899/46
RECEIVED
BY 7 ต.ค. 2546 DATE

รายงานฉบับสมบูรณ์

การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis และสารที่มีพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์ เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์

Development of anti-metastasis and human cell line cytotoxicity tests for screening of bioactive compounds from plants and microbes

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ ผู้รับทุนโครงการ BRT **วันที่** 31 กรกฎาคม พ.ศ. 2546

ที่

เรื่อง ส่งรายงานฉบับสมบูรณ์โครงการ "การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis และสารที่มีพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์" (BRT R_645002)

เรียน หัวหน้าโครงการ BRT

สิ่งที่ส่งมาด้วย รายงานฉบับสมบูรณ์ และรายงานการเงิน

ตามที่โครงการพัฒนาองค์ความรู้และศึกษานโยบายการจัดการทรัพยากรธรรมชาติในประเทศไทย (โครงการ BRT) ได้สนับสนุนการทำวิจัยและพัฒนา เรื่อง "การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis และสารที่มีพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์" รหัสโครงการ BRT R_645002 เริ่มโครงการ 11 มีนาคม พ.ศ. 2545 ระยะเวลา 1 ปี

บัดนี้ถึงกำหนดส่งรายงานฉบับสมบูรณ์ จึงขอจัดส่งรายงานสรุปผลการปฏิบัติงานของโครงการและรายงานการเงินมาดังเอกสารแนบท้ายนี้

ขอแสดงความนับถือ

(น.ส.โชติกา สุญาณเศรษฐกร)
หัวหน้าโครงการ

R-615009

รายงานฉบับสมบูรณ์

11 มีนาคม 2545 – 31 กรกฎาคม 2546

1. **ชื่อโครงการวิจัย** (ไทย) การพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis และสารที่มีพิษ (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์เพื่อเพิ่มความสามารถในการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์

(อังกฤษ) Development of anti-metastasis and human cell line cytotoxicity tests for screening of bioactive compounds from plants and microbes

ชื่อหัวหน้าโครงการ (ไทย) น.ส.โชติกา สุญาณเศรษฐกร

(อังกฤษ) Chotika Suyarnsestakorn

ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย 2

ความชำนาญ การตรวจสอบสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ที่ทำงาน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
113 ถ.พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 0-2564-6700 ต่อ 3467, 3469 โทรสาร 0-2564-6701-5

ความรับผิดชอบต่อโครงงานที่เสนอคิดเป็น 45%

ความรับผิดชอบต่อโครงงานอื่นๆ การศึกษากลไกการชดเชยระหว่างเอ็นไซม์ COX-1 COX-2 และ PLA_2 ในเซลล์ที่ขาด COX-1 หรือ COX-2

E-mail chotika@biotec.or.th

2. **ชื่อหัวหน้าสถาบัน** (ไทย) ดร. รุจ วัลยะเสวี

(อังกฤษ) Dr. Ruud Valyasevi

ตำแหน่ง ผู้อำนวยการหน่วยหน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค

ที่ทำงาน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
113 ถ.พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 0-2564-6700 ต่อ 3236 โทรสาร 0-2564-6701-5

E-mail valy@biotec.or.th

3. **ระยะเวลาตลอดโครงการ**: 1 ปี

เริ่ม: 11 มีนาคม 2545 สิ้นสุดโครงการ: 31 กรกฎาคม 2546

4. **งบประมาณตลอดการดำเนินงาน**: 450,000 บาท

5. **คณะผู้วิจัย**:

ชื่อ **ดร. วนิชา วิชัย**

ตำแหน่ง นักวิจัย

ความชำนาญ การควบคุมการสร้าง prostaglandin ในระดับอณูชีววิทยา
การตรวจหาสารที่มีฤทธิ์แก้อักเสบ

ที่ทำงาน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
113 ถ.พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 0-2564-6700 ต่อ 3471 โทรสาร 0-2564-6701-5

ความรับผิดชอบต่อโครงงานที่เสนอคิดเป็น 10%

ความรับผิดชอบต่อโครงงานอื่นๆ 80%

E-mail vanicha@biotec.or.th

ชื่อ **น.ส.โชติกา สุญาณเศรษฐกร**

ตำแหน่ง ผู้ช่วยนักวิจัย 2

ความชำนาญ การตรวจสอบสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ที่ทำงาน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
113 ถ.พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 0-2564-6700 ต่อ 3467, 3469 โทรสาร 0-2564-6701-5

ความรับผิดชอบต่อโครงงานที่เสนอคิดเป็น 45%

ความรับผิดชอบต่อโครงงานอื่นๆ 55%

E-mail chotika@biotec.or.th

ชื่อ **น.ส.กัณวัฒน์ ด่านวิเศษกาญจน**

ตำแหน่ง เจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการ 1

ความชำนาญ การตรวจสอบสารยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง

ที่ทำงาน ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ
113 ถ.พหลโยธิน ตำบลคลองหนึ่ง อำเภอคลองหลวง
ปทุมธานี 12120

โทรศัพท์ 0-2564-6700 ต่อ 3467, 3469 โทรสาร 0-2564-6701-5

ความรับผิดชอบต่อโครงงานที่เสนอคิดเป็น 45%

ความรับผิดชอบต่อโครงงานอื่นๆ 55%

E-mail kannawat@biotec.or.th

6. ประวัติคณะผู้วิจัย

ดร. วนิชา วิชัย

EDUCATION

B.S.	1991	Medical Technology	Chiang mai University, Chiang mai, Thailand
Ph.D.	2000	Biochemistry	University of Virginia, Charlottesville, VA, USA

PROFESSIONAL EXPERIENCE

Aug. 2000 – present	Research scientist, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology, Bangkok, Thailand

SCHOLARSHIP, FELLOWSHIP AND HONOR

- Graduate fellowship from the School of Medicine, University of Virginia, Charlottesville, VA, USA 1990-2000
- Scholarship from the Ministry of Science, Thailand 1993-1998
- First degree honor from Chiang mai University, Thailand 1991

PUBLICATION

- Whittington, AT, Vichai, V, Webb, GC, Baker, RT, Pearson, WR and Board, PG. Gene structure, expression and chromosomal localization of murine theta class glutathione transferase mGSTT1-1. *Biochem J* 1993; 337: 141-151.

น.ส. โชติกา สุญาณเศรษฐกร

EDUCATION

Master of Science in Human Molecular Genetics, Imperial College of Science, technology and Medicine, London University, UK, 1999-2000

Bachelor degree of Science, Chulalongkorn University, 1994-1997

EMPLOYMENT

2000 - present	Research Assistant, Bioassay Research Facility, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology

WORK EXPERIENCE

May-July 2000	MSc Project at Institute of Child Health, University College London, UK "Investigation of the interaction between P15INK and MAP4K3 proteins in the yeast system"
10-31 March 1996	Training in molecular genetic at the Armed Forces Research Institute of Medical Sciences (AFRIMS), Pra Mongkut Hospital, Bangkok

น.ส.กัณวัฒน์ ด่านวิเศษกาญจน

EDUCATION

Bachelor degree of Microbiology, Srinakarinwiroj University, 1992-1995

EMPLOYMENT

1998 - present	Laboratory technician, Bioassay Research Facility, National Center for Genetic Engineering and Biotechnology
1995-1998	Microbiologist, International Laboratory Corporation

WORK EXPERIENCE

1-30 May 1995	Training at the Division of Plant Disease, Department of Technical Agriculture, Ministry of Agriculture
March-April 1995	Training at the Division of Food Analysis, Department of Medical Science, Ministry of Public Health

7. บทคัดย่อ (ภาษาไทย)

ห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค เป็นห้องปฏิบัติการเฉพาะทาง ที่มีความสามารถในการทดสอบคุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพของสารตัวอย่าง โดยในขณะนี้สามารถทำการตรวจสอบได้ทั้งสิ้น 13 วิธีการคือ anti-cancer cells ต่อเซลล์มะเร็ง 3 ชนิด (KB, BC และ NCI-H187), anti-herpes simplex virus type I, anti-*Candida albicans*, anti-*Mycobacterium tuberculosis*, anti-malaria, anti-inflammation, anti-ras, anti-mitotic cell division, anti-topoisomrease II, anti-telomerase และ cytotoxicity test ต่อเซลล์ไตของลิง (vero cell) เพื่อเพิ่มความสามารถของห้องปฏิบัติการฯในการสนับสนุนงานวิจัยในประเทศไทยทางด้านการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ จึงมีการพัฒนาวิธีการตรวจสอบใหม่อีกสองวิธีคือ anti-metastasis assay และ cytotoxicity test ต่อเซลล์ของมนุษย์

เนื่องจากยาส่วนใหญ่ที่ใช้รักษาผู้ป่วยโรคมะเร็งในปัจจุบันเป็นยาที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ซึ่งจะใช้ได้ผลกับมะเร็งระยะที่ยังไม่ลุกลาม แต่คนไข้ส่วนใหญ่จะตรวจพบว่าเป็นมะเร็งก็ต่อเมื่อเข้าสู่ระยะลุกลามแล้ว จึงทำให้ยาเหล่านี้ไม่ให้ผลในการรักษาอย่างเต็มที่ การใช้ยาเพื่อยับยั้งการลุกลามของมะเร็ง (metastasis) ร่วมกับการรักษาด้วยยาแบบเดิมจึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษาโรคมะเร็ง ทางห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจึงทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบหาสารที่มีฤทธิ์ anti-metastatic compounds แบบ throughput assay โดยดัดแปลงมาจาก Transwell Invasion Assay ของ Knutson *et. al.* (1996) โดยใช้เซลล์ HT-1080 (fibrosarcoma) เป็นเซลล์ทดสอบ จากงานวิจัยพบว่าจำนวนเซลล์ HT-1080 และเวลาในการ incubate ที่เหมาะสมเพื่อให้ได้จำนวน invading เซลล์สูงสุดในการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ซึ่งเคลือบอยู่ที่ transmembrane คือ $2.0x10^5$ cells/transwell และ 18 ชั่วโมงตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้พัฒนาวิธีการวัดปริมาณ invading cells จาก MTT metabolites ที่สร้างขึ้นเพื่อใช้แทนวิธีการอ่านผลด้วยการนับเซลล์แบบเดิม โดยพบว่าความเข้มข้นของ MTT ที่เหมาะสมคือ 0.2 mg/ml ผู้วิจัยได้ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นมาใหม่นี้เพื่อตรวจสอบสารที่เคยมีรายงานมาแล้วว่าสามารถลดคุณสมบัติการเป็นเซลล์มะเร็งระยะลุกลามของ invasive cells ต่างๆ ได้แก่ NS-398 Sulindac sulfide Doxycyclin Lovastatin Sodium selenite Ilomastat และ Aspirin โดยพบว่ามีเพียง Lovastatin ที่ความเข้มข้น 6.25 µg/ml ซึ่งเป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 สามารถยับยั้ง cell invasion ได้ 39% 12% และ 9.5% เมื่อมี 1% 5% และ 10% FBS ใน culture medium ตามลำดับ อย่างไรก็ตามจะได้หา positive control เพิ่มเพื่อใช้ควบคู่กับ Lovastatin เพื่อให้การทดสอบในแต่ละครั้งมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

วิธีการที่สองที่พัฒนาขึ้นมาใหม่ได้แก่การตรวจสอบความเป็นพิษของสาร (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์ โดยใช้วิธีการวัดปริมาณ ATP ที่ endpoint เพื่อดูเปอร์เซนต์การรอดชีวิตของเซลล์ HL-60 ซึ่งเป็นวิธีการที่ถูกทดสอบแล้วว่าใช้ทำนายความเป็นพิษของสารตัวอย่างต่อเซลล์มนุษย์ได้ดี วิธีการนี้สามารถนำมาใช้ในกระบวนการพัฒนายาเพื่อลดปริมาณการใช้สัตว์ทดลองซึ่งมีค่าใช้จ่ายสูง ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาการทดสอบนี้ให้อยู่ในรูปของ 96-well format แทนการใช้หลอดทดลองตามวิธีเดิมของ Wakuri *et al.* (1993) เพื่อให้เหมาะสมกับการทดสอบสารจำนวนมาก จากงานวิจัยพบว่าจำนวนเซลล์ HL-60 ที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบคือ 500,000 cells ต่อหนึ่งการทดสอบ และได้ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นมาทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารที่มีระดับความเป็นพิษต่างๆ ดังที่มีรายงานไว้ก่อนหน้านี้ เปรียบเทียบกับ IC_{50} ที่ได้จากวิธีการแบบเดิม (Wakuri *et al.*, 1993) พบว่าค่า IC_{50} ที่ได้ใกล้เคียงกัน และยังได้ทดสอบหาค่า IC_{50}ของสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ เปรียบเทียบกับการ

ทดสอบความเป็นพิษต่อ vero cells โดยใช้วิธี SRB assay พบว่าค่าที่ได้ให้ผลเทียบเท่ากับการทดสอบความเป็นพิษใน vero cell line นอกจากนี้ได้ทำการทดสอบหา IC_{50} ของ positive control ของสารสองชนิด เพื่อใช้เป็นตัวควบคุมในการทดสอบที่ทำในแต่ละครั้ง สารทั้ง 2 ชนิด คือ Ellipticine และ Doxorubicin โดยค่า IC_{50} ที่ได้คือ 4.7 ± 1.9 µg/ml กับ 0.7 ± 0.3 µg/ml ตามลำดับ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่าวิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มนุษย์ โดยการวัดปริมาณ ATP ใน 96-well plate ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีความถูกต้องแม่นยำเทียบได้กับวิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองว่าให้ค่า toxicity ใกล้เคียงกับ blood toxicity level ในคน ผู้วิจัยจะนำวิธีนี้ไปใช้ในการให้บริการตรวจสอบความเป็นพิษของสารในห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

8. บทคัดย่อ (ภาษาอังกฤษ)

The Bioassay laboratory specializes in bioactive compounds screening. Currently, it offers 13 tests: anti-cancer cell growth for 3 types of cancer cells (KB, BC and NCI-H187 cell lines), anti-herpes simplex virus type I, anti-*Candida albicans*, anti-*Mycobacterium tuberculosis*, anti-malaria, anti-inflammatory tests, anti-ras, anti-mitotic cell division, anti-topoisomerase II, anti-telomerase test and cytotoxicity test using vero cells. In addition, two more assays, an anti-metastatic test and a cytotoxicity test to human cells, are being developed to increase the capacity of the bioassay laboratory as a screening service laboratory.

Most cancer remedies available today are anti-proliferative drugs, which are most beneficial when the cancer is in a non-invasive stage. However, these drugs are no longer effective after the disease has advanced to an invasive stage. Therefore, anti-metastatic compounds that specifically target invading tumours are thought to be an alternative cancer treatment, which can be used to increase the efficiency of conventional anti-proliferative drugs. A throughput assay for the screening of anti-metastatic compounds is being developed based on the "Transwell Invasion Assay" of Knutson *et. al.* (1996). The cell line used for the assay is HT-1080 (fibrosarcoma). We found that the optimal conditions for cell invasion assay using HT-1080 cells are $2.0x10^5$ seeding cells/transwell and 18 hour incubation time. To replace cell counting method used in the traditional assay, we developed an MTT test for quantifying MTT metabolites from invading cells. We found that MTT at the concentration of 0.2 mg/ml maximized the amount of formazan metabolites to the appropriate absorbance for colorimetric measurement. We also tested compounds that are known to inhibit invasiveness of cancer cells using this developed anti-metastasis assay for positive control. These compounds are NS-398, Sulindac sulfide, Doxycyclin, Lovastatin, Sodium selenite, Ilomastat and Aspirin. We found that only 6.25 μg/ml Lovastatin, which was the highest and non-cytotoxic concentration to HT-1080 cells, could inhibit cell invasion at 39% 12% and 9.5% when there were 1% 5% and 10% FBS in culture medium, respectively. However, we will test for another positive control used with Lovastatin for higher accuracy and precision.

The second assay that has been developed is a cytotoxicity test against a human cell line, HL-60 (human acute promyelocytic leukemia), using ATP content at end point as a marker for HL-60 viability. This test has been shown to give a good estimation of human toxicity and can replace the animal tests that are very expensive. We plan to modify the HL-60 cytotoxicity test from the original test tube method (Wakuri *et al.*, 1993) into a 96-well format for throughput screening. We found that the optimal number of HL-60 cells used for 96-well cytotoxicity test is 500,000 cells/50 μl/well. We used the 96-well format method to test compounds that have been previously tested for their cytotoxicity against HL-60 cells to determine whether this method is as sensitive and as accurate as the conventional test tube method. We found that the IC_{50} values obtained from both methods are not

significantly different. Moreover, we used our new method to test drugs and extracts from plants and microorganisms that had been tested for cytotoxicity against vero cells by the SRB method used currently in our laboratory. Likewise, the IC_{50} values from the new method and the SRB method are not significantly different. We selected two compounds, Ellipticine and Doxorubicin, with IC_{50} values of 4.7 ± 1.9 µg/ml and 0.7 ± 0.3 µg/ml to be used as positive controls for our cytotoxicity assay using the 96-well format method. Our results showed that the 96-well cytotoxicity test method is as accurate and as sensitive as the conventional test tube method and we will use this method for our screening service in the future.

