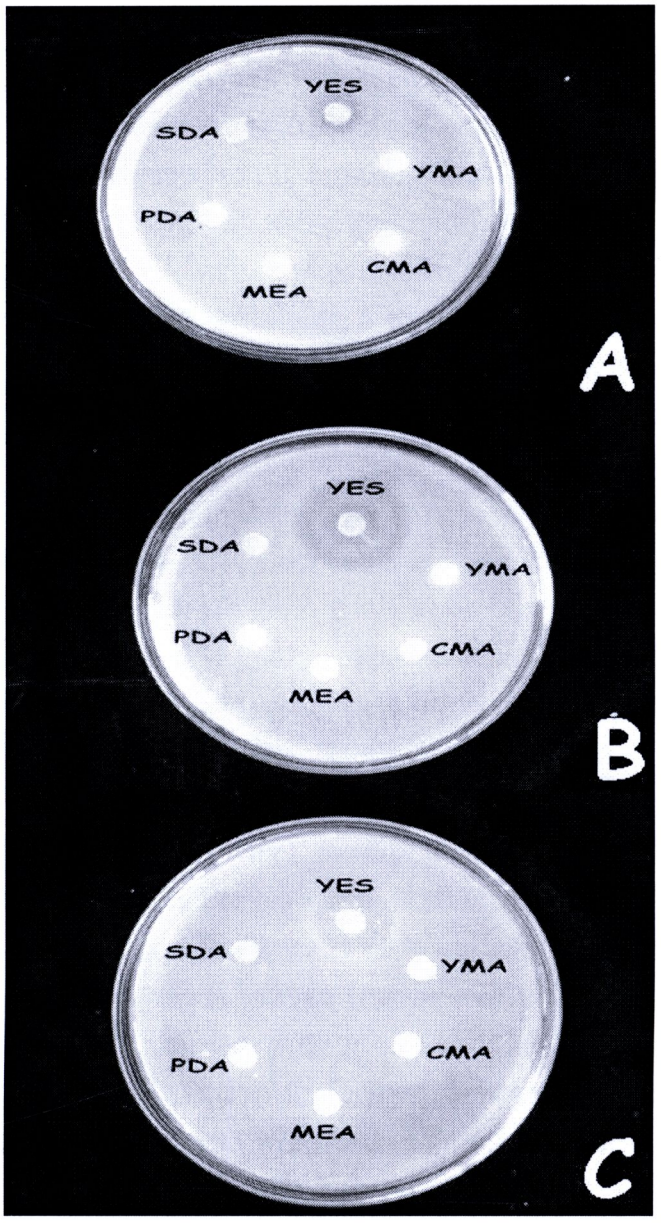
บทที่ 3
ผล และอภิปรายผลการทดลอง

3.1 การคัดเลือกเชื้อราในสกุล *Beauveria* เพื่อนำมาศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพ

นำเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 25 ไอโซเลต และ *B. brongniartii* จำนวน 4 ไอโซเลต ที่เก็บรักษาไว้ มาเพาะเลี้ยงในอาหารสูตร PDA เพื่อให้ได้โคโลนีเดี่ยวก่อนการลงเชื้อ คัดเลือกเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ดีที่สุด 2 อันดับแรกในแต่ละสปีชีส์ ด้วยวิธี Dual-culture agar diffusion โดยศึกษาทั้งชนิดอาหาร และระยะเวลาที่เชื้อสามารถผลิตสารได้ดี เพื่อใช้เป็นสภาวะที่เหมาะสมในการศึกษาขั้นต่อไป โดยนำเชื้อราแต่ละไอโซเลตมาเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 7, 14, 21 และ 28 วัน เมื่อครบเวลาใช้ cork borer เส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 6 มิลลิเมตรเจาะลงบริเวณขอบโคโลนีและนำชิ้นวุ้นที่มีเส้นใยไปวางในจานที่เพาะเลี้ยงเชื้อจุลินทรีย์แต่ละชนิดจำนวน 4 ชนิด ได้แก่ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* DMST 4212, *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 บ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดขนาดการเกิดวงใส (clear zone) รอบชิ้นวุ้น โดยทำการทดสอบจำนวน 3 ซ้ำ พบว่า *B. bassiana* ไอโซเลต B019 (ไอโซเลต A) และ B015 (ไอโซเลต B) และ *B. brongniartii* ไอโซเลต B013 (ไอโซเลต C) และ B027 (ไอโซเลต C) ที่เลี้ยงในอาหาร YES มีขนาดของรัศมีการเกิดวงใสที่มีขนาดใหญ่ 2 อันดับแรก ในแต่ละสปีชีส์ ดังแสดงตัวอย่างของไอโซเลต B015 (ไอโซเลต B) ดังรูปที่ 3.1 โดยมีผลทั้งแบคทีเรียแกรมบวก คือ *Staphylococcus aureus* (รูปที่ 3.1 A) และแบคทีเรียแกรมลบ คือ *Pseudomonas aeruginosa* (รูปที่ 3.1 B) และ *Escherichia coli* (รูปที่ 3.1 C) โดยอาหารสูตร YES อาจจะมีแหล่งอาหารที่กระตุ้นให้เชื้อราสกุล *Beauveria* ผลิตสารออกมายับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ได้ดีที่สุด และพบว่าเชื้อราที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 28 วัน สามารถเกิดวงใสที่กว้างที่สุด ดังนั้นจะใช้อาหารชนิด YES ในการเพาะเลี้ยงเชื้อเพื่อใช้ในการสกัดสาร เป็นระยะเวลา 1 เดือน ในการทดลองต่อไป

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดบาหวิจัย



รูปที่ 3.1 แสดงลักษณะของการต้านเชื้อจุลินทรีย์ของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B015 ที่เพาะเลี้ยงบนอาหารที่แตกต่างกัน 6 ชนิด คือ Potato Dextrose Agar (PDA), Malt Extract Agar (MEA), Corn Meal Agar (CMA),Yeast Extract Sucrose (YES), Yeast-Malt Extract Agar (YMA) และ Sabouraud Dextrose Agar (SDA) บ่มที่อุณหภูมิห้องเป็นระยะเวลา 28 วัน โดยแสดงผลต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* (A), *Pseudomonas aeruginosa* (B) และ *Escherichia coli* (C) ที่เพาะเลี้ยงรวมกันเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.2 ผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมี

การวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ด้วยเทคนิคแก๊สโครมาโทกราฟี/แมสสเปคโทรเมตรี (chromatography/mass spectrometry: GC-MS) โดยได้ทำการศึกษาจากการสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต A (B019) และไอโซเลต B (B015) และจากเชื้อรา *B. brongniartii* จำนวน 2 ไอโซเลต คือ ไอโซเลต C (B013) และไอโซเลต D (B027) โดยในการศึกษาหาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ของไอโซเลต A พบสารทั้งหมด 22, 25 และ 25 พีค ไอโซเลต B พบสารทั้งหมด 20, 22 และ 29 พีค ไอโซเลต C พบสารทั้งหมด 45, 32 และ 17 พีค และไอโซเลต D พบสารทั้งหมด 16, 25 และ 17 พีค ตามลำดับ ปริมาณสารที่พบที่มากกว่า 5 เปอร์เซ็นต์ แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 3.1 และ 3.2

โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 49.07, 35.75 และ 22.50 % ตามลำดับ เช่นเดียวกับเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ที่พบว่าสารสกัดหยาบทั้งจากชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตท มี 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 57.60 และ 40.53 % ตามลำดับ แต่พบ Hexadecanoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 24.91 % และพบ 9, 12-Octadecadienoic acid เพียง 8.99 % สำหรับ *B. brongniartii* ไอโซเลต C ทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล พบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 23.42, 29.41 และ 25.33 % ตามลำดับ สำหรับ *B. brongniartii* ไอโซเลต D ในชั้นเฮกเซนพบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 29.90 % แต่สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทพบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในปริมาณ 21.71 % และไม่พบ 9, 12-Octadecadienoic acid ในชั้นเอทานอล โดย *B. brongniartii* ไอโซเลต D สารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทและเอทานอลพบ 9-Octadecenoic acid ในปริมาณสูงสุดคือ 23.65 และ 46.25 % ตามลำดับ

โดยพบสารที่ทราบโครงสร้างทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ส่วนใหญ่เป็นกรดไขมัน เช่น Hexadecanoic acid หรือ กรดปาล์มิติก (palmitic acid): $CH_3 (CH_2)_{14}COOH$ ซึ่งเป็นกรดไขมันอิ่มตัว รวมทั้งกรดไขมันไม่อิ่มตัวทั้ง 9-Octadecenoic acid หรือ กรดโอเลอิก (oleic acid): $CH_3 (CH_2)_7CH=CH (CH_2)_7 COOH$ และ 9, 12-Octadecadienoic acid หรือ กรดลิโนเลอิก (linoleic acid): $CH_3 (CH_2)_4(CH=CHCH_2)_2(CH2)_6 COOH$ ซึ่งกรดไขมันไม่อิ่มตัวนี้ร่างกายไม่สามารถสังเคราะห์ขึ้นมาเองได้จึงจัดว่าเป็นกรดไขมันที่จำเป็น (Essential fatty acid) จากตารางที่ 3.1 และ 3.2 พบว่าในแต่ละไอโซเลตมีปริมาณกรดไขมันที่แตกต่างกัน โดยเชื้อราจะนำคาร์บอนที่เหมาะสมจากแหล่งอาหารไปสังเคราะห์ไขมันโดยตรงจึงมีผลต่อการสะสมไขมันในเซลล์ ซึ่งจากการศึกษาสามารถนำความรู้นั้นมาประยุกต์ใช้ในการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* มาใช้ในกระบวนการผลิตกรดไขมันเพื่อให้เพียงพอต่อความต้องการด้านอุตสาหกรรม โดยมีการศึกษาเพิ่มเติมในด้านต่างๆเช่น แหล่งคาร์บอนที่เหมาะสมในการผลิตกรดไขมันเพิ่มมากยิ่งขึ้น หรือปัจจัยด้านอุณหภูมิที่มีต่อปัจจัยด้านการเพิ่มปริมาณของกรดไขมันอิ่มตัว หรือกรดไขมันไม่อิ่มตัว (Somashekar และคณะ, 2001)

ในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และไอโซเลต B ในชั้นเอทานอลพบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ในปริมาณ 6.24 และ 12.50 % ตามลำดับ และในสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. brongniartii* ไอโซเลต C ในชั้นเอทานอลพบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ในปริมาณ 7.30 % แต่ไอโซเลต D ไม่พบ Ergosta-5, 7, 22-trien-3-ol ในชั้นเอทานอล แต่พบในชั้นเอทิลอะซิเตทในปริมาณ 8.55 % โดย Ergosterol เป็นสารในกลุ่มสเตรียรอล ซึ่งเป็นสารประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา และเป็นสารตั้งต้นสำหรับการสังเคราะห์โปรวิตามินดี 2 (viosterol) และวิตามินดี 2 (ergocalciferol) ตามลำดับ โดยปริมาณของ Ergosterol จากเชื้อรา *Aspergillus*, *Penicillium*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Cladosporium*, *Candida* และ *Alternaria* มีปริมาณตั้งแต่ 0.4 - 14.3 µg/mg ซึ่งขึ้นกับชนิดของอาหาร และระยะเวลาในการเพาะเลี้ยง จึงนิยมนำ Ergosterol มาใช้ในการวัดการเจริญเติบโตของเชื้อรา (Axelsson และคณะ,1995; Schnürer, 1993) เนื่องจาก Ergosterol เป็นสารประกอบสำคัญในเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อรา ทำให้มีการศึกษาหาสารที่สามารถยับยั้งการสร้าง หรือการทำงานของ Ergosterol เพื่อใช้ผลิตยาต้านเชื้อรา

B. brongniartii ไอโซเลต C พบสารที่แตกต่างไปคือ สารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และเอทานอลพบกรดเบนโซอิก (benzoic acid) ปริมาณ 6.69 และ 10.28 % ตามลำดับ ซึ่งไม่พบในไอโซเลตอื่นๆ โดยกรดเบนโซอิกเป็นสารถนอมอาหาร หรือสารกันเสีย หรือสารกันบูด (preservative agent) ที่นิยมใช้อย่างแพร่หลายในอุตสาหกรรมอาหาร และในปัจจุบันยังใช้ในอุตสาหกรรมการผลิตเครื่องสำอางและยาด้วย ในธรรมชาติกรดเบนโซอิกผลิตได้จากผลไม้ประเภทเบอรี่ พรุน และกานพลู กรดเบนโซอิกออกฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อจุลินทรีย์ เช่น รา ยีสต์ และแบคทีเรีย โดยจุลินทรีย์จะดูดซึมกรดเข้าไปในเซลล์มีผลทำให้กระบวนการแทรกซึมของอาหารเข้าไปในเซลล์ของจุลินทรีย์ผิดปกติไป ในขณะเดียวกันจะยับยั้งการสร้างเอนไซม์บางชนิดและปฏิกิริยาการทำงานของเอนไซม์ เช่น ฟอสโฟฟรุตโตไคเนส (phosphofructokinase enzyme) ที่มีความสำคัญต่อการดำรงชีพของจุลินทรีย์ทำให้จุลินทรีย์ไม่สามารถเจริญเติบโตต่อไปได้ กรดเบนโซอิกผ่านการประเมินความปลอดภัยทางพิษวิทยาว่ามีความเป็นพิษต่ำ มีความปลอดภัยสูง และไม่ได้อยู่ในรายชื่อของสารก่อมะเร็ง จึงนำมาใช้ในการผลิตอาหารได้ และ The Joint FAO/WHO Expert Committee of Food Additives (JECFA) กำหนดค่าความปลอดภัยหรือค่า Acceptable Daily Intake (ADI) ซึ่งเป็นปริมาณที่ร่างกายสามารถรับสารนั้นได้ต่อวันตลอดชั่วชีวิตโดยที่ไม่ก่อให้เกิดผลกระทบใดๆ ต่อสุขภาพไว้ที่ 0 - 5 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวัน

นอกจากนั้นแล้ว *B. bassiana* ไอโซเลต A ในสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน และเอทิลอะซิเตทพบ Cephalosporolide ปริมาณ 0.32 และ 0.40 % ตามลำดับ และ *B. brongniartii* ไอโซเลต C พบทั้งในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ในปริมาณ 0.69, 0.57 และ 0.87 % ตามลำดับ แม้ว่าพบในปริมาณน้อยแต่น่านำมาหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำให้เชื้อรานี้ผลิตในปริมาณที่มากขึ้น เนื่องจาก Cephalosporolide มีฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์

ตารางที่ 3.1 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

Isolate	Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
B. bassiana (B019) ไอโซเลต A	- Cephalosporolide (0.32) - Hexadecanoic acid (23.80) - 9,12-Octadecadienoic acid (49.07) - 9-Octadecenoic acid (14.15)	- Cephalosporolide (0.40) - Hexadecanoic acid (21.57) - 9,12-Octadecadienoic acid (35.75) - 9-Octadecenoic acid (13.04)	- 1,2,3-Propanetriol (14.83) - Hexadecanoic acid (19.60) - 9,12-Octadecadienoic acid (22.50) - 9-Octadecenoic acid (12.33) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (6.24)
B. bassiana (B015) ไอโซเลต B	- Hexadecanoic acid (27.66) - 9,12-Octadecadienoic acid (57.60)	- Hexadecanoic acid (28.39) - 9,12-Octadecadienoic acid (40.53)	- Hexadecanoic acid (24.91) - Ethyl linoleate (22.84) - 9,12-Octadecadienoic acid (8.99) - 9-Octadecenoic acid (10.50) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (12.50)

ปริมาณใน () มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

ตารางที่ 3.2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่วิเคราะห์ด้วยเทคนิค GC-MS

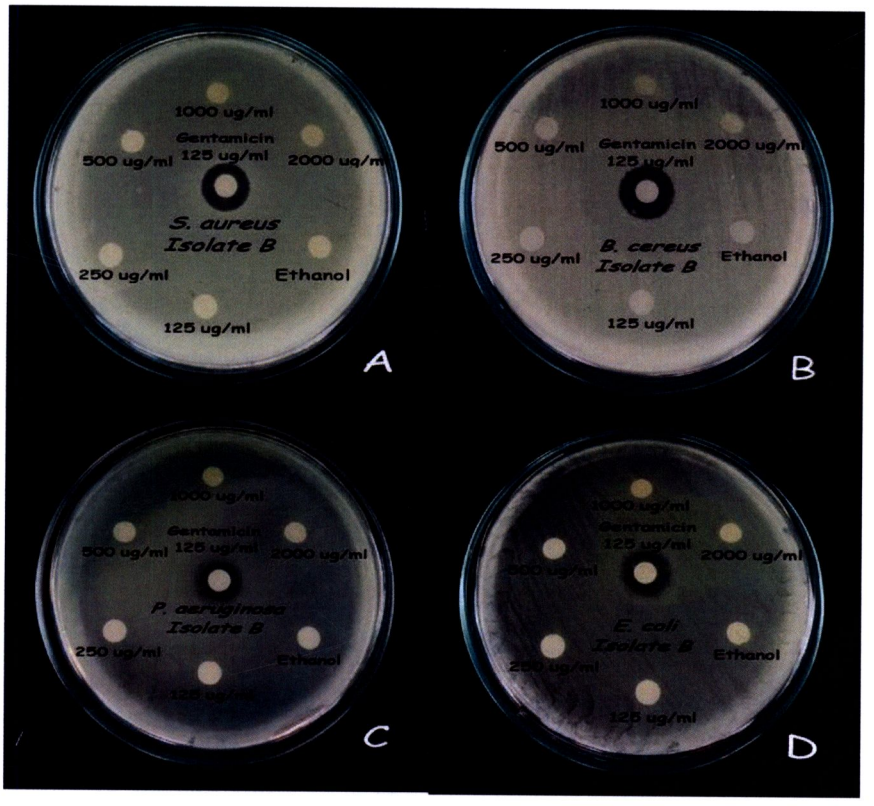
Isolate	Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
B. brongniartii (B013) ไอโซเลต C	- Cephalosporolide (0.69) - Hexadecanoic acid (18.79) - 9,12-Octadecadienoic acid (23.42) - 9-Octadecenoic acid (18.30)	- Cephalosporolide (0.57) - Cyclohexanone (1.48) - Benzoic acid (6.69) - Thiazol (6.04) - Hexadecanoic acid (18.20) - 9,12-Octadecadienoic acid (29.41) - 9-Octadecenoic acid (7.84)	- Cephalosporolide (0.87) - Benzoic acid (10.28) - Hexadecanoic acid (18.71) - 9,12-Octadecadienoic acid (25.33) - 9-Octadecenoic acid (11.84) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (7.30)
B. brongniartii (B027) ไอโซเลต D	- Hexadecanoic acid (27.66) - 9,12-Octadecadienoic acid (29.90) - 9-Octadecenoic acid (19.35) - Ethyl oleate (9.08)	- Cyclohexanone (1.04) - Thiazol (0.22) - Hexadecanoic acid (21.88) - 9,12-Octadecadienoic acid (21.71) - 9-Octadecenoic acid (23.65) - Ergosta-5,7,22-trien-3-ol (8.55)	- Hexadecanoic acid (18.60) - 9-Octadecenoic acid (46.25)

ปริมาณใน () มีหน่วยเป็นเปอร์เซ็นต์

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

3.3 ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบด้วยวิธี disc diffusion

นำส่วนของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongniartii* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอลที่ความเข้มข้น 2000, 1000, 500, 250 และ 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และยาปฏิชีวนะ คือ gentamicin ที่ระดับความเข้มข้น 125 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการทดสอบฤทธิ์การยับยั้งจุลินทรีย์ด้วยวิธี Disc diffusion โดยจุลินทรีย์ที่นำมาใช้ทดสอบ คือ *Staphylococcus aureus* TISTR 118 และ *Bacillus cereus* DMST 5040 แบคทีเรียแกรมลบ 2 ชนิดคือ *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 และ *Escherichia coli* DMST 4212 และทำการวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง พบว่าในทุกไอโซเลตของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อราสกุล *Beauveria* ทั้งในชั้นเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอลนั้น ไม่เกิดบริเวณใส (clear zone) หรือไม่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์ที่ใช้ในการทดสอบได้ เนื่องจากไม่พบบริเวณยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย (inhibition zone) อย่างไรก็ตามในแต่ละการทดลองมีเพียงยาปฏิชีวนะเท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของจุลินทรีย์เหล่านี้ได้ ดังแสดงในรูปที่ 3.2 โดยจากภาพเป็นการศึกษาจากสารสกัดหยาบในชั้นเอธิลอะซิเตทของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ต่อเชื้อ *S. aureus* (รูปที่ 3.2 A), *B. cereus* (รูปที่ 3.2 B), *P. aeruginosa* (รูปที่ 3.2 C) และ *E. coli* (รูปที่ 3.2 D) โดยผลการวิจัยก่อนหน้านี้พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของ *M. anisopliae* เท่านั้นที่สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *B. subtilis* และ *M. luteus* ที่ระดับความเข้มข้น 1000-2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แต่ที่ความเข้มข้นต่ำไม่สามารถยับยั้งได้ และในแต่ละไอโซเลตให้ผลไม่แตกต่างกัน โดยไอโซเลต SNB 03 มีแนวโน้มในการยับยั้งเชื้อได้ดีกว่าไอโซเลตอื่นๆ ซึ่งสอดคล้องกับการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีที่พบว่าสารสกัดหยาบในชั้นเอทิลอะซิเตทของ *M. anisopliae* ไอโซเลต SNB03 พบสารแตกต่างไป คือ 1,9-Diazabicyclo ในปริมาณ 46.588 % ซึ่งมีรายงานถึงความสามารถของสารในกลุ่ม bicyclo ว่ามีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ อย่างไรก็ตามผลที่ได้จากการทดลองในครั้งนี้ไม่สอดคล้องกับองค์ประกอบของสารทั้งชนิดและปริมาณของสารที่พบในส่วนของสารสกัดหยาบที่น่าจะมีแน้วโน้มในการยับยั้งการเจริญของเชื้อจุลินทรีย์ ซึ่งผลการทดลองที่ได้ยังต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมต่อไปทั้ง สภาวะในการเพาะเลี้ยง วิธีการสกัด หรือองค์ประกอบของสารที่สกัดได้ เพื่อเป็นข้อมูลในการประยุกต์ใช้ประโยชน์ในการเป็นสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพได้ในอนาคต



รูปที่ 3.2 แสดงขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของการยับยั้งการเจริญของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากชั้นเอทิลอะซิเตท ที่ความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมี Gentamicin และ ethanol เป็นกลุ่มควบคุม และในกลุ่มทดลอง คือ *Staphylococcus aureus* (A), *Bacillus cereus* (B), *Pseudomonas aeruginosa* (C) และ *Escherichia coli* (D) บ่มที่อุณหภูมิห้อง เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง

3.4 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์

การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay ที่ดัดแปลงวิธีการมาจาก Mosmarin (1983) และของ Hussain และคณะ (1993) ซึ่งเป็นการทดสอบการทำงานของเซลล์จากความสามารถในการทำงานของไมโทคอนเดรียในการรีดิวซ์สาร 3-[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) โดยเซลล์ที่มีชีวิต และมีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติ เอนไซม์ dehydrogenase และ cofactor ในไมโทคอนเดรียจะรีดิวซ์ MTT ให้กลายเป็นผลึก formazan ได้ ดังนั้นเมื่อนำสารละลาย MTT ไปบ่มในเซลล์ที่ต้องการทดสอบ เซลล์ที่มีการทำงานของไมโทคอนเดรียปกติจะรีดิวซ์ MTT ให้เป็น formazan ที่มีสีม่วง โดยเซลล์ที่ตายนั้นจะมีลักษณะใสไม่มีสี ส่วนเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่จะติดสีม่วง ซึ่งเมื่อนำมาละลายในตัวทำละลายจะได้สารละลายสีม่วง สามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ด้วยเครื่อง spectrophotometer นำมาคำนวณเป็นเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ ซึ่งนิยมรายงานผลเป็นความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50})

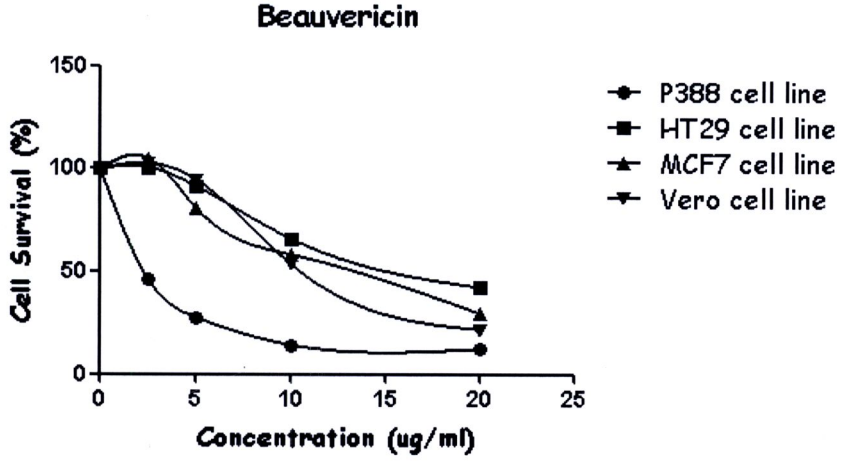
ในการทดลองนี้จะทำการศึกษากับเซลล์ 4 ชนิด คือเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู (murine leukemia cell line: P388) เซลล์มะเร็งเต้านมของมนุษย์ (human breast cancer cell line: MCF-7) เซลล์มะเร็งลำไส้ใหญ่ของมนุษย์ (human colon adenocarcinoma cell line: HT-29) และเซลล์ไตของลิง (african green monkey kidney cell line: Vero cell) นำมาทดสอบกับสารสกัดหยาบที่ได้จากการสกัดด้วยตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง พิจารณาในแต่ละไอโซเลต จากการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* และเชื้อรา *B. brongniartii* พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ที่ทำการทดสอบด้วยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 125, 250, 500, 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร

ก่อนการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบ ทำการศึกษาความเป็นพิษของสารละลาย beauvericin ต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด เพื่อนำไปใช้เป็น positive control ในความเข้มข้นที่เหมาะสม พบว่าเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ชนิด P388, MCF-7, Vero และ HT-29 cell ที่ทำการทดสอบด้วยสารละลาย beauvericin ที่ความเข้มข้น 5 ระดับ คือ 20, 10, 5, 2.5 และ 1.25 µg/ml เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง ที่มี 1% methanol ร่วมในการตรวจสอบด้วย และนำมาตรวจสอบหาค่าระดับความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50% พบว่าสารละลาย beauvericin ในระดับความเข้มข้นต่ำๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดลดลงแตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยเป็นพิษต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์ประเภท lymphocyte มากที่สุด โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.25, 10.48, 13.40 และ 15.05 µg/ml ตามลำดับ ดังรายละเอียดในตารางที่ 3.3 ซึ่งเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นมีผลทำให้อัตราการมีชีวิตรอดลดลง ดังแสดงในกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย beauvericin กับเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์ไลน์ทั้ง 4 ชนิด ในรูปที่ 3.3 สอดคล้องกับรายงานที่พบว่า beauvericin มีผลต่อความอยู่รอดของ mammalian cell lines หลายชนิด โดยอัตราการตายของเซลล์ขึ้นกับทั้งความเข้มข้นของสารและระยะเวลา โดยมีผลทำให้เพิ่มการหลั่งของ cytochrome C จากไมโทคอนเดรียและเพิ่มการทำงานของ caspase-3 ซึ่งมีผลต่อการทำงานของแคลเซียมอิออนภายในเซลล์ (Dombrink-Kurtzman, 2003; Calo และคณะ, 2003; Calo และคณะ, 2004; Jow และคณะ, 2004; Lin และคณะ, 2005; Segvit Klarit และคณะ, 2008) ซึ่งใน

การศึกษาครั้งนี้ใช้สารละลาย beauvericin ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็น positive control ในขั้นตอนต่อไป

ตารางที่ 3.3 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารละลาย beauvericin ที่มีต่อเซลล์ไลน์ชนิดต่างๆ ด้วยวิธี MTT assay

Treatment	Cell Line Types	50% cytotoxic concentration: CC_{50} (µg/ml)
Beauvericin (BEA)	P388	2.25
	MCF-7	13.40
	HT-29	15.05
	Vero Cell	10.48



รูปที่ 3.3 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ beauvericin ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ 4 ชนิด คือ P388, HT-29, MCF-7 และ Vero cell lines

ในการศึกษาวิจัยก่อนหน้านี้ได้ทำการทดสอบยาปฏิชีวนะชนิด Mitomycin C กับเซลล์ชนิดต่างๆ เพื่อใช้เป็นกลุ่มควบคุมชนิดบวก โดย Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10, 20, 40, 80 และ 160 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลทำให้อัตราการอยู่รอดของเซลล์ลดลงเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (CC_{50}) ในเซลล์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell เท่ากับ 49.77, 88.15, 52.49 และ 99.34 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาครั้งนี้พบว่า beauvericin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า เนื่องจากใช้ความเข้มข้นที่น้อยกว่า โดยเซลล์ไลน์ชนิด P388, Vero, MCF-7 และ HT-29 cell มีค่า CC_{50} เท่ากับ 2.25, 10.48, 13.40 และ 15.05 µg/ml ตามลำดับ

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่สกัดได้จากตัวทำละลายเฮกเซน เอธิลอะซิเตท และเอทานอล ของทั้งเชื้อรา *B. bassiana* และ *B. brongniartii* มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ 4 ชนิด แบ่งเป็นเซลล์มะเร็ง คือ P388, MCF-7 และ HT-29 และเซลล์ปกติ คือ Vero cell ที่เพาะเลี้ยงในหลอดทดลองเป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง และนำมาคำนวณเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ และค่า CC_{50} โดยความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ คือ 2000 µg/ml ดังนั้นหาก CC_{50} > 2000 µg/ml นับว่ามีค่าความเป็นพิษต่ำ พบว่าสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลายจากเชื้อรา *B. brongniartii* มีค่า CC_{50} > 2000 µg/ml ยกเว้นสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากไอโซเลต C มีค่า CC_{50} = 1788 µg/ml (ไม่ได้แสดงข้อมูล)

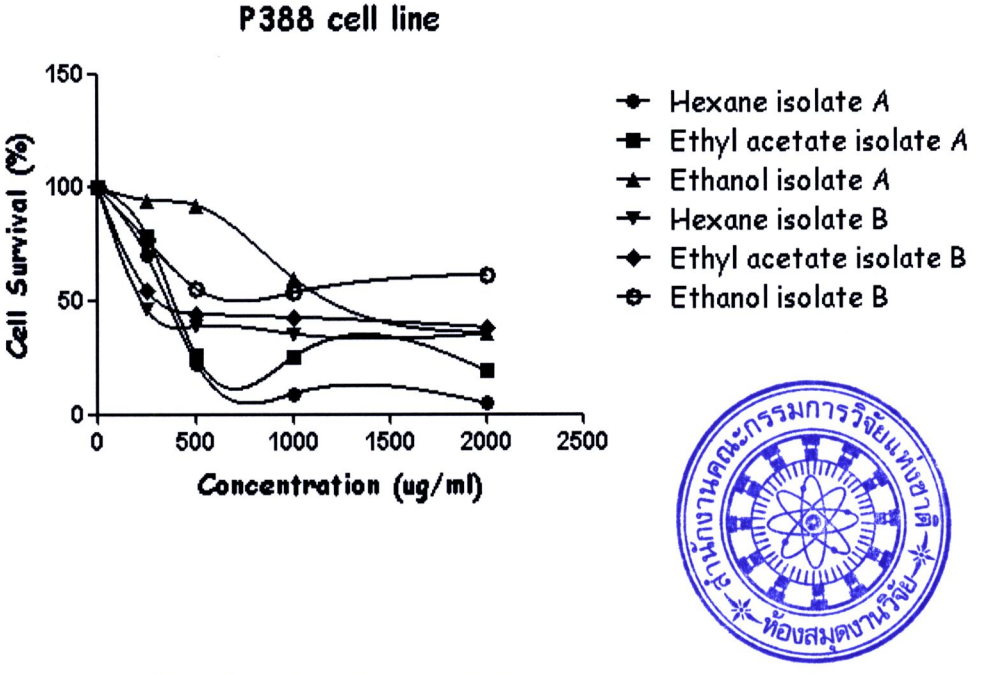
สำหรับค่า CC_{50} ของสารสกัดหยาบในทุกตัวทำละลายจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงในตารางที่ 3.4

ตารางที่ 3.4 แสดงค่าความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ตายร้อยละ 50 (CC_{50}) ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายชนิดเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ต่อเซลล์ชนิดต่างๆด้วยวิธี MTT assay

Isolates	Cell Types	50% Cytotoxic Concentration: CC_{50} (µg/ml)		
		Hexane	Ethyl acetate	Ethanol
A	P388	354.18	384.27	1176.12
	MCF-7	488.07	1019.90	>MCT
	HT-29	914.92	988.98	>MCT
	Vero	447.16	719.21	>MCT
B	P388	220.55	300.45	669.53
	MCF-7	379.52	>MCT	>MCT
	HT-29	808.08	>MCT	>MCT
	Vero	>MCT	>MCT	>MCT

MCT=maximal concentration tested (≥2000 µg/ml)

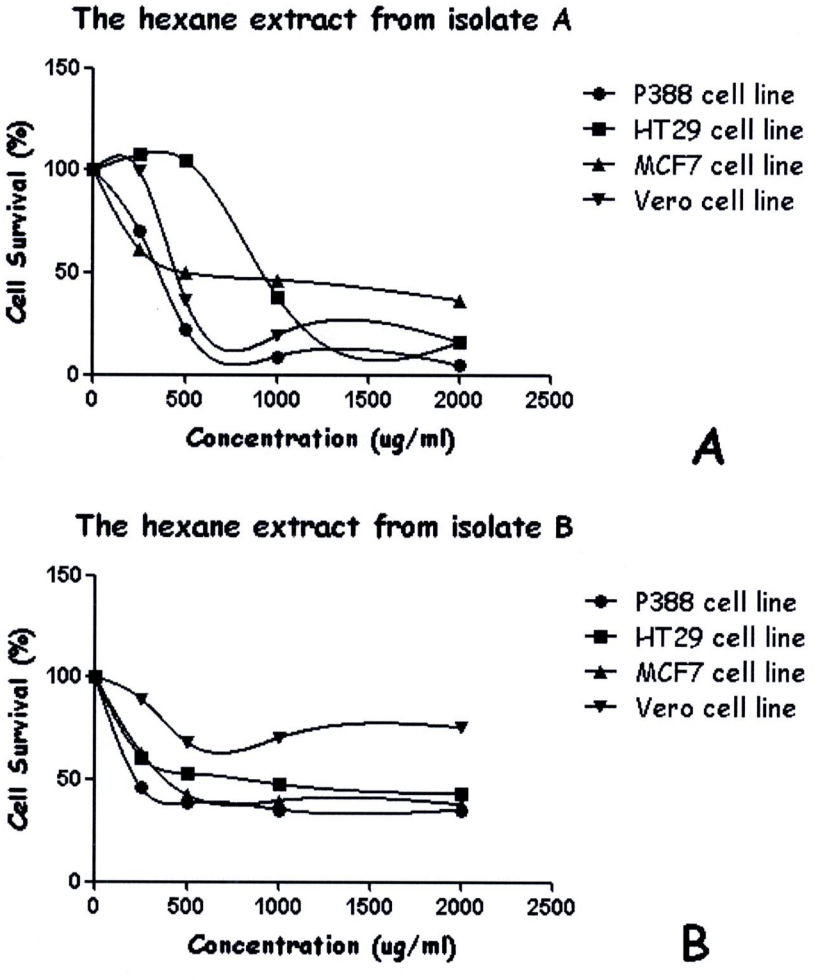
สารสกัดจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ (50% cytotoxic concentration: CC_{50}) เท่ากับ 354.18, 384.27 และ 1176.12 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นเอทานอลที่ไม่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ MCF-7, HT-29 และ Vero cell ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุด คือ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เช่นเดียวกับไอโซเลต B ทั้งสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดโดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ชนิด P388 ตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 220.55, 300.45 และ 669.53 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และมีเพียงสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนที่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ MCF-7 และ HT-29 โดยความเข้มข้นที่ทำให้เซลลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 379.52 และ 808.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ จากผลการทดลองพบว่าสารสกัดหยาบจากทุกตัวทำละลายของทั้งสองไอโซเลตจากเชื้อรา *B. bassiana* มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น โดยเฉพาะสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของไอโซเลต B มีค่า CC_{50} ต่ำสุดเพียง 220.55 µg/ml โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และ B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388 (รูปที่ 3.4)



สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย

รูปที่ 3.4 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล จากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และไอโซเลต B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388

สารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนของเชื้อรา *B. bassiana* ทั้งสองไอโซเลตแสดงความเป็นพิษมากที่สุด โดยสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิดต่างๆมากที่สุด โดยเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A มีผลต่อเซลล์ชนิด P388, MCF-7, HT-29 และ Vero cell โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 354.18, 488.07, 914.92 และ 447.16 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไอโซเลต B มีผลต่อเซลล์ชนิด P388, MCF-7 และ HT-29 โดยมีความเข้มข้นที่ทำให้เซลลตาย 50 เปอร์เซ็นต์ เท่ากับ 220.55, 379.52 และ 808.08 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และไม่มีผลต่อการตายต่อเซลล์ Vero ที่ค่าความเข้มข้นสูงสุด โดยแสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบในชั้นเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A และ B ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิดต่างๆ (รูปที่ 3.5 A และ B)



รูปที่ 3.5 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างระดับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A (A) และไอโซเลต B (B) ต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์ชนิด P388, MCF-7, HT-29 และ Vero cell

โดยไอโซเลต A มีค่า CC_{50} ส่วนใหญ่มากกว่าไอโซเลต B ซึ่งอาจกล่าวได้ว่า B จัดเป็นไอโซเลตที่น่าจะเป็นพิษต่อเซลล์มากกว่า เนื่องจากใช้ปริมาณสารเพียงเล็กน้อยสามารถที่จะทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์ร้อยละ 50 ได้ แต่อย่างไรก็ตามพบว่าทั้งสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนและเอธิลอะซิเตทของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต A แสดงความเป็นพิษต่อ Vero cell ซึ่งเป็นเซลล์ปกติจากไตของลิงได้ ดังนั้นในการนำเชื้อราในสกุล *Beauveria* มาประยุกต์ใช้ในการควบคุมแมลงศัตรูพืชอาจกล่าวได้ว่าเชื้อรา *B. bassiana* น่าจะมีประสิทธิภาพดีกว่า *B. brongniartii* แต่อย่างไรก็ตามอาจมีโอกาสปนเปื้อนของสารเข้าสู่สิ่งแวดล้อม หรือห่วงโซ่อาหารที่จะมีผลกระทบต่อสุขภาพได้ ซึ่งควรมีการศึกษาการปนเปื้อนของสารที่ได้จากเชื้อรา ดังเช่นการรายงานการปนเปื้อนของสารพิษจากเชื้อราและประเมินฤทธิ์ของสารพิษจากเชื้อราในตลาดฟินแลนด์และอิตาลี แม้ว่าปริมาณที่พบมีระดับต่ำ (Jestoi *et al.*, 2004) ฉะนั้นสารจากเชื้อราจึงไม่ควรที่จะมีฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติชนิดอื่นๆ โดยเฉพาะเซลล์ของสัตว์และมนุษย์ จากการศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากเชื้อราในสกุล *Beauveria* มีปัจจัยทั้งจากตัวทำละลาย ชนิดของเซลล์ที่นำมาทดสอบ ระดับความเข้มข้น และสายพันธุ์ของเชื้อรา

จากการศึกษาก่อนหน้านี้ที่ศึกษาสารสกัดหยาบจากเส้นใยของ *M. anisopliae* พบว่ามีผลต่อเซลล์ P388 ซึ่งเป็นเซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาวของหนู และสอดคล้องกับการศึกษาของ Skrobek และ Butt (2005) ที่ได้ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดหยาบจาก *M. anisopliae* ไอโซเลต V275 เปรียบเทียบกับสาร Destruxin ต่อเซลล์เซลล์มะเร็งเม็ดเลือดขาว (human promyelocytic leukemia cell line: HL-60) พบว่าสารสกัดหยาบมีผลต่อเซลล์ชนิด HL-60 โดยมีค่า LC_{50} ที่ 193 ppm เมื่อบ่มเป็นเวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่มีผลต่อเซลล์แมลง *Spodoptera frugiperda*: Sf9 เมื่อใช้ความเข้มข้น 500 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง สำหรับสาร Destruxin มีผลต่อเซลล์แมลงโดยมีค่า LC_{50} ในช่วง 5-12 ppm และการศึกษาของ Skrobek และคณะ (2006) ที่ศึกษาสารสกัดจาก *M. anisopliae* ไอโซเลต V275 และ V245 เปรียบเทียบกับสารสกัดจาก *Stagonospora convolvuli* และ Destruxin A โดยทดสอบกับเชื้อ *Pseudomanas syringae*, โปรโตซัว (*Tetrahymena pyriformis*) หนอนตัวกลม (*Daphnia magna*) เซลล์ชนิด HL-60 และ Sf9 ซึ่งสารสกัดหยาบจากไอโซเลต V275 และ V245 ไม่มีผลในการยับยั้งเชื้อ *P. syringae* ที่ระดับความเข้มข้น 500 ppm เมื่อบ่มเป็นเวลา 18 ชั่วโมง และไม่เป็นพิษต่อ *T. pyriformis* แต่มีความเป็นพิษต่อ *D. magna* โดยมีค่า LC_{50} เท่ากันที่ 0.01 ppm ทั้งในเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และให้ผลในเซลล์แต่ละชนิดแตกต่างกัน โดยเมื่อทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ HL-60 สารสกัดจากไอโซเลต V275 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 221 และ 193 ppm ที่เวลา 4 และ 24 ชั่วโมง ตามลำดับ สารสกัดจากไอโซเลต V245 มีค่า LC_{50} เท่ากับ 303 ppm ที่เวลา 4 ชั่วโมง และมีค่า LC_{50} มากกว่าความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบที่เวลา 24 ชั่วโมง แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ชนิด Sf9 เมื่อใช้ระดับความเข้มข้น 500 ppm ที่เวลา 24 ชั่วโมง ซึ่งผลที่ได้จากการทดลอง อาจกล่าวได้ว่าสารชีวภาพจากเชื้อราที่เป็นสาเหตุโรคแมลงสามารถนำมาใช้ควบคุมแมลงศัตรูพืช โดยมีภาวะเสี่ยงต่อสุขภาพของมนุษย์และสัตว์ในระดับต่ำ เนื่องจากมีความเป็นพิษต่อเซลล์ในระดับต่ำ หรือต้องใช้ระดับความเข้มข้นของปริมาณสารในระดับที่สูงจึงจะแสดงค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ และสารสกัดหยาบจากตัวทำละลายเฮกเซนจากเชื้อรา *B. bassiana* แสดงความเป็นพิษในทุกเซลล์แต่มีผลต่อเซลล์ชนิด P388 มากกว่าเซลล์ชนิดอื่น สำหรับ beauvericin แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์ชนิด P388 มากที่สุดเช่นกัน อย่างไรก็ตามข้อมูลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้เป็นเพียงการตรวจสอบเบื้องต้น (screening method) เท่านั้น เนื่องจากมีปัจจัยอีกหลายชนิดที่มีผลต่อการ

ทดลองโดยเฉพาะเรื่องของอาหารที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเชื้อรา ดังนั้นควรมีการศึกษาวิจัยถึงความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธีอื่นๆ ฤทธิ์ทางชีวภาพด้านอื่นๆ รวมทั้งการประเมินความปลอดภัยในสิ่งมีชีวิต (*in vivo*) ด้วย เนื่องจากการนำสารชีวภาพมาใช้ควรต้องคำนึงถึงความปลอดภัย อีกทั้งการตกค้างในธรรมชาติ ซึ่งอาจมีผลต่อสุขภาพทั้งต่อมนุษย์และสัตว์ ดังนั้นการประเมินความเป็นพิษของสารชีวภาพเป็นสิ่งที่จำเป็นเพื่อตรวจสอบ และยืนยันว่ามีความปลอดภัยต่อมนุษย์และสัตว์เพียงใด

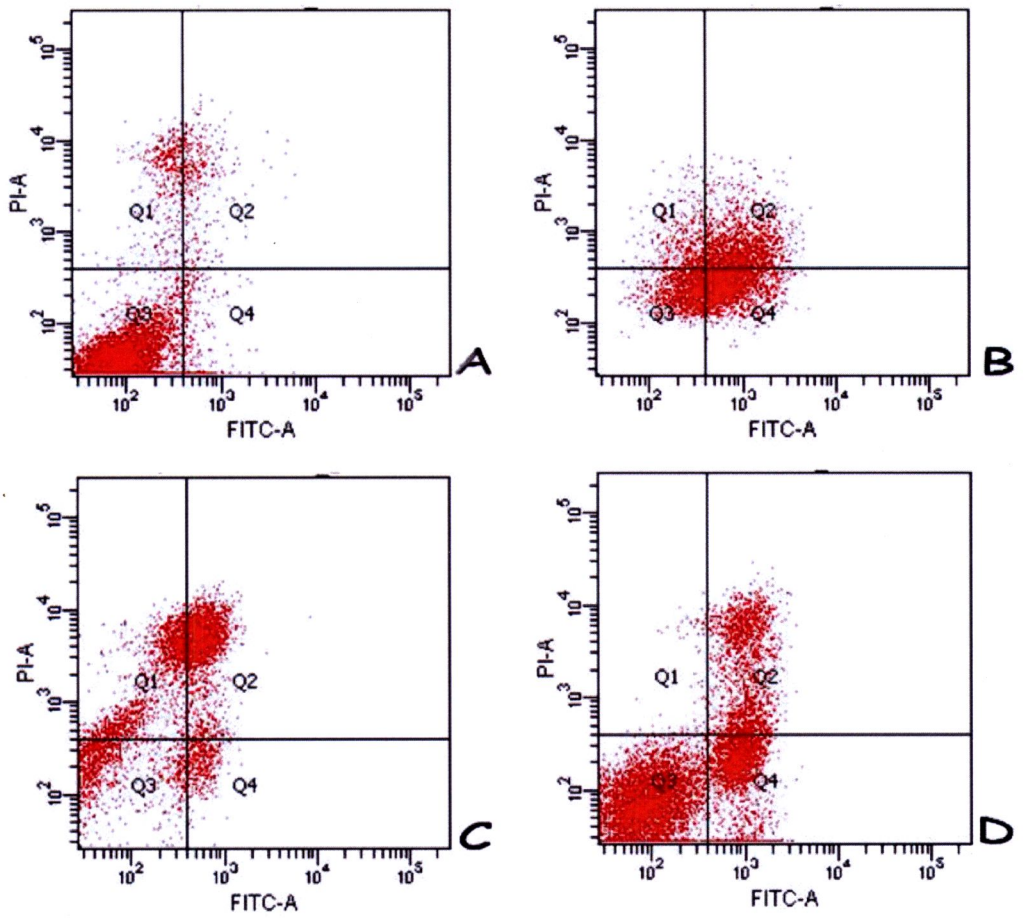
3.5 การตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด Apoptosis

อะพอพโทซิส (Apoptosis) เป็นรูปแบบหนึ่งของการตายของเซลล์ (cell death) แบบที่มีการโปรแกรมไว้แล้ว (programmed cell death) ของสิ่งมีชีวิตหลายเซลล์ ซึ่งมีความจำเป็นต่อการพัฒนาการ การรักษาสมดุลของเนื้อเยื่อในสิ่งมีชีวิต เช่น นิ้วทั้งห้าแยกออกจากกัน เนื่องจากเซลล์ที่อยู่ระหว่างนิ้วเกิดอะพอพโทซิส การกำจัดเซลล์ที่เสียหายที่เกิดจากการติดเชื้อไวรัส หรือเกิดจากการกลาย (mutation) แต่หากอะพอพโทซิสเกิดขึ้นมากเกินไปจะทำให้เกิดการฝ่อของอวัยวะได้ ซึ่ง apoptosis เกี่ยวข้องกับปฏิกิริยาทางชีวเคมีที่ทำให้เซลล์ตายอย่างมีลักษณะที่เฉพาะ โดยเซลล์จะมีลักษณะสัณฐานวิทยาเปลี่ยนแปลงหลายรูปแบบ เช่น การบวมของเยื่อหุ้มเซลล์เป็นถุง (membrane blebbing) การหดตัวหรือการเหี่ยวของเซลล์ (cell shrinkage) นิวเคลียสแตกเป็นชิ้นส่วน (nuclear fragmentation) การหดสั้นของโครมาติน (chromatin condensation) และการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอ (chromosomal DNA fragmentation) ซึ่งมีผลทำให้เซลล์แตกเป็นชิ้นส่วนเล็กๆ เรียก apoptotic body ที่เกิดจากเยื่อหุ้มเซลล์เปลี่ยนแปลงโดยเหี่ยวฝ่อลงและห่อหุ้มส่วนของนิวเคลียสและองค์ประกอบของเซลล์ โดย apoptotic body นี้จะถูกกำจัดหรือสลายไปโดย phagocyte หรือ macrophage ซึ่งจะไม่เกิดปฏิกิริยาการอักเสบหรือความเสียหายต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่อยู่ข้างเคียง ซึ่งกระบวนการที่เกิดขึ้นนี้จะแตกต่างจากการตายแบบเนโครซิส (necrosis)

การตรวจสอบการตายของเซลล์แบบ apoptosis มีหลากหลายวิธี เช่น การย้อมสี DAPI เพื่อศึกษาลักษณะสัณฐานวิทยาของเซลล์ที่มีการเปลี่ยนแปลง การศึกษาการแตกหักของชิ้นดีเอ็นเอที่มีขนาดจำเพาะประมาณ 180-200 คู่เบส การประเมินการทำงานของ Caspase ชนิดต่างๆ การตรวจวัดปริมาณ mRNA ของยีน หรือโปรตีนที่เกี่ยวข้อง รวมทั้งการตรวจด้วยการจับของ Annexin V และ propidium iodide: PI (Annexin V/ PI staining) การตรวจด้วยวิธี annexin V/ propidium iodide มีหลักการจากเซลล์ระยะเริ่มแรกที่เกิด apoptosis จะมีการเปลี่ยนแปลงของเยื่อหุ้มเซลล์โดย phosphatidyl serine (PS) ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ปกติ แต่จะมีการเคลื่อนที่ไปอยู่ด้านนอกเซลล์ในระยะเริ่มแรกของการ apoptosis ซึ่ง annexin V สามารถเข้าไปจับกับประจุลบของ phosphatidyl serine ได้ ในสภาพที่ต้องมี calcium ดังนั้นหากนำสารเรืองแสง (fluorescein) เช่น fluorescein isothiocyanate (FITC) จับกับ annexin V จะสามารถตรวจสอบเซลล์ที่เกิดการตายของเซลล์ในระยะเริ่มแรก (early apoptosis) ได้จากการเรืองแสงสีเขียว แต่การย้อมสีด้วย propidium iodide อาศัยหลักการความแตกต่างของการให้สารผ่านเข้าออกเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ที่มีชีวิต (viable) ระยะเริ่มแรกของการเกิด apoptosis (early apoptotic) และระยะสุดท้ายของการเกิด apoptosis (late apoptotic) หรือการเกิด necrosis โดย propidium iodide จะไม่แพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์ขณะเซลล์มีชีวิต แต่จะแพร่ผ่านเยื่อหุ้มเซลล์เมื่อเซลล์ตายหรือไม่มีชีวิต

และสามารถย้อมนิวเคลียสหรือดีเอ็นเอติดสีแดง ถ้าหากตรวจสอบด้วย annexin V พร้อมกับ propidium iodide จะทำให้สามารถแบ่งเซลล์เป็นเซลล์ที่มีชีวิต ถ้าไม่พบการเรืองแสงทั้งสองสีของ Annexin V และ PI (Annexin V negative/ PI negative) ระยะเริ่มแรกของการเกิด apoptosis (early apoptosis) ถ้าตรวจพบการเรืองแสงของ Annexin V (Annexin V positive/ PI negative) และระยะสุดท้ายของการเกิด apoptosis (late apoptosis) หรือการเกิด necrosis ถ้าตรวจพบการเรืองแสงของ PI (PI positive) ซึ่งสามารถตรวจสอบจากกล้องจุลทรรศน์ หรือการใช้เครื่อง fluorescence flow cytometry

โดยในการศึกษาในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต B มีแนวโน้มมีความเป็นพิษมากที่สุด จึงเลือกมาเพื่อใช้ในการตรวจสอบการตายของเซลล์ชนิด apoptosis โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 1000 และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สาร mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และสาร Beauvericin ที่ระดับความเข้มข้น 5, 10 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ชนิด P388 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ด้วยการย้อม Annexin V/PI staining assay และตรวจวัดด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry โดยวิเคราะห์จากจำนวนเซลล์ 10,000 เซลล์ต่อตัวอย่าง โดยทำการทดลองอย่างละ 3 ซ้ำ รายงานผลเป็นกราฟชนิด dot plot ที่ใช้จุดแทนตัวข้อมูล โดยในการวิเคราะห์ข้อมูลจะแบ่งออกเป็น 4 quadrant (Q1-Q4) โดย Q1 แสดงการตรวจพบการติดสีหรือการเรืองแสงของ PI (PI positive) ซึ่งหมายถึงการเกิด necrosis ของเซลล์, Q2 แสดงการตรวจพบการติดสีหรือการเรืองแสงทั้งสองสีของ Annexin V และ PI (Annexin V positive/ PI positive) หมายถึงระยะสุดท้ายของการเกิด apoptosis (late apoptosis), Q3 แสดงการตรวจที่ไม่พบการเรืองแสงทั้งสองสีของ Annexin V และ PI (Annexin V negative/ PI negative) ซึ่งหมายถึงเซลล์ที่มีชีวิต (Normal cell) และ Q4 แสดงการตรวจพบการเรืองแสงของ Annexin V เพียงอย่างเดียว (Annexin V positive/ PI negative) ซึ่งหมายถึงระยะเริ่มแรกของการเกิด apoptosis (early apoptosis) ดังแสดงค่าร้อยละของเซลล์ชนิด P388 ที่มีชีวิต เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรก และเซลล์ที่เกิด apoptosis ระยะท้าย จากกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ ในตารางที่ 3.5 และแสดงตัวอย่างกราฟ dot plot ในรูปที่ 3.6 โดยเป็นของกลุ่มควบคุม (รูปที่ 3.6 A) และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซน (รูปที่ 3.6 B) เอทิลอะซิเตท (รูปที่ 3.6 C) และเอทานอล (รูปที่ 3.6 D) ที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ที่แสดงให้เห็นว่ากลุ่มควบคุมมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ร้อยละ 87.40 ซึ่งอาจเป็นได้ว่าเซลล์ชนิด P388 เป็นเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตเร็วทำให้มีปริมาณเซลล์เพิ่มขึ้นอย่างมากมีผลทำให้อาหารไม่เพียงพอ ดังนั้นควรลดปริมาณเซลล์เริ่มต้นลดน้อยลง และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซนที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด โดยมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่เพียงร้อยละ 22.87 และแสดงเซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรกร้อยละ 44.50 ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาด้วยวิธี MTT assay ที่พบว่าสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซนมีความเป็นพิษต่อเซลล์มากที่สุด



รูปที่ 3.6 แสดง dot plot histogram จาก Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescence flow cytometry ของกลุ่มควบคุม (A) และสารสกัดหยาบจากเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B จากตัวทำละลายเฮกเซน (B) เอทิลอะซิเตท (C) และเอทานอล (D) ที่ระดับความเข้มข้น 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อเซลล์ P388 เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง

ตารางที่ 3.5 แสดงค่าร้อยละของเซลล์ชนิด P388 ที่มีชีวิต เซลล์ที่เกิด apoptosis ในระยะเริ่มแรก และเซลล์ที่เกิด apoptosis ระยะท้าย จากกลุ่มควบคุม และกลุ่มที่ได้รับสารสกัดหยาบของเชื้อรา *B. bassiana* จากตัวทำละลายเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้นต่างๆ จาก Annexin V/PI staining assay ด้วยเครื่อง fluorescent flow cytometry

	% Normal cell	% Early apoptosis cell	% Late apoptosis cell or Necrosis
Control	87.40	3.53	9.10
DMSO 2%	83.80	3.73	12.43
Hexane 1000 µg/ml	41.43	22.60	35.93
Hexane 2000 µg/ml	22.87	44.50	32.67
Ethyacetate 1000 µg/ml	29.77	5.53	64.70
Ethyacetate 2000 µg/ml	47.50	3.57	48.90
Ethanol 1000 µg/ml	78.07	11.43	10.50
Ethanol 2000 µg/ml	56.00	25.60	18.73
BEA 5 µg/ml	87.00	3.83	9.10
BEA 10 µg/ml	87.03	2.00	11.00
BEA 20 µg/ml	85.40	2.73	11.87
Mitomycin 5 µg/ml	78.63	4.50	16.83
Mitomycin 10 µg/ml	67.40	10.70	21.87
Mitomycin 20 µg/ml	44.17	10.93	44.87

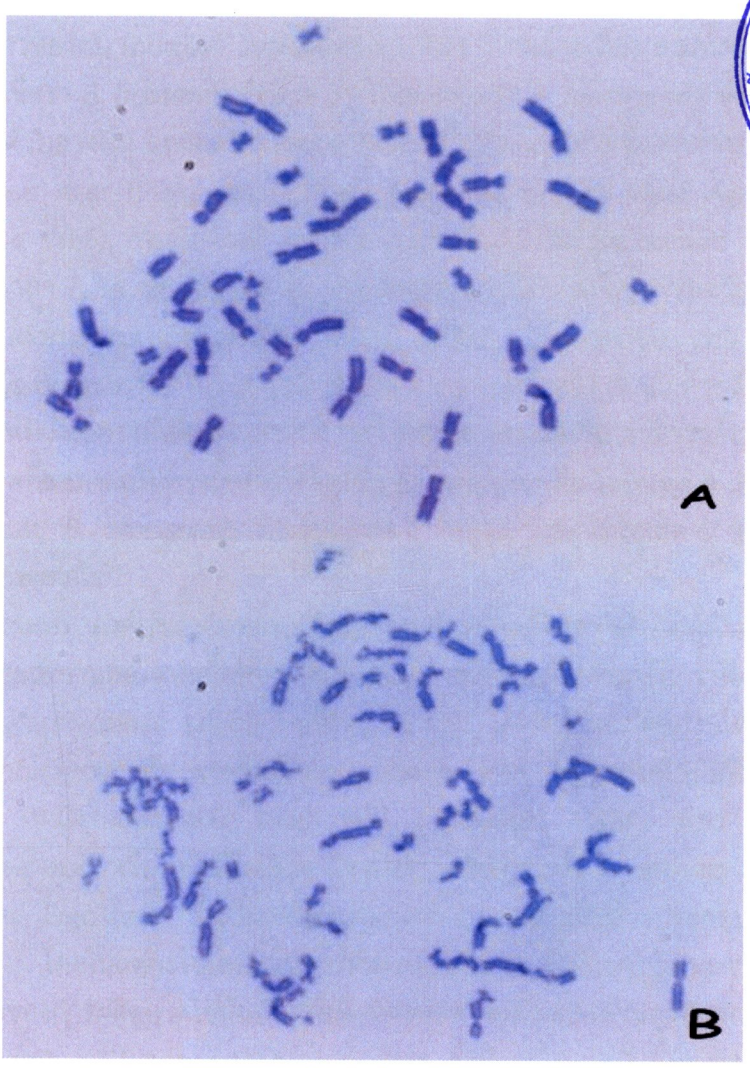
3.6 ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี MTT assay พบว่าสารสกัดหยาบจากไอโซเลต B มีแนวโน้มมีความเป็นพิษมากที่สุด จึงเลือกมาเพื่อใช้ในการทดสอบความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรม โดยจากการศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ที่มีต่อการเปลี่ยนแปลงอัตราการแบ่งเซลล์ หลังการเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเติมสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท เอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 2000 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรที่ใช้เป็นกลุ่ม positive control และน้ำกลั่นปลอดเชื้อที่ใช้เป็นกลุ่ม negative control ทำการบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมง เมื่อเก็บเกี่ยวเซลล์ และกระจายเซลล์บนสไลด์ เมื่อนับเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้งหมดจำนวน 2,000 เซลล์ และคำนวณจำนวนเซลล์เมทาเฟส นำไปหาค่าอัตราการแบ่งเซลล์ (Mitotic index) โดยเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ใส่เฉพาะน้ำกลั่น

เมื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ไอโซเลต B ในชั้นเฮกเซน เอทิลอะซิเตท และเอทานอล ที่ระดับความเข้มข้น 2000 และ 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำ

กลั่น และ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อความผิดปกติของโครโมโซม พบว่าทั้งกลุ่มทดลอง และกลุ่มที่เติมเฉพาะน้ำกลั่นไม่พบความผิดปกติของโครโมโซมใดๆ (รูปที่ 3.7 A) แตกต่างจาก Mitomycin C ที่แสดงความผิดปกติของโครโมโซมทั้งชนิด single chromatid gap, isochromatid gap และ single chromatid break (รูปที่ 3.7 B) จึงอาจกล่าวได้ว่าสารสกัดหยาบจากเส้นใยของเชื้อรา *B. bassiana* ที่ระดับความเข้มข้นสูงสุดที่ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่แสดงความเป็นพิษต่อสารพันธุกรรมในระดับโครโมโซม

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ห้องสมุดงานวิจัย



รูปที่ 3.7 แสดงลักษณะโครโมโซมจากเซลล์เม็ดเลือดขาวของคน (A) โครโมโซมของคนปกติ และ (B) ความผิดปกติของโครโมโซมที่ได้รับ Mitomycin C ที่ระดับความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร