ผลของสารสกัดมะเม่า (*Antidesma ghaesembilla*) ต่อจำนวน CD4 และ CD8 และการทำหน้าที่ของ NK cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

นางสาววินันดา แสงทอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2550
ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECT OF MAMAO (*ANTIDESMA GHAESEMBILLA*) EXTRACT ON CD4 AND CD8 COUNT AND NK CELLS ACTIVITY

Miss Winanda Sangthong

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2007

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์	ผลของสารสกัดมะเม่า *(Antidesma ghaesembilla)* ต่อจำนวน CD4 และ CD8 และการทำหน้าที่ของ NK cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์
โดย	นางสาววินันดา แสงทอง
สาขาวิชา	วิทยาศาสตร์การแพทย์
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์ นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิง วิไล ชินธเนศ)

..... อาจารย์ที่ปรึกษา

(รองศาสตราจารย์ โสภิต ธรรมอารี)

..... กรรมการ

(ศาสตราจารย์ (พิเศษ) คร. แพทย์หญิง สมบูรณ์ เกียรตินันทน์)

..... กรรมการ

(รองศาสตราจารย์ คร. จินตนา จิรถาวร)

..... กรรมการ

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ คร. วัชรี ลิมปนสิทธิกุล)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วินันดา แสงทอง : ผลของสารสกัดมะเม่า (*Antidesma ghaesembilla*) ต่อจำนวน CD4 และ CD8 และการทำหน้าที่ของ NK cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ (EFFECT OF MAMAO (*ANTIDESMA GHAESEMBILLA*) EXTRACT ON CD4 AND CD8 COUNT AND NK CELLS ACTIVITY) อ.ที่ปรึกษา : รศ.โสภิต ธรรมอารี 66 หน้า.

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะเม่าไข่ปลา (*A. ghaesembilla*) ด้วยเอทานอลต่อจำนวน CD4 และ CD8 และการทำหน้าที่ของ NK cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

ผลการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยวิธี MTT ที่ความเข้มข้นต่างๆ พบว่าสารสกัดไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ใช้ศึกษา การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ลิมโฟไซต์ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติ ด้วยวิธี ^{3}H-thymidine incorporation method พบว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้แก่ 20, 100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร โดยที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรให้ผลในการเพิ่มจำนวนเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามฤทธิ์ของสารสกัดที่ทำให้เซลล์ลิมโฟไซต์เจริญเพิ่มจำนวนนั้นมีค่าต่ำกว่าฤทธิ์ของสาร phytohemagglutinin (PHA) ที่ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัม ต่อมิลลิลิตรอย่างมาก การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อปริมาณ $CD4^{+}$ และ $CD8^{+}$ T cells โดยการใช้แอนติบอดีต่อโมเลกุลของ CD3, CD4 และ CD8 พบว่าสารสกัดไม่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวน $CD4^{+}$ และ $CD8^{+}$ T cells การทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดต่อการกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ โดยการวิเคราะห์การทำงานของ NK cells ด้วยวิธี ^{51}Cr release cytotoxicity assay พบว่าสารสกัดที่ความเข้มข้น 4 และ 20 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cells ได้ ในขณะที่ความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้น (100 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร) กลับมีผลทำให้การทำงานของ NK cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ โดยสรุปสารสกัด *A. ghaesembilla* ไม่มีผลเพิ่มจำนวนของ $CD4^{+}$ และ $CD8^{+}$ T cells แต่สามารถเพิ่มการทำงานของ NK cells ได้ จากข้อมูลการศึกษานี้ควรศึกษากลไกอื่นๆ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกาย และศึกษาผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ในเม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือดผู้ป่วยโรคเอดส์ อาจทำให้สามารถพัฒนามะเม่าเป็นยาบำบัดรักษาโรคต่อไปได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต.....วินันดา แสงทอง.....

ปีการศึกษา 2550 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....

4774781430 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : *ANTIDESMA GHAESEMBILLA*/ CYTOTOXICITY/ CELL PROLIFERATION/ CD4/CD8 T CELLS/NK CELLS ACTIVITY

WINANDA SANGTHONG : EFFECT OF MAMAO (*ANTIDESMA GHAESEMBILLA*) EXTRACT ON CD4 AND CD8 COUNT AND NK CELLS ACTIVITY. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF. SOPIT THAMAREE., 66 pp.

This study aimed at determining the effect of Mamao (*Antidesma ghaesembilla*) extract (AGE) on CD4 and CD8 count and NK cells activity in normal lymphocyte (PBMC). Cytotoxic effect of the extract was evaluated by MTT assay. The result indicated that all concentrations of the AGE were not toxic to PBMC. The stimulating effect of the AGE on normal lymphocyte proliferation was evaluated by ^{3}H-thymidine incorporation method. The AGE at the concentrations of 20, 100 and 500 µg/ml stimulated the proliferation of PBMC, the significant stimulation was seen at the concentration of 500 µg/ml. However, this stimulating effect of the AGE is much less potent than the effect of 10 µg/ml phytohemagglutinin (PHA). The $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells count were determined using antibodies against CD3, CD4 and CD8 and detecting by flow cytometer. The result indicated that the AGE did not increased these cells. The non-specific immunostimulating effect of the MME was investigated by measurement of NK cells activity using ^{51}Cr release cytotoxicity assay. Although the extract at concentrations of 4 and 20 µg/ml stimulated NK cells activity, high concentration (100 and 500 µg/ml) significantly reduced NK cells activity. In conclusion, the extract of AGE did not increased $CD4^{+}$ and $CD8^{+}$ T cells, but increased NK cells activity. The results of this study suggested further study on other immunostimulating mechanisms and study the effect of AGE on PBMC obtained from AIDS patients in order to develop AGE for therapeutic use.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study	Medical Science	Student's Signature……W. Sangthong……
Academic year	2007	Advisor's Signature……Thamaree S……
		Co-advisor's Signature……

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์โสภิต ธรรมอารี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ดร. ทรงศรี เกษมพิมลพร และ คุณวชิราภรณ์ แสงสีสม ฝ่ายวิจัยและพัฒนา สถานเสาวภา สภากาชาดไทย และขอขอบคุณ ศ. นพ. เกียรติ รักษ์รุ่งธรรม ดร. สุนี สิริวิชยกุล และ คุณสุปราณี บูรณประดิษฐ์กุล หน่วยโรคภูมิแพ้-ภูมิคุ้มกันทางคลินิก คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ ในการทำวิจัยครั้งนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาและคำแนะนำต่างๆ จนทำให้การวิจัยครั้งนี้สำเร็จไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรี ลิมปนสิทธิกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในทุกๆ ด้านเสมอมา และเป็นกำลังใจให้ในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับปริญญามหาบัณฑิต

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา และเพื่อนๆ ที่สนับสนุนและเป็นกำลังใจในการศึกษาและการทำวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย..... ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง..... ญ

สารบัญภาพ..... ฎ

คำอธิบายสัญญาลักษณ์และคำย่อ..... ฐ

บทที่ 1 บทนำ..... 1

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย..... 3

1.3 สมมติฐานการวิจัย..... 3

1.4 รูปแบบการวิจัย..... 3

1.5 วิธีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย..... 3

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย..... 4

1.7 ปัญหาทางจริยธรรม..... 4

1.8 คำสำคัญ..... 4

บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม..... 5

2.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน..... 5

2.1.1 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ 6

2.1.1.1 สิ่งกีดขวางการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม..... 6

2.1.1.2 การกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว..... 6

2.1.1.3 ระบบคอมพลีเมนท์..... 7

2.1.1.4 Natural Killer Cells..... 8

2.1.1.5 อินเตอร์เฟียรอน..... 8

หน้า

2.1.2 การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ..... 8
2.1.2.1 Humoral immune response…..... 9
2.1.2.2 Cell mediated immune response..... 9
2.1.3 Lymphocyte..... 10
2.1.3.1 B lymphocyte..... 12
2.1.3.2 T lymphocyte..... 12
2.1.3.3 Natural killer cells..... 14
2.1.4 Cytokines..... 16
2.2 มะเม่าไข่ปลา..... 17
2.3 ฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชสมุนไพรบางชนิด..... 20

บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย 24
3.1 สมุนไพรและแหล่งที่มา 24
3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี..... 25
3.2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์..... 25
3.2.2 สารเคมี..... 25
3.3 ตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ศึกษา..... 26
3.3.1 เซลล์เม็ดเลือดขาว..... 26
3.3.2 The human erythroleukemia cell line: K562..... 26
3.4 การเตรียมสารละลายสมุนไพร..... 26
3.5 วิธีดำเนินการวิจัย..... 26
3.5.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Mononuclear cells..... 26
3.5.2 การเลี้ยง erythroleukemia cell line K562..... 27
3.5.3 การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (MTT assay)..... 28
3.5.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (Proliferation Assay)..... 29
3.4.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 30

หน้า

3.4.6 การวิเคราะห์การทำงานของ NK cell ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* 31
3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล..... 32

บทที่ 4 ผลการวิจัย..... 33
4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสาร PHA (positive control) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell..... 33
4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell..... 34
4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ที่มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell 35
4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A.ghaesembilla*..... 36
4.5 การวิเคราะห์การทำงานของ NK cell (NK cell activity) ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 37
4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ NK cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 40

บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย..... 42

รายการอ้างอิง..... 47
ภาคผนวก..... 53
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 66

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

ตารางที่ **หน้า**

1. ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells (PBMC) ที่แยกจากเลือดของคนปกติ..... 56
2. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells (PBMC) ที่แยกจากเลือดของคนปกติ..... 57
3. %CD4 count ใน PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 58
4. %CD8 count ใน PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 59
5. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cells..... 60
6. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* และผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ร่วมกับ IL-2 ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cells..... 61
7. %CD16-56PE count ใน PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 62

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญภาพ

ภาพที่ **หน้า**

1. แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ innate และ adaptive immunity 5
2. แสดงกระบวนการเกิด phagocytosis..... 7
3. แสดงภาพการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ 10
4. แสดง Lymphocyte ชนิดต่าง ๆ 11
5. แสดงการทำงานของ T lymphocytes 13
6. แสดง Human NK cell subsets 14
7. แสดงกลไกการทำงานของ NK cells 15
8. แสดงการกระตุ้นการทำงานของ NK cells ด้วย cytokine 16
9. แสดงลักษณะของต้นมะเม่าไข่ปลา..... 18
10. แสดงการเปลี่ยนแปลงของสาร MTT 22
11. แสดงการสกัดสมุนไพรมะเม่า..... 24
12. ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารละลาย PHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (PBMC) ด้วยวิธี MTT assay..... 33
13. ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยวิธี MTT assay..... 34
14. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว mononuclear cell ด้วยวิธี [^{3}H] Thymidine incorporation method..... 35
15. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณ $CD4^{+}$ T cells และ $CD8^{+}$ T cells โดยการย้อมเซลล์ด้วย anti-CD3/CD4/CD8 แล้ววิเคราะห์ด้วย Flow cytometer..... 36
18. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ด้วยวิธี ^{51}Cr release assay..... 37
17. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ, PHA, IL-2 และสารสกัด *A. ghaesembilla* ร่วมกับ IL-2 ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ด้วยวิธี ^{51}Cr release assay..... 39

ภาพที่ **หน้า**

18. ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณของ NK cell โดยการย้อมเซลล์ด้วย anti-CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer..... 41
19. แสดง Chromatogram ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร..... 54
20. แสดง Chromatogram ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร..... 54
21. แสดงสูตรโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากการทำ HPLC ของสารสกัด *A. ghaesembilla*..... 55

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

ADCC	antibody dependent cell mediated cytotoxicity
AGE	*Antidesma ghaesembilla* extract
AIDS	Acquired Immunodeficiency Syndrome
ARC	AIDS related complex
APC	Antigen-presenting cell
CD	cluster of differentiation
CMIR	cell-mediated immune response
CO_2	carbondioxide
Con A	concanavalin A
Cr	chromium
CTL	cytotoxic T lymphocyte
DMSO	dimethyl sulfloxide
DTH	delayed-type hypersensitivity
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
FBS	Fetal Bovine Serum
FITC	Fluorescein isothiocyanate
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
GL	Glycyrrhizin
^{3}H-Tdr	tritiated thymidine
HIR	humoral immune response
HIV	human immunodeficiency virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
IFN-	Interferon
Ig	immunoglobulin
IL	Interleukin
ILT	Immunoglobulin-like transcripts
KCl	potassium chloride
KIR	Killer Immunoglobulin-like receptors
KOH	potassium hydroxide
LAK	lymphokines-activated killer cells

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

mg	milligram(s)
ml	milliliter(s)
M-CSF	Monocyte-Colony Stimulating Factor
MHC	major histocompatibility complex
MTT	3-(4,5-dimethythiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
N	sample size
NaCl	sodium chloride
NCR	natural cytotoxicity receptors
NK	natural Killer
O_2	oxygen
OD	optical density
P	probability
PBS	phosphate buffer saline solution
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
PE	Phycoerythrin
PerCD	Peridinin chlorophyll protein
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
PHA	phytohemagglutinin
RA	Rheumatiod arthritis
SLE	Systemic lupus erythematosus
S.E.M.	standard error of mean
TCR	T cell receptor
T_H	helper T cell
T_C	cytotoxic T cell
T_s	suppressor T cell
Grz	granzymes
°C	degree Celsius
μg	microgram (s)
nm	nanometer (s)
%	percent
/	per

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายมีความสำคัญอย่างยิ่งในการต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมต่างๆ รวมทั้งจุลชีพก่อโรคหลาย ๆ ชนิด ในภาวะปกติร่างกายจะมีกลไกในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย โดยอาศัยกระบวนการต่าง ๆ ทั้งในลักษณะของภูมิต้านทานแบบไม่จำเพาะเจาะจงที่มีโดยธรรมชาติ (innate immunity) ที่ประกอบด้วยระบบปกคลุมร่างกาย สารเคมีในร่างกาย ขบวนการ phagocytosis ระบบ complement และ cytokine ต่าง ๆ หรืออาศัยภูมิคุ้มกันแบบที่จำเพาะเจาะจง (adaptive immunity) ที่เป็นการทำงานร่วมกันของระบบ humoral immune response (HIR) และระบบ cell-mediated immune response (CMIR) ซึ่งการทำงานของระบบต่าง ๆ เหล่านี้จะเกิดขึ้นแตกต่างกันไปขึ้นกับชนิดของการได้รับจุลชีพนั้น ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย เชื้อรา ไวรัส หรือปาราสิต ซึ่งถ้าการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายบกพร่อง เช่นในผู้ป่วยเอดส์ที่ติดเชื้อไวรัส เอช ไอ วี (HIV) ร่างกายก็จะเกิดการเจ็บป่วยด้วยโรคต่าง ๆ และในบางคนที่เจ็บป่วยด้วยโรคอื่น ๆ อยู่ก่อนแล้วก็อาจเกิดโรคแทรกซ้อนหรือเกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสได้ง่ายขึ้นจากการที่มีภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง[1,2,3,4]

การศึกษาค้นคว้าวิจัยเพื่อค้นหายาชนิดใหม่จากพืชสมุนไพรได้ดำเนินมาอย่างต่อเนื่อง โดยมีวัตถุประสงค์ในการค้นหาสารที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา (pharmacologically active compounds) เพื่อนำมาใช้หรือพัฒนาเป็นยารักษาโรค ซึ่งฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่กำลังได้รับความสนใจศึกษากันมากในขณะนี้ได้แก่ ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulating/immunomodulatory activity)[5,6] ปัจจุบันร่างกายของคนเราต้องเผชิญกับภาวะเครียดต่างๆอย่างต่อเนื่อง การได้รับสารจากในสิ่งแวดล้อม เช่น ยาปราบศัตรูพืช สารก่อภูมิแพ้ การได้รับสารเคมีหรือ รังสีบำบัดในระยะเวลานาน หรือภาวะความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง จะมีผลทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายทำหน้าที่ลดลง จึงมีโอกาสเกิดการติดเชื้อโรคต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นแบคทีเรีย หรือไวรัส ตลอดจนเสี่ยงต่อการเกิดโรคมะเร็ง ในปัจจุบันปัญหาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพมีจำนวนชนิดเพิ่มขึ้นเรื่อยๆ ตลอดจนอุบัติการณ์ของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) ก็มีจำนวนมากขึ้นโดยเฉพาะอย่างยิ่งวัณโรค ซึ่งกลับมาเป็นปัญหาอีกครั้ง โดยเฉพาะผู้ป่วยเอดส์ จึงเกิดแนวคิดที่จะนำความรู้เกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกันด้าน

ต่างๆ ของร่างกายมาประยุกต์ใช้ในการบำบัดรักษาโรค (immunotherapy) เพิ่มมากขึ้น เพื่อทำให้ผู้ป่วยสามารถมีคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้น หรือมีอายุได้นานขึ้นหากระบบภูมิคุ้มกันของผู้ป่วยได้รับการฟื้นฟู การค้นคว้าวิจัยเพื่อหาสารที่มีฤทธิ์ในการปรับภาวะภูมิคุ้มกันของร่างกาย ไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นภูมิคุ้มกันหรือยับยั้งสารหรือเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่พึงปรารถนา น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีส่วนช่วยในการรักษาโรคให้ได้ผลดียิ่งขึ้น และสามารถทำให้ผู้ป่วยมีชีวิตที่ยืนยาวขึ้นได้[7,8,9]

ในปัจจุบันได้มีการค้นพบสารจากผลิตภัณฑ์ธรรมชาติมากมาย โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารสกัดจากพืชสมุนไพร ซึ่งหลายประเทศได้ให้ความสำคัญกับการนำทรัพยากรธรรมชาติภายในประเทศมาใช้เป็นวัตถุดิบที่สำคัญในการศึกษาค้นคว้าเพื่อผลิตยาที่มีคุณภาพและมีต้นทุนในการผลิตที่ต่ำลง ทำให้มีการเล็งเห็นความสำคัญของสมุนไพรที่ใช้สืบทอดกันมายาวนานมากขึ้น ผนวกกับระบบการค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีที่ก้าวหน้าและทันสมัยในหลายๆ ด้าน รวมกับประสบการณ์การใช้สมุนไพรของประชาชนเข้าด้วยกันทำให้มีสมุนไพรหลากหลายชนิดที่ผ่านการค้นคว้าวิจัยจนสามารถพัฒนาและผลิตเป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เกิดขึ้นมากมายในหลายประเทศ

ประเทศไทยเป็นประเทศที่มีความหลากหลายทางด้านชีวภาพ อุดมไปด้วยพรรณไม้นานาชนิดรวมทั้งพืชสมุนไพร มีสมุนไพรจำนวนมากที่นำมาค้นคว้าวิจัยและพัฒนาเพื่อที่จะนำมาผลิตเป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาโรคและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้ร่างกาย และมีสมุนไพรไทยมากกว่า 18 ชนิดที่ได้ทำการศึกษาแล้วพบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ HIV ต้านเชื้อฉวยโอกาส และกระตุ้นการทำงานระบบภูมิคุ้มกันได้ เช่น มะระขี้นก ฟ้าทลายโจร บอระเพ็ด[9] เถาวัลย์เปรียง[10] และดอกดินแดง[11] เป็นต้น นอกจากสมุนไพรที่กล่าวมาข้างต้นนี้ ยังมีสมุนไพรอีกหลายชนิดที่น่าจะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน มะเม่า (*Antidesma ghaesembilla*) ก็เป็นสมุนไพรอีกชนิดหนึ่งที่น่าจะนำมาศึกษา เพราะมีการใช้กันอย่างแพร่หลายในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ภาคใต้ และบริเวณเขตติดต่อกับประเทศกัมพูชา นอกจากนี้ยังมีรายงานการวิจัยเบื้องต้นที่พบว่าสารสกัดสมุนไพรมะเม่าหลวง (*A. acidum*) สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว เพิ่มปริมาณ Interferon gamma (IFN-γ) และ Interleukin-2 (IL-2)[12] ได้ จากผลการศึกษาเบื้องต้นดังกล่าวนี้จึงเป็นที่มาที่น่าจะนำสมุนไพรมะเม่า (*A. ghaesembilla*) มาทำการศึกษาต่อในส่วนของฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันด้านอื่นๆ ที่ยังไม่ได้ทำการศึกษา เพื่อให้ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานที่จะยืนยันฤทธิ์ของสมุนไพรมะเม่าในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objective)

เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดมะเม่า (*A. ghaesembilla)* ในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนเซลล์เม็ดเลือดขาว เพิ่มปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells และการทำงานของ NK cells ในเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (PBMC) ที่แยกจากเลือดของคนปกติในหลอดทดลอง

1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

สารสกัด *A. ghaesembilla* น่าจะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันโดยการเพิ่มประชากรย่อยของ T lymphocyte (CD4/CD8 T cells) และกระตุ้นการทำงานของ Natural killer cells ได้

1.4 รูปแบบการวิจัย (Research design)

รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Experimental Research

1.5 วิธีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย (Study design and processes)

ประกอบด้วยขั้นตอนดังต่อไปนี้

1.5.1 การสกัดสารสกัด *A. ghaesembilla* ด้วย 95% ethanol โดย ผศ. ปราณี นันทศรี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

1.5.2 การศึกษาพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารสกัดด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) โดย ผศ. ปราณี นันทศรี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ เพื่อให้ได้ HPLC Chromatogram

1.5.3 การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่มีต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยวิธี MTT assay

1.5.4 การศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวน (Cell Proliferation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยวิธี [^{3}H] Thymidine incorporation method

1.5.5 การวิเคราะห์หาปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* โดยการนับจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นจากการย้อมเซลล์ด้วย monoclonal antibodies ด้วยเครื่อง Flow cytometer

1.5.6 การวิเคราะห์การทำงานของ NK cell ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* ด้วยวิธี ^{51}Cr release assay

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Anticipated benefits from the study)

1. เพื่อทราบประสิทธิผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

2. เพื่อเป็นข้อมูลเบื้องต้นสำหรับการศึกษาในขั้นต่อไปในด้านต่างๆ และหาสารสำคัญใน *A. ghaesembilla* ที่ทำหน้าที่ในการออกฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน

3. นำผลการทดลองที่ได้ไปศึกษาตามขั้นตอนการพัฒนายาจากสมุนไพรและศึกษาทางคลินิกต่อไป

1.7 ปัญหาจริยธรรม (Ethical Consideration)

การวิจัยนี้เป็นการทดลองแบบ *in vitro* โดยได้รับเลือดมาจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ซึ่งไม่ทราบชื่อของผู้บริจาคโลหิตและไม่ทำให้เกิดความเสี่ยงใดๆ ต่อผู้บริจาคโลหิต ทั้งนี้โครงร่างการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย แล้วก่อนดำเนินการวิจัย (ดู Certificate of Approval ในภาคผนวก)

1.8 คำสำคัญ (Key words)

สารสกัด *A. ghaesembilla*

Cytotoxicity

Cell Proliferation

CD4/CD8 T cells

NK cells activity

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

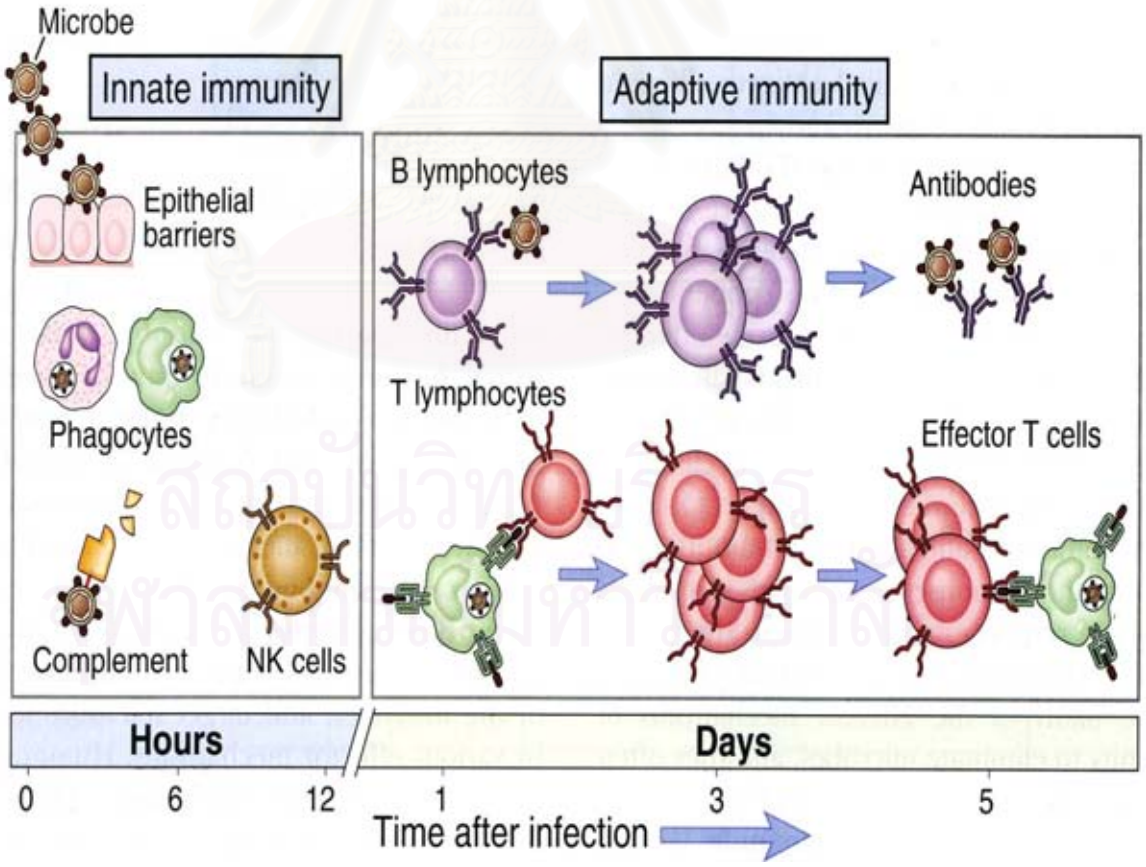
บทที่ 2

ทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

2.1 การตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน (Immune Response)[1,2,3,34,36]

เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกายต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย จากการทำงานของเซลล์และอวัยวะต่างๆ เชื่อมโยงกันเพื่อที่จะทำลายและกำจัดสิ่งแปลกปลอมให้ออกไปจากร่างกายโดยเร็วและมีประสิทธิภาพ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของร่างกายแบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ

- nonspecific (innate) immune response
- specific (adaptive) immune response



ภาพที่ 1 แสดงการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันแบบ innate และ adaptive immunity[36]

2.1.1. การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ [nonspecific (innate) immune response] [1,2,3,34]

เป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่มีมาแต่กำเนิด (Innate immunity) หรือเกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ (Natural immunity) โดยเกิดขึ้นเมื่อร่างกายได้รับสิ่งแปลกปลอมนั้นเป็นครั้งแรกหรือแม้ได้รับอีกในครั้งต่อมา ร่างกายก็อาจใช้วิธีนี้ร่วมกับการตอบสนองของภูมิคุ้นกันแบบจำเพาะ ซึ่งเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมจะถูกกำจัดออกไปโดยอาศัยองค์ประกอบต่างๆ ของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย ได้แก่

2.1.1.1 สิ่งกีดขวางการบุกรุกของสิ่งแปลกปลอม (Mechanical Barriers)

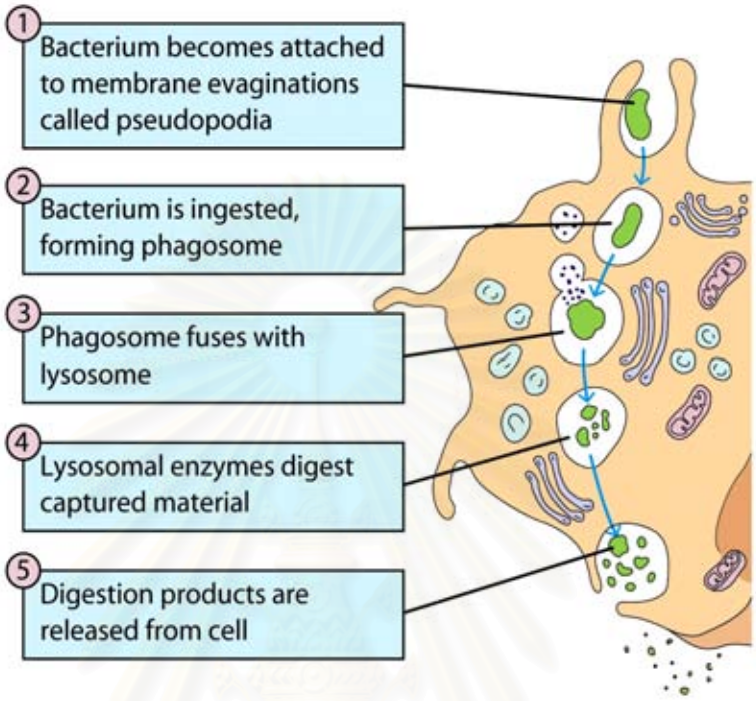
ร่างกายจะมีองค์ประกอบที่จะช่วยป้องกัน ต่อต้านการบุกรุกของเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมต่าง ๆ ซึ่งถือเป็นกลไกการป้องกันด่านแรกของร่างกาย ได้แก่ ผิวหนัง เยื่อเมือกที่บุตามอวัยวะต่างๆ ขนอ่อน (cilia) น้ำตา ระดับอุณหภูมิภายในร่างกาย ปฏิกิริยา Reflex เช่น การขับถ่ายปัสสาวะ หรือ อุจจาระ การไอ การจาม เป็นการช่วยขับเอาสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายได้ ถ้าเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสามารถผ่านเครื่องกีดขวางเหล่านี้มาได้ ร่างกายก็จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกโดยอาศัยกลไกการจับกิน (phagocytosis) หรืออาศัยการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์

2.1.1.2 การกลืนกินสิ่งแปลกปลอมของเม็ดเลือดขาว (Phagocytosis)

เป็นขบวนการจับกินสิ่งแปลกปลอมและย่อยทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกายถือว่าเป็น innate immunity ชนิดหนึ่งที่มีการตอบสนองอย่างรวดเร็ว และขบวนการนี้จะเพิ่มประสิทธิภาพมากขึ้นถ้าได้ทำงานร่วมกับระบบ adaptive immunity โดยเฉพาะแอนติบอดีและร่วมกับระบบ complement ขบวนการนี้มีความสำคัญในการกำจัดเชื้อพวก extracellular bacteria หลายชนิด เซลล์ที่มีความสำคัญในขบวนการนี้ได้แก่ neutrophils monocytes และ macrophages

ขบวนการ phagocytosis เริ่มด้วยเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่เป็น phagocyte เข้ายึดจับกับสิ่งแปลกปลอมหรือจุลชีพ (attachment) จากนั้นจะมีการยื่น psuedopod ออกไปโอบล้อมรอบจุลชีพต่อมาจะกลืนกิน (ingestion) จุลชีพเข้ามาในเซลล์ของ phagocyte เรียกว่า phagosome จากนั้น lysosome ในเซลล์จะรวมกับ phagosome เป็น phagolysosome แล้วปล่อยเอนไซม์ต่าง ๆ เช่น lipase,

protease และ ribonuclease ทำลายจุลชีพนั้น (digestion) จากนั้นจะปล่อยเศษเซลล์ออกจาก phagocyte ดังแสดงในภาพที่ 2



ภาพที่ 2 แสดงกระบวนการเกิด phagocytosis[3]

2.1.1.3 ระบบคอมพลีเมนท์ (Complement System)

คอมพลีเมนท์ เป็นสารน้ำในระบบภูมิคุ้มกันชนิดหนึ่งซึ่งเป็นโปรตีนในน้ำเลือดที่มีคุณสมบัติเป็นเอนไซม์ ประกอบด้วยโปรตีนหน่วยย่อย 9 หน่วย คือ C1 ถึง C9 โดยที่การทำงานของระบบคอมพลีเมนท์เป็นการทำงานอย่างต่อเนื่องของโปรตีนทั้ง 9 ชนิด ในการกำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม โดยที่โปรตีนเหล่านี้อยู่ในกระแสเลือดในรูป inactive form ปฏิกิริยาของระบบคอมพลีเมนท์เริ่มขึ้นเมื่อโปรตีนในถูกกระตุ้นด้วยแอนติบอดีที่จับกับแอนติเจนเป็น Antigen-Antibody complex แล้วจึงมีการกระตุ้นโปรตีนในระบบอย่างต่อเนื่องจนได้เป็นสารตัวสุดท้าย คือ C9 หลายโมเลกุลที่รวมตัวกัน มีผลทำให้เซลล์เสียสมดุลของภายในเซลล์ ด้วยการเกิดรูที่ผิวเซลล์ เซลล์จึงถูกทำลายในที่สุด การทำงานของระบบคอมพลีเมนท์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ทางได้แก่ Classical pathway และ Alternative pathway

2.1.1.4 Natural Killer Cells (NK cells)

การทำลายสิ่งแปลกปลอมของ NK cells เป็นการทำลายโดยตรงหรืออาจจะทำงานร่วมกับแอนติบอดีในการทำลายเซลล์นั้น โดยมีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์เซลล์มะเร็งรวมทั้งเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส

2.1.1.5 อินเตอร์เฟียรอน (Interferon, IFNs)

IFNs เป็นสารประเภทโปรตีนชนิดที่ถูกสร้างขึ้นจากเซลล์ที่มีการเจริญของไวรัสและ IFNs ที่หลั่งออกมาจากเซลล์สามารถชักนำให้เซลล์อื่นๆ ในบริเวณใกล้เคียงให้มีการสร้างสารโปรตีนกลุ่มหนึ่งที่เรียกว่า Antiviral protein ซึ่งมีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อไวรัส (multiplication) ในเซลล์นั้น ๆ ได้

2.1.2. การตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ [Specific (adaptive) immune response][34,35,36,37]

เป็นการตอบสนองของภูมิคุ้มกันที่เกิดขึ้นหลังจากที่เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายแล้วหรือเกิดจากการกระตุ้นด้วยองค์ประกอบต่างๆ ที่ได้จากการกระตุ้น nonspecific immunity มาก่อน เซลล์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ คือ lymphocytes (T lymphocytes และ B lymphocytes) การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันร่างกายแบบจำเพาะแบ่งย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านสารน้ำ *Humoral immune response* และ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันผ่านเซลล์ *Cell mediated immune response* การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้ง 2 แบบนี้มีลักษณะที่สำคัญคือ

- มีความจำเพาะเจาะจงต่อชนิดของสิ่งแปลกปลอม (Specificity) เนื่องจาก lymphocyte ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะนี้จะมี Receptor ที่มีความจำเพาะต่อสิ่งแปลกปลอมนั้น ๆ
- มีความสามารถที่จะจดจำ (Memory) เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เคยได้รับ ทำให้การตอบสนองต่อเชื้อโรคในครั้งต่อไป (secondary immune response) รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงกว่าครั้งแรก (primary immune response) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของภูมิคุ้มกันร่างกายชนิดนี้

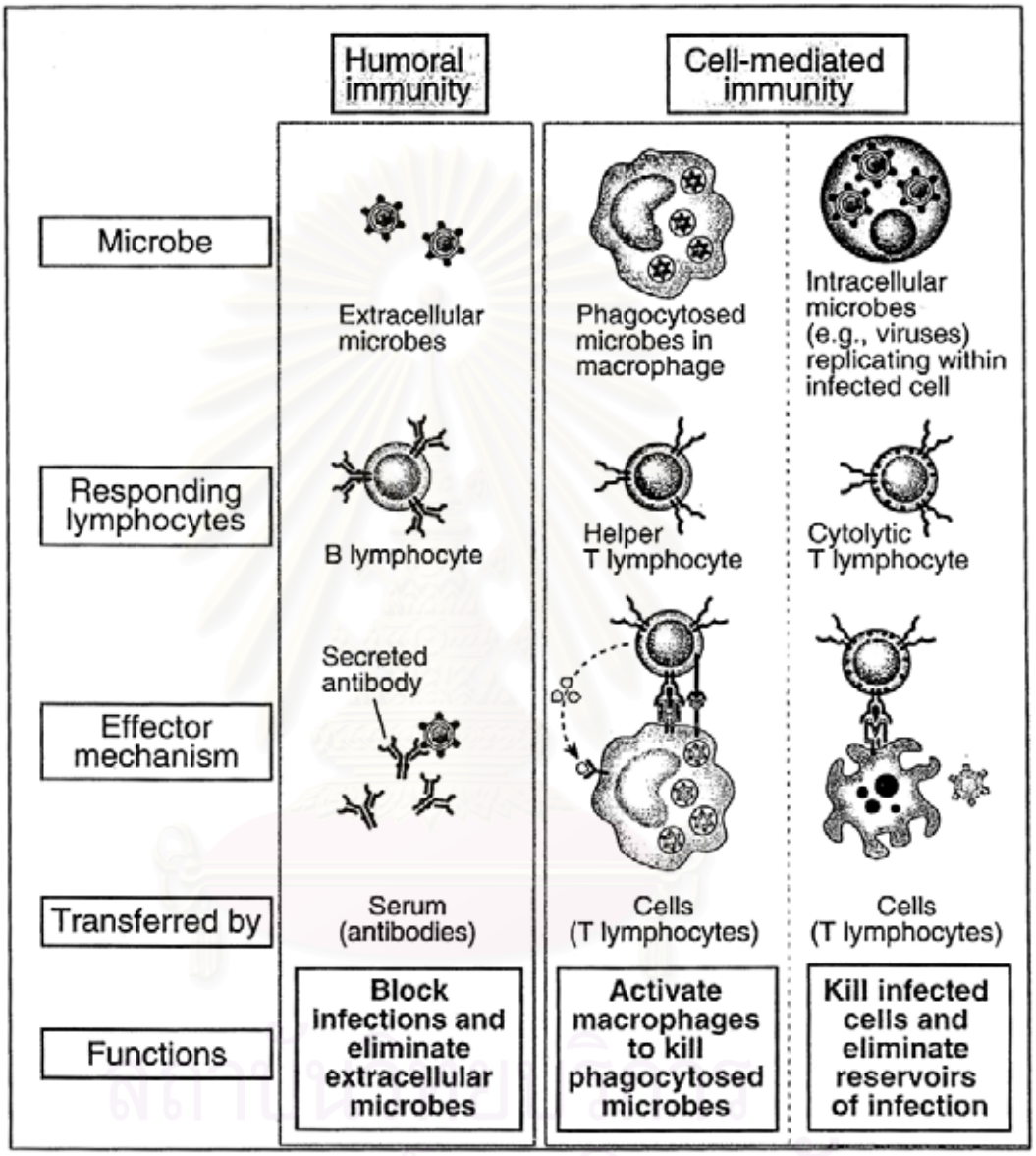
- มีกลไกการควบคุมการทำงาน (Self-Regulation) ของตัวมันเอง เพื่อให้ร่างกายกลับเข้าสู่ภาวะปกติหลังมีการตอบสนองต่อสิ่งเร้าเรียบร้อยแล้ว
- เป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมของร่างกาย โดยที่ระบบภูมิคุ้มกันจะสามารถจดจำและแยกแยะความแตกต่างของเนื้อเยื่อหรือองค์ประกอบของร่างกายตนเอง (self) ออกจากสิ่งที่ไม่ใช่ตัวเอง (non-self) ได้

2.1.2.1 Humoral immune response (HIR)

เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยการใช้สารน้ำ ได้แก่ แอนติบอดี (antibody) ที่สร้างและหลั่งจาก plasma cell ที่พัฒนามาจาก B lymphocyte โดย antibody มีคุณสมบัติสำคัญที่สามารถจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้อย่างเฉพาะเจาะจง ภูมิคุ้มกันชนิดนี้มีบทบาทสำคัญในการกำจัดจุลชีพที่ติดเชื้อภายนอกเซลล์ (extracellular microbe) และการป้องกันสารพิษจากจุลชีพ (microbial toxin) ต่างๆ ที่แอนติบอดีสามารถเข้าถึงได้ แต่ภูมิคุ้มกันชนิดนี้จะไม่มีประสิทธิภาพในการต่อต้านจุลชีพที่สามารถเพิ่มจำนวนในเซลล์ได้

2.1.2.2 Cell mediated immune response (CMIR) เป็นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยอาศัยเซลล์ ซึ่งเซลล์ที่สำคัญได้แก่ T lymphocyte (T- cell) การตอบสนองแบบ CMIR เป็นการตอบสนองที่เกิดขึ้นกับแอนติเจนของจุลชีพชนิด intracellular microbe โดย $CD4^+$ T cell จะตอบสนองต่อแอนติเจนที่อยู่ภายใน vesicle ของ Antigen-presenting cell (APC) เช่น macrophage ทั้งนี้เนื่องจากแอนติเจนดังกล่าวจะถูกย่อยสลายและนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC class II ซึ่ง $CD4^+$ (class II-restricted) T cell สามารถจับและเกิดการตอบสนองได้ ส่วน $CD8^+$ T cell จะตอบสนองต่อจุลชีพที่อยู่ภายใน cytosol ของเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อ (infected cell) ทั้งนี้เป็นเพราะโปรตีนที่เป็นแอนติเจนที่อยู่ในส่วนของ cytoplasm จะถูกย่อยภายใน cytosol และถูกนำเสนอร่วมกับโมเลกุลของ MHC class I จากนั้นจะถูกจับ (recognize) โดย $CD8^+$ (class I-restricted) T cell จุลชีพดังกล่าว ได้แก่ ไวรัส และแบคทีเรียที่ถูก phagocytosis (phagocytosed bacteria) และสามารถออกจาก phagosome มาอยู่ใน cytosol รวมถึงสารเคมีบางชนิดที่เข้าสู่ผิวหนังแล้วก่อให้เกิดปฏิกิริยาภูมิไวเกินชนิด delayed –type hypersensitivity (DTH) หรือที่เรียกว่า contact sensitivity reaction ซึ่งเชื่อกันว่าสารเคมีที่เป็นตัวกระตุ้นปฏิกิริยานี้จะจับกับโปรตีนของร่างกาย แล้วกลายเป็น antigenic determinant หรือ epitope ตัวใหม่ที่ไปกระตุ้น $CD4^+$ T cell และ $CD8^+$ T cell ได้ นอกจากนี้เซลล์ดังกล่าวยังสามารถที่จะหลั่ง cytokine ต่าง ๆ เช่น IL-2, IL-3, IL-5, IL-10 และ TNF ซึ่ง cytokine

เหล่านี้มีส่วนช่วยในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์ต่าง ๆ ทั้ง T cell, B cell, NK cell และ macrophage เพื่อให้ทำลายแอนติเจนได้ดีขึ้นและรวดเร็วยิ่งขึ้น

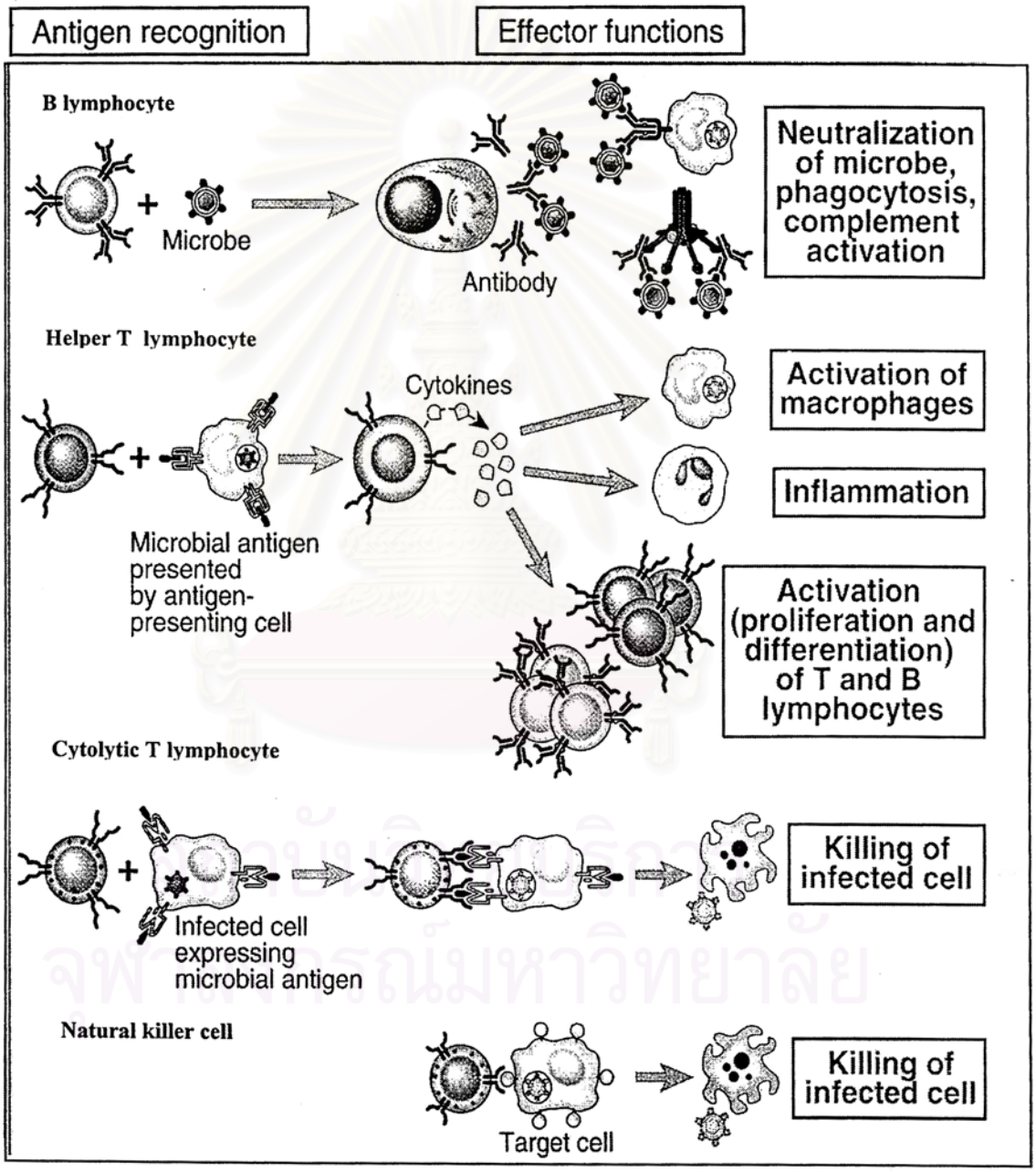


ภาพที่ 3 แสดงภาพการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ[36]

2.1.3 Lymphocyte

เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีอยู่ในระบบภูมิคุ้มกัน พบในกระแสเลือดของคนปกติประมาณ 20-25% เมื่อดูจากลักษณะของเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ สามารถแบ่ง lymphocyte ออกเป็น 2 ประเภท คือ large granular lymphocyte และ small lymphocyte ซึ่งบทบาทหน้าที่ของ lymphocyte

แต่ละชนิดมีความเฉพาะแตกต่างกันออกไป บทบาทที่สำคัญของ lymphocyte ก็คือสามารถตอบสนองและกำจัดสิ่งแปลกปลอมหรือเชื้อโรคได้อย่างมีประสิทธิภาพ เป็นเซลล์ที่สำคัญในการตอบสนองแบบ HIR และ CMIR ซึ่ง large granular lymphocyte ที่รู้จักกันก็คือ natural killer cells (NK cells) และ small lymphocyte ได้แก่ B lymphocyte และ T lymphocyte



ภาพที่ 4 แสดง Lymphocyte ชนิดต่าง ๆ [36]

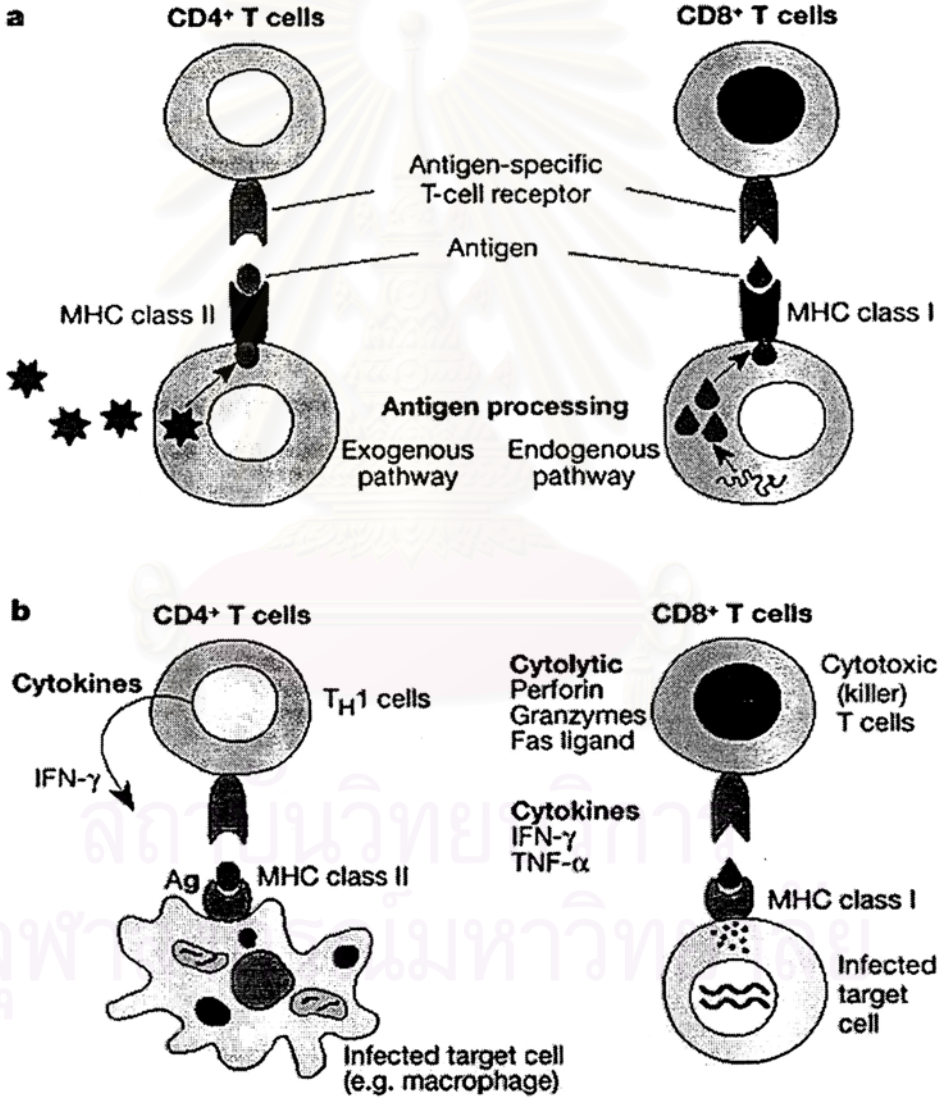
2.1.3.1 B lymphocyte (B cells) มีต้นกำเนิดมาจากไขกระดูกและมีพัฒนาการที่ไขกระดูก จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปอยู่ที่ lymphoid organ ต่าง ๆ ที่บริเวณผิวของ B cells จะมีการแสดงออกของ Antigen-binding receptor ที่จำเพาะต่อแอนติเจน ซึ่ง B cells receptor จะเป็น membrane-bound Immunoglobulin (mIg) เมื่อ B cells จับกับแอนติเจนที่จำเพาะด้วย Antigen-binding receptor จะกลายเป็น activated B cells ที่สามารถแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและหลั่งแอนติบอดีหรือ Immunoglobulin (Ig) ออกมานอกเซลล์ และแอนติบอดีบางตัวจะเป็น memory B cells ที่ยังคงแสดง mIg อยู่บนผิวเซลล์ และเคลื่อนที่ไปตามกระแสโลหิตไปยัง lymphoid organ ต่าง ๆ เมื่อมีแอนติเจนตัวเดิมมากระตุ้นอีกครั้งเป็น secondary response เซลล์เหล่านี้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างกลายเป็น plasma cells ที่สามารถสร้าง Ig แต่ละชนิดเหมือนกับ mIg บน B cells ที่เป็นต้นกำเนิดและหลั่งอกมานอกเซลล์ซึ่งจะเป็นแอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนที่มากระตุ้น

2.1.3.2 T lymphocyte (T cells) มีต้นกำเนิดมาจากไขกระดูกและไปเจริญเติบโตที่ต่อม Thymus ที่บริเวณผิวของ T cells จะมีการแสดงออกของ Antigen-binding receptor ที่จำเพาะต่อแอนติเจน ที่เรียกว่า T cell receptor (TCR) เป็น receptor ทำหน้าที่รับรู้แอนติเจนที่สัมพันธ์กับการทำงานของ major histocompatability complex (MHC) molecules บนผิวของ antigen presenting cells (APC) โดยแอนติเจนจะกระตุ้น T cell ให้กลายเป็น activate T- cell โดยผ่านการนำเสนอของ APC โดยมี TCR ทำหน้าที่รับรู้แอนติเจนที่ถูกนำเสนอ ซึ่งแอนติเจนนี้จะรวมกับ MHC class II molecules เป็น complex อยู่ที่ผิวของ APC ซึ่งการจับกันระหว่าง TCR ที่ผิวของ T-cell และ complex ของแอนติเจนกับ MHC class II ที่ผิวของ APC จะเป็นสัญญาณในการกระตุ้น T cells ให้เกิดการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลงไปเป็น memory T cells และ effector T cells

T lymphocytes สามารถแบ่งเป็นกลุ่มย่อยตามแอนติเจนหรือโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ ที่ใช้เป็น marker ที่เรียกว่า Cluster of differentiation (CD) ได้แก่

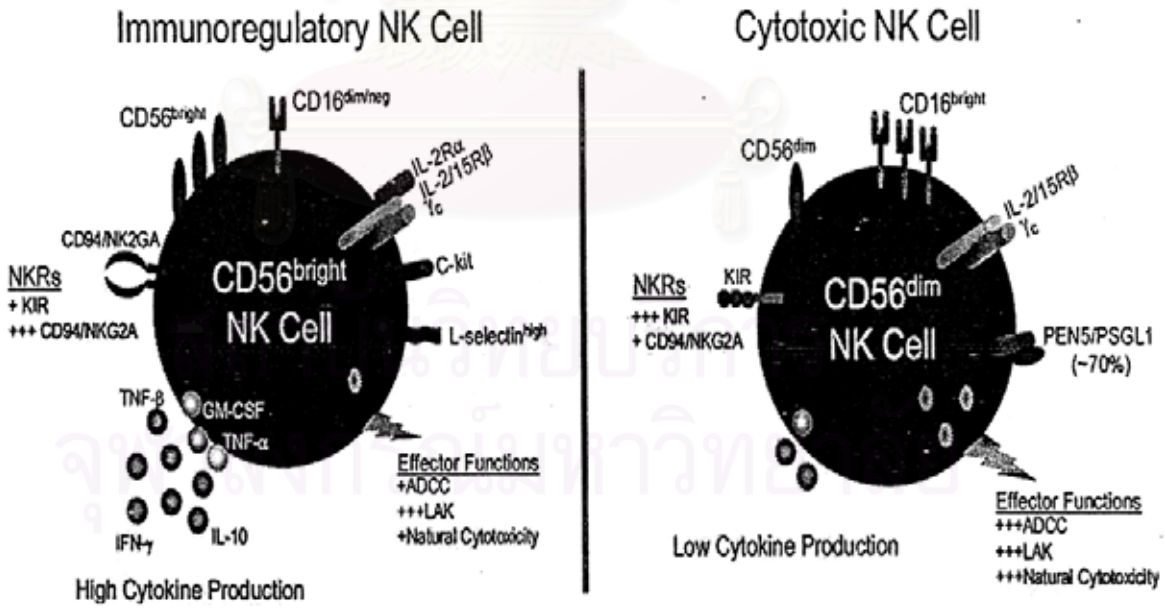
- <u>CD4 T lymphocyte</u> หมายถึง T lymphocytes ที่มีเครื่องหมายชนิด CD4 อยู่ที่ผิวเซลล์ สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 2 ชนิด คือ helper T-cell (T_H) ซึ่งมีบทบาทในการช่วยเหลือหรือส่งเสริมให้มีการทำงานของ lymphocyte และการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่าง ๆ ให้ดีขึ้น และ delayed type hypersensitivity T-cell (TD) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของปฏิกิริยาภูมิไวเกิน (Hypersensitivity) ทั้งนี้การทำงานของ CD4 T lymphocyte จะรับรู้แอนติเจนด้วย T cell receptor ร่วมกับ MHC class II

- CD8 T lymphocyte หมายถึง T lymphocytes ที่มีเครื่องหมายชนิด CD8 อยู่ที่ผิวเซลล์ สามารถแบ่งย่อยเป็น cytotoxic T lymphocyte (CTL;T_C) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์เนื้องอก เซลล์เนื้อเยื่อที่มีการปลูกถ่าย เซลล์ที่ติดเชื้อต่าง ๆ และ suppressor T- cell (T_S) ซึ่งทำหน้าที่ในการควบคุมการตอบสนองของภูมิคุ้มกันให้พอเหมาะโดยการทำงานของ CD8 T lymphocyte จะรับรู้แอนติเจนด้วย T cell receptor ร่วมกับ MHC class I

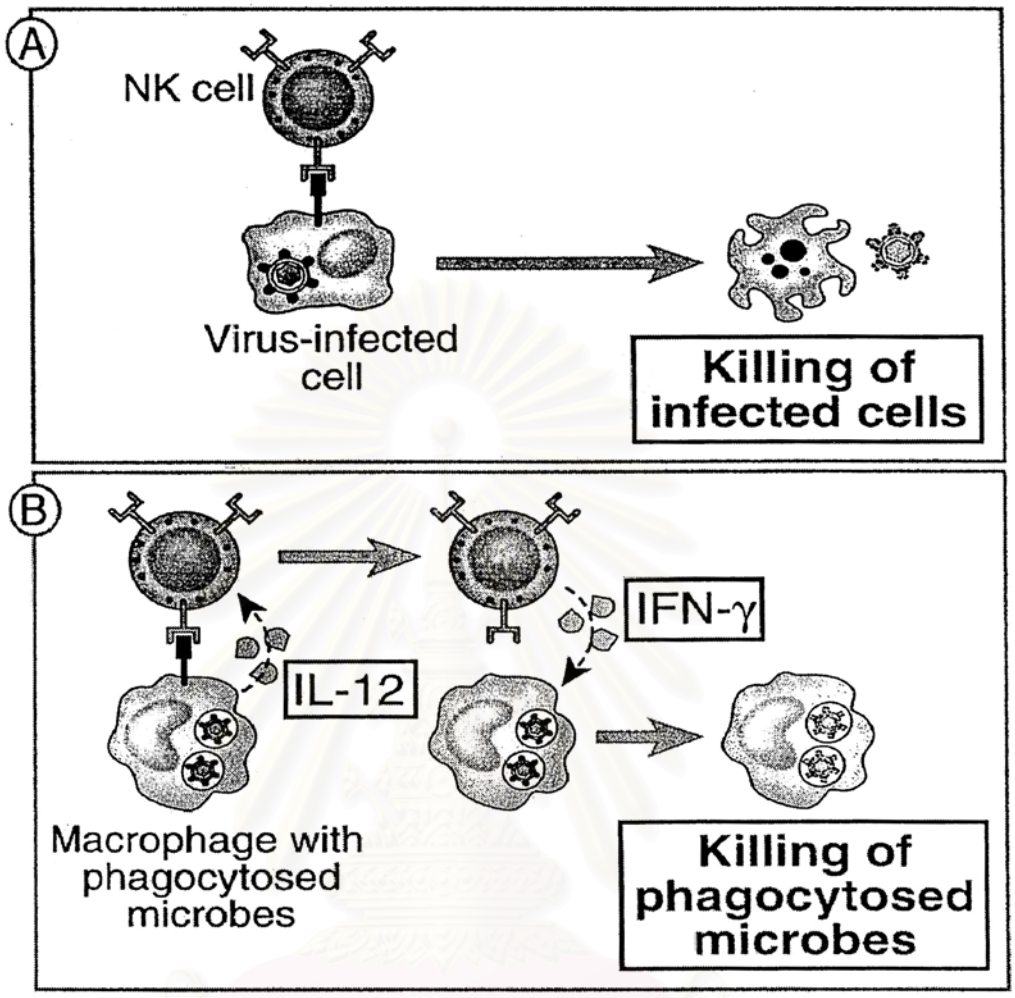


ภาพที่ 5 แสดงการทำงานของ T lymphocytes

2.1.3.3 Natural killer cells (NK cell) เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดเช่นเดียวกับ lymphocyte แต่มีขนาดใหญ่กว่า มีประมาณ 5-10% ของ lymphocyte ในกระแสเลือด ที่ไม่แสดงเครื่องหมาย (marker) ของ T cell และ B cell คือ ไม่มี T cell receptor ที่เรียกว่า CD3 complex และไม่มี surface Ig บนผิวเซลล์ แต่จะมี receptor ที่เฉพาะของเซลล์ NK cell ได้แก่ Killer Immunoglobulin-like receptors (KIR), Heterodimeric C-type Lactin receptors, Natural cytotoxicity receptors (NCR), Immunoglobulin-like transcripts (ILT) และ Activating co-receptors[38,39] NK cell มีโมเลกุลจำเพาะบนผิวเซลล์ ที่ใช้เป็น marker ได้แก่ CD56 และ CD16 ดังแสดงในภาพที่ 7 ลักษณะของเซลล์ชนิดนี้ คือ ภายในเซลล์จะมีแกรนูลขนาดใหญ่จึงเรียกเซลล์เหล่านี้ว่า large granular lymphocyte เป็นส่วนหนึ่งของระบบภูมิคุ้มกันแบบ innate immunity ทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้ 2 วิธี คือ การกำจัดสิ่งแปลกปลอมได้โดยตรง (Direct contact) โดยอาศัยสารพิษภายในแกรนูลของเซลล์ ได้แก่ perforin, granzymes (Grz) และ granulysin[40] และกำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยร่วมกับแอนติบอดีที่เคลือบกับสิ่งแปลกปลอมนั้นไว้แล้ว ซึ่งวิธีนี้อาศัยแอนติบอดีร่วมด้วย เรียกว่า antibody dependent cell mediated cytotoxicity (ADCC) การทำงานของ NK cell ที่มีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์ เนื้องอก เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ เป็นสำคัญ

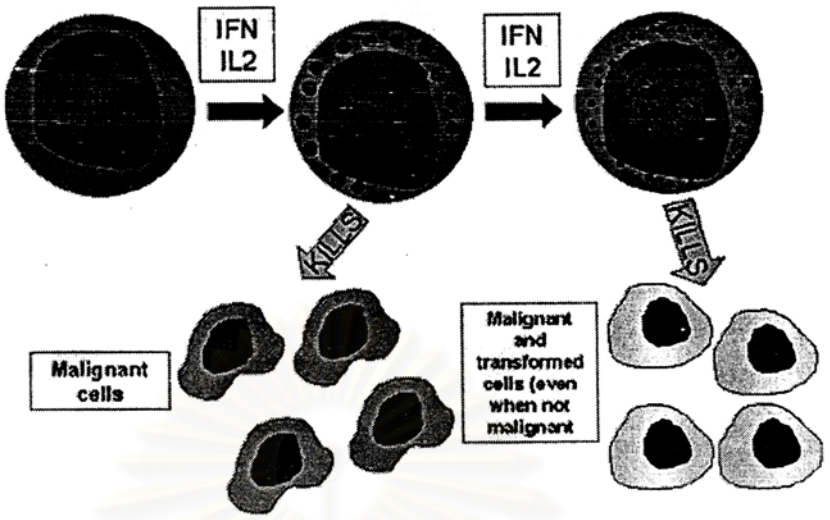


ภาพที่ 6 Human NK cell subsets



ภาพที่ 7 แสดงกลไกการทำงานของ NK cells[36]

นอกจากนี้ NK cells สามารถได้รับการกระตุ้นจาก cytokine ต่าง ๆ เช่น IFN-γ, TNF และ IL-2 ที่หลั่งจาก T lymphocyte และ NK cell เอง ซึ่งสารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้ NK cells เพิ่มประสิทธิภาพในการทำลายเซลล์เป้าหมายได้ โดยเพิ่มสารต่าง ๆ ภายในแกรนูล เช่น cytotoxin, serine erastases, proteoglycans และบางเซลล์สามารถเจริญแบ่งเซลล์ไปเป็น lymphokines-activated killer cells (LAK) ซึ่งมีฤทธิ์มากในการทำลายเซลล์มะเร็งหลายชนิด และเกี่ยวข้องกับการเกิดปฏิกิริยา graft-versus-host ในผู้ป่วยที่ได้รับการปลูกถ่ายไขกระดูก



ภาพที่ 8 แสดงการกระตุ้นการทำงานของ NK cells ด้วย cytokine

2.1.4 Cytokines

เป็นโปรตีนหรือไกลโคโปรตีนที่มีน้ำหนักโมเลกุลน้อย ๆ ที่สร้างและหลั่งออกมาจากเซลล์ต่างๆ ซึ่ง cytokines ที่หลั่งมาจาก lymphocyte เรียกว่า lymphokines และถ้าหลั่งมาจาก monocyte เรียกว่า monokines นอกจากนี้ cytokines ยังหมายความรวมถึง chemotactic factor ต่าง ๆ ที่เรียกว่า chemokines สาร cytokines จะมีผลต่อการทำงานของเซลล์อื่น ๆ ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น ภาวะภูมิแพ้ การอักเสบ และการตอบสนองต่อแอนติเจน

ตัวอย่างของ cytokines ได้แก่ Interleukin (IL), Interferon (IFN), Granulocyte-Colony Stimulating Factor (G-CSF) และ Monocyte-Colony Stimulating Factor (M-CSF)

ปัจจุบันร่างกายของคนเราต้องเผชิญกับภาวะเครียดต่างๆ อย่างต่อเนื่องก็อาจจะทำให้ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายอ่อนแอลงได้ ซึ่งอาจจะก่อให้เกิดการโรคต่างๆ ตามมาไม่ว่าจะเป็นการติดเชื้อแบคทีเรียหรือไวรัส การเกิดโรคมะเร็ง สารพิษจากสิ่งแวดล้อม สารก่อภูมิแพ้ การได้รับเคมีหรือรังสีบำบัดในระยะเวลานาน ภาวะทุพโภชนาการ หรือแม้แต่ความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเอง ซึ่งโรคเรื้อรังหลายชนิดก็มีสาเหตุมาจากความผิดปกติหรือความบกพร่องของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย อีกทั้งในปัจจุบันปัญหาของเชื้อจุลินทรีย์ที่ทำให้เกิดโรคดื้อต่อยาปฏิชีวนะหรือยาต้านจุลชีพก็มีจำนวนเพิ่มมากขึ้นเรื่อยๆ ตลอดจนอุบัติการณ์ของโรคที่เกิดจากการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) ก็มีจำนวนมากขึ้นเช่นเดียวกับโรควัณโรค ซึ่งกลับมาสร้างปัญหาอีกครั้งโดยเฉพาะในผู้ป่วยเอดส์ จึงเกิดแนวคิดในการที่จะนำระบบภูมิคุ้มกันที่มีอยู่ในร่างกายของเราเองมาเป็นส่วนสำคัญในการบำบัดรักษาโรค ซึ่งการค้นคว้าวิจัยเพื่อที่จะค้นหาสารที่มีฤทธิ์หรือมี

ผลต่อระบบภูมิคุ้มกันไม่ว่าจะเป็นการกระตุ้นหรือการยับยั้งเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเพื่อก่อให้เกิดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันที่พึงปรารถนาเพื่อที่จะป้องกันและรักษาโรคนับว่าเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่น่าสนใจที่จะสามารถช่วยให้ผู้ป่วยสามารถมีชีวิตที่ยาวนานยิ่งขึ้นได้ ผลิตภัณฑ์ธรรมชาติโดยเฉพาะสมุนไพรกำลังได้รับความนิยมอย่างแพร่หลายในหลายๆ ประเทศ มีสมุนไพรไทยหลายชนิดที่นำมาค้นคว้าวิจัยและพบว่าสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ และน่าจะนำมาพัฒนาเพื่อที่จะผลิตเป็นยาที่นำมาใช้ในการรักษาโรคและเสริมสร้างภูมิคุ้มกันให้ร่างกายต่อไป

2.2 มะเม่าไข่ปลา

ชื่อวิทยาศาสตร์ *Antidesma ghaesembilla* Gaertn จัดอยู่ใน Family Euphorbiaceae (Stilaginaceae)[13,14] มีชื่อเรียกหลายชื่อ ได้แก่ หมักเม่า ขะเม่า ส้มกุ้ง (นครราชสีมา) ขะเม่าผา มะเม่า (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) เม่าไข่ปลา (ชลบุรี) มะเม่าข้าวเบา (ชุมพร) มังเม่า (จันทบุรี) เม่าทุ่ง (ชุมพรและสงขลา) และ กูแจ (มลายู-นราธิวาส)[14]

ลักษณะทางพฤกษศาสตร์[14]

ต้น เป็นไม้พุ่มหรือไม้ยืนต้นขนาดเล็ก สูง 2-8 เมตร เปลือกต้นสีเทาดำ กิ่งอ่อนและยอดอ่อนมีขน

ใบ ใบเดี่ยวออกเรียงสลับ เป็นรูปไข่ถึงรูปวงรี ใบอ่อนมีสีชมพู ใบแก่สีเขียว ขอบใบเรียบผิวด้านบนเกลี้ยงหรือมีขนประปราย

ดอก ดอกเป็นช่อออกที่ซอกใบและปลายกิ่ง ดอกขนาดเล็ก สีขาวออกเหลือง มีกลิ่นเล็กน้อย ออกดอกเดือนกุมภาพันธ์ถึงเดือนเมษายน

ผล ผลรูปทรงกลม ขนาดเล็ก ผลสุกมีสีม่วงแดง มี 1 เมล็ด ออกผลเดือนพฤษภาคมถึงเดือนกรกฎาคม

พบได้ที่บริเวณป่าเบญจพรรณ และป่าดิบแล้งทั่วไปแถบชายแดน ภาคตะวันออกเฉียงเหนือติดกับชายแดนเขมร ใบอ่อนและยอดอ่อนนำมาใส่แกงเพื่อให้มีรสเปรี้ยว นำมาลวก ต้มเป็นผักจิ้ม ผลดิบและผลสุกสามารถรับประทานได้หรือนำผลสุกมาคั้นเอาน้ำนำมาหมักทำเป็นเครื่องดื่มจำพวกไวน์

ภาพที่ 9 แสดงลักษณะของต้นมะเม่าไข่ปลา[15]

ในตำราชุดภาพสีสมุนไพรจีน พบต้นมะเม่าในป่าดงดิบ หรือป่าโปร่งแถบกวางตุ้งถึงยูนาน รากและใบเก็บได้ตลอดปี ผลเก็บได้ในหน้าร้อนและฤดูใบไม้ร่วง มีชื่อเรียกอีกอย่างหนึ่งคือ อู่เหว่ยเยี้ย (ใบ 5 รส) หรือ อู่เยี้ยใช่ (ผัก 5 ใบ) หรือเรียกต้นไม้รสเปรี้ยว (ส้ม) รสเปรี้ยวมีความเป็นกลาง มีผลทางยาต่อระบบทางเดินหายใจ ปอด ระบบย่อยอาหาร ลำไส้ ไต

ในคุณสมบัติทางยาแผนโบราณของสมุนไพรมะเม่าที่บันทึกไว้ในตำราประเทศไทยและประเทศจีน ดังนี้

ราก -ใช้ขับปัสสาวะ บำรุงไต แก้มดลูกพิการ[16]
-ผสมกับรากของใบไมยราบและรากพริกขี้หนูอย่างละเท่าๆ กัน ฝนกับสุราใช้สำลีชุบพอกบาดแผลแก้งูพิษทุกชนิด[17]
-หยุดอาการท้องเสียอย่างรุนแรง สร้างน้ำลาย แก้ไอ แก้กระหายน้ำ[18] แก้ปวดเมื่อยตามร่างกาย แก้มดลูกอักเสบช้ำบวม ขับโลหิตและขับน้ำคาวปลา แก้ตกขาว

ใบ - ใช้รักษาฝีบนศีรษะเด็กได้
- แก้พิษรักษาโรคซิฟิลิส ชนิดร้ายแรง

ผล - ใช้ขับเสมหะ ฟอกโลหิต
- ใช้เป็นยาระบาย และช่วยบำรุงสายตา[18]

มีชาวบ้านนำเอามะเม่า (ส่วนรากและลำต้น) มาต้มใช้แทนน้ำดื่มทุกวันในขณะที่เป็นไข้หวัดใหญ่ ซึ่งอาการไข้จะหายเป็นปกติ และใช้รักษาเริมบริเวณเริมฝีปากก็หายเป็นปกติ[12]

ในปี 1992 สุรเดช มหารมณ์และคณะ ให้ความสนใจประโยชน์ของพืชสมุนไพรในการนำมารักษาโรคต่าง ๆ ได้พยายามสกัดสาร methoxy flavone จากสมุนไพรหลายชนิด ซึ่งเป็นสารที่มีฤทธิ์ในลักษณะของ extra verrucidal effect เป็นการทำลายต่อต้าน virus นอก host cell และได้พบสาร flavonoid และ phenolic ที่ได้จากต้นมะเม่า (ไม่มีการระบุชื่อวิทยาศาสตร์) นอกจากนี้ยังสามารถสกัดได้สารอื่นๆ นอกเหนือจาก flavonoid และ phenolic ได้แก่ Anthrocyanin, β-sitosterol, Tannins, Stigmasterol และ Triterpenes ในส่วนของผลได้อัดเป็นเม็ด (tablets) และสารละลายจากลำต้น เมล็ด และรากทำเป็น solution โดยในส่วนของรากและลำต้นจะพบสารสกัดทั้ง 5 ตัว[19]

ในปี 1994 สุรเดช มหารมณ์ ได้นำสารละลายที่แยกได้จากลำต้น เมล็ด และรากของมะเม่า (ไม่มีการระบุชื่อวิทยาศาสตร์) มาทำการทดลองรักษาไก่ที่เป็นโรคไข้หวัดใหญ่ที่เกิดจากเชื้อไวรัส โดยให้กินแทนน้ำติดต่อกัน 2 วัน ผลปรากฏว่าไก่ทุกตัวหายป่วยและรอดชีวิตทุกตัวและได้นำไปใช้ในการรักษาโรคท้องร่วงในสุนัข พบว่าสามารถรักษาหายได้[19]

ในปี 1996 สุรเดช มหารมณ์[20] ได้นำสารละลายที่แยกสารประกอบ flavonoid และ phenolic ไปใช้รักษาผู้ติดเชื้อ HIV และผู้ป่วยโรคเอดส์หลายราย พบว่าสามารถลดจำนวน viral load ได้อย่างมีนัยสำคัญ และไม่ปรากฏว่ามีผลข้างเคียงใด ๆ รวมทั้งผลกระทบต่ออวัยวะอื่น ๆ ของร่างกาย เช่น ตับ ไต

ในปี 1998 สุรเดช มหารมณ์ และ พญ. ภาศรี มหารมณ์[20] ได้นำมะเม่า (ไม่มีการระบุชื่อวิทยาศาสตร์) มาใช้เป็นยารักษาผู้ป่วยติดเชื้อ HIV โดยได้ผลิตออกมาในรูปของยาเม็ดและยาน้ำ มีผู้ป่วยทั้งหมด 56 คน ผลปรากฏว่า viral load ลดลง และสามารถยืดอายุขัยของผู้ป่วยบางรายที่ติดเชื้อ HIV รุนแรงจนเกิดโรคติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic disease) แทรกแซง และในปีเดียวกันหลังจากได้รับใบสำคัญการขึ้นทะเบียนตำรับยาแผนโบราณที่ G446/41G263/41[21] แล้ว นพ. สมิทธ์ สนั่นเสียง[22] ได้นำยานี้ไปรักษาผู้ป่วยติดเชื้อ HIV จำนวน 20 ราย และผู้ป่วยในขั้น ARC (AIDS Related Complex) จำนวน 10 ราย ผลปรากฏว่าสุขภาพโดยทั่วไป (Overall health) ดีขึ้นทุกราย และผู้ป่วยเอดส์ (Full AIDS) สามารถรอดชีวิตอยู่ได้เป็นปีและเสียชีวิตลงด้วยโรคแทรกแซง นอกจากนี้ผลข้างเคียงของการใช้ยาที่สกัดจากสมุนไพรมะเม่าโดยตรวจทางด้าน blood chemistry ของผู้ติดเชื้อ

HIV ก่อนและหลังให้ยาในระยะเวลา 5 เดือน พบว่าไม่มีการเปลี่ยนแปลงของ blood chemistry และ electrolyte รวมถึงผู้ป่วยทุกรายมีน้ำหนักและมีความอยากอาหารเพิ่มขึ้น

นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของนักวิทยาศาสตร์และแพทย์ชาวญี่ปุ่น ได้นำเอาสาร methoxy flavone จากสมุนไพรไทยชนิดต่าง ๆ ซึ่งเป็นส่วนประกอบส่วนหนึ่งของสมุนไพรมะเม่าชนิดนี้มาทำการทดลอง พบว่ามีฤทธิ์เป็น extra verrucidal effect ที่น่าจะนำมาใช้เป็น indicator หรือ marker ที่สำคัญในขั้นตอนการพัฒนาสารประกอบที่อยู่ในสมุนไพรมะเม่าเพื่อพัฒนาเป็นยาต่อไป[23,24,25]

ในปี 2004 พญ.สมบูรณ์ เกียรตินันทน์ และคณะ[12] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต่าง ๆ ของสมุนไพรมะเม่า (*A. acidum*) และพืชสมุนไพรไทยอีก 9 ชนิด ได้แก่ฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อแบคทีเรีย หรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน พบว่าสารสกัดสมุนไพรมะเม่ามีผลยับยั้งไวรัสเข้าสู่เซลล์ได้ใน 3 วันแรก และมีผลต่อเซลล์ที่มีการติดเชื้อเรื้อรัง ในระดับยาที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์พบว่าสารสกัดสมุนไพรมะเม่าสามารถลดจำนวนไวรัสที่ปล่อยออกมาได้ดีกว่ากลไกการยับยั้งไวรัสเข้าสู่เซลล์ นอกจากนี้ โสภิต ธรรมอารี และคณะ[12] ได้ทำการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันชนิดอาศัยเซลล์โดยทำการศึกษาในหลอดทดลอง พบว่าสารสกัดสมุนไพรมะเม่าสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte และสามารถเพิ่มระดับ cytokines ได้แก่ IFN-γ และ IL-2 ได้ และศึกษาพิษเฉียบพลันและพิษกึ่งเฉียบพลันของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ผลการศึกษาพบว่าสารสกัดสมุนไพรมะเม่า ไม่ก่อให้เกิดพิษและไม่มีฤทธิ์ mutagenicity นอกจากนี้ทำการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของสารสกัดสมุนไพรมะเม่า[26] พบว่าไม่มีฤทธิ์ที่เป็นอันตรายต่อระบบต่าง ๆ ของสัตว์ทดลอง นอกจากทำให้กล้ามเนื้อเรียบของลำไส้เล็กคลายตัว

2.3 ฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของพืชสมุนไพรบางชนิด

การใช้พืชสมุนไพรเพื่อได้เริ่มขึ้นมาหลายพันปีแล้ว โดยใช้ในรูปของ crude drugs ซึ่งชนิดของสมุนไพรและวิธีการรักษาถูกถ่ายทอดโดยการบอกเล่าต่อๆ กันมา ข้อมูลเกี่ยวกับพืชสมุนไพรได้ถูกบันทึกและเริ่มมีการสกัดแยกสารประกอบสำคัญจากพืชสำหรับเป็นยา ซึ่งที่ผ่านจนถึงปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าด้านสมุนไพรกันอย่างแพร่หลาย และมีสมุนไพรหลาย ๆ ชนิดที่สามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ ตัวอย่างเช่น

ในปี 1983-1999 มีคณะผู้วิจัยได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสาร Glycyrrhizin (GL) ที่สกัดได้จากรากของชะเอม ซึ่งนิยมใช้ในผู้ป่วยโรคตับอักเสบเรื้อรังในประเทศญี่ปุ่นและบางประเทศในแถบยุโรป[27] จากการทดลองพบว่าสาร GL มีฤทธิ์เหนี่ยวนำให้เกิดการสร้าง IFN เพิ่มการทำงานของ NK cells และเพิ่มการตอบสนองของ lymphocyte ผ่านการสร้าง IL-2 นอกจากนี้ GL ยังมีฤทธิ์เป็นด้านไวรัส ที่ต้านเชื้อ cytomegalovirus, herpes simplex type 1 และ influenza virus และยังสามารถยับยั้งการ replication ของเชื้อ HIV ในหลอดทดลอง[28,29]

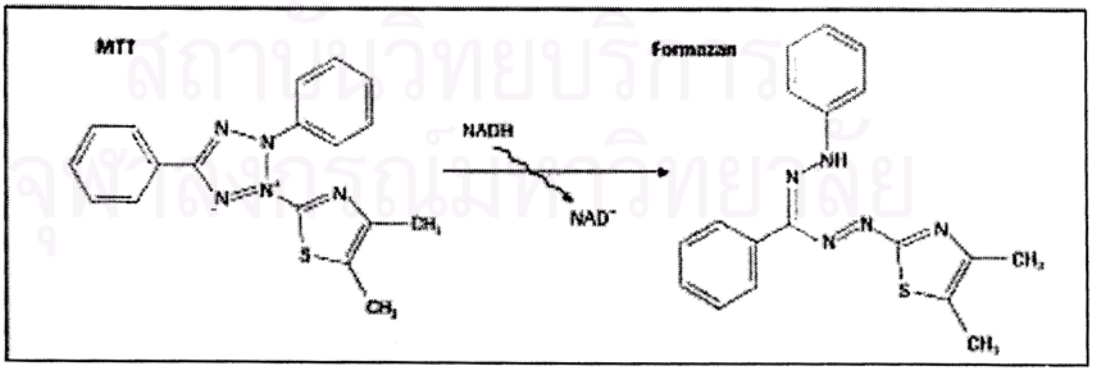
ในปี 2001 Falchetti ได้ทำการศึกษาผลของสาร resveratrol ซึ่งเป็นสาร polyphenol ที่ได้จากองุ่นและผลิตภัณฑ์จากองุ่น ซึ่งผลการทดลองพบว่าสารดังกล่าวสามารถกระตุ้นให้ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells มีการสร้างและหลั่ง IFN-γ, IL-2 และ IL-4 ได้ และสารดังกล่าวยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ CTL และ NK cells ได้อีกด้วย[30] ในปีเดียวกัน Busarawan และ Pranee ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดเอทานอกจากต้นของ *Derris scandens* (เถาวัลย์เปรียง) ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวการทำงานของ NK cells และการหลั่ง IL-2 และ IL-4 ในคนปกติและในผู้ติดเชื้อ HIV-1 พบว่าสารสกัดดังกล่าวสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวในคนปกติได้อย่างมีนัยสำคัญ และยังสามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cells ทั้งในคนปกติและในผู้ติดเชื้อ HIV-1 นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง IL-2 จากเซลล์เม็ดเลือดขาวในคนปกติได้[10]

ในปี 2003 ชมพูนุท บุญอากาศ ได้ทำการคัดกรองฤทธิ์การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดสมุนไพรไทย 15 ชนิด ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte ที่ได้จากม้ามหนูขาวและการ phagocytosis โดยเซลล์เพาะเลี้ยง macrophage ชนิด J774A.1 นอกจากนี้ยังดูผลของสารสกัดต่อการผลิต cytokines ด้วย จากการทดลองพบว่ามีสารสกัดสมุนไพรไทย 5 ชนิด ที่มีผลต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์ lymphocyte ได้แก่ หอมไกลดง ผักกระโฉม นางแดง สังหยูใบขน และงำเงาะ และยังพบว่าหอมไกลดงและสังหยูใบขนมีผลกระตุ้นการ phagocytosis ของเซลล์ macrophage ชนิด J774A.1 นอกจากนี้ได้ทำการสกัดแยกสารบริสุทธิ์จากหอมไกลดงได้สาร quebrachitol นางแดงได้สาร kaurenoic acid สังหยูใบขนได้สาร1,2,3-trimethoxy-4,5-dioxo-6a,7-dehydroaporphine และ ouregidione และงำเงาะได้สาร β- sitosterol ซึ่งสารบริสุทธิ์ทั้งหมด มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocyte และสามารถเพิ่มการ phagocytosis ของเซลล์ macrophage ชนิด J774A.1 นอกจากนี้สารบริสุทธิ์ทั้งหมดยกเว้น 1,2,3-trimethoxy-4,5-dioxo-6a,7-dehydroaporphine สามารถเหนี่ยวนำให้เซลล์ macrophage ชนิด J774A.1 หลั่ง IL-2 ได้[31]

ในปี 2005 ปิยะรัตน์ ศรีดารณพ ได้ทำการศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นร่างกายของสารสกัดผลพุงทะลาย จากการทดลองพบว่าสารสกัดน้ำจากผลพุงทะลาย สามารถกระตุ้นการเมตาบอลิซึมของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ และสามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ตามระดับความเข้มข้นที่ทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดดังกล่าวยังสามารถกระตุ้น T cells ได้จากการทดสอบการแสดงออกของโมเลกุล CD69 ด้วยวิธี FACS อย่างไรก็ตามฤทธิ์การกระตุ้นการแบ่งตัวและการกระตุ้น T cells นั้นให้ผลการกระตุ้นที่ต่ำกว่าฤทธิ์ของสาร PHA อย่างมาก ในทางตรงข้ามสารสกัดน้ำของผลพุงทะลายสามารถกระตุ้นการจับกิน zymogen ของ macrophage ชนิด J774A.1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ พร้อมทั้งยังสามารถกระตุ้นการสร้างไนตริกออกไซด์จากเซลล์นี้ได้อีกด้วย[32]

วิธีการศึกษาฤทธิ์ของสารต่าง ๆ ที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันมีด้วยกันหลายวิธี และการศึกษาฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันด้านเซลล์ในหลอดทดลอง (In vitro test) ก็มีหลายวิธีเช่นกัน ซึ่งในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เลือกใช้วิธีที่จะทำการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรมะเม่าไข่ปลาดังนี้คือ

1. การศึกษาความเป็นพิษของเซลล์โดยวิธี MTT assay[41,42] เป็นวิธีที่สามารถนำมาศึกษา cell proliferation และ cell viability ของเซลล์ โดยตรวจสอบจากการเปลี่ยนแปลงสีของสาร Tetrazolium salt MTT (3, (4, 5-dimethylthiazolyl-2)-2, 5-diphenyltetrazolium bromine) ถ้าเซลล์ที่ทำการทดสอบเป็นเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ เซลล์จะมีขบวนการ metabolism เกิดขึ้น ซึ่งสามารถปล่อยเอนไซม์มาย่อยสารละลาย MTT จากสีเหลืองเปลี่ยนไปเป็นสีม่วงของ Formazan ซึ่งวัดค่าได้โดยการอ่านจากเครื่อง microplate reader ที่ความยาวคลื่น 570 และ 650 nm



ภาพที่ 10 แสดงการเปลี่ยนแปลงของสาร MTT

2. การทดสอบการทำงานของ T lymphocyte โดยวิธี lymphocyte proliferation assay[10,32,43,44] เป็นการ ตรวจว่า T lymphocyte มีการเจริญแบ่งเซลล์ เพิ่มจำนวน เพื่อตอบสนองต่อสิ่งกระตุ้นได้หรือไม่ ซึ่งสามารถทำได้โดยนำสารกระตุ้น (mitogen) polyclonal lymphocyte activator ซึ่งสารที่นิยมนำมาใช้ในการทดสอบที่จำเพาะต่อการกระตุ้น T lymphocyte ไม่กระตุ้น B lymphocyte ได้แก่ phytohemagglutinin (PHA) และ concanavalin A (Con A) ผสมกับ T lymphocyte ที่ต้องการทดสอบโดย incubate ไว้ 2-7 วัน จากนั้นตรวจการเจริญเปลี่ยนแปลงของ lymphocyte เป็นเซลล์ lymphoblast เรียกว่าเกิด blast transformation นอกจากนี้ยังดูการเปลี่ยนแปลงจากการตรวจดูการสร้าง DNA, RNA หรือโปรตีนภายในเซลล์ได้ด้วย เช่น การเจริญเปลี่ยนแปลงของ T lymphocyte (lymphocyte proliferation) สามารถตรวจสอบโดยการเติมสาร tritiated thymidine (^{3}H-Tdr) หลังจากการเลี้ยงเซลล์ lymphocyte กับ mitogen แล้ว incubate ต่ออีก 6-18 ชั่วโมง ถ้าเซลล์มีการเจริญเปลี่ยนแปลงจะมีการสร้าง DNA มากขึ้น ซึ่งเซลล์จะใช้ thymidine ในการสร้าง DNA เซลล์ก็จำนะเอา ^{3}H-Tdr เข้าสู่เซลล์เพื่อสังเคราะห์ DNA จากนั้นทำการตรวจวัดปริมาณของสารกัมมันตภาพรังสีที่เซลล์นำเข้าไป โดยใช้เครื่อง β- scintillation counter

3. การหาปริมาณของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยการย้อมเซลล์ด้วย monoclonal antibody ซึ่งเป็นการตรวจหา specific marker ของเซลล์[46,47] มีประโยชน์ในการตรวจนับแยกชนิดของเซลล์ต่าง ๆ ซึ่งจะใช้หลักการ direct fluorescence immunoassay โดยใช้ monoclonal antibody ที่จำเพาะต่อแอนติเจนที่เป็น specific marker ของเซลล์ชนิดนั้น ๆ ติดฉลากด้วยสารเรืองแสง หรือตรวจนับด้วยเครื่องนับเซลล์อัตโนมัติคือ Flow cytometry ซึ่งวิธีนี้ใช้ตรวจนับแยกชนิดของเซลล์ต่าง ๆ โดยดูจาก marker ที่ผิวเซลล์ เช่น CD16 และ CD56 ที่จำเพาะต่อ NK cell, CD19 และ CD20 ที่จำเพาะต่อ B lymphocyte และ CD4 ที่จำเพาะต่อ helper T cell และ CD8 ที่จำเพาะต่อ cytotoxic T lymphocyte

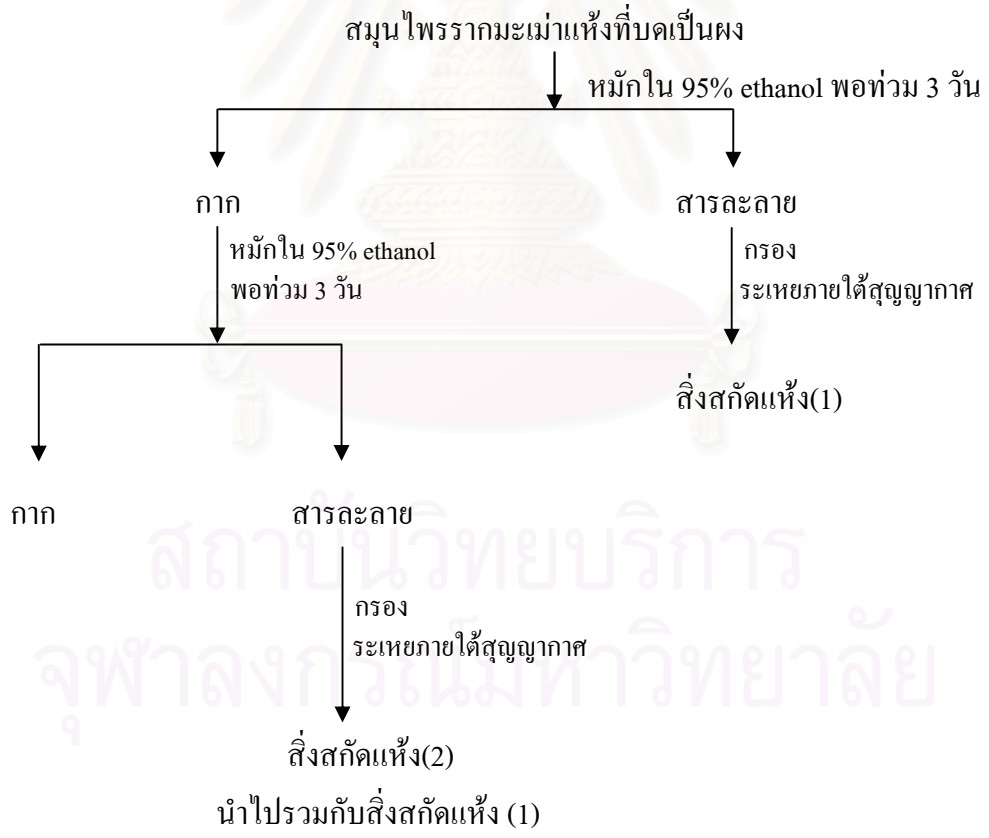
4. การตรวจการทำหน้าที่ของ NK cell ซึ่ง NK cell มีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์เป้าหมายได้โดยตรงและการทำงานร่วมกับแอนติบอดี (ADCC) NK cell สามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้โดยการนำเซลล์เป้าหมายติดฉลากด้วยสารกัมมันตภาพรังสี Chromium (^{51}Cr)[10,48] และนำมาทำปฏิกิริยากับ lymphocyte ที่ต้องการทดสอบ ถ้าหาก NK cell ที่ทดสอบสามารถทำลายเซลล์เป้าหมายได้ จะทำให้สารกัมมันตภาพรังสี (^{51}Cr) ถูกปลดปล่อยออกมาจากเซลล์เป้าหมายสู่น้ำเลี้ยงเซลล์ จากนั้นนำสารน้ำไปตรวจวัดปริมาณกัมมันตภาพรังสีด้วยเครื่อง gamma emission counter

บทที่ 3

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 สมุนไพรและแหล่งที่มา

รากมะเม่าไข่ปลา *(A. ghaesembilla)* ได้มาจากจังหวัดอุบลราชธานี นำมาสกัดด้วย 95% Ethanol ดังแสดงในภาพที่ 10 การควบคุมคุณภาพของสารสกัด *A. ghaesembilla* (*A. ghaesembilla* extract : AGE) ที่นำมาศึกษาทำโดยการตรวจเอกลักษณ์ขององค์ประกอบทางเคมีด้วยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) และผลการตรวจแสดงเป็น HPLC Chromatogram โดย ผศ. ปราณี นันทศรี คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ (ดูในภาคผนวก)



ภาพที่ 11 แสดงการสกัดสมุนไพรมะเม่า

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2 เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 เครื่องมือ และอุปกรณ์

autoclave tape (3M, USA), autoclave (Hirayama, Japan), autopipette (Gilson, France), beakers (Pyrex, USA), biohazard lamina-flow hood (Science, Gelman), centrifuge, cylinders (Pyrex, USA), eppendorf (Corning, USA), ELISA microplate reader (Multiskan EX, Germany), glass pipettes (Witeg, Germany), hemocytometer (Boeco, Germany), hot air oven, incubator, light microscope (Olympus, Japan), microscope glass cover slips (Chance, England), 96-well plates (Corning, USA), parafilm (American National Can, USA), pH meter SA 520 (Orian, USA), pipette (Falcon, USA), pipette tip (Molecular Bio- products, USA), plastic tube (Becton Dickinson), reagent bottles (Duran, Germany), sterile polypropylene centrifuge tube (Corning, USA), refrigerator $4^{o}C$, - $20^{o}C$ (Sanyo, Japan), T- 25 and T-75 Tissue Culture flasks (Nunc, Denmark), vortex mixer (Labnet, USA), gamma emission counter, Wallac 1214 Rackbeta Liquid Scintillation Counter, BD FACSCalibur, 500 ml bottle top filter w/45 mm neck 0.22 μM (Corning, USA), single use syringe filter 0.20 and 0.45 μm (Minisart, Germany), solvent saver scintillation vials 7 ml (Kimble), glass microfiber filter (Whatman, England), polystyrene round-bottom tube 5 ml (Falcon, USA)

3.2.2 สารเคมี

absolute ethanol (Merck, Germany), dexamethasone, dimethyl sulfloxide (DMSO) (Sigma, USA), fetal bovine serum (Gibco, USA), HEPES (Hyclone,USA), hydrochloric acid: (Merck, Germany), L- glutamine (Gibco, Germany), MTT (Sigma, USA), penicillin/streptomycin (Hyclone, USA), potassium chloride (Merck, Germany), Germany), sodium chloride (Sigma, USA), sodium hydroxide (Merck, Germany), di-sodium hydrogen phosphate monobasic (Merck, Germany), sodium bicarbonate (Baker, USA), sodium hypochloride (Clorox, USA), 0.4 % Trypan blue dye (Sigma, USA), BDTriTEST^{TM} CD4FITC/CD8PE/CD3PerCD (BD, USA), CHROMIUM-51 (Amercham, England), L-1667 Lectin (PHA) (Sigma, USA), toluene (Merck, Germany), heparin (LEO, Denmark), Histopaque-1077 (Sigma, USA), [methyl-^{3}H] Thymidine (Amercham, England)

3.3 ตัวอย่างเซลล์ที่ใช้ศึกษา

3.3.1 เซลล์เม็ดเลือดขาว

ได้จากเลือดของผู้บริจาคโลหิต ที่ศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย เพศชาย ที่มีอายุ 20-35 ปี ที่มีสุขภาพดี และเนื่องจากการขอตัวอย่างเลือดเป็นการขอจากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย โดยไม่มีการระบุ ชื่อ นามสกุล ของผู้บริจาคเลือด คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัย ของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จึงอนุญาตให้ยกเว้น ไม่ต้องขอความยินยอมจากผู้บริจาคโลหิต โดยผู้วิจัยขอตัวอย่างเลือดครั้งละ 10 ml จากผู้บริจาคโลหิต 1คน

3.3.2 The human erythroleukemia cell line: K562 (ATCC Number CCL243)

เลี้ยงเซลล์ใน 25-cm^2 cultured flasks ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% fetal bovine serum ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C, 97% humidity, 5%CO_2

3.4 การเตรียมสารละลายสมุนไพร

ทำการเตรียมสารละลายของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ความเข้มข้น 4 µg/ml, 20 µg/ml, 100 µg/ml และ 500 µg/ml ตามลำดับ โดยทำการชั่ง AGE แล้วละลายด้วย 0.05% DMSO ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

3.5 วิธีดำเนินการวิจัย

3.5.1 การเตรียมเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Mononuclear cells (peripheral blood mononuclear cells : PBMC)[44]

1. นำเลือดที่ได้จากศูนย์บริการโลหิตแห่งชาติ สภากาชาดไทย ที่มีสารป้องกันการแข็งตัวของเลือด (Heparin) มาเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ด้วยอัตราส่วน 1:1
2. ใส่สาร Ficoll-Hypaque (1.077 g/L) 5 mlลงใน centrifuge tube
3. จากนั้นค่อย ๆ เติมเลือดที่เจือจางแล้ว 9 ml ลงไปบนชั้นของ Ficoll-Hypaque

4. นำไปปั่น โดยใช้ความเร็วรอบ 2,200 rpm นาน 30 นาที ที่อุณหภูมิ 18°-20°C และเมื่อปั่นแล้วจะเกิดการแยกชั้นของเม็ดเลือดชนิดต่าง ๆ พลาสมา และสาร Ficoll-Hypaque

5. ใช้ Pasteur-pipet ค่อย ๆ ดูดชั้นของ mononuclear cells มาใส่ centrifuge tube อีกหลอดหนึ่ง (ระวังอย่าดูดชั้นของ Ficoll-Hypaque ออกมามากเกินไป)

6. เติม RPMI-1640 medium ลงในหลอดที่มี mononuclear cells โดยใช้ปริมาณของ RPMI-1640 medium ประมาณ 3 เท่าของปริมาณ mononuclear cells ที่ดูดออกมา

7. นำไปปั่น โดยใช้ความเร็วรอบ 1,500 rpm เป็นเวลา 10 นาที ที่อุณหภูมิห้อง

8. เมื่อปั่นเสร็จให้ดูดของเหลวข้างบนทิ้ง แต่ให้เหลือไว้ประมาณ 1 ml แล้วใช้ Pasteur-pipet กระจายเซลล์ออกจากกัน

9. ทำซ้ำข้อ 6 ถึงข้อ 8 จำนวน 2 ครั้ง

10. ครั้งสุดท้ายให้ดูดของเหลวออกให้มากที่สุด จากนั้นเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% fetal bovine serum 5 ml

11. mononuclear cells ที่ได้ นำมาย้อมเซลล์และนับจำนวนของเซลล์ด้วยสารละลาย 0.2% trypan blue เพื่อดูอัตราส่วนของเซลล์ที่มีชีวิต และทำการปรับปริมาณของเซลล์ให้ได้ความเข้มข้นของเซลล์ตามต้องการ ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI-1640 ที่มี 10% FBS เพื่อเตรียมไว้ใช้สำหรับการทดลองต่อไป

3.5.2 การเลี้ยง erythroleukemia cell line K562

เซลล์ erythroleukemia cell line (K562) จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ RPMI-1640 medium ที่มี 10% FBS แล้วเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2 และทำการแบ่งเซลล์ที่โตเต็มแล้วพร้อมกับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 3 วัน หรือเมื่อเซลล์เต็ม flask ถึง 70% ของพื้นที่ของ flask ที่เลี้ยง

การตรวจสอบ viability ของเซลล์ ทำโดยการย้อมสีเซลล์ด้วย trypan blue และทำการนับจำนวนเซลล์ โดยเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่สามารถติดสีน้ำเงิน และต้องมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตไม่ต่ำกว่า 90% จึงจะสามารถนำมาใช้ในการทดลองได้

3.5.3 การศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ที่มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (MTT assay)[41,42]

วิธีการศึกษา

1. เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้ได้ $1x10^6$ cells/ml ปริมาตร 90 µl ลงใน 96-well plate Incubate cells ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2

2. จากนั้นเติม AGE (4, 20, 100 และ 500 µg/ml) 10 µl ลงใน well โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS และกลุ่มที่ให้ PHA 10 µg/ml

3. Incubate cells ไว้ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C, 97% humidity, 5%CO_2

4. เติมสารละลาย MTT ความเข้มข้น 5 mg/ml 10 µL ลงในแต่ละ well

5. Incubate cells เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2 เมื่อครบ 3 ชั่วโมง นำไป centrifuge ที่ 2,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที

6. เท supernatant ทิ้งไป แล้วเติม concentrate DMSO 100 µl ลงในแต่ละ well เพื่อละลาย formazan crystal

7. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดและสังเกตว่าผลึกของ formazan ละลายหมด จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm และ 650 nm โดยเครื่อง microplate reader

8. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้ไปคำนวณหา %viability เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามสูตร

$$\% \text{ viability} = \left(\frac{\text{OD (sample)}}{\text{OD (control)}} \right) \times 100$$

OD (sample) = ค่า absorbance ของสารที่ทดสอบความเป็นพิษคือ สมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ และ PHA

OD (control) = ค่า absorbance ของกลุ่มควบคุม

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.4 การวิเคราะห์ประสิทธิภาพของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ที่มีผลต่อการเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (Proliferation Assay) [10,43,44]

วิธีการศึกษา

1. เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้ได้ $1x10^6$ cells/ml ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate Incubate cells ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C, 97% humidity, 5%CO_2

2. จากนั้นเติม AGE (4, 20, 100 และ 500 µg/ml) 50 µl ลงใน well โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS และกลุ่มที่ให้ PHA 10 µg/ml

3. Incubate cells ไว้ 72 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37^{o}C, 97% humidity, 5%CO_2

4. 18 ชั่วโมงก่อนครบเวลา เติมสารรังสี ^{3}H-thymidine (^{3}H-TdR) ความเข้มข้น 20 µCi/ml 25 µL ลงในแต่ละ well แล้ว Incubate cells ต่อที่อุณหภูมิ 37^{o}C, 97% humidity, 5%CO_2

5. จากนั้น harvest cells ด้วยเครื่อง cell harvester ลงบนแผ่นกระดาษกรองสำหรับกรองเซลล์โดยเฉพาะ (filter strip)

6. ปล่อยให้กระดาษกรองแห้งอย่างน้อย 3 ชั่วโมงถึง 1 วัน แล้วนำแผ่นกระดาษกรองมาใส่ใน counting vial ที่มีสารละลาย scintillation

7. นำไปนับปริมาณการปล่อยสารกัมมันตรังสีในแต่ละ vial เป็น count per minute (CPM) ด้วยเครื่อง Scintillation counter

8. นำค่าที่ได้ไปคำนวณหาเป็น % stimulation เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามสูตร

$$\% \text{ stimulation} = \left(\frac{\text{CPM (sample)} - \text{CPM (control)}}{\text{CPM (control)}} \right) \times 100$$

3.5.4 การวิเคราะห์หาปริมาณ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) [46,47]

วิธีการศึกษา

1. เลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS โดยปรับปริมาตรเซลล์ให้ได้ $2x10^5$ cells/ml ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate Incubate cells ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2

2. จากนั้นเติม AGE (4, 20, 100 และ 500 µg/ml) 50 µl ลงใน well โดยมีกลุ่มควบคุมคือ กลุ่มที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS, กลุ่มที่ให้ PHA 10 µg/ml และ SEB 5 µl/ml

3. นำเซลล์มา incubate ที่อุณหภูมิ 37°C ที่มีความชื้นและ 5% CO_2 เป็นเวลา 72 ชั่วโมง

4. จากนั้นค่อย ๆ แยก supernatant ออก 100 µl และดูดเซลล์ที่อยู่ใน wellใส่ใน tube ปริมาณ 50 µl จากนั้นทำการย้อมสีเซลล์ โดยเติม monoclonal antibody ที่ปิดฉลากด้วยสารเรืองแสง 3 ชนิดดังนี้ คือ Fluorescein isothiocyanate (FITC) สำหรับ $CD4^+$ cell, Phycoerythrin (PE) สำหรับ $CD8^+$ cells และ Peridinin chlorophyll protein (PerCD) สำหรับ $CD3^+$ cell ปริมาตร 5 µl ลงไปในหลอดทดลอง

5. ผสมให้เข้ากันแล้ว incubate ในที่มืด ที่อุณหภูมิ 4°C เป็นเวลา 20 นาที

6. จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วยสารละลาย PBS ปริมาตร 2 ml ที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4 °C

7. เติม 0.5 % formaldehyde ปริมาตร 200µl

8. นำมาวิเคราะห์ค่าปริมาณ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells ด้วยเครื่อง Flow cytometry

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.5.5 การวิเคราะห์การทำงานของ NK cell ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocyte ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) [10,48]

วิธีการศึกษา

3.5.5.1 การเตรียม effector cells

1. นำเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ที่เตรียมไว้ตามขั้นตอนข้างต้น มาปรับปริมาตรเซลล์ให้ได้ $2x10^5$ cells/ml ปริมาตร 100 µl ลงใน 96-well plate Incubate cells ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 ^{o}C, 97% humidity, 5%CO_2

2. จากนั้นเติม AGE (4, 20, 100 และ 500 µg/ml) 50 µl ลงใน well โดยมีกลุ่มควบคุมคือกลุ่มที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS, กลุ่มที่ให้ PHA 10 µg/ml และ IL-2 5 µl/ml

3. เมื่อครบ 72 ชั่วโมง นำ plate มา centrifuge ที่ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเท supernatant ออก แล้วเติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FBS ลงใน well 100 µl ก็จะได้ effector cells เพื่อเตรียมไว้สำหรับการวิเคราะห์ NK cells activity ต่อไป

3.5.5.2 การเตรียม target cell

1. ใช้ K 562 cells ที่ได้เลี้ยงไว้ในอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FBS ปรับปริมาตร cell suspension ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ให้มีปริมาตรเป็น 2×10^5 cells/ml

2. นำไปปั่น ที่ความเร็วรอบ 1500 rpm เป็นเวลา 5 นาที

3. เท supernatants ออกให้มากที่สุด จากนั้นเติม inactivate FBS 100 µl

4. นำเซลล์ที่ได้มา labeled ด้วย 100µCi ของ $Na_2{}^{51}CrO_4$ โดยบ่มที่อุณหภูมิ 37°C 37 ^{o}C, 97% humidity, 5%CO_2 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง

5. จากนั้นปั่นล้างเซลล์ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่อุณหภูมิ 4°C จำนวน 2 ครั้ง และปรับปริมาตร cell suspension ให้มีความเข้มข้นเป็น 5×10^5 cells/ml

3.5.5.3 ขั้นตอนการวิเคราะห์ฤทธิ์ cytotoxicity

1. เตรียม serial 2-fold dilutions ของ PBMCในอาหารเลี้ยงเซลล์ โดยใช้ปริมาณ target cellc 2 x 10^3 cells/well โดยให้มีอัตราส่วนของ effector : target เท่ากับ 40 :1 และ 20 :1

2. ดูด effector cell ปริมาตร 100µl ใส่ใน 96-well plate (triplicate)

3. นำ K562 target cells ที่ labeled ไว้แล้ว มาใส่ well ที่มี effector cell ปริมาตร 100 µl ทำการแยก K562 target cells ที่ labeled แล้ว ออกเป็น 2 triplicate series โดยไม่มี effector cells

4. triplicate series ชุดที่ 1 ของ labeled target cell เติม 5% Triton-X 100 ปริมาตร100 µl ของ (maximum release well) triplicate series ชุดที่ 2 เติมอาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10% FBS ปริมาตร100 µl (spontaneous release well)

5. ปิด plate และปั่นที่ความเร็วรอบ ที่ 500 rpm เป็นเวลา 5 นาที

6. จากนั้น Incubate ที่อุณหภูมิ 37°C 37 °C, 97% humidity, 5%CO_2 เป็นเวลา 4 ชั่วโมง

7. เมื่อครบ 4 ชั่วโมง ดูดเอา supernatants 100 µl ใส่ใน counting tubes

8. จากนั้นนำมาวิเคราะห์การปล่อยสาร ^{51}Cr โดยใช้ gamma emission counter โดยใช้เวลา 1 นาทีต่อ 1 sample tube คำนวณออกมาเป็น % Specific cytolysis ตามสูตร

$$\% \text{ Specific cytolysis} = \left(\frac{\text{experimental release} - \text{spontaneous release}}{\text{maximal release - spontaneous release}} \right) \times 100$$

3.6 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

รวบรวมข้อมูลและทำการวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติโดยใช้ One-Way ANOVA เปรียบเทียบผลของสารสกัดมะเม่าในความเข้มข้นต่าง ๆ

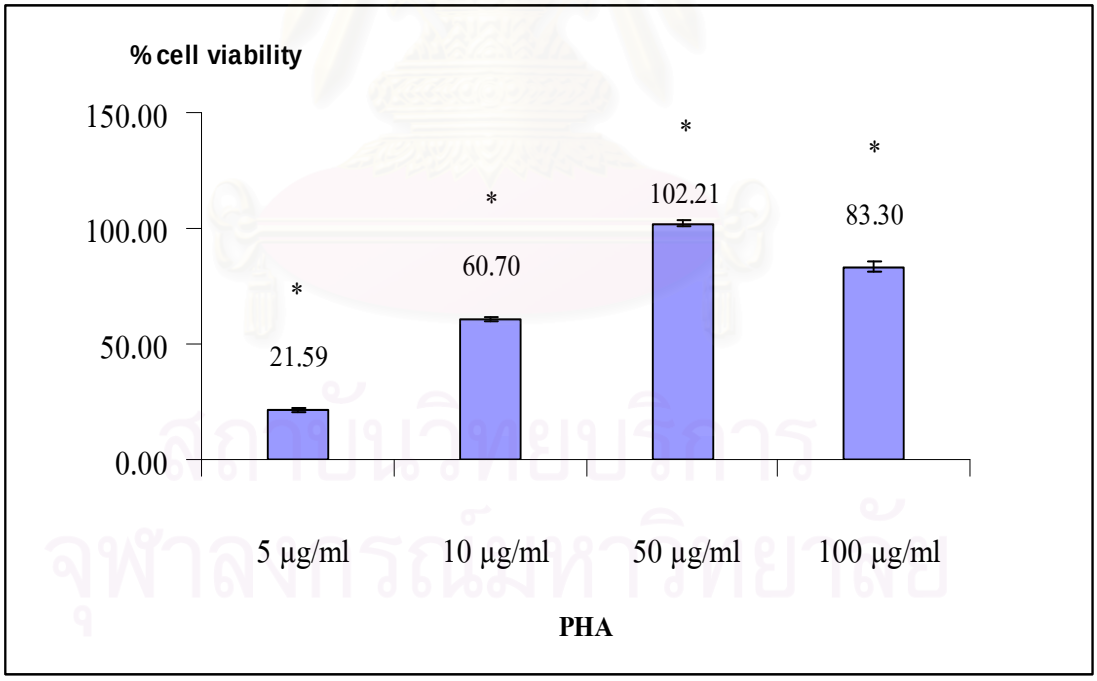
ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย ± ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean ± S.E.M.) เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่ม ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

บทที่ 4

ผลการวิจัย

4.1 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสาร PHA (positive control) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell

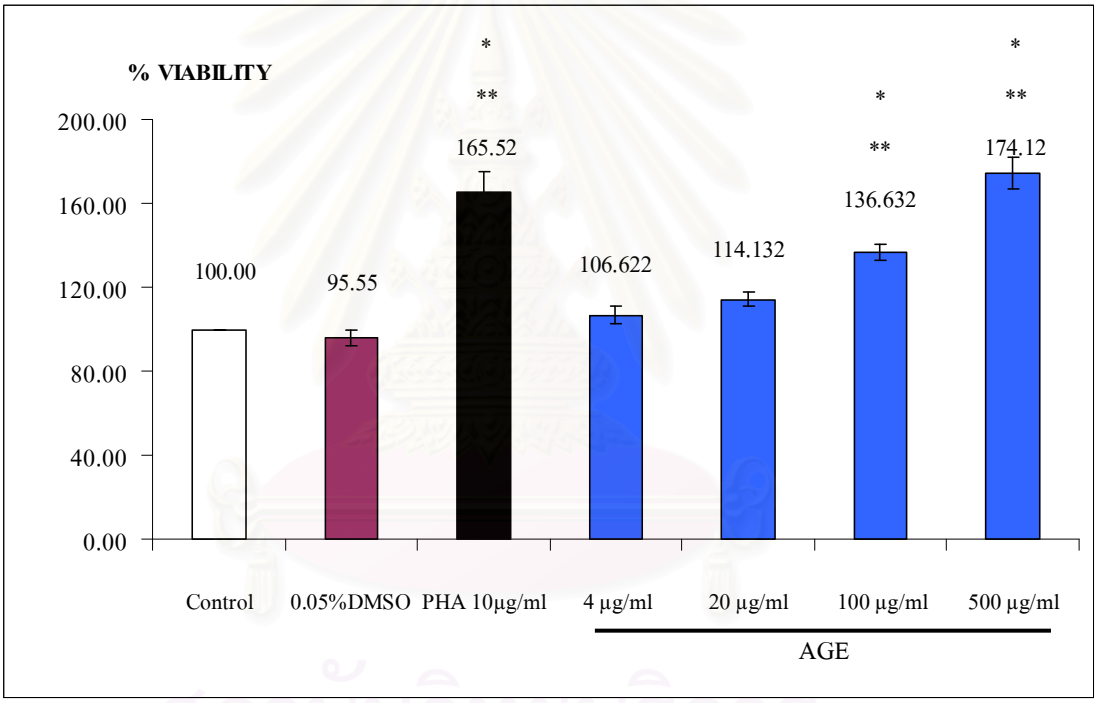
จากการทดสอบฤทธิ์ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวของสารสะลาย PHA ด้วยวิธี MTT assay เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมที่จะใช้เป็น positive control สำหรับใช้ในการวิจัยในครั้งนี้ ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า PHA ที่ความเข้มข้น 5, 10, 50 และ100 µg/ml สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้ง 4 ความเข้มข้น ดังแสดงในภาพที่ 12 ความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นเซลล์ได้ 50% จะนำมาใช้เป็น positive control ในการศึกษาขั้นต่อไป ซึ่งจากการศึกษานี้เลือกใช้ที่ระดับความเข้มข้น 10 µg/ml



ภาพที่ 12 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารละลาย PHA ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ในการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell (PBMC) ด้วยวิธี MTT assay โดยคำนวณเป็น % viability แสดงค่าเป็น mean ± S.E.M (n = 3) (* $P < 0.05$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS)

4.2 ผลการศึกษาความเป็นพิษ (cytotoxicity) ของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell

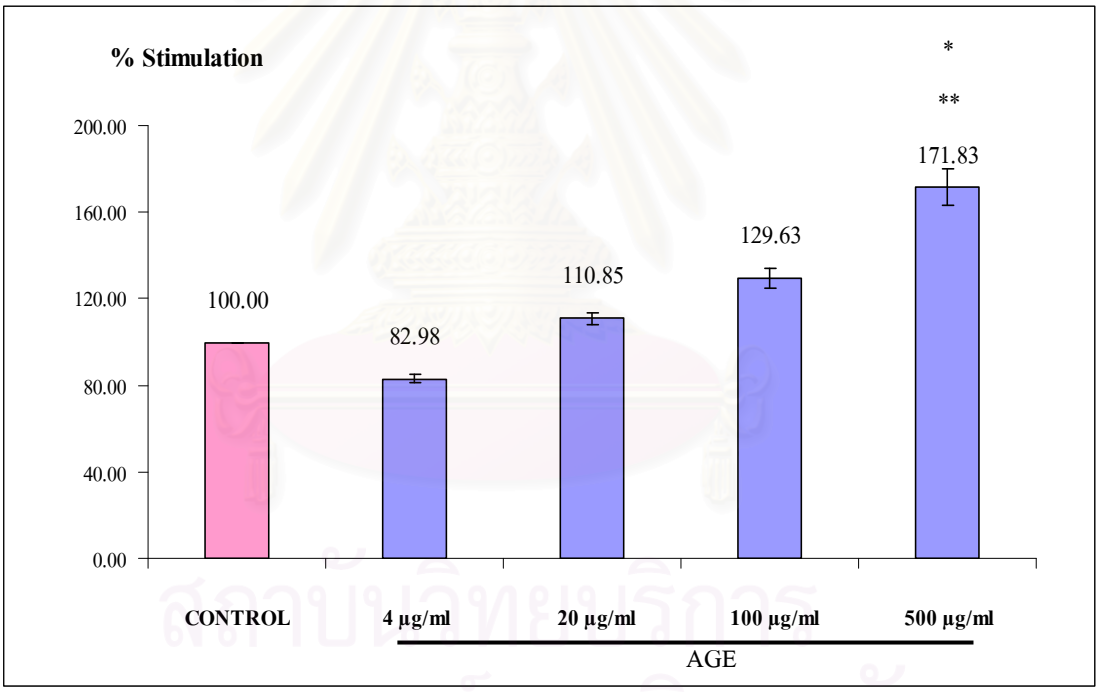
ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml ด้วยวิธี MTT assay เพื่อดู % viability ของเซลล์ที่มีชีวิตภายหลังการให้สารสกัด พบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ทั้ง 4 ความเข้มข้นที่ใช้ในการศึกษาให้ผลที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ใช้ทดสอบและที่ระดับความเข้มข้น 100 และ 500 µg/ml มีผลทำให้ %viability ของเซลล์มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) มีค่าเท่ากับ 37.63% และ 74.12% ตามลำดับ ดังแสดงในภาพที่ 13 โดยมี PHA ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml เป็น positive control



ภาพที่ 13 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยการ incubate เซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ตรวจสอบเซลล์ที่มีชีวิตด้วยวิธี MTT assay โดยคำนวณเป็น % viability แสดงค่าเป็น mean ± S.E.M (n = 8) เพื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS, 0.05%DMSO และ PHA 10 µg/ml เมื่อให้กลุ่มควบคุมมี %viability = 100% (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control)

4.3 ผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัด *A. ghaesembilla* (AGE) ที่มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell

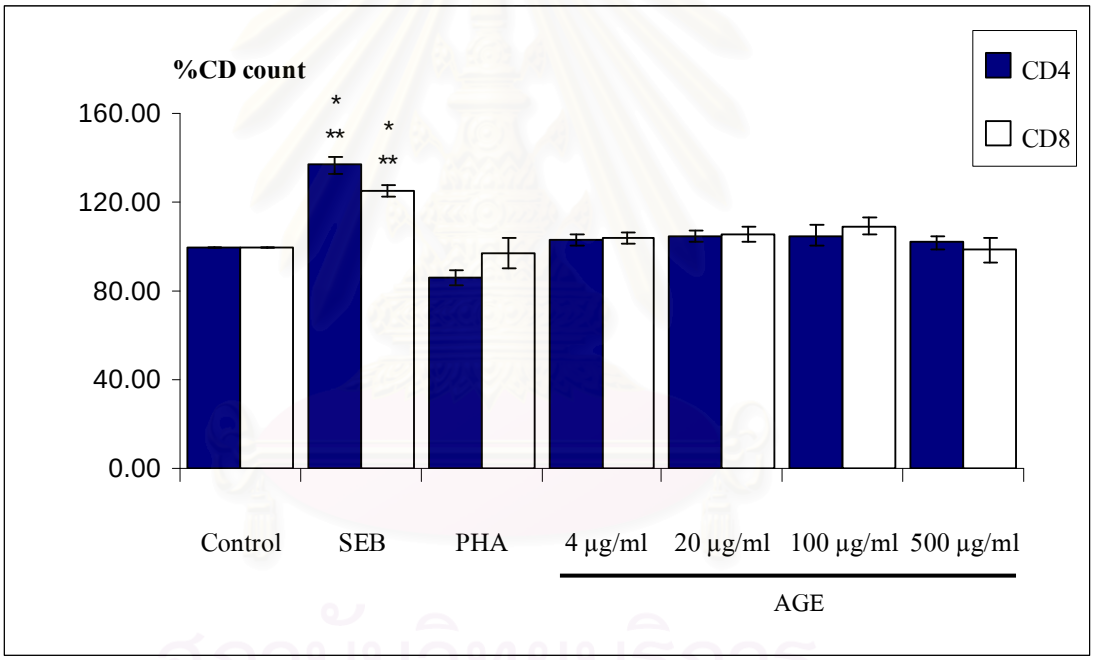
ผลการศึกษาฤทธิ์สารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการเจริญเพิ่มจำนวน (proliferation) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยวิธี [^{3}H] Thymidine incorporation method พบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 20-500 µg/ml สามารถกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนขึ้น และที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถกระตุ้นเซลล์ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % stimulation เท่ากับ 71.83 ± 8.26% ดังแสดงในภาพที่ 14 อย่างไรก็ตามพบว่าค่า % stimulation ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ดังกล่าวมานั้นสามารถกระตุ้นเซลล์ได้ในระดับที่น้อยมากซึ่งแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับ PHA ความเข้มข้น 10 µg/ml ที่ใช้เป็น positive control ซึ่งให้ผลในการกระตุ้นเซลล์ได้ถึง 986.79 ± 29.24%



ภาพที่ 14 ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ที่มีผลต่อการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว mononuclear cell ด้วยการ incubate เซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง การเพิ่มขึ้นของเซลล์ประเมินค่าด้วยวิธี [^{3}H] Thymidine incorporation method โดยคำนวณค่าเป็น %stimulation แสดงเป็นค่า mean ± S.E.M (n = 8) และมี PHA 10 µg/ml เป็น positive control ที่สามารถกระตุ้นเซลล์ ได้ 986.79 ± 29.24% ซึ่งไม่ได้แสดงไว้ในภาพ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS)

4.4 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*

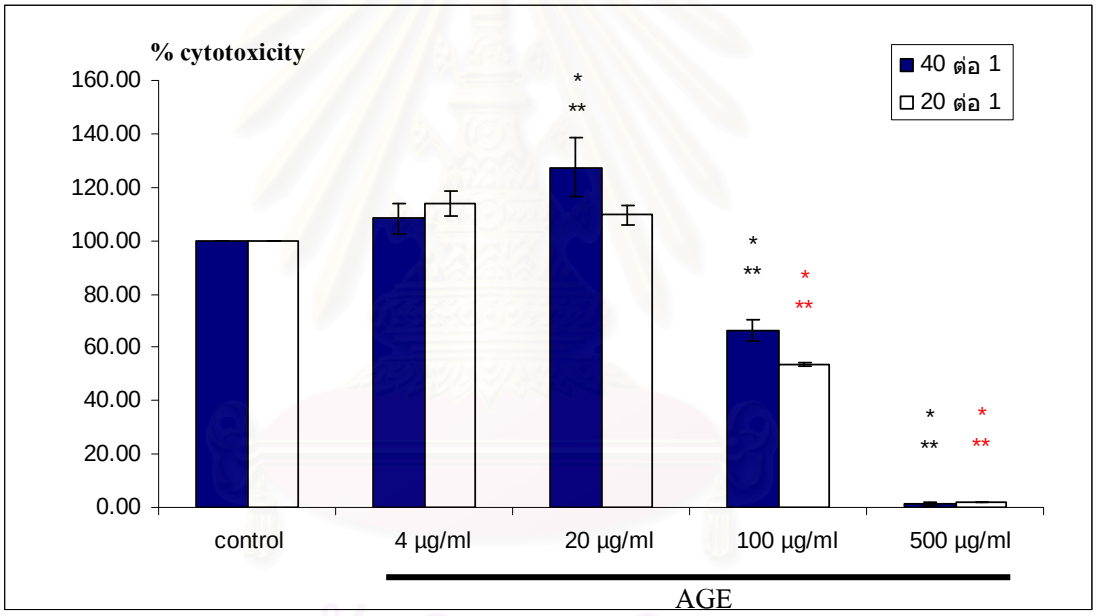
ผลการประเมินค่าปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml พบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ทั้ง 4 ความเข้มข้น ที่ใช้ในการทดสอบไม่มีผลในการเพิ่มปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells ดังแสดงในภาพที่ 15 ซึ่งการทดลองนี้ได้เปลี่ยนมาใช้ *Staphylococcal enterotoxin* B (SEB) เป็น positive control เนื่องจาก PHA ไม่ให้ผลในการเพิ่มปริมาณของ $CD4^+$ และ $CD8^+$ T cells โดย SEB มีผลกระตุ้นการเพิ่มขึ้นของปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells เท่ากับ 36.68 ± 3.78% และ 25.11 ± 2.62% ตามลำดับ



ภาพที่ 15 ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อการเพิ่มปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells ด้วยการ incubate เซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมง จากนั้นย้อมเซลล์ด้วย anti-CD3/CD4/CD8 แล้ววิเคราะห์ด้วย Flow cytometer โดยคำนวณเป็น % CD count แสดงเป็นค่า mean ± S.E.M (n = 6) โดยมี SEB เป็นกลุ่ม positive control ที่ให้ผลเพิ่มปริมาณ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells เท่ากับ 36.68 ± 3.78% และ 25.11 ± 2.62% ตามลำดับ (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS)

4.5 การวิเคราะห์การทำงานของ NK cell (NK cell activity) ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*

ผลการศึกษาการทำงานของ NK cell ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาว mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml ด้วยวิธี ^{51}Cr release assay พบว่าสารสกัดที่ระดับความเข้มข้น 4-20 µg/ml สามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้เพิ่มขึ้น และที่ความเข้มข้น 20 µg/ml ที่อัตราส่วน effector : target cell เท่ากับ 40:1 ให้ผลในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % cytotoxicity เท่ากับ 27.47±11.14% ในขณะที่ความเข้มข้น 100 และ 500 µg/ml ที่อัตราส่วน 40:1 และ 20:1 มีผลทำให้การทำงานของ NK cell ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่ 16



<u>ภาพที่ 16</u> ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ด้วยการ incubate เซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจากนั้นนำมา incubate ร่วมกับ K562 ที่ label ด้วย $Na_2{}^{51}CrO_4$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธี ^{51}Cr release assay จากเครื่อง gamma emission counter แล้วคำนวณผลเป็น % cytotoxicity แสดงเป็นค่า mean ± S.E.M (n = 3) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS)

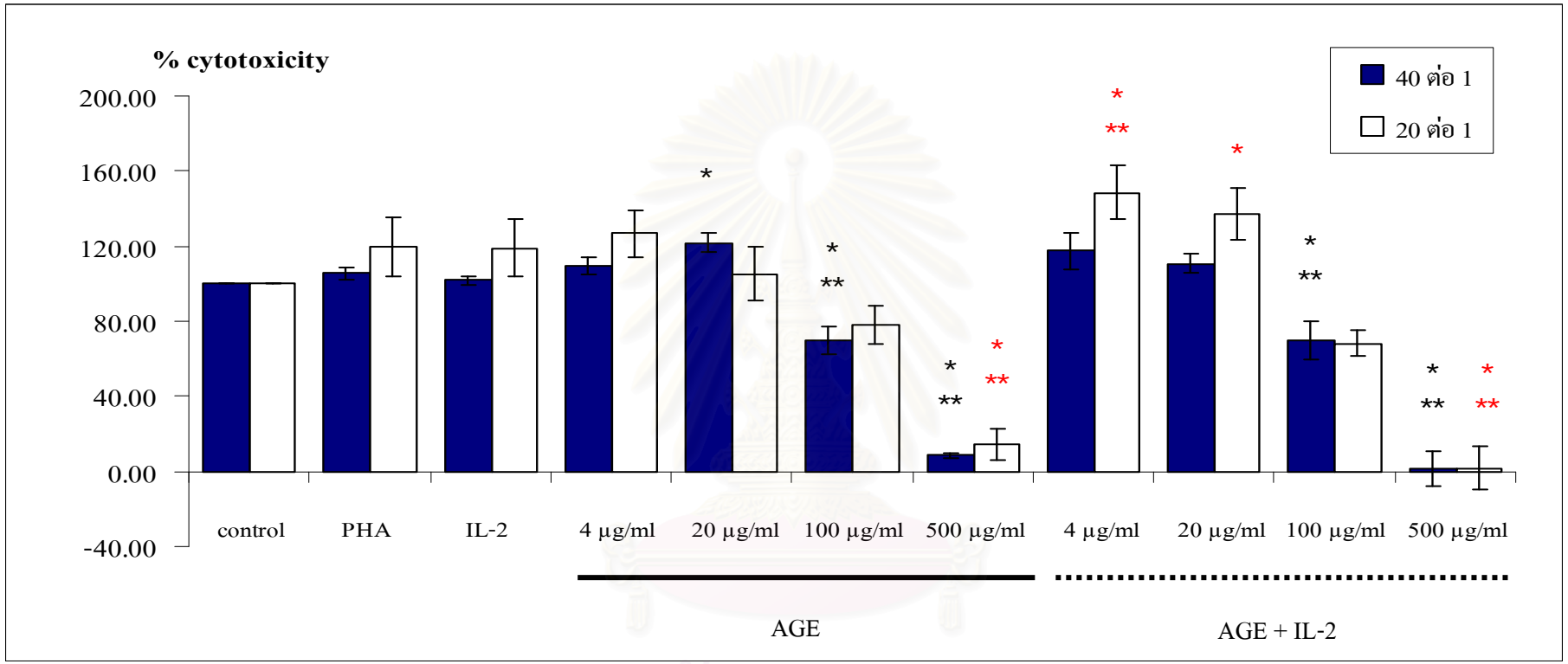
จากการทดสอบข้างต้น ได้ทำการทดสอบต่อโดยการให้สารสกัด *A. ghaesembilla* ร่วมกับ cytokine (IL-2) ที่มีผลในการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวและกระตุ้นการทำงานของ NK cell ดังนี้

1. incubate เซลล์ PBMC กับสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เพียงอย่างเดียว

2. incubate เซลล์ PBMC กับสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml ร่วมกับ IL-2 ความเข้มข้น 5 µl/ml

3. incubate เซลล์ PBMC กับ PHA (10 µg/ml) 4. incubate เซลล์ PBMC กับ IL-2 (5 µl/ml) จากนั้นนำมาวิเคราะห์ผลด้วยวิธี ^{51}Cr release assay เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ให้ร่วมกับ IL-2 ที่ระดับความเข้มข้น 4 µg/ml และ 20 µg/ml ที่อัตราส่วน effector : target cell เท่ากับ 20:1 สามารถกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยมีค่า % cytotoxicity เท่ากับ 48.59±14.06% และ 37.36±13.77% ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 100 µg/ml และ 500 µg/ml ที่อัตราส่วน effector : target cell เท่ากับ 40:1 และ 20:1 มีผลทำให้การทำงานของ NK cell ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังแสดงในภาพที่17 ในขณะที่กลุ่มที่ให้สาร PHA และ IL-2 มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ไม่แตกต่างจากกลุ่ม control ที่อัตราส่วน 40:1 แต่ที่อัตราส่วน 20:1 มีผลในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell ให้เพิ่มขึ้นเล็กน้อยและในกลุ่มที่ให้สารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เพียงอย่างเดียวให้ผลการศึกษาเหมือนกับการทดลองที่ผ่านมาข้างต้น

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

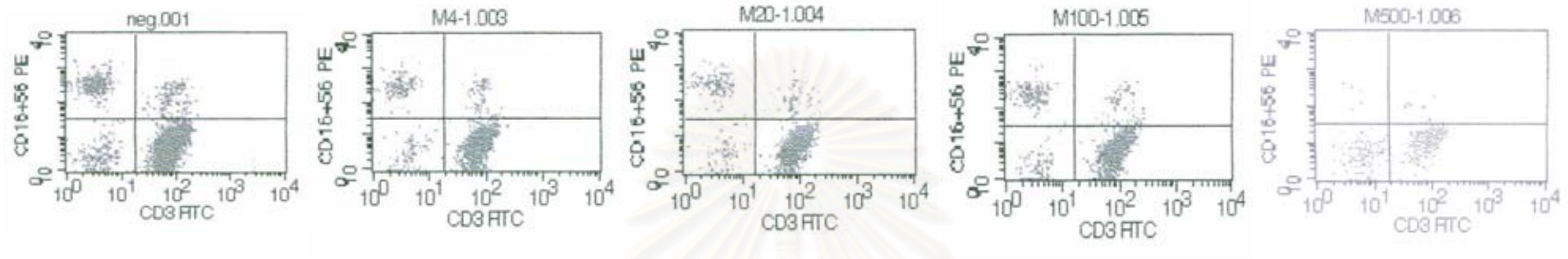


ภาพที่ 17 ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ, PHA, IL-2 และสารสกัด *A. ghaesembilla* ร่วมกับ IL-2 ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cell จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ด้วยการ incubate เซลล์ร่วมกับสารสกัดที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml และ IL-2 (5 µl/ml) เป็นเวลา 72 ชั่วโมงจากนั้นนำมา incubate ร่วมกับ K562 ที่ label ด้วย $Na_2{}^{51}CrO_4$ เป็นเวลา 4 ชั่วโมง แล้ววิเคราะห์ผลด้วยวิธี ^{51}Cr release assay จากเครื่อง gamma emission counter แล้วคำนวณผลเป็น % cytotoxicity แสดงเป็นค่า mean ± S.E.M (n = 3) (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS)

4.6 ผลการวิเคราะห์หาปริมาณ NK cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cell ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*

จากผลการศึกษาที่ 4.5 ได้ทำการศึกษาต่อโดยการประเมินค่าปริมาณ NK cells ภายหลังการกระตุ้นเซลล์ PBMC ด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml เพียงอย่างเดียว และการให้สารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml ร่วมกับ IL-2 โดยการย้อมเซลล์ด้วย anti-CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer ผลการศึกษาพบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4 µg/ml, 20 µg/ml และ100 µg/ml มีค่า % CD16+CD56PE เท่ากับ 10%, 9% และ 8% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS และกลุ่มที่ให้ IL-2 ซึ่งมีค่า % CD16+CD56PE เท่ากับ 9% และ 12% ตามลำดับ ในขณะที่ความเข้มข้น 500 µg/ml มีค่า % CD16+CD56PE เท่ากับ 1% และผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-500 µg/ml ร่วมกับ IL-2 พบว่าที่ความเข้มข้น 4 µg/ml, 20 µg/ml และ100 µg/ml มีค่า % CD16+CD56PE เท่ากับ 10%, 11% และ 10% ตามลำดับ ซึ่งไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่ม control ที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS และกลุ่มที่ให้ IL-2 ในขณะที่ความเข้มข้น 500 µg/ml มีค่า % CD16+CD56PE เท่ากับ 2 % ดังแสดงในภาพที่ 18

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



กลุ่ม control

%CD16+56PE = 9.16%

AGE 4 µg/ml

%CD16+56PE = 10.08%

AGE 20 µg/ml

%CD16+56PE = 9.19%

AGE 100 µg/ml

%CD16+56PE = 8.45%

AGE 500µg/ml

%CD16+56PE = 1.40%

IL-2

%CD16+56PE = 12.54%

AGE 4 µg/ml + IL-2

%CD16+56PE = 10.44%

AGE 20 µg/ml + IL-2

%CD16+56PE = 11.59%

AGE 100 µg/ml+ IL-2

%CD16+56PE = 10.25%

AGE 500 µg/ml+ IL-2

%CD16+56PE = 2.23%

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 18 ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้นต่างๆ ต่อปริมาณของ NK cell ด้วยการย้อมเซลล์ด้วย anti-CD3/CD16+CD56/CD45/CD19 แล้วนำมาวิเคราะห์หาปริมาณเซลล์ด้วยเครื่อง Flow cytometer โดยคำนวณเป็น % CD16+56PE แสดงเป็นค่า mean (n = 3)

บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

Immunomodulators สามารถแบ่งได้เป็น 2 กลุ่มด้วยกัน คือ immunostimulating และ immunosuppressive agents ซึ่งสารทั้ง 2 กลุ่มนี้มีประโยชน์ในการบำบัดรักษาโรค[6,49] ผู้ป่วยที่มีปัญหาเกี่ยวกับความบกพร่องในการทำหน้าที่และการควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันนั้น ถ้ามีการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันจะช่วยเสริมการรักษาที่ใช้ยาต้านไวรัส มีสมุนไพรจำนวนมากที่ใช้สืบทอดกันมายาวนานที่แสดงคุณสมบัติในการกระตุ้นการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันทั้งแบบ Humoral Immune Response (HIR) และ Cell Mediated Immune Response (CMIR) ประโยชน์จากพืชสมุนไพรเหล่านี้น่าจะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งที่มีศักยภาพที่จะสามารถกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันได้ มี parameter หลายชนิดที่นำมาใช้เป็นตัววัด (measurements) ในการทดสอบการกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของผลิตภัณฑ์หรือสารสกัดที่ได้จากธรรมชาติ เช่น การทดสอบการทำงานของ NK cells การเหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ lymphocytes และการสร้าง specific antibodies ในการศึกษาวิจัยนี้ได้ทำการทดสอบฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันของสารสกัดด้วยเอทานอลของสมุนไพรมะเม่าไข่ปลา *(A. ghaesembilla)* ซึ่งเป็นสมุนไพรที่นิยมใช้กันในแถบภาคตะวันออกเฉียงเหนือและภาคใต้ของประเทศไทย ก่อนนำสารสกัดสมุนไพรมาศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน จะต้องทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดดังกล่าวว่าไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว ดังนั้นจึงทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเอธานอลของมะเม่าเป็นอันดับแรก

Colorimetric MTT assay เป็นวิธีที่นำมาใช้ในการศึกษาความเป็นพิษของสาร โดยอาศัยหลักการที่ เซลล์มีชีวิตจะสามารถเปลี่ยนแปลงสาร Tetrazolium (MTT) จากสารที่เป็นสีเหลืองมาเป็นสาร Formazan ที่เป็นสีม่วง โดยเอนไซม์ succinate-tetrazolium reductase ที่เกิดขึ้นในขบวนการ mitochondrial respiratory chain[42] เฉพาะในเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น ซึ่งปริมาณการเปลี่ยนแปลงสีที่วัดได้เป็นสัดส่วนโดยตรงกับเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดผลิตภัณฑ์ธรรมชาติหรือยาต่างๆ แบบ *in vitro* สามารถทดสอบการทำงานของเซลล์โดยประเมินค่าการทำงานของ MTT mitochondrial reduction ของเซลล์ได้หลายชนิด ในการศึกษาครั้งนี้ได้ทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดด้วยเอทานอลของ *A. ghaesembilla* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) จากเลือดของคนปกติ ที่ความเข้มข้น 4-500 μg/ml ซึ่งความเข้มข้นดังกล่าวให้ผลที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวที่นำมาทดสอบ เนื่องจากค่า % viability ที่วัดได้ มีค่ามากกว่ากลุ่มควบคุม

ที่ไม่ได้ให้สารสกัดและยังพบว่าค่า % viability ได้ดีเพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นที่นำมาทดสอบอีกด้วย และยังสามารถให้ผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ทดสอบได้ เมื่อเปรียบเทียบกับ PHA ที่ใช้เป็น positive control ซึ่งเป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ T lymphocytes ได้ การศึกษาในขั้นต่อไปเพื่อที่จะให้ทราบฤทธิ์ของสารสกัดให้มากขึ้นและเพื่อยืนยันฤทธิ์ในการกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ T lymphocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันร่างกายชนิด specific immunity ในแบบ CMIR การตรวจสอบการเจริญเพิ่มจำนวนของ T lymphocytes สามารถทำได้หลายวิธีด้วยกัน โดยตรวจการเจริญเปลี่ยนแปลงของ lymphocyte เป็นเซลล์ lymphoblast เรียกว่าเกิด blast transformation นอกจากนี้ยังดูการเปลี่ยนแปลงจากการตรวจดูการสร้าง DNA RNA หรือโปรตีนภายในเซลล์ได้ด้วย ในการศึกษาครั้งนี้เป็นการทดสอบการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาว (PBMC) ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นเซลล์ด้วยสารสกัดสมุนไพรมะเม่าไข่ปลาที่ความเข้มข้นต่างๆ โดยวิธี [^{3}H] thymidine incorporation method[10,32,43,44] ผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* สามารถกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ตั้งแต่ความเข้มข้น 20 µg/ml จนถึง 500 µg/ml โดยเฉพาะที่ความเข้มข้น 500 µg/ml สามารถกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวให้เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญสถิติ โดยมีค่า % stimulation เท่ากับ 71.83 % แต่ผลการกระตุ้นดังกล่าวนั้นเมื่อเปรียบเทียบกับผลของสาร PHA ที่ความเข้มข้น 10 µg/ml ที่ใช้เป็น positive control แล้วพบว่าฤทธิ์ของสารสกัดสามารถกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้น้อยกว่าฤทธิ์ของ PHA ที่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้ถึง 986.79 %

จากการทดสอบพื้นฐานข้างต้นแสดงให้เห็นว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* สามารถกระตุ้นให้มีการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้ ดังนั้นการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดในขั้นต่อไป คือการทดสอบผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการเพิ่มปริมาณของ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells ซึ่ง T lymphocyte เป็นเซลล์ที่สำคัญในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด CMIR โดยที่ $CD4^+$ T cells (helper T cell) เมื่อถูกกระตุ้นจะช่วยในการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันของ B cell ในการสร้างแอนติบอดี ช่วยให้ T cell อื่นๆ และ NK cells ตอบสนองต่อแอนติเจนได้ดีขึ้น และสามารถรับรู้ peptide antigen ที่จับอยู่กับโมเลกุลของ MHC class II ได้ นอกจากนี้ยังสามารถหลั่ง cytokine ต่างๆ ออกมาเพื่อกระตุ้นการทำงานของภูมิคุ้มกันอื่นๆ ให้ตอบสนองได้ดีขึ้นอีกด้วย ส่วน $CD8^+$ T cells (cytotoxic T cell/suppressor T cell) เมื่อได้รับกระตุ้นจะสามารถทำลายเซลล์แปลกปลอม เช่น เซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส เซลล์เนื้อเยื่อที่มีการปลูกถ่ายและเซลล์มะเร็ง ซึ่งเซลล์ชนิดนี้สามรถรับรู้การนำเสนอแอนติเจนผ่านทางโมเลกุลของ MHC class I และเมื่อถูกกระตุ้นจะหลั่ง

cytokine ต่างๆ เช่น IL-2 และ IFN-γ เพื่อกระตุ้นการทำงานของเซลล์อื่นๆ และตัวมันเองให้ตอบสนองได้รวดเร็วขึ้น นอกจากนี้ยังสามารถควบคุมการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันให้ทำงานอย่างพอเหมาะพอดีอีกด้วย แต่จากผลการทดสอบพบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ไม่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่มีสารสกัด ซึ่ง $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells เป็นกลุ่มประชากรย่อยของ T lymphocyte จึงอาจจะสรุปได้ว่าจากการทดลองที่ผ่านมาข้างต้นสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่สามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวได้นั้น เป็นผลมาจากการเพิ่มขึ้นของเซลล์ชนิดอื่นๆ ที่อยู่ใน PBMC ที่ไม่ใช่ T lymphocyte เช่น B lymphocyte NK cells หรือ monocytes ได้ เนื่องจากผลการหาปริมาณประชากรย่อยของ T lymphocyte ไม่พบการเปลี่ยนแปลง

นอกจากการศึกษาผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด specific immunity แล้ว ในการศึกษาครั้งนี้ยังทำการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันชนิด innate immunity ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด natural killer cell (NK cells) การทำงานของ NK cell ที่มีบทบาทสำคัญในการทำลายเซลล์เนื้องอก เซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสต่าง ๆ เป็นสำคัญ โดย NK cells จะทำหน้าที่ในการกำจัดสิ่งแปลกปลอมออกจากร่างกายโดยอาศัยสารพิษภายในแกรนูลของเซลล์ เช่น perforin, granzymes และ granulysin[40] เป็นต้น NK cells จะปล่อยสารเหล่านี้ออกมาทำลายเซลล์เป้าหมายโดยตรงและยังสามารถกำจัดสิ่งแปลกปลอมต่างๆ ด้วยวิธี ADCC (Antibody-Dependent Cell Cytotoxicity)ได้ด้วย การวิเคราะห์การทำงานของ NK cells สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การตรวจสอบจากการทำลายเซลล์เป้าหมายโดยตรงของ NK cells ตรวจดูการทำงานของเซลล์ด้วยวิธี ADCC และการตรวจวัดปริมาณ cytokines เช่น IFN-γ, TNF-β, IL-10, IL-13 และ GM-CSF[50] ที่หลั่งออกมาจากเซลล์ ในการศึกษาครั้งนี้จะตรวจสอบการทำงานของ NK cells ด้วยวิธี radioactive chromium (^{51}Cr)-release method ซึ่งเป็นวิธีที่ NK cells ทำลายเซลล์เป้าหมายได้โดยตรงจากสารพิษภายในแกรนูล มีผลทำให้เซลล์เป้าหมายถูกทำลายและปล่อย ^{51}Cr ออกมา ผลการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการทำงานของ NK cells พบว่าที่ความเข้มข้นต่ำๆ (4 และ 20 μg/ml) สามารถเพิ่มการทำงานของ NK cells ในการทำลายเซลล์เป้าหมายได้ ในขณะที่ความเข้มข้นที่สูงขึ้น (100 และ 500 μg/ml) จะมีผลทำให้การทำงานของ NK cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังได้ทำการทดสอบผลของสารสกัดเมื่อให้ร่วมกับ IL-2 ต่อการทำงานของ NK cells พบว่าที่ความเข้มข้น 4 และ 20 μg/ml มีผลทำให้การทำงานของ NK cells เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและเพิ่มสูงกว่าการให้สารสกัดเพียงอย่างเดียว แต่ที่ความเข้มข้น 100 และ 500 μg/ml มีผลทำให้การทำงานของ NK cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกับการให้สารสกัดเพียงอย่างเดียว จากผลดังกล่าวน่าจะมาจาก

NK cells ที่ขณะพักจะมีการแสดงออกของ β-chain ของ IL-2 receptor เมื่อให้ IL-2 เข้าไป IL-2 จะจับกับ IL-2 receptor มีผลทำให้ NK cells ถูกกระตุ้นและมีการเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์ lymphokine activated killer cell (LAK) ที่มีผลทำให้ทำลายเซลล์เป้าหมายได้หลากหลายและมีความรุนแรงมากขึ้น[51,52,53] โดยจะเห็นผลชัดเจนที่ความเข้มข้น 4 และ 20 μg/ml ในทางตรงข้ามเมื่อให้สารทดสอบที่ความเข้มข้นสูงขึ้น กลับพบว่ามีผลทำให้การทำงานของ NK cells ลงลดอย่างมากที่ความเข้มข้น 500 μg/ml อาจเป็นผลมาจากสารสกัดที่ความเข้มข้นสูงๆ ให้ผลที่เป็นพิษต่อ NK cells ทำให้เซลล์ตายได้ เนื่องจากได้ลองทำการวัดปริมาณของ NK cells ภายหลังการเลี้ยงเซลล์ PBMC ที่ให้สารสกัด *A. ghaesembilla* เป็นเวลา 3 วัน จากนั้นนำมาย้อมด้วย anti- CD16-CD56PE ซึ่งเป็นโมเลกุลจำเพาะบนผิว NK cells ซึ่งโดยปกติปริมาณของ NK cells มีประมาณ 5-10% ของ lymphocyte ในกระแสเลือด จากการทดลองพบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 4-100 μg/ml มี % CD16-CD56PE เท่ากับ 10%, 9% และ 8% ตามลำดับ ซึ่งให้ผลไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ให้อาหารเลี้ยงเซลล์ RPMI 1640 ที่มี 10 % FBS และกลุ่มที่ให้ IL-2 โดยมี % CD16-CD56PE เท่ากับ 9% และ12% ตามลำดับ ในขณะที่สารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความเข้มข้น 500 μg/ml มี % CD16-CD56PE เท่ากับ 1% ซึ่งจะเห็นได้ว่ามีค่าลดลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในกลุ่มที่ให้สารสกัด *A. ghaesembilla* ร่วมกับ IL-2 ก็ให้ผลในการทดลองเช่นเดียวกัน ซึ่งก็อาจจะสรุปได้ว่าความเข้มข้นของสารสกัดที่สูงขึ้นมีผลทำให้ NK cells ตายได้ ถึงแม้ว่าจากการทดสอบความเป็นพิษของเซลล์ด้วยวิธี MTT assay นั้นพบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ PBMC ที่ใช้ศึกษาแต่ปริมาณ NK cells ที่มีใน PBMC นั้นมีน้อยมากเมื่อเทียบกับเซลล์อีกใน PBMC ซึ่งอาจทำให้ไม่เห็นผลการตายของ NK cells จากการทดลองดังกล่าวได้ ถ้าต้องการทราบผลความเป็นพิษต่อ NK cells ที่แน่นอนควรทำการแยกเอาเฉพาะ NK cells ออกมาศึกษาโดยตรง

จากการสกัดสารจาก *A. ghaesembilla* ด้วยเอทานอล พบองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ gallic acid เป็นสารในกลุ่ม phenolic acid quercetin และ kaempferol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids สารที่ได้ดังกล่าวเหมือนกับการศึกษาของสุรเดช มหารมณ์และคณะ ที่พบสาร flavonoid และ phenolic ที่ได้จากต้นมะเม่า (ไม่ได้ระบุ ชื่อวิทยาศาสตร์) และยังสามารถสกัดได้สารอื่นๆ นอกเหนือจาก flavonoid และ phenolic ได้แก่ Anthrocyanin, β-sitosterol, Tannins, Stigmasterol และ Triterpenes จากรากและลำต้น[19] ซึ่งสารสำคัญทั้ง 3 ชนิดที่พบได้จากการสกัด *A. ghaesembilla* นั้นมีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาของสารดังกล่าวที่พบในพืชชนิดอื่นๆ พบว่า gallic acid มีฤทธิ์เป็น anti-fungal, anti-viral, antioxidant และเป็นพิษต่อเซลล์มะเร็ง ส่วน quercetin และ kaempferol ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids มีฤทธิ์เป็น antioxidant, anti-inflammatory[54] และ

anti-tumor มีรายงานการศึกษาที่ผ่านมาพบว่าสาร flavonoids มีฤทธิ์ทำให้มีการเพิ่มจำนวนของ lymphocytes ได้อย่างมีนัยสำคัญ และยังทำให้หนูที่ถูกยับยั้งด้วยสาร hydrocortisone acetate สามารถผลิตและหลั่ง IL-2 ออกมาใหม่ได้ ดังนั้นผลการเจริญเพิ่มจำนวนของ lymphocyte และการเพิ่มการทำงานของ NK cells ที่พบจากการศึกษาครั้งนี้ น่าจะเป็นผลมาจากสาร quercetin และ kaempferol ซึ่งเป็นสารประกอบในกลุ่ม flavonoids ที่พบได้ในสารสกัด *A. ghaesembilla*

การศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัด *A. ghaesembilla* น่าจะมีฤทธิ์ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายได้ทั้งแบบ innate immunity และ adaptive immunity โดยสามารถกระตุ้นการเจริญเพิ่มจำนวนของ lymphocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้น 500 μg/ml และมีผลเพิ่มการทำงานของ NK cells ที่ความเข้มข้น 4 และ 20 μg/ml ในขณะที่ความเข้มข้น 100 และ 500 μg/ml มีผลทำให้การทำงานของ NK cells ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ อย่างไรก็ตามจากผลการทดลองพบว่าสารสกัด *A. ghaesembilla* ไม่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มปริมาณของ $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells

ข้อเสนอแนะ

จากผลการศึกษาในครั้งนี้สารสกัดราก *A. ghaesembilla* มีฤทธิ์ในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ lymphocyte และสามารถเพิ่มการทำงานของ NK cell ได้ แต่ไม่เพิ่ม $CD4^+$ T cells และ $CD8^+$ T cells ซึ่งสารสกัดราก *A. ghaesembilla* อาจมีผลเพิ่มเซลล์ชนิดอื่น เช่น B lymphocyte ดังนั้นน่าที่จะนำไปศึกษาอย่างต่อเนื่องเกี่ยวกับกลไกอื่นๆ ในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันของร่างกายต่อไป เพื่อที่จะนำมาพัฒนาเป็นยาชนิดใหม่ที่ได้จากพืชสมุนไพร โดยแนวทางในการศึกษาในขั้นต่อไป ได้แก่ การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด ศึกษาฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้เซลล์เม็ดเลือดขาวที่แยกจากเลือดของผู้ป่วยที่เป็นโรคภูมิคุ้มกันบกพร่อง (AIDS) ศึกษาทางคลินิก เพื่อพัฒนายาจากสมุนไพร *A. ghaesembilla* และในอนาคตอาจศึกษาองค์ประกอบทางเคมีเพื่อนำองค์ประกอบทางเคมีแต่ละชนิดที่น่าจะเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์มาศึกษาฤทธิ์การกระตุ้นภูมิคุ้มกันชนิดต่างๆ ต่อไป

รายการอ้างอิง

[1] Mayer G. Immunology-Chapter One: Innate (non-specific) Immunity [Online]. 2007. Available from: http://pathmicro.med.sc.edu/ghaffar/innate.htm [2007, August 15]

[2] Janeway C. A., Travera P., Walport M., Shlomchick M. J. Immunobiology the immune system in health and disease. Garland Science. New York; USA, 2005.

[3] Pier G. B., Lyczak J. B., Wetzler L. M. Immunology, Infection and Immunity. Washington, D.C., USA, 2004.

[4] Parslow T. G., Stites D. P., Terr A. I., Imboden J. B. Medical Immunology. McGrawHill, 2003.

[5] Labadie R.P. Immunomodulatory compounds. In: Bioactive natural Products. Edited by Colegate S. M. and Molyneux R. J. Boca Raton: CRC Press, 1993: 279-317.

[6] Wagner H., Kraus S., Jurcic K. Search for potent immunostimulating agents from plants and other sources. In: Immunomodulatory agents from plants. Edited by Wagner H. Basel: Birkhauser Verlag, 1999: 1-39.

[7] Chin Y. W., Balunas M. J., Chai H. B., Kinghorn D. Drug discovery from medicinal plants. The AAPS Journal. 2006; 8(2):E239-E253.

[8] Balunas M. J. and Kinghorn A. D. Drug discovery from medicinal plants. Life Science. 2005; 78:431-441.

[9] เอมอร โสมนะพันธุ์. สมุนไพรและผักพื้นบ้านกับโรคเอดส์และโรคฉวยโอกาส สรุปรายงานการสัมมนาวิชาการ เรื่องการดูแลผู้ป่วยติดเชื้อเอดส์ด้วยสมุนไพรผักพื้นบ้าน. สถาบันการแพทย์แผนไทย กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข มหาวิทยาลัยสงขลานครินทร์ 19-21 เมษายน, 2542-3:35-53.

[10] Sriwanthana B and Chavalittumrong P. In vitro of *Derris scandens* on normal lymphocyte proliferation and its activities on natural killer cells in normal and HIV-1 infected patients. Journal of Ethnopharmacol. 2001; 76:125-129.

[11] Auttachoat W., Chitsomboon B., Peachee V. L., Goub T. L., White K. L. Immunomodulation by Dok Din Daeng (*Aeginetia indica* Roxb) extracts in female B6c3F1 mice(I):Stimulation of T cells. Int. Immunopharmacol. 2004; 1367-1379.

[12] โสภิต ธรรมอารี และคณะ. รายงานการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปและพิษวิทยาของสมุนไพรมะเม่าและสมุนไพรไทย 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อแบคทีเรียหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน. มีนาคม, 2547.

[13] เต็ม สมิตินันทน์. ชื่อพรรณไม้แห่งประเทศไทย. สำนักวิชาการป่าไม้ กรมป่าไม้ กรุงเทพมหานคร, 2543.

[14] สถาบันวิจัยวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งประเทศไทย (วว.). พืชกินได้ในป่าสะแกราช. 261-262.

[15] ฐานข้อมูลพันธุ์ไม้ข้างขนำ [Online].2550. แหล่งที่มา: http://www.geocities.com/plugmet/flora_index.htm [2007, August 28]

[16] เชาว์ กสิพันธ์. ตำราเภสัชศึกษา. กรุงเทพฯ : สมชายการพิมพ์, 2523.

[17] หนังสือไม้อเนกประสงค์กินได้. สำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ คณะอนุกรรมการประสานงานวิจัยและพัฒนาทรัพยากรป่าไม้และไม้โตเร็วอเนกประสงค์.

[18] พจนานุกรมสมุนไพรไทย. พิมพ์ครั้งที่ 6, 2548.

[19] สุรเดช มหารมณ์ และคณะ 2541 (บทความไม่ได้ตีพิมพ์) อ้างถึงใน โสภิต ธรรมอารี และคณะ. รายงานการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปและพิษวิทยาของสมุนไพรมะเม่าและสมุนไพรไทย 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อแบคทีเรียหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน. มีนาคม, 2547.

[20] สุรเดช มหารมณ์ และภาศรี มหารมณ์ 2541-2542 (บทความไม่ได้ตีพิมพ์) อ้างถึงใน โสภิต ธรรมอารี และคณะ. รายงานการวิจัย การศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาทั่วไปและพิษวิทยาของสมุนไพรมะเม่าและสมุนไพรไทย 4 ชนิดที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ HIV ต้านเชื้อรา ต้านเชื้อแบคทีเรียหรือกระตุ้นภูมิคุ้มกัน. มีนาคม, 2547.

[21] สุรเดช มหารมณ์ ใบอนุญาต อย. สมุนไพร (ส.ต.ญ.) ที่G269/41 และ G446/41.

[22] สมิทธิ์ สนั่นเสียง. คุณสมบัติทางยาของสมุนไพรมะเม่า, 2541.

[23] Ishizuka H., Ohsawa C., Ohiwa T. Antipicoma viruses favone Ro-09-0179. *Antimicrob Agent. Chemother*. 1982.

[24] Takeshi M. and Tanoak Y. Antiviral substance from root of Paconia spp. *Planta. Medica*. 1982.

[25] Kuroyanagi M., Sato M., Ueno A., Nishi K. Flavonoids from *Andrographis paniculata*. *Chem. Pharm. Bull*. 1987.

[26] อุษณี ขวัญสังข์. การศึกษาด้านเภสัชวิทยาของสมุนไพรมะเม่า. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2545.

[27] Suzuki H., Ohta Y., Takino T., Fujisawa K., Hirayama C. Effect of gltcyrrhizin on biochemical tests to patients with chronic hepatitis, double-blind trial. Asian Med. J. 1983; 16:423-438.

[28] Numazaki K., Nagata N., Sato T., chiba S. Effect of glycyrrhizin, cyclosporine A, and tumor necrosis factor alpha on infection of U-937 and MRC-5 cells by human cytomegalovirus. J. Leukoc. Biol. 1994; 55:24-28.

[29] Harada S., Maekawa T., Haneda E., Morikawa Y., Nagata N., Ohtsuki K. Biochemical characterization of recombinant HIV-1 reverse transcriptase (rRT) as a glycyrrhizin-binding protein and the CK-II-Mediated stimulation of rRT activity potently inhibited by glycyrrhetinic acid derivative. Biol. Pharm. Bull. 1998; 21: 1282-1285.

[30] Falchetti R., Fuggetta M. P., Lanzilli G., Tricarico M., Ravagnan G. Effect of resveratrol on human immune cell function. Life Science. 2001; 70:81-96.

[31] ชมพูนุท บุญอากาศ. ฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของสารสกัดสมุนไพรไทยบางชนิด. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาชีวเวชเคมี ภาควิชาชีวเคมี คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2546.

[32] ปิยะรัตน์ ศรีดารณพ. ฤทธิ์กระตุ้นภูมิคุ้มกันร่างกายของสารสกัดจากผลพุงทะลาย. วิทยานิพนธ์ปริญญามหาบัณฑิต, สาขาวิชาเภสัชวิทยา บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, 2548.

[33] Goldsby, R.A. Immunology. 5th Edit. New York: W.H. Freeman and Company, 2003.

[34] Delves P. J., and Roitt I. M. The immune system. N. Engl. J. Med. 2000; 343:37-49.

[35] กฤษณา จรรยาพูน. พื้นฐานการทดสอบทางวิทยาภูมิคุ้มกัน: Basic Immunoassays. ขอนแก่น : โรงพิมพ์แอนนาออฟเซต, 2548.

[36] Abbas A. K. and Lichtman A. H. Cellular and Molecular Immunology. 5th ed. Elsevier Saunders. 2005.

[37] Goldsby R. A., Kindt T. J., Osborne B. A., Kuby J. Immunology 5th ed. W.H. Freeman and Company. New York; USA, 2003.

[38] Farag S. S. and Caligiuri M. A. Human natural killer cell development and biology. Blood Review. 2006; 20:123-137.

[39] Hallett H. D. and Murphy W. J. Positive and negative regulation of Natural Killer cells:Therapeutic implications. Seminars in Cancer Biology. 2006; 16:367-382.

[40] Smyth M. J., Cretney E., Kelly J M., Westwood J. A., Street E. A, Yagita H. Activation of NK cell cytotoxicity. Molecular Immunology. 2005; 42:501-510.

[41] Ferrari M., Fornasiero M.C., Isetta A.M. MTT colorimetric assay for testing macrophage cytotoxic activity *in vitro*. J. Immunol. Methods. 1990; 131:165 – 172.

[42] ATCC : MTT cell proliferation assay [Online]. 2001. Available from: http://www.atcc.org [2007, May 5]

[43] Hickling J. K. Measuring human T-lymphocyte function. Expert Reviews in Molecular Medicine. 1998; 1:1-20.

[44] Coligan J. E., Bierer B. E., Margulies D. H., Shevach E. M. Shot protocols in immunology:A compendium of methods from current protocols in immunology. Warren Strober; USA, 2005.

[45] Patki A. H., Purvis S. F., Meyerson H. J., Laderman M. M. Lymphocyte proliferation assay may underestimate antigen responsiveness in human immunodeficiency virus infection. Chin. Immunol. 1999; 93:245-249.

[46] Tenorio E. P. and Saavedra R. Differential effect of sodium arsinite during the activation of human CD4+ and CD8+ T lymphocyte. International Immunopharmacology. 2005; 5:1853-1869.

[47] Giorgi J.V. and Hultin L.E. Lymphocyte subset alterations and immunophenotyping by flow cytometry in HIV disease. Clin Immunol Newslett. 1990; 10:5561.

[48] Helgason C.M., Frank J.L., Johnson D.R., frank M.G., Hendricks S.E. The effects of St. John's Wort (*Hypericum perforatum*) on NK cell activity in vitro. Immunopharmacol. 2000; 46:247-251.

[49] Werner G. H. and Jolles P. Immunostimulaing agents:what next? A review of their present and potential medical applications. European Journal of Biochemistry. 1996; 242:1-19.

[50] Cooper M.A., Fehniger T.A., Caligiuri M.A. The biology of human natural killer-cell subsets. *TRENDS* in immunology. 2001; 22:633-640.

[51] Whiteside T. L. and Herberman R. B. Role of human nature cells in immune sueveillance of cancer. Curr. Opin. Immunol. 1995; 7:704.

[52] Viveiros M. M. and Antczak D. F. Characterization of equine natural killer and IL-2 stimulation lymphokine activated killer cell population. Developmental and Comparative Immunology. 1999; 23:521-532.

[53] Frederick M., Grimm E., Krohn E., Smid C., Yu T. K. Cytokine-induced cytotoxic function expressed by lymphocyte of the innate immune system: distinguishing characteristics of NK and LAK based on function and molecular markers. J Interferon Cytokine Res. 1997; 17:435-447.

[54] Lee E. J., Choi E. J., Choi I., Park J. S., Sung M. K. Effects of Anti-inflammatory Quercetin and Kaempferol on Cell Growth and the Production of Angiogenic Factors in HT-29 Human Colon Cancer Cells. The FASEB Journal. 2007; 21:847.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก.

แสดงผลการสกัดสารสกัด *A. ghaesembilla*

ผลของการสกัด *A. ghaesembilla* ด้วยเอทานอล

จากการสกัด *A. ghaesembilla* ส่วนรากด้วย 95% เอทานอล ได้สารสกัดออกมาเป็นสีม่วงดำ มีกลิ่นเฉพาะ

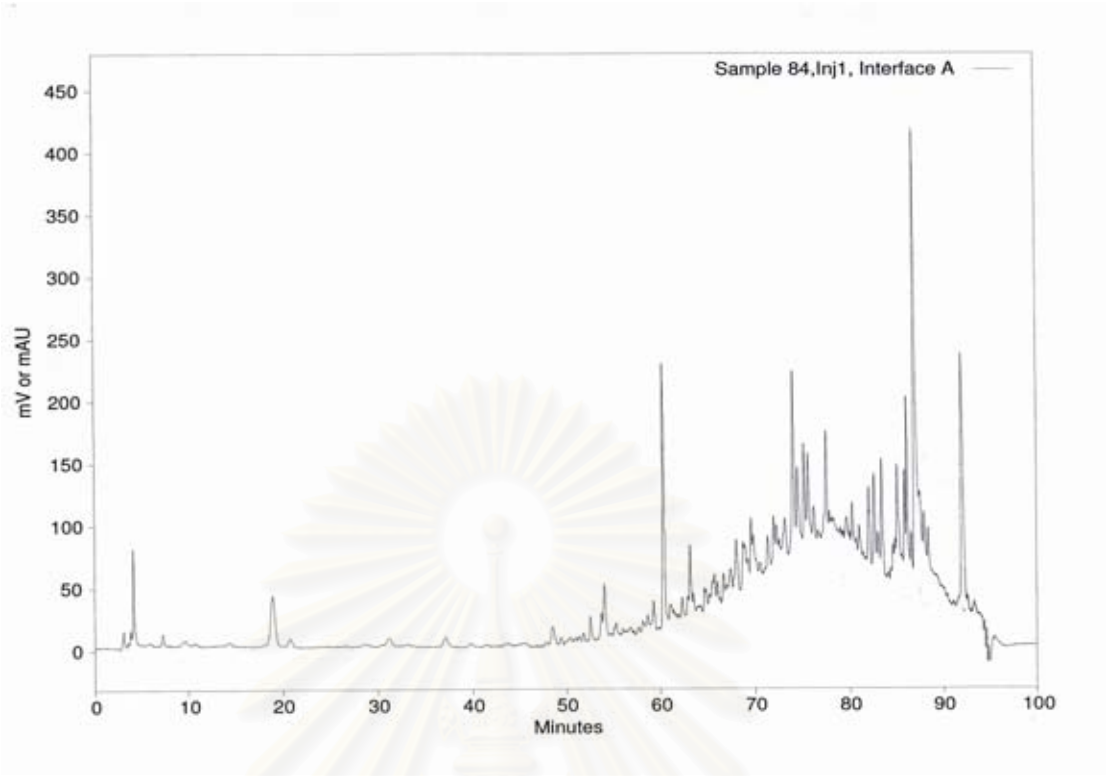
ผลของสารสกัดมะเม่าส่วนราก	
% Yield	7.69
% Ash	1.99
% Moisture	38.86

จากการทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสารสกัด *A. ghaesembilla* ด้วย 95% เอทานอล โดยวิธี HPLC (High Performance Liquid Chromatography) จะได้ Chromatogram ดังแสดงในภาพที่ 19 และ 20

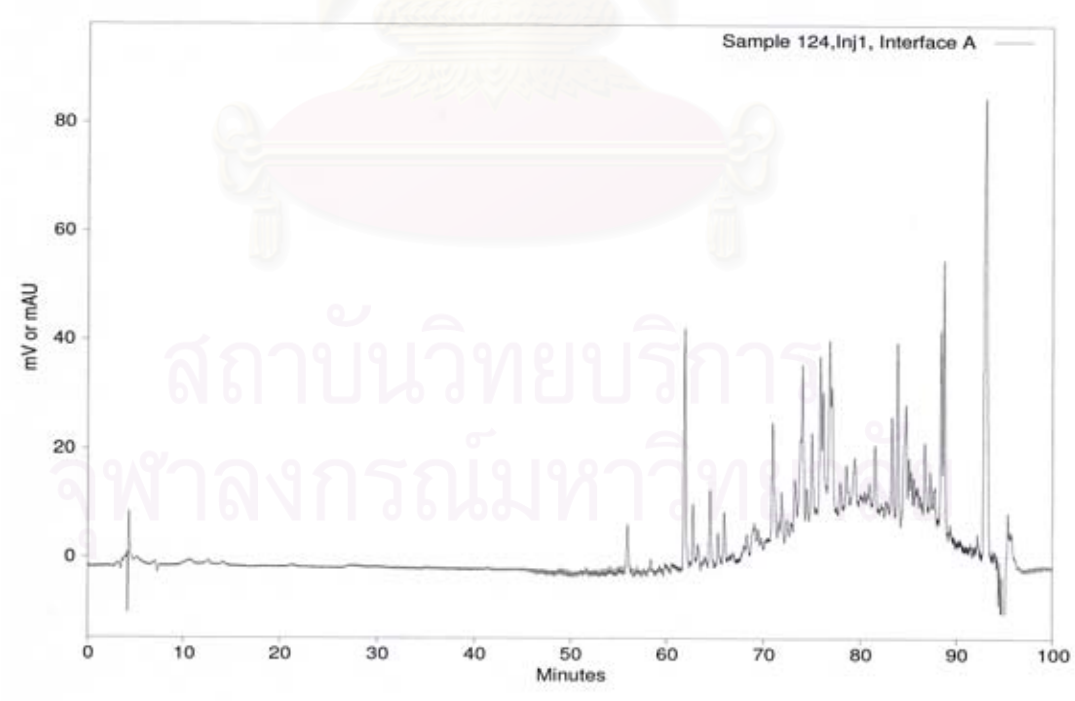
HPLC (High Performance Liquid Chromatography)

Column	:	Phenomenex, Luna C18, 5 μ size 250 x 4.6 nm
Mobile Phase	:	0.3% Acetic acid : Methanol (gradient)
Flow rate	:	0.8 min/ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

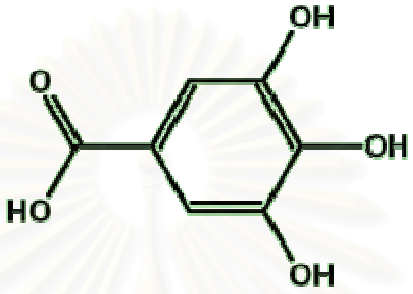


ภาพที่ 19 แสดง Chromatogram ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความยาวคลื่น 280 นาโนเมตร

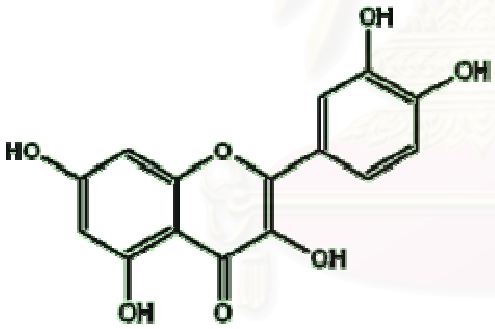


ภาพที่ 20 แสดง Chromatogram ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ที่ความยาวคลื่น 365 นาโนเมตร

จากการวิเคราะห์ดังกล่าวจะได้องค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่ได้จากการทำ HPLC คือ จะพบ Gallic acid ที่ประมาณนาทีที่ 20 Quercetin ที่ประมาณนาทีที่ 80-81 และ Kaempferol ที่ประมาณนาทีที่ 83-84 ดังแสดง Chromatogram ในภาพ ที่ 11 และ 12 และสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารประกอบ Gallic acid, Quercetin และ Kaempferol ในภาพที่ 13



Gallic acid ($C_7H_6O_5$)



Quercetin ($C_{15}H_{10}O_7$)

Kaempferol ($C_{15}H_{10}O_6$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 21 แสดงสูตรโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากการทำ HPLC ของสารสกัด *A. ghaesembilla*

ภาคผนวก ข.

แสดงผลการทดลอง

สารทดสอบ	% CELL VIABILITY								MEAN	SD	SE
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8			
CONTROL	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
0.05%DMSO	111.04	89.80	100.68	101.77	83.22	81.19	104.89	91.78	95.55	10.67	3.77
PHA 10 µg/ml	174.03	165.21	172.79	150.25	166.23	145.48	222.99	127.23	165.52	28.11	9.93
Extract 4 µg/ml	107.14	98.91	114.29	99.49	98.90	103.57	133.05	97.65	106.62	12.05	4.26
Extract 20 µg/ml	107.58	118.21	111.90	108.84	106.62	113.10	136.49	110.33	114.13	9.74	3.44
Extract 100 µg/ml	125.32	144.81	134.69	132.83	120.31	151.19	151.72	132.16	136.63	11.58	4.09
Extract 500 µg/ml	156.49	178.32	192.52	175.00	144.81	211.67	177.30	156.81	174.12	21.53	7.61

ตารางที่ 1 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells (PBMC) ที่แยกจากเลือดของคนปกติ

สารทดสอบ	% Stimulation								MEAN	SD	SE
	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8			
Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
PHA 10 µg/ml	1201.40	1104.62	1191.00	1012.23	1016.85	1138.41	1007.83	1021.93	1086.79	82.70	29.24
Extract 4 µg/ml	83.74	91.92	74.23	82.80	88.62	81.29	81.93	79.29	82.98	5.43	1.92
Extract 20 µg/ml	95.35	107.72	116.10	120.82	110.11	109.33	119.55	107.84	110.85	8.15	2.88
Extract 100 µg/ml	105.53	129.78	149.94	138.38	122.49	127.82	136.93	126.16	129.63	13.04	4.61
Extract 500 µg/ml	198.57	205.70	194.25	160.38	155.08	150.01	158.73	151.92	171.83	23.36	8.26

ตารางที่ 2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัด *A. ghaesembilla* ต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells (PBMC) ที่แยกจากเลือดของคนปกติ

สารทดสอบ	% CD4 count						MEAN	SD	SE
	N1	N2	N3	N4	N5	N6			
Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
SEB	148.29	131.43	132.65	148.68	130.55	128.47	136.68	9.25	3.78
PHA	73.25	89.50	78.48	96.69	85.72	92.78	86.07	8.85	3.61
Extract 4 µg/ml	114.85	101.10	98.35	101.82	102.93	96.70	102.63	6.42	2.62
Extract 20 µg/ml	114.62	101.62	106.66	101.23	107.33	97.52	104.83	6.04	2.46
Extract 100 µg/ml	121.87	104.79	102.45	96.10	112.17	93.10	105.08	10.62	4.33
Extract 500 µg/ml	107.38	102.68	94.33	110.82	102.29	93.70	101.87	6.85	2.80

ตารางที่3 %CD4 count ใน PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*

สารทดสอบ	% CD8 count						MEAN	SD	SE
	N1	N2	N3	N4	N5	N6			
Control	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
SEB	123.40	138.09	123.25	121.81	122.93	121.20	125.11	6.41	2.62
PHA	90.82	78.47	76.75	115.22	110.50	109.36	96.86	17.08	6.97
Extract 4 µg/ml	103.24	99.53	109.47	101.91	95.78	112.86	103.80	6.34	2.59
Extract 20 µg/ml	110.49	102.20	108.05	105.48	92.21	115.14	105.59	7.90	3.22
Extract 100 µg/ml	112.53	112.04	108.89	108.84	91.76	120.23	109.05	9.44	3.85
Extract 500 µg/ml	115.11	103.36	103.53	80.58	83.59	104.76	98.49	13.47	5.50

ตารางที่4 %CD8 count ใน PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*

สารทดสอบ	% cytotoxicity (40:1)						% cytotoxicity (20:1)					
	N1	N2	N3	MEAN	SD	SE	N1	N2	N3	MEAN	SD	SE
control	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
Extract 4 µg/ml	98.32	117.91	108.64	108.29	9.80	5.66	108.39	123.19	109.33	113.63	8.28	4.78
Extract 20 µg/ml	116.09	149.74	116.59	127.47	19.29	11.14	105.93	117.18	105.50	109.53	6.62	3.82
Extract 100 µg/ml	58.19	70.80	70.21	66.40	7.11	4.11	52.39	54.52	53.03	53.31	1.10	0.63
Extract 500 µg/ml	0.22	3.03	1.03	1.42	1.45	0.83	1.67	1.89	2.06	1.87	0.19	0.11

ตารางที่ 5 ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cells

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารทดสอบ	% cytotoxicity (40:1)						% cytotoxicity (20:1)					
	N1	N2	N3	MEAN	SD	SE	N1	N2	N3	MEAN	SD	SE
control	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00
PHA 10 µg/ml	109.67	107.79	98.92	105.46	5.74	3.32	149.75	110.97	98.08	119.60	26.90	15.53
IL-2 5 µl/ml	107.01	99.48	99.19	101.89	4.44	2.56	148.95	108.97	99.36	119.09	26.30	15.18
Extract 4 µg/ml	110.18	101.61	117.72	109.84	8.06	4.65	148.43	105.32	127.10	126.95	21.56	12.45
Extract 20 µg/ml	119.18	114.49	131.89	121.85	9.01	5.20	134.29	90.69	90.65	105.21	25.19	14.54
Extract 100 µg/ml	57.00	83.66	69.21	69.96	13.34	7.70	59.94	95.36	79.69	78.33	17.75	10.25
Extract 500 µg/ml	10.67	6.70	8.44	8.60	1.99	1.15	16.23	-1.32	27.74	14.22	14.63	8.45
Extract 4 µg/ml+IL-2	102.85	114.21	135.17	117.41	16.40	9.47	176.70	133.90	135.17	148.59	24.35	14.06
Extract 20 µg/ml+IL-2	120.67	106.18	104.65	110.50	8.84	5.11	164.14	129.56	118.39	137.36	23.85	13.77
Extract 100 µg/ml+IL-2	49.83	82.59	76.57	69.66	17.44	10.07	54.45	74.74	75.49	68.23	11.94	6.89
Extract 500 µg/ml+IL-2	-2.34	-12.33	19.62	1.65	16.34	9.43	-2.35	-15.61	23.22	1.75	19.74	11.40

ตารางที่ 6 ผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* และผลของสารสกัด *A. ghaesembilla* ร่วมกับ IL-2 ในการกระตุ้นการทำงานของ NK cells

สารทดสอบ	% CD16-56PE					
	N1	N2	N3	MEAN	SD	SE
control	9.10	9.15	9.22	9.16	0.06	0.03
IL-2 5 µl/ml	12.55	12.79	12.27	12.54	0.26	0.15
Extract 4 µg/ml	10.24	10.11	9.89	10.08	0.18	0.10
Extract 20 µg/ml	9.13	9.25	9.19	9.19	0.06	0.03
Extract 100 µg/ml	9.01	8.23	8.11	8.45	0.49	0.28
Extract 500 µg/ml	1.16	2.01	1.02	1.40	0.54	0.31
Extract 4 µg/ml+IL-2	10.27	10.73	10.31	10.44	0.25	0.15
Extract 20 µg/ml+IL-2	11.59	11.24	11.93	11.59	0.35	0.20
Extract 100 µg/ml+IL-2	10.19	10.05	10.52	10.25	0.24	0.14
Extract 500 µg/ml+IL-2	2.10	1.98	2.60	2.23	0.33	0.19

ตารางที่7 %CD16-56PE count ใน PBMC ที่แยกได้จากเลือดของคนปกติภายหลังการกระตุ้นด้วยสารสกัด *A. ghaesembilla*

ภาคผนวก ค.

Buffer and Reagents

1. RPMI-1640 stock solution 1 liter

RPMI powder	10.4 g
$NaHCO^3$	2.0 g
Hepe	10.0 ml
Penicillin/Streptomycin	10.0 ml
ddH_2O	900 ml

Adjust pH to 7.2 with 1M HCl or NaOH

Add ddH_2O to 1 liter and sterilized by 0.45 membrane filter

2. Complete RPMI 1640 medium

RPMI stock	45 ml
Fetal bovine serum	5 ml

3. Scintillation fluid

PPO	12.5 g
POPOP	0.25 g
Toluene	2.5 L

4. Phosphate buffer saline (PBS) 1 liter

NaCl	80 g
KCl	2 g
$Na_2 HPO_4$	9.136 g
NH_2PO_4	2 g
ddH_2O	900 g

Adjust pH to 7.2 with 1M HCl or NaOH

Add ddH_2O to 1 liter and sterilized by autoclave

5. 0.5% paraformaldehyde (PFA) in PBS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Paraformaldehyde	2.50 ml
PBS	497.25 ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ง.

ผลการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย

No. 241/2006
REC. No. 29/49

Certificates of Approval

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol, the principal investigator and informed consent dated and/or amended as follows in compliance with the ICH/GCP.

Study Title : Effects of Mamao (*Antidesma ghaesembilla*) extract on CD4 and CD4 and CD8 counts and NK cell activity

Study Code : -

Center : Chulalongkorn University

Principal Investigator : Miss Winanda Sangthong

Document Reviewed :

: .....
(Professor Anek Aribarg, M.D.)
Chairman of Ethics Committee

: .....
(Associate Professor. Vilai Chentanez, M.D.)
Associate Dean for Research Affairs

Date of Approval : March 10, 2006

Approval Expire Date : March 10, 2007

Approval is granted subject to the following conditions: (see back of this Certificates)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาววินันดา แสงทอง เกิดเมื่อวันที่ 19 มกราคม พ.ศ. 2525 ชัยนาท สำเร็จการศึกษาปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต (วิทยาศาสตร์การแพทย์) คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยบูรพา ในปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ (เภสัชวิทยา) คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย