บทที่ 2

วิธีการวิจัย

วัสดุ

1. กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ (Glass ionomer cement, GIC)

กลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ เลือก LINING CEMENT ของบริษัท GC corporation

ผงประกอบด้วย :100% fluoro-aluminosilicate glass

ส่วนเหลวประกอบด้วย :40% polyacrylic acid

batch number ของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ในการหาโปรตีน คือ 0404241

batch number การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ คือ 0410121

2. ไคโตซาน (chitosan, CS) ผลิตโดยบริษัท Fluka มีน้ำหนักโมเลกุล 150 kilodalton และ 98 % deacetylation (Lot :45508/1 34203348)

3. อัลบูมิน (Bovine serum albumin, AL) ผลิตโดยบริษัท Sigma มีน้ำหนักโมเลกุล 66 kilodalton (Lot : 78H0696)

4. เซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน (pulpal cell) passage ที่ 6-8

5. อาหารเลี้ยงเซลล์ alpha modification of Eagle's medium (MEM) และ สารเคมีสำหรับทดสอบการหาปริมาณโปรตีนโดยใช้เทคนิค BCA Protein Assay Colorimethod โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (BCA, PIERCE) , สารเคมีในการทำ SDS polyacrylamide gel electrophoresis of protein สารเคมีในการทำ MTT assay

อุปกรณ์

1. เครื่องชั่งทศนิยม 5 ตำแหน่ง Sartorius รุ่น MC 210 S, Germany
2. Incubator shaker, GALLENKAMP, Japan
3. Incubator, Memmert, Germany
4. Spectrophotometer Titertek Multiscan Plus MK II ของบริษัท Flow Laboratories International SA, Finland
5. ตู้เย็น –80° c Bio-Freezer ของบริษัท Forma Scientific, U.S.A.
6. Shaker รุ่น STOVALL ของบริษัท Life Science Inc, U.S.A.
7. Vortex Genie-2 –ของบริษัท Scientific industries, U.S.A.
8. เครื่องนับเซลล์ Coulter Particle counter Z-1, U.S.A.
9. เครื่องเหวี่ยงตกตะกอน (centrifuge) Savant Speed fuge HSC 15 R, U.S.A.
10. กล้องจุลทรรศน์ Nikon TMS, Japan
11. ตู้อบเลี้ยงเซลล์ HERA cell 240 Heraeus, Germany
12. ตู้กรองอากาศปราศจากเชื้อ Microflow Advanced Bio safty cabinet Bioquell, UK.
13. Freeze dryer ALPHA 2-4 พร้อม controller LDC-1M MARTIN CHRIST, German
14. กล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ (inverted microscope) Nikon TE 2000 U, Japan

วิธีการวิจัย

ตอนที่ 1 การศึกษาถึงผลของการเติมไคโตซานในกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ต่อการปลดปล่อยโปรตีนอัลบูมิน

ตอนที่ 1.1 การเตรียมชิ้นทดสอบ (Specimens) และน้ำตัวอย่าง

เตรียมชิ้นทดสอบโดยใช้แบบพิมพ์พลาสติก (mold) ที่มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 มิลลิเมตร หนา 2 มิลลิเมตร ที่ได้ทำการบากไว้เพื่อให้สามารถแกะชิ้นทดสอบออกได้

โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มๆ ละ 6 ชิ้น ดังนี้

กลุ่มที่ 1 GIC+AL มีสัดส่วนของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ 98.5 เปอร์เซ็นต์ และอัลบูมิน 1.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

กลุ่มที่ 2 GIC+CS มีสัดส่วนของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ 80 เปอร์เซ็นต์และไคโตซาน 20 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

กลุ่มที่ 3 GIC+CS+AL โดยมีสัดส่วนของไคโตซาน 20 เปอร์เซ็นต์, อัลบูมิน 1.5 เปอร์เซ็นต์และกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ 78.5 เปอร์เซ็นต์โดยน้ำหนัก

โดยชั่งสารต่างๆมาผสมเข้าด้วยกันในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ประมาณน้ำหนักของส่วนผงต่อหนึ่งชิ้นทดสอบเท่ากับ 350 มิลลิกรัม เตรียมส่วนผงให้น้ำหนักรวมเป็น 3,500 มิลลิกรัม ดังแสดงในตารางที่ 2 ผสมโดยใช้ เครื่อง vortex เป็นเวลา 5 นาที เพื่อให้ส่วนต่าง ๆ ผสมเข้ากันได้ดี จะทำการผสมชิ้นทดสอบครั้งละ 2 ชิ้น ให้มีสัดส่วนระหว่างส่วนผงต่อส่วนเหลวต่อชิ้นคือ 350:300 มิลลิกรัมซึ่งเท่ากับ 1.16 :1

ตารางที่ 2 สัดส่วนของกลาสไอโอโนเมอร์ซีเมนต์ ไคโตซานและอัลบูมิน (มิลลิกรัม)

กลุ่มที่	GIC	ไคโตซาน	อัลบูมิน	น้ำหนักรวม
1	3,447.5	-	52.5	3,500
2	2,800.0	700	-	3,500
3	2,747.5	700	52.5	3,500

