


ผลของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูก (MG-63) ในหลอดทดลอง



นาย ศุภชัย ฤทธิเจริญวัตถุ

สถาบันวิทยบริการ

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิศวกรรมไฟฟ้า ภาควิชาวิศวกรรมไฟฟ้า

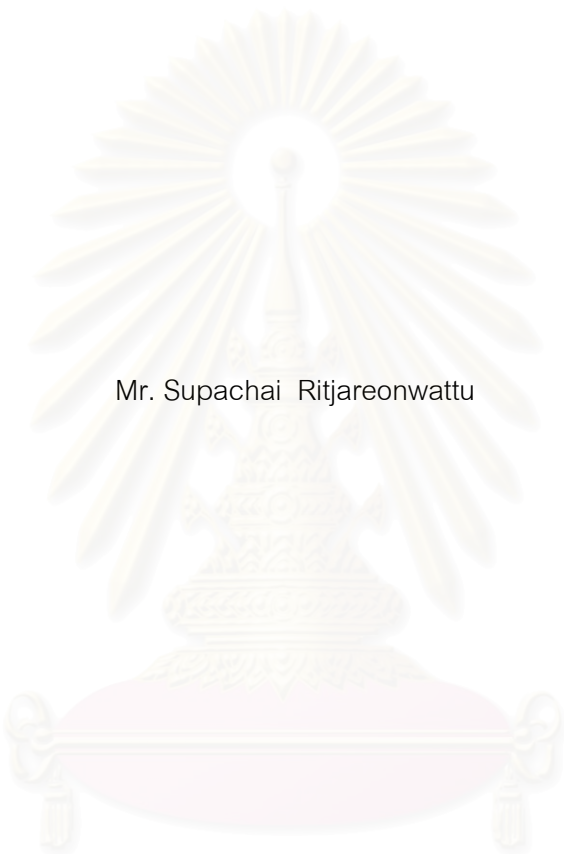
คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2544

ISBN 974-03-0449-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF AC-CURRENT ON BEHAVIOR OF BONE CELLS (MG-63) IN VITRO



Mr. Supachai Ritjareonwattu

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Engineering in Electrical Engineering

Department of Electrical Engineering

Faculty of Engineering

Chulalongkorn University

Academic Year 2001

ISBN 974-03-0449-4

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูก (MG-63) ในหลอดทดลอง
โดย	นาย ศุภชัย ฤทธิเจริญวัตถุ
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	อาจารย์ ทพญ. ดร. สุกคนธา เจริญวิทย์

คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... คณบดีคณะวิศวกรรมศาสตร์
(ศาสตราจารย์ ดร. สมศักดิ์ ปัญญาแก้ว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เจ็ดกุล โสภานิตย์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(อาจารย์ ทพญ. ดร. สุกคนธา เจริญวิทย์)

..... กรรมการ
(รองศาสตราจารย์ นสพ. ชินวร พรหมชัยนันท์)

บทคัดย่อวิทยานิพนธ์

ศุภชัย ฤทธิ์เจริญวัตถุ : ผลของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมของเซลล์กระดูก (MG-63) ในหลอดทดลอง. (EFFECTS OF AC-CURRENT ON BEHAVIOR OF BONE CELLS (MG-63) IN VITRO) อ. ที่ปรึกษา : รศ. ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์, อ. ที่ปรึกษาร่วม : ดร. ทพญ. สุกนธา เจริญวิทย์ 68 หน้า. ISBN 974-03-0449-4.

วัตถุประสงค์ของงานวิจัยนี้ คือ การศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 Hz ต่ออัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์กระดูก MG-63 โดยทำการประดิษฐ์อุปกรณ์สำหรับศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าสลับต่อการแบ่งเซลล์ MG-63 และการศึกษาผลกระทบที่สืบเนื่องหลังจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าต่อการแบ่งเซลล์ MG-63 เมื่อนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นไปเลี้ยงต่อในสภาวะปกติ โดยตัวแปรที่ศึกษามีดังนี้ คือ ขนาดกระแสไฟฟ้าสลับที่ใช้กระตุ้น ปริมาณซีรัม (serum) และ L-Glutamine ในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด DMEM โดยมีระยะเวลาในการกระตุ้นเป็น 24 ชม. เก็บผลการทดลองด้วย Haemocytometer และวิธีสุ่มนับ จากนั้นวิเคราะห์ผลเชิงสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS

ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 Hz พบว่า ส่งผลเชิงลบต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์อย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 โดยสังเกตพบว่าปริมาณซีรัมและ L-glutamine ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตโดยรวมของเซลล์ MG-63 แต่อย่างไรก็ตามสังเกตไม่พบอิทธิพลของปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเชื้อต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ในขณะที่สังเกตพบว่า ปริมาณ L-Glutamine ในอาหารเลี้ยงเชื้อมีอิทธิพลต่ออัตราการแบ่งเซลล์ MG-63 เมื่อกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ และเมื่อนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าค่าต่างๆ ไปเลี้ยงต่อในภาวะปกติ พบว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ามีอัตราการแบ่งเซลล์เฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มควบคุม ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า

ภาควิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า	ลายมือชื่อนิสิต.....
สาขาวิชา	วิศวกรรมไฟฟ้า	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....
ปีการศึกษา	2544	ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

AN ABSTRACT

4170700321 : MAJOR ELECTRICAL ENGINEERING

KEY WORDS : ELECTRICAL STIMULATION / CURRENT STIMULATION / PROLIFERATION /
OSTEOSARCOMA / MG-63

SUPACHAI RITJAREONWATTU : EFFECTS OF AC-CURRENT ON BEHAVIOR
ON BONE CELLS (MG-63) IN VITRO. THESIS ADVISER : ASSOC. PROF. DR.
MANA SRIYUDTHSAK, THESIS CO-ADVISOR : DR. SUKOLTHA CHAREONWIT,
68 pp. ISBN 974-03-0449-4.

Objectives of the present study are to investigate the effects of 50 Hz ac current on proliferation of bone cells, MG-63, in DMEM culture medium by constructing the apparatus for the study on the effects of ac-current on behavior of the bone cells, and to investigate the effects which occur after ac current stimulation on proliferation of the MG-63 cells. The parameters such as current amplitude, concentration of serum and L-glutamine in DMEM were varied in the experiments. The current stimulation period is fixed at 24 h. The cell concentration of the stimulated and the non-stimulated (control) groups were compared using Haemocytometer and random count methods. After that, the SPSS was used to analyzed the results.

The results from the ac current stimulation on the MG-63 cells imply that ac current stimulation caused significantly negative effects on the cell proliferation, at 0.05-level of significance ($\alpha=0.05$). The influence of the serum and L-glutamine concentration in DMEM on the MG-63 cells proliferation were observed. Nevertheless, the influence of the serum concentration on the MG-63 proliferation under ac-current stimulation could not be observed. On the other hand, it was observed that there was influence of the L-glutamine concentration on the MG-63 proliferation under ac-current stimulation. Moreover, after the stimulation, the proliferation of the MG-63 cells in regular medium is significantly higher than the control group.

Department Electrical Engineering

Student's signature.....

Field of study Electrical Engineering

Advisor's signature.....

Academic year 2001

Co-advisor's signature.....

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ รศ. ดร. มานะ ศรียุทธศักดิ์ สำหรับหัวข้อวิทยานิพนธ์ที่น่าสนใจ ตลอดจนความช่วยเหลือ สนับสนุนต่าง ๆ ในการทำวิทยานิพนธ์

ขอขอบคุณ อาจารย์ ทพญ. ดร. สุคนธา เจริญวิทย์ สำหรับความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดจนคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ ผู้อำนวยการศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก และเจ้าหน้าที่ประจำศูนย์ชีววิทยาช่องปากทุกท่านที่คอยช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกต่าง ๆ ในการทำวิจัย

ขอขอบคุณ หัวหน้าภาควิชาทันตกรรมหัตถการ และเจ้าหน้าที่ประจำคลินิกทันตกรรมหัตถการทุกท่าน ที่เอื้อเฟื้ออุปกรณ์และวัสดุพิมพ์ปากสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. อารมณ์ ธีรมงคลรัศมี สำหรับคำแนะนำและความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำวิทยานิพนธ์นี้

ขอขอบคุณ ผศ. แมนสรวง อักษรนุกิจ ที่ช่วยจัดหาอุปกรณ์และวัสดุพิมพ์ปากสำหรับใช้ในงานวิจัย

ขอขอบคุณ อาจารย์ประจำภาควิชากายวิภาคศาสตร์ทุกท่าน ที่ให้ความเอื้อเฟื้อเพื่อข้าพเจ้าตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ พี่รุ่งอรุณ พี่เกษรา พี่ศิริลักษณ์ สำหรับความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

ขอขอบคุณ คณาจารย์ นิสิต และ บุคลากรของห้องปฏิบัติการไบโออิเล็กทรอนิกส์ และห้องปฏิบัติการวิจัยสารกึ่งตัวนำ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือต่าง ๆ ตลอดระยะเวลาการทำวิจัย

สุดท้าย ข้าพเจ้าขอขอบคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และญาติพี่น้องทุกคนของข้าพเจ้าที่ช่วยเหลือและคอยสนับสนุนทั้งร่างกาย แรงใจ และทุนทรัพย์ ในการศึกษาและทำวิจัยครั้งนี้

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เกิดขึ้นได้จากความช่วยเหลือและสนับสนุนจากบุคคลต่าง ๆ ดังที่กล่าวมาข้างต้น ซึ่งข้าพเจ้าขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้

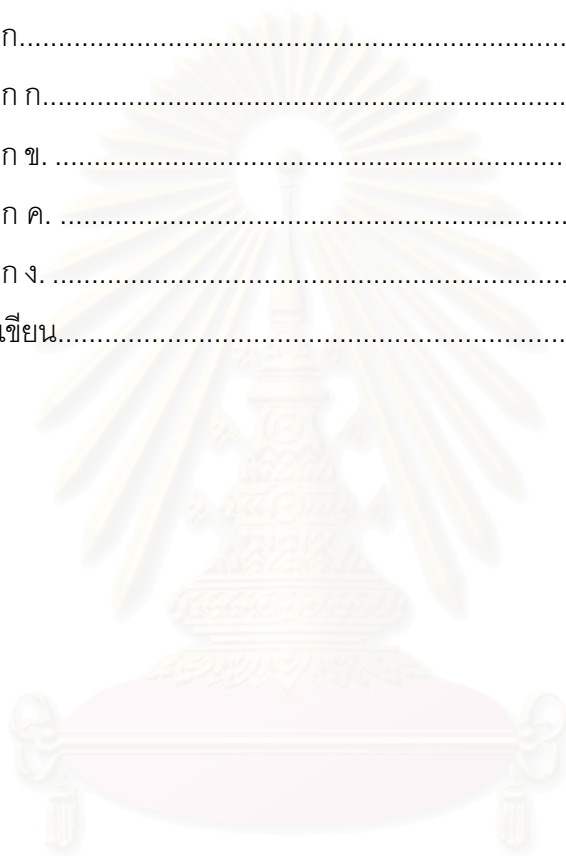
อย่างไรก็ตาม หากมีบุคคลที่มีส่วนช่วยเหลือในงานวิจัยนี้ แต่ข้าพเจ้าไม่ได้กล่าวไว้ ณ ที่นี้ ข้าพเจ้าต้องขออภัย และ ขอขอบคุณไว้ ณ โอกาสนี้ด้วย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ญ
สารบัญภาพ.....	ฎ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 กระดูก : แขนงหลักของร่างกาย.....	1
1.2 กระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 เฮิร์ตซ	3
1.3 วิธีการศึกษาวิจัย.....	4
2 วัสดุอุปกรณ์.....	5
2.1 สารอาหารเลี้ยงเซลล์.....	5
2.2 อุปกรณ์จ่ายกระแสสลับ.....	5
2.2.1 วงจรกรองผ่านต่ำ.....	6
2.2.2 วงจรแปลงผันแรงดันเป็นกระแส.....	7
2.3 อุปกรณ์การกระตุ้นเซลล์.....	8
2.4 การนับจำนวนเซลล์.....	9
2.4.1 การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer.....	9
2.4.2 การนับเซลล์ด้วยวิธีสุ่มนับ (Random count).....	11
2.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	11
2.5.1 เครื่องมือทางสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	11
2.5.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง.....	12

บทที่	หน้า
3 ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ.....	16
3.1 การทดลองศึกษาผลกระทบของขนาดกระแสไฟฟ้าสลับ.....	16
จุดประสงค์.....	16
วิธีการศึกษา.....	16
ผลการทดลอง.....	17
วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	19
3.2 ผลกระทบของปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ.....	23
จุดประสงค์.....	23
วิธีการศึกษา.....	23
3.2.1 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ก.....	23
3.2.2 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ข.....	24
ผลการทดลอง.....	24
วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	25
3.3 ผลของปริมาณ L-glutamine ในอาหารเลี้ยงเซลล์.....	27
จุดประสงค์.....	27
วิธีการศึกษา.....	27
3.3.1 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ค.....	27
3.3.2 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ง.....	27
ผลการทดลอง.....	28
วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	29
4 ผลสืบเนื่องจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ.....	31
จุดประสงค์.....	31
วิธีการศึกษา.....	31
4.1 การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 – 250 μ A.....	31
4.2 การศึกษาผลกระทบหลังการกระตุ้น.....	32
ผลการทดลอง.....	32
วิเคราะห์ผลการทดลอง.....	36

5	สรุปผลการทดลอง.....	39
	รายการอ้างอิง.....	41
	ภาคผนวก.....	43
	ภาคผนวก ก.....	44
	ภาคผนวก ข.	46
	ภาคผนวก ค.	48
	ภาคผนวก ง.	53
	ประวัติผู้เขียน.....	57



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
3.1 สรุปผลการทดลองขนาดของกระแสไฟฟ้าสลับ.....	18
3.2 สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS.....	20
3.3 ข้อมูลเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ก. และ สูตร ข.....	24
3.4 ข้อมูลเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ค. และ สูตร ง.....	28
4.1 ตารางที่ 4.1 สรุปข้อมูลจำนวนเซลล์เฉลี่ยภายหลังการกระตุ้นแยกตามรุ่นเซลล์ที่เลี้ยง (Normalized Data).....	25
4.2 ตารางที่ 4.2 สรุปข้อมูลจำนวนเซลล์เฉลี่ยรวมภายหลังการกระตุ้น (เฉลี่ยสะสมจาก เซลล์รุ่นที่ 1 ถึงเซลล์รุ่นต่าง ๆ) (Normalized Data).....	25



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพประกอบ	หน้า
1.1 แผนภาพแสดงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อกระดูกได้รับแรงเชิงกล.....	1
1.2 กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก.....	2
2.1 วงจรจ่ายกระแสสลับคงที่.....	6
2.2 วงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า.....	7
2.3 อุปกรณ์เลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้นด้วยกระแสไฟสลับ.....	8
2.4 ส่วนประกอบของ Haemocytometer.....	10
2.5 จุดที่สุ่มนับทั้ง 5 จุด.....	11
3.1 เซลล์ MG-63 ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0 5 50 และ 500 μA	17
3.2 ผลการทดลองกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ขนาด 0.1 – 5000 μA ...	19
3.3 กราฟเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ก. และ สูตร ข.	25
3.4 กราฟเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ค. และ สูตร ง.....	28
4.1 กราฟค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในแต่ละรุ่น โดยแยกแสดงตามกระแสกระตุ้นเปรียบ เทียบกับกลุ่มควบคุม.....	34
4.2 กราฟจำนวนเซลล์เฉลี่ยสะสมจากรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นต่าง ๆ โดยแยกแสดงตามกระแส กระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม.....	35

บทที่ 1

บทนำ

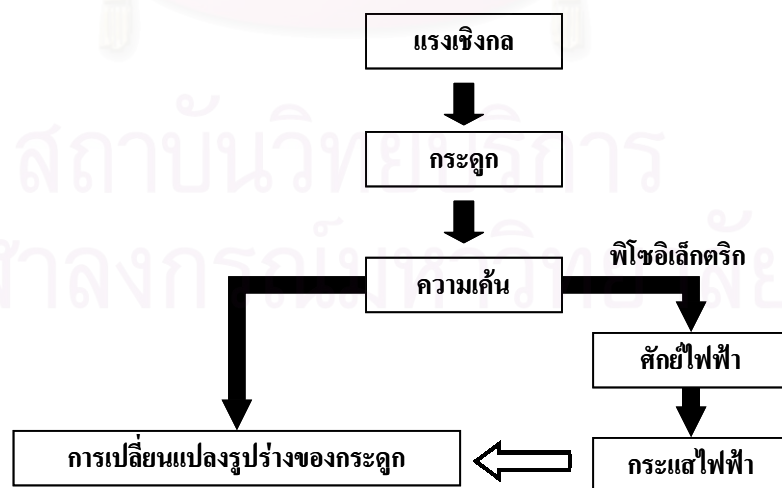
การศึกษาและค้นคว้าเพื่อทำความเข้าใจเกี่ยวกับระบบการทำงานของร่างกายมนุษย์ มีมานานควบคู่กับประวัติศาสตร์ของมนุษยชาติ เพราะความเข้าใจถึงกระบวนการทำงาน และกลไกต่าง ๆ ของร่างกายที่ถูกต้อง จะทำให้การรักษา บำบัด และป้องกันโรคต่าง ๆ มีประสิทธิภาพ

แม้การศึกษาค้นคว้าจะมีมาเป็นเวลานาน และมีการสะสมความรู้ต่าง ๆ ไว้มากมาย แต่ปรากฏการณ์ และกลไกหลายอย่างที่เกิดขึ้นภายในร่างกายยังไม่สามารถอธิบายได้อย่างถูกต้อง ชัดเจน และบางครั้งเป็นเพียงข้อสมมติฐาน ดังนั้นการศึกษาในด้านนี้ยังคงมีเรื่องที่รอการศึกษา ค้นคว้าอีกมาก

1.1 กระดูก : แกนหลักของร่างกาย

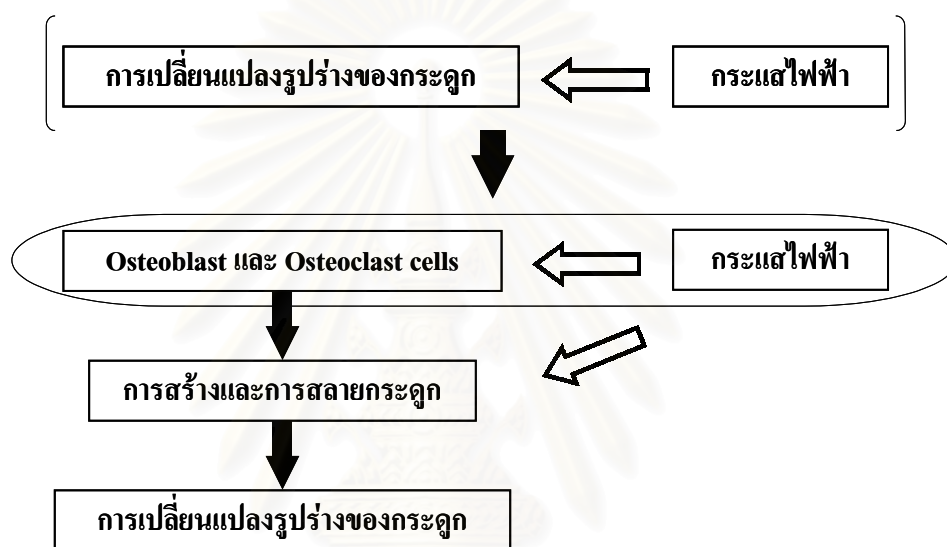
กระดูกเป็นอวัยวะที่สำคัญที่สุดอวัยวะหนึ่งในร่างกาย โดยเป็นโครงสร้างแกนหลัก คอยค้ำจุนร่างกาย และรับแรงเชิงกลต่าง ๆ กระดูกเป็นอวัยวะหนึ่งที่ถูกศึกษามานาน ทำให้เราเข้าใจการทำงานของกระดูกมากขึ้นตามลำดับ

ปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นขณะที่กระดูกได้รับแรงเชิงกล เป็นปรากฏการณ์ที่น่าสนใจ โดยสามารถสรุปปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นได้ดังรูปที่ 1.1



รูปที่ 1.1 แผนภาพแสดงปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้นเมื่อกระดูกได้รับแรงเชิงกล

จากแผนภาพ กระดูกเมื่อได้รับแรงเชิงกลจะเกิดความเค้นขึ้นภายในเนื้อกระดูก ความเค้นที่เกิดขึ้น จะทำให้เกิดกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกขึ้น ในขณะเดียวกัน จากคุณสมบัติพิโซอิเล็กทริก (Piezoelectric property) ความเค้นที่เกิดขึ้นในเนื้อกระดูกจะทำให้เกิดศักย์ไฟฟ้า (Electrical Potential) ขึ้นภายในเนื้อกระดูก[1] และเมื่อเกิดศักย์ไฟฟ้าขึ้น จะทำให้เกิดกระแสไฟฟ้าไหลในบริเวณนั้น ซึ่งกระแสไฟฟ้านี้จะเกิดขึ้นควบคู่กับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก จึงมีความเป็นไปได้สูงที่กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นจะมีอิทธิพลหรือความสัมพันธ์กับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก



รูปที่ 1.2 กลไกการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก

รายละเอียดของกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก สามารถสรุปได้ดังรูปที่ 1.2 โดยกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกเกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์ชนิดสร้างกระดูก (Osteoblast cell) และเซลล์ชนิดสลายกระดูก (Osteoclast cell) โดยการสร้างและสลายกระดูกที่เกิดขึ้นจากการทำงานของเซลล์ทั้ง 2 ชนิดนี้ จะทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกขึ้น ในที่สุด กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นควบคู่กับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกอาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกได้ 2 ลักษณะ คือ

1. เกี่ยวข้องหรือมีผลกระทบโดยตรงกับเซลล์ชนิดสร้างกระดูก และเซลล์ชนิดสลายกระดูก
2. เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้นในกระบวนการสร้างและสลายกระดูก ซึ่งกระแสที่เกิดขึ้น อาจเกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูกลักษณะใดลักษณะหนึ่ง หรืออาจเกี่ยวข้องกับทั้ง 2 ลักษณะ

อย่างไรก็ตาม รายละเอียดหรือกลไกต่าง ๆ ที่เกิดขึ้น เมื่อกระดูกได้รับแรงเชิงกล ยังไม่มีคำอธิบายกลไกและปรากฏการณ์ต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นได้อย่างชัดเจน ดังนั้น ความสัมพันธ์ระหว่างปรากฏการณ์ฟิสิกส์เล็กทรอนิกส์ รวมถึงปริมาณทางไฟฟ้าต่าง ๆ กับกระบวนการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของกระดูก จึงเป็นปรากฏการณ์และความสัมพันธ์ที่น่าสนใจ และทำให้เกิดคำถามที่น่าสนใจคือ

- ศักย์ไฟฟ้าที่เกิดขึ้น มีความสัมพันธ์กับปรากฏการณ์สร้างและสลายตัวของกระดูกหรือไม่
- ถ้ามี จะสามารถใช้ปริมาณทางไฟฟ้าต่าง ๆ กระตุ้นให้เกิดกระบวนการสร้างและสลายตัวของกระดูก เพื่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างตามที่เราต้องการได้หรือไม่

จากคำถามดังกล่าว จึงนำมาสู่งานวิจัยนี้ โดยเลือกกระแสไฟฟ้าเป็นปริมาณไฟฟ้าที่ใช้กระตุ้นเซลล์กระดูก และเลือกศึกษาผลกระทบต่อกระบวนการสร้างกระดูก ซึ่งจะเน้นศึกษาถึงผลกระทบต่อของของกระแสไฟฟ้าต่อกระบวนการแบ่งเซลล์ของเซลล์ชนิดสร้างกระดูก

1.2 กระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 เฮิร์ตซ

จากปรากฏการณ์ที่เกิดขึ้น เมื่อกระดูกได้รับแรงเชิงกลดังกล่าวข้างต้น ประกอบกับธรรมชาติของเซลล์ รวมถึงเซลล์กระดูกที่ต้องเกี่ยวข้องกับสารละลายอิเล็กโทรไลต์ตลอดเวลา และของเหลวภายในเซลล์ก็เป็นสารละลายอิเล็กโทรไลต์เช่นกัน ในสภาวะปกติ อนุภาคที่มีประจุ (ion) เหล่านี้จะมีการเคลื่อนที่อยู่ตลอดเวลาตามสภาวะการทำงานของเซลล์ นั่นคือ จะมีกระแสไฟฟ้าไหลผ่านและไหลไปมารอบ ๆ เซลล์ตลอดเวลา

ดังนั้น กระแสไฟฟ้าที่เกิดขึ้นเนื่องจากการเกิดศักย์ไฟฟ้าที่กระดูกเมื่อกระดูกได้รับแรงเชิงกล จึงมีความเป็นไปได้มากที่จะเกี่ยวข้องหรือส่งผลกระทบต่อเซลล์กระดูก รวมทั้งผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์ ทำให้การกระตุ้นเซลล์กระดูกด้วยกระแสไฟฟ้าโดยตรง จะสามารถส่งผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์กระดูกได้

การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า โหลดของวงจรคือ เซลล์กระดูกและสารอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยสารอาหารเลี้ยงเซลล์มีองค์ประกอบเป็นเกลือไอออนิก เพื่อให้สารอาหารเลี้ยงเซลล์ไม่เกิดการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติเมื่อถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า จึงจำเป็นต้องให้กระแสไหลผ่านสารอาหารเลี้ยงเซลล์โดยไม่ให้เกิดปฏิกิริยาแยกสลายด้วยไฟฟ้า (Electrolysis)

จากการทดสอบคุณสมบัติทางไฟฟ้าของอาหารเลี้ยงเซลล์พบว่า ในภาวะที่ไม่เกิดปรากฏการณ์แยกสลายด้วยไฟฟ้า อาหารเลี้ยงเซลล์หรือโหลดของวงจรกระตุ้น จะมีลักษณะสมบัติเช่นเดียวกับตัวเก็บประจุ คือ เมื่อจ่ายไฟฟ้ากระแสตรงผ่านโหลด จะเกิดการแยกอนุภาคประจุบวกและอนุภาคประจุลบออกจากกัน ประจุบวกและลบที่แยกออกจากกันนี้จะทำให้เกิดแรงดันการ

เคลื่อนที่ของกระแส ทำให้เมื่อทิ้งไว้จนระบบอยู่นิ่ง จะไม่พบกระแสไฟฟ้าไหลผ่านโหนด ดังนั้น เราจึงไม่สามารถจ่ายพลังงานกระตุ้นเซลล์ได้คงที่ตลอดระยะเวลากระตุ้น

จากข้อจำกัดของคุณสมบัติโหนด (อาหารเลี้ยงเซลล์) ดังกล่าวที่ไม่สามารถกระตุ้นระบบ ด้วยไฟฟ้ากระแสตรงได้ ทำให้เลือกใช้กระแสไฟฟ้าสลับเป็นตัวกระตุ้น เพื่อให้สามารถจ่ายพลังงานกระตุ้นเซลล์ตามเงื่อนไขต่าง ๆ ได้คงที่ตลอดระยะเวลากระตุ้น

1.3 วิธีการศึกษาวิจัย

ในการศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าต่อเซลล์กระดูกสามารถทำได้หลายวิธี สำหรับงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ (tissue culture) ซึ่งในปัจจุบันเป็นที่นิยมนักแพร่หลาย เนื่องจากเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาโดยใช้สัตว์ในการทดลองแล้ว การศึกษาด้วยวิธีนี้มีข้อดีหลายประการ คือ

- สามารถควบคุมเงื่อนไขหรือตัวแปรที่สนใจศึกษาได้ง่ายและแม่นยำ
- สามารถควบคุมปัจจัยอื่น ๆ หรือสิ่งแวดล้อมให้คงที่ได้ดี ทำให้ความแปรปรวนของผลการทดลองลดลง
- ระยะเวลาในการทดลองสั้น และสามารถทดลองซ้ำได้ง่าย
- ลดความยุ่งยากในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสามารถแบ่งออกได้ 2 กลุ่ม คือ

- การเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ (Primary cell culture)
- การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ (Cell-line culture)

ในงานวิจัยนี้ใช้การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ เนื่องจากมีข้อดี คือ คุณสมบัติต่างๆ ของเซลล์จะคงที่ ไม่ว่าจะถูกเลี้ยงไว้เป็นระยะเวลาเท่าใด และการเตรียมเซลล์ รวมถึงการดูแลรักษาสามารถทำได้ง่าย โดยเซลล์ไลน์ที่ใช้ในงานวิจัย คือ เซลล์ MG-63 ซึ่งเป็นเซลล์ไลน์ประเภทเซลล์มะเร็งกระดูก (Osteosarcoma) ในกลุ่มเซลล์สร้างกระดูก (Osteoblast-like cell) ลักษณะเด่นของเซลล์นี้ คือ คุณสมบัติต่าง ๆ ของเซลล์คงที่ไม่ขึ้นกับอายุของเซลล์ ทำให้เซลล์ไม่ถูกจำกัดด้วยอายุของเซลล์ สามารถเลี้ยงต่อเนื่องไปได้ไม่จำกัด การเจริญเติบโตหรืออัตราการแบ่งเซลล์ (Proliferation rate) สูง ทำให้ระยะเวลาในการทดลองสั้น ช่วยในลดความเสี่ยงต่อการติดเชื้อระหว่างการกระตุ้น นอกจากนี้ กิจกรรมหลักของเซลล์ชนิดนี้ คือ กิจกรรมการแบ่งเซลล์ ดังนั้น จึงเหมาะสมในการใช้ศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าต่อการแบ่งเซลล์

บทที่ 2

วัสดุอุปกรณ์และการวิเคราะห์ผลการทดลอง

ในงานวิจัยนี้ ต้องใช้วัสดุอุปกรณ์ เครื่องมือและสารเคมีต่าง ๆ หลายชนิด โดยเครื่องมือและสารเคมีส่วนใหญ่เป็นเครื่องมือและสารเคมีที่ใช้กันโดยทั่วไปในงานวิจัยเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ ซึ่งรายละเอียดและวิธีการใช้งานเครื่องมือและสารเคมีต่าง ๆ เหล่านี้สามารถหาได้จากหนังสือและเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ[10-11] อย่างไรก็ตาม ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของกระแสไฟฟ้าสลับต่อการพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ซึ่งไม่ใช่สภาวะปกติ จึงจำเป็นต้องใช้อุปกรณ์พิเศษที่ประดิษฐ์ขึ้นโดยเฉพาะ และมีอุปกรณ์บางชิ้นที่ใช้งานต่าง ๆ จากงานใช้งานโดยทั่วไป ดังนั้น เนื้อหาของบทนี้จึงขอกกล่าวถึงเพียงอุปกรณ์พิเศษเหล่านี้ รวมถึงสารเคมีหลักที่ใช้ในงานวิจัยนี้เท่านั้น

2.1. สารอาหารเลี้ยงเซลล์

สารอาหารเลี้ยงเซลล์ MG-63 ในงานวิจัยนี้ใช้สูตร Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) อาหารเลี้ยงเซลล์สูตรนี้เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรหนึ่งที่มีการใช้อย่างแพร่หลาย เพราะสามารถใช้เลี้ยงเซลล์ได้หลายชนิด เซลล์ MG-63 เป็นเซลล์ชนิดหนึ่งที่สามารถเลี้ยงในอาหารสูตรนี้ได้¹²

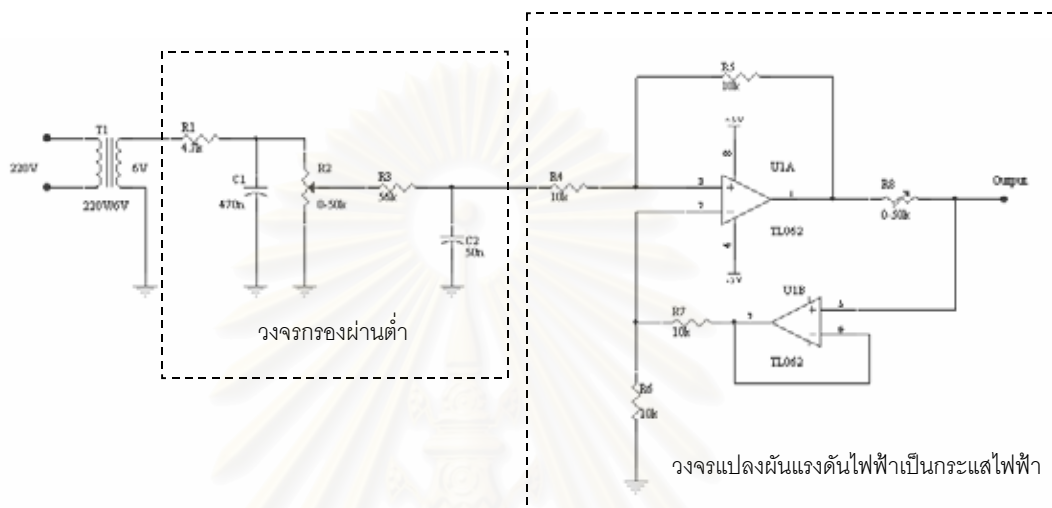
อาหารเลี้ยงเซลล์สูตรนี้ยังแบ่งออกเป็นหลายชนิดซึ่งเหมาะสมกับสภาพการใช้งานแตกต่างกันไป โดยในงานวิจัยนี้เลือกใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สูตร DMEM ของบริษัท ซิกมา (SIGMA) ชนิดผงที่สามารถอบฆ่าเชื้อด้วยความร้อนได้ เมื่อเตรียมเป็นของเหลวจะมีปริมาณน้ำตาลกลูโคส 1000 mg/L ไม่มีโปรตีนกลูตามีน (L-glutamine) และโซเดียมไบคาร์บอเนต ดังนั้น ก่อนนำไปใช้จึงต้องเติมกลูตามีน โซเดียมไบคาร์บอเนต และ ซีรัม (serum) ตามปริมาณที่ต้องการ รายละเอียดและขั้นตอนการเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์อยู่ในภาคผนวก ก.

2.2. อุปกรณ์จ่ายกระแสไฟฟ้าสลับ

อุปกรณ์ชิ้นนี้เป็นอุปกรณ์ที่ทำขึ้นเพื่อใช้จ่ายกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 เฮิร์ตซ ในการกระตุ้นเซลล์ MG-63 รูปที่ 2.1 แสดงวงจรจ่ายกระแสไฟฟ้าสลับที่ประดิษฐ์ขึ้น จากการทดสอบอุปกรณ์ พบว่า สามารถจ่ายกระแสไฟฟ้าสลับได้ในช่วง 0.1 ถึง 5000 μA และสามารถจ่ายกระแสไฟฟ้าสลับได้พร้อมกัน 18 ช่อง และจากการทดสอบโหลดด้วยตัวต้านทาน 1 $\text{k}\Omega$ ต่ออนุกรมกับตัวเก็บประจุ 0.1 μF พบว่า สามารถจ่ายกระแสไฟฟ้าสลับรูปคลื่นไซน์ได้โดยไม่มีการเพี้ยนของรูป

คลื่น ถ้าค่าสูงสุดและต่ำสุดของแรงดันไฟฟ้าที่ตกคล่อมโหลดมีค่าอยู่ในช่วง $\pm 3 \text{ V}$ ($6V_{p-p}$) หากค่าสูงสุดหรือต่ำสุดมากกว่า $\pm 3 \text{ V}$ ยอดคลื่นจะถูกขริบทำให้รูปคลื่นไซน์เพี้ยน ซึ่งองค์ประกอบหลักของอุปกรณ์ประกอบด้วยวงจรหลัก 2 วงจร คือ

- วงจรกรองผ่านต่ำ
- วงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า



รูปที่ 2.1 วงจรจ่ายกระแสไฟฟ้าสลับ

2.2.1 วงจรกรองผ่านต่ำ

เมื่อแปลงแรงดันไฟฟ้าจาก 220 V ลงมาสู่ระดับแรงดันไฟฟ้า 6 V ก่อนที่จะใช้เป็นสัญญาณเข้าของวงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า ต้องตัดสัญญาณรบกวนออกโดยใช้วงจรกรองผ่านต่ำ เพราะสัญญาณรบกวนที่พบเป็นสัญญาณรบกวนที่มีความถี่สูงกว่าความถี่ 50 เฮิรตซ์

วงจรกรองผ่านต่ำที่ใช้เป็นวงจรกรองผ่านต่ำอันดับหนึ่ง 2 วงจร ต่อกัน โดยระหว่างวงจรทั้งสองต่อตัวต้านทานปรับค่าได้ (R_2) ใช้เป็นตัวปรับแรงดันไฟฟ้าที่ส่งเข้าวงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า ซึ่งจะช่วยให้สามารถปรับค่ากระแสไฟฟ้าขาออกได้ละเอียดมากขึ้น การปรับค่าตัวต้านทาน R_2 เพื่อปรับระดับแรงดันไฟฟ้าขาเข้านี้ จะส่งผลกระทบต่อตำแหน่งขั้ว (pole) ของวงจรผ่านต่ำ ซึ่งรายละเอียดอยู่ในภาคผนวก ค.

อย่างไรก็ตาม พบว่า เกิดผลกระทบต่อการทำงานของวงจรไม่มาก โดยทำให้ตำแหน่งของขั้ววงจรเลื่อนไปเล็กน้อยเมื่อปรับตัวต้านทาน R_2 ดังนั้น ประสิทธิภาพการตัดสัญญาณรบกวนที่มีความถี่สูงของวงจรกรองผ่านต่ำจึงไม่ได้รับผลกระทบจากการปรับตัวต้านทาน R_2

2.2.2 วงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า

วงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า ประกอบด้วยอุปกรณ์ต่าง ๆ ดังรูปที่ 2.2 โดยสามารถหาความสัมพันธ์ระหว่าง แรงดันไฟฟ้าขาเข้า (V_{in}) กับกระแสไฟฟ้าขาออก (I_o) ได้ดังนี้

$$V_a = V_b \quad \dots (1)$$

$$V_d = 2V_b \quad \dots (2)$$

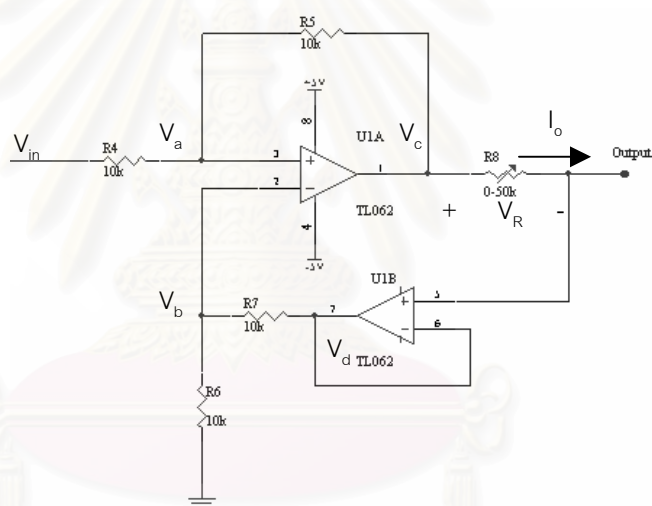
$$V_o = V_d = 2V_b = 2V_a \quad \dots (3)$$

$$\frac{V_a - V_{in}}{10k} + \frac{V_a - V_c}{10k} = 0$$

$$2V_a - V_{in} = V_c \quad \dots (4)$$

$$V_R = V_c - V_o = 2V_a - V_{in} - 2V_a = -V_{in}$$

$$I_o = \frac{V_R}{R_8} = -\frac{V_{in}}{R_8} \quad \dots (5)$$



รูปที่ 2.2 วงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้า

ดังนั้น จากสมการ พบว่า การปรับค่า V_{in} และ R_8 จะทำให้สามารถปรับค่ากระแสไฟฟ้าขาออกที่จ่ายให้โหลดได้ตามต้องการ

อย่างไรก็ตาม เนื่องจากการทำงานของวงจรแปลงผันแรงดันไฟฟ้าเป็นกระแสไฟฟ้าที่จะทำให้รูปคลื่นขาออกของวงจรไม่เพี้ยนได้นั้น ออปแอมป์ในวงจรจะต้องทำงานอยู่ในช่วงการทำงานเชิงเส้น ดังนั้น ค่าแรงดันไฟฟ้าขาออกหรือแรงดันไฟฟ้าที่ตกคร่อมโหลดสูงสุดโดยรูปคลื่นไม่เพี้ยนจึงหาได้จากความสัมพันธ์

$$V_o + V_{in} = \text{linear operation range} \quad \dots (6)$$

โดยในกรณีอุดมคติช่วงการทำงานเชิงเส้นของออปแอมป์ คือช่วงแรงดันไฟเลี้ยงออปแอมป์ ดังนั้น เมื่อใช้ไฟเลี้ยงออปแอมป์ $\pm 5 \text{ V}(V_{CC})$ จะได้

$$V_o + V_{in} = \pm 5 \text{ V} \quad \dots (7)$$

แต่เนื่องจากความไม่อุดมคติของออปแอมป์ จึงทำให้ช่วงการทำงานเชิงเส้นของออปแอมป์อยู่ในช่วง $\pm (V_{CC} - 2V_D)$ โดยที่ V_{CC} : แรงดันไฟเลี้ยง V_D : แรงดันไฟฟ้าคล่อมหัวต่อ p-n เมื่อไบแอสไปข้างหน้า (ประมาณ 0.7 V)

$$\text{ดังนั้น จะได้ ; } V_o + V_{in} = \pm (5 - 1.4) = \pm 3.6 \text{ V} \quad \dots (8)$$

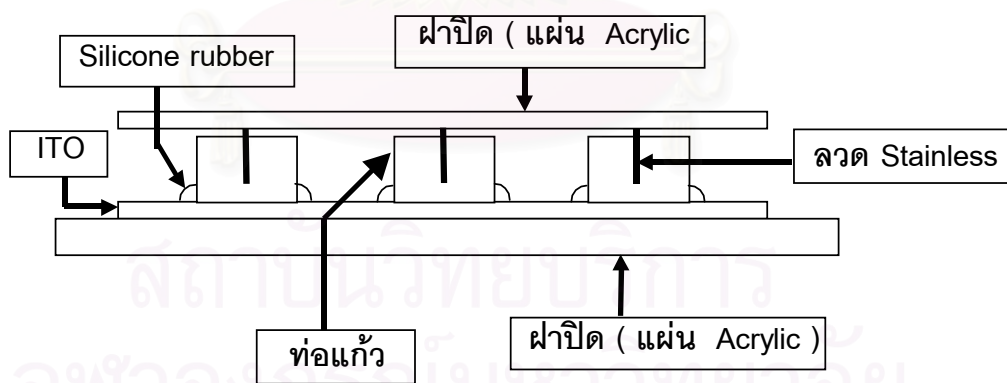
เนื่องจาก V_{in} อยู่ในช่วง ± 0.1 ถึง $\pm 0.5 \text{ V}$ ดังนั้น

$$V_o = \pm 3.1 \text{ V} \quad \dots (9)$$

จากสมการ ค่าสูงสุดและค่าต่ำสุดของแรงดันไฟฟ้าตกคล่อมโหลดจะต้องอยู่ในช่วงแรงดัน $+3 \text{ V}$

2.3. อุปกรณ์การกระตุ้นเซลล์

การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ จำเป็นต้องใช้หลอดเลี้ยงเซลล์ที่สามารถใส่อิเล็กโทรดเป็นขั้วจ่ายกระแสไฟฟ้าสลับได้ ซึ่งหลอดเลี้ยงเซลล์มาตรฐานที่ใช้ในงานเลี้ยงเชื้อโดยทั่วไปไม่สามารถใส่อิเล็กโทรดดังกล่าวได้ ดังนั้น จึงประดิษฐ์อุปกรณ์หรือหลอดที่ใช้สำหรับการกระตุ้นเซลล์โดยมีลักษณะดังรูปที่ 2.3



รูปที่ 2.3 อุปกรณ์เลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

จากรูป หลอดเลี้ยงเซลล์ที่ประดิษฐ์ขึ้นมีองค์ประกอบหลักดังนี้

- ท่อแก้ว ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางวงรอบนอก 25 มม. เส้นผ่านศูนย์กลางวงรอบใน 23 มม. ความสูง 17 มม.
- กระจกเคลือบชั้นนำไฟฟ้า ใช้เป็นพื้นของหลอดเลี้ยงเซลล์ โดยใช้กระจกที่เคลือบด้วยชั้น ITO (Indium Tin Oxide) หรือ SnO_2 เป็นชั้นนำไฟฟ้า ทำหน้าที่เป็นอิเล็กโทรด

ด้านล่าง บริเวณมุมทั้ง 4 ด้านของกระจกต่อสายไฟด้วยการบัดกรีด้วยอัลตราโซนิก แล้วหุ้มจุดที่บัดกรีด้วยซิลิโคน

- ฝาปิดด้านบน ทำจากแผ่นอะคริลิกใส (Acrylic) ความหนา 5 มม. โดยเจาะรูใส่ที่ต่อสายไฟชนิด banana jack 3 mm. สำหรับใส่อิเล็กทรอนิกส์ด้านบน
- ลวดสเตนเลส เส้นผ่านศูนย์กลาง 2 มม. ความยาว 20 มม. ใช้เป็นอิเล็กทรอนิกส์ด้านบน
- แผ่นฐานรอง ทำจากแผ่นอะคริลิกใส (Acrylic) ความหนา 5 มม
- วัสดุพิมพ์ปากชนิดฉีด เป็นซิลิโคนเหลวชนิดหนึ่ง ในงานทันตกรรมเนื่องจากไม่มีสารที่เป็นอันตรายต่อเนื้อเยื่อมนุษย์ ใช้ฉีดประกอบหลุมเลี้ยงเซลล์ โดยยึดให้หลุมติดแน่นกับแผ่นอิเล็กทรอนิกส์ด้านล่างและกันไม่ให้ของเหลวภายในหลุมรั่วออกมาภายนอก ซึ่งซิลิโคนชนิดนี้จะไม่เป็นอันตรายต่อเซลล์ MG-63

ขั้นตอนการล้าง ประกอบ และทำให้ปราศจากเชื้อ (sterilization) ดูจากภาคผนวก ข

2.4. การนับจำนวนเซลล์

งานวิจัยนี้เน้นศึกษาถึงผลกระทบของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์กระดูกชนิด MG-63 ดังนั้น จึงใช้การนับเซลล์เป็นวิธีเก็บผลการทดลอง การนับจำนวนเซลล์มีหลายวิธี แต่ในงานวิจัยนี้เลือกใช้วิธีนับเซลล์ 2 วิธี คือ

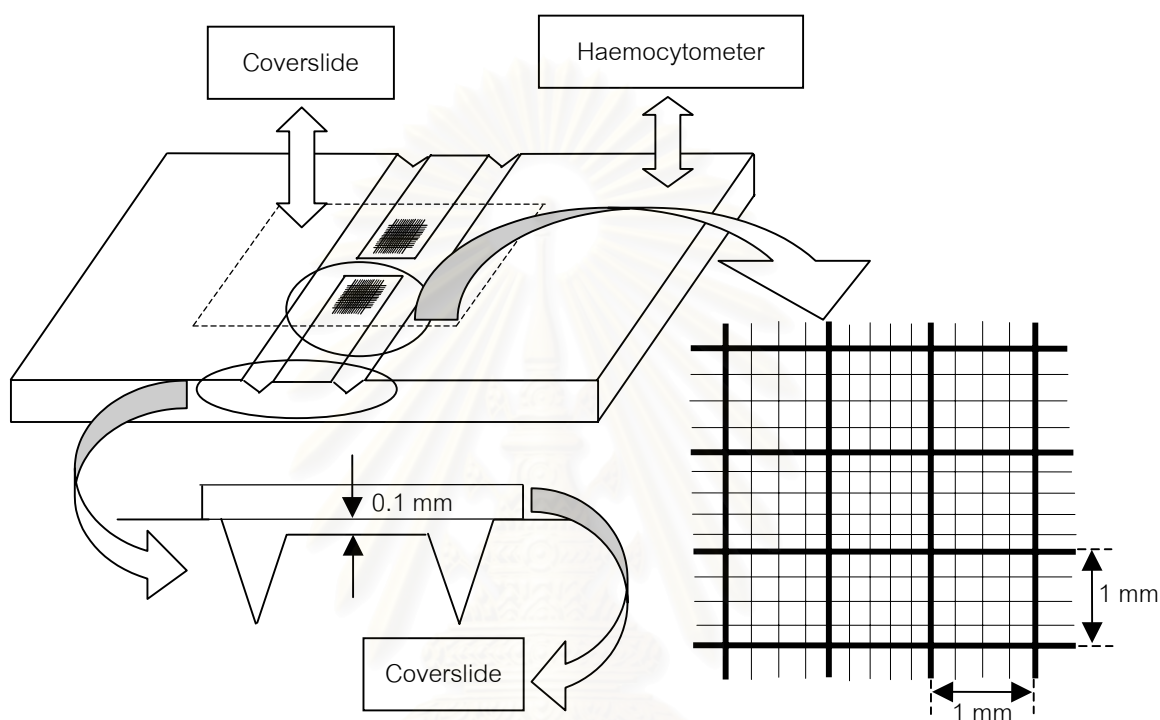
2.4.1 การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer

วิธีการนับเซลล์แบบนี้เป็นวิธีการนับเซลล์หลักในงานวิจัยนี้ เนื่องจากผลการนับเซลล์ด้วยวิธีการนับเซลล์ด้วยวิธีนี้มีความคลาดเคลื่อนเชิงปริมาณน้อยเมื่อเทียบกับการนับเซลล์ด้วยวิธีสุ่มนับ ทำให้เห็นแนวโน้มจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่ชัดเจนและถูกต้อง

Haemocytometer เป็นอุปกรณ์ที่ใช้ในการนับจำนวนเซลล์ มีลักษณะเป็นแผ่น ตรงกลางแผ่นจะเป็นแอ่งที่มีแท่นที่ใช้ในการนับเซลล์ 2 อันอยู่ตรงกลาง (แท่นนี้จะสูงน้อยกว่าขอบของแอ่ง 0.1 mm) ดังรูป ซึ่งบนแท่นทั้ง 2 อันนี้ จะมีเส้นที่ถูกตีไว้เป็นตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ 9 ช่อง โดยช่องใหญ่ตรงมุมทั้ง 4 ช่องจะถูกแบ่งออกเป็น 16 ช่องย่อย ส่วนช่องใหญ่ตรงกลางจะถูกแบ่งออกเป็น 25 ช่องย่อย และช่องที่เหลือ 4 ช่องใหญ่จะถูกแบ่งออกเป็น 20 ช่องย่อย ดังรูปที่ 2.5 บริเวณสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่แต่ละช่องจะมีพื้นที่ $1 \times 1 \text{ mm}^2$ ดังนั้น ปริมาตรเหนือช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่แต่ละช่อง(เมื่อปิดสไลด์ไว้ด้านบน)จะเท่ากับ $1 \times 1 \times 0.1 \text{ mm}^3$ ฉะนั้น ปริมาตรนี้จึงเป็น $1 \text{ ใน } 10^4$ เท่าของปริมาตร 1 cm^3 ขั้นตอนการนับเซลล์ด้วย Haemocytometer มีดังนี้

1. วางแผ่นสไลด์ด้านบนบริเวณที่มีการตีตารางของแผ่น Haemocytometer ดังรูป พร้อมกับกดแผ่นสไลด์เบา ๆ จนกระทั่งเห็น Newton's Rings ซึ่งจะทำให้ปริมาตรเหนือบริเวณที่ตีตารางมีความถูกต้อง โดยแผ่นสไลด์จะอยู่ห่างจากบริเวณดังกล่าว 0.1 mm

2. หยดสารละลายที่มีเซลล์ลอยอยู่บน Haemocytometer บริเวณร่องทั้ง 2 ข้างของแท่นที่จะใช้นับเซลล์ เพื่อให้สารละลายไหลเข้าไปบนแท่นตรงกลางด้วยปรากฏการณ์ capillary
3. จากนั้นดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ
4. นับเซลล์ในช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสใหญ่ตรงมุมทั้ง 4 ช่อง พร้อมทั้งหาค่าเฉลี่ย แล้วคูณค่าที่ได้ด้วย 10^4 จะได้เป็นจำนวนเซลล์ต่อลูกบาศก์เซนติเมตร



รูป 2.4 ส่วนประกอบของ Haemocytometer

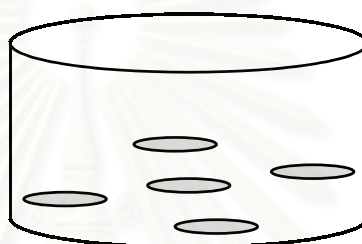
โดยปกติ การนับเซลล์ด้วย Haemocytometer จะทำการนับเซลล์ที่อยู่ในแต่ละช่องใน 9 ช่อง ดังรูป ซึ่งจะทำให้การนับทั้งหมดประมาณ 3 – 5 ช่อง จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยและคูณค่าที่ได้ด้วย 10^4 จะได้ปริมาณเซลล์ใน 1 cm^3

เนื่องจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ จะทำให้เหลือเซลล์หลังกระตุ้นน้อยมาก ในงานวิจัยนี้จึงนับเซลล์ด้วย Haemocytometer ต่างจากที่ใช้งานตามปกติ โดยในการนับเซลล์แต่ละครั้งจะทำการนับเซลล์ทั้งหมดที่อยู่ภายในทั้ง 9 ช่อง และทำการนับอย่างน้อย 4 ครั้ง จากนั้นนำค่าที่ได้ไปหาค่าเฉลี่ยและทำการประมาณจำนวนเซลล์ด้วยการหาค่าเฉลี่ยที่ได้ด้วย 9 และคูณด้วย 10^4 จะได้จำนวนเซลล์ใน 1 cm^3

2.4.2 การนับเซลล์ด้วยวิธีสุ่มนับ (Random count)

วิธีการนับเซลล์นี้ร่วมกับการนับเซลล์ด้วย Haemocytometer เพื่อยืนยันว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นตายทั้งหมดหรือไม่ โดยเมื่อดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดอินเวิร์ท (inverted mode microscope) เซลล์ที่มีชีวิตจะมีลักษณะเรืองแสง ในขณะที่เซลล์ที่ตายจะทึบแสง[11] เนื่องจากบางครั้งเมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ เซลล์จะตายทั้งหมดโดยเกาะอยู่ที่ก้นหลุม ซึ่งไม่สามารถดึงเอาเซลล์เหล่านี้ออกมาได้ จึงใช้การนับเซลล์ด้วยวิธีสุ่มนับเพื่อยืนยันผลการกระตุ้น

อย่างไรก็ตาม การนับเซลล์ด้วยวิธีนี้จะมีความแปรปรวนและความคลาดเคลื่อนของข้อมูลสูง เนื่องจากการกระจายตัวของเซลล์โดยมากจะไม่สม่ำเสมอ



รูปที่ 2.5 จุดที่สุ่มนับทั้ง 5 จุด

การนับเซลล์ด้วยวิธีนี้ จะทำการสุ่มนับ 5 จุดต่อหลุม โดย จุดแรกอยู่ที่จุดศูนย์กลางของหลุม และที่เหลือ 4 จุดอยู่ในแนวเส้นตรง 2 เส้นดังรูปที่ 2.4 จากนั้นทำการนับเซลล์ในแต่ละจุดแล้วนำมาหาค่าเฉลี่ย

2.5 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

งานวิจัยนี้เน้นศึกษาผลกระทบของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 โดยเก็บผลการทดลองด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์ ข้อมูลที่ได้จะมีความแปรปรวนสูงซึ่งเป็นธรรมชาติของข้อมูลจากการทดลองทางชีววิทยา โดยจุดประสงค์ของการวิเคราะห์ข้อมูล คือ การเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย (ตัวแทน) ของกลุ่มควบคุมกับค่าเฉลี่ย (ตัวแทน) ของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า (ในงานวิจัยนี้สิ่งเร้าคือกระแสไฟฟ้าสลับ) ว่าแตกต่างกันหรือไม่ ดังนั้น จึงจำเป็นต้องใช้เครื่องมือทางสถิติมาช่วยในการวิเคราะห์ข้อมูลดังกล่าว เพื่อให้ผลการวิเคราะห์มีความถูกต้อง

2.5.1 เครื่องมือทางสถิติที่ใช้ในการวิเคราะห์ผลการทดลอง

เนื่องจากต้องการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ย 2 ค่าระหว่างค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นว่าแตกต่างกันหรือไม่ อย่างไร ประกอบกับข้อมูลที่ได้จากการทดลองในงานวิจัยนี้ มีการกระจายตัวแบบปกติและจำนวนข้อมูลน้อย จึงเลือกใช้การทดสอบนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างค่าเฉลี่ยของสองกลุ่มโดยใช้ t-test อย่างไรก็ตาม การทดสอบนัยสำคัญโดยใช้ t-test จะต้องทราบค่าความแปรปรวนของประชากรของทั้งสองกลุ่มที่ต้องการวิเคราะห์ เนื่อง

จากไม่ทราบค่าความแปรปรวนดังกล่าว ซึ่งในกรณีที่ทราบค่าความแปรปรวนนี้จะต้องตั้งสมมติฐานในการทดสอบ t-test ว่าค่าความแปรปรวนของประชากรดังกล่าวเท่ากันหรือไม่ เพื่อให้สามารถตั้งสมมติฐานที่ถูกต้องและเหมาะสมจึงต้องทดสอบนัยสำคัญของความแตกต่างระหว่างความแปรปรวนของสองกลุ่มดังกล่าวโดยใช้วิธี F-test

ในงานวิจัยนี้ การทดสอบนัยสำคัญของความแตกต่างของความแปรปรวนโดยใช้ F-test และการทดสอบนัยสำคัญของความแตกต่างของความแปรปรวนโดยใช้ t-test จะวิเคราะห์โดยใช้โปรแกรม SPSS รุ่น 7.5

2.5.2 การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ปัจจัยที่ส่งผลกระทบต่อจำนวนเซลล์ที่นับได้ คือ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์หรืออัตราการแบ่งเซลล์ และอัตราการตายของเซลล์ ในสภาวะปกติที่สิ่งแวดล้อมเหมาะสม อัตราการแบ่งเซลล์ MG-63 จะสูง ส่วนอัตราการตายของเซลล์ MG-63 จะต่ำเพราะเซลล์ชนิดนี้ เป็นเซลล์ตาย (cell-line) ชนิดหนึ่ง ซึ่งมีคุณสมบัติคงที่ไม่ขึ้นกับอายุของเซลล์ จึงทำให้เซลล์ MG-63 สามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ไม่จำกัด

ในการทดลองทุกครั้ง จะมีเซลล์ส่วนหนึ่งซึ่งไม่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า(กระแสไฟฟ้าสลับ) เป็นกลุ่มควบคุม โดยเซลล์ในกลุ่มควบคุมนี้เป็นเซลล์ที่อยู่ในสภาวะแวดล้อมปกติและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 ซึ่งโดยทั่วไป เซลล์ MG-63 ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า อัตราการแบ่งเซลล์จะสูงกว่าอัตราการตาย ทำให้จำนวนเซลล์หลังการเพาะเลี้ยงมีจำนวนเพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น อย่างไรก็ตาม ถ้าเซลล์อยู่สภาวะแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต อาจทำให้ภายหลังการกระตุ้นจำนวนเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า มีจำนวนเซลล์เท่ากับหรือน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้นได้ ดังนั้น ในสภาวะปกติ อัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์หรืออัตราการแบ่งเซลล์ และอัตราการตายของเซลล์ในกลุ่มควบคุมจึงอยู่ในระดับปกติ เมื่อวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้จากการทดลอง โดยพิจารณาจากจำนวนเซลล์ของกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า ร่วมกับจำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุมและจำนวนเซลล์ตั้งต้น ผลการทดลองที่สามารถเกิดขึ้นได้มีดังนี้

1) จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น > จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม > จำนวนเซลล์ตั้งต้น

กรณีนี้ เซลล์ในกลุ่มควบคุมมีอัตราการเจริญเติบโตปกติ ดังนั้น การที่จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม แสดงว่า สิ่งเร้ากระตุ้นให้เซลล์ MG-63 ที่ถูกกระตุ้นมีอัตราการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น

2) จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น > จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม \cong จำนวนเซลล์ตั้งต้น

กรณีนี้ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการแบ่งเซลล์ ทำให้ภายหลังการกระตุ้นมีจำนวนเซลล์มากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า อัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้านี้ มากหรือน้อยกว่าอัตราการแบ่งเซลล์ปกติอย่างไร เนื่องจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทำให้ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ภายหลังการกระตุ้น ดังนั้น จึงไม่สามารถเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้ากับเซลล์ในกลุ่มควบคุมได้ เพราะกลุ่มควบคุมอยู่ในสภาวะการเจริญเติบโตที่ไม่ปกติ

3) จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น > จำนวนเซลล์ตั้งต้น > จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม

กรณีนี้ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการแบ่งเซลล์ ทำให้ภายหลังการกระตุ้นมีจำนวนเซลล์มากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แต่ไม่สามารถบอกได้ว่า อัตราการแบ่งเซลล์ของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้านี้ มากหรือน้อยกว่าอัตราการแบ่งเซลล์ปกติอย่างไร เนื่องจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมอยู่ในสภาวะที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต ทำให้มีการลดลงสุทธิภายหลังการกระตุ้น ดังนั้น จึงไม่สามารถเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ในกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยสิ่งเร้ากับเซลล์ในกลุ่มควบคุมได้ เพราะอัตราการเจริญเติบโตหรือการแบ่งเซลล์ในกลุ่มควบคุมต่ำกว่าระดับปกติ

4) จำนวนเซลล์ตั้งต้น > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น > จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม

กรณีนี้ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นและเซลล์ในกลุ่มควบคุม จำนวนเซลล์ภายหลังการกระตุ้นต่างมีจำนวนลดลงเมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น โดยที่อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายของเซลล์ในกลุ่มควบคุมไม่อยู่ในระดับปกติ แสดงว่า สภาพแวดล้อมในการทดลองไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ทำให้ไม่สามารถสรุปผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ว่า อัตราการแบ่งเซลล์ที่ต่ำกว่าปกติ เนื่องมาจากการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า หรือเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือเกิดจากทั้งการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

5) จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น \cong จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม > จำนวนเซลล์ตั้งต้น

กรณีนี้ อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นใกล้เคียงกับของเซลล์ในกลุ่มควบคุม และการจำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นมากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นอยู่ในระดับปกติ ดังนั้น การกระตุ้นไม่ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63

6) จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น \cong จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม \cong จำนวนเซลล์ตั้งต้น

กรณีนี้ ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีการเพิ่มจำนวนเซลล์เมื่อเทียบกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า เซลล์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ทำให้ไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ภายหลังการกระตุ้น อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายของเซลล์ในกลุ่มควบคุมจึงอยู่ในระดับที่ไม่ปกติ ดังนั้น จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า การที่จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น เกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต หรือเกิดจากการกระตุ้น หรือเกิดจากทั้งสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมและการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า

7) จำนวนเซลล์ตั้งต้น > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น \cong จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม

กรณีนี้ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นและเซลล์ในกลุ่มควบคุม จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นต่างมีจำนวนใกล้เคียงกัน และมีจำนวนน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น โดยที่อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายของเซลล์ในกลุ่มควบคุมไม่อยู่ในระดับปกติ แสดงว่า สภาพแวดล้อมในการทดลองไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ ทำให้ไม่สามารถสรุปผลที่เกิดขึ้นกับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นได้ว่า อัตราการแบ่งเซลล์ที่ต่ำกว่าปกติ เนื่องมาจากการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า หรือเนื่องจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์ หรือเกิดจากทั้งการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า และสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสม

8) จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น > จำนวนเซลล์ตั้งต้น

กรณีนี้ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการเพิ่มจำนวนเซลล์หลังกระตุ้น ทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น อย่างไรก็ตาม ภายหลังจากการกระตุ้น จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม แสดงว่า การกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ MG-63 ต่ำกว่าระดับปกติของเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

9) จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น \cong จำนวนเซลล์ตั้งต้น

กรณี การกระตุ้นด้วยสิ่งเร้านี้ ทำให้เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีอัตราการแบ่งเซลล์ใกล้เคียงกับอัตราการตายของเซลล์ MG-63 เซลล์ที่ถูกกระตุ้นไม่มีการเพิ่มเซลล์สุทธิภายหลังจากการกระตุ้น ทำให้จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น แต่อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นด้วยสิ่งเร้าอาจส่งผลกระทบต่อเซลล์ MG-63 ได้ คือ การกระตุ้นอาจทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ลดลง และอัตราการตายของเซลล์เพิ่มขึ้นในสัดส่วนที่ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์ใกล้เคียงกับอัตราการตาย หรือ การกระตุ้นอาจยับยั้งการแบ่งเซลล์อยู่ในระดับต่ำ โดยที่อัตราการตายยังอยู่ในระดับปกติ ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายใกล้เคียงกัน

10) จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม > จำนวนเซลล์ตั้งต้น > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

กรณีนี้ การกระตุ้นทำให้เกิดการลดลงสุทธิภายหลังจากการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า ทำให้จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า การกระตุ้นทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 จึงทำให้อัตราการตายของเซลล์สูงกว่าอัตราการแบ่งเซลล์

11) จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม \cong จำนวนเซลล์ตั้งต้น > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

กรณีนี้ จำนวนเซลล์ภายหลังการกระตุ้นในกลุ่มควบคุมไม่มีการเพิ่มจำนวนสุทธิ ทำให้จำนวนเซลล์ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า เซลล์ในกลุ่มควบคุมอยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต ดังนั้น การที่เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีจำนวนเซลล์น้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น จึงไม่สามารถสรุปได้แน่ชัดว่า เกิดจากการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า หรือเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต

12) จำนวนเซลล์ตั้งต้น > จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม > จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

กรณีนี้ ภายหลังการกระตุ้น จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่าอัตราการตายของเซลล์สูงกว่าอัตราการแบ่งเซลล์ แสดงว่า เซลล์อยู่ในสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 ดังนั้น การที่จำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น จึงไม่สามารถสรุปได้ว่า เป็นผลจากการกระตุ้นด้วยสิ่งเร้า หรือเกิดจากสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต หรือเป็นผลร่วมกันของการกระตุ้นด้วยกระแสและสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิต



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3

ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

บทนี้จะกล่าวถึง ผลกระทบหรืออิทธิพลของกระแสไฟฟ้าสลับที่มีต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 เมื่อเซลล์อยู่ในสภาวะแวดล้อมที่มีกระแสไฟฟ้าสลับไหลผ่าน

เซลล์ MG-63 ที่ใช้ในการศึกษานั้น ปกติเลี้ยงด้วยสารอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรมาตรฐาน (DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine) ซึ่งกลูตามีนและซีรั่ม เป็นสารอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโต และการแบ่งเซลล์ MG-63 การเปลี่ยนแปลงปริมาณสารทั้ง 2 ชนิดนั้นจึงอาจส่งผลต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ได้ ดังนั้น จึงเกิดประเด็นที่น่าสนใจ คือ เซลล์ที่ถูกเลี้ยงในสารอาหารที่มีปริมาณซีรั่ม และกลูตามีน แตกต่างกัน เมื่อถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในเหมือนกัน ผลกระทบของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 จะเหมือนหรือแตกต่างกันอย่างไร

ตัวแปรสำคัญที่สนใจในการศึกษาผลของกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 มีดังนี้

- ขนาดของกระแสไฟฟ้าสลับ
- ปริมาณของซีรั่มในอาหารเลี้ยงเซลล์
- ปริมาณของกลูตามีน ในอาหารเลี้ยงเซลล์

3.1 การทดลองศึกษาผลกระทบของขนาดกระแสไฟฟ้าสลับ

จุดประสงค์ เพื่อศึกษากระแสไฟฟ้าสลับขนาดตั้งแต่ 0.1 ถึง 5000 μA ว่ามีผลกระทบต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ที่ถูกกระตุ้นอย่างไร

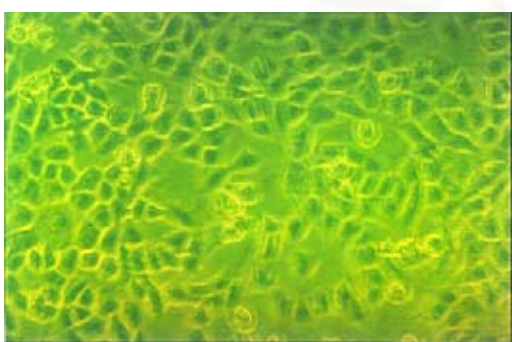
วิธีการศึกษา ทดลองกระตุ้นเซลล์ MG-63 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตรมาตรฐาน

DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดตั้งแต่ 0.1 ถึง 5000 μA ตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

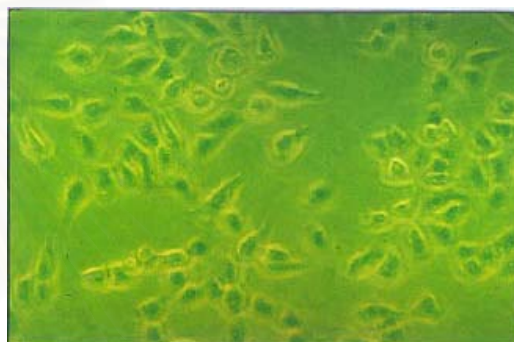
- เตรียมหลุมเลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้น พร้อมกับทำให้ปราศจากเชื้อตามขั้นตอนในภาคผนวก ข.
- เตรียมเซลล์สำหรับเลี้ยงในแต่ละหลุม 10,000 เซลล์ โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรรวม 2 มล.
- เลี้ยงในตู้บเลี้ยงเชื้อก่อนทำการกระตุ้น 24 ชม.ภายใต้บรรยากาศ 5%ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

- กระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดต่าง ๆ ในช่วง 0.1 – 5000 μA โดยการทดลองทุกครั้งจะมีเซลล์ส่วนหนึ่งที่ไม่ถูกกระตุ้น (0 μA) อย่างน้อย 2 หลุม เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control group) เพื่อประโยชน์ในการเปรียบเทียบผลกระทบบที่เกิดขึ้น โดยทำการกระตุ้นในตู้บเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ภายใต้บรรยากาศ 5% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$
- เก็บผลการทดลองด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์

ผลการทดลอง



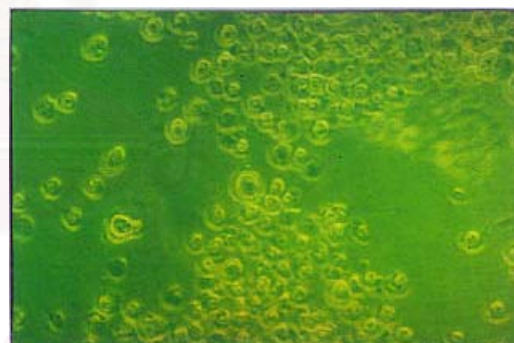
รูป ก. กลุ่มควบคุม (กระตุ้นด้วยกระแส 0 μA)



รูป ข. กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 5 μA



รูป ค. กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 50 μA



รูป ง. กลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 500 μA

รูปที่ 3.1 เซลล์ MG-63 ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0 5 50 และ 500 μA

เมื่อกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0 (กลุ่มควบคุม) 5 50 และ 500 μA เซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นจะมีลักษณะดังรูปที่ 3.1

จากนั้น ทำการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer และวิธีสุ่มนับ แต่เนื่องจากการเก็บผลการทดลองด้วยวิธีสุ่มนับมีความคลาดเคลื่อนเชิงปริมาณสูง ดังนั้น ในการวิเคราะห์และเปรียบเทียบผลกระทบบเชิงปริมาณจึงใช้ผลที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ Haemocytometer

ในการทดลอง มีปัจจัยต่าง ๆ ที่มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หลายปัจจัย ปัจจัยบางอย่างสามารถควบคุมให้คงที่ได้ แต่ปัจจัยหลายอย่างไม่สามารถควบคุมให้คงที่เหมือนกันทุกการทดลองได้ ทำให้จำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมของการทดลองแต่ละครั้งแตกต่างกัน จึงต้องปรับเทียบกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมในแต่ละการทดลอง (normalization) เพื่อปรับให้ข้อมูลในแต่ละการทดลองสามารถนำมาเปรียบเทียบกันได้ สมการในการปรับเทียบ คือ

$$X^* = \frac{X}{C}$$

โดยที่ X^* : normalized data
 X : raw data
 C : control mean

$$SD = \sqrt{\frac{\sum (X - \bar{X})^2}{N(N-1)}}$$

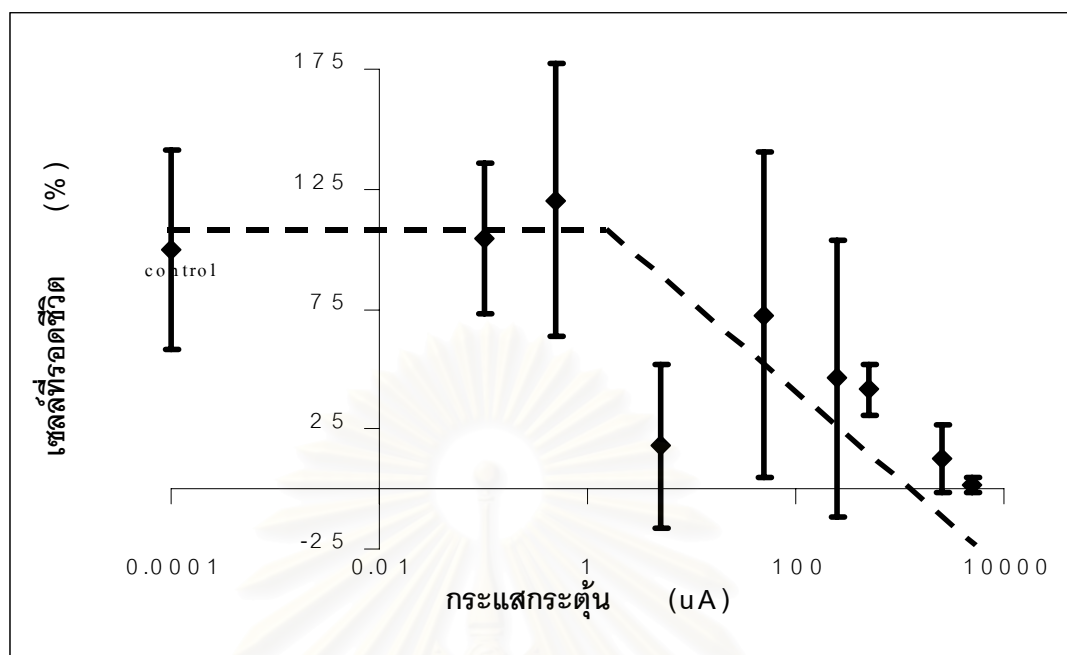
โดยที่ SD : Standard Deviation
 X : data
 \bar{X} : mean
 N : total number of data

เมื่อทำการปรับเทียบข้อมูลแต่ละการทดลองแล้ว สามารถสรุปข้อมูลทั้งหมดที่ได้จากทุกการทดลองดังตาราง 3.1

ตาราง 3.1 สรุปผลการทดลองขนาดของกระแสไฟฟ้าสลับ

กระแสกระตุ้น (μA)	จำนวนการทดลอง	จำนวนครั้งที่นับ (ครั้ง)	ค่าเฉลี่ย (%)	SD
0 (control)	5	68	100	41.47
0.1	1	8	104.42	31.65
0.5	4	24	120.44	56.92
5	5	32	17.96	34.28
50	5	36	72.55	67.95
250	2	18	46.27	57.56
500	1	8	41.37	10.71
2500	1	8	12.59	14.26
5000	1	8	1.80	3.33

จากข้อมูลในตารางสามารถเขียนกราฟได้ดังรูป



รูปที่ 3.2 ผลการทดลองกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ขนาด 0.1 – 5000 μA

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากรูปที่ 3.1 แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ มีผลกระทบต่อเซลล์ MG-63 อย่างชัดเจน โดยเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 500 μA จะมีรูปร่างลักษณะกลม ซึ่งลักษณะดังกล่าว แสดงว่าเซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวของหลุมเลี้ยงเซลล์ได้น้อย แม้ว่าลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 500 μA จะมีลักษณะเหมือนกับเซลล์ที่อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ (Mitosis) อย่างไรก็ตาม ยังไม่สามารถสรุปได้แน่นอน เพราะเซลล์ MG-63 ที่ไม่ยึดเกาะกับผิวหลุมเลี้ยงเซลล์ก็มีลักษณะกลมเช่นเดียวกัน ซึ่งพฤติกรรมของเซลล์ MG-63 ที่ไม่ยึดเกาะกับผิวหลุมเลี้ยงเซลล์นั้น จะไม่มีการแบ่งเซลล์ (ไม่อยู่ในระยะการแบ่งเซลล์ (Mitosis phase))

สำหรับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 และ 50 μA สังเกตไม่พบลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่แตกต่างจากเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างชัดเจน แสดงว่า เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดน้อยกว่า 500 μA ยังสามารถยึดเกาะกับผิวหลุมเลี้ยงเซลล์ได้ดี แสดงว่า เซลล์จะสามารถแบ่งเซลล์ได้

ข้อมูลที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับค่าต่าง ๆ กับข้อมูลของเซลล์ในกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์สรุปได้ดังตาราง 3.2

ตาราง 3.2 สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS (* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ความเชื่อมั่น 95%)

เปรียบเทียบระหว่าง	Levene's test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Diff.
0-0.1	0.817	0.369	-0.360	10.072	0.726	-4.42
0-0.5	3.643	0.059	-1.614	32.039	0.116	-20.44
0-5*	2.931	0.090	10.418	72.5	0.000	82.04
0-50*	29.113	0.000	2.556	102	0.012	27.45
0-250*	2.252	0.137	3.714	21.889	0.001	53.73
0-500*	8.715	0.004	3.961	74	0.000	58.63
0-2500*	6.940	0.010	5.89	74	0.000	87.41
0-5000*	12.494	0.001	6.656	74	0.000	98.2

จากกราฟที่ได้จากผลการทดลอง และจากตารางผลการวิเคราะห์ความแตกต่างด้วยโปรแกรม SPSS สามารถแบ่งผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ได้ 5 กลุ่ม ดังนี้

- ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.1 และ 0.5 μA

จากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.1 μA พบว่า จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์เชิงสถิติโดยใช้โปรแกรม SPSS พบว่า จำนวนที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% โดยมากกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมประมาณ 4.4% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุมของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม ประกอบกับความคลาดเคลื่อนจากการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer มีค่าประมาณ 10% [10] จึงอาจกล่าวได้ว่า การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.1 μA ไม่ส่งผลกระทบต่ออัตราการแบ่งเซลล์และอัตราการตายของเซลล์ MG-63 ทำให้อัตราการเพิ่มสุทธิของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นใกล้เคียงกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นจึงใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม

ส่วนผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA พบว่า จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมากกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมประมาณ 20.4% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตาม เมื่อทำการวิเคราะห์โดย SPSS แล้ว พบว่า ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แม้ว่าความแตกต่างที่เกิดขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจะไม่มีนัยสำคัญเชิงสถิติ แต่ความแตกต่างที่เกิดขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมมีค่ามากกว่าความคลาดเคลื่อน

จากการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer แสดงว่า มีความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นด้วย กระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA จะกระตุ้นให้เซลล์ MG-63 แบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่ม ควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

- ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA

จากการทดลอง พบว่า ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA ผลกระทบที่เกิดขึ้นมีความแปรปรวนมาก โดยบางการทดลอง ผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA มีแนวโน้มแตกต่างจากแนวโน้มโดยรวมของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า แต่การทดลองบางครั้ง ผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA ก็เป็นไปตามแนวโน้มโดยรวม คือ จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมากกว่ากรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 μA โดยความแปรปรวนที่เกิดขึ้นเป็นธรรมชาติของการทดลองด้านชีววิทยา จึงทำให้ผลการทดลองมีความแปรปรวนของข้อมูลสูง ซึ่งสามารถลดความแปรปรวนที่เกิดขึ้น โดยการทดลองซ้ำหลาย ๆ ครั้ง โดยการศึกษาได้ทำการทดลองกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA 4 การทดลอง จำนวนหลุมตัวอย่าง 8 หลุม จึงมีจำนวนข้อมูลทั้งหมด 32 ข้อมูล

เมื่อนำข้อมูลทั้งหมดทุกการทดลองมาทำการวิเคราะห์จะได้ว่า การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมประมาณ 82% และมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า มีการลดลงสุทธิของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น ซึ่งเกิดจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA ทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 อัตราการแบ่งเซลล์จึงน้อยกว่าอัตราการตาย ดังนั้นจึงเกิดการลดลงสุทธิของเซลล์

เมื่อพิจารณากราฟรูป 3.1 ผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA ไม่เป็นไปตามแนวโน้มโดยรวมของผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับค่าอื่น ๆ เนื่องจากแนวโน้มดังกล่าว คือ การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่สูงขึ้น จะทำให้จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นลดลง ซึ่งการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 μA จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นควรน้อยกว่ากรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA แต่จากผลการทดลอง จำนวนเซลล์หลังกระตุ้น กรณีกระตุ้นด้วยกระแส 50 μA มีจำนวนมากกว่า กรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA ประมาณ 54.6% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม และมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% นอกจากนี้ จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นกรณี 5 μA จะมีจำนวนใกล้เคียงกับกรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 2500 μA แสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 μA ทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 ในระดับเดียวกับที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 2500 μA

- ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 μA

ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 μA พบว่า จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมประมาณ 27.4% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม และมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ซึ่งความแตกต่างที่เกิดขึ้นมากกว่าความคลาดเคลื่อนจากการนับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer ประกอบกับ จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 μA ทำให้อัตราการเพิ่มสุทธิของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นน้อยกว่ากรณีเซลล์ไม่ถูกกระตุ้น โดยอัตราการแบ่งเซลล์ลดลง อัตราการเพิ่มสุทธิของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจึงน้อยกว่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นจึงน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม แต่มีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น

- ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 250 μA และ 500 μA

ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 250 μA และ 500 μA จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมประมาณ 53.7% และ 58.6% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม ตามลำดับ โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์หลังกระตุ้นทั้งกรณี 250 μA และกรณี 500 μA มีจำนวนใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วง 250 – 500 μA ทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ ใกล้เคียงกับอัตราการตายของเซลล์ MG-63 จึงไม่มีการเพิ่มขึ้นสุทธิของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น

เมื่อเปรียบเทียบผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 250 μA และ 500 μA พบว่า จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นกรณี 250 μA มากกว่ากรณี 500 μA ประมาณ 4.9% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม โดยไม่มีนัยสำคัญเชิงสถิติ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 μA และ 2500 μA ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ในช่วงกระแสไฟฟ้าสลับ 250 – 500 μA ทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 โดยการกระตุ้นด้วยกระแสสูงขึ้นไปจึงทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นจะลดลง

- ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 2500 μA และ 5000 μA

ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 2500 μA และ 5000 μA จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมประมาณ 87.4% และ 97.2% ตามลำดับ และมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อพิจารณาจำนวนเซลล์หลังกระตุ้น พบว่า มีจำนวนน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วงกระแส 2500 – 5000 μA ทำให้เกิดการลดลงสุทธิของเซลล์ที่ถูกกระตุ้น โดยอัตราการตายของ

เซลล์ที่ถูกกระตุ้นมากกว่าอัตราการแบ่งเซลล์ เนื่องจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วงนี้ทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 อย่างมาก จึงทำให้อัตราการตายของเซลล์ MG-63 เพิ่มขึ้นจากระดับปกติ ประกอบกับอัตราการแบ่งเซลล์ลดลง ทำให้อัตราการแบ่งเซลล์น้อยกว่าอัตราการตาย จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นจึงน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น

3.2 ผลกระทบของปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ ต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

จุดประสงค์ เพื่อศึกษาว่าผลของการเปลี่ยนแปลงปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์จะส่งผลกระทบต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดตั้งแต่ 0.1 ถึง 50 μA หรือไม่ อย่างไร

วิธีการศึกษา ในการทดลองนี้ แบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 สูตร คือ

- 1) อาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ก. : DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine
- 2) อาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ข. : DMEM+ 2%FBS+4mM L-glutamine

ทดลองกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดตั้งแต่ 0.1 ถึง 50 μA เพราะกระแสไฟฟ้าสลับในช่วงนี้ไม่ทำให้อัตราการตายของเซลล์ MG-63 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญดังที่กล่าวมาแล้วในหัวข้อ 3.1 โดยทดลองตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.2.1 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ก.

- เตรียมหลุมเลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้น พร้อมกับทำให้ปราศจากเชื้อตามขั้นตอนในภาคผนวก ข.
- เตรียมเซลล์สำหรับเลี้ยงในแต่ละหลุม 10,000 เซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรรวม 2 มล.
- เลี้ยงในตู้บเลี้ยงเชื้อก่อนทำการกระตุ้น 24 ชม. ภายใต้บรรยากาศ 5% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$
- กระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดต่าง ๆ ในช่วง 0.1 – 50 μA โดยการทดลองทุกครั้งจะมีเซลล์ส่วนหนึ่งที่ไม่ถูกกระตุ้น (0 μA) อย่างน้อย 2 หลุม ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control group) เพื่อประโยชน์ในการเปรียบเทียบผลกระทบที่เกิดขึ้น โดยทำการกระตุ้นในตู้บเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ภายใต้บรรยากาศ 5% ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม CO_2 อุณหภูมิ 37 $^{\circ}\text{C}$

- เก็บผลการทดลองด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์

3.2.2 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ข.

ทดลองตามขั้นตอนในการทดลอง 3.2.1 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ก. เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ข.

ผลการทดลอง

ผลการทดลองสรุปได้ดังตาราง 3.3 โดยที่

ค่าเฉลี่ย คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูลดิบทั้งหมด ที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ด้วย

Haemocytometer ตามวิธีการนับในบทที่ 2

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

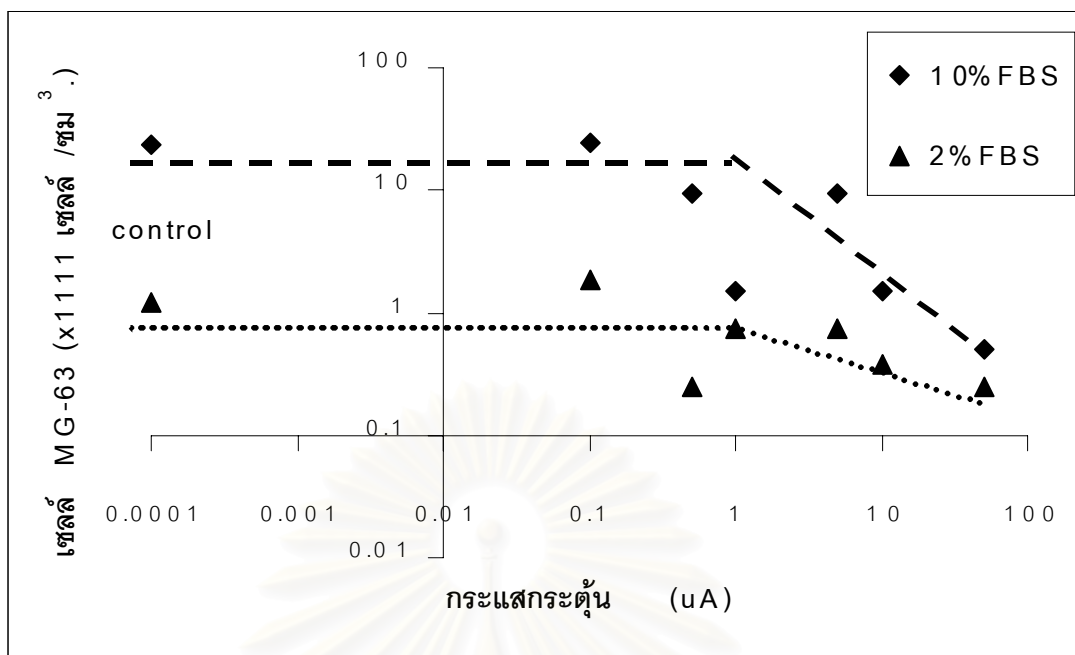
ค่าประมาณ คือ ค่าประมาณจำนวนเซลล์ทั้งหมด โดยใช้สูตร

$$\text{ค่าประมาณ} = (\text{ค่าเฉลี่ย} \times 10000) / 9 \text{ เซลล์/ชม}^3$$

ตาราง 3.3 ข้อมูลเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ก. และ สูตร ข.

กระแสดำเนิน (μA)	อาหารสูตร ก.			อาหารสูตร ข.		
	DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine			DMEM+2%FBS+4mM L-glutamine		
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าประมาณ	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าประมาณ
0 (control)	23.58333	4.541893	26203.7	1.208333	0.931533	1342.593
0.1	24.625	7.463004	27361.11	1.875	0.64087	2083.333
0.5	9.25	3.40343	10277.78	0.25	0.46291	277.7778
1	1.5	0.57735	1666.667	0.75	0.46291	833.3333
5	9.5	3.41565	10555.56	0.75	0.707107	833.3333
10	1.5	0.57735	1666.667	0.375	0.517549	416.6667
50	0.5	0.57735	555.5556	0.25	0.46291	277.7778

จากข้อมูลที่ได้ สามารถเขียนกราฟได้ดังรูป



รูป 3.3 กราฟเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ก. และ สูตร ข.

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากกราฟ ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วง 0 – 50 μA กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ก. (มีซีรัม 10% โดยปริมาตร) เส้นกราฟอยู่เหนือกรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ข. (มีซีรัม 2% โดยปริมาตร) ซึ่งจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมกรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร มากกว่า กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร ประมาณ 10 เท่า และ กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นในกลุ่มควบคุมมากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น ในขณะที่กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นจะน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า ปริมาณซีรัมที่แตกต่างกันทำให้การเจริญเติบโตของเซลล์แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัมมากกว่าจะสามารถเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้มากกว่า สำหรับเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณซีรัมน้อย (อาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร) จะมีอัตราการแบ่งเซลล์น้อย เนื่องจาก กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้น แสดงว่า เกิดการลดลงสุทธิของเซลล์ขึ้น โดยอัตราการตายของเซลล์มากกว่าอัตราการแบ่งเซลล์ ซึ่งอาจเกิดขึ้นเนื่องจากปริมาณซีรัมไม่เพียงพอต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง (48 ชม.) จึงทำให้เซลล์ตายจากการขาดสารอาหารที่จำเป็นในการดำรงชีวิต ดังนั้น ปริมาณซีรัมจึงมีผลกระทบโดยตรงต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ MG-63 อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งทำให้ระดับการเจริญเติบโตและ

จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นโดยรวมของเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร สูงกว่ากรณีที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร

สำหรับผลกระทบของปริมาณซีรัมต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ พบว่า การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ทั้งกรณีที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร และที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร การกระตุ้นด้วยกระแสสูงขึ้น จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นจะลดลง ซึ่งแสดงให้เห็นว่า การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ MG-63 โดยที่กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่มากกว่า $0.5 \mu\text{A}$ จะทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ส่วนกรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่มากกว่า $0.5 \mu\text{A}$ จะทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างไม่มีนัยสำคัญเชิงสถิติ และความชันของกราฟในช่วงที่กระแสกระตุ้นมากกว่า $0.5 \mu\text{A}$ จะมีความชันมากกว่ากราฟผลการกระตุ้นเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร แสดงให้เห็นว่าการกระตุ้นเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณซีรัมสูง (ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร) ผลกระทบของกระแสไฟฟ้าต่อการแบ่งเซลล์ MG-63 จะชัดเจนมากกว่าผลกระทบที่เกิดจากการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณซีรัมต่ำ (ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร) เนื่องจากอัตราการแบ่งเซลล์โดยรวมของเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณซีรัมมากกว่า ทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นแตกต่างจากจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับกรณีเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารที่มีปริมาณซีรัมต่ำ

อย่างไรก็ตาม แนวโน้มที่เกิดขึ้นเหมือนกันทั้งกรณีที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร และกรณีที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% เนื่องจากเส้นกราฟในกรณีที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 10% โดยปริมาตร และเส้นกราฟในกรณีที่ถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีซีรัม 2% โดยปริมาตร มีลักษณะเส้นกราฟเหมือนกัน โดยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับจะส่งผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 และการกระตุ้นด้วยกระแสสูงขึ้นจะทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นลดลง เพราะฉะนั้น ปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์จึงไม่มีอิทธิพลหรือไม่มีผลกระทบอย่างมีนัยสำคัญต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

3.3 ผลของปริมาณกลูตามีน ในอาหารเลี้ยงเซลล์

จุดประสงค์ เพื่อศึกษาว่าการเปลี่ยนแปลงปริมาณกลูตามีน ในสารอาหารเลี้ยงเซลล์จะมีผลกระทบต่อการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดตั้งแต่ 0.1 ถึง 50 μA หรือไม่ อย่างไร

วิธีการศึกษา ในการทดลองนี้ แบ่งอาหารเลี้ยงเซลล์ออกเป็น 2 สูตร คือ

- อาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ค. : DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine
- อาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ง. : DMEM+ 10%FBS

ทดลองกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดตั้งแต่ 0.1 ถึง 50 μA เพราะกระแสไฟฟ้าสลับในช่วงนี้ไม่ทำให้อัตราการตายของเซลล์ MG-63 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยทดลองตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

3.3.1 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ค.

- เตรียมหลุมเลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้น พร้อมกับทำให้ปราศจากเชื้อตามขั้นตอนในภาคผนวก ข.
- เตรียมเซลล์สำหรับเลี้ยงในแต่ละหลุม 10,000 เซลล์ โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรรวม 2 มล.
- เลี้ยงในตู้บเลี้ยงเชื้อก่อนทำการกระตุ้น 24 ชม. ภายใต้บรรยากาศ 5%ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม CO_2 อุณหภูมิ 37 °C
- กระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาดต่าง ๆ ในช่วง 0.1 – 50 μA โดยการทดลองทุกครั้งจะมีเซลล์ส่วนหนึ่งที่ไม่ถูกกระตุ้น (0 μA) อย่างน้อย 2 หลุม ใช้เป็นกลุ่มควบคุม (control group) เพื่อประโยชน์ในการเปรียบเทียบผลกระตุ้นที่เกิดขึ้น โดยทำการกระตุ้นในตู้บเลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม. ภายใต้บรรยากาศ 5%ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม CO_2 อุณหภูมิ 37 °C
- เก็บผลการทดลองด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์

3.3.2 ทดลองกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารสูตร ง.

ทดลอง ตามขั้นตอนในการทดลอง 3.3.1 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ค. เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ง.

ผลการทดลอง

ผลการทดลองดังตาราง 3.4 โดยที่

ค่าเฉลี่ย คือ ค่าเฉลี่ยของข้อมูลดิบทั้งหมด ที่ได้จากการนับจำนวนเซลล์ด้วย

Haemocytometer ตามวิธีการนับในบทที่ 2

SD คือ ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย

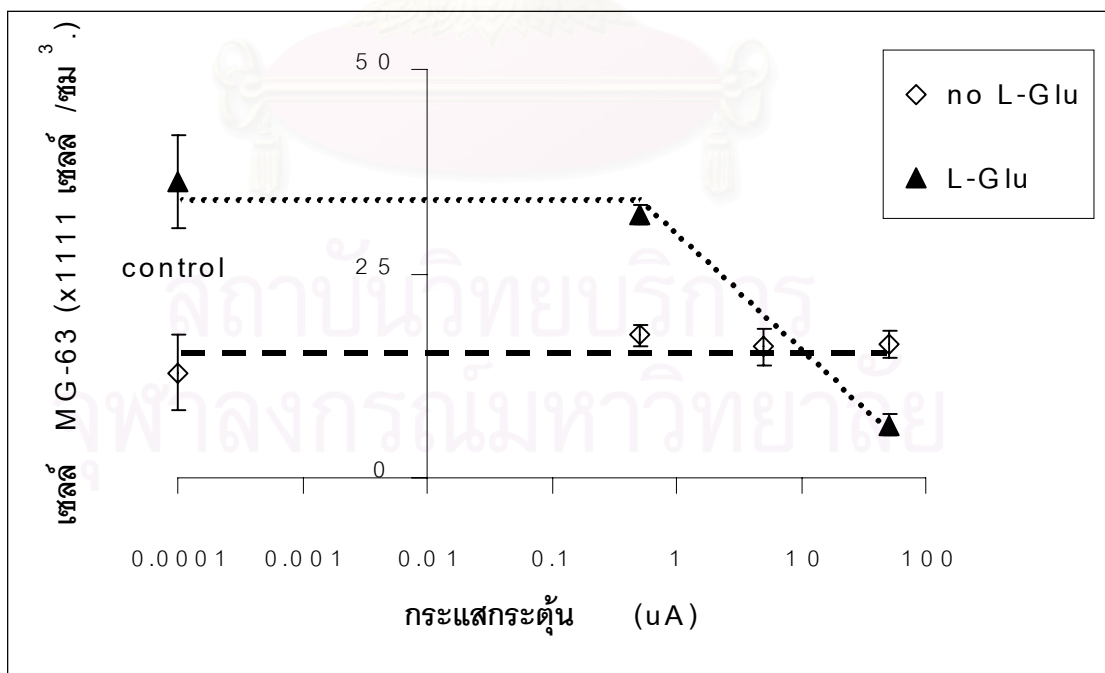
ค่าประมาณ คือ ค่าประมาณจำนวนเซลล์ทั้งหมด โดยใช้สูตร

$$\text{ค่าประมาณ} = (\text{ค่าเฉลี่ย} \times 10000) / 9 \text{ เซลล์/ชม}^3$$

ตาราง 3.4 ข้อมูลเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารสูตร ค. และ สูตร ง.

กระแสกระตุ้น (μA)	อาหารสูตร ค.			อาหารสูตร ง.		
	DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine			DMEM+10%FBS		
	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าประมาณ	ค่าเฉลี่ย	SD	ค่าประมาณ
0 (control)	36.25	5.737305	40277.78	12.875	4.580627	14305.56
0.5	32.25	1.258306	35833.33	17.5	1.290994	19444.44
5	-	-	-	16	2.309401	17777.78
50	6.5	1.290994	7222.222	16.25	1.669046	18055.56

จากข้อมูลในตาราง สามารถเขียนกราฟได้ดังรูป



รูป 3.4 กราฟเปรียบเทียบผลการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ค. และ สูตร ง.

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วง 0.1 – 50 μA จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นในกลุ่มควบคุมที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ค. (4mM L-glutamine) มากกว่าในกรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์สูตร ง. (ไม่มีกลูตามีน) ประมาณ 3 เท่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าปริมาณกลูตามีน ในอาหารเลี้ยงเซลล์มีอิทธิพลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 โดยการเติมกลูตามีน 4mM จะทำให้เซลล์ MG-63 สามารถเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ได้ดีกว่าเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีกลูตามีน และเมื่อเปรียบเทียบผลกระทบกรณีเซลล์ขาดกลูตามีน และกรณีเซลล์ขาดซีรั่ม กรณีที่เลี้ยงด้วยอาหารที่มีซีรั่ม 2% โดยปริมาตร จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นในกลุ่มควบคุมจะมีจำนวนเซลล์น้อยกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้นประมาณ 7 เท่า ในขณะที่ การเลี้ยงเซลล์ MG-63 ด้วยอาหารที่มีกลูตามีน จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นในกลุ่มควบคุมจะมีจำนวนเซลล์มากกว่าจำนวนเซลล์ตั้งต้นประมาณ 1.4 เท่า แสดงว่ากลูตามีน จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 น้อยกว่าซีรั่ม

สำหรับผลกระทบของปริมาณกลูตามีน ต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วงกระแส 0 – 50 μA พบว่า กรณีกระตุ้นเซลล์ MG-63 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีกลูตามีน เมื่อกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับมากกว่า 0.5 μA จะส่งผลกระทบต่อผลการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 อย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติ โดยการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่สูงขึ้นจะทำให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นลดลง และไม่สามารถสังเกตพบผลกระทบต่อการแบ่งเซลล์จากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับน้อยกว่า 0.5 μA

ส่วนกรณีกระตุ้นเซลล์ MG-63 ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีกลูตามีน ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วง 0 - 50 μA พบว่า ไม่สามารถสังเกตเห็นผลกระทบของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับต่อการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ได้ชัดเจน โดยผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 , 5 และ 50 μA จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นทั้ง 3 กรณี ใกล้เคียงกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยความแตกต่างที่เกิดขึ้นไม่มีนัยสำคัญเชิงสถิติ อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาผลกระทบที่เกิดขึ้นในกรณีการกระตุ้นเซลล์ที่เลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีกลูตามีน กรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 , 5 และ 50 μA จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมากกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างไม่นัยสำคัญเชิงสถิติ ประมาณ 36%ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม 24%ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม และ 26%ของจำนวนเซลล์กลุ่มควบคุม ตามลำดับ ซึ่งมากกว่าความคลาดเคลื่อนที่เกิดขึ้นจากการนับเซลล์ด้วย Haemocytometer ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นเซลล์ในภาวะที่ขาดกลูตามีน จะกระตุ้นให้เซลล์มีการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้น

จากผลการทดลอง การกระตุ้นเซลล์ที่ถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงที่มีกลูตามีน อาจทำให้กลูตามีน เกิดการแปรสภาพเป็นสารที่เป็นพิษต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 ทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 ดังนั้น จึงเกิดภาวะการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์จากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ในขณะที่การกระตุ้นเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีกลูตามีน จะไม่สามารถสังเกตเห็นผลกระทบจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมแบ่งเซลล์ MG-63 ได้ชัดเจนและมีนัยสำคัญเชิงสถิติ เพราะฉะนั้น ปริมาณกลูตามีนในอาหารเลี้ยงเซลล์จึงมีอิทธิพลต่อผลกระทบที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลสืบเนื่องจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

บทนี้จะกล่าวถึง ผลกระทบสืบเนื่องจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ซึ่งทำการศึกษาต่อเนื่องจากการศึกษาในบทที่ 3 โดยเน้นศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ภายหลังจากถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ โดยเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ เปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม

เนื่องจากภายหลังการกระตุ้น ต้องนำเซลล์ที่ถูกกระตุ้นไปเลี้ยงเพื่อศึกษาพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ จำนวนเซลล์สุทธิหลังการกระตุ้นต้องมีจำนวนเพียงพอสำหรับการนับเซลล์ด้วย Haemocytometer และสำหรับใช้เป็นเซลล์ตั้งต้นสำหรับศึกษาผลกระทบสืบเนื่องหลังการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ดังนั้น กระแสไฟฟ้าสลับที่ใช้กระตุ้นจึงอยู่ในช่วง 0.5 – 250 μA เพราะกระแสช่วงนี้ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 โดยที่จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นมีจำนวนเพียงพอที่จะใช้ในการศึกษาต่อไป

จุดประสงค์ เพื่อศึกษาผลกระทบสืบเนื่องจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์

วิธีการศึกษา ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 การทดลอง โดยแบ่งเป็นขั้นตอนหลัก 2 ขั้นตอน ดังนี้

4.1 การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 – 250 μA

ขั้นตอนนี้เป็นการเตรียมเซลล์สำหรับศึกษาผลกระทบที่สืบเนื่องจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ สำหรับการทดลองนี้ ใช้เซลล์ตั้งต้นสำหรับกระตุ้นจำนวน 30000 เซลล์/หลุม เพื่อให้จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมีจำนวนเพียงพอสำหรับการศึกษาต่อไป โดยทำการทดลองตามขั้นตอนต่อไปนี้

- เตรียมหลุมเลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้น พร้อมกับทำให้ปราศจากเชื้อตามขั้นตอนในภาคผนวก ข.
- เตรียมเซลล์สำหรับเลี้ยงในแต่ละหลุม 30,000 เซลล์ โดยใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมให้มีปริมาตรรวม 2 มล.
- เลี้ยงในตู้บเลี้ยงเชื้อก่อนทำการกระตุ้น 24 ชม.ภายใต้บรรยากาศ 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 °C
- กระตุ้นเซลล์ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาด 0.5 5 50 และ 250 μA โดยการทดลองทุกครั้งจะมีเซลล์ส่วนหนึ่งที่ไม่ถูกกระตุ้น (0 μA) อย่างน้อย 2 หลุม ใช้เป็นกลุ่มควบคุม

- (control group) เพื่อประโยชน์ในการเปรียบเทียบผลกระทบบที่เกิดขึ้น และทำการกระตุ้นในตู้เลี้ยงเชื้อเป็นเวลา 24 ชม.ภายใต้บรรยากาศ 5%CO₂ อุณหภูมิ 37 °C
- เก็บผลการทดลองด้วยวิธีนับจำนวนเซลล์

4.2 การศึกษาผลกระทบหลังการกระตุ้น

ขั้นตอนนี้เป็นการนำเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ รวมทั้งเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ไปเลี้ยงต่อในสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์สูตร DMEM+10%FBS+4mM L-glutamine

เนื่องจากต้องเลี้ยงเซลล์จำนวนมาก จึงใช้หลุมเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well plate) การเลี้ยงเซลล์ในขั้นตอนนี้ใช้เซลล์ตั้งต้น 3000 เซลล์ต่อหลุม โดยทำการแบ่งเลี้ยงในรุ่นต่อไป (subculture) ทุก ๆ 3 วัน โดยมีขั้นตอนดังต่อไปนี้

- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เดิมออกทั้งหมดทุกหลุม
- ใส่สารละลาย 0.25%trypsin-EDTA หลุมละ 50 µl ทิ้งไว้ประมาณ 3 นาที
- ใส่อาหารเลี้ยงหลุมละ 450 µl
- ล้างเซลล์ที่เกาะที่ผิวหลุมเลี้ยงเซลล์ให้หลุดลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์
- ดูดเซลล์ที่ลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์เก็บไว้ในหลอดทดลองขนาด 1.5 มล. เพื่อป้องกันไม่ให้เซลล์กลับไปเกาะที่ผิวหลุมเลี้ยงเซลล์
- นับจำนวนเซลล์ด้วย Haemocytometer และบันทึกผล
- แบ่งเซลล์ใส่ในหลุมเลี้ยงเซลล์หลุมละ 3000 เซลล์ สำหรับเป็นเซลล์ตั้งต้นของเซลล์รุ่น (passage) ต่อไป
- เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาตรรวม 2 มล.

ผลการทดลอง

การทดลองนี้ กำหนดให้รุ่น (passage) ของเซลล์ คือ ลำดับที่ของเซลล์ที่ถูกแบ่งเลี้ยง (subculture) โดยที่

เซลล์รุ่น 0 (passage 0) คือ เซลล์ที่ถูกแบ่งเลี้ยง สำหรับกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับค่าต่าง ๆ

ในการทดลองตอนที่ 1

เซลล์รุ่น 1 (passage 1) คือ เซลล์ที่ได้จากการแบ่งเลี้ยงจากเซลล์รุ่นที่ 0 โดยเลี้ยงในอาหารและสภาพแวดล้อมปกติ ภายหลังจากที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

เซลล์รุ่น 2 (passage 2) คือ เซลล์ที่ได้จากการแบ่งเลี้ยงจากเซลล์รุ่นที่ 1

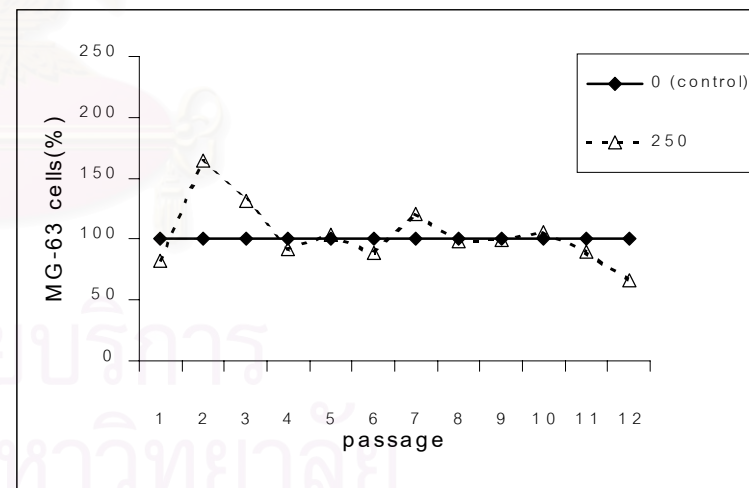
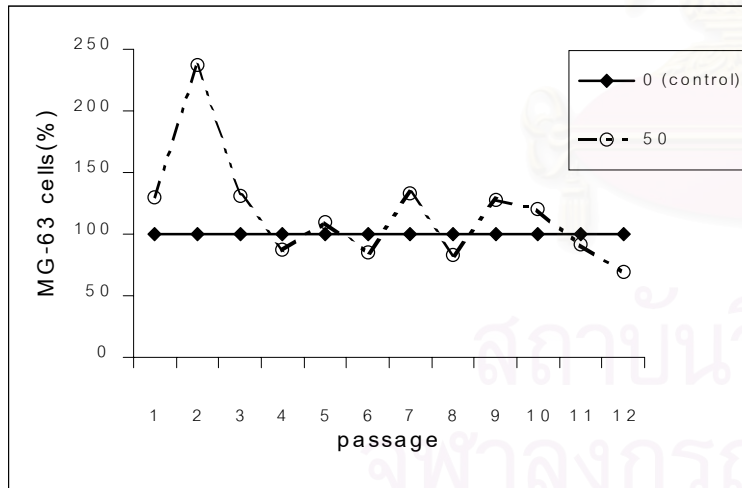
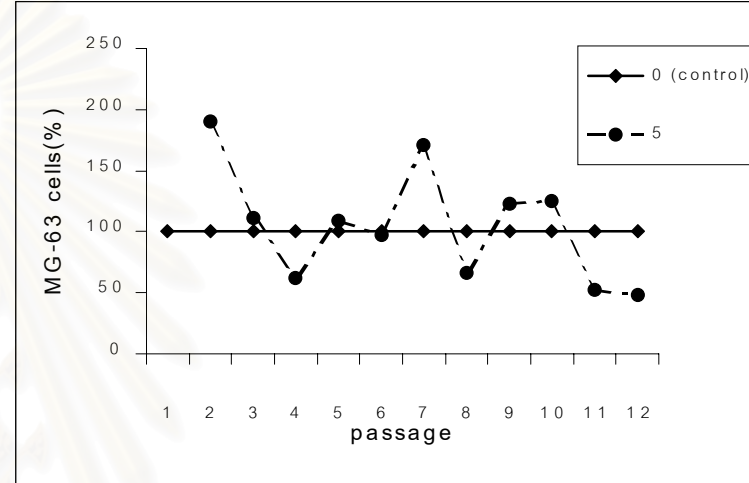
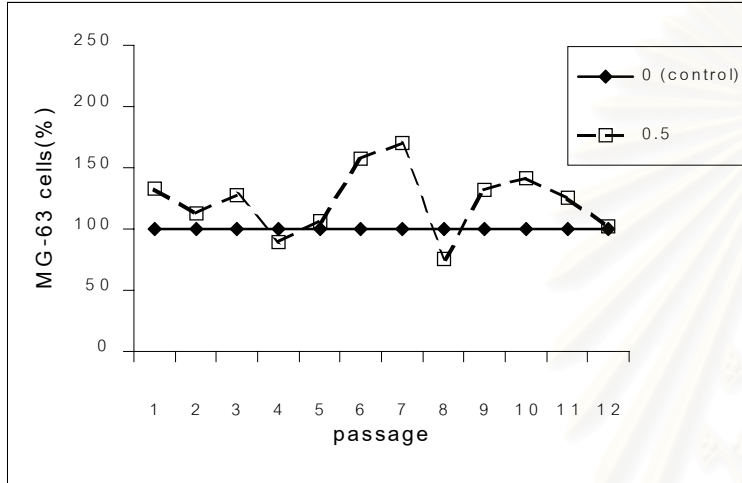
ฯลฯ

ตารางที่ 4.1 สรุปข้อมูลจำนวนเซลล์เฉลี่ยภายหลังการกระตุ้นแยกตามรุ่นเซลล์ที่เลี้ยง (Normalized Data)

กระแสกระตุ้น (μA)	เซลล์รุ่นที่ 1	เซลล์รุ่นที่ 2	เซลล์รุ่นที่ 3	เซลล์รุ่นที่ 4	เซลล์รุ่นที่ 5	เซลล์รุ่นที่ 6	เซลล์รุ่นที่ 7	เซลล์รุ่นที่ 8	เซลล์รุ่นที่ 9	เซลล์รุ่นที่ 10	เซลล์รุ่นที่ 11	เซลล์รุ่นที่ 12
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
0.5	132.83	112.27	127.98	89.79	106.62	157.58	169.69	75.14	132.38	141.59	125.87	102.28
5	-	190.55	110.67	61.64	109.36	97.06	170.46	66.60	123.10	124.91	51.93	47.96
50	129.81	237.65	130.41	87.70	109.49	85.14	132.52	82.75	127.62	120.23	91.65	68.84
250	81.96	164.36	131.35	91.90	103.27	88.49	120.24	97.96	99.88	105.82	89.41	66.48

ตารางที่ 4.2 สรุปข้อมูลจำนวนเซลล์เฉลี่ยรวมภายหลังการกระตุ้น (เฉลี่ยสะสมจากเซลล์รุ่นที่ 1 ถึงเซลล์รุ่นต่าง ๆ) (Normalized Data)

กระแสกระตุ้น (μA)	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 1	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 2	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 3	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 4	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 5	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 6	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 7	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 8	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 9	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 10	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 11	ค่าเฉลี่ยรวม ถึงรุ่นที่ 12
0	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00
0.5	132.83	122.55	125.35	113.74	112.74	115.68	119.00	116.46	117.33	118.59	118.95	118.17
5	-	190.55	129.47	101.40	103.12	101.99	107.52	104.46	105.76	107.01	103.64	100.44
50	129.81	183.73	151.73	127.72	124.84	119.43	120.00	118.45	118.81	118.87	117.86	116.11
250	81.96	123.16	127.57	115.38	113.13	109.64	110.34	109.57	109.01	108.83	107.82	105.76



รูปที่ 4.1 กราฟค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในแต่ละรุ่น โดยแยกแสดงตามกระแสกระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ตารางที่ 4.1 ได้จากการปรับเทียบ (normalize) ข้อมูลทั้งหมดจากผลการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละรุ่น (passage) ด้วยค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ) จากนั้นนำค่าที่ได้มาหาค่าเฉลี่ยแยกตามขนาดของกระแสกระตุ้น

ตารางที่ 4.2 ได้จากการปรับเทียบ (normalize) ข้อมูลทั้งหมดจากผลการนับจำนวนเซลล์ในแต่ละรุ่น (passage) ด้วยค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ) จากนั้นหาค่าเฉลี่ยรวมของข้อมูลจำนวนเซลล์จากเซลล์รุ่นที่ 1 ถึงเซลล์รุ่นต่าง ๆ โดยแยกตามขนาดของกระแสกระตุ้น

จากนั้นนำข้อมูลที่ได้จากตารางที่ 4.1 และ 4.2 มาเขียนกราฟเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยแยกตามขนาดกระแสกระตุ้น จะได้ดังรูปที่ 4.1 และ 4.2 ตามลำดับ

วิเคราะห์ผลการทดลอง

จากข้อมูลที่ได้จากการทดลอง เมื่อวิเคราะห์เปรียบเทียบข้อมูลของเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับค่าต่าง ๆ กับข้อมูลของเซลล์ในกลุ่มควบคุมด้วยโปรแกรม SPSS ผลการวิเคราะห์สรุปได้ดังตาราง 4.3

ตาราง 4.3 สรุปผลการวิเคราะห์ข้อมูลด้วยโปรแกรม SPSS (ผลสืบเนื่องจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้า)

เปรียบเทียบระหว่าง	Levene's test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means			
	F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Diff.
ควบคุม-0.5 μ A*	74.277	0.000	-6.142	385	0.000	-18.17
ควบคุม-5 μ A	104.720	0.000	-0.123	354	0.902	-0.44
ควบคุม-50 μ A *	55.241	0.000	-3.447	439	0.001	-16.11
ควบคุม-250 μ A	47.802	0.000	-1.664	536	0.097	-5.82

* แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

จากผลการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 ที่ผ่านการกระตุ้น และผลการวิเคราะห์ข้อมูลที่ได้โดยใช้โปรแกรม SPSS สามารถแยกผลกระทบของกระแสไฟฟ้าต่อพฤติกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ได้ดังนี้

1. ลักษณะการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ MG-63 ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

จากรูปที่ 4.1 พบว่า เมื่อนำเซลล์ MG-63 ที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ไปเลี้ยงด้วยอาหารและสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโต จำนวนเซลล์จากรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นที่ 12

เมื่อเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีลักษณะแกว่งขึ้นลงไม่คงที่ โดยเซลล์บางรุ่นมีจำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม และบางรุ่นมีจำนวนเซลล์ที่ถูกกระตุ้นน้อยกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม ซึ่งเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA มีการแกว่งขึ้นลงของจำนวนเซลล์รุ่นต่าง ๆ เทียบกับกลุ่มควบคุมมากที่สุด และกรณีเซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 50 และ 250 μA มีการแกว่งขึ้นลงของจำนวนเซลล์ในรุ่นต่าง ๆ เรียงจากมากไปน้อย แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับสูงขึ้น จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นเปรียบเทียบกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีการแกว่งลดลง หรือกล่าวได้ว่า เซลล์ที่ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสมากขึ้น เสถียรภาพของการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ MG-63 จะมากขึ้น ปฏิกิริยาการที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นด้วยกระแสต่ำ จะส่งผลกระทบต่อเซลล์อย่างไม่เสถียรภาพ และจำนวนเซลล์หลังการกระตุ้นแกว่งลดลง เมื่อระยะเวลาที่เลี้ยงเซลล์ที่ถูกกระตุ้นในอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาพแวดล้อมปกติมากขึ้น แสดงว่า เซลล์หลังกระตุ้นพยายามปรับตัวเข้าสู่สภาวะที่การเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์มีเสถียรภาพ จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นเทียบกับกลุ่มควบคุมกรณีเซลล์ช่วงหลังจึงแกว่งน้อยกว่ากรณีเซลล์ช่วงแรก

2. จำนวนเซลล์หลังการกระตุ้น

จากรูปที่ 4.2 พบว่า ภายหลังจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 จำนวนเซลล์เฉลี่ยรวมจากข้อมูลของเซลล์รุ่นที่ 1 ถึงเซลล์รุ่นต่าง ๆ ภายหลังจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 5 50 และ 250 μA มีจำนวนมากกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดย กรณีที่เซลล์ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA มีจำนวนเซลล์เฉลี่ยรวมมากที่สุดเทียบกับจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม และกรณีที่เซลล์ผ่านการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 250 และ 5 μA จะมีจำนวนเซลล์เฉลี่ยรวมเรียงจากมากไปน้อย ตามลำดับ ซึ่งมีลักษณะในการทำงานเดียวกับผลการทดลองหัวข้อ 3.1 ที่การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA จำนวนเซลล์หลังกระตุ้นมีจำนวนมากที่สุด และกรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 50 250 และ 5 μA จะมีจำนวนหลังกระตุ้นเรียงจากมากไปน้อยตามลำดับ ดังนั้น การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ส่งผลกระทบต่อพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ต่อเนื่องหลังจากหยุดกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ และนำเซลล์เหล่านั้นไปเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาพแวดล้อมปกติ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ จะส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงลักษณะภายในเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการแบ่งเซลล์อย่างถาวร

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองในหัวข้อ 3.1 เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม กรณีที่กระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA จะมีจำนวนเซลล์มากกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุม อย่างไรก็ตามมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่เมื่อพิจารณาร่วมกับผลการเจริญเติบโต

ภายหลังการกระตุ้น พบว่า มีความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA กระตุ้นให้อัตราการแบ่งเซลล์ MG-63 ที่ถูกกระตุ้นเพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุม สำหรับเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 50 และ 250 μA จำนวนเซลล์จากการกระตุ้นน้อยกว่าจำนวนเซลล์ในกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เมื่อนำเซลล์เหล่านี้มาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสม จำนวนเซลล์เฉลี่ยรวมมีจำนวนมากกว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุม โดยอาจเกิดจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 50 และ 250 μA เป็นการกระตุ้นที่สูงเกินไป ทำให้เกิดสภาพที่ไม่เหมาะสมต่อการดำรงชีวิตของเซลล์ MG-63 จึงมีอัตราการตายสูงกว่าอัตราการแบ่งเซลล์ ดังนั้น ในสถานะที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 5 50 และ 250 μA จึงไม่สามารถสังเกตพบผลการเพิ่มอัตราการแบ่งเซลล์จากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การทดลองกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับความถี่ 50 เฮิร์ตซ สามารถสรุปผลกระทบต่อพฤติกรรมกรรมการแบ่งเซลล์ MG-63 ได้ดังนี้

1. ผลกระทบจากการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

1.1 การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับขนาด 500 μA จะส่งผลกระทบต่อลักษณะทางกายภาพของเซลล์ MG-63 อย่างชัดเจน โดยเซลล์จะมีลักษณะกลม สำหรับการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่น้อยกว่า 500 μA จะสังเกตเห็นพบผลกระทบของการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับต่อลักษณะทางกายภาพ

1.2 การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ส่งผลเชิงยับยั้งการแบ่งเซลล์ MG-63 เมื่อกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้ามากกว่า 0.5 μA โดยผลกระทบมีแนวโน้มมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับที่สูงขึ้น และการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับสูงกว่า 500 μA ทำให้เซลล์ MG-63 มีอัตราการตายมากกว่าอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ สำหรับการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับในช่วง 0.1 ถึง 0.5 μA นั้น แม้ว่าจะไม่พบผลกระทบที่มีนัยสำคัญเชิงสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% อย่างไรก็ตาม การกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ 0.5 μA มีแนวโน้มกระตุ้นให้เซลล์ MG-63 มีอัตราการแบ่งเซลล์สูงขึ้นเมื่อเทียบกับเซลล์ในกลุ่มควบคุมที่ไม่ถูกกระตุ้น

1.3 ผลการทดลองชี้ว่า ความแตกต่างของปริมาณซีรัมในอาหารเลี้ยงเซลล์ MG-63 ไม่ส่งผลกระทบต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ โดยผลการกระตุ้นจะมีแนวโน้มเหมือนกัน แม้ว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นจะถูกเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณซีรัมแตกต่างกัน

1.4 สำหรับปริมาณ L-glutamine ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ส่งผลกระทบต่อผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ เนื่องจาก ไม่สามารถสังเกตพบผลกระทบเชิงยับยั้งการแบ่งเซลล์จากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ ถ้าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นถูกเลี้ยงด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี L-glutamine

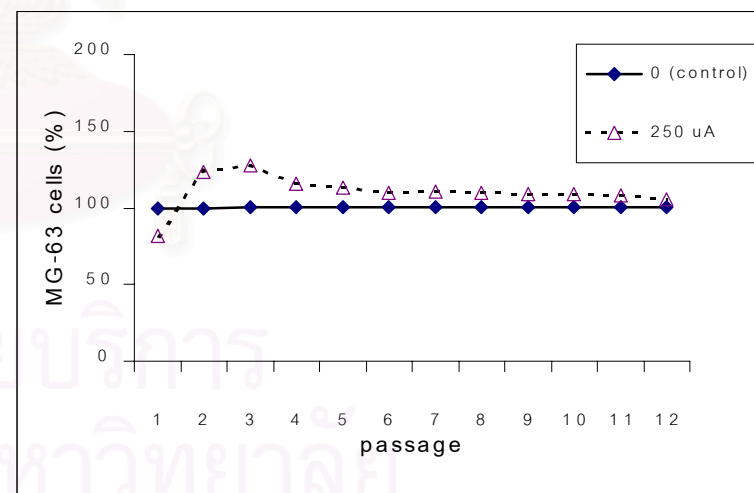
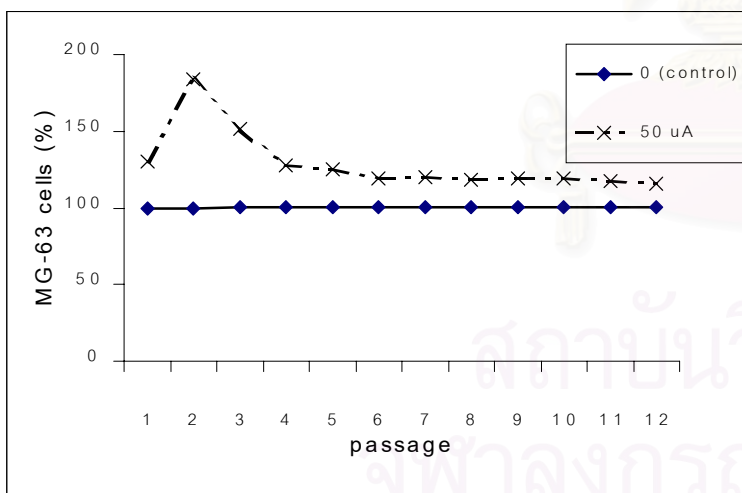
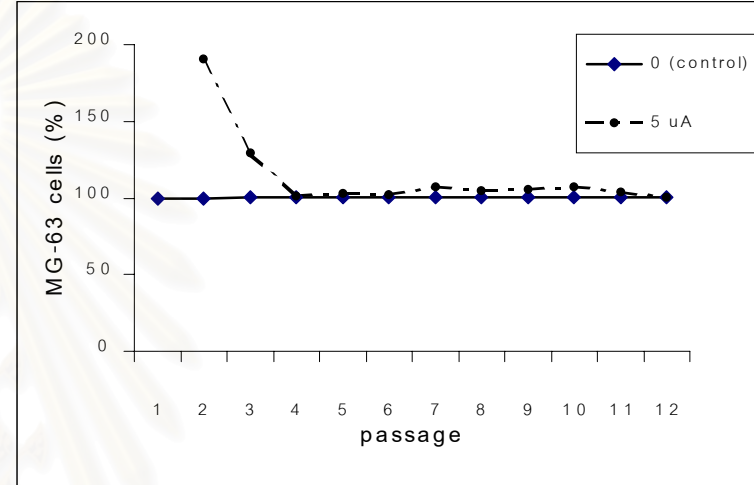
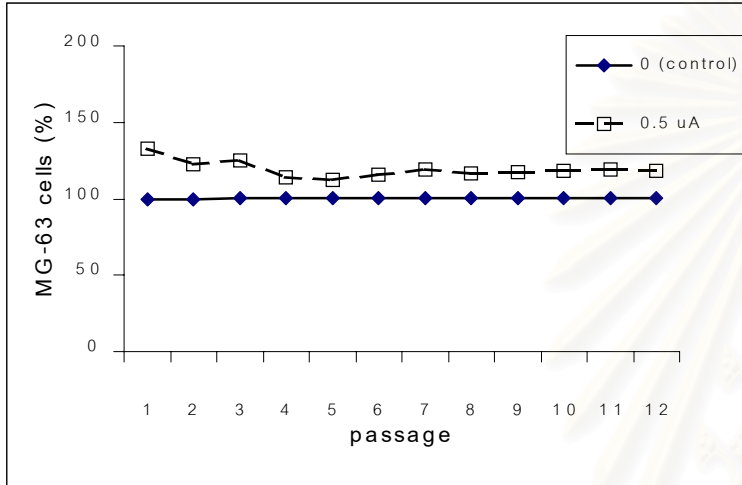
2. ผลกระทบภายหลังกการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ

เซลล์ MG-63 ที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ เมื่อถูกนำไปเลี้ยงต่อด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์และสภาพแวดล้อมที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ MG-63 มีแนวโน้มที่อัตราการแบ่งเซลล์จะสูงกว่าเซลล์ที่ไม่ถูกกระตุ้นกระแสไฟฟ้าสลับ

จากการศึกษา พบว่า มีความเป็นไปได้ที่การกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับจะทำให้เซลล์ MG-63 ที่ถูกกระตุ้นไม่มีเสถียรภาพในการเจริญเติบโตและการแบ่งเซลล์ เนื่องจากจำนวนเซลล์ ภายหลังจากกระตุ้นแต่ละรุ่นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมจะแกว่งขึ้นลง อย่างไรก็ตาม การแกว่งขึ้นลงของจำนวนเซลล์ที่เกิดขึ้นลดลงเมื่อระยะเวลาในการเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติมากขึ้น แสดงให้เห็นว่าเซลล์ที่ถูกกระตุ้นมีการปรับตัวให้การแบ่งเซลล์มีเสถียรภาพมากขึ้น



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 4.2 กราฟจำนวนเซลล์เฉลี่ยสะสมจากรุ่นที่ 1 ถึงรุ่นต่าง ๆ โดยแยกแสดงตามกระแสกระตุ้นเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

รายการอ้างอิง

1. C. H. Turner, M. Forwood, J-Y. Rho, and T. Yoshikawa. Mechanical strain threshold for lamellar bone formation. Biomedical Engineering Conference.1993. Proceedings of the Twelfth Southern Published (1993) : 248 –250.
2. Z. Davidovitch, M. D. Finkelson, and S. Steigman, J. L. Shanfeld, and P. C. Montgomery, and E. Korostoff. Electric currents, bone remodeling and orthodontic tooth movement : The effect of electric currents on periodontal cyclic nucleotides. Am. J. Orthod. January 77 (1980) : 14 – 32.
3. Z. Davidovitch, M. D. Finkelson, and S. Steigman, J. L. Shanfeld, and P. C. Montgomery, and E. Korostoff. Electric currents, bone remodeling and orthodontic tooth movement : Increase in rate of tooth movement and periodontal cyclic nucleotide levels by combined force and electric current. Am. J. Orthod. January, 77 (1980) : 33 – 47.
4. Thomas M. Stark, and Peter M. Sinclair. Effect of pulsed electromagnetic fields on orthodontic tooth movement. Am. J. Orthod. February 91 (1987) : 91 – 104.
5. Eugene M. Goodman, Ben Greenbaum, and Michael T. Marron. Effects of electromagnetic fields on molecules and cells. International Review of Cytology 158 (1995) : 279 – 338.
6. J. Behari. Mechanism of accelerated bone fracture healing. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medical and Biology Society 20 (1998) : 2928 – 2930.
7. Larry E. Anderson. Biological effects of magnetic fields: Laboratory studies. Proceedings of the 20th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medical and Biology Society 20 (1998) : 2791 – 2797.
8. Dennis A. Chakkalakal, Louis Lippiello, Richard L. Shindell, and John. F. Connolly. IEEE Transactions on Biomedical Engineering 37 (November 1990) : 1048 – 1057.
9. Paul Hotowitz and Winfield Hill. The art of electronics. 2nd : Cambridge university press, 1995.

10. R. H. Burden and P. H. van Knippenberg. Laboratory techniques in biochemistry and molecular biology. Vol. 8 : Cell culture for biochemists. 2nd revised edition. Netherlands : Elsevier , 1990.
11. Jennie P. Mather and Penelope E. Roberts. Introduction to cell and tissue culture: Theory and techniques. (n.p.) : Plenum Press, 1998.



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

1. ขั้นตอนการเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใช้ในการวิจัยนี้ เป็นอาหารสูตร DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) ชนิดผง (Product No. D5280) โดยมีขั้นตอนการเตรียมสามารถแบ่งได้เป็น 2 ขั้นตอนใหญ่ คือ

- การเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อเก็บไว้ใช้งาน (stock media)
- การเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้งาน

1.1. การเตรียม stock media

การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์ตามคู่มือการเตรียมของบริษัท Sigma Chemical จะเติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตใน stock media ด้วย แต่ในทางปฏิบัติ ถ้าจำเป็นต้องเก็บเอาไว้ใช้เป็นเวลานาน ไม่ควรเติมสารละลายโซเดียมไบคาร์บอเนตเพราะเมื่อเก็บเอาไว้เป็นเวลานาน อาจจะทำให้เกิดตะกอนขึ้นได้ ส่วน L-glutamine และ ซีรั่ม จะเติมเมื่อต้องการจะใช้งาน

- ตวงน้ำ DI ประมาณ 1.5 ลิตรใส่ในบีกเกอร์ (น้ำที่ใช้ควรมีอุณหภูมิประมาณ 15–20 องศาเซลเซียส)
- กวนน้ำด้วยเครื่อง stirrer พร้อมกับเทมของ medium ลงไปจนกระทั่งหมดขวด จะได้สารละลายสีเหลือง อันเนื่องมาจาก Phenol Red ซึ่งแสดงให้เห็นว่าสารละลายมีสภาพเป็นกรด
- ใช้น้ำ DI ใสลงไปในขวดเพื่อละลายสารที่เหลือค้างอยู่ในขวดออก แล้วเทใส่รวมกับ medium ในบีกเกอร์
- จากนั้นใช้กระบอกตวง ทำการตวง medium ที่เตรียมไว้ใส่ลงในขวดชมพูขนาด 5 ลิตร พร้อมกับเติมน้ำ DI จนกระทั่งได้ปริมาตรรวม 4650 ml
- ทำการกรองสารละลายที่ได้ด้วย หัวกรอง ขนาด 0.22 μm
- ทำการตวงสารละลายใส่ในขวด ขวดละ 465 ml พร้อมทั้งปิดฝาไม่ให้นั่นมากนัก (โดยการคลายเกลียวออกประมาณ 1-2 เกลียว)
- ทำการอบฆ่าเชื้อด้วยวิธีการ autoclave ที่ 121 องศาเซลเซียส 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 15 นาที
- ทิ้ง medium ไว้ในเครื่อง autoclave กระทั่งอุณหภูมิเท่ากับอุณหภูมิห้อง จากนั้นปิดฝาให้แน่น แล้วนำไปเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิประมาณ 2 - 8 องศาเซลเซียส

1.2. การเตรียมสารอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อใช้งาน

เมื่อต้องการใช้อาหารเลี้ยงเซลล์ ต้องนำเอา stock media มาเติมสารละลายไซโตเดียมไบคาร์บอเนต L-glutamine และ ซีรั่ม ดังขั้นตอนต่อไปนี้

- เมื่อต้องการใช้ เติมสารละลายไซโตเดียมไบคาร์บอเนตความเข้มข้น 7.5 g/100 ml ปริมาตร 25 ml ลงในแต่ละขวด แล้วปิดฝาให้แน่น เพื่อไม่ให้เกิดตะกอนขึ้นในสารละลาย สารละลายที่ได้จะมีสีแดง ค่า pH ควรอยู่ในช่วง 7.3 ± 0.3 ซึ่งถ้าค่า pH ไม่อยู่ในช่วงนี้ จะสามารถปรับค่า pH ได้โดยการเติมสารละลาย HCl 1 N หรือ NaOH 1 N (N : Normality)
- จากนั้นเติมสารละลาย L-glutamine ความเข้มข้น 200 mM จำนวน 10 ml และเติมซีรั่มวัว(Fetal bovine serum) ตามปริมาณที่ต้องการ โดยปกติจะเติมซีรั่มประมาณ 10% โดยปริมาตร คือจะเติมซีรั่มประมาณ 50 ml /ขวด (เมื่อเติม สารละลายไซโตเดียมไบคาร์บอเนตและ L-glutamine ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เตรียมไว้ 1 ขวด จะมีปริมาตรประมาณ 500 ml)
- แล้วทำการกรองสารละลายที่ได้ด้วย หัวกรอง ขนาด 0.22 μm อีกครั้ง เนื่องจากการเก็บอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเวลานานอาจทำให้เกิดการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ นอกจากนี้สารละลายไซโตเดียมไบคาร์บอเนต L-glutamine และซีรั่มอาจจะมีตะกอนหรือมีการปนเปื้อนของจุลินทรีย์ได้ จึงควรกรองอีกครั้งก่อนการใช้งาน

ภาคผนวก ข

1. ขั้นตอนการล้างอุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

- แช่อุปกรณ์ไว้ในน้ำผสมสารทำความสะอาด (detergent) อย่างอ่อนประมาณ 1 คืน (เพื่อให้เหลือสารตกค้างในอุปกรณ์เป็นพินัยน้อยที่สุด ในงานวิจัยนี้ใช้น้ำยาล้างขวดนมเด็ก)
- ล้างอุปกรณ์ด้วยฟองน้ำ แล้วล้างด้วยน้ำสะอาด
- จากนั้น ล้างด้วยการผ่านน้ำสะอาด (rinse) ในที่นี้ใช้น้ำประปาเป็นเวลาประมาณ 30 นาที
- ล้างด้วยน้ำ RO (Reverse Osmosis water) 1 ครั้ง
- ล้างด้วยน้ำ DI (Deionized water) 2 ครั้ง
- นำไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 คืน

2. ขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อ

การทำให้อุปกรณ์ปราศจากเชื้อที่ใช้ในงานวิจัยนี้แบ่งออกได้ 3 วิธี คือ

2.1 การทำให้ปราศจากเชื้อโดยไม่ใช้ความร้อน

การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีนี้ จะใช้กับอุปกรณ์เลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้นด้วยกระแสสลับ เนื่องจากส่วนประกอบบางส่วนของอุปกรณ์ดังกล่าวทำจากแผ่นอะคริลิก (Acrylic) ซึ่งไม่สามารถทำความร้อนสูงที่ใช้ในกระบวนการทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีอบไอน้ำ (Autoclave) ได้ มีขั้นตอนการทำให้ปราศจากเชื้อ ดังนี้

- นำอุปกรณ์ที่จะทำให้ปราศจากเชื้อมาแช่ในแอลกอฮอล์ 70% เป็นเวลาประมาณ 30 นาที
- ตูดแอลกอฮอล์ออก แล้วล้างด้วยน้ำ DI ที่ปราศจากเชื้อ (sterilized DI water) 2 ครั้ง
- ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลา 1 คืน

2.2 การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรอง

การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีกรองใช้เมื่อต้องการทำสารบางอย่างที่ไม่สามารถทนความร้อนสูงให้ปราศจากเชื้อ เช่น เอนไซม์ทริปซิน (trypsin) โปรตีน L-glutamine ซีรัม เป็นต้น

การกรองทำบรรยากาศที่ปราศจากเชื้อในตู้ปลอดเชื้อ (hood) ใช้หัวกรองที่มีขนาดรู 0.22 μm กรณีที่กรองสารเป็นจำนวนมาก ใช้ปั๊มบีต้อกับหัวกรองใหญ่เพื่อช่วยดูดสารให้ผ่านหัวกรอง กรณีที่กรองสารจำนวนน้อย ใช้หลอดฉีดยาดูดสารแล้วต่อกับหัวกรองเล็ก แล้วดันหลอดฉีดยาให้สารผ่านหัวกรอง

2.3 การทำให้ปราศจากเชื้อโดยใช้ความร้อนด้วยวิธีอบไอน้ำ (Autoclave)

การทำให้ปราศจากเชื้อด้วยวิธีอบไอน้ำ ใช้กับอุปกรณ์และสารต่าง ๆ ที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์ เช่น ขวดใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ หลอดใส่สารต่าง ๆ อาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นต้น มีขั้นตอนดังนี้

- ใส่หรือเปลี่ยนน้ำกลั่นลงในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ
- ติดเทปที่ชี้สภาพการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ (Autoclave tape) ลงบนอุปกรณ์ทุกชิ้นที่จะทำการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ซึ่งเทปนี้จะแสดงว่าการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำมีประสิทธิภาพหรือไม่ โดยการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่ดี เทปจะเปลี่ยนสีให้เห็นเป็นแถบสีน้ำตาล ถ้าเทปไม่เปลี่ยนสี การอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำไม่มีประสิทธิภาพ
- นำอุปกรณ์ที่ติดเทป ไปใส่ในเครื่องอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ปิดฝาให้แน่น
- ทำการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว (PSI : Pound Square inch) เป็นเวลา 15 นาที
- นำอุปกรณ์ที่ผ่านการอบฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำ ไปอบแห้งที่อุณหภูมิ 65 องศาเซลเซียส ประมาณ 1 คืน

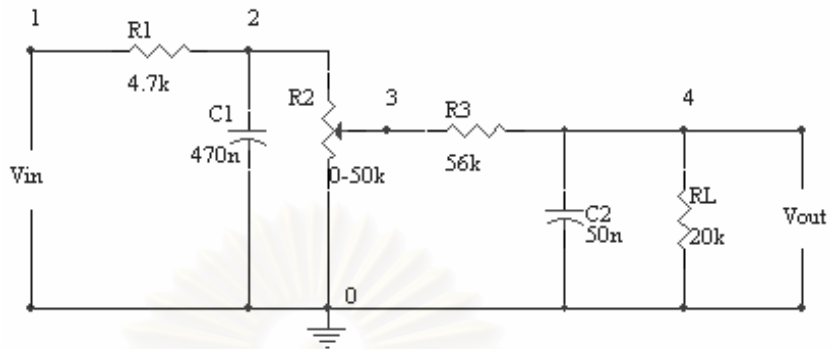
3. การประกอบอุปกรณ์การเลี้ยงเซลล์สำหรับกระตุ้นด้วยกระแสไฟสลับ

- ผสมวัสดุพิมพ์ปากระหว่างซิลิโคนกับตัวเร่งปฏิกิริยา (catalyst) ด้วยอัตราส่วนประมาณ 1 : 8 แล้วใส่ในหลอดฉีดซิลิโคน
- ยึดแผ่นกระจกที่เคลือบชั้นตัวนำกับแผ่นฐานด้วยวัสดุพิมพ์ปาก
- ยึดและผนึก (seal) ท่อแก้วกับแผ่นกระจกที่เคลือบชั้นตัวนำ
- นำไปทำให้ปราศจากเชื้อ
- ยึดลวดสแตนเลสกับแผ่นอะคริลิกด้านบน โดยยึดให้เมื่อปิดฝาด้านบนแล้วปลายลวดอยู่เหนือพื้นกระจกด้านล่างหลุมประมาณ 3 มม.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

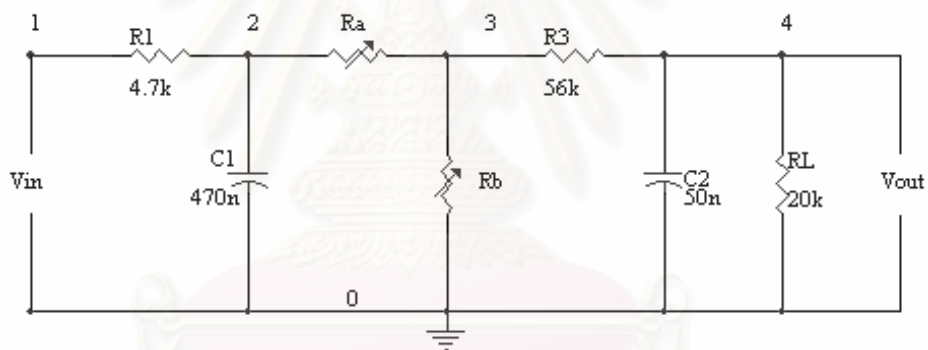
ภาคผนวก ค

1. วิเคราะห์วงจรกรองผ่านต่ำ



รูป ค.1 วงจรกรองผ่านต่ำ

ในการวิเคราะห์วงจรจะแทนวงจรสมมูลของตัวต้านทานปรับค่าได้ (R_2) ด้วยตัวต้านทาน 2 ตัวดังรูป ค.2



รูป ค.2 วงจรสมมูลวงจรกรองผ่านต่ำ

$$\text{KVL ที่วงรอบ 3-4-0-3 ; } V_3 = V_0 \left[\frac{R_3}{R_L} (1 + sC_2 R_L) + 1 \right] \quad \dots (1)$$

$$\text{KVL ที่วงรอบ 2-3-0-2 ; } V_2 = \frac{R_a}{R_L} (1 + sC_2 R_L) V_0 + m V_3 ; m = 1 + \frac{R_a}{R_b} \quad \dots (2)$$

KVL ที่วงรอบ 1-2-0-1 ;

$$V_{in} = V_0 \left(\frac{1 + sC_2 R_L}{R_L} \right) \left[R_1 (1 + sC_1 R_a) + R_a \right] + V_3 \left[\frac{R_1}{R_b} (1 + m s C_1 R_b) + m \right] \quad \dots (3)$$

จากสมการ (1) และ (3) จะได้ ;

$$V_{in} = V_o \left(\frac{1 + sC_2R_L}{R_L} \right) \left[R_1(1 + sC_1R_a) + R_a \right] + V_o \left[\frac{R_3}{R_L}(1 + sC_2R_L) + 1 \right] \left[\frac{R_1}{R_b}(1 + msC_1R_b) + m \right]$$

จัดสมการใหม่ โดย $p = C_2R_L$ และ $q = C_1R_1$ จะได้ ;

$$\frac{V_o}{V_{in}} = \frac{R_L}{s^2 pq \left[R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + mR_3 \right] + s \left[p \left(R_1 + R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + mR_3 \left(1 + \frac{R_1}{R_2} \right) \right) + q \left(R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + m(R_3 + R_L) \right) \right] + R_1 + R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + m(R_3 + R_L) \left(1 + \frac{R_1}{R_2} \right)}$$

$$\frac{V_o}{V_{in}} = \frac{\frac{1}{pq} \left(\frac{R_L}{R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + mR_3} \right)}{s^2 + s \left[\frac{1}{q} \left(1 + \frac{R_1 + mR_3 \left(\frac{R_1}{R_2} \right)}{R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + mR_3} \right) + \frac{1}{p} \left(1 + \frac{mR_L}{R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + mR_3} \right) \right] + \frac{1}{pq} \left(1 + \frac{R_1 + mR_L + m(R_3 + R_L) \left(\frac{R_1}{R_2} \right)}{R_2 \left(1 - \frac{1}{m} \right) + mR_3} \right)}$$

... (4)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แทนค่า $R_1 = 4.7\text{k}\Omega$, $R_2 = 50\text{k}\Omega$, $R_3 = 56\text{k}\Omega$, $\frac{1}{p} = \frac{1}{C_2 R_L} = 10^3$ และ $\frac{1}{q} = \frac{1}{C_1 R_1} = 453$ ลงในสมการ (4) ;

$$\frac{V_o}{V_{in}} = \frac{(453 \times 10^3) \left(\frac{20\text{k}}{50\text{k} \left(1 - \frac{1}{m} \right) + 56\text{k}} \right)}{s^2 + s \left[453 \left(1 + \frac{4.7\text{k} + m(56\text{k}) \left(\frac{4.7\text{k}}{50\text{k}} \right)}{50\text{k} \left(1 - \frac{1}{m} \right) + m(56\text{k})} \right) + 10^3 \left(1 + \frac{m(20\text{k})}{50\text{k} \left(1 - \frac{1}{m} \right) + m(56\text{k})} \right) \right] + (453 \times 10^3) \left(1 + \frac{4.7\text{k} + m(20\text{k}) + m(56\text{k} + 20\text{k}) \left(\frac{4.7\text{k}}{50\text{k}} \right)}{50\text{k} \left(1 - \frac{1}{m} \right) + m(56\text{k})} \right)}$$

$$\frac{V_o}{V_{in}} = \frac{\frac{1.812 \times 10^5}{\left(1 - \frac{1}{m} \right) + 1.12\text{m}}}{s^2 + s \left[453 \left(1 + 0.094 \frac{1 + 1.12\text{m}}{\left(1 - \frac{1}{m} \right) + 1.12\text{m}} \right) + 10^3 \left(1 + \frac{0.4\text{m}}{\left(1 - \frac{1}{m} \right) + 1.12\text{m}} \right) \right] + (453 \times 10^3) \left(1 + \frac{0.094 + 0.54288\text{m}}{\left(1 - \frac{1}{m} \right) + 1.12\text{m}} \right)}$$

... (5)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมการ (5) เป็นฟังก์ชันโอนย้าย (transfer function) ของวงจรกรองผ่านต่ำในพจน์ค่า m โดยแสดงผลของตัวต้านทานปรับค่าได้ว่ามีผลกระทบต่อรากสมการโอนย้าย (pole) อย่างไร การปรับตัวต้านทานปรับค่าได้ (R_2) เป็นการปรับค่า m ในสมการ (5) รากสมการที่ m ค่าต่าง ๆ เป็นดังตาราง ค.1

ตาราง ค.1 รากของสมการโอนย้าย ที่ m ค่าต่าง ๆ

$\frac{R_a}{R_b}$	$m = 1 + \frac{R_a}{R_b}$	f_1 (Hz)	f_2 (Hz)	$\frac{R_a}{R_b}$	$m = 1 + \frac{R_a}{R_b}$	f_1 (Hz)	f_2 (Hz)
0.0000001	1.0000001	-82.3517	-218.57	1.4	2.4	-79.4187	-206.179
0.000001	1.000001	-82.3517	-218.57	1.6	2.6	-79.3397	-206.353
0.00001	1.00001	-82.3517	-218.569	1.8	2.8	-79.277	-206.564
0.0001	1.0001	-82.3509	-218.564	2	3	-79.2264	-206.794
0.001	1.001	-82.3432	-218.51	3	4	-79.0758	-207.967
0.01	1.01	-82.2677	-217.99	4	5	-79.005	-208.972
0.02	1.02	-82.1871	-217.442	5	6	-78.966	-209.783
0.03	1.03	-82.1095	-216.924	6	7	-78.9423	-210.437
0.04	1.04	-82.0349	-216.434	7	8	-78.9267	-210.973
0.05	1.05	-81.9632	-215.97	8	9	-78.9159	-211.417
0.06	1.06	-81.8941	-215.53	9	10	-78.9082	-211.79
0.07	1.07	-81.8275	-215.112	10	11	-78.9024	-212.108
0.08	1.08	-81.7633	-214.715	12	13	-78.8945	-212.621
0.09	1.09	-81.7014	-214.338	14	15	-78.8896	-213.015
0.1	1.1	-81.6417	-213.98	16	17	-78.8862	-213.327
0.2	1.2	-81.1425	-211.195	18	19	-78.8839	-213.58
0.3	1.3	-80.7751	-209.409	20	21	-78.8822	-213.789
0.4	1.4	-80.4951	-208.226	30	31	-78.878	-214.457
0.5	1.5	-80.2757	-207.428	40	41	-78.8764	-214.815
0.6	1.6	-80.1001	-206.888	50	51	-78.8757	-215.038
0.7	1.7	-79.957	-206.528	60	61	-78.8753	-215.19
0.8	1.8	-79.8384	-206.295	70	71	-78.875	-215.3
0.9	1.9	-79.7391	-206.153	80	81	-78.8749	-215.384
1	2	-79.6548	-206.08	90	91	-78.8748	-215.45
1.2	2.2	-79.5204	-206.071	100	101	-78.8747	-215.503

เมื่อนำรากของสมการมาเขียนกราฟได้ดังรูป



รูป ค.3 กราฟรากสมการที่ค่า m ต่าง ๆ

วงจรรองผ่านต่ำตามรูป ค.1 เป็นวงจรรองผ่านต่ำแบบเฉื่อยงาน (passive) มีรากหลัก (dominant pole) ที่ความถี่ 82.34 Hz และรากตัวที่ 2 ความถี่ 218.51 Hz เมื่อ $m = 1.001$ และเมื่อปรับค่าตัวต้านทานปรับค่าได้ รากหลักและรากตัวที่ 2 ของฟังก์ชันโอนย้ายจะเลื่อนไปตามค่า

m ($m = 1 + \frac{R_a}{R_b}$) หรือ อัตราส่วนระหว่าง $R_a : R_b$ โดย

- กรณีรากหลัก (dominant pole) ความแตกต่างมากที่สุดที่เกิดขึ้นเมื่อค่า m เปลี่ยนแปลง คือ 3.48 Hz คิดเป็น 4.2 % โดยเกิดขึ้นเมื่อเปลี่ยนค่า m จาก $m = 1$ (รากหลัก 82.35 Hz) เป็น $m = \infty$ (โดยประมาณ คือ ตั้งแต่ $m = 100$ จะทำให้รากหลักมีค่า 78.87 Hz)
- กรณีรากตัวที่ 2 ความแตกต่างมากที่สุดที่เกิดขึ้นเมื่อค่า m เปลี่ยนแปลง คือ 12.51 Hz คิดเป็น 5.7 % โดยเกิดขึ้นเมื่อเปลี่ยนค่า m จาก $m = 1$ (รากตัวที่ 2 คือ 218.57 Hz) เป็น $m = 2.1$ (รากตัวที่ 2 มีค่า 206.06 Hz)

จากการคำนวณตำแหน่งรากฟังก์ชันโอนย้าย เมื่อเปลี่ยนค่า m ตำแหน่งรากฟังก์ชันโอนย้ายจะเลื่อนไม่ไปมาก อยู่ในวงที่สามารถกรองสัญญาณรบกวนที่ไม่ต้องการออกได้ ดังนั้น การจึงสามารถใช้ตัวต้านทานปรับค่าได้ (R_2) ปรับขนาดของสัญญาณได้ เนื่องจากขนาดของสัญญาณออกจากวงจรรองจะเป็นฟังก์ชันของค่า m

ภาคผนวก ง.

การวิเคราะห์ผลการกระตุ้นเซลล์ MG-63 ด้วย SPSS

ง.1 การวิเคราะห์ข้อมูลผลของขนาดกระแสไฟฟ้าสลับ(หัวข้อ 3.1)

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 0.1 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	.817	.369	-.291	74	.772	-4.4170	15.1915	-34.6867	25.8528
	Equal variances not assumed			-.360	10.072	.726	-4.4170	12.2666	-31.7224	22.8885

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 0.5 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	3.643	.059	-1.875	90	.064	-20.4403	10.9020	-42.0991	1.2185
	Equal variances not assumed			-1.614	32.039	.116	-20.4403	12.6608	-46.2283	5.3476

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 5 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	2.931	.090	9.728	98	.000	82.0359	8.4331	65.3007	98.7711
	Equal variances not assumed			10.418	72.500	.000	82.0359	7.8746	66.3400	97.7318

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 50 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	29.113	.000	2.556	102	.012	27.4468	10.7379	6.1482	48.7454
	Equal variances not assumed			2.215	49.167	.031	27.4468	12.3914	2.5474	52.3462

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 250 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	2.252	.137	4.486	84	.000	53.7344	11.9787	29.9134	77.5554
	Equal variances not assumed			3.714	21.889	.001	53.7344	14.4682	23.7203	83.7485

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 500 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	8.715	.004	3.961	74	.000	58.6331	14.8008	29.1419	88.1243
	Equal variances not assumed			9.315	40.385	.000	58.6331	6.2943	45.9157	71.3505

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 2500 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	6.940	.010	5.890	74	.000	87.4101	14.8403	57.8401	116.9801
	Equal variances not assumed			12.275	25.251	.000	87.4101	7.1210	72.7515	102.0687

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 5000 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
SUM	Equal variances assumed	12.494	.001	6.656	74	.000	98.2014	14.7545	68.8025	127.6004
	Equal variances not assumed			19.012	72.462	.000	98.2014	5.1651	87.9060	108.4968

ง.2 การวิเคราะห์ข้อมูลผลกระทบสืบเนื่องจากการกระตุ้นด้วยกระแสไฟฟ้าสลับ(บทที่ 4)

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 0.5 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
ALL_DATA	Equal variances assumed	74.277	.000	-6.142	385	.000	-18.1670	2.9578	-23.9824	-12.3516
	Equal variances not assumed			-5.790	258.451	.000	-18.1670	3.1378	-24.3460	-11.9880

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 5 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
ALL_DATA	Equal variances assumed	104.720	.000	-1.123	354	.902	-4.372	3.5545	-7.4277	6.5533
	Equal variances not assumed			-1.107	178.260	.915	-4.372	4.0886	-8.5055	7.6310

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 50 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
ALL_DATA	Equal variances assumed	55.241	.000	-3.447	439	.001	-16.1092	4.6740	-25.2954	-6.9229
	Equal variances not assumed			-3.491	271.241	.001	-16.1092	4.6143	-25.1936	-7.0247

การวิเคราะห์เปรียบเทียบกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วยกระแส 250 μA ด้วยสถิติ T-Test

Independent Samples Test

		Levene's Test for Equality of Variances		t-test for Equality of Means						
		F	Sig.	t	df	Sig. (2-tailed)	Mean Difference	Std. Error Difference	95% Confidence Interval of the Mean	
									Lower	Upper
ALL_DATA	Equal variances assumed	47.802	.000	-1.664	536	.097	-5.8231	3.4995	-12.6974	1.0513
	Equal variances not assumed			-1.897	472.701	.058	-5.8231	3.0689	-11.8534	.2073

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นาย ศุภชัย ฤทธิ์เจริญวัฒน์ เกิดเมื่อวันที่ 11 มีนาคม พ.ศ. 2520 ที่จังหวัดมหาสารคาม สำเร็จการศึกษาปริญญาวิศวกรรมศาสตรบัณฑิต สาขา วิศวกรรมไฟฟ้าสื่อสาร ภาควิชา วิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2540 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิศวกรรมศาสตรมหาบัณฑิต ภาควิชา วิศวกรรมไฟฟ้า คณะวิศวกรรมศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2541



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย