บทที่ 2
การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการแพทย์สมัยใหม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรและได้มีการใช้พืชสมุนไพรควบกับยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรคหลายชนิด (Yoshida et al., 1988; วีณา จิรัจฉริยากูล, 2541) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาให้ได้ผลดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่มักมีปัญหาของการดื้อยา โรคมะเร็ง และโรคเอดส์ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่ดีพอ วิธีการบำบัดโดยใช้สารเคมีเพื่อกำจัดจุลินทรีย์เป้าหมาย หรือฉายรังสีเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งมักจะมีผลต่อเซลล์ปกติอื่น ๆ ภายในร่างกาย และมีผลข้างเคียงก่อให้เกิดอาการแพ้หรือเกิดอันตรายร้ายแรงต่อผู้ป่วยถ้าใช้วิธีการบำบัดดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน (Goldstein et al., 1974; Brunton et al., 2006) ส่วนยาจากพืชสมุนไพรที่เป็นภูมิปัญญาของท้องถิ่นในแต่ละประเทศมักมีความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงต่ำ สาเหตุอาจเป็นเพราะสารออกฤทธิ์มีความเข้มข้นน้อยกว่ายาแผนปัจจุบันและอยู่ร่วมกับสารประกอบอื่นอีกมากมายอย่างซับซ้อนตามธรรมชาติของพืชแต่ละชนิด ที่อาจช่วยเสริมการออกฤทธิ์ หรือต้านผลข้างเคียงของสารออกฤทธิ์ แม้เทคโนโลยีสมัยใหม่ จะสามารถหาองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์ได้บ้าง แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ปฏิกริยาร่วมกัน (interaction) และเลียนแบบการสังเคราะห์ส่วนประกอบเหล่านี้ซึ่งซับซ้อนตามธรมชาติได้หมด ยังคงต้องพึ่งองค์ความรู้ที่สะสมสืบทอดกันมานับแต่บรรพบุรุษโบราณเพื่อให้ทราบว่าพืชสมุนไพรชนิดใดให้ผลดีและช่วยในการรักษาโรคเฉพาะชนิดใด แต่องค์ความรู้เหล่านี้ยังต้องการหลักฐานสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ ในปัจจุบัน ได้มีตัวอย่างของโรงพยาบาลและสถาบันหลายแห่งในประเทศไทยที่นำพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณค่อนข้างแน่ชัดมาใช้รักษาโรค โดยใช้เสริมกับยาแผนปัจจุบัน เช่น การส่งเสริมการใช้สมุนไพรสาธารณสุขมูลฐานในโรงพยาบาลชุมชนต่าง ๆ โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศร์ที่นครราชสีมา โรงพยาบาลสรรพสิทธ์ประสงค์ที่อุบลราชธานี คลินิกอายุรเวท สถานการณ์แพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โรงพยาบาลซานเปาโลที่หัวหิน โรงพยาบาลแพทย์แผนไทยที่นครปฐม และศูนย์ธรรมชาติบำบัดบัลวีที่กรุงเทพ เป็นต้น

การศึกษาและวิจัยเกี่ยวกับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันมีความสำคัญดังงานวิจัยมากมายในต่างประเทศที่ศึกษาเกี่ยวกับพืชสมุนไพรซึ่งมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยเฉพาะพืชสมุนไพรที่ใช้ในประเทศจีน ญี่ปุ่น และอินเดีย เช่น ตำรับยาอายุรเวทของอินเดียที่เตรียมจากสารสกัดพืช 5 ชนิดคือ *Boerhavia diffusa, Tinospora cordifolia, Berberis aristata, Terminalia chebula* และ *Zingiber officinale* ช่วยบรรเทาอาการอักเสบ ฝีในตับสืบเนื่องจากโรคบิดอะมีบา (amoebiasis) โดยออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันแบบสารน้ำ (humoral immunity) และภูมิคุ้มกันแบบเซลล์ (cell-mediated immunity) ใน golden hamster โดยประเมินจากการเพิ่ม haemaglutination titre ต่อ