ผสมส่วนผงและส่วนเหลวเข้าด้วยกันและตักใส่ในแบบพิมพ์ หลังจากนั้นใช้แผ่นกระจกกดอัดทั้งสองด้านโดยมีแผ่นพลาสติกอยู่ระหว่างกระจกและชิ้นทดสอบ หลังจากที่ชิ้นทดสอบแข็งตัวแล้วให้ตัดแต่งส่วนเกินออกชั่งน้ำหนัก ใส่ชิ้นทดสอบในถุงพลาสติก และนำไปอบในตู้อบอุณหภูมิที่ 37°C เป็นเวลา 1 ชั่วโมง เมื่อครบชั่วโมงแล้ว นำชิ้นทดสอบที่ได้มาแช่ phosphate- buffered saline pH 7.4 (PBS) ปริมาตร 1 มิลลิลิตร ในหลอดทดลองขนาด 50 มิลลิลิตร ปิดฝาไว้ให้แน่น วางหลอดทดลองในเครื่อง incubator shaker ที่อุณหภูมิ 37°C จำนวน 60 รอบต่อนาที เป็นเวลา 1 ชั่วโมงหยิบชิ้นทดสอบขึ้นมาซับให้แห้ง 2-3 ครั้งด้วยกระดาษทิชชูไม่มีขุยชั่งน้ำหนักของชิ้นทดสอบและแช่ชิ้นทดสอบใน PBS หลอดใหม่แช่ต่ออีก 5 ชั่วโมงนับจากชั่วโมงแรกเป็นชั่วโมงที่ 6 ทำเช่นเดียวกันที่ชั่วโมงที่ 12, ชั่วโมงที่ 24, ชั่วโมงที่ 48, ชั่วโมงที่ 72, ชั่วโมงที่ 168 และชั่วโมงที่ 336 ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 3 ทำการเปลี่ยน PBS ใหม่ทุกครั้ง ชั่งน้ำหนักของชิ้นทดสอบและบันทึกทุกครั้งที่มีการเก็บน้ำตัวอย่างของโปรตีนทุกช่วงเวลาที่ทดลอง นำ PBS ที่ผ่านการแช่ชิ้นทดสอบแช่ในตู้เย็นที่ -80 ° C

ตารางที่ 3 แสดงเวลาในการแช่ชิ้นงาน (ชั่วโมง)

ชั่วโมงที่	ระยะเวลาที่แช่ใน PBS
0	0
1	1
6	5
12	6
24	12
48	24
72	24
168	96
336	168

หมายเหตุ ; ที่เวลา 0 ชั่วโมงนับจากเวลาหลังจากผสมเสร็จและอยู่ในตู้อบ 1 ชั่วโมง
ที่เวลา 1 ชั่วโมงนับจากเวลาหลังจากที่แช่ใน PBS 1 ชั่วโมงหรือหลังจากผสมเสร็จ 2 ชั่วโมง

ตอนที่ 1.2 การวัดปริมาณโปรตีนอัลบูมินที่ปล่อยออกมา

การวัดโปรตีนโดยใช้ เทคนิค BCA Protein Assay Colorimethod

หลักการทำงานของ Colorimetric Assay[47] คืออิออนของโลหะหนักและสีจับกับโปรตีนในอัตราส่วนที่ค่อนข้างจะจำเพาะ (specific) และการจับจะกลายเป็นความเข้มของสีที่จะขึ้นกับค่าของโปรตีน ตัว reagent จะสามารถดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนแบบ linear proportion ขึ้นกับปริมาณความเข้มข้นของโปรตีนในสารละลายต่อหนึ่งหน่วยปริมาตร วิธีที่ใช้กันมากคือ Biuret assay, The Lawry assay และ Bradford assay สำหรับการทดลองนี้ใช้ Biuret assay โดยให้ ทองแดง (copper) จับกับโปรตีนภายใต้ภาวะ alkaline ปฏิกิริยาระหว่างโปรตีน และทองแดง (copper) ยังไม่ชัดเจนนักแต่ขึ้นกับความเข้มของ charge-transfer absorption band ที่มีผลจาก copper-protein complex ซึ่งเป็นความสัมพันธ์แบบ linear proportion ระหว่างความเข้มข้นของโปรตีนและค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ของสารประกอบดังกล่าว

วิธีการ

นำน้ำตัวอย่างและ PBS pH 7.4 ที่ไม่ได้ผ่านการแช่ชิ้นทดสอบ แต่ใช้เป็น blank ไปทำ lyophilized เพื่อดึงน้ำออกให้มีความเข้มข้นขึ้นอีก 10 เท่า เนื่องจากโปรตีนที่ปลดปล่อยออกมามีปริมาณน้อย ไม่สามารถตรวจพบได้ถ้าไม่ทำ lyophilized โดยเครื่อง Freeze dryer ALPHA 2-4 พร้อม controller LDC-1M ของบริษัท MARTIN CHRIST, Germany หลักการทำงาน[47] คือการดึงน้ำออกจากวัสดุที่ถูกทำให้อุณหภูมิลดต่ำกว่าจุดเยือกแข็งโดยอยู่ในภาวะสูญญากาศ สารที่นำมาควรที่จะละลายน้ำง่ายและไม่มีการระเหยและเมื่อเติมน้ำลงไปสารละลายดังกล่าวจะมีคุณสมบัติเหมือนเดิม โดยดูดสารละลายประมาณ 300 ไมโครลิตร นำไปผ่านขบวนการดึงน้ำออกจนกลายเป็นผงแห้ง (lyophilized) เมื่อต้องการทดสอบให้ใส่น้ำกลั่น double distilled water ลงไป 30 ไมโครลิตร จะทำให้สารละลายที่ต้องการทดสอบมีความเข้มข้นขึ้นมา 10 เท่า ในการทดสอบการหาโปรตีนจะทำการหาซ้ำ 2 ครั้ง (duplicate) โดยการใช้ microplate ขนาด 96 หลุม และใช้เทคนิค BCA Protein Assay Colorimethod โดยใช้ชุดสำเร็จรูป (BCA,PIERCE)[48] เพื่อดูปริมาณโปรตีนที่ปล่อยออกมา

1. การเตรียม standards

ในชุดนี้คือ อัลบูมิน (BSA) ที่บรรจุเป็น ampule ที่มีความเข้มข้น 2 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร นำมาเตรียมความเข้มข้นโดยการเติมน้ำกลั่น (dilutions) โดยพิจารณาความเข้มข้นของสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบว่ามีความเข้มข้นสูงหรือไม่และเตรียมโปรตีนมาตรฐาน (albumin standard) ให้มีความเข้มข้นครอบคลุมสารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบได้ดังตารางที่ 4 สำหรับการทดลองนี้ใช้ความเข้มข้นที่ 25-1,000 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. การเตรียม BCA working reagent (WR)

สำหรับ microplate ใช้ 200 ไมโครลิตรต่อหลุม นำมาคำนวณจำนวนที่ต้องใช้ได้

vial	volume of diluent	volume and source of BSA	Final BSA concentration
A	0	300 µl of stock	2,000
B	125	375 µl of stock	1,500
C	325	325 µl of stock	1,000
D	175	175 µl of vial B dilution	750
E	325	325 µl of vial C dilution	500
F	325	325 µl of vial E dilution	250
G	325	325 µl of vial F dilution	125
H	400	100 µl of vial G dilution	25

