การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด

นายวิศรุต กิจพิพิธ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ
คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2552
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM MUSHROOMS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES AGAINST LUNG CANCER CELL LINES

Mr. Wissarut Kitpipit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Biotechnology
Faculty of Science
Chulalongkorn University
Academic Year 2009

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด
โดย	นายวิศรุต กิจพิพิธ
สาขาวิชา	เทคโนโลยีชีวภาพ
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก	อาจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข
อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม	รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย

คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

………………………………………….. คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

(ศาสตราจารย์ ดร.สุพจน์ หารหนองบัว)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

…………………………………………… ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์)

…………………………………………... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อาจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข)

…………………………………………… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์)

…………………………………………… อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย)

…………………………………………… กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(อาจารย์ อนิวรรต เฉลิมพงษ์)

วิศรุต กิจพิพิธ: การสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งปอด. (EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM MUSHROOMS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES AGAINST LUNG CANCER CELL LINES) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : อาจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข, อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม : รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์, ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย, 93 หน้า.

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทยจำนวน 25 ตัวอย่างและจัดจำแนกโดยตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายใน พบว่าสามารถจัดจำแนกเห็ดได้ 8 ชนิด คือ *Amanita chepangiana* Tulloss & Bhandary., *Boletus vermiculosoides* Smith & Thiers., *Lentinus polychrous* Lev'., *Russula virescens* (Schaeff.) Fr., *Ganoderma colossus* (Fr.) Baker., *Lepiota* sp., *Phallus rugulosus* [Fisch.] Kuntze และ *Psilocybe cubensis* [Earle] Sing. เมื่อทำการสกัดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดทั้ง 8 ชนิดและเส้นใยบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ PBRU-W0157 และ *Schizophyllum commune* และทำการวัดปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี antrone test พบว่าสารสกัดหยาบจาก *S. commune* มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดคือ 6.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร นำสารสกัดหยาบมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดและผลต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิด *B. vermiculosoides* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดได้เท่ากับ 96.56 เปอร์เซ็นต์และยับยั้งเซลล์มะเร็งปอดได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ระดับความเข้มข้นนี้มีผลต่อเซลล์ตับปกติน้อยมากเมื่อเทียบกับเซลล์มะเร็งปอด โดยยับยั้งการเติบโตเพียง 9.92 เปอร์เซ็นต์ เมื่อทำการแยกพอลิแซ็กคาไรด์ออกจากสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิด *B. vermiculosoides* ด้วยวิธี ultrafiltration, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography และนำพอลิแซ็กคาไรด์มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วย ^{1}H NMR พบว่ากราฟของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ได้มีลักษณะและค่า coupling constant ใกล้เคียงกับรูปแบบของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้า-กลูแคน ผลการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าพอลิแซ็กคาไรด์จาก *B. vermiculosoides* สามารถนำมาพัฒนาและประยุกต์ใช้ควบคู่กับการรักษามะเร็งในปัจจุบันได้

สาขาวิชา เทคโนโลยีชีวภาพ	ลายมือชื่อนิสิต....................................
ปีการศึกษา 2552	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก....................
	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม....................
	ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม....................

5072473423 : MAJOR BIOTECHNOLOGY

KEYWORDS : MUSHROOM / POLYSACCHARIDES / ANTITUMOR

WISSARUT KITPIPIT: EXTRACTION OF POLYSACCHARIDES FROM MUSHROOMS AND BIOLOGICAL ACTIVITIES AGAINST LUNG CANCER CELL LINES. THESIS ADVISOR : SEHANAT PRASONGSUK, Ph.D., THESIS CO-ADVISER : ASSOC.PROF. HUNSA PUNNAPAYAK, Ph.D. AND ASST.PROF. ORAWAN SATAYALAI, Ph.D., 93 pp.

In this research, twenty-five basidiocarps of mushroom samples were collected from natural areas in Thailand and identified using morphological examination including macroscopic and microscopic observation. Eight mushrooms were successfully identified as *Amanita chepangiana* Tulloss & Bhandary., *Boletus vermiculosoides* Smith & Thiers., *Lentinus polychrous* Lev'., *Russula virescens* (Fr.) Baker., *Ganoderma colossus* (Schaeff.) Fr., *Lepiota* sp., *Phallus rugulosus* [Fisch.] Kuntze and *Psilocybe cubensis* [Earle] Sing. The fruiting bodies of all eight species and two mycelia of PBRU-W0157 and *Schizophyllum commune* were extracted for their polysaccharides using hot water extraction. Polysaccharide content was assessed using anthrone test method. It was found that *S. commune* contained the highest polysaccharide content as 6.56 mg/ml. The extracted polysaccharides were tested for biological activities against lung cancer and hepatic cell lines. The crude polysaccharides from *B. vermiculosoides* indicated the highest inhibitory activity against lung cancer cell lines (95.56% cell inhibition) and showed 50% cell inhibition (IC_{50}) at 0.08 mg/ml. At concentration of IC_{50}, the polysaccharides affected the hepatic cell lines with 9.92% cell inhibition. The polysaccharides were purified using ultrafiltration, ion exchange chromatography and gel filtration chromatography and analyzed using ^{1}H NMR. The NMR spectra and coupling constants of *B. vermiculosoides* polysaccharides were resemble to the pattern of β-glucan polysaccharide. This research suggested that polysaccharide from *B. vermiculosoides* can be potentially developed and applied for cancer treatment.

Field of Study : Biotechnology .... Student's Signature ....

Academic Year : 2009 .... Advisor's Signature ....

Co-Advisor's Signature ....

Co-Advisor's Signature................................

กิตติกรรมประกาศ

ขอกราบขอบพระคุณ อาจารย์ ดร.สีหนาท ประสงค์สุข อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รองศาสตราจารย์ ดร.หรรษา ปุณณะพยัคฆ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.อรวรรณ สัตยาลัย อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วมที่ได้กรุณาให้คำปรึกษา แนะแนวทางการทำวิจัย ตลอดจนให้ความเห็นในการปรับปรุงงานวิจัยให้สำเร็จโดยสมบูรณ์

ขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.ศิริรัตน์ เร่งพิพัฒน์ ประธานกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ อาจารย์อนิวรรต เฉลิมพงษ์ กรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความเห็นและคำแนะนำในการจัดทำวิทยานิพนธ์

ขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.ธนาภัทร ปาลกะ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาเอื้อเฟื้ออุปกรณ์ในการถ่ายภาพเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับ

ขอขอบพระคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยอณูพันธุศาสตร์ทางการแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และคุณทรงจันทร์ ภู่ทอง นักวิจัยจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการผลิตแอนติบอดี สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและวิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำในขั้นตอนการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับ

ขอขอบพระคุณ คุณธรา จันทธรรม และคุณสุนทรียา บุญคมรัตน์ ภาควิชาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สำหรับความช่วยเหลือและคำแนะนำในขั้นตอนการทำบริสุทธิ์สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด

ขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ทุกคนในครอบครัว ที่ให้การสนับสนุนด้านการศึกษามาตลอดและเป็นกำลังใจที่ดีที่สุดเสมอมา

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนทุนวิจัยจาก “ทุน 90 ปี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย” กองทุนรัชดาภิเษกสมโภช

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย...	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ...	จ
กิตติกรรมประกาศ...	ฉ
สารบัญ...	ช
สารบัญตาราง...	ญ
สารบัญภาพ...	ฏ
บทที่	
1 บทนำ...	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา...	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย...	2
1.3 ขอบเขตของการวิจัย...	2
1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ...	3
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง...	4
2.1 แนวคิดและทฤษฎี...	4
2.1.1 มะเร็งและสาเหตุของการเกิดมะเร็ง...	4
2.1.2 วิธีการที่ใช้ในการรักษามะเร็งในปัจจุบัน...	5
2.1.3 มะเร็งที่พบมากในเพศชายและเพศหญิง...	6
2.1.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์...	7
2.1.5 การเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์...	8
2.1.6 เห็ด...	10
2.1.7 กลุ่มของเห็ดที่แบ่งได้จากรูปร่างของที่ให้กำเนิดสปอร์...	10
2.1.8 เห็ดในป่า...	13
2.1.9 สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพจากเห็ดกับการรักษาโรคมะเร็ง...	13
2.1.10 พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด...	14
2.1.11 กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง...	16

บทที่ หน้า

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.. 17
3 วิธีดำเนินการวิจัย…………………………………………………………………… 20
3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย... 20
3.2 เครื่องมือ วัสดุ และอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 20
3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย... 21
3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย.. 23
3.4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย................ 23
3.4.1 การจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐาน วิทยา.. 23
3.4.3 การคัดเลือกและเตรียมดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งเพื่อสกัดสาร พอลิแซ็กคาไรด์ 24
3.4.4 การสกัดสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใย บริสุทธิ์อบแห้ง... 25
3.4.5 การหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test………………… 26
3.4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จาก เห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง.. 26
3.4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จาก เห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการเติบโตของเซลล์ปกติ............................ 29
3.4.8 การทำบริสุทธิ์ของสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด ในการต้านเซลล์มะเร็งและผลต่อการเติบโตของเซลล์ปกติ……………….. 29
3.4.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์ จากสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็ง และผลต่อการเติบโตของเซลล์ปกติที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} ……………… 31
3.4.10 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จาก สารสกัดหยาบจากเห็ด………………………………………………….. 31
4 ผลการทดลอง... 32

บทที่ หน้า

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย............................ 32
4.2 การจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา….. 32
4.3 การคัดเลือกและเตรียมดอกเห็ดอบแห้งหรือเส้นใยบริสุทธิ์ที่คัดแยกได้ก่อนสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์.. 45
4.4 การสกัดสารสกัดหยาบจากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง…………………….. 49
4.5 การหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test………………………….. 51
4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็งปอด.. 53
4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ... 58
4.8 การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งปอดและผลต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ…………………………………...... 60
4.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งปอดและผลต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} …………………….......... 63
4.10 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด.. 63
5 อภิปรายและสรุปผลการทดลอง……………………………………………………….. 66
5.1 อภิปรายผลการทดลอง... 66
5.2 สรุปผลการทดลอง…………………………………………………………………… 69
5.3 ข้อเสนอแนะ.. 70
รายการอ้างอิง... 71
ภาคผนวก………………………………………………………………………………….. 75
ภาคผนวก ก 76
ภาคผนวก ข... 90
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.. 93

สารบัญตาราง

ตารางที่ หน้า

ตารางที่ 2.1 สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในเห็ดชนิดต่าง ๆ................................. 16

ตารางที่ 3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 20

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย.. 20

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย... 21

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการสำรวจจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย............ 32

ตารางที่ 4.2 การจัดแบ่งกลุ่มเห็ดที่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุลและชนิด................... 37

ตารางที่ 4.3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้......................... 52

ตารางที่ 4.4 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดที่มาจาก
หน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช..................................... 52

ตารางที่ 4.5 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้..... 53

ตารางที่ 4.6 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดพิษ........................... 53

ตารางที่ ก.1 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับ
สารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด 10 ชนิด.. 80

ตารางที่ ก.2 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบ
ที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides*
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.. 84

ตารางที่ ก.3 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์ตับที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบ
ที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides*
ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.. 87

สารบัญภาพ

ภาพที่ หน้า

ภาพที่ 2.1 โรคมะเร็งที่พบในเพศชาย.. 6
ภาพที่ 2.2 โรคมะเร็งที่พบในเพศหญิง.. 7
ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้า-กลูแคน... 15
ภาพที่ 2.4 กลไกการทำงานแบบกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายของเลนติแนน........................ 17
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เอราวัณ 6..................................... 38
ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาน้ำพุ 12.................................... 39
ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาน้ำพุ 13.................................... 40
ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์สะแกราช 16.................................. 41
ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์สะแกราช 23.................................. 42
ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์สะแกราช 24.................................. 43
ภาพที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาเขียว 25.................................. 44
ภาพที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาเขียว 26.................................. 45
ภาพที่ 4.9 ลักษณะของดอกเห็ดอบแห้งบางส่วนที่ถูกปั่นเป็นผงก่อนนำมาทำการสกัดสาร.... 46
ภาพที่ 4.10 เส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ด 2 ชนิด.. 47
ภาพที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDB........................ 48
ภาพที่ 4.12 การเตรียมเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง... 49
ภาพที่ 4.13 สารสกัดหยาบจากเห็ดชนิดต่าง ๆ.. 50
ภาพที่ 4.14 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม........................ 55
ภาพที่ 4.15 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์
จากเห็ด *B. vermiculosoides*.. 55
ภาพที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบ
ที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่าง ๆ... 56
ภาพที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบ
ที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.... 57

สารบัญภาพ

หน้า

ภาพที่

ภาพที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ตับปกติบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ.......... 59

ภาพที่ 4.19 การแยกสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ด้วยวิธี ion exchange chromatography………… 61

ภาพที่ 4.20 การแยกสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ด้วยวิธี gel filtration chromatography…………… 62

ภาพที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับสารประกอบที่ทำบริสุทธิ์พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร.. 64

ภาพที่ 4.22 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด 65

ภาพที่ ก.1 กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยวิธี anthrone test ………………… 76

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

เซลล์มะเร็งเป็นเซลล์ของร่างกายที่มีความผิดปกติที่สารพันธุกรรม ส่งผลให้เซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและมากกว่าปกติ เกิดก้อนเนื้อที่ผิดปกติ ในที่สุดก็จะเกิดการตายของเซลล์บริเวณก้อนเนื้อที่ผิดปกตินั้น นอกจากความผิดปกติที่สารพันธุกรรมแล้วยังมีปัจจัยอีกหลายอย่างที่ทำให้เกิดมะเร็ง เช่น การทำงานที่ผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกันภายในร่างกายมนุษย์เอง เป็นต้น ทำให้การรักษาโรคมะเร็งทำได้ยาก ดังนั้นมะเร็งจึงเป็นสาเหตุการตายอันดับต้น ๆ ของมนุษย์ในปัจจุบัน (El-Gohary, 2008) สำหรับยาหรือสารที่ใช้ในการรักษานั้นมีราคาแพง ต้องนำเข้าจากต่างประเทศ และมักพบอาการข้างเคียงด้วยเสมอ เนื่องจากสารเคมีจากตัวยาไปทำลายเซลล์ปกติบางส่วนด้วย เพราะฉะนั้นจึงมีการศึกษาค้นคว้าเพื่อหาสารใหม่ ๆ ที่มีราคาถูก ปลอดภัยและมีประสิทธิภาพใกล้เคียงกันกับยาที่ใช้ในปัจจุบันและไม่ทำลายเซลล์ปกติเพื่อมาพัฒนาเป็นยาสำหรับใช้ทดแทน พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharide) จากเห็ด (mushroom) ก็เป็นหนึ่งในสารเหล่านั้น เห็ดเป็นกลุ่มของสิ่งมีชีวิตที่เติบโตจากรูปแบบของเส้นใยต่อเมื่อถึงระยะสร้างเซลล์สืบพันธุ์จึงรวมตัวเป็นกลุ่มก้อนเกิดเป็นโครงสร้างหรือดอกขนาดใหญ่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า เห็ดสามารถจัดจำแนกไว้ใน 2 ไฟลัม (phylum) คือเบซิดิโอไมโคตา (basidiomycota) และแอสโคไมโคตา (ascomycota) แต่เห็ดส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัมเบซิดิโอไมโคตา (วินัย กลิ่นหอม, 2548; อนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ, 2551) พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นพอลิเมอร์ (polymer) ของคาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) ที่พบได้เป็นจำนวนมากบนผนังเซลล์ (Moradali et al, 2007) โดยพอลิแซ็กคาไรด์สายหลักที่พบจะเป็นโครงสร้างของน้ำตาลกลูโคส (glucose) ต่อกันเป็นสายยาวด้วยพันธะเบต้า – (1,3) [β – (1,3)] เรียกว่า กลูแคน (glucans) ซึ่งละลายน้ำได้ สำหรับชื่อเรียกของพอลิแซ็กคาไรด์ตัวอื่นที่พบในเห็ดเช่น เฮทเทอโร-เบต้า-กลูแคน (hetero-β-glucans), อัลฟา-แมนโน-เบต้า-กลูแคน-คอมเพล็กซ์ (α-manno-β-glucan complexs) หรือเรียกตามชนิดของเห็ดนั้น ๆ เช่น เลนติแนน (lentinan) จาก *Lentinus edodes* เป็นต้น ต่างก็มีโครงสร้างสายหลักเป็นกลูแคนทั้งสิ้นแต่แตกต่างกันที่ชนิดของน้ำตาลที่มาต่อเป็นโซ่กิ่งที่พันธะเบต้า – (1,6)

[β - (1,6)] ซึ่งส่งผลให้มีคุณสมบัติในการต้านเซลล์มะเร็งได้ต่างกันด้วย (Mizuno, 1996, 1999; Wasser and Weis, 1999; Ikekawa, 2001)

ปริญญา รัตนะพิมาน (2535) ได้ทำการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งจากเห็ดหมื่นปี *Ganoderma lucidum* (Fr). Karst. โดยนำเส้นใยและดอกเห็ดมาสกัดด้วยน้ำร้อน และทำการตกตะกอนด้วยเอธานอล (ethanol) แล้วนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทรกราฟี (column chromatography) ได้สารพอลิแซ็กคาไรด์ออกมา นำไปทดสอบการออกฤทธิ์ต่อต้านการเจริญของเซลล์มะเร็งปากมดลูกของคนที่เจริญในหนูไมซ์ไร้ขน (nude mice) พบว่า สารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากทั้งเส้นใยหรือดอกเห็ดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งในหนูไร้ขนสูงมาก และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้ โดยการฉีดให้แก่หนูไร้ขน พบว่า มีค่า LD_{50} สูงถึง 6,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวของหนูไร้ขน ตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง 90 วันซึ่งแสดงว่าสารที่สกัดได้ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติและยังพบว่าน้ำหนักตัวของหนูไร้ขนไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มการทดลอง

สำหรับประเทศไทยซึ่งเป็นพื้นที่เขตร้อนชื้นนับเป็นบริเวณที่มีความหลากหลายและปริมาณของเห็ดเป็นจำนวนมาก แต่ยังไม่ได้นำมาศึกษาเกี่ยวกับเรื่องนี้มากนัก ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงมุ่งที่จะทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในประเทศไทยเพื่อทดสอบประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็งและนำไปประยุกต์ใช้ต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดบางชนิดในประเทศไทย และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็งปอด

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

1) ศึกษาค้นคว้าและรวบรวมข้อมูลจากเอกสารที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัย
2) สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย
3) จัดจำแนกตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา
4) คัดเลือกและเตรียมดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งที่คัดแยกได้ก่อนสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

5) สกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง
6) หาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test
7) ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็ง
8) วิเคราะห์โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์
9) วิเคราะห์ข้อมูล สรุปผล และเขียนวิทยานิพนธ์

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

ทราบข้อมูลของสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดบางชนิดในประเทศไทยที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็ง

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 มะเร็งและสาเหตุของการเกิดมะเร็ง

มะเร็ง (cancer) คือกลุ่มของโรคที่เกิดเนื่องจากเซลล์ร่างกายมีความผิดปกติ ส่งผลให้เซลล์มีการเจริญเติบโต มีการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนเซลล์รวดเร็วและมากกว่าปกติ ดังนั้นจึงอาจทำให้เกิดก้อนเนื้อที่ผิดปกติ และในที่สุดก็จะทำให้เกิดการตายของเซลล์ในก้อนเนื้อนั้น โดยปกติแล้วเซลล์ทั่วไปจะมีการแบ่งเซลล์ประมาณ 50 ถึง 70 ครั้ง จึงจะเข้าสู่การตายของเซลล์ในกระบวนการเจริญปกติ (apoptosis) แต่เซลล์มะเร็งนั้นสามารถเจริญเติบโตได้ไม่สิ้นสุด (immortal) และสามารถบุกรุกไปสู่เซลล์ข้างเคียงได้อีกด้วย (metastasis) สำหรับสาเหตุของการเกิดมะเร็งสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภทคือ เกิดจากสิ่งแวดล้อมภายนอกร่างกาย ได้แก่ สารก่อมะเร็งที่ปนเปื้อนในอาหารและเครื่องดื่ม สารพิษจากเชื้อราที่มีชื่อว่า อัลฟาทอกซิน (alfatoxin) สารก่อมะเร็งพวกไฮโดรคาร์บอน (hydrocarbon) ที่เกิดจากการปิ้งย่าง สีผสมอาหารที่มาจากสีย้อมผ้า รังสีเอ็กซเรย์ (X-ray) และรังสีอุลตร้าไวโอเลต (ultraviolet) จากแสงแดด การติดเชื้อไวรัสฮิวแมนแพบพิลโลมา (humanpapillomaviruses) การสูบบุหรี่และการดื่มสุรา เป็นต้น (Daba และ Ezeronye, 2003) และเกิดจากความผิดปกติภายในร่างกายที่สารพันธุกรรมหรือดีเอ็นเอของยีน (gene) ที่มีบทบาทในกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ 2 ชนิดคือ ทิวเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีน (tumor suppressors gene) และออนโคยีน (oncogene) โดยออนโคยีนนั้นเป็นยีนที่มีบทบาทกระตุ้นให้เซลล์มีการแบ่งตัวและทำให้เกิดวัฏจักรของเซลล์ (cell division) แต่การทำงานของออนโคยีนจะถูกควบคุมโดยทิวเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีน เพราะฉะนั้นเมื่อสารพันธุกรรมของทิวเมอร์ซับเพรสเซอร์ยีนมีความผิดปกติ ก็จะทำให้การทำงานของยีนดังกล่าวผิดปกติ ไม่สามารถควบคุมการทำงานของออนโคยีนได้ ทำให้การแบ่งเซลล์เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วจนควบคุมไม่ได้และเกิดเป็นมะเร็งดังที่ได้กล่าวไปแล้วข้างต้น (Gibbs, 2003)

2.1.2 วิธีการที่ใช้ในการรักษามะเร็งในปัจจุบัน

1) การรักษามะเร็งโดยวิธีศัลยกรรม (surgery) หรือการรักษาด้วยวิธีการผ่าตัดเอาก้อนเนื้อที่เป็นมะเร็งออกโดยตรง

2) การรักษามะเร็งโดยวิธีรังสีรักษา (radiotherapy) คือการฉายรังสีไปยังบริเวณที่มีเซลล์มะเร็งอยู่โดยตรงเพื่อฆ่าเซลล์มะเร็ง วิธีนี้มักจะทำร่วมกับวิธีการทางศัลยกรรม

3) การรักษาด้วยวิธีเคมีบำบัด (chemotherapy) คือการรักษาหรือการทำลายเซลล์มะเร็งที่แหล่งกำเนิดและที่ได้กระจายไปตามท่อน้ำเหลือง กระแสเลือดหรืออวัยวะอื่นของร่างกาย เป็นการรักษามะเร็งแบบทั้งตัวของผู้ป่วยมะเร็ง โดยการรับประทานยาที่ประกอบด้วยสารเคมีที่มีความสามารถในการฆ่าหรือทำลายเซลล์มะเร็งอย่างจำเพาะเจาะจง เป้าหมายของการใช้ยาในการรักษาก็คือใช้ยาในการรักษาในปริมาณที่น้อย แต่มีประสิทธิภาพสูงในการทำลายเซลล์มะเร็ง และให้มีผลกระทบต่อเซลล์ปกติ (normal cell) ของร่างกายน้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ สำหรับตัวยาที่นิยมใช้ในปัจจุบันมีหลายชนิด ได้แก่ แอสไพริน (aspirin) ไพรอกซิแคน (piroxican) อินโดเมทาซิน (indomethacin) เป็นต้น ตัวยาเหล่านี้จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ไซโคลออกซิจิเนส (cyclooxygenase หรือ COX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นการเปลี่ยนกรดอะราซิโดนิค (aracidonic acid) ไปเป็นสารโพรสตาแกรนดิน (prostaglandin) ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Jang et al., 1997; Wasser and Weis, 1999) แต่การรักษาด้วยวิธีนี้มักจะมีผลข้างเคียงตามมาด้วยคือ เซลล์ปกติจะถูกทำลายไปบางส่วน

4) การรักษาโดยใช้ฮอร์โมน (hormone) เป็นวิธีการรักษาที่มีความจำเพาะเจาะจงสูงมาก จึงไม่ค่อยนิยมนำวิธีนี้มาใช้ในการรักษามากนัก เช่น ผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งเต้านมในวัยหลังหมดประจำเดือน จะมีการตอบสนองต่อการรักษาด้วยวิธีนี้ดีมาก เมื่อผ่าตัดเอาก้อนมะเร็งออกไปแล้ว เป็นต้น

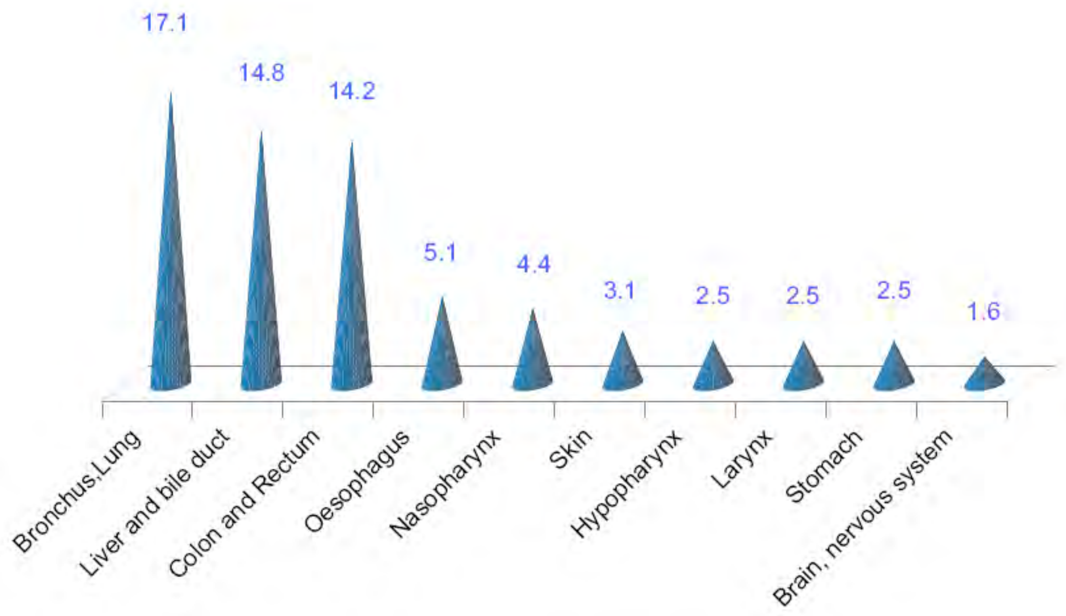
5) การรักษาโดยการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกาย เป็นวิธีการรักษาที่นำสารสกัดต่าง ๆ ที่มีอยู่ในธรรมชาติมาช่วยกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สูงขึ้น เช่น สารสกัดจากพืชสมุนไพรชนิดต่าง ๆ สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด เป็นต้น วิธีนี้มักจะทำการรักษาร่วมกับวิธีเคมีบำบัด ซึ่งสามารถลดผลข้างเคียงที่จะเกิดกับเซลล์ปกติของร่างกายได้ แต่การรักษาโดยวิธีการเพิ่มภูมิคุ้มกันให้กับร่างกายนี้ยังอยู่ในระหว่างการศึกษาและต้องการข้อมูลอีกมากเพื่อยืนยันว่าได้ผลในการรักษามะเร็ง

6) การรักษาที่ยีนที่ผิดปกติและทำให้เกิดมะเร็งโดยตรง เป็นวิธีการรักษาในอนาคตที่นักวิทยาศาสตร์กำลังคิดค้น โดยพยายามกำจัดยีนที่มีโอกาสหรือมีความเสี่ยงในการเกิด

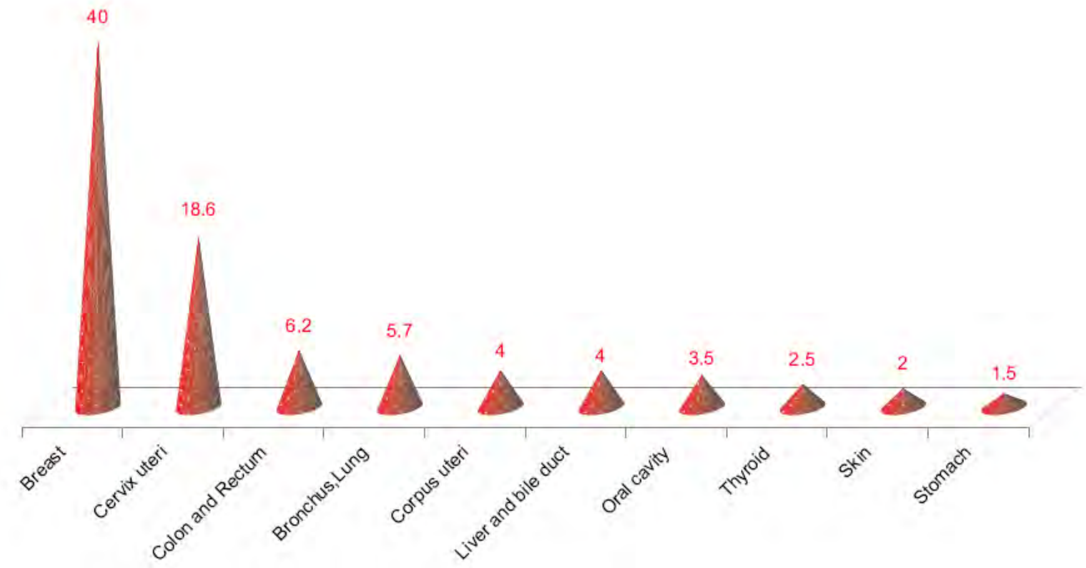
โรคมะเร็งออกไป แต่วิธีการนี้เป็นวิธีการที่ยากที่สุดและไม่นิยมนำมาใช้มากนัก เนื่องจากมีค่าใช้จ่ายสูงและการเกิดมะเร็งก็ไม่ได้ขึ้นอยู่กับยีนแค่เพียงยีนเดียว แต่เกิดจากยีนหลายชนิดที่ทำงานร่วมกัน

2.1.3 มะเร็งที่พบมากในเพศชายและเพศหญิง

มะเร็งเป็นโรคที่เกิดได้ทั้งในเพศชายและเพศหญิง นอกจากนี้ยังเป็นสาเหตุของการเสียชีวิตอันดับต้น ๆ ของมนุษย์ โดยมะเร็งที่พบมากที่สุดในผู้ชายคือมะเร็งปอด ซึ่งสาเหตุหลักของการเกิดมะเร็งชนิดนี้มาจากการสูบบุหรี่ รองลงมาคือมะเร็งตับ ซึ่งมีสาเหตุส่วนใหญ่มาจากการดื่มเครื่องดื่มที่มีแอลกอฮอล์เป็นส่วนผสม ได้แก่ สุราและเบียร์ เป็นต้น โดยพบว่าผู้ชายเป็นมะเร็งปอดสูงถึง 17.1 เปอร์เซ็นต์ และเป็นมะเร็งตับ 14.8 เปอร์เซ็นต์ สำหรับมะเร็งที่พบมากที่สุดในผู้หญิงคือมะเร็งเต้านม รองลงมาคือมะเร็งปากมดลูก โดยเป็นมะเร็งเต้านมสูงถึง 40 เปอร์เซ็นต์และเป็นมะเร็งปากมดลูก 18.6 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 2.1 และ 2.2)



ภาพที่ 2.1 โรคมะเร็งที่พบในเพศชาย (Attasara and Buasom, 2008)



ภาพที่ 2.2 โรคมะเร็งที่พบในเพศหญิง (Attasara and Buasom, 2008)

2.1.4 ลักษณะการเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์

เซลล์สัตว์เป็นหน่วยพื้นฐานของสิ่งมีชีวิตที่มีความบอบบาง และมีเพียงเยื่อหุ้มเซลล์ (membrane) หุ้มล้อมรอบออร์แกเนล (organelle) ต่าง ๆ ไว้ เซลล์สัตว์เมื่อนำมาเพาะเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์จะมีการเจริญ 2 รูปแบบ ได้แก่ เกาะผิวหรือแขวนลอยในอาหารเลี้ยงเซลล์ สำหรับเซลล์เกาะผิว (attached cell หรือ anchorage dependent cell) เป็นลักษณะของเซลล์โดยทั่วไปที่มีความต้องการเกาะผิวเพื่อการเจริญเติบโต โดยมีการเกาะแผ่บนพื้นผิวภาชนะได้เป็น 2 รูปแบบขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์คือ เซลล์เกาะผิวที่มีลักษณะบางยาวคล้ายกระสวย วางตัวกันห่าง ๆ และง่ายต่อการแยกเซลล์ออกจากกัน (fibroblast like cell) และเซลล์เกาะผิวที่มีลักษณะเป็นเหลี่ยม ๆ คล้ายกระเบื้องปูพื้น เซลล์ชนิดนี้จะเรียงตัวชิดกันมาก การแยกเซลล์ออกจากกันสามารถทำลายเซลล์รูปแบบนี้ได้ในบางครั้ง การเกาะแผ่ของเซลล์เกาะผิวนี้ต้องการสารที่ช่วยในการยึดเกาะ (attachment factor) ร่วมกับโปรตีนทั้งภายในเซลล์และภายนอกเซลล์ เช่น intergrin, actin และ vimitin เป็นต้น ส่วนเซลล์แขวนลอยเป็นเซลล์ที่ไม่สามารถผลิตสารที่ช่วยในการยึดเกาะกับพื้นผิวภาชนะเลี้ยงเซลล์ จึงแขวนลอยเจริญในอาหารในลักษณะเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ หรือกลุ่มเซลล์ เช่น เซลล์มะเร็งบางชนิด เป็นต้น (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์, 2550)

2.1.5 การเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์

2.1.5.1 การเลี้ยงเซลล์และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเซลล์

การเลี้ยงเซลล์ในภาชนะเลี้ยงนอกร่างกายของสิ่งมีชีวิต (*in vitro* condition) ต้องจัดสภาพแวดล้อมเลียนแบบให้คล้ายสภาพแวดล้อมจริงที่เซลล์เจริญอยู่ภายในสิ่งมีชีวิต โดยคำนึงถึงอุณหภูมิ ความเป็นกรดด่าง (pH) ความเข้มข้นของออกซิเจน ความเข้มข้นของคาร์บอนไดออกไซด์ และสารอาหาร ซึ่งสารละลายที่ให้สภาพแวดล้อมเหมาะสมต่อการเจริญของเซลล์ได้ก็คืออาหารเลี้ยงเซลล์ องค์ประกอบส่วนใหญ่ในอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นเกลืออนินทรีย์ มีความเข้มข้นของเกลือประมาณ 150 มิลลิโมลาร์ การมีเกลือเป็นองค์ประกอบจะช่วยในการคงสภาพของเยื่อหุ้มเซลล์ได้ นอกจากนี้เกลืออนินทรีย์ยังให้คุณสมบัติการเป็นบัฟเฟอร์ (buffer) ที่จัดการกับผลของคาร์บอนไดออกไซด์และกรดแลคติกที่เกิดจากกระบวนการเมตาโบลิซึมของเซลล์ได้ โดยอาหารที่มีโซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต ($NaHCO_3$) เป็นระบบบัฟเฟอร์ที่ต้องบ่มเลี้ยงเซลล์ในที่ที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ เพื่อให้ค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสมต่อการเจริญเติบโต (pH 6.9 ถึง 7.4) นอกจากนี้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ยังมีน้ำตาลและกลูตามีนเป็นแหล่งพลังงานและไนโตรเจน มีฟีนอลเรด (phenol red) เป็นตัวบอกค่าความเป็นกรดด่างของอาหารเลี้ยงเซลล์คือ ถ้ามีสีส้มหรือสีแดง (pH 7.0 ถึง 7.4) แสดงว่ามีค่าความเป็นกรดด่างเหมาะสม อาหารเลี้ยงเซลล์มีหลายชนิด ได้แก่ Dulbecco's Modified Eagle's Medium หรือ DMEM ซึ่งเหมาะต่อเซลล์ของสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม RPMI1640 เหมาะกับเซลล์ไฮบริโดมา (hybridoma cell) เป็นต้น (กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์, 2550)

2.1.5.2 สารเสริมในอาหารเลี้ยงเซลล์

สารเสริมในอาหารเลี้ยงเซลล์หรือซีรัม เป็นสารหรือน้ำเลือดที่มีองค์ประกอบต่าง ๆ มากมาย เช่น อัลบูมิน (albumin) โกลบูลลิน (globulin) สารส่งเสริมการเจริญ (growth promoter) และสารยับยั้งการเจริญเติบโต (growth inhibitor) เป็นต้น โดยจะมีองค์ประกอบและปริมาณมากน้อยเพียงใดขึ้นกับชนิดของสัตว์ อายุของสัตว์ อาหารและสุขภาพของสัตว์ที่นำมาใช้ในการผลิตซีรัม ซีรัมผลิตได้โดยการนำเลือดไปปั่นเหวี่ยงหรือปล่อยให้เลือดจับตัวกันเป็นก้อนแล้วค่อยนำไปปั่นเหวี่ยง แล้วจึงนำสารละลายส่วนใสหรือซีรัมมากรองกำจัด

จุลินทรีย์โดยผ่านตัวกรองขนาด 0.1 ไมโครเมตรเป็นอย่างน้อย และอาจผ่านกระบวนการอื่นเพิ่มเติม ซีรัมที่นิยมใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์คือ fetal bovine serum

2.1.5.3 phosphate buffer saline

phosphate buffer saline หรือ PBS เป็นสารละลายที่มีคุณสมบัติเป็นบัฟเฟอร์หรือมีค่าความเป็นกรดด่างเปลี่ยนแปลงเล็กน้อย และสามารถทำงานโดยไม่ใช้คาร์บอนไดออกไซด์ นอกจากนี้ยังให้ความดันออสโมติกที่เหมาะสมจึงทำให้เซลล์อยู่รอดได้ แต่ไม่สามารถให้เซลล์เจริญเพิ่มจำนวนเนื่องจากไม่มีสารอาหาร มักนิยมใช้ในการล้างเซลล์ และแช่เซลล์ในช่วงระยะเวลาสั้น ๆ

2.1.5.4 ทริปซิน (trypsin)

ทริปซินเป็นเอนไซม์ย่อยโปรตีนชนิดหนึ่งเรียกว่า pancreatic serine protease แต่มีชื่อทางการค้าว่าทริปซิน ใช้ในการแยกเซลล์หรือทำให้เซลล์หลุดจากผิวภาชนะโดยย่อยโปรตีนที่เป็นองค์ประกอบในการยึดเกาะของเซลล์กับพื้นผิวและสามารถย่อยเซลล์ได้ ดังนั้นจึงไม่ควรแช่เซลล์ไว้ในทริปซินนานเกินไปและควรหยุดปฏิกิริยาด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีจำนวนมากกว่า เพื่อเจือจางทริปซินให้มีความเข้มข้นน้อยลง เนื่องจากทริปซินเป็นเอนไซม์ชนิดหนึ่งจึงควรอยู่ในที่เย็นตลอดเวลาเพื่อไม่ให้หมดฤทธิ์เร็ว

2.1.5.5 trypan blue

trypan blue เป็นสีประเภทเดียวกับ safranin, eposin, congo red, erythrosin, nigrosin และ alcian blue ที่มีคุณสมบัติไม่ซึมผ่านเข้าเซลล์หากเซลล์เมมเบรนยังคงสภาพดี ดังนั้นการย้อมเซลล์โดยเทคนิคนี้จึงเรียกว่า dye exclusion method ซึ่งทำให้เซลล์มีชีวิตไม่ติดสี นิยมใช้ตรวจความมีชีวิตหรือการคงสภาพดีของเซลล์เมมเบรน สี trypan blue เป็นสีที่นิยมใช้แต่ก็เป็นสารอันตรายหากดื่มหรือหายใจเข้าไป สามารถก่อให้เกิดความระคายเคืองตา เป็นอันตรายต่อผิวหนัง และสามารถก่อมะเร็งกับสัตว์ทดลองได้ จึงควรใช้ด้วยความระมัดระวัง

2.1.5.6 สารละลาย MTT

สารละลาย MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) เป็นสารละลายสีเหลืองที่มีความไวต่อแสง และสามารถทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ไมโทคอนเดรียลดีไฮโดรจีเนส (mitochondrial dehydrogenase) ที่พบในเซลล์ที่มีชีวิตและมีปริมาณคงที่ ทำให้เกิดผลึกสีม่วงของ formazan ที่ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายใน dimethylsulfoxide หรือ DMSO ได้สารละลายที่มีสีม่วงและสามารถวัดค่าการดูดกลืนแสงได้ที่ 540-570 นาโนเมตร ซึ่งปริมาณฟอร์มาซานที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิต จึงนิยมใช้สารละลาย MTT ในการหาปริมาณของเซลล์ที่ยังมีชีวิต

2.1.6 เห็ด

เห็ด (mushroom) คือกลุ่มราที่มีเส้นใยซึ่งสามารถรวมตัวกันเกิดเป็นโครงสร้างหรือดอก (fruiting body) ขนาดใหญ่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าอันเป็นที่เกิดของเซลล์สืบพันธุ์หรือสปอร์ (spore) โครงสร้างหรือดอกนี้มีรูปร่างและลักษณะแตกต่างกันมากมายหลายแบบ เห็ดสามารถจัดจำแนกไว้ใน 2 ไฟลัม (phylum) คือ เบซิดิโอไมโคตา (basidiomycota) และแอสโคไมโคตา (ascomycota) แต่ส่วนใหญ่อยู่ในไฟลัมเบซิดิโอไมโคตา ซึ่งเป็นพวกที่สร้างสปอร์แบบอาศัยเพศ (sexual spore) ที่มีชื่อเรียกว่าเบซิดิโอสปอร์ (basidiospore) สปอร์ชนิดนี้เกิดอยู่ภายนอกโครงสร้างที่มีรูปร่างคล้ายกระบองเรียกว่า เบซิเดียม (basidium) และพบเห็ดบางชนิดในไฟลัมแอสโคไมโคตา ซึ่งมีสปอร์ที่เกิดแบบอาศัยเพศเรียกว่าแอสโคสปอร์ (ascospore) เกิดอยู่ภายในโครงสร้างรูปร่างคล้ายถุงเรียกว่าแอสคัส (ascus) ทั้งเบซิดิโอสปอร์ เบซิเดียม แอสโคสปอร์และแอสคัส มีขนาดเล็กมาก ต้องใช้กล้องจุลทรรศน์ส่องดูจึงจะมองเห็น ดอกเห็ดมีชีวิตอยู่ไม่นานก็ตาย แต่เส้นใยของเห็ดที่เจริญอยู่ในดิน เศษซากพืช ซากสัตว์ หรือในเซลล์ของสิ่งมีชีวิตต่าง ๆ เช่น พืช และแมลง สามารถมีชีวิตอยู่ได้นานเป็นปีหรือหลายปี และสามารถสร้างดอกเห็ดดอกใหม่ได้อีกเมื่อสภาพแวดล้อมเหมาะสม (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2551)

2.1.7 การแบ่งกลุ่มของเห็ดตามรูปร่างของที่ให้กำเนิดสปอร์ (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2551)

ส่วนที่ให้กำเนิดสปอร์ของดอกเห็ด มีรูปร่างหลายแบบและสามารถนำมาใช้ในการแบ่งเห็ดออกเป็นกลุ่มย่อย ๆ ได้ดังต่อไปนี้

1) กลุ่มเห็ดที่มีครีบ (agarics or gilled mushrooms) เป็นกลุ่มเห็ดที่มีหมวกดอกคล้ายร่ม ที่ด้านล่างของหมวกดอกเป็นครีบชัดเจนและเป็นที่เกิดของสปอร์ อาจจะมีก้านหรือไม่มีก้านก็ได้ พบได้ทั่วไปบนดิน ท่อนไม้ ใบไม้ผุหรือบนมูลสัตว์ เป็นเห็ดกลุ่มที่มีลักษณะพื้นฐานของเห็ดราขนาดใหญ่มากที่สุด
2) กลุ่มเห็ดมันปู (chanterelles) เป็นเห็ดที่มีหมวกดอกคล้ายแตรหรือแจกันปากบาน มีก้าน ผนังด้านนอกของหมวกดอกที่มีรูปร่างเป็นกรวยอาจจะเรียบหรือหยักย่นหรือเป็นร่องตื้น ๆ สปอร์เกิดอยู่บนผนังด้านนี้ พบขึ้นอยู่บนดิน
3) กลุ่มเห็ดตับเต่า (boletes) เป็นเห็ดที่มีหมวกดอกเนื้ออ่อนนิ่ม มีก้าน ด้านล่างของหมวกดอกมีลักษณะคล้ายฟองน้ำที่มีรูพรุน ชั้นที่มีรูนี้ถูกดึงแยกออกจากหมวกดอกได้โดยง่าย สปอร์เกิดอยู่ภายในรู พบขึ้นบนดิน
4) กลุ่มเห็ดหิ้ง (polypores and bracet fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีลักษณะคล้ายชั้นหิ้ง หรือพัด ไม่มีก้านหรือมีก้านเยื้องไปทางด้านใดด้านหนึ่งของหมวก หรือติดอยู่ทางด้านข้างของหมวก ส่วนใหญ่เนื้อเหนียวและแข็งคล้ายเนื้อไม้ ด้านล่างหรือด้านหลังของหมวกมีรูขนาดเล็กเรียงกันแน่นและภายในรูเป็นที่เกิดของสปอร์ ชั้นที่เป็นรูไม่สามารถแยกออกมาจากส่วนหมวกได้ ตามปกติขึ้นอยู่บนไม้แต่อาจพบขึ้นบนดินได้
5) กลุ่มเห็ดแผ่นหนัง (leather-bracket fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีรูปร่างคล้ายเครื่องหมายวงเล็บหรือคล้ายพัด ไม่มีก้าน มีลักษณะเป็นแผ่นบางเหนียว และมักเรียงซ้อนกันหรือขึ้นอยู่ติด ๆ กัน ด้านบนของหมวกมีสีอ่อนแก่สลับกันเป็นวงและบนผิวของหมวกอาจมีขนสั้น ๆ ด้านตรงข้ามซึ่งเป็นที่เกิดของสปอร์มีลักษณะเรียบหรือเป็นรอยนูนขึ้นลง บางชนิดขึ้นบนดิน บางชนิดขึ้นบนไม้
6) กลุ่มเห็ดหูหนู (jelly fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีรูปร่างหลายแบบ อาจเหมือนใบหูเนื้อบางคล้ายแผ่นยาง นิ่มและเป็นเมือก สปอร์เกิดอยู่ทางด้านที่มีรอยย่นหรือมีรอยเส้นแตกแขนง ขึ้นบนไปไม้ผุในที่ชื้น
7) กลุ่มเห็ดที่เป็นแผ่นแบนราบไปกับท่อนไม้ (crust and parchment fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีลักษณะเป็นแผ่นแข็งติดบนไม้ หรือมีขอบดอกโค้งงอออกจากท่อนไม้คล้ายหิ้ง เนื้อเหนียวและไม่เป็นเมือก ด้านที่อยู่ตรงข้ามกับท่อนไม้คือที่เกิดของสปอร์ อาจมีลักษณะเรียบ ย่นเป็นเส้นคดเคี้ยวหรือนูนเป็นปุ่ม
8) กลุ่มเห็ดฟันเลื่อย (tooth fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้อาจมีหมวกดอกและก้านหรือไม่มีก้านก็ได้ ด้านล่างของหมวกมีลักษณะคล้ายขี้เลื่อยหรือหนาม ทิ่มลง

หาพื้นดิน สปอร์เกิดอยู่ที่ซี่เลื่อยหรือหนามนี้ ดอกเห็ดอาจขึ้นจากดินหรือขึ้นบนไม้

9) กลุ่มเห็ดปะการัง และเห็ดกระบอง (coral and club fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีลักษณะตั้งตรง อาจแตกแขนงเป็นกิ่งก้านเล็ก ๆ หรือตั้งตรงและพองออกตอนปลายดูคล้ายกับกระบอง อยู่เดี่ยว ๆ หรือเป็นกลุ่ม สปอร์เกิดบนผนังด้านนอกของกระบองและตามกิ่งแขนง ขึ้นบนดินหรือบนไม้

10) กลุ่มเห็ดรูปร่มหุบ (gastroid agarics) ดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายกับร่มหุบ คือมีหมวกดอกและก้านอยู่ตรงกลางหมวก และหมวกอยู่ในลักษณะคุ่ม ไม่กางออกเนื่องจากขอบหมวกติดอยู่กับก้าน ภายใต้หมวกมีแผ่นเนื้อเยื่อที่แตกเป็นร่องแยกออกหลายแขนง มองดูคล้ายกับครีบที่บิดเบี้ยว เนื้อเยื่อส่วนนี้คือที่เกิดของสปอร์ ซึ่งจะเปลี่ยนไปเป็นฝุ่นผงทั้งหมดเมื่อดอกเห็ดแก่ สปอร์ออกสู่ภายนอกได้ต่อเมื่อหมวกดอกฉีกขาด มักพบเห็ดชนิดนี้บนดินในที่ร้อนและแห้งในทะเลทรายและบนภูเขาสูง

11) กลุ่มเห็ดลูกฝุ่นและเห็ดดาวดิน (puffballs and earthstars) ดอกเห็ดกลุ่มนี้เป็นรูปทรงกลม รูปไข่ หรือรูปคล้ายผลสาลี่ บางชนิดเมื่อดอกแก่ผนังชั้นนอกแตกและบานออกคล้ายกลีบดอกไม้ สปอร์เกิดอยู่ภายในส่วนที่เป็นทรงกลม เมื่ออ่อนผ่าดูเนื้อข้างในมีลักษณะหยุ่นและอ่อนนุ่ม เมื่อแก่มีลักษณะเป็นฝุ่นผง ดอกเห็ดอาจเกิดบนดินหรือบนไม้

12) กลุ่มเห็ดลูกฝุ่นก้านยาว (stalked puffballs) ดอกเห็ดกลุ่มนี้เป็นรูปทรงกลมคล้ายกับเห็ดลูกฝุ่น แต่มีก้านยาวชัดเจน ปลายก้านสิ้นสุดที่ฐานของรูปทรงกลมและสปอร์มีลักษณะเป็นฝุ่นผงเกิดอยู่ภายในรูปทรงกลม มักจะพบในทะเลทราย ในทราย หรือบนดินในที่รกร้าง

13) กลุ่มเห็ดรังนก (bird’s nest fungi) ดอกเห็ดกลุ่มนี้มีขนาดเล็ก ตามปกติเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 1 เซนติเมตร รูปร่างคล้ายรังนกและมีสิ่งที่มองแล้วคล้ายไข่ รูปร่างกลมแบนวางอยู่ในรัง ภายในไข่เต็มไปด้วยสปอร์ ดอกเห็ดนี้เมื่อยังอ่อนด้านบนของรังมีเนื้อเยื่อปิดหุ้ม พบขึ้นบนไม้ผุ

14) กลุ่มเห็ดเขาเหม็น (stinkhorns) ดอกเห็ดกลุ่มนี้เมื่ออ่อนจะมีรูปร่างคล้ายไข่ ต่อมาส่วนของก้านค่อย ๆ โผล่ดันเปลือกหุ้มจนแตกออก เปลือกไข่ส่วนล่างกลายเป็นถุงหรือถ้วยหุ้มโคนดอก ด้านบนส่วนปลายก้านอาจจะมีหมวกหรือไม่มี และมีสปอร์เป็นเมือกสีเข้มฉาบอยู่ ส่วนของก้านมีลักษณะพรุนและนิ่มมาก

อาจมีร่างแหปกคลุมก้านที่โผล่ออกมาจากเปลือก อาจจะแตกคล้ายหนวดปลาหมึก หรือพองเป็นช่องโปร่งคล้ายลูกตะกร้อ ดอกเห็ดมีกลิ่นเหม็นมาก ขึ้นบนดินที่มีซากพืชทับถมหนา

2.1.8 เห็ดในป่า

เห็ดที่เกิดขึ้นในระบบนิเวศป่าธรรมชาติและสวนป่า เราสามารถสำรวจเก็บตัวอย่างได้จากดิน ในน้ำ ในพืช ต้นไม้ที่ยืนต้นอยู่ ขอนไม้ ตอไม้ ซากกิ่งไม้ ใบไม้ มูลสัตว์และอินทรียวัตถุต่าง ๆ ที่มีชีวิตหรือไม่มีชีวิต เห็ดในป่าจะอยู่ใน 3 สภาพของวัตถุที่อาศัยคือ เห็ดแซบโปรไฟต์ (saprophyte) เห็ดกลุ่มนี้จะพบตามซากอินทรียวัตถุที่ตายแล้ว (dead organic matters) เช่น ใบไม้ หญ้า กิ่งก้าน ไม้ซุง ตอไม้ ผลไม้ เมล็ดไม้ มูลสัตว์ อาจจะพบดอกเห็ดที่ยังมีชีวิตอยู่หรือดอกเห็ดที่ตายแล้วก็ได้ เห็ดประเภทนี้สามารถสำรวจได้ทุกฤดู เห็ดพาราไซต์ (parasite) เห็ดกลุ่มนี้มักจะเป็นเห็ดที่ชอบทำลายต้นไม้ทั้งที่ยังยืนต้นอยู่หรือที่ตายไปแล้วซึ่งสามารถสำรวจได้ทุกฤดู และเห็ดไมคอร์ไรซา (mycorrhizal mushroom) เป็นกลุ่มเห็ดที่มีเส้นใยเจริญอยู่กับรากของพืชชั้นสูงที่มีชีวิตในแบบพึ่งพาอาศัยซึ่งกันและกัน กล่าวคือ เห็ดกลุ่มนี้จะได้รับสารอาหารพวกคาร์โบไฮเดรตที่พืชสังเคราะห์ขึ้นมาใช้ในการเติบโต ส่วนพืชได้รับธาตุอาหารต่าง ๆ และน้ำที่เส้นใยของเห็ดดูดขึ้นมาจากดิน แล้วส่งผ่านมายังเซลล์พืช ความเป็นอยู่แบบนี้ช่วยให้ทั้งเห็ดและพืชเจริญเติบโตได้ดีขึ้น โดยเฉพาะพืชจะมีความแข็งแรงและทนทานต่อสภาพแวดล้อมที่ไม่เหมาะสมสูงกว่าปกติ เห็ดทั้ง 3 ประเภทนี้มีทั้งที่กินได้ ไม่มีข้อมูลว่ากินได้หรือไม่ได้ และเป็นพิษ โดยความเป็นพิษต่อคนที่กินเข้าไปมีอยู่หลายระดับ ตั้งแต่มีพิษอย่างอ่อน เช่น ท้องเสีย อาเจียน ประสาทหลอน เป็นต้น จนถึงขั้นเสียชีวิต เห็ดบางชนิดนอกจากรับประทานได้แล้วยังมีคุณสมบัติเป็นยารักษาโรคอีกด้วย (อนงค์ จันทร์ศรีกุล, 2551)

2.1.9 สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่ได้จากเห็ดกับการรักษาโรคมะเร็ง

ประเทศในภูมิภาคเอเชียโดยเฉพาะจีนกับญี่ปุ่น ได้มีการศึกษาและนำเห็ดหลายสายพันธุ์ ได้แก่ *Ganoderma lucidum*, *Lentinus edodes* และ *Tremella fuciformis* เป็นต้น มาใช้ในการรักษาโรคมะเร็งร่วมกับวิธีการทางเคมีบำบัด โดยใช้สารสกัดที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพหลายชนิดที่พบได้ในเห็ดเหล่านั้น ได้แก่ พอลิแซ็กคาไรด์ (polysaccharides) ไกลโคโปรตีน (glycoproteins) โปรติโอไกลแคน (proteoglycans) โปรตีน (proteins) และเลคติน (lectin)

เป็นต้น สารเหล่านี้สามารถพบได้ทั้งในดอกเห็ด เส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดและสปอร์ ในปัจจุบันพบว่าสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นสารที่นิยมนำมาใช้ในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (antitumor) และช่วยกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วย (immunomodulating properties) ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocytes) เซลล์มาโครฟาจ (macrophages) เป็นต้น ให้สูงขึ้น นอกจากนี้ยังพบอีกว่าสารดังกล่าวมักจะไม่มีผลข้างเคียงและเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ (Zhang et al., 2007)

2.1.10 พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด

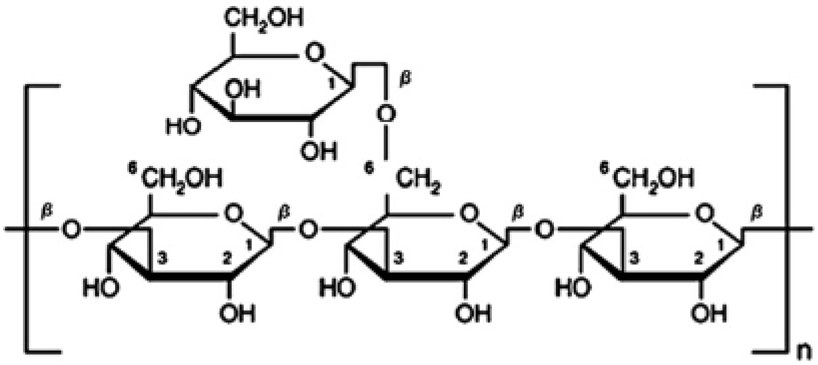
พอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเป็นสารที่ประกอบขึ้นจากน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharides) หลายชนิด และยึดติดกันด้วยพันธะไกลโคซิดิก (glycosidic linkages) พบได้บนผนังเซลล์ของเห็ดเป็นส่วนใหญ่ มีทั้งที่สามารถละลายน้ำได้และละลายไม่ได้ โดยพวกที่สามารถละลายน้ำได้มักจะเป็นองค์ประกอบที่จับตัวกันเป็นโครงสร้างภายนอกที่สัมผัสกับสิ่งต่าง ๆ สามารถสกัดออกมาได้ง่ายกว่าพวกที่ไม่ละลายน้ำ ซึ่งเป็นโครงสร้างที่จับตัวกันอยู่ภายใน (Wessels and Sietsman, 1979) น้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบมากและเป็นโครงสร้างหลักของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบในเห็ดคือกลูโคส โดยจะต่อกันเป็นเส้นตรงสายยาวสลับกันไปมาที่เรียกว่า เบต้า-กลูแคน (β-Glucans) (ภาพที่ 2.3) จากนั้นจะมีน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวชนิดอื่น ๆ เช่น กาแลคโทส (galactose) แมนโนส (mannose) อะราบิโนส (arabinose) และไซโลส (xylose) เป็นต้น มาต่อเป็นกิ่งก้านสาขาไม่มีที่สิ้นสุด เรียกว่าเฮทเทอโรกลูแคน (heteroglucans) ซึ่งพบได้หลายรูปแบบแล้วแต่ชนิดของเห็ดดังแสดงในตารางที่ 2.1 นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์บางชนิดที่พบก็จับตัวกับโปรตีน เรียกสารประกอบพวกนี้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์-โปรตีนคอมเพล็กซ์ (polysaccharide-protein complex) ความหลากหลายของโครงสร้างเหล่านี้ยังส่งผลต่อฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งด้วย (Wasser, 2002) ปัจจุบันมีการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและนำมาใช้ในการรักษามะเร็งแล้วหลายชนิด ดังต่อไปนี้

1) เลนติแนน (lentinan) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากเห็ดกลุ่มกินได้สายพันธุ์ *Lentinus edodes* มีโครงสร้างเป็นเบต้า (1,3) กลูแคนหรือเบต้า (1,6) กลูแคนก็ได้ โดยพบเป็นครั้งแรกว่ามีประสิทธิภาพในการต้านเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 ที่ปลูกถ่ายเข้าไปใน Swiss albino mice (Chihara et al., 1970) นอกจากนี้ยังเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดแรกที่พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งและได้มีการนำมาใช้ร่วมกับวิธีเคมีบำบัดอย่างแพร่หลายในประเทศญี่ปุ่น โดยมีการนำเลนติแนนไปใช้

ร่วมกับยาในกลุ่ม tegafur เพื่อรักษามะเร็งกระเพาะและมะเร็งลำไส้ พบว่าผู้ป่วย 19.5 เปอร์เซ็นต์มีอายุยืนขึ้นมากกว่า 1 ปี 10.4 เปอร์เซ็นต์ มีอายุยืนขึ้นมากกว่า 2 ปี และ 6.5 เปอร์เซ็นต์ มีอายุยืนขึ้นมากกว่า 3 ปี อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Furue et al., 1981 และ Taguchi et al., 1985) และยังพบอีกว่าช่วยลดอาการบางอย่างที่เกิดจากผลข้างเคียงของยาได้อีกด้วย เช่น อาการผมร่วง เป็นต้น

2) Active Hexose Correlated Compound (AHCC) เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดออกมาจากอาหารเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดหลายสายพันธุ์รวมกัน รวมไปถึงเส้นใยบริสุทธิ์ของ *Lentinus edodes* ด้วย พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ได้มีการนำมาใช้ในการรักษามะเร็งเป็นครั้งแรกในปี 1992 โดยสามารถลดการเจริญของมะเร็งตับหลังจากการผ่าตัด 1 ปีได้อย่างมีประสิทธิภาพและมีนัยสำคัญ เทียบกับผู้ป่วยที่ไม่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ (Kamiyama, 1992) ปัจจุบันมีการตั้งศูนย์วิจัยสำหรับสร้างพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้ในประเทศญี่ปุ่น เพราะนักวิทยาศาสตร์เชื่อว่าการผสมผสานของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดนี้จะทำให้สามารถรักษามะเร็งได้อีกหลายชนิด

3) Grifan-D เป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากกลุ่มเห็ดกินได้สายพันธุ์ *Grifola frondosa* ซึ่งสามารถสกัดได้ง่ายและมีความบริสุทธิ์สูงมาก โดยนำมาทดสอบครั้งแรกกับเซลล์มะเร็งตับที่ถ่ายเข้าไปในหนูไมซ์ และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และได้มีการนำมาใช้ในการรักษาร่วมกับวิธีทางเคมีบำบัดอย่างแพร่หลายในประเทศจีนและสหรัฐอเมริกา (Nanba, 1995)



ภาพที่ 2.3 โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้า-กลูแคน (Moradali et al., 2007)

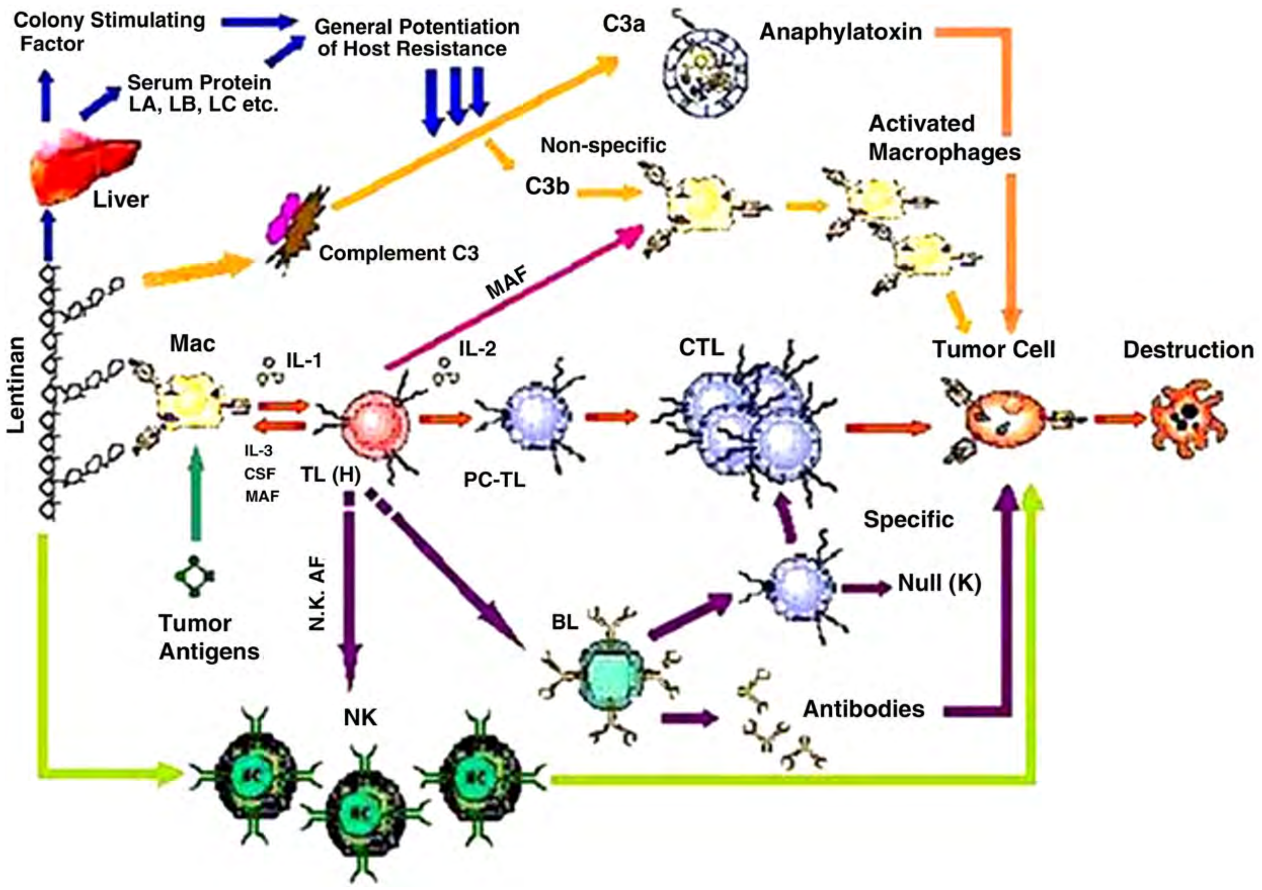
ตารางที่ 2.1 สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบได้ในเห็ดชนิดต่าง ๆ

ชนิดของเห็ด	ลักษณะของพอลิแซ็กคาไรด์ที่พบ	รายการอ้างอิง
Polyporus confluens	Xyloglucan	Mizuno, 1999
Ganoderma tsugae	Arabinoglucan	Zhuang et al., 1994
Ganoderma lucidum	β-(1,3)-glucuronoglucan, Mannogalactoglucan	Cho, 1999
Grifola frondosa	Mannoxyloglucan, Xyloglucan	Zhuang et al., 1994
Agaricus blazei	Mannogalactoglucan, Riboglucan	Cho, 1999

2.1.11 กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง

กลไกการทำงานของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดต่อการต้านเซลล์มะเร็งมีอยู่ด้วยกัน 3 รูปแบบหลัก ๆ ได้แก่ กระตุ้นการสร้างสารบางชนิดที่ใช้ในการป้องกันการบุกรุกของเซลล์มะเร็ง (cancer preventing activity) สำหรับกลไกการทำงานรูปแบบนี้มีการทำการทดลองในหนูไมซ์ โดยให้อาหารที่มีส่วนผสมของพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบแล้วทำการถ่ายเซลล์มะเร็งตับเข้าไปในตัวหนู พบว่าหนูที่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์ก่อนทำการถ่ายเซลล์มะเร็ง เป็นมะเร็งน้อยลงกว่าหนูที่ไม่ได้รับพอลิแซ็กคาไรด์มาก่อน แต่กลไกการทำงานรูปแบบนี้ยังหาข้อพิสูจน์ได้ค่อนข้างยาก (Ikekawa, 2001) แบบที่ 2 คือการกระตุ้นการสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สูงขึ้น (immuno enhancing activity) เป็นกลไกที่พอลิแซ็กคาไรด์ไปกระตุ้นการทำงานของพวกเซลล์เม็ดเลือดขาวหรือเอนไซม์ต่าง ๆ ที่มีส่วนเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งปัจจุบันเป็นกลไกที่ได้รับการยอมรับและพิสูจน์ได้ โดยทำการถ่ายเซลล์มะเร็งเข้าไปในตัวหนูไมซ์ไร้ขน แล้วตามด้วยสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ พบว่าหากหนูได้รับพอลิแซ็กคาไรด์หลังจากได้รับเซลล์มะเร็งแล้วจะไม่สามารถยับยั้งการเกิดเซลล์มะเร็งได้เลย (Maeda และ Chihara, 1971) สำหรับพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีกลไกการทำงานรูปแบบนี้ที่ได้รับการศึกษาและพิสูจน์มาแล้วเป็นจำนวนมากคือ เลนติแนน โดยเลนติแนนจะไปกระตุ้นการทำงานของ tumor necrosis factor (TNFα), interleukin-1, interleukin-3, interferon (ITF), Natural Killer cell และ cytotoxic T lymphocytes ให้มีจำนวนมากขึ้นและเข้าทำลายเซลล์มะเร็งได้ดีขึ้น (ภาพที่ 2.4) และรูปแบบสุดท้ายคือการเข้าไปทำลายเซลล์มะเร็งโดยตรงของพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งนักวิทยาศาสตร์อธิบายไว้ว่าบนเซลล์มะเร็งน่าจะมีตัวรับบนเซลล์ (receptor) ที่มีความเฉพาะเจาะจงกับพอลิแซ็กคาไรด์

เมื่อพอลิแซ็กคาไรด์ที่มีความจำเพาะเจาะจงกับตัวรับ ไปจับกับตัวรับที่ผิวเซลล์ อาจจะไปมีผลต่อเนื่องกระตุ้นให้เกิดการตายของเซลล์ในกระบวนการเจริญปกติ (apoptosis) กลไกรูปแบบนี้เป็นกลไกที่นักวิทยาศาสตร์ต้องการมากที่สุด แต่ก็ยังพิสูจน์ได้ไม่ชัดเจนเช่นกัน



ภาพที่ 2.4 กลไกการทำงานแบบกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายของเลนติแนน (Moradali et al., 2007)

2.2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

Miyasaki et al. (1995) ได้ทำการรักษาผู้ป่วยที่เป็นมะเร็งปากมดลูกจำนวน 90 คน โดยวิธีรังสีรักษาและ 82 คน โดยวิธีรังสีรักษาร่วมกับการให้สาร schizophyllan ซึ่งเป็นพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดจากอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดสายพันธุ์ *Schizophyllum commune* เป็นเวลา 5 ปี และทำการวัดจำนวน T-lymphocyte ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ชนิดหนึ่ง พบว่าผู้ป่วยที่รักษาโดยวิธีรังสีรักษาร่วมกับการให้สาร schizophyllan มีจำนวนของ T-lymphocyte สูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเทียบกับผู้ป่วยที่รักษาด้วยวิธีรังสีรักษาเพียงอย่างเดียว

ปริญญา รัตนะพิมาน (2535) ได้ทำการผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งจากเห็ดหมื่นปี [*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst] โดยนำเส้นใยหรือดอกเห็ดมาสกัดด้วยน้ำร้อน ตกตะกอนด้วยเอธานอล แล้วนำไปผ่านคอลัมน์โครมาโทกราฟี ได้สารพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งนำไปทดสอบการออกฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งปากมดลูกของมนุษย์ที่ถูกปลูกถ่ายในหนูไมซ์ไร้ขน พบว่าสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากทั้งเส้นใยหรือดอกเห็ดมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งดังกล่าวในหนูสูงมาก และเมื่อทดสอบความเป็นพิษของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้โดยการฉีดให้แก่หนูไมซ์ไร้ขน พบว่าน้ำหนักตัวของหนูไมซ์ไร้ขนไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง 90 วัน

Chung et al. (2001) ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากเห็ดสายพันธุ์ *Ganoderma lucidum* กับเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่มีความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าเซลล์มะเร็งปอดมีเปอร์เซ็นต์การอยู่รอดที่ 24.04 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการบ่มสารสกัดดังกล่าวกับ human T cell line (H9) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย พบว่าสามารถเพิ่มจำนวนเซลล์ดังกล่าวได้จาก 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 400,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในเวลา 4 วัน นับเป็นข้อสนับสนุนทางอ้อมว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดสายพันธุ์ *G. lucidum* ช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด และทดสอบสารสกัดหยาบจาก *G. lucidum* ต่อเซลล์ปอดปกติของมนุษย์ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์การอยู่รอดของเซลล์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์แสดงว่าสารสกัดหยาบจาก *G. lucidum* มีผลเพียงเล็กน้อยต่อเซลล์ปกติ

Lavi et al. (2006) ได้มีการนำอาหารเหลวที่ใช้ในการเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดสายพันธุ์ *Pleurotus ostreatus* มาทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยเอธานอล 80 เปอร์เซ็นต์ที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียสและระเหยเอาเอธานอลออกด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ นำตะกอนที่ได้ไปสกัดต่อด้วยน้ำร้อนและแยกส่วนที่เป็นน้ำมาทำให้แห้งด้วยวิธี lyophilization จากนั้นนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค ^{13}C NMR พบว่าได้พอลิแซ็กคาไรด์ชนิดแอลฟา-กลูแคน (α-glucan) ซึ่งเมื่อนำไปทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลำไส้ (HT-29 colon cancer cells) พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์เท่ากับ 20 เปอร์เซ็นต์ และนำเซลล์ที่ถูกบ่มด้วยพอลิ

แซ็กคาไรด์ดังกล่าวอีกชุดหนึ่งไปทำการวัดปริมาณ Annexin-positive cells ซึ่งเป็นสารที่ทำหน้าที่กระตุ้น Bax และ cytosolic cytochrome-c ที่ทำหน้าที่ชักนำให้เกิดการตายของเซลล์ในการเจริญปกติ พบว่ามีปริมาณสูงขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ

Nie et al. (2006) ทำการแยกสารพอลิแซ็กคาไรด์ที่ไม่ละลายน้ำชนิดกลูแคนซัลเฟต (glucan-sulfate) จากเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดสายพันธุ์ *Grifola frondosa* ซึ่งมีมวลโมเลกุล 28 กิโลดาลตัน และมีซัลเฟอร์เป็นองค์ประกอบ 16.4 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งกระเพาะ (SGC-7901) พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และเมื่อนำไปทดสอบกับเซลล์มะเร็ง sarcoma 180 และเซลล์มาโครฟาจ (macrophage) ซึ่งเป็นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกถ่ายเข้าไปใน Kunming mice พบว่ามีการกระตุ้นการสร้างเซลล์ดังกล่าวมากขึ้น

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.1 เซลล์ที่ใช้ในงานวิจัย

เซลล์	แหล่งที่มา
เซลล์ตับปกติ (CH-LIVER) ATCC No: HB 8065 เซลล์มะเร็งปอด (CHAGO)	สถาบันเทคโนโลยีชีวภาพและ วิศวกรรมพันธุศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เครื่องมือ วัสดุและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

ตารางที่ 3.2 เครื่องมือและอุปกรณ์ที่ใช้ในงานวิจัย

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
กระบอกฉีดยาขนาด 10 และ 20 มิลลิลิตร	Terumo, Japan
กระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.2 ไมโครเมตร	Millipore Corporation, USA
กระดาษกรองเบอร์หนึ่ง	Whatman, England
กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ชนิดหัวกลับ	Olympus, Japan
กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง	Olympus, Japan
ขวดรูปชมพู่ขนาด 250 และ 1000 มิลลิลิตร	Pyrex, USA
ขวดเลี้ยงเซลล์ขนาด 25 และ 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร	SPL, Korea
เครื่องกรองสุญญากาศ	Gast Manufacturing, Inc., USA
เครื่องบด	Philips, Netherland
เครื่องปั่นเหวี่ยง	Kokusan, Japan
เครื่องผสมด้วยแรงหมุน (Vortex)	Scientific Industries, Inc., USA
เครื่องระเหยสุญญากาศ	Eyela, Japan
เครื่องสกัดสาร Soxhlet	Sac sci, Thailand
เครื่องวัดค่าการดูดกลืนแสง	Unico, Spain
เครื่อง Microplate reader	Met, USA

เครื่องมือและอุปกรณ์	แหล่งที่มา
เครื่อง Plate mixer	IKA, Germany
เครื่อง Vivaflow 50	Sartorius Stedim Biotech, Germany
จานเพาะเชื้อพลาสติกแบบปลอดเชื้อ	SPL, Korea
ชุดกรองสารสำเร็จรูปแบบปลอดเชื้อที่มีรูขนาด 0.2 ไมโครเมตร	Sartorius Stedim Biotech, Germany
ตู้ดูดควัน	Astec, USA
ตู้นึ่งฆ่าเชื้อ	Gammy Industrial Corp., Taiwan
ตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์	Forma Scientific, USA
ตู้ปลอดเชื้อ (Laminar flow hood)	ISSCO, Thailand
ตู้อบ	Memmert, Germany
ถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม	SPL, Korea
ปิเปตไฟฟ้า	IBS, Switzerland
ปิเปตอัตโนมัติ	Gilson, France
ปิเปตอัตโนมัติชนิดหลายช่อง	Genex, Finland
หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 15 และ 50 มิลลิลิตร	SPL, Korea
อ่างควบคุมอุณหภูมิ	Forma Scientific, USA
Hemacytometer	Boeco, Germany
Peristatic pump	Cole-Parmer, Malaysia

3.3 **สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย**

ตารางที่ 3.3 สารเคมีที่ใช้ในงานวิจัย

สารเคมี	แหล่งที่มา
Acetone	Fisher chemicals, UK
Anthrone (9, 10 – dihydro – 9 – oxoanthracene)	Fluka, India
Chloral hydrate	Unilab, Australia
DEAE-cellulose	Sigma, USA

สารเคมี	แหล่งที่มา
Dextrose	Sigma, Germany
D-glucose	Sigma, Germany
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	Scharlau, Spain
Di-sodium hydrogen phosphate (Na_2HPO_4)	Merck, Germany
DMEM	Gibco, UK
Ethanol 95%	Merck, Germany
Fetal bovine serum	Gibco, UK
Glycine	Univar, Australia
Hydrochloric acid (HCl)	Merck, Germany
Iodine (Crystals)	Gammaco, Thailand
MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)	Ameresco, USA
Penicillin-streptomycin	Gibco, UK
Potassium chloride (KCl)	Univar, Australia
Potassium iodine (KI)	Analar, England
Potassium dihydrogen phosphate (KH_2PO_4)	Merck, Germany
Rose Bengal	Fisher, USA
Sephadex G-100	Pharmacia, Sweden
Sodium chloride (NaCl)	Merck, Germany
Sodium hydrogen carbonate ($NaHCO_3$)	Unilab, Australia
Sodium hydroxide (NaOH)	Merck, Germany
Sulfuric acid 96-98%	Merck, Germany
Trypan Blue	Sigma, USA
Trypsin 0.25%	Gibco, UK

3.4 วิธีดำเนินงานวิจัย

3.4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย

ทำการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากแหล่งธรรมชาติพื้นที่ต่าง ๆ จากบางจังหวัดในประเทศไทย ในการศึกษานี้ ทำการเก็บตัวอย่างเห็ดตั้งแต่เดือนพฤษภาคม ถึงเดือนตุลาคม พ.ศ. 2551 ซึ่งเป็นช่วงฤดูฝนและมีโอกาสพบเห็ดได้ง่ายกว่าช่วงฤดูอื่น โดยเก็บตัวอย่างเห็ดทั้งที่เป็นดอกตูมและดอกที่บานแล้ว ซึ่งเจริญอยู่ในบริเวณต่าง ๆ เช่น บนพื้นดิน ใต้ดิน บนกิ่งไม้ ใบไม้ ท่อนไม้ ขอนไม้ ต้นไม้ยืนต้นที่มีชีวิตหรือตายแล้ว หรือบนมูลสัตว์ ซากสัตว์ เป็นต้น โดยแยกเห็ดที่รวบรวมได้ใส่ภาชนะให้แต่ละตัวอย่างไม่ปะปนกัน จากนั้นจึงนำตัวอย่างเห็ดที่ได้มาทำการแบ่งกลุ่มและเก็บรักษา

3.4.2 การจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา (morphology)

3.4.2.1 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอก (macrostructure)

นำดอกเห็ดมาทำการแบ่งกลุ่มหรือจัดจำแนกโดยทำการศึกษา จดบันทึกและถ่ายภาพลักษณะภายนอกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่า ได้แก่ ลักษณะของหมวกดอก (cap) ขนาดความกว้างความยาวของหมวกดอก ขนาดความกว้างความยาวของก้านดอก (stalk, stem) การมีอยู่ของปลอกก้านดอก (valva) และห่วง (ring, annulus) สีของดอกเทียบกับตารางเทียบสีมาตรฐาน การเปลี่ยนสีของเนื้อเยื่อบางชนิดของเห็ดเมื่อถูกทำให้เกิดแผล กลิ่นหรือรสชาติของเห็ด (odor and taste) ลักษณะของครีบและรูพรุน (gill, pores) เช่น ความถี่หรือความห่างของครีบ การเรียงตัวของครีบ เป็นต้น

3.4.2.2 การตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใน (microstructure)

ใช้ใบมีดโกนที่คมตัดหมวกดอกเห็ดทางด้านแนวดิ่ง (vertically) หรือด้านตัด (cross หรือ X-section) และด้านขนาน (horizontally) กับดอกเห็ดให้เป็นชิ้นบาง วางบนสไลด์ที่ mount ด้วยน้ำกลั่น (distilled water) หนึ่งข้าง อีกหนึ่งข้าง mount ด้วยน้ำยา Melzer’s

ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (cover glass) นำไปตรวจสอบใต้กล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสง (compound light microscope) เพื่อตรวจสอบและเปรียบเทียบลักษณะภายในของเนื้อเยื่อ (texture) ฐานสร้างสปอร์ (basidia) รูปร่างและลักษณะสปอร์ (spores) เป็นต้น

นำลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่ได้มาทำการเปรียบเทียบกับเอกสารที่เกี่ยวข้องกับลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ด เช่น Diversity of Mushroom and Macrofungi in Thailand ของอนงค์ จันทร์ศรีกุลและคณะ (2008), เห็ดในประเทศไทย ของอนงค์ จันทร์ศรีกุล และคณะ (2551) เป็นต้น

3.4.3 การคัดเลือกและเตรียมดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งเพื่อการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

3.4.3.1 การคัดเลือกตัวอย่างเห็ดบางสายพันธุ์มาทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

คัดเลือกตัวอย่างเห็ดบางสายพันธุ์หลังจากทำการแบ่งกลุ่มหรือจัดจำแนกโดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา และตรวจสอบข้อมูลจากเอกสารที่เกี่ยวข้องแล้ว พบว่ามีการศึกษาไม่มากนักในประเทศไทย มาทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์อย่างน้อย 10 ชนิด

3.4.3.2 การเตรียมดอกเห็ดอบแห้ง (dry specimen)

นำดอกเห็ดมาทำการอบแห้ง (drying) ในตู้อบ (oven) ที่อุณหภูมิประมาณ 50-60 องศาเซลเซียส นานประมาณ 48 ชั่วโมง ถึง 1 สัปดาห์ แล้วแต่ชนิดของเห็ด หลังจากนั้นเก็บดอกเห็ดอบแห้งไว้ในกล่องพลาสติกหรือกล่องกระดาษหรือถุงกระดาษแล้วแต่กรณี

3.4.3.3 การแยกเส้นใยบริสุทธิ์ (pure culture)

นำดอกเห็ดมาเช็ดผิวด้านนอกด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ (ethanol 70%) ในตู้ถ่ายเชื้อ (laminar flow) ใช้มีดผ่าตัดที่ทำความสะอาดด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์และ

ผ่านการลนไฟแล้ว เฉือนเนื้อเยื่อด้านใน ตัดเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาด 2 ถึง 3 มิลลิเมตร นำมาวางบนจานเพาะเชื้อ (petri dish) ที่มีอาหาร Potato Dextrose Agar (PDA) หรือ PDA ผสม Rose Bengal 0.01% (W/V) (ภาคผนวก ข) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) ที่ 5.5-6.5 บ่มที่อุณหภูมิห้อง (30±2 องศาเซลเซียส) ประมาณ 3 ถึง 5 วัน จะเห็นเส้นใยของเห็ดเจริญออกมาจากชิ้นเนื้อเยื่อ ในแต่ละวันสังเกตว่ามีการปนเปื้อนจากเชื้ออื่นหรือไม่ ถ้ามีการปนเปื้อนควรย้ายชิ้นเนื้อเยื่อเห็ดลงในอาหารใหม่ (subculture)

3.4.3.4 การเตรียมเส้นใยบริสุทธิ์ก่อนนำไปทำการสกัด

เตรียมอาหารเลี้ยงเชื้อ Potato Dextrose Broth (PDB) (ภาคผนวก ข) ที่มีค่าความเป็นกรดด่าง 5±0.2 จำนวน 100 มิลลิลิตรใส่ในขวดทดลองรูปชมพู่ (erlenmeyer flask) ขนาด 250 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว อบฆ่าเชื้อ PDB ที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว เป็นเวลา 20 นาที ทิ้งให้เย็น นำเส้นใยบริสุทธิ์ที่อยู่ในจานเพาะเชื้อมาเจาะเป็นวงกลมด้วย cork border ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร จำนวน 10 ชิ้นใส่ลงใน PDB เลี้ยงเส้นใยเห็ดในสภาพนิ่ง (stationary culture) บ่มเชื้อเห็ดใน PDB ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 25 ถึง 30 วัน จึงนำเส้นใยเห็ดที่เจริญออกจาก PDB ในขวดเลี้ยงมาล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ถึง 3 ครั้ง หรือจนกว่าคราบอาหารเลี้ยงหมด หรือให้มีคราบอาหารเลี้ยงติดอยู่น้อยที่สุดเท่าที่จะเป็นได้ นำเส้นใยที่ได้ไปอบแห้งที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และเก็บไว้เพื่อนำไปทำการสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์ต่อไป

3.4.4 การสกัดสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง

ทำการบดเส้นใยหรือดอกเห็ดที่อบแห้งแล้วด้วยเครื่องบด (blender) นำไปสกัดด้วยน้ำร้อน ในอัตราส่วนเส้นใยหรือดอกเห็ด 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ด้วยเครื่องสกัดสาร soxhlet จากนั้นนำสารสกัดหยาบจากเห็ดที่ได้กรองผ่านกระดาษกรองเบอร์หนึ่ง โดยใช้เครื่องกรองสุญญากาศ (vacuum pump) เพื่อแยกส่วนผงละเอียดออกเป็นจำนวน 5 ครั้ง นำของเหลวที่กรองได้มาทำการกรองละเอียดอีกครั้งโดยใช้กระดาษกรองที่มีรูขนาด 0.2 ไมโครเมตร สารสกัดหยาบที่ได้จะนำไปทำการหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test และทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งต่อไป

3.4.5 การหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test

เตรียมสารละลายอันโทรน (anthrone) โดยชั่งสารอันโทรน 0.2 กรัม ละลายในกรดซัลฟูริกเข้มข้น 96 ถึง 98 เปอร์เซ็นต์ (conc.H_2SO_4 96-98%) จำนวน 100 มิลลิลิตร เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากันทิ้งไว้เป็นเวลา 30 นาที จึงนำมาใช้ทดสอบหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ โดยผสมสารสกัดหยาบจากเห็ดที่ต้องการทดสอบ 0.5 มิลลิลิตรให้เข้ากันดีกับสารละลายอันโทรน 2.5 มิลลิลิตร สังเกตการเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้นภายใน 5 นาที หากในสารสกัดมีพอลิแซ็กคาไรด์อยู่สีของสารละลายจะเปลี่ยนเป็นสีเขียว หรือสีเขียวแกมน้ำเงิน นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร ทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด โดยเทียบจากกราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ภาคผนวก ก)

3.4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็ง

3.4.6.1 การเลี้ยงเซลล์มะเร็ง

เพาะเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดในขวดเลี้ยงเซลล์ (tissue culture flasks หรือ T-flasks) ขนาด 75 ลูกบาศก์เซนติเมตร ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ Dulbecco's Modified Eagles' Medium (DMEM) ที่มีซีรัม (fetal bovine serum) 10 เปอร์เซ็นต์ และยาปฏิชีวนะ penicillin-streptomycin 0.01 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำไปบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ (CO_2 incubator) ซึ่งควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น เปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 ถึง 3 วันหรือเมื่อเซลล์มีจำนวนมากเกินไป

3.4.6.2 การทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวขวดเลี้ยงเซลล์โดยใช้เอนไซม์ทริปซิน (trypsinization)

นำเซลล์ในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีการเจริญเติบโตดีหรือมีเซลล์เกือบเต็มพื้นผิวด้านในของขวดเลี้ยงเซลล์ มาดูดอาหารเลี้ยงเก่าออก ล้างอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ยังตกค้างอยู่โดยใช้ phosphate buffered saline (PBS) 2 มิลลิลิตร ดูด PBS ออก เติมเอนไซม์ทริปซิน 0.25

เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 มิลลิลิตร หรือใช้ปริมาตรที่มากพอที่คลุมเซลล์ที่เกาะพื้นผิวได้อย่างทั่วถึง เพื่อทำให้เซลล์หลุดจากพื้นผิวด้านในของขวดเลี้ยง ติดตามการหลุดของเซลล์โดยใช้กล้องจุลทรรศน์ phase contrast ชนิดหัวกลับ (inverted phase contrast microscope) ในเวลา 2 ถึง 5 นาที สามารถสังเกตเห็นการหลุดของเซลล์จากพื้นผิวของขวดเลี้ยงได้ เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ (DMEM) ในปริมาตร 1 ถึง 2 เท่าของปริมาตรเอนไซม์ทริปซินที่ใช้เพื่อหยุดปฏิกิริยาของเอนไซม์ทริปซิน ดูดของเหลวทั้งหมดออกจากขวดเลี้ยงเซลล์ใส่ในหลอดปั่นเหวี่ยง (centrifuge tube) ขนาด 25 มิลลิลิตร นำไปปั่นที่ 2000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาที เพื่อตกตะกอนเซลล์ นำหลอดปั่นเหวี่ยงที่เซลล์ตกตะกอนแล้ว มาเทส่วนที่เป็นส่วนใสทิ้ง จากนั้นทำให้เซลล์ที่อยู่ในหลอดปั่นเหวี่ยงที่ตกตะกอนเป็นก้อนด้านล่างมาทำให้เซลล์กระจายตัว โดยเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ใหม่ให้เท่ากับปริมาตรก่อนที่จะทำการปั่นเหวี่ยง ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเบา ๆ ประมาณ 10 ครั้ง ให้เซลล์กระจายตัวทั่วอาหารเลี้ยงเซลล์ที่ใส่เข้าไปใหม่ (resuspend) ถ้าต้องการเพิ่มจำนวนเซลล์หรือเลี้ยงเซลล์ต่อเนื่อง (subculture) สามารถถ่ายเซลล์ไปยังภาชนะเลี้ยงเซลล์ขวดใหม่โดยปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม แต่หากต้องการจะทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดต่อการต้านเซลล์มะเร็ง ทำได้โดยคำนวณหาจำนวนเซลล์ที่มีอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ทั้งหมด โดยการนำเซลล์แขวนลอย (cell suspension) มานับจำนวนเซลล์โดยใช้ hemacytometer เพื่อคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์หรือจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร (เซลล์ต่อมิลลิลิตร) จากนั้นเจือจางเซลล์แขวนลอยให้ได้ความเข้มข้นและปริมาตรของเซลล์ตามต้องการแล้วจึงนำไปทดสอบต่อไป

3.4.6.3 การนับจำนวนเซลล์เพื่อนำมาคำนวณหาความเข้มข้นของเซลล์ต่อหน่วย (จำนวนเซลล์ต่อมิลลิลิตร) โดยใช้ hemacytometer

นำเซลล์ในอาหารเลี้ยงที่ผ่านกระบวนการ trypsinization แล้ว มาหาจำนวนเซลล์ในอาหารเลี้ยง 1 มิลลิลิตร โดยนำเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยง 20 ไมโครลิตรผสมกับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ Trypan Blue ในปริมาตรที่เท่ากัน ตั้งทิ้งไว้ประมาณ 1 นาที เตรียมอุปกรณ์ hemacytometer โดยการทำความสะอาดทั้งที่ตัวสไลด์และแผ่นกระจกปิดด้วยเอธานอล 70 เปอร์เซ็นต์ นำแผ่นกระจกวางบนบริเวณที่จะใช้นับเซลล์บนสไลด์ กดแผ่นกระจกปิดเบา ๆ ใช้ปิเปตอัตโนมัติผสมเซลล์ที่ใส่ Trypan Blue ให้กระจายตัวสม่ำเสมอและแยกเป็นเซลล์เดี่ยวในอาหารเลี้ยง ดูดเซลล์ในอาหารเลี้ยงใส่ในช่องระหว่างแผ่นกระจกปิดสไลด์และตัวสไลด์ นำไปนับจำนวนเซลล์ในตารางตามที่กำหนด ด้วยกล้องจุลทรรศน์แบบใช้แสงชนิด phase contrast โดยนับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตซึ่งไม่ติดสีย้อม Trypan Blue เป็นสีฟ้าและนำผลที่ได้มาคำนวณหาความเข้มข้นของ

เซลล์ หรือจำนวนเซลล์ต่อหน่วยปริมาตร (ภาคผนวก ก) เพื่อนำมาปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์และปริมาตรที่เหมาะสมสำหรับการเลี้ยงเซลล์ต่อ (subculture) หรือนำมาทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

3.4.6.4 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและการหาปริมาณเซลล์โดย MTT assay

นำเซลล์แขวนลอยในอาหารเลี้ยงจากข้อ 3.4.6.3 ที่ได้ปรับให้มีความเข้มข้นของเซลล์เป็น 50,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร และมีปริมาตรที่เหมาะสมกับความต้องการใช้งาน โดยการทดลองในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม แต่ละหลุมมีปริมาตรที่เหมาะสมประมาณ 200 ไมโครลิตร ดังนั้นการทดลองที่ใช้ถาดเลี้ยงเซลล์ 1 ถาด จะต้องการเซลล์แขวนลอยประมาณ 20 มิลลิลิตร นำเซลล์แขวนลอยใส่ในจานเพาะเชื้อขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 9 เซนติเมตรที่ปลอดเชื้อ ใช้ปิเปตอัตโนมัติชนิดหลายช่อง (multichannel pipette) ดูดเซลล์แขวนลอยใส่ในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม แต่ละหลุมได้รับเซลล์แขวนลอย 200 ไมโครลิตร ดังนั้นในแต่ละหลุมจะมีเซลล์ประมาณ 5,000 ถึง 10,000 เซลล์ นำถาดที่มีเซลล์ไปบ่มในตู้บ่มอุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มีความชื้นและมีคาร์บอนไดออกไซด์ 5 เปอร์เซ็นต์ นาน 24 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดการบ่ม นำถาดที่มีเซลล์มาดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ที่มีสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่าง ๆ ที่สนใจศึกษา หรือสารสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดที่ได้คัดเลือกมาแล้วในความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 200 ไมโครลิตร นำไปบ่มในสภาพเช่นเดียวกับข้างต้นเป็นเวลา 72 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดให้นำเซลล์ในถาดเลี้ยงเซลล์ไปตรวจสอบผลของสารสกัดต่อการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยใช้เทคนิค MTT assay ต่อไป โดยดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ในแต่ละหลุมออก จากนั้นเติมสารละลาย MTT (3-[4,5 dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) ใน PBS ที่ค่าความเป็นกรดด่าง 7.4 ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จำนวน 100 ไมโครลิตร นำถาดไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสในตู้ที่มีความชื้นเป็นเวลา 2 ถึง 4 ชั่วโมง เซลล์ที่มีชีวิตรอดอยู่จะสามารถเปลี่ยนสารละลาย MTT ซึ่งเป็น tetrazolium dye ที่มีสีเหลืองให้เป็น formazan ที่เป็นผลึกสีน้ำเงินหรือสีม่วง ซึ่งความเข้มข้นของสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ที่รอดชีวิตจึงทำให้สามารถวัดความเข้มของสีที่เกิดขึ้นโดยใช้เทคนิคทาง colorimetric method ได้ และเมื่อเปรียบเทียบสีกับเซลล์ในหลุมที่ไม่ได้รับสารสกัดก็สามารถไปคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การรอดชีวิตของเซลล์ที่ได้รับสารสกัดได้ ในขั้นตอนต่อไปดูดสารละลาย MTT ที่ยังเหลืออยู่ออกจากทุกหลุม เติม DMSO (dimethylsulfoxide) 200 ไมโครลิตร นำไปเขย่าบน plate mixer 5 นาที เพื่อละลาย

ผลึกที่เกิดขึ้น เติม glycine buffer (0.1M glycine in 0.1M NaCl pH 10.5) 25 ไมโครลิตร เขย่าบน plate mixer 5 นาที นำถาดเลี้ยงเซลล์ที่ทำการทดลองไปวัดค่าการดูดกลืนแสง (absorbance) ที่ช่วงคลื่น 540 นาโนเมตร ด้วยเครื่อง microplate reader ทันที โดยใช้หลุมที่มีเซลล์แต่ไม่ได้รับสารสกัดเป็นกลุ่มควบคุม นำค่าการดูดกลืนแสงในแต่ละหลุมทดลองแต่ละหลุมที่ได้รับสารสกัดมาคำนวณหาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์โดยเปรียบเทียบกับค่าการดูดกลืนแสงของหลุมควบคุม

3.4.6.5 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ทำการทดลองตามข้อที่ 3.4.6.1-3.4.6.4 แต่ทำการบ่มเซลล์มะเร็งปอดที่ 72 ชั่วโมงด้วยสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดและมีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

3.4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการเติบโตของเซลล์ปกติ (normal cell lines)

ทำการทดลองตามข้อที่ 3.4.6.1-3.4.6.5 แต่ใช้เซลล์ตับปกติแทนเซลล์มะเร็งปอดในการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด

3.4.8 การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งและผลต่อการเติบโตของเซลล์ปกติ

3.4.8.1 การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบจากเห็ดโดยการทำ ultrafiltration

นำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดหลังจากทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพแล้วมาทำการ ultrafiltration ด้วยเครื่อง vivaflow 50 ที่มีมวลโมเลกุล cut off เท่ากับ 5000 ดาลตัน (Da) เพื่อแยกสารที่มีมวลโมเลกุลขนาดเล็กออก ทำการเก็บสารสกัดหยาบที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 5000 ดาลตันไปหาปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test จากนั้นนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ (evaporator) ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส จนแห้ง แช่ตะกอนด้วยเอธานอล 95 เปอร์เซ็นต์ ในอัตราส่วนสารสกัด

1 มิลลิลิตรต่อเอธานอล 6 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้นาน 1 ชั่วโมง ทำการแยกเอธานอลและตะกอนออก โดยนำไปปั่นที่ 5000 รอบต่อนาที ด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงนาน 10 นาที นำส่วนที่เป็นตะกอนมาทำให้แห้งด้วยอะซิโตน (acetone) เก็บตะกอนไปแยกให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography เพื่อนำไปวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (nuclear magnetic resonance)

3.4.8.2 การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบจากเห็ดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี ion exchange chromatography

นำดีอีเออี-เซลลูโลส (DEAE-cellulose) 10 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นาน 1 คืน จากนั้นจึงกรองเอาน้ำออกด้วยเครื่องกรอง เติม 0.1 โมลาร์ ไฮโดรคลอริก (0.1 M HCl) ลงในดีอีเออี-เซลลูโลส แช่ไว้ 30 นาที ล้างกรดออกด้วยน้ำกลั่นจนสารละลายมีค่าความเป็นกรดด่าง (pH) เท่ากับ 7 จึงกรองน้ำออก เติม 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮดรอกไซด์ (0.1 M NaOH) แช่ไว้ 30 นาที ล้างด่างออกด้วยน้ำกลั่นจนได้สารละลายที่เป็นกลาง บรรจุดีอีเออี-เซลลูโลส ลงในคอลัมน์แก้ว (glass column) ขนาด 2 x 30 เซนติเมตร ให้สูง 15 หรือ 20 เซนติเมตร ปรับสมดุลด้วยน้ำกลั่น 12 ถึง 24 ชั่วโมง ใช้อัตราการไหลของน้ำกลั่น 60 ถึง 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำตะกอนของสารสกัดหยาบจากเห็ดที่เตรียมได้จากข้อ 3.4.8.1 มาแยกสารประกอบต่าง ๆ ที่ไม่เกี่ยวข้องออก โดยนำตะกอนของสารสกัดหยาบจากข้อ 3.4.8.1 มาละลายน้ำในอัตราส่วนตะกอน 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร แล้วนำมาผ่านคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลสตามปริมาตรที่ต้องการ ชะด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราการไหลที่ใช้ตอนปรับสมดุลและเก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ในหลอดทดลอง (fractions) หลอดละ 8 มิลลิลิตร ทดสอบการเกิดสีด้วยสารละลายอันโทรนวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตรเพื่อติดตามหลอดที่มีสารพอลิแซ็กคาไรด์ จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดลงต่ำกว่า 0.1 หน่วย จึงทำการชะตามด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต (0.1 M $NaHCO_3$) จากนั้นทำการรวมของเหลวจากหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงกว่า 0.1 หน่วยเข้าด้วยกัน แล้วนำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เติมน้ำกลั่นลงไปละลายตะกอนประมาณ 5 ถึง 10 มิลลิลิตร แล้วนำไปทำให้บริสุทธิ์มากขึ้นด้วยวิธี gel filtration chromatography

3.4.8.3 การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบจากเห็ดให้บริสุทธิ์ด้วยวิธี gel filtration chromatography

นำ sephadex G-100 จำนวน 50 กรัม แช่ในน้ำกลั่น 1 ลิตร นาน 1 คืน อุ่นไล่ก๊าซออกจากเม็ดเจล เป็นเวลา 30 นาที ทิ้งไว้ให้เย็น กรองน้ำออกแล้วเติมน้ำกลั่นลงไปใหม่ จึงนำมาบรรจุลงในคอลัมน์ขนาด 2 x 50 เซนติเมตร ให้สูง 40 เซนติเมตร ปรับสมดุลด้วยน้ำกลั่น เป็นเวลา 12 ถึง 24 ชั่วโมง ด้วยอัตราการไหลของน้ำกลั่น 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง นำสารสกัดจากข้อ 3.4.8.2 จำนวน 4 มิลลิลิตร ผ่านคอลัมน์ sephadex G-100 แล้วชะด้วยน้ำกลั่นด้วยอัตราการไหลที่ใช้ปรับสมดุล เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์ในหลอดทดลอง (fractions) หลอดละ 8 มิลลิลิตร ติดตามผลด้วยวิธีการเดียวกันกับข้อ 3.4.8.2 แต่จะทำการรวมของเหลวจากหลอดที่มีค่าการดูดกลืนแสงตั้งแต่ 0.08 หน่วยขึ้นไป นำไปทำให้เข้มข้นขึ้นด้วยเครื่องระเหยสุญญากาศ เก็บส่วนที่เป็นตะกอนไปทำให้แห้งด้วยอะซิโตน แล้วนำไปทำการวิเคราะห์โครงสร้างต่อไป

3.4.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งและต่อการเติบโตของเซลล์ปกติที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50}

ทำการทดลองตามข้อที่ 3.4.6.1-3.4.6.5 แต่ใช้สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} ในการบ่มเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติเป็นเวลา 72 ชั่วโมง

3.4.10 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด

นำตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการต้านเซลล์มะเร็งและแยกให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR (Tada et al., 2009)

บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย

จากการสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย สามารถได้ตัวอย่างเห็ดทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง ดังแสดงในตารางที่ 4.1

ตารางที่ 4.1 จำนวนตัวอย่างเห็ดที่ได้จากการสำรวจจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย

สถานที่สำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ด	จำนวนตัวอย่างที่เก็บได้
อำเภอเมือง จังหวัดปัตตานี	4
อุทยานแห่งชาติเอราวัณ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี	4
สถานีพัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าเขาน้ำพุ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี	6
อำเภอเมือง จังหวัดนครปฐม	1
สถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา	8
สวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี	2

4.2 การจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้โดยการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยา

จากการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในของตัวอย่างเห็ดที่เก็บได้จากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย และทำการเปรียบเทียบลักษณะที่ได้กับเอกสารที่เกี่ยวข้องกับการจัดจำแนกเห็ด พบว่าสามารถจัดจำแนกตัวอย่างเห็ดที่ได้ในระดับสกุล (Genus) จำนวน 1 สายพันธุ์ และในระดับชนิด (Species) จำนวน 7 สายพันธุ์ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

4.2.1 สายพันธุ์ที่เก็บได้จากอุทยานแห่งชาติเอราวัณ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.2.1.1 สายพันธุ์เอราวัณ 6

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ.2551 บริเวณที่เห็ดขึ้นคือพื้นดินริมทางไปอุทยานแห่งชาติเอราวัณ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี ทำการเก็บมาเป็นจำนวน 13 ดอก มีทั้งที่เป็นดอกตูมและดอกที่บานแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของหมวกดอกตั้งแต่ 1.8 เซนติเมตรถึง 6.7 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 4.2 เซนติเมตรถึง 10 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ มีห่วง ไม่มีปลอกก้านดอก ก้านกลวงแข็ง หมวกดอกมีสีน้ำตาลตรงกลางถัดมามีสีขาว ที่ฐานก้านไม่บวมหรือโป่งพอง (ภาพที่ 4.1) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ ได้แก่ มีสปอร์เป็นรูปไข่ ขนาดกว้าง 4 ถึง 6 ไมโครเมตร ยาว 8 ถึง 10 ไมโครเมตร มีสีเหลือง หรือสีเหลืองแกมน้ำตาล (yellow brown) ไม่ทำปฏิกิริยากับ Melzer's reagent (non-amyloid) ผนังสปอร์มี 2 ชั้น มีติ่งหรือช่องเปิดที่ปลายสปอร์ (apical germ pore) มีหยดน้ำมัน (oil drop) อยู่ภายใน 1-2 หยด (ภาพที่ 4.1) ซึ่งสายพันธุ์เอราวัณ 6 สามารถจัดจำแนกได้ในสกุล *Lepiota* sp.

4.2.2 สายพันธุ์ที่เก็บได้จากสถานีพัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าเขาน้ำพุ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.2.2.1 สายพันธุ์เขาน้ำพุ 12

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ.2551 บริเวณที่เห็ดขึ้นคือบนมูลสัตว์ระหว่างทางเดินป่าภายในสถานีพัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าเขาน้ำพุ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี ทำการเก็บมาเป็นจำนวน 3 ดอก เป็นดอกที่บานแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 6.5 ถึง 10 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 5.5 ถึง 12 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ หมวกดอกเป็นรูปประฆังแล้วแบน กลางหมวกมีปมนูนเล็ก ๆ หนืดมือ ผิวหมวกเรียบ ขอบบาง มีสีเหลืองอ่อนกลางหมวกมีสีน้ำตาลอ่อน มีห่วงขนาดใหญ่เห็นได้ชัด บริเวณครีบมีสีดำ หรือสีน้ำเงินเข้ม (ภาพที่ 4.2) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ

ได้แก่ สปอร์มีขนาดกว้าง 8 ถึง 10 ไมโครเมตร ยาว 12.5 ถึง 16 ไมโครเมตร ทรงรียาว เรียบ ผนังหนา มีรูงอกแคบ ๆ 1 รู มีสีน้ำตาลอมม่วง (ภาพที่ 4.2) ซึ่งสายพันธุ์เขาน้ำพุ 12 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Psilocybe cubensis* [Earle] Sing. เห็ดชนิดนี้กินไม่ได้ มีพิษ ทำให้เกิดประสาทหลอน

4.2.2.2 สายพันธุ์เขาน้ำพุ 13

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 18 พฤษภาคม พ.ศ.2551 บริเวณที่เห็ดขึ้นคือพื้นดินระหว่างทางเดินป่าภายในสถานีพัฒนาและส่งเสริมการอนุรักษ์สัตว์ป่าเขาน้ำพุ อำเภอศรีสวัสดิ์ จังหวัดกาญจนบุรี ทำการเก็บมาเป็นจำนวน 4 ดอก เป็นดอกที่บานแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 2 ถึง 3 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 10 ถึง 15 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ หมวกดอกมีลักษณะเป็นรูปไข่ มีสีขาวไปถึงชมพูอ่อน หรือชมพูเข้ม ก้านมีลักษณะเป็นทรงกระบอก เรียวเล็กด้านบน คล้ายฟองน้ำ มีสีชมพูอ่อน ปลายบนมีสีชมพูเข้มถึงแดง (ภาพที่ 4.3) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ ได้แก่ สปอร์มีขนาดกว้าง 2 ไมโครเมตร ยาวตั้งแต่ 4 ถึง 5 ไมโครเมตร รูปไข่ เรียบ ผนังบาง มีสีน้ำตาลอมเขียวหม่น ๆ (ภาพที่ 4.3) ซึ่งสายพันธุ์เขาน้ำพุ 13 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Phallus rugulosus* [Fisch.] Kuntze เห็ดชนิดนี้ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

4.2.3 สายพันธุ์ที่เก็บได้จากสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.2.3.1 สายพันธุ์สะแกราช 16

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 10 มิถุนายน พ.ศ.2551 บริเวณที่เห็ดขึ้นคือพื้นดินบริเวณสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา บางส่วนทำการซื้อมาจากหน้าสถานีวิจัยดังนั้นจำนวนตัวอย่างจึงมีมาก ส่วนใหญ่เป็นดอกที่บานแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5 ถึง 10 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 4 ถึง 6 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ หมวกดอกมีลักษณะนูน กลางหมวกเป็นแอ่งเล็กน้อย แห้ง เมื่อแก่มักปริแตกเป็นเกล็ดใหญ่ ขอบเป็นลอนเล็กน้อย มีสีเขียวอมเทา หรือมีสีเขียวตรงกลางที่ปุ่มชัดเจน มีครีบติดก้าน กว้างเล็กน้อย เรียงถี่ สีขาว แต่สามารถเปลี่ยนเป็นสีครีมก็ได้ ก้านเรียบ สีขาว (ภาพที่ 4.4) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยา

ภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ ได้แก่ สปอร์มีขนาดกว้างตั้งแต่ 7 ถึง 8 ไมโครเมตร ยาวตั้งแต่ 8 ถึง 10 ไมโครเมตร ทรงรี มีปุ่มและตาข่ายบางส่วน เมื่อย้อมด้วย Melzer's reagent จะติดสีน้ำเงินเข้ม (Amyloid) (ภาพที่ 4.4) ซึ่งสายพันธุ์สะแกราช 16 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Russula virescens* (Schaeff.) Fr. เห็ดชนิดนี้กินได้

4.2.3.2 สายพันธุ์สะแกราช 23

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน พ.ศ.2551 เป็นเห็ดที่ทำการซื้อมาจากหน้าสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ดังนั้นจำนวนตัวอย่างจึงมีมาก มีทั้งที่เป็นดอกตูม และดอกที่บานแล้ว ส่วนใหญ่เป็นดอกที่บานแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 3 ถึง 10 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 13 ถึง 15 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่สามารถมองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ หมวกดอกมีสีขาว แต่สามารถเปลี่ยนเป็นสีครีมเข้ม หรือสีน้ำตาลอ่อนได้ ไม่มีริ้วที่ขอบหมวก การเรียงตัวของครีบติดกันมาก มีห่วง มีปลอกก้านดอกชัดเจน (ภาพที่ 4.5) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ ได้แก่ สปอร์มีขนาดกว้างตั้งแต่ 6 ถึง 8 ไมโครเมตร ยาว 10 ไมโครเมตร สปอร์มีลักษณะกลมหรือค่อนข้างกลม มีตุ่มตรงปลาย สีใสหรือขาว มีหยดน้ำมันขนาดเล็ก (ภาพที่ 4.5) ซึ่งสายพันธุ์สะแกราช 23 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Amanita chepangiana* Tulloss & Bhandary. เห็ดชนิดนี้กินได้

4.2.3.3 สายพันธุ์สะแกราช 24

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 22 มิถุนายน พ.ศ.2551 เป็นเห็ดที่ซื้อมาจากหน้าสถานีวิจัยสิ่งแวดล้อมสะแกราช อำเภอวังน้ำเขียว จังหวัดนครราชสีมา ดังนั้นจำนวนตัวอย่างจึงมีมาก ส่วนใหญ่เป็นดอกที่บานแล้ว มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 1 ถึง 3 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 2 ถึง 3 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ ผิวของหมวกค่อนข้างขรุขระ มีสีน้ำตาลเข้มหรือสีดำ มีสีเหลืองแทรกอยู่บ้างในบางจุด ที่ก้านก็มีลักษณะของสีเช่นเดียวกับหมวก ครีบมีลักษณะเป็นรูขนาดเล็กจำนวนมากคล้ายฟองน้ำ (ภาพที่ 4.6) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ ได้แก่ สปอร์มีความกว้างตั้งแต่ 4 ถึง 5 ไมโครเมตร ยาวตั้งแต่ 8 ถึง 10 ไมโครเมตร สปอร์มีลักษณะคล้ายผลมะม่วง มีหยดน้ำมัน 1 ถึง 2 หยด ผนังสปอร์บาง มีสีเหลืองหรือสีเหลืองอ่อน

(true yellow or light yellow) (ภาพที่ 4.6) ซึ่งสายพันธุ์สะแกราชสามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Boletus vermiculosoides* Smith & Thiers. เห็ดชนิดนี้กินได้

4.2.4 สายพันธุ์ที่เก็บได้จากสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี มีรายละเอียดดังต่อไปนี้

4.2.4.1 สายพันธุ์เขาเขียว 25

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ.2551 บริเวณที่เห็ดขึ้นคือใต้กอไม้ไผ่ภายในบริเวณสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บมาเป็นจำนวน 2 ดอก มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 20 ถึง 25 เซนติเมตร ไม่มีก้าน มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ ดอกเห็ดมีรูปร่างคล้ายชั้นหรือหิ้ง เนื้อเห็ดค่อนข้างเหนียวแต่นิ่มกว่าเห็ดหิ้งทั่ว ๆ ไป หมวกดอกมีสีส้มหรือสีน้ำตาลอ่อน ขอบหมวกด้านล่างมีสีขาว ครีบเป็นรู มีสีเหลือง หลุดง่ายเมื่อสัมผัส (ภาพที่ 4.7) และมีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายในที่สังเกตได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่สำคัญ ได้แก่ สปอร์มีความกว้างตั้งแต่ 5 ถึง 8 ไมโครเมตร ยาวตั้งแต่ 6 ถึง 8 ไมโครเมตร สปอร์มีลักษณะกลม (Oval) หัวสปอร์ตัดเล็กน้อย มีหยดน้ำมัน สปอร์มีผนัง 2 ชั้น มีสีเหลืองหรือสีเหลืองอ่อน (ภาพที่ 4.7) ซึ่งสายพันธุ์เขาเขียว 25 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Ganoderma colossus* (Fr.) Baker. เห็ดชนิดนี้ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

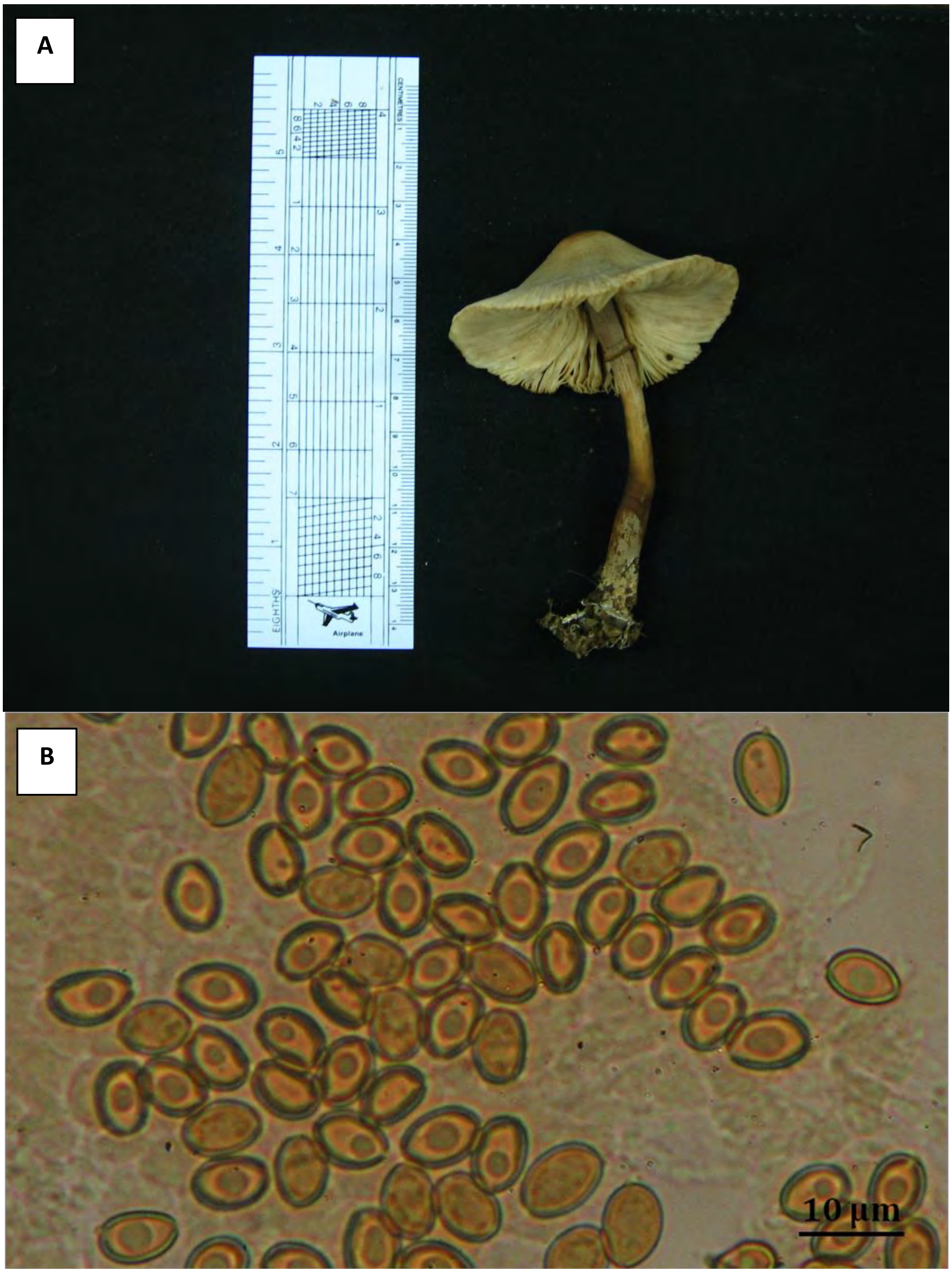
4.2.4.2 สายพันธุ์เขาเขียว 26

ทำการเก็บเมื่อวันที่ 23 สิงหาคม พ.ศ.2551 บริเวณที่เห็ดขึ้นคือ บนขอนไม้ระหว่างทางเดินภายในสวนสัตว์เปิดเขาเขียว อำเภอศรีราชา จังหวัดชลบุรี ทำการเก็บมาเป็นจำนวน 5 ดอก เป็นดอกที่บานเต็มที่แล้วทั้งหมด มีขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางตั้งแต่ 5 เซนติเมตรถึง 15 เซนติเมตร มีความยาวก้านตั้งแต่ 0.5 เซนติเมตรถึง 2.5 เซนติเมตร มีลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกที่มองเห็นได้ด้วยตาเปล่าที่สำคัญ ได้แก่ ลักษณะหมวกดอกเป็นรูปกรวยลึก มีสีน้ำตาลอ่อน ปกคลุมด้วยขนสั้นและเกล็ดงอขึ้นสีน้ำตาลอ่อนโดยเฉพาะบริเวณกลางหมวก ขอบงอลงแล้วเหยียดตรง มีรอยฉีกตามขอบ ครีบเรียวยาวลงไปติดก้าน แคบ เรียงถี่ มีสีน้ำตาลอ่อนหรือน้ำตาลเข้ม เนื้อเห็ดเหนียวมากและแข็ง (ภาพที่ 4.8) ซึ่งสายพันธุ์เขาเขียว 26 สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Lentinus polychrous* Lev'. เห็ดชนิดนี้กินได้

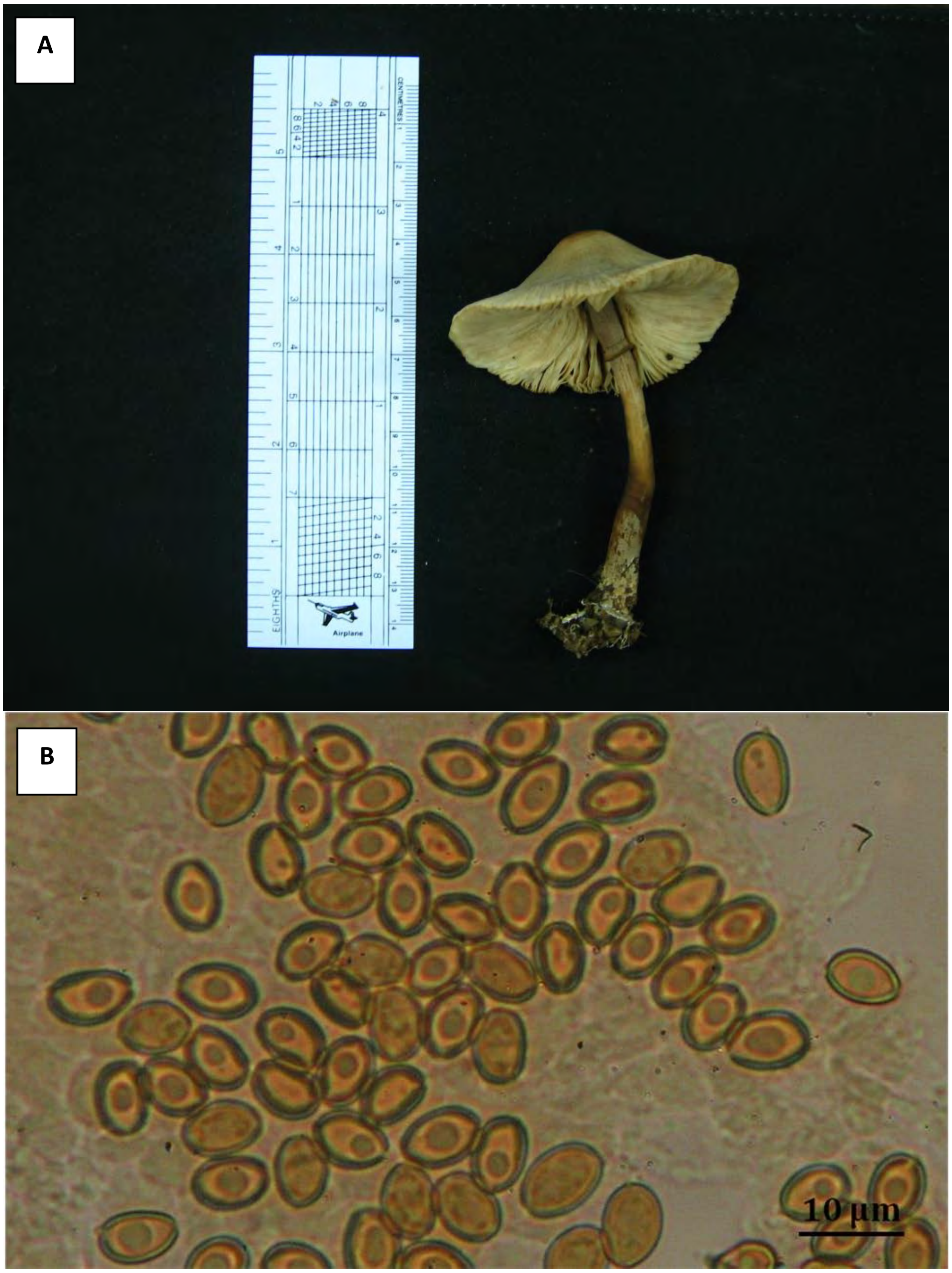
จากจำนวนตัวอย่างเห็ดทั้ง 8 สายพันธุ์ที่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุลและชนิด สามารถนำมาแบ่งกลุ่มได้ 3 กลุ่ม ได้แก่ เห็ดกินได้ เห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้ และเห็ดพิษ ดังแสดงในตารางที่ 4.2

ตารางที่ 4.2 การจัดแบ่งกลุ่มเห็ดที่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุลและชนิด

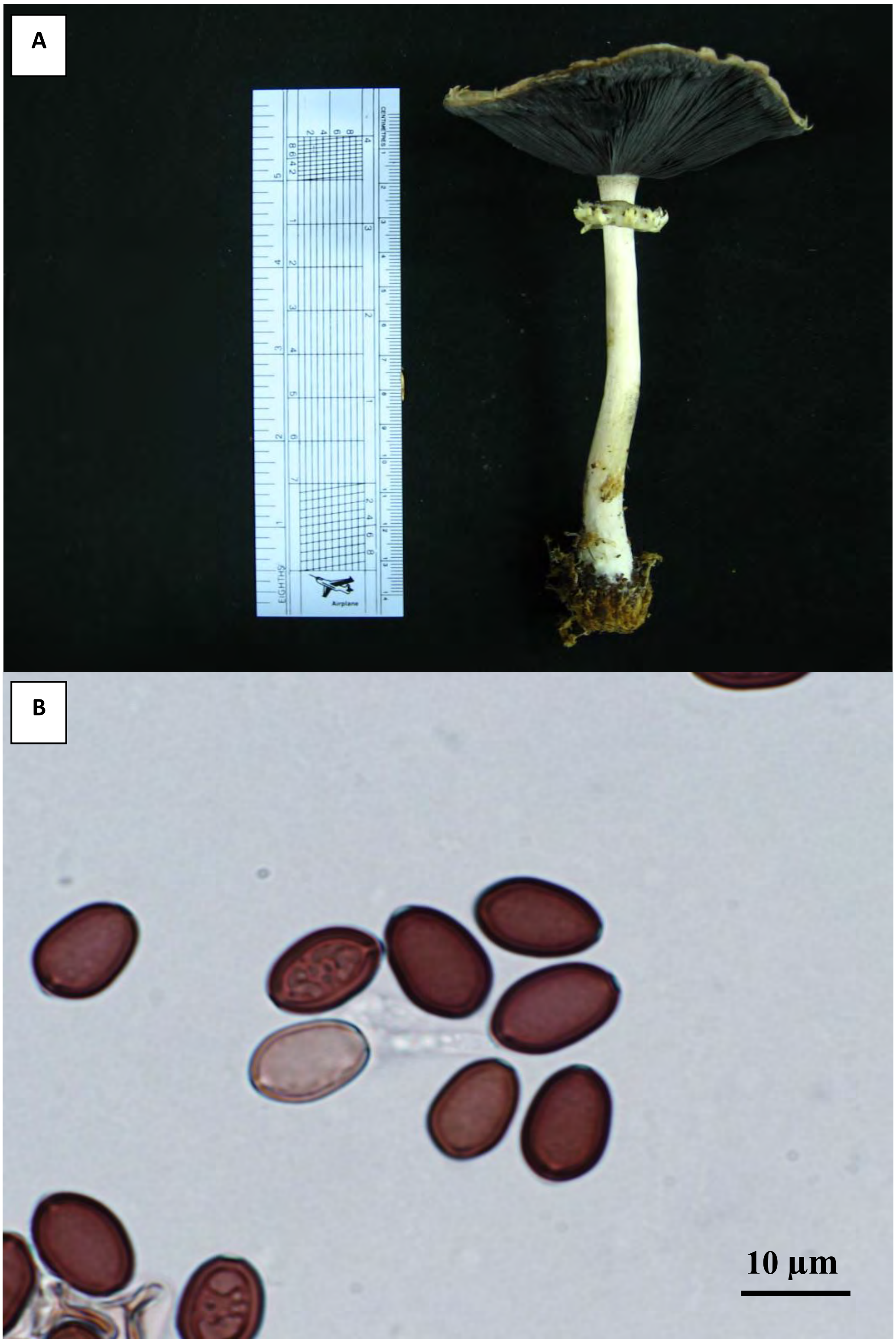
เห็ดกินได้	เห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้	เห็ดพิษ
Amanita chepangiana *Boletus vermiculosoides* *Lentinus polychrous* *Russula virescens*	*Ganoderma colossus* *Lepiota* sp. *Phallus rugulosus*	*Psilocybe cubensis*



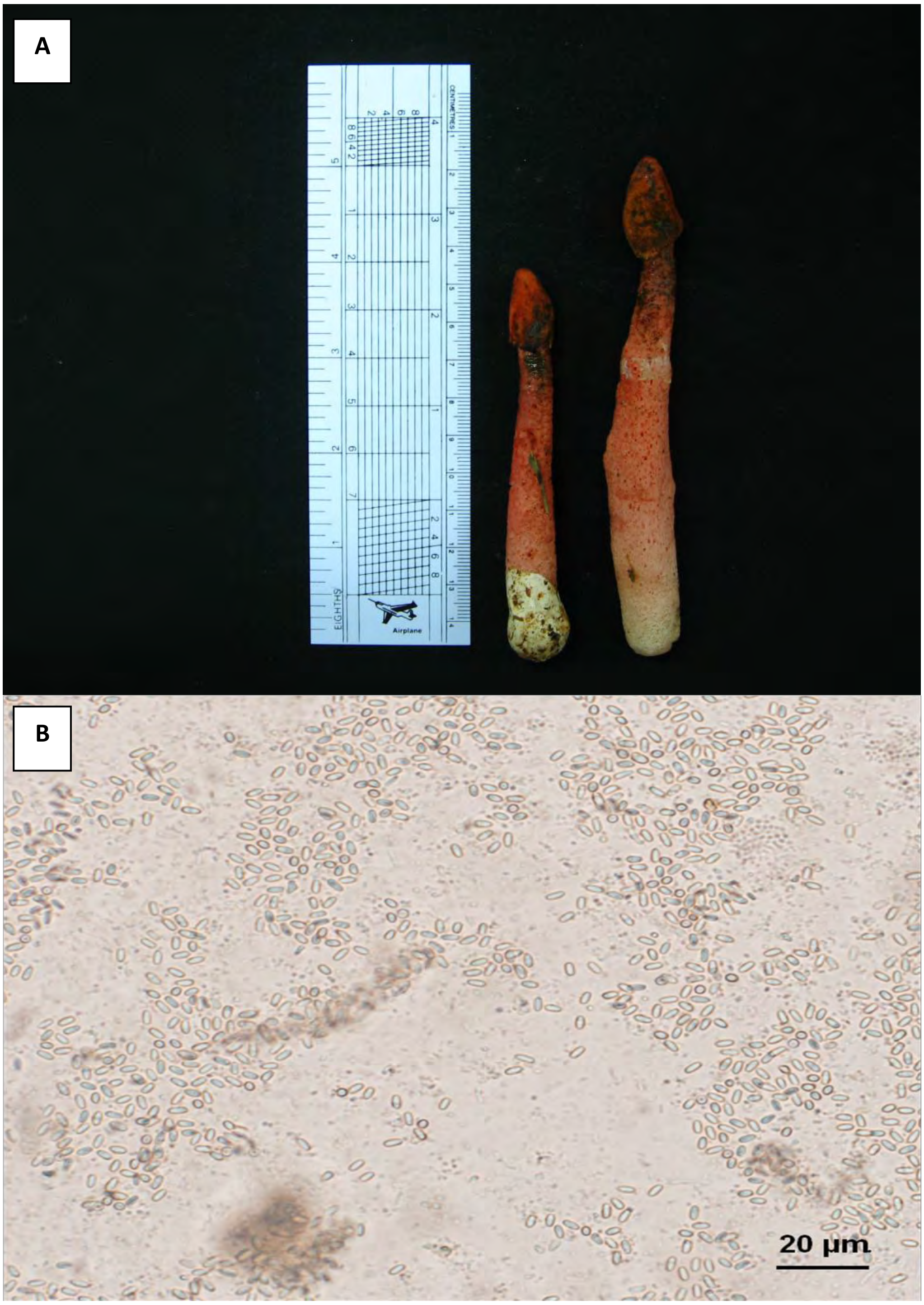
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เอราวัณ 6 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นสกุล *Lepiota* sp. : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400X



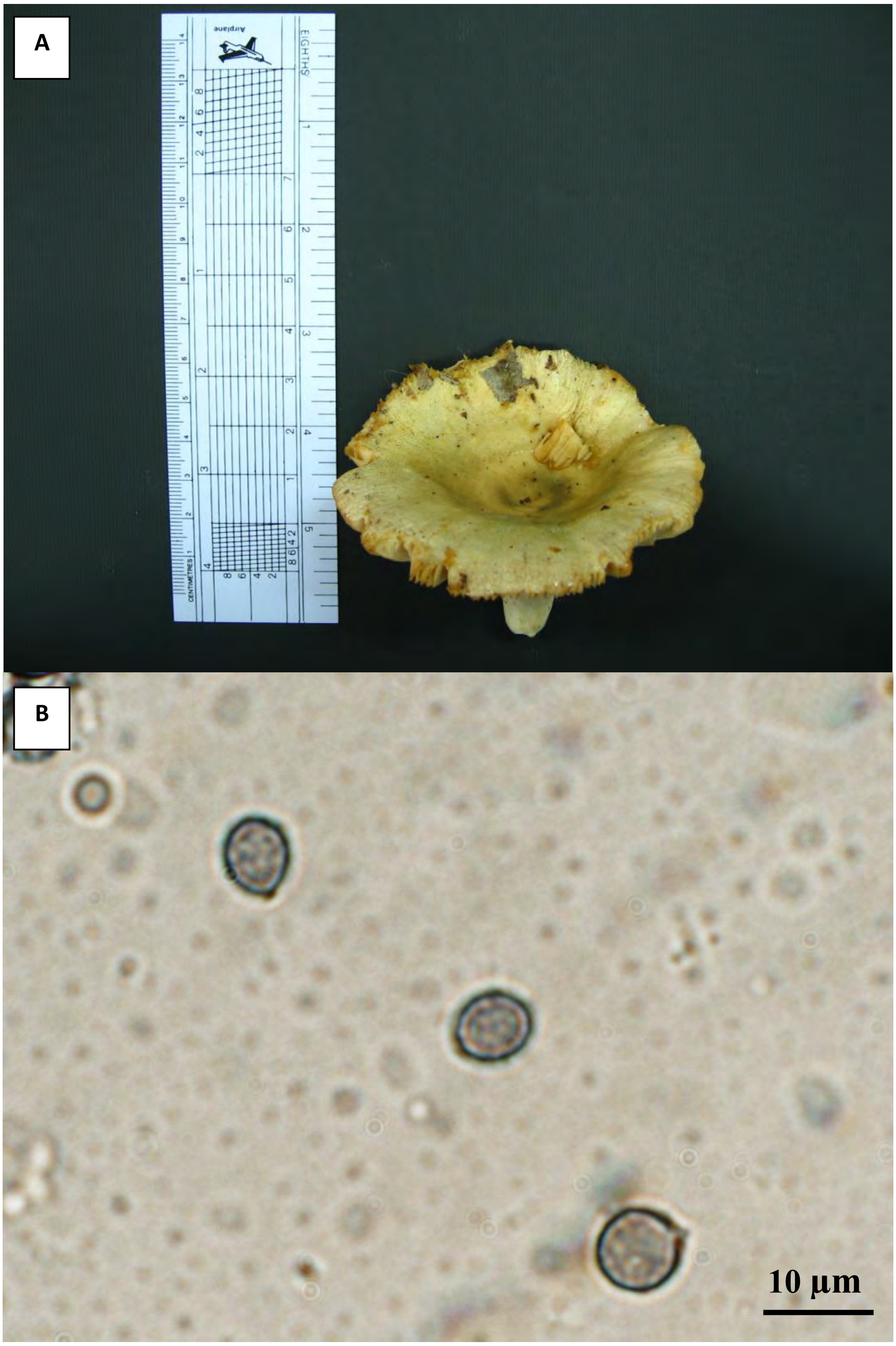
ภาพที่ 4.1 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เอราวัณ 6 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นสกุล *Lepiota* sp. : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 400X



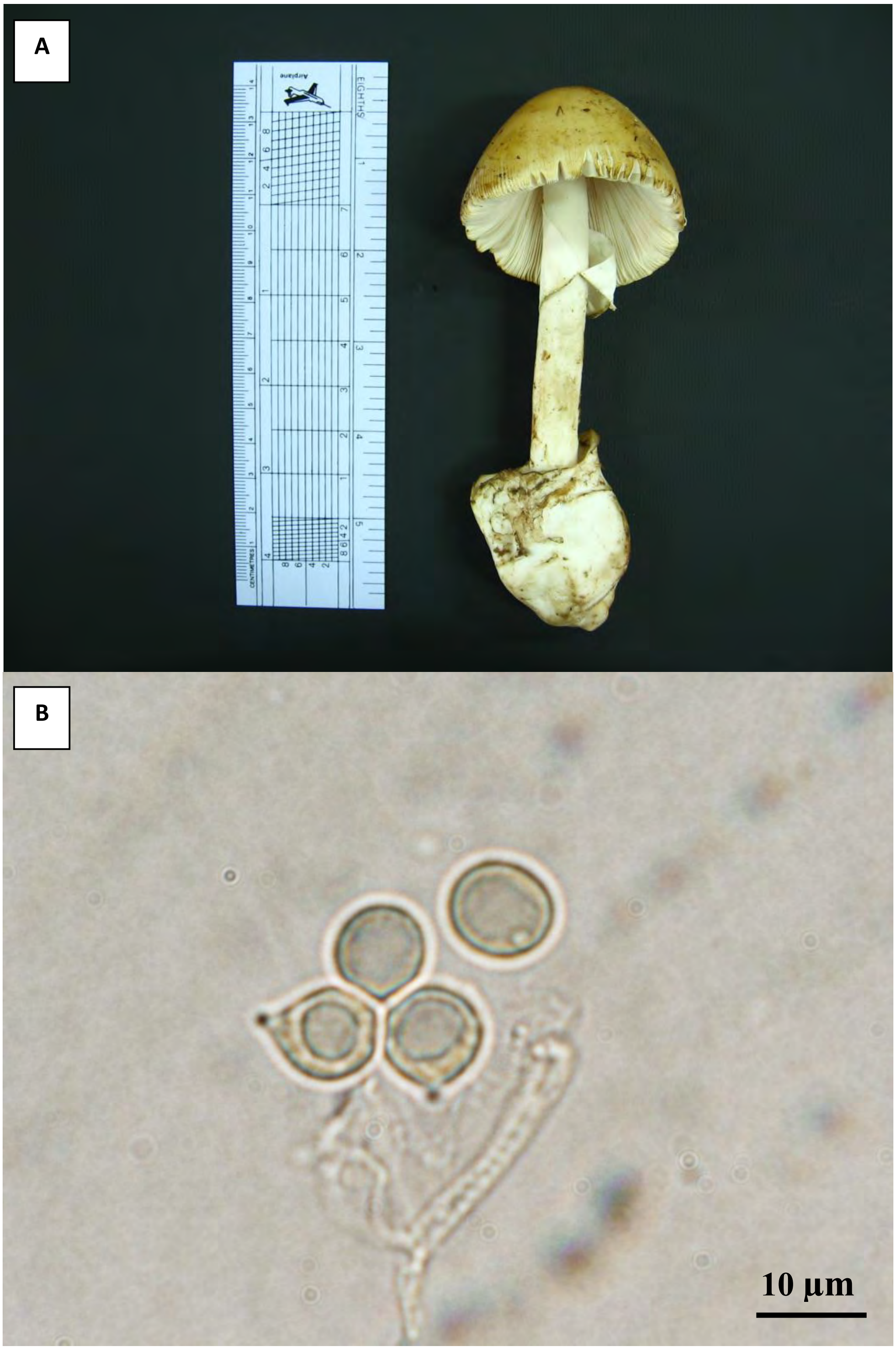
ภาพที่ 4.2 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาน้ำพุ 12 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Psilocybe cubensis* [Earle] Sing. : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X



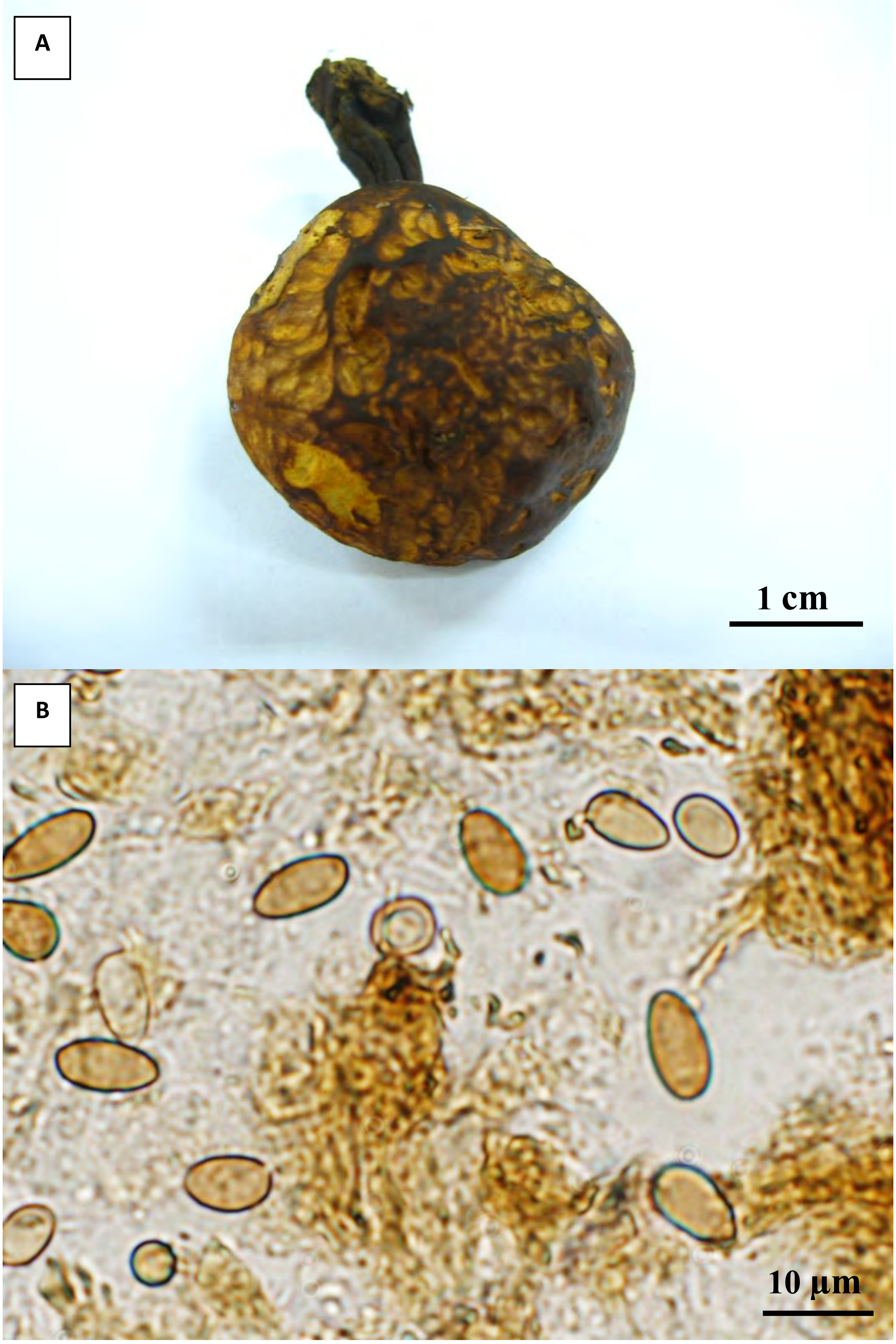
ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาน้ำพุ 13 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Phallus rugulosus* [Fisch.] Kuntze : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X



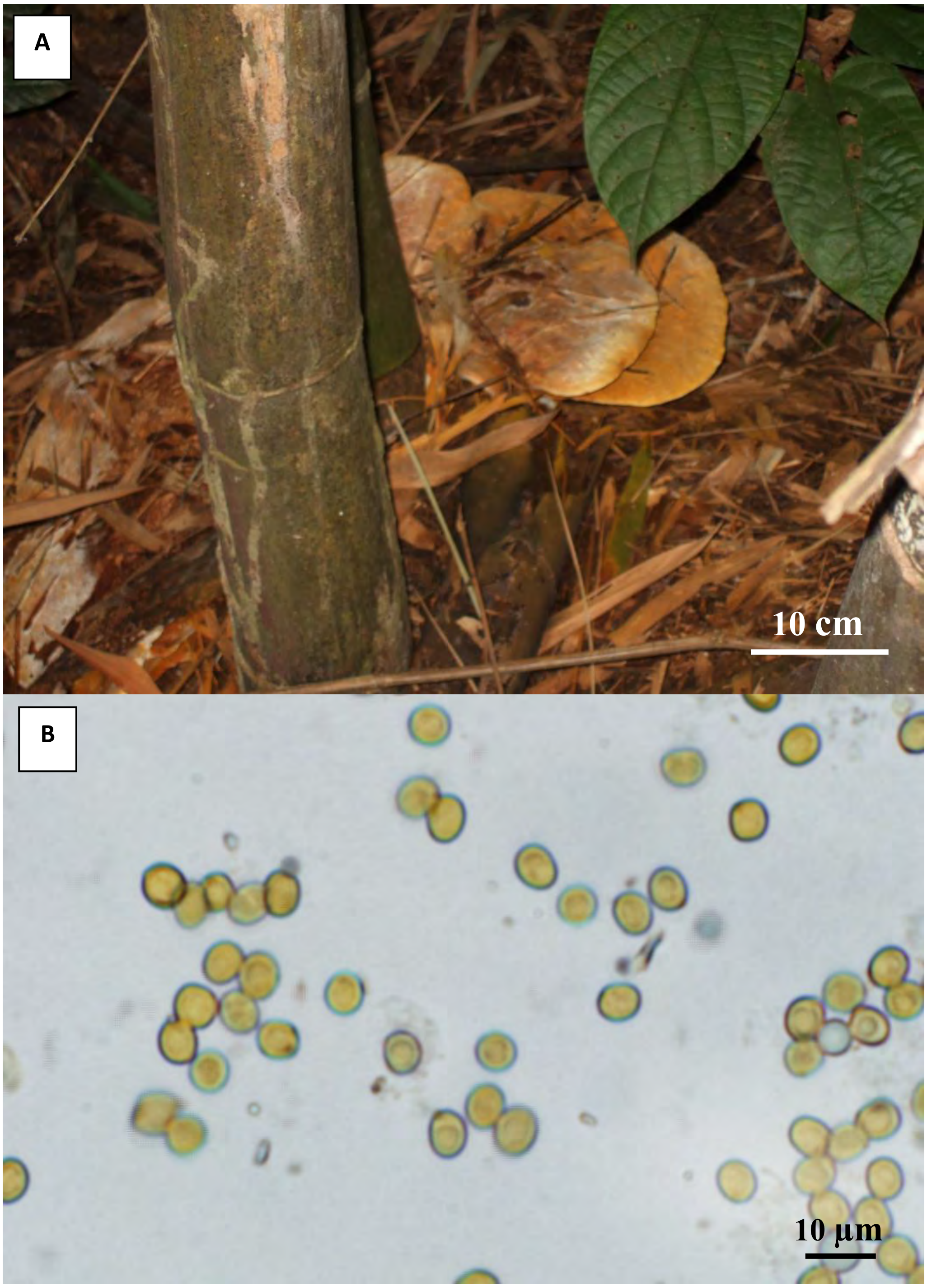
ภาพที่ 4.4 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์สะแกราช 16 ที่สามารถจัดจำแนกได้ เป็นชนิด *Russula virescens* (Schaeff.) Fr. : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ใน Melzer's reagent ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X



ภาพที่ 4.5 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์สะแกราช 23 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Amanita chepangiana* Tulloss & Bhandary. : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X



ภาพที่ 4.6 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์สะแกราช 24 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Boletus vermiculosoides* Smith & Thiers. : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X



ภาพที่ 4.7 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาเขียว 25 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Ganoderma colossus* (Fr.) Baker : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 1000X

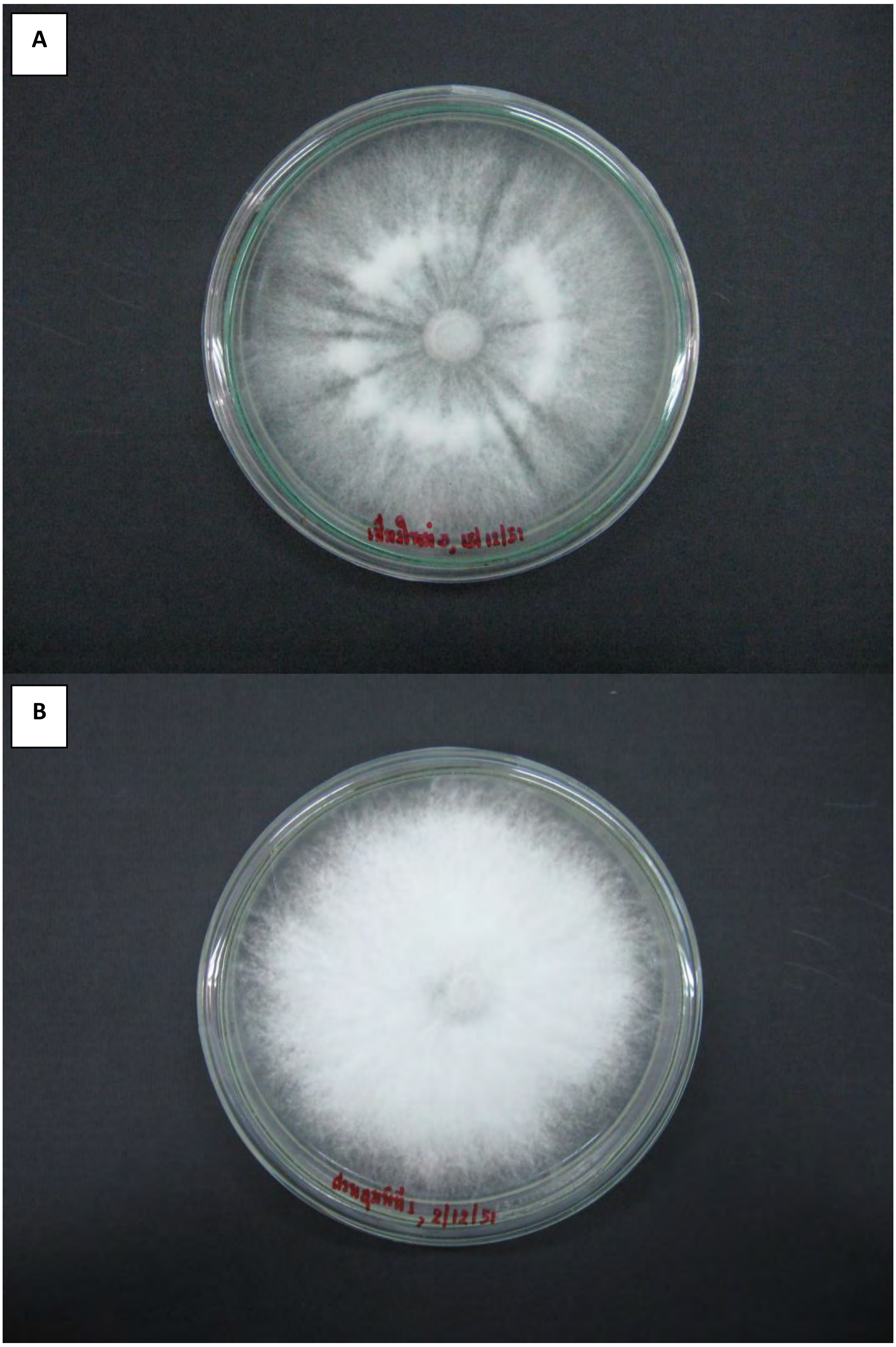
ภาพที่ 4.8 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาเขียว 26 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Lentinus polychrous* Lév. : A. ลักษณะดอกเห็ด

4.3 การคัดเลือกและเตรียมดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งที่คัดแยกได้ก่อนสกัดสารพอลิแซ็กคาไรด์

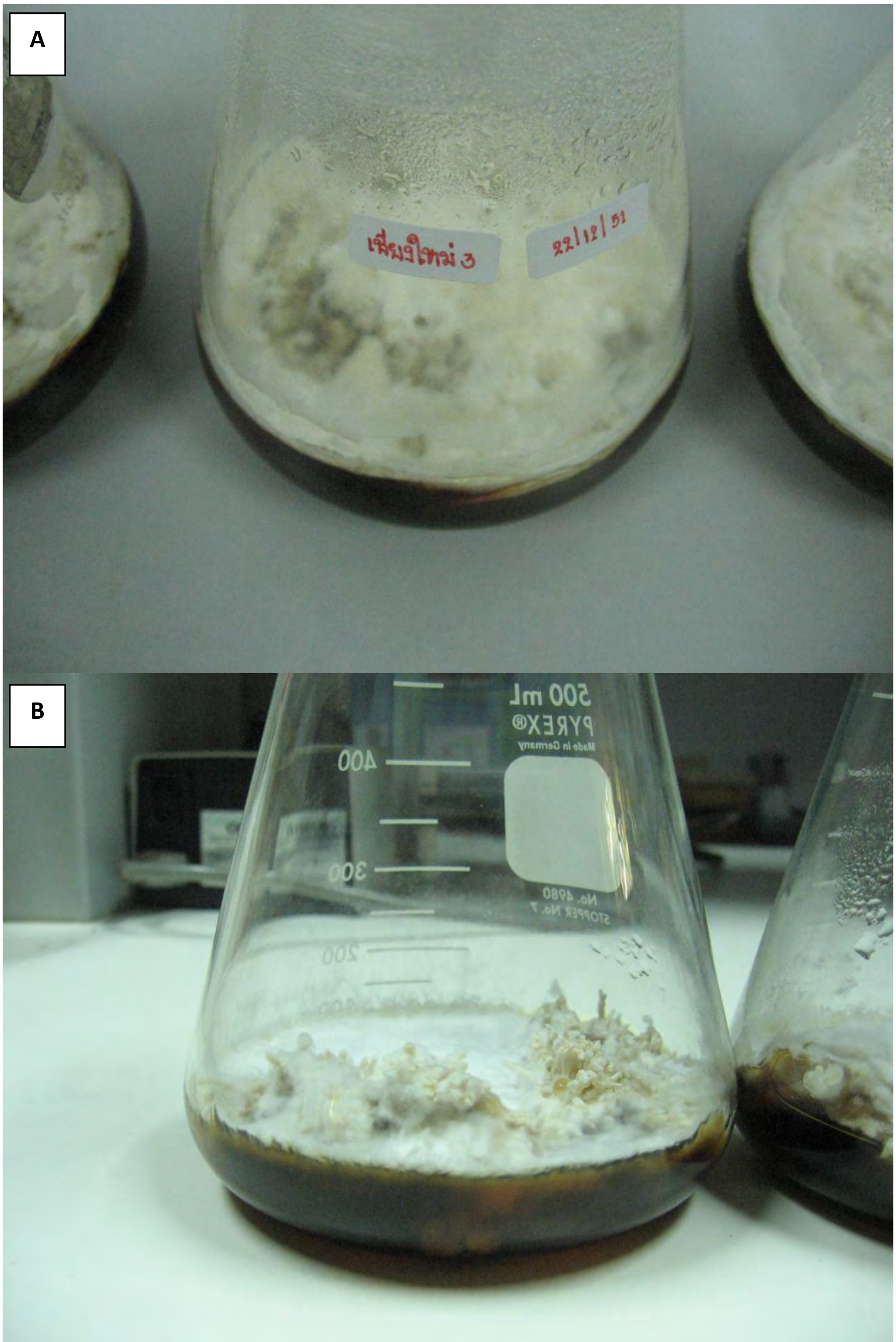
นำตัวอย่างเห็ดจากธรรมชาติทั้ง 8 สายพันธุ์ที่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับสกุลและชนิดแล้วมาทำการเตรียมตัวอย่างแห้ง โดยอบที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 48 ชั่วโมง และทำการบดให้เป็นผงด้วยเครื่องบด (ภาพที่ 4.9) และมีการนำเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ด 2 ชนิดคือ *Schizophyllum commune* และ PBRU-W0157 ที่แยกได้จากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาพที่ 4.10) มาใช้ในการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์ด้วย โดยนำเส้นใยบริสุทธิ์ที่ได้จะถูกนำไปเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDB เพื่อเพิ่มจำนวนเส้นใยซึ่งจะสังเกตพบว่า การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบนอาหาร PDB จะให้เส้นใยเห็ดมีลักษณะสีขาว หนา เมื่อเส้นใยเห็ดได้รับแสงสว่างสลับกับช่วงไม่มีแสง เส้นใยจะเปลี่ยนจากสีขาวเป็นสีเหลืองแกมน้ำตาลบ้าง อาจจะมีการสร้างตุ่มเห็ด (primordia) แต่ไม่สามารถเจริญเป็นดอกเห็ดที่สมบูรณ์ได้ คือจะมีลักษณะเป็นก้านดอกไม่มีการแผ่ขยายออกเป็นดอกเห็ด ไม่มีการ

สร้างสปอร์ ใช้เวลาในการเจริญเติบโตในสภาวะนิ่งเฉลี่ย 30 วัน จึงจะเต็มผิวหน้าของ PDB (ภาพที่ 4.11) จากนั้นนำแผ่นเส้นใยบริสุทธิ์ดังกล่าวออกมาจากขวดรูปชมพู่และนำไปล้างด้วยน้ำกลั่น พบว่าแผ่นของเส้นใยมีลักษณะเหนียวแต่ไม่มากนัก สามารถฉีกขาดได้ง่ายถ้าจับหรือล้างด้วยน้ำกลั่นแรงเกินไป เมื่อนำไปอบที่ 60 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปบดหรือปั่นให้เป็นผง พบว่ามีลักษณะเป็นผงสีขาวขุ่นคล้ายผงแป้ง (ภาพที่ 4.12) โดยเฉลี่ยจะได้น้ำหนักเส้นใยแห้งประมาณ 1 กรัมต่ออาหารเลี้ยงปริมาตร 100 มิลลิลิตร

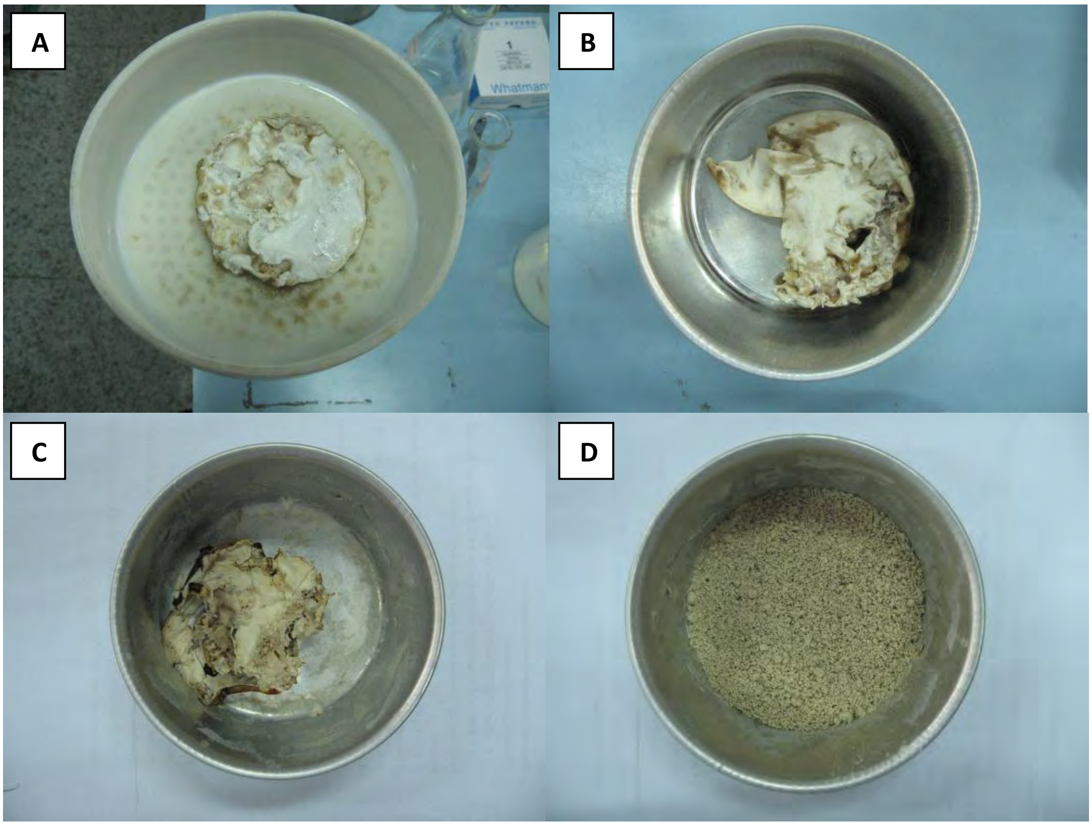
ภาพที่ 4.9 ลักษณะของดอกเห็ดอบแห้งบางส่วนที่ถูกปั่นเป็นผงก่อนนำมาทำการสกัดสาร:
A. *A. chepangiana*, B. *B. vermiculosoides*, C. *G. colossus*,
D. *L. polychrous*, E. *P. cubensis* และ F. *R. virescens*



ภาพที่ 4.10 เส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ด 2 ชนิดคือ A. PBRU-W0157 และ B. *S. commune* ที่นำมาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



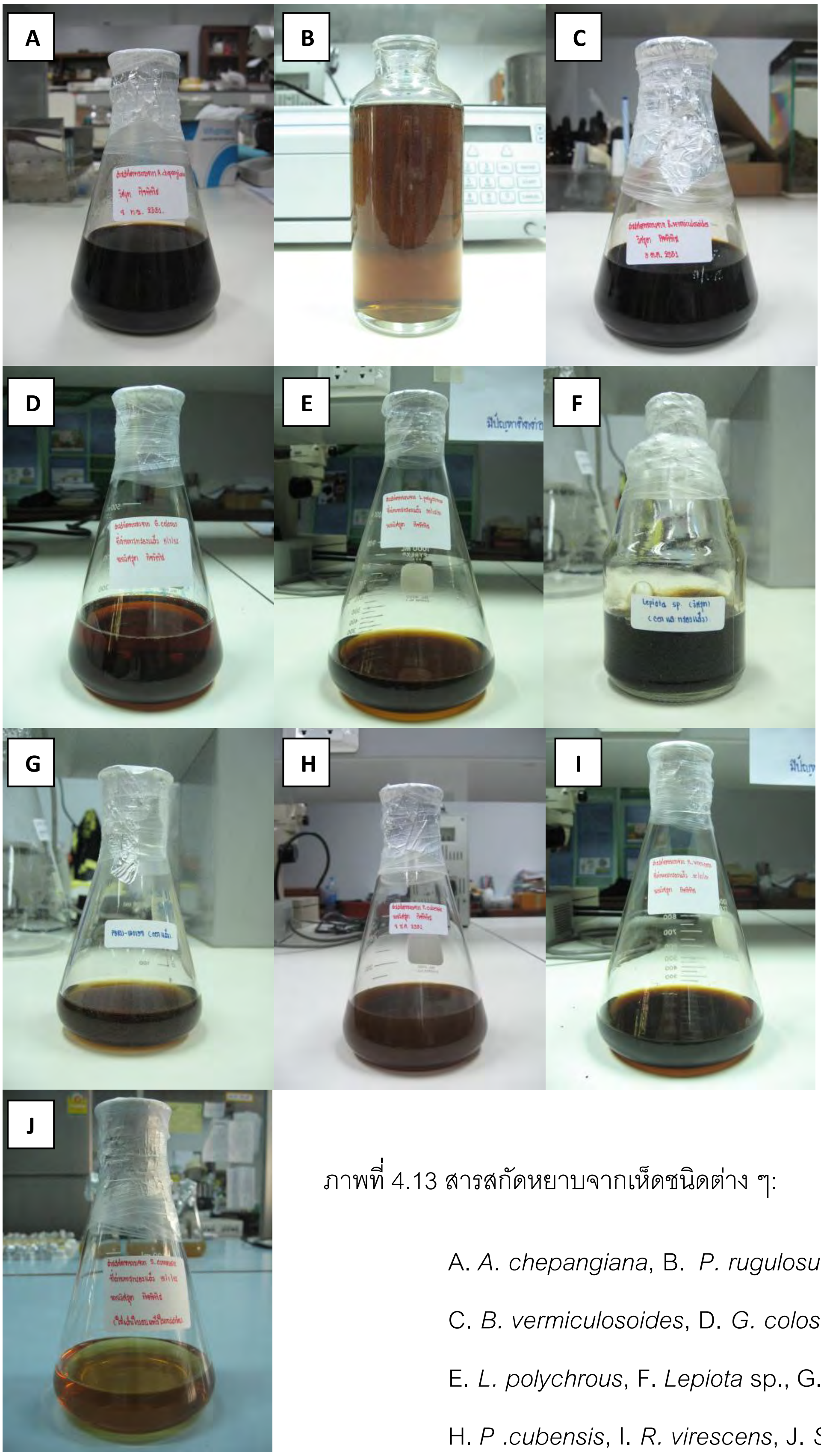
ภาพที่ 4.11 การเจริญเติบโตของเส้นใยเห็ดบนอาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDB โดยบ่มที่อุณหภูมิห้อง และเลี้ยงในสภาวะนิ่งเป็นเวลา 25-30 วัน: A. PBRU-W0157 และ B. *S. commune*



ภาพที่ 4.12 การเตรียมเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง: A. แผ่นเส้นใยบริสุทธิ์ที่ถูกนำออกมาจากขวดรูปชมพู่ที่ใช้เลี้ยงเป็นเวลา 25-30 วัน, B. แผ่นเส้นใยบริสุทธิ์หลังจากล้างด้วยน้ำกลั่นแล้ว C. แผ่นเส้นใยบริสุทธิ์หลังจากนำไปอบแล้วเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และ D. เส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งที่ถูกปั่นให้เป็นผงแล้ว

4.4 การสกัดสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง

เมื่อนำดอกเห็ดหรือเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งไปทำการสกัดด้วยน้ำร้อน ด้วยเครื่องสกัดสาร soxhlet ด้วยอัตราส่วนดอกเห็ดหรือเส้นใย 1 กรัมต่อน้ำกลั่น 10 มิลลิลิตร เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และนำไปทำการปั่นตกและกรองเพื่อเอาตะกอนออกพบว่า ผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการสกัดมีลักษณะเป็นสารละลายสีน้ำตาลเข้มหรือสีน้ำตาลอ่อน มีกลิ่นเฉพาะตัวขึ้นอยู่กับชนิดของเห็ด ดังแสดงในภาพที่ 4.13



ภาพที่ 4.13 สารสกัดหยาบจากเห็ดชนิดต่าง ๆ:

A. *A. chepangiana*, B. *P. rugulosus*,

C. *B. vermiculosoides*, D. *G. colossus*,

E. *L. polychrous*, F. *Lepiota* sp., G. PBRU-W0157,

H. *P .cubensis*, I. *R. virescens*, J. *S. commune*

4.5 การหาปริมาณสารพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test

นำสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิดต่าง ๆ ที่สกัดได้จำนวน 0.5 มิลลิลิตรผสมให้เข้ากันกับสารละลายอันโทรนจำนวน 2.5 มิลลิลิตร ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบจะให้สารละลายที่มีสีเขียว หรือสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยความเข้มของสีจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากเห็ด เมื่อนำสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *A. chepangiana*, *B. vermiculosoides*, *L. polychrous* และ *R. virescens* ไปทำการหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยตั้งแต่ 0.153 ถึง 0.276 และนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้ไปทำการคำนวนหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดเทียบกับกราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ภาคผนวก ก) พบว่ามีค่าตั้งแต่ 1.02 ถึง 1.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่า 1 กรัมของดอกเห็ดอบแห้งกลุ่มดังกล่าวให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 9.80 ถึง 18.71 มิลลิกรัม โดยทั้ง 3 ค่าดังกล่าวพบมากที่สุดในกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* และพบน้อยที่สุดในเห็ดชนิด *R. virescens* ดังแสดงในตารางที่ 4.3 เมื่อนำสารสกัดหยาบจากเส้นใยบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ PBRU-W0157 และ *S. commune* ไปทำการหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.622 และ 0.657 ตามลำดับ และนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้ไปทำการคำนวนหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากเห็ด พบว่ามีค่าเท่ากับ 2.07 และ 6.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ และยังพบว่า 1 กรัมของเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 24.33 และ 73.85 กรัม ตามลำดับ ดังแสดงในตารางที่ 4.4 เมื่อนำสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้ชนิดต่าง ๆ ได้แก่ *G. colossus*, *Lepiota* sp., *P. rugulosus* ไปทำการหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยตั้งแต่ 0.043 ถึง 0.259 โดยค่าดังกล่าวพบมากที่สุดในกลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้ชนิด *Lepiota* sp. และพบน้อยที่สุดในเห็ดชนิด *P. rugulosus* และนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้ไปทำการคำนวนหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากเห็ด พบว่ามีค่าตั้งแต่ 0.086 ถึง 1.00 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยค่าดังกล่าวพบมากที่สุดในเห็ดชนิด *G. colossus* และพบน้อยที่สุดในเห็ดชนิด *P. rugulosus* และยังพบว่า 1 กรัมของดอกเห็ดอบแห้งกลุ่มดังกล่าวให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 8.66 ถึง 53.13 มิลลิกรัม โดยค่าดังกล่าวพบ

มากที่สุดในเห็ดชนิด *P. rugulosus* และน้อยที่สุดในเห็ดชนิด *G. colossus* ดังแสดงในตารางที่ 4.5 และเมื่อนำสารสกัดจากกลุ่มเห็ดพิษชนิด *P. cubensis* มาทำการหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 625 นาโนเมตร จำนวน 3 ซ้ำ พบว่าได้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.113 นำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้ไปทำการคำนวนหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากเห็ด พบว่ามีค่าเท่ากับ 0.75 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และยังพบว่า 1 กรัมของดอกเห็ดอบแห้งชนิดดังกล่าวให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 7.53 มิลลิกรัม ดังแสดงในตารางที่ 4.6

ตารางที่ 4.3 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้

ชนิดของเห็ด	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อผงเห็ด 1 กรัม (มิลลิกรัม)
Amanita chepangiana	1.12	11.57 ± 0.82
Boletus vermiculosoides	1.77	18.71 ± 0.88
Lentinus polychrous	1.17	10.07 ± 0.43
Russula virescens	1.02	9.80 ± 0.19

ตารางที่ 4.4 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากเส้นใยเห็ดที่มาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช

ชนิดของเห็ด	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อผงเห็ด 1 กรัม (มิลลิกรัม)
PBRU-W0157	2.07	24.33 ± 0.41
Schizophyllum commune	6.56	73.85 ± 0.79

ตารางที่ 4.5 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้

ชนิดของเห็ด	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อผงเห็ด 1 กรัม (มิลลิกรัม)
Ganoderma colossus	1.00	8.66 ± 0.30
Lepiota sp.	0.086	11.19 ± 0.72
Phallus rugulosus	0.14	53.13 ± 2.14

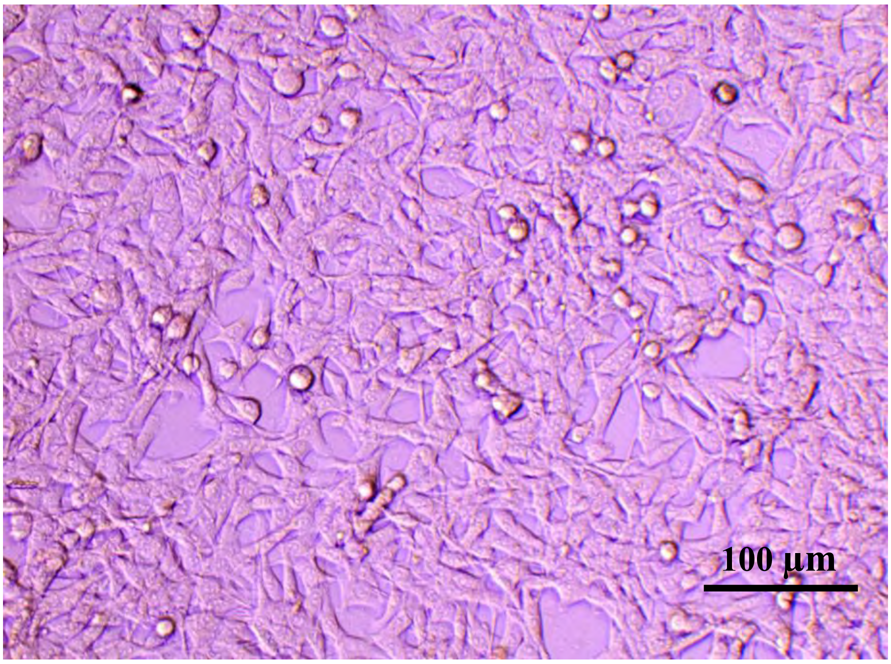
ตารางที่ 4.6 ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ของสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดพิษ

ชนิดของเห็ด	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ในสารสกัดหยาบจากเห็ด (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ต่อผงเห็ด 1 กรัม (มิลลิกรัม)
Psilocybe cubensis	0.75	7.53 ± 0.42

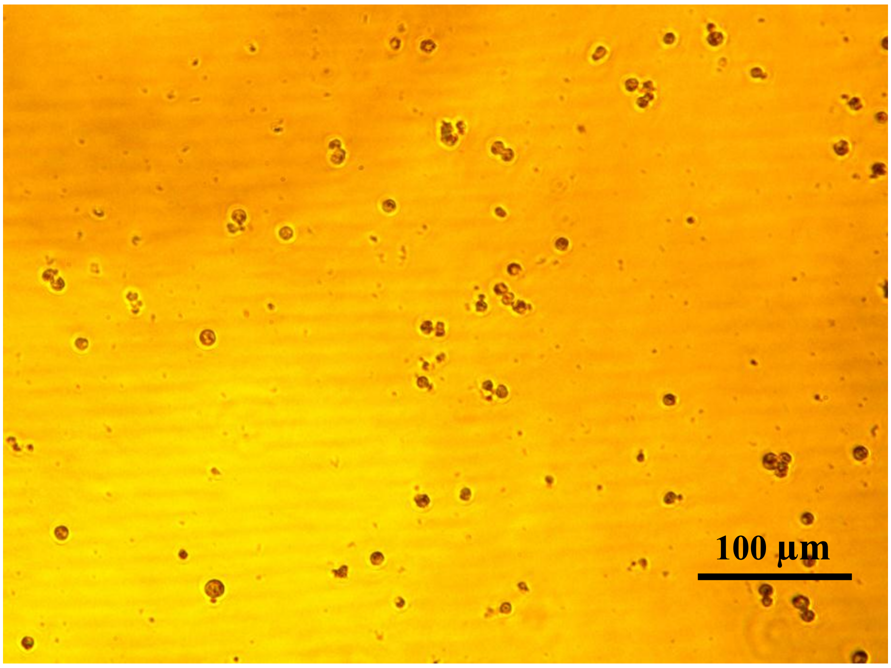
4.6 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านเซลล์มะเร็งปอด

ทำการเลี้ยงเซลล์มะเร็งปอดในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ผสมกับซีรัมและยาปฏิชีวนะ ในภาวะที่ไม่มีสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด โดยบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น พบว่าเซลล์มะเร็งปอดที่เลี้ยงมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะผิว บางยาวคล้ายกระสวย ด้านบนและด้านล่างของเซลล์ไม่แตกต่างกัน (fibroblast like cell) (ภาพที่ 4.14) ใช้เวลาในเพิ่มจำนวน 2 ถึง 3 วัน จึงจะปกคลุมเต็มผิวของภาชนะเลี้ยงเซลล์ จากนั้นเมื่อนำเซลล์มะเร็งปอดมาทำการบ่มด้วยสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดทั้ง 3 กลุ่มคือ กลุ่มเห็ดกินได้ กลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้ กลุ่มเห็ดพิษ และจากเส้นใยบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ PBRU-W0157 และ *S. commune* เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยทำการหาปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ (% cell survival) เทียบกับเซลล์ที่ไม่ได้ถูก

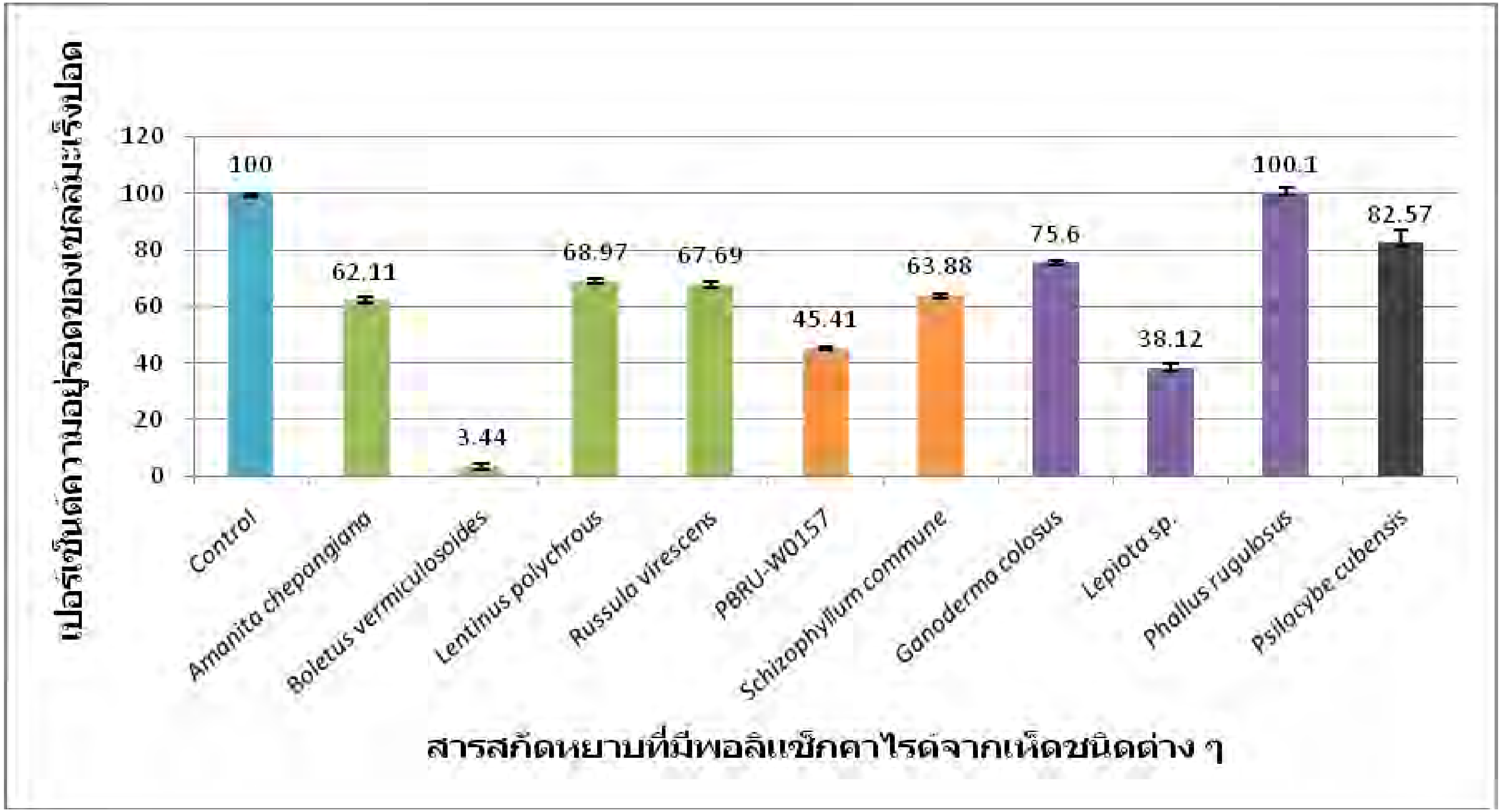
บ่มด้วยสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด พบว่าสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้คือ *A. chepangiana*, *B. vermiculosoides*, *L. polychrous* และ *R. virescens* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดตั้งแต่ 3.44 ถึง 68.9 เปอร์เซ็นต์ สารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเส้นใยเห็ด 2 ชนิดคือ PBRU-W0157 และ *S. commune* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเท่ากับ 45.41 และ 63.88 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ สารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้คือ *G.colossus*, *Lepiota* sp., *P. rugulosus* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดตั้งแต่ 38.12 ถึง 75.60 เปอร์เซ็นต์ และสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดพิษคือ *P. cubensis* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเท่ากับ 82.57 เปอร์เซ็นต์ (ภาคผนวก ก) (ภาพที่ 4.16) และยังพบว่าสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง โดยให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดต่ำที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิดดังกล่าวมีลักษณะกลม ไม่แผ่ยาวคล้ายกระสวย แขวนลอยอยู่ในสารละลายและมีจำนวนน้อยลงเมื่อสังเกตภายใต้กล้องจุลทรรศน์เทียบกับภาวะที่ไม่มีสารสกัด (ภาพที่ 4.15) ต่อมานำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกลุ่มกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* มาทำการบ่มเซลล์มะเร็งปอดที่ 72 ชั่วโมง ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0.01, 0.02, 0.05, 0.10 และ 0.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดอยู่ระหว่าง 80.48 ถึง 22.63 เปอร์เซ็นต์ (ภาพที่ 4.17) โดยที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ที่ 50 เปอร์เซ็นต์ เรียกว่าค่า IC_{50} เมื่อนำเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติแบบจำแนกทางเดียว (complete randomized design) โดยทำการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยระหว่างกลุ่มทดลองหรือระหว่าง 2 ค่าเฉลี่ย (multiple comparisons) (ภาคผนวก ก) จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่าง ๆ และแต่ละกลุ่มมีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดอย่างมีนัยสำคัญ นอกจากนี้ยังมีแนวโน้มไปในทิศทางเดียวกันในแต่ละกลุ่ม สำหรับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ภาคผนวก ก) จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มีผลต่อเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดอย่างมีนัยสำคัญ มีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งได้มากขึ้นเมื่อมีความเข้มข้นสูงขึ้น



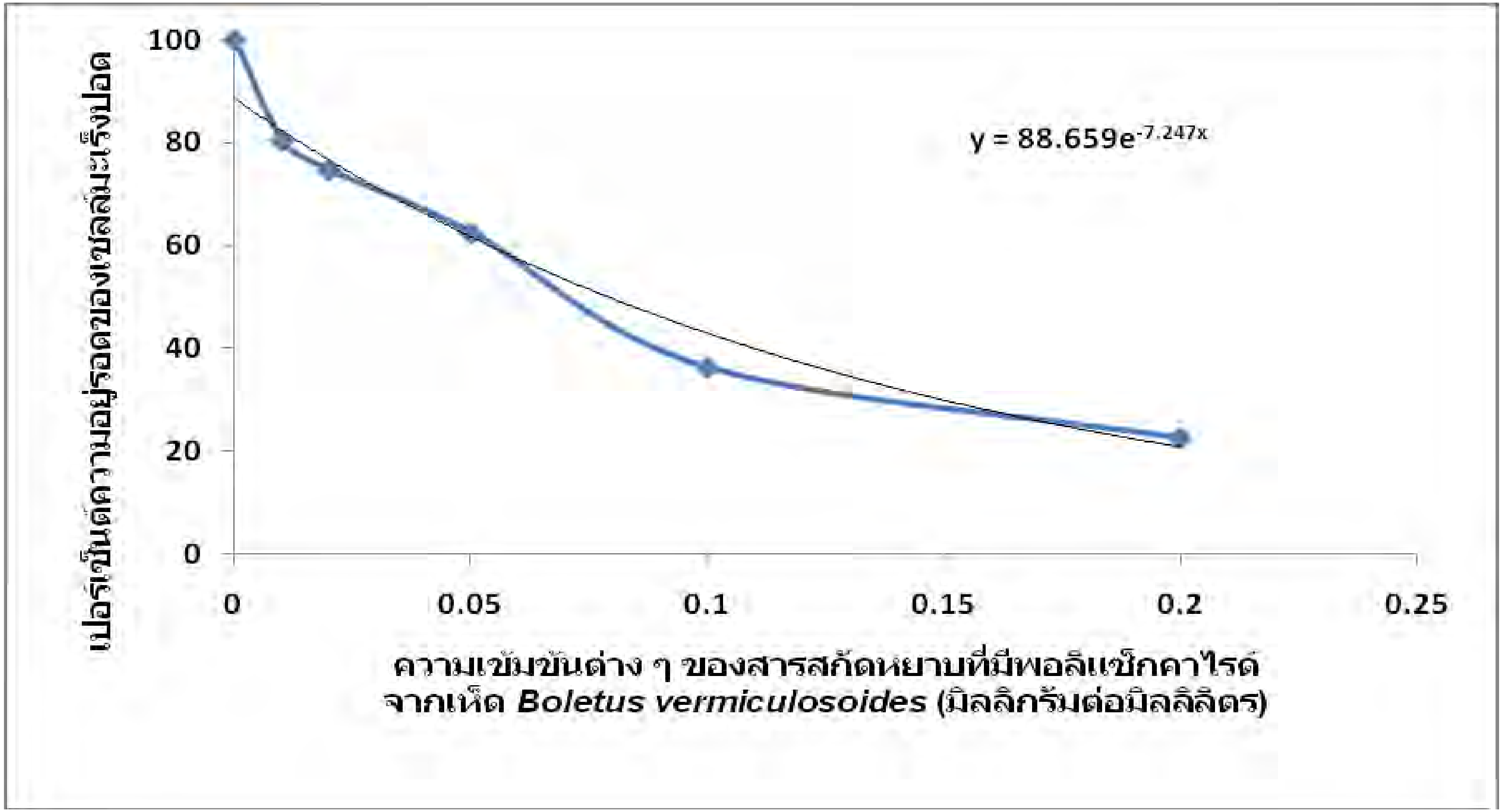
ภาพที่ 4.14 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอด
ที่เลี้ยงในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม เป็นเวลา 72 ชั่วโมง



ภาพที่ 4.15 ลักษณะของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มในถาดเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม
เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *B. vermiculosoides*