9. วัตถุประสงค์ของโครงการ

1. ทำการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis และวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของสาร (cytotoxicity test) ต่อเซลล์ของมนุษย์ เพื่อเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการภายในประเทศให้สามารถตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่มาจากทรัพยากรภายในประเทศไทยซึ่งมีความหลากหลายทางชีวภาพสูง
2. เพื่อเพิ่มการให้บริการในการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์แก่นักวิจัย และบุคคลทั่วไปที่ขอรับบริการ เพื่อให้เป็นศูนย์กลางการให้บริการของประเทศ

10. ผลกระทบเชิงเศรษฐศาสตร์

ห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค มีความสามารถในการตรวจวิเคราะห์คุณสมบัติในการออกฤทธิ์ทางชีวภาพทั้งสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ ทั้งยังให้บริการตรวจสอบแก่บุคคลและหน่วยงานทั่วไป โดยในการพัฒนา anti-metastasis assay และ cytotoxicity test ต่อเซลล์ HL-60 จะเป็นการเพิ่มศักยภาพของห้องปฏิบัติการในการให้บริการแก่ผู้สนใจในประเทศ ทั้งนี้เพื่อลดการสูญเสียเงินตราและเวลาในการที่จะส่งสารตัวอย่างไปทดสอบยังต่างประเทศ และส่งเสริมให้มีการส่งสารตัวอย่างมาตรวจเพิ่มขึ้นเพื่อเพิ่มโอกาสในการค้นพบยารักษาโรคมะเร็งชนิดใหม่ๆขึ้นสำหรับประเทศไทย เพื่อลดค่าใช้จ่ายของการนำเข้ายาจากต่างประเทศในอนาคต

11. ผลกระทบเชิงสังคม

ห้องปฏิบัติการตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ ณ หน่วยปฏิบัติการวิจัยกลางไบโอเทค เป็นหน่วยงานที่ส่งเสริมให้มีการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากทรัพยากรภายในประเทศ เช่น จากสมุนไพรไทยและจุลชีพที่ค้นพบภายในประเทศ การพบยารักษาโรคจากทรัพยากรดังกล่าวจะให้ผลดีแก่ผู้เพาะปลูก ทั้งยังส่งเสริมเศรษฐกิจและสังคมในท้องถิ่นของประเทศต่อไป

12. การพัฒนาเทคโนโลยี

เทคโนโลยีที่ได้รับการพัฒนาจากโครงการนี้ เป็นเทคโนโลยีที่เหมาะแก่การให้บริการตรวจหาฤทธิ์ของสาร ซึ่งมีจำนวนมาก กล่าวคือสะดวกต่อการตรวจสอบ รวดเร็ว และแม่นยำ นอกจากนี้ยังสามารถยืนยันผลการทดลองซ้ำได้โดยง่าย

ในการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งสู่ระบบน้ำเหลืองหรือเส้นเลือด จะได้มีการนำ MTT assay มาประยุกต์ใช้กับ anti-metastasis assay เดิม ซึ่งใช้วิธีการนับเซลล์ในการวัดปริมาณ invading cells ซึ่งใช้เวลานานและมีความผิดพลาดสูง นอกจากนี้ในการพัฒนา cytotoxicity test ต่อ HL-60 เซลล์ ได้มีการพัฒนาวิธีการให้อยู่ใน 96-well microtiter plate แทนการทำในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นวิธีที่มีค่าใช้จ่ายสูง ไม่เหมาะสมต่อการให้บริการ

13. หลักการ เหตุผล และงานที่มีมาก่อน

Anti-metastasis assay

โรคมะเร็งโดยทั่วไปแบ่งได้เป็น 2 ระยะ คือ ระยะเริ่มแรกที่มีการแบ่งตัวของเซลล์อย่างรวดเร็วผิดปกติจนเกิดเป็นเนื้องอกขึ้น (*in situ* carcinoma) และระยะที่สองซึ่งเซลล์มะเร็งสามารถแทรกตัวผ่าน basement membrane ที่ล้อมรอบ (invasive stage) และนำไปสู่การแพร่กระจายของเนื้องอกจากจุดเริ่มต้นไปยังอวัยวะที่อยู่ห่างออกไป (metastasis) ขั้นตอนการเกิดมะเร็งตั้งแต่เริ่มจนกลายมาเข้าสู่ระยะลุกลามเริ่มต้นจากการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมของเซลล์ภายในร่างกาย (genetic alteration) โดยความเปลี่ยนแปลงนั้นก็จะถูกถ่ายทอดไปเรื่อยๆ ควบคู่ไปกับการแบ่งเซลล์ที่ผิดปกติ ซึ่งระยะนี้อาจจะกินเวลาหลายปีในคนไข้บางราย นอกจากนี้ยังเริ่มพบการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมในยีนตัวอื่นๆ เพิ่มขึ้นในกลุ่มเซลล์เหล่านี้อีกด้วย การเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเหล่านี้จะนำมาซึ่งกระบวนการแบ่งตัวของเซลล์ที่ไม่สามารถควบคุมได้ (hyperplasia) กลุ่มของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นมาอย่างมากนี้เริ่มมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (dysplasia) และต่อมากลุ่มของเซลล์มะเร็งนี้จะเริ่มขยายตัวขึ้นกลายเป็นเนื้อร้ายที่สามารถตรวจพบได้ตามอวัยวะต่างๆ ของร่างกาย (*in situ* carcinoma) ในระยะนี้ยังคงมีการเปลี่ยนแปลงทางพันธุกรรมเกิดขึ้นได้อีก ซึ่งท้ายสุดแล้วจะทำให้เซลล์มะเร็งสามารถลุกลามขยายตัวไปสู่อวัยวะอื่นๆ ได้ (Invasive cancer) เซลล์มะเร็งที่เข้าสู่ระยะลุกลามแล้วจะมีคุณสมบัติในการย่อยสลาย extracellular matrix เพื่อผ่าน basement membrane และเข้าสู่ระบบหมุนเวียนโลหิตเพื่อไปเกิดเป็นมะเร็งยังอวัยวะอื่นๆ ของผู้ป่วยต่อไป (Ruoslahti, 1996)

ในเซลล์มะเร็งระยะลุกลามนี้เองที่จะพบว่ามีคุณสมบัติหลายๆ อย่างที่แตกต่างไปจากเซลล์ปกติ กล่าวคือมีคุณสมบัติเป็น "anchorage independent" คือไม่ยึดเกาะกับเซลล์ที่อยู่ข้างเคียงและ extracellular matrix เนื่องจากขาดโมเลกุลสำคัญในการยึดเกาะได้แก่ E-cadherin และ integrin ในภาวะปกติเซลล์ที่ไม่ยึดเกาะนี้จะถูกกระตุ้นให้เข้าสู่กระบวนการ apoptosis เนื่องจากนิวเคลียร์โปรตีน (cyclin E-CDK2 complex) ซึ่งมีหน้าที่ควบคุมออกคำสั่งให้เซลล์เติบโตและแบ่งตัวจะถูกสร้างน้อยลง ตรงข้ามกับเซลล์มะเร็งระยะลุกลามที่ถึงแม้จะมีคุณสมบัติดังกล่าว แต่ cyclin E-CDK2 complex กลับถูกกระตุ้นให้สร้างขึ้นตลอดเวลา (Ruoslahti, 1996) เซลล์มะเร็งระยะลุกลามนี้สามารถผลิตเอนไซม์ชื่อ matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่งมีคุณสมบัติในการย่อยสลาย extracellular matrix การย่อยสลายนี้เป็นการเริ่มต้นของกระบวนการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็งไปสู่อวัยวะอื่นๆ ของร่างกาย โดยอาศัยระบบน้ำเหลืองและระบบหมุนเวียนโลหิตเป็นตัวพาไป (Nagase and Woessner, 1999; McCawley and Matrisian, 2000) ซึ่งระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายไม่สามารถตรวจสอบหรือทำลายเซลล์แปลกปลอมนี้ได้ ต่อจากนั้นเซลล์แปลกปลอมนี้จึงเกิดการ invade ออกจากระบบน้ำเหลืองหรือระบบหมุนเวียนโลหิต (adhesion and extravasation) เพื่อเข้าสู่กระบวนการแบ่งเซลล์และสร้างระบบหมุนเวียนโลหิตใหม่เพื่อหล่อเลี้ยงกลุ่มเซลล์มะเร็งนี้ (angiogenesis) (Liotta *et al.*, 1991) ซึ่งก็คือการเข้าสู่ระยะที่สองของโรคมะเร็งนั่นเอง

การตรวจวินิจฉัยมะเร็งในผู้ป่วยโดยทั่วไปมักพบในระยะ invasive แล้ว ทำให้การรักษาด้วยยาที่มีอยู่ในปัจจุบันมักไม่ได้ผล เนื่องจากเป็นยาที่มีฤทธิ์ทำลายเซลล์ระยะที่กำลังแบ่งตัว (cytotoxic, anti-proliferative drugs) ซึ่งจะใช้ได้ดีกับมะเร็งระยะแรกๆ เท่านั้น (Kohn and Liotta, 1995) นอกจากนี้ anti-proliferative drugs ยังเป็นพิษต่อเซลล์ปกติ ทำให้เกิดผลข้างเคียงต่างๆ เช่น ผมร่วง เยื่อบุทางเดินอาหารอักเสบ คลื่นไส้ อาเจียน และภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น การใช้ยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ (anti-metastatic compounds)

จึงเป็นทางเลือกใหม่ที่ได้รับความสนใจอย่างมาก และเนื่องจากลักษณะพิเศษของ metastatic cancer ดังที่กล่าวมาแล้วนั้น ทำให้เป้าหมายในการรักษาด้วยยา (drug targets) จึงมีหลากหลาย ภายในระยะเวลาไม่กี่ปีที่ผ่านมา ได้มีการค้นพบยาที่ยับยั้ง cancer metastasis หลายชนิด เช่น lovastatin (Wang *et al.*, 2000) endostatin (Young-Mi *et al.*, 2000), NAMI-A (Pacor *et al.*, 2001) และ doxycycline (DC) (Lokeshwar *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังมีผู้ค้นพบว่ายาแก้อักเสบบางชนิด เช่น NS398 ibuprofen aspirin และ JTE522 สามารถยับยั้ง cancer cell invasion ได้ (Nagatsuka *et al.*, 2002; Attiga *et al.*, 2000; Murono *et al.*, 2000; Tsujii *et al.*, 1998)

วิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ใช้กันโดยทั่วไปคือ วิธี transwell invasion assay (Knutson *et al.*, 1996) ที่อาศัยหลักการดูความสามารถของสารในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์มะเร็งผ่าน matrigel ซึ่งประกอบด้วย extracellular matrix protein ซึ่ง matrigel นี้จะถูกเคลือบลงบน membrane filter ของ transwell วิธีนี้เป็นวิธีที่มีความสามารถในการตรวจสารที่ยับยั้งกระบวนการต่างๆ ดังกล่าวข้างต้นได้ แต่ไม่เหมาะสำหรับการตรวจสอบสารตัวอย่างคราวละมากๆ เนื่องจากต้องอ่านผลด้วยการนับจำนวน invading cells ด้วยตาเปล่า ทำให้ใช้เวลามากและเกิดความผิดพลาดได้ง่าย

ผู้วิจัยมีจุดมุ่งหมายที่จะพัฒนาวิธีการตรวจหา anti-metastatic compounds จากสารตัวอย่างโดยปรับปรุงวิธี transwell invasion assay เพื่อให้สามารถอ่านผลด้วยการวัดค่า absorbance ได้จากเครื่อง spectrophotometer ทั้งเพื่อให้การตรวจสอบมีประสิทธิภาพดีขึ้นและมีความคลาดเคลื่อนจากผู้ทำการทดลองน้อยที่สุด วิธีการที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใหม่นี้มีความเหมาะสมที่จะใช้ในห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพที่จะต้องทดสอบสารตัวอย่างคราวละมากๆ

Cytotoxicity test

ในกระบวนการพัฒนายาใหม่มีด้วยกัน 3 ขั้นตอนคือ 1) discovery phase 2) preclinical phase และ 3) clinical phase การทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity test) ของสารที่สงสัยจัดอยู่ใน discovery phase ซึ่งจะช่วยในการคัดเลือกสารที่มีคุณสมบัติทางชีวภาพที่ต้องการและไม่มีพิษต่อเซลล์หรือมีพิษต่อเซลล์ต่ำให้เหลือจำนวนจำกัด เพื่อนำเข้าสู่การทดสอบในสัตว์ทดลอง (preclinical phase) ต่อไป ซึ่งการทดลองในขั้นนี้จะเป็นการใช้สัตว์ทดลองเพื่อทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพ (in *vivo*) รวมทั้งศึกษาทาง pharmacokinetics, toxicology, drug absorption และ drug metabolism ซึ่งจะมีค่าใช้จ่ายที่สูง ดังนั้นจึงมีแนวโน้มในการใช้สัตว์ทดลองในการทดสอบให้น้อยลง โดยมีการพยายามหาระบบ in *vitro* มาใช้ทดแทนให้มากขึ้น (Dierickx and Ekwall, 1992) ซึ่งนอกจากจะช่วยลดค่าใช้จ่ายแล้ว ยังเป็นการลดจำนวนชีวิตสัตว์ที่จะต้องสูญเสียไปในการทดลอง

ความพยายามนี้ได้ทำให้เกิดโปรแกรม Multicenter Evaluation of *In Vitro* Cytotoxicity (MEIC) ขึ้น จัดตั้งโดย The Scandinavian Society for Cell Toxicology ซึ่งมีจุดประสงค์เพื่อหาวิธีทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์หลากหลายแบบด้วยวิธีการวัดความเป็นพิษแบบต่างๆ แล้วนำข้อมูลนั้นมาเปรียบเทียบกับข้อมูลค่าความเป็นพิษแบบเฉียบพลัน (acute toxicity) ใน rat mouse และมนุษย์ที่รวบรวมไว้ เพื่อหาความสัมพันธ์ระหว่างวิธีทดสอบความเป็นพิษ *in vitro* กับค่าความเป็นพิษในสิ่งมีชีวิต การศึกษาในโปรแกรมนี้เป็นการร่วมมือกันของห้องปฏิบัติการในประเทศต่างๆ ในการทดสอบสารที่ได้คัดเลือกมา เช่น sodium chloride, ethyl alcohol, phenol, paraquat, malathion และ aspirin เป็นต้น รวมทั้งสิ้นเป็นสาร 50 ชนิด สารทั้งหมดนี้ได้ผ่านวิธีการทดสอบ 67 วิธีโดยใช้

- cell line จากมนุษย์รวม 20 ชนิด
- primary culture จากมนุษย์รวม 7 ชนิด
- cell line จากสัตว์รวม 19 ชนิด
- primary culture จากสัตว์รวม 18 ชนิด
- และเซลล์ที่ใช้ใน ecotoxicological tests เช่น bacteria rotifer และปลา รวมทั้งสิ้น 18 ชนิด

จากผลการวิเคราะห์สรุปได้ว่ามีวิธีการทดสอบ 3 ชนิดที่ให้ค่าความเป็นพิษ (IC_{50}) ที่มีความสัมพันธ์อย่างสูงกับ acute lethal blood concentration (LC_{50}) ของมนุษย์ ได้แก่ 1) การวัดปริมาณ ATP ที่ end point โดยใช้ HL-60 cell line 2) ดูการเปลี่ยนรูปร่างและ pH ที่ end point โดยใช้ WI-1003 และ Hep G2 cell lines 3) การวัดปริมาณโปรตีนที่ end point โดยใช้ Hep G cell line โดยจากการศึกษานี้ได้แสดงให้เห็นว่าค่าความเป็นพิษของสารเมื่อผ่านการทดสอบ in vitro ทั้ง 3 ชนิดนี้แล้วสามารถใช้ทำนายค่า lethal blood concentration ในมนุษย์ได้ดี ($R^2 = 0.77$) ซึ่งดีกว่าการใช้ค่าความเป็นพิษใน mouse และ rat มาทำนาย ($R^2 = 0.65$) ถึงแม้ว่าวิธีนี้จะไม่ได้ทำนาย lethal dosage โดยตรงแต่เป็นการทำนาย lethal blood concentration (เนื่องจาก lethal dose ขึ้นอยู่กับปัจจัยอื่นๆอีก เช่น gut absorption และ distribution volume) การผ่านการทดสอบทั้งสามจะช่วยในการกำหนดแนวทางการทดสอบในสัตว์ทดลองได้ต่อไป

ในปัจจุบันห้องปฏิบัติการหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพมีความสามารถในการทดสอบ cytotoxicity test ต่อ vero cell line และวัด end point โดยวัดจากสีย้อม sulforhodamine B ซึ่งสารทุกตัวที่ได้รับการทดสอบฤทธิ์ทางชีวภาพจะได้รับการทดสอบความเป็นพิษต่อ vero cell line ด้วย ดังนั้นโครงการนี้จึงเสนอที่จะให้บริการทดสอบ cytotoxicity test เพิ่มขึ้นจากที่มีอยู่เดิม เพื่อเป็นการช่วยในการทำนาย lethal blood concentration ใน

สัตว์ทดลอง และเป็นการช่วยให้กระบวนการพัฒนายาก้าวต่อไปข้างหน้าโดยมีค่าใช้จ่ายที่ลด โดยจะใช้วิธีการทดสอบวิธีแรก คือการวัดปริมาณ ATP ที่ end point และจะปรับปรุงการทดสอบให้อยู่ในรูปแบบของ 96-well format แทนการทดสอบในหลอดทดลองตามวิธีเดิมเพื่อความสะดวกและเหมาะสมกับการทดสอบสารจำนวนมาก

14. แผนการดำเนินงาน

เดือนที่	ผลงานที่คาดว่าจะสำเร็จ
1-4	1. สามารถพัฒนาวิธีตรวจสอบหาสารที่มีฤทธิ์เป็น anti-metastasis 2. สามารถพัฒนาวิธีตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี ATP assay
5-9	1. ได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการตรวจสอบหาสารที่มีฤทธิ์เป็น anti-metastasis จากตัวอย่าง 2. เปรียบเทียบวิธีการตรวจสอบการเป็นพิษต่อเซลล์โดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง HL-60 กับวิธีมาตรฐาน
11-12	1. สามารถตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยอาศัยกลไกยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (anti-metastasis) ได้ โดยจะทดสอบสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ 2. สามารถตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยการใช้เซลล์เพาะเลี้ยง HL-60 ในสารตัวอย่างได้ โดยจะทดสอบสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์

15. ผลการทดลอง

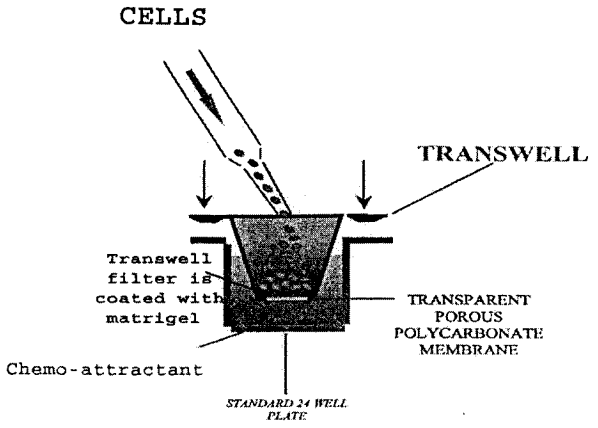
สรุปผลการปฏิบัติงานของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis

ขั้นตอนการทดลอง

1. การหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับ anti-metastasis assay

ในการพัฒนา anti-metastasis assay ให้เป็น throughput assay ผู้วิจัยได้นำวิธี cell invasion assay (Knutson *et al.*, 1996) มาดัดแปลง โดยใช้เซลล์ Caco-2 (colorectal adenocarcinoma, ATCC) ซึ่งเลี้ยงใน Minimum Essential Medium (MEM, Hyclone) ที่เติม 20% Fetal Bovine Serum (FBS) 2 mM L-glutamine 0.1 mM non-essential amino acid และ 0.1 mM sodium pyruvate และ HT-1080 (fibrosarcoma, ATCC) ซึ่งเลี้ยงใน MEM (Hyclone) ที่เติม 10% FBS 2 mM L-glutamine 0.1 mM non-essential amino acid และ 0.1 mM sodium pyruvate เป็นเซลล์ทดสอบ เนื่องจากเซลล์มะเร็งแต่ละชนิดมีความสามารถในการเคลื่อนที่ผ่าน extracellular matrix ได้ต่างกัน จึงจำเป็นต้องมีการหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ assay ในแต่ละ cell line ทั้งนี้เพื่อให้ได้วิธีการวัด metastatic activity ที่ถูกต้องแม่นยำ และมีความไวสูง เหมาะสมแก่การให้บริการทดสอบตัวอย่างคราวละมากๆ

วิธีการทำ invasion assay โดยย่อมีดังนี้ เติม cell suspension ที่มีความหนาแน่นต่างๆ ปริมาตร 200 µl ลงใน transwell ที่เคลือบไว้ด้วย matrigel และเติม mouse fibroblast conditioned medium (ภาคผนวก 3) หรือ culture medium ธรรมดาปริมาตร 300 µl ลงใน lower chamber ของหลุม 24-well plate นำไป incubate เป็นเวลาต่างๆ ที่ 37°C 5% CO_2 จากนั้นจึงเช็ด non-invading cells ที่ด้านบนของ transwell filter ออกแล้วนำไป fix และย้อมด้วย crystal violet dye จากนั้นจึงนับจำนวน invading cells ที่ข้างใต้ transwell filter และที่ก้นหลุมของ 24-well plate ใต้กล้องจุลทรรศน์ (ภาคผนวก 1) จำนวน invading cells ที่ได้จากการใช้เซลล์เริ่มต้นที่ความหนาแน่นต่างๆ และจากการ incubate ที่เวลาต่างๆ จะถูกนำมาเปรียบเทียบกัน โดยเลือกความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์และเวลาในการ incubate ที่เหมาะสมจากความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์และเวลาที่ให้จำนวน invading cells สูงสุดขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน transmembrane ยังคงที่และเวลาในการ incubate ไม่เกิน doubling time ของเซลล์ที่นำมาทดสอบ



รูปที่ 1 แสดงการทำ invasion assay โดยเติมเซลล์ลงใน upper chamber ของ transwell และเติม chemo-attractant ใน lower chamber หรือในหลุม 24-well plate

2. การอ่านผล

ในการศึกษาครั้งนี้จะเป็นการทดลองเปรียบเทียบวิธีอ่านผลที่เป็น colorimetric measurement สองวิธี คือการวัด absorbance ของสี crystal violet ที่ละลายมาจาก invading cells และการวัด absorbance ของ MTT metabolites ที่สร้างโดย invading cells กับการนับจำนวนเซลล์ซึ่งเป็นวิธีมาตรฐาน (Knutson *et al.*, 1996)

<u>การวัดปริมาณสี crystal violet ที่ย้อมติด invading cells</u>

สี crystal violet เป็น basic dye ซึ่งย้อมติดส่วนที่เป็น acidic components ของเซลล์ หลังจาก fix invading cells แล้วจึงย้อมต่อด้วย 0.5% crystal violet dye ใน 25% methanol ทิ้งไว้จนแห้งแล้วจึงสกัดสีที่ย้อมติด invading cells ด้วย 0.1 M sodium citrate ใน 50% ethanol ปริมาตร 300 µl จากนั้นวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 585 nm ด้วย microplate reader โดยใช้สารละลายที่ได้จาก transwell filter ที่เติม culture medium แต่ไม่มีเซลล์เป็น blank นำค่า absorbance ที่ได้ไปเขียนกราฟกับจำนวนเซลล์ที่นับได้ ถ้าความสัมพันธ์เป็นเส้นตรงและค่า absorbance ที่ได้สูงพอที่จะอ่านค่าได้แม่นยำ (0.1-2.0) วิธีวัดค่า absorbance ของสี crystal violet จะถูกใช้ในการตรวจสอบสารตัวอย่างต่อไป

<u>การวัดปริมาณ MTT metabolites ที่สร้างโดย invading cells</u>

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) เป็น tetrasolium dye มีสีเหลืองและละลายน้ำได้ เมื่อเข้าไปในเซลล์ที่มีชีวิต จะถูก reduce กลายเป็น MTT-formazan ซึ่งมีสีม่วงและไม่ละลายน้ำ วิธีย้อมเซลล์ด้วย MTT เป็นวิธีที่ใช้กันแพร่หลายในการตรวจหายาจากตัวอย่างเนื่องจากใช้ได้กับเซลล์หลายชนิด (Carmichael *et al.*, 1987) และมีข้อดีคือให้ background น้อยเพราะ MTT-formazan ดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่นต่างจาก MTT ที่เป็น substrate

ก่อนที่จะใช้วิธีนี้ต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT เพื่อให้ปริมาณสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์ โดยดัดแปลงมาจากวิธีของ Plumb *et al.* ที่ใช้ในการทำ chemosensitivity assay (Plumb *et al.*, 1989) แล้วจึงทดสอบความไวและความแม่นยำต่อไป การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT ทำโดยเตรียม cell suspension ใน culture medium ให้มีความหนาแน่นต่างๆ ในปริมาตร 300 µl ใส่ลงใน 24-well

plate โดยใช้ well ที่มี culture medium แต่ไม่มีเซลล์เป็น blank นำ plate ไป incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเติมสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ลงใน cell suspension และ incubate ต่ออีก 4 ชั่วโมง ดูด medium เก่าออกแล้วเติม 300 µl 100% dimethy sulfoxide (DMSO) และ 38 µl Sorensen's glycine buffer (0.1 M glycine, 0.1 M NaCl, pH10.5) ลงไปเพื่อละลายผลึก MTT-formazan (Plumb *et al.*, 1989) จากนั้นจึงถ่ายสารละลาย MTT formazan ที่ได้ 200 µl ลงในหลุม 96-well plate และนำไปวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 570 nm ด้วย microplate reader นำค่า absorbance ที่ได้มาเขียนกราฟกับความเข้มข้นของสารละลาย MTT ความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับการทดลองคือความเข้มข้นสุดท้ายที่ความสัมพันธ์ระหว่างทั้งสองค่ายังเป็นเส้นตรง

3. การทดสอบความไวและความถูกต้องแม่นยำเปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน

เมื่อดัดแปลงใช้ colorimetric method ในการวัดจำนวน invading cells ได้แล้วจึงทดสอบความไวและความถูกต้องแม่นยำของวิธีการใหม่นี้เปรียบเทียบกับวิธีมาตรฐาน โดยทำ invasion assay ตามวิธีการที่ได้กล่าวไว้ โดยใช้ cell suspension ที่ความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 200 µl และใช้ chemo-attractant ปริมาตร 300 µl จากนั้นจึงย้อม invading cells ที่อยู่ด้านล่างของ transwell filter และที่อยู่ใน lower chamber ด้วย crystal violet dye หรือ MTT แล้วเช็ด non-invading cells ที่อยู่ด้านบนของ transwell ออก ละลาย MTT formazan ตามวิธีที่กล่าวไว้ข้างต้น แล้วนำสารละลายที่ได้ 200 µl ไปวัดค่า absorbance ที่ 570 nm ด้วย microplate reader เขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance ที่ได้กับจำนวน invading cells ที่นับได้จากวิธีการมาตรฐานที่ใช้ cell suspension ที่มีความหนาแน่นเท่ากัน ค่า absorbance ที่ได้ควรจะสูงพอ (0.1-2.0) และความสัมพันธ์ที่ได้ควรเป็นเส้นตรง จึงจะถือว่าเป็นวิธีที่เหมาะสมกับการตรวจหาสารตัวอย่าง

4. การคัดเลือกและทดสอบยาที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการทดลอง

การทดสอบหาฤทธิ์ anti-metastasis ของสารตัวอย่างเป็นการตรวจสอบที่มีวิธีการหลายขั้นตอน ซึ่งมีปัจจัยต่างๆที่จะทำให้เกิดความแปรปรวนในการทดสอบได้ ดังนั้นในการทดสอบแต่ละครั้งจำเป็นที่จะต้องมีตัวควบคุมการทดลอง (positive control) เพื่อตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของผลการทดสอบ โดยที่ตัวควบคุมนั้นๆจะต้องเป็นสารที่ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการแปลผลผิดพลาด (false positive) ที่เกิดจากการที่ยาไปฆ่าเซลล์ ทำให้ได้จำนวน invading cells น้อยกว่าความเป็นจริง ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกยาที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมโดยทำการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์และความสามารถในการยับยั้ง cell invasion ของสารต่างๆดังนี้

- ยาที่นำมาทดสอบ

ในการคัดเลือก positive control ผู้วิจัยได้เลือกทดสอบยาหรือสารเคมีที่เคยมีรายงานมาแล้วว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ของเซลล์มะเร็งทั้งในระดับ in *vitro* และ in *vivo* ยาที่นำมาทดสอบได้แก่ NS-398 Sulindac sulfide และ Aspirin (Acetylsalicylic acid) ซึ่งเป็นยาที่มีฤทธิ์ในการยับยั้งเอนไซม์ Cyclooxygenase สาเหตุของอาการอักเสบในร่างกาย การศึกษาที่ผ่านมาแสดงว่า NS-398 สามารถยับยั้งการสร้างเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) และ matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ในเซลล์มะเร็งต่อมลูกหมาก (DU-145 และ PC-3) (Attiga FA *et al.*, 2000) และ Sulindac sulfide สามารถลด

การเกิด cell invasion ของเซลล์มะเร็งลำไส้ (Weyant MJ *et al.*, 2000) ส่วน Aspirin สามารถลดคุณสมบัติการเป็น invasive cells ของเซลล์ SW480 (human colon cancer) (Yu HG *et al.*, 2002) นอกจากนี้ยังได้ทดสอบ Doxycycline ซึ่งเป็นยาประเภท antibiotics ที่สามารถลดการหลั่งเอนไซม์ matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) ในมะเร็งต่อมลูกหมากของหนู (Lokeshwar *et al.*, 2002) Lovastatin ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยโรคหัวใจ สามารถยับยั้ง cell adhesion และ migration ของ F311 mammary carcinoma cells ทั้งในระดับ in *vitro* และ in *vivo* (Farina HG *et al.*, 2002) Sodium selenite ซึ่งมีความสามารถในการยับยั้งการสร้าง matrix metalloproteinase-2 (MMP-2) และ matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ซึ่งเป็น MMP ที่ถูกสร้างขึ้นมากในเซลล์ HT-1080 (fibrosarcoma) (Yoon *et al.*, 2001) และ Ilomastat ซึ่งเป็น broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor (ยับยั้ง MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9) ที่ใช้กันในห้องปฏิบัติการทั่วไป (http://www.cnbi.com/Products)

- การทดสอบตัวทำละลายยา

ก่อนที่จะทดสอบ anti-metastatic activity ของยา จะต้องมีการทดสอบก่อนว่าตัวทำละลายยาไม่มีความเป็นพิษและไม่ยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ของเซลล์ HT-1080 เนื่องจากยาส่วนใหญ่ละลายอยู่ใน DMSO จึงจะต้องมีการทดสอบหาความเข้มข้น DMSO ที่เหมาะสมที่จะนำมาใช้กับ cytotoxicity test และ anti-metastasis assay กับเซลล์ HT-1080 การทดสอบ cytotoxicity test ใช้วิธี Sulforhodamine B assay (SRB assay) ทำโดยเติม DMSO ความเข้มข้นต่างๆ ลงในหลุม 96-well plate ที่มีเซลล์ HT-1080 จำนวน 2×10^4 เซลล์ แล้ว incubate ที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 20 นาทีซึ่งเท่ากับ doubling time ของเซลล์ จากนั้นจึง fix และ stain เซลล์ด้วย 50% (w/v) trichloroacetic acid (TCA) ในน้ำที่ 4°C เป็นเวลา 30 นาที และ 0.057% (w/v) SRB ใน 1% acetic acid ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาทีตามลำดับ เมื่อสีแห้งแล้วจึงละลายสีย้อมด้วย 10 mM Tris-base (pH10) และวัด OD ที่ 515 nm จากนั้นจึงคำนวณหาเปอร์เซ็นต์ cytotoxicity จากสมการดังนี้

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{(\text{mean OD}_{\text{control}} - \text{mean OD}_{\text{test}}) \times 100}{\text{mean OD}_{\text{control}}}$$

โดยที่ : $\text{mean OD}_{\text{control}} = \text{mean OD}_{\text{10\%DMSO}} - \text{mean OD}_{\text{zero day}}$

$\text{mean OD}_{\text{test}} = \text{mean OD}_{\text{sample}} - \text{mean OD}_{\text{zero day}}$

เมื่อได้ความเข้มข้น DMSO ที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 แล้วจึงนำความเข้มข้นนั้นมาทดสอบกับ anti-metastasis assay (ภาคผนวก 1) ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใหม่ โดยนำค่า OD ของจำนวน invading cells ที่วัดได้มาคำนวณหาเปอร์เซนต์ inhibition จากสมการข้างล่างนี้

$$\% \text{ inhibition} = 100 - \% \text{ invasion}$$

โดยที่ : $\% \text{ invasion} = \frac{\text{absorbance value of invading cells (drug)}}{\text{absorbance value of invading cells (control)}} \times 100$

ผู้วิจัยจะเลือกใช้สารละลาย DMSO ที่ความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์และไม่ยับยั้ง cell invasion ในการละลายสารตัวอย่างต่อไป

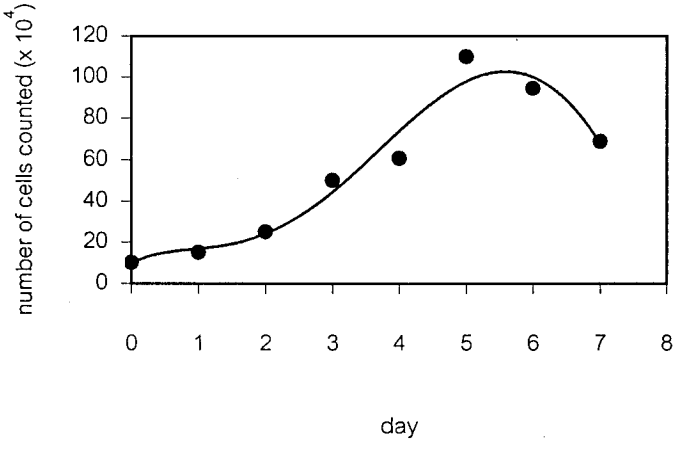
- การทดสอบยาที่จะนำมาใช้เป็น positive control

ยาชนิดต่างๆที่กล่าวไว้ข้างต้นจะถูกนำมาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยวิธี SRB assay เพื่อหาความเข้มข้นสูงสุดของยาที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เมื่อได้ความเข้มข้นของยาที่ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 แล้ว จึงนำความเข้มข้นนั้นมาทดสอบความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ของเซลล์ HT-1080 โดยทดสอบกับ anti-metastasis assay (ภาคผนวก 1) ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาใหม่ และคำนวณเปอร์เซนต์ inhibition ของยาตามที่กล่าวไว้แล้วข้างต้น

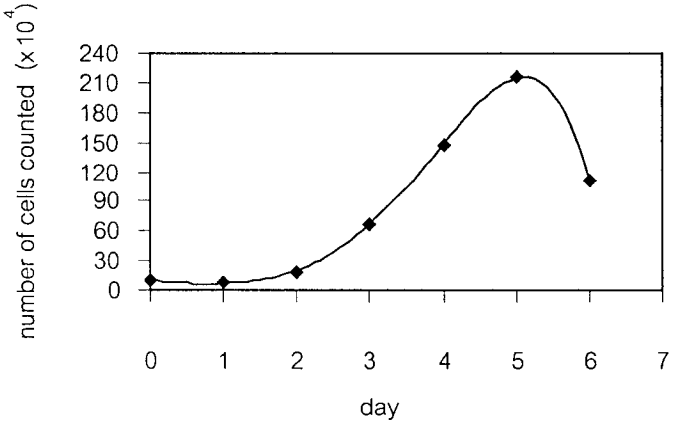
ผลการทดลอง

1. Growth curve ของ HT-1080 และ Caco-2 cell lines

เนื่องจากเซลล์แต่ละชนิดมีการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน ผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาอัตราการเจริญเติบโตของเซลล์ HT-1080 และ Caco-2 ซึ่งจะนำมาใช้ในการทำ anti-metastasis assay เพื่อให้สามารถประมาณช่วงเวลาในการ incubate เซลล์ โดยเวลาที่จะใช้ในการ incubate เซลล์จะต้องไม่เกิน doubling time ของเซลล์นั้นๆ เพื่อมิให้จำนวน invading cells ที่นับเกิดความคลาดเคลื่อนจากการแบ่งตัวของเซลล์



รูปที่ 2 แสดง growth curve ของเซลล์ Caco-2 ซึ่งได้จากการเติมเซลล์เริ่มต้นจำนวน 20,000 เซลล์ลงใน 50 mm tissue culture dish แล้วนำไป incubate ที่ 37°C 5% CO_2 และนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จาก growth curve ที่ได้พบว่า doubling time ของเซลล์ Caco-2 คือ 41 ชั่วโมง



รูปที่ 3 แสดง growth curve ของเซลล์ HT-1080 โดยเติมเซลล์เริ่มต้นจำนวน 20,000 เซลล์ลงใน 50 mm tissue culture dish แล้วนำไป incubate ที่ 37°C 5% CO_2 และนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นทุกวันเป็นเวลา 7 วัน จาก growth curve ที่ได้พบว่า doubling time ของเซลล์ HT-1080 คือ 20 ชั่วโมง

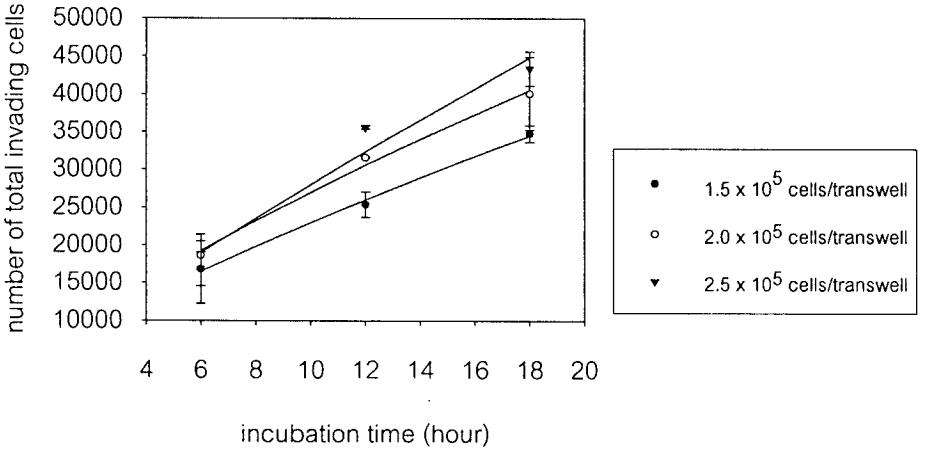
จากรูปทั้งสองข้างต้นจะเห็นว่า doubling time ของ HT-1080 คือ 20 ชั่วโมง ส่วน doubling time ของ Caco-2 คือ 41 ชั่วโมง ดังนั้นเวลาที่จะเลือกใช้ในการ incubate เซลล์ HT-1080 และ Caco-2 จะต้องน้อยกว่า 20 และ 41 ชั่วโมงตามลำดับ เพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการนับจำนวน invading cells ได้มากกว่าความเป็นจริงเนื่องจากการแบ่งตัวของเซลล์

2. การหาสภาวะที่เหมาะสมในการทำ invasion assay

ในการหาสภาวะที่เหมาะสมในการพัฒนา anti-metastasis assay ผู้วิจัยได้ทดลองเปรียบเทียบปัจจัยต่างๆ ที่จะมีผลต่อปริมาณ invading cells ได้แก่ จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่จะใช้ เวลาในการ incubate และ medium ที่จะใช้เป็น chemo-attractant ทั้งนี้เพื่อให้ได้จำนวน invading cells สูงสุด และวัด metastatic activity ได้ถูกต้องแม่นยำ

2.1 การหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นและ incubation time ที่เหมาะสม

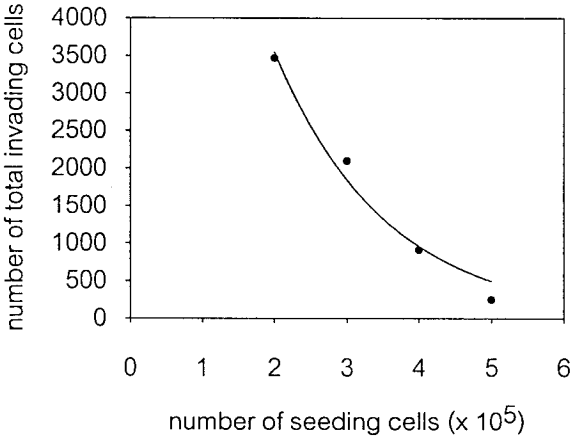
การหาจำนวนเซลล์ HT-1080 เริ่มต้นที่เหมาะสมสำหรับ anti-metastasis assay ทำโดยเติมเซลล์จำนวนต่างๆ ได้แก่ 1.5×10^5 2.0×10^5 และ 2.5×10^5 cells ใน culture medium 200 µl ใน transwell ที่เคลือบด้วย matrigel แล้วนำไป incubate ใน lower chamber ที่มี culture medium ที่มี 10% FBS อยู่ 300 µl ที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 6 12 และ 18 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่น้อยกว่า doubling time ของเซลล์ HT-1080 จากนั้นจึง fix และย้อม invading cells ที่อยู่ใต้ transwell filter แล้วนำมานับจำนวน invading cells เพื่อให้ได้ค่าที่ใกล้เคียงกับจำนวน invading cells ทั้งหมดจริง (ภาคผนวก 1) ผู้วิจัยได้ทำการนับจำนวนเซลล์ที่อยู่ใต้ transwell filter ทั้งหมด 9 fields (1field = 0.8 mm^2) แล้วนำค่าเฉลี่ยของจำนวน invading cells/field มาคำนวณหาจำนวนเซลล์ต่อพื้นที่ทั้งหมดของ transwell filter (28.3 mm^2) จากนั้นจึงนำจำนวนเซลล์ที่ได้มารวมกับจำนวนเซลล์ที่ตกอยู่ที่ lower chamber เป็นจำนวน invading cells ทั้งหมด



รูปที่ 4 แสดงจำนวน HT-1080 invading cells ที่ได้จากการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1.5×10^5 2.0×10^5 และ 2.5×10^5 cells/transwell และใช้เวลาในการ incubate ทั้งหมด 6 12 และ 18 ชั่วโมง ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำสองครั้ง

จากการทดลองนี้พบว่าจำนวนเซลล์ HT-1080 ที่เหมาะสมคือ 2.0×10^5 cells/transwell และเวลาที่เหมาะสมในการ incubate คือ 18 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นความหนาแน่นเริ่มต้นและช่วงเวลาที่ให้จำนวน invading cells สูง ขณะที่อัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน transmembrane ยังคงที่ ผู้วิจัยไม่ได้เลือกใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่ 2.5×10^5 cells/transwell เพราะถึงแม้ว่าจะได้จำนวน invading cells สูงกว่าเล็กน้อย แต่ต้องใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นที่มากกว่า

ในการหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นและเวลาในการ incubate ที่เหมาะสมเบื้องต้นสำหรับ anti-metastasis assay ที่ใช้เซลล์ Caco-2 ผู้วิจัยใช้วิธีการเดียวกันกับเซลล์ HT-1080 โดยใช้จำนวนเซลล์ Caco-2 เริ่มต้น 2.0×10^5 3.0×10^5 4.0×10^5 และ 5×10^5 cells/transwell และใช้เวลาในการ incubate เป็น 15 21 และ 39 ชั่วโมงซึ่งเป็นเวลาที่น้อยกว่า doubling time ของเซลล์ Caco-2



รูปที่ 5 แสดงจำนวน Caco-2 invading cells ที่ได้จากการนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์เมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 2.0×10^5 3.0×10^5 4.0×10^5 และ 5×10^5 cells/transwell และใช้เวลาในการ incubate ทั้งหมด 39 ชั่วโมง

จากการทดลองพบ Caco-2 invading cells เป็นจำนวนน้อยมาก (ต่ำกว่า 50 เซลล์/transwell) เมื่อ incubate เซลล์เป็นเวลา 15 และ 21 ชั่วโมง แต่เมื่อพิจารณาที่ 39 ชั่วโมงของการ incubate ผู้วิจัยพบว่าจำนวน Caco-2 invading cells ที่ได้น้อยลงเมื่อใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้นเพิ่มขึ้น จึงคาดว่าความหนาแน่นเริ่มต้นของเซลล์ที่มากเกินไปมีผลทำให้เซลล์ invade น้อยลง อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาจำนวน invading cells ที่ได้เมื่อ incubate เซลล์ Caco-2 จำนวน 2.0×10^5 cells/transwell เป็นเวลา 39 ชั่วโมง พบว่าน้อยมากเมื่อเปรียบเทียบกับจำนวน invading cells ที่ได้จากการใช้เซลล์ HT-1080 จำนวนเท่ากันในเวลา 18 ชั่วโมง (รูปที่ 4 และ 5) ซึ่งจำนวน invading cells ที่ได้นี้ไม่เพียงพอสำหรับการวัดปริมาณด้วยวิธี colorimetric method ที่จะกล่าวถึงต่อไป ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเปลี่ยน chemo-attractant จาก culture medium เป็น conditioned medium ดังที่เคยมีรายงานมาแล้วว่าสามารถเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน matrigel *(Connolly* et al., *2002; Woodward* et al., *2002)*

2.2 การเปรียบเทียบความเป็น chemo-attractant ที่ดีระหว่าง conditioned medium (serum-freed mouse fibroblast conditioned medium) และ culture medium ธรรมดา

จากการทดลองที่มีผู้ทำไว้ก่อนหน้านี้ (Connolly *et al.*, 2002; Woodward *et al.*, 2002) พบว่าการใช้ conditioned medium ช่วยเพิ่มอัตราการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน matrigel ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดลองเปรียบเทียบการใช้ conditioned medium (serum-freed mouse fibroblast conditioned medium) (ภาคผนวก 3) แบบไม่เติมและเติม 10% FBS กับ culture medium ธรรมดาที่ไม่มีและมี 10% FBS เป็น chemo-attractant ทั้งนี้เพื่อให้ได้สภาวะที่เหมาะสมในการทำ anti-metastasis assay และเพื่อให้ได้จำนวน invading cells สูงสุด

ในขั้นแรกผู้วิจัยได้ทดสอบผลของ medium ทั้งสี่ชนิดต่อ invasion ของเซลล์ HT-1080 โดยใช้เซลล์ HT-1080 จำนวน 2.0×10^5 cells/transwell และ incubate ที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 6 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบจำนวน invading cells ที่ได้จากการใช้ medium ทั้ง 4 ชนิดเป็น chemo-attractant

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบจำนวน invading cells ที่ได้จากการใช้ culture medium ที่เติมและไม่เติม 10% FBS และ mouse fibroblast conditioned medium ที่เติมและไม่เติม 10% FBS เป็น chemo-attractant ในการทำ invasion assay เมื่อใช้เซลล์ HT-1080 จำนวน 2.0×10^5 cells/transwell และ incubate เป็นเวลา 6 ชั่วโมง ค่าตัวเลขที่ปรากฏในตารางเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำสามครั้ง

	number of invading cells		
	beneath transwell	at lower chamber	total
serum-freed culture medium	9187	109	9296
culture medium + 10% FBS	28183	364	28547
serum-freed conditioned medium	14052	310	14362
conditioned medium + 10% FBS	33045	407	33452

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าเมื่อใช้ conditioned medium เป็น chemo-attractant จะทำให้ได้จำนวน invading cells สูงกว่าเมื่อใช้ serum-freed medium แต่เมื่อเติม 10% FBS ลงใน culture medium และ conditioned medium กลับพบว่าจำนวน invading cells ที่ได้เพิ่มสูงขึ้นโดย conditioned medium ที่เติม 10% FBS ให้จำนวน invading cells สูงที่สุด จากผลการทดลองจึงสรุปได้ว่า conditioned medium ที่มี 10% FBS เป็น chemo-attractant ที่ดีที่สุด ส่วน culture medium ที่มี 10% FBS serum-freed conditioned medium และ serum-freed culture medium เป็น chemo-attractant ที่ดีรองลงมาตามลำดับ ผู้วิจัยเลือกใช้ culture medium ที่มี 10% FBS เป็น chemo-attractant สำหรับการทำ invasion assay กับเซลล์ HT-1080 ต่อไปเนื่องจาก medium ชนิดนี้ให้จำนวน invading cells สูงพอสำหรับการวัดด้วยวิธี colorimetric method และจำนวนเซลล์ที่ได้แตกต่างจากการใช้ conditioned medium ที่มี 10% FBS ไม่มากนัก (15%) อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ว่า serum ที่มีอยู่ใน medium อาจมีผลต่อยาที่จะนำมาทดสอบ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบผลของ serum ต่อ activity ของยา ซึ่งจะกล่าวต่อไปในขั้นตอนที่ 4.3

หลังจากที่ทราบผลของ chemo-attractant ที่ใช้ต่อเซลล์ HT-1080 แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดลองเช่นเดียวกันกับเซลล์ Caco-2 โดยใช้เซลล์จำนวน 2.0×10^5 cells/transwell และ incubate ที่ 37°C 5% CO_2 เป็น

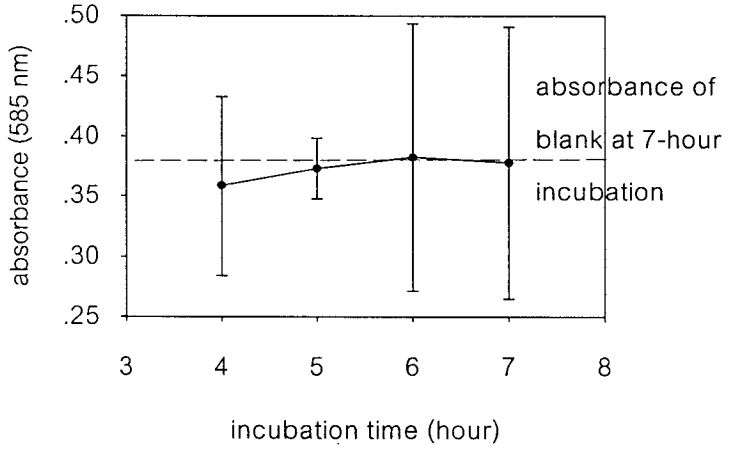
เวลา 39 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงเปรียบเทียบจำนวน invading cells ที่ได้จากการใช้ culture medium และ mouse fibroblast conditioned medium ทั้งที่เติมและไม่เติม 10% FBS เป็น chemo-attractant ผู้วิจัยทำการทดลองซ้ำทั้งหมดสามครั้ง แต่ไม่พบ invading cells เลยสักครั้งแม้ว่าจะใช้ conditions ตามที่หาได้แล้ว ผู้วิจัยจึงคาดว่าเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการไปจึงทำให้ไม่มีการ invade เกิดขึ้น ผู้วิจัยได้ทำการทดลองอีกครั้งโดยเปลี่ยนเซลล์ชุดใหม่ แต่ก็ยังไม่พบ invading cells เหมือนเดิม ผู้วิจัยจะได้ทำการทดลองเติมโปรตีนที่มีคุณสมบัติเป็น chemo-attractant เช่น fibronectin (Momiki *et al.*, 1991) ในการทดลองขั้นต่อไป ในขั้นต้นจึงเลือกใช้เซลล์ HT-1080 สำหรับการพัฒนา anti-metastasis assay ต่อไป

3. เปรียบเทียบวิธีการอ่านผลด้วยการนับเซลล์และ colorimetric measurements

ผู้วิจัยได้ทำการเปรียบเทียบวิธีอ่านผลระหว่างวิธีการนับแบบมาตรฐาน (Knutson *et al.*, 1996) และวิธีที่เป็น colorimetric measurement สองวิธี คือการวัด absorbance ของสี crystal violet ที่ละลายมาจาก invading cells ที่ 585 nm และการวัด absorbance ของ MTT metabolites ที่สร้างโดย invading cells ที่ 570 nm เพื่อหาวิธีการวัด HT-1080 invading cells ที่ได้จาก anti-metastasis assay ที่มีความถูกต้องแม่นยำ และสะดวกต่อการทดสอบตัวอย่างจำนวนมาก

3.1 การทดสอบวิธีการอ่านผลด้วยสี crystal violet

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบเบื้องต้นเพื่อทดสอบว่าสามารถใช้วิธีการวัด crystal violet dye แทนการนับจำนวนเซลล์ได้หรือไม่ โดยได้ย้อม invading cells ใต้ transwell filter ที่ได้จากการทำ invasion assay ด้วยจำนวนเซลล์ 2.0 × 10^5 cells/transwell เป็นเวลา 4 5 6 และ 7 ชั่วโมงตามลำดับ แล้วจึงวัดปริมาณ invading cells โดยวิธีการย้อมด้วยสี crystal violet ตามวิธีที่ได้อธิบายไว้ในขั้นตอนการทดลอง ผลที่ได้ดังแสดงในรูปที่ 6



รูปที่ 6 แสดงผลการวัดปริมาณ HT-1080 invading cells โดยการวัดค่า absorbance ของ crystal violet dye ที่ความยาวคลื่น 585 nm เมื่อทำ invasion assay โดยใช้จำนวนเซลล์ 2.0 × 10^5 cells/transwell และ incubate เป็นเวลา 4 5 6 และ 7 ชั่วโมง โดยใช้สารละลายที่สกัดได้จาก transwell filter ที่เติมเฉพาะ culture media และ incubate 7 ชั่วโมงเป็น blank ค่า absorbance ที่แสดงในรูปเป็นค่าเฉลี่ยจากการทำซ้ำสองครั้ง

จากผลการทดลองข้างต้นจะเห็นว่าค่า absorbance ของ blank (0.38) ไม่แตกต่างกับ absorbance ของ HT-1080 invading cells ที่ได้จากการ incubate เป็นเวลาต่างๆ นอกจากนี้แล้วค่า absorbance ที่ได้จากการ incubate ตั้งแต่ 4 ถึง 7 ชั่วโมงแตกต่างกันเพียงเล็กน้อย ผู้วิจัยจึงมิได้ทดลองเพิ่ม incubation time ให้เป็น 18 ชั่วโมง เนื่องจากเห็นว่าค่า background ที่ได้จากการย้อม crystal violet dye สูงเกินไป ซึ่งจะทำให้การทดสอบนี้มีความไวต่ำ ดังนั้นจึงพิจารณาว่าจะทดสอบการวัดปริมาณ invading cells ด้วย MTT metabolites แทนการย้อมด้วย crystal violet dye

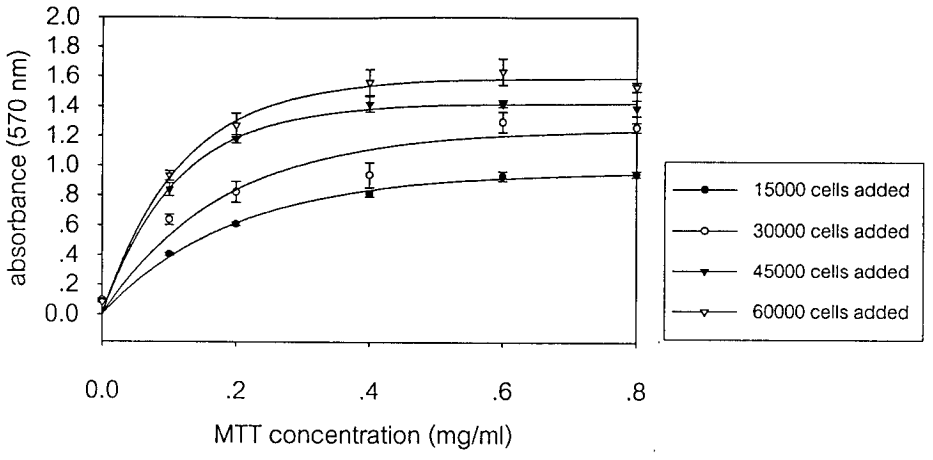
3.2 การทดสอบวิธีการอ่านผลด้วยการวัด MTT metabolites (MTT assay)

3.2.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT

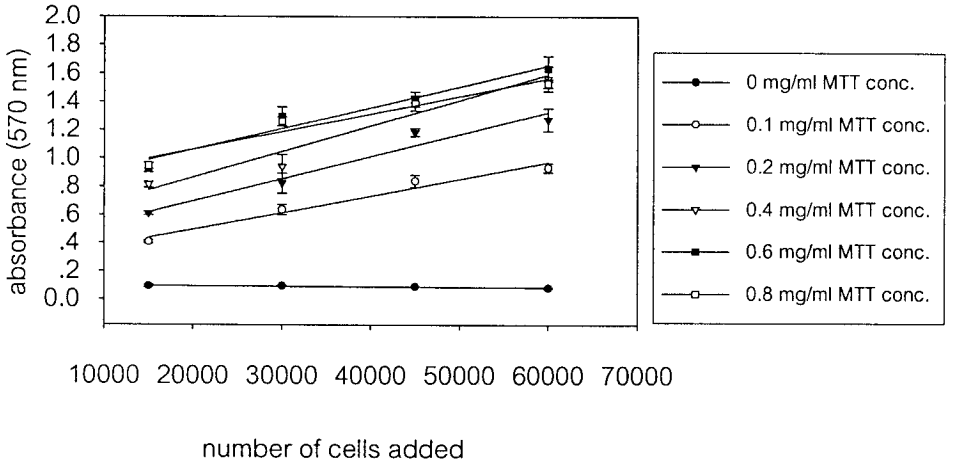
ในการทดลองเบื้องต้นผู้วิจัยได้ทดลองหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT เพื่อให้ปริมาณสีที่เกิดขึ้นเป็นสัดส่วนโดยตรงกับจำนวนเซลล์

ผู้วิจัยได้ทดลองโดยเติมเซลล์ HT-1080 จำนวนต่างๆ คือ 15,000 30,000 45,000 และ 60,000 เซลล์ใน culture medium ปริมาตร 300 µl ลงในหลุม 24-well plate โดยคาดว่าจำนวนเซลล์ดังกล่าวจะครอบคลุมช่วงจำนวน invading cells ที่ได้เมื่อทดสอบกับสารที่มีฤทธิ์เป็น anti-metastatic compounds ทั้งนี้พิจารณาจากจำนวน invading cells ที่ได้จากการทดลองที่ผ่านมา (รูปที่ 4) จากนั้นนำเซลล์ไป incubate ที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วทำ MTT assay โดยใช้สารละลาย MTT ใน Phosphate Buffer Saline (PBS) ความเข้มข้น 0 0.1 0.2 0.4 0.6 และ 0.8 mg/ml ตามวิธีที่กล่าวไปแล้วในวิธีการทดลอง เมื่อได้ค่า absorbance ของ MTT formazan ในแต่ละหลุมแล้ว จึงนำค่า absorbance ที่ได้ไปเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของสารละลาย MTT และจำนวนเซลล์ที่เติมลงไป (รูปที่ 7A และ 7B)

A



B



รูปที่ 7 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance ของ MTT formazan ที่ได้กับความเข้มข้นของ MTT (A) และกับจำนวนเซลล์ที่ใช้ (B) เมื่อ incubate เซลล์ HT-1080 จำนวนต่างๆ กับสารละลาย MTT ที่มีความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงละลายผลึก MTT formazan ที่เซลล์สร้างขึ้น และนำสารละลายที่ได้ไปวัดค่า absorbance ที่ 570 nm ดังวิธีที่กล่าวไว้ในขั้นตอนการทดลอง ค่าตัวเลขที่ได้เกิดจากค่าเฉลี่ยของการทำซ้ำสองครั้ง

จากผลการทดลองที่ได้พบว่าโดยรวมแล้วค่า absorbance ของ MTT metabolites ที่ได้จะมีความสัมพันธ์โดยตรงกับปริมาณ MTT ที่ใช้เมื่อความเข้มข้นของสารละลาย MTT ไม่เกิน 0.2 mg/ml (7A) และให้ค่า absorbance ในช่วงที่สูงพอที่จะอ่านค่าได้ถูกต้อง ผู้วิจัยไม่ได้เลือกใช้ MTT ที่ความเข้มข้น 0.1 mg/ml ถึงแม้ว่าความสัมพันธ์ระหว่างค่า absorbance ของ MTT metabolites ที่เกิดขึ้นเมื่อใช้ MTT ที่ความเข้มข้นนี้จะแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์มากกว่า (7B) เนื่องจากค่า absorbance ของ MTT metabolites ที่ได้อยู่ในช่วงที่ต่ำเกินไปที่จะอ่านค่าได้ถูกต้องแม่นยำภายหลังจากทดสอบกับสารตัวอย่างแล้ว อย่างไรก็ตามค่า absorbance ที่อ่าน

ได้นี้ไม่สามารถนำไปคาดคะเนค่า absorbance ที่จะได้จากการทำ invasion assay จริงเนื่องจากในการทดลองนี้เป็นการวัด metabolic activity ของเซลล์ที่เกาะอยู่ที่ plate ซึ่งต่างกับการทำ invasion assay ซึ่งเป็นการวัด metabolic activity ของเซลล์ที่เคลื่อนที่ผ่าน matrigel ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ MTT assay เพื่อวัดปริมาณ invading cells ที่ได้จากการทำ invasion assay โดยใช้ MTT ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ในการทดลองขั้นต่อไป

3.2.2 การวัดปริมาณ invading cells โดยวัดค่า absorbance ของ MTT metabolites

เมื่อได้ทดสอบพบว่าความเข้มข้นที่เหมาะสมของ MTT คือ 0.2 mg/ml แล้ว ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ MTT ที่ความเข้มข้นนี้ในการทำ invasion assay โดยใช้เซลล์ HT-1080 2.0×10^5 cells/transwell ทั้งนี้เพื่อทดสอบว่าค่า absorbance ที่ได้จาก invading cells สูงพอที่จะทำให้การทดสอบมีความถูกต้องแม่นยำหรือไม่ อย่างไรก็ตามมีความเป็นไปได้ว่าการเติม MTT ลงไปในขณะที่ทำ invasion assay อาจมีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน transwell ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเพื่อดูความแตกต่างของผลที่ได้เมื่อเติม MTT ลงไป 4 ชั่วโมงก่อนที่จะครบเวลา incubate (18 ชั่วโมง) และเมื่อเติม MTT ลงไปหลังจากครบ incubation time แล้ว และ incubate ต่อไปอีก 4 ชั่วโมงก่อนที่จะนำไปวัดสี MTT formazan ที่เกิดขึ้น

ตารางที่ 2 แสดงค่า absorbance ของ invading cells และ blank จากการทำ invasion assay โดยใช้เซลล์ HT-1080 จำนวน 2.0×10^5 cells/transwell เมื่อเติม MTT ความเข้มข้น 0.2 mg/ml ในชั่วโมงที่ 14 และ incubate จนครบ 18 ชั่วโมง และเมื่อเติม MTT ความเข้มข้นเท่ากันหลังจากที่ incubate เป็นเวลา 18 ชั่วโมงแล้ว และ incubate ต่ออีก 4 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาแล้วจึงเช็ด non-invading cells ออก ก่อนที่จะละลายสี MTT formazan ใน 300 µl 100% DMSO และ 38 µl Sorensen's glycine buffer การทดลองที่ทำเป็นการทำซ้ำสามครั้ง

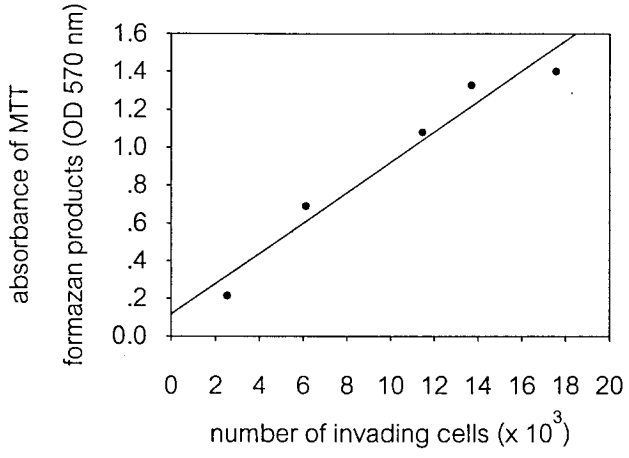
	#1	#2	#3	ave	sd	blank
18-hour incubation	1.053	1.112	1.103	1.089	0.032	0.036
22-hour incubation	1.091	1.034	1.089	1.071	0.032	0.039

จากผลการทดลองที่ได้ (ตารางที่ 2) เมื่อพิจารณาค่า absorbance จากการทำซ้ำสามครั้ง พบว่าการอ่านผลด้วยวิธีนี้ความคลาดเคลื่อนต่ำ (%SD = 2.918 และ 3.019 สำหรับ 18-hour incubation และ 22-hour incubation ตามลำดับ) เมื่อพิจารณาผลที่ได้จากการเติม MTT ที่ชั่วโมงที่ 14 และ 18 พบว่าให้ค่า absorbance ที่ใกล้เคียงกัน ผู้วิจัยจึงสรุปว่า MTT ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ผ่าน matrigel และเลือกที่จะเติม MTT ที่ชั่วโมงที่ 14 และใช้เวลาในการ incubate 18 ชั่วโมง เนื่องจากเป็นเวลาที่น้อยกว่า doubling time ของเซลล์ HT-1080

3.2.3 ตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของการใช้ MTT assay กับ invasion assay

เพื่อตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของการใช้ MTT assay ในการวัดปริมาณ invading cells จากการทำ invasion assay ผู้วิจัยได้พิจารณาความสัมพันธ์ของการวัดปริมาณ invading cells ที่ได้ระหว่างวิธีการนับ

ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ซึ่งเป็นวิธีการแบบเดิมกับการอ่านค่า absorbance ของ MTT metabolites ที่เกิดขึ้นจาก invading cells โดยผู้วิจัยคาดว่าถ้าค่าที่ได้จากการวัดผลทั้งสองวิธีแปรผันกันโดยตรง การวัดปริมาณ invading cells โดยใช้ MTT assay น่าจะมีความถูกต้องแม่นยำเทียบได้กับวิธีการนับเซลล์แบบเดิม ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบโดยการทำ invasion assay โดยใช้เซลล์ HT-1080 จำนวนต่างๆได้แก่ 1.0×10^4 5.0×10^4 1.0×10^5 1.5×10^5 และ 2.0×10^5 cells แล้วหาปริมาณ invading cells ที่ได้โดยการนับจำนวนเซลล์และโดยใช้วิธี MTT assay จากนั้นจึงนำค่าที่ได้จากทั้งสองวิธีการมาเปรียบเทียบกัน (รูปที่ 8)



รูปที่ 8 แสดงความสัมพันธ์ของค่า absorbance (570 nm) ของ MTT metabolites ที่เกิดขึ้นจาก invading cells จากการทำ MTT assay (MTT ความเข้มข้น 0.2 mg/ml) กับจำนวน invading cells ที่นับได้ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ เมื่อเติมเซลล์ HT-1080 จำนวน 1.0×10^4 5.0×10^4 1.0×10^5 1.5×10^5 และ 2.0×10^5 cells/transwell และ incubate ที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง

จากผลการทดลองดังรูปที่ 8 จะเห็นว่าผลที่ได้จากการวัดปริมาณเซลล์ทั้งสองวิธีมีความสัมพันธ์กันแบบแปรผันตรง โดยพิจารณาจากค่า R^2 (coefficient of determination) ซึ่งมีค่าเป็น 0.95 ดังนั้นในการทำ cell invasion assay ครั้งต่อไปจะใช้วิธีวัด MTT metabolites แทนวิธีการนับเซลล์แบบเดิม

4. การคัดเลือกยาที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการทดลอง (positive control)

ในการให้บริการตรวจสอบสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพว่ามีความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HT-1080 ผ่าน matrigel โดย anti-metastasis assay หรือไม่นั้น จะต้องมีตัวควบคุมการทดลอง (positive control) ที่จะใช้ในการตรวจสอบการทดลองแต่ละครั้งว่ามีความถูกต้องแม่นยำเหมือนเดิม โดยที่ตัวควบคุมนั้นๆ จะต้องยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์แต่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ทั้งนี้เพื่อป้องกันการแปลผลผิดพลาด (false positive) ที่เกิดจากการที่ยาไปฆ่าเซลล์ ทำให้ได้จำนวน invading cells น้อยกว่าความเป็นจริง โดยยาที่เลือกมาทดสอบได้แก่ NS-398 Sulindac sulfide และ Aspirin ซึ่งเป็นยาประเภท anti-inflammatory drug นอกจากนี้ยังมี Doxycyclin ซึ่งเป็นยาประเภท antibiotics Lovastatin ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในผู้ป่วยโรคหัวใจ Sodium selenite ซึ่งเป็น derivative ของ Selenium ที่เป็นแร่ธาตุที่มีความจำเป็นต่อการดำรงชีวิตของสัตว์ และ Ilomastat ซึ่งเป็น broad spectrum matrix metalloproteinase inhibitor ที่ใช้ในห้องปฏิบัติการทั่วไป

4.1 การหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของตัวทำละลายยา

ก่อนที่จะนำยาหรือสารเคมีมาทดสอบ anti-metastasis assay นั้นจะต้องมีการตรวจสอบก่อนว่าตัวทำละลายที่ใช้ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์และไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ของเซลล์ HT-1080 ทั้งนี้เพื่อป้องกันการแปลผลผิดพลาด โดยทั่วไปสารที่จะนำมาทดสอบการออกฤทธิ์ทางชีวภาพในห้องปฏิบัติการมักจะถูกละลายอยู่ในน้ำกลั่นหรือ DMSO ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกทดสอบความเป็นพิษและผลต่อการเคลื่อนที่ต่อเซลล์ HT-1080 ของ DMSO ที่ความเข้มข้นต่างๆ

ผู้วิจัยได้ใช้วิธีทดสอบความเป็นพิษของสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพ (cytotoxicity test) ตามวิธีการที่ใช้อยู่ภายในห้องปฏิบัติการนั้นคือวิธี SRB assay ดังที่อธิบายไว้แล้วในขั้นตอนการทดลองเพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 ของ DMSO ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ได้แก่ 0.1% 0.3% และ 0.5% หลังจากที่ได้ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 ของ DMSO แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบผลของน้ำกลั่นและ DMSO ความเข้มข้นต่างๆต่อการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ของเซลล์ HT-1080 โดยนำเซลล์ HT-1080 จำนวน 2.0×10^5 cells มา incubate กับ culture medium ที่มีน้ำกลั่นหรือ DMSO ความเข้มข้น 0.1% 0.3% และ 0.5% ที่ 37°C ใน 5% CO_2 เป็นเวลา 30 นาที ก่อนที่จะนำไปทำ anti-metastasis assay และวัดปริมาณ invading cells ด้วยวิธี MTT assay ตามที่กล่าวไว้ข้างต้น

ตารางที่ 3 แสดงค่าความเป็นพิษ (%cytotoxicity) และความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel (%inhibition) ของเซลล์ HT-1080 ของน้ำกลั่นและ DMSO ความเข้มข้น 0.1% 0.3% และ 0.5% โดยตัวเลขภายในวงเล็บคือค่าความเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ผลที่ได้เกิดจากการทำซ้ำสองครั้ง

	distill water	DMSO concentration		
		0.1 %	0.3 %	0.5 %
% cytotoxicity (SD)	0	-3.10 (± 8.40)	1.22 (± 4.71)	4.11 (± 6.24)
% inhibition (SD)	0	-13.92 (± 2.37)	3.4 (± 7.40)	18.63 (± 2.20)

จากผลการทดลองในตารางที่ 3 จะเห็นว่าน้ำกลั่นและ DMSO ที่ความเข้มข้นถึง 0.5% ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 อย่างไรก็ตามเมื่อพิจารณาผลที่ได้จากการทำ invasion assay พบว่าน้ำกลั่นและ DMSO ความเข้มข้น 0.1% และ 0.3% ไม่มีผลต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์ ขณะที่ DMSO 0.5% มีผลทำให้การเคลื่อนที่ของเซลล์ลดลงเล็กน้อย ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกใช้ 0.1% DMSO ซึ่งเป็นความเข้มข้นที่ต่ำที่สุดเป็นตัวทำละลายสำหรับการทดสอบ cytotoxicity test และ anti-metastasis assay ต่อไป

4.2 การตรวจสอบความเป็นพิษและความสามารถในการยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ HT-1080 ผ่าน matrigel ของยา

ก่อนที่จะทำการทดสอบหา anti-metastatic activity ของสารต่างๆเพื่อนำมาใช้เป็น positive control สารเหล่านี้จะต้องผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 ก่อน โดยจะเลือกความเข้มข้นของสารที่ให้เปอร์เซ็นต์ cytotoxicity ต่ำกว่า 20% เพื่อไปทดสอบหา anti-metastatic activity ต่อไป

ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบยาชนิดต่างๆได้แก่ NS-398 Sulindac sulfide Doxycyclin Lovastatin Sodium selenite Ilomastat และ Aspirin ที่มีความเข้มข้นต่างๆกับเซลล์ HT-1080 โดยใช้วิธี SRB assay ดังวิธีการที่อธิบายไว้แล้วในขั้นตอนการทดลองข้างต้น จากผลการทดลองพบว่าความเข้มข้นสูงสุดของ NS-398 Sulindac sulfide Doxycyclin Lovastatin Sodium selenite Ilomastat และ Aspirin ที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 ต่ำกว่า 20% คือ 31.4 62.5 3.9 6.25 0.8 10 และ 250 μg/ml ตามลำดับ

เมื่อได้ความเข้มข้นสูงสุดของยาที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ HT-1080 ต่ำกว่า 20% แล้วผู้วิจัยได้นำสารเหล่านี้มาทดสอบ anti-metastatic activity ต่อเซลล์ HT-1080 โดย incubate เซลล์ HT-1080 จำนวน 2.0×10^5 cells กับสารต่างๆที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 30 นาทีก่อนที่จะนำไปทำ anti-metastasis assay ตามวิธีที่ได้พัฒนาขึ้นมา นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทดสอบเบื้องต้นว่า serum ที่มีอยู่ใน medium จะมีผลต่อการทำงานของสารต่างๆที่นำมาทดสอบหรือไม่ โดยได้ทดลองทำ anti-metastasis assay ใน medium ที่มีเปอร์เซนต์ FBS ต่างๆกัน ดังแสดงผลในตารางที่ 4

ตารางที่ 4 แสดงค่า % invasion ของเซลล์ HT-1080 จากการ incubate กับ NS-398 Sulindac sulfide Doxycyclin Lovastatin Sodium selenite Ilomastat และ Aspirin ความเข้มข้น 31.4 62.5 3.9 6.25 0.8 10 และ 250 μg/ml ตามลำดับที่ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 18 ชั่วโมง และอ่านผลโดยวัดค่า absorbance ของ MTT formazan ที่ได้จาก invading cells ที่ 570 nm

	NS-398			Sulindac sulfide			Doxycyclin			Lovastatin			Sodium selenite			Ilomastat			Aspirin		
conc. (ug/ml)	31.40			62.50			3.90			6.25			0.80			10.00			250.00		
% FBS	10	5	1	10	5	1	10	5	1	10	5	1	10	5	1	10	5	1	10	5	1
%inhibition*	1.1	2.3	3.6	1.2	5.1	8.2	5.2	6.3	6.8	9.5	11.8	39.3	2.5	2.9	3.0	4.3	4.6	6.3	16.8	12.4	11.7

* % inhibition = 100 - % invasion

$$\% \text{ invasion} = \frac{\text{absorbance value of invading cells (drug)}}{\text{absorbance value of invading cells (control)}} \times 100$$

จากสารที่ได้ทดสอบทั้งหมดมีเพียง Lovastatin ที่สามารถยับยั้งการ invade ของเซลล์ HT-1080 โดยที่ anti-metastatic activity ของ Lovastatin จะขึ้นอยู่กับเปอร์เซนต์ของ serum ใน medium กล่าวคือ เมื่อมี FBS อยู่ใน culture medium 1% 5% และ 10% Lovastatin ที่มีความเข้มข้น 6.25 μg/ml สามารถยับยั้ง cell invasion ได้ 39% 12% และ 9.5% ตามลำดับ ซึ่งชี้ให้เห็นว่า Lovastatin อาจถูกทำลายหรือถูกจับไว้โดยโปรตีนที่อยู่ใน serum ดังนั้นในการทดสอบ anti-metastatic activity ของสารตัวอย่าง อาจจำเป็นต้องใช้ medium ที่มี serum อยู่เป็นเปอร์เซนต์ต่ำๆ

สรุป

ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนา anti-metastatic assay โดยดัดแปลงมาจากวิธี transwell invasion assay ของ Knutson *et al.* (1996) ที่ใช้ตรวจสอบสารที่มีฤทธิ์ยับยั้งการเคลื่อนที่ของเซลล์ โดยได้ดัดแปลงการอ่านผลด้วยการนับจำนวน invading cells ด้วยตาเปล่าให้เป็นการอ่านผลโดยใช้วิธี colorimetric measurement ซึ่งทำให้สามารถทดสอบสารตัวอย่างได้คราวละมากๆและเกิดความผิดพลาดน้อยกว่าวิธีการเดิม เซลล์ที่เลือกนำมาทดสอบได้แก่ HT-1080 (fibrosarcoma) และ Caco-2 (colorectal adenocarcinoma)

ในขั้นต้นผู้วิจัยได้ทดสอบหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นและเวลาในการ incubate ที่เหมาะสมสำหรับการทำ invasion assay และเปรียบเทียบความเป็น chemo-attractant ที่ดีระหว่าง HT-1080 medium ธรรมดากับ mouse fibroblast conditioned medium เพื่อให้ได้จำนวน invading cells ที่สูงเพียงพอสำหรับอ่านค่า absorbance ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ นอกจากนี้แล้วผู้วิจัยยังได้พัฒนาวิธีการอ่านผลแทนการนับเซลล์แบบมาตรฐาน โดยเปรียบเทียบผลการทดลองที่ได้จากการนับเซลล์กับการย้อมสี invading cells ด้วย crystal violet dye และการวัดปริมาณ invading cells โดย MTT assay ผลการทดลองที่ผ่านมาพบว่าภาวะที่เหมาะสมในการทำ invasion assay คือ ใช้จำนวนเซลล์ HT-1080 เริ่มต้น 2.0×10^5 cells/transwell และเวลาในการ incubate 18 ชั่วโมง ทั้งนี้จำนวนเซลล์และเวลาดังกล่าวให้จำนวน invading cells สูงสุดและยังไม่เกิน doubling time ของเซลล์ นอกจากนี้ยังพบว่า culture medium ที่มี serum อยู่ 10% เป็น chemo-attractant ที่เหมาะสมสำหรับการทำ invasion assay กับเซลล์ HT-1080 จากการทดลองวัดปริมาณ invading cells ด้วยการย้อม crystal violet dye และวัดปริมาณ MTT metabolites ที่เกิดขึ้นจากการทำ MTT assay พบว่าการย้อม invading cells ด้วย crystal violet dye ให้ background ที่สูง ในขณะที่การวัดปริมาณ invading cells จาก MTT metabolites ที่เกิดขึ้นให้ background ต่ำซึ่งจะทำให้การทดสอบมีความไวสูงกว่า นอกจากนี้ผลที่ได้จากการวัดด้วย MTT assay ยังแปรผันโดยตรงกับผลที่ได้จากการนับเซลล์โดยพบว่า 0.2 mg/ml คือความเข้มข้นของ MTT ที่เหมาะสม สำหรับเซลล์ Caco-2 นั้นผู้วิจัยไม่สามารถหาสภาวะที่เหมาะสมได้ เนื่องจากเซลล์ไม่มีการเคลื่อนที่ผ่าน matrigel ทั้งเมื่อใช้ Caco-2 culture medium และ conditioned medium เป็น chemo-attractant ซึ่งอาจจะเนื่องมาจากเซลล์มีการเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติบางประการไปจึงทำให้ไม่มีการ invade ในการทดลองต่อมาจึงเลือกใช้เซลล์ HT-1080 ในการทดสอบ

เมื่อได้วิธีการที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบแล้ว ผู้วิจัยได้ทำการคัดเลือกยาที่จะนำมาใช้เป็น positive control เพื่อใช้ตรวจสอบการทำ anti-metastasis assay ว่ามีความถูกต้องแม่นยำในทุกๆครั้งของการทดลอง สารที่นำมาทดสอบได้แก่ NS-398 Sulindac sulfide Doxycyclin Lovastatin Sodium selenite Ilomastat และ Aspirin โดยในเบื้องต้นได้ตรวจสอบความเป็นพิษของสารเหล่านี้ต่อเซลล์ HT-1080 ก่อนเพื่อป้องกันการแปลผลผิดพลาด จากนั้นจึงใช้ยาที่ให้ค่าความเป็นพิษต่อเซลล์ต่ำกว่า 20% ในการทำ anti-metastasis assay โดยได้ทำการทดสอบใน medium ที่มีปริมาณ FBS ต่างกัน จากการทดลองพบว่ามีเพียง Lovastatin ที่สามารถยับยั้งการ invade ของเซลล์ HT-1080 ผ่าน matrigel โดยเมื่อทดสอบใน culture medium ที่มี FBS อยู่ 1% 5% และ 10% จะสามารถยับยั้ง cell invasion ได้ 39% 12% และ 9.5% ตามลำดับ ดังนั้นผู้วิจัยจะใช้ Lovastatin เป็น positive control สำหรับการทำ anti-metastasis assay ที่มี 1% FBS อยู่ใน culture medium ในครั้งต่อๆไป อย่างไรก็ตามจะทำการหา positive control เพิ่มเติมก่อนที่จะเปิดให้บริการต่อไป

จากการทดลองที่ผ่านมาสามารถสรุปได้ว่าการอ่านผลโดยใช้ MTT assay สามารถแทนการอ่านผลโดยวิธีการนับเซลล์แบบเดิมได้ นอกจากนี้ยังเหมาะสมต่อการให้บริการทดสอบตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งหาก

ทดสอบได้ positive control เพิ่มนอกเหนือจาก Lovastatin แล้ว ผู้วิจัยจะได้เปิดให้บริการอย่างเป็นทางการต่อไป อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะได้ทำการปรับปรุงวิธีการทำ anti-metastasis assay โดยใช้เซลล์ Caco-2 เพิ่มเติม โดยจะทดลองใช้ chemo-attractant ชนิดต่างๆที่เคยมีรายงานมาเช่น conditioned medium ที่เติม fibronectin (Momiki *et al.*, 1991) ทั้งนี้เพื่อเพิ่มจำนวน Caco-2 invading cells ให้มากขึ้นเพื่อให้สามารถอ่านจำนวนโดยใช้ colorimetric measurement ได้ถูกต้องแม่นยำ

งานที่จะทำต่อไป

1. ทดสอบ positive control เพิ่มนอกเหนือจาก Lovastatin เพื่อให้การทดลอง anti-metastasis assay ต่อเซลล์ HT-1080 แต่ละครั้งมีความถูกต้องแม่นยำยิ่งขึ้น

2. ปรับปรุงวิธีการทำ anti-metastasis assay โดยใช้เซลล์ Caco-2 โดยจะทดลองใช้ conditioned medium ที่เติม fibronectin (Momiki *et al.*, 1991) เพื่อเพิ่มจำนวน Caco-2 invading cells ให้มากขึ้นเพื่อให้สามารถอ่านจำนวนโดยใช้ colorimetric measurement ได้ถูกต้องแม่นยำ

สรุปผลการปฏิบัติงานของการพัฒนาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของสาร (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์ (HL-60) โดยการวัดปริมาณ ATP ที่ end point ด้วย luciferase enzyme

ขั้นตอนการทดลอง

1. พัฒนาวิธีการทดสอบให้อยู่ใน 96-well format

เนื่องจากวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษของสาร (cytotoxicity test) ต่อเซลล์มนุษย์โดยการวัดปริมาณ ATP ที่ end point ด้วย luciferase enzyme ที่มีมาก่อนเป็นการทดสอบในหลอดทดลอง ซึ่งต้องใช้สารตัวอย่างและ reagent ปริมาณมาก (Wakuri *et al.*, 1993) (ภาคผนวก 2) ดังนั้นจึงต้องมีการพัฒนาให้อยู่ในรูปแบบที่สะดวก และเหมาะสมสำหรับการให้บริการทดสอบสารตัวอย่างจำนวนมาก ซึ่งได้แก่การทดสอบใน 96-well format ในขั้นต้นผู้วิจัยได้ทดลองหาจำนวนเซลล์เริ่มต้นที่จะใช้ในการทดสอบซึ่งเป็นจำนวนที่ให้ค่า activity ในช่วงที่อ่านค่าได้จาก ATP standard curve และแปรผันโดยตรงกับจำนวนเซลล์ โดยเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบคือเซลล์ HL-60 (human acute promyelocytic leukemia, ATCC) ที่เลี้ยงอยู่ใน RPMI1640 media (Hyclone) ที่มี 10% FBS

การหาจำนวนเซลล์ HL-60 เริ่มต้นที่เหมาะสม

เติมเซลล์ HL-60 จำนวนต่างๆ ในปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate แล้วนำไป incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วเติม cell lysis reagent (Roche Molecular Biochemicals USA) ปริมาตร 50 µl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นจึงถ่าย lysate ที่ได้ปริมาตร 50 µl ลงใน 96-well plate สีดำ (Black Polystyrene, Costar) แล้วจึงเติม luciferase reagent (luciferase reagent ประกอบด้วย D-luciferin และ luciferase enzyme) ปริมาตร 50 µl จากนั้นนำไปวัดแสงที่เกิดขึ้น (bioluminescence) ด้วย microplate luminometer (Anthos Lucy1, Austria) ที่ 570 nm (ภาคผนวก 2)

การทำ ATP standard curve

ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทำ ATP standard curve คู่กันไป เพื่อใช้คำนวณหาค่า ATP จาก activity หรือแสงที่วัดได้จากปฏิกิริยา โดยเตรียม standard ATP (Roche Molecular Biochemicals, USA) ให้มีความเข้มข้นเป็น 3.5×10^{-6} M 1.75×10^{-6} M 3.5×10^{-7} M 1.75×10^{-7} M 3.5×10^{-8} M 1.75×10^{-8} M 3.5×10^{-9} M 1.75×10^{-9} M และ 3.5×10^{-10} M โดยใช้ culture medium เป็นตัวทำละลายผสม standard ATP ที่มีความเข้มข้นต่างๆ ปริมาตร 50 µl กับ cell lysis reagent (Roche Molecular Biochemicals, USA) ปริมาตร 50 µl ทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง 5 นาที จากนั้นจึงดูดสารละลาย ที่ได้ปริมาตร 50 µl ใส่ลงใน 96-well plate สีดำ (Black Polystyrene, Costar) เติม luciferase reagent ปริมาตร 50 µl แล้วนำไปวัดแสงที่เกิดขึ้นด้วย microplate luminometer ที่ 570 nm

2. ทดสอบความไว และความถูกต้องแม่นยำ

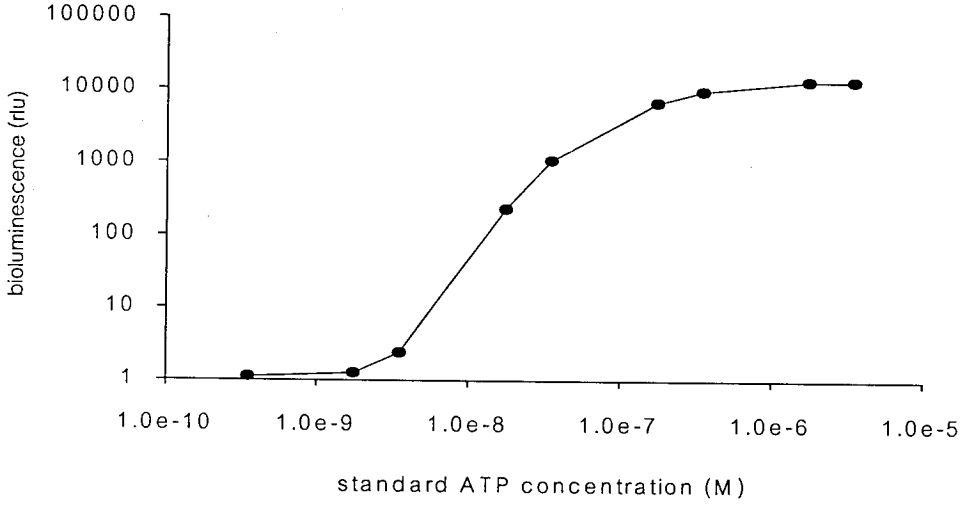
ก่อนที่จะนำวิธีการ ATP assay ในรูปแบบ 96-well format ที่พัฒนาได้มาใช้ทดสอบหาค่า cytotoxicity ของสารตัวอย่าง จำเป็นต้องทดสอบว่าวิธีที่พัฒนาได้นี้มีความไวและความถูกต้องแม่นยำเทียบได้กับวิธีการเดิมที่ทำในหลอดทดลองหรือไม่ ผู้วิจัยได้คัดเลือกสารจากกลุ่มสารที่ได้รับการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 แล้ว (Wakuri *et al.*, 1993) เพื่อนำมาทำการทดสอบหาค่า IC_{50} ด้วยวิธีที่พัฒนาขึ้น โดย incubate สารเหล่านี้ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ กับเซลล์ HL-60 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ก่อนที่จะหาปริมาณ ATP ในเซลล์ตามวิธีที่กล่าวไว้

ข้างต้น จากนั้นจึงเปรียบเทียบค่า IC_{50} ที่ได้กับค่าที่ได้จากวิธีในหลอดทดลองแบบเดิม (Wakuri *et al.*, 1993) นอกจากนี้ได้ทำการเปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 โดยใช้วิธีวัดปริมาณ ATP ใน 96-well plate นี้กับสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ ที่ผ่านการทดสอบกับ Vero cell line (African green monkey kidney cell line, ATCC) มาแล้ว เพื่อดูประสิทธิภาพของการทดสอบ Cytotoxicity test และทดสอบสารที่จะนำมาเป็น positive control เพื่อใช้ในการตรวจสอบความถูกต้องแม่นยำของการทดสอบความเป็นพิษแต่ละครั้งเมื่อเปิดให้บริการ

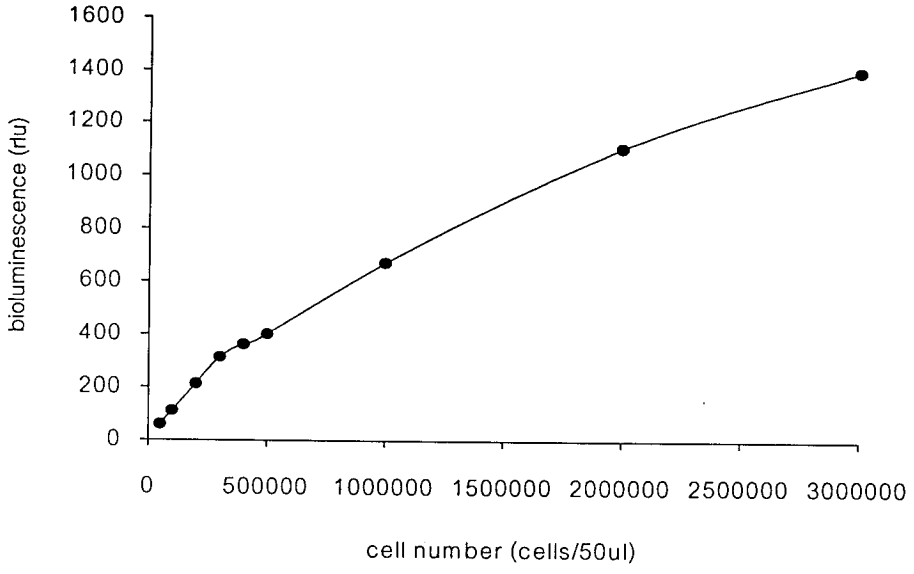
ผลการทดลอง

1. การหาปริมาณเซลล์เริ่มต้นของ HL-60 (Human acute promyelocytic leukemia, ATCC)

ในการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์ HL-60 โดยการวัดปริมาณ ATP ต้องอาศัยการอ่านค่า ATP จาก standard curve ซึ่งจะอ่านค่าได้ถูกต้องเมื่อค่า bioluminescence ที่ได้แปรผันตรงกับปริมาณ ATP เท่านั้น ดังนั้นจำนวนเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบจะต้องเพียงพอที่จะให้ค่า bioluminescence ในช่วงดังกล่าว นอกจากนี้ยังจะต้องให้ค่า bioluminescence ที่สูงพอสำหรับการอ่านค่าภายหลังทดสอบกับยา ผู้วิจัยได้ทำการหาปริมาณเซลล์เริ่มต้นที่เหมาะสมโดยใช้ ATP Bioluminescent kit (Roche Molecular Biochemicals, USA) ในการวัดปริมาณ ATP จากเซลล์จำนวนต่าง ๆ พร้อมกับทำ ATP standard curve โดยใช้วิธีที่กล่าวไว้ในขั้นตอนการทดลอง



รูปที่ 9 ATP standard curve แสดงความสัมพันธ์ของ bioluminescence กับความเข้มข้นของ ATP (โดยเตรียม standard ATP (Roche Molecular Biochemicals, USA) ให้มีความเข้มข้นเป็น $3.5x10^{-6}$ M $1.75x10^{-6}$ M $3.5x10^{-7}$ M $1.75x10^{-7}$ M $3.5x10^{-8}$ M $1.75x10^{-8}$ M $3.5x10^{-9}$ M $1.75x10^{-9}$ M และ $3.5x10^{-10}$ M โดยใช้ culture medium เป็นตัวทำละลาย และใช้ เป็น blank ค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำ 3 ครั้ง



รูปที่ 10 แสดงความสัมพันธ์ของ bioluminescence ที่ได้จากการวัดปริมาณ ATP ที่ end point กับจำนวนเซลล์ HL-60 ที่ใช้คือ 50,000, 100,000, 200,000, 300,000, 400,000, 500,000, 1,000,000, 2,000,000 และ 3,000,000 cells/50 μl) ค่าที่แสดงในกราฟเป็นค่าเฉลี่ยที่ได้จากการทำซ้ำสามครั้ง

จาก ATP standard curve ที่ได้จะเห็นว่าช่วงค่า bioluminescence ที่แปรผันตรงกับความเข้มข้นของ ATP จะอยู่ระหว่าง 5 ถึง 1,000 RLU (Relative Light Units) (รูปที่ 9) ดังนั้นเมื่อพิจารณากราฟความสัมพันธ์ระหว่างปริมาณเซลล์ HL-60 กับค่า bioluminescence ที่ได้ (รูปที่ 10) พบว่าปริมาณเซลล์ HL-60 (ที่ให้ค่า bioluminescence ในช่วงดังกล่าว) จะอยู่ระหว่าง 50,000 cells/50 μl ถึง 1,800,000 cells/50 μl ผู้วิจัยได้เลือกใช้เซลล์จำนวน 500,000 และ 1,000,000 เซลล์ สำหรับการทดสอบต่อไปเนื่องจากคาดว่าปริมาณเซลล์นี้จะให้ค่า bioluminescence ที่สูงเพียงพอสำหรับการอ่านค่าเมื่อทดสอบกับสารตัวอย่าง

2. การทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่าง (cytotoxicity test)

หลังจากที่ได้ทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมสำหรับการหาปริมาณ ATP ในหลุม 96-well plate แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการทดสอบต่อไปเพื่อดูว่าวิธีที่พัฒนาได้นี้สามารถใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่างได้จริง โดยในขั้นต้นได้ทดลองใช้เซลล์จำนวน 500,000 และ 1,000,000 เซลล์ ทดสอบกับ aspirin ซึ่งเป็นยาที่ได้ผ่านการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 โดยวิธีที่ทำในหลอดทดลอง (Wakuri *et al.*, 1993) มาแล้ว โดยได้ทดลองหาค่า IC_{50} ของ aspirin โดยใช้ค่า % cytotoxicity ที่ได้จากการคำนวณด้วยปริมาณ ATP ที่อ่านจาก standard curve (สมการที่ 1) และจากการคำนวณด้วยค่า bioluminescence ที่วัดได้โดยตรง (สมการที่ 2) ดังที่แสดงข้างล่างนี้

(สมการที่ 1)

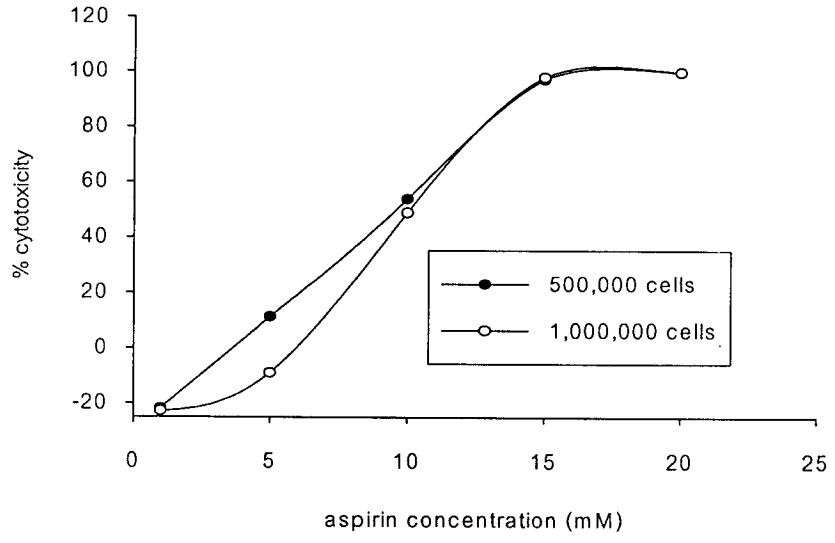
$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{mean ATP conc. (negative control)} - \text{mean ATP conc. (sample)}}{\text{mean ATP conc. (negative control)}} \times 100$$

(สมการที่ 2)

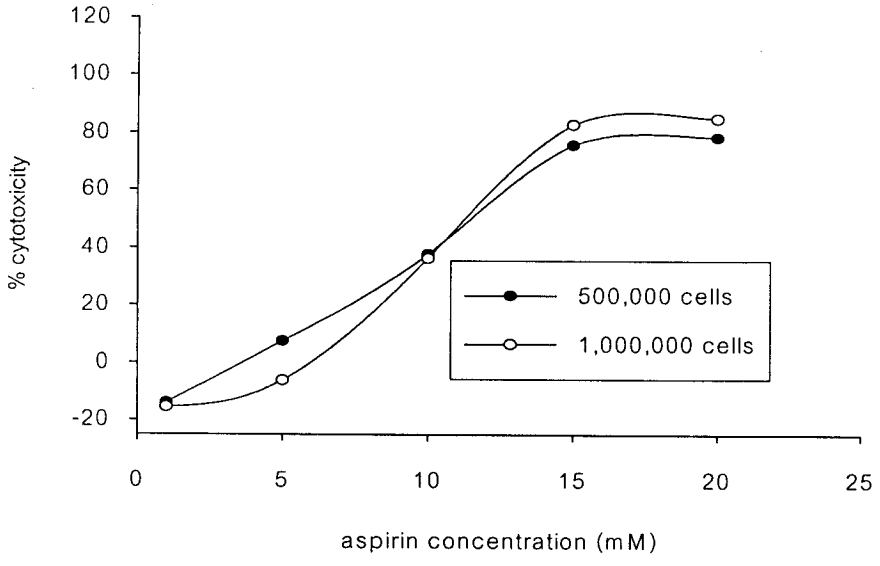
$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{mean bioluminescence (negative control)} - \text{mean bioluminescence (sample)}}{\text{mean bioluminescence (negative control)}} \times 100$$

โดยที่ mean ATP conc. (negative control) และ mean bioluminescence (negative control) คือ ค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ ATP และ bioluminescence ที่ได้จาก negative control ซึ่งได้แก่ตัวทำละลายของสารที่นำมาทดสอบตามลำดับ

A



B



รูปที่ 11 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างความเข้มข้นของ aspirin กับ % cytotoxicity ที่คำนวณได้โดยตรงจากค่า bioluminescence (A) และที่คำนวณได้จากค่า ATP จาก ATP standard curve (B) จากการใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 500,000 และ 1,000,000 cells/50 µl ค่า % cytotoxicity ที่แสดงได้จากการคำนวณโดยใช้ค่าเฉลี่ยของค่า bioluminescence ที่ได้จากการทำซ้ำสามครั้ง

จากการทดลองหาค่า IC_{50} ของ aspirin ต่อเซลล์ HL-60 โดยใช้วิธีใน 96-well plate พบว่าเมื่อใช้จำนวนเซลล์ HL-60 เริ่มต้น 500,000 เซลล์ จะได้ค่า IC_{50} 9.033 และ 11.264 mM เมื่อคำนวณหา % cytotoxicity จากค่า luminescence โดยตรงและจากค่าความเข้มข้นของ ATP ตามลำดับ และเมื่อใช้จำนวน

เซลล์ HL-60 เริ่มต้น 1,000,000 เซลล์ จะได้ค่า IC_{50} เป็น 9.995 และ 10.835 mM เมื่อคำนวณหา % cytotoxicity จากค่า luminescence โดยตรงและจากค่าความเข้มข้นของ ATP ตามลำดับ (รูปที่ 11A และ 11B) ซึ่งค่า IC_{50} ของ aspirin ที่ได้จากการคำนวณทั้งสองวิธี ไม่ว่าจะใช้เซลล์จำนวน 500,000 หรือ 1,000,000 เซลล์ มีค่าใกล้เคียงกับ IC_{50} ของ aspirin ที่ได้จากวิธีการในหลอดทดลอง (9 mM) (Wakuri *et al.*, 1993) ดังนั้น ผู้วิจัยจึงคาดว่าจำนวนเซลล์ HL-60 เริ่มต้น 500,000 cells/50 µl เป็นจำนวนที่เพียงพอสำหรับการทำ ATP assay ใน 96-well plate เนื่องจากให้ค่า % cytotoxicity ทั้งที่คำนวณโดยตรงจาก activity ที่อ่านได้และที่เทียบเป็นปริมาณ ATP แล้วไม่แตกต่างจากการใช้จำนวนเซลล์เริ่มต้น 1,000,000 cells/50 µl ทั้งนี้จะสิ้นเปลืองน้อยกว่าและเหมาะแก่การให้บริการตรวจสอบตัวอย่างจำนวนมากๆ นอกจากนี้ยังพบว่าสามารถคำนวณค่า IC_{50} ของสารที่นำมาทดสอบได้โดยตรงจากค่า bioluminescence ที่อ่านได้ เนื่องจากค่า IC_{50} ที่ได้ใกล้เคียงกับค่า IC_{50} ที่ได้จากการคำนวณโดยเทียบค่า activity เป็น ATP จาก ATP standard curve ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำ ATP standard curve ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ เพื่อเป็นการประหยัด luciferase reagent ซึ่งมีราคาแพง อย่างไรก็ตามในการทดลองทุกครั้งจะมีการทำ positive control ควบคู่ไปเพื่อควบคุมคุณภาพของการทดสอบ

3. ทดสอบความไวและความถูกต้องแม่นยำ

3.1 ทดสอบความเป็นพิษของสารที่เปรียบเทียบกับวิธีการทดสอบในหลอดทดลอง

จากการหาค่า IC_{50} ของ sodium chloride และ aspirin ต่อเซลล์ HL-60 โดยใช้วิธีทดสอบใน 96-well plate พบว่า IC_{50} ของ aspirin ที่ได้มีค่าใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากการใช้วิธีในหลอดทดลอง (Wakuri *et al.*, 1993) ผู้วิจัยได้ใช้วิธีที่พัฒนาขึ้นใหม่นี้ในการทดสอบสารตัวอย่างอื่นๆ ที่เคยได้รับการทดสอบมาแล้วเพิ่มเติม เพื่อให้ได้ข้อมูลที่จะนำมาเปรียบเทียบเพิ่มขึ้น สารที่นำมาทดสอบได้แก่ sodium chloride, ethanol (ใช้น้ำกลั่นเป็นตัวทำละลาย), phenol (ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย) และ chloroform (ใช้ ethanol เป็นตัวทำละลาย) ผลการทดสอบ ดังตารางที่ 5

ตารางที่ 5 แสดงค่า IC_{50} (mM) ของสารตัวอย่างที่เคยได้รับการทดสอบมาแล้วในหลอดทดลอง (Wakuri *et al.*, 1993) เปรียบเทียบกับที่ทำใน 96-well plate โดยใช้ HL-60 เซลล์จำนวนเริ่มต้น 500,000 cells/50 µl ค่าที่ได้จากการทดสอบซ้ำ 2 ครั้ง ครั้งละ 3 ซ้ำ

Sample	50% inhibition concentration (IC_{50}) (mM)	
	Test tube method	96-well format method
Sodium chloride	19	18.4 ± 2.4
Ethanol	20	20.8 ± 0.4
Aspirin	9	3.1 ± 1.9
Phenol	5	7.0 ± 3.6
Chloroform	> 0.1	0.9 ± 0.5

จากผลการทดลองที่ได้จะเห็นว่าเมื่อใช้วิธี 96-well format หาค่า IC_{50} ของสารจะได้ค่า IC_{50} ที่ได้ใกล้เคียงกับวิธีเดิมที่ทำในหลอดทดลอง จึงสรุปได้ว่าวิธีการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 ที่ทำใน 96-well format นี้มีความไวเทียบได้กับวิธีมาตรฐานในหลอดทดลอง (Wakuri *et al.*,1993)

3.2 ทดสอบความเป็นพิษกับสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์

เพื่อดูประสิทธิภาพของการทดสอบ cytotoxicity test ที่ได้รับการพัฒนาขึ้นมาว่าให้ผลการทดสอบสอดคล้องกับการทดสอบความเป็นพิษต่อ Vero cell line (African green monkey kidney cell line, ATCC) ซึ่งเป็นวิธีที่ใช้ให้บริการอยู่แล้วหรือไม่ ผู้วิจัยจึงได้ทำการทดสอบเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารตัวอย่างจากพืชและจุลินทรีย์ที่รู้ค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดสอบกับ Vero cell line โดยวิธีย้อมผนังเซลล์ด้วยสีย้อม SRB นำมาทดสอบกับเซลล์ HL-60 โดยใช้ความเข้มข้นสูงสุดของสารที่ใช้ทดสอบ คือ 50 μg/ml (เป็นความเข้มข้นสูงสุดที่ใช้ทดสอบความเป็นพิษกับ Vero cell) ใช้ DMSO เป็นตัวทำละลาย, โดยมี 0.5 % DMSO เป็น negative control และใช้ culture medium เป็น blank ผลการทดสอบดังแสดงในตารางที่ 6

ตารางที่ 6 เปรียบเทียบการทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่างที่รู้ค่า IC_{50} (ทดสอบกับ Vero cell line โดยวิธี SRB assay) กับเซลล์ HL-60 โดยใช้วิธีวัดปริมาณ ATP ใน 96-well plate โดยใช้ HL-60 เซลล์จำนวนเริ่มต้น 500,000 cells/50 μl

Sample code	50% inhibition concentration (IC_{50}) (μg/ml)	
	Vero cell line – SRB assay	HL-60 cell line – measurement ATP content
R 1333	9	5
R 1450	2	2
R 1481	17	11
R 1540	10	11
R 1615	23	20
IC 107	2	0.5
IC 122	1	3
IC 127	13.7	12
IC 141	6	8
IC 143	38	28
IC 220	17	12
IC 365	35	23
IC 395	32	12
V 1653	> 50	> 50
V 1654	> 50	> 50
V 1655	> 50	> 50
V 1656	> 50	> 50

จากตารางที่ 6 จะเห็นว่าผลการทดสอบความเป็นพิษกับเซลล์ HL-60 โดยใช้วิธีวัดปริมาณ ATP ใน 96-well plate ให้ค่า IC_{50} ของสารส่วนใหญ่ใกล้เคียงหรืออยู่ในช่วงตัวเลขหลักเดียวกับค่า IC_{50} ที่ได้จากการทดสอบกับ Vero cell line โดยวิธี SRB assay ผู้วิจัยจึงสรุปว่า วิธีการนี้สามารถใช้ในการทดสอบความเป็นพิษของสารได้ดีเทียบเท่ากับการใช้ Vero cell line

3.3 ทดสอบหาค่าความเป็นพิษของสารเคมีที่จะนำมาใช้เป็นตัวควบคุมการทดลอง (positive control)

ในการนำวิธีการที่พัฒนาขึ้นได้ไปใช้ให้บริการการทดสอบความเป็นพิษของสารตัวอย่าง ในการทดสอบแต่ละครั้งจำเป็นต้องมี positive control ด้วย เพื่อใช้เป็นตัวบ่งบอกถึงความถูกต้องแม่นยำในการทดสอบนั้น ๆ ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารสองชนิดคือ Ellipticine และ Doxorubicin ซึ่งเป็นยาที่ใช้เป็น positive control ในการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ Vero cell อยู่แล้ว นอกจากนี้ยังเป็นยาที่ใช้ในการรักษาโรคมะเร็งหลายชนิดโดยผู้วิจัยได้ทดสอบ Ellipticine ที่ความเข้มข้น 0.25 ถึง 8.0 μg/ml และ Doxorubicin ที่

ความเข้มข้น 0.19 ถึง 6.25 μg/ml กับ HL-60 cell โดยใช้ 0.5 % DMSO และ น้ำกลั่น เป็น negative control สำหรับ Ellipticine และ Doxorubicin ตามลำดับ และใช้ culture medium เป็น blank พบว่าค่า IC_{50} ของ Ellipticine คือ 4.7±1.9 μg/ml (โดยมีค่าเฉลี่ยที่ได้มาจากการทดสอบ 6 ครั้งคือ 5 3 7 6 2 และ 5 μg/ml) และค่า IC_{50} ของ Doxorubicin คือ 0.7±0.3 μg/ml (โดยมีค่าเฉลี่ยที่ได้มาจากการทดสอบ 4 ครั้งคือ 1 0.7 0.5 และ 0.4 μg/ml) จากผลการทดสอบสารทั้ง 2 ชนิด จะเห็นว่า HL-60 cell line มีความไวต่อ Doxorubicin มากกว่า Ellipticine แต่อย่างไรก็ตามผู้วิจัยจะใช้ ทั้ง Ellipticine และ Doxorubicin เป็น positive control ในการให้บริการเพื่อให้การทดสอบความเป็นพิษแต่ละครั้งมีความถูกต้องแม่นยำมากขึ้น

สรุป

ผู้วิจัยได้ทำการพัฒนาวิธีทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 ในรูปแบบ 96-well format ให้มีประสิทธิภาพและมีความถูกต้องแม่นยำ เทียบเท่ากับการทดสอบค่าความเป็นพิษวิธีเดิมซึ่งทำในหลอดทดลองและวิธีที่ใช้ Vero cell ซึ่งใช้อยู่แล้วในห้องปฏิบัติการ โดยในขั้นต้นได้ทำการหาปริมาณเซลล์ HL-60 ที่เหมาะสม พบว่าเซลล์จำนวน 500,000 cells/50 μl ให้ค่า bioluminescence อยู่ในช่วงที่อ่านค่าจาก ATP standard curve ได้ถูกต้องและมีค่าสูงเพียงพอสำหรับการทดสอบกับสารตัวอย่าง โดยดูจากการทดสอบหาค่า IC_{50} ของ aspirin ได้ผลใกล้เคียงกับวิธีที่ทำในหลอดทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่า IC_{50} ที่คำนวณได้จากค่า bioluminescence ที่วัดได้โดยตรงกับค่า IC_{50} ที่คำนวณได้จากค่า ATP (เมื่อเทียบกับ ATP standard curve) มีค่าใกล้เคียงกัน ดังนั้น จึงสามารถคำนวณหาค่า IC_{50} ของสารตัวอย่างจากค่า bioluminescence ที่อ่านได้เลย โดยไม่ต้องคำนวณจากการเทียบค่า biolumunescence ที่อ่านได้เป็นค่า ATP ก่อน ดังนั้นจึงไม่จำเป็นต้องทำ ATP standard curve ทุกครั้งที่ทำการทดสอบ เพื่อเป็นการประหยัด luciferase reagent ซึ่งมีราคาแพง หลังจากนั้นผู้วิจัยได้ทดสอบความถูกต้องแม่นยำของวิธีที่พัฒนาขึ้นนี้เปรียบเทียบกับวิธีในหลอดทดลอง โดยทำการทดสอบหาความเป็นพิษของสารเพิ่มเติมซึ่งเคยมีรายงานไว้ (Wakuri *et al.*, 1993) และเปรียบเทียบกับวิธีที่ใช้ Vero cell กับสารสกัดจากพืชและจุลินทรีย์ พบว่าค่า IC_{50} ของสารที่ได้จากการทดสอบด้วยวิธีการที่พัฒนาขึ้นใหม่ใกล้เคียงกับค่าที่ได้จากวิธีเดิมทั้งสองวิธี นอกจากนี้ผู้วิจัยได้ทดสอบหาความเป็นพิษของสารสองตัวคือ Ellipticine และ Doxorubicin ซึ่งใช้เป็น positive control เพื่อควบคุมคุณภาพของการทดสอบ โดยค่า IC_{50} ของ Ellipticine และ Doxorubicin อยู่ในช่วง 4.7±1.9 μg/ml กับ 0.7±0.3 μg/ml ตามลำดับ วิธีการทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์มนุษย์โดยการวัดปริมาณ ATP ใน 96-well plate ที่ได้พัฒนาขึ้นนี้ มีความถูกต้องแม่นยำเทียบได้กับวิธีมาตรฐานที่ได้รับการรับรองว่าให้ค่า toxicity ใกล้เคียงกับ blood toxicity level ในคน ผู้วิจัยจะนำวิธีนี้ไปใช้ในการให้บริการตรวจสอบความเป็นพิษของสารในห้องปฏิบัติการตรวจหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพต่อไป

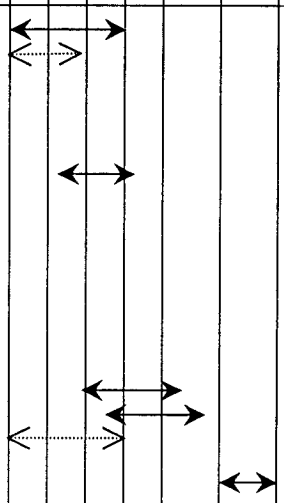
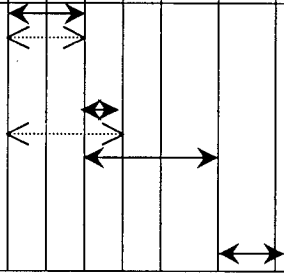
ปัญหาที่พบและแนวทางในการแก้ไข

1. เนื่องจากวิธีการวัดปริมาณ ATP นี้ เป็นวิธีที่มีความไวมาก ดังนั้นในการทดสอบต้องระวังในขั้นตอนการดูดปล่อยสาร ต้องไม่ให้เกิดฟองอากาศ เพราะจะทำให้ค่า bioluminescence ที่อ่านได้เหวี่ยงมาก
2. เนื่องจากได้ระบุไปในข้อเสนอโครงการว่าจะทำการทดสอบสารที่ได้รับการตีพิมพ์ (Wakuri *et l.*,1993) โดยจะทำการทดสอบสาร 5 ชนิด ซึ่งรวมทั้งสาร Malathion ด้วย แต่เนื่องจากสารนี้เป็นสารพิษใช้เป็นสารฆ่าแมลง ทำให้การสั่งซื้อจากบริษัทมีปัญหา ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนจากสาร Malathion เป็น Chloroform แทน

งานที่จะทำต่อไป

1. เปิดให้บริการการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ HL-60 โดยวิธีวัดปริมาณ ATP ใน 96-well format
2. ทดลองใช้ luciferase reagent อื่น ๆ แทน luciferase reagent ที่อยู่ในชุด ATP kit (Roche Molecular Biochemicals, USA) เพื่อเป็นการลดราคาค่าบริการ

16. ตารางแสดงความก้าวหน้าของงานวิจัย

กิจกรรม	วิธีการดำเนินงาน	ระยะเวลา (เดือนที่ 2 4 6 8 10 12)	ผู้รับผิดชอบ
1. พัฒนาวิธีการตรวจสอบฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยกลไกยับยั้งการแพร่กระจายของเซลล์มะเร็ง (anti-metastasis)	1.ทดสอบหาสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทำ invasion asay ด้วยเซลล์HT-1080 2.เปรียบเทียบวิธี colorimetric measurement กับการนับจำนวนเซลล์ 2.1.เปรียบเทียบวิธีการวัดปริมาณสี crystal violet กับการนับจำนวนเซลล์ 2.2.เปรียบเทียบวิธีการวัดปริมาณ MTT metabolite กับการนับจำนวนเซลล์ 2.2.1 หาความเข้มข้นของ MTT ที่เหมาะสม 2.2.2 ทดสอบความไวและความแม่นยำ 3.ตรวจสอบหาสารที่มีฤทธิ์ anti-metastasis จากสารตัวอย่าง		โชติกา สุญาณเศรษฐกร วนิชา วิชัย
2. พัฒนาวิธีการตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์โดยใช้เซลล์ HL-60	1. พัฒนาวิธีการทดสอบให้อยู่ใน 96 well format 2. การเปรียบเทียบกับวิธีที่ได้รับการตีพิมพ์ 2.1 จัดตั้งการตรวจสอบตามวิธีที่ได้รับการตีพิมพ์ 2.2 ทดสอบหาค่า IC_{50} ของสารเคมี 5 ชนิด และทำการวิเคราะห์ข้อมูลเพื่อทำการเปรียบเทียบ 3. ตรวจสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ในสารตัวอย่าง		กัณวัฒน์ ด่านวิเศษกาญจน วนิชา วิชัย

17. เอกสารอ้างอิง

1. *The multicenter evaluation of invitro cytotoxicity (MEIC). Summary.* (2000) National Toxicology Program (NTP) Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods (NICEATM).
2. Attiga, F.A., Fernandez, P.M., Weeraratna, A.T., Manyak, M.J. and Patierno, S.R. (2000) *Cancer Research*, 60, 4629-4637.
3. Bauer, K.S., Figg, W.D., Hamilton, J.M., Jones, E.C., Premkumar, A., Steinberg, S.M., Dyer, V., Linehan, W.M., Pluda,J.M. and Reed, E. (1999) *Clin. Cancer Res.*, 5, 2324-2329.
4. Carmichael, J., DeGraff, W.G., Gazdar, A.F., Minna,J.D. and Mitchell, J.B. (1987) *Cancer Res.*, 47, 936-942.
5. Connolly, L.. and Maxwell, P. (2002) *Br J Biomed Science* , 59(1), 11-4.
6. Crouch, S.P.M. and Slater, K. (2001) *DDT*, 12(suppl.), s48-s53.
7. Cushion, M.T., Chen, F. and Kloepfer, N. (1997) *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 14, 379-384.
8. Dierickx, P.J. and Ekwall, B. (1992) *ATLA*, 20, 285-289.
9. Farina HG., Bublik DR., Alonso DF. and Gomez DE. (2002) *Clin Exp Metastasis*, 19(6), 551-559.
10. Knutson, J.R., Lida, J., Fields, G.B. and McCarthy, J.B. (1996) *Molecular Biology of the cell*, 7, 383-396.
11. Kohn, E.C. and Liotta, L.A. (1995) *Cancer Res.*, 55, 1856-1862.
12. Liotta, L.A., Steeg, P.S. and Stetler-Stevenson, W.G. (1991) *Cell*, 64, 327-336.
13. Lokeshwar, B.L., Selzer, M.G.,Zhu, B.Q., Block, N.L. and Golub, L.M. (2002) *Ins J Cancer*, 98(2), 297-309.
14. McCawley, LJ. and Matrisian, LM. (2000) *Molecular Madicine Today*, 6, 149-156.
15. Momiki, S., Baba, M., Caamano, J., Iizasa, T., Nakajima, M., Yamaguchi, Y. and Klein-Szanto, A. (1991) *Invasion Metastasis*, 11(2), 66-75.
16. Murono, S., Yoshizaki, T., Sato, H., Takeshita, H., Furakawa, M. and Pagano, j.S. (2000) *Cancer Research*, 60, 2555-2561.
17. Nagase, N., and Woessner, J.F., Jr. (1999) *J.Biol.Chem.*, 274, 21491-21494.
18. Nagatsuka, I., Yamada, N., Shimizu, S., Ohira, M., Nishino, H., Seki, S. and Hirakawa, K., (2002) *Ins J Cancer*, 100(5), 515-519.
19. Pacor, S., Vadori, M., Vita, F., Bacac, M., Soranzo, M.R., Zabucchi, G. and Sava, G., (2001) *Anticancer Res* ,21(4A), 2523-2530.
20. Plumb, J.A., Milroy, R. and Kaye, S.B. (1989) *Cancer Res.*, 49, 4435-4440.
21. Ruoslahti, E. (1996) *Scientific American*, September, 42-47.
22. Yoon, SO., Kim, MM. and Chung, AS. (2001) *The Journal of Biological Chemistry*, 276(23), 20085-20092.
23. Sasaki, C.Y. and Passaniti, A. (1998) *Biotechniques*, 24, 1038-1043.
24. Slater, K. (2001) *Current Opinion in Biotechnology*, 12, 70-74.
25. Tsujii, M., Kawano, S., Tsuji, S., Sawaoka, H., Hori, M., and DuBois, R.N. (1998) *Cell*, 93, 705-716.
26. Wakuri, S., Izumi, J., Sasaki, K., Tanaka, N. and Ono, H. (1993) *Toxic in Vitro*, 7, 517-521.
27. Wang, I., Lin-Shiau, S. and Lin, J. (2000) *Oncology*, 59, 245-254.
28. Weyant MJ., Carothers AM., Bertagnolli ME. and Bertagnolli MM. (2000) *Clin Cancer Res.*, 6(3), 949-956.
29. Woodward, JK., Elshaw, SR., Murray, AK., Nichols, CE., Cross, N., Laws, D., Rennie, IG. and Sisley, K. (2002) *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 43(10), 3144-3152.
30. Young-Mi, K., Jin-Wook, J., Ok-Hee, L., Jungheum, Y., Eu-Yul, C., Kyu-Won, K., Seung-Taek, L. and Young-Guen, K. (2000) *Cancer Research*, 60, 5410-5413.

31. Yu HG., Huang JA., Yang YN., Huang H., Luo HS., Yu JP., Meier JJ., Schrader H., Bastian A., Schmidt WE. and Schmitz F. (2002) *Eur J Clin Invest.*, 32(11), 838-846.

ภาคผนวก 1

วิธีการทำ *anti-metastasis assay*

วิธีการที่จะใช้ในการศึกษาครั้งนี้ดัดแปลงมาจาก วิธี transwell invasion assay (Knutson *et al.*, 1996) ซึ่งมีขั้นตอนการทำดังนี้

1. แช่อุปกรณ์ทุกชิ้นที่จะนำมาใช้กับ matrigel ไว้ที่ 4^0C ล่วงหน้าข้ามคืนเพื่อป้องกันการแข็งตัวของ matrigel ขณะทำการทดลอง นำ matrigel ที่เก็บไว้ที่ -20^0C มาละลายโดยทิ้งไว้ในตู้เย็น 4^0C ข้ามคืน
2. ละลาย matrigel ใน serum-free medium ที่อุณหภูมิ 4^0C ให้มีความเข้มข้น 0.3 ug/ml
3. เคลือบ 100 µl matrigel ลงบน transmembrane ใน 24-well plate
4. Incubate matrigel ที่ 37^0C 5% CO_2 ข้ามคืน
5. เติม 100 µl room temperature serum-free medium ลงในหลุม transwell แล้วนำ plate ไป incubate ที่อุณหภูมิห้อง 90 นาที บน rotator ที่อัตราเร็วต่ำที่สุด
6. ในระหว่างรอเวลา เตรียม cell suspension จาก monolayer cells ที่เลี้ยงไว้ใน tissue culture flask โดย trypsinize และปรับให้มีความหนาแน่นของเซลล์ตามต้องการด้วย culture medium ที่มี fetal bovine serum
7. เมื่อครบ 90 นาทีแล้ว ดูดส่วนเกินของ medium ทิ้ง เติม 200 µl cell suspension ลงในแต่ละ transwell ในกรณีที่มีการทดสอบยาให้เติมยาที่ผสมอยู่ใน culture medium ตามความเข้มข้นที่ต้องการลงไปก่อน 100 µl แล้วจึงเติม cell suspension ที่มีความหนาแน่นเท่ากับความหนาแน่นเริ่มต้นที่ต้องการอีกทันที 100 µl
8. เติม culture medium หรือ conditioned medium ลงใน lower chamber โดยให้ปกคลุมบริเวณ transmembrane พอดี
9. นำ plate ไป incubate ที่ 37^0C 5% CO_2 เป็นเวลาต่างๆ ตามต้องการ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์ที่ใช้ในการทดสอบ
10. เมื่อครบเวลาแล้วดูด medium เก่าออกจาก transwell ใช้ไม้พันสำลีชุบน้ำกลั่นพอหมาดเช็ด non-invading cells ที่ค้างอยู่ด้านบนของ transwell ออก
11. Fix เซลล์ด้วย 25% methanol 15 นาที
12. ในกรณีที่ย้อมเซลล์ด้วย crystal violet dye ให้นำ transmembrane ไปจุ่มลงในหลุม 24-well plate ที่มี 0.5% crystal violet ใน 25% methanol อยู่เป็นเวลา 15 นาที โดยให้สารละลายสี crystal violet ท่วม filter พอดี
13. นำ transwell filter ไปล้างน้ำกลั่นจนกระทั่งไม่มีสีละลายออกมา หลังจากทิ้ง transwell filter ไว้จนแห้งแล้วจึงนำไปส่องใต้กล้องจุลทรรศน์เพื่อนับจำนวน invading cells

ภาคผนวก 2

วิธีการทำ ATP assay ในรูปแบบ 96-well format

1. เลี้ยง HL-60 cell line (human acute promyelocytic leukemia, ATCC) ใน RPMI medium ที่มี 10% fetal bovine serum (FBS) และปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เป็น 10^6 cells/ml
2. Aliquot 50 µl ของเซลล์ดังกล่าวลงในแต่ละหลุมของ 96-well plate
3. ทำการละลายสารที่ต้องการจะทดสอบด้วย DMSO หรือน้ำกลั่นที่ sterile ให้มีความเข้มข้น 200 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ
4. เจือจางสารในข้อ 3. ให้มีความเข้มข้น 2 เท่าของความเข้มข้นสุดท้ายที่ต้องการ
5. เติมสารในข้อ 4. ปริมาตร 50 µl ลงในแต่ละหลุมของ 96- well plate ที่มีเซลล์ปริมาตร 50 µl อยู่แล้ว
6. incubate เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ใน incubator ที่อุณหภูมิ 37°C และ 5% CO_2
7. ใส่ cell lysis reagent ปริมาตร100 µl ลงในแต่ละหลุมของ 96- well plate ที่ได้ในข้อ 6เซลล์ที่ผสมอยู่กับสารมายัง 96-well plate ใหม่
8. incubate 5 นาที ที่อุณหภูมิห้อง
9. ถ่าย cell lysate ที่ได้ ปริมาตร 50 µl ลงใน ลงใน 96-well plate สีดำ (Black Polystyrene, Costar) เติม luciferase reagent ซึ่งประกอบด้วย D-luciferin และ luciferase enzyme ปริมาตร 50 µl จากนั้น นำไปวัดแสงที่เกิดขึ้น (bioluminescence) ด้วย microplate luminometer (Anthos Lucy1, Austria) ที่ 570 nm ทันที แสงที่ได้มาจากปฏิกิริยาดังต่อไปนี้

$$ATP + D\text{-luciferin} + O_2 + \text{luciferase} \longrightarrow \text{oxyluciferin} + PP_i + CO_2 + \text{light}$$

โดย ATP ที่ใช้ในปฏิกิริยามาจากเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ดังนั้นปริมาณแสงที่วัดได้จะเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณ ATP เมื่อเขียนกราฟความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยแสงที่ได้ (biolubinescence,rlu) และปริมาณ cell ที่ใช้แล้ว ความสัมพันธ์ที่ได้ควรเป็นเส้นตรง จึงจะถือว่าเป็นปริมาณที่เหมาะสมกับการตรวจหาสารตัวอย่าง การคำนวณปริมาณ ATP ที่มาจากเซลล์จะมาจากกราฟที่แสดงความสัมพันธ์ระหว่างหน่วยของแสงที่วัดได้และปริมาณของ standard ATP

10. หาค่า IC_{50} จาก % cytotoxicity ที่คำนวณจาก

$$\% \text{ cytotoxicity} = \frac{\text{mean ATP conc. (negative control)} - \text{mean ATP conc. (sample)}}{\text{mean ATP conc. (negative control)}} \times 100$$

โดยใช้ความเข้มข้นของ ATP ที่ได้จากการ treat เซลล์ด้วยตัวทำละลายของยาเป็นค่า control

ภาคผนวก 3

วิธีการเตรียม serum-freed mouse fibroblast conditioned media

ภายหลังจากเลี้ยงเซลล์ mouse lung fibroblast (ATCC) ใน culture medium ที่มี 10% FCS ได้ 70 ถึง 80% confluence แล้วจึงเปลี่ยน medium เป็น serum-free medium แล้วจึง incubate ที่ 37°C และ 5% CO_2 เป็นเวลา 24 ชั่วโมงจึงเก็บ medium โดยทำการกรองก่อนแล้วเก็บไว้ที่ 4°C