จากจำนวนหลุมคูณกับ 200 ไมโครลิตร สำหรับอัตราส่วนของ Sample : Working reagent ในการทดลองนี้คือ 1 : 20

ตารางที่ 4 แสดงการเตรียมความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐาน (ไมโครกรัม/ไมโครลิตร) ตามบริษัทผู้ผลิต

วิธีการทดลอง

1. ใช้ microplate ที่มี 96 หลุม เติมโดยเริ่มจาก PBS ที่ใช้เป็น blank ก่อน เติม 2 หลุมๆ ละ 10ไมโครลิตร

2. เติมอัลบูมินมาตรฐานที่มีความเข้มข้นตามลำดับ ให้แต่ละความเข้มข้นหนึ่งมีจำนวน 2 หลุมโดยเติมหลุมละ 10 ไมโครลิตร หลังจากนั้นเติมน้ำตัวอย่างที่ต้องการทดสอบ โดยทำซ้ำตัวอย่างละ 2 หลุมๆ ละ 10 ไมโครลิตรเช่นกัน

3. ผสม reagent A และ B เข้าด้วยกัน และเติมหลุมละ 200 ไมโครลิตร เขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน นำไปอบใน incubator ที่ 37°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปอ่านค่า optical density (OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Titertek Multiscan Plus MK II ของบริษัท Flow Laboratories International SA หลักการทำงานคือให้แสงอัลตราไวโอเลทหรือแสงในช่วงที่มองเห็นได้มาฉายผ่านสารละลายของชีวโมเลกุล พลังงานแสงจะกระตุ้นอิเลคตรอนของชีวโมเลกุล ทำให้ดูดพลังงานแสงบางส่วนไว้ ดังนั้นแสงที่ผ่านออกมามีความเข้ม (intensity) น้อยลง นอกจากนี้ค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) หรือ optical density (OD) ยังมีความสัมพันธ์กับความเข้มข้น (c) ของชีวโมเลกุลในสารละลายตามกฎของ Beer-Lambert ดังต่อไปนี้[49]

$$A = \log_{10} (I_0 / I) = kcl$$

A = ค่าของการดูดกลืนแสงและไม่มีหน่วย

I_0 และ I = ความเข้มของแสงที่ฉายเข้าไปและที่ผ่านออกมาตามลำดับ

c = ความเข้มข้นของชีวโมเลกุลเป็น Molar (M)

l = ความหนาของสารละลายที่แสงผ่านเป็นเซนติเมตร

k = ค่าคงที่เรียกว่า molar extinction coefficient

เมื่อ l = 1ซม. (k มีหน่วยเป็น $M^{-1} cm^{-1}$)

กฎของ Beer –Lambert มีประโยชน์มากในการหาค่าความเข้มข้นของชีวโมเลกุลโดยใช้สเปคโตรโฟโตมิเตอร์

4. นำค่าความเข้มข้นของอัลบูมินมาตรฐาน ที่ทราบค่าความเข้มข้นมาคำนวณหาความเข้มข้นโปรตีนที่ปล่อยออกมาจากชิ้นทดสอบ โดยเปรียบเทียบการปลดปล่อยโปรตีนของชิ้นทดสอบจาก 3 กลุ่มที่เวลาต่างๆ โดยคำนวณหาปริมาณโปรตีนต่อหนึ่งหน่วยน้ำหนักต่อชั่วโมง (ไมโครกรัม/กรัม/ชั่วโมง) และวิเคราะห์ความแปรปรวนระหว่างกลุ่มแบบวัดซ้ำ (Repeated measures ANOVA) และเปรียบเทียบเชิงซ้อนแบบ Tukey HSD (Turkey HSD-Multiple Comparison) ทดสอบที่ระดับนัยสำคัญ $p < 0.05$

ตอนที่ 2 การตรวจสอบสมบัติโปรตีนที่ปล่อยออกมา

หลักของการทำ electrophoretic method ใช้กันมากในงานด้านโปรตีน[50] เช่นการหา sample purity, molecular weight

สำหรับการทดลองนี้เป็นการตรวจสอบโปรตีนที่ปล่อยออกมาจากชิ้นทดสอบ ว่าถูกทำลายหรือไม่ (denature) โดยการทำ Sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE)[51] หลักการพื้นฐานคือโมเลกุลที่มีประจุจะเคลื่อนที่ในสนามที่มีแม่เหล็กซึ่งอัตราการเคลื่อนที่จะขึ้นกับขนาดของโมเลกุลและประจุ (charge) โดยให้มีกระแสไฟผ่านไปยังแผ่น polyacrylamide gel ที่ทำหน้าที่เหมือน barrier ต่อการเคลื่อนที่ของโมเลกุล ก่อนการ run เจลต้องนำโปรตีนไป denature ก่อนซึ่งมีหลายวิธีเช่น การใช้ความร้อน denature detergents และเคลือบด้วย anionic detergent คือ SDS ในสภาพ denature โปรตีนเกือบทั้งหมดจับกับ SDS ด้วยอัตราของน้ำหนักที่คงที่ ทำให้มีความหนาแน่นของประจุที่ใกล้เคียงกัน ดังนั้นอัตราการเคลื่อนตัวของโปรตีนจึงขึ้นกับขนาดของโมเลกุล (molecular weight) เพียงอย่างเดียว โดยที่โปรตีนที่มีขนาดใหญ่จะมีการเคลื่อนได้น้อยกว่าโปรตีนโมเลกุลเล็ก ส่วนบนของเจลต่อเข้ากับขั้วลบ ส่วนล่างของเจลต่อเข้ากับขั้วบวกเมื่อปล่อยกระแสไฟฟ้าโปรตีนจะเคลื่อนไปยังส่วนล่างของเจล

Polyacrylamide มาจากการเกิด polymerization ของ acrylamide ซึ่งสัดส่วนของ acrylamide ที่ใช้ในการเตรียมเจล มีผลต่อขนาดของรูพรุนของเจล ดังนั้นร้อยละ acrylamide ในเจลจะขึ้นกับช่วงของน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight range) ของโปรตีนที่ต้องการหา

การหาโปรตีนต้องมี marker ซึ่งคือโปรตีนที่ผสมกันหลายตัวและรู้ค่าน้ำหนักโมเลกุลของโปรตีน ในการทดลองต้องมีอย่างน้อยหนึ่งช่อง (lane) เป็นน้ำหนักโมเลกุลของ standards เพื่อเป็นตัวเปรียบเทียบกับโปรตีนที่ต้องการหา ในที่นี้ใช้ SDS-PAGE Molecular weight standard (Invitrogen) ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ในช่วง 2.5-200 kDa สำหรับชุด BCA ที่นำมาทดสอบมีน้ำหนักโมเลกุล 66 kDa

การเตรียม polyacrylamide gel ที่อยู่บนกระจกแบนขนาด 10×12 เซนติเมตร และความหนาของเจลประมาณ 1 มิลลิเมตร โดยการเตรียม

Separating gel =12.5 % (v/v) total acrylamide gel

Stacking gel = 4.5% (v/v) total acrylamide gel

Running buffer = 0.25M Tris HCL buffer solution (pH 8.3)

ใช้ syringe ดูดส่วนผสมเติมลงบนเจลชั้นล่าง (separating gel) ที่แข็งตัวจากนั้นรีบเสียบ comb ลงบนส่วนของเจลชั้นบน (Stacking gel) เมื่อเจลแข็งตัวแล้วถอด comb ออกจะเกิดช่องว่างเพื่อเติมสารตัวอย่าง

การเตรียมสารตัวอย่าง

1. อัลบูมินของ Sigma ที่เป็นส่วนผสมในชิ้นทดสอบ นำมาเตรียมให้มีความเข้มข้นต่างๆ โดยใช้ผงอัลบูมินละลายน้ำกลั่นโดยเริ่มต้นใช้อัลบูมิน 1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และทำการเจือจางให้เป็น 0.5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร, 0.25 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร และ 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ความเข้มข้นที่เตรียมคือ 0.5, 0.25, 0.1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร

2. น้ำตัวอย่างจากการแช่ชิ้นทดสอบกลุ่ม GIC+AL, กลุ่ม GIC+CS, กลุ่ม GIC + CS+AL และกลุ่ม GIC ที่เตรียมเพิ่มขึ้นมาเพื่อเป็นกลุ่มควบคุมและยืนยันว่าไม่มีโปรตีนในกลาสไอโอโนเมอร์

3. SDS-PAGE molecular weight standards marker ของบริษัท Invitrogen ซึ่งได้ทำการ denature มาแล้ว

การเตรียมโปรตีนโดยนำสารละลายปริมาณ 15 ไมโครลิตร ผสมกับ sample buffer ต้มสารที่อุณหภูมิประมาณ 100°C ประมาณ 5-10 นาที โดยใช้สารตัวอย่างที่เตรียมเอาไว้ 15 ไมโครลิตร เติมลงในช่องว่างระหว่างเจลที่เตรียมไว้ โดยจะใช้อัลบูมินที่เป็น standard protein และรู้ค่าน้ำหนักโมเลกุลคือประมาณ 66 kDa เปิดเครื่องและใช้กระแสไฟฟ้าที่ 25 mA ตลอดการทดลองรอจนเจลเคลื่อนลงมาถึง running buffer ใช้เวลาประมาณ 2-3 ชั่วโมง จากนั้นแกะเอาเจลออกมาจากกระจกและนำมาย้อมสีที่เรียกว่า staining solution ซึ่งประกอบด้วย Coomassie Brilliant Blue R 250 0.25 กรัมละลายใน ethanol 125 มิลลิลิตร Gracial citic acid 25 มิลลิลิตรและน้ำ 100 มิลลิลิตร แช่เจลในน้ำยาย้อมสีประมาณ 3 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการล้างด้วยน้ำยาย้อมสีที่เตรียมไว้คือ 10% (v/v) acetic acid เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมงวางบนเครื่องเขย่าเปลี่ยนน้ำยาระหว่างที่แช่เป็นระยะ จนกระทั่งเจลมีสีใสจะสามารถเห็นแถบของโปรตีนปรากฏขึ้นมาและนำมาเปรียบเทียบกับแถบสีของ protein molecular weight standard และอ่านผล โดยในการทดลองนี้ได้กำหนดโดยให้

ช่องที่ 1 ใส่ protein molecular weight standards
ช่องที่ 2 ใส่ อัลบูมิน 0.25 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร
ช่องที่ 3 ใส่ อัลบูมิน 0.5 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร
ช่องที่ 4 ใส่ อัลบูมิน 0.1 มิลลิกรัม / มิลลิลิตร
ช่องที่ 5 ใส่ GIC ชั่วโมงที่ 1
ช่องที่ 6 ใส่ GIC+AL ชั่วโมงที่ 1
ช่องที่ 7 ใส่ GIC+CS ชั่วโมงที่ 1
ช่องที่ 8 ใส่ GIC +CS+AL ชั่วโมงที่1
ช่องที่ 9 ใส่ protein molecular weight standards

การแปลผลของ SDS-PAGE โดยดูจากแถบ (band) ของโปรตีนที่ปล่อยออกจากชิ้นทดสอบเปรียบเทียบกับโปรตีนใน protein molecular weight standards marker ว่ามีน้ำหนักโมเลกุลประมาณเท่าใดและเปรียบเทียบจำนวนแถบของโปรตีนที่พบถ้าแถบแตกออกเป็นหลายแถบมากขึ้นและน้ำหนักโมเลกุลน้อยลงแสดงว่ามีการแตกตัวหรือถูกย่อยสลาย

ตอนที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โพรงประสาทฟัน

ตอนที่ 3.1 การทดสอบ MTT Assay

หลักการทดสอบความเป็นพิษโดยวิธี MTT assay (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide)[52] คือการวัดจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่โดยวัดจาก mitochondrial succinic dehydrogenase activity ซึ่งเซลล์ที่มีชีวิตจะมี mitochondrial function ในเซลล์ Krebs cycle ที่เกิดใน mitochondria เป็น metabolic pathway ที่สำคัญในการสังเคราะห์ adenosine triphosphate จากคาร์โบไฮเดรต โปรตีนและไขมัน โดยขั้นตอนต้นคือการเปลี่ยนจาก succinate ไปเป็น fumarate โดย succinic dehydrogenase (SDH) ส่วน FAD เป็นตัวที่ทำให้ ปฏิกิริยา reduction สมบูรณ์โดยผ่าน FADH2 และ FADH2 สามารถเปลี่ยน tetrazolium salt ไปเป็น formazen ที่มีสีน้ำเงินและตกตะกอนใน mitochondria โดยการทดสอบนี้ต้องการ disodium succinate เป็นตัวตั้งต้นเมื่อปฏิกิริยาสมบูรณ์มีผลทำให้มีการเปลี่ยนจากสีเหลืองไปเป็นสีน้ำเงิน และระดับของการเปลี่ยนสีเป็นสัดส่วนโดยตรงกับ enzymatic reduction ของ tetrazolium salt ผลึกของ MTT formazen สามารถละลายใน dimethyl sulfoxide (DMSO) ก่อน ที่จะนำไปอ่านค่า optical density ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ค่าที่อ่านได้จะบอก mitochondrial activity และ เซลล์ที่มีชีวิต

การศึกษานี้ได้ผ่านคณะกรรมการจริยธรรมในการวิจัย มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ และได้รับความอนุเคราะห์เซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟันจาก ผศ. ดร. ทพญ. สุวรรณา จิตภักดีบดินทร์ ภาควิชาชีววิทยาช่องปากและระบบการบดเคี้ยว คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยนำเซลล์จากโพรงประสาทฟันมาทำการเพาะเลี้ยงใน Alpha modified Eagle's medium (αMEM) และใส่ 20% FCS, 100 um L-ascorbic acid 2-phosphate, 2 Mm L-glutamate, 100 units/ml penicillin และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร streptomycin นำมา incubation ที่ 37 ^{o}C ใน 5% co_2 เซลล์จากโพรงประสาทฟันที่นำมาทดสอบเป็น passage ที่ 6-8

วิธีการเตรียมน้ำตัวอย่างจากชิ้นทดสอบและการทดสอบความเป็นพิษ

เตรียมชิ้นทดสอบที่ต้องการทดสอบโดยการเตรียมกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ (GIC) และกลุ่มกลาสไอโอโนเมอร์ผสมไคโตซาน (GIC+CS) ที่สัดส่วนของไคโตซาน 20%โดยน้ำหนัก

อัตราส่วนระหว่างส่วนผงต่อส่วนเหลวทั้ง 2 กลุ่มคือ 1.16 :1 ผสมและตักใส่แบบพิมพ์พลาสติก เหมือนการทดลองในตอนที่ 1 กำหนดกลุ่มการทดลองดังนี้คือ

กลุ่มที่ 1 GIC 24 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 2 GIC 48 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 3 GIC 168 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 4 GIC+CS 24 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 5 GIC+CS 48 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 6 GIC+CS 168 ชั่วโมง
กลุ่มที่ 7 น้ำกลั่นซึ่งใช้เป็นกลุ่มควบคุม

เตรียมชิ้นทดสอบของกลุ่มทดสอบกลุ่มละ 2 ชิ้น โดยให้ชิ้นทดสอบ 1 ชิ้นแช่ในน้ำกลั่น ปริมาตร 2 มิลลิลิตร นำไป ไว้ที่ incubator shaker 37ºC เขย่า 60 รอบต่อนาที โดยแช่ไว้เป็นเวลา 24 48 และ 168 ชั่วโมง นำน้ำตัวอย่างในกลุ่มเดียวกันที่ผ่านการแช่ชิ้นทดสอบหลอดละ 2 มิลลิลิตรมาเทรวมกันทั้ง 2 หลอดไปกรองด้วย filter ขนาด 2 ไมครอนเพื่อเป็นการทำให้ปลอดเชื้อ ทดสอบด้วย microplate 96 หลุม ที่ในแต่ละหลุมมีเซลล์จากเนื้อเยื่อโพรงประสาทฟัน จำนวน 5,000 cells และ อาหารเลี้ยงเชื้อ 200 ไมโครลิตร ต่อหนึ่งหลุมเลี้ยงไว้ประมาณ 24 ชั่วโมง incubation ที่ 37ºCใน 5% CO_2 โดยเว้นสดมภ์ (column) แรกให้ว่างเพื่อเป็น blank ครบ 24 ชั่วโมงดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อออก ใช้อาหารเลี้ยงเชื้อที่มีความเข้มข้นสองเท่า (2MEM) ปริมาตร 125 ไมโครลิตร และใช้น้ำตัวอย่างปริมาตร 125 ไมโครลิตร (elute) รวม 250 ไมโครลิตร โดยทำการทดสอบซ้ำ 8 หลุมต่อน้ำตัวอย่างหนึ่งชนิดคือให้หนึ่งสดมภ์ (column) เป็นสารหนึ่งตัวอย่าง ทิ้งเอาไว้เป็นเวลา 48-72 ชั่วโมง incubation ที่ 37ºC ใน 5% CO_2 จากนั้นดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อที่ผสมอยู่กับน้ำตัวอย่างออกทิ้งแล้วเติมอาหารเลี้ยงเชื้อใหม่ 200 ไมโครลิตรที่ประกอบด้วย HEPES (pH 7.4) 10 mM โดยที่ต้องเติมทุกหลุมรวมทั้ง blank ด้วย หลังจากนั้นจึงเติม MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) ที่ผสมอยู่ใน PBS (pH 7.2) ความเข้มข้น 2-5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ปริมาณ 50 ไมโครลิตร ห่อ microplate ด้วย foil เพื่อป้องกันแสงและนำไปอบเป็นเวลา 4 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37ºC ใน 5% CO_2 เมื่อครบ 4 ชั่วโมงให้ดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อและ MTT ออก และเติม dimethyl sulfonate (DMSO) หลุมละ 200 ไมโครลิตร ตามด้วย Sorensen's glycine buffer ที่เตรียมจาก 0.1M glycine ผสมกับ 0.1M NaCl ที่มีค่า pH 10.5 ในอัตราส่วนที่เท่าๆ กัน สารละลายใน microplate จะกลายเป็นสีม่วงและนำไปอ่านค่า optical density (OD) ด้วยเครื่อง Titertek ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร และค่าที่ได้ออกมาแปรตามปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่รอด คิดค่าเฉลี่ยทั้งสดมภ์ โดยตัดค่าต่ำสุดและสูงสุดออกไป ทำซ้ำเหมือนกัน 3 microplate ทำให้แต่ละกลุ่มการ

