

บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

5.1 การศึกษาพื้นฐานวิทยาของเซลล์

จากข้อ 4.1 เมื่อทำการเลี้ยงเซลล์ HeLa , A549 และ NCI-H1299 ในสภาวะปกติ นาน 72 ชั่วโมงเซลล์ทั้งสามเชื้อสายจะอยู่ในระยะ subconfluence จากนั้นทำการย้อมเซลล์ ด้วยสี aceto-orcein พบว่า HeLa จะมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะชั้นเดียว มีรูปร่างหลายเหลี่ยม แบบแบบ epithelial-like นิวเคลียสมีหลายรูปร่าง ตั้งแต่กลมไปถึงรีและรูปถั่ว และภายใน นิวเคลียสมีนิวคลีโอลัส 1-2 อัน ส่วนเซลล์ A549 นั้นจะมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะชั้นเดียว มี รูปร่างแหลมหัวแหลมท้าย แบบ fibroblast-like นิวเคลียสที่ติดสีแดง มีรูปร่างลักษณะยาว รี ภายในมีนิวคลีโอลัสอยู่ 1-3 อัน และเซลล์ NCI-H1299 มีลักษณะการเกาะ รูปร่างเซลล์ และรูปร่างนิวเคลียสเหมือนเซลล์ HeLa แต่ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัส 2-3 อัน ซึ่ง ลักษณะดังกล่าวของเซลล์แต่ละเชื้อสายนั้นสอดคล้องกับรายงานของ ATCC (2011) ที่ได้ กล่าวถึงลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเซลล์ทั้งสามเชื้อสาย

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเซลล์ทั้ง 3 เชื้อสายในสถานะลอย เมื่อย้อมสี aceto-orcein จะเห็นว่ามีความแตกต่างพื้นฐานวิทยาที่เปลี่ยนไป คือจะมีรูปร่างค่อนข้างกลม หรือรี สามารถ มองเห็นนิวเคลียสได้ ซึ่งในสถานะลอยนี้นิวเคลียสจะมีขนาดเล็กกว่าและเห็นนิวคลีโอลัส จำนวนเท่ากับในสถานะเกาะ

5.2 การศึกษาวัฏจักรเซลล์ในสภาวะปกติ

จากผลการทดลองข้อ 4. 2 พบว่าเซลล์ HeLa ทั้งสถานะเกาะและสถานะลอย มี แบบการกระจายตัวในระยะต่างๆ ตามวัฏจักรเซลล์ ดังนี้สถานะเกาะมี G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 69.37, 14.30 และ 13.82 ตามลำดับ ทั้งนี้ยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิส ร้อยละ 2.51 ส่วนเซลล์ HeLa ในสถานะลอย นั้น พบว่า มี G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 51.88, 11.50 และ 30.05 นอกจากนี้ยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะพ โโทซิสร้อยละ 1.17 กับ 0.08 ตามลำดับ ผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าทั้งสองสถานะที่ ทำการศึกษานั้น มีแนวโน้มการกระจายของเซลล์ในระยะต่างๆ แตกต่างกัน สถานะเกาะ จะมี G1 มากที่สุด และมี S กับ G2 ที่ใกล้เคียงกันมาก แต่ในสถานะลอยนั้น จะมีระยะ G1

มากที่สุดรองลงมาก็คือระยะ G2 และ S ตามลำดับ ซึ่งผลการทดลองในสถานะลอยที่ได้สอดคล้องกับการศึกษาวัฏจักรเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry ซึ่งพบว่ามีระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ 67.60, 7.44 และ 20.09 ตามลำดับ (จริยา, 2553) และจากการศึกษาในหัวข้อเดียวกันของ Wang (2006) พบว่าเซลล์ HeLa มีแนวโน้มการกระจายตัวในระยะต่างๆ คือ มีระยะ S มากที่สุด รองลงมาก็คือ G1 และ G2 ซึ่งต่างจากการทดลองนี้ นอกจากนี้ เบญจวรรณ (2554) ยังได้รายงานว่าเมื่อให้ cisplatin 2.05 $\mu\text{g/ml}$ แก่เซลล์ HeLa นาน 72 ชั่วโมง จากนั้นทำการวัดแล้วคำนวณขนาดนิวเคลียส พบว่ามีระยะ G1, S และ G2 ในร้อยละที่ใกล้เคียงกัน คือ 22.43, 25.67 และ 21.08 อีกทั้งพบการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสมากถึงร้อยละ 25.67 นอกจากนี้ยังพบการตายแบบอะพอโทซิส ร้อยละ 2.7 เมื่อดูผลการทดลองนี้เทียบกับผลการทดลองของเบญจวรรณ (2554) พบว่า ถึงแม้จะมีวิธีการทดลองที่เหมือนกัน แต่ก็ยังมีความแตกต่างของผลการทดลอง เนื่องมาจากเทคนิคส่วนบุคคล การเก็บข้อมูล และวิธีการคำนวณอาจมีความแตกต่างกันในรายละเอียด

