สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

1. การศึกษาประสิทธิภาพการต้านเชื้อจุลชีพของสารสกัดพืชและน้ำมันชนิดต่าง ๆ

1.1 การเตรียมเชื้อจุลชีพ

ทำการเพาะเชื้อแบคทีเรีย *S.aureus* บนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 37 °C และทำการเพาะเลี้ยงเชื้อรา *M.furfur* บนอาหาร modified's Dixon agar ที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นทำการเตรียมเป็นสารแขวนตะกอน โดยการล้างด้วยน้ำเกลือ และปรับความขุ่นให้เท่ากับสารละลายมาตรฐาน McFarland standard No. 0.5 ด้วย spectrophotometer (Pharmacia LKB Novaspec II, LKB biochrom, UK) ที่ความยาวคลื่น 625 nm

1.2 Agar disc diffusion method

การศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ ด้วยวิธี agar disc diffusion มีวัตถุประสงค์เพื่อคัดแยกสารสกัดและน้ำมันหอมระเหยที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อจุลชีพ โดยดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Jorgensen และคณะ (Jorgensen et al., 1999) ซึ่งสรุปได้ดังนี้ ละลายสารสกัดถั่วเหลือง สารสกัดกวาวเครือขาว และเจือจางด้วยตัวทำละลายผสมของ ethanol: petroleum ether อัตราส่วนปริมาตร (v/v) เป็น 1 : 1 ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดเป็น 50 mg/ml ส่วนน้ำมันชนิดต่างๆ ละลายและเจือจางด้วยตัวทำละลายเช่นเดียวกันให้มีความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 500 mg/ml จากนั้นปิเปตสารทดสอบปริมาตร 50 µl ลงในกระดาษซับ (paper disc: Whatman®) ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 6 mm ทิ้งไว้ให้ตัวทำละลายผสมระเหยจนแห้ง จึงนำไปวางบนอาหารเพาะเลี้ยงที่มีเชื้อจุลชีพที่เตรียมไว้ทดสอบ ในการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *S.aureus* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงชนิด MHA ใช้ ampicillin (10 µg/disc) เป็น positive control ส่วนเชื้อ *M.furfur* ใช้อาหารเพาะเลี้ยงชนิด modifier's Dixon agar ใช้ amphotericin B (500 µg/disc) เป็น positive control และใช้ตัวทำละลายเป็น negative control รายงานผลฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพวัดจากความยาวเส้นผ่าศูนย์กลางเฉลี่ยของ clear zone

1.3 Agar dilution method

การทดสอบด้วยวิธี Agar dilution method มีวัตถุประสงค์เพื่อทดสอบหาความเข้มข้นต่ำที่สุดของสารสกัดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) โดยการคัดเลือกสารที่นำมาทดสอบจากผลการทดลองฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพในข้อ 3.6.3.2 ซึ่งดัดแปลงวิธีการทดลองจาก EUCAST (EUCAST, 2000) โดยสรุปได้ดังนี้ ผสมน้ำมันหอมระเหยด้วย tween®20 และเจือจางในอัตราส่วนความเข้มข้น 2 เท่า ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อตามชนิดที่ใช้ในการทดสอบ โดยกำหนดให้ปริมาณของ tween®20 เป็น 100 µl เท่ากันทุกความเข้มข้น ปั่นผสมอาหารให้เข้ากัน ทิ้งไว้ภายใต้ Laminar air flow (Bio 2+ MK3, Envair, UK) จนกระทั่งอาหารแข็งตัว โดยให้ความเข้มข้น

สุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยในอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อมีความเข้มข้นระหว่าง 0.390-200.000 mg/ml จากนั้นปิเปตเชื้อทดสอบ (ปรับปริมาณเชื้อเท่ากับ McFarland standard No. 0.5) ปริมาตร 1 µl ลงบนอาหารที่เตรียมไว้ ทำการบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 h สำหรับเชื้อ *S.aureus* และที่ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *M.furfur* ตามลำดับ โดยใช้ อาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่มี tween®20 ปริมาตร 100 µl เป็น negative control รายงานผลจากค่าเฉลี่ยของความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพ

1.4 การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของนีโอโซมน้ำมันหอมระเหย

การประเมินฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของนีโอโซมน้ำมันหอมระเหยจากการเตรียมนีโอโซมน้ำมันหอมระเหยในข้อ 3.6.4 เพื่อตรวจสอบประสิทธิภาพของน้ำมันหอมระเหยในนีโอโซม โดยทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธี broth micro-dilution ซึ่งดัดแปลงมาจาก Drulis และคณะ (Drulis-Kawa et al., 2006) สามารถสรุปได้ดังนี้ เจือจางนีโอโซมกักเก็บน้ำมันหอมระเหยในอัตราส่วนความเข้มข้น 2 เท่า ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเชื้อที่ใช้ในการทดสอบ ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยในนีโอโซมระหว่าง 0.078-2.500 mg/ml จากนั้น ปิเปตเชื้อทดสอบปริมาตร 1 µl จึงนำไปบ่มเพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *S.aureus* และที่ 25 °C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง สำหรับเชื้อ *M.furfur* ตามลำดับ เมื่อครบถึงระยะเวลาที่กำหนด เติม *p*-iodonitrotetrazolium violet (INT) ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ปริมาตร 40 µl ลงในแต่ละหลุม (Odalo et al., 2009) แล้วนำไปบ่มที่ 37 °C เป็นเวลา 30 นาที รายงานผลของฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของนีโอโซมน้ำมันหอมระเหยเป็นความเข้มข้นของน้ำมันหอมระเหยในนีโอโซมที่สามารถยับยั้งเชื้อจุลชีพได้

2. การศึกษาประสิทธิภาพการกระตุ้นการงอกของเส้นผม

2.1 การศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์กระตุ้นการงอกต่อมรากผม

1) การแยกและเพาะเลี้ยงต่อมรากผม

การแยกต่อมรากผมมนุษย์ (Human hair follicles) จากชิ้นเนื้อหนังศีรษะ โดยดัดแปลงวิธีจาก Philpott และคณะ (Philpott et al., 1990) ซึ่งสรุปได้ดังนี้ หลังจากแยกชิ้นเนื้อหนังศีรษะออกจากผู้ป่วยแล้ว ทำความสะอาด ด้วยน้ำเกลือ และแช่ providone iodine ประมาณ 30 นาที จากนั้นแยกชั้นหนังกำพร้าออกจากหนังแท้ (Dermo-epidermis) ด้วยใบมีด นำส่วนหนังแท้ (dermis) ที่ได้ถอนต่อมรากผม (Hair follicle bulb) ออกทีละเส้น เลือกต่อมรากผมที่อยู่ระยะ anagen นำไปเลี้ยงในอาหาร complete Williams' E medium บ่มเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator (Nu-4750, Nuaire, Inc., USA) ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 1-2 วัน วัดความยาวของต่อมรากผมภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (CKX 41/DP12, Olympus, Philippines)

2) การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นต่อมรากผม

คัดเลือกต่อมรากผมที่อยู่ในระยะของการเจริญเติบโต (anagen phase) ด้วยวิธีข้างต้น จากนั้นทำการเติมนีโอโซมของสารสกัดพืช และน้ำมันหอมระเหย เจือจางความเข้มข้นใน

อัตราส่วน 10 เท่า ด้วยอาหารเพาะเลี้ยงต่อมรากผมให้มีความเข้มข้นของสารทดสอบในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสุดท้ายเป็น 10^{-1}-10^{-8} %v/v เปลี่ยนอาหารที่ใช้ในการทดสอบทุก 2 วัน และทำการวัดความยาวของต่อมรากผมในการทดสอบภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ โดยใช้ minoxidil (10 μM) เป็น positive control (Kwon et al., 2006) และใช้นีโอโซมเปล่าเป็น negative control

2.2 การศึกษาประสิทธิภาพฤทธิ์การกระตุ้นการเจริญของเซลล์รากผม

1) การเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบ

เซลล์รากผม (Dermal papilla cells) ซึ่งได้จากการแยกต่อมรากผมนั้น นำไปเลี้ยงในอาหาร complete minimum essential medium (cMEM) ใน CO_2 Incubator ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 ที่ 37 °C จนกระทั่งมีปริมาณเซลล์ตามที่ต้องการ ปิเปตอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออก จากนั้นทำการล้างเซลล์ด้วย PBS และปิเปต 0.25% Trypsin-EDTA (Gibco, Invitrogen Corporation, Canada) ปริมาตร 4 ml ลงในภาชนะเพาะเลี้ยงเซลล์ บ่มเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 นาที นำไปส่องกล้องจุลทรรศน์หัวกลับ เพื่อตรวจสอบว่าเซลล์หลุดออกจากภาชนะแล้ว โดยเซลล์จะมีรูปร่างกลมและลอยไปมา เติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ cMEM จากนั้นถ่ายเซลล์ใส่ Centrifuge tube (Corning Inc., USA) นำไปปั่นแยกอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ออก ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสาร (MR 23, Jouan, Germany) ที่ความเร็ว 1,500 rpm 25 °C เป็นเวลา 5 นาที ปิเปตอาหารเพาะเลี้ยงทิ้ง และเติมอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum ในปริมาณที่เหมาะสม และนับจำนวนเซลล์ที่ต้องการใช้ ปิเปตอาหารเลี้ยงเซลล์ปริมาณเพียงพอต่อการทดสอบในแต่ละครั้ง และทำการกระจายเซลล์ให้เข้ากันใน centrifuge tube ปิเปตเซลล์ลงใน 96 Well Cell Culture Cluster (Corning Inc., USA) หลุมละ 100 μl จนครบจำนวนหลุมที่ต้องการทดสอบ นำเซลล์ไปบ่มเลี้ยงใน CO_2 Incubator ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

2) การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเซลล์รากผม

การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์รากผม เป็นการวัดอัตราการเจริญของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ได้ดัดแปลงวิธีการทดลองจาก Hansen และคณะ (Hansen et al., 1989) สามารถสรุปได้ดังนี้ คือ หลังจากการเตรียมเซลล์สำหรับการทดสอบในข้อ 1) ข้างต้น นำสารสกัดที่ความเข้มข้นต่างๆ น้ำมันหอมระเหย นีโอโซมสารสกัดพืชและน้ำมันหอมระเหยชนิดต่างๆ ที่เตรียมในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum เติมลงในหลุมเซลล์รากผมที่เตรียมไว้ โดยมีเซลล์รากผมที่เติมเฉพาะตัวทำละลายสารสกัด และนีโอโซมเปล่า ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นกลุ่มควบคุม นำไปบ่มเลี้ยงใน CO_2 Incubator ภายใต้สภาวะ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 5 วันและทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 วัน หลังจากเติมสารทดสอบ ในวันที่ 5 เปลี่ยนอาหารเดิมที่มีสารทดสอบอยู่เป็นอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum ใหม่ ปริมาตร 100 μl และเติม 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5 diphenyltetrasolium bromide (MTT) (5 mg/ml) ปริมาตร 25 μl ในแต่ละหลุมเซลล์ และเลี้ยงต่อไปเป็นเวลา 4 ชั่วโมง จึงเติม lysing buffer ปริมาตร 100 μl บ่มเพาะเลี้ยงใน CO_2 Incubator ภายใต้

สภาวะ 5% CO_2 ที่ 37 °C เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสง ที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วยเครื่อง Multi-detection microplate reader (Synergy™ HT biotek, instruments, USA)

2.1) การทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลายที่มีต่อเซลล์รากผม

เพิ่มตัวทำละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ ลงในอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum โดยเจือจางในอัตราส่วน 2 เท่า ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วงระหว่าง 1-0.01% v/v ทำ MTT assay เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของตัวทำละลาย DMSO ที่ทำให้เซลล์รอดตายมากกว่า 80% ไปใช้ในการทดสอบต่อไป

2.2) การทดสอบความเป็นพิษของนีโอโซมเปล่าที่มีต่อเซลล์รากผม

เตรียมสารละลายทดสอบโดยเจือจางนีโอโซมเปล่าด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum ในอัตราส่วน 10 เท่า ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายอยู่ในช่วง 10-10^{-6}% v/v ทำ MTT assay เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จากนั้นคัดเลือกความเข้มข้นของ blank niosome ที่ทำให้เซลล์รอดตายมากกว่า 80% ไปใช้ในการทดสอบต่อไป

2.3) การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเซลล์รากผมของสารสกัดพืชและน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบความเป็นพิษของตัวทำละลายที่มีต่อเซลล์รากผมเลือกความเข้มข้นของตัวทำละลาย DMSO ที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายทดสอบ โดยเตรียม stock solution ของสารสกัดพืชที่ความเข้มข้น 300 mg/ml จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum จนกระทั่งมีปริมาณตัวทำละลาย DMSO ตามความเข้มข้นที่เหมาะสม และมีความเข้มข้นสุดท้ายของสารสกัดพืชที่ใช้ในการทดสอบในช่วงระหว่าง 0.5 ng/ml-1.5 mg/ml และเตรียม stock solution ของน้ำมันหอมระเหยที่ความเข้มข้น 10 mg/ml จากนั้นเจือจางด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับสารสกัดพืช ให้ความเข้มข้นสุดท้ายของน้ำมันหอมระเหยที่ใช้ในการทดสอบอยู่ในช่วงระหว่าง 0.5 ng/ml-0.5 mg/ml ทำ MTT assay เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น

2.4) การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นการเจริญเซลล์รากผมของนีโอโซมกักเก็บสารสกัดพืชและน้ำมันหอมระเหย

การทดสอบความเป็นพิษของนีโอโซมเปล่าที่มีต่อเซลล์รากผม เลือกความเข้มข้นของนีโอโซมเปล่าที่เหมาะสมในการเตรียมสารละลายทดสอบ โดยเจือจางนีโอโซมด้วยอาหารเพาะเลี้ยงเซลล์ที่ไม่เติม fetal bovine serum ในอัตราส่วนความเข้มข้น 10 เท่า จนกระทั่งมีปริมาณ blank niosome ตามความเข้มข้นที่เหมาะสม และให้ความเข้มข้นสุดท้ายของปริมาณสารในนีโอโซมอยู่ในช่วงระหว่าง 10^{-5}-1 % v/v ทำ MTT assay เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น