sheep red blood cell antigen (SRBC) และการเพิ่ม leukocyte migration inhibition test ตามลำดับ (Sohni and Bhatt, 1996) หนูเม้าส์ที่ป้อน Extract I ซึ่งประกอบด้วย 2.6% mangiferin ที่สกัดจาก *Mangifera indica* L. ด้วย ethanol มีความสามารถในการสร้าง antibody titre และการตอบสนองใน delayed type hypersensitivity (DTH) ต่อ SRBC antigen เพิ่มขึ้น (Makare et al., 2001) aucubin ซึ่งเป็นสารประเภท iridoid glycoside ที่มีในพืชสมุนไพรหลายชนิด รวมทั้ง aucubin ที่สกัดจากใบ ราก ลำต้น และเมล็ดของ *Aucuba japonica* ซึ่งใช้รักษาโรคหลายชนิดรวมทั้งโรคภูมิแพ้ที่เกี่ยวข้องกับอาการอักเสบ (allergic inflammatory disease) Acubin ออกฤทธิ์โดยยับยั้งการสังเคราะห์ cytokines ที่ก่อให้เกิดอาการอักเสบ (proinflammatory cytokines) คือ TNF-α (tumor necrosis factor-α) และ IL-6 (interleukin-6) ใน RBL (rat basophilic leukemia)-2H3 mast cell ที่กระตุ้นด้วย antigen โดยยับยั้งการเคลื่อนเข้าสู่นิวเคลียส (nuclear translocation) ของ p65 และการสลาย (degradation) ของ IKBα ทำให้ไม่เกิดการกระตุ้น (activation) NF-κB ซึ่งเป็น transcription factor ของ TNF-α และ IL-6 (Jeong et al., 2002) สารสกัดของ fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในหนูเม้าส์เพศผู้ Swiss albino ด้วยการเพิ่มปริมาณเซลล์ใน thymus และเซลล์ไขกระดูก เพิ่มการตอบสนองใน DTH และเพิ่มปริมาณเซลล์ที่สร้าง antibody ต่อ SRBC antigen ใน plaque forming cell assay นอกจากนั้น สารสกัดเพิ่มการทำงานด้าน innate immunity โดยกระตุ้นความสามารถในการกลืนกินของเซลล์ macrophage ต่อเซลล์ยีสต์ (*Saccharomyces cereviceae*) เมื่อประเมินโดย phagocytic index และ phagocytic capacity (Bin-Hafeez et al., 2003) Ellagic acid ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoid สกัดจากพืชท้องถิ่นในประเทศเกาหลี *Phyllanthus urinaria* ช่วยบรรเทาโรคที่เกิดจาก hepatitis B virus (HBV) โดยยับยั้งการหลั่ง HbsAg จากเซลล์มะเร็งตับ HepG2 2.215 ซึ่ง HbsAg เกี่ยวข้องกับสภาวะการไม่สร้างภูมิคุ้มกัน (immune intolerance) ต่อ HBV ในผู้ป่วยด้วยโรคติดเชื้อเรื้อรังจาก HBV (Shin *et al.*, 2005) Ginsenosides สกัดจากรากของ *Panax ginseng* ช่วยกระตุ้นการทำงานของ neutrophil ในเลือดของวัวและเพิ่ม innate immunity ต่อ *Staphylococcus aureus* ซึ่งเป็นสาเหตุของโรคติดเชื้อเต้านมในวัว (Hu et al., 2001) และสามารถทำหน้าที่เป็น adjuvant ให้กับ *E. tenella* recombinant 5401 antigen ซึ่งใช้เป็นวัคซีนในไก่เพื่อป้องกันโรค coccidiosis โดยเพิ่มการตอบสนองของ antibody และ proliferative response ต่อ Con A (Du et al., 2005) สารประเภท pectic polysaccharide คือ GOA1 และ GOA2 ที่สกัดจาก *Glinus oppositifolius* ที่มีประสิทธิภาพรักษาโรคที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคปวดข้อ การอักเสบ และแผลติดเชื้อต่าง ๆ สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบ complement โปรตีน และชักนำการดึงดูด (chemotaxis) เซลล์เม็ดเลือดขาวต่าง ๆ เช่น macrophage, T เซลล์ และ NK เซลล์ (Inngjerdingen et al., 2005) นอกจากฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน สมุนไพรบางชนิดมีฤทธิ์กดการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น triptolide สารบริสุทธิ์ประเภท diterpene triepoxide ที่สกัดจากพืช *Triptergium wilfordii*

Hook F. มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation) และใช้ในการรักษาโรคภูมิต้านตนเอง (autoimmunity) เช่นโรค rheumatoid arthritis, immune complex nepritis และ systemic lupus erythematosus (SLE) เนื่องจาก triptolide มีฤทธิ์ยับยั้งและทำลาย T เซลล์ที่ถูกกระตุ้น (activated T cell) triptolide ยับยั้ง proliferative response และกระตุ้นการทำลายตนเองของเซลล์ด้วยกระบวนการ apoptosis (proapoptotic activity) ในเซลล์ต่าง ๆ เช่น T และ B เซลล์, monocytes, dendritic cell (DC) และเซลล์มะเร็ง การศึกษากลไกการเกิด apoptosis ใน DC พบว่า triptolide ที่ความเข้มข้นต่ำเพียง 10 ng/ml สามารถกระตุ้น p38 ก่อนกระตุ้น caspase 3 ซึ่งเป็นโปรตีนสำคัญในกระบวนการเกิด (initiation) และการพัฒนา (progression) ของกระบวนการ apoptosis ในเซลล์หลากหลายชนิด (Chan et al., 1999; Kiviharju et al., 2002; Liu et al., 2004) สารสกัดจาก *Sutherlandia frutescens* สามารถต้านการอักเสบและช่วยรักษาโรคที่เกี่ยวกับไวรัสได้เนื่องจากคุณสมบัติต้านออกซิเดชั่นโดยทำหน้าที่เป็น hydrogen peroxide และ superoxide radicals scavengers ในเม็ดเลือดขาว neutrophl ที่กระตุ้นด้วย FMLP (L-formyl-L-methionyl-L-leucyl-L-phenylalanine) (Fernandes et al., 2004) ดังนั้น สารสกัดจากพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันมีทั้งกลุ่มสารที่เป็น alkaloid, terpene, saponin, phenol, flavanoid, polysaccharide peptide และ prtotein ต่าง ๆ

เราสามารถประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulators) ในการเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิต้านทานให้สูงขึ้น เพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากความบกพร่องในการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคมะเร็ง โรคเอดส์ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น นอกจากนั้น พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressants) สามารถประยุกต์ใช้ลดหรือยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอันไม่พึงประสงค์ เช่น เช่นโรคภูมิแพ้ (allergy) โรคสภาวะภูมิไวเกิน (hypersensitivity) โรคภูมิต้านตนเอง (autoimmunity) และปฏิกริยาการตอบสนองต่อการปลูกถ่ายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (graft transplantation) ดังนั้น พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ควบคุมระบบภูมิคุ้มกันได้ (immunomodulator) จึงมีประโยชน์มากมาย

ระบบภูมิคุ้มกันเป็นระบบการทำงานที่ซับซ้อน แต่มีความเป็นระเบียบสูง เซลล์ชนิดต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกันทำงานร่วมกันอย่างมีระบบ เซลล์แต่ละชนิดทำหน้าที่แตกต่างกัน ทำงานร่วมกันและควบคุมซึ่งกันและกันในการตอบสนองต่อจุลินทรีย์หรือสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ และรักษาความสมดุลภายในร่างกาย (homeostasis) โดยการสื่อสารระหว่างเซลล์ผ่านตัวรับรู้ที่ผิวเซลล์ (surface cell receptor) และ/หรือผ่านสารน้ำที่เซลล์สร้างขึ้น เช่น cytokines และ lymphokines ชนิดต่าง ๆ (Roitt et al., 1998; Murphy et al., 2008) ตัวอย่างเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ T lymphocytes, B lymphocytes, macrophages, dendritic cells, natural killer cells และ polymorphonuclear granulocytes ชนิดต่าง ๆ คือ basophils, neutrophils และ eosinophils ตัวอย่างสารน้ำในระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ antibody ที่สร้างโดย plasma cells ซึ่งพัฒนาจาก B lymphocytes, ระบบ complement

proteins ซึ่งประกอบด้วยโปรตีน 30 กว่าชนิดทำงานร่วมกันอย่างเป็นลูกโซ่ (cascade), interferon, chemokines และ cytokines ชนิดต่าง ๆ เป็นต้น (Roit et al., 1998; Murphy et al., 2008) การศึกษาทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันสามารถวัดผลกระทบของสารพิษหรือสารเคมีต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะ (nonspecific immunity) และแบบจำเพาะ (specific immunity) วิธีการทดสอบด้านพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันมีหลายวิธี แต่อาจแบ่งเป็น 2 ประเภทหลักคือ การทดสอบผลของสารเคมีในร่างกายของสัตว์ทดลอง (*in vivo*) และในหลอดทดลอง (*in vitro*) การทดลองผลของสารเคมีในสัตว์ทดลองสามารถวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายสัตว์ทดลอง หรือนำเซลล์ออกจากสัตว์ทดลองเพื่อวัดการตอบสนองในหลอดทดลองแล้วแต่วิธีการทดสอบที่เลือกใช้ และมีหลายวิธีของการทดสอบชนิดเดียวกันในทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันที่สามารถเลือกวางแผนการทดสอบให้ได้รับสารเคมีในร่างกายสัตว์ทดลอง หรือในหลอดทดลองตามต้องการ ตัวอย่างวิธีการทดสอบมาตรฐานที่สำคัญในด้านพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกันได้แก่ การวัดการสร้าง antibody ด้วยวิธี plaque forming cell assay หรือวิธี ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) เพื่อศึกษาผลกระทบของสารต่อการทำงานของ B lymphocytes ในการตอบสนองแบบสารน้ำ (humoral immunity) หรือใช้วิธี ELISPOT (Enzyme-Linked Immunosorbent Spot Assay) ที่สามารถประยุกต์ใช้วัดปริมาณของ antibody และ cytokines ต่าง ๆ ตลอดจนวัดปริมาณของ cytotoxic T lymphocyte ที่ถูกกระตุ้นด้วย antigen จำเพาะ สำหรับการวัดผลกระทบของสารต่อการตอบสนองด้านเซลล์ (cellular immunity) ได้แก่ cytotoxic T cell assay, mitogenesis assay, mixed lymphocyte response และ delayed type hypersensitivity การวัดการตอบสนองแบบไม่จำเพาะด้าน innate immunity ได้แก่การทดสอบ phagocytosis, antigen processing และ presentation และการสร้าง nitric oxide ในเซลล์ macrophage รวมทั้งการทดสอบ natural killer cell activtiy การวัดภูมิต้านทานโดยรวมในร่างกายต่อเชื้อโรค หรือต่อการเกิดมะเร็งอันสืบเนื่องจากสารพิษหรือสารเคมีใช้วิธี host resistance studies หรือวัดผลกระทบต่อการควบคุมการทำงานขององค์ประกอบในระบบภูมิคุ้มกันโดยวัดปริมาณ lymphokines หรือการแสดงออกของจีน (gene) ต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับ lymphokines (Burns et al., 2001; Burleson et al., 1955a และ 1955b)

เนื่องจากสารพิษ หรือสารเคมีหลากชนิดอาจมีผลกระทบต่อการทำหน้าที่ของเซลล์ หรือสารน้ำชนิดต่าง ๆ ในระบบภูมิคุ้มกันเพียงชนิดเดียว หรือหลายชนิดพร้อมกัน การประเมินพิษหรือผลกระทบของสารเคมีต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงยากที่จะใช้วิธีการทดสอบเพียงชนิดเดียว แต่ใช้วิธีการทดสอบหลายชนิดร่วมกันเป็นลำดับชั้น (tier approach) ตามหลักการทดสอบมาตรฐานสากลที่พัฒนาโดย US National Toxicology Program (Luster et al., 1988, 1992, 1993) การทดสอบในขั้นตอนแรก (tier I) เป็นการทดสอบว่าสารมีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกันหรือไม่ และถ้ามีผลกระทบต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงทำการทดสอบในขั้นต่อไป (tier II) เพื่อศึกษาว่า เซลล์ หรือ สารน้ำชนิดใดในระบบ

ภูมิคุ้มกันเป็นเป้าหมายของกลไกการออกฤทธิ์ของสารชนิดนั้น ตารางที่ 1 และ 2 แสดงตัวอย่างการทดสอบทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน tier I และ tier II ตามลำดับ

ตารางที่ 1 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier I*

Parameter	วิธีทดสอบ
Immunopathology	การตรวจสอบทาง hematology: complete blood และ differential count ข้อมูลทั่วไปทางพิษวิทยา: น้ำหนักตัว น้ำหนักม้าม thymus ตับไต รวมทั้งการตรวจ histophathology ของอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะของภูมิคุ้มกันเหล่านี้
Humoral-mediated immunity	การตอบสนองต่อ mitogen ของ B เซลล์ เช่น LPS หรือ $F(ab)_2$ การวัดการตอบสนองของ primary antibody เช่น การนับจำนวน plaque ของ IgM antibody forming cells ต่อ T-dependent antigen (เม็ดเลือดแดงแกะ) ปริมาณ IgM ในซีรั่ม
Cell-mediated immunity	การตอบสนองต่อ mitogen ของ T เซลล์ เช่น concanavalin A และ mixed lymphocyte response ต่อ allogeneic lymphocytes, local lymph node assay
Nonspecific immunity	Natural killer cell activity

*ดัดแปลงจาก Luster et al., 1988, 1992

ตารางที่ 2 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier II*

Parameter	วิธีทดสอบ
Immunopathology	การนับจำนวน และ subsets ของ T และ B เซลล์ การทำ immunocytochemistry ของ lymphoid tissue การนับชนิดและปริมาณของเซลล์ในไขกระดูก
Humoral-mediated immunity	การวัดการตอบสนองของ secondary antibody (IgG) ต่อเม็ดเลือดแดงแกะ
Cell-mediated immunity	การวัดความสามารถในการฆ่าของ cytotoxic T เซลล์ การวัด delayed type hypersensitivity, mouse ear swelling test (MEST), guinea pig maximization test

Nonspecific immunity	การวัดการทำงานของ macrophage ต่าง ๆ เช่น *in vitro* phagocytosis ของ covasphere ที่ติดฉลากด้วย fluorescent, การฆ่า *Listeria monocytogenes* หรือการทำลายเซลล์มะเร็งของ macrophage ในสภาวะปกติ หรือเมื่อถูกกระตุ้นโดย macrophage activating factor (MAF)
Host resistance studies	โมเดลของแบคทีเรีย: *Listeria monocytogenes* (ดูการตายของสัตว์ทดลองหรือความสามารถของสัตว์ทดลองในการกำจัดแบคทีเรีย) และ *Streptococuus* sp. (ดูการตายของสัตว์ทดลองเท่านั้น) โมเดลของไวรัส: influenza (ดูการตายของสัตว์ทดลอง) โมเดลของปรสิต เช่น *Plasmodium yoelii* หรือ *Trichinella spiralis* (นับปริมาณตัวอ่อนของปรสิตในกล้ามเนื้อ และการถูกขับออก (expulsion) ของปรสิต โมเดลของ syngeneic tumor: PYB6 sarcoma (ดูการเกิดมะเร็งในตำแหน่งที่ปลูกถ่าย), B16F10 melanoma (ดูการเกิดมะเร็งที่ลุกลาม หรือเกิด metastasize ไปที่ปอด)

*ดัดแปลงจาก Luster et al., 1988, 1992

เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเป็นระบบที่สลับซับซ้อนดังกล่าว พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันอาจมีอิทธิพลต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ หรือแบบจำเพาะ โดยอาจทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงต่อจำนวน หรือระดับการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น T เซลล์, B เซลล์, macrophage, natural killer cell หรือ lymphokines ชนิดต่าง ๆ หรืออาจมีผลต่อระบบ complement proteins วิธีการทดสอบและการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันจึงควรยึดหลักที่คล้ายคลึงกับการทดสอบสารเคมีทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน คือไม่ควรใช้วิธีการทดสอบเพียงวิธีเดียว แต่ควรใช้การทดสอบที่เกี่ยวข้องกับเซลล์หรือสารต่างชนิดในระบบภูมิคุ้มกันร่วมกันหลายวิธี (a battery of test) และควรเป็นวิธีการทดสอบที่กระทำได้ไม่ยุ่งยากนัก สำหรับการพัฒนาวิธีการทดสอบการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในเบื้องต้นเลือกดัดแปลงการทดสอบด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันเพียง 2 การทดสอบ ซึ่งวัดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันด้านเซลล์คือ mitogenesis assay และ mixed lymphocyte response และเลือกเฉพาะวิธีทดสอบในหลอดทดลองเท่านั้น ทั้งนี้ เพื่อความสะดวกและความประหยัดในการทดสอบ เหมาะต่อการใช้เป็นวิธีคัดกรองเบื้องต้นสำหรับพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

