รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอ ที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์

(Comparative study of effect of Morinda citrifolia Linn. leave extract by different preparation techniques on cytokine secretion)

โดย ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา และคณะ

กันยายน 2554

สัญญาเลขที่ R2553B035

รายงานวิจัยฉบับสมบูรณ์

โครงการ การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอ ที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์

(*Comparative study of effect of Morinda citrifolia Linn. leave extract by different preparation techniques on cytokine secretion*)

คณะผู้วิจัย

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา

สังกัด ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ

สังกัด ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

สนับสนุนโดยกองทุนวิจัยมหาวิทยาลัยนเรศวร

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยเรื่อง “การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์ (Comparative study of effect of *Morinda citrifolia* Linn. leave extract by different preparation techniques on cytokine secretion)” ได้รับการสนับสนุนจากทุนอุดหนุนการวิจัยจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553 จึงทำให้งานวิจัยนี้สำเร็จได้ด้วยดี ขอขอบคุณคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่ให้ความอนุเคราะห์สถานที่และเครื่องมือวิทยาศาสตร์ในการทดลอง และขอขอบคุณคุณจรรยา รื่นเกษร ผู้ทำหน้าที่ผู้ช่วยวิจัยในโครงการ

สุดท้ายนี้ขอขอบคุณบิดามารดาที่ให้กำลังใจในการทำวิจัยเสมอมา ตลอดจนครูอาจารย์เจ้าของงานวิจัยที่ผู้วิจัยที่ได้อ้างอิงและมิได้อ้างอิงไว้ในรายงานฉบับนี้ ผู้วิจัยขอขอบคุณเป็นอย่างสูงไว้ ณ โอกาสนี้

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา

บทคัดย่อ

ชื่อโครงการ	การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์
ชื่อผู้วิจัย	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา[1] รองศาสตราจารย์ ดร. พัฒนา ศรีพลากิจ[2]
หน่วยงานที่สังกัด	[1]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร [2]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
หมายเลขโทรศัพท์	0-5596-1872
ได้รับทุนอุดหนุน	การวิจัยสาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช งบประมาณแผ่นดินประจำปี 2553
จำนวนเงิน	สามแสนบาทถ้วน
ระยะเวลาทำการวิจัย	1 ปี 6 เดือน

ส่วนต่างๆ ของยอ (*Morinda citrifolia* Linn.) ใช้เป็นอาหารและยาสมุนไพรมากว่าพันปีแล้ว งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคต่างๆ ต่อการสร้าง ไซโตไคน์จากที-ลิมพ์โฟไซต์ชนิด MOLT-4 สารสกัดเตรียมจากใบยอสดหมักในเอทธานอล (FMC_CE), ใบยอแห้งหมักในเอทธานอล (DMC_CE), ใบยอสดปั่นรวมกับน้ำและทำแห้งเยือกแข็ง (FMC_CF), ใบยอแห้งปั่นรวมกับน้ำและทำแห้งเยือกแข็ง (DMC_CF) และใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) กระตุ้นเซลล์ด้วยคอนคานาวาลิน-เอ (คอน-เอ) ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดปริมาณอินเตอเฟอรอน-แกมมา และอินเตอลิวคิน-10 ด้วยเทคนิค ELISA และคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างอินเตอเฟอรอน-แกมมาและอินเตอลิวคิน-10 (IFN-γ/IL-10) เพื่อแสดงสมดุลการตอบสนองของที-ลิมพ์โฟไซต์ชนิด Th1 และ Th2 เทียบ HPLC-fingerprints ของสารสกัดใบยอกับสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol โดยพิจารณาจากตำแหน่ง retention time ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ โดยสารสกัด FMC_CF 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดค่า IFN-γ /IL-10 ratio ได้มากที่สุดประมาณ 0.7 และ 0.4 เมื่อไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ มีผลต่อการตอบสนองของ Th2 มากกว่า Th1 และมีฤทธิ์ต้านอักเสบมากที่สุดซึ่ง rutin น่าจะมีส่วนในฤทธิ์ดังกล่าว ในทางตรงกันข้าม สารสกัด FMC_HW 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งเพิ่มค่า IFN-γ/IL-10 ratio มากที่สุดประมาณ 5.7 และ 13.3 เมื่อไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ แสดงให้เห็นฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสกัด FMC_HW ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองของ Th1 มากกว่า Th2 และ quercetin, kaempferol น่าจะเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ดังกล่าว ผลการวิจัยสรุปได้ว่า สารสกัดจากใบยอมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของที-ลิมพ์โฟไซต์และเทคนิคการเตรียมสารสกัดมีผลต่อฤทธิ์ของสารสกัด อาจนำสารสกัดที่เตรียมจากใบยอสดปั่นรวมกับน้ำและทำแห้งเยือกแข็งและใบยอสดต้มน้ำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษากลไกการออกฤทธิ์และแยกสารสำคัญในสารสกัดทั้งสองชนิดต่อไป

คำสำคัญ: ยอ, อินเตอเฟอรอน-แกมมา, อินเตอลิวคิน-10, ที-ลิมพ์โฟไซต์

ABSTRACT

Title Comparative study of effect of *Morinda citrifolia* Linn. leave extract by different preparation techniques on cytokine secretion)

By Assist. Prof. Dr. Aurasorn Saraphanchotiwitthaya[1]

Assoc. Prof. Dr. Pattana Sripalakit[2]

Affiliation [1]Department of Pharmaceutical Technology,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

[2]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy,
Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University

Tel. 0-5596-1872

Financial support by National Research Council of Thailand 2010

Duration 1 year 6 month

Various parts of "Yor" (*Morinda citrifolia* Linn.) has been using for food and medicinal purposes for thousands of years. This study was to investigate effect of *M. citrifolia* leave extracts using different preparation techniques on cytokine production from human T lymphocytes (MOLT-4). The extracts were prepared by using fresh leaves macerate in ethanol (FMC_CE), dried leaves macerate in ethanol (DMC_CE), fresh leaves blend with water and freeze-dry (FMC_CF), dried leaves blend with water and freeze-dry (DMC_CF) and fresh leaves boil in water (FMC_HW). Concanavalin A (con A) 5 μg/mL was used as a stimulant. IFN-γ and IL-10 production were measured by ELISA techniques and IFN-γ/IL-10 ratio was calculated to determine Th1/Th2 balance. Characterization of HPLC-fingerprints of *M. citrifolia* extracts was achieved by comparing the retention time of target peaks with standard rutin, quercetin and kaempferol. The results showed that most of *M. citrifolia* extracts showed anti-inflammatory activity. FMC_CF extract at 100 μg/mL maximally decreased IFN-γ/IL-10 ratio of about 0.7 and 0.4 when without or with con A stimulation, respectively. The induction on a shift to Th2-response of FMC_CF extract indicated its potent anti-inflammatory activity and rutin might be partially responsible for this activity. In contrast, FMC_HW at 100 μg/mL maximally increased IFN-γ/IL-10 ratio of about 5.7 and 13.3 when without or with con A stimulation, respectively. These performed immunomodulatory activity of FMC_HW extract which inclined to dominance of Th1 more than Th2 subpopulation which quercetin and kaempferol might involve in this activity. Our investigations might be concluded that *M. citrifolia* leaves had immunological activity on human T-lymphocytes and different preparation techniques affected to their activity. Its fresh leaves prepared by freeze-dry technique or boiling in water may also exert beneficial immunomodulation effects in conditions involving inadequate immune responses. However, the mechanism of actions and identification of active ingredients of both extracts must be further investigated.

Keywords: *Morinda citrifolia* Linn., IFN-γ, IL-10, T-lymphocytes

หน้าสรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)

สัญญาเลขที่	R2553B035
โครงการ	การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์
หัวหน้าโครงการ	ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อรสร สารพันโชติวิทยา
หน่วยงาน	ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ระยะเวลาดำเนินงาน	1 ปี 6 เดือน
งบประมาณ	300,000.00 บาท (สามแสนบาทถ้วน)

---

1. ความสำคัญและที่มาของปัญหา

เนื่องจากผลพวงของการแพร่ระบาดของเอดส์และโรคต่างๆ ที่ยากแก่การเยียวยาในปัจจุบัน ผู้คนทั่วโลกจึงตื่นตัวด้านการดูแลสุขภาพและเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับร่างกาย และให้ความสำคัญกับการรักษาสุขภาพเชิงป้องกันซึ่งช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและทรัพยากรได้มากกว่าการรักษา ดังนั้นตลาดยาและอาหารเสริมสุขภาพ จึงมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างมาก และขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ดังจะเห็นได้ว่า ในปี 2551 ตลาดผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ คาดว่าจะมีมูลค่าสูงถึงประมาณ 18,000 ล้านบาท หรือเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 7.0 เมื่อเทียบกับปี 2550 และมีแนวโน้มการเติบโตอยู่ในเกณฑ์สูง มีการแข่งขันรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาหารเสริมสุขภาพที่มีคุณสมบัติเป็นยา (Nutraceutical) ซึ่งนับว่าเป็นตลาดที่มีขนาดใหญ่และเป็นเรื่องท้าทายให้ประเทศต่างๆ ที่มีศักยภาพมีการแข่งขันด้านการผลิต รวมทั้งการวิจัยและพัฒนาอาหารเสริมสุขภาพประเภทนี้ (บริษัท ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด, 2550)

ทั้งนี้เหตุที่ตลาดอาหารเสริมประเภทสมุนไพรเป็นที่สนใจสำหรับผู้บริโภคอย่างมากนั้น เนื่องจากปัจจัยหลักด้านความเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติ ไม่ใช่เคมีสังเคราะห์ กอปรกับกระแสอนุรักษ์ธรรมชาติ (Green Movement) จึงยิ่งส่งเสริมให้สมุนไพรได้รับความสนใจมากขึ้นเป็นลำดับ ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรเพื่อสุขภาพมาแต่อดีต ทั้งการบำรุงสุขภาพ และการบรรเทาหรือรักษาอาการหรือโรคต่างๆ ดังที่ได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาไทยต่างๆ มากมาย ทั้งนี้เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์สูงสุดในการใช้สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพประเภทสมุนไพรที่มีมาตรฐาน ข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อรับรองสรรพคุณหรือฤทธิ์ของสมุนไพร

และความปลอดภัยในการใช้จึงนับว่ามีความจำเป็นอย่างยิ่งในสนับสนุนการใช้หรือพัฒนาสมุนไพรชนิดนั้น

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรนับเป็นการสร้างรากฐานความรู้ด้านวิทยาศาสตร์เพื่อสร้างงานวิจัยที่มีมาตรฐาน และใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการอ้างอิงประโยชน์จากการใช้สมุนไพรเพื่อต่อยอดภูมิปัญญาไทยอันทรงค่าในอดีต สู่การยกระดับมาตรฐานการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเจาะขยายตลาดทั้งในและประเทศ ซึ่งในครึ่งแรกของปี 2551 ประเทศไทยนำเข้ายารักษาหรือป้องกันโรค มูลค่า 15,989.7 ล้านบาท ขยายตัวเพิ่มขึ้นจากช่วงเดียวกันของปีก่อนร้อยละ 21 แต่ส่งออกยารักษาหรือป้องกันโรคด้วยมูลค่าการส่งออกเพียง 2,607.4 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม, 2551) ตลาดยาและอาหารเสริมประเภทสมุนไพรจึงเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาจากต่างประเทศ และเพิ่มยอดการส่งออกเพื่อสร้างรายได้ให้แก่ประเทศได้ในอนาคต

นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากสมุนไพรยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของประเทศไทยในการบริหารจัดการ อนุรักษ์และฟื้นฟูสิ่งแวดล้อม เป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติอย่างคุ้มค่า รวมทั้งเป็นการสร้างโอกาสและการมีส่วนร่วมของประชาชนและชุมชนท้องถิ่น ในระยะยาวนับว่าเป็นการสร้างความเข้มแข็งให้กับชุมชน ในการแก้ไขปัญหา บริหารจัดการพัฒนาองค์ความรู้ในการ เพิ่มมูลค่าสมุนไพรและใช้ทรัพยากรให้คุ้มค่าอย่างแท้จริง

ประเทศไทยมีสมุนไพรอยู่มากมาย หลายชนิดเป็นพืชผักสวนครัว และเป็นส่วนประกอบในการทำอาหารไทยมาแต่อดีต ในงานวิจัยนี้ให้ความสนใจกับ “ใบยอ” เนื่องจากคนไทยใช้เป็นผักแกล้ม และใช้ประกอบอาหาร เช่นห่อหมก แกงอ่อม และแกงกะทิหลายประเภท ใบยอมีสรรพคุณทางยามากมาย รวมทั้งสรรพคุณด้านการบำรุงธาตุ แก้ปวดข้อ และม้ามโต ซึ่งมีแนวโน้มว่ามีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ใบยอยังเป็นแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ง่าย เนื่องจากต้นยอพบได้ทั่วไปในประเทศไทย ดังนั้นในการพัฒนาการใช้ใบยอเพื่อประโยชน์ในการดูแลสุขภาพ หรือการรักษาจึงทำได้ไม่ยุ่งยากนัก

จึงอาจกล่าวได้ว่าการวิจัยเพื่อทดสอบสรรพคุณของใบยอต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นงานวิจัยที่ทั้งสร้างประโยชน์โดยตรงต่อการรับรองสรรพคุณสมุนไพรเบื้องต้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานอันจำเป็นยิ่งสำหรับการวิจัยในเชิงประยุกต์อื่นๆ เพื่อการพัฒนายาใหม่หรือผลิตภัณฑ์เสริมการรักษาสำหรับอาการหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันตามแนวทฤษฎีเศรษฐกิจพอเพียง อันจะนำไปสู่การพึ่งพาตนเองของประเทศไทย และมีการต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นอันจะนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อการส่งออก ปรับระบบการวิจัยให้สร้างองค์ความรู้ที่ต้องการจากงานวิจัยสู่ชุมชน สืบสานภูมิปัญญาและเป็นรากฐานการพัฒนาศักยภาพการแข่งขันของประเทศในด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในอนาคต

2. วัตถุประสงค์

2.1 เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบยอต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้การทดสอบการหลั่งไซโต-ไคน์

2.2 เพื่อศึกษาผลของวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันต่อปริมาณสารองค์ประกอบในใบยอ และการหลั่งไซโตไคน์

3. ผลการวิจัย

เมื่อสกัดใบยอสดและแห้งด้วยเทคนิคการสกัด (ไม่ใช้, ใช้ความร้อน) และน้ำยาสกัด (น้ำ, ethanol) ที่แตกต่างกัน 5 เทคนิค ได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสดแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากใบยอสดปั่นคั้นน้ำและทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (FMC_CF) มีผลผลิตสูงสุด 7.14% และสารสกัดใบยอที่ผ่านการอบแห้งก่อนหมักใน ethanol มีผลผลิตต่ำสุด 5.16% ซึ่งจากการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดใบยอด้วยเทคนิค HPLC พบ rutin, quercetin และ kaempferol ในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสารองค์ประกอบอื่นๆ อีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ โดยสารสกัดใบยอฯ ทุกชนิดมีปริมาณ rutin มากที่สุด และรองลงมาคือ kaempferol และ quercetin ยกเว้นสารสกัดใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) พบว่ามี unidentified peak หนึ่งที่มีปริมาณมากกว่า rutin

ลำดับประสิทธิภาพของวิธีการสกัดซึ่งประเมินโดยคร่าวๆ จาก flavonoids เฉพาะ rutin quercetin และ kaempferol พบว่าประสิทธิภาพในการสกัด flavonoids ในงานวิจัยนี้คือ คือ FMC_CE = 3.46, DMC_CE = 0.49, FMC_CF = 11.72, DMC_CF = 9.26, FMC_HW = 0.62 mg/hr ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าวิธีการปั่นใบยอสดคั้นน้ำ นอกจากจะให้ %yield สูงสุดแล้วการปั่นคั้นน้ำยังให้ค่าประสิทธิภาพการสกัดฯ มากที่สุดด้วย จึงนับว่าเป็นวิธีการสกัดที่น่าสนใจ และหากมีการพัฒนาใช้ใบยอเพื่อสุขภาพในอนาคต ก็สามารถเตรียมใช้โดยง่ายและประหยัดเวลา ลดการใช้ organic solvent และมีต้นทุนการผลิตไม่มาก

เมื่อนำสารสกัดไปทดสอบผลต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 จาก T lymphocyte พบว่าเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน มีผลให้ได้สารสกัดที่มีผลต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 แตกต่างกัน สารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ การปั่นใบยอสดคั้นน้ำฯ ให้สารสกัด (FMC_CF) ที่มีผลลดการหลั่ง IFN-γ และเพิ่มการหลั่ง IL-10 (เฉพาะเมื่อเติม con A) จึงมีฤทธิ์ต้านอักเสบมากที่สุด หรือมีผลต่อการตอบสนองของ Th2 มากกว่า Th1 โดยมีค่า IFN-γ /IL-10 ratio = 0.74, 0.36 (100 μg/mL) เมื่อไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ ในขณะที่การต้มใบสดในน้ำ (FMC_HW) ให้สารสกัดที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ IFN-γ แต่ลดการหลั่ง IL-10 จึงมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันมากที่สุด

หรือมีผลต่อยับยั้งการตอบสนองของ Th2 โดยไม่มีผลต่อ Th1 โดยมีค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูงสุดเท่ากับ 5.69 และ 13.3 (100 μg/mL) ในระบบที่ไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ

เมื่อเทียบกับผลการทดสอบของ rutin, quercetin และ kaempferol ซึ่งส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอักเสบหรือมีผลต่อการตอบสนองของ Th2 มากกว่า Th1 มีเฉพาะบางช่วงความเข้มข้นเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน อาจอนุมานได้ว่า FMC_CF ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบ น่าจะเกิดจากผลของ rutin เป็นหลัก ส่วนสารสกัด FMC_HW ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน น่าจะเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ quercetin และ kaempferol ซึ่งพบในสารสกัด FMC_HW มากกว่าสารสกัดใบยออื่นๆ อย่างไรก็ตามไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าผลของสารสกัดใบยอฯ เป็นผลจาก flavonoids ชนิดใด เนื่องจากยังมี unidentified peak ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาโครงสร้าง ซึ่งอาจมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัดเช่นกัน

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบยอไทยมีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันทั้งต้านอักเสบ และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ขึ้นกับเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกันซึ่งมีผลให้ได้สารองค์ประกอบในปริมาณและรูปที่แตกต่างกัน จึงมีผลต่อการตอบสนองของ T lymphocyte ต่างกันด้วย ใบยอใช้เป็นอาหารของมนุษย์มานานแล้ว และหลายประเทศได้ทำการพัฒนาใบยอในรูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเพื่อการค้าแล้ว แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบทั้งรายงานที่แสดงถึงความปลอดภัยและรายงานความเป็นพิษที่เกิดจากสารองค์ประกอบ ในการพัฒนาใบยอไทยเพื่อสุขภาพและเชิงพานิชย์ นอกจากการควบคุมปริมาณสารสำคัญเพื่อให้มีฤทธิ์ตามต้องการ โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม ตลอดจนการทดสอบเทียบเคียงประสิทธิภาพกับสมุนไพรเพื่อสุขภาพที่ได้มาตรฐานแล้ว ยังควรทำการศึกษาพิษวิทยาของสารสกัดใบยอไทยด้วย

4. Output จากงานวิจัย

4.1 ข้อมูลผลของสารสกัดจากใบยอต่อระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง

4.2 ฐานองค์ความรู้ในการขยายผลเพื่อพัฒนาการนำใบยอไปใช้ในประโยชน์ในเชิงสุขภาพและเชิงพาณิชย์

4.3 ผลงานวิจัยเพื่อเสนอผลงานหรือตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศหรือระดับนานาชาติ

4.4 การสร้างนักวิจัยให้เป็นทุนปัญญาของชาติในระยะยาว

สารบัญ

หน้า

กิตติกรรมประกาศ

บทคัดย่อ

Abstract

หน้าสรุปรายงานวิจัย (Executive Summary)

สารบัญตาราง

สารบัญรูป

บทที่ 1 บทนำ 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย 1

1.2 วัตถุประสงค์ 2

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย 3

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ และหน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์ 5

1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย 5

1.6 ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ 5

บทที่ 2 ปริทัศน์วรรณกรรม 6

2.1 ข้อมูลทั่วไปของยอ 6

2.2 สรรพคุณด้านสมุนไพรของยอ 6

2.3 พฤกษเคมีของยอ 7

2.4 ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของใบยอ 8

2.5 รายงานความเป็นพิษของใบยอ 11

2.6 หน่วยภูมิคุ้มกันและสารที่เกี่ยวข้องในงานวิจัย 12

2.7 การศึกษาฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันของสมุนไพร 19

บทที่ 3 ระเบียบวิธีวิจัย 22

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง 22

3.2 สมุนไพร 22

3.3 สารเคมี 22

หน้า

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ 23

3.5 วิธีการทดลอง 24

การทดลอง 1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ 24

การทดลอง 2 การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ 25

การทดลอง 3 การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4) 26

3.6 ขอบเขตของการวิจัย 28

3.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย 28

บทที่ 4 รายงานผลการวิจัย 27

การทดลอง 1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ 29

การทดลอง 2 การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ 30

2.1 HPLC condition 30

2.2 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol 30

2.3 HPLC-fingerprints ของสารสกัดใบยอฯ และการวิเคราะห์ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัด 31

การทดลอง 3 การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4) 34

3.1 การเพาะเลี้ยงเซลล์ 34

3.2 การทดสอบการหลั่งไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA 34

3.2.1 ผลของสารสกัดใบยอต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 34

3.2.2 ผลของ rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 35

หน้า

บทที่ 5 อภิปรายผลการวิจัย 48

การทดลอง 1 การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ 48

การทดลอง 2 การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ 48

การทดลอง 3 การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4) 53

บทที่ 6 สรุปผลการวิจัย 60

บรรณานุกรม 62

ภาคผนวก 69

การนำเสนอและเผยแพร่ผลงานวิจัย 69

สารบัญตาราง

ตาราง		หน้า
2-1	ประเภทของ cytokines แบ่งตามชนิดของเซลล์ที่ผลิต เซลล์เป้าหมาย และหน้าที่	18
4-1	ลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสด ที่ได้จากการสกัดใบยอด้วยเทคนิคต่างๆ	29
4-2	ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ10 mg/mL ที่สกัดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เทียบจาก HPLC-fingerprint ของสารมาตรฐาน	32
4-3	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A)	37
4-4	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน stimulated system (เติม 5 μg/mL con A)	37
4-5	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A)	39
4-6	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน stimulated system (เติม 5 μg/mL con A)	39
4-7	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า IFN-γ /IL-10 ratio ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A) เทียบกับ stimulated system (เติม 5 μg/mL con A)	39
4-8	ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ และ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A)	43
4-9	ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ และ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน stimulated system (เติม 5 μg/mL con A)	44

สารบัญรูป

รูป		หน้า
2-1	ลักษณะใบและผลยอบ้าน (*Morinda citrifolia* Linn.)	7
3-1	แผนภาพการสกัดใบยอ (*M. citrifolia*) ด้วยเทคนิคต่างๆ	24
4-1	ตัวอย่าง chromatogram ของ rutin, quercetin และ kaempferol ความเข้มข้น 50 μg/mL	31
4-2	ตัวอย่าง HPLC-fingerprints ของสารสกัดหยาบจากใบยอความเข้มข้น 10 mg/mL	32
4-3	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$	38
4-4	ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$	40
4-5	ค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากการ culture สารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ณ ความเข้มข้น 1-100 μg/mL ร่วมกับ MOLT-4 cells เมื่อไม่เติมและเติม 5 μg/mL con A เทียบกับค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากสภาวะปกติ และผลจาก con A	41
4-6	ค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากการ culture สารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ณ ความเข้มข้น 1-100 μg/mL ร่วมกับ MOLT-4 cells เมื่อ (a) ไม่เติม (unstimulated system)และ (b) เติม 5 μg/mL con A (stimulated system) เทียบกับค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากสภาวะปกติ และผลของ con A ตามลำดับ	42
4-7	ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$	45

รูป **หน้า**

4-8 ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$ 46

4-9 เปรียบเทียบผลของสารสกัด FMC_CF, FMC_HW และสารมาตรฐาน quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า IFN-γ/IL-10 ratio ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 47

5-1 โครงสร้างเคมีของ rutin, quercetin และ kaempferol 49

บทที่ 1
บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

เนื่องจากผลพวงของการแพร่ระบาดของเอดส์และโรคต่างๆ ที่ยากแก่การเยียวยาในปัจจุบัน ผู้คนทั่วโลกจึงตื่นตัวด้านการดูแลสุขภาพและเสริมสร้างความแข็งแรงให้กับร่างกาย และให้ความสำคัญกับการรักษาสุขภาพเชิงป้องกันซึ่งช่วยลดการสูญเสียทางเศรษฐกิจและทรัพยากรได้มากกว่าการรักษา ดังนั้นตลาดยาและอาหารเสริมสุขภาพ จึงมีการขยายตัวเพิ่มขึ้นอย่างมาก และขยายตัวอย่างต่อเนื่อง ดังจะเห็นได้ว่า ในปี 2551 ตลาดผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพ คาดว่าจะมีมูลค่าสูงถึงประมาณ 18,000 ล้านบาท หรือเพิ่มขึ้นประมาณร้อยละ 7.0 เมื่อเทียบกับปี 2550 และมีแนวโน้มการเติบโตอยู่ในเกณฑ์สูง มีการแข่งขันรุนแรง โดยเฉพาะอย่างยิ่ง อาหารเสริมสุขภาพที่มีคุณสมบัติเป็นยา (Nutraceutical) ซึ่งนับว่าเป็นตลาดที่มีขนาดใหญ่และเป็นเรื่องท้าทายให้ประเทศต่างๆ ที่มีศักยภาพมีการแข่งขันด้านการผลิต รวมทั้งการวิจัยและพัฒนาอาหารเสริมสุขภาพประเภทนี้ (บริษัท ศูนย์วิจัยกสิกรไทย จำกัด, 2550)

ทั้งนี้เหตุที่ตลาดอาหารเสริมประเภทสมุนไพรเป็นที่สนใจสำหรับผู้บริโภคอย่างมากนั้น เนื่องจากปัจจัยหลักด้านความเป็นวัตถุดิบจากธรรมชาติ ไม่ใช่เคมีสังเคราะห์ กอปรกับกระแสอนุรักษ์ธรรมชาติ (Green Movement) จึงยิ่งส่งเสริมให้สมุนไพรได้รับความสนใจมากขึ้นเป็นลำดับ ประเทศไทยมีการใช้ประโยชน์จากสมุนไพรเพื่อสุขภาพมาแต่อดีต ทั้งการบำรุงสุขภาพ และการบรรเทาหรือรักษาอาการหรือโรคต่างๆ ดังที่ได้มีการบันทึกไว้ในตำรายาไทยต่างๆ มากมาย ทั้งนี้เพื่อให้ผู้บริโภคได้รับประโยชน์สูงสุดในการใช้สมุนไพรหรือผลิตภัณฑ์อาหารเสริมสุขภาพประเภทสมุนไพรที่มีมาตรฐาน มีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เพื่อรับรองสรรพคุณหรือฤทธิ์ของสมุนไพร และความปลอดภัยในการใช้จึงนับว่ามีความจำเป็นอย่างยิ่งในสนับสนุนการใช้หรือพัฒนาสมุนไพร

การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสมุนไพรนับเป็นการสร้างรากฐานความรู้ด้านวิทยาศาสตร์เพื่อสร้างงานวิจัยที่มีมาตรฐาน และใช้เป็นแหล่งข้อมูลในการอ้างอิงประโยชน์จากการใช้สมุนไพรเพื่อต่อยอดภูมิปัญญาไทยอันทรงค่าในอดีต สู่การยกระดับมาตรฐานการสร้างผลิตภัณฑ์เพื่อเจาะขยายตลาดทั้งในและต่างประเทศ ซึ่งในครึ่งแรกของปี 2551 ประเทศไทยนำเข้ายารักษาหรือป้องกันโรค มูลค่า 15,989.7 ล้านบาท ขยายตัวเพิ่มขึ้นจากช่วงเดียวกันของปีก่อนร้อยละ 21 แต่ส่งออกยารักษาหรือป้องกันโรคมีมูลค่าการส่งออกเพียง 2,607.4 ล้านบาท (สำนักงานเศรษฐกิจอุตสาหกรรม,

2551) ตลาดยาและอาหารเสริมประเภทสมุนไพรจึงเป็นส่วนหนึ่งในการช่วยลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ยาจากต่างประเทศ และเพิ่มยอดการส่งออกเพื่อสร้างรายได้ให้แก่ประเทศได้ในอนาคต

นอกจากนี้การใช้ประโยชน์จากสมุนไพรยังเป็นการเพิ่มขีดความสามารถของประเทศไทยในการบริหารจัดการ อนุรักษ์และฟื้นฟูสิ่งแวดล้อม เป็นการใช้ประโยชน์จากทรัพยากรธรรมชาติอย่างคุ้มค่า รวมทั้งเป็นการสร้างโอกาสและการมีส่วนร่วมของประชาชนและชุมชนท้องถิ่น ในระยะยาวนับว่าเป็นการสร้างความเข้มแข็งให้กับชุมชน ในการแก้ไขปัญหา บริหารจัดการพัฒนาองค์ความรู้ในการ เพิ่มมูลค่าสมุนไพรและใช้ทรัพยากรให้คุ้มค่าอย่างแท้จริง

ประเทศไทยมีสมุนไพรอยู่มากมาย หลายชนิดเป็นพืชผักสวนครัว และเป็นส่วนประกอบในการทำอาหารไทยมาแต่อดีต ในงานวิจัยนี้ให้ความสนใจกับ “ใบยอ” เนื่องจากคนไทยใช้เป็นผักแกล้ม และใช้ประกอบอาหาร เช่นห่อหมก แกงอ่อม และแกงกะทิหลายประเภท ใบยอมีสรรพคุณทางยามากมาย รวมทั้งสรรพคุณด้านการบำรุงธาตุ แก้ปวดข้อ และม้ามโต ซึ่งมีแนวโน้มว่ามีความเกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านภูมิคุ้มกัน นอกจากนี้ใบยอยังเป็นแหล่งวัตถุดิบที่หาได้ง่าย เนื่องจากต้นยอพบได้ทั่วไปในประเทศไทย ดังนั้นในการพัฒนาการใช้ใบยอเพื่อประโยชน์ในการดูแลสุขภาพ หรือการรักษาจึงทำได้ไม่ยุ่งยากนัก

จึงอาจกล่าวได้ว่าการวิจัยเพื่อทดสอบสรรพคุณของใบยอต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นงานวิจัยที่ทั้งสร้างประโยชน์โดยตรงต่อการรับรองสรรพคุณสมุนไพรเบื้องต้น และเป็นข้อมูลพื้นฐานอันจำเป็นยิ่งสำหรับการวิจัยในเชิงประยุกต์อื่นๆ เพื่อการพัฒนายาใหม่หรือผลิตภัณฑ์เสริมการรักษาสำหรับอาการหรือโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันตามแนวทฤษฎีเศรษฐกิจพอเพียง อันจะนำไปสู่การพึ่งพาตนเองของประเทศไทย และมีการต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นอันจะนำไปสู่การผลิตผลิตภัณฑ์สุขภาพเพื่อการส่งออก ปรับระบบการวิจัยให้สร้างองค์ความรู้ที่ต้องการจากงานวิจัยสู่ชุมชน สืบสานภูมิปัญญาและเป็นรากฐานการพัฒนาศักยภาพการแข่งขันของประเทศในด้านวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีในอนาคต

1.2 วัตถุประสงค์

(1) เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบยอต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้การทดสอบการหลั่งไซโตไคน์

(2) เพื่อศึกษาผลของวิธีการเตรียมที่แตกต่างกันต่อปริมาณสารองค์ประกอบในใบยอ และการหลั่งไซโตไคน์

1.3 ทฤษฎี สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ปัจจุบันสมุนไพรได้รับการพัฒนาขึ้นเพื่อใช้เป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและใช้รักษาโรคต่างๆ มากมาย ตัวอย่างสมุนไพรที่มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา และได้รับการพัฒนาจนสามารถนำมาใช้รักษาโรคในปัจจุบัน เช่น vinblastine จากต้นแพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) สำหรับรักษามะเร็ง, plaunotol จากต้นเปล้าน้อย (*Croton sublyratus* Kurz) และ curcumin จากขมิ้นชัน (*Curcuma longa* Linn.) สำหรับรักษาอาการของโรคกระเพาะอาหาร

ยอ (*Morinda citrifolia* Linn.) พบได้ทั่วไปในแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทย ปลูกและดูแลรักษาง่าย และใบยอออกทุกฤดูกาล ทำให้มีความน่าสนใจในการนำมาใช้เป็นวัตถุดิบในการพัฒนาการสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่สมุนไพรชนิดนี้ และ คนไทยก็ใช้ใบยอเป็นส่วนประกอบในอาหารไทยหลากหลายชนิดมาแต่อดีต จึงสันนิษฐานในเบื้องต้นได้ว่าน่าจะมีความปลอดภัยในการใช้ ซึ่งจากรายงานของ West และคณะ (2007) ได้ระบุว่าใบยอ มีความปลอดภัย เมื่อทดสอบความเป็นพิษทั้งแบบเฉียบพลัน กึ่งเฉียบพลัน และเรื้อรังในหนูถีบจักรเมื่อป้อนทางปาก

ใบยอพื้นบ้านของไทยมีสรรพคุณทางยาที่หลากหลาย เช่น แก้ท้องร่วง แก้จุกเสียด แก้บิด แก้คลื่นเหียน ฆ่าเหา และขับประจำเดือน นอกจากนี้ยังมีสรรพคุณบางประการที่มีความเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แก้โรคเก๊าท์ แก้ปวดตามนิ้วมือ นิ้วเท้า แก้ม้ามโต บำรุงธาตุ แก้ไข้ และแก้ไอ (นันทวรรณ บุณยะประภัทร, 2543) นอกจากนี้ใบยอยังประกอบด้วยสารองค์ประกอบที่หลากหลาย เช่น terpenoids, phytosterols, fatty acid (Takashima, et al. 2007) iridoids, flavonol, anthraquinones และอนุพันธ์ glycosides ของสารเหล่านี้ (Sang, et al. 2001; Takashima, et al. 2007) โดยมีสารประกอบในกลุ่ม flavonol glycosides เป็นสารองค์ประกอบหลัก (Sang, et al. 2001) ซึ่งสารประกอบในกลุ่ม flavonoids นี้สามารถพบได้ทั่วไปในพืชชนิดต่างๆ มีรายงานฤทธิ์ของ flavonoids ต่อระบบภูมิคุ้มกัน เช่นฤทธิ์ต้านอักเสบ (Garcia-Madiavilla, et al. 2006; Blonska, et al. 2004) ต้านการติดเชื้อไวรัส 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)

ซึ่งจากสรรพคุณทางยาและสารองค์ประกอบในใบยอที่มีรายงานไว้ จึงทำให้ผู้วิจัยมีแนวคิดว่าใบยอน่าจะมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันและได้กำหนดงานวิจัยนี้ขึ้น

ในประเทศญี่ปุ่นและสหรัฐอเมริกามีผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากใบยอจำหน่ายในรูปผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและสมุนไพรมานานกว่า 7 ปีแล้ว ซึ่งใบยอที่ใช้เป็นวัตถุดิบส่วนใหญ่นำเข้าจาก French Polynesia ซึ่งมีความน่าสนใจว่าหากเราสามารถใช้ใบยอพื้นบ้านของไทยเป็นวัตถุดิบเพื่อผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารและสมุนไพรได้ ก็จะเป็นการช่วยเพิ่มมูลค่าให้กับสมุนไพรไทย นอกจากนี้รูปแบบผลิตภัณฑ์ที่มีจำหน่ายในท้องตลาดก็มีก็มีทั้งแบบ ชาชง และผงแห้งบรรจุแคปซูล ซึ่งยังไม่มีการศึกษาเปรียบเทียบว่าการเตรียมสมุนไพรด้วยวิธีการเตรียมที่

แตกต่างกันนี้มีผลต่อฤทธิ์ของสมุนไพร หรือการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารในใบยออย่างไร จากรายงานการแยกสารหอมระเหยจากใบยอที่เตรียมโดยการแช่แข็ง ทำให้แห้ง และการอบแห้งโดย West และ Zhou (2008) ซึ่งใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ และวิเคราะห์ด้วย GC-MS พบว่าน้ำมันหอมระเหยที่ได้มีส่วนประกอบหลักเป็น palmitic acid และ E-phytol และวิธีการทำแห้งมีผลให้ปริมาณสารหอมระเหยลดลงมากกว่าครึ่งหนึ่ง ซึ่งงานวิจัยดังกล่าวแสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเตรียมที่แตกต่างกันนี้เอง มีผลต่อปริมาณสารที่สกัดได้จากใบยอ ดังนั้นผู้วิจัยจึงให้ความสนใจกับเทคนิคการเตรียมสารสกัด ซึ่งผลการทดลองที่ได้สามารถใช้เป็นข้อมูลในการพัฒนาการผลิตผลิตภัณฑ์เสริมอาหารจากใบยอที่เหมาะสมในอนาคต ทั้งนี้ในการวิจัยนี้จะใช้เทคนิคการวิเคราะห์สารประกอบ flavonoids ด้วยเทคนิค HPLC ซึ่งประยุกต์มาจากผลการศึกษาของ Deng และคณะ (2008) ซึ่งสกัดใบยอสดด้วยเทคนิค percolation ใน ethanol และวิเคราะห์ด้วยเทคนิค HPLC-UV/MS เทียบกับสารมาตรฐาน rutin (1), kaempferol-3-*O*-α-l-rhamnopyranosyl-(1⟶6)-β-d-glucopyranoside (2), quercetin (3) และ kaempferol (4) ซึ่งรายงานว่าเทคนิคการวิเคราะห์ดังกล่าวเป็นเทคนิคที่เป็นที่ยอมรับ และทำได้สะดวกรวดเร็ว โดยในการวิจัยจะเตรียมสารสกัดใบยอที่จำลองมาจากการใช้/รับประทานใบยอที่พบได้ เช่นสกัดใบยอสดโดยการหมักด้วยเอทธานอล ซึ่งพบได้ในการสกัดเพื่อเตรียมสารทดสอบทั่วไปเทียบกับการทำให้แห้งก่อนนำมาสกัด นอกจากนี้ยังเตรียมสารสกัดโดยการปั่นกับน้ำ คั้นกากแล้วนำไปผ่านการ freeze-dry คล้ายกับการรับประทานน้ำคั้นใบยอสดเทียบกับการใช้ใบยอแห้งซึ่งจำลองมาจากการเตรียมผงใบยอก่อนการบรรจุแคปซูล นอกจากนี้ยังเตรียมสารสกัดโดยการต้มใบยอสดก่อนนำไปทำให้แห้งด้วยการระเหย ซึ่งจำลองแบบการใช้ใบยอเพื่อรักษาในตำรายาโบราณ

ส่วนวิธีการทดสอบฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันนั้น ในงานวิจัยนี้จะทำการศึกษาผลของสารสกัดต่อการหลั่ง cytokines ชนิด IFN-γ ซึ่งเป็น Th1-mediated cytokine และ IL-10 ซึ่งเป็น Th2-mediated cytokine และตรวจวัดปริมาณ cytokines ดังกล่าวโดยเทคนิค ELISA เพื่อตรวจสอบการทำหน้าที่ของเซลล์ที่หลั่ง cytokines นั้นเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารทดสอบที่ต้องการศึกษา และทำนายผลของสารทดสอบต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ค่า Th1/Th2 ratio

ผลการศึกษาจากงานวิจัยนี้จึงสามารถใช้เป็นข้อมูลในการพิสูจน์สมมติฐานว่าใบยอมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันหรือไม่ และเป็นไปตามสรรพคุณทางยาที่เคยมีการใช้มาแต่อดีตอย่างไร นอกจากนี้หากต้องการพัฒนาใบยอเพื่อเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารประเภทสมุนไพรแล้ว วิธีการเตรียมใดจะเป็นวิธีการที่เหมาะสมที่สุด อย่างไรก็ตามแม้ว่าใบยอจะเป็นพืชกินได้และจัดว่าเป็นส่วนประกอบในอาหารพื้นบ้านของไทยก็ตาม การทดสอบเพิ่มเติมทั้งการทดสอบในระบบภูมิคุ้มกันอื่นๆ การทดสอบแบบ *in vivo* และการทดสอบความเป็นพิษเพิ่มเติมก็ยังนับว่ามีความจำเป็น และเป็นข้อมูลสนับสนุนการเพิ่มมูลค่าสมุนไพรใบยอของไทยเพื่อประยุกต์ใช้ในการบำบัดอาการหรือโรคที่เกี่ยวข้องอย่างเหมาะสมได้ในอนาคต

1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ เช่น การเผยแพร่ในวารสาร จดสิทธิบัตร ฯลฯ และหน่วยงานที่นำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

1.4.1 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

- ข้อมูลผลของสารสกัดจากใบยอต่อระบบภูมิคุ้มกันในหลอดทดลอง
- ฐานองค์ความรู้ในการขยายผลเพื่อพัฒนาการนำใบยอไปใช้ในประโยชน์ในเชิงสุขภาพและเชิงพานิชย์
- ผลงานวิจัยเพื่อเสนอผลงาน หรือ
  ตีพิมพ์ในวารสารระดับประเทศหรือระดับนานาชาติ
- การสร้างนักวิจัยให้เป็นทุนปัญญาของชาติในระยะยาว

1.4.2 หน่วยงานที่จะนำผลการวิจัยไปใช้ประโยชน์

- นิสิต คณาจารย์ นักวิจัยคณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร ประชาชน และหน่วยงานที่มีความสนใจ

1.5 แผนการถ่ายทอดเทคโนโลยีหรือผลการวิจัยสู่กลุ่มเป้าหมาย

(1) การถ่ายทอดความรู้แก่นิสิตสำหรับการเรียนการสอนหัวข้อปัญหาพิเศษ รวมทั้งคณาจารย์ นักวิจัย ประชาชนและผู้สนใจ

(2) การเผยแพร่ผลงานวิชาการในการประชุมวิชาการต่างๆ เช่น งานนเรศวรวิจัย และงานประชุมวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย

(3) การตีพิมพ์ผลงานวิจัยในวารสารระดับประเทศและ/หรือระดับนานาชาติ เช่น Journal of Ethnopharmacology และ Phytotherapy Research

1.6 ผลสำเร็จและความคุ้มค่าของการวิจัยที่คาดว่าจะได้รับ

ผลสำเร็จในงานวิจัยนี้อยู่ในระดับ **P** หรือ ผลสำเร็จเบื้องต้น (Preliminary results) เพื่อพัฒนาไปสู่การวิจัยแบบต่อยอด ทั้งนี้ผลสำเร็จของงานวิจัยที่ได้ยังมีประโยชน์ในการเพิ่มมูลค่าและประยุกต์ใช้สมุนไพรไทย ให้เกิดประโยชน์ในเชิงสุขภาพและพาณิชย์ ในลักษณะการลงทุนระยะยาว สู่การพึ่งพาตนเองโดยการบริหารจัดการทรัพยากรธรรมชาติที่มีอยู่ให้คุ้มค่าบนรากฐานแห่งภูมิปัญญาไทย

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 ออกเป็นช่อแบบช่อกระจุกแน่นติดกันเป็นก้อนกลมหรือเบี้ยวตามปลายกิ่งหรือซอกใบ 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) ทำการศึกษาแนวโน้มการก่อการแพ้ของสารสกัดจากใบยอในระบบน้ำย่อยเทียมของกระเพาะอาหาร โดยศึกษาการต้านต่อการย่อยโดย 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 ที่ต่อต้านกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้น หรือยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokines ส่วนใหญ่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ในกลุ่ม Th2 ได้แก่ IL-4, IL-10, IL-11 และ IL-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 ภายในนิวเคลียสตรงตำแหน่งของ 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-κB 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

บทที่ 3
ระเบียบวิธีวิจัย

3.1 เซลล์เพาะเลี้ยง

Human T lymphoblast (acute lymphoblastic leukemia, ALL) suspension (MOLT-4) Lot/ PASSAGE 36 Lot 3 00115-610 (CLS, Germany)

3.2 สมุนไพร

ชื่อสมุนไพร : ยอ (*Morinda citrifolia* Linn.)

ส่วนที่ใช้ในการสกัด : ใบ

แหล่งที่มา : จังหวัดลำพูน

ช่วงเวลาในการเก็บ : มีนาคม 2553

3.3 สารเคมี

(1) Acetic acid (J.T.Baker, Thailand)

(2) Concanavalin A (Sigma, USA)

(3) Dimethylsulfoxide; DMSO (Sigma #D8418, Singapore)

(4) Ethyl alcohol (RCI Labscan, Thailand)

(5) Fetal bovine serum (Sorali, Brazil)

(6) Interferon-γ (Prepotech, USA)

(7) Interferon-γ ELISA Kits (Prepotech, USA)

(8) Interleukin-10 (Prepotech, USA)

(9) Interleukin-10 ELISA Kits (Prepotech, USA)

(10) Kaempferol (Sigma, USA)

(11) Methyl alcohol (RCI Labscan, Thailand)

(12) Phosphate buffer saline (PBS) solution (Sigma, USA)

(13) Quercetin (Sigma, USA)

(14) RPMI-1640 supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma, USA)

(15) Rutin (Sigma, USA)

3.4 อุปกรณ์และเครื่องมือ

(1) 0.2, 0.45 μm nylon syringe filter (Altech Associates, Inc., USA)

(2) 24-well cell culture plate (Nunc, Denmark)

(3) 25-cm^3 cell culture flask (Nunc, Denmark)

(4) 96-well cell culture plate (Nunc Maxisorp flat-bottom, Nunc, Denmark)

(5) Autoclave (HA-300P, Hirayama Manufacturing Corporation, Japan)

(6) Centrifuge (Z230A, Hermle, Germany)

(7) Centrifuge tube (Neptune, USA)

(8) CO_2 Incubator (3121, Forma Scientific.Inc., USA)

(9) Hemocytometer & cover slip (Boeco, Germany)

(10) High-performance liquid chromatography (HPLC) (Shimadzu, Japan)

- Pump (LC-20 AT, Shimadzu, Japan)
- UV Detector (SPD-20 A, Shimadzu, Japan)
- System Controller (Model SPD-20 A, Shimadzu, Japan)
- Autosample (SIL-10ADVp, Shimadzu, Japan)
- Oven (CTO-10ASVp, Shimadzu, Japan)

(11) Hot air oven (Designer series, Contherm Scientific Ltd., New Zealand)

(12) HPLC column Lichrosphere 100 RP-18 column (250 x4 mm i.d., 5 μ° particle size) (Phenomenex, USA)

(13) Inverted microscope (Nikon, Japan)

(14) Laminar airflow cabinet (1185, Forma Scientific.Inc., USA)

(15) Micropipette (Rainin, USA)

(16) Microplate reader (DTX880, Beckman coulter, Austria)

(17) Microprocessor control freeze-dryer (Dura-stopTM uP, FTS Systems, Inc., USA)

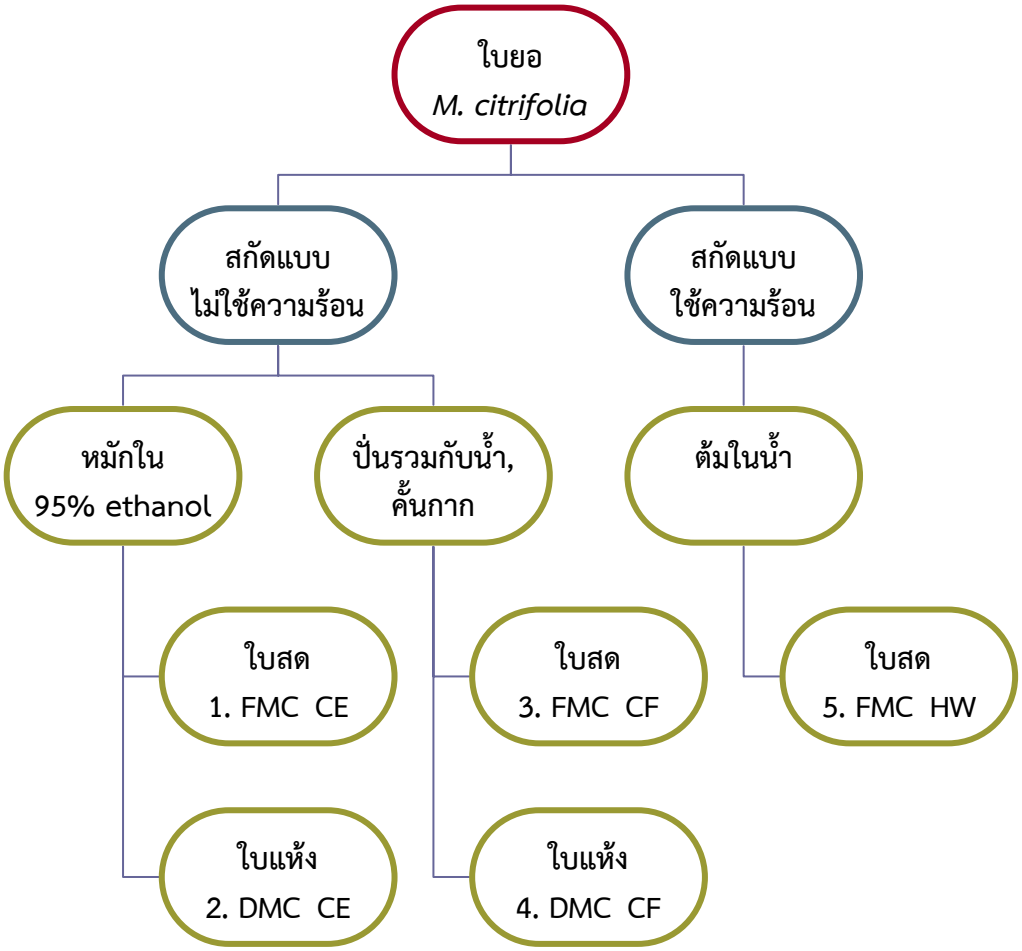
(18) Tip, blue, yellow (Bioline, USA)

(19) Vacuum evaporator (VV2000, Heidolph, Germany)

3.5 วิธีการทดลอง

<u>การทดลอง 1</u> การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ

นำใบยอที่ผ่านการทำความสะอาดและลดขนาดโดยการหั่นละเอียด มาสกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ดังนี้ (รูป 3-1)



รูป 3-1 แผนภาพการสกัดใบยอ (*M. citrifolia*) ด้วยเทคนิคต่างๆ

1. FMC_CE : นำใบยอสด 350 g มาสกัดโดยการหมัก (maceration) ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาณรวม 3.5 L คนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 4 ช.ม. จนกระทั่ง exhaust แล้วนำน้ำยาสารสกัดไประเหยแห้ง ด้วย vacuum rotatory evaporator โดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C

2. DMC_CE : นำใบยอที่ผ่านการอบแห้ง ณ อุณหภูมิ 60 °C ปริมาณ 350 g มาสกัดโดยการหมัก (maceration) ใน 95% Ethyl alcohol ปริมาณรวม 3.5 L คนเป็นครั้งคราว เป็นเวลา 4 hr จนกระทั่ง exhaust แล้วนำน้ำยาสารสกัดไประเหยแห้ง ด้วย vacuum rotatory evaporator โดยใช้อุณหภูมิไม่เกิน 60 °C

3. FMC_CF : นำใบยอสดปริมาณ 350 g มาปั่นรวมกับน้ำปริมาตรรวม 800 mL คั้นน้ำสกัดและแยกกากออกโดยการกรอง นำสารละลายของสารสกัดไประเหยแห้งด้วยการทำ freeze-dry

4. DMC_CF : ใบยอที่ผ่านการอบแห้ง ณ อุณหภูมิ 60 °C ปริมาณ 350 g มาปั่นรวมกับน้ำปริมาตรรวม 800 mL คั้นน้ำสกัดและแยกกากออกโดยการกรอง นำสารละลายของสารสกัดไประเหยแห้งด้วยการทำ freeze-dry

5. FMC_HW : นำใบยอสดปริมาณ 350 g มาสกัดโดยการต้มด้วยน้ำปริมาณ 1 L เป็นเวลา 8 hr จนได้สารละลายของสารสกัดที่แห้ง

เตรียมสารละลายของสารสกัดทั้ง 5 ชนิด ณ ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, 50 และ 100 µg/ml ใน Phosphate buffer saline (PBS) solution โดยใช้ dimethyl sulfoxide (DMSO) เป็นสารช่วยละลาย กำหนดให้ความเข้มข้นสุดท้าย (final concentration) ของ DMSO ไม่เกิน 0.1% จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ผ่านแผ่นกรอง (membrane filter) ขนาด 0.2 micron เพื่อทำไร้เชื้อสารสกัดก่อนนำไปทดสอบ

<u>การทดลอง 2</u> การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ

(1) กำหนดใช้ HPLC condition ในการทดสอบโดยประยุกต์จากการศึกษาของ Deng และคณะ (2008) และ Zu และคณะ (2006) ดังนี้

<u>Condition 1</u> (Deng et al., 2008)

Column:	Luna C18, 100 A column, Serial Number 422572-5		
	(250 × 4.6 mm i.d., 5 micron particle size)		
Mobile phase:	(A) 0.3% acetic acid in methanol : (B) 0.3% acetic acid in water		
	linear gradient A:B	35-50 : 65-50	0-10 นาที
		50-60 : 50-40	10-15 นาที
		60-65 : 40-35	15-18 นาที
		65-98 : 35-2	18-20 นาที
	Isocratic elution ด้วย A	100%	20-30 นาที
Flow rate:	1 mL/min		
Injection volume:	100 µL		
UV-detector:	365 nm		

Condition 2 (Zu et al., 2006)

Column:	Luna C18, 100 A column, Serial Number 422572-5
	(250 × 4.6 mm i.d., 5 micron particle size)
Mobile phase:	(A) 40% methanol : (B) 15% Acetronitrile : (C) 45% water
	(+ containing 1.0% acetic acid)
Run time:	17 min
Flow rate:	1 mL/min
Injection volume:	20 µL
UV-detector:	365 nm

(2) เตรียมสารละลาย rutin, quercetin และ kaempferol ใน methanol ความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 10 µg/mL วิเคราะห์ด้วย HPLC เพื่อสร้างกราฟมาตรฐานระหว่างความเข้มข้นและ peak area

(3) เตรียมสารละลายสารสกัดใบยอความเข้มข้น 1, 10 และ 50 mg/mL และนำไปกรองผ่าน membrane filter 0.45 micron ก่อนวิเคราะห์ด้วย HPLC

(4) เทียบปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ จากสมการเส้นตรงที่ได้จากกราฟมาตรฐานในข้อ (1) โดยพิจารณาจาก peak ที่ปรากฏ ณ retention time เดียวกับสารมาตรฐาน

<u>การทดลอง 3</u> การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4)

(1) เพาะเลี้ยง MOLT-4 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ ที่ประกอบด้วย RPMI-1640 medium, 2 mM L-glutamine และ 10% fetal bovine serum โดย sub-culture ทุก 2-4 วัน

(2) culture สารสกัดร่วมกับ cell suspensions (1×10^6 cell/ml) และ 5 µg/ml con A (stimulated system) หรือไม่เติม con A (unstimulated system)ใน 24-well cell culture plate จากนั้นนำไป incubate ณ อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

(3) ปั่นตก cell suspensions และเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ส่วนใส (supernatant) มาวิเคราะห์หาปริมาณ IFN-γ และ IL-10 โดยเทคนิค ELISA และวัดปริมาณ cytokine ด้วยเครื่อง microplate reader ณ 405 nm เทียบกับ standard curve

(4) การทดสอบปริมาณไซโตไคน์ด้วยชุดน้ำยาทดสอบมาตรฐานทำได้ ดังนี้

- coat 96 well-ELISA plate ด้วย capture antibody ใน coating buffer ผนึก plate และนำไป incubate ณ อุณหภูมิ 4 °C ทิ้งไว้ข้ามคืน

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 5 รอบ ระวังการตกค้างของ buffer

- block wells ด้วย assay diluents จากนั้นนำไป incubate ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง และล้าง plate ซ้ำหลายๆ ครั้ง

- เติมสาร standard ลงในแต่ละ well (เตรียมความเข้มข้นแบบ 2-fold serial dilutions) เพื่อนำค่าที่วัดได้ไปสร้าง standard curve

- เติมสารทดสอบลงในแต่ละ well จากนั้นผนึก plate และนำไป incubate ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง (หรือทิ้งไว้ข้ามคืน ณ อุณหภูมิห้อง 4 °C)

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 5 รอบ ระวังการตกค้างของ buffer

- เติม detection antibody จากนั้นผนึก plate และนำไป incubate ต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 1 ชั่วโมง

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 5 รอบ ระวังการตกค้างของ buffer

- เติม avidin-HRP จากนั้นผนึก plate และนำไป incubate ต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 30 นาที

- aspirate wells และล้าง plate ด้วย wash buffer 7 รอบ โดยแช่ buffer ค้างไว้ 1-2 นาทีก่อนดูดออก ระวังการตกค้างของ buffer

- เติม substrate และนำไป incubate ต่อ ณ อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 15 นาที

- เติม stop solution ลงในแต่ละ well จากนั้นจึงนำไปอ่านค่า OD ที่ 450 nm

- คำนวณค่า “IFN-γ / IL-10 ratio” เพื่อวิเคราะห์ผลของสารสกัดใบยอต่อการตอบสนองของ Th1 และ Th2 ตามลำดับ

การเก็บข้อมูล เก็บข้อมูลแบบสามหรือสี่ซ้ำ

การวิเคราะห์ข้อมูล

วิเคราะห์ข้อมูลโดยการใช้การคำนวณทางสถิติแบบ One-way ANOVA analysis หรือการวิเคราะห์ด้วยหลักการทางสถิติที่เหมาะสมขึ้นกับค่าข้อมูลที่ได้

สถานที่ทำการทดลอง/เก็บข้อมูล

หน่วยวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม (Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, PBRU) ห้อง ภ. 4305 คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร อ. เมือง จ. พิษณุโลก

3.6 ขอบเขตของการวิจัย

(1) ทดสอบด้วยสารสกัดจำนวน 3-5 ตัวอย่าง

(2) เปรียบเทียบปริมาณสารองค์ประกอบในสารสกัดโดยเทคนิค HPLC-fingerprint เทียบกับสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol

(3) ใช้ human leukemic T-lymphocyte cell line ในการทดสอบการหลั่งไซโตไคน์

(4) ทดสอบผลของสารสกัดต่อการหลั่งไซโตไคน์ชนิด IFN-γ และ IL-10 โดยเทคนิค ELISA

(5) ชนิดของเซลล์เพาะเลี้ยงรวมทั้งชนิดของไซโตไคน์ที่ใช้ในการทดสอบอาจมีการเปลี่ยนแปลงตามความเหมาะสม

3.7 แผนการดำเนินงานตลอดโครงการวิจัย

แผนการดำเนินงานวิจัย	เดือน											
	2	4	6	8	10	12	14	16	18	20	22	24
1. เตรียมสารสกัด - จัดหาสมุนไพร - ตรวจสอบเอกลักษณ์สมุนไพร - เตรียมสารสกัดด้วยเทคนิคต่างๆ	✓	✓	✓									
2. สร้าง HPLC-fingerprint - ศึกษา HPLC- condition - สร้าง standard curve และ ศึกษา HPLC-fingerprints ของสารสกัด ฯ - วิเคราะห์ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัด				✓	✓	✓	✓					
3. ศึกษาผลของสารสกัดฯ ต่อการสร้าง cytokine ใน human leukemic T-lymphocyte cell lines						✓	✓	✓	✓	✓	✓	
4. สรุป ประเมิน และรายงานการวิจัย						✓					✓	
5. นำเสนอผลงาน/ตีพิมพ์											✓	✓

บทที่ 4
รายงานผลการวิจัย

<u>การทดลอง 1</u> การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ

เมื่อสกัดใบยอสดและแห้งด้วยเทคนิคการสกัดและน้ำยาสกัดที่แตกต่างกัน 5 เทคนิค ได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสด แสดงดังตาราง 4-1

ตาราง 4-1 ลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสดที่ได้จากการสกัดใบยอด้วยเทคนิคต่างๆ

สารสกัด	วัตถุดิบ	เทคนิคการสกัด	น้ำยาสกัด	ลักษณะสารสกัดหยาบที่ได้	ร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสด
FMC_CE	ใบยอสด	การหมัก	เอทธานอล	สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม ข้นหนืด มีลักษณะคล้ายยางไม้	5.86
DMC_CE	ใบยออบแห้ง	การหมัก	เอทธานอล	สารสกัดสีเขียวเข้ม มีลักษณะเป็นผลึกเหนียว	2.54
FMC_CF	ใบยอสด	Freeze-dry	น้ำ	สารสกัดสีเขียว มีลักษณะเป็นผงแห้ง	7.14
DMC_CF	ใบยออบแห้ง	Freeze-dry	น้ำ	สารสกัดสีเขียวเข้ม มีลักษณะเป็นผงแห้ง	6.29
FMC_HW	ใบยอสด	ให้ความร้อนโดยการต้ม	น้ำ	สารสกัดสีน้ำตาลเข้ม ข้นหนืด มีลักษณะ คล้ายยางไม้	5.16

<u>การทดลอง 2</u> การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ

2.1 HPLC condition

HPLC condition ที่เหมาะสมและใช้ในการทดสอบคือ condition 2 ซึ่งเป็นการ run mobile phase แบบ isocratic ที่ประยุกต์จากการศึกษาการแยก rutin, quercetin และ kaempferol ของ Zu และคณะ (2006) ซึ่ง peak ของสารทั้งสามแยกจากกันได้ชัดเจน ดังนี้

Column: Luna C18, 100 A column, Serial Number 422572-5
(250 × 4.6 mm i.d., 5 micron particle size)

Mobile phase: (A) 40% methanol : (B) 15% Acetronitrile : (C) 45% water
(+ containing 1.0% acetic acid)

Run time: 17 min

Flow rate: 1 mL/min

Injection volume: 20 μL

UV-detector: 365 nm

2.2 กราฟมาตรฐาน (Standard curve) ของสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol

standard curve ของสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ใน methanol ช่วงความเข้มข้น 100, 75, 50, 25, 10 μg/mL วิเคราะห์ด้วย HPLC condition จากข้อ 2.1 ได้สมการเส้นตรงที่ใช้ในการคำนวณเทียบหาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดหยาบคือ

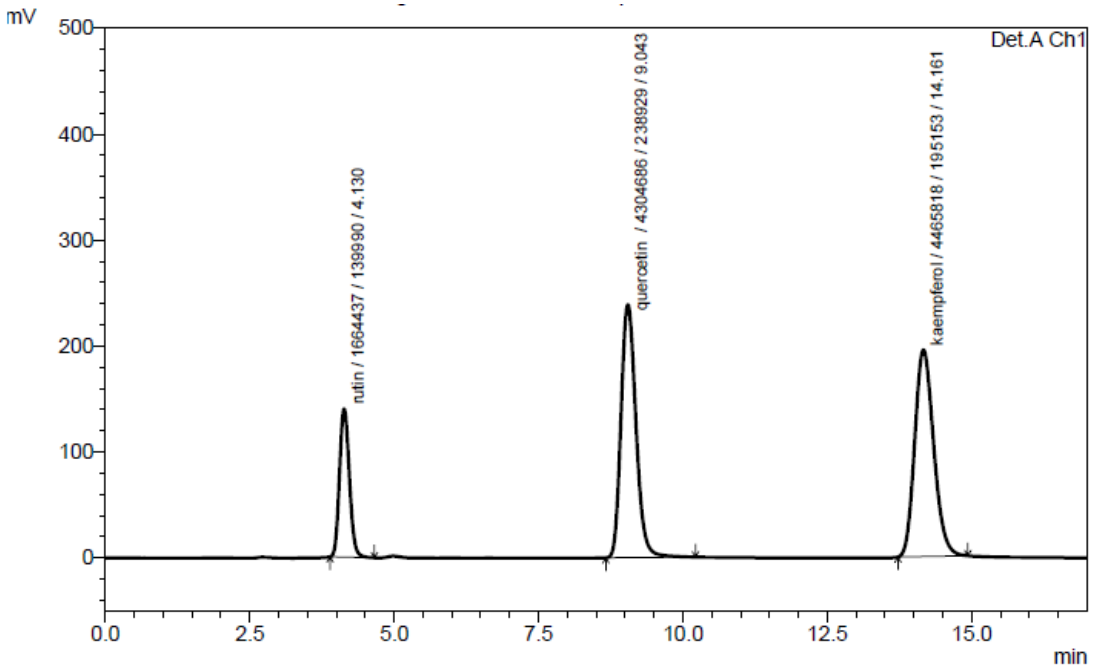
rutin: $y = 0.033x + 0.002$ $(r^2 = 1)$

quercetin: $y = 0.087x - 0.060$ $(r^2 = 1)$

kaempferol: $y = 0.091x - 0.088$ $(r^2 = 1)$

เมื่อ x คือความเข้มข้น (μg/mL) และ y คือ peak area × 10^6

retention time แสดงตำแหน่ง peak ของ rutin, quercetin และ kaempferol คือ 4, 9 และ 14 นาที ตามลำดับ ตัวอย่าง chromatogram ของ rutin, quercetin และ kaempferol แสดงดังรูป 4-1



รูป 4-1 ตัวอย่าง chromatogram ของ rutin, quercetin และ kaempferol ความเข้มข้น 50 μg/mL

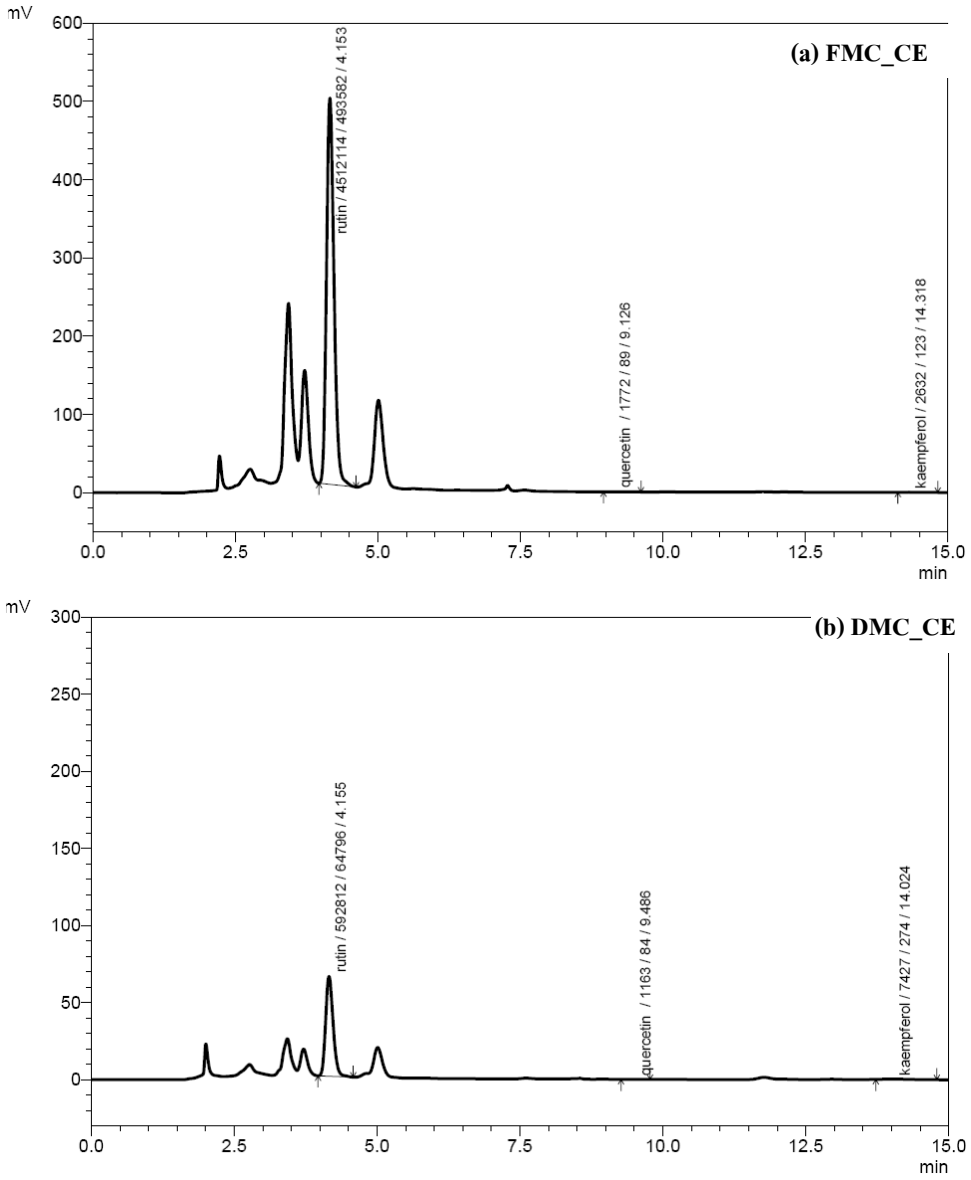
2.3 HPLC-fingerprints ของสารสกัดใบยอฯ และการวิเคราะห์ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัด

จากการวิเคราะห์ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอทั้ง 5 ชนิด โดยการเปรียบเทียบจาก HPLC-fingerprints ของสารสกัดฯ เทียบกับสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ได้ผลการทดลองดังตาราง 4-2 พบว่าสารสกัดใบยอที่เตรียมโดยใช้เทคนิคการเตรียมที่แตกต่างกัน มีปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol แตกต่างกัน โดย rutin พบมากในสารสกัดใบยอสดที่หมักด้วย ethanol (FMC_CE) การนำใบยอไปผ่านการอบแห้ง (DMC_CE) ทำให้ปริมาณ rutin ลดลงอย่างมาก ส่วนสารสกัดใบยอที่เตรียมจากใบสดที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง (FMC_CF) ก็พบปริมาณ rutin สูงเช่นกัน quercetin และ kaempferol พบมากในสารสกัดใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) ส่วนสารสกัดใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคการสกัดอื่นๆ มีปริมาณ quercetin และ kaempferol ไม่แตกต่างกันมากนัก

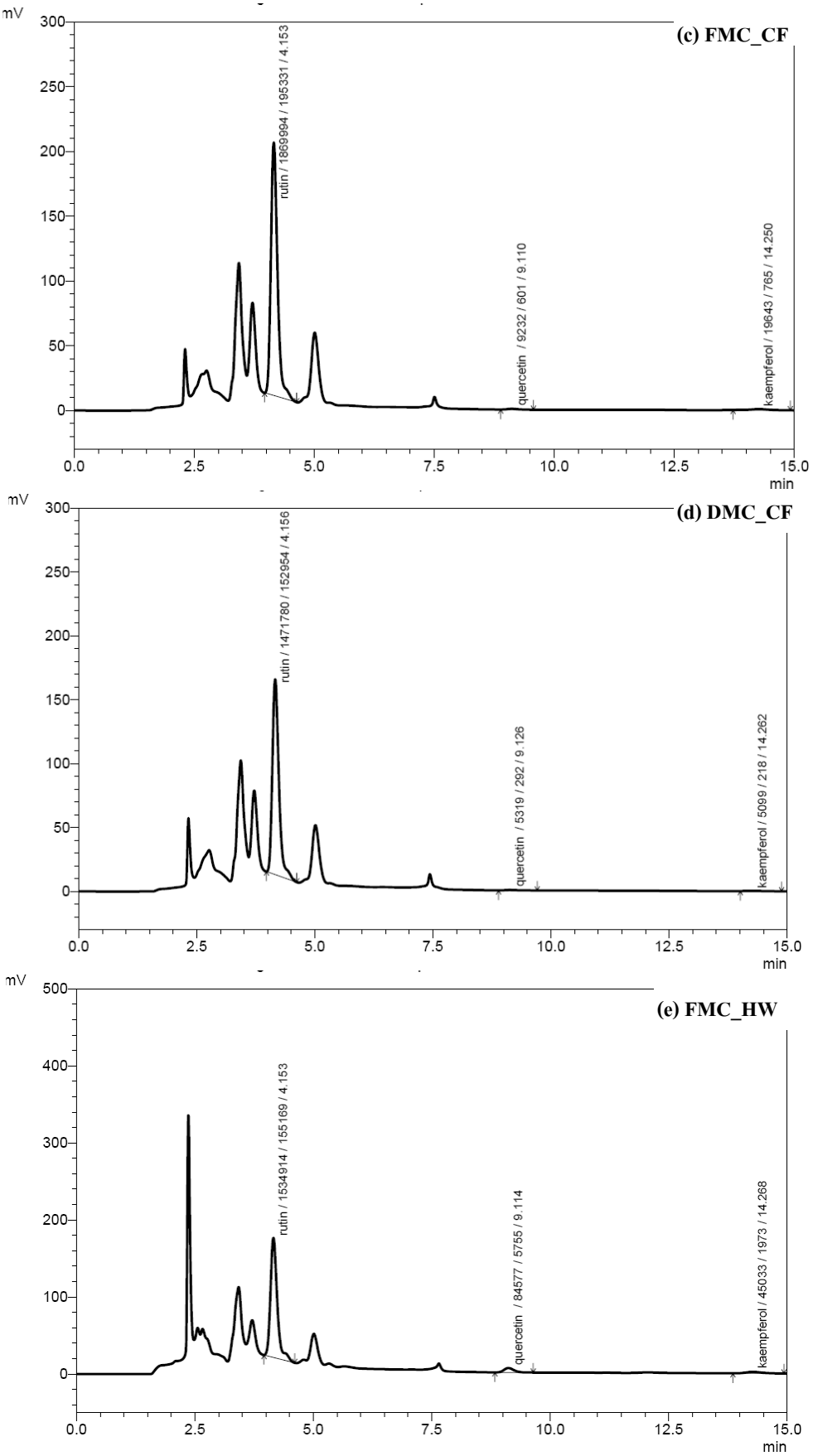
จาก HPLC-fingerprints ของสารสกัดหยาบจากใบยอที่สกัดด้วยวิธีที่แตกต่างกันทั้ง 5 ชนิด (รูป 4-2) นอกจาก peak ของ rutin, quercetin และ kaempferol แล้ว ยังพบ unidentified peak ปรากฏอีกหลาย peak ซึ่งยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ และมีปริมาณแตกต่างกันในสารสกัดฯ ใบยอแต่ละชนิด

ตาราง 4-2 ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ10 mg/mL ที่สกัดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน 5 ชนิด เทียบจาก HPLC-fingerprint ของสารมาตรฐาน

สารสกัด	rutin (mg%)	quercetin (mg%)	kaempferol (mg%)
FMC_CE	1366.37 ± 0.330	7.10 ± 0.004	10.16 ± 0.198
DMC_CE	179.03 ± 0.003	7.02 ± 0.009	10.35 ± 0.138
FMC_CF	566.00 ± 0.061	7.95 ± 0.011	11.80 ± 0.033
DMC_CF	445.37 ± 0.015	7.50 ± 0.008	10.19 ± 0.044
FMC_HW	464.58 ± 0.062	16.62 ± 0.007	14.62 ± 0.001



รูป 4-2 ตัวอย่าง HPLC-fingerprints ของสารสกัดหยาบจากใบยอความเข้มข้น 10 mg/mL



รูป 4-2 ตัวอย่าง HPLC-fingerprints ของสารสกัดหยาบจากใบยอความเข้มข้น 10 mg/mL (ต่อ)

<u>การทดลอง 3</u> การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4)

3.1 <u>การเพาะเลี้ยงเซลล์</u>

เมื่อทำการเพาะเลี้ยง human leukemic T-lymphocyte cell line ชนิด MOLT-4 ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 (with 2 mM L-glutamine and Earle's BSS adjusted to contain 1.5 g/L sodium bicarbonate, 0.1 mM L-glutamine, 10% fetal bovine serum) และ subculture ทุก 2-4 วัน

เซลล์ที่ได้มีการเจริญดี และมีร้อยละการอยู่รอด (% viability) เมื่อทดสอบด้วย trypan blue dye technique มากกว่าร้อยละ 90

3.2 <u>การทดสอบการหลั่งไซโตไคน์ด้วยเทคนิค ELISA</u>

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบยอความเข้มข้น ระหว่าง 1-100 μg/mL 5 ชนิด เทียบกับสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ซึ่งมีรายงานว่าพบในใบยอ ต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 จาก human T-lymphoblast ชนิด MOLT-4 cell suspensions โดยการ culture สารสกัดฯ หรือสารมาตรฐานร่วมกับ MOLT-4 cell (1×10^6 cell/mL) ณ อุณหภูมิ 37 °C, 5% CO_2 incubator เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เปรียบเทียบระหว่าง “ระบบที่ไม่เติม con A (unstimulated system)” และ “ระบบที่เติม 5 μg/mL con A (stimulated system)” และวิเคราะห์ปริมาณ IFN-γ และ IL-10 ใน culture supernatant โดยเทคนิค ELISA ได้ผลดังนี้

3.2.1 ผลของสารสกัดใบยอต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10

(1) ผลต่อการหลั่ง IFN-γ

(1.1) <u>unstimulated system</u> สารสกัดจากใบยอทั้ง 5 ชนิดไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการหลั่ง IFN-γ ให้ต่างจากสภาวะปกติ

(1.2) <u>stimulated system</u> (สารสกัด + 5 μg/mL con A) สารสกัด ณ ความเข้มข้นต่อไปนี้มีผลลดการหลั่ง IFN-γ จากผลของ con A แบบไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้น (non-dose dependent) ได้แก่ DMC_CE (55%, 50 และ 75 μg/mL), DMC_CF (55%; 25 ถึง100 μg/mL) และ FMC_CF (1 ถึง 100 μg/mL) ซึ่งสารสกัด FMC_CF ความเข้มข้น 50, 75, 100 μg/mL มีผลลดการหลั่ง IFN-γ มากที่สุดและมีค่าใกล้เคียงกัน ประมาณ 78% ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-3, 4-4 และรูป 4-3

(2) ผลต่อการหลั่ง IL-10

(2.1) <u>unstimulated system</u> สารสกัด ณ ความเข้มข้นต่อไปนี้มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 ได้แก่ FMC_CE (50, 100 μg/mL), DMC_CE (1 ถึง100 μg/mL), FMC_CF (1 ถึง 100 μg/mL) และ DMC_CF (1 และ 25 μg/mL) โดยสารสกัด DMC_CE ทุกความเข้มข้นที่ศึกษามีผลเพิ่มการ

หลั่ง IL-10 ได้ใกล้เคียงกันและมากที่สุดประมาณ 252% ส่วนสารสกัด FMC_HW และ DMC_CF 100 μg/mL มีผลลดการหลั่ง IL-10 ประมาณ 44.1% และ 32.5% ตามลำดับ

(2.2) stimulated system (สารสกัด + 5 μg/mL con A) สารสกัด DMC_CE (1, 25, 75 และ 100 μg/mL), FMC_CF (50, 75, 100 μg/mL) มีผลเพิ่มการหลั่ง IL-10 จากผลของ con A โดย FMC_CF 100 μg/mL กระตุ้นการหลั่ง IL-10 ได้สูงสุดประมาณ 90.4% ส่วนสารสกัด DMC_CF และ FMC_HW (1-100 μg/mL) มีผลลดการหลั่ง IL-10 โดย FMC_HW 100 μg/mL ลดการหลั่ง IL-10 มากที่สุด ประมาณ 87.5% ผลการทดลองแสดงดังตาราง 4-5, 4-6 และรูป 4-4

(3) Th1/Th2 balance (IFN-γ/IL-10 ratio)

(3.1) unstimulated system สารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio ต่ำกว่าค่าที่ได้จากสภาวะปกติ (2.4) โดยสารสกัด FMC_CF 100 μg/mL มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio ต่ำสุดเท่ากับ 0.74 และมีเฉพาะสารสกัด FMC_CE (1, 25 μg/mL), FMC_HW (50-100 μg/mL) ที่มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูงกว่าค่าปกติ โดยสารสกัด FMC_HW มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูงสุดประมาณ 5.69

(3.2) stimulated system (สารสกัด + 5 μg/mL con A) เมื่อเทียบจากผลของ con A (3.2) แล้ว พบว่าสารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio ต่ำกว่า 3.2 โดยสารสกัด FMC_CF 100 μg/mL มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio ต่ำสุดเท่ากับ 0.36 และมีเฉพาะสารสกัด DMC_CF (100 μg/mL) และ FMC_HW (1-100 μg/mL) ที่มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูงกว่า 3.2 โดยสารสกัด FMC_HW 100 μg/mL มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูงสุดเท่ากับ 13.35

ผลการทดลอง แสดงดังตาราง 4-7 และรูป 4-5, 4-6

3.2.2 ผลของ rutin, quercetin และ kaemferol ต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10

