

บทที่ 1

บทนำ

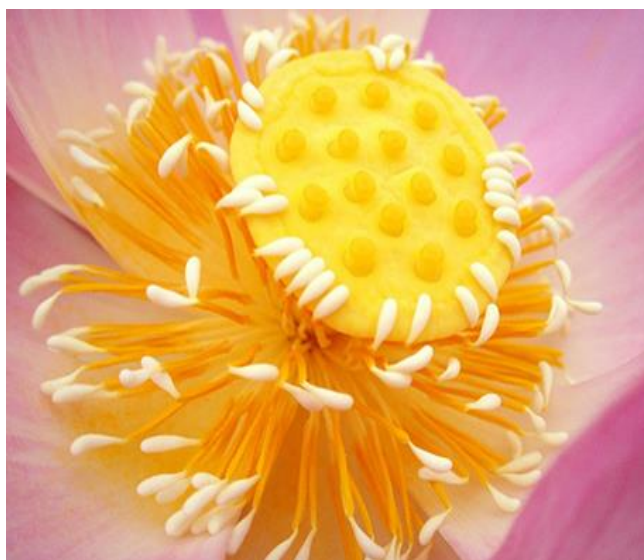
ความสำคัญ และที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

บัวหลวงเป็นพืชน้ำที่มีความสำคัญยิ่ง โดยถือว่าเป็นพืชน้ำที่มีความงามและประโยชน์มากมาย บัวหลวง เป็นพืชในวงศ์ Nymphaeaceae อยู่ในสกุล Nelumbo เป็นไม้ล้มลุกที่อยู่น้ำหลายฤดู มีถิ่นกำเนิดในเอเชีย มีเหง้าไหลอยู่ใต้ดิน ผงอยู่ในโคลนเลน ใบเดี่ยวมีลักษณะกลมใหญ่สีเขียวอมเทา ใบอ่อนจะลอยปริ่มน้ำ ส่วนใบแก่จะชูพ้นน้ำ แผ่นใบมีลักษณะกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 ซม. ก้านใบแข็ง มีหนามเล็ก ๆ เมื่อหักเป็นสายใยและมีน้ำยางสีขาว ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ มีสีขาวและสีชมพู มีทั้งดอกป้อมและดอกแหลม ก้านดอกมีลักษณะแข็งมีหนามเล็ก ๆ ชูเหนือน้ำ มีกลีบดอกจำนวนมาก เรียงซ้อนกันหลายชั้น ดอกมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ เมื่อดอกบานเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-25 ซม. ดอกมีหลายรูปทรงและมีหลายสี เช่น สีขาว สีชมพู แล้วแต่ละพันธุ์ จากการศึกษาพบว่าส่วนต่างๆ ของบัวหลวงมีสารสำคัญทางยา เช่น สาร nuciferine มีฤทธิ์กดประสาท ด้านการอักเสบ ลดไข้ แก้ไอ และมีผลในการยับยั้งการหลั่งสาร serotonin โดยพบว่า

1. ดิบบัว มีฤทธิ์เพิ่มการบีบตัวของกล้ามเนื้อหัวใจ และเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ
2. ฝักบัว ประกอบด้วยพฤษเคมีกลุ่มแอลคาลอย 4 ชนิด ได้แก่ สาร nuciferine , N-nornuciferine liriodenine และ N-noramepavine และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ quercitin ซึ่งมีฤทธิ์ในการห้ามเลือดได้ เนื่องจากมีสาร quercitin
3. เมล็ดบัว ใช้บำรุงร่างกาย แก้ไข้ มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ และมีฤทธิ์ด้านความเป็นพิษของตับได้เมื่อใช้ขนาด 300 mg/Kg
4. เกสรบัว มีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดจากน้ำของเกสรมีฤทธิ์ที่ด้านเชื้อก่อให้เกิดฝีหนอง เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง และสารสกัดในแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ด้านเชื้อ B-streptococcus group A มีฤทธิ์ด้านเชื้อราและยีสต์
5. ใบบัว มีฤทธิ์ในการลดคลอเรสเตอรอล สารสกัดแอลกอฮอล์จากใบแห้งมีผลป้องกันไม่ให้ระดับคลอเรสเตอรอลในเลือดสูง และสาร nuciferine มีฤทธิ์ในการกดประสาท ด้านการอักเสบ ลดไข้ แก้ไอ มีผลยับยั้งการหลั่งสาร serotonin
6. ก้านบัว เมื่อสกัดด้วยแอลกอฮอล์จากก้านดอกในขนาด 200 และ 400 mg/kg มีฤทธิ์ลดไข้ในหนูทดลองปกติได้นาน 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ และในหนูที่ทำให้เป็นไข้ด้วยยีสต์ได้นาน 4 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับยาพาราเซตามอล
7. รากบัว สามารถแก้อาการท้องเสีย สารสกัดจากเหง้าสามารถลดปริมาณของอุจจาระและการบีบตัวของลำไส้ ลดน้ำตาลในเลือด สารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้ามีฤทธิ์ลดน้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ด้านการอักเสบ สารสกัดจากแอลกอฮอล์และสาร betulinic acid สกัดได้จากส่วนของเหง้ามีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้เทียบเท่า

ยามาตรฐาน phenylbutazone และ dexamethasone สารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้ามีผลต่อระบบประสาท ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว และมีฤทธิ์เป็นยานอนหลับ ลดไข้ ลดอาการเกร็งของกล้ามเนื้อ (MalaKul et al.,2001, . Kisanaphun et al.,1998)

จากการศึกษาพบว่าสารสกัดจากเกสรดอกบัวหลวง (Lotus Stamen Extract) ช่วยในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ลดริ้วรอยก่อนวัย ลดรอยแดงของผิว ทำให้ผิวพรรณเปล่งปลั่ง โดยพบว่าสารสกัดในเกสรดอกบัวหลวงประกอบไปด้วยสารพฤษเคมีที่สำคัญคือ kaempferol , kaempferol 3- D-glucopyranoside, sitosterol-3- D- glucopyranoside ส่วนใหญ่เป็นสารที่ให้ค่าความเข้มข้นของสาร ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเริ่มต้นได้ดี เท่ากับวิตามินอี โดยมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ และช่วยในการผลิตเซลล์ผิว ช่วยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นสาเหตุของผิวคล้ำ ฝ้า จุดด่างดำ (ชยันต์ และคณะ,2547)



รูปที่ 1 แสดงดอกและเกสรของบัวหลวง

จากข้อมูลการศึกษาดังกล่าวที่พบว่าสารสกัดจากเกสรบัวมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องพบว่ายังไม่มีใครศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดจากเกสรบัวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดร่างกาย (Mesenchymal stem cell) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสำคัญต่อการซ่อมแซมและการเจริญเติบโตของร่างกาย ดังนั้นผู้วิจัยจึงได้ทำการศึกษาเรื่องเซลล์ต้นกำเนิดของร่างกาย (Mesenchymal stem cell) อยู่แล้ว จึงมีความสนใจต้องการศึกษาว่าสารสกัดจากเกสรบัวมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดของร่างกาย (Mesenchymal stem cell) ซึ่งใช้เป็นตัวแทนของเซลล์ในร่างกาย

ปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิด หรือสเต็มเซลล์ มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาทางการแพทย์ เนื่องจาก เป็นเซลล์ที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ใหม่ เพื่อทดแทนเซลล์ในร่างกายที่เสื่อมสภาพ มีการศึกษาพบว่า

คนที่เจ็บป่วยเป็นโรคเรื้อรังจะมีปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดน้อยกว่าคนปกติ จึงเป็นที่มาของการศึกษาถึงใช้เซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการฟื้นฟูสุขภาพ (regenerative medicine) ที่เรียกว่า cell therapy ในคนที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจและสมองขาดเลือด โรคตับแข็ง และโรคเบาหวาน เป็นต้น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดแรกที่ได้รับการเพาะเลี้ยง คือ Embryonic stem cell (ES cell) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกมาจากตัวอ่อนมนุษย์ หลังการปฏิสนธิได้ประมาณ 5 วัน เนื่องจากการศึกษาวิจัยพบว่า ES cell เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นได้เกือบทุกชนิด (Xu et al., 2002) ทำให้ความหวังที่จะนำ ES cell มาใช้ในการรักษาโรค แต่กัติดปัญหาหลักอยู่ 2 ประการ คือ 1. มีข้อถกเถียงทางด้านจริยธรรมว่า การกระทำการดังกล่าวเป็นการทำลายตัวอ่อนซึ่งอาจถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิต และ 2. ผลการวิจัยยังพบว่าเมื่อฉีดเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสัตว์ทดลอง จะส่งผลให้เกิดเนื้องอกชนิด teratoma ได้ ดังนั้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่เรียกว่า Adult stem cells (เซลล์ต้นกำเนิดที่โตเต็มวัย) ขึ้นมาแทน

Adult stem cells (เซลล์ต้นกำเนิดที่โตเต็มวัย) นี้ มีอยู่ในร่างกายของคนเราในจำนวนน้อย แต่เมื่อเซลล์ในร่างกายถูกทำลายลง เซลล์เหล่านี้ก็จะแบ่งตัว และสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ของอวัยวะต่างๆ เพื่อไปทดแทนเซลล์เดิมที่สูญเสียหรือเซลล์ต่าง ๆ ได้ (Fraser et al., 2004) เราสามารถพบ Adult stem cells ได้ในเกือบทุกอวัยวะของร่างกาย แต่ในปัจจุบัน แหล่งของ adult stem cell ที่ได้รับการศึกษา คือแหล่งของเซลล์ที่เราสามารถเก็บได้ง่าย ได้แก่ ไขมัน, รก, สายสะดือ, เลือดจากสายสะดือ, กระแสโลหิต และไขกระดูก นอกจากนี้ เรายังสามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดจากแหล่งดังกล่าวมาเพาะเลี้ยง และนำไปฉีดกลับเพื่อการรักษาตัวผู้ป่วยเองได้ (autologous transplantation) จึงมีความปลอดภัยสูง และไม่มีปัญหาทางด้านจริยธรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของระบบเลือด (hematopoietic stem cell, HSC) จากไขกระดูก (bone marrow transplantation) เป็นการวิธีการรักษาโรคด้วยเซลล์ต้นกำเนิดอย่างแรกที่ได้รับการยอมรับ (Thomas and Blume, 1999) อย่างไรก็ตาม นอกจาก HSC ในไขกระดูกยังมีเซลล์ต้นกำเนิดอีกชนิดหนึ่งคือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell, MSCs) ซึ่งได้รับการรายงานเป็นครั้งแรกโดย Cohnheim ในปี ค.ศ. 1867 และได้ถูกเรียกว่า stromal cell ในระยะแรก ไม่มีผู้สนใจทำการศึกษาวิจัยถึงคุณสมบัติของ MSCs มากนัก เพราะได้มุ่งความสนใจไปที่การปลูกถ่ายไขกระดูกมากกว่า มาจนกระทั่งช่วงหลังจากปี ค.ศ. 1966 เมื่อนักวิทยาศาสตร์พบว่า MSCs จากไขกระดูกมีคุณสมบัติที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เซลล์กระดูก (osteoblast) เซลล์ไขมัน (adipocyte) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ได้ จึงนำไปสู่การศึกษาวิจัยทางด้าน MSCs อย่างกว้างขวาง (Caplan; 1991) ผลการศึกษาในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมา พบว่า MSCs สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่าง ๆ ได้หลายชนิด ไม่เพียงแต่เซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูกอ่อนเท่านั้น แต่ยังรวมถึง เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์หลอดเลือด (Psaltis et al., 2008) และเซลล์ตับ นอกจากนี้ MSCs ยังมีคุณสมบัติพิเศษในการลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลเป็น และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้ (Giordano et al. 2007) ข้อดีอีกประการของการใช้ MSCs ก็คือ สามารถนำมาให้ข้ามคนได้ (allogeneic transplantation) ซึ่งแตกต่างจากในกรณีของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูก ซึ่งผู้ได้รับ (recipient) จะต้องได้รับสารเคมีร่วมกับการฉายแสงเพื่อทำลายไขกระดูกของ

ตนเองเสียก่อน ซึ่งอาจนำมาสู่ภาวะติดเชื้อแทรกซ้อน ในกรณีที่เซลล์ต้นกำเนิดที่ใส่เข้าไป ติดซ้ำ หรือไม่ติดเลย จากที่กล่าวมาพบว่าแนวโน้มของการนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดชนิด mesenchymal stem cell มาใช้ทางการแพทย์มากขึ้น แต่การเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ในปัจจุบันต้องอาศัยปัจจัยหลาย ๆ ด้านที่สำคัญคืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย growth factor จำนวนมากรวมถึงการใช้ antibiotic เช่น Penicillin/Streptomycin เพื่อเป็นปัจจัยช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์และป้องกันการติดเชื้อขณะเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากและยังอาจส่งผลต่อการนำเซลล์ไปใช้ในอนาคต

จากการศึกษาที่กล่าวมาพบว่าสารสกัดจากบัวมีคุณสมบัติเป็น growth factor ชนิดหนึ่งซึ่งส่งผลต่อการทำงานของเซลล์เช่น กระตุ้นการทำงานของหัวใจ มีคุณสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา จากคุณสมบัติดังกล่าวสารสกัดจากบัวน่าจะมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell และยังลดการใช้ antibiotic ในขณะที่เลี้ยงเซลล์ซึ่งอาจมีผลต่อการใช้เซลล์ได้ในอนาคตได้ จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากบัวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่น่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำสารสกัดจากบัวซึ่งเป็นพืชที่มีมากในประเทศไทย มาใช้ประโยชน์ทางยา หรือเครื่องสำอางค์ต่อไปในอนาคต

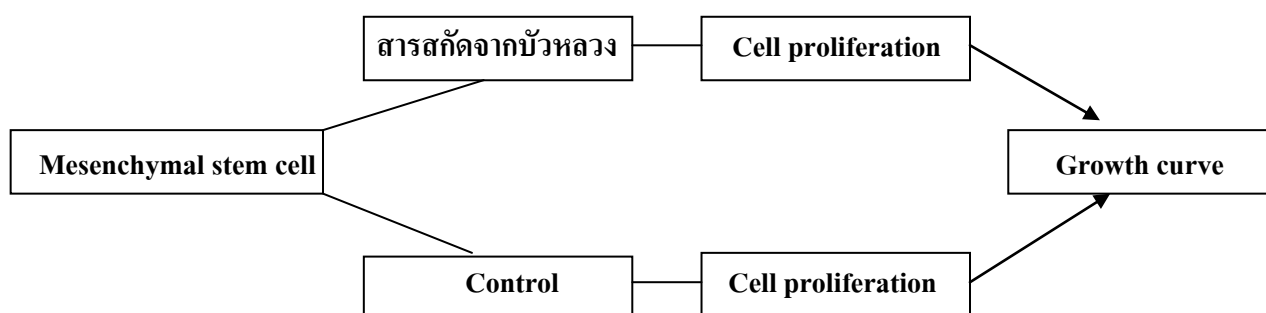
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

1. เพื่อศึกษาหาวิธีสกัดที่ได้จากบัวหลวง
2. เพื่อศึกษาผลของสารสกัดที่ได้จากเกสรบัวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell
3. เพื่อศึกษาหาปริมาณสารสกัดจากเกสรบัวที่เหมาะสมต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell
4. ศึกษาเปรียบเทียบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์เมื่อได้รับสารสกัดจากเกสรบัวที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell

ขอบเขตของโครงการวิจัย

งานวิจัยนี้มุ่งเน้นการศึกษาวิจัยผลของสารสกัดจากเกสรบัวหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell

กรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย



ตัวแปรที่ใช้ในการวิจัย

1. ตัวแปรอิสระที่ศึกษา คือ เกสรบัวหลวงแบบแห้ง
2. ตัวแปรตามที่ศึกษา คือ การเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell
3. ตัวแปรควบคุม คือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

การศึกษาเกี่ยวกับผลของสารสกัดจากบัวหลวง (*Nelumbo nucifera*) ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (Mesenchymal stem cell) ผู้วิจัยได้รวบรวมทฤษฎีและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องดังนี้

1. บัวหลวง
2. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์
3. สรรพคุณทางยาของบัวหลวง
4. องค์ประกอบทางเคมีของเกสรบัวหลวง
5. การศึกษาทางเภสัชวิทยาของเกสรบัวหลวง
6. การศึกษาฤทธิ์ทางพิษเคมีในบัวหลวงต่อทางเภสัชวิทยา
7. การสกัดสารสำคัญและสารออกฤทธิ์จากพืช
8. เซลล์
5. เซลล์ต้นกำเนิด
6. เซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell
7. การเจริญเติบโตของเซลล์
8. งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

บัวหลวง

บัวหลวงเป็นพืชที่มีความสำคัญ โดยถือว่าเป็นพืชที่มีความงามและประโยชน์มากมาย บัวหลวงเป็นพืชในวงศ์ Nymphaeaceae อยู่ในสกุล *Nelumbo* เป็นพืชน้ำเป็นพืชล้มลุกหลายฤดู มีถิ่นกำเนิดแถบเอเชีย มีเหง้าและไหลอยู่ใต้ดิน ผักตบชวาอยู่ในโคลนเลน ใบเดี่ยวมีลักษณะกลมใหญ่สีเขียวอมเทา ใบอ่อนจะลอยปริ่มน้ำ ส่วนใบแก่จะชูพ้นน้ำ แผ่นใบเกือบกลม เส้นผ่าศูนย์กลาง 20-50 ซม. ก้านใบแข็งมีหนามเล็ก ๆ เมื่อหักเป็นสายใยและมีน้ำยางสีขาว ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ มีสีขาวและสีชมพู มีทั้งดอกป้อมและดอกแหลม ก้านดอกแข็งมีหนามเล็ก ๆ ชูเหนือน้ำ กลีบดอกจำนวนมาก เรียงซ้อนกันหลายชั้น ดอกมีกลิ่นหอมอ่อน ๆ เมื่อดอกบานเส้นผ่านศูนย์กลาง 15-25 ซม. ดอกมีหลายรูปทรงและมีหลายสี เช่น สีขาว สีชมพู แล้วแต่พันธุ์

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์

ต้นเป็นไม้โผล่เหนือน้ำ อายุหลายปี ลำต้นมีทั้งที่เป็นเหง้าใต้ดิน และ เป็นไหลเหนือดินใต้น้ำ ใบเป็นใบเดี่ยว เรียงสลับ ใบรูปไข่ก่อนข้างกลมขอบใบเรียบและเป็นคลื่นเล็กน้อย แผ่นใบเรียบ สีเขียวและมีนวล

เคลือบ ก้านใบมีหนามเป็นตุ่มเล็กๆ ก้านใบติดกับแผ่นใบ ด้านหลังใบ (peltate leaf) โคนก้านใบมีหูใบ (stipule) 2 อัน ก้านใบกลม เรียวแข็งส่งใบให้เจริญที่ผิวน้ำหรือเหนือน้ำ ดอกสีชมพู ขาว มีกลิ่นหอม ดอกออกจากเหง้าใต้ดิน ตรงซอกใบ ก้านดอก (peduncle) ส่งดอกให้ขึ้นมาบนเหนือน้ำ ก้านดอกและก้านใบมีลักษณะเหมือนกัน ภายในก้านใบ และก้านดอก มีน้ำยางใส เมื่อถูกอากาศแล้วเป็นสีคล้ำ นอกจากนี้ยังมีท่ออากาศ (air canal) ใหญ่ 4-6 ช่อง ดอกเป็นดอกเดี่ยวขนาดใหญ่ สมบูรณ์เพศ (perfect flower) ก้าน ดอกสีเขียว อวบน้ำส่งดอกชูขึ้นเหนือน้ำ กลีบเลี้ยง (sepal) สีเขียว มี 4-5 กลีบ ขนาดเล็ก กลีบดอก (petal) จำนวนมาก สีขาว สีชมพู และสีเหลือง (ซึ่งไม่มีชนิดนี้ในเมืองไทย) เรียงซ้อนกันหลายชั้น ลักษณะของกลีบดอกเป็นรูปไข่กลับ เกสรตัวผู้จำนวนมากติดกับฐานรองดอกในตำแหน่งที่ต่ำกว่า เกสรตัวเมีย อับเรณู (anther) สีเหลืองมี 4 อัน ลักษณะเรียวยาว ปลายอับเรณูมีระยางค์สีขาวหรือ ขาวอมเหลือง บัณฑิตนี้บางพันธุ์มีเกสรตัวผู้ ๒ ธรรมดา (stamen) เกสรตัวผู้ที่เป็นหมัน (staminode) เกสรตัวผู้ที่เหมือนกลีบดอก (stamen petaloid) และ เกสรตัวผู้ที่เหมือนกลีบดอกและเป็นหมัน (staminode petaloid) เกสรตัวเมียประกอบด้วยรังไข่อยู่เหนือชั้นของกลีบดอกและเกสรตัวผู้ รังไข่ มีคาร์เพล (carpel) แยกออกจากกัน โดยแต่ละคาร์เพลฝังตัวอยู่ในตอนบนของฐานรองดอก (receptacle) ที่ขยายใหญ่เรียกว่า torus ก้านชูเกสรและยอดเกสรตัวเมียขนาดเล็กอยู่ทางด้านบน ใน รังไข่แต่ละอันมีไข่อ่อนเพียง 1 อัน ติดอยู่ที่ผนังส่วนบนของรังไข่ ผลเป็นผลกลุ่ม (aggregate fruit) ประกอบด้วยเมล็ดเดี่ยวเปลือกแข็ง (nut) จำนวนมาก เรียกว่า ฝักบัว (torus or thalamus) ผลย่อยมีรูปร่างคล้ายรูปไข่ เมล็ดมีเปลือกเมล็ดชั้นนอกอ่อนนุ่ม ไม่มีเอนโดสเปิร์ม มีใบเลี้ยงหนา 2 ใบนำมารับประทานได้ ด้้นอ่อน (embryo) ใบนำมาสกัดใช้มาทำยาได้ เป็นที่สะสมอาหารเมล็ดจะงอกส่วนของ epicotyl ออกมาก่อน ส่วนใบเลี้ยงยังคงอยู่ในเมล็ดซึ่งฝังอยู่ใต้ดิน (hypogeal-germination) สภาพการปลูกจะชอบดินเหนียวที่มีอินทรีย์วัตถุ เจริญได้ดีที่ระดับน้ำ 15-30 เซนติเมตร มีแสงเต็ม วัน และมีการขยายพันธุ์ (ปิยะวดี.,2552)

สรรพคุณทางยาของบัวหลวง

จากการศึกษาพบว่าส่วนต่างๆ ของบัวหลวงมีสารที่เป็นตัวยาสำคัญๆ เช่น สาร nuciferine มีฤทธิ์ในการกดประสาท ลดการอักเสบ ลดไข้ แก้ไอ และมีผลในการยับยั้งการหลั่งสาร serotonin โดยพบว่า

1. ดีบัว มีฤทธิ์เพิ่มการบีบตัวของหัวใจ และเพิ่มอัตราการเต้นของหัวใจ
2. ฝักบัว ฝักบัวประกอบด้วยสารกลุ่มแอลคาลอย 4 ชนิด ได้แก่ สาร nuciferine , N-nornuciferine liriodenine และ N-noramepavine และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ คือ quercitin ซึ่งมีฤทธิ์ในการห้ามเลือดได้ เนื่องจากมีสาร quercitin อยู่
3. เมล็ดบัว ใช้บำรุงร่างกาย แก้ไข้ซึ่งมีสารสกัดแอลกอฮอล์ต่อต้านอนุมูลอิสระ สารสกัด แอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต่อต้านความเป็นพิษของตับได้ในขนาด 300 mg/Kg

4. ใบบัว มีฤทธิ์ในการลดคลอเรสเตอรอล สารสกัดแอลกอฮอล์จากใบบัวแห้งมีผลป้องกันไม่ให้อัตราคลอเรสเตอรอลในเลือดสูง และสาร nuciferine มีฤทธิ์ในการกดประสาทต่อต้านการอักเสบ ลดไข้ แก้ไอ มีผลยับยั้งการหลั่งสาร serotonin

5. ก้านบัว สกัดด้วยแอลกอฮอล์จากก้านดอกในขนาด 200 และ 400 mg/kg มีฤทธิ์ลดไข้ในหนูทดลองปกติได้นาน 3 และ 6 ชั่วโมง ตามลำดับ และในหนูที่ทำให้เป็นไข้ด้วยยีสต์ได้นาน 4 ชั่วโมง โดยเปรียบเทียบกับยาพาราเซตามอล

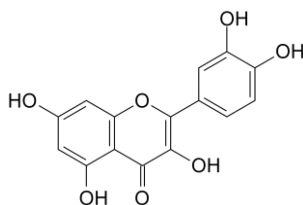
6. รากบัว สามารถบรรเทาอาการท้องเสีย สารสกัดจากเหง้าสามารถลดปริมาณของอุจจาระและการบีบตัวของลำไส้ ลดน้ำตาลในเลือด สารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้ามีฤทธิ์ลด น้ำตาลในเลือด ฤทธิ์ต้านการอักเสบ สารสกัดจากแอลกอฮอล์และสาร betulinic acid สกัดได้จากส่วนของเหง้ามีฤทธิ์ต้านการอักเสบ ได้เทียบเท่ามาตรฐาน phenylbutazone และ dexamethasone สารสกัดแอลกอฮอล์จากเหง้ามีผลต่อระบบประสาท ทำให้กล้ามเนื้อคลายตัว และมีฤทธิ์เป็นยานอนหลับ ลดไข้ ลดอาการเกร็งของลำไส้เล็ก

7. เกสรบัว เกสรบัวมีฤทธิ์ด้านเชื้อแบคทีเรีย สารสกัดจากน้ำของเกสรมีฤทธิ์ที่ต้านเชื้อก่อให้เกิดฝีหนอง เชื้อที่ก่อให้เกิดโรคท้องร่วง และสารสกัดแอลกอฮอล์มีฤทธิ์ต้านเชื้อ B-streptococcus group A มีฤทธิ์ต้านเชื้อราและยีสต์ นอกจากนี้สารสกัดจากเกสรดอกบัวหลวง (Lotus Stamen Extract) ช่วยในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ลดริ้วรอยก่อนวัย ลดรอยแดงของผิว ทำให้ผิวพรรณเปล่งปลั่ง โดยพบว่าสารสกัดในเกสรดอกบัวหลวงประกอบไปด้วยสารพฤษเคมีที่สำคัญคือ kaempferol , kaempferol 3- D-glucopyranoside, sitosterol-3- D- glucopyranoside ส่วนใหญ่เป็นสารที่ให้ค่าความเข้มข้นของสาร ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเริ่มต้นได้ดี เท่ากับวิตามินอี โดยมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ และช่วยในการผลิตเซลล์ผิว ช่วยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นสาเหตุของผิวคล้ำ ฝ้า จุดด่างดำ (MalaKul et al.,2001, . Kisanaphun et al.,1998) (ชยันต์ และคณะ,2547)

องค์ประกอบทางเคมีของสารสกัดจากบัวหลวง

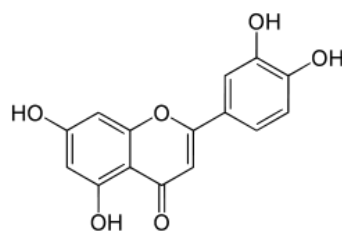
จากการทบทวนวรรณกรรมที่ผ่านมาพบว่าส่วนประกอบของบัวหลวงที่มีผลต่อการรักษาและกระตุ้นการทำงานของอวัยวะต่างๆ ที่สำคัญคือได้จากเกสรบัวมีซึ่งมีความสำคัญต่อความแข็งแรงของอวัยวะต่าง ๆ ดังนั้นสารสกัดจากเกสรบัวน่าจะมีผลต่อความแข็งแรงของเซลล์ช่วยในการการเจริญเติบโตของเซลล์ ซึ่งยังไม่มีการศึกษาก่อนหน้านี้ ดังนั้นผู้ศึกษาจึงสนใจศึกษาว่าสารสกัดจากเกสรบัวช่วยในการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนเซลล์ได้หรือไม่ จากการศึกษาที่ผ่านมาได้มีการศึกษาสารประกอบทางเคมีในเกสรบัวหลวงพบว่ามีส่วนสำคัญดังนี้

1.Quercetin



เคอร์ซีติน เป็นสารพฤกษเคมีหรือ ไฟโตนิวเทรียนท์ (Phytochemical หรือ Phytonutrients) ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ทางชีวภาพที่พบเฉพาะในพืช สารกลุ่มนี้อาจเป็นสารที่ทำให้พืชชนิดนั้นๆ มีสี กลิ่นหรือรสชาติที่เป็นลักษณะเฉพาะตัวที่พบมากที่สุด ในผัก และผลไม้หลายชนิดมีฤทธิ์ต่อต้านหรือป้องกันโรคได้หลายประเภท เคอร์ซีตินเป็นสารพฤกษเคมีที่อยู่ในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีมากในหัวหอม หอมแดง และพืชตระกูลถั่ว เคอร์ซีตินให้ฤทธิ์ในการป้องกันการอักเสบ ป้องกันแบคทีเรีย และไวรัส ช่วยป้องกันอาการแพ้ ปกป้องหลอดเลือด ป้องกันมะเร็ง ชะลอความชรา ป้องกันโรคที่มาพร้อมกับความเสื่อมต่างๆ รวมทั้งโรคทางระบบประสาทที่เกิดจากความเสื่อม (neurodegenerative diseases) (Russo et al.,2012) ผลงานวิจัยของกลุ่มวิจัยการแพทย์ทางเลือกแบบบูรณาการของมหาวิทยาลัยขอนแก่นพบว่าเคอร์ซีตินสามารถป้องกันโรคสมองเสื่อมพาร์กินสัน (Sriraksa et al.,2012) นอกจากนั้นยังมีรายงานว่าเคอร์ซีตินยังมีฤทธิ์ในการกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนทำให้แผลหายเร็ว (unpublished data) ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาที่ผ่านมา (Gomathi et al.,2003) เคอร์ซีตินยังมีความสามารถปกป้องผิวหนังจากแสงอัลตราไวโอเล็ต (Erden et al.,2000) ลดการทำลายเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้างอินซูลินในตับอ่อนของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำภาวะเบาหวาน ลดอัตราการเกิดต่อกระจกในภาวะเบาหวาน (Stefek et al.,2011) เคอร์ซีตินเป็นสารที่มีความปลอดภัยค่อนข้างสูงมีรายงานว่า ในสัตว์ทดลองที่ได้รับเคอร์ซีตินถึงวันละ 500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมน้ำหนักตัวเป็นเวลา 2 ปีไม่พบความผิดปกติใดๆ ในมนุษย์เองก็มีการศึกษาถึงความปลอดภัยของการใช้สารเคอร์ซีตินและพบว่าการใช้สารเคอร์ซีตินทางหลอดเลือดดำในขนาด 1,400 มิลลิกรัมต่อตารางเมตร หรือประมาณ 2.5 กรัมต่อน้ำหนักตัว 70 กิโลกรัมเป็นเวลา 3 สัปดาห์ยังคงมีความปลอดภัย โดยทั่วไปแล้วในแต่ละวันเราบริโภคเคอร์ซีตินเพียงวันละ 5-10 มิลลิกรัม เท่านั้น (Hertog et al.,1995)

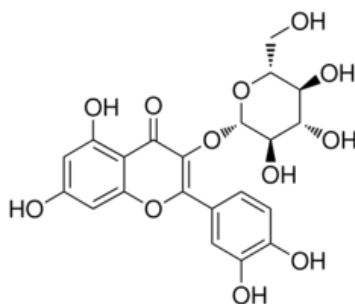
2.Luteolin



สารประกอบกลุ่ม ลูทีโอลิน (Luteolin) ในพืชสามารถลดความเสื่อมของสมองและช่วยชะลออาการหลงๆ ลืมๆ อันเนื่องมาจากความชราได้ โดยจะมีผลในการยับยั้งการปล่อยสารที่มาทำลายเซลล์สมอง ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้ความจำลดลง นอกจากนี้ลูทีโอลินยังมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ป้องการการทำลายดีเอ็นเอของเซลล์ และมีฤทธิ์ในการต้านแบคทีเรีย (Sirivan et al., 2011) สามารถพบได้ในพืชหลายชนิด เช่น แครอท (carrot) พริกหวาน (pepper) ขึ้นฉ่ายฝรั่ง (celery) น้ำมันมะกอก (olive oil) ใบสะระแหน่ (peppermint) โรสแมรี่ (rosemary) คาร์โมไมล์(chamomile) และ เกสรบัว จากการทดสอบลูทีโอลินในหนูทดลอง เพื่อดูลักษณะของ เซลล์ค้ำจุนระบบประสาท(neuroglial cell หรือ Glial cell) ชนิดที่เรียกว่า microglia cell ซึ่งพบทั้งในสมองและแนวไขสันหลัง พบว่าลูทีโอลินสามารถช่วยลดอาการอักเสบของเซลล์ประสาทหรือลดความเสียหายที่เกิดขึ้นกับเซลล์ประสาทได้

(http://www.sci.uidaho.edu/med532/neurons_neuroglial_cells_module3.htm)

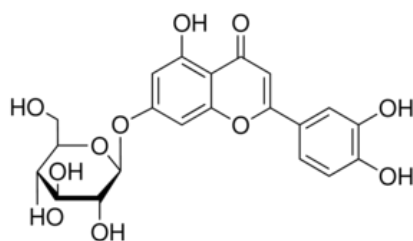
3.Isoquercitrin



มีฤทธิ์ด้านการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชัน ส่งเสริมความแข็งแรงให้กับเซลล์ ต้านอนุมูลอิสระ

(Sakakibara et al.,2003)

4.Iuteolin glucoside



มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน ต้านอนุมูลอนุมูลอิสระ มีฤทธิ์ลดอาการปวด และแก้อักเสบ ขับขี้
การ nitric oxide c]t prostaglandin E2 (Hu et al.,2004)

การศึกษาทางเภสัชวิทยาของเกสรบัวหลวง



รูปที่ 2 แสดงเกสรบัวหลวง

ตำรายาไทย: เกสรบัวหลวง ช่วยในการบำรุงหัวใจ ทำให้ชุ่มชื้น บำรุงปอด บำรุงตับ บำรุงกำลัง คุมธาตุ แก้ไข้

พิกัดยาไทยที่เกี่ยวข้องบัว “พิกัดยา” ซึ่งหมายถึงขบวนการจัดยาหรือจำกัดชนิดของยาตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป จัดรวมกันเข้า เป็นหมวดหมู่ โดยมีสัดส่วนของยาแต่ละชนิดเท่ากันหรือเสมอภาคกัน รวมเรียกเป็นชื่อเดียวเพื่อสะดวกในการจำ ได้แก่ พิกัดเกสรทั้งห้า พิกัดบัวทั้งห้า

พิกัดเกสรทั้ง 5 (บัวน้ำ) ทั้ง 5 ประกอบด้วย บัวสัตตบุษย์ บัวสัตตบรรณ บัวลินจง บัวจงกลนี และบัวนิลบล พิกัดบัวทั้ง 5 นี้ มีรสฝาดหอมเย็น สรรพคุณรวมกันเป็นยาบำรุงหัวใจ ช่วยชูกำลัง แก้ลมพานไส้ แก้อุจจาระธาตุ แก้ไข้เพื่อลมและโลหิต แก้ไข้รากสาด และบำรุงครรภ์รักษา

พิกัดบัวพิเศษ 6 อย่าง ประกอบด้วยบัวหลวงแดง บัวหลวงขาว บัวสัตตบงกชแดง บัว สัตตบงกชขาว บัวเผื่อน และบัวชม พิกัดบัวพิเศษนี้ มีรสฝาดเย็น สรรพคุณรวมกันในการชูกำลัง บำรุงหัวใจ แก้ลมพานไส้ แก้อุจจาระธาตุ แก้ไข้ แก้โลหิต (<http://www.kmitl.ac.th/agridata/Lotus/article/Lotus.pdf>)

ตำรายาจีน: ใช้แก้ปัสสาวะบ่อย แก้น้ำกามเคลื่อน (ฝันเปียก) แก่ตักขาว ประจำเดือนมามากกว่าปกติ เลือดกำเดาไหล และแก้อาการท้องเสีย

รูปแบบและขนาดยาที่ใช้ :

เมื่อใช้บำรุงหัวใจ เกสรปรุงเป็นยาหอมบำรุงหัวใจ บรรเทาอาการหน้ามืด วิงเวียนทำให้ชื่นใจ เป็นยาระงับประสาท ช่วยในการจับเสมหะ

1. เกสรบัวหลวงสด หรือแห้งประมาณ 1 หยิบมือ ชงกับน้ำร้อน 1 แก้ว (ประมาณ 240 มิลลิลิตร) ทิ้งไว้นาน 10-15 นาที ดื่มขณะที่ยังอุ่นอยู่ ครั้งละ 1 แก้ว วันละ 3-4 ครั้ง
2. เกสรบัวหลวงแห้ง บดเป็นผงครั้งละ 0.5 -1 ช้อนชา ชงน้ำร้อนดื่มหรือใช้ในขนาด 3-5 กรัม

การศึกษาฤทธิ์ทางพิษเคมีในบัวหลวงต่อทางเภสัชวิทยา

ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ : สารกลุ่มฟลาโวนอยด์ ที่พบในเกสร และดอกบัว มีฤทธิ์ต้านปฏิกิริยาออกซิเดชัน โดยเกสรตัวผู้มีฤทธิ์จับอนุมูลอิสระ DPPH โดยมีค่า EC₅₀ 42.05 mg/ml

ฤทธิ์ต้านเบาหวาน : เกสรตัวผู้ยังมีฤทธิ์ยับยั้ง rat lens aldose reductase (RLAR) และ advance glycation end products (AGE) โดยมีค่า IC₅₀ 48.30 และ 125.48 mg/ml ตามลำดับ ซึ่งการยับยั้ง RLAR และ AGE มีผลต่อการลดการเกิดภาวะเบาหวาน

ฤทธิ์ทำให้นอนหลับ : สารแอลคาลอยด์ ที่พบในบัว มีผลทำให้หนูนอนหลับ สารสกัดเมทานอลจากเหง้าบัว ทำให้ลดพฤติกรรม และกิจกรรมต่างๆในสัตว์ โดยเพิ่มการเกิด pentobarbitone-induced sleeping time ในหนูฤทธิ์ลดปวด และด้านการอักเสบ : สารแอลคาลอยด์ ที่พบในบัว มีฤทธิ์ลดอาการปวด และแก้การอักเสบ สารสกัดเมทานอลจากเหง้า ในขนาด 200 มก./กก. และ 400 มก./กก. ลดการอักเสบในหนู โดยมีประสิทธิภาพเทียบเท่ากับ phenylbutazone และ dexamethasone ทั้งการทดสอบในหลอดทดลอง และสัตว์ทดลอง

การศึกษาทางพิษวิทยา : สารสกัดแอลกอฮอล์ของเกสรบัวหลวงขนาด 10 กรัม/กิโลกรัม โดยการป้อน หรือฉีดได้ผิวหนังหนูถีบจักร ไม่ก่อให้เกิดความเป็นพิษ

(<http://www.thaicrudedrug.com/main.php?action=viewpage&pid=24>)

การสกัดสารสำคัญและสารออกฤทธิ์จากพืช

การสกัดสารสำคัญและสารออกฤทธิ์ในพืชมีหลายวิธี โดยทั่วไปวิธีการสกัดที่เหมาะสมขึ้นอยู่กับปัจจัยหลาย ๆ อย่าง ได้แก่ (วีณา, 2534)

1.คุณค่าของสารสกัดและค่าใช้จ่ายในการสกัด ถ้าคุณค่าทางการรักษาน้อย เช่น สารที่ใช้แต่งสี กลิ่นรส ของยาเตรียมต่าง ๆ ก็อาจใช้วิธีง่าย ๆ ที่ไม่ ยุ่งยาก นอกจากนี้ควรคำนึงถึงค่าใช้จ่ายทั้งหมดเปรียบเทียบกับราคาของสารสกัดที่เตรียมได้ว่าคุ้มค่า

2.ความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเพื่อใช้งาน การใช้วิธีมาเซอเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

3.ธรรมชาติของพืชสมุนไพร ลักษณะและโครงสร้างของเนื้อเยื่อ สมุนไพรที่มีลักษณะอ่อนนุ่ม เช่น ดอก ใบ อาจ สกัดด้วยวิธีมาเซอเรชัน หากเป็นพืชสมุนไพรที่มีเนื้อเยื่อที่แข็งแรงและเหนียว เช่น เปลือก ราก เนื้อ ไม้ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง ความสามารถในการละลายของสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้นิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่องความสามารถในการละลายสารสำคัญในน้ำยาสกัด ถ้าละลายได้ง่ายนิยมใช้วิธีดูดซับ แต่ถ้าละลายได้น้อยก็จำเป็นต้องใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่องความคงตัวของสารสำคัญในสมุนไพรต่อความร้อน ถ้าเป็นสารที่ไม่ทนต่อความร้อน ควรจะใช้วิธีมาเซอเรชันหรือเพอร์โคเลชัน

4.ความต้องการที่จะให้ได้การสกัดที่สมบูรณ์ (Exhausted extraction) หรือเกือบสมบูรณ์ หากต้องการสารสกัดเพื่อใช้งาน การใช้วิธีมาเซอเรชันก็เพียงพอแล้ว แต่ถ้าต้องการสารสกัดเข้มข้นก็ ควรใช้วิธีเพอร์โคเลชันหรือการสกัดแบบต่อเนื่อง

การสกัดด้วยตัวทำละลาย

การสกัดด้วยตัวทำละลาย เป็นวิธีทำสารให้บริสุทธิ์ หรือเป็นวิธีแยกสารออกจากกัน โดย อาศัยสมบัติของการละลายของสารแต่ละชนิด (ตารางที่ 1) เนื่องจากสารต่างชนิดกันละลายในตัวทำละลายต่างกันได้ต่างกันและสารชนิดเดียวกันละลายในตัวทำละลายต่างชนิดได้ต่างกัน ตัวทำละลายที่เหมาะสมควรมีสมบัติดังนี้ คือ ละลายได้ดีในสารที่ต้องการ ไม่ละลายสารอื่นในของผสมนั้น ไม่ทำปฏิกิริยากับสารที่ต้องการสกัด มีจุดเดือดต่ำ ระเหยได้ง่าย เมื่อ สกัดสารออกมาเป็นสารละลายแล้ว สามารถแยกตัวทำละลายออกจากสารละลายนั้นได้ง่าย ไม่เป็น พิษ หาง่าย และราคาถูก

ตารางที่ 1 แสดงชนิดตัวทำละลาย

ตัวทำละลาย	สูตรเคมี	จุดเดือด	Polarity	ความหนาแน่น
Non-Polar Solvents				
เฮกเซน	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_3$	69 °C	2.0	0.655 g/ml
เบนเซน	C_6H_6	80 °C	2.3	0.879 g/ml
โทลูอิน	$\text{C}_6\text{H}_5\text{-CH}_3$	111 °C	2.4	0.867 g/ml
Diethyl ether	$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_3$	35 °C	4.3	0.713 g/ml
คลอโรฟอร์ม	CHCl_3	61 °C	4.8	1.498 g/ml
Ethyl acetate	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-O-CH}_2\text{-CH}_3$	77 °C	6.0	0.894 g/ml
Tetrahydrofuran (THF)	$\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-O-CH}_2\text{-CH}_2\text{-}$	66 °C	7.5	0.886 g/ml
Methylene chloride	CH_2Cl_2	40 °C	9.1	1.326 g/ml
Polar Aprotic Solvents				
Acetone	$\text{CH}_3\text{-C(=O)-CH}_3$	56 °C	21	0.786 g/ml
Acetonitrile (MeCN)	$\text{CH}_3\text{-C}\equiv\text{N}$	82 °C	37	0.786 g/ml
Dimethylformamide (DMF)	$\text{H-C(=O)N(CH}_3)_2$	153 °C	38	0.944 g/ml
Dimethyl sulfoxide (DMSO)	$\text{CH}_3\text{-S(=O)-CH}_3$	189 °C	47	1.092 g/ml
Polar Protic Solvents				
Acetic acid	$\text{CH}_3\text{-C(=O)OH}$	118 °C	6.2	1.049 g/ml
n-Butanol	$\text{CH}_3\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-CH}_2\text{-OH}$	118 °C	18	0.810 g/ml
Isopropanol	$\text{CH}_3\text{-CH(OH)-CH}_3$	82 °C	18	0.785 g/ml

(ปิยะวดี., 2552)

การเตรียมตัวอย่างพืช

การเตรียมตัวอย่างพืชต้องคำนึงถึงสารสำคัญในพืชคือการตรวจเอกลักษณ์ของพืชที่ถูกต้อง ไม่มีพืชอื่นเจือปน ไม่มีโรคพืช อายุพืชที่ผลิตสารสำคัญ และการเก็บรักษา การเตรียมตัวอย่างให้แห้ง เพื่อคงคุณภาพของสมุนไพรไว้ ควรจะทำให้แห้งโดยวิธีที่เร็วและอุณหภูมิต่ำๆ เพราะอุณหภูมิสูงจะ ทำให้สารสำคัญสลายหรือเปลี่ยนแปลง (วันดี., 2536)

ขั้นตอนการสกัด

ตัวอย่างวิธีการสกัดอย่างเป็นขั้นตอน ทำได้หลายวิธี คือ

1. การสกัดโดยเพิ่มควมมีขั้วของตัวทำละลาย โดยสกัดด้วยแอลกอฮอล์หรือเมทานอล จากนั้นนำสารสกัดที่ได้จากแอลกอฮอล์นี้ไปทำให้เข้มข้นก่อนที่จะนำมาพาร์ทิชัน (Partition) กับตัวทำละลายที่มีขั้วต่าง ๆ กัน โดยเริ่มจากตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) ไปถึงตัวทำละลาย มีขั้ว (polar solvent) เช่น เฮกเซน อทิลแอซีเตต (ethyl acetate) บิวทานอล (butanol) เป็นต้น

2. การสกัดโดยอาศัยคุณสมบัติในการเป็นกรดและด่างของสาร โดยการสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม จากนั้นจึงแยกกลุ่ม โดยพาร์ทิชันกับกรดและด่าง หรือทางกลับกันพาร์ทิชันกับ กรดและด่างก่อน แล้วจึงสกัดด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม

การทำสารสกัดให้เข้มข้น (Concentration)

เนื่องจากสารสกัดอย่างหยาบที่ได้จากวิธีการสกัดข้างต้นจะมีปริมาณมากและเจือจาง ทำให้นำไปแยกองค์ประกอบได้ไม่สะดวกและไม่มีประสิทธิภาพ จึงต้องนำมาทำให้มีความเข้มข้นเสียก่อนด้วย วิธีต่าง ๆ ดังนี้

1. การกลั่นในภาวะสุญญากาศ (Distillation in vacuum) เป็นวิธีที่นิยมมากที่สุด เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดโดยการกลั่นที่อุณหภูมิต่ำ พร้อมกับลดความดันลงให้เกือบเป็นสุญญากาศ โดยใช้ปั๊มสุญญากาศ (vacuum pump) เครื่องมือนี้เรียกว่า โรตารีอีวาโพเรเตอร์ (rotary evaporator) ซึ่งประกอบด้วยส่วนต่าง ๆ 3 ส่วน คือ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบที่กลั่น (distillation flask) ส่วนคอนเดนเซอร์หรือส่วนควบแน่นไอสารละลาย (condenser) และภาชนะรองรับสารละลายหลังจากการกลั่น (receiving flask) โดยสารสกัดอย่างหยาบซึ่งบรรจุในภาชนะจะแช่อยู่ใน หม้ออ่างไอน้ำที่ควบคุมอุณหภูมิได้และจะหมุน (rotate) ตลอดเวลาที่ทำงาน เพื่อความร้อนอย่างทั่วถึงและสม่ำเสมอ ภาชนะบรรจุสารสกัดอย่างหยาบนี้ต่อเข้ากับส่วนควบแน่น ซึ่งมีระบบทำความเย็นหล่ออยู่ตลอดเวลา ปลายของส่วนควบแน่นจะมีภาชนะรองรับโดยทั้งระบบจะต่อเข้ากับระบบสุญญากาศสารละลายที่ระเหยออกจากภาชนะบรรจุจะควบแน่นที่บริเวณคอนเดนเซอร์และหยดลงมาในภาชนะรองรับสารละลายหลังการกลั่นซึ่งสารละลายดังกล่าว สามารถนำไปทำให้บริสุทธิ์และนำกลับมาใช้ได้

2. การระเหย (free evaporation) เป็นการนำตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัด โดยใช้ความร้อนจาก หม้อไอน้ำ (water bath) หรือแผ่นความร้อน (hot plate) วิธีนี้อาจทำให้องค์ประกอบในสาร สกัดสลายตัวได้ เนื่องจากอุณหภูมิสูงเกินไปและหากใช้สารละลายอินทรีย์ (organic solvent) ในสารสกัดการระเหยโดยให้

ความร้อนโดยตรง (direct heat) บนแผ่นความร้อนอาจเกิดอันตรายได้ง่าย นอกจากนี้ควรคำนึงถึงอุณหภูมิที่จะทำให้เกิดการสลายตัวของสารสำคัญ เมื่อใช้ความร้อน

3. การทำให้แห้ง (Drying) เป็นการระเหยเอาตัวทำละลายออกจากน้ำยาสกัดจนแห้งได้สาร สกัดออกมาในสภาพของแข็งหรือกึ่งของแข็งมีหลายวิธี เช่น การใช้ความเย็น (lyophilizer หรือ freeze dryer) หรือ การใช้ความร้อน (spray dryer) ฯลฯ

4. อัลตราฟิลเตรชัน (Ultrafiltration) เป็นการทำสารสกัดด้วยน้ำให้เข้มข้นโดยใช้แผ่นเมมเบรน (membrane) ใ้กับสารที่มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) สูงกว่า 5,000 โดยทั่วไปแล้วการสกัดเพื่อทำเป็นสารสกัดของพืชนั้นอาจทำได้ทั้งพืชที่แห้งแล้วหรือยังสดอยู่ ทั้งนี้ขึ้นอยู่กับประเภทของสารที่มีอยู่ในสารสกัดของพืชนั้นๆ สำหรับสารที่มีความเป็นขั้ว (polarity) น้อยเมื่อเทียบกับสารผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ โดยทั่วไปแล้ว และเป็นสารที่มักจะสกัดออกมาด้วยตัวทำละลายที่ไม่มีขั้ว (non-polar solvent) เฮกเซน (hexane) หรือปิโตรเลียมอีเทอร์ (petroleum ether) มักจะสกัดจากพืชที่แห้งแล้วหรือที่ยังสดอยู่ขึ้นอยู่กับสารที่มีอยู่ในสารสกัดที่มีอยู่มีเสถียรภาพมากน้อยเพียงใด สารบางชนิดเมื่อทำให้แห้งไม่ว่าจะโดยการใช้ความร้อนหรือโดยการตากแดดหรือแม้แต่ตากให้แห้งในร่มก็สามารถเกิดความเสี่ยงการสลาย (decomposition) ได้ ดังนั้นจึงมีความจำเป็นที่ต้องรีบนำมาสกัดขณะที่พืชยังสดอยู่ ในการสกัดนั้นถ้าใช้วิธีการสกัดเย็น (cold extraction) คือแช่ด้วยตัวทำละลายที่อุณหภูมิห้องหรือโดยการสกัดร้อน (hot extraction) คือใช้ Soxhlet extraction apparatus หรือโดยการต้มกับพืชด้วยตัวทำละลายที่เหมาะสม สำหรับวิธีการใดจะเหมาะสมนั้นขึ้นอยู่กับธรรมชาติของสารที่มีอยู่ เช่น หากสารนั้นสกัดออกมาได้ง่ายโดยตัวทำละลายชนิดหนึ่งหรือไม่เสถียรต่อความร้อน จะเลือกใช้วิธีการสกัดเย็นเพราะเป็นวิธีที่ง่ายและสะดวกและทำให้สารเกิดการเสื่อมสลายน้อย

จากการทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้องดังกล่าวทำให้ได้สารสกัดจากเกสรบัวพบว่าสารสกัดบัวที่ได้มีทั้งส่วนที่มีขั้วซึ่งจะสามารถละลายน้ำได้และส่วนที่ไม่มีขั้วซึ่งไม่สามารถละลายน้ำได้ ในการศึกษาครั้งนี้ต้องนำสารสกัดเกสรบัวที่ได้มาเป็นส่วนผสมในอาหารเลี้ยงเซลล์ซึ่งองค์ประกอบหลักเป็นน้ำ ดังนั้นสารสกัดบัวที่ได้จึงต้องเป็นสารสกัดที่ได้จากตัวทำละลายที่มีขั้ว ได้แก่ Acetone, Dimethyl sulfoxine (DMSO), Ethanol, Methanol และน้ำ เพื่อนำมาใช้ในการเลี้ยงเซลล์ต่อไป

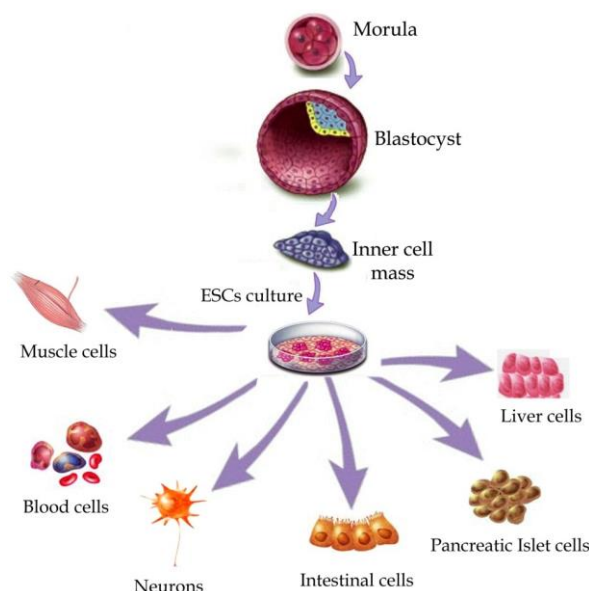
เซลล์

เซลล์คือหน่วยที่เล็กที่สุดของสิ่งมีชีวิตประกอบด้วยองค์ประกอบหลักคือเยื่อหุ้มเซลล์ องค์ประกอบภายในเซลล์ และนิวเคลียสซึ่งมีสารพันธุกรรมอยู่ภายในคือ DNA การรวมตัวของเซลล์หลายๆ เซลล์จะกลายเป็นเนื้อเยื่อ หลาย ๆ เนื้อเยื่อรวมกันเป็นอวัยวะ ดังนั้นถ้าเซลล์แข็งแรง ก็จะทำให้เนื้อเยื่อแข็งแรง เนื้อเยื่อแข็งแรงอวัยวะก็แข็งแรง ดังนั้นจากการศึกษาเกี่ยวกับสารสกัดที่ได้จากเกสรบัวมีฤทธิ์ทางยาในการบำรุงอวัยวะต่าง ๆ ช่วยในการหายของแผล (Gomathi et al., 2003) ดังนั้นสารสกัดจากเกสรบัวจึงน่าจะมีส่วนเกี่ยวข้องในการเจริญเติบโตของเซลล์ ช่วยให้เซลล์แข็งแรง และช่วยในการซ่อมแซมเซลล์ ดังนั้นการศึกษา

ครั้งนี้ ผู้ทำการวิจัยจึงใช้เซลล์ต้นกำเนิดเป็นตัวแทนเซลล์ของร่างกายเพื่อใช้ในการทดลองว่าสารสกัดจากเกสรบัวมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด

เซลล์ต้นกำเนิด

ปัจจุบันเซลล์ต้นกำเนิด หรือ สเต็มเซลล์ มีบทบาทสำคัญต่อการพัฒนาทางการแพทย์ เนื่องจากเป็นเซลล์ที่มีศักยภาพที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์ใหม่ เพื่อทดแทนเซลล์ในร่างกายที่เสื่อมสภาพ มีการศึกษาพบว่าคนที่เจ็บป่วยเป็นโรคเรื้อรังจะมีปริมาณเซลล์ต้นกำเนิดน้อยกว่าคนปกติ จึงเป็นที่มาของการศึกษาถึงใช้เซลล์ต้นกำเนิดเพื่อการฟื้นฟูสุขภาพ (regenerative medicine) ที่เรียกว่า cell therapy ในคนที่ป่วยเป็นโรคเรื้อรัง เช่น โรคหัวใจและสมองขาดเลือด โรคตับแข็ง และโรคเบาหวาน เป็นต้น เซลล์ต้นกำเนิดชนิดแรกที่ได้รับการเพาะเลี้ยง คือ Embryonic stem cell (ES cell) ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่แยกมาจากตัวอ่อนมนุษย์ หลังการปฏิสนธิได้ประมาณ 5 วัน ดังรูปที่ 3

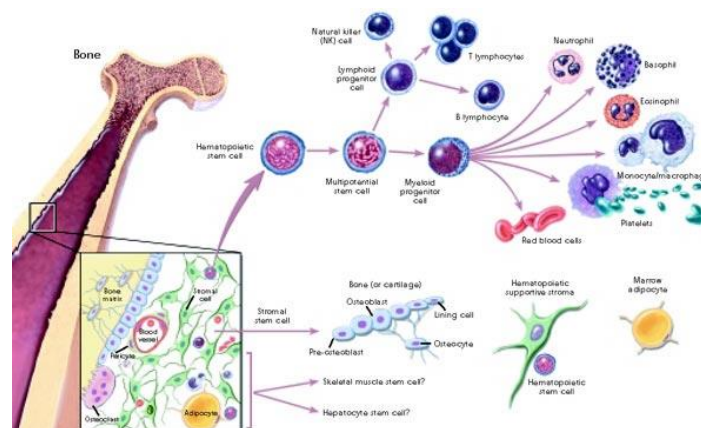


<http://www.intechopen.com/books/stem-cells-in-clinic-and-research/stem-cell-therapy>

รูปที่ 3 แสดง Embryonic stem cell

เนื่องจากการศึกษาวิจัยพบว่า ES cell เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่มีความสามารถในการพัฒนาไปเป็นเซลล์อื่นได้เกือบทุกชนิด (Xu et al., 2002) ทำให้ความหวังที่จะนำ ES cell มาใช้ในการรักษาโรค แต่ก็ติดปัญหาหลักอยู่ 2 ประการ คือ 1. มีข้อถกเถียงทางด้านจริยธรรมว่า การกระทำความดีกล่าวเป็นการทำลายตัวอ่อน ซึ่งอาจถือว่าเป็นสิ่งมีชีวิต และ 2. ผลการวิจัยยังพบว่าเมื่อนำเซลล์ต้นกำเนิดตัวอ่อนในสัตว์ทดลอง จะส่งผลให้เกิดเนื้องอกชนิด teratoma ได้ ดังนั้น เพื่อป้องกันปัญหาดังกล่าว จึงได้มีการพัฒนาการใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่เรียกว่า Adult stem cells (เซลล์ต้นกำเนิดที่โตเต็มวัย) ขึ้นมาแทน Adult stem cells (เซลล์ต้นกำเนิดที่โต

เต็มวัย) นี้ มีอยู่ในร่างกายของคนเราในจำนวนน้อย แต่เมื่อเซลล์ในร่างกายถูกทำลายลง เซลล์เหล่านี้ก็จะแบ่งตัว และสามารถเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ของอวัยวะต่างๆ เพื่อไปทดแทนเซลล์เดิมที่สูญเสียหรือเซลล์ต่าง ๆ ได้ (Fraser et al.,2004) ดังรูปที่ 4



<http://stemcells.nih.gov/info/basics/pages/basics4.aspx>

รูปที่ 4 แสดง Adult stem cell ที่ได้จากไขกระดูก

เราสามารถพบ Adult stem cells ได้ในเกือบทุกอวัยวะของร่างกาย แต่ในปัจจุบัน แหล่งของ adult stem cell ที่ได้รับการศึกษา คือแหล่งของเซลล์ที่เราสามารถเก็บได้ง่าย ได้แก่ ไขมัน, รก, สายสะดือ, เลือดจากสายสะดือ, กระแสโลหิต และไขกระดูก นอกจากนั้น เรายังสามารถนำเซลล์ต้นกำเนิดจากแหล่งดังกล่าวมาเพาะเลี้ยง และนำไปฉีดกลับเพื่อการรักษาตัวผู้ป่วยเองได้ (autologous transplantation) จึงมีความปลอดภัยสูง และไม่มีปัญหาทางด้านจริยธรรมเข้ามาเกี่ยวข้อง การปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดของระบบเลือด (hematopoietic stem cell, HSC) จากไขกระดูก (bone marrow transplantation) เป็นการวิธีการรักษาโรคด้วยเซลล์ต้นกำเนิดอย่างแรกที่ได้รับการยอมรับ (Thomas and Blume,1999)

เซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell

นอกจาก HSC ในไขกระดูกยังมีเซลล์ต้นกำเนิดอีกชนิดหนึ่งคือ เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ (mesenchymal stem cell, MSC) ซึ่งได้รับการรายงานเป็นครั้งแรกโดย Cohnheim ในปี ค.ศ. 1867 และได้ถูกเรียกว่า stromal cell ในระยะแรก ไม่มีผู้สนใจทำการศึกษาวิจัยถึงคุณสมบัติของ MSCs มากนัก เพราะได้มุ่งความสนใจไปที่การปลูกถ่ายไขกระดูกมากกว่า มาจนกระทั่งช่วงหลังจากปี ค.ศ. 1966 เมื่อนักวิทยาศาสตร์พบว่า MSCs จากไขกระดูกมีคุณสมบัติที่จะเจริญไปเป็นเซลล์ชนิดอื่น ๆ ได้แก่ เซลล์กระดูก (osteoblast) เซลล์ไขมัน (adipocyte) และเซลล์กระดูกอ่อน (chondrocyte) ได้ จึงนำไปสู่การศึกษาวิจัยทางด้าน MSCs อย่างกว้างขวาง (Caplan; 1991)

เซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคส (mesenchymal stem cells : MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่ทำหน้าที่สร้างเซลล์ใหม่เพื่อไปทดแทนเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายหรือทดแทนเซลล์ที่เสื่อมสภาพ เช่น เซลล์กระดูก เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์เยื่อปอด เป็นต้น มีรายงานการศึกษาวิจัยพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคส (MSC) มีความสามารถในการเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่าง ๆ ของร่างกายได้หลายชนิด ทำให้เซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้เป็นความหวังในอนาคตเพื่อไปการทดแทนเซลล์ต่าง ๆ ของร่างกายที่เสื่อมสภาพหรือมีความผิดปกติได้ ซึ่งแนวโน้มในอนาคตโรคของความเสื่อมมีโอกาสดำเนินการเกิดขึ้นได้ในอัตราที่สูง เช่น การเกิดโรคหัวใจ โรคสมองเสื่อม โรคกระดูกและข้อเสื่อม เป็นต้น

ผลการศึกษาในช่วง 10 ปี ที่ผ่านมา พบว่า MSCs สามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ต่าง ๆ ได้หลายชนิด ไม่เพียงแต่เซลล์กระดูก เซลล์ไขมัน และเซลล์กระดูกอ่อน เท่านั้น แต่ยังรวมถึง เซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เซลล์หลอดเลือด (Psaltis et al., 2008) และเซลล์ตับ นอกจากนี้ MSCs ยังมีคุณสมบัติพิเศษในการลดการอักเสบ ลดการเกิดแผลเป็น และสามารถยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็งในหลอดทดลองได้ (Giordano et al. 2007) ข้อดีอีกประการของการใช้ MSCs ก็คือ สามารถนำมาให้ข้ามคนได้ (allogeneic transplantation) ซึ่งแตกต่างจากในกรณีของการปลูกถ่ายเซลล์ต้นกำเนิดเม็ดเลือดจากไขกระดูก ซึ่งผู้ได้รับ (recipient) จะต้องได้รับสารเคมีร่วมกับการฉายแสงเพื่อทำลายไขกระดูกของตนเองเสียก่อน ซึ่งอาจนำมาสู่ภาวะติดเชื้อแทรกซ้อน ในกรณีที่เซลล์ต้นกำเนิดที่ใส่เข้าไป ติดซ้ำ หรือไม่ติดเลย จากที่กล่าวมาพบว่า แนวโน้มของการนำเซลล์ต้นกำเนิดชนิดชนิด mesenchymal stem cell มาใช้ทางการแพทย์มากขึ้น

ดังนั้นปัจจุบันจึงมีการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSCs กันอย่างกว้างขวาง แหล่งของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด MSCs ส่วนมากได้มาจากไขกระดูก ซึ่งมีข้อจำกัดที่สำคัญคือจำนวนของเซลล์ต้นกำเนิดจะแปรผันตามอายุ ถ้าอายุมากเซลล์ต้นกำเนิดก็จะน้อยลง จากการศึกษาวิจัยพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคส (MSC) นอกจากพบที่ไขกระดูกแล้ว ยังพบมากในอวัยวะหลังสิ้นสุดการตั้งครรภ์ เช่น รก สายสะดือ เยื่อหุ้มรก เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงใช้เซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell จากอวัยวะหลังสิ้นสุดการตั้งครรภ์เพื่อเป็นการศึกษาต่อยอดงานวิจัยที่มีอยู่เดิม โดยพบว่าการเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้ในปัจจุบันต้องอาศัยปัจจัยหลาย ๆ ด้านที่สำคัญคืออาหารเลี้ยงเซลล์ที่ประกอบด้วย growth factor จำนวนมากรวมถึงการใช้ antibiotic เช่น Penicillin/Streptomycin เพื่อเป็นปัจจัยช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์และป้องกันการติดเชื้อขณะเลี้ยงเซลล์ตามลำดับ ทำให้ต้องเสียค่าใช้จ่ายจำนวนมากและยังอาจส่งผลต่อการนำเซลล์ไปใช้ในอนาคต

สารสกัดจากบัวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิด

จากการศึกษาที่กล่าวมาพบว่าสารสกัดจากบัวมีคุณสมบัติเป็น growth factor ชนิดหนึ่งซึ่งส่งผลกระทบต่อการทำงานของเซลล์เช่น กระตุ้นการทำงานของหัวใจ มีคุณสมบัติยับยั้งอนุมูลอิสระ มีคุณสมบัติในการยับยั้งการเจริญเติบโตของแบคทีเรียและเชื้อรา จากคุณสมบัติดังกล่าวสารสกัดจากบัวน่าจะมีประโยชน์ต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell และยังลดการใช้ antibiotic ในขณะเลี้ยง

เซลล์ซึ่งอาจมีผลต่อการใช้เซลล์ได้ในอนาคตได้ จากการศึกษาที่ผ่านมายังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้สารสกัดจากบัวต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด mesenchymal stem cell การศึกษาในครั้งนี้เป็นการศึกษาครั้งแรกที่น่าจะมีประโยชน์อย่างยิ่งในการนำสารสกัดจากบัวซึ่งเป็นพืชที่มีมากในประเทศไทย มาใช้ประโยชน์ทางยา หรือเครื่องสำอางต่อไปในอนาคต

การเจริญเติบโตของเซลล์

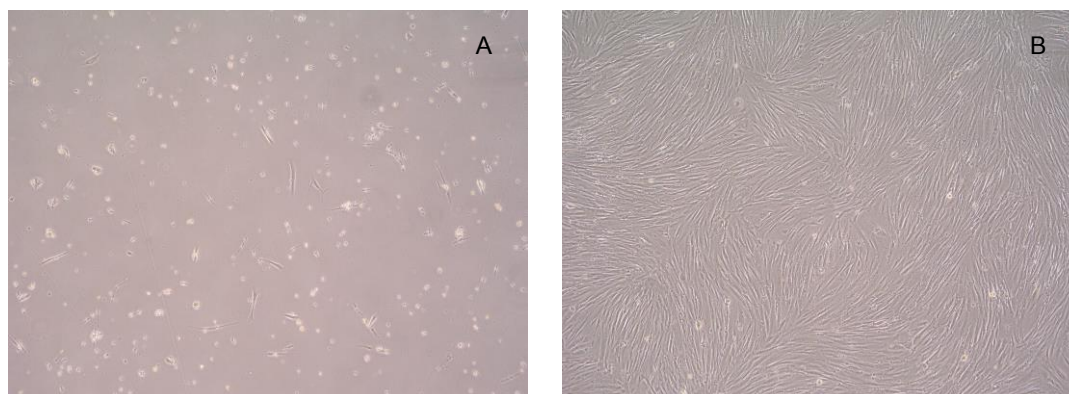
สิ่งมีชีวิตทุกชนิดในหลาย ๆ ช่วงของชีวิตจะสามารถเปลี่ยนแปลงขนาด ลักษณะและจำนวนภายใต้สภาพแวดล้อมที่เหมาะสม การเปลี่ยนแปลงนี้เรียกว่า การเจริญเติบโต (Growth) การเจริญเติบโตของเซลล์ประกอบด้วย 3 กระบวนการ

Differentiation เป็นกระบวนการที่เซลล์มีการเปลี่ยนแปลงที่เกิดจากการชักนำของเซลล์ข้างเคียง หรือสิ่งแวดล้อมที่เซลล์อยู่

Development คือกระบวนการเปลี่ยนแปลงของเซลล์พัฒนาไปเป็นเนื้อเยื่อชนิดต่างๆ

Morphogenesis คือการเปลี่ยนแปลงทางรูปร่างที่เกิดจากการรวมเซลล์หลายเซลล์เป็นเนื้อเยื่อ และมีการเจริญพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นอวัยวะต่างๆ

ขั้นตอนการเจริญเติบโตของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์ประกอบด้วย 3 กระบวนการในระดับเซลล์ คือ การแบ่งเซลล์ (Cell division) การขยายขนาดของเซลล์ (Cell enlargement) ซึ่งเป็นการเพิ่มปริมาตรของเซลล์ที่แบ่ง และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ (Cellular differentiation) เพื่อทำหน้าที่เฉพาะต่าง ๆ

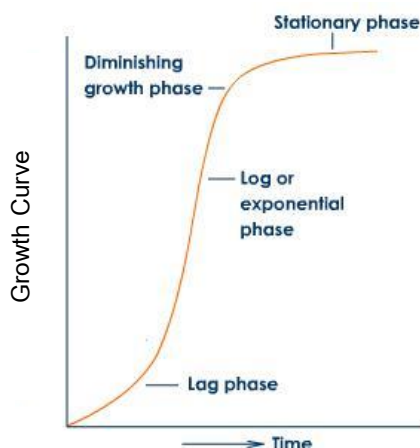


รูปที่ 5 การเจริญเติบโตของเซลล์ รูป A เซลล์เจริญเติบโต 1 สัปดาห์ รูป B เซลล์เจริญเติบโต 4 สัปดาห์

ความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตกับเวลา (Growth Kinetics)

การเจริญเติบโตของเซลล์นั้นสามารถบันทึกเป็นกราฟการเจริญเติบโต (Growth Curve) ได้โดยที่รูปแบบของการเจริญของเซลล์จะเป็นรูปตัว S หรือเรียกว่า Sigmoid Curve สามารถแบ่งออกได้เป็น 4 ส่วน ดังนี้

- 1.Lag Phase เป็นการเจริญเติบโตที่เกิดขึ้นช้า ๆ
- 2.Log Phase เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตเร็วและเป็นระยะที่ค่อนข้างยาว
- 3.Diminishing Growth Phase เป็นช่วงที่มีการเจริญลดลง
- 4.Stationary Phase เป็นช่วงที่มีการเจริญเติบโตคงที่



<http://www.tutorvista.com/content/biology/biology-iv/plant-growth-movements/growth-curve.php>

รูปที่ 6 แสดงความสัมพันธ์ของการเจริญเติบโตกับเวลา (Growth Kinetics)

วิเคราะห์การเจริญเติบโต

การเจริญเติบโตของเซลล์สัตว์วัดได้จากจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากการแบ่งตัวของเซลล์ โดยทำการบันทึกจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นต่อระยะเวลา แล้วทำการบันทึกเป็นกราฟ

งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

สุรารัตน์ พูลพิทยากร (2545 : ก) ศึกษาฤทธิ์ด้านการงอกลายพันธุ์ของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) ต่อ Somatic Mutation and Recombination ที่เหนี่ยวนำ ด้วยยูริเทนในแมลงหวี่ โดยศึกษาผลของเมล็ดบัวบด เมล็ดบัวต้น รากบัว ชาเกสรบัว ชาดิบบัว น้ำรากบัว ทำโดยศึกษาผลของหนอนที่ได้รับสารพิษและอาหารพร้อมกัน จนกระทั่งหนอนกลายเป็นแมลงหวี่จึงวิเคราะห์ พบว่า เครื่องดื่มจากบัวหลวงมีฤทธิ์ด้านการกลายพันธุ์อาจเป็นผลจากการยับยั้งการ ทำงานของเอนไซม์กระตุ้นสารพิษหรือส่งเสริมการทำงานของเอนไซม์ทำลายสารพิษ

วาสนา มินตรานนท์ (2527 : บทคัดย่อ) ศึกษาลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของพืชสกุล บัวหลวง (*Nelumbo* Adans.) ในประเทศไทย พบว่า ในประเทศไทยมี 6 พันธุ์คือ บุนนาค ปทุม สัตตบุษย์ สัตตบงกช ปักกิ่งขาว และปักกิ่งสีชมพู ลักษณะภายนอกคล้ายคลึงกันคือ ลำต้นเป็นเหง้า ใต้ดินและเป็นไหล เหนือดิน

ได้น้ำ รากเป็นระบบรากฝอย ใบเดี่ยวรูปร่างเกือบกลม ก้านใบติดกับ แผ่นใบตรงกลางทางด้านใต้ดอกเดี่ยวสีชมพูหรือขาว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกคล้ายกัน เกสรตัวผู้มีจำนวนมาก

ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, สุมนา ปานสมุทร, ดำรงค์ คงสวัสดิ์ และอำนาจ เพชรประไพ (2552 : บทคัดย่อ) การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ของสารสกัดจากบัวหลวง จากการศึกษาวิจัยพบสารชนิดต่างๆ ในส่วนประกอบของบัวหลวง ที่มีสรรพคุณในการบำรุงร่างกาย หรือนำมาปรุงเป็นยารักษาโรคได้ เช่น ส่วนต่างๆ ของบัวหลวง (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) คือ ดอก ใบ ก้านใบ ฝักบัว เมล็ด และโดยเฉพาะคือ บัว มีสารอัลคาลอยด์ (Alkaloids) หลายชนิด ที่มีฤทธิ์ต่อการขยายเส้นเลือดที่เลี้ยงหัวใจ เกสรบัว (ตัวผู้) พบสารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ รากบัว เหง้าบัว และเปลือกผล พบสารพวกแทนนิน (Tannin) เป็นสารฝาดสมานที่มีฤทธิ์ช่วยยับยั้งอาการท้องเดิน และรากบัวมีสารพวกแคลเซียม (Calcium) ช่วยบำรุงร่างกายเมล็ดบัว มีสารไขมัน (Lipid) ช่วยเพิ่มพลังงาน บำรุงไขข้อและเอ็น จากการศึกษาในครั้งนี้ ทำให้ทราบว่าสารสกัดบัวมีฤทธิ์ในการยับยั้งเชื้อจุลินทรีย์ และทราบองค์ประกอบทางเคมีและฤทธิ์ทางชีวภาพของบัวหลวง ในการนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ต่อไป

Hyun Ah Jung and Jae Sue Choi. 2003 : 279 ศึกษาการกำหนดสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) จากแหล่งธรรมชาติ ของเกสร *Nelumbo nucifera* พบว่า diphenyl-2-picrylhydrazyl (DPPH) สามารถยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา ROS (reactive oxygen species) ทั้งหมด ในการ homogenates ได้ จะใช้ 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate และสามารถจับสาร authentic peroxy nitrates สารสกัด เมทานอลที่ได้จากเกสรบัว แสดงให้เห็น antioxidant ที่กระบวนการ ONOO และมี ปฏิกิริยาเล็กน้อยในกลุ่ม DPPH และในกระบวนการ ของ ROS ยังแตกตัวในสารละลายอินทรีย์หลายชนิด

D.-H. Sohn, Y.-C. Kim, S. -H. Oh, E.-J. Park, X.Li, and B.-H.Lee. 2003 : 165 ศึกษา คุณสมบัติการจับอนุมูลอิสระและป้องกันตับของบัวหลวง *Nelumbo nucifera* (ENN) พบว่าสารสกัด Ethanol จากบัวหลวง เป็นสาร anti-oxidative มีความสามารถป้องกันตับ ผลการขจัด อนุมูลอิสระที่มีผลต่อร่างกายอย่างรุนแรง โดยมีค่าความเข้มข้นการยับยั้งเฉลี่ยอยู่ที่ 6.49 $\mu\text{g/ml}$ การรักษาเซลล์ตับโดยใช้ ENN ยับยั้งการผลิต serum enzyme การเป็นพิษต่อเซลล์จาก CCl₄ และ หน่วยพันธุกรรมจาก AFB₁ ถูกยับยั้งโดย ENN เช่นกัน

Mesenchymal stem cells (MSCs) เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่พบในไขกระดูก มีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ ได้แก่ CD73, CD90 และ CD105 และไม่แสดงออกของของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ hematopoietic stem cells ได้แก่ CD34, CD45 (Zhao RC 2003) MSCs มีความสามารถในการแบ่งเซลล์และเจริญพัฒนาไปเป็นเซลล์ได้หลายชนิด เช่น เซลล์กระดูก เซลล์กล้ามเนื้อ เซลล์กระดูกอ่อน นอกจากในไขกระดูกแล้ว ยังมีรายงานของ MSCs จากเลือด, สายสะดือ รก และเยื่อหุ้มรกอีกด้วย (Lu LL 2006, Miao Z 2006, Miki T 2006, Wang H 2004)

ในปี 2004 Xu และคณะ ได้ศึกษาการพัฒนา mesenchymal stem cells ที่ได้จาก human bone marrow ให้เจริญเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ โดยใช้ 5-azacytidine พบว่า MSCs ที่ถูกกระตุ้นด้วย 5-azacytidine มีโครงสร้างคล้าย myofilament และมีการแสดงออกของ β -myosin heavy chain (β -MHC), desmin และ α -cardiac actin นอกจากนี้ยังพบว่า MSCs ดังกล่าว สามารถนำ calcium เข้าสู่เซลล์ได้เมื่อกระตุ้นด้วย K^+ จากการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า MSCs ที่ได้จาก bone marrow สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ (Xu, Zhang et al. 2004)

ในปี 2008 Steingen และคณะ ได้ทำการสกัด human mesenchymal stem cells (hMSCs) จาก adult bone marrow แล้วทำการปลูกถ่าย (transplantation) เข้าไปในหัวใจของหนูที่มีภาวะผิดปกติ พบว่าเซลล์ที่ฉีดเข้าไปมีการเปลี่ยนแปลงเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เมื่อทดสอบด้วย immunohistochemistry พบว่ามีการแสดงออกของ desmin, beta-myosin heavy chain, alpha-actinin และ cardiac troponin T ในเซลล์ดังกล่าว การศึกษาในครั้งนี้จึงสรุปได้ว่า hMSCs จาก adult bone marrow สามารถเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจได้ (Steingen C 2008)

จากงานวิจัยที่เกี่ยวข้องพบว่าสารสกัดจากกระดูกมีส่วนช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ แต่ยังไม่พบว่ามีงานวิจัยใดที่มีการทดสอบสารสกัดกระดูกต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell ซึ่งเป็นเซลล์ต้นกำเนิดของร่างกาย จากการศึกษาพบว่าเซลล์ต้นกำเนิดชนิดนี้มีหน้าที่ในการซ่อมแซมเซลล์ร่างกายที่เกิดความเสื่อม หรือหมดอายุ และสามารถพัฒนาไปเป็นเซลล์ชนิดต่างๆ ได้หลายชนิดเช่นเซลล์กล้ามเนื้อหัวใจ เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงมีประโยชน์อย่างมากต่อการนำเอาสารสกัดจากกระดูกมาใช้ในการพัฒนาตำรับยาไทยหรือทางเภสัชวิทยาต่อไปในอนาคต

บทที่ 3

วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยผลของสารสกัดจากเกสรบัวหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ มีวิธีการดำเนินการวิจัยดังนี้

- 1.แบบของการวิจัย
- 2.ประชากร
- 3.กลุ่มตัวอย่าง
- 4.เครื่องมือที่ใช้ในการวิจัย
- 5.การเก็บรวบรวมข้อมูล
- 6.การวิเคราะห์ข้อมูล

แบบของการวิจัย

การวิจัยผลของสารสกัดจากบัวหลวงต่อการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิดมีเซนไคม์ เป็นวิจัยเชิงทดลอง สถานที่ทำการทดลองที่ วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี อำเภอธัญบุรี จังหวัดปทุมธานี และหน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด Greater Pharma Stem Cell For Life ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ อุทยานวิทยาศาสตร์ กระทรวงวิทยาศาสตร์

ประชากร

ประชากรที่ใช้ศึกษาวิจัยคือเกสรของบัวหลวงพื้นเมือง *Nelumbo nucifera*

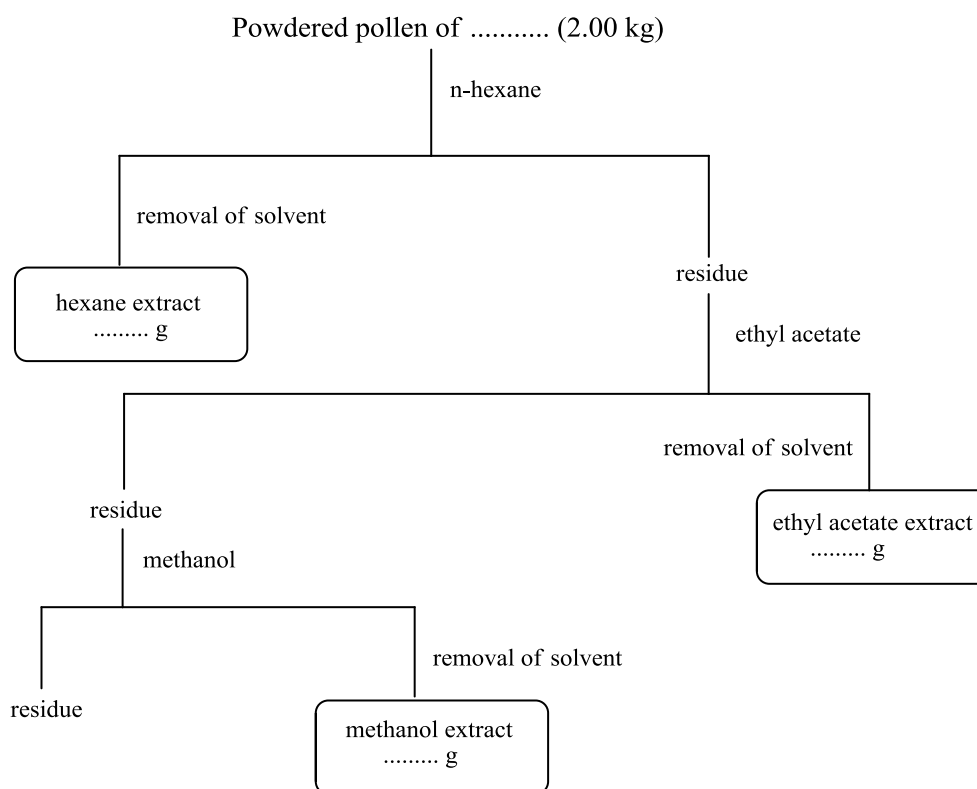
กลุ่มตัวอย่าง

เซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell ที่ได้จากสายสะดือที่ได้รับบริจาค และผ่านขบวนการของจริยธรรมแล้ว โดยได้รับการสนับสนุนเรื่องเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell และการทดสอบคุณสมบัติของเซลล์ต้นกำเนิดโดย หน่วยวิจัยเซลล์ต้นกำเนิด Greater Pharma Stem Cell For Life ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ กระทรวงวิทยาศาสตร์

การวิจัยแบ่งออกเป็น 2 ส่วน คือ

การเตรียมสารสกัดเกสรบัว

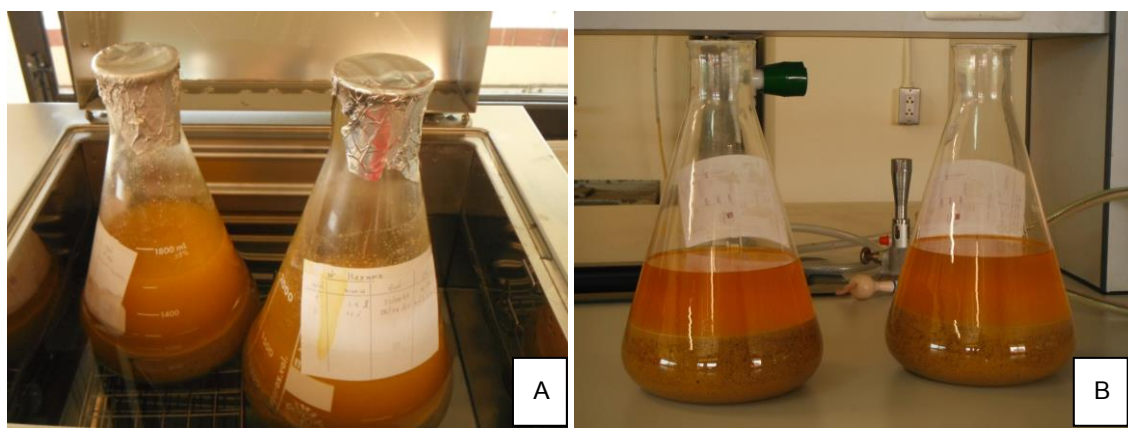
นำตัวอย่างเกสรบัวหลวงมาสกัดสารสำคัญด้วยสารละลาย n-hexane, Ethyl acetate และ methanol ดังรูปที่ 7 เก็บสารสกัดไว้ที่อุณหภูมิ 4° C เพื่อนำมาทดสอบการเจริญเติบโตของเซลล์กำเนิดชนิด mesenchymal stem cell ต่อไป



รูปที่ 7 แสดงขั้นตอนการสกัดสารจากเกสรบัวหลวง

การสกัดสารจากเกสรบัว

นำเกสรบัวหลวงจำนวน 2 กิโลกรัมมาบดให้ละเอียดแล้วนำมาหมักกับ n-hexane 3 วันในอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส พร้อมการเขย่าตลอดเวลา นำมาแยกส่วนของสารละลาย (Hexane extract) กับส่วนที่เป็นตะกอน นำตะกอนที่ได้มาสกัดสารด้วยการหมักกับ Ethyl acetate ต่ออีก 3 วันในอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส พร้อมการเขย่าตลอดเวลา จะได้สารสกัดในสารละลาย Ethyl acetate (Ethyl acetate extract) และส่วนของตะกอน นำตะกอนที่ได้มาหมักต่อในสารละลาย Methanol ต่ออีก 3 วันในอุณหภูมิ 45-50 องศาเซลเซียส พร้อมการเขย่าตลอดเวลา จะได้สารสกัดในสารละลาย Methanol (Methanol extract) ดังรูป 8



รูปที่ 8 แสดงการสกัดสารจากเนื้อเยื่อไขมัน A : การสกัดด้วย *n*-hexane B : การสกัดด้วย Methanol

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง MSCs จากสายสะดือ

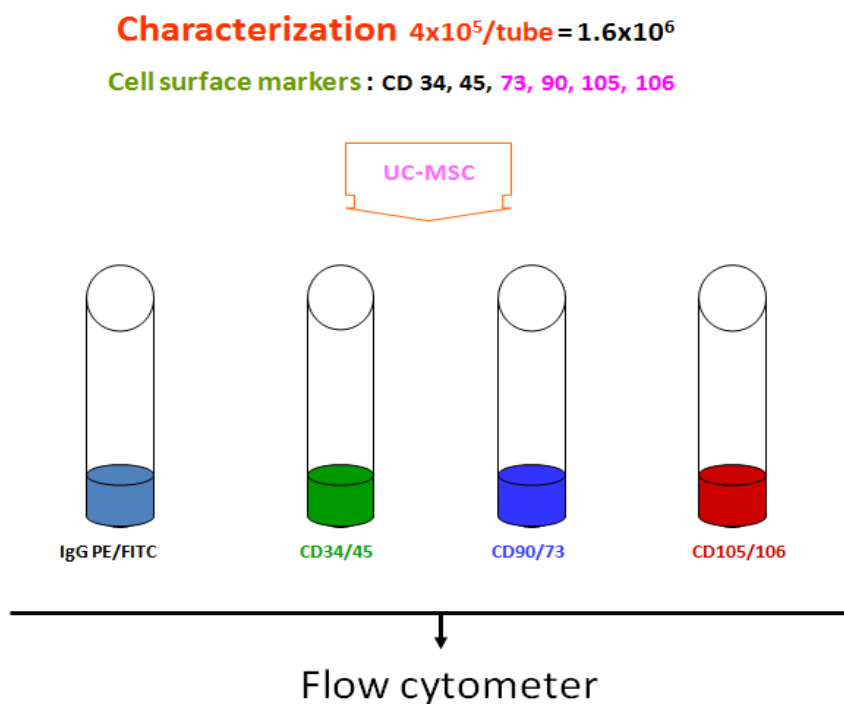
นำสายสะดือยาวประมาณ 3-5 เซนติเมตร มาล้างด้วย PBS ที่มี 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin แล้วหั่นจนละเอียด จากนั้นจึงนำไปปั่นล้างด้วย PBS ที่มี 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่ความเร็วรอบ 100xg เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงนำเนื้อเยื่อที่ได้มาย่อยต่อด้วย 0.5% trypsin-EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 30 นาที และนำไปปั่นล้างด้วย PBS ที่มี 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่ความเร็วรอบ 100xg เป็นเวลา 5 นาที 2 ครั้ง หลังจากนั้นจึงนำเซลล์รวมทั้งเนื้อเยื่อที่ได้มาเพาะเลี้ยงใน T25-Flask ในน้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air โดยเปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุกๆ 3-4 วัน หลังจากนั้นสังเกตและบันทึกภาพของเซลล์ทุกวันด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope จนกระทั่งเซลล์มีความหนาแน่นประมาณ 80-90% ของพื้นที่ผิวจึงเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.25% trypsin-EDTA เพื่อนำเซลล์ไปเลี้ยงเพื่อเพิ่มจำนวนต่อไป ดังรูปที่ 9



รูปที่ 9 แสดงขั้นตอนการคัดแยกและเพาะเลี้ยงเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell จากสายสะดือ

การศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วย Flow Cytometry

นำเซลล์ที่คัดแยกได้จากสายสะดือ Wharton's jelly และไขกระดูก ที่เพาะเลี้ยงใน T25-Flask ใน น้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin (passage ที่ 2-5) มาล้างด้วย PBS และ trypsinized ด้วย 0.25% trypsin/EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้น จึงนำเซลล์จำนวน 1×10^6 เซลล์ มาติดฉลากโดยการบ่มร่วมกับแอนติบอดี 5 ชนิด ได้แก่ anti-CD34 PE-conjugated (BD Bioscience, USA) anti-CD45 FITC-conjugated (BD Bioscience, USA) anti-CD73 PE-conjugated (BD Bioscience, USA) anti-CD90 FITC-conjugated (AbD Serotec, USA) และ anti-CD105 FITC-conjugated (AbD Serotec, USA) ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงนำมาปั่นล้างด้วย PBS ที่ความเร็วรอบ 100xg ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 5 นาที 1 ครั้ง แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาตรึงด้วย 1% paraformaldehyde 500 µl ก่อนที่จะนำเซลล์มาวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Flow cytometer (FACSCalibur™, Becton Dickinson) โดยใช้โปรแกรม CELLQuest® กลุ่มควบคุมถูกดำเนินการเช่นเดียวกับกลุ่มทดลองทุกประการ เว้นแต่ใช้ IgG FITC-conjugated (BD Bioscience, USA) และ IgG PE-conjugated (BD Bioscience, USA) ติดฉลากแทนการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อโมเลกุลบนผิวเซลล์ดังกล่าวข้างต้น ดังรูปที่ 10



รูปที่ 10 แสดงการตรวจสอบลักษณะเฉพาะของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell โดยการย้อม Cell surface marker ที่จำเพาะ

การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์กระดูก

นำ MSCs ที่ได้จากสายสะดือ ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน passage ที่ 3 มาล้างด้วย PBS และเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.25% trypsin/EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นจึงนำ MSCs ที่มีความเข้มข้น 3×10^4 เซลล์ต่อมิลลิลิตรมาเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา NH OsteoDiff (CliniMACs[®], USA) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร (Corning, NY) ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5% CO_2 in air เปลี่ยนน้ำยาเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนครบ 10 วัน จากนั้นนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย PBS และตรึงเซลล์ด้วย Formalin-methanol ที่อุณหภูมิ -20°C เป็นเวลา 30 นาที แล้วจึงนำมาล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งก่อนนำไปทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase ด้วยสารละลาย 1 mg/ml sodium naphthyl และ 1 mg/ml fast blue RR acid ใน propanidial buffer pH 9.75 ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 15 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปย้อมด้วย Hematoxylin เป็นเวลา 5 นาที แล้วล้างด้วยน้ำกลั่น 1 ครั้ง จากนั้นจึงนำไปศึกษากับกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope กลุ่มควบคุมถูกดำเนินการเช่นเดียวกับกลุ่มทดลองทุกประการเว้นแต่ใช้น้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS 100 U/ml penicillin 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ streptomycin แทนน้ำยา NH OsteoDiff

การศึกษาความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์ไขมัน

นำ MSCs ที่ได้จากสายสะดือ ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน passage ที่ 3 มาล้างด้วย PBS และเก็บเกี่ยวเซลล์ด้วย 0.25% trypsin/EDTA ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นนำ MSCs ที่มีความเข้มข้น 5×10^4 เซลล์ต่อ มิลลิตรมาเพาะเลี้ยงด้วยน้ำยา NH AdipoDiff Medium (CliniMACs®, USA) ในจานเลี้ยงเซลล์ขนาด 35 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air หลังจากนั้นเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จนครบ 21 วัน จึงนำเซลล์ที่ได้ไปล้างด้วย PBS และตรึงเซลล์ด้วย 40% Formalin vapor ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปย้อมด้วยสารละลาย 0.5% Oil Red O (Sigma, USA) ใน Isopropanol ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 20 นาที แล้วจึงล้างด้วยน้ำกลั่นอีก 2 ครั้ง ก่อนที่จะนำไปศึกษากับกล้องจุลทรรศน์ชนิด inverted microscope กลุ่มควบคุมถูกดำเนินการเช่นเดียวกับกลุ่มทดลองทุกประการเว้นแต่ใช้น้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin แทนน้ำยา NH AdipoDiff

การศึกษาความสามารถในการเพิ่มจำนวนของ MSCs ในสารสกัดบัว

โดยแบ่งการทดลองเป็น 2 กลุ่ม

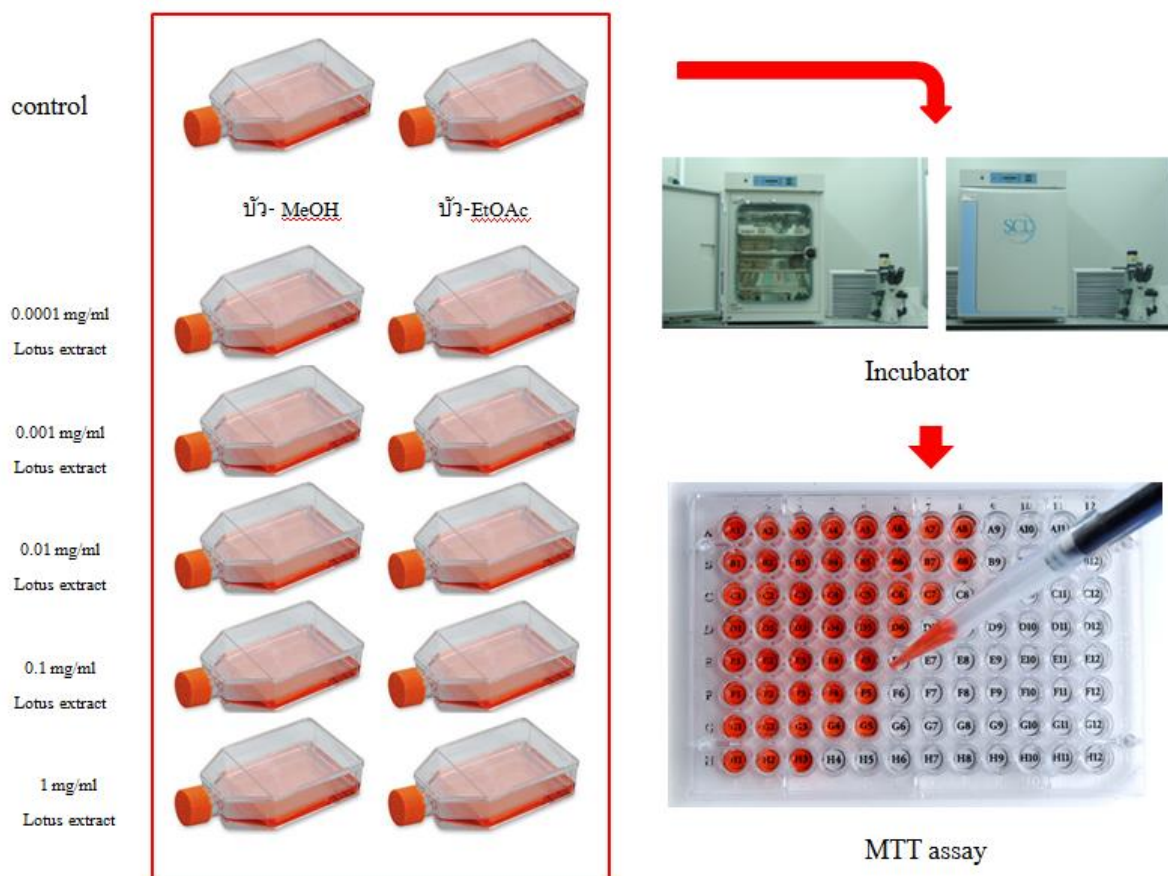
-เซลล์กลุ่มที่ 1 นำ MSCs ที่ได้ (passage 2) มาเพาะเลี้ยงใน T-25 Flask ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^5 เซลล์/well ในน้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin และสารสกัดจากเกสรบัวด้วย *n*-hexane ที่ความเข้มข้นที่ 0.0001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml และ 1 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5%CO₂ in air ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5%CO₂ in air

-เซลล์กลุ่มที่ 2 นำ MSCs ที่ได้ (passage 2) มาเพาะเลี้ยงใน T-25 Flask ที่ความหนาแน่นของเซลล์ 1×10^5 เซลล์/well ในน้ำยา DMEM ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin และสารสกัดจากเกสรบัวด้วย Methanol ที่ความเข้มข้นที่ 0.0001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml และ 1 mg/ml ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5%CO₂ in air

การศึกษาการเจริญเติบโตของเซลล์โดยใช้วิธี 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay

นำ Mesenchymal stem cell จำนวน 1×10^4 cells มาเลี้ยงใน 96-well plates ด้วยน้ำยา DMEM 180 µl ที่มี 2mM L-glutamine 10% FBS และ 100 U/ml penicillin 100 µg/ml streptomycin ที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นใส่สารสกัดจากเกสรบัวด้วย *n*-hexane และ Methanol ที่ความเข้มข้น 0.0001 mg/ml, 0.001 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.1 mg/ml และ 1 mg/ml แล้วเลี้ยงต่อ 24 ชั่วโมงที่อุณหภูมิ 37°C ในบรรยากาศที่มี 5% CO₂ in air 24 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยง มาล้างด้วย phosphate buffer saline (PBS) 3 ครั้ง แล้วใส่ 100µl ของ 0.5 mg/ml MTT solution 1x phosphate

buffer saline นำเข้าสู่ incubator อีก 3 ชั่วโมง เมื่อครบ 3 ชั่วโมงนำสารละลาย MTT ออกแล้วเติม DMSO 100 μ l ที่ละลายใน blue-violet crystals นำถาดเลี้ยงเซลล์มาเขย่าที่ 200 rpm 15 นาทีแล้วนำมาวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm โดย Microplate Reader วิเคราะห์หาร้อยละของเซลล์ที่มีชีวิตที่เลี้ยงในสารสกัดจากเกสรบัวต่อกลุ่มควบคุมที่ไม่ได้เลี้ยงในสารสกัดจากเกสรบัว ดังรูปที่ 11



รูปที่ 11 แสดงวิธีการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ MSCs ในสารสกัดบัวที่ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน

สถิติและการวิเคราะห์

ข้อมูลที่ได้ถูกวิเคราะห์เชิงปริมาณด้วยค่าเฉลี่ย (mean) และส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน (standard error of mean) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ ANOVA โดยค่า P-Value ที่น้อยกว่า 0.05 จึงถูกจัดว่ามีความสำคัญทางสถิติ

บทที่ 4

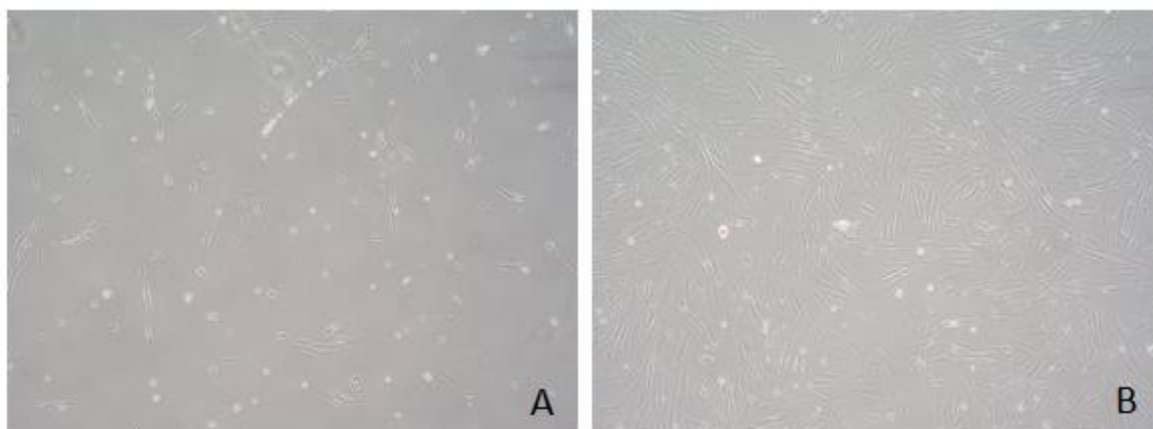
ผลการทดลอง

ผลการทดลอง

การคัดแยกและการเพาะเลี้ยง MSCs จากสายสะดือ

ในการศึกษาครั้งนี้ ผู้วิจัยสามารถคัดแยก MSCs จากเนื้อเยื่อของสายสะดือ จากกลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 5 ตัวอย่าง ซึ่งได้รับการสนับสนุนแหล่งตัวอย่างจากบริษัท Greater Pharma Stem Cell for Life จำกัด ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ สวทช. กระทรวงวิทยาศาสตร์

MSCs จากสายสะดือที่เพาะเลี้ยงไว้มีลักษณะเรียวยาว หัวแหลมท้ายแหลมคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast-like cell) เช่นเดียวกับ MSCs ที่ได้จากไขกระดูก (รูปที่ 12)



รูปที่ 12 แสดงลักษณะของ MSCs สายสะดือ ที่เพาะเลี้ยงไว้ในวันที่ 3 (A) และวันที่ 7 (B) ตามลำดับ (กำลังขยาย 40 เท่า)

ผลการศึกษาความสามารถในการเกิด colony พบว่า MSCs ที่คัดแยกจากสายสะดือมีความสามารถในการเกิด colony ได้ในวันที่ (7.6 ± 1.52) วัน ไม่แตกต่างกับ MSCs ที่คัดแยกได้จากไขกระดูก (8.2 ± 1.3) วัน ซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมตามลำดับ (รูปที่ 13) อย่างไรก็ตามความสามารถในการเกิด colony ของ MSCs จากสายสะดือ ไม่แตกต่างจาก MSCs จากไขกระดูกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p=0.5$ และ 0.08 ตามลำดับ)

Table

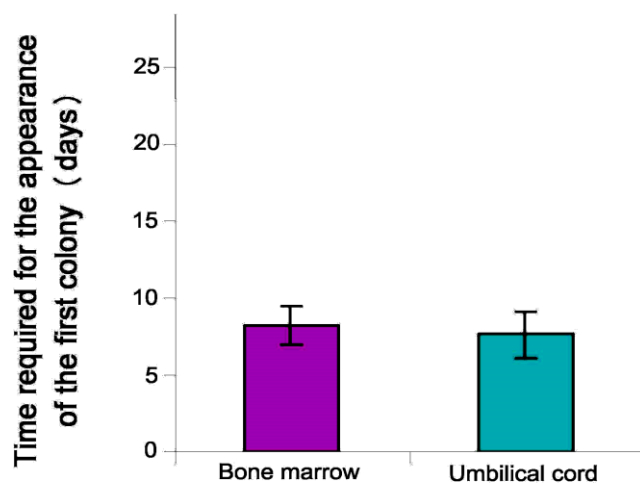
The onset of colony formation

Source of MSC	Time (days)	<i>P</i> -value
Bone marrow	8.2±0.75	-
Umbilical cord	7.6±0.88	0.521

Values are presented as mean ±SEM.

* $p < 0.05$ significantly different compared to control (bone marrow)

ตารางที่ 2 เปรียบเทียบการ colony formation ของ MSC ที่ได้จากไขกระดูกและสายสะดือ

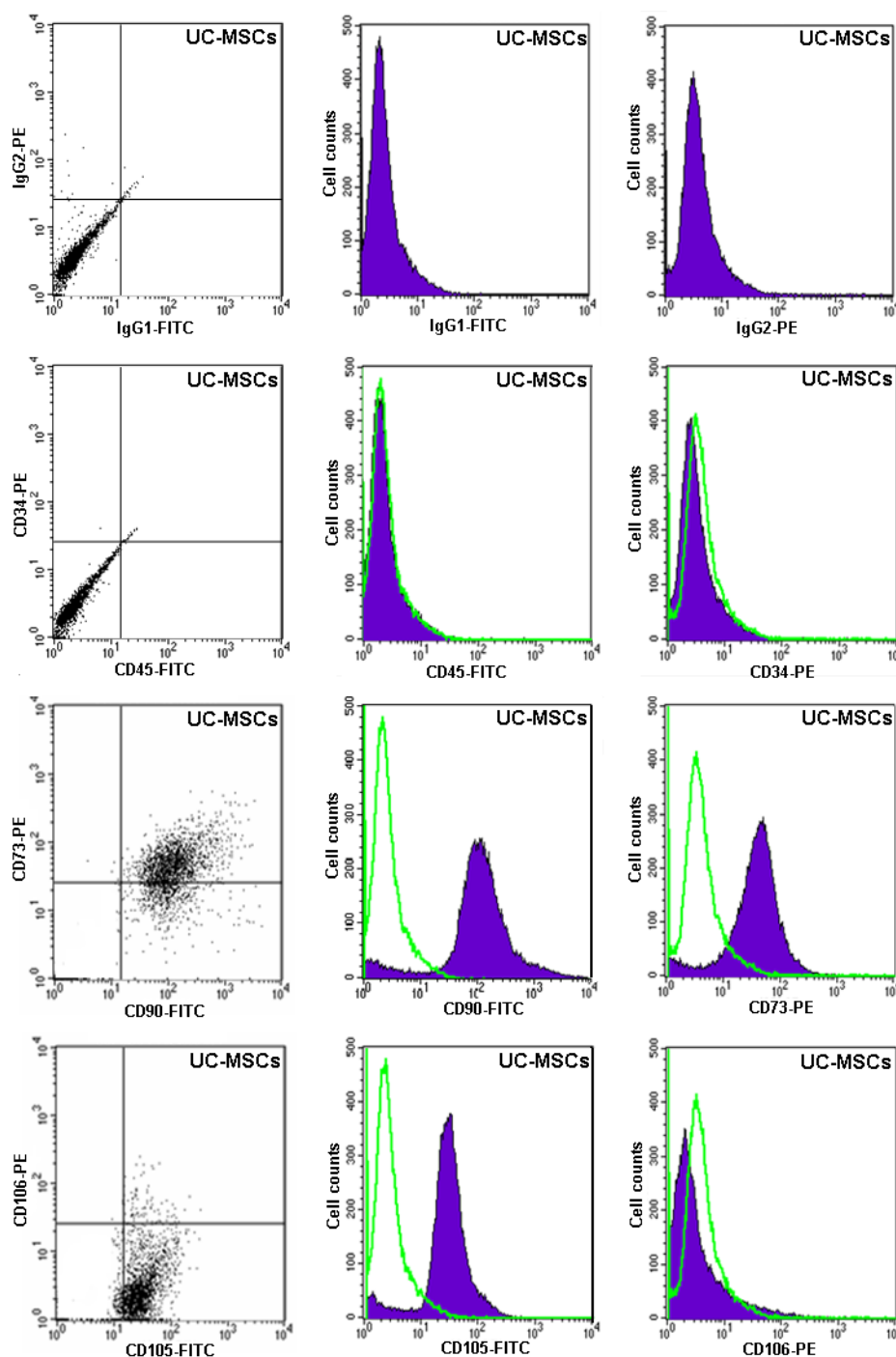


รูปที่ 13 แผนภูมิเปรียบเทียบความสามารถในการเกิด colony ของ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูกและสายสะดือ

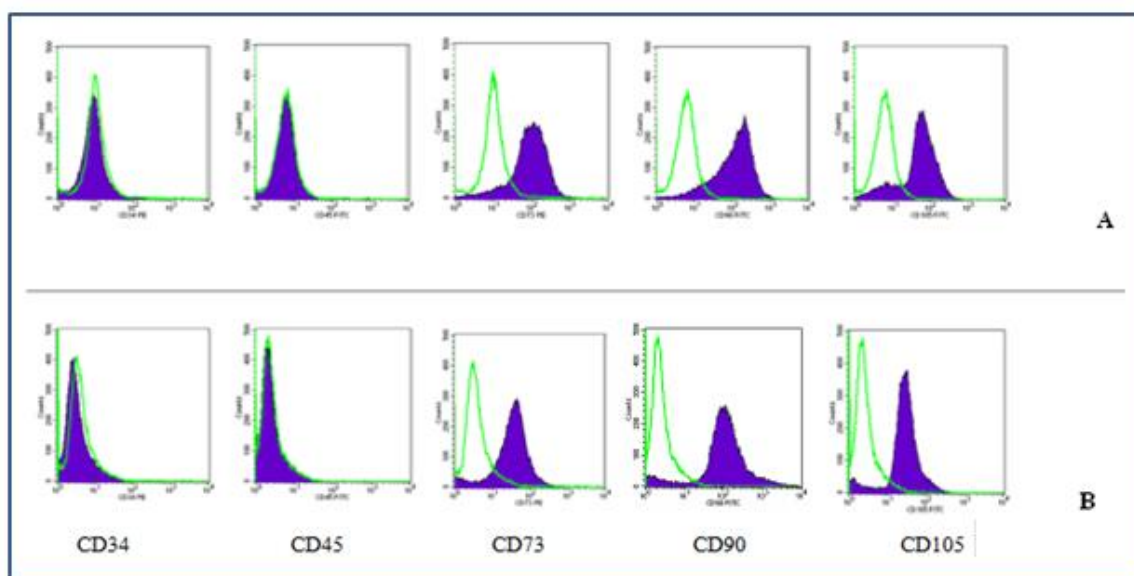
การแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs

เมื่อนำเซลล์ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน passage ที่ 2 - 5 มาศึกษาคุณสมบัติของ MSCs โดยศึกษาการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs พบว่า เซลล์ที่ได้จากสายสะดือมีการแสดงออกของ

CD73 CD90 และ CD105 คิดเป็น 88.70, 90.16 และ 87.91% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างจากเซลล์ที่ได้จากไขกระดูกที่มีการแสดงออกของ CD73 CD90 และ CD105 คิดเป็น 81.50, 89.63 และ 79.71 % ตามลำดับ นอกจากนี้ ยังพบว่าเซลล์ที่ได้จากสายสะดือไม่มีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ hematopoietic cells เช่นเดียวกับ MSCs ที่ได้จากไขกระดูก (รูปที่ 15)



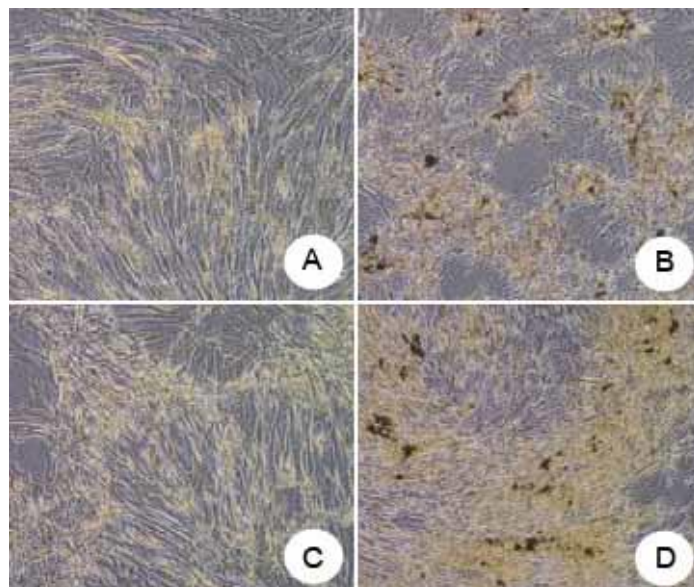
รูปที่ 14 แสดงผลการตรวจหาลักษณะเฉพาะบนผิวเซลล์ของ UC-MSC (passage 2) ด้วยเครื่อง Flow cytometer ที่เขียวแสดง negative control



รูปที่ 15 แสดงผลการทดสอบการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ MSCs ด้วย Flow Cytometry (A) MSCs จากไขกระดูก (B) MSCs จากสายสะดือ

ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์กระดูก

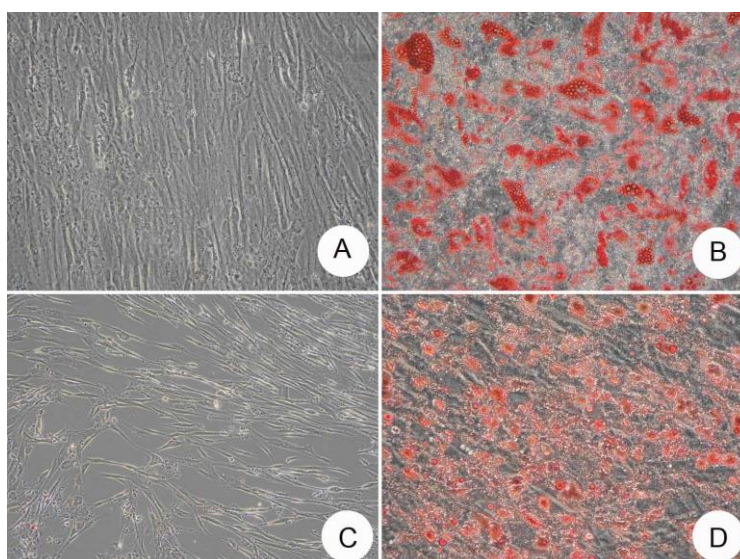
เมื่อนำ MSCs ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน passage ที่ 3 มาทดสอบความสามารถในการพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก พบว่า MSCs ที่ได้จากสายสะดือ ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา NH OsteoDiff มีความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์กระดูก (รูปที่ 16) เมื่อนำเซลล์ดังกล่าวมาทดสอบการทำงานของเอนไซม์ alkaline phosphatase พบว่ามีตะกอนสีน้ำตาลเข้มเกิดขึ้นในไซโตพลาซึมของเซลล์ เช่นเดียวกับ MSCs จากไขกระดูกที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา NH OsteoDiff (รูปที่ 16) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า MSCs ที่ได้จาก สายสะดือมีความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูก ไม่แตกต่างจาก MSCs ที่ได้จากไขกระดูก



รูปที่ 16 แสดงการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์กระดูก กลุ่มควบคุม: MSCs จากไขกระดูก (A) และสายสะดือ (C) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา DMEM กลุ่มทดลอง: MSCs จากไขกระดูก (B) และสายสะดือ (D) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา NH OsteoDiff (กำลังขยาย 40 เท่า)

ความสามารถในการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์ไขมัน

เมื่อนำ MSCs ที่เพาะเลี้ยงไว้ใน passage ที่ 3 มาทดสอบความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน พบว่า MSCs ที่ได้จากสายสะดือที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา NH AdipoDiff มีความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ที่มีลักษณะคล้ายเซลล์ไขมัน โดยเซลล์ดังกล่าวมีการสร้าง lipid droplet ซึ่งย้อมติดสีแดงของ Oil Red O เช่นเดียวกับ MSCs จากไขกระดูก (รูปที่ 17) ผลการทดลองนี้แสดงให้เห็นว่า MSCs ที่ได้จากสายสะดือมีความสามารถในการเจริญพัฒนาเป็นเซลล์ไขมัน เช่นเดียวกับ MSCs ที่ได้จากไขกระดูก



รูปที่ 17 แสดงการเจริญพัฒนาของ MSCs เป็นเซลล์ไขมัน กลุ่มควบคุม: MSCs จากไขกระดูก (A) และสายสะดือ (C) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา DMEM กลุ่มทดลอง: MSCs จากไขกระดูก (B) และสายสะดือ (D) ที่เพาะเลี้ยงในน้ำยา NH AdipoDiff (กำลังขยาย 40 เท่า)

การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการคัดแยกและเพิ่มจำนวน MSCs จากสายสะดือซึ่ง MSCs ที่คัดแยกจากแหล่งดังกล่าว มีคุณสมบัติของ MSCs เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก คือ

1.MSCs จากแหล่งดังกล่าว สามารถยึดติดพลาสติกของจานเพาะเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก

2.MSCs ที่ได้จากแหล่งดังกล่าวมีรูปร่างยาวรีว ลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาส เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกได้จากไขกระดูก

3.MSCs จากแหล่งดังกล่าวมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะต่อ MSCs ได้แก่ CD73 CD90 และ CD105 และไม่มีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ hematopoietic cells เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก 4) MSCs ที่ได้จากแหล่งดังกล่าวสามารถที่จะเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันได้ เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่คัดแยกได้จากสายสะดือ มีคุณสมบัติของ MSCs เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกได้จากไขกระดูก

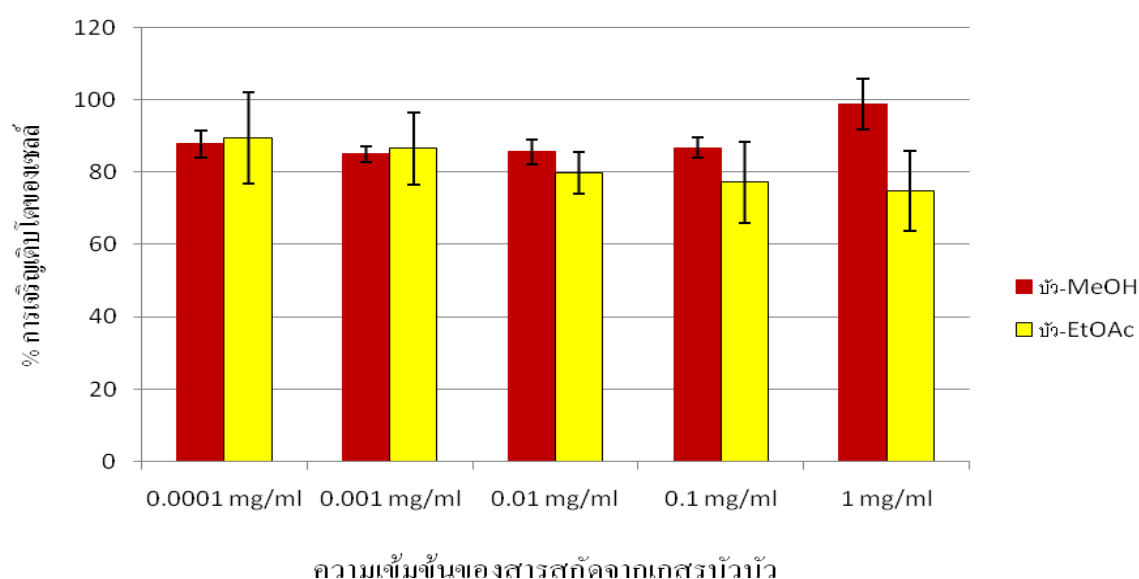
ผลการศึกษาครั้งนี้สรุปได้ว่า MSCs ที่ได้จากสายสะดือมีคุณสมบัติของ MSCs ไม่แตกต่างจาก MSCs ที่ได้จากไขกระดูกซึ่งเป็นแหล่งมาตรฐานที่ใช้ทางคลินิกในปัจจุบัน และที่สำคัญ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สายสะดือ เป็นแหล่งของ MSCs ที่มีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ในทางคลินิกทดแทน MSCs จากไขกระดูกเนื่องจาก MSCs จากแหล่งดังกล่าวมีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับ MSCs ที่ได้จากไขกระดูก นอกจากนี้การคัดแยก MSCs จากแหล่งดังกล่าวยังไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดรวมทั้งไม่มีข้อจำกัดในด้านจำนวนของ MSCs ที่ต้องการนำไปใช้อีกด้วย ดังนั้นการทดลองนี้จึงใช้ MSCs ที่ได้จากสายสะดือเป็นตัวแทนของเซลล์ต้นกำเนิดของร่างกายในการทดสอบกับสารสกัดจากเกสรบัว

ผลของการเลี้ยงเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารสกัดบัว

จากการทดลองพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน methanol มีความสามารถละลายในน้ำได้ดีกว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate โดยพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน methanol ที่ความเข้มข้น 1 mg/ml มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 98.90 ± 7.08 % และพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate ความเข้มข้น 0.0001 mg/ml มีการเจริญเติบโตได้ดีที่สุดคือ 89.51 ± 12.73 % ดังตารางที่ 3

สารสกัดเกสรบัว/ ความเข้มข้น	% Growth of Mesenchymal stem cell				
	0.0001 mg/ml	0.001 mg/ml	0.01 mg/ml	0.1 mg/ml	1 mg/ml
บัว- MeOH	87.85 ± 3.77	85.08 ± 2.21	85.64 ± 3.31	86.74 ± 2.78	98.90 ± 7.08
บัว-EtOAc	89.51 ± 12.73	86.52 ± 9.89	79.78 ± 5.79	77.15 ± 11.24	74.91 ± 11.08

ตารางที่ 3 แสดงการเจริญเติบโตของ mesenchymal stem cell ในสารสกัดบัวชนิดต่างๆ ที่ความเข้มข้นต่างกัน



รูปที่ 18 แสดงเปรียบเทียบการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell ในสารสกัดเกสรบัวในสารละลาย methanol (บัว-MeOH) และสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate (บัว-EtOAc) ในความเข้มข้นต่าง ๆ

จากการศึกษาในครั้งนี้พบว่าสารสกัดเกสรบัวใน Methanol มีความสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate และพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน Methanol ที่ความเข้มข้น 0.01-1 mg/ml เซลล์ต้นกำเนิดมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้นการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า สารสกัดเกสรบัวที่สามารถละลายน้ำได้ดี มีความสามารถช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell

บทที่ 5

สรุปผลการทดลอง

การศึกษาในครั้งนี้ ผู้วิจัยประสบความสำเร็จในการคัดแยกและเพิ่มจำนวน MSCs จากสายสะดือ ซึ่ง MSCs ที่คัดแยกจากแหล่งดังกล่าว มีคุณสมบัติของ MSCs เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก คือ 1) MSCs จากแหล่งดังกล่าว สามารถยึดติดพลาสติกของจานเพาะเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก 2) MSCs ที่ได้จากแหล่งดังกล่าวมีรูปร่างยาวรียาว ลักษณะคล้ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกได้จากไขกระดูก 3) MSCs จากแหล่งดังกล่าวมีการแสดงออกของโมเลกุลบนผิวเซลล์ซึ่งจำเพาะต่อ MSCs ได้แก่ CD73 CD90 และ CD105 และไม่มีการแสดงออกของ CD34 และ CD45 ซึ่งเป็นโมเลกุลบนผิวเซลล์ที่จำเพาะต่อ hematopoietic cells เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก 4) MSCs ที่ได้จากแหล่งดังกล่าวสามารถที่จะเจริญพัฒนาเป็นเซลล์กระดูกและเซลล์ไขมันได้ เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก จากคุณสมบัติดังกล่าวข้างต้น แสดงให้เห็นว่า เซลล์ที่คัดแยกได้จากสายสะดือและ Wharton's jelly มีคุณสมบัติของ MSCs เช่นเดียวกับ MSCs ที่คัดแยกได้จากไขกระดูก

การศึกษาระยะเวลาในการเกิด colony ของ MSCs ที่คัดแยกจากสายสะดือเปรียบเทียบกับ MSCs ที่คัดแยกจากไขกระดูก พบว่า MSCs ที่คัดแยกจากสายสะดือมีระยะเวลาในการเกิด colony สั้นที่สุด รองลงมาได้แก่ ไขกระดูก ข้อมูลดังกล่าวสอดคล้องกับผลการศึกษาการเพิ่มจำนวนของ MSCs จากแหล่งดังกล่าว โดยพบว่า MSCs ที่ได้จากสายสะดือมีอัตราการเพิ่มจำนวนเร็วที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับ MSCs ที่ได้จากไขกระดูก อย่างไรก็ตาม MSCs ที่ได้จากสายสะดือ ใน passage ที่ 3 มีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนไม่แตกต่างกัน เมื่อพิจารณาถึงประโยชน์ในด้านแหล่งทางเลือกของ MSCs ที่จะนำไปใช้ในทางคลินิกแล้ว พบว่าการเลือกใช้ MSCs ใน passage ต้นๆ น่าจะเป็นทางเลือกที่ดีกว่าการใช้ MSCs ใน passage หลังๆ เนื่องจากการใช้เซลล์ใน passage ต้นๆ จะช่วยประหยัดเวลารวมทั้งค่าใช้จ่ายในการเพาะเลี้ยงเซลล์ และรวมทั้งช่วยลดโอกาสเสี่ยงในการเกิดการผ่าเหล่า (mutation) ที่อาจจะเกิดขึ้นได้เมื่อเพาะเลี้ยง MSCs ในห้องปฏิบัติการเป็นระยะเวลานาน ด้วย ผลการศึกษาในขั้นแรกพบว่า MSCs ที่ได้จากสายสะดือมีคุณสมบัติของ MSCs ไม่แตกต่างจาก MSCs ที่ได้จากไขกระดูกซึ่งเป็นแหล่งมาตรฐานที่ใช้ทางคลินิกในปัจจุบัน และที่สำคัญ การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สายสะดือ เป็นแหล่งของ MSCs ที่มีศักยภาพสำหรับนำไปใช้ในทางคลินิกทดแทน MSCs จากไขกระดูกเนื่องจาก MSCs จากแหล่งดังกล่าวมีอัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วเมื่อเปรียบเทียบกับ MSCs ที่ได้จากไขกระดูก นอกจากนี้การคัดแยก MSCs จากแหล่งดังกล่าวยังไม่ก่อให้เกิดความเจ็บปวดรวมทั้งไม่มีข้อจำกัดในด้านจำนวนของ MSCs ที่ต้องการนำไปใช้อีกด้วย

จากผลการทดลองดังกล่าวผู้วิจัยจึงใช้เซลล์ต้นกำเนิดที่ได้จากสายสะดือมาเป็นตัวแทนของเซลล์ต้นกำเนิดของร่างกายเพื่อใช้ทดสอบความสามารถในการเจริญเติบโตของเซลล์ที่ได้รับใส่สารสกัดจากเกสรบัวในสารละลาย Methanol และ Ethyl acetate จากการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสารสกัดในเกสรบัว (Lotus

Stamen Extract) ช่วยในช่วยในการต่อต้านอนุมูลอิสระ ลดริ้วรอยก่อนวัย ลดรอยแดงของผิว ทำให้ผิวพรรณ เปล่งปลั่ง โดยพบว่าสารสกัดในเกสรดอกบัวหลวงประกอบไปด้วยสารพฤษเคมีที่สำคัญคือ kaempferol , kaempferol 3- D-glucopyranoside, sitosterol-3- D- glucopyranoside ส่วนใหญ่เป็นสารที่ให้ค่าความเข้มข้นของสาร ที่สามารถยับยั้งปฏิกิริยาเริ่มต้นได้ดี เท่ากับวิตามินอี โดยมีคุณสมบัติในการกำจัดอนุมูลอิสระ กระตุ้นการสร้างเซลล์ใหม่ และช่วยในการผลิตเซลล์ผิว ช่วยในการยับยั้งเอนไซม์ไทโรซิเนสที่เป็นสาเหตุของผิวคล้ำ ฝ้า จุดด่างดำ (ชยันต์ และคณะ,2547) ดังนั้นผู้วิจัยจึงต้องการทดลองพิสูจน์ว่าสารสกัดบัวมีผลต่อการเจริญเติบโตของเซลล์หรือไม่ และผลการทดลองพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน Methanol มีความสามารถละลายน้ำได้ดีกว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate และพบว่าสารสกัดเกสรบัวใน Methanol ที่ความเข้มข้น 0.01-1 mg/ml เซลล์ต้นกำเนิดมีการเจริญเติบโตได้ดีกว่าสารสกัดเกสรบัวใน Ethyl acetate ที่ความเข้มข้นเท่ากัน ดังนั้นการทดลองนี้จึงสรุปได้ว่า สารสกัดเกสรบัวที่สามารถละลายน้ำได้ดี มีความสามารถช่วยในการเจริญเติบโตของเซลล์ต้นกำเนิดชนิด Mesenchymal stem cell จากผลการทดลองดังกล่าวเป็นข้อมูลที่ช่วยในการพิสูจน์ว่าสารสกัดจากเกสรบัวช่วยในการดูแลเซลล์ ช่วยให้เซลล์เจริญเติบโตได้ ซึ่งผลการทดลองดังกล่าวมีประโยชน์อย่างยิ่งต่อการนำสารสกัดจากเกสรบัวเพื่อใช้ทางเภสัชวิทยาไม่ว่าจะเป็นยาภายนอกหรือภายใน รวมถึงการนำไปเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางเพื่อช่วยให้เซลล์ผิวมีความแข็งแรงต่อไป

บรรณานุกรม

- นนานการ์เด็นท์. ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของบัวหลวง (ออนไลน์) 2553.
- วันดี ถยณพนธ์. 2536. เกษษวินิจฉัยยาและผลิตภณฑจากธรรมชาติ. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.
- ปิยะวดี เจริญวัฒนะ, สุมนา ปานสมุทร, ดำรง คงสวัสดิ์, อำนวย เพชรประไพ. 2552.การศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งจุลินทรีย์ของสารสกัดจากบัวหลวง.คณะเทคโนโลยีการเกษตรและคณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี ปทุมธานี.
- วิมา จิรจรรย์กุล. 2534. ยาและผลิตภณฑจากธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.
- เศรษฐมนันต์ กาญจนกุล. 2551. ร้อยพรรณพฤกษา บัว. สำนักพิมพ์เศรษฐศิลป์ กรุงเทพฯ.
- สถาบันการแพทย์แผนไทย กระทรวงสาธารณสุข. สารเคมีในพืชสมุนไพร (ออนไลน์) 2553.
- สถาบันเทคโนโลยีพระจอมเกล้าเจ้าคุณทหารลาดกระบัง. บัวพืชมหัศจรรย์ (ออนไลน์) 2553.
- เสริมลาภ วสุวัต. 2549. บัวประดับในประเทศไทย 2. เนชั่นบุ๊คส์.กรุงเทพฯ. สุชาดา ศรีเพ็ญ. 2540. พรรณไม้น้ำ. ภาควิชาพฤกษศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, กรุงเทพฯ
- อรอุมา ภูประเสริฐ. 2547. การประยุกต์ใช้นิวเคลียร์แมกเนติกเรโซแนนซ์ในการพิสูจน์โครงสร้างของอินทรีย์สาร. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร นครปฐม.
- อ้อมบุญ ล้วนรัตน์. 2536. การสกัดและการตรวจสอบสารสำคัญจากผลิตภณฑธรรมชาติ. ภาควิชาเภสัชวินิจฉัย คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล กรุงเทพฯ.
- Agnihotri, V.K., Elsohly,H.N., Khan, S.I.,Jacob, M.R.,Joshi,V.C.,Smillie,T., Khan, I.A., and Walker,L.A. 2008. Constituents of *Nelumbo nucifera* leaves and their antimalarial and antifungal activity.-hytochemical Letters1: 89-93
- Boonpisuttinant K, Manosroi A, Rahmat D, and Monosroi J, 2012. Enhancement of *in vitro* membrane permeation and anti-proliferative on cancer cell lines of aqueous extracts from Thai anti-cancer medicinal plants by entrapping in chitosan and chitosan-TGA nanoparticles”, Journal of Advance Science Letters 17, 206-216.
- Deans RJ, Moseley AB. 2000. Mesenchymal stem cells: biology and potential clinical uses. Exp Hematol 28: 875-884.
- Daru, M. E.,Cakir, A.,Kordali,S., Zengin,H.,Harmandar, M., Isumi, S. and Hirata,T. 2003. Chemical composition and antifungal properties of essential oils of three Pistacia species.

- Hu, J-N., Shan, B., Deng, Z-Y., Li, J., Fan, Y-W., Ruan, Z., and Liu, R. 2010. Application of High-speed Counter-current Chromatography for the Isolation of 5 Alkaloids from Lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn.) Leaves. Food Sci. Biotechnol. 19(6): 1661-1665.
- Jung, H.A., Kim, J.E., Chung, H.Y., and Choi, J.S. 2003. Antioxidant Principles of *Nelumbo nucifera* Stamens. Arch Pharm Res 26(4): 279-285.
- Le Blanc K, Ringden O. 2006. Mesenchymal stem cells: properties and role in clinical bone marrow transplantation. Curr Opin Immunol; 18: 586-591.
- Le Blanc K. 2003. Immunomodulatory effects of fetal and adult mesenchymal stem cells. Cytotherapy; 5: 485-489.
- Liao, C-H., Guo, S-J., Lin, J-Y. 2011. Characterisation of the chemical composition and in vitro anti-inflammation assessment of a novel lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) plumule polysaccharide Food Chemistry 125: 930-935.
- Li, M. and Xu. Z. 2008. Quercetin in Lotus Leaves Extract may be responsible for antibacterial activity . Arch Pharm Res Vol. 31. No. 5: 640-644.
- Lu LL, Liu YJ, Yang SG, Zhao QJ, Wang X, Gong W, Han ZB, Xu ZS, Lu YX, Liu D, Chen ZZ, Han ZC. 2006. Isolation and characterization of human umbilical cord mesenchymal stem cells with hematopoiesis-supportive function and other potentials. Haematologica; 91: 1017-1026.
- Mueller SM, Glowacki J. 2001. Age-related decline in the osteogenic potential of human bone marrow cells cultured in three-dimensional collagen sponges. J Cell Biochem; 82: 583-590.
- Nishida S, Endo N, Yamagiwa H, Tanizawa T, Takahashi HE. 1999. Number of osteoprogenitor cells in human bone marrow markedly decreases after skeletal maturation. J Bone Miner Metab; 17: 171-177.
- Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. 1999. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. Science 284: 143-147.
- Phonkot, N., Wangsomnuk, P., and Aromdee, C. 2008. Antioxidant activity and DNA fingerprint of four varieties of lotus stamens (*Nelumbo nucifera* Gaertn.). Songklanakarin J Sci Technol 30 (1) : 55-58.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S.J., and Shahabimajd, N. 2006. Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. African Journal of Biotechnology. 5(11): 1142-1145.

- Romanov YA, Svintsitskaya VA, Smirnov VN. 2003. Searching for alternative sources of postnatal human mesenchymal stem cells: candidate MSC-like cells from umbilical cord. *Stem Cells*; 21: 105-110.
- Sakakibara, Hiroyuki; Honda, Yoshinori; Nakagawa, Satoshi; Ashida, Hitoshi; Kanazawa, Kazuki .2003. "Simultaneous Determination of All Polyphenols in Vegetables, Fruits, and Teas". *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51** (3): 571–81.
- Stenderup K, Justesen J, Clausen C, Kassem M. 2003. Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*; 33: 919-926.
- Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. 2004. Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*; 22: 1330-1337.
- Yang, D., Wang, Q., Ke, L., Jiang, J. and Ying, T. 2007. Antioxidant activities of various extracts of lotus (*Nelumbo nucifera* Gaertn) rhizome. *Asia Pac J Clin Nutr* 16 (suppl 1): 158-163.

ประวัติ

ชื่อ-สกุล	ดร.ศุภเดช ไร่ไพศาล Supadej Rojphrisarn, Ph.D. Supadej_buta@hotmail.co.th
ตำแหน่ง	อาจารย์สอนวิทยาศาสตร์การแพทย์ ปรีคลินิก
สถานที่ทำงาน	วิทยาลัยการแพทย์แผนไทย มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลธัญบุรี
การศึกษา	
Apr. 2000	M.Sc. Medical Science, Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Thailand.
May. 2008	Ph.D. Medical Science (Cell and Molecular Biology : Stem Cell), Faculty of Medicine, Thammasart University, Thailand.
ประสบการณ์ทำงาน	
1994-2004	Medical Science Educator, Boromarajonani College of Nursing, Nopparat Vajira Bangkok, Praboromarajchanok Institute, Ministry of Public Health, Thailand.
2004-2009	Research Assistance and study in Ph.D. Medical Science (Cell and Molecular Biology : Stem Cell), Faculty of Medicine, Thammasart University, Thailand. Laboratory work (stem cells) at Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University.
2007-2008	Short course study : Stem cell biology, The University of Sheffield, England.
2009-2010	Research Assistance (Stem Cell Biology), Faculty of Medicine, Siriraj Hospital, Mahidol University and Faculty of Medicine, Thammasat University Medical Science Educator, Siam university