โครงการ

การเรียนการสอนเพื่อเสริมประสบการณ์

ชื่อโครงการ **การสกัดและศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกระถินพิมาน**
Extraction of bioactive compounds from *Phellinus linteus*

ชื่อนิสิต **นางสาวปาณัสม์ แสงทองอร่าม** **เลขประจำตัว** **5933063223**

ภาควิชา **เคมี**

ปีการศึกษา **2562**

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

การสกัดและศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกระถินพิมาน

Extraction of bioactive compounds from *Phellinus linteus*

โดย

นางสาวปาณัสม์ แสงทองอร่าม

รายงานนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตร์บัณฑิต

ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2562

โครงการ การสกัดและศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกระถินพิมาน
โดย นางสาวปาณัสม์ แสงทองอร่าม

ได้รับอนุมัติให้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบโครงการ

1. ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์ ประธานกรรมการ
2. อาจารย์ ดร.ลักษณา ดูบาส กรรมการ
3. รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล อาจารย์ที่ปรึกษา

รายงานฉบับนี้ได้รับความเห็นชอบและอนุมัติโดยหัวหน้าภาควิชาเคมี

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล)
อาจารย์ที่ปรึกษา

.....
(รองศาสตราจารย์ ดร.วุฒิชัย พาราสุข)
หัวหน้าภาควิชาเคมี

วันที่ 1 เดือน กรกฎาคม พ.ศ. 2563

ชื่อโครงการ การสกัดและศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกระถินพิมาน
ชื่อนิสิตในโครงการ นางสาวปาณัสม์ แสงทองอร่าม เลขประจำตัว 5933063223
ชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล
ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2562

บทคัดย่อ

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพของเห็ดกระถินพิมาน โดยศึกษาสารออกฤทธิ์ที่มีอยู่ในสารสกัดที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำ และด้วยเอทานอล ทำให้ได้สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ และสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล ร้อยละ 0.20 และ ร้อยละ 3.30 น้ำหนักโดยน้ำหนักเห็ด ตามลำดับ ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานทั้งสอง มาทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งหมด 5 ชนิด เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) และเซลล์ปกติ (fibroblast cell) พบว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยน้ำ และเอทานอล เท่ากับ 190.7 และ IC_{50} 31.1 µg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานทั้ง 2 แบบยังมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ทั้ง 5 ชนิด โดยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยังเซลล์มะเร็งมากกว่า สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ ในขณะที่ผลการทดสอบกับเซลล์ปกตินั้น สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ มีฤทธิ์ที่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ ส่วนสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ที่ทำลายเซลล์ปกติบางส่วน โดยมี IC_{50} 117.1 µg/mL เมื่อพิจารณาลักษณะการตายของเซลล์พบว่าการตายของเซลล์มีทั้งแบบ Apoptosis และ Necrosis แบบ Coagulative necrosis

Project title Extraction of bioactive compounds from *Phellinus linteus*

Student Name Miss Panus Sangthongaram Student ID 5933063223

Advisor Name Associate Professor Dr.Surachai Pornpakakul, Ph.D.

Department of Chemistry, Faculty of Science, Chulalongkorn University, Academic Year 2019

Abstract

The objectives of this study were to study the bioactive substances from *Phellinus linteus* by studying the bioactive substances in the extract from water extraction and ethanol. The extraction using water and ethanol resulted in *Phellinus linteus* extract of 0.2% and 3.3% of its weight respectively. As taking the example of both extractions for the cytotoxic testing with 5 types of cancer cells; Breast cancer cell (BT474), Lung cancer cell (Chago-K1), Hepatic cancer cell (Hep-G2), Gastric cancer cell (KATO-III), Intestine cancer cell (SW620) and Fibroblast cell, it was found that *Phellinus linteus* extract from both water and ethanol extraction was the most effective in inhibiting Gastric cancer cell (KATO-III), having the same IC_{50} value for extracts from both types of extraction at 190.7 and having IC_{50} of 31.1 g/mL respectively. Moreover, the *Phellinus linteus* extract from both types of extraction was effective in inhabiting all 5 types of cancer, where the *Phellinus linteus* extract from the extraction using ethanol was more effective in inhibiting cancer cell than *Phellinus linteus* extract from water extraction. For the testing with Fibroblast cell, it was found that the *Phellinus linteus* extract from water extraction did not damage any Fibroblast cell, while *Phellinus linteus* extract from extraction using ethanol had the ability in damaging some part of Fibroblast cell with IC_{50} of 117.1 g/mL. Both Apoptosis and Coagulative Necrosis forms of cell death were found when considering the structure of cell death.

กิตติกรรมประกาศ

ผู้วิจัยขอขอบพระคุณอาจารย์ที่ปรึกษาโครงการ รองศาสตราจารย์ ดร.สุรชัย พรภคกุล เป็นอย่างสูงสำหรับความรู้ คำปรึกษา และคำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัย รวมไปถึงช่วยชี้แนะแนวทางในการแก้ปัญหาต่าง ๆ ตลอดการทำงานวิจัย และ การตรวจทานและแก้ไขการเขียนรายงานฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

ขอขอบพระคุณ ศาสตราจารย์ ดร.สนอง เอกสิทธิ์ ที่ให้เกียรติเป็นประธานกรรมการสอบ และ อาจารย์ ดร. ลักษณา ดูบาส ที่ให้เกียรติเป็นกรรมการสอบ ขอขอบคุณสำหรับการให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ต่องานวิจัยและคำชี้แนะที่ทำให้เกิดการแก้ไขปรับปรุงรูปเล่มงานวิจัยให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบพระคุณ คุณทรงจันทร์ ภู่ทอง เจ้าหน้าที่สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ ที่ให้ความรู้และคำปรึกษาเกี่ยวกับการเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็ง ให้ความช่วยเหลือในการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ

ขอขอบคุณ พี่นิสิตระดับปริญญาโทและปริญญาเอก โดยเฉพาะ นางสาวณัฐฐา รัตนปัญญา ที่ให้ความช่วยเหลือในการใช้เครื่องมือและอุปกรณ์ต่าง ๆ รวมไปถึงการให้กำลังใจตลอดการทำโครงการวิจัย

สุดท้ายนี้ ขอขอบคุณครอบครัว และเพื่อนๆ สำหรับกำลังใจและคำปรึกษา รวมทั้งผู้ที่เกี่ยวข้องทุกท่านที่ทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ค
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ง
กิตติกรรมประกาศ	จ
สารบัญ	ฉ
สารบัญตาราง	ซ
สารบัญรูป	ฌ
สัญลักษณ์และคำย่อ	ญ
บทที่ 1 บทนำ	1
1.1 มูลเหตุจูงใจ และความสำคัญของการวิจัย	1
1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย	2
บทที่ 2 ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	3
2.1 เห็ดกระถินพิมาน	3
2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
2.3 หลักการและทฤษฎี	4
2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)	4
2.3.2 การสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction)	5
2.3.3 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	
2.3.3.1 วิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์	5
2.3.3.2 การนับปริมาณเซลล์	6
2.3.3.3 การตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT (MTT assay)	7
2.3.4 การตายของเซลล์ (Cell death)	8
2.3.4.1 การตายแบบ Apoptosis	8
2.3.4.2 การตายแบบ Necrosis	9
2.3.6 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)	11
บทที่ 3 การทดลอง	13
3.1 วัตถุดิบ	13
3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์	13
3.3 สารเคมี	13
3.4 วิธีการทดลอง	14

3.4.1 การเตรียมสารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน 14
3.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytoxicity assay) 14
บทที่ 4 ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง 17
4.1 การเตรียมสารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน 17
4.2 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytoxicity assay) 17
บทที่ 5 สรุปผลการทดลอง 27
เอกสารอ้างอิง 28
ภาคผนวก 30
ประวัติผู้วิจัย 35

สารบัญตาราง

หน้า

2.1 วิธีการตรวจความมีชีวิตและการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเมมเบรนของเซลล์ 6

2.2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Necrosis กับ Apoptosis 11

4.1 แสดงลักษณะ น้ำหนัก และร้อยละปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% yield extract) ของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน 17

4.2 แสดงผลการนำสารสกัดต่าง ๆจากเห็ดกระถินพิมานมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (IC50) 18

สารบัญรูป

หน้า

2.1 เห็ดกระถินพิมาน 3

2.2 อุปกรณ์การสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction) 5

2.3 ลักษณะตารางสี่เหลี่ยมบน hemocytometer ที่ให้ปริมาตร 1 x 10^4 มล. และ ภาพขยายตารางแสดงตำแหน่งของเซลล์ที่ควรนับ และไม่ควรนับ 7

2.4 แสดงการรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan 8

2.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis 11

2.6 ค่า chemical shift โดยประมาณของโปรตอนในโมเลกุลประเภทต่าง ๆ 12

4.1 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) 19

4.2 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) 19

4.3 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) 20

4.4 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) 20

4.5 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) 21

4.6 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์ปกติ (Wi-38) 21

4.7 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) 22

4.8 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) 22

4.9 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) 23

4.10 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) 23

4.11 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) 24

4.12 การนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์ปกติ (Wi-38) 24

สัญลักษณ์และคำย่อ

^{1}H NMR	Proton Nuclear Magnetic Resonance
^{13}C NMR	Carbon Nuclear Magnetic Resonance
TLC	Thin layer chromatography
IC_{50}	Half maximal inhibitory concentration
DMSO	Dimethyl sulfoxide
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl])-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide
RPMI1640	อาหารเลี้ยงเซลล์
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้
Wi-38	เซลล์ปกติ

บทที่ 1
บทนำ

1.1 มูลเหตุจูงใจ และความสำคัญของการวิจัย

ในปัจจุบันโลกมีการพัฒนาและเปลี่ยนแปลงสิ่งต่าง ๆ ไปอย่างรวดเร็ว ทั้งในด้านอุตสาหกรรม รวมถึงด้านเทคโนโลยี ทำให้พฤติกรรมของมนุษย์เปลี่ยนแปลงไป ได้แก่ การดำเนินชีวิตที่มีความเร่งรีบมากขึ้นทำให้ขาดการออกกำลังกาย และมีแนวโน้มที่ได้รับสารอาหารไม่ครบถ้วน การทำงานที่มีการแข่งขันที่มากขึ้นทำให้เกิดความกดดันทำให้เกิดความเครียด หรือเกิดความซึมเศร้า รวมไปถึงปัจจัยทางสังคม ที่ส่งผลกระทบต่อสุขภาพได้ เช่น ฝุ่นละอองในอากาศ เป็นต้น โดยประเทศไทยในปี 2563 สำนักงานกองทุนสนับสนุนการสร้างเสริมสุขภาพ (สสส.) ได้พูดถึงพฤติกรรมที่ส่งผลต่อสุขภาพของคนไทย ซึ่งพฤติกรรมเหล่านี้ก็ได้ถูกพูดถึง ซึ่งนับเป็นสิ่งที่มีความเสี่ยงในการก่อให้เกิดโรคต่าง ๆ ได้ เช่น โรคหลอดเลือดหัวใจ โรคหลอดเลือดสมอง โรคเบาหวาน ความดันโลหิตสูง และโรคมะเร็ง ที่นับว่าเป็นโรคไม่ติดต่อเรื้อรัง (Non-Communicable diseases; NCD) ที่เป็นสาเหตุสำคัญของการเสียชีวิตของประชากรโลกเช่นกัน

ด้วยเหตุนี้มนุษย์จึงมีการหาทางป้องกันการเกิดโรคดังกล่าว โดยนิยมเสริมสร้างร่างกายด้วยการรับประทานอาหารที่มีประโยชน์มากขึ้น หรือการเลือกทานอาหารเสริม ซึ่งเห็ด ก็เป็นสมุนไพรหนึ่งที่ได้รับความนิยมในการทำมารับประทาน โดยเห็ดมี 2 ลักษณะคือเห็ดสามารถรับประทานได้ เช่น เห็ดโคน เห็ดเข็มทอง เห็ดหลินจือ เห็ดกระถินพิมาน เป็นต้น และเห็ดที่ไม่สามารถรับประทานได้ เช่น เห็ดขี้ควาย เห็ดเผาะ เห็ดดอกกระถิน เป็นต้น ซึ่งสำหรับเห็ดที่สามารถรับประทานได้นั้นจัดเป็นอาหารประเภทผักที่ปราศจากไขมัน มีปริมาณน้ำตาลและเกลือค่อนข้างต่ำ และยังเป็นแหล่งโปรตีนที่ดี และยังนิยมใช้เห็ดเป็นยาสมุนไพรรักษาโรค เพราะ เห็ดมีองค์ประกอบของพฤกษเคมีที่ชื่อว่า “โพลีแซคคาไรด์”(Polysaccharide) จะทำงานร่วมกับแมคโครฟากจ์ (macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์คุ้มกันขนาดใหญ่ โดยจะช่วยกระตุ้นวงจรการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเสริมและช่วยเพิ่มปริมาณและประสิทธิภาพของเซลล์คุ้มกันธรรมชาติ ให้ทำหน้าที่ทำลายเซลล์แปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย รวมถึงพวกไวรัสและแบคทีเรียอื่น ๆ ด้วย[2]

เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus linteus*) เป็นเห็ดที่ขึ้นเกาะติดอยู่บนลำต้นพืช โดยเฉพาะอย่างยิ่งต้น กระถินพิมาน มีลักษณะแข็งคล้ายเนื้อไม้ เจริญเติบโตข้างเดียวเป็นรูปครึ่งวงกลม กระจายพันธุ์อยู่ทั่วทุกภาคในประเทศไทย โดยเห็ดในสกุล Phellinus เป็นที่รู้จักและนำมาใช้เป็นยารักษาโรคกันอย่างแพร่หลาย เช่น ในทางการแพทย์แผนโบราณของประเทศจีน และในเอเชียตะวันออก โดยนำเห็ดในสกุล Phellinus มาใช้เป็นยาในการรักษาอาการปวดฟัน โรคที่เกี่ยวข้องกับลิ้นและคอ โรคท้องร่วง เป็นต้น นอกจากนี้มีการศึกษาพบว่าเห็ดในสกุล Phellinus มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ ต่อต้านเนื้องอก ต่อต้านการอักเสบ และรักษาความผิดปกติของตับได้[3]

อย่างไรก็ดี จากการสืบค้นข้อมูลพบว่าในประเทศไทยยังมีการศึกษาเห็ดชนิดนี้ไม่มากนัก โครงการนี้จึงได้ทำการสกัดและศึกษาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกระถินพิมาน โดยสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำและเอทานอล ทำการทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกระถินพิมานในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร, เซลล์มะเร็งเต้านม, เซลล์มะเร็งลำไส้, เซลล์มะเร็งตับ และเซลล์มะเร็งปอด รวมทั้งการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีโดยการวิเคราะห์ด้วย NMR spectroscopy

1.2 วัตถุประสงค์และขอบเขตของการวิจัย

1.เพื่อแยกและศึกษาองค์ประกอบทางเคมีที่มีอยู่ในเห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus linteus*)

2.เพื่อศึกษาการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในการต่อต้านเซลล์มะเร็งของสารที่แยกได้จาก เห็ดกระถินพิมาน (*Phellinus linteus*)

บทที่ 2
ทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 เห็ดกระถินพิมาน

รูปที่ 2.1 เห็ดกระถินพิมาน[4]

ชื่อสามัญ: *Phellinus linteus*, เห็ดกระถินพิมาน (ไทย), Sangwhang (เกาหลี), Sanghuang (จีน), Meshimakobu (ญี่ปุ่น)

ชื่ออาณาจักร: Fungi

ชื่อไฟลัม: Basidiomycota

ชื่อชั้น: Agaricomycetes

ชื่ออันดับ: Hymenochaetales

ชื่อวงศ์: Hymenochaetaceae

ชื่อสกุล: Phellinus

ชื่อสปีชีร์: *P. linteus*

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ลักษณะทั่วไปของเห็ดกระถินพิมานคือ ดอกเห็ดมีลักษณะแข็งเหมือนเนื้อไม้ ไม่มีก้าน และเจริญออกมาจากลำต้นของต้นไม้ ในลักษณะเป็นก้อนครึ่งวงกลมคล้ายเปลือกหอย เป็นเห็ดในตระกูล Olyporaceae ที่ขึ้นบนไม้ยืนต้นสูงประมาณ 8-10 เมตร มักขึ้นตามป่าละเมาะ หรือป่าเบญจพรรณที่แห้งแล้ง ซึ่งในประเทศไทยพบมากในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ[2]

สรรพคุณ

1. ส่วนราก สามารถนำไปแก้พิษสัตว์กัดต่อย แก้พิษงูได้
2. ส่วนลำต้น สามารถนำไปแก้ไข้พิษ ไข้กาฬได้
3. นำเห็ดมาผสมกับน้ำปูนใสหรือเหล้า สามารถทำไปหยอดหูแก้ปวดหู หรือนำมาทาบาดแผลที่เน่าเปื่อย รักษาเริม รักษางูสวัดได้

4. มีสาร พอลิแซ็กคาร์ไรด์ สารไตรโตรปีนอย สารเนเซอรัลสเตอรอยด์ ช่วยกระตุ้นการทำงานของระบบฮอร์โมน และระบบภูมิคุ้มกัน ลดการอักเสบและกดการเจริญและการแพร่กระจายของเซลล์เนื้องอกได้
5. มีสารต้านมะเร็ง ซึ่งมีส่วนช่วยยับยั้งมะเร็งปอด มะเร็งต่อมลูกหมาก และมะเร็งตับได้[3,4]

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในปี 2006 Collins และคณะ[5] ได้ศึกษาความสามารถในการยังยั้งเซลล์มะเร็งที่ต่อมลูกหมากโดยใช้เห็ดกระถินพิมานร่วมกับยา Doxorubicin ซึ่งพบว่าสารพอลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดกระถินพิมาน สามารถเพิ่มศักยภาพในการทำงาน ของยา Doxorubicin ที่ใช้ในปริมาณต่ำ ๆ ทำให้เกิดการตายแบบ Apoptosis ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้

ในปี 2016 Yan และคณะ[6] ได้ศึกษาโครงสร้างและความสามารถในการต่อต้านอนุมูลอิสระของสารพอลีแซคคาไรด์ที่สกัดได้จากสารสกัดเห็ดกระกินพิมาน พบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน ที่ได้จากการสกัดด้วยน้ำร้อน และทำการแยกสารสกัดน้ำด้วย DEAE Sepharose Fast Flow ทำให้ได้สาร กลุ่มพอลีแซคคาไรด์ ที่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านอนุมูลอิสระในหนูทดลอง สารสกัดพอลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากเห็ด Phellinus linteus ที่สามารถกระตุ้นการทำงานของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD), Catalase Enzyme (CAT), Glutathione peroxidase (GSH-Px) ในการต่อต้านอนุมูลอิสระในสิ่งมีชีวิตได้

ในปี 2017 Park และคณะ[7] ได้ศึกษาความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ที่เกิดจาก KRAS-Mutated โดยใช้เห็ดกระถินพิมานในสารสกัดข้าวกล้องงอก (PRB) ร่วมกับยา Cetuximab ซึ่งพบว่าการใช้ยา Cetuximab ผสมผสานกับ PRB สามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่และยับยั้งการแสดงออกของ KRAS-Mutated ได้อย่างมีนัยสำคัญ

ในปี 2018 Huang และคณะ[8] ได้ศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของสารกัดจากเห็ดกระถินพิมาน และความสามารถในการยับยั้งการเกิดพังผืดในตับของหนู ซึ่งพบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานนี้สามารถ ยับยั้งการเกิดพังผืดในตับ Hepatic stellate cells (HSCs) ของหนูได้ ซึ่งอาจพัฒนาเป็นยารักษาตับ หรืออาหารเสริมเพื่อสุขภาพได้

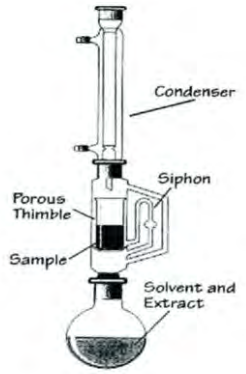
2.3 หลักการและทฤษฎี

2.3.1 การสกัดด้วยตัวทำละลาย (Solvent extraction)

การสกัดด้วยตัวทำละลายเป็นเทคนิคการแยกสารที่ใช้แยกของผสมเนื้อเดียว แบ่งได้ 2 แบบคือ
1. Liquid-liquid extraction เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย ที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของเหลว

2. Solid-liquid extraction เป็นการสกัดด้วยตัวทำละลาย ที่ใช้ตัวทำละลายที่เหมาะสมในการละลายสารที่ต้องการออกมาจากสารผสมซึ่งเป็นของแข็ง ซึ่งทำได้โดยแช่ของแข็งที่ต้องการสกัดในตัวทำละลายที่ต้องการเป็นเวลานาน โดยใช้ภาชนะที่เหมาะสม

2.3.2 การสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction)



รูปที่ 2.2 อุปกรณ์การสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction)[9]

การสกัดแบบซอกห์เลต (Soxhlet extraction) เป็นหนึ่งในวิธีการสกัดด้วยตัวทำละลาย โดยเป็นวิธีการสกัดแบบต่อเนื่อง มีหลักการคือให้ความร้อนให้กับตัวทำละลายในขวดก้นกลมเพื่อให้ตัวทำละลายระเหยและถูกควบแน่นลงใน Thimble ซึ่งบรรจุสารตัวอย่างที่ต้องการสกัดไว้ จนกระทั่งตัวทำละลายมีปริมาณถึงระดับของ Siphon ตัวทำละลายพร้อมสารที่ถูกสกัด จะไหลกลับลงสู่ขวดก้นกลมเหมือนเดิม ซึ่งตัวทำละลายจะได้รับความร้อนและถูกกลั่นตัวมาสกัดใหม่ วนเวียนเช่นนี้จนกระทั่งการสกัดสมบูรณ์[9]

2.3.3 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์[10]

เซลล์เพาะเลี้ยง เป็นทางเลือกใหม่ที่เริ่มเป็นที่นิยมใช้ในการศึกษาการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์แทนสัตว์ทดลอง เนื่องจากการตรวจสอบเซลล์ด้วยเซลล์เพาะเลี้ยงเป็นวิธีที่ให้ผลรวดเร็ว มีความประหยัด ลดการใช้ชีวิตสัตว์ทดลอง และสามารใช้ทดสอบกับเซลล์ของคนได้ ซึ่งให้ผลวิเคราะห์ที่สามารถใช้กับคนได้ดีกว่า ในปัจจุบันมีการนำเซลล์เพาะเลี้ยงไปประยุกต์ใช้ตรวจสอบความเป็นพิษกับงานทางอุตสาหกรรมและการแพทย์ เช่น การตรวจสอบความปลอดภัยของสารเคมีในชีวิตประจำวันและอุปกรณ์การแพทย์ การตรวจสอบฤทธิ์ของยาทั่วไปหรือยาต้านมะเร็ง เป็นต้น

2.3.3.1 วิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

วิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ที่นิยมใช้กันกับเซลล์เพาะเลี้ยง แบ่งออกได้เป็น 2 รูปแบบใหญ่ๆ คือ ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากการทำลายทางกายภาพเคมี (physical-chemical damage) และ ความเป็นพิษต่อเซลล์

ที่ออกฤทธิ์ต่อเมตาโบลิซึมของเซลล์ ซึ่งเป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์หรือกิจกรรมที่แสดงความมีชีวิตของเซลล์หลังการบ่มเซลล์กับสารทดสอบ จากนั้นนำค่าความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟความสัมพันธ์กับความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารที่ทดสอบ ค่าความเข้มข้นของสารที่ให้ผลยับยั้งความมีชีวิตลดลงเป็นครึ่งหนึ่งจากสภาวะไม่มีสารทดสอบคือ IC_{50}

1. ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่เกิดจากการทำลายทางกายภาพเคมี (physical-chemical damage) ที่มีผลให้เซลล์ตายทันที วิธีการวัดความมีชีวิตของเซลล์จะสามารถทำได้รวดเร็ว และมักเป็นวิธีที่เกี่ยวข้องกับ membrane integrity จึงอาจตรวจความเป็นพิษโดยการบ่มเซลล์กับสารทดสอบในระยะเวลาสั้น ๆ แล้ววัดความมีชีวิตของเซลล์ได้หลายวิธีดังแสดงในตารางที่ 2.1 ซึ่งต่างเป็นวิธีที่วัดความสมบูรณ์ของเซลล์เมมเบรนขณะนั้นเท่านั้น จึงไม่สามารถบอกความเป็นพิษที่ส่งผลกระทบต่อความบกพร่องส่วนอื่นของเซลล์ หรือพิษที่เกิดขึ้นภายหลังได้ (delay cytoxicity)

2. ความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ออกฤทธิ์ต่อเมตาโบลิซึมของเซลล์ มักออกฤทธิ์แสดงความเป็นพิษในช่วงเวลา 2-3 ชั่วโมงหรือเป็นวันหลังการบ่มกับสารทดสอบ เป็นการตรวจความเป็นพิษต่อเซลล์ที่ให้ผลชัดเจนกว่าวิธีแรก แต่การตรวจวัดความเป็นพิษจะต้องคำนึงถึงการออกฤทธิ์แบบผันกลับ-ไม่ผันกลับ (reversible-irreversible cytotoxicity) รวมทั้งระยะเวลาในการบ่มกับสารทดสอบด้วยเพื่อให้ครอบคลุมการออกฤทธิ์ของสาร แล้วจึงวัดกิจกรรมเมตาโบลิซึมของเซลล์โดยวิธีต่าง ๆ เช่น วัดความสามารถเจริญของเซลล์โดย plating efficiency หรือวัดปริมาณ ATP เป็นต้น

ตารางที่ 2.1 วิธีการตรวจความมีชีวิตและการตายของเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับเมมเบรนของเซลล์

วิธี	หลักการ
Trypan blue	เซลล์เมมเบรนที่สมบูรณ์ (เซลล์มีชีวิต) ไม่ติดสี เซลล์เมมเบรนที่ถูกทำลาย(เซลล์ตาย)ติดสีฟ้า
Neutral red	Lysosomal membrane ที่สภาพดี (เซลล์มีชีวิต) จะมีสีแดง แต่เซลล์ตายจะไม่ติดสี
FDA/PA	เซลล์เมมเบรนที่สมบูรณ์ (เซลล์มีชีวิต) ติดสีเขียว ส่วนเซลล์ตายติดสีแดง
LDH assay	เซลล์เมมเบรนที่สมบูรณ์ (เซลล์มีชีวิต) กัก LDH อยู่ภายในเซลล์ได้ แต่เซลล์ตาย LDH จะออกจากเซลล์ แล้ววัดการตายโดยวัดปริมาณกิจกรรมของ LDH

2.3.3.2 การนับปริมาณเซลล์

การนับปริมาณเซลล์ มักทำเมื่อศึกษาการเจริญของเซลล์ เพื่อให้ทราบสภาวะของเซลล์ที่เลี้ยงในช่วงเวลาต่าง ๆ เช่น การนับปริมาณเซลล์เพื่อทำให้ได้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมต่อการถ่ายเลี้ยงเซลล์ หรือการนับปริมาณเซลล์เพื่อตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ เป็นต้น โดยการนับปริมาณเซลล์สามารถแบ่งเป็น 2 ประเภทใหญ่ๆ คือ การนับปริมาณเซลล์โดยตรง และ การนับปริมาณเซลล์โดยอ้อม

ก. การนับปริมาณเซลล์โดยตรงด้วย Hemocytometer

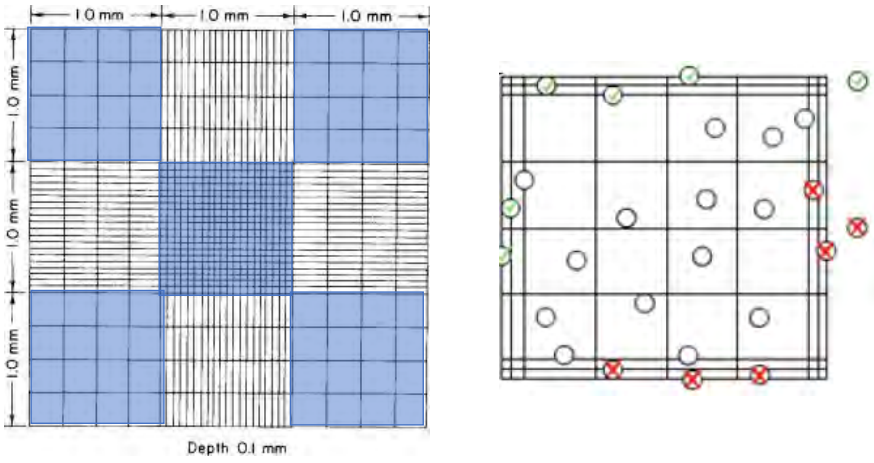
Hemocytometer เป็นแผ่นสไลด์แก้ว และ cover slip ที่มีขนาดและน้ำหนักเฉพาะ ที่มีตารางตรงบริเวณส่วนกลางแผ่นสไลด์เป็นบริเวณสำหรับนับเซลล์ โดยแต่ละตารางจะมีพื้นที่ขนาด 1 ตารางมิลลิเมตร และมักจะผลิตให้เป็นช่องสี่เหลี่ยมจัตุรัสสำหรับนับเซลล์ 9 ช่อง ซึ่งแต่ละช่องมีความลึก 0.1 มิลลิเมตร ดังนั้นเมื่อปิด cover slip จะ

มีปริมาตรในหนึ่งช่องตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสเท่ากับ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร (มม^3) ซึ่งก็คือจำนวนเซลล์ในปริมาตร 1 ลูกบาศก์เซนติเมตร (ซม^3) = n x 10^4 (เมื่อ n คือจำนวนเซลล์ที่บับได้ใน 1 ช่อง)

ในการนับเซลล์ควรนับทั้ง 5 ช่อง เพื่อให้ได้ค่าที่ถูกต้องมากขึ้น บางเซลล์อาจอยู่ตรงเส้นขอบตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสพอดี ให้นับเซลล์ที่อยู่ตรงของเส้นบน และขอบเส้นด้านซ้ายรวมกับเซลล์ในช่อง ขณะที่ไม่นับเซลล์ที่อยู่ตรงขอบเส้นด้านขวา โดยใช้เส้นกลางจาก 3 เส้นเป็นแนวในการนับ คือ เซลล์ใดก็ตามที่แตะเส้นกลางของขอบเส้นบน และซ้ายจะถูกนับ ส่วนเซลล์ที่อยู่นอกเส้นกลางของขอบจะไม่ถูกนับ

โดยสามารถหาจำนวนเซลล์ที่นับได้ จาก

$$\text{จำนวนเซลล์ที่นับได้}\left(\frac{\text{เซลล์}}{\text{มล}}\right) = \frac{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด}}{5}\ x\ 10^4$$



รูปที่ 2.3 ลักษณะตารางสี่เหลี่ยมบน hemocytometer ที่ให้ปริมาตร 1 x 10^4 มล. และภาพขยายตารางแสดงตำแหน่งของเซลล์ที่ควรนับ และไม่ควรนับ

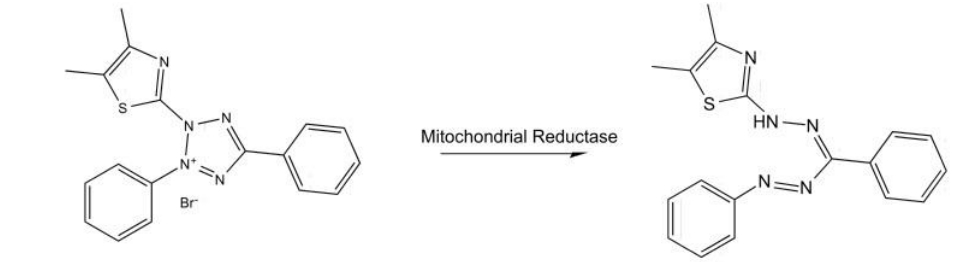
ข. การนับปริมาณเซลล์โดยอ้อม

การนับปริมาณเซลล์โดยอ้อม มีหลากหลายวิธี ได้แก่ การนับปริมาณเซลล์โดยการวัดปริมาณโปรตีน ซึ่งปริมาณโปรตีนที่อยู่ในเซลล์อาจสามารถใช้แทนมวล (Biomass) ได้ หรือการนับปริมาณเซลล์ด้วย Lactate Dehydrogenase (LDH) assay ซึ่งเป็นการตรวจวัดการตายของเซลล์ที่เกิดเนื่องมาจากเซลล์เมมเบรนถูกทำลายแล้วเกิดการหลั่งเอนไซม์ออกมานอกเซลล์ โดยการลดลงของเซลล์มีชีวิตจึงมีความสัมพันธ์กับการเพิ่มขึ้นของกิจกรรมเอนไซม์ หรือ การนับปริมาณเซลล์ด้วย MTT assay ซึ่งเป็นการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์

2.3.3.3 การตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วย MTT (MTT assay)

MTT assay เป็นวิธีการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์โดยไม่ต้องใช้ hemocytometer โดยเซลล์มีชีวิตจะมี mitochondrial dehydrogenase ที่จะเปลี่ยนเป็น MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl])-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง ให้เป็น formazan ที่มีสีฟ้าและไม่ละลายน้ำ เมื่อละลายตะกอน formazan ด้วย

ตัวทำละลายที่เหมาะสม (Sodium dodecyl sulfate; SDS หรือ dimethysulfoxide; DMSO) จะสามารถวัดความเข้มสีที่ OD 570 nm ได้ ปริมาณ dyhydrogenase ในเซลล์หนึ่งๆ จะคงที่ ดังนั้นปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต จึงสามารถใช้เป็นวิธีวัดความมีชีวิตของเซลล์ การเจริญของเซลล์ การศึกษาการกระตุ้นและยับยั้งเมตาบอลิซึมของเซลล์



รูปที่ 2.4 แสดงการรีดิวซ์ MTT เป็น Formazan

2.3.4 การตายของเซลล์ (Cell death)

Cell death เมื่อการบาดเจ็บของเซลล์รุนแรงมากขึ้น ทำให้เซลล์เปลี่ยนแปลงมากทั้งด้านชีวโมเลกุล โครงสร้าง และการทำงานของเซลล์ จนไม่สามารถซ่อมแซมได้ และทำให้เซลล์ตายในที่สุด การตายของเซลล์แบ่งตามลักษณะการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้าง โดยสามารถแบ่งการตายของเซลล์ได้เป็น 2 กลไก คือ Necrosis และ Apoptosis

2.3.4.1 การตายแบบ Apoptosis

เป็นการตายของเซลล์เดี่ยว ๆ เมื่อหมดอายุขัยตามที่กำหนดไว้ ซึ่งเรียกว่า programmed cell death หรือ เป็น suicide program ก็ได้ เมื่อเซลล์ถูกกำหนด หรือถูกสิ่งเร้าบางอย่างกระตุ้นทำให้เอนไซม์ต่าง ๆภายในเซลล์ถูกกระตุ้น ตามลำดับ และย่อยสลายทั้ง Nuclear DNA และโปรตีนต่าง ๆ ทั้งที่อยู่ในนิวเคลียสและในเซลล์ สุดท้ายเซลล์จะแตกออกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ ที่เรียกว่า Apoptotic bodies ซึ่งมี cell membrane ล้อมรอบและภายใน Apoptotic bodies จะประกอบด้วยเศษนิวเคลียส และ organellesต่าง ๆ หลังจากนั้นเซลล์ข้างเคียงและเซลล์ Macrophages จะเก็บ Apoptotic bodies เข้าไปทำลายโดยไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบ

ดังนั้นจึงเป็นที่ยอมรับถึงความแตกต่างทั้งสาเหตุ กลไก และพยาธิสภาพของ Apoptosis และ Necrosis ซึ่งสาเหตุการตายของเซลล์ อาจจะเป็นตามอายุขัยที่ก าหนดไว้แล้ว โดยเฉพาะในช่วงเจริญเติบโตของทารกในครรภ์ตามปกติ หรือปัจจุบันพบว่า อาจจะเกี่ยวข้องกับ pathologic stimuli บางอย่าง มากระทำ จะเริ่มจากที่ DNA ภายใน nucleus เสียสภาพไม่สามารถซ่อมแซมได้ เซลล์จะท าลายตนเองโดยเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงภายใน Nucleus ก่อน จากนั้นเซลล์จะแตกออกเป็นส่วนๆ โดยที่ไม่มีความผิดปกติของ membrane หลังจากนั้น ส่วนของเซลล์ที่แตกเป็นส่วนๆนั้นจะถูกเก็บกินโดยเซลล์ข้างเคียงหรือ Macrophages

เนื่องจากการตายของเซลล์แบบ Apoptosisจะเริ่มต้นด้วยการเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสก่อน โดย Chromatin จะติดสีเข้มและจับตัวเป็นกลุ่มก้อน (Clumps) ไปติดอยู่ที่ nuclear membrane ต่อมาทั้งตัวเซลล์และ nucleus จะยื่นโป่ง ออกโดยรอบ หลังจากนั้นเซลล์ก็แตกออกเป็นส่วนชิ้นส่วนเล็ก ๆ เรียก Apoptotic bodies และ Apoptotic bodies จะถูกกิน หรือ Phagocytosis โดยเซลล์ข้างเคียง และ เม็ดเลือดขาวพวก macrophages จนหมด โดยไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบของร่างกาย ลักษณะที่เห็นจากกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่าเซลล์จะเหี่ยว (Cell Shrinkage) มี cytoplasm ที่แดงเข้ม นิวเคลียสมีการติดสีโครมาตินสีน้ำเงินที่เข้ม ต่อมาจะเห็นลักษณะยื่นออกของทั้งผิวของนิวเคลียสและเซลล์ออกไปเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ (Formation of Cytoplasmic Bleb and apoptotic bodies) โดยแต่ละส่วนจะมี cell membrane ล้อมรอบและภายในก็มีทั้งเศษนิวเคลียสและ organelles เรียกว่า Apoptotic bodies และสุดท้ายเซลล์ macrophages หรือเซลล์ข้างเคียงจะกินส่วนดังกล่าวเข้าไปย่อยภายในเซลล์ เรียกว่า Phagocytosis of Apoptotic bodies

2.3.4.2 การตายแบบ Necrosis

การตายแบบเฉพาะส่วน หรือ Necrosis การตายแบบนี้จะมีการหลั่งเอนไซม์พิเศษ คือเริ่มจากเปลี่ยนแปลงที่ membrane ของทั้งเซลล์และ organelles ภายในเซลล์ ทำให้ lysosomal enzyme ไหลออกจาก lysosome เข้าสู่ cytoplasm และย่อยสลายโปรตีนและส่วนต่าง ๆ ภายในเซลล์ หรืออาจออกมายังภายนอกเซลล์ จึงทำให้เกิดการทำลายเซลล์ข้างเคียงด้วย เนื่องจากภายหลังที่เซลล์ตาย เซลล์ไม่สามารถรักษาสภาพของ cell membrane ดังนั้นส่วนประกอบภายในเซลล์จะไหลสู่ภายนอกและกระตุ้นขบวนการอักเสบตามมา ส่วนหนึ่งของเอนไซม์ที่ย่อยเซลล์นั้นจะมาจาก lysosome ของเซลล์ที่ตายเอง เรียกว่า Autolysis หรือ จากเอนไซม์ที่หลั่งจากเซลล์อักเสบ เรียกว่า Heterolysis จากการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า Cytoplasm ของ เซลล์ตายแบบ Necrosis จะแดงมากขึ้น เนื่องจาก ความผิดปกติของ RNA ใน Cytoplasm เอง และ การที่สีย้อมชิ้นเนื้อชนิด Eosin ซึ่งเป็นสีแดงจับกับโปรตีนที่เสียสภาพใน Cytoplasm มากขึ้น นอกจากนั้นจะพบว่า Cytoplasm จะมีลักษณะติดสีแดงผิดปกติ เนื่องจาก Glycogen ที่สะสมใน Cytoplasm หายไปและในระยะต่อมา อาจจะมีการสะสมของ Calcium salt ตามมาได้

สำหรับ Nucleus ก็จะพบการเปลี่ยนแปลงได้ 3 แบบ คือ

- Karyolysis คือ การเปลี่ยนแปลงของนิวเคลียสโดยจะพบว่าสีน้ำเงินของนิวเคลียสจะจางลงและไม่คมชัด เนื่องจากปฏิกิริยาของเอนไซม์ endonuclease ต่อ Chromatin
- Pyknosis คือ การเปลี่ยนแปลงที่นิวเคลียสโดยนิวเคลียสจะเหี่ยวและมีสีน้ำเงินเข้ม เนื่องจาก DNA รวมตัวเป็นก้อนสีน้ำเงินเข้ม (อาจจะพบในการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ได้เช่นกัน)
- Karyorrhexis นิวเคลียสที่เหี่ยวและจับเป็นกลุ่มก้อนสีน้ำเงิน (Pyknosis) จะแตกออกเป็นส่วนเล็ก ๆ อย่างไรก็ตามสุดท้ายอาจจะพบเซลล์ตายโดยที่ไม่เห็นส่วนของนิวเคลียสเนื่องจากการนิวเคลียสของเซลล์ที่ตายจะแตกเป็นชิ้นส่วนเล็ก ๆ และสลายไปในที่สุด

ลักษณะการตายเฉพาะส่วนของเนื้อเยื่อแบ่งออกเป็น 5 รูปแบบเด่น ๆ ได้ดังนี้

1. Coagulative necrosis แม้ว่าเนื้อเยื่อตายแล้ว แต่ยังมีการคงสภาพหรือโครงร่างของเนื้อเยื่อที่ตายไว้ในระยะหนึ่ง เข้าใจว่า เกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนรวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆภายในเซลล์เนื้อเยื่อ ไตส่วนที่ตายจะคงสภาพอยู่ เห็นขอบเขตแยกจากส่วนที่ไม่ตายได้ชัดและมีสีซีดกว่า เนื้อเยื่อข้างเคียง และผลการศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา พบว่า มีการคงสภาพ ของโครงสร้างของเนื้อเยื่อไต ทั้งส่วนที่เป็น Glomerulus และ tubules แต่ภายในเซลล์ที่ ตายไม่เห็นนิวเคลียสแล้ว และ Cytoplasm มีสีชมพู-แดงเข้มสม่ำเสมอ

2. Liquefactive necrosis ภายหลังที่เซลล์และเนื้อเยื่อตาย มีการย่อยสลายเซลล์และเนื้อเยื่อที่ตายโดยเอนไซม์ภายใน Lysosome ของเซลล์เอง เช่น กรณีเนื้อสมองตายจากการขาดเลือด และ/หรือมีการย่อยสลายโดยเอนไซม์จากเซลล์อักเสบในปฏิกิริยาการอักเสบ เช่น การอักเสบเป็นหนอง (Pus Formation หรือSuppurative Inflammation) ดังนั้นส่วนของเนื้อตายจะ เปลี่ยนสภาพเป็นของเหลว

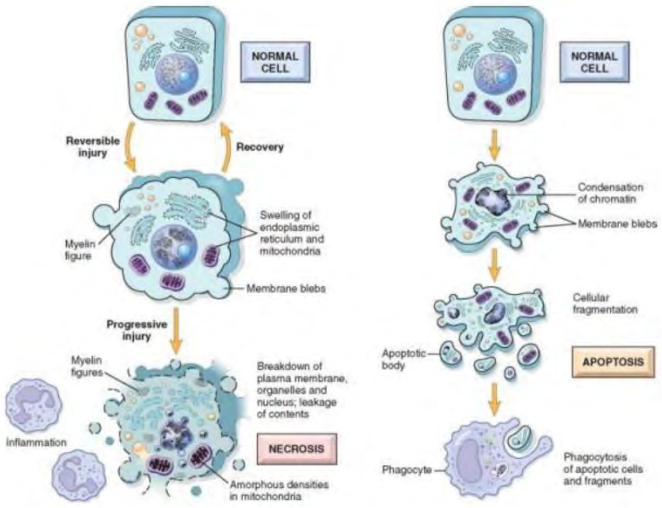
3. Fat necrosis เป็นผลจากการทำงานของเอนไซม์ไลเปสย่อยเนื้อเยื่อไขมัน ลักษณะเนื้อตายเป็น สีเหลืองซีด อาจเห็นจุดขาวคล้ายชอล์ค ในกล้องจุลทรรศน์จะเห็นบริเวณเซลล์ไขมันที่ถูกเอนไซม์ย่อยเป็นปื้นสีชมพูอมม่วง ในขณะที่เซลล์ที่ตายแบบไม่มีเอนไซม์ย่อยจะเห็นเซลล์ไขมันเสื่อมปะปนกับฮิสติโอไซต์ (histiocyte) ในบางครั้งอาจพบปฏิกิริยาการเปลี่ยนเป็นสบู่ (saponification) ในเนื้อเยื่อได้พบในตับอ่อนอักเสบเฉียบพลันและการตายของเนื้อเยื่อเต้านม

4. Caseous necrosis เป็นลักษณะการตายแบบ coagulation necrosis ที่จำเพาะต่อเชื้อไมโคแบคทีเรีย (mycobacteria) (เช่นวัณโรค) , เชื้อรา, และวัตถุแปลกปลอมบางชนิด บริเวณที่ตายจะออกสีเหลืองเหมือนเนย ไม่เป็นช่องว่าง มีขอบเขตเซลล์ไม่ชัด Cytoplasm สีชมพูปริมาณมาก เรียกว่า Epithelioid histiocytes และ Multinucleated giant cells (ซึ่งเกิดจากเซลล์ Epithelioid histiocytes หลายๆ เซลล์รวมตัวกันเป็นเซลล์ตัวโตที่มีหลายนิวเคลียส) การรวมกลุ่มของเซลล์ดังกล่าวเรียกว่า Granuloma และพบการตายรูปแบบคล้ายกับ Coagulative necrosis ตรงกลาง Granuloma จึงเรียกว่า Caseous Necrosis อาจกล่าวได้ว่าเป็นการตายรูปแบบผสมระหว่าง coagulative และ liquefactive necroses

5. Fibrinoid necrosis เป็นรูปแบบพิเศษของการตายของเนื้อเยื่อแบบ Necrosis ที่ หลอดเลือด ส่วนใหญ่เกิดจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง และเมื่อมีการสะสมของ immune complex ที่ผนังของหลอดเลือด ดังนั้นผนังของ หลอดเลือดจะถูกแทนที่ด้วยปื้นสีชมพูซึ่งเป็น immune complex และอาจพบ Fibrinoid Necrosis ของ Arterioles ในผู้ป่วยความดันโลหิตสูงที่รุนแรงได้

ตารางที่ 2.2 แสดงการเปรียบเทียบลักษณะของ Necrosis กับ Apoptosis

	Necrosis	Apoptosis
สิ่งที่กระตุ้น	Pathologic stimuli	Physiologic or Pathologic stimuli
เกิดขึ้นกับ	Many cells	Single cells
พยาธิสภาพกับ	(1) Membrane disrubtion (2) Cytoplasmic eosinophilla (3) Nuclear change; Karyorrhexis => Karyolysis	(1) Chromatin condensation (2) Fragmentation of cells (3) Apoptotic bodies
การเปลี่ยนแปลงภายหลังเซลล์ตาย	เกิดปฏิกิริยาอักเสบ (Inflammation)	มี Phagocytosis และ ไม่มีปฏิกิริยาการอักเสบ

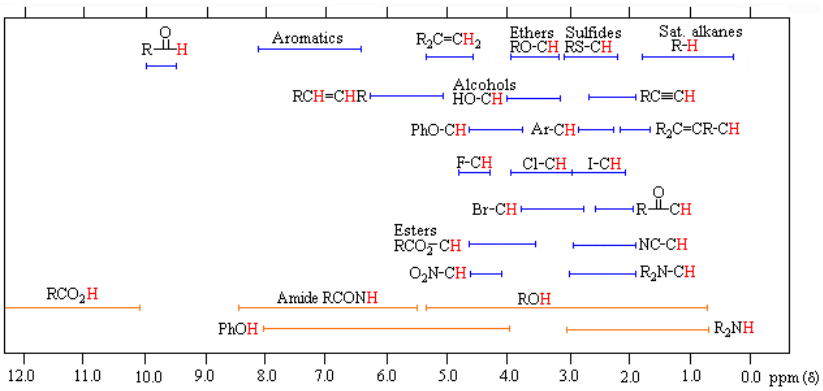


รูปที่ 2.5 การเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของเซลล์แบบ apoptosis และ necrosis

2.3.5 Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR)

Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) เป็นเทคนิคที่เกี่ยวข้องกับการวัดระดับพลังงานที่แตกต่างกันของนิวเคลียสที่อยู่ภายใต้อิทธิพลของสนามแม่เหล็ก

NMR เป็นเทคนิคที่ศึกษาเกี่ยวกับนิวเคลียสของธาตุที่มีสมบัติของแม่เหล็กตลอดจนสภาวะข้างเคียงรอบนิวเคลียสนั้น ๆ มีประโยชน์มากในการศึกษาสูตรโครงสร้างและพลวัตของสาร โดยมีหลักการคือ เครื่อง NMR จะส่งสัญญาณคลื่นวิทยุทุกความถี่ในช่วงที่สนใจเข้าไปยังตัวอย่างที่วิเคราะห์ ซึ่งส่งผลให้นิวเคลียสเกิดสถานะถูกกระตุ้น (excited state) จากนั้นนิวเคลียสดังกล่าวจะกลับสู่สถานะพื้น (ground state) โดยการคายพลังงานออกมาในรูปของคลื่นวิทยุในรูปของคลื่นที่ซ้อนกันที่เรียกว่าสัญญาณ FID (free induction decay) ซึ่งเราสามารถแยกออกเป็นความถี่ต่างๆ ซึ่งถูกคอมพิวเตอร์เก็บข้อมูลและประมวลผล มาในรูปของ NMR spectrum ซึ่งมีลักษณะเป็นพีค และสารอินทรีย์ที่มีหมู่ฟังก์ชันที่แตกต่างกัน จะปรากฏค่า chemical shift ที่แตกต่างกัน



รูปที่ 2.6 ค่า chemical shift โดยประมาณของโปรตอนในโมเลกุลประเภทต่างๆ

บทที่ 3

การทดลอง

3.1 วัตถุดิบ

เห็ดกระถินพิมาน บดเป็นผง

3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์

1. Thin Layer Chromatoplate (TLC)
2. NMR Tube: 5 mm standard NMR tube
3. Rotatory Vacuum Evaporator
4. NMR Spectrometer: 500 mHz JNM-ECZS series FT NMR
5. Tissue culture flask 25 cm^3
6. Tissue culture plate 96 well
7. 96-well (8x12) microtiter plate
8. Microtiter Plate Reader
9. CO_2 Incubator

3.3 สารเคมี

1. Ethanol
2. Methanol
3. Normal saline
4. Ethylene diamine tetra-acetic acid (EDTA)
5. Dimethyl sulfoxide (DMSO)
6. Dichloromethane
7. Chloroform
8. Deuterated solvents for NMR ได้แก่ Chloroform, Deuterium oxide, Methanol
9. Liquid and powder medium (RPMI1640)
10. Fetal calf serum
11. Trypsin
12. 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide (MTT)

3.4 วิธีการทดลอง

3.4.1 การเตรียมสารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน

1) การสกัดด้วยเอทานอล

นำเห็ดกระถินพิมานที่ถูกบดเป็นผงประมาณ 40 g ห่อด้วยกระดาษกรอง นำมาสกัดด้วย 400 mL เอทานอล โดยวิธีการสกัดด้วยซอกเลต (Soxhlet extraction) เป็นเวลา 6 ชั่วโมง และนำสารสกัดที่ได้มาระเหยตัวทำละลายออกด้วย Rotatory Vacuum Evaporator ชั่งน้ำหนัก เก็บตัวอย่างสารสกัดใน desiccator

2) สกัดด้วยน้ำ

ใส่เห็ดกระถินพิมานที่ถูกบดเป็นผงประมาณ 40 g ลงในขวดรูปกรวยขนาด 1000 mL เติมน้ำกลั่น 400 mL แล้วนำมาให้ความร้อนบน Hotplate เป็นเวลา 6 ชั่วโมง กรองสารกัดด้วยกระดาษกรอง และนำสารสกัดที่ได้ไประเหยตัวทำละลายออกด้วยการทำ Freeze Dry ชั่งน้ำหนัก เก็บตัวอย่างสารสกัดใน desiccator

3.4.2 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytoxicity assay)

ส่งตัวอย่างสารทดสอบที่สถาบันวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1) การเตรียมเซลล์

เซลล์ที่ใช้เป็น cell line จาก American Type Culture Condition (ATCC) ได้แก่เซลล์ดังต่อไปนี้

ชื่อในห้องปฏิบัติการ	ชื่อสามัญ	แหล่งที่มาของเซลล์
KATO-III	เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร	Gastric carcinoma, Human
BT474	เซลล์มะเร็งเต้านม	Ductal carcinoma, breast, Human
SW620	เซลล์มะเร็งลำไส้	Lymph node metastasis, colon adenocarcinoma, Human
Hep-G2	เซลล์มะเร็งตับ	Liver hepatoblastoma, Human
Chago-K1	เซลล์มะเร็งปอด	Lung undifferentiated, Human
Wi-38	เซลล์ปกติ	Fibroblast, Lung, Human

เลี้ยงเซลล์ใน tissue culture flask ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 ที่ผสม fetal calf serum 5% บ่มที่ 37 °C 5% CO_2 ไว้ประมาณ 3 วัน (มีเซลล์ 2-4 x 10^6 เซลล์/ขวด) หลังจากนั้นดูดอาหารเลี้ยงเซลล์เก่าออก เติม 0.05% trypsin + 0.01% EDTA ปริมาตร 0.5-1 mL บ่มประมาณ 2-5 นาที เมื่อเซลล์หดตัว ดูด trypsin ทิ้ง แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ เคาะให้เซลล์ที่เกาะใน flask หลุด ดูดเซลล์บางส่วนใส่ใน tissue culture flask อีกขวดหนึ่ง เพื่อขยายจำนวน

เซลล์เพิ่มเติมและเจือจางให้แต่ละ flask เซลล์มีความเข้มข้น 2.5 x 10^4 cell/mL โดยสามารถตรวจวัดความเข้มข้นด้วยการนับจำนวนเซลล์โดยใช้ Hemocytometer เตรียมเซลล์จนได้ปริมาณที่ต้องการทดสอบ

2) การเตรียมตัวอย่างสารสกัดทดสอบเซลล์มะเร็ง

สารตัวอย่างที่ต้องการทดสอบนั้นมี 2 ชนิด ได้แก่

I สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล

II สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ

เตรียมสารตัวอย่างเพื่อการทดสอบ เข้มข้น 50 mg/mL โดยการชั่งสารสกัดเอทานอลเห็ดกระถินพิมาน 39.6 mg ละลายด้วย DMSO 792 µL และ ชั่งสารสกัดน้ำเห็ดกระถินพิมาน 34 mg ละลายด้วย DMSO 680 µL จากนั้นเจือจางตัวอย่างสารสกัดให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.8, 3.9,1.95 µg/L ด้วย DMSO เพื่อนำไปทดสอบหาค่า IC_{50} ต่อไป

3) การเตรียมสารละลาย MTT

เตรียมสารละลาย MTT ใน normal saline ให้มีความเข้มข้น 5 mg/mL (เก็บสารละลายไว้ในขวดสีชา และเก็บรักษาไว้ที่ 4°C ได้ 1 เดือน)

4) การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT

4.1) เติมเซลล์ที่เลี้ยงไว้จากข้อที่ 1) ปริมาตร 100 µL ลงใน microtiter plate 96 well ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI1640 อยู่ 100 µL/well (จะได้ความเข้มข้น 2.5 x 10^3 cell/well/200 µL) บ่มไว้ที่ 37 °C 5% CO_2 นาน 24 ชั่วโมง

4.2) เติมตัวอย่างสารสกัดที่เตรียมไว้จากข้อที่ 2) ปริมาตร 2 µL/well ลงใน microtiter plate 96 well บ่มไว้ที่ 37 °C 5% CO_2 นาน 72 ชั่วโมง (3 วัน)

4.3) เติม MTT เข้มข้น 5 mg/mL ที่เตรียมไว้จากข้อที่ 3) ปริมาตร 10 µL/well ลงใน microtiter plate 96 well บ่มนาน 4 ชั่วโมง ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ทิ้ง

4.4) เติม 100% DMSO ปริมาตร 150 µg/mL เขย่าบน plate mixer นาน 2-3 นาที

4.5) วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm

5) การคำนวณ

$$\%\ \text{การมีชีวิตรอดของเซลล์ (\% cell survival)} = \frac{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ } MTT \text{ ในสารสกัด}}{\text{ค่าการดูดกลืนแสงของ } MTT \text{ ในตัวทำละลาย } DMSO} \times 100$$

นำค่า % cell survival มาสร้างกราฟเพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์มีการรอด 50% หรือค่า IC_{50} (Inhibit concentration 50%) โดยกำหนดให้แกน X เป็น log ของความเข้มข้นของสาร และ แกน Y เป็น % cell survival

บทที่ 4

ผลการทดลองและอภิปรายผลการทดลอง

4.1 การเตรียมสารสกัดของเห็ดกระถินพิมาน

จากการนำผงเห็ดกระถินพิมานมาประมาณ 40 กรัม แล้วทำการสกัดทั้งหมด 2 วิธี คือการสกัดด้วยน้ำ และการสกัดด้วยเอทานอล พบว่าได้ลักษณะของสารสกัด น้ำหนัก และปริมาณร้อยละของสารที่ได้ ดังตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 แสดงลักษณะ น้ำหนัก และร้อยละปริมาณของสารสกัดที่ได้ (% yield extract) ของสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน

สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมาน	ลักษณะของสารสกัด	น้ำหนักสารสกัด(กรัม)	ร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract)
สารสกัดด้วยน้ำ	ของแข็งเป็นเกล็ดสีน้ำตาลเข้ม	1.3187	3.30
สารสกัดด้วยเอทานอล	ของแข็งเป็นผงสีน้ำตาลเข้ม	0.0792	0.20

จากตารางที่ 4.1 จะเห็นได้ว่า สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่สกัดด้วยเอทานอล มีร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) มากกว่า สารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่สกัดด้วยน้ำ

4.2 การตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytoxicity assay)

MTT assay เป็นวิธีการตรวจวัดความมีชีวิตของเซลล์ โดยเซลล์มีชีวิต จะมี mitochondrial dehydrogenase ที่จะเปลี่ยนเป็น MTT (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl])-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide ซึ่งเป็นสารละลายสีเหลือง ให้เป็น formazan ที่มีสีฟ้าและไม่ละลายน้ำ โดยปริมาณ formazan ที่เกิดขึ้นจึงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์มีชีวิต จึงสามารถนำไปใช้วัดความมีชีวิตของเซลล์ได้

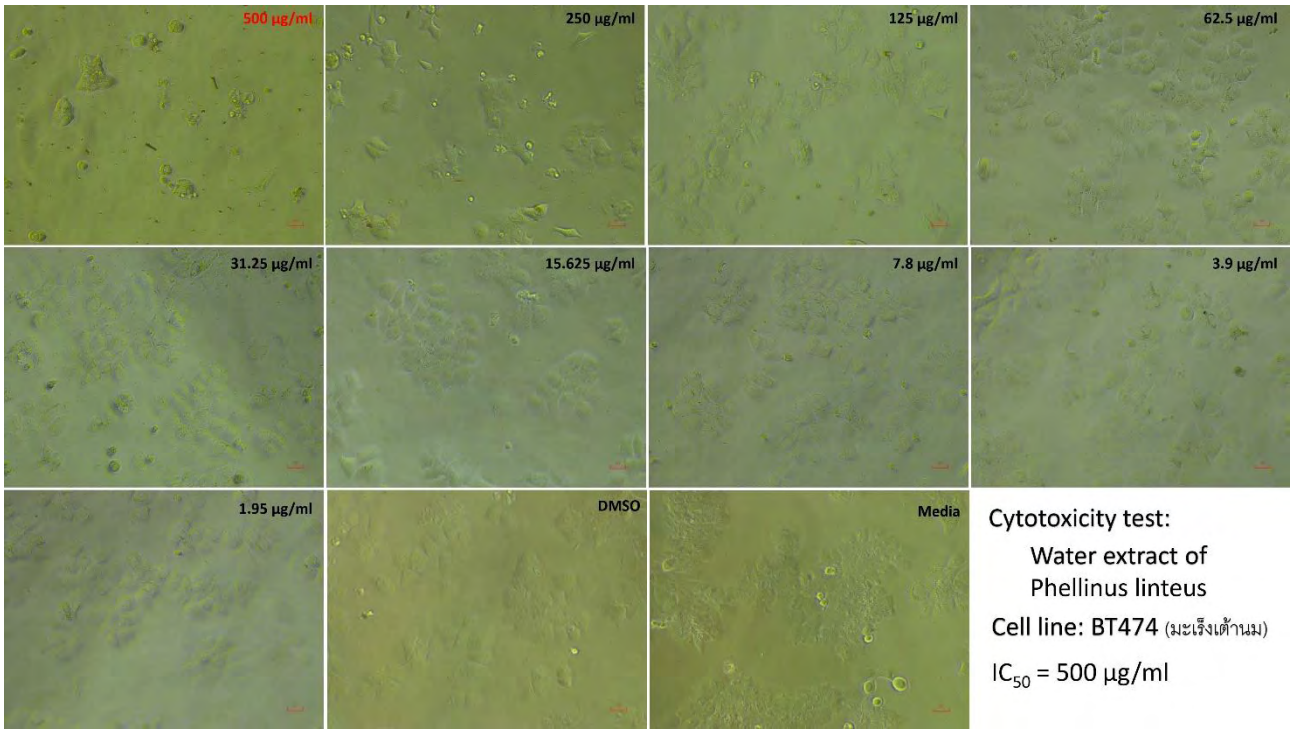
3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide **(MTT)**

(*E,Z*)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan **(Formazan)**

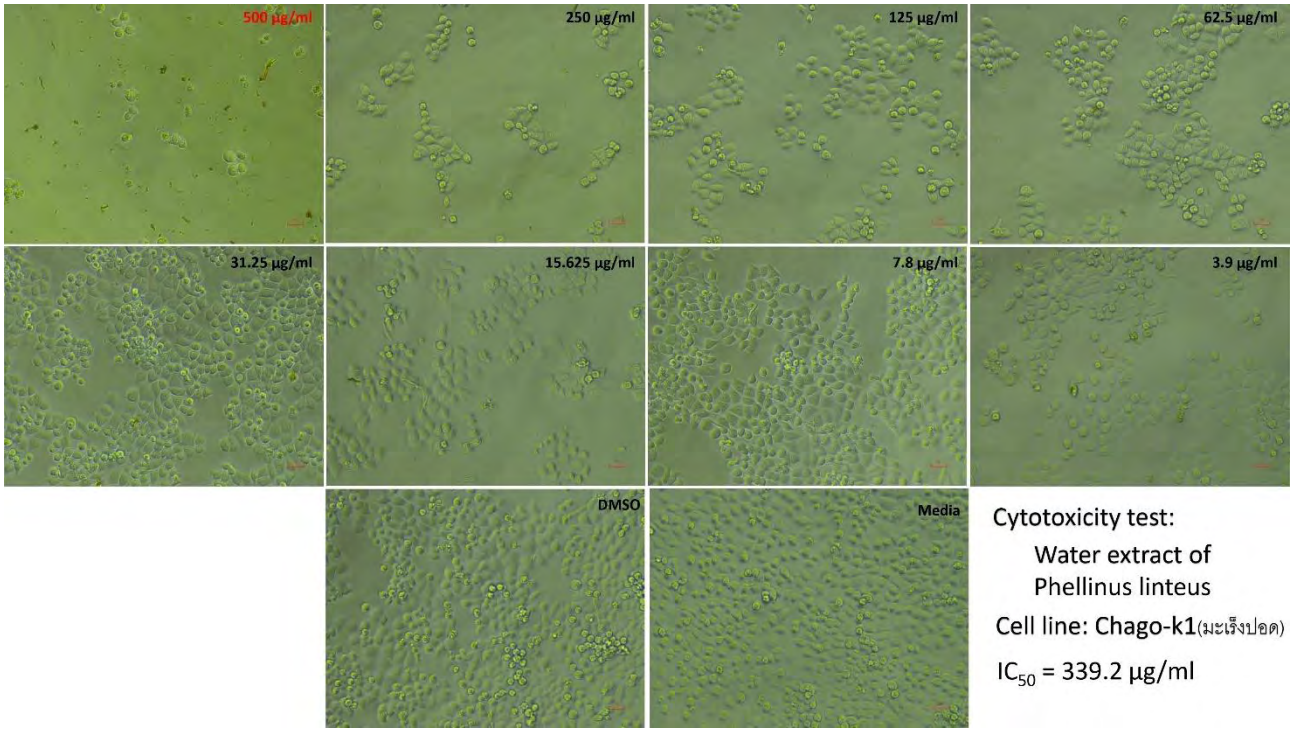
จากการนำสารตัวอย่าง 2 ชนิด ได้แก่ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ และ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytoxicity assay) ที่ความเข้มข้น 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.625, 7.80, 3.9 และ 1.95 µg/mL แล้วเติม MTT 5 mg/mL ปริมาตร 10 µL/well บ่มไว้ในตู้เซลล์นาน 4 ชั่วโมง แล้วเติม 100% DMSO ปริมาตร 150 µL/well เพื่อทำให้ formazan ละลายออกมา เขย่าบน plate mixer นาน 2-3 นาที แล้ววัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 nm และนำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell survival) และนำค่า % cell survival มาคำนวณหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (IC_{50}) ซึ่งได้ผลตามตารางที่ 4.2 และลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์มะเร็ง อันเนื่องมาจากสารสกัดทั้งสอง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ แสดงไว้ในรูปที่ 4.1-4.12

ตารางที่ 4.2 แสดงผลการนำสารสกัดต่างๆจากเห็ดกระถินพิมานมาตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิด และเซลล์ปกติ (IC_{50})

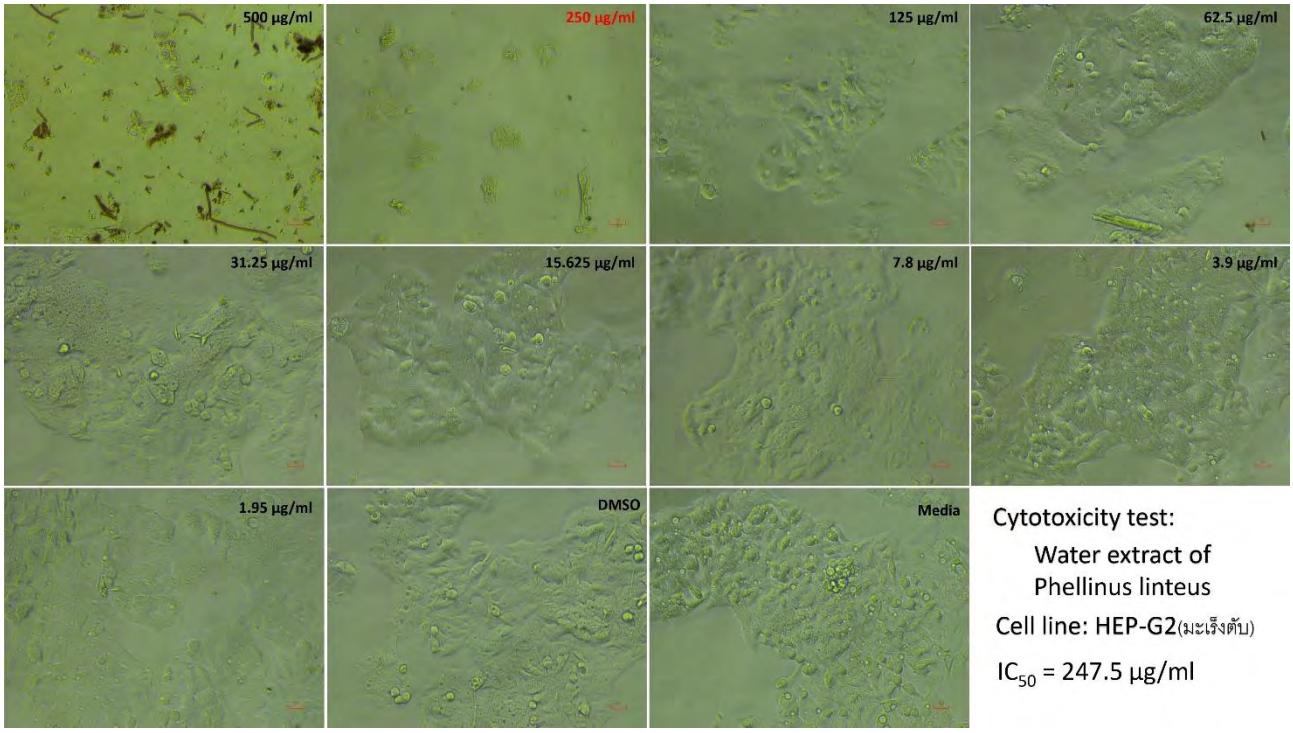
สาร/Cell lines	IC_{50} (µg/mL)					
	BT474	Chago-K1	Hep-G2	KATO-III	SW620	WI-38 (inactive)
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ	500	339.2	247.5	190.7	372.3	>500
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล	58.0	58.3	43.0	31.1	33.0	117.1



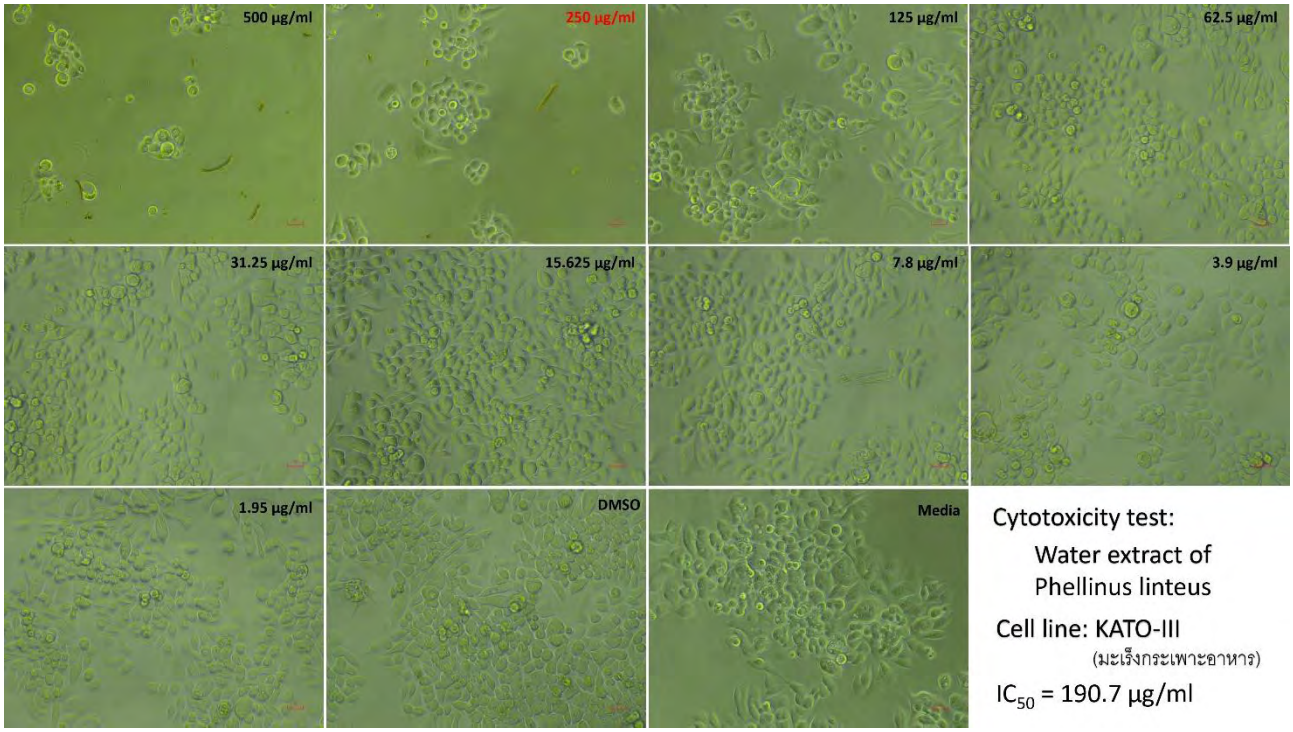
รูปที่ 4.1 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)



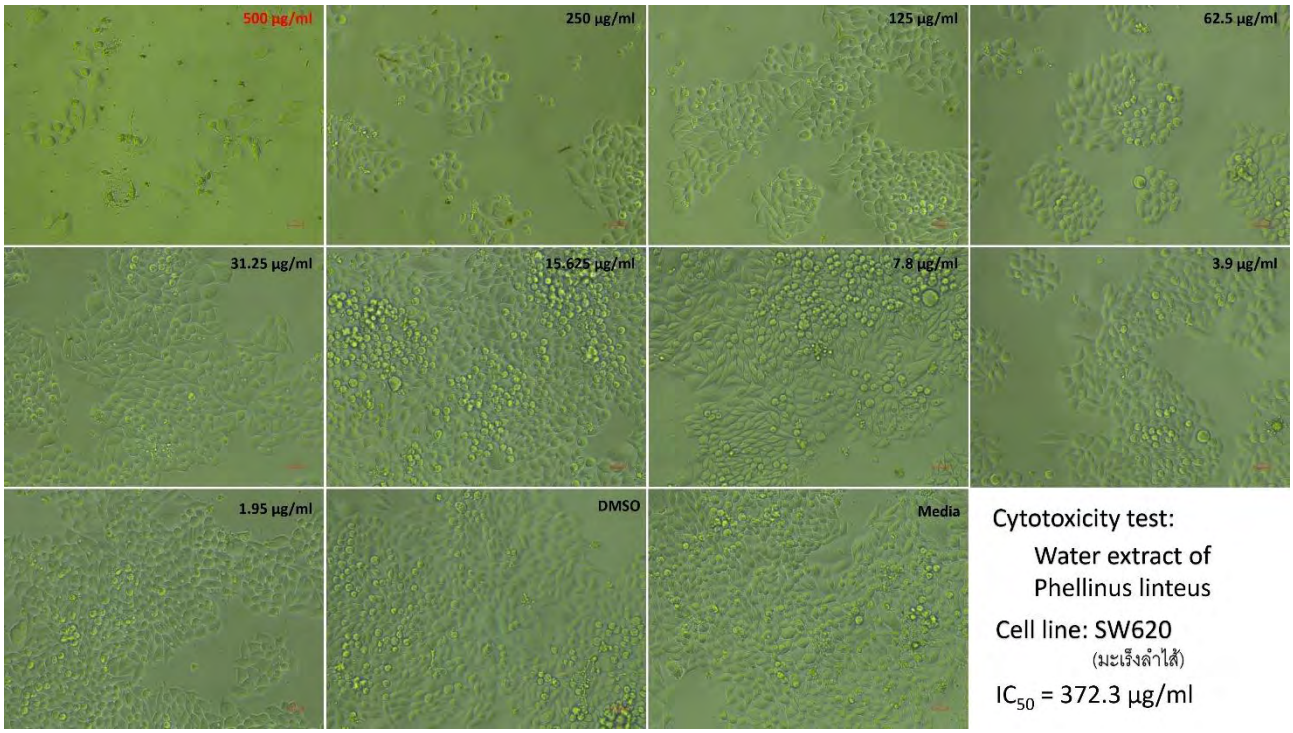
รูปที่ 4.2 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)



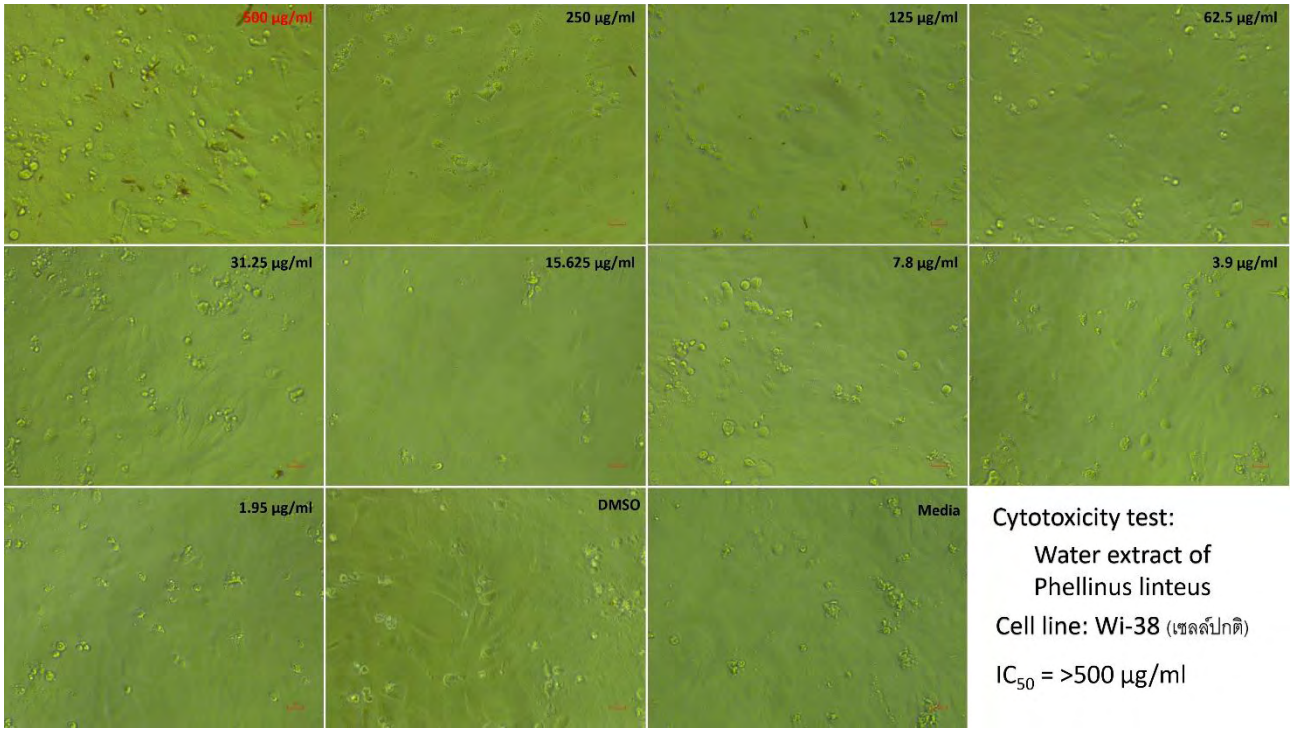
รูปที่ 4.3 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2)



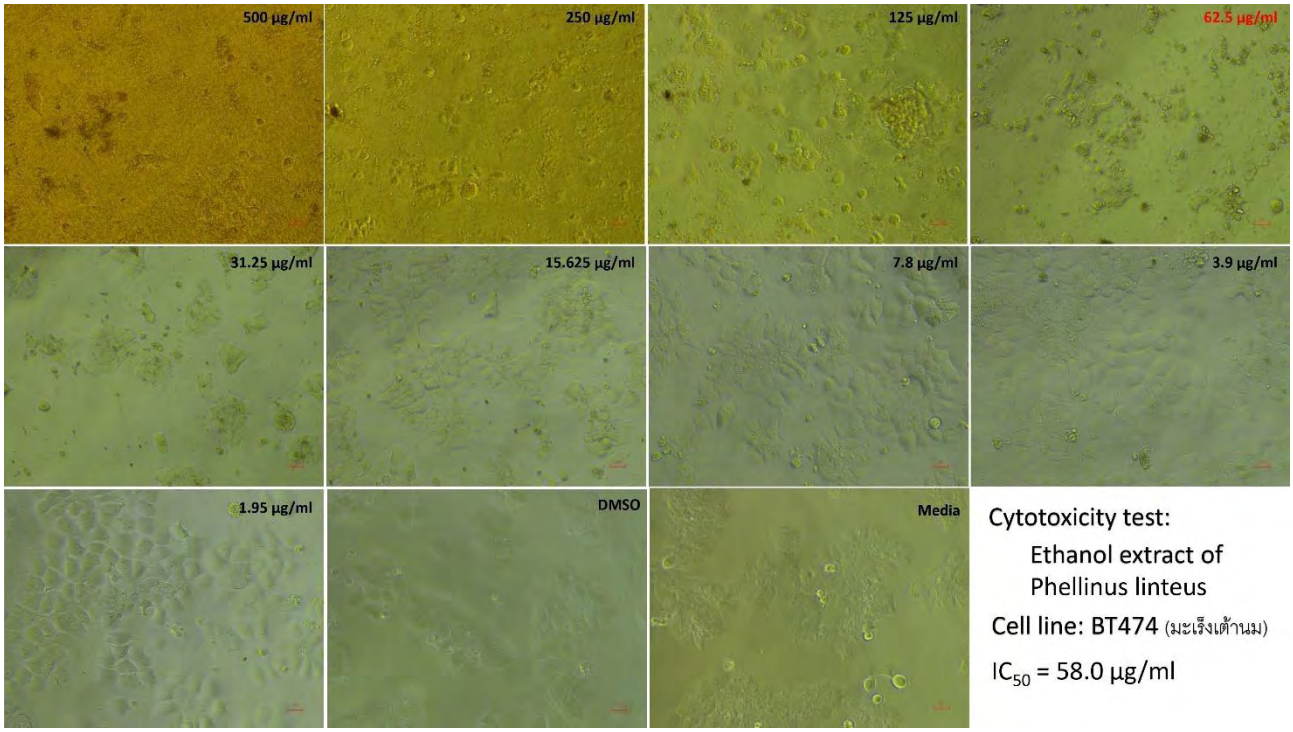
รูปที่ 4.4 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)



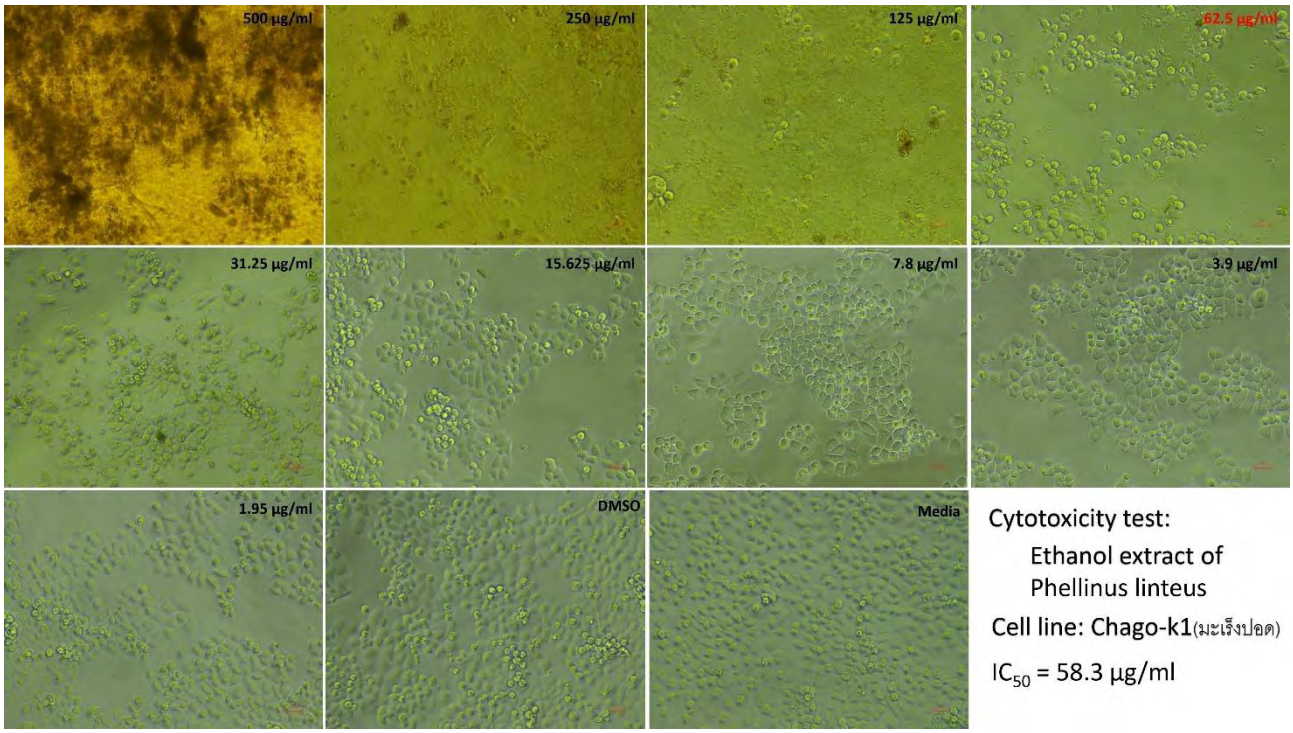
รูปที่ 4.5 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)



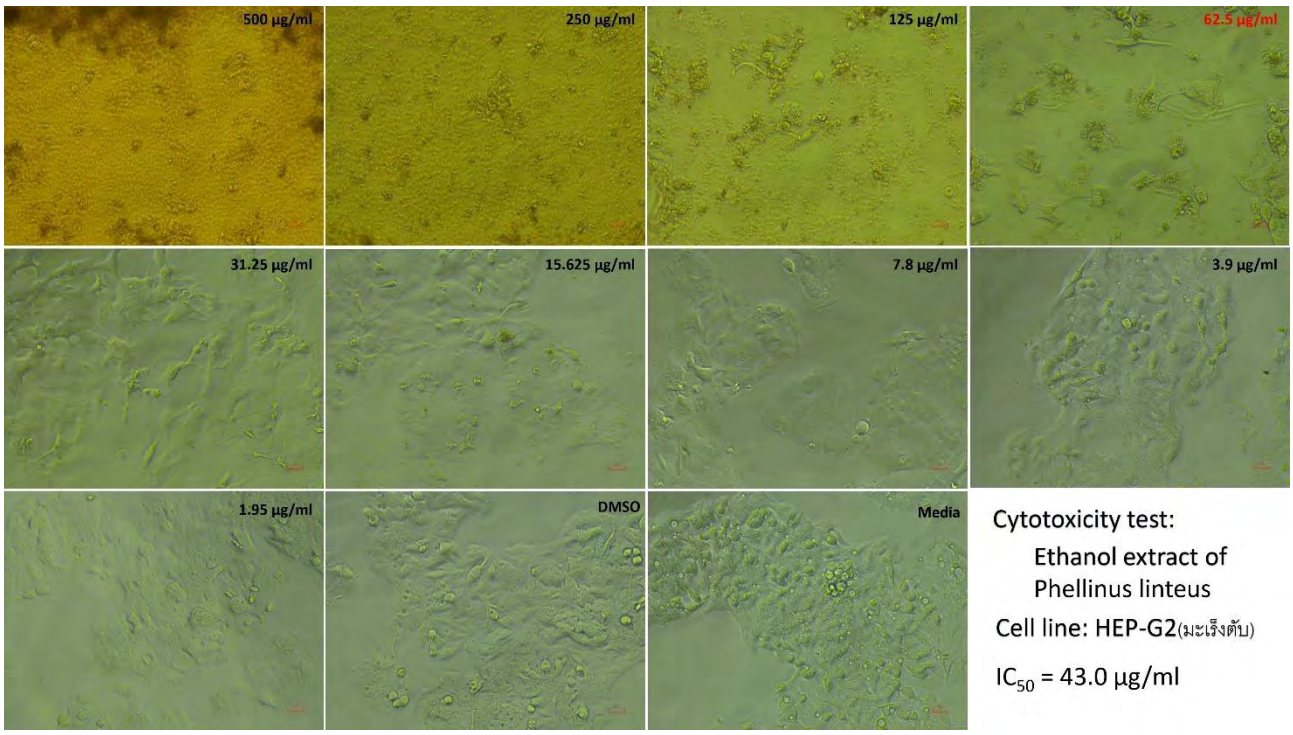
รูปที่ 4.6 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์ปกติ (Wi-38)



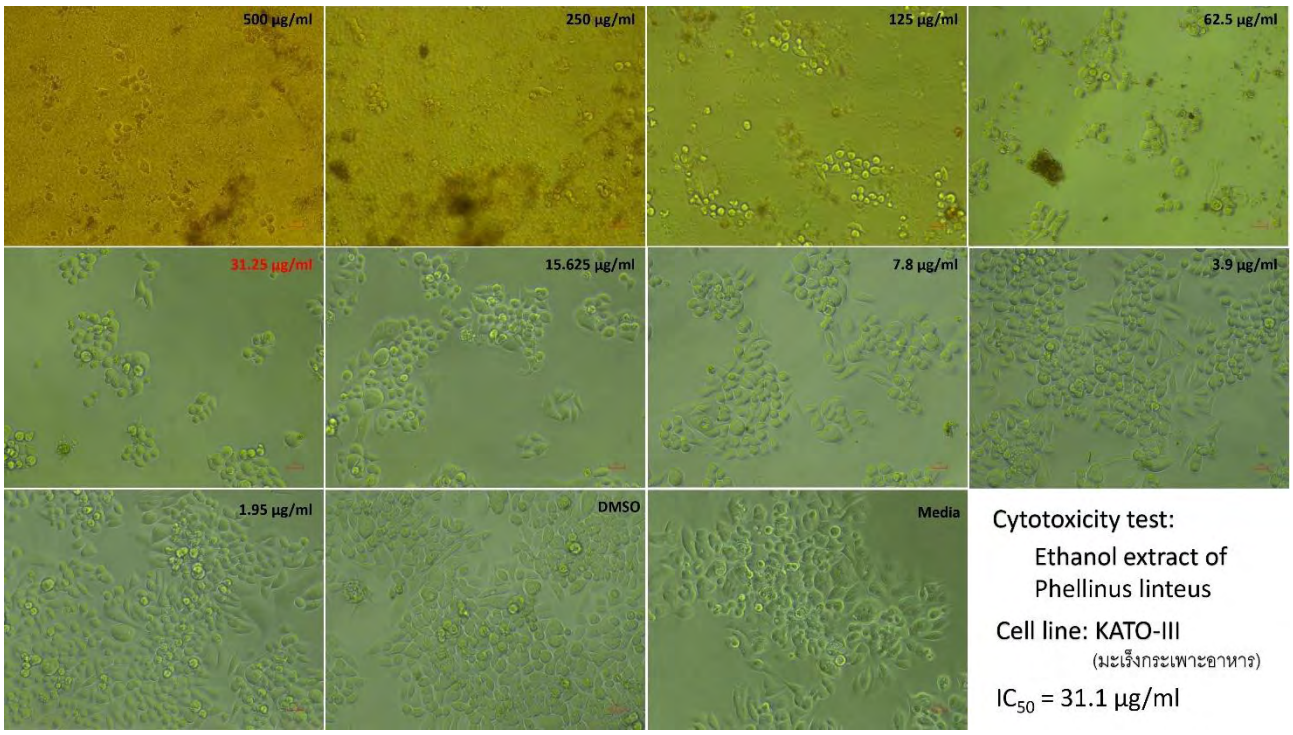
รูปที่ 4.7 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474)



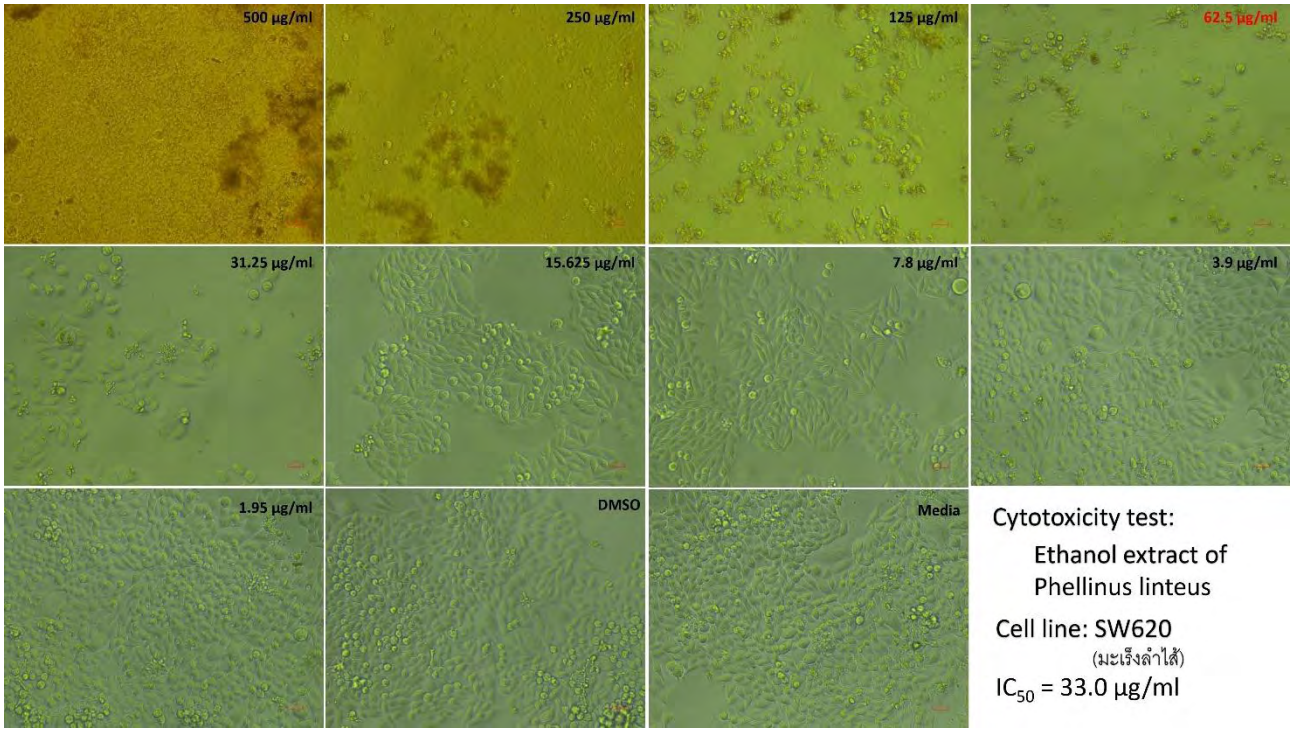
รูปที่ 4.8 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1)



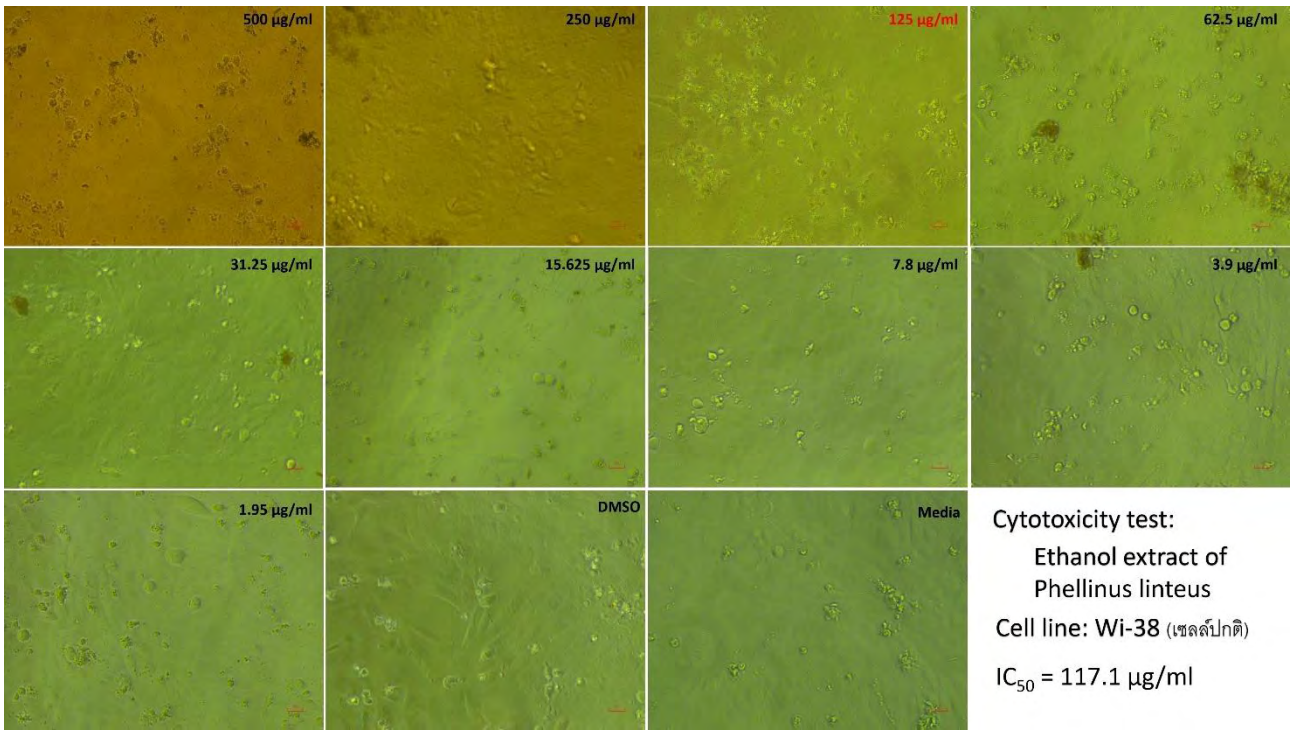
รูปที่ 4.9 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2)



รูปที่ 4.10 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)



รูปที่ 4.11 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620)



รูปที่ 4.12 ผลของการนำสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลในความเข้มข้นต่าง ๆมาตรวจสอบสารพิษต่อเซลล์ปกติ (Wi-38)

เมื่อได้ค่าดูดกลืนแสงจากการทำ MTT assay แล้วนำค่าดูดกลืนแสงมาคำนวณการมีชีวิตรอดของเซลล์ (% cell survival) และนำค่า % cell survival มาคำนวณหาความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดและเซลล์ปกติ (IC_{50}) ซึ่งค่า IC_{50} คือค่าความเข้มข้นของสารที่ให้ผลยับยั้งความมีชีวิตลดลงเป็นครึ่งหนึ่งจากสภาวะไม่มีสารทดสอบ ดังนั้นเมื่อสารที่ทดสอบมีค่า IC_{50} ที่น้อยกว่าแสดงว่ามีความสามารถในการยับยั้งความมีชีวิต หรือการเป็นพิษต่อเซลล์ได้ดีกว่า จากการคำนวณค่า IC_{50} ของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ และ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล พบว่า

สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ โดยไม่ทำลายเซลล์ปกติ (Wi-38) ซึ่งเห็นได้จากการแสดงค่า IC_{50} ที่มากกว่า 500 µg/mL โดยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำนี้มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 190.7 µg/mL รองลงมาคือ ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ(Hep-G2) ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 247.5 µg/mL ต่อมาคือ ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) และ เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ที่มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีพอ ๆ กัน ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 339.2 µg/mL และ 372.3 µg/mL ตามลำดับ สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านม(BT474) นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยที่สุด โดยแสดงค่า ค่า IC_{50} เท่ากับ 500 µg/mL

สำหรับสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มีความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งทั้ง 5 ชนิดได้ดีกว่าน้ำค่อนข้างมากเช่นกัน โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์กระเพาะอาหาร (KATO-III) ได้ดีที่สุด ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 31.1 µg/mL รองลงมาคือ ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 33.0 µg/mL ถัดมาคือ ฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) ซึ่งแสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 43.0 µg/mL สำหรับเซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และ เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) นั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งน้อยที่สุด โดยแสดงค่า ค่า IC_{50} เท่ากับ 58.0 µg/mL และ 58.3 µg/mL ซึ่งเมื่อเทียบกับค่า IC_{50} ของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำนั้น จะเห็นได้ว่า สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่าอย่างเห็นได้ชัด แต่เมื่อดู ค่า IC_{50} ของเซลล์ปกติ (Wi-38) ที่แสดงค่า IC_{50} 117.1 µg/mL ทำให้เห็นว่าแม้สารสกัดเห็ดกระถินพิมานจะมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ดีกว่า แต่ก็มีฤทธิ์ในการทำลายเซลล์ปกติบางส่วน

เมื่อพิจารณาลักษณะการตายของเซลล์มะเร็งแล้ว พบว่าการตายของเซลล์มีทั้งแบบ Apoptosis และ Necrosis โดยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ ในรูป 4.1 จะสังเกตเห็นได้ว่าที่ความเข้มข้น 250 และ 500 µg/mL เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) มีจำนวนที่ลดลงอย่างชัดเจนเมื่อเทียบกับ Media เนื่องจากเซลล์มีการหดตัวไม่รวมกลุ่มกัน ซึ่งเป็นการตายของเซลล์แบบ Apoptosis ส่วนเซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) ในรูป 4.2 และ 4.5 นั้นจะสังเกตเห็นว่า ที่ความเข้มข้น 500 µg/mL การตายของเซลล์มีทั้งการตายแบบ Apoptosis และพบเศษซากของเซลล์ที่เกิดจากการแตกตัวจากการตายแบบ Necrosis สำหรับเซลล์มะเร็งตับ (HEP-G2) ในรูป 4.3 นั้นจะสังเกตได้จากความเข้มข้น 250 µg/mL โดยมีการหดตัวและแยกออกจากกันจากเดิมที่เกาะกันเป็นกลุ่ม ซึ่งเป็นการตายแบบ Apoptosis สำหรับเซลล์กระเพาะอาหาร (KATO-III) ในรูป 4.4 จะเห็นลักษณะเซลล์ที่เปลี่ยนแปลงไปอย่างชัดเจน เซลล์มีการรวมกลุ่มที่ลดลง และเซลล์มีการแตกสลาย โดยการตายแบบ

Necrosis ของเซลล์มะเร็งนี้เป็นแบบ Coagulative necrosis เนื่องจากแม้เซลล์แตกแต่ยังมีเศษซากเซลล์คงเหลืออยู่ จากการคงสภาพของเซลล์ที่ตายในระยะหนึ่ง เกิดจากการเสียสภาพของโปรตีนรวมทั้งเอนไซม์ต่าง ๆภายในเซลล์

สำหรับการพิจารณาการตายของเซลล์มะเร็งในสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล ที่ความเข้มข้นมากกว่า 62.5 μg/mL เซลล์มะเร็งมีลักษณะหดตัว ไม่รวมกลุ่มกันอย่างเห็นได้ชัด ซึ่งเป็นลักษณะการตายแบบ Apoptosis และ เซลล์มะเร็งบางส่วนมีการแตกสลาย ซึ่งเป็นลักษณะการตายแบบ Necrosis

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

จากการสารสกัดเห็ดกระถินพิมานทั้งหมด 2 แบบคือ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ และ สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล พบว่าสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอลได้ร้อยละปริมาณของสารที่สกัดได้ (%yield extract) ร้อยละ 3.30 ซึ่งมากกว่า สารสกัดเห็ดกระถินพิมานที่ได้ปริมาณ ร้อยละ 0.20 ซึ่งเมื่อนำตัวอย่างสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานทั้งสองแบบ มาทดสอบการเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งทั้งหมด 5 ชนิด ได้แก่ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2) เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) รวมไปถึงเซลล์ปกติ (Wi-38) ด้วยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดจากเห็ดกระถินพิมานที่สกัดด้วยน้ำ และเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งได้ทั้ง 5 ชนิด โดยมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ได้ดีที่สุด โดยมีค่า IC_{50} ของสารสกัดด้วยน้ำ เท่ากับ 190.7 µg/mL และ IC_{50} ของสารสกัดด้วยเอทานอล เท่ากับ 31.1 µg/mL สำหรับเซลล์มะเร็งอื่นก็สามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งได้เช่นกัน โดยสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1), เซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620) และ เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 247.5 µg/mL, 339.2 µg/mL, 372.3 µg/mL และ 500 µg/mL ตามลำดับ ส่วนสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (SW620), เซลล์มะเร็งตับ (Hep-G2), เซลล์มะเร็งเต้านม (BT474) และ เซลล์มะเร็งปอด (Chago-K1) แสดงค่า IC_{50} เท่ากับ 33.0 µg/mL, 43.0 µg/mL, 58.0 µg/mL และ 58.3 µg/mL ตามลำดับ และเมื่อทดสอบกับเซลล์ปกตินั้น สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ มีฤทธิ์ที่ไม่ทำลายเซลล์ปกติ ส่วนสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล มีฤทธิ์ที่ทำลายเซลล์ปกติบางส่วนโดยมี IC_{50} 117.1 µg/mL เมื่อพิจารณาลักษณะการตายของเซลล์พบว่าการตายของเซลล์มีทั้งแบบ Apoptosis และ Necrosis แบบ Coagulative necrosis

เอกสารอ้างอิง

1. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. (2013). เห็ดกระถินพิมาน...เห็ดเงินล้าน. สำนักงานข้อมูลสมุนไพร, 30(2), 1-2.
2. สุริยวงศ์ หิรัญเตโช. (2017). เห็ดกระถินพิมาน พืชมหัศจรรย์ ยับยั้งเซลล์มะเร็ง. Retrieved Feb 1, 2020, from https://www.tnews.co.th/social/381592/
3. โครงการสมุนไพรเพื่อการพึงพาตนเอง มูลนิธิสุขภาพไทย. (2561). เรียนรู้เห็ดกระถินพิมาน. Retrieved Feb 1, 2020, from https://www.matichonweekly.com/column/article_101830
4. Richard Sullivan. (2020). Phellinus linteus. Retrieved Feb 1, 2020, from https://en.wikipedia.org/wiki/Phellinus_linteus
5. Wu, S., Liaw, C., Pan, S., Yang, H. C., Ng, L. (2013). *Phellinus linteus Polysaccharides andTheir Immunomodulatory Properties in Human Monocytic Cells. Journal of Functional Foods*. 5(2), 679–688.
6. Yan, J., Wang, Y., Ma, H., Wang, Z., & Pei, J. (2016). *Structural characteristics and antioxidant activity in vivo of a polysaccharide isolated from Phellinus linteus mycelia. Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 65, 110-117.
7. Park, H., Park, J., Lee, S., & Song, M. (2017). *Phellinus linteus Grown on Germinated Brown Rice Increases Cetuximab Sensitivity of KRAS-Mutated Colon Cancer*, 18, 1746.
8. Huang, S., Wang, P., Kuo, P., Hung, H., & Pan, T. (2018). *Hepatoprotective Principles and Other Chemical Constituents from the Mycelium of Phellinus linteus*, 23, 1705.
9. Jensen, William B. (2007). *The Origin of the Soxhlet Extractor. Journal of Chemical Education*, 84 (12), 1913– 1914.
10. กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. ภาควิชาเทคโนโลยีชีวภาพ คณะวิศวกรรมศาสตร์และเทคโนโลยีอุตสาหกรรม มหาวิทยาลัยศิลปากร. 2548
11. Shirahata, T., Ino, C., Mizuno, F., Asada, Y., Hirotani, M., & Kobayashi, Y. (2017). *Lonylidene-type sesquiterpenoids possessing antimicrobial activity against porphyromonas gingivalis from Phellinus linteus and their absolute structure determination. The Jornal of antibiotics*, 70, 695-698.
12. Chen, W., Tan, H., Liu, Q., Zheng, X., Zhang, H., Liu, Y., & Xu., L. (2019). *A Review: The Bioactivities and Pharmacological Applications of Phellinus linteus,* 24, 1888.
13. Techaoei, S., Jarmkom, K., Eakwaropas, P., Khobjai, W. (2017). *An Alternative Antimicrobial Approach to Fight Bacterial Pathogens from Phellinus linteus. International Journal of Bioengineering and Life Sciences*. 11(5)

14. สหพัฒน์ บริศว์รักษ์. อะพอพโทสิส. ภาควิชาภูมิคุ้มกันวิทยาคลินิก คณะเทคนิคการแพทย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น. คลังนานาวิทยา. 2548.

15. Ashe PC., and Berry MD. 2003. *Apoptotic signaling cascades. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 27(2): 199-214.

16. F. A. Bovey, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, 2nd Edition., Academic Press, N. Y. and London, 1987

17. R. K. Harris, Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, Longman Scientific and Technical, 1986.

18. Park, H. (2017). *Antiallergenic and Anti-inflammatory Activity of Phellinus linteus Grown on Panax ginseng. Food Science and Biotechnology*. 26(2), 467–472.

19. Yu, T., Ganapathy, S., Shen, L., Peng, B., Kim, S. Makriyannis, A., Chen, C. (2018). *A Lethal Synergy Induced by Phellinus linteus and Camptothecin11 in Colon Cancer Cells. Oncotarget.* 9(5): 6308–6319.

20. Yan, G. H., Choi, Y. H. (2014). *Phellinus linteus Extract Exerts Anti - asthmatic Effects by Suppressing NF-kB and p38 MAPK Activity in an OVA-induced Mouse Model of Asthma. Immune Network*. 14(2), 107–115.

ภาคผนวก

ตาราง ผ1 ร้อยละการอยู่รอดของเซลล์ (% Cell Survival)

สาร	Conc.	BT474 (A_{540})						Conc.	Chago-K1 (A_{540})						Conc.	Hep-G2 (A_{540})					
	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ	500	0.242	0.417	0.408	0.212	**0.320**	50	500	0.189	0.318	0.152	0.202	**0.215**	36	500	0.275	0.349	0.248	0.233	**0.276**	40
	250	0.426	0.363	0.373	0.407	**0.392**	61	250	0.343	0.386	0.372	0.318	**0.355**	60	250	0.241	0.366	0.352	0.393	**0.338**	49
	125	0.373	0.541	0.617	0.391	**0.481**	75	125	0.359	0.339	0.404	0.457	**0.390**	66	125	0.372	0.486	0.498	0.508	**0.466**	68
	62.5	0.478	0.466	0.471	0.485	**0.475**	74	62.5	0.571	0.360	0.392	0.390	**0.428**	73	62.5	0.595	0.574	0.546	0.511	**0.557**	81
	31.25	0.356	0.456	0.460	0.462	**0.434**	68	31.25	0.381	0.479	0.489	0.364	**0.428**	73	31.25	0.510	0.531	0.569	0.539	**0.537**	78
	15.625	0.493	0.533	0.490	0.524	**0.510**	80	15.625	0.387	0.505	0.455	0.415	**0.441**	75	15.625	0.692	0.664	0.546	0.560	**0.616**	90
	7.80	0.412	0.630	0.495	0.524	**0.515**	81	7.80	0.544	0.498	0.484	0.490	**0.504**	85	7.80	0.598	0.646	0.543	0.536	**0.581**	85
	3.9	0.412	0.630	0.495	0.524	**0.515**	81	3.9	0.449	0.487	0.464	0.499	**0.475**	80	3.9	0.604	0.797	0.744	0.498	**0.661**	96
	1.95	0.423	0.529	0.622	0.801	**0.594**	93	1.95	0.436	0.512	0.480	0.523	**0.488**	83	1.95	0.450	0.578	0.549	0.604	**0.545**	79
DMSO	0	0.492	0.527	0.736	0.707	**0.638**	100	0	0.607	0.564	0.526	0.530	**0.590**	100	0	0.575	0.779	0.721	0.654	**0.687**	100
		0.614	0.750	0.633	0.646				0.627	0.632	0.607	0.630				0.672	0.715	0.674	0.708		
Media		0.927	0.880	0.880	0.918	**0.911**			0.987	0.939	0.922	0.898	**0.916**			1.029	1.248	1.061	1.147	**1.097**	
		0.893	0.916	0.935	0.940				0.905	0.886	0.913	0.881				1.116	1.084	1.099	0.989		

สาร	Conc.	KATO-III (A_{540})						Conc.	SW620 (A_{540})						Conc.	WI-38 (A_{540})					
	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ	500	0.249	0.455	0.518	0.275	**0.374**	37	500	0.301	0.679	0.297	0.349	**0.407**	36	500	0.317	0.372	0.341	0.231	**0.315**	69
	250	0.349	0.402	0.495	0.421	**0.417**	41	250	0.889	0.698	0.552	0.619	**0.690**	62	250	0.402	0.394	0.320	0.341	**0.364**	80
	125	0.579	0.668	0.713	0.561	**0.630**	62	125	0.946	0.937	0.880	0.820	**0.896**	80	125	0.416	0.372	0.419	0.385	**0.398**	87
	62.5	0.675	0.726	0.672	0.567	**0.660**	65	62.5	1.176	0.943	0.897	0.888	**0.976**	87	62.5	0.342	0.379	0.365	0.374	**0.365**	80
	31.25	0.428	0.688	0.695	0.660	**0.618**	61	31.25	1.026	1.081	1.052	1.017	**1.044**	94	31.25	0.463	0.442	0.402	0.363	**0.418**	91
	15.625	0.488	0.730	0.671	0.592	**0.620**	61	15.625	0.978	0.964	0.977	1.071	**0.998**	89	15.625	0.431	0.374	0.384	0.384	**0.393**	86
	7.80	0.715	0.714	0.634	0.662	**0.681**	67	7.80	1.171	1.184	1.067	0.989	**1.103**	99	7.80	0.380	0.376	0.380	0.384	**0.380**	83
	3.9	0.657	0.741	0.735	0.662	**0.699**	69	3.9	1.144	1.130	1.009	0.902	**1.046**	94	3.9	0.496	0.405	0.384	0.409	**0.424**	92
	1.95	0.682	0.869	0.764	0.730	**0.761**	75	1.95	1.227	1.078	1.051	0.984	**1.085**	97	1.95	0.453	0.444	0.425	0.370	**0.423**	92
DMSO	0	1.011	1.054	1.003	1.056	**1.018**	100	0	1.126	1.197	1.100	1.131	**1.116**	100	0	0.454	0.487	0.457	0.459	**0.458**	100
		0.985	0.930	1.075	1.031				1.126	1.108	1.044	1.093				0.419	0.461	0.456	0.472		
Media		1.281	1.320	1.362	1.303	**1.326**			1.314	1.153	1.243	1.178	**1.192**			0.507	0.480	0.468	0.461	**0.473**	
		1.359	1.370	1.329	1.282				1.164	1.138	1.181	1.166				0.473	0.475	0.474	0.449		

สาร	Conc.	BT474 (A_{540})						Conc.	Chago-K1 (A_{540})						Conc.	Hep-G2 (A_{540})					
	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล	500	0.734	0.882	1.079	1.179	**0.969**	152	500	0.555	0.760	0.697	0.794	**0.702**	119	500	0.833	0.714	0.569	0.758	**0.719**	105
	250	0.416	0.579	0.426	0.473	**0.474**	74	250	0.328	0.355	0.342	0.343	**0.342**	58	250	0.359	0.350	0.325	0.469	**0.376**	55
	125	0.305	0.259	0.388	0.427	**0.345**	54	125	0.219	0.258	0.244	0.264	**0.246**	42	125	0.183	0.231	0.199	0.189	**0.201**	29
	62.5	0.306	0.256	0.289	0.312	**0.291**	46	62.5	0.289	0.247	0.299	0.221	**0.264**	45	62.5	0.269	0.301	0.272	0.301	**0.286**	42
	31.25	0.439	0.478	0.465	0.517	**0.475**	74	31.25	0.418	0.439	0.450	0.468	**0.444**	75	31.25	0.387	0.369	0.375	0.375	**0.377**	55
	15.625	0.536	0.547	0.608	0.630	**0.580**	91	15.625	0.581	0.557	0.567	0.562	**0.567**	96	15.625	0.341	0.339	0.371	0.277	**0.332**	48
	7.80	0.572	0.587	0.651	0.745	**0.639**	100	7.80	0.544	0.422	0.588	0.606	**0.540**	92	7.80	0.385	0.417	0.436	0.430	**0.417**	61
	3.9	0.647	0.606	0.729	0.706	**0.672**	105	3.9	0.588	0.448	0.545	0.631	**0.553**	94	3.9	0.521	0.408	0.425	0.481	**0.459**	67
	1.95	0.618	0.634	0.586	0.679	**0.629**	99	1.95	0.587	0.699	0.627	0.573	**0.622**	105	1.95	0.515	0.599	0.568	0.559	**0.560**	82
DMSO	0	0.492	0.527	0.736	0.707	**0.638**	100	0	0.607	0.564	0.526	0.530	**0.590**	100	0	0.575	0.779	0.721	0.654	**0.687**	100
		0.614	0.750	0.633	0.646				0.627	0.632	0.607	0.630				0.672	0.715	0.674	0.708		
Media		0.927	0.880	0.880	0.918	**0.911**			0.987	0.939	0.922	0.898	**0.916**			1.029	1.248	1.061	1.147	**1.097**	
		0.893	0.916	0.935	0.940				0.905	0.886	0.913	0.881				1.116	1.084	1.099	0.989		

สาร	Conc.	KATO-III (A_{540})						Conc.	SW620 (A_{540})						Conc.	WI-38 (A_{540})					
	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS	(µg/ml)	1	2	3	4	เฉลี่ย	PS
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล	500	0.631	0.689	0.808	0.763	**0.723**	71	500	0.529	0.650	0.514	0.601	**0.574**	51	500	0.594	0.695	0.571	0.406	**0.567**	124
	250	0.334	0.373	0.310	0.359	**0.344**	34	250	0.309	0.340	0.317	0.277	**0.311**	28	250	0.296	0.329	0.194	0.199	**0.255**	56
	125	0.297	0.262	0.259	0.363	**0.295**	29	125	0.210	0.263	0.178	0.290	**0.235**	21	125	0.213	0.162	0.219	0.212	**0.202**	44
	62.5	0.377	0.408	0.370	0.418	**0.393**	39	62.5	0.247	0.211	0.206	0.232	**0.224**	20	62.5	0.360	0.356	0.339	0.392	**0.362**	79
	31.25	0.446	0.484	0.528	0.511	**0.492**	48	31.25	0.598	0.597	0.607	0.521	**0.581**	52	31.25	0.398	0.410	0.410	0.405	**0.406**	89
	15.625	0.579	0.586	0.557	0.614	**0.584**	57	15.625	0.781	0.783	0.789	0.795	**0.787**	71	15.625	0.395	0.440	0.453	0.464	**0.438**	96
	7.80	0.655	0.625	0.575	0.753	**0.652**	64	7.80	0.764	0.879	0.819	0.752	**0.804**	72	7.80	0.420	0.448	0.427	0.421	**0.429**	94
	3.9	0.704	0.716	0.686	0.823	**0.732**	72	3.9	0.869	0.916	0.901	0.813	**0.875**	78	3.9	0.393	0.476	0.467	0.375	**0.428**	93
	1.95	0.927	0.868	0.876	0.827	**0.875**	86	1.95	0.897	0.926	0.918	0.941	**0.921**	82	1.95	0.440	0.441	0.464	0.434	**0.445**	97
DMSO	0	1.011	1.054	1.003	1.056	**1.018**	100	0	1.126	1.197	1.100	1.131	**1.116**	100	0	0.454	0.487	0.457	0.459	**0.458**	100
		0.985	0.930	1.075	1.031				1.126	1.108	1.044	1.093				0.419	0.461	0.456	0.472		
Media		1.281	1.320	1.362	1.303	**1.326**			1.314	1.153	1.243	1.178	**1.192**			0.507	0.480	0.468	0.461	**0.473**	
		1.359	1.370	1.329	1.282				1.164	1.138	1.181	1.166				0.473	0.475	0.474	0.449		

สาร/Cell lines	IC_{50} (µg/ml)					
	BT474	Chago-K1	Hep-G2	KATO-III	SW620	WI-38
เห็ด-H_2O	500	339.2	247.5	190.7	372.3	> 500
เห็ด-ETOH	58.0	58.3	43.0	31.1	33.0	117.1

ตัวอย่าง การคำนวณค่า IC_{50}

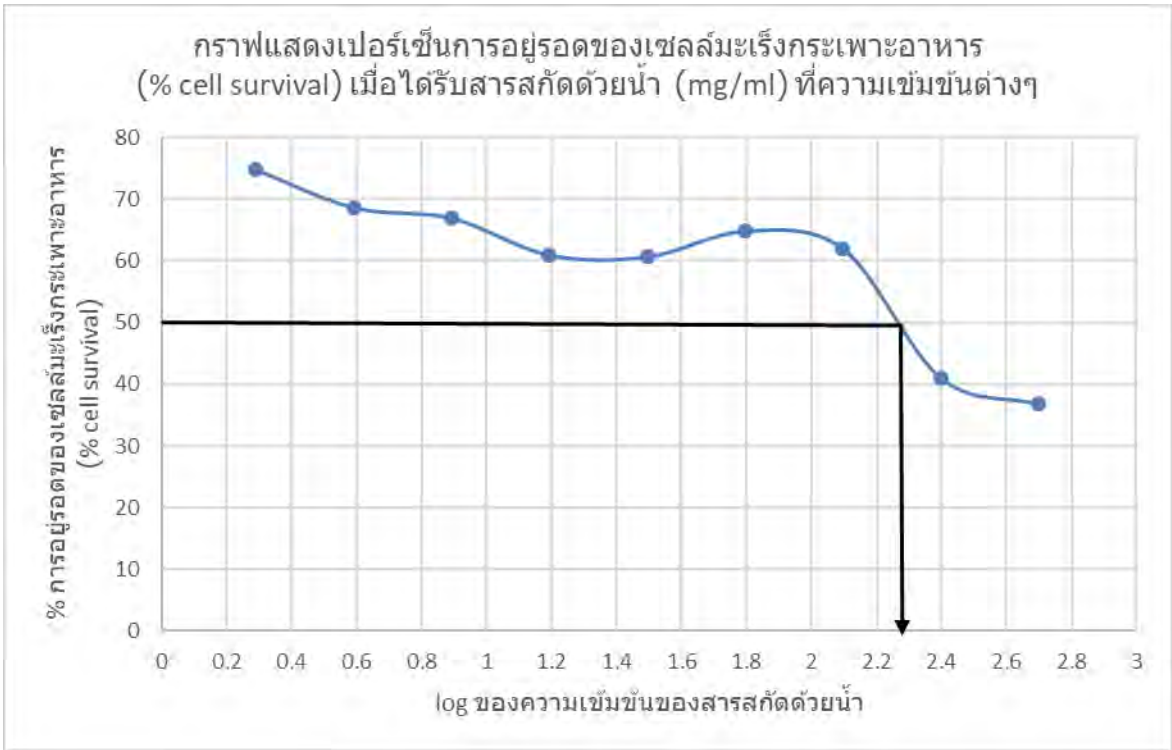
สารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ ที่ความเข้มข้น 500,250,125,62.5,31.25,15.625,7.80,3.9 และ 1.95 µg/mL ละลายใน DMSO ในความเป็นพิษต่อ เซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III)

ความเข้มข้นของสารสกัดน้ำ (µg/mL)	ค่าดูดกลืนแสงแสงที่ 540 nm ของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) หลังการเติม MTT					Percen of Survival
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3	ครั้งที่ 4	เฉลี่ย	
500	0.249	0.455	0.518	0.275	0.374	37
250	0.349	0.402	0.495	0.412	0.417	41
125	0.579	0.668	0.713	0.561	0.630	62
62.5	0.675	0.726	0.672	0.567	0.660	65
31.25	0.428	0.688	0.695	0.660	0.618	61
15.625	0.488	0.730	0.671	0.592	0.620	61
7.80	0.715	0.714	0.634	0.662	0.681	67
3.9	0.657	0.741	0.735	0.662	0.699	69
1.95	0.682	0.869	0.764	0.730	0.761	75
DMSO*	1.011	1.054	1.003	1.056	1.018	100
	0.985	0.930	1.075	1.031		
Media**	1.281	1.320	1.362	1.303	1.326	
	1.359	1.370	1.329	1.282		

*DMSO คือ negative control ที่ไม่เติม DMSO

**Media คือ ชุดควบคุมที่ไม่มีการเติมสารตัวอย่าง

นำค่าเปอร์เซ็นต์การรอดของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อใช้คำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยน้ำที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร (KATO-III) ร้อยละ 50 หรือหาค่า IC_{50} (Inhibit concentration 50%) ดังนี้



กราฟที่ 4.1 เปอร์เซ็นการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(% cell survival)
เมื่อได้รับสารสกัดด้วยน้ำ (mg/ml) ที่ความเข้มข้นต่างๆ

จากกราฟ สามารถคำนวณหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดด้วยน้ำที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) ร้อยละ 50 หรือค่า IC_{50} โดยอาศัยสมการ

$$Y = 10^{x}$$

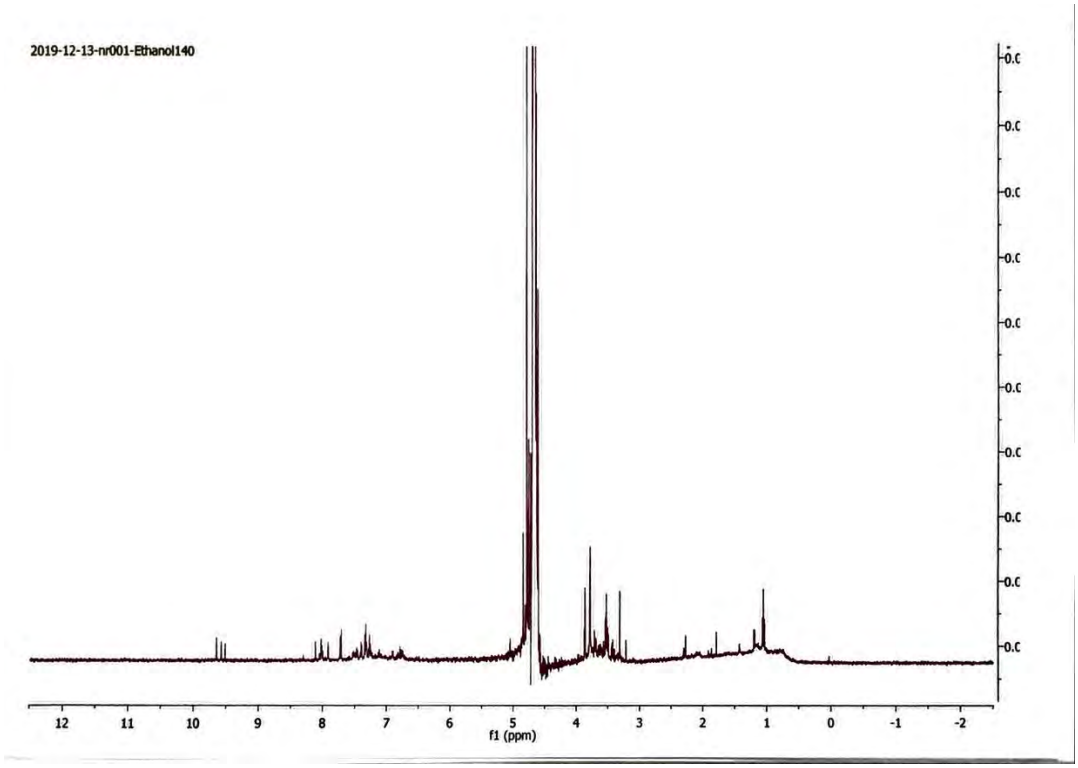
เมื่อ y คือ % การอยู่รอดของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร

X คือค่า log ของความเข้มข้นของสารสกัดด้วยน้ำที่มีเปอร์เซนการอยู่รอดของเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหารเท่ากับ 50 แทนค่า $Y = 10^{2.28}$

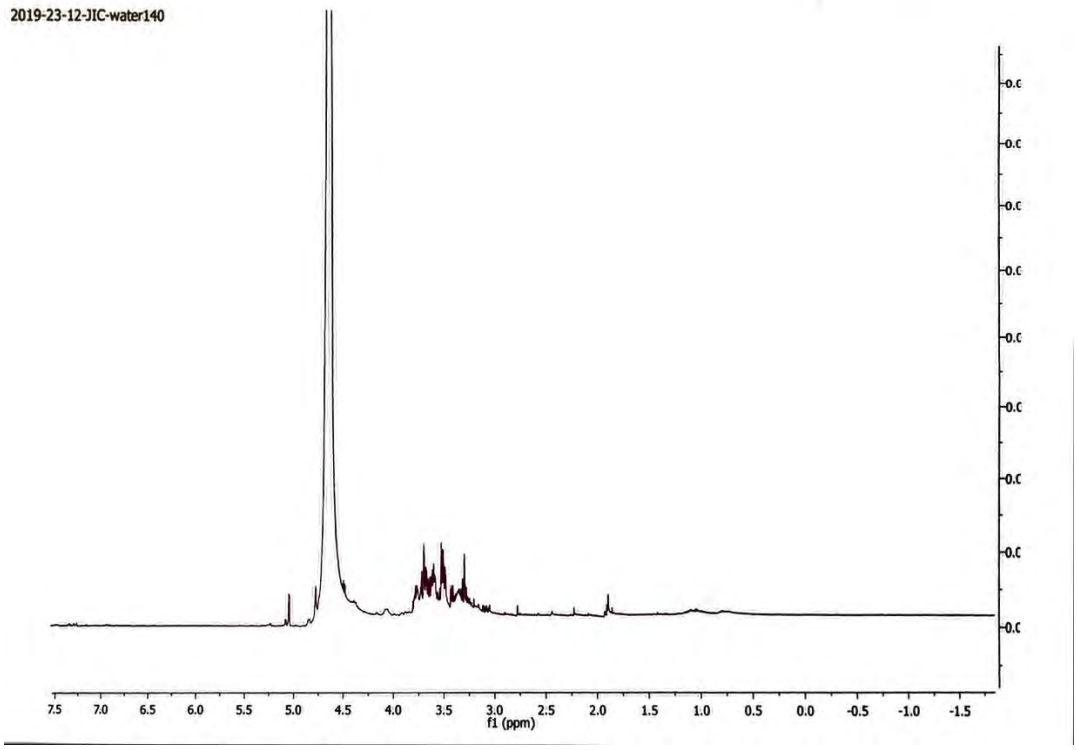
$= 190.72$

≈ 190.7

ดังนั้น ความเข้มข้นต่ำที่สุดของการสกัดด้วยน้ำที่เป็นพิษต่อเซลล์มะเร็งกระเพาะอาหาร(KATO-III) ร้อยละ 50 คือ 190.7 µg/mL



รูปที่ ผ1 ^{1}H-NMR ของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยเอทานอล



รูปที่ ผ2 ^{1}H-NMR ของสารสกัดเห็ดกระถินพิมานด้วยน้ำ

ประวัติผู้วิจัย

นางสาวปาณัสม์ แสงทองอร่าม เกิดเมื่อวันที่ 9 เดือนกรกฎาคม พ.ศ. 2541 ที่จังหวัดประจวบคีรีขันธ์ สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาตอนปลายจากโรงเรียนสิรินธราชวิทยาลัย จังหวัดนครปฐม เมื่อปีการศึกษา 2558 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาวิชาเคมี ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2559 ที่อยู่ที่สามารถติดต่อได้ บ้านเลขที่ 289/90 แขวงปากคลองภาษีเจริญ เขตภาษีเจริญ จังหวัดกรุงเทพมหานคร รหัสไปรษณีย์ 10160 อีเมล nat972541@gmail.com