บทที่ 3
วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง (cell culture) การเพาะเลี้ยง และการเก็บเซลล์เพาะเลี้ยงในสภาพแช่แข็ง

เซลล์เพาะเลี้ยงที่ใช้วิจัย เป็นเซลล์เพาะเลี้ยงแบบต่อเนื่อง (continuous cell line) จากเซลล์ไตลิงพันธุ์ African green monkey (Cercopithecus aethiops) หรือเรียกอีกอย่างว่า Vero cells เซลล์เพาะเลี้ยงนี้ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

อาหารเพาะเลี้ยง Vero cells เป็น growth medium (M199-GM) ที่ประกอบด้วย M199 ที่มี Earle's salt (บริษัท Gibco, สหรัฐอเมริกา), 10% ซีรัมของลูกวัวอ่อนที่ผ่านความร้อน 56°ซ.เป็นเวลา 30 นาที (10% heat-inactivated fetal bovine serum; บริษัท Gibco), 10mM HEPES (N-2-hydroxyethyl -piperazine-N'-2-ethane-sulphonic acid; บริษัท Flow laboratory, อังกฤษ), เพนนิซิลิน-จี (penicillin-G) และ สเตร็ปโตมัยซิน (streptomycin) (บริษัท Dumex,ประเทศไทย) ซึ่งเป็นยาปฏิชีวนะสำหรับต้านเชื้อแบคทีเรีย และฟังจิโซน (fungizone; บริษัท E.R. Squibb & Sons, สหรัฐอเมริกา) ซึ่งเป็นยาต้านเชื้อรา

3.1.1 การเพาะเลี้ยง Vero cells

(1) ล้างเซลล์ ด้วยสารละลายเกลือ ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (phosphate buffered saline solution ; PBS) 2 ครั้ง

(2) ย่อยเซลล์ด้วยสารผสมทริปซิน-เวอร์ซีน(trypsin-versene mixture) รอเวลาจนเซลล์เริ่มหลุดจากภาชนะจึงเทสารผสมทริปซิน-เวอร์ซีนทิ้ง เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-GM ปริมาณเล็กน้อย ใช้ลูกยางดูดขึ้นลงเพื่อแยกเซลล์ที่เกาะกลุ่มให้เป็นเซลล์เดี่ยว ๆ แบ่งใส่ขวดเพาะเลี้ยงใบใหม่ด้วยอัตราส่วน 1 ใน 3 (splitting ratio = 1:3)

(3) เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-GM ให้ท่วมพื้นที่ที่เลี้ยงเซลล์ บ่มเซลล์ในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความชื้น (humidified CO_2-incubator) ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 3 วัน จึงนำมาใช้งาน

หมายเหตุ : เซลล์ที่นำมาใช้ในการวิจัยควรเป็นเซลล์ที่สมบูรณ์เต็มที่ กล่าวคือ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ควรเรียงตัวชั้นเดียว (monolayer) มีขนาดใหญ่ ไม่พบแกรนูล (granule) ภายในเซลล์ เพราะถ้าพบแกรนูลจำนวนมากภายในเซลล์ แสดงว่าเซลล์แก่เกินไป หรือไม่สมบูรณ์ นอกจากนี้เซลล์ต้องไม่มีการปนเปื้อนจากจุลชีพใด ๆ

3.1.2 <u>การเก็บ Vero cells ในสภาพแช่แข็ง</u>

(1) ย่อยเซลล์ที่เรียงตัวชั้นเดียวอายุ 3 วัน ด้วยสารผสมทริปซิน-เวอร์ซีน

(2) เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-GM 10 มล. นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยง (centrifuge; บริษัท International Equipment Company, Model PR-6 centrifuge, สหรัฐอเมริกา) ที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อปั่นล้างทริปซิน ที่ยังหลงเหลืออยู่ ส่วนที่เหลือจากการปั่นแบ่งมานับในฮีโมไซโตมิเตอร์ (haemocytometer) เพื่อหาปริมาณเซลล์ทั้งหมด

(3) เทส่วนลอย (supernatant) ชั้นบนทิ้ง เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์สำหรับการเก็บเซลล์ในตู้แช่แข็ง (freezing media ; ซึ่งประกอบด้วย 10% DMSO (dimethylsulfoxide), 10% ซีรัมของลูกวัวอ่อน (fetal bovine serum) และ 80% M199-GM) ลงไปให้ได้สารแขวนลอย (suspension) ของเซลล์ให้มีปริมาณเซลล์ $1x10^7$ เซลล์/มล.

(4) แบ่งเก็บเซลล์ลงในหลอดเก็บเซลล์เล็ก ๆ หลอดละ 1 มล. นำไปเก็บที่ตู้แช่แข็ง (deep-freezer) ที่ -70°ซ. ทันที จนกว่าจะใช้งาน

หมายเหตุ : วัตถุประสงค์ในการเก็บเซลล์ เพื่อนำเซลล์กลับมาใช้ใหม่ได้ ในกรณีที่เซลล์ที่กำลังวิจัยมีปัญหาเช่น มีการปนเปื้อนของจุลชีพ เซลล์ไม่สมบูรณ์ เซลล์ตาย หรือเซลล์ก่อกลายพันธุ์ไป (mutant) เป็นต้น วิธีการนำเซลล์ที่เก็บไว้มาใช้งานใหม่ทำได้โดย

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(1) ละลาย (thaw)เซลล์ที่เก็บไว้ในเครื่องอังน้ำ (water bath) 37°ซ. อย่างรวดเร็ว ปิเปตต์(pipette)เซลล์ลงในหลอดทดลองจุกเกลียว เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-GM เพิ่มอีก 10 มล.

(2) ปั่นสารแขวนลอยของเซลล์ ด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 1200 รอบ/นาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อปั่นล้าง DMSO เทส่วนลอยชั้นบนทิ้ง เติมอาหารเลี้ยง เซลล์ M199-GM

(3) ปิเปตต์เซลล์เพาะเลี้ยงพร้อมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ ลงในขวดเพาะเลี้ยง นำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความชื้น และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°ซ.

3.2 ไวรัส การเตรียม seed ไวรัส และการหาไตเตอร์ของไวรัส

ไวรัสที่ใช้ทดสอบคือ

ไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ ทัยป์-1 สายพันธุ์ KOS (Herpes simplex virus type-1 : HSV-1)

ไวรัสเฮอร์ปีส์ซิมเพลกซ์ ทัยป์-2 สายพันธุ์ 186 (Herpes simplex virus type-2 : HSV-2)

โปลิโอไวรัส ทัยป์-2 (Poliovirus type-2)

ไวรัสทั้ง 3 ชนิดนี้ได้รับจากภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล

3.2.1 การเตรียม seed ไวรัส

(1) ล้างเซลล์เพาะเลี้ยงด้วยสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ (PBS) 2 ครั้ง

(2) เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด maintenance medium (M199-MM) ซึ่งประกอบไปด้วย M199 ที่มีซีรัมลูกวัวอ่อนเพียง 2% และยาปฏิชีวนะ

(3) เติมไวรัสตาม MOI (multiplicity of infection) ที่ต้องการ

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(4) บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความชื้น และ คาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 1 ชั่วโมง โดยกลิ้งขวดทุก ๆ 15 นาที เพื่อให้ไวรัสดูดซับ (adsorb)เข้าเซลล์อย่างทั่วถึง

(5) เทอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่มีไวรัสทิ้ง ล้างเซลล์ด้วยสารละลายเกลือฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 1 ครั้ง

(6) เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-MM ให้ท่วมพื้นที่ที่เลี้ยงเซลล์ บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้นและคาร์บอนไดออกไซด์ 5% อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 24 - 48ชั่วโมง ซึ่งเซลล์จะเกิด cytopathic effect (CPE) ประมาณ 80% ลักษณะเซลล์กลมวาวและบางเซลล์อาจหลุดขึ้นกว่าเดิม

(7) เก็บ seed ของไวรัสโดยนำเซลล์ที่ถูกทำให้ติดเชื้อแล้ว มาผ่านกระบวนการแช่แข็งและละลาย (freeze and thaw) 3 ครั้ง โดยแช่ขวดในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. เป็นเวลา 20-30 นาที จนเซลล์และอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์แข็งตัว จากนั้นนำไปทำให้ละลายในเครื่องอังน้ำที่อุณหภูมิ 37°ซ. จนละลายหมด ทำซ้ำไปมา 3 ครั้ง จนผิวเซลล์ที่เกาะกับภาชนะหลุดออก เขย่าให้เซลล์แตก

(8) นำไปปั่นด้วยเครื่องหมุนเหวี่ยงที่ 2000 รอบ/นาที อุณหภูมิ 4°ซ. เป็นเวลา 20-30 นาที

(9) เก็บส่วนลอยชั้นบนแบ่งลงหลอดเก็บไวรัส ซึ่งเป็นหลอดทดลองจุกเกลียวขนาดเล็กหลอดละ 1 ซีซี นำไปเก็บในตู้แช่แข็งอุณหภูมิ -70°ซ. จนกว่าจะใช้งาน

หมายเหตุ : MOI(multiplication of infection) คือจำนวนไวรัสที่ใส่เข้าไปต่อ Vero cell 1 เซลล์ ซึ่งปกติจะใช้ MOI = 0.01-0.1 นั่นคือ จำนวนไวรัสเท่ากับ 0.01-0.1 PFU (plaque forming unit)/เซลล์

3.2.2 การหาไตเตอร์ของ seed ไวรัส

โดยใช้วิธีไตเตรตนับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้น เพื่อคำนวณหาไตเตอร์ของไวรัส (plaque titration assay)

(1) เตรียม seed ไวรัสในหลอดทดลอง ให้เจือจางลงครั้งละ 5 เท่า (5-fold serial dilution) โดยใช้ M199-GM จำนวนทั้งหมด 11 หลอด สำหรับหลอดที่ 12 ให้เป็นหลอดควบคุมที่ไม่มีไวรัส ทุกหลอดแช่ในน้ำแข็งตลอดการทดลอง

(2) ย่อย Vero cells ที่เรียงตัวชั้นเดียว อายุประมาณ 3 วัน ด้วยสารผสมทริปซิน-เวอร์ซีน แล้วเตรียมเป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ $6x10^5$ เซลล์/มล.

(3) เติมไวรัสความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมจากข้อ (1) ลงบน 96-well tissue culture cluster (96-w-c, Costar, Cambridge, U.S.A.) หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยทำซ้ำ 4 ครั้ง (quadruplicate) ในเพลท (plate) เดียวกัน

(4) เติม Vero cells ที่เตรียมจากข้อ (2) ลงบนเพลท หลุมละ 50 ไมโครลิตร โดยใช้ไมโครปิเปตต์ (micropipette)

(5) บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น และ มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5% ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

(6) เติม overlay medium (ประกอบด้วย 1% gum tragacanth ใน M199-GM) หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์อีก 4-5 วัน

(7) ย้อมสีเซลล์ โดยเท overlay medium ทิ้ง เติม 1% crystal violet ใน 10 % formalin ลงเพลท ทิ้งไว้ 30 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำ นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นแล้วคำนวณหาค่าไตเตอร์ จำนวน plaque ที่แน่นอนนับได้จากหลุมที่มีจำนวนไม่เกิน 20 PFU ถ้ามากกว่านี้ plaque จะติดกันมาก ทำให้นับลำบาก

3.3 สารสกัดจากพืชสมุนไพร

สารสกัดจากสมุนไพรได้รับความอนุเคราะห์จาก รศ.ดร.นันทวัน บุณยะประภัศร หัวหน้าหน่วยข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล ซึ่งเตรียมโดยใช้ตัวทำละลายต่างกันดังนี้

3.3.1 สารสกัดด้วยน้ำ เตรียมโดยนำสมุนไพรสดมาตากแห้งแล้วบดเป็นผงยา นำผงยา 100 กรัม มาสกัดกับน้ำโดยการต้ม แล้วนำไปทำให้แห้งด้วยวิธีแช่แข็ง (lyophilization)

3.3.2 สารสกัดด้วยน้ำ : 95% เอทานอล = 1:1 เตรียมโดยนำเอาผงยาเช่นเดียวกับข้อ 3.3.1 ปริมาณ 100 กรัมไป reflux กับตัวทำละลาย แล้วทำให้แห้ง

โดยใช้การกลั่นภายใต้สูญญากาศ นำผงสกัดที่ได้ไปทำสารประกอบเชิงซ้อนหลวม ๆ กับ polyvinyl pyrrolidone (PVP) ด้วยอัตราส่วน 1:4 ให้ได้สารสกัดที่ละลายน้ำได้ เพื่อง่ายต่อการตรวจสอบ

หมายเหตุ : เหตุผลในการเลือกใช้น้ำ : 95% เอทานอล = 1:1 เป็นตัวทำละลายเนื่องจากตัวทำละลายนี้เป็นตัวทำละลายกึ่งมีขั้ว (semi-polar) จึงสามารถสกัดสารต่าง ๆ จากสมุนไพรได้มากชนิดกว่าการใช้ 95% เอทานอลเพียงอย่างเดียว เช่น สารประกอบพวกไกลโคไซด์ เป็นต้น

ดังนั้น สารสกัดจากสมุนไพรรวมแล้วมีทั้งหมด 23 ตัวอย่าง คือ สารสกัดด้วยน้ำ 12 ตัวอย่าง และสารสกัดด้วยน้ำ : 95% เอทานอล 11 ตัวอย่าง โดยแก่นแกแลมี 2 แหล่งคือ แกแลที่ซื้อจากร้านหมอนิรันดร์ และแกแลที่เก็บจากจังหวัดปราจีนบุรี ส่วนมะม่วงเขียวเสวยแยกเป็นสารสกัดจากใบมะม่วงและสารสกัดจากก้านมะม่วง และเนื่องจากใบพญายอได้รับเฉพาะสารสกัดด้วยน้ำจากหน่วยข้อมูลสมุนไพร จึงทำการวิจัยเฉพาะสารสกัดน้ำเท่านั้น

ตารางที่ 4 แสดงน้ำหนักของสมุนไพรที่ใช้และน้ำหนักของสารสกัดสมุนไพรที่สกัดได้

สมุนไพร	ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักที่ใช้ (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)
1.ใบน้ำเต้า	น้ำ	100	22.62
	แอลกอฮอล์	100	10.07
2.ใบว่านมหากาฬ	น้ำ	50	12.88
	แอลกอฮอล์	50	9.28
3.ใบพญายอ	น้ำ	100	29.94
4.ใบเสลดพังพอน	น้ำ	100	25.48
	แอลกอฮอล์	100	14.40

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สมุนไพร	ชนิดตัวทำละลาย	น้ำหนักที่ใช้ (กรัม)	น้ำหนักสารสกัดที่ได้ (กรัม)
5. เหง้าขมิ้นชัน	น้ำ	100	12.56
	แอลกอฮอล์	100	16.32
6. ใบชุมเห็ดเทศ	น้ำ	100	19.63
	แอลกอฮอล์	30	6.20
7. ใบน้อยหน่า	น้ำ	100	9.92
	แอลกอฮอล์	100	13.17
8. ใบบัวบก	น้ำ	100	19.38
	แอลกอฮอล์	100	11.71
9. แก่นแกแลซื้อจาก	น้ำ	100	8.05
ร้านหมอนิรันดร์	แอลกอฮอล์	100	20.38
10. แก่นแกแลจาก	น้ำ	100	7.33
ปราจีนบุรี	แอลกอฮอล์	100	16.90
11. ใบมะม่วง	น้ำ	100	3.29
12. ก้านมะม่วง	น้ำ	100	2.38

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4 การศึกษาอิทธิพลของอุณหภูมิและเวลาที่มีผลต่อไดเตอร์ของ HSV-1 และ HSV-2

เป็นการหาไดเตอร์ของไวรัส ที่สภาวะของอุณหภูมิและเวลาต่าง ๆ กัน คือ ที่อุณหภูมิ 0°ซ. 4°ซ. 25°ซ. และ 37°ซ. และ ที่เวลา 0-6 ชั่วโมง เพื่อสังเกตว่าเวลาและอุณหภูมิมีผลต่อไดเตอร์ของไวรัสหรือไม่ แล้วนำผลมาประยุกต์ใช้ในการปรับสภาวะของช่วงอุณหภูมิและกำหนดเวลาที่ทำการทดลองให้มีผลกระทบต่อไวรัสน้อยที่สุด

(1) ละลายไวรัสที่เก็บในตู้แช่แข็ง ปริมาตร 5 มล.ในเครื่องอังน้ำ ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. แบ่งใส่หลอดทดลองจุกเกลียวขนาดเล็กหลอดละ 1 มล. จำนวน 4 หลอด นำ

ไปไว้ที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 0°ซ. 4°ซ. 25°ซ.และ 37°ซ. ส่วนไวรัสที่เหลืออีก 1 มล. นำมาไตเตรตที่เวลา 0 ชั่วโมง

(2) ทำการทดลองหาไตเตอร์ของไวรัส โดยเตรียมไวรัสให้เจือจางลง ครั้งละ 5 เท่า (5-fold dilution) จำนวน 11 หลอด หลอดที่ 12 เป็นตัวควบคุม (control) เติมลง 96-well-plate ความเข้มข้นละ 8 หลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร

(3) ย่อย Vero cells แล้วเตรียมเป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ $6x10^5$ เซลล์/มล. เติมเซลล์ลงเพลทหลุมละ 50 ไมโครลิตร

(4) บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง แล้วนำมาเติม overlay medium 100 ไมโครลิตร นำไปบ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้นอีก 4 วัน

(5) เมื่อเวลา 1 ชั่วโมง ใช้ไมโครปิเปตต์ดูดไวรัสที่อุณหภูมิต่าง ๆ กัน คือ 0°ซ. 4°ซ. 25°ซ.และ 37°ซ. เตรียมไวรัสให้เจือจางลงครั้งละ 5 เท่า โดยเตรียมไวรัสให้แต่ละอุณหภูมิมีความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 8 หลอด

(6) เติมไวรัสช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสม ซึ่งอยู่ที่ $1:5^3$-$1:5^8$ ลง 96-well-plate หลุมละ 50ไมโครลิตรแต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง(quadruplicate) จัดให้มีไวรัสความเข้มข้นต่าง ๆ ทั้ง 4 อุณหภูมิอยู่ภายในเพลทเดียวกัน

(7) เติม Vero cells ที่ย่อยแล้วในข้อ(3)ลงเพลทหลุมละ 50 ไมโครลิตร

(8) บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาเติมoverlay medium 100ไมโครลิตรแล้วบ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้นอีก 4 วัน

และเมื่อเวลา 2 ,3 ,4 ,5 ,6 ชั่วโมง ทำซ้ำเช่นเดียวในข้อ (5)-(8) จนครบ 7 เพลท

(9) ย้อมสีเซลล์ด้วย 1% crystal violet ใน 10% formalin เป็นเวลา 30 นาที จึงล้างออกด้วยน้ำ คำนวณไตเตอร์จากการนับจำนวน plaque

(10) สร้างกราฟความสัมพันธ์ระหว่างเวลากับไตเตอร์ ที่อุณหภูมิต่าง ๆ เพื่อดูว่าไตเตอร์ของไวรัสเริ่มลดลงที่อุณหภูมิและเวลาเท่าใด

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5 การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity)

เพื่อทดสอบว่าสมุนไพรและสารที่เกี่ยวข้องมีความเป็นพิษต่อVero cellsหรือไม่

3.5.1 Polyvinyl pyrrolidone (PVP) เป็นสารที่นำมาทำสารประกอบเชิงซ้อนแบบหลวมๆ กับสารสกัดเอทานอล โดยใช้อัตราส่วน สารสกัด : PVP = 1:4

ก) ทดสอบผลต่อ monolayer ของ Vero cells โดยเลี้ยงเซลล์ให้เป็น monolayer ก่อน แล้วจึงเติม PVP ลงไป

(1) ย่อย Vero cells เตรียมให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ $3x10^5$ เซลล์/มล.เติมเซลล์ลง 24-well-plate หลุมละ 0.5 มล. นำไปบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้นที่อุณหภูมิ 37°ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง จนเซลล์เจริญเต็มหลุมเป็น monolayer

(2) ละลาย PVP ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-GM เตรียมให้เจือจางลงครั้งละ2เท่า (2-fold dilution) ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 16,000-500 ไมโครกรัม/มล.

(3) เทอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เดิมในเพลทที่นำไปบ่มออก เติมสารละลาย PVP ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ลงไป หลุมละ 1 มล.แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง โดยให้มีตัวควบคุมซึ่งเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี PVP ด้วยจำนวน 8 หลุม

(4) บ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความชื้นที่อุณหภูมิ 37°ซ. สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน บันทึกผล

ข) ทดสอบผลต่อการจัดเรียงตัวเป็น monolayer ของ Vero cells โดยเติม PVP ลงไปพร้อมๆ กับ Vero cells

(1) ละลาย PVP ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ M199-GM เตรียมให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า โดยให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 16,000 - 500 ไมโครกรัม/มล. เติมลง 24-well-plate ตามความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 0.25 มล. แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้งโดยให้มีตัวควบคุมเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี PVPด้วยจำนวน 8 หลุม

(2) ย่อย Vero cells เตรียมให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ $2.4x10^6$ เซลล์/มล. เติมลงเพลทหลุมละ 0.25 มล. บ่ม

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของลักษณะเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน บันทึกผล

3.5.2 <u>อะซัยคลอเวียร์</u> (ACV)

ACV (บริษัทเวลคัมประเทศไทย จำกัด) ที่นำมาทดสอบเป็นผงยาบริสุทธิ์สีขาว

(1) เตรียม ACV ให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าด้วย M199-GM ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1.25 - 0.00488 ไมโครกรัม/มล. เติมลง 24-well-plate ตามความเข้มข้นต่าง ๆ หลุมละ 0.25 มล. แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง โดยมีตัวควบคุมเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มี ACV ด้วยจำนวน 8 หลุม

(2) ย่อย Vero cells เตรียมให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ 2.4×10^6 เซลล์/มล. เติมลงเพลทหลุมละ 0.25 มล. บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ทุกวันเป็นเวลา 5 วัน บันทึกผล

3.5.3 <u>สารสกัดสมุนไพร</u> ทั้งสารสกัดด้วยน้ำ และ สารสกัดด้วยแอลกอฮอล์

(1) เตรียมสารสกัดสมุนไพรให้เป็นสารละลาย stock มีความเข้มข้น 2,000 ไมโครกรัม/มล. ถ้าเป็นสารสกัดสมุนไพรด้วยแอลกอฮอล์ให้คิดเฉพาะความเข้มข้นของสารสกัดสมุนไพรโดยหักน้ำหนักของ PVP ออกไป โดยละลายใน M199-GM แล้วทำให้ปราศจากเชื้อด้วยการกรองผ่าน millipore membrane(millipore,สหรัฐอเมริกา) เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.45 ไมครอน ให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าด้วย M199-GM ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2,000 - 31.25 ไมโครกรัม/มล. ส่วนสารสกัดพฤกษาอเริ่มทำการทดลองที่ความเข้มข้น 8,000 ไมโครกรัม/มล. เติมลง 96-well-plate ตามความเข้มข้นต่าง ๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง โดยให้มีตัวควบคุมเป็นอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่มีสมุนไพรด้วย

(2) ย่อย Vero cells เตรียมให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ 3×10^5 เซลล์/มล. เติมลงเพลทหลุมละ 100ไมโครลิตร บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. สังเกตผลการเปลี่ยนแปลงของ Vero cells ทุกวัน เป็นเวลา 5 วัน หลังจากนั้นย้อมด้วยสี 1% crystal violet ใน 10%formalin ถ้าเซลล์ที่ย้อมติดสีมีปริมาณเท่ากับเซลล์ควบคุมโดยการสังเกตด้วยตาเปล่า

แสดงว่า สมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นนั้นไม่มีพิษต่อ Vero cells แต่ถ้าปริมาณเซลล์อยู่ในระดับเท่ากับ หรือน้อยกว่า 50% ของเซลล์ควบคุม แสดงว่าสมุนไพรที่ระดับความเข้มข้นนั้นเป็นพิษต่อ Vero cells

หมายเหตุ : ค่า 50% cytotoxic dose (CD_{50}) คำนวณโดยวิธีของ Reed-Muench (ดูในภาคผนวก) สารสกัดในปริมาณความเข้มข้นซึ่งไม่เป็นพิษต่อเซลล์ปกติเท่านั้น ที่จะนำไปทดสอบความสามารถในการต้าน HSV

3.6 การทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ของอะซัยคลอเวียร์

3.6.1 ทดสอบความสามารถในการหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของ HSV เมื่อเติม ACV ลงไปพร้อมกับไวรัส

(1) เตรียม ACV ให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า ด้วย M199-GM ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 2 - 0.0078 ไมโครกรัม/มล. เติมลงใน 96-well-plate ตามความเข้มข้นต่าง ๆ หลุมละ 25 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง

(2) เตรียมไวรัสจาก stock seed ให้มี HSV ประมาณ 30 PFU/25 ไมโครลิตรโดยคำนวณจากไตเตอร์ของไวรัสที่ทราบเติมลงในเพลทหลุมละ 25 ไมโครลิตร

(3) ทำตัวควบคุมที่มีเฉพาะไวรัส (virus control) โดยใช้อาหารเลี้ยงเซลล์แทน ACV ให้ไวรัสมีปริมาณ 7.5 , 15 , 30 PFU/50 ไมโครลิตร

(4) ย่อย Vero cells เตรียมให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ $6x10^5$ เซลล์/มล. เติมลงในเพลทหลุมละ 50 ไมโครลิตร

(5) บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น และ มีอุณหภูมิ 37° ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง นำมาเติม overlay medium ที่มียาอยู่ เติมในขนาดความเข้มข้นเดิมหลุมละ 100 ไมโครลิตร สำหรับตัวควบคุมที่มีเฉพาะไวรัสให้เติม overlay medium ที่ไม่มี ACV หลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์อีก 4-5 วัน

(6) ย้อมสีเซลล์ ด้วย 1% crystal violet ใน 10% formalin นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณหาค่า 50% inhibitory dose (ID_{50}) แล้วนำค่าความเข้มข้นนี้มาประยุกต์ใช้ในการกำหนดช่วงของความเข้มข้นของ ACV ที่จะทำการทดลองเปรียบเทียบกับสมุนไพรต่อไป

หมายเหตุ : 50% inhibitory dose (ID_{50}) คือปริมาณความเข้มข้นที่สามารถหยุดยั้งการเกิด plaque ลงได้ร้อยละ 50 เปรียบเทียบกับปริมาณของ plaque ที่เกิดโดยบ่ม Vero cells และ HSV ในอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ปกติ (ไม่มี ACV) การคำนวณ ID_{50} ใช้ log curve ในการประมาณค่าจากใช้สมการ

$$Y = a + b \ln X$$

Y คือ จำนวน plaque

X คือ ความเข้มข้นของ ACV หรือ สารสกัดสมุนไพร

a และ b คือ ค่าคงที่

3.6.2 **การทดสอบความสามารถในการหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของ HSV เมื่อเติม ACV ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว**

(1) เตรียมไวรัส จาก stock seed ให้มี HSV ประมาณ 30 PFU/50 ไมโครลิตร เติมลงใน 96-well-plate หลุมละ 50 ไมโครลิตร

(2) ย่อย Vero cells เตรียมให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ด้วย M199-GM ให้มีปริมาณเซลล์ $6x10^5$ เซลล์/มล. เติมลงในเพลท หลุมละ 50 ไมโครลิตร

(3) บ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ ที่มีความชื้น และมีอุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 3 ชั่วโมง

(4) เตรียม ACV ให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าใน overlay medium ให้มีความเข้มข้นตั้งแต่ 1 - 0.0156 ไมโครกรัม/มล. เติมลงในเพลทตามความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง ส่วนตัวควบคุมที่มีเฉพาะไวรัสดำเนินการเช่นเดียวกับ 3.6.1

(5) บ่มต่อในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้น ที่อุณหภูมิ 37 °ซ. เป็นเวลา 5 วัน

(6) ย้อมเซลล์ด้วย 1% crystal violet ใน 10% formalin นับจำนวน plaque ที่เกิดขึ้นเพื่อคำนวณค่า ID_{50}

3.7 **การทดสอบความสามารถในการต้าน HSV ของสมุนไพร** เมื่อเปรียบเทียบกับ ACV แสดงเป็นค่า 50% inhibitory dose (ID_{50})

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.7.1 <u>ทดสอบความสามารถในการหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของ HSV เมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรพร้อมกับไวรัส</u>

(1) เตรียมสมุนไพรและ ACV ให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่า (สมุนไพรใช้ช่วงความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ตามผลที่ได้จากการทดลองข้อ 3.5.3 ส่วน ACV ใช้ช่วงความเข้มข้นที่สามารถนำมาคำนวณค่า ID_{50} ได้ตามผลที่ได้จากการทดลองที่ 3.6.1 และ 3.6.2) โดยใช้ M199-GM เติมลงใน 96-well-plate ตามความเข้มข้นต่างๆ หลุมละ 25 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง

(2) ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1 (2)-(6)

3.7.2 <u>ทดสอบความสามารถในการหยุดยั้งการเพิ่มจำนวนของ HSV เมื่อเติมสารสกัดสมุนไพรลงในอาหารเลี้ยงเซลล์หลังจากไวรัสเข้าสู่เซลล์แล้ว</u>

(1) ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2 (1)-(3)

(2) เตรียมสมุนไพร และ ACV ให้เจือจางลงครั้งละ 2 เท่าตามความเข้มข้นในข้อ 3.7.1(1)ใน overlay medium เติมลงใน 96-well-plate ตามความเข้มข้นต่าง ๆ หลุมละ 100 ไมโครลิตร แต่ละความเข้มข้นทำซ้ำ 4 ครั้ง ส่วนตัวควบคุมที่มีเฉพาะไวรัสดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.1

(3) ดำเนินการเช่นเดียวกับข้อ 3.6.2 (5)-(6)

3.8 <u>การทดสอบความสามารถในการต้านไวรัสกลุ่มอื่นของสารสกัดสมุนไพรที่ทดสอบแล้วว่ามีฤทธิ์ในการต้าน HSV</u>

การทดลองเหมือนข้อ 3.7.2 แต่เปลี่ยนจาก HSV-1 และ HSV-2 เป็นโปลิโอไวรัสทัยป์-2 (ใช้เวลาในการบ่มในตู้อบคาร์บอนไดออกไซด์ที่มีความชื้นเพียง 2 วัน) ส่วนสมุนไพรเลือกทำเฉพาะบางตัวที่มีฤทธิ์ในการต้าน HSV เท่านั้น

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย