

OPTIMIZATION OF COBALT CHLORIDE CONCENTRATION FOR INDUCING HYPOXIA-ASSOCIATED CELLULAR RESPONSES IN FIBROBLASTS

Nutthamon WONGSOMBAT¹, Nattapon ROTPENPIAN¹, Sukhum KEERATIVITTAYANUN¹, Nuttawut THUAKSUBAN^{1*} and Supaporn SANGKERT¹

¹ Faculty of Dentistry, Prince of Songkla University, Thailand; nuttawut.t@psu.ac.th (Corresponding Author)

ARTICLE HISTORY

Received: 10 April 2026

Revised: 24 April 2026

Published: 16 May 2026

ABSTRACT

Introduction: The objective of this study was to investigate the optimal concentration of cobalt chloride for inducing hypoxia-mimicking conditions in human gingival fibroblast (HGFs) and L929 fibroblast cell lines.

Methods: HGFs and L929 were induced into hypoxia-mimic conditions using cobalt chloride (CoCl₂). The cytotoxicity of CoCl₂ was evaluated using the PrestoBlue assay at concentrations of 0, 50, 100, 150, and 200 µM over 12, 24, 48, 72, and 96 hours. Optical density was measured and analysed using one-way ANOVA. Hypoxia-induced cellular responses were assessed by measuring fluorescence intensity. Cells treated with 200 µM CoCl₂ were incubated with Photo-oxidation Resistant 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) and fluorescence intensity was measured at 24, 72, and 120 hours. **Results:** In HGFs, exposure to 200 µM CoCl₂ significantly reduced cell viability compared with the control and other concentrations at 48, 72, and 96 hours. In L929 cells, 200 µM CoCl₂ significantly decreased cell viability at 96 hours compared to lower concentrations. DCFH-DA fluorescence intensity increased in both HGFs and L929 cells treated with 200 µM CoCl₂, compared to controls at 24, 72, and 120 hours. **Conclusion:** These findings indicate that 200 µM CoCl₂ induces oxidative stress and cytotoxic effects in both cell types. These responses are consistent with cellular stress conditions, including those observed under hypoxia-related environments, and may be relevant to hypoxia-associated cellular responses.

Keywords: Fibroblast, Hypoxia, Cobalt Chloride

CITATION INFORMATION: Wongsombat, N., Rotpenpian, N., Keerativittayanun, S., Thuaksuban, N., & Sangkert, S. (2026). Optimization of Cobalt Chloride Concentration for Inducing Hypoxia-Associated Cellular Responses in Fibroblasts. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 4(5), 63

การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์คลอไรด์เพื่อเหนี่ยวนำการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์

ณัฐมน วงษ์สมบัติ¹, ณัฐพล โรจน์เพ็ญเพียร¹, สุขุม กীরติวิทยานันท์¹, ณัฐวุฒิ เทือกสุบรรณ^{1*} และ สุภาพร แสงเกิด¹

¹ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์; nuttawut.t@psu.ac.th (ผู้ประพันธ์บทความ)

บทคัดย่อ

บทนำ: การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์คลอไรด์ สำหรับเหนี่ยวนำสภาวะเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกและไฟโบรบลาสต์เซลล์ไลน์ L929

วิธีการศึกษา: เซลล์ถูกกระตุ้นด้วยโคบอลต์คลอไรด์ ที่ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ และประเมินความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วย PrestoBlue assay ที่เวลา 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง และประเมินการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ด้วย Photo-oxidation Resistant 2',7'-Dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA ที่เวลา 24, 72 และ 120 ชั่วโมง

ผลการศึกษา: โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ขณะที่เซลล์ L929 ลดลงที่เวลา 96 ชั่วโมง อีกทั้งยังพบว่าความเข้มข้นของการเรืองแสงของ DCFH-DA เพิ่มขึ้นในทั้งสองชนิดของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่เวลา 24, 72 และ 120 ชั่วโมง

สรุป: โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ทั้งสองชนิด ซึ่งมีความสอดคล้องกับการตอบสนองของเซลล์ภายใต้สภาวะเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจน ความเข้มข้นดังกล่าวอาจเหมาะสมสำหรับใช้เป็นแบบจำลองเบื้องต้นในห้องปฏิบัติการเพื่อศึกษาการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจน

คำสำคัญ: ไฟโบรบลาสต์, ภาวะขาดออกซิเจน, โคบอลต์คลอไรด์

ข้อมูลการอ้างอิง: ณัฐมน วงษ์สมบัติ, ณัฐพล โรจน์เพ็ญเพียร, สุขุม กীরติวิทยานันท์, ณัฐวุฒิ เทือกสุบรรณ และ สุภาพร แสงเกิด. (2569). การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์คลอไรด์เพื่อเหนี่ยวนำการตอบสนองของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 4(5), 63

บทนำ

ออกซิเจนมีบทบาทสำคัญต่อการอยู่รอดของเซลล์ โดยทำหน้าที่เป็นตัวรับอิเล็กตรอนสุดท้ายในกระบวนการสร้างพลังงานภายในไมโทคอนเดรีย ภาวะพร่องออกซิเจนเป็นภาวะที่มีการลดลงของปริมาณออกซิเจนที่ไปเลี้ยงเซลล์ ($\leq 1\%$) ซึ่งอาจเกิดจากหลายสาเหตุ เช่น การอักเสบ แผลเรื้อรัง มะเร็ง และโรคเมแทบอลิซึมที่ส่งผลให้การไหลเวียนของเลือดไปยังเนื้อเยื่อลดลง (Matthiesen et al., 2021; Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019) การลดลงของออกซิเจนสามารถส่งผลกระทบต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ สมดุลภายในเซลล์ กระบวนการส่งสัญญาณในเซลล์ และกลไกการอยู่รอดของเซลล์ได้ ในการปรับตัวต่อภาวะพร่องออกซิเจน กลไกสำคัญอย่างหนึ่ง คือ การควบคุมโดย Hypoxia-inducible factors (HIFs) โดยเฉพาะ HIF-1 α ซึ่งเป็นโปรตีนที่ช่วยควบคุมการถอดรหัสของยีนที่มีบทบาทในการควบคุมการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการสร้างหลอดเลือด เมแทบอลิซึม การสร้างเม็ดเลือดแดง และการอยู่รอดของเซลล์ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน (Yu et al., 2018) การคงอยู่ของ HIF-1 α จะนำไปสู่การกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่ถูกควบคุมโดย HIF-1 α เช่น vascular endothelial growth factor (VEGF), erythropoietin และเอนไซม์ในกระบวนการเมแทบอลิซึมหลายชนิด ซึ่งช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวต่อภาวะพร่องออกซิเจนได้ ในการสร้างภาวะพร่องออกซิเจนในหลอดทดลอง วิธีที่เหมาะสมที่สุด คือ การลดระดับออกซิเจนโดยตรง อย่างไรก็ตาม การใช้ตัวจำลองภาวะพร่องออกซิเจนยังมีข้อจำกัดในหลายห้องปฏิบัติการเนื่องจากมีราคาสูง (Matthiesen et al., 2021) ดังนั้นจึงมีการพัฒนาวิธีเพื่อเลียนแบบสภาวะพร่องออกซิเจนในการเพาะเลี้ยงเซลล์ หนึ่งในวิธีที่นิยมใช้คือการใส่สารเคมีที่เลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจน ซึ่งสามารถกระตุ้นการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนได้โดยการรบกวนกระบวนการส่งสัญญาณที่ขึ้นกับออกซิเจน และทำให้ HIF-1 α มีความเสถียรภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนปกติ โคบอลต์คลอไรด์ (Cobalt chloride) เป็นสารที่ถูกใช้กันอย่างแพร่หลายในการเหนี่ยวนำภาวะพร่องออกซิเจนในแบบจำลองการเพาะเลี้ยงเซลล์ โดยโคบอลต์คลอไรด์ทำให้ HIF-1 α มีความเสถียรโดยการยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนดังกล่าว ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนอย่างต่อเนื่องแม้ในสภาวะที่มีระดับออกซิเจนปกติ (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019; Rana et al., 2019) เนื่องจากโคบอลต์คลอไรด์มีประสิทธิภาพในการจำลองสภาวะเลียนแบบการพร่องออกซิเจน และใช้งานได้สะดวก การศึกษาจึงต้องการสร้างแบบจำลองภาวะพร่องออกซิเจน โดยใช้โคบอลต์คลอไรด์ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อหัวใจและเซลล์ไลน์ L929 โดยมีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์คลอไรด์ที่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดสภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ทั้งสองชนิด

การทบทวนวรรณกรรม

ภาวะพร่องออกซิเจน

การได้รับออกซิเจนอย่างเพียงพอมีความสำคัญต่อเมแทบอลิซึมของเซลล์ การสร้างพลังงานในรูปของ ATP และกระบวนการส่วนใหญ่ของหายของแผล (Sharma et al., 2021) ภาวะพร่องออกซิเจนเป็นภาวะที่มีการลดลงของปริมาณออกซิเจนที่ไปเลี้ยงเซลล์ ($\leq 1\%$) ภาวะขาดเลือดบริเวณแผลทำให้การส่งออกซิเจน และสารอาหารที่จำเป็นต่อการหายของแผลลดลง ส่งผลให้เกิดการตายของเนื้อเยื่อ นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการลดลงของการส่งแอนติบอดี เม็ดเลือดขาว และยาปฏิชีวนะ ไปยังเนื้อเยื่อบริเวณนั้น เพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อ และลดความสามารถในการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเชื้อแบคทีเรีย (Hupp et al., 2019) ภาวะขาดออกซิเจนเฉพาะที่ส่งผลให้การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน (granulation tissue) การสร้างคอลลาเจน (collagen) และการเพิ่มจำนวนของไฟโบรบลาสต์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งทำให้กระบวนการการหายของแผลในขั้นตอนการสร้างเยื่อแผลใหม่ และความแข็งแรงของเนื้อเยื่อลดลง (Galeano et al., 2021) ภาวะขาดเลือดสามารถเกิดได้จากหลายปัจจัย ทั้งจากกระบวนการผ่าตัด เช่น การเย็บแผลที่ตึงเกินไป รวมถึงปัจจัยทางร่างกายและโรคทางระบบ เช่น การได้รับรังสีรักษา การสูบบุหรี่ โรคเบาหวาน และโรคหลอดเลือดบางชนิด (Olascoaga et al., 2008; Little et al., 2018; Silverstein, 1992; Iyer & Balasubramanian, 2012)

การตอบสนองของเซลล์ต่อภาวะพร่องออกซิเจน

การเกิดภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์เกิดขึ้นได้ในหลายสภาวะ เช่น ในระหว่างการหายของแผล หรือการเสียหายของหลอดเลือด สามารถทำให้เนื้อเยื่อบริเวณนั้นได้รับออกซิเจนไม่เพียงพอ ในสภาวะพร่องออกซิเจน ไฟโบรบลาสต์เป็นหนึ่งในเซลล์ที่พบว่ามีส่วนสำคัญในการซ่อมแซมเนื้อเยื่อ ภาวะพร่องออกซิเจนเฉียบพลันช่วยกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากผิวหนังได้ในช่วงแรก และในบางการศึกษาพบว่าการมีออกซิเจนไม่เพียงพอทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์ไฟโบรบลาสต์น้อยลง (Vogler et al., 2013) ภาวะพร่องออกซิเจนสามารถทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อความเครียดของเซลล์ในหลากหลายรูปแบบ ซึ่งมีผลต่อการอยู่รอดของเซลล์ การเผาผลาญพลังงาน และเส้นทางการส่งสัญญาณภายในเซลล์ ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน จะมีกลไกการปรับตัว เพื่อคงสภาวะสมดุลภายในเซลล์ และรักษาสสมดุลของพลังงาน กลไกสำคัญของการตอบสนองนี้คือเส้นทางการส่งสัญญาณของ HIF ซึ่งทำหน้าที่ควบคุมการแสดงออกของยีนจำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเผาผลาญกลูโคส และการอยู่รอดของเซลล์ (Yu et al., 2018) การกระตุ้น HIF-1 α ช่วยให้เซลล์สามารถปรับตัวต่อสภาวะที่มีออกซิเจนลดลง โดยส่งเสริมการเปลี่ยนแปลงทางเมตาบอลิซึม เช่น การเพิ่มกระบวนการไกลโคไลซิส และการเปลี่ยนแปลงการทำงานของไมโทคอนเดรีย (Mitochondria) นอกจากการปรับตัวทางเมตาบอลิซึมแล้ว ภาวะพร่องออกซิเจนยังส่งผลต่อกระบวนการต่างๆ ภายในเซลล์ เช่น ออโตฟาจี (Autophagy) และการตายของเซลล์ เพื่อรักษาสสมดุลของพลังงานในสภาวะเครียด กลไกนี้มีบทบาทในการปกป้องเซลล์ ทำให้เซลล์สามารถอยู่รอดได้ภายใต้สภาวะที่ไม่เหมาะสม เช่น การขาดออกซิเจน (Muz et al., 2015) อย่างไรก็ตาม หากภาวะพร่องออกซิเจนมีความรุนแรงหรือยาวนาน อาจกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ได้

การใช้โคบอลต์คลอไรด์เพื่อเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจน

มีการพัฒนาวิธีการเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนในหลอดทดลองหลายวิธี แม้ว่าการใช้ตู้จำลองภาวะพร่องออกซิเจนจะสามารถจำลองสภาวะที่ใกล้เคียงกับการขาดออกซิเจนจริงได้ดี แต่การใช้ตู้จำลองภาวะพร่องออกซิเจนมีค่าใช้จ่ายที่สูง การใช้สารเคมีเพื่อเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนจึงเป็นวิธีที่ถูกนำมาใช้เนื่องจากมีความสะดวก โคบอลต์คลอไรด์เป็นสารที่ถูกนำมาใช้อย่างแพร่หลายในการเพาะเลี้ยงเซลล์ มีกลไกในการทำให้โปรตีน HIF-1 α มีความเสถียร และยับยั้งการสลายตัวของโปรตีนดังกล่าวภายใต้สภาวะที่มีออกซิเจนปกติ ส่งผลให้ HIF-1 α สะสม และกระตุ้นการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจน (Matthiesen et al., 2021) โคบอลต์คลอไรด์จึงสามารถกระตุ้นการตอบสนองของเซลล์ที่คล้ายกับสภาวะพร่องออกซิเจนจริงได้ ซึ่งโดยปกติแล้ว HIF จะถูกควบคุมโดยเอนไซม์ prolyl hydroxylase (PHD) ที่ต้องอาศัย Fe^{2+} และออกซิเจนในการทำงาน โคบอลต์คลอไรด์รบกวนการทำงานของ PHD ทั้งจากการแทนที่ Fe^{2+} ใน ตำแหน่งที่ว่องไวต่อปฏิกิริยาและจากการเหนี่ยวนำให้เกิดความเครียดออกซิเดชันผ่านอนุมูลอิสระ รวมถึงการทำให้สารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ลดลง เช่น กรดแอสคอร์บิก (Ascorbic acid) ส่งผลให้ HIF-1 α ไม่เกิดปฏิกิริยาการเติมหมู่ไฮดรอกซิล จึงมีการสลายตัวลดลง (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019) โคบอลต์คลอไรด์ถูกนำมาใช้ในการสร้างแบบจำลองภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ชนิดต่างๆ โดยพบว่า โคบอลต์คลอไรด์สามารถกระตุ้นเส้นทางการส่งสัญญาณที่ขึ้นกับ HIF และเหนี่ยวนำการตอบสนองของเซลล์ที่คล้ายกับการขาดออกซิเจน เช่น การปรับตัวทางเมตาบอลิซึม ความเครียดออกซิเดชัน ออโตฟาจี และการตายของเซลล์ ด้วยเหตุนี้ โคบอลต์คลอไรด์ จึงเป็นหนึ่งในสารที่นิยมใช้มากที่สุดในการสร้างสภาวะเลียนแบบการพร่องออกซิเจนในห้องปฏิบัติการ (Yu et al., 2018)

การสร้างอนุมูลอิสระภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจน

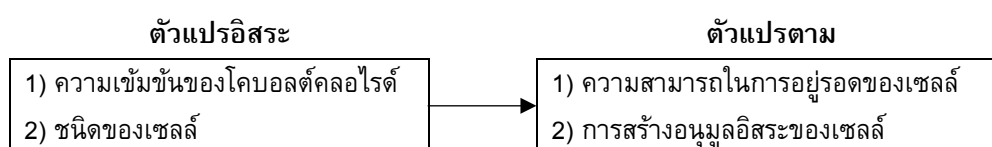
อนุมูลอิสระของออกซิเจน (Reactive oxygen species) เป็นโมเลกุลที่มีบทบาทสำคัญในการส่งสัญญาณภายในเซลล์ โดยเฉพาะในสภาวะเครียด ภายใต้ภาวะพร่องออกซิเจน การทำงานของไมโทคอนเดรียอาจถูกรบกวน ส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้น การสะสมของอนุมูลอิสระในระดับสูงสามารถก่อให้เกิดความเสียหายต่อองค์ประกอบของเซลล์ เช่น ไขมัน โปรตีน และ ดีเอ็นเอ ซึ่งนำไปสู่การบาดเจ็บของเซลล์ และการตายของเซลล์ (Yu et al., 2018) งานวิจัยก่อนหน้านี้แสดงให้เห็นว่า การเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยโคบอลต์คลอไรด์สามารถเพิ่มระดับ

อนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญ โดยการสะสมของอนุมูลอิสระ มีความสัมพันธ์กับความผิดปกติของไมโทคอนเดรีย และการกระตุ้นการเกิดการตายในเซลล์ที่อยู่ภายใต้สภาวะพร่องออกซิเจน ในการทดสอบการเกิดอนุมูลอิสระ เช่น DCFH-DA ซึ่งจะเปล่งแสงเมื่อถูกออกซิไดซ์โดยอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019; Vengellur & LaPres, 2004; Yu et al., 2018) การเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระยังสามารถทำให้เกิดความเสียหายต่อไมโทคอนเดรียและรบกวนสมตูลรีดอกซ์ภายในเซลล์ ซึ่งจะยิ่งส่งเสริมการเกิดการตายและการบาดเจ็บของเซลล์ ดังนั้นภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) จึงถือเป็นกลไกสำคัญที่ทำให้เซลล์เกิดการตอบสนองต่อภาวะพร่องออกซิเจนที่ถูกเหนี่ยวนำด้วยสารเคมี

สมมติฐานการวิจัย

- 1) การได้รับโคบอลต์คลอไรด์จะส่งผลให้ควมมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกและเซลล์ไลน์ L 929 ลดลง แบบขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลา
- 2) การได้รับโคบอลต์คลอไรด์จะกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์เพิ่มขึ้นเมื่อเทียบกับการไม่ได้รับโคบอลต์คลอไรด์

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิดการวิจัย

วิธีดำเนินการวิจัย

การเพาะเลี้ยงเซลล์

- 1) การเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก

งานวิจัยได้รับการรับรองจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ (EC6802-010) ชิ้นเนื้อเยื่อเหงือกจะถูกเก็บมาจากผู้ป่วยที่ไม่มีโรคประจำตัว หรือมีโรคประจำตัวที่ควบคุมได้ ที่เข้ามารับการผ่าตัดฟันคุดที่คลินิกศัลยศาสตร์ช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ โดยต้องไม่มีการติดเชื้อและอักเสบที่ฟันและเหงือกบริเวณฟันคุดซึ่งดังกล่าว ชิ้นเนื้อที่เก็บได้จะถูกเก็บไว้ใน Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM: Gibco BRL, New York, USA) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กลงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ โดยอาหารเลี้ยงเซลล์ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS (fetal bovine serum) และ 1% antibiotics บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% สังเกตรูปร่างและจำนวนของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงผ่านกล้องจุลทรรศน์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 70-80% ของภาชนะ จึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองจะเป็นเซลล์รุ่น (passage) ที่ 3-5 (Wanichpakorn & Kedjarune-Laggat, 2010)

- 2) การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

เซลล์ L929 (ATCC, USA) ที่ถูกเก็บไว้ในไนโตรเจนเหลว ถูกนำมาทำให้ละลายในอ่างควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และนำมาเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย DMEM, 10% FBS (fetal bovine serum) และ 1% antibiotics บ่มไว้ในตู้เพาะเลี้ยงเซลล์ที่ควบคุมปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความชื้น 95% สังเกตรูปร่างและจำนวนของเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงผ่านกล้องจุลทรรศน์ ทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 70-80% ของภาชนะ จึงนำไปเพาะเลี้ยงต่อไป

การจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนของเซลล์ด้วยสารละลายโคบอลต์คลอไรด์

1) การทดสอบความเป็นพิษของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ต่อเซลล์ด้วย Prestoblu assay

เซลล์ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 48 หลุม และบ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ ความเข้มข้น 0, 50, 100, 150 และ 200 ไมโครโมลาร์ เป็นเวลา 12, 24, 48, 72 และ 96 ชั่วโมง หลังจากนั้นเปลี่ยนเป็นสาร PrestoBlue (Thermo Fisher Scientific, USA) ความเข้มข้น 10 ไมโครลิตร ใน 100 ไมโครลิตรของอาหารเลี้ยงเซลล์ และบ่มต่ออีก 10 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าความหนาแน่นเชิงแสง (Optical density) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร ทำการทดสอบซ้ำกลุ่มละ 3 ครั้ง และนำค่าที่ได้มาเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม

2) การประเมินภาวะขาดออกซิเจนด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA

เซลล์ทั้งสองชนิดถูกเลี้ยงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม หลังการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีโคบอลต์คลอไรด์เป็นเวลา 24, 72, และ 120 ชั่วโมง เซลล์จะถูกบ่มด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA Working solution เป็นเวลา 30 นาที และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์เรืองแสง (Fluorescence microscope) โดยใช้ความยาวคลื่นที่ 488 นาโนเมตร เซลล์ที่เกิดภาวะพร่องออกซิเจนจะปรากฏสีเขียวเรืองแสง ความเข้มของการเรืองแสง (fluorescence intensity) ถูกวัดด้วยโปรแกรม ImageJ (National Institutes of Health, USA) เพื่อเปรียบเทียบการสร้างอนุมูลอิสระระหว่างกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่มีโคบอลต์คลอไรด์

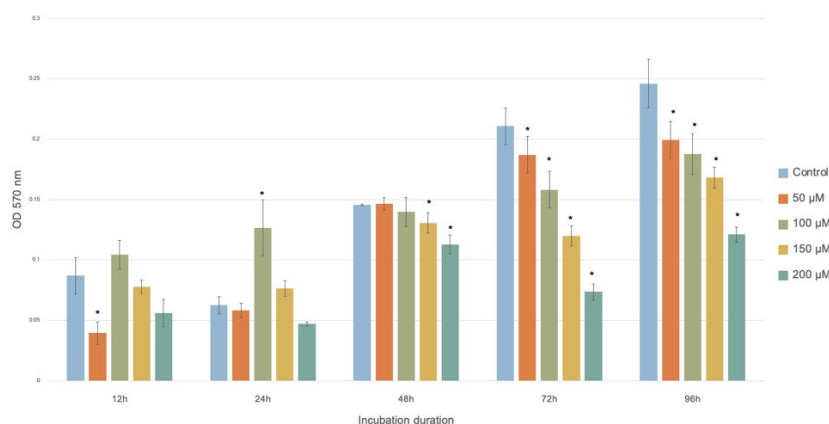
การวิเคราะห์ทางสถิติ

ข้อมูลถูกนำเสนอในรูปแบบค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) และวิเคราะห์ด้วยซอฟต์แวร์ SPSS เวอร์ชัน 29 (SPSS Inc., Chicago, USA) ในการทดสอบการกระจายของข้อมูลใช้สถิติ Shapiro-Wilk test สำหรับข้อมูลพาราเมตริก ใช้การวิเคราะห์ one-way ANOVA และ Tukey's post hoc test เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ต่อเซลล์ สำหรับข้อมูลที่ไม่เป็นพาราเมตริก การวิเคราะห์ความต่างระหว่างกลุ่มใช้สถิติ Kruskal-Wallis ในส่วนการสร้างอนุมูลอิสระในเซลล์ สำหรับข้อมูลพาราเมตริก ใช้การวิเคราะห์ด้วยสถิติ Independent-Samples T-test เพื่อเปรียบเทียบความเข้มของการเรืองแสงของเซลล์ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่บ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ สำหรับข้อมูลที่ไม่เป็นพาราเมตริก ใช้สถิติ Mann-Whitney U-Test ที่ระดับนัยสำคัญ < 0.05

ผลการวิจัย

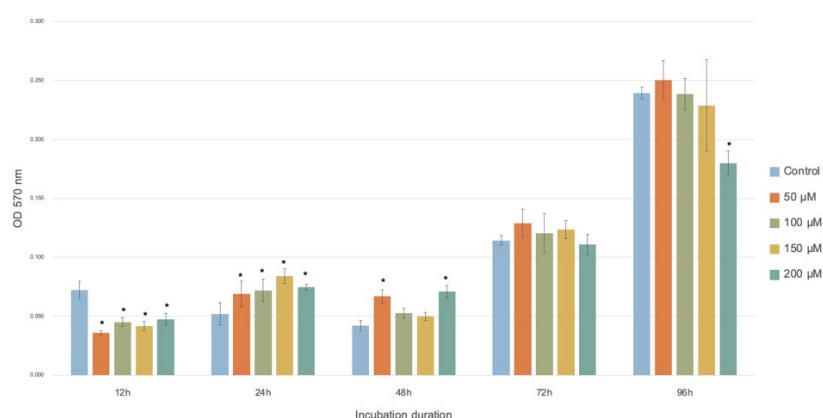
ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารละลายโคบอลต์คลอไรด์ต่อเซลล์ด้วย Prestoblu assay

1) การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก พบว่า การเลี้ยงเซลล์ด้วยโคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้นต่างๆ ส่งผลต่อความมีชีวิตของเซลล์แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลา โดยที่เวลา 12 และ 24 ชั่วโมง ไม่พบความแตกต่างกันทางสถิติระหว่างกลุ่มทดลอง อย่างไรก็ตาม เมื่อระยะเวลาการบ่มเพิ่มเป็น 48 ชั่วโมง พบว่า เมื่อความเข้มข้นของ โคบอลต์คลอไรด์สูงขึ้น เริ่มมีแนวโน้มทำให้ความสามารถในการอยู่รอดของเซลล์ลดลง เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โคบอลต์คลอไรด์ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มความเข้มข้นอื่น ที่เวลา 48, 72 และ 96 ชั่วโมง ขณะที่ความเข้มข้น 50, 100 และ 150 ไมโครโมลาร์ ทำให้ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ 72 และ 96 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังพบว่า หลังจาก 24 ชั่วโมง ความมีชีวิตของเซลล์เมื่อบ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ มีแนวโน้มลดลงแบบขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของสาร เมื่อความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์เพิ่มขึ้น ค่าความมีชีวิตจะลดลง โดยเฉพาะในช่วงเวลาที่นานขึ้น (กราฟที่ 1)



กราฟที่ 1 ความหนาแน่นเชิงแสงที่วัดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก เมื่อใช้ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

2) การทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ L929 พบว่า การตอบสนองต่อโคบอลต์คลอไรด์แตกต่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก โดยในช่วง 12-48 ชั่วโมง ค่าความมีชีวิตของเซลล์ในทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างทางสถิติจากกลุ่มควบคุม และในบางความเข้มข้นยังพบแนวโน้มของค่าความมีชีวิตของเซลล์สูงขึ้นเล็กน้อย อย่างไรก็ตาม ที่ 72 ชั่วโมง พบว่า ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ เริ่มมีผลต่อความมีชีวิตของเซลล์ โดยเฉพาะในกลุ่มที่ได้รับความเข้มข้นสูง และที่เวลา 96 ชั่วโมง พบว่า โคบอลต์คลอไรด์ ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ ทำให้ค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม และความเข้มข้นอื่นๆ ($p < 0.05$) ในขณะที่ความเข้มข้น 50-150 ไมโครโมลาร์ ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม (กราฟที่ 2)

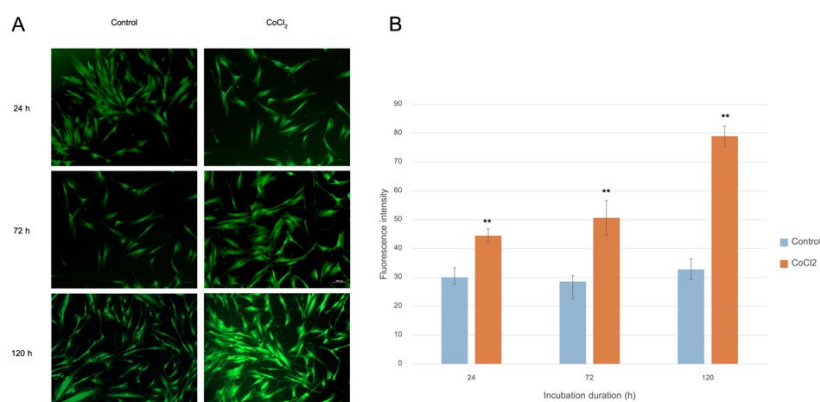


กราฟที่ 2 ความหนาแน่นเชิงแสงที่วัดจากเซลล์ L929 เมื่อใช้ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ต่างกันในแต่ละช่วงเวลา ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, * แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.05$)

การวัดอนุมูลอิสระของออกซิเจนด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA

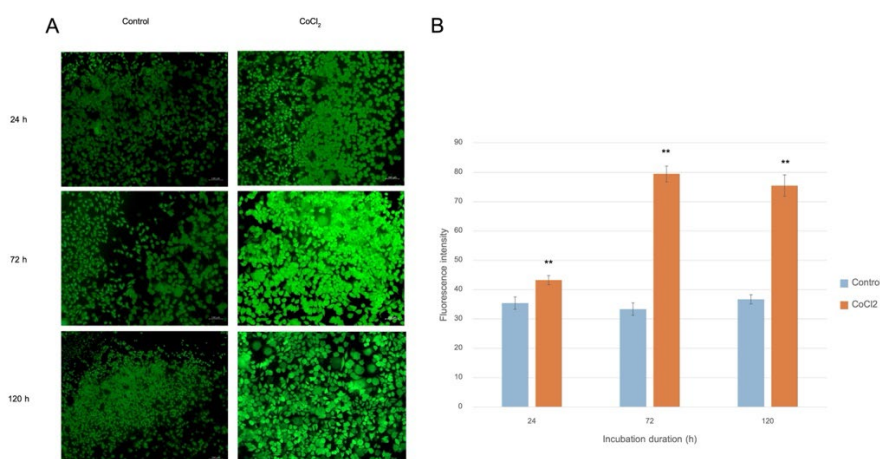
1) การทดสอบการสร้างอนุมูลอิสระของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก เมื่อเปรียบเทียบการเรืองแสงจาก Photo-oxidation Resistant DCFH-DA พบว่าที่ 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับโคบอลต์คลอไรด์มีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่ากลุ่มควบคุม และแตกต่างอย่างชัดเจนมากขึ้นเมื่อกระตุ้นด้วยโคบอลต์คลอไรด์เป็นเวลา 72 และ 120 ชั่วโมง

แสดงให้เห็นว่าโคบอลต์คลอไรด์สามารถกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระ ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกได้อย่างต่อเนื่องและเพิ่มขึ้นตามระยะเวลาที่บ่ม (ภาพที่ 2)



ภาพที่ 2 การสร้างอนุมูลอิสระของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ 200 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 24, 72, และ 120 ชั่วโมง (A) การเรืองแสงของเซลล์เมื่อย้อมด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA (B) ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณของความเข้มการเรืองแสงภายหลังการย้อมด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA โดยใช้โปรแกรม ImageJ ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$)

2) การทดสอบการสร้างอนุมูลอิสระของเซลล์ L929 เมื่อเปรียบเทียบการเรืองแสงจาก Photo-oxidation Resistant DCFH-DA พบว่า ที่ 24 ชั่วโมง กลุ่มที่ได้รับโคบอลต์คลอไรด์และกลุ่มควบคุมมีความเข้มของการเรืองแสงที่ต่างกันทางสถิติ และกลุ่มที่ได้รับโคบอลต์คลอไรด์มีความเข้มของการเรืองแสงมากกว่าอย่างชัดเจนมากขึ้นที่ 72 และ 120 ชั่วโมง แสดงให้เห็นว่าโคบอลต์คลอไรด์สามารถกระตุ้นการเกิดอนุมูลอิสระในเซลล์ L929 ได้เมื่อระยะเวลาในการบ่มยาวนานขึ้น (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 การสร้างอนุมูลอิสระของเซลล์ L929 ในกลุ่มควบคุมและกลุ่มที่บ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์ 200 ไมโครโมลาร์ที่ระยะเวลา 24, 72, และ 120 ชั่วโมง (A) การเรืองแสงของเซลล์เมื่อย้อมด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA (B) ผลการวิเคราะห์เชิงปริมาณของความเข้มการเรืองแสงภายหลังการย้อมด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA โดยใช้โปรแกรม ImageJ ผลการทดลองแสดงในรูปค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน, ** แสดงถึงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ($p < 0.01$)

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของโคบอลต์คลอไรด์สำหรับการเหนี่ยวนำการเปลี่ยนแปลงภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์ โดยประเมินจากความเป็นพิษต่อเซลล์และผลต่อการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์ ผลการศึกษาพบว่าโคบอลต์คลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดทั้งความเป็นพิษต่อเซลล์และภาวะเครียดออกซิเดชันแบบขึ้นกับความเข้มข้นและระยะเวลา โดยพบว่าความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ เป็นระดับที่ทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับที่ยอมรับได้ ซึ่งสอดคล้องกับการสร้างแบบจำลองภาวะพร่องออกซิเจนโดยใช้โคบอลต์คลอไรด์

โคบอลต์คลอไรด์ถูกนำมาใช้เป็นสารเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนอย่างแพร่หลาย เนื่องจากสามารถทำให้ HIF-1 α มีความเสถียร ไม่ถูกทำลาย ส่งผลให้เกิดการกระตุ้นสัญญาณที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจนได้ แม้ในภาวะที่มีออกซิเจนปกติ ในการศึกษา การได้รับโคบอลต์คลอไรด์เป็นเวลานานส่งผลให้การมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยเฉพาะเมื่อใช้ความเข้มข้นสูง และระยะเวลาการบ่มที่ยาวนาน ซึ่งสอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้ที่แสดงให้เห็นว่าการคงอยู่ของ HIF-1 α ในระดับสูงเป็นเวลานาน และภาวะพร่องออกซิเจนที่เรื้อรัง สามารถรบกวนสมดุลของเซลล์และนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019; Vengellur & LaPres, 2004)

จากผลการทดลองยังพบว่า เซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกมีความไวต่อความเป็นพิษของโคบอลต์คลอไรด์มากกว่าเซลล์ L929 โดยพบว่า ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ที่ 48 ชั่วโมง ในขณะที่เซลล์ L929 มีการลดลงของเซลล์ที่ช้ากว่า โดยความมีชีวิตของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญที่ 96 ชั่วโมง การที่เซลล์ทั้งสองชนิดตอบสนองแตกต่างกัน อาจอธิบายได้จากความแตกต่างของแหล่งกำเนิดของเซลล์ทั้งสองชนิด และเมแทบอลิซึมระหว่างเซลล์จากเนื้อเยื่อ และเซลล์ไลน์ โดยเซลล์จากเนื้อเยื่อมักมีความทนทานต่อความเครียดจากสิ่งแวดล้อมต่ำกว่า ขณะที่เซลล์ไลน์อาจมีกลไกการปรับตัวที่ช่วยให้ทนต่อความเครียดได้มากกว่า

นอกจากผลด้านความเป็นพิษต่อเซลล์แล้ว โคบอลต์คลอไรด์ยังเพิ่มระดับอนุมูลอิสระภายในเซลล์ทั้งสองชนิด เมื่อย้อมด้วย Photo-oxidation Resistant DCFH-DA โดยพบว่า เซลล์ที่ถูกบ่มด้วยโคบอลต์คลอไรด์มีการเพิ่มขึ้นของการเรืองแสงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยทั้งเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกและเซลล์ L929 มีความเข้มของการเรืองแสงเพิ่มขึ้นในกลุ่มโคบอลต์คลอไรด์อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ 24 ชั่วโมง และเห็นความแตกต่างที่ชัดเจนในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือก ผลการทดลองดังกล่าวชี้ให้เห็นว่าการสร้างอนุมูลอิสระภายใต้สภาวะเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนจะขึ้นกับเวลาและแตกต่างกันในแต่ละชนิดของเซลล์ กลไกที่โคบอลต์คลอไรด์เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระภายในเซลล์เกี่ยวข้องกับทั้งกับไมโทคอนเดรีย และกลไกอื่นๆ โดย Co^{2+} ที่ถูกปลดปล่อยสามารถกระตุ้นปฏิกิริยาออกซิเดชันโดยตรง ส่งผลให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระ และการออกซิไดซ์สารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เช่น กรดแอสคอร์บิก เมื่อเซลล์มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระลดลง ยิ่งส่งเสริมให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันมากขึ้น นอกจากนี้อนุมูลอิสระจากไมโทคอนเดรียยังมีบทบาทสำคัญในกระบวนการส่งสัญญาณเมื่อเกิดภาวะพร่องออกซิเจน และ โคบอลต์คลอไรด์ ยังสามารถกระตุ้นการสร้างอนุมูลอิสระได้โดยไม่ผ่านไมโทคอนเดรีย การสะสมของอนุมูลอิสระนำไปสู่ความเสียหายของดีเอ็นเอ และการกระตุ้นกระบวนการตายของเซลล์ ดังนั้น ภาวะเครียดออกซิเดชันจึงเป็นกลไกสำคัญที่มีส่วนทำให้เกิดความเป็นพิษของโคบอลต์คลอไรด์ ต่อเซลล์ (Oh et al., 2014)

ความสัมพันธ์ระหว่างการเพิ่มขึ้นของอนุมูลอิสระ และการลดลงของการมีชีวิตของเซลล์ สามารถบ่งชี้ได้ว่าภาวะเครียดออกซิเดชันก่อให้เกิดความเสียหายของเซลล์ภายใต้สภาวะเลียนแบบการพร่องออกซิเจน เมื่อระดับอนุมูลอิสระเพิ่มขึ้นตามเวลา พบว่า ความมีชีวิตของเซลล์ลดลงตามไปด้วย ผลดังกล่าวสะท้อนให้เห็นถึงผลของการเกิดออกซิเดชันของเซลล์ และบ่งชี้ว่าการสร้างอนุมูลอิสระในระดับที่สูงอาจทำให้ระบบต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ไม่เพียงพอและเกิดการตายของเซลล์ได้ (Muñoz-Sánchez & Cháñez-Cárdenas, 2019)

โดยสรุป ผลการศึกษานี้แสดงให้เห็นว่า โคบอลต์คลอไรด์ที่ความเข้มข้น 200 ไมโครโมลาร์ สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชันและความเป็นพิษต่อเซลล์ในเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกและเซลล์ L929 ได้อย่างมี

นัยสำคัญ ซึ่งการตอบสนองดังกล่าวสอดคล้องกับภาวะความเครียดของเซลล์ และอาจมีความเกี่ยวข้องกับ การตอบสนองของเซลล์ภายใต้สภาวะที่เกี่ยวข้องกับภาวะพร่องออกซิเจน อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้ยังมีข้อจำกัดคือ การใช้โคบอลต์คลอไรด์เป็นสารเลียนแบบภาวะพร่องออกซิเจนไม่สามารถจำลองสภาวะพร่องออกซิเจนทางสรีรวิทยา ได้อย่างสมบูรณ์เหมือนการใช้ตัวจำลองภาวะพร่องออกซิเจน นอกจากนี้ การตรวจเพื่อยืนยันว่าเซลล์มีภาวะพร่อง ออกซิเจน อาจใช้วิธีอื่นในการทดสอบร่วมด้วย เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถเกิดขึ้นได้จากสาเหตุอื่นนอกเหนือจาก ภาวะพร่องออกซิเจน วิธีที่ได้รับความนิยม เช่น การทำ Western blot เพื่อตรวจหา HIF-1 ซึ่งเป็นตัวบ่งชี้โดยตรงของ ภาวะพร่องออกซิเจน เพื่อยืนยันว่าเซลล์อยู่ในสภาวะพร่องออกซิเจนตามที่ต้องการ สำหรับนำไปใช้ในการทดลองต่อไป

ข้อเสนอแนะที่ได้รับจากการวิจัย

- 1) เซลล์แต่ละชนิดมีการตอบสนองต่อการเหนี่ยวนำสภาวะจำลองภาวะพร่องออกซิเจนแตกต่างกัน ถึงแม้จะเป็นเซลล์ ชนิดเดียวกันแต่มาจากแหล่งกำเนิดต่างกันก็มีการตอบสนองต่อโคบอลต์คลอไรด์ที่ต่างกัน
- 2) โคบอลต์คลอไรด์สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างอนุมูลอิสระได้ซึ่งสอดคล้องกับภาวะเครียดออกซิเดชันที่เกิดขึ้น ในภาวะพร่องออกซิเจน จึงสามารถนำมาใช้จำลองภาวะพร่องออกซิเจนได้ แต่ควรมีการทดสอบภาวะพร่องออกซิเจน ด้วยวิธีอื่นๆ เพิ่มเติม

ข้อเสนอแนะในการวิจัยครั้งต่อไป

- 1) ควรใช้วิธีทดสอบภาวะพร่องออกซิเจนของเซลล์วิธีอื่นร่วมกับการตรวจวัดอนุมูลอิสระ เนื่องจากอนุมูลอิสระสามารถ เกิดได้ในทั้งจากการพร่องออกซิเจนของเซลล์ และสาเหตุอื่นๆ
- 2) ในการทำให้เกิดภาวะพร่องออกซิเจนในเซลล์ไลน์ซึ่งตอบสนองต่อโคบอลต์คลอไรด์น้อยกว่าเซลล์เนื้อเยื่อเหงือก อาจใช้ความเข้มข้นของโคบอลต์คลอไรด์ที่สูงขึ้นสำหรับเซลล์ L929 ในการจำลองภาวะพร่องออกซิเจน

เอกสารอ้างอิง

- Galeano, M., Pallio, G., Irrera, N., Mannino, F., Bitto, A., Altavilla, D., ... & Squadrito, F. (2021). Polydeoxyribonucleotide: A promising biological platform to accelerate impaired skin wound healing. *Pharmaceuticals*, 14(11), 1103.
- Hupp, J. R., Ellis, E., & Tucker, M. R. (2019). *Contemporary oral and maxillofacial surgery*. 7th ed. St. Louis, MO: Elsevier
- Iyer, S., & Balasubramanian, D. (2012). Management of radiation wounds. *Indian Journal of Plastic Surgery*, 45(02), 325-331.
- Little, J. W., Miller, C. S., & Rhodus, N. L. (2018). *Little and Falace's dental management of the medically compromised patient*. 9th ed. St. Louis, MO: Elsevier.
- Matthiesen, S., Jahnke, R., & Knittler, M. R. (2021). A straightforward hypoxic cell culture method suitable for standard incubators. *Methods and protocols*, 4(2), 25.
- Muñoz-Sánchez, J., & Chánez-Cárdenas, M. E. (2019). The use of cobalt chloride as a chemical hypoxia model. *Journal of Applied Toxicology*, 39(4), 556-570.
- Muz, B., De La Puente, P., Azab, F., & Kareem Azab, A. (2015). The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia*, 3, 83-92.
- Oh, S. W., Lee, Y. M., Kim, S., Chin, H. J., Chae, D. W., & Na, K. Y. (2014). Cobalt chloride attenuates oxidative stress and inflammation through NF-KB inhibition in human renal proximal tubular epithelial cells. *Journal of Korean medical science*, 29(Suppl 2), S139-S145.

- Olascoaga, A., Vilar-Compte, D., Poitevin-Chacón, A., & Contreras-Ruiz, J. (2008). Wound healing in radiated skin: pathophysiology and treatment options. *International wound journal*, 5(2), 246-257.
- Rana, N. K., Singh, P., & Koch, B. (2019). CoCl₂ simulated hypoxia induce cell proliferation and alter the expression pattern of hypoxia associated genes involved in angiogenesis and apoptosis. *Biological research*, 52(1), 12.
- Sharma, A., Khanna, S., Kaur, G., & Singh, I. (2021). Medicinal plants and their components for wound healing applications. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 7(1), 1-13.
- Silverstein, P. (1992). Smoking and wound healing. *The American journal of medicine*, 93(1), S22-S24.
- Vengellur, A., & LaPres, J. J. (2004). The role of hypoxia inducible factor 1 α in cobalt chloride induced cell death in mouse embryonic fibroblasts. *Toxicological Sciences*, 82(2), 638-646.
- Vogler, M., Vogel, S., Krull, S., Farhat, K., Leisering, P., Lutz, S., ... & Zieseniss, A. (2013). Hypoxia modulates fibroblastic architecture, adhesion and migration: a role for HIF-1 α in cofilin regulation and cytoplasmic actin distribution. *PloS one*, 8(7), e69128.
- Wanichpakorn, S., & Kedjarune-Laggat, U. (2010). Primary cell culture from human oral tissue: gingival keratinocytes, gingival fibroblasts and periodontal ligament fibroblasts. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 32(4), 327-331.
- Yu, Y., Li, W., Ren, L., Yang, C., Li, D., Han, X., ... & Han, F. (2018). Inhibition of autophagy enhanced cobalt chloride-induced apoptosis in rat alveolar type II epithelial cells. *Molecular Medicine Reports*, 18(2), 2124-2132.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2026 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).