บทที่ 2
ปริทัศน์วรรณกรรม

2.1 ข้อมูลทั่วไปของยอ (สำนักงานพัฒนาเศรษฐกิจจากฐานชีวภาพ องค์การมหาชน, 2552)

ชื่อวิทยาศาสตร์	*Morinda citrifolia* Linn.
ชื่อวงศ์	Rubiaceae
ชื่ออังกฤษ	INDIAN MULBERRY, NONI
ชื่อท้องถิ่น	มะตาเสือ (ภาคเหนือ), ยอบ้าน (ภาคกลาง), แยใหญ่ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน)
การแพร่กระจาย	ปลูกให้ร่มเงาได้ในสวนทั่วไปหรือสวนสมุนไพร ดอกมีกลิ่นหอม

ลักษณะทั่วไป

ลำต้น: ไม้ต้นขนาดเล็กถึงขนาดกลาง สูง 4-25 m ผลัดใบ เรือนยอดเป็นพุ่มกลมรี ตามก้านและกิ่งอ่อนมีขนนุ่มทั่วไป ลำต้นมักคดงอ เปลือกสีเทาปนน้ำตาล แตกเป็นสะเก็ดเล็กตามความยาวลำต้น

ใบ: ใบเดี่ยว เรียงตรงข้ามสลับตั้งฉาก ใบรูปไข่กลับหรือรูปไข่แกมรูปขอบขนาน กว้าง 4-11 cm ยาว 8-23 cm ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่งแหลม โคนใบคอดและสอบไปสู่ก้านใบหรือบิดเบี้ยว ผิวใบด้านบนมีขนสากประปราย ด้านล่างมีขนนุ่มหนา ขอบใบเป็นคลื่นเส้นแขนงใบข้างละ 6-10 เส้น ก้านใบยาว 1.5-3 cm

ดอก: สีขาว มีกลิ่นหอม ออกเป็นช่อแบบช่อกระจุกแน่นติดกันเป็นก้อนกลมหรือเบี้ยว ตามปลายกิ่งหรือซอกใบ กลีบเลี้ยงเชื่อมติดกันเป็นหลอด กลีบดอกเชื่อมติดกันเป็นรูปแจกันทรงสูง ปลายแยกเป็น 5 แฉก ดอกบานเต็มที่กว้าง 2-2.5 cm

ผล: ผลรวมสีเขียว ทรงบิดเบี้ยวหรือกลม ขนาด 2-3 cm ผิวนอกผลเป็นปุ่มปมมีขน เนื้อเยื่อข้างในสีขาวมีน้ำมาก ก้านผลมีขนสั้นนุ่มยาว 1.5 cm เมล็ดบิดเบี้ยว ไม่มีปีก

2.2 สรรพคุณด้านสมุนไพรของใบยอ

เป็นเวลากว่า 2,000 ปีมาแล้วที่มนุษย์ได้รู้จักการใช้ประโยชน์จากส่วนต่างๆ ของต้นยอ เช่น ผลและใบใช้เป็นอาหาร เปลือกและรากใช้เป็นสีย้อม มีรายงานว่าเกือบทุกส่วนของพืชชนิดนี้ไม่ว่าจะเป็นผล ใบ เมล็ด เปลือก และราก ใช้เป็นยาสมุนไพรในการป้องกันและรักษาอาการปวดข้อหรือข้ออักเสบ ภาวะติดเชื้อ แก้ไข้หวัด มะเร็ง และเบาหวาน (Wang, et al., 2002)

รูป 2-1 ลักษณะใบและผลยอบ้าน (*Morinda citrifolia* Linn.) (Trade Winds Fruit, 2011)

คนไทยใช้ "ใบยอ" เป็นผักแกล้ม และใช้เป็นส่วนประกอบของอาหารหลายอย่างมานานแล้ว เช่น ห่อหมก แกงอ่อม และแกงกะทิ นอกจากนี้ยังใช้ประโยชน์จากใบยอบ้านในสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น แก้ท้องร่วง แก้จุกเสียด แก้บิด แก้คลื่นเหียน ฆ่าเหา และ ขับประจำเดือน และมีสรรพคุณบางประการที่อาจมีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แก้โรคเก๊าท์ แก้ปวดตามนิ้วมือ นิ้วเท้า แก้ม้ามโต บำรุงธาตุ แก้ไข้ และแก้ไอ (นันทวรรณ บุณยะประภัทร, 2543)

ใบยอได้รับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพในประเทศญี่ปุ่นและอเมริกามานานกว่า 10 ปีแล้ว โดยใช้ในรูปแบบชาชง (infusions) นอกจากนี้ยังมีรูปแบบแคปซูลบรรจุผงใบยอ โดยมีแหล่งวัตถุดิบส่วนใหญ่จาก French polynesia ซึ่งมีการประเมินความปลอดภัย (West et al., 2007) แหล่งวัตถุดิบอื่น ได้แก่ Panama, Fiji และ Hawaii

2.3 พฤกษเคมีของยอ

ใบยอประกอบด้วยสารในกลุ่ม terpenoids, phytosterols, fatty acid (Takashima, et al. 2007) iridoids, flavonol, anthraquinones และอนุพันธ์ glycosides ของสารเหล่านี้ (Sang, et al. 2001; Sang, et al. 2003; Takashima, et al. 2007) โดยมีสารประกอบในกลุ่ม flavonol glycosides เป็นสารองค์ประกอบหลักที่แยกได้จากใบยอ (Sang, et al. 2001)

Takashima และคณะ (2007) สกัดใบยอด้วย methanol และนำไปแยกสกัดโดยใช้ alkaline ethylacetate และ acidic ethylacetate พบ citrifoside ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม

iridoid glycosides และ 1,5,15-trimethylmorindol ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม anthraquinones นอกเหนือจากสารประกอบในใบยออีก 24 ชนิดที่ได้มีรายงานไว้แล้ว

นอกจากนี้ยังมีรายงานการแยก fration ของสารสกัดจากใบยอโดย Zin และคณะ (2006) ซึ่งรายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณ phenolics ใน methanolic fraction ส่วนต่างๆ ที่แยกสกัดจากใบยอ (สมมูลกับปริมาณ catechin) พบว่าแต่ละ fraction มีปริมาณ phenolic แตกต่างกัน และมีปริมาณมากกว่าใน fractions ที่แยกได้จากส่วนผลและราก

ในปี 2008 Deng และคณะ รายงานผลการวิเคราะห์ปริมาณสารองค์ประกอบหลักในกลุ่ม flavonols 4 ชนิด จาก ethanolic extract ของใบยอที่สกัดด้วยวิธี percolation คือ rutin, kaempferol-3-*O*-α-l-hamnopyranosyl-(1⟶6)-β-d-glucopyranoside, quercetin และ kaempferol ด้วยเทคนิค HPLC-UV/MS ว่าเป็นเทคนิคที่ง่าย มีความจำเพาะในการวิเคราะห์ และพบว่าปริมาณ flavonoids ทั้ง 4 ชนิดในใบยออยู่ในช่วงประมาณ 1.16-371.6 mg/100 g ของน้ำหนักใบแห้ง และในปีเดียวกันนี้ West และ Zhou (2008) ได้แยกสารหอมระเหยจากใบยอโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ โดยใช้ใบยอที่เตรียมโดยการแช่แข็ง ทำให้แห้ง และอบแห้ง วิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่าในน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีส่วนประกอบหลักเป็น palmitic acid และ E-phytol และวิธีการทำแห้งมีผลให้ปริมาณสารหอมระเหยลดลงมากกว่าครึ่ง นอกจากนี้ Zhou และคณะ (2009) ยังได้แยก pyro-pheophorbide, 10-hydroxy-pheophorbide และ pheophorbide จากใบยอโดยใช้เทคนิค chromatography โดย columns ชนิด normal และ reverse phase และวิเคราะห์โครงสร้างสารด้วย NMR spectra และ MS ซึ่งมีฤทธิ์เป็น adenosine A2A receptor agonists และช่วยในการสมานแผลได้

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบยอ

มีรายงานการศึกษามากมายกล่าวถึงฤทธิ์ทางชีวภาพของน้ำสกัดจากผลยอในด้านต่างๆ รวมทั้งผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่น สารประกอบในกลุ่ม polysaccharide ที่ได้จากการสกัดผลยอด้วย ethanol มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง และกระตุ้นภูมิคุ้มกันเมื่อทดสอบในหนูถีบจักร (Hirazumi and Furusawa 1999; Furusawa et al., 2003) มีผลกระตุ้น cannabinoid 2 receptor กดการหลั่ง IL-4 และกระตุ้นการหลั่ง IFN-α (Palu, et al. 2008) ในระยะเวลานับสิบปีที่ผ่านมา น้ำสกัดจากผลยอโดยเฉพาะจากหมู่เกาะตาฮิติได้รับความนิยมในตลาดผลิตภัณฑ์เสริมสุขภาพอย่างมาก เนื่องจากมีสรรพคุณบำรุงร่างกาย และมีคุณค่าทางโภชนาการสูงสามารถรับประทานได้ทั้งแบบน้ำคั้นสดและแบบน้ำลูกยอหมัก ส่วนรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดจากส่วนใบ โดยเฉพาะฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันนั้น พบน้อยกว่ามาก

มีรายงานการวิจัยที่หลายเรื่องกล่าวถึงฤทธิ์ antioxidant ของใบยอไว้ดังนี้ Zin และคณะ (2002) รายงานว่าเมื่อทดสอบฤทธิ์ antioxidant ของใบยอด้วยเทคนิค ferric thiocyanate (FTC)

ใบยอที่สกัดด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ antioxidant ไม่ต่างจาก α-tocopherol แต่ต่ำกว่า BHT ในขณะที่ใบยอที่สกัดด้วย methanol ไม่มีฤทธิ์ฯ เมื่อทดสอบฤทธิ์ antioxidant ด้วยเทคนิค thiobarbituric acid (TBA) ใบยอที่สกัดด้วย ethyl acetate มีฤทธิ์ฯ ไม่ต่างจาก α-tocopherol และ BHT ในขณะที่ใบยอที่สกัดด้วย methanol ไม่มีฤทธิ์ฯ ต่อมาในปี 2006 Zin และคณะได้รายงานผลการศึกษาต่อเนื่องจากงานวิจัยที่เคยรายงานไว้ โดยทำการแยก methanolic fractions จากใบยอเพื่อศึกษาฤทธิ์ antioxidant พบว่า fractions ที่แยกได้ทั้ง 5 ส่วนมีฤทธิ์ antioxidant มากกว่า α-tocopherol แต่ต่ำกว่า BHT เมื่อทดสอบด้วยเทคนิค FTC แต่จะมีผลต่างออกไปเมื่อทดสอบด้วยเทคนิค TBA Zin และคณะ อธิบายว่าอาจเกิดจากความแตกต่างของกลไกการต้านออกซิเดชันเนื่องจากโครงสร้างของสารที่แตกต่างกัน และ synergistic effect ของสารประกอบแต่ละชนิด

ใน ปี 2007 West และคณะรายงานว่าสารสกัดใบยอที่เตรียมโดยการสกัดโดยใช้ความร้อนและใช้น้ำเป็นน้ำยาสกัดมีฤทธิ์ในการขจัดหรือลดความแรงของสารพิษในหนูทดลองได้ ในการทดลองจะให้สารสกัดขนาด 3.2 g/kg ทางปากแก่ Kunming mice เป็นเวลา 7 วันก่อนให้ trichlorfon (ซึ่งเป็นยาฆ่าแมลงในกลุ่ม organophosphates) พบว่ากลุ่มหนูที่ได้รับสารสกัดมีอัตรารอดชีวิตเพิ่มขึ้น 32.6% ผ่านกลไกการเหนี่ยวนำ glutathione S-transferase activity ซึ่งในการทดลองแบบ *in vitro* สารสกัดฯ มีผลเหนี่ยวนำ glutathione S-transferase activity เพิ่มขึ้น 2.5 เท่า (1.665 mg/mL) และผ่านกลไกการต้าน oxidation เนื่องจากพิษของ trichlorfon เกิดจากการทำลายของ free-radical ทั้งนี้ glutathione S-tranferase พบบริเวณผิวหนังด้วย สารสกัดจากใบยอดังกล่าวจึงมีประโยชน์ทั้งในร่างกายและสุขภาพผิว

นอกจากฤทธิ์ anti-oxidant แล้ว ยังมีรายงานฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาอื่นๆ ของใบยอไว้ เช่น Sang และคณะ (2001) รายงานว่า citrifolinin A ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม irridoids จาก butanol fraction ที่แยกมาจาก ethanolic extract ของใบยอมีฤทธิ์ยับยั้ง activator protein-1 (AP-1) ใน cell culture ที่เหนี่ยวนำด้วย UVB ด้วยค่า IC_{50} เท่ากับ 69.6 μM ซึ่งสามารถชะลอภาวะการเกิดหลอดเลือดแข็งตัวได้ ต่อมา Li และคณะ (2003) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านอักเสบของสมุนไพรจากประเทศจีนและ Australia หลายชนิด และรายงานว่า ethanolic extract จากใบยอ Australia มีฤทธิ์ยับยั้ง PGE_2 และ PGD_2 ในระดับปานกลาง (ประมาณ 45%) เมื่อเทียบกับ 0.3 mg/mL aspirin และ 10 μg/mL indomethacin และ ใน ปี 2009 Zhou และคณะรายงานว่า pyro-pheophorbide, 10-Hydroxy-pheophorbide และ pheophorbide ที่แยกได้จากใบยอมีฤทธิ์เป็น adenosine A2A receptor agonists และช่วยในการสมานแผลได้

แม้ว่าจะยังไม่มีงานวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของใบยอที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันมากนัก แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีรายงานวิจัยมากมายกล่าวถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบในกลุ่ม flavonoids ที่พบในพืชชนิดต่างๆ รวมทั้งในใบยอ เช่น rutin, quercetin และ kaempferol ซึ่งใช้เป็นสารอ้างอิงในงานวิจัยนี้ ว่ามีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาหลากหลาย รวมถึง

ฤทธิ์ที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ฤทธิ์ต้านอักเสบ ของ flavonoids หลายชนิดที่พบใน ethanolic extract จาก propolis จากรังผึ้ง รวมทั้ง quercetin และ kaempferol ซึ่งมีผลยับยั้งการหลั่ง IL-1β และการแสดงออกของ iNOS gene (Blonska et al., 2004) Kwon (2005) รายงานว่า rutin มีผลลดอาการลำไส้อักเสบในหนูที่เหนี่ยวนำด้วย 5% dextran sulfate sodium (DSS) โดยมีผลต่อการยับยั้ง pro-inflammatory mediators genes (IL-1β, IL-6, GM-CSF, iNOS) จึงมีประโยชน์ในการป้องกันและรักษาภาวะ IBD (inflammatory bowel diseases) และ colorectal carcinogenesis

Mamani-Matsuda และคณะ (2006) พบว่า quercetin มีฤทธิ์ anti-arthritis ใน Lewis rats ที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้มีภาวะข้อเสื่อมเรื้อรัง เมื่อให้ทางปากในขนาด 5 x160 mg/kg และ intra-cutaneous ขนาด 5 x 60 mg/kg และหากให้ในขนาดต่ำๆ 5 x30 mg/kg จะมีผลลดอาการที่เกิดจากภาวะข้อเสื่อมเมื่อเหนี่ยวนำให้เกิดอาการภายหลังได้ โดย quercetin มีผลยับยั้ง nitric oxide และ TNF-α, 1L-1β, MCP-1, iNOS transcription ผ่านกลไกการยับยั้ง AP-1 และ NF-kB

Han และคณะ (2009) รายงานว่า rutin มี dual effect ระหว่าง anti-arthritic และ anti-candida สำหรับภาวะ septic arthritis เมื่อทดสอบโดยการเหนี่ยวนำ BALB/C mice ให้เกิดภาวะ arthritis โดยการฉีดส่วนผสมระหว่าง *C. albican* cell wall และ Complete Freund's Adjuvant (CACW/CFA) ที่อุ้งเท้าหลัง 1 ครั้ง x 3 วัน หลังจากนั้น 24 ชั่วโมง ให้ rutin 1 mg/dose/mouse ทางช่องท้อง วันเว้นวัน 3 ครั้ง พบว่ามีผลลดอาการบวมของเท้าได้ 45% (วันที่ 11) ผ่านกลไกการยับยั้ง NO จาก macrophage การยับยั้ง T cell proliferation และมีผลยับยั้งการเจริญของ *C. albican* ได้

ฤทธิ์อื่นๆ ที่มีรายงาน เช่น ฤทธิ์ต้านการติดเชื้อไวรัส รา และแบคทีเรีย (Bae, et al. 2000; Chiang, et al. 2003; Paulo, et al. 1997; Weidenborner, et al. 1990) ฤทธิ์ต้านการแพ้ (Cheong, et al. 1998) และฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (Lee, et al. 1995; Namgoong, et al. 1994)

มีรายงานวิจัยที่กล่าวถึงความสำคัญของ glycoside form ของสารองค์ประกอบในใบยอว่า flavonoids ส่วนใหญ่อยู่ในรูป glycosidic form และไม่สามารถดูดซึมผ่าน intestinal epithelium กระบวนการ enzymatic hydrolysis โดย intestinal flora จะช่วยเปลี่ยน glycosidic form เป็น free form และถูกดูดซึมเข้าสู่ลำไส้ได้ (Comalada et al., 2006) เช่น quercetin ที่รับประทานเข้าสู่ร่างกายมักจะพบในรูป glycoside มากกว่า free form ดังนั้นความรู้เรื่องปริมาณ quercetin ในเลือดและเนื้อเยื่อ รูปแบบของ quercetin และผลต่อเซลล์จึงมีความสำคัญอย่างมาก เพราะสามารถทำนายกลไกการออกฤทธิ์และการตอบสนองของเซลล์ได้ (Thangasamy et al., 2009)

ในปี 2009 Deng และคณะทำการศึกษา flavonoids ในใบยอที่เตรียมโดย non-aqueous roasting processes เพื่อเตรียมเป็นชาชง และเป็นผลิตภัณฑ์เครื่องดื่มเพื่อสุขภาพ ผลการศึกษาพบว่าการคั่วที่ใช้ความร้อนและเวลานานขึ้นมีผลให้ quercetin glycosides และ kaempferol glycosides มีปริมาณลดลงและเปลี่ยนรูปเป็น aglycone metabolites คือ quercetin และ kaempferol ซึ่งมีปริมาณเพิ่มขึ้น 2.5 และ 4.3 เท่าของปริมาณที่พบในใบยอที่ไม่ผ่านการคั่ว ทำให้ใบยอที่ผ่านการคั่วแบบนี้มี

ฤทธิ์ที่ดีขึ้น นอกจากนี้ยังพบว่า flavonoids ในใบยอจาก Tahiti มีปริมาณสูงกว่าใบยอ Tonga, Panama และ Saipan

2.5 รายงานความเป็นพิษของใบยอ

มีรายงานที่แสดงความไม่เป็นพิษ ของใบยอดังนี้ West และคณะ (2007) รายงานว่าไม่พบความเป็นพิษ หรือการเปลี่ยนแปลงของน้ำหนักในหนูถีบจักร ในการทดสอบความเป็นพิษทั้งแบบ acute, subacute, and subchronic oral toxicity tests ของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วย ethanol–water (1:1 v/v) และสกัดด้วยน้ำร้อน ในขนาด 2000, 200, and 20 mg /kg body weight นอกจากนี้ในการทดสอบการแพ้แบบ acute systemic anaphylaxis ของสารสกัดที่สกัดโดย ethanol–water (4:1 v/v) และสกัดด้วยน้ำร้อน ก็ให้ผลเป็นลบ ส่วน West และ Paru (2006) ทำการศึกษาแนวโน้มการก่อการแพ้ของสารสกัดจากใบยอในระบบน้ำย่อยเทียมของกระเพาะอาหารโดยศึกษาการต้านต่อการย่อยโดย pepsin วิเคราะห์โดยใช้ SDS-PAGE และสรุปว่าโปรตีนในใบยอไม่ก่อให้เกิดการแพ้เนื่องจากถูกย่อยด้วย pepsin ได้อย่างรวดเร็วในทุกเวลาการบ่มเพาะที่ศึกษา

อย่างไรก็ตาม Takashima และคณะ (2007) รายงานฤทธิ์ cytotoxicity ของ 1,5,15-trimethylmorindol ที่แยกได้จาก methanol extract ของใบยอ ต่อ Jurkat cells เมื่อ culture ร่วมกับ TRAIL (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand) ซึ่งต่อมาในปี 2009 Zhou และคณะได้ทำการศึกษาหาปริมาณ anthraquinones ในใบยอและผลยอเนื่องจากมีงานวิจัยก่อนหน้านี้รายงานว่า anthraquinones ในผลยอเป็นพิษต่อ gene (genotoxicity) ซึ่งสัมพันธ์กับโครงสร้างและปริมาณ Zhou และคณะ ใช้ 5,15-dimethyl-morindol ซึ่งเป็น anthraquinone ที่พบมากกว่า 60% ทั้งในใบและผลเป็นตัวชี้วัด ผลการวิเคราะห์ด้วย HPLC-UV พบ 5,15-dimethyl-morindol ในปริมาณที่น้อยมาก (4.2, 0.13 และ 8.4 ppm ในผลยอแห้ง ผลยอบด (Noni puree) และใบยอแห้งตามลำดับ) และสรุปว่าลูกยอและใบยอมีความปลอดภัยในการใช้เป็นอาหาร

ส่วนพิษวิทยาของสารองค์ประกอบในใบยอที่มีรายงานไว้ เช่น Undeger และคณะ (2004) รายงานว่า quercetin และ rutin มีฤทธิ์ป้องกัน DNA damage ใน human lymphocyte ที่เหนี่ยวนำด้วย mitomycin C แบบสัมพันธ์กับความเข้มข้น เมื่อทดสอบด้วย single cell free electrophoresis (Comet assay) ยกเว้น quercetin ความเข้มข้นสูงบางค่า (6 mM), rutin ความเข้มข้นต่ำ (0.02 mM) และ rutin ความเข้มข้นสูงบางค่า (1.64, 3.28 mM) Undeger และคณะอธิบายว่า flavonoids ความเข้มข้นต่ำอาจ switch เป็น pro-oxidant ได้ และได้เสนอให้ผู้ป่วยโรคมะเร็งรับประทานอาหารที่มีส่วนประกอบของ phenolic compounds เพื่อช่วยกระตุ้นภาวะ antimutagenic ต่อ mutagen และ carcinogen ด้วย