(1) ผลต่อการหลั่ง IFN-γ

(1.1) unstimulated system rutin ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงการหลั่ง IFN-γ ที่ต่างจากสภาวะปกติ quercetin 1 และ 25 μg/mL และ kaempferol 1 μg/mL มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ เพิ่มขึ้น แต่มีแนวโน้มว่าการกระตุ้นจะลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้น ทั้งนี้ quercetin 1 μg/mL กระตุ้นการหลั่ง IFN-γ เพิ่มขึ้นสูงสุดประมาณ 937%

(1.2) stimulated system (+ 5 μg/mL con A) rutin 100 μg/mL, quercetin 75, 100 μg/mL และ kaempferol 50, 100 μg/mL มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ เพิ่มขึ้นจากผลของ con A ในระดับแตกต่างกัน ทั้งนี้ quercetin 100 μg/mL จะมีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ เพิ่มขึ้นสูงสุดประมาณ 232%

(2) ผลต่อการหลั่ง IL-10

(2.1) unstimulated system rutin 1-75 μg/mL, quercetin 1-50 μg/mL และ kaempferol 1, 25 μg/mL มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 เพิ่มขึ้นในระดับแตกต่างกัน โดย rutin 25 μg/mL กระตุ้นการหลั่ง IL-10 สูงสุดประมาณ 516% ซึ่งมากกว่าผลของ kaemferol และ quercetin ตามลำดับ

(2.2) stimulated system (+ 5 μg/mL con A) rutin 1, 25 μg/mL, quercetin 1-50, 100 μg/mL มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 เพิ่มขึ้นมากกว่าผลของ con A แบบไม่สัมพันธ์กับความเข้มข้น ซึ่ง quercetin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 มากกว่า rutin โดยมีค่าสูงสุด 433% (1 μg/mL) ในขณะที่ kaempferol 1, 25 μg/mL มีผลกดการหลั่ง IL-10 ประมาณ 37 และ 44% ตามลำดับ

(3) Th1/Th2 balance (IFN-γ/IL-10 ratio)

(3.1) unstimulated system rutin, quercetin และ kaempferol มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ทั้งสูงกว่าและต่ำกว่าค่าที่ได้จากสภาวะปกติ (base line 2.4) แตกต่างกันตามความเข้มข้น ดังนี้ rutin 1-75 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ต่ำกว่า base line และมีค่าต่ำสุดประมาณ 0.28 (1 μg/mL) ส่วน rutin 100 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio สูงกว่า base line และมีค่าประมาณ 2.9 quercetin 1, 25 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio สูงกว่า base line และมีค่าสูงสุดประมาณ 6.0 (1 μg/mL) และในช่วงความเข้มข้น 50-100 μg/mL จะมีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ต่ำกว่า base line และมีค่าต่ำสุดประมาณ 0.4 (100 μg/mL) สำหรับ kaempferol 1 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio สูงกว่า base line และมีค่าประมาณ 3.0 และในช่วงความเข้มข้น 25-100 μg/mL จะมีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ต่ำกว่า base line และมีค่าต่ำสุดประมาณ 0.90 (25 μg/mL)

(3.2) stimulated system (+5 μg/mL con A) rutin, quercetin และ kaempferol มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ทั้งสูงกว่าและต่ำกว่า ค่าที่ได้จาก con A (base line 3.2) แตกต่างกันตามความเข้มข้น ดังนี้ rutin 1-75 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ต่ำกว่า base line และมีค่าต่ำสุดประมาณ 0.7 (1 μg/mL) ส่วน rutin 100 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio สูงกว่า base line และมีค่าประมาณ 7.2 quercetin 1-75 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ต่ำกว่า base line และมีค่าต่ำสุดประมาณ 0.6 (1 μg/mL) และความเข้มข้น 100 μg/mL จะมีค่า IFN-γ /IL-10 ratio สูงกว่า base line เล็กน้อยและมีค่าประมาณ 3.4 สำหรับ kaempferol เฉพาะความเข้มข้น 50 μg/mL ที่มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio สูงกว่า base line (3.9) ส่วนความเข้มข้น 1, 25, 75, 100 μg/mL มีค่า IFN-γ /IL-10 ratio ต่ำกว่า base line และมีค่าใกล้เคียงกันประมาณ 2.3

ผลการทดลอง แสดงดังตาราง 4-8, 4-9 และรูป 4-7 ถึง 4-8 และการเปรียบเทียบผลของสารสกัด FMC_CF, FMC_HW และ quercetin, kaempferol, rutin ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า IFN-γ/IL-10 ratio เมื่อไม่เติมและเติม con A แสดงดังรูป 4-9

ตาราง 4-3 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 microg./mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A)

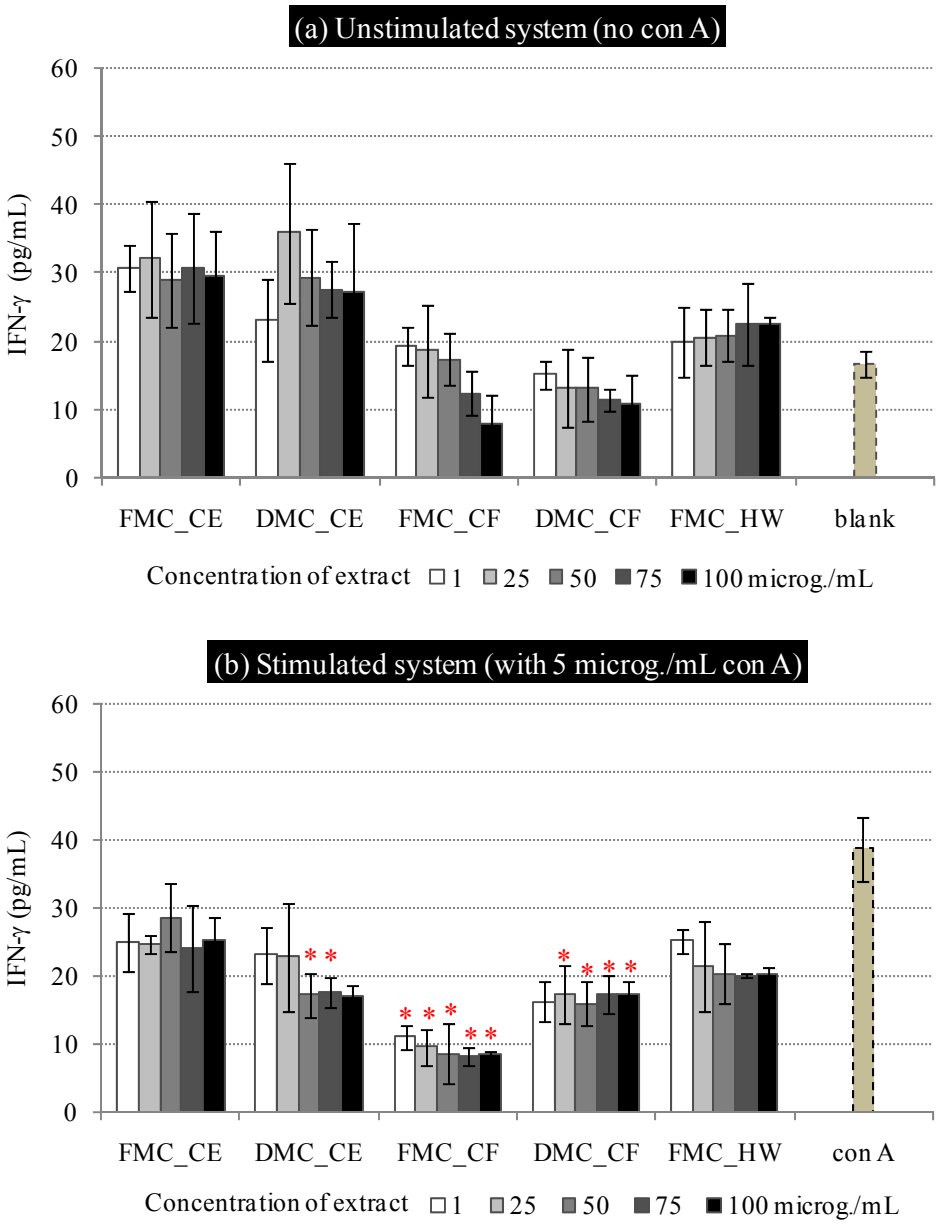
Unstimulated system	IFN-γ (pg/mL)*				
(no con A)	FMC_CE	DMC_CE	FMC_CF	DMC_CF	FMC_HW
Extract (1 microg./mL)	30.92 ± 3.36	23.25 ± 6.09	19.50 ± 2.81	15.25 ± 2.05	20.08 ± 5.15
Extract (25 microg./mL)	32.22 ± 8.47	36.00 ± 10.24	18.75 ± 6.81	13.38 ± 5.67	20.67 ± 4.05
Extract (50 microg./mL)	29.00 ± 6.83	29.50 ± 7.16	17.50 ± 3.74	13.19 ± 4.60	21.00 ± 3.91
Extract (75 microg./mL)	30.83 ± 7.95	27.75 ± 4.08	12.50 ± 3.18	11.50 ± 1.58	22.75 ± 5.99
Extract (100 microg./mL)	29.58 ± 6.69	27.25 ± 10.29	8.06 ± 4.31	10.88 ± 4.23	22.56 ± 1.11

* mean ± SE (n = 4), basal secretion (blank) =16.88 ± 1.95 pg/mL

ตาราง 4-4 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 microg./mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน stimulated system (เติม 5 microg./mL con A)

Stimulated system	IFN-γ (pg/mL)*				
(with 5 microg./mL con A)	FMC_CE	DMC_CE	FMC_CF	DMC_CF	FMC_HW
Extract (1 microg./mL)	25.00 ± 4.30	23.13 ± 4.04	11.00 ± 1.88**	16.25 ± 2.89	25.19 ± 1.84
Extract (25 microg./mL)	24.58 ± 1.30	22.88 ± 7.93	9.58 ± 2.63**	17.25 ± 4.28**	21.50 ± 6.55
Extract (50 microg./mL)	28.67 ± 5.07	17.25 ± 3.27**	8.56 ± 4.36**	16.00 ± 3.18**	20.33 ± 4.47
Extract (75 microg./mL)	24.00 ± 6.30	17.75 ± 2.23**	8.25 ± 1.25**	17.25 ± 2.79**	20.13 ± 0.38
Extract (100 microg./mL)	25.25 ± 3.54	17.00 ± 1.55	8.50 ± 0.50**	17.25 ± 2.01**	20.42 ± 0.87

* mean ± SE (n = 4), basal secretion of con A = 38.81 ± 4.72 pg/mL และ **; $p<0.05$



รูป 4-3 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$

ตาราง 4-5 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 microg./mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A)

Unstimulated system	IL-10 (pg/mL)*				
(no con A)	FMC_CE	DMC_CE	FMC_CF	DMC_CF	FMC_HW
Extract (1 microg./mL)	10.03 ± 1.28	23.27 ± 1.28**	15.68 ± 1.94**	15.60 ± 1.44**	10.17 ± 3.46
Extract (25 microg./mL)	11.55 ± 2.10	24.91 ± 2.68**	15.59 ± 0.75**	10.13 ± 0.93**	9.18 ± 1.15
Extract (50 microg./mL)	15.10 ± 0.52**	21.00 ± 1.73**	13.80 ± 0.55**	6.43 ± 0.67	5.67 ± 0.93
Extract (75 microg./mL)	14.75 ± 1.65	20.00 ± 2.02**	13.77 ± 0.93**	4.92 ± 1.25	4.11 ± 0.94
Extract (100 microg./mL)	13.50 ± 1.07**	20.73 ± 0.29**	10.84 ± 0.57**	4.78 ± 0.54**	3.96 ± 0.63**

* mean ± SE (n = 4), basal secretion (blank) =7.08 ± 0.36 pg/mL และ **; $p<0.05$

ตาราง 4-6 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 microg./mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน stimulated system (เติม 5 microg./mL con A)

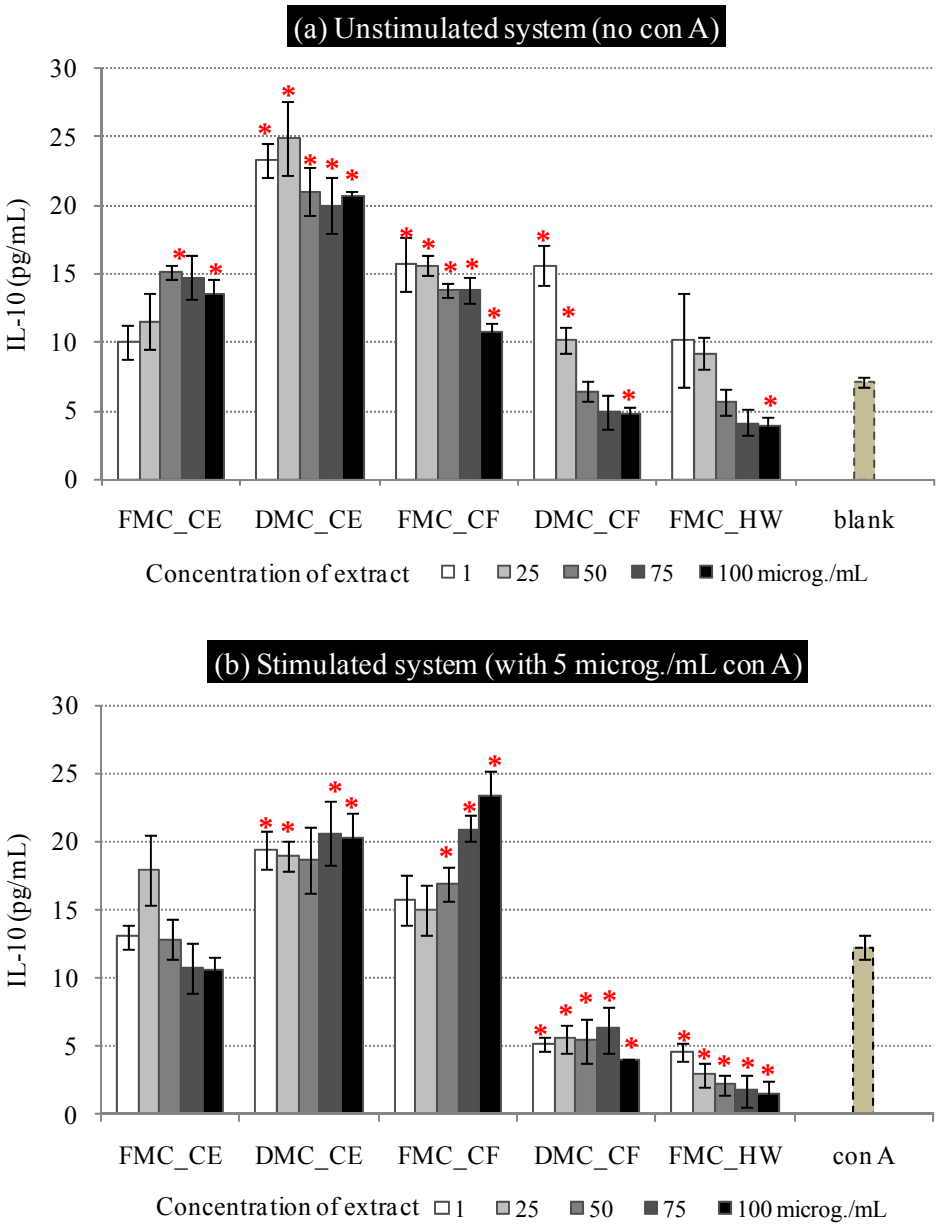
Stimulated system	IL-10 (pg/mL)*				
(with 5 microg./mL con A)	FMC_CE	DMC_CE	FMC_CF	DMC_CF	FMC_HW
Extract (1 microg./mL)	13.05 ± 0.85	19.36 ± 1.35**	15.70 ± 1.87	5.13 ± 0.50**	4.58 ± 0.65**
Extract (25 microg./mL)	17.93 ± 2.51	18.93 ± 1.08**	15.00 ± 1.82	5.57 ± 1.06**	2.89 ± 0.88**
Extract (50 microg./mL)	12.85 ± 1.43	18.61 ± 2.43	16.94 ± 1.28**	5.43 ± 1.62**	2.25 ± 0.72**
Extract (75 microg./mL)	10.77 ± 1.83	20.64 ± 2.36**	20.95 ± 0.93**	6.25 ± 1.71**	1.69 ± 1.18**
Extract (100 microg./mL)	10.63 ± 0.98	20.24 ± 1.88**	23.32 ± 1.83**	4.02 ± 0.03**	1.53 ± 0.91**

* mean ± SE (n = 4), basal secretion of con A = 12.25 ± 0.89 pg/mL และ **; $p<0.05$

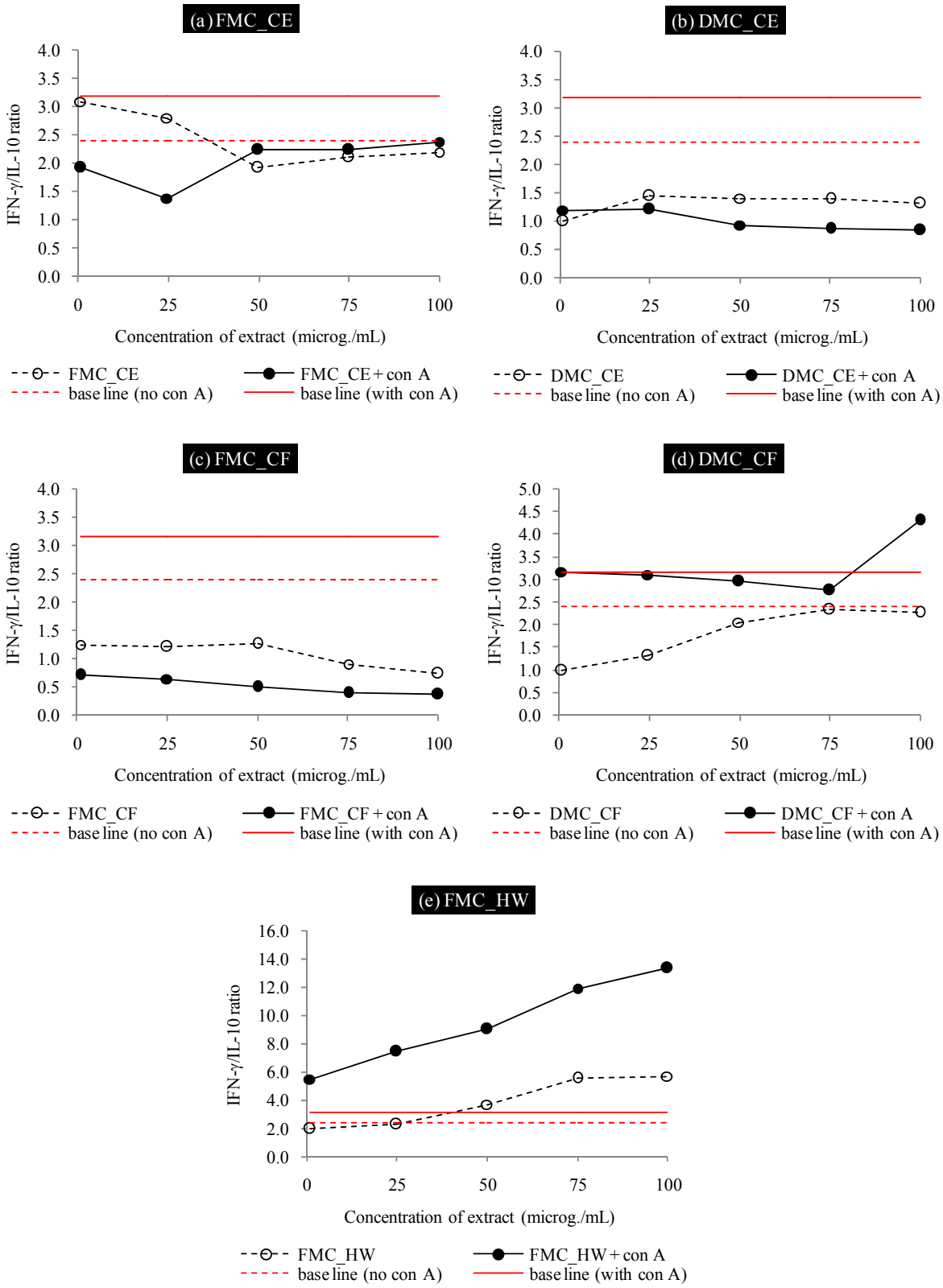
ตาราง 4-7 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 microg./mL) ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า IFN-γ/ IL-10 ratio ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A) เทียบกับ stimulated system (เติม 5 microg./mL con A)

Concentration of	IFN-γ / IL-10 ratio*									
extract	FMC_CE		DMC_CE		FMC_CF		DMC_CF		FMC_HW	
(microg./mL)	no con A	with con A	no con A	with con A	no con A	with con A	no con A	with con A	no con A	with con A
1	3.1	1.9	1.0	1.2	1.2	0.7	1.0	3.2	2.0	5.5
25	2.8	1.4	1.4	1.2	1.2	0.6	1.3	3.1	2.3	7.4
50	1.9	2.2	1.4	0.9	1.3	0.5	2.0	2.9	3.7	9.0
75	2.1	2.2	1.4	0.9	0.9	0.4	2.3	2.8	5.5	11.9
100	2.2	2.4	1.3	0.8	0.7	0.4	2.3	4.3	5.7	13.3

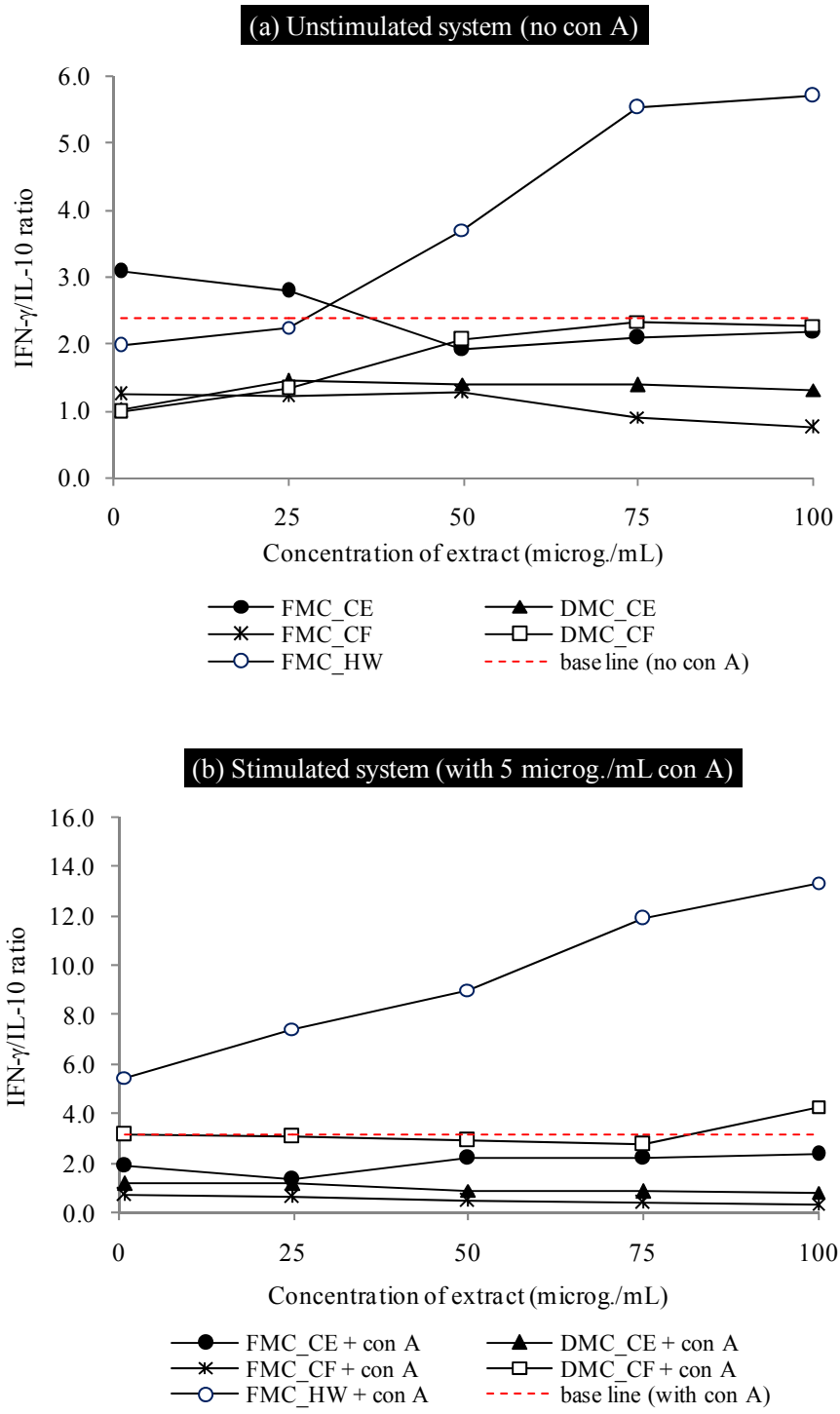
* IFN-γ / IL-10 ratio ของ basal secretion (blank) = 2.4 และ con A = 3.2



รูป 4-4 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$



รูป 4-5 ค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากการ culture สารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ณ ความเข้มข้น 1-100 μg/mL ร่วมกับ MOLT-4 cells เมื่อไม่เติมและเติม 5 μg/mL con A เทียบกับค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากสภาวะปกติ และผลจาก con A



รูป 4-6 ค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากการ culture สารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่างๆ ณ ความเข้มข้น 1-100 μg/mL ร่วมกับ MOLT-4 cells เมื่อ (a) ไม่เติม (unstimulated system)และ (b) เติม 5 μg/mL con A (stimulated system)เทียบกับค่า IFN-γ/IL-10 ratio ที่ได้จากสภาวะปกติ และผลของ con A ตามลำดับ

ตาราง 4-8 ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ และ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A)

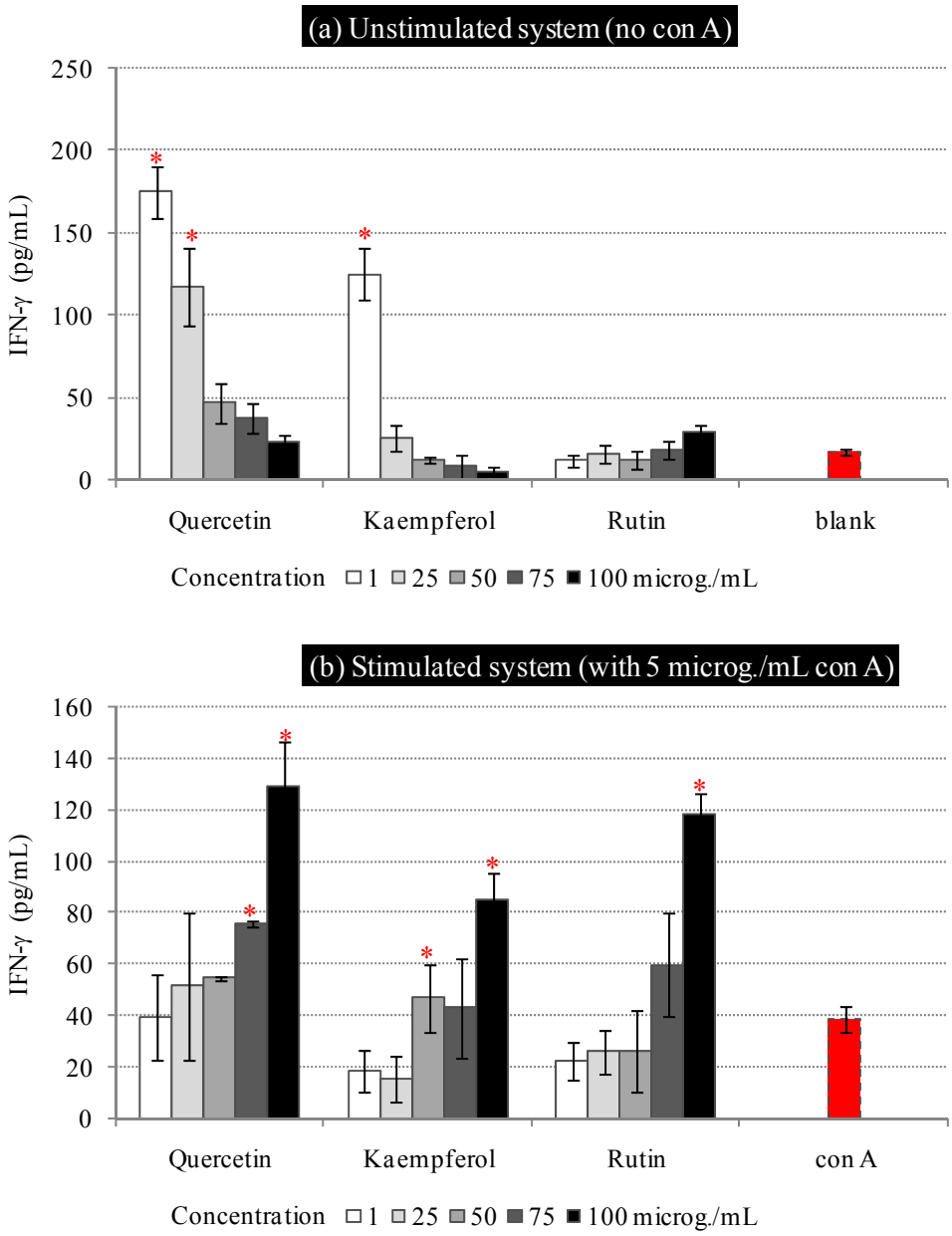
Standard substances	IFN-γ (pg/mL)*	IL-10 (pg/mL)*	IFN-γ/IL-10 ratio
Quercetin 1 microg./mL	175.00 ± 15.53**	28.94 ± 3.45**	6.0
Quercetin 25 microg./mL	117.25 ± 23.66**	27.00 ± 4.65**	4.3
Quercetin 50 microg./mL	46.50 ± 12.13	34.27 ± 5.68**	1.4
Quercetin 75 microg./mL	37.67 ± 9.09	36.45 ± 10.02	1.0
Quercetin 100 microg./mL	22.50 ± 4.36	55.82 ± 7.63	0.4
Kaempferol 1 microg./mL	124.83 ± 15.67**	41.50 ± 7.78**	3.0
Kaempferol 25 microg./mL	25.88 ± 8.21	28.73 ± 5.99**	0.9
Kaempferol 50 microg./mL	12.50 ± 1.56	8.82 ± 2.43	1.4
Kaempferol 75 microg./mL	8.00 ± 7.37	7.11 ± 1.92	1.1
Kaempferol 100 microg./mL	4.75 ± 3.36	5.23 ± 0.70	0.9
Rutin 1 microg./mL	12.33 ± 3.63	42.73 ± 5.39**	0.3
Rutin 25 microg./mL	16.00 ± 5.66	43.52 ± 2.26**	0.4
Rutin 50 microg./mL	12.50 ± 5.30	38.43 ± 3.13**	0.3
Rutin 75 microg./mL	18.33 ± 5.20	35.66 ± 5.95**	0.5
Rutin 100 microg./mL	28.50 ± 5.57	9.93 ± 1.72	2.9

* mean ± SE (n = 4), basal secretion (blank) of IFN-γ=16.88 ± 1.95 pg/mL, IL-10=7.07 ± 0.36 pg/mL, ** $p < 0.05$

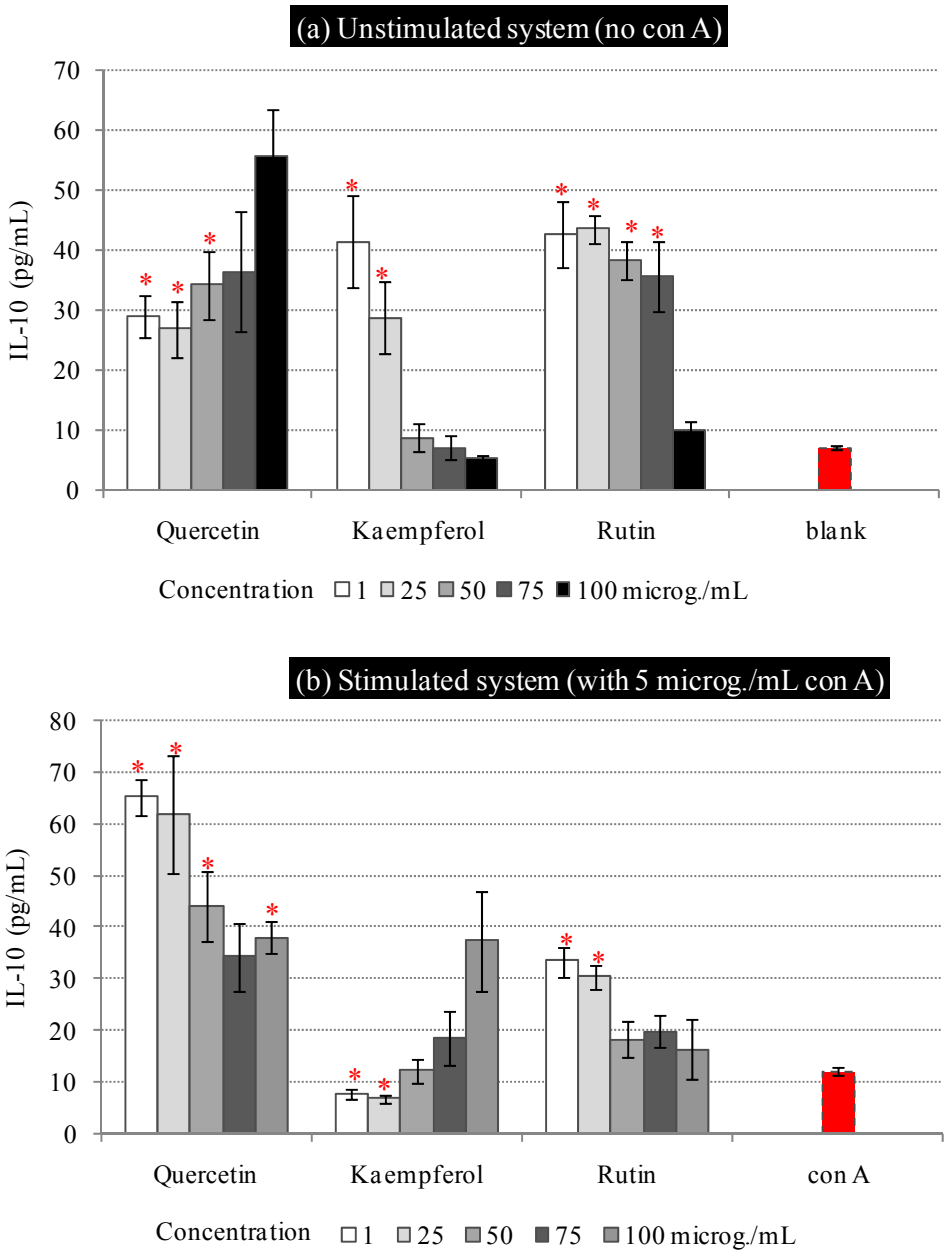
ตาราง 4-9 ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ และ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน stimulated system (เติม 5 μg/mL con A)

Standard substances	IFN-γ (pg/mL)*	IL-10 (pg/mL)*	IFN-γ/IL-10 ratio
Quercetin 1 microg./mL	39.50 ± 16.62	65.24 ± 3.65**	0.6
Quercetin 25 microg./mL	51.50 ± 28.64	61.94 ± 11.35**	0.8
Quercetin 50 microg./mL	55.00 ± 0.71	44.12 ± 6.88**	1.2
Quercetin 75 microg./mL	76.00 ± 1.41**	34.24 ± 6.55	2.2
Quercetin 100 microg./mL	129.00 ± 18.00**	38.03 ± 3.10**	3.4
Kaempferol 1 microg./mL	18.50 ± 7.97	7.76 ± 0.84**	2.4
Kaempferol 25 microg./mL	15.50 ± 8.83	6.88 ± 0.85**	2.3
Kaempferol 50 microg./mL	47.00 ± 13.05**	12.18 ± 2.42	3.9
Kaempferol 75 microg./mL	43.00 ± 19.62	18.61 ± 5.13	2.3
Kaempferol 100 microg./mL	85.00 ± 10.85**	37.55 ± 9.65	2.3
Rutin 1 microg./mL	22.50 ± 7.22	33.43 ± 2.98**	0.7
Rutin 25 microg./mL	26.00 ± 8.54	30.41 ± 2.25**	0.9
Rutin 50 microg./mL	26.63 ± 16.03	18.32 ± 3.46	1.5
Rutin 75 microg./mL	59.88 ± 20.13	19.89 ± 3.12	3.0
Rutin 100 microg./mL	118.63 ± 7.83**	16.36 ± 5.84	7.2

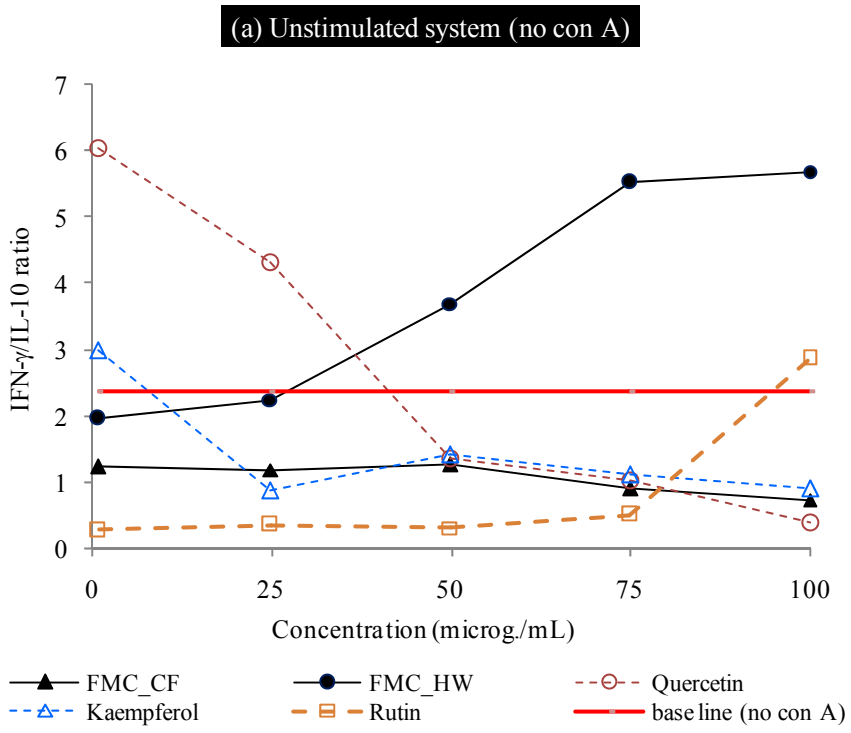
* mean ± SE (n = 4), basal secretion (con A) of IFN-γ =38.81 ± 4.72 pg/mL, IL-10=12.25 ± 0.89 pg/mL, ** $p < 0.05$

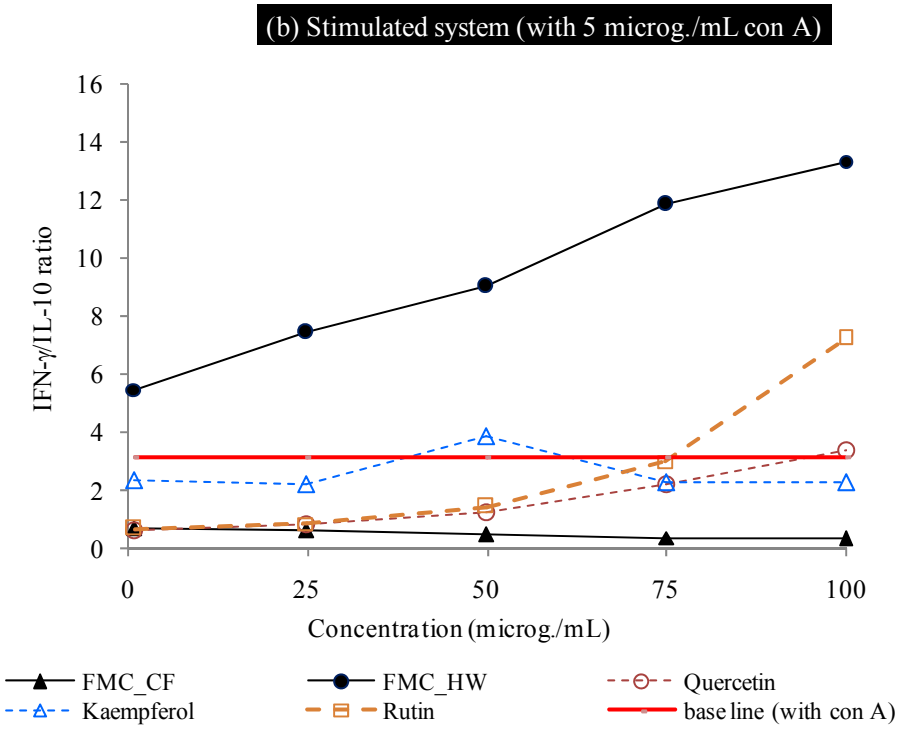


รูป 4-7 ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IFN-γ ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$



รูป 4-8 ผลของ quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อปริมาณ IL-10 ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$





รูป 4-9 เปรียบเทียบผลของสารสกัด FMC_CF, FMC_HW และสารมาตรฐาน quercetin, kaempferol และ rutin (1-100 μg/mL) ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า IFN-γ/IL-10 ratio ใน **(a)** unstimulated system (ไม่เติม con A) และ **(b)** stimulated system (เติม 5 μg/mL con A) เมื่อ n = 4

บทที่ 5
อภิปรายผลการวิจัย

<u>การทดลอง 1</u> การเตรียมสารสกัดหยาบ (crude extracts) จากใบยอ

ในการทดลองเลือกใช้น้ำและ ethanol เป็นน้ำยาสกัดเนื่องจากสารกลุ่มเป้าหมายที่ต้องการวิเคราะห์คือ rutin, quercetin และ kaempferol ซึ่งเป็น polar molecule นอกจากนี้น้ำและ ethanol ยังเป็นน้ำยาสกัดหรือตัวทำละลายที่ใช้กันทั่วไปในห้องปฏิบัติการ ใบยอที่ใช้ทดสอบมีทั้งแบบใบสดและที่ผ่านการอบแห้ง (60 °C) เพื่อศึกษาว่าวิธีการเตรียมวัตถุดิบก่อนการสกัดโดยการอบแห้งก่อนจะมีผลต่อการเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ทางชีวภาพต่างจากการใช้ใบสดหรือไม่

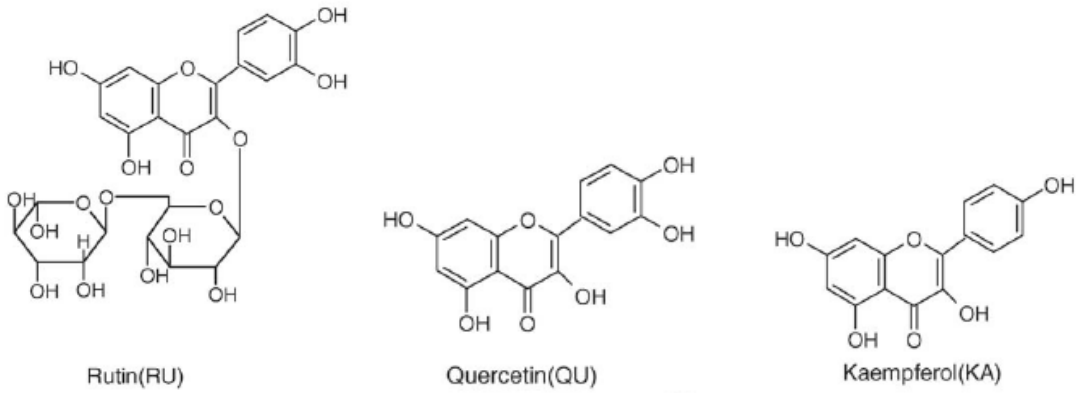
นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของการเตรียมสารสกัดแบบไม่ใช้ความร้อนเทียบกับการใช้ความร้อน ซึ่งในกรณีนี้ใช้การหมักใน ethanol และการปั่นรวมกับน้ำแล้วคั้น แทนการสกัดแบบไม่ใช้ความร้อน และการต้มใบสดในน้ำเป็นตัวแทนการสกัดแบบใช้ความร้อน ซึ่งวิธีหลังนี้เป็นวิธีการเตรียมสารสกัดอย่างง่ายตามแบบการเตรียมยาพื้นบ้านทั่วไป เมื่อสกัดใบยอสดและแห้งด้วยเทคนิคการสกัดและน้ำยาสกัดที่แตกต่างกัน 5 เทคนิค ได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสดแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากใบยอสดปั่นคั้นน้ำและทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (FMC_CF) มีผลผลิตสูงสุด และสารสกัดใบยอที่ผ่านการอบแห้งก่อนหมักใน ethanol มีผลผลิตต่ำสุด

<u>การทดลอง 2</u> การวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ

ผู้วิจัยได้ทดลองใช้ HPLC condition ในการวิเคราะห์ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอ โดยประยุกต์จากวิธีการทดลองของ Deng และคณะ (2008) ซึ่งรายงานผลการวิเคราะห์ flavonol glycosides และ aglycones 4 ชนิดในใบยอ โดยใช้เทคนิค HPLC-UV/MS ซึ่งมีความไวและจำเพาะต่อการวิเคราะห์ ระบบดังกล่าวใช้ C18-column และ mobile phase คือ 0.3% acetic acid in methanol : 0.3% acetic acid in water และ run mobile phase แบบ gradient เวลา 30 นาที wavelength 365 nm แต่ condition ดังกล่าว ไม่สามารถวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดใบยอ ตลอดจน สารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ได้เนื่องจากการแยก peak ต่างๆ ไม่สมบูรณ์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเปลี่ยนมาใช้ HPLC condition ที่ประยุกต์มาจากวิธีการทดลองของ Zu และคณะ (2006) แทน ซึ่งรายงานวิธีการวิเคราะห์สารในกลุ่ม flavonoids (catechin, rutin, quercetin, kaempferol และ isorhamnetin) ของสารสกัดจากใบ *Hippophae rhamnoides* L. โดยใช้เทคนิค RP-

HPLC with DAD ซึ่งมีความไวและจำเพาะต่อการวิเคราะห์ ระบบดังกล่าวใช้ C18-column และ mobile phase คือ methanol : acetonitrile : water ในอัตราส่วน 40:15:45 by volume และ run mobile phase แบบ isocratic ในเวลา 15 นาที wavelength ขึ้นกับชนิดของ flavonoids ที่ทำการวิเคราะห์ ซึ่ง condition ดังกล่าว สามารถแยก peak ของ rutin, quercetin และ kaempferol จากกันได้อย่างชัดเจน Zu และคณะระบุว่าการเติม acetic acid ปริมาณเล็กน้อย ช่วยลดการเกิด peak trailing ได้ อย่างไรก็ตามปริมาณ acid ที่มากเกินไปมีผลให้อายุการใช้งานของ column ลดลงได้ ดังนั้นผู้วิจัยจึงประยุกต์ใช้ HPLC conditions ของ Zu และคณะในการสร้าง standard curve และ HPLC-fingerprints ของสารสกัดใบยอ เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol ในสารสกัดใบยอต่อไป

จาก HPLC-fingerprints ของสารสกัดใบยอฯ ทั้ง 5 ชนิด ปรากฏ unidentified peak ของ polar molecule หลายชนิด และมี 3 peak ซึ่งตำแหน่งการเกิด peak ตรงกับ peak ของสารมาตรฐานในกลุ่ม flavonoids 3 ชนิดคือ rutin, quercetin และ kaempferol ที่กำหนดเป็นสารมาตรฐานในการทดลองซึ่ง Deng และคณะ (2008) ได้รายงานว่าเป็นสารองค์ประกอบสำคัญที่พบในใบยอ ทั้งนี้ผู้วิจัยได้ทดลอง spike สารมาตรฐานลงในสารสกัดใบยอฯ เพื่อยืนยันผลการทดลองด้วย ผลการทดลองพบว่าสารสกัดฯ ทุกชนิดมีปริมาณ rutin มากที่สุด และรองลงมาคือ kaempferol และ quercetin ยกเว้นสารสกัดใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) ซึ่งจาก fingerprint แสดงให้เห็นว่ามี unidentified peak หนึ่งที่มีปริมาณมากกว่า rutin ซึ่งต้องทำการศึกษาต่อไปว่าเป็นสารองค์ประกอบหรือไม่ ส่วนลำดับการเกิด peak คือ rutin → quercetin → kaempferol ซึ่งอธิบายได้ด้วยโครงสร้างทางเคมีของสารซึ่งภายใต้ HPLC condition ที่ใช้ในการทดลองนี้นั้น สารที่มี polarity มากกว่าจะถูก elute ออกมาก่อน ดังนั้นเราจึงพบ peak ของ rutin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม O-glycoside ก่อน ตามด้วย quercetin และ kaempferol ตาม จำนวน OH- group ในโครงสร้าง ring B (รูป 5-1) ส่วน unidentified peak อีกประมาณ 3-5 peak ยังต้องทำการวิเคราะห์ต่อไป



รูป 5-1 โครงสร้างเคมีของ rutin, quercetin และ kaempferol (Zu et al., 2006)

จากผลการสกัดสารสกัดใบยอด้วยวิธีต่างๆ พบว่าการสกัดใบยอสดโดยการหมักใน ethanol (FMC_CE) ให้ปริมาณ rutin มากกว่าการสกัดด้วยน้ำ เนื่องจาก rutin ละลายใน ethanol ได้มากกว่าน้ำ โดยมีค่าการละลายในหน่วย mole fraction ในน้ำ และ ethanol เท่ากับ 0.66 และ 436.5 (25 °C) ตามลำดับ (Zi et al., 2007) ส่วน quercetin เป็นสารที่ละลายในน้ำได้น้อยมาก (sparingly soluble in water) และไม่คงตัวทางเคมี โดยเฉพาะอย่างยิ่งในตัวกลางที่เป็นน้ำและมีฤทธิ์เป็นด่าง (aqueous alkaline medium) (Makris and Rossiter, 2000) Srinivas และคณะ (2010) ทดลองหาค่าการละลายของ quercetin ได้เท่ากับ 2.15 mg/mL (25.6 °C) และ Sutthiparinyanont และคณะ (2006) รายงานการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีฟิสิกส์ของ quercetin ว่าไม่ละลายใน DI water และ phosphate buffer (pH7.4) แต่ละลายและคงตัวดีใน ethanol มีค่าการละลาย 3.80 และ 4.00 mg/mL ที่ 25 และ 37 °C ตามลำดับ มีอัตราการสลายตัวลดลงอย่างรวดเร็วและเริ่มคงที่ที่เวลา 12 ชั่วโมง สำหรับ kaempferol มีคุณสมบัติละลายได้ใน ethanol แต่ละลายน้ำได้น้อยโดยมีค่าประมาณ 20 mg/mL (The Merck Index) ซึ่ง Plochmann และคณะ (2007) ทดลองหาค่าการละลายสูงสุดของ kaempferol ใน pre-warmed RPMI containing 10%FCS ได้เท่ากับ 0.250 mM

ผลการสกัดใบยอพบว่า quercetin และ kaempferol ที่วิเคราะห์ได้จากการสกัดด้วย ethanol โดยการหมักมีปริมาณไม่ต่างจากการสกัดด้วยน้ำโดยการปั่นคั้นน้ำ และการต้มใบสดให้ปริมาณ quercetin และ kaempferol มากกว่า มีความเป็นไปได้ของปัจจัยที่เกี่ยวข้องหลายประการ เช่น ความร้อนช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด และการเสื่อมสลายของสารอันเนื่องจากความร้อนในกระบวนการสกัด และความไม่คงตัวของสารซึ่งอธิบายได้จากโครงสร้างทางเคมี

เมื่อเปรียบเทียบการใช้ใบยอสดและใบยอแห้ง (อบแห้ง 60 °C) เป็นวัตถุดิบในการสกัด พบว่า rutin ที่ได้จากการใช้ใบยออบแห้งมีปริมาณต่ำกว่าเมื่อใช้ใบยอสดที่สกัดด้วยวิธีเดียวกัน กล่าวคือการหมักใบยออบแห้งใน ethanol (DMC_CE) มีปริมาณ rutin น้อยกว่าเมื่อใช้ใบยอสด (FMC_CE) ถึง 87% ส่วนการปั่นคั้นน้ำและทำแห้งเยือกแข็งใบยออบแห้ง (DMC_CF) มีปริมาณ rutin น้อยกว่าเมื่อใช้ใบยอสด (FMC_CF) 21.3% สอดคล้องกับผลการศึกษาของ West และ Zhou (2008) ซึ่งแยกสารหอมระเหยจากใบยอโดยใช้วิธีการกลั่นด้วยไอน้ำ และรายงานว่าการทำให้แห้งมีผลให้ปริมาณสารหอมระเหยลดลงมากกว่าครึ่ง

Katsube และคณะ (2009) รายงานผลของการอบแห้งใบ mulberry (*Morus alba* L.) ด้วยอุณหภูมิไม่เกิน 60 °C ว่าไม่มีผลเปลี่ยนแปลงฤทธิ์ต้าน oxidation ซึ่งสัมพันธ์กับปริมาณ polyphenolic compounds ในสารสกัด ในเบื้องต้นอนุมานได้ว่าการใช้อุณหภูมิ 60 °C ในการอบแห้งใบยอ ไม่น่าจะมีผลต่อการเสื่อมสลายของ flavonoids ในใบยอเช่นกัน

ในปี 2011 Biesago และคณะรายงานการศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อความคงตัวของ flavonoids จากข้าวโพดที่ใช้เลี้ยงสัตว์ ซึ่งวิธีการสกัดหนึ่งที่ศึกษาคือ heat reflux extraction Biesago และคณะพบว่าการสกัด flavonoids แต่ละชนิดให้ได้ %yield สูงสุดจะใช้น้ำยาสกัดคือ

methanol:water ในอัตราส่วนที่แตกต่างกัน และน้ำในน้ำยาสกัดมีส่วนช่วยให้ข้าวโพดฯ พองตัว ช่วยเพิ่มการสัมผัสระหว่างตัวทำละลายและตัวถูกละลาย นอกจากนี้ Biesago และคณะยังวิเคราะห์ผลการทดลองร่วมกับงานวิจัยที่มีรายงานก่อนหน้านี้แล้วสรุปว่า แม้ flavonoids จะละลายใน methanol ได้ดีกว่าน้ำ แต่การสกัดโดยใช้ตัวทำละลายเดี่ยวๆ จะมีประสิทธิภาพต่ำกว่าการสกัดโดยใช้ส่วนผสมของ alcohol และน้ำ ซึ่งหลักการดังกล่าวสามารถนำมาอธิบายผลการทดลองในงานวิจัยนี้ได้ว่า การอบแห้งใบยอด้วยอุณหภูมิ 60 °C แม้ว่าจะไม่มีผลให้เกิดการเสื่อมสลายของ flavonoids แต่มีผลลดประสิทธิภาพของการสกัด เนื่องจากใบยออบแห้งซึ่งไม่มีน้ำอยู่เลยหรืออาจมีอยู่น้อยมาก เทียบได้กับการสกัดด้วยตัวทำละลายเดี่ยวๆ จึงมีประสิทธิภาพในการสกัดด้อยกว่าการใช้ใบยอสด ซึ่งมีน้ำอยู่บางส่วนและเทียบได้กับการมีส่วนผสมของ ethanol และน้ำเป็นน้ำยาสกัด นอกจากนี้ผลจากการที่ใบยอแห้งไม่พองตัวหรือพองตัวไม่เต็มที่ ทำให้น้ำยาสกัดไม่สามารถไหลผ่านเข้าไปสกัดสารองค์ประกอบในใบยอแห้งได้อย่างสมบูรณ์ กรณีการสกัดใบยอแห้งโดยการปั่นคั้นน้ำแล้วนำไปทำแห้งเยือกแข็ง (DMC_CF) ซึ่งผู้วิจัยไม่ได้ทำการหมักก่อน ทำให้ใบยอแห้งสัมผัสกับน้ำในเวลาที่น้อยเกินไปทำให้พองตัวไม่เต็มที่ และเป็นปัจจัยที่ทำให้ในภาพรวมของปริมาณ flavonoids โดยเฉพาะอย่างยิ่ง rutin ที่สกัดได้จากการใช้ใบยออบแห้งต่ำกว่าการใช้ใบสด

เมื่อเปรียบเทียบเทคนิคการสกัดแบบใช้และไม่ใช้ความร้อน พบว่าการสกัดใบยอโดยการต้มใบสด (FMC_HW) ให้ปริมาณ rutin ต่ำกว่า แต่ให้ปริมาณ quercetin และ kaempferol สูงกว่าการสกัดใบยอสดฯ ที่ไม่ใช้ความร้อน Biesago และคณะ (2011) รายงาน % recovery ของสารในกลุ่ม flavonoids ที่สกัดจากข้าวโพดเลี้ยงสัตว์ซึ่งสกัดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน 4 เทคนิคคือการหมัก (maceration) 24 ช.ม., heat reflux 30 นาที, การใช้คลื่นเสียงความถี่สูง (ultrasonic extraction) 30 นาที และการใช้คลื่นไมโครเวฟ (microwave assisted extraction) ที่มีความแรงและเวลาต่างๆ กัน และใช้ methanol:water 60:40 เป็นน้ำยาสกัด ผลการทดลองของ Biesago และคณะพบว่าการใช้คลื่นเสียงความถี่สูงทำให้ flavonoids ส่วนใหญ่เกิดการเสื่อมสลายไปมาก และเป็นวิธีการสกัดที่ไม่เหมาะสมนัก การสกัดโดยวิธี heat reflux และการใช้คลื่นไมโครเวฟซึ่งมีความร้อนเกิดขึ้นระหว่างการสกัดนั้นสามารถสกัด flavonoids หลายชนิดได้ในปริมาณมากกว่าการสกัดโดยการหมัก สอดคล้องกับผลการวิจัยของผู้วิจัย ซึ่งการสกัดใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) ให้ปริมาณ quercetin และ kaemferol มากกว่าเมื่อสกัดโดยการหมักและการปั่นคั้นน้ำ (ไม่ใช้ความร้อน) แสดงให้เห็นว่าความร้อนมีส่วนเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัด

นอกจากนี้ Biesago และคณะยังอธิบายว่าในการหมักนั้น เอนไซม์ในพืชโดยเฉพาะอย่างยิ่งที่ทำให้เกิดกระบวนการ oxidation อาจเป็นปัจจัยที่ทำให้เกิดการเสื่อมสลายของ flavonoids และสารที่มี OH-group มากยิ่งเสื่อมสลายได้มาก มีผลให้ flavonoids ที่ทำการศึกษาซึ่งมีหลายชนิด รวมทั้ง kaempferol และ quercetin มีปริมาณลดลง และยังพบอีกว่า kaempferol มีความคงตัวน้อยและเกิดการเสื่อมสลายได้ง่ายแม้ไม่มีผลของเอนไซม์จากพืช ผลการทดลองของผู้วิจัยสนับสนุน

แนวคิดดังกล่าว ซึ่งสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของ %yield ของ kaempferol ที่ได้จากการต้มใบยอสดเทียบกับการสกัดที่ไม่ใช้ความร้อนวิธีอื่นๆ จะต่ำกว่าสัดส่วนการเพิ่มขึ้นของ quercetin แสดงให้เห็นว่า kaempferol น่าจะเกิดการสลายตัวไปบางส่วน และมีความคงตัวน้อยกว่า quercetin

Zhou และคณะ (2000) ได้ทำการศึกษาความคงตัวของ rutin ด้วยเครื่อง Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR) เมื่อมีการเปลี่ยนแปลงอุณหภูมิแบบ real time ระหว่าง 25-270 °C ผลการศึกษาพบว่าการเพิ่มอุณหภูมิมีผลเหนี่ยวนำให้ rutin เสื่อมสลายทั้งจากความร้อนและการส่งเสริมการเกิดปฏิกิริยา oxidation และพบการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของ rutin เกิดขึ้น ณ อุณหภูมิ 75°C ซึ่ง Zhou และคณะ สรุปว่า rutin เป็นสารที่ไม่คงตัว ต่างจากผลการศึกษาของ Biesago และคณะ (2011) ที่สรุปว่า rutin มีความคงดี เนื่องจากมี glycoside ในโครงสร้างที่ช่วยป้องการเสื่อมสลายได้ ดังนั้นในการสกัดด้วยวิธีต่างๆ จึงยังคงพบ rutin ที่มี %recovery สูง แต่ในการสกัดโดยใช้คลื่นไมโครเวฟ (ซึ่งมีความร้อนเกิดขึ้น) ในเวลาที่นานขึ้นพบว่า rutin มีปริมาณลดลงเล็กน้อยในขณะที่ quercetin และ kaempferol ลดลงอย่างชัดเจนซึ่ง Biesago และคณะได้สรุปว่า แม้ความร้อนจะช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด แต่ก็มีผลต่อการเสื่อมสลายของสารที่ไม่ทนความร้อน และเนื่องจากในการสกัดใบยอโดยการต้มใบสดในงานวิจัยของผู้วิจัย ใช้เวลาในสกัดมาก จึงเป็นไปได้ว่าการต้มใบยอสดน่าจะให้ปริมาณ rutin, quercetin และ kaempferol มาก แต่ความร้อนสูงที่ต่อเนื่องเป็นเวลานานทำให้ flavonoids ทั้ง 3 ชนิดเกิดการเสื่อมสลายไป และลำดับความคงตัวของสารที่มีความคงตัวดีคือ rutin > quercetin > kaempferol

มีงานวิจัยก่อนหน้านี้หลายเรื่องที่สนับสนุนว่าเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกันมีผลต่อประสิทธิภาพในการสกัด ความคงตัวของสาร ตลอดจนฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดที่ได้ นอกจากงานวิจัยของ Biesaga และคณะ (2011) ซึ่งศึกษาผลของวิธีการสกัดต่อความคงตัวของ flavonoids ที่สัมพันธ์กับโครงสร้างและ functional group ซึ่งสนับสนุนงานวิจัยนี้แล้ว ยังมีงานวิจัยของ Gao และ Liu (2005) ที่ทำการศึกษาเปรียบเทียบเทคนิคการสกัด flavonoids จาก callus ของ *Saussurea medusa* Maxim ใน ethanol โดยเทคนิค solvent extraction (25 °C), heat reflux extraction (90 °C), Soxhlet extraction (90 °C), ultrasound assisted extraction และ microwave assisted extraction ซึ่ง Gao และ Liu พบว่าการสกัดโดยใช้ microwave เป็นวิธีที่มีประสิทธิภาพในการสกัดสารในกลุ่ม flavonoids ที่ใช้เวลาน้อย และสามารถประยุกต์ใช้ในการสกัด phytochemical compounds อื่นๆ ของเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ ของพืชสมุนไพรได้ เนื่องจาก microwave ทำให้โมเลกุลของสารมีการเคลื่อนที่โดยการเคลื่อนย้าย ions และการหมุนของขั้ว จึงเพิ่มแรงในการแทรกตัวของ solvent ในการสกัด จึงช่วยเพิ่มประสิทธิภาพในการสกัดทั้ง %yield และเวลาที่ใช้ในการสกัด นับเป็นแนวทางในการพัฒนาเทคนิคการสกัดสารที่ดีและสามารถนำไปประยุกต์ใช้ในงานวิจัยต่อๆ ไป ทั้งนี้เมื่อเปรียบเทียบระหว่างวิธีการสกัดแบบอื่นๆ ที่คล้ายกับวิธีการสกัดในงานวิจัยนี้ คือ solvent extraction และ heat reflux พบว่าการสกัดแบบ heat reflux มีประสิทธิภาพในการสกัดให้ได้ flavonoids ที่มี

%yield สูงกว่าในเวลาอันสั้นกว่า แตกต่างจากการวิจัยของผู้วิจัย ซึ่งวิธีการหมักหรือ solvent extraction นั้น ให้ yield สูงกว่าการต้ม ซึ่งเทียบกับการทำ heat reflux ทั้งนี้เนื่องจากความแตกต่างของน้ำยาสกัดที่ Gao และ Liu ใช้ตลอดการทดลองคือ 80% ethanol ส่วนงานวิจัยนี้ใช้ 95% ethanol ในการหมักและใช้น้ำในการต้มจึงมีปัจจัยเรื่องความสามารถในการละลายมาเกี่ยวข้อง

การลำดับประสิทธิภาพของวิธีการสกัดนั้นนอกจาก %yield ที่ได้แล้ว Gao และ Liu ยังกำหนดค่าประสิทธิภาพในการสกัดจากสัดส่วนของปริมาณ flavonoids ทั้งหมดที่สกัดได้ (mg) ต่อเวลา (hr) โดยใช้เทคนิค UV spectrophotometry ในการตรวจวัดปริมาณ flavonoids ทั้งหมด ซึ่งผู้วิจัยคาดว่าควรนำไปใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการสกัดของผู้วิจัยในอนาคต แม้ว่าในงานวิจัยนี้จะไม่ได้ใช้วิธีการดังกล่าวในการประเมินประสิทธิภาพการสกัด แต่หากประเมินโดยคร่าวๆ จาก flavonoids เฉพาะ rutin quercetin และ kaempferol พบว่าประสิทธิภาพในการสกัด flavonoids ในงานวิจัยนี้คือ คือ FMC_CE = 3.46, DMC_CE = 0.49, FMC_CF = 11.72, DMC_CF = 9.26, FMC_HW = 0.62 mg/hr ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าวิธีการปั่นใบยอสดคั้นน้ำ นอกจากจะให้ %yield สูงสุดแล้วการปั่นคั้นน้ำยังให้ค่าประสิทธิภาพการสกัดฯ มากที่สุดด้วย จึงนับว่าเป็นวิธีการสกัดที่น่าสนใจ และหากมีการพัฒนาใช้ใบยอเพื่อสุขภาพในอนาคต ก็สามารถเตรียมใช้โดยง่ายและประหยัดเวลา ลดการใช้ organic solvent และมีต้นทุนการผลิตไม่มาก

<u>การทดลอง 3</u> การทดสอบผลของสารสกัดใบยอ และสารมาตรฐาน rutin, quercetin และ kaempferol ต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก human leukemic T-lymphocytes (MOLT-4)

ในระบบภูมิคุ้มกัน cytokine เป็น polypeptide ที่สร้างและหลั่งโดยเซลล์ของร่างกาย มีบทบาทในระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (non-specific immunity) และแบบจำเพาะ (specific immunity) ในการควบคุมการเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันหลายชนิด (Ho et al., 2004) cytokine ที่ช่วยใน specific immunity ส่วนใหญ่หลั่งมาจาก T-lymphocyte ส่วน cytokine ที่ช่วยใน non-specific immunity ส่วนใหญ่หลั่งมาจาก mononuclear phagocyte แต่ก็ได้รับการกระตุ้นจาก T -lymphocyte ด้วยเช่นกัน

T lymphocytes ชนิด T helper-1 (Th1) ผลิต cytokine หลายชนิดรวมทั้ง IFN-γ และ IL-2 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ (cell mediated immunity; CMI) ส่วนชนิด Th2 ผลิต cytokine หลายชนิดรวมทั้ง IL-4 และ IL-10 ซึ่งเกี่ยวข้องกับการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันด้านสารน้ำ (humoral mediated immunity; HMI) (Lucey et al., 1996; Nakayama et al., 2000)

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดใบยอต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 เพื่อเป็นตัวแทนการทำงานของ Th1 และ Th2 ตามลำดับ IFN-γ จัดเป็น pro-inflammatory cytokines จัดอยู่ในกลุ่ม type 1 cytokine ผลิตโดย T cells และ NK cells มีฤทธิ์ขัดขวางการเพิ่มจำนวนของไวรัสภายในเซลล์ และขัดขวางการแบ่งเซลล์ กระตุ้นการทำงานของ monocytes/ macrophages ส่งเสริม

การทำงานของ NK cells และส่งเสริมการทำงานของ cytotoxic T lymphocytes ส่วน IL-10 เป็น anti-inflammatory cytokines จัดอยู่ในประเภท type 2 cytokine และสร้างโดย T cells มีหน้าที่ยับยั้งการหลั่ง chemokines และมีผลยับยั้งฤทธิ์ของ IFN-γ, IL-2 และ IL-4 (Cruse et al., 2004)

ในงานวิจัยนี้ใช้ MOLT-4 cells เป็นต้นแบบในการศึกษา เนื่องจากเป็นเซลล์ชนิด human leukemic T-lymphocyte cell line และมีการใช้เป็นเซลล์ต้นแบบในการศึกษาการทำงานของ T-lymphocytes ในหลายงานวิจัย (Mamata et al., 2007; Shin et al., 2005; Conti et al., 1992) และกำหนดรูปแบบการศึกษาเปรียบเทียบระหว่าง ระบบที่เติม concanavalin A (con A) (stimulated system) และไม่เติม con A (unstimulated system) เพื่อให้เห็นการเปลี่ยนแปลงปริมาณ cytokines ทั้งสองชนิดชัดเจนมากขึ้น con A มีผลในการกระตุ้นการแบ่งตัวของ T lymphocytes ตลอดจนมีผลเพิ่มการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 (Piuvezam et al., 1999) และเป็น mitogen อีกชนิดหนึ่งที่มีการใช้ในงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ T lymphocyte อยู่แล้ว จึงเลือกใช้ con A เป็นสารกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 ในการวิจัยนี้

จากการศึกษาผลของสารสกัดใบยอ 1-100 μg/mL ต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 จาก human T-lymphoblast พบว่าสารสกัดจากใบยอทั้ง 5 ชนิดไม่มีผลต่อการหลั่ง IFN-γ แต่เมื่อเติม con A ในระบบ พบว่าการหมักใบยออบแห้งใน ethanol (DMC_CE) และการปั่นใบยอคั้นน้ำทั้งแบบใบสด (FMC_CF) และใบแห้ง (FMC_CF) ได้สารสกัดที่มีผลยับยั้งการหลั่ง IFN-γ จากผลของ con A ซึ่งการสกัดโดยใช้ใบยอสดปั่นรวมกับน้ำและนำไปทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (FMC_CF 50-100 μg/mL) ลดการหลั่ง IFN-γ ได้มากที่สุดประมาณ 78%

สารสกัดที่เตรียมโดยการหมักใบสดและใบแห้งของใบยอใน ethanol (FMC_CE, DMC_CE) และเตรียมโดยการปั่นคั้นน้ำและทำแห้งเยือกแข็ง (FMC_CF, DMC_CF) มีผลเพิ่มการหลั่ง IL-10 โดยสารสกัดที่เตรียมโดยการหมักใบแห้งใน ethanol (DMC_CE) มีผลเพิ่มการหลั่ง IL-10 มากที่สุดถึง 252% แต่เมื่อเติม con A ร่วมกับสารสกัดฯ พบว่าเฉพาะสารสกัดใบยออบแห้งที่หมักใน ethanol (DMC_CE) และใบยอสดปั่นคั้นน้ำ (FMC_CF) ที่ยังคงมีผลเพิ่มการหลั่ง IL-10 มากขึ้น แต่อัตราการเพิ่มขึ้นของ IL-10 ต่ำกว่าไม่ไม่เติม con A อย่างไรก็ตามการต้มใบยอสด (FMC_HW) และการปั่นใบยออบแห้งคั้นน้ำฯ (DMC_CF) ทั้งที่ไม่เติมและเติม con A กลับมีผลลดการหลั่ง IL-10 โดยการต้มใบยอสด (FMC_HW) มีผลลดการหลั่ง IL-10 มากกว่าการปั่นใบยออบแห้งคั้นน้ำฯ (DMC_CF) ซึ่งการเติม con A ทำให้เห็นผลการลดลงของ IL-10 ชัดเจนขึ้น (87.5%)

จากผลการทดลองจะเห็นได้ว่าการสกัดด้วยเทคนิคที่แตกต่างกัน นอกจากสารสำคัญ อย่างน้อย 3 ชนิดคือ rutin, quercetin และ kaempferol ที่มีปริมาณแตกต่างกันแล้ว สารสกัดที่ได้ยังมีผลต่อการหลั่ง cytokine จาก T-lymphocytes ทั้ง IFN-γ และ IL-10 แตกต่างกัน โดยสารสกัดบางชนิดมีผลกระตุ้นและบางชนิดมีผลกดหรือยับยั้ง และสารสกัดบางชนิดก็มีผลทั้งกระตุ้นและยับยั้งเมื่อใช้

ความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน นอกจากนี้การเติม con A ในระบบ ยังมีผลให้สารสกัดบางชนิดแสดงผลที่ชัดเจนมากขึ้นและบางชนิดมีผลปลี่ยนไปจากเมื่อไม่เติม con A

เนื่องจากภูมิคุ้มกันทำงานเป็นระบบ การพิจารณาจาก mediators ชนิดใดชนิดหนึ่งคงไม่สามารถเป็นคำตอบของภูมิคุ้มกันทั้งระบบได้ Swain และคณะ (1991) จึงได้คำนวณค่า IFN-γ/IL-10 ratio เพื่อแสดงรูปแบบการตอบสนองที่สัมพันธ์กันระหว่าง Th1 และ Th2 (Th1/Th2 balance) นอกจากนี้ยังมีการศึกษาผลการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วยค่า Th1/Th2 ratio อื่นๆ เช่นการใช้อัตราส่วนระหว่าง IL-1β/IL-10 เพื่อศึกษาผลของสารประกอบ phenolic ในใบชาต่อการสร้าง pro- และ anti-inflammatory cytokine ชนิด IL-1β และ IL-10 โดยกำหนดให้สารทดสอบที่มี IL-1β/IL-10 ratio ≥ 1 มีผลต่อกระบวนการอักเสบ ส่วนสารทดสอบที่มี ratio < 1 มีฤทธิ์ต้านอักเสบ และผลการทดสอบพบว่า epicatechin gallate, epigallocatechin และ epigallocatechin gallate มีฤทธิ์ต้านอักเสบ (Crouvezier et al., 2001) ในหนูทดลองและมนุษย์ ความไม่สมดุลของ Th1/Th2 cytokines มีความสัมพันธ์กับการเกิดโรคหลายชนิดเช่น การติดเชื้อ มะเร็งและการอักเสบ (Clerici and Shearer, 1993; Lucey et al., 1996)

จากผลการทบทวนวรรณกรรมนี้เอง ผู้วิจัยจึงคำนวณค่า IFN-γ/IL-10 ratio เพื่อศึกษารูปแบบการตอบสนองที่สัมพันธ์กันระหว่าง Th1 และ Th2 (Th1/Th2 balance) ในทำนองเดียวกัน และกำหนดให้ค่า IFN-γ/IL-10 ratio ของ blank กรณีไม่เติม con A (ratio = 2.4) และ con A (ratio = 3.2) กรณีเติม con A เป็น base line สำหรับแต่ละระบบที่ทำการศึกษา หากค่า IFN-γ/IL-10 ratio มีค่ามากกว่า base line จะแปลผลว่าสารสกัดมีผลในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน หากค่า IFN-γ/IL-10 ratio มีค่าต่ำกว่า base line จะแปลผลว่าสารสกัดมีผลต้านอักเสบ

ผลการทดลองพบว่าสารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีค่า IFN-γ/IL-10 ratio ต่ำกว่า base line ทั้งในระบบที่ไม่เติม และเติม con A แสดงว่าสารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีผลต่อการตอบสนองของ Th2 cells มากกว่า Th1 cells และมีฤทธิ์ต้านอักเสบ การปั่นใบยอสดคั้นน้ำฯ (FMC_CF) ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบมากที่สุด (ratio = 0.74, 100 μg/mL) และเมื่อมี con A ในระบบ สารสกัดจะมีผลต่อการตอบสนองของ Th2 มากขึ้น ทำให้ฤทธิ์ต้านอักเสบเพิ่มมากขึ้น (ratio = 0.36, 100 μg/mL)

วิธีการสกัดบางเทคนิคก็ทำให้ได้สารสกัด (บางช่วงความเข้มข้น) ที่ให้ค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูง ซึ่งมีผลต่อการตอบสนองของ Th1 cells มากกว่า Th2 cells และมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น การหมักใบสดใน ethanol (FMC_CE 1, 25 μg/mL) และการปั่นใบแห้งคั้นน้ำฯ (DMC_CF 100 μg/mL+ con A) สำหรับการต้มใบสดในน้ำ (FMC_HW) ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันมากที่สุด ทั้งในระบบที่ไม่เติมและเติม con A โดยมีค่า IFN-γ/IL-10 ratio เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับความเข้มข้น และมีค่าสูงสุดเท่ากับ 5.69 และ 13.3 (100μg/mL) ในระบบที่ไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ

จากผลการทดลองข้างต้น ในภาพรวมจะเห็นได้ว่า เมื่อเปรียบเทียบการสกัดวิธีเดียวกัน การสกัดโดยใช้ใบสดจะให้ผลการทดสอบที่ดีกว่าการใช้ใบแห้ง และเป็นที่น่าสนใจว่าการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบสูงสุด เตรียมโดยการปั่นคั้นน้ำก่อนนำไปทำแห้งเยือกแข็ง (FMC_CF) และการสกัดที่ให้สารสกัดที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันสูงสุด เตรียมโดยการต้มใบสดในน้ำ (FMC_HW) ซึ่งจะเห็นได้ว่าเป็นเทคนิคที่ใช้น้ำเป็นน้ำยาสกัดเหมือนกัน แต่ต่างกันที่เตรียมโดยไม่ใช้ความร้อนและใช้ความร้อน ตามลำดับ ผู้วิจัยจึงทำการทดสอบต่อเพื่อหาว่าสารใดในสารสกัดเป็นสารออกฤทธิ์ ซึ่งในการทดลองส่วนต่อไป ได้ทำการทดสอบผลของ rutin, quercetin และ kaempferol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids ที่พบในสารสกัดใบยอ และมีรายงานว่ามีฤทธิ์ทางชีวภาพหลากหลายต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 จาก T lymphocyte เพื่อนำผลการทดลองที่ได้มาเปรียบเทียบกับผลของสารสกัด FMC_CF และ FMC_HW ต่อไป

ผลการทดลองในภาพรวมพบว่า quercetin และ kaempferol มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ เพิ่มขึ้นทั้งในระบบที่ไม่เติมและเติม con A ส่วน rutin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ เฉพาะเมื่อเติม con A โดย quercetin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ สูงสุดมากกว่า basal secretion สูงถึง 936.7% (1 μg/mL) ในขณะที่ rutin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ สูงสุดมากกว่า con A สูงถึง 205.7% (100 μg/mL) เมื่อทดสอบผลต่อการหลั่ง IL-10 พบว่า rutin และ quercetin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 เพิ่มขึ้นทั้งในระบบที่เติมและไม่เติม con A ทั้งนี้ rutin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 สูงสุดมากกว่า basal secretion สูงถึงประมาณ 515.6% (25 μg/mL) ในขณะที่ quercetin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ สูงสุดมากกว่า con A สูงถึง 205.7% (100 μg/mL) ส่วน kaempferol เมื่อไม่เติม con A จะมีผลกระตุ้น แต่ในระบบที่เติม con A จะมีกดการหลั่ง IL-10 และมีผลกดการหลั่ง IL-10 มากที่สุด 43.8% (25 μg/mL)

จากการคำนวณค่า IFN-γ /IL-10 ratio และใช้เกณฑ์การพิจารณาเช่นเดียวกับการศึกษาผลของสารสกัดใบยอฯ พบว่า rutin, quercetin และ kaempferol มีทั้งฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านอักเสบ แตกต่างกันตามความเข้มข้น กล่าวคือ **quercetin** ความเข้มข้นต่ำจะมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน และเมื่อความเข้มข้นเพิ่มมากขึ้นจะมีฤทธิ์ต้านอักเสบแต่เมื่อเติม con A ในระบบผลที่ได้จะกลับกัน คือความเข้มข้นต่ำจะมีฤทธิ์ต้านอักเสบในขณะที่ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ซึ่งเป็นไปได้ว่าเกิดจากการที่ con A มีผลส่งเสริมการหลั่ง cytokine เช่นเดียวกับสารสกัดทำให้เกิดการตอบสนองแบบ negative feedback ซึ่งจะเห็นได้จากเมื่อความเข้มข้นของ quercetin เพิ่มขึ้นจะมีผลให้ IFN-γ ลดลงตามความเข้มข้น แต่เมื่อเติม con A IFN-γ กลับเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น และจะมีผลให้ IL-10 เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้น แต่เมื่อเติม con A IL-10 จะลดลงเมื่อความเข้มข้นเพิ่มขึ้นสลับกัน ทั้งนี้รูปแบบการออกฤทธิ์ฯ ดังกล่าวเกิดขึ้นเมื่อทดสอบ **kaempferol** ในทำนองเดียวกัน อย่างไรก็ตามเฉพาะ kaempferol 50 μg/mL ที่แสดงค่า IFN-γ /IL-10 ratio ที่ shift ไปทางฤทธิ์

กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เนื่องจากความเข้มข้นดังกล่าวเริ่มมีการกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ อย่างมาก สำหรับ **rutin** ทั้งในระบบที่ไม่เติมและเติม con A พบว่าช่วงความเข้มข้นต่ำจะมีฤทธิ์ต้านอักเสบ แต่ช่วงความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน

ในการพิจารณาว่า ฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือต้านอักเสบของสารสกัดฯ เป็นผลจากสารสำคัญใดนั้น ในเบื้องต้นพิจารณาได้จากปริมาณสารองค์ประกอบและความสอดคล้องของฤทธิ์ฯ ของสารนั้น จาก HPLC-fingerprint แสดงว่าสารสกัดใบยอแต่ละชนิดมี flavonoids ในปริมาณเพียงเล็กน้อย เช่นสารสกัด FMC_CE ซึ่งเตรียมจากการหมักใบยอสดใน ethanol เมื่อเตรียมในรูปสารละลายทดสอบ 1 – 100 μg/mL จะมี rutin ในช่วง 0.014 – 1.4 μg/mL, quercetin 0.07 – 7 ng/mL และ kaempferol ในช่วง 0.10 – 10 ng/mL จึงไม่สามารถเปรียบเทียบความเข้มข้นของสารสกัดฯ และ flavonoids ที่ทำการทดสอบเทียบเคียง ณ ความเข้มข้นเดียวกันได้ และอาจทำการศึกษาเพิ่มเติมโดยกำหนดความเข้มข้นของ rutin, quercetin และ kaempferol ให้อยู่ในช่วงที่พบในสารสกัด เช่น 0.1 – 100 ng/mL และในงานวิจัยนี้จะอนุมานเทียบจากฤทธิ์ของ rutin, quercetin และ kaempferol ในช่วงความเข้มข้นต่ำๆ แทน

เมื่อพิจารณา rutin, quercetin และ kaempferol ในช่วงความเข้มข้นต่ำ พบว่า rutin ที่ไม่เติมและเติม con A มีฤทธิ์ต้านอักเสบ ในขณะที่ quercetin และ kaempferol ที่ไม่เติม con A มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิกัน แต่เมื่อมี con A ร่วมด้วยจะแสดงฤทธิ์ต้านอักเสบ กรณีสารสกัด FMC_CF ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบ จึงอาจเป็นผลของ rutin ส่วนสารสกัด FMC_HW ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน ส่วนหนึ่งจึงอาจเป็นผลจาก quercetin และ kaempferol ซึ่งพบในสารสกัด FMC_HW มากกว่าสารสกัดใบยออื่นๆ อย่างไรก็ตามเนื่องจากฤทธิ์ของสารสกัดเป็นผลร่วมของสารองค์ประกอบหลายชนิดในสารสกัด ซึ่งนอก rutin, quercetin และ kaempferol ที่พบในสารสกัดแต่ละชนิดแล้ว ยังมี unidentified peak ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาโครงสร้าง ซึ่งอาจมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัดเช่นกัน

จากงานวิจัยนี้ นอกจากจะทำให้เราทราบว่าวิธีการสกัดมีผลต่อฤทธิ์ของสารสกัดที่ได้ เนื่องจากปัจจัยที่ใช้ในการสกัด เช่น วัตถุดิบ (การใช้ใบสดหรือใบแห้ง) น้ำยาสกัดซึ่งเกี่ยวข้องกับค่าการละลายของสารองค์ประกอบ และความร้อนที่ให้แก่ระบบซึ่งมีผลต่อสารสำคัญบางชนิดที่ไม่ทนความร้อนตลอดจนการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างสารเนื่องจากการสลายตัว ปัจจัยเหล่านี้มีผลต่อปริมาณสารองค์ประกอบแต่ละชนิดที่ได้การสกัด และสัดส่วนของสารองค์ประกอบเหล่านั้นเองที่มีผลต่อการตอบสนองของ Th1 และ Th2 โดยแสดงการเปลี่ยนแปลงระดับการหลั่ง cytokine ที่แตกต่างกัน

เป็นที่น่าสังเกตว่าในสารสกัด FMC_CE ซึ่งมีปริมาณ rutin มากที่สุด กลับไม่ใช่สารสกัดที่มีฤทธิ์ต้านอักเสบสูงสุด แต่ในสารสกัด DMC_CE ซึ่งปริมาณ rutin ลดลงอย่างมาก กลับมีฤทธิ์ต้านอักเสบเพิ่มขึ้น แสดงให้เห็นว่ามีสารองค์ประกอบบางชนิดที่เป็น antagonist กับ rutin หรือ rutin ความเข้มข้นสูง อาจมีผลให้เกิด negative feed back ทำให้ Th1/Th2 balance เกิดการ shift ไปใน

ทางตรงข้ามได้เช่นกัน อย่างไรก็ตามจากงานวิจัยนี้ เราจะสังเกตได้ว่าในใบยอมี rutin เป็นส่วนประกอบในปริมาณมาก และการสกัดด้วยการหมักใบยอสดใน ethanol ทำให้ได้ rutin สูงถึง 1366.37 mg ต่อสารสกัด 100 g (เทียบเท่ากับปริมาณ rutin 80.07 mg/พืชสด 100 g) ดังนั้นเราจึงอาจใช้วิธีการสกัดดังกล่าวในการสกัด rutin จากใบยอเพื่อใช้ประโยชน์ด้านอื่นๆ ต่อไป และเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด FMC_HW และ FMC_CF ควรทำการศึกษาเปรียบเทียบกับยาหรือสมุนไพรมาตรฐานที่มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันและต้านอักเสบ ตามลำดับ

แม้ว่าจะยังไม่มีงานวิจัยฤทธิ์ทางชีวภาพของใบยอที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันมากนัก แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่ามีรายงานวิจัยมากมายกล่าวถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารประกอบในใบยอ เช่น rutin, quercetin และ kaempferol ต่อภูมิคุ้มกัน เช่น Cherng และคณะ (2008) รายงานผลการศึกษาที่สอดคล้องกับผลการวิจัยของผู้วิจัยว่า rutin และ quercetin ที่สกัดได้จากผักและพืชในกลุ่มเครื่องเทศ family Umbelliferae มีฤทธิ์กระตุ้นการหลั่ง IFN-γ จาก peripheral blood mononuclear cells (PBMC) ซึ่งเป็นผลจากการกระตุ้น $CD8^+$ T cells ในขณะที่ Comalada และคณะ (2006) รายงานว่าเมื่อทดสอบผลของ flavonoids ชนิดต่างๆ ต่อการหลั่ง pro-inflammatory markers จาก bone marrow-derived mouse macrophages ที่เหนี่ยวนำด้วย lipopolysaccharides (LPS) พบว่า kaempferol มีผลยับยั้งการหลั่ง IL-10 ในขณะที่ quercetin มีผลเพิ่มระดับ IL-10 mRNA กระตุ้นการหลั่ง IL-10 อย่างมาก และมีฤทธิ์ต้านอักเสบ แต่เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้นสูง พบว่าการกระตุ้น IL-10 ลดลง ผลการทดลองดังกล่าวก็เป็นไปในทำนองเดียวกันกับผลการวิจัยของผู้วิจัยที่ quercetin มีผลกระตุ้นการหลั่ง IL-10 และ kaempferol ความเข้มข้นสูงมีผลยับยั้งการหลั่ง IL-10

Comalada และคณะวิเคราะห์ว่าอาจเกิดจากกระบวนการ post transcription และมีกลไกเกี่ยวข้องกับทั้ง NF-κB และ p38 MAPK ซึ่งควบคุมการแสดงออกของ IL-10 ทั้งนี้ OH- group ณ ตำแหน่ง 5, 7, 3', 4' และพันธะคู่ ณ C2-C3 ของ ring B จำเป็นต่อประสิทธิภาพในการต้านอักเสบ นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยของ Thangasamy และคณะ (2009) ที่รายงานว่า quercetin ณ ความเข้มข้นสูงจะมีฤทธิ์ pro-oxidant และ pro-apoptotic สอดคล้องกับผลการทดลองในงานวิจัยนี้ ซึ่งการเติม con A ซึ่งกระตุ้นการหลั่ง IL-10 ได้ ร่วมกับ quercetin มีผลให้การกระตุ้นการหลั่ง IL-10 ลดลง หลักการดังกล่าวสามารถนำมาใช้ในการอธิบายการที่สารสกัดใบยอความเข้มข้นสูงมีผลให้การหลั่ง cytokine ลดลงได้

อย่างไรก็ตามมีรายงานวิจัยที่ต่างจากผลการวิจัยในงานวิจัยนี้เช่นกัน เช่นงานวิจัยของ Lopes-Pasadas และคณะ (2008) ซึ่งทำการศึกษาผลของ flavonoids หลายชนิดต่อการหลั่ง IFN-γ จากเซลล์ที่เหนี่ยวนำด้วย con A เมื่อทดสอบที่ความเข้มข้น 50 μM พบว่า quercetin มีผลยับยั้งการหลั่ง IFN-γ มากที่สุด รองลงมาคือ kaempferol ส่วน rutin มีผลยับยั้งเพียงเล็กน้อย ผลการยับยั้งการหลั่ง cytokine อาจเกิดได้จากกลไกการควบคุมจาก lymphocyte ผลจากการยับยั้งการแบ่งตัว (anti-

proliferation) และผลของ cytotoxic และ apoptosis หรือผลของหลายกลไกร่วมกัน ซึ่งผลการทดลองพบว่า quercetin มีผลกระตุ้น cell apoptosis ส่วน kaempferol, rutin มีผลน้อยมาก และงานวิจัยของ Yu และคณะ (2008) ที่พบว่า quercetin มีผลยับยั้งการหลั่ง IL-2, IFN-γ จาก T helper cells จึงช่วยสนับสนุนว่า quercetin มีฤทธิ์ต้านอักเสบ และลดภาวะข้ออักเสบ (anti-arthritis) ในหนูได้

บทที่ 6
สรุปผลการวิจัย

1. เมื่อสกัดใบยอสดและแห้งด้วยเทคนิคการสกัด (ไม่ใช้, ใช้ความร้อน) และน้ำยาสกัด (น้ำ, ethanol) ที่แตกต่างกัน 5 เทคนิค ได้สารสกัดหยาบ (crude extracts) ซึ่งมีลักษณะทางกายภาพและร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสดแตกต่างกัน โดยสารสกัดจากใบยอสดปั่นคั้นน้ำและทำให้แห้งแบบเยือกแข็ง (FMC_CF) มีผลผลิตสูงสุด 7.14% และสารสกัดใบยอที่ผ่านการอบแห้งก่อนหมักใน ethanol มีผลผลิตต่ำสุด 5.16%

2. จากการวิเคราะห์สารองค์ประกอบในสารสกัดใบยอด้วยเทคนิค HPLC พบ rutin, quercetin และ kaempferol ในปริมาณที่แตกต่างกัน นอกจากนี้ยังสารองค์ประกอบอื่นๆ อีกหลายชนิดที่ยังไม่ได้ทำการวิเคราะห์ในงานวิจัยนี้ โดยสารสกัดใบยอฯ ทุกชนิดมีปริมาณ rutin มากที่สุดและรองลงมาคือ kaempferol และ quercetin ยกเว้นสารสกัดใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) พบว่ามี unidentified peak หนึ่งที่มีปริมาณมากกว่า rutin

3. ปัจจัยที่มีผลต่อประสิทธิภาพการสกัดในงานวิจัยนี้ ได้แก่ (1) การเตรียมวัตถุดิบที่เหมาะสม ซึ่งการใช้ใบยอสดเหมาะสมกว่าการใช้ใบอบแห้ง (2) การเลือกน้ำยาสกัดที่เหมาะสม เช่น ethanol หรือ ส่วนผสมระหว่างน้ำและ ethanol (3) การสกัดใช้ความร้อนเพิ่มประสิทธิภาพการสกัด แต่มีผลต่อการเสื่อมสลายของสารที่ไม่ทนความร้อนบางชนิด การลดเวลาในการสัมผัสความร้อน เช่นการใช้ microwave ช่วยเพิ่มประสิทธิภาพการสกัดได้

4. ลำดับประสิทธิภาพของวิธีการสกัดซึ่งประเมินโดยคร่าวๆ จาก flavonoids เฉพาะ rutin quercetin และ kaempferol พบว่าประสิทธิภาพในการสกัด flavonoids ในงานวิจัยนี้คือ คือ FMC_CE = 3.46, DMC_CE = 0.49, FMC_CF = 11.72, DMC_CF = 9.26, FMC_HW = 0.62 mg/hr ซึ่งเป็นที่น่าสนใจว่าวิธีการปั่นใบยอสดคั้นน้ำ นอกจากจะให้ %yield สูงสุดแล้วการปั่นคั้นน้ำยังให้ค่าประสิทธิภาพการสกัดฯ มากที่สุดด้วย จึงนับว่าเป็นวิธีการสกัดที่น่าสนใจ และหากมีการพัฒนาใช้ใบยอเพื่อสุขภาพในอนาคต ก็สามารถเตรียมใช้โดยง่ายและประหยัดเวลา ลดการใช้ organic solvent และมีต้นทุนการผลิตไม่มาก

5. เทคนิคการสกัดที่แตกต่างกัน มีผลให้ได้สารสกัดที่มีผลต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 แตกต่างกัน สารสกัดใบยอบางชนิดมีผลกระตุ้นและบางชนิดมีผลกดหรือยับยั้ง และสารสกัดบางชนิดก็มีผลทั้งกระตุ้นและยับยั้งเมื่อทดสอบ ณ ความเข้มข้นของสารสกัดต่างกัน การเติม con A ใน

ระบบ มีผลให้สารสกัดบางชนิดแสดงผลที่ชัดเจนมากขึ้นและบางชนิดมีผลปลี่ยนไปจากเมื่อไม่เติม con A

6. สารสกัดใบยอส่วนใหญ่มีฤทธิ์ต้านอักเสบ การปั่นใบยอสดคั้นน้ำฯ ให้สารสกัด (FMC_CF) ที่มีผลลดการหลั่ง IFN-γ และเพิ่มการหลั่ง IL-10 (เฉพาะเมื่อเติม con A) จึงมีฤทธิ์ต้านอักเสบมากที่สุด หรือมีผลต่อการตอบสนองของ Th2 มากกว่า Th1 โดยมีค่า IFN-γ /IL-10 ratio = 0.74, 0.36 (100 μg/mL) เมื่อไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ ในขณะที่การต้มใบสดในน้ำ (FMC_HW) ให้สารสกัดที่ไม่มีผลเปลี่ยนแปลงปริมาณ IFN-γ แต่ลดการหลั่ง IL-10 จึงมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันมากที่สุด หรือมีผลต่อยับยั้งการตอบสนองของ Th2 โดยไม่มีผลต่อ Th1 โดยมีค่า IFN-γ/IL-10 ratio สูงสุดเท่ากับ 5.69 และ 13.3 (100 μg/mL) ในระบบที่ไม่เติมและเติม con A ตามลำดับ

7. rutin, quercetin และ kaempferol ทั้งที่ไม่เติมและเติม con A ส่วนใหญ่มีผลกระตุ้นการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 ยกเว้น kaempferol + con A ที่มีผลกดการหลั่ง IL-10 และ rutin ที่ไม่มีผลต่อการหลั่ง IFN-γ เมื่อพิจารณาจากค่า Th1/Th2 balance พบว่า rutin, quercetin และ kaempferol มีฤทธิ์ต้านอักเสบหรือมีผลต่อการตอบสนองของ Th2 มากกว่า Th1 มีเฉพาะบางช่วงความเข้มข้นเท่านั้นที่แสดงฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น rutin, rutin + con A, quercetin + con A ความเข้มข้นสูงมาก และ quercetin, kaempferol ความเข้มข้นต่ำมาก ซึ่งอาจเป็นผลจากการที่สารเกิดเป็น pro-oxidant และ pro-apoptotic หรือเกิด post transcription ณ ช่วงความเข้มข้นนั้น

8. แม้ว่าจะไม่สามารถชี้ชัดได้ว่าผลของสารสกัดใบยอฯ เป็นผลจาก flavonoids ชนิดใด เนื่องจากยังมี unidentified peak ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษาโครงสร้าง ซึ่งอาจมีส่วนสำคัญในการออกฤทธิ์ของสารสกัดเช่นกัน แต่หากอนุมานเทียบผลของ flavonoids ที่ทำการศึกษาในช่วงความเข้มข้นที่ใกล้เคียงกับที่พบในสารสกัดฯ อาจเทียบได้ว่า FMC_CF ซึ่งมีฤทธิ์ต้านอักเสบ น่าจะเกิดจากผลของ rutin เป็นหลัก ส่วนสารสกัด FMC_HW ซึ่งมีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกัน น่าจะเป็นผลจากการเพิ่มขึ้นของ quercetin และ kaempferol ซึ่งพบในสารสกัด FMC_HW มากกว่าสารสกัดใบยออื่นๆ

งานวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดจากใบยอไทยมีฤทธิ์ต่อภูมิคุ้มกันทั้งต้านอักเสบ และกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ขึ้นกับเทคนิคการสกัดที่แตกต่างกันซึ่งมีผลให้ได้สารองค์ประกอบในปริมาณและรูปที่แตกต่างกัน จึงมีผลต่อการตอบสนองของ T lymphocyte ต่างกันด้วย ใบยอใช้เป็นอาหารของมนุษย์มานานแล้ว และหลายประเทศได้ทำการพัฒนาใบยอในรูปแบบผลิตภัณฑ์เพื่อสุขภาพเพื่อการค้าแล้ว แต่จากการทบทวนวรรณกรรมพบทั้งรายงานที่แสดงถึงความปลอดภัยและรายงานความเป็นพิษที่เกิดจากสารองค์ประกอบ ในการพัฒนาใบยอไทยเพื่อสุขภาพและเชิงพานิชย์ นอกจากการควบคุมปริมาณสารสำคัญเพื่อให้มีฤทธิ์ตามต้องการ โดยใช้วิธีการสกัดที่เหมาะสม ตลอดจนการทดสอบเทียบเคียงประสิทธิภาพกับสมุนไพรเพื่อสุขภาพที่ได้มาตรฐานแล้ว ยังควรทำการศึกษาพิษวิทยาของสารสกัดใบยอไทยด้วย

บรรณานุกรม

Bae, E.A., Han, M.J., Lee, M., & Kim, D.H. (2000). *In vitro* inhibitory effect of some flavonoids on rotavirus infectivity. *Biological & Pharmaceutical Bulletin, 23*, (9), 1122-1124.

Biesaga, M. (2011). Influence of extraction methods on stability of flavonoids. *Journal of Chromatoghaphy A, 1218*, 2505-2512.

Blonska, M., Bronikowska, G., Pietsz, G., Czuba, Z. P., Scheller, S., Krol, W. (2004). Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. *Journal of Ethnopharmacology, 91*, 25-30.

Byun, J.A., Ryu, M.H., Lee, J.K. (2006). The immunomodulatory effects of 3-monochloro-1,2-propanediol on murine splenocyte and peritoneal macrophage function *in vitro*. *Toxicology in Vitro, 20*, 272-278.

Chan-Blanco, Y., Vaillant, F., Perez, A.M., Reynes, M., Brillouet, J-M., Brat, P. (2006). The noni (*Morinda citrifolia* L.): A review of agricultural research, nutritional and therapeutic properties. *Journal of Food Composition and Analysis, 19*, 645-654.

Cheong, H., Ryu, S.Y., Oak, M.H., Cheon, S.H., Yoo, G.S., Kim, K.M. (1998). Studies of structure-activity relationship of flavonoids for anti-allergy actions. *Archives of Pharmacal Research, 21 (4)*, 478-480.

Cherng, J., Chiang, W., Chiang, L. (2008). Immunomodulatory activities of common vegetables and spices of Umbelliferae and its related coumarins and flavonoids. *Food Chemistry, 106*, 944-950.

Chiang, L.C., Ng, L.T., Chiang, W., Chang, M.Y., & Lin, C.C. (2003). Immunomodulatory activities of flavonoids, monoterpenoids, tripenoids, iridoid glycosides and phenolic compounds of Plantago species. *Planta Medica, 69 (7)*, 600-604.

Clerici, M., Shearer, G.M. (1993). A TH1/TH2 switch is a critical step in the etiology of HIV infection. *Immunology Today, 14*, 107-111.

Comalada, M., Ballester, I., Bailón, E., Sierra, S., Xaus, J., Gálvez, J., Sánchez de Medina, F., Zarzuelo, A. (2006). Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: Analysis of the structure–activity relationship. *Biochemical Pharmacology, 72 (8)*, 1010-1021.

Conti, P., Barbacane, R.C., Panara, M.R., Reale, M., Placido, F.C., Fridas, S., Bongrazio, M., Dempsey, R.A. (1992). Human recombinant interleukin-1 receptor antagonist (hrIL-1ra) enhances the stimulatory effect of interleukin-2 on natural killer cell activity against molt-4 target. *International Journal of Immunopharmacology, 14 (6)*, 987-993.

Crouvezier, S., Powell, B., Keir, D., Yaqoob, P. (2001). The effects of phenolic components of tea on the production of pro- and anti-inflammatory cytokines by human leukocytes in vitro. *Cytokine, 13 (5)*, 280-286.

Cruse, J.M., Lewis, R.E., Wang, H. (2004). *Immunology Guidebook.* San Diego: Elsevier Academic.

Deng, S., West, B. J., & Jensen, J. (2008). Simultaneous characterisation and quantitation of flavonol glycosides and glycones in noni leaves using a validated HPLC-UV/MS method. *Food Chemistry, 111*, 526-529.

Deng, S., West, B.J., Jensen, J., Palu, A.K. (2009). Thermal degradation of flavonol glycosides in Noni leaves during roasting processes. AGFD 72. *237th National Meeting of the American Chemical Society*, Salt Lake City, Utah, March 22-26.

Furusawa, E., Hirazumi, A., Story, S.J. (2003). Antitumour potential of a polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (Noni) on sarcoma 180 ascites tumour in mice. *Phytotherapy Reserch, 17* (10), 1158-1164.

Gao, M., Song, B., Liu, C. (2005). Dynamic microwave-assisted extraction of flavonoids from *Saussurea medusa* Maxim cultured cells. *Biochemical Engineering Journal, 32 (2)*, 79-83.

Garcia-Madiavilla, V., Crespo, I., Collado, P.S., Esteller, A.S.-C., Tunon, M.J., et al. (2006). The anti-inflammatory flavones quercetin and kaempferol cause inhibition of inducible nitric oxide synthase, cyclooxygenase-2 and reactive C-protein, and down regulation of the nuclear factor kappa-b pathway in Chang liver cells. *European Journal of Pharmacology, 557*, 221-229.

Gooi, H.C., Chapel, H. (1990). *Clinical Immunology: A practical approach*. New York: IRC Press. pp.51-72.

Ha, C-L., Weng, C-Y., Wang, L., Lian, T-W., Wu, M-J. (2006). Immunomodulatory effect of *Glossogyne tenuifolia* in murine peritoneal macrophages and splenocytes. *Journal of Ethnopharmacology, 107*, 116-125.

Han, Y. (2009). Rutin has therapeutic effect on septic arthritis caused by *Candida albicans*. *International Immunopharmacology, 9 (2)*, 207-211.

Hirazumi, A., Furusawa, E. (1999). An immunomodulatory polysaccharide-rich substance from the fruit juice of *Morinda citrifolia* (noni) with antitumour activity. *Phytotherapy Research, 13*, 380-387.

Ho, C.Y., Lau, C., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., Chan, H., Chow, M. (2004). Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes *in vitro*. *International Immunopharmacology, 4(12)*, 1549-1557.

John, E.C., Ada, M.K., David, H.M., Ethan, M.S., Warren, S. (1993). *Current Protocols in Immunology, volume 3*. New York: John Wiley & Sons, Inc.

Katsube, T., Tsurunaga, Y., Sugiyama, M., Furuno, T., Yamasaki, Y. (2009). Effect of air-drying temperature on antioxidant capacity and stability of polyphenolic compounds in mulberry (*Morus alba* L.) leaves. *Food Chemistry, 113*, 964–969.

Kwon, H., Murakami, A., Tanaka, T., Ohigashi, H. (2005). Dietary rutin, but not its aglycone quercetin, ameliorates dextran sulfate sodium-induced experimental colitis in mice: attenuation of pro-inflammatory gene expression. *Biochemical Pharmacology, 69 (3)*, 395-406.

Lee, S.J., Choi, J.H., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., & Kim, H.P. (1995). Suppression of mouse lymphocyte proliferation *in vitro* by naturally-occuring bioflavonoids. *Life Sciences, 57 (6)*, 551-558.

Li, R., Myers, S., Leach, D., Lin, G., Leach, G. (2003). A cross-cultural study: anti-inflammatory activity of Australian and Chinease plants. *Journal of Ethnopharmacology, 85*, 23-32.

Lo´pez-Posadas, R., Ballester, I., Abadı´a-Molina, A.C., Sua´rez, M.D., Zarzuelo, A., Martı´nez-Augustin, O., Sa´ nchez de Medina, F. (2008). Effect of flavonoids on rat splenocytes, a structure–activity relationship study. *Biochemical Pharmacology, 76*, 495-506.

Lucey, D.R., Clerici, M., Shearer, G.M. (1996). Type 1 and type 2 cytokine dysregulation in human infectious, neoplastic, and inflammatory diseases. *Clinical Microbiology Reviews, 9*, 532-562.

Makris, D.P., Rossiter, J.T. (2000). Quercetin and rutin (quercetin 3-O-rhamnosylglucoside) thermal degradation in aqueous media under alkaline conditions. In: Buttriss, J., Saltmarsh, M., editors. *Functional foods II: Claims and evidence*. Cambridge, UK: Royal Society of Chemistry. pp 216-238.

Mamani-Matsuda, M., Kauss, T., Al-Kharrat, A., Rambert, J., Fawaz, F., Thiolat, D., et al. (2006). Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. *Biochemical Pharmacology, 72 (10)*, 1304-1310.

Mamata, Y., Hakki, A., Newton, C., Burdash, N., Klein, T.W., Friedman, H. (2007). Differential effects of *Chlamydia pneumoniae* infection on cytokine levels in human T lymphocyte- and monocyte-derived cell cultures. *International Journal of Medical Microbiology, 297 (2)*, 109-115.

Mark, P., Diego, V. (1997). *Basic and Clinical Immunology*. London: Churchill Livingstone. pp. 26-29.

Nakayama, H., Kitayama, J., Muto, T., Nagawa, H. (2000). Characterization of intracellular cytokine profile of CD4(+) T cells in peripheral blood and tumor-draining lymph nodes of patients with gastrointestinal cancer. *Japanese Journal of Clinical Oncology, 30*, 301-305.

Namgoong, S.Y., Son, K.H., Chang, H.W., Kang, S.S., & Kim, H.P. (1994). Effects of naturally occuring flavonoids on mitogen-induced lymphocyte proliferation and mixed lymphocyte culture. *Life Sciences, 54 (5)*, 313-320.

Palu, A., Kim, A.H., West, B.J., Deng, S., Jensen, J., White, L. (2008). The effects of *Morinda citrifolia* L. (noni) on the immune system: its molecular mechanisms of action. *Journal of Ethnopharmacology, 12 (115)*, 502-506.

Paulo, A., Gomes, E.T., Duarte, A., Perett, S., & Houghton, P.J. (1997). Chemical and antimicrobial studies on *Cryptolepis obtuse* leaves. *Fitoterapia, 68*, 558-559.

Piuvezam, M.R., Peçanha, L.M.T., Alexander, J., Thomas, G. (1999). *Cissampelos sympodialis* Eichl. leaf extract increases the production of IL-10 by concanavalin-A-treated BALB/c spleen cells. *Journal of Ethnopharmacology, 67(1)*, 93-101.

Plochmann, K., Korte, G., Koutsilieri, E., Richling, E. (2007). Structure–activity relationships of flavonoid-induced cytotoxicity on human leukemia cells. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, *460*, 1–9.

Rachon, D., Rimoldi, G., Wuttke, W. (2006). *In vitro* effects of genistein and resveratrol on the production of interferon-γ (IFN-γ) and interleukin-10 (IL-10) by stimulated murine splenocyte. *Phytomedicine, 13*, 419-424.

Sander, C., Cruse, J., Lewis, R. (2008). Toll-like receptors, cytokines and HIV-1. *Experimental and Molecular Pathology, 84*, 31-36.

Sang, S., Cheng, X., Zhu, N., Stark, R.E., Badmaev, V.G., et al. (2001). Flavonol glycosides and novel iridoid glycoside from the leaves of *Morinda citrifolia*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry, 49*, 4478-4481.

Sang, S., He, K., Liu, G., Zhu, N., Wang, M., Jhoo, J., et al. (2001). Citrifolinin A, a new unusual iridoid with inhibition of Activator Protein-1 (AP-1) from the leaves of noni (*Morinda citrifolia* L.). *Tetrahedron Letters, 42,* 1823-1825.

Sang, S., Liu, G., He, K., Zhu, N., Dong, Z., Zheng, Q., Rosen, R., Ho, C. (2003). New unusual iridoids from the leaves of Noni (*Morinda citrifolia* L.) show inhibitory effect on ultraviolet B-induced transcriptional activator protein-1 (AP-1) activity. *Bioorganic & Medicinal Chemistry, 11*, 2499-2502.

Shin, H., Park, S., Seo, S., Hong, S., Um, J., Lee, S., et al. (2005). Gamibojungikki-tang decreases immobility time on the forced swimming test and increases interferon-γ production from MOLT-4 cells. *Journal of Ethnopharmacology, 102 (1)*, 113-119.

Srinivas, K., King, J.,Howard, L., Monrad, J. (2010). Solubility and solution thermodynamic properties of quercetin and quercetin dihydrate in subcritical water. *Journal of Food Engineering, 100*, 208–218.

Sutthiparinyanont, S., Priprem, A., Chulasiri, M. (2006). Quercetin: characterization and development of liposomal encapsulation for drug delivery system. *32nd Congress on Science and Technology of Thailand (STT.32)*, C5_C0110.

Swain, S.L., Bradley, L.M., Croft, M., Tonkonogy, S., Atkins, G., Weinberg, A.D., Duncan, D.D., Hedrick, S.M., Dutton, R.W., Husto, G. (1991). Helper T-cell subsets: phenotype, function and role of lymphokines in regulating their development. *Immunological Reviews,* 123, 115-144.

Takashima, J., Ikeda, Y., Komiyama, K., Hayashi, M., Kishida, A., Ohsaki, A. (2007). *Chemical & Pharmaceutical Bulletin (Tokyo), 55 (2)*, 343-345.

Thangasamy, T., Sittadjody, S., Burd, R. (2009). Quercetin: a potential complementary and alternative cancer therapy. *Complementary and Alternative Therapies and the Aging Population*, 563-584.

Ündeer, U., Aydın, S., Baaran, A., Baaran, N. (2004). The modulating effects of quercetin and rutin on the mitomycin C induced DNA damage. *Toxicology Letters, 151 (1)*, 143-149.

Wang, M., West, B., Jensen, C., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. K., et al. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. *Acta Phrmacological Sinica, 12*, 1127-1141.

Weidenborner, M., Hindorf, H., Jha, H. C., & Tsotsonos, P. (1990). Antifungal activity of flavonoids against storage fungi of genus *Aspergillus*. *Phytochemistry, 29*, 1103-1105.

West, B. J., Zhou, B. N. (2008). Identification of major aroma compounds in the leaf of *Morinda citrifolia* Linn. *Journal of Natural Medicines, 62 (4)*, 485-487.

West, B. J., Tani, H., Palu, A. K., Tolson, C. B., & Jensen, C. J. (2007). safety tests and antinutient analyses of noni (*Morinda citrifolia* L.) leaf. *Journal of Science of Food and Agriculture, 87*, 2583-2588.

West, B.J., Palu, A. (2006). Evaluation of the allergenic potential of *Morinda citrifolia* L. leaf proteins. AGFD 158. *The 232nd American Chemical Society National Meeting*, San Francisco, CA, September 10-14.

West, B.J., Palu, A.K., Su, C.X. (2007). Detoxification activity of noni leaf water extract. Poster 149. *62nd Northwest Regional Meeting of the American Chemical Society*, Boise, ID. June 17-20.

Yu, E.S., Min, H.J., An, S.Y., Won, H.Y., Hong, J.H., Hwang, E.S. (2008). Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN-γ suppression by quercetin in T helper cells. *Biochemical Pharmacology, 76 (1)*, 70-78.

Zheng, R., Jie, S., Hanchuan, D., Moucheng, W. (2005). Characterization and immunomodulating activities of polysaccharide from *Lentinus edodes*. *International Immunopharmacology, 5*, 811-820.

Zhou, B., Palu, A.K., Su, C.X., West, B., Jensen, C. J., Story, S. (2009). Anthraquinones in Noni (*Morinda citrifolia*). AGFD 92. *237th National Meeting of the American Chemical Society*, Salt Lake City, Utah, March 22-26.

Zhou, B., Palu, A.K., Su, C.X., West, B., Jensen, C.J., Story, S. (2009). Adenosine A2A receptor agonists from Noni leaves. AGFD 130. *237th National Meeting of the American Chemical Society*, Salt Lake City, Utah, March 22-26.

Zhou, Q., Sun, S., Du, D., Liang, X., Yang, X. (2000). Real time monitor of rutin stability during heating by Fourier transform infrared spectroscopy. *Guang Pu Xue Yu Guang Pu Fen Xi, 20(2)*, 195-198.

Zi, J., Peng, B., Yan, W. (2007). Solubilities of rutin in eight solvents at T = 283.15, 298.15, 313.15, 323.15, and 333.15 K. *Fluid Phase Equilibria, 261*, 111-114.

Zin, Z., Abdul-Hamid, A., Osman, A. (2002). Antioxidative activity of extracts from Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.) root, fruit and leaf. *Food Chemistry, 78*, 227-231.

Zin, Z., Hamid, A., Osman, A., Saari, N. (2006). Antioxidatives activities fractions obtained from root, fruit and leaf of Mengkudu (*Morinda citrifolia* L.). *Food Chemistry, 94*, 169-178.

Zu, Y., Li, C., Fu, Y., Zhao, C. (2006). Simultaneous determination of catechin, rutin, quercetin kaempferol and isorhamnetin in the extract of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) leaves by RP-HPLC with DAD. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis 41*, 714–719.

นันทวรรณ บุณยะประภัทร. (2543). *สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน (4).* กรุงเทพฯ: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 1-5.

ฤทัย สกุลแรมรุ่ง. (2536). *วิทยาภูมิคุ้มกัน. พิมพ์ครั้งที่ 9*. กรุงเทพฯ: ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ. (2541). การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อสิ่งแปลกปลอม. ใน: สุทธิพันธ์ สาระสมบัติ, บรรณาธิการ. *อิมมูโนวิทยา*. กรุงเทพฯ: พริ้นต์โพร. หน้า 127-136.

ภาคผนวก
การนำเสนอและเผยแพร่ผลงานวิจัย

Aurasorn Saraphanchotiwitthaya, Janya Riunkesorn, Pattana Sripalakit. Comparative study of effect of *Morinda citrifolia* Linn. leave extracts by different preparation techniques on cytokine secretion. The 7th Naresuan Research Conference, Naresuan University, Phitsanulok, Thailand, July 28-30, 2011. (Poster presentation)

1. รางวัลที่ได้รับ

ผลคะแนน การนำเสนอผลงานวิจัย ประเภท Poster Presentation การประชุมวิชาการ นเรศวรวิจัย ครั้งที่ 7

กลุ่มวิทย์สุขภาพฯ

รางวัล	ชื่อ	ชื่อผลงาน
รางวัลชนะเลิศ	รักษิณา พลสีลา	การกระจายตัวของชนิดริ้นฝอยทรายในเวลากลางวันและกลางคืนในถ้ำ ในจังหวัดพิษณุโลก
รองชนะเลิศอันดับที่1	ธวัชชัย กิตติ	การศึกษาจำนวนประชากรของ Acinetobacter baumannii bacteriophage จากบ่อบำบัดน้ำเสียของโรงพยาบาลพุทธชินราชและโรงพยาบาลบางระกำ
รองชนะเลิศอันดับที่2	อรสร สารพันโชติวิทยา	การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์

2. บทคัดย่อ

การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์

อรสร สารพันโชติวิทยา[1,2,*], จรรยา รื่นเกษร[2] และ พัฒนา ศรีพลากิจ[2,3]

Comparative study of effect of *Morinda citrifolia* Linn. leave extracts by different preparation techniques on cytokine secretion

Aurasorn Saraphanchotiwitthaya[1,2,*], Janya Riunkesorn[2] and Pattana Sripalakit[2,3]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม, [2]หน่วยปฏิบัติการเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม, [3]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

[1]Department of Pharmaceutical Technology, [2]Pharmaceutical Biotechnology Research Unit, [3]Department of Pharmaceutical Chemistry and Pharmacognosy, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Naresuan University, Phitsanulok

*Corresponding author. E-mail : aurasorns@nu.ac.th (S. Aurasorn)

บทคัดย่อ

ส่วนต่าง ๆ ของยอใช้เป็นอาหารและยาสมุนไพรมากว่าพันปีแล้ว งานวิจัยนี้ได้ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคต่าง ๆ ต่อการสร้างไซโตไคน์จากที-ลิมพ์โฟไซต์ ชนิด MOLT-4 สารสกัดเตรียมจากใบยอสดหมักในเอทธานอล (FMC_CE), ใบยอแห้งหมักในเอทธานอล (DMC_CE), ใบยอสดสกัดด้วยน้ำและผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง (FMC_CF), ใบยอแห้งสกัดด้วยน้ำและผ่านการทำแห้งเยือกแข็ง (DMC_CF) และใบยอสดต้มน้ำ (FMC_HW) กระตุ้นเซลล์ด้วยคอนคานาวาลิน-เอ (คอน-เอ) ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร วัดปริมาณอินเตอเฟอรอน-แกมมา และอินเตอลิวคิน-10 ด้วยเทคนิค ELISA และคำนวณค่าอัตราส่วนระหว่างอินเตอเฟอรอน-แกมมาและอินเตอลิวคิน-10 (IFN-γ/IL-10) เพื่อแสดงสมดุลการตอบสนองของที-ลิมพ์โฟไซต์ชนิดทีเฮลเปอร์-1 และทีเฮลเปอร์-2 ผลการทดลองพบว่าสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกัน มีผลต่อรูปแบบการผลิตอินเตอเฟอรอน-แกมมาและอินเตอลิวคิน-10 โดยสารสกัด FMC_CF 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลลดค่าอัตราส่วน IFN-γ/IL-10 มากที่สุด ประมาณ 3.2 และ 8.8 เท่าเมื่อไม่กระตุ้นและกระตุ้นด้วยคอน-เอตามลำดับ การที่สารสกัด FMC_CF เหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของทีเฮลเปอร์-2 เป็นหลักนี้ แสดงความแรงของฤทธิ์ต้านอักเสบของสารสกัดดังกล่าว ในทางกลับกันสารสกัด FMC_HW 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร มีผลเพิ่มค่าอัตราส่วน IFN-γ/IL-10 มากที่สุด ประมาณ 2.4 และ 4.2 เท่าเมื่อไม่กระตุ้นและกระตุ้นด้วยคอน-เอตามลำดับ แสดงให้เห็นว่าสารสกัด FMC_HW มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันโดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของทีเฮลเปอร์-1 มากกว่าทีเฮลเปอร์-2 ผลการวิจัยสรุปได้ว่าสารสกัดจากใบยอมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์เพาะเลี้ยงที-ลิมพ์โฟไซต์ของมนุษย์ ชนิด MOLT-4 และเทคนิคการเตรียมสารสกัดมีผลต่อฤทธิ์ของสารสกัด อาจนำสารสกัดที่เตรียมจากใบยอสดที่ผ่านการทำแห้งเยือกแข็งและสารสกัดที่เตรียมจากใบยอสดต้มน้ำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษากลไกการออกฤทธิ์และแยกสารสำคัญในสารสกัดทั้งสองชนิดต่อไป

คำสำคัญ: ยอ, อินเตอเฟอรอน-แกมมา, อินเตอลิวคิน-10, ที-ลิมพ์โฟไซต์

Abstract

Various parts of *Morinda citrifolia* Linn. (noni) or “Yor” in Thai has been using for food and medicinal purposes for thousands of years. This study was to investigate effect of *M. citrifolia* leave extracts using different preparation techniques on cytokine production from human T lymphocytes (MOLT-4). The extracts were prepared by using fresh leaves macerate in ethanol (FMC_CE), dried leaves macerate in ethanol (DMC_CE), fresh leaves prepared by freeze-dry technique (FMC_CF), dried leaves prepared by freeze-dry technique (DMC_CF) and fresh leaves prepared by boiling in water (FMC_HW). Concanavalin A (con A) 5 μg/mL was used as a stimulant. IFN-γ and IL-10 production were measured by ELISA techniques and IFN-γ/IL-10 ratio was calculated to determine Th1/Th2 balance. The results showed that *M. citrifolia* extracts prepared using different techniques affected the IFN-γ and IL-10 secretion patterns. FMC_CF extract at 100 μg/mL maximally decreased IFN-γ/IL-10 ratio of about 3.2 and 8.8 times when without or with con A stimulation, respectively. The induction on a shift to Th2-response of FMC_CF extract indicated its potent anti-inflammatory activity. In contrast, FMC_HW at 100 μg/mL maximally increased IFN-γ/IL-10 ratio of about 2.4 and 4.2 times when without or with con A stimulation, respectively. These performed immunomodulatory activity of FMC_HW extract which inclined to dominance of Th1 more than Th2 subpopulation. Our investigations might be concluded that *M. citrifolia* leaves had immunological activity on human T-lymphocytes (MOLT-4) and different preparation techniques affected to their activity. Its fresh leaves prepared by freeze-dry technique or boiling in water may also exert beneficial immunomodulation effects in conditions involving inadequate immune responses. However, the mechanism of actions and identification of active ingredients of both extracts must be further investigated.

Keywords: *Morinda citrifolia* Linn., IFN-γ, IL-10, T-lymphocytes

3. โปสเตอร์เผยแพร่ผลงานวิจัย

นเรศวรวิจัย 7

Comparative study of effect of *Morinda citrifolia* Linn. leave extracts by different preparation techniques on cytokine secretion

การศึกษาเปรียบเทียบผลของสารสกัดจากใบยอ ที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกันต่อการหลั่งไซโตไคน์

อรสร สารพันโชติวิทยา[1,2,*], จรรยา รื่นเกษร[2] และ พัฒนา ศรีพลากิจ[2,3]

[1]ภาควิชาเทคโนโลยีเภสัชกรรม, [2]หน่วยปฏิบัติการวิจัยเทคโนโลยีชีวภาพเภสัชกรรม, [3]ภาควิชาเภสัชเคมีและเภสัชวิทย, คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก

บทนำ

ยอ (*Morinda citrifolia* Linn.) (รูป 1) เป็นพืชที่พบได้ทั่วไปในแถบเอเชียรวมทั้งประเทศไทย ปลูกและดูแลรักษาง่าย มีรายงานว่าส่วนต่าง ๆ ของยอล้วนมีสรรพคุณทางยา สำหรับใบยอซึ่งเป็นส่วนประกอบในอาหารไทยหลายชนิดมาแต่อดีต มีสรรพคุณช่วยบำรุงธาตุ แก้ปวดข้อ และม้ามโต [1,2] จึงสันนิษฐานว่าอาจเกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน

งานวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่าง ๆ ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยทดสอบผลของสารสกัดต่อการหลั่งไซโตไคน์จาก Th1 (IFN-γ) และ Th2 cells (IL-10) จากเซลล์เพาะเลี้ยง human leukemic T lymphocytes ชนิด MOLT-4 และศึกษาความเป็นไปได้ในการพัฒนาการใช้ประโยชน์จากใบยอเพื่อสุขภาพ การปรับระบบภูมิคุ้มกัน และสร้างมูลค่าเพิ่มให้แก่สมุนไพรชนิดนี้

วิธีการวิจัย

1. การเตรียมสารสกัด

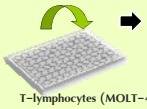
รูป 1 ใบยอ (*Morinda citrifolia* Linn.)

- FMC_CE (5.0%*): หมักใบสดใน 95% Ethanol → ระเหยแห้ง (vacuum evaporator, 60 °C)
- DMC_CE (2.5%): หมักใบอบแห้งใน 95% Ethanol → ระเหยแห้ง (vacuum evaporator, 60 °C)
- FMC_CF (7.1%): ปั่นใบสดร่วมกับน้ำ, คั้นกรอง → ระเหยแห้ง (freeze-dry)
- DMC_CF (0.3%): ปั่นใบอบแห้ง (60 °C) ร่วมกับน้ำ, คั้นกรอง → ระเหยแห้ง (freeze-dry)
- FMC_HW (5.2%): ต้มใบสดในน้ำ (4 ชั่วโมง) → ระเหยแห้ง (freeze-dry)

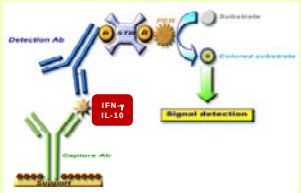
* ร้อยละผลผลิต (% yield) ต่อน้ำหนักใบสด

2. การทดสอบการหลั่งไซโตไคน์

Extract (1-100 μg/mL) with/without con A → Incubate 37 °C, 5% CO_2, 48 hr → Supernatant → ELISA (IFN-γ, IL-10) เทียบกับสารมาตรฐาน [3]



T-lymphocytes (MOLT-4)



เอกสารอ้างอิง

[1] Wang, M., West, B., Jensen, C., Nowicki, D., Su, C., Palu, A. K., et al. (2002). *Morinda citrifolia* (Noni): a literature review and recent advances in Noni research. Acta Pharmacological Sinica, 12, 1127-1141.

[2] นันทวรรณ บุญยประภัศร. (2543). สมุนไพร ไม้พื้นบ้าน (4). กรุงเทพฯ: สำนักงานข้อมูลสมุนไพร คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล. หน้า 1-5.

[3] Ho, C.Y., Lau, C., Kim, C.F., Leung, K.N., Fung, K.P., Tse, T.F., et al. (2004). Differential effect of *Coriolus versicolor* (Yunzhi) extract on cytokine production by murine lymphocytes *in vitro*. International Immunopharmacology, 4, 1549-1557.

กิตติกรรมประกาศ งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนจากงบประมาณแผ่นดิน ประจำปี 2553 มหาวิทยาลัยนเรศวร (รหัสโครงการ R2553B035)

ผลการวิจัย และวิจารณ์ผลการวิจัย

จากผลการวิจัย (รูป 2 และ ตาราง 1) พบว่าสารสกัดจากใบยอที่เตรียมโดยเทคนิคที่แตกต่างกัน มีผลต่อรูปแบบการผลิต IFN-γ และ IL-10 ต่างกัน โดยสารสกัด "FMC_CF" (100 microg./mL) มีผลลดค่า IFN-γ/IL-10 ratio มากที่สุด ประมาณ 3.2 และ 8.8 เท่าเมื่อไม่กระตุ้นและกระตุ้นด้วย con A ตามลำดับ และจากการที่สารสกัด FMC_CF เหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของ Th-2cells เป็นหลักนี้ แสดงให้เห็นแนวโน้มประสิทธิภาพของสารสกัดดังกล่าวในการต้านอักเสบ

ส่วนสารสกัด "FMC_HW" (100 microg./mL) มีผลเพิ่มค่า IFN-γ/IL-10 ratio มากที่สุด ประมาณ 2.4 และ 4.2 เท่าเมื่อไม่กระตุ้นและกระตุ้นด้วย con A ตามลำดับ แสดงให้เห็นแนวโน้มประสิทธิภาพของสารสกัด FMC_HW ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน โดยการเหนี่ยวนำให้เกิดการตอบสนองของ Th-1 cells มากกว่า Th-2 cells

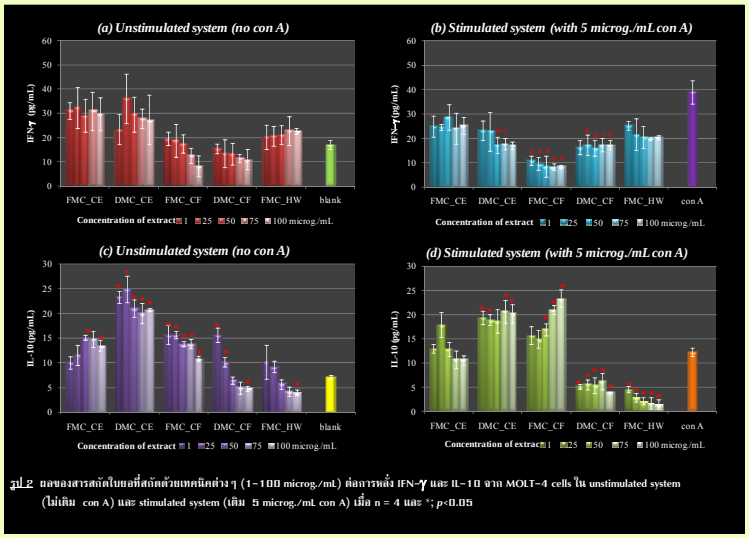
สรุปผลการวิจัย

สารสกัดจากใบยอมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันที่เกี่ยวข้องกับการทำงานของ human T-lymphocytes และเทคนิคการเตรียมสารสกัดที่แตกต่างกัน มีผลให้ได้สารสกัดใบยอที่มีผลต่อการหลั่งไซโตไคน์ต่างกัน อาจนำสารสกัดที่เตรียมจากใบยอสดต้มน้ำไปพัฒนาใช้ประโยชน์ที่เกี่ยวข้องกับความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันได้ อย่างไรก็ตามยังต้องศึกษากลไกการออกฤทธิ์ และแยกสารสำคัญในสารสกัดทั้งสองชนิดต่อไป

ตาราง 1 ผลของสารสกัดใบยอ (1-100 microg./mL) ที่สกัดด้วยเทคนิคต่าง ๆ ต่อการเปลี่ยนแปลงค่า IFN-γ/ IL-10 ratio ที่หลั่งจาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A) เทียบกับ stimulated system (เติม 5 microg./mL con A)

Concentration of extract (microg./mL)	IFN-γ/ IL-10 ratio*									
	FMC_CE		DMC_CE		FMC_CF		DMC_CF		FMC_HW	
	no con A	with con A	no con A	with con A	no con A	with con A	no con A	with con A	no con A	with con A
1	3.1	1.9	1.0	1.2	1.2	0.7	1.0	3.2	2.0	5.5
25	2.8	1.4	1.4	1.2	1.2	0.6	1.3	3.1	2.3	7.4
50	1.9	2.2	1.4	0.9	1.3	0.5	2.0	2.9	3.7	9.0
75	2.1	2.2	1.4	0.9	0.9	0.4	2.3	2.8	5.5	11.9
100	2.2	2.4	1.3	0.8	0.7	0.4	2.3	4.3	5.7	13.3

* IFN-γ/ IL-10 ratio ของ basal secretion (blank) = 2.4 และ con A = 3.2



รูป 2 ผลของสารสกัดใบยอที่สกัดด้วยเทคนิคต่าง ๆ (1-100 microg./mL) ต่อการหลั่ง IFN-γ และ IL-10 จาก MOLT-4 cells ใน unstimulated system (ไม่เติม con A) และ stimulated system (เติม 5 microg./mL con A) เมื่อ n = 4 และ *; $p<0.05$

4. เอกสารตอบรับการเข้าร่วมประชุม

บันทึกข้อความ

ส่วนราชการ สำนักงานอธิการบดี กองบริหารการวิจัย งานส่งเสริมและเผยแพร่ผลงานวิจัย โทร. 8641

ที่ ศธ 0527.01.33(3)/ว1956 **วันที่** 7 กรกฎาคม 2554

เรื่อง ตอบรับการนำเสนอผลงานทางวิชาการ การประชุมทางวิชาการ "นเรศววิจัย" ครั้งที่ 7

เรียน ผศ.ดร.อรสร สารพันโชติวิทยา

ตามที่ท่านสมัครเข้าร่วมนำเสนอผลงาน ในการประชุมทางวิชาการ "นเรศววิจัย" ครั้งที่ 7 "ก้าวสู่ทศวรรษที่ 3 : มุ่งมั่นงานวิจัย พัฒนาชาติไทยให้ยั่งยืน" ในระหว่างวันที่ 29 - 30 กรกฎาคม 2554 ณ มหาวิทยาลัยนเรศวร จังหวัดพิษณุโลก นั้น

ในการนี้ คณะกรรมการฝ่ายจัดการนำเสนอผลงาน Oral Presentation / Poster Presentation ได้พิจารณาผลงานของท่านเป็นที่เรียบร้อยแล้ว **และขอแจ้งให้ทราบว่าผลงานวิจัยของท่านได้รับการคัดเลือกให้นำเสนอผลงาน ในการประชุมทางวิชาการ "นเรศววิจัย" ครั้งที่ 7** สำหรับขั้นตอนการพิจารณาผลงานเพื่อตีพิมพ์ลงใน Proceedings / Abstracts นั้น ขณะนี้กำลังดำเนินการให้ผู้ทรงคุณวุฒิพิจารณาผลงาน หากได้รับผลการพิจารณาจากผู้ทรงคุณวุฒิแล้ว คณะกรรมการจักดำเนินการแจ้งให้ทราบต่อไป

ทั้งนี้ ได้ส่งแบบฟอร์มยืนยัน รายละเอียดการประชุมทางวิชาการ "นเรศววิจัย" ครั้งที่ 7 ท่านสามารถตรวจสอบความถูกต้องในการเข้าร่วมประชุมทางวิชาการ **หากมีการเปลี่ยนแปลงแก้ไขรายละเอียดให้แจ้งกลับภายในวันที่ 14 กรกฎาคม 2554** โดยสามารถส่งแบบยืนยันมาได้ที่ กองบริหารการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร หรือทาง E-mail : dra@nu.ac.th หรือทางโทรสาร 0-5596-8641 สำหรับกำหนดการนำเสนอและรายละเอียดการเตรียมข้อมูลการนำเสนอ ท่านสามารถตรวจสอบได้ทางเว็บไซต์ http://www.research.nu.ac.th/NURC7 ตั้งแต่วันศุกร์ที่ 8 กรกฎาคม 2554 เป็นต้นไป

จึงเรียนมาเพื่อโปรดทราบ

(รองศาสตราจารย์ ดร.สุชาติ ยะโสธรศรีกุล)
รองอธิการบดีฝ่ายวิจัยและวิเทศสัมพันธ์