

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ	ค
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฌ
สารบัญภาพ	ญ
อักษรย่อและสัญลักษณ์	ณ
บทที่ 1 บทนำ	1
บทที่ 2 ทบทวนเอกสาร	4
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการวิจัย	15
บทที่ 4 ผลการทดลอง	30
บทที่ 5 อภิปรายผลการทดลอง	62
บทที่ 6 การจัดทำสื่อการสอน	71
บทที่ 7 สรุปผลการวิจัย	79
เอกสารอ้างอิง	82
ภาคผนวก	86
ภาคผนวก ก อุปกรณ์และสารเคมี	87
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมี	90
ภาคผนวก ค เทคนิคในการวิจัยและคำนวณ	91
ภาคผนวก ง ข้อมูลในการทดลอง	94
ประวัติผู้เขียน	108

สารบัญตาราง

ตาราง	หน้า
4.1 ความต่างทางสถิติของข้อมูลที่เก็บโดยวิธีการนับด้วยมือกับข้อมูลที่ได้จาก flow cytometry	57
4.2 ร้อยละการตายแบบอะพอโทซิสของเซลล์สามเชื้อสายในสภาวะต่างๆ	59
4.3 ครรชนิการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์สามเชื้อสายในสภาวะต่างๆ	61

สารบัญภาพ

ภาพ	หน้า
2.1 โครงสร้างของ cisplatin	7
2.2 ระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์	8
2.3 การตายของเซลล์	11
2.4 เครื่อง Flow Cytometry	13
4.1 ลักษณะเซลล์ HeLa (A) มีชีวิตในสถานะเกาะ (B) ในสถานะเกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (C) มีชีวิตหลังจาก trypsinization (D) หลังจาก trypsinization และย้อมด้วยสี aceto-orcein	32
4.2 ลักษณะเซลล์ A549 (A) มีชีวิตในสถานะเกาะ (B) ในสถานะเกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (C) มีชีวิตหลังจาก trypsinization (D) หลังจาก trypsinization และย้อมด้วยสี aceto-orcein	33
4.3 ลักษณะเซลล์ NCI-H1299 (A) มีชีวิตในสถานะเกาะ (B) ในสถานะเกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (C) มีชีวิตหลังจาก Trypsinization (D) หลังจาก trypsinization และย้อมด้วยสี aceto-orcein	34
4.4 เซลล์ HeLa ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะ เป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของ นิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่าง ในตาราง(B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมา จำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์	38

- 4.5 เซลล์ HeLa ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะลอย 39
- (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียสดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์
- 4.6 เซลล์ A549 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะ 40
- เซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง(B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียสดังแสดงในกราฟ(C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์
- 4.7 เซลล์ A549 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะ 41
- ลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียสดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

- 4.8 เซลล์ NCI-H1299 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์ โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์ 42
- 4.9 เซลล์ NCI-H1299 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้ว จากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์ 43
- 4.10 เซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์ 47

- 4.11 เซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะลอย 48
(A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็น
นิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อ
วัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของ
นิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ดังแสดง
ตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณ
แล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส
ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์
- 4.12 เซลล์ A549 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเป็น 49
เซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein
ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์
เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่
ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดง
ตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณ
แล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส
ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์
- 4.13 เซลล์ A549 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะลอย 50
(A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็น
นิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัด
ขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียส
ตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง
(B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนก
จำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C)
ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวน

- 4.14 เซลล์ NCI-H1299 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะ
เป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein
ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์
เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่
ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดัง
แสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดย
ประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของ
นิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟ
คือจำนวนเซลล์ 51
- 4.15 เซลล์ NCI-H1299 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะ
ลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็น
นิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์
เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณ
พื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้
ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์
โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่
ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่ง
กราฟคือจำนวนเซลล์ 52
- 4.16 เซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติทั้ง 3 เชื้อสาย แสดงค่าเฉลี่ย
ของร้อยละการกระจายในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์และ
เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis (A) ทั้งในสถานะเกาะและสถานะลอย 55
- 4.17 เซลล์ที่ได้รับ cisplatin ระยะเวลา 72 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ย
ของร้อยละการกระจายในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์และ
เซลล์ที่ตายแบบ apoptosis ของเซลล์มะเร็ง 3 เชื้อสาย
ทั้งในสภาวะเกาะและสภาวะลอย 56
- 4.18 การตายแบบอะพอโทซิส ในเซลล์มะเร็งสามเชื้อสาย
(A) เซลล์ HeLa (B) เซลล์ A549 (C) เซลล์ NCI-H1299 58
- 4.19 เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และเซลล์ NCI-H1299
ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะโพรเฟส โดยลักษณะ
โครโมโซมหดตัวมากขึ้นเห็นเป็นเส้นๆ ชัดเจน 60

4. 20	เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และเซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะเมทาเฟส โดยลักษณะ สำคัญของระยะนี้คือโครโมโซมหดตัวสั้นหนาตัวมาก และโครโมโซมมาเรียงตัวกันตรงกลางของเซลล์	60
4. 21	เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และ เซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะแอนาเฟส โครโมโซม ถูกดึงแยกออกจากกันไปยังคนละขั้วของเซลล์	60
4. 22	เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และ เซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะเทโลเฟส โครโมโซมอยู่ ที่ขั้วของเซลล์แต่ละขั้วและเริ่มคลายตัวตอนท้ายของ ระยะนี้จะการคอดเว้าของเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อแบ่ง ออกเป็น 2 เซลล์	60
6.1	ระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์	71
6.2	เซลล์ HeLa แสดงรูปร่างลักษณะและขนาดนิวเคลียส มีหน่วยเป็น μm^2 รูป A, B, C เซลล์อยู่ในระยะ G1 รูป D, E, F อยู่ในระยะ S รูป G, H, I อยู่ในระยะ G2 (ถ่ายที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 28.6 เท่า)	73
6.3	เซลล์ A549 แสดงรูปร่างลักษณะและขนาดนิวเคลียส มีหน่วย μm^2 รูป A, B, C เซลล์อยู่ในระยะ G1 รูป D, E, F อยู่ในระยะ S รูป G, H, I อยู่ในระยะ G2 (ถ่ายที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 28.6 เท่า)	74
6.4	เซลล์ NCI-H1299 แสดงรูปร่างลักษณะและขนาด นิวเคลียสมีหน่วยเป็น μm^2 รูป A, B, C เซลล์อยู่ใน ระยะ G1 รูป D, E อยู่ในระยะ S รูป F, G, H อยู่ในระยะ G2 (ถ่ายที่กำลังขยายของกล้องจุลทรรศน์ 28.6 เท่า)	75

อักษรย่อ และสัญลักษณ์

°C	องศาเซลเซียส
Cell/ μ l	เซลล์ต่อไมโครลิตร
Cm ²	ตารางเซนติเมตร
CO ₂	คาร์บอนไดออกไซด์
DMEM	Dulbecco's modified Minimum Essential Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EDTA	ethylenediaminetetraacetic acid
FBS	fetal bovine serum
HAM-12	Nutrient Mixture F-12
IC	inhibition concentration
ml	มิลลิลิตร
NCI-H1299	non-small cell lung carcinoma cell lines
RPMI 1640	roswell park memorial institute medium
PBS	phosphate buffer saline
μ g/ml	ไมโครกรัมต่อไมโครลิตร
μ m ²	ตารางไมโครเมตร
μ l	ไมโครลิตร