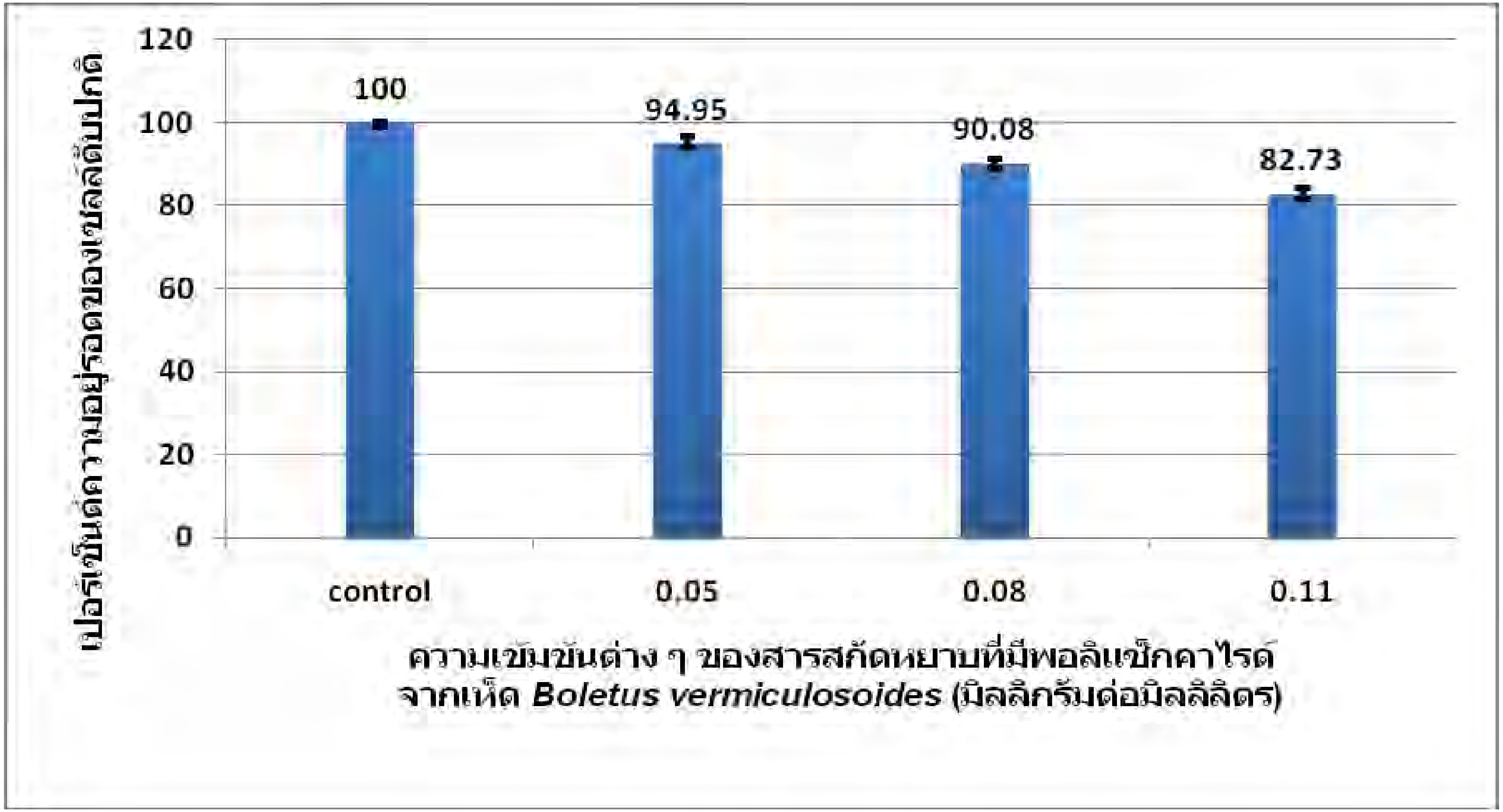
ภาพที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่าง ๆ



ภาพที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.7 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ

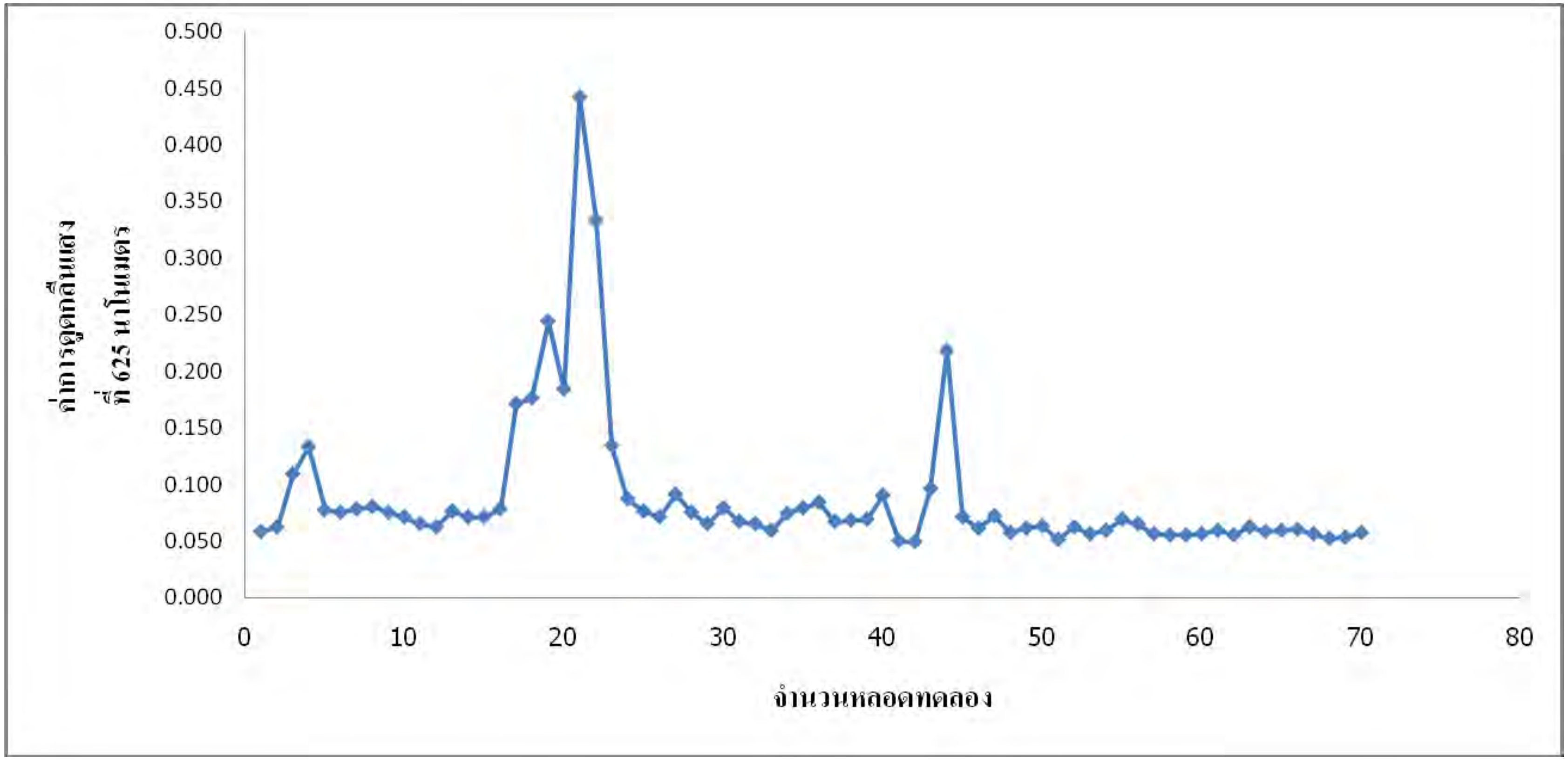
ทำการเลี้ยงเซลล์ตับปกติในขวดเลี้ยงเซลล์ที่มีอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM ที่มีซีรัมและยาปฏิชีวนะ ในสภาวะที่ไม่มีสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด โดยบ่มในตู้บ่มคาร์บอนไดออกไซด์ที่ควบคุมอุณหภูมิที่ 37 องศาเซลเซียส และก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ที่ 5 เปอร์เซ็นต์ และมีความชื้น พบว่าเซลล์ตับปกติที่เลี้ยงมีลักษณะเป็นเซลล์เกาะผิวคล้ายกับเซลล์มะเร็งปอด แต่มีความหนาแน่นน้อยกว่า และใช้เวลาในการเจริญเติบโต 7 ถึง 10 วัน จึงจะปกคลุมเต็มผิวภาชนะเลี้ยงเซลล ์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ค่าความเข้มข้นที่ IC_{50} และช่วงใกล้เคียง (0.05, 0.08 และ 0.11 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) มาทำการบ่มเซลล์ตับปกติ เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยทำการหาปริมาณเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ตับปกติเป็น 94.95, 90.08 และ 82.73 ตามลำดับ (ภาพที่ 4.18) เห็นได้ว่าความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} (0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *B. vermiculosoides* มีผลต่อการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติน้อยมากเมื่อเทียบกับเซลล์ตับปกติที่ไม่ได้ทำการบ่มด้วยสารสกัดดังกล่าว สำหรับเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ (ภาคผนวก ก) จะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกลุ่มกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} (0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ มีแนวโน้มที่จะไม่ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ตับปกติ แต่เมื่อเทียบกับความเข้มข้นที่สูงกว่าช่วงดังกล่าว กลับมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ แสดงว่าเมื่อเพิ่มความเข้มข้นมากขึ้นจะไปมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตับปกติ



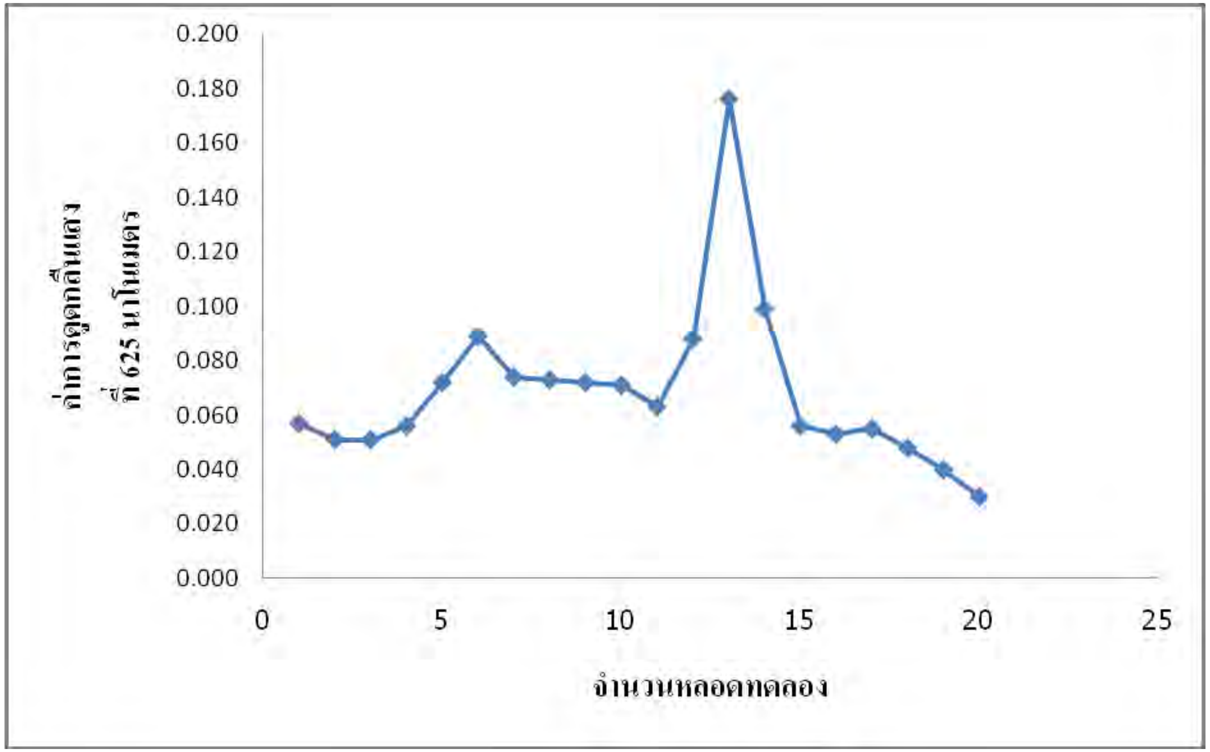
ภาพที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ตับปกติเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

4.8 การทำบริสุทธิ์สารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งปอดและผลต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ

เมื่อนำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* มาทำ ultrafitration ด้วยเครื่อง vivaflow 50 ที่มีมวลโมเลกุล cut off เท่ากับ 5000 ดาลตัน พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดดังกล่าวที่มีองค์ประกอบของสารที่มีมวลโมเลกุลต่ำกว่า 5000 ดาลตัน จะมีลักษณะเป็นสารละลายสีขาวขุ่น ส่วนสารสกัดที่มีมวลโมเลกุลมากกว่า 5000 ดาลตัน จะมีสีน้ำตาลเข้ม มีความหนืดสูงขึ้น เมื่อนำไปหาปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test พบว่ามีค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยเพิ่มขึ้นจาก 0.276 เป็น 0.342 และคิดเป็นปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 2.27 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่มีมวลโมเลกุลสูงกว่า 5000 ดาลตัน จากการทำ ultrafiltration ไปทำให้บริสุทธิ์ขึ้นด้วยวิธี ion exchange chromatography ที่ชะด้วยน้ำกลั่นที่มีอัตราการไหล 60 ถึง 120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง และเก็บสารที่ออกมาจากคอลัมน์ใส่หลอดทดลองหลอดละ 8 มิลลิลิตร ทำให้เกิดสีด้วยสารละลายอันโทรน ติดตามค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร จนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดลงต่ำกว่า 0.1 หน่วย จึงชะด้วยสารละลาย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนตด้วยวิธีการเดียวกันพบว่า ค่าการดูดกลืนแสงจะเริ่มสูงกว่า 0.1 หน่วย ในหลอดทดลองที่ 17 และสูงสุดที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.442 ในหลอดทดลองที่ 21 และเริ่มมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.1 หน่วย ในหลอดทดลองที่ 24 และพบว่าค่าการดูดกลืนแสงเมื่อชะด้วย 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต จะมีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดเท่ากับ 0.218 ในหลอดทดลองที่ 44 (ภาพที่ 4.19) จากนั้นทำการรวมสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้และมีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.1 หน่วยขึ้นไปเข้าด้วยกัน นำไปทำการแยกต่อให้บริสุทธิ์มากขึ้น ด้วยวิธี gel filtration chromatography ชะด้วยน้ำกลั่นที่มีอัตราการไหล 15 มิลลิลิตร เก็บสารที่ออกจากคอลัมน์และติดตามค่าการดูดกลืนแสงด้วยวิธีเดียวกันกับ ion exchange chromatography แต่ทำการเก็บจนกระทั่งค่าการดูดกลืนแสงลดต่ำลงกว่า 0.08 หน่วย พบว่าค่าการดูดกลืนแสงจะเริ่มสูงกว่า 0.08 หน่วย ในหลอดทดลองที่ 12 และสูงสุดที่ค่าการดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.176 ในหลอดทดลองที่ 13 และเริ่มมีค่าการดูดกลืนแสงต่ำกว่า 0.08 หน่วย ในหลอดทดลองที่ 14 (ภาพที่ 4.20)



ภาพที่ 4.19 การแยกสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ด้วยวิธี ion exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด 2 X 30 เซนติเมตร ชะด้วยน้ำกลั่นและ 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต อัตราการไหล 60-120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บใส่หลอดทดลองหลอดละ 8 มิลลิลิตร



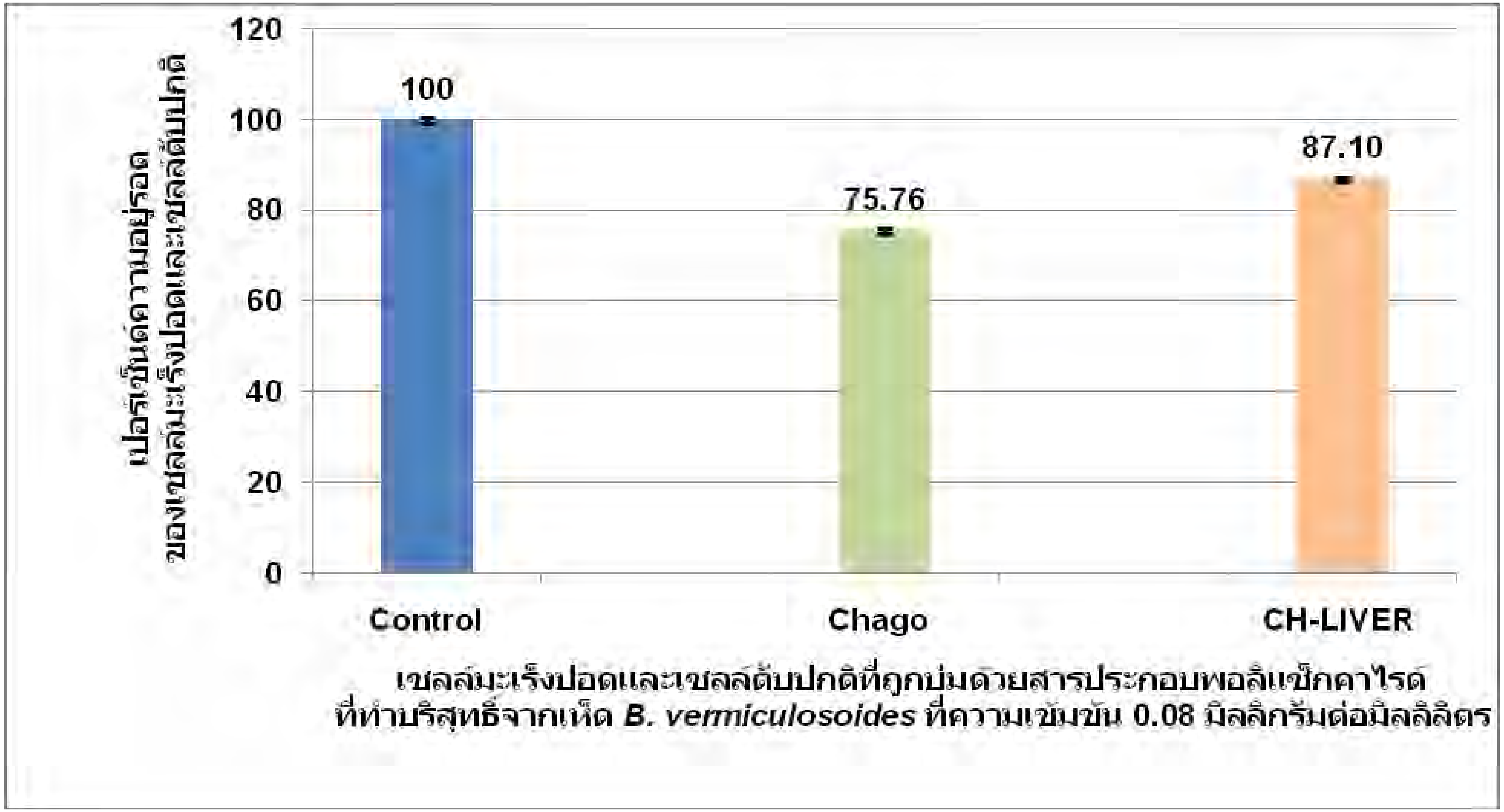
ภาพที่ 4.20 การแยกสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ด้วยวิธี gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 2 X 50 เซนติเมตร ชะด้วยน้ำกลั่น อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บใส่หลอดทดลองหลอดละ 8 มิลลิลิตร

4.9 การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการต้านเซลล์มะเร็งและต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติที่ความเข้มข้นที่ค่า IC_{50}

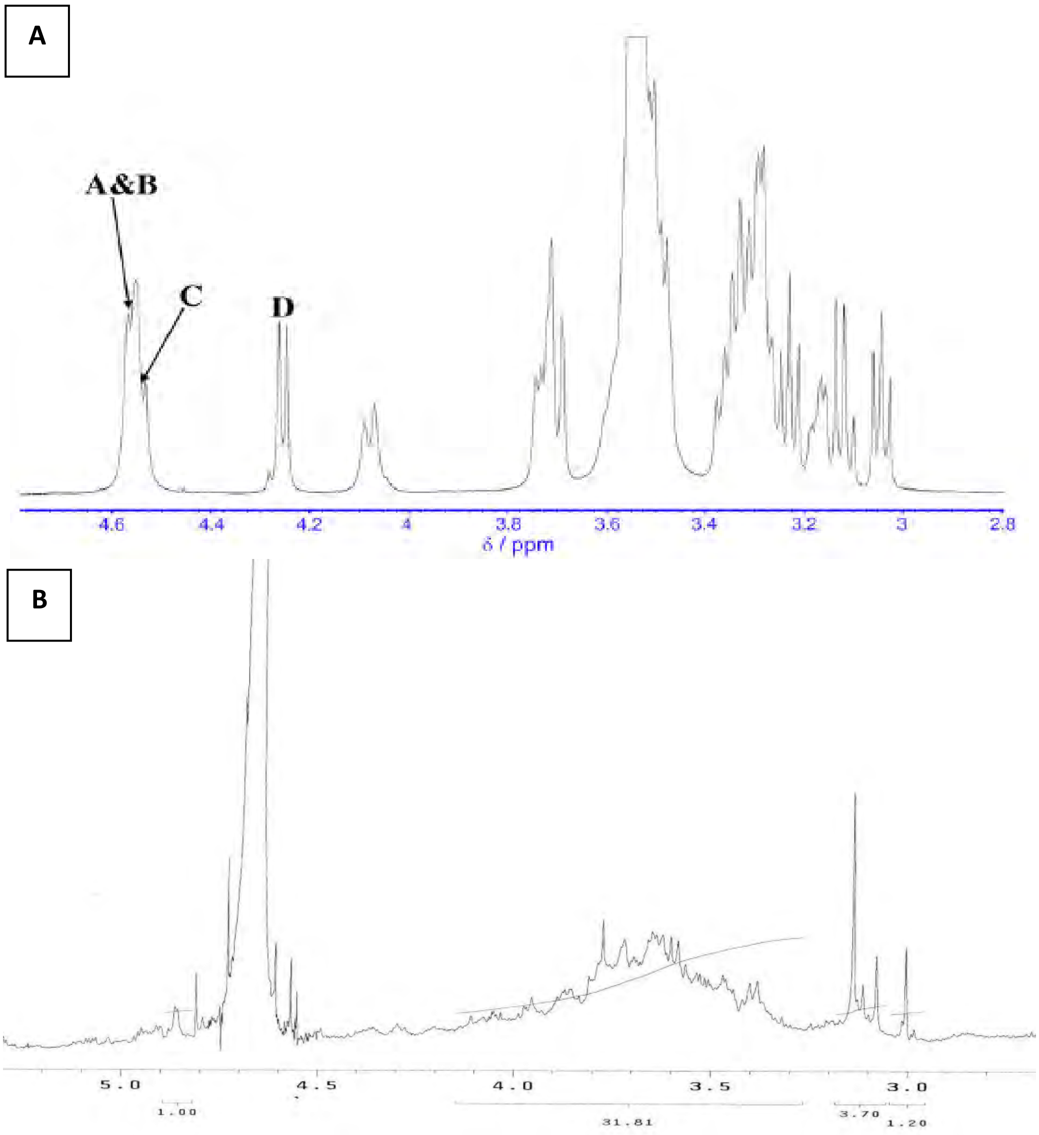
นำเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติมาทำการบ่มด้วยสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้ด้วยวิธี ultrafiltration, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography จากสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 72 ชั่วโมง ในถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม โดยทำการหาปริมาณเซลล์ด้วยวิธี MTT assay และวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 540 นาโนเมตร จากนั้นนำค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยที่ได้มาคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ พบว่าสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้ด้วยวิธี ultrafitration, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเท่ากับ 75.76 เปอร์เซ็นต์ และเซลล์ตับปกติเท่ากับ 87.10 เปอร์เซ็นต์ โดยเทียบกับเซลล์ทั้งสองชนิดที่ไม่ได้ถูกบ่มร่วมกับสารประกอบดังกล่าว (ภาพที่ 4.21)

4.10 การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด

นำตะกอนของพอลิแซ็กคาไรด์ที่ผ่านการทดสอบว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งและแยกให้บริสุทธิ์แล้วมาทำการวิเคราะห์โครงสร้างด้วยเทคนิค NMR นำกราฟที่ได้ไปทำการเปรียบเทียบกับโครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้ากลูแคน (Tada et al, 2009) ซึ่งเป็นโครงสร้างหลักของสารประกอบกลุ่มนี้ที่มีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งและพบได้มากที่สุด พบว่ากราฟ ^{1}H NMR ของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้ากลูแคนจะมีค่า Coupling constants อยู่ในตำแหน่งที่ 4.559 4.559 4.542 และ 4.254 ppm ส่วนกราฟ ^{1}H NMR ของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* มีค่า Coupling constants อยู่ในตำแหน่งที่ 4.610 4.608 4.568 และ 4.553 ppm (ภาพที่ 4.22)



ภาพที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับ
สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร



ภาพที่ 4.22 กราฟแสดงผลการวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด: A. กราฟ ^{1}H NMR ของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้ากลูแคนจากเห็ด *G. frondosa* (Tada et al, 2009), B. กราฟ ^{1}H NMR ของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides*

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง อภิปรายผลการทดลองและข้อเสนอแนะ

5.1 อภิปรายผลการทดลอง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย สามารถได้ตัวอย่างทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง เมื่อนำมาตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายนอกและภายในพบว่าสามารถจัดจำแนกเห็ดที่ได้ในระดับสกุล จำนวน 1 สายพันธุ์คือ *Lepiota* sp. โดยเปรียบเทียบได้จากรายงานของ Arora (1979) แต่เนื่องจากเห็ดชนิดดังกล่าวมีการอ้างอิงมากกว่า 400 ชนิดและมีลักษณะที่ใกล้เคียงกันมากจึงทำให้การจำแนกถึงระดับชนิดนั้นทำได้ยาก สำหรับตัวอย่างเห็ดที่สามารถจัดจำแนกได้ในระดับชนิดมีจำนวน 7 สายพันธุ์คือ *Amanita chepangiana*, *Boletus vermiculosoides*, *Lentinus polychrous*, *Russula virescens*, *Ganoderma colossus*, *Phallus rugulosus* และ *Psilocybe cubensis* โดยเห็ดชนิด *L. polychrous*, *R. virescens*, *P. rugulosus* และ *P. cubensis* เป็นเห็ดที่มีรายงานในประเทศไทยโดยอนงค์ จันทร์ศรีกุลและคณะ (2551) ส่วนเห็ดชนิด *A. chepangiana*, *B. vermiculosoides* และ *G. colossus* เป็นเห็ดที่มีลักษณะเหมือนกับรายงานของ Yang (1992), Smith & Theirs (1971) และ Ryvarden & Johansen (1980) ตามลำดับ นอกจากนี้ยังพบว่าเห็ดทั้ง 3 ชนิดนี้มีรายงานไม่มากนักในประเทศไทย เมื่อทำการแบ่งกลุ่มเห็ดที่จัดจำแนกได้ในระดับสกุลและชนิด พบว่าอยู่ในกลุ่มเห็ดกินได้จำนวน 4 ชนิดคือ *A. chepangiana*, *B. vermiculosoides*, *L. polychrous* และ *R. virescens* อยู่ในกลุ่มเห็ดที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้หรือไม่ได้จำนวน 3 ชนิดคือ *G. colossus*, *Lepiota* sp. และ *P. rugulosus* และอยู่ในกลุ่มเห็ดพิษจำนวน 1 ชนิดคือ *P. cubensis*

การสกัดสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากดอกเห็ด 8 ชนิดและเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง 2 ชนิดคือ PBRU-W0157 และ *Schizophyllum commune* ที่นำมาจากหน่วยปฏิบัติการวิจัยการใช้ประโยชน์จากชีวมวลพืช ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ทำโดยการสกัดด้วยน้ำร้อน เนื่องจากสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นโครงสร้างหลักที่พบในเห็ดเป็นกลุ่มที่สามารถละลายน้ำได้ (Mizuno, 1996) และเมื่อนำสารสกัดหยาบที่ได้มาหาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการหาความเข้มข้นของพอลิเมอร์ดังกล่าว โดยผสมสารสกัดหยาบจากเห็ดที่เจือจางแล้วกับสารละลายอันโทรนที่เป็นผสมระหว่างสารอันโทรนกับกรดซัลฟิวริกเข้มข้น พบว่าสารสกัดที่มีพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบจะให้สารละลายที่มีสีเขียวหรือสีเขียวแกมน้ำเงิน โดยสารสกัดหยาบจากเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดชนิด

S. commune มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์มากที่สุดคือ 6.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและยังพบว่า 1 กรัมของเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งของเห็ดชนิดดังกล่าวให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 73.85 กรัม Kumari et al. (2007) ทำการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิด *S. commune* NRCM โดยทำการเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดใน seed culture medium ที่อุณหภูมิ 28 องศาเซลเซียส และทำการปั่นเหวี่ยงที่ 180 รอบต่อนาที เป็นเวลา 68 ชั่วโมง จากนั้นนำส่วนที่เป็นของเหลวมาวิเคราะห์ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ โดยการตกตะกอนด้วย isopropanal 96 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส ตั้งทิ้งไว้เป็นเวลา 1 ชั่วโมง พบว่ามีปริมาณของพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 8.03 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และปริญญา รัตนะพิมาน (2535) ได้ทำการสกัดพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิด *Ganoderma lucidum* โดยทำการสกัดด้วย น้ำร้อนและวิเคราะห์หาปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test พบว่าเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้ง 1 กรัม ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 31 มิลลิกรัม จากการศึกษาครั้งนี้จะเห็นได้ว่าเส้นใยบริสุทธิ์อบแห้งจากเห็ดชนิด *S. commune* ให้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงเมื่อเทียบกับการผลิตพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดอื่น ๆ แต่การสกัดออกมาให้ได้ปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ที่สูงหรือต่ำขึ้นอยู่กับปัจจัยหลายชนิดร่วมกัน เช่น วิธีการที่ใช้ในการสกัด ระยะเวลาที่ใช้ในการสกัด และอาหารที่ใช้ในการเลี้ยงเส้นใยบริสุทธิ์ เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดในการต้านการเจริญเติบโตเซลล์มะเร็งปอดและผลต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ สำหรับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *Boletus vermiculosoides* ซึ่งมีความเข้มข้น 1.77 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดต่ำสุดคือ 3.44 เปอร์เซ็นต์ และเมื่อนำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดดังกล่าวที่ความเข้มข้นต่าง ๆ มาบ่มเซลล์มะเร็งปอด พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดคือ 50 เปอร์เซ็นต์ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เรียกว่าความเข้มข้นที่ค่า IC_{50} ซึ่งฤทธิ์ทางชีวภาพของพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *B. vermiculosoides* ต่อเซลล์มะเร็งนั้นยังไม่มีรายงานมาก่อนในประเทศไทย Chung et al. (2001) ได้ทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบที่สกัดด้วยน้ำร้อนจากเส้นใยบริสุทธิ์ของเห็ดชนิด *G. lucidum* กับเซลล์มะเร็งปอดของมนุษย์ที่ความเข้มข้น 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดที่ 24.04 เปอร์เซ็นต์ และได้ทำการบ่มสารสกัดดังกล่าวกับ human T cell line (H9) ซึ่งเป็นเซลล์ชนิดหนึ่งในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมนุษย์ พบว่าสามารถเพิ่มจำนวน human T cell line (H9) ได้จาก 100,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตร เป็น 400,000 เซลล์ต่อมิลลิลิตรในเวลา 4 วัน แสดงว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิด *G. lucidum* ช่วยในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเพื่อยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอด นอกจากนี้ยังทำการทดสอบผลของสารสกัดจากเห็ด *G. lucidum* กับเซลล์ปอดปกติของมนุษย์ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์สูงถึง 80 เปอร์เซ็นต์ สำหรับการศึกษา

ครั้งนี้เห็นได้ว่าสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* สามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้ดีในระดับหนึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับรายงานอื่น ๆ กลไกการทำงานเป็นไปได้ว่าพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบจากเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* อาจจะไปจับกับตัวรับ (receptor) บางชนิดบนเซลล์มะเร็งปอดแล้วทำให้เกิดการยับยั้งการเจริญได้ เนื่องจากในการทดลองครั้งนี้บ่มสารสกัดหยาบดังกล่าวร่วมกับเซลล์มะเร็งปอด แต่มิได้ทดสอบกับเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายจึงยังไม่สามารถยืนยันได้ว่าสารสกัดจากเห็ด *B. vermiculosoides* มีผลกระตุ้นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเช่นเดียวกับสารสกัดจาก *G. lucidum* หรือไม่ ปริญญา รัตนะพิมาน (2535) ได้ทำการทดสอบความเป็นพิษของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้โดยการฉีดให้แก่หนูไมซ์ไร้ขน พบว่าน้ำหนักตัวของหนูไมซ์ไร้ขนไม่มีการเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญในทุกกลุ่มทดลองตลอดระยะเวลาที่ทำการทดลอง 90 วัน ซึ่งแสดงว่าสารที่สกัดได้ไม่มีผลต่อเซลล์ปกติ อย่างไรก็ดีพบว่าสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ตับเท่ากับ 90.08 เปอร์เซ็นต์ซึ่งแสดงว่าพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ไม่ได้เป็นอันตรายต่อเซลล์ปกติเช่นเดียวกัน

การทำบริสุทธิ์สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ด้วยวิธี ultrafiltration, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography และนำมาทำการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งปอดและต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติ พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้บ้าง และมีผลต่อการเติบโตของเซลล์ตับปกติเล็กน้อยซึ่งไม่ตรงกับผลของปริญญา รัตนะพิมาน (2535) โดยให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติเท่ากับ 75.76 และ 87.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จะเห็นได้ว่าความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลง Chow et al. (2003) ทดลองเลี้ยงเซลล์มะเร็งปากมดลูก MAD-MB-231 ใน *in vitro* และบ่มด้วย PSP (polysaccharide-peptide complex) จากเห็ดสายพันธุ์ *Trametes versicolor* พบว่าสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งดังกล่าวได้อย่างมีนัยสำคัญ และทำการบ่มร่วมกับ T-lymphocytes พบว่าไม่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ดังกล่าวได้ นอกจากนี้พอลิแซ็กคาไรด์บางชนิด เช่น schizophyllan ที่สกัดได้และทำให้บริสุทธิ์แล้วจากเห็ดชนิด *S. commune* ก็มีความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งลดลงถ้าไม่บ่มร่วมกับสารอื่น เช่น โปรตีนหรือยาบางชนิด (Daba & Ezeronye, 2003) นอกจากนี้ยังพบอีกว่า schizophyllan ไม่สามารถยังยั้ง Yoshida sarcoma ascites tumor ได้ (Wasser and Weis, 1999) แสดงว่าสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* อาจจะต้องทำงานร่วมกับสารอื่น เช่น โปรตีน เม็ดสี และเกลือบางชนิด เป็นต้น ที่ถูกแยกออกไปด้วยวิธี

ultrafitration, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography จึงทำให้สารที่ผ่านการทำบริสุทธิ์มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งลดลงจากที่เคยทำได้ในสารสกัดหยาบขั้นต้น

การวิเคราะห์โครงสร้างของสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้จากสารสกัดหยาบจากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* โดยการวิเคราะห์แบบ ^{1}H NMR พบว่าได้กราฟที่มีลักษณะใกล้เคียงกันกับรูปแบบของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้า-กลูแคนของ Tada et al. (2007) ซึ่งพบในเห็ดชนิด *Grifola frondosa* ที่สกัดด้วยน้ำและมีฤทธิ์ในการยับยั้งเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมากได้ (Fullerton et al., 2000) แสดงว่าสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้น่าจะมีเบต้า-กลูแคนเป็นโครงสร้างหลัก เนื่องจากเบต้า-กลูแคนนั้นเป็นโครงสร้างหลักและมีจำนวนมากในเห็ด สามารถละลายน้ำได้ และมีรายงานว่ามีฤทธิ์ในการต้านเซลล์มะเร็งชนิดต่าง ๆ (Moradali et al., 2007)

5.2 สรุปผลการทดลอง

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่าง ๆ ในประเทศไทย สามารถได้ตัวอย่างทั้งสิ้น 25 ตัวอย่าง นำมาจัดจำแนกโดยลักษณะทางสัณฐานวิทยาได้ในระดับสกุล 1 สายพันธุ์คือ *Lepiota* sp. และในระดับชนิด 7 สายพันธุ์คือ *Amanita chepangiana, Boletus vermiculosoides, Lentinus polychrous, Russula virescens, Ganoderma colossus, Phallus rugulosus* และ *Psilocybe cubensis* เมื่อทำการแบ่งกลุ่มเห็ดที่จัดจำแนกได้ พบว่าอยู่กลุ่มเห็ดกินได้ 4 ชนิดคือ *A. chepangiana, B. vermiculosoides, L. polychrous* และ *R. virescens* อยู่ในกลุ่มที่ไม่มีข้อมูลว่ากินได้หรือไม่ได้ 3 ชนิดคือ *G. colossus*, *Lepiota* sp. และ *P. rugulosus* และอยู่ในกลุ่มเห็ดพิษ 1 ชนิดคือ *P. cubensis* จากนั้นนำเห็ดทั้ง 8 ชนิดและเส้นใยบริสุทธิ์ 2 ชนิดคือ PBRU-W0157 และ *Schizophyllum commune* มาสกัดด้วยน้ำร้อนด้วยเครื่องสกัดสาร soxhlet และหาความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ด้วยวิธี anthrone test พบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดมีความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ตั้งแต่ 0.086 ถึง 6.56 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรโดยพบมากที่สุดในสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิด *S. commune* จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดไปบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งปอด พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดตั้งแต่ 3.44 ถึง 100.1 เปอร์เซ็นต์ โดยสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดต่ำสุดหรือมีประสิทธิภาพสูงสุดในการยับยั้งเซลล์มะเร็งปอด นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดหยาบจากเห็ดสายพันธุ์ดังกล่าวให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดที่ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ต่อมานำสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความ

เข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มาทำการบ่มร่วมกับเซลล์ตับปกติ พบว่าให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเท่ากับ 90.08 เปอร์เซ็นต์ จากนั้นทำการแยกพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ให้บริสุทธิ์โดยวิธี ultrafiltration, ion exchange chromatography และ gel filtration chromatography จากนั้นนำมาบ่มร่วมกับเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติให้เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติเท่ากับ 75.76 และ 87.10 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ ซึ่งพบว่าเซลล์ตับปกติมีเปอร์เซ็นต์การ อยู่รอดสูงกว่าเซลล์มะเร็งปอด แต่สารจากเห็ดชนิด *B. vermiculosoides* ที่ทำบริสุทธิ์โดยผ่านกระบวนการต่าง ๆ ยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งปอดได้น้อยกว่าสารสกัดหยาบ ซึ่งเป็นไปได้ว่าสารสกัดจากเห็ดชนิด *B. vermiculosoides* ยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งปอดโดยการทำงานร่วมกับสารอื่น เช่น โปรตีน เม็ดสี และเกลือบางชนิด เป็นต้น สุดท้ายนำพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้มาทำการวิเคราะห์โครงสร้างของพอลิแซ็กคาไรด์ที่แยกได้ด้วยเทคนิค ^{1}H NMR พบว่ามีลักษณะใกล้เคียงกับรูปแบบของพอลิแซ็กคาไรด์ชนิดเบต้า-กลูแคน

5.3 ข้อเสนอแนะ

การสำรวจและเก็บตัวอย่างเห็ดในสภาพธรรมชาติจากพื้นที่ต่าง ๆ ของประเทศไทย ไม่ว่าจะเป็นการเก็บเห็ดเพื่อนำมารับประทานหรือเพื่อการวินิจฉัยชนิด จะต้องมีการเตรียมตัวที่ดีและทราบถึงฤดูกาลที่เหมาะสมในการออกไปเก็บเห็ดซึ่งก็คือฤดูฝน โดยเฉพาะตอนต้นฤดูหรือภายหลังจากที่มีฝนตกแล้ว 3 ถึง 4 วัน และมีแดดส่องจนพื้นดินอบอุ่นในระหว่างนั้นด้วย เพราะความชื้นและความอบอุ่นช่วยให้เส้นใยของราที่อยู่ใต้ดิน หรือในเศษซากสิ่งมีชีวิตเจริญอย่างรวดเร็วและสมบูรณ์เต็มที่จนสร้างดอกเห็ดขึ้นมาได้ การเก็บดอกเห็ดควรเก็บทั้งที่เป็นดอกตูมและดอกที่บานแล้ว ในขณะที่เก็บต้องสังเกตและจดบันทึกสภาพที่ดอกเห็ดเจริญอยู่ เช่น ดอกเห็ดขึ้นอยู่บนสิ่งใด เกิดเดี่ยว ๆ กระจายอยู่ห่างกันหรือเกิดเป็นกลุ่มอยู่ใกล้ ๆ กัน เป็นต้น ต้องรีบอธิบายลักษณะภายนอกของดอกเห็ดในขณะที่ดอกยังสดอยู่ เมื่อบันทึกลักษณะภายนอกเรียบร้อยแล้ว ถ้าสามารถวินิจฉัยชื่อดอกเห็ดได้ถึงระดับสกุลและชนิดก็ควรที่จะกระทำให้เสร็จโดยเร็ว

การทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งและผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ปกติของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด ควรจะทดสอบกับเซลล์จากระบบภูมิคุ้มกันด้วย เพื่อทำการตรวจสอบว่าสารสกัดดังกล่าวจะช่วยกระตุ้นการสร้างหรือยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์ และยังสามารถนำไปใช้ในการอธิบายกระบวนการที่เกิดขึ้นจากผลการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพได้ชัดเจนมากยิ่งขึ้น

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

กัลยาณี จิรศรีพงศ์พันธ์. เทคนิคพื้นฐานการเพาะเลี้ยงเซลล์สัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 3. นครปฐม : โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยศิลปากร, 2550.

วินัย กลิ่นหอมและอุษา กลิ่นหอม. 57 เห็ดเป็นยาแห่งป่าอีสาน. กรุงเทพมหานคร: มูลนิธิสุขภาพไทย, 2548.

อนงค์ จันทร์ศรีกุล ธานี พานิชผล ธีรวัฒน์ บุญทวีคุณและอนิวรรต เฉลิมพงษ์. เห็ดในประเทศไทย. 2000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 2. นนทบุรี: ทีฟิล์ม, 2551.

ปริญญา รัตนะพิมาน. การผลิตสารที่มีฤทธิ์ต่อต้านมะเร็งในเห็ดหมื่นปี [*Ganoderma lucidum* (Fr.) Karst.]. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต สาขาวิชาเทคโนโลยีชีวภาพ บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2535.

ภาษาอังกฤษ

Attasara. P. and Buasom. R. Hospital-based cancer registry. National cancer Institute, 2008.

Arora. D. Mushrooms demystified. Second edition. Berkeley california : Ten speed press, 1979.

Chandrasrikul. A. Suwanarit. P. Sangwanit. U. Morinaga. T. Nishizawa. Y. and Murakami. Y. Diversity of Mushrooms Macrofungi in Thailand. Bangkok : Kasetsart, 2008.

Chihara. G. Hamuro. J. Meada. Y. Arai. Y. and Fukuoka. F. Fractionation and purification of polysaccharides with marked antitumor activity, especially Lentinan from *Lentinus edodes* (Bark) sing, an edible mushroom. Cancer Research 30 (1970): 2776-2781.

Cho. S.M. Park. J.S. Kim. K.P. Cha. D.Y. Kim. H.M. and Yoo. I.D. Chemical features and purification of immunostimulating polysaccharides from the fruit bodies of *Agaricus blazei*. The Korean Journal of Mycology 27 (1999) : 170-174.

Chung. W.T. Lee. S.H. Kim. J.D. Park. Y.S. Hwang. B. Lee. S.Y. and Lee. H.Y. Effect of mycelia culture broth of *Ganoderma lucidum* on the growth characteristics of human cell lines. Jounal of Bioscience and Bioengineering 92 (2001) : 550-555.

Chow. L. Lo. W. Loo. C.S. Hu. W. and Sham. X.J. Polysaccharide peptide mediates apoptosis by up-regulating p21 gene and down-regulating cyclin D1 gene. American Journal Chinese Medicine 31 (2003) : 1-9.

Daba. A.S and Ezeronye. O.U. Antitumor effect of polysaccharides isolated from higher basidiomycetes mushrooms (minireview). African Journal of Biotechnology 2 (2003) : 672-678.

El-Gohary. A. Chaos and optimal control of cancer self-remission and tumor system steady states.Choaos Solitons and Fractals 37 (2008) : 1305-1316.

Fulleroton. S.A. and Samadi. A.A. Induction of apoptosis in human prostate cancer cell with β-glucan (Maitake mushroom polysaccharides). Molecular Urology 4 (2000) : 7-13.

Furue. H. and Kitoh. I. Phase 111-study on Lentinan. Japanese Journal of Cancer and. Chemotherapy 8 (1981) : 944-960.

Gibbs. W.W. Untangling the root of cancer. Scientific American 289 (2003) : 48-57.

Ikekawa. T. Beneficial effects of edible and medicinal mushrooms in health care. International Journal of Medicinal Mushrooms 3 (2001) : 291-298.

Jang. M. Cai. L Udeani G.O. Slowing. K.V. Thomas C.F. Beecher. C.W.W. Fong. H.H.S. Farnsworth. N.R. Kinghorn. A.D. Mehta. R.G. Moon. R.C. and Pezzuto. J.M. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes. Science 10 (1997) : 218-221.

Kamiyama. Y. Improving effect of active hexose correlated compound (AHCC) on the prognosis of postoperative hepatocellular carcinoma patients. European Surgical Research 31 (1992) : 216.

Kumari. M. Survase. A.S. and Singhal. S.R. Production of schizophyllan using *Schizophyllum commune* NRCM. Bioresource Technology 99 (2008) : 1036-1043.

Lavi. I. Friesem. D. Geresh. S. Hadar. Y. and Schwartz. B. An aqueous polysaccharide extract from the edible mushroom *Pleurotus ostratus* induces anti-proliferative and pro-apoptotic effects on HT-29 colon cancer cells. Cancer Letters 244 (2006) : 61-70.

Maeda. Y. and Chihara. G. Lentinan, a new immunoaccelerator of cells-mediated response. Nature 229 (1971) : 634-647.

Miyazaki. K. Mizutani. H. Katabuchi. H. Fukuma. K. Fujsaki. S and Okamura. H. Activated (HLA-DR+) T-Lymphocyte subsets in cervical carcinomas and effects of radiotheraphy and immunotherapy with sizofiran on cell mediated immunity and survival. Gynecologic Oncology 56 (1995) : 412-420.

Mizuno. T. A development of antitumor polysaccharides from mushroom fungi. Foods and Food Ingredients Journal of Japan 167 (1996) : 69-85.

Mizuno. T. The extraction and development of antitumor-active polysaccharides from medicinal mushrooms in Japan (review). International Journal of Medicinal Mushrooms 1 (1999) : 9-29.

Moradali. M. Mostafavi. H. Ghods. S. and Hedjaroude. G. Immunomodulating and anticancer agents in the realm of macromycetes fungi (macrofungi) (review). International Immunophamacology 7 (2007) : 701-724.

Nanba. H. Results of non-controlled clinical study for various cancer patients using Maitake D-fraction. Explore 6 (1995) : 19-21.

Nie. X. Shi. B. Ding. Y. and Tao. W. Preparation of a chemically sulfated polysaccharide derived from *Grifola frondosa* and its potential biological activities. International Journal of Biological Macromolecules 39 (2006) : 228-233.

Ryvarden. L. and Johansen. I. A preliminary polypore flora of East Africa. Oslo Norway : Fungiflora, 1980.

Smith. H.A. and Theirs. D.H. The Bolete of Michigan. The University of Michigan : 1971.

Tada. R. Adachi. Y. Isibashi. K. and Ohno. N. An unambiguous structural elucidation of 1,3-β-D-glucan obtained from liquid-cultured *Grifola frondosa* by solution NMR experiments. Carbohydrate Research 344 (2009) : 400-404.

Taguchi. T. Furue. H. Kimura. T. Kondo. T. Hattori. T. Itoh. T. and Osawa. N. End point results of phase III study of lentinan. Japanese Journal of Cancer and Chemotherapy 12 (1985) : 366-380.

Wasser. J.G.H. and Sietaman. J. Wall structure and growth in *Schizophyllum commune*. Fungal walls and hyphal growth 1979 : 27-37.

Wasser. S.P. Medicinal mushrooms as a source of antitumor and immunimodulating polysaccharides. Applied Microbiology and Biotechnology 10 (2002) : 13-32.

Wasser. S.P. and Weis. A.L. Medicinal Properties of substances occurring in Higher Basidiomycetes Mushroom: current perspectives (Review). International Journal of Medicinal Mushrooms 1 (1999) : 31-62.

Yang. C.L. *Amanita caesarea*. *Edible Fungi of China* 11(1992): 1-6.

Zhang. M. Cui. S.W. Cheung. P.C.K. and Wang. Q. Antitumor polysaccharides from mushroom: a review on their isolation process, structural characteristics and antitumor activity. Food Science & Technology 18 (2007) : 4-19.

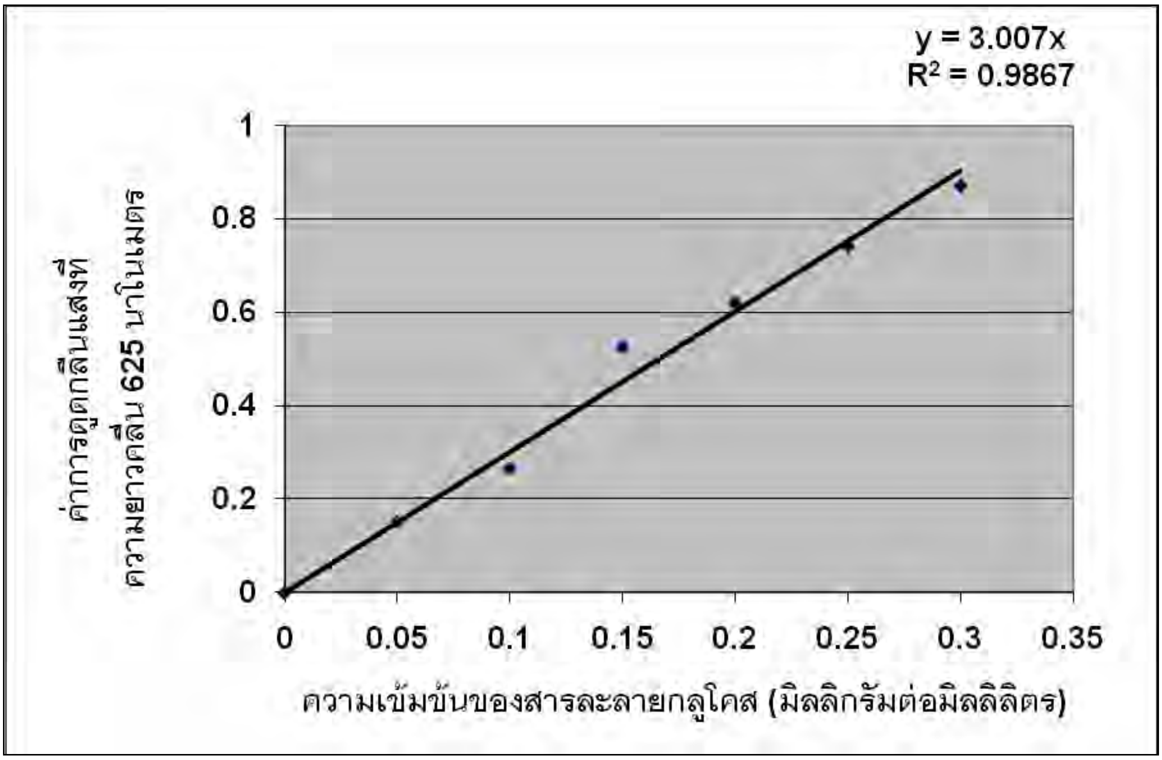
Zhuang. C. Mizuno. T. Ito. H. Shimura. K. Sumiya. T. and Kawade. M. Antitumor activity and immunological property of polysaccharides from mycelium of liquid-cultured *Grifola frondosa*. Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi 41 (1994) : 724-735.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก

ก.1 การทำกราฟสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

การทำกราฟสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายอันโทรนลงไป 2.5 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ภาพที่ ก.1)



ภาพที่ ก.1 กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยวิธี anthrone test

ก.2 ตัวอย่างวิธีคำนวณค่าความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากเห็ดเทียบกับกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน

Amanita chepangiana Tulloss & Bhandary.

1) ทำการเจือจางสารสกัดหยาบจากเห็ด 1 มิลลิลิตรต่อน้ำกลั่น 19 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:20)

2) น้ำหนักผงที่ใช้ในการสกัดสารทั้งหมดคือ 53.24 กรัม

3) ปริมาตรของสารสกัดทั้งหมดคือ 550 มิลลิลิตร

4) ค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร โดยวิธี anthrone test คือ 0.180, 0.155, 0.168

ดังนั้น (0.180/3.007) X 20 (จำนวนเท่าที่เจือจาง) มีค่าเท่ากับ 1.20 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(0.155/3.007) X 20 (จำนวนเท่าที่เจือจาง) มีค่าเท่ากับ 1.04 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

(0.168/3.007) X 20 (จำนวนเท่าที่เจือจาง) มีค่าเท่ากับ 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

เพราะฉะนั้นความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์เฉลี่ยคือ 1.12 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

5) สารสกัดหยาบจากเห็ด 1 มิลลิลิตร มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบ 1.12 มิลลิกรัม ดังนั้น สารสกัดหยาบจากเห็ด 550 มิลลิลิตร จะมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เป็นองค์ประกอบเท่ากับ 1.12 X 550 หรือ 616 มิลลิกรัม แสดงว่าผงเห็ด 53.24 กรัมที่ใช้ในการสกัดทั้งหมด มีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์ 616 มิลลิกรัม ดังนั้นผงเห็ด 1 กรัม จะมีปริมาณพอลิแซ็กคาไรด์เท่ากับ 616/53.24 หรือ 11.57 มิลลิกรัม

หมายเหตุ สำหรับการคำนวณหาค่าความเข้มข้นของพอลิแซ็กคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบในสารสกัดหยาบจากเห็ดชนิดอื่น ๆ ก็ใช้วิธีการเดียวกันกับวิธีการข้างต้นที่กล่าวมา

ก.3 ตัวอย่างวิธีการคำนวณหาปริมาณเซลล์ด้วยวิธี hemacytometer

1 ช่องตารางสี่เหลี่ยมจัตุรัสมีปริมาตรเท่ากับ 1 X 1 X 0.1 หรือ 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตร และปริมาตร 0.1 ลูกบาศก์มิลลิเมตรมีค่าเท่ากับ 10^{-4} มิลลิลิตร

จำนวนเซลล์มีชีวิต (ย้อมไม่ติดสี Trypan blue) ในช่องนับเซลล์ทั้ง 4 ช่องมีค่าเท่ากับ 35+30+31+34 หรือ 130 เซลล์ และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 130/4 หรือ 32.5 เซลล์

จำนวนเซลล์ตาย (ย้อมติดสี Trypan blue) ในช่องนับเซลล์ทั้ง 4 ช่องมีค่าเท่ากับ 4+5+4+5 มีค่าเท่ากับ 18 เซลล์ และมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 18/4 หรือ 4.5 เซลล์

โดยตัวอย่างที่นับถูกเตรียมจากเซลล์ 0.2 มิลลิลิตร (200 ไมโครลิตร) เจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ 0.4 มิลลิลิตร (400 ไมโครลิตร) ใน นำสารละลายเซลล์ที่เจือจางแล้วใน มา 0.02 มิลลิลิตร (20 ไมโครลิตร) ผสมกับ 0.4 เปอร์เซ็นต์ Trypan blue 0.02 มิลลิลิตร (อัตราส่วน 1:1) ย้อมเป็นเวลา 1 นาที ดังนั้น dilution Factor (1) มีค่าเท่ากับ (0.2+0.4)/0.2 หรือ 3 และค่า dilution Factor (2) มีค่าเท่ากับ (0.02+0.02)/0.02 หรือ 2 จะได้ว่าค่า dilution Factor รวมเท่ากับ 3 X 2 หรือ 6

เซลล์ตัวอย่างที่นับได้มีจำนวนเซลล์มีชีวิตเท่ากับ (130/4) X 10^{4} หรือ 3.25 X 10^{5} เซลล์ต่อมิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ตายเท่ากับ (18/4) X 10^{4} หรือ 4.5 X 10^{4} เซลล์ต่อมิลลิลิตร ดังนั้นเปอร์เซ็นต์ความมีชีวิตมีค่าเท่ากับ [32.5/(32.5+4.5)] X 100 หรือ 87.84 เปอร์เซ็นต์และมีปริมาณเซลล์ตั้งต้นก่อนเจือจางเท่ากับ [(130+18)/4] X 6 (dilution Factor)X 10^{4} หรือ 2.22 X 10^{6} เซลล์ต่อมิลลิลิตร

สมมติให้เซลล์ตั้งต้นแขวนลอยอยู่ในอาหารเลี้ยงเซลล์ในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 25 มิลลิลิตร จำนวน 6 มิลลิลิตร เพราะฉะนั้นเซลล์ทั้งหมดในภาชนะเลี้ยงมีค่าเท่ากับ 2.22 X 10^{6} X 6 หรือ 1.33 X 10^{7} เซลล์

1 หลุมของถาดเลี้ยงเซลล์ 96 หลุม บรรจุสารละลายเซลล์รวมกับอาหารเลี้ยงเซลล์จำนวน 200 ไมโครลิตร (0.2 มิลลิลิตร) สมมติว่าบรรจุเซลล์ทั้งหมด 36 หลุม ดังนั้นใช้ปริมาตรสารละลายเซลล์จำนวน 36 X 0.1 หรือ 3.6 มิลลิลิตร แต่เตรียมจริง 4 มิลลิลิตร

เนื่องจากสารละลายเซลล์ 0.1 มิลลิลิตร มีจำนวนเซลล์ 5000 เซลล์ ดังนั้นสารละลาย 4 มิลลิลิตร จะมีจำนวนเซลล์เท่ากับ (5000 X 4)/0.1 หรือ 200,000 เซลล์

แต่เซลล์ตั้งต้นมีความมีชีวิต 87.84 เปอร์เซ็นต์ เพราะฉะนั้นต้องใช้เซลล์จากเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ (100 X 200,000)/87.84 หรือ 2.28 X 10^5 เซลล์

และต้องใช้เซลล์จากเซลล์ตั้งต้นเท่ากับ (2.28 X 10^5)/2.22 X 10^6 หรือ 0.10 มิลลิลิตร ดังนั้นจะดูดเซลล์จากหลอดปั่นเหวี่ยงมาจำนวน 0.08 มิลลิลิตร ผสมกับอาหารเลี้ยงเซลล์ให้ได้ 4 มิลลิลิตร กระจายเซลล์ให้สม่ำเสมอกันแล้วค่อยหยอดลงหลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร

ก.4 วิธีคำนวณเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอด

สมมติ ให้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่ไม่ได้ถูกบ่มด้วยสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดเท่ากับ 1.600 หรือคิดเป็น 100 เปอร์เซ็นต์ และให้ค่าการดูดกลืนแสงเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่ถูกบ่มด้วยสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด เท่ากับ 0.800 เพราะฉะนั้น เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์คิดเป็น (0.800/1.600) X 100 = 50 เปอร์เซ็นต์

ก.5 การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

1) ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดชนิดต่าง ๆ โดยการศึกษานี้จะเก็บผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดชนิดต่าง ๆ จำนวน 10 ชนิด ชนิดละ 3 ซ้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ก.1

ตารางที่ ก.1 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด 10 ชนิด

ชนิดเห็ด	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอด		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
A. chepangiana	62.89	62.85	60.55
B. vermiculosoides	3.98	4.14	2.18
L. polychrous	68.07	70.15	68.69
R. virescens	67.36	67.10	68.64
PBRU-W0157	45.66	45.72	44.84
S. commune	64.44	64.27	62.94
G. colossus	74.91	76.12	75.79
Lepiota sp.	36.56	39.83	37.99
P. rugulosus	102.11	99.75	98.47
P. cubensis	81.80	78.76	87.28

H_0 = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด

H_1 = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดชนิดต่าง ๆ 10 ชนิด อย่างน้อย 1 ค่า

Descriptives

Number

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
A. chepangiana	3	62.0967	1.33960	.77342	58.7689	65.4244
B. vermiculosoides	3	3.4333	1.08836	.62837	.7297	6.1370
L. polychrous	3	68.9700	1.06790	.61655	66.3172	71.6228
R. virescens	3	67.7000	.82438	.47596	65.6521	69.7479
PBRU-W0157	3	45.4067	.49166	.28386	44.1853	46.6280
S. commune	3	63.8833	.82136	.47421	61.8430	65.9237
G. colossus	3	75.6067	.62549	.36112	74.0529	77.1605
Lepiota sp.	3	38.1267	1.63928	.94644	34.0545	42.1989
P. rugulosus	3	100.1100	1.84651	1.06608	95.5230	104.6970
P. cubensis	3	82.6133	4.31784	2.49291	71.8872	93.3394
Total	30	60.7947	25.78776	4.70818	51.1654	70.4240

Number

	Minimum	Maximum
A. chepangiana	60.55	62.89
B. vermiculosoides	2.18	4.14
L. polychrous	68.07	70.15
R. virescens	67.10	68.64
PBRU-W0157	44.84	45.72
S. commune	62.94	64.44
G. colossus	74.91	76.12
Lepiota sp.	36.56	39.83
P. rugulosus	98.47	102.11
P. cubensis	78.76	87.28
Total	2.18	102.11

Test of Homogeneity of Variances

Number

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
2.900	9	20	.023

ANOVA

Number

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	19223.553	9	2135.950	692.429	.000
Within Groups	61.694	20	3.085		
Total	19285.248	29			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Number
LSD

(I) Mushroom	(J) Mushroom	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
A. chepangiana	*B. vermiculosoides*	58.66333*	1.43404	.000	55.6720	61.6547
	L. polychrous	-6.87333*	1.43404	.000	-9.8647	-3.8820
	R. virescens	-5.60333*	1.43404	.001	-8.5947	-2.6120
	PBRU-W0157	16.69000*	1.43404	.000	13.6986	19.6814
	S. commune	-1.78667	1.43404	.227	-4.7780	1.2047
	G. colossus	-13.51000*	1.43404	.000	-16.5014	-10.5186
	Lepiota sp.	23.97000*	1.43404	.000	20.9786	26.9614
	P. rugulosus	-38.01333*	1.43404	.000	-41.0047	-35.0220
	P. cubensis	-20.51667*	1.43404	.000	-23.5080	-17.5253
B. vermiculosoides	*A. chepangiana*	-58.66333*	1.43404	.000	-61.6547	-55.6720
	L. polychrous	-65.53667*	1.43404	.000	-68.5280	-62.5453
	R. virescens	-64.26667*	1.43404	.000	-67.2580	-61.2753
	PBRU-W0157	-41.97333*	1.43404	.000	-44.9647	-38.9820
	S. commune	-60.45000*	1.43404	.000	-63.4414	-57.4586
	G. colossus	-72.17333*	1.43404	.000	-75.1647	-69.1820
	Lepiota sp.	-34.69333*	1.43404	.000	-37.6847	-31.7020
	P. rugulosus	-96.67667*	1.43404	.000	-99.6680	-93.6853
	P. cubensis	-79.18000*	1.43404	.000	-82.1714	-76.1886
L. polychrous	*A. chepangiana*	6.87333*	1.43404	.000	3.8820	9.8647
	B. vermiculosoides	65.53667*	1.43404	.000	62.5453	68.5280
	R. virescens	1.27000	1.43404	.386	-1.7214	4.2614
	PBRU-W0157	23.56333*	1.43404	.000	20.5720	26.5547
	S. commune	5.08667*	1.43404	.002	2.0953	8.0780
	G. colossus	-6.63667*	1.43404	.000	-9.6280	-3.6453
	Lepiota sp.	30.84333*	1.43404	.000	27.8520	33.8347
	P. rugulosus	-31.14000*	1.43404	.000	-34.1314	-28.1486
	P. cubensis	-13.64333*	1.43404	.000	-16.6347	-10.6520
R. virescens	*A. chepangiana*	5.60333*	1.43404	.001	2.6120	8.5947
	B. vermiculosoides	64.26667*	1.43404	.000	61.2753	67.2580
	L. polychrous	-1.27000	1.43404	.386	-4.2614	1.7214
	PBRU-W0157	22.29333*	1.43404	.000	19.3020	25.2847
	S. commune	3.81667*	1.43404	.015	.8253	6.8080
	G. colossus	-7.90667*	1.43404	.000	-10.8980	-4.9153
	Lepiota sp.	29.57333*	1.43404	.000	26.5820	32.5647
	P. rugulosus	-32.41000*	1.43404	.000	-35.4014	-29.4186
	P. cubensis	-14.91333*	1.43404	.000	-17.9047	-11.9220
PBRU-W0157	*A. chepangiana*	-16.69000*	1.43404	.000	-19.6814	-13.6986
	B. vermiculosoides	41.97333*	1.43404	.000	38.9820	44.9647
	L. polychrous	-23.56333*	1.43404	.000	-26.5547	-20.5720
	R. virescens	-22.29333*	1.43404	.000	-25.2847	-19.3020
	S. commune	-18.47667*	1.43404	.000	-21.4680	-15.4853
	G. colossus	-30.20000*	1.43404	.000	-33.1914	-27.2086
	Lepiota sp.	7.28000*	1.43404	.000	4.2886	10.2714
	P. rugulosus	-54.70333*	1.43404	.000	-57.6947	-51.7120
	P. cubensis	-37.20667*	1.43404	.000	-40.1980	-34.2153
S. commune	*A. chepangiana*	1.78667	1.43404	.227	-1.2047	4.7780
	B. vermiculosoides	60.45000*	1.43404	.000	57.4586	63.4414
	L. polychrous	-5.08667*	1.43404	.002	-8.0780	-2.0953
	R. virescens	-3.81667*	1.43404	.015	-6.8080	-.8253
	PBRU-W0157	18.47667*	1.43404	.000	15.4853	21.4680
	G. colossus	-11.72333*	1.43404	.000	-14.7147	-8.7320
	Lepiota sp.	25.75667*	1.43404	.000	22.7653	28.7480
	P. rugulosus	-36.22667*	1.43404	.000	-39.2180	-33.2353
	P. cubensis	-18.73000*	1.43404	.000	-21.7214	-15.7386

*. The mean difference is significant at the .05 level.

Multiple Comparisons

Dependent Variable: Number
LSD

(I) Mushroom	(J) Mushroom	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
G. colossus	*A. chepangiana*	13.51000*	1.43404	.000	10.5186	16.5014
	B. vermiculosoides	72.17333*	1.43404	.000	69.1820	75.1647
	L. polychrous	6.63667*	1.43404	.000	3.6453	9.6280
	R. virescens	7.90667*	1.43404	.000	4.9153	10.8980
	PBRU-W0157	30.20000*	1.43404	.000	27.2086	33.1914
	S. commune	11.72333*	1.43404	.000	8.7320	14.7147
	Lepiota sp.	37.48000*	1.43404	.000	34.4886	40.4714
	P. rugulosus	-24.50333*	1.43404	.000	-27.4947	-21.5120
	P. cubensis	-7.00667*	1.43404	.000	-9.9980	-4.0153
Lepiota sp.	*A. chepangiana*	-23.97000*	1.43404	.000	-26.9614	-20.9786
	B. vermiculosoides	34.69333*	1.43404	.000	31.7020	37.6847
	L. polychrous	-30.84333*	1.43404	.000	-33.8347	-27.8520
	R. virescens	-29.57333*	1.43404	.000	-32.5647	-26.5820
	PBRU-W0157	-7.28000*	1.43404	.000	-10.2714	-4.2886
	S. commune	-25.75667*	1.43404	.000	-28.7480	-22.7653
	G. colossus	-37.48000*	1.43404	.000	-40.4714	-34.4886
	P. rugulosus	-61.98333*	1.43404	.000	-64.9747	-58.9920
	P. cubensis	-44.48667*	1.43404	.000	-47.4780	-41.4953
P. rugulosus	*A. chepangiana*	38.01333*	1.43404	.000	35.0220	41.0047
	B. vermiculosoides	96.67667*	1.43404	.000	93.6853	99.6680
	L. polychrous	31.14000*	1.43404	.000	28.1486	34.1314
	R. virescens	32.41000*	1.43404	.000	29.4186	35.4014
	PBRU-W0157	54.70333*	1.43404	.000	51.7120	57.6947
	S. commune	36.22667*	1.43404	.000	33.2353	39.2180
	G. colossus	24.50333*	1.43404	.000	21.5120	27.4947
	Lepiota sp.	61.98333*	1.43404	.000	58.9920	64.9747
	P. cubensis	17.49667*	1.43404	.000	14.5053	20.4880
P. cubensis	*A. chepangiana*	20.51667*	1.43404	.000	17.5253	23.5080
	B. vermiculosoides	79.18000*	1.43404	.000	76.1886	82.1714
	L. polychrous	13.64333*	1.43404	.000	10.6520	16.6347
	R. virescens	14.91333*	1.43404	.000	11.9220	17.9047
	PBRU-W0157	37.20667*	1.43404	.000	34.2153	40.1980
	S. commune	18.73000*	1.43404	.000	15.7386	21.7214
	G. colossus	7.00667*	1.43404	.000	4.0153	9.9980
	Lepiota sp.	44.48667*	1.43404	.000	41.4953	47.4780
	P. rugulosus	-17.49667*	1.43404	.000	-20.4880	-14.5053

*. The mean difference is significant at the .05 level.

2) ฤทธิ์ทางชีวภาพในการต้านเซลล์มะเร็งปอดของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการศึกษานี้จะเก็บผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ก.2

ตารางที่ ก.2 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอด		
(มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.01	80.39	80.79	80.26
0.02	75.86	74.53	73.65
0.05	62.68	61.36	63.58
0.10	36.53	35.51	37.04
0.20	22.26	22.58	23.05

H_0 = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

H_1 = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์มะเร็งปอดที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 1 ค่า

Descriptives

number

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.01	3	80.4800	.27622	.15948	79.7938	81.1662
0.02	3	74.6800	1.11261	.64237	71.9161	77.4439
0.05	3	62.5400	1.11660	.64467	59.7662	65.3138
0.10	3	36.3600	.77904	.44978	34.4248	38.2952
0.20	3	22.6300	.39737	.22942	21.6429	23.6171
Total	15	55.3380	23.10054	5.96453	42.5453	68.1307

number

	Minimum	Maximum
0.01	80.26	80.79
0.02	73.65	75.86
0.05	61.36	63.58
0.10	35.51	37.04
0.20	22.26	23.05
Total	22.26	80.79

Test of Homogeneity of Variances

number

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
1.396	4	10	.304

ANOVA

number

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	7464.239	4	1866.060	2805.430	.000
Within Groups	6.652	10	.665		
Total	7470.891	14			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: number
LSD

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval Lower Bound	95% Confidence Interval Upper Bound
0.01	0.02	5.80000*	.66591	.000	4.3163	7.2837
	0.05	17.94000*	.66591	.000	16.4563	19.4237
	0.10	44.12000*	.66591	.000	42.6363	45.6037
	0.20	57.85000*	.66591	.000	56.3663	59.3337
0.02	0.01	-5.80000*	.66591	.000	-7.2837	-4.3163
	0.05	12.14000*	.66591	.000	10.6563	13.6237
	0.10	38.32000*	.66591	.000	36.8363	39.8037
	0.20	52.05000*	.66591	.000	50.5663	53.5337
0.05	0.01	-17.94000*	.66591	.000	-19.4237	-16.4563
	0.02	-12.14000*	.66591	.000	-13.6237	-10.6563
	0.10	26.18000*	.66591	.000	24.6963	27.6637
	0.20	39.91000*	.66591	.000	38.4263	41.3937
0.10	0.01	-44.12000*	.66591	.000	-45.6037	-42.6363
	0.02	-38.32000*	.66591	.000	-39.8037	-36.8363
	0.05	-26.18000*	.66591	.000	-27.6637	-24.6963
	0.20	13.73000*	.66591	.000	12.2463	15.2137
0.20	0.01	-57.85000*	.66591	.000	-59.3337	-56.3663
	0.02	-52.05000*	.66591	.000	-53.5337	-50.5663
	0.05	-39.91000*	.66591	.000	-41.3937	-38.4263
	0.10	-13.73000*	.66591	.000	-15.2137	-12.2463

*. The mean difference is significant at the .05 level.

3) ฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ตับปกติของสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดที่มีประสิทธิภาพสูงสุด โดยการศึกษานี้จะเก็บผลเป็นเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ จำนวน 3 ซ้ำ ได้ผลดังแสดงในตารางที่ ก.3

ตารางที่ ก.3 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์ตับที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

ความเข้มข้น (มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร)	เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์ตับปกติ		
	ครั้งที่ 1	ครั้งที่ 2	ครั้งที่ 3
0.05	93.94	95.28	95.63
0.08	90.08	90.19	89.97
0.11	82.50	82.81	82.88

H_0 = ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ

H_1 = มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างเปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดเฉลี่ยของเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากกลุ่มเห็ดกินได้ชนิด *B. vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ อย่างน้อย 1 ค่า

Descriptives

number

	N	Mean	Std. Deviation	Std. Error	95% Confidence Interval for Mean	
					Lower Bound	Upper Bound
0.05	3	94.9500	.89202	.51501	92.7341	97.1659
0.08	3	90.0800	.11000	.06351	89.8067	90.3533
0.11	3	82.7300	.20224	.11676	82.2276	83.2324
Total	9	89.2533	5.34749	1.78250	85.1429	93.3638

number

	Minimum	Maximum
0.05	93.94	95.63
0.08	89.97	90.19
0.11	82.50	82.88
Total	82.50	95.63

Test of Homogeneity of Variances

number

Levene Statistic	df1	df2	Sig.
7.623	2	6	.023

ANOVA

number

	Sum of Squares	df	Mean Square	F	Sig.
Between Groups	227.068	2	113.534	401.322	.000
Within Groups	1.697	6	.283		
Total	228.765	8			

Post Hoc Tests

Multiple Comparisons

Dependent Variable: number
LSD

(I) concentration	(J) concentration	Mean Difference (I-J)	Std. Error	Sig.	95% Confidence Interval	
					Lower Bound	Upper Bound
0.05	0.08	4.87000*	.43428	.000	3.8074	5.9326
	0.11	12.22000*	.43428	.000	11.1574	13.2826
0.08	0.05	-4.87000*	.43428	.000	-5.9326	-3.8074
	0.11	7.35000*	.43428	.000	6.2874	8.4126
0.11	0.05	-12.22000*	.43428	.000	-13.2826	-11.1574
	0.08	-7.35000*	.43428	.000	-8.4126	-6.2874

*. The mean difference is significant at the .05 level.

ภาคผนวก ข

การเตรียมสาร

ข.1 การเตรียมน้ำยา Melzer's reagent สำหรับการตรวจสอบลักษณะทางสัณฐานวิทยาภายใน

ผลึกไอโอดีน (Iodine Crystals)	0.5	กรัม
โพแทสเซียมไอโอไดด์ (KI)	1.5	กรัม
คลอรอลไฮเดรต (Chloralhydrate)	22	กรัม
น้ำกลั่น (Distilled water)	20	มิลลิลิตร

ผสมผลึกไอโอดีน 0.5 กรัม โพแทสเซียมไอโอไดด์ 1.5 กรัม คลอรอลไฮเดรต 22 กรัมและน้ำกลั่น 20 มิลลิลิตร เข้าด้วยกัน เขย่าเบา ๆ ให้เข้ากัน แล้วจึงนำไปใช้

ข.2 การเตรียมอาหารเพื่อใช้ในการแยกเส้นใยบริสุทธิ์และการเลี้ยงเชื้อ

1). Potato Dextrose Agar (PDA)

มันฝรั่ง	200	กรัม
เดกโทรส (Dextrose) หรือกลูโคส (Glucose)	20	กรัม
ผงวุ้น (Agar)	20	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

นำมันฝรั่ง 200 กรัม นำไปต้มในน้ำกลั่นจนเดือด สังเกตเห็นชิ้นมันฝรั่งเริ่มนิ่ม นำมากรองเนื้อมันฝรั่งออกด้วยผ้าขาวบาง เติมน้ำตาลเดกโทรสหรือน้ำตาลกลูโคส 20 กรัม ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 6.5 และเติมผงวุ้น 20 กรัมลงไปในสารละลายที่ยังร้อนอยู่เพื่อให้ผงวุ้นละลายได้ง่ายขึ้น เมื่อผงวุ้นละลายหมดให้ปรับปริมาตรสารละลายให้เป็น 1000 มิลลิลิตร นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที แล้วจึงนำไปใช้

2). PDA ผสมผง Rose Bengal 0.01% (W/V)

ผสมผง Rose Bengal 0.01 กรัมต่ออาหารเลี้ยงเชื้อชนิด PDA 100 มิลลิลิตร โดยผสม Rose Bengal ใน PDA หลังจากที่ผงวุ้นละลายหมด นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้วนาน 15 นาที แล้วจึงนำไปใช้

3). Potato Dextrose Broth (PDB)

ทำการเตรียมด้วยวิธีการเดียวกันกับการเตรียม PDA แต่ไม่ต้องใส่ผงวุ้นลงไป

ข.3 การเตรียมอาหารเลี้ยงเซลล์และสารเคมีที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์

1). อาหารเลี้ยงเซลล์

อาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM แบบสำเร็จรูปและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว

ซีรัมสำเร็จรูปและผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว (Fetal Bovine Serum)

ยาปฏิชีวนะ (Penicillin-streptomycin)

ใช้ปิเปตดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด DMEM แบบสำเร็จรูปและผ่านการฆ่าเชื้อแล้วใส่หลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้วที่อุณหภูมิ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว จำนวน 45 มิลลิลิตร จากนั้นใช้หลอดฉีดยาขนาด 20 มิลลิลิตร ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์จากหลอดปั่นเหวี่ยงที่กล่าวไปแล้วข้างต้นมากรองผ่านชุดกรองที่มีขนาดรู 0.2 ไมโครเมตร ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว ใส่ลงในหลอดปั่นเหวี่ยงขนาด 50 มิลลิลิตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว เมื่อจะนำมาใช้ให้เติมซีรัมจำนวน 5 มิลลิลิตรและยาปฏิชีวนะจำนวน 0.5 มิลลิลิตร ผสมให้เข้ากัน

หมายเหตุ ซีรัมจะต้องนำไปทำการกรองผ่านตัวกรองขนาด 0.2 ไมโครเมตร ตามวิธีการเดียวกับการกรองอาหารเลี้ยงเซลล์ ก่อนจะนำมาทำการผสม

2). Phosphate buffered saline (PBS)

โซเดียมคลอไรด์ (NaCl)	8	กรัม
โพแทสเซียมคลอไรด์ (KCl)	0.2	กรัม
ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต (Na_2HPO_4)	1.25	กรัม
โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต (KH_2PO_4)	0.2	กรัม
น้ำกลั่น	1000	มิลลิลิตร

ผสมผงโซเดียมคลอไรด์ 8 กรัม โพแทสเซียมคลอไรด์ 0.2 กรัม ไดโซเดียมไฮโดรเจนฟอสเฟต 1.25 กรัม โพแทสเซียมไดไฮโดรเจนฟอสเฟต 0.2 กรัม และน้ำกลั่น 1000 มิลลิลิตรเข้าด้วยกัน ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.4 นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 ปอนด์ต่อตารางนิ้ว นาน 15 นาที โดยสารละลาย PBS จะเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้อง

3). Trypan blue 0.4% (W/V)

Trypan blue	0.4	กรัม
PBS pH 7.4	100	มิลลิลิตร

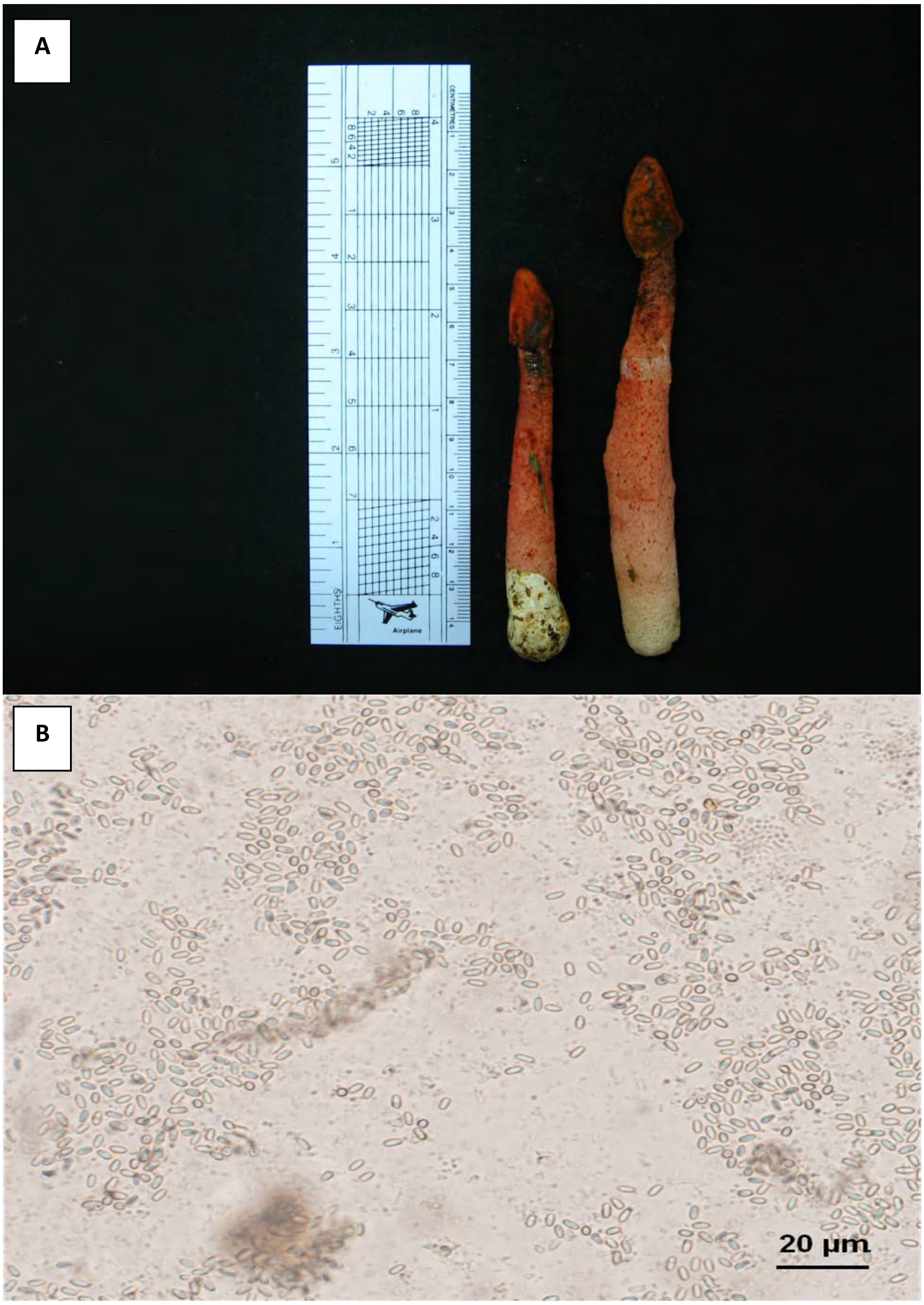
ผสม Trypan blue 0.4 กรัม ลงในสารละลาย PBS 100 มิลลิลิตร ปรับค่าความเป็นกรดด่างให้ได้ 7.2 แบ่งเก็บใส่ในขวดไว้ ถ้าละลายยากสามารถใช้ความร้อนช่วยในการละลายได้

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

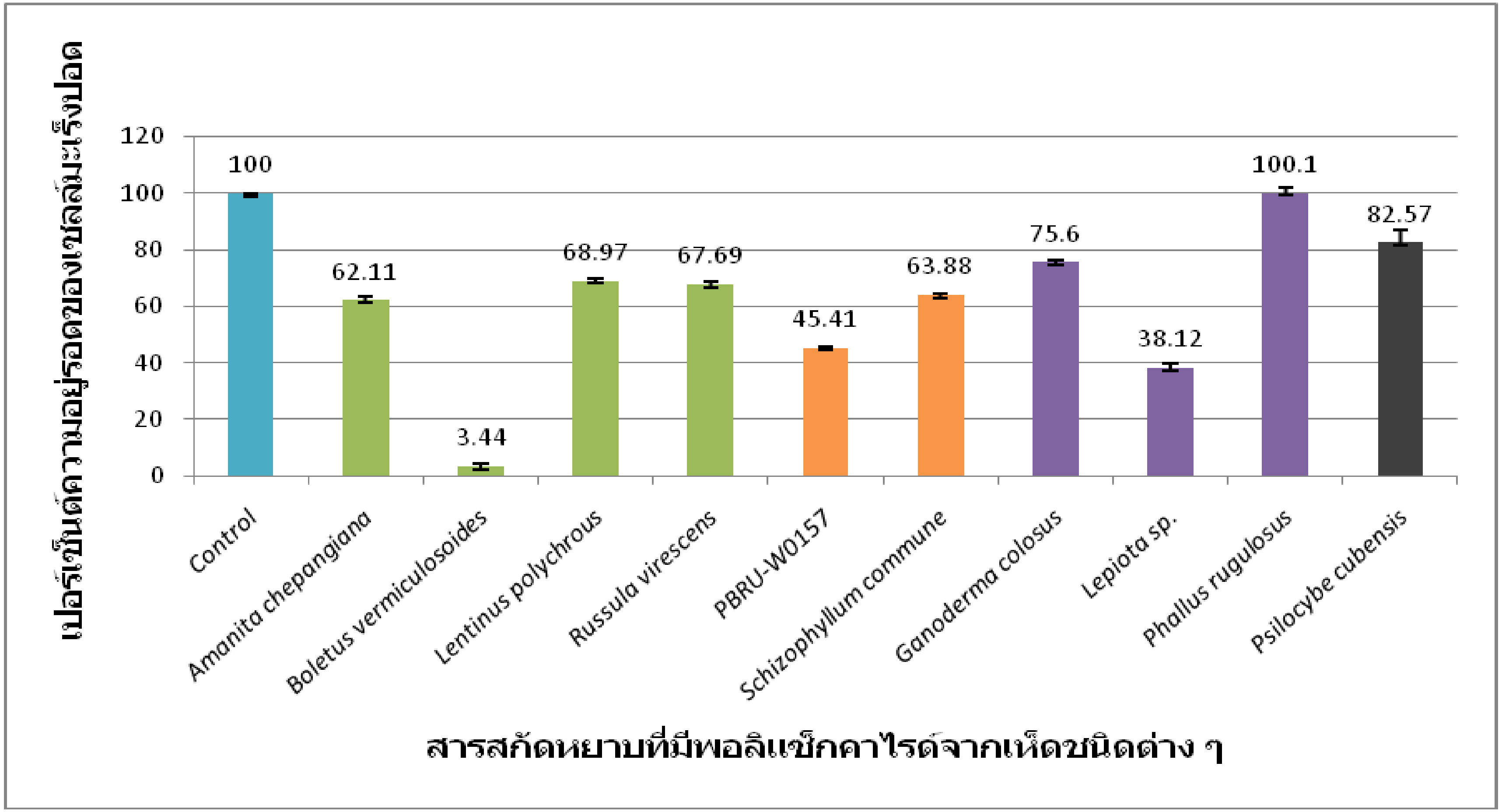
นายวิศรุต กิจพิพิธ เกิดเมื่อวันที่ 23 มิถุนายน พ.ศ.2527 ที่จังหวัดปัตตานี สำเร็จการศึกษาหลักสูตรวิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาพฤกษศาสตร์ จากคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2549 และเข้าศึกษาต่อในหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิตของคณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย เมื่อปีการศึกษา 2550 และสำเร็จการศึกษาในปี พ.ศ. 2553

การเสนอผลงาน

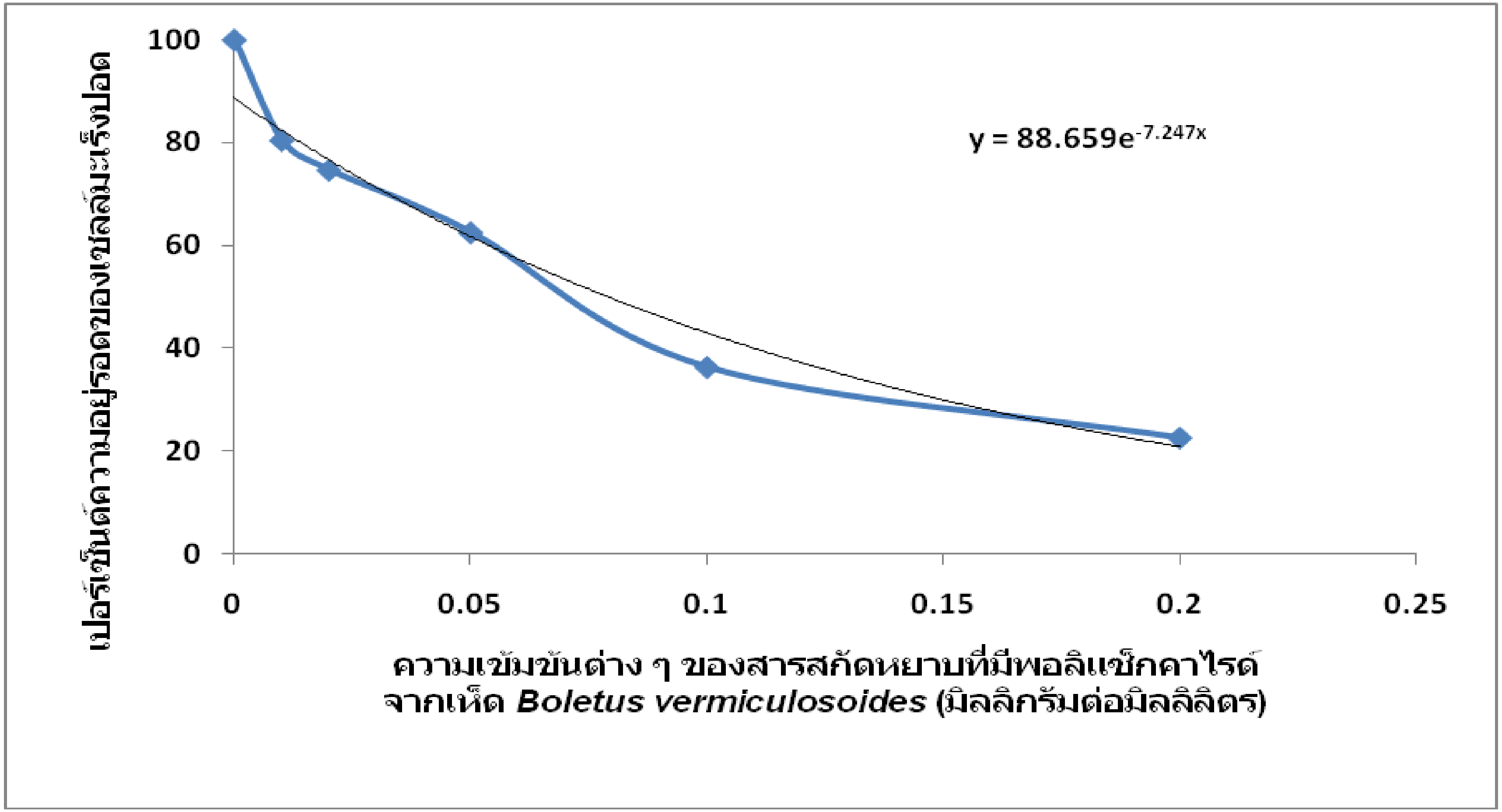
Kitpipit, W., Satayalai, O., Punnapayak, H., and Prasongsuk, S. 2009. DETECTION OF POLYSACCHARIDES FROM MUSHROOMS COLLECTED FROM NATURE IN THAILAND. In Proceeding of the 21th Annual Meeting and International Conference of Thai Society for Biotechnology: 638-644. Queen Sirikit National Convention Center Bangkok, Thailand. September 24-25, 2009.



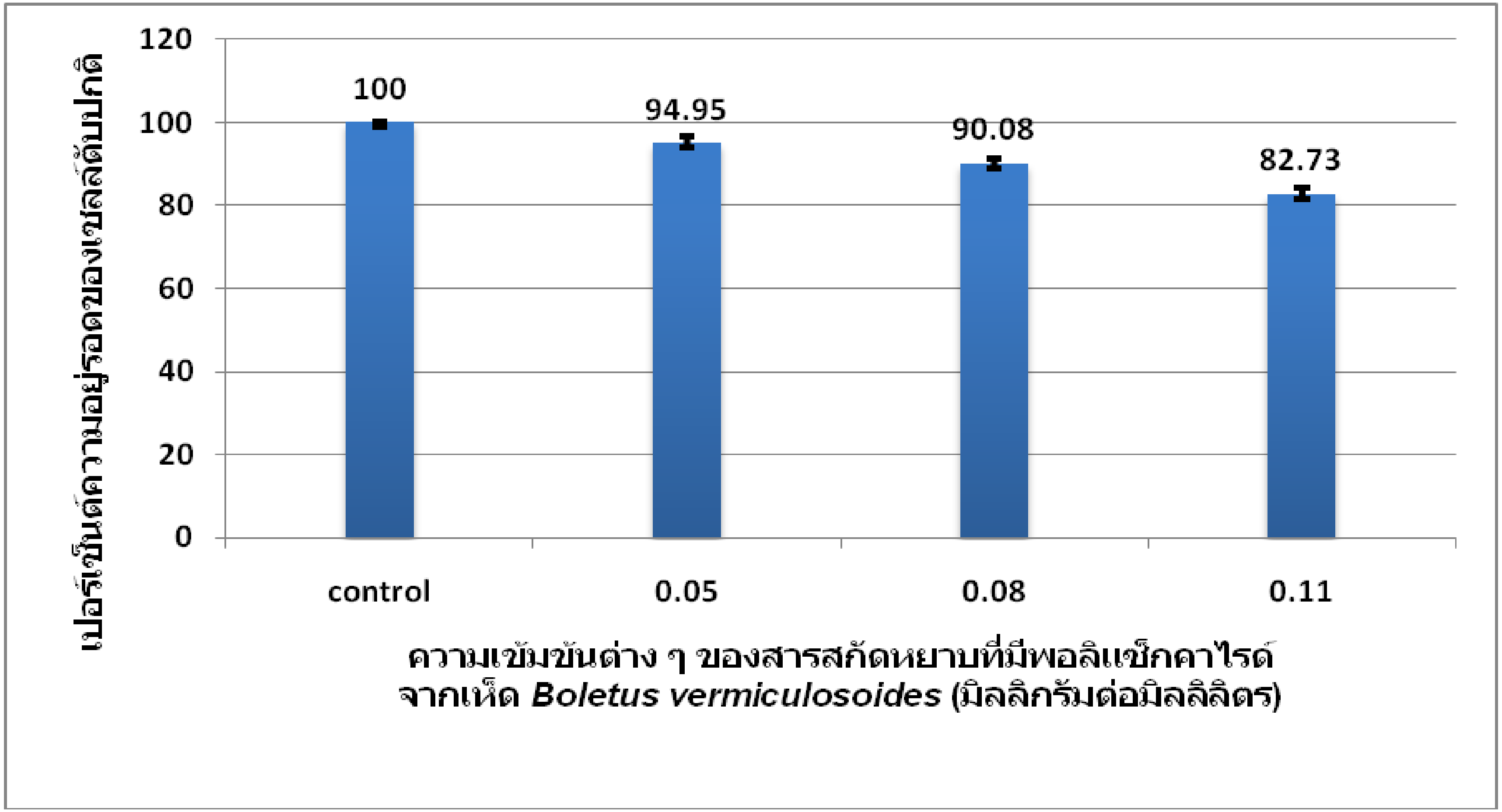
ภาพที่ 4.3 ลักษณะทางสัณฐานวิทยาของเห็ดสายพันธุ์เขาน้ำพุ 13 ที่สามารถจัดจำแนกได้เป็นชนิด *Phallus rugulosus* [Fisch.] Kuntze : A. ลักษณะดอกเห็ด B. ลักษณะสปอร์ในน้ำกลั่นภายใต้กล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X



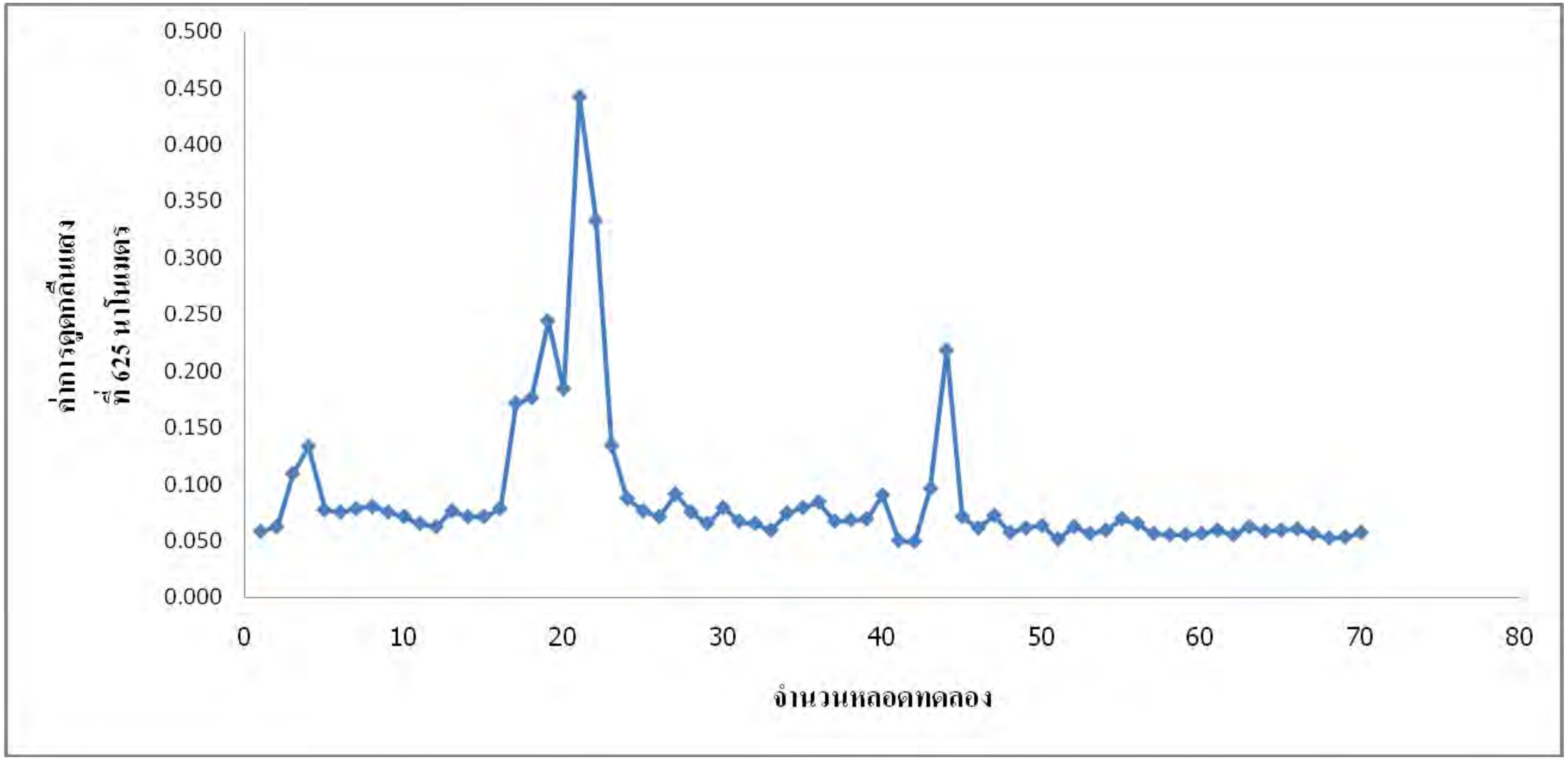
ภาพที่ 4.16 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ดชนิดต่าง ๆ



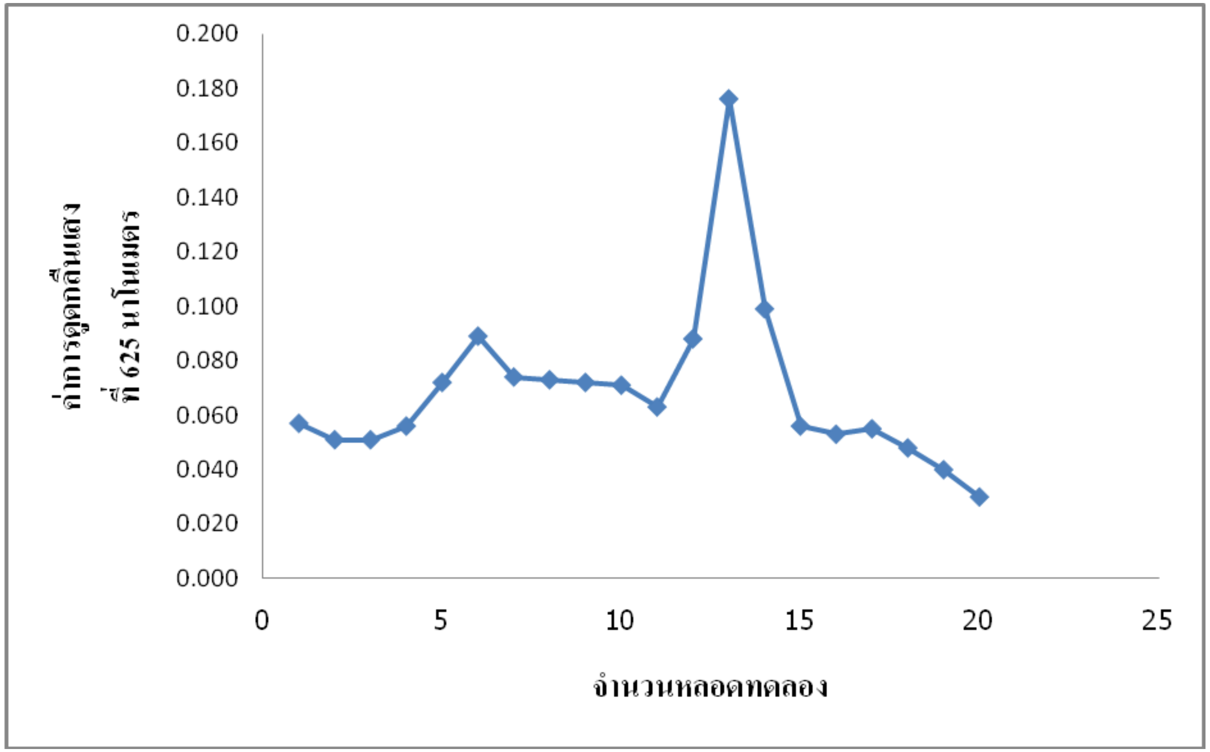
ภาพที่ 4.17 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



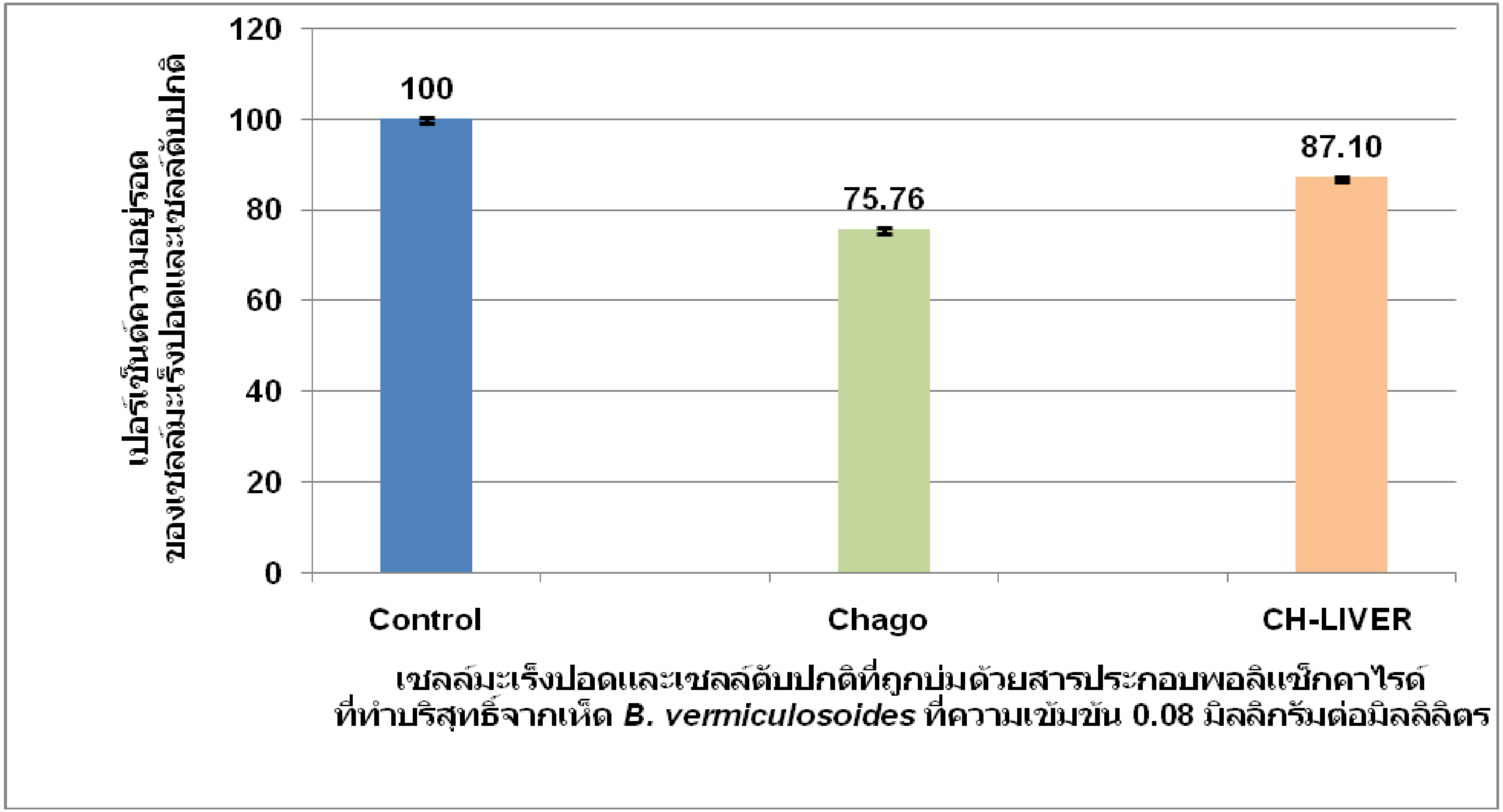
ภาพที่ 4.18 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์ตับปกติเมื่อบ่มร่วมกับสารสกัดหยาบที่มีพอลิแซ็กคาไรด์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ



ภาพที่ 4.19 การแยกสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ด้วยวิธี ion exchange chromatography ด้วยคอลัมน์ดีอีเออี-เซลลูโลส ขนาด 2 X 30 เซนติเมตร ชะด้วยน้ำกลั่นและ 0.1 โมลาร์ โซเดียมไฮโดรเจนคาร์บอเนต อัตราการไหล 60-120 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บใส่หลอดทดลองหลอดละ 8 มิลลิลิตร



ภาพที่ 4.20 การแยกสารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์จากสารสกัดหยาบจากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ด้วยวิธี gel filtration chromatography ด้วยคอลัมน์ Sephadex G-100 ขนาด 2 X 50 เซนติเมตร ชะด้วยน้ำกลั่น อัตราการไหล 15 มิลลิลิตรต่อชั่วโมง เก็บใส่หลอดทดลอง หลอดละ 8 มิลลิลิตร

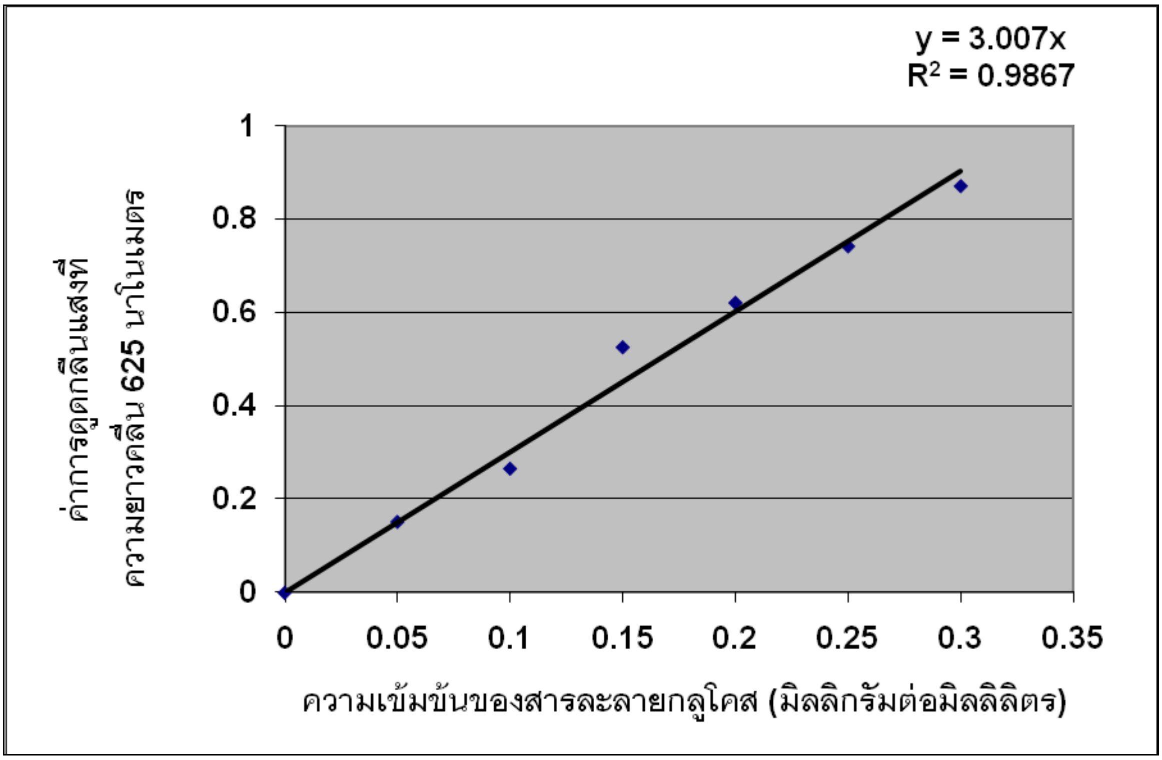


ภาพที่ 4.21 เปอร์เซ็นต์ความอยู่รอดของเซลล์มะเร็งปอดและเซลล์ตับปกติที่บ่มร่วมกับ
สารประกอบพอลิแซ็กคาไรด์ที่ทำบริสุทธิ์จากเห็ด *Boletus vermiculosoides* ที่ความเข้มข้น 0.08 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

ภาคผนวก ก

ก.1 การทำกราฟสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐาน

การทำกราฟสารละลายน้ำตาลกลูโคสมาตรฐานทำได้โดย เตรียมสารละลายน้ำตาลกลูโคสที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กันคือ 0, 0.05, 0.10, 0.15, 0.20, 0.25 และ 0.30 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ใส่ในหลอดทดลองหลอดละ 0.5 มิลลิลิตร ผสมสารละลายอันโทรนลงไป 2.5 มิลลิลิตร ในแต่ละความเข้มข้นทำเป็นจำนวน 3 ซ้ำ ตั้งทิ้งไว้ 5 นาที แล้วนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 625 นาโนเมตร นำค่าที่ได้มาสร้างกราฟสารละลายกลูโคสมาตรฐาน (ภาพที่ ก.1)



ภาพที่ ก.1 กราฟของสารละลายกลูโคสมาตรฐาน โดยวิธี anthrone test