ทดลองมีขนาดกลุ่มตัวอย่าง 18 หลุม คำนวณเป็นร้อยละโดยเปรียบเทียบกับน้ำ โดยให้น้ำ autoclave เป็น 100% นำค่าร้อยละที่ได้มาวิเคราะห์หาความแตกต่างระหว่างกลุ่มและเปรียบเทียบหาความแตกต่างภายในกลุ่มเดียวกันที่เวลาแตกต่างกัน ใช้การวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (One way ANOVA) และเปรียบเทียบเชิงซ้อนแบบ Tukey HSD (Turkey HSD-Multiple Comparison) ทดสอบที่ระดับนัย สำคัญ $p < 0.05$

ตอนที่ 3.2 การทำ direct contact

เป็นการทดสอบความเป็นพิษของชิ้นทดสอบต่อเซลล์จากโพรงประสาทฟัน ชิ้นทดสอบที่มีความเป็นพิษมากหรือมีการปล่อยสารที่เป็นพิษอย่างต่อเนื่อง เซลล์จะไม่สามารถมาเกาะติดกับชิ้นทดสอบได้ แต่ถ้าชิ้นทดสอบไม่มีพิษมากเซลล์จะสามารถมาเกาะติดกับชิ้นทดสอบได้

1. ผสมชิ้นทดสอบอย่างละ 1 ชิ้น วิธีการผสมเช่นเดียวกับการทดลองในตอนที่ 1 ให้มีการปนเปื้อนน้อยที่สุด โดยการเตรียมในตู้ปราศจากเชื้อและใช้เครื่องมือที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว นำชิ้นทดสอบและชิ้นขี้ผึ้งไปยึดกับ plate ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 5.5 เซนติเมตรด้วยขี้ผึ้ง ชิ้นทดสอบมีดังนี้

ชิ้นทดสอบ GIC

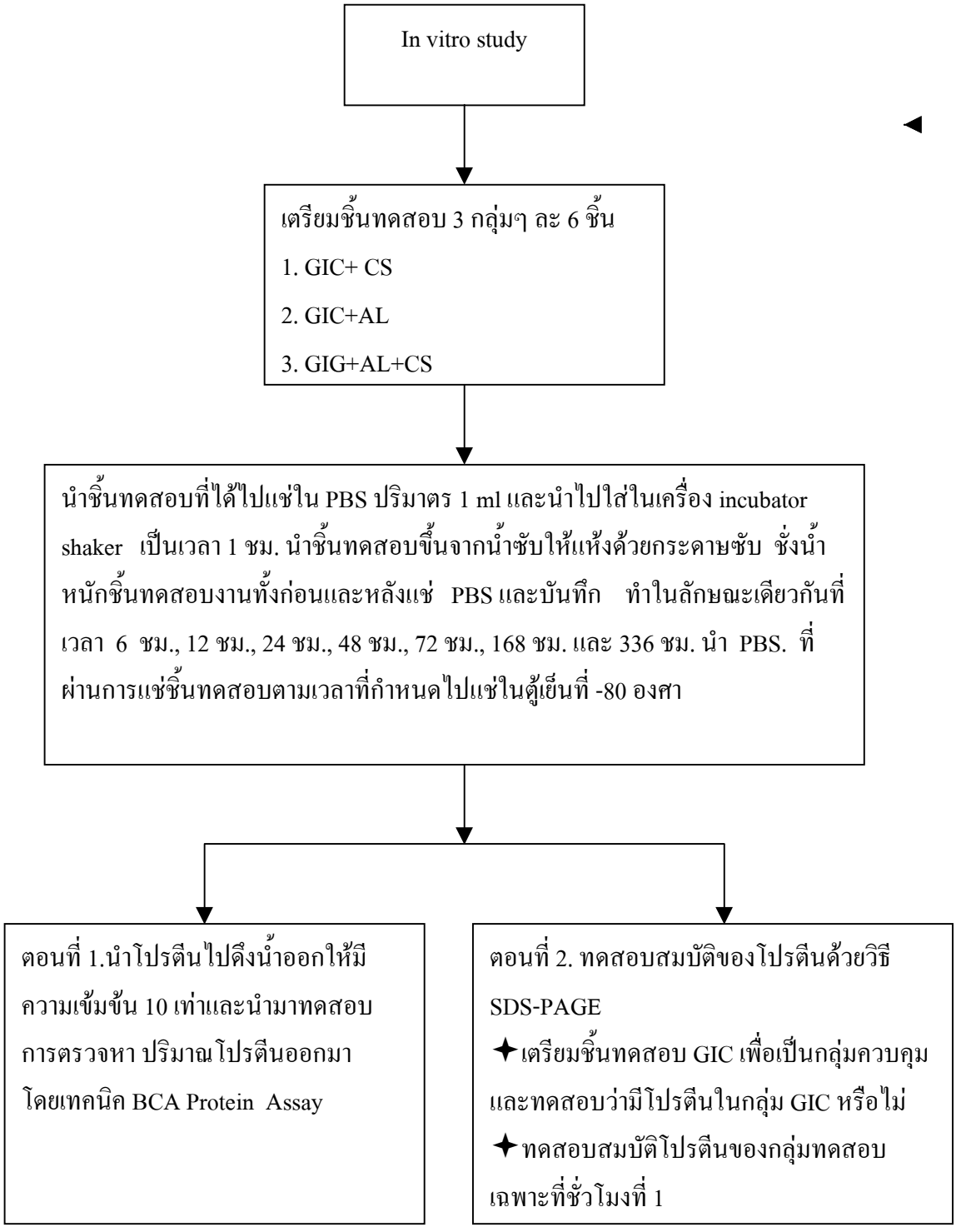
ชิ้นทดสอบ GIC+CS

ขี้ผึ้งพาราฟิน (parafin wax) เป็นกลุ่มควบคุม

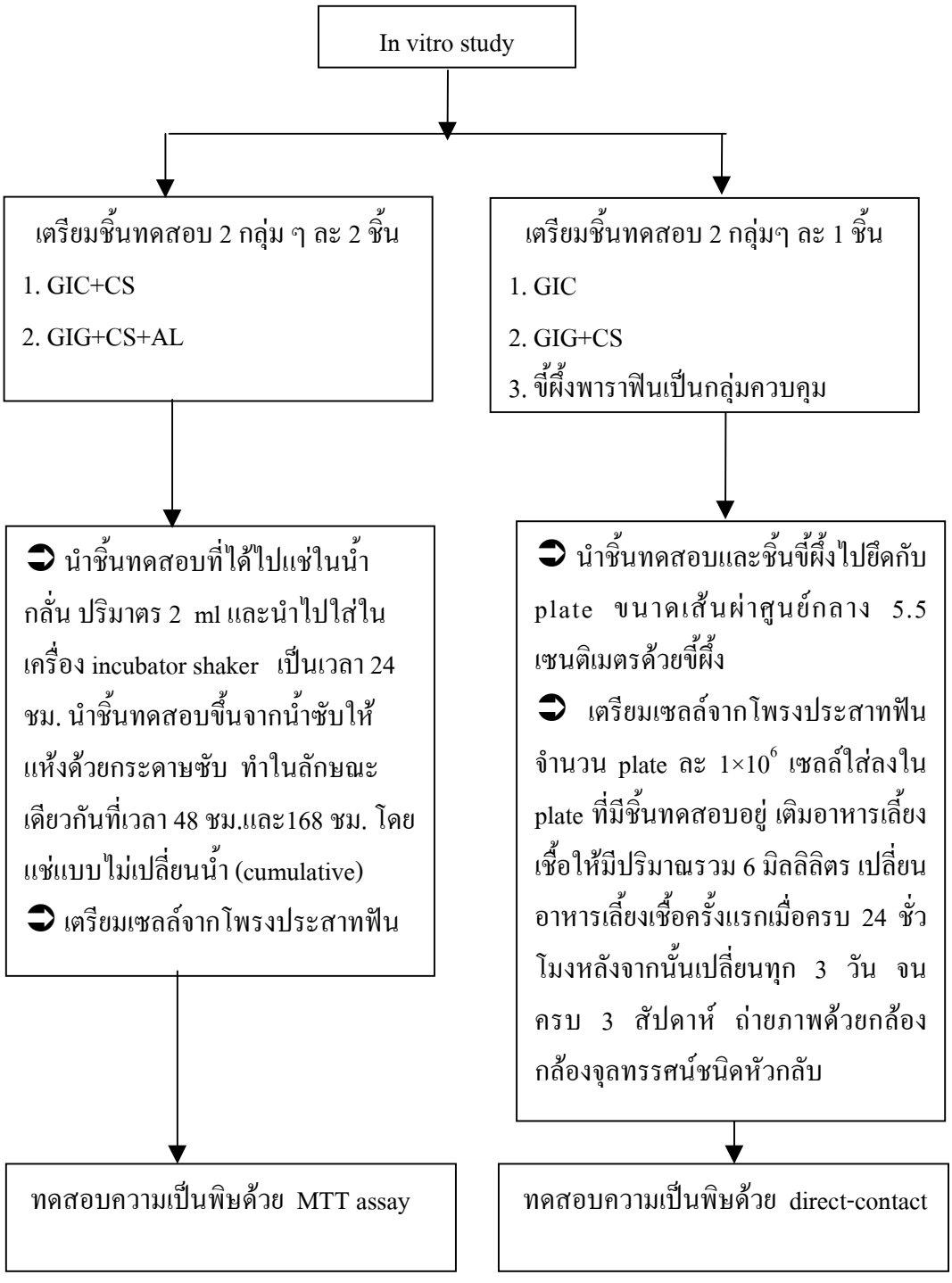
2. เตรียมเซลล์จากโพรงประสาทฟัน passage ที่ 6-8 จำนวน plate ละ 1×10^6 เซลล์ ใส่ลงใน plate ที่มีชิ้นทดสอบอยู่ เติมอาหารเลี้ยงเชื้อให้มีปริมาณรวม 6 มิลลิลิตร เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อครั้งแรกเมื่อครบ 24 ชั่วโมงหลังจากนั้นเปลี่ยนทุก 3 วัน จนครบ 3 สัปดาห์

3. หลังจากครบ 3 สัปดาห์ ทำการนับเซลล์ที่เหลืออยู่ โดยดูดเอาอาหารเลี้ยงเชื้อทิ้งไป ใช้ trypsin 2 มิลลิลิตรใส่ลงใน plate ให้เซลล์หลุดออกนำไปปั่นและนับด้วยเครื่องนับเซลล์ (Coulter Particle counter Z-1,U.S.A.)

