5. วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการดำเนินการวิจัย และสถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

5.1 เซลล์มะเร็ง

เซลล์มะเร็งที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้เป็นเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี 2 ชนิด ได้แก่ KKU-100 (poorly-differentiated adenocarcinoma), KKU-M156 (moderately-differentiated adenocarcinoma), เซลล์มะเร็งท่อน้ำดีทั้ง 2 ชนิด เป็นเซลล์ที่ establish ขึ้นที่หน่วยปฏิบัติการวิจัยพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

การเพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งทั้ง 2 ชนิด เพาะเลี้ยงใน Dulbecco's minimum essential medium/F-12 (Ham) ใส่ 10 % heat-inactivated fetal bovine serum, 2mM-glutamine, 100 IU Penicillin, 100 μg streptomycin เซลล์ทุกชนิดเลี้ยงในตู้อบที่อุณหภูมิ 37°ซ ภายใต้บรรยากาศ 5 % CO_2 ทำการเปลี่ยน media สัปดาห์ละ 2 ครั้ง

5.2 ยาเคมีบำบัด

ยา 5-FU, placlitaxel และ cisplatin ซื้อจากบริษัท Boryung Pharmaceutic Co. LTD (Korea) ยา gemcitabine และ doxorubicin ซื้อจากบริษัท Dabur Pharma Limited, New Delhi, India.

5.3 การเตรียมสารละลาย resveratrol และยาเคมีบำบัด

ละลายสารด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นนำมาทำให้ปราศจากเชื้อโดยกรองผ่าน millipore filter membrane ขนาด 0.45 μm นำสารละลายที่ได้มาทำการเจือจางให้ได้ความเข้มข้นในขนาดต่าง ๆ กัน เพื่อใช้ในการทดสอบฤทธิ์ต่อเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ เทียบกับ vehicle และสารมาตรฐานต่อไป

5.4 การทดสอบฤทธิ์ความเป็นพิษของ resveratrol และยาเคมีบำบัดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ทำการทดสอบโดยตรวจหาปริมาณของ cellular protein ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) (34) ในการทดสอบนำเซลล์ที่มีปริมาณ 0.5 ถึง 1 x 10^5 เซลล์ต่อมล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate เติมสารละลาย resveratrol และสารละลายยา ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กันใช้ ellipticine เป็น positive control ใช้ 0.1% DMSO และ normal saline solution เป็น solvent control จากนั้นนำไปบ่มที่ 37°ซ ใน CO_2 incubator นาน 72 ชั่วโมง ทำการย้อมด้วย SRB แล้วจึงทำการละลายสีด้วย Tris buffer เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำไปวัด OD ที่ 510 nm จากค่า OD ที่ได้นำมาคำนวณหา % viability และค่า IC_{50}

5.5 การทดสอบฤทธิ์การใช้ร่วมกันของ resveratrol กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิดในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี

ทำการทดสอบโดยตรวจหาปริมาณของ cellular protein ด้วยวิธี sulforhodamine B (SRB) assay ตามวิธีของ Skehan และคณะ (1990) (34) ในการทดสอบนำเซลล์ที่มีปริมาณ 0.5 ถึง 1 x 10^5 เซลล์ต่อมล. ใส่ลงใน 96-well microtiter plate เติมสารละลายยาและสารละลาย resveratrol ที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมลงในเซลล์ ในการทดลองต้องมีเซลล์ที่ใส่สารละลายยาหรือสารละลาย resveratrol ที่มีความเข้มข้นที่พอเหมาะเพียงอย่างเดียวทำควบคู่ไปด้วย แล้วทำ SRB assay ดังรายละเอียดในข้อ 5.4 จากนั้นทำการวิเคราะห์ผลโดยใช้วิธีของ Chou and Talalay (35)

5.6 **Apoptosis assay**

เลือก combination ที่ให้ผลเสริมฤทธิ์กันมาทำการตรวจสอบกลไกการตายของเซลล์ว่าเกิดจากกระบวนการ apoptosis หรือไม่ ในการศึกษาครั้งนี้จะทำการศึกษากลไกการเกิด apoptosis โดยการดู nuclear morphology ด้วยวิธี ethidium bromide/acridine orange (EB/AO) staining (36) ทำโดยเลี้ยงเซลล์ 1 x 10^4 เซลล์ / หลุม ใน 96-well culture plate นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°ซ ใน CO_2-incubator เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติมสาร resveratrol และยาเคมีบำบัดที่ความเข้มข้นต่างๆกันลงไป และใช้ RPMI 1640 ที่มี 0.1%DMSO เป็น vehicle control นำไปบ่มที่ 37°ซ ใน CO_2-incubator นาน 48 ชั่วโมง แล้วทำการย้อมเซลล์ด้วย ethidium bromide/acridine orange จากนั้นนำมาตรวจสอบ nuclear morphology โดยใช้กล้อง Nikon fluorescent microscope เซลล์ที่เกิด apoptosis จะมีนิวเคลียสที่มี condensed chromatin และพบ fragmented apoptotic nuclei ทำการนับเซลล์ที่เกิด apoptosis จากเซลล์ทั้งหมด 500 เซลล์ แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณหาค่าเปอร์เซ็นต์การเกิด apoptosis และคำนวณหาค่า mean ± SEM ของการทดลอง 3 ครั้ง ต่อไป

5.7 **Statistical analysis** ทำการทดสอบความแตกต่างทางสถิติด้วย Student's *t* test ของค่า mean ± SEM ของการทดลองที่ทำซ้ำอย่างน้อย 3 ครั้ง

ระยะเวลาทำการวิจัย และแผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

ระยะเวลาทำการวิจัย ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี 7 เดือน
ตั้งแต่ ตุลาคม 2552 – พฤษภาคม 2554

แผนการดำเนินงานตลอดโครงการ

กิจกรรม	ระยะเวลา (เดือน)						
	2552	2553				2554	
	1-3	4-6	7-9	10-12	13-15	16-18	19
1. ทดสอบฤทธิ์ cytotoxicity ของ resveratrol ยาเคมีบำบัด ได้แก่ 5-FU, cisplatin, gemcitabine, doxorubicin, paclitaxel ต่อเซลล์มะเร็งท่อน้ำดี โดยวิธี SRB assay	←	→					
2. ทดสอบผลการใช้ร่วมกันของ resveratrol กับยาเคมีบำบัดทั้ง 5 ชนิด ในเซลล์เพาะเลี้ยงมะเร็งท่อน้ำดี		←	→		←	→	
3. ทดสอบกลไกเบื้องต้นในการยับยั้งเซลล์มะเร็งท่อน้ำดีโดยทำ apoptosis assay ใช้วิธี Ethidium bromide /acridine orange staining					←	→	
5. รวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล			←	→		←	→
6. สรุปผลและจัดทำราย งานการวิจัย				←	→		← →

สถานที่ทำการทดลอง และ/หรือ เก็บข้อมูล

ภาควิชาจุลชีววิทยา ภาควิชาชีวเคมี ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น