บทที่ 5
การวิจารณ์

นับแต่อดีตกาล ผู้คนได้ตระหนักถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน ดังตำหรับยาสำคัญต่าง ๆ ในด้านอายุรเวท รวมทั้งแพทย์ทางเลือกของหลากหลายประเทศ เช่น อินเดีย จีน ญี่ปุ่น และไทย ได้นำพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันมาช่วยบำบัดรักษาโรค ป้องกันการเกิดโรค หรือใช้บำรุงร่างกาย ดังนั้น วิธีการตรวจสอบและคัดเลือกพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน จึงมีความสำคัญยิ่งต่อการแสวงหาพืชสมุนไพรที่ทรงคุณค่าและควรได้รับการพัฒนาอย่างต่อเนื่องควบคู่กับการศึกษาในด้านอื่น ๆ ของพืชสมุนไพร

วิธีการทดสอบด้านระบบภูมิคุ้มกันมีหลายวิธี เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันมีความซับซ้อนเกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์หลายกลุ่มและสารน้ำหลายชนิด จึงไม่สามารถใช้วิธีการทดสอบเพียง 1-2 วิธีเพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่ในการพัฒนาวิธีการทดสอบเบื้องต้นนี้ ได้ดัดแปลงการทดสอบจากวิธีทางด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันเพียง 2 วิธี คือการวัดการตอบสนองอย่างไม่จำเพาะของเซลล์ภูมิคุ้มกันต่อ mitogen ใน mitogenesis assay และการวัดการตอบสนองแบบจำเพาะของ T เซลล์ต่อ allogeneic เซลล์ ใน MLR ซึ่งทั้ง 2 วิธี สามารถกระทำได้ใน *in vitro* เป็นวิธีทดสอบที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ให้ผลค่อนข้างรวดเร็ว และสามารถสะท้อนการทำงานบางส่วนของ T และ B เซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญทางระบบภูมิคุ้มกัน จึงเหมาะสมสำหรับเป็นวิธีคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้ได้ทดลองตามวิธีมาตรฐานของการทดสอบ แต่ได้ดัดแปลงสภาวะการทดสอบเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งมีปัญหาเกี่ยวกับความปลอดภัยของการใช้งาน และความยุ่งยากในการกำจัดขยะของเสียที่เป็นกัมมันตภาพ-รังสี และหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น เครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvester) และ เครื่องนับสารกัมมันตภาพรังสีแบบเบต้า (beta-scintillation counter) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ในวิธีมาตรฐานของการทดสอบ โครงการนี้ได้ดัดแปลงโดยใช้ MTT colorimetric assay วัดการตอบสนองของเซลล์แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสีและใช้ ELISA plate reader อ่านผลการทดสอบแทนเครื่องมือราคาแพงที่ใช้ควบคู่กับสารกัมมันตภาพรังสี โดยการทดสอบ จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสภาวะการทดลองต่าง ๆในวิธีทดสอบมาตรฐาน เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้ MTT colorimetric assay แทนวิธีการใช้สารกัมมันตภาพรังสี

การทดสอบด้าน mitogenesis

ในทางพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน นิยมใช้ mitogenesis assay เพื่อเป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นในการประเมินว่าสารพิษสามารถส่งผลกระทบต่อการตอบสนองของ T หรือ B เซลล์ต่อ mitogen

หรือไม่ เนื่องจากความสามารถในการตอบสนองต่อ mitogen ใน *in vitro* มีความสัมพันธ์กับการถูกกระตุ้น (activation) และการเจริญ (proliferation) ของกลุ่ม lymphocyte ที่ถูก sensitize เพื่อตอบสนองต่อแอนติเจน (antigen) ที่เข้าสู่ร่างกาย (*in vivo*) (Smialowicz, 1995) ในการวิจัยนี้ ได้เลือก mitogen 3 ชนิดที่นิยมใช้กันมากที่สุดคือ LPS ซึ่งเป็น mitogen ที่กระตุ้นเฉพาะ B เซลล์ Con A ที่กระตุ้นได้เฉพาะ T เซลล์ และ PWM ซึ่งกระตุ้นได้ทั้ง T และ B เซลล์ (Murphy, 2008; Smialowicz, 1995) การวิจัยนี้ใช้เซลล์ม้ามซึ่งเตรียมจากหนูเม้าส์เพศหญิง C57Bl/6 เป็นแหล่งของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกวัดการตอบสนอง เพราะเป็นสายพันธุ์ที่สามารถสั่งซื้อได้ในประเทศไทยในขณะทำการวิจัย และเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับสายพันธุ์ B6C3F1 มากที่สุด หนูเพศหญิงทั้ง 2 สายพันธุ์เป็น strain ที่นิยมใช้มากที่สุดในการศึกษาทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน และเป็นสายพันธุ์ที่ National Toxicology Program (NTP) แนะนำให้ใช้ในการทดสอบทางด้านพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน สาเหตุที่นิยมใช้หนูเพศหญิงมากกว่าเพศชายในการทดสอบ เนื่องจากหนูเม้าส์เพศชายในสายพันธุ์ดังกล่าวมีความก้าวร้าวสูง ชอบทำร้ายกันเอง ทำให้บาดเจ็บและส่งผลกระทบต่อ parameter ต่าง ๆ ที่ใช้ประเมินการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้ NTP แนะนำให้ใช้หนูเพศหญิงในการทดสอบ ยกเว้นกรณีที่เพศของสัตว์ทดลองมีอิทธิพลต่อการออกฤทธิ์ของสาร

จากผลการทดลองดัดแปลงวิธีการทดสอบ พบว่าโดยภาพรวมการวัดการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ mitogen ทั้ง 3 ชนิด ถ้าใช้สภาวะการทดลองตามวิธีมาตรฐานที่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสี ไม่สามารถวัดการตอบสนองได้ การตอบสนองต่อ mitogen ได้หมายถึงค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี mitogen ต้องสูงกว่า culture ที่ไม่มี mitogen หรือกลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p \leq 0.05$) โครงการวิจัยนี้จึงได้ตรวจสอบ 3 ปัจจัยหลักที่ส่งผลกระทบโดยตรงต่อการทดสอบ mitogenesis คือปริมาณเซลล์/หลุมเมื่อเริ่มแรกในการทดสอบ ช่วงความเข้มข้นของ mitogen ที่ใช้ในการทดสอบ และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดการตอบสนอง ผลการทดลองในการวัดการตอบสนอง mitogen ทั้ง 3 ชนิดให้ผลคล้ายคลึงกัน คือ การวัดการตอบสนองโดยการใช้ MTT จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเซลล์ต่อหลุมให้เพิ่มขึ้นประมาณ 4 เท่าจากวิธีมาตรฐาน จึงสามารถวัดการตอบสนองได้สูง ส่วนระดับความเข้มข้นของ mitogen ที่ใช้กระตุ้นและระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดการตอบสนองจะไม่แตกต่างจากวิธีมาตรฐานมากนัก ดังกรณีการทดสอบการตอบสนองต่อ LPS ถ้าใช้ปริมาณเซลล์ตามวิธีมาตรฐาน 2×10^5 เซลล์/หลุมในวันที่ทำการทดสอบ ถึงแม้จะกระตุ้นด้วย LPS ตั้งแต่ 1-500 μg/ml ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองที่แตกต่างจาก culture ที่ไม่มี mitogen เมื่อวัดการตอบสนองที่ 24 ชม. ภายหลังการกระตุ้น และแม้เพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 2 เท่าคือ 4×10^5 เซลล์/หลุม การตอบสนองต่อ mitogen ของ lymphocyte ใน splenocyte ยังคงต่ำเช่นเดิม ในการทดสอบจำเป็นต้องใช้เซลล์ถึง 8×10^5 เซลล์/หลุม จึงสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้ (รูปที่ 3) ทั้งนี้ความเข้มข้นของ LPS ต้องเหมาะสมเช่นกันคือ อยู่ในช่วง 1-100 μg/ml ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้ใน 24 ชม. การ

ทดลองพบว่า เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม LPS ที่ 10 μg/ml สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองสูงสุด และที่ความเข้มข้นนี้ การตอบสนองยังอยู่ในระดับสูง ไม่เปลี่ยนแปลงเมื่อประเมินการตอบสนองที่ 48 หรือ 72 ชม. ส่วน LPS ที่ 1 และ 100 μg/ml การตอบสนองใกล้เคียงกันมาก และการตอบสนองในระยะเวลา 72 ชม.มีค่าลดลงเล็กน้อย แต่ยังคงมีการตอบสนองสูงกว่าเมื่อเทียบกับการตอบสนองที่ 24 ชม. ($p \leq 0.05$, รูปที่ 6) ส่วนความเข้มข้นของ LPS ที่สูงขึ้นคือ 500 μg/ml ไม่เหมาะสมต่อการทดสอบ เพราะสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองสูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen ที่ระยะเวลา 24 ชม. เท่านั้น หลังจากนั้น การตอบสนองลดลงต่ำกว่ากลุ่มควบคุมที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. (รูปที่ 6) และความเข้มข้นของ LPS ที่ 1000 μg/ml ให้ค่าที่ใกล้เคียงกับที่ 500 μg/ml คือไม่ก่อให้เกิดการกระตุ้นการตอบสนองสูงกว่าช่วง 1-100 μg/ml และสามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองเฉพาะ 24 ชม. แรกภายหลังการกระตุ้นด้วย mitogen เท่านั้น (ไม่ได้แสดงผลการทดลอง) ค่าความเข้มข้นของ LPS และระยะเวลาที่เหมาะสมของงานวิจัยนี้ ใกล้เคียงกับค่าที่รายงานในงานวิจัยอื่นซึ่งวัดการตอบสนองด้วยวิธีมาตรฐาน (ใช้สารกัมมันตภาพ-รังสีหรือด้วยวิธีอื่น) ใช้ LPS ในช่วงความเข้มข้น 0.62-160 μg/ml และวัดการตอบสนองในช่วง 12-96 ชม. (Hildebrandt et al., 1982, Elena et al., 2003, Iwanowicz et al., 2005; Hernández-Godoy et al., 2008) การใช้ความเข้มข้นของ LPS ที่สูงขึ้น ไม่มีประโยชน์ เพราะนอกจากจะมีราคาแพง และยังไม่ช่วยให้การตอบสนองเพิ่มขึ้น

สำหรับการทดลองเกี่ยวกับ PWM .ให้ผลที่คล้ายคลึงกับ LPS คือต้องใช้เซลล์สูงกว่าปริมาณมาตรฐาน $2x10^5$ เซลล์/หลุม จึงสามารถวัดการตอบสนองได้ โครงการวิจัยนี้ชี้แนะว่าปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมคือ $8x10^5$ เซลล์/หลุม และความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 1-100 μg/ml โดยที่ 1-25 μg/ml สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองสูงสุด และการตอบสนองสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชม. เท่านั้น หลังจากนั้น การตอบสนองลดลง (รูปที่ 8 และ รูปที่ 11) เป็นที่น่าสังเกตว่า PWM เป็น mitogen ที่มีประสิทธิภาพต่ำในการกระตุ้นเมื่อเทียบกับ LPS และ Con A ทั้งที่ PWM เป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B เซลล์ (Smialowicz., 1995; Iwanowicz et al., 2005) ทั้งนี้พิจารณาจากค่า OD ที่ 590 nm ของ culture ที่กระตุ้นด้วย mitogen เทียบกับ culture ที่ไม่มี mitogen เช่น การตอบสนองสูงสุดใน culture ที่มี $8x10^5$ เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย 25 μg/ml PWM วัดที่ระยะเวลา 24 ชม.มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 52% เท่านั้น (รูปที่ 8) ส่วนการตอบสนองต่อ LPS และ Con A ที่มีค่าสูงสุดเพิ่มขึ้นประมาณ 147 และ 466% ตามลำดับ (รูปที่ 6 และ รูปที่ 15) เนื่องจากข้อจำกัดในงบประมาณ ผู้วิจัยไม่ได้ทดลองสั่งซื้อ PWM จากบริษัทอื่น หรือ lot อื่นจากบริษัทเดิม มาเปรียบเทียบการทดสอบว่าสามารถกระตุ้นการตอบสนองให้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า lot ที่ใช้ในงานทดลองหรือไม่ ทั้งนี้ เพราะผู้วิจัยคิดว่า LPS และ Con A เป็น mitogen ที่น่าสนใจและมีประโยชน์มากกว่า PWM เนื่องจากสามารถให้ข้อมูลของการตอบสนองเฉพาะ B เซลล์

หรือ T เซลล์เพียงชนิดเดียว ซึ่งได้เปรียบกว่าการใช้ PWM ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ว่าการตอบสนองเกิดจากการกระตุ้นกลุ่ม T เซลล์ หรือ B เซลล์

สำหรับการวัดการตอบสนองของ T เซลล์โดยใช้ Con A พบว่า Con A เป็น mitogen ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองเมื่อเทียบกับ LPS และ PWM แต่การทดลองยังคงต้องใช้ปริมาณเซลล์สูง ตั้งแต่ $4x10^5$ เซลล์/หลุมขึ้นไป คล้ายคลึงกับการทดสอบการตอบสนองต่อ LPS และ PWM ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม เป็นปริมาณที่เหมาะสมต่อการทดสอบการตอบสนองต่อ Con A เมื่อได้ทดลองเพิ่มปริมาณเซลล์ใน culture ให้สูงถึง $10x10^5$ เซลล์/หลุม พบว่าการตอบสนองภายใน 24 ชม. มีค่าเพิ่มขึ้น (รูปที่ 13) แต่หลังจากนั้น ไม่ได้เพิ่มการตอบสนองที่แตกต่างจาก culture ที่ใช้ $8x10^5$ เซลล์/หลุมมากนัก (รูปที่ 15-16) ในเชิงปฏิบัติ การใช้เซลล์/หลุมในปริมาณสูงมาก ไม่ค่อยสะดวก เพราะต้องพลีชีพสัตว์ทดลองหลายตัวในการเตรียมเซลล์เพื่อใช้ในการทดสอบ สำหรับความเข้มข้นของ Con A ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง 2.5-10 µg/ml และที่ 5 µg/ml ให้การตอบสนองสูงสุด ระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบอยู่ที่ 48 หรือ 72 ชม.

โดยภาพรวม การทดลงในโครงการวิจัยชี้แนะว่า Con A เป็น mitogen ที่มีประสิทธิภาพสูงสุดในการกระตุ้นการตอบสนองใน mitogenesis assay รองลงมาเป็น LPS และ PWM ตามลำดับ จากการเปรียบเทียบกับงานวิจัยอื่น ซึ่งประเมินการตอบสนองโดยการใช้ [^{3}H]-TdR หรือวิธีอื่น พบว่า Con A mitogen มีประสิทธิภาพสูงกว่า LPS และ PWM ในการกระตุ้นการตอบสนองใน mitogenesis assay (Hildebrandt et al., 1982, Mason and Gwanzzura, 1990, Kliger et al., 2000, Elena et al., 2003, Iwanowicz et al., 2005) ซึ่งสอดคล้องกับผลจากงานวิจัยนี้ ส่วนประสิทธิภาพระหว่าง LPS และ PWM มีรายงานที่แตกต่างกัน บางงานวิจัย LPS มีประสิทธิภาพสูงกว่า PWM แต่ในบางงานวิจัย PWM มีประสิทธิภาพสูงกว่า LPS (Hildebrandt et al., 1982, Mason and Gwanzzura, 1990, Kliger et al., 2000, Elena et al., 2003, Iwanowicz et al., 2005) อย่างไรก็ดี การเปรียบเทียบช่วงความเข้มข้นที่เหมาะสมของ mitogen LPS, PWM และ Con A ที่ใช้ในงานวิจัยนี้กับความเข้มข้นที่รายงานจากงานวิจัยอื่น ไม่ค่อยมีความหมายมากนัก และนักวิจัยไม่ควรยึดความเข้มข้นที่ชี้แนะจากโครงการวิจัยนี้ไปใช้โดยตรง ควรทำการทดลองเบื้องต้นเพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมเอง โดยใช้ความเข้มข้นของ mitogen จากงานวิจัยนี้ เป็นเพียงตัวบ่งชี้เบื้องต้นเพื่อหาช่วงความเข้มข้นของ mitogen ที่จะใช้ในการทดสอบ ซึ่งสภาวะที่เหมาะสมอาจจะแตกต่างจากที่รายงานในโครงการวิจัยนี้ เนื่องจากการตอบสนองใน mitogenesis นอกจากขึ้นกับชนิดของ mitogen แล้ว mitogen ชนิดเดียวกันที่สั่งซื้อจากบริษัทต่างกันอาจมีความแตกต่างกัน หรือแม้แต่ mitogen ชนิดเดียวกัน สั่งซื้อจากบริษัทเดียวกัน มีรหัสสั่งซื้อ (catalogue number) เหมือนกัน แต่ต่าง lot number ก็อาจมีความแตกต่างกันในประสิทธิภาพของการกระตุ้น ดังนั้น นักวิจัยจึงจำเป็นต้องหาความเข้มข้นที่เหมาะสมของ mitogen ในการทดสอบ ถ้ามีการสั่งซื้อใหม่ทุกครั้งไม่ว่า mitogen จะสั่งซื้อจากบริษัทเดิม หรือเปลี่ยนบริษัทใหม่

โดยภาพรวม การศึกษาในโครงการวิจัยนี้ชี้แนะว่า การใช้ MTT ในการประเมินการตอบสนองในการทดสอบ mitogenesis ให้ผลเป็นที่น่าพึงพอใจ แม้การตอบสนองจะถูกวัดในรูปของค่าการดูดกลืนแสง ซึ่งมีความไวต่ำกว่าในวิธีมาตรฐานที่รายงานค่าการตอบสนองในรูปของจำนวนนับของสารกัมมันตภาพรังสีต่อนาที (count/min; cpm) ที่มีความไวสูงกว่า เช่น ในการทดลองที่มีการตอบสนองสูง ใน culture ที่ไม่มี mitogen มีค่าประมาณ 3000 cpm. ส่วนใน culture ที่กระตุ้นด้วย LPS และ Con A อาจมีค่าสูงถึง 20,000 และ 61,800 cpm ตามลำดับ (Smialowicz, 1995) แต่การประเมินการตอบสนองใน mitogenesis assay โดยการใช้ MTT ก็สะดวกกว่า กระทำได้ง่ายและมีราคาถูกกว่า ให้ผลอยู่ในเกณฑ์ที่น่าพึงพอใจ เหมาะสมกับการเป็นวิธีเบื้องต้นที่ใช้คัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

การทดสอบด้าน mixed lymphocyte reaction

การทดสอบ MLR เป็นวิธีทดสอบหนึ่งที่มีประโยชน์และเป็นที่นิยมทางด้านพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกัน การทดสอบนี้ให้ข้อมูลเกี่ยวกับการตอบสนองของ T เซลล์ต่อเซลล์แปลกปลอมจากบุคคลอื่นที่แตกต่างกันใน species เดียวกัน เลียนแบบการตอบสนองต่อการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อจากบุคคลต่างกันในมนุษย์ด้วยกัน การตอบสนองวัดการแบ่งเซลล์และพัฒนา (proliferation) ของกลุ่ม T helper เซลล์ที่จำเพาะต่อแอนติเจนบนผิวเซลล์แปลกปลอม หรือ allogeneic antigen การตอบสนองใน MLR มีปริมาณสูงเมื่อเทียบกับการตอบสนองต่อแอนติเจนอื่น (Murphy et al., 2008) ปฏิกิริยาต่อเนื่องจาก MLR คือการพัฒนาของ cytotoxic T cell (CTL) ที่ได้รับสัญญาณการเจริญและพัฒนาจาก T helper เซลล์จาก MLR CTL ที่มีปริมาณเพิ่มขึ้นจะเป็นกลุ่มเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการฆ่า เพื่อกำจัดเซลล์หรือเนื้อเยื่อจำเพาะที่ถูกปลูกถ่าย โครงการวิจัยไม่ได้ทดลองพัฒนาการทดสอบการตอบสนองของ CTL แต่เลือกเฉพาะดัดแปลงวิธีการทดสอบ MLR โดยวัดการตอบสนอง แบบ one way response เพื่อประยุกต์ใช้ในการศึกษาทางพิษวิทยา เช่น ตรวจสอบสมุนไพรเฉพาะชนิดว่ามีผลกระทบต่อการตอบสนองของ T helper เซลล์ในเซลล์ม้ามที่ได้รับสารสกัดจากสมุนไพรโดยตรงในหลอดทดลอง (*in vitro*) หรืออาจเตรียมเซลล์จากม้ามของหนูที่ได้รับสารสกัดสมุนไพร (*in vivo*) และตรวจสอบความสามารถในการตอบสนองต่อ allogeneic antigen ในหลอดทดลอง การวัดการตอบสนองแบบ one way mixed lymphocyte reaction ใน *in vitro* ช่วยให้การแปลผลมีความหมายง่ายขึ้น เพราะถ้าการทดสอบเป็นแบบ two way response คือทั้ง responder และ stimulator ต่างฝ่ายต่างตอบสนองซึ่งกันและกัน จะไม่สามารถประเมินได้ว่า การตอบสนองใน MLR ที่เพิ่มขึ้นหรือลดลงมีสาเหตุจากผลของสารสกัดต่อกลุ่มเซลล์ใน responder หรือ ต่อ stimulator โดยเฉพาะการทดลองที่ใส่สารสกัดโดยตรงในหลอดทดลง สารสกัดอาจมีฤทธิ์ต่อกลุ่มเซลล์ใน responder หรือ stimulator หรือทั้ง 2 กลุ่ม

ในการทดลองได้เลือกเซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 เป็นเซลล์ responder หรือผู้สามารถตอบสนองได้ และ ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ DBA/2 เป็น stimulator เพื่อแทนเซลล์ที่ใช้ในการปลูกถ่าย ซึ่งในการทดลอง เซลล์จากหนู DBA/2 จะถูกบังคับไม่ให้สามารถตอบสนองได้ โดยบ่มร่วมกับ mitomycin C 50 μg/ml เป็นระยะเวลา 45 นาที ที่ 37°C สาเหตุที่เลือกหนูเม้าส์ทั้ง 2 สายพันธุ์เพื่อใช้ใน MLR เนื่องจาก หนู C57Bl/6 มี haplotype H^{2b} ส่วน DBA/2 มี haplotype H^{2d} ซึ่งมีความแตกต่างกันที่ major histocompatibility complex (MHC) class II และเป็นที่ทราบกันดีในระบบภูมิคุ้มกันว่า ความแตกต่างกันของโปรตีนที่ MHC class II เป็นตัวการสำคัญในการไม่ยอมรับการปลูกถ่ายเซลล์ หรือเนื้อเยื่อ (Roitt et al., 1998; Murphy et al., 2008) ซึ่งหมายถึงการตอบสนองใน MLR มีค่าสูง ง่ายต่อการตรวจวัด และโมเลกุลของ MHC class II บนผิวของ stimulator cell เป็นปัจจัยหลักที่สำคัญในการกระตุ้นการตอบสนองของ MLR

โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีทดสอบ MLR โดย ใช้ MTT วัดการตอบสนองแทนการใช้ [^{3}H]-TdR ตามวิธีมาตรฐานที่วัดการใช้ thymidine ของเซลล์เพื่อสังเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองโดยมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น ผลการทดลองใน MLR คล้ายคลึงกับการทดสอบด้าน mitogenesis คือถ้าใช้สภาวะการทดลองตามวิธีมาตรฐานที่ใช้ [^{3}H]-TdR จะไม่สามารถวัดการตอบสนองโดยใช้ MTT ได้ จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเซลล์ของ responder ให้เพิ่มขึ้นจาก $1x10^5$ เซลล์/หลุมเป็น $4x10^5$ หรือ $8x10^5$ เซลล์/หลุม จึงให้ค่าการตอบสนองที่น่าพึงพอใจ แต่สำหรับอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดการตอบสนองจะไม่แตกต่างจากค่าที่ใช้ตามวิธีมาตรฐาน คือใช้อัตราส่วนของ responder:stimulator เป็น 1:4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ วันที่ 5 และการตอบสนองที่วัดได้น่าจะเป็นการตอบสนองของเซลล์ responder เพียงฝ่ายเดียว เพราะเซลล์ stimulator ถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยใช้ mitomycin C ซึ่งการใช้ mitomycin C เป็นวิธีมาตรฐาน เช่นเดียวกับวิธีการใช้รังสี (irradiation) เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ stimulator ทำให้ไม่สามารถตอบสนองต่อ allogeneic antigen ของเซลล์ responder (Harrison and Paul, 1973) กลไกการออกฤทธิ์ของ mitomycin C คือการ crosslink DNA และยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ส่งผลต่อการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้ลดต่ำลง ดังนั้นเซลล์ที่ได้รับ mitomycin C จึงมีวัฎจักรเซลล์ (cell cycle) สู่ S phase และ G2 phase ช้าลง (Malinowski et al., 1992) การทดลองในโครงการวิจัยนี้ สนับสนุนฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ mitomycin C รูปที่ 20 ชี้ชัดว่าเซลล์ stimulator ที่ได้รับ 50 μg/ml mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ เมื่อระยะเวลา 72 ชม.หลังจากการกระตุ้น อย่างไรก็ตาม ในการเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A ของเซลล์ stimulator ที่ผ่านการบ่มกับ mitomycin C และไม่ได้บ่มกับ mitomycin C เป็นที่น่าสนใจว่า เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ยังสามารถตอบสนองต่อ mitogen ในวันที่ 2 ได้บ้าง (รูปที่ 21 ก) และการตอบสนองจะน้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ mitomycin C ประมาณ 40 % แต่ในวันที่ 3 เซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ

Con A ได้ต่อไป ในขณะที่เซลล์ที่ไม่ได้รับ mitomycin C ยังสามารถตอบสนองต่อ Con A แต่มีการตอบสนองที่ลดต่ำลงจากที่ระยะเวลา 48 ชม. (รูปที่ 21 ข) นั่นหมายความว่าเซลล์ stimulator ที่บ่มร่วมกับ mitomycin C ไม่ได้ตายหมดทันที แต่สามารถแบ่งเซลล์ได้บ้างในช่วงระยะเวลา 1-2 วันแรกและไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ตั้งแต่ระยะเวลาประมาณวันที่ 3 ดังนั้น การวัดการตอบสนองใน MLR ซึ่งกระทำในวันที่ 4 หรือ 5 จึงน่าจะเป็นการตอบสนองของ responder เพียงฝ่ายเดียว หรือเป็น one-way mixed lymphocyte reaction จากประสบการณ์ของผู้ปฏิบัติงานเกี่ยวกับการทดสอบ MLR ในด้านพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน พบว่าแม้ ในเชิงทฤษฎี เทคนิคการทดสอบเกี่ยวกับ one-way mixed lymphocyte reaction ไม่ยุ่งยากนัก แต่ในเชิงปฏิบัติ บางครั้งอาจจะไม่ได้การตอบสนองที่สูงนัก แม้ใช้วิธีมาตรฐานซึ่งใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งมีความไวกว่าการใช้ วิธี MTT ทั้งนี้เนื่องจากขั้นตอนการยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ stimulator โดย mitomycin C เป็นปัจจัยหนึ่งที่สำคัญนอกเหนือจากปัจจัยอื่น เนื่องจากปฏิกริยาตอบสนองใน MLR เป็นการตอบสนองของ responder ต่อ MHC class II โดยเฉพาะ HLA-DR สำหรับเซลล์มนุษย์ หรือ H^{2d} สำหรับเซลล์หนูซึ่งเป็นโมเดลที่ใช้ในโครงการวิจัยนี้ ปริมาณ mitomycin C ที่ใช้ต้องสามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์ stimulator แต่ไม่ก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโปรตีนที่ผิวเซลล์มากนัก โดยเฉพาะ MHC class II เพราะทำให้การตอบสนองของ allogeneic T เซลล์ลดต่ำลง (Stivaktas, 2008) โครงการวิจัยนี้ ใช้ความเข้มข้นของ mitomycin C ตามวิธีทดสอบมาตรฐานที่รายงานของห้องปฏิบัติการพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน ที่ใช้ยับยั้งการเจริญของเซลล์ stimulator ที่เตรียมจากหนูเมาส์ DBA/2 (Smialowicz, 1995, Auttachoat et al., 2004) เพราะเป็นสายพันธุ์เดียวกับที่ทดลองใช้ในโครงการวิจัย การทดลองชี้แนะว่าใน 2 วันแรกหลังจากรับ mitomycin C เซลล์ stimulator ยังไม่ตาย เนื่องจากเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C บางส่วนยังสามารถตอบสนองต่อ Con A ในได้ 48 ชม. (รูปที่ 21 ก) ซึ่งผลการทดลองสอดคล้องกับการศึกษาเปรียบเทียบการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ stimulator ที่ถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยใช้วิธีต่าง ๆ คือ การฉายรังสี (irradiation) การใช้ mitomycin C และการใช้ cyclosporine พบว่าการฉายรังสี ก่อให้เกิดการตายของเซลล์สูงกว่าการใช้ mitomycin C และ cyclosporine ในกรณีของ mitomycin C การมีชีวิตอยู่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (mononuclear leukocyte) ของคน หลังจากรับ mitomycin C 24 และ 48 ชม. ลดลงจาก 99.1% ของเซลล์ปกติ (ไม่ได้รับ mitomycin C) เหลือประมาณ 68.3 และ 67.9% ตามลำดับ (Stivaktas, 2008) ยังไม่เป็นที่ทราบแน่ชัดว่าเซลล์ stimulator ที่ถูกยับยั้งการเจริญโดย mitomycin C ยังคงมีชีวิตอยู่ได้นานกี่วัน แต่แน่ชัดว่า เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ไม่ได้ตายทันที เพราะภายหลังการบ่มเซลล์ stimulator กับ 50 μg/ml mitomycin C เป็นระยะเวลา 45 นาที ล้างเซลล์ครั้งสุดท้าย นับและปรับปริมาณเซลล์เพื่อใส่ใน culture ด้วยวิธี trypan blue พบว่าเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่ยังคงมีชีวิตไม่ต่างจากเซลล์แรกเริ่มที่ยังไม่ได้รับ mitomycin C (ประมาณ 93-95%) โครงการวิจัยนี้ ไม่ได้ประเมินการยังคงมีชีวิตอยู่ของเซลล์ stimulator ตลอดการทดสอบในระยะเวลา 4-5 วัน เพียงแต่ตรวจสอบ

ความไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ตามวิธีมาตรฐานของการทดสอบ one-way mixed lymphocyte reaction เพราะเซลล์ที่ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ก็ไม่น่าตอบสนองต่อ responder ได้เช่นกัน เนื่องจากโดยทั่วไป การตอบสนองต่อ Con A mitogen มีค่าสูงกว่าการตอบสนองต่อ allogeneic antigen มาก เพราะการตอบสนองต่อ mitogen จัดเป็นการตอบสนองแบบไม่จำเพาะ และเป็น polyclonal response ส่วนการตอบสนองใน MLR มีความจำเพาะ เป็นการตอบสนองของกลุ่ม lymphocyte ที่จำเพาะต่อ allogeneic determinant ที่ต่างกันของ MHC class II (Smialowicz, 1995)

ในการพัฒนาวิธีวัด one-way mixed lymphocyte reaction โดยใช้ MTT วัดการตอบสนองแทนการใช้ [^{3}H]-TdR ของเซลล์เพื่อสังเคราะห์ DNA อาจจะซับซ้อนต่อการแปลผล เพราะ MTT วัดปริมาณ formazan product ที่เป็นผลลัพธ์จากการเปลี่ยน MTT โดย mitochondrial เอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิต ในกรณีที่เซลล์ stimulator ซึ่งได้รับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ allogneic antigen แต่ยังอาจมีชีวิตอยู่ใน culture ได้ ค่าที่วัดจึงอาจสูงกว่าความเป็นจริงและทำให้นักวิจัยเข้าใจผิดว่า การใช้ MTT มีความไวกว่าวิธีมาตรฐานตามที่เคยรายงาน (VanBuskirk et al., 1995) เพราะใน culture ที่ responder กระตุ้นด้วย stimulator ค่าที่อ่านได้จากวิธี MTT นอกจากเป็นผลจากปริมาณเซลล์ของ responder ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการตอบสนองต่อ allogeneic antigen บนผิวของ stimulator แล้ว อาจรวมเซลล์ stimulator บางส่วนที่ยังคงมีชีวิตอยู่ เพียงแต่ไม่สามารถตอบสนองได้ ซึ่งข้อบกพร่องนี้ ไม่พบในวิธีมาตรฐาน ซึ่งวัดการตอบสนองโดยการสังเคราะห์ DNA ปัจจัยของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ stimulator ไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการสังคราะห์ DNA ของ culture เพราะแม้อาจมีเซลล์ stimulator บางส่วนที่ยังไม่ตาย แต่การสร้าง DNA ได้ถูกยับยั้งโดย mitomycin C ค่า [^{3}H]-TdR ซึ่งวัดการสังเคราะห์ DNA ของ culture ในวิธีมาตรฐาน จึงเป็นของ responder เพียงอย่างเดียว ซึ่งต่างจากค่าการดูดกลืนแสงของการใช้ MTT ที่วัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตใน culture ถ้าเซลล์ที่มีชีวิตมีปริมาณสูง ปริมาณ formazan product ย่อมสูงตาม ดังนั้น ในการทดสอบด้วยการใช้ MTT จึงควรมีกลุ่มทดลองเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบว่าเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่ใน culture ในวันที่ 4 -5 หรือวันที่ทำการวัดการตอบสนองหรือไม่ เพื่อให้สามารถแปลผลได้อย่างถูกต้องว่า การตอบสนองเป็นของ responder เพียงอย่างเดียว และวิธีทดสอบเป็น one-way mixed lymphocyte reaction อย่างแท้จริง อย่างไรก็ดี โครงการวิจัยนี้ ชี้แนะว่า สามารถใช้ MTT วัดการตอบสนองใน mixed lymphocyte reaction ได้ แต่การแปลผลสำหรับ culture ที่เป็น one-way mixed lymphocyte reaction จำเป็นต้องเพิ่มกลุ่มทดลองของเซลล์ stimulator เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่อาจยังคงมีชีวิตอยู่ควบคู่ไปกับการทดสอบด้วย ถึงแม้มักเข้าใจกันว่า ในที่สุด เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C จะตายทั้งหมดใน culture เนื่องจากไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ต่อไป แต่ก็ควรเพิ่มกลุ่มทดลองเพื่อยืนยันทุกครั้ง ในกรณีที่ต้องการทำการทดสอบแบบ two-way mixed lymphocyte reaction ซึ่งวัดการ

ตอบสนองของทั้ง stimulator และ responder ร่วมกัน การใช้ MTT น่าจะทัดเทียมและดีกว่าวิธีมาตรฐาน เพราะไม่ต้องใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการทดสอบ และแปลผลได้อย่างถูกต้องเช่นกัน เนื่องจากค่าการตอบสนองที่วัดได้ ไม่จำเป็นต้องแยกว่าเป็นของ responder หรือของ stimulator เพียงฝ่ายเดียวเหมือนการทดสอบแบบ one way-mixed lymphocyte reaction อย่างไรก็ดี มีงานวิจัยใหม่ที่เสนอให้ปรับปรุงวิธีการทดสอบ mixed lymphocyte reaction จากวิธีมาตรฐานเดิม โดยหลีกเลี่ยงการใช้ mitomycin C หรือการใช้รังสี เนื่องจากทั้ง mitomycin C และ รังสี ส่งผลให้การตอบสนองใน mixed lymphocyte reaction ลดต่ำลง เพราะมีผลกระทบต่อโครงสร้างและ expression ของโมเลกุล HLA-DR (เป็น MHC class II ในเซลล์มนุษย์) ซึ่งเป็นปัจจัยหลักในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนอง โดยแนวความคิดใหม่ แนะให้ทำการทดลองเป็นแบบ two-way mixed lymphocyte reaction จึงไม่ต้องใช้ทั้ง mitomycin C และ รังสี แต่ให้ย้อมเซลล์ที่ต้องการวัดการตอบสนอง หรือการแบ่งเซลล์ด้วยการใช้สีเรืองแสง CFSE (fluorochrome 5,6 carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester) และประเมินโดยใช้ flow cytometry เมื่อเซลล์เกิดการตอบสนองและแบ่งเซลล์อย่างรวดเร็ว จะเกิดการลดสัญญาณของ CFSE และการเพิ่ม expression ของ CD25 ที่ผิวเซลล์ ซึ่งเป็นโปรตีนที่บ่งชี้การกระตุ้นและการเจริญอย่างรวดเร็วของเซลล์ (Stivaktas, 2008) ซึ่งวิธีที่เสนอดังกล่าวก็เป็นวิธีที่น่าสนใจ แต่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือ flow cytometry ที่มีราคาแพงในการทดลอง สำหรับการประเมินการตอบสนองใน MLR โดยใช้วิธี MTT ไม่จำเป็นต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง และง่ายกว่าในเชิงเทคนิค จึงอาจเหมาะสมกว่าถ้าต้องการใช้เพียงคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน แต่ถ้าต้องการวัดการตอบสนองเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte response ความเชื่อมั่นของการแปลผลจะน้อยกว่าในวิธีมาตรฐานที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี