

รหัสโครงการ SUT1-104-43-24-11



รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการ
คัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

(A Basic Development of Immunotoxicological Assays as A Screening
Tool for Detecting Immuno-modulating Activities of Thai Herbal Plants)

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจาก
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว



รายงานการวิจัย

การพัฒนาวิธีการศึกษาเบื้องต้นทางพิษวิทยาภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการ
คัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน

(A Basic Development of Immunotoxicological Assays as A Screening
Tool for Detecting Immuno-modulating Activities of Thai Herbal Plants)

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

สาขาวิชาชีววิทยา

สำนักวิชาวิทยาศาสตร์

มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ พ.ศ. 2543

ผลงานวิจัยเป็นความรับผิดชอบของหัวหน้าโครงการวิจัยแต่เพียงผู้เดียว

มกราคม 2553

กิตติกรรมประกาศ

การวิจัยครั้งนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ปีงบประมาณ 2543 ผู้วิจัยขอขอบคุณมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ที่เล็งเห็นความสำคัญและให้ทุนสนับสนุนโครงการวิจัยนี้ ขอขอบคุณศูนย์เครื่องมือวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี สำหรับสถานที่ทำการวิจัย อุปกรณ์ และเครื่องมือต่าง ๆ ที่ใช้ในงานวิจัย ขอขอบคุณสถาบันวิจัยพัฒนา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี และสถานวิจัยสำนักวิชาวิทยาศาสตร์ที่ให้ความสนับสนุนและอำนวยความสะดวกอย่างต่อเนื่อง

ขอขอบคุณ อาจารย์ ดร. Nakao Nomura จาก University of Tsukuba ที่ให้คำแนะนำเกี่ยวกับเทคนิค MTT เมื่อเริ่มต้นโครงการ คุณวัชระ วงศ์วิริยะ ที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการใช้สัตว์ทดลอง คุณสิรินยา บุญภูมิ สำหรับความช่วยเหลือด้านงานเอกสาร

ท้ายสุดขอขอบคุณคุณพ่อ-คุณแม่ สมาชิกในครอบครัว รศ. ดร. ทวิช จิตรสมบูรณ์ และ นายโพธิพล จิตรสมบูรณ์ที่เป็นขวัญและกำลังใจให้มีพลังในการทำงานและฟันฝ่าอุปสรรคต่าง ๆ จนท้ายสุดสามารถปิดโครงการวิจัยและสามารถเขียนรายงานวิจัยได้สำเร็จ แม้จะใช้เวลาานมากกว่าที่ตั้งใจไว้

เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์

หัวหน้าโครงการ

บทคัดย่อ

วิธีการทดสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาาระบบภูมิคุ้มกันได้ถูกดัดแปลงเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน โครงการวิจัยนี้ได้ดัดแปลงวิธีการทดสอบ mitogenesis assay และ mixed lymphocyte reaction (MLR) โดยวัดการตอบสนองด้วยการใช้สีตั้งเคราะห์ tetrazolium 3-(4, 5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสี [³H]-thymidine ตามวิธีมาตรฐาน ในวิธีทดสอบ mitogenesis ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6 บ่มร่วมกับ media ที่มี หรือไม่มี mitogen ใน 96 microtiter plate ที่อุณหภูมิ 37°C 5% CO₂ สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมใช้ปริมาณเซลล์ 8x10⁵ เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองของ B lymphocyte โดยกระตุ้นด้วย 1-100 µg/ml lipopolysaccharide และวัดการตอบสนองที่ 24-48 ชม. ภายหลังกการกระตุ้น การทดสอบการตอบสนองของ T เซลล์ใช้ 2.5-10 µg/ml concanavalin A mitogen และวัดการตอบสนองที่ 48-72 ชม. ส่วนการทดสอบการตอบสนองของทั้ง T และ B เซลล์ ใช้ 1-100 µg/ml pokeweed mitogen และวัดการตอบสนองที่ 24 ชม. ในวิธีทดสอบ MLR ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย C57Bl/6 เป็นเซลล์ responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์เพศเมีย DBA/2 ที่ผ่านการบ่มร่วมกับ 50 µg/ml mitomycin C เป็นระยะเวลา 45 นาทีเป็นเซลล์ stimulator สภาวะการทดสอบที่เหมาะสมคือ ปริมาณเซลล์ของ responder 4-8x10⁵ เซลล์/หลุม อัตราส่วนของเซลล์ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ 5 การใช้ MTT colorimetric assay อาจเหมาะสมในการใช้คัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันใน mitogenesis assay แต่สำหรับการทดสอบของ MLR ที่ต้องการวัดการตอบสนองแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ความเชื่อมั่นของการแปลผลจะน้อยกว่าในวิธีมาตรฐาน

Abstract

Two basic immunotoxicological tests were modified for screening medicinal plants with immunomodulating activity. The present project used the tetrazolium dye 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) for the measurement of lymphoproliferative response in mitogenesis assay and mixed lymphocyte reaction (MLR) as an alternative to the standard method using the radioactive [³H]-thymidine. In the mitogenesis assay, splenocytes from female C57Bl/6 mice were cultured in the presence or absence of mitogen in a 96-well plate, incubated at 37°C and 5% CO₂. The optimized cell number of the culture was 8x10⁵ cells/well. For the optimum B cell mitogenic response, 1-100 µg/ml lipopolysaccharide was used, and the peak response was 24-48 h post stimulation. For the T-cell mitogenic response, the optimum concentration of concanavalin A was 2.5-10 µg/ml, and the response was evaluated at 48-72 hr. For the optimum mitogenic response of both T and B cells, 1-100 µg/ml poke weed mitogen was used and the response was evaluated at 24 hr.. In MLR, splenocytes from female C57Bl/6 mice was used as responder cells and the 50 µg/ml mitomycin C-treated splenocytes from DBA/2 mice were used as stimulator cells. The optimum concentration of responder cells in the culture was 4-8x10⁵ cells/well, the ratio of responders to stimulators was 1 to 4, and the peak response occurred at day 4 or 5. Overall, MTT colorimetric method could be used for determining lymphoproliferative response in the mitogenesis assay, and applied for selecting medicinal plants with immunomodulating activity. However, using the MTT method for measurement of the response in one-way mixed lymphocyte reaction in MLR could be difficult to interpret and might be less relevant compared to the traditional method.

สารบัญ

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ	ก
บทคัดย่อภาษาไทย	ข
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	ค
สารบัญเรื่อง	ง
สารบัญตาราง	จ
สารบัญภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ	
ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย	1
วัตถุประสงค์ ขอบเขต และประโยชน์ของโครงการวิจัย	2
บทที่ 2 การวิจัยที่เกี่ยวข้อง	4
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	
สารเคมี	14
น้ำ	14
วัสดุ	14
เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย	15
วิธีดำเนินการวิจัย	16
บทที่ 4 ผลการวิจัย	24
บทที่ 5 การวิจารณ์	44
บทที่ 6 บทสรุป	
สรุป	53
ข้อเสนอแนะ	54
บรรณานุกรม	55
ภาคผนวก	
ภาคผนวก ก	61
ภาคผนวก ข	63
ภาคผนวก ค	64
ประวัติผู้วิจัย	65

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier I	8
2 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier II	8
3 การเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A ของ lymphocyte ที่ระยะเวลา แตกต่างกัน	36
4 การตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ใน mixed lymphocyte reaction ในวันที่ 4 และ 5	40

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay	12
2 การตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อระยะเวลา 24 ชม.	25
3 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)	26
4 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 2×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.	27
5 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.	27
6 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)	28
7 แสดงการตอบสนองของ culture ที่มีปริมาณ lymphocyte 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่มีความเข้มข้น 0.1-100 $\mu\text{g/ml}$ (* และ ** หมายถึง ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM ที่ $p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.001$ ตาม ลำดับ)	29
8 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)	30
9 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 2×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.	31

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
10 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)	31
11 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (**, * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.001$ และ 0.05 ตามลำดับ)	32
12 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$)	33
13 การตอบสนอง (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ของ culture ที่มีปริมาณเซลล์ 4×10^5 , 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม เมื่อประเมินการตอบสนองในระยะเวลา 24 ชม. หลังจากกระตุ้นด้วย Con A (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$)	34
14 การตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)	35
15 การตอบสนองของ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)	35
16 การตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)	36

สารบัญภาพ (ต่อ)

ภาพที่	หน้า
17 การตอบสนองของ lymphocyte 1×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อเซลล์ stimulator ใน mixed lymphocyte reaction เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 R= responder, S = stimulator	38
18 การตอบสนองของ lymphocyte 1×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อเซลล์ stimulator ใน MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 5 ภายหลังจากกระตุ้น R= responder, stimulator (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)	38
19 การตอบสนองของ responder (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ stimulator ที่ความเข้มข้นของเซลล์ responder ต่างกันในอัตราส่วนของ responder : stimulator ที่ 1:4 และ 1:5 ใน one-way MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 (R = responder, S = stimulator กราฟที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ จาก การเปรียบเทียบ โดยวิธี Duncan's Multiple Range Test)	39
20 การตอบสนองของเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A mitogen เทียบกับการตอบสนองของเซลล์ responder ในการทดสอบใช้เซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม $5 \mu\text{g/ml}$ Con A และวัดการตอบสนองในวันที่ 3 (R = responder, S = stimulator * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)	41
21 การตอบสนองของเซลล์ stimulator (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ที่ได้รับและไม่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A การทดลองใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม Con A $5 \mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองในวันที่ 2 (ก) และวันที่ 3 (ข) (R = responder, US = stimulator ที่ไม่ได้รับ mitomycin C, S = stimulator ที่ได้รับ mitomycin C. * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)	43

บทที่ 1

บทนำ

ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

ในปัจจุบัน ประชาชนชาวไทยเริ่มตื่นตัว ให้ความสนใจ และตระหนักถึงคุณค่าของพืชสมุนไพรไทยมากขึ้น ดังตัวอย่างของการส่งเสริมใช้พืชสมุนไพรในโครงการสาธารณสุขมูลฐานของกระทรวงสาธารณสุข โครงการตามพระราชดำริสวนป่าสมุนไพรของพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัว โครงการวิจัยพืชสมุนไพรตามมหาวิทยาลัยและสถาบันต่าง ๆ ตลอดจนมีการโฆษณาสรรพคุณ และการขายผลิตภัณฑ์ที่เตรียมจากพืชสมุนไพรมากขึ้น

แม้ภูมิปัญญาของบรรพบุรุษไทยได้ใช้ประโยชน์จากพืชสมุนไพรในด้านต่าง ๆ มากมาย เช่น เป็นยารักษาโรค อาหาร เครื่องดื่ม และเครื่องสำอาง เป็นต้น แต่ในปัจจุบัน องค์ความรู้ ความเข้าใจ และข้อมูลสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์เกี่ยวกับสรรพคุณและกลไกการออกฤทธิ์ของพืชสมุนไพรต่าง ๆ ตามที่อ้างอิงในตำราแพทย์แผนไทยโบราณยังมีปริมาณจำกัด หรือไม่มี (เพยาว์ เหมือนวงษ์ญาติม 2537; ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2541; คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช, สมacamสมุนไพรแห่งประเทศไทย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2540) เช่น การหาสารออกฤทธิ์ในส่วนประกอบของพืชสมุนไพร โครงสร้างทางเคมี เภสัชจลนศาสตร์ (pharmacokinetics) กลไกการออกฤทธิ์ของสาร พิษและผลข้างเคียงจากการใช้พืชสมุนไพรในระยะเวลาสั้น เป็นต้น ในปัจจุบัน งานวิจัยด้านตรวจสอบฤทธิ์ของพืชสมุนไพรในประเทศไทยเน้นวิธีการคัดเลือกสารที่มีฤทธิ์ต้านเชื้อวัณโรค ต้านมาลาเรีย ต้านมะเร็ง ต้านไวรัส และต้านเชื้อราเป็นหลัก โดยทดสอบคุณสมบัติของพืชสมุนไพรที่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เป้าหมายด้วยกลไกต่าง ๆ เช่น ยับยั้งการเจริญหรือฆ่าเซลล์เป้าหมายโดยตรง (cytotoxicity) รบกวนสารสำคัญบางชนิดในปฏิกิริยาชีวเคมีภายในเซลล์ (metabolites) ลดหรือหยุดการทำงานของเอนไซม์ (enzymes) ในวิถีทาง (pathways) ต่าง ๆ (ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และ สำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ, 2541; คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ, มหาวิทยาลัยขอนแก่น, สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช, สมacamสมุนไพรแห่งประเทศไทย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ, 2540) แต่งานวิจัยที่เกี่ยวกับการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยซึ่งมีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันยังมีปริมาณจำกัด ทั้งที่เป็นคุณสมบัติของพืชสมุนไพรที่สำคัญยิ่ง เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันทำหน้าที่ป้องกันและเพิ่มความต้านทานของร่างกายต่อเชื้อโรคและสารแปลกปลอมต่าง ๆ รวมทั้งสร้างภูมิคุ้มกันการเฝ้าระวัง (immune surveillance) เพื่อทำลายเซลล์แปลกปลอมและเซลล์มะเร็งที่เกิดขึ้นภายในร่างกาย นอกจากนี้ ระบบภูมิคุ้มกันยังมีบทบาทสำคัญเกี่ยวข้องกับ

กระบวนการอักเสบ ซึ่งสัมพันธ์กับการเกิดโรคต่าง ๆ มากมาย (Roitt et al., 1998; Murphey et al., 1996; Stites and Terr, 1991; Burns-Naas et al., 2001; Niesink et al., 1996) พืชสมุนไพรที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulator) น่าจะสัมพันธ์กับกลุ่มพืชที่มีสรรพคุณในการรักษาโรคติดเชื้อทั้งแบบเฉียบพลันและแบบเรื้อรัง โรคมะเร็ง โรคเอดส์ และโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสอื่น ๆ รวมทั้งโรคที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบต่าง ๆ เป็นต้น นอกจากนั้น การคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันยังได้เปรียบกว่าวิธีการคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีพิษต่อจุลินทรีย์หรือเซลล์เป้าหมายโดยตรง เพราะโดยทั่วไป สารซึ่งมีพิษต่อเซลล์จุลินทรีย์หรือเซลล์เป้าหมาย ส่วนใหญ่มักออกฤทธิ์ต่อเซลล์ปกติของร่างกายด้วย นอกจากนั้น ภายหลังจากใช้ยาหรือสารที่มีผลต่อจุลินทรีย์ หรือเซลล์เป้าหมายโดยตรงสักระยะหนึ่ง เชื้อจุลินทรีย์หลายชนิดที่เป็นสาเหตุของโรค มักมีกลไกในการปรับตัว เกิดปัญหาคือยา (drug resistance) เช่น เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) เปลี่ยนแปลงโครงสร้างบางอย่างของเซลล์ เปลี่ยน metabolite(s) บางตัว เปลี่ยนชนิดของ enzyme หรือเปลี่ยนวิถีทางของกระบวนการชีวเคมีต่าง ๆ ซึ่งเดิมเป็นเป้าหมายการออกฤทธิ์ของยา (Goldstein et al., 1974) ปัญหาดังกล่าวก่อให้เกิดการแสวงหา การสังเคราะห์ หรือการดัดแปลงยาชนิดใหม่ เพื่อปรับตามการเปลี่ยนแปลง หรือวิวัฒนาการที่เกิดขึ้นกับจุลินทรีย์เป้าหมาย และมักส่งผลให้มีความจำเป็นในการเปลี่ยนแปลงวิธีการทดสอบ หรือดัดแปลงวิธีการคัดเลือกพืชสมุนไพรแบบใหม่ ถ้าหลักการของวิธีทดสอบและการคัดเลือกพืชสมุนไพรอาศัยคุณสมบัติของปฏิกิริยาชีวเคมี หรือ metabolites ดั้งเดิมของจุลินทรีย์ก่อนการเปลี่ยนแปลงหรือวิวัฒนาการของจุลินทรีย์เพื่อด้านฤทธิ์ของยา แต่การคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันจะเกิดปัญหาดังกล่าวน้อยมาก และโดยหลักการทั่วไป การกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายให้ทำงานอย่างมีประสิทธิภาพเป็นหนทางที่ดีที่สุดในการเอาชนะและการรักษาโรคมะเร็งและโรคติดเชื้อที่เกิดจากจุลินทรีย์ต่างๆ โดยเฉพาะโรคที่เกิดจากเชื้อไวรัส ที่ในปัจจุบัน ยังไม่มีสารเคมีหรือยาชนิดใดที่สามารถรักษาได้ รวมทั้งโรคเอดส์ และโรคไข้หวัดนกที่กำลังแพร่ระบาดไปทั่วโลกและทวีความรุนแรงขึ้น

การตรวจสอบและคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันจึงมีความสำคัญยิ่งและควรได้รับการสนับสนุนให้มีการพัฒนาอย่างเร่งด่วนควบคู่กับการศึกษาและวิจัยในโครงการศึกษาด้านอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับพืชสมุนไพรไทย

วัตถุประสงค์ ขอบเขต และประโยชน์ของโครงการวิจัย

โครงการวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อพัฒนาและดัดแปลงวิธีการทดสอบเบื้องต้นทางพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกันเพื่อประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพรไทยที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันในห้องปฏิบัติการ โดยหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสีตามวิธีทดสอบมาตรฐานในทางพิษวิทยา ระบบภูมิคุ้มกัน และเลือกการทดสอบ 2 วิธีคือ วัดการตอบสนองของเซลล์ภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะ

ต่อสารกระตุ้นประเภท mitogen ในวิธีที่เรียกว่า mitogenesis assay หรือ lymphoproliferative response ต่อ mitogen และการตอบสนองแบบจำเพาะต่อ allogeneic cell ในวิธีที่เรียกว่า mixed lymphocyte response ขอบเขตของโครงการวิจัยจะจำกัดเฉพาะการใช้เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่มีคุณลักษณะทางพันธุกรรมของเซลล์ที่เหมือนกัน (inbred strain) เพื่อลดการแปรปรวนของการตอบสนองของเซลล์ต่อ mitogen และต่อ allogeneic cell เนื่องจากความแตกต่างระหว่างสายพันธุ์ นอกจากนั้น หนู C57Bl/6 เป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับหนู B6C3F1 ซึ่งเป็นสายพันธุ์ที่ National Toxicology Program ในประเทศสหรัฐอเมริกาใช้ในการศึกษาและวิจัยด้านพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกัน แต่หนู B6C3F1 ยังไม่มีจำหน่ายในประเทศไทยในช่วงระยะเวลาที่ทำการวิจัย นอกจากนั้น โครงการวิจัยนี้เลือกวิธีวัดการตอบสนองแบบ *in vitro* เพื่อความสะดวกและเรียบง่ายในการประยุกต์ใช้ในการคัดเลือกพืชสมุนไพร

การวัดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันด้วยวิธี mitogenesis และ mixed lymphocyte response ร่วมกับวิธีมาตรฐานอื่นในด้านพิษวิทยาของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถดัดแปลงและนำมาประยุกต์ใช้ในด้านต่าง ๆ ดังนี้คือ 1) การคัดเลือกพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน 2) การศึกษาผลกระทบของยา หรือพืชสมุนไพรที่มีต่อระบบภูมิคุ้มกัน 3) การพัฒนาการใช้พิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันเป็นดัชนีบ่งชี้ทางชีวภาพ (biological marker) ของมลพิษในสภาวะแวดล้อม 4) การศึกษาและวิจัยด้านระบบการเฝ้าระวัง (monitoring) ผลกระทบต่อสุขภาพอันสืบเนื่องจากสารที่มีผลต่อการทำงานของระบบภูมิคุ้มกัน 5) การศึกษาด้านการประเมินความเสี่ยงต่อสุขภาพของสารเคมีต่าง ๆ เป็นต้น

บทที่ 2

การวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ปัจจุบันการแพทย์สมัยใหม่ได้ตระหนักถึงความสำคัญของพืชสมุนไพรและได้มีการใช้พืชสมุนไพรควบกับยาแผนปัจจุบันในการรักษาโรคหลายชนิด (Yoshida et al., 1988; วิณา จิรัจฉริยากุล, 2541) เพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของการรักษาให้ได้ผลดียิ่งขึ้น โดยเฉพาะโรคที่มักมีปัญหาของการดื้อยา โรคมะเร็ง และโรคเอดส์ซึ่งในปัจจุบันยังไม่มีวิธีการรักษาที่ดีพอ วิธีการบำบัดโดยใช้สารเคมีเพื่อกำจัดจุลินทรีย์เป้าหมาย หรือฉายรังสีเพื่อทำลายเซลล์มะเร็งมักจะมีผลต่อเซลล์ปกติอื่น ๆ ภายในร่างกาย และมีผลข้างเคียงก่อให้เกิดอาการแพ้หรือเกิดอันตรายร้ายแรงต่อผู้ป่วยถ้าใช้วิธีการบำบัดดังกล่าวเป็นระยะเวลานาน (Goldstein et al., 1974; Brunton et al., 2006) ส่วนยาจากพืชสมุนไพรที่เป็นภูมิปัญญาของท้องถิ่นในแต่ละประเทศมักมีความเป็นพิษหรือผลข้างเคียงต่ำ สาเหตุอาจเป็นเพราะสารออกฤทธิ์มีความเข้มข้นน้อยกว่ายาแผนปัจจุบันและอยู่ร่วมกับสารประกอบอื่นอีกมากมายอย่างซับซ้อนตามธรรมชาติของพืชแต่ละชนิด ที่อาจช่วยเสริมการออกฤทธิ์ หรือต้านผลข้างเคียงของสารออกฤทธิ์ แม้เทคโนโลยีสมัยใหม่ จะสามารถหาค่าประกอบของสารออกฤทธิ์ได้บ้าง แต่ยังไม่สามารถวิเคราะห์ปฏิสัมพันธ์ร่วมกัน (interaction) และเลียนแบบการสังเคราะห์ส่วนประกอบเหล่านี้ซึ่งซับซ้อนตามธรรมชาติได้หมด ยังคงต้องพึ่งองค์ความรู้ที่สะสมสืบทอดกันมานับแต่บรรพบุรุษโบราณ เพื่อให้ทราบว่าพืชสมุนไพรชนิดใดให้ผลดีและช่วยในการรักษาโรคเฉพาะชนิดใด แต่องค์ความรู้เหล่านี้ยังต้องการหลักฐานสนับสนุนทางวิทยาศาสตร์ ในปัจจุบัน ได้มีตัวอย่างของโรงพยาบาลและสถาบันหลายแห่งในประเทศไทยที่นำพืชสมุนไพรที่มีสรรพคุณค่อนข้างแน่ชัดมาใช้รักษาโรค โดยใช้เสริมกับยาแผนปัจจุบัน เช่น การส่งเสริมการใช้สมุนไพรสาธารณสุขมูลฐานในโรงพยาบาลชุมชนต่าง ๆ โรงพยาบาลเจ้าพระยาอภัยภูเบศรที่นครราชสีมา โรงพยาบาลสรรพสิทธิประสงค์ที่อุบลราชธานี คลินิกอายุรเวท สถานการณ์แพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ศิริราชพยาบาล มหาวิทยาลัยมหิดล โรงพยาบาลชานเปาโลที่หัวหิน โรงพยาบาลแพทย์แผนไทยที่นครปฐม และศูนย์ธรรมชาติบำบัดบัลวิที่กรุงเทพฯ เป็นต้น

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

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

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

เราสามารถประยุกต์ใช้พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์กระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulators) ในการเพิ่มประสิทธิภาพของภูมิคุ้มกันให้สูงขึ้น เพื่อใช้รักษาโรคที่เกิดจากความบกพร่องในการทำหน้าที่ของระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคมะเร็ง โรคเอดส์ โรคที่เกิดจากเชื้อไวรัสหรือจุลินทรีย์ชนิดอื่น นอกจากนั้น พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์กดภูมิคุ้มกัน (immunosuppressants) สามารถประยุกต์ใช้ลดหรือยับยั้งการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอันไม่พึงประสงค์ เช่น เช่น โรคภูมิแพ้ (allergy) โรคผิวหนัง (hypersensitivity) โรคภูมิคุ้มกันตนเอง (autoimmunity) และปฏิกิริยาการตอบสนองต่อการปลูกถ่ายเซลล์หรือเนื้อเยื่อ (graft transplantation) ดังนั้น พืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ควบคุมระบบภูมิคุ้มกันได้ (immunomodulator) จึงมีประโยชน์มากมาย

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

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

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

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

ตารางที่ 1 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันโดยใช้ การทดสอบ Tier I*

Parameter	วิธีทดสอบ
Immunopathology	การตรวจสอบทาง hematology: complete blood และ differential count ข้อมูลทั่วไปทางพิษวิทยา: น้ำหนักตัว น้ำหนักม้าม thymus ตับไต รวมทั้งการตรวจ histopathology ของอวัยวะต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับอวัยวะของภูมิคุ้มกันเหล่านี้
Humoral-mediated immunity	การตอบสนองต่อ mitogen ของ B เซลล์ เช่น LPS หรือ F(ab) ₂ การวัดการตอบสนองของ primary antibody เช่น การนับจำนวน plaque ของ IgM antibody forming cells ต่อ T-dependent antigen (เม็ดเลือดแดงแกะ) ปริมาณ IgM ในซีรัม
Cell-mediated immunity	การตอบสนองต่อ mitogen ของ T เซลล์ เช่น concanavalin A และ mixed lymphocyte response ต่อ allogeneic lymphocytes, local lymph node assay
Nonspecific immunity	Natural killer cell activity

*ดัดแปลงจาก Luster et al., 1988, 1992

ตารางที่ 2 แสดงการคัดกรอง (screen) สารที่มีผลต่อระบบภูมิคุ้มกัน โดยใช้ การทดสอบ Tier II*

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

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

*คัดแปลงจาก Luster et al., 1988, 1992

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

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

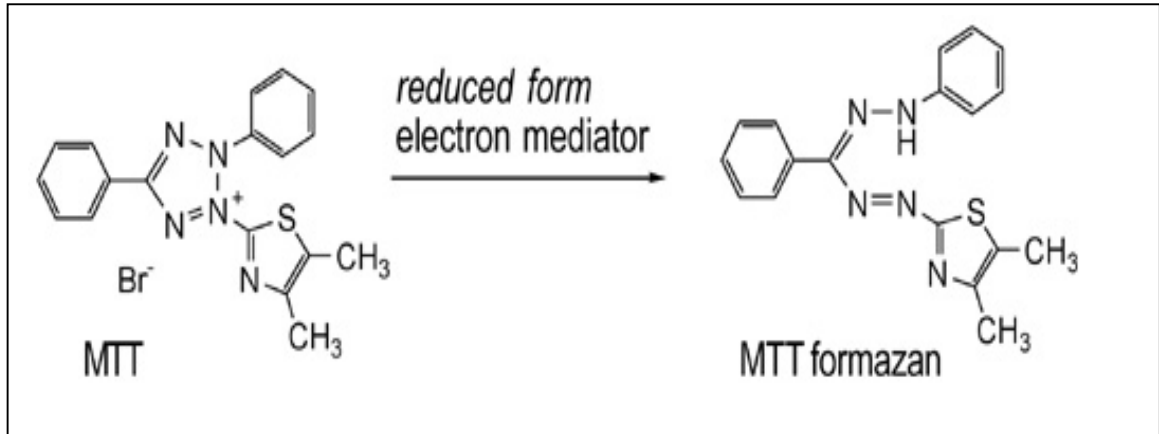
สำหรับการทดสอบ mixed lymphocyte response (MLR) เป็นการวัดการตอบสนองของ T เซลล์ต่อ allogeneic antigen ที่มีความแตกต่างกันที่ major histocompatibility complex (MHC) allogeneic antigen หมายถึง antigen บนผิวเซลล์ของสัตว์ species เดียวกันที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรม ส่วน MHC เป็นโปรตีนบนผิวเซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในเรื่องการไม่ยอมรับการปลูกถ่ายเนื้อเยื่อ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

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

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

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

เซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้น จึงสามารถวัดปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ โดยการวัดปริมาณ formazan product ที่เกิดจากการเปลี่ยนแปลง MTT ภายในเซลล์



รูปที่ 1 แสดงโครงสร้างของ MTT และหลักการของ MTT colorimetric assay

(www.dojindo.com/products/category/dsp_detail.cfm?requesttimeout=500&ProdName=MTT)

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

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

บทที่ 3

วิธีดำเนินงานวิจัย

สารเคมี

Mitogens:

LPS: Lipopolysaccharide WS. Typhosa (Difco Laboratory)

PWM: Pokeweed (Phytolacca Americana) (Sigma)

Con A: Concanavalin A (Pharmacia)

MTT: [3(4,5-dimethylthiazol 2 -yl) 2, 5-diphenyltetrazolium bromide (Sigma)

RPMI: Roswell Park Memorial Institute (Gibco BRL)

FCS: Fetal calf serum (Gibco BRL)

Glutamine (Sigma)

Hepes buffer---(Gibco BRL)

Mercaptoethanol (Sigma)

Mitomycin C (Sigma)

Penicillin/Streptomycin (Gibco BRL)

Tris base (Sigma)

Ethanol (Sigma)

DMSO: dimethyl sulfoxide (Sigma)

HCl (Sigma)

น้ำ

น้ำที่ใช้ในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ทั้งหมดเป็น ultra pure water ที่ได้จากการผ่าน ionized-double distilled water ในเครื่องกรองน้ำ nanopure (Barnsted)

วัสดุ

วัสดุปลอดเชื้อสำหรับการเพาะเลี้ยงเซลล์

60 x15 mm petri plates (Falcon)

15 ml และ 50 ml conical tubes (Sarstedt)

5 ml snap cap culture tubes (Falcon)

Pasteur pipettes

Glass pipettes (1, 5, 10, 25 ml)

Culture flasks ขนาด 25 และ 75 cm² (Nunc)

96 well flat bottom plate (Nunc)

Sterile filter unit ขนาด 1000 ml (0.2 μm, Gelman)

Acrodisc 2.5 ml (0.2 μm; Gelman)

วัสดุอื่น ๆ

12 x75 mm glass test tubes

Slide (25.4x72 mm) และ cover slip (22x22 mm, หน้า 0.1-0.7 mm)

Single frosted end slide (25.4x72 mm)

อาหารหนูเม้าส์ (เบอร์ 082, ซีพี)

ถุงมือ

ผ้าปิดจมูก เสื้อและหมวกเพื่อใช้ในอาคารสัตว์ทดลอง

เครื่องมือและอุปกรณ์การวิจัย

หม้อนึ่งความดันไอน้ำ

เครื่องชั่งทศนิยม 4 ตำแหน่ง

เครื่องปั่นเหวี่ยงแบบตั้งโต๊ะ

Compound microscope

Inverted microscope

Laminar flow hood class II

ตู้เย็น

ตู้แช่แข็ง (-20°C)

ELISA plate reader

Stirrer และ hot plate

Haemocytometer

8-Multichannel pipette ขนาด 1-20 และ 50-200 ไมโครลิตร

Micropipette ขนาด 1-20, 1-200 และ 1-1000 ไมโครลิตร

Liquid nitrogen tank

Carbon dioxide incubator

อุปกรณ์ผ่าตัดขนาดเล็ก

กรงเลี้ยงหนูแบบมีฝาซึ่งบุ Hepa filter เพื่อให้ปลอดเชื้อ

วิธีดำเนินการวิจัย

ทุกการทดลองที่เกี่ยวข้องกับการเพาะเลี้ยงเซลล์ (cell culture) กระทำในตู้ปลอดเชื้อ (laminar flow hood class II) ใช้วัสดุและอุปกรณ์ต่าง ๆ ที่ปลอดเชื้อ และใช้เทคนิคปลอดเชื้อ ผลการทดลองที่แสดงทุกการทดลองเป็นตัวแทนของการทดลองแบบเดียวกันซ้ำอย่างน้อย 2-3 ครั้ง

1. การพัฒนาวิธีการทดสอบ mitogenesis

1.1 สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์ (C57Bl/6J) เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เป็นระยะเวลา 1-2 สัปดาห์เป็นอย่างต่ำ เพื่อปรับตัวให้เข้ากับสภาวะแวดล้อมใหม่ (acclimatization) ก่อนนำมาใช้งานทดลอง หนู C57Bl/6 ถูกเลี้ยงในกรงพลาสติกขนาด 7.5 X 11.5 X 5 นิ้ว ที่ปูด้วยจิป (ห่างหุ้มส่วนจำกัดอึดไม่พาเหรด) ปลอดเชื้อ (อุณหภูมิ 121°C 20 นาที) และใช้ที่ปิดด้วยฝาซึ่งมีกระดาดกรองชนิด hepa filter (filter cap จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล) โดยมีหนู 4 ตัวต่อ 1 กรง หนูได้รับน้ำและอาหารสำหรับหนูเม้าส์ (บริษัทซีพี) ตามต้องการ (*ad libitum*) ในห้องปราศจากเชื้อ (clean room) ที่ควบคุมอุณหภูมิ 25 ± 1°C และไฟเปิดเปิดอัตโนมัติทุก 12 ชม ตามเวลากลางวันและกลางคืน กรงหนูและอาหารจะได้รับการเปลี่ยนใหม่ทุก 2 วัน

1.2 การเตรียมเซลล์จากม้าม

การเตรียมเซลล์เดี่ยว ๆ (single cell suspension) ของ lymphocytes จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 มีขั้นตอนดังนี้คือ

1. พลีสัพ (sacrifice) หนู 1 กลุ่ม (ประมาณ 3-4 ตัว) ด้วยวิธีการหักกระดูกคั่นคอ (cervical dislocation)
2. นำม้าม (spleen) ของหนูแต่ละตัวออกด้วยเทคนิคปลอดเชื้อ ซึ่งกระทำโดยสเปรย์ alcohol ที่ตำแหน่งของม้าม ก่อนผ่าเอาม้ามออกด้วยกรรไกร และปากคีบปลอดเชื้อ นำม้ามทั้งหมดใส่ใน centrifuge tube ขนาด 15 ml ซึ่งบรรจุ EBSS (ภาคผนวก ก) ที่แช่เย็นไว้ที่ 4°C (ใช้ EBSS 3 ml ต่อ 1 ม้าม)

3. ภายใต้อุณหภูมิห้อง เชื้อ เหม้ามที่อยู่ใน EBSS ลงใน petri plate ขนาด 60 x 15 mm และเตรียม single cell suspension โดยบดนมระหว่างส่วนปลายด้านที่ใช้เขียน (frosted end) ของ สไลด์ 2 แผ่น
4. ใช้ pasteur pipette ดูด EBSS ใน petri plate เพื่อชะเซลล์ที่อาจติดสไลด์ และดูดเซลล์ขึ้นลง (resuspend cell) อย่างนุ่มนวลเพื่อแยกเซลล์ที่เป็นกลุ่มเล็ก ๆ ให้แยกจากกันเป็นเซลล์เดี่ยว ๆ ดูดเซลล์กลับเข้าสู่หลอด centrifuge เดิม
- 5.ปั่น (centrifuge) หลอดด้วยความเร็ว 1,200 rpm, 4°C เป็นเวลา 5 นาที
6. เท supernatant ของเซลล์ออกและ resuspend เซลล์ใน complete RPMI media เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

1.3 Media

Complete media ที่ใช้ในการทดสอบ mitogenesis คือ RPMI -1640 (ภาคผนวก ก) ที่มี 10% FCS (ภาคผนวก ก), 15 mM Hepes และ 100 U/ml ของ penicillin และ streptomycin

1.4 วิธีทดสอบ mitogenesis

วิธีมาตรฐานของการทดสอบ mitogenesis วัดการแบ่งเซลล์ของ lymphocyte เพื่อตอบสนองต่อ mitogen โดยวัดปริมาณการสังเคราะห์ DNA ด้วยการใส่ thymidine ที่ติดฉลากด้วยสารกัมมันตรังสี (tritium labeled-thymidine [³H-TdR]) แต่ในงานวิจัยนี้ ทดลองใช้ MTT แทนการใช้ [³H-TdR] และวัด formazan product ที่แปรผันโดยตรงกับปริมาณ lymphocyte ที่เพิ่มขึ้นเนื่องจากการแบ่งเซลล์เพื่อตอบสนองต่อ mitogen

1.4.1 ขั้นตอนการทดสอบ mitogenesis

รายละเอียดของขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เตรียม stock solution ของ mitogen Con A (1.5 mg/ml) LPS (10 mg/ml) และ pokeweed (5 mg/ml) ใน EBSS (ภาคผนวก ข)
2. พลิซิปหนู C57Bl/6 จำนวน 3-4 ตัว ในการทดลองแต่ละครั้ง นำนมมาเตรียม single cell suspension ของ lymphocyte ตามวิธีที่ระบุใน 1.2
3. ภายหลังจาก resuspend single cell suspension ของเซลล์นมใน RPMI complete media (ใส่ 3 ml ต่อ 1 นม) นับจำนวนเซลล์ด้วยวิธี trypan blue exclusion (ภาคผนวก ค) และปรับความเข้มข้นของเซลล์ให้มีปริมาณตามต้องการ
4. สำหรับ mitogen LPS หรือ PWM ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter flat bottom plate ใส่ 25 μ l complete media ในหลุมที่เป็น control หรือ 25 μ l ของ mitogen (LPS

- หรือ pokeweed) ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และ ใส่ 100 μ l เซลล์ ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 125 μ l
5. สำหรับ ConA mitogen ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter flat bottom plate ใส่ 50 μ l complete media ในหลุมที่เป็น control หรือ 50 μ l ของ ConA ที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน และ ใส่ 100 μ l เซลล์ ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมมีค่าเท่ากับ 150 μ l
 6. บ่ม plate ที่ 5% CO₂ incubator อุณหภูมิ 37°C
 7. ภายหลังการบ่ม culture ตามระยะเวลาที่กำหนด นำแต่ละ plate มาวัดปริมาณเซลล์ของ lymphocyte เมื่อถูกกระตุ้นด้วย mitogen โดยใช้ MTT colorimetric assay ตามวิธีในหัวข้อ 1.5

1.4.2 การทดลองหาความเข้มข้นของ mitogen ที่เหมาะสม

ในการทดลองหาความเข้มข้นของ LPS ที่เหมาะสม เตรียม LPS โดยเจือจางจาก stock solution ของ LPS ด้วย EBSS ให้มีความเข้มข้นที่ 5,000, 2,500, 500, 50 และ 5 μ g/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของ LPS ในแต่ละหลุมเป็น 1,000, 500, 100, 10 และ 1 μ g/ml ตามลำดับ

ในการทดลองหาความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสม เตรียม PWM โดยเจือจางจาก stock solution ของ PWM ด้วย EBSS ให้มีความเข้มข้นที่ 500, 250, 125, 62.5 และ 6.25 μ g/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเป็น 100, 50, 25, 12.5 และ 1.25 μ g/ml ตามลำดับ

ในการทดลองหาความเข้มข้นของ ConA ที่เหมาะสม เตรียม ConA โดยเจือจางจาก stock solution ของ ConA ด้วย EBSS ให้มีความเข้มข้นที่ 30, 15 และ 7.5 μ g/ml เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายในแต่ละหลุมเป็น 10, 5, และ 2.5 μ g/ml ตามลำดับ

1.4.3 การทดลองหาปริมาณเซลล์ ที่เหมาะสม

สำหรับการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบ ปรับความเข้มข้นเซลล์ให้เป็น 2×10^6 , 4×10^6 และ 8×10^6 cells/ml ด้วย complete RPMI media เพื่อให้ได้ความเข้มข้นสุดท้ายของเซลล์ในแต่ละหลุมเป็น 2×10^5 , 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม ตามลำดับ บ่มร่วมกับ mitogen

1.4.4 การทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสม

ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมของการตอบสนอง วัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 1, 2 และ 3 วัน ภายหลังการกระตุ้นด้วย mitogen โดยนับวันที่ทำการทดลองเป็นวันที่ 0 และวันถัดมาเป็นวันที่ 1

1.5 MTT colorimetric assay

เตรียม stock solution ของ MTT 6 mg/ml โดยชั่ง MTT จำนวน 0.06 กรัมใน 8 ml PBS ใส่ใน beaker ที่หุ้ม aluminium foil กวนด้วย stirring rod จนละลาย ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 10 ml ใน

volumetric flask ด้วย PBS (ภาคผนวก ก) และกรองให้ปราศจากเชื้อด้วยเยื่อกรอง cellulose nitrate (0.2 μm acrodisc) เก็บที่ 4 °C ใน centrifuge tube ที่หุ้มด้วย aluminium foil (MTT stock solution เก็บในที่มืด และ 4 °C ได้ไม่เกิน 2 สัปดาห์)

ภายหลังการบ่มเซลล์ตามระยะเวลาที่กำหนดของ mitogenesis assay วัดการเจริญของเซลล์โดยประเมินจากปริมาณเซลล์โดยหลักการ bioreduction ของ MTT ซึ่งมีขั้นตอนดังนี้คือ

1. เมื่อครบระยะเวลาที่บ่ม ใส่ 25 μl MTT stock solution (6 mg/ml) ลงใน culture ให้มีความเข้มข้นสุดท้ายของ MTT เป็น 1 mg/ml
2. นำ plate ที่เติม MTT แล้วไปบ่มใน 5% CO₂ incubator ที่ 37 °C เป็นระยะเวลา 4 ชม.
3. ภายหลัง 4 ชม. นำ plate ไปส่องดูด้วย inverted microscope เพื่อสังเกตลักษณะรูปร่างของ formazan product ในแต่ละหลุม และปั่น plate ที่ 2,000 rpm. 10 นาที
4. ภายหลังการปั่น เทสารละลายออกจาก plate โดยการพลิก plate อย่างรวดเร็ว และซับสารละลายที่เหลือในแต่ละหลุมโดยคว่ำ plate บนกระดาษ tissue พร้อมทั้งเกาะเบา ๆ 2-3 ครั้ง ระวังอย่าให้ตะกอนสีม่วงของ formazan product ไหลออกจากหลุม
5. เติม 100 μl DMSO ลงในแต่ละหลุม และ pipette ขึ้นลงหลาย ๆ ครั้งเพื่อละลายตะกอนของ formazan product ซึ่งจะได้สารละลายสีม่วงน้ำเงิน ระวังอย่าให้เกิดฟอง (ในกรณีที่เกิดฟอง ให้นำ plate ไปปั่นที่ 1,000 rpm ประมาณ 3-4 นาที)
6. นำ plate ไปอ่านค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ด้วย ELISA plate reader (Packard model AS10001)

2. การพัฒนาวิธีทดสอบ Mixed Lymphocyte Response

วิธีทดสอบมาตรฐานของ MLR วัดความสามารถของ responder cell ในการตอบสนองต่อ stimulator cell โดยวัดการสังเคราะห์ DNA ด้วยการใส่ [³H]-TdR งานวิจัยนี้ดัดแปลงวิธีทดสอบโดยทดลองใช้ MTT แทนการใช้ [³H]-TdR เพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสี

2.1 สัตว์ทดลอง

หนูเม้าส์ C57Bl/6J และ DBA/2 เพศเมีย อายุ 6-8 สัปดาห์ จากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ถูกเลี้ยงที่อาคารสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี ตามรายละเอียดที่ระบุในหัวข้อ 1.1

งานวิจัยนี้เลือกใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 เป็น responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนู DBA/2 เป็น stimulator ตามวิธีมาตรฐานของการทดสอบด้าน immunotoxicology ของ National Toxicology Program ซึ่งเลือกใช้หนู B6C3F1 เป็น responder และ DBA/2 เป็น stimulator

เพราะเป็นคู่ที่มีความแตกต่างกันทางพันธุกรรมที่ major histocompatibility complex class II antigen โดย H-2 haplotype ของ B6C3F1 และ DBA/2 เป็น H-2^b และ H-2^d ตามลำดับ งานวิจัยนี้เลือกใช้ C57Bl/6 เป็น responder แทน B6C3F1 เพราะเป็นสายพันธุ์ที่ใกล้เคียงกับ B6C3F1 เป็น H-2^b haplotype เช่นเดียวกัน และในช่วงระยะเวลาที่ทำการวิจัยยังไม่สามารถหาหนูสายพันธุ์ B6C3F1 ได้ในประเทศไทย แต่ในปัจจุบัน สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล เริ่มมีการจำหน่ายหนูสายพันธุ์ B6C3F1 ดังนั้น สามารถใช้เซลล์มาจากหนูเม้าส์ B6C3F1 เป็น responder ได้เช่นกัน

Media

Complete media ที่ใช้ใน MLR (ภาคผนวก ก) คือ RPMI 1640 ที่มี 10% FCS, 15 mM Hepes, 50 μ M 2-mercaptoethanol (2-ME) (ภาคผนวก ข) และ 100 U/ml ของ penicillin และ streptomycin

2.3 วิธีทดสอบ mixed lymphocyte response

งานวิจัยนี้เลือกใช้การทดสอบแบบ one-way mixed lymphocyte response ซึ่งวัดเฉพาะการตอบสนองของ responder cell ต่อ stimulator cell เท่านั้น โดยใช้ mitomycin C ยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ของ stimulator cell เพราะให้ข้อมูลที่มีประโยชน์กว่าการทดสอบแบบ two-way mixed lymphocyte response และสามารถประยุกต์ใช้ในการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดสมุนไพรต่อการเปลี่ยนแปลงการตอบสนองของ responder cell

2.3.1 ขั้นตอนการทดสอบ mixed lymphocyte response

รายละเอียดขั้นตอนการทดสอบมีดังนี้คือ

1. เตรียม stimulator cell โดยใช้ม้ามจากหนู DBA/2 จำนวน 4-5 ตัว เพื่อเตรียม single cell suspension ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.2 แต่ ภายหลังจากปั่น resuspend เซลล์ใน 10 ml EBSS
2. นับ stimulator cell โดยใช้ trypan blue exclusion method ปรับความเข้มข้นของ viable cell ให้เป็น 2×10^7 cell/ml ปิเปต 20-30 ml ของ 2×10^7 cell/ml ใส่ใน 50 ml conical tube
3. เตรียม mitomycin C (5000 μ g/ml) (ภาคผนวก ข) ด้วยความระมัดระวัง เนื่องจาก mitomycin C เป็นสารก่อมะเร็งและสารก่อกลายพันธุ์
4. ใช้ 0.1 ml mitomycin C (5000 μ g/ml) ต่อ 10 ml 2×10^7 cell/ml stimulator cell เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ mitomycin C เป็น 50 μ g/ml ห่อหลอดทดลองของ stimulator cell ที่ได้รับ mitomycin C ด้วย aluminium foil

5. นำเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C เข้าสู่บ่ม 37°C 5% CO₂ โดยคลายเกลียวของ conical tube เล็กน้อย บ่มเซลล์เป็นเวลา 45 นาที เขย่าหลอดอย่างนุ่มนวล ทุก ๆ 10 นาที ระหว่างช่วงเวลาการบ่ม
6. ระหว่างที่บ่ม stimulator cell เตรียม responder cell โดยใช้ม้ามจากหนู C57Bl/6 จำนวน 2-3 ตัว เตรียม single cell suspension จากม้ามตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.2 ภายหลังการปั่นเหวี่ยง resuspend เซลล์ใน complete media
7. นับจำนวน responder cell โดย trypan blue exclusion method และปรับความเข้มข้นของ viable cells ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ เก็บเซลล์ไว้ที่ 4°C ระหว่างรอ stimulator cell
8. เมื่อครบกำหนดเวลา 45 นาที เขย่าหลอดทดลอง stimulator cell ที่ได้รับ mitomycin C อีกครั้งหนึ่งอย่างนุ่มนวล ทำการล้างเซลล์โดยใส่ 20 ml EBSS และนำไปปั่นทันทีที่ 1,200 rpm 4°C เป็นเวลา 10 นาที
9. เมื่อสิ้นสุดการปั่น เท supernatant ออก และ resuspend เซลล์ใน 20 ml EBSS และทำการล้างเซลล์ซ้ำอีก 3 ครั้ง เพื่อให้แน่ใจว่าล้าง mitomycin C ที่ไม่ได้ถูกนำเข้าสู่เซลล์ (uptake) ออกจนหมด
10. ภายหลังการล้างเซลล์ครั้งสุดท้าย resuspend stimulator cell ใน complete media นับและปรับเซลล์ให้มีความเข้มข้นตามต้องการ
11. ในแต่ละหลุมของ 96 well microtiter U bottom plate ใส่เซลล์ดังต่อไปนี้คือ
 - หลุมที่มี responder อย่างเดียว: 100 μ l responder + 100 μ l media
 - หลุมที่มี responder + stimulator: 100 μ l responder + 100 μ l stimulator
 - ปริมาตรสุดท้ายในแต่ละหลุมเท่ากับ 200 μ l
12. ปั่น plate ที่ประมาณ 600 rpm เป็นเวลา 5 นาที 4°C ก่อนนำเข้าบ่มในตู้บ่ม 37°C, 5% CO₂
13. เมื่อครบกำหนดเวลาของการบ่มใน MLR assay นำ plate สำหรับการทดสอบ mixed lymphocyte response วัดการตอบสนองโดยใช้ MTT ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.5

2.3.2 การหาปริมาณเซลล์และอัตราส่วน responder ต่อ stimulator ที่เหมาะสม

สำหรับการทดลองหาปริมาณเซลล์และอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator cell ที่เหมาะสมใน MLR ทดลองใช้ responder : stimulator ในสัดส่วน 1:4 และ 1:5 โดยใช้ 100 μ l ของ 2, 4, 8 และ 10x10⁶ cells/ml responder cell บ่มร่วมกับ 100 μ l ของ 8, 16, 32 และ 40x10⁶ cells/ml stimulator cell ตามลำดับสำหรับอัตราส่วนของ responder: stimulator เท่ากับ 1:4 และบ่ม

ร่วมกับ 100 μl ของ 10, 20, 40 และ 50×10^6 cells/ml stimulator cell ตามลำดับ สำหรับอัตราส่วนของ responder: stimulator เท่ากับ 1:5

2.3.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ MLR

สำหรับการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสม วัดการตอบสนองภายหลังการบ่มเป็นระยะเวลา 4 และ 5 วัน โดยนับวันที่ทำการทดลองเป็นวันที่ 0 และถัดจากวันทำการทดลองเป็นวันที่หนึ่ง ในการทดลอง ใช้ปริมาณเซลล์ของ responder เป็น 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับเซลล์ stimulator 16×10^5 และ 20×10^5 เซลล์/หลุม (สำหรับ responder 4×10^5 เซลล์/หลุม) และเซลล์ stimulator 32×10^5 และ 40×10^5 เซลล์/หลุม (สำหรับ responder 8×10^5 เซลล์/หลุม) เพื่อให้ได้อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 และ 1:5 ตามลำดับ

2.3.4 การตอบสนองต่อ mitogen ของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C

เพื่อให้แน่ใจว่าการทดสอบเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte response จึงตรวจผลยับยั้งของ mitomycin C ต่อการแบ่งเซลล์ของ DBA/2 stimulator cell โดยวัดการตอบสนอง ต่อ mitogen ตามวิธี mitogenesis assay ในหัวข้อ 1.4 อาจเลือกใช้ Con A หรือ LPS เพียงชนิดใดชนิดหนึ่งเป็น mitogen และเลือกใช้ความเข้มข้นที่เหมาะสมของ mitogen และของเซลล์ สำหรับโครงการวิจัยนี้เลือกใช้ Con A 5 $\mu\text{g/ml}$ เป็น mitogen และเลือกใช้ความเข้มข้นของเซลล์เป็น 4×10^5 เซลล์/หลุม ในการทดสอบ ตัวอย่างการ plate เซลล์ ใน 96 well microtiter flat bottom plate เพื่อตรวจสอบการตอบสนองต่อ mitogen ของเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C เทียบกับเซลล์ responder มีดังนี้คือ

100 μl responder cell + 50 μl media

100 μl responder cell + 50 μl Con A

100 μl mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μl media

100 μl mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μl Con A

นำ plate เข้าตู้บ่มที่ 37°C, 5% CO₂ ภายหลังการบ่มเป็นเวลา 2 วัน (นับวันที่เข้าตู้บ่มเป็น 0 วัน) นำ plate สำหรับการทดสอบ mitogenesis วัดการตอบสนองต่อ mitogen ด้วยการใช้ MTT ตามวิธีที่ระบุในหัวข้อ 1.5

2.3.5 การตอบสนองต่อ mitogen ของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ หรือไม่ได้รับ mitomycin C

เพื่อให้แน่ใจว่า stimulator เซลล์ที่เตรียมจากหนู DBA/2 สามารถตอบสนองต่อ mitogen ได้ จึงทำการเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ mitogen ของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ หรือไม่ได้รับ mitomycin C ในการทดลองใช้ เซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย Con A 5 $\mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ตัวอย่างการ plate เซลล์ ใน 96 well microtiter flat bottom plate มีดังนี้คือ

100 μ l untreated stimulator cell + 50 μ l media

100 μ l untreated stimulator cell+ 50 μ l Con A

100 μ l mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μ l media

100 μ l mitomycin C-treated stimulator cell + 50 μ l media

3. การวิเคราะห์ข้อมูล

ข้อมูลที่วัดเป็นค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่ 590 nm \pm standard error mean (SEM) โดยมีจำนวนซ้ำของการทดลองเท่ากับ 3 ข้อมูลทั้งหมดมาวิเคราะห์ความแปรปรวน (analysis of variances) ด้วยการใช้โปรแกรม Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) เปรียบเทียบความแตกต่างของแต่ละกลุ่มจากกลุ่มควบคุม โดย least square test (LSD) และเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มโดยใช้ Duncan's Multiple Range Test สำหรับการเปรียบเทียบข้อมูลที่มีเฉพาะ 2 กลุ่มใช้ independent T test ข้อมูลมีความแตกต่างทางสถิติอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$

บทที่ 4

ผลการวิจัย

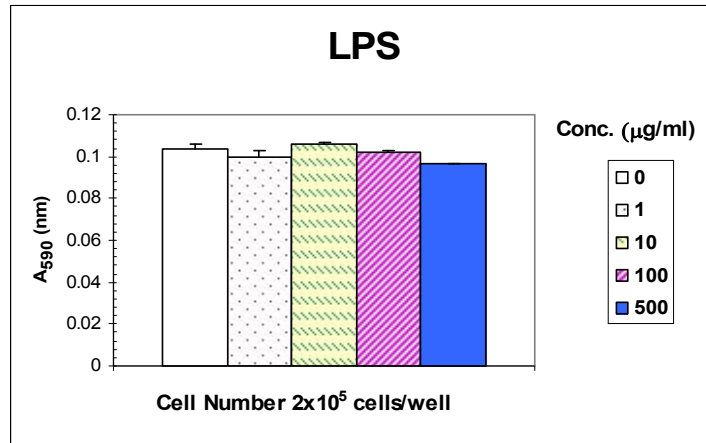
การพัฒนาวิธีการทดสอบ mitogenesis

การทดสอบ mitogenesis เป็นการวัดความสามารถของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันในการตอบสนองต่อสาร mitogen ชนิดต่าง ๆ ในงานทดลองนี้ ใช้เซลล์ของระบบภูมิคุ้มกัน คือ T และ B เซลล์ที่อยู่ใน single cell suspension เตรียมจากม้ามของหนูเม้าส์ C57Bl/6 และเลือก mitogen 2 ชนิดคือ LPS และ Con A เพื่อใช้กระตุ้น B และ T เซลล์ตามลำดับ และเลือก PWM ซึ่งเป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B เซลล์ ในการพัฒนาวิธีทดสอบ เลือกการใช้ MTT colorimetric assay วัดการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ mitogen แทนวิธีมาตรฐานที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสี tritium thymidine ($[^3\text{H}]\text{-TdR}$) ในการวัดการตอบสนอง

1. การทดลองความสามารถในการตอบสนองต่อ LPS mitogen

1.1 การหาความเข้มข้นของ LPS ที่เหมาะสมในการทดสอบ

รูปที่ 2 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS mitogen ที่ความเข้มข้น 0, 1, 10, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ภายหลังจากบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้ จำนวนเซลล์ใน culture เป็น 2×10^5 เซลล์/ml ซึ่งเป็นจำนวนเซลล์ตามวิธีมาตรฐานที่ใช้สารกัมมันตภาพรังสีในการวัดการตอบสนองของเซลล์ ผลการทดลองชี้ชัดว่า LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ lymphocyte ต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี LPS ดังนั้น ในการประเมินการตอบสนองของเซลล์โดยใช้ MTT จึงไม่สามารถใช้จำนวนเซลล์ใน culture เช่นเดียวกับวิธีมาตรฐานของการใช้ $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ ปิศาจ DNA เพื่อประเมินการเจริญเติบโตของเซลล์ หรือการตอบสนองต่อ mitogen และในการทดลองนี้ ไม่สามารถตัดสินได้ว่าความเข้มข้นใดของ LPS ที่เหมาะสมต่อการทดสอบ เพราะทุกความเข้มข้นของ LPS ที่ใช้ไม่สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองได้

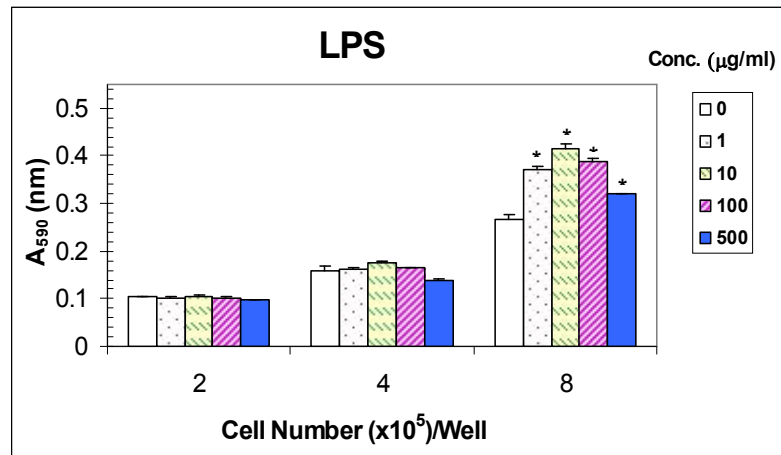


รูปที่ 2 การตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ เมื่อระยะเวลา 24 ชม.

1.2 การหาความเข้มข้นของ เซลล์ ที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ LPS

เนื่องจากการใช้ MTT ในการประเมินความสามารถของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ mitogen มีความไวน้อยกว่าการใช้ $[^3\text{H}]\text{-TdR}$ จึงทดลองเพิ่มจำนวนเซลล์ใน culture ให้มีปริมาณสูงขึ้นจากเดิม 2×10^5 เซลล์/หลุม เป็น 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม เพื่อหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบ และกระตุ้นด้วย LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลองแสดงไว้ในรูปที่ 3 จากรูปชี้ชัดว่า ค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ซึ่งหมายถึงการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS mitogen เพิ่มขึ้นเป็นสัดส่วนตามจำนวนเซลล์ที่เพิ่มขึ้นใน culture โดยค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm เพิ่มขึ้นเมื่อเพิ่มจำนวนเซลล์ใน culture จาก 2×10^5 เป็น 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม ตามลำดับ ส่วนการเพิ่มการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ จะมีค่าที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่มี mitogen) อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$) ทุกความเข้มข้น พบเฉพาะใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุมเท่านั้น แต่เมื่อใช้จำนวนเซลล์เป็น 2×10^5 หรือ เพิ่มจำนวนเป็น 4×10^5 เซลล์/หลุม ค่าการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมซึ่งไม่มี LPS mitogen ดังนั้น ปริมาณเซลล์ 2×10^5 และ 4×10^5 เซลล์/หลุม จึงไม่เหมาะสมสำหรับการวัดการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS mitogen โดยวิธี MTT ใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม LPS ที่ความเข้มข้น 1, 10, 100, และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ lymphocyte เพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุม 40, 56.23, 46.79 และ 20.38 % ตามลำดับ ดังนั้น ช่วงความ

เข้มข้นที่เหมาะสมของ LPS ที่สามารถกระตุ้น lymphocyte ให้ตอบสนองอยู่ที่ 1-100 $\mu\text{g/ml}$ โดยความเข้มข้นที่สามารถกระตุ้นได้สูงสุดอยู่ที่ 10 $\mu\text{g/ml}$

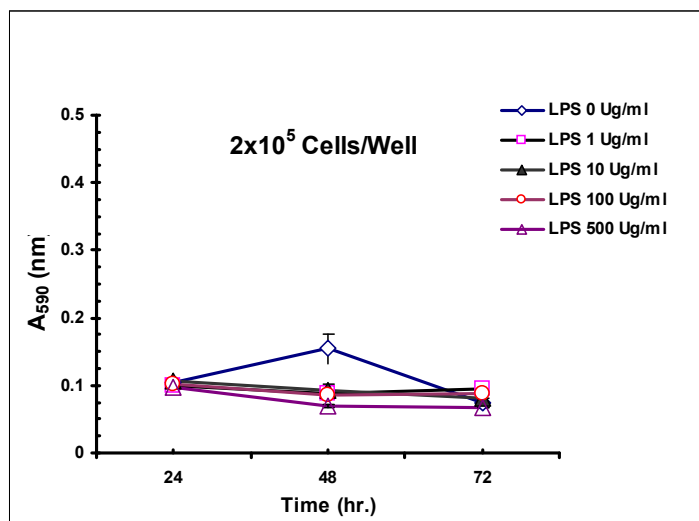


รูปที่ 3 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)

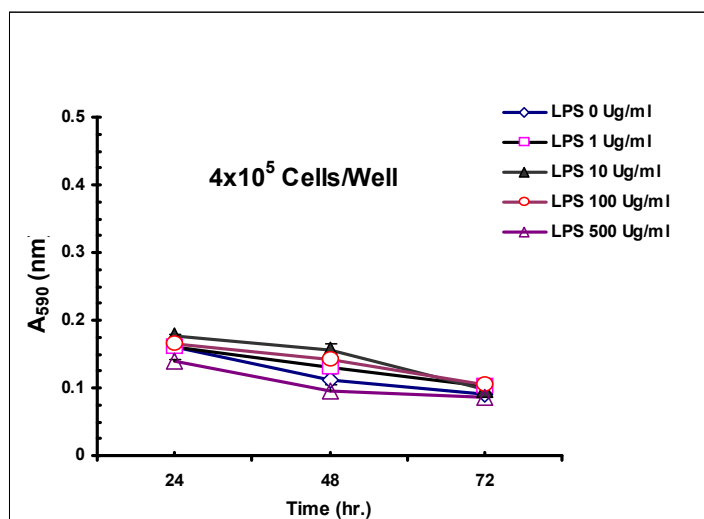
1.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ LPS

นอกจากปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับปริมาณเซลล์ใน culture และความเข้มข้นของ mitogen ระยะเวลาของการบ่มเซลล์ร่วมกับ mitogen เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่สำคัญต่อการตอบสนองในการทดสอบ mitogenesis จึงได้ทำการทดลองแปรผันระยะเวลาของการบ่มเซลล์ร่วมกับ mitogen โดยใช้เซลล์ที่มีปริมาณ 2×10^5 , 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ LPS 1, 10, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม เพื่อหาระยะเวลาของการบ่มเซลล์ที่เหมาะสม ผลที่ได้แสดงในรูปที่ 4-6 ผลการทดลองชี้ชัดว่า ใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 2×10^5 (รูปที่ 4) และ 4×10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 5) การเพิ่มระยะเวลาการบ่มเซลล์กับ LPS mitogen เป็น 48 และ 72 ชม. ไม่ได้ช่วยให้เซลล์ตอบสนองต่อ LPS ได้ทุกความเข้มข้น ส่วน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 6) ไม่ว่าจะเป็นกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS หรือกลุ่มที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS 1, 100 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ จะมีความเข้มข้นเซลล์ (ในกรณีของกลุ่มควบคุม) หรือการตอบสนองต่อ mitogen (กลุ่มที่ได้รับ mitogen) สูงสุดที่ 24 ชม. หลังจากนั้น ปริมาณเซลล์หรือการตอบสนองจะลดลงอย่างมีนัยสำคัญ เมื่อระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ($p \leq 0.05$) ส่วน culture ที่กระตุ้นด้วย LPS 10 $\mu\text{g/ml}$ ยังคงให้การตอบสนองสูงสุดไม่ว่าจะเป็นที่ 24, 48 และ 72 ชม. และการตอบสนองไม่ได้มีการเปลี่ยนแปลงมากนักในช่วงระยะเวลา 24-72 ชม. จากรูปที่ 6 ถึงแม้การตอบสนองของ lymphocyte ต่อ LPS ที่ 1 และ 100

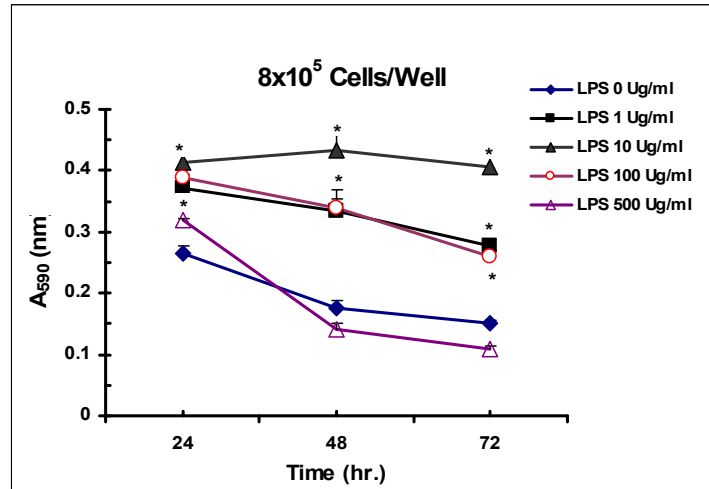
$\mu\text{g/ml}$ จะลดลงภายหลัง 24 ชม แต่ LPS ที่ความเข้มข้น 1 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ก็ยังสามารถกระตุ้นการตอบสนองของ lymphocyte ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้น การทดลองชี้แนะว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมในการบ่ม lymphocyte กับ LPS ที่เหมาะสมที่สุดคือระยะเวลา 24 ชม. ที่ความเข้มข้น LPS 1-100 $\mu\text{g/ml}$ ส่วน LPS ที่ความเข้มข้นสูงมาก ๆ คือ 500 $\mu\text{g/ml}$ ไม่เหมาะสมที่จะใช้ในการทดสอบ เพราะนอกจากสิ้นเปลืองสารแล้ว ยังไม่สามารถกระตุ้นการตอบสนองได้ภายหลัง 24 ชม. (รูปที่ 6)



รูปที่ 4 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 2×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม



รูปที่ 5 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ความเข้มข้น 1-500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.

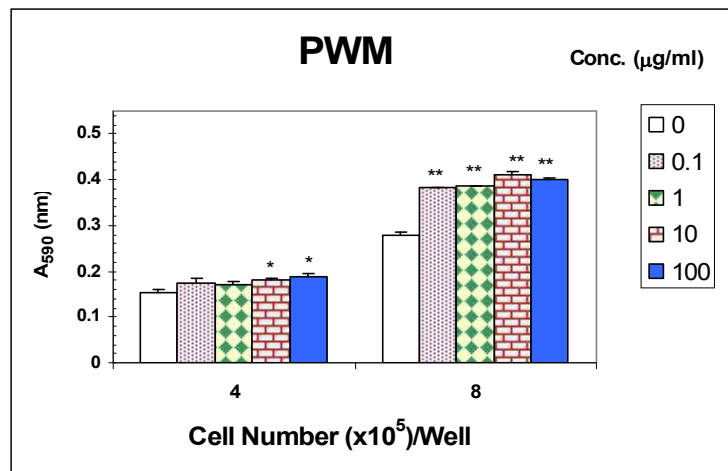


รูปที่ 6 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ LPS ที่ 1-500 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี LPS; $p \leq 0.001$)

2. การทดลองความสามารถในการตอบสนองต่อ PWM mitogen

2.1 การหาความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสมในการทดสอบ

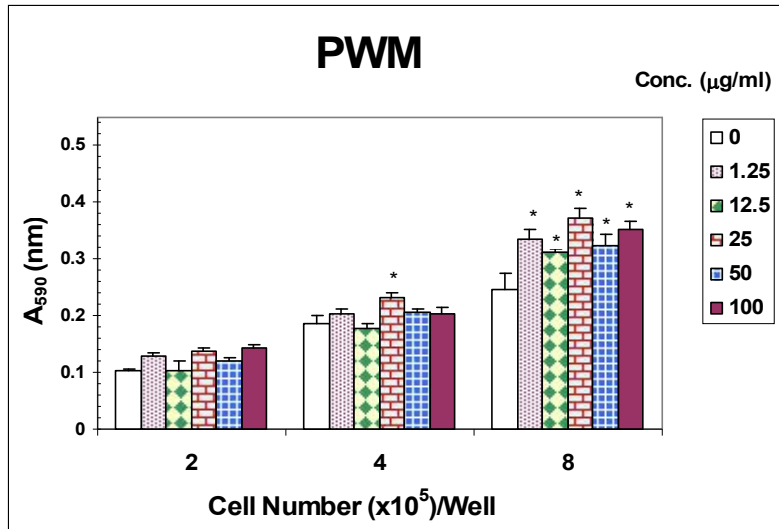
รูปที่ 7 แสดงผลการตอบสนองของ lymphocyte ต่อ PWM ที่ความเข้มข้นตั้งแต่ 0, 0.1, 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ภายหลังจากบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยใช้จำนวนเซลล์ใน culture เป็น 4×10^5 เซลล์/หลุม และ 8×10^5 เซลล์/หลุม ผลการทดลองชี้แนะว่า PWM ที่ความเข้มข้น 0.1, 1, 10, และ 100 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นให้ culture ที่มีปริมาณ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม เกิดการตอบสนองเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$) จากกลุ่มควบคุม ประมาณ 36.4, 37.5, 46.4 และ 42.9 % ตามลำดับ แต่ใน culture ที่มีปริมาณเซลล์ 4×10^5 เซลล์/หลุม การตอบสนองจะเพิ่มขึ้นจากกลุ่มควบคุมเพียง 17.6 และ 22.2% ($p \leq 0.05$) เมื่อใช้ PWM ที่มีความเข้มข้นสูงคือ 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น



รูปที่ 7 แสดงการตอบสนองของ culture ที่มีปริมาณ lymphocyte 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่มีความเข้มข้น 0.1-100 $\mu\text{g/ml}$ (* และ ** หมายถึง ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM ที่ $p \leq 0.05$ และ $p \leq 0.001$ ตาม ลำดับ)

2.2 การหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ PWM

ในการทดลองหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสม ทดลองใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 2×10^5 , 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ PWM ที่ 1.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และบ่มร่วมกับเซลล์เป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลอง (รูปที่ 8) ชี้แนะว่า จำนวนเซลล์ใน culture ต้องมีปริมาณเซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม จึงสามารถตอบสนองต่อ PWM ได้ ถ้าใช้ความเข้มข้นของเซลล์ต่ำเหมือนวิธีมาตรฐานคือ 2×10^5 เซลล์/หลุม จะไม่เกิดการตอบสนองต่อ PWM ปริมาณเซลล์เพิ่มเป็น 4×10^5 เซลล์/หลุม การตอบสนองต่อ PWM จะแตกต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen เฉพาะ culture ที่กระตุ้นด้วย 25 $\mu\text{g/ml}$ เท่านั้น โดยมีการตอบสนองเพิ่มขึ้น 25% ($P \leq 0.05$) culture ที่ใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม การตอบสนองจะต่างจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen ทุกความเข้มข้นของ PWM โดยการตอบสนองเพิ่มขึ้นประมาณ 34.1, 27.8, 51.8, 32.7 และ 44.1% ที่ความเข้มข้นของ PWM 1.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) ดังนั้น การทดลองชี้แนะว่า ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมในการทดสอบคือ 8×10^5 เซลล์/หลุม และ PWM 25 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองสูงสุด ซึ่งผลการทดลองนี้สอดคล้องกับการทดลองที่ 2.1 ที่ชี้แนะว่า ความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสมอยู่ระหว่าง 10-100 $\mu\text{g/ml}$

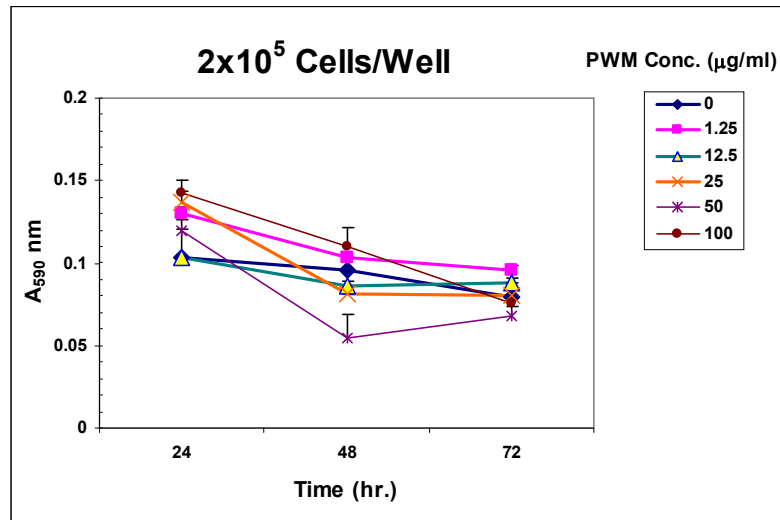


รูปที่ 8 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้นของเซลล์ที่แตกต่างกัน เมื่อระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)

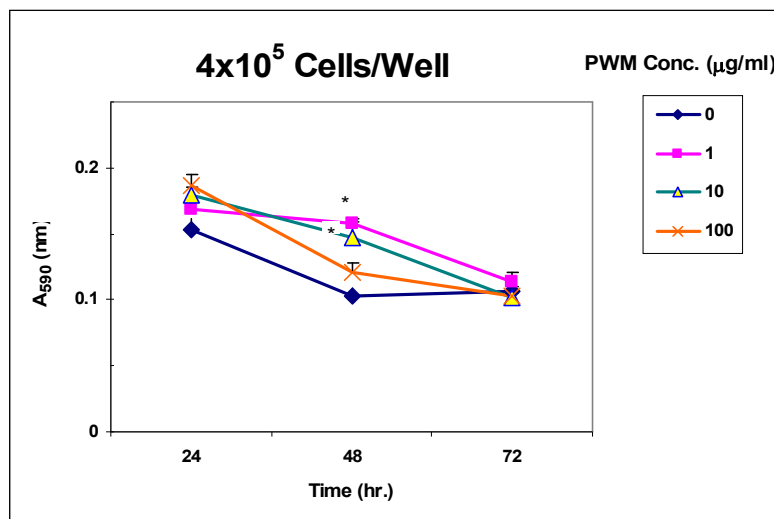
2.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ PWM

ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสม ใช้เซลล์ 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย PWM, 1, 10 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ หรือใช้เซลล์ 2×10^5 เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย PWM, 1.25, 12.5, 25, 50 และ 100 $\mu\text{g/ml}$ และบ่มเซลล์เป็นระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ผลการทดลองแสดงว่า การตอบสนองต่อ PWM สูงสุดที่ 24 ชม. หลังจากนั้น การตอบสนองลดลงเมื่อระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ (รูปที่ 9-11) ใน culture ที่ใช้ 2×10^5 เซลล์/หลุม ไม่เกิดการตอบสนองต่อ PWM ทุกความเข้มข้นที่ใช้ทดสอบ ไม่ว่าจะบ่มเซลล์ร่วมกับ mitogen ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (รูปที่ 9) ที่ปริมาณเซลล์ 4×10^5 เซลล์/หลุม เมื่อบ่มร่วมกับ PWM ที่ 1 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ เป็นระยะเวลา 48 ชม. จะเกิดการตอบสนองสูงกว่ากลุ่มควบคุม 53.4 และ 42.7% ($p \leq 0.05$) ตามลำดับ (รูปที่ 10) แต่ค่าการตอบสนองยังคงอยู่ในระดับต่ำเมื่อเทียบกับ culture ที่ใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 10-11) การตอบสนองของ culture ที่ใช้ 4×10^5 เซลล์/หลุม ต่อความเข้มข้นอื่นของ PWM และที่ระยะเวลาอื่น ไม่ต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ (รูปที่ 10) ส่วน culture ที่ใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม มีการตอบสนองต่อ PWM ทุกความเข้มข้นที่ใช้ และต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.001$) ที่ 24 ชม. (รูปที่ 11) หลังจากนั้น การตอบสนองลดลงที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ตามลำดับ โดยที่ระยะเวลา 48 ชม. ยังคงมีการตอบสนองต่อ PWM 1 $\mu\text{g/ml}$ สูงกว่ากลุ่มควบคุมอยู่ประมาณ 44% ($p \leq 0.05$) (รูปที่ 11)

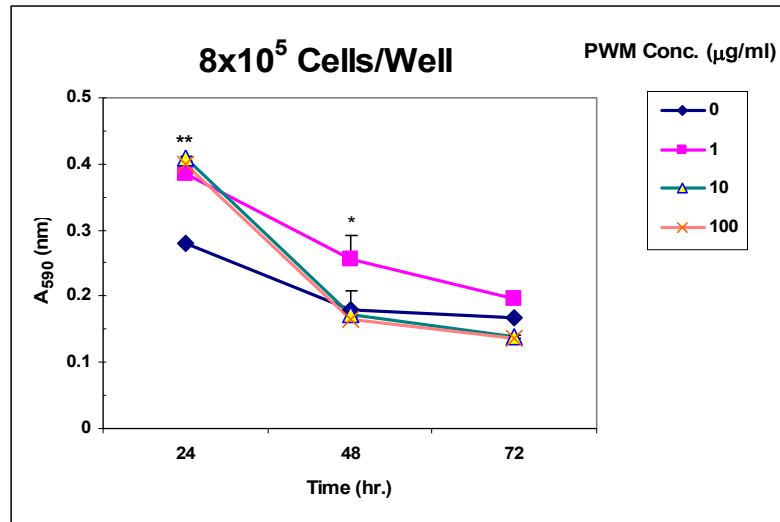
ดังนั้น การทดลองชี้ชัดว่า การตอบสนองต่อ PWM เกิดสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชม. ใน culture ที่ใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม



รูปที่ 9 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 2×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 µg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม.



รูปที่ 10 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 µg/ml ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.05$)

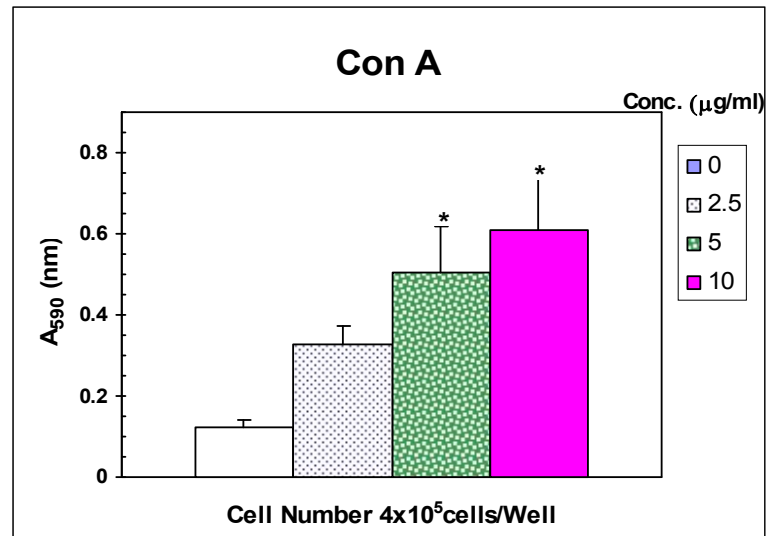


รูปที่ 11 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ PWM ที่ความเข้มข้น 1.25-100 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (**, * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี PWM; $p \leq 0.001$ และ 0.05 ตามลำดับ)

3. การทดลองความสามารถในการตอบสนองต่อ Con A mitogen

3.1 การหาความเข้มข้นของ Con A ที่เหมาะสมในการทดสอบ

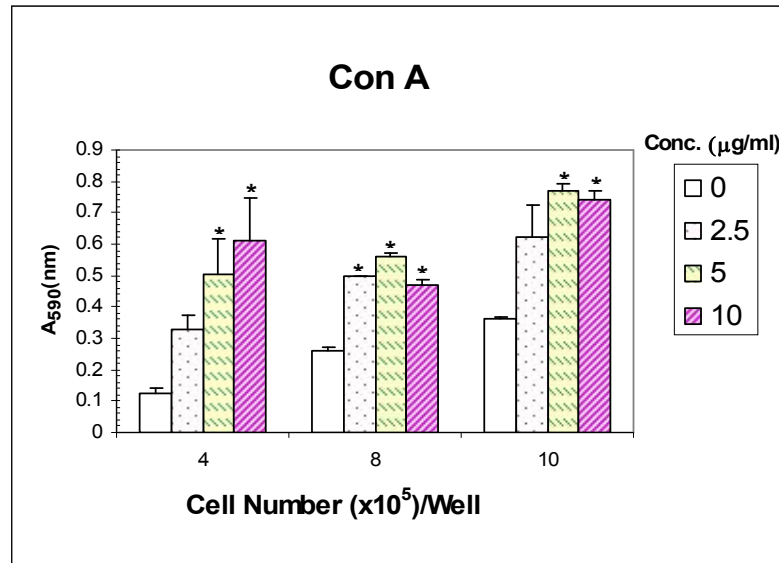
ในการหาความเข้มข้นของ Con A ที่เหมาะสมในการทดสอบ ใช้เซลล์ 4×10^5 เซลล์/หลุม ซึ่งสูงกว่าวิธีมาตรฐานคือ 2×10^5 เซลล์/หลุม เนื่องจากผลจากการทดลองที่ผ่านมา พบว่าจำเป็นต้องใช้เซลล์สูงกว่าวิธีมาตรฐาน จึงสามารถวัดการตอบสนองทั้งต่อ LPS และ PWM การทดลองใช้ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองในระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลอง (รูปที่ 12) แสดงว่า Con A ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองของ lymphocyte สูงกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่มี mitogen 2.66, 4.11 และ 4.95 เท่าตามลำดับ โดยมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ ($p \leq 0.01$) ดังนั้น ความเข้มข้นของ Con A ในช่วง 2.5 - 10 $\mu\text{g/ml}$ จึงเหมาะสมต่อการทดสอบ เมื่อใช้ปริมาณเซลล์ 4×10^5 เซลล์/หลุม Con A 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นการตอบสนองสูงกว่าที่ 2.5 $\mu\text{g/ml}$



รูปที่ 12 แสดงการตอบสนองของ lymphocyte (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$)

3.2 การหาความเข้มข้นของเซลล์ที่เหมาะสมต่อการตอบสนอง Con A

ในการทดลองใช้ความเข้มข้นของเซลล์ 4×10^5 , 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ Con A mitogen 2.5, 5, และ 10 $\mu\text{g/ml}$ บ่มเป็นระยะเวลา 24 ชม. ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 13 ซึ่งชี้แนะว่าเมื่อใช้เซลล์ในปริมาณสูง คือ 4×10^5 , 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม สามารถตอบสนองต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ได้ดี ดังค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ใน culture ที่มี Con A 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ มีค่าสูงกว่า culture ที่ไม่มี mitogen ทุกความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ โดยเฉพาะใน culture ที่ใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม การตอบสนองสูงกว่า culture ที่ไม่มี mitogen อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทุกความเข้มข้นของ Con A ที่ใช้

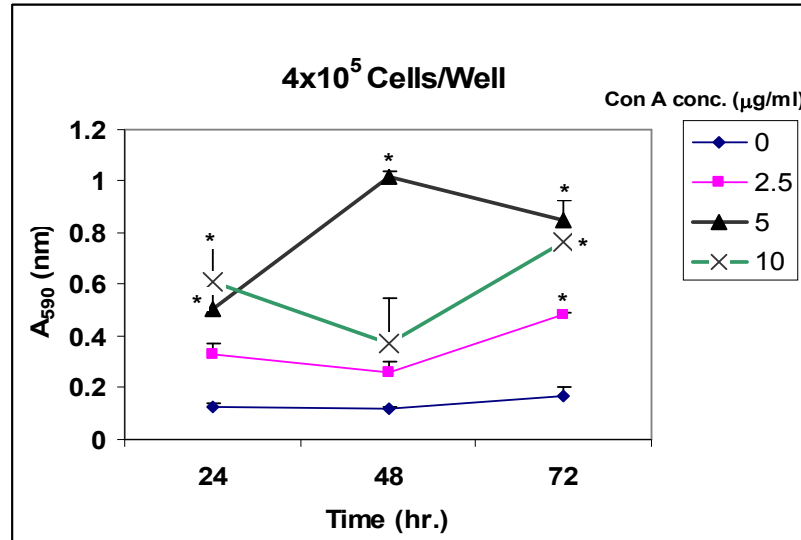


รูปที่ 13 การตอบสนอง (ค่าเฉลี่ย $A_{590\text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ของ culture ที่มีปริมาณเซลล์ 4×10^5 , 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม เมื่อประเมินการตอบสนองในระยะเวลา 24 ชม. หลังจากกระตุ้นด้วย Con A (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.01$)

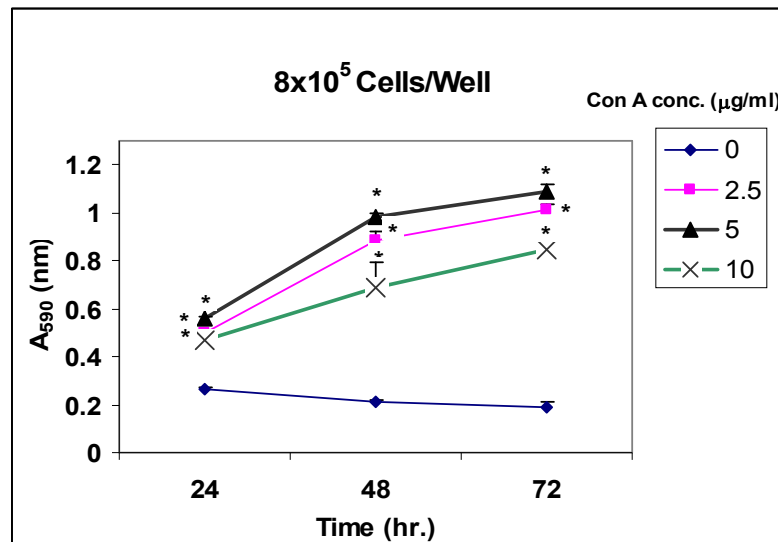
3.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการตอบสนองต่อ Con A

ในการหาระยะเวลาที่เหมาะสม ใช้เซลล์ 4×10^5 , 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม บ่มร่วมกับ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5, 5 และ 10 $\mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. ผลการทดลองแสดงว่า ระยะเวลาที่เหมาะสมต่อการทดสอบ ขึ้นกับความเข้มข้นของเซลล์ใน culture ที่ใช้ และความเข้มข้นของ Con A ที่ใช้กระตุ้น (รูปที่ 14-16) ใน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 4×10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 14) ค่าการตอบสนองสูงสุดเมื่อถูกกระตุ้นด้วย Con A 5 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 48 ชม. และการตอบสนองลดลงประมาณ 16.6% ที่ 72 ชม. ส่วน culture ที่ใช้ปริมาณเซลล์ 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม (รูปที่ 15 และ รูปที่ 16 ตามลำดับ) พบว่าการตอบสนองต่อ Con A เพิ่มขึ้นที่ 48 และ 72 ชม. เมื่อเทียบกับที่ 24 ชม. แทบทุกความเข้มข้นของ Con A ที่ใช้ โดยเฉพาะที่ 8×10^5 เซลล์/หลุม ค่าการตอบสนองต่อ Con A 2.5 และ 5 $\mu\text{g/ml}$ ที่ 72 ชม. (ตารางที่ 3) มีค่าสูงกว่าที่ 24 และ 48 ชม. อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) แต่เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์เป็น 10×10^5 เซลล์/หลุม ค่าการตอบสนองต่อ Con A ที่ 5 $\mu\text{g/ml}$ กลับมีค่าลดลงประมาณ 13.2% ที่ระยะเวลา 72 ชม. เมื่อเทียบกับที่ 48 ชม. ส่วนการตอบสนอง ต่อ Con A ที่ความเข้มข้นอื่นของ culture ที่ใช้ 10×10^5 เซลล์/หลุม ไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างระยะเวลา 48 และ 72 ชม. (รูปที่ 16 และตารางที่ 3) ดังนั้น สำหรับการทดสอบ

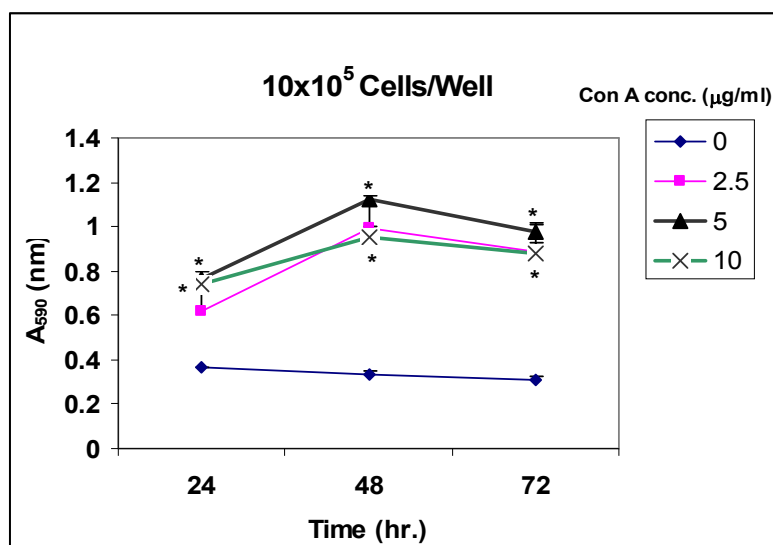
การตอบสนองต่อ Con A การใช้ปริมาณเซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม ความเข้มข้นของ Con A ที่ 2.5 หรือ 5 $\mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองที่ 48 หรือที่ 72 ชม. น่าจะเป็นสถานะที่เหมาะสมที่สุด



รูปที่ 14 การตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)



รูปที่ 15 การตอบสนองของ lymphocyte 8×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)



รูปที่ 16 การตอบสนองของ lymphocyte 4×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A ที่ความเข้มข้น 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ที่ระยะเวลา 24, 48 และ 72 ชม. (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุมที่ไม่มี Con A; $p \leq 0.05$)

ตารางที่ 3 การเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A ของ lymphocyte ที่ระยะเวลาแตกต่างกัน

ความเข้มข้นของ Con A ($\mu\text{g/ml}$)	การตอบสนอง (ค่าเฉลี่ย $\text{OD}_{590 \text{ nm}} \pm \text{S.D.}$)		
	24 ชม.	48 ชม.	72 ชม.
8×10^5 เซลล์/หลุม			
0	0.263 ^a ±0.013	0.212 ^b ±0.011	0.192 ^b ±0.037
2.5	0.496 ^a ±0.007	0.883 ^b ±0.063	1.015 ^c ±0.038
5	0.563 ^a ±0.010	0.980 ^b ±0.028	1.087 ^c ±0.049
10	0.472 ^a ±0.023	0.685 ^{a,b} ±0.183	0.844 ^b ±0.033
10×10^5 เซลล์/หลุม			
0	0.363 ^a ±0.007	0.333 ^a ±0.025	0.313 ^a ±0.026
2.5	0.621 ^a ±0.181	0.990 ^a ±0.257	0.891 ^a ±0.223
5	0.767 ^a ±0.046	1.122 ^b ±0.039	0.974 ^c ±0.061
10	0.742 ^a ±0.043	0.949 ^b ±0.093	0.883 ^{a,b} ±0.083

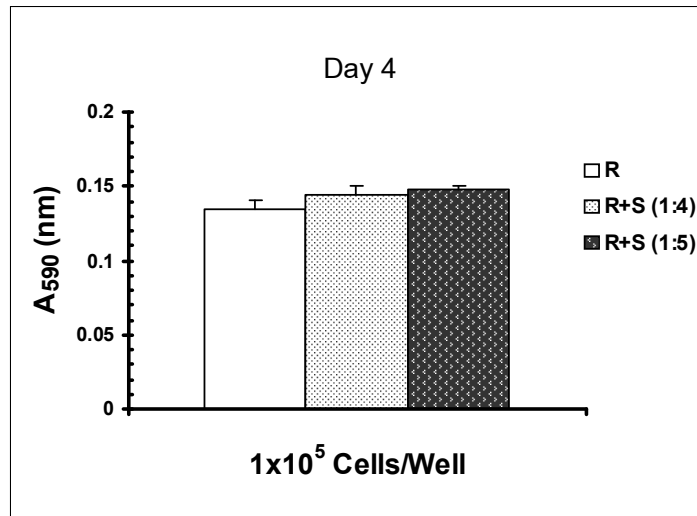
Superscript ในแนวนอนที่ตามด้วยอักษรต่างกัน มีความแตกต่างทางสถิติที่ระดับ 0.05 จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test

4. การพัฒนาวิธีทดสอบ mixed lymphocyte response

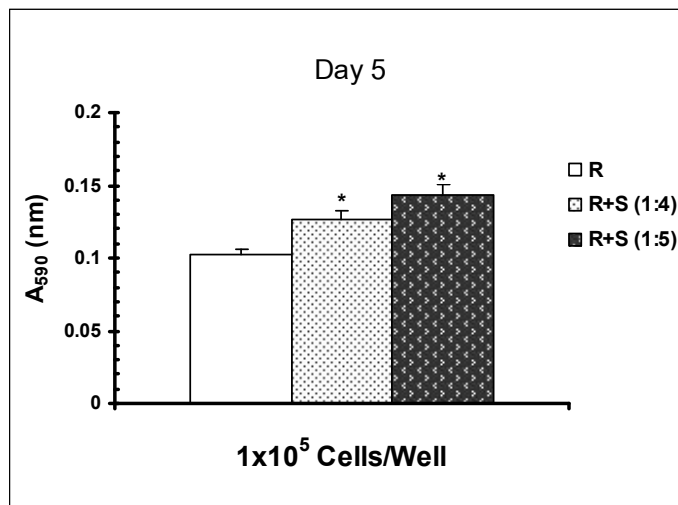
MLR เป็นการทดสอบความสามารถของ lymphocyte ในการตอบสนองต่อ allogeneic cell ซึ่งหมายถึงเซลล์จากบุคคลต่างกัน ใน species เดียวกัน ในการทดลองนี้ ใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ C57B1/6 เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ตอบสนอง เรียกว่า responder และใช้เซลล์จากม้ามของหนูเม้าส์ DBA/2 เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่กระตุ้น เรียกว่า stimulator และจัดให้มีการทดสอบวัตถุประสงค์การตอบสนองของ responder เพียงฝ่ายเดียว เรียกว่า one-way mixed lymphocyte reaction โดย stimulator ถูกยับยั้งการตอบสนองต่อ responder โดยการใส่ mitomycin C

4.1 การทดลอง mixed lymphocyte response โดยใช้สถานะการทดลองตามวิธีมาตรฐาน

การทดลองเริ่มแรกใช้สถานะต่าง ๆ ของการทดลองตามที่กำหนดในวิธีมาตรฐานทั่วไปของ MLR (Smialowicz, 1995) ที่ประเมินการตอบสนองโดยใช้สารกัมมันตภาพรังสี [³H]-TdR คือใช้จำนวนเซลล์ของ responder เป็น 1×10^5 เซลล์/หลุม และใช้ปริมาณเซลล์ของ stimulator เป็น 8×10^5 เซลล์ หรือ 10×10^5 เซลล์ เพื่อให้อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator เป็น 1:4 หรือ 1:5 ตามลำดับ และวัดการตอบสนองโดยการใช้ MTT ภายหลังจากบ่ม responder ร่วมกับ stimulator เป็นระยะเวลา 4 วัน หรือ 5 วัน ผลการทดลองชี้แนะว่า ในวันที่ 4 ถ้าใช้ปริมาณเซลล์ของ responder ตามวิธีมาตรฐาน 1×10^5 เซลล์/หลุม ไม่ว่าอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator จะเป็น 1:4 หรือ 1:5 ก็ไม่เกิดการตอบสนองต่อเซลล์ stimulator (รูปที่ 17) ส่วนในวันที่ 5 มีการเพิ่มการตอบสนองต่อ stimulator ที่อัตราส่วน 1:4 และ 1:5 ประมาณ 24 และ 40% ตามลำดับ ($p \leq 0.05$) เมื่อเทียบกับ culture ที่มี responder เพียงอย่างเดียว แต่การตอบสนองจัดอยู่ในเกณฑ์ต่ำ เพราะค่า stimulation index (อัตราส่วนของค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี responder บ่มร่วมกับ stimulator หารด้วย ค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มีเพียง responder; $\frac{A_{590} [R + S]}{A_{590} [R]}$) อยู่ที่ประมาณ 1.2 และ 1.4 เท่านั้น (รูปที่ 18)



รูปที่ 17 การตอบสนองของ lymphocyte 1×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ stimulator เซลล์ใน mixed lymphocyte reaction เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 R= responder, S = stimulator

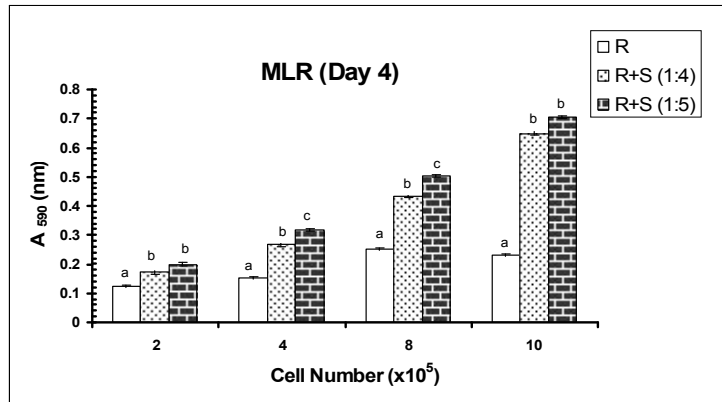


รูปที่ 18 การตอบสนองของ lymphocyte 1×10^5 เซลล์/หลุม (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ stimulator เซลล์ใน MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 5 ภายหลังจากกระตุ้น R= responder, stimulator (* = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)

4.2 การหาปริมาณเซลล์และอัตราส่วน responder ต่อ stimulator ที่เหมาะสม ใน MLR

ในการทดลองหาปริมาณเซลล์ที่เหมาะสม ได้เพิ่มปริมาณเซลล์จากวิธีมาตรฐาน 1×10^5 เซลล์/หลุม เป็น 2×10^5 , 4×10^5 , 8×10^5 และ 10×10^5 เซลล์/หลุม และใช้อัตราส่วน responder : stimulator

เป็น 1:4 และ 1:5 วัดการตอบสนองในวันที่ 4 ภายหลังกระตุ้นด้วย stimulator ผลการทดลองแสดงในรูปที่ 19 การทดลองแสดงว่า เมื่อเพิ่มปริมาณเซลล์ของ responder ใน culture สามารถชักนำให้เกิดการตอบสนองต่อ stimulator ได้ โดยค่า OD ใน culture ที่ถูกกระตุ้นด้วย stimulator จะสูงกว่า culture ที่มีเพียง responder อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ทุกความเข้มข้นของเซลล์ที่ใช้ และการตอบสนองต่อ stimulator ที่เป็น allogeneic เซลล์จะสูงขึ้นเมื่อปริมาณเซลล์ของ responder ใน culture เพิ่มขึ้น ดังนั้น ปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมจึงควรเริ่มตั้งแต่ $4-8 \times 10^5$ เซลล์/หลุม ส่วนที่ 10×10^5 เซลล์/หลุม ถึงแม้จะให้ค่าการตอบสนองสูงสุด แต่ต้องใช้ปริมาณเซลล์สูงมาก ไม่ค่อยเหมาะสมในการปฏิบัติงานจริง เพราะต้องใช้สัตว์ทดลองจำนวนมากในการเตรียมปริมาณเซลล์ให้เพียงพอต่อการทดสอบ นอกจากปริมาณเซลล์ อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator เป็นอีกปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อการตอบสนองใน mixed lymphocyte reaction ผลการทดลองชี้แนะว่า อัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator ในวิธีมาตรฐานที่ใช้ 1:4 ก่อนข้างเหมาะสม เพราะถึงแม้จะเพิ่มอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator จาก 1:4 เป็น 1:5 การตอบสนองของ responder จะเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญเฉพาะที่ปริมาณเซลล์ 4 และ 8×10^5 เซลล์/หลุมเท่านั้น และการตอบสนองเพิ่มขึ้นอีกเพียงเล็กน้อยคือประมาณ 19.1 และ 15.4% ตามลำดับ (รูปที่ 19)



รูปที่ 19 การตอบสนองของ responder (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ stimulator ที่ความเข้มข้นของ responder เซลล์ต่างกัน ในอัตราส่วนของ responder : stimulator ที่ 1:4 และ 1:5 ใน one-way MLR เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 (R = responder, S = stimulator กราฟที่มีอักษรต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test)

4.3 การหาระยะเวลาที่เหมาะสมในการทดสอบ MLR

ในการทดลองหาระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับ MLR ได้ทำการวัดการตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ที่ระยะเวลา 4 และ 5 วันหลังจากกระตุ้นด้วย stimulator โดยใช้ปริมาณของ responder ที่ 4×10^5 และ 8×10^5 เซลล์/หลุม อัตราส่วนของ responder : stimulator ที่ 1:4 และ 1:5 ผลการทดลองชี้แนะว่า (ตารางที่ 4) ไม่ว่าจะวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ วันที่ 5 สามารถวัดการตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ในการทดสอบ MLR ได้ทั้งสิ้น โดย culture ที่ถูกกระตุ้นด้วย stimulator มีค่า $A_{590 \text{ nm}}$ สูงกว่า responder อย่างมีนัยสำคัญ ($p \leq 0.05$) ยกเว้น ในสภาวะที่ใช้ 4×10^5 เซลล์/หลุม อัตราส่วนของ responder : stimulator เป็น 1:5 ของวันที่ 5 ซึ่ง ค่าไม่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจาก culture ที่มีเพียง responder อย่างเดียว สำหรับการเปรียบเทียบค่า $A_{590 \text{ nm}}$ ของ culture ที่มี responder, responder ปมร่วมกับ stimulator ทั้งที่อัตราส่วน 1:4 และ 1:5 เมื่อวัดการตอบสนองในวันที่ 4 และ วันที่ 5 พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ $p \leq 0.05$ ดังนั้น ระยะเวลาที่เหมาะสมสำหรับการทดสอบอาจเป็นได้ทั้งวันที่ 4 หรือ วันที่ 5

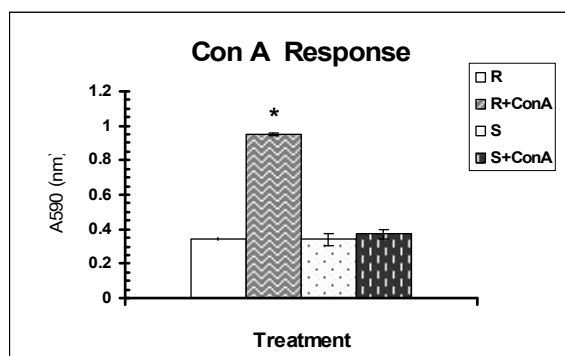
ตารางที่ 4 การตอบสนองของ responder ต่อ stimulator ใน mixed lymphocyte reaction ในวันที่ 4 และ 5

Mixed Lymphocyte Reactions	ค่าเฉลี่ย $OD_{590 \text{ nm}} \pm \text{S.D.}$	
	Day 4	Day 5
4×10^5 Cells/well		
Responder	0.119 ^{a,1} ± 0.004	0.249 ^{a,1} ± 0.061
Responder + Stimulator (1:4)	0.321 ^{b,1} ± 0.039	0.800 ^{b,1} ± 0.496
Responder + Stimulator (1:5)	0.492 ^{b,1} ± 0.116	0.648 ^{ab,1} ± 0.070
8×10^5 Cells/well		
Responder	0.130 ^{a,1} ± 0.015	0.147 ^{a,1} ± 0.007
Responder + Stimulator (1:4)	0.804 ^{b,1} ± 0.093	0.956 ^{b,1} ± 0.211
Responder + Stimulator (1:5)	0.781 ^{b,1} ± 0.122	0.914 ^{b,1} ± 0.039

ในแต่ละความเข้มข้นของเซลล์ superscript ที่เป็นตัวอักษร (เปรียบเทียบตามแนวตั้ง) และที่เป็นตัวเลข (เปรียบเทียบตามแนวนอน) ที่ตามด้วยอักษรหรือตัวเลขที่ต่างกัน มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญที่ $p \leq 0.05$ จากการเปรียบเทียบโดยวิธี Duncan's Multiple Range Test และ independent T test ตามลำดับ

4.4 การตรวจสอบการตอบสนองต่อ mitogen ของเซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C

เพื่อให้แน่ใจว่าการตอบสนองใน MLR เป็นแบบ one way-mixed lymphocyte reaction ซึ่งหมายถึง responder เซลล์เท่านั้นที่สามารถตอบสนองเพียงฝ่ายเดียว แต่ stimulator เซลล์ไม่สามารถตอบสนองต่อ responder ได้ เนื่องจากการแบ่งเซลล์ถูกยับยั้งโดย mitomycin C ในวันที่ทำการทดลอง MLR จึงควรตรวจสอบการตอบสนองของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ต่อ mitogen ควบคู่ทุกครั้ง การทดลองนี้ได้เลือกวัดการตอบสนองของ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A mitogen โดยเลือกใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม ความเข้มข้นของ Con A $5 \mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองที่ 72 ชม. ภายหลังจากกระตุ้น ซึ่งเป็นสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการวัดการตอบสนองต่อ Con A mitogen และเพื่อเป็นการยืนยันว่า Con A mitogen ยังคงคุณสมบัติที่สามารถกระตุ้นการตอบสนองของ lymphocyte ได้ดี จึงวัดการตอบสนองของ responder ต่อ Con A ควบคู่กัน ผลการทดลอง (รูปที่ 20) พบว่า ไม่มีความแตกต่างระหว่างค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ระหว่าง culture ที่มี stimulator เพียงอย่างเดียว หรือ stimulator ที่บ่มร่วมกับ $5 \mu\text{g/ml}$ Con A แสดงว่า stimulator เซลล์ที่ได้รับ $50 \mu\text{g/ml}$ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen อย่างที่ควรจะเป็น เมื่อวัดการตอบสนองที่ 72 ชม ในทางตรงกันข้าม responder เซลล์สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ดีมาก ดังค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี responder บ่มร่วมกับ Con A มีค่าเท่ากับ 0.953 ± 0.025 ในขณะที่ culture ที่มีเพียง responder มีค่าเท่ากับ 0.346 ± 0.03 ดังนั้น stimulator เซลล์ที่ได้รับ $50 \mu\text{g/ml}$ mitomycin C ซึ่งเป็นเซลล์ชุดเดียวกับที่ใช้ในการทดสอบ MLR จึงไม่สามารถตอบสนองต่อ responder ได้ในการทดสอบ MLR การตอบสนองที่วัดได้จึงเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte reaction

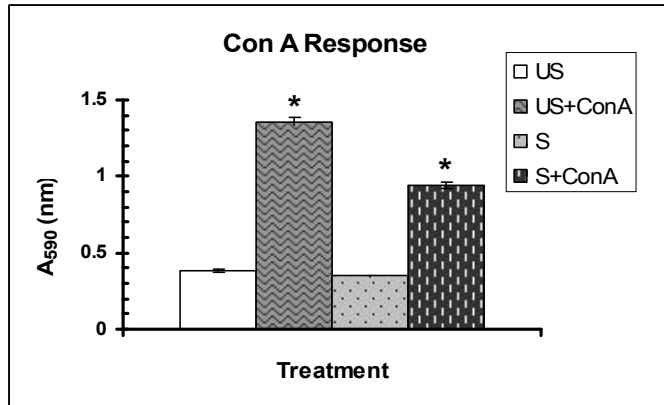


รูปที่ 20 การตอบสนองของ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ต่อ Con A mitogen เทียบกับการตอบสนองของเซลล์ responder ในการทดสอบใช้เซลล์ 8×10^5 เซลล์/หลุม $5 \mu\text{g/ml}$ Con A และวัดการตอบสนองในวันที่ 3 (R = responder, S = stimulator * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)

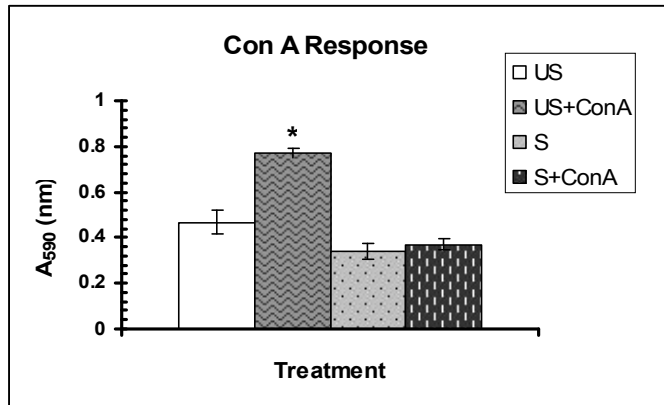
4.5 การตอบสนองของ stimulator เซลล์ที่ไม่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A mitogen

เพื่อเป็นการยืนยันว่า การไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ของเซลล์ stimulator เป็นผลสืบเนื่องจากการได้รับ mitomycin C ไม่ใช่เป็นเพราะหนูเม้าส์ DBA/2 เป็นสายพันธุ์ที่มีการตอบสนองต่อ Con A ต่ำ จึงทำการทดลองเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A mitogen ระหว่าง stimulator เซลล์ที่ได้รับ และไม่ได้รับ mitomycin C และวัดการตอบสนองที่ระยะเวลา 48 และ 72 ชม. ผลการทดลอง แสดงว่า ที่ระยะเวลา 24 ชม. (รูปที่ 21 ก) ภายหลังจากกระตุ้นด้วย 5 $\mu\text{g/ml}$ Con A เซลล์ stimulator ที่ไม่ได้ผ่านการบ่มร่วมกับ mitomycin C สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ดี ดังค่าการดูดกลืนแสงใน culture ที่บ่มร่วมกับ Con A สูงกว่า culture ที่ไม่มี Con A ประมาณ 3.6 เท่า ส่วนเซลล์ที่ผ่านการบ่มกับ 50 $\mu\text{g/ml}$ mitomycin C สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้เช่นกัน แต่การตอบสนองต่อ Con A mitogen จะต่ำกว่า คือการตอบสนองใน culture ที่มี Con A สูงกว่า culture ที่ไม่มี Con A เพียง 2.7 เท่า แต่เมื่อวัดการตอบสนองต่อ Con A ที่ระยะเวลา 72 ชม. (รูปที่ 21 ข) พบว่า เซลล์ที่ไม่ได้ผ่านการบ่มกับ mitomycin C ยังสามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ แต่ระดับการตอบสนองจะลดลงจากที่ 24 ชม. ประมาณ 45.8 % คือการตอบสนองสูงกว่า culture ที่ไม่มี Con A เพียง 1.7 เท่า แต่ stimulator เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A ได้ต่อไป เมื่อประเมินการตอบสนองในระยะเวลา 72 ชม. ดังค่าการดูดกลืนแสงที่ 590 nm ของ culture ที่มี Con A ไม่แตกต่างจาก culture ที่ไม่มี Con A ดังนั้น stimulator เซลล์ที่ผ่านการบ่มกับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ที่ระยะเวลา 72 ชม. การวัดการตอบสนองใน MLR กระทำในวันที่ 5 หรือ 120 ชม. ภายหลังจากกระตุ้น ค่าการตอบสนองของ culture ที่วัดได้ จึงน่าจะเป็นการตอบสนองของ responder เซลล์ต่อ stimulator เซลล์เพียงฝ่ายเดียว หรือเป็นแบบ one-way mixed lymphocyte reaction

ก



ข



รูปที่ 21 การตอบสนองของเซลล์ stimulator (ค่าเฉลี่ย $A_{590 \text{ nm}} \pm \text{SEM}$) ที่ได้รับ และไม่ได้รับ mitomycin C ต่อ Con A การทดลองใช้ 8×10^5 เซลล์/หลุม Con A $5 \mu\text{g/ml}$ และวัดการตอบสนองในวันที่ 2 (ก) และวันที่ 3 (ข) (R = responder, US = stimulator ที่ไม่ได้รับ mitomycin C, S = stimulator ที่ได้รับ mitomycin C . * = ค่าที่แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่ม responder; $p \leq 0.05$)

บทที่ 5

การวิจารณ์

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

วิธีการทดสอบด้านระบบภูมิคุ้มกันมีหลายวิธี เนื่องจากระบบภูมิคุ้มกันมีความซับซ้อน เกี่ยวข้องกับการทำงานของเซลล์หลายกลุ่มและสารน้ำหลายชนิด จึงไม่สามารถใช้วิธีการทดสอบเพียง 1-2 วิธีเพื่อใช้ในการคัดเลือกพืชที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันได้ แต่ในการพัฒนาวิธีการทดสอบเบื้องต้นนี้ ได้ดัดแปลงการทดสอบจากวิธีทางด้านพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกันเพียง 2 วิธี คือการวัดการตอบสนองอย่างไม่จำเพาะของเซลล์ภูมิคุ้มกันต่อ mitogen ใน mitogenesis assay และการวัดการตอบสนองแบบจำเพาะของ T เซลล์ต่อ allogeneic เซลล์ ใน MLR ซึ่งทั้ง 2 วิธี สามารถกระทำได้ใน *in vitro* เป็นวิธีทดสอบที่ง่าย ไม่ยุ่งยาก ให้ผลค่อนข้างรวดเร็ว และสามารถสะท้อนการทำงานของ T และ B เซลล์ซึ่งมีบทบาทสำคัญทางระบบภูมิคุ้มกัน จึงเหมาะสมสำหรับเป็นวิธีคัดกรองพืชสมุนไพรที่มีฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกัน งานวิจัยนี้ได้ทดลองตามวิธีมาตรฐานของการทดสอบ แต่ได้ดัดแปลงสถานะการทดสอบเพื่อหลีกเลี่ยงการใช้สารกัมมันตภาพรังสี ซึ่งมีปัญหาเกี่ยวกับความปลอดภัยของการใช้งาน และความยุ่งยากในการกำจัดขยะของเสียที่เป็นกัมมันตภาพรังสี และหลีกเลี่ยงการใช้เครื่องมือราคาแพง เช่น เครื่องเก็บเกี่ยวเซลล์ (cell harvester) และ เครื่องนับสารกัมมันตภาพรังสีแบบเบต้า (beta-scintillation counter) ซึ่งจำเป็นต้องใช้ในวิธีมาตรฐานของการทดสอบ โครงการนี้ได้ดัดแปลงโดยใช้ MTT colorimetric assay วัดการตอบสนองของเซลล์แทนการใช้สารกัมมันตภาพรังสีและใช้ ELISA plate reader อ่านผลการทดสอบแทนเครื่องมือราคาแพงที่ใช้ควบคู่กับสารกัมมันตภาพรังสี โดยการทดสอบ จำเป็นต้องปรับเปลี่ยนสถานะการทดลองต่าง ๆ ในวิธีทดสอบมาตรฐาน เพื่อให้เหมาะสมกับการใช้ MTT colorimetric assay แทนวิธีการใช้สารกัมมันตภาพรังสี

การทดสอบด้าน mitogenesis

ในทางพิษวิทยาต่อระบบภูมิคุ้มกัน นิยมใช้ mitogenesis assay เพื่อเป็นวิธีทดสอบเบื้องต้นในการประเมินว่าสารพิษสามารถส่งผลกระทบต่อการทำงานของ T หรือ B เซลล์ต่อ mitogen

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

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

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

สำหรับการทดลองเกี่ยวกับ PWM ให้ผลที่คล้ายคลึงกับ LPS คือต้องใช้เซลล์สูงกว่าปริมาณมาตรฐาน 2×10^5 เซลล์/หลุม จึงสามารถวัดการตอบสนองได้ โครงการวิจัยนี้ชี้แนะว่าปริมาณเซลล์ที่เหมาะสมคือ 8×10^5 เซลล์/หลุม และความเข้มข้นของ PWM ที่เหมาะสมอยู่ในช่วง $1-100 \mu\text{g/ml}$ โดยที่ $1-25 \mu\text{g/ml}$ สามารถกระตุ้นให้เกิดการตอบสนองสูงสุด และการตอบสนองสูงสุดที่ระยะเวลา 24 ชม. เท่านั้น หลังจากนั้น การตอบสนองลดลง (รูปที่ 8 และ รูปที่ 11) เป็นที่น่าสังเกตว่า PWM เป็น mitogen ที่มีประสิทธิภาพต่ำในการกระตุ้นเมื่อเทียบกับ LPS และ Con A ทั้งที่ PWM เป็น mitogen ที่สามารถกระตุ้นได้ทั้ง T และ B เซลล์ (Smialowicz., 1995; Iwanowicz et al., 2005) ทั้งนี้พิจารณาจากค่า OD ที่ 590 nm ของ culture ที่กระตุ้นด้วย mitogen เทียบกับ culture ที่ไม่มี mitogen เช่น การตอบสนองสูงสุดใน culture ที่มี 8×10^5 เซลล์/หลุม กระตุ้นด้วย $25 \mu\text{g/ml}$ PWM วัดที่ระยะเวลา 24 ชม. มีค่าเพิ่มขึ้นประมาณ 52% เท่านั้น (รูปที่ 8) ส่วนการตอบสนองต่อ LPS และ Con A ที่มีค่าสูงสุดเพิ่มขึ้นประมาณ 147 และ 466% ตามลำดับ (รูปที่ 6 และ รูปที่ 15) เนื่องจากข้อจำกัดในงบประมาณ ผู้วิจัยไม่ได้ทดลองสั่งซื้อ PWM จากบริษัทอื่น หรือ lot อื่นจากบริษัทเดิม มาเปรียบเทียบการทดสอบว่าสามารถกระตุ้นการตอบสนองให้มีประสิทธิภาพที่ดีกว่า lot ที่ใช้ในงานทดลองหรือไม่ ทั้งนี้ เพราะผู้วิจัยคิดว่า LPS และ Con A เป็น mitogen ที่น่าสนใจ และมีประโยชน์มากกว่า PWM เนื่องจากสามารถให้ข้อมูลของการตอบสนองเฉพาะ B เซลล์

หรือ T เซลล์เพียงชนิดเดียว ซึ่งได้เปรียบกว่าการใช้ PWM ที่ไม่สามารถแยกความแตกต่างได้ว่าการตอบสนองเกิดจากการกระตุ้นกลุ่ม T เซลล์ หรือ B เซลล์

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

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

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

การทดสอบด้าน mixed lymphocyte reaction

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

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

โครงการวิจัยนี้ได้พัฒนาวิธีทดสอบ MLR โดย ใช้ MTT วัดการตอบสนองแทนการใช้ [³H]-TdR ตามวิธีมาตรฐานที่วัดการใช้ thymidine ของเซลล์เพื่อสังเคราะห์ DNA ที่เพิ่มขึ้น เมื่อเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันตอบสนองโดยมีการแบ่งเซลล์เพิ่มขึ้น ผลการทดลองใน MLR คล้ายคลึงกับการทดสอบด้าน mitogenesis คือถ้าใช้สภาวะการทดลองตามวิธีมาตรฐานที่ใช้ [³H]-TdR จะไม่สามารถวัดการตอบสนองโดยใช้ MTT ได้ จำเป็นต้องเพิ่มปริมาณเซลล์ของ responder ให้เพิ่มขึ้นจาก 1×10^5 เซลล์/หลุมเป็น 4×10^5 หรือ 8×10^5 เซลล์/หลุม จึงให้ค่าการตอบสนองที่น่าพึงพอใจ แต่สำหรับอัตราส่วนของ responder ต่อ stimulator และระยะเวลาที่เหมาะสมในการวัดการตอบสนอง จะไม่แตกต่างจากค่าที่ใช้ตามวิธีมาตรฐาน คือใช้อัตราส่วนของ responder:stimulator เป็น 1:4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4 หรือ วันที่ 5 และการตอบสนองที่วัดได้น่าจะเป็นการตอบสนองของเซลล์ responder เพียงฝ่ายเดียว เพราะเซลล์ stimulator ถูกยับยั้งการแบ่งเซลล์โดยใช้ mitomycin C ซึ่งการใช้ mitomycin C เป็นวิธีมาตรฐาน เช่นเดียวกับวิธีการใช้รังสี (irradiation) เพื่อยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ stimulator ทำให้ไม่สามารถตอบสนองต่อ allogeneic antigen ของเซลล์ responder (Harrison and Paul, 1973) กลไกการออกฤทธิ์ของ mitomycin C คือการ crosslink DNA และยับยั้งการสังเคราะห์ DNA ส่งผลต่อการสังเคราะห์ RNA และโปรตีนต่าง ๆ ภายในเซลล์ให้ลดต่ำลง ดังนั้นเซลล์ที่ได้รับ mitomycin C จึงมีวัฏจักรเซลล์ (cell cycle) ตู๋ S phase และ G2 phase ช้าลง (Malinowski et al., 1992) การทดลองในโครงการวิจัยนี้ สนับสนุนฤทธิ์ยับยั้งการแบ่งเซลล์ของ mitomycin C รูปที่ 20 ซึ่งชี้ว่าเซลล์ stimulator ที่ได้รับ 50 $\mu\text{g/ml}$ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ Con A mitogen ได้ เมื่อระยะเวลา 72 ชม.หลังจากการกระตุ้น อย่างไรก็ตาม ในการเปรียบเทียบการตอบสนองต่อ Con A ของเซลล์ stimulator ที่ผ่านการบ่มกับ mitomycin C และไม่ได้บ่มกับ mitomycin C เป็นที่น่าสนใจว่า เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C ยังสามารถตอบสนองต่อ mitogen ในวันที่ 2 ได้บ้าง (รูปที่ 21 ก) และการตอบสนองจะน้อยกว่าเซลล์ที่ไม่ได้รับ mitomycin C ประมาณ 40 % แต่ในวันที่ 3 เซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ

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

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

ในการพัฒนาวิธีวัด one-way mixed lymphocyte reaction โดยใช้ MTT วัดการตอบสนอง แทนการใช้ [³H]-TdR ของเซลล์เพื่อสังเคราะห์ DNA อาจจะซับซ้อนต่อการแปลผล เพราะ MTT วัดปริมาณ formazan product ที่เป็นผลผลิตจากการเปลี่ยน MTT โดย mitochondrial เอนไซม์ succinate dehydrogenase ของเซลล์ที่มีชีวิต ในกรณีที่เซลล์ stimulator ซึ่งได้รับ mitomycin C ไม่สามารถตอบสนองต่อ allogeneic antigen แต่ยังมีชีวิตอยู่ใน culture ได้ ค่าที่วัดจึงอาจสูงกว่าความเป็นจริงและทำให้นักวิจัยเข้าใจผิดว่า การใช้ MTT มีความไวกว่าวิธีมาตรฐานตามที่เคยรายงาน (VanBuskirk et al., 1995) เพราะใน culture ที่ responder กระตุ้นด้วย stimulator ค่าที่อ่านได้จากวิธี MTT นอกจากเป็นผลจากปริมาณเซลล์ของ responder ที่เพิ่มขึ้น เนื่องจากการตอบสนองต่อ allogeneic antigen บนผิวของ stimulator แล้ว อาจรวมเซลล์ stimulator บางส่วนที่ยังคงมีชีวิตอยู่ เพียงแต่ไม่สามารถตอบสนองได้ ซึ่งข้อบกพร่องนี้ ไม่พบในวิธีมาตรฐาน ซึ่งวัดการตอบสนอง โดยการสังเคราะห์ DNA ปัจจัยของการมีชีวิตอยู่ของเซลล์ stimulator ไม่ส่งผลกระทบต่อค่าการสังเคราะห์ DNA ของ culture เพราะแม้จะมีเซลล์ stimulator บางส่วนที่ยังไม่ตาย แต่การสร้าง DNA ได้ถูกยับยั้งโดย mitomycin C ค่า [³H]-TdR ซึ่งวัดการสังเคราะห์ DNA ของ culture ในวิธีมาตรฐาน จึงเป็นของ responder เพียงอย่างเดียว ซึ่งต่างจากค่าการดูดกลืนแสงของการใช้ MTT ที่วัดปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตใน culture ถ้าเซลล์ที่มีชีวิตมีปริมาณสูง ปริมาณ formazan product ย่อมสูงตาม ดังนั้น ในการทดสอบด้วยการใช้ MTT จึงควรมีกุ่มทดลองเพิ่มเติมเพื่อตรวจสอบว่า เซลล์ stimulator ที่ได้รับ mitomycin C ยังคงมีเซลล์ที่มีชีวิตเหลืออยู่ใน culture ในวันที่ 4-5 หรือวันที่ทำการวัดการตอบสนองหรือไม่ เพื่อให้สามารถแปลผลได้อย่างถูกต้องว่า การตอบสนองเป็นของ responder เพียงอย่างเดียว และวิธีทดสอบเป็น one-way mixed lymphocyte reaction อย่างแท้จริง อย่างไรก็ตาม ใดๆก็ดี โครงการวิจัยนี้ ชี้แนะว่า สามารถใช้ MTT วัดการตอบสนองใน mixed lymphocyte reaction ได้ แต่การแปลผลสำหรับ culture ที่เป็น one-way mixed lymphocyte reaction จำเป็นต้องเพิ่มกลุ่มทดลองของเซลล์ stimulator เพื่อตรวจสอบปริมาณเซลล์ที่อาจยังมีชีวิตอยู่ควบคู่ไปกับการทดสอบด้วย ถึงแม้จะเข้าใจกันว่า ในที่สุด เซลล์ที่ได้รับ mitomycin C จะตายทั้งหมดใน culture เนื่องจากไม่สามารถแบ่งเซลล์ได้ต่อไป แต่ก็ควรเพิ่มกลุ่มทดลองเพื่อยืนยันทุกครั้ง ในกรณีที่ต้องการทำการทดสอบแบบ two-way mixed lymphocyte reaction ซึ่งวัดการ

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

บทที่ 6

สรุป

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

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

- 24 ชม. ภายหลังจากกระตุ้น ทั้งนี้ การตอบสนองของ PWM 1-100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีความแตกต่างกันที่ 24 ชม.
5. สำหรับการวัดการตอบสนองของ T lymphocyte ใช้ Con A ความเข้มข้นระหว่าง 2.5-10 $\mu\text{g/ml}$ ปริมาณเซลล์ $8-10 \times 10^5$ เซลล์/หลุม วัดการตอบสนองที่ 48-72 ชม. ภายหลังจากกระตุ้น การตอบสนองสูงสุดอยู่ที่ Con A 5 $\mu\text{g/ml}$ 72 ชม. เมื่อปริมาณเซลล์เป็น 8×10^5 เซลล์/หลุม
 6. ในการวัดการตอบสนองของ MLR เมื่อใช้ C57Bl/6 เป็น responder และ DBA/2 เป็น stimulator สภาวะที่เหมาะสมของปริมาณเซลล์ของ responder คือ $4-8 \times 10^5$ เซลล์/หลุม และอัตราส่วนของเซลล์ responder ต่อ stimulator เป็น 1: 4 และวัดการตอบสนองในวันที่ 4-5
 7. ในการทดสอบ MLR ถ้าต้องการวัดการตอบสนองแบบ one-way mixed lymphocyte reaction ใช้เซลล์ stimulator บ่มร่วมกับ 50 $\mu\text{g/ml}$ mitomycin C สำหรับการวัด MTT colorimetric assay เพื่อประเมินการตอบสนองใน one-way mixed lymphocyte reaction อาจจะไม่ใช่วิธีที่เหมาะสมนัก เพราะยากต่อการแปลผล สืบเนื่องจากแม้เซลล์ stimulator ไม่สามารถตอบสนองต่อ responder ได้ แต่ยังสามารถมีชีวิตอยู่ได้ใน culture ในช่วงระยะเวลาหนึ่ง ทำให้ค่าการตอบสนองที่วัดได้โดยการใช้ MTT อาจไม่สามารถสะท้อนเฉพาะการตอบสนองของ responder เพียงฝ่ายเดียวตามความต้องการ ในกรณีนี้ การใช้ [^3H]-TdR จึงมีความเหมาะสมและถูกต้องมากกว่าการเลือกใช้ MTT

ข้อเสนอแนะ

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

บรรณานุกรม

1. Alley, M.C., Scudiero, D.A., Monks, A., Hursey, M.L., Czerwinski, M.J., Fine, D.L., Abbot, B.J., Mayo, J.G., Shoemaker, R.H., and Boyd, M.R. 1988. Feasibility of drug screening with panels of human tumor cell lines using a microculture tetrazolium assay. *Cancer Research* 48: 589-601.
2. Auttachoat, W., Chitsomboon, B., Peachee, V.L., Guo, T.L., and White, K.L. 2004. Immunomodulation by Dok Din Daeng (*Aeginetia indica* Roxb.) extracts in female B6C3F1 mice (I): Stimulaiton of T cells. *International Immunopharmacology* 4: 1367-1379.
3. Bin-Hafeez, B., Haque, R., Parvez, S., Pandey, S., Sayeed, I and Raisuddin, S. 2003. Immunomodulatory effects of fenugreek (*Trigonella foenum graecum* L.) extract in mice. *International Immunopharmacology* 3: 257-265.
4. Brock, T. D., Madigan, M. T., Martinko, J. M., and Parker, J. 1994. *Biology of Microorganisms*. Prentice-Hall, Englewood cliffs.
5. Brunton, L.L., Parker, K. L, Murri, N., Blumenthal, D.K., and Knollmann, B.C. 2006. *Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics*. (Online edition) Available URL: <http://www.accessmedicine.com/resource TOC.aspx?resource ID=28>
6. Burleson, G. R., Dean, J. H. and Munson, A. E. 1995a. *Methods in Immunotoxicology*. V.I. Wiley-Liss, New York.
7. Burleson, G. R., Dean, J. H. and Munson, A. E. 1995b. *Methods in Immunotoxicology*. V.II. Wiley-Liss, New York.
8. Burns-Naas, L.A., Meade, B.J., and Munson, A.E. 2001. Toxic responses of the immune system. In *Casarett & Doull's Toxicology: The basic science of poisons*. 6th ed. C.D. Klassen (ed.) pp. 419-470. McGraw-Hill Medical Pub. Division, New York.
9. Buttke, T.M., McCubrey, J.A., and Owen, T.C. 1993. Use of an aqueous soluble tetrazolium/formazan assay to measure viability and proliferation of lymphokine-dependent cell lines. *Journal of Immunological Methods* 157: 233-240.
10. Chan, M., Kohlmeier, J., Branden, M., Jung, M., Benedict, S. 1999. Triptolide is more effective in preventing T cell proliferation and interferon-gamma production than is FK506. *Phytotherapy Research* 13:464-467.

11. Denizot, F., and R. Lang, 1986. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. *Journal of Immunological Methods* 89: 271-277.
12. Du, A., Hu, S. and Wang, S. 2005. *Eimeria tenella*: Ginsenosides-enhanced immune response to the immunization with recombinant 5401 antigen in chickens. *Experimental Parasitology* 11: 191-197.
13. Elena, G., Amerio, N., Ferrero, P., Bay, M.L., Valenti, J., Colucci, D. and Puig, N.R. 2003. Effects of repetitive sevoflurane anaesthesia on immune response, select biochemical parameters and organ histology in mice. *Laboratory Animals* 37: 193-203.
14. Fernandes, A., Cromarty, D., Albrecht, C., and Rensburg, C. 2004. The antioxidant potential of *Sutherlandia frutescens*. *Journal of Ethnopharmacology* 95:1-5.
15. Gieni, R.S., Li, Y., and HayGlass, K.T. 1995. Comparison of [³H]-thymidine incorporation with MTT-and MTS-based bioassays for human and murine IL-2 and IL-4 analysis: Tetrazolium assays provide markedly enhanced sensitivity. *Journal of Immunological Methods* 187: 85-93.
16. Givens, K., Kirada, S., Chen, A., Rothschilder, J., and Lee, D. 1990. Purification of human ocular fibroblasts.: An assessment of *in vitro* colorimetric assays. *Investigative Ophthalmology & Visual Science* 31: 1856-1862.
17. Goldstein, A., Aronow, L., and Kalman, S. M. 1974. *Principles of Drug Action: The Basis of Pharmacology*. pp. 517-567. John Wiley & Sons, New York.
18. Hammerling, U., Henningson, A.C., Sjödin, L., 1992. Development and validation of a bioassay for interleukin-2. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis* 10(8): 547-553.
19. Harrison, M.R. and Paul, W.E. 1973. Stimulus-response in the mixed lymphocyte reaction. *The Journal of Experimental Medicine* 138: 1602-1607.
20. Hernández-Godoy, J., Planelles, D., Balsalobre, B., and González-Molina, A. 2008. The effect of *in vitro* g-irradiation on mitogenic responsiveness of murine lymphocytes. *Journal of Physiology and Biochemistry* 64(3): 179-188.
21. Hildebrandt, K.M., Luecke, R.W., and Fraker, P.J. 1982. Effects of maternal dietary zinc on growth and mitogenic responsiveness in suckling mice. *Journal of Nutrition* 112: 1921-1928.

22. Hu, S., Concha, C., Johannisson, A., Meglia, G., Waller, K.P. 2001. Effect of subcutaneous injection of ginseng on cows with subclinical *Staphylococcus aureus* mastitis. *Journal of Veterinary Medicine Series B* 48: 519-528.
23. Inngjerdingen, K., Debes, S., Inngjerdingen, M., Hokputsa, S., Harding, S. Rolstad, B., Michaelsen, T., Diallo, D. and Paulsen, B. 2005. Bioactive pectic polysaccharides from *Glinus oppositifolius* (L.) Aug. DC., a Malian medicinal plant, isolation and partial characterization. *Journal of Ethopharmacology* 101 (1-3): 204-14.
24. Iwanowicz, L.R., Lerner, D.T., Blazer, V.S., and McCormick, S.D. 2005. Aqueous exposure to Aroclor 1254 modulates the mitogenic response of Atlantic salmon anterior kidney T-cells: Indications of short- and long-term immunomodulation. *Aquatic Toxicology*: 72: 305-314.
25. Jeong, H., Koo, H., Na, H., Kim, M., Hong, S., Eom, J., Kim, K., Shin, T. And Kim, H. 2002. Inhibition of TNF- α and IL-6 production by aucubin through blockade of NF-kB activation in RBL-2H3 mast cells. *Cytokine* 18(5): 252-259.
26. Jiao, H. Y., Soejima, Y., Ohe, Y. and Saijo, N. 1992. A new MTT assay for examining the cytotoxicity of activated macrophages towards the non-adherent P388 leukemia cell line. *Journal of Immunological Methods* 153: 265-266.
27. Kiviharju, T., Lecane, P., Sellers, R., Peehl, D. 2002. Antiproliferative and proapoptotic activities of triptolide (PG490), a natural product entering clinical trials, on primary cultures of human prostatic epithelial cells. *Clinical Cancer Research* 8:2666-2674.
28. Kliger, C.A., Gehad, A.E., Hulet, R.M., Roush, W.B., Lillehoj, H.S. and Mashaly, M.M. 2000. Effects of photoperiod and melatonin on lymphocyte activities in male broiler chickens. *Poultry Science* 79: 18-25.
29. Landegren, U. 1984. Measurement of cell numbers by means of the endogenous enzyme hexosaminidase: Applications to detection of lymphokines and cell surface antigens. *Journal of Immunological Methods* 67: 379-388.
30. Liu, Q., Chen, T., Chen, H., Zhang, M., Li, N., Lu, Z., Ma, P. And Cao, X. 2004. Triptolide (PG-490) induces apoptosis of dendritic cells through sequential p38 MAP kinase phosphorylation and caspase 3 activation. *Biochemical Biophysical Research Communication* 319(3): 980-986.
31. Luster, M.L., Munson, A.E., Thomas, P.T., Holsapple, M.P., and Fenters, J.D., and White, K.L. 1988. Development of a testing battery to assess chemical-induced immunotoxicity

- National Toxicology Program's criteria for immunotoxicity evaluation in mice. *Fundamental and Applied Toxicology* 10: 2-19.
32. Luster, MI., Portier, C., Pait, D.G., White, K.L., Gennings, C., Munson, A.E., Rosenthal, G.J. 1992. Risk assessment in immunotoxicology I. Sensitivity and predictability of immune tests. *Fundamental and Applied Toxicology* 18:200-210.
33. Luster, MI., Portier, C., Pait, D.G., Rosenthal, G.J., Germolec, D.R., Comment, C.E., Corsini, E., Blaylock, B.L., Pollock, P., Kouchi, Y., Craig, W., Munson, A.E., and White, K.L. 1993. Risk assessment in immunotoxicology II. Relationships between immune and host resistant tests. *Fundamental and Applied Toxicology* 21:71-82.
34. Makare, N., Bodhankar, S. and Rangari, V. 2001. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 78(2-3):133-137.
35. Malinowski, K., Pullis, C., Raisbeck, A. P. and Rapaport, F. T. 1992. Modulation of human lymphocyte marker expression by γ irradiation and mitomycin C. *Cellular Immunology* 143: 368-377.
36. Martin A., and Cynes, M. 1993. Comparison of 5 microplate colorimetric assays for *in vitro* cytotoxicity testing and cell proliferation assays. *Cytotechnology* 11: 49-58.
37. Mason, P.R. and Gwanzura, L. 1990. Reduced lymphocyte responses to mitogens in natural and experimental trichomoniasis. *Infection and immunity* 58 (11): 3553-3557.
38. Mire-Sluis, A.R., and Thorpe, R. 1998. Protocol: Laboratory protocols for the quantitation of cytokines by bioassay using cytokine responsive cell lines. *Journal of Immunological Methods* 211: 199-210.
39. Mosmon, T. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods* 65: 55-63.
40. Murphy, K.P., Travers, P., and Walport, M. 2008. *Janeway's immunobiology*. 7th ed. Garland Science, New York.
41. Niesink, R. J. M., Vries, J. and Hollinger, M. A. 1996. *Toxicology, principles and applications*. pp.1113-1139. CRC press, Inc., Florida.
42. Nomura, N., Saijo, K., Kato, M., Wang, P., Ohno, T. and Matsumura, M. 1996. Improved MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) assay for the measurement of viable animal cell number in porous cellulose carriers. *Biotechnology Techniques* 10(11): 883-888.

43. Racher, A.J., Looby, D., and Griffiths, J.B. 1990. Use of lactate dehydrogenase release to assess changes in culture viability. *Cytotechnology* 3: 301-307.
44. Roehm, N.W., Rodgers, G.H., Hatfield, S.M., and Glasebrook, A.L. 1991. An improved colorimetric assay for cell proliferation and viability utilizing the tetrazolium salt XTT. *Journal of Immunological Methods* 142: 257-265.
45. Roitt, I. M., Brostoff, J. and Male, D. K., 1998. *Immunology*. 5th ed. Mosby: London.
46. Shin, M., Kang, E., and Lee, Y. 2005. Flavonoid from medicinal plants blocks hepatitis B virus-e antigen secretions in HBV-infected hepatocyte. *Antiviral Research* 67(3): 163-167.
47. Smialowicz, R.J. 1995. *In vitro* lymphocyte proliferation assays: The mitogen-stimulated response and the mixed-lymphocyte reaction in immunotoxicity testing. In *Methods in immunotoxicology*. V. I. G.R. Bureson, J.H. Dean, and A.E. Munson (eds). pp. 197-210. Wiley-Liss, New York.
48. Sohni, Y.R. and Bhatt, R. M. 1996. Activity of a crude extract formulation in experimental hepatic amoebiasis and in immunomodulation studies. *Journal of Ethnopharmacology* 54: 119-124.
49. Stites, D. P. and Terr, A. I., 1991. *Basic and clinical immunology*. Lange medical publications, Connecticut.
50. Stivaktas, P.I. 2008. Comparison of cyclosporine A with mitomycin and gamma irradiation as inactivators of stimulator cells in the one-way mixed lymphocyte reaction. *Master thesis*. Department of Immunology, Faculty of Health Sciences, University of Pretoria.
51. Sun, Y., Hersh, E. M., Talapaz, M., Lee, S., Wong, W., Loo, T.A., and Mavligit, G. M. 1983. Immune restoration and/or augmentation of local graft versus host reaction by traditional chinese medicinal herbs. *Cancer* 52:70-73.
52. Toriizuka, K., Hou, P., Yabe, T., Iijima, K., Hanawa, T., Cyong, J. 2000. Effects of Kampo medicine, Toki-shakuyaku-san (Tang-Kuei-Shao-Yao-San), on choline acetyltransferase activity and norepinephrine contents in brain regions, and mitogenic activity of splenic lymphocytes in ovariectomized mice. *Journal of Ethnopharmacology* 71:133-143.
53. VanBuskirk, A.M., Adams, P.W., and Orosz, C.G. 1995. Nonradioactive alternative to clinical mixed lymphocyte reaction. *Human Immunology* 43(1): 38-44.
54. Xu, J., Song, S. Tang, Z., Jiang, Z., Liu, X., Zhou, L., Zhang, j., and Liu, X. 1999. Predictive chemotherapy of advanced breast cancer directed by MTT assay *in vitro*. *Breast Cancer Research and Treatment* 53: 77-85.

55. Yoshida, O., Nakashima, H., Yoshida, T., Kaneko, Y., Yamamoto, I., Matsuzaki, K., Uryu, T., and Yamamoto, N. 1988. Sulfation of the immunomodulating polysaccharide lentinan: a novel strategy for antivirals to human immunodeficiency virus (HIV). *Biochemical Pharmacology* 37(15):2884-91
56. ศูนย์พันธุวิศวกรรมและเทคโนโลยีชีวภาพแห่งชาติ และสำนักงานพัฒนาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีแห่งชาติ (2541). เอกสารการฝึกอบรมเรื่อง การตรวจสอบหาสารออกฤทธิ์ทางชีวภาพจากพืชและจุลินทรีย์. 22-24 กรกฎาคม.
57. เพียว เหมือนวงษ์ญาติ 2537. สมุนไพรก้าวใหม่: แก้วปรับปรุงจากตำราวิทยาศาสตร์สมุนไพร. บริษัท ที. พี. พรินท์, กรุงเทพฯ ฯ
58. คณะกรรมการสภาวิจัยแห่งชาติ สาขาวิทยาศาสตร์เคมีและเภสัช มหาวิทยาลัยขอนแก่น สมาคมสมุนไพรแห่งประเทศไทย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (2540). รายงานการสัมมนาทางวิชาการเรื่อง สมุนไพรไทย: เกล็ดพระเกียรติพระบาทสมเด็จพระเจ้าอยู่หัวทรงครองสิริราชสมบัติ ครบ 50 ปี. 23-25 มกราคม.
59. วิณา จิรัจฉริยากุล 2541. ยาจากสมุนไพร. *อุตสาหกรรมสมุนไพร* 15 (3): 5-17.

ภาคผนวก ก

EBSS 10X (Earle's balanced salt solution)

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>กรัม</u>
CaCl ₂	0.20
KCl	0.40
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.20
NaCl	6.80
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	0.14
D-Glucose	1.00
Phenol red	0.01

เติมน้ำปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 100 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C 20 นาที

EBSS 1X

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml</u>
EBSS 10X	10.0
1M HEPES buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml/10,000 U/ml)	1.0
น้ำปลอดเชื้อ	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

PBS (phosphate-buffered saline)

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>กรัม</u>
NaH ₂ PO ₄ (anhydrous)	0.23
Na ₂ HPO ₄ (anhydrous)	1.15
NaCl	9.00

เติมน้ำ 900 ml ปรับ pH ให้อยู่ระหว่าง 7.2-7.4 ด้วย 1 M NaOH หรือ 1 M HCl ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml ทำให้ปลอดเชื้อโดย autoclave ที่ 121°C 20 นาที

Heat-inactivated fetal calf serum (FCS)

นำขวด FCS (500 ml) ที่เก็บแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20°C มาหลอมละลาย (thaw) อย่างช้า ๆ โดยใส่ขวด FCS ใน beaker ที่เติมน้ำ ทิ้งที่อุณหภูมิห้อง 1 ชม. หลังจากนั้น นำไปหลอมละลายต่อที่ water bath อุณหภูมิ 37°C จนละลายเป็นของเหลวหมด (เขย่าขวดอย่างนี้มนวลทุก 15 –20 นาที หลีกเลี่ยงการเกิดฟอง) inactivate complement protein ใน FCS โดยนำไปต้มที่ water bath อุณหภูมิ 56°C เป็นเวลา 20 นาที aliquot ใส่ sterile culture tube (ใช้เทคนิคปลอดเชื้อ) และเก็บที่ -20°C

1X RPMI media

ละลาย 10X RPMI (Gibco BRL; Cat. No. 31800-022) 1 ซองในน้ำ nanopure ประมาณ 900-950 ml ใส่ 2 g NaHCO_3 คนบนเครื่องกวนแม่เหล็ก ปรับ pH ด้วย 1 N NaOH หรือ 1 N HCl จนได้ pH ประมาณ 6.8-7.2 ปรับปริมาตรสุดท้ายเป็น 1000 ml กรองด้วย sterile filter unit 0.2 μm (pH ของ media จะเพิ่มขึ้นประมาณ 0.2-0.3 เมื่อผ่านการกรอง) pH ของ 1X RPMI ควรอยู่ที่ 7-7.4

Complete RPMI media สำหรับ mitogenesis assay

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml</u>
FCS	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml/10,000 U/ml)	1.0
1X RPMI	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

Complete RPMI media สำหรับ mixed lymphocyte reaction

<u>ส่วนประกอบ</u>	<u>จำนวน ml</u>
FCS	10.0
1M Hepes buffer	1.5
Penicillin/Streptomycin (10,000 U/ml/10,000 U/ml)	1.0
500 μM 2 ME (ภาคผนวก ข)	1
1X RPMI	ปรับให้ปริมาตรสุดท้ายเป็น 100

ภาคผนวก ข

Stock solution ของ Mitogen

Lipopolysaccharide (W.S. typhosa 0901; Difco Laboratories 3124-25-6 Bacto; LPS.)

เตรียม stock solution 5 mg/ml โดยใส่ 20 ml EBSS ใน vial ที่มี LPS 100 mg เขย่าเบา ๆ จนละลายหมด แบ่งใส่หลอดทดลอง eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20°C

Pokeweed mitogen (Sigma L-9379)

เตรียม stock solution 5 mg/ml โดยใส่ 1 ml EBSS ใน vial ขนาด 5 mg เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย แบ่งใส่หลอดทดลอง eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20°C

Concanavalin A (Pharmacia Biotech. 17-0450-01)

เตรียม stock solution 1500 $\mu\text{g/ml}$ โดย ชั่ง 0.015 กรัมใส่ใน 10 ml EBSS เขย่าเบา ๆ ให้ละลาย ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน sterile filter disc 0.2 μm แบ่งใส่หลอดทดลอง eppendorf tube เก็บแช่แข็งที่ -20°C

ในวันที่ทดลอง mitogenesis assay เมื่อเตรียมความเข้มข้นสูงสุดของ mitogen แต่ละชนิดเรียบร้อยแล้ว ทำให้ปลอดเชื้อโดยกรองผ่าน sterile filter disc 0.2 μm ก่อนเจือจางเพื่อเตรียมความเข้มข้นอื่นที่ต้องการ

2-Mercaptoethanol (2ME)

เตรียม stock solution 5000 μM (โดยประมาณ) 2-mercaptoethanol หรือ 2-hydroxyethylmercaptan (Sigma M 7522 ความเข้มข้น 14.3 M) โดยใช้ 18 μl ใส่ใน 50 ml EBSS เขย่าสารอย่างนุ่มนวลให้เข้าเป็นเนื้อเดียวกัน เจือจาง stock solution ที่เตรียม 100 เท่าใน media เพื่อให้ความเข้มข้นสุดท้ายของ 2 ME เป็น 50 μM เช่นใส่ 1 ml 5000 μM 2 ME ใน media 100 ml

Mitomycin C

ใช้เข็มฉีดยาปลอดเชื้อ ใส่ 0.4 ml EBSS ใน vial ที่บรรจุ mitomycin C 2 mg (Sigma M4287) ใช้เข็มฉีดยาเดิมดูดสารละลายขึ้นลงอย่างนุ่มนวลประมาณ 2-3 ครั้ง เพื่อละลาย mitomycin C ได้สารละลายสีม่วงซึ่งไวต่อแสง (ห่อ vial ด้วย aluminium foil และเก็บในที่มืดที่ 4°C เพื่อรอระหว่างใช้งาน) เนื่องจากสารละลายไม่เสถียร เก็บที่ 4°C ในที่มืดได้ไม่เกิน 2-3 วัน ดังนั้น ควรเตรียมใหม่ทุกครั้ง ต้องระมัดระวังการใช้งาน mitomycin C เป็นพิเศษ เนื่องจากเป็นสารก่อกลายพันธุ์ (mutagen) และก่อลูกวิรูป (teratogen)

ภาคผนวก ก

การนับจำนวนเซลล์โดยวิธี Trypan blue exclusion

1. เตรียม 0.4% trypan blue โดยชั่ง 0.4 gm trypan blue ละลายใน sterile PBS 100 ml
2. นำ cell suspension ที่ได้ปรับให้มีความเข้มข้นที่เหมาะสม ในการนับใช้ 100 μ l cell suspension + 100 μ l 0.4% trypan blue ผสมให้เข้ากัน ทิ้งไว้ประมาณ 2 นาทีที่อุณหภูมิห้อง
3. ใส่สารละลายเซลล์ที่มี trypan blue 1 หยดใน haemocytometer และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์
4. นับจำนวนเซลล์ที่ไม่ติดสี และเซลล์ที่ติดสีน้ำเงินแยกกัน จำเป็นต้องรีบนับเซลล์ภายใน 3-5 นาทีหลังจากใส่ trypan blue (ถ้าทิ้งเซลล์ใน trypan blue เป็นเวลานาน ทุกเซลล์จะติดสีน้ำเงินหมด)
5. คำนวณ % เซลล์ที่มีชีวิตจากสูตรดังนี้:

$$\% \text{ เซลล์ที่มีชีวิต} = \frac{\text{จำนวนเซลล์ที่ติดสีน้ำเงิน}}{\text{จำนวนเซลล์ทั้งหมด (ติดสี+ไม่ติดสี)}} \times 100$$

ประวัติผู้วิจัย

ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบุญ จบการศึกษาปริญญาตรีสาขาวิชาวิทยาศาสตร์ทั่วไป(เคมี-ชีววิทยา) คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2516-2520) ได้รับทุนการศึกษารัฐบาลไทย (กรรมการข้าราชการพลเรือน) ไปศึกษาต่อระดับปริญญาโทสาขาวิชา Environmental Health (Toxicology) ที่ University of Michigan ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2521-2523) และทุนการศึกษาระดับปริญญาเอกสาขาวิชา Toxicology ของมหาวิทยาลัย Utah State University ในประเทศสหรัฐอเมริกา (พ.ศ. 2525-2529)

ก่อนปฏิบัติงานที่มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี เคยเป็นผู้ช่วยวิจัยสาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล (พ.ศ. 2525-2529) นักวิจัยสถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (พ.ศ. 2523-2525) postdoctoral fellow ที่ Medical College of Virginia (พ.ศ. 2529-2532) special fellow ที่ Cleveland Clinic Foundation (พ.ศ. 2529-2532) และ research associate ที่ Case Western Reserve University (พ.ศ. 2533-2537) ประเทศสหรัฐอเมริกา ปัจจุบันดำรงตำแหน่งผู้ช่วยศาสตราจารย์ สาขาวิชาชีววิทยา สำนักวิชาวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี

ประวัติผู้วิจัย

ชื่อ	ผศ. ดร. เบ็ญจมาศ จิตรสมบูรณ์
สถานภาพ	สมรส (รศ. ดร. ทวีช จิตรสมบูรณ์) มีบุตร 1 คน (นาย โภธิพล จิตรสมบูรณ์)
ประวัติการศึกษา	
ปริญญาตรี	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (2516-2520)
ปริญญาโท	University of Michigan (2521-2523)
ปริญญาเอก	Utah State University (2525-2529)
ประวัติการทำงาน	
2520-2521	ผู้ช่วยวิจัย สาขาวิชาชีวเคมี มหาวิทยาลัยมหิดล
2523-2525	นักวิจัย สถาบันวิจัยสภาวะแวดล้อม จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2529-2532	Postdoctoral fellow, Medical College of Virginia, USA
2532-2533	Special fellow, Cleveland Clinic Foundation, USA
2533-2537	Research associate, Case Western Reserve University, USA
2538-ปัจจุบัน	อาจารย์ประจำสาขาวิชาชีววิทยา มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
สมาชิกสมาคม	
	สมาชิกสโมสรมหาวิทยาลัยเทคโนโลยีสุรนารี
	สมาชิกสมาคมพิษวิทยาแห่งประเทศไทย
	สมาชิกสมาคมเทคโนโลยีชีวภาพ
	สมาชิก Thai Environmental Mutagens Society
	สมาชิกสมาคมเทคโนโลยีสิ่งแวดล้อมเพื่อธุรกิจ