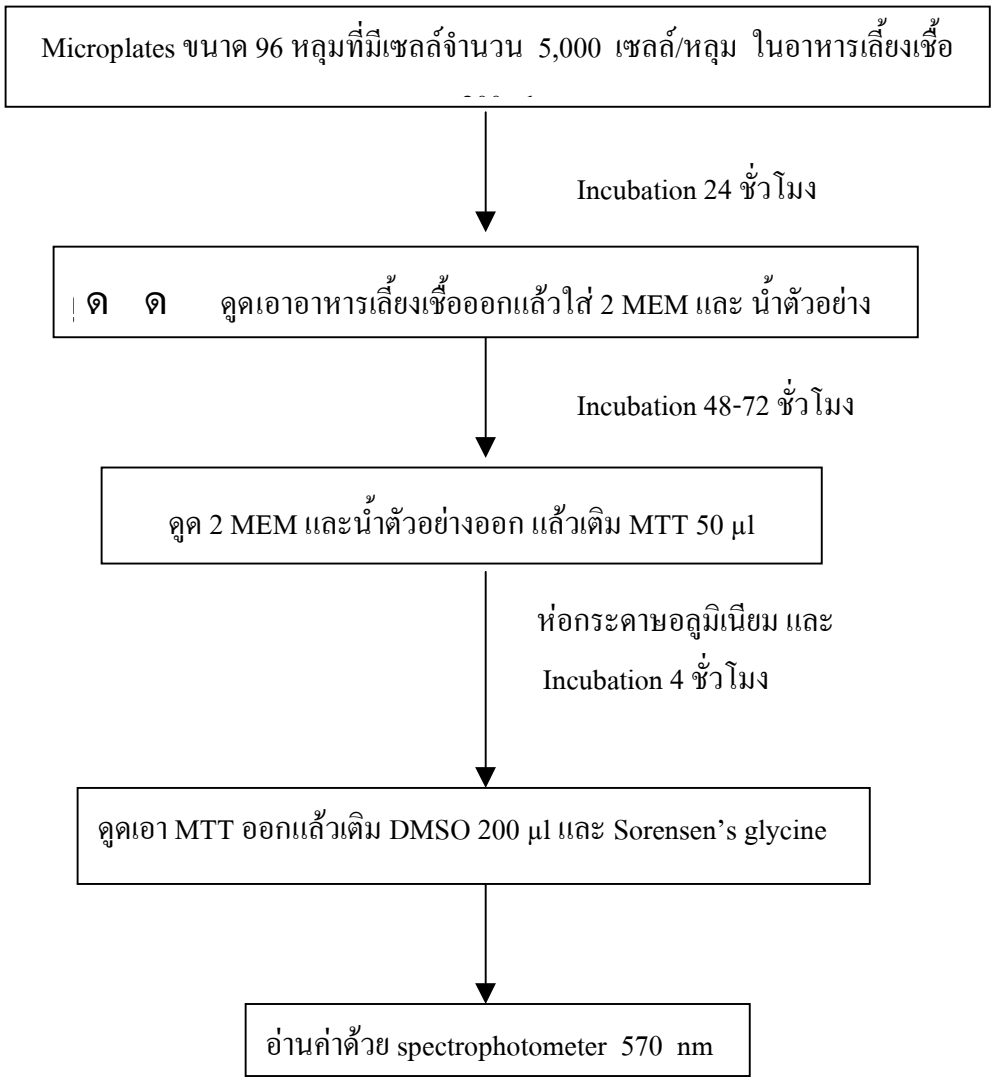
แผนผังแสดงระเบียบวิธีวิจัย ตอนที่ 1 และ 2



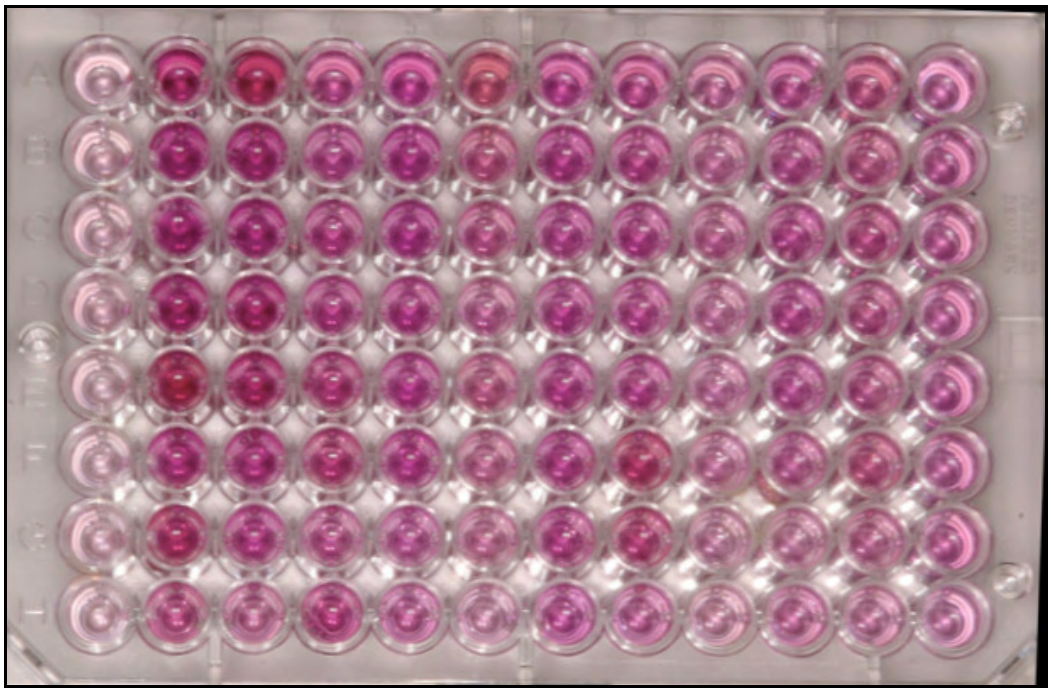
แผนผังแสดงระเบียบวิธีวิจัย ตอนที่ 3



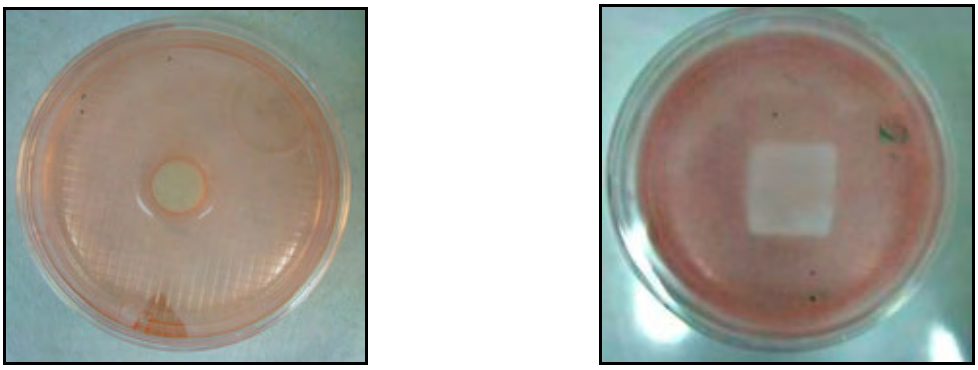
แผนผังแสดงขั้นตอนการทดสอบ MTT assay



รูปที่ 2 บน : แสดงชิ้นทดสอบขณะที่อยู่ในเบ้าหล่อและ
ล่าง : นำชิ้นทดสอบออกจากเบ้าหล่อ



รูปที่ 3 แสดงภาพ microplate ของการทำ MTT assay



(a) (b)

รูปที่ 4 แสดงภาพการทดสอบ direct contact ของชิ้นทดสอบ (a) และ ชิ้นขี้ผึ้ง (b)