ในเซลล์ A549 พบว่าในสถานะเกาะมีการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 56.98, 25.4 และ 11.00 ตามลำดับ ทั้งยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสถึงร้อยละ 6.58 ส่วนเซลล์ในสถานะลอย นั้น มี G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 60.25, 26.69 และ 10.28 ตามลำดับ ทั้งยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะพอโทซิสร้อยละ 2.52 กับ 0.51 เมื่อพิจารณาค่าการกระจายตัวของเซลล์ทั้งสองสถานะพบว่า มีแนวโน้มการกระจายตัวไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะ G1 มากที่สุด รองลงมา คือระยะ S และ G2 ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของจริยา (2553) ที่ทำการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ A549 โดยใช้วิธี flow cytometry แล้วพบว่า มีเซลล์อยู่ใน G0/G1, S, G2/M ร้อยละ 79.59, 13.22 และ 2.71 อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีแนวโน้มการกระจายตัวไปในทางเดียวกัน แต่ก็มีมีความต่างในร้อยละของเซลล์ที่กระจายอยู่ในแต่ละระยะ ซึ่งอาจเนื่องมาจากวิธีการเลี้ยงที่แตกต่างกัน และวิธีที่ใช้ศึกษาวัฏจักรเซลล์ก็มีความแตกต่างกัน เมื่อศึกษาการทดลองของสุพัตรา (2552) ที่ทำการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ A549 โดยใช้วิธี flow cytometry เช่นเดียวกัน พบว่า มีเซลล์อยู่ใน G0/G1 S และ G2/M ร้อยละ 47.72, 8.19 และ 21.94 ซึ่งเมื่อพิจารณาค่าที่ได้ พบว่าแนวโน้มการกระจายตัวของเซลล์ในระยะต่างๆ นั้น เป็นไปคนละทิศทางกับการศึกษาของ จริยา (2553) และของการทดลองนี้ นอกจากนี้จากรายงานการทดลองของไพบูลย์ (2554) ซึ่งได้ทำการศึกษาวัฏจักรเซลล์ A549 โดยทำการวัดขนาดนิวเคลียสเซลล์ในสถานะเกาะ ซึ่งมีกระจายของเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 ดังนี้ คือร้อยละ 52.0 8.0 และ 39.0 ตามลำดับ ซึ่งหากพิจารณาค่าที่มีการรายงานจะพบว่าแม้จะทำการทดลองด้วยวิธี

เดียวกันก็ตาม แต่การกระจายของเซลล์ในระยะต่างๆ นั้นก็ยังมีแนวโน้มการกระจายไปในทิศทางที่ต่างกัน

เซลล์ NCI-H1299 ในสถานะเกาะมีการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 70.59, 9.74 และ 16.40 ตามลำดับ ทั้งยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะโพโทซิสร้อยละ 5.04 และ ร้อยละ 0.17 ส่วนเซลล์ในสถานะลอย นั้นมีการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 66.35, 10.4 และ 18.56 ทั้งยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะโพโทซิสร้อยละ 4.44 กับ 0.25 ตามลำดับ จากค่าที่ได้จะเห็นว่าในสถานะเกาะและสถานะลอยนั้น มีจำนวนเซลล์ในระยะ G1, S และ G2 ในร้อยละที่ไม่แตกต่างกันมากนัก และยังมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกัน คือ มีระยะ G1 มากที่สุด รองลงมา คือระยะ G2 และ S ตามลำดับ สอดคล้องกับการทดลองของวอล์คกัสน์ (2553) ที่ทำการศึกษาวัยจักรเซลล์ NCI-H1299 ที่เลี้ยงในสภาวะปกติ พบว่า มีระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ ร้อยละ 75.00, 4.00 และ 14.00 ตามลำดับ นอกจากนี้ยังสอดคล้องกับการทดลองของจริยา (2553) ซึ่งศึกษาวัยจักรเซลล์ NCI-H1299 ด้วยวิธี flow cytometry พบว่า มีระยะ G1, S, G2 เท่ากับร้อยละ 75.00, 5.00 และ 15.00

