ชื่อเรื่องการค้นคว้าแบบอิสระ การศึกษาวัฏจักรเซลล์สัตว์โดยการนับแยกตามขนาดของนิวเคลียสภายใต้กล้องจุลทรรศน์

ผู้เขียน นางสาวศศิชา วรรณวิไล

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (การสอนชีววิทยา)

อาจารย์ที่ปรึกษาการค้นคว้าแบบอิสระ ผศ.ดร.วีระ วงศ์คำ

บทคัดย่อ

การวิเคราะห์วัฏจักรของการแบ่งเซลล์ในสภาพเพาะเลี้ยงภายนอกร่างกายนั้น เป็นกระบวนการที่มีประโยชน์ทางชีววิทยาการแพทย์ในการประเมินคุณสมบัติของยา และความเป็นพิษต่อเซลล์ การศึกษากลไกของสารประกอบที่ออกฤทธิ์ทางชีวภาพซึ่งสามารถส่งผลในระดับเซลล์นั้นเป็นสิ่งที่จำเป็นอย่างยิ่งในกระบวนการเริ่มต้นของงานวิจัยและเพื่อที่จะหลีกเลี่ยงการใช้สัตว์ทดลองในห้องปฏิบัติการ วิธีการในการตรวจสอบวัฏจักรของเซลล์ที่นิยมใช้กันแพร่หลายคือ โฟลไซโตเมตทรี ซึ่งมีความถูกต้องแม่นยำในการตรวจสอบ โดยหลักการทำงานพื้นฐานของวิธีการนี้คือ การวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์โดยอาศัยการวัดปริมาณของโครมาตินที่อยู่ภายในนิวเคลียสของเซลล์ ซึ่งวิธีการนี้จำเป็นต้องใช้สารเคมีที่มีราคาแพง ผู้ทำการทดลองต้องมีความเชี่ยวชาญในการใช้เครื่องและการวิเคราะห์ข้อมูล นอกจากนี้เครื่องยังมีราคาแพงและไม่สามารถซื้อได้ งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อจะหาแนวทางในการวิเคราะห์วัฏจักรของเซลล์ที่ง่าย และมีราคาถูกกว่าการใช้เครื่องดังกล่าว โดยในงานวิจัยนี้ได้นำหลักการวิเคราะห์แบบเดียวกับโฟลไซโตเมตทรี เพื่อระบุระยะของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์ ความแตกต่างระหว่างขนาดของนิวเคลียสรวมทั้งปริมาณโครมาตินที่อยู่ภายใน ในงานวิจัยนี้ได้ทำการทดลองกับเซลล์เชื้อสายมะเร็ง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์เชื้อสายมะเร็งปากมดลูก (HeLa) และเซลล์เชื้อสายมะเร็งปอดอีก 2 ชนิด คือ A549 และ NCI-H1299 โดยได้ทำการตรวจสอบทางด้านสัณฐานวิทยาของเซลล์และขนาดของนิวเคลียสจำนวนมากกว่า 400 เซลล์ต่อเซลล์เชื้อสายแต่ละชนิดที่ถูกเพาะเลี้ยงในสภาวะปกติ และเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงในสารมาตรฐาน cisplatin ในความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพื่อใช้ในการหยุดการแบ่งตัวของเซลล์ในวัฏจักรเซลล์แบบไม่จำเพาะเจาะจง ขนาดของนิวเคลียสของเซลล์ที่วัดได้ถูกจัดกลุ่มเป็น 3 ระยะในวัฏจักร

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

เซลล์ ได้แก่ G_1, S และ G_2 โดยอ้างจากข้อมูลที่ได้มาจากการวิเคราะห์ด้วยโฟลไซโตเมทรี นอกจากนี้ยังทำการตรวจวัดดัชนีการแบ่งตัวและการตายของเซลล์แบบอะโพโทซิส ผลจากการทดลองพบว่าสามารถตรวจสอบระยะการแบ่งตัวของเซลล์เชื้อสายมะเร็งทั้ง 3 ชนิดได้ด้วยตาผ่านกล้องจุลทรรศน์ เมื่อส่องภายใต้กล้องจุลทรรศน์และนำไปจัดกลุ่มตามระยะต่างๆ ของวัฏจักรเซลล์ได้ ถึงแม้ว่าการวิเคราะห์ข้อมูลความแตกต่างทางสถิตินั้นยังมีความไม่แน่นอนและไม่น่าเชื่อถือเนื่องจากจำนวนของตัวอย่างที่ใช้ในการทดลองมีจำนวนจำกัดและอาจเกิดมาจากความผิดพลาดจากการนับในระหว่างการทำการทดลอง แต่รูปถ่ายที่ได้จากงานวิจัยในครั้งนี้สามารถนำไปพัฒนาเป็นสื่อการสอนในเรื่องของวัฏจักรของเซลล์ในระดับมัธยมศึกษาได้เป็นอย่างดี

คำสำคัญ: *cell cycle, flow cytometry technique, apoptotic index, mitotic index, HeLa, A549, NCI-H1299, mitosis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

Independent Study Title Study on Animal Cell Cycle Using Microscopic Counting on Nuclear Size Categories

Author Miss Sasicha Wannawilai

Degree Master of Science (Teaching Biology)

Independent Study Advisor Asst. Prof. Dr. Weerah Wongkham

Abstract

Cell cycle analysis of the in vitro cultured cell proliferation is a very useful method in biomedical evaluation of drug and toxin activities. Studying the activity mechanism of bioactive compound at the cellular level is necessary at the initial stage of laboratory level to avoid the animal experiment. Flow cytometry is a well-known legitimate method to study cell cycle and has been accepted for the validity and accuracy. The basic concept of flow cytometry to analyze cell cycles is the measurement of the amount of nuclear chromatin material. Methodology involves pricey chemical reagents, technical expertise and above all the instrument itself cost too high to be available for economic laboratory. This research aim to investigate the basic and alternative low cost technique to analyze the cell cycle. Using the same basic concept to flow cytometry to identify the cell cycle stages, different nuclear size according chromatin content has been evaluated. The 3 human cancer cell lines were employed as the in vitro laboratory model including cervical carcinoma cells, HeLa, and the other two lung cancer cells, A549 and NCI-H1299. Morphology and the size of nucleus was observed and measured from more than 400 cells of each cell line in standard condition. Cisplatin, at a nontoxic concentration, was used as a positive reagent to block the cells at non-specific stages of cell cycles. Sizes of nucleus were categorized into the three stages of the cell cycle, G1, S and G2, according to a previous literature flow cytometry methods. Mitotic index and apoptosis was also observed in these experiments. The result showed that cell cycle stages can be visualized and categorized in the three cell lines

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved

under microscopy. However, statistical analysis of the cell cycle stages was a problematic reliability due to the low number of samples and the manual measuring errors. Some of photographs taken in this research have been patterned as a teaching tool in the cell cycle lesson at a high school level.

Keywords: *cell cycle, flow cytometry technique, apoptotic index, mitotic index, HeLa, A549, NCI-H1299, mitosis*

ลิขสิทธิ์มหาวิทยาลัยเชียงใหม่
Copyright© by Chiang Mai University
All rights reserved