บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การศึกษาผลของเชื้อ *Helicobacter pylori* ต่อการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากในห้องปฏิบัติการครั้งนี้ เป็นการศึกษาเชิงทดลองซึ่งประกอบด้วยการทดลองดังนี้

1. การเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกเชื้อ *Helicobacter pylori* จากชิ้นเนื้อที่ตัดจากแผลในกระเพาะอาหารของผู้ป่วย
2. การเตรียมเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli* ที่ใช้ในการศึกษา
3. การเตรียมเยื่อบุผิวช่องปากที่ใช้ในการศึกษา
4. การเพาะเลี้ยงเยื่อบุผิวช่องปากร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* และเชื้อ *Escherichia coli*
5. การเตรียมตัวอย่างสำหรับศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ซึ่งประกอบด้วยเยื่อบุผิวช่องปาก เชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli*

ประชากรและตัวอย่าง

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่ได้จากเนื้อเยื่อปกติในช่องปากของผู้ที่มารับการผ่าฟันคุด ที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และได้รับการอนุญาตจากผู้เป็นเจ้าของให้นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ (ตามแบบขออนุญาตใช้ชิ้นเนื้อ) เนื้อเยื่อที่นำมาศึกษานี้เป็นเนื้อเยื่อส่วนที่เกินและไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของช่องปาก เช่น เหงือกที่งอกเกินหรือเหงือกที่ยึดกับตัวฟันในระดับที่สูงกว่าปกติหรือปกคลุมฟันคุดที่ไม่อักเสบและจำเป็นต้องตัดออก ชิ้นเนื้อเยื่อได้จากผู้ป่วยจำนวน 4 ราย ซึ่งเนื้อเยื่อจากผู้ป่วยแต่ละรายถูกแบ่งออกเป็น 3 ส่วน ส่วนที่หนึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มีการทำให้ติดเชื้อแบคทีเรียใด ๆ ส่วนที่สองเป็นกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* และส่วนที่สามเป็นกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Escherichia coli* ซึ่งเป็นเชื้อชนิดที่ทราบกันทั่วไปว่าไม่ก่อโรค (Nonpathogenic *E. coli*) ในคนปกติ

วัสดุอุปกรณ์ สารเคมี เชื้อแบคทีเรียและเยื่อบุผิวช่องปากที่ใช้ในการทดลอง

1. สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเชื้อและแยกเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli*

1.1 Oxoid brain heart infusion (Oxoid, England)

1.2 Oxoid bacto agar (Oxoid, England)

1.3 Eosin methylene blue agar (EMB Agar; Oxoid, England)

1.4 Nutrient agar (Oxoid, England)

1.5 Tryptone soy broth

1.6 MRV-P broth

1.7 Human blood

1.8 Distilled water

1.9 Sterile normal saline solution

1.10 Peptone

1.11 NaCl

1.12 KH_2PO_4

1.13 Dextrose

1.14 Urea

1.15 0.5% Phenol red

1.16 Crystal violet (Difco, USA)

1.17 95% Ethyl alcohol

1.18 Iodine crystal (Difco, USA)

1.19 Safranin O (Difco, USA)

1.20 Tetramethyl-p-phenylenediamine hydrochloride (Difco, USA)

1.21 Hydrogen peroxide 3%

1.22 Indole

1.23 Methyl red

1.24 Gas pack (AnaeroPack-MicroAero; Mitsubishi Gas Chemical, Japan)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ส่วนประกอบของน้ำยาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

2.1 Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco BRL, USA)

2.2 L – glutamine (Gibco BRL, USA)

2.3 Fetal bovine serum (Gibco BRL, USA)

2.4 Antibiotic – antimycotic solution (Gibco BRL, USA)

3. สารที่ใช้ในการศึกษาด้วยวิธีจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน

3.1 Osmium tetroxide (EMS, USA)

3.2 Glutaraldehyde (EMS, USA)

3.3 Phosphate buffer

3.4 Ethanol

3.5 Propylene oxide

3.6 SPURR's resin (EMS, USA)

3.7 Uranyl acetate

3.8 Lead citrate

4. เครื่องมือที่ใช้ในการทดลอง

4.1 สไลด์แก้ว (microscopic slide)

4.2 แผ่นกรอง (Millipore, membrane pore size 0.22 μ)

4.3 จานเพาะเลี้ยงเชื้อ (petri dish)

4.4 Platinum loop (Delta Lab)

4.5 จานเพาะเลี้ยงเซลล์ (tissue culture plate) ขนาด 35 มิลลิเมตร (Falcon, USA)

4.6 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 15 (Surgical blade No.15)

4.7 Forceps

4.8 Test tubes

4.9 Disposable pipette

4.10 Anaerobic jar (Oxoid, England)

4.11 Cuvette ขนาด 2.5 มิลลิลิตร (Bibby Sterilin, EU)

4.12 เครื่องชั่งน้ำหนัก (Metler Toledo, Switzerland)

4.13 เครื่องเหวี่ยงแบบ bench-top centrifuge (Hermle Z320, Germany)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

4.14 Spectrophotometer (Ultrospec 3000, USA)

4.15 เครื่องนึ่งฆ่าเชื้อ (autoclave)

4.16 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ (incubator, Memmert, Germany)

4.16 ตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ (CO_2 incubator; Shel Lab, USA)

4.17 ตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow unit; MDH, England)

4.18 เครื่องตัดชิ้นเนื้อเยื่อบางสำหรับการศึกษาด้วย TEM (Ultrotome, LKB, Sweden)

4.19 กล้องจุลทรรศน์ชนิดใช้แสง (Olympus CK2, Japan)

4.20 กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน (Jeol รุ่น JEM -200 CX, Japan)

5. เชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ใช้ศึกษา

เป็นเชื้อ *Helicobacter pylori* ที่ได้จากการเพาะเลี้ยงและแยกเชื้อจากชิ้นเนื้อเยื่อ จำนวน 1 ชิ้น ที่ตัดจากแผลในกระเพาะอาหารของผู้ป่วยที่มารับการตรวจรักษาที่สาขาวิชาโรคทางเดินอาหาร ภาควิชาอายุรศาสตร์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ และได้รับอนุญาตให้นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ (ตามแบบขออนุญาตใช้ชิ้นเนื้อ) และได้รับและนำมาเพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการที่ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

6. เชื้อ *Escherichia coli* ที่ใช้ศึกษา

เป็นเชื้อ *Escherichia coli* ชนิดที่ไม่ก่อโรคที่ได้มาจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

7. เซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก

เป็นเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่ได้จากเนื้อเยื่อปกติในช่องปากของผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าฟันคุดที่ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จำนวน 4 ราย โดยเนื้อเยื่อเหล่านี้เป็นเนื้อเยื่อปกติ และเป็นส่วนที่เกินไม่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของอวัยวะช่องปากและจำเป็นต้องตัดเพื่อประโยชน์ในด้านการดูแลรักษา และได้รับการอนุญาตจากผู้เป็นเจ้าของให้นำมาใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้ได้ (ตามแบบขออนุญาตใช้ชิ้นเนื้อ)

วิธีทดลอง

1. การเพาะเชื้อและแยกเชื้อ *Helicobacter pylori*

1.1 นำชิ้นเนื้อที่ได้จากผู้ป่วยใส่ในน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้ว (sterile normal saline solution) ประมาณ 2 มิลลิลิตร และส่งห้องปฏิบัติการทันทีหรือภายใน 5 ชั่วโมง โดยเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

1.2 ทำการเพาะเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อที่มีส่วนประกอบของสมองและเยื่อหัวใจวัว (Brain Heart Infusion Agar) ที่เตรียมไว้โดยใช้ที่ตักเชื้อ (loop) ที่ทำความสะอาดให้ปราศจากเชื้อและ streak ชิ้นเนื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

1.3 นำจานอาหารที่เพาะเชื้อ ใส่ใน anaerobic jar และเติม gas pack ลงใน anaerobic jar เพื่อให้เกิดสภาวะที่มีออกซิเจนน้อย

1.4 นำ anaerobic jar ใส่ในตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้อ และเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส

1.5 ตรวจสอบดูโคโลนีของเชื้อเพื่อดูการเจริญเติบโตของเชื้อในจานเพาะเลี้ยงเชื้อในวันที่ 3 ถึงวันที่ 7 หากไม่มีการเจริญของเชื้อให้จำหน่ายทิ้งจานเพาะเลี้ยงเชื้อ ในวันที่ 7

1.6 ถ้าพบว่ามีการเจริญเติบโตของเชื้อ ให้นำโคโลนีที่ได้มาทดสอบโดยการย้อมสีกรัม เพื่อดูรูปร่างลักษณะการเรียงตัวและการติดสีของเชื้อ ร่วมกับการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีต่าง ๆ เพื่อวินิจฉัยเชื้อ

การอ่านผลเพาะเชื้อ

- ลักษณะของโคโลนีของเชื้อ *Helicobacter pylori* จะมีสีเหลืองใส มีความมันขอบของโคโลนีเรียบ มีเส้นผ่านศูนย์กลางประมาณ 0.5-1.0 มิลลิเมตร
- ผลการย้อมสีกรัมเมื่อตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์จะเห็นเชื้อติดสีแดงและมีรูปร่างโค้งงอ
- ผลการทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อ *Helicobacter pylori*

ก. ให้ผลบวกต่อการทดสอบเอนไซม์ยูรีเอสด้วย urease reagent ซึ่งจะมีสีชมพู เกิดขึ้นที่ปลาย cotton swab

ข. ให้ผลบวกต่อการทดสอบเอนไซม์ออกซิเดสซึ่งจะเกิดสีม่วงขึ้น

ค. การทดสอบเอนไซม์แคทาเลสจะเกิดฟองแก๊สจำนวนมากทันที

2. การเพาะเชื้อและแยกเชื้อ *Escherichia coli*

2.1 ทำการเพาะเชื้อในจานอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด nutrient broth ที่เตรียมไว้โดยใช้ที่ตักเชื้อที่ทำให้ปราศจากเชื้อและ streak เชื้อบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ

2.2 ใส่ในตู้อบเพาะเลี้ยงเชื้อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2.3 ตรวจสอบลักษณะโคโลนีและทดสอบปฏิกิริยาชีวเคมีของเชื้อ

- โคโลนีของเชื้อมีลักษณะ metallic sheen บน EMB agar
- ให้ผลบวกต่อการทดสอบด้วย indole และ methyl red test

3. การเตรียมเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli*

เมื่อเพาะเลี้ยงเชื้อและแยกเชื้อจนได้เป็นเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli* เพียงชนิดเดียวแล้ว จะเตรียมให้ความเข้มข้นของแบคทีเรียทั้งสองชนิดเท่ากันในน้ำยาเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ซึ่งมีวิธีการเตรียมโดยอาศัย spectrophotometer กำหนดให้มีค่าดูดกลืนแสง (Absorbance) เท่ากับ 0.16 ที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร ซึ่งจะมีความเข้มข้นของเชื้อ *Helicobacter pylori* เท่ากับ 10^8 โคโลนีต่อมิลลิลิตร โดยเป็นค่าเฉลี่ยจากการนับจำนวนโคโลนีของเชื้อที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ภายหลังจากที่เตรียมเชื้อทั้งสองให้มีความเข้มข้นของเชื้อเท่ากันแล้ว จะนำไปปั่นล้าง broth ที่ความเร็ว 13,000 รอบ/วินาที เป็นเวลา 15 นาที 2 ครั้ง แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงไปใน centrifuge tube ของแบคทีเรียทั้งสองชนิด

4. การเตรียมน้ำยาเลี้ยงเซลล์

น้ำยาเลี้ยงเซลล์ประกอบไปด้วย

DMEM 1X	ร้อยละ 89
L – glutamine	ร้อยละ 1
Fetal bovine serum	ร้อยละ 10

นำส่วนประกอบของน้ำยาเลี้ยงเซลล์มาผสมกันในอัตราส่วนดังกล่าวภายในตู้ปลอดเชื้อที่อุณหภูมิห้อง หลังจากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำไปใช้ในการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

5. การเตรียมเยื่อบุผิวช่องปาก

เซลล์ที่ใช้ในการศึกษานี้เป็นเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากที่ได้จากเนื้อเยื่อเหงือกปกติของผู้ป่วย การนำเนื้อเยื่อที่ได้มาเพาะเลี้ยงมีขั้นตอนในการเตรียมดังนี้

5.1 ล้างเนื้อเยื่อให้สะอาดปราศจากเลือดและน้ำลายด้วย DMEM จากนั้นนำมาแช่ใน DMEM ที่มีส่วนผสมของน้ำยาต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราความเข้มข้นร้อยละ 5 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เพื่อกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่ติดมากับชิ้นเนื้อเยื่อแล้วล้างด้วย DMEM ที่ไม่มีส่วนผสมของน้ำยาต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราอีกครั้ง

5.2 ตัดแยกชิ้นเนื้อเยื่อตามแนวรอยต่อระหว่างชั้นเยื่อบุผิว (epithelium) และชั้นเนื้อเยื่อยึดต่อ (connective tissue) ด้วยใบมีดผ่าตัดเบอร์ 15 หลังจากนั้นตัดชิ้นส่วนที่เป็นเยื่อบุผิวออกเป็นชิ้นเล็ก ๆ จำนวน 12 ชิ้น วางในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ ขนาด 35 มิลลิเมตร โดยแบ่งเป็น 3 กลุ่ม คือ กลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* (4 ชิ้น) กลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Escherichia coli* (4 ชิ้น) และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียชนิดใด ๆ (4 ชิ้น) แล้วเติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ให้ท่วมชิ้นเนื้อเหล่านั้น

6. การเพาะเลี้ยงเยื่อบุผิวช่องปากร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli*

เมื่อแบ่งจานที่เพาะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก ออกเป็น 3 กลุ่ม คือกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* กลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Escherichia coli* และกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียชนิดใด ๆ แล้วดูดน้ำยาเลี้ยงเซลล์เก่าทิ้งทั้งสามกลุ่มและ

6.1 นำเชื้อ *Helicobacter pylori* และเชื้อ *Escherichia coli* ที่เตรียมไว้ใส่ลงไปในจานเพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* และกลุ่มที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Escherichia coli* ตามลำดับ

6.2 เติมน้ำยาเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีแบคทีเรียใด ๆ ในปริมาณ 1 มิลลิลิตร ลงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อแบคทีเรียชนิดใด ๆ

6.3 นำจานเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้ง 3 กลุ่มเก็บไว้ในตู้อบเพาะเลี้ยงเซลล์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ระดับคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นสัมพัทธ์สูงสุด (ร้อยละ 95 ถึงร้อยละ 100)

7. การเตรียมตัวอย่างเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ซึ่งประกอบด้วยตัวอย่างเยื่อบุผิวช่องปากที่เพาะเลี้ยงร่วมกับเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli* ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง และตัวอย่างเชื้อ *Helicobacter pylori* กับ *Escherichia coli*

เมื่อนำเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli* ใส่ลงไปในจานเพาะเลี้ยงเยื่อบุผิวช่องปากแล้ว ทำการศึกษาผลของเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli* ต่อเซลล์เยื่อบุผิวช่องปากด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง และ 24 ชั่วโมง ซึ่งมีขั้นตอนในการเตรียมตัวอย่างดังนี้

7.1 นำชิ้นเนื้อเยื่อออกจากจานเพาะเลี้ยงเซลล์ในกลุ่มทดลองทั้งสองกลุ่ม 4 ชิ้น และกลุ่มควบคุม 2 ชิ้นไปแช่ด้วยน้ำยารักษาสภาพชิ้นเนื้อ (glutaraldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส จากนั้นทำการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อเยื่อเพื่อทำการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านตามขั้นตอนต่อไป

7.2 ล้างชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้แช่ในน้ำยา glutaraldehyde ด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 หลาย ๆ ครั้ง ก่อนที่จะแช่ในน้ำยา osmium tetroxide ความเข้มข้นร้อยละ 2 ใน 0.1 M phosphate buffer pH 6.2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิห้อง ภายใต้เครื่องดูดอากาศเสีย

7.3 ล้างชิ้นเนื้อเยื่ออีกครั้งด้วย 0.1 M phosphate buffer pH 7.3 ก่อนทำการกำจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ (dehydration)

7.4 การกำจัดน้ำออกเนื้อเยื่อ ที่อุณหภูมิห้อง ด้วยการแช่ชิ้นเนื้อเยื่อในน้ำยาความเข้มข้นต่าง ๆ ดังนี้

Ethanol	ความเข้มข้นร้อยละ 50 ในน้ำ	เป็นเวลา 10 นาที	1 ครั้ง
Ethanol	ความเข้มข้นร้อยละ 75 ในน้ำ	เป็นเวลา 10 นาที	1 ครั้ง
Ethanol	ความเข้มข้นร้อยละ 90 ในน้ำ	เป็นเวลา 10 นาที	1 ครั้ง
Ethanol	ความเข้มข้นร้อยละ 100	ครั้งละ 10 นาที	2 ครั้ง
Propylene oxide	ความเข้มข้นร้อยละ100	ครั้งละ 10 นาที	2 ครั้ง

7.5 เนื้อเยื่อที่ถูกกำจัดน้ำออกแล้วถูกนำไปแช่ในสารลาย SPURR's resin ใน propylene oxide สัดส่วน 1 : 2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง จากนั้นเปลี่ยนเป็นแช่ในสารละลาย SPURR's resin ใน propylene oxide สัดส่วน 2 : 1 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และตามด้วยการแช่ใน SPURR's resin ความเข้มข้นร้อยละ100 เป็นเวลา 12 ชั่วโมง

7.6 เรียงชิ้นเนื้อเยื่อที่ผ่านขบวนการดังกล่าวลงใน embedding mold เติม SPURR's resin ความเข้มข้นร้อยละ100 จนเต็ม mold แล้วนำ mold ไปอบในตู้ควบคุมอุณหภูมิ ที่อุณหภูมิ 70 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 8 ชั่วโมง ทิ้งไว้ให้เย็นก่อนตัด section นอกจากการเตรียมตัวอย่างชิ้นเนื้อที่ใช้ในการศึกษาแล้ว ยังได้เตรียมตัวอย่างเชื้อ *Helicobacter pylori* และ *Escherichia coli* เพื่อศึกษาลักษณะของเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน ด้วยการเตรียมตัวอย่างในลักษณะขั้นตอนเดียวกัน (7.1-7.9)

7.7 ตัด semithin section ความหนา 1 ไมครอนด้วย glass knife เพื่อเลือกบริเวณของเนื้อเยื่อที่จะศึกษาก่อน เมื่อได้บริเวณที่ต้องการแล้วจึงตัด ultrathin section ความหนาประมาณ 60–80 นาโนเมตร ด้วย diamond knife โดยใช้เครื่อง LKB Ultratome เก็บ ultrathin section ที่ได้บน 200 mesh copper grids

7.8 ย้อม ultrathin section ด้วย uranyl acetate ความเข้มข้นร้อยละ 1 และ lead citrate ความเข้มข้นร้อยละ 2

7.9 ศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อและเชื้อด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่าน JEM - 200 CX บันทึกภาพผลการทดลองด้วยฟิล์ม Fuji ขนาด 5.9 x 8.2 เซนติเมตร

การศึกษาและวิเคราะห์ข้อมูล

1. ศึกษาผลของเชื้อ *Helicobacter pylori* ต่อการเสื่อมของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก โดยพิจารณาจากลักษณะของนิวเคลียส (nucleus) ไซโทพลาซึม (cytoplasm) และเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เยื่อบุผิวช่องปาก ดังนี้

- <u>นิวเคลียส</u> โดยดูการสลายของเยื่อหุ้มนิวเคลียส (nuclear membrane) นิวเคลียสถูกทำลาย
- <u>ไซโทพลาซึม</u> พบมีการเปลี่ยนแปลงของไมโทคอนเดรีย (mitochondria) เช่น มีการบวม หรือการไม่ต่อเนื่องของเยื่อหุ้มไมโทคอนเดรียและครีสตี (cristae) พบแวคิวโอลในไซโทพลาซึม (cytoplasmic vacuolation)
- <u>เยื่อหุ้มเซลล์</u> พบการเปลี่ยนแปลงที่เยื่อหุ้มเซลล์ เช่น เกิดลักษณะเป็นตุ่มพอง (blebbing) หรือเกิดรูที่เยื่อหุ้มเซลล์ และการยึดเกาะระหว่างเซลล์ (intercellular attachment) เสียไป

2. เปรียบเทียบผลและข้อมูลที่ได้จากการศึกษาโดยใช้กล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องผ่านทั้งในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง โดยบรรยายลักษณะของข้อมูลเป็นสถิติเชิงบรรยาย (descriptive statistics) สรุปผลการวิจัยและตอบสมมติฐานต่อไป