2. ระเบียบวิธีวิจัย

2.1 การเตรียมน้ำคั้นส้มโอในรูป freeze-dried

ใช้เนื้อส้มโอ 2 สายพันธุ์ ได้แก่ ขาวแตงกวา จากจังหวัดชัยนาท และทับทิมสยาม จากจังหวัดนครศรีธรรมราช ที่ผ่านการพิสูจน์เอกลักษณ์จาก รศ.ดร.อำไพวรรณ ภราดร์นุวัฒน์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

นำเนื้อผลส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) 685 กรัม ไปคั้นน้ำแยกกาก ได้น้ำคั้น 270 มิลลิลิตร และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 3000 x *g* ที่ 4 °C นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปกรองด้วยกระดาษกรอง Whatman No.1 อีกครั้ง จะได้น้ำคั้นส้มโอใสจำนวน 205 มิลลิลิตร นำน้ำคั้นที่กรองแล้วจำนวน 125 มิลลิลิตร ไปทำให้แห้งแบบเย็น จะได้สารในรูปของผงแห้งสีขาวจำนวน 11.13 กรัม คิดเป็น 8.9% (w/v) หรือผง 1 กรัม เท่ากับ 11.23 มิลลิลิตร

เนื้อผลส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) 1,081.38 กรัม คั้นน้ำแยกกาก ได้น้ำคั้น 560 มิลลิลิตร และนำไปปั่นตกตะกอนที่ 3000 x *g* ที่ 4 °C นาน 30 นาที หลังจากนั้นนำไปกรอง Whatman No.1 อีกครั้ง จะได้น้ำคั้นส้มโอใสจำนวน 460 มิลลิลิตร นำน้ำคั้นที่กรองแล้วจำนวน 380 มิลลิลิตร ไปทำให้แห้งแบบเย็น จะได้สารในรูปของผงแห้งสีขาวปนชมพูจำนวน 38.39 กรัม คิดเป็น 10.1% (w/v) หรือผง 1 กรัม เท่ากับ 9.90 มิลลิลิตร แสดงดัง (รูปที่ 1) เก็บผงแห้งที่ได้ที่อุณหภูมิ 4 °C

A)

B)

C)

D)

E)

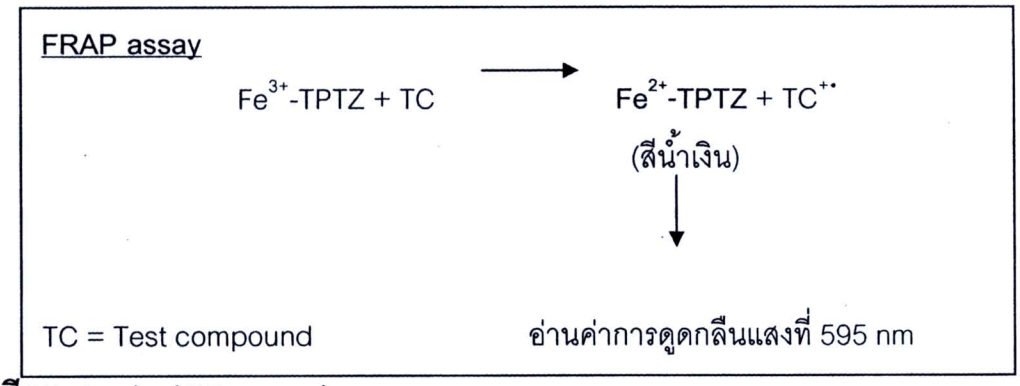
รูปที่ 1 รูปผลส้มโอ เนื้อส้มโอ น้ำคั้นส้มโอและผงแห้ง A) ส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม จากจังหวัดนครศรีธรรมราช; B,C) เนื้อส้มโอ; D) น้ำคั้นส้มโอ; E) ผงแห้งที่ผ่านกระบวนการ freeze-dried

2.2 *การหาปริมาณ total phenolic compound ในน้ำคั้นส้มโอ*

การหาปริมาณ total phenolic compound ในน้ำคั้นส้มโอ จะวัดด้วยวิธี Folin-Ciocalteu assay โดยใช้ gallic acid เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำ standard มา dilute ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1,000 µM, 500 µM, 250 µM, 125 µM, 62.5 µM, 31.25 µM, 0 µM) เพื่อใช้สร้าง calibration curve จากนั้น เตรียมหลอดทดลองให้พอ และเติมน้ำกลั่น 1.58 mL ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด จากนั้น เติม Folin-Ciocalteu reagent 100 µL ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด และเติม Sample หรือ Standard เติมลงไป 20 uL เขย่าให้เข้ากัน และเติม sodium carbonate solution 300 µL ลงไปในหลอดทดลองทุกหลอด และเขย่าให้เข้ากัน ปิดฝาหลอดทดลองและนำไป incubate ที่ 40°C เป็นเวลา 30 นาที นำออกมาตั้งที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 756 nm ด้วยเครื่อง UV-Visible Spectrophotometer ในการทดสอบน้ำค้นส้มโอ จะเตรียมสารที่ความเข้มข้น 10 mg/mL และทำการทดลองเช่นเดียวกับสารละลายมาตรฐาน ทำการทดสอบอย่างน้อยตัวอย่างละ 3 ครั้ง และแต่ละครั้งทำซ้ำในลักษณะ triplicate และคำนวณแปลผลปริมาณสารฟีนอลรวมเฉลี่ยในรูปไมโครกรัม ของ milligram gallic acid equivalents (mg GAE) ต่อน้ำคั้นส้มโอในรูปผงแห้ง 1 กรัม (21)

2.3 *การทดสอบความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอ*

การวัดความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระในน้ำคั้นส้มโอ จะวัดด้วยวิธี FRAP [Ferric Reducing/Antioxidant Power] assay โดยใช้ $Fe(II)SO_4.7H_2O$ เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำ Standard มา dilute ที่ความเข้มข้นต่างๆ (1,000 µM, 500 µM, 250 µM, 125µM, 0µM) จากนั้นนำ Sample และ Standard เติมลงในหลุมๆละ 10 µL และเติม FRAP Reagent [ประกอบด้วย Acetate Buffer 300 mM (pH 3.6), TPTZ 10 mM in HCl 40 mM and $FeCl_3.6H_2O$ 20 mM] ลงไปหลุมละ 200 µL และนำไปอ่านด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 595 nm นำค่าที่ได้ไปเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อหาค่า FRAP value (22)



การเตรียม standard และ sample

- เตรียม $Fe(II)SO_4$ standard ที่ความเข้มข้น 0.1 M โดยละลายในน้ำกลั่นแล้วทำ serial dilution ให้เป็น 1,000 uM, 500, 250, 125, 0 uM
- เตรียมตัวอย่างน้ำคั้นส้มโอ โดยชั่งผงน้ำคั้นส้มโอที่อยู่ในรูป freeze-dried ที่ความเข้มข้น 10 mg/mL แล้ว dilute ด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 1, 0.5, 0.25, 0.125 mg/mL เพื่อนำไปทดสอบหาค่า FRAP แล้วเลือกความเข้มข้นที่ตกอยู่ในช่วงของ standard curve มาคำนวณหาค่า FRAP value จาก standard curve ของ $Fe(II)SO_4$

2.4 การสกัดและเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

เก็บสายสะดือของทารกแรกคลอดในภาวะกึ่งปราศจากเชื้อ แล้วนำไปแช่อยู่ในถุงที่มีน้ำเกลือเก็บที่อุณภูมิประมาณ 4 - 8 °C โดยนำไปใช้ในการสกัดภายใน 48 ชั่วโมง ล้างสายสะดือด้วย 70% EtOH จากนั้นล้างเลือดที่อยู่ในหลอดเลือดสายสะดือจนใสสะอาดด้วย lactate-ringer solution และเติม 0.1% collagenase ลงไปแล้วจึงผูกปลายทั้งสองข้าง นำไป incubate ที่ 37 °C เป็นเวลา 25 นาที และใช้กรรไกรตัดด้ายที่ผูกไว้ออก ทำการ flush เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดด้วย PBS และใส่ Media ที่มี FBS ลงไป นำไปปั่นตกตะกอนเซลล์ เป็นเวลา 5 นาที นำตะกอนเซลล์มาเลี้ยงใน flask ขนาด T25 และเปลี่ยนอาหารทุก 2-3 วัน (23) ใช้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในการทดลองที่ passage 2 – 4 เท่านั้น ลักษณะเซลล์เป็นที่เกาะติดกับภาชนะเลี้ยงเซลล์ เมื่อเซลล์เพิ่มจำนวนมากขึ้นจะมีการเรียงตัวในลักษณะเป็น cobble-stone monolayer

2.5 การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

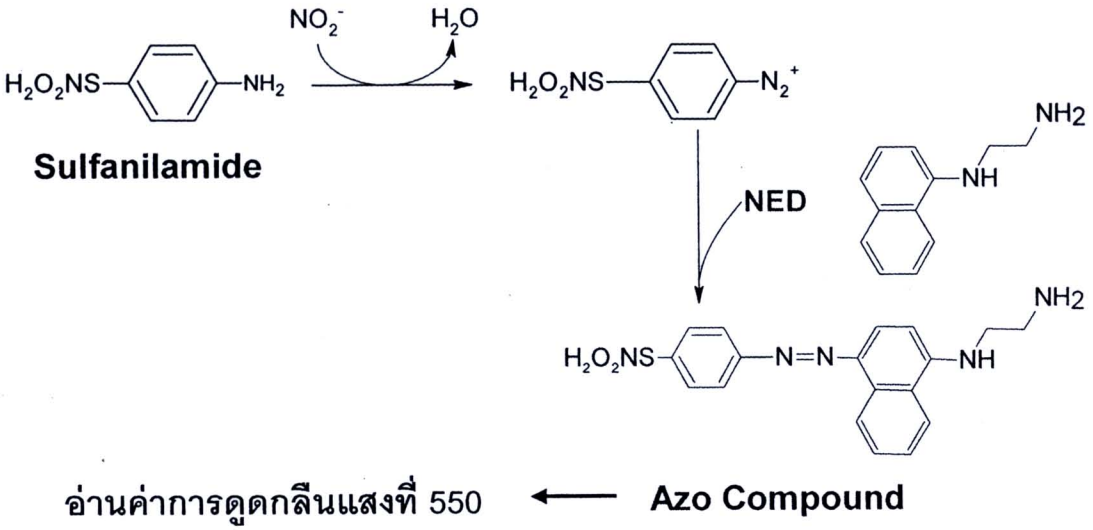
การตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงของการสร้างไนตริกออกไซด์หลังจากได้รับน้ำคั้นส้มโอทำโดยการวัดปริมาณผลิตภัณฑ์คงตัวไนไตรท์ ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณไนตริกออกไซด์ วัดด้วยวิธี Griess

Reaction เตรียมเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดสำหรับการทดสอบ โดย seed cells จำนวน 20,000 cells/well ใน 96-well plate ในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด M199 ที่มี fetal bovine serum 1 % โดยปล่อยให้เซลล์เกาะติดภาชนะข้ามคืน แล้วกำหนดแผนที่ของการทดสอบให้มีจำนวนหลุม 3 หลุมต่อ 1 ความเข้มข้นของสารที่ใช้ทดสอบ และทำการทดลองแยกกัน (separate experiment) อย่างน้อย 3 ครั้ง

หลังจากบ่มเป็นเวลา 24 h ในตู้เลี้ยงเซลล์ที่อยู่ในบรรยากาศของ CO_2 5% ที่อุณหภูมิ 37 °C เติมสารที่ต้องการทดสอบในความเข้มข้นต่างๆ คือละลายผงแห้งจากส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และ ผงแห้งจากส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) ในน้ำกลั่น เพื่อให้มีความเข้มข้นสุดท้ายในหลุมเท่ากับ 1, 10, 100, 1000 ไมโครกรัม/มล. แล้วบ่มเป็นเวลา 48 ชม. ในตู้เลี้ยงเซลล์

เมื่อครบกำหนดเวลา ใช้ multichannel pipette ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมปริมาณ 50 µL เพื่อใช้ทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ของน้ำคั้นจากส้มโอ โดยใช้เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (% control) ต่อไป นอกจากนี้ในการทดลองได้เพิ่มกลุ่ม positive control โดยใช้สารสกัดกระชายดำ (KP) ในปริมาณ 10 ไมโครกรัม/มล. ซึ่งจากการทดลองที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดกระชายดำในขนานนี้สามารถกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ได้ (24)

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการหลั่งไนตริกออกไซด์ จะวัดด้วยวิธี Griess Reaction โดยใช้ $NaNO_2$ เป็นสารมาตรฐาน เริ่มจากนำ Standard มา dilute ที่ความเข้มข้นต่างๆ (100 µM, 50 µM, 25 µM, 12.5 µM, 6.25 µM, 0µM) จากนั้นนำ Sample และ Standard เติมลงในหลุมๆละ 50 µL และเติม 1% Sulfanilamide Solution ลงไปหลุมละ 50 µL และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) 10 นาที จากนั้นนำมาเติม 0.1%NED solution ลงไปหลุมละ 50 µL และ incubate ที่อุณหภูมิห้อง (ในที่มืด) 10 นาที และนำไปอ่านด้วยเครื่อง microplate reader ที่ 540 nm ภายใน 30 นาที นำค่าที่ได้ไปเทียบกับสารมาตรฐานเพื่อหาค่า NO_2 แสดงดัง (รูปที่ 2)



รูปที่ 2 ปฏิกิริยา Griess Reaction

2.6 การศึกษาฤทธิ์ต่อการเพิ่มระดับ mRNA ของ eNOS ในเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด

ทำการเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในถาด 24 หลุม และบ่มรวมกับสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงนาน 48 ชั่วโมง จากนั้นนำมาสกัด total RNA โดยใช้วิธีของ Trizol reagent โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ล้างเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่อยู่ใน 24 wells microplate ด้วย PBS จำนวน 1 รอบ และเติม 250 µL Trizol และนำมาวางที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 15 นาที
- ดูดส่วนใสสีแดงใส่ eppendorff tube (RNase-free tube)
- เติม chloroform 50 µL และนำไป vortex แรงๆนาน 15 วินาที จากนั้นนำมาวางที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 5 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 x *g* 4°C เป็นเวลานาน 15 นาที
- ดูดส่วนใสชั้นบนประมาณ 60 uLไปใส่ eppendorf tube(RNase-free tube) อันใหม่
- เติม isopropyl alcohol 125 uL ลงใน eppendorf tube และเขย่าหลอดเบาๆ (เคาะข้างหลอดเบาๆ จากนั้นนำมาวางที่อุณหภูมิห้องนานเป็นเวลา 10 นาที
- นำไปปั่นที่ 12,000 x*g* 4°C เป็นเวลานาน 10 นาที
- เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และซับด้วยกระดาษให้แห้งพอหมาด
- เติม 1 ml 75% EtOH และ vortex เบาๆ จากนั้นนำไปปั่นที่ 7,000 x *g* 4°C เป็นเวลานาน 5 นาที
- เทส่วนใสด้านบนทิ้ง และซับด้วยกระดาษให้แห้งพอหมาด
- ตั้งให้ RNA pellet แห้ง (ตั้งเอียงไว้) ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 min (เคาะหยดน้ำออกให้หมด)
- ละลาย RNA ด้วย 20 µL DEPC-treated water และตั้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลานาน 15 นาที จากนั้นเก็บ RNA ที่ได้ในตู้เย็น -70°C เมื่อได้ RNA เป็นที่ต้องการแล้ว หลังจากนั้นจะนำ RNA ที่ได้มานั้นไปเปลี่ยนเป็น cDNA ด้วย DyNamo™ cDNA Synthesis kit (F-4705) (Finnzymes, Finland) โดยมีขั้นตอนดังนี้
- เตรียม Master mix จาก kits

Preparation Master Mix: 15 µL/ tube 1 Reaction

Oligo dT primer	1
2X RT Buffer	10
RT enzyme mix	2
Rnase-Free water	2
Template : RNA Sample	5
Total	**20**

- เขียนหมายเลขบน tube PCR ตามจำนวนหลอดที่ต้องการ
- เติม Template: RNA Sample 5 µL ลงใน PCR tubes
- นำไป incubate 65 °C นาน 5 นาที ด้วยเครื่อง Thermocycle (Mastercycler® personal, Eppendorf, Deutschland)
- เติม Master Mix 15 µL ลงใน tube ข้างต้น แล้วนำไป vortex เบาๆ
- ใส่เครื่อง Thermocycle

25 °C	10 min
40 °C	30 min
85 °C	5 min
4 °C	Hold

- เก็บ cDNA ได้ที่ตู้เย็น -30 °C

เมื่อได้ cDNA แล้ว หลังจากนั้นจะนำไปตรวจวัดการแสดงออกของ eNOS mRNA แบบ semi-quantitative โดยวิธี Real Time-PCR โดยใช้ Dynamo™ Flash SYBR®Green qPCR kit (F-415) (Finnzymes, Finland) โดยมีขั้นตอนดังนี้

- ละลาย cDNA, Primer และ Master Mix 2X ในน้ำแข็ง
- เขียนหมายเลขบน tube PCR ตามจำนวนหลอดที่ต้องการ
- เติม DEPC-treated water ใน PCR tube ละ 7 µL
- เติม Master mix 2X ใน PCR tube ละ 10 µL
- เติม primer mix [eNOS, ß-actin] ใน PCR tube ละ 2 µL

Primer sequences:

eNOS primer

Forward: 5'-GACGCTACGAGGAGTGGAAG-3'

Reverse: 5'-CCTGTATGCCAGCACAGCTA-3'

β-actin primer

Forward: 5'- GGACTTCGAGCAAGAGATGG-3'

Reverse: 5'-AGCACTGTGTTGGCGTACAG-3'

- เติม cDNA Sample ใน PCR tube ละ 1 µL แล้วผสมให้เข้ากัน
- นำไปใส่ในเครื่อง Real time PCR (Rotor Gene 6000, Corbett Life Science, Australia)

Hold	95 °C	7	นาที
Cycle: 40	95 °C	10	วินาที
	58 °C	15	วินาที
	72 °C	20	วินาที
Melt	72 – 95°C		

2.7 การทดสอบผลของน้ำคั้นส้มโอต่อการอยู่รอดของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay

เลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีปริมาณ serum ต่ำ (1%) เพื่อลดผลของ growth factors อื่นๆลง โดยจะเลี้ยงเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมที่มีความหนาแน่นของเซลล์ประมาณ 4 x 10^4 เซลล์ต่อหลุม และเลี้ยงในตู้บ่มเซลล์ที่มี 5% CO_2 อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นเติมสารสมุนไพรหรือสารเคมีที่ความเข้มข้นต่างๆลงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุมที่มีเซลล์อยู่ และนำไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเซลล์ที่มีสภาวะข้างต้นนาน 48 ชั่วโมง หลังจากนั้น เติมสารละลาย MTT (3 – (4,5 – dimethylthiazol – 2 - yl) 2,5 diphenyl tetrazolium bromide) ลงไปหลุมละ 10 µL และนำเข้าไปเลี้ยงต่อในตู้บ่มเซลล์ที่มีสภาวะข้างต้นนาน 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตจะติดสีน้ำเงิน จากนั้นนำอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วล้างด้วย PBS 3 ครั้ง และเติม DMSO (Dimethyl sulfoxide) ลงไปหลุมละ 100 µL นำไปเขย่าก่อนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 595 nm ด้วยเครื่อง

microplate reader (Thermo Multiskan EX, Finland) ซึ่งความเข้มของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่

2.8 การศึกษาฤทธิ์การปกป้องเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดจากภาวะ Oxidative stress

ภาวะ oxidative stress ภายในเซลล์จะส่งผลเหนี่ยวนำให้เกิดความผิดปกติของการทำงานของโปรตีน และเอนไซม์หลายชนิด และอาจนำไปสู่การตายของเซลล์แบบ apoptosis ต่อไป ในการทดลองนี้ใช้ H_2O_2 ที่ความเข้มข้นต่างๆเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด เกิดภาวะ oxidative stress แล้ววัด fluorescent intensity ที่เกิดจาก 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) โดยอาศัยหลักการคือ สาร DCFH-DA จะเป็นสาร non-fluorescent ที่สามารถเคลื่อนที่ผ่านเข้าสู่เซลล์ได้อย่างอิสระ แต่หลังจากทำปฏิกิริยากับสารในกลุ่ม ROS จะเกิดเป็นอนุพันธ์ที่สามารถให้แสงฟลูออเรสเซน ซึ่งจะแปรผันไปตามปริมาณอนุพันธ์ที่เกิดขึ้น หรืออีกนัยหนึ่งก็คือปริมาณ ROS ที่มีภายในเซลล์ โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่ได้รับสารทดสอบ โดยทำการทดลองแยกจากกัน 4 ครั้ง แต่ละครั้งทดสอบตัวอย่างในลักษณะ triplicate โดยมีขั้นตอนดังนี้ (25)

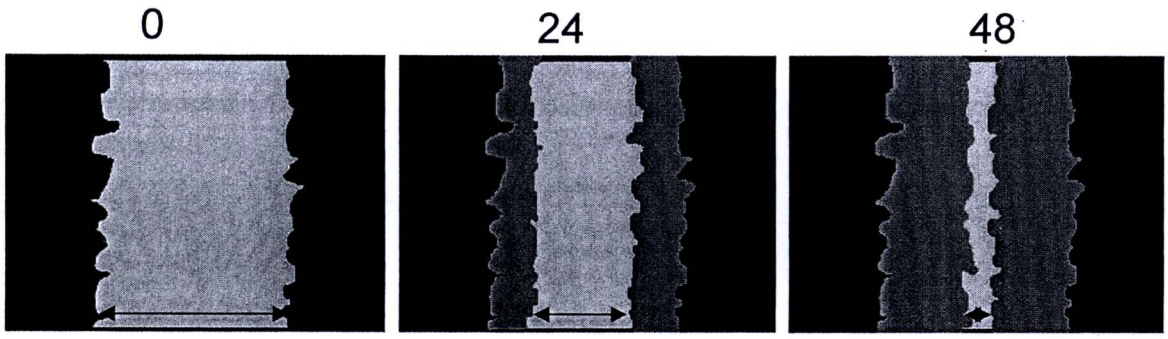
- เลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดใน 96- well microplate (Black plate: Clear bottom, Black side) และบ่มรวมกับสารตัวอย่างที่ความเข้มข้นและเวลาต่างๆกัน และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงนาน 24 ชั่วโมง
- เติมสมุนไพรที่ความเข้มข้นต่างๆ แล้วบ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยง 24 ชม.
- เมื่อครบ 24 ชั่วโมง จากนั้นเติม H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 1 M ลงไปหลุมละ 20 µL (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 mM) และเลี้ยงในตู้เพาะเลี้ยงต่อนานประมาณ 10 นาที
- เติม 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) ซึ่งมีความเข้มข้น 0.2 mM ลงไปหลุมละ 10 µL และเลี้ยงต่อในตู้ CO_2 incubator 37°C เป็นเวลานาน 15 นาที
- ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก และล้างด้วย PBS จำนวน 3 รอบ
- เติม PBS 100 µL ลงในแต่ละหลุม และนำไปอ่านด้วยเครื่อง Fluorescense microplate reader [Excitation 485 nm, Emission 528 nm] (Synergy HT, Biotek, USA)

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 28 ก.ย. 2555
เลขทะเบียน 246363
เลขเรียกหนังสือ

*2.9 **การทดสอบของน้ำคั้นส้มโอต่อการสมานแผลแบบ** in vitro scratch wound closure assay*

การศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นสมานแผลนั้น จะเลี้ยงเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุมให้มีเซลล์ประมาณ 100% confluency ในอาหารเลี้ยงเซลล์ 20% serum หลังจากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ไปเป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ 1% serum เพื่อลดผลของ growth factors อื่นๆ ลง แล้วทำให้เกิดแผลโดยการใช้ปลาย pipette tip ขูดลงไปบนเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดที่เลี้ยงไว้ จากนั้นเติมสารสมุนไพรหรือสารเคมีลงไป และศึกษาผลการสมานแผลของน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ขาวแตงกวา (CM1) และน้ำคั้นส้มโอพันธุ์ทับทิมสยาม (CM2) โดยจะติดตามการสมานแผลหรือการปิดของแผลที่ช่วงเวลาต่างกันคือ 24 และ 48 ชั่วโมง ทั้งนี้ จะถ่ายภาพเซลล์เยื่อบุหลอดเลือดไว้แล้วจึงนำไปวัดระยะห่างของแผลที่เกิดขึ้นนั่นเอง (26)

การวัดระยะห่างที่เกิดขึ้นหรือการวัดระยะห่างของบาดแผล จะนำภาพถ่ายของเซลล์ในช่วงเวลาต่างกันที่กำลังขยายเท่าๆกันไว้มาวัดระยะห่างด้วยโปรแกรม Cell*B (Olympus, Japan) ซึ่งจะได้ค่าระยะห่างของแผลในแต่ละช่วงเวลา และนำค่าที่ได้ไปคำนวณหาค่า %Wound confluence ของแต่ละช่วงเวลา ดังแสดงวิธีคำนวณดังภาพต่อไปนี้



$$\%\text{Wound confluence at time} = \frac{(\text{Baseline width} - \text{Time width})}{\text{Baseline width}} \times 100$$

จากนั้น นำค่าที่ได้จากการคำนวณด้วยสูตรข้างต้นไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่าง %Wound confluence กับ Time [Hour] ซึ่งถ้าค่า %Wound confluence ยิ่งมากจะหมายถึงการปิดของแผลมาก หรือรอยแผลมีขนาดเล็กลงนั่นเอง

2.10 สถิติ

การทดลองในแต่ละการทดลองจะทำแบบ duplicate หรือ triplicate และใช้จำนวนครั้ง (n) ตั้งแต่ 3 ถึง 9 ครั้ง การแสดงข้อมูลจะอยู่ในรูปแบบ mean±SEM และมีการทดสอบความแตกต่างทางสถิติของชุดข้อมูลโดยใช้วิธี ใช้ One-way ANOVA โดยมี Dunnett (เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม) หรือ Newman-Keuls posthoc test จากโปรแกรม GraphPad Prism 5.0 ซึ่งค่า $p<0.05$ ถือว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