ในปี 2008 Lopes-Pasadas และคณะ (2008) ทำการศึกษาผลของ flavonoids หลายชนิดต่ออัตราการอยู่รอดของเซลล์ (viability), การแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (proliferation), การแสดงออกของเอนไซม์ cyclooxygenase, iNOS (inducible nitric oxide syntase) และ pro-inflammatory cytokines (TNF-α, IFN-γ, IL-2) จาก rat splenocytes และพบว่า quercetin มีผลยับยั้ง iNOS และ cyclooxygenase, มีความเป็นพิษต่อเซลล์ (cytotoxicity) และมีฤทธิ์ pro-apoptic ในขณะที่ kaempferol ไม่มีผลลด viability นอกจากนี้ทั้ง quercetin และ kaempferol ยังมีฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างมาก ซึ่ง quercetin มีผลยับยั้งดังกล่าวมากกว่า kaempferol

2.6 หน่วยภูมิคุ้มกันและสารที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย (สุทธิพันธ์, 2541; ฤทัย, 2536)

ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์ประกอบด้วย ต่อมน้ำเหลือง ซึ่งเป็นที่อยู่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว มีท่อน้ำเหลือง ซึ่งเชื่อมต่อระหว่างต่อมน้ำเหลือง และเชื่อมต่อเข้ากับเส้นเลือด นอกจากนี้ยังประกอบด้วยม้าม ไขกระดูก ต่อมทอนซิล Payer's patch ที่อยู่ตามเยื่อบุทางเดินอาหาร สิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพก่อโรคเมื่อเข้าสู่ร่างกาย จะผ่านไปยังต่อมน้ำเหลือง เข้าสู่ต่อมน้ำเหลืองเฉพาะที่ ผ่านเข้าสู่เส้นเลือดและท่อน้ำเหลืองกระจายไปทั่วร่างกาย เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน สร้างมาจาก stem cells ในไขกระดูกมีทั้งเซลล์ที่ทำหน้าที่กินสิ่งแปลกปลอม เช่น macrophages, monocytes และ neutrophils เซลล์ที่มีแกรนูล (granule) จำนวนมาก ได้แก่ eosinophils และ basophils และเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดเล็ก ได้แก่ B-, T-lymphocytes และ natural killer cells เนื้อหาต่อไปนี้ จะกล่าวถึงส่วนของระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับงานวิจัยฉบับนี้ ซึ่งทำการศึกษาผลของสารสกัดที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก T-lymphocytes ดังนี้

(1) T-lymphocytes เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดเล็กที่ทำหน้าที่ตอบสนองด้านเซลล์ (cellular mediated immunity; CMI) เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ แบ่งเป็นชนิด helper T (Th) lymphocytes และ suppressor T (Ts) lymphocytes **"helper T- lymphocytes"** เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี antigen ชนิด CD4 บนผิวเซลล์ ทำหน้าที่ส่งสัญญาณสื่อสารไปยังเซลล์เม็ดเลือดขาวอื่น เช่นเพื่อให้ B-lymphocytes สร้าง antibody และเปลี่ยน T-lymphocytesเป็น cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) ดังนั้น helper T-cells จึงมีความสำคัญทั้งในระบบภูมิคุ้มกันแบบ HMI (humoral mediated immunity) และ CMI (cellular mediated immunity) ส่วน **"Suppressor T-cells"** หรือ killer cells เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี antigenชนิด CD8 บนผิวเซลล์ มีหน้าที่ทำลายเซลล์ที่ผิดปกติหรือติดเชื้อ

(2) Concanavalin A (con A) ในการทดลองได้ทดสอบเปรียบเทียบการหลั่งไซโตไคน์จาก T-lymphocytes ในระบบปกติ (unstimulated system) และระบบที่มีการเติม con A (stimulated system) **con A"** ได้จากถั่วพร้า (*Canavalia ensiformis* ; Jack Bean) เป็นสารในกลุ่ม mitogen ซึ่งมีผลให้ lymphocytes แบ่งตัว และสร้าง DNA มีฤทธิ์ไม่จำเพาะกับที่รับ antigen ใดๆ con A มีฤทธิ์

กระตุ้นการแบ่งตัวของ T-cells โดยเฉพาะ suppressor T-cells สารอื่นๆ ที่มีคุณสมบัติเป็น mitogen เช่น phytohemagglutinin (PHA), pokeweed mitogen (PWM), lipopolysaccharide (LPS) *Staphylococcal* enterotoxin B, anti-immunoglobulin sera, dextran polyvinylpyrrolidone และ trypsin

(3) Cytokines เมื่อ T-lymphocytes ใน culture medium ได้รับการกระตุ้น จะเกิดการหลั่ง cytokines ซึ่งเป็นโปรตีนโมเลกุลขนาดเล็ก สร้างจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อสื่อสารระหว่างเซลล์ มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน การอักเสบ และสมดุลของร่างกาย โดยทั่วไป cytokines จะออกฤทธิ์ในความเข้มข้นต่ำ สื่อสารได้ในระยะสั้น และในเวลาไม่นาน cytokines อาจมีชื่อเรียกต่างกันไปเช่น lymphokines กรณีที่สร้างจาก T- และ B-lymphocytes, monokines กรณีที่สร้างจาก monocytes และ macrophages, chemokines กรณีที่มี chemotactic activity, interleukins กรณีที่หลั่งจาก leukocytes หนึ่งแล้วไปมีผลต่ออีก leukocytes หนึ่ง การทำงานของ cytokines เกิดจากการเข้าจับกับที่รับบนผิวเซลล์ ผ่าน secondary messengers ซึ่งมักเป็น tyrosine kinases เพื่อเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของ genes

การตอบสนองต่อ cytokines ประกอบด้วยการเพิ่มหรือลดการแสดงออกของโปรตีนที่ผิวเซลล์ การแบ่งเซลล์ และการหลั่งสารสื่อสารอื่นๆ เช่น เพื่อเรียกเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มารวมกันที่ตำแหน่งที่มีสิ่งแปลกปลอม กระตุ้น การเพิ่มจำนวนเซลล์ ทำให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันมีการเปลี่ยนแปลง และทำลายเซลล์ กรณีที่ cytokines ถูกสร้างและหลั่งออกมาเพื่อมีผลต่อเซลล์ที่สร้างเองเรียกว่า autocrine action หากมีผลต่อเซลล์ข้างเคียงเรียกว่า paracrine action

เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิดอาจหลั่ง cytokines ชนิดเดียวกัน ในขณะที่ cytokines ชนิดหนึ่งๆ อาจไปมีผลต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันต่างกันไป รวมทั้งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันอย่างเดียวกันอาจเกิดได้จากผลของ cytokines หลายชนิด และบางครั้งเกิดการทำงานที่คล้ายว่ามีความซ้ำซ้อน ในลักษณะของการกระตุ้นเซลล์ต่างชนิดกันอย่างต่อเนื่องเพื่อให้หลั่ง cytokines ต่างชนิดกันเพื่อให้เกิดผลในทำนองเดียวกัน อย่างไรก็ดีการออกฤทธิ์ของ cytokines นั้นเกิดได้ทั้งแบบ synergistic ซึ่งหมายถึงการทำงานร่วมกันของ cytokines ตั้งแต่สองชนิดขึ้นไป หรืออาจเป็นแบบ antagonistic หมายถึงการให้ฤทธิ์ตรงข้ามกัน สามารถแบ่งประเภทของ cytokines ตามผลที่เกิดขึ้นต่อการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันได้ดังนี้

Pro-inflammatory cytokines เป็นกลุ่ม cytokines ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบมากขึ้น มีการตอบสนองเพื่อทำลายเซลล์ หรือเนื้อเยื่อในบริเวณนั้น ส่วนใหญ่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ในกลุ่ม Th1 ได้แก่ TNF-α, TNF-β, IL-1, IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18 และ IFN-γ

Anti-inflammatory cytokines เป็นกลุ่ม cytokines ที่ต่อต้านกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นหรือยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ส่วนใหญ่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ในกลุ่ม Th2 ได้แก่ IL-4, IL-10, IL-11 และ IL-13

243921 13

Cytokines with dual effects เป็นกลุ่ม cytokines ที่มีฤทธิ์ทั้งกระตุ้นและยับยั้งการอักเสบ ได้แก่ IL-6 และ TGF-β

ในภาวะปกติ cytokines จะออกฤทธิ์เฉพาะบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บหรือติดเชื้อ โดยกระตุ้นให้เกิดการกำจัดจุลชีพ สิ่งแปลกปลอม หรือเนื้อเยื่อตาย และกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมของเนื้อเยื่อ (healing) อย่างไรก็ดีการสร้าง pro-inflammatory cytokines ที่มากเกินไปอาจก่อเกิดผลเสียต่อร่างกาย เช่น เกิดภาวะ shock, metabolic disturbance, organ dysfunction หรือเสียชีวิตได้หากไม่สามารถควบคุมได้ ในกรณี anti-Inflammatory cytokines ก็เช่นเดียวกัน หากสร้างมากเกินไปก็จะมีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppression) ทำให้มีโอกาสติดเชื้อที่รุนแรงได้มากขึ้น

แม้ว่า cytokines อาจสร้างได้จากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด แต่เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญได้แก่ helper T-cells (Th) และ macrophages Th-cells มีหน้าที่หลัก 2 ประการคือกระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ การอักเสบและกระตุ้นให้ B-cells สร้าง antibody Th1-cells ทำหน้าที่ผลิต IL-2, IFN-γ และ TNF-β มีผลกระตุ้น Tc และ macrophages ซึ่งเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์และการอักเสบ นอกจากนี้ยังหลั่ง IL-3 และ GM-CSF เพื่อกระตุ้นให้ไขกระดูกผลิตเม็ดเลือดขาวมากขึ้น ส่วน Th2-cells นั้นจะหลั่ง IL-4, IL-5, IL-6 และ IL-10 ซึ่งมีผลกระตุ้นการผลิต antibody โดย B-cells

ก่อนการพัฒนาเป็น Th1- และ Th2-cells นั้น อาจเรียก T-cells ในระยะนี้ว่า Th0-cells ซึ่งสามารถหลั่ง cytokines ชนิด IL-2, IL-4 และ IFN-γ ได้ เมื่อ Th0-cells ได้รับการกระตุ้นด้วย cytokines หลายชนิดจะเกิดการเปลี่ยนแปลงเป็น Th1- และ Th2-cells IL-4 จะมีผลกระตุ้นการทำงานของ Th2 แต่กดการทำงานของ Th1 ในขณะที่ IL-12 กระตุ้นการทำงานของ Th1-cells ได้ ดังนั้นจึงอาจกล่าวได้ว่า cytokines ที่หลั่งจาก Th1- และ Th2-cells ออกฤทธิ์เป็น antagonist ซึ่งกันและกัน IFN-γ และ IL-2 ซึ่งหลั่งจาก Th1-cells ออกฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งตัวของ Th2-cells ในขณะที่ IL-10 ซึ่งหลั่งจาก Th2-cells ออกฤทธิ์ยับยั้งการหลั่ง IFN-γ และ IL-2 ซึ่งหลั่งจาก Th1-cells การควบคุมการหลั่ง cytokines จากทั้ง Th1- และ Th2-cells จะช่วยควบคุมระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทั้งด้านเซลล์และสารน้ำให้มีความสมดุล

ในงานวิจัยนี้ได้ทดสอบหาปริมาณ cytokines ชนิด IFN-γ และ IL-10 เป็นตัวแทน cytokines ในการแสดงการตอบสนองของ Th1- และ Th2-lymphocytes ตามลำดับ ซึ่งมีรายละเอียดดังนี้

Interferon (IFN) เป็น cytokines ที่มีฤทธิ์ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัส แบ่งเป็น 3 ชนิด ได้แก่ IFN-α สร้างจาก mononuclear phagocytes, IFN-β สร้างจาก fibroblast และ IFN-γ ซึ่งส่วนใหญ่สร้างจาก CD_4^+ T-lymphocytes และ CD_8^+ T-lymphocytes ส่วนน้อยสร้างจาก NK cells การสร้าง IFN-γ เกิดขึ้นเมื่อพบกับ specific antigen หรือ mitogen ซึ่งได้รับการส่งเสริมโดย IL-2 ที่หลั่งจาก CD_4^+ T-lymphocytes IFN-γ มีฤทธิ์ต่อเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ดังนี้

1. กระตุ้นการทำงานของ monocytes/macrophages โดยการชักนำให้เกิดการสร้างเอนไซม์ที่ทำให้เกิด respiratory burst ภายในเซลล์ จึงกล่าวได้ว่า IFN-γ เป็น macrophage activating factor (MAF) นอกจากนี้ยังมีเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ ที่เป็น MAF เช่นกัน ได้แก่ GM-CSF, IL-1 และ TNF นอกจากนี้ IFN- γ ยังมีฤทธิ์เพิ่มจำนวน Fc receptor สำหรับ IgG บนผิวเซลล์ของ monocytes/macrophages ทำให้สามารถกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (ingestion) และ ADCC (Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity) ของเซลล์เพิ่มขึ้น

2. ส่งเสริมการทำงานของ NK cells ในการสลายเซลล์แปลกปลอมต่างๆ ซึ่ง IFN-γ มีประสิทธิภาพดีกว่า IFN-α และ IFN-β

3. เพิ่มการปรากฏตัวของ MHC class I บนเซลล์แปลกปลอม ทำให้ CTLs เข้าทำลายได้ดี และเพิ่มการปรากฏตัวของ MHC class II บน antigen presenting cell (APC) ทำให้การนำเสนอ antigen ดีขึ้น เป็นผลให้การตอบสนองทาง CMI และ HMI ดีขึ้นด้วย อย่างไรก็ตาม เนื่องจาก IFN-γ สามารถทำให้ MHC class II ปรากฏบนเซลล์ที่ตามปกติไม่พบโมเลกุลนี้ จึงอาจนำไปสู่การเกิด autoimmune response ได้

4. มีฤทธิ์โดยตรงต่อ CMI โดยส่งเสริมการเจริญจาก pre CTLs เป็น mature CTLs และมีฤทธิ์โดยตรงต่อ HMI โดยกระตุ้นการสร้างและหลั่ง antibody โดยออกฤทธิ์ที่ระยะหลังของขบวนการสร้าง antibody

5. มีฤทธิ์ขัดขวางการสร้างเม็ดเลือดในร่างกาย (hemopoiesis) โดยตรง รวมทั้งชักนำให้เซลล์บางชนิดหลั่ง cytokines ออกมาขัดขวาง

ปัจจุบันพบว่า IFN-γ ให้ผลดีมากในการรักษาโรค hairy cell leukemia

Interleukin-10 (IL-10) มีชื่อเดิมว่า cytokine synthesis inhibitory factor (CSIF) IL-10 สร้างโดย T-cells เช่นเดียวกับ IL-4 มีหน้าที่ยับยั้งการหลั่ง chemokines และมีผลยับยั้งฤทธิ์ของ IFN-γ, IL-2 และ IL-4 (Cruse et al., 2004)

(4) Cytokine receptors เซลล์ในร่างกายมี DNA ที่เหมือนกัน แต่การแสดงออกของเซลล์ที่ต่างกันเกิดจาก activation และ deactivation ของ genes ซึ่งทำให้แต่ละเซลล์มีรูปร่างและหน้าที่การทำงานที่จำเพาะเจาะจง การควบคุมการแสดงออกของ genes ในมนุษย์จะถูกควบคุมในระดับของ DNA transcription ได้ RNA, mRNA และ protein ซึ่งจะมีหน้าที่เฉพาะในเซลล์ต่อไป การกระตุ้นกระบวนการ transcription ใน genes ต้องอาศัยการจับของโปรตีน promoter กับตำแหน่ง DNA ที่จำเพาะบน genes ส่วนการยับยั้งกระบวนการ transcription ต้องอาศัยโปรตีน repressor เช่นกัน กระบวนการอักเสบอาศัย transcription factor เพื่อควบคุมลักษณะและระดับความรุนแรงของการตอบสนองของเซลล์ต่อการบาดเจ็บหรือติดเชื้อ

การที่สารใดๆ จะสามารถส่งสัญญาณกระตุ้นเซลล์ได้นั้น เซลล์ต้องมีกลไกในการรับสารเหล่านั้น แล้วเปลี่ยนเป็นสัญญาณที่จะกระตุ้นหรือยับยั้งกระบวนการ transcription ภายในนิวเคลียส ตรงตำแหน่งของ genes ที่จำเพาะ ตัวอย่างกลไก ได้แก่ HSP, G-Protein, Ligand-Gate Ion Channel, Receptor Thyrosine Kinase, JAK/STAT, SOCS, MAPK, NF-kB, CD-14 และ CD-95 โดยแต่ละกลไกก็จะพบในเซลล์ต่างชนิดกัน มีหน้าที่รับสารที่จะมากระตุ้นต่างกัน ตลอดจนก่อให้เกิดปฏิกิริยาที่แตกต่างกัน

cytokines ออกฤทธิ์โดยการจับกับที่รับบนผิวเซลล์ที่จำเพาะ cytokine receptors มีความหลากหลายขึ้นกับโครงสร้างและการออกฤทธิ์ แบ่งเป็นกลุ่มต่างๆ ได้แก่ ที่รับในกลุ่ม hematopoietin, interferon, tumor necrosis factor และ chemokine

การยับยั้งฤทธิ์ของ cytokines เกิดจากสารในกลุ่ม antagonists ซึ่งมีโมเลกุลที่สามารถจับกับ cytokines หรือ cytokine receptors ได้ เช่น antagonist ของ IL-1 ยับยั้งการจับกันระหว่าง IL-1α, IL-1β และ receptors ซึ่งไวรัสหลายชนิดก็มีกลไกการสร้างโมเลกุลให้คล้ายกับ cytokines เพื่อแข่งขันการเข้าจับกับ receptors และกดภูมิคุ้มกันของ host

สามารถแบ่งประเภทของ cytokines ตามชนิดของเซลล์ที่ผลิต เซลล์เป้าหมาย และหน้าที่ดังตาราง 2-1

(5) การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เมื่อจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมผ่านเข้าสู่ผิวหนังและเยื่อบุต่างๆ ของร่างกาย ผิวหนัง และเยื่อบุนั้นจะมีระบบการป้องกันตัวเองแบบ innate immunity ซึ่งเป็นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ เซลล์ที่เกี่ยวข้องได้แก่ phagocytic cells เช่น macrophages, dendritic cells และ granulocytes ทำหน้าที่จับกินและทำลายสิ่งแปลกปลอม นอกจากนี้ IgA, lysozyme และ lactoferin ที่เคลือบตามเยื่อบุ ภาวะความเป็นกรด หรือการทำงานของ cilia ที่เยื่อบุ การไอ และการปัสสาวะก็ช่วยพัดพาจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมออกมาได้ อย่างไรก็ดีหากผิวหนังและเยื่อบุขาดคุณสมบัติที่จะป้องกัน เช่น เป็นแผลหรือฉีกขาด จุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอมก็จะสามารถผ่านเข้าร่างกายได้ง่ายขึ้น

(6) ภาวะอักเสบ (inflammation) เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันชนิดไม่จำเพาะที่สำคัญ เกิดจากกลุ่มเซลล์ที่ถูกทำลายโดยจุลชีพ phagocytic cells ที่จับกินจุลชีพ หรือสิ่งแปลกปลอม และ mast cells ที่ถูกกระตุ้นจากระบบ complement เซลล์ต่างๆ เหล่านี้จะหลั่งสารเคมีต่างๆ ที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น mast cells หลั่ง histamine ทำให้เส้นเลือดขยายตัว (vasodilate) และผนังเส้นเลือดเปิดให้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่ถูกกระตุ้นออกมาจากเส้นเลือดเข้าสู่ตำแหน่งที่มีจุลชีพมากขึ้น prostaglandins ทำให้เส้นเลือดขยายตัว เกิดอาการไข้และเจ็บปวด leukotrienes มีคุณสมบัติเป็น chemotaxis ดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มายังบริเวณที่มีสารนี้อยู่ ทั้ง prostaglandins และ leukotrienes สร้างจากเซลล์เม็ดเลือดขาว และเซลล์ทั่วไปที่ถูกกระตุ้นโดยจุลชีพ นอกจากนี้เซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเฉพาะ lymphocytes และ macrophages ที่มายังบริเวณที่ติดเชื้อจะหลั่ง cytokines

ที่สำคัญในการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ ได้แก่ interleukin 1 (IL-1) และ tumor necrosis factor (TNF) มีผลให้เกิดอาการอ่อนเพลีย เบื่ออาหาร ไข้ และที่สำคัญ คือ กระตุ้นให้มีเซลล์เม็ดเลือดขาวมายังบริเวณนั้นมากขึ้น เพื่อตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะต่อไป กรณีที่สามารถทำลายจุลชีพได้หมดก็จะกระตุ้นให้เกิดการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายไป

การตอบสนองระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (specific acquired immunity) ได้แก่การตอบสนองแบบสารน้ำ หรือ humoral mediated immunity (HMI) และการตอบสนองแบบเซลล์หรือ cellular mediated immunity (CMI) การตอบสนองแบบ HMI เริ่มจากกระบวนการกระตุ้น B-lymphocytes ให้สร้าง antibody และ จับกับ antigen ที่จำเพาะด้วย antibody receptor ที่ผิวเซลล์ และนำ antigen เข้ามาในเซลล์ เปลี่ยนแปลงและนำเสนอที่ผิวเซลล์ร่วมกับโมเลกุล HLA class II ซึ่งทำให้ T helper-cells มาจับและถูกกระตุ้น T-cells จึงหลั่ง lymphokines ที่มีผลให้ B-cells เปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็น plasma cells เพื่อสร้าง antibody เพิ่มขึ้นต่อไป

Antibody ยับยั้งการติดเชื้อ ด้วยการ neutralize กับจุลชีพนั้น โดยใช้ส่วนปลายโมเลกุลจับกับจุลชีพ กรณีไวรัส จะทำให้ไวรัสนั้นไม่สามารถเข้าสู่เซลล์เป้าหมาย นอกจากนี้ยังมีผลกระตุ้นระบบ complement เพื่อทำลายจุลชีพ หรือกระตุ้นระบบ ADCC ได้เช่นกัน

เมื่อได้รับจุลชีพในครั้งแรก ร่างกายจะสร้าง antibody มากขึ้นจนตรวจพบได้ภายใน 7-10 วันหลังจากที่ได้รับจุลชีพ ระยะต่อมา antibody จะมีปริมาณเพิ่มขึ้น และกลับลดลงจนใกล้ระดับเริ่มต้น เรียกการตอบสนองนี้ว่า primary response หากร่างกายได้รับจุลชีพนั้นอีกครั้ง ระดับ antibody นี้จะเพิ่มสูงจนตรวจพบได้ภายใน 24 ชั่วโมง เรียกการตอบสนองแบบนี้ว่า secondary response

