บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.1.1 สัตว์ทดลอง หนูไร้ขน(nude mice) สายพันธุ์ BALB/C ที่ผสมได้จากพ่อพันธุ์เป็นหนูไร้ขน(nu,nu)ได้จากสถาบันราชประชาสมาศัย และแม่พันธุ์เป็นหนูขาว(+,nu) จากสถาบันมะเร็งแห่งชาติ เลี้ยงดูใน Housing System (รูปที่ 4) ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยควบคุมสภาวะต่างๆ คือ

2.1.1.1 กรง พื้นที่ขนาด 15x15 นิ้ว^2 สูง 5 นิ้ว ทำด้วย stainless steel สามารถนึ่งฆ่าเชื้อได้ ทำความสะอาดสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2.1.1.2 วัสดุรองพื้นกรง ใช้ขี้เลื่อยละเอียดซึ่งสะอาดปราศจากฝุ่นผง และไม่จับกันเมื่อผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รองพื้นกรงให้สูงประมาณ 0.5 นิ้ว

2.1.1.3 อุณหภูมิ ประมาณ 26-28^{o}ซ. และอากาศถ่ายเทได้สะดวก

2.1.1.4 ความชื้นสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 40-60%

2.1.1.5 แสงสว่าง ให้แสงสว่างวันละ 10 ชั่วโมง สลับกับมืด 14 ชั่วโมง

2.1.1.6 อาหาร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 24%, ไขมัน 3, เส้นใย 4%, เถ้า 8.5%, Calcium 1.6%, Phosphorus 1.0%, Nitrogen-free extract 4.8% และความชื้น 12%) จากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ ทำการฆ่าเชื้อด้วยรังสี แกมม่า ที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ และน้ำที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วตลอดเวลา และเปลี่ยนขวดน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

รูปที่ 4 ห้องเลี้ยงหนูไร้ขน (Housing system) สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.2 เชื้อเห็ด เชื้อเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) สายพันธุ์ MU220 ซึ่งแยกได้จากสายพันธุ์ในประเทศไทย ที่พบในกรุงเทพมหานคร เก็บเชื้อไว้โดยการเลี้ยงเส้นใยในอาหาร PDA slant ทำการ subculture ทุก 3 เดือน เก็บรักษาไว้โดยหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 เนื้อเยื่อมะเร็งปากมดลูก ได้จาก stock ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ ซึ่งเลี้ยงไว้ภายใต้ผิวหนังของหนูไร้ขน ทำการ subculture ทุก 3 เดือน หรือเมื่อพบว่าก้อนมะเร็งมีขนาดโตประมาณ 1 ลบ.ซม.

2.1.4 มันฝรั่ง(potato) ขนาด 3-4 หัว/กก. จากตลาดสามย่าน

2.1.5 ข้าวฟ่าง จากร้านชุมทางเกษตร หน้ามหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

2.1.6 ขี้เลื่อยไม้ยางพารา จากฟาร์มเห็ดอรัญญิก

2.1.7 รำข้าว ใช้รำข้าวเจ้าเกรดละเอียด จากฟาร์มเห็ดอรัญญิก

2.1.8 ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6x12 นิ้ว^2 คอขวด จากฟาร์มเห็ดอรัญญิก

2.1.9 เคมีภัณฑ์

Acetone บริษัท BDH Chemical Ltd., England

Anthrone บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

Bacto agar บริษัท Difco, U.S.A.

Bactyl บริษัท IMEX

Bacto Peptone บริษัท Difco, U.S.A.

Blue dextran บริษัท Pharmacia, Sweden

Calcium sulfate (ยิปซั่ม) บริษัท BDH Chemical Ltd., England

DEAE-cellulose บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

Dextrose บริษัท Difco, U.S.A.

Eosin บริษัท MERCK

Ethyl alcohol องค์การเภสัช

D18750

Hibiscrub บริษัท Olic

L-aspartic acid บริษัท BDH Chemical Ltd., England

Magnesium sulfate (ดีเกลือ) บริษัท BDH Chemical Ltd., England

Malt extract บริษัท Difco, U.S.A.

Minimum Essential Medium (MEM) ของ Gibco labaratories

Paraffin บริษัท oxford, U.S.A.

Sephadex G-75 บริษัท Pharmacia, Sweden

Sodium bicarbonate บริษัท BDH Chemical Ltd., England

Sunfuric acid บริษัท Mallinekrodt, U.S.A.

Yeast extract บริษัท Difco, U.S.A.

Thiamine HCl บริษัท Sigma Chemical, U.S.A.

สารเคมีนอกเหนือจากนี้ เป็นสารเคมีที่ใช้โดยทั่วไป เช่น กรดเกลือ โซเดียมไฮดรอกไซด์, ฟอร์มาลิน, K_2CrO_4, KH_2PO_4, $CaCl_2$, NH_4Cl, $(NH_4)_2SO_4$ $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ เกรดวิเคราะห์ สั่งซื้อจากบริษัท Sigma BDH และ Fluka

2.2 อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ห้องเพาะเลี้ยงเชื้อ ห้องเลี้ยงเส้นใย และห้องบ่มถุงก้อนเชื้อ ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด เปิดดอกในโรงเรือนธรรมชาติ

ห้องเลี้ยงหนูไร้ขน ห้องเลี้ยงหนูปลอดเชื้อ ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

หม้อนึ่งความดันไอ (autoclave) บริษัท Hirayama Manufacturing Corporation model HA-3D

เครื่องผสมชี้เลื่อย (mixer) ห้างหุ้นส่วนจำกัดนาวิวัฒน์การช่าง

ตู้อบ (hot air oven) บริษัท Memmert

ตู้ถ่ายเชื้อ (larminar flow) บริษัท International

Scientific Supply model 25

เครื่องชั่ง (balance)

- แบบละเอียด 4 ตำแหน่ง บริษัท Sartorius Type 1702

- แบบหยาบ บริษัท OHAUS, U.S.A.

เครื่องกรอง บริษัท International Scientific Supply

เครื่องถ่ายภาพ Canon Type QL17

กล้องจุลทรรศน์ Nikon UFX-II พร้อมกล้อง Nikon FX-35A

พี เอช มิเตอร์ (pH meter) บริษัท Radiometer PHM 83

Autocal pH meter

เครื่องผสม (mixer) Model H-11, Denmark

เครื่องปั่น (centrifuge) บริษัท Kokusan,Japan

เครื่องกลั่นระเหย (soxhlet) England

คอลัมน์แก้ว

- ขนาด กว้างxยาว (3x25 ซม.) และ (3x60 ซม.)

Fraction collector บริษัท LKB, Sweden

Microtome บริษัท AOP, U.S.A.

Magnetic stirrer บริษัท Corning Grasswork, U.S.A.

Rotary evaporater BUCHI RE III

Sakura rotary model RH-12A, Japan

Spectrophotometer model Spectronic 2000 บริษัท Bausch & Lomb , U.S.A.

Soxhlet apparatus ขนาด 100 และ 250 มล.

Voxtex-Genie model K-550-GE บริษัท SI, U.S.A.

Waring Blender model 34 BL 99 U.S.A.

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การผลิตเส้นใยและดอกเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

2.3.1.1 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

2.3.1.1.1 การเตรียมเชื้อเห็ด (inoculum)

เชื้อเห็ดหมื่นปี ที่ใช้ในการทดลองแยกมาจากเส้นใยเห็ดที่เก็บไว้บนอาหารวุ้น PDA slant (stock culture) การเพิ่มปริมาณเส้นใยเห็ดทำโดยย้ายเส้นใยจากหลอดทดลองนำไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA (ภาคผนวก ก) ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{o}ซ) เป็นเวลา 6-7 วันจึงตัดส่วนของเส้นใยบริเวณที่มีอายุน้อยที่สุด (รอบนอกสุดของบริเวณรัศมีการเจริญของเส้นใย)พร้อมทั้งอาหารวุ้นด้วยเครื่องเจาะจุกคอร์คขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 5 มิลลิเมตร แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นเชื้อเห็ดดังกล่าวย้ายไปลงบนอาหารเหลวต่อไป

2.3.1.1.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อและคัดเลือกอาหารเหลวที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเส้นใยเห็ด

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PD YEM และ SM (ภาคผนวก ก) ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5± 0.2 เทลงในขวดทดลอง ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว 100 มิลลิลิตร อบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ. ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^{2} เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วจึงใส่เชื้อเห็ด เลี้ยงเส้นใยเห็ดในสภาพนิ่ง (stationary culture) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{o}ซ.) ในสภาพที่มีแสงวันละ 8 ชั่วโมง เก็บผลทุก 3 วันโดยการกรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อ ด้วยเครื่องกรองล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ครั้งละ 50 มล. แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ. เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหาค่าเฉลี่ยเป็นน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ด จำนวน 4 ขวดต่อการเก็บผล 1 ครั้ง เป็นเวลา 45 วัน เมื่อได้อาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ดที่เหมาะสมแล้วจึงทำการผลิตเส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการสกัดสารออกฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งต่อไป

2.3.1.2 การเพาะดอกเห็ดในถุงขี้เลื่อย

2.3.1.2.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด (grain spawn) (ดัดแปลงจากวิธีของ Triratana and Tantikanjina, 1989) ทำการล้างเมล็ดข้าวฟ่างให้สะอาดแช่น้ำทิ้งไว้12ชั่วโมงและล้างน้ำให้สะอาดอีกครั้งนึ่งให้สุกด้วยไอน้ำผึ่งเมล็ดให้หมาด แล้วนำมาผสมกับ Yeast extract 0.5% และยิบซั่ม 0.05% ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันดีแล้วบรรจุลงในขวดแก้วขนาด 500 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งขวดปิดด้วยจุกสำลีและปิดทับด้วยกระดาษอลูมิเนียมอบฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 ^{o}ซ. ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^{2} เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงใส่หัวเชื้อเห็ดบ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-34 ^{o}ซ) ในที่มืด เมื่อเส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง ซึ่งใช้เวลา 10-12 วัน จึงนำไปเป็นหัวเชื้อสำหรับการเพาะแบบถุง

2.3.1.2.2 วิธีการเพาะและการบรรจุถุง

เตรียมวัสดุเพาะผสมตามสูตรมาตราฐาน (Triratana et al., 1991) คือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา (ความชื้นประมาณ 50%) 94% รำข้าว 5% ยิบซั่ม 1% และดีเกลือ 0.1% ผสมด้วยเครื่องผสม (mixer) ให้คลุกเคล้าเข้ากันดีแล้วบรรจุลงในถุงทนร้อนขนาด 6x12 นิ้ว^{2} ถุงละ 600 กรัม ใส่คอขวด ปิดจุกสำลี หุ้มทับด้วยกระดาษ นำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 ^{o}ซ ความดัน 15 ปอนด์/นิ้ว^{2} 2 ครั้ง คือครั้งแรก 3 ชั่วโมง ปล่อยถุงไว้ 24 ชั่วโมงแล้วนึ่งซ้ำอีกครั้งเป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยให้เย็นจึงใส่หัวเชื้อเห็ดบนเมล็ดข้าวฟ่างลงในถุงวัสดุเพาะถุงละประมาณ 20-30 เมล็ด โดยทำในตู้ถ่ายเชื้อบ่มถุงก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 ^{o}ซ) ในที่มืด อากาศถ่ายเทได้ดีเมื่อเส้นใยเจริญเต็มถุงแล้วปล่อยให้ถูกแสงประมาณ 15 วัน จึงเปิดดอกเห็ดโดยการเปิดทางปากถุงด้วยการดึงจุกสำลีออก วางบนชั้นวางถุงเห็ด ในโรงเพาะธรรมชาติ ภาควิชาพฤกษศาสตร์ อุณหภูมิ 28-32 ^{o}ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 90% มีแสงสลัว รดน้ำเป็นละออง 2 ครั้งเช้าเย็น เก็บผลผลิต เมื่อดอกเห็ดแก่เต็มที่ (30-45 วัน) โดยสังเกตจากผิวเห็ดด้านบนมีสีน้ำตาลแดงเหมือนกันทั่วทั้งดอก และมีการ

สร้างสปอร์ปล่อยออกมา จึงทำการเก็บดอกเห็ด หาค่า Biological efficiency (B.E.) โดยคำนวณได้จากสูตร

$$B.E. = \frac{\text{น้ำหนักดอกเห็ดสด}}{\text{น้ำหนักวัสดุเพาะแห้ง}} \times 100$$

แล้วจึงนำดอกเห็ดไปอบที่อุณหภูมิ 60 ^{0}ซ.ในตู้อบ (hot air oven) เป็นเวลา 48 ชั่วโมง นำไปใช้สกัดสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป

2.3.2. การสกัดแยกสารจากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

2.3.2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเส้นใยและดอกเห็ด

ทำการบดเส้นใยหรือดอกเห็ดที่อบแห้งแล้วด้วยเครื่องบด (waring blenber) นำไปสกัดด้วยน้ำร้อน ในอัตราส่วนเส้นใยหรือดอกเห็ด 1 กรัม/น้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องสกัด (soxhlet) ปล่อยให้เย็นนำไปทำ dialysis 3 ครั้ง ในอัตราส่วนสารสกัด 1 มิลลิลิตร/น้ำกรอง 100 มิลลิลิตร 3 ครั้งใช้เวลา 3,6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศที่อุณหภูมิ 95 ^{o}ซ ขจัดน้ำออกไปประมาณ 95 ส่วน สารละลายข้นหนืดที่ได้นำไปตกตะกอนด้วย 95% เอธานอลในอัตราส่วน สารสกัด 1 มิลลิลิตร/เอธานอล 6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ทำการแยกสารละลายและตะกอนโดยนำไปปั่นที่ 5000 rpm ด้วยเครื่องปั่น (centrifuge) นาน 10 นาที เก็บสิ่งที่เป็นตะกอนไปใช้แยกผลิตภัณฑ์ โดยทำให้แห้งด้วยอะซิโตน

2.3.2.2 การแยกสารประกอบโพลิแซคคาร์ไรด์จากสารสกัดหยาบ(crude extract)

2.3.2.2.1 การเตรียมคอลัมม์ DEAE-cellulose

ใส่ DEAE- cellulose 10 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตรแช่ไว้ 1 คืน จากนั้นจึงกรองด้วยเครื่องกรองเอาน้ำออก เติม 0.1 M

HCl ลงใน DEAE-cellulose แช่ไว้ 30 นาที ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมี pH เท่ากับ 7 จึงกรองน้ำออก เติม 0.1 N NaOH แช่ไว้ 30 นาที ล้างเบสออกด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่เป็นกลาง บรรจุ DEAE-cellulose ลงในคอลัมม์ขนาด 3 x 25 ซม. ให้สูง 20 เซนติเมตร ปรับสมดุลย์ด้วยน้ำกลั่น 12 ชั่วโมงด้วยอัตราการไหลของน้ำกลั่น 30 มล./ชั่วโมง แยกสารประกอบต่างๆ ออกจากสารสกัดหยาบโดยนำสารสกัดหยาบ 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำมาผ่านคอลัมน์ ชะด้วยน้ำกลั่น ด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชั่วโมงและเก็บสารที่ออกจากคอลัมม์แฟรกชั่นละ 5 มล. ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร โดยการทำให้เกิดสีด้วยสารละลายอันโทรน จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดต่ำลงกว่า 0.05 หน่วย จึงทำการชะตามด้วย 0.1 M $NaHCO_3$ (ตรวจหาปริมาณสารประกอบโปรตีนจากสารที่ถูกชะออกมาโดยติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และ ตรวจหาปริมาณสารประกอบโพลิแซกคาไรด์ด้วย 0.2% สารละลายอันโทรน ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร) รวมแฟรกชั่นของสารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร เข้าด้วยกันแล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง rotary evaporator ที่อุณหภูมิ 95^0ซ. ขจัดน้ำออกไปประมาณ 95 ส่วน จึงนำไปผ่านคอลัมน์ Sephadex G-75 เพื่อแยกโปรตีนออกจากสารประกอบโพลิแซกคาไรด์ต่อไป

2.3.2.2.2 การเตรียมคอลัมม์ Sephadex G-75

ใส่ Sephadex G-75 50 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร แช่ทิ้งไว้ 1 คืน อุ่นไล่ก๊าซออกจากเม็ดเจล เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองน้ำออกแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใหม่จึงนำมาบรรจุลงในคอลัมม์ขนาด 3 x 90 ซ.ม. ปรับสมดุลย์ด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 12 ชั่วโมงด้วยอัตราการไหลของน้ำกลั่น 15 มล./ ชั่วโมง นำผลผลิตที่รวมได้ในผีคที่ 1และ 2 จากเส้นใยและดอกเห็ดที่ได้จาคอลัมม์ DEAE-cellulose ปริมาณ 4 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมม์ Sepadex G-75 ชะด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราการไหล 15 มล./ ชั่วโมง เก็บสารที่ออกจากคอลัมม์แฟรกชั่นละ 5 มล. ติดตามผลด้วยวิธีการเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 2.3.3.3.1 แล้วทำการรวมแฟรกชั่นของสารละลายที่มีค่าการดูดกลืน

แสงที่ 625 นาโนเมตร ไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่อง evaporator ที่อุณหภูมิ 95 °ซ. ขจัดน้ำออกไป 95 ส่วน แล้วนำไปตกตะกอนโดยนำไปปั่นที่ 5000 rpm ด้วยเครื่องปั่น (centrifuge) นาน 10 นาที เก็บสิ่งที่เป็นตะกอนไปทำให้แห้งด้วยอะซิโตนสารที่ได้นำไปหาปริมาณสารโพลิแซกคาไรด์โดยวิธี Anthrone test และ หาปริมาณโปรตีน โดยวิธี Lowry 's method (Lowry and Rosenbrough,1951) แล้วจึงนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์การต่อต้านมะเร็งต่อไป

2.3.2.2.3 การหาปริมาณสารโพลิแซกคาไรด์ด้วยวิธี Anthrone test

เตรียมสารละลายอันโทรนโดยชั่งสารอันโทรน 0.2 กรัมละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 100 มล. ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณสารโพลีแซกคาไรด์ โดยผสมสารละลายที่ต้องการทดสอบ 0.5 มล. ให้เข้ากันดีกับสารละลายอันโทรนสังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที โดยสังเกตสีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร

2.3.2.2.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry's method

เตรียมสารเคมีต่อไปนี้

สารละลาย ก.ละลาย Na_2CO_3 20 กรัม/ลิตร ใน 0.1 M NaOH

สารละลาย ข. ละลาย $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ 5 กรัม/ลิตร ใน sodiumpotassiumtartrate 10 กรัม/ลิตร

สารละลายต่างเตรียมโดยผสมสารละลาย ก. 50 มล.กับสารละลาย ข. 1 มล.

Folin-Ciocalteau reagent เตรียมโดยผสมกับน้ำกลั่นด้วยปริมาตรที่เท่ากัน

วิธีการทดสอบหาปริมาณโปรตีนทำได้โดย เติมสารละลายต่าง 5 มล. ลงในสารละลายโปรตีนที่ต้องการตรวจสอบปริมาตร 1 มล. เขย่าให้เข้ากันดี ตั้งทิ้งไว้ 10 นาที แล้วเติม Folin-Ciocalteau reagent 0.5 มล. โดยเร็ว ผสมให้เข้ากันทันที หลังจาก

นั้น 30 นาทีนำไปอ่านค่าการดูดแสงที่ 750 นาโนเมตร

2.3.3 วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในการต่อต้านมะเร็งทางชีวภาพ (Bio-assay)

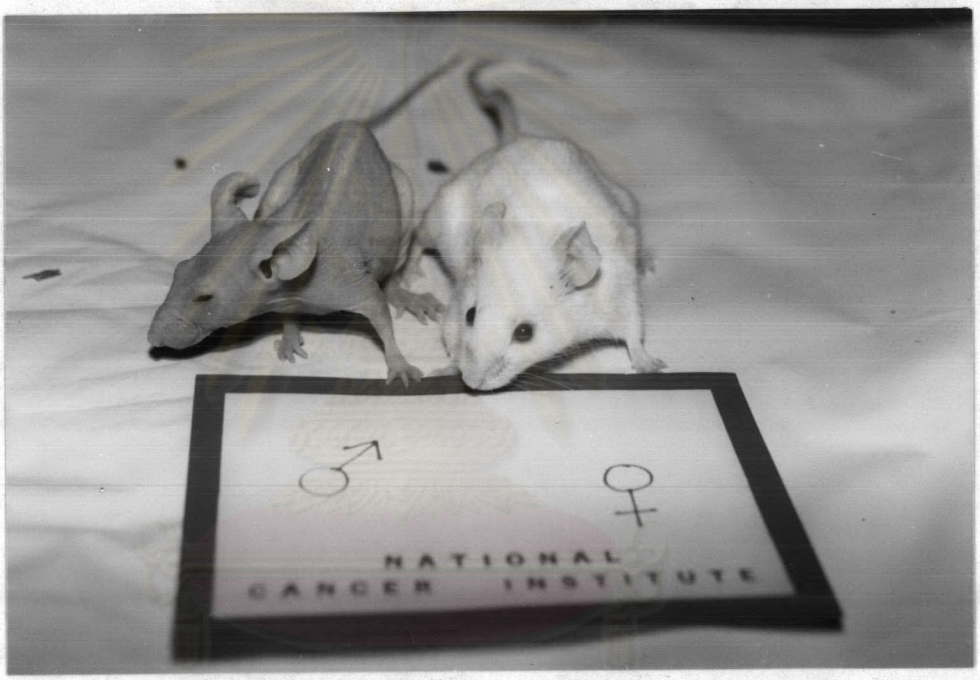
2.3.3.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

เตรียมหนูทดลอง โดยใช้แม่พันธุ์เป็นหนูขาว (+,nu) พ่อพันธุ์เป็นหนูไร้ขน (nu,nu) ที่มีอายุประมาณ 2 เดือน (รูปที่ 5) มาเป็นพ่อแม่โดยแต่ละกรงใช้ตัวผู้ 1 ตัวต่อตัวเมีย 2 ตัวให้อยู่ร่วมกันประมาณ 5-7 วัน จึงแยกตัวผู้ออก ตัวเมียจะตั้งท้องนานประมาณ 3 สัปดาห์แล้วจึงคลอด(ระยะที่ท้องแก่จะต้องแยกตัวเมียออกจากกัน เพื่อป้องกันเวลามีลูกกรงจะได้ไม่แน่นจนเกินไป) เมื่อลูกหนูเกิดได้ 5-7 วัน ให้แยกลูกหนูที่มีขนออกจากหนูไร้ขนเลี้ยงร่วมกับแม่ต่อไปจนอายุอายุได้ 3 สัปดาห์ จึงแยกออกจากแม่หนูและทำการแยกเพศลูกหนู ทำเครื่องหมายประจำตัวที่บริเวณหู (รูปที่ 6)

เลี้ยงลูกหนูที่มีเพศเดียวกัน อายุและขนาดใกล้เคียงกัน ไว้ในกรงเดียวกันกรงละประมาณ 5 ตัว เมื่อลูกหนูมีอายุได้ 5-6 สัปดาห์หรือมีน้ำหนักตัวประมาณ 15-20 กรัมจึงนำมาปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป

2.3.3.2 การเตรียม doner ของเซลล์มะเร็ง

นำเนื้อเยื่อมะเร็งจากปากมดลูกคนไข้ที่ได้จาก stock ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติมาปลูกในหนูไร้ขนที่บริเวณใต้ผิวหนัง (subcutanouse) ข้างสีข้างลำตัวของหนูที่ใช้เป็น doner โดยนำเนื้อเยื่อมะเร็งมาล้างด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ EME ตัดชิ้นมะเร็งบริเวณที่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงขนาดประมาณ 5 ลบ.มม. จากนั้นเช็ดทำความสะอาดบริเวณสะโพกของหนูด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน ใช้ใบมีดกรีดผิวหนังบริเวณนั้น ให้ยาวประมาณ 5 มม. สอดนำด้วยเข็มนำ (needles) ใส่ชิ้นเนื้อมะเร็งเข้าไปใต้ผิวหนังด้วย cannula ฆ่าเชื้อบริเวณบาดแผลด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน ทำการเลี้ยงก้อนมะเร็งในหนูประมาณ 60 วันหรือจนกระทั่งมีขนาดประมาณ 1 ลบ.ซม. จึงนำไปย้ายปลูก (transplantation) ให้แก่หนูทดลองชุดใหม่ต่อไป



รูปที่ 5 ลักษณะพ่อพันธุ์ที่เป็นหนูไร้ขน (nu,nu) และแม่พันธุ์ที่เป็นหนูขาว (+,nu)
(อายุ 2 เดือน)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 6 การทำเครื่องหมายประจำตัวหนูที่จะใช้ในการทดลอง

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.3.3.3 การเคลื่อนย้ายมะเร็งจาก doner ไปยังกลุ่มหนูทดลอง

ทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการทดลองด้วยสารละลาย Bactyl และทำการฆ่าเชื้อที่มือและแขนด้วยสารละลาย Hibiscrub จากนั้นฆ่าหนูที่เป็น donor ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (โดยนำหนูใส่ลงในถุงพลาสติกอย่างหนา เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในถุงมัดปากถุงให้แน่นประมาณ 5 นาที) ทำการฆ่าเชื้อที่ผิวหนังบริเวณที่มีก้อนมะเร็งด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน ผ่าเอาก้อนมะเร็งออกมาล้างก้อนมะเร็งด้วย MEM 2 ครั้ง แช่ก้อนมะเร็งใน MEM ที่เย็นตลอดเวลาที่มีการปลูกถ่ายมะเร็งอยู่ ตัดชิ้นเนื้อมะเร็งบริเวณที่มีเส้นเลือดมาหล่อเลี้ยงขนาดประมาณ 5 ลบ.มม. เพื่อใช้เป็น doner จากนั้นเช็ดทำความสะอาดบริเวณสะโพกของหนูที่จะปลูกมะเร็งด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน ใช้ใบมีดกรีดผิวหนังบริเวณสะโพกให้ยาวประมาณ 5 มิลลิเมตร สอดนำด้วยเข็มนำ (needles) ใส่ชิ้นเนื้อมะเร็งเข้าไปใต้ผิวหนังบริเวณสีข้างลำตัวของหนูไร้ขนด้วย cannula ทำการฆ่าเชื้อที่บริเวณบาดแผลด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน (รูปที่ 7) และเช็ดด้วยทิงเจอร์ไอโอดีนทุกวันจนกว่าบาดแผลจะหาย

2.3.3.4 การเตรียมสารออกฤทธิ์สำหรับฉีดให้หนูทดลอง

สารสกัดหยาบ (crude extract) จากเห็ดหิ่นปีที่เตรียมได้จากเส้นใยหรือดอกเห็ด ละลายด้วยน้ำกลั่นที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วให้ได้ความเข้มข้น 100 มก./มล. ส่วนสารประเภทโพลิแซกคาร์ไรด์ละลายด้วยน้ำกลั่นให้ได้ความเข้มข้น 10 มก./มล. จากนั้นกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมครอน

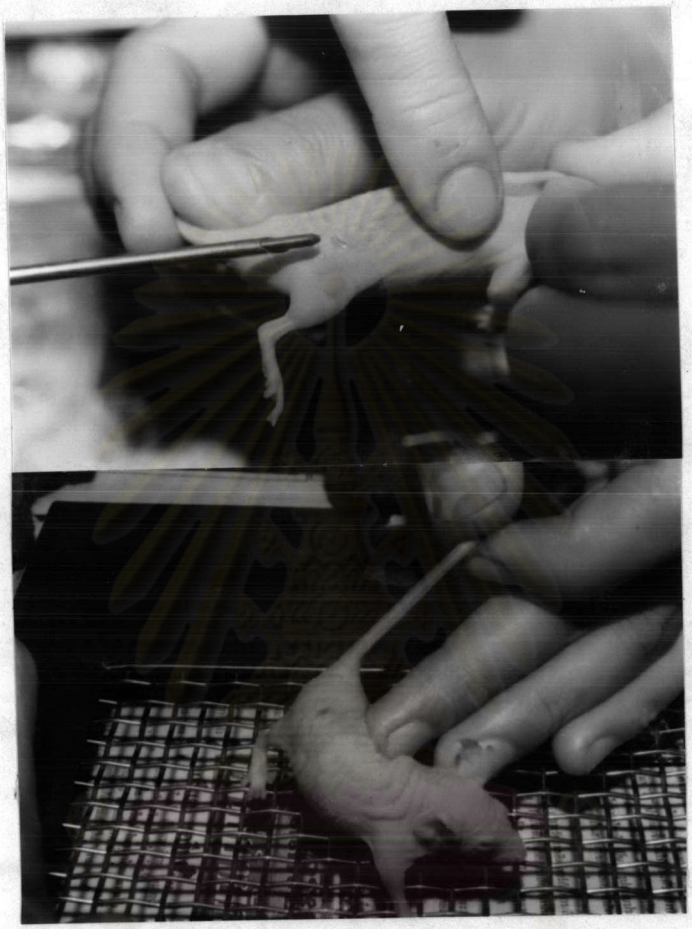
2.3.3.5 การให้สารออกฤทธิ์แก่หนูทดลอง

หลังจากปลูกมะเร็งให้หนูทดลองได้ประมาณ 21-35 วัน โดยมีขนาดของก้อนมะเร็งโตประมาณ 20-25 ลบ.มม. น้ำหนักตัวเฉลี่ยประมาณ 20-25 กรัม จึงนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ของสารต่อต้านมะเร็ง โดยแบ่งหนูออกเป็น 8 กลุ่มๆ ละ 8 ตัว ให้สารออกฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งโดยการฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal)

(A)

(B)

(C)



(D)

(E)

รูปที่ 7 ขั้นตอนการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็งจาก donor ไปยังหนูที่จะใช้ทดลอง

A = หนู donor อายุก้อนมะเร็ง 70 วัน

(ขนาดก้อนมะเร็งประมาณ 1 ลบ.ซม.)

B = ตัดชิ้นเนื้อมะเร็งบริเวณที่มีเส้นเลือดมาเลี้ยง ให้ได้

ขนาดประมาณ 5 ลบ.มม.

C = การใช้เข็มนำทางในการส่งก้อนมะเร็ง

D = ส่งชิ้นเนื้อมะเร็งเข้าสู่หนูตามทางที่เข็มนำไว้

E = เช็ดบริเวณบาดแผลด้วยทิงเจอร์ไอโอดีน

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

แบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดน้ำกลั่นปริมาณ 0.5 มล./25 กรัม น้ำหนักตัว ทุกวันเป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 2 และ 3 ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด (0.5 กรัม/กก. น้ำหนักตัว และ 2 กรัม/กก.น้ำหนักตัวหนู) ฉีดวันเว้นวันครั้งละ 0.5 มล./25 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 4 ฉีดสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (2 กรัม/กก. น้ำหนักตัวหนู) ฉีดวันเว้นวันครั้งละ 0.5 มล./25 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 5 และ 6 ฉีดสารที่แยกได้จากดอกเห็ดที่นำไปผ่านคอลัมม์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-75 พีคที่ 1 และ 2 (100 มก./ กก.น้ำหนักตัว) ฉีดทุกวัน ครั้งละ 0.5 มล./25 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 7 และ 8 ฉีดสารที่แยกได้จากเส้นใยเห็ดที่นำไปผ่านคอลัมม์ DEAE-cellulose และ Sephadex G-75 พีคที่ 1 และ 2 (100 มก./ กก.น้ำหนักตัว) ฉีดทุกวัน ครั้งละ 0.5 มล./25 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

ติดตามผลหลังจากให้สารออกฤทธิ์แก่หนูแล้วโดยทำการชั่งน้ำหนักและวัดขนาดก้อนเซลล์มะเร็งของหนูสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 60 วัน เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่ให้สารสกัดจากเห็ดหมื่นปีและชุดควบคุมที่ให้น้ำกลั่น โดยใช้เกณฑ์มาตราฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (Standard Criteria of The National Cancer Institute of The U.S.A.) ซึ่งกำหนดให้ค่า % T/C ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 75% จึงถือได้ว่ายาหรือสารนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\text{Tumor voluma (T.V.)} = (\pi/6)\ a^2 \times b$$

a = ด้านที่สั้นที่สุดของขนาดก้อนมะเร็ง (มิลลิเมตร)

b = ด้านที่ยาวที่สุดของขนาดก้อนมะเร็ง (มิลลิเมตร)

Average tumor volume = ϵ T.V./$_n$

n = จำนวนหนูในแต่ละกลุ่ม

$$\text{Relative tumor volume} = \frac{\text{ค่า T.V. ของวันที่ทำการวัด}}{\text{ค่า T.V. ของวันที่เริ่มให้ยา}}$$

$$\%T/C = \frac{\text{Relative T.V. ของกลุ่มทดลอง}}{\text{Relative T.V. ของกลุ่มควบคุม}} \times 100$$

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดหิ่นปี (toxicity test)

ใช้หนูขาวที่ได้จากแม่พันธุ์ที่เป็นหนูขาว (+,nu) พ่อพันธุ์ที่เป็นหนูไร้ขน (nu,nu) ที่มีอายุได้ 5-6 สัปดาห์ หรือมีน้ำหนักตัวประมาณ 20-25 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 10 ตัว เตรียมสารสกัดหยาบที่ได้จากดอกเห็ดโดยละลายด้วยน้ำกลั่นที่ฆ่าเชื้อแล้ว ฉีดสารออกฤทธิ์แก่หนูทดลอง โดยฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง 4 กลุ่มๆ ละ 2, 4, 6 และ 8 กรัม/กก.น้ำหนักตัว ตามลำดับโดยการฉีดเพียงครั้งเดียว

สำหรับการทดสอบโดยการให้สารออกฤทธิ์ทางปากทำโดยใช้หลอดฉีดยาป้อนกลุ่มละ 5 และ 10 กรัม/กก.น้ำหนักตัว โดยการป้อนเพียงครั้งเดียว

ติดตามผลการทดลองโดยคำนวณหาปริมาณการตายครึ่งหนึ่งของหนูทดลอง (LD_{50}) และตรวจสอบหาอาการผิดปกติของอวัยวะภายในของหนู

2.5 การตรวจสอบทาง histopathology

หลังจากเก็บผลการยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยสารออกฤทธิ์แล้วทำการฆ่าหนูทั้งในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง สุ่มตัดชิ้นเนื้อจากก้อนมะเร็ง และอวัยวะภายในที่สำคัญ ได้แก่ ตับ ปอด ม้าม และไต แช่ใน 10% Foralin solution เพื่อทำการ fixing เนื้อเยื่อ และนำไปทำสไลด์ (ภาคผนวก ข) แล้ว จึงนำไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อชันสูตรลักษณะของเซลล์มะเร็ง และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย