

## บทที่ 4

### ผลการวิเคราะห์ข้อมูล

การศึกษาครั้งนี้ เป็นการศึกษาในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ แต่ละตอนของการศึกษาทำการทดลองซ้ำ 4 ครั้ง โดยใช้เซลล์จากชิ้นเนื้อที่ได้รับจากผู้ป่วย 4 ราย ซึ่งผลการศึกษาที่ทำซ้ำ 4 ครั้งนี้ ได้ผลเป็นไปในแนวทางเดียวกัน

**การศึกษาปฏิกิริยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีต่อแผ่นโคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ**

จากการทดลองเพื่อศึกษาปฏิกิริยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ต่อแผ่นโคโตซานทั้ง 2 ชนิดที่มีดีอะเซทิลเลชันต่างกัน (ร้อยละ 75.9 และ 95.4) ที่ระยะเวลาของการเพาะเลี้ยงต่างๆ กัน ผลการศึกษาพบว่า เซลล์มีการตอบสนองต่อแผ่นโคโตซานทั้ง 2 ชนิดใกล้เคียงกัน เซลล์ที่เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงที่มีแผ่นโคโตซานทั้ง 2 ชนิดยึดอยู่มีการเจริญเติบโตได้ดี เซลล์สามารถเจริญมาชิดขอบของแผ่นได้ (ภาพที่ 8A-D และ 9A-D) และเซลล์เหล่านี้มีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้น แต่การเจริญของเซลล์บนแผ่นโคโตซานแต่ละชนิดมีความแตกต่างกัน โดยพบว่า เซลล์มีการยึดเกาะและเพิ่มจำนวนบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 ได้ดีกว่าบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 (ภาพที่ 8 E-H และ 9 E-H)

**การศึกษาปฏิกิริยาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มีต่อแผ่นโคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด**

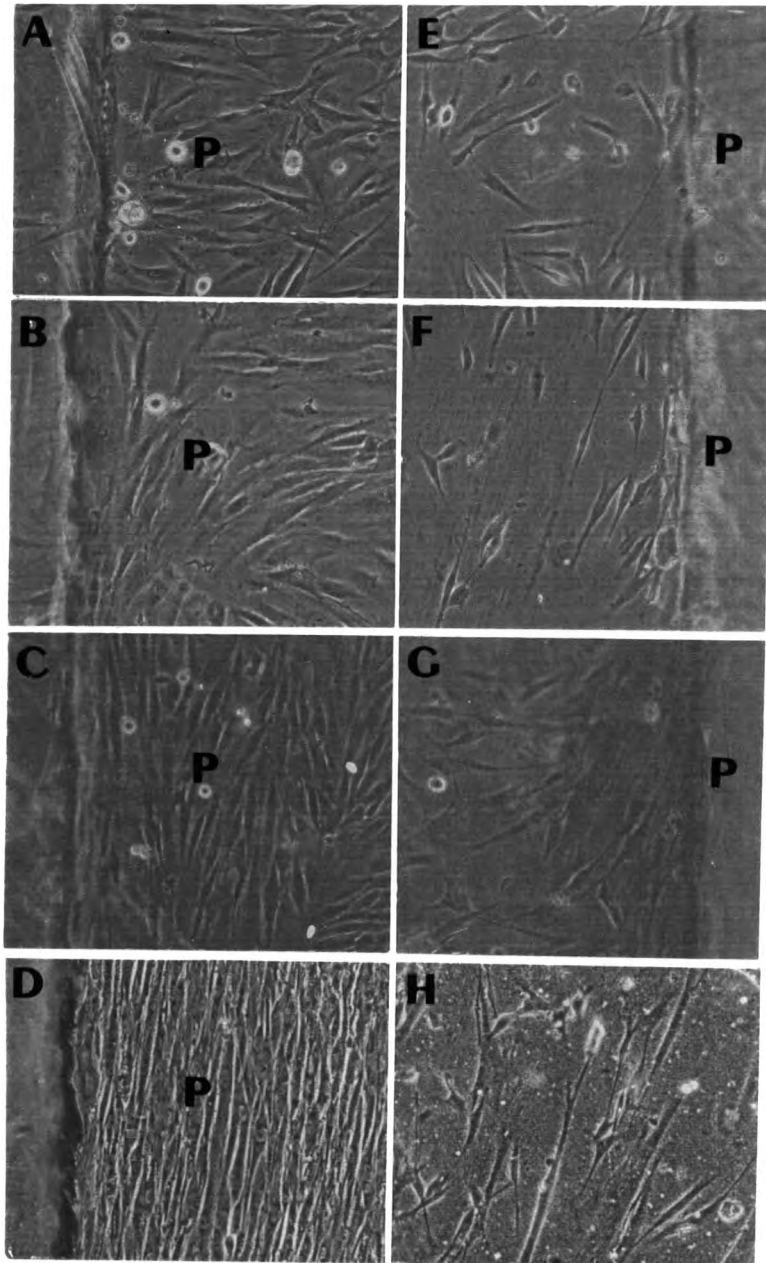
จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นโคโตซานทั้ง 2 ชนิดที่มีดีอะเซทิลเลชันต่างกัน (ร้อยละ 75.9 และ 95.4) พบว่า ลักษณะการยึดเกาะและจำนวนของเซลล์ที่มีการยึดเกาะแตกต่างกัน เซลล์สามารถเจริญเติบโตและยึดเกาะบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 ได้ดีกว่า โดยส่วนใหญ่ที่พบเป็นเซลล์ที่มีการแผ่ขยายส่วนยื่น (processes) ของเซลล์ออกมาเกาะกับพื้นผิวของแผ่นและเซลล์ข้างเคียง (ภาพที่ 10B, 10D และ 11B, 11D) ในขณะที่เซลล์ที่พบบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 มีจำนวนน้อยกว่าและมีการยึดเกาะไม่ดีเท่า ซึ่งสังเกตได้จากการที่เซลล์มีการแผ่ตัวน้อยกว่า (ภาพที่ 10A และ 11A) นอกจากนั้นเซลล์ยังมีลักษณะรูปร่างค่อนข้างกลม ผนังขรุขระมีปุ่ม (bleb) (ภาพที่ 10C และ 11C) ยื่นออกมาจำนวนมากซึ่งไม่ค่อยพบในแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 (ภาพที่ 10 D และ 11D)

ภาพที่ 8 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงให้เห็นการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 (การทดลองตอนที่ 1)

- A. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 3 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- B. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 5 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- C. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 7 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- D. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 10 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- E. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 3 วัน บนแผ่นโคโตซาน
- F. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 5 วัน บนแผ่นโคโตซาน
- G. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 7 วัน บนแผ่นโคโตซาน
- H. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 10 วัน บนแผ่นโคโตซาน

สังเกตได้ว่าการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นโคโตซานไม่ดีเท่าการเจริญบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์น้อยกว่า

$P =$  พื้นที่ของจานเพาะเลี้ยง

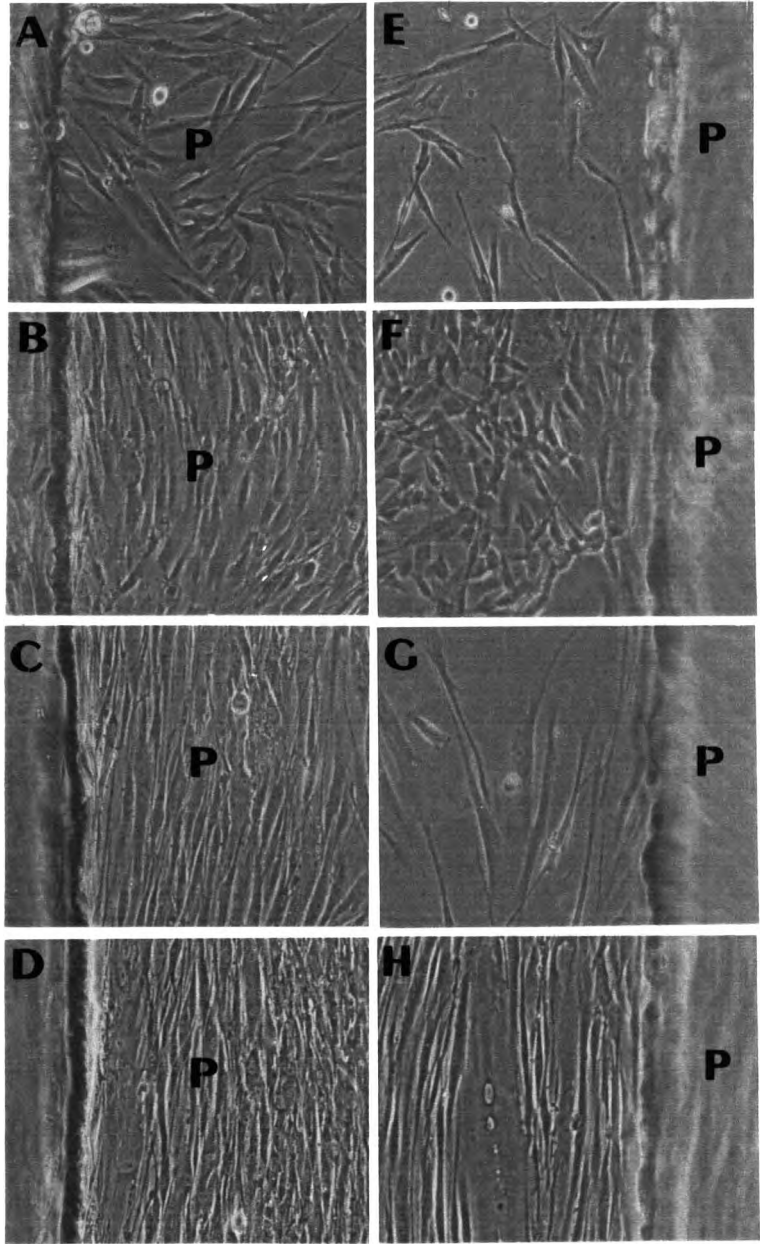


ภาพที่ 9 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ แสดงให้เห็นการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่เพาะเลี้ยงร่วมกับแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 (การทดลองตอนที่ 1)

- A. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 3 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- B. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 5 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- C. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 7 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- D. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 10 วัน บนจานเพาะเลี้ยงเซลล์บริเวณขอบแผ่นโคโตซาน
- E. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 3 วัน บนแผ่นโคโตซาน
- F. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 5 วัน บนแผ่นโคโตซาน
- G. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 7 วัน บนแผ่นโคโตซาน
- H. เซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 10 วัน บนแผ่นโคโตซาน

สังเกตได้ว่าการเจริญของเซลล์ไฟโบรบลาสต์บนแผ่นโคโตซานไม่ดีเท่าการเจริญบนจานเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยพบว่ามีจำนวนเซลล์น้อย

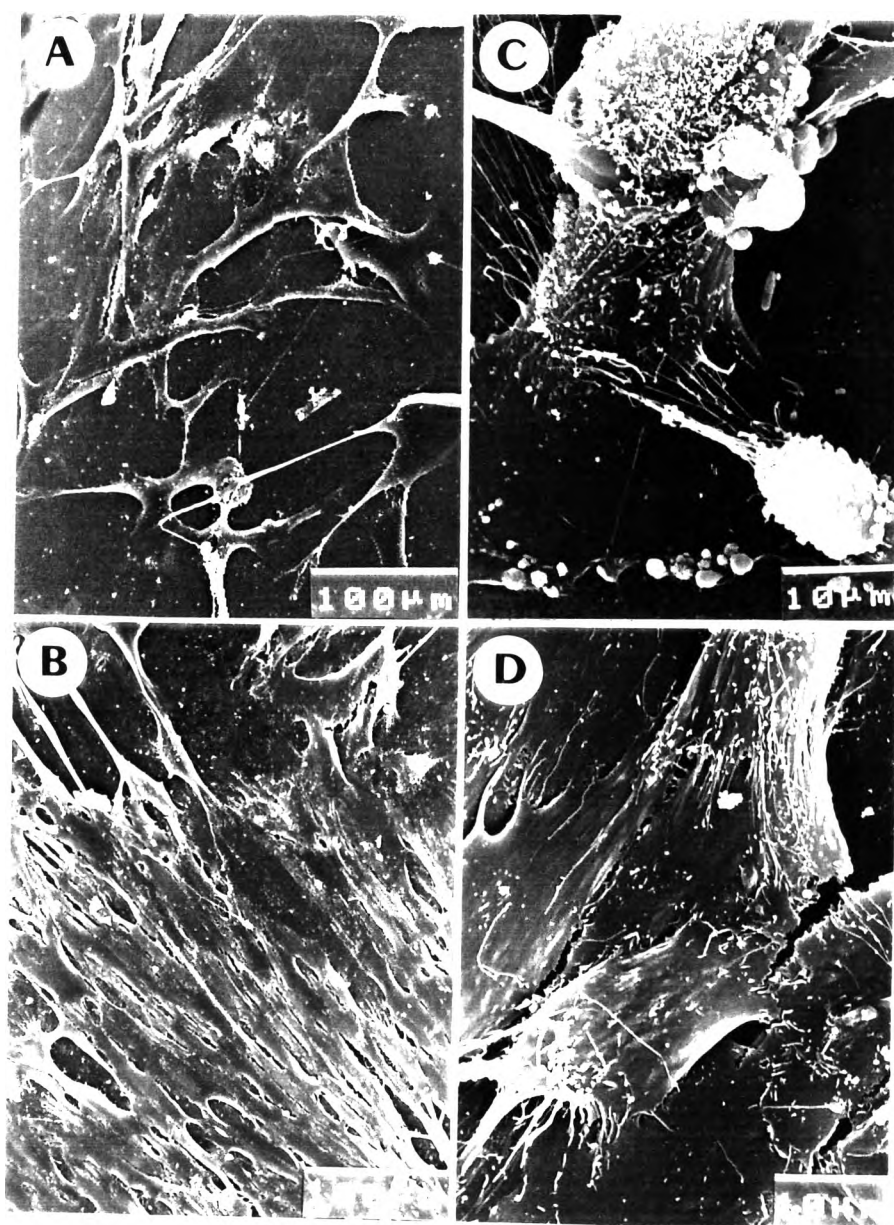
$P =$  พื้นที่ของจานเพาะเลี้ยง



ภาพที่ 10 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบร بلاสต์อายุ 10 วันที่พบบนแผ่นโคโคซานทั้ง 2 ชนิด (การทดลองตอนที่ 1)

A และ C แสดงเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 79.5  
 B และ D แสดงเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4  
 สังเกตได้ว่า จำนวนเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 มีมากกว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 79.5 และมีการแผ่ตัวและการยึดเกาะของเซลล์ที่ดีกว่า

กำลังขยายของแต่ละภาพแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายบาร์ (bar) ที่ขอบล่างด้านขวาของภาพ

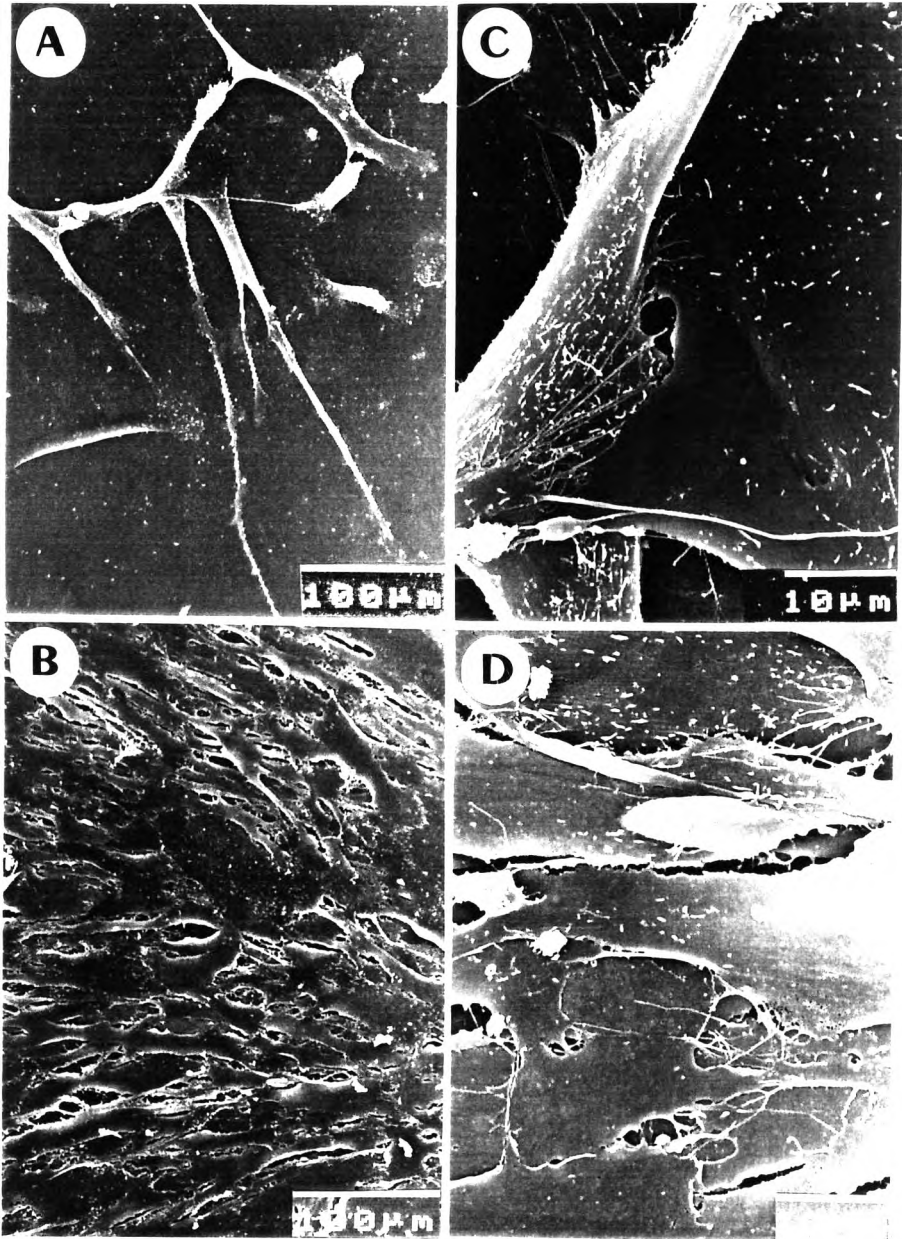


ภาพที่ 11 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบร بلاสต์อายุ 16 วันที่พบบนแผ่นโคโคซานทั้ง 2 ชนิด (การทดลองตอนที่ 1)

A และ C แสดงเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 79.5  
B และ D แสดงเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4  
สังเกตได้ว่า จำนวนเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 มีมากกว่าเซลล์ไฟโบร بلاสต์บนแผ่นโคโคซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 79.5 และมีการแผ่ตัวและการยึดเกาะของเซลล์ที่ดีกว่า

กำลังขยายของแต่ละภาพแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายบาร์ (bar) ที่ขอบล่างด้านขวาของภาพ





## การศึกษาคุณสมบัติการยอมให้สารละลายอาหารซึมผ่านของแผ่นโคโตซานด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นโคโตซาน ทั้ง 2 ชนิดในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์พิเศษ ที่ระยะเวลาต่าง ๆ กัน พบว่าเซลล์สามารถเจริญบนแผ่นโคโตซานได้ ทั้งในกลุ่มควบคุมซึ่งเซลล์มีการสัมผัสกับน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์โดยตรง (ภาพที่ 12 A และ 12D) และในกลุ่มทดลองซึ่งเซลล์อยู่คนละด้านของแผ่นโคโตซานกับน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์ ในกลุ่มทดลองทั้ง 2 พบเซลล์เป็นจำนวนมากที่เจริญและยึดเกาะบนแผ่นโคโตซานได้ดี เทียบเท่าหรือเกือบเทียบเท่ากับเซลล์ในกลุ่มควบคุม จากการทดลองกลับด้านอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ดังอธิบายในบทที่ 3 หัวข้อ "การศึกษาคุณสมบัติการยอมให้สารละลายอาหารซึมผ่านของแผ่นโคโตซานโดยวิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์" พบว่า มีเซลล์ที่ไม่ได้สัมผัสโดยตรงกับน้ำยาเพาะเลี้ยงเซลล์สามารถเจริญได้ทั้งบนแผ่นโคโตซานชนิดที่มีดีอะเซทิลเลขันร้อยละ 75.9 และ 95.4 แสดงให้เห็นว่าแผ่นโคโตซานมีการยอมให้สารละลายอาหารซึมผ่านไปเลี้ยงเซลล์ได้ สังเกตได้จากความอยู่รอดของเซลล์ที่เหลืออยู่ทั้งที่ระยะเวลา 3 วัน (ภาพที่ 12 B, 12C, 12E และ 12F) และแม้จะเพาะเลี้ยงนานมากขึ้นเป็นเวลา 7 วัน ก็ยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่ได้ (ภาพที่ 13 A-D) แต่ที่น่าสังเกตคือ จำนวนของเซลล์ที่พบบนแผ่นที่มีดีอะเซทิลเลขัน ร้อยละ 75.9 มีมากกว่าและมีการยึดเกาะที่ดีกว่าเซลล์ที่พบบนแผ่นที่มีดีอะเซทิลเลขัน ร้อยละ 95.4 (ภาพที่ 12 B และ 12C, ภาพที่ 13 A และ 13B) ที่กำลังขยายของภาพที่สูงขึ้น พบว่าเซลล์ที่อยู่บนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลขัน ร้อยละ 75.9 มีการแผ่ตัวได้ดี แม้จะเพาะเลี้ยงเป็นเวลานานขึ้นจาก 3 วัน เป็น 7 วัน (เปรียบเทียบภาพที่ 12 E กับ 13 C) ในขณะที่เซลล์บนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลขัน ร้อยละ 95.4 มีการยึดเกาะและแผ่ตัวลดลงเมื่อใช้เวลาเพาะเลี้ยงนานขึ้น (เปรียบเทียบภาพที่ 12 F กับ 13 D)

ภาพที่ 12 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงจำนวนและลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 3 วันที่พบบนแผ่นโคโตซานทั้ง 2 ชนิด ที่เลี้ยงในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ ในกลุ่มศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม (การทดลองตอนที่ 2)

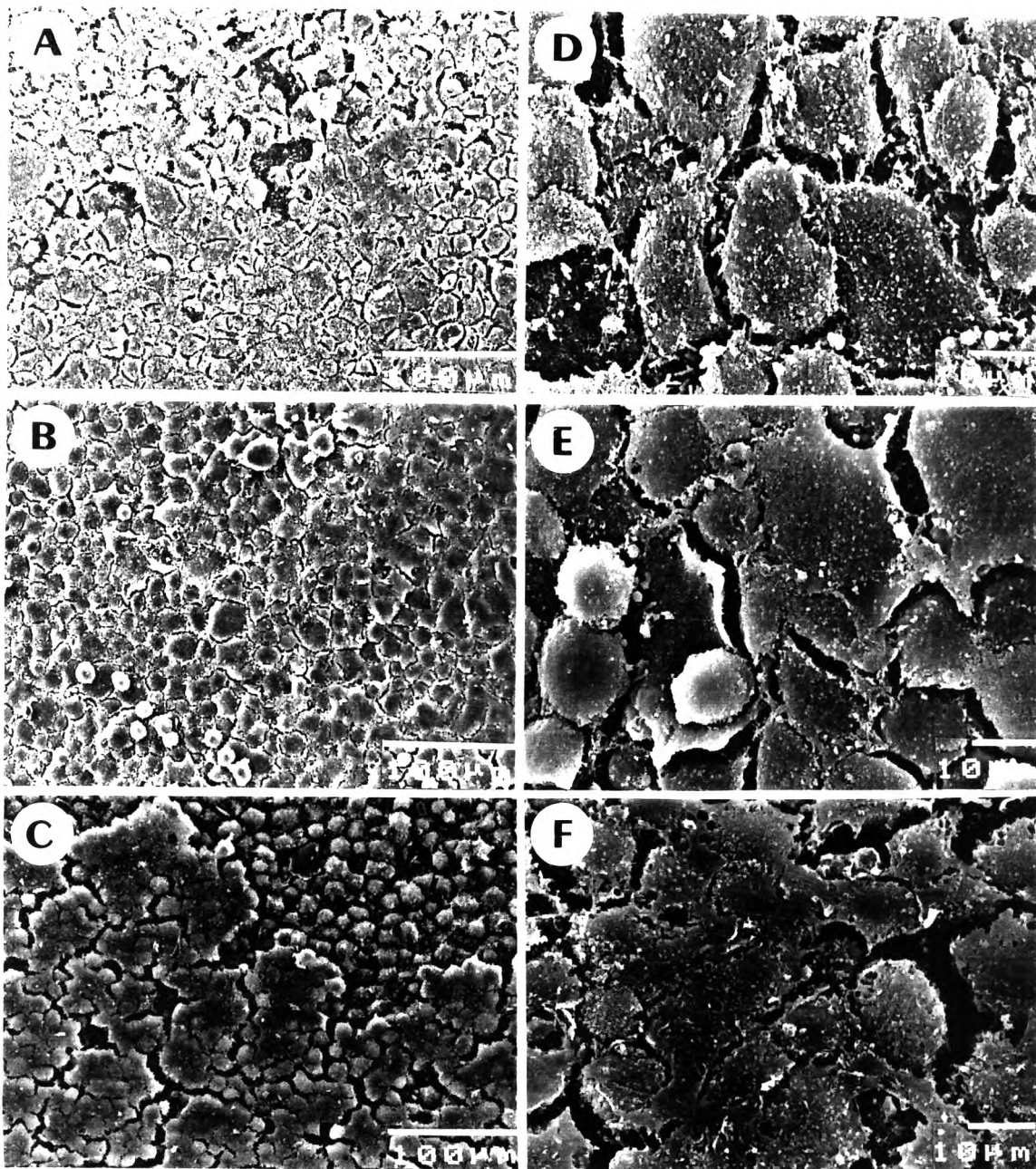
A และ D เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มควบคุม

B และ E เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9

C และ F เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4

สังเกตได้ว่า จำนวนและการยึดเกาะของเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่แผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 ดีกว่าที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 เล็กน้อย

กำลังขยายของแต่ละภาพแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายบาร์ (bar) ที่ขอบล่างด้านขวาของภาพ



ภาพที่ 13 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด แสดงจำนวนและลักษณะการยึดเกาะของเซลล์ไฟโบรบลาสต์อายุ 7 วันที่พบบนแผ่นโคโตซานทั้ง 2 ชนิด ที่เลี้ยงในอุปกรณ์เพาะเลี้ยงเซลล์ ในกลุ่มศึกษาทั้ง 2 กลุ่ม (การทดลองตอนที่ 2)

A และ C เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9

B และ D เซลล์ไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มทดลองที่เพาะเลี้ยงบนแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4

สังเกตได้ว่า จำนวนและการยึดเกาะของเซลล์ในกลุ่มที่แผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 มากกว่าและดีกว่าที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 แม้ว่าเซลล์ส่วนใหญ่ของแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 95.4 มีการยึดเกาะไม่ดีเท่าเทียมแผ่นโคโตซานที่มีดีอะเซทิลเลชันร้อยละ 75.9 แต่ก็อาจพบเซลล์ที่แผ่และยึดเกาะได้บ้าง (ครีซี)

กำลังขยายของแต่ละภาพแสดงไว้ด้วยเครื่องหมายบาร์ (bar) ที่ขอบล่างด้านขวาของภาพ