Mitogenesis assay เป็นการวัดการตอบสนองของ lymphocytes ต่อ mitogen ซึ่งหมายถึงสารที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ lymphocyte ได้หลายกลุ่มเป็นจำนวนมาก มีฤทธิ์ไม่จำเพาะกับตัวรับรู้ (receptor) ใด ๆ B หรือ T เซลล์ มีการตอบสนองต่อ mitogen ต่างชนิดกัน mitogen ที่นิยมใช้กระตุ้น T lymphocyte ได้แก่ lectin 2 ชนิดคือ phytohaemaglutinin (PHA) และ concanavalin A (Con A) PHA เป็นสารที่สกัดจาก red kidney bean (*Phaseolus vulgaris*) Con A เป็นสารที่สกัดจาก jack bean (*Canavalia ensiformis*) mitogen ที่ใช้กระตุ้น B lymphocyte ได้แก่ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งสกัดจากผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ ส่วน mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B lymphocyte คือ pokeweed mitogen ที่สกัดจากรากของ *Phytolaca americana* ซึ่งประกอบด้วย 5 mitogen ย่อยคือ Pa1-5 ที่ทั้งหมดกระตุ้น T lymphocyte ส่วน PWM Pa-1 สามารถกระตุ้น B lymphocyte ให้แบ่งเซลล์และสร้าง immunoglobulin เมื่อมี macrophage และ T lymphocyte (Smialowicz, 1995) การศึกษาทางพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกันใช้วิธี mitogenesis assay เพื่อตรวจสอบว่าสารเคมีมีผลกระทบต่อการตอบสนองของ B หรือ T lymphocyte ต่อ mitogen อย่างไร หลักของการทดสอบคือ ภายหลังการได้รับสารเคมีที่ใช้ทดสอบซึ่งอาจเป็น *in vivo* หรือ *in vitro* กระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันด้วย mitogen และวัดการตอบสนอง *in vitro* ต่อ mitogen เทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้รับสารที่ใช้ทดสอบ ภายหลังการบ่ม (incubate) เซลล์ กับ mitogen ด้วยระยะเวลาที่เหมาะสม เซลล์ที่ตอบสนองต่อ mitogen จะเกิดการเจริญโดยการแบ่งเซลล์ (proliferation) เกิดการสังเคราะห์ DNA เพิ่มขึ้น และใช้ thymidine (TdR) ที่อยู่ในอาหารเพาะเลี้ยงเพื่อสังเคราะห์ DNA ที่สร้างขึ้นใหม่ ในวิธีมาตรฐาน วัดการตอบสนอง ของ lymphocyte ต่อ mitogen โดยใช้ thymidine ที่ปิดฉลาก (labeled) ด้วยสารกัมมันตภาพรังสี tritium (tritium-labeled thymidine; [^{3}H]-TdR) เพื่อ ปิดฉลาก DNA ที่ถูกสังเคราะห์ขึ้นใหม่ และใช้เครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvester) เก็บ (harvest) เซลล์บนเยื่อกรอง (membrane filter) ภายหลังการ harvest cell สลายเซลล์ให้เหลือแต่ DNA ซึ่งติดที่เยื่อกรองและนำเยื่อกรองไปอ่านค่าสารกัมมันตภาพรังสี ปริมาณสารกัมมันตภาพรังสีบนเยื่อกรองจะแปรผันโดยตรงกับปริมาณการสังเคราะห์ DNA ซึ่งคือปริมาณการตอบสนองของเซลล์ต่อ mitogen นั่นเอง (Smialowicz, 1995)

