

ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผลพวงทะเลสาบในหนองคลอง



นาย ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์ ภาควิชาเภสัชวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2550

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF SCAPHIUM SCAPHIGERUM FRUITS IN MICE



Mr. Parkpoom Siriarchavatana

สถาบันวิทยบริการ  
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements  
For the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pharmacology

Department of Pharmacology

Faculty of Veterinary Science

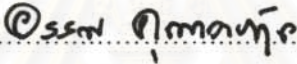
Chulalongkorn University

Academic Year 2007

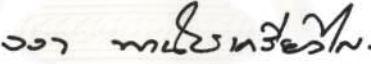
Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์                    ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผลพุงทะเลลายในหนูทดลอง  
โดย    นาย ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒน์  
สาขาวิชา                                เภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์  
อาจารย์ที่ปรึกษา                        ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร้อยโท สัตวแพทย์หญิงดร. เนาวรัตน์ สุธัมมณาตพงษ์  
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม                    ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิร ลิมปณิสติกุล

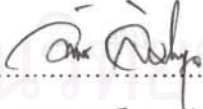
คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้หัวข้อวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็น  
ส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

 ..... คณบดีคณะสัตวแพทยศาสตร์  
(ศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. อรรณพ คุณาวงษ์กุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

 ..... ประธานกรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. วรา พานิชเกรียงไกร)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษา  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ร้อยโท สัตวแพทย์หญิง ดร. เนาวรัตน์ สุธัมมณาตพงษ์)

 ..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม  
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิร ลิมปณิสติกุล)

 ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ นายสัตวแพทย์ ดร. สมเกียรติ ทาจำปา)

 ..... กรรมการ  
(รองศาสตราจารย์ สัตวแพทย์หญิง ดร. สันนิภา สุรทัตต์)

ภาคภูมิ สิริอาชาวัฒนา : ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายของผลพุทพทะเลลายในหนูทดลอง.  
(IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF SCAPHIUM SCAPHIGERUM FRUITS IN  
MICE) อ. ที่ปรึกษา: ผศ.รท.สพญ.ดร. เนาวรัตน์ สุธัฒนาพงษ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม : ผศ.ดร. วัชร  
ลิมปณสิทธิ์กุล 78 หน้า.

ปัจจุบันผล *Scaphium scaphigerum* ได้รับความนิยมในการนำมาบริโภคเป็นเครื่องคั้น ตำรา  
การแพทย์แผนไทยระบุสรรพคุณของเนื้อผล *S. scaphigerum* เพื่อแก้อาการเจ็บคอ และบรรเทาอาการ  
ตาอักเสบ การศึกษาวิจัยในหลอดทดลองพบว่า สารสกัดน้ำจากผล *S. scaphigerum* มีโพลีแซคคาไรด์  
เป็นองค์ประกอบ สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาว และกระตุ้นการทำงานของ  
macrophage ได้ ในการศึกษาที่มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อระบบ  
ภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง

การวิจัยนี้ได้ศึกษาฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ทั้งในหนูปกติ และ หนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน  
ด้วยยา cyclophosphamide (CP) เม็ดเลือดแดงและแอนติเจนที่ใช้ในการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนอง  
ของภูมิคุ้มกันร่างกาย ผลการศึกษาในหนูปกติพบว่า การป้อนผล *S. scaphigerum* สามารถยับยั้ง  
การอักเสบจากปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity (DTH) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และ  
สัมพันธ์กับขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้ แต่ไม่พบความเปลี่ยนแปลงอย่างมีนัยสำคัญของการ  
สร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงและ การป้อนผล *S. scaphigerum* ในขนาด 78 มก./กก. ยังส่งผลต่อ  
การทำงานของ peritoneal macrophage ในการหลั่ง nitric oxide เพิ่มขึ้น เมื่อได้รับการกระตุ้นจาก  
lipopolysaccharide สำหรับการศึกษาในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน พบว่า การให้ผล *S. scaphigerum*  
ในขนาด 78 มก./กก. จะเพิ่มการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในปฏิกิริยา DTH, การสร้างแอนติบอดี และ  
ปริมาณ lymphocyte ในกระแสเลือด ชนิด CD4<sup>+</sup> T lymphocyte และ CD8<sup>+</sup> T lymphocyte ได้อย่างมี  
นัยสำคัญทางสถิติ การตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เพิ่มขึ้นในหนูที่ได้รับยา CP ยังไม่ได้คืนสู่ระดับ  
เดียวกับที่พบในหนูปกติทั้งหมด แต่สามารถลดความรุนแรงในการกดภูมิคุ้มกันจาก CP ได้ การศึกษานี้  
แสดงให้เห็นว่าผล *S. scaphigerum* มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายทั้งในส่วน innate และ  
adaptive immunity ข้อมูลจากการศึกษานี้ จะเป็นประโยชน์ต่อการนำผล *S. scaphigerum* ไปใช้  
ในทางปฏิบัติ เพื่อส่งเสริมสุขภาพ หรือการพัฒนาสารช่วยการเจริญเติบโตในสัตว์

ภาควิชาเภสัชวิทยา

ลายมือชื่อนิสิต.....

สาขาวิชาเภสัชวิทยาทางสัตวแพทยศาสตร์

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ปีการศึกษา 2550

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....



## 4875562631 : MAJOR VETERINARY PHARMACOLOGY

KEY WORD: *Scaphium scaphigerum* / IMMUNOMODULATION / IMMUNE RESPONSE

PARKPOOM SIRIARCHAVATANA : IMMUNOMODULATORY ACTIVITY OF  
SCAPHIUM SCAPHIGERUM FRUITS IN MICE. THESIS ADVISOR : ASST. PROF.  
NAOWARAT SUTHUMNATPONG, Ph.D., THESIS COADVISOR : ASST. PROF.  
WACHAREE LIMPANASITHIKUL, Ph.D. 78 pp.

Nowadays, *Scaphium scaphigerum* fruits are widely used as a beverage. The claimed efficacies in folklore medicine are treatment of sore throat and conjunctivitis. The *in vitro* study demonstrated the water extract of *S. scaphigerum* fruits contained large amount of polysaccharide which could stimulate leukocyte proliferation and macrophage function. This research objective was to study the effect of *S. scaphigerum* fruits on immune system in the laboratory animal.

The effect of *S. scaphigerum* was investigated in immunocompetent mice and cyclophosphamide-induced immunosuppressed mice. Sheep red blood cells (SRBC) were used as an antigen for immunization. The results from immunocompetent mice showed that the oral administration of *S. scaphigerum* significantly inhibited delayed-type hypersensitivity (DTH) reaction in a dose dependent manner but not significantly changed the SRBC-induced antibody production. *S. scaphigerum* at the concentration of 78 mg/kg resulted in the increment of nitric oxide releasing function of peritoneal macrophage when activated by lipopolysaccharide. The results from immunosuppressed mice showed that 78 mg/kg *S. scaphigerum* could significantly increase DTH reaction, antibody production, the absolute numbers of CD4<sup>+</sup> T lymphocyte and CD8<sup>+</sup> T lymphocyte. Although the increasing of immune responses after *S. scaphigerum* treatment in immunosuppressed mice did not restored back to the same level as those of the immunocompetent mice but it could alleviate the harmful immunosuppressive effect of cyclophosphamide. This study reveals that *S. scaphigerum* fruits have immunomodulatory activity on both innate and adaptive immunity. This data provides the usefulness in primary health care or the development of growth promoter in livestock production.

Department : Pharmacology

Field of study : Veterinary Pharmacology

Academic year 2007

Student's signature

Advisor's signature

Co-advisor's signature

*Parkpoom Siriarchavatana.*  
*Naowarat Suthumnatpong*  
*Wacharee Limpanasithikul*

## กิตติกรรมประกาศ

หากเปรียบเทียบงานวิทยานิพนธ์เล่มหนึ่งๆเป็นเช่นชีวิต ที่จักประกอบกันขึ้นด้วยโครงสร้างของส่วนต่างๆ เนื้อหาคือโครงสร้างของร่างกาย และส่วนกิตติกรรมประกาศในหน้านี้อาจเปรียบได้กับจิตวิญญาณ เพราะเป็นเพียงส่วนเดียวของวิทยานิพนธ์เล่มนี้ที่ได้บรรลุไว้ถึง ความรู้สึกนึกคิด ความตั้งใจ ความมุ่งหวัง แรงผลักดัน และกำลังใจ อันเป็นสิ่งบ่งชี้ถึง อัตตลักษณ์ของบุคคลให้ขับเคลื่อนเจตคติเหล่านั้นให้บรรลุถึงเป้าหมาย และตั้งเช่นที่จิตวิญญาณควบคุมในทุกส่วนของร่างกาย เจตคติในส่วนกิตติกรรมประกาศนี้ก็ไ้แทรกกระจายไปอยู่ในเนื้อหาและทุกขั้นตอนของการทำวิทยานิพนธ์

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผศ.รท. สพ.ญ. ดร.เนาวรัตน์ สุทธิมาตพงษ์ ผู้เป็น อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ให้กับข้าพเจ้า ตั้งแต่วันที่ข้าพเจ้ายังมีบอดต่อการวิจัย และมองไม่เห็นสีสรรของโลก ภูมิคุ้มกันวิทยา

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ผศ. ดร. วัชรวิ ลิมปนสิทธิกุล ผู้เป็นอาจารย์ที่ปรึกษาร่วมวิทยานิพนธ์ และอาจารย์ผู้สอนให้เห็นถึงมิติในโลกของภูมิคุ้มกันวิทยา ตลอดจนให้การสนับสนุนในทุกๆด้าน จนการทำวิทยานิพนธ์นี้สำเร็จ ลุล่วงด้วยดี

ข้าพเจ้าขอขอบคุณคณาจารย์ทุกท่านในภาค วิชาเภสัชวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการปรับปรุงโครงร่างวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์ขึ้น ตลอดจนการสนับสนุนทุนเริ่มต้นในการทำวิจัย

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ศูนย์ความร่วมมือไทย-สหรัฐ ด้านสาธารณสุข ตลอดจนเจ้าหน้าที่ทุกท่าน ในการวิเคราะห์ตัวอย่างเลือด พร้อมทั้งสอนวิธีการใช้เครื่องมือ และการแปลผล

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ฝ่ายเภสัชและผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย ในการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์ของสมุนไพร

ข้าพเจ้าขอขอบคุณ ญาติมิตร และครอบครัว ซึ่งเป็นกำลังใจหนุนหลังในทุกๆเรื่อง ที่ข้าพเจ้าได้กระทำ

ข้าพเจ้าขอระลึกถึงคุณครูทุกท่านในอายุรเวทวิทยาลัย อีกทั้ง รศ.พญ. บุญเรือง นิยมพร ผู้ซึ่งสานต่อเจตนารมย์จากอาจารย์ของท่านจนวันสุดท้ายของชีวิต ผู้ซึ่งสอนสั่งความรู้ด้านสมุนไพร และโลกปริทรรศน์การแพทย์ทางเลือกในยามที่ท่านมีชีวิต และทำให้ข้าพเจ้าตระหนักถึงความยิ่งใหญ่ ในการรักษาคำมั่นสัญญาเมื่อวาระที่ท่านจากไป

และสุดท้าย ข้าพเจ้าขอน้อมคารวะต่อดวงวิญญาณ ศาสตราจารย์นายแพทย์อวย เกตุสิงห์ บรมครูผู้ก่อตั้งอายุรเวทวิทยาลัย แม้ว่าข้าพเจ้าจะไม่เคยได้พบท่าน แต่ด้วยเจตนารมย์ อุดมคติ คุณความดีและผลงานที่ท่านกระทำไว้ คอยสั่งสอนและคำจูนอุดมคติของข้าพเจ้าให้ตั้งมั่นอยู่เสมอ งานวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนวิทยานิพนธ์ จากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

# สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ญ
รายการคำย่อ.....	ฎ
<b>บทที่</b>	
1     บทนำ.....	1
1.1    ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา.....	1
1.2    วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3    สมมติฐานงานวิจัย.....	3
1.4    ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	3
2     เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	4
2.1 <i>Scaphium scaphigerum</i> .....	4
2.2    ระบบภูมิคุ้มกัน (Innate immunity).....	6
2.3    การทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (Immune function).....	10
2.4    Immunosuppressive model .....	23
3     วิธีการดำเนินการวิจัย.....	24
3.1    วัสดุอุปกรณ์.....	24
3.1.1    สัตว์ทดลอง.....	24
3.1.2    ผล <i>S.scaphigerum</i> .....	24
3.1.3    สารเคมีและเซลล์.....	24
3.1.4    เครื่องมือและอุปกรณ์.....	25
3.2    วิธีการทดลอง.....	25
3.2.1    การเตรียมสารแขวนลอยจากผล <i>S. scaphigerum</i> .....	25
3.2.2    การเตรียมเม็ดเลือดแดงแกะ.....	25

บทที่	หน้า
3.2.3	การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity.....26
3.2.4	การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity.....28
3.2.5	การรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ.....33
4	ผลการทดลอง 34
4.1	การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity.....34
4.2	การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity.....36
4.2.1	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเป็นปกติ.....36
4.2.2	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....40
5	สรุปผลการวิจัย อภิปรายผลและข้อเสนอแนะ 57
รายการอ้างอิง.....64	
ภาคผนวก 71	
	ภาคผนวก ก.....72
	ภาคผนวก ข.....73
	ภาคผนวก ค.....77
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....78	



## สารบัญญัตินำ

ตารางที่	หน้า
1	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อเซลล์ peritoneal macrophage ในการหลั่ง nitric oxide.....73
2	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาDTH และการสร้างแอนติบอดี ในหนูปกติ.....73
3	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาDTH และการสร้างแอนติบอดี ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....74
4	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวและ lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....75
5	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ T lymphocyte และ CD3 <sup>-</sup> lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....75
6	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ CD4 <sup>+</sup> T lymphocyte และ CD8 <sup>+</sup> T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....75

## สารบัญญภาพ

รูปที่	หน้า
1 ภาพผล <i>Scaphuim scaphigerum</i> .....	5
2 การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย.....	9
3 ภูมิคุ้มกันร่างกายแบบ innate และ adaptive immunity.....	10
4 ภาพแสดงตัวรับชนิดต่างๆของโพลีแซคคาไรด์ที่ปรากฏบนผิวเซลล์ macrophage.....	14
5 ระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity.....	16
6 หน้าทีของ lymphocyte ชนิดต่างๆในระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity.....	22
7 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อเซลล์ peritoneal macrophage ในการหลั่ง nitric oxide .....	35
8 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity (DTH) ในหนูปกติ.....	37
9 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อการสร้างแอนติบอดีในหนูปกติ.....	39
10 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	41
11 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อการสร้างแอนติบอดี ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	43
12 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณเม็ดเลือดขาว ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	47
13 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	48
14 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	49
15 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ CD3 <sup>-</sup> lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	50
16 ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ CD4 <sup>+</sup> T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน.....	51

รูปที่	หน้า
17	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อปริมาณ CD8 <sup>+</sup> T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน.....52
18	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ที่มีต่อน้ำหนักของม้าม ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน.....54
19	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิของม้าม (40 เท่า) ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน.....55
20	ฤทธิ์ของผล <i>S. scaphigerum</i> ต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิของม้าม (500 เท่า) ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน.....56
21	ภาพ chromatogram ของสารสกัดเอทานอลของ <i>Scaphium scaphigerum</i> .....72
22	ภาพ chromatogram ของสารสกัดน้ำของ <i>Scaphium scaphigerum</i> .....72
23	percent inhibition ของค่าโลหิตวิทยาในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน.....76
24	percent change ของค่าโลหิตวิทยาในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน.....76

## รายการคำย่อ

APC	antigen presenting cell
BCR	B cell receptor
cNOS	constitutive nitric oxide syntase
CP	cyclophosphamide
DMEM	dulbecco's modified eagle's medium
DTH	delayed-type hypersensitivity
FBS	fetal bovine serum
FT	footpad thickness
H&E	Hematoxylin-Eosin
Ig	immunoglobulin
iNOS	inducible nitric oxide syntase
IP	intraperitoneal
LPS	lipopolysaccharide
M	molar (mole per liter)
MHC	major histocompatibility complex
NO	nitric oxide
NS	normal saline
p.o.	by mouth
PBS	phosphate buffer saline
PRRs	pattern recognition receptors
RNIs	reactive nitrogen intermediates
ROIs	reactive oxygen intermediates
SS	<i>Scaphium scaphigerum</i>
TCR	T cell receptor
TLRs	Toll-like receptors

# บทที่ 1

## บทนำ

### 1.1 ความเป็้มาและความสำคัญของปัญหา

กล่าวได้ว่าการเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายให้เข้มแข็งขึ้น เป็นหนทางหนึ่งในการดูแลสุขภาพ หรือ ปกป้องร่างกายจากการเกิดโรค นอกเหนือจากการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อกำจัดโรค ในปัจจุบันพบว่ามีโรคจำนวนมากที่คุกคามสุขภาพของมนุษย์ โดยก่อให้เกิดสภาพโรคเรื้อรัง ดังเช่น โรคติดเชื้อไวรัส, โรคติดเชื้อรา, โรคเอดส์, โรคภูมิแพ้, โรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง และโรคมะเร็ง โรคเรื้อรังต่างๆเหล่านี้มักเกิดขึ้นเนื่องจากความบกพร่องในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ซึ่งอาจเป็นผลจากการทำงานที่มากหรือน้อยเกินไป หรือจากความผิดปกติของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำให้ไม่สามารถแยกแยะเซลล์ปกติของร่างกายออกจากสิ่งแปลกปลอม จนนำไปสู่โรคในที่สุด ดังนั้นยาหรือสารใดๆที่มีประสิทธิภาพในการปรับเปลี่ยนหรือควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้อยู่ในสภาวะที่เหมาะสมย่อมเป็นประโยชน์ในการดูแลสุขภาพ สารที่มีฤทธิ์ดังนี้จึงเรียกว่า สารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (immunomodulator)

สารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันนอกจากจะมีประโยชน์ใช้ในมนุษย์แล้ว ยังอาจมีประโยชน์ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ โดยใช้เป็นสารเสริมในอาหารสัตว์ เพื่อเสริมสร้างภูมิคุ้มกันของร่างกายให้สามารถต้านทานเชื้อโรคในสภาพการเลี้ยงที่แออัด สัตว์จึงสามารถเจริญเติบโตได้เต็มที่ ดังนั้นสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน จึงเป็นอีกความคาดหวังหนึ่งที่จะนำมาพัฒนาเป็นสารช่วยการเจริญเติบโต (growth promoter) ของสัตว์ แทนการใช้ยาปฏิชีวนะที่อาจก่อให้เกิดสารตกค้างในผลิตภัณฑ์ ซึ่งจะเป็้ผลกระทบต่อผู้บริโภค และในอนาคตองค์การการค้าโลก (WTO) และมาตรฐานอาหารระหว่างประเทศ (Codex) ได้กำหนดข้อตกลงให้ยกเลิกการใช้ยาปฏิชีวนะเพื่อเป็นสารช่วยการเจริญเติบโต ทำให้วงการปศุสัตว์ต้องเร่งหาสารช่วยการเจริญเติบโตอื่นๆที่ปลอดภัยมากกว่ามาทดแทน

พืชสมุนไพรก็เป็นอีกทางเลือกหนึ่ง เพราะจากการศึกษาวิจัยพบพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์เป็นสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันหลายชนิด เช่น

สันโศก (*Clausena excavata* Burn f.) ที่สกัดตามวิธีการแพทย์พื้นบ้าน มีผลกระตุ้น phagocytic activity และ splenocyte proliferation ในเซลล์เพาะเลี้ยง (Manosroi et al.,



2003) และมีผลเพิ่มการสร้างแอนติบอดี, ยับยั้งการอักเสบที่เกิดจากปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity ในสัตว์ทดลอง (Manosroi<sup>a</sup> et al., 2005)

สารสกัดคณมนาง (*Pouteria campodiana*) สามารถกระตุ้น phagocytic activity ของ peritoneal macrophage และยังสามารถกระตุ้น splenocyte proliferation ได้ (Manosroi<sup>b</sup> et al., 2005)

ดีปลี (*Piper longum*) มีฤทธิ์เพิ่ม macrophage migration inhibition และ phagocytic activity (Agarwal et al., 1994)

สารสกัดสมุนไพรขมิ้นชันที่ระดับ 0.05% และสารสกัดสมุนไพรบอระเพ็ดที่ระดับ 0.03% ในอาหารสัตว์ สามารถช่วยเพิ่มระดับการสร้างแอนติบอดีต่อการทำวัคซีนนิวคาสเซิลในลูกไก่ กระทั่ง (กิติมา จินดามงคล, 2548)

สารสกัดกระเพราแดงสกัดด้วยเอทานอลในปริมาณ 10 มก./วัน สามารถเพิ่มการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเชื้อไวรัส Tobacco mosaic virus ในไก่ไข่ม้วน Hisex (สรราชัย จันทะจร, 2548)

นอกจากนี้พบว่าโพลีแซคคาไรด์หลายชนิดมีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน ซึ่งปัจจุบันกำลังได้รับความสนใจในการพัฒนามาใช้ในทางการแพทย์ โดยเฉพาะโพลีแซคคาไรด์ ที่ได้จากพืช จะมีความปลอดภัยในการใช้มากกว่า โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากผนังเซลล์แบคทีเรีย หรือสารสังเคราะห์ที่พบวก่อให้เกิดผลข้างเคียงได้

จากการศึกษา โพลีแซคคาไรด์ ในพืช 35 ชนิด จาก 22 วงศ์ ที่แตกต่างกัน พบว่าสามารถเพิ่มการทำงานของ macrophage ได้ (Schepetkin and Quinn, 2006) เนื่องจากกลไกการทำงานของ macrophage สามารถเชื่อมโยง innate immunity ไปสู่ adaptive immunity ได้ จึงถือได้ว่าสารที่สามารถกระตุ้น macrophage มีความสำคัญมาก

ตัวอย่างพืชที่ให้ โพลีแซคคาไรด์ ที่มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันเช่น

ว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis*) สามารถเพิ่มการสร้าง nitric oxide, IL-1 $\beta$ , IL-6 และ TNF- $\alpha$  ใน macrophage cell line RAW 264.7 (Ramamoorthy et al., 1966)

ชะเอมเทศ (*Glycyrrhiza glabra*) เพิ่มการสร้าง nitric oxide, IL-1 และ กระตุ้น phagocytosis ใน murine peritoneal macrophage (Nose et al., 1998)

โกศกั๊กกรา (*Anacyclus pyrethrum*) และข่า (*Alpinia galanga*) มีฤทธิ์เพิ่ม splenocyte proliferation ในสัตว์ทดลอง (Bendjeddou et al., 2003)

ต้นตำรอง หรือเรียกอีกชื่อหนึ่งว่า พุงทะลาย มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Scaphium scaphigerum* เป็นพรรณไม้ที่พบได้มากในเขตภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทย โดยเฉพาะใน จังหวัดจันทบุรี ผลของต้นจัดเป็นสมุนไพรเย็นมี สรรพคุณ แก้เจ็บคอ แก้ร้อนในกระหายน้ำ มีการนำมาผลิตเป็นเครื่องดื่ม มีรายงานพบว่าสารสกัดน้ำจากผลมีสารโพลีแซคคาไรด์เป็น องค์ประกอบ นอกจากนี้ ยังพบว่ามีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในเซลล์เพาะเลี้ยง

ผลจากการศึกษา ในครั้งนี้ทำให้ได้ข้อมูลที่เป็นประโยชน์ ในการพัฒนาและ ประยุกต์ใช้สมุนไพรพุงทะลาย ทั้งในทางการแพทย์และการปศุสัตว์ต่อไปในอนาคต

## 1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน ร่างกายทั้งในส่วนของ innate และ adaptive immunity

## 1.3 สมมติฐานงานวิจัย

ผล *S. scaphigerum* มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกาย โดยมีผลกระตุ้นระบบ ภูมิคุ้มกันร่างกาย ทั้งในส่วนของ innate และ adaptive immunity

## 1.4 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

เป็นข้อมูลทางวิทยาศาสตร์เบื้องต้นเกี่ยวกับฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของผล *S. scaphigerum* ในสัตว์ทดลองที่สามารถนำไปใช้สนับสนุนให้เกิดการใช้สมุนไพรในการรักษา โรคและส่งเสริมสุขภาพ ตลอดจนพัฒนาไปสู่ยาหรือผลิตภัณฑ์บำรุงสุขภาพในอนาคต และช่วยใน การพัฒนาแนวทางการใช้สมุนไพรในการเลี้ยงสัตว์เพื่อเป็นสารช่วยการเจริญเติบโต อันนำไปสู่การ ทดแทนการใช้ยาปฏิชีวนะ

## บทที่ 2

### เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

#### 2.1 *Scaphium scaphigerum*

ตำรากรมมีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Scaphium scaphigerum* (G. Don) Guib and Planch เป็นพืชที่จัดอยู่ในวงศ์ Sterculiaceae สำหรับชื่อเรียกอื่นในท้องถิ่นเช่น ตำโรง, พุงทะลาย, ลำเภา, ท้ายเภา พืชชนิดนี้มีถิ่นกระจายตัวในประเทศเวียดนาม, จีน, มาเลเซีย, อินโดนีเซีย, และไทย (Yamada et al., 2000) สำหรับในประเทศไทยพบได้มากทางภาคตะวันออกเฉียงใต้ โดยเฉพาะที่จังหวัดจันทบุรี จะสามารถพบได้ทั่วไปในป่า ซึ่งเป็นไม้ป่ายืนต้นสูงใหญ่ ราว 30-40 เมตร ลำต้นกลมตรง เป็นไม้เนื้อแข็งปานกลาง มีกิ่งก้านเฉพาะเรือนยอด ออกดอกที่ปลายกิ่ง ติดผลทุก 1-3 ปี ในช่วงเดือน ธันวาคม-มกราคม ผลจะเริ่มแก่และร่วง ประมาณเดือน มีนาคม-เมษายน ต้นตำโรงให้ผลที่โดยทั่วไปนิยมเรียกว่า ผลพุงทะลาย ขั้วผลมีลักษณะเป็นแผ่นบางๆ แต่ออกคล้ายเรือลำเภา ที่นำพาผลพุงทะลายปลิวไปกำเนิดในที่ไกลๆ (นันทวัน บุญยะ ประภัสสร, 2548)

ลักษณะของผล *S. scaphigerum* (รูปที่ 1) เมื่อแห้ง จะมีผิวที่ยาวน สีน้ำตาลเข้ม มีลักษณะเป็นรูปรี ขนาดกว้างยาวประมาณ 2.5X1.5 ซม. มีเนื้อของผล (pericarb) หุ้มเมล็ดอยู่เป็นชั้นบางๆ ส่วนของเนื้อผลนี้ เมื่อนำไปแช่น้ำไว้ จะสามารถดูดซับน้ำและพองตัวขึ้นอย่างมากทำให้มีลักษณะคล้ายวุ้น อันเนื่องจากเนื้อของผล *S. scaphigerum* เป็นสารที่มีคุณสมบัติบางประการ คล้ายกับกัม(gum) และมีน้ำหนักโมเลกุลมาก โดยองค์ประกอบทางเคมีเป็น คาร์โบไฮเดรต 62%, โปรตีน 8.3%, ไขมัน 8.4% และความชื้น 7.8% (Pantipa et al., 2006) โพลีแซคคาไรด์เป็นส่วนประกอบหลักในคาร์โบไฮเดรตและ ได้มีการแยกบางส่วนของโพลีแซคคาไรด์ออกมา มีชื่อเรียกว่า Sterculia polysaccharide PP III (Chen et al., 1966) กัมที่ได้จากผล *S. scaphigerum* จะประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยว (monosaccharide) หลายชนิด ที่พบได้เป็นจำนวนมาก เช่น arabinose, galactose, rhamnose และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวที่พบเป็นจำนวนน้อยเช่น uronic acid, glucose และ xylose จากการวิเคราะห์โครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์พบพันธะต่างๆดังนี้ terminal L-Araf, 1-3 linked L-Araf, 1-4 link D- Galp, 1,2,4-linked D-Galp และ 1,2,3,4-linked Rhamp (Pantipa et al., 2006)

ในทางการแพทย์พื้นบ้านมีการอ้างถึงการใช้ผล *S. scaphigerum* เพื่อบรรเทาอาการเจ็บคอ, ร้อนใน กระจายน้ำ, บำรุงปอด, หน้าตาอักเสบ สำหรับการวิจัยทางด้านเภสัชวิทยาของ *S. scaphigerum* ยังมีปรากฏไม่มากนัก โดยพบว่าไม่มีฤทธิ์ต้านมะเร็ง (anti-tumor activity) (Ito et al., 1990) และ ไม่พบฤทธิ์ยับยั้งการจับกับตัวรับของ platelet-activating factor (Jantan et al., 1996) เรีวๆนี้ การศึกษาในเซลล์เพาะเลี้ยงได้พบฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกาย โดยสามารถเพิ่ม lymphocyte proliferation และการทำงานของ macrophage ในด้านการกลืนกินสิ่งแปลกปลอม (phagocytosis) ตลอดจนเพิ่มการสร้าง nitric oxide (Piyarat, 2005)



รูปที่ 1 ภาพผล *Scaphim scaphigerum*

ภาพบน เป็นผลของ *S. scaphigerum* ที่ยังคงติดอยู่กับขั้วผลซึ่งพัฒนามาจากกลีบเลี้ยง (calyx) ที่แผ่เป็นแผ่นกว้างออกเพื่อช่วยในการกระจายพันธุ์ ภาพล่างเป็นผลแห้งของ *S. scaphigerum* โดยมีชั้นของเนื้อผล (pericarb) หุ้มอยู่บางๆเห็นเป็นผิวหยาบๆ ซึ่งนำมาใช้ในการบริโภค

(รูปจาก <http://thaimedicinalplant.com/popup/Pungtalay.html> [2007, May 10])

## 2.2 ระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system)

ระบบภูมิคุ้มกันมีหน้าที่เพื่อปกป้องร่างกายจากแอนติเจนแปลกปลอมหรือจุลชีพที่ก่อโรคต่างๆ (รูปที่ 2) เช่น แบคทีเรีย, ไวรัส, เชื้อรา, ปรสิต ตลอดจนการป้องกันการเกิดขึ้นของเนื้องอกต่างๆ องค์ประกอบในการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จะประกอบไปด้วยอวัยวะน้ำเหลือง (lymphoid organ), เซลล์ภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ, องค์ประกอบที่อยู่ในของเหลว(soluble factor) และ recognition molecule ที่มีลักษณะเฉพาะ ทำให้ทำการตรวจจับและแยกแยะสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ได้ อวัยวะน้ำเหลืองแบ่งออกได้เป็นสองส่วนใหญ่ๆ คือ primary lymphoid organ กับ secondary lymphoid organ โดย primary lymphoid organ จะทำหน้าที่เป็นศูนย์กลางของระบบทำการสร้างและพัฒนาให้ lymphocyte เติบโตอย่างสมบูรณ์ อวัยวะน้ำเหลืองเหล่านี้ได้แก่ ไชกระดูก (bone marrow) และ ต่อมธัยมัส (thymus gland) สำหรับ secondary lymphoid organ เป็นอวัยวะน้ำเหลืองที่มี lymphocyte อยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก มีการกระจายอยู่ตามส่วนต่างๆ ของร่างกาย และเป็นตำแหน่งที่ lymphocyte จะได้รับการกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองต่อแอนติเจนจนพัฒนาไปสู่การตอบโต้ของระบบภูมิคุ้มกันในแบบที่เรียกว่า adaptive immune response อวัยวะน้ำเหลืองเหล่านี้ได้แก่ ม้าม, ต่อม้ำเหลือง (lymph nodes) และรวมถึงเนื้อเยื่อ น้ำเหลืองต่างๆ (lymphoid tissues) ที่มีบทบาทอย่างมากในการป้องกันการรุกรานเข้ามาทางผิวเยื่อเมือก (mucosal surface) ของจุฬารักษาโรค (Janway et al., 2005)

เซลล์ภูมิคุ้มกันที่กระจายอยู่ทั่วไปในร่างกาย ประกอบไปด้วยเซลล์ชนิดต่างๆ ดังนี้ macrophage, dendritic cell, granulocyte, natural killer cell (NK cell), B lymphocyte และ T lymphocyte ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดต่างก็มีบทบาทการทำงานในระบบภูมิคุ้มกันที่แตกต่างกัน เซลล์เหล่านี้บางชนิดตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมทั่วไปที่มีโครงสร้างที่เป็น pattern ที่ host cells ไม่มี เซลล์ภูมิคุ้มกันเหล่านี้ จัดอยู่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity กลุ่มเซลล์ดังกล่าวเช่น macrophage, dendritic cell, neutrophil เป็นต้น เซลล์บางกลุ่มมีความสามารถรับรู้และจดจำโครงสร้างอย่างจำเพาะเจาะจงและหลากหลายมากได้ ซึ่งเซลล์เหล่านี้มีบทบาทหลักในการพัฒนาภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity เซลล์เหล่านี้ได้แก่ lymphocyte นอกจากนี้เซลล์บางชนิดยังประกอบไปด้วยคุณลักษณะของทั้งสองกลุ่มดังเช่น NK cell ซึ่งตรวจจับสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยตัวรับแบบไม่จำเพาะ แต่สามารถมีกลไกตอบโต้ผ่านการทำงานของ adaptive immunity โดยอาศัยการตรวจจับความผิดปกติของเซลล์บนการแสดงออกของ major histocompatibility complex class I และยังสามารถฆ่าทำลายเซลล์ที่ผิดปกติเหล่านั้นด้วยกระบวนการที่เรียกว่า antibody dependent cell-mediated cytotoxicity (ADCC) กลุ่มเซลล์อีกกลุ่มที่มีความสำคัญในการ



เชื่อมโยง primary immune response ไปสู่ secondary immune response ที่มีความรุนแรงกว่า หรือกล่าวได้ว่าเชื่อมโยง innate immunity ไปสู่ adaptive immunity คือ เซลล์ในกลุ่มที่เรียกว่า antigen presenting cell (APC) ซึ่งได้แก่ macrophage และ dendritic cell

ความจำเพาะ (specificity) ของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีต่อแอนติเจนนั้นๆเกิดขึ้นได้จาก recognition molecule ที่ปรากฏอยู่บนผิวเซลล์ซึ่งมีหลายชนิด แตกต่างกันไปตามชนิดของเซลล์ภูมิคุ้มกัน ลักษณะของแอนติเจนนั้นอาจเป็นพวกโปรตีน หรือไม่ใช่โปรตีนก็ได้ ตัวอย่างของแอนติเจนที่ไม่ใช่โปรตีน เช่น โพลีแซคคาไรด์ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรียซึ่งตรวจจับได้ด้วย recognition molecule ในกลุ่มที่เรียกว่า Toll-like receptors (TLRs) เป็นต้น สำหรับแอนติเจนที่เป็นโปรตีนและตรวจจับด้วย B cell receptor (BCR) ของ B lymphocyte หรือ T cell receptor (TCR) ของ T lymphocyte จะมีความจำเพาะสูงกว่า

ร่างกายจะดำรงอยู่ในสุขภาพภาวะย่อมต้องมีระบบภูมิคุ้มกันที่สมบูรณ์และสมดุล ความผันแปรของระบบภูมิคุ้มกันไม่ว่าจะเป็นไปในด้านมากเกินไปหรือน้อยเกินไป สามารถก่อให้เกิดสภาวะความผิดปกติใน 3 รูปแบบหลัก คือ สภาวะภูมิคุ้มกันไวเกิน (hypersensitivity), สภาวะภูมิคุ้มกันตอบโต้ร่างกายตนเอง (autoimmune disease) และสภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง (immunodeficiency)

สภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง หรือการกีดการทำงานของภูมิคุ้มกันร่างกาย (immune suppression) อาจเกิดขึ้นได้จาก การติดเชื้อ, การเกิดมะเร็ง, ความเครียด, การผ่าตัด, ภาวะขาดสารอาหาร, การได้รับยาที่กีดการทำงานจากระบบภูมิคุ้มกัน ตัวอย่างเช่น dexamethasone, cyclosporine, cyclophosphamide (CP) เป็นต้น

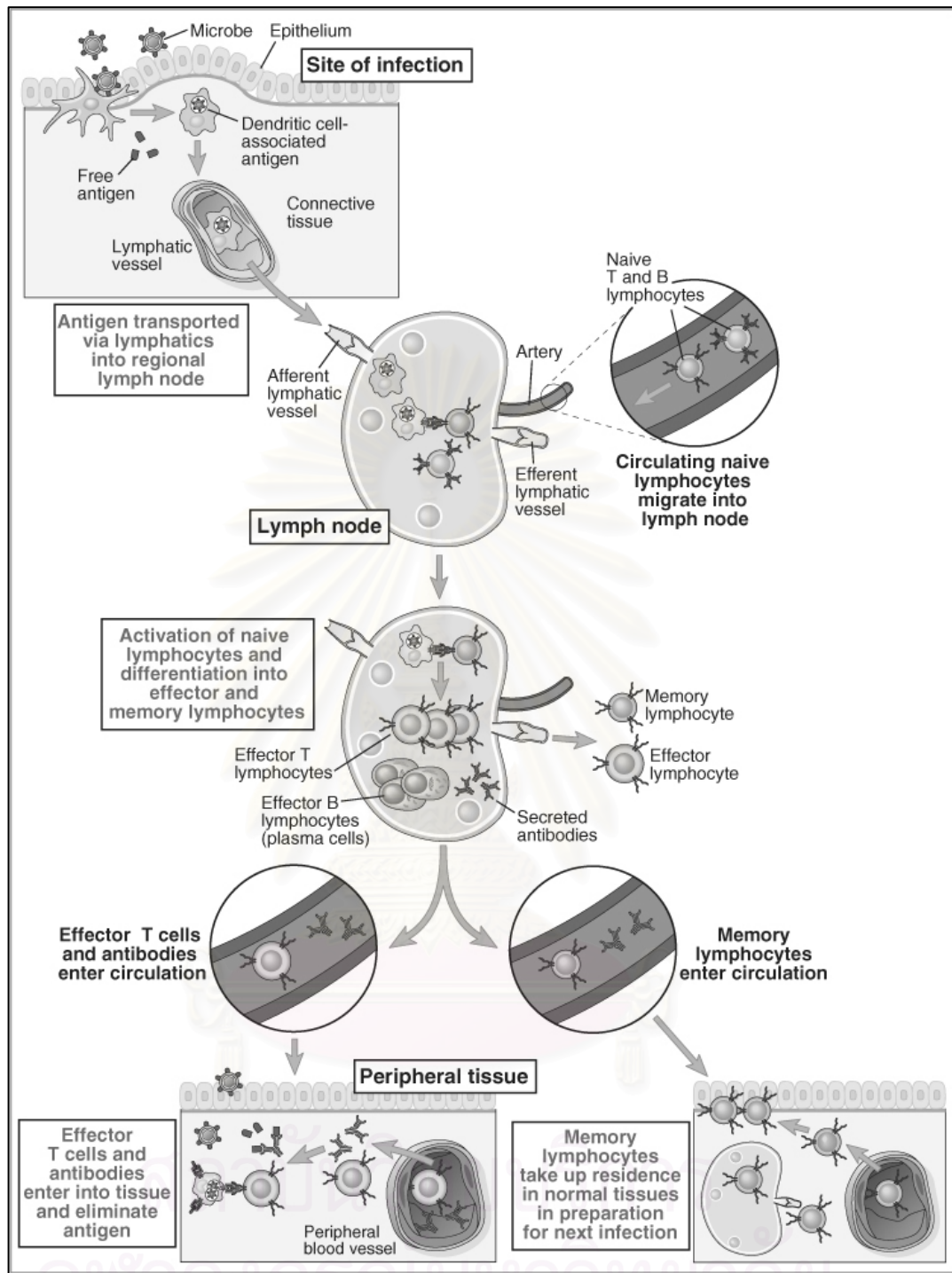
Dexamethasone เป็นยาที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบที่ดีและการใช้ในขนาดสูงทำให้มีผลกดภูมิคุ้มกันได้ โดยยาจะมีกลไกการออกฤทธิ์อย่างกว้างขวาง เช่น ยับยั้ง phospholipase C, cytokine, การ phagocytosis และการเคลื่อนที่ของ neutrophil ตลอดจน macrophage, มีผลลดปริมาณ T lymphocyte ในกระแสเลือด (Plumb, 2005)

Cyclophosphamide (CP) เป็นยากดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressant) ที่ถูกนำมาใช้เพื่อรักษามะเร็ง จัดอยู่ในกลุ่มของ alkylating agent โดยมีสารออกฤทธิ์เป็น เมตาบอไลต์ของตัวเองคือ phosphoramidate ซึ่งจะไปรบกวนขบวนการ DNA replication, RNA transcription, RNA replication ทำให้มีฤทธิ์ยับยั้งการสร้างเม็ดเลือดขาว หรือเซลล์ที่กำลังมีการแบ่งตัวเช่น เซลล์มะเร็ง และมีผลกดการสร้างแอนติบอดี (Plumb, 2005)

สารที่สามารถทำการปรับเปลี่ยนการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายได้ เรียกว่า สารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (immunomodulator) ตัวอย่างของ สารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน ได้แก่ interleukin-1 (IL-1), colony stimulating factors ที่เป็น cytokine หรือ bacillus calmette guerin (BCG), muramyl dipeptide ซึ่งมีโครงสร้างเป็นโพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากผนังเซลล์ของ แบคทีเรีย อย่างไรก็ตามการใช้สารเหล่านี้ยังมีข้อจำกัดที่ไม่สามารถให้โดยทางการกิน จึงต้องให้ยา โดยการฉีดที่มักพบว่าก่อให้เกิด granuloma และ สารเหล่านี้ยังมีราคาแพง การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน ร่างกายของโพลีแซคคาไรด์จากผนังเซลล์แบคทีเรียเกิดจากลักษณะ โครงสร้างที่มีน้ำตาลโมเลกุล เดี่ยวเรียงต่อซ้ำๆกันที่เรียกว่า repeating unit สามารถจับกับ recognition molecule ที่ปรากฏบน ผิวเซลล์ภูมิคุ้มกัน โพลีแซคคาไรด์จากพืชบางชนิดก็มีคุณลักษณะเช่นเดียวกับโพลีแซคคาไรด์จาก ผนังเซลล์แบคทีเรีย จึงมีการศึกษาวิจัยโพลีแซคคาไรด์จากพืชมากขึ้น (Mishra, 2004)

Levamisole เป็นสารสังเคราะห์อยู่ในรูปของ phenylimidazo-thiazole สามารถ ละลายน้ำได้ดีและเป็นยาที่ใช้แพร่หลายในงานปศุสัตว์เพื่อการถ่ายพยาธิตัวกลม และยังพบว่ามีฤทธิ์ เป็นสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันที่ใช้ในคนและสัตว์ด้วย (Tripoli et al., 1972) ทั้งยังสามารถเพิ่มการ ทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ในสภาวะที่ภูมิคุ้มกันร่างกายบกพร่อง มีการทดลองการใช้ในงานวิจัย ทางคลินิกในคนเพื่อเป็นยาร่วมรักษาในการรักษาโรคมะเร็ง เช่น การใช้ levamisole ร่วมกับ 5-fluorouracil ในการรักษา adenocarcinoma บริเวณลำไส้ใหญ่ภายหลังการผ่าตัด (Tall et al., 2001) จากการศึกษาฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันพบว่า levamisole สามารถกระตุ้น humoral และ cell-mediated immune responses (Kang et al., 2005) ตลอดจนกระตุ้น macrophage cell line ให้สร้าง IL-1 เพิ่มขึ้น (Kimball et al., 1991) โดยกลไกการออกฤทธิ์อาจเกิดจากการ เปลี่ยนแปลงระดับของ cyclic nucleotide ในเซลล์ซึ่งพบว่าเมื่อกระตุ้นเซลล์ให้เกิดการแบ่งตัวด้วย levamisole จะมีระดับของ cyclic GMP เพิ่มขึ้น และ cyclic AMP ลดลง (Hadden, 1997)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

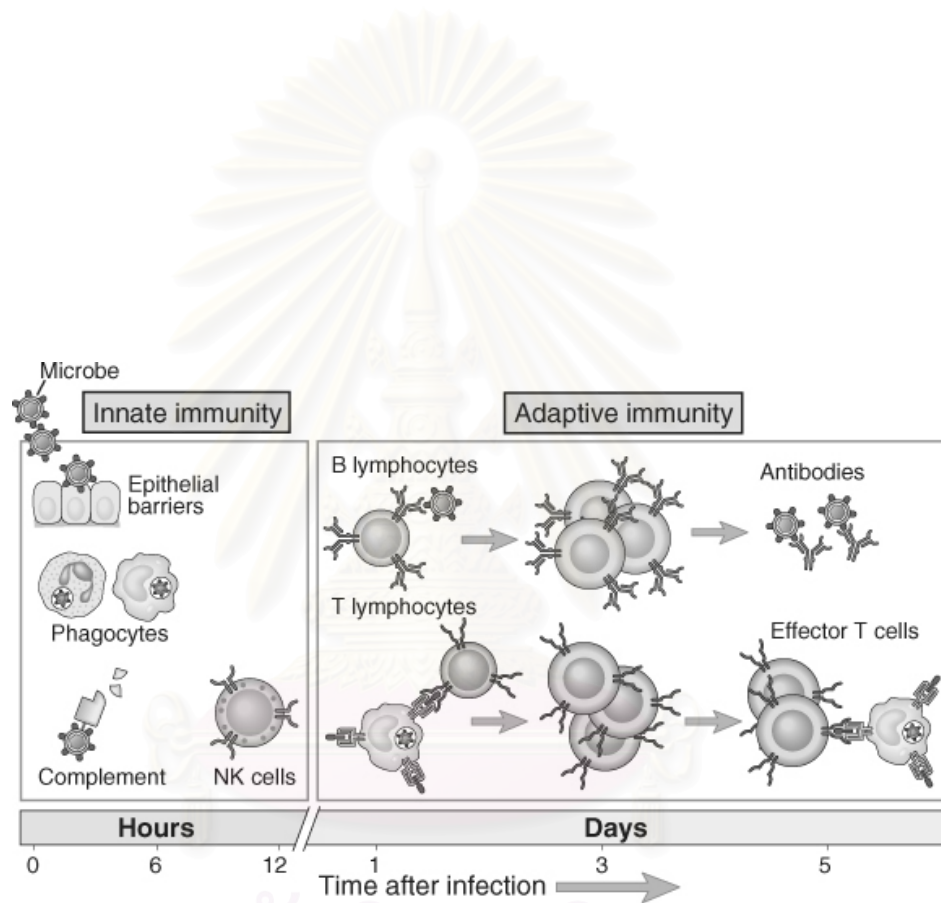


รูปที่ 2 การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกาย

แอนติเจนจะถูกตรวจจับได้โดย dendritic cell แล้วเคลื่อนเข้ามายังต่อมน้ำเหลือง เพื่อกระตุ้น naive lymphocyte ที่หมุนเวียนเข้ามาทางหลอดเลือด ทำให้ lymphocyte พัฒนาไปเป็น effector cell และ memory cell หลังจากนั้น effector lymphocyte และแอนติบอดีที่สร้างขึ้นจะออกสู่กระแสเลือดและกระจายไปยังเนื้อเยื่อต่างๆ ส่วน memory cell จะแฝงตัวอยู่ในอวัยวะน้ำเหลืองต่างๆ (Abbas and Lichtman, 2005)

### 2.3 การทำงานของภูมิคุ้มกัน (Immune function)

ระบบภูมิคุ้มกันสามารถแบ่งแยกออกเป็น 2 ลักษณะ คือ ภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity และ ภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity เซลล์ภูมิคุ้มกันที่มีบทบาทสำคัญใน innate immunity คือ phagocytic cell (macrophage, dendritic cell, neutrophil) สำหรับ adaptive immunity อาศัย lymphocyte ทำหน้าที่เป็นสำคัญ (รูปที่ 3)



รูปที่ 3 ภูมิคุ้มกันร่างกายแบบ innate และ adaptive immunity  
ร่างกายตอบโต้การรุกรานของเชื้อโรคด้วยกลไกการทำงานของ innate immunity เป็นอันดับแรก หลังจากนั้นภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity จะได้รับการพัฒนาขึ้นเมื่อ lymphocyte ได้รับการกระตุ้น ระยะเวลาในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ innate และ adaptive immunity จะขึ้นอยู่กับชนิดของการติดเชื้อและชนิดของสัตว์ (Abbas and Lichtman, 2005)

### 2.3.1 ระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity

Innate immunity กล่าวได้ว่าเป็นภูมิคุ้มกันด่านหน้าในการปกป้องเชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย เป็นภูมิคุ้มกันเบื้องต้นที่ร่างกายมีและสามารถทำงานได้ตั้งแต่กำเนิด ไม่ต้องถูกกระตุ้นด้วยแอนติเจนมาก่อน ไม่มีความจำที่จำเพาะต่อแอนติเจน ประกอบไปด้วยกลไกการทำงานในหลายด้าน ทั้งอาศัยคุณสมบัติทางกายภาพ เช่น ผิวหนัง, ชั้นเยื่อเมือก, ขนอ่อน (cilia) และคุณสมบัติทางสรีรภาพ เช่น อุณหภูมิของร่างกาย, การเคลื่อนตัวของลำไส้, ความเป็นกรดในกระเพาะอาหาร ตลอดจนเกี่ยวข้องกับ การทำงานของ phagocytic cell และกระบวนการอักเสบ ด้วยเซลล์ที่มีบทบาทในภูมิคุ้มกันชนิดนี้เช่น macrophage, neutrophil, monocyte, NK cell นอกจากนี้ ระบบการทำงานของ complement system ก็จัดอยู่ในภูมิคุ้มกันชนิดนี้เช่นกัน

เซลล์ต้นกำเนิดของ macrophage คือ myeloid progenitor เกิดขึ้นภายในไขกระดูก สามารถพบ macrophage ได้ในเนื้อเยื่อและอวัยวะต่างๆ ซึ่งจะมีลักษณะและชื่อเรียกต่างกันไป ตัวอย่างเช่น Kupffer cell ในตับ, microglia ในระบบประสาท, mesenchymal cell ในไต, osteoclast ในกระดูก, alveolar macrophage ในปอด, peritoneum macrophage ใน peritoneal cavity อีกทั้ง macrophage ที่อาศัยอยู่ในม้าม ต่อม้ำเหลือง และ Peyer's patches (Burlison et al., 1995) เซลล์ชนิดนี้มีหน้าที่การทำงานและผลิตสารต่างๆหลายชนิด เช่น chemokines, cytokines, enzymes, complement components, coagulation factors, extracellular matrix protein, growth factors, arachidonic acid metabolites, และ toxic radicals เซลล์ชนิดนี้ยังมีหน้าที่เป็น antigen presenting cell ซึ่งเป็นประโยชน์ในการพัฒนาภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity อีกด้วย (Rich et al., 2001)

การต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมของระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity อาศัยตัวรับ (receptor) หลายชนิดที่ไม่มีความจำเพาะเช่นในกรณีของ lymphocyte แต่อาศัยการรับรู้โครงสร้างลักษณะซ้ำๆของจุลชีพ (repeating unit) ที่มีความจำเป็นในการดำรงชีวิตของจุลชีพนั้น และตัวรับเหล่านี้ก็สามารถจับกับโพลีแซคคาไรด์จากพืชด้วย ตัวรับเหล่านี้เรียกโดยรวมว่าเป็น pattern recognition receptors

Pattern recognition receptors (PRRs) สามารถแบ่งออกได้ 3 กลุ่ม ตามตำแหน่งที่อยู่คือ 1). membrane-bound PRRs ซึ่งอยู่บนผิวเซลล์ เช่น กลุ่ม Toll-like receptors, mannose receptor เป็นต้น 2). cytoplasmic PRRs ซึ่งอยู่ภายในเซลล์ เช่น nucleotide-binding oligomerization domain (NOD), Toll-like receptors (TLRs) บางชนิดที่พบใน endosome เช่น



TLRs 3,7,8,9 เป็นต้น 3). secreted PRRs ซึ่งเป็นโปรตีนที่ถูกหลั่งออกจากเซลล์ เช่น mannan binding lectin เป็นต้น

สำหรับ PRRs ที่เกี่ยวข้องกับ การจับกับโพลีแซคคาไรด์จากพืชจะประกอบไปด้วยกลุ่ม membrane-bound PRRs และ secreted PRRs อันได้แก่ scavenger receptor (SR), complement type III receptor (CR3),  $\beta$  glucan receptor, mannose receptor (MR), mannan binding lectin, CD14 และ TLRs (Leung et al., 2006) SR เป็นตัวรับที่จับกับ ligands ได้หลายชนิดเช่นจับกับอนุภาคของ low density lipoprotein,  $\beta$  glucan และ fucoidan ที่เป็นองค์ประกอบของผนังเซลล์แบคทีเรีย ตลอดจนโพลีแซคคาไรด์จากพืช ดังนั้นทำให้ตัวรับชนิดนี้จะตรวจจับจุลชีพได้หลายชนิด ผลจากการจับกันนี้จะทำให้เกิดการ phagocytosis นอกจากนี้การกระตุ้น SR หรือ CR3 จะนำไปสู่การกระตุ้น phospholipase C (PLC) ทำให้เกิดการถ่ายทอดสัญญาณ (signalling cascade) ทาง MAP kinase pathway และ JAK/STAT pathway ส่งผลให้เกิดการคัดลอกยีน (gene transcription) ในที่สุด สำหรับการกระตุ้นตัวรับ MR จะทำให้ macrophage เกิด phagocytosis, oxidant production, และกระตุ้น nuclear factor  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) สำหรับการกระตุ้นตัวรับ TLRs จะเกิดการถ่ายทอดสัญญาณผ่านทาง myeloid differentiation 88 (MyD88) adaptor protein เพื่อกระตุ้น activator protein (AP-1) และ NF- $\kappa$ B ที่เป็น transcription factor การกระตุ้น transcription pathway ต่างๆดังกล่าวก่อให้เกิดการสร้าง proinflammatory cytokines และ nitric oxide synthase (Schepetkin and Quinn, 2006) สำหรับ CD14 เป็นตัวรับที่ทำงานร่วมกับ TLR4 หรือ CR3 (Abbas and Litchman, 2005) (รูปที่ 4)

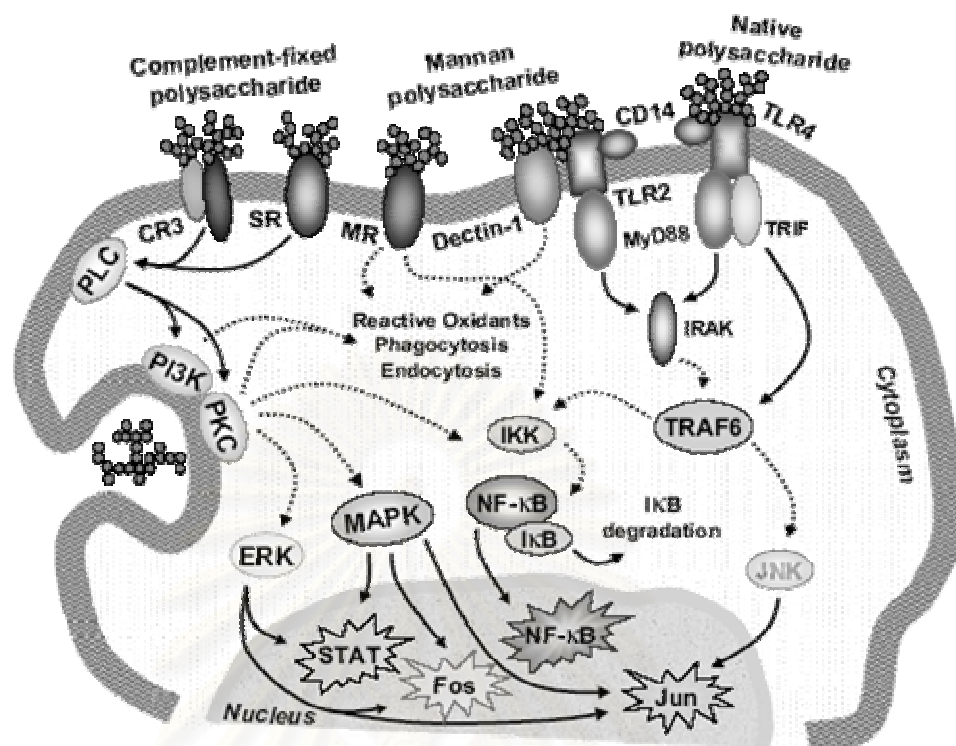
กลไกการทำลายสิ่งแปลกปลอมแบบใช้ออกซิเจน (oxygen-dependent killing) ของ macrophage อาศัย toxic radicals 2 ชนิดคือ reactive oxygen intermediated (ROIs) และ reactive nitrogen intermediated (RNIs) การสร้าง ROIs เกิดขึ้นโดยเอนไซม์ NADPH oxidase ซึ่งอยู่ที่เยื่อหุ้มเซลล์ถูกกระตุ้นให้ทำงานโดย cytokine ต่างๆเช่น interferon gamma (IFN- $\gamma$ ), tumor necrosis factor beta (TNF- $\beta$ ), TNF- $\alpha$  และ granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF) ทำให้มีการเปลี่ยนแปลงใน oxidative metabolism ของเซลล์อย่างมากซึ่งเรียกการเปลี่ยนแปลงนี้ว่า respiratory burst แล้วทำให้เกิด superoxide anion ซึ่งจะมีเอนไซม์ superoxide dismutase ทำหน้าที่เปลี่ยนต่อไปให้กลายเป็น hydrogen peroxide ตลอดจน metabolites อื่นๆอีกมาก สำหรับการสร้าง RNIs ใน macrophage จะอาศัยเอนไซม์ที่เรียกว่า nitric oxide synthase (NOS) ซึ่งจะมีอยู่ด้วยกัน 2 รูปแบบคือ constitutive NOS (cNOS) และ inducible NOS (iNOS) สำหรับ cNOS ในสภาวะปกติพบได้ในระดับต่ำๆ แต่ขณะที่ iNOS

พบได้ต่อเมื่อ macrophage ได้รับการกระตุ้นด้วย cytokine หรือสิ่งกระตุ้นอื่นๆ เช่น lipopolysaccharide (LPS) การทำงานของ iNOS ส่งผลให้เกิดการสร้าง nitric oxide เป็นจำนวนมากกว่า cNOS (Garcia and Stein, 2006) เอนไซม์ NOS ทำหน้าที่เปลี่ยน L-arginine ให้กลายเป็น nitric oxide และ L-citrulline nitric oxide เป็นสารอนุมูลอิสระที่อยู่ในรูปแก๊ส มีอายุสั้น เปลี่ยนเป็นสารอื่นๆต่อไปอย่างรวดเร็ว โดยจะมีรูปของผลผลิตสุดท้ายซึ่งมีความเสถียรมากคือ nitrite ( $\text{NO}_2^-$ ) and nitrate ( $\text{NO}_3^-$ ) (Smith et al., 2001)

cNOS ซึ่งทำการสร้าง nitric oxide ในปริมาณน้อยๆจะมีบทบาทสำคัญต่อสรีรการทำงานตามปกติของร่างกาย เช่น ทำหน้าที่เป็น second messengers ในการส่งสัญญาณของเซลล์, สารสื่อประสาท (neurotransmitter), ขยายหลอดเลือด, ปกป้องหัวใจและหลอดเลือด (Lamy and Deby-dupont, 2005) แต่การสร้าง iNOS เกิดจากmacrophage ที่ได้รับการกระตุ้นเพื่อการทำหน้าที่ทำลายเชื้อโรคหรือเซลล์มะเร็ง (Stuehr and Nathan, 1987) ดังนั้นการวัดผล การสร้าง nitric oxide ที่เกิดขึ้นจากการกระตุ้นmacrophageนี้ จะเป็นการบ่งชี้ให้เห็นถึงศักยภาพของเซลล์ macrophage นั้นๆ ในการทำลายจุลชีพ และสามารถเชื่อมโยงถึงกลไกการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันในแบบ innate immunity

การศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการทดลองในสัตว์ทดลอง โดยการแยกmacrophageออกมาจากสัตว์ทดลองที่ได้รับสารทดสอบแต่ละชนิดเป็นเวลา 10 วัน ซึ่งจะทำการเก็บแยก peritoneal macrophage จากสัตว์ทดลองแต่ละตัวออกมาประเมินความสามารถในการสร้างnitric oxide หลังถูกกระตุ้นด้วย LPS การทดลองจะเปรียบเทียบผลของการสร้างnitric oxide ในสัตว์ทดลองแต่ละกลุ่ม

สำหรับการวัดปริมาณ nitric oxide ทำการตรวจโดยวัดความเข้มข้นของ nitrite ด้วยวิธีการ Griess reaction assay โดยวิธีการนี้เป็นกระบวนการของปฏิกิริยา diazotization ที่เกิดขึ้นระหว่าง nitrite กับ sulfanilamide หรือ sulfanilic acid ในสถานะที่เป็นกรด และ N-(1-naphthyl)ethylenediamine dihydrochloride (NED) ผลจากปฏิกิริยานี้จะเกิด chromophogenic azo dye ที่มีค่าการดูดกลืนแสงสูงสุดอยู่ในช่วงระหว่าง 540-550 นาโนเมตร (Dietert et al., 1995)



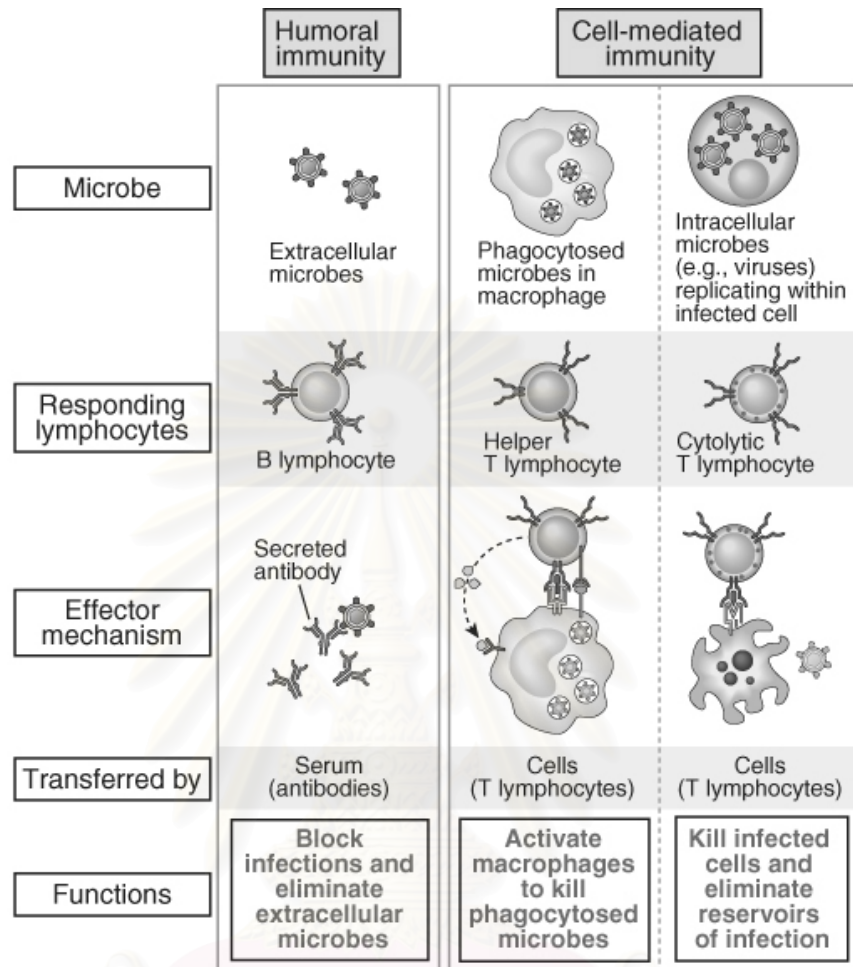
รูปที่ 4 ภาพแสดงตัวรับชนิดต่างๆของโพลีแซคคาไรด์ที่ปรากฏบนผิวเซลล์ macrophage

โพลีแซคคาไรด์จากพืชสามารถกระตุ้น macrophage ผ่านตัวรับชนิดต่างๆ เช่น complement receptor (CR3), mannose receptor (MR), scavenger receptor (SR), dectin-1 หรือ  $\beta$ -glucan receptor และ Toll-like receptor 4 (TLR4) ผลจากการกระตุ้นตัวรับจะทำให้เกิดการ phagocytosis หรือกระบวนการสื่อสารสัญญาณต่างๆภายในเซลล์ (signaling pathway) ดังแสดงในภาพ อักษรย่อ: phospholipase C (PLC), protein kinase C (PKC), phosphoinositide-3-kinase (PI3K), mitogen-activated protein kinase (MAPK), extracellular signal regulated kinase (ERK), nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B), IL-1R associated kinase (IRAK), myeloid differentiation protein 88 (MyD88), TNF receptor-associated factor 6 (TRAF-6), inducible nitric oxide synthase (iNOS), inhibitor of NF- $\kappa$ B (I $\kappa$ B), I $\kappa$ B kinase (IKK), Jun N-terminal kinase (JNK), signal transducers and activators of transcription (STAT) (Schepetkin and Quinn, 2006)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

### 2.3.2 ระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity

กลไกการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity มีความจำเพาะต่อแอนติเจน (antigen specificity) ที่มีลักษณะอันหลากหลาย และสามารถจดจำลักษณะของแอนติเจนนั้นๆ (memory) ได้ ความสามารถในการแยกแยะความแตกต่างระหว่างสิ่งที่เป็นแอนติเจนของร่างกายตนเองและไม่ใช่แอนติเจนของร่างกาย (self/non self antigen recognition) ได้อย่างจำเพาะเจาะจงนี้เกิดขึ้นโดยอาศัย recognition molecule และกระบวนการ antigen presentation ในกรณีที่ร่างกายได้รับแอนติเจนนั้นเป็นครั้งแรก จะเกิดปฏิกิริยาซึ่งเรียกว่า primary immune response การตอบสนองของภูมิคุ้มกันครั้งแรกนี้เป็นไปอย่างช้าๆ โดยเฉพาะในช่วงเวลาเริ่มต้น ก่อนที่แอนติบอดี หรือ การทำงานของ lymphocyte ที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนนั้นจะปรากฏให้ทำการวัดได้ในกระแสเลือด แอนติบอดีที่เกิดขึ้นในระยะเริ่มต้นนี้มักจะเป็น IgM เมื่อปฏิกิริยาการตอบโต้ในครั้งแรกสิ้นสุดลง lymphocyte ที่มีความจำเพาะกับแอนติเจนส่วนใหญ่ก็จะหมดอายุขัยและลดจำนวนลง คงเหลือแต่ เซลล์ที่เรียกว่า memory lymphocyte ที่ยังมีอายุยืนยาวอยู่ต่อไปในร่างกาย ซึ่งสามารถทำงานได้ทันทีเมื่อได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนเดิมในครั้งที่สอง กรณีที่ร่างกายได้รับการกระตุ้นจากแอนติเจนเดิมในครั้งที่สองนี้จะเกิดปฏิกิริยาเรียกว่า secondary immune response ซึ่งการตอบโต้ของภูมิคุ้มกันจะเกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและมีความรุนแรงกว่าเดิม ตัวอย่างของ secondary immune response ที่เห็นได้ชัดเจนเช่น การทำวัคซีน หรือการเกิดขึ้นของปฏิกิริยาภูมิแพ้ ระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity สามารถตอบสนองได้ในสองลักษณะ คือ humoral immune response และ cell-mediated immune response (รูปที่ 5. 6)



รูปที่ 5 ระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity

ภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity จะมี B lymphocyte ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดีเพื่อกำจัดเชื้อโรคที่อยู่ภายนอกเซลล์ สำหรับ

ภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immunity จะมี T lymphocyte ทำหน้าที่กระตุ้นการ phagocytosis ของ macrophage และกระตุ้น cytotoxic T lymphocyte เพื่อทำลายเซลล์เป้าหมายที่ติดเชื้อโดยตรง (Abbas and Lichtman, 2005)



### 2.3.2.1 Humoral immune response

Humoral immune response หมายถึงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นจากการทำงานของแอนติบอดีที่สร้างขึ้นโดย B lymphocyte แอนติบอดีนี้มีความสามารถรับรู้จำเพาะกับแอนติเจน, ทำลายความสามารถในการก่อโรคของเชื้อจุลชีพ, และยังสามารถทำงานร่วมกับ complement system ในการกำจัดเชื้อโรค

เซลล์ต้นกำเนิดของ B lymphocyte คือ pluripotent hematopoietic stem cell ในไขกระดูก และได้รับการพัฒนาจนสมบูรณ์ที่นี้ โดยขั้นตอนการเกิด gene rearrangement ของ B lymphocyte จะทำให้เกิด B lymphocyte receptor (BCR) ที่มีความหลากหลายเพียงพอต่อการตรวจจับแอนติเจนในทุกรูปแบบ lymphocyte หนึ่งตัวจะสามารถรับรู้จำเพาะกับแอนติเจนรูปแบบหนึ่ง และเมื่อ B lymphocyte นี้ได้รับการกระตุ้นผ่าน BCR ก็จะเกิดการแบ่งตัวแบบ mitosis ทำให้ได้เซลล์ที่มีความสามารถสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนชนิดเดียวกันเป็นจำนวนมาก เรียก กระบวนการนี้ว่า clonal expansion ซึ่งเกิดขึ้นที่ตำแหน่ง germinal center ของ peripheral lymphoid organ เมื่อแอนติเจนจับกับ BCR จะเกิดการ endocytosis แอนติเจนนั้นเข้าไป แล้วแอนติเจนที่เป็นโปรตีนจะถูกย่อยสลายให้กลายเป็น peptide ที่ถูกนำเสนอโดย MHC class II molecule ไปปรากฏบนผิวเซลล์ เมื่อ B lymphocyte ที่ได้รับการกระตุ้นเดินทางมาถึงบริเวณขอบของ lymphoid follicle ที่อยู่ใน secondary lymphoid organ ก็จะเกิดปฏิสัมพันธ์กับ T lymphocyte ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง antigenic peptide-MHC molecule complex บน B lymphocyte กับ TCR ที่มีความจำเพาะของแอนติเจนซึ่งสอดคล้องกัน พร้อมทั้งความร่วมมือของ costimulatory molecules เช่น B7, CD28 และ CD40 ทำให้ T lymphocyte หลั่ง cytokine ออกมาเพื่อกระตุ้น B lymphocyte ให้เกิดการ proliferation และ differentiation เพื่อพัฒนาไปเป็น plasma cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ (effector cell) ในการสร้างแอนติบอดี และบางส่วนจะได้รับการพัฒนาไปเป็น memory cell ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีอายุยืนยาวนาน หมุนเวียนอยู่ในต่อมน้ำเหลืองและม้าม เพื่อคอยตรวจหาการเข้ามาของแอนติเจนเดิมซ้ำอีก โดยการตอบสนองในครั้งที่สอง (secondary immune response) จะเกิดแอนติบอดีที่มีความจำเพาะยิ่งขึ้น ทั้งความรวดเร็วและรุนแรงกว่าเดิม (Abbas and Lichtman, 2005)

แอนติบอดีแบ่งออกได้ 5 isotypes ดังนี้ IgG, IgM, IgE, IgD และ IgA โดยพบว่า IgM มีโครงสร้างเป็น pentameric molecule สร้างขึ้นใน primary immune response ขณะที่ isotypes อื่นๆเป็น monomer โดย IgG มีค่าครึ่งชีวิตยาวนานที่สุดและพบได้มากใน secondary immune response แอนติบอดีแต่ละ isotypes มีหน้าที่ที่แตกต่างกันไป IgA มีบทบาทสำคัญใน

mucosal immunity, IgD และ IgM เป็นตัวรับแอนติเจน (BCR) ของ naïve B lymphocyte และ IgM ยังมีผลให้เกิดการกระตุ้นระบบ complement, IgE เกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยาภูมิแพ้แบบ immediate hypersensitivity และ การตอบสนองต่อ หนองพยาธิและปรสิต สำหรับ IgG มีผลต่อการเกิด opsonization, complement activation, antigen neutralization, ADCC (Abbas and Lichtman, 2005)

นอกจากนี้ปฏิกิริยาของแอนติบอดีต่อแอนติเจนสามารถนำมาใช้เป็นวิธีการทดสอบทางห้องปฏิบัติการ เช่น การเกิดการตกตะกอน (precipitation) กับแอนติเจนที่เป็นสารละลาย หรือ การเกาะกลุ่ม (agglutination) กับ แอนติเจนที่อยู่บนผิวของอนุภาค ซึ่งหากอนุภาคนั้นเป็นเม็ดเลือดแดงก็จะเรียกปฏิกิริยานี้ว่า Haemagglutination

Haemagglutination antibody test (HA test) เป็นวิธีการทดสอบทางซีรั่มวิทยาที่มีการใช้ในห้องปฏิบัติการทางการแพทย์ เช่น การหาหมู่เลือด, การตรวจวินิจฉัยโรค เป็นต้น ภายใต้สภาวะที่เหมาะสมของ อุณหภูมิ, pH และ ionic strength แอนติบอดีที่จำเพาะในซีรั่มกับเม็ดเลือดแดงจะเกิดปฏิกิริยาต่อกันด้วยพันธะ non-covalent โดยแอนติบอดีนี้อาจเป็นได้ทั้ง IgM และ IgG จากคุณสมบัติในการเป็นแอนติเจนที่ติดของเม็ดเลือดแดงแเกาะ จึงได้นำมาใช้ในการทดสอบหาความสามารถในการสร้างแอนติบอดีของสัตว์ทดลองในหลายๆงานวิจัยที่ผ่านมา (Puri et al., 1992; Mediratta et al., 2002; Bafna and Mishra, 2005) โดยสัตว์ทดลองจะได้รับการฉีดกระตุ้นด้วยเม็ดเลือดแดงแเกาะ หลังจากนั้นจึงทำการเก็บซีรั่มมาทดสอบในช่วงระยะเวลาที่เหมาะสม ซีรั่มจะได้รับการเจือจางตามวิธีทวีคูณและทำปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงแเกาะใน 96-well microplate (U-shaped well) ถ้าแอนติบอดีมีปริมาณที่เหมาะสมต่อการเกิดปฏิกิริยากับเม็ดเลือดแดงแเกาะก็จะเกิดโครงข่ายของเม็ดเลือดแดงที่เกาะกันเป็นกลุ่ม ตกลงที่เห็นเป็นลักษณะแผ่กระจายหากแอนติบอดีมีปริมาณไม่เพียงพอ เม็ดเลือดแดงแเกาะก็จะจมลงที่ก้นหลุมเห็นเป็นจุดกลมๆ

### 2.3.2.2 Cell-mediated immune response

ในอดีต นักภูมิคุ้มกันวิทยาเชื่อว่า การทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่มีความจำเพาะเกิดขึ้นในแบบ humoral immune response เท่านั้น เนื่องจากในขณะนั้นพบเพียงหลักฐานทางวิทยาศาสตร์ที่บ่งชี้ว่าภูมิคุ้มกันที่จำเพาะสามารถถ่ายทอดจากสัตว์ตัวหนึ่งไปสู่สัตว์อีกตัวได้โดยการให้ซีรั่มซึ่งประกอบไปด้วย แอนติบอดี แต่ในเวลาต่อมา Landsteiner และ Chase (1942) ได้แสดงให้เห็นถึงการถ่ายทอด ภาวะภูมิไวเกินแบบ delayed-type hypersensitivity โดยการให้เซลล์มิใช่การให้ซีรั่ม ดังนั้นการทดลองนี้ทำให้นักภูมิคุ้มกันวิทยาเกิดความเข้าใจถึงการมีอยู่ของภูมิคุ้มกันในแบบ cell-mediated immune response

Cell-mediated immune response เกิดจากการทำงานของ T lymphocyte ที่จำเพาะต่อแอนติเจน มีประโยชน์ในการป้องกัน การติดเชื้อ ไวรัส, เชื้อรา, แบคทีเรีย และเซลล์มะเร็ง การรับรู้แอนติเจนของ T lymphocyte มีความแตกต่างจาก B lymphocyte ซึ่งสามารถรับรู้ผ่าน BCR ได้โดยตรง แต่ในกรณีของ T lymphocyte แอนติเจนที่เป็นโปรตีนจะต้องได้รับการเปลี่ยนแปลงให้กลายเป็น peptide ที่เกาะอยู่บน MHC molecule เสียก่อน TCR บนผิว T lymphocyte จึงสามารถทำการรับรู้ได้ MHC molecule แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่ม คือ MHC class I กับ MHC class II โดย MHC class I พบได้ทั่วไปในเซลล์ทุกเซลล์ที่มีนิวเคลียส ส่วน MHC class II ปรากฏบนเซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น APC แม้ว่า T lymphocyte มีต้นกำเนิดมาจากไขกระดูกเช่นเดียวกับ B lymphocyte แต่ T lymphocyte จะต้องผ่านกระบวนการพัฒนาต่อจนสมบูรณ์ในต่อมธัยมัส กระบวนการดังกล่าวประกอบด้วยขั้นตอน proliferation, positive และ negative selection โดย immature T lymphocyte ที่ปรากฏ TCR บนผิวเซลล์จะคงอยู่และเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (proliferation) ส่วน immature T lymphocyte ที่ไม่มี TCR จะตายโดยเกิด apoptosis และเข้าสู่ขั้นตอน selection process ซึ่งเซลล์ที่สามารถจับกับ MHC molecule ของร่างกายตนเองจะได้รับคัดเลือกให้มีชีวิตรอด เรียกขั้นตอนนี้ว่า positive selection ต่อมาเซลล์ที่สามารถจับกับแอนติเจนของร่างกายตนเองอย่างแน่นหนา จะถูกกำจัดออกไปด้วยขั้นตอนที่เรียกว่า negative selection ดังนั้น T lymphocyte ที่มีพัฒนาการที่สมบูรณ์แล้ว (mature T lymphocyte) ผ่านออกจากต่อมธัยมัสเข้าสู่การทำงานในระบบภูมิคุ้มกัน จะสามารถรับรู้ลักษณะของ MHC molecule ที่ปรากฏบน APC ได้ แต่จะไม่มีปฏิกิริยาตอบโต้ต่อแอนติเจนของร่างกายตนเอง T lymphocyte ที่สมบูรณ์แล้วเหล่านี้กระจายอยู่ในระบบหมุนเวียนเลือดและรวมตัวกันอย่างหนาแน่นใน secondary lymphoid organ

ตัวรับบน T lymphocyte ที่ประกอบด้วย TCR และ CD3 อยู่ด้วยกัน และมีการทำงานร่วมกันในการตรวจจับแอนติเจน โมเลกุลทั้งสองชนิดนี้สามารถใช้เป็นเครื่องหมายบ่งชี้ T lymphocyte ได้ และนอกจากนี้ยังสามารถพบ ตัวรับร่วม (coreceptor) ที่มีความสำคัญในการแยกประเภทของ T lymphocyte อีก 2 ชนิด คือ CD4 และ CD8 จากผลของขั้นตอน selection process จะทำให้ได้ T lymphocyte ที่ปรากฏเฉพาะ CD4 หรือ CD8 อย่างใดอย่างหนึ่ง ดังนั้นเราสามารถจำแนก T lymphocyte ออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ จากตัวรับชนิดนี้ คือ CD4<sup>+</sup> T lymphocyte และ CD8<sup>+</sup> T lymphocyte

CD4<sup>+</sup> T lymphocyte เป็นเซลล์ที่สามารถหลั่ง cytokine หลากชนิดออกมาเพื่อควบคุมและกระตุ้นการทำงานของเซลล์ภูมิคุ้มกันอื่นๆ ให้มีการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่เหมาะสม

ด้วยเหตุนี้จึงเรียกเซลล์ชนิดนี้ว่าเป็น T helper cells (Th) Th cells แบ่งออกได้เป็น 2 กลุ่มย่อยคือ Th1 และ Th2 สำหรับ Th1 สามารถหลั่ง IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\beta$ , เพื่อกระตุ้นการทำงานของ cytotoxic T lymphocyte, macrophage นำไปสู่การส่งเสริมภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immunity สำหรับ Th2 จะหลั่ง IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 เพื่อกระตุ้น B lymphocyte ให้พัฒนาเป็น plasma cell ที่ทำหน้าที่สร้างแอนติบอดี, เพิ่มการสร้าง IgE , เพิ่มการตอบสนองของ eosinophil และยับยั้งการทำงานของ macrophage ผลจากการทำงานของ Th2 จะนำไปสู่การเพิ่มภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity ปัจจัยสำคัญปัจจัยหนึ่ง ที่มีผลต่อการพัฒนาของ Th cells ให้กลายเป็น Th cells ที่จำเพาะชนิดใดชนิดหนึ่งคือ ประเภทของแอนติเจนที่ถูกนำเสนอโดย MHC class II molecules

CD8<sup>+</sup> T lymphocyte เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการกำจัดเซลล์ร่างกายที่ติดเชื้อ และเซลล์เนื้อร้ายต่างๆ โดยจะต้องเข้าไปประชิดกับเซลล์เหล่านั้น เพื่อทำการหลั่งสาร granzyme และ perforin ทำให้เซลล์เหล่านั้นเกิด apoptosis ดังนั้นจึงมักเรียก CD8<sup>+</sup> T lymphocyte ว่า cytotoxic T lymphocyte (Tc) ทั้ง Th1 และ Tc ล้วนมีบทบาทสำคัญในการเกิด delayed-type hypersensitivity reaction (Miller et al., 1993)

ปฏิกิริยาภูมิไวเกินจำแนกได้เป็น 4 ประเภท คือ anaphylactic hypersensitivity (type I), cytolytic hypersensitivity (type II), immune complex hypersensitivity (type III), delayed-type hypersensitivity (type IV) โดยที่ type I-III เกิดจากการทำงานของแอนติบอดี ขณะที่ type IV เกิดจากการทำงานของ T lymphocyte และ macrophage ภูมิไวเกินแบบ delayed-type hypersensitivity (DTH) เกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับแอนติเจนที่มีความจำเพาะต่อการเกิดปฏิกิริยาซ้ำอีกครั้ง ทำให้เนื้อเยื่อที่ได้รับแอนติเจนนั้นเกิดการอักเสบ ที่มีลักษณะแข็งตึงเป็นพิเศษ (induration) ความรุนแรงของปฏิกิริยาจะปรากฏให้เห็นเด่นชัดที่สุดหลังจากที่ได้รับแอนติเจนเข้าไปแล้วเป็นเวลา 24-72 ชั่วโมง ระยะเวลาในการตอบสนองนี้จะขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์ โดยพบว่าหนู mice ใช้เวลาเฉลี่ย 24 ชั่วโมง, หนูตะเภาใช้เวลาเฉลี่ย 48 ชั่วโมง และคนจะใช้เวลาเฉลี่ย 72 ชั่วโมง (Black, 1999) เราสามารถอธิบายได้ว่าการปรากฏขึ้นของ DTH นั้น เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันในแบบ cell mediated response ได้ด้วยเหตุผลดังนี้ 1) เป็นปฏิกิริยาที่ต้องการ T lymphocyte ซึ่งสามารถทำการถ่ายทอดปฏิกิริยานี้ให้เกิดขึ้นโดยการให้ T lymphocyte ที่จำเพาะ 2) ในบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดปฏิกิริยาเช่นนี้จะพบเห็น T lymphocyte เข้ามาอยู่รวมกันเป็นจำนวนมาก ซึ่งแตกต่างจากการอักเสบในกรณีอื่นๆ 3) การให้แอนติเจนที่จำเพาะในสัตว์ทดลองที่ไม่มี

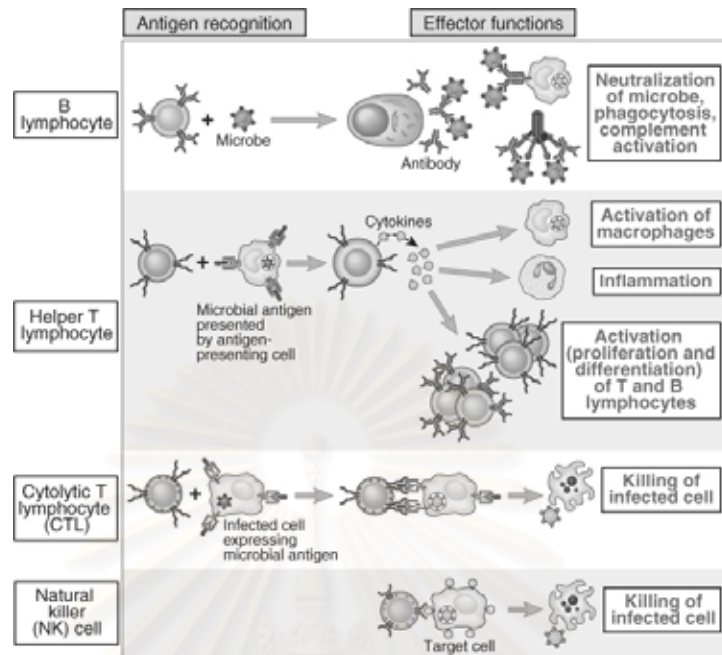


ต่อมัยมัส หรือต่อมัยมัสไม่ทำงานจะไม่สามารถก่อให้เกิด DTH 4) การให้ anti-lymphocyte serum สามารถระงับการเกิด DTH (Waksman, 1979)

การเกิดปฏิกิริยา DTH อาจแบ่งออกได้เป็น 2 ระยะ คือ sensitization และ elicitation ในระยะ sensitization คือช่วงเวลาที่ร่างกายได้รับแอนติเจนเป็นครั้งแรก ซึ่งแอนติเจนที่เป็นโปรตีนจะได้รับการเปลี่ยนแปลงให้เป็น peptide ที่ปรากฏบน MHC molecule ของ APC แล้วไปนำเสนอให้กับ naïve T lymphocyte สำหรับระยะ elicitation คือช่วงเวลาที่ได้รับแอนติเจนเดิมเป็นครั้งที่สองผ่านทางผิวหนังและ APC นำเสนอแอนติเจนไปยัง memory T lymphocyte เป็นผลให้ T lymphocyte นั้นหลั่ง cytokine เช่น IL-2 ไปกระตุ้นการทำงานของ APC ให้เพิ่มขึ้น และยังกระตุ้นให้ T lymphocyte เองเกิดการ proliferation และ clonal expansion หลังจากนั้นทั้ง T lymphocyte และ APC ต่างก็หลั่ง cytokines ออกมาเพื่อก่อให้เกิดการอักเสบในแบบจำเพาะ ความเสียหายของเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นในปฏิกิริยา DTH เป็นผลมาจากสารต่างๆ ที่หลั่งมาจาก APC และ macrophage ตัวอย่างเช่น hydrolytic enzyme, ROIs, NO, proinflammatory cytokine, chemokine, ตลอดจนทั้ง adhesion molecule จาก endothelial cells ที่ก่อให้เกิดการเคลื่อนเข้ามารวมตัวกันของเซลล์ภูมิคุ้มกันในบริเวณเนื้อเยื่อนั้น (Abbas and Lichtman, 2005)

การวัดปฏิกิริยา DTH เป็นวิธีการที่สามารถนำมาใช้ประเมินการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันในแบบ cell-mediated immune response ในสัตว์ทดลองได้ โดยการวัดปฏิกิริยานี้อาจทำได้ใน 2 ลักษณะคือ การทำ mouse ear swelling test (MEST) (Gad et al., 1986) และ footpad swelling test วิธี MEST เป็นการเหนี่ยวนำให้เกิดปฏิกิริยา DTH โดยการให้สัมผัสกับสารเคมีผ่านทางผิวหนัง สารเคมีที่ใช้ในกรณีนี้จะมีคุณสมบัติที่เป็น hapten เช่น dinitrochlorobenzene, picryl chloride ซึ่งเมื่อทาผ่านไปที่ผิวหนัง จะแทรกซึมเข้าไปรวมตัวกับโปรตีนทำให้กลายเป็นแอนติเจนที่มีความสามารถในการกระตุ้น T lymphocyte ปฏิกิริยา DTH ในแบบนี้เป็นสาเหตุของการเกิด allergic contact dermatitis ซึ่ง CD8<sup>+</sup> T lymphocyte มีบทบาทสำคัญในการก่อให้เกิดพยาธิสภาพที่เนื้อเยื่อ (Viraben et al., 1994) สำหรับวิธี footpad swelling test เป็นวิธีที่ได้ใช้กันอย่างแพร่หลาย แอนติเจนที่ใช้ในการทดสอบมีหลายชนิด เช่น bovine serum albumin, complete Freund's adjuvant (Henningsen et al., 1984) และ เม็ดเลือดแดงแกะซึ่งมีความเหมาะสมในการศึกษาวิจัยเกี่ยวกับสารที่มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน (Schrier, 1985) เพราะสามารถตรวจสอบผลการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ humoral immunity ไปพร้อมกัน





รูปที่ 6 หน้าทีของ lymphocyte ชนิดต่างๆ ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity

B lymphocyte จะตรวจจับแอนติเจนที่ละลายได้ (soluble antigen) และพัฒนาเป็น plasma cell สำหรับ Helper T lymphocyte จะตรวจจับแอนติเจนจากผิว antigen presenting cell แล้วจึงทำการหลั่ง cytokine ออกมาเพื่อกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในหลายๆ ส่วน และก่อให้เกิดการอักเสบ เมื่อ Cytolytic T lymphocyte ตรวจพบเซลล์ที่ติดเชื้อมันก็จะทำลายเซลล์เหล่านั้น เช่นเดียวกับ natural killer cell ที่สามารถตรวจหาเซลล์เป้าหมายที่ผิดปกติแล้วกำจัดออกไป (Abbas and Lichtman, 2005)

## 2.4 Immunosuppressive model

ปัจจุบันยังไม่มีกระบวนการทดลองที่กำหนดไว้อย่างเฉพาะเจาะจงเพื่อการพิสูจน์ฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของสมุนไพรในสัตว์ทดลอง พบว่ามีการศึกษาทั้งในสัตว์ทดลองที่มีระบบภูมิคุ้มกันเป็นปกติ และ สัตว์ทดลองที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน บางกรณีการทดสอบสมุนไพรในสัตว์ที่มีภูมิคุ้มกันปกติ ไม่แสดงฤทธิ์ของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่เมื่อทดลองในสัตว์ที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันกลับสามารถแสดงฤทธิ์ของการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน เช่น การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ Davis พบว่า *Withania somnifera* มีฤทธิ์ยับยั้งการเกิดปฏิกิริยา DTH ในหนูปกติ (Davis and Kuttan, 2000) ในขณะที่การทดลองในหนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน จะแสดงการเพิ่มขึ้นของปฏิกิริยา DTH (Bani et al., 2006) และเช่นเดียวกับในกรณีของการศึกษา *Chrysanthemum indicum* พบฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูปกติ พร้อมกับ มีฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันในแบบ humoral และ cell-mediated immune response ในหนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน (Chang et al., 2005) ดังนั้นเราอาจเห็นผลที่แน่ชัดของสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันได้จากการทดลองในหนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน (Patwardhan et al., 1990) อย่างไรก็ตาม สารที่สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้นในสภาวะที่ร่างกายปกติก็มีความสำคัญ แต่สารที่สามารถกระตุ้นหรือปกป้องภูมิคุ้มกันร่างกายในสภาวะที่ร่างกายมีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันจะมีความสำคัญยิ่งกว่า ในงานวิจัยนี้ได้มุ่งเน้นที่ทำการศึกษารูปร่างของผล *S. scaphigerum* ในหนูทดลองที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน โดยยาที่ใช้คือ cyclophosphamide

## บทที่ 3

### วิธีดำเนินการวิจัย

#### 3.1 วัสดุอุปกรณ์

##### 3.1.1 สัตว์ทดลอง

หนู mouse เพศเมีย พันธุ์ ICR อายุ 5-6 สัปดาห์, น้ำหนัก 25-35 กรัม จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล วิทยาเขตศาลายา จังหวัดนครปฐม สัตว์ทดลองได้รับการเลี้ยงดูตามวิธีมาตรฐาน โดยสถานที่เลี้ยงคูมีการควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง  $25 \pm 2^{\circ}$  เซลเซียส ช่วงเวลาได้รับแสง 12 ชั่วโมงต่อวัน มีอาหารตามมาตรฐานจากสำนักสัตว์ทดลองและน้ำสะอาดให้กินได้ตลอดเวลา สัตว์ทดลองจะได้รับการเลี้ยงดูเพื่อปรับตัวก่อนทำการทดลองเป็นเวลา 1 สัปดาห์

##### 3.1.2 ผลพวงทะลาย (*Scaphium scaphigerum* fruits)

สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทยได้ทำการตรวจพิสูจน์เอกลักษณ์เนื้อผลแห้ง (pericarb) ของ *S. scaphigerum* และได้มอบตัวอย่างนั้นไปเพื่อใช้ในการวิจัยครั้งนี้ โดยตลอดการวิจัยได้ใช้ผล *S. scaphigerum* จากชุดเดียวกันตลอด ตัวอย่างผล *S. scaphigerum* นี้เก็บรักษาในขวดที่บดแสง ป้องกันความชื้น ที่อุณหภูมิ  $4^{\circ}$  เซลเซียส

##### 3.1.3 สารเคมีและเซลล์

Dulbecco's modified eagle's medium (DMEM)(Sigma, USA), fetal bovine serum (Hyclone, USA), HEPES (Hyclone, USA), L-glutamine (Gibco, Germany), potassium chloride (Merck, Germany), potassium hydrogen phosphate (Merck, Germany), sodium chloride (Sigma, USA), disodium hydrogen phosphate monobasic (Merck, Germany), penicillin/streptomycin (Hyclone, USA), lipopolysaccharide (Sigma, USA), Trypan blue (Gibco, Germany), sheep red blood cells (SRBC) (faculty of veterinary medicine, Chulalongkorn university, Thailand), levamisole hydrochloride (TP drug, Thailand), Fluorothiocynate(FITC)-labeled CD3 anti-mouse monoclonal antibody (Becton Dickinson, USA), Phycoerytherin(PE) labeled CD4 anti-mouse monoclonal antibody(Becton Dickinson, USA), Phycoerytherin(PE) labeled CD8 anti-mouse monoclonal antibody(Becton Dickinson, USA) , FACS lysing solution (Becton Dickinson,

USA), cyclophosphamide (Baxter, Germany), FACS sheath fluid (Becton Dickinson, USA), ketamine hydrochloride (Parnell Laboratory, Austraria), xylazine hydrochloride (Farvet, Holland), normal saline solution (Takeda, Japan), nitric oxide assay kit (Promega, USA)

### 3.1.4 เครื่องมือและอุปกรณ์

Aluminium foils (diamond, USA), autoclave tape (3M, USA), autoclave (Hirayama, Japan), autopipette (Gilson, France), beakers (Pyrex, USA), biohazard lamina-flow hood (Science, Germany), cell harvester (Nunc, Denmark), centrifuge (Beckman GS-6R, Germany), disposable needle (Nipro, Japan), disposable syringe (Nipro, Japan), eppendorf (Corning, USA), ELISA microplate reader (Multiskan EX, Germany), flowcytometer (Becton Dickinson, USA), glass pipettes (Witeg, Germany), hemocytometer (Boeco, Germany), light microscope (Nikon, Japan), glass cover slips (Chance, England), 96 well microplate (Nunc, Denmark), pipette tip 200,1000 (Molecular Bio products, USA), 15 ml sterile centrifuge tube (Nunc, Denmark), sterile membrane filters (Whatman, Japan), vacuum pump, vortex mixer (Labnet, USA), dial thickness gauge (Ozazi, Japan)

## 3.2 วิธีการทดลอง

### 3.2.1 การเตรียมสารแขวนลอยจากผล *S. scaphigerum*

เนื้อผลแห้งของ *S. scaphigerum* ได้รับการเตรียมให้เป็นสารแขวนลอยในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ 0.9% (normal saline) แล้วทำการบดให้เนื้อผล *S. scaphigerum* กระจายตัวเป็นเนื้อเดียวกัน และเตรียมให้ได้ความเข้มข้นที่แตกต่างกัน 3 ความเข้มข้นคือ 5.85, 11.7, 23.4 มก./มล. เพื่อป้อนให้ได้ขนาด (dose) 19.5, 39, และ 78 มก./กก. ตามลำดับ ผล *S. scaphigerum* ที่ป้อนให้สัตว์ทดลองกินจะได้รับการเตรียมขึ้นใหม่ทุกๆครั้งในแต่ละวัน (สารแขวนลอยจากผล *S. scaphigerum* = SS)

### 3.2.2 การเตรียมเม็ดเลือดแดงแกะ

เลือดแกะที่ใช้ในการวิจัยได้รับจากภาควิชาสัตวบาล คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และมีอายุการเก็บไม่เกิน 3 สัปดาห์ โดยใช้เม็ดเลือดแดงแกะทั้งสำหรับการเป็น

แอนติเจนเพื่อกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกายและในวิธีการวิเคราะห์ตัวอย่าง โดยทั้งสองกรณีใช้ส่วนประกอบของเลือดที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดงเท่านั้น ดังนั้นเลือดจะต้องผ่านการแยกซีรัมและล้างเม็ดเลือดแดงก่อนตามวิธีดังนี้

1. ผสมเลือดแกะ 5 มล. กับ normal saline (NS) 5 มล. ที่ปราศจากเชื้อใน 15 ml sterile centrifuge tube แล้วทำการปั่นด้วยความเร็วรอบ 1400 รอบ/นาที ในอุณหภูมิ 4° เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที
2. ดูดของเหลวใสด้านบน (supernatant) ทิ้งไปแล้วทำการเติม NS ลงไปในหลอดอีกครั้งให้ได้ปริมาตร 10 มล.
3. ทำการล้างเม็ดเลือดแดงในลักษณะเช่นนี้ สามรอบ
4. คำนวณความหนาแน่นของเม็ดเลือดแดงโดยใช้ hemocytometer แล้วเตรียมเม็ดเลือดแดงให้ได้ตามความหนาแน่นที่ต้องการ

### 3.2.3 การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity

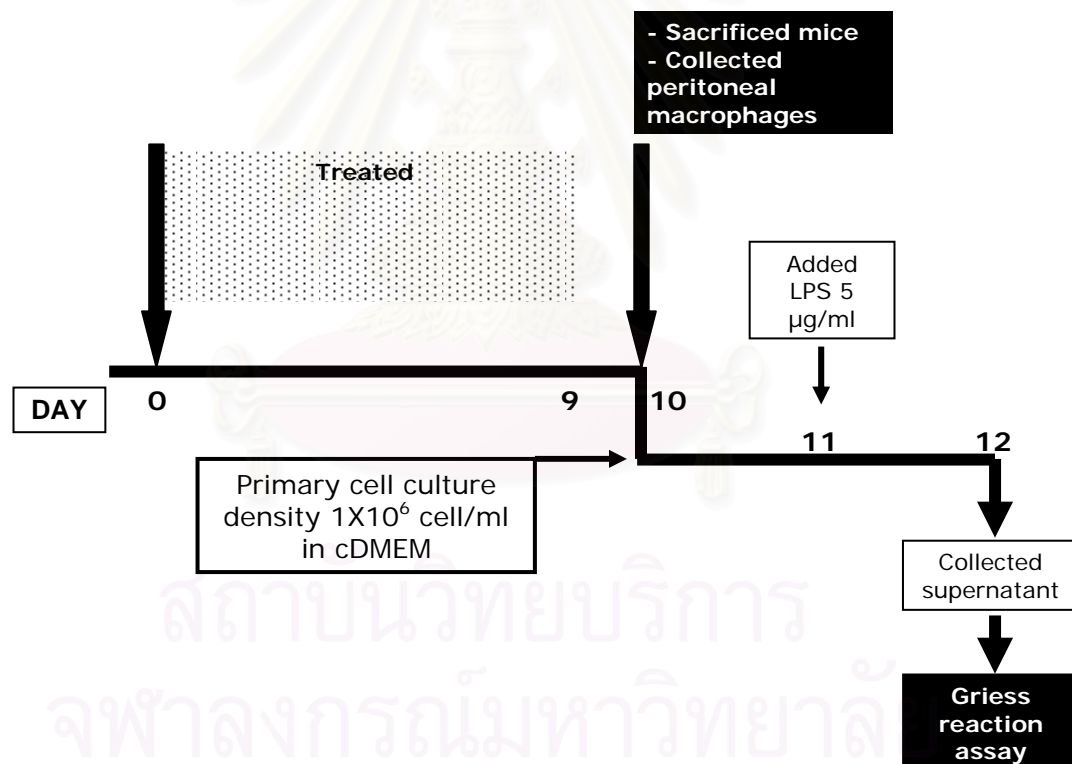
- ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อเซลล์ peritoneal macrophage ในการหลั่ง nitric oxide

1. เลือกหนูเข้ากลุ่มทดลองโดยวิธีการสุ่ม แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 7 ตัว ดังนี้
 

กลุ่ม 1 (Control)	ป้อน NS 0.1 มล./ 30 กรัม
กลุ่ม 2 (SS 1)	ป้อนสารแขวนลอยจากผล <i>S. scaphigerum</i> (SS) ในขนาด 19.5 มก./กก.
กลุ่ม 3 (SS 2)	ป้อน SS ในขนาด 39 มก./กก.
กลุ่ม 4 (SS 3)	ป้อน SS ในขนาด 78 มก./กก.
กลุ่ม 5 (Lev)	ป้อนยา levamisole 25 มก./กก.
2. วันที่ 0-9 ให้สารต่างๆที่ให้ทางการกินตามกลุ่มทุกวัน
3. วันที่ 10 ภายหลังจากการเคลื่อนกระดูกต้นคอหนูแล้ว ทำการเก็บ peritoneal macrophage
4. สอดเข็มฉีดยาเบอร์ 18 เข้าในแนวกลางตัว แล้วฉีดน้ำยา phosphate buffer saline (PBS) จำนวน 9 มล. เข้าในช่องท้อง จากนั้นจึงทำการเขย่าตัวหนู
5. เปิดผิวหนังบริเวณหน้าท้องเพื่อทำการคูดน้ำในช่องท้องออกมา (peritoneal lavage fluids) เก็บไว้ใน 15 ml sterile centrifuge tube แล้วจึงนำไปปั่นด้วยความเร็วรอบ 1000 รอบ/นาที ที่อุณหภูมิ 4° เซลเซียส เป็นเวลา 10 นาที



6. เท supernatant ที่ทิ้ง แล้วเซลล์ที่ตกตะกอนจะนำไปเตรียมให้มีความหนาแน่น  $1 \times 10^6$  เซลล์/มล. ใน complete DMEM media เซลล์ที่นำมาใช้ในการทดลองต้องมีอัตราความมีชีวิต(%viability) มากกว่าร้อยละ 90 โดยทำการตรวจสอบด้วยการย้อมสี trypan blue
7. นำเซลล์ดังกล่าว ปริมาณ 150 ไมโครลิตร ใส่ลงใน 96 well microplate แต่ละหลุม
8. หลังจากบ่มพักเซลล์ไว้ 24 ชั่วโมง เซลล์ที่ไม่สามารถเกาะติดกับ plate จะถูกขจัดออกไปโดยการดูดและล้างด้วย PBS 3 รอบ แล้วจึงเติม complete DMEM media ที่มี LPS หรือ ไม่มี LPS ในความเข้มข้น 5 ไมโครกรัม/มิลลิตร ทำการพักเซลล์ที่อุณหภูมิ  $37^{\circ}$  เซลเซียส, ความชื้น 97%, คาร์บอนไดออกไซด์ 5 % เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
9. เก็บ supernatant จากเซลล์ในแต่ละหลุม ปริมาณ 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate เพื่อวิเคราะห์หาปริมาณ nitrite ด้วยวิธี Griess reaction assay ต่อไป



### การวิเคราะห์หาปริมาณ nitrite ด้วยวิธี Griess reaction assay

การตรวจวิเคราะห์ทำได้ทำตามแบบของ Dietert et al. (1995) ดังนี้

1. เติมตัวอย่าง supernatant จากเซลล์เพาะเลี้ยงในแต่ละหลุม จำนวน 100 ไมโครลิตร ลงใน 96 well microplate.
2. เติมสารละลาย sulfanilamide จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในหลุมตัวอย่างแต่ละหลุม
3. พักไว้ในที่มืด ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
4. เติมสารละลาย NED จำนวน 20 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
5. พักไว้ในที่มืด ภายใต้อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 10 นาที
6. วัดค่าการดูดกลืนแสงของสารที่เกิดขึ้นโดยใช้เครื่อง microplate reader ตั้งค่าความยาวคลื่นที่ 550 นาโนเมตร
7. เปรียบเทียบและคำนวณหาความเข้มข้นของ nitrite ในตัวอย่าง โดยทำการเทียบกับกราฟของสาร nitrite มาตรฐาน (nitrite standard reference curve) กราฟดังกล่าว สร้างจากค่าการดูดกลืนแสงของสารมาตรฐาน โดยการเจือจางให้มีความเข้มข้นแตกต่างกัน 8 ระดับดังนี้ 100, 50, 25, 12.5, 6.25, 3.13, 1.56, และ 0 ไมโครโมลาร์

#### 3.2.4 การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity

- ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเป็นปกติ (immunocompetent mice)

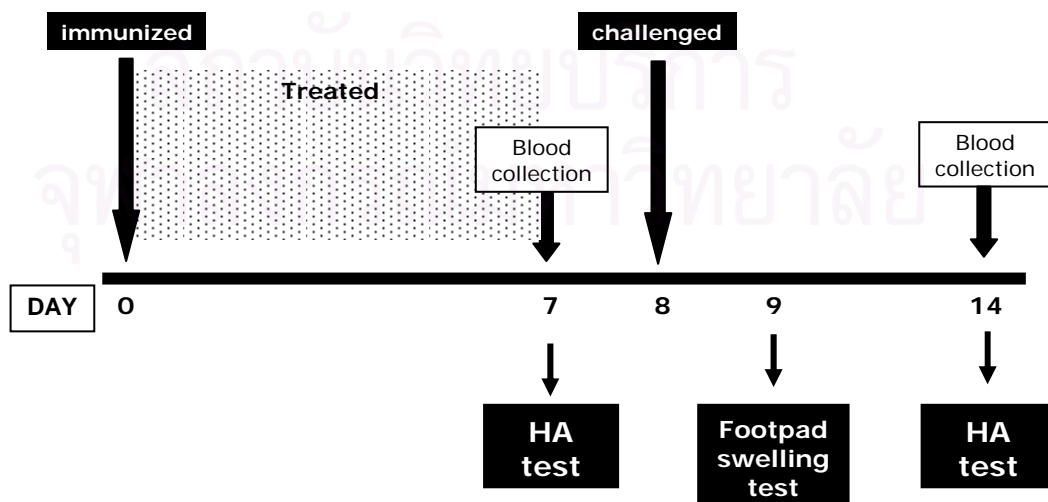
วิธีการทดลองพัฒนาจากแบบของ Manosroi<sup>a</sup> et al. (2005) ดังนี้

1. เลือกหนูเข้ากลุ่มทดลองโดยวิธีการสุ่ม แบ่งกลุ่มทดลอง เป็น 6 กลุ่มๆละ 7 ตัว และแต่ละกลุ่มได้รับการป้อนสารต่างๆดังนี้

กลุ่ม 1 (Control)	ป้อน NS 0.1 มล./ 30 ก.
กลุ่ม 2 (SS1)	ป้อน SS ในขนาด 19.5 มก./กก.
กลุ่ม 3 (SS2)	ป้อน SS ในขนาด 39 มก./กก.
กลุ่ม 4 (SS3)	ป้อน SS ในขนาด 78 มก./กก.
กลุ่ม 5 (Dex)	ป้อน dexamethasone ในขนาด 1 มก./กก.
กลุ่ม 6 (Cim)	ป้อน cimetidine ในขนาด 33 มก./กก.

2. วันที่ 0 เป็นวันเริ่มต้นการทดลอง หนูทุกกลุ่มทุกตัวได้รับการฉีดเม็ดเลือดแดงแก่จำนวน  $1 \times 10^8$  เซลล์ ในปริมาตร 0.2 มล. เข้าทางช่องท้อง
3. วันที่ 0-7 ทำการป้อนสารต่างๆตามกลุ่ม และในวันแรกทำการป้อนสารต่างๆภายหลังการฉีดเม็ดเลือดแดงแก่เป็นเวลา 2 ชั่วโมง
4. วันที่ 7 ทำการเก็บตัวอย่างเลือดจากหนูแต่ละตัว โดยการเจาะเลือดผ่านหลอดเลือดดำที่หาง นำเลือดที่ได้ไปปั่นแยกซีรัม เพื่อตรวจหาปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี haemagglutination antibody test
5. วันที่ 8 หลังจากที่ได้ทำการวัดความหนาของอุ้งเท้า (footpad thickness) ด้านซ้ายในหนูทุกตัวแล้ว จึงทำการฉีดเม็ดเลือดแดงแก่จำนวน  $1 \times 10^8$  เซลล์ ในปริมาตร 20 ไมโครลิตร เข้าอุ้งเท้าซ้าย การวัดความหนาของอุ้งเท้าจะใช้เครื่องมือ dial thickness meter ที่มีหน่วยการวัดเป็นมิลลิเมตร อ่านความละเอียดได้ที่ทศนิยม 2 ตำแหน่ง
6. ภายหลังจากการฉีดเม็ดเลือดแดงแก่เข้าอุ้งเท้า 24 ชั่วโมง จึงทำการวัดความหนาของอุ้งเท้าซ้ายอีกครั้ง ความหนาของอุ้งเท้าซ้ายที่แตกต่างกันระหว่างก่อนการฉีดและหลังฉีดเม็ดเลือดแดงแก่จะนำไปใช้คำนวณให้เป็นร้อยละของการอักเสบ (%Inflammation) ตามสมการด้านล่าง
$$\text{Inflammation (\%)} = \frac{[\text{FT after challenge} - \text{FT before challenge}]}{\text{FT before challenge}} \times 100$$

( FT = footpad thickness )
7. วันที่ 14 ทำการเจาะเลือดจากหางหนูอีกครั้ง เพื่อนำไปตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีที่มีต่อเม็ดเลือดแดงแก่ โดยวิธี haemagglutination test

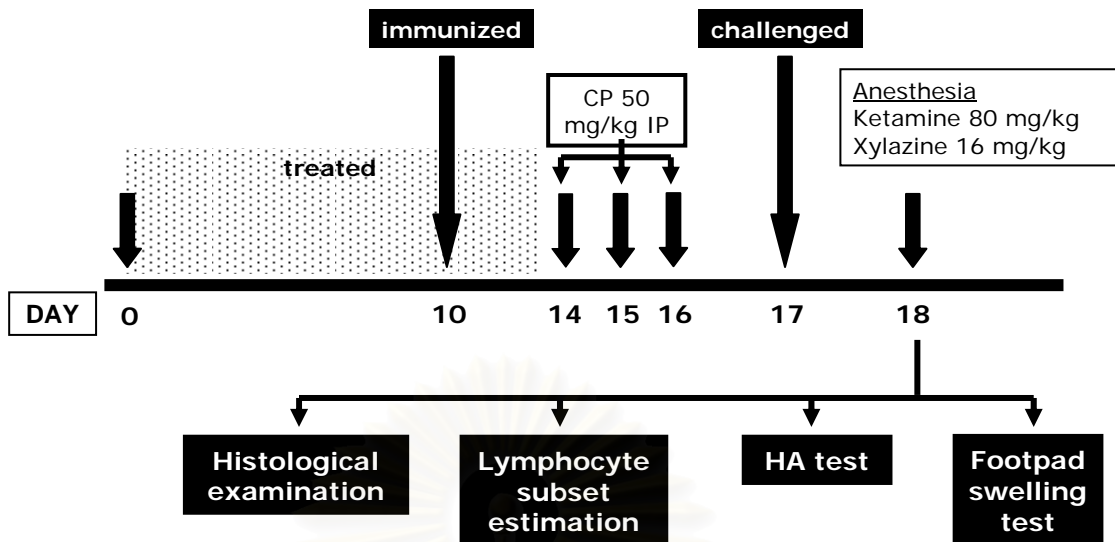


- ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกัน ( immunosuppressed mice ) ด้วยยา cyclophosphamide (CP)

วิธีการทดลองพัฒนาจากแบบของBafna and Mishra (2005) ดังนี้

1. เลือกหนูเข้ากลุ่มทดลองโดยวิธีการสุ่ม แบ่งกลุ่มทดลองเป็น 6 กลุ่มๆละ 7 ตัว และแต่ละกลุ่มจะได้รับการป้อน (PO)สารต่างๆ หรือฉีดสารเข้าช่องท้อง(IP) ดังนี้
 

กลุ่ม 1 (NS-control)	NS 0.1 มล./30 ก. (PO) and NS ( IP)
กลุ่ม 2 (CP-control)	NS ( PO) and CP ( IP)
กลุ่ม 3 (SS1)	SS. 19.5 มก./กก.(PO) and CP (IP)
กลุ่ม 4 (SS2)	SS. 39 มก./กก.(PO) and CP (IP)
กลุ่ม 5 (SS3)	SS. 78 มก./กก.(PO) and CP (IP)
กลุ่ม 6 (Lev)	levamisole 25 มก./กก.(PO) and CP (IP)
2. วันที่ 0 เป็นวันเริ่มต้นการทดลอง ทำการป้อนสารต่างๆตามกลุ่มทดลองตลอดตั้งแต่วันที่ 0-13
3. วันที่ 10 ทำการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะเข้าช่องท้อง จำนวน $1 \times 10^8$  เซลล์ /0.2 มล. ในหนูทุกตัว
4. วันที่ 14-16 หนูกลุ่ม 2-6 ได้รับการฉีด CP ขนาด 50 มก./กก./วัน เข้าทางช่องท้องต่อเนื่องกันเป็นเวลา 3 วัน สำหรับหนูกลุ่ม 1 จะได้รับการฉีด NS
5. วันที่ 17, หลังจากที่ได้ทำการวัดอุ้งเท้าซ้ายในหนูทุกตัว จึงทำการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะ จำนวน $1 \times 10^8$  เซลล์ /20 ไมโครลิตร เข้าชั้นใต้ผิวหนังของอุ้งเท้าซ้าย แล้วจึงพักหนูไว้เป็นเวลา 24 ชั่วโมง
6. วันที่ 18, วางยาสลบหนูทุกตัวด้วยยา ketamine hydrochloride ในขนาด 80 มก./ กก. ร่วมกับ xylazine hydrochloride ในขนาด 16 มก./ กก. จากนั้นจึงทำการวัดความหนาของอุ้งเท้าซ้าย, เก็บตัวอย่างเลือด เพื่อนำไปวิเคราะห์หาปริมาณแอนติบอดี และศึกษาทางโลหิตวิทยาโดยนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและแยกชนิดของlymphocytes, เก็บม้ามเพื่อนำไปศึกษาทางจุลพยาธิวิทยา



### การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและ lymphocyte

วิธีการวิเคราะห์ตามแบบของ Jackson and Warner (1986) ดังนี้

1. เก็บตัวอย่างเลือดไว้ในขวดเก็บเลือดที่มีสารป้องกันเลือดแข็งตัว ( $K_3$  EDTA) และอยู่ในอุณหภูมิ 20-25° เซลเซียส
2. ตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาว (leukocyte count) โดยใช้เครื่องอัตโนมัติ Coulter Act Diff ®
3. สำหรับการนับแยก T lymphocyte ชนิด CD4 และ CD8 จะกระทำโดยใช้เครื่อง FACScan ® โดยใส่ตัวอย่างเลือดจำนวน 100 ไมโครลิตรลงในแต่ละหลอด จำนวน 3 หลอด
4. หลอดที่หนึ่ง เติม FITC labeled CD3 anti-mouse monoclonal antibody และ PE labeled CD4 anti-mouse monoclonal antibody ปริมาณอย่างละ 10 ไมโครลิตร, หลอดที่สองเติม FITC labeled CD3 anti-mouse monoclonal antibody และ PE labeled CD8 anti-mouse monoclonal antibody ปริมาณอย่างละ 10 ไมโครลิตร สำหรับหลอดสุดท้ายเป็นหลอด internal control
5. เขย่าหลอดเบาๆให้เข้ากัน แล้วพักไว้ในที่มืด ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 30 นาที จากนั้นจึงเติม 1XFACS lysing solution ปริมาณ 2 มล. แล้วเขย่าเบาๆให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้อีก 10 นาที



6. นำหลอดปั่นด้วยความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 5 นาที แล้วจึงดูด supernatant ทิ้งไปให้เหลือเฉพาะเซลล์ที่ตกตะกอน ทำการล้างเซลล์ด้วย FACS sheath fluid
7. เติม 1% paraformaldehyde ปริมาณ 500 ไมโครลิตรลงในหลอด แล้วจึงเขย่าเบาๆ ให้เข้ากัน
8. นำหลอดตัวอย่างเข้าเครื่อง FACScan® และทำการประมวลผลด้วยโปรแกรม Cell Quest
9. นำข้อมูลที่ได้มาคำนวณหาค่าสัมบูรณ์ของจำนวน lymphocyte ชนิดต่างๆ ดังสมการต่อไปนี้
 
$$\text{Absolute lymphocyte (Alymp.)} = \text{leukocyte count} \times \% \text{ lymphocyte}$$

$$\text{Absolute T lymphocyte} = \text{Alymp.} \times \% \text{CD3+ Cell}$$

$$\text{Absolute CD4+ T lymphocyte} = \text{Alymp.} \times \% \text{CD3+CD4+ Cell}$$

$$\text{Absolute CD8+ T lymphocyte} = \text{Alymp.} \times \% \text{CD3+CD8+ Cell}$$

#### การตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีโดยวิธี haemagglutination antibody test

1. นำตัวอย่างเลือดที่แข็งตัวไปปั่นแยกซีรัมออก อุ่นซีรัมที่ได้ใน water bath ที่อุณหภูมิ 56° เซลเซียส เป็นเวลา 30 นาที
2. เติม NS ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงในหลุมแต่ละหลุมของ 96-wells U bottom plate
3. ปิเปิดตัวอย่างซีรัม 25 ไมโครลิตร แล้วทำการเจือจางแบบทวีคูณต่อไป
4. เติมเม็ดเลือดแดงแกะ 1 % ปริมาณ 25 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม
5. ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จึงทำการอ่านผล โดยให้ค่าหลุมสุดท้ายของการเจือจางซีรัมแบบทวีคูณที่ปรากฏปฏิกิริยาการเกาะกลุ่มของเม็ดเลือดแดงเป็นค่าแอนติบอดี ไตเตอร์

#### การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของม้าม (histological examination)

1. ตัดแยกม้ามออกจากร่างกายหนู ทำการชั่งน้ำหนัก แล้วเก็บรักษาม้ามใน 10 % formalin
2. ตัวอย่างชิ้นเนื้อจะถูกทำให้แห้ง (dehydrate) ก่อนทำการตรึง (embed) ด้วยพาราฟิน
3. ตัดชิ้นเนื้อให้มีความหนาประมาณ 3 ไมโครเมตร แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin-Eosin แล้วเตรียมเป็นสไลด์

4. สไลด์ที่ได้นำไปส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์เพื่อศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิสภาพของม้ามในแต่ละกลุ่ม

### 3.2.5 การรวบรวมข้อมูลและวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

รายงานผลการทดลองเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ค่าทางสถิติโดยใช้วิธีการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว(one-way analysis of variances; ANOVA) และเปรียบเทียบความแตกต่างของกลุ่มต่างๆโดย Least Significant Difference (LSD) multiple comparison test ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติ  $p < 0.05$  หรือ  $p < 0.01$  โดยอาศัยโปรแกรม SPSS



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## บทที่ 4

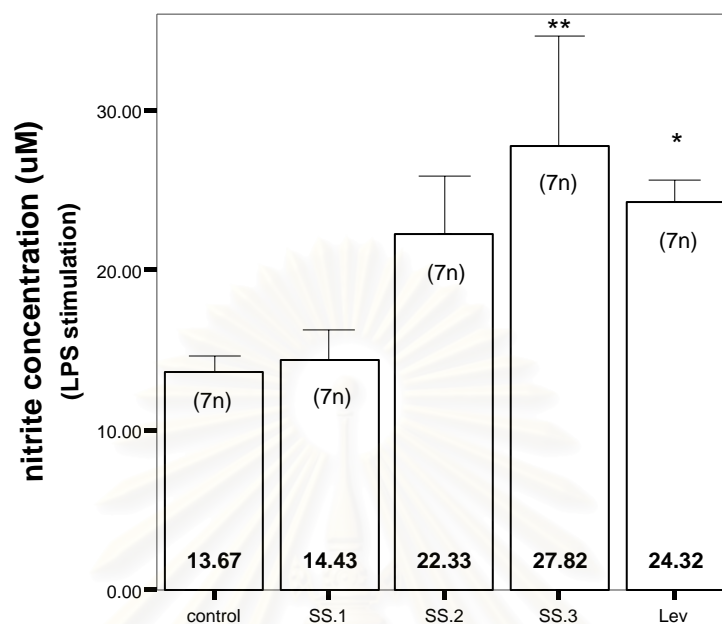
### ผลการทดลอง

#### 4.1 การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity

- ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อความสามารถในการหลั่ง nitric oxide จากเซลล์ peritoneal macrophage

เซลล์ peritoneal macrophage ซึ่งได้เก็บออกมาจากหนู วัดความเข้มข้นของ nitrite ใน supernatant จากเซลล์เพาะเลี้ยงโดยวิธี Griess reaction assay ได้ผลดังนี้

พบว่าหนูกลุ่ม control มีค่าเฉลี่ยความเข้มข้นของ nitrite เท่ากับ  $13.67 \pm 0.92$  ไมโครโมลาร์ ซึ่งต่ำกว่าที่ปรากฏในหนูกลุ่มอื่นๆ สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* จะมีความเข้มข้นของ nitrite เพิ่มขึ้นสัมพันธ์กับขนาดที่เพิ่มขึ้นของผล *S. scaphigerum* ดังนี้ กลุ่ม SS1 เท่ากับ  $14.43 \pm 0.89$ , กลุ่ม SS2 เท่ากับ  $22.33 \pm 3.53$ , และกลุ่ม SS3 เท่ากับ  $27.82 \pm 6.91$  ไมโครโมลาร์ โดยกลุ่ม SS3 ซึ่งได้รับผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดมีค่าเฉลี่ยของระดับความเข้มข้นของ nitrite ที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control สำหรับหนูที่ได้รับ levamisole ในขนาด 25 มก./กก. หรือกลุ่ม Lev จะมีความเข้มข้นของ nitrite เท่ากับ  $24.32 \pm 1.35$  ไมโครโมลาร์ ซึ่งมากกว่าในกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (รูปที่ 7)



**รูปที่ 7**ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อความสามารถในการหลั่ง nitric oxide จากเซลล์ peritoneal macrophage ทำการวัดความเข้มข้นของ nitrite ด้วยวิธี Griess reaction assay แท่งกราฟเป็นค่าเฉลี่ยของ nitrite มีหน่วยเป็น ไมโครโมลาร์  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่าง = 7 เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่  $p < 0.05$  และ \*\* ที่  $p < 0.01$

Control = กลุ่มควบคุม, SS1 = *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = *S. scaphigerum* (39 มก./กก.),

SS3 = *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = levamisole(25 มก./กก.)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## 4.2 การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity

### 4.2.1 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่มีการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันเป็นปกติ ( immunocompetent mice )

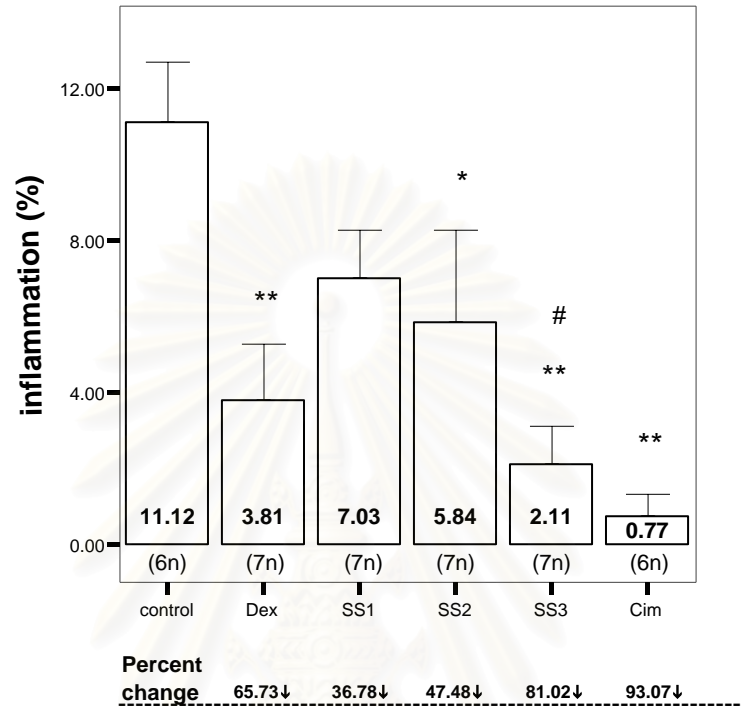
ในการศึกษาเบื้องต้น เพื่อให้ทราบถึงฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันในสัตว์ทดลอง จึงได้ทำการทดสอบฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อความสามารถในการสร้างแอนติบอดีและ ปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity ที่เหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นด้วยเม็ดเลือดแดงแกะในหนูปกติ หนูทดลองในแต่ละกลุ่มจะมี 7 ตัว ยกเว้นในกลุ่ม control และกลุ่ม cimetidine จะมีเพียง 6 เนื่องจากหนูในกลุ่มดังกล่าวตายเพราะความผิดพลาดของการทำหัตถการ

- การทดสอบด้วยปฏิกิริยาแบบ delayed-type hypersensitivity (DTH)

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่ม control มีการบวมของอุ้งเท้าซึ่งแสดงเป็นค่าเฉลี่ยของ %inflammation สูงสุดเท่ากับ  $11.12 \pm 1.60$  ขณะที่หนูกลุ่มที่ได้รับผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่างๆคือ SS1, SS2, SS3 ต่างก็แสดง %inflammation ต่ำกว่ากลุ่ม control โดยแปรผกผันกับขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่เพิ่มขึ้นดังนี้ กลุ่ม SS1= $7.03\% \pm 1.25$ , กลุ่ม SS2= $5.84\% \pm 2.43$ , กลุ่ม SS3= $2.11\% \pm 1.02$  สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับยา dexamethasone และ cimetidine จะมีค่า %inflammation ค่อนข้างต่ำ โดยกลุ่ม Dex เท่ากับ  $3.81 \pm 1.49$  และกลุ่ม Cim เท่ากับ  $0.77 \pm 0.54$  หนูกลุ่ม Dex, Cim, และ SS3 มีค่า %inflammation ต่ำกว่ากลุ่ม control อย่างเด่นชัดและมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p$  น้อยกว่า 0.01 แต่การพิจารณาเปรียบเทียบภายใน 3 กลุ่มดังกล่าวพบว่ามิได้มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับหนูที่ได้รับผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่ำที่สุด (SS1) ไม่พบความแตกต่างทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control การเปรียบเทียบระหว่างกลุ่ม SS1 กับ SS3 พบว่ามีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p$  น้อยกว่า 0.05 (รูปที่ 8)

ทั้งผล *S. scaphigerum*, Dex และ Cim ต่างมีฤทธิ์ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้โดยทำให้เกิดเปอร์เซ็นต์การยับยั้งหรือเปอร์เซ็นต์การเปลี่ยนแปลง (Percent change) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมตามลำดับดังต่อไปนี้ผล *S. scaphigerum* ในขนาด 19.5 มก./กก. (SS1) เท่ากับ 36.78%, ผล *S. scaphigerum* ในขนาด 39 มก./กก. (SS2) เท่ากับ 47.48%, ผล *S. scaphigerum* ในขนาด 78 มก./กก. (SS3) เท่ากับ 81.02%, dexamethasone ในขนาด 1 มก./กก. เท่ากับ 65.73% และ cimetidine ในขนาด 33 มก./กก. เท่ากับ 93.07%





**รูปที่ 8**ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity (DTH) ในหนูปกติ

การทดสอบปฏิกิริยา DTH ใช้รูปแบบ footpad swelling test แท่งกราฟแสดงกลุ่มของหนู, ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย ได้แท่งกราฟแสดงจำนวนตัวอย่างในแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่  $p < 0.05$  และ \*\* ที่  $p < 0.01$  เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 ที่  $p < 0.05$  สำหรับการเปรียบเทียบร้อยละของความแตกต่างระหว่างกลุ่มต่างๆกับกลุ่ม control (percent change) รายงานไว้ด้านล่างของรูป

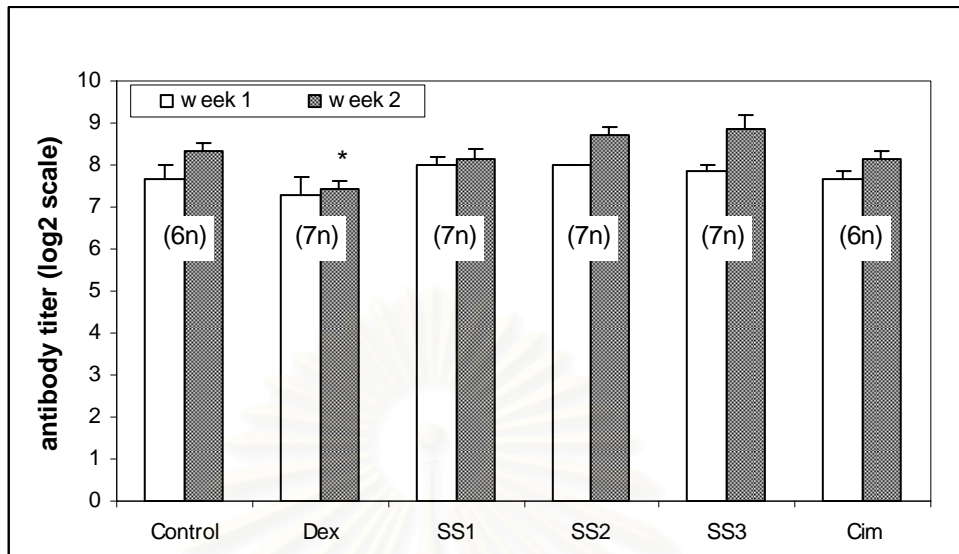
Control = กลุ่มควบคุม, Dex = dexamethasone (1 มก./กก.), SS1 = *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Cim = cimetidine (33 มก./กก.)

● การตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี haemagglutination antibody test

การวัดปริมาณแอนติบอดีในร่างกายที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงและเป็นการประเมินการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในแบบ humoral immune response โดยวัดปริมาณแอนติบอดีที่เกิดขึ้นด้วยวิธี haemagglutination antibody test ตัวอย่างซีรัมที่นำมาทดสอบได้จากการเจาะเลือดปริมาณ 50 ไมโครลิตร จาก tail vein ในสัปดาห์ที่หนึ่งและสัปดาห์ที่สองภายหลังการฉีดเม็ดเลือดแดงแก่เข้าช่องท้อง แอนติบอดีจากสัปดาห์ที่หนึ่งเป็นผลของ primary immune response และแอนติบอดีจากสัปดาห์ที่สองเป็นผลของ secondary immune response ปริมาณแอนติบอดีแสดงเป็นค่า  $\log_2$  ของแอนติบอดีไตเตอร์วัดเป็นระดับแอนติบอดี

ในสัปดาห์ที่หนึ่งพบว่าหนูทุกกลุ่มมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามหนูกลุ่มที่ได้รับยา dexamethasone มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำกว่ากลุ่มอื่นคือเท่ากับ 7.29 ซึ่งเป็นผลจากการยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันของยา

ในสัปดาห์ที่สองค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของหนูทุกกลุ่มเพิ่มสูงขึ้นกว่าในสัปดาห์ที่หนึ่ง จากการเปรียบเทียบค่าแอนติบอดีไตเตอร์ของสัปดาห์ที่สอง พบว่าหนูกลุ่ม Dex จะมีค่าเฉลี่ยของแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำกว่าหนูกลุ่ม control อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สำหรับหนูกลุ่ม SS1, SS2 และ SS3 มีค่าเฉลี่ยของแอนติบอดีไตเตอร์เพิ่มสูงขึ้นโดยแปรผันตามขนาดของผล *S. scaphigerum* แต่อย่างไรก็ตามยังไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และผลของกลุ่ม Cim ก็ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเช่นกัน (รูปที่ 9)



**รูปที่ 9** ผลของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการสร้างแอนติบอดีในหนูปกติ

การตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีที่จำเพาะต่อเม็ดเลือดแดงแกะในหนูปกติด้วยวิธี HA test ปริมาณแอนติบอดีรายงานเป็นค่า log<sub>2</sub> ของค่าแอนติบอดีไคเตอร์ ที่สัปดาห์ที่หนึ่งและสองหลังการฉีดเม็ดเลือดแดงแกะเข้าช่องท้อง แห่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของแอนติบอดีไคเตอร์, ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย, และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control โดย  $p < 0.05$

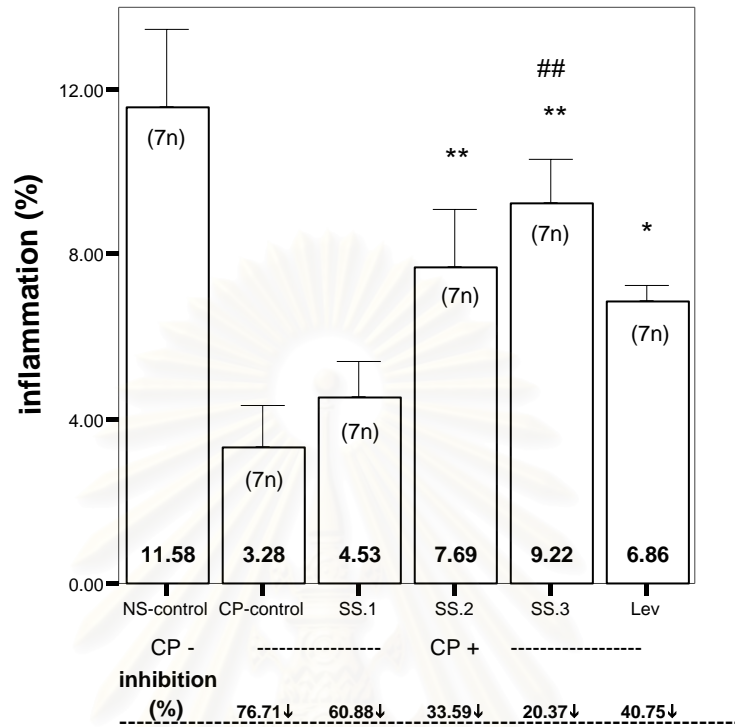
Control = กลุ่มควบคุม, Dex = dexamethasone(1 มก./กก.), SS1 = *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Cim = cimetidine(33 มก./กก.)

#### 4.2.1 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน ( immunosuppressed mice )

การทดลองในหนูที่ถูกกดภูมิคุ้มกันเป็นรูปแบบหนึ่งที่ใช้ทดสอบฤทธิ์ของสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ของสารที่จะทำการปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันร่างกายในสภาวะที่ร่างกายมีความบกพร่องของภูมิคุ้มกันอันอาจเกิดจากสภาวะของการติดเชื้อ, ความเครียด, การได้รับสารพิษจากสิ่งแวดล้อม และ การได้รับยากดภูมิคุ้มกันเพื่อรักษาโรคต่างๆ นอกจากนั้นการศึกษาในสภาวะที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันนั้นสามารถลดผลกระทบจาก immunoregulatory system การทดลองครั้งนี้ได้ใช้ cyclophosphamide(CP) เป็นยากดภูมิคุ้มกัน และกลุ่มควบคุมให้ยา levamisole ซึ่งเป็นยาที่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันที่ถูกกดการทำงานด้วยยา CP โดยสามารถกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity และแบบ adaptive immunity ได้ หนูทดลองแบ่งออกเป็น 6 กลุ่มๆละ 7 ตัว ทุกกลุ่มได้รับการกดภูมิคุ้มกันร่างกายด้วยการฉีดยา CP เข้าช่องท้อง (IP) ในขนาด 50 มก./กก./วัน ติดต่อกัน 3 วัน ยกเว้นหนูในกลุ่ม NS-control จะได้รับการฉีด normal saline แทน เพื่อเป็นกลุ่มเปรียบเทียบความรุนแรงของการกดภูมิคุ้มกันจากยา CP หนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันทุกตัวยังคงกินอาหาร น้ำ และมีกิจกรรมตามปกติ สำหรับน้ำหนักเฉลี่ยของหนูแต่ละกลุ่มภายหลังได้รับยากดภูมิคุ้มกันพบว่าไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ

##### ● การทดสอบด้วยปฏิกิริยา DTH

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่ม NS-control จะมี %inflammation สูงที่สุดคือเท่ากับ  $11.58 \pm 1.88$  ขณะที่หนูกลุ่มอื่นที่ได้รับยา CP จะแสดง %inflammation ต่ำกว่าดังนี้ กลุ่ม CP-control =  $3.28 \pm 1.03$ , SS1 =  $4.53 \pm 0.86$ , SS2 =  $7.69 \pm 1.38$ , SS3 =  $9.22 \pm 1.06$ , Lev =  $6.85 \pm 0.40$  แสดงให้เห็นว่า ยา CP สามารถยับยั้งปฏิกิริยา DTH ได้อย่างชัดเจน หนูกลุ่มที่ได้รับยา CP แต่ไม่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* หรือ levamisole จะแสดง %inflammation ต่ำที่สุด หากแสดงผลการทดลองเป็นค่าร้อยละของการถูกยับยั้งเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control หนูกลุ่มที่ได้ยา CP เท่ากับ 76.71% กลุ่มหนูที่ได้รับทั้งผล *S. scaphigerum* และ CP %การยับยั้งจะลดน้อยลงแปรผันตามความเข้มข้นที่เพิ่มขึ้นของขนาดผล *S. scaphigerum* ที่ให้ดังนี้ SS1 = 60.88%, SS2 = 33.59%, SS3 = 20.37% โดยกลุ่ม SS2 และ SS3 จะมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control และกลุ่ม SS3 ยังแตกต่างจากกลุ่ม SS1 อย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับ levamisole จะถูกยับยั้งเท่ากับ 40.75% ซึ่งแตกต่างจากกลุ่ม CP-control อย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  (รูปที่ 10)



**รูปที่ 10**ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา delayed-type hypersensitivity ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน ปฏิกิริยา DTH ทดสอบโดยวิธี footpad swelling test แ่่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของ % inflammation ± ค่าความคลาดเคลื่อน มาตรฐานของค่าเฉลี่ย, และจำนวนตัวอย่าง เครื่องหมาย \* และ \*\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $p < 0.05$  และ  $P < 0.01$  ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกควบคุมคุ้มกันของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปภาพ

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole(25 มก./กก.)

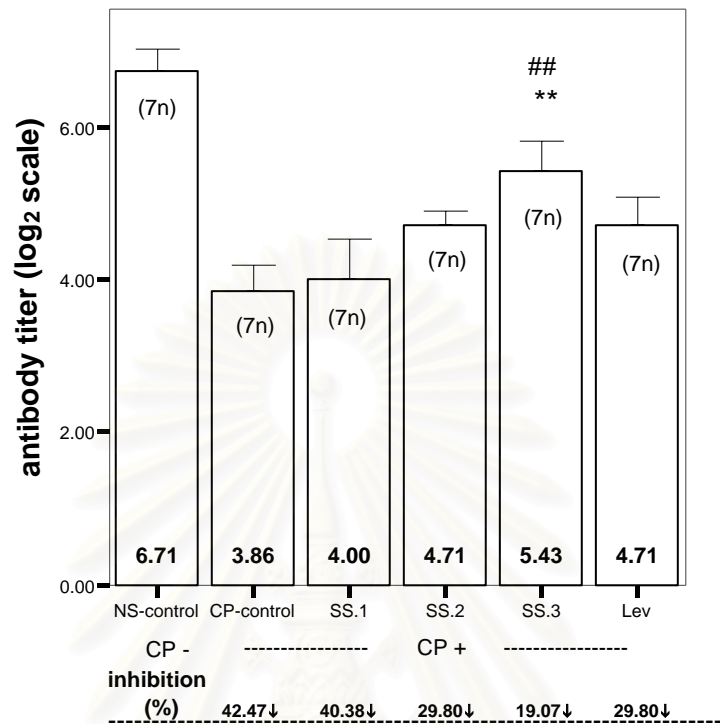


• การตรวจวัดปริมาณแอนติบอดีด้วยวิธี haemagglutination antibody test

จากผลการศึกษาเบื้องต้นในหนูปกติ พบว่าหนูกลุ่มที่ได้รับผล *S. scaphigerum* มีแนวโน้มที่จะมีการสร้างแอนติบอดีเพิ่มขึ้นเพียงแต่ค่าแอนติบอดี ไตเตอร์ที่สูงขึ้นอย่างแปรผันตามขนาดของผล *S. scaphigerum* นั้น เมื่อนำมาเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมแล้วไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ อย่างไรก็ตามเนื่องจากผลที่ได้แสดงให้เห็นแนวโน้มว่า *S. scaphigerum* อาจมีฤทธิ์กระตุ้นการสร้างแอนติบอดี ดังนั้นจึงได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการสร้างแอนติบอดีในหนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกันด้วย

ผลการทดลองพบว่า หนูกลุ่ม NS-control ซึ่งไม่ได้รับยา CP มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์สูงที่สุดคือ เท่ากับ  $6.71 \pm 0.28$  เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่มอื่นๆทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ซึ่งมีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ดังนี้ กลุ่มCP-control= $3.86 \pm 0.34$ , SS1= $4.00 \pm 0.53$ , SS2= $4.71 \pm 0.18$ , SS3= $5.42 \pm 0.36$  และ Lev= $4.71 \pm 0.35$  จะเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบอื่นๆร่วมด้วย มีค่าแอนติบอดีไตเตอร์ต่ำที่สุด และหากแสดงค่าการยับยั้งเป็นเปอร์เซ็นต์แล้วพบว่าการสร้างแอนติบอดีถูกยับยั้งไปมากที่สุดถึง 42.47% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control ในหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* ร่วมกับยา CP พบว่าฤทธิ์ยับยั้งภูมิคุ้มกันของยา CP มีความรุนแรงลดน้อยลงเมื่อขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้เพิ่มขึ้นตามลำดับ โดยที่การให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดที่ 78 มก./กก.(SS3) จะเป็นผลให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ทั้งยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่ำที่สุด 19.5 มก./กก. (SS1) สำหรับหนูกลุ่ม Lev แสดงการถูกยับยั้งภูมิคุ้มกันที่ลดลงเช่นกัน แต่ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 11)

สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 11ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการสร้างแอนติบอดีในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

การวัดปริมาณแอนติบอดีใช้วิธี haemagglutination antibody test ปริมาณแอนติบอดีแสดงเป็นค่า Log<sub>2</sub> ของ แอนติบอดีไตเตอร์ แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของแอนติบอดีไตเตอร์ ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \*\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control และ เครื่องหมาย ## แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกกดภูมิคุ้มกันของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ NS-control = กลุ่มควบคุม ได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุม ได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole (25 มก./กก.)

● การตรวจนับจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาวและ lymphocyte

ผลการนับจำนวนเม็ดเลือดขาวพบว่า หนูกลุ่ม NS-control ซึ่งไม่ได้รับยา CP มีจำนวนเม็ดเลือดขาวมากที่สุดคือเท่ากับ  $3886 \pm 369$  เซลล์/ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control =  $829 \pm 124$ , SS1 =  $871 \pm 165$ , SS2 =  $1257 \pm 201$ , SS3 =  $1767 \pm 387$  และ Lev =  $1733 \pm 295$  ดังเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบอื่นร่วมด้วย มีจำนวนเม็ดเลือดขาวน้อยที่สุดซึ่งแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว ถูกกดไปมากที่สุดถึง 78.66% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนทั้งผล *S. scaphigerum* และยา CP พบว่าการยับยั้งโดย CP ค่อยๆลดลง เมื่อขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยที่การให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดที่ 78 มก./กก.(SS3) ทำให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ทั้งยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่ำที่สุด 19.5 มก./กก.(SS1) สำหรับหนูกลุ่ม Lev แสดงการถูกยับยั้งที่ลดลงเช่นกันและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 12)

ผลการนับจำนวนเซลล์ lymphocyte พบว่าหนูกลุ่ม NS-control มีจำนวน lymphocyte มากที่สุดคือ เท่ากับ  $3362 \pm 339$  เซลล์/ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control =  $783 \pm 120$ , SS1 =  $840 \pm 167$ , SS2 =  $1220 \pm 202$ , SS3 =  $1681 \pm 377$  และ Lev =  $1606 \pm 293$  ดังเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบอื่นร่วมด้วย มีจำนวนเซลล์ lymphocyte น้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ถูกยับยั้งไปมากที่สุดถึง 76.71% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนทั้งผล *S. scaphigerum* และยา CP การถูกยับยั้งโดยยา CP จะค่อยๆลดลง เมื่อขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยที่การให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดที่ 78 มก./กก.(SS3) จะเป็นผลให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ทั้งยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่ำที่สุด 19.5 มก./กก. (SS1) สำหรับหนูกลุ่ม Lev แสดงการถูกยับยั้งที่ลดลงเช่นกันและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 13)

ผลการนับจำนวน T lymphocyte ( $CD3^+$  lymphocyte) พบว่าหนูกลุ่ม NS-control มีจำนวน T lymphocyte มากที่สุดคือเท่ากับ  $1419 \pm 127$  เซลล์/ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control =  $533 \pm 99$ , SS1 =  $626 \pm 144$ , SS2 =  $886 \pm 172$ , SS3 =

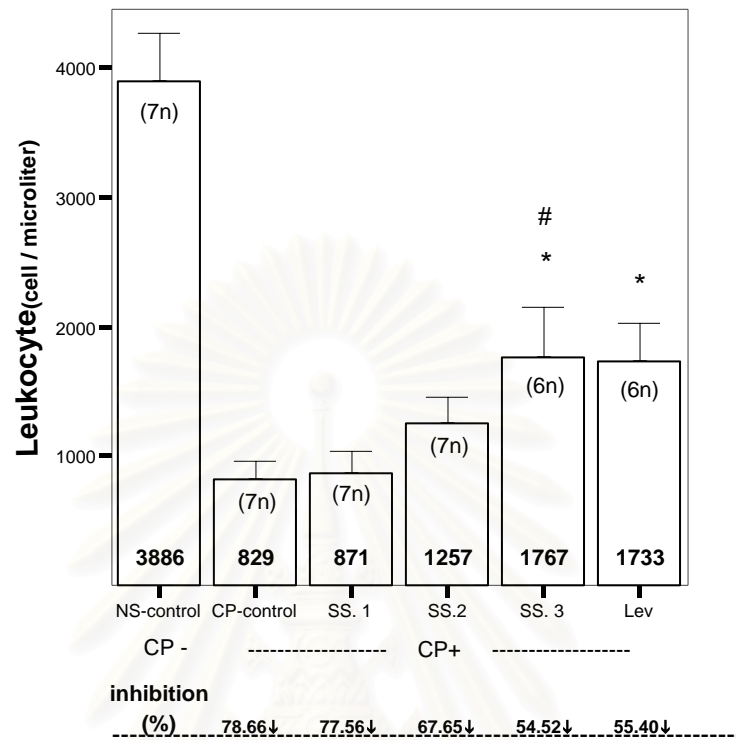
1119 ± 253 และ Lev = 1087 ± 212 ดังเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบอื่นร่วมด้วย มีจำนวน T lymphocyte น้อยที่สุด แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของ T lymphocyte ถูกยับยั้งไปมากที่สุดถึง 62.43% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* สภาวะภูมิคุ้มกันถูกยับยั้งจะค่อยๆลดลง เมื่อขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยที่การให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดที่ 78 มก./กก.(SS3) จะเป็นผลให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ทั้งยังแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับการให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่ำที่สุด 19.5 มก./กก. (SS1) สำหรับหนูกลุ่ม Lev แสดงการถูกยับยั้งที่ลดลงเช่นกันและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 14)

ผลการนับจำนวน CD3<sup>+</sup> lymphocyte พบว่าหนูกลุ่ม NS-control มีจำนวน CD3<sup>+</sup> lymphocyte เท่ากับ 1943±247 เซลล์/ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control = 249 ± 59, SS1 = 214 ± 27, SS2 = 335 ± 37, SS3 = 562 ± 142 และ Lev = 519 ± 88 ดังเห็นได้ว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับ CP จะมีจำนวน CD3<sup>+</sup> lymphocyte ลดลงอย่างมากในระดับที่ไม่เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ โดยหนูกลุ่ม CP-control และ กลุ่ม SS1 จะลดลงใกล้เคียงกัน เท่ากับ 87.18% และ 88.98% ตามลำดับ แม้ว่าหนูที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* ในขนาดต่างๆกันจะไม่แสดงผลที่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ แต่สามารถที่แสดงให้เห็นถึงผลที่ตอบสนองอย่างแปรผันตามขนาดของผล *S. scaphigerum* (รูปที่ 15)

ผลการนับจำนวน CD4<sup>+</sup> T lymphocyte พบว่าหนูกลุ่ม NS-control มีจำนวน CD4<sup>+</sup> T lymphocyte เท่ากับ 1075±101 เซลล์/ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control = 421 ± 74, SS1 = 491 ± 113, SS2 = 693 ± 134, SS3 = 868 ± 201 และ Lev = 817 ± 159 ดังเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบใดๆ มีจำนวน CD4<sup>+</sup> T lymphocyte น้อยกว่าทุกกลุ่ม แสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของ CD4<sup>+</sup> T lymphocyte ถูกยับยั้งไปมากที่สุดถึง 60.83% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนทั้งผล *S. scaphigerum* และยาCP การถูกยับยั้งโดยยาCPจะค่อยๆลดลง เมื่อขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยที่การให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดที่ 78 มก./กก.(SS3) จะเป็นผลให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control สำหรับหนูกลุ่ม Lev แสดงการถูกยับยั้งที่ลดลงเช่นกันและมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 16)

ผลการนับจำนวน CD8<sup>+</sup> T lymphocyte พบว่าหนูกลุ่ม NS-control จะมีจำนวน CD8<sup>+</sup> T lymphocyte เท่ากับ 361±28 เซลล์/ไมโครลิตร ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control = 114 ± 26, SS1 = 123 ± 30, SS2 = 196 ± 38, SS3 = 257 ± 51 และ Lev = 271 ± 58 ดังจะเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบใดๆ จะมีจำนวน CD8<sup>+</sup> T lymphocyte น้อยกว่าทุกกลุ่มหรือแสดงให้เห็นว่าการเพิ่มจำนวนของ CD8<sup>+</sup> T lymphocyte ถูกยับยั้งไปมากที่สุดถึง 68.42% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* และยา CP การถูกยับยั้งโดยยา CP จะค่อยๆ ลดลง เมื่อขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้เพิ่มขึ้นเป็นลำดับ โดยที่การให้ผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุดที่ 78 มก./กก.(SS3) จะเป็นผลให้เกิดความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ทั้งยังมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับหนูกลุ่ม Lev แสดงการถูกยับยั้งที่ลดลงมากที่สุด (24.93%) และมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 17)



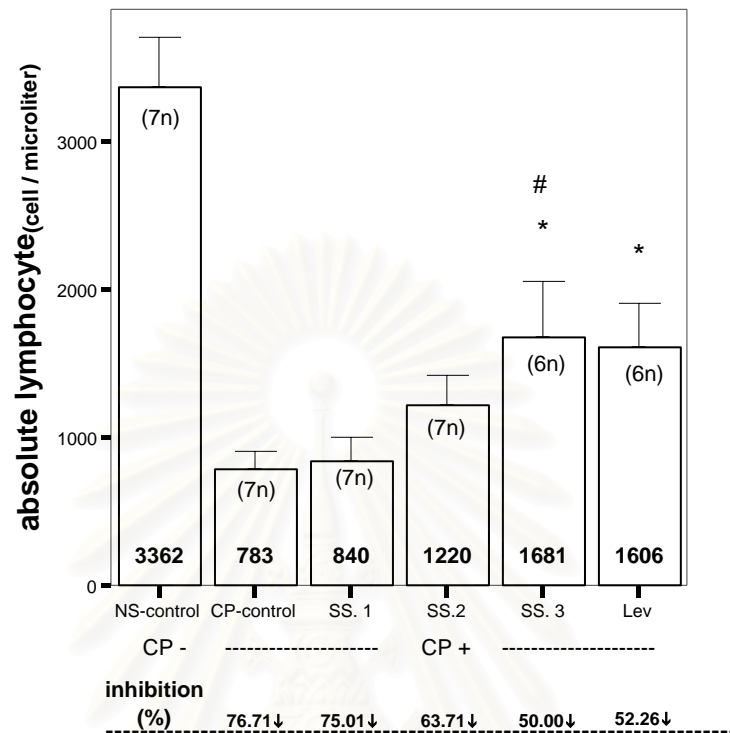


**รูปที่ 12** ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

ปริมาณเม็ดเลือดขาวรายงานเป็นจำนวนเซลล์/ไมโครลิตร แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของจำนวนเม็ดเลือดขาว ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control และ เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวนเม็ดเลือดขาวของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole(25 มก./กก.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

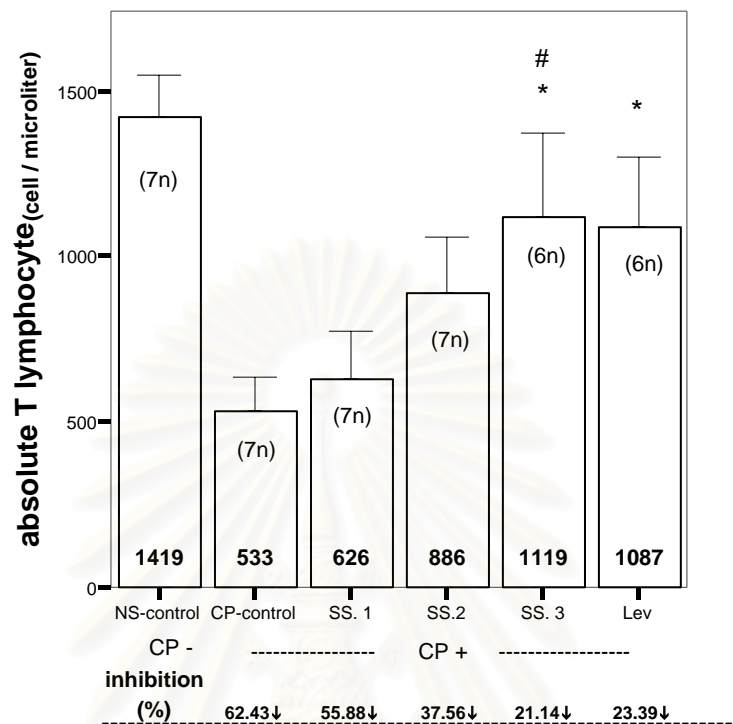


**รูปที่ 13** ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมกลุ่มกัน

ปริมาณ lymphocyte รายงานเป็นจำนวนเซลล์/ไมโครลิตร แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของจำนวน lymphocyte ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control และ เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวน lymphocyte ของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline; ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole (25 มก./กก.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

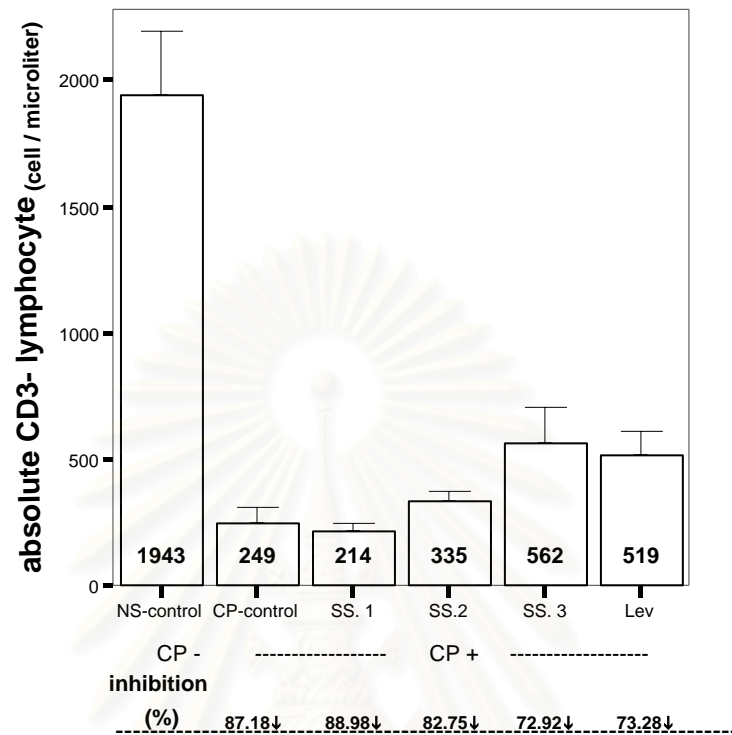


รูปที่ 14.ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมกลุ่มกัน

ปริมาณ T lymphocyte รายงานเป็นจำนวนเซลล์/ไมโครลิตร แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของจำนวน T lymphocyte  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control และ เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวน T lymphocyte ของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้น โดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole (25 มก./กก.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

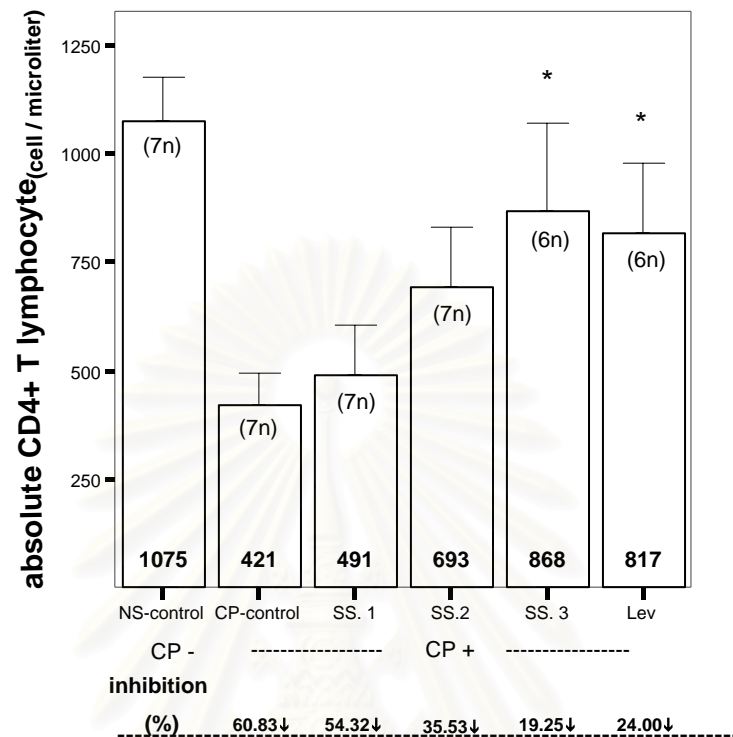


รูปที่ 15 ผลฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ CD3<sup>+</sup> lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

ปริมาณ CD3<sup>+</sup> lymphocyte รายงานเป็นจำนวนเซลล์/ไมโครลิตร แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของจำนวน CD3<sup>+</sup> lymphocyte ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระหว่างกลุ่มต่างๆที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวน CD3<sup>+</sup> lymphocyte ของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole (25 มก./กก.)

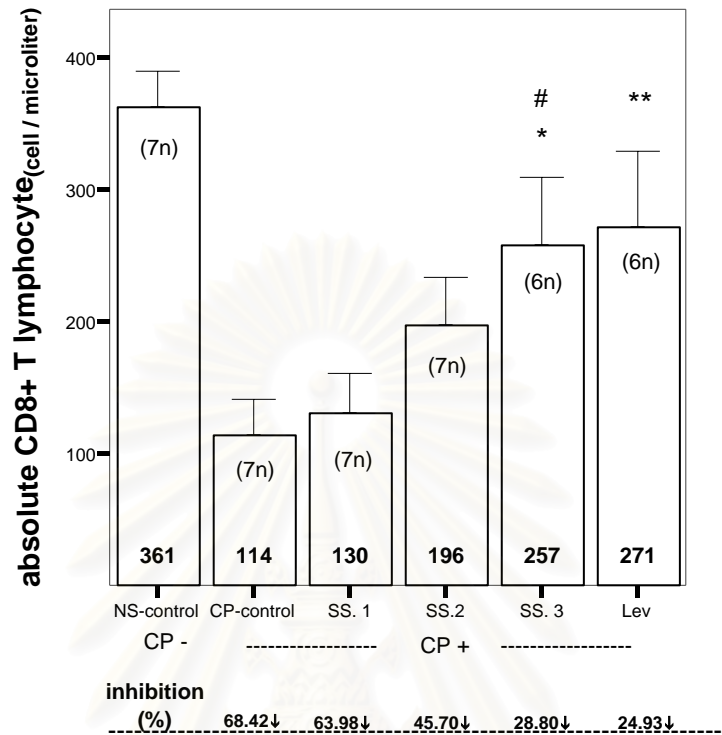
สถาบันวิจัยชีววิทยา  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



รูปที่ 16ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ  $CD4^+$  T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

ปริมาณ  $CD4^+$  T lymphocyte รายงานเป็นจำนวนเซลล์/ไมโครลิตร แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของจำนวน  $CD4^+$  T lymphocyte, ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย, และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวน  $CD4^+$  T lymphocyte ของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ  
 NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole (25 มก./กก.)





รูปที่ 17 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ  $CD8^+$  T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมร่วมกัน

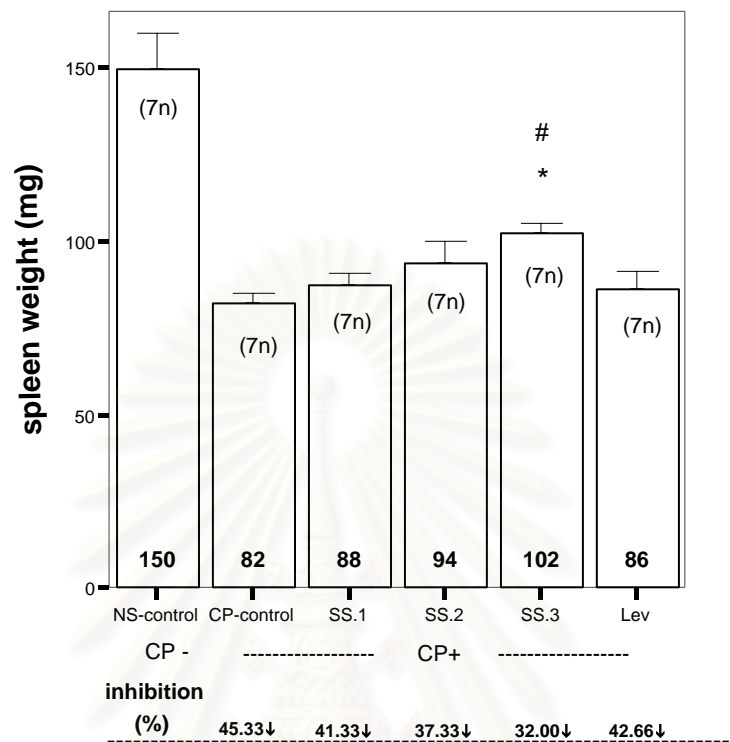
ปริมาณ  $CD8^+$  T lymphocyte รายงานเป็นจำนวนเซลล์/ไมโครลิตร แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของจำนวน  $CD8^+$  T lymphocyte, ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* และ \*\* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  หรือ  $p < 0.01$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ตามลำดับ เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความรุนแรงในการถูกยับยั้งการเพิ่มจำนวน  $CD8^+$  T lymphocyte ของกลุ่มต่างๆที่เกิดขึ้นโดยเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปกราฟ NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline; ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP: ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole (25 มก./กก.)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

• การศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของม้าม

ภายหลังที่ได้ทำการทดสอบปฏิกิริยา DTH และเก็บตัวอย่างเลือดแล้ว ได้ทำการตัดแยกม้าม ออกจากร่างกายหนูทุกตัว ทำการชั่งน้ำหนัก และหาค่าเฉลี่ยของน้ำหนักม้ามในหนูแต่ละกลุ่มได้ผล ดังนี้ พบว่าหนูกลุ่ม NS-control จะมีน้ำหนักม้ามเฉลี่ย  $150 \pm 10$  มก. ซึ่งมากกว่าหนูทุกกลุ่มที่ได้รับ ยา CP ดังนี้ กลุ่ม CP-control =  $82 \pm 3$ , SS1 =  $86 \pm 3$ , SS2 =  $94 \pm 6$ , SS3 =  $102 \pm 3$  และ Lev =  $86 \pm 5$  ดังเห็นได้ว่าหนูกลุ่ม CP-control ซึ่งไม่ได้รับการป้อนสารทดสอบใดๆ จะมีน้ำหนักม้าม เฉลี่ยน้อยกว่าทุกกลุ่มหรือน้อยกว่ากลุ่ม NS-control ถึง 45.33% หนูกลุ่มที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* ที่ขนาด 78 มก./กก. (SS3) จะมีน้ำหนักม้ามเฉลี่ยมากที่สุด และมีความแตกต่างอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control สำหรับน้ำหนักม้ามเฉลี่ยของ หนูกลุ่ม Lev ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control (รูปที่ 18)

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาของม้ามพบว่า ม้ามจากหนูกลุ่ม NS-control จะมีการขยายตัวของ lymphoid follicle อย่างเด่นชัด และเห็นขอบเขตของ germinal center ในส่วนของ white pulp ได้ และ lymphocyte ที่อยู่ในส่วนนี้จะอยู่เรียงตัวกันอย่างหนาแน่น ม้ามจากหนูกลุ่ม CP-control จะมีความแตกต่างจากหนูกลุ่ม NS-control อย่างชัดเจน ขอบเขตและการกระจายตัวของ lymphoid follicle น้อยกว่าหนูกลุ่มอื่นๆ, ไม่พบ germinal center, และการเรียงตัวของ lymphocyte ใน white pulp มีความหนาแน่นน้อยกว่ากลุ่มอื่น สำหรับหนูกลุ่มที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกันและได้รับการ ป้อนผล *S. scaphigerum* จะมีขอบเขตและการกระจายตัวของ lymphoid follicle เพิ่มขึ้นแปรผัน ตามขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้ โดยที่กลุ่ม SS3 จะเห็น lymphoid follicle อย่างเด่นชัด และมีความหนาแน่นของ lymphocyte ใน white pulp มากกว่ากลุ่ม SS1 และ SS2 สำหรับกลุ่ม lev พบว่ามีการเปลี่ยนแปลงในลักษณะเดียวกับกลุ่ม SS3 (รูปที่ 19, 20)

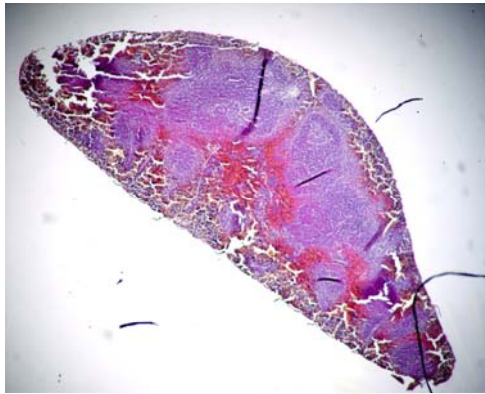


รูปที่ 18ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อน้ำหนักของม้ามในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน

น้ำหนักม้ามรายงานเป็นหน่วยมิลลิกรัม แท่งกราฟแสดงกลุ่ม, ค่าเฉลี่ยของน้ำหนักม้าม  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย และจำนวนตัวอย่างของแต่ละกลุ่ม เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม CP-control ตามลำดับ เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่  $p < 0.05$  เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 สำหรับการรายงานความแตกต่างของน้ำหนักม้าม ของกลุ่มต่างๆเปรียบเทียบกับกลุ่ม NS-control แสดงเป็น inhibition % ระบุไว้ด้านล่างของรูปภาพ

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole(25 มก./กก.)

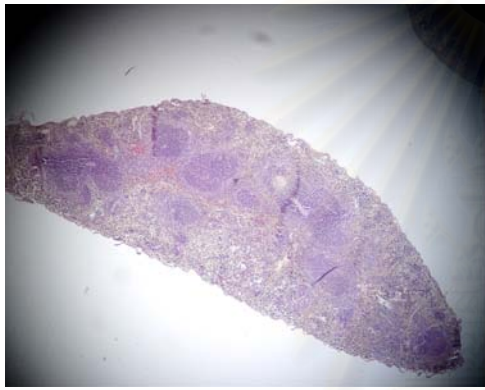
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



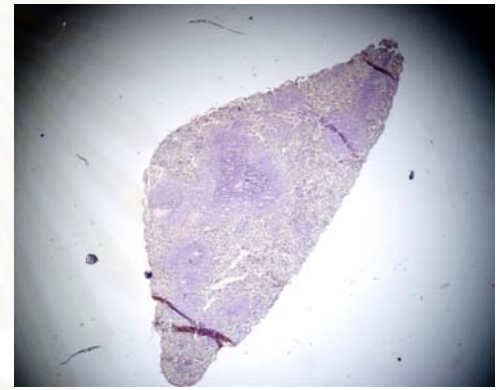
กลุ่ม NS-control



กลุ่ม CP-control



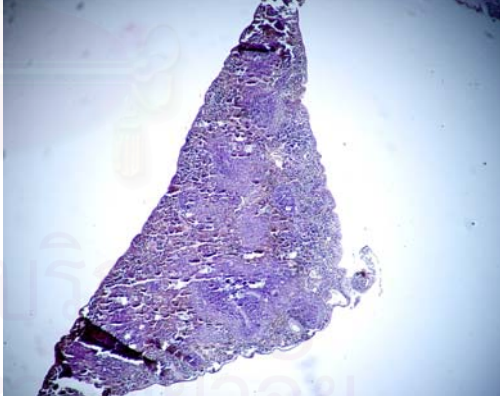
กลุ่ม SS1



กลุ่ม SS2



กลุ่ม SS3

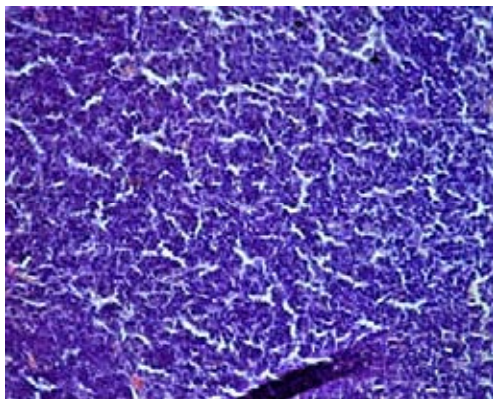


กลุ่ม Lev

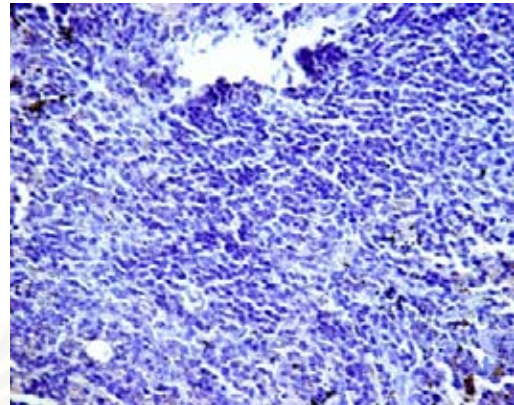
รูปที่ 19 ภาพตัดขวางของผล *S. scaphigerum* ต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิของม้าม (40 เท่า) ในหนูที่ได้รับยาควบคุมกลุ่มกัน ภาพตัดขวางทางจุลพยาธิของม้ามหนูในกำลังขยาย 40 เท่า ย้อมด้วยสี H&E

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP : ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole(25 มก./กก.)

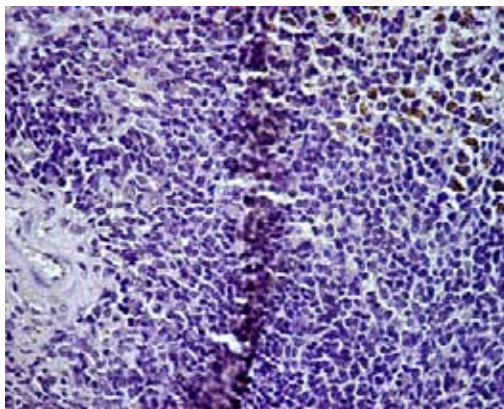




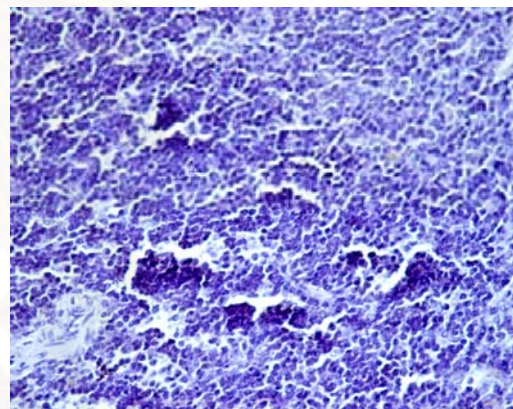
กลุ่ม NS-control



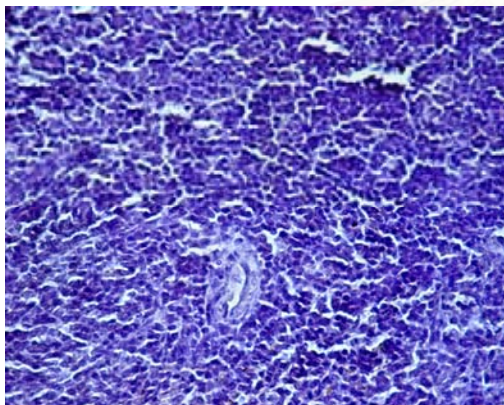
กลุ่ม CP-control



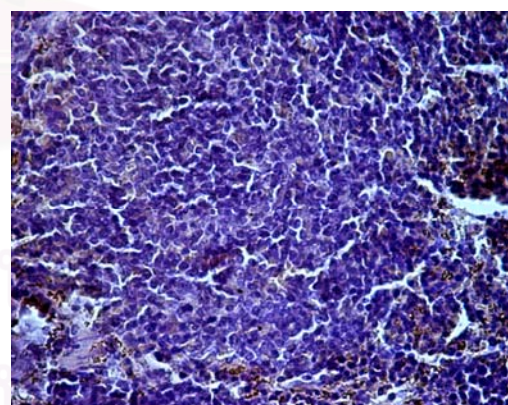
กลุ่ม SS1



กลุ่ม SS2



กลุ่ม SS3



กลุ่ม Lev

**รูปที่ 20** ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ต่อการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิของม้าม (500 เท่า) ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน ภาพทางจุลพยาธิของม้ามหนูตัวเดียวกันกับที่แสดงในรูป 19 ในกำลังขยาย 500 เท่า แสดงเฉพาะบริเวณ white pulp จะเห็นการเรียงตัวของเซลล์ในความหนาแน่นที่แตกต่างกัน

NS-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด normal saline: ป้อน normal saline, CP-control = กลุ่มควบคุมได้รับการฉีด CP: ป้อน normal saline, SS1 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (19.5 มก./กก.), SS2 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (39 มก./กก.), SS3 = ฉีด CP: ป้อน *S. scaphigerum* (78 มก./กก.) และ Lev = ฉีด CP: ป้อน levamisole(25 มก./กก.)



## บทที่ 5

### สรุปผลการวิจัย อภิปรายผล และข้อเสนอแนะ

การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของผล *S. scaphigerum* ในหนูทดลองครั้งนี้ สมุนไพรที่ใช้ทดสอบเป็นรูปแบบที่ไม่ได้ผ่านกรรมวิธีการสกัดใดๆ (crude drug) คงใช้แต่เพียงผงแห้งจากเนื้อผล *S. scaphigerum* ที่ได้มาจากแหล่งเดียวกันโดยตลอด เนื่องจากเป้าหมายหลักของการวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นถึงผลที่เกิดขึ้นต่อการนำไปใช้ในเชิงปฏิบัติ ซึ่งปัจจุบันมีการบริโภคเครื่องดื่มที่ผลิตจากเนื้อผล *S. scaphigerum* เป็นจำนวนมาก โดยมีการกล่าวถึงสรรพคุณมากมาย แต่ยังไม่มีความรู้ทางวิทยาศาสตร์ที่ยืนยันได้ หรือการนำไปใช้ในทางปศุสัตว์เพื่อเป็นสารช่วยการเจริญเติบโตในสัตว์ หรือเป็นข้อมูลสนับสนุนการใช้ในทางการแพทย์ทางเลือก อีกทั้งข้อมูลในการวิจัยนี้จะป็นข้อมูลพื้นฐานที่ยืนยันฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของผล *S. scaphigerum* ในสัตว์ อันจะนำไปสู่การศึกษาในเชิงลึกต่อไป ถึงองค์ประกอบย่อยใดในผล *S. scaphigerum* ที่กระทำฤทธิ์เช่นนั้น หรือกระทำโดยกลไกใด

เนื้อผลของ *S. scaphigerum* นั้น จัดเป็นสารประเภทที่เรียกว่า gum โครงสร้างพื้นฐานของ gum คือโพลีแซคคาไรด์ที่ประกอบด้วยน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวหลายๆชนิด อันได้แก่ glucose, xylose, arabinose, rhamnose และ polyuronic acid โดยพันธะเคมีที่เชื่อมระหว่างน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวนั้นจะเป็นทั้งพันธะ alfa และ beta-glycosidic linkage (Wynn and Fougere, 2007) พันธะที่เป็นสาย alfa สามารถที่จะถูกตัดย่อยได้ด้วยเอนไซม์ alfa-galactosidase ที่มีอยู่ในทางเดินอาหารของสัตว์ ขณะที่สาย beta อาจไม่ถูกตัดย่อยอย่างสมบูรณ์เนื่องจากความบกพร่องของเอนไซม์ beta-galactosidase ในสัตว์ (Case et al., 2000) ดังนั้น gum ที่กินเข้าไปจะถูกย่อยได้บางส่วน ส่วนที่ไม่ถูกย่อยจะคงเป็นสายโพลีแซคคาไรด์สั้นๆอยู่ในลักษณะที่เรียกว่า repeating unit โครงสร้างที่มีความเหมาะสมของ repeating unit นี้ จะสามารถกระตุ้น pattern recognition receptors (PRRs) ต่างๆที่ปรากฏบนผิวเซลล์ภูมิคุ้มกันได้

*S. scaphigerum* ที่ให้โดยการกินอาจกระตุ้นภูมิคุ้มกันผ่าน PRRs ของเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ gut-associated lymphoid tissue (GALT) หรือเข้าสู่ระบบของร่างกาย เช่นในงานศึกษาทางเภสัชจลนศาสตร์ของ betaglucan (โพลีแซคคาไรด์ที่ได้จากเห็ดประกอบด้วยสายพันธะ beta) พบว่า betaglucan ที่ให้โดยการกินจะเคลื่อนที่ไปยัง GALT และสามารถผ่านเข้าสู่กระแส

เลือดได้ (Rice et al., 2005) ดังจะเห็นได้ว่าโครงสร้างของโพลีแซคคาไรด์จากผล *S. scaphigerum* อาจถูกระบบทางเดินอาหารย่อยสลายให้มีลักษณะเป็น repeating unit ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ภูมิคุ้มกันที่ GALT หรือเคลื่อนที่ผ่านผนังลำไส้เข้าสู่กระแสเลือดเพื่อกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในแบบ systemic ต่อไป

ระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity เกิดขึ้นจากกลไกพื้นฐานทางสรีรวิทยาของร่างกายในหลายรูปแบบและการทำงานของ phagocytic cells เช่น neutrophil, macrophage หน้าที่การทำงานของเซลล์ macrophage ที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity นั้นประกอบด้วย การสร้างสารหลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ (เช่น proinflammatory cytokines, arachidonic acid metabolites) และ การกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยอาศัยการ phagocytosis ซึ่งในกระบวนการนี้จะมีการสร้างและหลั่งสารที่เรียกว่า nitric oxide

Nitric oxide มีบทบาทสำคัญต่อสรีรการทำงานในร่างกาย เช่น การขยายหลอดเลือด, ควบคุมการบีบตัวของหัวใจ, เป็นสารสื่อประสาท (neurotransmitter), การเป็น second messenger ในขบวนการ signaling transduction ของเซลล์, ควบคุมการเกาะกลุ่มของเกล็ดเลือด (Garcia and Stein, 2006) ขณะเดียวกัน nitric oxide มีสภาพเป็นอนุมูลอิสระ ซึ่งสามารถเปลี่ยนแปลงไปเป็นอนุมูลอิสระตัวอื่นๆที่เป็นอันตรายต่อเซลล์ได้เช่นกัน การเกิดขึ้นของ nitric oxide ที่นำไปสู่การทำลายเซลล์จะเกิดจากการทำงานของเอนไซม์ iNOS ซึ่งถูกกระตุ้นโดยกระบวนการอักเสบ macrophage เป็นเซลล์ที่สามารถสร้างและหลั่ง nitric oxide จากการทำงานของเอนไซม์ iNOS อันนำไปสู่การฆ่าและทำลายเซลล์จุลชีพหรือสิ่งแปลกปลอม การวัดปริมาณ nitric oxide ที่เกิดขึ้นภายหลังการกระตุ้น macrophage ด้วย LPS จะเป็นการวัดความสามารถในการทำงานของเซลล์นี้ ซึ่งจะเชื่อมโยงไปถึงผลของ innate immunity จากการศึกษาโพลีแซคคาไรด์ของพืชหลายชนิด พบว่ามีฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของ macrophage (Schepetkin and Quinn, 2006) โดยมีวิธีการทดลองแบบ in vitro ซึ่งอาจทำการแยก macrophage ออกจากกายหนู หรือ ใช้ macrophage cell line มาทดสอบกับโพลีแซคคาไรด์ที่สกัดแยกออกมาจากพืชสมุนไพร การทดสอบดังกล่าวอาจไม่สามารถแสดงถึงผลของสมุนไพรที่เกิดขึ้นจริงในร่างกาย เพราะไม่ได้ครอบคลุมถึงผลทางเภสัชจลนศาสตร์ที่ร่างกายได้กระทำต่อยาอันเป็นเหตุให้อาจมีการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของยาให้แตกต่างไปจากเดิม สำหรับการศึกษายุทธศาสตร์ของผล *S. scaphigerum* ต่อ macrophage ในงานวิจัยนี้เป็นรูปแบบของ ex vivo ซึ่งผลการทดลองที่เกิดขึ้นจะมีความสัมพันธ์กับเภสัชจลนศาสตร์ และเหมาะสมในการนำไปอธิบายผลที่เกิดขึ้นจากการใช้ผล *S. scaphigerum* ในทางปฏิบัติ นอกจากนี้รายงานของ Schepetkin (2006) ยังแสดงให้เห็นว่า โพลีแซคคาไรด์ที่

สามารถกระตุ้น macrophage ให้หลั่ง nitric oxide เพิ่มขึ้น ยังมีผลต่อการหลั่ง proinflammatory cytokines และความสามารถในการ phagocytosis เพิ่มขึ้นด้วยเช่นกัน ผลจากการทดลองนี้จะเห็นว่า การให้กินผล *S. scaphigerum* เป็นระยะเวลาต่อเนื่องกัน 10 วัน สามารถเพิ่มการหลั่ง nitric oxide จาก peritoneal macrophage เมื่อได้รับการกระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญ และแสดงผลเด่นชัดกว่าการให้ levamisole แต่อย่างไรก็ตามการกินผล *S. scaphigerum* ไม่ได้ก่อให้เกิดการเพิ่มขึ้นของ nitric oxide อย่างรุนแรงจนอาจเป็นผลเสียต่อร่างกาย ผลการทดลองครั้งนี้มีความสอดคล้องกับผลการวิจัยใน in vitro ที่พบว่าโพลีแซคคาไรด์จากผล *S. scaphigerum* สามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage cell line ในการหลั่ง nitric oxide และการ phagocytosis (Piyarat, 2005)

การศึกษาฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของผล *S. scaphigerum* ต่อ adaptive immunity ในหนูปกติ พบว่าการให้กินผล *S. scaphigerum* สามารถยับยั้งการรวมของอู้ง่ายทำหนูจากปฏิกิริยาDTHได้โดยมีความสัมพันธ์กับขนาดของผล *S. scaphigerum* ที่ให้ และแสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ

Dexamethasone สามารถออกฤทธิ์เป็นยาต้านการอักเสบ หรือ ยากดภูมิคุ้มกันเมื่อให้ในขนาดสูง ขนาดของยาที่ใช้ในการทดลองนี้คือ 1 มก./กก. เป็นขนาดที่สามารถก่อให้เกิดการกดภูมิคุ้มกันได้(Plumb, 2005) ผลของการให้ dexamethasone ในสัปดาห์ที่หนึ่งนั้นพบว่าสามารถยับยั้งการรวมของอู้ง่ายทำหนูจากปฏิกิริยาDTHได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกลุ่ม control แต่ผลการยับยั้งการรวมของอู้ง่ายทำหนูโดย dexamethasone นั้นไม่ได้แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญกับหนูกลุ่มที่ได้รับผล *S. scaphigerum* ในขนาด 78 มก./กก. และกลุ่มที่ได้รับ cimetidine นอกจากนั้น dexamethasone ในสัปดาห์ที่หนึ่งนั้นไม่ได้แสดงฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้างแอนติบอดี ผลของ dexamethasone ที่มีต่อการยับยั้งการรวมของอู้ง่ายทำหนูจากปฏิกิริยาDTHในสัปดาห์ที่หนึ่งนั้น อาจมิได้เกิดจากฤทธิ์การกดภูมิคุ้มกันอย่างเด่นชัด เพราะหนูกลุ่มที่ได้รับ dexamethasone ยังมีได้แสดงการถูกยับยั้งการสร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงแกะในสัปดาห์ที่หนึ่ง แต่แสดงการถูกยับยั้งอย่างมีนัยสำคัญต่อเมื่อสัปดาห์ที่สองแล้ว

Cimetidine เป็น H<sub>2</sub> receptor antagonist ที่ใช้เป็นยาลดการหลั่งกรดในกระเพาะอาหาร นอกเหนือจากฤทธิ์ดังกล่าว cimetidine สามารถยับยั้งการทำงานของ suppressor cell (Brockmeyer et al., 1989; Tanji et al. 1991) ทำให้มีการใช้ cimetidine เพื่อเป็นสารกระตุ้นภูมิคุ้มกัน(Plumb, 2005) ในการศึกษาวิจัยนี้จึงได้นำ cimetidine มาใช้เป็นสารอ้างอิงฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน แต่อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองจากหนูกลุ่มที่ได้รับ cimetidine แสดงให้เห็นการ

ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูจากปฏิกิริยา DTH อย่างชัดเจน ซึ่งอาจอธิบายได้ว่า cimetidine ยังสามารถมีฤทธิ์ระงับการอักเสบ โดยพบว่ามีการวิจัยที่แสดงให้เห็นถึงฤทธิ์ระงับการอักเสบ เช่นการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวที่เหนียวน้ำด้วย complete Freund's adjuvant ได้ถึง 92% (Ezeamazi and Umezurike, 1989) และ การระงับการอักเสบของ cimetidine อาจเกิดจากหลายกลไกเช่น histamine antagonist หรือ antioxidant (Ching et al., 1994; Hunter et al., 1999)

การอักเสบจากปฏิกิริยา DTH นอกจากเกี่ยวข้องกับการทำงานของ T lymphocyte แล้ว ยังเป็นผลพวงจากการทำงานของสารต่างๆที่หลั่งออกจาก macrophage หรือ APC เช่น proinflammatory cytokine, hydrolytic enzyme, ROIs และ nitric oxide (Abbas and Lichtman, 2005) ดังนั้นผลจากการทดลองแบบ ex vivo พบว่า ผล *S. scaphigerum* สามารถเพิ่มการหลั่ง nitric oxide จากเซลล์ macrophage ได้ จึงเป็นเหตุที่น่าจะมีการเพิ่มการบวมของอุ้งเท้าหนูจากปฏิกิริยา DTH ที่เกิดขึ้นในหนูปกติ แต่จากการทดลองกลับพบว่า ผล *S. scaphigerum* ยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูจากปฏิกิริยา DTH ทั้งนี้ข้อขัดแย้งที่ปรากฏอาจอธิบายได้ว่า ผล *S. scaphigerum* ที่นำมาใช้ในการทดลองนี้เป็นสมุนไพรที่ยังไม่ผ่านกระบวนการสกัดใดๆจึงอาจมีองค์ประกอบของสารออกฤทธิ์หลายชนิด ซึ่งบางส่วนอาจออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของเซลล์ macrophage ผ่าน PRRs ในขณะที่บางส่วนอาจมีฤทธิ์เป็น anti-inflammation ซึ่งแสดงผลต้านการอักเสบในสัตว์ทดลอง

กระบวนการอักเสบนั้นเป็นเหตุการณ์ที่เกิดขึ้นภายหลังการหลั่ง nitric oxide ของ macrophage ซึ่ง nitric oxide นั้น สามารถกระตุ้นการทำงานของ phospholipase A<sub>2</sub> ให้เกิดการสร้าง arachidonic acid (AA) จาก phospholipids ของผนังเซลล์ ซึ่ง AA จะถูกเปลี่ยนต่อไปด้วยกระบวนการที่ต่างกัน 2 วิธี คือ เปลี่ยนโดยเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) กับ lipoxygenase (LOX) จะได้ prostaglandins (PG), thromboxane A<sub>2</sub>, leukotrienes, และ platelet activating factor (Stokes and Granger, 2000) ผลรวมของ inflammatory mediators เหล่านี้จะชักนำเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เคลื่อนผ่านผนังเยื่อหลอดเลือดเข้ามายังบริเวณเนื้อเยื่อมากขึ้น และก่อให้เกิดปฏิกิริยาการอักเสบ (Karasawa et al., 1991) ดังนั้นการให้กินผล *S. scaphigerum* ในช่วงเวลาที่มีการเหนียวน้ำให้เกิดปฏิกิริยา DTH สารออกฤทธิ์บางส่วนที่อาจมีฤทธิ์เป็น anti-inflammation จึงสามารถยับยั้ง inflammatory mediators ต่างๆที่เกิดขึ้นภายหลังการหลั่ง nitric oxide ของ macrophage และเป็นผลให้ปฏิกิริยาการอักเสบของอุ้งเท้าหนูลดลง จากหลายงานวิจัยที่แสดงให้เห็นว่า โพลีแซคคาไรด์จากพืช สามารถมีฤทธิ์ anti-inflammation เช่น *Echinacea purpurea* (L.) และ *Hypericum perforatum* (L.) สามารถระงับการอักเสบของอุ้งเท้าหนู ที่ถูกเหนียวน้ำให้เกิดขึ้น



ด้วยสาร carrageenan โดยพบว่ามีการยับยั้งเอนไซม์ iNOS และ COX-2 (Raso et al., 2002) หรือในกรณีการศึกษาอื่นของวุ้นหางจระเข้ ซึ่งประกอบด้วย acemannan, aloctin, aloctin A, และ mannose-6-phosphate พบว่ามีฤทธิ์เป็น anti-inflammation โดยมีกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ เช่น ทำลาย bradykinin (Yagi et al., 1987) , ยับยั้งการสังเคราะห์ prostaglandin E<sub>2</sub> (Pennys, 1982; Langmead et al., 2004) , ยับยั้งการทำงานของ LOX (Bezakova et al., 2005) , ยับยั้งการทำงานของ COX (Yagi et al., 2003) , ยับยั้ง integrins ที่เป็น adhesion molecules (Bowden, 1998) นอกจากนี้ยังพบพืชที่ให้สารโพลีแซคคาไรด์ชนิดอื่นที่มีฤทธิ์ anti-inflammation เช่น *Picorrhiza kurroa* (Pandey and Das, 1988) และ *Echinacea angustifolia* (Tubaro et al., 1987) เป็นต้น

คงจะเห็นได้ว่าโพลีแซคคาไรด์จากพืชสามารถมีฤทธิ์ anti-inflammation ทั้งยังมีโครงสร้างที่ใช้ในการกระตุ้น PRRs ดังเช่นที่พบในวุ้นหางจระเข้ ซึ่งสามารถเพิ่มการสร้าง nitric oxide ให้กับ macrophage cell line (Ramamoorthy et al., 1996) และขณะเดียวกันสามารถยับยั้งกระบวนการอักเสบด้วยกลไกการออกฤทธิ์ต่างๆ ในสัตว์ทดลอง ผลการวิจัยฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่ปรากฏในครั้งนี้นี้ซึ่งแสดงการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูจากปฏิกิริยา DTH จึงอาจอธิบายได้ในลักษณะเดียวกัน นอกจากนี้ ยังมีรายงานว่า สารสกัด ethanol ของ *S. scaphigerum* สามารถเกิดกิจกรรมต้านอนุมูลอิสระกับสารที่เป็นอนุมูลอิสระที่เสถียร คือ 2, 2 dipheyl-1-picrylhydrazyl radical (ฉันทนัท ตราชู, 2545)

เม็ดเลือดแดงเกาะเป็น T-dependent antigen ดังนั้นในการสร้างแอนติบอดีต่อเม็ดเลือดแดงจำเป็นต้องอาศัยความร่วมมือในการทำงานของทั้ง T lymphocyte, B lymphocyte และ macrophage (Benacerraf, 1978) หนูปกติที่ได้รับ dexamethasone จะแสดงสภาวะการถูกกดการสร้างแอนติบอดีให้เห็นได้อย่างชัดเจนในสัปดาห์ที่สอง ในขณะที่ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* นั้นส่งผลไปในทางกระตุ้นการสร้างแอนติบอดีให้เพิ่มขึ้นโดยแปรผันตามขนาดของผล *S. scaphigerum* แต่ความแตกต่างนั้นยังไม่มีความสำคัญทางสถิติ ซึ่งเป็นคุณลักษณะเช่นเดียวกับฤทธิ์ของ cimetidine โดยสาเหตุอาจเนื่องจากการตอบโต้ของระบบภูมิคุ้มกันใน secondary immune response นี้ได้รับผลจาก immune regulatory system เช่น การเกิด antibody feedback mechanism เป็นต้น

การทดสอบฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ในหนูที่ได้รับการกดภูมิคุ้มกัน หนูจะได้รับการฉีดเม็ดเลือดแดงเกาะที่อุ้งเท้า หลังจากที่ได้หยุดการป้อนผล *S. scaphigerum* ไปแล้วเป็นเวลา 3 วัน ดังนั้นฤทธิ์ของ anti-inflammation ที่อาจเกิดขึ้นใน *S. scaphigerum* จึงไม่น่าจะมี

อิทธิพลต่อการเกิดการอักเสบในระยะ elicitation ของปฏิกิริยา DTH การฉีดยา CP ในขนาด 50 มก./กก. ติดต่อกัน 3 วัน สามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันในร่างกายทั้งแบบ cell-mediated และ humoral immunity ได้อย่างเด่นชัด โดยแสดงให้เห็นจากการลดลงของปฏิกิริยา DTH, การสร้างแอนติบอดี, จำนวนเม็ดเลือดขาว และพยาธิสภาพของม้าม การป้องกันผล *S. scaphigerum* บ่งชี้ถึงการปกป้องระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายโดยสามารถลดผลกระทบจากการกดภูมิคุ้มกันของ CP ทำให้เห็นการตอบสนองที่เพิ่มขึ้นของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายจากการทดสอบ footpad swelling test ซึ่งเกิดจากการทำงานของ T lymphocyte เป็นสำคัญ และจากการสร้างแอนติบอดีที่เพิ่มขึ้นซึ่งเป็นหน้าที่ของ B lymphocyte

การเปลี่ยนแปลงการตอบสนองในปฏิกิริยา DTH และการสร้างแอนติบอดีของหนูที่ได้รับผล *S. scaphigerum* นอกจากที่เป็นผลจากการทำงานที่เพิ่มขึ้นของ macrophage แล้ว ยังเกิดจากจำนวนของเม็ดเลือดขาวด้วย หนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน เมื่อได้รับการป้องกันผล *S. scaphigerum* จะพบปริมาณเม็ดเลือดขาวเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ โดยเม็ดเลือดขาวที่เพิ่มขึ้นคือ  $CD4^+$  T lymphocyte และ  $CD8^+$  T lymphocyte ซึ่งเซลล์ทั้งสองต่างมีบทบาทสำคัญในการเกิดปฏิกิริยา DTH

$CD3^-$  lymphocyte ประกอบด้วยเซลล์ส่วนใหญ่คือ B lymphocyte และเซลล์ส่วนน้อยคือ NK cell การให้ CP จะทำให้ปริมาณ  $CD3^-$  lymphocyte ในกระแสเลือดของหนูลดลงอย่างมาก เมื่อให้ผล *S. scaphigerum* ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน จะทำให้พบปริมาณ  $CD3^-$  lymphocyte มากขึ้นแปรผันตามขนาดของผล *S. scaphigerum* แต่ปริมาณที่เพิ่มขึ้นนั้นไม่มากพอให้เห็นความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับหนูที่ได้รับแต่ยากดภูมิคุ้มกัน ผลดังกล่าวนี้สอดคล้องกับการหายไปของ germinal center ในม้ามหนูทุกกลุ่มที่ได้รับ CP ซึ่งเป็นตำแหน่งที่มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของ B lymphocyte แต่อย่างไรก็ตาม เมื่อพิจารณาเปรียบเทียบถึงความเปลี่ยนแปลงของปริมาณ lymphocyte ชนิดต่างๆ ในกลุ่มหนูที่ได้รับผล *S. scaphigerum* ในขนาด 78 มก./กก. กับหนูกลุ่มที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันเพียงอย่างเดียว เป็นค่าร้อยละ (percent change) พบว่าผล *S. scaphigerum* ในขนาด 78 มก./กก. สามารถก่อให้เกิดความเปลี่ยนแปลงต่อ  $CD3^-$  lymphocyte ได้มากกว่า  $CD3^+$  lymphocyte (รูปที่ 22) ซึ่งแสดงให้เห็นว่าผล *S. scaphigerum* อาจมีผลต่อ B lymphocyte ได้เช่นกัน

CP มีผลต่อทั้ง T และ B lymphocyte โดยแสดงผลต่อ B lymphocyte อย่างเด่นชัดกว่า ซึ่งสามารถเห็นได้จากการลดลงของ lymphocyte ใน B cell zone ของต่อมน้ำเหลืองและม้าม ในขณะที่ T cell zone นั้นไม่ได้รับผลกระทบ (Turk et al., 1972) และจากการทดลองนี้



(รูปที่ 23) พบว่า CD3<sup>-</sup> lymphocyte และ CD3<sup>+</sup> lymphocyte ได้รับผลกระทบจาก CP ในระดับความรุนแรงที่ต่างกัน ดังนั้นผลการทดลองนี้ยังไม่อาจสรุปได้อย่างชัดเจนว่าผล *S. scaphigerum* ไม่มีผลต่อการเพิ่ม B lymphocyte และควรที่จะมีการศึกษาต่อไป

การนับจำนวน T lymphocyte ในกระแสเลือดนี้ แสดงถึงประชากรของ T lymphocyte ทั้งหมดซึ่งไม่อาจจะบ่งชี้ถึงจำนวน specific T lymphocyte ที่เพิ่มขึ้นจากการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้วยเม็ดเลือดแดงแกะ แต่อย่างไรก็ตาม มีความเป็นไปได้ว่า T lymphocyte ที่เพิ่มขึ้นนั้นมาจาก T lymphocyte ที่ตอบสนองต่อเม็ดเลือดแดงแกะ เพราะจากภาพทางจุลพยาธิของม้าม ในหนูที่ได้รับการป้อนผล *S. scaphigerum* ในขนาดสูงสุด มีการขยายตัวของขอบเขต lymphoid follicle ซึ่งเป็นลักษณะที่แสดงให้เห็นว่า มีการตอบสนองต่อแอนติเจน อย่งไรก็ตาม ข้อมูลเชิงคุณภาพนี้ยังไม่เพียงพอที่จะสรุปว่า มีการเพิ่มขึ้นของ specific T lymphocyte ในหนูที่ได้รับผล *S. scaphigerum* หรือไม่อาจสรุปได้อย่างชัดเจนว่ามีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันแบบ cell-mediated immunity จึงควรที่จะต้องทำการศึกษถึงฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ต่อการเปลี่ยนแปลงของ specific T lymphocyte ใน adaptive immunity ต่อไป และเพื่อให้ข้อมูลในการวิจัยสมบูรณ์ยิ่งขึ้น จึงควรเพิ่มกลุ่มทดลองที่ไม่ได้ถูกกระตุ้นภูมิคุ้มกันเพื่อเปรียบเทียบความแตกต่างในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity

ผลการวิจัยฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันของผล *S. scaphigerum* ในหนูทดลองนี้ สามารถสรุปได้ว่าผล *S. scaphigerum* เป็นสารปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน ที่มีฤทธิ์ต่อทั้ง innate และ adaptive immunity โดยพบว่า สามารถเพิ่มการผลิต nitric oxide ของ macrophage, เพิ่มการสร้างแอนติบอดีที่จำเพาะ, ปกป้องระบบภูมิคุ้มกันในสภาวะที่ร่างกายถูกกดภูมิคุ้มกันด้วยยา CP โดยเฉพาะ T lymphocyte และนอกจากนี้ ยังพบว่าผล *S. scaphigerum* สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูจากปฏิกิริยา DTH ได้ ซึ่งอาจเป็นผลจากฤทธิ์ anti-inflammation จึงควรที่จะต้องทำการศึกษาต่อไป ข้อมูลที่ได้จากงานวิจัยนี้สามารถนำไปใช้สนับสนุนการใช้ผล *S. scaphigerum* ในทางปฏิบัติ เช่น การบริโภคเครื่องดื่มที่ผลิตจากผล *S. scaphigerum*, การใช้เพื่อเป็นสารเสริมสุขภาพ, การใช้ในการแพทย์ทางเลือก, การใช้เพื่อเป็นสารช่วยการเจริญเติบโตในสัตว์ และเป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะนำไปสู่การพัฒนาที่มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกันต่อไป ซึ่งการนำไปในมนุษย์และสัตว์ ควรที่จะมีการศึกษาทางด้านความปลอดภัย หรือ ความเป็นพิษของผล *S. scaphigerum* และเพื่อการพัฒนาต่อไป จะต้องทำการศึกษถึงองค์ประกอบใดของผล *S. scaphigerum* ที่มีฤทธิ์ปรับเปลี่ยนภูมิคุ้มกัน และมีกลไกการออกฤทธิ์อย่างไร

## รายการอ้างอิง

### ภาษาไทย

กิติมา จินดามงคล, สุภาพร อิศริโยดม, ชนินทร์ ตีรวัฒนวานิช, งามพ่อง คงคาทิพย์ และ คณะ. 2548. ผลของสารสกัดสมุนไพรมิ้นชัน ย่านพาโหม และบอระเพ็ด ต่อภาวะเครียดและระดับภูมิคุ้มกันโรคนในไก่กระตัง. รายงานการประชุมวิชาการสมุนไพรรไทย: โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 3 ณ. ศูนย์การประชุมสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 49-54.

ณฐนนท์ ตราชู. 2545. กิจกรรมต้านอนุมูลอิสระในเมล็ดพุททะเลลาย ชิง และผลส้มแขก.

มหาสารคาม. มหาวิทยาลัยมหาสารคาม.

นันทวัน บุญยะประภัศร และ อรุณช โชคชัยเจริญพร, บรรณาธิการ. 2548. สมุนไพรม้พื้นบ้าน(4).

พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: สำนักพิมพ์ประชาชน จำกัด. หน้า 642-643.

สรราชัย จันทะจร, ธนายุทธ์ จิรัฐพงศ์, รัชณี ฮงประยูร และสุรัตน์วีดี จิระจินดา. 2548. การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันในไก่ไข่โดยใช้สารสกัดจากกระเพราแดง. รายงานการประชุมวิชาการสมุนไพรรไทย: โอกาสและทางเลือกใหม่ของอุตสาหกรรมการผลิตสัตว์ ครั้งที่ 3 ณ. ศูนย์ประชุมสถาบันวิจัยจุฬาภรณ์ กรุงเทพฯ. หน้า 91-96.

### ภาษาอังกฤษ

Abbas A. K., Lichtman, A. H. 2005. Cellular and molecular immunology. 5<sup>th</sup> ed. Philadelphia: Elsevier Saunder.

Agarwal, A. K., Singh, M., Gupta, N. 1994. Management of giadiasis by immunomodulatory herbal drug Pipali Rasayan. J. Pharmacol. 44: 143.

Bafna, A. R., Mishra, S. H. 2005. Immunostimulatory effect of methanol extract of *Curliquo orchioides* on immunosuppressed mice. J. Ethnopharmacol. 104: 1-4

Bani, S., Gautam, M., Sheikh, F. A., Khan, B., Satti, N. K., Suri, K. A., Qazi, G. N., Patwardhan, B. 2006. Selective Th1 up regulating activity of *Withania somnifera* aqueous extract in an experimental system using flowcytometry. J. Ethnopharmacol. 107: 107-115.

- Benacerraf, B. 1978. A hypothesis to relate the specificity of T lymphocytes and the activity of I region specific Ir in macrophages and borrower lymphocytes. *J. Immunol.* 120: 1809-1832.
- Bendjeddou, D., Lalaoui, K., Satta, D. 2003. Immunostimulating activity of the hot water soluble polysaccharide extracts of *Anacyclus pyrethrum*, *Alpinia galanga* and *Citrullus colocynthis*. *J. Ethnopharmacol.* 88: 155-160.
- Bezakova, L., Oblozinsky, M., Sykorova, M., Paulikova, I., Kostalova, D. 2005. Antilipoxygenase activity and trace elements content of *Aloe vera* in relation to therapeutic effect. *Slovenska Farmacie* 54: 43-46.
- Black, C. A. 1999. Delayed type hypersensitivity: current theories with an historic perspective [Online]. Available from: <http://dermatology.cdlib.org/DOJvol5num1/reviews/black.html>.
- Bowden, R. A. 1998. A mannose rich extract reduces inflammation by inhibiting b(2)-integrins (*Aloe vera*, neutrophil, adhesion). *Diss. Abstr. Int.* 58: 35-43.
- Brockmeyer, N. H., Kreuzfelder, E., Bluhm, C., Shen, G., Scheiermann, E., Keinecke, H. O., Ohnhaus, E. E. 1989. Immunomodulation of cimetidine in healthy volunteers. *Klin. Wochenschr.* 67: 26-30.
- Burleson, G. R., Dean, J. H., Munson, A. E. 1995. *Method in immunotoxicology*. New York: Wiley-Liss.
- Case, L. P., Carey, D. P., Hirakawa, D. A., Daristotle, L. 2000. *Canine and feline nutrition*. St. Louis: Mosby.
- Chen, J. M., Cao, P. R., Song, H. T. 1996. Purification and characterization of polysaccharide PP III from *Sterculia lychnophora* Hance. *Zhongguo Zhongyao Zazhi* 21: 39-41.
- Cheng, W., Li, J., You, T., Hu, C. 2005. Anti-inflammatory and immunomodulatory activities of the extracts from the inflorescence of *Chrysanthemum indicum* Linne. *J. Ethnopharmacol.* 101: 334-337.
- Ching, T. L., Jong, J. D., Bast, A. 1994. Structural characteristics of histamine H2 receptor antagonists that scavenge hypochlorous acid. *Eur. J. Pharmacol.* 268: 89-93.

- Davis, L., Kuttan, G. 2000. Immunomodulatory activity of *Withania somnifera*.  
J. Ethnopharmacol. 71: 193-200.
- Dietert, R. R., Hotchkiss, J. H., Austic, R. E., sung, Y.-J. 1995. Production of reactive nitrogen intermediates by macrophages. In G. R. Burleson; J. H. Dean and A. E. Munson(eds), Methods in immunotoxicology, pp. 99-117. New York: Wiley-Liss.
- Ezeamazie, C. I., Umezurike, C. C. 1989. Effect of histamine H<sub>2</sub>-receptor antagonists on acute inflammation of the rat paw oedema. J. Pharm. Pharmacol. 41: 261-265.
- Gad, S. C., Dunn, B., Dobb, D. W., Reilly, C., Walsh, R. D. 1986. Development and validation of an alternative dermal sensitization test. the mouse ear swelling test (MEST). Toxicol. Appl. Pharmacol. 84: 93-114.
- Gagnerault, M. C., Bach, J. F., Dardenne, M., Lepault, F. 1995. Two different mechanisms for the inhibition of rosette formation in mice. Mol. Immunol. 32: 177-183.
- Garcia, X., Stein, F. 2006. Nitric oxide. Sem. Pediat. Infect. Disease 17: 55-57.
- Hadden, J. W., Coffey, R. G., Hadden, E. M., Lopez-Corrales, E., Sunshine, G. H. 1975. Effect of levamisole and imidazole on lymphocyte proliferation and cyclic nucleotide level. Cell Immun. 10: 98-103.
- Henningsen, G. M., Koller, L. D., Exon, J. H., Talcott, P. A., Osborne, C. A. 1984. A sensitive delayed-type hypersensitivity model in the rat for assessing in vivo cell mediated immunity. J. Immunol. Methods 70: 153-165.
- Hunter, R. P., Short, C. R., McClure, J. R., Koch, C. E., Keowen, M. L., VanSteenhouse, J. L., Dees, A. A. 1999. Cimetidine inhibits nitric oxide associated nitrate production in a soft-tissue inflammation model in the horse. J. Vet. Pharmacol. Ther. 22: 136-147.
- Itokawa, H., Hirayama, F., Tsuruoka, S., Mizuno, K., Takaya, K., Nitta, A. 1990. Screening test for antitumor activity of crude drugs (III): Studies on antitumor activity of Indonesian medicinal plants. Shoyakugaku Zasshi 44: 58-62.
- Jackson, A., Warner, N. 1986. Preparation, staining, and analysis by flow cytometry of peripheral blood leukocytes. In N. Rose; H. Friedman and J. Fahey (eds),

- Manual of clinical laboratory immunology, pp 226-235. Washington DC: American Society for Microbiology.
- Jantan, I. B., Kang, Y. H., Suh, D. Y., Han, B. H. 1996. Inhibitory effect of Malaysian medicinal plants on the platelet-activating factor (PAF) receptor binding. *Nat. Prod. Sci.* 2: 86-89.
- Janeway, C. A., Travers, P., Walport, M., Shlomchick, M. J. 2005. *Immunobiology*. 6<sup>th</sup> ed. New York: Garland Science Publishing.
- Kang, Y., Jin, H., Zheng, G., Xie, O., Yin, J., Yu, Y. 2005. The adjuvant effect of levamisole on killed virus vaccines. *Vaccine* 23: 5543-5550.
- Karasawa A., Guo J. P., Ma X. L. 1991. Protective action of a leukotriene B<sub>4</sub> antagonist in splanchnic ischemia and reperfusion in rat. *Am. J. Physiol.* 261: 191-198.
- Kimball, E. S., Clark, M. C., Schneider, C. R., Persico, F. J. 1991. Enhancement of in vitro lipopolysaccharide-stimulated interleukin-1 production by levamisole. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 58: 385-398.
- Landsteiner, K., Chase, M. W. 1942. Experiments on transfer of cutaneous sensitivity to simple compounds. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 49: 688.
- Langmead, L., Makins, R. J., Rampton, D. S. 2004. Anti-inflammatory effect of *Aloe vera* in human colorectal mucosa in vitro. *Aliment. Pharmacol. Ther.* 19: 521-527.
- Leung, M. Y. K., Liu, C., Koon, J. C. M., Fung, K. P. 2006. Polysaccharide biological response modifiers. *Immunol. Letter* 105: 101-114.
- Manosroi, A., Saraphanchotiwitthaya, A., Manosroi, J. 2003. Immunomodulatory activity of *Clausena excavata* Burm. f. wood extracts. *J. Ethnopharmacol.* 89: 155-160.
- Manosroi<sup>a</sup>, A., Saraphanchotiwitthaya, A., Manosroi, J. 2005. In vivo immunomodulating activity of wood extracts from *Clausena excavata* Burm. f. *J. Ethnopharmacol.* 102: 5-9.
- Manosroi<sup>b</sup>, A., Saraphanchotiwitthaya, A., Manosroi, J. 2005. In vitro immunomodulatory effect of *Pouteria cambodiana* (Pierre ex Dubard) Baehni extract. *J. Ethnopharmacol.* 101: 90-94.
- Mediratta, P. K., Sharma, K. K., Singh, S. 2002. Evaluation of immunomodulatory potential of *Ocimum sanctum* seed oil and its possible mechanism of action. *J. Ethnopharmacol.* 80: 15-20.



- Mishra, L. C. 2004. Scientific Basis for Ayurvedic Therapies. Boca Raton: CRC Press.
- Mller, I., Kropfe, P., Etges, R. J., Louis, J. A. 1993. Gamma interferon response in secondary Leishmania major infection: role of CD8+ T cell. Infect. Immunol. 61: 3730-3738.
- Nose, M., Terawaki, K., Oguri, K., Okihara, Y., Yoshimatsu, K., Shimomura, K. 1998. Activation of macrophages by crude polysaccharide fractions obtained from shoots of *Glycerrhiza glabra* and hairy roots of *Glycerrhiza uralensis* in vitro. Biol. Pharm. Bull. 21: 1110-1112.
- Pantipa, S., Wang, Q., Cui, W., Barbut, S., Jantawat, P. 2006. Malva nut gum. (Part I) extraction and physicochemical characterization. Carbohydr. Polymers 64: 247-253.
- Pandey, B. L., Das, P. K. 1988. Immunopharmacological studies on *Picrorrhiza kurroa* Royle-Ex-Benth. part V: anti-inflammatory action: relation with cell types involved in inflammation. Indian. J. Physiol. Pharmacol. 32: 289-292.
- Patwardhan, B., Kalbagh, D., Patki, P. S., Nagsampagi, B. A. 1990. Search of immunomodulatory agents: a review. Indian Drugs 28: 56-63.
- Penneys, N. S. 1982. Inhibition of arachidonic acid oxidation in vitro by vehicle components. Acta. Derm-Venereol. 62: 59-61.
- Piyarat, S. 2005. Immunostimulating activity of the extract from *Scaphium scaphigerum* fruits. Master's Thesis. Inter-Department, Graduated school, Chulalongkorn University.
- Plumb, D. C. 2005. Veterinary drug handbook. 5<sup>th</sup> ed. Wisconsin: Pharma Vet Publishing.
- Puri, A., Saxena, R. P., Sumati, Guru, P. Y., Kulshreshtha, D. K., Saxena, K. C., Dhawan, B. N. 1992. Immunostimulant activity of Picroliv, the iridoid glycoside fraction of *Picrorrhiza kurroa*. Planta Med. 58: 528-532.
- Ramamoorthy, L., Kemp, M. C., Tizard, I. R. 1996. Acemannan, a  $\beta$ -(1,4)-acetylated mannan, induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. Mol. Pharmacol. 50: 878-884.



- Raso, G. M., Pacilio, M., Carlo, G. D., Esposito, E., Pinto, L., Meli, R. 2002. In-vivo and in-vitro anti-inflammatory effect of *Echinacea purpurea* and *Hypericum perforatum*. J. Pharm. Pharmacol. 54: 1379-1383.
- Rice, P. J., Adams, E. L., Ozment-Skelton, T., Gonzalez, A. J., Goldman, M. P., Lockhart, B. E., Barker, L. A., Breuel, K. F., DePonti, W. K., Kalbfleisch, J. H., Ensley, H. E., Brown, G. D., Gordon, S., Williams, D. L. 2005. Oral delivery and gastrointestinal absorption of soluble glucans stimulate increased resistance to infectious challenge. J. Pharmacol. Exp. Ther. 314: 1079-1086.
- Rich, R. R., Shearer, T. T., Kotzin, B. L., Jr, H. W. S. 2001. Clinical immunology principles and practice. 2<sup>nd</sup> ed. London: Mosby.
- Schepetkin, I. A., Quinn, M. T. 2006. Botanical polysaccharide: macrophage immunomodulation and therapeutic potential. International Immunopharmacol. 6: 317-333.
- Schrier, D. J. 1985. Effects of arthritic compounds on sheep erythrocyte induced delayed-type hypersensitivity. J. Immunopharmacol. 7: 313-323.
- Smith, P. D., Smythies, L. E., Wahl, S. M. 2001. Macrophage effector function. 2<sup>nd</sup> ed. London: Mosby.
- Stokes, K. Y., Granger, D. N. 2000. Role of nitrite oxide in ischemia reperfusion injury. In L. J. Ignarro (ed), Nitric oxide : biology and pathology, pp. 633-647. Sandiego: Academic Press.
- Stuehr, D. J., Nathan, C. J. 1987. Nitric oxide: a macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. J. Immunol. 169: 1543-1555.
- Tall, B. G., Van, T. H., Zoetmulder, F. A. 2001. Adjuvant 5 FU plus levamisole in colonic or rectal cancer: improved survival in stage II and III. Brit. J. Cancer 85: 1437-1443.
- Tanji, M. M., Cianga-Tanji, M., R, R. K., MN, M. N. S., Duarte, A. J. 1991. Inhibitory effect of cimetidine on graft survival of allotransplanted rats submitted to an active-passive enhancement protocol. Braz. J. Med. Biol. Res. 24: 933-936.

- Tripoli, D., Parks, L. C., Bruggmans, J. N. 1973. Drug-induced restoration of cutaneous delayed type hypersensitivity in anergic patients with cancer. *New Engl. J. Med.* 289: 354-357.
- Tubaro, A., Tragni, E., Del, N. P., Galli, C. L., Della, L. R. 1987. Anti-inflammatory activity of a polysaccharidic fraction of *Echinacea angustifolia*. *J. of Pharmacy & Pharmacol.* 39: 567-569.
- Turk, J. L., Parker, D., Poulter, L. W. 1972. Functional aspects of depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Immunology* 23: 493-501.
- Viraben, R., Aquilina, C., Cambon, L., Bazex, J. 1994. Allergic contact dermatitis in HIV-positive patients. *Contact dermatitis* 31: 326-327.
- Waksman, B. H. 1979. Cellular hypersensitivity and immunity: conceptual changes in the last decade. Philadelphia: Saunders.
- Wynn, S. G., Fougere, B. J. 2007. *Veterinary Herbal Medicine*. St. Louis: Mosby.
- Yamada, T., Itoh, A., Kanzaki, M., Suzuki, E., Ashton, P. 2000. Local and geographical distribution for a tropical tree genus *Scaphium* (Sterculiaceae) in the far east. *Plant Ecol.* 148: 23-28.
- Yagi, A., Hrada, N., Shimomura, K., Nishioka, I. 1987. Bradykinin-degrading glycoprotein in *Aloe arborescens* var. *natalensis*. *Planta Med.* 19-21.
- Yagi, A., Kabash, A., Mizuno, K., Moustafa, S. M., Khalifa, T. I., Tsuji, H. 2003. Radical scavenging glycoprotein inhibiting cyclooxygenase-2 and thromboxane A2 synthase from *Aloe vera* gel. *Planta Med.* 69: 269-271.

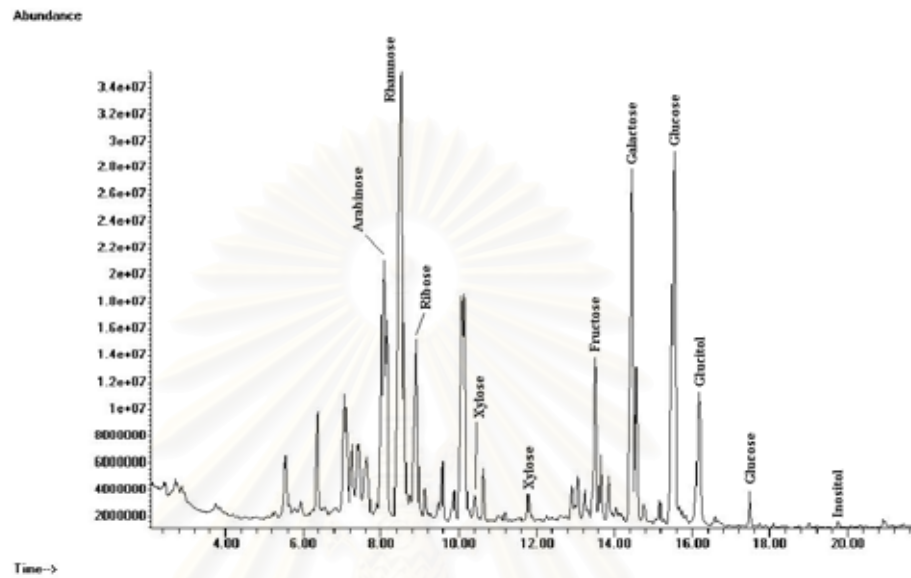


ภาคผนวก

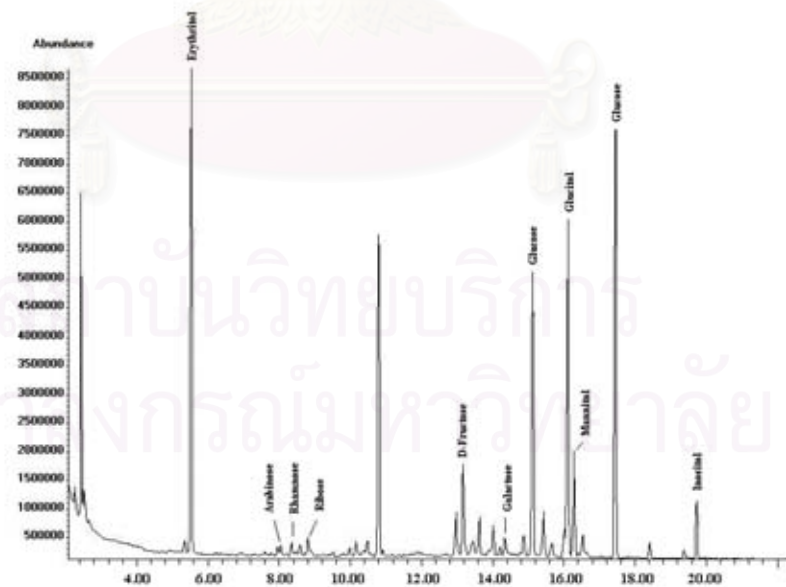
สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

## ภาคผนวก ก

การพิสูจน์เอกลักษณ์ (identification) ของ *Scaphium scaphigerum* ด้วยวิธี GC-MS



รูปที่ 21 ภาพ chromatogram ของสารสกัดเอทานอลของ *Scaphium scaphigerum*



รูปที่ 22 ภาพ chromatogram ของสารสกัดน้ำของ *Scaphium scaphigerum*

## ภาคผนวก ข

### ตารางผลการทดลอง

#### การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity

Group	Treatment	Nitrite concentration ( $\mu\text{M}$ )
Control	-	13.67 $\pm$ 0.92
SS1	SS (19.5mg/kg)	14.43 $\pm$ 0.89
SS2	SS (39 mg/kg)	22.33 $\pm$ 3.53
SS3	SS (78 mg/kg)	27.82 $\pm$ 6.91 **
Lev	Levamisole (25 mg/kg)	24.32 $\pm$ 1.35 *

ตารางที่ 1ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อเซลล์ peritoneal macrophage ในการหลั่ง nitric oxide ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ทางสถิติโดย วิธี one way ANOVA เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่  $p < 0.05$  และ \*\* ที่  $p < 0.01$

#### การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูปกติ

Group	Treatment	Inflammation %	Antibody titer ( $\log_2$ scale)	
			Week1	Week2
Control	-	11.2 $\pm$ 1.6	7.66 $\pm$ 0.33	8.33 $\pm$ 0.21
Dex	Dexamethasone 1mg/kg	3.81 $\pm$ 1.49 **	7.28 $\pm$ 0.42	7.42 $\pm$ 0.20 *
SS1	SS (19.5 mg/kg)	7.03 $\pm$ 1.25	8.00 $\pm$ 0.21	8.14 $\pm$ 0.26
SS2	SS (39 mg/kg)	5.84 $\pm$ 2.43 *	8.00 $\pm$ 0.00	8.71 $\pm$ 0.18
SS3	SS (78 mg/kg)	2.11 $\pm$ 1.02 ** #	7.85 $\pm$ 0.14	8.85 $\pm$ 0.34
Cim	Cimetidine 30 mg/kg	0.77 $\pm$ 0.54 **	7.66 $\pm$ 0.21	8.16 $\pm$ 0.16

ตารางที่ 2 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยา DTH และการสร้างแอนติบอดีในหนูปกติ ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย  $\pm$  ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ทางสถิติโดย วิธี one way ANOVA เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่  $p < 0.05$  และ \*\* ที่  $p < 0.01$  เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 ที่  $p < 0.05$

การประเมินภูมิคุ้มกันแบบ adaptive immunity ในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

Group	Treatment (intraperitoneal / oral)	Inflammation %	Antibody titer (log <sub>2</sub> scale)
NS-control	- / -	11.58 ± 1.88	6.71 ± 0.28
CP-control	CP / -	3.28 ± 1.03	3.86 ± 0.34
SS1	CP / SS 19.5 mg/kg	4.53 ± 0.86	4.00 ± 0.53
SS2	CP / SS 39 mg/kg	7.69 ± 1.38 **	4.71 ± 0.18
SS3	CP / SS 78 mg/kg	9.22 ± 1.06 ** ##	5.43 ± 0.36 ** ##
Lev	CP / levamisole 25 mg/kg	6.86 ± 0.40 *	4.71 ± 0.35

ตารางที่ 3.ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อการเกิดปฏิกิริยาDTH และการสร้างแอนติบอดีในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน  
ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ทางสถิติโดย วิธี one way ANOVA  
เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่  $p < 0.05$  และ \*\* ที่  $p < 0.01$   
เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 ที่  $p < 0.05$  และ ## ที่  $p < 0.01$



### การตรวจนับจำนวนเม็ดเลือดขาวและ lymphocyte

ตารางที่ 4 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณเม็ดเลือดขาวและ lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน

Group	Treatment (intraperitoneal / oral)	Leukocyte (cell/microliter)	lymphocyte (cell/microliter)
NS-control	- / -	3886 ± 369	3362 ± 339
CP-control	CP / -	829 ± 124	783 ± 120
SS1	CP / SS 19.5 mg/kg	871 ± 165	840 ± 167
SS2	CP / SS 39 mg/kg	1257 ± 201	1220 ± 202
SS3	CP / SS 78 mg/kg	1767 ± 387 * #	1681 ± 377 * #
Lev	CP / levamisole 25 mg/kg	1733 ± 295 *	1606 ± 293 *

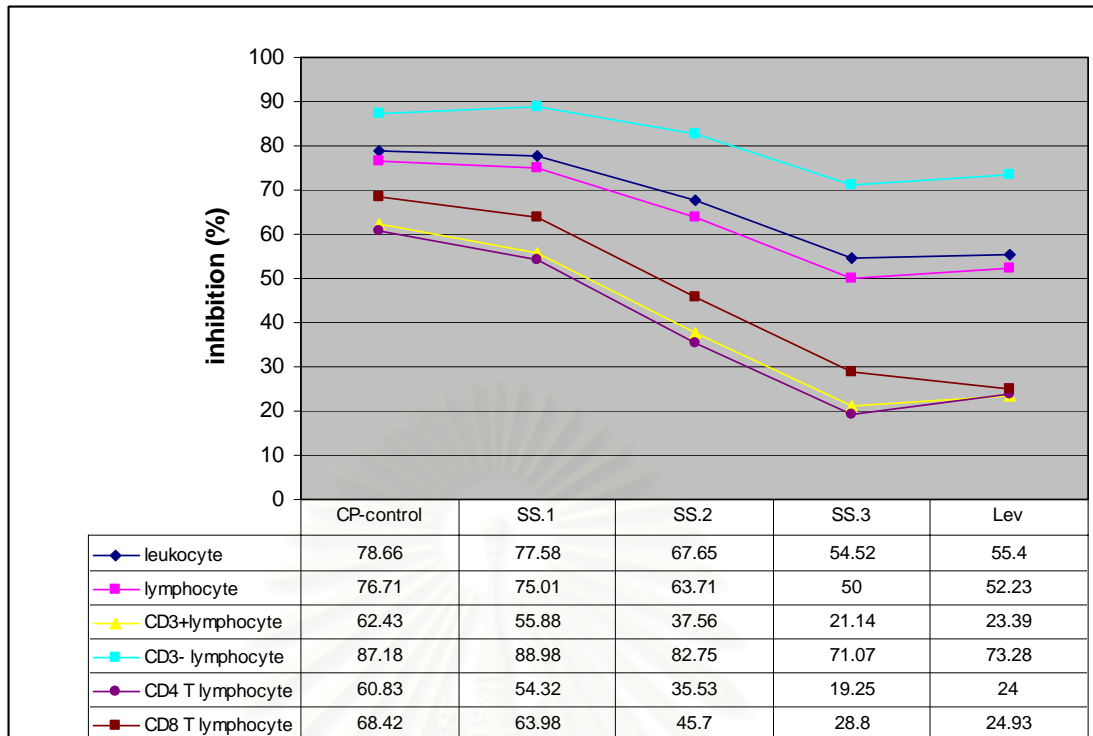
ตารางที่ 5 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ T lymphocyte และ CD3<sup>+</sup> lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน

Group	Treatment (intraperitoneal / oral)	T lymphocyte (cell/microliter)	CD3 <sup>+</sup> lymphocyte (cell/microliter)
NS-control	- / -	1419 ± 127	1943 ± 247
CP-control	CP / -	533 ± 99	249 ± 59
SS1	CP / SS 19.5 mg/kg	626 ± 144	214 ± 27
SS2	CP / SS 39 mg/kg	886 ± 172	335 ± 37
SS3	CP / SS 78 mg/kg	1119 ± 253 * #	562 ± 142
Lev	CP / levamisole 25 mg/kg	1087 ± 212 *	519 ± 88

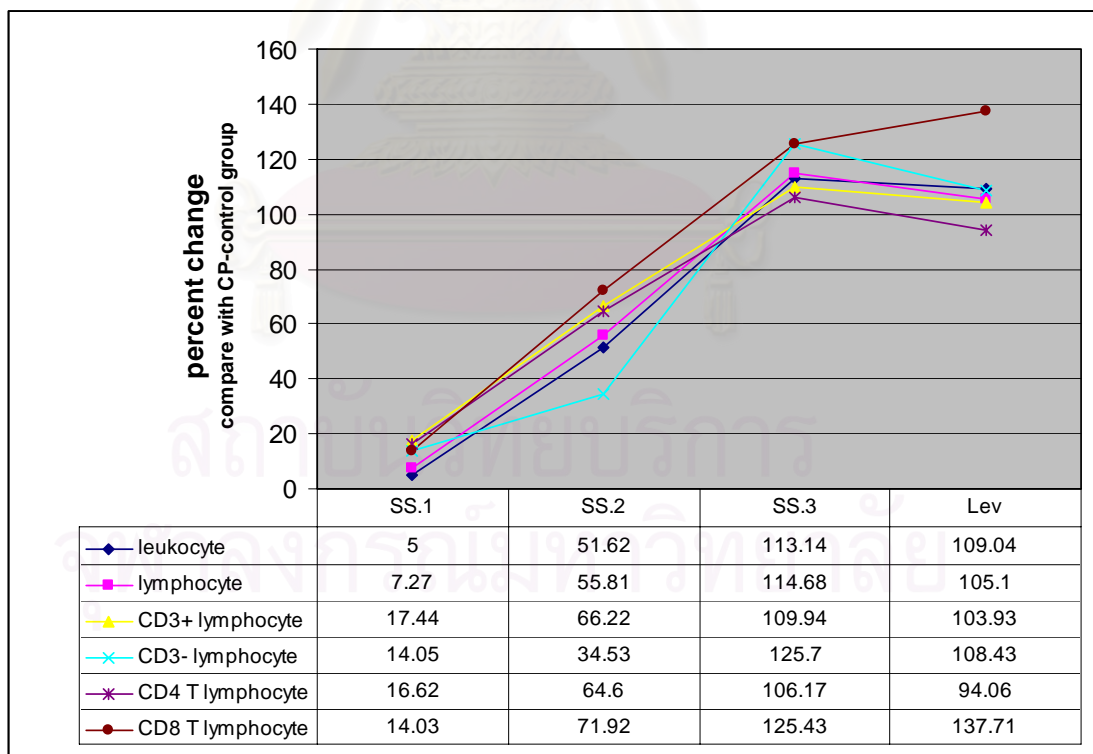
ตารางที่ 6 ฤทธิ์ของผล *S. scaphigerum* ที่มีต่อปริมาณ CD4<sup>+</sup> T lymphocyte และ CD8<sup>+</sup> T lymphocyte ในหนูที่ได้รับยาควบคุมคุ้มกัน

Group	Treatment (intraperitoneal / oral)	CD4 <sup>+</sup> T lymphocyte (cell/microliter)	CD8 <sup>+</sup> T lymphocyte (cell/microliter)
NS-control	- / -	1075 ± 101	361 ± 28
CP-control	CP / -	421 ± 74	114 ± 26
SS1	CP / SS 19.5 mg/kg	491 ± 113	130 ± 30
SS2	CP / SS 39 mg/kg	693 ± 134	196 ± 38
SS3	CP / SS 78 mg/kg	863 ± 201 *	257 ± 51* #
Lev	CP / levamisole 25 mg/kg	817 ± 159 *	271 ± 58 **

ค่าที่แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย วิเคราะห์ทางสถิติโดย วิธี one way ANOVA เครื่องหมาย \* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่  $p < 0.05$  และ \*\* ที่  $p < 0.01$  เครื่องหมาย # แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม SS1 ที่  $p < 0.05$  และ ## ที่  $p < 0.01$



รูปที่ 23 percent inhibition ของค่าโลหิตวิทยาในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน



รูปที่ 24 percent change ของค่าโลหิตวิทยาในหนูที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกัน

เปรียบเทียบผลของการให้สารทดสอบ

## ภาคผนวก ค

## น้ำยาเคมี

## 1. 10X Phosphate buffer saline (PBS) 1 ลิตร

NaCl	80	กรัม
KCl	2	กรัม
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	9.136	กรัม
NH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2	กรัม
ddH <sub>2</sub> O	900	กรัม

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.4 ด้วย 1 M HCl

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร กำจัดเชื้อด้วยความร้อน

## 2. DMEM stock solution 1 ลิตร

DMEM powder	10.4	กรัม
NaHCO <sub>3</sub>	1.5	กรัม
HEPE	10.0	มล.
ddH <sub>2</sub> O	900	มล.

ปรับค่า pH ให้เท่ากับ 7.2 ด้วย 1 M HCl

ปรับปริมาตรให้ครบ 1 ลิตร กำจัดเชื้อด้วยการกรอง

## 3. Complete DMEM 100 มล.

DMEM stock solution	90	มล.
Fetal bovine serum	10	มล.

## ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

น.สพ. ภาคภูมิ ศิริอาชาวัฒนา เกิดที่ กรุงเทพมหานคร เมื่อวันที่ 16 มิถุนายน 2514 จบการศึกษา สัตวแพทยศาสตรบัณฑิต จากมหาวิทยาลัยขอนแก่น ในปี พศ. 2538 ด้วยมีความสนใจในการแพทย์ทางเลือกจึงได้ศึกษาต่อที่ อายurvedaวิทยาลัย และสำเร็จการศึกษาในปี พศ. 2546



สถาบันวิทยบริการ  
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย