บทที่ 2

วัสดุ อุปกรณ์ และวิธีการทดลอง

2.1 วัสดุและเคมีภัณฑ์

2.1.1 สัตว์ทดลอง หนู(Inbred) สายพันธุ์ C3H และหนูไร้ขน (nude mice) เลี้ยงที่สถาบันมะเร็งแห่งชาติ โดยควบคุมสภาวะต่างๆ คือ

ก. กรง พื้นที่ขนาด 15x15 นิ้ว สูง 5 นิ้ว ทำด้วย stainless steel ทำความสะอาดสัปดาห์ละ 3 ครั้ง

ข. วัสดุรองพื้นกรง ใช้ขี้เลื่อยละเอียดซึ่งสะอาดปราศจากฝุ่นผง และไม่เกาะกันเมื่อ อบด้วยความร้อน หรือผ่านการนึ่งฆ่าเชื้อแล้ว รองพื้นกรงให้สูงประมาณ 1 นิ้ว

ค. อุณหภูมิในห้องเลี้ยงหนู ประมาณ 26-28 ^{o}ซ. และอากาศถ่ายเทได้สะดวก

ง. ความชื้นสัมพัทธ์ อยู่ในช่วง 40-60 %

จ. แสงสว่าง ให้แสงสว่างวันละ 10 ชั่วโมง สลับกับมืด 14 ชั่วโมง

ฉ. อาหาร ให้อาหารเม็ดสำเร็จรูป (โปรตีน 24%, ไขมัน 3%, เส้นใย 4%, เถ้า 8.5 %, Calcium 1.6 %, Phosphorus 1.0 %, Nitrogen-free extract 4.8% และความชื้น 12 %) จากบริษัทเจริญโภคภัณฑ์อาหารสัตว์ อาหารหนูไร้ขนทำการฆ่าเชื้อด้วยรังสีแกมม่าที่สำนักงานพลังงานปรมาณูเพื่อสันติ

ช. น้ำสำหรับหนูไร้ขนต้องผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว รวมทั้งภาชนะที่ใส่ด้วย และเปลี่ยนขวดน้ำสัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2.1.2 เซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma ได้จากหนูสีน้ำตาล สายพันธุ์ C3H ที่ทำ Tumor Transplant ทุก 10-15 วัน ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ (นำมาจากสถาบัน

019126

วิจัยรังสีแห่งชาติ เมืองชิบะประเทศญี่ปุ่น) ซึ่งปลูกไว้บริเวณกล้ามเนื้อรอบขาของหนู ส่วนในหนูไร้ขนจะปลูกด้วยเซลล์มะเร็งชนิด KB cell line (Origin ; Human Carcinoma of the floor of the mouth) เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) เติม Newborn Calf Serum (NCS) เป็นจำนวน 10 % (v/v) ทำการ subculture สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

2.1.3 เชื้อเห็ด จากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*) สายพันธุ์ G008 ของหน่วยปฏิบัติการวิจัยเห็ด ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ซึ่งแยกเนื้อเยื่อมาจากพันธุ์ที่ขึ้นบริเวณรอบต้นหางนกยูงฝรั่ง ภายในจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เก็บเชื้อไว้โดยการเลี้ยงเส้นใยในอาหาร PDA slant ที่ผสมขี้เลื่อยไม้ยางพารา ทำการ subculture ทุก 3 เดือน

2.1.4 วัสดุเตรียมเชื้อ ได้แก่ มันฝรั่ง ข้าวฟ่าง

2.1.5 วัสดุเพาะ

ก. วัสดุเพาะหลักคือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา

ข. วัสดุเพาะเสริมได้แก่ รำข้าวเจ้าละเอียด ดีเกลือ และยิบซั่ม

ค. วัสดุทำถุงก้อนเชื้อเห็ดได้แก่ ถุงพลาสติกทนร้อน ขนาด 6x12 นิ้ว คอขวด สำลี และยางรัด

2.1.6 วัสดุอื่น ๆ เช่น ขวดเหล้าแบน เครื่องเจาะจุกขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 7 มิลลิเมตร

2.1.7 เคมีภัณฑ์

สารเคมี	บริษัทผู้ผลิต
Anthrone	BDH Chemical Ltd., England
Bacto agar	Difco, U.S.A.
Bovine serum albumin	Sigma Chemical Co., U.S.A.
Calcium Sulphate	BDH Chemical Ltd., England
DEAE- cellulose	Sigma Chemical Co., U.S.A.
Dextran T2000,T500,T40	Pharmacia, Sweden
D-Glucose monohydrate	Sulfehannover, Germany
Glucose oxidase	Sigma Chemical Co., U.S.A.
Hibiscrub	BDH Chemical Ltd., England
Malt extract	Difco , U.S.A.
Molasses	สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
o-dianisidine	Sigma Chemical Co., U.S.A.
Perchloric acid	Carlo Erba , Italy
Peroxidase	Sigma Chemical Co., U.S.A.
Sephadex G75	Pharmacia, Sweden
Sephadex G200	" "
Sepharose 4B	" "
Sepharose 6B	" "

สารเคมีอื่น ๆ ที่ใช้นอกจากที่กล่าวนี้ ได้แก่ กรดเกลือ , โซเดียมไฮดรอกไซด์, KH_2PO_4, K_2HPO_4, $MgSO_4.7H_2O$ เกรดวิเคราะห์สั่งซื้อจากบริษัท Sigma Chemical Co. ประเทศสหรัฐอเมริกา, บริษัท BDH Chemicals Ltd. ประเทศอังกฤษ, บริษัท Fluka ประเทศสวิสซแลนด์ เป็นต้น

2.2 อุปกรณ์และครุภัณฑ์

ห้องเพาะเลี้ยงเชื้อ ห้องเลี้ยงเส้นใย และห้องบ่มถุงก้อนเชื้อของภาควิชาชีวเคมี เปิดดอกในโรงเรือนธรรมชาติ

ห้องเลี้ยงหนูปลอดเชื้อของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ

เครื่องแก้วกลั่นระเหย (soxhlet apparatus) ขนาด 500 มล.

คอลัมน์แก้ว ขนาดกว้างxยาว (2.3 x 25 ซม.) และ (1.8 x 90 ซม.)

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
หม้อนึ่งความดัน (Autoclave)	HA-3D	Hirayama Manufacturing Co., Japan
ตู้อบสูญญากาศ (Vacuum Oven)	VT 5042 EK	Heraeus, Germany
เครื่องทำแห้ง (Lyophilyzer)	Vacuum Gauge	Labconco Co., U.S.A.
ตู้ถ่ายเชื้อ (Laminar flow)	H-25	ISSCO

ชนิดเครื่องมือ	แบบ-รุ่น	บริษัทผู้ผลิต
เครื่องกรองลดปริมาตร (Stirred Ultrafiltration Cells)	8200	Amicon, U.S.A.
กระดาษกรอง (Ultrafiltration membrane)	YM 10	Amicon, U.S.A.
เครื่องวัด พีเอช (Autocal pH meter)	PHM 83	Radiometer Ltd.,U.S.A.
เครื่องบด (Waring blender)	34 BL 99	U.S.A.
เครื่องบด (Moter Drien Mill)	Wiley Mill 4 (sieves 3 mm)	Arthur H. Thomas, U.S.A.
เครื่องผสม (Vortex)	K-550-GE	Scientific Industries, U.S.A.
เครื่องปั่น (Centrifuge)	J-21C	Beckman, U.S.A.
เครื่องวัดการดูดกลืนแสง (Spectrophotometer)	Spectronic 2000	Bausch & Lomb, U.S.A.
เครื่องเก็บลำดับส่วน (Fraction collector)	LKB 2211 superrac	pharmacia, Sweden
เครื่องมือวัดจุดหลอมเหลว (Capillary melting point apparatus)	Hoover, unit-melt	Thomas scientific,U.S.A.

2.3 วิธีการทดลอง

2.3.1 การผลิตเส้นใยและดอกเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

2.3.1.1 การเพาะดอกเห็ดในถุงขี้เลื่อย

2.3.1.1.1 การเตรียมหัวเชื้อเห็ด (grain spawn)

ดัดแปลงจากวิธีของ (Triratana and Tantikanjina, 1989) ทำการล้างเมล็ดข้าวฟ่างให้สะอาดอีกครั้ง ก่อนนึ่งให้สุกด้วยไอน้ำ ผึ่งเมล็ดพอหมาดๆ แล้วนำมาผสมกับ Yeast extract 0.5 %(w/w) และเติมยิบซั่ม 0.05 %(w/w) ผสมคลุกเคล้าให้เข้ากันดี แล้วบรรจุลงในขวดแก้ว ขนาด 500 มิลลิลิตร ประมาณครึ่งขวดปิดด้วยจุกสำลี และหุ้มด้วยกระดาษอลูมิเนียม นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ทิ้งให้เย็นแล้วจึงใส่หัวเชื้อเห็ด บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) ในที่มืดเป็นเวลา 10-12 วัน เส้นใยเจริญเต็มเมล็ดข้าวฟ่าง แล้วจึงนำไปใช้เป็นหัวเชื้อในการเพาะแบบถุง

2.3.1.1.2 วิธีการเพาะและการบรรจุถุง

เตรียมวัสดุเพาะ ผสมตามสูตรมาตรฐาน คือ ขี้เลื่อยไม้ยางพารา (ความชื้นประมาณ 50 %) 94% (w/w) รำข้าว 5 %(w/w) ยิบซั่ม 1 %(w/w) และดีเกลือ 0.1 % ผสมด้วยเครื่องผสม (mixer) ให้คลุกเคล้าเข้ากันดี แล้วบรรจุลงในถุงทนร้อนขนาด 6 x 12 นิ้ว ถุงละ 1 กิโลกรัม ใส่คอขวด ปิดจุกสำลี หุ้มด้วยกระดาษนำไปอบฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว 2 ครั้ง คือ ครั้งแรก 3 ชั่วโมง ทิ้งไว้ 24 ชั่วโมง แล้วนึ่งซ้ำอีกครั้ง เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ปล่อยถุงให้เย็นจึงใส่หัวเชื้อเห็ดเมล็ดข้าวฟ่างลงในถุงวัสดุเพาะถุงละประมาณ ครึ่งช้อนโต๊ะ โดยทำในตู้ถ่ายเชื้อ บ่มถุงก้อนเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) ในที่มืดอากาศถ่ายเทได้ดี เมื่อเส้นใยเจริญเต็มถุงแล้วปล่อยให้ถูกแสงประมาณ 15 วัน จึงเปิดดอกเห็ด โดยดึงจุกสำลีออก วางนอนบนชั้นวางถุงเห็ด ในโรงเพาะธรรมชาติ ภาควิชาชีวเคมี อุณหภูมิ 28-34 °ซ ความชื้นสัมพัทธ์ 90 % มีแสงสลัว ให้ความชื้นเป็นละอองน้ำ 2 ครั้ง เช้าเย็นใช้เวลาประมาณ 30-45 วัน เก็บดอกเห็ดที่

เจริญเต็มที่ รอบแรกได้ภายใน 28 วัน รอบที่ 2-3 หลังจากที่เลี้ยงไปเป็นเวลา 46 และ 80 วัน ตามลำดับ โดยสังเกตุจากผิวเห็ดด้านบนมีสีน้ำตาลแดงเหมือนกันทั่วทั้งดอก และมีการสร้างสปอร์ปล่อยออกมา จึงทำการเก็บดอกเห็ด นำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ ในตู้อบ(hot air oven) เป็นเวลา 5 วัน จึงนำไปบดแล้วใช้เป็นวัตถุดิบในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ เพื่อทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่อไป

2.3.1.2 การเลี้ยงเส้นใยเห็ดในอาหารเหลว

2.3.1.2.1 การเตรียมเชื้อเห็ด (inoculum)

นำเชื้อเห็ดหมื่นปีที่เก็บไว้บนอาหารวุ้น PDA slant (stock culture) ใช้เข็มเขี่ยไปเลี้ยงบนอาหารวุ้น PDA ในจานเลี้ยงเชื้อ บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) เป็นเวลา 6-7 วันจึงใช้ cork borer ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 0.5 เซนติเมตร ตัดส่วนของเส้นใยบริเวณที่มีอายุน้อยที่สุด (รอบนอกสุดของรัศมีการเจริญของเส้นใย) แล้วใช้เข็มเขี่ยเชื้อตักชิ้นเชื้อเห็ดดังกล่าวย้ายเลี้ยงบนอาหารเหลวต่อไป

2.3.1.2.2 การเตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อเห็ดและคัดเลือกอาหารเหลวที่เหมาะสมแก่การเลี้ยงเส้นใยเห็ด

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ PD,YM และ Molass (ภาคผนวก 1) ปรับ pH ให้ได้ประมาณ 5±0.2 เทลงในขวดทดลอง ขนาด 500 มิลลิลิตร ปริมาตร 200 มิลลิลิตร นึ่งฆ่าเชื้อที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็นแล้วจึงใส่เชื้อเห็ด เลี้ยงเส้นใยเห็ดในสภาพนิ่ง (stationary culture) บ่มเชื้อที่อุณหภูมิห้อง (28-32 °ซ) ในสภาพที่มีแสงวันละ 8 ชั่วโมง เก็บผลทุก 3 วัน โดยกรองเส้นใยออกจากอาหารเลี้ยงเชื้อด้วยเครื่องกรอง ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ๆละ 50 มล. แล้วนำไปอบที่อุณหภูมิ 60 °ซ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และหาค่าเฉลี่ยน้ำหนักแห้งของเส้นใยเห็ดจำนวน 4 ขวดต่อการเก็บผล 1 ครั้ง เป็นเวลา 45 วัน เมื่อได้สภาวะและชนิดของอาหารเลี้ยงเส้นใยที่เหมาะสมแล้วจึงทำการผลิต เส้นใยเห็ดเพื่อใช้ในการสกัดสารโพลิแซคคาไรด์ และทดสอบคุณสมบัติทางกายภาพและชีวภาพต่อไป

ส่วนอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่เหลือจากการกรองเส้นใยออกแล้ว ทำให้เข้มข้นขึ้นโดยกำจัดน้ำออก 95 ส่วน ด้วย vacuum oven ที่ 60 °ซ เข้าสู่ขั้นตอนการทำให้บริสุทธิ์ต่อไปเหมือน ในดอกและเส้นใยเห็ด

2.3.1.2.3 การศึกษาสูตรอาหารที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี

แหล่งคาร์บอน :

