

ผลการทดลอง

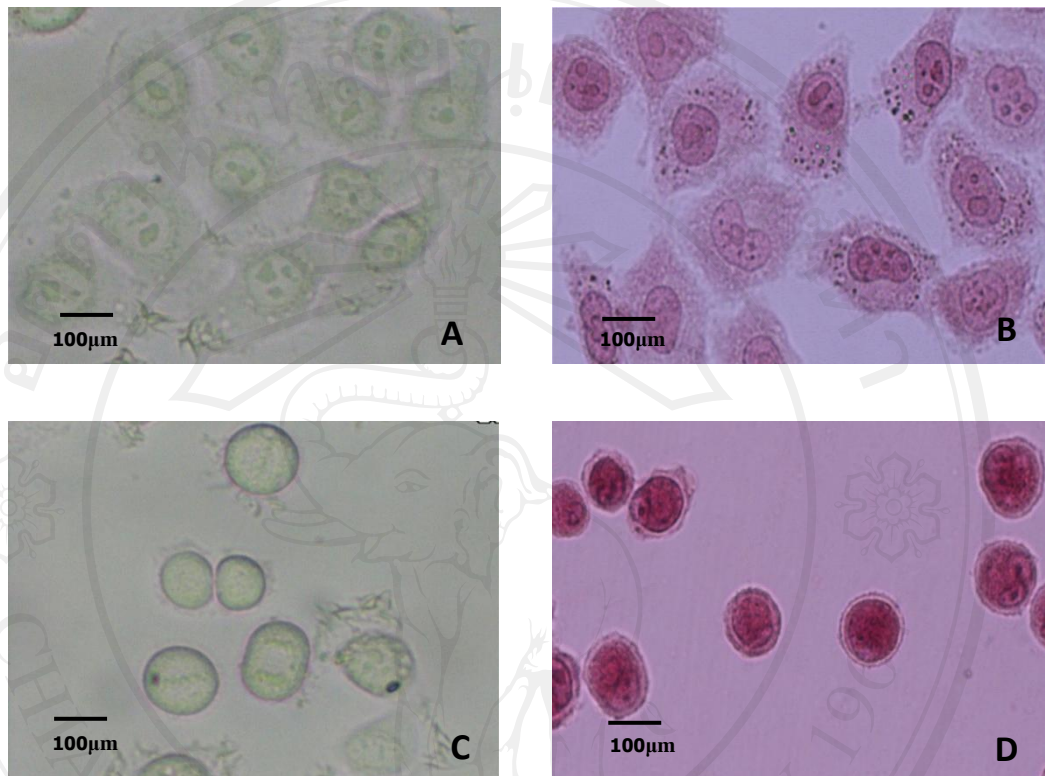
4.1 ผลการศึกษาพื้นฐานวิทยาของเซลล์

จากการทดลองที่ 3.1 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์เชื้อสาย 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก HeLa เซลล์เชื้อสายมะเร็งปอด A-549 และ NCI-H1299 ที่สภาวะมาตรฐาน ทำการย้อมสีแล้วถ่ายภาพเพื่อนำมาศึกษาพื้นฐานวิทยาของเซลล์พบว่าแต่ละเซลล์เชื้อสายมีลักษณะที่ปรากฏแตกต่างกัน

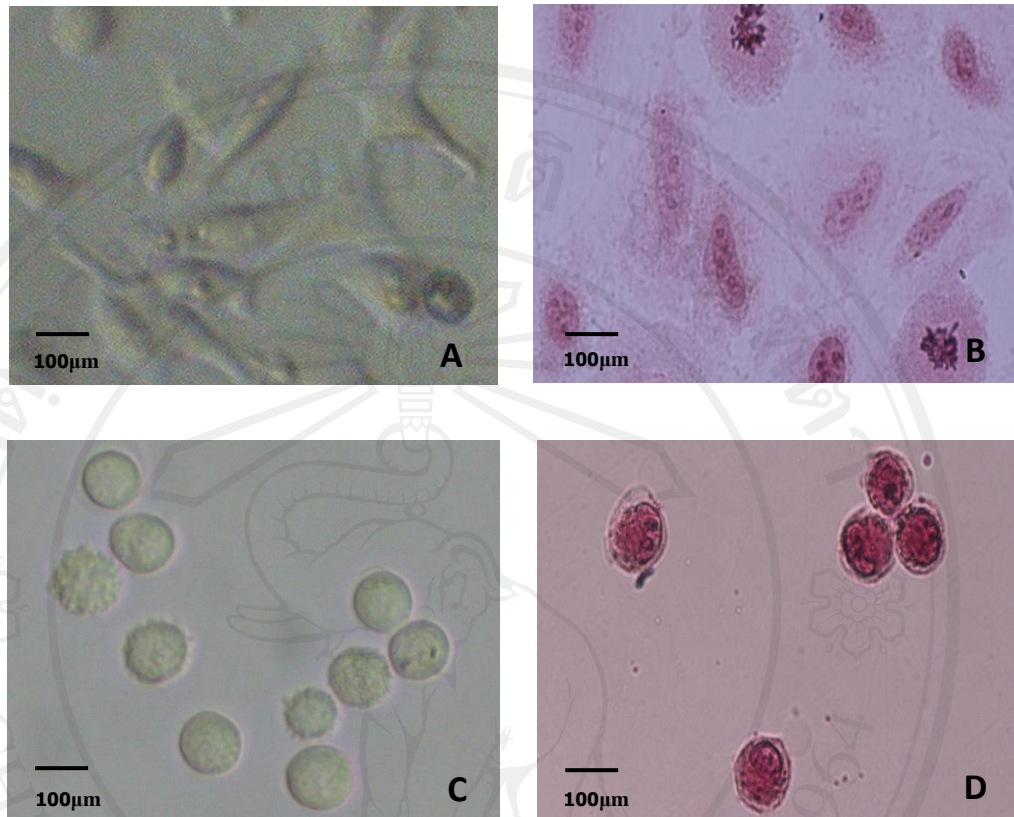
จากภาพ 4.1A และ B ซึ่งเป็นเซลล์ที่เกาะกับ cover slips จะเห็นได้ว่าเซลล์ HeLa ในสภาพเลี้ยงลักษณะเป็นเซลล์แบบเกาะชั้นเดียว (monolayer) มีรูปร่างแบบ epithelial-like คือเซลล์แบนราบแนบไปกับพื้นผิววัสดุที่ใช้เลี้ยง (ซึ่งอาจเป็น cover slips ขวดเลี้ยงหรือจานเลี้ยง) เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายสูงจะเห็นเซลล์ที่มีชีวิต (ภาพ 4.1A) มีลักษณะใส สามารถปรับระยะชัด (focus) ให้เห็นนิวเคลียส (nucleus) ที่อยู่ภายในได้ชัดเจน และภายในนิวเคลียสยังสามารถมองเห็นนิวคลีโอลัส (nucleolus) 1-2 อันหรือมากกว่า โดยนิวคลีโอลัสที่มีจำนวนน้อยจะมีขนาดใหญ่กว่าที่มีจำนวนมาก สำหรับเซลล์ที่มีชีวิตนี้ ขอบเขตของไซโทพลาสซึมเห็นไม่ค่อยชัดเจนนักเนื่องจากความแบนราบของการเกาะ แต่เมื่อนำเซลล์มาย้อมสี aceto-orcein (ภาพ 4.1B) จึงเห็นขอบเขตของไซโทพลาสซึมได้ชัดเจนขึ้น และปรากฏว่าเซลล์มีรูปร่างหลายเหลี่ยมแบน (squamous) ภายในติดสีแดงเข้มของนิวเคลียสชัดเจน รูปร่างมีตั้งแต่กลมไปถึงรีและรูปเมล็ดถั่ว (bean shape) ถ้าหากเป็นเซลล์มีชีวิตที่อยู่ในสถานะลอยหลังจาก trypsinization (ภาพ 4.1C) สังเกตลักษณะของเซลล์จะเห็นได้ว่าเซลล์มีรูปร่างค่อนข้างเป็นทรงกลม เห็นขอบเขตเซลล์ได้ชัดเจน แต่มองเห็นนิวเคลียสได้ไม่ชัดเจนนัก เมื่อทำการย้อมด้วยสี aceto-orcein ทำให้เห็นเซลล์ได้ชัดเจนขึ้น (ภาพ 4.1D) คือเซลล์จะมีรูปร่างได้หลายแบบ เช่น กลมรี และบางเซลล์มีรูปร่างคล้ายหยดน้ำ โดยทั่วไปจะมีขนาดเล็กกว่าเซลล์ที่อยู่ในสถานะยึดเกาะ ในส่วนของนิวเคลียสพบว่าบางเซลล์มีมากกว่า 1 นิวเคลียส และมีหลายรูปร่าง ส่วนใหญ่กลมหรือรี (มีน้อยมากที่เป็นรูปถั่ว) และมีขนาดเล็กกว่าในสถานะยึดเกาะโดยสามารถเห็นนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ลักษณะเซลล์ที่สังเกตนี้ เห็นได้ชัดว่ามีการแบนราบบริเวณขอบเซลล์ และนูนสูงขึ้นบริเวณตรงกลางซึ่งมีนิวเคลียสอยู่เป็นลักษณะของเซลล์เกาะโดยทั่วไป

เซลล์ A549 ในสภาพสด (ภาพ 4.2A) เป็นเซลล์แบบเกาะชั้นเดียว มีรูปร่างเป็น fibroblast-like คือเซลล์มีลักษณะค่อนข้างแหลมหัวแหลมท้าย และบางเซลล์มีลักษณะคล้ายดาว แต่เนื่องจากการเกาะของเซลล์ในลักษณะที่แบนราบกับพื้นผิววัสดุ ทำให้มองเห็นขอบเขตเซลล์ ไซโทพลาสซึม และนิวเคลียสไม่ชัดเจนนัก แต่หลังจากทำการย้อมสี aceto-orcein (ภาพ 4.2B) สามารถมองเห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจน มีพื้นที่ของไซโทพลาสซึมมากและนิวเคลียสที่ติดสีแดง มีรูปร่างลักษณะยาวรี และภายในมีนิวคลีโอลัสอยู่ 1-3 อัน (หรือมากกว่า) นอกจากนั้นยังพบเห็นการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส (mitosis) ในระยะต่างๆ เมื่อทำการ trypsinization ให้เซลล์อยู่ในสถานะลอย (ภาพ 4.2C) จะเห็นเซลล์มีรูปร่างกลมและเห็นขอบเขตของเซลล์ชัดเจน แต่ไม่สามารถจำแนกไซโทพลาสซึมแยกออกจากนิวเคลียสและนิวคลีโอลัสที่อยู่ภายในได้ ต่อเมื่อนำมาย้อมสี aceto-orcein (ภาพ 4.2D) ทำให้สามารถมองเห็นขอบเขตของนิวเคลียสได้ชัดเจน มีรูปร่างกลม หรือรีและภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัสติดสีแดงเข้มชัดเจน แต่มีขนาดของนิวเคลียสที่กลมกว่าสถานะเกาะ และมีพื้นที่ของไซโทพลาสซึมที่น้อยกว่า

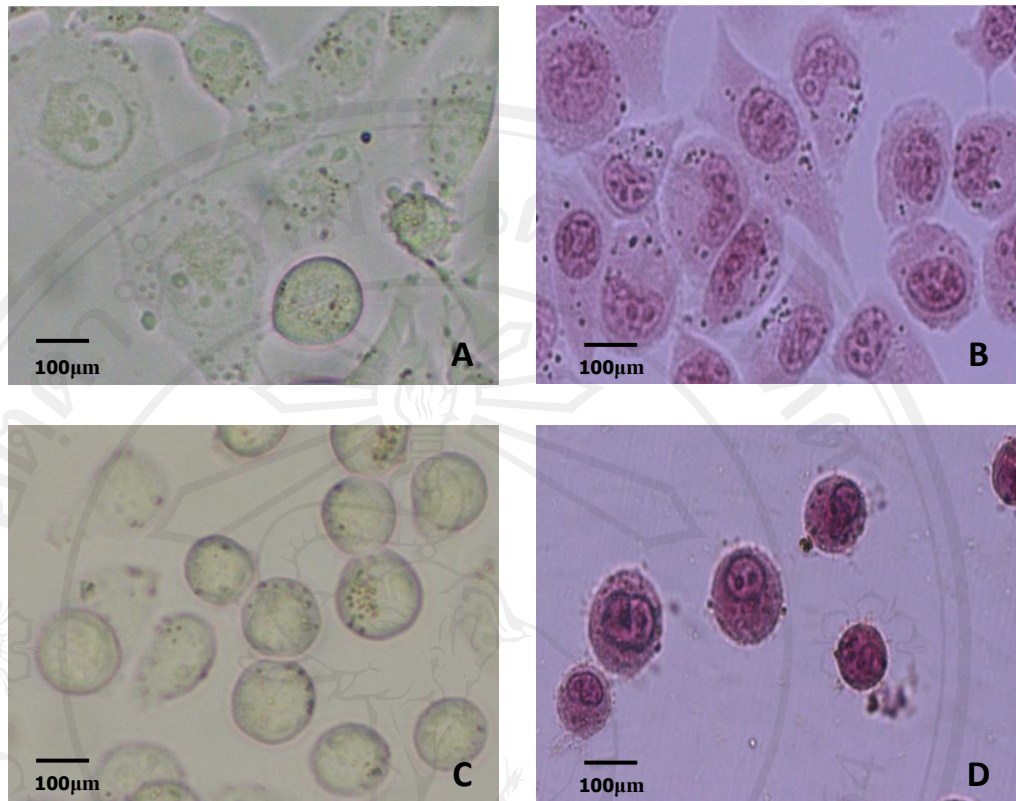
ลักษณะฐานานวิทยาของเซลล์ NCI-H1299 ซึ่งเป็นเซลล์มีชีวิตในสถานะเกาะ (ภาพ 4.3A) เป็นเซลล์แบบเกาะชั้นเดียว มีรูปร่างแบบ epithelial-like เช่นเดียวกับเซลล์ HeLa และพบว่าไม่สามารถระบุขอบเขตของเซลล์และไซโทพลาสซึมได้ชัดเจนนัก แต่ขอบเขตของนิวเคลียสสามารถมองเห็นได้บ้าง จำนวนนิวคลีโอลัสมีหลายอันเมื่อทำการย้อมเซลล์ด้วยสี aceto-orcein (ภาพ 4.3B) จะมองเห็นขอบเขตเซลล์และไซโทพลาสซึมได้ชัดเจน รูปร่างเซลล์นั้นมีทั้ง กลม รี เหลี่ยม และหยดน้ำค้าง ส่วนของนิวเคลียสมีรูปร่างหลายแบบทั้งแบบกลม รี และคล้ายเมล็ดถั่ว นิวคลีโอลัสติดสีเข้มเห็นชัด เมื่อสังเกตเซลล์มีชีวิตในสถานะลอยหลังการทำ trypsinization (ภาพ 4.3C) ระบุได้เพียงว่า เซลล์มีรูปร่างกลมเท่านั้น ไม่สามารถมองเห็นรายละเอียดอื่นได้ จนกระทั่งทำการย้อมเซลล์ด้วยสี aceto-orcein (ภาพ 4.3D) ทำให้มองเห็นขอบเขตนิวเคลียสได้ชัดเจน โดยรูปร่างของเซลล์นั้นมีเฉพาะกลมหรือรี ขนาดต่างๆ กันไม่หลากหลายเหมือนเซลล์ที่อยู่ในสถานะเกาะ แต่มีรูปร่างของนิวเคลียสลักษณะกลมเช่นเดียวกันแต่ขนาดจะเล็กกว่า