5.3 การศึกษาวัยจักรเซลล์ในสภาวะที่ได้รับ cisplatin

cisplatin เป็นยามาตรฐานที่ใช้ในการรักษามะเร็ง ซึ่งมีหลายงานวิจัย ที่ได้รายงานว่ายาชนิดนี้สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์มะเร็งและชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสได้ เช่น Eastman (1990) ได้รายงานว่า cisplatin จะไปยับยั้งการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ แต่เซลล์ที่นั้นจะยังเข้าสู่ระยะ G2 ได้ และจะหยุดอยู่ที่ระยะนี้แล้วเกิดการตายแบบอะโพโทซิส นอกจากนี้ยังมีการทดลองใน Chinese hamster ovary cell ของ Demarcq *et al.* (1994) และ Barry *et al.* (2002) พบว่า cisplatin สามารถชักนำให้เกิดการตายแบบอะโพโทซิสได้

จากข้อ 4.3 เมื่อให้ cisplatin แก่ เซลล์ HeLa พบว่าเมื่ออยู่ในสถานะเกาะ มีร้อยละการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ 45.64, 19.16 และ 33.09 ทั้งยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะโพโทซิส ร้อยละ 1.11 และ 1.00 เมื่ออยู่ในสถานะลอย เซลล์จะมีร้อยละการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ 43.35, 20.44 และ 34.98 ตามลำดับ เซลล์ในสถานะลอยนี้ ไม่พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิส แต่พบการตายแบบอะโพโทซิสร้อยละ 1.23 จากข้อมูลทั้งสองสถานะ พบว่าเซลล์มีการกระจายตัวในระยะต่างๆ ไปในทิศทางเดียวกันคือมีระยะ G1 มากที่สุด รองลงมาคือระยะ G2 และ S ตามลำดับ ซึ่งในแต่ละระยะมีร้อยละการกระจายตัวค่อนข้างใกล้เคียงกัน ผลการทดลองที่ได้สอดคล้องกับ

การทดลองของ จริยา (2553) ที่ทำการศึกษาวัฏจักรเซลล์ HeLa ที่ได้รับ cisplatin ที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้วิธี flow cytometry พบว่า เมื่อให้ สารที่เข้มข้น 2 $\mu\text{g/ml}$ นาน 72 ชั่วโมง จะมีเซลล์กระจายในระยะ G1, S และ G2 ร้อยละ 62.71 8.51 และ 22.83 ตามลำดับ ซึ่งแม้จะมีการกระจายไปในทิศทางเดียวกัน แต่ยังมีความแตกต่างของจำนวนร้อยละในแต่ละระยะ อาจเนื่องมาจาก วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์ และวิธีการเก็บข้อมูลที่ไม่เหมือนกัน รวมไปถึงความเข้มข้นของสารที่ให้กับเซลล์ก็แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังพบว่า cisplatin สามารถยับยั้งการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและชักนำการตายแบบอะพอโทซิสได้ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Ishibashi and Lippard (1998) ที่พบว่า เมื่อให้ cisplatin 5 μM แก่เซลล์ HeLa นาน 48 ชั่วโมง ทำให้ เซลล์ HeLa มีทีโลเมียร์ (telomere) ที่สั้นลง ส่งผลให้เกิดการจำลองตัวของดีเอ็นเอที่ไม่สมบูรณ์ในระยะ S และชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะพอโทซิสในที่สุด

ในเซลล์ A549 พบว่าการกระจายของเซลล์ในสถานะเกาะมีร้อยละการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ 57.03, 26.83 และ 16.07 ตามลำดับ และพบการตายแบบอะพอโทซิสร้อยละ 0.08 ในสถานะลอยมี G1, S และ G2 ร้อยละ 70.39, 18.48 และ 11.00 ตามลำดับ ไม่พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะพอโทซิสเมื่อพิจารณาผลการทดลอง จะพบว่า มีการกระจายตัวในระยะ G1 มากที่สุด รองลงมาคือ S และ G2 ตามลำดับ แต่ในทั้งสองสภาวะมีค่าร้อยละที่แตกต่างกัน เมื่อเปรียบเทียบกับผลการทดลองของ จริยา (2553) ที่รายงานว่าทำการให้ cisplatin 2 $\mu\text{g/ml}$ นาน 72 ชั่วโมง แล้วนำไปศึกษาด้วย flow cytometry พบว่า มีการกระจายในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับร้อยละ 79.68, 2.21 และ 13.53 ซึ่งมีแนวโน้มการกระจายแตกต่างจากการทดลองนี้ อาจมีสาเหตุเนื่องมาจากความเข้มข้นของสาร และวิธีการที่ใช้ในการศึกษาวัฏจักรเซลล์มีความแตกต่างกัน

ในเซลล์ NCI-H1299 พบว่าเมื่อเซลล์อยู่ในสถานะเกาะมีร้อยละการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ 50.23, 12.14 และ 35.60 ทั้งยังพบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะพอโทซิส ร้อยละ 0.92 และ 1.09 ตามลำดับ เมื่ออยู่ในสถานะลอย จะมีร้อยละการกระจายตัวในระยะ G1, S และ G2 เท่ากับ 53.37, 4.26 และ 43.27 ซึ่งในสถานะลอยนี้ ไม่พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสและการตายแบบอะพอโทซิส จากการพิจารณาข้อมูลในสองสถานะ พบว่า มีแนวโน้มการกระจายตัวไปในทิศทางเดียวกัน คือ มี G1 มากที่สุด รองลงมาคือ G2 และ S ตามลำดับ ในส่วนค่าร้อยละการกระจายตัวในแต่ละระยะ พบว่า ในระยะ G1 มีความใกล้เคียงกันของข้อมูล แต่ระยะ S และ G2 นั้น ค่าร้อยละยังมีความแตกต่างกัน อาจเนื่องจากการจัดวัฏจักรเซลล์ในสถานะที่ต่างกัน ทำให้ค่าร้อยละที่

ต่างกัน อย่างไรก็ตามแนวโน้มการกระจายตัวในแต่ละระยะที่ได้ก็ยังมีค่า สอดคล้องกับการศึกษาวัฏจักรเซลล์ NCI-H1299 หลังจากได้รับ cisplatin 2 $\mu\text{g/ml}$ นาน 72 ชั่วโมง โดยวิธี flow cytometry ซึ่งพบว่า เซลล์มีการกระจายจากมากไปหาน้อยเป็นร้อยละ ดังนี้ $G0/G1 = 54.94$, $G2/M = 27.10$ และ $S = 8.25$ (จริยา, 2553) เมื่อนำค่าที่ได้เปรียบเทียบกับ การทดลองของ Crescenzi *et al.* (2006) ที่ให้ cisplatin 5 $\mu\text{g/ml}$ เป็นเวลา 1 ชั่วโมง แก่เซลล์ NCI-1299 แล้วนำไปวิเคราะห์ด้วย flow cytometry พบว่า เซลล์มีการกระจายตัวมากที่สุด ในระยะ G1, S และ G2 ในร้อยละ 64.8, 28.6 และ 6.6 9 ตามลำดับ เมื่อพิจารณาจะเห็นว่า ผลการกระจายตัวจะแตกต่างจากการทดลองนี้ ซึ่งอาจเกิดจากการให้สารที่มีความเข้มข้น และระยะเวลาที่ต่างกัน อีกทั้งยังใช้วิธีในการศึกษาวัฏจักรเซลล์ที่แตกต่างกัน

5.4 การวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์

ในการวิเคราะห์การเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์นั้น จะเป็นการเปรียบเทียบวัฏจักร เซลล์ในสภาวะปกติกับสภาวะที่ได้รับ cisplatin นาน 72 ชั่วโมง เพื่อศึกษาว่า เมื่อเซลล์ ได้รับ cisplatin จะมีการเปลี่ยนแปลงวัฏจักรเซลล์อย่างไร ซึ่งสาร cisplatin นี้ ได้มีรายงาน ก่อนหน้านี้แล้วว่า มีฤทธิ์ควบคุมวัฏจักรเซลล์และสามารถชักนำให้มีการตายแบบอะพอโท ซิส (ข้อ 5.3)

เมื่อเปรียบเทียบ HeLa ที่อยู่ในสภาวะปกติและหลังจากได้รับ cisplatin พิจารณา ทั้งในสถานะเกาะและสถานะลอย พบว่ามีการเพิ่มขึ้นและลดลงของระยะ G1, S และ G2 แตกต่างกัน กล่าวคือเมื่ออยู่ในสถานะเกาะ ร้อยละของเซลล์ในระยะ G1 และ S ลดลงร้อยละ 25 กับ 5 แต่ระยะ G2 เพิ่มขึ้นร้อยละ 20 ส่วนสถานะลอย นั้น G1 ลดลงร้อยละ 10 ระยะ S เพิ่มขึ้นร้อยละ 8 และมีระยะ G2 เท่าๆ กับในสภาวะปกติ นอกจากนี้ยังพบว่าเมื่อ ได้รับ cisplatin พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสลดลง และพบการตายแบบอะพอโทซิสเพิ่ม มากขึ้น จากผลการทดลองสามารถสรุปได้ว่าในสถานะเกาะ นั้น cisplatin มีฤทธิ์ ควบคุมวัฏจักรเซลล์ HeLa ให้หยุดอยู่ในระยะ G2 ซึ่งสอดคล้องกับ การทดลองของ Lin- choa and choa (1994) ที่รายงานว่า เมื่อให้ cisplatin กับเซลล์ HeLa ยะจะไปยับยั้งการ สังเคราะห์ดีเอ็นเอ และควบคุมวัฏจักรเซลล์ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2 และการทดลอง ของ Zhang *et al.* (2009) ที่ให้ cisplatin 4 $\mu\text{g/ml}$ แล้วศึกษาด้วยวิธี flow cytometry พบว่า เซลล์หยุดอยู่ในระยะ G2 เพิ่มขึ้นร้อยละ 30 และสามารถควบคุมวัฏจักรเซลล์ให้หยุดอยู่ใน ระยะ S

เมื่อเปรียบเทียบเซลล์เชื้อสาย A549 ที่เลี้ยงในสภาวะปกติและสภาวะที่ได้รับ cisplatin นาน 72 ชั่วโมง พบว่า สถานะเกาะมีระยะ G1 และ S ใกล้เคียงกับสภาวะปกติ แต่มีระยะ G2 เพิ่มขึ้นร้อยละ 5 และสถานะลอย มีระยะ G1 เพิ่มขึ้นร้อยละ 10 ระยะ S ลดลงร้อยละ 18 และระยะ G2 มีค่าใกล้เคียงกับสภาวะปกติ นอกจากนี้หลังจากได้รับ cisplatin ไม่พบการแบ่งตัวแบบไมโทซิส แต่พบการตายแบบอะโพโทซิสเพิ่มขึ้นในสถานะเกาะ สำหรับสถานะลอยนั้นเมื่ออยู่ในสภาวะปกตินั้นพบทั้งสองกระบวนการ แต่เมื่อได้รับสาร ไม่พบกระบวนการใดเลย จากผลการทดลองที่ได้ สามารถสรุปได้ว่า ในสถานะเกาะ cisplatin สามารถควบคุมวัฏจักรเซลล์ให้หยุดอยู่ในระยะ G2 และสถานะลอยจะควบคุมให้หยุดอยู่ในระยะ G1 และยังสามารถชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะโพโทซิสได้ ซึ่งผลการทดลองในสถานะเกาะนั้น มีส่วนที่คล้ายกับการทดลองที่ทำการให้สาร cisplatin เข้มข้น 10 $\mu\text{g/ml}$ แก่เซลล์ A549 นาน 48 ชั่วโมง แล้วทำการตรวจสอบวัฏจักรเซลล์ด้วยวิธี flow cytometry พบว่าร้อยละของเซลล์ในระยะ G2/M เพิ่มขึ้น (สุพัตรา, 2552) และผลการทดลองในสถานะลอย จะสอดคล้องกับ จริยา (2553) ที่ให้ cisplatin เข้มข้น 8 $\mu\text{g/ml}$ แล้ววิเคราะห์ด้วยวิธี flow cytometry เช่นเดียวกัน พบว่า เซลล์ A549 หยุดอยู่ในระยะ G0 /G1

จะเห็นได้ว่า ในเซลล์ HeLa และ A549 นั้น เมื่ออยู่ในสถานะที่เซลล์เกาะ และสถานะลอย จะพบการควบคุมวัฏจักรเซลล์ของ cisplatin ในระยะที่แตกต่างกัน ซึ่งอาจมีสาเหตุมาจาก ความยากในการเก็บข้อมูล เพราะเมื่ออยู่ในสถานะลอย จะเก็บข้อมูลได้ยากกว่า ทำให้เกิดความคลาดเคลื่อนในการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ และเมื่อนำมาเปรียบเทียบกับหลายการทดลอง จะเห็นว่าข้อมูลในสถานะเกาะค่อนข้างมีแนวโน้มที่ใกล้เคียงมากกว่า ดังนั้นข้อมูลที่เก็บในสถานะเกาะน่าจะมีความแม่นยำกว่าในการใช้วิเคราะห์ วัฏจักรเซลล์

ในส่วนของเซลล์ NCI-H1299 นั้น พบว่า เมื่อได้รับ cisplatin สถานะเกาะมีจำนวนเซลล์ระยะ G1 และ S ลดลงร้อยละ 20 และ 3 มี G2 เพิ่มขึ้นร้อยละ 20 นอกจากนี้ยังพบว่าการแบ่งตัวแบบ ไมโทซิสลดลง และมีการตายแบบอะโพโทซิสเพิ่มขึ้น ในสถานะลอย จำนวนเซลล์ในระยะ G1 และ S ลดลงร้อยละ 13 และ 5 มี G2 เพิ่มขึ้น ร้อยละ 21 เมื่อเปรียบเทียบการแบ่งตัวแบบไมโทซิสกับการตายแบบอะโพโทซิส พบว่า เมื่อเลี้ยงเซลล์ในสภาวะปกติ พบทั้งสองกระบวนการ แต่เมื่อได้รับ cisplatin แล้ว ไม่พบกระบวนการใดเลย จึงสามารถสรุปได้ว่า cisplatin สามารถชักนำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ S และ G2 ได้ ซึ่งสอดคล้องกับการทดลองของ Elvira *et al.* (2006) ที่รายงานว่า เมื่อได้รับ cisplatin นาน 72 ชั่วโมง เซลล์ NCI-H1299 จะหยุดอยู่ในระยะ G2

5.5 การเปรียบเทียบประสิทธิภาพของข้อมูล

จากข้อ 4.5 เมื่อทำการเปรียบเทียบข้อมูลที่ได้จากวิธีการวัดแล้วคำนวณพื้นที่นิวเคลียส กับข้อมูลที่ได้จาก flow cytometry พบว่าข้อมูลทั้งสองชุดนั้นมีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ ไม่สามารถยอมรับได้ในทางสถิติ ซึ่งแสดงให้เห็นว่าวิธีการวัดแล้วคำนวณพื้นที่นิวเคลียสนั้น ยังไม่มีความแม่นยำเพียงพอ เมื่อเทียบกับวิธี flow cytometry ซึ่งได้รับการยอมรับว่ามีความถูกต้องแม่นยำและสามารถใช้อ้างอิงในผลในเชิงวิชาการได้ วิธี flow cytometry มีความละเอียดสูงมาก เนื่องจากการตรวจสอบเซลล์ที่ไหลผ่านเครื่องที่ละเอียด ซึ่งวิธีนี้จะแยกวัฏจักรเซลล์ได้โดยวัดจากปริมาณดีเอ็นเอ และยังสามารถวัดได้ที่หลากหลาย พารามิเตอร์ร่วมกันได้ เช่น รูปร่าง ขนาด สี (โกวิทย์, 2539) แต่จะไม่สามารถบอกได้ว่า เซลล์อยู่ในระยะ prophase, metaphase, anaphase และ telophase ได้ เนื่องจากเครื่องไม่สามารถตรวจวัดการเคลื่อนที่ของโครโมโซมได้ (วลัยลักษณ์, 2554) นอกจากนี้วิธี flow cytometry ยังมีข้อจำกัด คือ การเตรียมเซลล์ต้องมีจำนวนที่มากเพียงพอ และต้องไม่มีสิ่งอื่นเจือปนนอกจากเซลล์เท่านั้น เพราะจะทำให้ไปอุดตันทำให้เครื่องเสียหาย และไม่สามารถวัดผลได้ ราคาของเครื่องก็เป็นข้อจำกัดในการทดสอบ เนื่องจากมีราคาแพงมาก ด้วยข้อจำกัดที่กล่าวมาจึงได้คิดค้นการศึกษาวัฏจักรเซลล์ด้วยการวัดและคำนวณพื้นที่นิวเคลียส โดยก่อนทำการวัดนั้นจะมีการย้อมสี aceto-orcein ซึ่งจะทำให้สามารถมองเห็นขอบเขตของนิวเคลียสและการแบ่งเซลล์ในระยะ prophase, metaphase, anaphase และ telophase ได้ชัดเจน จึงสามารถแยกได้ว่าเซลล์มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสในระยะไหน และวิธีนี้ยังประหยัดค่าใช้จ่ายอีกด้วย แต่ปัญหาที่พบจากวิธีนี้ คือ ต้องใช้หลายกระบวนการ คือ การบันทึกภาพ การนับเซลล์ การวัด การคิดหมายเลขเซลล์ การกรอกข้อมูล และการคำนวณ ซึ่งแต่ละขั้นตอนค่อนข้างใช้เวลานาน ทั้งยังเกิดความผิดพลาดและความคลาดเคลื่อนได้ง่าย เช่น ในการสุ่มถ่ายภาพเซลล์ให้มีจำนวนประมาณ 400 เซลล์ อาจเกิดความผิดพลาดในการสุ่ม ทำให้ได้ภาพที่มีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสมากหรือน้อยกว่าปกติ ส่งผลต่อการวิเคราะห์วัฏจักรเซลล์ได้ นอกจากนี้กระบวนการต่างๆที่ใช้ ผู้ทำการทดลองต้องมีความแม่นยำและรอบคอบสูง ทั้งยังต้องมีความเข้าใจเป็นอย่างดี เกี่ยวกับวัฏจักรเซลล์ ลักษณะการแบ่งตัวแบบไมโทซิส และลักษณะการตายแบบอะโพโทซิส ซึ่งการแบ่งตัวและการตายจะมองเห็นได้ค่อนข้างยากในสถานะลอยอยู่ เนื่องจาก นิวเคลียสจะมีขนาดเล็กลงจากสถานะเกาะ ดังนั้นเมื่อต้องการข้อมูลของวัฏจักรเซลล์ที่มีความแม่นยำสูง วิธีการนับและคำนวณพื้นที่นิวเคลียสอาจยังไม่แม่นยำเพียงพอ อย่างไรก็ตามวิธีนี้ก็พอจะบอกแนวโน้มการกระจายตัวของเซลล์ ในระยะต่างๆได้ ทั้งยังแสดงให้เห็นว่าสามารถ

จำแนกวัฏจักรเซลล์ได้โดยพิจารณาพื้นที่นิวเคลียส จึงเหมาะสำหรับใช้ในการเรียนการสอนที่ไม่ต้องการข้อมูลที่ละเอียดและไม่ต้องการความแม่นยำมาก

5.6 การคำนวณร้อยละการตายแบบอะโพโทซิส

การตายแบบอะโพโทซิสเป็นการตายที่มีการวางแผนไว้ล่วงหน้า ซึ่งการตายในลักษณะนี้ ร่างกายจะสามารถทำลายเซลล์หรือเศษซากต่างๆ ที่เกิดขึ้นได้ จึงทำให้ไม่เกิดการอักเสบ พบว่าสารหรือยาบางชนิดหลายชนิดสามารถชักนำให้เซลล์มะเร็งเกิดการตายแบบอะโพโทซิสได้ เช่น lupeol ที่สกัดจากกิ่งประทัดคอย สามารถชักนำให้เกิดอะโพโทซิสในเซลล์ A549 ได้ (Prasad *et al.* 2008) และยามาตรฐาน เช่น cisplatin กับ etoposide เป็นต้น การทดลองนี้ทำการเก็บข้อมูลการตายแบบอะโพโทซิสของเซลล์ HeLa, A549 และ NCI-H1299 ทั้งในสถานะปกติและหลังจากให้ cisplatin ที่ IC_{20} นาน 72 ชั่วโมง แล้วพิจารณารูปภาพที่มีการสุมถ่ายแล้วย้อมสี ว่าในเซลล์ที่มีประมาณ 400 เซลล์นั้น มีการตายแบบอะโพโทซิสกี่เซลล์ จากนั้นจึงคำนวณออกมาเป็นร้อยละ พบว่า ในเซลล์ HeLa เมื่อได้รับ cisplatin เซลล์มีการตายแบบอะโพโทซิสเพิ่มขึ้น สามารถสังเกตเห็นได้ทั้งในสถานะที่เซลล์เกาะและลอย ซึ่งเป็นไปในทางเดียวกันกับการศึกษา ของ (เบญจวรรณ, 2554) ที่ทำการศึกษการตายแบบอะโพโทซิสในเซลล์ HeLa ด้วยวิธีเดียวกัน และ Kim *et al.* (2006) กับ Jiang *et al.* (2007) ก็ได้รายงานไว้ว่า เมื่อให้ cisplatin กับเซลล์จะชักนำให้เซลล์เกิดการตายแบบอะโพโทซิสเพิ่มขึ้น สำหรับเซลล์ A549 และ NCI-H1299 นั้น หลังจากได้รับ cisplatin พบว่าในสถานะเกาะ พบว่ามีการตายแบบอะโพโทซิสเพิ่มขึ้นจากสถานะปกติ ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ ไพนุลย์ (2554) ที่รายงานไว้ว่า หลังจากได้รับ cisplatin ที่ IC_{20} นาน 72 ชั่วโมง เซลล์ A549 มีการตายแบบอะโพโทซิสเพิ่มขึ้น และจากผลการทดลองของจริยา (2553) ที่ให้ cisplatin 2 $\mu\text{g/ml}$ แก่เซลล์ A549 และ NCI-H1299 พบว่าเซลล์มีการตายแบบอะโพโทซิสมากกว่าในเซลล์ปกติ แต่เมื่อสังเกตสถานะลอย พบว่าในสถานะปกติ จะตรวจพบการตายแบบอะโพโทซิสมากกว่า ซึ่งอาจเนื่องมาจาก เมื่ออยู่ในสถานะลอย ทำให้เห็นการตายแบบอะโพโทซิสได้ไม่ชัดเจน เกิดความสับสน ทำให้ยากในการเก็บข้อมูล และส่งผลให้ค่าร้อยละการตายแบบอะโพโทซิสของเซลล์ A549 กับ NCI-H1299 ในสถานะลอย เกิดความคลาดเคลื่อนไป

5.7 การคำนวณร้อยละการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส

ในวัฏจักรเซลล์นั้น เมื่อเซลล์ผ่าน ระยะ G1, S และ G2 และจุดตรวจสอบแต่ละจุดมาได้ ก็จะเข้าสู่การแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส ซึ่งประกอบไปด้วยระยะ prophase, metaphase, anaphase และ telophase ตามลำดับ ในแต่ละระยะนั้นจะสามารถแยกได้โดยดูจากลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเส้นใยโครมาติด ซึ่งจะแตกต่างกัน (ข้อ 4.7) ลักษณะดังกล่าวจะสามารถเห็นได้ชัดเจนเมื่อทำการย้อมเซลล์ ด้วยสี aceto-orcein ในการทดลองนี้ทำการเก็บข้อมูลการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิส โดยสังเกตลักษณะการแบ่งเซลล์ แล้วพิจารณารูปภาพที่มีการสุ่มถ่ายแล้วย้อมสี ว่าในเซลล์ที่มีประมาณ 400 เซลล์นั้น มีการแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสกี่เซลล์จากนั้นจึงคำนวณออกมาเป็นร้อยละพบว่าเป็นสภาวะปกติ เซลล์ทั้งสามเชื้อสายจะมีการแบ่งตัวแบบไมโทซิสมากกว่า ภายหลังได้รับ cisplatin เนื่องจาก cisplatin มีฤทธิ์ควบคุมวัฏจักรเซลล์ ทำให้เซลล์หยุดอยู่ในระยะ interphase จึงไม่สามารถเข้าสู่การแบ่งตัวแบบไมโทซิสได้ ส่งผลให้มีร้อยละการแบ่งตัวที่น้อยลง นอกจากนี้ยังพบการแบ่งตัวในสถานะเกาะมากกว่าสถานะลอย ซึ่งอาจเนื่องมาจากการเก็บข้อมูลในสถานะลอยนั้น สังเกตลักษณะการแบ่งเซลล์แบบอะโพโทซิสได้ยากกว่า เพราะนิวเคลียสจะมีขนาดเล็กลง นอกจากนี้ในขั้นตอนการย้อมเซลล์ในสถานะลอย ด้วยสี aceto-orcein ต้องมีการปั่นเหวี่ยงก่อนทำการย้อมสี ซึ่งการปั่นเหวี่ยงนี้อาจส่งผลให้ลักษณะการเคลื่อนตัวของเส้นใยโครมาติด เกิดการบิดเบี้ยว หรือเกาะกลุ่มกัน ทำให้การจัดเซลล์ตามระยะ prophase, metaphase, anaphase และ telophase ทำได้ยากขึ้น และถ้าเส้นใยโครมาติดเคลื่อนที่มาเกาะกลุ่มกันเป็นรูปร่างค่อนข้างกลม ก็จะทำให้เกิดความสับสน ระหว่าง interphase กับ prophase ได้ง่าย