้องต้น.....  | 13        |
| 1.7 คำสำคัญ.....   | 13        |
| 1.8 รูปแบบการวิจัย.....  | 13        |
| 1.9 ประโยชน์ที่จะได้รับจากการวิจัย.....                                | 14        |
| <b>2 ระเบียบวิธีวิจัย.....</b>   | <b>15</b> |
| 2.1 ประชากรและตัวอย่าง.....  | 16        |
| 2.2 วัสดุและอุปกรณ์การทดลอง.....                                       | 16        |
| 2.3 วิธีทดลอง.....   | 17        |
| 2.3.1 การวัดปริมาณไข่โดยเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....         | 17        |
| 2.3.2 การทดสอบผลของไข่โดยเจนเพอร์ออกไซด์ต่อเซลล์ในปฏิกิริยา.....       | 19        |
| 2.3.2.1 การเตรียมเซลล์.....  | 19        |
| 2.3.2.2 การตอบสนองของเซลล์.....  | 20        |
| 2.3.3 การทดสอบผลต่อการสร้างโปรตีน.....                                 | 21        |
| 2.3.3.1 การวิเคราะห์หาปริมาณไฟฟ์ไบเรนกติน.....                         | 23        |
| 2.3.3.2 การวิเคราะห์หาปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1.....              | 24        |
| 2.3.4 การสร้างกราฟมาตรฐานไฟฟ์ไบเรนกตินและเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1..... | 25        |

|   |    |
|---|----|
| 3 ผลการทดลอง.....                                     | 26 |
| 3.1 ปริมาณไฮโดรเจนเพอร์ออกไซด์ในอาหารเลี้ยงเซลล์..... | 26 |
| 3.2 ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซต์ต่อเซลล์ในปฏิกิริยา..... | 26 |
| 3.2.1 การศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์.....                 | 26 |
| 3.2.2 ผลการย้อมสีเมทิลีนบลู .....                     | 30 |
| 3.3 ผลของไฮโดรเจนเพอร์ออกไซต์ต่อการสร้างโปรตีน.....   | 36 |
| 3.3.1 ผลต่อการสร้างไฟбраเกติน.....                    | 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

## สารบัญ

หน้า

|          |   |                      |
|----------|---|----------------------|
| รูปที่ 1 | เสถียรภาพของ $H_2O_2$ ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....   | 27                   |
| รูปที่ 2 | ภาพถ่ายชิ้นเนื้อ ในขั้นตอนการเตรียมเซลล์.....   | 28                   |
| รูปที่ 3 | (ก) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก $H_2O_2$<br>(ก) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี $H_2O_2$ 1.0 $\mu M$ .....<br>(ค) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาวะที่มี $H_2O_2$ 10 $\mu M$<br>ที่กำลังขยาย 40 เท่า .....<br>(ง) ลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่มี $H_2O_2$ 10 $\mu M$<br>ที่กำลังขยาย 100 เท่า ..... | 29<br>29<br>29<br>29 |
| รูปที่ 4 | กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะ<br>ที่ปราศจาก $H_2O_2$ และในสภาวะที่มี $H_2O_2$ 0.1 $\mu M$ -1.0 mM .....  | 31                   |
| รูปที่ 5 | กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะ<br>ที่ปราศจาก $H_2O_2$ และในสภาวะที่มี $H_2O_2$ 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 $\mu M$<br>(ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 (ข) ผู้ป่วยรายที่ 2.....   | 33                   |
| รูปที่ 6 | กราฟความสัมพันธ์ของปริมาณเซลล์ที่ไม่ตายจากการเพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะ<br>ที่ปราศจาก $H_2O_2$ และในสภาวะที่มี $H_2O_2$ 50, 25, 12.5, 6.25 และ 3.125 $\mu M$<br>(ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 (ข) ผู้ป่วยรายที่ 2.....   | 35                   |
| รูปที่ 7 | ภาพถ่ายผลการข้อมูลใบเรณดิน ที่ได้จากการวิเคราะห์ทางวิธี<br>ภูมิคุ้มกันวิทยา เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก $H_2O_2$ และในสภาวะที่มี<br>$H_2O_2$ 25, 12.5 และ 6.25 $\mu M$<br>(ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 (ข) ผู้ป่วยรายที่ 2 .....   | 37                   |

## หน้า

- รูปที่ 8 ภาพถ่ายผลการย้อมไฟไบร์เนกตินที่ได้จากเซลล์บล็อก และการวิเคราะห์ทางวิธีคุณคันกันวิทยา เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง ในสภาวะที่ปราศจาก  $H_2O_2$  และในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  25, 12.5 และ 6.25  $\mu M$   
(ก) ผู้ป่วยรายที่ 1 (ข) ผู้ป่วยรายที่ 2 .....38
- รูปที่ 9 กราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณไฟไบร์เนกตินที่ได้จากเซลล์เพาะเลี้ยง ในสภาวะที่ปราศจาก  $H_2O_2$  และในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  25, 12.5 และ 6.25  $\mu M$   
ของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2  
(ก) เพาะเลี้ยง 24 ชั่วโมง (ข) เพาะเลี้ยง 48 ชั่วโมง.....41
- รูปที่ 10 ภาพถ่ายผลการวิเคราะห์ปริมาณเส้นใยคอลลาเจน ชนิดที่ 1 ด้วยเครื่องดอทบล็อก และวิธีทางวิทยาคุณคันกันจากการเพาะเลี้ยงเซลล์ ในสภาวะที่ปราศจาก  $H_2O_2$  และในสภาวะที่มี  $H_2O_2$  25, 12.5 และ 6.25  $\mu M$   
(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  $\mu M$   
เพาะเลี้ยง 7 วัน ของผู้ป่วยรายที่ 1 และผู้ป่วยรายที่ 2 .....44

---

สถาบันวิทยบรการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย