บทที่ 6
สรุป

การทดลองพัฒนาวิธีทดสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน เพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในโครงการวิจัยนี้ เลือกเฉพาะ mitogenesis assay และ mixed lymphocyte reaction ซึ่งเป็นเพียงวิธีทดสอบเบื้องต้นที่สำคัญในอีกหลายวิธีการทดสอบทางด้านพิษวิทยาระบบภูมิคุ้มกัน ในวิธี mitogenesis assay โครงการวิจัยนี้ เลือกใช้ Concanavalin A (Con A) และ lipopolysaccharide (LPS) ซึ่งเป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้เฉพาะ T และ B lymphocyte ตามลำดับ นอกจากนั้น ยังเลือก poke weed mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B lymphocyte สำหรับการทดสอบ mixed lymphocyte reaction (MLR) โครงการวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 เป็นเซลล์ responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ DBA/2 เป็นเซลล์ stimulator และวัดการตอบสนองเฉพาะของเซลล์ responder เพียงฝ่ายเดียวซึ่งเรียกว่า one-way mixed lymphocyte reaction เพื่อให้วิธีทดสอบสามารถกระทำได้ง่าย รวดเร็ว ไม่ต้องอาศัยเครื่องมือราคาแพง เหมาะต่อการใช้เป็นวิธีคัดกรองพืชสมุนไพรที่ออกฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โครงการวิจัยนี้เลือกวัดการตอบสนองการแบ่งเซลล์และพัฒนา (proliferation) ใน *in vitro* ของ lymphocyte ทั้งใน mitogenesis asay และ MLR โดยใช้ MTT colorimetric assay แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี [^{3}H]-TdR ตามวิธีมาตรฐาน สภาวะที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบทั้ง mitogenesis assay และ MLR สรุปได้ดังนี้คือ

1. ทั้ง mitogenesis assay และ MLR ที่วัดการตอบสนองโดยใช้ MTT colorimetric assay จำเป็นต้องใช้เซลล์ใน culture สูงกว่าการใช้วิธีมาตรฐาน [^{3}H]-TdR เพื่อวัดการตอบสนอง โครงการนี้ พบว่าปริมาณเซลล์ที่ให้การตอบสนองสูงสุดอยู่ที่ $8x10^5$ เซลล์/หลุม
2. Con A เป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองสูงที่สุด รองลงมาเป็น LPS และ PWM ตามลำดับ
3. สำหรับการวัดการตอบสนองของ B lymphocyte ใช้ LPS mitogen ที่ความเข้มข้นระหว่าง 1-100 μg/ml ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองที่ 24-48 ชม. ภายหลังการกระตุ้น ทั้งนี้การตอบสนองสูงสุด (peak response) อยู่ที่ LPS 10 μg/ml ที่ระยะเวลา 48 ชม.
4. สำหรับการวัดการตอบสนองทั้ง T และ B lymphocyte รวมกัน ใช้ PWM ความเข้มข้นระหว่าง 1-100 μg/ml ปริมาณเซลล์ $8x10^5$ เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองที่

24 ชม. ภายหลังการกระตุ้น ทั้งนี้ การตอบสนองของ PWM 1-100 μg/ml ไม่มีความแตกต่างกันที่ 24 ชม.

5. สำหรับการวัดการตอบสนองของ T lymphocyte ใช้ Con A ความเข้มข้นระหว่าง 2.5-10 μg/ml ปริมาณเซลล์ 8-10x10^5 เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองที่ 48-72 ชม. ภายหลังการกระตุ้น การตอบสนองสูงสุดอยู่ที่ Con A 5 μg/ml 72 ชม. เมื่อปริมาณเซลล์เป็น 8x10^5 เซลล์/หลุม
6. ในการวัดการตอบสนองของ MLR เมื่อใช้ C57Bl/6 เป็น responder และ DBA/2 เป็น stimulator สภาวะที่เหมาะสมของปริมาณเซลล์ของ responder คือ 4-8x10^5 เซลล์/หลุม และอัตราส่วนของเซลล์ responder ต่อ stimulator เป็น 1: 4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4-5
7. ในการทดสอบ MLR ถ้าต้องการวัดการตอบสนองแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ใช้เซลล์ stimulator บ่มร่วมกับ 50 μg/ml mitomycin C สำหรับการใช้ MTT colorimetric assay เพื่อประเมินการตอบสนองใน one-way mixed lymphocyte reaction อาจจะไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมนัก เพราะยากต่อการแปลผล สืบเนื่องจากแม้เซลล์ stimulator ไม่สามารถตอบสนองต่อ responder ได้ แต่ยังอาจคงมีชีวิตอยู่ได้ใน culture ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ทำให้ค่าการตอบสนองที่วัดได้โดยการใช้ MTT อาจไม่สามารถสะท้อนเฉพาะการตอบสนองของ responder เพียงฝ่ายเดียวตามความต้องการ ในกรณีนี้ การใช้ [^{3}H]-TdR จึงมีความเหมาะสมและถูกต้องมากกว่าการเลือกใช้ MTT

ข้อเสนอแนะ

ในการใช้ MTT วัดการตอบสนองใน MLR โดยเฉพาะแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ควรทดลองหาระยะเวลาที่เซลล์ stimulator ยังคงมีชีวิตอยู่ภายหลังได้รับ mitomycin C และนอกจากตรวจสอบความสามารถของเซลล์ stimulator ในการตอบสนองต่อ Con A หรือ mitogen อื่น ควรเพิ่มกลุ่มทดลองของ culture ที่มีเพียง stimulator เซลล์เพียงอย่างเดียวในการทดลอง MLR ด้วย เพื่อตรวจสอบความถูกต้องของค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้ ว่าเป็นการตอบสนองของเซลล์ responder ต่อ allogeneic antigen เพียงอย่างเดียว หรือรวมค่าของเซลล์ stimulator บางส่วนที่ยังคงมีชีวิตอยู่ใน culture ภายหลังได้รับ mitomycin C อย่างไรก็ตาม วิธีที่ดีที่สุดในการเปรียบเทียบ ควรทำการทดลองวัดการตอบสนองโดยใช้ MTT ควบคู่กับการใช้ [^{3}H]-TdR ตามวิธีมาตรฐาน ซึ่งโครงการวิจัยนี้ไม่อาจกระทำได้ เพราะยังไม่มีห้องปฏิบัติการที่สามารถใช้สารกัมมันตภาพรังสีได้