สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสมุนไพรราชดัด ต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

นางสาว รังรอง พิศาลนรเดช
นางสาว สิริวรรณ พิมพ์สุวรรณ

โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต
ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง
ปีการศึกษา 2542

เลขหมู่.....
เลขทะเบียน.....35855
วัน, เดือน, ปี 27 มิ.ย. 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cytotoxicity of Extract from *Brucea amarissima* Desv. on Leukemia Cells

Miss Rangrong Phisannoradej

Miss Siriwan Pimsuwan

A Special Project Submitted in Partial Fulfillment of the

Requirement for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Monkut's Institute of Technology Ladkrabang

1999

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสมุนไพรราชดัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว

โดย นางสาว รังรอง พิศาลนรเดช

นางสาว สิริวรรณ พิมพ์สุวรรณ

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

อาจารย์ที่ปรึกษา อาจารย์ ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

..... หัวหน้าภาควิชาชีววิทยาประยุกต์

(รศ. ดร. พรรณี ฐิตาภิชิต)

คณะกรรมการสอบโครงงานพิเศษ

..... ประธานกรรมการ

(รศ. ดร. ดุษณี ธนะบริพัฒน์)

..... กรรมการ

(ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์)

..... กรรมการ

(อาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี)

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หัวข้อโครงงานพิเศษ	การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากสมุนไพรราชดัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว
นักศึกษา	นางสาว รังรอง พิศาลนรเดช
	นางสาว สิริวรรณ พิมพ์สุวรรณ
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ชูวงศ์ เอื้อสุขอารี
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
ปีการศึกษา	2542

บทคัดย่อ

พืชสกุลราชดัด (*Brucea amarissima* Desv. หรือ *Brucea javanica* Merr.) มีสารประกอบพวก quassinoid หลายชนิด เช่น Bruceine, Bruceatin และ Brusatol ซึ่งสารประกอบเหล่านี้มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง KB cell ในระดับหลอดทดลอง (*In vitro*) จากการทดลองใช้สารสกัดอย่างหยาบจากผลของราชดัดต่อเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 พบว่าสารสกัดอย่างหยาบจากผลราชดัดมีค่า ED_{50} (ความเข้มข้นของยาที่มีผลลดจำนวนเซลล์มะเร็งลงเหลือครึ่งหนึ่ง) เท่ากับ 26.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งแสดงว่าสารสกัดอย่างหยาบจากผลราชดัดยังไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 แต่มีผลเพียงยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ P388 เท่านั้น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title Cytotoxicity of Extract from *Brucea amarissima* on Leukemia Cells

Name Miss Rangrong Phisannoradej

Miss Siriwan Pimsuwan

Special Project Advisor Mr. Choowong Auesukarree

Department Applied Biology

Academic Year 1999

Abstract

Some plant species in the same family of a *Brucea amarissima* Desv. or *Brucea javanica* Merr. possess many quassnoid compounds such as Bruceine, Bruceantin and Brusatol, which have an cytoxicity against KB cells *in vitro*. In this study, the crude extract from *Brucea amarissima* fruits was examined for their activity against leukemia cells P388. The 50% effective dose (ED_{50}) for this crude extract is 26.21 mg/ml. This result revealed that the crude extract from *Brucea amarissima* showed no significant cytotoxic activity but only inhibited the growth of P388 cells.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยความช่วยเหลือจากอาจารย์ชูวงศ์ เอื้อสุขอารีผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษา ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ และอาจารย์สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม ผู้ให้คำแนะนำและเป็นกำลังใจให้โครงงานพิเศษนี้สำเร็จลุล่วง รวมถึงรศ.ดร.ดุษณี ธนะบริพัฒน์ ประธานกรรมการสอบของโครงงานพิเศษนี้ ซึ่งทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณไว้ ณ ที่นี้ด้วย

อนึ่งคณะผู้จัดทำขอขอบพระคุณ อาจารย์พรทิพา พิชา และพี่ๆ ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติที่ช่วยสอนการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ขอขอบพระคุณ ดร.กฤษณา ไกรสินธุ์ ผู้อำนวยการสถาบันวิจัยและพัฒนา องค์การเภสัชกรรมที่ให้ความอนุเคราะห์สมุนไพรราชดัด และขอบคุณพี่พยอม พี่หมู และพี่ๆ ห้องธุรการ รวมทั้งพี่ปริญญาโททุกคน ที่คอยให้ความสะดวกในเรื่องเครื่องมือ อุปกรณ์ สถานที่ และคอยให้กำลังใจอยู่เสมอ

ขอขอบคุณพี่ชูศรี แม่บ้านของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ที่ให้ความสะดวกในเรื่องห้องปฏิบัติการ และช่วยทำให้ภาควิชาสะอาดน่าอยู่

และที่สำคัญที่สุดเพื่อนๆ รุ่น 13 ทุกคนโดยเฉพาะจริยา กัลยานี อภิชญา ธัญวรรณ ภาวิตา พรศิรินทร์ นิมมิตตา เสาวรจนีย์ อัศจรรย์ อิทธิชัย เชฎช วรพงษ์ และอีกหลายๆ คนที่ไม่สามารถกล่าวได้หมดที่คอยช่วยเหลือ ให้ความบันเทิง และช่วยสนับสนุนปากท้องให้เรามีเรี่ยวแรงทำโครงงานพิเศษนี้จนสำเร็จ

รังรอง พิศาลนรเดช
สิริวรรณ พิมพ์สุวรรณ
มีนาคม 2543

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญตาราง	ง
สารบัญรูปภาพ	จ
บทที่ 1 บทนำ	1
▪ ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ	1
▪ วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ	2
▪ ขอบเขตของโครงงานพิเศษ	2
▪ ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	2
บทที่ 2 ตรวจเอกสาร	3
▪ สมุนไพรที่มีประวัติในการรักษาโรคมะเร็ง	3
▪ การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์	3
▪ เทคนิคการสกัดสารจากพืช	4
▪ ราชดัด	5
▪ ประโยชน์ของราชดัด	7
▪ ส่วนประกอบทางเคมีของราชดัด	7
▪ P388 lymphocytic leukemic cell	9
▪ สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์	11
บทที่ 3 ขั้นตอนการดำเนินงาน	13
▪ สารเคมีและอุปกรณ์	13
▪ การสกัดสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด	13
▪ การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบกับเซลล์	14
▪ เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์	15
▪ วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์	15
▪ การนับเซลล์	15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

	หน้า
บทที่ 4 ผลการทดลอง	18
▪ ผลของสารสกัดจากราชดัดต่อลักษณะทั่วไปของเซลล์ P388	18
▪ ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์	27
บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	30
▪ สรุปผลของความเป็นพิษของสารสกัดจากผลราชดัดต่อเซลล์ P388	30
▪ วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ	30
เอกสารอ้างอิง	31
ภาคผนวก ก การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์	33
ภาคผนวก ข การเตรียมสารเคมีชนิดต่างๆ	35
ภาคผนวก ค รายละเอียดข้อมูลในการทดลอง	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
4.1	ตารางแสดงปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ในแต่ละวันในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ	27
ค-1	ตารางแสดงปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ ภายในระยะเวลา 7 วัน	37

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ

รูปที่	หน้า
2.1 ต้น ใบ และผลราชดัด	6
2.2 ผลราชดัดแห้ง	6
2.3 ผลราชดัดแห้งบด	7
2.4 สูตรโครงสร้างของ quassin	8
2.5 สูตรโครงสร้างของสารประกอบพวก quassinoid บางชนิดที่พบในราชดัด	8
2.6 แสดงความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะต่อ L cell (NCTC 929) และ *Ehrlich Ascites* cell	10
2.7 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของ mycoplasma ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ	11
3.1 การเตรียมสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด	14
3.2 ตารางบน hemacytometer ขนาดมาตรฐาน	16
3.3 ตารางส่วนมุมบนของ hemacytometer	17
4.1 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 0 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	19
4.2 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 0 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	19
4.3 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 1 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	20
4.3 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 1 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	20
4.5 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 2 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	21
4.6 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 2 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	21
4.7 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 3 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	22
4.7 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 3 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	22
4.9 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 4 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	23
4.10 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 4 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	23

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูปภาพ(ต่อ)

รูปที่	หน้า
4.11 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 5 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	24
4.12 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 5 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	24
4.13 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 6 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	25
4.14 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 6 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	25
4.15 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 7 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด	26
4.16 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 7 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร	26
4.17 แผนภูมิเส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์และเวลาหลังจากเติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ แล้ว	28
4.18 แผนภูมิเส้นแสดงอัตราการเจริญของเซลล์ในวันที่ 4 เมื่อเทียบกับ control ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากราชดัด	29
ก-1 ส่วนประกอบของอาหาร RPMI 1640	33
ก-2 แสดงขั้นตอนการเตรียมอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร	34

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

ความสำคัญและที่มาของโครงงานพิเศษ

ปัจจุบันโรคมะเร็งเป็นโรคร้ายแรงที่ยังไม่สามารถรักษาให้หายขาดได้ ดังนั้นจึงได้มีการศึกษาค้นคว้าหาวิธีรักษาต่างๆ ซึ่งอาจจะสามารถช่วยยืดอายุผู้ป่วยให้ยืนยาวขึ้นและดำรงชีวิตได้เช่นคนปกติซึ่งในปัจจุบันมีอยู่ด้วยกันหลายวิธีเช่น 1. เคมีบำบัด 2. การฉายรังสี 3.การใช้ยาต้านมะเร็ง แต่เนื่องจากวิธีที่กล่าวมานั้นมีผลข้างเคียงสูง ดังนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหายาต้านมะเร็งชนิดใหม่ๆ ที่มีประสิทธิภาพสูงและไม่มีผลข้างเคียงกับผู้ป่วย นักวิทยาศาสตร์เริ่มให้ความสนใจมายังสารจากธรรมชาติเนื่องจากน่าจะเป็นสารที่มีผลข้างเคียงต่อร่างกายน้อยกว่าสารเคมีอื่นๆ ที่สังเคราะห์ขึ้น โดยการศึกษาสารต้านมะเร็งจากธรรมชาตินั้นได้แบ่งกลุ่มสารที่ออกฤทธิ์ในระดับต่างๆ ดังนี้

1. สารเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity agents) หมายถึง สารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (*In vitro* culture)
2. สารต้านเนื้องอก (antitumor หรือ antineoplastic agents) หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกและมะเร็งในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)
3. สารต้านมะเร็ง (anticancer agents) หมายถึง สารที่ให้ผลในการต้านมะเร็งในการทดลองขั้นคลินิกในคนเท่านั้น (human clinical trials)

โดยในโครงงานพิเศษนี้จะทำการทดสอบสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ โดยจะทดสอบจากสารสกัดอย่างหยาบ (Crude extract) จากผลแห้งของราชดัด (*Brucea amarissima* Desv.) กับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388 เนื่องจากพบว่าพืชสกุลเดียวกับสมุนไพรชนิดนี้มีสารประเภท quassinoid เช่น Bruceantin (Kupchan, S.M. และคณะ, 1973) Bruceine A, B, C (Polonsky, J. และคณะ, 1967) Bruceine D, E (Xie, J.X. และคณะ, 1981) และ Brusatol (Eigebaly, S.A. และคณะ, 1979) ซึ่งพบว่าสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของมนุษย์ชนิด KB cell ได้ (Anderson, M.M. และคณะ, 1991)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

วัตถุประสงค์ของโครงงานพิเศษ

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด ในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนูชนิด P388
2. เพื่อเป็นข้อมูลในการนำไปใช้ทดสอบในระดับสิ่งมีชีวิตต่อไป
3. เพื่อเป็นแนวทางการศึกษาว่าสารชนิดใดในสมุนไพรราชดัดที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388
4. เพื่อเป็นการแนวทางในการพัฒนาการใช้สมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง

ขอบเขตของโครงงานพิเศษ

สกัดสารสกัดอย่างหยาบจากผลแห้งของสมุนไพรราชดัด *Brucea amarissima* Desv. แล้วนำมาทดสอบกับเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวเพื่อหาความเข้มข้นของยาที่มีผลลดจำนวนเซลล์มะเร็งลงเหลือครึ่งหนึ่ง (50% Effective dose, ED_{50})

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ช่วยให้ทราบความเข้มข้นของสารสกัดจากราชดัดที่เหมาะสมต่อการต้านเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388
2. เพื่อให้ทราบถึงความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาราชดัดเป็นยาสมุนไพรรักษาโรคมะเร็ง
3. เพื่อเป็นแนวทางในการพัฒนายาต้านมะเร็งจากสมุนไพรในประเทศไทย

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2

การตรวจเอกสาร

สมุนไพรที่มีประวัติในการรักษาโรคมะเร็ง

มีการนำสมุนไพรนานาชนิดมาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งเป็นเวลาหลายร้อยปีแล้ว ตัวอย่างได้แก่ โพโดไฟลัม (podophyllum) ซึ่งเป็นสมุนไพรที่ใช้เป็นยารักษาโรคมะเร็งในประเทศจีนมากกว่า 2,000 ปี จากการศึกษาสารประกอบในยางจากรากของ *Podophyllum hexandrum* และรากของ May-apple (*P. peltatum*) พบสารที่มีฤทธิ์ต้านเซลล์มะเร็งเป็นสารจำพวกลิกแนน (lignan) ทั้งในรูปอิสระและรูปกลัยโคไซด์ แม้ว่าสารสำคัญคือ phyllotoxin และ peltatins จะมีความเป็นพิษสูงไม่สามารถนำไปใช้เป็นยาได้โดยตรงแต่อนุพันธ์ 2 ชนิดของ podophyllotoxin คือ etoposide และ teniposide เป็นยารักษามะเร็งที่ใช้อยู่ในปัจจุบัน

สมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่ใช้รักษามะเร็งมาตั้งแต่สมัย ค.ศ. 180 คือ Woody nightsade (*Solanum dulcamara*) สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกจากสมุนไพรนี้เป็นกลัยโคไซด์ของสเตอรอยด์แอลคาลอยด์ คือ β-solamarine

ยาต้านมะเร็งจากพืชชั้นสูงที่มีความสำคัญที่สุดในปัจจุบันได้แก่ แอลคาลอยด์จากแพงพวยฝรั่ง (Madagascar periwinkle, *Catharanthus roseus*) จากการศึกษาพบแอลคาลอยด์พวก dimeric indole หลายชนิดซึ่งมีฤทธิ์ต้านมะเร็งเม็ดเลือดขาว ในจำนวนนี้มีแอลคาลอยด์ 2 ชนิด คือ วินบลาสตีน (vinblastine, VLB) และ วินคริสตีน (vincristine, VCR) ซึ่งมีการสกัดในเชิงพานิชย์เพื่อนำมาใช้เป็นยาต้านมะเร็งในปัจจุบัน (เอมอร โสมนะพันธุ์, 2536)

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์

สถาบันมะเร็งแห่งชาติของสหรัฐอเมริกา (National Cancer Institute; NCI) ได้ใช้คำนิยามเพื่อแบ่งสารที่ออกฤทธิ์ในระดับต่างๆ ดังนี้

1. สารเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity agents) หมายถึง สารที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งที่เลี้ยงในหลอดทดลอง (*In vitro* culture)
2. สารต้านเนื้องอก (antitumor หรือ antineoplastic agents) หมายถึง สารที่มีฤทธิ์ต้านเนื้องอกและมะเร็งในสัตว์ทดลอง (*In vivo*)
3. สารต้านมะเร็ง (anticancer agents) หมายถึง สารที่ให้ผลในการต้านมะเร็งในการทดลองขั้นคลินิกในคนเท่านั้น (human clinical trials)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ปัจจุบัน NCI ใช้การทดสอบเบื้องต้นโดยผ่านการทดสอบในสัตว์ทดลองซึ่งทำให้เป็นมะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388 และใช้กระบวนการในหลอดทดลอง (9 KB หรือ 9 PS) เป็นแนวทางในการแยกสารออกฤทธิ์ซึ่งขั้นตอนดังกล่าวให้ผลดีพอสมควร

ในการทดสอบสารที่แยกได้นั้น ถือว่าสารมีฤทธิ์เมื่อมีคุณสมบัติ ดังนี้

1. มีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายครึ่งหนึ่งต่ำกว่า 4 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ($ED_{50} < 4$ µg/ml) เมื่อทำการทดสอบกับ KB เซลล์ในหลอดทดลอง
2. มีอัตราส่วนสัตว์ที่หลอดชีวิตในกลุ่มทดลองเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมเท่ากับ 120% หรือมากกว่า ($T/C \geq 120\%$) เมื่อทดสอบในสัตว์ทดลอง (เอมอร โสมนะพันธุ์, 2536)

<u>เทคนิคการสกัดสารจากพืช</u>

การสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธี ขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่สกัด คุณสมบัติของสารในการทนต่อความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ แต่ละวิธีมีข้อดีและข้อจำกัด วิธีเหล่านี้ได้แก่ (นันทวัน บุณยะประภัศร, 2536)

1. **Marceration** เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญจากพืชโดยวิธีหมักสมุนไพรกับตัวทำละลายในภาชนะปิด วิธีนี้มีข้อดีที่สารไม่ถูกความร้อน แต่สิ้นเปลืองตัวทำละลายมาก
2. **Percolation** เป็นกระบวนการสกัดสารสำคัญแบบต่อเนื่องโดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า percolator โดยนำสมุนไพรมาหมักกับตัวทำละลาย
3. **Soxhlet Extractor** เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง โดยใช้ตัวทำละลายซึ่งมีจุดเดือดต่ำ การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายในฟลาสก์ระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวลงมาใน Thimble ซึ่งบรรจุสมุนไพรไว้ เมื่อตัวทำละลายใน extracting chamber สูงถึงระดับการเกิดกาลักน้ำ สารสกัดจะไหลกลับลงไปในฟลาสก์ด้วยวิธีกาลักน้ำ ฟลาสก์นี้ได้รับความร้อนจาก heating mantle หรือหม้ออังไอน้ำ ตัวทำละลายจึงระเหยขึ้นไปทิ้งสารสกัดไว้ในฟลาสก์ ตัวทำละลายเมื่อกระทบ condenser จะกลั่นตัวกลับลงมาสกัดสารใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์ การสกัดด้วยวิธีนี้ใช้ความร้อนด้วยจึงอาจทำให้สารเคมีบางชนิดสลายตัว
4. **Liquid-liquid Extractor** เป็นการสกัดสารจากสารละลายซึ่งเป็นของเหลวลงในตัวทำละลายอีกชนิดหนึ่งซึ่งไม่ผสมกับตัวทำละลายชนิดแรก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

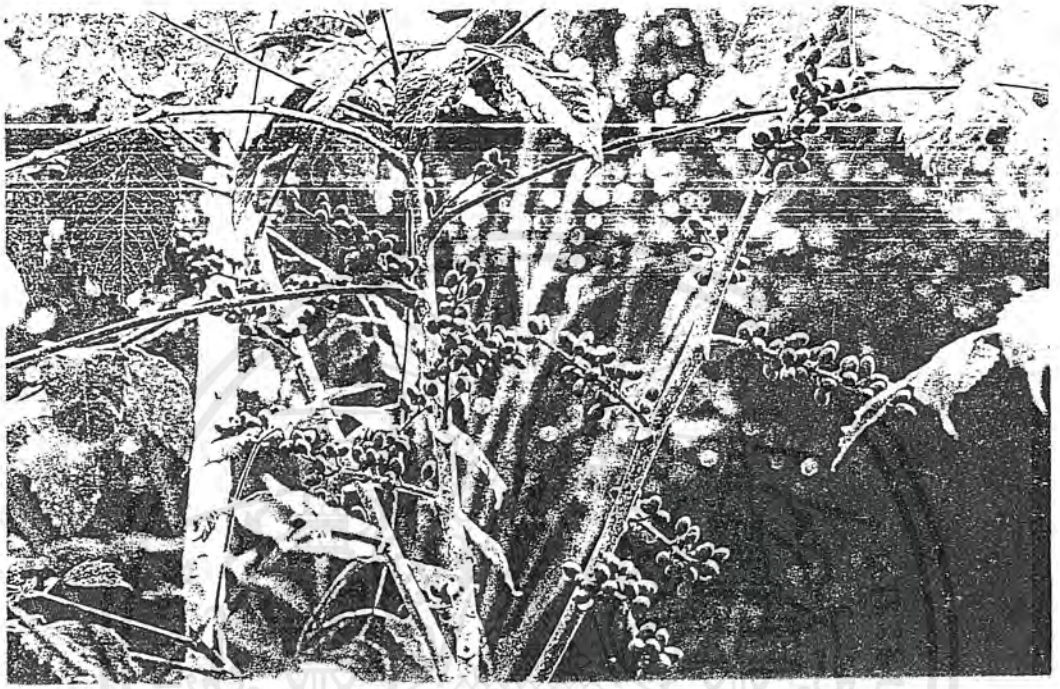
ขั้นตอนต่อไปเป็นการแยกสารให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยคอลัมน์โครมาโทกราฟฟี (adsorption, partition, ion-exchange, gel fitration) แล้วจึงนำส่วนที่ออกฤทธิ์มาแยกออกด้วย TLC, HPLC หรือ GC เพื่อให้ได้สารบริสุทธิ์ การพิสูจน์โครงสร้างของสารออกฤทธิ์ทำได้โดยการใช้ข้อมูลทางสเปกโตรสโกปี (MS, NMR, IR และ UV) รวมทั้ง X-ray crystallography (เอมอร โสมนะพันธุ์, 2536)

ราชดัด

มีชื่อสามัญอื่นๆ อีกว่า กะดัด ฉะดัด กาจับหลัก เท้ายายม่อมน้อย มะดีควาย ดีคน พญาดาบหัก (ตราด) ฯลฯ มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Brucea amarissima* Desv. หรือ *Brucea javanica* (Linn.) Merr. อยู่ในวงศ์ Simaroubaceae มีถิ่นกำเนิดในอินเดีย จีนตอนใต้ มาลายา และออสเตรเลีย

ราชดัดมีลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูง 2-4 เมตร ใบเป็นใบประกอบแบบขนนก เรียงสลับวนรอบกิ่ง ใบย่อยเป็นรูปไข่แกมหอก กว้าง 3-6 เซนติเมตร ยาว 5-10 เซนติเมตร ขอบใบหยัก ผิวใบมีขนนุ่มทั้งสองด้าน ดอกเป็นช่อออกที่ซอกใบแบบ panicle ยาว 10-40 เซนติเมตร สีน้ำตาลแดง ขนาดเล็ก แยกเพศ มีต้นที่พบเฉพาะช่อดอกตัวผู้ และต้นที่มีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมียในช่อเดียวกัน ดอกย่อยมีขนาดเล็กสีน้ำตาลแดง มีขนปกคลุม ผลเป็นผลสดสีเขียว (รูปที่ 2.1) เมื่อแห้งมีสีน้ำตาลดำคล้ายเมล็ดมะละกอแห้ง เนื้อในมีสีขาว (รูปที่ 2.2 และ 2.3) รสขมมาก (สมุนไพรสวนสิรีรุกชาติ, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.1 ต้น ใบ และผลราชดัด
(จาก สมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ หน้า 67, 2535)

รูปที่ 2.2 ผลราชดัดแห้ง (จากสมุนไพรสวนสิรีรุกขชาติ หน้า 67, 2535)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 ผลราชดัดแห้งบด

<u>ประโยชน์ของราชดัด</u>

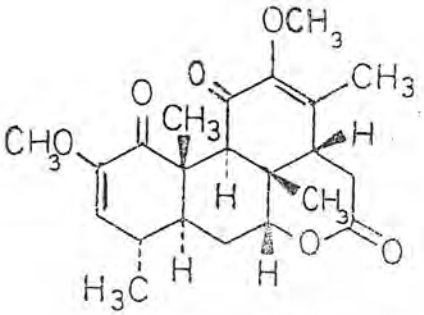
ในตำรายาไทยใช้ประโยชน์จากราชดัดในหลายรูปแบบ เช่นใช้ผลแห้งเป็นยาบำรุงน้ำดี แก้ไข้ แก้บิด ใบใช้เป็นยาพอกสำหรับรักษาโรคกลาก ผลสดใช้เป็นยาถ่ายพยาธิ

ในผลแห้งพบสาร bruceantin, bruceine A-E, yadanziolide A, F, I ซึ่งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเชื้อมาลาเรียชนิดฟัลซิพารัม (*Plasmodium falciparum*) และเชื้อบิดในหลอดทดลอง (Pavanand, K และคณะ, 1989)

<u>ส่วนประกอบทางเคมีที่สำคัญในราชดัด</u>

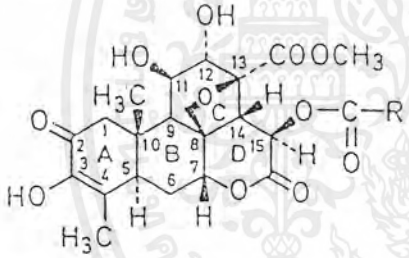
มีการพบสารประเภท quassinoid หลายชนิดในราชดัด quassinoid เป็นสารประกอบซึ่งมีสูตรโครงสร้างคล้าย quassin (รูปที่ 2.4) หรือเป็นอนุพันธ์ของ quassin (2, 12-Dimethoxypicrasa-2, 12-diene-1, 11,-16-trione.; 3aβ, 6aβ, 7, 7aα, 8, 11a, 11bα, 11c-octahydro-2, 10-dimethoxy-3, 8α, 11aβ-tetramethylphenanthro [10, 1-bc]pyran-1, 5, 11(4H)-trione)

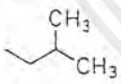
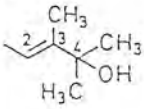
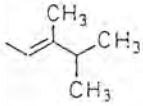
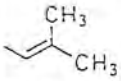
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

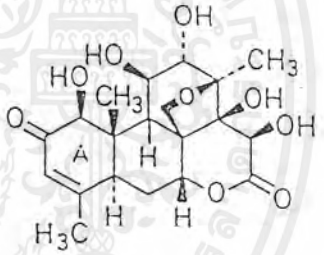


รูปที่ 2.4 สูตรโครงสร้างของ **quassin** (Windholz, M. in The Merck Index, 1983)

สาร quassinoid ที่พบในราชดัด ได้แก่ bruceine A, B, C, D, E, bruceantin, bruceoside D, E, F และ brusatol ซึ่งมีสูตรโครงสร้างดังรูปที่ 2.5



	R	
1		bruceine A
2	CH_3	bruceine B
3		bruceine C
4		bruceantin
5		brusatol
6	C-15β-OH	bruceolide (parent alcohol)



7 bruceine D

รูปที่ 2.5 สูตรโครงสร้างของสารประกอบพวก quassinoid บางชนิดที่พบในราชดัด

(Anderson และคณะ from *Planta Med.* 57(1991))

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

bruceine A, B, C, D, bruceantin และ brusatol มีฤทธิ์ในการยับยั้ง KB cell ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งชนิด epidermoid carcinoma ของมนุษย์ โดยมีความเข้มข้นที่สามารถลดจำนวนเซลล์เหลือครึ่งหนึ่ง(50% effective dose ,ED_{50}) ของ bruceine A, B, C, D, bruceantin และ brusatol เป็น 0.098 μg/ml, 0.55 μg/ml, 0.021 μg/ml, 1.158 μg/ml, 0.008 μg/ml และ 0.102 μg/ml ตามลำดับ (Anderson และคณะ, 1991)

P388 lymphocytic leukemic cell

เซลล์ P388 ถูกใช้อย่างกว้างขวางในการหาสารต้านมะเร็งจากผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ สารกึ่งสังเคราะห์ และสารสังเคราะห์ ซึ่งสารประกอบเหล่านี้สามารถยังยั้งการเจริญของเซลล์ P388 ได้ทั้งในระดับหลอดทดลอง (*In vitro*) และในสิ่งมีชีวิต (*In vivo*)

สารสกัดอีเทอร์จาก *Rhaphidophora korthalsii* สารสกัดแอลกอฮอล์จากรากของ *Melia azedarach* และสารสกัดจาก pericarp ของ *Mallotus japonicus* มีฤทธิ์ต่อต้านเซลล์ P388 ในระดับหลอดทดลอง สารสกัดเอทานอลของ *Geigeria alata* แสดงศักยภาพว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 น้ำมันหอมระเหยจาก *Geigeria alata* หรือ α-pinene มีผลกระทบต่อเซลล์ P388 ในระดับหลอดทดลอง สารกึ่งสังเคราะห์ที่ออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง (antitumor) ที่แยกได้จากเห็ดพิษ illudin S (6-Hydroxymethylacylfulvene) ก็แสดงผลเป็นพิษต่อเซลล์ P388 เช่นกัน (Teaktong, T.,1999)

เซลล์ P388 เป็นเซลล์ที่เริ่มแรกแยกได้มาจากหนูที่เป็นมะเร็ง เราสามารถเลี้ยงเซลล์นี้โดยการปลูกถ่ายลงในหนูหรือเลี้ยงในอาหารเหลวก็ได้ ในอาหารเหลวเราสามารถเลี้ยงเซลล์โดยใช้อาหารต่างๆ เช่น RPMI 1640, Fischer's medium และ Eagle's medium โดยเติมด้วย fetal bovine serum และยาปฏิชีวนะ เช่นเดียวกับเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอื่นๆ เซลล์นี้ก็ต้องการกรดอะมิโนอย่างน้อย 13 ชนิด ได้แก่ arginine, cystine, glutamine, histidine, isoleucine, leucine, lysine, methionine, phenylalanine, threonine, tryptophan, tyrosine และvaline ในการอยู่รอดและการเจริญเติบโต นอกจากนี้เซลล์ P388 ก็ยังต้องการ ไพรูเวทสำหรับปฏิกิริยาการสร้างและสลายสารประกอบของเซลล์ด้วย

fetal bovine serum ถูกเติมลงไปในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ประมาณ 10% ซึ่งซีรัมเป็นส่วนผสมของสารประกอบทางชีววิทยาซึ่งประกอบด้วยปัจจัยการเจริญของเซลล์ (cell growth factor) โปรตีนขนส่ง (transport protein) ฮอร์โมน แร่ธาตุ และไขมัน ถ้าไม่เติมซีรัมลงในอาหารจะทำให้เซลล์เจริญเติบโตได้ไม่ดีเท่าที่ควร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำหรับยาปฏิชีวนะนั้นเติมลงในอาหารเลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันการปนเปื้อนจากแบคทีเรีย และจาก mycoplasma ในอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ซึ่งยาปฏิชีวนะมีหลายชนิด แต่ละชนิดจะออกฤทธิ์แตกต่างกัน แสดงในรูปที่ 2.6

Antibiotic	*Spectrum*	*Cytotoxic concn.**	*Recommended concn.†*
Potassium benzylpenicillin	Gram-positive bacteria	10,000	100
Streptomycin sulphate	Gram-negative bacteria	>20,000 (15,000)	100
Dihydrostreptomycin sulphate	Gram-negative bacteria	>30,000	100
Neomycin sulphate	Gram-positive and gram-negative	3,000	50
Kanamycin sulphate	Gram-positive and gram-negative	10,000	100
Paromomycin sulphate	Gram-positive and gram-negative bacteria	5,000	100
Viomycin sulphate	Gram-positive and gram-negative bacteria	3,000	50
Polymyxin B sulphate	Gram-negative bacteria	>3,000	50
Chloramphenicol	Gram-positive and gram-negative bacteria	30 (40)	5
Tetracycline hydrochloride	Gram-positive and gram-negative bacteria and PPLO	35 (60)	10
7-Chlortetracycline	Gram-positive and gram-negative bacteria and PPLO	80 (60)	10
6-Demethyl-7-chlortetracycline hydrochloride	Gram-positive and gram-negative bacteria and PPLO	15 (20)	5
5-Hydroxytetracycline hydrochloride	Gram-positive and gram-negative bacteria and PPLO	25	5
Nystatin	Fungi and yeasts	600	50
Amphotericin B deoxycholate	Fungi and yeasts, and PPLO	30	2·5

* Concentration causing 50 per cent reduction in cell multiplication in suspension cultures growing in serum-containing media. Expressed as μg/ml. except for potassium benzylpenicillin and nystatin, which are given in units per ml.
† Concentrations recommended for use in serum-containing media.

รูปที่ 2.6 แสดงความเป็นพิษของยาปฏิชีวนะต่อ L cell (NCTC929) และ*Ehrlich Ascites* cell (ผลของ *Ehrlich Ascites* cell จะแสดงในวงเล็บ) (Paul, J.in Cell and Tissue Culture, 1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Antibiotic	*Stability in tissue culture media**	*Concentration showing marked cytotoxicity (μg./ml.)*	*Minimum concentration inhibiting mycoplasma in artificial medium (μg./ml.)*	*Concentration recommended for controlling mycoplasma in tissue cultures† (μg./ml.)*
Chloramphenicol	High	30	15	30
7-Chlortetracycline	Very low	80	40	100
6-Demethyl-7-chlortetracycline	High	15	5	10
Erythromycin	Moderate	300	15	50
Fusidic acid	High	40	20	20
Gentamicin	High	3,000	1	200
5-Hydroxytetracycline	Moderate	35	5	10
Hygromycin B	Moderate	300	15	50
Kanamycin	Very high	10,000	25	200
Neomycin B	Very high	3,000	15	50
Novobiocin	Low	200	10	50
Paromomycin	High	5,000	20	50
Spiramycin	Moderate	1,000	1	50
Tetracycline	Moderate	35	2	10
Tylosin	Moderate	300	1	10

* Stability scale: half-life of 2 days, very low; 4 days, low to moderate; 8 days, very high.
† Recommended on basis of 3-day incubation between changes of medium.

รูปที่ 2.7 ยาปฏิชีวนะที่ใช้ในการควบคุมการปนเปื้อนของ mycoplasma ในการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ

(Paul, J. in Cell and Tissue Culture, 1975)

<u>สภาวะที่เหมาะสมต่อการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์</u> (Barile, F. A.,1994)

นอกจากอาหาร ซีรัม และยาปฏิชีวนะที่เติมลงในอาหารแล้ว สภาวะในการเลี้ยงก็เป็นปัจจัยสำคัญอีกปัจจัยหนึ่งซึ่งมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งสภาวะต่างๆ เหล่านี้ได้แก่

1. อุณหภูมิ เซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมส่วนใหญ่มีอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อการเจริญที่ 37 องศาเซลเซียส เซลล์จะสามารถทนอุณหภูมิที่ต่ำกว่านี้ได้ดีกว่าที่อุณหภูมิสูงกว่า ในความเป็นจริงแล้วที่อุณหภูมิต่ำกว่า 4 องศาเซลเซียสอาจจะลดกิจกรรมการสร้างและสลายของเซลล์แต่จะไม่ถึงกับทำให้เกิดการยับยั้งการทำงานของเซลล์แบบผันกลับไม่ได้ อุณหภูมิที่สูงถึง 39 องศาเซลเซียสอาจทำให้เกิด heat shock มีผลทำให้โปรตีนเสียสภาพและไม่สามารถทำหน้าที่ได้

2. พีเอช ช่วงพีเอชที่เหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอยู่ที่ 7.2-7.4 สำหรับเซลล์บางชนิดอาจอยู่ในช่วงกว้างถึง 7.0-7.6 เซลล์บางชนิดอาจทนต่อสภาพที่เป็นกรดกว่านี้ได้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

3. คาร์บอนไดออกไซด์ อาหารที่เพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่จะประกอบด้วย bicarbonate ซึ่งเป็นส่วนหนึ่งของระบบการควบคุมการเปลี่ยนแปลงพีเอช เพื่อป้องกันการเปลี่ยนแปลงพีเอชที่มากและรวดเร็ว ที่อุณหภูมิและความดันมาตรฐาน bicarbonate และกรดคาร์บอนิคจะอยู่ในสภาพสมดุล แต่ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสทำให้กรดคาร์บอนิคอยู่ในสถานะก๊าซ ทำให้สมดุลของ bicarbonate และกรดคาร์บอนิคเปลี่ยนไป จึงต้องรักษาความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ภายในตู้บ่ม โดยอาหารสำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์ส่วนใหญ่จึงทำมาให้ใช้กับคาร์บอนไดออกไซด์ 2-10%

4. บัฟเฟอร์ เมื่อจานเพาะเลี้ยงเซลล์ถูกยกออกมาจากตู้บ่ม ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่อยู่เหนืออาหารจะค่อยๆ เจือจางไป ซึ่งทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงพีเอชอย่างมากในการทดลองที่จำเป็นต้องใช้เวลาภายนอกตู้บ่มมาก ในหลายๆ ห้องวิจัยจึงมีการใช้บัฟเฟอร์ เช่น HEPES ใส่ลงในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อป้องกันการเพิ่มของพีเอชอย่างรวดเร็วเมื่อต้องเอาจานเพาะเลี้ยงออกจากตู้บ่มที่ควบคุมความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ แต่ปัญหานี้ก็อาจสามารถแก้ไขได้อีกวิธีโดยการใช้ฟลาสก์สำหรับเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อซึ่งมีลักษณะปากแคบและปิดด้วยฝาเกลียวป้องกันการระเหยของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
ขั้นตอนการดำเนินงาน

สารเคมีและอุปกรณ์

อุปกรณ์

1. จานเพาะเลี้ยงพลาสติกขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 10 เซนติเมตร
2. เครื่องแก้วต่างๆ
3. ตู้ปลอดเชื้อ
4. ตู้บ่มควบคุมความชื้นและอุณหภูมิ
5. ตู้อบลมร้อน (hot air oven)
6. เครื่องชั่ง
7. เครื่องระเหยภายใต้สุญญากาศ (rotary evaporator)
8. Hemacytometer

สารเคมี

1. อาหาร RPMI 1640 จาก Gibco BRL #31800-022
2. fetal bovine serum จาก Gibco BRL #10270-098
3. hexane
4. ethyl acetate
5. 95% ethanol
6. 0.85% normal saline
7. trypan blue 0.25%

การสกัดสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด

นำผลราชดัดไปอบที่อุณหภูมิประมาณ 60-70 °C เป็นเวลา 3-4 ชั่วโมง แล้วนำมาบดให้เป็นผงชั่งน้ำหนักแห้ง สกัดผงราชดัดแห้งด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet ด้วย hexane ที่ 60 องศาเซลเซียส 48 ชั่วโมง นำกากของราชดัดที่เหลือมาสกัดด้วย ethyl acetate ที่ 65 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำกากที่เหลือมาสกัดด้วย 95% ethanol ที่ 60 องศาเซลเซียสอีกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดที่ต้องการจะละลายอยู่ในชั้นของ ethanol นำส่วนของ ethanol นี้ไประเหยภายใต้ความดันด้วยเครื่อง rotary evaporator จะได้สารสกัดอยู่ในลักษณะของแข็ง (รูปที่ 3.1) นำไปชั่งน้ำหนัก

รูปที่ 3.1 การเตรียมสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด นำผลราชดัดบดมาสกัดด้วยชุดอุปกรณ์ Soxhlet โดยใช้ hexane เป็นตัวทำละลาย และนำส่วนของราชดัดที่เหลือซึ่งจะนำมาสกัดต่อด้วย ethyl acetate หลังจากนั้นนำส่วนของราชดัดที่เหลือไปสกัดต่อด้วย ethanol แล้วนำสารละลาย ethanol นี้ไประเหยก่อนเพื่อให้ได้สารสกัดอย่างหยาบจากราชดัด

<u>การเตรียมสารละลายที่ใช้ทดสอบกับเซลล์</u>

นำสารสกัดในรูปของแข็งที่ได้มาละลายด้วยน้ำกลั่นปราศจากไอออน นำสารละลายที่ได้ไปกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.45 ไมครอนเพื่อแยกของแข็งที่ไม่ละลายออก ชั่งน้ำหนักของแข็งที่ได้ คำนวณความเข้มข้นของตัวยาที่เหลือ ทำให้ปราศจากจุลินทรีย์ด้วยวิธีการกรองด้วยกระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.22 ไมครอน เก็บตัวยาไว้ที่ 4 องศาเซลเซียสเมื่อยังไม่ได้ใช้

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์

เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว P388 ได้รับมาจากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (The National Cancer Institute of Thailand) เลี้ยงเซลล์ P388 ในอาหาร RPMI 1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum และ kanamycin 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ในจานเพาะเลี้ยง บ่มในตู้บ่มควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5%

ทำการย้ายเซลล์ที่เจริญเติบโตและเริ่มแออัดในจานเพาะเลี้ยงสู่อาหารใหม่ (subculture) ประมาณทุกๆ 3 วันเพื่อรักษาเซลล์ไว้ให้อยู่ในช่วง log phase เสมอ

วิธีวิเคราะห์ความเป็นพิษต่อเซลล์

ใส่เซลล์ P388 ลงในจานเพาะเลี้ยงซึ่งมีอาหาร RPMI 1640 ที่เติม 10% fetal bovine serum และ kanamycin 0.6 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้มีความเข้มข้นของเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร วิเคราะห์โดยการบ่มเซลล์กับสารสกัดจากราชดัดที่มีความเข้มข้น 0 20 25 30 35 40 45 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร บ่มเซลล์ในตู้บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ควบคุมความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5% วัดการเจริญของเซลล์ทุกวันที่เวลาเดียวกันเป็นเวลา 7 วัน โดยการนับเซลล์มีชีวิตที่ย้อมด้วยสารละลาย trypan blue ความเข้มข้น 0.25% ใน 0.85% normal saline

การนับเซลล์

Trypan blue เป็นหนึ่งในสีย้อมที่นิยมใช้ในการย้อมเพื่อนับเซลล์มีชีวิต วิธีนี้มีหลักการที่ว่าเซลล์มีชีวิตจะไม่ติดสีย้อมขณะที่เซลล์ตายจะติดสีย้อมเนื่องจากเกิดช่องที่เยื่อหุ้มเซลล์ทำให้สีสามารถเข้าไปภายในเซลล์ได้

ใช้สารละลาย trypan blue 0.25% และ hemacytometer ในการนับเซลล์ในแต่ละจานเพาะเลี้ยง โดยดูดสารละลาย trypan blue 0.2 มิลลิลิตร และตัวอย่างเซลล์ 0.2 มิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองแล้วผสมโดยใช้ปิเปตดูดขึ้นดูดลง วางกระจกปิดสไลด์ (cover-slip) ลงบน hemacytometer ดูดตัวอย่างใส่ใน chamber ของ hemacytometer นับเซลล์มีชีวิต (ไม่ติดสี) ในช่องขนาด 1 ตารางมิลลิเมตรตรงกลาง และช่องที่มุมทั้งสี่ของตาราง (รูปที่ 3.2) จากนั้นคำนวณหาจำนวนเซลล์เฉลี่ยต่อ 1 ช่อง ($\bar{X}$)

Counting Chamber ปริมาตรของช่อง 1 ช่อง = 1 mm x 1 mm x 0.1 mm

= $0.1\ mm^3$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ในปริมาตร 0.1 mm^3 นับเซลล์ได้ $\overline{X}$ เซลล์

ถ้าปริมาตร 1 mm^3 นับเซลล์ได้ $\frac{\overline{X} \times 1}{0.1}$ เซลล์ = $10\overline{X}$ เซลล์

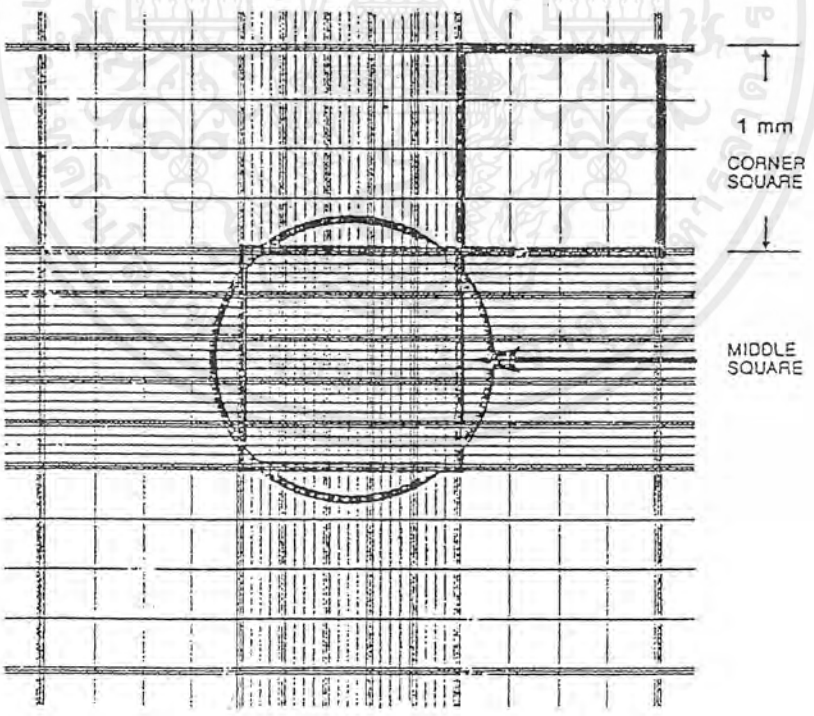
ถ้าเซลล์ที่นับเจือจาง Y เท่า

ดังนั้น ในปริมาตร 1 mm^3 นับเซลล์ได้ $10\overline{X}Y$ เซลล์

ถ้าในปริมาตร 1 ml จะมีเซลล์ $10\overline{X}Y \times 10^3$ เซลล์ = $10^4\overline{X}Y$ เซลล์

ดังนั้น เราสามารถคำนวณความเข้มข้นของเซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้จากสูตร

จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์เฉลี่ยใน 1 ช่อง ($\overline{X}$) x dilution factor (Y) x 10^4

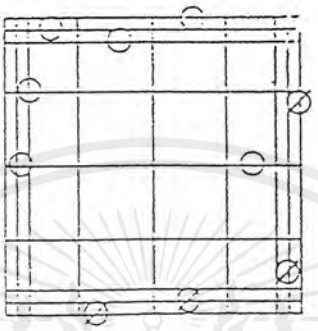


รูปที่ 3.2 ตารางบน hemacytometer ขนาดมาตรฐาน (Teaktong, T.,1999)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

เซลล์ที่อยู่ทับเส้นขอบจะนับเซลล์ที่ทับเส้นด้านบน และเส้นด้านซ้ายที่ติดบริเวณที่วงไว้ใน รูปบนเท่านั้น (Teaktong, T.,1999) รูปที่ 3.3



รูปที่ 3.3 ตารางส่วนมุมบน hemacytometer

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

35855

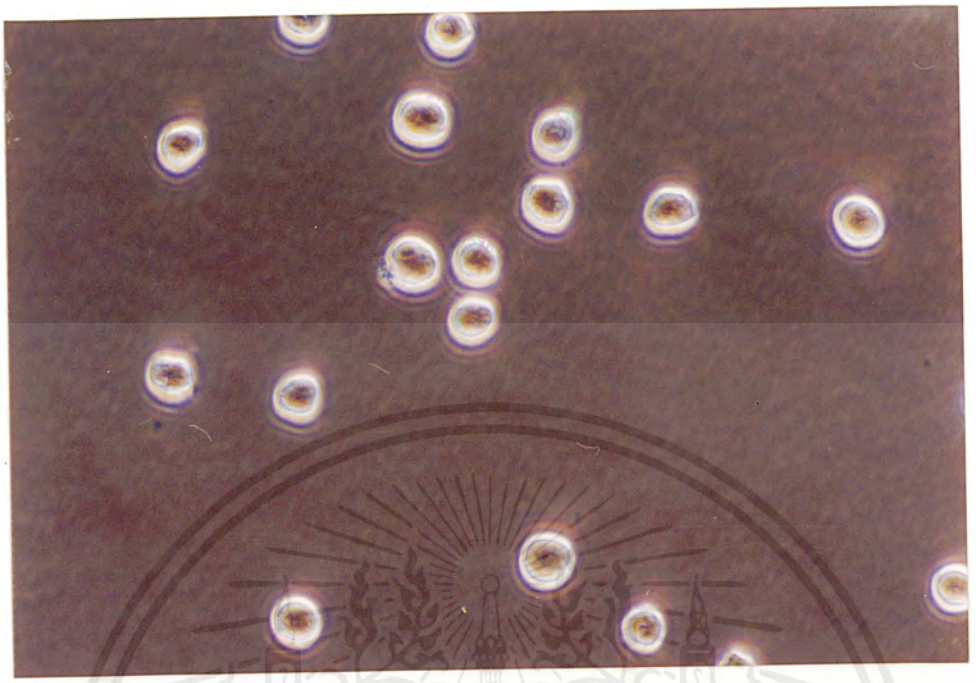
บทที่ 4
ผลการทดลอง

<u>ผลของสารสกัดจากราชดัดต่อลักษณะทั่วไปของเซลล์ P388</u>

ลักษณะทั่วไปของเซลล์ P388 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัดจะมีลักษณะกลม เซลล์มีความแวววและใส เซลล์จะมีจำนวนสูงสุดในวันที่ 4 ของการเพาะเลี้ยง เริ่มมีรูปร่างไม่กลม ในวันที่ 5 เริ่มมีจำนวนลดลง ในขณะที่วันที่ 7 ผนังเซลล์จะเริ่มไม่เรียบ เซลล์ไม่ใส

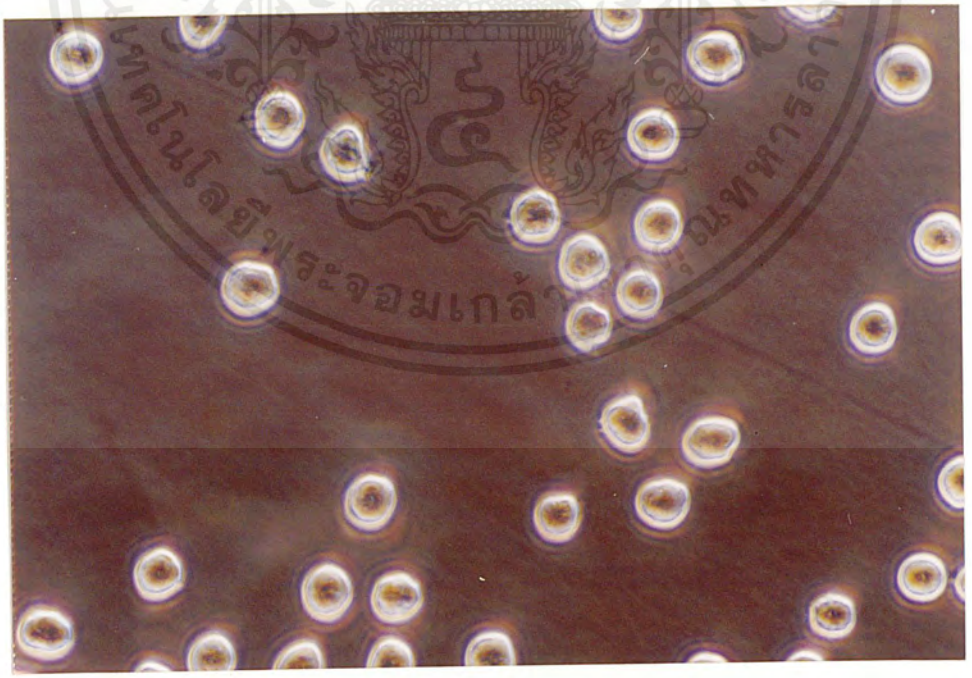
ส่วนลักษณะทั่วไปของเซลล์ที่ถูกเติมด้วยสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เซลล์จะเริ่มมีการเปลี่ยนแปลงตั้งแต่วันแรกหลังจากเติมยา โดยจะมีรูปร่างผิดปกติและไม่ใส ในวันที่ 2 จำนวนเซลล์จะลดลงอย่างเห็นได้ชัด และผนังเซลล์จะมีลักษณะผิดปกติมากขึ้น หลังจากวันที่ 3 แทบมองไม่เห็นผนังเซลล์ ตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไปจะแทบไม่สามารถพบเซลล์ได้เลย (รูปที่ 4.1-4.16)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(400X)

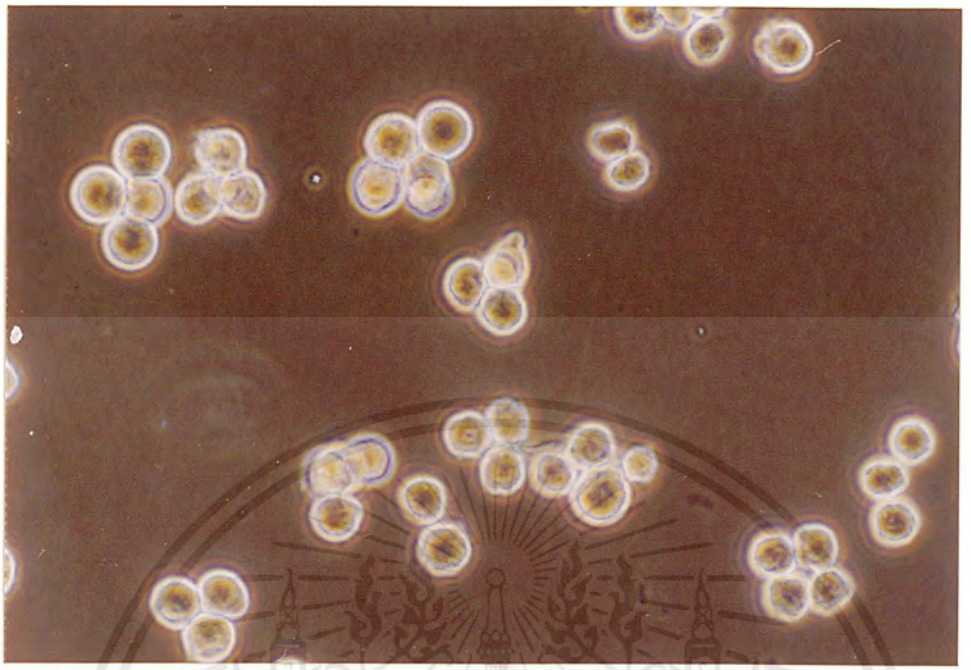
รูปที่ 4.1 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 0 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด



(400X)

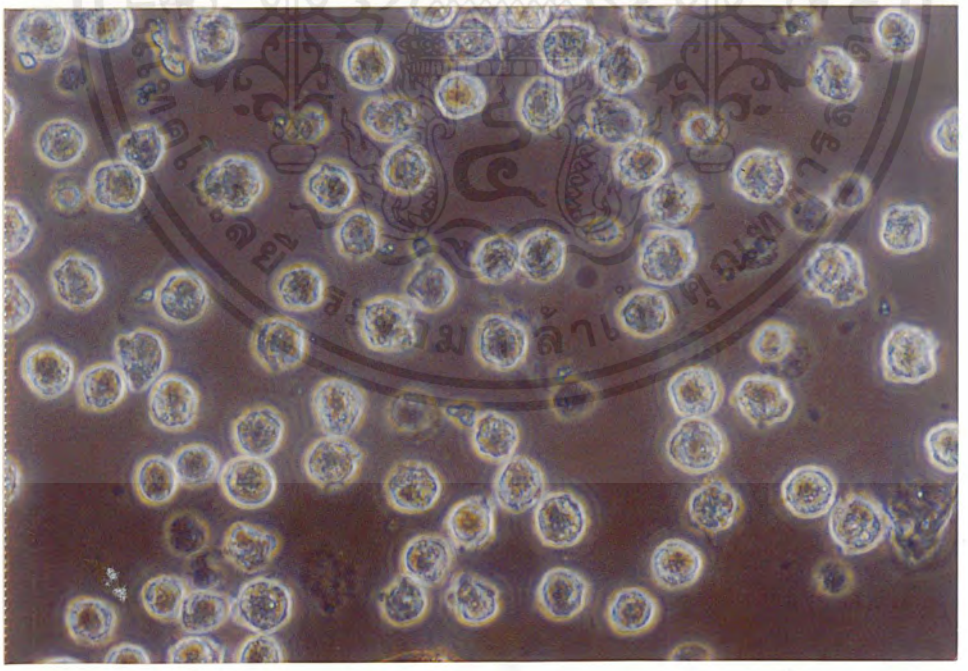
รูปที่ 4.2 ลักษณะของเซลล์ P388 ในวันที่ 0 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(400X)

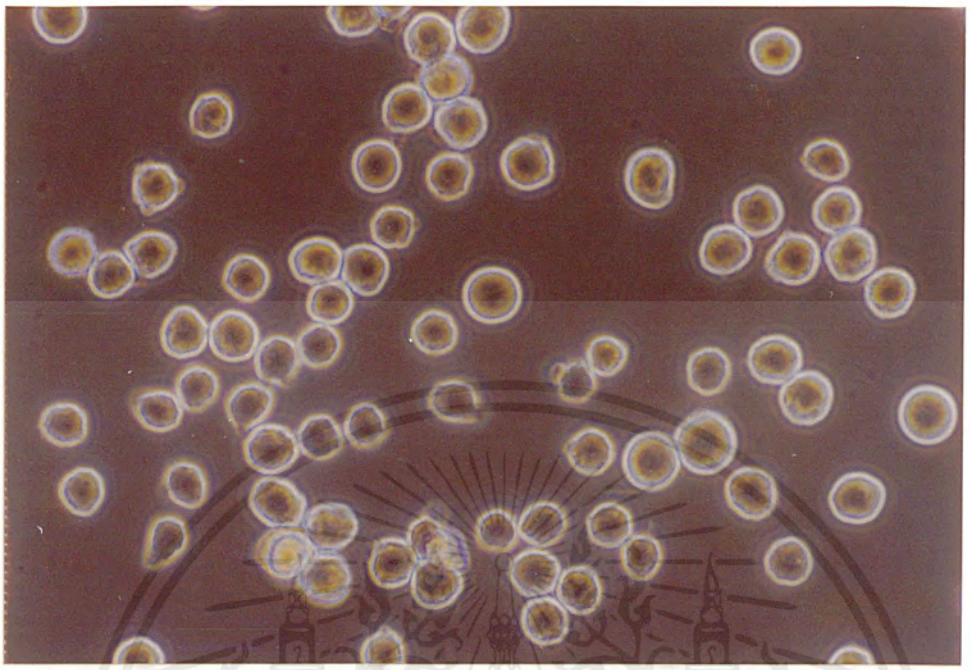
รูปที่ 4.3 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 1 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด



(400X)

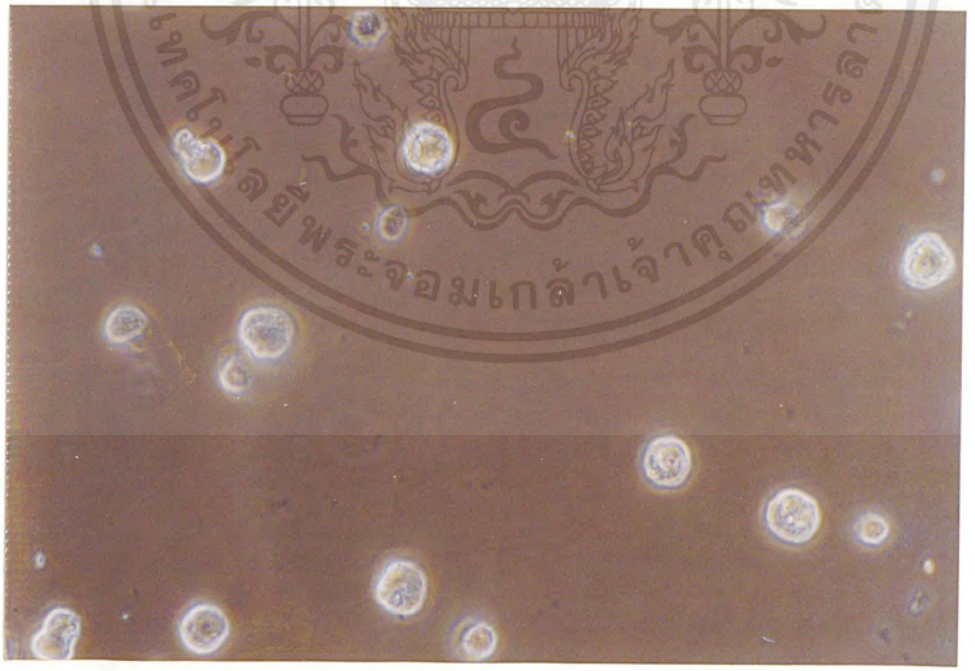
รูปที่ 4.4 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 1ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(400X)

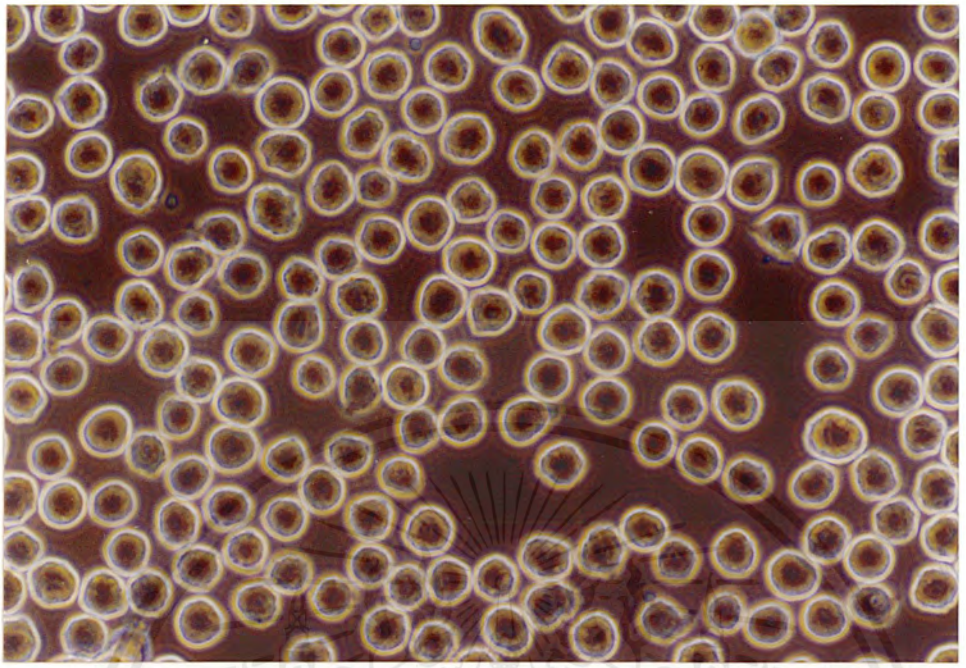
รูปที่ 4.5 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 2 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด



(400X)

รูปที่ 4.6 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 2 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



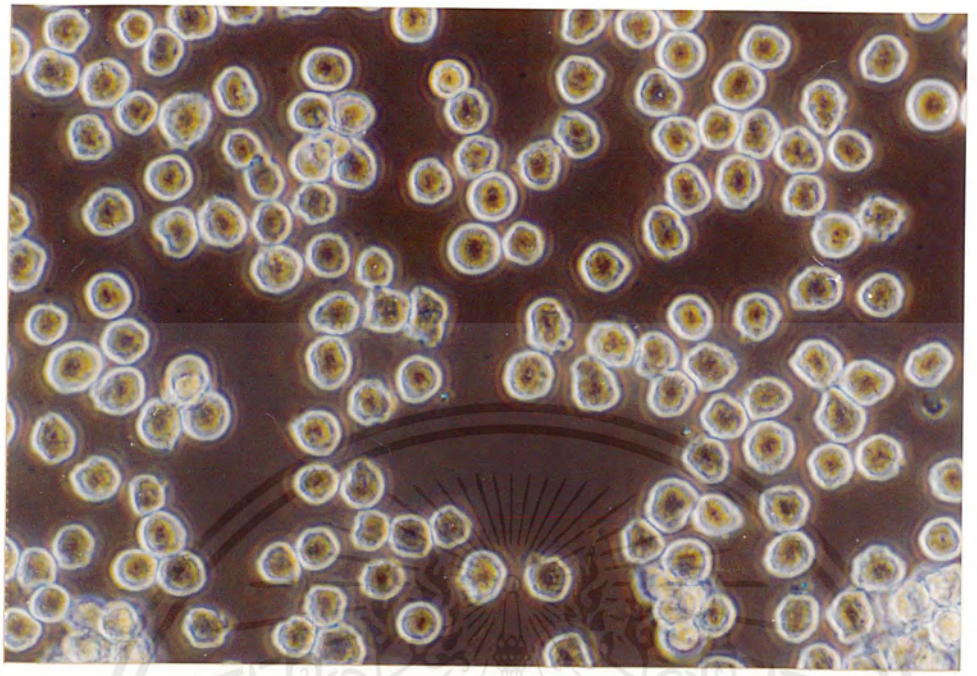
(400X)

รูปที่ 4.7 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 3 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด

(400X)

รูปที่ 4.8 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 3 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



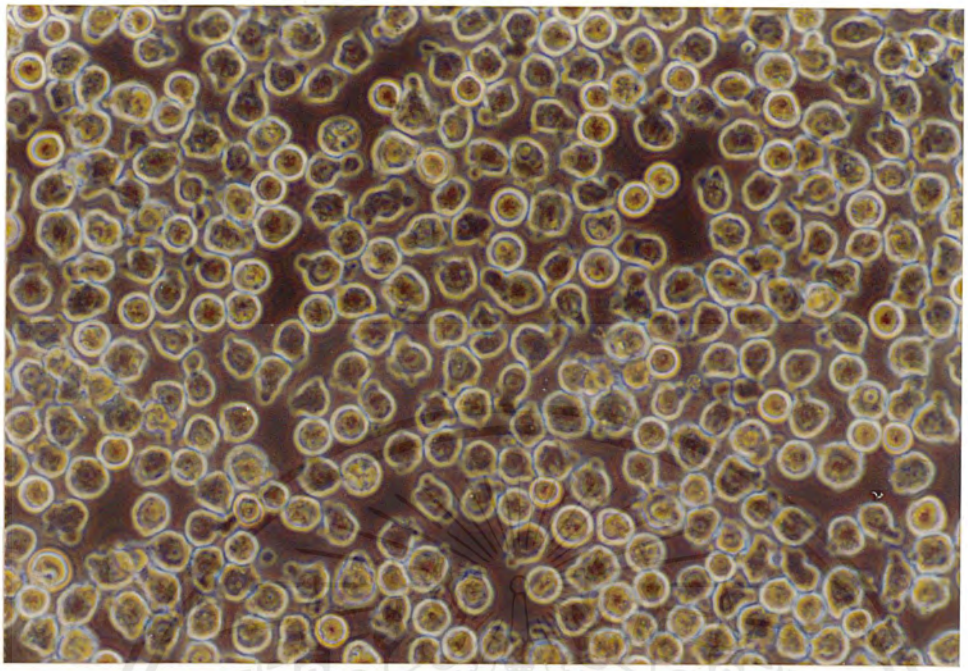
(400X)

รูปที่ 4.9 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 4 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด

(400X)

รูปที่ 4.10 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 4 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



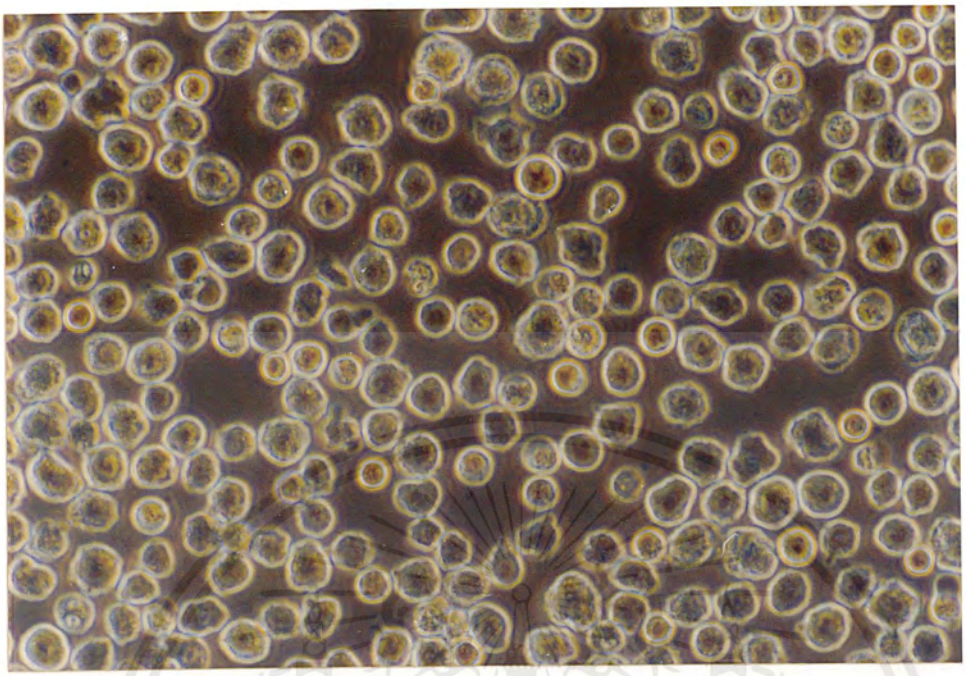
(400X)

รูปที่ 4.11 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 5 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด

(400X)

รูปที่ 4.12 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 5 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



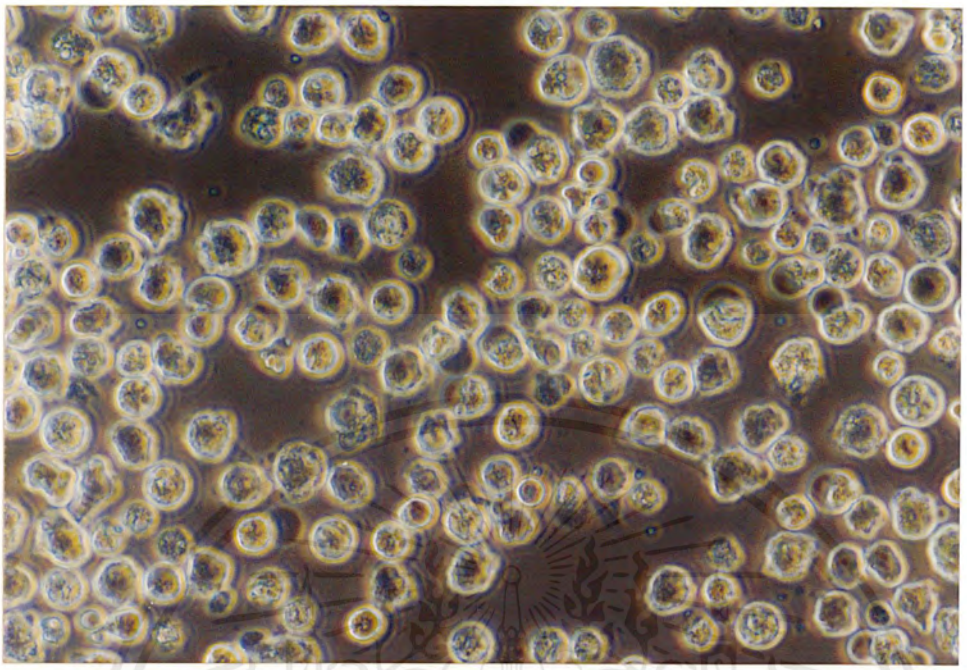
(400X)

รูปที่ 4.13 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 6 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด

(400X)

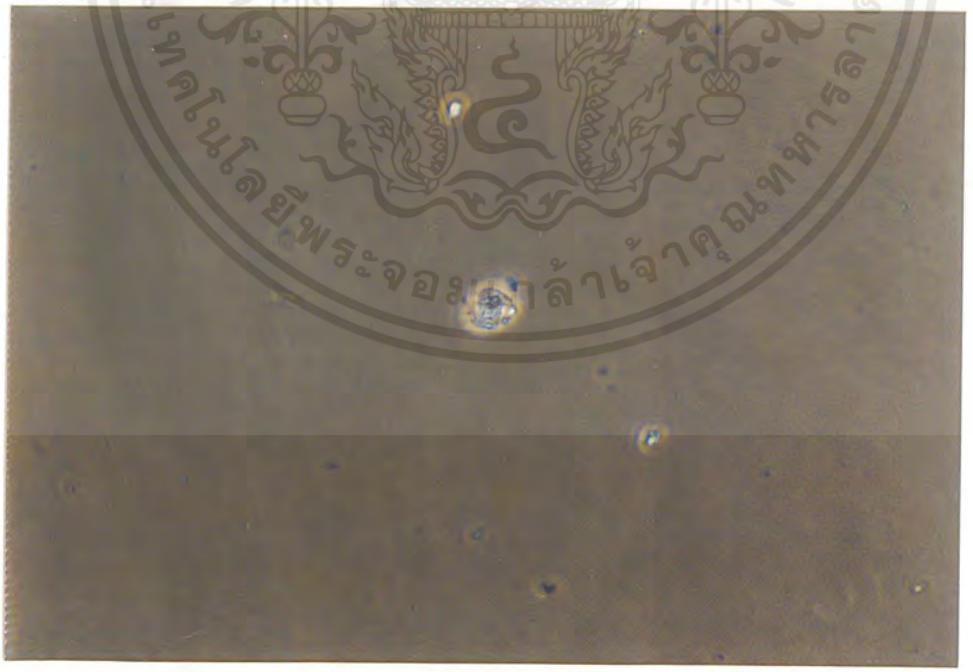
รูปที่ 4.14 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 6 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



(400X)

รูปที่ 4.15 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 7 ในอาหารเลี้ยงที่ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด



(400X)

รูปที่ 4.16 ลักษณะของเซลล์ P388 วันที่ 7 ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ผลของความเป็นพิษต่อเซลล์

เมื่อเลี้ยงเซลล์ P388 ในอาหาร RPMI 1640 เป็นเวลา 7 วัน โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร ได้ผลเป็นปริมาณเซลล์ที่รอดชีวิต ดังตารางที่ 4.1

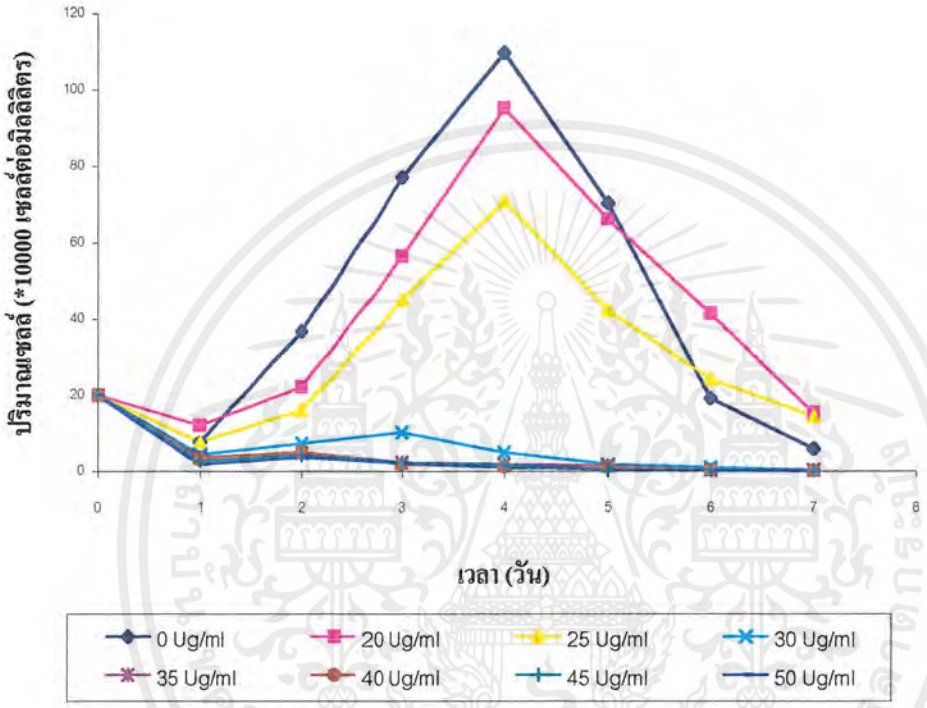
ตารางที่ 4.1 ตารางแสดงปริมาณเซลล์เฉลี่ยที่นับได้ในแต่ละวันในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ

ความเข้มข้น (µg/ml)	ปริมาณเซลล์เฉลี่ยในแต่ละวัน ($\times 10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร)						
	วันที่ 1	วันที่ 2	วันที่ 3	วันที่ 4	วันที่ 5	วันที่ 6	วันที่ 7
0	7.80	36.80	77.10	109.60	70.30	19.10	5.90
20	12.00	22.10	56.40	95.10	66.00	41.40	15.30
25	7.70	16.10	45.00	70.70	42.20	24.23	14.40
30	4.40	7.30	10.20	4.90	1.80	0.90	0.30
35	3.60	4.70	2.20	1.90	1.40	0.40	0.30
40	3.00	5.10	1.80	1.20	1.00	0.40	0.00
45	2.75	4.20	2.25	1.60	0.30	0.20	0.00
50	1.80	3.70	2.10	1.00	0.60	0.20	0.00

ในการทดลองใช้การวางแผนการทดลองแบบสุ่มตลอด (Completely Randomized Design) โดยทำการคำนวณเปรียบเทียบความแตกต่างผลของสารสกัดจากราชดัดแต่ละความเข้มข้นต่อเซลล์กับการเจริญของเซลล์เมื่อ ไม่ได้เติมสารสกัดจากราชดัด (control) ด้วยวิธี Least Significant Difference(LSD) (สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์, 2534) ได้ผลว่า สารสกัดจากราชดัดทุกความเข้มข้นมีผลต่อเซลล์ต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญยิ่ง ($P < 0.05$)

ผลการเจริญของเซลล์แสดงอยู่ในรูปที่ 4.17 จะเห็นได้ว่าเซลล์จะมีการเจริญสูงสุดในวันที่ 4 นอกจากนี้ยังมีความแตกต่างของสารสกัดจากราชดัดแต่ละความเข้มข้นเมื่อเทียบกับ control ในทางสถิติมากที่สุดอีกด้วย เราจึงใช้ข้อมูลของวันที่ 4 นี้ในการคำนวณหาค่า ED_{50} ซึ่งได้ผลว่าสารสกัดอย่างหยาบจากราชดัดมีค่า ED_{50} เท่ากับ 26.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

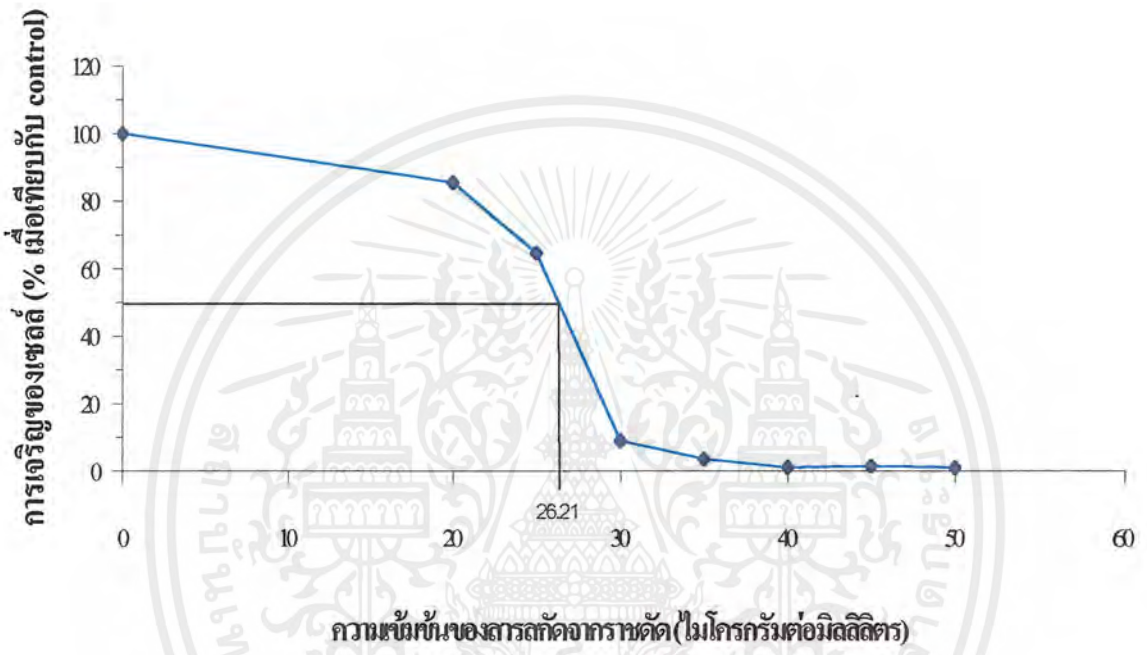
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.17 แผนภูมิเส้นแสดงความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์และเวลาหลังจากเติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ แล้ว

(ปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดทุกความเข้มข้นในแต่ละวันมีปริมาณเซลล์แตกต่างจาก control อย่างมีนัยสำคัญยิ่งที่ค่า $P < 0.05$)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.18 แผนภูมิเส้นแสดงอัตราการเจริญของเซลล์ในวันที่ 4 เมื่อเทียบกับ control ที่ความเข้มข้นต่างๆ ของสารสกัดจากราชดัด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

<u>สรุปผลของความเป็นพิษของสารสกัดจากผลราชดัดต่อเซลล์ P388</u>

เซลล์ P388 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหารที่มีความเข้มข้นของราชดัด 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จะเริ่มมีลักษะผิดปกติตั้งแต่วันที่ 1 หลังจากเติมสารสกัดลงไป และมีปริมาณลดลงอย่างเห็นได้ชัดหลังจากเติมสารสกัดลงไป 2 วันแตกต่างจากเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงปกติซึ่งเริ่มมีลักษณะผิดปกติเพียงเล็กน้อยตั้งแต่วันที่ 4 และเริ่มมีปริมาณลดลงตั้งแต่วันที่ 5 เป็นต้นไป

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดอย่างหยาบจากผลราชดัดต่อเซลล์ P388 โดยใช้ความเข้มข้นของสารสกัดที่ 0 20 25 30 35 40 45 และ 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรในอาหารเพาะเลี้ยงที่มีความเข้มข้นของเซลล์ 2×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และวัดปริมาณเซลล์ทุกๆ วันเป็นเวลา 7 วันพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดจากราชดัดที่มีผลลดจำนวนเซลล์ลงเหลือครึ่งหนึ่ง (ED_{50}) มีค่าเท่ากับ 26.21 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงว่าสารสกัดจากราชดัดไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ P388 เนื่องจากสารสกัดจากพืชที่ถือว่ามีพิษต่อเซลล์จะต้องมีค่า $ED_{50} < 20$ ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นสารสกัดจากราชดัดจึงมีฤทธิ์เพียงยับยั้งการเจริญของเซลล์ P388 เท่านั้น

<u>วิจารณ์ผลการทดลองและข้อเสนอแนะ</u>

จากการศึกษาผลของสารสกัดจากราชดัด แม้จะพบว่าสารสกัดนี้จะสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวชนิด P388 ได้ แต่ควรทำการศึกษาเพิ่มเติมถึงผลของสารสกัดนี้กับเซลล์ปกติด้วย และนอกจากนี้ยังควรศึกษาถึงวิธีสกัดหาสารประกอบซึ่งเป็นตัวออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์ P388 เพราะถ้าเราสามารถสกัดสารให้มีความบริสุทธิ์มากกว่านี้ก็น่าจะทำให้ค่า ED_{50}ลดลง เพื่อที่จะได้นำไปพัฒนาการใช้สารสกัดนี้ทดสอบกับสิ่งมีชีวิตต่อไป และเป็นแนวทางการนำสารจากธรรมชาติไปใช้ในการรักษาโรคมะเร็งได้จริง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

นันทวัน บุณยะประภัศร ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 2 เล่มที่ 1 หน้า 99-136 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 2536.

สมุนไพรสวนสิริรุกขชาติ (พร้อมจิตร ศรลัมพ์, บรรณาธิการ) พิมพ์ครั้งที่ 1 หน้า 67 อมรินทร์พริ้นติ้งกรุ๊ป. 2535.

สุวิทย์ เลาหศิริวงศ์ สถิติเพื่อการวิจัยทางพืชศาสตร์ พิมพ์ครั้งที่ 1 สำนักพิมพ์เพื่อนชีวิต กรุงเทพฯ 2534.

เอมอร โสมนะพันธุ์ ยาและผลิตภัณฑ์จากธรรมชาติ พิมพ์ครั้งที่ 2 เล่มที่ 2 หน้า 202-227 ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ 2536.

Anderson, M.M., O's neill, M.J., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C. 1991. *In Vitro* Cytotoxicity of a Series of Quassinoids from *Brucea javanica* Fruits Against KB Cells. Planta Med. 57 : 62-64.

Barile, F.A. Introduction to *In Vitro* Cytotoxicology : mechanisms and methods, pp.12-15, CRC Press, New York, 1994.

Eigebaly, S.A., Hall, I.H., Lee, K.H., Sumida, Y., Imakura, Y., Wu, R.Y. 1979. Antitumor agents. XXXV : Effects of brusatol, bruceoside A, and bruceantin on P-388 lymphocytic leukemia cell respiration. J. Pharm Sci. 68(7) : 887-890.

Fracier, J.M. in *in Vitro* Toxicity Testing, pp.1-11, Marcel Dekker, New York, 1992.

Kupchan, S.M., Britton, R.W., Ziegler, M.F., Sigel, C.W. 1973. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. J Org Chem. 38(1): 178-179.

Paul, J. in Cell and Tissue Culture, 5th ed., pp.142-143, 446, Churchill Livingstone, Edinburgh London, New York, 1975.

Pavanand, K., Nutakul, W., Dechatiwongse, T., Yoshihira, K., Yongvanitchit, K., Scovill, J.P., Flippen-Anderson, J.L., Gilardi, R., George, C., Kanchanapee, P., et al. 1986. In vitro antimalarial activity of *Brucea javanica* against multi-drug resistant *Plasmodium falciparum*. Planta Med. (2): 108-111.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Polonsky, J., Baskevitch, Z., Gaudemer, A., Das, B.C. 1967. Bitter constituents of *Brucea amarissima*; structures of bruceins A, B and C. Experientia. 23(6): 424-426.

Teaktong, T. "The Effects of *Garnoderma lucidum* Extracts on P388 Leukemic Cells" M.Sc. Thesis, Department of Pharmacology, Faculty of Graduate Studies, Mahidol University, 1999.

Windholz, M. The Merck Index, 10th ed., Merck & co, N.J., U.S.A., 1983.

Xie, J.X., Ji, Z. 1981. The chemical constituents of the Chinese drug "Yadanzi" I. Isolation and identification of daucosterol, brucein D and brucein E. Yao Hsueh Hsueh Pao. 16(1): 53-55

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ก
การเตรียมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์

ส่วนประกอบของอาหาร RPMI 1640 (รูปที่ ก-1)

Component	*RPMI (1) 1629 mg./litre*	*RPMI (2) 1630 mg./litre*	*RPMI (3) 1634 mg./litre*	*RPMI (4) 1640 mg./litre*
AMINO ACIDS				
L-Alanine	13·4	——	——	——
L-Arginine (free base)	42·1 (HCl)	200·0	100·0	200·0
L-Asparagine	45·0	30·0	30·0	50·0
L-Aspartic Acid	19·9	30·0	30·0	20·0
L-Cysteine	31·5	——	——	——
L-Cystine	——	100·0	100·0	50·0
L-Glutamic Acid	22·1	80·0	80·0	20·0
L-Glutamine	219·2	300·0	300·0	300·0
Glutathione (reduced)	0·5	10·0	10·0	1·0
Glycine	7·5	15·0	15·0	10·0
L-Histidine (free base)	20·9 ($HCl.H_2O$)	35·0	35·0	15·0
L-Hydroxyproline	19·7	——	——	20·0
L-Isoleucine (Allo free)	39·3	50·0	50·0	50·0
L-Leucine(Methionine free)	39·3	50·0	50·0	50·0
L-Lysine HCl	36·5	60·0	75·0	40·0
L-Methionine	14·9	15·0	15·0	15·0
L-Phenylalanine	16·5	30·0	30·0	15·0
L-Proline (Hydroxy L-Proline free)	17·3	30·0	30·0	20·0
L-Serine	26·3	50·0	50·0	30·0
L-Threonine (Allo free)	17·9	50·0	50·0	20·0
L-Tryptophan	3·1	10·0	10·0	5·0
L-Tyrosine	18·1	30·0	30·0	20·0
L-Valine	17·6	40·0	40·0	20·0
VITAMINS				
Ascorbic acid	0·5	——	——	——
Biotin	0·2	0·2	0·1	0·2
Vitamin B_{12}	2·0	0·05	0·1	0·005
D-Ca pantothenate	0·2	3·0	0·25	0·25
Choline Cl	5·0	3·0	3·0	3·0
Folic acid	10·0	2·0	1·0	1·0
i-Inositol	36·0	5·0	15·0	35·0
Niacin	0·5	——	——	——
Nicotinamide	0·5	2·5	2·5	1·0
Para Aminobenzoic Acid	1·0	0·5	——	1·0
Pyridoxal HCl	0·5	——	——	——
Pyridoxine HCl	0·5	2·0	2·0	1·0
Riboflavin	0·2	0·5	0·25	1·0
Thiamine HCl	0·2	5·0	0·25	0·2
Bactopeptone	600·0	——	——	——

รูปที่ ก-1 ส่วนประกอบของอาหาร RPMI 1640 (Paul, J. in Cell and Tissue Culture, 1975)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมอาหาร RPMI 1640

ใช้อาหาร RPMI 1640 ชนิดผง โดยมีขั้นตอนการเตรียมดังนี้ (รูปที่ก-2)

รูปที่ ก-2 แสดงขั้นตอนการเตรียมอาหาร RPMI 1640 ปริมาตร 1000 มิลลิลิตร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาพผนวก ข
การเตรียมสารเคมีชนิดต่างๆ

<u>การเตรียมสารละลาย 0.85% normal saline</u>

ส่วนประกอบ

Sodium Chloride	21.25	กรัม
น้ำกลั่น	250	มิลลิลิตร

การเตรียม

นำ Sodium Chloride เติมลงในน้ำกลั่นเล็กน้อยจนละลายหมด ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask)

<u>การเตรียมสารละลาย 0.25% trypan blue</u>

ส่วนประกอบ

trypan blue dye	0.625	กรัม
สารละลาย 0.85% normal saline	250	มิลลิลิตร

การเตรียม

นำ trypan blue dye เติมลงในน้ำกลั่นเล็กน้อยจนละลายหมด ปรับปริมาตรสารละลายให้ได้ 250 มิลลิลิตร โดยใช้ ขวดวัดปริมาตร (volumetric flask) นำไปกรองผ่านกระดาษกรองวัทแมนเบอร์ 1

<u>การเตรียมสารละลายกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น 1 N</u>

ส่วนประกอบ

กรดไฮโดรคลอริกเข้มข้น (conc. HCl)	0.7292	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

การเตรียม

นำกรดไฮโดรคลอริกเข้มข้นเทลงในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเตรียมสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์เข้มข้น 1 N

ส่วนประกอบ

โซเดียมไฮดรอกไซด์	40.1	มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	20	มิลลิลิตร

การเตรียม

เทสารละลายโซเดียมไฮดรอกไซด์ลงในน้ำกลั่น คนให้เข้ากัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก ค

รายละเอียดข้อมูลในการทดลอง

ตารางที่ ค-1 ตารางแสดงปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ ภายในระยะเวลา 7 วัน

วันที่บันทึกผล	ซ้ำ	ปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ ($\times 10^4$ เซลล์/มล.)							
		0 µg/ml	20 µg/ml	25 µg/ml	30 µg/ml	35 µg/ml	40 µg/ml	45 µg/ml	50 µg/ml
วันที่1	1	6.2	14.4	9.0	5.0	3.2	2.2	2.6	1.2
	2	4.6	11.2	5.8	3.0	2.0	3.0	2.6	1.6
	3	11.2	13.4	9.0	5.2	4.8	3.2	3.0	2.0
	4	9.2	9.0	7.0	4.4	4.4	3.6	3.4	2.4
วันที่2	1	34.2	19.4	15.2	9.2	3.0	6.0	4.6	3.0
	2	44.2	25.0	12.4	6.4	4.2	5.2	2.2	3.4
	3	46.8	22.0	19.2	6.6	5.4	4.2	5.8	5.2
	4	22.0	18.0	17.6	7.0	6.2	5.0	4.2	3.2
วันที่3	1	69.4	75.2	51.4	10.0	1.4	0.8	1.2	1.8
	2	80.2	68.0	41.4	12.0	1.0	0.8	2.0	1.4
	3	75.8	38.2	44.2	10.6	3.0	3.0	2.6	3.0
	4	83.0	44.2	43.0	8.2	3.4	2.6	3.2	2.2
วันที่4	1	127.0	100.4	58.2	7.4	1.2	0.8	1.2	0.4
	2	112.2	96.4	62.6	3.4	2.0	0.4	2.0	0.4
	3	101.2	113.6	85.0	5.6	2.4	1.6	1.4	1.2
	4	98.0	70.0	77.0	3.2	2.0	2.0	1.8	2.0
วันที่5	1	93.8	90.2	52.0	1.4	1.2	0.6	0.2	0.4
	2	69.0	89.4	49.2	1.0	0.4	0.6	0.2	0.4
	3	62.4	40.4	34.2	2.4	2.2	1.0	0.6	1.0
	4	56.0	44.0	33.4	2.4	1.8	1.8	0.2	0.6

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ตารางที่ ค-1(ต่อ) ตารางแสดงปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ ภายในระยะเวลา 7 วัน

วันที่บันทึกผล	ซ้ำ	ปริมาณเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่เติมสารสกัดจากราชดัดความเข้มข้นต่างๆ($X10^4$เซลล์/มล.)							
		0µg/ml	20µg/ml	25µg/ml	30µg/ml	35µg/ml	40µg/ml	45µg/ml	50µg/ml
วันที่6	1	17.0	47.0	32.2	0.8	0.6	0.4	0.2	0.2
	2	18.2	40.2	28.2	0.4	0.2	0.4	0.2	0.2
	3	20.0	38.2	19.0	1.4	0.4	0.6	0.2	0.4
	4	21.2	40.2	17.4	1.0	0.4	0.2	0.2	0.0
วันที่ 7	1	5.4	14.2	15.0	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0
	2	5.4	12.2	9.4	0.2	0.4	0.0	0.0	0.0
	3	7.4	19.4	17.2	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0
	4	5.4	15.4	16.0	0.4	0.2	0.0	0.0	0.0

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหาและต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้