บทที่ 4
ผลการทดลอง

1. การศึกษากราฟมาตรฐานเพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์กับค่าการดูดกลืนแสง

จากการวัดค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย MTT กับเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase ที่ความยาวคลื่นแสง 570 นาโนเมตร และนำค่าที่ได้มาหาความสัมพันธ์เพื่อสร้างเป็นกราฟมาตรฐาน ผลการศึกษาในกลุ่มตัวอย่าง 4 กลุ่ม พบว่าจำนวนเซลล์กับค่าการดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์กันเป็นกราฟเส้นตรงมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์ (correlation coefficient หรือ r) ของกลุ่มที่ 1, 2, 3 และ 4 เท่ากับ 0.994, 0.993, 0.995 และ 0.996 ตามลำดับ (ภาคผนวก หน้า 72 ถึง 75) และเมื่อนำค่าเฉลี่ยของค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละความหนาแน่นของเซลล์ของทุกกลุ่มตัวอย่างมาหาความสัมพันธ์ พบว่ามีความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรงเช่นเดียวกัน โดยมีค่าสัมประสิทธิ์สหสัมพันธ์เท่ากับ 0.994 (ภาคผนวก หน้า 76)

2. การศึกษาผลของแคปไซซินที่ระดับความเข้มข้นและระยะเวลาที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่แตกต่างกันต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์

การศึกษาในหัวข้อนี้แบ่งออกเป็น 2 ส่วน ได้แก่ การศึกษาผลของแคปไซซินต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ด้วย MTT assay และการศึกษาผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

2.1 ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์เมื่อศึกษาด้วย MTT assay

การศึกษาจำนวนเซลล์ด้วย MTT assay เป็นการวัดจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตทางอ้อมโดยใช้ค่าการดูดกลืนแสงของสารละลายที่ได้จากการทำปฏิกิริยาของสารละลาย MTT กับเอนไซม์ mitochondrial dehydrogenase จากผลการทดลองในหัวข้อ 1 พบว่าจำนวนเซลล์และค่าการดูดกลืนแสงมีความสัมพันธ์เป็นกราฟเส้นตรง ดังนั้นจึงสามารถนำค่าการดูดกลืนแสงมาใช้เปรียบเทียบแทนจำนวนเซลล์โดยตรงได้ โดยคำนวณหาร้อยละของจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมได้จากสูตรที่กล่าวไว้ในบทที่ 3 หัวข้อ 5.3 กำหนดให้ค่าการดูดซับแสงในกลุ่มควบคุมเป็นร้อยละ 100

ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตจะลดลงตามความเข้มข้นที่มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ความเข้มข้นของแคปไซซินที่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ เซลล์ที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.003, 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 ซึ่งมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ร้อยละ 89.6±1.6, 72.7±2.0, 59.5±2.7, 47.4±1.9, 20.1±1.5 และ 19.4±0.8 ตามลำดับ ในขณะที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยพบว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตร้อยละ 98.3± 1.4 (ภาคผนวก หน้า 77 และภาพที่ 3A ซึ่งเป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละความเข้มข้น)

ผลการศึกษาที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง ได้ผลคล้ายกับที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง คือ ความเข้มข้นของแคปไซซินที่มีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) ได้แก่ ร้อยละ 0.003, 0.004, 0.006, 0.010, 0.20 และร้อยละ 0.03 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่คิดเป็นร้อยละ 87.4±2.9, 62.5±2.2, 46.2±2.6, 41.2±0.9, 16.0±0.8 และ 15.7±1.1 ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) โดยพบว่ามีเซลล์ที่มีชีวิตร้อยละ 98.3±0.5 (ภาคผนวก หน้า 78 และภาพที่ 3B เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละความเข้มข้น)

ผลการศึกษาที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง และ 48 ชั่วโมง คล้ายกับที่ระยะเวลา 6 และ 12 ชั่วโมง คือมีเพียงความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ที่ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ส่วนความเข้มข้นอื่น ๆ ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาคผนวก หน้า 79, 80 และภาพที่ 3C, D เป็นกราฟแสดงความสัมพันธ์ระหว่างร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละความเข้มข้น)

ผลการศึกษาที่ระยะเวลา 72, 96 และ 120 ชั่วโมง พบว่าทุกความเข้มข้นของแคปไซซินที่ทดสอบมีผลทำให้ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาคผนวก หน้า 81 ถึง 83 และภาพที่ 3E ถึง G เป็นกราฟแสดงร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมของแต่ละความเข้มข้น)

หอสมุดกลาง ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผลการศึกษาเปรียบเทียบปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมสรุปได้ว่าที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงแรก มีเพียงกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินร้อยละ 0.002 เพียงกลุ่มเดียวที่ปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตไม่แตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) แต่ตั้งแต่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป กลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินทุกกลุ่มมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาพที่ 4)

นอกจากการเปรียบเทียบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตระหว่างกลุ่มทดสอบด้วยแคปไซซินกับกลุ่มควบคุมแล้ว ในการศึกษานี้ยังเปรียบเทียบการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ของแต่ละกลุ่มโดยไม่เทียบเป็นร้อยละกับกลุ่มควบคุม เพื่อดูการเปลี่ยนแปลงจำนวนเซลล์ในแต่ละช่วงเวลาคือตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 120 ชั่วโมง ว่ามีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไรเมื่อเทียบกับจุดเริ่มต้น ผลการทดลองพบว่าในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.002 และ 0.003 จำนวนเซลล์ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง มีจำนวนเพิ่มขึ้นแตกต่างจากเมื่อเริ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาคผนวก หน้า 84 ถึง 86) แต่กลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 พบว่า ที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง จำนวนเซลล์ลดลงแตกต่างจากเมื่อเริ่มทดลองอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) (ภาคผนวก หน้า 87 ถึง 91) เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงและระยะเวลามาสร้างกราฟเพื่อดูการเปลี่ยนแปลงอย่างต่อเนื่อง พบว่าในกลุ่มควบคุมจำนวนเซลล์มีการเพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่องทุกช่วงเวลาตั้งแต่เริ่มต้นจนถึง 120 ชั่วโมง เช่นเดียวกับกลุ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.002 ซึ่งมีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกันโดยเฉพาะในช่วง 48 ชั่วโมงแรก จะมีลักษณะใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมงขึ้นไป การเพิ่มของจำนวนเซลล์ก็ยังคงเพิ่มอย่างต่อเนื่อง แต่เพิ่มขึ้นในอัตราที่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม สำหรับกลุ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.020 และ 0.030 พบว่าจำนวนเซลล์ลดลงอย่างมาก ตั้งแต่ 6 ชั่วโมงแรก (ภาพที่ 5)

2.2 ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับ

ผลการทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าการเสื่อมของเซลล์จะสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแคปไซซิน (ภาพที่ 6) จะเห็นว่าในกลุ่มควบคุมเซลล์จะมีรูปร่างเป็นรูปกระสวย (spindle) มีการแผ่ตัวและยึดเกาะบนจานเพาะเลี้ยงได้ (ภาพที่ 6A) และที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003, 0.004, 0.006 และร้อยละ 0.010 พบว่าเซลล์ยังคงมีลักษณะคล้ายกับในกลุ่มควบคุม (ภาพที่ 6B ถึง F) ตามลำดับ แต่ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.020 และ 0.030 พบว่าลักษณะ

เซลล์จะแตกต่างจากกลุ่มที่กล่าวมาแล้ว โดยพบว่าเซลล์มีลักษณะกลม ไม่แผ่ตัวและไม่มีการยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยง (ภาพที่ 6G, H)

ผลการทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าการเสื่อมของเซลล์ยังคงสัมพันธ์กับความเข้มข้นของแคปไซซิน โดยในกลุ่มควบคุม กลุ่มที่ทดสอบด้วยความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003, 0.004 และร้อยละ 0.006 เซลล์มีรูปร่างเป็นรูปกระสวย มีการแผ่ตัวดี (ภาพที่ 7A ถึง E) ตามลำดับ แต่ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.010 พบว่าเซลล์บางส่วนมีลักษณะกลม ไม่แผ่ตัวแต่ยังมีเซลล์บางส่วนที่ยังมีรูปร่างเป็นรูปกระสวย แต่ลักษณะการแผ่ตัวน้อยกว่าที่พบในกลุ่มควบคุม และเซลล์ในแคปไซซินที่ความเข้มข้นต่ำกว่า (ภาพที่ 7F) และที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.020 และ 0.030 พบว่าเซลล์มีลักษณะกลมทั้งหมด (ภาพที่ 7G, H)

การทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง ลักษณะเซลล์จะคล้ายกับที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมง ยกเว้นที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.010 เซลล์จะมีลักษณะกลมเกือบทั้งหมดซึ่งต่างจากที่ระยะเวลา 24 ชั่วโมงซึ่งยังมีเซลล์บางส่วนที่มีรูปร่างเป็นรูปกระสวยอยู่ (ภาพที่ 8 A ถึง F)

การทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง พบว่ากลุ่มควบคุม และกลุ่มความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003, 0.004 เซลล์ยังมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยมีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี (ภาพที่ 9A ถึง D) ในขณะที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.006 เซลล์ยังมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยแต่จะพบว่า plasma membrane มีลักษณะไม่ต่อเนื่อง (ภาพที่ 9E) และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.010, 0.020 และ 0.030 เซลล์ทั้งหมดมีลักษณะกลมและไม่มีการยึดเกาะกับพื้นผิวจานเพาะเลี้ยงเซลล์ (ภาพที่ 9F ถึง H)

การทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 96 ชั่วโมง ในกลุ่มควบคุมเซลล์ยังคงมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยแผ่ตัวและมีการยึดเกาะที่ดี นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มีความหนาแน่นมากกว่าที่ระยะเวลา 6, 24, 48, และ72 ชั่วโมง (ภาพที่ 10A) ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002, 0.003 และ 0.004 พบว่าเซลล์ยังคงมีรูปร่างกระสวยและมีการยึดเกาะที่ดี แต่ความหนาแน่นของเซลล์น้อยกว่ากลุ่มควบคุม โดยความหนาแน่นของเซลล์ที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 > 0.003 > 0.004 (ภาพที่ 10B ถึง D) สำหรับที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.006 เมื่อเทียบกับที่ระยะเวลา 72 ชั่วโมง จะพบว่า plasma membrane ของเซลล์มีความเสื่อมสภาพมากขึ้น และถูกทำลายเกือบหมด (ภาพที่ 10E) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.010, 0.020 และ 0.030 เซลล์มีลักษณะกลมทั้งหมดและไม่มีการยึดเกาะ (ภาพที่ 10F ถึง H)

การทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 120 ชั่วโมง พบว่าเซลล์ในกลุ่มควบคุมมีความหนาแน่นมากขึ้น และยังคงมีรูปร่างเป็นรูปกระสวย มีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี (ภาพที่ 11A) ที่ระดับความเข้มข้นร้อยละ 0.002 และร้อยละ 0.003 เซลล์ยังคงมีรูปร่างเป็นรูปกระสวยและมีความหนาแน่นเพิ่มขึ้นแต่น้อยกว่ากลุ่มควบคุม (ภาพที่ 11B, C) ในขณะที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.004 เริ่มพบเซลล์ที่มีลักษณะกลมปะปนอยู่กับเซลล์รูปร่างกระสวย (ภาพที่ 11D) และที่ความเข้มข้นร้อยละ 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 เซลล์ทั้งหมดจะมีลักษณะกลมและมีจำนวนน้อยลง (ภาพที่ 11E ถึง H)

สรุปผลการศึกษาการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์ด้วยกล้องจุลทรรศน์เฟสคอนทราสต์ชนิดหัวกลับพบว่าการตายของเซลล์สัมพันธ์กับความเข้มข้นและระยะเวลาที่สัมผัสกับแคปไซซิน โดยพบว่าที่ความเข้มข้นต่ำคือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.002 และ 0.003 เซลล์มีรูปร่างปกติเหมือนกลุ่มควบคุม แต่ที่ความเข้มข้นสูงขึ้นคือ ความเข้มข้นร้อยละ 0.004, 0.006, 0.010, 0.020 และ 0.030 พบว่าเซลล์มีการตาย เช่น เซลล์มีลักษณะกลมและหลุดลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ไม่ยึดเกาะกับจานเพาะเลี้ยงเซลล์

2.3 ผลของแคปไซซินต่อการเปลี่ยนแปลงลักษณะของเซลล์เมื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด

จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราดที่กำลังขยายต่ำ (100 เท่า) เพื่อดูลักษณะการยึดเกาะของเซลล์และความหนาแน่นของเซลล์ที่ยึดเกาะ พบว่าในกลุ่มควบคุมเซลล์มีการแผ่ตัวและยึดเกาะดี นอกจากนี้จำนวนเซลล์ที่พบมีความหนาแน่นมาก (ภาพที่ 12A) ในขณะที่กลุ่มทดสอบด้วยแคปไซซินร้อยละ 0.020 ที่ระยะเวลา 2, 3 และ 6 ชั่วโมง พบว่าการยึดเกาะของเซลล์ลดลง เซลล์มีการแผ่ตัวน้อยลง และความหนาแน่นของจำนวนเซลล์ที่ยึดเกาะน้อยลงเมื่อระยะเวลาที่ใช้ทดสอบนานขึ้น (ภาพที่ 12B ถึง D ตามลำดับ)

เมื่อศึกษาด้วยกำลังขยายสูงขึ้น ในกลุ่มควบคุมพบว่าเซลล์มีการยึดเกาะดี มีการแผ่ตัวดี พบ cytoplasmic processes อันได้แก่ cytoplasmic extensions (หัวลูกศรชี้ในภาพที่ 13A) และ lamellopodia (ลูกศรชี้ในภาพที่ 13B) plasma membrane มีลักษณะเรียบโดยทั่วไป แต่บางตำแหน่งพบ microvilli ได้บ้าง (หัวลูกศรชี้ในภาพที่ 13B) ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซินที่ระยะเวลา 2 ชั่วโมง พบว่าการยึดเกาะของเซลล์ไม่ค่อยดี เซลล์แผ่ตัวน้อยลง (ภาพที่ 14A) ยังคงพบ cytoplasmic extensions ได้บ้าง plasma membrane ไม่ค่อยเรียบ (ภาพที่ 14B ถึง D) มี bleb เกิดขึ้นมาก

(หัวลูกศรชี้ในภาพที่ 14B) ซึ่ง bleb ในบางตำแหน่งมีขนาดใหญ่ (หัวลูกศรชี้ในภาพที่ 14C) และอาจมีการแตกของ bleb ได้ (หัวลูกศรชี้ในภาพที่ 14D) กลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซิน 3 ชั่วโมง พบว่าการยึดเกาะของเซลล์ไม่ดี เซลล์เป็นรูปกลมขึ้น และบางครั้งพบว่า cytoplasmic extension ขาดและหลุดออกจากตัวเซลล์ (หัวลูกศรชี้ในภาพที่ 15A) ซึ่งอาจเกิดจากการถดถอยของ cytoplasm ในขณะที่การยึดเกาะของเซลล์ลดลง หรือเกิดจากการเตรียมตัวอย่างเพื่อการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนชนิดส่องกราด นอกจากนั้น plasma membrane มีการหลุดลอกและมีรูเกิดขึ้นโดยทั่วไป (ภาพที่ 15B) ยังคงพบ bleb อยู่ทั่วไปที่ plasma membrane (ภาพที่ 15C หัวลูกศรชี้ bleb ขนาดใหญ่) ในกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซิน 6 ชั่วโมง (ภาพที่ 16) มีลักษณะคล้ายกับกลุ่มที่ทดสอบด้วยแคปไซซิน 3 ชั่วโมง แต่ความผิดปกติรุนแรงกว่า ผลการศึกษาสรุปได้ว่าแคปไซซินในขนาดความเข้มข้นที่เป็นอันตรายต่อเซลล์มีผลต่อการยึดเกาะของเซลล์ รวมทั้ง plasma membrane ของเซลล์โดยพบว่าทำให้เกิด bleb และรูที่ plasma membrane