บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สารสกัดสมุนไพร

สารสกัดจากต้น *Croton lechleri* และจาก *Lagestroemia speciosa* ได้รับความอนุเคราะห์จากบริษัท คอสมีเทค จำกัด โดย dragon's blood จาก *Croton lechleri* ละลายด้วยโพรพานิดิออล (propanediol) ต่อน้ำในอัตราส่วน 1:1 สำหรับสารสกัดจาก *Lagestroemia speciosa* หรือ อินทนิลน้ำละลายด้วยดีเอ็มเอสโอ (DMSO, dimethyl sulfonyloxide) 1 % โดยสารสกัดถูกเตรียมให้มีความเข้มข้น 10,000 μg/ml และถูกกรองผ่านด้วยแผ่นกรองขนาด 0.2 μm เพื่อทำให้ปลอดเชื้อ แล้วจึงนำไปทดสอบต่อไป

3.2 การเพาะเลี้ยงเซลล์

ในการศึกษานี้ ทำการเพาะเลี้ยงเซลล์สีผิวของคน (ได้รับความกรุณาจาก ศ.ดร. รัชนีย์ อุดมแสงเพ็ชร ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยเซลล์จะถูกเพาะเลี้ยงในหลอดทดลองที่มีอาหารชนิด ดีเอ็มอีเอ็ม (DMEM, dulbecco's modified eagle medium) ที่มีส่วนผสมของซีรั่มลูกวัว 10 % (10 % of fetal bovine serum) และถูกอบในตู้อบที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ที่มีก๊าซคาร์บอนไดออกไซดี (CO_2) 5 % โดยจะต้องมีการให้อาหารแก่เซลล์อย่างสม่ำเสมอทุก ๆ 2-3 วัน และเซลล์จะต้องถูก subculture ทุกๆ สัปดาห์ เพื่อให้ได้เซลล์ที่มีคุณภาพที่พร้อมใช้งานเสมอ และปลอดจากเชื้อแบคทีเรีย และรา สำหรับห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเซลล์ได้รับความอนุเคราะห์ให้เข้าไปใช้ห้องปฏิบัติการที่ ภาควิชาพยาธิชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.3 การเพาะเลี้ยงเซลล์ในจานหลุม 96 หลุม

การเลี้ยงเซลล์เมลาโนมาในจานหลุม 96 หลุม (96-well plate) โดยเลี้ยงเซลล์ที่จำนวนเซลล์ 2,500, 5,000, 10,000, 20,000, 40,000, 80,000 เซลล์ต่อหลุม ในอาหารเลี้ยงเซลล์ DMEM 10 % FBS ถูกเลี้ยงไว้ที่อุณหภูมิ 37 ^{O}C ที่มีปริมาณคาร์บอนไดออกไซด์ 5% เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง พร้อมกับทำการสังเกตการเจริญของเซลล์ภายใต้กล้องหัวกลับ (inverted microscope) หลังจากนั้น วัดปริมาณเซลล์โดยการย้อมด้วยสีคริสทอลไวโอเลต (crystal violet) และนำไปวัดค่า OD (optical density, ค่าการดูดกลืนแสงที่คลื่นแสง 560 nm) ด้วยเครื่องไมโครเพลทรีเดอร์ (microplate reader รุ่น GLOMAX multi detection system ได้รับความอนุเคราะห์จากห้องปฏิบัติการวิจัยวัณโรค หน่วยวิจัยชีวโมเลกุลทางการแพทย์ ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สำนักงานพัฒนาวิทยาศษสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ) และนำค่า OD มาวิเคราะห์การเจริญของเซลล์

3.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ

เซลล์ที่ถูกเลี้ยงจากข้อ 1 จะถูกนำมาใช้ทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษ (cytotoxic test) ของสาร ซึ่งจะมีผลทำให้เซลล์ตาย โดยวิธีทดสอบพอสังเขปดังนี้ เซลล์จะถูกเลี้ยงในภาชนะจานหลุม 96 หลุม

ที่มีอาหารและปลอดเชื้อเป็นเวลา 1 วัน หลังจากจะเตรียมสารที่จะทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ โดยการทำให้เจือจาง 1:10 เท่าของปริมาตรดังนี้ 0.1, 1, 10, 100, 1000 μg/ml และ เจือจาง 1:2 เท่าของปริมาตร ดังนี้ 125, 250, 500, 1000, 2000 μg/ml การเตรียมสารต้องทำโดยวิธีที่ปลอดเชื้อ นำสารที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ มาใส่ในหลุมที่มีเซลล์เจริญอยู่ หลังจากนั้นนำเซลล์เลี้ยงต่อในตู้อบอุณหภูมิ 37^{O}C ที่มีก๊าซ CO_2 เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบและหาความเข้มข้นของสารและระยะเวลาที่สารออกฤทธิ์มีผลทำให้เซลล์ตาย เซลล์ที่ตายจะถูกดูดออก เหลือแต่เซลล์เป็นในจานหลุม นำเซลล์ที่เหลือมาย้อมด้วยสีคริสทอลไวโอเลต (crystal violet) และวัดสีด้วยเครื่อง microplate reader นำผลที่ได้มาวิเคราะห์หาค่า EC_{50} หมายถึงที่ระดับความเข้มข้นของสารที่ทำให้เซลล์ตาย 50 % เปรียบเทียบกับหลุมที่เซลล์ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารทดสอบ (Tengchaisri et al., 1998; Freshney, 1987)

นอกจากนี้ได้ทดสอบฤทธิ์ของสารละลายโพรพานิดิออล และดีเอ็มเอสโอ ต่อเซลล์เมลาโนมา โดยทำการเจือจางสารทั้งสองชนิดที่ความเข้มข้น 0.001, 0.01, 0.1, 1, 3 และ 6 % ทดสอบกับเซลล์เมลาโนมาเป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง

3.5 การศึกษาลักษณะรูปร่างของเซลล์ตาย

นำเซลล์ที่ถูกทดสอบในข้อ 2 มาศึกษารูปร่างลักษณะรูปร่างของเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่และเซลล์ที่ตายแล้ว โดยการย้อมด้วยสีทริแพนบลู (trypan blue) และย้อมนิวเคลียสของเซลล์ด้วยสีแดปี้ (DAPI, 4,6-Diamidin-2-Phenylindol Dihydrochlorid) เพื่อดูลักษณะของเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ตาย หลังจากเซลล์ถูกทดสอบกับสารสกัดอินทนิลน้ำที่ความเข้มข้น 500 μg/ml และสารสกัดเลือดมังกร 1000 μg/ml เป็นเวลา 24, 48 และ 72 ชั่วโมง เซลล์ถูกแบ่งเป็นสองส่วน โดยส่วนแรกถูกย้อมด้วยสีทริแพนบลู หยดเซลล์บนสไลด์ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เพื่อนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตแยกจากเซลล์ตาย และเซลล์ส่วนที่สองถูกย้อมด้วยสีแดปี้ ดูภายใต้กล้องจุลทรรศน์เรืองแสงที่ความยาวคลื่น 430 nm เพื่อดูลักษณะนิวเคลียสของเซลล์ (Tengchaisri et al., 1998)

3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

ค่า OD (optical density) ที่วัดได้จากผลการทดลองถูกนำมาคิดวิเคราะห์หาเปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) โดยเปรียบเทียบกับหลุมที่เซลล์ถูกทดสอบกับสารสกัดอินทนิลน้ำกับเซลล์ที่ถูกเลี้ยงในอาหารที่ไม่มีสารทดสกัดอินทนิลน้ำ แล้วจึงนำผลของ เปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์มาสร้างกราฟเพื่อวิเคราะห์หาค่า EC_{50} ของสารสกัดอินทนิลน้ำ หมายถึงที่ระดับความเข้มข้นของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ตายหรือค่าความมีชีวิตของเซลล์ลดลง 50 %

สูตรการหา

เปอร์เซ็นของความมีชีวิตของเซลล์ (% of cell viability) = $\frac{\text{ค่า OD ของเซลล์ในหลุมที่ทดสอบกับสาร}}{\text{ค่า ODของเซลล์ในหลุมที่ไม่มีสาร}} \times 100$