สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง

นางสาวอัจจิมา ไพรอนันต์
นางสาวอาทิยา ปัตเมฆ

จุไพ.
อ5ด1ก
2549
เลขหมู่....................
เลขทะเบียน 72601
วัน,เดือน,ปี 20 มิ.ย. 2550
b. 11769907
i.........................

โครงงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์
คณะวิทยาศาสตร์
สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

ปีการศึกษา 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Cytotoxicity of *Gynura sp.* Effected on cell in Vitro.

Aujjima Prianan

Atiya Pattamake

A Special Project submitted in Partial of the Requirement

for the Degree of Bachelor of Science

Department of Applied Biology

Faculty of Science

King Mongkut's Institute of Technology Ladkrabang

Academic Year 2006

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง

นักศึกษา นางสาวอัจจิมา ไพรอนันต์ รหัสนักศึกษา 46050155

นางสาวอาทิยา ปัตเมฆ รหัสนักศึกษา 46050157

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ

อาจารย์ที่ปรึกษา ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม

อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์

ภาควิชา ชีววิทยาประยุกต์

คณะวิทยาศาสตร์ สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง อนุมัติให้โครงงานพิเศษนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต

คณะกรรมการตรวจสอบ		ลายมือชื่อ
ประธานกรรมการ	ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม	
กรรมการ	ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์	
กรรมการ	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม	

....

(รศ.ดร.นวลพรรณ ณ.ระนอง)

หัวหน้าภาควิชา

ลิขสิทธิ์ของภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์

สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

โครงงานพิเศษเรื่อง	การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลอง
นักศึกษา	นางสาวอัจจิมา ไพรอนันต์
	นางสาวอาทิยา ปัตเมฆ
ภาควิชา	ชีววิทยาประยุกต์
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
ปีการศึกษา	2549
อาจารย์ที่ปรึกษา	ผศ.ดร. สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ผศ.ดร. อุ่นเรือน เพชราวัลย์

บทคัดย่อ

จักรนารายณ์ (*Gynura sp.*) เป็นพืชสมุนไพรไทยที่มีสรรพคุณเป็นยารักษาโรคต่าง ๆ อย่างกว้างขวาง เช่น เบาหวาน เริม และแก้แผลอักเสบพุพอง เป็นต้น ในการศึกษาครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อศึกษาการสกัดสารสกัดอย่างหยาบจากจักรนารายณ์ โดยใช้น้ำกลั่นและเอทานอลในการสกัด และศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ L929 ในหลอดทดลองในระดับความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ของ fetal bovine serum (FBS) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำการทดสอบด้วยสารสกัดอย่างหยาบจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT พบว่าค่า CC_{50} ของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์มีค่าเท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นไม่พบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

Special Project Title	Cytotoxicity of *Gynura sp.* Effected on cell in Vitro.
Name	Miss Aujjima Praianan
	Miss Atiya Pattamake
Department	Applied Biology
Program	Biotechnology
Academic Year	2549
Special Project Advisor	Assist. Prof. Dr. Supattar Poeaim
Special Project Co-Advisor	Assist. Prof. Dr. Ounrean Petcharawan

Abstract

Gynura sp. is widely used in Thai folk medicine to treat many diseases such as diabetes herpes and inflammation etc. The aim of this study are to extract crude extraction of *Gynura sp.* by ethanol and distilled water. And study for cytotoxicity of *Gynura sp.* effected on L929 cells in various concentration culture in Dulbecco's modified medium (DMEM) supplement with 10% fetal bovine serum (FBS). L929 cells were cultured for 24 hour before incubating with crude extract of *Gynura sp.* (0-10 mg/ml) overnight. Then , the cytotoxicity were measured using the MTT colorimetric method. Results of this study were expressed as CC_{50}, the CC_{50} value (concentrations altering MTT activity by 50%) of the treated cells in crude ethanolic extract of *Gynura sp.* was 1.25 mg/ml and crude extract of *Gynura sp.* by distilled water (0-10 mg/ml) was not found cytotoxicity in L929 cell line.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กิตติกรรมประกาศ

โครงงานพิเศษนี้ ได้จัดทำขึ้นตามหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต ซึ่งสามารถสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดีนั้น ทางคณะผู้จัดทำขอกราบขอบพระคุณ ผศ.ดร.สุพัตรา โพธิ์เอี่ยม และผศ.ดร.อุ่นเรือน เพชราวัลย์ อาจารย์ที่ปรึกษาโครงงานพิเศษนี้ที่ได้กรุณาให้ความรู้และคำแนะนำ รวมทั้งได้กรุณาตรวจแก้ไขด้านภาษาและให้คำแนะนำในด้านต่าง ๆ ในการทำโครงงานพิเศษนี้ รวมทั้ง ผศ.ดร. อนุรักษ์ โพธิ์เอี่ยม ประธานกรรมการโครงงานพิเศษที่ได้กรุณาให้คำแนะนำและตรวจแก้ไขโครงงานพิเศษฉบับนี้ให้สมบูรณ์ยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ คุณพยอม เกียรติกำจร คุณอนิทัต ทองจันทร์ และคุณพงศ์ศักดิ์ ประสานภักดี เจ้าหน้าที่วิทยาศาสตร์ที่กรุณาให้ความสะดวกในการใช้อุปกรณ์และสารเคมีต่าง ๆ สำหรับการทดลองโครงงานพิเศษนี้

สุดท้ายขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ตลอดจนเพื่อน พี่และน้อง ๆ ที่มีส่วนช่วยในการสนับสนุนและเป็นกำลังใจในการทำโครงงานพิเศษนี้จนกระทั่งสำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี

คณะผู้จัดทำ
มีนาคม 2549

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ก
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ข
กิตติกรรมประกาศ	ค
สารบัญ	ง
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูป	ช
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและหลักการ	3
2.1 จักรนารายณ์	3
2.2 กระบวนการในการสกัดสารสำคัญจากพืช	10
2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์	15
2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์	16
2.5 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเซลล์	21
2.6 เทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์	24
2.7 การตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์	27
2.8 ชนิดของเซลล์	29
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการทดลอง	31
3.1 การเตรียมสารสกัดจากจักรนารายณ์	31
3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929	31
3.3 การทดสอบด้วยวิธี MTT	32
3.4 วิธีการทดลอง	32
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผล	37
4.1 การสกัดสารจากจักรนารายณ์	37
4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929	39
4.3 การทดสอบความเป็นพิษของเซลล์จักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT	42

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญ (ต่อ)

หน้า

บทที่ 5 สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ 50

5.1 สรุปผลการทดลอง 50

5.2 ข้อเสนอแนะ 50

เอกสารอ้างอิง 51

ภาคผนวก 54

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

4.1 แสดงลักษณะของสารสกัดจากจักรนารายณ์ในชั้นของเอทานอลและน้ำกลั่น 37

4.2 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 จากการทดสอบด้วยสารสกัดน้ำกลั่น
จากจักรนารายณ์ 44

4.3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 จากการทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอล
จากจักรนารายณ์ 46

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป

รูปที่ **หน้า**

2.1 ลักษณะปลายยอด ขอบใบ และขนใบของจักรนารายณ์ 4
2.2 ดอกของต้นจักรนารายณ์ 4
2.3 จักรนารายณ์ชนิดใบกลม 5
2.4 จักรนารายณ์ชนิดใบยาว 5
2.5 โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ Anti-herpes simplex virus Activity (dicaffeoylquinic) 7
2.6 โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ Anti-inflammatory Activity (glycoglycerolipid) 7
2.7 โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ Biguanide-like Activity (phytosterol) 8
2.8 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการหมัก 10
2.9 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการหมักที่ดัดแปลงโดยใช้เครื่องกวน 11
2.10 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการย่อยสลาย 11
2.11 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีเปอร์โคเลชันหรือการแช่ในคอลัมน์ 12
2.12 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการสกัดด้วย soxhlet extractor 13
2.13 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการชง 13
2.14 การสกัดสารจากพืชโดยวิธี Supercritical Extraction System 14
2.15 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ 17
2.16 กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted 18
2.17 T-flask ขนาดต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 19
2.18 multi well plate ขนาดต่างๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ 19
2.19 การกรองอาหารผ่าน membrane filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร 20
2.20 อาหาร DMEM 21
2.21 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว 22
2.22 การย่อยด้วยเอนไซม์ 22
2.23 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ 23
2.24 ตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นและ continuous cell line 24
2.25 เทคนิคปลอดเชื้อขั้นพื้นฐาน 26
2.26 การตรวจสอบด้วยทริปแพนบลู 28

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารบัญรูป (ต่อ)

รูปที่ หน้า

2.27 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ MTT เป็นผลึกฟอร์มาซาน ในไมโตคอนเดรีย 29
2.28 การเปรียบเทียบเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้ว เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT ใน 96-well plate 29
2.29 เซลล์ไลน์ L929 ที่กำลังขยาย 200 เท่า 30
3.1 แผนผังการทดลองการปลูกเซลล์จำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well plate โดยสัญลักษณ์ b คือ blank สัญลักษณ์ c คือ กลุ่มควบคุม 34
3.2 แผนผังการทดลองการใส่สารสกัดจากจักรนารายณ์ ใน 96-well plate 35
4.1 ภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดจากจักรนารายณ์ 38
4.2 แสดงตัวอย่างสารสกัดจากจักรนารายณ์ 38
4.3 แสดงตัวอย่างความเข้มข้นระดับต่างๆของสารสกัดจากจักรนารายณ์ 39
4.4 ลักษณะของเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแล้วซึ่งอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส และเซลล์ที่มีลักษณะกลมซึ่งอยู่ในระยะเมทาเฟส 40
4.5 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ที่ passage 30 เป็นเวลา 12 วัน 40
4.6 ภาพการแสดงการ cryopresentation 41
4.7 แสดงภาพเซลล์ภายหลังการ cryopresentation ไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน 41
4.8 เซลล์ไลน์ L929 หลังจากการปลูกเซลล์เริ่มต้น $5 x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 40 เท่า 42
4.9 เซลล์ L929 ที่ได้รับการทดสอบด้วยวิธี MTT 43
4.10 ผลของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากจักรนารายณ์หลังจากการตรวจสอบด้วยวิธี MTT 43
4.11 กราฟแสดงความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์กับความอยู่รอดของเซลล์ ที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ L 929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละจุดบนกราฟนั้นเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากค่าการทดสอบ 8 ซ้ำ 45
4.12 กราฟแสดงความเข้มข้นของสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์กับความอยู่รอดของเซลล์ ที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ L 929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละจุดบนกราฟนั้นเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากค่าการทดสอบ 8 ค่า 47

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาของโครงงานพิเศษ

เนื่องจากปัจจุบันคนไทยนิยมใช้พืชสมุนไพรในการรับประทานและรักษาโรคต่างๆ อย่างกว้างขวาง โดยการนำสารสกัดจากสมุนไพรมาใช้ประโยชน์ทางด้านต่างๆแทนสารเคมี โดยเฉพาะทางด้านการแพทย์ได้มีการศึกษาวิจัยเพื่อนำสารสกัดจากสมุนไพรมารักษาโรคต่างๆเช่น เบาหวาน เริม ความดันโลหิตสูง ริดสีดวง ภูมิแพ้ เป็นต้น สมุนไพรชนิดหนึ่งที่น่าสนใจคือ จักรนารายณ์

จักรนารายณ์ (*Gynura sp.*) หรือแป๊ะตำปึง เป็นพืชสมุนไพรจัดอยู่ในวงศ์ Ateraceae สามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดใบกลม และชนิดใบยาว (จินฉี่เหมาเยี่ย) ซึ่งมีสรรพคุณในการรักษาโรคได้แก่ เบาหวาน ความดันสูง ภูมิแพ้ หอบหืด มะเร็ง งูสวัด เกาต์ ริดสีดวงทวารหนัก ขับนิ่ว แผลสะเก็ดเงิน ตาอักเสบ ตาเป็นต้อ แผลอักเสบ พุพอง ฝีหนอง ปวดเหงือก ปวดฟัน โรคกระเพาะอาหาร โรคหัวใจ ล้างสารพิษในร่างกาย และเริม เป็นต้น (http://topicstock.pantip.com) จากการศึกษาด้านพฤกษศาสตร์และคุณสมบัติทางชีวภาพ พบว่าสารสกัดของจักรนารายณ์เมื่อทำการสกัดด้วยเอทานอลมีคุณสมบัติต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเริม โดยมีสาระสำคัญได้แก่ สารผสมของกรดไดคาร์ฟีออยควินิก (dicaffeoylquinic acid) ไฟโตเสตอรอล (phytotserrol) ไฟโตเสตอริลกลูโคไซด์ (phytosteryl glucoside) และไกลโคกลีเซอโรลิปิด (glycoglycerolipids) (จุฑามาศก์, 2547) นอกจากนี้ได้มีการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเอทานอลยังสามารถรักษาอาการอักเสบของหูหนูได้ (Iskander และคณะ 2004)

ในการศึกษาสมุนไพรหรือสารสกัดจากพืชนั้นควรทำการศึกษาว่าสมุนไพรชนิดนั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ โดยจะมีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลอง (In Vivo) เช่น หนู กระต่าย เป็นต้น และในหลอดทดลอง (In Vitro) เช่น เซลล์ตับ เซลล์ผิวหนัง เป็นต้น การเลือกใช้เซลล์ในการทดสอบนั้นควรเลือกใช้ให้เหมาะสมกับการทดลอบ เช่น การศึกษาการดูดซึมควรใช้เซลล์ตับ ซึ่งวิธีในการตรวจสอบความเป็นพิษของเซลล์นั้นสามารถทำได้หลายวิธี เช่น Lactate dehydrogenase (LDH) leakage, Neutral red, Protein, Cell cycle analysis และ MTT เป็นต้น เมื่อทำการเปรียบเทียบความว่องไวในการตรวจสอบความเป็นพิษของแคดเมียมต่อเซลล์ตับ พบว่า LDH assay และ MTT assay มีความว่องไวในการตรวจสอบมากกว่าวิธีอื่นๆ เนื่องจากสามารถสามารถตรวจสอบความเป็นพิษของแคดเมียมที่มีผลต่อเซลล์ตับได้อย่างรวดเร็วและแม่นยำที่สุด (Fotakis, 2005) ดังนั้นในการตรวจสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์มนุษย์ในหลอดทดลอง จึงเลือกทำการทดสอบด้วยวิธี MTT (3-(4, 5-Dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จักรนารายณ์ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลายชนิด แต่สารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ยังมีงานวิจัยไม่เพียงพอต่อการยอมรับของผู้บริโภคว่ามีผลข้างเคียงต่อร่างกายหรือไม่ (http://samunpai.com/xchange/index) ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลองโดยทำการทดสอบด้วยวิธี MTT เพื่อเป็นการทดสอบในเบื้องต้นก่อนที่จะนำสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ไปพัฒนาเป็นยาในการรักษาโรคในอนาคตต่อไป โดยในการศึกษวิจัยในครั้งนี้มีจุดประสงค์เพื่อ (1) ทำการสกัดสารจากต้นจักรนารายณ์ด้วยวิธีการสกัดอย่างง่าย (2) ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีต่อความอยู่รอดของเซลล์ไลน์ *L929* ในหลอดทดลอง (3) ศึกษาความเข้มข้นของจักรนารายณ์ที่เป็นพิษต่อเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 2
ทฤษฎีและหลักการ

2.1 จักนารายณ์

จักรนารายณ์ (*Gynura sp.*) เป็นพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคได้หลายชนิด เช่น เบาหวาน เริม ความดันสูง ริดสีดวง และ ภูมิแพ้ เป็นต้น โดยจักรนารายณ์นั้นมีพืชที่อยู่ในสกุลเดียวกัน คือ ว่านมหากาฬ โดยพืชในตระกูลนี้นำเข้ามาจากประเทศจีน เรียกว่า จินฉี่เหมาเยี่ย และถูกตั้งชื่อเป็นภาษาไทยหลากหลาย เช่น กิมกอยมอเช่าหรือผักพันปี (http://topicstock.pantip.com)

2.1.1 คุณลักษณะทางพฤกษศาสตร์และวิทยาศาสตร์ (http://www.aldthai.org)

ชื่อสมุนไพร	จักนารายณ์
ชื่อวิทยาศาสตร์	*Gynula divaricata* DC.
ชื่อพ้อง	*G.auriculata* Cass. *G.procumbens* Merr. *หรือ G.sarmentosa* DC.
ชื่อสามัญ	แปะตำปึง จินฉี่เหมาเยี่ย กิมกอยมอเช่า หรือผักพันปี
ชื่ออื่น ๆ	purple passion vine
ชื่อวงศ์	Asteraceae

2.1.1.1 ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ (http://topicstock.pantip.com)

เป็นไม้ล้มลุกขนาดเล็ก สูง 1-1.5 เมตร ลำต้นเดี่ยว ใบเดี่ยวออกเรียงสลับ ลักษณะกลมรี รูปไข่ ใบสีเขียวหนาอวบน้ำ มีขนปกคลุมด้านบน ขอบใบหยัก โคนใบสอบก้านใบสั้น ก้านใบอ่อนมีสีเขียว ก้านใบและลำต้นมีสีม่วง กิ่งก้านอ่อนหักง่าย ดังรูปที่ 2.1 ดอกออกเป็นช่อที่ซอกใบและปลายยอด แต่ละช่อประกอบด้วยดอกย่อย 3-5 ดอก มีสีเหลืองอยู่รวมเป็นกระจุกคล้ายดอกช้อนทอง ดังรูปที่ 2.2 โดยสามารถแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ

2.1.1.1.1 ชนิดใบกลม (แป๊ะตำปึง) มีลักษณะดังรูปที่ 2.3 คือ ใบสีเขียวอ่อน ใบหนาเพราะมีขนหนานุ่มแบบกำมะหยี่ทั้งด้านบนและด้านล่าง เส้นใบด้านบนลึกเช่นเดียวกับเส้นกลางใบแต่ด้านหลังเส้นใบมีลักษณะนูน กิ่งก้านออกเขียวปนแดง เปราะหักง่าย ใบมีลักษณะรี กว้างและสั้น

2.1.1.1.2 ชนิดใบยาว (จินฉี่เหมาเยี่ย) มีลักษณะดังรูปที่ 2.4 ใบค่อนข้างยาวและแหลมกว่าชนิดใบกลม และมีผิวใบค่อนข้างเรียบเพราะมีขนน้อย ขอบใบหยัก นอกจากนี้ยังมีลักษณะทอดเลื้อยไปตามหน้าดินซึ่งจะแตกต่างจากชนิดใบกลม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.1 ลักษณะปลายยอด ขอบใบ และขนใบของจักรนารายณ์ (http://topicstock.pantip.com)

รูปที่ 2.2 ดอกของต้นจักรนารายณ์ (http://topicstock.pantip.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.3 จักรนารายณ์ชนิดใบกลม (http://topicstock.pantip.com)

รูปที่ 2.4 จักรนารายณ์ชนิดใบยาว (http://topicstock.pantip.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.1.2 การขยายพันธุ์

ต้นจักรนารายณ์เป็นพืชที่ขยายพันธุ์ง่าย ด้วยวิธีการปักชำกิ่งที่ตัดออกเป็นท่อนๆ ยาวประมาณ 10-15 เซนติเมตร บนดินที่ร่วนซุยจากนั้นตั้งทิ้งไว้ในพื้นที่ที่มีแดดรำไรและหมั่นรดน้ำอยู่เสมอ เป็นเวลา 7-10 วัน ต้นจักรนารายณ์จะแตกยอดอ่อนและเกิดรากเป็นต้นใหม่ เมื่อโตเต็มที่จะมีดอกสีเหลืองที่ไม่มีเมล็ดเกิดขึ้น (http://www.siamhealthy.net)

2.1.1.3 สรรพคุณและส่วนที่นำมาใช้เป็นยา

ส่วนที่นำมาใช้เป็นยา คือ ส่วนใบ โดยนำมากินสด ประกอบอาหาร เพื่อรักษาโรคความดัน โรคเบาหวาน โรคกระเพาะอาหาร โรคมะเร็ง หรือใช้เป็นยาภายนอกโดยการบดละเอียดเป็นยาทาเพื่อรักษาโรคเริม แผลอักเสบต่าง ๆ เป็นต้น (http://topicstock.pantip.com) จากการวิจัยพบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบสามารถต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเริมและงูสวัดได้ (ศิริเพ็ญ, 2543) อีกทั้งสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ยังสามารถรักษาอาการอักเสบของหูหนูทดลองได้ (Iskander และคณะ, 2002) และพบว่าสามารถลดน้ำตาลในเลือดหนูขาวที่เป็นเบาหวาน ลดระดับคลอเลสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูขาวได้ (Zhang และ Tan, 2000)

1.1.2 การศึกษาทางด้านคุณสมบัติทางเคมีของสารสำคัญในจักรนารายณ์ (จุฑามาศก์, 2544)

ได้มีการศึกษาปริมาณสารสำคัญในสารสกัดและน้ำคั้นของจักรนารายณ์โดยเทคนิคโครมาโตกราฟีที่ใช้แรงดันสูง (HPLC) พบว่า ในจักรนารายณ์มีสารสำคัญอยู่หลายชนิด ดังนี้

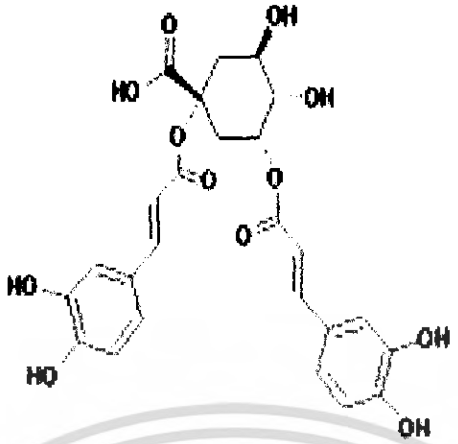
1. กรดไดคาฟีออยควินิก (dicaffeoylquinic acid)
2. ไฟโตสเตอรอล (phytosterol)
3. ไฟโตสเตอริลกลูโคไซด์ (phytosteryl glucoside)
4. ไกลโคกลีเซอโรลิปิด (glycoglycerollipids)

1.1.3 ฤทธิ์ของสารสกัดจากใบจักรนารายณ์

2.1.3.1 Anti-hrepes simplex virus Activity (ศิริเพ็ญ, 2543)

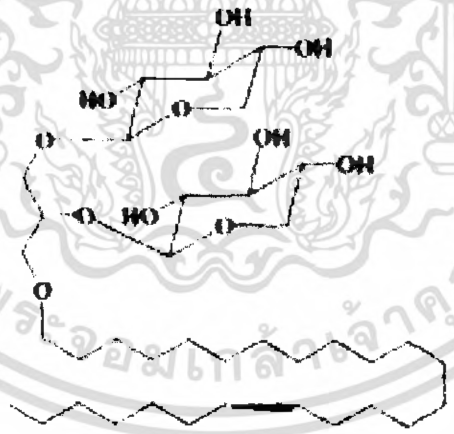
คือฤทธิ์ในการต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคเริมและงูสวัด มีโครงสร้าง ดังรูปที่ 2.5

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.5 โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ Anti-hrepes simplex virus Activity (dicaffeoylquinic acid) (http://chemdb.niaid.nih.gov)

2.1.3.2 Anti-inflammatory Activity (Iskander และคณะ, 2002) คือฤทธิ์ในการลดการอักเสบ ติดเชื้อ ปวดบวม มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.6

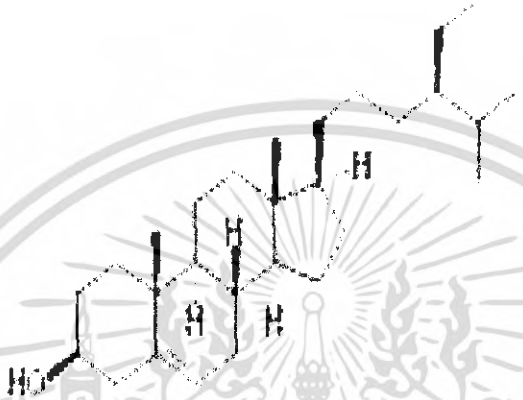


รูปที่ 2.6 โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ Anti-inflammatory Activity (glycoglycerollipids) (www.cyberlipid.org)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.1.3.3 Biguanide-like Activity (http://www.medplant.mahidol.ac.th)

คือมีกิจกรรมคล้าย biguanide ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน ตัวอย่างของ biguanide เช่น metformin, phenformin และ buformin ซึ่ง metformin เป็นชนิดที่ใช้อย่างแพร่หลาย ส่วน phenformin และ buformin ยังไม่นำออกจำหน่ายเนื่องจากมีผลข้างเคียงที่เป็นพิษ มีโครงสร้างดังรูปที่ 2.7



รูปที่ 2.7 โครงสร้างสารที่ออกฤทธิ์ Biguanide-like Activity (phytosterol) (http://en.wikipedia.org/wiki/Phytosterol)

2.1.4 การศึกษาที่เกี่ยวข้อง

2.1.4.1 การศึกษาทางเภสัชวิทยา

ศิริเพ็ญ (2543) ได้ทำการศึกษาทางพฤกษเคมีของสารต้านไวรัสเริมจากจักรนารายณ์ พบว่าสารสกัดเอทานอลมีคุณสมบัติต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดเริม และสารสำคัญที่ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ คือ สารผสมของกรดไดคาฟีออยควินิก ซึ่งมีศักยภาพเป็นยาทาภายนอกประเภทบรรเทาอาการอักเสบ ระคายเคืองที่ผิวหนังที่เกิดจากอาการแพ้ แมลงกัดต่อย และโรคเริม

จุฑามาศก์ (2544) ได้ศึกษาสูตรโครงสร้างและการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดและน้ำคั้นของจักรนารายณ์ด้วยเทคนิค HPLC พบว่าสามารถแยกสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริมในปริมาณที่มากเพียงพอต่อการพัฒนาและวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดจากจักรนารายณ์โดยเทคนิค HPLC ได้สาร phytosterol และ phytosteryl glucoside จากสารสกัดคลอโรฟอร์ม และทำการพิสูจน์โครงสร้างทางเคมีโดยเทคนิค NMR ซึ่งสกัดสาร phytosteryl glucoside สามารถแยกได้ในปริมาณมากและเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านไวรัสเริม ปริมาณของ phytosteryl glucoside ที่พบใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สารสกัดเอทานอลและในน้ำคั้นที่ทำให้แห้งด้วยความเย็น คือ 0.35% w/w และ 0.096% w/w ตามลำดับ

วัลลภ และคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง ทำการสกัดสารสกัดจากพืชด้วยวิธีการสกัดอย่างง่ายโดยการหมัก (maceration) ผงพืชแห้งสกัดในตัวทำละลาย ได้แก่ เมทานอลและเอทานอลจากนั้นระเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract)

Zhang และ Tan (2000) ได้ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ในการตรวจสอบเกี่ยวกับระดับกลูโคส คลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูทดลอง โดยการให้หนูทดลองกินสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ 1 ครั้ง เพื่อตรวจสอบกลูโคสในกระแสเลือดของหนูที่ทดลองที่เป็นเบาหวานและหนูปกติ ผลที่ได้พบว่าที่ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ 150 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัม หรือเท่ากับ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เหมาะสมที่สุดในการลดระดับกลูโคสในกระแสเลือด ซึ่งในหนูปกติจะไม่มีผลการเปลี่ยนแปลง เมื่อทราบความเข้มข้นที่เหมาะสมแล้วจึงนำไปให้หนูที่เป็นเบาหวานกินสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ 14 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน พบว่าสามารถลดระดับคลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดของหนูที่เป็นเบาหวานได้

Iskander และคณะ (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ในการลดการอักเสบติดเชื้อ ที่มีอยู่ในสารสกัดเอทานอลอย่างหยาบจากใบจักรนารายณ์พบว่า สามารถลดการอักเสบของหูหนูทดลองได้เมื่อใช้ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ 0.75 มิลลิกรัมต่อหูหนูทดลอง โดยมีเปอร์เซ็นต์การลดการอักเสบของหูหนูทดลอง 65.2 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดเฮกเซนและโทลูอีนจากใบจักรนารายณ์ชนิดเดียวกันพบว่าสามารถลดการอักเสบของหูหนูทดลองได้ 44.6 เปอร์เซ็นต์ และ 34.8 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่า สารสเตอรอยด์จากสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์มีผลในการลดการอักเสบของหูหนูทดลองได้ดีที่สุด แต่สารสกัดที่ได้จากน้ำนั้นไม่มีผลในการลดการอักเสบของหูหนูทดลอง

2.1.4.2 การศึกษาทางพิษวิทยา

เบญจมาศและคณะ (2546) ได้ทำการศึกษาการพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้การตรวจสอบด้วยวิธี MTT พบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT คือ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และหากใช้ DMSO เป็นสารละลายอินทรีย์ในการละลายผลึกฟอร์มาซานจะให้ผลดีกว่าใช้ ไอโซโพรพานอล

วัลลภและคณะ (2547) ได้ทำการศึกษาการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลองโดยใช้การตรวจสอบด้วยวิธี MTT พบว่าการตรวจสอบด้วยวิธี MTT เป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดักชันสาร MTT เซลล์ที่มีชีวิตและมีการทำงานของไมโทรคอนเดรียปกติ เอนไซม์ดีไฮโดร

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จีเนสและโคแฟคเตอร์ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลึกฟอร์มาซาน ซึ่งในการละลายผลึกฟอร์มาซานใช้ DMSO หรือ ไอโซโพรพานอล/กรดไฮโดรคลอริก และวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้ microplate reader ในช่วงความยาวคลื่น 550-590 นาโนเมตร

แต่ยังไม่มีรายงานการศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงของสารสกัดจากจักรนารายณ์ทั้งในสัตว์ทดลองและในหลอดทดลอง อย่างไรก็ตามจะต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมภายหลัง

2.2 กระบวนการในการสกัดสารสำคัญจากพืช

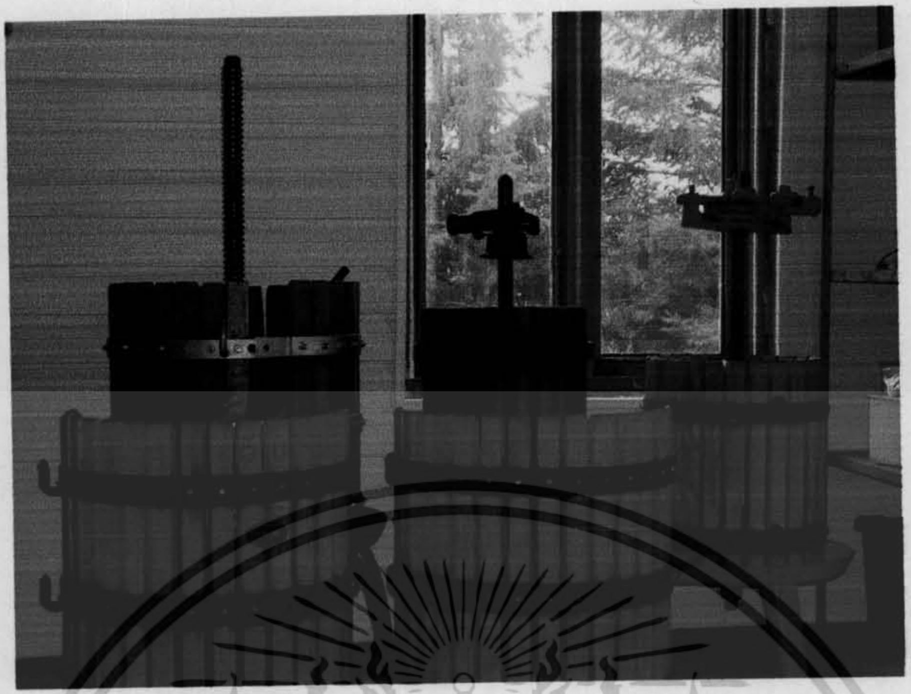
กระบวนการในการสกัดสารสำคัญจากพืชอาจทำได้หลายวิธีขึ้นอยู่กับชนิดของสารที่ต้องการสกัดออกมา สมบัติของสารในการทนความร้อน ชนิดของตัวทำละลายที่ใช้ ซึ่งในแต่ละวิธีมีข้อดีข้อเสียต่างกัน จึงควรเลือกให้เหมาะสมกับความต้องการ จะขอกล่าวถึงเฉพาะวิธีที่ง่ายและนิยมใช้กันมาก ดังนี้ (วัลลภและคณะ, 2547)

2.2.1 การหมัก (Maceration)

เป็นการสกัดพืชสดหรือแห้งที่ผ่านการบดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสมในภาชนะปิด โดยมีการเขย่าเป็นครั้งคราวที่อุณหภูมิห้อง อาจใช้เวลาตั้งแต่ 2-3 ชั่วโมง จนถึง 3 สัปดาห์แล้วแต่ชนิดของพืช จนแน่ใจว่าสารสำคัญถูกละลายออกมาจนหมด จากนั้นนำไปกรองพร้อมกับมีการบีบสารละลายออกจากกากจนหมด อาจต้องมีการสกัดซ้ำหลายครั้งเพื่อให้ได้สารสำคัญมากที่สุด ดังรูปที่ 2.8 วิธีนี้อาจดัดแปลงโดยใช้เครื่องกวนเพื่อให้การสกัดดีขึ้นเพราะทำให้เซลล์พืชแตกออกดังรูปที่ 2.9 (จุฑาทิปและคณะ, 2547) ต่อจากนั้นนำมากรองและระเหยตัวทำละลายออกได้เป็นสารสกัดหยาบ (crude extract) และอาจนำสารสกัดหยาบที่ได้มาสกัดต่อไปด้วยตัวทำละลายชนิดต่างๆ ที่มีขั้วต่างกันเพื่อเพื่อให้ได้สารสกัดต่างๆ หลากชนิด ตัวทำละลายที่ใช้สกัดสารโดยทั่วไปได้แก่ เมทานอล เอทานอล ปิโตรเลียมอีเทอร์ เอทิลอะซิเตท และเฮกเซน เป็นต้น (วัลลภและคณะ, 2547)

รูปที่ 2.8 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการหมัก (www.banlieusardises.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.9 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการหมักที่ดัดแปลงโดยใช้เครื่องกวน (www.canadavintage.com)

2.2.2 การย่อยสลาย (Digestion)

เป็นการสกัดด้วยการหมักที่อุณหภูมิสูง 40-60 องศาเซลเซียสดังรูปที่ 2.10 (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

รูปที่ 2.10 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการย่อยสลาย (www.buchi.com)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.3 เปอร์โคเลชันหรือการแช่ในคอลัมน์ (Percolation)

เป็นวิธีที่นิยมใช้รองจากวิธีการหมัก เป็นการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้เปอร์โคเลชัน (อาจเป็นแก้วหรือโลหะ) บดพืชที่หมักให้ละเอียด ทำการหมักให้พองตัวก่อนประมาณ 1 ชั่วโมง หรือมากกว่า จากนั้นบรรจุผงลงในเปอร์โคเลชันทีละน้อยเป็นชั้น ใส่ตัวทำละลายลงไปให้ท่วมพืช ตั้งทิ้งไว้ 24-48 ชั่วโมง จากนั้นไขท่อข้างล่างให้สารสกัดออกมา คอยเติมตัวทำละลายเก็บสารสกัดจนการสกัดสมบูรณ์และบีบสารละลายออกจากกากเช่นกันแล้วจึงนำไปกรอง การสกัดด้วยวิธีนี้เทคนิคการบรรจุผงพืชลงไปในเปอร์โคเลชัน อัตราการไขสารละลายและอุณหภูมิที่ใช้ล้วนมีผลต่อคุณภาพของสารสกัดที่ได้ จึงควรมีการศึกษาทดลองอย่างดี วิธีนี้นิยมใช้ในการเตรียมสารสกัดเหลว ซึ่งมีปริมาณพืช : สารสกัดเท่ากับ 1: 1 (จุฑาทิปและคณะ, 2547) ดังรูปที่ 2.11

รูปที่ 2.11 การสกัดสารจากพืช โดยวิธีเปอร์โคเลชันหรือการแช่ในคอลัมน์ (www.henriettesherbal)

2.2.4 การสกัดด้วย Soxhlet extractor

เป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่องโดยใช้ตัวทำละลายที่มีจุดเดือดต่ำ ทำใน Soxhlet extractor การสกัดทำได้โดยใช้ความร้อนทำให้ตัวทำละลายระเหยขึ้นไปแล้วกลั่นตัวกลับลงมาอีกวนเวียนเรื่อยไปจนการสกัดสมบูรณ์ วิธีนี้จะประหยัดตัวทำละลายที่ใช้สกัด แต่ควรระวังความร้อนซึ่งอาจทำให้สารเคมีในพืชบางชนิดสลายตัวดังรูปที่ 2.12 (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.12 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการสกัดด้วย soxhlet extractor (www.gozips.uakron.edu)

2.2.5 การต้ม (Decogtion)

เป็นการสกัดสารสำคัญซึ่งละลายได้ในน้ำและทนต่อความร้อน ส่วนใหญ่ใช้เวลาต้มประมาณ 15 นาที สารสกัดโดยวิธีนี้ควรมีการเติมสารกันเสียหรือแช่แข็ง เพื่อป้องกันจุลินทรีย์ และสารสกัดชนิดนี้มีอายุสั้นควรเตรียมเพื่อใช้ใหม่ ๆ (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

2.2.6 การชง (Infusion)

วิธีนี้ใช้สกัดสารที่ละลายน้ำได้ แช่พืชทิ้งไว้นานประมาณ 15 นาที จากนั้นเปิดฝาทิ้งไว้ต่ออีก 30 นาที จึงนำมาใช้ดังรูปที่ 2.13 (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

รูปที่ 2.13 การสกัดสารจากพืชโดยวิธีการชง (www.darjeelingtea.net) (www.twiningsfs.co.uk)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.2.7 Supercritical Fluid Extraction System

เป็นเทคนิคการสกัดพืชที่มีสารไม่ทนความร้อนเป็นองค์ประกอบสำคัญ โดยอาศัยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ช่วย อาจมีการใช้ตัวทำละลายร่วมเพื่อให้การสกัดดีขึ้น มีการใช้ปั๊มช่วยเพื่อให้การสกัดมีคุณภาพดีขึ้นคือเพิ่มอัตราการแพร่ผ่านของตัวทำละลายและลดความหนืดลงดังรูปที่ 2.14 (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

รูปที่ 2.14 การสกัดสารจากพืชโดยวิธี Supercritical Fluid Extraction System (www.pressureproductsindustries.com)

วิธีการสกัดที่นิยมใช้ในการสกัดพืชในระดับอุตสาหกรรมคือวิธีการหมัก การย่อยสลายเปอร์โคเลชันหรือการแช่ในคอลัมน์ การสกัดด้วย soxhlet extractor และ Supercritical Fluid Extraction System (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

สารสกัดจากวิธีการสกัดดังกล่าวมาแล้วมักอยู่ในรูปสารสกัดของเหลวซึ่งเจือจางและมีปริมาตรมากทำให้นำไปใช้ได้ไม่สะดวก จึงจำเป็นต้องนำมาทำให้เข้มข้นขึ้นเสียก่อนเพื่อลดปริมาตรและสะดวกต่อการนำไปแยกส่วนผสมในผลิตภัณฑ์ต่อไป อาจทำได้หลายวิธี เช่น การระเหยแห้งโดยการใช้ความร้อนจากหม้ออังไอน้ำ การระเหยแห้งโดยการกลั่นตัวทำละลายออกที่อุณหภูมิต่ำและลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน (rotary evaporator) ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด การแช่แข็งเป็นการทำให้แห้งโดยไม่ผ่านความร้อนเหมาะกับการสกัดที่สลายตัวโดยความร้อน การทำให้แห้งโดยวิธีสเปร์ดราย ซึ่งมักใช้กับสารสกัดด้วยน้ำ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

และอัลตราฟิวเตรชันซึ่งทำการสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นขึ้นโดยใช้เมมเบรน วิธีนี้ใช้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุลสูงกว่า 5,000 เป็นต้น (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

วิธีการสกัดสารจากพืชมักเริ่มด้วยการสกัดในรูป pre-extract โดยหมักส่วนของพืชที่ต้องการด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม เช่น น้ำสามารถสกัดน้ำตาล ซาโปนิน และเกลือแร่ต่าง ๆ ขณะที่แอลกอฮอล์สามารถสกัด คลอโรฟิลด์ น้ำมัน สารไขมัน และสารอินทรีย์อื่น ๆ จากนั้นทำให้ใสโดยการกรอง ปั่นเหวี่ยงและระเหยแห้งหรือทำให้แห้งโดยวิธีสเปร์ดราย เพื่อให้ได้สารสกัดเข้มข้น ดังวิธีที่ได้กล่าวมาแล้ว (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

สารสกัดเบื้องต้นหรือสารสกัดหยาบจะประกอบด้วยสารเคมีหลายชนิดผสมกันอยู่หากต้องการแยกส่วนประกอบ เช่น ทำให้ได้สารสำคัญกึ่งบริสุทธิ์หรือสารบริสุทธิ์ จะต้องอาศัยการแยกด้วยเทคนิคและอุปกรณ์ต่าง ๆ มากมายหลายวิธี เช่น อาศัยสมบัติและปฏิกิริยาทางเคมี ได้แก่ ความเป็นกรดด่าง ปฏิกิริยาการเกิดเกลือ เป็นต้น หรืออาศัยสมบัติทางฟิสิกส์ ได้แก่ การกลั่น การระเหิด การตกผลึก การแยกด้วยตัวทำละลายที่มีขั้วต่างกันหรือเทคนิคทางโครมาโตกราฟี เป็นต้น ซึ่งต้องอาศัยความรู้ความชำนาญ ประสบการณ์และเวลาอย่างมากในการศึกษาและวิจัยเพื่อให้สารสำคัญบริสุทธิ์ที่ต้องการแยกออกมา ต้องศึกษาและทราบถึงโครงสร้างทางเคมีของสารสำคัญในพืช สมบัติต่าง ๆ ของสารเหล่านั้นและทราบว่าพืชแต่ละชนิดควรมีสารประกอบอะไรบ้าง อาจอาศัยความรู้ทาง Chemotaxonomy ทราบวิธีการตรวจสอบเบื้องต้นเพื่อคัดเลือกกลุ่มสาร ทราบสมบัติการละลายของสารที่ต้องการแยกและตรวจเอกลักษณ์เบื้องต้น ตลอดจนทราบเทคนิคต่าง ๆ ในการตรวจวิเคราะห์เชิงปริมาณและเชิงคุณภาพ เป็นต้น นอกจากนี้ยังต้องทราบวิธีการในการทดสอบฤทธิ์ของสารสำคัญที่สกัดได้และความปลอดภัยเพื่อนำมาใช้เป็นยา (จุฑาทิปและคณะ, 2547)

2.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์คือ การเลี้ยงเซลล์ที่ทำการแยกออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อเริ่มต้น โดยวิธีทางกลหรือการใช้เอนไซม์ แล้วทำการเลี้ยงเซลล์ให้มีชีวิตในหลอดทดลองเป็นเวลานานกว่า 24 ชั่วโมง โดยทำการควบคุมสภาวะ (in culture) ให้เซลล์สามารถเจริญเติบโตได้บนอาหารที่ใช้ทำการเพาะเลี้ยงแบบแข็งหรือในอาหารที่เป็นสารละลาย โดยเซลล์จะแผ่ออกและเพิ่มจำนวน เช่นการเพาะเลี้ยงเซลล์ของมนุษย์นั้นต้องการเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้ประสบผลสำเร็จต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมในการเจริญเติบโตของเซลล์

ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์คือ ใช้ในการผลิตไวรัส ผลิตโปรตีนและเอนไซม์ ตรวจสอบสารพิษและยา ผลิตวัสดุชีวภาพ การ transgenic animal และเพื่อการศึกษาต่างๆ เช่น การรับส่งสัญญาณ การแสดงออกของยีน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2.3.1 สาเหตุการเลือกใช้ประโยชน์จากการเพาะเลี้ยงเซลล์

เนื่องจากมีสภาพแวดล้อมเดียวกัน คือ มาจากแหล่งเดียวกัน ใช้อาหารชนิดเดียวกันในการเลี้ยง ทุกเซลล์มีลักษณะเหมือนกัน ใช้ประโยชน์ได้หลากหลาย สามารถเก็บไว้ได้นาน ลดต้นทุน และใช้เวลาน้อยในการตรวจสอบผล

2.4 อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Unchern, 1999)

ใช้อุปกรณ์และเทคนิคเฉพาะในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์

2.4.1 บริเวณทำงานปลอดเชื้อ

ถ้าเป็นไปได้ควรใช้ห้องที่แยกออกมาและเป็นห้องที่สะอาดในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ไม่ควรเป็นห้องที่มีความวุ่นวายและถ้าเป็นไปได้ควรติดตัวกรองในบริเวณที่ทำงาน HEPA filter เป็นตัวกรองที่มีประสิทธิภาพ ไม่ควรทำการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อสัตว์หรือจุลินทรีย์ในบริเวณใกล้เคียง และห้องปฏิบัติการต้องเป็นห้องที่ออกแบบเฉพาะสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์ ควรสวมเสื้อกราวน์ที่ใช้ในห้องเฉพาะและไม่ควรนำออกนอกห้อง

2.4.2 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

นอกจากตู้ปลอดเชื้อ (laminar air flow) และบริเวณทำงานที่สะอาด ในห้องปฏิบัติการนั้นจำเป็นต้องมีตู้ควบคุมอุณหภูมิหรือห้องที่ใช้ในการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ 30-40 องศาเซลเซียส โดยอุณหภูมิที่ใช้ในการบ่มขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง โดยเซลล์แมลงจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 30 องศาเซลเซียส ส่วนเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะเจริญเติบโตได้ดีที่สุดที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส โดยต้องใช้ตู้ควบคุมอุณหภูมิที่มีการรักษาปริมาณก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ให้อยู่ที่ 2-5 เปอร์เซ็นต์

โดยปกติการเก็บรักษาเซลล์จะใช้อุณหภูมิ 36.5 องศาเซลเซียส แต่เซลล์บางชนิดต้องการอุณหภูมิที่ต่ำกว่าในการเก็บรักษาเช่น เซลล์ผิวหนัง อย่างไรก็ตาม ตู้ควบคุมอุณหภูมิจะถูกตั้งอุณหภูมิไว้ไม่ให้เกิน 38.5 องศาเซลเซียส เพื่อป้องกันเซลล์ตาย ตู้ควบคุมอุณหภูมิมีลักษณะดังรูปที่ 2.15

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

สำนักหอสมุดกลาง พระจอมเกล้าลาดกระบัง

รูปที่ 2.15 ตู้ควบคุมอุณหภูมิ

2.4.3 ตู้เย็นและตู้แช่แข็ง (-20 องศาเซลเซียส)

อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงต้องทำการเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส สำหรับเอนไซม์ เช่น ทริปซิน และส่วนประกอบอื่นๆของอาหารเช่น กลูตามีน หรือ ซีรัม จะทำการเก็บรักษาที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ใช้ตู้เย็นหรือห้องเย็นในการเก็บรักษาอาหารและบัฟเฟอร์ และใช้ตู้แช่แข็งในการเก็บรักษา ซีรัมและยาปฏิชีวนะ และสารอาหารอื่นๆ

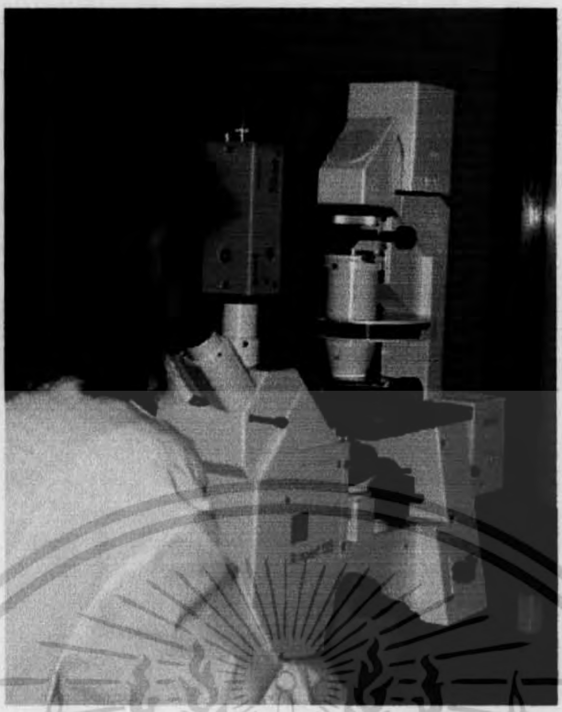
2.4.4 กล้องจุลทรรศน์

กล้องจุลทรรศน์เป็นสิ่งจำเป็นที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อสังเกตการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและลักษณะของเซลล์ในการเพาะเลี้ยง นอกจากนี้ยังใช้เป็นอุปกรณ์ในการนับจำนวนเซลล์ด้วยฮีมาไซโตมิเตอร์ (Hemacytometer)

กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ (compound microscope) นั้นใช้ในการนับจำนวนเซลล์ ส่วนกล้องจุลทรรศน์แบบ inverted นั้นใช้ในการส่องดูเซลล์ที่อยู่ที่ก้นภาชนะเพาะเลี้ยง ดังรูปที่ 2.16 ในการเพาะเลี้ยงเซลล์จะใช้ภาชนะที่เป็นพลาสติกในการเพาะเลี้ยง ซึ่งการใช้ภาชนะพลาสติกชนิดใดก็ตามแต่ไม่ควรส่งผลกระทบต่อการเจริญหรือความสามารถในการยึดเกาะของเซลล์

72601

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



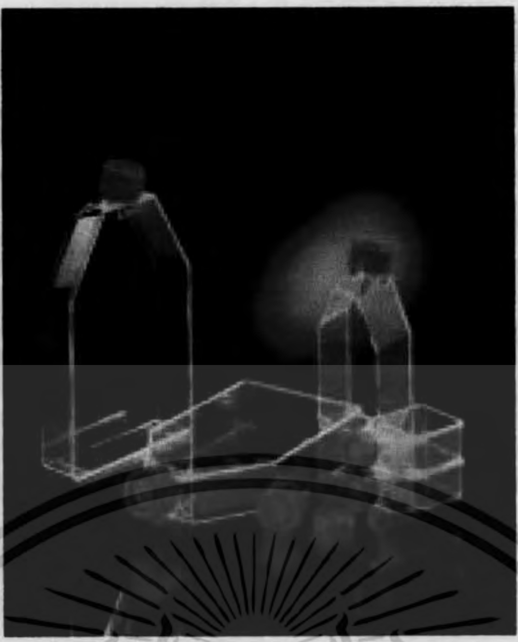
รูปที่ 2.16 กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted (Unchern, 1999)

2.4.5 ภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

ภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นทำจากแก้วหรือพลาสติกชนิดโพลีสไตรีน ซึ่งทำให้เซลล์สามารถเกาะบนพื้นผิวของภาชนะได้ ภาชนะที่นิยมใช้ได้แก่ จานเพาะเลี้ยงและฟลาสก์ซึ่งมีพื้นที่ผิว 25 และ 75 ตารางเซนติเมตร โดยภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบธรรมดานั้นไม่ทนต่อตัวทำละลายอินทรีย์

การเลือกใช้ภาชนะขึ้นอยู่กับลักษณะการเพาะเลี้ยงเซลล์ว่าเป็นแบบแขวนลอยหรือเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ราคาก็เป็นอีกปัจจัยหนึ่งในการเลือกใช้ หากไม่ต้องการใช้พื้นที่ผิวในการเพาะเลี้ยงเซลล์มาก สามารถใช้ multi-well dish ที่มีจำนวนหลุมตั้งแต่ 6 หลุมถึง 96 หลุม ภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์มีลักษณะดังรูปที่ 2.17 และรูปที่ 2.18

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.17 T-flask ขนาดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (http://www.biotech-online.com)

รูปที่ 2.18 multi well plate ขนาดต่าง ๆ ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ (www.sumibe.co.jp)

2.4.6 การกรอง

อาหารไม่สามารถฆ่าเชื้อได้โดยการ autoclave แต่ใช้การกรองด้วย membrane fitter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร (ไมครอน) ดังรูปที่ 2.19 นอกจากนี้ยังใช้กับเอนไซม์,

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ฮอร์โมน, บัฟเฟอร์ และโคเฟคเตอร์ ซึ่งไม่สามารถฆ่าเชื้อได้โดยการใช้ความร้อน เนื่องจากจะทำให้โปรตีนเสียสภาพ

รูปที่ 2.19 การกรองอาหารผ่าน membrane filter ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร (Unchern, 1999)

2.4.7 อาหาร (Unchern, 1999)

อาหารพื้นฐานที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์นั้นคือ Balance Salt Solution (BSS) เช่น Phosphate Buffer Saline (PBS) ซึ่งใช้สำหรับล้างเซลล์หรือใช้สำหรับบ่มเซลล์ในช่วงระยะเวลาสั้นๆ ในรูปเซลล์แขวนลอย ส่วนอาหารที่มีองค์ประกอบซับซ้อนนั้นใช้สำหรับการเจริญเติบโตของเซลล์และการเพาะเลี้ยงเซลล์ให้อยู่รอด เช่น Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ซึ่งเป็นอาหารที่มีกรดอะมิโนจำเป็น วิตามิน และเกลือแร่บางชนิด ดังรูปที่ 2.20 McCoy's medium ซึ่งเป็นอาหารที่มีกรดอะมิโนต่างๆอยู่เป็นจำนวนมาก มีวิตามินและแร่ธาตุ และมีสารเมตาบอไลท์เช่น นิวคลีโอไซด์ ส่วนซีรัมนั้นได้มีการวิจัยและพัฒนาเพื่อลดความต้องการซีรัมของเซลล์ โดยการเติมสารอื่นๆลงในอาหารแทน แต่ก็พบว่าเซลล์ไลน์ส่วนใหญ่ยังคงมีความต้องการซีรัมเพื่อการเจริญเติบโต แหล่งของซีรัมนั้นมีหลายแหล่งเช่น ลูกวัว ตัวอ่อนของลูกวัว (FCS) และม้า ในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นได้มีการนำซีรัมของลูกวัวมาใช้ แต่ซีรัมจากตัวอ่อนของลูกวัวนั้นมีประสิทธิภาพสูงสุด ปริมาณซีรัมที่ใช้นั้นขึ้นอยู่กับเซลไลน์แต่ละชนิด ส่วนยาปฏิชีวนะต่างๆ จะใช้เมื่อไม่มั่นใจว่าสภาวะที่ใช้นั้นปลอดเชื้อเพียงพอ จึงจำเป็นต้องใส่ลงไปในอาหาร ยาปฏิชีวนะแต่ละชนิดนั้นใช้ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน โดยยาปฏิชีวนะที่เลือกใช้นั้นต้องไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เหมาะสมกับชนิดการปนเปื้อนที่เกิดขึ้น และเหมาะสมกับชนิดของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

รูปที่ 2.20 อาหาร DMEM (www.hyclone.com/news/rsm.html)

2.5 ชนิดของการเพาะเลี้ยงเซลล์

2.5.1 การเพาะเลี้ยงอวัยวะกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (Ryan, 2003)

การเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อนั้นเป็นการนำเซลล์ เนื้อเยื่อ หรืออวัยวะ จากสัตว์หรือพืช มาทำการเพาะเลี้ยงในสภาวะจำลองเพื่อให้เจริญเติบโตต่อไปได้ในอาหารที่ประกอบด้วยธาตุอาหารที่จำเป็นต่อการเจริญเติบโตและการมีชีวิตของเซลล์ การเพาะเลี้ยงที่ทำการเพาะเลี้ยงทั้งอวัยวะหรือเฉพาะชิ้นส่วนของอวัยวะที่ต้องการศึกษาการทำงานที่ยังคงดำเนินต่อไป เรียกว่า การเพาะเลี้ยงอวัยวะ (organ culture) แต่เมื่อมีการนำเซลล์ออกมาจากชิ้นส่วนอวัยวะแล้วทำลายพันธะระหว่างเซลล์ข้างเคียง และทำการเพาะเลี้ยงต่อไป เรียกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture)

2.5.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวกับการเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอย (Unchern, 1999)

เซลล์สามารถเจริญได้ทั้งแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวและแบบแขวนลอย การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวนั้น เซลล์จะต้องมีความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวได้ และมี contact inhibition ซึ่งหมายความว่าเซลล์จะหยุดเจริญเมื่อมีการเจริญไปชนหรือสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง ยกเว้นเซลล์มะเร็งซึ่งจะไม่มี contact inhibition การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวนั้นมีลักษณะดังรูปที่ 2.21

ในทางกลับกันเซลล์เลือดหรือเซลล์ไขกระดูกนั้นจะไม่มีความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง เพราะว่าในร่างกายของมนุษย์ เซลล์เหล่านี้จะอยู่อย่างปกติในสภาพแขวนลอย

การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยนั้นทำได้ง่ายกว่าการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว อย่างเช่นในการ subculture นั้นเพียงแต่ทำการเจือจางในอาหารใหม่เท่านั้น แต่การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวนั้นต้องใช้เอนไซม์ย่อยโปรตีนเพื่อทำลายพันธะระหว่าง

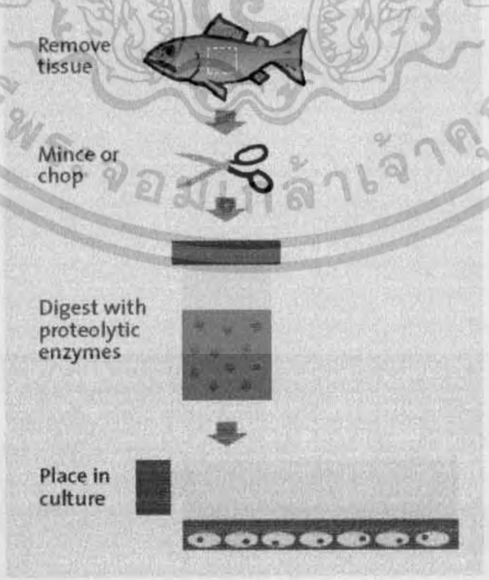
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์กับพื้นผิวที่ยึดเกาะ เอนไซม์ที่ใช้คือ ทริปซิน คอลลาจีเนส ปาเปน เป็นต้น ซึ่งการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบแขวนลอยนั้นไม่ต้องทำการย่อยด้วยทริปซิน การเก็บเกี่ยวเซลล์ก็สามารถทำได้ง่ายกว่า

รูปที่ 2.21 การเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว (Unchern, 1999)

2.5.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นกับ Continuous cell line

เมื่อเซลล์นั้นถูกแยกออกจากอวัยวะและนำมาเพาะเลี้ยงต่อในสภาวะที่ควบคุม ทำให้เซลล์สามารถยึดเกาะกับพื้นผิวได้และเจริญเติบโตต่อไป ซึ่งเรียกว่า การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น (primary cell culture) ซึ่งมี 2 วิธีในการปฏิบัติคือ วิธีที่ 1 ใช้ชิ้นส่วนเล็กๆ ของเนื้อเยื่อ ปลูกในภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งอาจทำจากแก้วหรือพลาสติกที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ 2-3 วันต่อมาจะมีการแยกออกมาของเซลล์จากชิ้นส่วนเนื้อเยื่อ และเจริญเติบโตต่อไปจนเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง ส่วนวิธีที่ 2 คือใช้เอนไซม์ในการย่อยโปรตีนย่อยชิ้นเนื้อเยื่อให้แยกออกเป็นเซลล์เดี่ยวๆ แล้วทำการปลูกเซลล์ลงในภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ ซึ่งมีอาหารที่ทำให้เซลล์เจริญเติบโตและแบ่งเซลล์ต่อไปได้ วิธีการนี้เรียกว่า การย่อยด้วยเอนไซม์ (Ryan, 2003) ดังรูปที่ 2.22

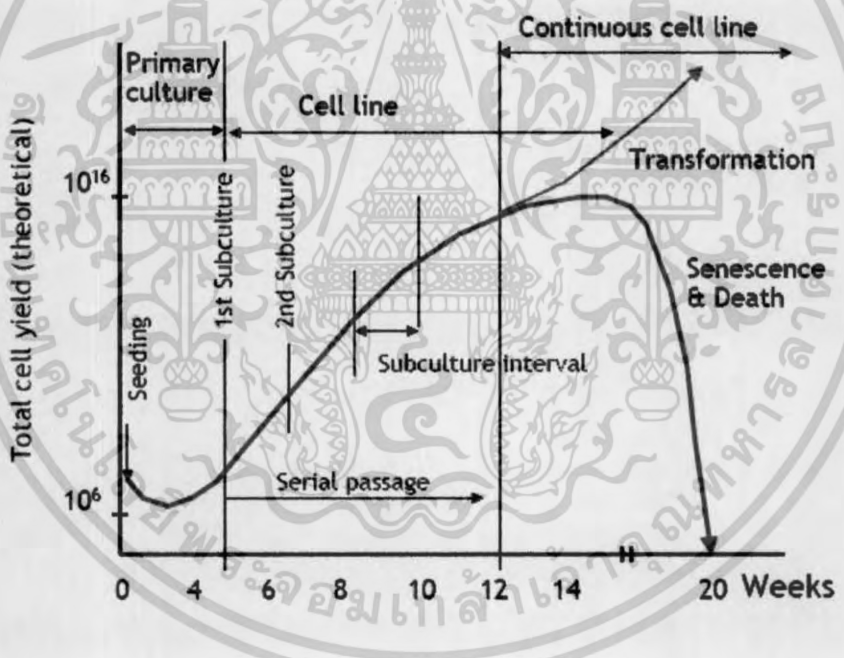


รูปที่ 2.22 การย่อยด้วยเอนไซม์ (Ryan, 2003)

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นเป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ได้มาโดยตรงจากสัตว์ ซึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างและตายไปในที่สุด ซึ่งเมื่อต้องการใช้ในการปฏิบัติงานอีกครั้งต้องกลับไปเอาเนื้อเยื่อจากสัตว์มาทำการเพาะเลี้ยงใหม่ (Unchern, 1999)

ระยะการเจริญเติบโตของเซลล์มี 4 ระยะ คือ lag phase ในระยะนี้จะไม่มีการเพิ่มจำนวนเซลล์ แต่จะเป็นการปรับตัวให้เข้ากับสภาวะใหม่ ระยะต่อมาคือ log phase โดยเมื่อเซลล์สามารถปรับตัวได้แล้วจะมีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว ระยะต่อมาคือ stationary phase เมื่อเซลล์เจริญเติบโตมากขึ้นจนไปสัมผัสกับเซลล์ข้างเคียง เซลล์จะหยุดแบ่งตัวและเริ่มที่จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างให้เหมือนเนื้อเยื่อต้นกำเนิดเช่น epithelial cell จากตับหรือกระเพาะอาหารจะเชื่อมติดกันและเกิดการแลกเปลี่ยนไอออนซึ่งกันและกัน เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจจะเริ่มมีการเต้นอย่างต่อเนื่อง และระยะสุดท้ายคือ dead phase ซึ่งเซลล์จะตายเนื่องจากไม่มีการเปลี่ยนอาหารใหม่ กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์มีลักษณะดังรูปที่ 2.23 (Unchern, 1999)

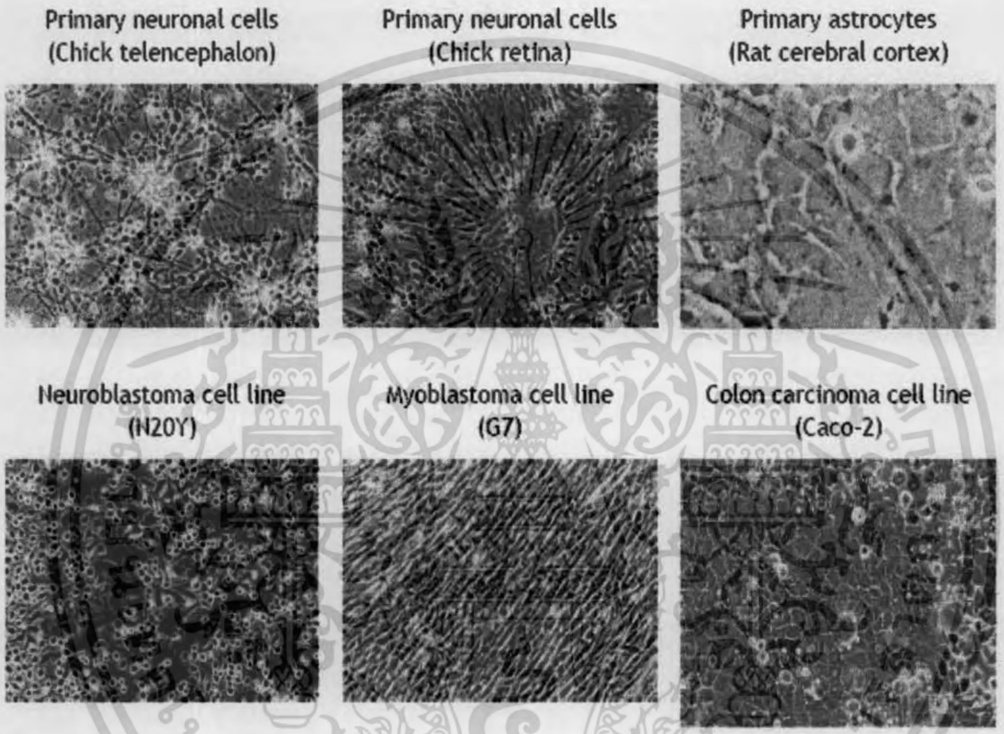


รูปที่ 2.23 กราฟแสดงการเจริญเติบโตของเซลล์ (Unchern, 1999)

การแยกเซลล์ไปเพาะเลี้ยงใหม่ทำได้โดยการ passage หรือการ subculture โดยการชักนำให้เซลล์หลุดออกมาจากวัสดุยึดเกาะ แล้วทำการเจือจางเซลล์แขวนลอยในอาหารใหม่และเลี้ยงในขวดเพาะเลี้ยงใหม่ อย่างไรก็ตามคุณสมบัติของเซลล์ที่ทำการเพาะเลี้ยงนั้นมักจะเปลี่ยนแปลงไปตาม passage เช่น เจริญได้เร็วขึ้นและมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างมากขึ้น ส่วนพวกที่เจริญช้าก็จะตายไปในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อมีการ subculture ขึ้นหมายความว่าเซลล์มีอายุมากขึ้น ซึ่งระบุความเป็น passage ไว้ที่ขวดเพาะเลี้ยงเซลล์ เมื่อผ่านไปหลายๆ passage จะได้เซลล์ไลน์ (cell line) ที่มีลักษณะคงตัวไม่ผิดปกติ และถ้าเป็น immortal จะเรียกว่า continuous cell line แต่ถ้ามีลักษณะผิดปกติ จำนวนโครโมโซมเปลี่ยนไป มีการเจริญแบบไม่มีที่สิ้นสุด สูญเสีย contact inhibition เจริญเติบโตได้รวดเร็วมากขึ้น และไม่ต้องการยึดเกาะพื้นผิวเพื่อการเจริญเติบโตจะเรียกว่า transform cell line หรือ tumor cell line โดยลักษณะของเซลล์เริ่มต้นและ continuous cell line มีลักษณะดังรูปที่ 2.24



รูปที่ 2.24 ตัวอย่างของการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นและ continuous cell line (Unchern, 1999)

2.6 เทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ (Unchern, 1999)

2.6.1 เทคนิคปลอดเชื้อ

ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ นั้นจำเป็นต้องใช้เทคนิคที่ปลอดเชื้อโดยการ sterile หรือ aseptic technique ตลอดเวลา เช่นการปฏิบัติงานในตู้ปลอดเชื้อหรือในห้องปลอดเชื้อ ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อควบคู่ไปด้วย ถ้าปฏิบัติงานในที่ที่ไม่ sterile ก็ต้องใช้เทคนิคปลอดเชื้อที่มีประสิทธิภาพมากขึ้น เทคนิคปลอดเชื้อขั้นพื้นฐานคือ พื้นที่ปฏิบัติงานต้องสะอาด เช็ดด้วยเอทานอลเข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์ อุปกรณ์ที่ใช้ทุกชิ้นต้อง sterile และเสื้อกราวน์ที่สะอาดก็มีความจำเป็นด้วยเช่นกัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เทคนิคปลอดเชื้อที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงจุลินทรีย์นั้นคล้ายกับเทคนิคที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์ อย่างไรก็ตามคงเป็นไปไม่ได้ที่จะอธิบายถึงทุกเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งผู้ปฏิบัติงานควรทำการศึกษาจากผู้มีประสบการณ์

กฎขั้นพื้นฐานของเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งควรปฏิบัติเมื่อปฏิบัติงานในตู้ปลอดเชื้อ มีดังนี้

2.6.1.1 ต้องใช้เปลวไฟจากตะเกียงบุนเซน เพื่อให้ความร้อนแก่อากาศบริเวณรอบๆ ซึ่งควรทำการเปิดขวดบริเวณพื้นที่ดังกล่าว

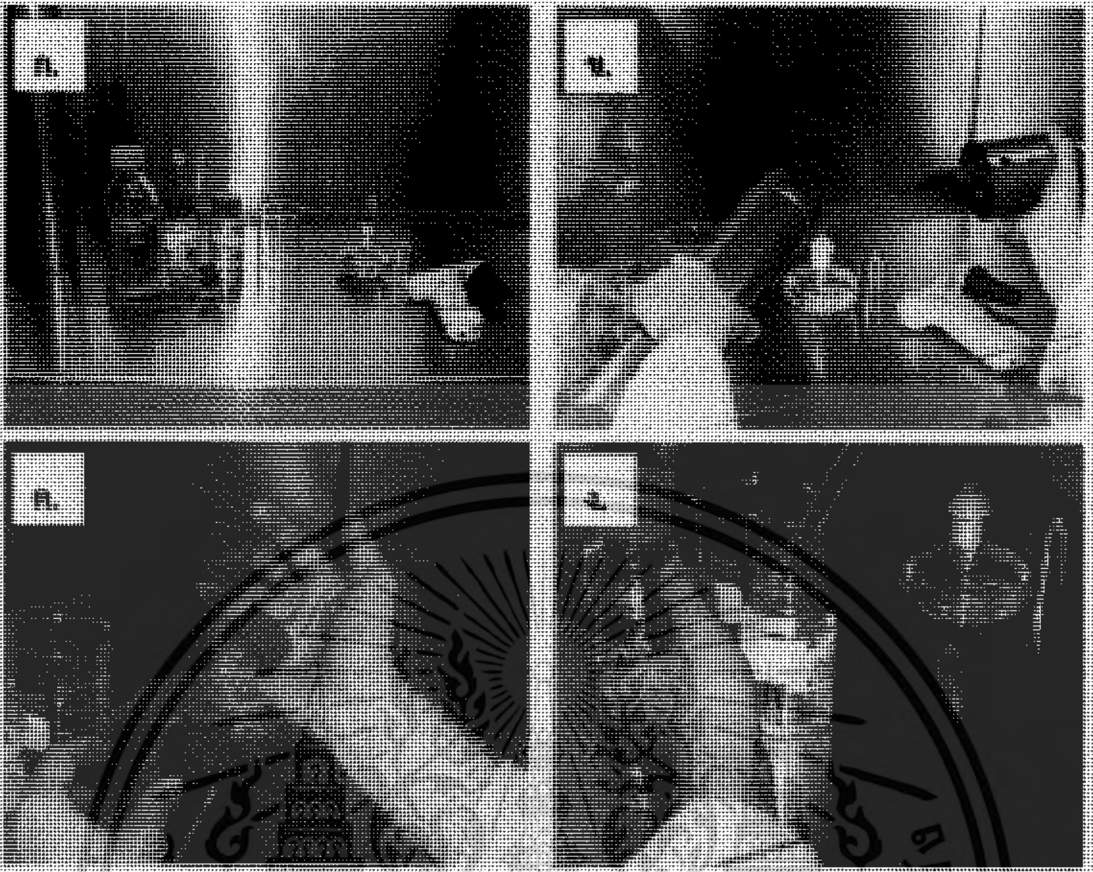
2.6.1.2 เช็ดฝาขวดและคอทุกครั้งด้วยเอทานอล เข้มข้น 70 เปอร์เซ็นต์

2.6.1.3 ลนไฟที่คอขวดและปิเปตทุกครั้ง โดยการผ่านเปลวไฟอย่างรวดเร็ว ถ้าหากเป็นฟลาสก์หรือปิเปตพลาสติกไม่จำเป็นต้องลนไฟ

2.6.1.4 ไม่ควรวางฝาขวดหรือปิเปตลงบนพื้นโต๊ะ ควรคีบไว้ด้วยปลายนิ้ว ในระหว่างการเทสารหรือการปิเปต

2.6.1.5 ควรแยกอุปกรณ์ที่ใช้งานแล้วและอุปกรณ์ที่ยังไม่ได้ใช้งานออกจากกัน เพื่อป้องกันความสับสนในการปฏิบัติงานที่ใช้ขวดและฟลาสก์ ปากขวดและฟลาสก์ห้ามสัมผัสกับอุปกรณ์ใดทั้งสิ้น โดยหากต้องการเทสารออกจากขวดหนึ่งไปยังอีกขวดหนึ่ง ควรเทห่างกันอย่างน้อย 5 มิลลิเมตร เช็ดสารที่หกออกมาทันที และทำความสะอาดบริเวณพื้นที่ปฏิบัติงานให้สะอาดอยู่เสมอ เครื่องแก้วหรืออุปกรณ์พลาสติกที่ใช้แล้วควรนำไป autoclave ทุกครั้งก่อนที่จะนำไปล้างหรือทิ้ง ดูรูปที่ 2.25 ประกอบ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.25 เทคนิคปลอดเชื้อขั้นพื้นฐาน (ก) เตรียมอุปกรณ์ที่ใช้วางไว้ในตู้ปลอดเชื้อให้เรียบร้อย (ข) ลนไฟอุปกรณ์ทุกครั้ง (ค) ถือฝาขวดไว้ด้วยปลายนิ้ว (ง) ห้ามสัมผัสปากขวดโดยเด็ดขาด (Lindere, 1999)

2.6.2 การ subculture

เมื่อเซลล์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นเจริญเติบโตและแบ่งตัวจนเต็มพื้นผิววัสดุที่ใช้เพาะแล้ว ต้องทำการ subculture เพื่อให้เซลล์มีการเจริญเติบโตต่อไป โดยการนำเซลล์ออกจากพื้นผิวที่ใช้เพาะโดยใช้เอนไซม์ ซึ่งคล้ายคลึงกับการใช้เอนไซม์ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น โดยเอนไซม์จะทำลายพันธะโปรตีนระหว่างเซลล์กับพื้นผิวที่เพาะ โดยเซลล์ไลน์บางชนิดนั้นสามารถทำการเก็บเกี่ยวโดยการทำให้หลุดออกจากพื้นผิวโดยการขูดเบาๆ ในกรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงเซลล์แบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว แต่หากเป็นกรณีที่เป็นการเพาะเลี้ยงแบบเซลล์แขวนลอยแล้ว จะทำการ subculture โดยการเจือจางเซลล์ในอาหารเพาะเลี้ยงเท่านั้น (Ryan, 2003)

ถ้าการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นนั้นไม่สามารถนำไปใช้งานได้ ควรทำการ subculture เพื่อให้เป็นเซลล์ไลน์ เพื่อที่จะนำไปใช้งานได้ แต่เซลล์บางชนิดเช่น macrophage และ neuron ไม่สามารถทำการเพาะเลี้ยงได้ในหลอดทดลอง จึงต้องใช้งานในรูปของการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้น

การเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นประกอบไปด้วยเซลล์หลายชนิดปะปนกันในเนื้อเยื่อต้นกำเนิด บางเซลล์ก็ตาย บางเซลล์ก็ไม่สามารถเจริญได้ ส่วนบางเซลล์เท่านั้นที่สามารถเจริญเติบโตจนกลายเป็นเซลล์ที่เป็นเซลล์เด่น ในการ subculture ของการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นเซลล์ที่เป็นเซลล์เด่นก็จะยิ่งมีความโดดเด่นมากขึ้น แสดงว่าการ subculture นั้นสามารถทำให้เซลล์เหลือเพียงชนิดเดียวได้

เรียกการเพาะเลี้ยงเซลล์หลังจากการ subculture ของการเพาะเลี้ยงเซลล์เริ่มต้นว่าเซลล์ไลน์ การสร้างเซลล์ไลน์ มีข้อดีคือ เซลล์ที่เลี้ยงได้นั้นจะมีลักษณะเดียวเหมือนกันทุกเซลล์ทำให้ง่ายต่อการวางแผนการทดลอง อย่างไรก็ตามเซลล์ไลน์ก็ยังมีข้อเสียคือ การสร้างเซลล์ไลน์นั้นจะทำให้เซลล์สูญเสียความสามารถในการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (differentiate) เซลล์จะมีจำนวนโครโมโซมที่ผิดปกติทำให้เจริญเร็วอย่างผิดปกติได้

ความอยู่รอดของเซลล์สามารถตรวจสอบได้จากเซลล์ที่เพาะเลี้ยงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียวก่อนที่จะนำไป subculture เพื่อที่จะได้เซลล์ที่มีชีวิตในการเพาะเลี้ยงต่อไป การตรวจสอบมักจะตรวจสอบจากความสามารถในการเป็นเยื่อเลือกผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์ ซึ่งมีหลายวิธีการเช่น การตรวจสอบด้วยทริปแพนบลู การตรวจสอบด้วยวิธี LDH leakage การตรวจสอบด้วยวิธี MTT เป็นต้น

2.7 การตรวจสอบความอยู่รอดของเซลล์

2.7.1 การตรวจสอบด้วยทริปแพนบลู (Sangthong และคณะ, 2005)

เป็นการตรวจสอบความเสียหายของเยื่อหุ้มเซลล์ได้อย่างรวดเร็ว ซึ่งวิธีนี้สามารถตรวจสอบจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตได้ดังรูปที่ 2.26 โดยมีวิธีการดังนี้

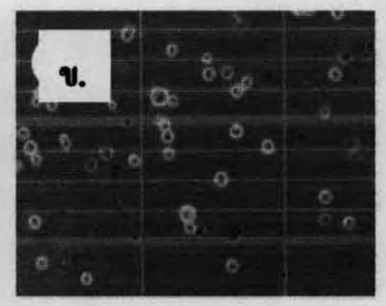
2.7.1.1 ผสมเซลล์แขวนลอยกับทริปแพนบลูเข้มข้น 0.4 เปอร์เซ็นต์ ในหลอดทดลอง

2.7.1.2 ทิ้งไว้ 1-15 นาที และนำเซลล์ที่ย้อมสีไปไหลดลง hemacytometer

2.7.1.3 เซลล์ตายจะติดสีน้ำเงิน ที่นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินเข้มกว่าบริเวณอื่นๆ

2.7.1.4 นับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต (ไม่ติดสี) เพื่อคำนวณหาเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

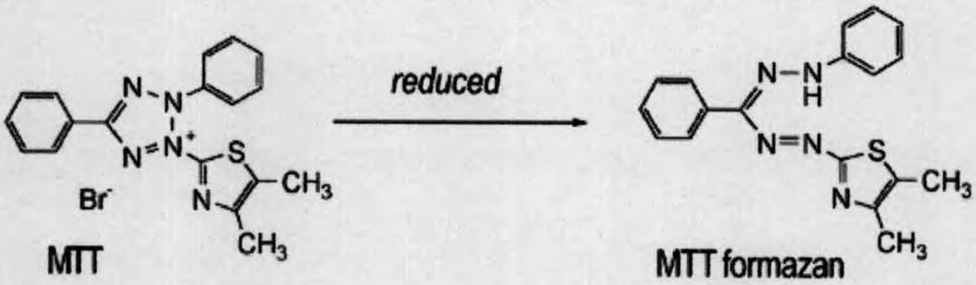


รูปที่ 2.26 การตรวจสอบด้วยทริปแพนบลู (ก) โหลดเซลล์ที่ย้อมสีลงใน hemacytometer (ข) การนับเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายที่กำลังขยาย 100 เท่า (Unchern, 1999)

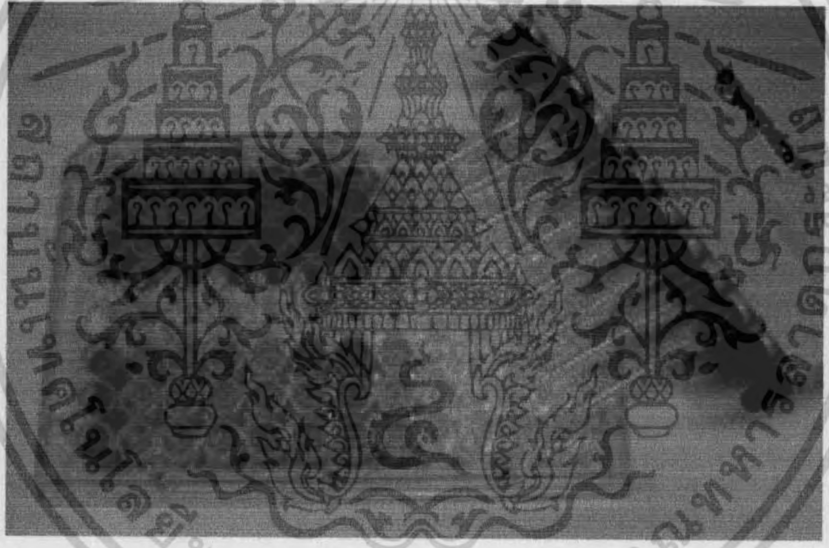
2.7.3 การตรวจสอบด้วยวิธี Methyl tetrazolium (MTT) (Wan และคณะ, 1994)

การตรวจสอบด้วยวิธี MTT เป็นวิธีที่ใช้เป็นเครื่องมือในการศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ในหลอดทดลอง โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะถูกอ่านค่าโดยใช้เครื่อง spectrophotometer โดยข้อดีการตรวจสอบด้วยวิธี MTT คือ เป็นวิธีที่ง่าย รวดเร็ว สะดวก ประหยัดและปลอดภัย โดยหลักการของการตรวจสอบด้วยวิธี MTT คือ สาร MTT ซึ่งอยู่ในรูปสารละลายสีเหลืองสามารถเข้าสู่เซลล์ที่มีชีวิตได้เนื่องจากเซลล์จะนำสาร MTT ไปใช้เป็นพลังงานของเซลล์โดยนำเข้าสู่ไมโตคอนเดรียของเซลล์ และเอนไซม์ซัคซิเนทดีไฮโดรจีเนส ที่มีอยู่ในไมโตคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิตจะเปลี่ยนสารละลาย MTT ไปเป็นผลึกฟอร์มาซานสีม่วง ดังรูปที่ 2.27 ซึ่งผลึกฟอร์มาซานนี้จะแสดงถึงจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นจึงสามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกันได้ โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะมีสีม่วงของผลึกฟอร์มาซาน ส่วนเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ดังรูปที่ 2.28 แต่เนื่องจากผลึกฟอร์มาซานมีความเป็นพิษต่อเซลล์จึงทำให้เซลล์ตายในที่สุด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 2.27 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ MTT เป็นผลึกฟอร์มาซาน ในไมโตคอนเดรีย (www.dojindo.com)



รูปที่ 2.28 การเปรียบเทียบเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้ว เมื่อทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT ใน 96-well plate (www.nikoderm.com/jyudakushiken/saibo.html)

2.8 ชนิดของเซลล์

การเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นบ่อยครั้งอาจทำการพิจารณาจำแนกการเพาะเลี้ยงได้จาก รูปร่างลักษณะของเซลล์ที่ปรากฏหรือทำการจำแนกจากลักษณะอื่นๆ ซึ่งสามารถแบ่งรูปร่างลักษณะของเซลล์เบื้องต้นได้ 3 ลักษณะ คือ (1) Epithelial ซึ่งเซลล์จะมีลักษณะหลายเหลี่ยม และมีความสามารถในการยึดเกาะพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยงได้ (2) Lymphoblast ซึ่งเป็นเซลล์ที่ไม่มีความสามารถในการยึดเกาะพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง แต่สามารถเจริญแบบแขวนลอยได้ (3) Fibroblast ซึ่งเป็น

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เซลล์ที่มีความสามารถในการยึดเกาะพื้นผิวของภาชนะเพาะเลี้ยง และมีลักษณะเซลล์ยืดยาว หรือเป็นรูปกระสวยก็ได้ (Ryan, 2003)

2.8.1 เซลล์ไลน์ mouse connective tissue fibroblast (L929) (http://www.dsmz.de/mutz/mutz002.htm)

เซลล์ไลน์ L929 เป็นเซลล์ไลน์ที่เจริญแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ในการเพาะเลี้ยงจะใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM 90% ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ หรืออาจใช้อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ RPMI 90 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 10 เปอร์เซ็นต์ โดยใช้เวลาประมาณ 3-4 วัน เซลล์จึงจะเจริญเต็มภาชนะเพาะเลี้ยง จากนั้นจึงทำการ subculture โดยใช้เอนไซม์ ทริปซินที่ความเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ แล้วบ่มในตู้บ่มที่มีอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ การเก็บเซลล์แช่แข็งจะเก็บในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM หรือ RPMI 70 เปอร์เซ็นต์ ที่มี fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์ และ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ ภาพเซลล์ไลน์ L929 แสดงดังรูปที่ 2.29

รูปที่ 2.29 เซลล์ไลน์ L929 ที่กำลังขยาย 200 เท่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 3
อุปกรณ์และวิธีการทดลอง

3.1 การเตรียมสารสกัดจากจักรนารายณ์

3.1.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากจักรนารายณ์

- ใบจักรนารายณ์
- ตู้อบลมร้อน
- ถาด
- เครื่องปั่น
- ผ้าขาวบาง
- ขวดดูแรน
- เครื่องกรองแบบลดความดัน
- กระดาษกรองเบอร์ 1
- กระดาษฟรอยด์
- ขวดสีชา
- เครื่องระเหยแบบหมุน

3.1.2 สารเคมีที่ใช้ในการเตรียมสารสกัดจากจักรนารายณ์

- เอทานอล
- น้ำกลั่น

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

3.2.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

- เซลล์ไลน์ L929
- ผ้าก๊อซ
- สำลี
- ปิเปตแก้ว
- ตู้ควบคุมอุณหภูมิ
- ตู้ปลอดเชื้อ
- ออโตปิเปต
- คีมคีบ
- ภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

- กล้องจุลทรรศน์แบบประกอบ
- กล้องจุลทรรศน์แบบ inverted
- เครื่องปั่นเหวี่ยง
- หลอดปั่นเหวี่ยง
- ขวดดูแรน
- ทิปขนาดต่าง ๆ
- ตู้เย็น

3.2.2 สารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

- แอลกอฮอล์ 70%
- Phosphate buffer saline (PBS)
- Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)
- Fetal bovine serum (FBS)
- EDTA
- Trypsin 0.25%
- สารสกัดจากต้นจักรนารายณ์
- Freezing media
- Gentamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

3.3 การทดสอบด้วยวิธี MTT

3.3.1 วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี MTT

- 96-well plate
- มัลติเปิลแชนแนล
- ไมโครเพลท รีดเดอร์

3.3.2 สารเคมีที่ใช้ในการทดสอบด้วยวิธี MTT

- MTT
- Organic solvent (ethanol:DMSO ในอัตราส่วน 1:1)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารสกัดจากจักรนารายณ์

สกัดสารจากต้นจักรนารายณ์อย่างง่ายโดยใช้ตัวสกัด คือ เอทานอลหรือน้ำกลั่น ดังนี้ นำใบของต้นจักรนารายณ์มาล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบในตู้อบที่อุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

จนแห้งสนิทซึ่งจะใช้เวลาประมาณ 2 วัน โดยสามารถสังเกตได้จากลักษณะของใบจักรนารายณ์จะแห้งกรอบ มีสีเขียวไม่เป็นสีน้ำตาล หลังจากนั้นนำมาบดด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้มีขนาดเล็กลง หลังจากนั้นชั่งน้ำหนักผงแห้งของใบจักรนารายณ์ประมาณ 1.5-2 กรัมบรรจุลงในถุงผ้าขาวบางที่เตรียมไว้ แล้วใส่ลงในโหลแก้วที่เติมเอทานอลหรือน้ำกลั่น ปริมาตร 100 มิลลิลิตร โดยเติมให้ท่วมใบจักรนารายณ์ แช่ทิ้งไว้เป็นเวลา 7 วัน นำสารละลายที่มีสารสกัดจากใบจักรนารายณ์นั้นไปกรองด้วยเครื่องกรองแบบลดความดัน แล้วบรรจุในขวดสีชาเพื่อนำไปแยกตัวทำละลายออกและทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยใช้เครื่องระเหยแบบหมุน(rotary evaporator) แล้วนำมาเจือจางตามระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยใช้อาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์ แล้วเก็บไว้ในขวดสีชาแช่ตู้เย็นเพื่อเก็บไว้ใช้ต่อไปเป็น stock สารสกัดที่ได้นั้นสามารถนำไปใช้ทดสอบกับเซลล์ซึ่งจะกล่าวถึงในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์ต่อไป

3.4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

3.4.2.1 การ subculture

ทำการเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 โดยใช้อาหาร DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS และยาปฏิชีวะนะ gentamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ในภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์โดยในการเพาะเลี้ยงเซลล์นั้นจะต้องทำการเปลี่ยนอาหารเพื่อการคงอยู่ของเซลล์และต้องทำการ subculture เพื่อเป็นการเพิ่มจำนวนเซลล์ อายุของเซลล์ และทำให้เซลล์มีการเจริญต่อไปได้ ซึ่งการ subculture นั้นมีวิธีการปฏิบัติ 2 แบบ โดยแบบที่ 1 คือ นำเซลล์ไลน์ L929 ที่เลี้ยงอยู่ในฟลาสก์มาล้างด้วย PBS 2–3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลั้วให้ทั่วเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ แล้วใช้มือเคาะภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะจนหมด เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะแล้วทำการเติม DMEM ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วแบ่งเป็น 2 ฟลาสก์ใหม่ ฟลาสก์ละ 1 มิลลิลิตรและเติม DMEM ในแต่ละฟลาสก์ ให้ได้ปริมาตร 3 มิลลิลิตร ส่วนแบบที่ 2 คือ นำเซลล์ไลน์ L929 ที่เลี้ยงอยู่ในฟลาสก์มาล้างด้วย PBS 2–3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลั้วให้ทั่วเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ แล้วใช้มือเคาะภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะจนหมด เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะแล้วทำการเติม DMEM ปริมาตร 3 มิลลิลิตรโดยไม่มีการเปลี่ยนฟลาสก์ และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์จนได้เซลล์ที่แข็งแรงมีสุขภาพดีจึงทำการย้ายสู่ 96-well plate เพื่อนำไปใช้ทดสอบกับสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ต่อไป

3.4.2.2 การทำ cryopreservation

นำเซลล์เซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงอยู่ในฟลาสก์มาล้างด้วย PBS 2–3 ครั้ง แต่ละครั้งใช้ปริมาตร 2 มิลลิลิตร แล้วใส่สารละลายเอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

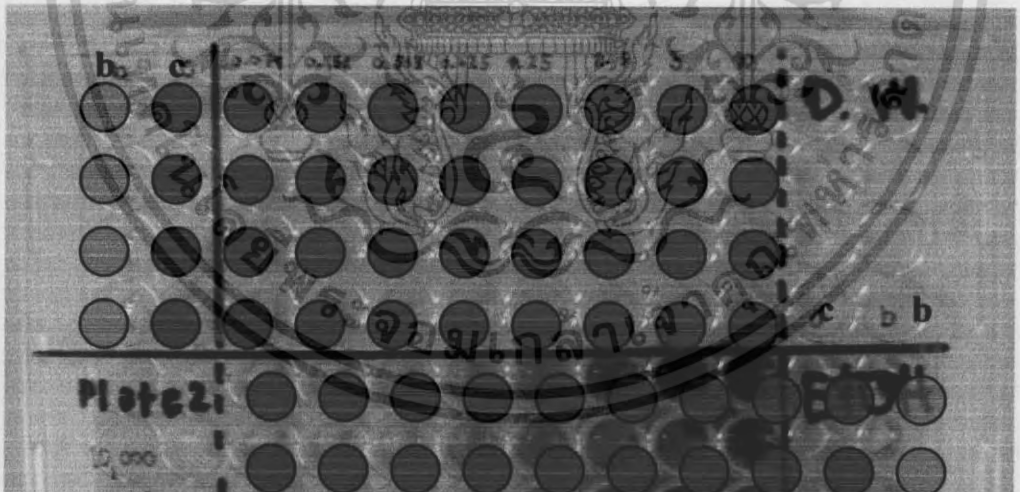
ปริมาตร 1 มิลลิลิตร กลั้วให้ทั่วเพื่อให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะ แล้วใช้มือเคาะภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อทำให้เซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะจนหมด เมื่อเซลล์หลุดออกจากพื้นผิวยึดเกาะแล้วทำการเติม DMEM ปริมาตร 3-4 มิลลิลิตร แล้วทำการดูดเซลล์ทั้งหมดใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง และนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 1100 รอบต่อนาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วเทส่วนใสทิ้ง และละลายเซลล์ที่ตกตะกอนด้วย freezing media ปริมาตร 1 มิลลิลิตร และนำไปใส่ใน cryopreservation tube แล้วค่อย ๆ ลดอุณหภูมิลง โดยนำไปเก็บในตู้เย็น -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 1 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงย้ายไปเก็บที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

3.4.3.3 การทดสอบความเป็นพิษของจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

ในการทดสอบด้วยวิธี MTT นั้น ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 โดยการปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลง ในแต่ละหลุมของ 96- well plate โดยวางแผนผังการทดลองดังรูปที่ 3.1 โดยแถวที่เป็นกลุ่มควบคุม (control) และแถวที่เป็นกลุ่มการทดลองที่จะใส่สารสกัดจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่างๆนั้นจะต้องทำการปลูกเซลล์เริ่มต้นจำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ส่วนแถวที่เป็น blank นั้นใส่ DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ FBS และยาปฏิชีวนะ gentamycin 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ไม่ต้องทำการปลูกเซลล์ลงไปในหลุม



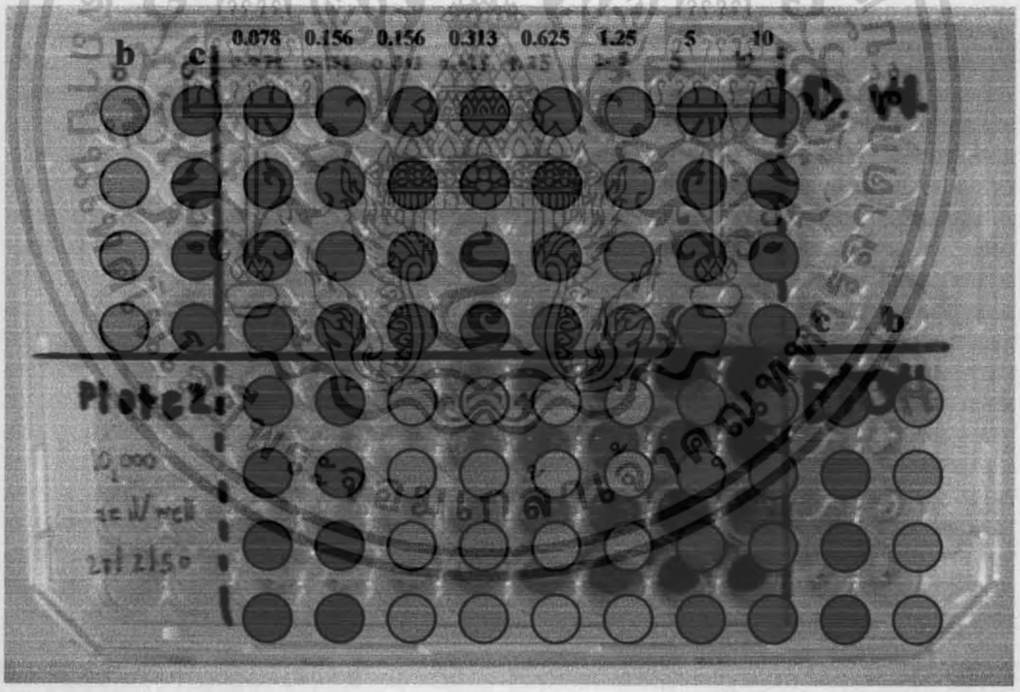
รูปที่ 3.1 แผนผังการทดลองการปลูกเซลล์จำนวน $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ใน 96-well plate โดยสัญลักษณ์ b คือ blank สัญลักษณ์ c คือ กลุ่มควบคุม

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์

ทำการทดสอบสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์โดยใส่สารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.313 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ โดยนำ 96- well plate ที่มีเซลล์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ 24 ชั่วโมง คว่ำลงบนกระดาษเพื่อซับเอาอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงออกให้หมด แล้วจึงใส่สารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ลงในแต่ละหลุมใน 96- well plate หลุมละ 100 ไมโครลิตร ส่วนหลุมที่เป็นกลุ่มควบคุมและ blank นั้นให้เติม DMEM ที่ไม่เติม FBS และยาปฏิชีวนะ และบริเวณด้านบนของ 96-well plate นั้นใส่สารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ ส่วนบริเวณด้านล่างของ 96-well plate นั้นใส่สารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ ดังรูปที่ 3.2



รูปที่ 3.2 แผนผังการทดลองการใส่สารสกัดจากจักรนารายณ์ ใน 96-well plate ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

หลังจากนั้นนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบด้วยวิธี MTT

เตรียมสารละลาย MTT โดยละลายผง MTT ใน PBS โดยให้มีความเข้มข้นเท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เทสารสกัดจากจักรนารายณ์ออกจากหลุมให้หมด แล้วเติม DMEM ที่ไม่เติมซีรัมและยาปฏิชีวนะลงไปหลุมละ 100 ไมโครลิตร จากนั้นเติมสารละลาย MTT ลงในแต่ละหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร และนำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมงโดยต้องเก็บให้พ้นแสง เมื่อบ่มจนครบเวลา ให้นำ 96-well plate ออกจากตู้บ่ม แล้วเทอาหารที่มีสารละลาย MTT ออกอย่างรวดเร็ว โดยการคว่ำ 96-well plate ลงบนกระดาษซับ และเติมสารละลายอินทรีย์ (DMSO:ethanol ในอัตราส่วน 1:1) หลุมละ 100 ไมโครลิตร เพื่อใช้ละลายผลึกฟอร์มาซานสีม่วงให้อยู่ในรูปสารละลาย แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 นาที และวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องไมโครเพลทรีดเดอร์ (microplate reader) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร แล้วนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ดังนี้

$$\text{\% การมีชีวิตรอดของเซลล์} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ใส่สารที่ต้องการทดสอบ}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของหลุมที่ควบคุม}}$$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 4
ผลการทดลองและอภิปรายผล

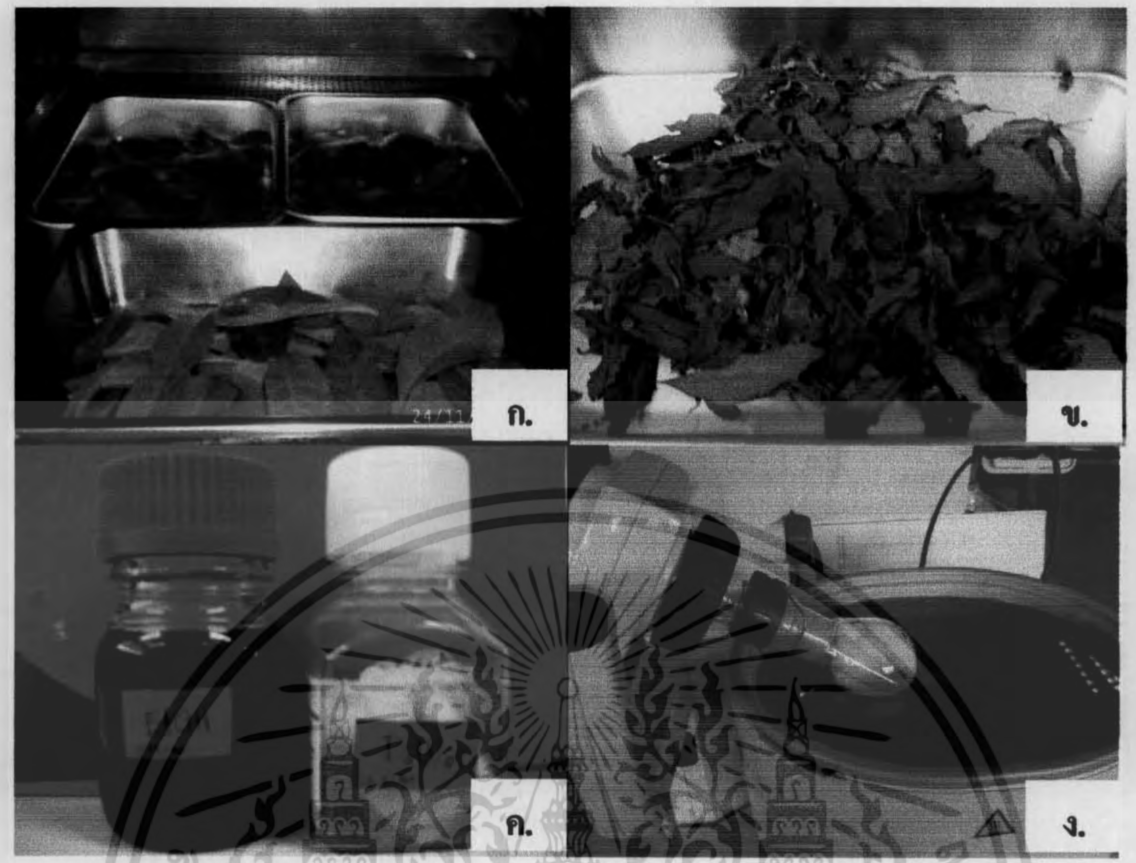
4.1 การสกัดสารจากจักรนารายณ์

จากการศึกษาการสกัดสารจากจักรนารายณ์พบว่า หลังจากนำใบจักรนารายณ์สดน้ำหนัก 195.53 กรัม มาล้างให้สะอาดแล้วนำไปอบในตู้อบพืชที่อุณหภูมิ 45 องศาเซลเซียส 2 วัน จนได้ใบจักรนารายณ์แห้ง น้ำหนัก 13.105 กรัม คงที่ หลังจากนั้นนำไปบดด้วยเครื่องปั่นเพื่อให้มีขนาดเล็กลง จะได้ใบจักรนารายณ์บดแห้ง 12.730 กรัม แล้วนำมาสกัดสารออกจากใบจักรนารายณ์โดยการนำใบจักรนารายณ์บดแห้ง 1.5–2 กรัมมาบรรจุลงในถุงผ้าขาวบาง มัดปากถุงแล้วใส่ลงในขวดที่ปิดสนิทแล้วแช่ในตัวทำละลายอินทรีย์คือ เอทานอล และน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร เป็นเวลา 7 วัน จึงนำสารสกัดจากใบจักรนารายณ์ในชั้นของเอทานอลและน้ำกลั่นไปกรองด้วยเครื่องกรองแบบลดความดัน แล้วบรรจุลงในขวดแก้ว ซึ่งลักษณะของสารสกัดจักรนารายณ์ในชั้นของเอทานอลและน้ำกลั่นนั้นแสดงในตารางที่ 4.1 หลังจากนั้นนำไปแยกตัวทำละลายออก และทำให้สารสกัดมีความเข้มข้นเพิ่มขึ้นโดยการใช้เครื่องระเหยแบบหมุน ดังรูปที่ 4.1 จนได้สารสกัดเอทานอลและน้ำกลั่นอย่างหยาบจากจักรนารายณ์แล้วนำมาเจือจางในอาหาร DMEM ให้ได้ระดับความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เก็บในตู้เย็นเป็น stock ดังรูปที่ 4.2 แล้วทำการเจือจาง 2 เท่า จนได้ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.313 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร 0.156 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และ 0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับเพื่อใช้ในการทดลองต่อไป ดังรูปที่ 4.3

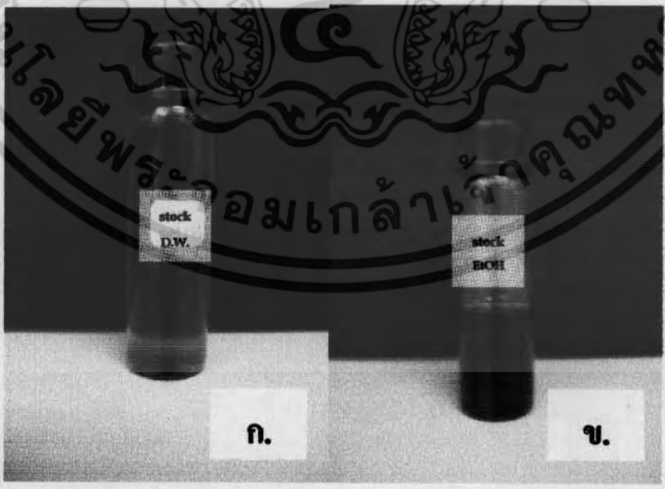
ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะของสารสกัดจากจักรนารายณ์ในชั้นของเอทานอลและน้ำกลั่น

สารสกัดจากจักรนารายณ์	ลักษณะของสารสกัด
ชั้นของสารสกัดเอทานอล	สีเขียวเข้ม ไม่เหนียวหนืด
ชั้นของสารสกัดน้ำกลั่น	สีเหลืองขุ่นไม่ใส เหนียวหนืด

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.1 ภาพแสดงขั้นตอนการสกัดสารสกัดจากจักรนารายณ์ (ก) ใบจักรนารายณ์สด (ข) ใบจักรนารายณ์อบแห้ง (ค) ใบจักรนารายณ์บดแห้งที่แช่ในเอทานอลและน้ำกลั่น (ง) การระเหยสารสกัดจากจักรนารายณ์ด้วยเครื่องระเหยแบบหมุน

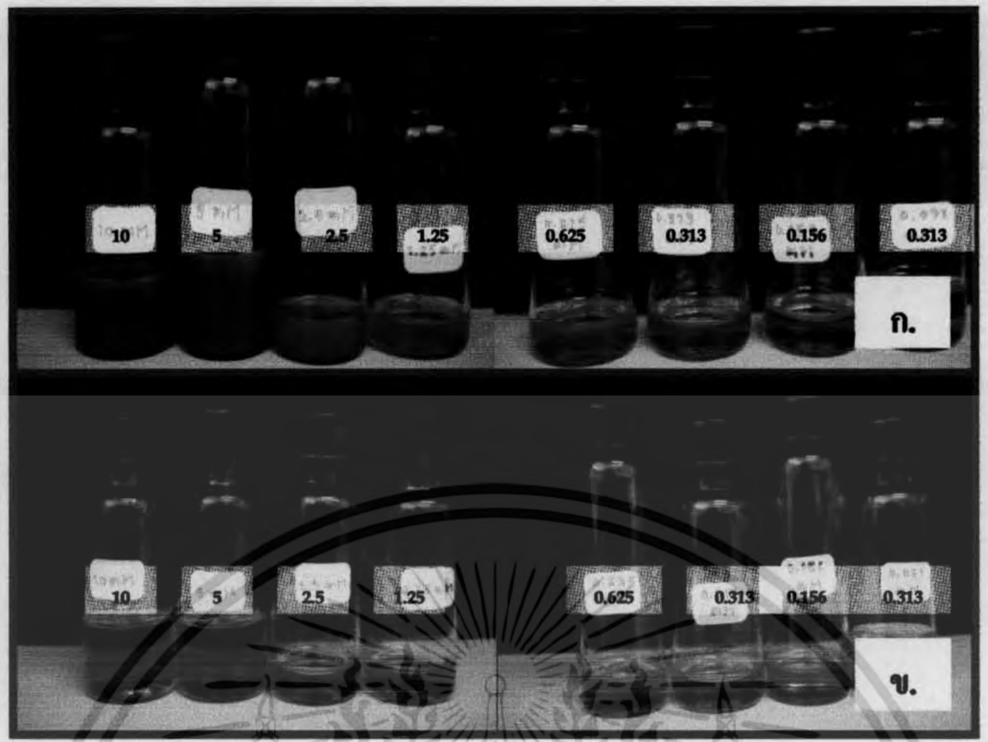


รูปที่ 4.2 แสดงตัวอย่างสารสกัดจากจักรนารายณ์

(ก) สารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์เมื่อทำการเจือจางด้วยอาหาร DMEM

(ข) สารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์เมื่อทำการเจือจางด้วยอาหาร DMEM

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.3 แสดงตัวอย่างความเข้มข้นระดับต่างๆของสารสกัดจากจักรนารายณ์

(ก) สารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์เมื่อทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

(ข) สารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์เมื่อทำการเจือจางที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ

4.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

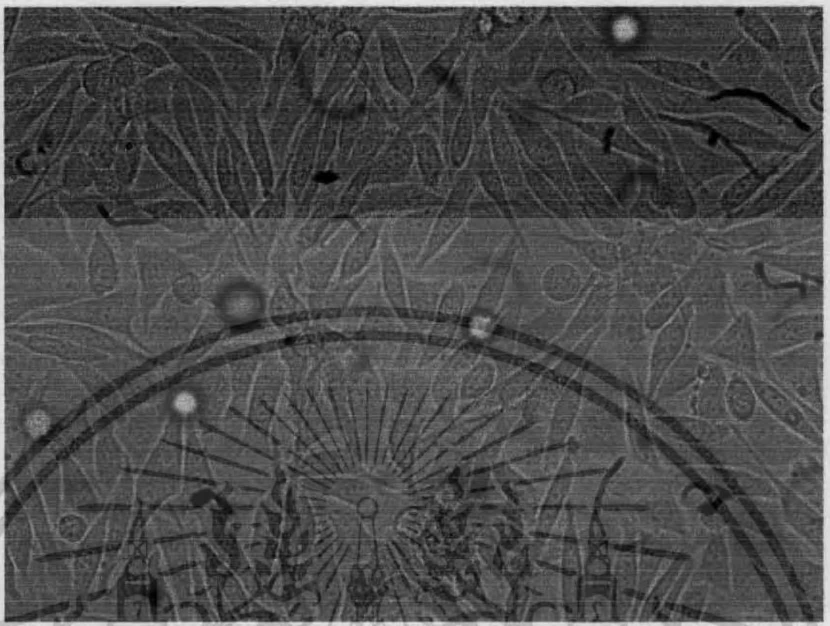
4.2.1 การ subculture

จากการเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929 ดังรูปที่ 4.4 เป็นเวลานานนั้น เมื่อเซลล์มีอายุมากขึ้นและตายในที่สุด จึงทำให้ต้องมีการ subculture เพื่อเป็นการเพิ่มอายุของเซลล์ ทำให้ต้องทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ต่อไปอีกระยะหนึ่ง การ subculture นั้นเป็นการชักนำให้เซลล์ที่เกาะอยู่บนพื้นผิวหลุดออกจากภาชนะที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงโดยใช้เอนไซม์ทริปซินเข้มข้น 0.25 เปอร์เซ็นต์ เพื่อทำลายพันธะโปรตีนที่ยึดเกาะกับพื้นผิวภาชนะ โดยเซลล์ที่มีลักษณะเป็นไฟโบรบลาสต์จะหดสั้นจนมีลักษณะกลม แล้วทำให้เซลล์ยึดเกาะกับพื้นผิวใหม่และเกิดการแบ่งเซลล์ต่อไปจนเต็มพื้นผิวได้ ดังรูปที่ 31

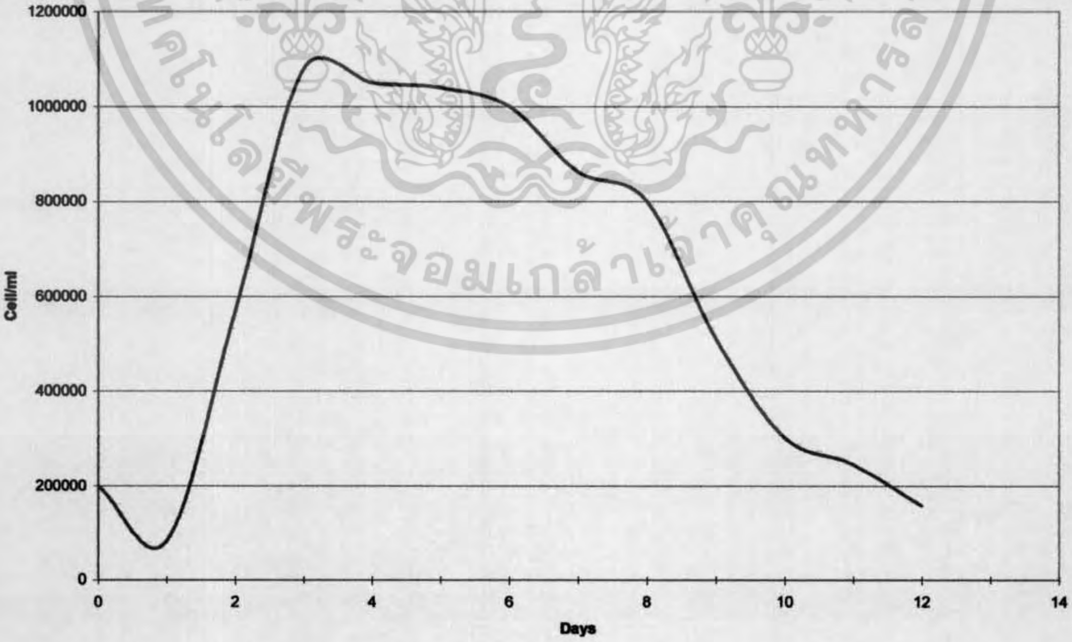
จากการศึกษากราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ดังรูปที่ 4.5 นั้น สามารถคำนวณค่า Population doubling time (PDT) โดยใช้วิธีการคำนวณของ McAteer และ Davis (1994) ได้เท่ากับ 29.63 ชั่วโมง และใช้วิธีการคำนวณของ Mitsuhashi และคณะ (2002) ได้ค่า PDT เท่ากับ 29.61 ชั่วโมง จากค่า PDT ที่คำนวณได้นั้นสามารถบอกได้ว่า เซลล์ L929 นั้นมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนจาก

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

1 เซลล์ เป็น 2 เซลล์ ภายในเวลา 29.6 ชั่วโมง หรือประมาณ 2 วัน จึงควรทำการ subculture เซลล์ไลน์ L929 เมื่อทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไปได้ 2-3 วัน



รูปที่ 4.4 ลักษณะของเซลล์ที่เกาะพื้นผิวแล้วซึ่งอยู่ในระยะอินเตอร์เฟส และเซลล์ที่มีลักษณะกลมซึ่งอยู่ในระยะเมทาเฟส ที่กำลังขยาย 200 เท่า

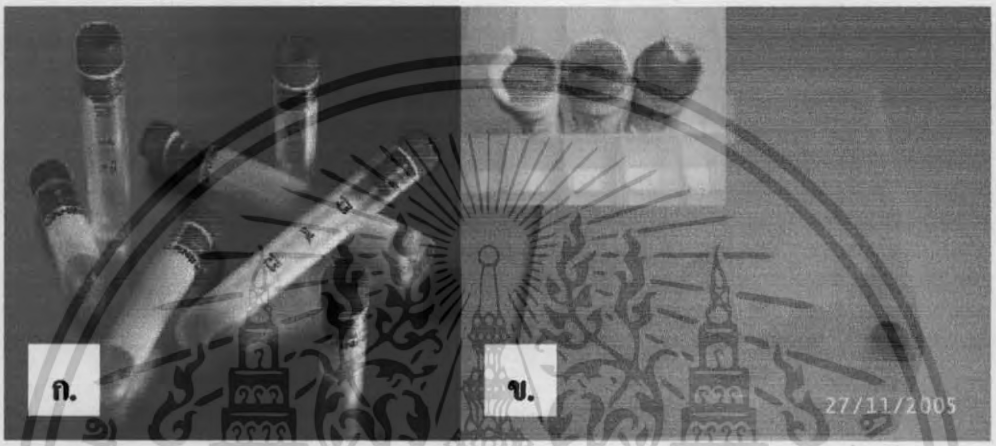


รูปที่ 4.5 กราฟการเจริญของเซลล์ไลน์ L929 ที่ passage 30 เป็นเวลา 12 วัน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.2.2 การ Cryopreservation

การทำ cryopreservation นั้นเป็นการเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำ (-80 องศาเซลเซียส) เพื่อเป็นการเก็บรักษาเซลล์ไว้ใช้ในอนาคต ป้องกันกันปนเปื้อนจากจุลินทรีย์และป้องกันการกลายพันธุ์โดยการ cryopreservation นั้นจะทำการเก็บเซลล์ไว้ใน cryopreservative tube ที่มี freezing media ซึ่งประกอบด้วย อาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ DMEM 70 เปอร์เซ็นต์ fetal bovine serum 20 เปอร์เซ็นต์ DMSO 10 เปอร์เซ็นต์ แล้วนำไปแช่ไว้ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส ดังรูปที่ 4.6



รูปที่ 4.6 ภาพการแสดงการ cryopresentaion (ก.) cryopreservation tube
(ข.) การเก็บรักษาเซลล์ที่อุณหภูมิ -80 องศาเซลเซียส

โดยทำการเก็บเซลล์ที่อุณหภูมิต่ำเป็นเวลา 1 เดือน ซึ่งเมื่อนำเซลล์มา thaw และ recovery จะได้เซลล์ที่มีลักษณะคงเดิมไม่มีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง ดังรูปที่ 4.7

รูปที่ 4.7 แสดงภาพเซลล์ภายหลังการ cryopreservation ไว้เป็นระยะเวลา 1 เดือน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

4.3 การทดสอบความเป็นพิษของจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

ขั้นตอนที่ 1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ไลน์ L929

จากการปลูกเซลล์ L929 ลงใน 96-well plate โดยให้มีปริมาณเซลล์เริ่มต้น $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร นำไปบ่มในตู้ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง พบว่าเซลล์เจริญเติบโตเพิ่มขึ้นจนเกือบเต็มหลุม ดังรูปที่ 4.8

รูปที่ 4.8 เซลล์ไลน์ L929 หลังจากการปลูกเซลล์เริ่มต้น $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ลงใน 96-well plate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่กำลังขยาย 40 เท่า

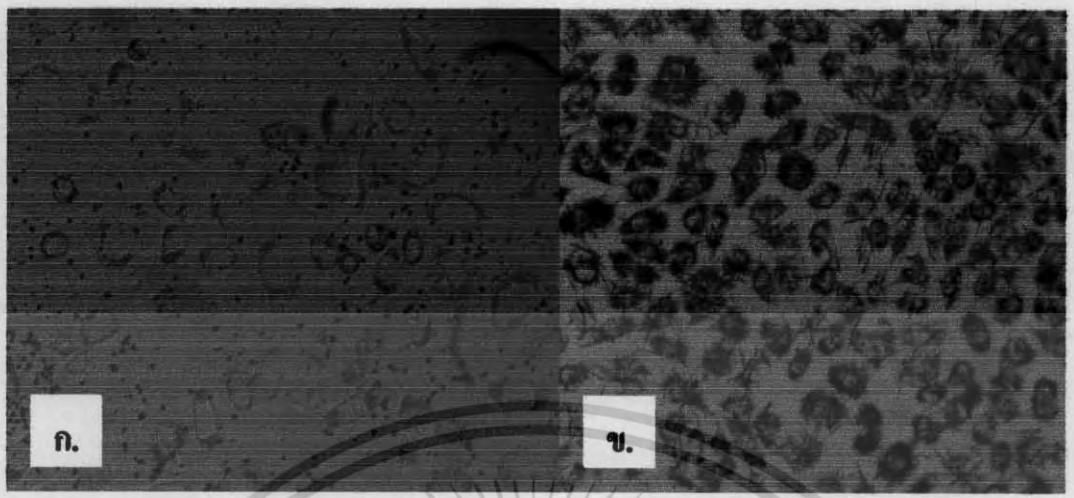
ขั้นตอนที่ 2 การทดสอบสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์

จากการทดสอบสารสกัดจากจักรนารายณ์ ทั้งสารสกัดจากเอทานอลและสารสกัดจากน้ำกลั่น ที่ความเข้มข้น 0 – 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate ที่ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์ไว้ จำนวน 8 ซ้ำ แล้วบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ขั้นตอนที่ 3 การทดสอบด้วยวิธี MTT

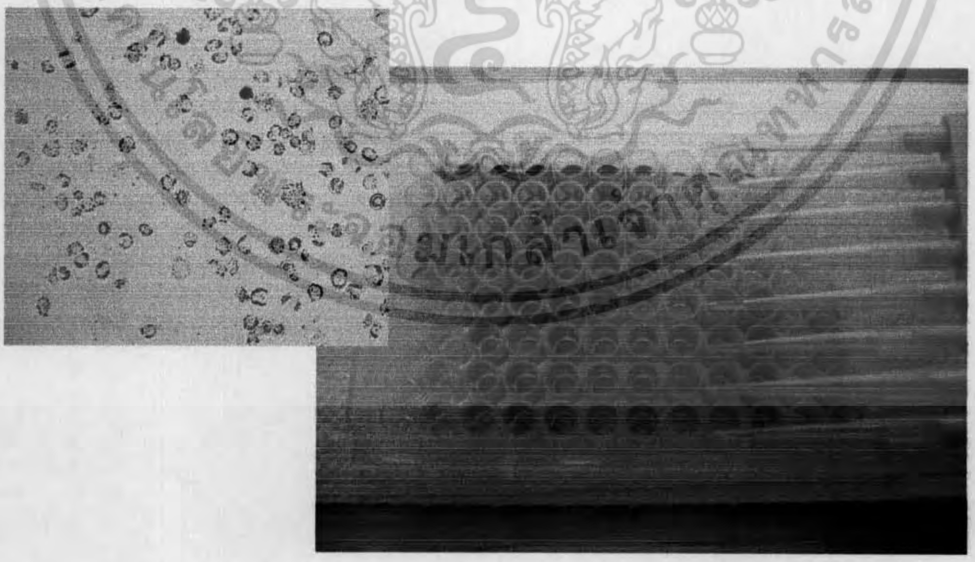
จากการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ไลน์ L929 ด้วย MTT assay ทำให้สามารถแยกเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้วออกจากกันได้ โดยเซลล์ที่มีชีวิตนั้นจะติดสีม่วงส่วนเซลล์ที่ตายจะมีลักษณะใสไม่มีสี ดังรูปที่ 4.9

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.9 เซลล์ L929 ที่ได้รับการทดสอบด้วยวิธี MTT (ก.) เซลล์ L929 ที่ตาย (ข.) เซลล์ L929 ที่มีชีวิต

และเมื่อทำการล้างสีด้วยสารละลายอินทรีย์ คือ DMSO:ethanol ในอัตราส่วน 1:1 จะทำให้เซลล์แตกและสีที่อยู่ในเซลล์จะละลายออกมาอยู่ในสารละลาย ทำให้สารละลายเป็นสีม่วง ดังรูปที่ 4.10



รูปที่ 4.10 ผลของเซลล์ที่ทดสอบด้วยสารสกัดจากจักรนารายณ์หลังจากตรวจสอบด้วยวิธี MTT

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เมื่อนำ 96 well plate ที่มีสารละลายสีม่วงของผลึกฟอร์มาซานไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร แล้วนำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ได้ดังตารางที่ 4.2

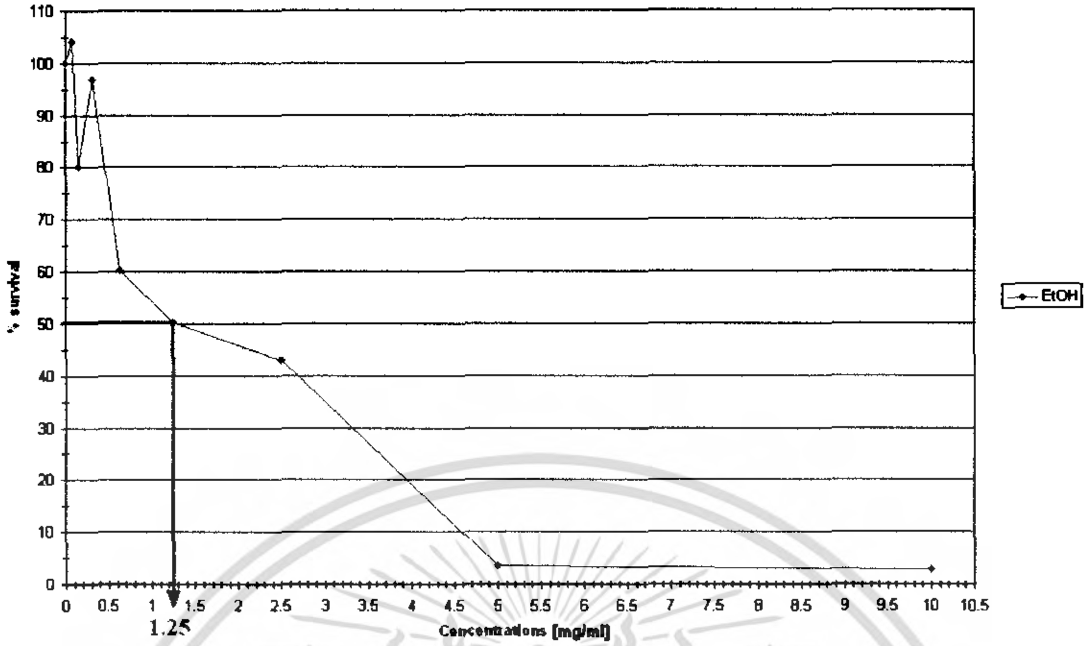
ตารางที่ 4.2 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ *L929* จากการทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์

ซ้ำที่		ความเข้มข้น [มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร]								
		0	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
1	หลุม 1	100	86.16	66.09	73.01	34.60	30.10	36.33	0	0
	หลุม 2	100	93.43	69.20	85.81	52.60	26.99	31.14	0	0
	หลุม 3	100	103.46	73.70	86.51	63.66	32.53	23.53	10.38	10.73
	หลุม 4	100	100.35	74.05	96.19	60.90	30.80	25.95	0	0
2	หลุม 1	100	93.68	84.58	118.97	69.96	54.15	48.22	0	0
	หลุม 2	100	120.55	102.77	100.79	61.66	71.93	60.87	9.09	5.14
	หลุม 3	100	113.44	88.14	112.25	74.31	78.66	62.85	9.09	5.93
	หลุม 4	100	122.13	82.61	101.58	64.43	77.08	54.55	0	0
เฉลี่ย		100	104.15	80.14	96.89	60.27	50.28	42.93	3.57	2.73

จากตารางที่ 4.1 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 จากการทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0.156-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมคือ เซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์มากกว่า 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้เซลล์ไลน์ L929 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดลดลงมากกว่า 50 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเทียบกับกับกลุ่มควบคุมที่มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ดังรูปที่ 4.11

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.11 กราฟแสดงความเข้มข้นของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์กับความอยู่รอดของเซลล์ ที่ทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ L929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละจุดบนกราฟนั้นเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากค่าการทดสอบ 8 ซ้ำ

กิจกรรมของเอนไซม์ในไมโตคอนเครียที่มีชื่อว่า ซัคซิเนทดีไฮโดรจีเนส (succinate dehydrogenase) นั้นสอดคล้องเป็นการบ่งชี้ถึงความอยู่รอดของเซลล์ได้ ซึ่งสามารถวัดได้จากการตรวจสอบด้วยวิธี MTT โดยสามารถบ่งบอกถึงความแตกต่างของเซลล์ที่มีชีวิตกับเซลล์ที่ตายแล้วได้คือ ภายในเซลล์ที่มีชีวิตนั้นจะมีเอนไซม์ซัคซิเนทดีไฮโดรจีเนส ซึ่งก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของสารละลาย MTT (tetrazolium salt) ไปเป็นผลึกสีม่วง (formazan)

จากการทดสอบพบว่า สารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์นั้นมีผลในการยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ซัคซิเนทดีไฮโดรจีเนส มีผลทำให้เซลล์ไลน์ L929 ตาย ซึ่งบ่งชี้ได้จากการเซลล์ที่ไม่สามารถเปลี่ยนแปลงสารละลาย MTT ให้เป็นผลึกฟอร์มาซานสีม่วงได้ ทำให้เห็นเป็นเซลล์ไลน์ L929 ที่ใสไม่มีสี โดยค่า CC_{50} (50 % Cytotoxicity Concentration) คือค่าความเข้มข้นที่เป็นพิษต่อเซลล์โดยทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เทียบกับกลุ่มควบคุม ซึ่งจากผลการทดสอบที่ได้นั้นสามารถหาค่า CC_{50} ได้จากกราฟคือ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากการนำเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ในระดับความเข้มข้น 0, 0.078, 0.156, 0.313, 0.6, 25, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 ซึ่งมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MTT โดยใช้ ethanol:DMSO ใน

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

อัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลายผลึกฟอร์มาซาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการทดสอบความเป็นของสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ดังตารางที่ 4.3

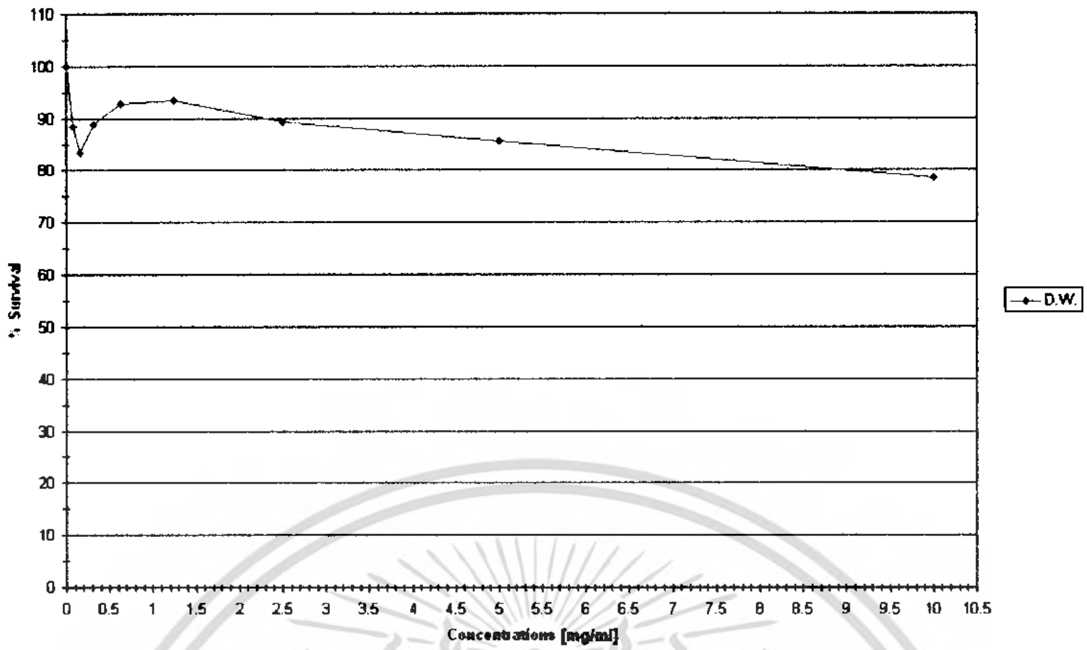
ตารางที่ 4.3 เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 จากการทดสอบด้วยสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์

ซ้ำที่		ความเข้มข้น [มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร]								
		0	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
1	หลุม 1	100	70.24	48.10	88.58	87.54	84.08	83.04	78.20	66.09
	หลุม 2	100	84.43	68.17	79.58	87.20	79.93	78.89	74.39	78.55
	หลุม 3	100	84.78	83.74	90.66	85.12	83.39	84.78	68.17	74.39
	หลุม 4	100	79.58	80.62	88.92	93.08	81.66	89.62	76.47	76.81
2	หลุม 1	100	95.65	90.12	96.84	102.77	97.63	83.00	90.51	74.70
	หลุม 2	100	90.51	87.75	88.54	90.51	90.91	87.35	81.03	85.77
	หลุม 3	100	94.47	105.14	91.70	93.28	98.02	105.93	110.67	90.51
	หลุม 4	100	107.51	103.16	85.38	102.77	132.41	100.79	105.53	82.61
เฉลี่ย		100	88.40	83.35	88.78	92.78	93.50	89.18	85.62	78.67

จากตารางที่ 4.3 แสดงเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 จากการทดสอบด้วยสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ พบว่า เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0.078-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นมีผลทำให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ลดลง แต่ไม่ถึง 50 เปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมคือเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอด 100 เปอร์เซ็นต์

เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ในแต่ละความเข้มข้นของสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์มาเขียนกราฟระหว่างความเข้มข้นของสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ L929 ดังรูปที่ 4.12

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้



รูปที่ 4.12 กราฟแสดงความเข้มข้นของสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์กับความอยู่รอดของเซลล์ที่ทำการ ตรวจสอบด้วยวิธี MTT เมื่อทดสอบกับเซลล์ไลน์ L 929 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง โดยแต่ละจุดบนกราฟนั้นเป็นค่าเฉลี่ยที่เกิดจากค่าการทดสอบ 8 ซ้ำ

จากการนำเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ในระดับความเข้มข้น 0, 0.078, 0.156, 0.313, 0.6, 25, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าไม่แสดงค่า CC_{50} ซึ่งที่ความเข้มข้นสูงที่สุดที่ใช้ในการทดสอบคือ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นพบว่าเซลล์ไลน์ L929 มีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดสูงถึง 78.68 เปอร์เซ็นต์ จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 ในหลอดทดลองในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT โดยใช้ ethanol:DMSO ในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลายผลึกฟอร์มาซาน และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

จากการศึกษาความเป็นพิษสารสกัดจากต้นจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร DMEM ที่มี FBS 10 เปอร์เซ็นต์ โดยการเติมสารสกัดเอทานอลและน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ในระดับความเข้มข้น 0, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT ส่วนสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 ที่ทำการเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองโดยมีค่า

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

CC_{50} เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อทำการทดสอบความเป็นพิษด้วยวิธี MTT โดยใช้สารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและใช้ DMSO:Ethanol ในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวละลายผลึกฟอร์มาซาน วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

โดยจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลองข้างต้นโดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย MTT เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น สอดคล้องกับการศึกษาของ Issa และคณะ (2003) ที่ทำการตรวจสอบความเป็นพิษของโมโนเมอร์จากเรซินในวัสดุเคลือบหลุมร่องฟัน คือ Bis-GMA, TEGDMA, HEMA, HPMA และDMAEMA ต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกของมนุษย์ด้วยวิธี MTT โดยใช้สารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าโมโนเมอร์จากเรซินชนิด Bis-GMA นั้นมีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อเหงือกมากที่สุด โดยมีค่า TC_{50} เท่ากับ 0.32 มิลลิโมลาร์ และสอดคล้องกับการศึกษาของ Aziz (2006) ที่ทำการตรวจสอบความอยู่รอดของตัวอสุจิในวัวด้วยวิธี MTT โดยใช้สารละลาย MTT ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

การใช้ DMSO เป็นตัวละลายผลึกฟอร์มาซานยังสอดคล้องกับการศึกษาของเบญจมาศ และคณะ (2546) ที่ทำการศึกษาการพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี MTT โดยใช้เซลล์ที่ถูกเตรียมจากม้ามของหนูเมาส์เพศเมียในการศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการละลายผลึกฟอร์มาซานระหว่าง DMSO และ Isopropanol พบว่า DMSO เป็นสารละลายอินทรีย์ที่มีความสามารถในการละลายผลึกฟอร์มาซานได้ดีกว่า Isopropanol

การศึกษาสารสกัดอย่างหยาบจากใบจักรนารายณ์นั้นสอดคล้องกับการศึกษาของ Iskender และคณะ (2002) ที่ทำการศึกษาฤทธิ์ในการลดการอักเสบติดเชื้อในหูหนูทดลองของสารสกัดอย่างหยาบจากใบจักรนารายณ์ โดยใช้สารสกัดจากใบจักรนารายณ์ 4 ชนิด คือ สารสกัดเอทานอล สารสกัดเฮกเซน สารสกัดโทลูอีน และสารสกัดน้ำกลั่น พบว่า สารสกัดจากเอทานอลมีฤทธิ์ในการลดการอักเสบติดเชื้อได้มากที่สุดโดยสามารถลดการอักเสบติดเชื้อได้ 62.5% สารสกัดเฮกเซนสามารถลดการอักเสบติดเชื้อได้ 44.6% สารสกัดโทลูอีนสามารถลดการอักเสบติดเชื้อได้ 34.8% และสารสกัดน้ำกลั่นนั้นไม่มีผลในการลดการอักเสบติดเชื้อในหูหนูทดลอง

จากการศึกษาของ Zhang และ Tan (2000) ที่ทำการศึกษาสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์ในการตรวจสอบเกี่ยวกับระดับน้ำตาลกลูโคส คลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูทดลอง พบว่าสารสกัดเอทานอลจากใบจักรนารายณ์สามารถลดระดับน้ำตาลกลูโคส คลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูทดลองได้ โดยความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด คือ 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งจากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจากจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ในหลอดทดลองพบว่าค่า CC_{50} ของสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์มีค่าเท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดังนั้นความเข้มข้น 0.15 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่เหมาะสมที่สุดในการลดระดับน้ำตาล

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

กลูโคส คลอเรสเตอรอลและไตรกลีเซอไรด์ในเลือดหนูทดลองนั้นอยู่ในระดับที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาถึงสารสำคัญในจักรนารายณ์โดย ศิริเพ็ญ และคณะ(2543) ทำการศึกษาทางพฤกษเคมีของสารต้านไวรัสเริมจากจักรนารายณ์ พบว่าสารสกัดเอทานอลมีคุณสมบัติต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ซึ่งเป็นไวรัสที่ทำให้เกิดโรคเริมและสารสำคัญที่ต้านไวรัสเฮอร์ปีส์ คือ สารผสมของกรดไดคาฟีออยดวินิก และจุฑามาศก์ (2544) ทำการศึกษาสูตรโครงสร้างและการวิเคราะห์ปริมาณสารสกัดและน้ำคั้นของจักรนารายณ์ด้วยเทคนิค HPLC ได้สาร phytosterol และ phytosteryl glucoside จากสารสกัดคลอโรฟอร์ม โดยปริมาณของ phytosteryl glucoside ในสารสกัดเอทานอล คือ 0.35% w/w และ 0.096% w/w

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

บทที่ 5
สรุปผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 สรุปผลการทดลอง

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดจักรนารายณ์ที่มีผลต่อเซลล์ L929 ในหลอดทดลอง ซึ่งทำการตรวจสอบด้วยวิธี MTT โดยใช้เซลล์เริ่มต้นเท่ากับ $5x10^4$ เซลล์ต่อมิลลิลิตร ในอาหาร DMEM ที่มี 10 เปอร์เซ็นต์ ของ FBS และยาปฏิชีวะนะ gentamycin เข้มข้น 50 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยทำการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาใส่สารสกัดเอทานอลและน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ที่ระดับความเข้มข้น 0, 0.078, 0.156, 0.313, 0.625, 1.25, 2.5, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แล้วทำการทดสอบความเป็นพิษจากสารสกัดจักรนารายณ์ด้วยวิธี MTT โดยใช้ความเข้มข้นของสารละลาย MTT เท่ากับ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และใช้ DMSO:ethanol ในอัตราส่วน 1:1 เป็นตัวทำละลายผลึกฟอร์มาซาน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร พบว่าสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 ในหลอดทดลอง ในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์ในช่วงความเข้มข้น 0-10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นั้นพบว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ L929 โดยมีค่า CC_{50} เท่ากับ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5.2 ข้อเสนอแนะ

5.2.1 ในการทดสอบสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ นั้นสารสกัดที่ใช้ผ่านการกรองด้วยแผ่นกรองที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 0.2 ไมครอน ซึ่งอาจทำให้สารบางตัวที่มีอยู่ในจักรนารายณ์ไม่สามารถผ่านได้ จึงควรทำการกรองที่ 0.4 ไมครอนเพิ่มเติม

5.2.2 ในการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจักรนารายณ์ในหลอดทดลอง ควรทำการทดลองเพิ่มจำนวนซ้ำ เพื่อให้ผลทดลองมีความถูกต้องแม่นยำขึ้น

5.2.3 ควรมีการทดสอบกับเซลล์ชนิดอื่น ๆ เพิ่มเติมเพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดจากจักรนารายณ์ในเซลล์

5.2.4 ควรมีการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากจักรนารายณ์ด้วยวิธีการทดสอบอื่นๆ เพื่อเพิ่มความถูกต้องแม่นยำของผลการทดลอง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า
ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เอกสารอ้างอิง

จุฑาธิป เขียววงศ์จันทร์, ชนิดา ชุ่มมาตย์ และ นิศาชล เศรษฐไกรกุล. 2547. ผลของสารสกัดจากไพลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวของคนในหลอดทดลอง. โครงงานพิเศษหลักสูตรวิทยาศาสตร์บัณฑิต ภาควิชาชีววิทยาประยุกต์ คณะวิทยาศาสตร์, สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง.

จุฑามาศก์ แสงไสย์. 2544. การแยก การพิสูจน์โครงสร้าง และการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญในสารสกัดและน้ำคั้นของแป๊ะตำปึงโดยใช้เทคนิคโครมาโตกราฟีที่ใช้แรงดันสูง. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชเคมีและพฤกษเคมี, มหาวิทยาลัยมหิดล.

เบญจมาศ จิครสมบูรณ์. 2546. การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน. สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์, มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี.

ศิริเพ็ญ จริเกษม. การศึกษาทางพฤกษเคมีของสารต้านไวรัสเริมจากแป๊ะตำปึง. 2543. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต ภาควิชาเภสัชเคมีและพฤกษเคมี บัณฑิตวิทยาลัย, มหาวิทยาลัยมหิดล.

วัลลภ วีชะรังสรรค์ และ ประณีต โอปณะโสภิต. 2547. ภาพรวมของอนุมูลอิสระและการทดสอบฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระในสารสกัดจากพืชในหลอดทดลอง. 2004. ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ องครักษ์ นครนายก.

Aziz D.M. 2006. Assessment of bovine sperm viability by MTT reduction assay. Animal Reproduction Science. 92:1-8.

Fotakis G., Timbrell J.A. 2006. In vitro cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. Toxicology Letters. 160:171-177.

Iskander M.N., Song Y., Couparand I.M. and Jiratchariyakul W. 2002. Antiinflammatory screening of the medicinal plant *Gynura procumbens*. Plant Foods for Human Nutrition. 57:233-244.

Issa Y., Watts D.C., Brunton P.A., Waters C.M. and Duxbury A.J. 2004. Resin composite monomers alter MTT and LDH activity of human fibroblast in vitro. Dental Materials. 20:12-20.

Mitsuhashi J., Hayasaka S. and Imanishi S. 2002. Contineous cell lines from the common white *Pieria Rapea Crucivora* Boisduval. In Vitro Cellular and Development Biology – Animal. 114-116.

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

McAteer J.A. and Davis J.M. 1994. "Basic Cell Culture, A Practical Approach," ed by Davis J.M. IRL Press at Oxford University Press, USA. 93-148.

Ryan J.A. 2003. Introduction to Animal Cell Culture. Life Sciences. Corning Incorporated. USA. 1-8.

Sangthong T., Areekijseree M. and Vajaratpimol R. 2005. Cytoxicity and genotoxicity of mouse derived (L929) cells exposed to cadmium chloride and cell viability assays. Science and Technology of Thailand at Suranaree University of Technology

Unchern S. 1999. Basic Technique in Animal Cell Culture. Drug Delivery System Workshop. 19-20.

Wan H., William R., Doherty P. and William D.F. 1994. A study of the reproducibility of the MTT test. Department of Clinical Engineering Faculty of Medicine, University of Liverpool, UK. 0957-4530.

Zhang X.F. and Tan B.K. 2000. Effects of an ethanolic extract of *Gynura procumbens* on serum glucose cholesterol and triglyceride levels in normal and streptomycin-induced diabetic rats. Singapore Med J. 41(1):9-13.

[Online]. Available: http://chemdb.niaid.nih.gov

[Online]. Available: http://en.wikipedia.org/wiki/Phytosterol

[Online]. Available: http://topicstock.pantip.com

[Online]. Available: http://www.aidthai.org

[Online]. Available: http://www.biotech-online.com

[Online]. Available: http://www.dsmz.de/mutzoo2.html

[Online]. Available: http://www.geocities.com/siammedherb

[Online]. Available: http://www.medplant.mahidol.ac.th

[Online]. Available: http://www.samunpai.com/xchange/index.php

[Online]. Available: http://www.siamhealthy.net

[Online]. Available: www.banlieusardises.com

[Online]. Available: www.buchi.com

[Online]. Available: www.canadavintage.com

[Online]. Available: www.cyberlipid.org

[Online]. Available: www.darjeelingtea.net

[Online]. Available: www.dojindo.com

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

[Online]. Available: www.gozips.uakron.edu

[Online]. Available: www.henriettesherbal

[Online]. Available: www.hyclone.com/news/rsm.html

[Online]. Available: www.nikoderm.com/jyudakushiken/saibo.html

[Online]. Available: www.pressureproductsindustries.com

[Online]. Available: www.twiningsfs.co.uk

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

ภาคผนวก

1. การเตรียม EDTA

ปริมาตรที่เตรียม 200 มิลลิลิตร

EDTA	40 มิลลิกรัม
PBS	200 มิลลิกรัม

1. ชั่ง EDTA 40 มิลลิกรัมใส่ลงในบีกเกอร์
2. เติม PBS 150 มิลลิลิตรแล้วใช้แท่งแก้วคนให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับปริมาตรโดยใช้ PBS ให้เป็น 200 มิลลิลิตรในกระบอกตวง
4. ใส่ขวดดูแรนและเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

2. การเตรียม PBS (1X)

ปริมาตรที่เตรียม 1000 mL

NaCl	8 กรัม
KCl	0.2 กรัม
KH_2HPO_2	0.2 กรัม
Na_2HPO_4	2.9 กรัม
น้ำกลั่น	

1. นำ NaCl, KCl, KH_2HPO_2, Na_2HPO_4 ใส่ในบีกเกอร์และเติมน้ำกลั่น 800 มิลลิลิตร
2. ใช้แท่งแก้วคนสารเคมีทั้งหมดให้ละลายเป็นเนื้อเดียวกัน
3. ปรับปริมาตรให้เป็น 1000 มิลลิลิตรในกระบอกตวงโดยใช้น้ำกลั่น
4. ใส่ขวดดูแรนและเข้าเครื่อง autoclave ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 20 นาที

3. การเตรียมเอนไซม์ทริปซิน 0.25 เปอร์เซ็นต์

ปริมาตรที่เตรียม 50 มิลลิลิตร

stock เอนไซม์ทริปซินความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร
น้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อ
EDTA

1. เติมน้ำกลั่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อปริมาตร 10 มิลลิลิตร ลงใน stock เอนไซม์ทริปซินผง ได้เอนไซม์ทริปซินที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

2. ดูด 5 เปอร์เซ็นต์ เอนไซม์ทริปซินที่มีความเข้มข้น 5 เปอร์เซ็นต์ ผสมกับ EDTA ปริมาตร 47.5 มิลลิลิตร ใส่ในขวดดูแรน และทำการฆ่าเชื้อโดยใช้การกรองผ่าน membrane filter

4. การเตรียม complete media

1. เตรียม DMEM : FBS ในอัตราส่วน 9:1
2. เติม Gentamycin 50 มิลลิกรัมต่อไมโครลิตร
3. ทำการกรองด้วย membrane filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตรและเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

5. การเตรียม freezing media

1. เตรียม DMEM : FBS : DMSO ในอัตราส่วน 7:2:1 จะได้ freezing media 10 มิลลิลิตร
2. ทำการกรองด้วย millipore filter ที่มีเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.22 ไมโครเมตร
3. เก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส

6. การเตรียมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ปริมาตรที่เตรียม 20 มิลลิลิตร

MTT ผง

PBS

1. ชั่งผง MTT 100 มิลลิกรัม
2. ละลายผง MTT ด้วย PBS 20 มิลลิลิตร

7. การเตรียมสารสกัดจากจักรนารายณ์

1. เตรียมสารสกัดเอทานอลหรือน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยชั่งสารสกัดจากจักรนารายณ์ 35 มิลลิกรัม ใส่ในอาหาร DMEM ปราศจาก FBS 3.5 มิลลิลิตร
2. ทำการเจือจางสารสกัดโดยเจือจาง 2 เท่าในอาหาร DMEM ที่ปราศจาก FBS จากความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 5, 2.5, 1.25, 0.625, 0.313, 0.156 และ 0.078 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

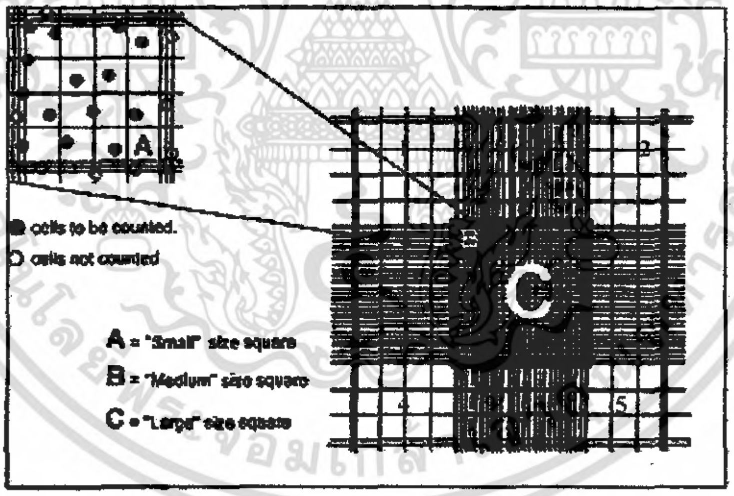
เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

8. วิธีการนับเซลล์และการคำนวณเซลล์

วิธีการนับเซลล์

1. เตรียมเซลล์ที่ต้องการนับจำนวน กรณีที่เป็นเซลล์ซึ่งเพาะเลี้ยงแบบเรียงตัวเป็นชั้นเดียว ต้องทำการขูดเซลล์ให้หลุดออกจากภาชนะเพาะเลี้ยงเสียก่อน
2. ดูดเซลล์แขวนลอย 40 ไมโครลิตร และทำการย้อมสีด้วยทริปแพนบลู 10 ไมโครลิตร
3. ทำความสะอาด coverslip และวางลงบน hemacytometer
4. ดูดเซลล์แขวนลอยที่ย้อมสีปริมาตร 10 ไมโครลิตร ใส่ในช่องทั้งสองด้านของ hemacytometer
5. ส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 10X หรือ 40X โดยเซลล์ที่มีชีวิตจะไม่ติดสีของทริปแพนบลู ส่วนเซลล์ที่ตายจะติดสีฟ้าหรือน้ำเงินของทริปแพนบลู
6. นับจำนวนเซลล์ใน 5 ช่องใหญ่ดังรูปที่ ก1 และบันทึกจำนวนเซลล์มีชีวิตและเซลล์ที่ตาย
7. ทำการคำนวณเซลล์ที่มีชีวิตต่อ 1 มิลลิลิตร โดยใช้สูตรต่อไปนี้

จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร = จำนวนเซลล์มีชีวิตเฉลี่ย X 10^4 X ค่าความเจือจาง (dilution factor)



รูปที่ ก1 การนับเซลล์โดยใช้ hemacytometer แบบ 5 ช่องใหญ่ (www.aqua.ait.ac.th)

ตัวอย่างการคำนวณที่ค่าการเจือจาง 5/4

เซลล์ที่ไม่ติดสีทริปแพนบลู ต่อ 1 ช่องใหญ่ (primary sguare)

Grid A   28 35 25 32 44 = 164 เซลล์

Grid B   30 32 26 40 29 = 157 เซลล์

รวม = 321 เซลล์

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

เฉลี่ย = 32.1 เซลล์

จำนวนเซลล์มีชีวิตต่อมิลลิลิตร = 32.1 x 10^4x 5/4 = 6.42 x 10^5 เซลล์ต่อมิลลิลิตร

9. การคำนวณหาค่า Population doubling time

9.1 ตารางแสดงการนับจำนวนเซลล์ไลน์ L929 เป็นเวลา 12 วัน

ระยะเวลาหลังจากปลูกเซลล์ (วัน)	จำนวนเซลล์มีชีวิต/มิลลิลิตร		ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต/มิลลิลิตร
	ซ้ำที่ 1	ซ้ำที่ 2	
0	2.00 x 10^5	2.00 x 10^5	2.00 x 10^5
1	0.823	0.815	0.819 x 10^5
2	5.75	5.59	5.67 x 10^5
3	10.89	10.71	10.80 x 10^5
4	10.63	10.37	10.50 x 10^5
5	10.45	10.35	10.40 x 10^5
6	10.08	9.92	10.00 x 10^5
7	8.73	8.53	8.63 x 10^5
8	8.00	8.02	8.01 x 10^5
9	5.12	5.12	5.12 x 10^5
10	3.00	3.06	3.03 x 10^5
11	2.56	2.36	2.46 x 10^5
12	1.57	1.57	1.57 x 10^5

9.2 วิธีการคำนวณของ McAteer และ Davis (1994) ซึ่งต้องหาค่าต่อไปนี้

9.2.1 Population doubling level (PDL) หรือ Generation number (*n*)

$n = 3.32 (\log N_H - \log N_I)$

N_I คือ จำนวนเซลล์ที่ปลูกตั้งต้น $N_I = 2.00 \times 10^5$ $\log N_I = 5.301$

N_H คือ จำนวนเซลล์ที่ปลูกตั้งต้น $N_H = 1.08 \times 10^5$ $\log N_H = 6.033$

แทนค่า $n = 3.32 (\log N_H - \log N_I)$

$n = 3.32 (6.033 - 5.301)$

$n = 2.43$

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9.2.2 Multiplication rate (r) และ Population doubling time (PDT)

Multiplication rate (r) คือจำนวน generation ต่อหน่วยเวลา ในที่นี้ใช้ 24 ชั่วโมง

$$\text{Multiplication rate (r)} = \frac{3.32 \times (\log N_H - \log N_I)}{(t_2 - t_1)}$$

แทนค่า

$$\text{Multiplication rate (r)} = \frac{3.32 \times n}{(t_2 - t_1)}$$

$$r = \frac{2.43}{(72 - 0)}$$

r = 0.034 ต่อชั่วโมง

r = 0.81 ต่อ 24 ชั่วโมง

Population doubling time (PDT) คือเวลา (ในที่นี้คิดเป็นชั่วโมง) ที่เซลล์เพิ่มจำนวนเป็น 2 เท่า มีค่าเป็นส่วนกลับกับค่า Multiplication rate

$$\text{Population doubling time (PDT)} = \frac{1}{r}$$

แทนค่า

$$PDT = \frac{1}{r}$$

$$PDT = \frac{1}{0.81/24}$$

$$PDT = \frac{24}{0.81}$$

PDT = 29.63 ชั่วโมง

9.3 วิธีการคำนวณของ Mitsuhasbi และคณะ (2002)

$$\text{Population doubling time (PDT)} = \frac{(t - t_0)\log 2}{(\log N - \log N_0)}$$

t_0 = เวลาที่นับจำนวนเซลล์ตั้งต้น (ชั่วโมงที่ 0 หรือ วันที่ 0)

t = เวลาที่เซลล์มีจำนวนสูงสุดก่อนที่จะลดจำนวนลง ในที่นี้คือชั่วโมงที่ 72

แทนค่า

$$PDT = \frac{(72 - 0)(3.01)}{(6.033 - 5.301)}$$

$$PDT = \frac{21.672}{0.732}$$

PDT = 29.61 ชั่วโมง

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้

9. ตารางแสดงค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรเมื่อทำการทดสอบด้วยวิธี MTT

9.1 ทดสอบด้วยสารสกัดน้ำกลั่นจากจักรนารายณ์

	blank	control	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
A	0.087	0.341	0.299	0.235	0.352	0.349	0.339	0.336	0.322	0.287
B	0.088	0.322	0.34	0.293	0.326	0.348	0.327	0.324	0.311	0.323
C	0.096	0.315	0.341	0.338	0.358	0.342	0.337	0.341	0.293	0.311
D	0.093	0.34	0.326	0.329	0.353	0.365	0.332	0.355	0.317	0.318
E	0.097	0.347	0.338	0.324	0.341	0.356	0.343	0.306	0.325	0.285
F	0.106	0.356	0.325	0.318	0.32	0.335	0.326	0.317	0.301	0.313
G	0.102	0.354	0.335	0.362	0.328	0.332	0.344	0.364	0.376	0.325
H	0.096	0.414	0.368	0.357	0.312	0.356	0.431	0.351	0.363	0.305

9.2 ทดสอบด้วยสารสกัดเอทานอลจากจักรนารายณ์

	blank	control	0.078	0.156	0.313	0.625	1.25	2.5	5	10
A	0.087	0.325	0.345	0.287	0.307	0.196	0.183	0.201	0.081	0.114
B	0.088	0.367	0.366	0.296	0.344	0.248	0.174	0.186	0.085	0.113
C	0.096	0.361	0.395	0.309	0.346	0.28	0.19	0.164	0.126	0.129
D	0.093	0.353	0.386	0.31	0.374	0.272	0.185	0.171	0.088	0.087
E	0.097	0.432	0.333	0.31	0.397	0.273	0.233	0.218	0.093	0.087
F	0.106	0.407	0.401	0.356	0.351	0.252	0.278	0.25	0.119	0.109
G	0.102	0.464	0.383	0.319	0.38	0.284	0.295	0.255	0.119	0.111
H	0.096	0.38	0.405	0.345	0.353	0.259	0.291	0.234	0.085	0.081

เอกสารนี้เป็นเอกสารที่สงวนไว้สำหรับการใช้งานเพื่อการศึกษาเท่านั้น ไม่อนุญาตให้นำไปใช้ประโยชน์ด้านการค้า ไม่ว่ากรณีใดๆ ทั้งสิ้น อีกทั้งห้ามมิให้ดัดแปลงเนื้อหา และต้องอ้างอิงถึงเจ้าของเอกสารทุกครั้งที่มีการนำไปใช้