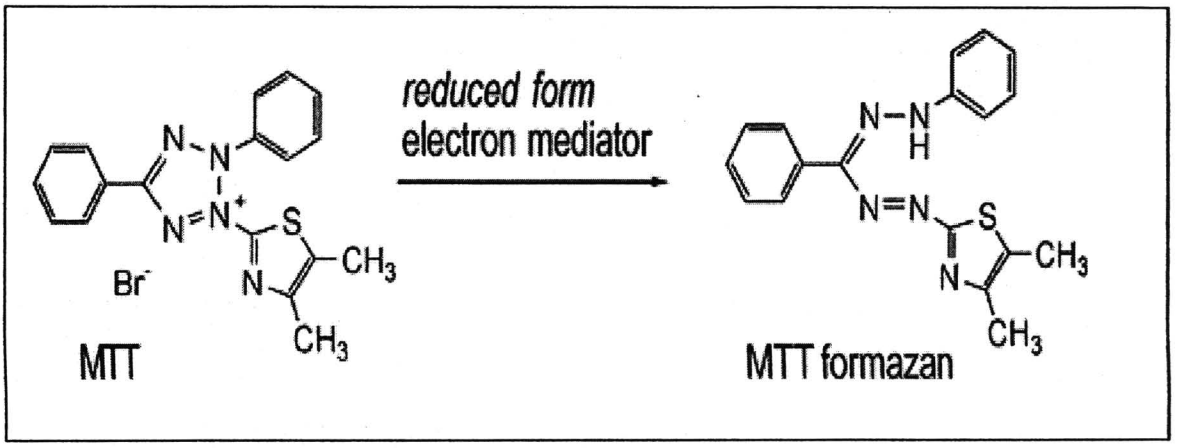
สำหรับการทดสอบ mixed lymphocyte response (MLR) เป็นการวัดการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ allogeneic antigen ที่มีความแตกต่างกันที่ major histocompatibility complex (MHC) allogeneic antigen หมายถึง antigen บนผิวเซลล์ของสัตว์ species เดียวกันที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ส่วน MHC เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการไม่ยอมรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ MLR เป็นการทดสอบที่ประยุกต์ใช้ในด้านการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อเพื่อตรวจสอบปฏิกริยาตอบสนองการเข้ากันได้ (compatibility) หรือการไม่ยอมรับ (rejection) ของผู้รับ (receipient) ต่อเซลล์หรือเนื้อเยื่อที่ปลูกถ่าย (graft) การทดสอบอาศัยหลักการว่า เมื่อนำ lymphocyte 2 กลุ่มที่มีความ

แตกต่างกันทางพันธุกรรมมาเพาะเลี้ยง (culture) ร่วมกัน เซลล์ lymphocyte จะเกิดการตอบสนองซึ่งกันและกันต่อ MHC antigen ที่แตกต่างกัน โดยเซลล์มีขนาดขยายใหญ่ขึ้น (blast formation) เกิดการสังเคราะห์ DNA และแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ในการทดสอบทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน นิยมวัดการตอบสนองเฉพาะกลุ่ม lymphocyte ที่ได้จากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารเคมีเพียงฝ่ายเดียว เพื่อตรวจสอบว่าสารเคมีที่ทดสอบมีผลเปลี่ยนแปลงความสามารถของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ MHC antigen ที่ต่างกันหรือไม่ lymphocyte ที่ถูกตรวจสอบความสามารถในการตอบสนองเรียกว่า responder ส่วน lymphocyte อีกกลุ่มหนึ่งที่เลี้ยงร่วมกันใน culture จะถูกยับยั้งความสามารถในการตอบสนองโดยการฉายรังสี หรือใช้สารเคมี mitomycin C เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ เซลล์กลุ่มนี้ทำหน้าที่เป็นเพียงตัวกระตุ้นให้ responder ตอบสนองเท่านั้น เรียกเซลล์ที่ทำหน้าที่กระตุ้นว่า stimulator การวัดความสามารถในการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ allogeneic MHC ฝ่ายเดียวใน MLR เรียกว่า one-way mixed lymphocyte reaction หลักการของวิธีวัดการตอบสนองใน MLR ใช้ [^{3}H]-TdR เพื่อติดฉลาก DNA ที่สังเคราะห์ขึ้นใหม่เช่นเดียวกับ mitogenesis assay ที่อธิบายเบื้องต้น (Smialowicz, 1995)

โครงการวิจัยนี้ดัดแปลงและหาสภาวะที่เหมาะสมของการใช้ MTT colorimetric assay ที่พัฒนาโดย Mosmann (1983) วัดการตอบสนองของ lymphocytes เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสีที่ยุ่งยาก และเครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ที่มีราคาแพง โดยอาศัยหลักการว่าเมื่อเซลล์มีการตอบสนอง ต่อ mitogen ใน mitogenesis assay หรือ allogeneic antigen ใน MLR จะเกิดการแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว ปริมาณเซลล์ที่เพิ่มขึ้นย่อมเป็นสัดส่วนโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase ซึ่งเป็น enzyme ใน mitochondria ของเซลล์ ดังนั้นจึงสามารถใช้ cellular metabolism ซึ่งในกรณีนี้คือ activity ของ succinate dehydrogenase วัดปริมาณการแบ่งเซลล์แทนวิธีวัดการสังเคราะห์ DNA ตามวิธีมาตรฐาน

MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) เป็นสีสังเคราะห์ประเภท tetrazolium salt (รูปที่ 1) ที่ในปัจจุบันมีผู้นิยมใช้ในการทดสอบทางชีววิทยาในงานด้านต่าง ๆ มากมาย เพื่อหลีกเลี่ยงวิธีทดสอบมาตรฐานที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี (Jiao et al., 1992; Buttke et al., 1993; VanBuskirk et al., 1995; Nomura et al., 1996; Mire-Sluis and Thorpe, 1998; Toriizuka et al., 2000; Xu et al., 1999) หลักการทำงานของ MTT คือเซลล์ซึ่งยังมีชีวิตอยู่ หรือ metabolically active เท่านั้นที่สามารถใช้ enzyme succinate dehydrogenase เปลี่ยน MTT ให้เป็น formazan product โดยปฏิกริยา reduction ผลึกของ formazan ที่ได้มีสีม่วงน้ำเงินและมีความสามารถดูดกลืนแสงสูงสุดที่ความยาวช่วงคลื่นประมาณ 550-600 nm (Mosmann, 1983; Denizot and Lang, 1986) ค่าการดูดกลืนแสงเป็นสัดส่วนโดยตรงกับความเข้มของสีม่วงน้ำเงิน หรือปริมาณ formazan product ที่เกิด อันแปรผันโดยตรงกับปริมาณของ succinate dehydrogenase enzyme ซึ่งขึ้นกับจำนวน

เซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณ formazan product ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay (www.dojindo.com/products/category/dsp_detail.cfm?requesttimeout=500&ProdName=MTT)

ตัวอย่างการประยุกตร์ใช้ MTT colorimetric assay ในการศึกษาทางชีววิทยามีมากมาย เช่น ใช้ในการวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิต (viability cell count) แทนการนับเซลล์โดยการใช้ haemocytometer และกล้องจุลทรรศน์ (Nomura et al., 1996) การวัดปริมาณการสังเคราะห์ lymphokines (Buttke et al., 1993; Mire-Sluis and Thorpe, 1998; Hammerling et al., 1992) การวัดความเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง (cytotoxicity test) (Alley et al., 1988) หรือวัดการแบ่งเซลล์เพื่อตอบสนองของ lymphocytes ต่อ allogeneic cell ใน mixed lymphocyte reaction (VanBuskirk et al., 1995) หรือต่อ mitogen (Toriizuka et al., 2000) ดังเสนอในโครงการพัฒนาวิธีทดสอบเบื้องต้นนี้ แต่รายงานส่วนใหญ่ซึ่งเกี่ยวกับการประยุกตร์ใช้ MTT กับ lymphocyte ที่เป็น primary cell มีเพียงส่วนน้อย วิธีทดสอบที่รายงานมีรายละเอียดแตกต่างกัน และผลที่ได้ไม่ค่อยอยู่ในระดับที่น่าพึงพอใจเมื่อเทียบกับการใช้ MTT กับ cell line ที่มีรายงานการใช้ MTT มากกว่า นอกจากการใช้ MTT ทดแทนการทดสอบที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ในปัจจุบันมีการใช้สารอนุพันธ์ (derivatives) ของ MTT หรือ สารที่ทำงานคล้ายคลึงกับ MTT เช่น การใช้ MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxy-methoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, XTT (sodium 3'-[1-[(phenylamino) carbo-nyl]-3, 4-tetrazolium]-bis (4-methoxy-6-nitro) benzene-sulfonic acid hydrate, AP (acid phosphatase), NR (neutral red), CVDE (crystal violet dye elution), SRB (sulforhodamine B),

lactate dehydrogenase, hexosaminidase เป็นต้น (Buttke et al., 1993; Gieni et al., 1995; Roehm et al., 1991; Martin and Clynes, 1993, Racher et al., 1990; Givens et al., 1990; Landegren, 1984) แต่สารที่เป็นอนุพันธ์ของ MTT มีราคาสูงกว่า MTT มาก และ MTT เป็น tetrazolium salt ที่มีผู้นิยมใช้กันมาก เพราะให้ค่าที่ถูกต้อง แม่นยำ และมีความสม่ำเสมอ เมื่อเทียบกับสารอื่น โครงการวิจัยนี้จึงเลือกใช้ MTT ในการพัฒนาวิธีการทดสอบ

สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ
ห้องสมุดงานวิจัย
วันที่ 20 ก.ค. 2554
เลขทะเบียน 242864
เลขเรียกหนังสือ