ภาพ 4.1 ลักษณะเซลล์ HeLa (A) มีชีวิตในสถานะเกาะ (B) ในสถานะเกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (C) มีชีวิตหลังจาก trypsinization (D) หลังจาก trypsinization และย้อมด้วยสี aceto-orcein



ภาพ 4.2 ลักษณะเซลล์ A549 (A) มีชีวิตในสถานะเกาะ (B) ในสถานะเกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (C) มีชีวิตหลังจาก trypsinization (D) หลังจาก trypsinization และย้อมด้วยสี aceto-orcein



ภาพ 4.3 ลักษณะเซลล์ NCI-H1299 (A) มีชีวิตในสถานะเกาะ (B) ในสถานะเกาะที่ย้อมด้วยสี aceto-orcein (C) มีชีวิตหลังจาก trypsinization (D) หลังจาก trypsinization และย้อมด้วยสี aceto-orcein

4.2 ผลการศึกษาวัฏจักรเซลล์ในสถานะปกติ

จากการทดลองในข้อ 3.2.1 เมื่อถ่ายภาพเซลล์แต่ละเชื้อสายแล้วนำภาพมาทำการติดหมายเลขเซลล์ วัดขนาดนิวเคลียส จากนั้นนำข้อมูลที่ได้มาวิเคราะห์ตามข้อ 3.2.2 เพื่อจำแนกเซลล์ให้อยู่ในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์โดยเทียบกับข้อมูลที่ได้จากวิธี flow cytometry ทำให้ได้กราฟการกระจายของจำนวนเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส ซึ่งในส่วนของผลการทดลองนี้ จะแสดงข้อมูล ดังนี้ (1) ตัวอย่างภาพถ่ายเซลล์ที่มีการติดหมายเลข (2) ตัวอย่างข้อมูลขนาดเซลล์ที่มีการวัดและคำนวณ (ข้อมูลทั้งหมดอยู่ในภาคผนวก ง) โดยข้อมูลทั้งสองส่วนมีความสัมพันธ์กัน และ (3) กราฟการกระจายของจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆ ตามพื้นที่นิวเคลียส (แสดงเพียงซ้ำเดียว อีกสองซ้ำอยู่ในภาคผนวก ง)

สำหรับเซลล์ HeLa (ภาพ 4.4(A)) เมื่อนำภาพเซลล์มาทำการติดหมายเลขให้แต่ละเซลล์แล้ว จากนั้นทำการวัดความกว้างและความยาวของนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ แล้วจึงนำมาคำนวณหาพื้นที่ตามลำดับ (ภาพ 4.4 ตาราง(B)) ซึ่งเมื่อพิจารณาภาพและข้อมูลในตารางจะมีความสัมพันธ์กันโดย เรียงลำดับ จนครบจำนวนที่ได้ให้หมายเลขไว้ เมื่อคำนวณพื้นที่เสร็จสิ้นจะทำให้ทราบพื้นที่ของนิวเคลียสในแต่ละเซลล์ จากนั้นนำมาทำการแจกแจงการกระจายของจำนวนเซลล์ตามพื้นที่ของนิวเคลียส (ภาพ 4.4(C)) โดยให้แกน X คือพื้นที่ของนิวเคลียส (μm^2) และแกน y คือจำนวนเซลล์ ในส่วนของพื้นที่นิวเคลียสนั้นได้จัดเรียงลำดับจากน้อยไปหามาก ตั้งแต่ขนาด $24.48\text{-}398.94 \mu\text{m}^2$ ซึ่งในแต่ละพื้นที่จะมีการกระจายของจำนวนเซลล์ไม่เท่ากัน โดยถ้าพิจารณาจากความสูงของกราฟแต่ละแท่ง พบว่าเซลล์ที่มีพื้นที่นิวเคลียสขนาด $60.45 \mu\text{m}^2$ มีจำนวนมากที่สุดคือ 52 เซลล์ และขนาดที่รองลงมาคือ $90.67 \mu\text{m}^2$ ที่มีจำนวนเซลล์ 51 เซลล์ และพื้นที่นิวเคลียสที่มีจำนวนเซลล์น้อยที่สุดนั่นคือ 1 เซลล์ มีอยู่กระจัดกระจายโดยทั่วของกราฟ และพบว่าเซลล์ที่มีจำนวนมากกว่า 40 เซลล์ขึ้นไป จะกระจายอยู่บริเวณช่วงกลางของกราฟ ในช่วงหัวกับท้ายนั้นพบว่าพื้นที่นิวเคลียสในแต่ละแท่งตั้งแต่ $148.09 \mu\text{m}^2$ มีเซลล์กระจายอยู่เป็นจำนวนน้อยคือ 1- 5 เซลล์ จากนั้นทำการแบ่งการกระจายของเซลล์ออกเป็นระยะ G1, S และ G2 ตามวัฏจักรของเซลล์ โดยอ้างอิงเทียบข้อมูลกับวิธี flow cytometry ของจริยา (2553) ซึ่งระยะ G1, S และ G2 มีค่าเท่ากับร้อยละ 62.94, 9.72 และ 22.84 ตามลำดับ จากนั้นจะทำการจัดพื้นที่ของนิวเคลียสออกเป็นช่วงๆ ตามระยะ G1, S และ G2 เช่น การหาช่วงระยะ G1 จะนำเอาจำนวนเซลล์ที่อยู่บนยอดกราฟมารวมกัน ในที่นี้ได้ทั้งหมด 413 เซลล์ และนำเอาค่าร้อยละ G1 ของ flow cytometry ที่อ้างอิง คือ 62.94 มาคำนวณตามข้อ 3.2.2 (ข.2) จะทำให้ได้ค่าจำนวนเซลล์ในระยะ G1 ซึ่งเท่ากับ 282 เซลล์ หลังจากนั้นให้นำจำนวนเซลล์ในกราฟ

ตั้งแต่พื้นที่แรก คือ 24.18 ไปจนถึง 90.67 μm^2 ได้จำนวนเซลล์รวม 282 เซลล์ ตามที่ต้องการพอดี (ดูกรอบ G1 ในภาพ 4.4(C)) จึงจัดให้จำนวนเซลล์ในช่วงนั้น เป็นระยะ G1 และให้ทำเช่นนี้อีกทั้ง 2 ระยะ ถ้าพิจารณาจากกราฟจะเห็นว่า G1, S และ G2 มีขนาดพื้นที่นิวเคลียส 24.18-90.67, 90.68-105.78 และ 105.79-190.40 μm^2 ตามลำดับ จะเห็นว่าในการคิดคำนวณเซลล์ที่อยู่ในระยะ G2 ได้มีการตัดเซลล์ที่มีขนาดนิวเคลียสใหญ่ที่สุดคือ 190.41 μm^2 จำนวน 1 เซลล์ออกไปเพื่อให้จำนวนโดยรวมใกล้เคียงมากที่สุดกับที่ได้คำนวณไว้

เซลล์ HeLa ที่อยู่ในสถานะลอย และได้ทำการติดหมายเลข (ภาพ 4.5(A)) เพื่อนำมาคำนวณหาพื้นที่ของนิวเคลียส (ภาพ 4.4 ตาราง(B)) และสร้างกราฟการกระจายของเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 ตามวัฏจักรของเซลล์โดยเทียบกับข้อมูล flow cytometry โดยใช้ข้อมูลเช่นเดียวกับเซลล์ HeLa ในสถานะเกาะ (จริยา, 2553) โดยสามารถจำแนกขนาดของนิวเคลียสในระยะ G1, S และ G2 ตามลำดับดังนี้ 27.20-74.80, 74.81-83.11 และ 83.12-272.00 μm^2 จากภาพ 4.5(C) พบว่าเซลล์ที่มีจำนวน 30-40 เซลล์จะกระจายอยู่ตรงช่วงกลางของกราฟ และมีพื้นที่นิวเคลียสที่มีจำนวนเซลล์มากที่สุดถึง 96 เซลล์โดยมีการกระจายของจำนวนอยู่ที่ 60.45 μm^2 เหมือนกับเซลล์ในสถานะเกาะ (ภาพ 4.4(C)) และเซลล์ที่มีจำนวนมากกว่า 20 เซลล์ มีการกระจายกว้างๆ บริเวณช่วงกลางกราฟ ส่วนในช่วงขอบสองข้างของกราฟ พบว่าแต่ละพื้นที่ที่มีจำนวนเซลล์กระจายอยู่น้อยโดยที่ถ้ามีขนาดพื้นที่น้อยกว่า 45.33 μm^2 และมากกว่า 90.67 μm^2 มีจำนวนน้อยกว่า 10 เซลล์

จากการติดหมายเลขให้กับเซลล์ A549 ที่อยู่ในสถานะปกติ สถานะเกาะ (ภาพ 4.6(A)) หลังจากนั้นนำไปคำนวณหาพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขที่กำหนดไว้ (ภาพ 4.6 ตาราง(B)) และสร้างเป็นกราฟจำแนกจำนวนตามขนาดของพื้นที่ (ภาพ 4.6(C)) โดยเทียบกับค่าที่อ้างอิงมาจากวิธี flow cytometry ของสุพัตรา (2552) ซึ่งร้อยละของจำนวนเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 มีค่าดังนี้ 60, 28 และ 12 ตามลำดับ และสามารถแบ่งพื้นที่นิวเคลียสออกเป็นช่วงระยะเซลล์ G1, S และ G2 ได้ตามลำดับ คือ 15.11-120.89, 120.90-154.13 และ 154.14-211.56 μm^2 จากกราฟพบว่าพื้นที่ของนิวเคลียสที่ 120.89 μm^2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 45 เซลล์ และเซลล์ที่มีจำนวนตั้งแต่ 10 – 20 เซลล์จะกระจายอยู่ทั่วทั้งกราฟ เซลล์ที่มีจำนวนมากกว่า 20 ขึ้นไป จะกระจายอยู่ในบริเวณช่วงกลาง และพื้นที่ในช่วงขอบสองด้านของกราฟจะมีจำนวนน้อยกว่า 5 เซลล์ เป็นส่วนใหญ่

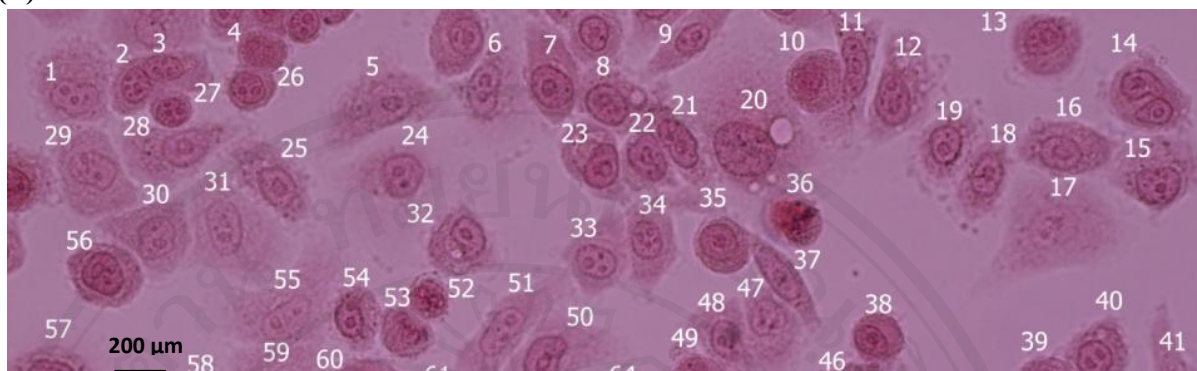
จากภาพ 4.7(A) คือเซลล์ A549 สถานะลอย ที่ได้ทำการติดหมายเลขไว้ และนำมาคำนวณหาพื้นที่นิวเคลียสและสร้างกราฟการกระจายตามพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.7 ตาราง (B) และภาพ(C)) เช่นเดียวกับเซลล์ในสถานะเกาะ แต่จะมีช่วงระยะ G1, S และ G2 ดังนี้

18.13-72.53, 72.54-105.78 และ 105.79-169.25 μm^2 โดยเซลล์ที่มีจำนวน มากกว่า 20 เซลล์ มีการกระจายช่วงกลางของกราฟ ซึ่งพื้นที่นิวเคลียส 60.45 μm^2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ 50 เซลล์ ส่วนในช่วงขอบกราฟนั้นพื้นที่นิวเคลียสตั้งแต่มากกว่า 108.80 μm^2 ขึ้นไปและน้อยกว่า 42.31 μm^2 แต่ละขนาดจะมีจำนวนเซลล์ไม่เกิน 10 เซลล์

ภาพ 4.8(A) คือเซลล์ NCI-H1299 ปกติในสถานะเกาะที่ติดหมายเลขกำกับไว้เพื่อนำมาวัดและคำนวณขนาดพื้นที่นิวเคลียส (ตาราง 4.8(B)) และนำมาสร้างกราฟแจกแจงการกระจายจำนวนเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.8(C)) โดยเทียบกับข้อมูล flow cytometry ของจิริยา (2553) ที่มีค่าร้อยละตามระยะ G1, S และ G2 คือ 75, 5 และ 15 ตามลำดับ และเมื่อแจกแจงข้อมูลของการทดลองนี้แล้วสามารถแบ่งช่วงระยะ G1, S และ G2 ดังนี้ 45.33-120.89, 120.90-132.98 และ 132.99 -217.60 μm^2 และพบว่าเซลล์ที่มีจำนวนมากกว่า 20 เซลล์ จะกระจายตัวอยู่ในช่วงกลางของกราฟ พื้นที่นิวเคลียส 105.78 μm^2 จะพบจำนวนเซลล์ที่มากที่สุดคือ 54 เซลล์ในช่วงขอบกราฟมากกว่า 169.25 μm^2 และน้อยกว่า 66.49 μm^2 ส่วนใหญ่มีจำนวนเซลล์ในแต่ละพื้นที่น้อยกว่า 10 เซลล์

เซลล์ NCI-H1299 ในสถานะลอย ที่ติดหมายเลขกำกับไว้ (ภาพ 4.9(A)) เพื่อนำมาวัดคำนวณขนาดพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.9 ตาราง(B)) และนำมาสร้างกราฟแจกแจงการกระจายจำนวนเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.9(C)) เช่นเดียวกับเซลล์สถานะเกาะ และเมื่อแจกแจงข้อมูลของการทดลองแล้วสามารถแบ่งช่วงระยะ G1, S และ G2 ดังนี้ 30.22-84.62, 84.63-90.67 และ 90.68-181.34 μm^2 และเซลล์จำนวนมากกว่า 30 เซลล์ กระจายอยู่ในช่วงกลางของกราฟ โดยพื้นที่นิวเคลียส 60.45 μm^2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 60 เซลล์ และในส่วนขอบของกราฟ ที่พื้นที่นิวเคลียสส่วนใหญ่มีมากกว่า 108.80 μm^2 จะมีเซลล์กระจายอยู่เป็นจำนวนน้อยกว่า 10 เซลล์

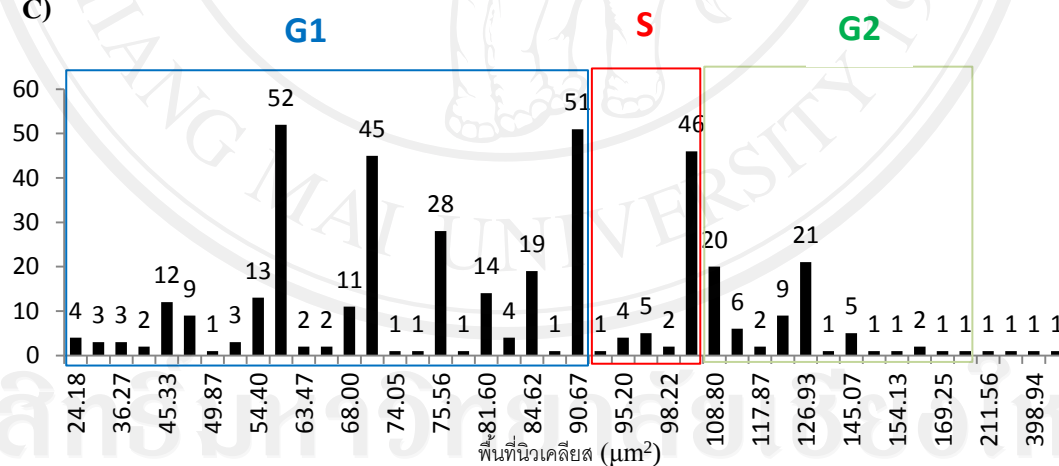
(A)



(B)

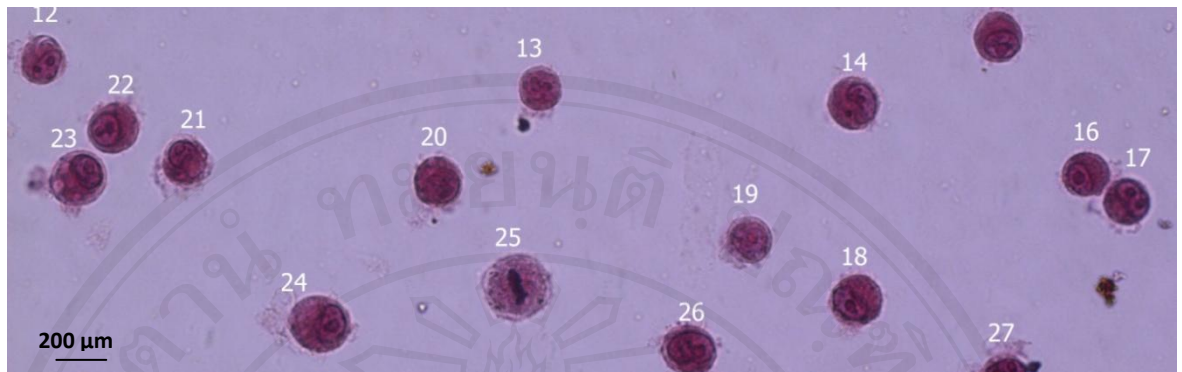
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่นิวเคลียส (μm ²)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่นิวเคลียส (μm ²)
1	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	9	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45
2	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	10	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
3	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	11	$((3.14 \times 0.3 \times 0.8)/4) \times 385$	72.53
4	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	12	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78
5	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	13	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
6	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	14	มีมากกว่า 1 นิวเคลียส	-
7	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	15	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
8	$((3.14 \times 0.6 \times 0.6)/4) \times 385$	108.80	16	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67

(C)



ภาพ 4.4 เซลล์ HeLa ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะเป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

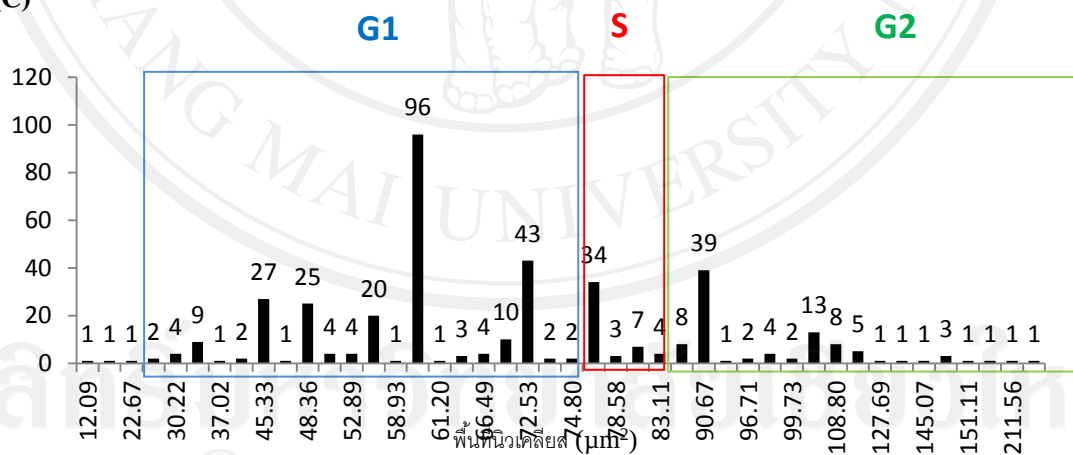
(A)



(B)

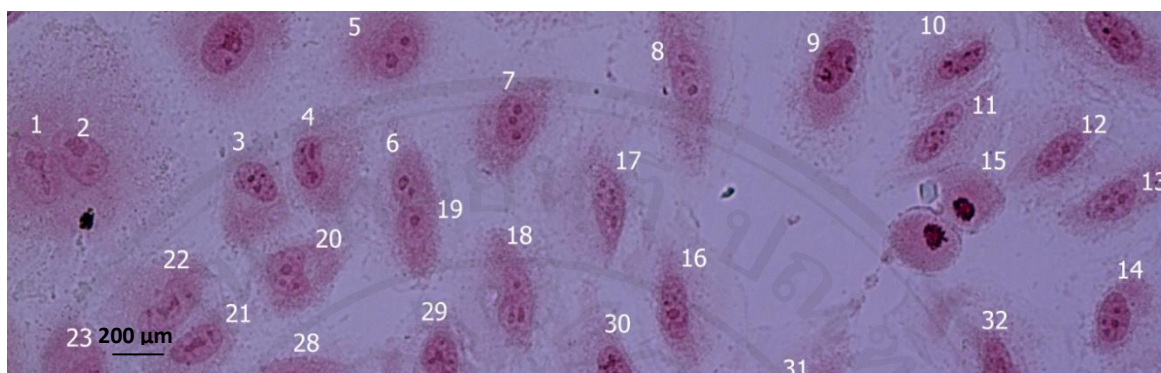
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
12	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6) / 4) \times 385$	72.53	20	$((3.14 \times 0.7 \times 0.9) / 4) \times 385$	190.40
13	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5) / 4) \times 385$	60.45	21	$((3.14 \times 0.4 \times 0.8) / 4) \times 385$	96.71
14	$((3.14 \times 0.2 \times 0.6) / 4) \times 385$	36.27	22	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6) / 4) \times 385$	90.67
15	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5) / 4) \times 385$	60.45	23	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6) / 4) \times 385$	72.53
16	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5) / 4) \times 385$	60.45	24	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6) / 4) \times 385$	90.67
17	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7) / 4) \times 385$	105.78	25	Metaphase	
18	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6) / 4) \times 385$	72.53	26	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5) / 4) \times 385$	60.45
19	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5) / 4) \times 385$	60.45	27	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5) / 4) \times 385$	60.45

(C)



ภาพ 4.5 เซลล์ HeLa ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่
 ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาด
 นิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ดัง
 แสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตาม
 ขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

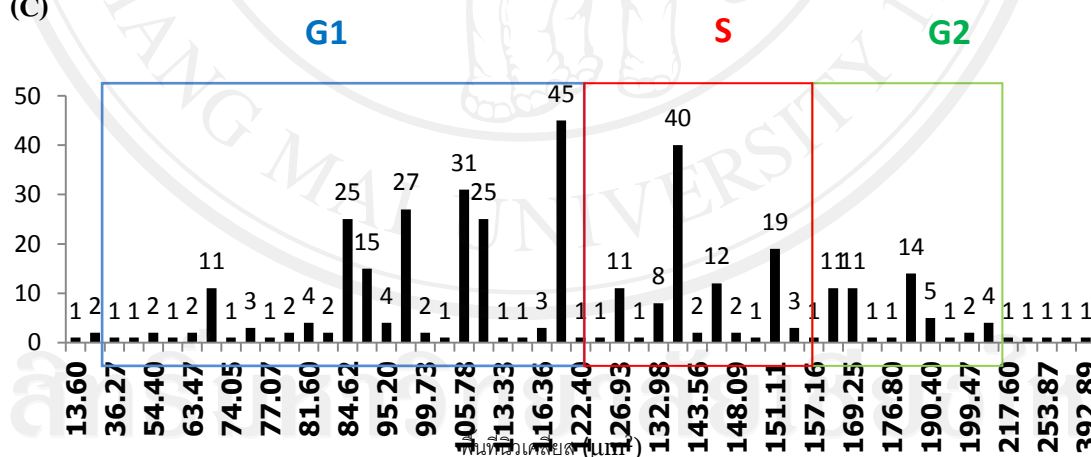
(A)



(B)

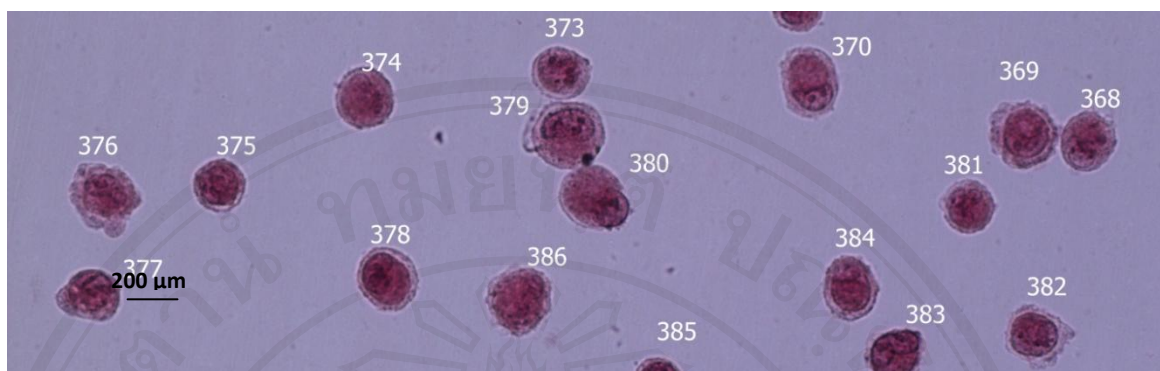
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
1	$((3.14 \times 0.7 \times 0.9)/4) \times 385$	190.40	9	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89
2	$((3.14 \times 0.6 \times 0.85)/4) \times 385$	154.13	10	$((3.14 \times 0.3 \times 0.8)/4) \times 385$	72.53
3	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	11	$((3.14 \times 0.3 \times 1.0)/4) \times 385$	90.67
4	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62	12	$((3.14 \times 0.4 \times 0.8)/4) \times 385$	96.71
5	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	13	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89
6	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53	14	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89
7	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	15	telophase	-
8	$((3.14 \times 0.5 \times 0.9)/4) \times 385$	136.00	16	$((3.14 \times 0.4 \times 0.9)/4) \times 385$	108.80

(C)



ภาพ 4.6 เซลล์ A549 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

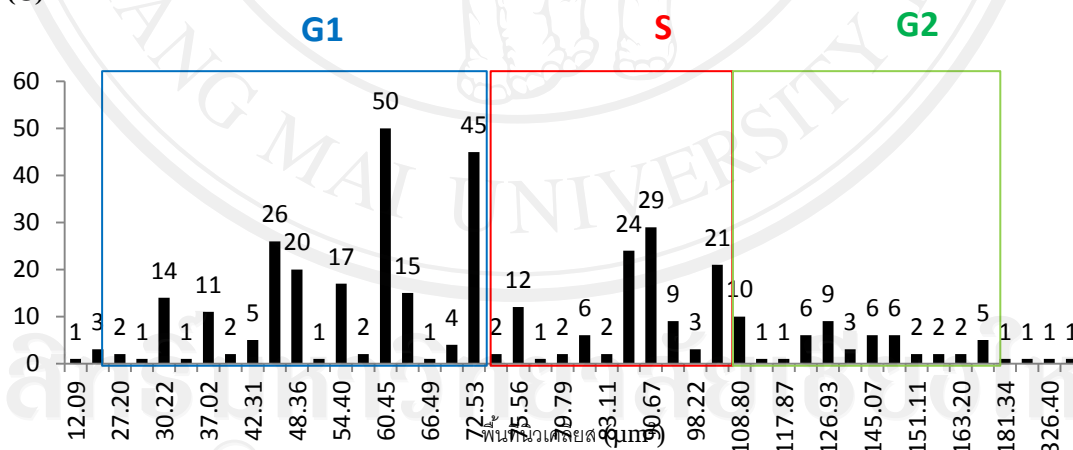
(A)



(B)

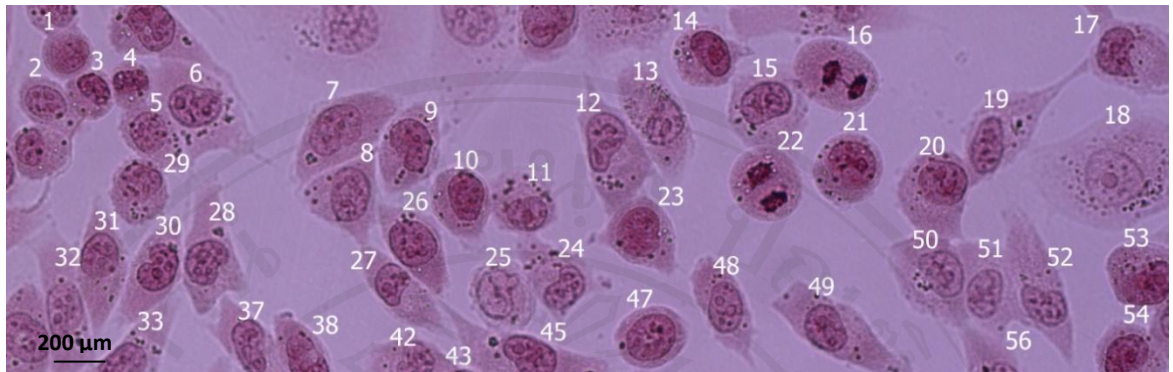
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
373	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	381	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
374	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	382	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62
375	$((3.14 \times 0.3 \times 0.6)/4) \times 385$	54.40	383	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53
376	$((3.14 \times 0.6 \times 0.6)/4) \times 385$	108.80	384	$((3.14 \times 0.2 \times 0.4)/4) \times 385$	24.18
377	$((3.14 \times 0.5 \times 0.65)/4) \times 385$	98.22	385	$((3.14 \times 0.6 \times 0.7)/4) \times 385$	126.93
378	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62	386	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33
379	$((3.14 \times 0.5 \times 0.5)/4) \times 385$	75.56	387	$((3.14 \times 0.4 \times 0.4)/4) \times 385$	48.36
380	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	388	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45

(C)



ภาพ 4.7 เซลล์ A549 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่
ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาด
นิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดัง
แสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตาม
ขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ(C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

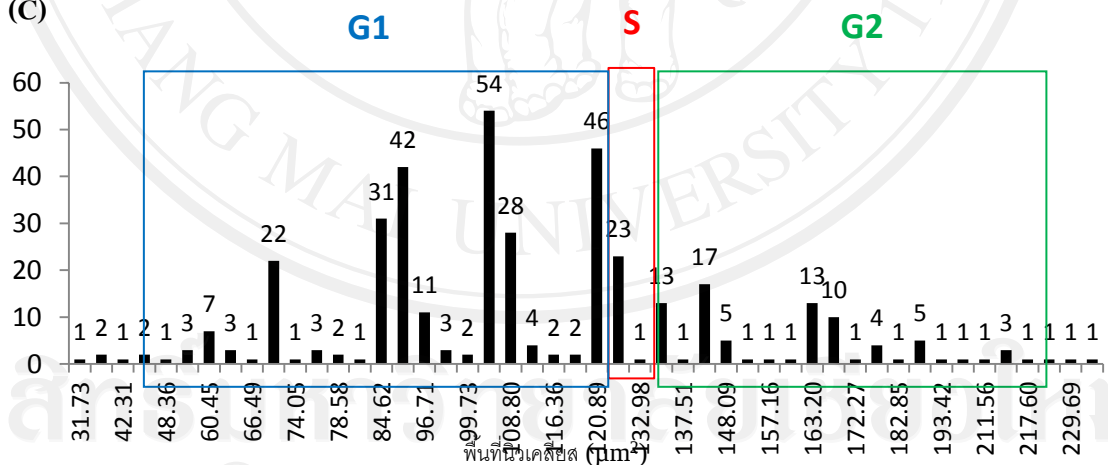
(A)



(B)

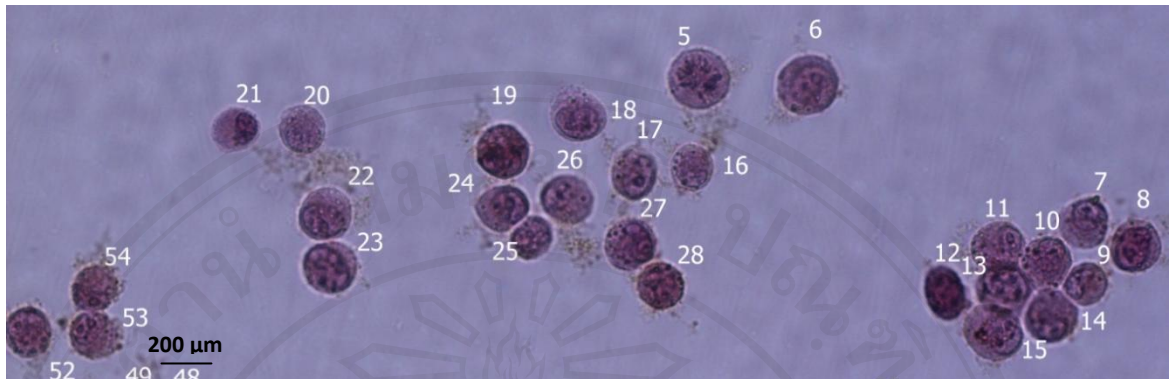
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
1	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	9	$((3.14 \times 0.6 \times 0.7)/4) \times 385$	126.93
2	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	10	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
3	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33	11	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53
4	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33	12	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89
5	$((3.14 \times 0.5 \times 0.5)/4) \times 385$	75.56	13	$((3.14 \times 0.45 \times 0.7)/4) \times 385$	95.20
6	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	14	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
7	$((3.14 \times 0.6 \times 0.8)/4) \times 385$	145.07	15	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78
8	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	16	anaphase	-

(C)



ภาพ 4.8 เซลล์ NCI-H1299 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ(C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

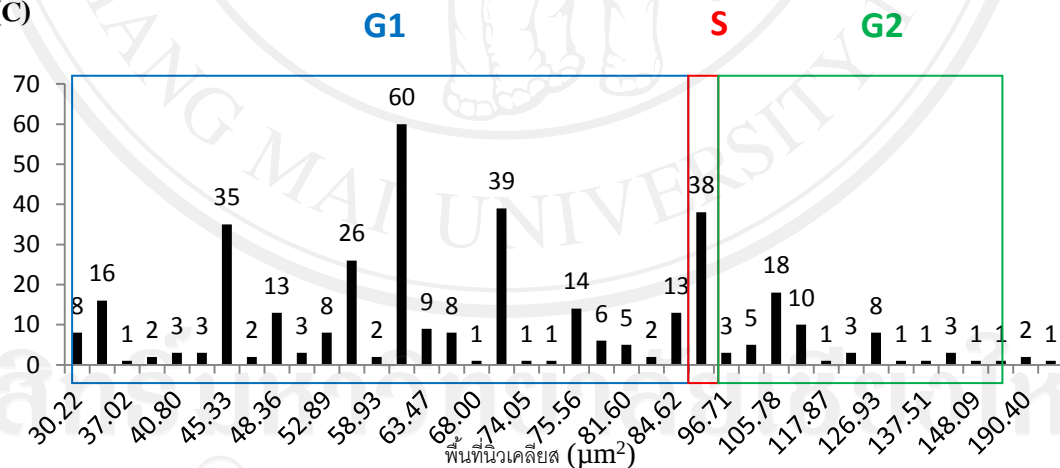
(A)



(B)

ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
5	prophase	-	13	$((3.14 \times 0.4 \times 0.55)/4) \times 385$	66.49
6	$((3.14 \times 0.6 \times 0.7)/4) \times 385$	126.93	14	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53
7	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	15	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
8	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	16	$((3.14 \times 0.3 \times 0.4)/4) \times 385$	36.27
9	$((3.14 \times 0.4 \times 0.4)/4) \times 385$	48.36	17	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53
10	$((3.14 \times 0.35 \times 0.35)/4) \times 385$	37.02	18	$((3.14 \times 0.45 \times 0.6)/4) \times 385$	81.60
11	$((3.14 \times 0.3 \times 0.4)/4) \times 385$	36.27	19	$((3.14 \times 0.45 \times 0.6)/4) \times 385$	81.60
12	$((3.14 \times 0.5 \times 0.5)/4) \times 385$	75.56	20	$((3.14 \times 0.5 \times 0.5)/4) \times 385$	75.56

(C)



ภาพ 4.9 เซลล์ NCI-H1299 ปกติที่ไม่ได้รับสารพิษใดๆ และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ(C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

4.3 ผลการศึกษาวัฏจักรเซลล์หลังจากได้รับ cisplatin

จากการทดลองที่ 3.3 เมื่อทำการเก็บข้อมูลและจำแนกเซลล์ในวัฏจักรเซลล์เรียบร้อยแล้ว จะได้ข้อมูลที่เป็นแบบแผนเช่นเดียวกับที่แสดงไว้ในข้อ 4.2 ซึ่งได้นำมาแสดงในหัวข้อนี้ ได้แก่ ตัวอย่างภาพถ่ายเซลล์ที่ทำการติดหมายเลข ตัวอย่างข้อมูลขนาดนิวเคลียสที่มีการวัดขนาดนิวเคลียสเพื่อนำมาคำนวณพื้นที่นิวเคลียส และกราฟการกระจายของจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆ ตามพื้นที่นิวเคลียส ซึ่งข้อมูลในส่วนของกราฟ ทั้งเซลล์ 3 เซื้อสายจะอ้างอิงข้อมูลช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐานจากเซลล์สถานะปกติ

ภาพ 4.10(A) คือเซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร cisplatin อยู่ในสถานะเกาะที่ได้ติดหมายเลขไว้ มาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียส (ภาพ 4.10 ตาราง(B)) เพื่อนำมาสร้างกราฟการกระจายของเซลล์ตามพื้นที่ของนิวเคลียส (ภาพ 4.10(C)) ข้อมูลช่วงนิวเคลียสมาตรฐานมีค่าของช่วงขนาดนิวเคลียสตามระยะ G1, S และ G2 ดังนี้ 24.18-90.67, 90.68-105.78 และ 105.79-190.40 μm^2 ตามลำดับ ต่อมาเมื่อทำการตัดระยะตามช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐาน เซลล์มีการกระจายตั้งแต่ 20 เซลล์ขึ้นไปอยู่ตรงกลางของกราฟ และพื้นที่นิวเคลียส 90.67 μm^2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุด คือ 43 เซลล์ และยังพบว่าในช่วงขอบของกราฟพื้นที่นิวเคลียสมากกว่า 145.07 μm^2 มีจำนวนเซลล์ในแต่ละพื้นที่น้อยกว่า 10 เซลล์ และเซลล์ที่อยู่ในระยะ G1 ที่มีขนาดนิวเคลียสมากกว่า 190.40 μm^2 จะถูกคัดออกเพื่อให้ขนาดพื้นที่นิวเคลียสของข้อมูลการทดลองอยู่ในช่วงตามขนาดนิวเคลียสมาตรฐาน

เซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะลอย ที่ได้ติดหมายเลขที่เซลล์ (ภาพ 4.11(A)) เมื่อนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียส (ภาพ 4.11 ตาราง(B)) แล้วนำข้อมูลที่ได้นำมาสร้างกราฟเพื่อจำแนกจำนวนตามขนาดของพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.11(C)) ซึ่งค่าร้อยละตามระยะ G1, S และ G2 ของช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐานของเซลล์ HeLa ปกติสถานะลอย เท่ากับ 27.20-74.80, 74.81-83.11 และ 83.12-272.00 μm^2 ตามลำดับ ทำการตัดระยะ G1, S และ G2 เมื่อพิจารณาจากกราฟ พบว่ามีจำนวนเซลล์ที่มากกว่า 20 เซลล์ขึ้นไปอยู่ในช่วงกลางของกราฟ และพื้นที่นิวเคลียส 105.78 μm^2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุดถึง 51 เซลล์ และจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า 10 เซลล์จะมีในช่วงพื้นที่นิวเคลียสที่มากกว่า 148.09 μm^2

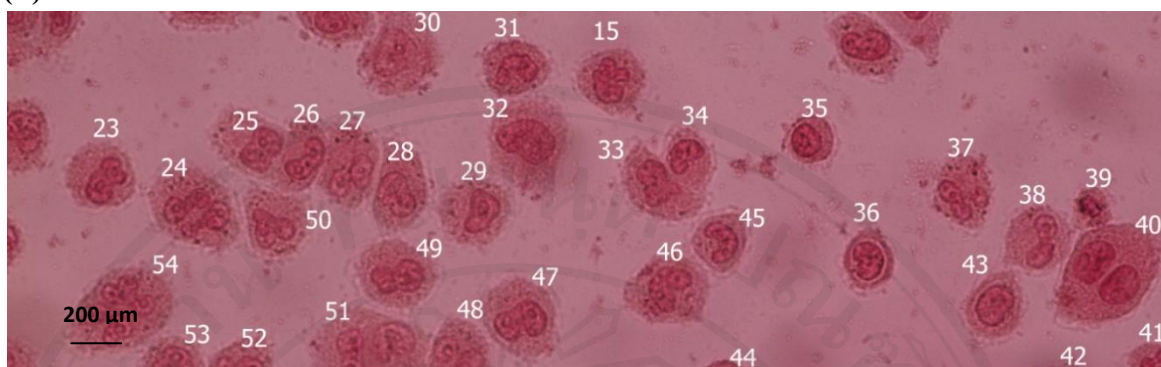
ภาพเซลล์ A549 (ภาพ 4.12(A)) ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเกาะ พร้อมติดหมายเลขไว้ นำมาคำนวณหาพื้นที่ของนิวเคลียสเพื่อสร้างกราฟการกระจายของ เซลล์ตามพื้นที่ของนิวเคลียส (ภาพ 4.12 ตาราง(B) และภาพ(C)) ตามลำดับ ซึ่งค่าช่วงขนาด นิวเคลียสมาตรฐานที่นำมาอ้างอิงมีค่าร้อยละตามระยะ G1, S และ G2 ของเซลล์ A549 ปกติ สถานะเกาะ เท่ากับ 15.11-120.89, 120.90-154.13 และ 154.14-211.56 μm^2 ตามลำดับ พบว่า ระยะ G1, S และ G2 ที่ได้ตัดตามช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐาน ในช่วงกลางของ กราฟจะมีจำนวนเซลล์มากตั้งแต่ 30 เซลล์ขึ้นไป โดยพื้นที่นิวเคลียส 136.00 μm^2 มีจำนวน เซลล์มากที่สุดคือ 56 เซลล์ ส่วนจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า 5 เซลล์จะพบที่ขนาดพื้นที่ นิวเคลียสน้อยกว่า 63.47 μm^2 และเพื่อให้พื้นที่ขนาดนิวเคลียสของการทดลองนี้อยู่ในช่วง ตามช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐานจึงได้ตัดพื้นที่นิวเคลียสที่มากกว่า 211.56 μm^2 ออกไป

เซลล์ A549 ที่ได้รับสาร cisplatin อยู่ในสถานะลอย และถูกติดหมายเลข (ภาพ 4.13(A)) เพื่อนำมาคำนวณพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.13 ตาราง(B)) และสร้างเป็นกราฟในการ จำแนกจำนวนเซลล์ตามพื้นที่ของนิวเคลียส และค่าร้อยละของช่วงขนาดนิวเคลียส มาตรฐานเซลล์ A549 ปกติ สถานะลอยของระยะ G1, S และ G2 มีค่า 18.13-72.53, 72.54-105.78 และ 105.79-165.25 μm^2 เมื่อตัดแบ่งช่วงระยะ G1, S และ G2 ตามช่วงขนาด นิวเคลียสมาตรฐาน (ภาพ 4.13(C)) สามารถพบการกระจายของจำนวนเซลล์ที่มากกว่า 20 เซลล์ในช่วงกลางของกราฟ ซึ่งพื้นที่นิวเคลียส 72.53 μm^2 มีจำนวนเซลล์มากที่สุดคือ 58 เซลล์ และพบว่าส่วนใหญ่พื้นที่นิวเคลียสทางขอบของกราฟที่ขนาดพื้นที่ที่มากกว่า 136.00 μm^2 มีจำนวนเซลล์ที่น้อยกว่า 5 เซลล์ และตัดพื้นที่นิวเคลียสที่มากกว่า 169.25 ออกเพื่อให้ ได้ช่วงตามช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐาน

ภาพ 4.14 (A) คือ เซลล์ NCI-H1299 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเกาะ โดยมีการติดหมายเลขกำกับไว้ ต่อมานำมาคำนวณพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.14 ตาราง(B)) และมาสร้างกราฟเพื่อจำแนกจำนวนเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.14(C)) ซึ่งค่าร้อยละ ตามระยะ G1, S และ G2 นำมาจากช่วงนิวเคลียสมาตรฐานเซลล์ NCI-H1299 ปกติ สถานะเกาะ ดังนี้ 45.33-120.89, 120.90-132.98 และ 132.99-217.60 μm^2 ภายหลังการตัด ช่วงขนาดนิวเคลียสของการทดลองนี้ พบว่าเซลล์ที่มีจำนวนมากกว่า 30 เซลล์ขึ้นไปจะ กระจายอยู่บริเวณช่วงกลางของกราฟ และพื้นที่นิวเคลียส 120.89 μm^2 มีจำนวนเซลล์ มากกว่าพื้นที่นิวเคลียสบริเวณอื่นคือ 51 เซลล์ และพื้นที่นิวเคลียสที่มากกว่า 217.60 μm^2 และน้อยกว่า 45.33 จะตัดออกเพื่อให้อยู่ในช่วงตามช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐาน

เมื่อติดหมายเลขให้กับเซลล์ NCI-H1299 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะ
 ลอย (ภาพ 4.15(A)) แล้วนำมาคำนวณพื้นที่นิวเคลียสเพื่อจะสร้างกราฟการกระจายของ
 เซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส (ภาพ 4.15 ตาราง(B) และภาพ(C)) ตามลำดับ ซึ่งข้อมูลช่วงขนาด
 นิวเคลียสมาตรฐานที่นำมาอ้างอิงเป็นของเซลล์ NCI-H1299 ปกติสถานะลอย ทำการตัด
 ออกเป็นช่วงระยะ G1, S และ G2 พบว่าการกระจายของกราฟพบว่าเซลล์จำนวนมากกว่า
 40 เซลล์อยู่บริเวณช่วงกลางของกราฟ และจำนวนเซลล์ที่มากที่สุดคือ 70 เซลล์จะอยู่
 บริเวณพื้นที่นิวเคลียส $72.53 \mu\text{m}^2$ เซลล์ที่มีขนาดพื้นที่นิวเคลียสมากกว่า 181.34 และน้อย
 กว่า 24.18 จะตัดออกเพื่อให้ข้อมูลอยู่ในช่วงตามช่วงขนาดนิวเคลียสมาตรฐาน

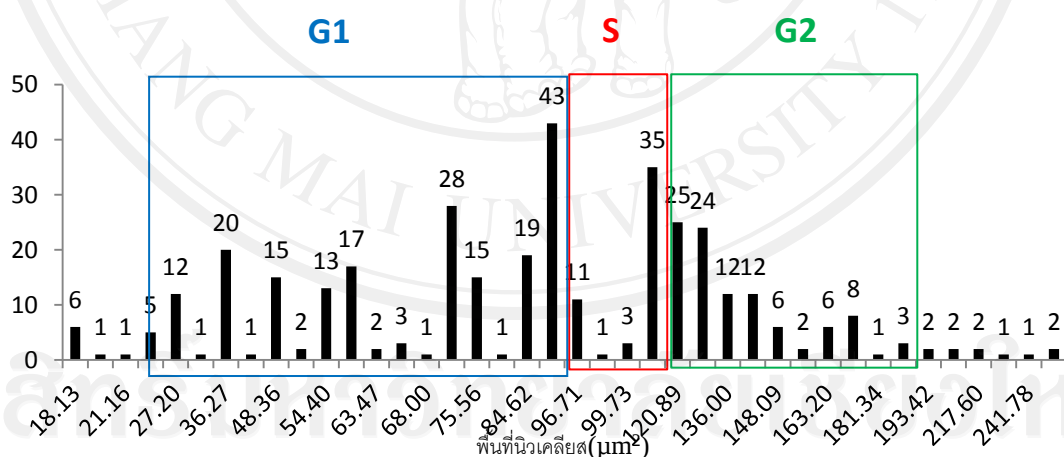
(A)



(B)

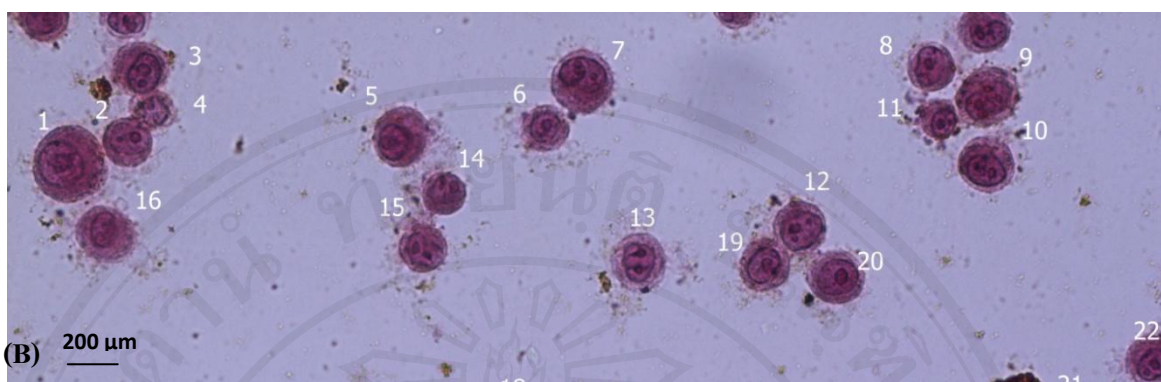
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
30	$((3.14 \times 0.7 \times 0.8)/4) \times 385$	169.25	38	$((3.14 \times 0.3 \times 0.9)/4) \times 385$	81.60
31	$((3.14 \times 0.3 \times 0.7)/4) \times 385$	63.47	39	$((3.14 \times 0.3 \times 0.4)/4) \times 385$	36.27
32	$((3.14 \times 0.6 \times 0.9)/4) \times 385$	163.20	40	มีมากกว่า 1 นิวเคลียส	-
33	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78	41	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
34	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53	42	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78
35	$((3.14 \times 0.5 \times 0.5)/4) \times 385$	75.56	43	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78
36	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	44	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89
37	มีมากกว่า 1 นิวเคลียส	-	45	$((3.14 \times 0.3 \times 0.8)/4) \times 385$	72.53

(C)



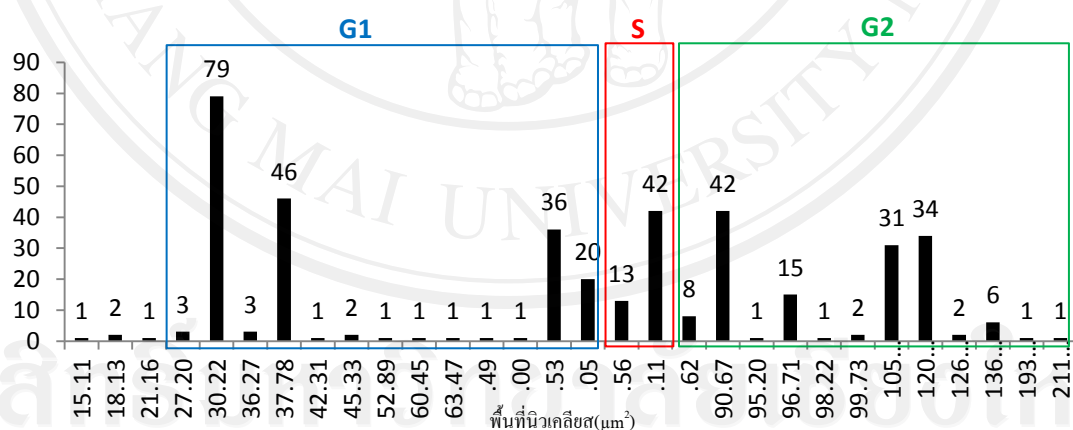
ภาพ 4.10 เซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพ
 ภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัด
 ขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้
 ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตาม
 ขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

(A)



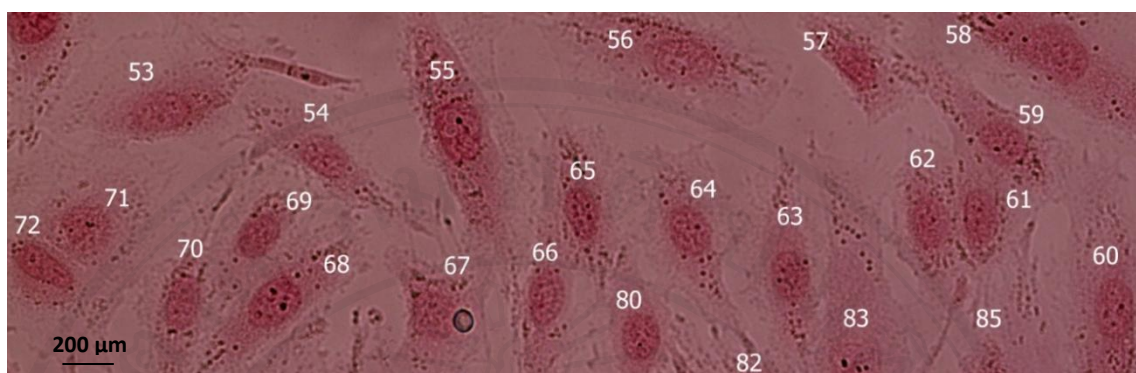
(B) 200 μm

ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่นิวเคลียส (μm ²)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่นิวเคลียส (μm ²)
1	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	9	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62
2	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53	10	$((3.14 \times 0.6 \times 0.6)/4) \times 385$	108.80
3	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	11	$((3.14 \times 0.4 \times 0.4)/4) \times 385$	48.36
4	$((3.14 \times 0.4 \times 0.4)/4) \times 385$	48.36	12	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
5	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	13	$((3.14 \times 0.4 \times 0.55)/4) \times 385$	66.49
6	$((3.14 \times 0.3 \times 0.4)/4) \times 385$	36.27	14	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45
7	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62	15	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33
8	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	16	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45



ภาพ 4.11 เซลล์ HeLa ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ข้อม สี่ aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียส แล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ดังแสดงตัวอย่าง ในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของ นิวเคลียสดังแสดงในกราฟ(C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

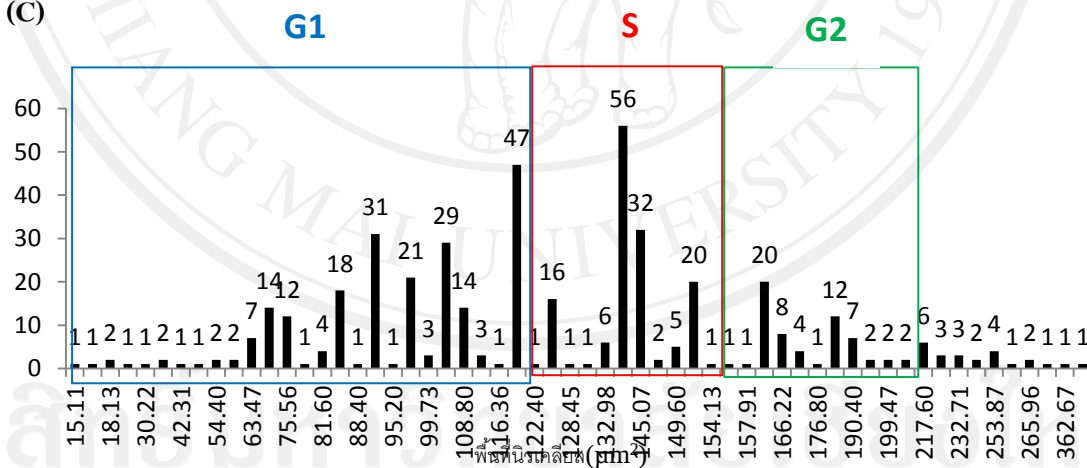
(A)



(B)

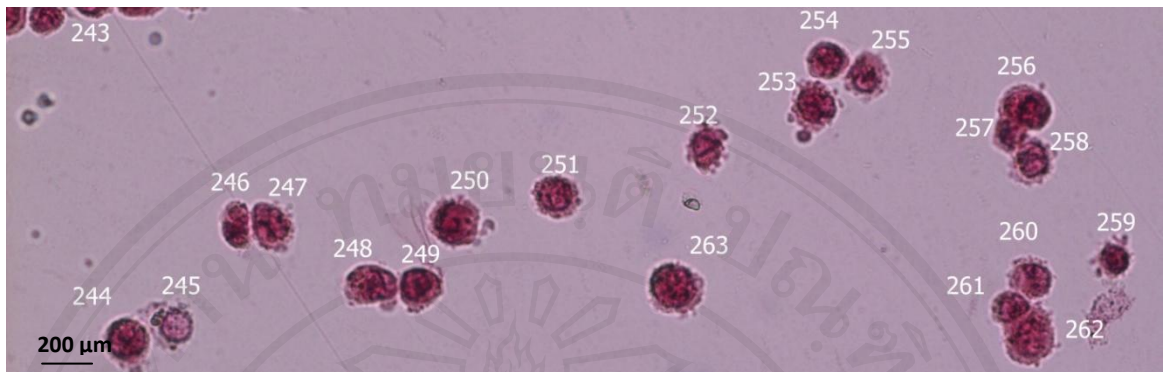
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
53	$((3.14 \times 0.5 \times 0.9)/4) \times 385$	90.67	61	$((3.14 \times 0.3 \times 1.0)/4) \times 385$	84.62
54	$((3.14 \times 0.6 \times 0.7)/4) \times 385$	72.53	62	$((3.14 \times 0.4 \times 0.8)/4) \times 385$	108.80
55	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	60.45	63	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	48.36
56	$((3.14 \times 0.6 \times 0.8)/4) \times 385$	48.36	64	$((3.14 \times 0.6 \times 0.8)/4) \times 385$	90.67
57	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	60.45	65	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	66.49
58	$((3.14 \times 0.8 \times 1.0)/4) \times 385$	36.27	66	$((3.14 \times 0.5 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45
59	$((3.14 \times 0.6 \times 1.2)/4) \times 385$	84.62	67	$((3.14 \times 0.6 \times 0.8)/4) \times 385$	45.33
60	$((3.14 \times 0.5 \times 1.0)/4) \times 385$	90.67	68	$((3.14 \times 0.65 \times 0.9)/4) \times 385$	60.45

(C)



ภาพ 4.12 เซลล์ A549 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

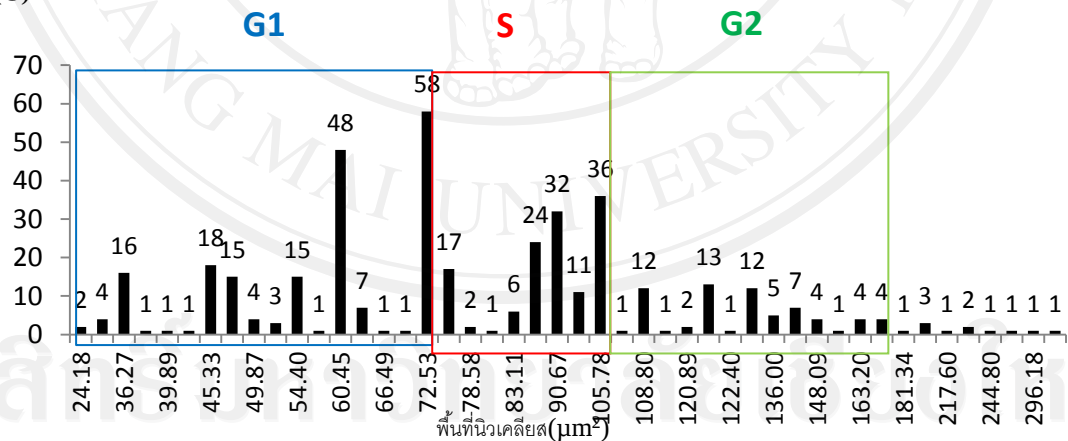
(A)



(B)

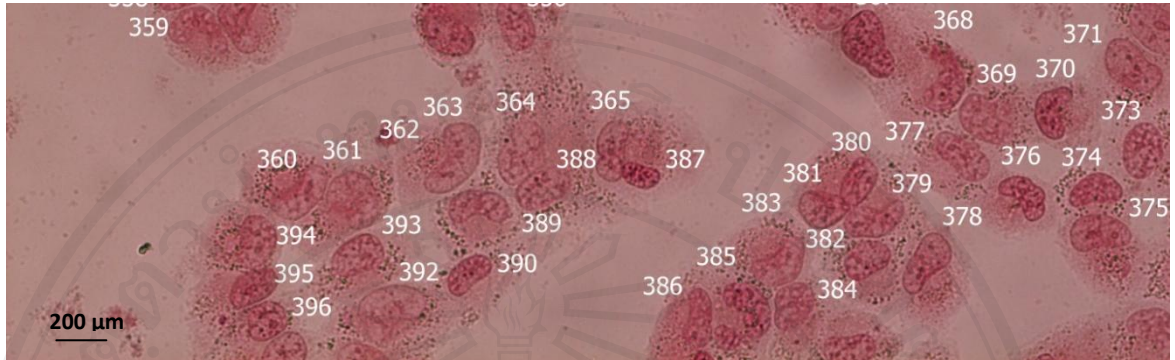
ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
254	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33	262	$((3.14 \times 0.3 \times 0.4)/4) \times 385$	36.27
255	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33	263	$((3.14 \times 0.3 \times 0.4)/4) \times 385$	36.27
256	$((3.14 \times 0.6 \times 0.6)/4) \times 385$	108.80	264	$((3.14 \times 0.3 \times 0.6)/4) \times 385$	54.40
257	$((3.14 \times 0.2 \times 0.4)/4) \times 385$	24.18	265	$((3.14 \times 0.3 \times 0.6)/4) \times 385$	54.40
258	$((3.14 \times 0.3 \times 0.6)/4) \times 385$	54.40	266	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
259	$((3.14 \times 0.6 \times 0.7)/4) \times 385$	126.93	267	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78
260	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62	268	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53
261	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67	269	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33

(C)



ภาพ 4.13 เซลล์ A549 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์เพื่อวัดขนาดนิวเคลียส แล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวน

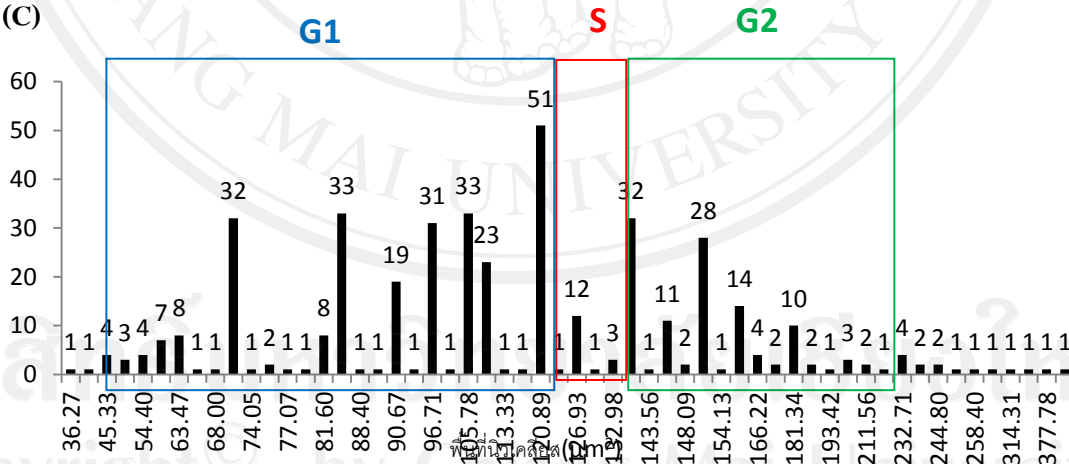
(A)



(B)

ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่นิวเคลียส (μm ²)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่นิวเคลียส (μm ²)
368	$((3.14 \times 0.5 \times 0.9)/4) \times 385$	136.00	376	$((3.14 \times 0.3 \times 0.9)/4) \times 385$	81.60
369	$((3.14 \times 0.7 \times 0.9)/4) \times 385$	190.40	377	$((3.14 \times 0.6 \times 0.8)/4) \times 385$	145.07
370	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89	378	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
371	$((3.14 \times 0.4 \times 0.8)/4) \times 385$	96.71	379	$((3.14 \times 0.5 \times 1.0)/4) \times 385$	151.11
372	$((3.14 \times 0.4 \times 1.0)/4) \times 385$	120.89	380	$((3.14 \times 0.5 \times 1.2)/4) \times 385$	181.34
373	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89	381	$((3.14 \times 0.9 \times 0.9)/4) \times 385$	244.80
374	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89	382	$((3.14 \times 0.4 \times 0.8)/4) \times 385$	96.71
375	$((3.14 \times 0.5 \times 0.9)/4) \times 385$	136.00	383	$((3.14 \times 0.3 \times 0.9)/4) \times 385$	81.60

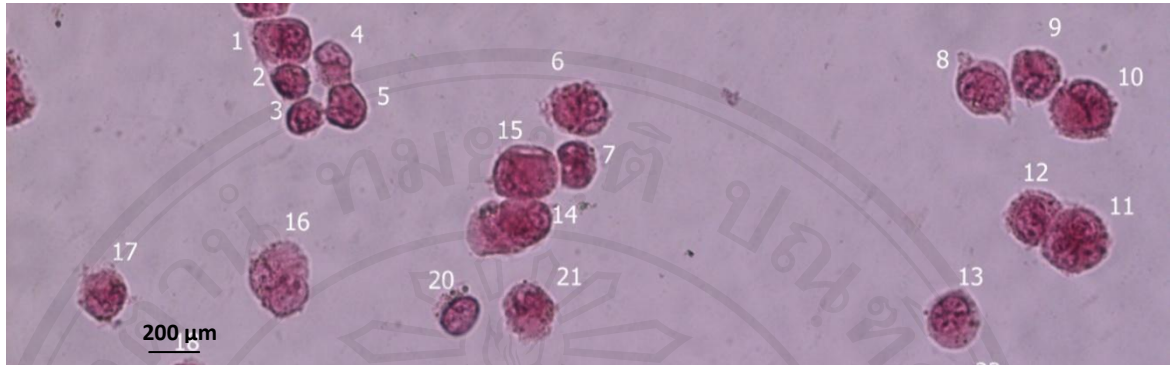
(C)



ภาพ 4.14 เซลล์ NCI-H1299 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะเป็นเซลล์เกาะ (A) เป็นตัวอย่าง

ภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

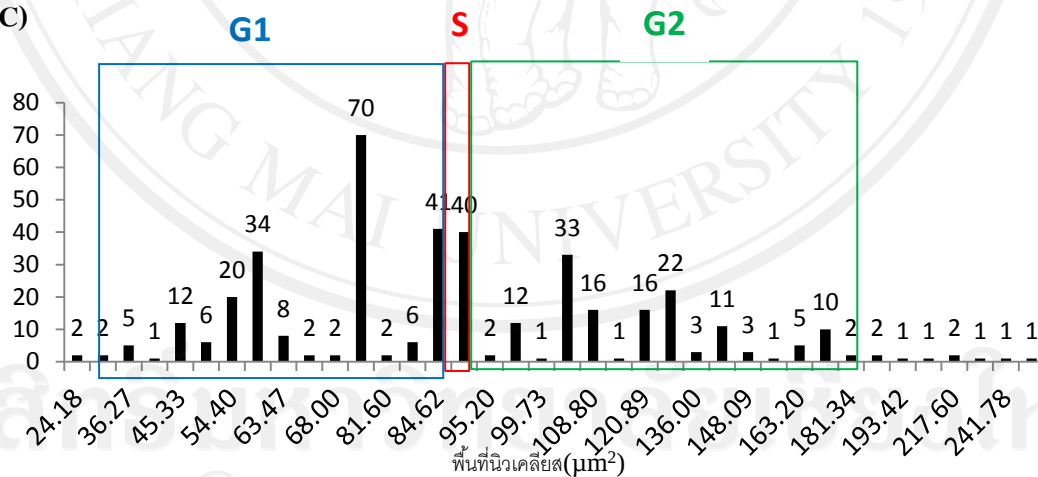
(A)



(B)

ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)	ที่	การคำนวณพื้นที่	พื้นที่ นิวเคลียส (μm^2)
1	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	9	$((3.14 \times 0.4 \times 0.8)/4) \times 385$	96.71
2	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33	10	$((3.14 \times 0.35 \times 0.7)/4) \times 385$	74.05
3	$((3.14 \times 0.4 \times 0.5)/4) \times 385$	60.45	11	มีมากกว่า 1 นิวเคลียส	-
4	$((3.14 \times 0.3 \times 0.5)/4) \times 385$	45.33	12	$((3.14 \times 0.5 \times 0.7)/4) \times 385$	105.78
5	$((3.14 \times 0.4 \times 0.7)/4) \times 385$	84.62	13	$((3.14 \times 0.45 \times 0.6)/4) \times 385$	81.60
6	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89	14	$((3.14 \times 0.5 \times 0.8)/4) \times 385$	120.89
7	$((3.14 \times 0.4 \times 0.6)/4) \times 385$	72.53	15	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67
8	$((3.14 \times 0.6 \times 0.7)/4) \times 385$	126.93	16	$((3.14 \times 0.5 \times 0.6)/4) \times 385$	90.67

(C)



ภาพ 4.15 เซลล์ NCI-H1299 ที่ได้รับสาร cisplatin และอยู่ในสถานะลอย (A) เป็นตัวอย่างภาพถ่ายที่ย้อมสี aceto-orcein ให้เห็นนิวเคลียสภายในและมีการให้หมายเลขแต่ละเซลล์ เพื่อวัดขนาดนิวเคลียสแล้วจากนั้นจึงนำมาคำนวณพื้นที่ของนิวเคลียสตามหมายเลขของเซลล์ที่กำหนดไว้ ดังแสดงตัวอย่างในตาราง (B) เมื่อครบทั้ง 400 เซลล์โดยประมาณแล้วจึงนำมาจำแนกจำนวนตามขนาดพื้นที่ของนิวเคลียส ดังแสดงในกราฟ (C) ตัวเลขบนยอดแท่งกราฟคือจำนวนเซลล์

4.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์

การวิเคราะห์ตามหัวข้อนี้เป็นการศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็งทั้ง 3 เซลล์สายในวัฏจักรเซลล์ อันเนื่องมาจากผลของ cisplatin ทั้งนี้เป็นการวิเคราะห์เชิงสถิติเพื่อประเมินว่าการวัดขนาดพื้นที่นิวเคลียสจะมีการเปลี่ยนแปลงไปอย่างไร และมีประสิทธิภาพหรือไม่เมื่อเทียบวิธีการทาง flow cytometry

4.4.1 เซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ

จากการทดลองข้อ 3.2.2 และ 3.3.3 จะได้กราฟการกระจายของจำนวนเซลล์ตามพื้นที่นิวเคลียส ซึ่งจัดให้อยู่ในระยะ G1, S และ G2 แล้ว (ภาพ 4.4, 4.5, 4.6, 4.7, 4.8, 4.9, 4.10, 4.11, 4.12, 4.13, 4.14, 4.15) ทำให้ทราบจำนวนเซลล์ในแต่ละระยะ จากนั้นเมื่อนำมาวิเคราะห์ตามวิธีในหัวข้อ 3.4 ทำให้ได้ข้อมูลดังนี้ (1) แผนภาพวงกลมแสดงจำนวนเซลล์ในระยะต่างๆ และ (2) ขนาดของเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 ที่ได้จากการวัด

จากภาพ 4.16 พบว่าการกระจายของร้อยละจำนวนเซลล์ HeLa สถานะเกาะในระยะ G1, S และ G2 ตามลำดับดังนี้ 69.37, 14.30 และ 13.82 และสถานะลอย มีค่า 51.88, 11.50 และ 35.05 ตามลำดับ พบว่าทั้งสองสถานะมีความแตกต่างกัน โดยเฉพาะในระยะ G1 กับ G2 ที่มากถึงร้อยละ 17.49 และ 21.23 ตามลำดับ ในส่วนของการแบ่งตัวแบบไมโทซิส (M) นั้นสถานะเกาะพบได้ร้อยละ 2.51 ในขณะที่สถานะลอยพบร้อยละ 1.17 และยังพบว่าการเก็บข้อมูลในขณะสถานะลอยนั้นสามารถตรวจพบการตายแบบอะโพโทซิสได้

ในส่วนการกระจายของจำนวนเซลล์ A-549 นั้น สถานะเกาะและลอยไม่มีความแตกต่างกันมากนักในระยะ S กับ G2 แต่ในระยะ G1 กับ M พบว่ามีการกระจายของเซลล์แตกต่างกันโดยในสถานะเกาะ G1 มีค่าร้อยละ 56.98 และ M ร้อยละ 6.58 ส่วนในสถานะลอยพบระยะ G1 ร้อยละ 60.25 และ M 2.52 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบมีความแตกต่างโดยคิดเป็นร้อยละ 3.27 และ 4.06 ตามลำดับ นอกจากนี้ในสถานะที่เซลล์ลอยสามารถตรวจพบการตายแบบอะโพโทซิสได้

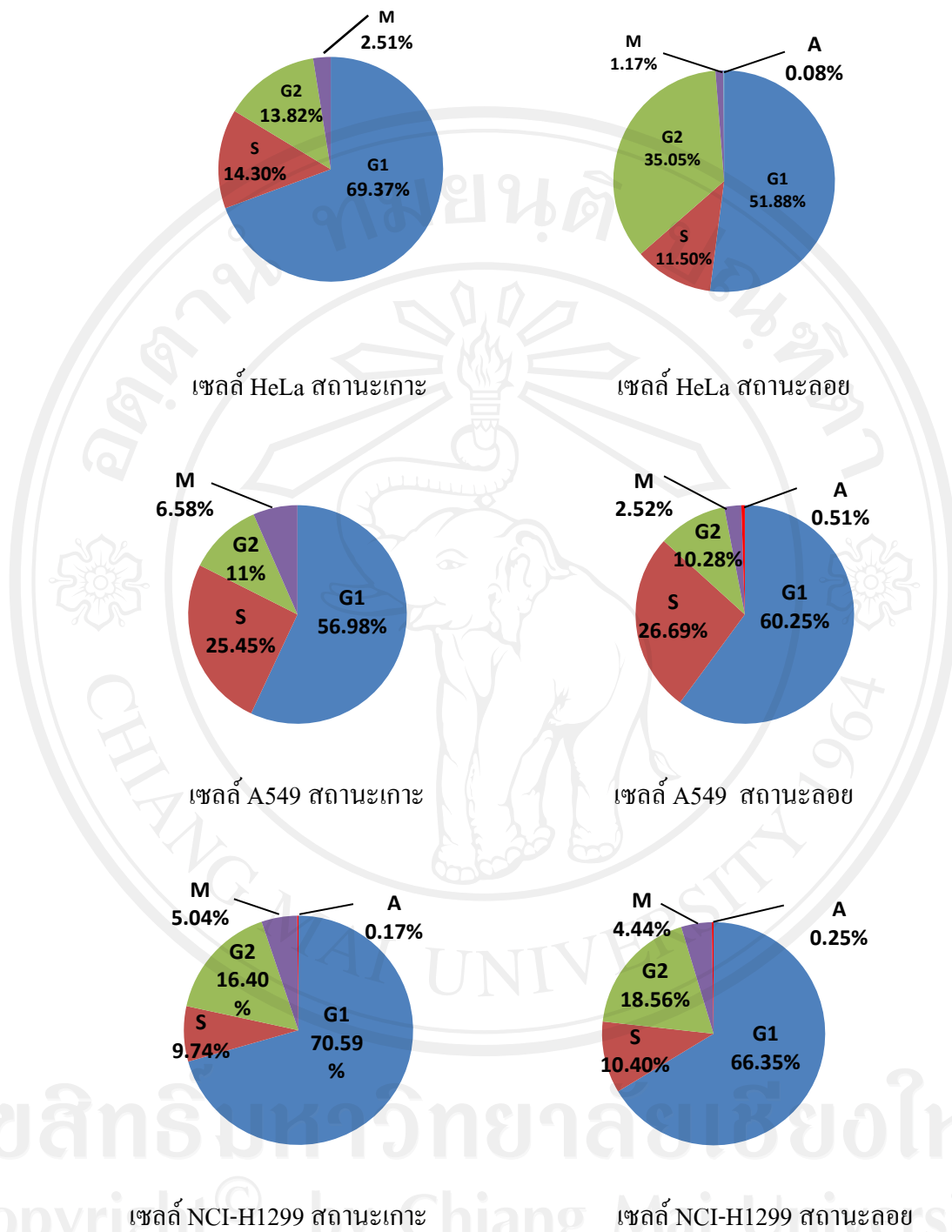
สำหรับการกระจายของเซลล์ NCI-H1299 นั้น เมื่อพิจารณาจากแผนภาพวงกลมพบว่าทั้งสถานะเกาะและลอย มีแนวโน้มไปในทางเดียวกันไม่มีความแตกต่างในค่าร้อยละการกระจายของเซลล์มากนัก นอกจากนี้ยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะโพโทซิสในทั้งสองสถานะ

4.4.2 เซลล์ที่ได้รับ cisplatin

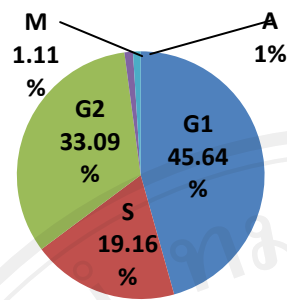
จากภาพ 4.17 เมื่อให้ cisplatin เป็นเวลา 72 ชั่วโมง พบว่าร้อยละการกระจายของเซลล์ HeLa สถานะเกาะในระยะ G1, S และ G2 ดังนี้ 43.25, 20.44 และ 34.98 และสถานะลอย มีร้อยละการกระจายในระยะ G1, S และ G2 คือ 49.53, 7.08 และ 41.53 ตามลำดับ จากข้อมูลจะเห็นได้ว่าทั้งสถานะเกาะและสถานะลอย มีร้อยละการกระจายตัวในไปในทิศทางเดียวกัน คือมีการกระจายตัวมากใน ระยะ G1, G2 และ S ตามลำดับ แต่อาจมีร้อยละที่แตกต่างกัน และเมื่อเก็บข้อมูลเซลล์ในสถานะเกาะ พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสร้อยละ 1.11 และมีการตายแบบอะโพอโทซิสร้อยละ 1 แต่เมื่อเก็บข้อมูลในสถานะลอย จะพบเฉพาะการตายแบบอะโพอโทซิสร้อยละ 1.23

ในส่วนของ เซลล์ A549 พบว่า เซลล์มีร้อยละการกระจายตัวไปในทิศทางเดียวกัน คือในระยะ G1 มีร้อยละการกระจายมาก และรองลงมาคือ G2 และ S ตามลำดับ แต่อาจจะมีค่าแตกต่างกันในค่าของร้อยละ โดยค่าร้อยละ ระยะ G1, S และ G2 สถานะเกาะคือ 57.03, 26.83 และ 16.07 ตามลำดับ และในสถานะลอย คือ 70.39, 18.48 และ 11.13 ตามลำดับ และทั้งในสถานะเกาะกับลอย ไม่พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิส แต่การตายแบบอะโพอโทซิสนั้นตรวจพบได้ในสถานะลอยเพียงอย่างเดียว

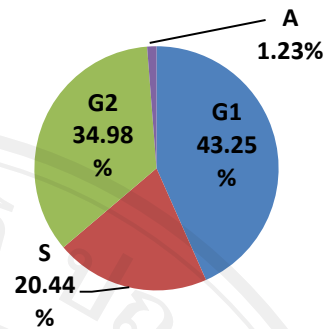
สำหรับร้อยละการกระจายตัวของจำนวนเซลล์ NCI-H1299 นั้น ในระยะ G1 และ G2 ไม่มีความแตกต่างกันมากนัก โดยถ้าพิจารณาจากแผนภาพวงกลม เช่น G1 สถานะเกาะพบร้อยละ 50.23 และสถานะลอยพบ 52.37 เป็นต้น แต่ระยะ S พบว่าสถานะเกาะมีค่าร้อยละที่มากกว่าสถานะลอย คือ 12.14 และ 4.26 ตามลำดับ สามารถตรวจพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะโพอโทซิสได้ในเซลล์ที่มีสถานะเกาะเท่านั้น โดยพบร้อยละ 0.92 และ 1.09 ตามลำดับ



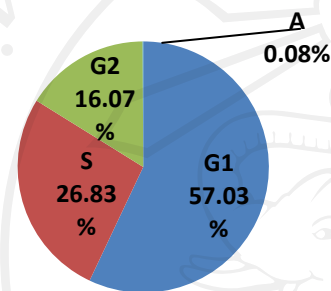
ภาพ 4.16 เซลล์ที่เลี้ยงในสภาวะปกติทั้ง 3 เซื้อสาย แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการกระจายในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์และเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis (A) ทั้งในสถานะเกาะและสถานะลอย



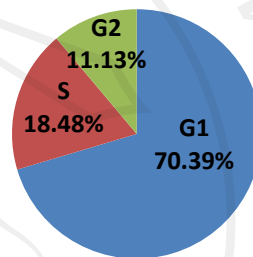
เซลล์ HeLa สถานะเกาะ



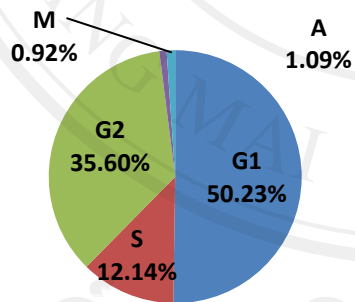
เซลล์ HeLa สถานะลอย



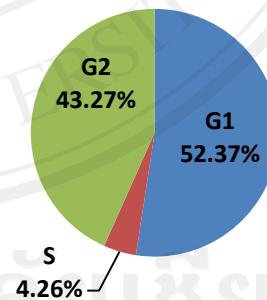
เซลล์ A-549 สถานะเกาะ



เซลล์ A-549 สถานะลอย



เซลล์ NCI-H1299 สถานะเกาะ



เซลล์ NCI-H1299 สถานะลอย

ภาพ 4.17 เซลล์ที่ได้รับ cisplatin ระยะเวลา 72 ชั่วโมง แสดงค่าเฉลี่ยของร้อยละการกระจายในระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์และเซลล์ที่ตายแบบ apoptosis (A) ของเซลล์มะเร็ง 3 เซื้อสาย ทั้งในสถานะเกาะและสถานะลอย

4.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของข้อมูลในเชิงสถิติ

ตาราง 4.1 ความต่างทางสถิติของข้อมูลที่เก็บ โดยวิธีการนับด้วยมือกับข้อมูลที่ได้จาก flow cytometry

เซลล์เชื้อ สาย	สภาวะที่ ตรวจสอบ	ความต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับวิธี flow cytometry		
		G1	S	G2
HeLa	control+เกาะ	0.15±13.16	0.08±5.20	0.14±7.57
	control+ลอย	0.34±15.60	0.39±2.87	0.31±15.90
	cisplatin+เกาะ	0.15±13.16	0.11±7.66	0.14±7.57
	cisplatin+ลอย	0.09±10.66	0.05±3.46*	0.17±12.10
A549	control+เกาะ	0.49±6.36	0.44±4.73	0.46±1.93
	control+ลอย	0.94±5.07	0.24±1.41	0.43±3.05
	cisplatin+เกาะ	0.92±12.83	0.03±8.17*	0.56±6.44
	cisplatin+ลอย	0.20±8.64	0.84±8.73	0.65±7.90
NCI- H1299	control+เกาะ	0.33±5.62	0.13±1.95	0.69±5.33
	control+ลอย	0.38±13.43	0.11±3.49	0.57±9.10
	cisplatin+เกาะ	0.85±20.84	0.00±0.03*	0.31±20.93
	cisplatin+ลอย	0.14±3.45	0.16±3.08	0.00±1.03*

* ยอมรับได้ในเชิงสถิติที่ร้อยละ 95

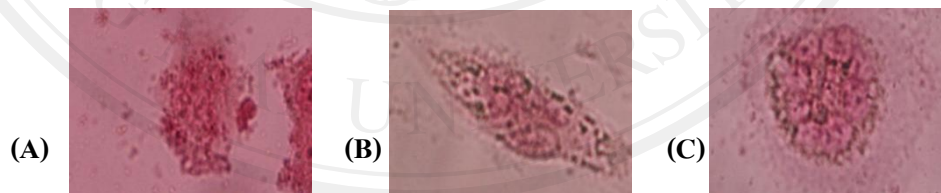
เมื่อนำค่าร้อยละของเซลล์ในระยะต่างๆ ที่ได้จากการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ ข้อ 4.2 และ 4.3 มาเปรียบเทียบกับ ร้อยละที่ได้จากวิธี flow cytometry โดยใช้ Paired t- test ในการวิเคราะห์ความต่างทางสถิติในแต่ละระยะ ซึ่งเซลล์ HeLa และ NCI-H1299 ในสภาวะปกติ ได้เปรียบเทียบกับร้อยละที่ได้จากการศึกษาวัฏจักรเซลล์ทั้ง 2 เซื้อสาย ของจริยา (2553) ซึ่งพบว่า เซลล์ HeLa การกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 ร้อยละ 62.94, 9.72 และ 22.84 ตามลำดับ และเซลล์ NCI-H1299 มีการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 ร้อยละ 75.00, 5.00 และ 15.00 ตามลำดับ ส่วนของเซลล์ A549 นั้นได้เปรียบเทียบกับค่าจากการทดลอง สุพัตรา (2552) ที่ทำการศึกษาวัฏจักรเซลล์ A549 แล้วพบว่ามีการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 ร้อยละ 60.00, 28.00 และ 12.00 ตามลำดับ และในเซลล์ที่ได้รับ cisplatin นั้นนำค่าร้อยละที่ได้จากการทดลองมาเปรียบเทียบกับการศึกษาวัฏจักรเซลล์ทั้ง 3 เซื้อสาย ที่

ได้รับ cisplatin 2 $\mu\text{g/ml}$ นาน แล้วนำไปตรวจสอบด้วยวิธี flow cytometry พบว่า เซลล์แต่ละเชื้อสายมีร้อยละการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 ดังนี้ HeLa 62.71, 8.51 และ 27.10 ตามลำดับ เซลล์ A549 เท่ากับ 79.68, 2.21 และ 13.53 และเซลล์ NCI-H1299 เท่ากับ 54.94, 8.25 และ 27.10 ตามลำดับ

จากการเปรียบเทียบค่าที่ได้จากการเก็บข้อมูลด้วยการย้อมสีแล้วนำมานับกับค่าที่ได้จาก วิธี flow cytometry ที่ระยะ พบว่าที่ความเข้มข้นร้อยละ 95 มีเพียง 4 ค่าเท่านั้นที่สามารถยอมรับได้ แต่ส่วนใหญ่นั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ไม่สามารถยอมรับได้ในทางสถิติ ดังนั้นจึงอาจสรุปได้ว่าการเก็บข้อมูลด้วยการย้อมสีแล้วนำมานับนั้น ยังไม่มีความแม่นยำเท่ากับวิธี flow cytometry

4.6 ผลของการคำนวณร้อยละการตายแบบอะโพโทซิส

จากขั้นตอนการทดลองที่ 3.2 และ 3.5.5 ในขั้นตอนของการวัดและคำนวณพื้นที่นิวเคลียส จะมีการเก็บข้อมูลเซลล์ที่มีการตายแบบอะโพโทซิสซึ่งมีลักษณะ ดังภาพ 4.17 เมื่อนำมาคำนวณร้อยละการตายแบบอะโพโทซิส ดังข้อ 3.5.6 ทำให้ค่าดังตารางที่ 4.2



ภาพ 4.18 การตายแบบอะโพโทซิส ในเซลล์มะเร็งสามเชื้อสาย (A) เซลล์ HeLa (B) เซลล์ A549 (C) เซลล์ NCI-H1299

ตาราง 4.2 ร้อยละการตายแบบอะโพโทซิสของเซลล์สามเชื้อสายในสภาวะต่างๆ

เซลล์ เชื้อสาย	สภาวะ	ร้อยละการตาย แบบอะโพโทซิส
HeLa	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ	0.00 ±0.00
	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ แล้วนำไป trypsinization	0.08 ±0.14
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin	1.00 ±1.29
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin แล้วนำไป trypsinization	1.23 ±0.36
A549	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ	0.00±0.00
	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ แล้วนำไป trypsinization	0.51±0.50
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin	0.08±0.13
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin แล้วนำไป trypsinization	0.00±0.00
NCI-H1299	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ	0.17±0.29
	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ แล้วนำไป trypsinization	0.25±0.01
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin	1.09±0.36
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin แล้วนำไป trypsinization	0.00±0.00

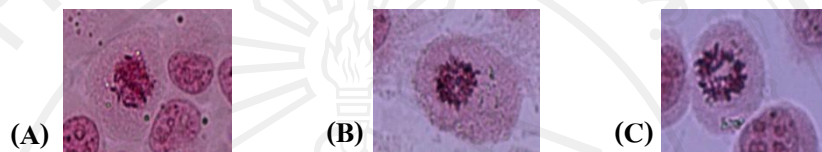
จากตาราง 4.2 ในเซลล์ HeLa เมื่อทำการเปรียบเทียบสภาวะปกติ กับสภาวะที่เซลล์ได้รับ cisplatin นาน 72 ชั่วโมง พบว่าเมื่อเซลล์ได้รับ cisplatin ทั้งในสถานะเกาะและลอย จะมีการตายแบบอะโพโทซิสมากกว่า สภาวะปกติที่เซลล์เกาะและลอย โดยมีร้อยละการตายเท่ากับ 1.00 ± 1.29 และ 1.23 ± 0.36 ตามลำดับ ซึ่งในขณะที่เซลล์ปกติสถานะลอย พบการตายร้อยละ 0.08 ± 0.14 นั้นหมายถึงว่ามีการตาย แบบอะโพโทซิสเพียง 8 เซลล์ใน 100 เซลล์ และเซลล์เกาะที่ไม่ได้รับสารไม่พบการตายแบบอะโพโทซิส

ในส่วนของเซลล์ A549 พบว่าเซลล์ปกติสถานะลอย มีการตายคิดเป็นร้อยละ 0.51 ± 0.50 ซึ่งมีค่าร้อยละการตายมากกว่าทุกสภาวะ ส่วนเซลล์ปกติสถานะเกาะและได้รับ cisplatin และสถานะลอยไม่พบว่ามี การตาย (0.00 ± 0.00)

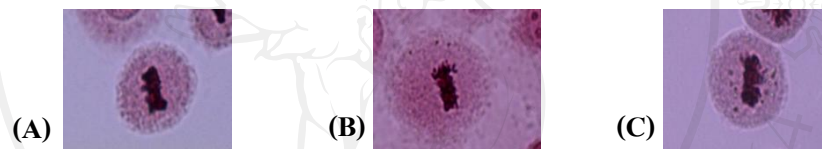
เซลล์ NCI-H1299 พบว่า ในเซลล์ปกติสถานะลอย พบการตายแบบอะโพโทซิสมากกว่าสถานะเกาะ โดยมีค่าร้อยละการตายเท่ากับ 0.25 ± 0.01 และมีค่าการตายมากกว่าทุกสภาวะ ส่วนในสถานะลอย ที่ได้รับ cisplatin ตรวจพบการตายแบบอะโพโทซิส 0.00 ± 0.0

4.7 ผลของการคำนวณร้อยละการแบ่งตัวแบบไมโทซิส

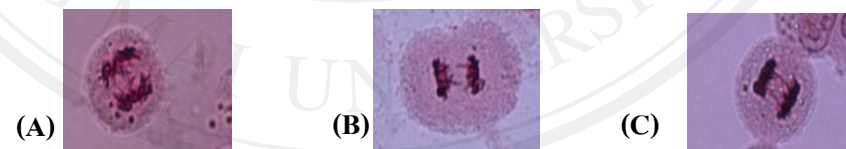
จากขั้นตอนการทดลองที่ 3.2 และ 3.5.5 ในขั้นตอนของการวัดและคำนวณพื้นที่นิวเคลียส จะมีการเก็บข้อมูลเซลล์ที่มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสซึ่งมีลักษณะการแบ่งตัวในแต่ละเซลล์ ดังภาพ 4.19-4.22 เมื่อนำมาคำนวณร้อยละการแบ่งตัวแบบไมโทซิสดังข้อ 3.5.7 ทำให้ทราบร้อยละการแบ่งตัวของเซลล์ทั้งสามเชื้อสาย



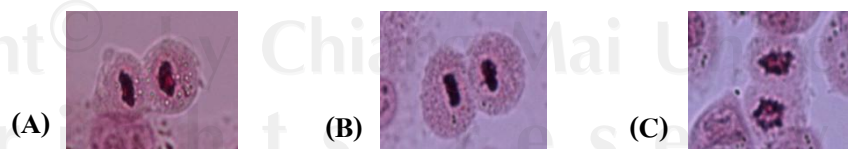
ภาพ 4.19 เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และเซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะโพรเฟส โดยลักษณะโครโมโซมหดตัวมากขึ้นเห็นเป็นเส้นๆชัดเจน



ภาพ 4.20 เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และเซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะเมทาเฟส โดยลักษณะสำคัญของระยะนี้คือ โครโมโซมหดตัวสั้นหนาตัวมาก และโครโมโซมมาเรียงตัวกันตรงกลางของเซลล์



ภาพ 4.21 เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และ เซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะแอนาเฟส โครโมโซมถูกดึงแยกออกจากกันไปยังคนละขั้วของเซลล์



ภาพ 4.22 เซลล์ HeLa (A) เซลล์ A549 (B) และ เซลล์ NCI-H1299 ที่มีการแบ่งแบบไมโทซิสระยะเทโลเฟส โครโมโซมอยู่ที่ขั้วของเซลล์แต่ละขั้วและเริ่มคลายตัว ตอนท้ายของระยะนี้คือการคอดเว้าของเยื่อหุ้มเซลล์เพื่อแบ่งออกเป็น 2 เซลล์

ตาราง 4.3 ครรชนีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสของเซลล์สามเชื้อสายในสภาวะต่างๆ

เซลล์ เชื้อสาย	สภาวะ	ครรชนีการแบ่งตัวแบบ ไมโทซิส (ร้อยละ)
HeLa	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ	2.51 ±0.10
	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ แล้วนำไป trypsinization	1.17 ±0.54
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin	1.11 ±0.74
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin แล้วนำไป trypsinization	0.00 ±0.00
A549	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ	6.58 ±0.47
	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ แล้วนำไป trypsinization	2.52 ±0.65
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin	0.00 ±0.00
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin แล้วนำไป trypsinization	0.00 ±0.00
NCI-H1299	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ	5.04 ±1.76
	เซลล์ที่ไม่ได้รับสารใดๆ แล้วนำไป trypsinization	4.44 ±0.90
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin	0.92 ±0.50
	เซลล์ที่ได้รับ cisplatin แล้วนำไป trypsinization	0.00 ±0.00

จากตาราง 4.3 พบว่าเซลล์ทั้งสามเชื้อสายมีค่าร้อยละแบ่งตัวแบบไมโทซิสไปในทิศทางเดียวกัน คือ เซลล์ปกติในสถานะเกาะพบการแบ่งตัวมากที่สุด รองลงมา คือ เซลล์ปกติสถานะลอยต่อมาก็คือ เซลล์ที่ได้รับ cisplatin ในสถานะเกาะและเซลล์ที่มีการให้ cisplatin ในสถานะลอยเช่น HeLa ที่มีร้อยละการแบ่งแบบไมโทซิสตามที่ได้กล่าวมาข้างต้น คือ 2.51 ±0.10, 1.17 ±0.54, 1.11 ±0.74 และ 0.00 ±0.00 ตามลำดับ และสามารถสรุปได้ว่า จะพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสในเซลล์ปกติที่ไม่ได้รับสารแปลกปลอมใดๆ มากกว่ากลุ่มที่มีการให้สาร และพบในสถานะเกาะมากกว่าสถานะลอย