สำหรับการกระตุ้น helper T-lymphocytes และ cytotoxic T-lymphocytes นั้นเริ่มจากเมื่อ antigen-presenting cells (เช่น macrophages และ dendritic cells) กินจุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอม antigen จะถูกเปลี่ยนแปลงและนำเสนอที่ผิวเซลล์ร่วมกับโมเลกุล HLA class II ที่ไปจับกับ Th-cells ทำให้มีการหลั่ง lymphokines ซึ่งมีผลให้ T-cells ชนิดต่างๆ มีการเปลี่ยนแปลง เช่น Th-cells เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงเป็น memory cells CD8+, T-cells เปลี่ยนแปลงเป็น cytotoxic T-lymphocytes (CTLs) ซึ่งมีหน้าที่ทำลายเซลล์ติดเชื้อที่มี antigen ของจุลชีพนั้นเสนอที่ผิวเซลล์ร่วมกับโมเลกุล HLA class I

จุลชีพบางชนิดสามารถเจริญภายในเซลล์ได้ เช่น ไวรัส และ mycobacteria เมื่อถูกจับกลืนกินด้วย macrophages จะไม่ถูกทำลาย แต่จะคงอยู่ในเซลล์และเพิ่มจำนวนได้ กรณีนี้จำเป็นต้องให้ CTLs มาทำลายเซลล์ที่ติดไวรัสนี้ โดย granules ภายใน CTLs ประกอบด้วยโปรตีน perforin ซึ่งมีส่วนในการทำลายเซลล์ติดเชื้อแบบ apoptosis ร่วมกับการหลั่ง cytokines จาก CTLs เช่น interferon-γ (IFN-γ) และ tumor-necrosis factor (TNF)

ตาราง 2-1 ประเภทของ cytokines แบ่งตามชนิดของเซลล์ที่ผลิต เซลล์เป้าหมาย และหน้าที่ (http://microvet.arizona.edu/Courses/MIC419/Tutorials/cytokines.html)

Cytokine	Producing cell	Target cell	Function
GM-CSF	Th cells	progenitor cells	growth and differentiation of monocytes and DC
IL-1α IL-1β	monocytes macrophages B cells DC	Th cells B cells NK cells various	co-stimulation maturation and proliferation activation inflammation, acute phase response, fever
IL-2	Th1 cells	activated T and B cells, NK cells	growth, proliferation, activation
IL-3	Th cells NK cells	stem cells mast cells	growth and differentiation growth and histamine release
IL-4	Th2 cells	activated B cells macrophages T cells	proliferation and differentiation IgG_1 and IgE synthesis MHC Class II proliferation
IL-5	Th2 cells	activated B cells	proliferation and differentiation IgA synthesis
IL-6	monocytes macrophages Th2 cells stromal cells	activated B cells plasma cells stem cells various	differentiation into plasma cells antibody secretion differentiation acute phase response
IL-7	marrow stroma thymus stroma	stem cells	differentiation into progenitor B and T cells
IL-8	macrophages endothelial cells	neutrophils	chemotaxis
IL-10	Th2 cells	macrophages B cells	inhibit cytokine production activation
IL-12	macrophages B cells	activated Tc cells NK cells	differentiation into CTL (with IL-2) activation
IFN-α	leukocytes	various	inhibit viral replication MHC I expression
IFN-β	fibroblasts	various	inhibit viral replication MHC I expression
IFN-γ	Th1 cells, Tc cells, NK cells	various macrophages activated B cells Th2 cells macrophages	inhibit viral replication MHC expression Ig class switch to IgG_{2a} inhibit proliferation pathogen elimination
MIP-1α	macrophages	monocytes, T cells	chemotaxis
MIP-1β	lymphocytes	monocytes, T cells	chemotaxis
TGF-β	T cells, monocytes	monocytes, macrophages activated macrophages activated B cells various	chemotaxis IL-1 synthesis IgA synthesis inhibit proliferation
TNF-α	macrophages, mast cells, NK cells	macrophages tumor cells	CAM and cytokine expression cell death
TNF-β	Th1 and Tc cells	phagocytes tumor cells	phagocytosis, NO production cell death

CTL: cytotoxic T-lymphocytes; DC: dendritic cells; GM-CSF: Granulocyte-Monocyte Colony Stimulating Factor; IL: Interleukin; IFN: Interferon; TGF: Tumor Growth Factor; TNF: Tumor Necrosis Factor.

เนื่องจาก B- และ T-lymphocytes ส่วนหนึ่งจะมีการเปลี่ยนแปลงเป็น memory cells เมื่อมีการนำเสนอ antigen ชนิดเดิมอีกครั้ง ระบบภูมิคุ้มกันที่มี memory B-, T- lymphocytes จะสามารถจดจำและทำลาย antigen นั้นอย่างรวดเร็ว การเกิดภาวะ long-term immunity นี้อาจเกิดจากการติดเชื้อตามธรรมชาติ หรือการได้รับวัคซีน

2.7 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสมุนไพร

มนุษย์มีภูมิคุ้มกันต่อ antigen หรือสิ่งแปลกปลอมผ่านทั้งระบบ HMI และ CMI ผลต่อระบบ HMI ตรวจสอบได้จากปริมาณและการทำหน้าที่ของสารที่เกี่ยวข้อง เช่น antibody ที่สร้างขึ้นต่อ antigen complement หรือ โปรตีนต่างๆ ผลต่อระบบ CMI ตรวจสอบได้จากการทำงานของเซลล์ต่างๆ ที่เกี่ยวข้องเช่น lymphocytes macrophages และ granulocytes การทดสอบทำได้ทั้งในร่างกาย (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) การศึกษาระบบการตอบสนองของร่างกายแบบ CMI จะมีความสำคัญในการตอบสนองต่อการติดเชื้อในเซลล์ (intracellular infection) มะเร็ง และเนื้องอกชนิดต่างๆ

มีงานวิจัยมากมายที่รายงานฤทธิ์ของสมุนไพรต่อระบบภูมิคุ้มกัน ทั้งต่อ HMI และ CMI เช่น ผลต่อการสร้าง antibody การหลั่ง cytokines การหาปริมาณหรือศึกษาการทำหน้าที่ของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น T-cells, B-cells, polymorphonuclear cells (PMN cells), NK cells หรือ phagocytic cells ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีบทบาทเกี่ยวข้องกับการอักเสบ การหลั่งสารอักเสบ และสาร chemotactic รวมทั้งเซลล์และเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการผลิต oxygen-free radicals และ hydrogen peroxides

การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง (*in vitro*) สามารถศึกษาได้จากการใช้ whole cell preparations ได้แก่ polymorphonuclear cells (PMNs), monocytes, macrophages, lymphocytes รวมทั้งระบบ enzyme และ receptor binding อย่างไรก็ตามการทดสอบ *in vitro* ยังมีข้อจำกัดในการทำนายความเป็นไปได้ของผลการทดสอบในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) ซึ่งผลการทดสอบใน *in vivo* อาจไม่สัมพันธ์กับผลที่ได้จากการทดสอบแบบ *in vitro* ก็ได้ นอกจากนี้ผลที่ได้จากการศึกษาในสัตว์ทดลองก็ยังไม่สามารถสรุปได้ว่าจะให้ผลดีในมนุษย์เช่นกัน

ตัวอย่างในการทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง (*in vitro* test) เช่น **"การหาปริมาณเซลล์ที่เกี่ยวข้องในระบบภูมิคุ้มกันแบบเซลล์"** เช่น T-cells, macrophages และ B-cells เพื่อเป็นดัชนีแทนภูมิต้านทาน โดยอาจใช้วิธีนับเซลล์โดย smear บนสไลด์โดยตรง หรือย้อมเซลล์ด้วย monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อ antigen บนผิวเซลล์ (CD) ที่ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง แล้วนับด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดเรืองแสงหรือใช้ fluorescence activated cell sorter (FACS) รวมทั้งการใช้สมบัติเฉพาะของเซลล์แต่ละชนิด เช่นความสามารถในการเกิด rosette กับ sheep red blood cells หรือการเกาะติดแก้วหรือพลาสติก

"การตรวจสอบการทำงานของ B-lymphocytes" ทำได้โดยการวัดระดับ immunoglobulin เมื่อ B-lymphocytes ถูกกระตุ้นด้วยสารทดสอบ ตัวอย่างเทคนิค เช่น hemolytic plaque forming cell assay (PFC assay), solid-phase enzyme-linked immunospot (ELISPOT) หรือการตรวจสอบการทำงานของ B-lymphocytes ร่วมกับการใช้สารกระตุ้น เช่น pokeweed mitogen (PWM), lipopolysaccharides (LPS) แล้วตรวจสอบการแบ่งตัวด้วยการวัดปริมาณ DNA ในเซลล์

"การตรวจสอบการทำงานของ T-lymphocytes" (Mark and Diego, 1997; John et al., 1993; Gooi and Chapel, 1990) เช่นการทดสอบผลการกระตุ้น lymphocyte ร่วมกับสารกระตุ้น เช่น phytohemagglutinin (PHA) หรือ antigen ที่จำเพาะ เมื่อเกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์และแบ่งตัว สามารถตรวจสอบ blast transformation ที่เกิดขึ้นจากการสังเคราะห์ DNA, RNA หรือโปรตีนที่เกิดในเซลล์ด้วยเครื่อง scintillation counter หรือการเปลี่ยนแปลงปริมาณ dehydrogenase enzyme ด้วยเทคนิค colorimetry ซึ่งสัมพันธ์กับจำนวน lymphocytes ที่เพิ่มขึ้น

"การตรวจวัดปริมาณ cytokines และ soluble cell products" cytokines คือสารน้ำที่หลั่งจากเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วย antigen หรือ mitogen มีสมบัติเป็น immunoregulatory protein มีผลต่อเซลล์ต่างๆ หลายชนิดในระบบภูมิคุ้มกัน cytokines ที่นิยมใช้ในการวัดการทำงานของ T- lymphocytes ได้แก่ IL-2 และ IFN-γ นอกจากนี้ยังอาจวัดสารที่สร้างขึ้นในภาวะที่ T- lymphocytes ถูกกระตุ้น เช่น soluble IL-2 receptor, soluble CD8 และ soluble CD4 ในสภาวะที่มีการสร้างสารเหล่านี้เพิ่มขึ้นบนผิวเซลล์ สารเหล่านี้จะหลุดออกมาจากเซลล์ จึงตรวจพบสารเหล่านี้ในปริมาณเพิ่มมากขึ้น

มีรายงานฤทธิ์ของ *Glossogyne tenuifolia* ต่อการหลั่ง cytokines หลายชนิดจาก macrophages และ splenocytes ของหนูถีบจักร ว่ามีผลยับยั้ง pro-inflammatory mediators หลายชนิด เช่น TNF-α, IL-1β, IL-6, nitric oxide และ prostaglandin E_2 จาก macrophages ที่กระตุ้นด้วย LPS และ IFN-γ จาก splenocytes ที่กระตุ้นด้วย PHA ซึ่งคาดว่าเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นผ่าน nuclear factor-KB DNA (Ha et al., 2006)

3-Monochloro-1,2-propanediol (MCPD) เป็นผลิตภัณฑ์เหลือทิ้งจากอุตสาหกรรมการผลิตซอสถั่วเหลืองก็มีรายงานว่ามีฤทธิ์ลดการหลั่ง IFN-γ, IL-4 และ IL-10 จาก splenocytes เมื่อกระตุ้นด้วย con A และลดการหลั่ง TNF-α จาก macrophages เมื่อกระตุ้นด้วย LPS (Byun et al., 2006) polysaccharide L-II ที่แยกได้จากผลของ *Lentinus edodes* มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันในหนูทดลองที่ได้รับ Sarcoma-180 โดยมีผลต่อการเพิ่มการหลั่ง TNF-α และ IFN-γ ใน serum โดยไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ IL-2 แสดงให้เห็นว่า polysaccharide L-II มีฤทธิ์ต้านมะเร็งโดยการเหนี่ยวนำการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ T-lymphocytes และ macrophages (Zheng et al., 2005)

นอกจากงานวิจัยที่รายงานผลของสารสกัด หรือสารที่แยกได้จากสารสกัดที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลงปริมาณ cytokines แล้ว ยังมีรายงานการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่นำเสนอด้วยค่าอัตราส่วนระหว่าง IFN-γ/IL-10 โดยให้ IFN-γ เป็นตัวแทน cytokines ที่หลั่งจาก Th1-cells และ IL-10 เป็น cytokines ที่หลั่งจาก Th2-cells เช่นรายงานผลการศึกษา phytoestrogen สองชนิดได้แก่ genistein และ resveratrol ต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 จาก splenocytes ของหนูถีบจักรเทียบกับ 17β-estradiol (E2) พบว่า genistein และ resveratrol มีผลลดสัดส่วนระหว่าง IFN-γ /IL-10 เช่นเดียวกับ E2 แสดงให้เห็นผลของ phytoestrogen ทั้งสองต่อสมดุลระหว่าง Th1/Th2 โดยมีผลเกี่ยวข้องต่อการตอบสนองของ Th2-cells เป็นหลัก (Rachon et al., 2006) อย่างไรก็ตามการเลือกศึกษา cytokines ชนิดใดขึ้นกับวัตถุประสงค์ของงานวิจัยและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ต้องการศึกษาหน้าที่ ซึ่งแนวทางการศึกษาสมดุลระหว่าง Th1/Th2 นี้จะนำไปเป็นต้นแบบในงานวิจัยของคณะผู้วิจัยต่อไป

นอกจากนี้การทดสอบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง (*in vitro* test) ยังทำได้โดยเทคนิคอื่นๆ เช่น การตรวจสอบระบบการทำงานของ Natural Killer (NK) cells, Antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC), การตรวจสอบความสามารถในการทำหน้าที่ของ neutrophils และ monocytes ในกระบวนการ phagocytosis เช่น chemotactic motility, การนับจำนวน phagocytic cells ที่กินจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอม, การวัดปริมาณ lysosomal enzyme ของ phagocytes และการกำจัดภายในเซลล์ (intracellular killing) (ซึ่งมีวิธีการทดสอบได้หลายวิธี เช่น Neutrophil bactericidal activity, Nitroblue tetrazolium (NBT) dye reduction, Chemiluminescence และ Carbon clearance test (CCT))

อย่างไรก็ดีการเลือกใช้วิธีการทดสอบใดๆ เพื่อศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันก็มีข้อคำนึงในหลายปัจจัย เช่นเครื่องมือ ความชำนาญของผู้ทำการทดสอบ ความจำเพาะต่อเซลล์หรือสารน้ำที่ต้องการศึกษา ต้นทุนการดำเนินการและเวลา รวมทั้งความน่าเชื่อถือของแต่ละวิธีทดสอบ โดยต้องทำการพิจารณาให้เหมาะสมก่อนการวางแผนการทดลอง