สูตรอาหาร PD แปรผันปริมาณมันฝรั่ง20,40 และ60 % และปริมาณกลูโคส 2,4 และ6%

สูตรอาหาร YM แปรผันปริมาณกลูโคส 2, 4, 6, 10 และ 15 %

สูตรอาหาร YM แปรผันชนิดน้ำตาล ได้แก่ กลูโคส ฟรุคโตส และซูโครส (ใช้2 %)

สูตรอาหาร Molass โดยแปรผันความเข้มข้น (v/v) % คือ 0.05%, 0.1%, 0.5%, 1.0%, 5.0%, 7.5% และ 10 %

แหล่งไนโตรเจน :

สูตรอาหาร YM ดัดแปลงไม่ใส่ Malt extract โดยแปรผันปริมาณ yeast extract คือ 0.3, 0.6 และ 1.0 %

สูตรอาหาร Molass ความเข้มข้น 5 % (v/v) เติม yeast extract 1.0 %

ธาตุอาหาร :

สูตรอาหาร PD ใส่แร่ธาตุเหมือนในสูตร YM โดยใช้กลูโคส 2 %

สูตรอาหาร YM เพิ่ม $CaSO_4$ 0.05 %

สูตรอาหาร YM แปรผันปริมาณ $MgSO_4$ 0.1 % และ 0.2 %

สูตรอาหาร Molass ความเข้มข้น 5 % (v/v) เติม yeast extract 1.0 % และแร่ธาตุเช่นเดียวกับในสูตร YM

สูตรอาหาร Molass ความเข้มข้น 5 % (v/v)เติมกลูโคส 6% และใส่แร่ธาตุของสูตร YM

2.3.1.2.4 การศึกษา pH และอุณหภูมิ ที่เหมาะสมต่อการเจริญและการผลิตสารโพลิแซคคาไรด์จากเส้นใยเห็ดหมื่นปี

เมื่อหาสูตรอาหารที่เหมาะสมได้แล้ว จึงนำมาใช้เป็นอาหารเลี้ยงเส้นใยโดยแปรผันค่า pH เริ่มต้น คือ 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0และ 7.0 หลังจากได้ pH ที่เหมาะสมแล้วจึงนำไปเลี้ยงในที่มีอุณหภูมิ 24-26 °ซ และ 28-32 °ซ (อุณหภูมิห้อง) เพื่อหาอุณหภูมิที่เหมาะสมต่อไป

2.3.1.2.5 การวิเคราะห์ปริมาณกลูโคสในกากน้ำตาล (Molass) ดัดแปลงจากวิธีของ Boehringer Mannheim GmbH (Bergmeyer, 1974)

วิธีเตรียมสารเคมี:

สารละลาย (ก) ละลาย NADP (nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate) 110 มก. และ adenosine-5'-triphosphate (ATP) 260 มก.ในสารละลายบัฟเฟอร์ triethanolamine pH 7.6 ปริมาตร 45 มล.

สารละลาย(ข)ละลายเอนไซม์ hexokinase 320 U ,glucose-6-phosphate dehydrogenase 160 U ในสารละลายบัฟเฟอร์ citrate pH 4.6 ปริมาตร 1.1 มล.

วิธีทดสอบ:

1. นำสารละลายตัวอย่าง 0.10 มล. เติมสารละลาย ก 1.0 มล. และเติมน้ำกลั่นจนมีปริมาตร 2.0 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 3 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A1)

2. หลังจากนั้นจึงนำมาเติมสารละลาย ข 0.20 มล. เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ 10-15 นาที นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 340 นาโนเมตร (A2)

วิธีคำนวณ: หาค่าความแตกต่างระหว่าง A1 กับ A2 หลังจากหักค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมแล้ว

$$A = A2 - A1$$

คำนวณจากสูตรเพื่อหาความเข้มข้นของกลูโคส

$$C = \frac{V \times MW}{\varepsilon \times d \times v \times 1000} \times \Delta A \quad (g/l)$$

V = ปริมาตรสุดท้าย (มิลลิลิตร)

v = ปริมาตรสารละลายตัวอย่าง (มิลลิลิตร)

MW = มวลโมเลกุลของกลูโคส (กรัม/โมล)

d = ระยะผ่านแสง (เซนติเมตร)

ε = ประสิทธิภาพการดูดกลืนแสงของ NADPH ที่ 340 nm คือ 6.3 (lxmmolxcm)

$$C = \frac{3.02 \times 180.16}{6.3 \times 1 \times .1 \times 1000} \times \Delta A \quad (g/l)$$

2.3.1.2.6 การวัดปริมาณกลูโคส (Bergmeyer และคณะ, 1965) เพื่อติดตามการใช้กลูโคสในระหว่างการเจริญของเส้นใยเห็ดหมื่นปี

วิธีเตรียมสารเคมี:

1. สารละลายกลูโคสรีเอเจนต์ (glucose reagent) ประกอบด้วย

ก. สารละลายผสมของบัฟเฟอร์และเอนไซม์

ละลายเอนไซม์เปอร์ออกซิเดส 40 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร และเอนไซม์กลูโคสออกซิเดส 250 ไมโครกรัม ต่อ มิลลิลิตร ในโซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ 0.2 โมลาร์ pH 7.0

ข. โครโมเจน

เป็นสารละลายของออโธไดอะนิซีดินไดไฮโดรคลอไรด์ (orthodianicidine dihydrochloride) 10 มิลลิกรัมในน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร เก็บที่ 4° ซ. ได้นาน 2-3 วัน

ผสมสารละลาย ก. และ ข. ในอัตราส่วน 50 : 0.5 ก่อนใช้ทุกครั้ง

2. สารละลายกลูโคสมาตราฐาน

ละลายกลูโคส 25 มิลลิกรัม ด้วยน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เติมกรดเปอร์คลอลิก (perchloric acid) 70 เปอร์เซนต์ ปริมาตร 0.625 มล. แล้วเติมน้ำกลั่นจนครบ 25 มล.

วิธีทดสอบ:

นำสารละลายตัวอย่างที่ต้องการวัดปริมาณกลูโคส 0.1 มิลลิลิตร มาผสมกับกรดเปอร์คลอลิก 2.9 % (v/v) 1.0 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันนำมา 0.2 มิลลิลิตร ผสมกับสารละลายกลูโคสรีเอเจนต์ 5 มิลลิลิตร เขย่าให้เข้ากันตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิ 25° ซ. นาน 30 นาที จนสารละลายมีสีน้ำตาลส้ม นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 440 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง Spectronic 20 เปรียบเทียบกับกราฟมาตราฐานของสารละลายกลูโคส

2.3.2 การสกัดแยกสารจากเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

2.3.2.1 การสกัดสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งจากเส้นใยและดอกเห็ด

ทำการบดเส้นใยที่อบแห้งแล้วด้วยเครื่องบด (waring blender) มีขนาดความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที ส่วนดอกเห็ดที่อบแห้งจะใช้เครื่องบด (Moter Driven Mill) ขนาดความเร็ว 800 รอบต่อนาที นำไปสกัดด้วยน้ำร้อนในอัตราส่วน 10 กรัม ต่อ น้ำกลั่น 200 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องสกัด soxhlet กรองด้วยกระดาษกรอง (Whatman No.4) ทำให้เข้มข้นขึ้นในตู้อบสูญญากาศ (Vacuum Oven) ที่อุณหภูมิ 60 °ซ ขจัดน้ำออกไปประมาณ 95 ส่วน ทำการแยกตะกอนออก ด้วยเครื่องปั่น (centrifuge) ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที นำสารละลายที่ได้ไปผ่าน dialysis 3 ครั้ง ใช้เวลา 3,6 และ12 ชั่วโมง ตามลำดับ โดยใช้สารละลาย 50 มิลลิลิตร ต่อน้ำกรอง 5 ลิตร แล้วทำการแยกตะกอนอีกครั้งด้วยเครื่องปั่น ที่ความเร็ว 10,000 รอบต่อนาที นาน 20 นาที เก็บสิ่งเป็นตะกอนไปใช้แยกผลิตภัณฑ์ โดยทำให้แห้งด้วยอะซิโตน

2.3.2.2 การสกัดสารต้านมะเร็งจากอาหารเลี้ยงเส้นใยเห็ด

นำอาหารเหลวเลี้ยงเชื้อที่กรองเส้นใยออกแล้วไปทำให้เข้มข้นขึ้น โดยขจัดน้ำออกไป 95 % ด้วยตู้อบสูญญากาศ (Vacuum oven) อุณหภู มิ 60 °ซ ทำการแยกสารละลายและตะกอนโดยนำไปปั่นที่ 10,000 rpm ด้วยเครื่องปั่น (centrifuge) นาน 20 นาที นำส่วนสารละลายไปทำ dialysis ในอัตราส่วน 1 มิลลิลิตร ต่อ น้ำกรอง 100 มิลลิลิตร 3 ครั้ง ใช้เวลา 3,6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับ หลังจากนั้นจึงนำสารละลายไปตกตะกอนด้วย 95 %

เอทธานอลในอัตราส่วน สารละลาย 1 มิลลิลิตร ต่อ เอทธานอล 6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ทำการแยกสารละลายและตะกอนโดยนำไปปั่นที่ 10,000 rpm ด้วยเครื่องปั่น (centrifuge)นาน 20 นาที เก็บสิ่งที่เป็นตะกอนไปใช้แยกผลิตภัณฑ์ โดยทำให้แห้งด้วยอะซิโตน

2.3.2.3 การแยกสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ จากสารสกัดที่ตกตะกอนด้วยเอทธานอล

2.3.2.3.1 การเตรียมคอลัมน์ DEAE-cellulose

ใส่ DEAE-cellulose 50 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร แช่ไว้ 1 คืน จากนั้นจึงกรองด้วยเครื่องกรองเอาน้ำออก เติม 0.1 M HCL ลงใน DEAE-cellulose แช่ไว้ 30 นาที ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมี pH เท่ากับ 7 จึงกรองน้ำออกเติม 0.1 N NaOH แช่ไว้ 30 นาที ล้างด่างด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่เป็นกลาง บรรจุ DEAE-cellulose ลงในคอลัมน์ขนาด 2.3 x 25 ซม. ให้สูง 20 เซนติเมตร ปรับสมดุลย์ด้วยน้ำกลั่น 12 ชั่วโมงด้วยอัตราการไหลของน้ำกลั่น 30 มล./ชม. แยกสารประกอบต่างๆ ออกจากสารสกัดหยาบโดยนำสารสกัดหยาบ 0.2 กรัม ละลายด้วยน้ำกลั่น 2 มิลลิลิตร นำมาผ่านคอลัมน์ ด้วยอัตราการไหล 30 มล./ชม. และเก็บสารที่ออกมาจากคอลัมน์ หลอดละ 5 มิลลิลิตร ติดตามค่าการดูดกลืนแสง จนกระทั่งลดต่ำลงกว่า 0.05 หน่วย จึงทำการชะตามด้วย 0.1 M $NaHCO_3$ (ตรวจหาปริมาณสารประกอบโปรตีนจากสารที่ถูกชะออกมา โดยติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 280 นาโนเมตร และตรวจหาปริมาณสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ด้วย 0.2 % สารละลายแอนโทรน ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร) รวมแฟรกชั่นของสารละลายที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ของแต่ละฟีคเข้าด้วยกัน แล้วทำการลดปริมาตรลงให้เหลือประมาณ 2 มิลลิลิตร ด้วยเครื่องกรองลดปริมาตร (Ultrafiltration) ก่อนนำไปผ่านคอลัมน์ gel filtration เพื่อแยกขนาดของสารสกัดโพลิแซคคาไรด์ต่อไป

2.3.2.3.2 การเตรียมคอลัมน์ gel filtration ชนิดต่าง ๆ

1. การเตรียมคอลัมน์ Sepharose 6B

บรรจุ Sepharose 6B ปริมาตร 255 มล. ในคอลัมน์ขนาด 1.8 X 90 ซม. ปรับสมดุลย์ด้วยน้ำกลั่นเป็นเวลา 12 ชั่วโมง ด้วยอัตราการไหลของน้ำกลั่น 20

มล./ชม. นำผลผลิตที่รวมได้ในฟีคที่ 1 และ 2 จากเส้นใยและดอกเห็ดที่ได้จากคอลัมน์ DEAE-cellulose ปริมาตร 2 มิลลิลิตร มาผ่านคอลัมน์ Sepharose 6B ชะด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตรการไหล 20 มล./ชม. เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์แฟรกชั่นละ 2.8 มิลลิลิตร ติดตามผลด้วยวิธีการเดียวกับวิธีการทดลองข้อ 1. รวมแฟรกชั่นของแต่ละฟีคที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ทำการลดปริมาตรด้วยเครื่องกรอง (Ultrafiltration) ก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยเครื่อง Lyophilizer เก็บไว้ในที่แห้งและเย็น เพื่อนำไปใช้ทดสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป

2. การเตรียมคอลัมน์ Sepharose 4B (ภาคผนวก 2)

เช่นเดียวกับการเตรียมคอลัมน์ Sepharose 6B

3. การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G 75 (ภาคผนวก 3)

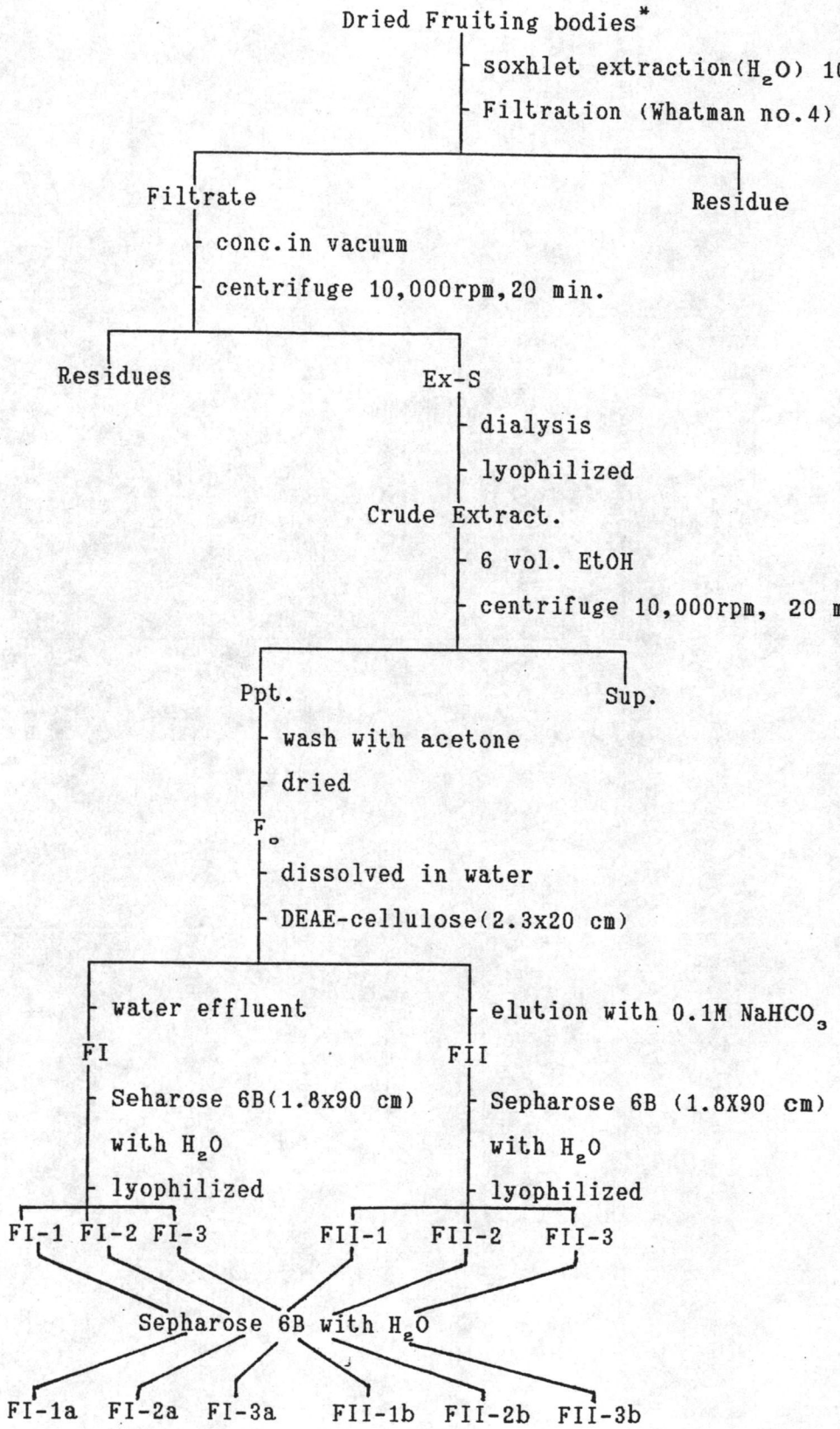
ใส่ Sephadex G 75 15 กรัม ลงในน้ำกลั่น 1 ลิตร แช่ทิ้งไว้ 1 คืน อุ่นไล่ก๊าซออกจากเม็ดเจล เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองน้ำออกแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใหม่ก่อนนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาดเดียวกัน และปรับสภาวะต่าง ๆ ก่อนใช้เหมือนในคอลัมน์ 2.1

4. การเตรียมคอลัมน์ Sephadex G 200 (ภาคผนวก 4)

ต้ม Sephadex G 200 12 กรัมในน้ำกลั่น 1 ลิตร นานประมาณ 5-8 ชั่วโมง ตั้งทิ้งไว้ให้เย็น กรองน้ำออกแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใหม่ และดูดฟองอากาศออกจากเม็ดเจล โดยใช้ suction pump นานประมาณ 1 ชั่วโมง ก่อนนำไปบรรจุคอลัมน์ขนาดเดียวกันและอัตราการชะด้วยน้ำกลั่นเหมือนเจลชนิดอื่นข้างต้น

2.3.2.3.3 การหาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ด้วยวิธี Anthrone test

เตรียมสารละลายแอนโทรนโดยชั่งสารแอนโทรน 0.2 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 100 มล. ทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณสารโพลิแซคคาไรด์ โดยผสมสารละลายที่ต้องการทดสอบ 0.5 มล.ให้เข้ากันดีกับสารละลายแอนโทรน 2 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 3-5 นาที สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียวน้ำเงิน แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร



*Mycelium : MI,MII

Extracellular : EI

รูปที่ 5 แสดงการเตรียมสารสกัดโพลิแซคคาไรด์จากดอกเห็ดหมื่นปี (*G. lucidum*)

2.3.2.3.4 การหาปริมาณโปรตีนโดยวิธี Lowry (Lowry และคณะ 1951)

เตรียมสารเคมีต่อไปนี้

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

สารละลาย ข ละลาย $CuSO_4.5H_2O$ 5 กรัม/ลิตร ใน Na/K tartrate 10 กรัม/ลิตร

สารละลายต่าง เตรียมโดยผสมสารละลาย 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. โดยเร็วผสมให้เข้ากันทันที หลังจากนั้น 30 นาทีนำไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 750 นาโนเมตร

2.3.3 การศึกษาคุณสมบัติทางเคมีและกายภาพของสารประกอบโพลิแซคคาไรด์

2.3.3.1 การหาจุดหลอมเหลว โดยวิธี Oil bath (สุภาพ บุณยะรัชเวช,2527)

นำสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ที่ได้จาก 2.3.2.3 จำนวนเล็กน้อยมาบดให้ละเอียดแล้วบรรจุลงในหลอด capillary (ที่หลอมปลายข้างหนึ่งให้ตัน) จุ่มลงในน้ำมันที่มีจุดเดือดสูง (silicone oil) ให้ความร้อนแก่ oil bath จนอุณหภูมิต่ำกว่าจุดหลอมเหลวของสารที่จะหาประมาณ 15 องศาเซลเซียส แล้วจึงลดความร้อนจนกระทั่ง อัตราการเพิ่มอุณหภูมิเท่ากับประมาณ 1-2 องศาต่อนาที เริ่มบันทึกค่าจุดหลอมเหลวที่อุณหภูมิตั้งแต่สารเริ่มหลอมเหลวหมดพอดี

2.3.3.2 การหาค่า specific rotation

นำสารละลายโพลิแซคคาไรด์จาก 2.3.2.3 ที่ทราบความเข้มข้นบรรจุลงในหลอด polarizer แล้วนำไปวัดองศาของการบิดระนาบแสงด้วยเครื่อง Polarimeter เป็นจำนวน 20 ครั้ง นำค่าที่อ่านได้มาคำนวนหาค่าการบิดระนาบแสงเฉลี่ย (a) แล้วนำไปคำนวนหาค่า specific rotation จากสูตร

specific rotation = 0.348 a/2b

เมื่อ b คือค่าความเข้มข้นของสารละลายโพลิแซคคาไรด์ (กรัม/มิลลิลิตร)

2.3.3.3 การหามวลโมเลกุล

โดยใช้ dextran (Pharmacia) ในช่วง $1x10^4$ - $2x10^6$ ดาลตัน เป็นสารมาตราฐานเพื่อหามวลโมเลกุลของสารประกอบโพลิแซคคาไรด์ ที่ได้จาก 2.3.2.3 ด้วยคอลัมม์ Sepharose 6B ขนาด 1.8 x 90 เซนติเมตร ชะด้วยน้ำกลั่นอัตราการไหล 20 มล./ชม. เก็บแฟรกชั่นละ 2.8 มิลลิลิตร

2.3.4 วิธีการตรวจสอบคุณสมบัติของสารออกฤทธิ์ในการต้านมะเร็งทางชีวภาพ

โดยการพัฒนาวิธีการทดสอบ 2 วิธีคือ

2.3.4.1 การใช้หนู Inbred สายพันธุ์ C3H กับมะเร็งของหนูชนิด Fibrosarcoma

2.3.4.1.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

หนูสีน้ำตาลสายพันธุ์ C3H เป็น inbred mice โดยใช้พ่อแม่พันธุ์ C3H จากญี่ปุ่นซึ่งมีอายุประมาณ 10 สัปดาห์ โดยแต่ละกรงใช้ตัวผู้ 1 ตัวต่อตัวเมีย 2 ตัวให้อยู่ร่วมกันประมาณ 15 วัน ทำการแยกตัวผู้ออก ตัวเมียจะตั้งท้องนานประมาณ 19-21 วัน จึงคลอด(ระยะที่ตั้งท้องแก่จะแยกตัวเมียออกจากกัน เพื่อป้องกันเวลามีลูกจะได้ไม่แน่นกรงเกินไป) เลี้ยงลูกหนูร่วมกับแม่จนอายุได้ 4-5 สัปดาห์ จึงแยกออกจากแม่หนูและแยกเพศลูกหนู พร้อมกับทำเครื่องหมายประจำตัวที่บริเวณหู - เลี้ยงลูกหนูที่มีเพศเดียวกัน อายุและขนาดใกล้เคียงกันไว้ในกรงเดียวกัน กรงละประมาณ 5 ตัว เมื่อลูกหนูมีอายุได้ 5-6 สัปดาห์ หรือมีน้ำหนักตัวประมาณ 20-25 กรัม จึงนำมาปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง เพื่อใช้ในการทดสอบสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็งต่อไป

2.3.4.1.2 การเตรียม และปลูกเซลล์มะเร็ง (Tumor cell preparation and transplantion)

นำเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma จากหนูที่ทำ Transplant ทุก 10-15 วัน ของสถาบันมะเร็งแห่งชาติ มาปลูกในหนูสีน้ำตาลสายพันธุ์ C3H ที่ใช้ทดลอง

รูปที่ 6 ห้องเลี้ยงหนูสีน้ำตาล C3H (Housing system) สถาบันมะเร็งแห่งชาติ

สถาบันวิทยบริการ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 7 ลักษณะของหนูสีน้ำตาลสายพันธุ์ C3H

A

B

รูปที่ 8 ขั้นตอนการเตรียมและการปลูกเซลล์มะเร็งชนิด Fibrosarcoma ในหนู C3H

A,B = เลือกตัดชิ้นเนื้อมะเร็งบริเวณที่เป็นเนื้อมะเร็งขาว ๆ หลีกเลี่ยงเซลล์ตาย (necrosis)

C = ชั่งชิ้นเนื้อมะเร็งที่แช่ใน media EMEM

D = บดชิ้นเนื้อมะเร็งด้วยไส้ syringe (plunger) บนกระชอนที่มีน้ำแข็งหล่อเย็นตลอดเวลา

E = กรองเซลล์มะเร็งผ่านหัวกรอง 8 seive เพื่อกรอง cell debris ออก

F = ทำการเจือจางเพื่อให้ได้เปอร์เซนต์เซลล์ (w/v) ตามต้องการ โดยการนับเซลล์ด้วย hemacytometer

G = ฉีดเซลล์มะเร็ง 0.1 มล./ตัว โดยการฉีดเข้ากล้ามเนื้อโคนขาขวาของหนู (intramuscle)

C

D

E

F

G

โดยทำความสะอาดบริเวณที่จะทำการทดลองด้วยสารละลาย Bactyl และทำการฆ่าเชื้อที่มือและแขนด้วยสารละลาย Hibiscrub จากนั้น ฆ่าหนูที่ถูก Transplant ด้วยก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ (โดยใส่หนูในถุงพลาสติกอย่างหนา เติมก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เข้าไปในถุง มัดปากถุงให้แน่น ประมาณ 5 นาที) ทำการฆ่าเชื้อผิวหนังบริเวณที่มีก้อนมะเร็ง ด้วยแอลกอฮอล์ ใช้กรรไกรตัดรอบๆ แล้วลอกผิวหนังบนออก จากนั้นเลือกตัดก้อนเนื้อมะเร็งขาวๆ ที่ยังไม่เน่า ขนาดประมาณ 5 ลบ.มม. ล้างด้วย media EME 10 %(w/v) ตัดให้เป็นชิ้นเล็กบนกระชอนที่วางบนน้ำแข็ง บดให้ละเอียดด้วยไส้ plunger syringe กรองอีกครั้งด้วยหัวกรองขนาด 8 seive ตั้งทิ้งไว้ในที่เย็น 10 นาที เพื่อให้ส่วนที่เป็นเยื่อเซลล์ชิ้นใหญ่ ๆ ตกตะกอน ดูดเอาเฉพาะเซลล์แขวนลอยส่วนบน ไปฉีดในหนูทดลอง (0.1 มล.ต่อตัว) บริเวณกล้ามเนื้อโคนขา (intramuscle) โดยแปรผันปริมาณเซลล์มะเร็ง 0.1,0.2,0.3,0.5,1.0 และ2.0 % (w/v) เพื่อหาปริมาณเซลล์มะเร็งจำนวนน้อยที่สุด ที่ทำให้หนูทดลองเป็นมะเร็งทุกตัว และทำการนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมด้วย 0.4 % Trypan blue ด้วยเครื่อง hemacytometer ขนาด 0.01 ลูกบาศก์มิลลิเมตร

2.3.4.2 การใช้หนูไร้ขน nude mice กับมะเร็งในช่องปากของคน (KB cell)

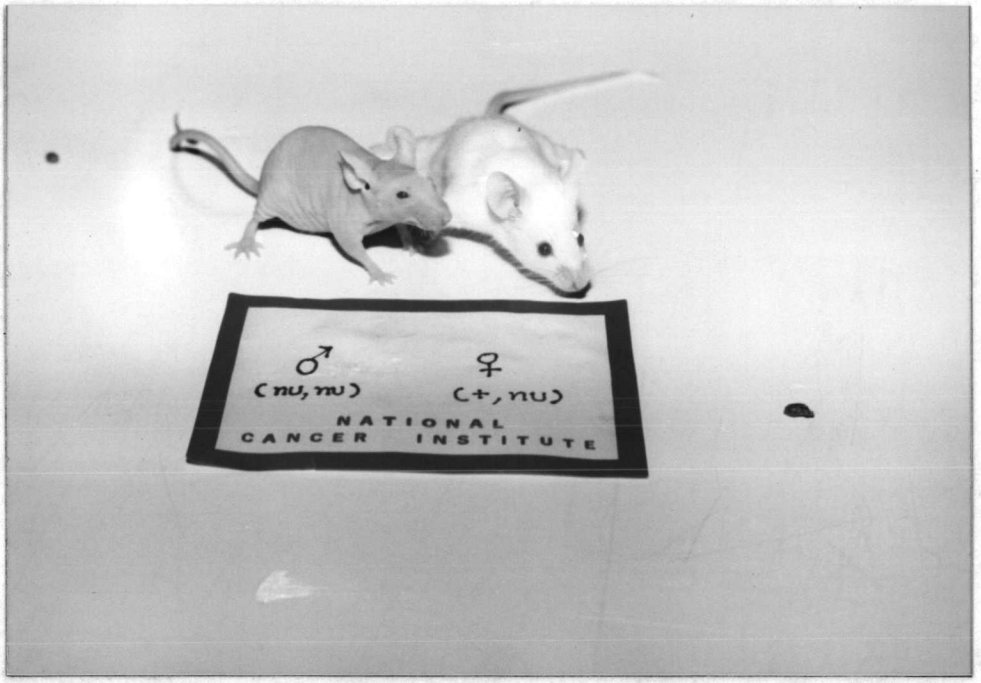
2.3.4.2.1 การเตรียมสัตว์ทดลอง

ต่างจากวิธีที่ 1 ตรงหนูที่ใช้เป็น outbred โดยแม่พันธุ์เป็นหนูขาวที่มี heterozygous gene เป็น nu/+ กับพ่อพันธุ์ที่มี homozygous recessive gene คือ nu/nu

2.3.4.2.2 การเตรียมเซลล์มะเร็ง (cell culture)

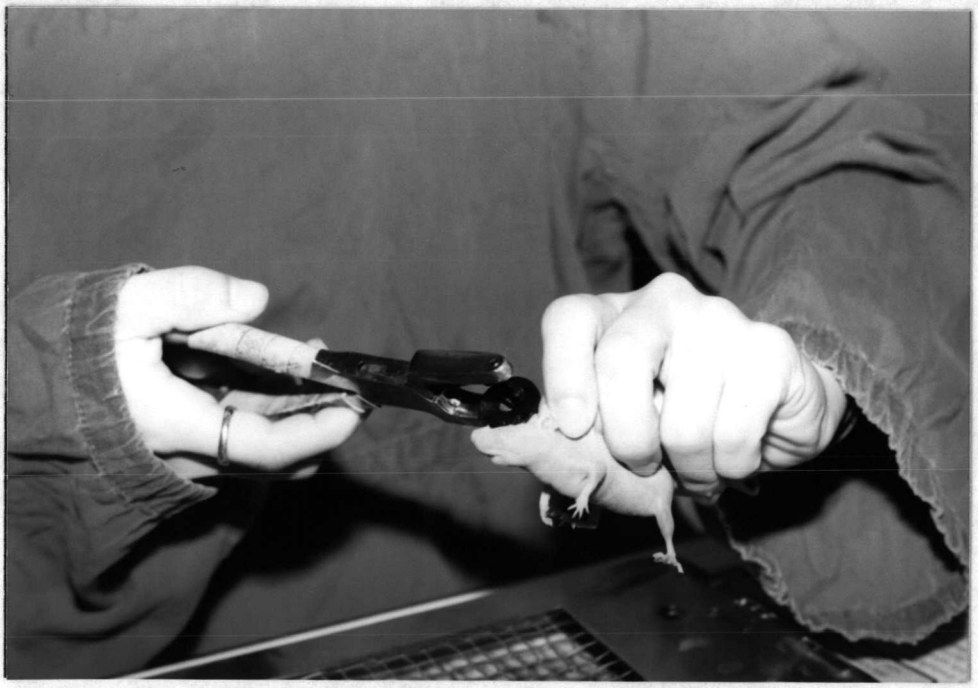
ใช้เซลล์มะเร็งในช่องปากคน (KB cell line) เพาะเลี้ยงในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM) เติม Newborn calfe Serum (NCS) เป็นจำนวน 10 % (v/v) เก็บไว้ในตู้บ่มเชื้อ CO_2 ทำการ subculture ทุก 4 วัน

นำเซลล์ที่เลี้ยงไว้นี้มาปั่นที่ความเร็วรอบ 800-1000 รอบต่อนาที นาน 10 นาที เพื่อให้ได้ปริมาณเซลล์มากพอ คือ 10^6 เซลล์ ต่อ 0.1 มิลลิลิตร ต่อ ตัว ก่อนนำไปฉีดจะนับจำนวนเซลล์ด้วย hemacytometer โดยการย้อมด้วย 0.4 % Trypan blue



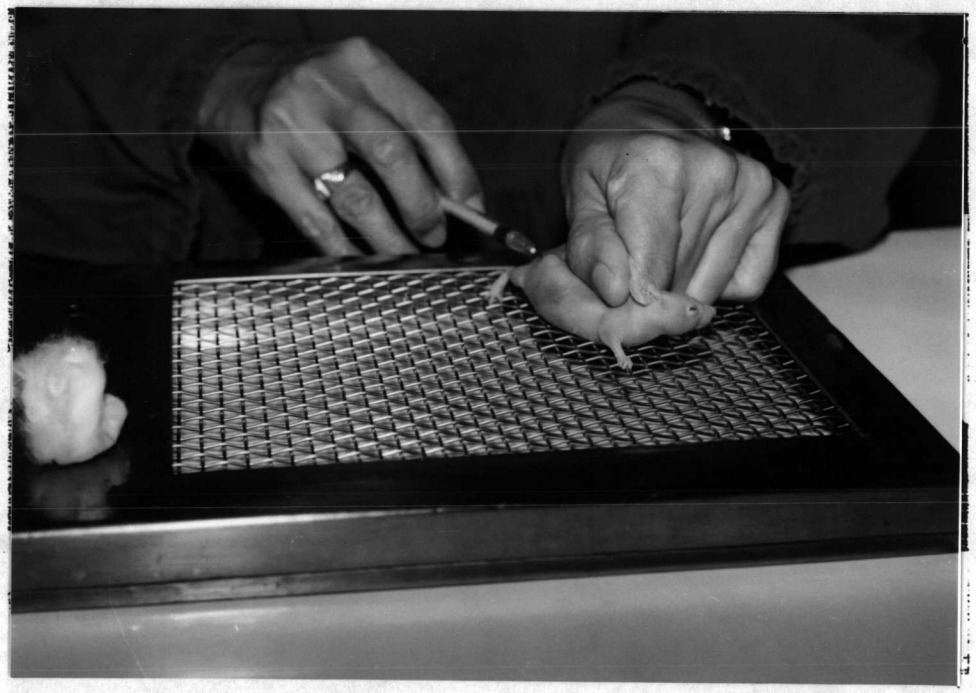
ศูนย์วิทยทรัพยากร จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

รูปที่ 9 ลักษณะพ่อพันธุ์ที่เป็นหนูไร้ขน (nu,nu) และแม่พันธุ์ที่เป็นหนูขาว (+,nu) อายุ 2 เดือน



รูปที่ 10 การทำเครื่องหมายประจำตัวหนูทดลอง

รูปที่ 11 การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งชนิด KB cell ในตู้ CO_2 incubator



รูปที่ 12 การฉีดเซลล์มะเร็งใต้ผิวหนังของหนูไร้ขน (subcutaneuos)

2.3.4.3 การเตรียมสารออกฤทธิ์สำหรับฉีดให้หนูทดลอง

สารสกัดหยาบที่ตกตะกอนด้วยเอทธานอล จากดอกและเส้นใยเห็ดหมื่นปี ละลายด้วยสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ที่นึ่งฆ่าเชื้อแล้วโดยแปรผันความเข้มข้น 50,80 และ 100 มก./มล. ส่วนสารโพลิแซคคาไรด์ละลายด้วยโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ให้ได้ความเข้มข้น 10 มก./มล. จากนั้นกรองโดยวิธีปราศจากเชื้อผ่าน millipore filter ขนาด 0.45 ไมครอน

2.3.4.4 การให้สารออกฤทธิ์แก่หนูทดลอง

1. ในหนูสีน้ำตาลสายพันธุ์ C3H

หลังจากฉีดเซลล์มะเร็ง 0.3 % ให้หนูทดลองได้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงให้สารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยการฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal) โดยแบ่งหนูออกเป็น 7 กลุ่ม ๆ ละ 7-10 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว ฉีดทุกวันเป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ด (0.5 กรัม/กก. น้ำหนักตัว) ฉีดวันเว้นวัน ครั้งละ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัวเป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 3 ฉีดสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ด (0.8 กรัม/กก. สลับกับ 0.5 กรัม/กก. น้ำหนักตัว) ฉีดวันเว้นวัน ครั้งละ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 4 ฉีดสารที่แยกได้จากเส้นใย เมื่อนำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ฟีคที่ 2 (100 มก./กก. น้ำหนักตัว) ฉีดทุกวันครั้งละ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 5 และ 6 ฉีดสารที่แยกได้จากเส้นใย และดอกเห็ดที่นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ฟีคที่ 2 และ Sepharose 6B 2 ครั้ง ฟีคที่ 1 คือ MII-1b และFII-1b (100 มก./กก. น้ำหนักตัว) ฉีดทุกวัน ครั้งละ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 7 ฉีดสารที่แยกได้จากอาหารเลี้ยงเส้นใย ที่นำไปผ่านคลอลัมน์ DEAE-

cellulose และ Sepharose 6B 2 ครั้ง ฟิคที่ 1 คือ MI-1a (100 มก./กก. น้ำหนักตัว) ฉีดทุกวันครั้งละ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา 21 วัน

ติดตามผลหลังจากให้สารออกฤทธิ์แก่หนูทดลองแล้ว โดยทำการชั่งน้ำหนักตัว และวัดขนาดก้อนมะเร็ง สัปดาห์ละ 3 ครั้ง โดยวัดเส้นผ่านศูนย์กลางของก้อนมะเร็ง 3 ด้าน คือ a b c คำนวณจากสูตร π abc/6

เปอร์เซนต์การยับยั้งเซลล์มะเร็ง คำนวนได้จากสูตร

$$(1-T/C) \times 100$$

T = ขนาดก้อนมะเร็งเฉลี่ยในกลุ่มทดลอง (cm^3)

C = ขนาดก้อนมะเร็งเฉลี่ยในกลุ่มควบคุม (cm^3)

และหาค่าเฉลี่ยที่ช่วยยืดอายุหนูทดลองที่ได้รับเซลล์มะเร็ง MSD (Mean Servival Day) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลองที่ให้สารสกัดจากเห็ดหมื่นปี และกลุ่มควบคุมที่ให้น้ำเกลือ โดยใช้เกณฑ์มาตราฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (Standard Criteria of the National Cancer Institute of the U.S.A.)ซึ่งกำหนดให้ค่า % T/C ต้องมีค่ามากกว่า 120 % จึงถือได้ว่ายาหรือสารนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง โดยคำนวณได้จากสูตร

$$\% \ T/C = \frac{\text{MSD (treated)}}{\text{MSD (control)}} \times 100$$

2. ในหนูไร้ขน (nude mice)

หลังจากฉีดเซลล์มะเร็ง 10^6 เซลล์ ให้หนูทดลองได้ประมาณ 24 ชั่วโมง จึงเริ่มฉีดสารออกฤทธิ์ต้านมะเร็ง โดยการฉีดเข้าบริเวณช่องท้อง (intraperitoneal) โดยแบ่งหนูออกเป็น 2 กลุ่ม ๆ 5 ตัว

กลุ่มที่ 1 เป็นกลุ่มควบคุม ฉีดสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9 % ปริมาณ 0.2 มล./กก. น้ำหนักตัว ฉีดทุกวันเป็นเวลา 21 วัน

กลุ่มที่ 2 ฉีดสารที่แยกได้จากเส้นใยเห็ด ที่นำไปผ่านคอลัมน์ DEAE-cellulose ฟิคที่ 2 (100 มก./กก. น้ำหนักตัว) ฉีดทุกวันครั้งละ 0.2 มล./20 กรัม น้ำหนักตัว เป็นเวลา

21 วัน

ติดตามผลหลังจากให้สารออกฤทธิ์แก่หนูแล้ว โดยทำการชั่งน้ำหนักตัวและวัดขนาดก้อนเซลล์มะเร็งของหนูสัปดาห์ละ 2 ครั้ง เป็นเวลา 40 วัน เปรียบเทียบระหว่างชุดทดลองที่ให้สารสกัดจากเห็ดหมื่นปี และชุดควบคุมที่ให้น้ำเกลือ โดยใช้เกณฑ์มาตราฐานของสถาบันมะเร็งแห่งชาติสหรัฐอเมริกา (Standard Criteria of the National Cancer Institue of the U.S.A.) ซึ่งกำหนดให้ค่า % T/C ต้องมีค่าน้อยกว่าหรือเท่ากับ 75 % จึงถือได้ว่ายาหรือสารนั้นมีฤทธิ์ในการยับยั้งมะเร็ง โดยคำนวณได้จากสูตร

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

a = ด้านที่สั้นที่สุดของขนาดก้อนมะเร็ง (มิลลิลิตร)

b = ด้านที่ยาวที่สุดของขนาดก้อนมะเร็ง (มิลลิลิตร)

$$\text{Average Tumor Volume} = \text{T.V.}/n$$

n = จำนวนหนูในแต่ละกลุ่ม

$$\text{Relative Tumor Volume} = \frac{\text{ค่า T.V. ของวันที่ทำการวัด}}{\text{ค่า T.V. ของวันที่เริ่มให้ยา}}$$

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

2.4 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดจากเห็ดหมื่นปี (Toxicity test)

ใช้หนูขาว Swiss mice ที่มีอายุ 5-6 สัปดาห์ หรือมีน้ำหนักตัวประมาณ 20-25 กรัม แบ่งหนูออกเป็น 3 กลุ่ม ๆละ 4 ความเข้มข้น ๆละ 10 ตัว (ตัวผู้ 5 ตัว และตัวเมีย 5 ตัว) เตรียมสารสกัดหยาบที่ตกตะกอนด้วยเอทธานอล จากดอก เส้นใยและอาหารเลี้ยงเส้นใย นำมาละลายด้วยน้ำเกลือที่ฆ่าเชื้อแล้ว ฉีดสารออกฤทธิ์แก่หนูทดลอง โดยฉีดเข้าช่องท้องกลุ่มละ 4 ความเข้มข้น โดยการฉีดเพียงครั้งเดียว ดูผลภายใน 24 ชั่วโมง

ติดตามผลการทดลองโดยคำนวณหาปริมาณการตายครึ่งหนึ่งของหนูทดลอง (LD_{50}) และตรวจสอบหาอาการผิดปกติของอวัยวะภายในของหนู

2.5 การตรวจสอบทาง Histopatology

หลังจากเก็บผลการยับยั้งการเจริญของเนื้อเยื่อมะเร็งด้วยสารออกฤทธิ์แล้วทำการฆ่าหนูทั้งในหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลอง สุ่มตัดชิ้นเนื้อจากก้อนมะเร็ง และอวัยวะภายในที่สำคัญ ได้แก่ ตับ ปอด ม้าม และไต แช่ใน 10 % Formalin solution เพื่อทำการ fix เนื้อเยื่อ และนำไปทำสไลด์ แล้วจึงไปตรวจดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ เพื่อชันสูตรลักษณะของเซลล์มะเร็ง และการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปยังอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย