



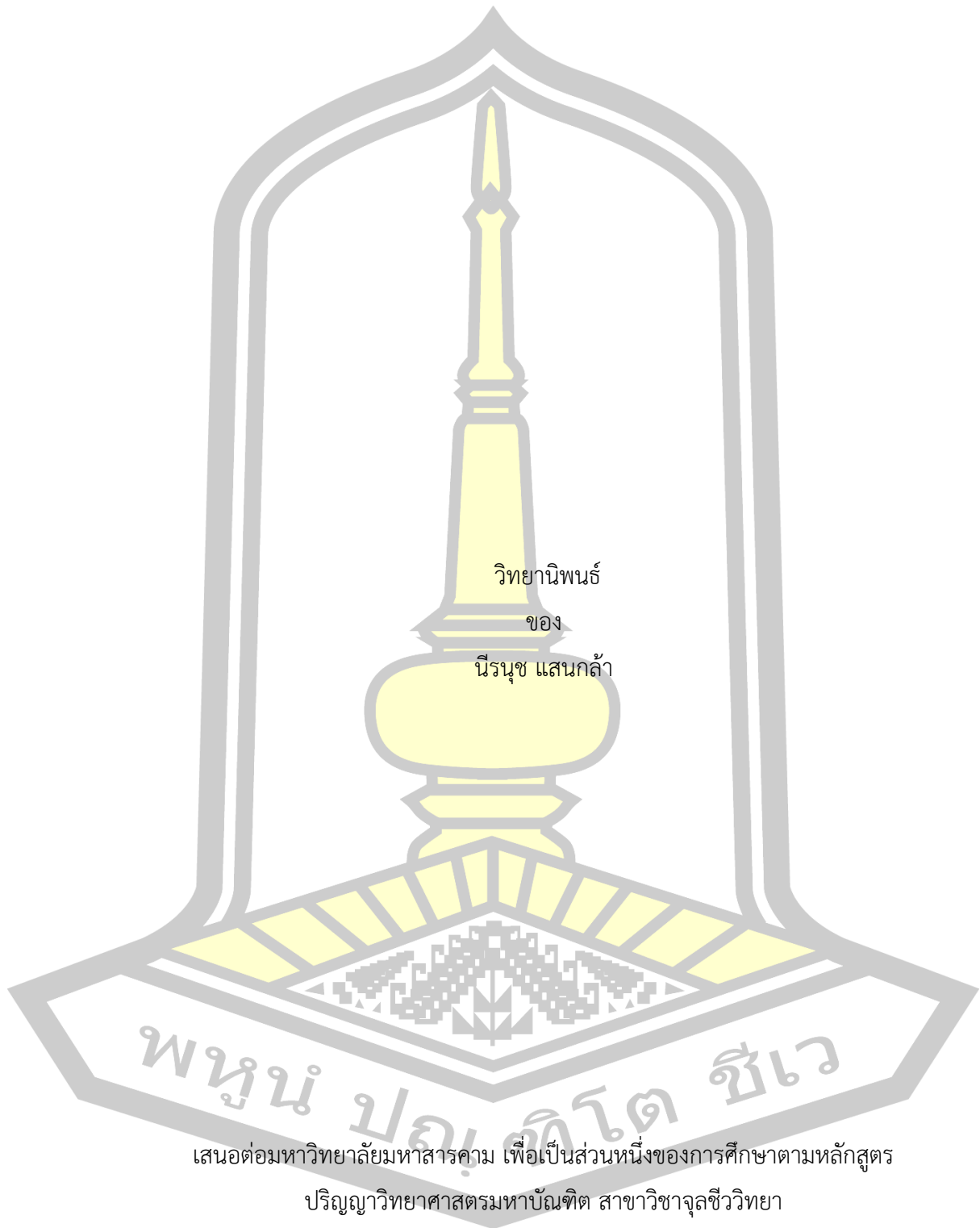
ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็ม หนามพุงดอ หนามแดง และขลุ่

วิทยานิพนธ์
ของ
นිරินุช แสนกล้า

เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา
พฤศจิกายน 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็ม หนามพุงดอ หนามแดง และขลุ่



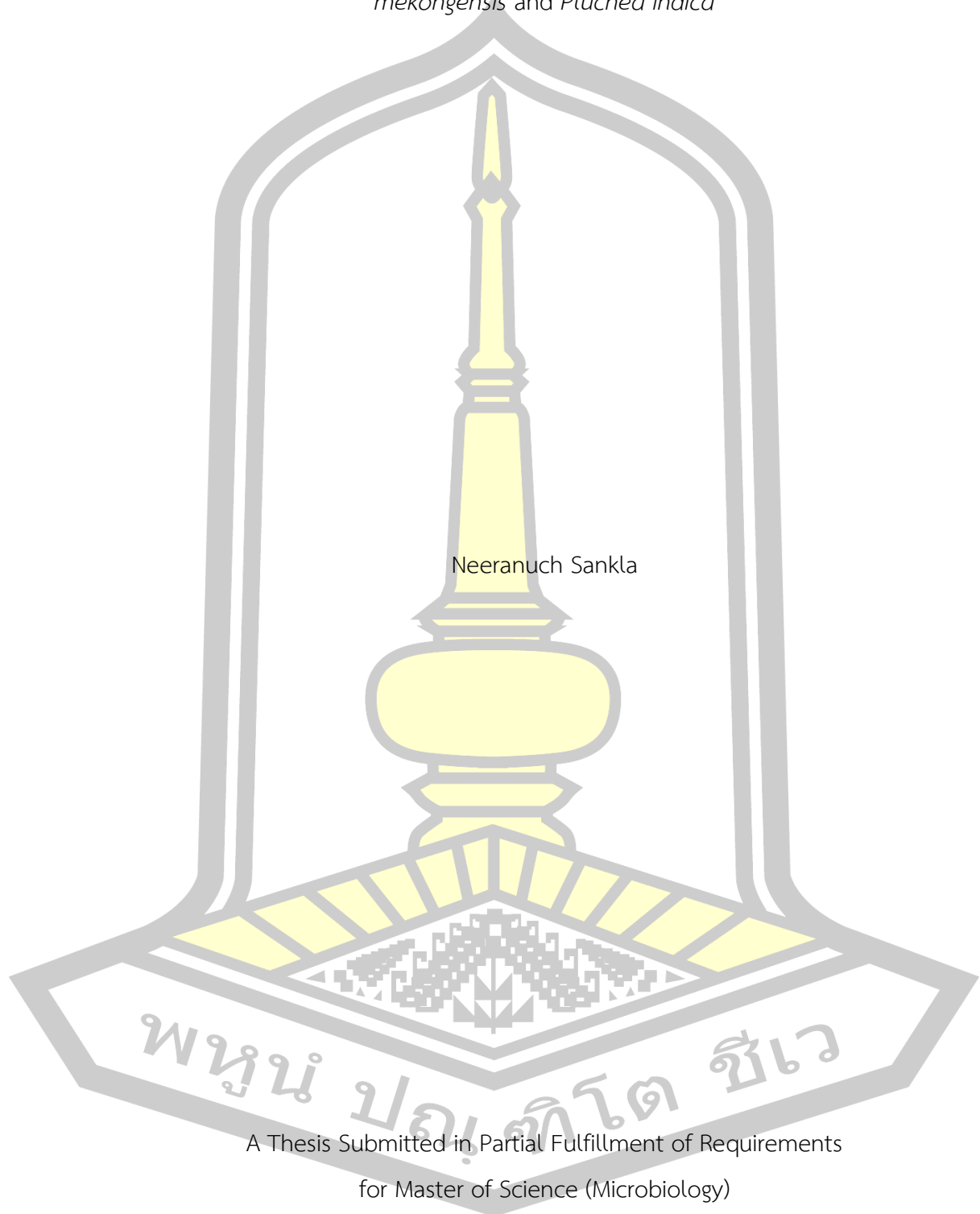
เสนอต่อมหาวิทยาลัยมหาสารคาม เพื่อเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา

พฤษภาคม 2563

ลิขสิทธิ์เป็นของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

Biological Activity of Crude Extracts from Halophytes *Azima sarmentosa*, *Maytenus mekongensis* and *Pluchea indica*



Neeranuch Sankla

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of Requirements
for Master of Science (Microbiology)

November 2020

Copyright of Mahasarakham University



คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ ได้พิจารณาวิทยานิพนธ์ของนางสาวนිරุช แสนกล้า
แล้วเห็นสมควรรับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

..... ประธานกรรมการ

(อ. ดร. ชรินญา พิมพ์สอน)

..... อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(อ. ดร. นุชสุภา สุนทมาลา)

..... กรรมการ

(รศ. ดร. ขนิษฐา สมตระกูล)

..... กรรมการ

(ผศ. ดร. วรนนต์ นาคบรรพต)

มหาวิทยาลัยอนุมัติให้รับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร
ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาจุลชีววิทยา ของมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

.....
(ศ. ดร. ไพโรจน์ ประมวล)

คณบดีคณะวิทยาศาสตร์

.....
(รศ. ดร. กริสน์ ชัยมูล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

ชื่อเรื่อง	ฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็ม หนามพุงดอ หนามแดง และขลุ่		
ผู้วิจัย	นิรันุช แสนกล้า		
อาจารย์ที่ปรึกษา	อาจารย์ ดร. นุชสุภา สุนทมาลา		
ปริญญา	วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต	สาขาวิชา	จุลชีววิทยา
มหาวิทยาลัย	มหาวิทยาลัยมหาสารคาม	ปีที่พิมพ์	2563

บทคัดย่อ

ดินที่ใช้ในการเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยยังคงประสบกับปัญหาดินเค็ม ซึ่งเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออาชีพเกษตรกร เนื่องจากดินในบริเวณพื้นที่ดินเค็มส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และส่งผลให้มีผลผลิตทางการเกษตรต่ำและกลายเป็นพื้นที่ว่างเปล่า ไม่มีพืชเจริญ อย่างไรก็ตามพบว่าพืชบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ดินเค็มได้ โดยพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการทนเค็มได้แตกต่างกัน ซึ่งภาวะดินเค็มอาจส่งเสริมให้พืชในบริเวณนี้มีสารสำคัญ ที่มีคุณสมบัติน่าสนใจในการนำไปใช้ประโยชน์ในด้านสมุนไพรได้ พืชสมุนไพรจึงได้รับความสนใจ และมีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมยาและการใช้ในครัวเรือน ปัจจุบันจึงมีการศึกษาสมุนไพรทางการแพทย์เป็นจำนวนมาก ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาพืชชอบเค็มที่อาจมีคุณสมบัติและมีสารสำคัญที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับสมุนไพรในอนาคต ซึ่งได้ทำการศึกษาพืชชอบเค็ม 3 ชนิด ได้แก่ หนามพุงดอ หนามแดง และขลุ่ โดยทำการเก็บตัวอย่างพืชและแยกส่วนของพืชออกเป็นส่วนต่าง ๆ และสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ 70% เอทานอล โดยวิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์ จากนั้นนำสารสกัดหยาบไปศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นด้วยวิธี total phenolic content (TPC) และ total flavonoid content (TFC) คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS คุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ด้วยวิธี agar disc diffusion และหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) และการทดสอบการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC) ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงด้วยวิธี hemolysis assay ประเมินความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ด้วยวิธี MTT assay วิเคราะห์ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อกระบวนการกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) และวิเคราะห์การแสดงออกของยีน tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) ของเซลล์แมโครฟาจด้วยวิธี reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) จากงานวิจัยนี้พบว่าในการสกัดสารสกัดหยาบจากพืชทั้ง 3 ชนิดมี %yield ในส่วนสกัดใบสูงที่สุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนต่าง ๆ ของพืช โดย

หนามแดงจะมี %yield ของใบสูงกว่าพีชอีก 2 ชนิด พบปริมาณสารประกอบฟีนอลและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุดในการสกัดส่วนใบสำหรับหนามพุดและขลุ้ ขณะทีหนามแดงพบมากในส่วนราก ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระพบว่าดอกขลุ้มีฤทธิ์การต้านออกซิเดชันมากที่สุดโดยมีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ ascorbic acid นอกจากนี้ปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมีความสัมพันธ์กับฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในวิธี DPPH อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในระดับสูงมากสำหรับหนามแดงและระดับสูงในขลุ้ สารสกัดหยาบพีชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0-512 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ รวมถึงเซลล์เม็ดเลือดแดง สารสกัดหยาบชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 50 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นให้เซลล์จับกินและทำลาย *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 ได้ดีทีสุดตามด้วย *Staphylococcus aureus* DMST 8840 สารสกัดหยาบหนามพุดส่วนใบที่ความเข้มข้น 5 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และหนามพุดส่วนลำต้น ที่ความเข้มข้น 5 50 และ 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร กระตุ้นให้เซลล์จับกินและทำลาย *Salmonella Typhimurium* TISTR 2511 ในขณะที่สารสกัดหยาบหนามพุดส่วนราก หนามแดง และขลุ้ กระตุ้นให้มีการจับกิน *Escherichia coli* ATCC 25922 และ *S. Typhimurium* TISTR 2511 ในชั่วโมงที่ 2 มากกว่าชั่วโมงที่ 1 สารสกัดหยาบจากพีชชอบเค็มทั้ง 11 ส่วน สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TNF-alpha ได้ ในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก โดยสารสกัดหยาบส่วนรากและลำต้น หนามพุด ลำต้นและใบหนามแดง ดอกและเปลือกนอกของขลุ้ กระตุ้นการแสดงออกของ TNF-alpha สูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นของสารสูงขึ้น ในขณะที่เดียวกัน พบว่า สารสกัดหยาบส่วนใบขลุ้ลดการแสดงออกของ TNF-alpha เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร ลดลงในระดับ 1X PBS+hydrogen peroxide (H₂O₂) จากการวิจัยนี้แสดงให้เห็นว่า ลำต้นและใบของหนามพุดและหนามแดง และดอกและใบของขลุ้ อาจนำไปพัฒนาใช้ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมโครฟาจสำหรับรักษาโรคต่าง ๆ ในผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำ มีการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน หรือส่งเสริมการตอบสนองเมื่อมีการติดเชื้อ เช่น โรคเท้าช้าง เป็นต้น ในทางตรงกันข้าม ใบของขลุ้ อาจนำมาพัฒนาเป็นยาสมุนไพร สำหรับใช้ในการรักษาบาดแผล และการต้านการอักเสบ เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหัวใจและหลอดเลือด เป็นต้น ดังนั้นการศึกษานี้จึงอาจนำมาซึ่งการส่งเสริมการปลูกพืชที่ไม่ได้ใช้ประโยชน์ในพื้นที่ดินเค็มเพื่อสร้างรายได้ให้เกษตรกร อย่างไรก็ตามยังคงต้องมีการศึกษาผลกระทบการออกฤทธิ์ของสารเพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ : เซลล์แมโครฟาจ, ด้านจุลินทรีย์, ด้านอนุมูลอิสระ, กระบวนการฟาโกไซโทซิส, พีชชอบเค็ม

TITLE Biological Activity of Crude Extracts from Halophytes *Azima sarmentosa*, *Maytenus mekongensis* and *Pluchea indica*

AUTHOR Neeranuch Sankla

ADVISORS Nuchsupha Sunthamala , Ph.D.

DEGREE Master of Science **MAJOR** Microbiology

UNIVERSITY Mahasarakham **YEAR** 2020
University

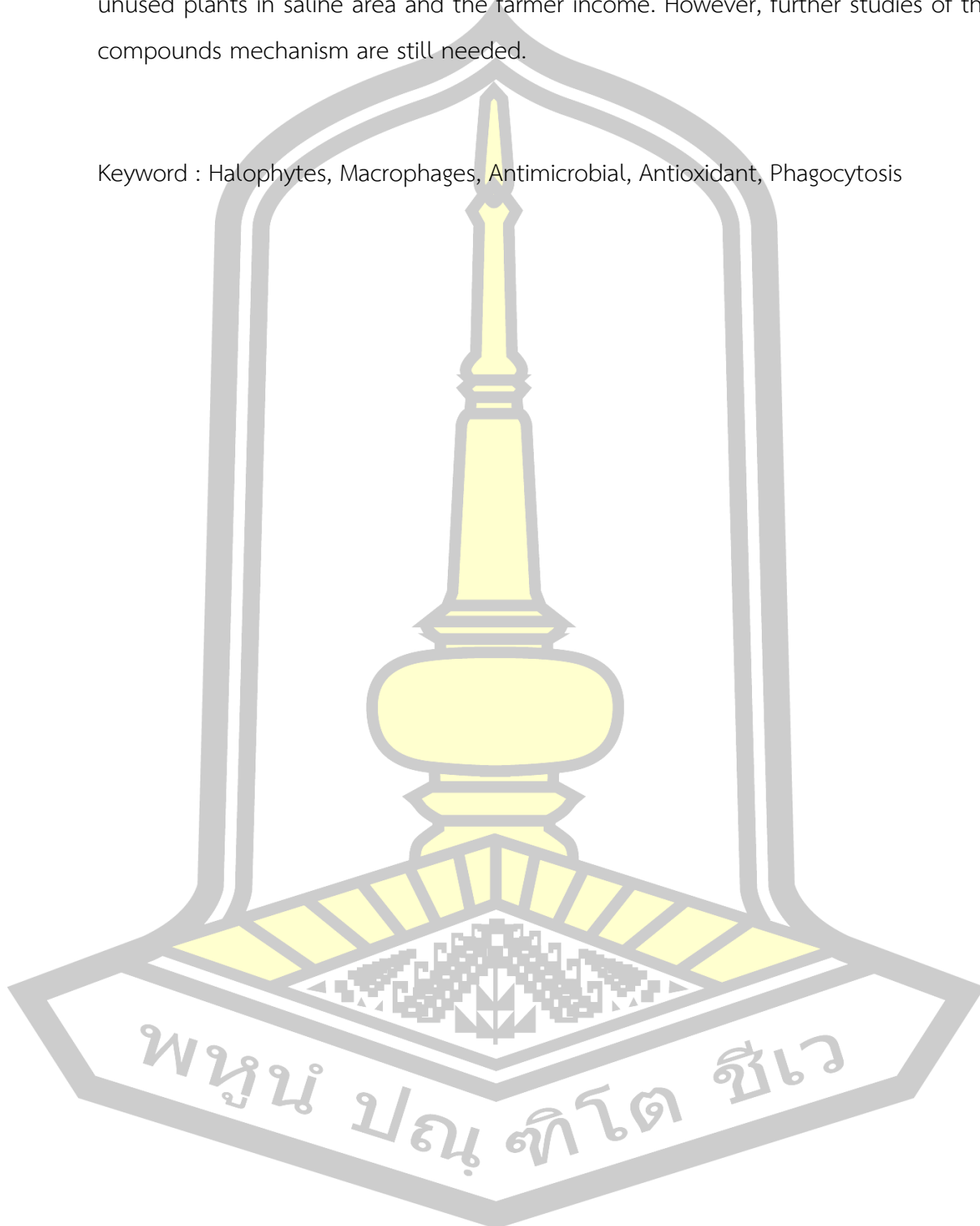
ABSTRACT

Land use in agriculture in the Northeastern Thailand is still faced with the problem of soil salinity, which is an important problem to the farmers. The soil in this area affect plant growth and result in low agricultural productivity and become to be an empty area with no vegetation. However, there are some plants that can grow in saline soil with different ability to tolerate salt. Soil conditions may promote plants in this area to contain important substances with interesting properties for medicinal uses. Medicinal plants have been interested and are important in the pharmaceutical industry and the household, which is present in several studies. Therefore, the researcher is interested in studying the halophytes that may have properties and contain important substances that can be developed into herbal recipes in the future. Three types of the halophytes were studied: *Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f., *Maytenus mekongensis* and *Pluchea indica*. Plant samples were collected and plant parts were separated into parts and extracted with 70% ethanol by reflux extraction. The crude extract was then studied using the phytochemical properties of total phenolic content (TPC) and total flavonoid content (TFC), properties of an antioxidant by DPPH and ABTS methods, antimicrobial properties by agar disc diffusion and MIC / MBC methods, evaluate the toxicity of the crude extract of red blood cells by hemolysis assay, assessment of the toxicity of a crude extract on human lymphocytes by MTT assay, analysis of the activity of crude extracts on phagocytosis process, and the tumor necrosis factor-alpha (TNF-alpha) gene expression of macrophage cells was analyzed by reverse transcription polymerase chain reaction

(RT-PCR) method. The study found that the crude extracts from all 3 types of plants had the highest % yield in leaf extraction when compared to other parts of the plant, the leaves of *Maytenus mekongensis* has a higher % yield than the other 2 plants. The high phenolic and flavonoid contents were found in the leaves extracts of *Azima sarmentosa* and *Pluchea indica* and root extract of *Maytenus mekongensis*. The study of antioxidant activity, it was found that flowers of *Pluchea indica* has the most anti-oxidation activity similar to the ascorbic acid. In addition, total phenolic content and total flavonoid content were significantly positive correlated with antioxidant activity in DPPH method, at very strong level for *Maytenus mekongensis* and strong level for *Pluchea indica*. Crude extracts of 3 halophytes were non-toxic to white blood cell (WBCs), monocytes (CD14⁺), non-monocytes (CD14⁻) and red blood cells at a concentration of 0-512 ug/ml. Crude extracts of 3 halophytes stimulated the macrophage phagocytic activity and killing activity to *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654, followed by *Staphylococcus aureus* DMST 8840 at concentrations of 5, 50 and 500 ug/ml. The leaves extract of *Azima sarmentosa* at 5 ug/ml and stem extract of *Azima sarmentosa* at 5, 50 and 500 ug/ml stimulate the macrophage phagocytic activity and killing activity to *Salmonella* Typhimurium TISTR 2511, while *Maytenus mekongensis*, *Pluchea indica* and root extract of *Azima sarmentosa* stimulating macrophage phagocytic activity in 2 h greater than the 1 h to *Escherichia coli* ATCC 25922 and *S. Typhimurium* TISTR 2511. Crude extracts from 11 fractions of the saline soil plants were able to stimulate TNF-alpha expression in all three selected concentrations. The crude extracts of the root and stem of หนามพุงตอ, flower and bark of *Pluchea indica*, stimulate TNF-alpha expression in dose-dependent manners. In the other hand, it was found that the crude extract from the leaf of *Pluchea indica* was found to the reduction of TNF-alpha mRNA expression in the high concentration (500 ug/mL) was reduced at the level 1X PBS + hydrogen peroxide (H₂O₂). This research shows that the stems and leaves of *Azima sarmentosa* and *Maytenus mekongensis*, flowers and leaves of *Pluchea indica* might be used to stimulate the activity of macrophages for the treatment of various diseases including, immunocompromised host with immune suppression or the filaria infection. In contrast, the leaves of *Pluchea indica* might be used for wound healing and anti-inflammation such as rheumatoid

arthritis and cardiovascular disease. This study may lead to increasing the value of unused plants in saline area and the farmer income. However, further studies of the compounds mechanism are still needed.

Keyword : Halophytes, Macrophages, Antimicrobial, Antioxidant, Phagocytosis



กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิต (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความรู้และความช่วยเหลืออย่างสูงยิ่งจากรองศาสตราจารย์ ดร. อภิเดช แสงดี ประธานกรรมการบริหารหลักสูตร อาจารย์ ดร. นุชสุภา สุนทมาลา กรรมการควบคุมวิทยานิพนธ์ อาจารย์ ดร. สพ.ญ. ชรินญา พิมพ์สอน ประธานกรรมการสอบ รองศาสตราจารย์ ดร. ขนิษฐา สมตระกูล และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณนต์ นาคบรรพต กรรมการสอบ

ขอขอบพระคุณ อาจารย์ ดร. นุชสุภา สุนทมาลา อาจารย์ ดร. สุรศักดิ์ ชันคำ อาจารย์ ดร.สุจิตรา มณีรัตน์ อาจารย์ ดร.รุ่งฤดี ทิวทอง ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วรรณนต์ นาคบรรพต และรองศาสตราจารย์ ดร.ขวัญเรือน นาคสุวรรณกุล ผู้ให้การช่วยเหลือสนับสนุนการวิจัย

ขอขอบคุณบุคลากรศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม ที่ให้ความช่วยเหลือและอำนวยความสะดวกในการใช้อุปกรณ์ เครื่องมือในการวิจัย

สุดท้ายนี้ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ รวมถึงญาติพี่น้องทุกคนที่คอยดูแลอบรมสั่งสอน ให้ความสนับสนุน รวมทั้งให้กำลังใจในการทำงานวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วง

นිරนุช แสนกล้า



สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	ฉ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฌ
สารบัญ.....	ญ
สารบัญตาราง.....	ฒ
สารบัญภาพ.....	ณ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	4
1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ.....	4
1.4 ขอบเขตงานวิจัย.....	4
1.5 สถานที่ทำการวิจัย.....	5
บทที่ 2 การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง.....	6
2.1 ดินเค็ม.....	6
2.1.1 ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	7
2.1.2 การจำแนกดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	7
2.2 พืชชอบเค็ม.....	8
2.2.1 หนามพุงดอและสารสกัดหนามพุงดอ.....	9
2.2.2 หนามแดงและสารสกัดหนามแดง.....	9
2.2.3 ขลุ่และสารสกัดขลุ่.....	10
2.3 พืชสมุนไพรไทยและตำรับยาไทย.....	11

2.4 ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system).....	12
2.4.1 ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด.....	12
2.4.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ	13
2.5 เซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน (immune cells).....	14
2.5.1 เซลล์แมโครฟาจ (macrophage).....	14
2.5.2 เซลล์โมโนไซต์ (monocytes).....	15
2.5.3 เซลล์เดนไดรติกส์ (dendritic cells (DCs)).....	16
2.5.4 ลิมโฟไซต์ชนิดที (T cells).....	17
2.5.5 Natural killer (NK) cells	17
2.6 เซลล์แมโครฟาจและกลไกการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ.....	18
2.7 ไซโตไคน์ (cytokines).....	21
2.8 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway	22
2.9 การรักษาแผนปัจจุบัน.....	25
บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย	28
3.1 อุปกรณ์และวิธีการ.....	28
3.1.1 ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร.....	28
3.1.2 ตัวอย่างพืชชอบเค็ม.....	28
3.1.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย (เลขที่การรับรอง IBC09-10/2563)	28
3.2 วิธีการทดลอง.....	29
3.2.1 ระยะที่ 1 การขอรับการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์ และขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ.....	29
3.2.1.1 ขอรับการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์	29
3.2.1.2 ขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ.....	29

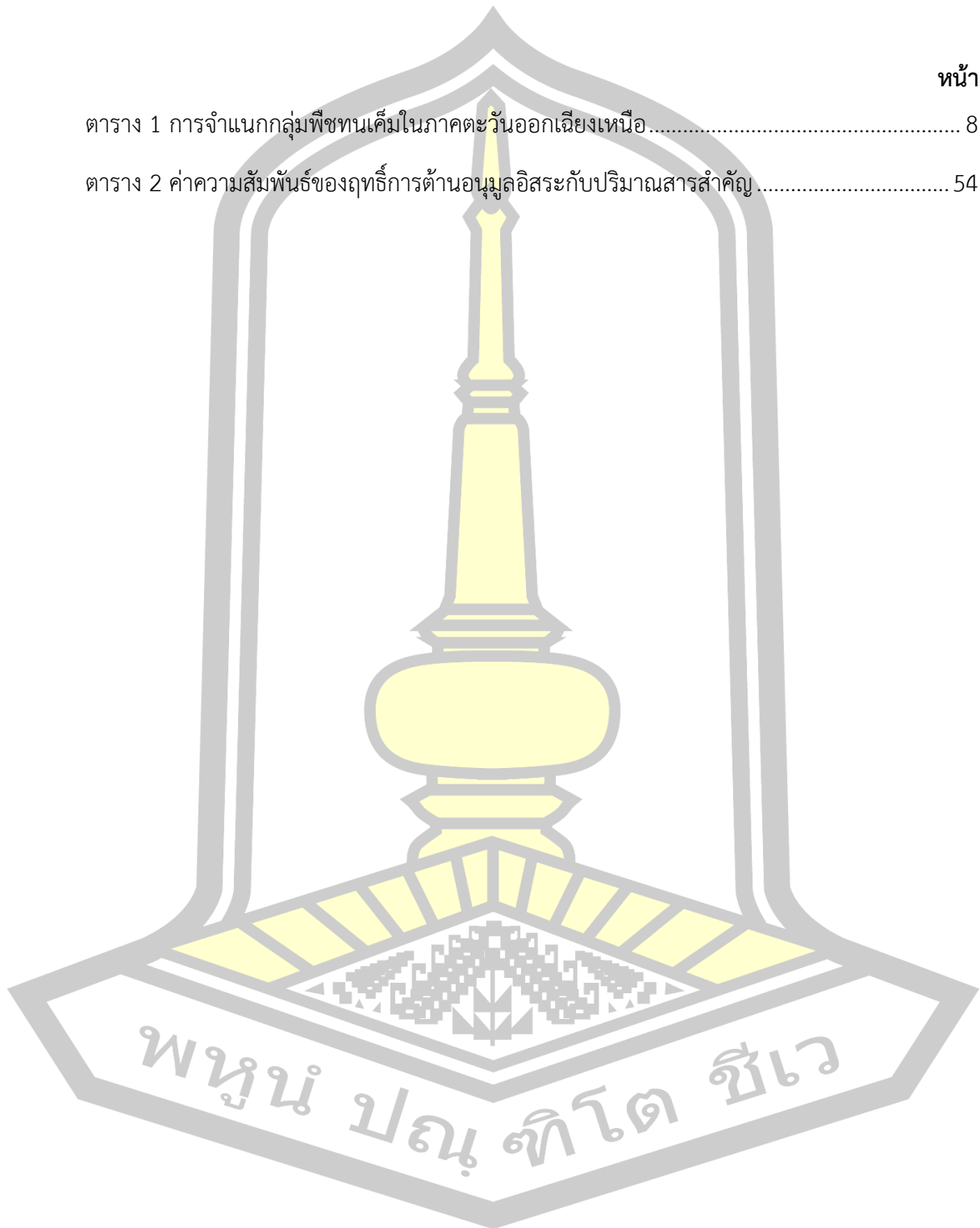
3.2.2	ระยะที่ 2 การเตรียมตัวอย่างพืชชอบเค็มสำหรับการสกัดสารสกัดหยาบ การศึกษาคุณสมบัติของสารสำคัญของสารสกัดหยาบ คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์.....	29
3.2.2.1	การเก็บและการเตรียมตัวอย่างพืช.....	29
3.2.2.2	กระบวนการสกัดสารจากพืชชอบเค็ม.....	29
3.2.2.3	การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC).....	30
3.2.2.4	การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC).....	30
3.2.2.5	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical.....	30
3.2.2.6	การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS).....	31
3.2.2.7	การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญ.....	31
3.2.2.8	การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion.....	32
3.2.2.9	การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) และการทดสอบการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC) ของสารสกัดหยาบโดยวิธี micro dilution.....	32
3.2.3	ระยะที่ 3 การศึกษาการความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ แบบ ex vivo.....	33
3.2.3.1	การแยกเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (CD14 ⁺) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cells (WBCs)) และการเพาะเลี้ยงเซลล์ภูมิคุ้มกัน.....	33
3.2.3.2	การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็ม (cytotoxicity test) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซไซโตไซต์ โดยการวิเคราะห์หา % viable cells.....	33
3.2.3.3	การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธี hemolysis assay.....	34

3.2.4	ระยะที่ 4 การศึกษาการการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจต่อสารสกัดจากพืชชอบเค็มแบบ <i>ex vivo</i> โดยการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว จากอาสาสมัครที่ปกติในการทดลอง	35
3.2.4.1	การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยง	35
3.2.4.2	การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ	35
3.2.4.3	การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งต่อการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ	36
3.3	การวิเคราะห์ผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ	38
บทที่ 4	ผลการทดลอง	39
4.1	การเตรียมตัวอย่างพืชชอบเค็มและการสกัดสารสกัดยับยั้ง	39
4.2	การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น	43
4.3	การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS	45
4.4	การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญ	54
4.5	การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์	56
4.6	การศึกษาผลของสารสกัดยับยั้งพืชชอบเค็มต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์	56
4.7	การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษของสารสกัดยับยั้งพืชชอบเค็มต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธี hemolysis assay	61
4.8	การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยง	63
4.9	การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ	65
4.10	การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจ	70
4.11	การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งต่อการแสดงออกของยีน IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ	73
บทที่ 5	อภิปรายผลการทดลอง	75

บรรณานุกรม.....	87
ภาคผนวก.....	99
ภาคผนวก ก การเตรียมสารเคมีและอาหารเลี้ยงเชื้อ.....	100
ภาคผนวก ข การเตรียมเชื้อแบคทีเรีย.....	105
ภาคผนวก ค พื้นที่เก็บตัวอย่างพืช การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธีรีฟลักซ์.....	107
ภาคผนวก ง ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น.....	113
ภาคผนวก จ ผลการตรวจสอบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ.....	118
ภาคผนวก ฉ การตรวจสอบฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบ.....	135
ภาคผนวก ช การศึกษาผลของสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาว (WBCs) เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (CD14 ⁺) และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ (CD14 ⁻).....	152
ภาคผนวก ฌ การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษของสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงโดยวิธี hemolysis assay.....	165
ภาคผนวก ฉ การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยงตารางผนวกที่ ฉ1 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงออกของ GAPDH ในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน โดยโปรแกรม ImageJ.....	177
ภาคผนวก ฎ การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ.....	181
ภาคผนวก ฏ การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจ.....	186
ภาคผนวก ฐ การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการแสดงออกของยีน IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ.....	197
ภาคผนวก ร การรับรองจริยธรรมการวิจัย.....	203
ประวัติผู้เขียน.....	206

สารบัญตาราง

	หน้า
ตาราง 1 การจำแนกกลุ่มพืชทนเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ.....	8
ตาราง 2 ค่าความสัมพันธ์ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารสำคัญ.....	54



สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1 พื้นที่ดินเค็ม หมู่บ้านโพนสิม ตำบลหัวนาคำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์.....	6
ภาพที่ 2 การพัฒนาการจากเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจ.....	20
ภาพที่ 3 การ polarization ของเซลล์แมโครฟาจชนิดต่าง ๆ.....	20
ภาพที่ 4 หน้าที่และการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ.....	21
ภาพที่ 5 ERK MAPK pathway.....	23
ภาพที่ 6 JNK MAPK pathway.....	24
ภาพที่ 7 p38 MAPK pathway.....	25
ภาพที่ 8 แสดงส่วนต่าง ๆ ของหนามพุดอ ได้แก่ ราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) และ % yield ของสารสกัดหนามพุดจากส่วนต่าง ๆ (ง).....	40
ภาพที่ 9 แสดงส่วนต่าง ๆ ของหนามแดง ได้แก่ ราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) และ % yield ของสารสกัดหนามแดงจากส่วนต่าง ๆ (ง).....	41
ภาพที่ 10 แสดงส่วนต่าง ๆ ของขลุ้ ได้แก่ ราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) เปลือกนอก (จ) และ % yield ของสารสกัดขลุ้จากส่วนต่าง ๆ (ฉ).....	42
ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐาน gallic acid (ก) และกราฟมาตรฐาน quercetin (ข).....	44
ภาพที่ 12 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของพืชหนามพุดอ (ก) หนามแดง (ค) และขลุ้ (จ) และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของพืชหนามพุดอ (ข) หนามแดง (ง) และขลุ้ (ฉ).....	45
ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid จากวิธี DPPH (ก) และกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid จากวิธี ABTS (ข).....	47
ภาพที่ 14 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชหนามพุดอส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC ₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดอจากวิธี DPPH (ง).....	48
ภาพที่ 15 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชหนามพุดอส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC ₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดอจากวิธี ABTS (ง).....	49

ภาพที่ 16 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชหนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC ₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดงจากวิธี DPPH (ง).....	50
ภาพที่ 17 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชหนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC ₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดงจากวิธี ABTS (ง).....	51
ภาพที่ 18 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชขลุ้ส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) และเปลือกนอก (จ) และแสดงค่า IC ₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชขลุ้จากวิธี DPPH (ฉ).....	52
ภาพที่ 19 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชขลุ้ส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) และเปลือกนอก (จ) แสดงค่า IC ₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชขลุ้จากวิธี ABTS (ฉ).....	53
ภาพที่ 20 กราฟความสัมพันธ์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ฤทธิ์กับการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบจากพืชขอบเค็ม ...	55
ภาพที่ 21 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนราก (ก-ค) ลำต้น (ง-ฉ) และใบ (ช-ฉ) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ ด้วยวิธี MTT assay	58
ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนราก (ก-ค) ลำต้น (ง-ฉ) และใบ (ช-ฉ) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ ด้วยวิธี MTT assay	59
ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบขลุ้ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (ก ง ช ญ และฐ) เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (ข จ ช ฎ และท) และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ (ค ฉ ฎ และฒ) ด้วยวิธี MTT assay.....	60
ภาพที่ 24 ความเป็นพิษของ Propolis (positive control) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (ก) เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (ข) และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ (ค) ด้วยวิธี MTT assay	61
ภาพที่ 25 ความเป็นพิษของสารสกัดพืชหนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธี hemolysis assay	62
ภาพที่ 26 ความเป็นพิษของสารสกัดพืชหนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธี hemolysis assay	62
ภาพที่ 27 ความเป็นพิษของสารสกัดพืชขลุ้ส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) และเปลือกนอก (จ) ต่าง ๆ ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธี hemolysis assay	63
ภาพที่ 28 การแสดงออกของ CD14 (จ-ฉ) และ CD16 (ค-ง) ในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน โดยมี GAPDH ที่เป็นยีน internal control (ก-ข).....	64

ภาพที่ 29 ค่า CFU (cells)/macrophage หลังการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจต่อ
แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของหนามพุงดอ..... 67

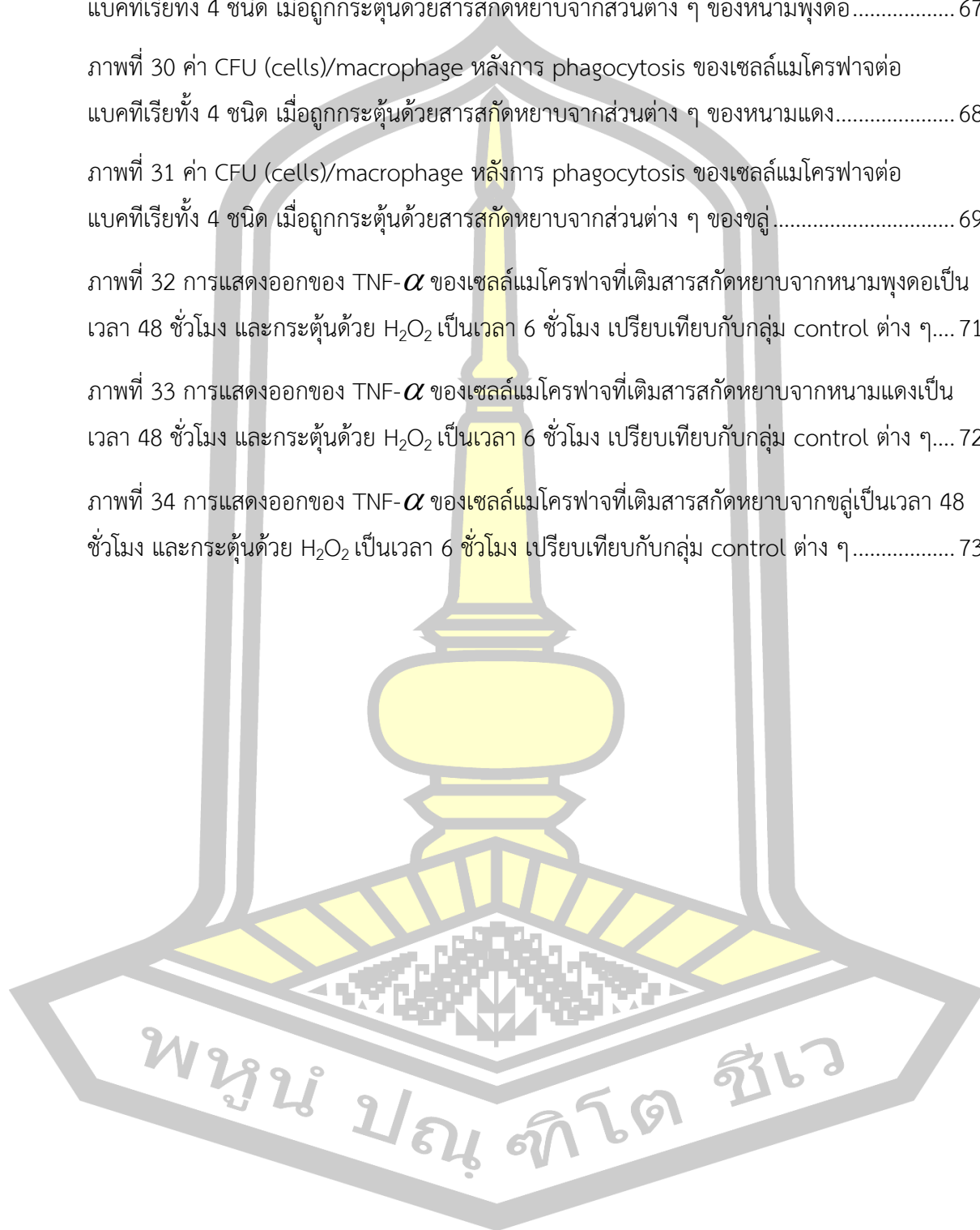
ภาพที่ 30 ค่า CFU (cells)/macrophage หลังการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจต่อ
แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของหนามแดง..... 68

ภาพที่ 31 ค่า CFU (cells)/macrophage หลังการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจต่อ
แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของขลุ่..... 69

ภาพที่ 32 การแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบจากหนามพุงดอเป็น
เวลา 48 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ต่าง ๆ.... 71

ภาพที่ 33 การแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบจากหนามแดงเป็น
เวลา 48 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ต่าง ๆ.... 72

ภาพที่ 34 การแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบจากขลุ่เป็นเวลา 48
ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ต่าง ๆ..... 73



บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาที่ทำการวิจัย

ปัจจุบันดินที่ใช้ในการเกษตรในภาคตะวันออกเฉียงเหนือของประเทศไทยยังคงประสบกับปัญหาดินเค็ม ซึ่งเป็นอีกปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออาชีพเกษตรกร เนื่องจากดินในบริเวณพื้นที่ดินเค็มส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และส่งผลให้มีผลผลิตทางการเกษตรต่ำ เนื่องจากดินเค็ม (saline soil) เป็นดินที่มีปริมาณของเกลือชนิดต่าง ๆ ที่ละลายน้ำได้ ปะปนในเนื้อดินสูง ทำให้เป็นอันตรายต่อพืช พืชไม่สามารถที่จะดูดน้ำเข้ายังระบบรากได้สะดวก หรือเกิดความเป็นพิษต่อพืช ดังนั้นบริเวณที่เป็นดินเค็มจึงมีลักษณะเป็นพื้นที่ว่างเปล่า ไม่มีพืชเจริญ หรือมีวัชพืชขึ้นเพียงเบาบาง และในกรณีที่เป็นดินเค็มจัดจะเห็นคราบเกลือสีขาวบนผิวดินเป็นบริเวณกว้าง ส่วนในฤดูฝนแม้จะไม่เห็นคราบเกลือ แต่สังเกตได้จากพื้นที่ที่ไม่มีพืชปกคลุมเหมือนบริเวณใกล้เคียง (กรมทรัพยากรธรณี, 2550) อย่างไรก็ตามพบว่ามีพืชบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ดินเค็มได้ โดยพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการทนเค็มได้แตกต่างกัน หรือพืชชนิดเดียวกันแต่ต่างสายพันธุ์กันก็มีความทนเค็มได้ต่างกัน พืชทนเค็มเป็นพืชที่สามารถทนต่อดินที่มีความเค็ม 0.5-0.75% หรือ 8-12 เดซิซีเมนต่อเมตร (ds/m) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มของดินเค็มจัด (กรมพัฒนาที่ดิน, 2561) จากการศึกษาพื้นที่ดินเค็มแถบแม่น้ำชีในช่วงปี พ.ศ. 2556 พบว่ามีพืชจำนวน 5 ชนิดที่จัดเป็นพืชชอบเค็ม (halophytes) ได้แก่ หนามพุงดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) สร้อยนกเขา (*Synostema bacciformis*) ชลู่ (*Pluchea indica*) และพีชวงศ์ผักเบี้ย (*Gisekia pharnaceoides*) (Deeprom et al., 2015; Poodeetip et al., 2013) โดยพืชที่พบเป็นส่วนใหญ่ คือ หนามพุงดอ หนามแดง และชลู่

หนามพุงดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์ Salvadoraceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม มีหนามแหลม 1-2 อัน ตามซอกใบ เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นน้ำมัน เนื่องจากใบมีน้ำมันมัสตาร์ดซึ่งเป็นสาร glucosinolates จากการศึกษาสารสำคัญที่พบในหนามพุงดอ พบว่า ส่วนสกัดใบมีสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ 1) terxerol 2) triterpenoid I และ 3) taraxerone ส่วนสกัดรากมีสารสำคัญที่พบ 7 ชนิด ได้แก่ 1) stigmasterol 2) triterpenoid II 3) 1-methoxy-indole-3-carboxaldehyde 4) 1H-indole-3-carboxaldehyde 5) 5-hydroxy methylefurfuraldehyde 6) stigmasteryl-3-O- beta-D-glucopyranoside และ 7) 1-methoxy-indole-3-Acetonitrile โดย สาร 2 ชนิด คือ 1-methoxy-indole-3-acetonitrile และ 1-methoxy-indole-3-carboxaldehyde พบว่ามีฤทธิ์เป็นพืชต่ออาร์ทีเมียหรือไรทะเล (*Artemia*

salina Linn.) ที่ ระดับ lethal concentration fifty (LC₅₀) เท่ากับ 0.09 และ 9.24 µg/mL ตามลำดับ นอกจากนี้ประเทศไทยมีการใช้หนามพุงตอในเชิงสมุนไพรโดยใช้รากแก้ไข้และลดการอักเสบ รวมทั้งมีการใช้เพื่อรักษาโรคทางผิวหนัง (Sunintaboon, 1999) หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) มีสรรพคุณรักษาโรคน้ำเหลือง (โรคตาแดง) ในเด็ก จากการศึกษาสารสำคัญที่พบในหนามแดงพบว่า ส่วนสกัดรากมีสาร sesquiterpene alkaloids ใหม่ 8 ชนิด ได้แก่ 1) 7-epi-mekongensine 2) mekongensine (2,9'-di-O-acetyl-5-O-benzoyl-5-deacetyl-wilforidine) 3) 9'-deacetoxymekongensine 4) 1-O-benzoyl-1-deacetylmekongensine 5) 7-epi-euojaponine A 6) 1-O-benzoyl-1-deacetyl-9'-deacetoxymekongensine 7) 7-epi-5-O-benzoyl-5-deacetylperitassine A และ 8) 2-O-benzoyl-2-deacetylmayteine และ สาร sesquiterpene alkaloids 4 ชนิด ที่รู้จักอยู่แล้ว 4 ชนิด ได้แก่ 1) euonymine 2) mayteine 3) 7-epi-mayteine และ 4) 7-epi-euonymine (Lhinhatrakool *et al.*, 2011) และยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน ชลู่ (*Pluchea indica*) เป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร มีรายงานว่าสารสกัดจากรากที่สกัดจากเฮกเซนยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกกลีโอบลาสโตมา (glioblastoma) ลดจำนวนประชากรของเซลล์ในเฟส S และ G2/M ได้อย่างชัดเจน สารสกัดหยาบของใบและรากชลู่ที่สกัดจากน้ำ ทำให้เกิดการยับยั้งการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (proliferation) และการมีชีวิตรอดของเซลล์ (viability) ของเซลล์มะเร็งสมอง (GBM8401 cells) และเซลล์มะเร็งปากมดลูก (HeLa cells) (Cho *et al.*, 2017; Cho *et al.*, 2012) อย่างไรก็ตามพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิดนี้ยังไม่เป็นที่รู้จักสรรพคุณทางยาอย่างแพร่หลาย มีการศึกษาทางด้านวิทยาศาสตร์น้อย และยังไม่มีการระบุลงในตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย ฉบับปี พ.ศ. 2558 (คณะกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย ในคณะกรรมการคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญาการแพทย์ไทย, 2558) และบัญชียาหลักแห่งชาติ (“ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ,” 2562) รวมถึงยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเนื่องจากสมุนไพรมีทั้งประโยชน์และอันตรายหากใช้ไม่ถูกต้อง ไม่ถูกกับอาการ ไม่ถูกโรค ปริมาณขนาดไม่เหมาะสม ใช้ไม่ถูกส่วน หรือแพ้สมุนไพร ก็อาจทำให้เกิดอันตรายที่คาดไม่ถึงได้ ผู้วิจัยจึงคิดค้นการนำพืชชอบเค็มดังกล่าวสกัดสารจากพืชชอบเค็มแบบแยกส่วนของพืช ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก สำหรับศึกษาการตอบสนองของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โดยศึกษาการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจในมนุษย์ต่อสารสกัดหยาบพืชชอบเค็ม

ในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย เป็นการตอบสนองเพื่อป้องกันสิ่งแปลกปลอมและการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ที่เข้ามาทำอันตรายต่อร่างกาย โดยการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดนั้นมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นภูมิคุ้มกันเริ่มแรก จะมีการตอบสนองหลัก 2 แบบ คือ

การอักเสบ (inflammation) และการต้านไวรัส (antiviral defense) รวมถึงเชื่อมต่อการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันต่อเซลล์ที่ติดเชื้อและเซลล์ที่ผิดปกติไปยังระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะอีกด้วย (Abbas *et al.*, 2015) ซึ่งเซลล์หลักในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด คือ เซลล์แมโครฟาจ (Miteva *et al.*, 2018) ที่มีหน้าที่ในการป้องกันโฮสต์โดยการกลืนกินและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังกลืนกินเซลล์ apoptotic ก่อนที่เซลล์จะตาย และกระตุ้นการอักเสบที่ตอบสนองต่อการอักเสบได้ไว การกลืนกินของเซลล์ (phagocytosis) และนำเสนอแอนติเจน (Abbas *et al.*, 2015) เซลล์แมโครฟาจจะพัฒนาได้เป็น 2 กลุ่มหลัก ๆ คือ แมโครฟาจชนิด M1 (M1 macrophages) และแมโครฟาจชนิด M2 (M2a M2b หรือ M2c) macrophages ที่จะรับรู้โมเลกุลของจุลินทรีย์โดย pattern recognition receptors (PRRs) ต่าง ๆ เพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อและการบาดเจ็บ (Vanaki *et al.*, 2018) ในปัจจุบันพบว่าปัญหาสุขภาพมีสาเหตุหลักมาจากการอักเสบเรื้อรัง อนุมูลอิสระ และจากจุลินทรีย์ (Chen *et al.*, 2018; Steck and Grassl, 2014; Yadav *et al.*, 2018) ที่ทำให้เกิดความเจ็บป่วย ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย (Wongrakpanich *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2015) ดังนั้นเพื่อหลีกเลี่ยงผลข้างเคียงที่อาจเกิดขึ้นจากการใช้ยาเคมี ลดค่าใช้จ่าย และใช้ประโยชน์ทางการแพทย์ที่มีประสิทธิภาพ พืชสมุนไพร (medicinal plant) จึงได้รับความสนใจและมีความสำคัญในด้านอุตสาหกรรมยาและการใช้ในครัวเรือน (Houghton, 1995)

การวิจัยนี้จะเป็นการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ เพื่อตรวจหาสารสกัดหยาบกลุ่มที่มีคุณสมบัติสูงและสามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับสมุนไพรในอนาคตได้ โดยทำการศึกษาเป็น 4 ระยะ ได้แก่

1. ระยะที่ 1 การขอรับการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์ และขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ
2. ระยะที่ 2 การเก็บตัวอย่างพืชและแยกส่วนของพืชออกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก และสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ 70% เอทานอล โดยวิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์ (reflux extraction) จากนั้นทำการศึกษาคูณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC) หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC) คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์
3. ระยะที่ 3 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์
4. ระยะที่ 4 การวิเคราะห์ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อกระบวนการ phagocytosis และการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1.2.1 เพื่อศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

1.2.2 เพื่อประเมินความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

1.2.3 เพื่อวิเคราะห์ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อกระบวนการ phagocytosis และการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ

1.3 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.3.1 ได้ข้อมูลคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

1.3.2 ได้ข้อมูลความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์

1.3.3 ได้ข้อมูลฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อกระบวนการ phagocytosis และการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ

1.4 ขอบเขตงานวิจัย

การวิจัยนี้แบ่งออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

1.4.1 การศึกษาวิจัยในระยะที่ 1

การขอรับการพิจารณาขออนุญาตการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม และขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.4.2 การศึกษาวิจัยในระยะที่ 2

การเก็บตัวอย่างพืชและแยกส่วนของพืชออกเป็นส่วนต่าง ๆ ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และดอก และสกัดด้วยตัวทำละลาย คือ 70% เอทานอล โดยวิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์ จากนั้นทำการศึกษาคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น ได้แก่ การตรวจสอบหาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ คุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

1.4.3 การศึกษาวิจัยในระยะที่ 3

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาว
มนุษย์

1.4.4 การศึกษาวิจัยในระยะที่ 4

การวิเคราะห์ฤทธิ์สารสกัดหยาบต่อกระบวนการ phagocytosis และการแสดงออกของยีน
TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจ

1.5 สถานที่ทำการวิจัย

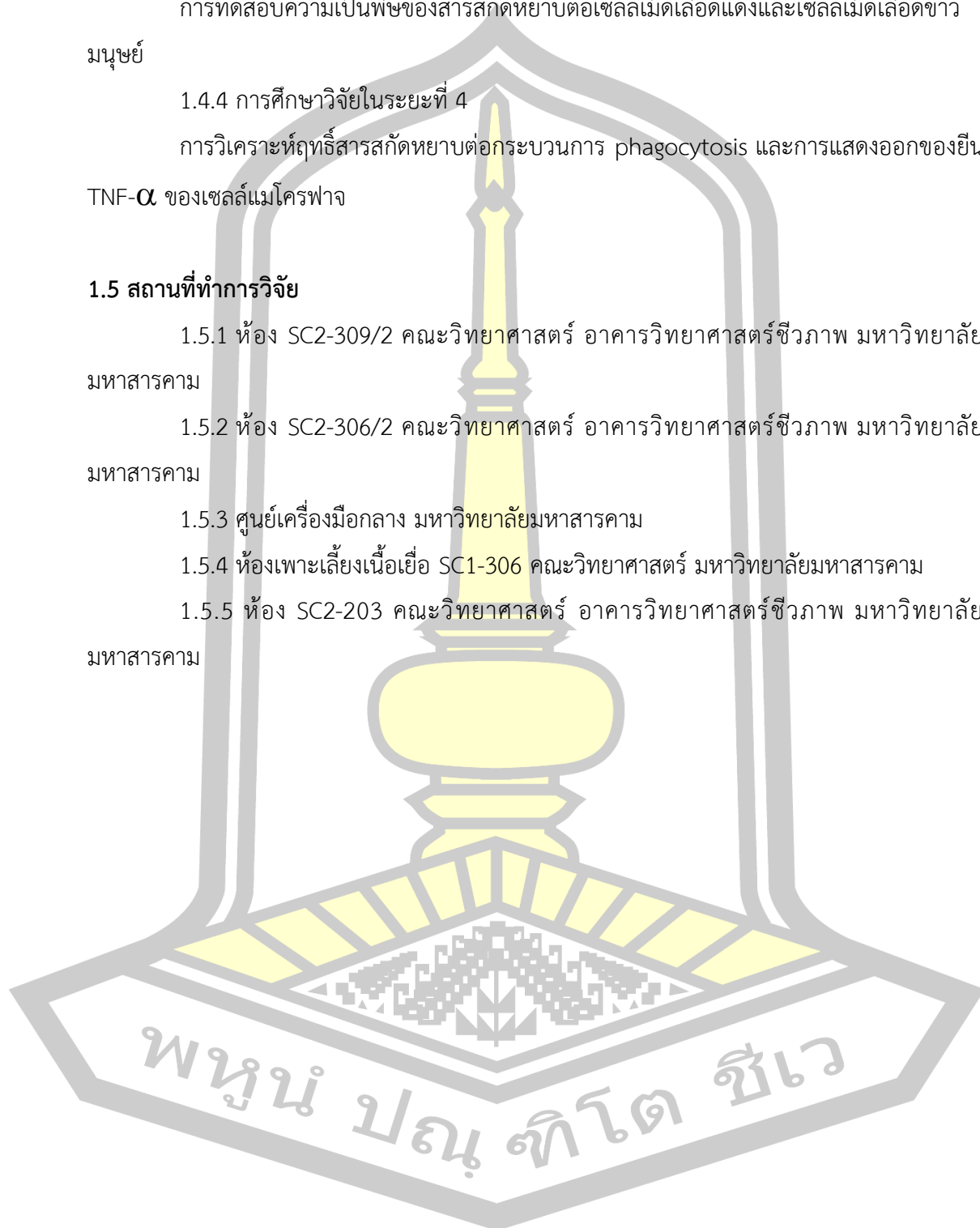
1.5.1 ห้อง SC2-309/2 คณะวิทยาศาสตร์ อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

1.5.2 ห้อง SC2-306/2 คณะวิทยาศาสตร์ อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

1.5.3 ศูนย์เครื่องมือกลาง มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.4 ห้องเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อ SC1-306 คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

1.5.5 ห้อง SC2-203 คณะวิทยาศาสตร์ อาคารวิทยาศาสตร์ชีวภาพ มหาวิทยาลัย
มหาสารคาม

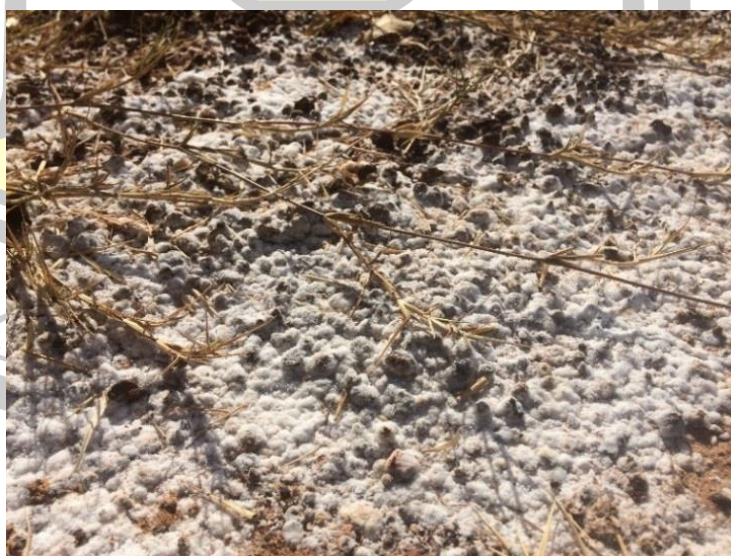


บทที่ 2

การทบทวนวรรณกรรม/สารสนเทศที่เกี่ยวข้อง

2.1 ดินเค็ม

ดินเค็ม คือ ดินที่มีปริมาณเกลือละลายในสารละลายดินปริมาณมาก จนส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืช ทำให้ธาตุอาหารบางชนิดเกิดความไม่สมดุล เช่น โบรอน สังกะสี เป็นต้น โดยเฉพาะในฤดูแล้ง พืชมักจะแสดงอาการใบไหม้ ลำต้นแคระแกร็น เนื่องจากความเป็นพิษ ของธาตุคลอไรด์และโซเดียม ทำให้พืชไม่สามารถดูดน้ำเข้าสู่ระบบรากได้สะดวก นอกจากนี้ดินเค็มยังเป็นดินที่มีค่าการนำไฟฟ้าของสารละลายที่สกัดจากดินที่อิ่มตัวด้วยน้ำมากกว่า 4 เดซิซีเมนต่อเมตร ที่ อุณหภูมิ 25 องศาเซลเซียส โดยลักษณะทั่วไปของดินเค็มจะสังเกตได้จากคราบเกลือสีขาวเป็นแผ่น หรือขุยเกลือบนผิวน้ำดินในฤดูแล้ง (ภาพที่ 1) ขณะที่ในฤดูฝนดินจะมีลักษณะเยิ้มเป็นเงา นอกจากนี้ ยังสามารถสังเกตได้จากการเจริญเติบโตของพืชในบริเวณนั้น ๆ พืชที่เจริญเติบโตได้ปกติบนดินเค็ม มักเป็นพืชที่สามารถปรับตัวและทนเค็มได้ (บุปผา โตภาคนาม, 2549) พืชบางชนิดสามารถทนเค็มได้ ถึง 4-8 เดซิซีเมนต่อเมตร แต่เมื่อระดับความเค็มสูงถึง 16 เดซิซีเมนต่อเมตร จะส่งผลกระทบต่อ การเจริญเติบโตและผลผลิตของพืชอย่างรุนแรง โดยพืชแต่ละชนิดมีความสามารถในการปรับตัวให้เข้ากับสภาพ ความเค็มได้ต่างกัน สำหรับประเทศไทยจะมีกลุ่มพืชทนเค็มน้อย เช่น พืชตระกูลถั่ว ผักกาด และ มะม่วง เป็นต้น กลุ่มพืชทนเค็มปานกลาง เช่น ข้าวโพด และ มันสำปะหลัง เป็นต้น และกลุ่มพืชทนเค็ม มาก เช่น มันเทศ กระถินณรงค์ และ หญ้าแพรก เป็นต้น (กรมพัฒนาที่ดิน, 2561)



ภาพที่ 1 พื้นที่ดินเค็ม หมู่บ้านโพนสิม ตำบลหัวนาคำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์
ที่มา : ภาพถ่ายโดย นิรนุช แสนกล้า (2562)

2.1.1 ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ในภาคตะวันออกเฉียงเหนือมีพื้นที่ประมาณ 107 ล้านไร่ โดยเป็นพื้นที่ปลูกข้าว 37.9 ล้านไร่ พื้นที่ป่าไม้ 5.5 ล้านไร่ พื้นที่อยู่อาศัย 50.48 ล้านไร่ และ พื้นที่ปลูกพืชไร่ 13.12 ล้านไร่ (บุปผา โตภาคงาม, 2549) และพบว่า 17% ของพื้นที่เป็นดินเค็มที่มีการกระจายใน 18 จังหวัด 94 อำเภอ ที่ส่งผลให้ผลผลิตทางการเกษตรต่ำจากปัญหาเกี่ยวกับความอุดมสมบูรณ์ของดินและปัญหาดินเค็ม รวมพื้นที่ที่ได้รับผลกระทบจากดินเค็มประมาณ 17.8 ล้านไร่ (สมศักดิ์ สุขจันทร์., 2548)

ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือเป็นดินที่มีความเค็มสูง อันเนื่องมาจากธรณีวิทยาและสภาพภูมิอากาศของภาคที่เป็นเอกลักษณ์ต่างจากภูมิภาคอื่นอย่างเด่นชัด เป็นที่รู้จักกันทั่วไปอีกชื่อว่า ที่ราบสูงโคราช เชื่อกันว่าเป็นส่วนของแผ่นเปลือกโลกที่ยกตัวขึ้น ตั้งแต่ยุคเทอร์เชียรีตอนกลาง ถึง ยุคควอเทอร์นารี จึงทำให้กลายเป็นที่ราบสูง ที่มีสภาพทางธรณีวิทยาโดยทั่วไปที่ประกอบด้วยหินตะกอนของกลุ่มหินโคราช ซึ่งเป็นตะกอนแดง ที่แบ่งออกเป็น 9 หมวดหิน ได้แก่ 1) หมวดหินลาด 2) หมวดหินน้ำพอง 3) หมวดหินภูกระดึง 4) หมวดหินพระวิหาร 5) หมวดหินเสา 6) หมวดหินภูพาน 7) หมวดหินโคกกรวด 8) หมวดหินมหาสารคาม และ 9) หมวดหินภูทอก ซึ่งในหมวดหินมหาสารคาม เป็นหมวดหินที่ประกอบด้วยหินเกลือและถูกพิจารณาว่าเป็นแหล่งของเกลือในดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ (บุปผา โตภาคงาม, 2549)

2.1.2 การจำแนกดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

การจำแนกพื้นที่ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ จำแนกตามปริมาณของคราบเกลือบนผิวดิน คุณสมบัติ ต่าง ๆ เช่น ระดับความลึกและคุณภาพน้ำใต้ดิน รวมถึงชั้นของหินเกลือข้างใต้ดิน สามารถแบ่งดินเค็มออกเป็น 7 ระดับ ดังนี้ (บุปผา โตภาคงาม, 2549)

1. บริเวณพื้นที่ที่มีดินเค็มมาก คิดเป็น 0.21% ของพื้นที่ ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณคราบเกลือมากกว่า 50% ของพื้นที่ ระดับน้ำใต้ดินตื้นมาก พืชที่เจริญได้ดีจัดเป็นพืชทนเค็ม ได้แก่ หนามแดง หนามพรม และ หนามพุดดอ เป็นต้น
2. บริเวณพื้นที่ที่มีดินปานกลาง คิดเป็น 1.35% ของพื้นที่ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณคราบเกลือประมาณ 10-50% ของพื้นที่ ระดับน้ำใต้ดินลึกกว่าบริเวณชายเนิน พืชที่พบ ได้แก่ ไม้สะแก เป็นต้น
3. บริเวณพื้นที่ที่มีดินเค็มน้อย คิดเป็น 4.07% ของพื้นที่ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ มีปริมาณคราบเกลือประมาณ 1-10% ของพื้นที่ เกิดจากน้ำใต้ดินที่ไม่เค็มจัดที่อยู่ลึกประมาณ 2 เมตร พืชพบ ได้แก่ ไม้ยาง ไม้กราด สะแบง หรือสะแก เป็นต้น
4. บริเวณที่ราบต่ำ มีศักยภาพเป็นดินเค็ม คิดเป็น 16.47% ของพื้นที่ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไม่พบคราบเกลือหรืออาจพบน้อยกว่า 1% น้ำใต้ดินเป็นน้ำกร่อยหรือน้ำเค็ม

5. บริเวณที่สูงมีหินเกล็ดอยู่ข้างใต้ คิดเป็น 19.02% ของพื้นที่ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไม่พบคราบเกลือบนผิวดิน มีหมวดหินมหาสารคามอยู่ข้างใต้

6. บริเวณที่ไม่เค็ม คิดเป็น 47.32% ของพื้นที่ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไม่พบคราบเกลือบนผิวดิน น้ำใต้ดินไม่เค็ม ไม่มีหินเกล็ดอยู่ข้างล่าง

7. บริเวณที่เป็นภูเขา คิดเป็น 10.59% ของพื้นที่ดินเค็มทั้งหมดในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ ไม่เหมาะกับการเกษตรกรรมใด ๆ

นอกจากนี้ การเจริญเติบโตของพืชสามารถใช้ประเมินความเค็มของดินได้ เนื่องจากพืชแต่ละชนิดมีกลไกในการปรับตัวในการดำรงการเจริญเติบโตที่แตกต่างกัน โดยแบ่งพืชทนเค็มออกเป็นกลุ่มต่าง ๆ ตามค่าของการนำไฟฟ้าและความเข้มข้นของเกลือดังตาราง 1 (บุปผา โตะภาคงาม, 2549)

ตาราง 1 การจำแนกกลุ่มพืชทนเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ

ประเภทของดิน	ความเข้มข้นของเกลือ (%)	การนำไฟฟ้า (เดซิซีเมนต่อเมตร)	ชนิดพืช
เค็มน้อย	0.12-0.25	2-4	พืชตระกูลถั่ว ผักกาด มะนาว ลินจี่ มะม่วง กล้วย ส้ม
เค็มปานกลาง	0.25-0.5	4-8	บวบ องุ่น พริกยักษ์ หอมใหญ่ ข้าวโพด หวาน กุหลาบ มันสำปะหลัง มะกอก แตงโม มันฝรั่ง
เค็มมาก	0.5-1.0	8-16	มะเขือเทศ ชะอม เข็ม เขียวหมื่นปี มันเทศ กระถินณรงค์ มะยม มะพร้าว สุน หนามแดง หญ้าแพรก

ที่มา : บุปผา โตะภาคงาม (2549)

2.2 พืชชอบเค็ม

จากการศึกษาพื้นที่ดินเค็มแถบแม่น้ำชีในช่วงปี พ.ศ. 2556 พบว่ามีพืชจำนวน 5 ชนิดที่จัดเป็นพืชชอบเค็ม ได้แก่ หนามพุงดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) สร้อยนกเขา (*Synostema bacciformis*) ชลู (*Pluchea indica*) และพีชวงศ์ ผักเบี้ย (*Gisekia pharnaceoides*) (Deeprom et al., 2015; Poodeetip et al., 2013) โดยพืชที่พบเป็นส่วนใหญ่ คือ หนามพุงดอ หนามแดง และ ชลู

2.2.1 หนามพุงดอและสารสกัดหนามพุงดอ

หนามพุงดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) ชื่อท้องถิ่น ชี้แฮด (ภาคเหนือ) ปืดเต๊ะ (เชียงใหม่) หนามพุงดอ พุงดอม (ภาคกลาง) จัดอยู่ในวงศ์ Salvadoraceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูงถึงประมาณ 800 เมตร มีกิ่งห้อยลงยาว 2-4 เมตร ตามซอกใบมีหนามยาว 1-1.5 เซนติเมตร จำนวน 1-2 อัน ใบมีลักษณะรี กลม หรือ รูปไข่กว้าง ใบเรียงตรงข้ามกัน ปลายใบแหลมหรือเป็นติ่งคล้ายหนาม แผ่นด้านบนของใบเป็นมันเงา เส้นกลางใบนูนชัด ออกดอกสีเหลืองอมเขียวเป็นช่อแบบแยกแขนง ยาวได้ถึง 25 เซนติเมตร ดอกเพศผู้เกือบไร้ก้าน ออกหนาแน่น กลีบเลี้ยงเป็นรูปประฆังมี 4 กลีบ กลีบดอกมี 4 กลีบ ยาวกว่ากลีบเลี้ยงเล็กน้อย มีเกสรเพศผู้ 4 อัน เรียงสลับกับกลีบดอก ส่วนดอกเพศเมียจะมีขนาดเล็กกว่าดอกเพศผู้เล็กน้อย เมล็ดมี 1-3 เมล็ด พืชชนิดนี้พบได้ที่ไต้หวันและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ รวมถึงนิวกินีและฟิลิปปินส์ โดยในไทยได้พบได้แทบทุกภาค ขึ้นตามที่โล่งของชายป่าชายเลน ป่าชายหาด หรือป่าเต็งรังผสมสน เมื่อขยี้ใบจะมีกลิ่นน้ำมัน เนื่องจากในใบมีน้ำมันมัสตาร์ด ซึ่งเป็นสาร glucosinolates สกุล *Azima* Lam. มี 4 ชนิด พบในแอฟริกาและเอเชียตะวันออกเฉียงใต้ ในไทยมีชนิดเดียว ชื่อสกุลมาจาก *azimeana* ซึ่งเป็นภาษาพื้นเมืองของมาลากาซีหรือมาดากัสการ์ที่ใช้เรียกพืชสกุลนี้ (Sunintaboon, 1999; สำนักงานหอพรรณไม้ และคณะ, 2559) จากการศึกษาสารสำคัญที่พบในหนามพุงดอ พบว่าส่วนสกัดเอทเชนของใบมีสารสำคัญ 3 ชนิด ได้แก่ 1) taraxerol 2) triterpenoid I และ 3) taraxerone ส่วนสกัด 95% เอทานอลของรากมีสารสำคัญที่พบ 7 ชนิด ได้แก่ 1) stigmasterol 2) triterpenoid II 3) 1-methoxy-indole-3-carboxaldehyde 4) 1H-indole-3-carboxaldehyde 5) 5-hydroxymethyle furfuraldehyde 6) stigmasteryl-3-O- beta-D-glucopyranoside และ 7) 1-methoxy-indole-3-Acetonitrile โดยสาร 2 ชนิด คือ 1-methoxy-indole-3-acetonitrile และ 1-methoxy-indole-3-carboxaldehyde พบว่ามีฤทธิ์เป็นพืชต่ออาร์ทีเมียหรือไรทะเล (*Artemia salina* Linn.) ที่ระดับ LC₅₀ เท่ากับ 0.09 และ 9.24 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ นอกจากนี้ประเทศไทยมีการใช้หนามพุงดอในเชิงสมุนไพรโดยใช้รากแก้ไข้และลดการอักเสบ รวมทั้งมีการใช้เพื่อรักษาโรคคางทูมด้วย (Sunintaboon, 1999) ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้ม

2.2.2 หนามแดงและสารสกัดหนามแดง

หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) ชื่อท้องถิ่น หนามกะจาง กกกะจาง หนามกระทิง (อ.ศรีสงคราม นครพนม) หนามแดง (ขอนแก่น มหาสารคาม) ดนิกะมุ่ม (เขมร อ.ท่าตูม สุรินทร์) ลาบ้อ (ส่วย อ.ท่าตูม สุรินทร์) เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์ Celastraceae มีลักษณะเป็นไม้พุ่ม สูง 0.5-3 เมตร ปลายกิ่งและยอดมีหนามแหลมคม กิ่งอ่อนสีแดงอมม่วง มีขนสั้นประปราย ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่กลับ เรียงตรงข้ามหรือเกือบตรงข้ามกัน ผิวใบมีขนประปรายหรือเกลี้ยง เนื้อใบหนา ดอกมีสีขาวอม

เขียว กลีบเลี้ยงและกลีบดอกมีอย่างละ 5 กลีบ เมล็ดมีสีน้ำตาลผิวมันเงารูปไข่กลับ หนามแดงเป็นยาสมุนไพรที่มีสรรพคุณรักษาโรคซาง (โรคตานขโมย) ในเด็ก โดยใช้ลำต้นทุบแล้วแช่น้ำไว้ 1 วัน จนมีสีน้ำตาล (มานพ ผู้พัฒนา และคณะ, 2561) จากการศึกษาสารสำคัญที่พบในหนามแดงพบว่า พบว่า ส่วนสกัดรากมีสาร sesquiterpene alkaloids ใหม่ 8 ชนิด ได้แก่ 1) 7-*epi*-mekongensine 2) mekongensine (2,9'-di-*O*-acetyl-5-*O*-benzoyl-5-deacetyl-wilforidine) 3) 9'-deacetoxy mekongensine 4) 1-*O*-benzoyl-1-deacetyl mekongensine 5) 7-*epi*-euojaponine A 6) 1-*O*-benzoyl-1-deacetyl-9'-deacetoxymekongensine 7) 7-*epi*-5-*O*-benzoyl-5-deacetylperitassine A และ 8) 2-*O*-benzoyl-2-deacetyl mayteine และ สาร sesquiterpene alkaloids 4 ชนิด ที่รู้จักอยู่แล้ว 4 ชนิด ได้แก่ 1) euonymine 2) mayteine 3) 7-*epi*-mayteine และ 4) 7-*epi*-euonymine (Lhinhatrakool *et al.*, 2011) ซึ่งจากการศึกษาในปัจจุบันยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับระบบภูมิคุ้มกัน

2.2.3 ขลุ่และสารสกัดขลุ่

ขลุ่ (*Pluchea indica*) ชื่อท้องถิ่น ขี้ป่าน (แม่ฮ่องสอน) หนาดงัว หนาดวัว หนวดงัว หนวดงั่ว (อุดรธานี) เพี้ยพาน (ภาคตะวันออกเฉียงเหนือ) ขลุ่ คลู (ภาคใต้) หล่องไซ (แต่จิว) หลวนซี (จีนกลาง) ขลุ่เป็นพืชจัดอยู่ในวงศ์ Asteraceae (Compositae) มีลักษณะเป็นไม้พุ่มขนาดเล็ก สูง 1-2 เมตร ขึ้นเป็นกอ แตกกิ่งก้านสาขามาก มีลำต้นกลมสีน้ำตาลแดงหรือเขียว กิ่งก้านและลำต้นมีขนปกคลุม ใบเป็นใบเดี่ยวรูปไข่กลับ ออกแบบสลับ ปลายใบมีขนาดใหญ่กว่าโคนใบ แผ่นใบเรียบ ใบค่อนข้างแข็งและเปราะ มีกลิ่นหอมฉุน ออกดอกเป็นช่อที่บริเวณปลายยอดหรือซอกใบ ดอกมีลักษณะเป็นฝอยสีขาวนวลหรือสีขาวอมม่วง กลีบดอกวงนอกสั้นกว่าวงใน กลีบดอกวงในเป็นรูปท่อน ภายในมีทั้งดอกตัวผู้และดอกตัวเมีย มีสีขาวอมม่วงขนาดเล็กอยู่เป็นจำนวนมาก ปลายของกลีบดอกหยักเป็นซี่ฟัน 5-6 หยัก อับเรณูบริเวณโคนเป็นรูปหัวลูกศรสั้น ๆ เกสรตัวเมียแยกเป็น 2 แฉกสั้นๆ มีก้านช่อดอกยาวแต่ไม่มีก้านดอกย่อย รังไข่ประดับแข็ง สีเขียว และเรียงกันประมาณ 6-7 วง วงนอกเป็นรูปไข่ วงในเป็นรูปหอกแคบ ปลายแหลม ผลเป็นผลแห้ง ไม่แตก รูปทรงกระบอก ขนาดเล็ก เป็นสัน มีขนาดเล็กมาก มีเหลี่ยม 10 สัน มีรยางค์สีขาว เมล็ดเป็นฝอยเล็ก ๆ เมื่อแก่จะปลิวไปตามลม (สำนักงานหอพรรณไม้ และคณะ, 2559) ยอดจะมีรสมันซึ่งสามารถรับประทานเป็นผักสดได้ ชอบขึ้นตามธารน้ำที่ขึ้น โดยเฉพาะที่ที่น้ำเค็มขึ้นถึง ใบอ่อนใช้รับประทานเป็นผักจิ้ม สามารถนำไปผึ่งให้แห้ง ซึ่งจะให้กลิ่นหอมคล้ายน้ำผึ้ง ใช้ชงดื่มแทนชาได้ ขลุ่มีสรรพคุณเป็นยาสมุนไพร ใบและต้นอ่อน บรรเทาอาการปวดข้อสำหรับโรคไขข้ออักเสบ เลือดลม และ รักษาประดง ใบและรากใช้เป็นยาฝาดสมาน แก้ไข้ แก้แผลอักเสบ ขับเหงื่อ ต้มน้ำอาบรักษาเส้นตึง และทำเป็นขี้ผึ้งทาแผลเรื้อรัง ใบเป็นยาแก้เบาหวาน แก้ไข้ ขับปัสสาวะ บรรเทาอาการปวดเมื่อย และ ขับเหงื่อ เปลือกลำต้นนำมาทำวุ้นหรือสุบแก้โพรงจมูกอักเสบ (ไซนัส) ดอกแก่นัว รากขี้ป่านและแก้กระษัย ทั้งต้นใช้ต้มกินรักษาอาการชั้เบา แก่นัวในไต

ขับปัสสาวะ แก้วริดสีดวงทวาร แก้วปัสสาวะพิการ แก้วมุกติระดูขาว แก้วเบาหวาน แก้วตานขโมย รักษา วัณโรคที่ต่อมน้ำเหลือง หรือ ใช้ต้มอาบแก้ผื่นคัน เลือดลม แก้วประดง และแก้วโรคผิวหนัง (นพพล เกตุประสาท, ม.ป.ป.) จากการศึกษาสารสำคัญพบว่า ส่วนประกอบหลักเป็นกรด quinic flavonoids thiophenes และ กรดพีโนลิก (Ruan *et al.*, 2019) มีรายงานว่าองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์ที่สกัดได้จากขลุ่ยยับยั้งกิจกรรมของเอนไซม์ CYP2A6 และ CYP2A13 เป็นเอนไซม์ที่เกี่ยวข้องกับการติด บุหรี่และการเกิดเนื้องอกปอด (Boonruang *et al.*, 2019) นอกจากนี้ยังพบว่าสารสกัดจากรากที่สกัด จากเฮกเซนยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์เนื้องอกกลัยโอบลาสโตมา ลดจำนวนประชากรของเซลล์ ในเฟส S และ G2 / M ได้อย่างชัดเจน ระดับการแสดงออกของโปรตีน microtubule-associated light chain 3-II (LC3-II) phosphorylated JNK และ phosphorylated p38 เพิ่มขึ้นอย่างมี นัยสำคัญ (Cho *et al.*, 2017) สารสกัดหยาดของใบและรากขลุ่ยที่สกัดจากน้ำ ทำให้เกิดการยับยั้งการ เพิ่มจำนวนของเซลล์และการมีชีวิตรอดของเซลล์เซลล์มะเร็งสมองและเซลล์มะเร็งปากมดลูก (Cho *et al.*, 2012) ปัจจุบันได้มีการศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของสารสกัดจากใบขลุ่ย ในด้านการต้านทาน อนุมูลอิสระ ด้านการอักเสบ และต้านเซลล์มะเร็ง ทั้งนี้ยังไม่พบรายงานการศึกษาเกี่ยวกับเซลล์ใน ระบบภูมิคุ้ม

2.3 พืชสมุนไพรไทยและตำรับยาไทย

สมุนไพร เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติได้จากแร่ธาตุ พืช และสัตว์ ใช้เป็นยาหรือผสมกับสารอื่น ตามตำรับยาเพื่อบำรุงร่างกาย บำบัดโรค หรือใช้เป็นยาพิษ ถ้าเป็นสมุนไพรที่ได้จากพืชจะเรียกพืชนั้น ว่า พืชสมุนไพรในประเทศไทยมีสมุนไพรและพืชผักพื้นบ้านที่หลากหลายชนิดที่สามารถใช้เป็นอาหาร และยา ในการบำรุงสุขภาพร่างกายและรักษาโรคต่าง ๆ ให้ทุเลาลง พืชสมุนไพรมีประโยชน์มากมาย (วิวรรณ วงศ์อรุณ และคณะ, 2558) ได้แก่

1. ใช้สกัดน้ำมันหอมระเหยสำหรับที่ใช้ในผลิตภัณฑ์ครีมทาภายนอก สกัดน้ำมันกระวาน สำหรับใช้แต่งกลิ่นเห้าและอุตสาหกรรมน้ำหอม สกัดน้ำมันพลูเพื่อใช้ในอุตสาหกรรมเครื่องสำอาง หรือเป็นเจลทาภายนอก แก้อาการคัน
2. ใช้รับประทานเป็นยา ในการรักษาโรคต่าง ๆ
3. ใช้เป็นยาทาตามผิวหนัง รวมทั้งแผลที่เกิดในช่องปาก
4. ใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องดื่มและอาหารที่ในการรักษาโรค
5. ใช้ทำเครื่องสำอาง เช่น แชมพู สบู่ ครีมนวดผผ และโลชั่นบำรุงผิว
6. ใช้เป็นผลิตภัณฑ์กำจัดศัตรูพืช ซึ่งจะไม่มฤทธิ์ตกค้างที่เป็นพิษต่อสิ่งแวดล้อม
7. ใช้บริโภคเป็นอาหาร และ เครื่องเทศ ดับกลิ่นคาว เพิ่มรสชาติ และยังช่วยย่อยอาหาร

8. มีความปลอดภัย เนื่องจากสมุนไพรส่วนมากจะมีฤทธิ์ที่อ่อน และไม่เป็นพิษหรือมีอาการข้างเคียงมาก ขณะที่ยาแผนปัจจุบันที่บางครั้งจะมีฤทธิ์เฉียบพลัน ถ้าหากมีการบริโภคเกินขนาดซึ่งอาจทำให้เสียชีวิตได้

9. ประหยัด เนื่องจากสมุนไพรมีราคาถูกกว่าราคาของยาแผนปัจจุบันมาก เป็นทรัพยากรที่มีอยู่แล้ว จึงควรอย่างยิ่งที่จะนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์เพิ่มมากขึ้น อีกทั้งยังช่วยลดดุลการค้าที่เสียเปรียบต่างประเทศ เป็นการสอดคล้องกับภาวะเศรษฐกิจของชาติ

10. เหมาะสำหรับผู้ที่อยู่ห่างไกล หรือตามชนบท ที่ไม่สามารถเข้าถึงการบริการทางการแพทย์แผนปัจจุบันได้ จึงควรใช้สมุนไพรที่ปลอดภัยและเชื่อถือได้รักษาโรค

11. ไม่ต้องกลัวปัญหาขาดแคลนยา ปัจจุบันยาหลายตัวถูกผลิตจากวัตถุดิบที่ได้จากผลผลิตของน้ำมัน ซึ่งปัจจุบันนี้ น้ำมันเริ่มขาดแคลน ทำให้ส่งผลกระทบต่อสิ่งต่าง ๆ รวมไปถึงการรักษาโรค จึงต้องศึกษาเกี่ยวกับยาสมุนไพรและนำมาใช้ให้เป็นประโยชน์มากขึ้น

12. เป็นพืชเศรษฐกิจ ควรส่งเสริมให้มีการปลูกสมุนไพรที่ใช้ในประเทศ และเพื่อการส่งออกอย่างจริงจัง โดยต้องคำนึงถึงผลผลิตให้มีคุณภาพดี และต้นทุนต่ำสำหรับส่งออกในรูปของสารสกัดจะทำให้ได้ราคาดีกว่าการส่งออกในรูปของวัตถุดิบ

2.4 ระบบภูมิคุ้มกัน (immune system)

ระบบภูมิคุ้มกัน คือ ระบบภูมิคุ้มกันทั้งหมดของร่างกาย มีหน้าที่ป้องกันสิ่งแปลกปลอมและการติดเชื้อจากจุลินทรีย์ที่เข้ามาทำอันตรายต่อร่างกาย เรียกสิ่งแปลกปลอมเหล่านี้ว่าแอนติเจน ระบบภูมิคุ้มกันสามารถตอบสนองต่อส่วนประกอบของจุลินทรีย์รวมถึงโมเลกุลของจุลินทรีย์ เช่น โปรตีน (protein) และโพลีแซคคาไรด์ (polysaccharides) ระบบภูมิคุ้มกันของมนุษย์สามารถแบ่งออกเป็น 2 ระบบใหญ่ๆ ได้แก่ ระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity) (Abbas *et al.*, 2015)

2.4.1 ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด

ภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (innate immunity หรือเรียกว่า natural หรือ native immunity) เป็นด่านแรกที่เกิดขึ้นเมื่อพบกับเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม มีเซลล์ (cellular) และ สารชีวเคมี (biochemical) เป็นส่วนประกอบของระบบภูมิคุ้มกัน สามารถตอบสนองต่อแอนติเจนได้อย่างรวดเร็ว (Abbas *et al.*, 2015) เป็นการตอบสนองในเบื้องต้นก่อนที่จะมีการตอบสนองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดจะตอบสนองต่อแอนติเจนอย่างไม่จำเพาะ (non-specificity) และไม่มี ความจำ โดยอาศัยตัวรับและตรวจจับความผิดปกติที่เรียกว่า PRRs (Alam, 1998) ซึ่ง PRRs ส่วนใหญ่เป็นโปรตีนในกลุ่ม toll-like receptors (TLRs) โดยจับกับชิ้นส่วนที่มีลักษณะเหมือนๆ กันในกลุ่มเชื้อที่ก่อโรคที่เรียกว่า pathogen associated molecular pattern

(PAMPs) (Liso *et al.*, 2018) กลุ่มของ PRRs ที่มีความสำคัญมากคือ TLRs เนื่องจากสามารถจับกับเชื้อได้อย่างกว้างขวางตั้งแต่ไวรัส แบคทีเรีย และปรสิต (Akira *et al.*, 2006) และมีเซลล์ที่เกี่ยวข้องในภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ได้แก่ ฟาโกไซต์ (phagocytes) (เซลล์นิวโตรฟิลล์ เซลล์โมโนไซต์ และเซลล์แมโครฟาจ) เซลล์เดนไดรติกส์ (dendritic cells หรือ DCs) เซลล์ natural killer (NK) และเซลล์มาสต์ (mast cells) (Vanaki *et al.*, 2018) ในการตอบสนองของภูมิคุ้มกันทางด้านเซลล์ต่อจุลินทรีย์ของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด จะมีการตอบสนองหลัก 2 แบบ คือ การอักเสบและการต้านไวรัส

ส่วนประกอบที่สำคัญของภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Abbas *et al.*, 2015) ได้แก่

1. การป้องกันทางกายภาพและทางเคมี (physical และ chemical barriers) เช่น ผิวหนังและ สารเคมีต้านจุลินทรีย์บนผิวของเยื่อบุผิว
2. เซลล์ฟาโกไซต์ (เซลล์นิวโตรฟิลล์ เซลล์โมโนไซต์ และเซลล์แมโครฟาจ) เป็นเซลล์ที่ทำการกำจัดสิ่งแปลกปลอมในร่างกายโดยการจับกินแบบ phagocytosis เซลล์เดนไดรติกส์ ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจน และ เซลล์ NK เป็นเม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์ที่สามารถปล่อยสารที่เป็นพิษต่อเซลล์ มีคุณสมบัติในการทำลายเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส
3. โปรตีนในเลือด รวมถึงสื่อกลางในการอักเสบ (mediators of inflammation) และระบบ complement ซึ่งเป็นกลุ่มของโปรตีนในซีรัมมากกว่า 20 ชนิด ที่ในภาวะปกติจะอยู่ในรูป inactive form แต่เมื่อถูกกระตุ้นจาก antigen-antibody complex หรือ immune complex จะทำให้เกิดการกระตุ้นเชื่อมโยงต่อ ๆ ไป และผลผลิตที่เกิดขึ้นจับเป็นคอมเพล็กซ์ที่เยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane) และก่อให้เกิดการเปลี่ยนแปลงที่กลับคืนไม่ได้ของเยื่อหุ้มเซลล์ทั้งหน้าที่และรูปร่าง ทำให้เซลล์เกิดการแตกสลาย นอกจากนี้ biological products ที่เกิดขึ้นจะมีผลให้เกิดปฏิกิริยาต่าง ๆ ตามมามากมาย เช่น การอักเสบ และการแพ้รุนแรง (anaphylaxis) เป็นต้น

2.4.2 ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ

ภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (adaptive immunity หรือเรียกว่า specific หรือ acquired immunity) เป็นการตอบสนองที่มีความซับซ้อนมากกว่าภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และมีความจำเพาะต่อแอนติเจนชนิดใดชนิดหนึ่งเป็นอย่างมาก มีความหลากหลาย (diversity) และจำเพาะ (specificity) มากกว่าการตอบสนองแบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด รวมทั้งมีความจำ (memory) การตอบสนองแบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ประกอบด้วยเซลล์ลิมโฟไซต์ (B cells และ T cells) และ สารคัดหลั่งต่าง ๆ เช่น แอนติบอดี (antibodies) (Abbas *et al.*, 2015) การตอบสนองแบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ มีระบบจดจำที่จำเพาะต่อแอนติเจน (antigen-specific recognition system) โดยตัวรับ (receptor) ของเซลล์ลิมโฟไซต์ชนิดทีและบีในแต่ละ clone นั้น จะสามารถจับกับแอนติเจนได้เพียงชนิดเดียวและรับรู้แอนติเจนโดยการนำเสนอแอนติเจนจากเซลล์ที่ทำหน้าที่นำเสนอแอนติเจน (antigen-presenting cells หรือ APC) ผ่านทาง Human leukocyte antigen (HLA) (Alam, 1998) การ

ตอบสนองแบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ แบ่งได้ 2 แบบ คือ การตอบสนองโดยใช้สารน้ำ (humoral immune responses) เป็นการตอบสนองต่อแอนติเจนโดยกระตุ้นให้ลิมโฟไซต์ชนิดบีหลั่งแอนติบอดีที่เป็นโปรตีนที่เรียกว่า immunoglobulins (Ig) และการตอบสนองชนิดพึ่งเซลล์ (cell-mediated immune responses) เป็นการตอบสนองขั้นที่สองของภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ เป็นการทำหน้าที่ของเซลล์อย่างจำเพาะ เช่น เซลล์เม็ดเลือดขาวพวกลิมโฟไซต์ชนิดที (Alberts *et al.*, 2002) โดยทั่วไปก่อนที่แอนติเจนหรือเซลล์แปลกปลอมจะจับกับลิมโฟไซต์ชนิดที แอนติเจนเหล่านี้จะถูกเก็บกินด้วยเซลล์แมโครฟาจ ซึ่งเซลล์แอนติเจนส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ของเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง การตอบสนองของลิมโฟไซต์ชนิดทีจะเกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนของแอนติเจน ขณะที่การตอบสนองด้านสารน้ำจะถูกกระตุ้นจากทั้งโปรตีนและส่วนที่ไม่ใช่โปรตีนของแอนติเจน เมื่อลิมโฟไซต์ชนิดทีจับกับแอนติเจนที่ถูกนำเสนอผ่านตัวรับจำเพาะอยู่บนผิวของลิมโฟไซต์ชนิดทีแล้ว จะเปลี่ยนแปลงเป็น activated T cells จากนั้นจะแบ่งเซลล์แบบไมโทซิสเพื่อเพิ่มจำนวนลิมโฟไซต์ชนิดที จากนั้นจะเคลื่อนที่ไปยังตำแหน่งที่แอนติเจนเข้ามาและกำจัดเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และลิมโฟไซต์ชนิดทียังสามารถกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจเพื่อทำลายจุลินทรีย์โดยวิธี phagocytosis ซึ่งลิมโฟไซต์ชนิดทีที่ทำงานได้ดีในร่างกาย ได้แก่ cytotoxic T lymphocyte (CTL) เป็นเซลล์ที่ทำลายสิ่งแปลกปลอม helper T cells (Th) เป็นเซลล์ผู้ช่วย กระตุ้นลิมโฟไซต์ชนิดบีให้สร้างแอนติบอดีที่จำเพาะต่อแอนติเจนและกระตุ้นการทำงานของลิมโฟไซต์ชนิดอื่น ๆ และ suppressor T cells (Ts) เป็นเซลล์ที่ยับยั้งการทำงานของ Th แลลิมโฟไซต์ชนิดบี เป็นต้น (Abbas *et al.*, 2015)

2.5 เซลล์ระบบภูมิคุ้มกัน (immune cells)

ในการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมหรือแอนติเจนของร่างกายนั้นมีเซลล์จำนวนมากที่เกี่ยวข้องกับการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน เซลล์ที่ทำหน้าที่ในระบบภูมิคุ้มกันสร้างมาจากเซลล์ต้นกำเนิด (stem cells) ที่อยู่ในไขกระดูก เซลล์ที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด ได้แก่ เซลล์ phagocytic เช่น แมโครฟาจ โมโนไซต์ และ นิวโตรฟิลส์ NK และ granulocytes เซลล์ที่เกี่ยวข้องในการตอบสนองแบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ได้แก่ เซลล์ที่ทำหน้าที่เป็น APC รวมทั้งแมโครฟาจ และเซลล์เดนไดรติกส์ เซลล์ที่มีบทบาทสำคัญในการปกป้องโฮสต์ ได้แก่ ลิมโฟไซต์ชนิดทีและบี และแมโครฟาจ (Miteva *et al.*, 2018)

2.5.1 เซลล์แมโครฟาจ (macrophage)

เซลล์แมโครฟาจ เป็นโมโนไซต์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ เป็นเซลล์หลักในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด มีหน้าที่ในการ phagocytosis นำเสนอแอนติเจน และซ่อมแซม เซลล์แมโครฟาจ แบ่งออกย่อยออกเป็นแมโครฟาจชนิด M1 และแมโครฟาจชนิด M2 โดยแบ่งตามการแสดงออกของ markers การหลั่งสารและการทำงาน เป็นต้น การสัมผัสกับลิแกนด์ (ligands) ของแอนติเจน

(lipopolysaccharide หรือ LPS) หรือโปรตีนที่เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสังเคราะห์ขึ้น (ไซโตไคน์) เช่น interferon- γ (IFN- γ) และ tumor necrosis factor- α (TNF- α) จะช่วยส่งเสริมการกระตุ้นให้เกิดแมโครฟาจชนิด M1 ในทางตรงกันข้ามการแสดงออกของ immune complexes complements cytokines หรือ สารธรรมชาติที่เซลล์ใช้สื่อสารระหว่างกันเพื่อกระตุ้นให้เกิดการเจริญเติบโต (growth factors) เช่น macrophage colony stimulating factor (M-CSF) Interleukin (IL)-4 Interleukin (IL)-13 และ Interleukin (IL)-33 จะกระตุ้นให้เกิดแมโครฟาจชนิด M2 โดยแมโครฟาจชนิด M2a จะถูกกระตุ้นด้วย IL-4 และ IL-13 ขณะที่แมโครฟาจชนิด M2b จะถูกกระตุ้นด้วย LPS เซลล์ apoptotic และ IL-1Ra และแมโครฟาจชนิด M2c จะถูกกระตุ้นด้วย IL-10 ไซโตไคน์ ชนิด transforming growth factor- β หรือ กลูโคคอร์ติคอยด์ (glucocorticoids) (Miteva *et al.*, 2018) หลังจากที่เริ่มเกิดการอักเสบ แล้วแมโครฟาจชนิด M1 จะหลั่ง TNF- α IL-1 และ IL-23 เพื่อส่งเสริมการฆ่าเชื้อโรคโดยตรง และแมโครฟาจชนิด M2 จะหลั่ง immunoregulatory cytokines เช่น IL-10 เพื่อที่หยุดการอักเสบ (Vanaki *et al.*, 2018) เซลล์แมโครฟาจ มีความสามารถในการรับรู้แอนติเจน โดยการรับรู้ส่วนที่เรียกว่า conserved pathogen-associated molecular patterns และเริ่มต้นในการตอบสนองการอักเสบ เนื้อเยื่อแมโครฟาจ (Tissue-macrophages) มีบทบาทสำคัญในการ recruitment ของนิวโทรฟิลส์โดยสังเคราะห์ไซโตไคน์ก่ออักเสบ (pro-inflammatory cytokines) และคีโมไคน์ (chemokines) เช่น TNF- α IL-1 IL-6 และ IL-8 นอกจากนี้ยังมีความสามารถในการนำเสนอแอนติเจนให้กับลิมโฟไซต์ชนิดทีเพื่อกระตุ้นภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Castelo-Branco and Soveral, 2014)

2.5.2 เซลล์โมโนไซต์ (monocytes)

เซลล์โมโนไซต์ เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวขนาดใหญ่ที่สร้างจากไขกระดูกและเข้าสู่กระแสเลือด หลังจากนั้นเซลล์โมโนไซต์ จะเคลื่อนที่ไปยังอวัยวะต่าง ๆ เช่น ม้าม ตับ และ ปอด ซึ่งจะเจริญและพัฒนาเป็นแมโครฟาจ ซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่กินเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกาย บนผิวเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ที่มีการแสดงออกของ CD14^{high}CD16^{low} จะเรียกว่า classical monocytes และเรียกโมโนไซต์ที่มีการแสดงออกของ CD14^{low}CD16^{high} ว่า non-classical monocytes การแสดงออกของยีนของ intermediate CD14⁺⁺CD16⁺ monocytes ในมนุษย์จะมีความเกี่ยวข้องกับการนำเสนอแอนติเจน การ phagocytosis และการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) (Miteva *et al.*, 2018) เซลล์โมโนไซต์มีการแสดงออกของ TLRs ทุกชนิดแต่ TLRs ที่มีการแสดงออกในระดับสูง ได้แก่ TLR1 TLR 2 และ TLR4 (Dolganic *et al.*, 2006) เซลล์โมโนไซต์สามารถถูกกระตุ้นการทำงานด้วยผลิตภัณฑ์ของจุลินทรีย์ผ่าน TLRs ได้แก่ TLR2 TLR4 และ TLR5 นอกจากนี้ตัวรับที่เป็น signaling lymphocytic activation molecule หรือ SLAM (CD150) ก็สามารกระตุ้น

การทำงานของเซลล์โมโนไซต์ผ่าน TLR2 TLR4 และ TLR5 แต่ IL-1 TNF- α IFN- β IFN- γ GM-CSF หรือ CD40-L จะไม่สามารถกระตุ้นได้ (Farina *et al.*, 2004) โดย TLR-2 เป็นตัวรับสำหรับจับกับองค์ประกอบของแบคทีเรียแกรมบวก เช่น peptidoglycan (PGN) จดจำไลโปโปรตีน (lipoproteins) และ lipoteichoic acid TLR4 เป็นตัวรับสำหรับ LPS ที่เป็นส่วนประกอบของผนังเซลล์ของแบคทีเรียแกรมลบ (gram-negative) และ TLR5 จะจดจำโปรตีนแฟลกเจลลิน (flagellin) ของแบคทีเรีย (Skinner *et al.*, 2005) เนื่องจากโมโนไซต์มีการแสดงออกของ TLRs ที่หลากหลายดังนั้น นอกจาก TLR2 TLR4 และ TLR5 แล้ว ยังมี TLR3 ที่สามารถกระตุ้นโดย polyinosine-polycytidylic acid polyIC และ TLR9 สามารถถูกกระตุ้นโดย unmethylated oligodeoxynucleotides ที่มี CpG motifs (CpG-B) การกระตุ้น TLRs โดยลิแกนด์ดังกล่าวนำไปสู่การผลิตไซโตไคน์ก่ออักเสบ เช่น IL-1 IL-6 IL-8 IL-12p70 และ TNF- α (Mao *et al.*, 2005) มีรายงานว่า การกระตุ้น TLR โดยใช้ IL-15/IL-15R จะทำให้เกิด differentiation ของโมโนไซต์ ไปเป็นแมโครฟาจอย่างรวดเร็ว และการกระตุ้นโดยใช้ GM-CSF/GM-CSFR ทำให้เกิดการ differentiation ของโมโนไซต์ไปเป็นเซลล์เดนไดรติกส์อย่างรวดเร็ว (Krutzik *et al.*, 2006)

2.5.3 เซลล์เดนไดรติกส์ (dendritic cells (DCs))

เซลล์เดนไดรติกส์ เป็นตัวแรกที่รับรู้ตัวแอนติเจน มีเซลล์เดนไดรติกส์ที่กำเนิดจาก myeloid และกำเนิดจาก lymphoid (Castelo-Branco and Soveral, 2014) เป็นเซลล์ที่สามารถกระตุ้นได้ ทั้ง CD4⁺ T cell และ CD8⁺ T cell เนื่องจากสามารถนำเสนอแอนติเจนผ่านทาง Major histocompatibility complex (MHC) class I และ class II ได้ และมี co-stimulatory ซึ่งเป็นคุณสมบัติของ APC เมื่อเซลล์ dendritic ตัวอ่อน (immature-dendritic cells) รับรู้แอนติเจนผ่านทางตัวรับต่าง ๆ เช่น TLR ก็จะถูกกระตุ้นให้กลายเป็น เซลล์ dendritic ตัวเต็มวัย (mature-dendritic cells) มีการแสดงออกของ MHC II เพิ่มขึ้นและเคลื่อนที่ไปยังต่อมน้ำเหลืองเพื่อนำเสนอแอนติเจนให้กับ CD4⁺ T cell เซลล์เดนไดรติกส์ จึงเป็นตัวเชื่อมระหว่างภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและแบบจำเพาะ (Yatim and Lakkis, 2015) TLRs ที่แสดงออกบนเซลล์เดนไดรติกส์เรียกว่า professional APC โดยเซลล์เดนไดรติกส์จะถูกกระตุ้นให้เกิดการทำงานเมื่อมีการติดเชื้อแบคทีเรีย โดยกระตุ้น TLRs และเหนี่ยวนำให้ Th-1 กระตุ้นไซโตไคน์ เช่น IL-12 โดยเฉพาะลิแกนด์ของ TLR7 (imidazoquinolines และ imiquimod) และลิแกนด์ของ TLR9 (oligodeoxynucleotides หรือ CpG DNAs) จะกระตุ้นการตอบสนองของ Th1 ได้ดีมาก ในทางกลับกันลิแกนด์ของ TLR2 (Pam3Cys) และลิแกนด์ของ TLR5 (แฟลกเจลลิน) สามารถกระตุ้นเซลล์ Th-2 ได้ มีรายงานว่า LPS ในปริมาณสูงจะกระตุ้น Th1 cells ขณะที่ LPS ในปริมาณที่ต่ำจะกระตุ้นการตอบสนองของ Th2 จะเห็นว่าลิแกนด์ของ TLR ส่งผลต่อการตอบสนองของ Th1 และ Th2 ผ่านทางเซลล์เดนไดรติกส์ โดย

เซลล์เดนไดรติกส์ที่เรียกว่า plasmacytoid DCs (PDCs) จะมีการผลิต IFN- α ในเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัส และมีการแสดงออกของ TLR7 และ TLR9 แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR1-6 หรือ TLR8 และจะมีการสร้าง IFN- α แต่ไม่สร้าง IL-12 ในการตอบสนองต่อลิแกนด์ของ TLR7 หรือลิแกนด์ของ TLR9 ส่วน DCs อื่นที่เป็น myeloid DCs (MDCs) จะมีการแสดงออกของ TLR1-7 แต่ไม่มีการแสดงออกของ TLR9 และจะหลั่ง IL-12 แต่ไม่หลั่ง IFN- α ในการตอบสนองต่อลิแกนด์ของ TLR4 (LPS) หรือลิแกนด์ของ TLR7/8 (imidazoquinolines) (Hemmi and Akira, 2005)

2.5.4 ลิมโฟไซต์ชนิดที (T cells)

ลิมโฟไซต์ชนิดทีผลิตจากไขกระดูก (bone marrow) ไปที่เนื้อเยื่อต่อมน้ำเหลือง (thymus) และพัฒนาเป็นลิมโฟไซต์ชนิดที ดังนั้นลิมโฟไซต์ชนิดทีจึงเป็นเซลล์ที่ผลิตจากต่อมน้ำเหลืองจะเริ่มทำงานเมื่อได้รับสัญญาณจาก APC การตอบสนองผ่านการทำงานของเซลล์ เรียกว่า cell-mediated immune responses แบ่งเป็น 2 ส่วนหลักๆ โดยดูสิ่งที่แสดงบนผิวเซลล์คือ CD4⁺ และ CD8⁺ (Castelo-Branco and Soveral, 2014)

CD4⁺ T cell หรือ Th หรือ CD4⁺ lymphocytes เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มี แอนติเจนชนิด CD4⁺ บนผิวเซลล์ จะรับรู้แอนติเจนผ่านทาง MHC class II เป็นเซลล์ที่ควบคุมให้เกิดการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ไม่ทำลายเซลล์ที่เป็นพิษและไม่สามารถฆ่าเซลล์ที่เป็นสิ่งแปลกปลอม CD4⁺ T cell แบ่งออกได้ 2 ชนิด คือ Th1 cells จะสัมผัสกับแอนติเจนแบบ endogenous เป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมในเซลล์ และ exogenous เป็นการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมนอกเซลล์ จะหลั่ง IFN- γ กระตุ้นการอักเสบ และ Th2 cells จะหลั่ง IL-4 ที่มีประสิทธิภาพในการยับยั้งเซลล์ Th1 และหลั่ง IFN- γ (Miteva *et al.*, 2018)

CD8⁺ T cell หรือ CTL เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีแอนติเจนชนิด CD8⁺ บนผิวเซลล์ มีการจำแนกและจดจำสิ่งแปลกปลอมว่าเป็นเซลล์ของตัวเองหรือเซลล์สิ่งแปลกปลอม ถ้าเป็นเซลล์ของสิ่งแปลกปลอมจะเข้าไปฆ่าหรือทำลาย จะรับรู้แอนติเจนผ่านทาง MHC class I โดยอาศัยการส่งสัญญาณของ Th สามารถจดจำแอนติเจนต่าง ๆ ที่เคยเข้าสู่ร่างกาย เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีหน้าที่ทำลายเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสเป็นหลัก (Castelo-Branco and Soveral, 2014)

suppressor T cell เป็นลิมโฟไซต์ชนิดทีที่ยับยั้งการทำงานของลิมโฟไซต์ชนิดที (Th และ CTL) โดยควบคุมการตอบสนองทางภูมิคุ้มกันไม่ให้มีมากเกินไป (Abbas *et al.*, 2015)

2.5.5 Natural killer (NK) cells

เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดหนึ่ง มีอยู่ประมาณ 10-15% ของปริมาณเม็ดเลือดขาวในเลือด (peripheral blood lymphocyte) มีบทบาทสำคัญในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด มี markers ที่จำเพาะแสดงอยู่บนผิว เช่น D56 เป็นต้น มี 2 กลไกหลักคือทำลายเซลล์และหลั่งไซโต

โคห์น ดำเนินการโดยประชากรกลุ่มย่อย (subpopulations) 2 ตัวหลักๆ คือ CD56dimCD16⁺ NK cells และ CD56brightCD16⁻ NK cells (Castelo-Branco and Soveral, 2014)

NK cell มีความสามารถในการเป็นนักฆ่าโดยธรรมชาติ สามารถทำลายเซลล์มะเร็งและเซลล์ที่ติดเชื้อไวรัสได้ทันที โดยไม่จำเป็นต้องผ่านการกระตุ้นจากแอนติเจนนั้น ๆ มาก่อน การที่ NK cell จะทำลายเซลล์เป้าหมาย (target cell) เช่น เซลล์มะเร็งหรือเซลล์ติดเชื้อไวรัสได้นั้นจะต้องมีการจับระหว่าง NK cell และ target cell ซึ่ง NK cell จะใช้ตัวรับที่อยู่บนผิวเซลล์จับกับลิแกนด์บน target cell จากนั้นจะส่งสัญญาณเข้าไปภายในเซลล์เพื่อควบคุมการทำงานของ NK cell เนื่องจากตัวรับของ NK cell สามารถส่งสัญญาณได้ 2 ลักษณะคือ สัญญาณกระตุ้น (activating signal) และสัญญาณยับยั้ง (inhibitory signal) ขึ้นอยู่กับชนิดตัวรับของ NK cell ว่าเป็นชนิดใด หากเป็น activating receptor จะจับกับ MHC class I ซึ่งถ้าเซลล์ปกติ MHC class I จะนำเสนอแอนติเจนของตัวเอง และส่งสัญญาณไม่ให้ NK cell ทำลายเซลล์เป้าหมายนั้น แต่กรณีที่เป็นเซลล์ติดเชื้อไวรัสหรือเซลล์มะเร็ง สามารถยับยั้งการแสดงออกของ MHC class I ได้หรือส่งเสริมการแสดงออกของ activating ligand ในกรณีนี้จะส่งเสริมให้ NK cell ทำลายเซลล์ที่ติดเชื้อ โดยการหลั่ง perforin ซึ่งทำให้เกิดรูที่บริเวณเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์เป้าหมาย และขนส่ง granzyme เข้าสู่เซลล์เป้าหมาย ผ่านรูที่เกิดจาก perforin จากนั้น granzyme จะกระตุ้นให้เซลล์เป้าหมายตายด้วยกระบวนการ apoptosis (Abbas *et al.*, 2015; Alam, 1998)

2.6 เซลล์แมโครฟาจและกลไกการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ

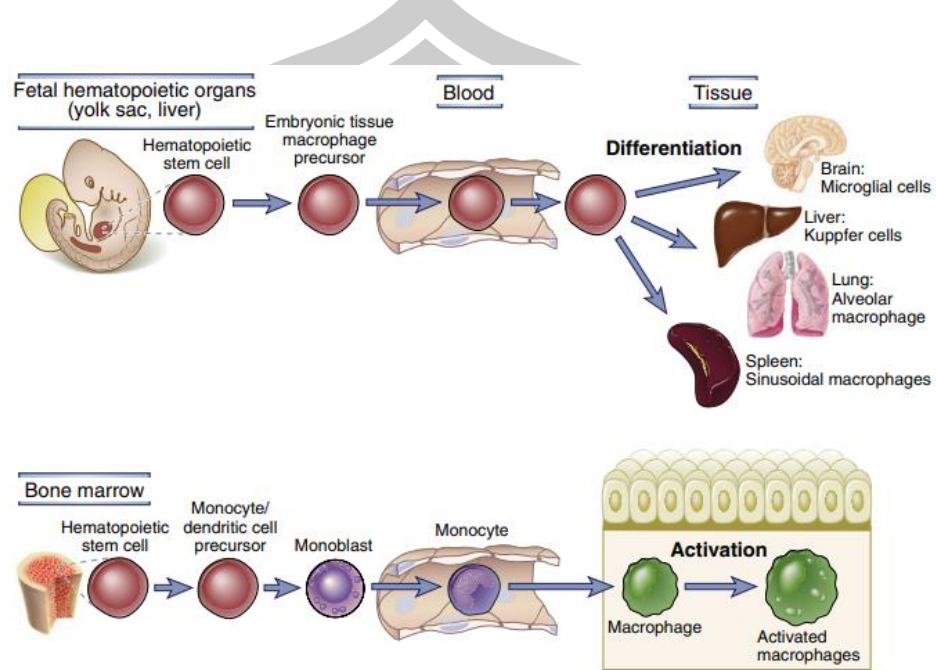
แมโครฟาจ เป็นเซลล์ phagocytic ชนิด mononuclear phagocyte ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ มีบทบาทสำคัญในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ และเป็นเซลล์หลักในการตอบสนองแบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด มีหน้าที่ในการ phagocytosis นำเสนอแอนติเจน และซ่อมแซม เป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากเซลล์โมโนไซต์ (CD14⁺CD16⁻) โดยกรณีที่เป็นเด็กทารกอยู่ในครรภ์ จะมีการสร้าง hematopoietic stem cell ซึ่งอยู่ในถุงไข่แดง (yolk sac) และตับ โดยเซลล์เหล่านี้เมื่อเข้าสู่กระแสเลือดแล้วจะเดินทางไปยังอวัยวะต่าง ๆ และพัฒนาการเป็น resident macrophage ในอวัยวะต่าง ๆ ที่มีชื่อแตกต่างกันไป ได้แก่ ในสมองเรียกว่าเซลล์ microglial ในตับเรียกว่าเซลล์ kupffer ในปอดเรียกว่าเซลล์ alveolar macrophage และในม้ามเรียกว่าเซลล์ sinusoidal macrophage ขณะที่ในผู้ใหญ่เซลล์ต้นกำเนิดจะถูกสร้างในไขกระดูก และถูกกระตุ้นด้วยโปรตีนที่เรียกว่า monocyte (หรือ macrophage) colony-stimulating factor (M-CSF) เซลล์จึงพัฒนาเป็นเซลล์โมโนไซต์ และเคลื่อนที่อยู่ในหลอดเลือด จากนั้นจะเคลื่อนย้ายไปยังเนื้อเยื่อเมื่อเกิดการอักเสบ และพัฒนาเป็นเซลล์แมโครฟาจ (CD14⁺CD16⁺) (ภาพที่ 2) ที่มีหน้าที่หลักในการป้องกันโฮสต์โดยการกลืน

กินและฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ อีกทั้งยังกลืนกินเซลล์ apoptotic ก่อนที่เซลล์จะตาย และกระตุ้นการอักเสบที่ตอบสนองต่อการอักเสบได้ไว (Abbas *et al.*, 2015)

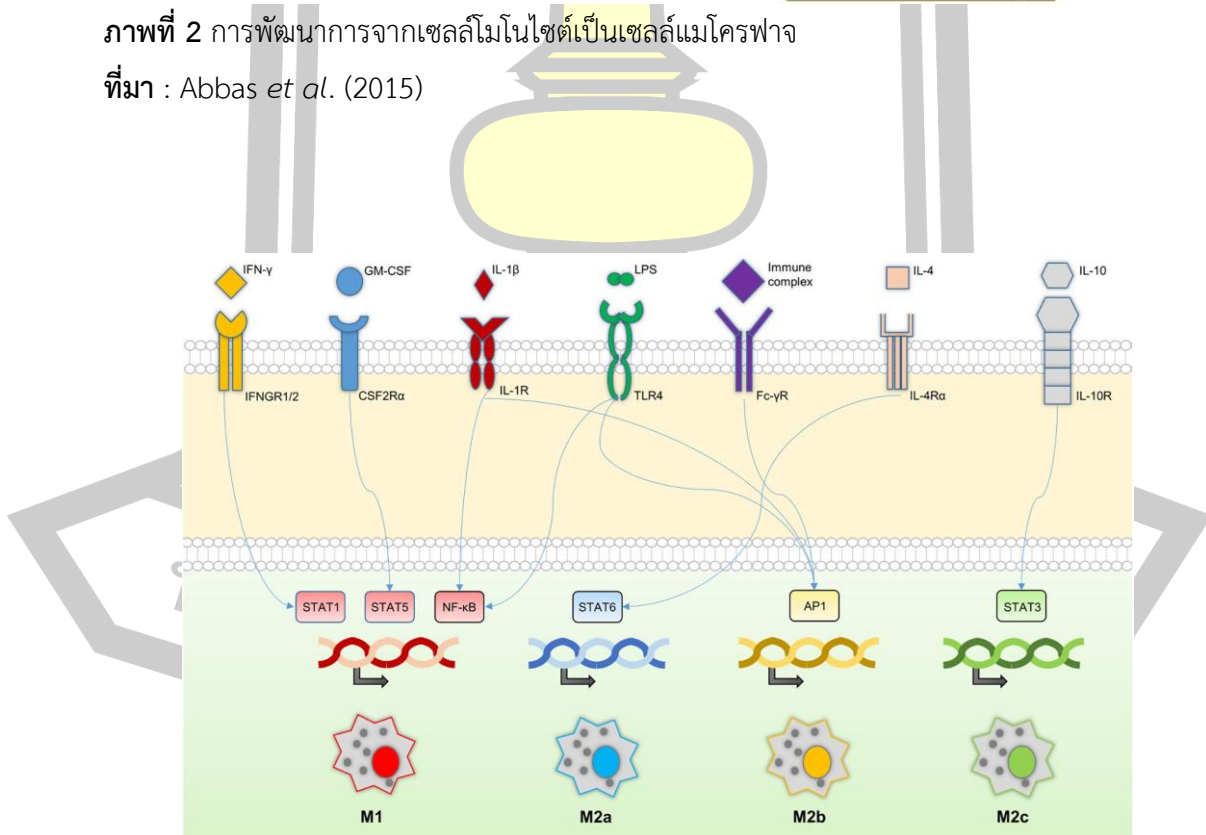
เซลล์แมโครฟาจแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่ แมโครฟาจชนิด M1 ที่มีบทบาทในการต้านไวรัส แบคทีเรีย และเนื้องอก ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS IFN- γ GM-CSF และ IL-1 β ผ่าน pathway ต่าง ๆ ได้แก่ Signal transducer and activator of transcription (STAT) และ Nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway จะส่งผลให้เกิด polarization เป็นแมโครฟาจชนิด M1 ที่จะไปกระตุ้นให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์ก่ออักเสบ เช่น TNF- α IL-1 β IL-16 IL-12 และ IL-23 ลดการแสดงออกของ IL-10 กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ MHC class II ที่สูง รวมถึงการแสดงออกของคีโมไคน์ ได้แก่ Cxcl5 Cxcl9 และ Cxcl10 เป็นต้น และแมโครฟาจชนิด M2 ที่มีบทบาทในการลดการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการสร้างเส้นเลือดเข้าไปยังเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งเป็น tumor promotion โดยตัวที่กระตุ้นให้เกิดการ polarization เป็นแมโครฟาจชนิด M2 ได้ดี คือ IL-4 และ IL-13 และส่งผลให้มีการผลิตพอลิเอมีน (polyamine) ลดการแสดงออกของ IL-12 และ IL-23 กระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 ในระดับสูง มีการหลั่งคีโมไคน์ ต่าง ๆ เช่น Ccl17 Ccl22 และ Ccl24 กระตุ้นให้มี vascular endothelial growth factor (VEGF) และ matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) ที่ส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง รวมถึงมีการแสดงออกของ M2 markers ได้แก่ MR Fizz-1 และ Yim1 เป็นต้น โดย M2 สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 1) M2a ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-4 ผ่าน STAT6 pathway 2) M2b ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-1 β LPS และ immune complex ผ่าน AP1 pathway และ 3) M2c ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-10 ผ่าน STAT3 pathway (ภาพที่ 3) (Palma *et al.*, 2018; Través *et al.*, 2012)

เซลล์แมโครฟาจ สามารถรับรู้โมเลกุลของจุลินทรีย์โดยตัวรับสัญญาณ (signaling receptors) ที่สำคัญคือ TLRs ที่อยู่บนผิวและอยู่ภายในเซลล์ เพื่อตอบสนองต่อการติดเชื้อและการบาดเจ็บ ทั้งนี้การทำงานของแมโครฟาจ จะขึ้นอยู่กับตัวกระตุ้นแมโครฟาจ จะกลืนกินจุลินทรีย์เข้าไปในถุง vesicles และหลอมรวม phagocytic vesicles เข้ากับไลโซโซมซึ่งเป็นกลไกในการฆ่าของแมโครฟาจ โดยแมโครฟาจจะแสดงตัวรับต่าง ๆ ที่รับรู้จุลินทรีย์ ได้แก่ PRRs (เช่น TLRs PAMPs DAMPs CLRs RLRs และ NLRs) opsonin receptors (เช่น Fc และ C3 receptors) และตัวรับสำหรับไซโตไคน์ในการจับกับตัวรับของจุลินทรีย์ จากนั้นจะโอบกั้นจุลินทรีย์เข้าไปข้างในและทำลายจุลินทรีย์โดยการสร้าง reactive oxygen species (ROS) ที่ได้จากการแปลงโมเลกุลของออกซิเจนไปเป็น ROS ด้วยระบบ phagocyte oxidase นอกจาก ROS แล้ว ยังมีการผลิต reactive nitrogen species ที่ส่วนใหญ่จะเป็น nitric oxide (NO) โดยเอนไซม์ inducible nitric oxide synthase (iNOS) ที่สามารถฆ่าเชื้อจุลินทรีย์ได้ นอกจากการฆ่าจุลินทรีย์แล้วแมโครฟาจ ยังมีหน้าที่อื่น ๆ ใน

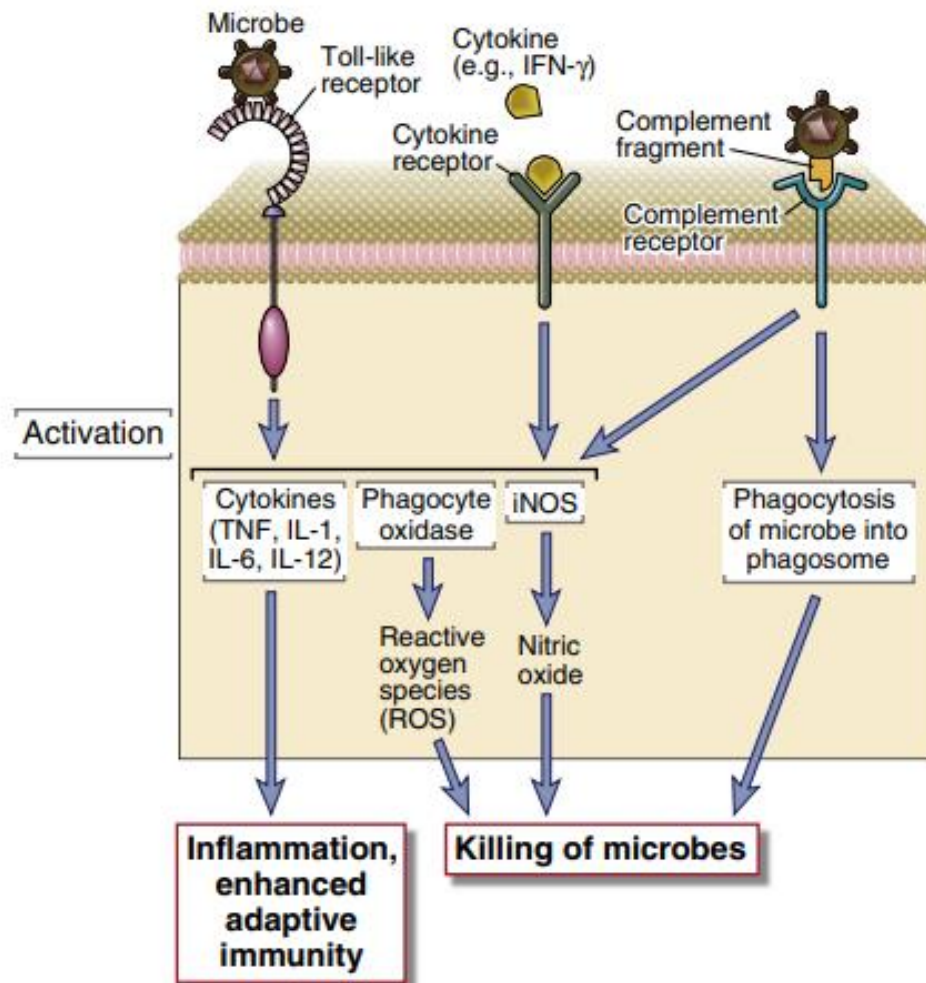
การป้องกันการติดเชื้อ เช่น การสร้าง TNF- α IL-1 β และ chemokines จะส่งเสริมปฏิกิริยาการอักเสบมากขึ้น (ภาพที่ 4) (Abbas *et al.*, 2015)



ภาพที่ 2 การพัฒนาการจากเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจ
ที่มา : Abbas *et al.* (2015)



ภาพที่ 3 การ polarization ของเซลล์แมโครฟาจชนิดต่าง ๆ
ที่มา : Palma *et al.* (2018)



ภาพที่ 4 หน้าที่และการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ

ที่มา : Abbas *et al.* (2015)

2.7 ไซโตไคน์ (cytokines)

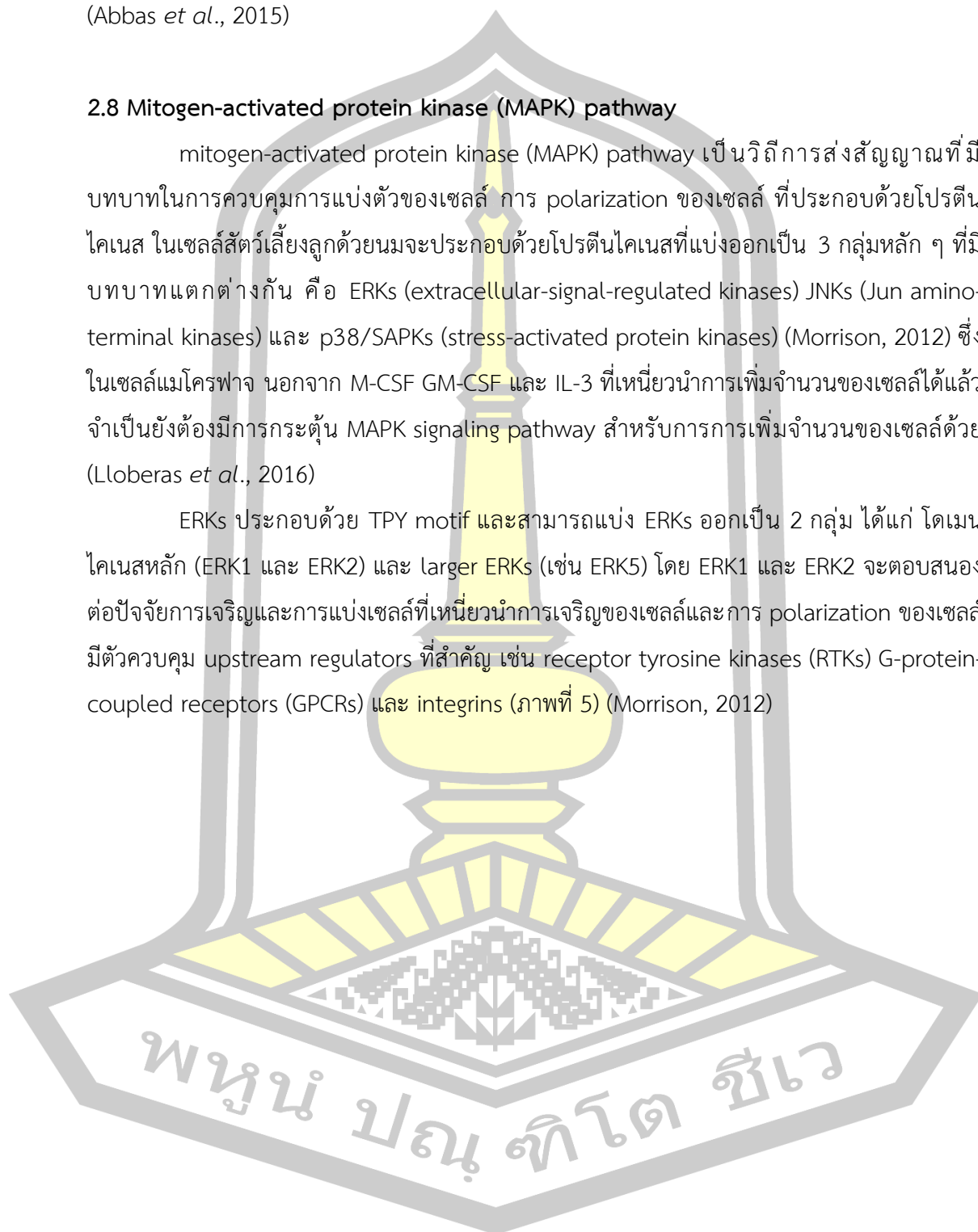
ไซโตไคน์เป็นกลุ่มโปรตีนที่หลั่งออกมาเป็นจำนวนมาก มีโครงสร้างหลากหลายและมีหน้าที่แตกต่างกันไป สร้างและหลั่งโดยเซลล์ของร่างกาย มีบทบาทในภูมิคุ้มกันทั้งแบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิดและภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ ในทุกเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันจะมีการหลั่งไซโตไคน์ และมีการแสดง signaling receptors ที่จำเพาะสำหรับไซโตไคน์ โดยไซโตไคน์ในภูมิคุ้มกันแบบโดยกำเนิดส่วนใหญ่หลั่งมาจาก mononuclear phagocyte ที่พบสิ่งแปลกปลอม และการกระตุ้นจากลิโพไพลด์ชนิดที่ 1 ส่วนภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะส่วนใหญ่หลั่งมาจากลิโพไพลด์ชนิดที่ 2 คุณสมบัติโดยทั่วไปของไซโตไคน์ คือ จะถูกหลั่งออกมาชั่วคราวหนึ่ง ไซโตไคน์ชนิดหนึ่ง ๆ อาจสร้างขึ้นโดยเซลล์หลายชนิดและออกฤทธิ์ต่อเซลล์หลายชนิด (pleiotropism) อาจมีบทบาทเพิ่มหรือลดการสร้างไซโตไคน์ชนิดอื่น ๆ อาจมีฤทธิ์

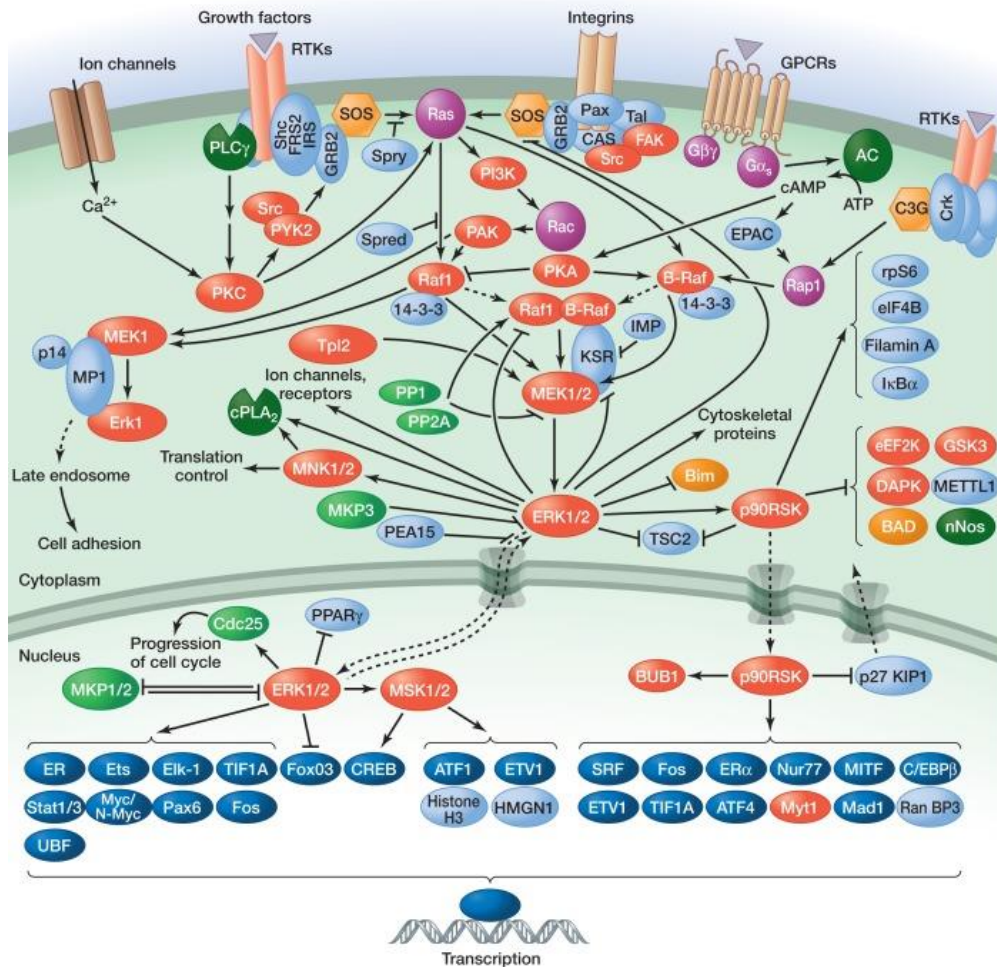
เสริม (additive effect/synergistic effect) หรือต้าน (antagonistic effect) กับไซโตไคน์อื่น ๆ (Abbas *et al.*, 2015)

2.8 Mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway

mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway เป็นวิถีการส่งสัญญาณที่มีบทบาทในการควบคุมการแบ่งตัวของเซลล์ การ polarization ของเซลล์ ที่ประกอบด้วยโปรตีนไคเนส ในเซลล์สัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมจะประกอบด้วยโปรตีนไคเนสที่แบ่งออกเป็น 3 กลุ่มหลัก ๆ ที่มีบทบาทแตกต่างกัน คือ ERKs (extracellular-signal-regulated kinases) JNKs (Jun amino-terminal kinases) และ p38/SAPKs (stress-activated protein kinases) (Morrison, 2012) ซึ่งในเซลล์แมโครฟาจ นอกจาก M-CSF GM-CSF และ IL-3 ที่เหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนของเซลล์ได้แล้ว จำเป็นยังต้องมีการกระตุ้น MAPK signaling pathway สำหรับการเพิ่มจำนวนของเซลล์ด้วย (Lloberas *et al.*, 2016)

ERKs ประกอบด้วย TPY motif และสามารถแบ่ง ERKs ออกเป็น 2 กลุ่ม ได้แก่ โดเมนไคเนสหลัก (ERK1 และ ERK2) และ larger ERKs (เช่น ERK5) โดย ERK1 และ ERK2 จะตอบสนองต่อปัจจัยการเจริญและการแบ่งเซลล์ที่เหนี่ยวนำการเจริญของเซลล์และการ polarization ของเซลล์ มีตัวควบคุม upstream regulators ที่สำคัญ เช่น receptor tyrosine kinases (RTKs) G-protein-coupled receptors (GPCRs) และ integrins (ภาพที่ 5) (Morrison, 2012)



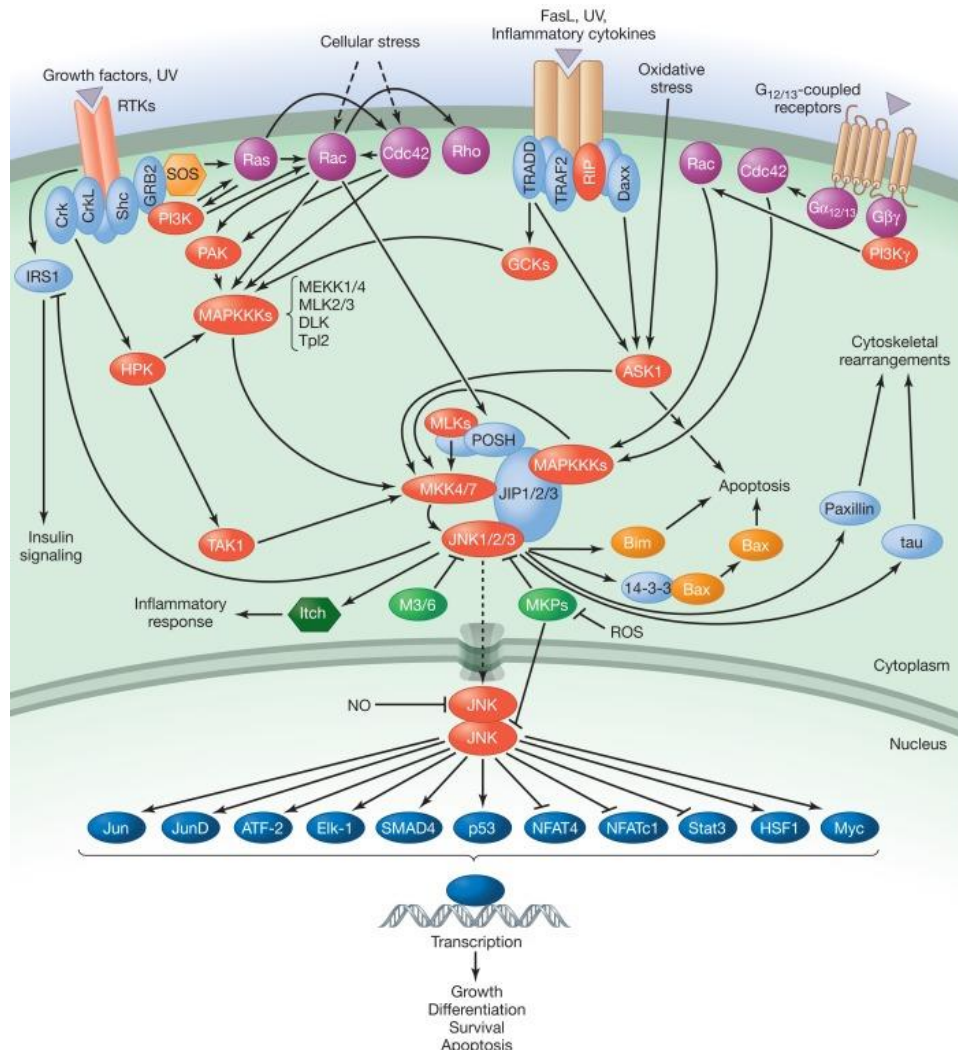


ภาพที่ 5 ERK MAPK pathway

ที่มา : Morrison (2012)

JNKs ประกอบด้วย TPY motif รวมถึง JNK1 JNK2 และ JNK3 มีบทบาทสำคัญใน apoptosis การอักเสบ การผลิตไซโตไคน์และการเผาผลาญ JNKs จะถูกเปิดใช้งานโดยความเครียดในสิ่งแวดล้อม (ionizing radiation ความร้อน oxidative stress และ DNA damage) และไซโตไคน์ การอักเสบ การส่งสัญญาณต่อ JNK จะเกี่ยวข้องกับ Rho family GTPases Cdc42 และ Rac (ภาพที่ 6) (Morrison, 2012)

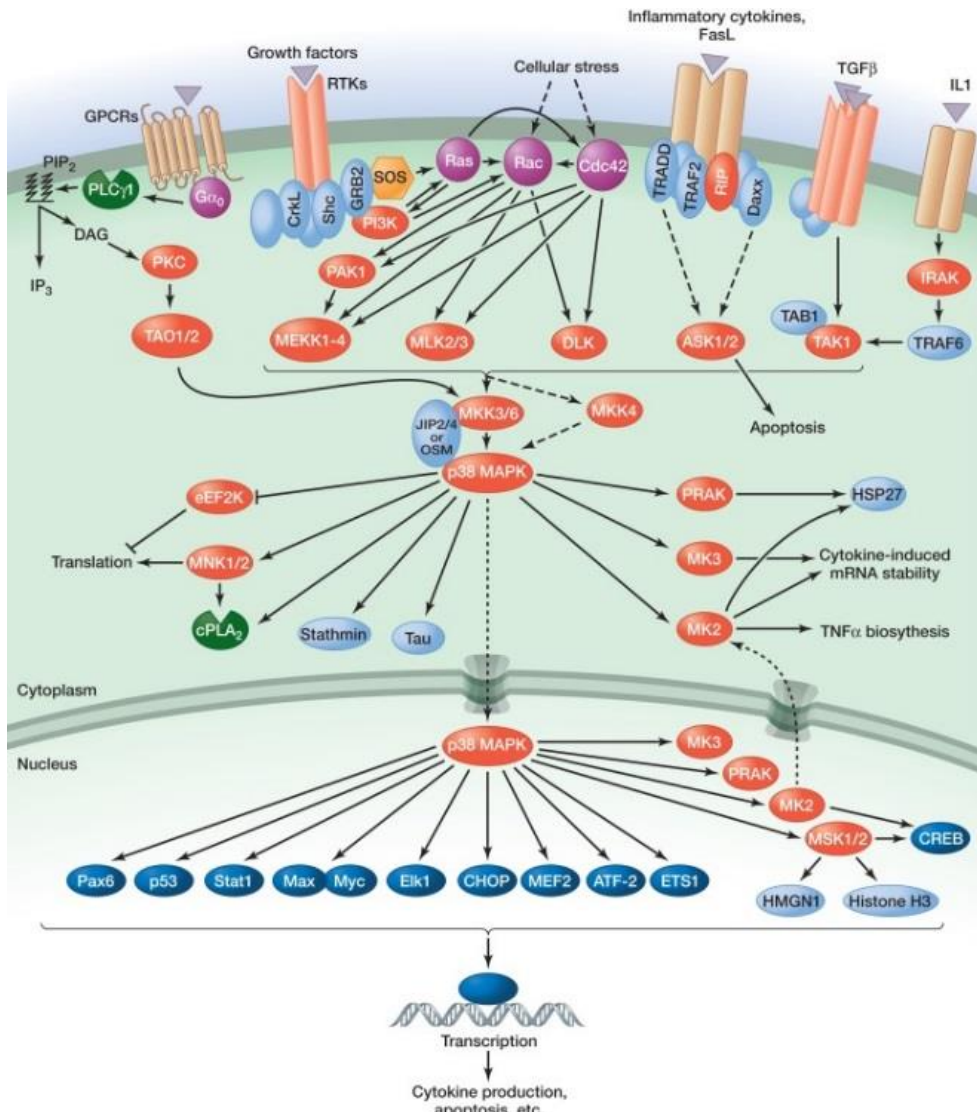




ภาพที่ 6 JNK MAPK pathway

ที่มา : Morrison (2012)

p38 ประกอบด้วย TPY motif รวมถึง 38α , 38β , 38γ และ 38δ โดยการเปิดใช้งานของ p38 จะคล้ายกับ JNK คือ ถูกกระตุ้นจากสภาพแวดล้อมและไซโตไคน์การอักเสบ และเมื่อถูกเปิดการใช้งานแล้วจะไปกระตุ้นให้เกิดการอักเสบ apoptosis การ differentiation และการควบคุม cell cycle ซึ่ง substrates ที่สำคัญใน p38 signaling คือ downstream kinases MK2/3 PRAK และ MSK1 และ MSK รวมถึง transcription factors ต่าง ๆ (ภาพที่ 7) (Morrison, 2012)



ภาพที่ 7 p38 MAPK pathway

ที่มา : Morrison (2012)

2.9 การรักษาแผนปัจจุบัน

การรักษาโรคต่าง ๆ ในปัจจุบันรักษาตามหลักการแพทย์แผนปัจจุบันจะมีเทคโนโลยีในการรักษาใหม่ ๆ มากมาย เช่น ยากลุ่มใหม่ การผ่าตัดแนวใหม่ ที่สามารถนำมาบำบัดรักษาผู้ป่วยต่าง ๆ ได้มากมาย (Thimbleby, 2013) แต่ก็ยังคงมีข้อจำกัดอยู่ไม่น้อยในการรักษา ไม่ว่าจะเป็นผลอื่น ๆ เกิดขึ้นร่วมโดยขึ้นอยู่กับคุณสมบัติของยาและสภาพของผู้ใช้ยา ผลข้างเคียงของยาที่เกิดขึ้นพร้อมกับผลรักษาที่ผู้ป่วยไม่อาจหลีกเลี่ยงได้ (Zhang *et al.*, 2015) เช่น ผลข้างเคียงของยาแก้แพ้ส่วนใหญ่คือ อาการง่วงนอน คอแห้ง ปากแห้ง อาจทำให้เกิดปัญหาในการเรียน การขับรถ แต่อาจทำให้ผู้ป่วยนอนหลับได้ง่ายในตอนกลางคืน (Kuna *et al.*, 2016) ผลไม่พึงประสงค์จากการใช้ยา เช่น การใช้ยา

ระงับปวด ต้านอักเสบ ทำให้เกิดผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น พิษที่อาจเกิดจากการใช้ยาเกินขนาด หรือพิษจากยาโดยตรง เช่น ยาแก้ปวดพาราเซตามอล ที่หากรับประทานมากเกินไปหรือติดต่อกันนานเกินไป อาจทำให้เกิดพิษทำลายตับได้ (McCrae *et al.*, 2018) แต่มียาหลายชนิดที่เกิดพิษได้ในขนาดที่ใช้ปกติ เช่น ยาปฏิชีวนะบางกลุ่มทำให้เกิดพิษต่อไต เป็นต้น นอกจากนี้ยังมีอาการแพ้ยาที่จะเกิดได้น้อยครั้งและคาดเดาได้ยาก การแพ้ยานั้นเกิดจากการตอบสนองของภูมิคุ้มกันในร่างกายที่มากเกินไป ต่อยานั้น ๆ ระดับการแพ้ยาของผู้ป่วยแต่ละคนจะขึ้นอยู่กับคุณสมบัติทางเคมีของยา และสถานภาพภูมิคุ้มกันของผู้ใช้ยา ดังนั้นจึงคาดเดาได้ยาก แต่โดยทั่วไปยาปฏิชีวนะ ยาแก้ปวดต้านอักเสบ ยาต้านมะเร็ง จะทำให้เกิดการแพ้ได้มากกว่ายาในกลุ่มอื่น ๆ การแพ้ยาอาจมีอาการที่ต่างกัน เช่น คัน ผื่นแดง เป็นผื่น ลมพิษ อักเสบ และ หอบหืด เป็นต้น รวมถึงการติดยาที่ทำให้ร่างกายเปลี่ยนแปลงลักษณะการทำงานไปจากเดิม กลายเป็นต้องอาศัยยารักษาในการทำหน้าที่ปกติ ดังนั้นการแพทย์ทางเลือกจึงเป็นการรักษาที่อาจตอบโจทย์และช่วยเติมเต็มความต้องการของผู้ป่วย ได้แก่ การรักษาที่เน้นความเป็นธรรมชาติ ปลอดภัยและเป็นพิษต่อร่างกาย มองสุขภาพที่เป็นปัจเจกบุคคลและเป็นองค์รวม คือ สุขภาพจะมีความเกี่ยวเนื่องทั้งทางร่างกาย จิตใจ ปัญญา รวมทั้งปัจจัยทางสังคมและสิ่งแวดล้อมต่าง ๆ ที่สัมพันธ์กับคนคนนั้น (Burd, 2003)

ในปัจจุบันมีการใช้ทรัพยากรอย่างมากในการป้องกันและรักษาโรคต่าง ๆ การพัฒนาและผลิตยาตัวใหม่เพื่อใช้ประโยชน์ทางการแพทย์นั้นจะใช้ระยะเวลาประมาณ 10-17 ปี และค่าใช้จ่ายสูงถึงประมาณ 1.3 พันล้านดอลลาร์ ในแต่ละปีนั้นจะมีทุนจำนวนมากในการพัฒนาและวิจัยยาตัวใหม่ แต่ก็มีจำนวนน้อยที่ได้รับการอนุมัติจากองค์การอาหารและยา (FDA) (Jadamba and Shin, 2016) ซึ่งมีเพียง 11% ของยาที่ได้รับการตรวจสอบในการทดลองทางคลินิกและได้รับการอนุมัติ (Li and Jones, 2012) โดยในกระบวนการพัฒนายานั้นจะต้องผ่านหลายขั้นตอนด้วยกัน ขั้นตอนที่สำคัญในกระบวนการนี้คือ การคัดกรอง HTS (high-throughput screening) ของสมุดสารประกอบขนาดเล็ก (small compound libraries) (Langhans, 2018) แต่เนื่องจากการพัฒนาและผลิตเป็นยาใหม่เพื่อการรักษาโรคเป็นกระบวนการที่มีอัตราเสี่ยงที่จะล้มเหลวในระหว่างการพัฒนาสูง ระยะเวลาในกระบวนการทดสอบยาที่ยาวนาน และค่าใช้จ่ายที่สูงมาก ดังนั้นเพื่อลดความเสี่ยง ค่าใช้จ่าย และระยะเวลาในการผลิตพัฒนายา (Jadamba and Shin, 2016) จึงนำไปสู่การพัฒนาสมุนไพร ที่เป็นการนำสมุนไพรที่มีสรรพคุณในการรักษาและมีสูตรตำรับยามาศึกษาและยืนยันประสิทธิภาพทางวิทยาศาสตร์และพัฒนาสูตรตำรับยาใหม่ใช้ในการรักษาโรคต่าง ๆ ที่ถือว่าเป็นกลยุทธ์จำเป็นในการพัฒนายาและลดความเสี่ยงในการลงทุน ดังนั้นการศึกษาพืชสมุนไพรและการพัฒนาสูตรตำรับยาใหม่จึงมีความจำเป็นในการรักษาโรคโดยทดแทนการใช้ยาแผนปัจจุบัน ซึ่งเป็นหนึ่งในการรักษาแบบการแพทย์ทางเลือก

การแพทย์ทางเลือกมีมากมายหลายประเภท มีการจัดระบบการแพทย์ทางเลือกออกเป็น 5 กลุ่ม (Bishop *et al.*, 2008) ดังนี้ 1) ระบบการแพทย์ทางเลือก (alternative medical systems) ได้แก่ แพทย์แผนจีน แพทย์แผนไทย โหมีโอพาธี อายุรเวทอินเดีย เป็นต้น 2) การแพทย์ความสัมพันธ์กายและจิต (mind-body interventions) ได้แก่ สมาธิบำบัด ชีกง โยคะ เป็นต้น 3) การรักษาทางชีวภาพ (biologically based therapies) ได้แก่ สมุนไพรอาหาร เป็นต้น 4) การรักษาทางกายภาพ (manipulative and body-based methods) ได้แก่ การกดจุด การจัดกระดูก การนวด เป็นต้น และ 5) การรักษาด้วยพลัง (energy therapies) เช่น พลังจักรวาล เรกิ โยเร เป็นต้น



บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

3.1 อุปกรณ์และวิธีการ

3.1.1 ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัคร

ตัวอย่างเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี อายุ 20-45 ปี ปริมาตร 20 ml จำนวน 3-6 ราย (เลขที่การรับรอง 208/2563) สำหรับการศึกษาการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจต่อสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็มแบบ *ex vivo*

3.1.2 ตัวอย่างพืชชอบเค็ม

ตัวอย่างพืชชอบเค็มในพื้นที่ดินเค็ม หมู่บ้านโนนสิม ตำบลหัวนาคำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ จำนวน 3 ชนิด คือ หนามพุดดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) และ ขลุ่ (*Pluchea indica*) ในวันที่ 12 เดือนธันวาคม พ.ศ. 2562 บริเวณละติจูด 16.4005 ลองจิจูด 103.2703 ที่ความสูงเหนือระดับน้ำทะเล 149.6568 เมตร (Google, n.d.) ที่มีปริมาณคราบเกลือมากกว่า 50% ของพื้นที่ (ภาพผนวกที่ ค1) จัดเป็นบริเวณพื้นที่ที่มีดินเค็มมาก (บุปผา โตภาคงาม, 2549)

3.1.3 จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย (เลขที่การรับรอง IBC09-10/2563)

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. รุ่งฤดี ทิวทอง ประกอบด้วย

1. *Staphylococcus aureus* DMST 8840 เป็นเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อทางผิวหนัง แผลและเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ ที่จะส่งผลร้ายแรงเมื่อเข้าสู่กระแสเลือดและเนื้อเยื่อภายใน (Taylor and Unakal, 2020)
2. *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อ methicillin ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ร้ายแรงและเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต (Reddy *et al.*, 2017)
3. *Escherichia coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ก่อโรค ได้รับการรับรองเป็น BSL-1 (Pang *et al.*, 2013)
4. *Salmonella* Typhimurium TISTR 2511 เป็นเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในมนุษย์ (Bottoni *et al.*, 2008)

โดยนำเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อกลีเซอรอลมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase soy broth (TSB) ก่อนนำไป quadrant streak ในอาหาร Trypticase soy agar (TSA) และนำไปตรวจสอบบนอาหารที่จำเพาะ ได้แก่ Eosin methylene blue (EMB) agar สำหรับ *E. coli* (ลักษณะ

metallic sheen ของเชื้อ *E. coli* บนจานอาหาร) และ Mannitol salt agar (MSA) สำหรับ *S. aureus* (ลักษณะโคโลนีสีเหลืองและโซลใสสีเหลือง) และ MSA ที่มียา Oxacillin สำหรับการตรวจสอบเชื้อ *S. aureus* (MRSA) และ Salmonella-Shigella (SS) agar สำหรับ Salmonella (ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก ไม่มีสี) จากนั้นทำการย้อมแกรมเพื่อยืนยันเชื้อก่อนการทดลอง

3.2 วิธีการทดลอง

ในการวิจัยนี้แบ่งการทดลองออกเป็น 4 ระยะ ดังนี้

3.2.1 ระยะที่ 1 การขอรับการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์ และขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ

3.2.1.1 ขอรับการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์

เตรียมเอกสารเพื่อขอรับการพิจารณาจรรยาบรรณการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.2.1.2 ขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ

เตรียมเอกสารเพื่อขอรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ ระดับห้องปฏิบัติการ จากคณะกรรมการเพื่อความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

3.2.2 ระยะที่ 2 การเตรียมตัวอย่างพืชขอบเค็มสำหรับการสกัดสารสกัดหยาบ การศึกษาคุณสมบัติของสารสำคัญของสารสกัดหยาบ คุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ และคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

3.2.2.1 การเก็บและการเตรียมตัวอย่างพืช

เก็บตัวอย่างพืชขอบเค็มทั้งต้น ได้แก่ หนามพุงดอ หนามแดง และ ชลู โดยระบุ วันช่วงเวลา พิกัดในการเก็บตัวอย่าง และวิเคราะห์ความเป็นดินเค็ม ในพื้นที่ดินเค็ม หมู่บ้านโพธิ์ส้ม ตำบลหัวนา คำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ สำหรับการเตรียมตัวอย่างพรรณไม้แห้ง (herbarium) เพื่อวิเคราะห์หาชื่อทางวิทยาศาสตร์ (scientific name) โดยการอ้างอิงตำราทางพฤกษศาสตร์ และเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับการสกัดสาร โดยนำตัวอย่างมาทำการแยกส่วนต่าง ๆ ของพืช นำตัวอย่างแต่ละส่วนไปล้างทำความสะอาดและหั่นเป็นชิ้นเล็ก ๆ ตากให้แห้งในที่ร่มนาน 14 วัน จากนั้นบดเป็นผงละเอียด (Zhang *et al.*, 2019) ซึ่งเก็บใส่ภาชนะปิดสนิทแล้วนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิห้องโดยมีสารดูดความชื้น (silica gel) ในการเก็บรักษา เพื่อใช้ในการสกัดสารต่อไป

3.2.2.2 กระบวนการสกัดสารจากพืชขอบเค็ม

นำตัวอย่างผงของพืชขอบเค็ม ได้แก่ หนามพุงดอ หนามแดง และ ชลู ที่เตรียมไว้มาสกัดด้วยตัวทำละลาย ได้แก่ 70% เอทานอล โดยวิธีการสกัดแบบรีฟลักซ์ มีอัตราส่วนของตัวอย่าง:ตัวทำ

ละลายที่ 1:10 (Dhanani *et al.*, 2013) ที่ 60 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นกรองสารละลายที่ได้ด้วยกระดาษกรอง นำสารละลายที่ได้จากการกรองไปทำแห้งด้วยเครื่อง เครื่องกลั่นระเหยสารแบบหมุน (rotary evaporator) จากนั้นนำสารสกัดหยาบที่แห้งแล้วละลายด้วย 100% dimethyl sulfoxide (DMSO) แล้วทำให้ปราศจากเชื้อโดยการกรองด้วย 100 μm nylon mesh ตามด้วย millipore filter ขนาด 0.45 μm และ 0.22 μm และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จนกว่าจะนำมาทดสอบเพื่อใช้ในการศึกษาต่อไป และคำนวณหา %yield ดังนี้

$$\% \text{ yield} = (\text{น้ำหนักสารสกัดที่ได้} / \text{น้ำหนักพืชที่ใช้ในการสกัด}) \times 100$$

3.2.2.3 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมด (TPC)

วิเคราะห์ด้วยวิธี Folin-Ciocalteu เติมตัวอย่างสารสกัดหยาบปริมาตร 100 μL ผสมกับ 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent ปริมาตร 500 μL จากนั้นเขย่าให้สารละลายเข้ากันและตั้งบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 3 นาที จากนั้นเติม 7.5% (w/v) Na_2CO_3 ปริมาตร 400 μL แล้วเขย่าให้เข้ากันและตั้งบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 30 นาที ก่อนนำไปทำการวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 731 nm โดยใช้ UV-Vis spectrometer โดยนำตัวอย่างสารสกัดไปเปรียบเทียบกับ gallic acid (GA) ที่เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 2 50 100 200 และ 250 mg/L และแสดงค่า TPC ในรูปแบบของค่าเทียบเท่า GA (mg GAE/g น้ำหนักแห้ง) (Cicco *et al.*, 2009) โดยทำการศึกษาในตัวอย่างสารสกัด

3.2.2.4 การวิเคราะห์หาปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด (TFC)

วัดค่า TFC โดยใช้ colorimetric assay โดยเติมน้ำ deionized ปริมาตร 500 μL และเติมตัวอย่างสารสกัดหยาบ 100 μL จากนั้นเติม 5% (w/v) NaNO_2 ปริมาตร 30 μL แล้วเขย่าให้สารละลายเข้ากันและบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 5 นาที จากนั้นเติม 10% (w/v) AlCl_3 ปริมาตร 60 μL แล้วเขย่าให้เข้ากันและบ่มไว้ในที่มืดเป็นเวลา 6 นาที แล้วทำการเติม 1M NaOH ปริมาตร 200 μL และเติมน้ำ deionized ปริมาตร 110 μL แล้วเขย่าให้เข้ากันและบ่มในที่มืด 5 นาที ก่อนนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 510 nm โดยนำตัวอย่างสารสกัดไปเปรียบเทียบกับ quercetin ที่เป็นสารมาตรฐานที่ความเข้มข้น 20 40 80 100 และ 200 mg/L และแสดงค่า TFC ในรูปแบบของค่าเทียบเท่า quercetin (mg QE/g น้ำหนักแห้ง) (Yoo *et al.*, 2008) โดยทำการศึกษาในตัวอย่างสารสกัดหยาบ

3.2.2.5 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) free radical

วิเคราะห์ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH โดยใช้ตัวอย่างสารสกัดสกัดหยาบปริมาตร 100 μL ผสมกับสารละลาย 80 μM DPPH ปริมาตร 900 μL แล้วเขย่าให้สารละลายเข้ากันและบ่ม

ไวน์ที่มีดีเป็นเวลา 30 นาที แล้วนำไปวัดค่าดูดกลืนแสงที่ 515 nm (Brand-Williams *et al.*, 1995) โดยทำการศึกษาในตัวอย่างสารสกัดหยาบ และใช้ ascorbic acid เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ คำนวณกิจกรรมการต้านอนุมูลอิสระโดยใช้สูตร

$$\text{Free radical scavenging activity (\%)} = \{(A_0 - A_i) / A_0\} \times 100$$

เมื่อ A_0 และ A_i เป็นค่าการดูดกลืนแสง

3.2.2.6 การวัดฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี 2, 2-azobis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS)

ผสม 7 mM ABTS (ละลายใน DI) กับ 2.45 mM potassium persulfate (ละลายใน DI) ในอัตราส่วน 1:10 บ่มที่มีดีเป็นเวลา 12-16 ชั่วโมงก่อนนำไปใช้ จากนั้นทำการทดลองโดย ทำการเจือจางสารละลาย ABTS⁺⁺ ด้วยเมทานอลให้ได้ค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.7 ± 0.01 ที่ความยาวคลื่น 734 nm จากนั้นนำ 1 ml ตัวอย่าง ผสมกับ 1ml สารละลาย ABTS⁺⁺ บ่ม 3-5 นาที แล้วนำไปวัดความยาวคลื่น 734 nm โดยใช้ ascorbic acid เป็นมาตรฐานในการเปรียบเทียบ (ปรับปรุงวิธีการจาก Zheleva-dimitrova *et al.*, 2010)

คำนวณ percentage inhibition

$$\text{ABTS radical scavenging activity (\%)} = (\text{Abs}_{\text{control}} - \text{Abs}_{\text{sample}}) / \text{Abs}_{\text{control}} \times 100$$

เมื่อ $\text{Abs}_{\text{control}}$ และ $\text{Abs}_{\text{sample}}$ เป็นค่าการดูดกลืนแสงของ blank และตัวอย่าง ตามลำดับ โดยเปรียบเทียบกับ ascorbic acid (AC) ที่ใช้เป็นสารมาตรฐาน

3.2.2.7 การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญ สารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์นั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Kaurinovic and Vastag, 2019) ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารสำคัญ 2 ชนิดกับการต้านอนุมูลอิสระ โดยใช้สารสกัดหยาบที่ความเข้มข้นเดียว คือ ที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$ ของสารสกัดหยาบ และนำไปหาค่าความสัมพันธ์เชิงเส้น (linear regression) ของปริมาณสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์ทั้งหมดที่มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระ (Aryal *et al.*, 2019) โดยค่าความสัมพันธ์แสดงเป็น R^2 (correlation coefficient) ที่พิจารณาค่านี้สำคัญที่ $p < 0.05$ ซึ่งทำให้จัดแบ่งกลุ่มของค่าความสัมพันธ์เป็น 5 กลุ่ม คือ R^2 น้อยกว่า 0.3 จัดเป็นความสัมพันธ์ระดับเล็กน้อย (biologically negligible) R^2 ระหว่าง 0.31-0.5 จัดเป็นความสัมพันธ์ระดับต่ำ (weak correlation) R^2 ระหว่าง 0.51-0.7 จัดเป็นความสัมพันธ์ระดับกลาง (moderate correlation) R^2 ระหว่าง 0.71-0.9 จัดเป็นความสัมพันธ์ระดับสูง (strong correlation) และ R^2 มากกว่า 0.9 จัดเป็นความสัมพันธ์ระดับสูงมาก (very strong correlation) (Miot, 2018)

3.2.2.8 การทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียด้วยวิธี agar disc diffusion

ทดสอบฤทธิ์ต้านแบคทีเรียของสารสกัด ในแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่

1.

Staphylococcus aureus DMST 8840 2. *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654 3. *Escherichia coli* ATCC 25922 และ 4. *Salmonella* Typhimurium TISTR 2511 ด้วยวิธี agar disc diffusion เตรียมอาหารแข็ง TSA ในจานเพาะเลี้ยง ใช้ไม้พันสำลีที่ปราศจากเชื้อชุบแบคทีเรียที่ปรับความชุ่มชื้นไว้โดยมีปริมาณเชื้อที่ความเข้มข้น 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL) ทำการ swab ให้ทั่วบนผิวอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA จากนั้นวางแผ่น paper disc (ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร) ที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ของสารสกัดหยาบลงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ TSA โดยใช้ตัวทำละลายนั้น ๆ เป็น control โดยใช้ จากนั้นนำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วนำมาวัดขนาดเส้นผ่านศูนย์กลางของบริเวณยับยั้ง (inhibition zone) โดยวัดหน่วยเป็นมิลลิเมตร (Arullappan *et al.*, 2009)

3.2.2.9 การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (Minimum inhibitory concentration; MIC) และการทดสอบการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (Minimum bactericidal concentration; MBC) ของสารสกัดหยาบโดยวิธี micro dilution

เพาะเลี้ยงแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ 1. *S. aureus* DMST 8840 2. *S. aureus*

(MRSA) DMST 20654 3. *E. coli* ATCC 25922 และ 4. *S. Typhimurium* TISTR 2511 ในอาหาร Mueller- Hinton broth (MHB) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง นำมาปรับความเข้มข้นของเชื้อเท่ากับ 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL) จากนั้นนำเชื้อ 5 μ l ผสมกับสารสกัดหยาบที่ความเข้มข้น 0-512 μ g/mL ปริมาตร 100 μ l ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อใน 96-well plates โดยทดสอบสารสกัดหยาบแบบเชิงเดี่ยว โดยมี 0.5% DMSO และอาหารเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารสกัดและตัวทำละลายของสารสกัดหยาบเป็นกลุ่ม control นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปตรวจสอบและวิเคราะห์หาค่า MIC จากค่าความเข้มข้นต่ำสุดของสารสกัดหยาบ และหาค่า MBC โดยวิธี drop plate ลงบนอาหารแข็ง Mueller-Hinton agar (MHA) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ตรวจสอบการเจริญของเชื้อ ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบที่ไม่มีเชื้อเจริญจะเป็นค่า MBC ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง (Nanasombat and Teckchuen, 2009)

3.2.3 ระยะที่ 3 การศึกษาการความเป็นพิษของสารสกัดหยาบต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงและเซลล์เม็ดเลือดขาวมนุษย์ แบบ *ex vivo*

3.2.3.1 การแยกเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (CD14⁺) จากเซลล์เม็ดเลือดขาว (White blood cells (WBCs)) และการเพาะเลี้ยงเซลล์ภูมิคุ้มกัน

นำเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดี อายุ 20-45 ปี ปริมาตร 20 mL จำนวน 3-6 ราย โดยแต่ละรายจัดเป็น n จากนั้นทำการแยก WBCs โดยวิธีการปั่นเหวี่ยงร่วมกับ red blood cell (RBC) lysis buffer และเก็บพลาสมาในแต่ละรายเพื่อใช้ในการเพาะเลี้ยงเซลล์เม็ดเลือดขาว ที่ได้ โดย WBCs ที่ได้จะนำมาแยกชนิดของเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ด้วยวิธี antibody-magnetic bead isolation ทำการแยกเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ โดยใช้ anti-human CD14 magnetic particles จาก WBCs ด้วย IMag separator (BD Biosciences, CA, USA) จะได้ความบริสุทธิ์ของเซลล์โมโนไซต์ ถึง 95% (Xiao *et al.*, 2018) และทำการเพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ (CD14⁻) ในอาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Thermo Fisher, USA) ที่มี 5% FBS + 5% autologous serum (Gibco, Thermo Fisher, USA) + 1X Antibiotic-Antimycotic โดยบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ แบบ overnight จะได้เซลล์ adherent ที่เป็นเซลล์ monocyte-derived macrophages (MDM) (Madhvi *et al.*, 2019)

3.2.3.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็ม (cytotoxicity test) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ โดยการวิเคราะห์หา % viable cells

ในการประเมินความเป็นพิษของสารต่อการส่งผลให้เซลล์ตาย เพื่อเลือกความเข้มข้นที่เหมาะสมในการนำไปศึกษาการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ หาได้จากค่า % ของ viable cells ของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็มต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ โดยวิธี 3, [4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazoliumbromide (MTT) assay

ทำการเปิดเซลล์ (เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์) ที่มีจำนวนเซลล์ 2×10^4 cells/well ลงใน 96-well culture plate จากนั้นเติมสารสกัดหยาบที่มีความเข้มข้นต่าง ๆ ได้แก่ 0-512 $\mu\text{g/ml}$ โดยมี 0.1% DMSO เป็นกลุ่ม control และ 0-10% propolis เป็น positive control ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) และบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมงทำการเติม 10 μl ของ 12 mM ของ MTT ในทุกหลุม บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 4 ชั่วโมงในที่มืด (หุ้มด้วย aluminum foil) ดูดสารละลาย MTT ออก โดยไม่ให้ผลึก formazan ซึ่งมีสีม่วงหลุดออกมาด้วยและละลายผลึก

formazan ด้วย 100% DMSO ปริมาตร 100 μl แล้วนำไปเขย่าเป็นเวลา 10 วินาที วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตรและนำค่าการดูดกลืนแสงที่อ่านได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์เซลล์ที่มีชีวิต (% ของ viable cells) จะทำให้ทราบระดับความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อนำไปใช้ต่อไป โดย % ของ viable cells คำนวณได้จากสูตร (Carmichael *et al.*, 1987)

$$\% \text{ viable cells} = (\text{OD of treated sample} / \text{OD of untreated sample}) \times 100$$

positive control ที่ใช้ในการทดลอง คือ 0-10% propolis เป็นสารจากธรรมชาติ มีลักษณะเป็นยางเหนียว (resinous) มีประสิทธิภาพในการต่อต้านแบคทีเรีย ไวรัส และเชื้อรา และสามารถกระตุ้นภูมิคุ้มกันอย่างไม่จำเพาะ โดยไม่เกิดผลข้างเคียงต่อร่างกาย (Shahryar *et al.*, 2011) สามารถกระตุ้นการทำงานของ macrophage (Orsi *et al.*, 2000)

3.2.3.3 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธี hemolysis assay

นำเลือดจากอาสาสมัครสุขภาพดีจำนวน 6 ราย โดยแต่ละรายจัดเป็น n จากนั้นนำมาปั่นเหวี่ยง 2,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ทำการเก็บส่วนชั้นล่างสุดที่เป็นเซลล์เม็ดเลือดแดง (erythrocyte, red blood cells) ปั่นล้างเซลล์ด้วย 1X PBS และเก็บส่วนชั้นล่างที่เป็น RBCs สำหรับเตรียมเป็น 2% RBCs ใน 1X PBS จากนั้นทดสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยนำสารสกัดที่เตรียมไว้ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ (2-fold dilution) เติมลงใน 2% RBCs อัตราส่วน 1:1 (500 μl :500 μl) เขย่าหลอดเบา ๆ แล้วบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส นาน 30 นาที นำมาปั่นเหวี่ยงที่ 2,500 \times g เป็นเวลา 6 นาที จากนั้นนำส่วนของเหลวเหนือตะกอนที่ได้ไปวัดการดูดกลืนแสงที่ 541 nm ด้วยเครื่อง UV-Vis spectrometer ทำการทดลอง 3 ซ้ำ (triplicate) โดยมี 1X PBS และ 0.1% DMSO เป็น negative control และมี 0.1% Triton-X 100 เป็น positive control (Sharmin *et al.*, 2018) นำค่าที่ได้ไปคำนวณ % hemolysis โดยสมการ

$$\% \text{ hemolysis} = \frac{\text{OD of sample} - \text{OD of negative control}}{\text{OD of positive control} - \text{OD of negative control}} \times 100$$

3.2.4 ระยะที่ 4 การศึกษาการการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจต่อสารสกัดจากพืชชอบเค็มแบบ *ex vivo* โดยการใช้เซลล์เม็ดเลือดขาว จากอาสาสมัครที่ปกติในการทดลอง

3.2.4.1 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยง

ศึกษาการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์ (CD14⁺CD16⁻) เป็นเซลล์แมโครฟาจ (CD14⁻CD16⁺) โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์โมโนไซต์จำนวน 1×10^6 cells ใน 24 well plates นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ ที่วันต่าง ๆ ได้แก่ วันที่ 0 1 2 3 4 5 6 7 8 และ 9 จากนั้นทำการเก็บเซลล์แล้วนำไปวิเคราะห์การแสดงออกของ CD14 และ CD16 สำหรับตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงจากโมโนไซต์เป็นแมโครฟาจ โดยการสกัด RNA ด้วย Trizol[®] reagent จากนั้นนำ RNA ไปทำ complementary DNA โดยวิธี reverse transcription และ ตรวจสอบการแสดงออกของยีนด้วยวิธี Reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) โดยใช้ยีน GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase) เป็นยีน internal control

3.2.4.2 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ

แมโครฟาจเป็นเซลล์ที่พัฒนามาจากโมโนไซต์ เพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอม โดยการเข้าล้อมรอบและทำลายเซลล์เป้าหมาย เซลล์แมโครฟาจจึงเป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการ phagocytosis สูง ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารต่อการ phagocytosis ของ MDM

กลุ่ม control ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลุ่ม control ที่ส่งเสริมแมโครฟาจชนิด M1 ได้แก่ 1) 10 ng/mL LPS 2) 10 ng/mL IFN- γ 3) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ กลุ่ม control ที่ส่งเสริมแมโครฟาจชนิด M2 ได้แก่ 2 ng/mL IL-4 (Nakao *et al.*, 2008; Orecchioni *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2012; Tonks *et al.*, 2003) โดยมี 20 μ M quercetin และ 300 μ M ascorbic acid เป็นสาร control กลุ่มต้านอนุมูลอิสระและต้านจุลินทรีย์ มีรายงานว่า quercetin มีความสามารถในการเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการ phagocytosis และลดการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบของ bovine neutrophils (Heinz *et al.*, 2010) และ ascorbic acid ยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการ phagocytosis และการฆ่าจุลินทรีย์ได้ (Carr and Maggini, 2017)

เพาะเลี้ยงเซลล์ MDM ที่ความเข้มข้น 1.5×10^5 cell/mL ใน 96 well plates และเติมสารสกัดยับยั้งจากพืชชอบเค็มที่ระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม นำไปบ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบ 48 ชั่วโมง ทำการเติมแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ 1. *S. aureus* DMST8840 2. *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 3. *E. coli* ATCC 25922 และ

4. *S. Typhimurium* TISTR 2511 ที่ MOI เท่ากับ 30 (30 แบคทีเรีย/1 แมโครฟาจ) บ่มที่ 37 องศาเซลเซียส ที่มี 5% CO₂ เป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมง ทำการตรวจสอบการจับกินแบคทีเรียที่ 1 และ 2 ชั่วโมง โดยการเติม 1% SDS เพื่อ lyse cell หยุดปฏิกิริยาด้วย TSB จากนั้นบ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm รายงานเป็น cells แบคทีเรีย/macrophage โดยเปรียบเทียบจากสมการของกราฟมาตรฐานของแบคทีเรีย จากการเพาะเลี้ยงแบคทีเรียความเข้มข้น 0-10⁷ cells/well ในอาหาร TSB บ่มเชื้อที่ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง วัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 600 nm (Lu *et al.*, 2014; Ponnusamy and Clinkenbeard, 2012)

3.2.4.3 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดยับยั้งต่อการแสดงออกของยีน TNF- α และ IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ

แมโครฟาจเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่สำคัญทั้งในระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด และภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ โดยมีหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมโดยการกลืนกิน การผลิตและหลั่งไซโตไคน์ และการนำเสนอแอนติเจนต่อลิมโฟไซต์ชนิดที่เมื่อถูกกระตุ้นจะแปรสภาพ (polarized) เป็นแมโครฟาจที่ทำหน้าที่แตกต่างกันอยู่อย่างน้อยสามชนิด ได้แก่ แมโครฟาจชนิด M1 เมื่อกระตุ้นด้วย LPS IFN- γ GM-CSF และ IL-1 β ผ่าน pathway ต่าง ๆ ซึ่งมีสมบัติในการเพิ่มประสิทธิภาพการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุกและเพิ่มการตอบสนองต่อการอักเสบ กระตุ้นให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์ก่ออักเสบ เช่น TNF- α IL-1 β IL-16 IL-12 และ IL-23 ลดการแสดงออกของ IL-10 และแมโครฟาจชนิด M2 (M2a M2b หรือ M2c) เมื่อกระตุ้นด้วย IL-4 และ IL-13 ซึ่งมีความสามารถในการกำจัดเชื้อจุลินทรีย์ที่บุกรุกได้เช่นเดียวกับแมโครฟาจชนิด M1 แต่มีสมบัติยับยั้งการอักเสบควบคุม การตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกัน และส่งเสริมการซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เสียหาย กระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 ในระดับสูง และมีรายงานว่า hydrogen peroxide (H₂O₂) ทำให้เกิดการผลิต TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจผ่าน p38 และ stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) (Nakao *et al.*, 2008) ในงานวิจัยนี้จึงศึกษาฤทธิ์ของสารต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจ

กลุ่ม control ที่ใช้ในการศึกษา ได้แก่ กลุ่ม control ที่ส่งเสริมแมโครฟาจชนิด M1 ได้แก่ 1) 10 ng/mL LPS 2) 10 ng/mL IFN- γ 3) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ กลุ่ม control ที่ส่งเสริมแมโครฟาจชนิด M2 ได้แก่ 2 ng/mL IL-4 (Nakao *et al.*, 2008; Orecchioni *et al.*, 2019; Rao *et al.*, 2012; Tonks *et al.*, 2003)

ศึกษาฤทธิ์ของสารต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยง โดยการเพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ ที่ความเข้มข้น 1x10⁶ cell/well ใน 24 well plates เป็นเวลา 3 วัน เติม 1) 1X PBS เป็น negative control 2) 10 ng/mL LPS 3) 10 ng/mL IFN- γ

4) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ และ 5) 2 ng/mL IL-4 เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 3 วัน จากนั้นทำการล้างเซลล์และแบ่งกลุ่มเป็นกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 40 μM H₂O₂ และกลุ่มที่ไม่ได้กระตุ้นด้วย 40 μM H₂O₂ ในกลุ่มที่กระตุ้นด้วย 40 μM H₂O₂ จะบ่มต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จากนั้นทำการเก็บเซลล์ สำหรับการสกัด RNA ด้วย Trizol[®] reagent และตรวจสอบการแสดงออกของ TNF- α (ไซโตไคน์สำหรับแมโครฟาจชนิด M1) และ IL-10 (ไซโตไคน์สำหรับแมโครฟาจชนิด M2) ด้วย RT-PCR โดยใช้ยีน GAPDH เป็นยีน internal control

เพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ ที่ความเข้มข้น 1x10⁶ cell/well ใน 24 well plates เป็นเวลา 6 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน เมื่อครบ 6 วัน ทำการล้างเซลล์และเติม MAPK inhibitor ได้แก่ ERK inhibitor PD98059 (10 μM) JNK inhibitor SP600125 (10 μM) p38 MAPK inhibitor SB203580 (5 μM) และ PD98059 (10 μM)+ SP600125 (10 μM)+ SB203580 (5 μM) บ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมงจากนั้นทำการล้างเซลล์และกระตุ้นด้วย 40 μM H₂O₂ จะบ่มต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จากนั้นทำการเก็บเซลล์สำหรับการสกัด RNA ด้วย Trizol[®] reagent และตรวจสอบการแสดงออกของ TNF- α (ไซโตไคน์สำหรับแมโครฟาจชนิด M1) ด้วย RT-PCR โดยใช้ยีน GAPDH เป็นยีน internal control

เพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ ที่ความเข้มข้น 1x10⁶ cell/well ใน 24 well plates เป็นเวลา 3 วัน โดยทำการเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 3 วัน จากนั้นทำการเติมสารสกัดหยาบจากพืช ขอบเค็มที่ความเข้มข้น 5 50 และ 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ เป็นเวลา 2 วัน โดยมี 20 μM quercetin และ 300 μM ascorbic acid เป็นสาร control กลุ่มต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบ มีรายงานว่า quercetin กระตุ้นการแสดงออกของ CD169 ซึ่งเป็น marker ของเซลล์แมโครฟาจ และยับยั้งการอักเสบ (Fu *et al.*, 2020; Fujiwara *et al.*, 2018) และมีรายงานว่า quercetin และ ascorbic acid ยับยั้งโปรตีน thioredoxin-interacting protein (TXNIP) ที่ควบคุมการทำงานของ fructose-induced NLRP3 inflammasome ส่งผลยับยั้งการแสดงออกของไซโตไคน์การอักเสบ (Choe and Kim, 2017) จากนั้นทำการล้างเซลล์ และกระตุ้นด้วย 40 μM H₂O₂ จะบ่มต่อเป็นเวลา 6 ชั่วโมงหลังการกระตุ้น จากนั้นทำการเก็บเซลล์ สำหรับการสกัด RNA ด้วย Trizol[®] reagent และตรวจสอบการแสดงออกของ TNF- α (ไซโตไคน์สำหรับแมโครฟาจชนิด M1) ด้วย RT-PCR โดยใช้ยีน GAPDH เป็นยีน internal control โดยวิเคราะห์ปริมาณของ PCR products ด้วยโปรแกรม ImageJ (Choe and Kim, 2017; Kim and Park, 2016; Nakao *et al.*, 2008; Nathan and Root, 1977)

3.3 การวิเคราะห์ผลและการวิเคราะห์ทางสถิติ

เก็บรวบรวมข้อมูลจากการทดลองอิสระสามครั้ง (three independent experiments) วิเคราะห์โดยการวิเคราะห์ความแปรปรวน (ANOVA) และทดสอบความแตกต่างของกลุ่มการทดลอง โดย Tukey's multiple comparison test สำหรับ One-Way ANOVA และ Bonferroni สำหรับ Two-Way ANOVA โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์สำเร็จรูป SPSS หรือ prism หรือโปรแกรมอื่นที่เหมาะสม และแสดงเป็นค่าเฉลี่ยและค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (SD) ที่ระดับนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เปอร์เซ็นต์ ($p < 0.05$)



บทที่ 4

ผลการทดลอง

4.1 การเตรียมตัวอย่างพืชชอบเค็มและการสกัดสารสกัดหยาบ

จากการเก็บตัวอย่างพืชชอบเค็ม สามารถเก็บตัวอย่างพืชได้ 3 ชนิด ได้แก่ หนามพุดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) และ ขลุ่ (*Pluchea indica*) พืชถูกแยกส่วนและสกัดด้วยวิธีรีฟลักซ์ โดยใช้ 70% เอทานอลเป็นตัวทำละลาย พบว่าพืชทั้ง 3 ชนิด สามารถแยกพืชออกเป็นส่วนต่าง ๆ และมี %yield ที่ได้ ดังนี้

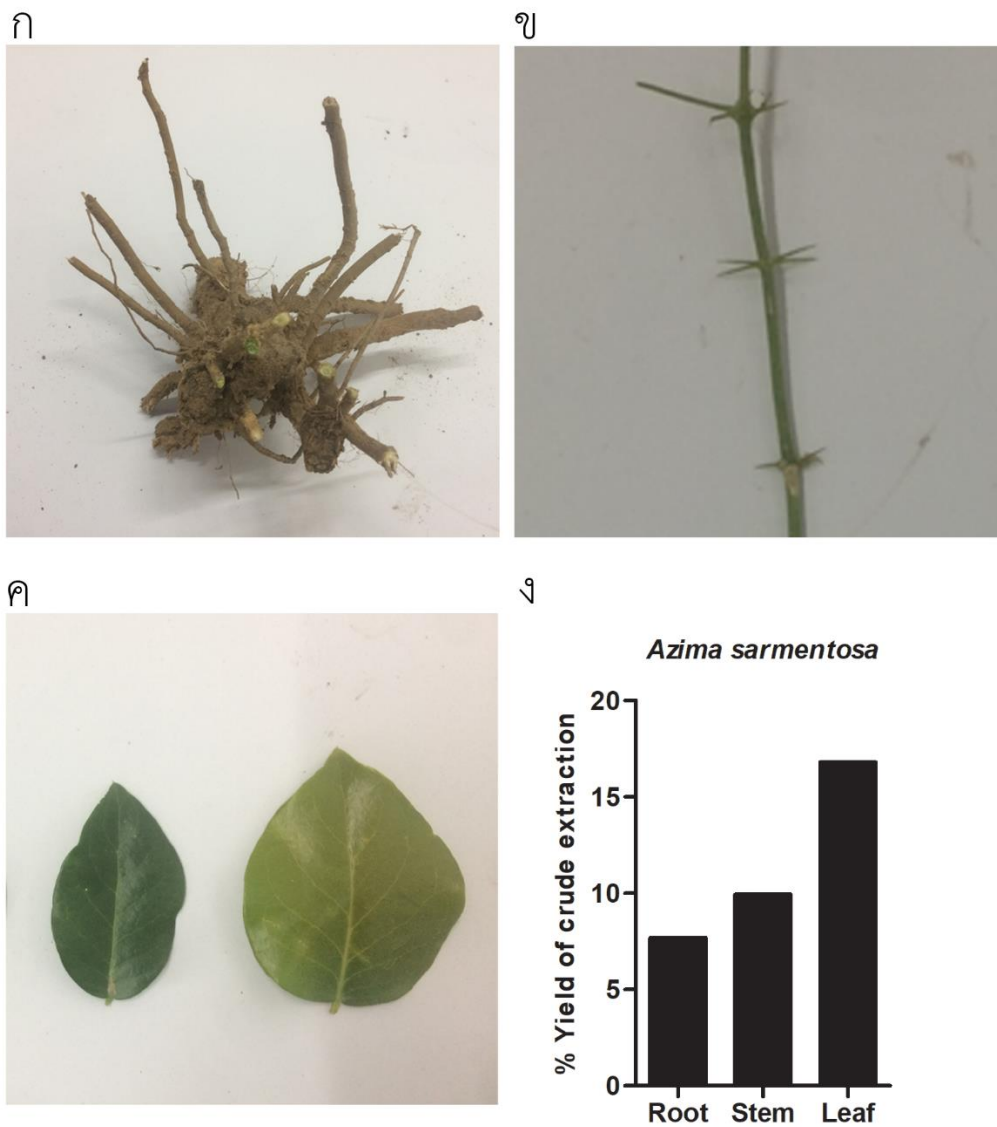
หนามพุดอ สามารถแยกพืชได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ (ภาพที่ 8ก ข และ ค) และมี %yield เป็น 7.68% 9.93% และ 16.79% ตามลำดับ (ภาพที่ 8ง) ซึ่งส่วนใบจะมี %yield สูงสุด

หนามแดง สามารถแยกพืชได้เป็น 3 ส่วน ได้แก่ ราก ลำต้น และใบ (ภาพที่ 9ก ข และ ค) และมี %yield เป็น 7.11% 9.70% และ 11.52% ตามลำดับ (ภาพที่ 9ง) ซึ่งส่วนใบจะมี %yield สูงสุด

ขลุ่ สามารถแยกพืชได้เป็น 5 ส่วน ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ ดอก และเปลือกนอก (ภาพที่ 10ก ข ค ง และ จ) และมี %yield เป็น 10.32% 8.81% 12.92% 9.02% และ 7.02% ตามลำดับ (ภาพที่ 10ฉ) ซึ่งส่วนใบจะมี %yield สูงสุด

จากวิธีการสกัดสารจากพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ด้วยวิธีสกัดแบบรีฟลักซ์ พบว่าสารสกัดหยาบส่วนใบมี %yield สูงสุด เมื่อเปรียบเทียบกับส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยหนามพุดอมี %yield ของสารสกัดหยาบส่วนใบสูงกว่าขลุ่และหนามแดง

พจนัน ปณฺ ทิโต ชีเว



ภาพที่ 8 แสดงส่วนต่าง ๆ ของหนามพุงดอ ได้แก่ ราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) และ % yield ของสารสกัดหยาบหนามพุงดอจากส่วนต่าง ๆ (ง)



ก



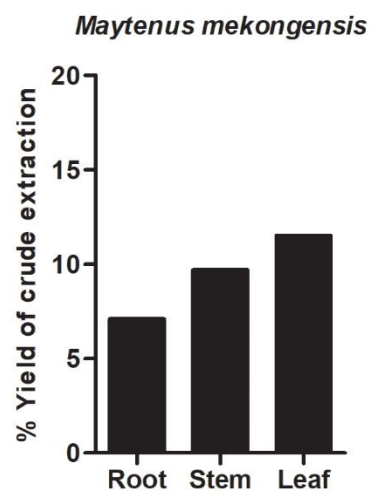
ข



ค

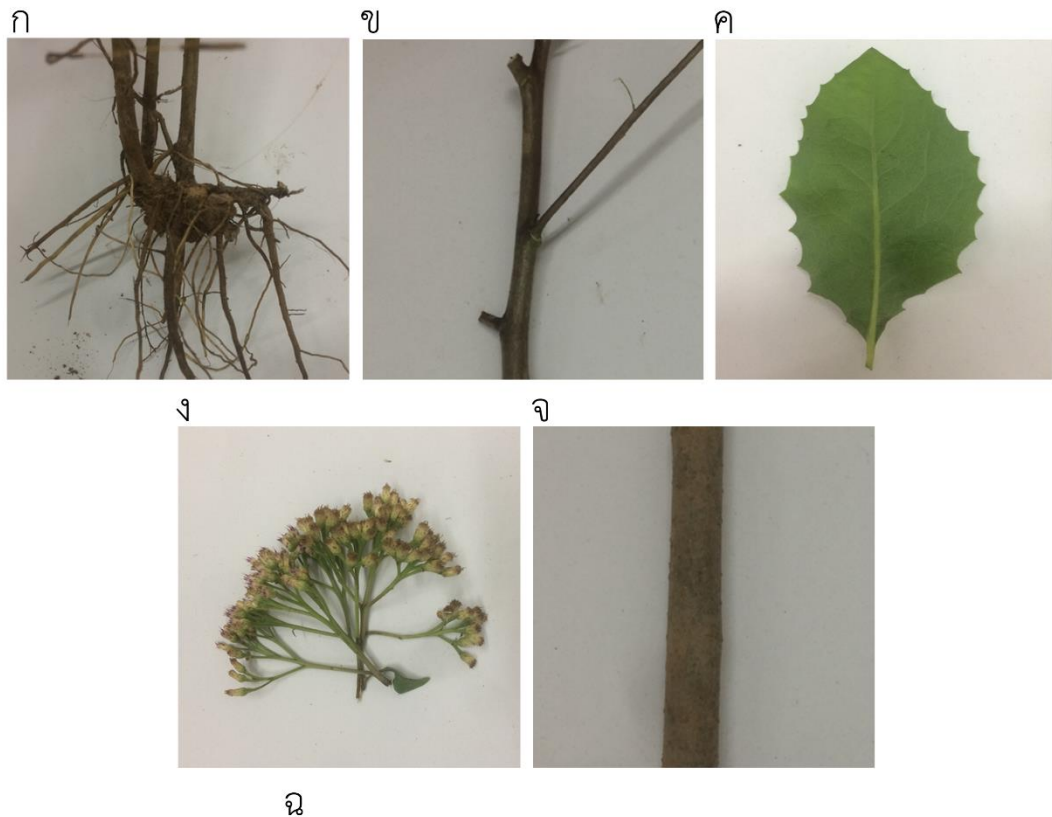


ง

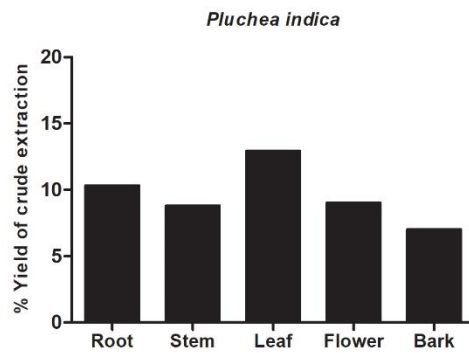


ภาพที่ 9 แสดงส่วนต่าง ๆ ของหนามแดง ได้แก่ ราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) และ % yield ของสารสกัดหยาบหนามแดงจากส่วนต่าง ๆ (ง)





ฉ



ภาพที่ 10 แสดงส่วนต่าง ๆ ของขลุ้ ได้แก่ ราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) เปลือกนอก (จ) และ % yield ของสารสกัดหยาบขลุ้จากส่วนต่าง ๆ (ฉ)

พหุบัน ปณุ ทิโต ชีเว

4.2 การวิเคราะห์คุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น

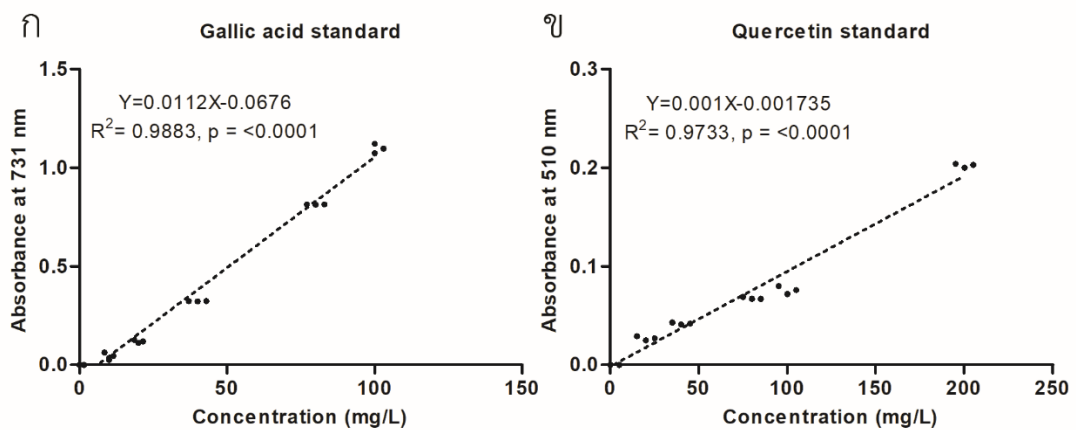
จากการวิเคราะห์ปริมาณสารสำคัญ 2 ชนิด ได้แก่ ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน gallic acid ($Y=0.0112X-0.0676$, $R^2=0.9883$) (ภาพที่ 11ก) และ ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดโดยคำนวณจากกราฟมาตรฐาน quercetin ($Y=0.001X-0.001735$, $R^2=0.9733$) (ภาพที่ 11ข) พบว่าสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มมีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด ดังนี้

หนามพุดอง พบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 21.371 ± 0.134 29.049 ± 0.312 และ 33.915 ± 0.759 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนใบ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้นและราก ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของทั้ง 3 ส่วนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12ก) และพบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 30.950 ± 8.500 35.700 ± 0.250 และ 58.950 ± 1.000 mg QE/g crude extract ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนใบ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้นและราก ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของใบแตกต่างกับรากและลำต้นอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของรากและลำต้นไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12ข)

หนามแดง พบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 408.464 ± 0.000 158.286 ± 0.536 และ 135.964 ± 0.000 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนราก มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้นและใบ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของทั้ง 3 ส่วนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12ค) และพบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดเท่ากับ 557.600 ± 2.000 271.800 ± 0.000 และ 179.800 ± 8.000 mg QE/g crude extract ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนราก มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้นและใบ ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของทั้ง 3 ส่วนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12ง)

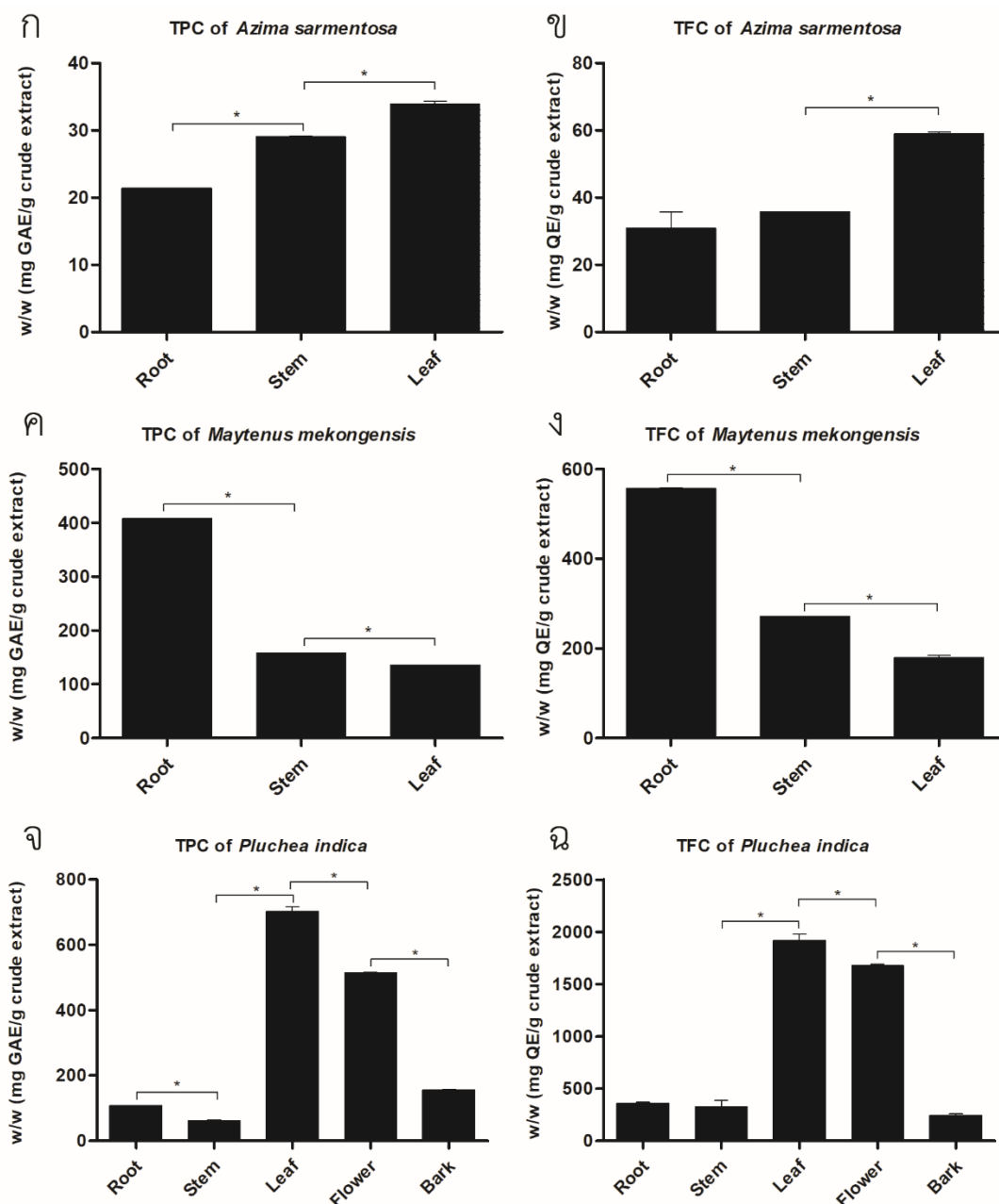
ขลุ้ พบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และเปลือกนอก มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดเท่ากับ 107.536 ± 1.696 62.625 ± 1.429 703.036 ± 19.429 514.643 ± 2.679 และ 155.393 ± 3.482 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนใบ มีปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ดอก เปลือกนอก ราก และลำต้น ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของทั้ง 5 ส่วนแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12จ) และพบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และเปลือกนอก มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด

เท่ากับ 359.800 ± 14.000 327.800 ± 98.000 1919.000 ± 100.000 1679.000 ± 20.000 และ 243.800 ± 24.000 mg GAE/g crude extract ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนใบ มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดมากที่สุด รองลงมาคือ ดอก ราก ลำต้น และเปลือกนอก ตามลำดับ ซึ่งปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของใบและดอกแตกต่างจากราก ลำต้น และใบอย่างมีนัยสำคัญ ขณะที่ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของราก ลำต้น และใบไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 12)



ภาพที่ 11 กราฟมาตรฐาน gallic acid (ก) และกราฟมาตรฐาน quercetin (ข)





ภาพที่ 12 แสดงปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดของพืชหนามพุงดอ (ก) หนามแดง (ค) และขลุ้ (จ) และปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมดของพืชหนามพุงดอ (ข) หนามแดง (ง) และขลุ้ (ฉ)

4.3 การศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS

จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด โดยเปรียบเทียบกับสารมาตรฐาน ascorbic acid จากวิธี DPPH ($Y=2.976X+3.154$, $R^2=0.9835$) มีค่า inhibitory concentration (IC_{50}) เท่ากับ $1.574\pm 0.002 \mu\text{g/mL}$ (ภาพที่ 13ก) และวิธี ABTS ($Y=$

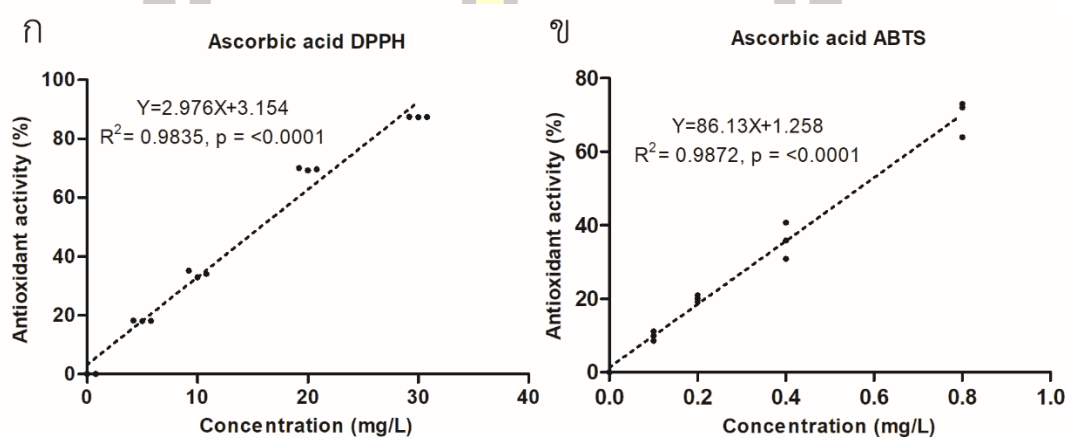
86.13X+1.258, $R^2=0.9872$) มีค่า IC_{50} เท่ากับ $0.291\pm 0.068 \mu\text{g/mL}$ (ภาพที่ 13ข) พบว่าพืชชอบเค็มแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ดังนี้

หนามพุงดอ พบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 197.133 ± 46.660 232.805 ± 4.774 และ $124.855\pm 1.012 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยส่วนของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาก ได้แก่ ใบ และสารสกัดหยาบส่วนราก และลำต้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าส่วนใบ ซึ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของใบแตกต่างจากส่วนอื่นอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 14) และพบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 12.026 ± 0.387 17.180 ± 0.216 และ $11.811\pm 0.655 \mu\text{g/mL}$ โดยส่วนของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาก ได้แก่ ใบและราก และสารสกัดหยาบส่วนลำต้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าอีก 2 ส่วน ซึ่งฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของรากและใบไม่ได้แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 15) จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของพืชหนามพุงดอด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดส่วนใบแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระสูงกว่าส่วนต่าง ๆ ของพืช

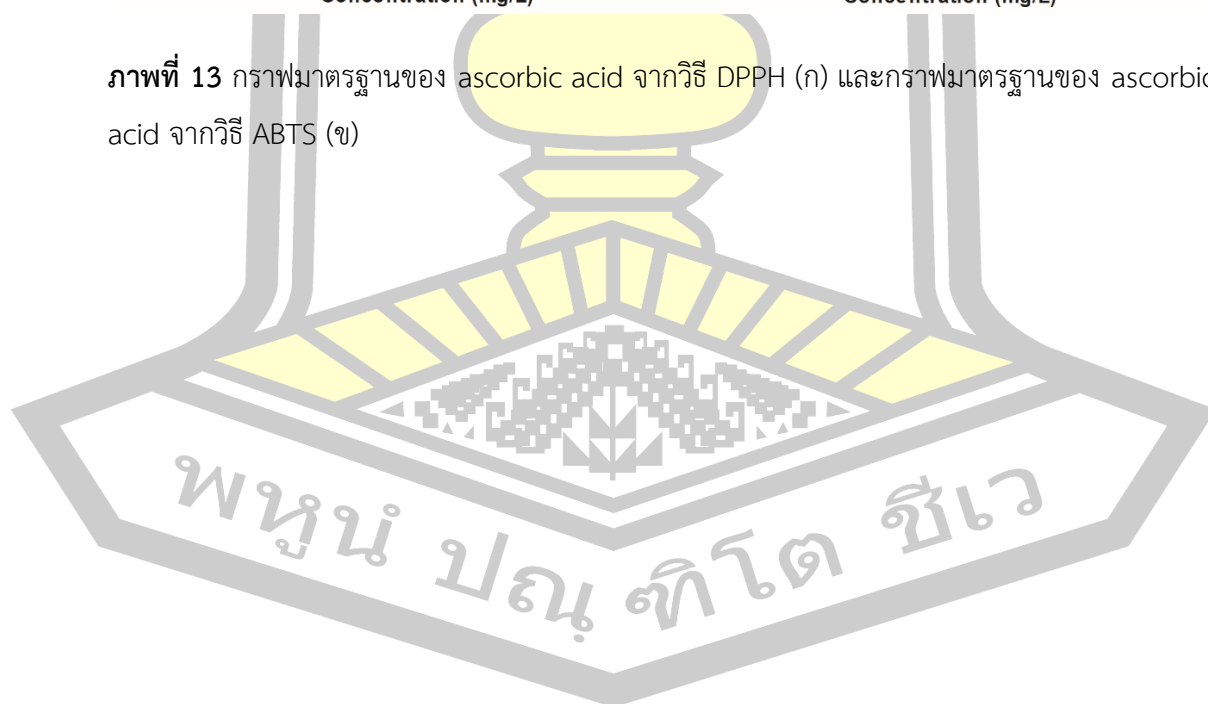
หนามแดง พบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 5.388 ± 0.008 15.266 ± 0.282 และ $25.700\pm 0.013 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยส่วนของสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาก ได้แก่ ราก และสารสกัดหยาบส่วนลำต้นและใบมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าราก ทั้งนี้สารทั้ง 3 ส่วน มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 16) และพบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น และใบ มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 0.607 ± 0.022 0.699 ± 0.029 และ $2.875\pm 0.015 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาก ได้แก่ รากและลำต้น ที่แสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ ascorbic acid และสารสกัดหยาบส่วนใบมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าอีก 2 ส่วน (ภาพที่ 17) จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของพืชหนามพุงดอด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดส่วนรากและลำต้นแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี

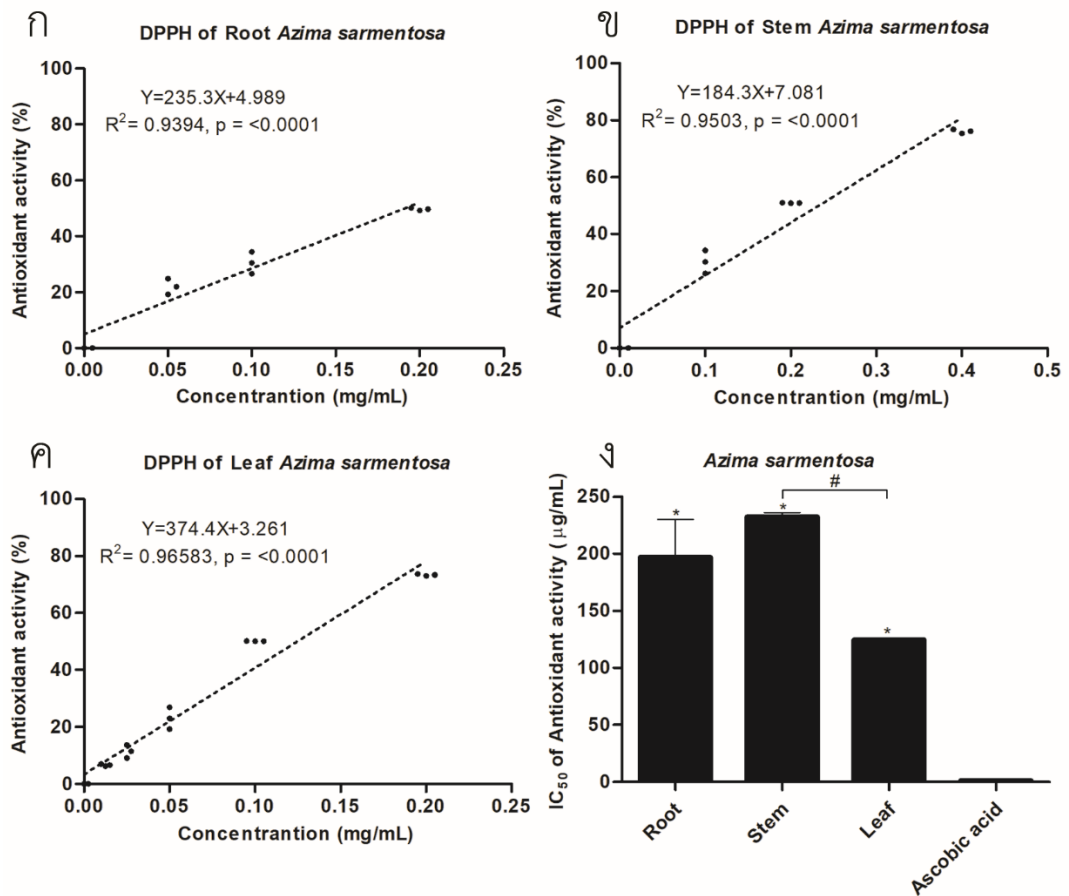
ขลุ้ พบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และเปลือกนอก มีค่า IC_{50} ของการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH เท่ากับ 32.552 ± 1.383 28.133 ± 0.685 5.665 ± 0.910 3.621 ± 0.050 และ $17.753\pm 0.851 \mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาก ได้แก่ ดอกและใบ โดยส่วนดอกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ ascorbic acid และฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของของดอกและใบไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ สารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระระดับกลาง ได้แก่ เปลือกนอก และสารสกัดหยาบส่วนใบฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อย ได้แก่ ลำต้นและราก (ภาพที่ 18) และพบว่า สารสกัดส่วนราก ลำต้น ใบ ดอก และเปลือกนอก มีค่า IC_{50} ของการ

ต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี ABTS เท่ากับ 47.331 ± 0.426 1.403 ± 0.049 0.761 ± 0.003 0.217 ± 0.015 และ 0.735 ± 0.023 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมาก ได้แก่ ดอก เปลือกนอก ใบ และลำต้น ซึ่งมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ ascorbic acid ที่สำคัญพบว่าส่วนดอกมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่า ascorbic acid และสารสกัดหยาบที่มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่าส่วนอื่น คือ ราก (ภาพที่ 19) จากการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของพืชหนามพุดด้วยวิธี DPPH และ ABTS พบว่าสารสกัดส่วนดอกและใบแสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดีและมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ ascorbic acid ทั้งในวิธี DPPH

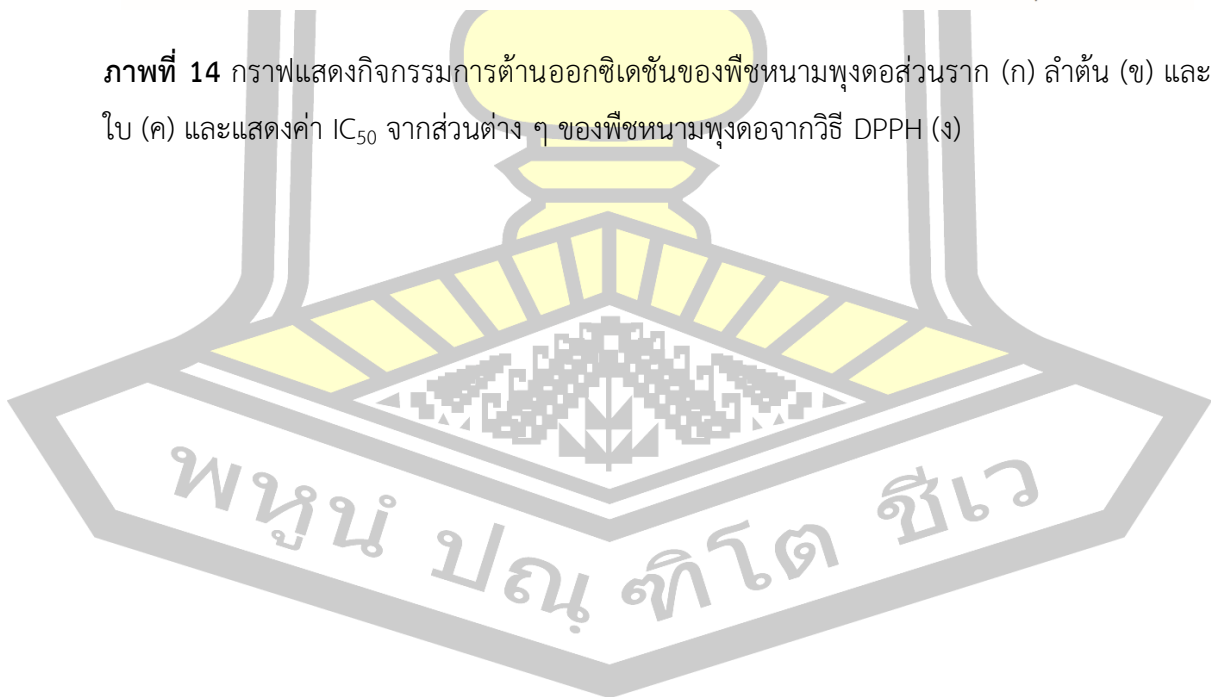


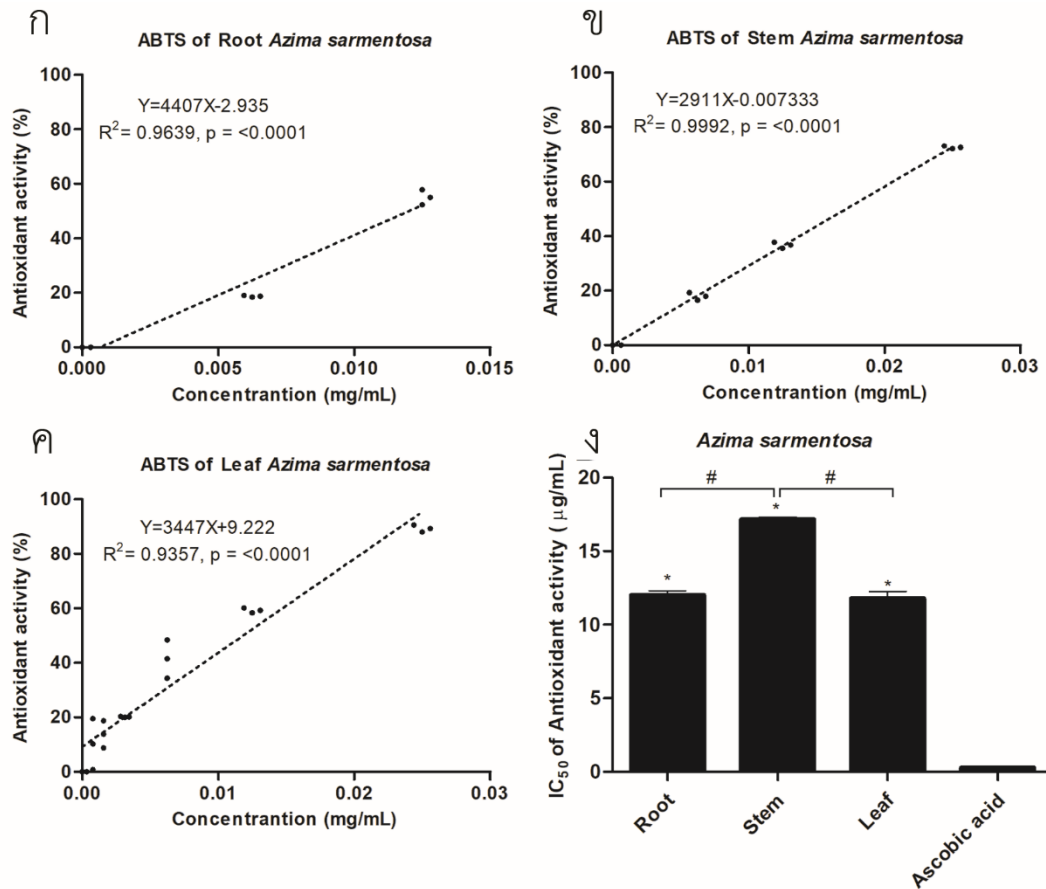
ภาพที่ 13 กราฟมาตรฐานของ ascorbic acid จากวิธี DPPH (ก) และกราฟมาตรฐานของ ascorbic acid จากวิธี ABTS (ข)





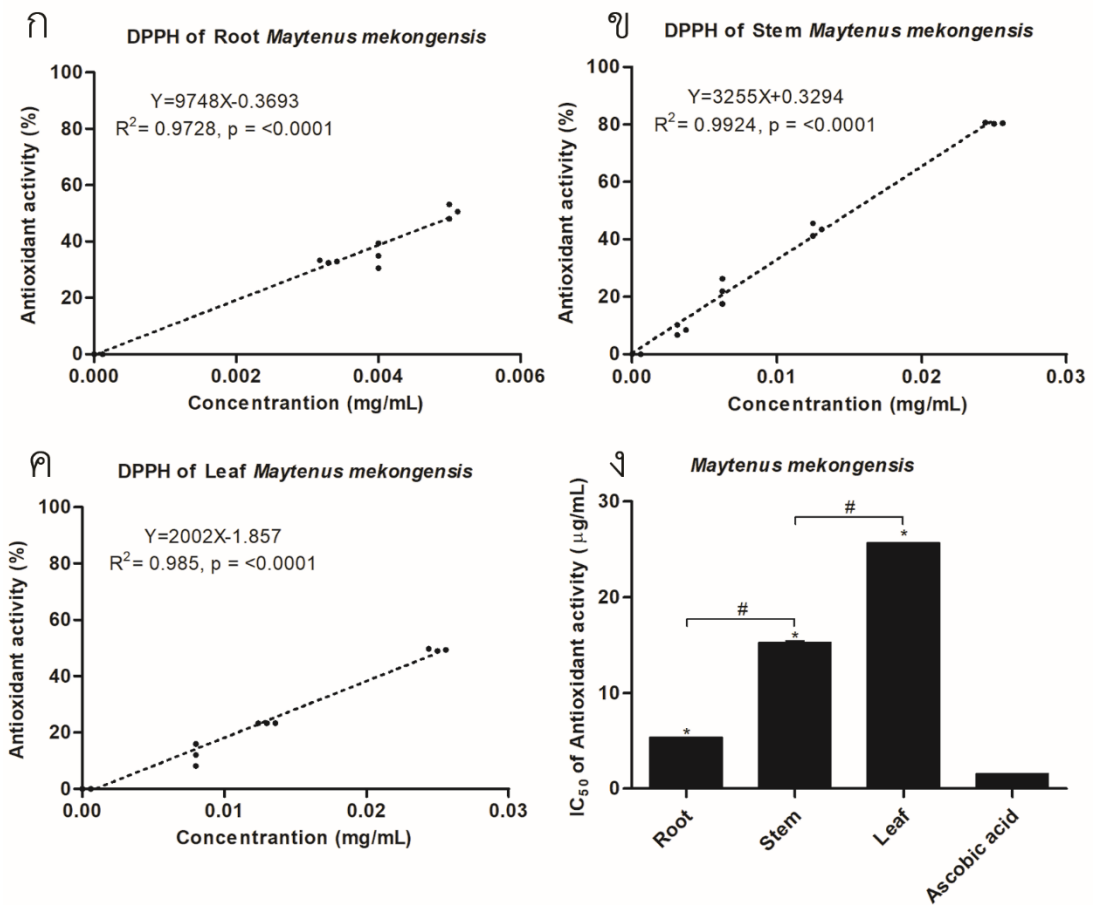
ภาพที่ 14 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชหนามพุดอส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และใบ (ค) และแสดงค่า IC₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดจากวิธี DPPH (ง)



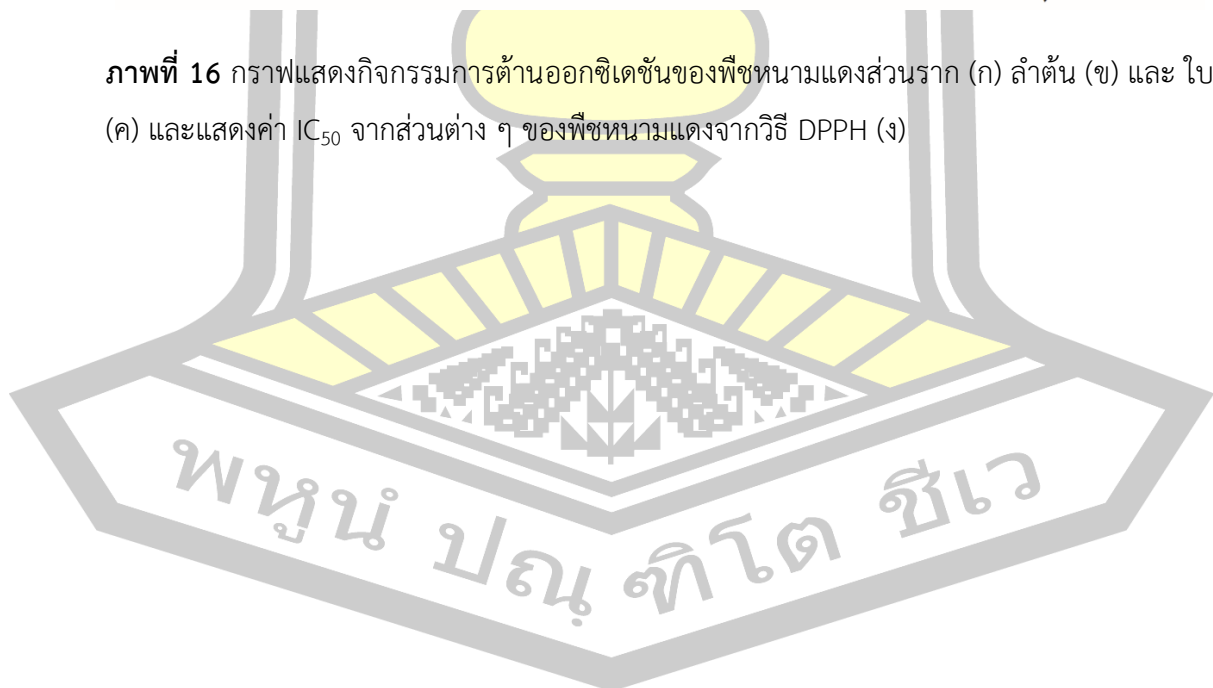


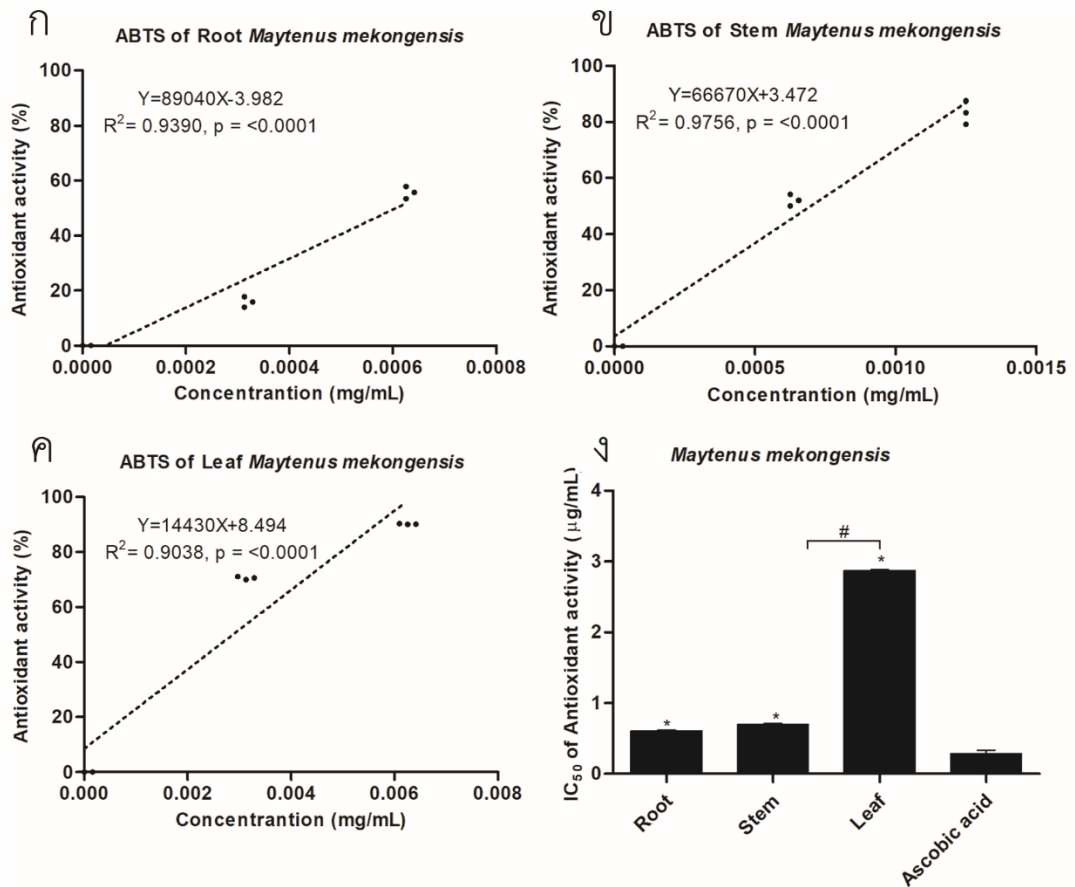
ภาพที่ 15 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชนามพุดอส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชนามพุดอจากวิธี ABTS (ง)





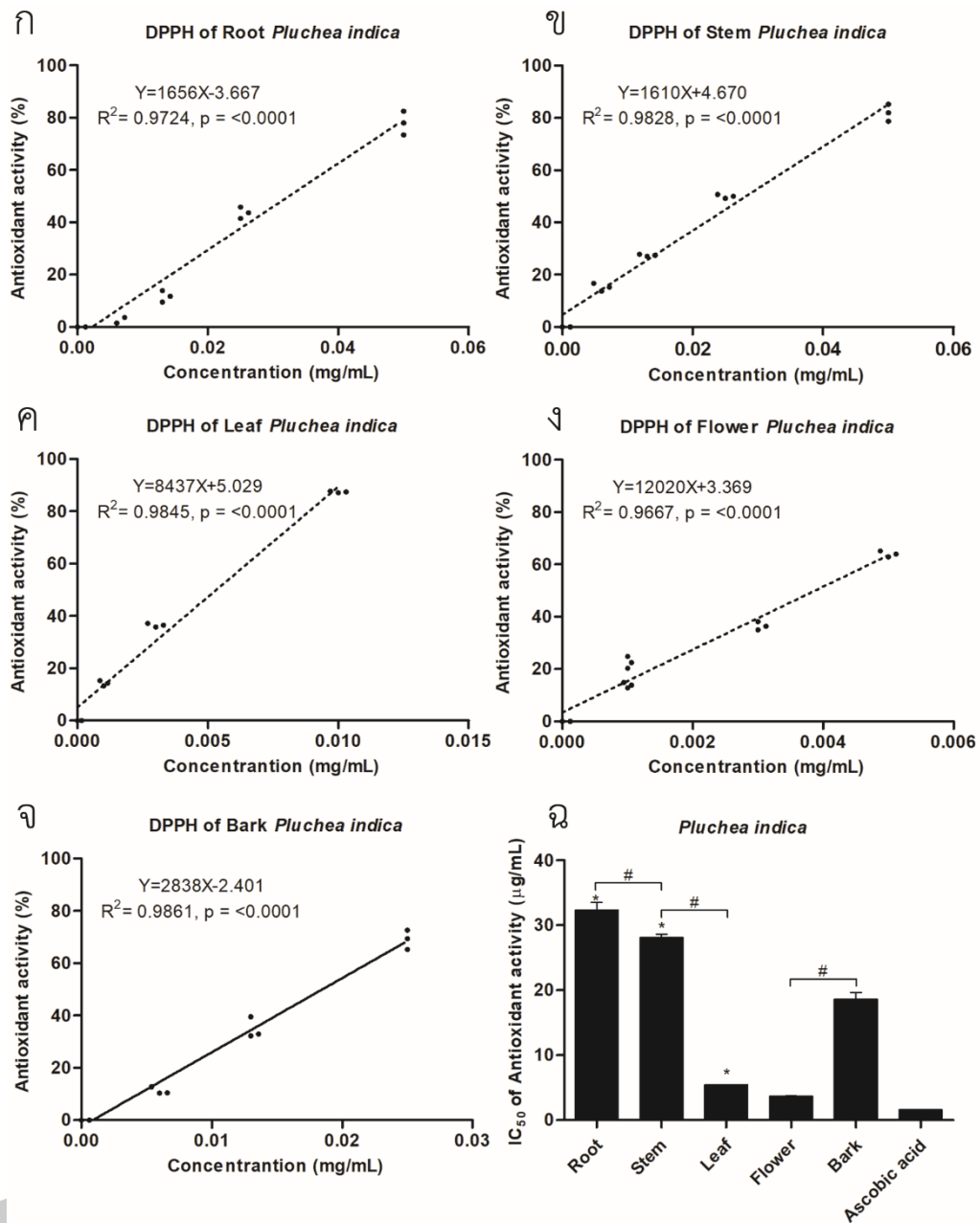
ภาพที่ 16 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชนามแดงจากวิธี DPPH (ง)



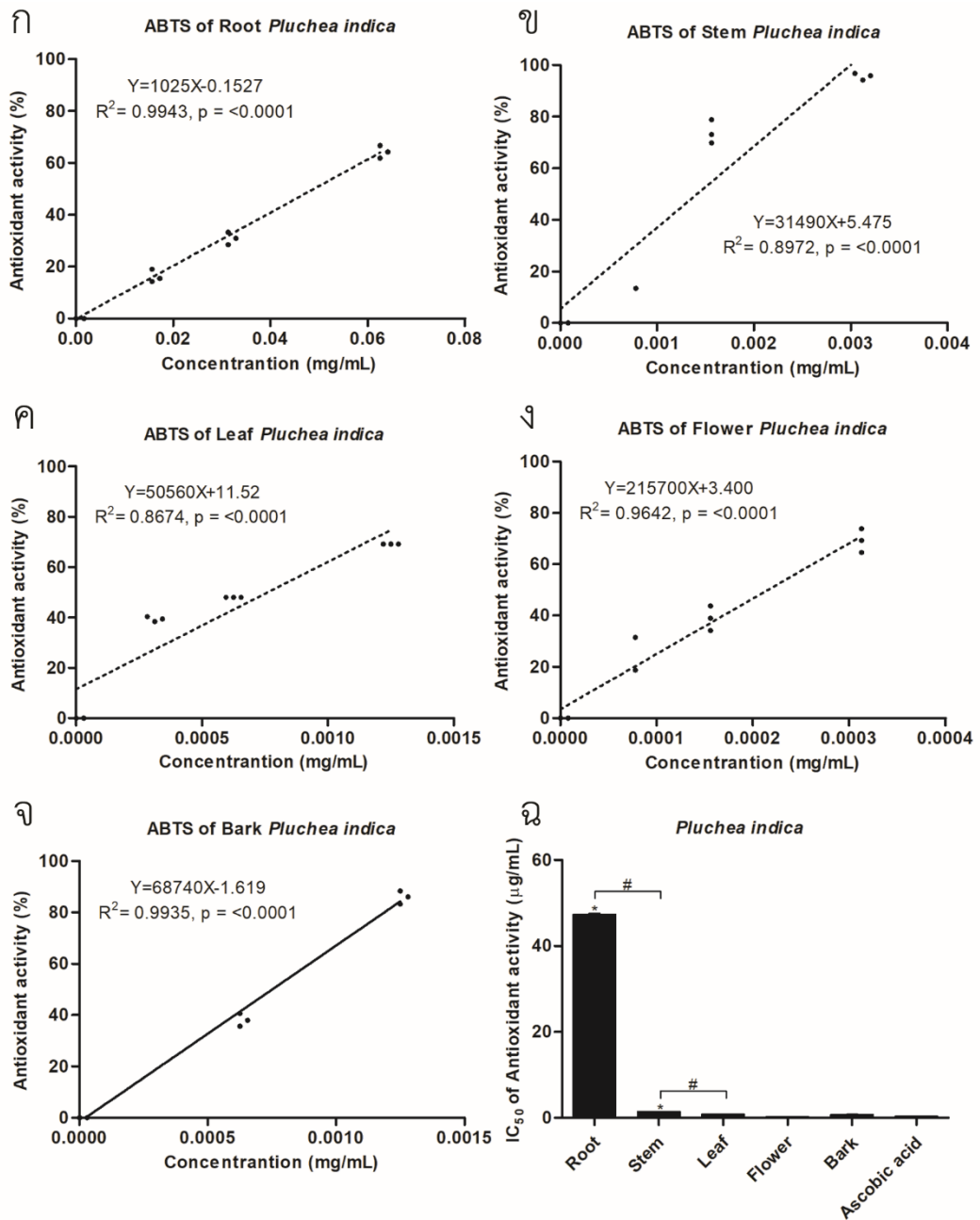


ภาพที่ 17 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชหนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) และแสดงค่า IC₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดงจากวิธี ABTS (ง)





ภาพที่ 18 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชลู่ส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) และเปลือกนอก (จ) และแสดงค่า IC₅₀ จากส่วนต่าง ๆ ของพืชลู่จากวิธี DPPH (ฉ)



ภาพที่ 19 กราฟแสดงกิจกรรมการต้านออกซิเดชันของพืชกลุ่มส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) และเปลือกนอก (จ) แสดงค่า IC_{50} จากส่วนต่าง ๆ ของพืชกลุ่มจากวิธี ABTS (ฉ)

4.4 การหาค่าความสัมพันธ์ระหว่างฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและปริมาณสารสำคัญ

จากการศึกษาความสัมพันธ์ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารสำคัญ โดยค่าความสัมพันธ์แสดงเป็น R^2 (correlation coefficient) ที่พิจารณาค่านัยสำคัญที่ $p < 0.05$ จัดแบ่งกลุ่มของค่าความสัมพันธ์เป็น 5 กลุ่ม ดังตาราง 2

ตาราง 2 ค่าความสัมพันธ์ของฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระกับปริมาณสารสำคัญ

R^2	ระดับความสัมพันธ์
น้อยกว่า 0.3	ความสัมพันธ์ระดับเล็กน้อย (biologically negligible)
0.31-0.5	ความสัมพันธ์ระดับต่ำ (weak correlation)
0.51-0.7	ความสัมพันธ์ระดับกลาง (moderate correlation)
0.71-0.9	ความสัมพันธ์ระดับสูง (strong correlation)
มากกว่า 0.9	ความสัมพันธ์ระดับสูงมาก (very strong correlation)

ที่มา : Miot (2018)

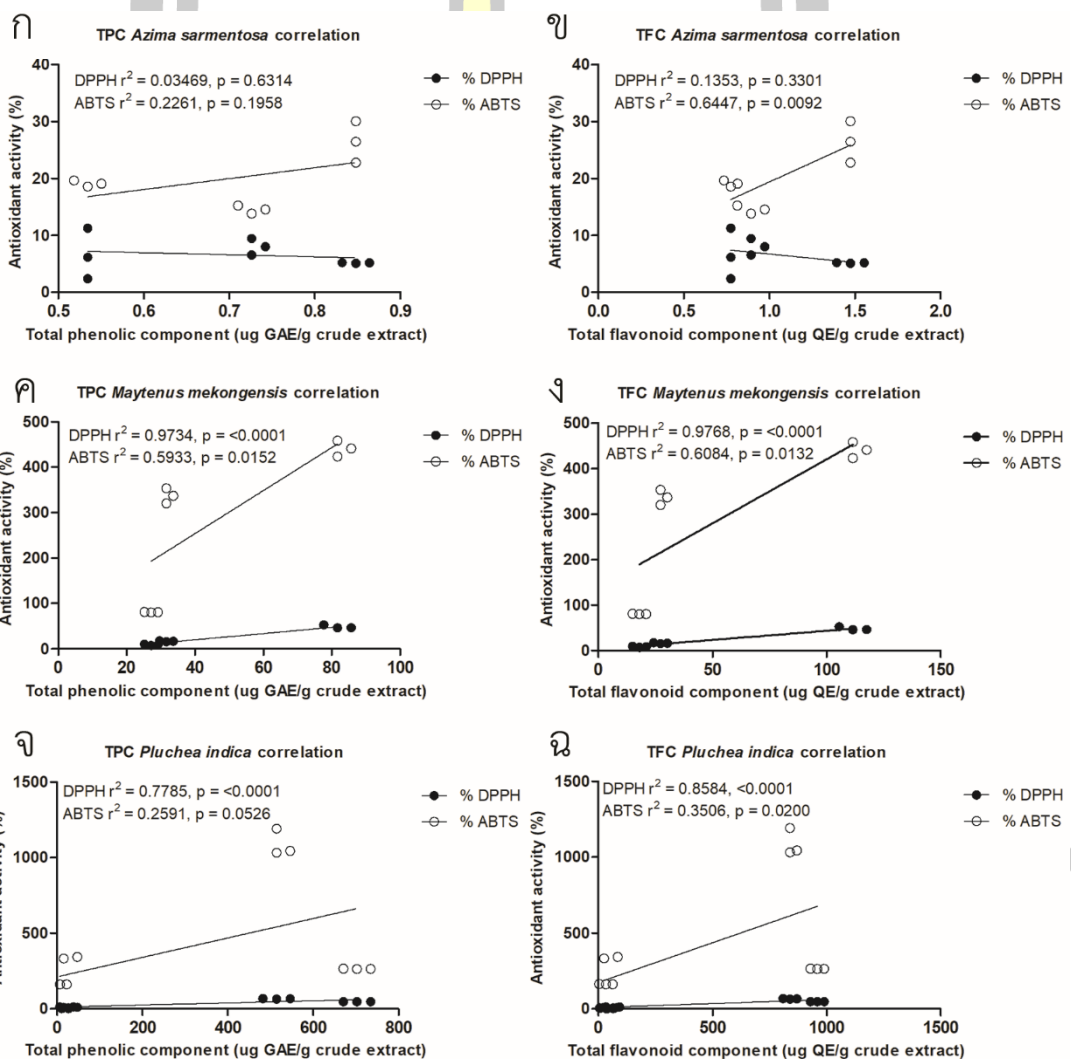
พืชหนามพุดอ พบว่า ปริมาณฟีนอลที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดอไม่มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในวิธี DPPH และ ABTS และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดอมีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับกลางในวิธี ABTS แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.6447 มีค่า p-value เท่ากับ 0.0092 (ภาพที่ 20ก และข) แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ของพืชหนามพุดออาจเป็นสารกลุ่มอื่นที่ไม่เป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์

พืชหนามแดง พบว่า ปริมาณฟีนอลที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดงมีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงมากในวิธี DPPH แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.9734 มีค่า p-value น้อยกว่า 0.0001 และมีความสัมพันธ์ระดับกลางในวิธี ABTS แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.5933 มีค่า p-value เท่ากับ 0.0152 และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดง มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงมากในวิธี DPPH แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.9768 มีค่า p-value น้อยกว่า 0.0001 และมีความสัมพันธ์ระดับกลางในวิธี ABTS แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.6084 มีค่า p-value เท่ากับ 0.0132 แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ของพืชหนามพุดออาจเป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ (ภาพที่ 20ค และง)

พืชขลุ้ พบว่า ปริมาณฟีนอลที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชขลุ้มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงในวิธี DPPH แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.7785 มีค่า p-value น้อยกว่า 0.0001 และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชขลุ้ มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้าน

อนุมูลอิสระในระดับสูงในวิธี DPPH แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.8584 มีค่า p-value น้อยกว่า 0.0001 และมีความสัมพันธ์ระดับต่ำในวิธี ABTS แสดงค่า R^2 เท่ากับ 0.3506 มีค่า p-value เท่ากับ 0.0200 (ภาพที่ 20จ และฉ) แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ของพืชขลุ่ยอาจเป็นสารกลุ่มกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์

อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการต้านอนุมูลอิสระและความเป็นไปได้ที่อาจมาจากสารสำคัญที่พบได้ ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อวิเคราะห์สารประกอบที่บริสุทธิ์ในสารสกัดและกลไกในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวต่อไป



ภาพที่ 20 กราฟความสัมพันธ์ปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ต่อการต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธี DPPH และ ABTS ของสารสกัดหยาบจากพืชขลุ่ย

4.5 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์

ผู้วิจัยได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านจุลินทรีย์ของสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0-5120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ โดยศึกษาในแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ 1. *S. aureus* DMST 8840 2. *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 3. *E. coli* ATCC 25922 และ 4. *S. Typhimurium* TISTR 2511 โดยทำการศึกษา 2 วิธี ได้แก่ 1. วิธี agar disc diffusion และ 2. การทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถยับยั้งเชื้อแบคทีเรีย (MIC) และการทดสอบการทดสอบหาความเข้มข้นต่ำสุดที่สามารถฆ่าเชื้อแบคทีเรีย (MBC) ของสารสกัดหยาบโดยวิธี micro dilution จากผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0-5120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ไม่แสดงคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์จากการทดลองดังกล่าว (ภาพผนวกที่ ฉ1-13)

4.6 การศึกษาผลของสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์

ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเป็นระบบที่เกิดจากการทำงานร่วมกันขององค์ประกอบต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่ เซลล์เม็ดเลือดขาว (WBCs) แอนติบอดีในกระแสเลือดและสารคัดหลั่ง และอวัยวะต่าง ๆ โดยในการศึกษานี้ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาสารสกัดหยาบต่ออัตราการมีชีวิตรอดของ WBCs ที่เป็นเซลล์ของระบบภูมิคุ้มกันซึ่งคอยป้องกันร่างกายจากทั้งเชื้อก่อโรคและสารแปลกปลอมต่าง ๆ และศึกษาต่อเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมโครฟาจ ($\text{CD14}^+\text{CD16}^+$) รวมถึงเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ (เซลล์กลุ่ม lymphocyte และเซลล์กลุ่ม granulocyte) จากการศึกษาอัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ต่อสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ โดยมี 0.5% DMSO เป็น control และมี 0-10% propolis เป็น positive control แสดงผลดังนี้

หนามพุงดอ พบว่าสารสกัดส่วนรากที่ความเข้มข้น 2 8-64 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ทำให้มีอัตราการมีชีวิตรอดของ WBCs ลดลง (ภาพที่ 21ก) แต่ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของ เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ ที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ (ภาพที่ 21ข และค) ขณะที่สารสกัดส่วนลำต้นและใบ ที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ (ภาพที่ 21ง-ฉ)

หนามแดง พบว่าสารสกัดส่วนราก (ภาพที่ 22ก-ค) ลำต้น (ภาพที่ 22ง-ฉ) และใบ (ภาพที่ 22ข-ฉ) มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ทั้ง 3 ชนิดสูงขึ้นในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 สารสกัด โดยมีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของ WBCs สูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนรากและลำต้น และ 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนใบ มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์กลุ่มโมโนไซต์สูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 128 256 และ 512 $\mu\text{g}/\text{ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนราก 256 และ

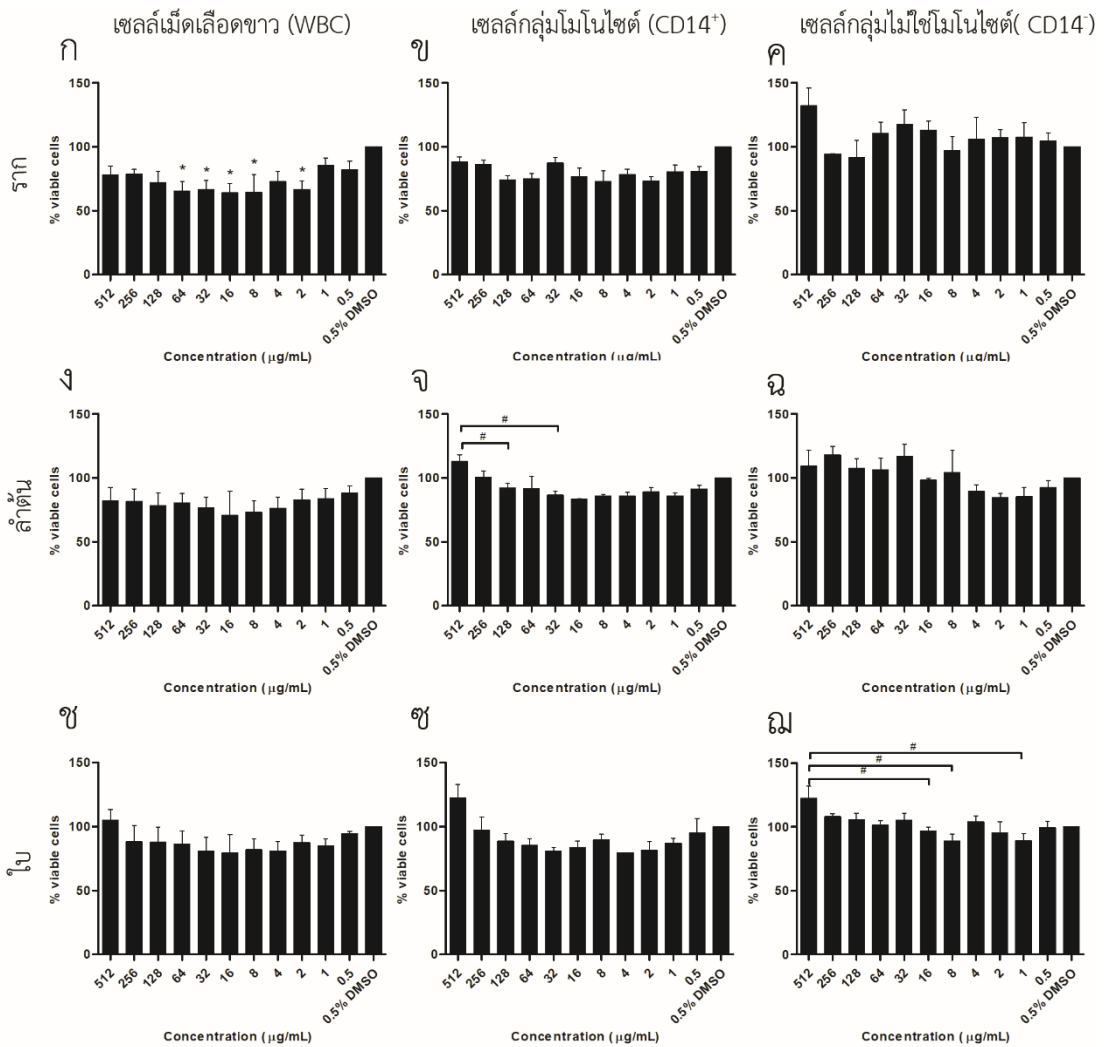
512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนลำต้น 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนใบ และมีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์สูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 128 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนราก 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนลำต้นและใบ

ขลุ้ พบว่าสารสกัดส่วนราก (ภาพที่ 23ก-ค) ใบ (ภาพที่ 23ข-ฅ) และเปลือกนอก (ภาพที่ 23ฉ-ฅม) มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงขึ้น ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ในทิศทางเดียวกันทั้ง 3 สารสกัด โดยมีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์เม็ดเลือดขาว สูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 128 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนราก ใบและเปลือกนอก มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์กลุ่มโมโนไซต์สูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนราก และมีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์สูงขึ้น ที่ความเข้มข้น 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนราก 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับสารสกัดส่วนใบและเปลือกนอก สารสกัดส่วนลำต้น (ภาพที่ 23ง-ฉ) มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงขึ้นในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ และมีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงขึ้นใน WBC และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ที่ความเข้มข้น 512 $\mu\text{g/ml}$ ในขณะที่สารสกัดส่วนดอก (ภาพที่ 23ญ-ฎ) มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงขึ้นในเซลล์เม็ดเลือดขาวที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ และมีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงขึ้นในเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ที่ความเข้มข้น 512 $\mu\text{g/ml}$ แต่ไม่มีผลต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์กลุ่มโมโนไซต์

Propolis พบว่า ที่ความเข้มข้น 0-10% propolis มีผลให้อัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์สูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent ในเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ (ภาพที่ 24ก-ค)

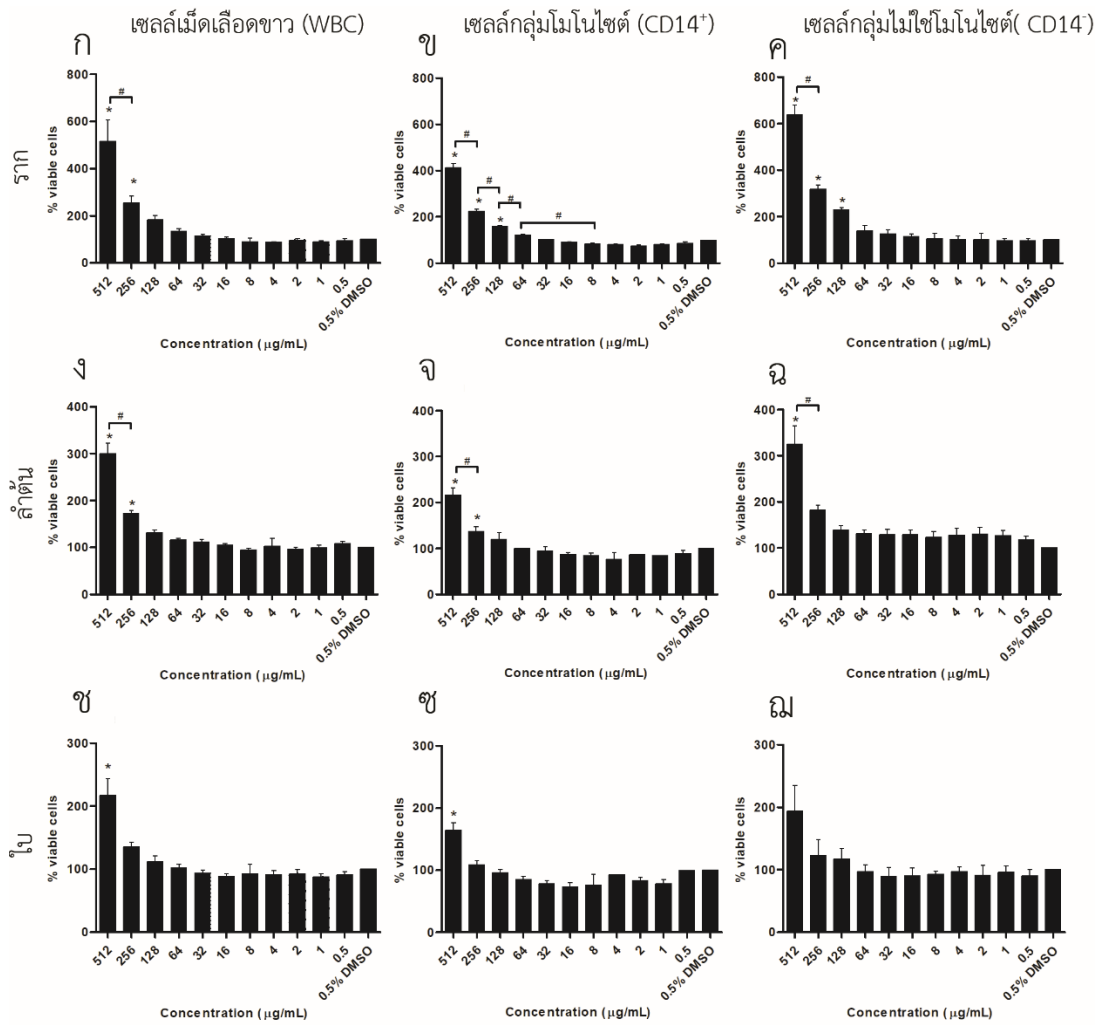
จากการศึกษาผลของสารต่ออัตราการมีชีวิตรอดของเซลล์ทั้ง 3 ชนิด พบว่า สารสกัดหยาบจากพืชขอบเค็มที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 กลุ่ม ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่ 5 50 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ เพื่อนำไปศึกษาต่อไป

พญ. ปณ. ทิโต ชีเว



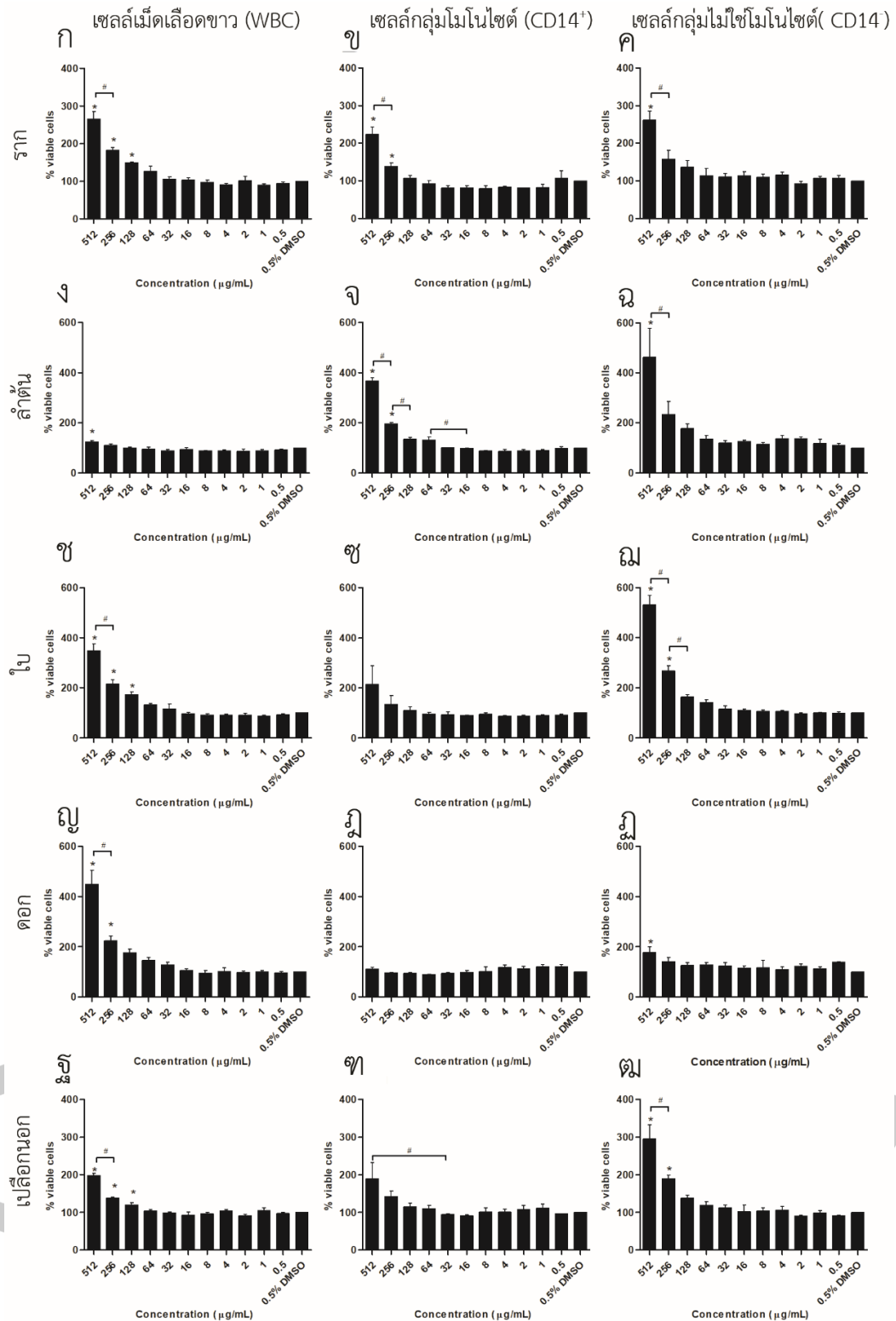
ภาพที่ 21 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบหนามพุดต่อส่วนราก (ก-ค) ลำต้น (ง-จ) และใบ (ข-ฉ) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ ด้วยวิธี MTT assay



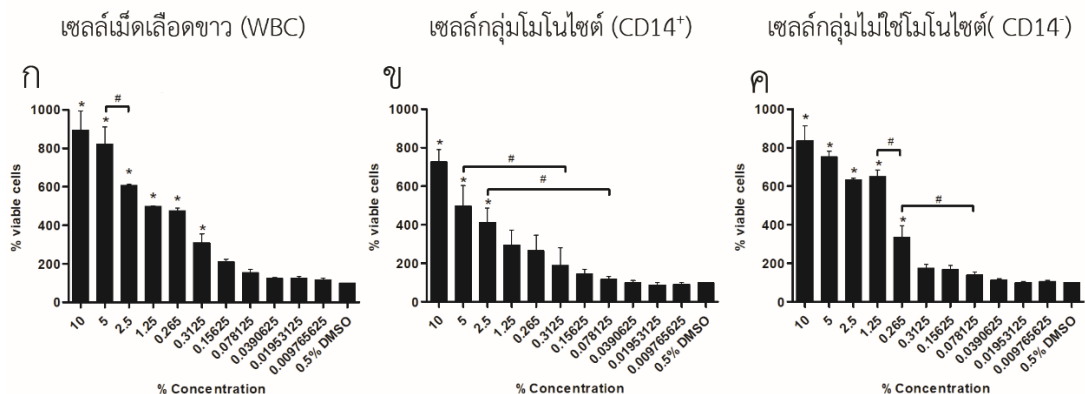


ภาพที่ 22 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนราก (ก-ค) ลำต้น (ง-ฉ) และใบ (ช-ฉ) ต่อ เซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่มไม่ไซโมโนไซต์ ด้วยวิธี MTT assay





ภาพที่ 23 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบขลุ่ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (ก ง ช ฎ และฐ) เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (ข จ ช ฏ และฑ) และเซลล์กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ (ค ฉ ฏ และฒ) ด้วยวิธี MTT assay



ภาพที่ 24 ความเป็นพิษของ Propolis (positive control) ต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว (ก) เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ (ข) และเซลล์กลุ่มไมโซโมโนไซต์ (ค) ด้วยวิธี MTT assay

4.7 การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษของสารสกัดหยาบพิษขอบเค็มต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธี hemolysis assay

ผู้วิจัยได้ทำการศึกษาคุณสมบัติความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพิษขอบเค็มต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธี hemolysis assay ที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g/ml}$ โดยมี 0.5% DMSO เป็น control และมี 0.1% Triton X-100 เป็น positive control เพื่อหาความเข้มข้นที่เหมาะสมสำหรับนำไปใช้ศึกษาสำหรับกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจ จากการศึกษาของพืชทั้ง 3 ชนิด แสดงคุณสมบัติดังนี้

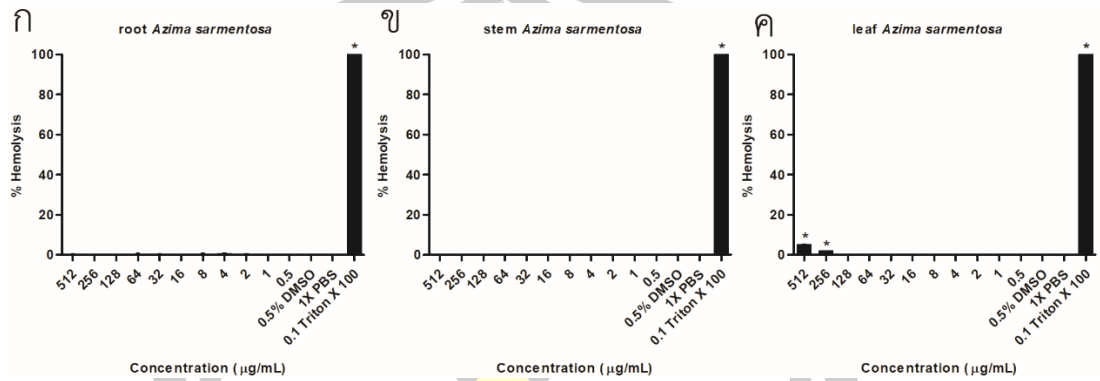
หนามพุงดอ พบว่า ส่วนสกัดราก (ภาพที่ 25ก) และลำต้นที่ (ภาพที่ 25ข) ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ขณะที่ส่วนสกัดใบ (ภาพที่ 25ค) ที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในระดับต่ำเมื่อเปรียบเทียบกับ control

หนามแดง พบว่า ส่วนสกัดลำต้น (ภาพที่ 26ข) ที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g/ml}$ ไม่ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก ส่วนสกัดราก (ภาพที่ 26ก) และใบ (ภาพที่ 26ค) ทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตกในระดับต่ำที่ความเข้มข้น 512 และ 256 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ เมื่อเปรียบเทียบกับ control

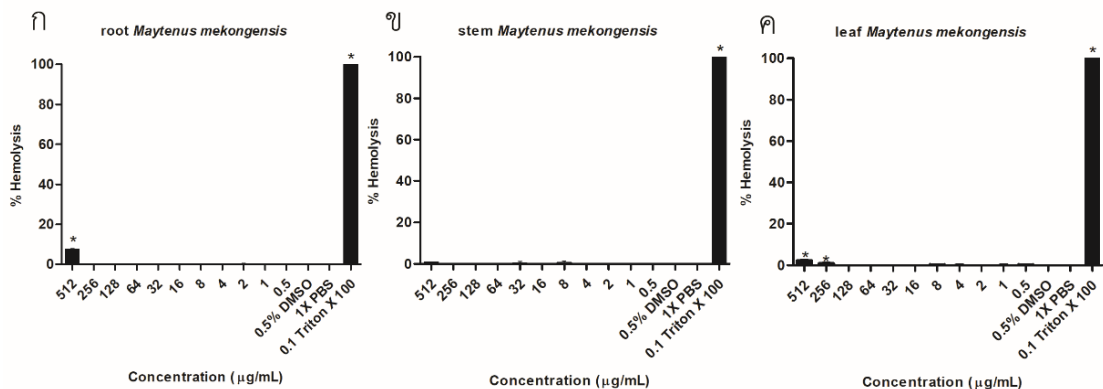
ขลุ้ พบว่า ส่วนสกัดทั้ง 5 ส่วน คือ ราก (ภาพที่ 27ก) ลำต้น (ภาพที่ 27ข) ใบ (ภาพที่ 27ค) ดอก (ภาพที่ 27ง) และเปลือกนอก (ภาพที่ 27จ) ที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g/ml}$ ไม่พบว่าทำให้เซลล์เม็ดเลือดแดงแตก

จากการศึกษาความเป็นพิษของสารต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง พบว่าส่วนสกัดใบหนามพุงดอ และใบหนามแดง แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับต่ำที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$ ส่วนสกัดรากหนามแดง แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับต่ำที่ความเข้มข้น

512 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ส่วนสกัดอื่น ๆ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่ 5 50 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับนำไปศึกษาต่อไป

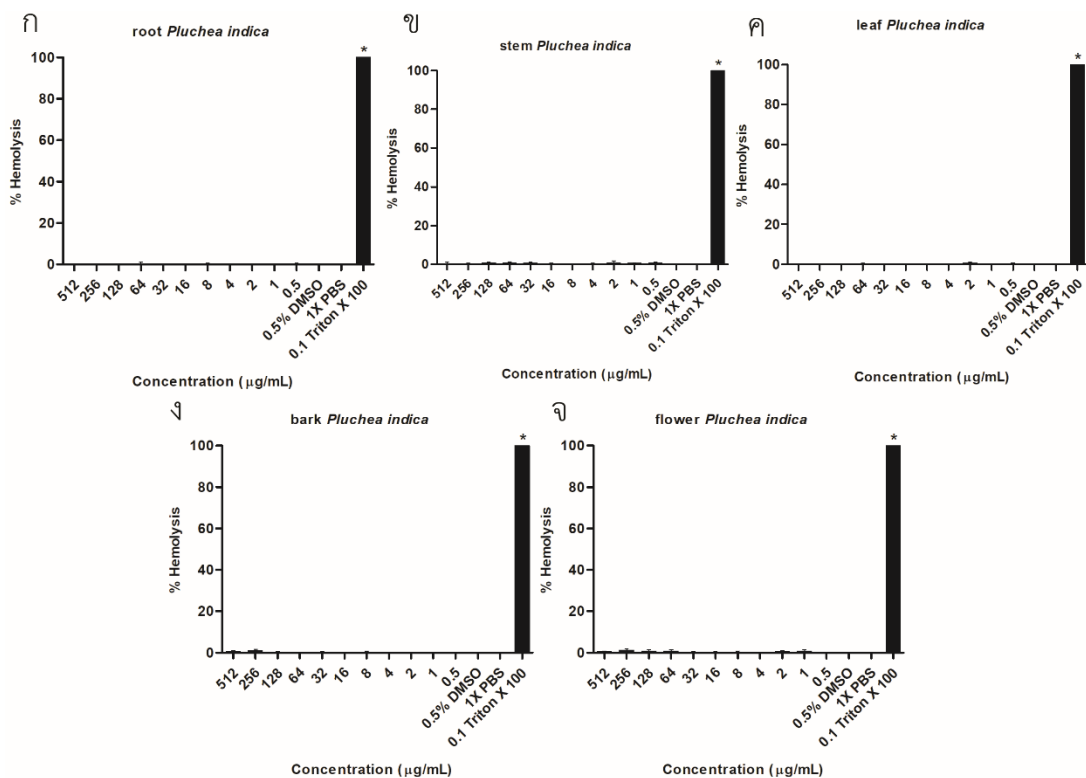


ภาพที่ 25 ความเป็นพิษของสารสกัดพืชหนามพุงคอส่วราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธี hemolysis assay



ภาพที่ 26 ความเป็นพิษของสารสกัดพืชหนามแดงส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) และ ใบ (ค) ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธี hemolysis assay

พหุบัณฑิต ชีวะ

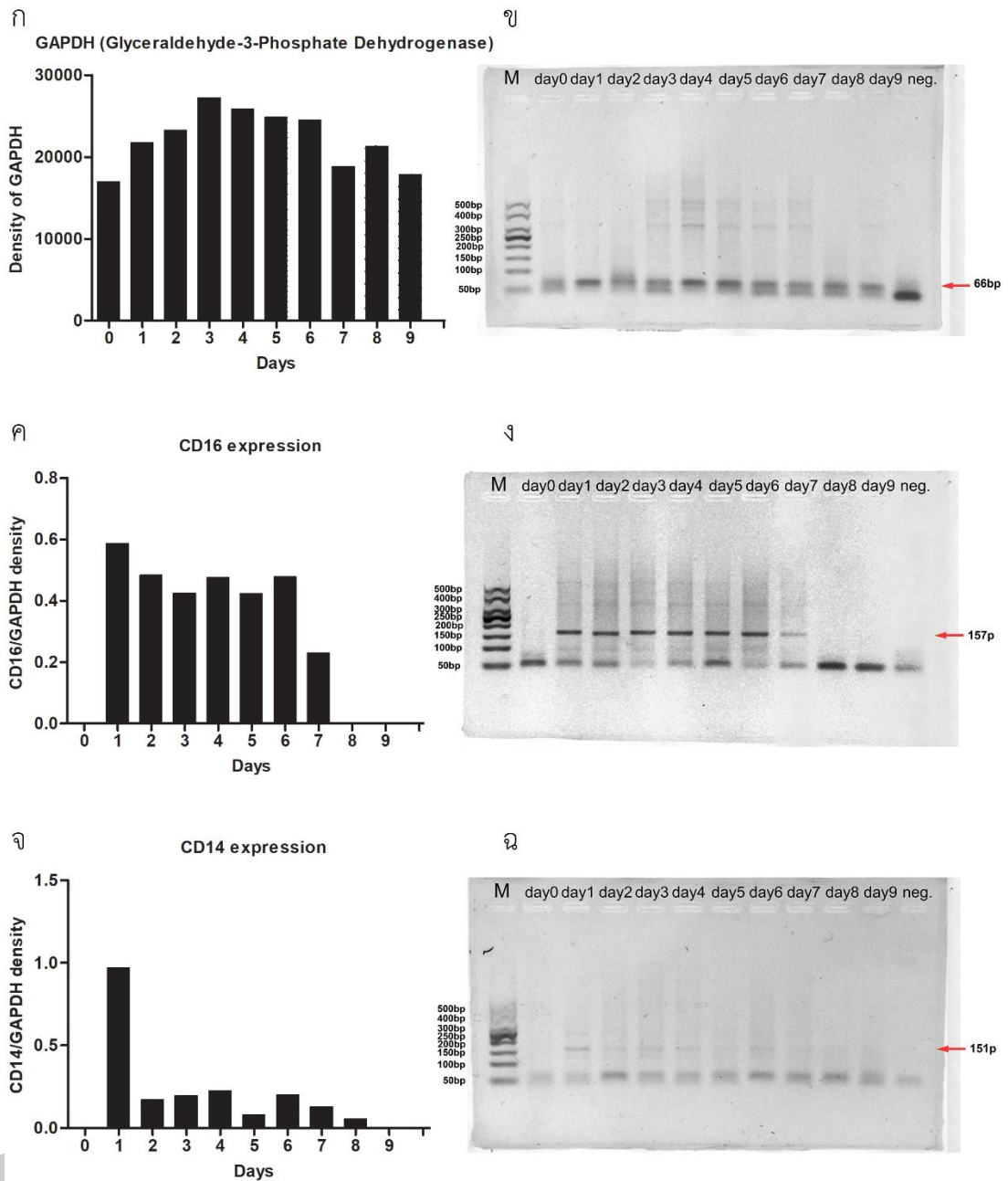


ภาพที่ 27 ความเป็นพิษของสารสกัดพืชคลู่ส่วนราก (ก) ลำต้น (ข) ใบ (ค) ดอก (ง) และเปลือกนอก (จ) ต่าง ๆ ต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง วิธี hemolysis assay

4.8 การตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยง

จากการวิเคราะห์การแสดงออกของ CD14 และ CD16 ต่อการแสดงออกของ GAPDH ที่เป็นยีน internal control โดยแสดงค่าเป็น CD14/GAPDH density และ CD16/GAPDH density พบว่าเซลล์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน มีการแสดงออกของ GAPDH (ภาพที่ 28ก และข) เมื่อเพาะเลี้ยงเซลล์ในวันแรก เซลล์จะมีการแสดงออกของ CD14 และจะลดลงไปเรื่อย ๆ จนหายไป ตามวันที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 28จ และฉ) ขณะที่การแสดงออกของ CD16 จะเกิดขึ้นเมื่อเพาะเลี้ยงในวันที่ 2 และค่อย ๆ ลดลง จนถึงวันที่ 7 และไม่มีการแสดงออกของ CD16 เมื่อเพาะเลี้ยงในวันที่ 8 เป็นต้นไป (ภาพที่ 28ค และง)

จากผลการวิจัยพบว่า เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ มีการแสดงออกของ CD14 ในวันแรก และเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมโครฟาจที่มีการแสดงออกของ CD16 ในวันแรก จนถึงวันที่ 7 และหายไป ในวันที่ 8 ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกการเพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ สำหรับเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมโครฟาจในเป็นเวลา 6 วัน สำหรับการศึกษาการกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจด้วยสารสกัดหยาบพืชชอบเค็ม



ภาพที่ 28 การแสดงออกของ CD14 (จ-ฉ) และ CD16 (ค-ง) ในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นระยะเวลา 9 วัน โดยมี GAPDH ที่เป็นยีน internal control (ก-ข)

4.9 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ

การศึกษาผลของสารสกัดหยาบพืชชอบเค็มต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ ที่ความเข้มข้นของสาร 5 50 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ โดยการเติมสารลงในเซลล์และบ่มเป็นเวลา 48 ชั่วโมง ก่อนการเติมแบคทีเรียที่ MOI เท่ากับ 30 โดยมี 1X PBS ที่ไม่เติมแบคทีเรีย เป็น negative control และมีกลุ่ม control ต่าง ๆ ได้แก่ 1) 1X PBS 2) 10 ng/mL LPS 3) 10 ng/mL IFN- γ 4) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 5) 2 ng/mL IL-4 6) 20 μM quercetin และ 7) 300 μM ascorbic acid ที่เติมแบคทีเรีย โดยบ่มเป็นเวลา 1 และ 2 ชั่วโมงหลังเติมแบคทีเรีย และแสดงผลเป็น CFU (cells)/macrophages โดยเปรียบเทียบกับสมการของกราฟมาตรฐานของแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด ได้แก่ 1. *S. aureus* DMST 8840 ($Y = 0.00000004X + 0.169$, $R^2 = 0.9849$) (ตารางผนวกและภาพผนวกที่ ญ1) 2. *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 ($Y = 0.00000003X + 0.1764$, $R^2 = 0.8652$) (ตารางผนวกและภาพผนวกที่ ญ2) 3. *E. coli* ATCC 25922 ($Y = 0.00000007X + 0.1627$, $R^2 = 0.887$) (ตารางผนวกและภาพผนวกที่ ญ3) และ 4. *S. Typhimurium* TISTR 2511 ($Y = 0.00000001X + 0.4496$, $R^2 = 0.8353$) (ตารางผนวกและภาพผนวกที่ ญ4) โดยผลต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ เป็นดังนี้

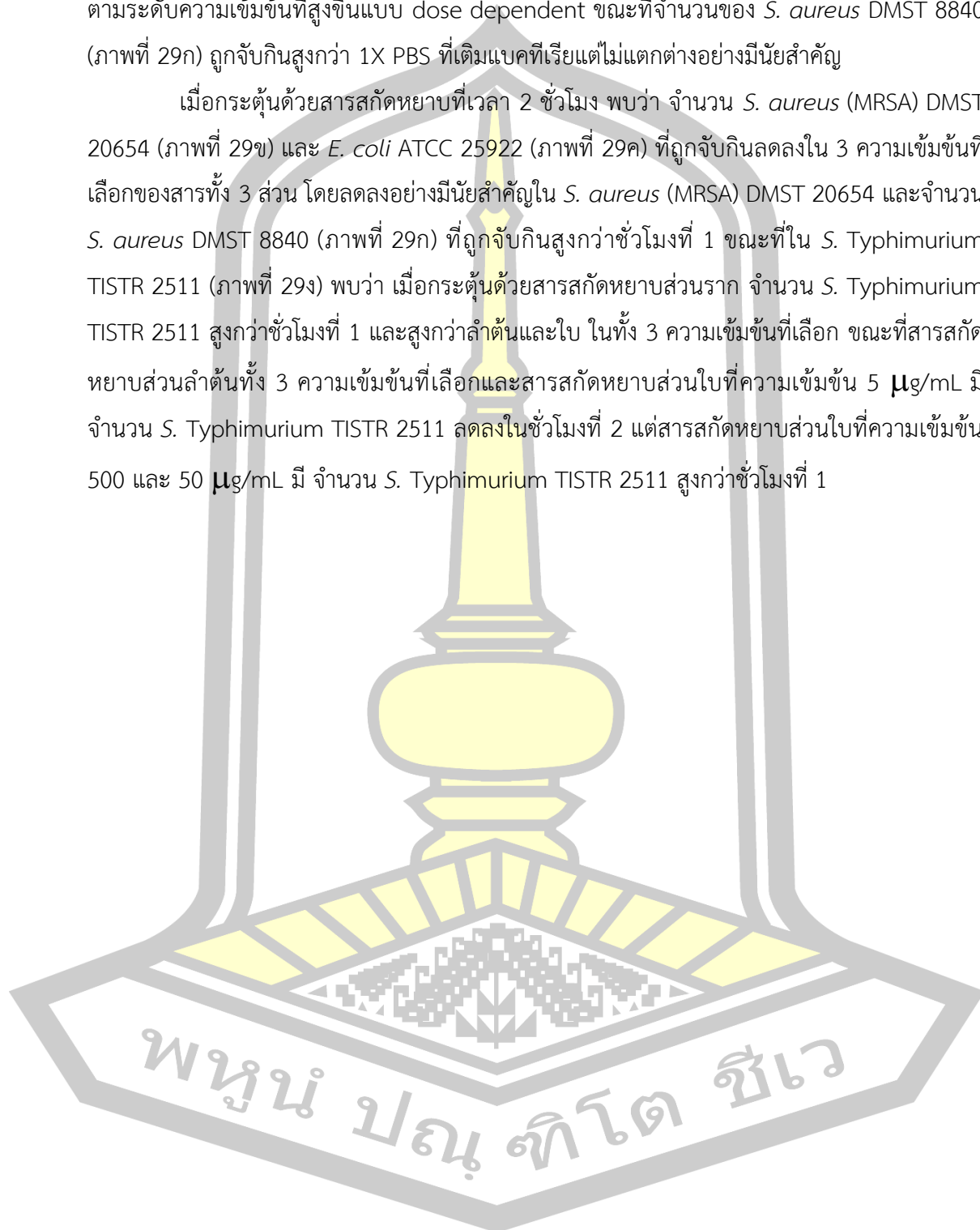
ในกลุ่ม control ที่เติมแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด พบว่า ที่เวลา 1 ชั่วโมง มีจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินสูงกว่า 1X PBS ที่เติมแบคทีเรีย ในทุกกลุ่ม control โดย *S. aureus* DMST 8840 จะถูกจับกินสูงใน 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 300 μM ascorbic acid และ 20 μM quercetin ตามลำดับ แต่ไม่แตกต่างกับ 1X PBS ที่เติมแบคทีเรีย (ภาพที่ 29ก) ขณะที่ *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *S. Typhimurium* TISTR 2511 จะถูกจับกินสูงใน 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 300 μM ascorbic acid 20 μM quercetin และ IL-4 อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 29ข และ ค) และ *E. coli* ATCC 25922 ถูกจับกินสูงใน 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 300 μM ascorbic acid 2 ng/mL IL-4 และ 10 ng/mL IFN- γ ตามลำดับ อย่างมีนัยสำคัญ (ภาพที่ 29ง) และที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่า มีจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินลดลงในทุกกลุ่ม control (ภาพที่ 29 30 และ 31)

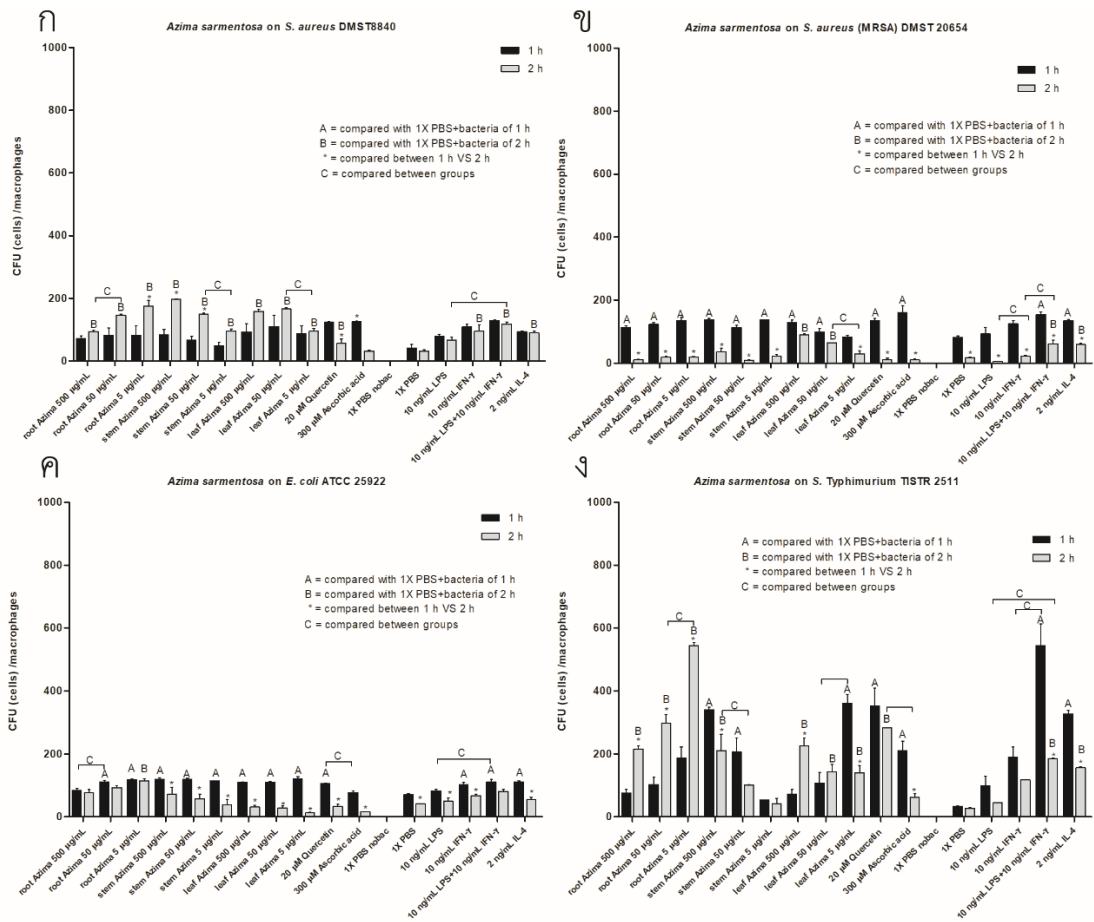
4.8.1 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบหนามพุงต่อต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ

หนามพุงต่อ พบว่า ที่เวลา 1 ชั่วโมงเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบส่วนลำต้นและใบ จำนวน *S. Typhimurium* TISTR2511 (ภาพที่ 29ง) ที่ถูกจับกินสูงกว่าราก โดยเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบส่วนลำต้น มีจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วน มีจำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 (ภาพที่ 29ข) และ *E. coli* ATCC 25922 (ภาพที่ 29ค) ที่ถูกจับกินสูงในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่

เลือก โดยสารสกัดหยาบส่วนใบ จะมีจำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 ที่ถูกจับกินสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent ขณะที่จำนวนของ *S. aureus* DMST 8840 (ภาพที่ 29ก) ถูกจับกินสูงกว่า 1X PBS ที่เติมแบคทีเรียแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบเป็นเวลา 2 ชั่วโมง พบว่า จำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 (ภาพที่ 29ข) และ *E. coli* ATCC 25922 (ภาพที่ 29ค) ที่ถูกจับกินลดลงใน 3 ความเข้มข้นที่เลือกของสารทั้ง 3 ส่วน โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 และจำนวน *S. aureus* DMST 8840 (ภาพที่ 29ก) ที่ถูกจับกินสูงกว่าชั่วโมงที่ 1 ขณะที่ใน *S. Typhimurium* TISTR 2511 (ภาพที่ 29ง) พบว่า เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบส่วนราก จำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 สูงกว่าชั่วโมงที่ 1 และสูงกว่าลำต้นและใบ ในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก ขณะที่สารสกัดหยาบส่วนลำต้นทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือกและสารสกัดหยาบส่วนใบที่ความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 ลดลงในชั่วโมงที่ 2 แต่สารสกัดหยาบส่วนใบที่ความเข้มข้น 500 และ 50 $\mu\text{g/mL}$ มีจำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 สูงกว่าชั่วโมงที่ 1





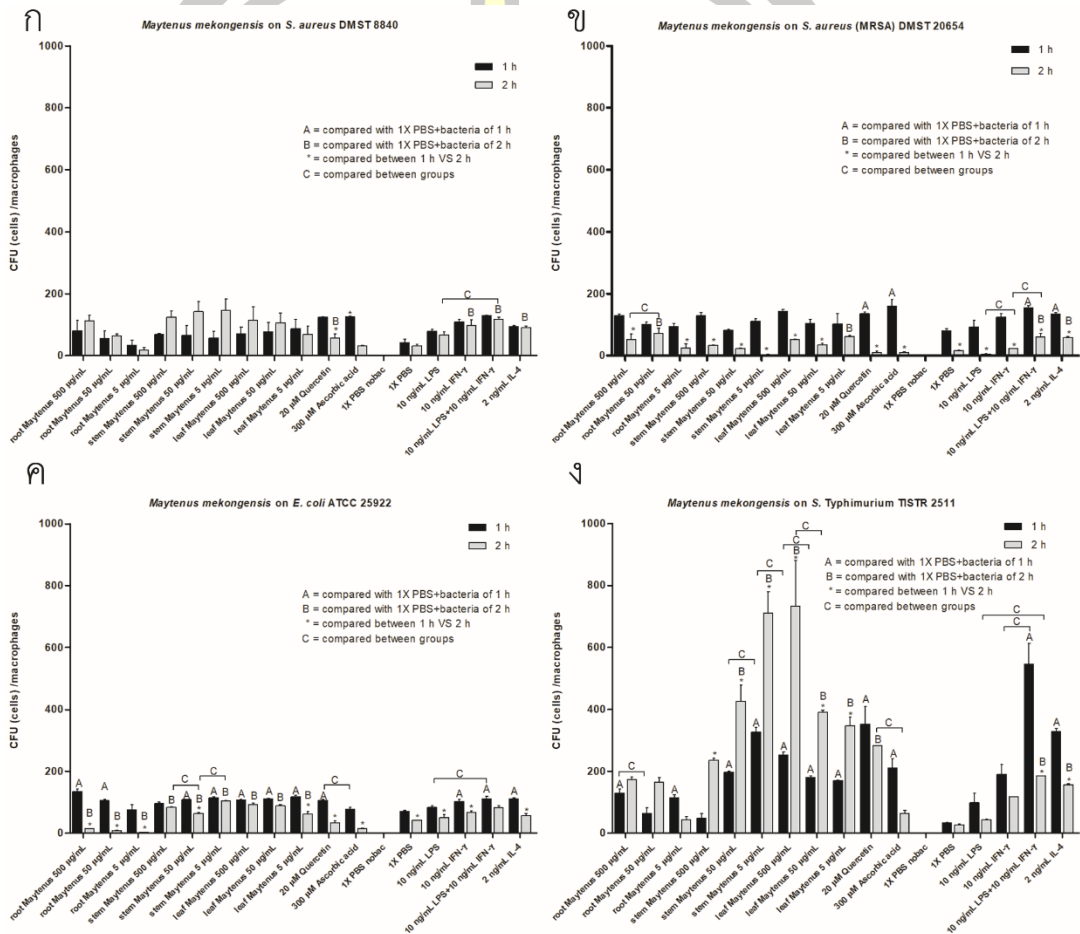
ภาพที่ 29 ค่า CFU (cells)/macrophage หลังการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดจากส่วนต่าง ๆ ของหนามพุงดอ

4.8.2ฤทธิ์ของสารสกัดหยาดหนามแดงต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ

หนามแดง พบว่า ที่เวลา 1 ชั่วโมงเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดส่วนลำต้นและใบ จำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 (ภาพที่ 30ง) ที่ถูกจับกินสูงกว่าราก และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดทั้ง 3 ส่วน มีจำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 (ภาพที่ 30ข) และ *E. coli* ATCC 25922 (ภาพที่ 30ค) ที่ถูกจับกินสูงในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก โดยสารสกัดหยาดส่วนราก จะมีจำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *E. coli* ATCC 25922 ที่ถูกจับกินสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent ขณะที่จำนวนของ *S. aureus* DMST 8840 (ภาพที่ 30ก) ถูกจับกินสูงกว่า 1X PBS ที่เติมแบคทีเรียแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่า จำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 (ภาพที่ 30ข) และ *E. coli* ATCC 25922 (ภาพที่ 30ค) ที่ถูกจับกินลดลงใน 3 ความเข้มข้นที่เลือกของสารทั้ง 3 ส่วน โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 และจำนวน

S. aureus DMST 8840 (ภาพที่ 30ก) และ *S. Typhimurium* TISTR2511 (ภาพที่ 30ง) ที่ถูกจับกินสูงขึ้นกว่าชั่วโมงที่ 1 โดยเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดส่วนลำต้นและใบ จำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 สูงกว่าราก และจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent ในสารสกัดหยาดส่วนใบ



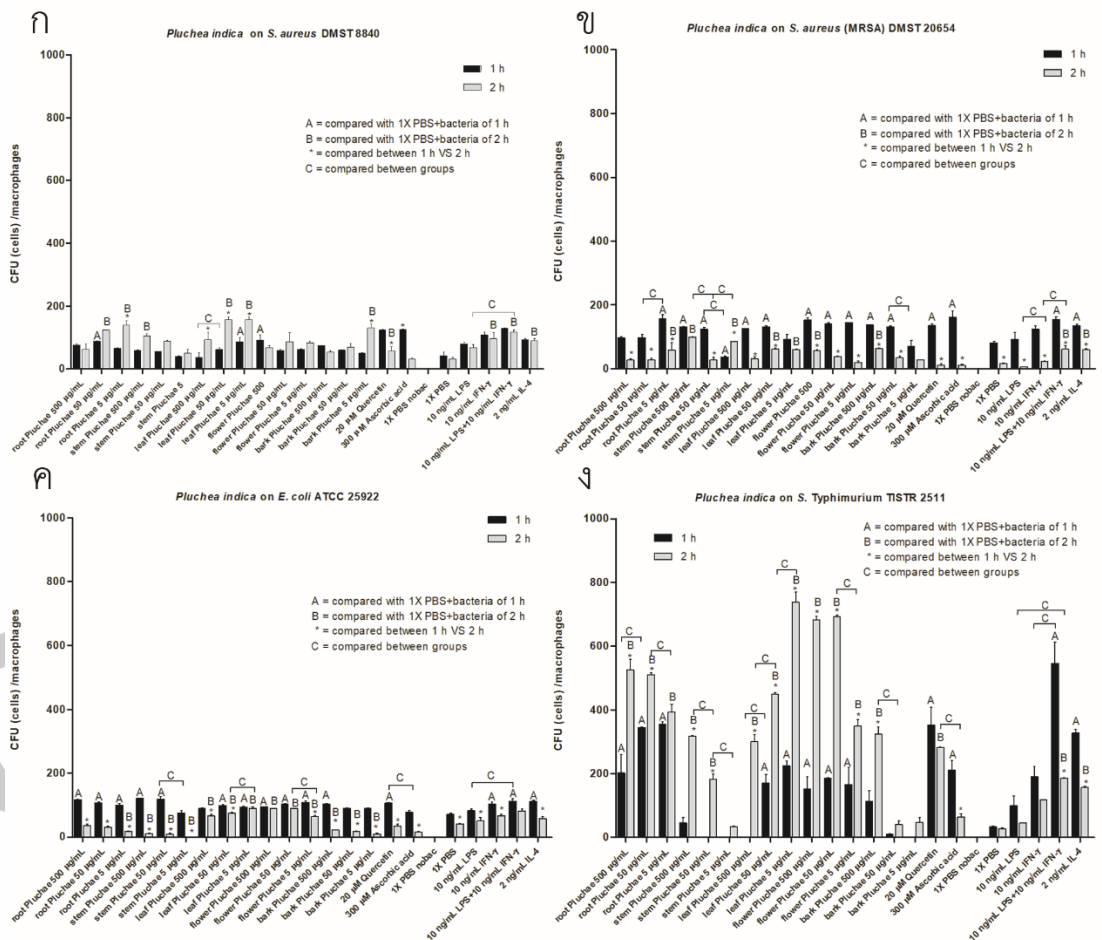
ภาพที่ 30 ค่า CFU (cells)/macrophage หลังการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดจากส่วนต่าง ๆ ของหนามแดง

4.8.3 ฤทธิ์ของสารสกัดหยาดต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ

ขลุ่ พบว่า ที่เวลา 1 ชั่วโมงเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดส่วนราก ใบ และดอก จำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511(ภาพที่ 31ง) ที่ถูกจับกินสูงกว่าลำต้นและเปลือกนอก จะส่วนรากจะมีจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินสูงที่สุดในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดทั้ง 5 ส่วน มีจำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 (ภาพที่ 31ข) และ *E. coli* ATCC 25922

(ภาพที่ 31ค) ที่ถูกจับกินสูงในทั้ง 5 ความเข้มข้นที่เลือก ขณะที่จำนวนของ *S. aureus* DMST 8840 (ภาพที่ 31ก) ถูกจับกินสูงกว่า 1X PBS ที่เติมแบคทีเรียแต่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญ

เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบที่เวลา 2 ชั่วโมง พบว่า จำนวน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 (ภาพที่ 31ข) และ *E. coli* ATCC 25922 (ภาพที่ 31ค) ที่ถูกจับกินลดลงใน 3 ความเข้มข้นที่เลือกของสารทั้ง 5 ส่วน โดยลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 และสารสกัดหยาบส่วน ราก ลำต้น ใบ และเปลือก ลดลงอย่างมีนัยสำคัญใน *E. coli* ATCC 25922 และจำนวน *S. aureus* DMST 8840 (ภาพที่ 31ก) และ *S. Typhimurium* TISTR 2511 (ภาพที่ 31ง) ที่ถูกจับกินสูงขึ้นกว่าชั่วโมงที่ 1 โดยเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบส่วนรากและใบ จำนวน *S. aureus* DMST 8840 ที่ถูกจับกินสูงกว่า ลำต้น ดอก และเปลือกนอก และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบส่วน ใบ และดอก จำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 ที่ถูกจับกินสูงกว่า ราก ลำต้นและเปลือกนอก



ภาพที่ 31 ค่า CFU (cells)/macrophage หลังการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจต่อแบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด เมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบจากส่วนต่าง ๆ ของขลุ้

4.10 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจ

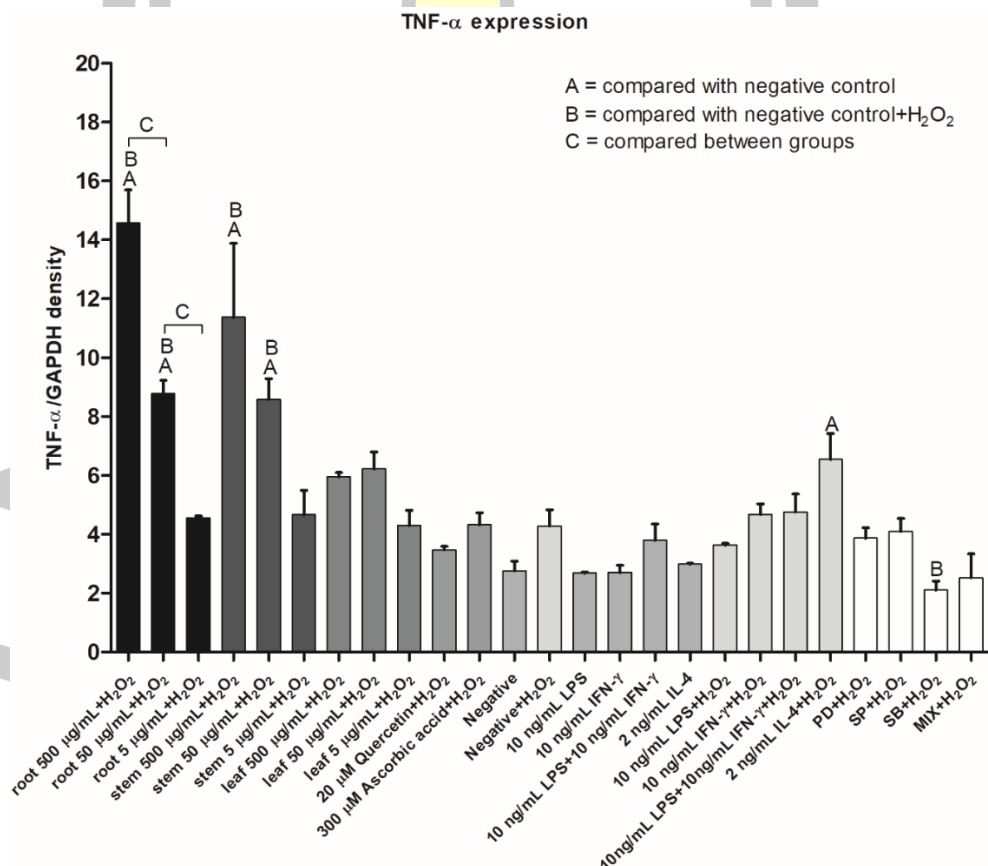
TNF- α เป็นไซโตไคน์ก่ออักเสบที่ถูกหลั่งออกจากเซลล์แมโครฟาจเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสิ่งแปลกปลอม ซึ่ง H_2O_2 ภายในเซลล์ (Intracellular H_2O_2) สามารถกระตุ้น signal pathways ที่ควบคุม inducible expression ของยีนที่ควบคุมการทำงานของ macrophage-effector และ cytokine signaling มีรายงานว่า H_2O_2 กระตุ้นให้มีการผลิตไซโตไคน์ก่ออักเสบแบบ *in vitro* และ *in vivo* ได้แก่ TNF- α ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการก่อโรคติดเชื้อและการอักเสบหลายชนิด และ H_2O_2 ทำให้เกิดการผลิต TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจผ่าน p38 และ stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) (Nakao *et al.*, 2008) ในการศึกษาครั้งนี้ผู้วิจัยได้ตรวจสอบการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบพืชขอบเค็ม และ H_2O_2 ที่ความเข้มข้น 40 μM โดยมีกลุ่ม control ที่ถูกกระตุ้นด้วย 40 μM H_2O_2 ได้แก่ 1) 1X PBS เป็น negative 2) 10 ng/mL LPS 3) 10 ng/mL IFN- γ 4) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 5) 2 ng/mL IL-4 6) 20 μM quercetin และ 7) 300 μM ascorbic acid 6) ERK inhibitor PD98059 (10 μM) 7) JNK inhibitor SP600125 (10 μM) 8) p38 MAPK inhibitor SB203580 (5 μM) และ PD98059 (10 μM)+ SP600125 (10 μM)+ SB203580 (5 μM) และ กลุ่ม control ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย 40 μM H_2O_2 ได้แก่ 1) 1X PBS เป็น negative 2) 10 ng/mL LPS 3) 10 ng/mL IFN- γ 4) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 5) 2 ng/mL IL-4 จากการทดลอง แสดงผลดังนี้

กลุ่มควบคุม พบว่า ในทุกกลุ่ม control เมื่อกระตุ้นด้วย H_2O_2 ทำให้เซลล์มีการแสดงออกของ TNF- α สูงขึ้น โดยเฉพาะใน IL-4 เมื่อเปรียบเทียบกับ negative และเมื่อทำการยืนยันการผลิต TNF- α ผ่าน MAPK pathway ด้วย MAPK inhibitor ที่ถูกกระตุ้นด้วย H_2O_2 พบว่าเมื่อยับยั้งด้วย p38 MAPK inhibitor (SB203580) และ MAPK inhibitor ทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน การแสดงออกของ TNF- α ลดลง โดยเฉพาะใน p38 MAPK inhibitor ที่ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับ negative+ H_2O_2 แสดงให้เห็นว่า H_2O_2 กระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจผ่าน p38 ดังรายงานข้างต้น (ภาพที่ 32 33 และ 34)

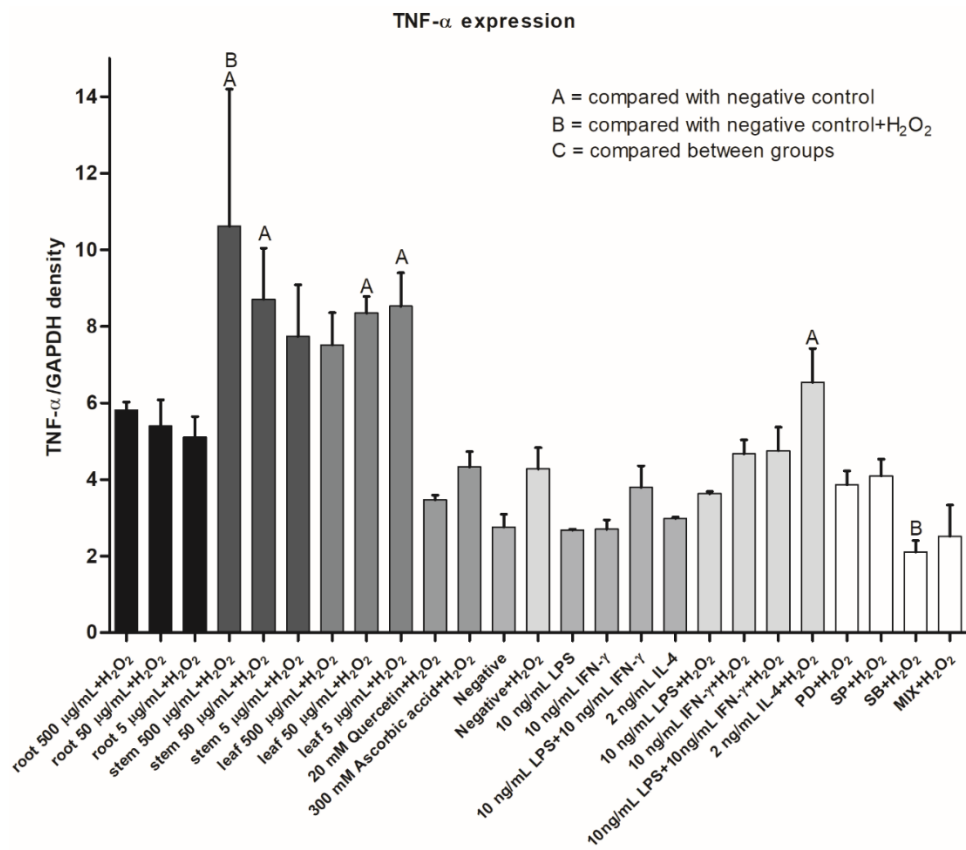
จากการตรวจสอบในกลุ่มของสารสกัด พบว่า สารสกัดหยาบหนามพุงตอส่วนรากและลำต้น มีการแสดงออกของ TNF- α สูงกว่าใบในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก ตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent โดยที่ความเข้มข้น 5 $\mu g/mL$ สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกได้ในระดับ 1X PBS+ H_2O_2 (ภาพที่ 32) และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหนามแดง พบว่า สารสกัดหยาบหนามแดงส่วนลำต้นและใบมีการแสดงออกของ TNF- α สูงกว่ารากในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก โดย

การแสดงผลจะสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent เมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนลำต้น ซึ่งเมื่อกระตุ้นด้วยสารที่มีความเข้มข้น 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกได้สูงกว่า 1X PBS+H₂O₂ (ภาพที่ 33) และเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดขลุ่ พบว่า สารสกัดหยาบขลุ่ส่วนดอกและเปลือกนอกมีการแสดงออกของ TNF- α สูงในทั้ง 3 ความเข้มข้นที่เลือก โดยการแสดงผลจะสูงขึ้นตามระดับความเข้มข้นที่สูงขึ้นแบบ dose dependent ซึ่งสารสกัดหยาบขลุ่ส่วนดอกจะมีการแสดงออกที่สูงกว่าส่วนเปลือกนอก ในขณะที่สารสกัดหยาบส่วน ราก ลำต้น และใบ สามารถกระตุ้นให้มีการแสดงออกของ TNF- α ในระดับที่ต่ำกว่าดอก และที่สำคัญพบว่า ในสารสกัดหยาบส่วนใบขลุ่ เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้นทำให้การแสดงออกของ TNF- α ลดลง โดยที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ลดลงในระดับ 1X PBS+H₂O₂ (ภาพที่ 34)

จากผลการทดลอง พบว่า H₂O₂ กระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจผ่าน p38 และสารสกัดส่วนดอกขลุ่ รากหนามพุงคอก เปลือกนอกขลุ่ กระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ได้ดีที่สุด ตามลำดับ

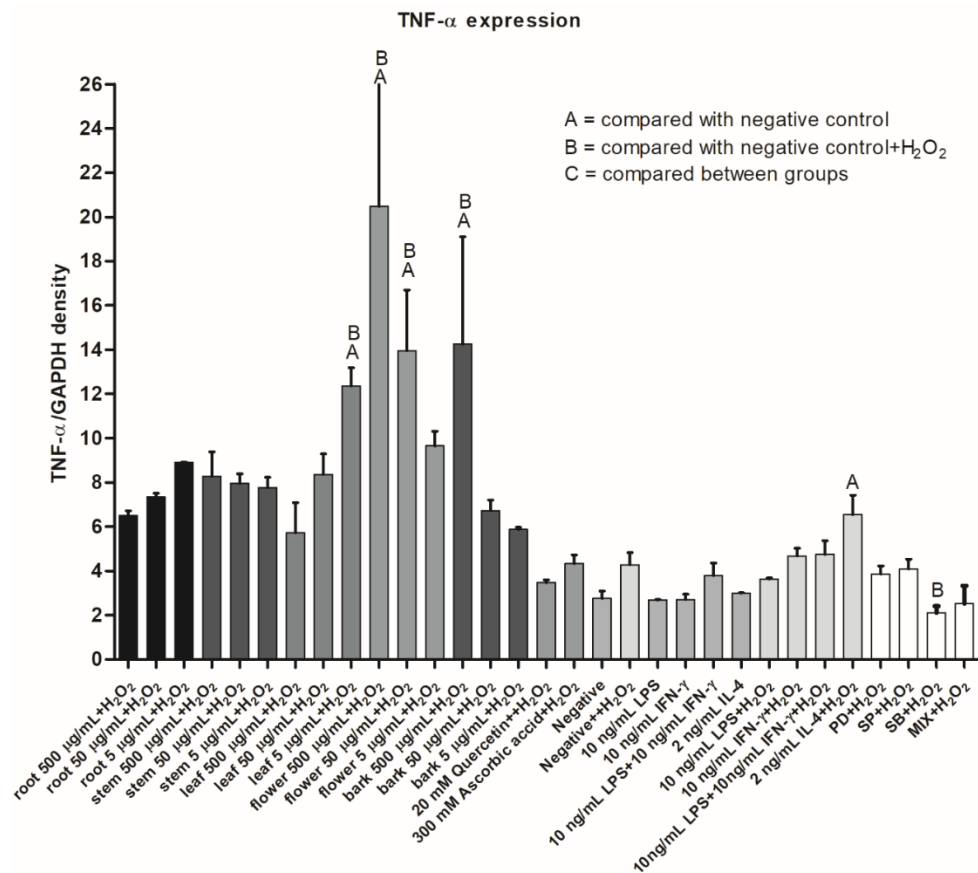


ภาพที่ 32 การแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบจากหนามพุงคอกเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ต่าง ๆ



ภาพที่ 33 การแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบจากหนามแดงเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ต่าง ๆ



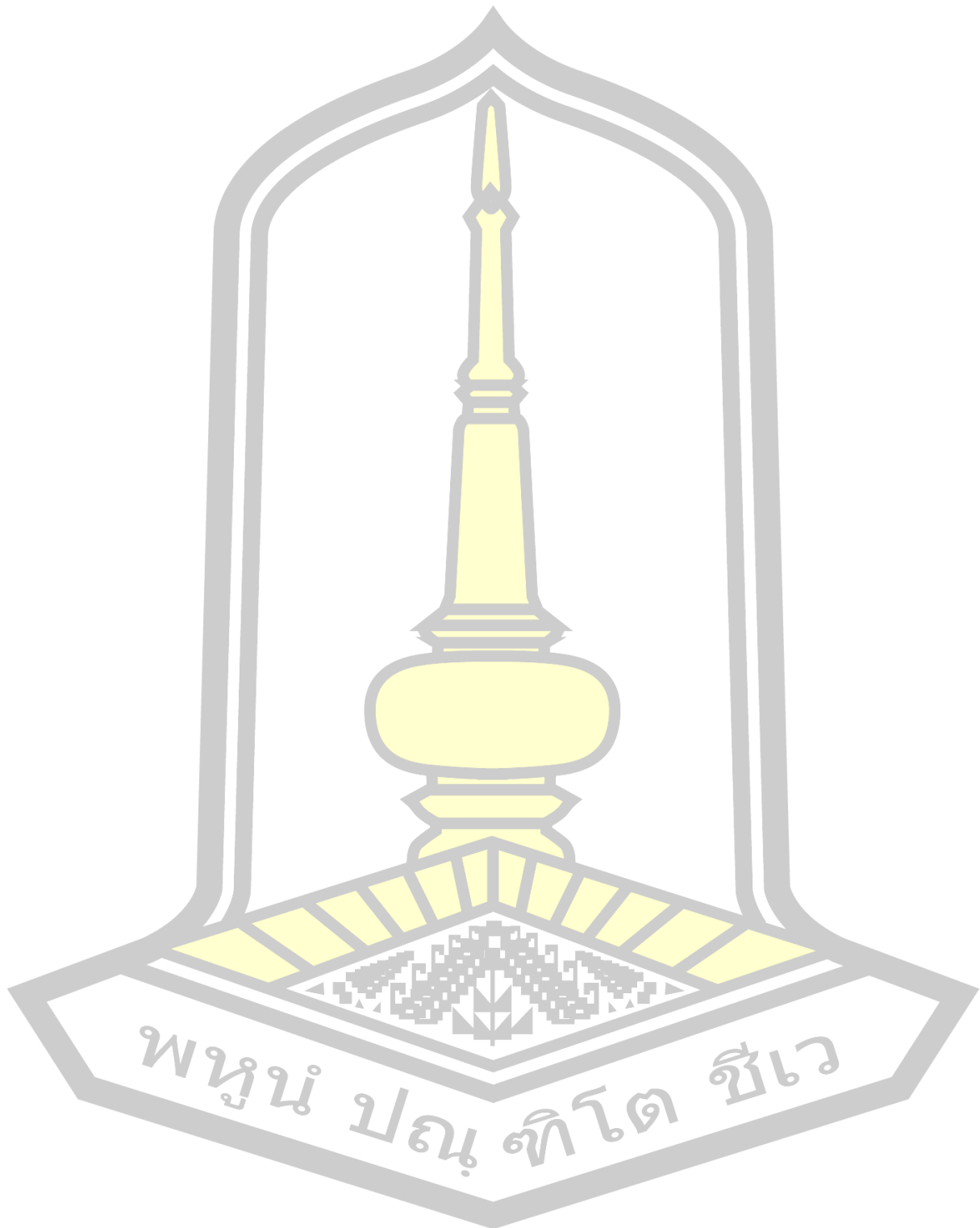


ภาพที่ 34 การแสดงออกของ TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาดจากขลุ่ยเป็นเวลา 48 ชั่วโมง และกระตุ้นด้วย H₂O₂ เป็นเวลา 6 ชั่วโมง เปรียบเทียบกับกลุ่ม control ต่าง ๆ

4.11 การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาดต่อการแสดงออกของยีน IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ

ผู้วิจัยได้ศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาดต่อการแสดงออกของยีน IL-10 ของเซลล์แมโครฟาจ ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดพืชชอบเค็ม และ H₂O₂ ที่ความเข้มข้น 40 μ M โดยมีกลุ่ม control ที่ถูกกระตุ้นด้วย 40 μ M H₂O₂ ได้แก่ 1) 1X PBS เป็น negative 2) 10 ng/mL LPS 3) 10 ng/mL IFN- γ 4) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 5) 2 ng/mL IL-4 6) 20 μ M quercetin และ 7) 300 μ M ascorbic acid 6) ERK inhibitor PD98059 (10 μ M) 7) JNK inhibitor SP600125 (10 μ M) 8) p38 MAPK inhibitor SB203580 (5 μ M) และ PD98059 (10 μ M)+ SP600125 (10 μ M)+ SB203580 (5 μ M) และ กลุ่ม control ที่ไม่ถูกกระตุ้นด้วย 40 μ M H₂O₂ ได้แก่ 1) 1X PBS 2) 10 ng/mL LPS 3) 10 ng/mL IFN- γ 4) 10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ 5) 2 ng/mL IL-4 จากการวิจัย พบว่า สารสกัดหยาดพืชชอบเค็มทั้ง 3 ชนิด ที่ความเข้มข้น 5 50

และ 500 รวมถึงกลุ่ม control ไม่มีการแสดงออกของ IL-10 (ภาพผนวกที่ ๑)



บทที่ 5

อภิปรายผลการทดลอง

ปัจจุบันได้มีการตระหนักถึงความสำคัญของการพัฒนาสมุนไพรไทย อันเป็นภูมิปัญญาและทรัพยากรที่สำคัญของประเทศ และจากการที่อุตสาหกรรมยาประเทศไทยในอนาคตต้องเผชิญกับการนำเข้ายาจากต่างประเทศในปริมาณสูง ประสบกับภาวะตลาดในประเทศมีการแข่งขันสูงขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มยาชื่อสามัญซึ่งจะส่งผลกระทบต่อองค์การเภสัชกรรม ต้องมีการพัฒนาสมุนไพรเพื่อเป็นยารักษาโรคให้ครอบคลุมการรักษาเพิ่มเติมอย่างครบวงจร ตามนโยบายของกระทรวงสาธารณสุขในการรณรงค์การใช้สมุนไพรทางยา ที่สนับสนุนการใช้สมุนไพรในลักษณะพึ่งพาตนเอง และสร้างความมั่นคงด้านยาให้กับประเทศไทยควบคู่กับการพัฒนาคุณภาพชีวิตที่ดีขึ้นของผู้ป่วยให้ใช้ชีวิตได้อย่างปกติสุขในสังคม จึงได้มีแผนแม่บทที่มีเป้าหมายเพื่อพัฒนาการผลิตและใช้ประโยชน์สมุนไพรไทยอย่างมีคุณภาพและครบวงจร ซึ่งจะส่งผลต่อความมั่นคง มั่งคั่ง และยั่งยืนของสมุนไพรไทย และการสร้างมูลค่าเพิ่มทางเศรษฐกิจของไทย (กระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ-เอกชน, 2559) ดังนั้น ผู้วิจัยได้เล็งเห็นความสำคัญดังกล่าว ในงานวิจัยนี้ผู้วิจัยมีความสนใจในการศึกษาพืชตัวอย่างจากพื้นที่ดินเค็ม ที่อาจมีคุณสมบัติและสารสำคัญที่สามารถนำไปพัฒนาเป็นตำรับสมุนไพรในอนาคตได้

ดินเค็ม เป็นปัญหาหนึ่งที่มีความสำคัญต่ออาชีพเกษตรกร เนื่องจากดินในบริเวณพื้นที่ดินเค็มส่งผลต่อการเจริญเติบโตของพืช และส่งผลให้มีผลผลิตทางการเกษตรต่ำ ทำให้เป็นอันตรายต่อพืชที่ไม่สามารถที่จะดูดน้ำเข้ายังระบบรากได้สะดวก หรือเกิดความเป็นพิษต่อพืช ดังนั้นบริเวณที่เป็นดินเค็มจึงมีลักษณะเป็นพื้นที่ว่างเปล่า ไม่มีพืชเจริญ (กรมทรัพยากรธรณี, 2550) อย่างไรก็ตามพบว่า มีพืชบางชนิดที่สามารถเจริญเติบโตได้ในพื้นที่ดินเค็มได้ โดยพืชแต่ละชนิดจะมีความสามารถในการทนเค็มได้แตกต่างกัน (กรมพัฒนาที่ดิน, 2561) โดยผู้วิจัยได้ทำการเก็บตัวอย่างพืชชอบเค็ม ณ บ้านโพนสิม ตำบลหัวนาคำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ ซึ่งเป็นพื้นที่ดินเค็ม ที่มีปริมาณคราบเกลือมากกว่า 50% ของพื้นที่ (ภาพผนวกที่ ค1) จัดเป็นบริเวณพื้นที่ที่มีดินเค็มมาก (บุปผา โดภาคงาม, 2549) ตัวอย่างพืชที่ทำการเก็บตัวอย่าง ได้แก่ หนามพุงดอ (*Azima sarmentosa* (Blume) Benth. & Hook. f.) หนามแดง (*Maytenus mekongensis*) และ ชลู่ (*Pluchea indica*) (Deeprom et al., 2015; Poodeetip et al., 2013) และเตรียมตัวอย่างพืชสำหรับสกัดสารสกัดหยาบ ด้วยวิธีสกัดแบบรีฟลักซ์และใช้ 70% เอทานอล เป็นตัวทำละลาย ที่มีความปลอดภัยและเหมาะสมสำหรับสกัดสารสมุนไพร (Wendakoon and Gagnon, 2012; ชุตินา ลีหมั้วทวาริทธิ์, 2555) และในการวิเคราะห์

คุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้นและการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ ในพืชหนามพุดอง หนามแดง และขลุ้ ได้ผลการวิเคราะห์ ดังนี้

จากการสกัดสารด้วยตัวทำละลาย 70% เอทานอล พบว่า สารสกัดหยาบส่วนใบของพืชทั้ง 3 ชนิด มี %yield สูงที่สุดเมื่อเปรียบเทียบกับส่วนต่าง ๆ ของพืช อาจเนื่องจากสารจากส่วนใบสามารถละลายในตัวทำละลาย 70% เอทานอล ตามกฎ “like dissolves like” ที่สารจะละลายได้ดีในตัวทำละลายที่มีขั้วใกล้เคียงกัน (Zhang *et al.*, 2018) แสดงให้เห็นว่า ส่วนใบของพืชมีสารที่มีขั้วใกล้เคียงกับตัวทำละลายละลายมากกว่าส่วนอื่น ๆ จึงทำให้มี %yield สูงสุดเมื่อสกัดด้วย 70% เอทานอล ด้วยวิธีสกัดแบบรีฟลักซ์ และเมื่อทำการตรวจสอบปริมาณสารประกอบฟีนอลทั้งหมดและสารประกอบฟลาโวนอยด์ทั้งหมด พบว่าในการศึกษานี้ สารสกัดหยาบหนามพุดองส่วนใบมีปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือลำต้นและรากตามลำดับ มีรายงานพบว่าหนามพุดองมีองค์ประกอบของสารกลุ่ม Triterpenoids (taraxerol taraxerone triterpenoid I) จากส่วนสกัดเฮกเซนของใบ และกลุ่ม Triterpenoids (triterpenoid II) Phytosterol (stigmasterol) flavonoids (stigmasteryl-3-O- beta-D-glucopyranoside) จากส่วนสกัด 95% เอทานอลของราก (Sunintaboon, 1999) ผลการศึกษาของเราพบว่าสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนรากมีปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือลำต้นและใบตามลำดับ มีรายงานพบว่าหนามแดงมีองค์ประกอบของสารกลุ่ม Terpenoids (sesquiterpene alkaloids) จากส่วนสกัดราก (Lhinhatrakool *et al.*, 2011) และสารสกัดหยาบขลุ้ส่วนใบมีปริมาณฟีนอลมากที่สุด รองลงมาคือดอก เปลือกนอก ราก และลำต้น ลำดับ และพบว่าส่วนใบมีปริมาณฟลาโวนอยด์มากที่สุด รองลงมาคือ ดอก ราก ลำต้นและเปลือกนอก ตามลำดับ มีรายงานพบว่าขลุ้มีองค์ประกอบของสารกลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (กรด quinic และกรดฟีนอลิก) flavonoids และ thiophenes จากสารสกัด 70% เอทานอล ส่วนเหนือดิน (aerial part) (Ruan *et al.*, 2019) ซึ่งองค์ประกอบของฟลาโวนอยด์มีค่ามากกว่าฟีนอลในพืชทั้ง 11 ส่วน ทั้งนี้ปริมาณของฟีนอลจะสูงกว่าฟลาโวนอยด์เสมอ เนื่องจากสารประกอบฟีนอลิกมีโครงสร้างทางเคมีที่มีขั้วปานกลาง และฟลาโวนอยด์เป็นสารประกอบฟีนอล (Panche *et al.*, 2016; Tsao, 2010) จากผลการวิจัยพบว่าปริมาณของฟลาโวนอยด์มีค่ามากกว่า ฟีนอล อาจเกิดจากสารมาตรฐาน quercetin มีปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์ที่น้อยและมีค่า OD₅₁₀ น้อยกว่าสารสกัดหยาบ เมื่อทำการเปรียบเทียบปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์กับกราฟมาตรฐานจึงทำให้ปริมาณของฟลาโวนอยด์มีค่าสูงส่งผลให้ปริมาณฟลาโวนอยด์มีค่ามากกว่าฟีนอล และมีการศึกษาว่าสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์นั้นมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระที่ดี พืชทั้ง 3 ชนิดที่ผู้วิจัยได้นำมาศึกษานั้นจัดเป็นพืชชอบเค็ม โดยการที่พืชเจริญได้ในสภาวะดินเค็มนั้น จะส่งผลให้พืชเกิดความเครียดที่ทำให้พืชมีการผลิตสารบางชนิดที่แตกต่างจากสภาวะปกติ ซึ่งสารเหล่านั้นอาจเป็นสารที่มีคุณสมบัติสำคัญในการเป็นสมุนไพร เช่น โหระพา (*Ocimum basilicum*) เป็นพืชทนเกลือใน

ระดับเล็กน้อย ที่มีประโยชน์ในการต้านการอักเสบ ต้านจุลินทรีย์ สารต้านอนุมูลอิสระ ต้านไวรัส เป็นต้น (Arshad Ullah, 2019) มีการผลิตกรดอะมิโนในระดับสูง และมีการผลิต Proline สะสมในใบของ แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) และ เยอร์มันคาโมไมล์ (*Matricaria chamomilla*) มีการผลิตอัลคาลอยด์ที่เพิ่มขึ้นใน มะแว้งนง (*Solanum nigrum*) (solasodine) แพงพวยฝรั่ง (*Catharanthus roseus*) (indole alkaloids) และ ยาร์โรว์ (*Achillea fragrantissima*) มีการผลิตสารประกอบฟีนอลิกใน สเปียร์มินต์ (Spearmint) และมีการสะสมกรดฟีนอลิก (protocatechuic chlorogenic และ caffeic acids) ใน เยอร์มันคาโมไมล์ (*Matricaria chamomilla*) มีการผลิต cardenolide ในใบของ ถุงมือจิ้งจอก (*Digitalis purpurea*) ที่ระดับความเค็มปานกลาง (Said-Al Ahl, 2011)

ในการศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระ พบว่า พืชหนามพุดทั้ง 3 ส่วนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ในสารสกัดหยาบส่วนใบมากที่สุด รองลงมาคือ รากและ ลำต้น ตามลำดับ ทั้งนี้อาจเนื่องมาจากใบพืชมีส่วนประกอบของคลอโรฟิลล์อยู่มาก ซึ่งคลอโรฟิลล์แสดงฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระและต้านมะเร็ง (Yilmaz and Gökmen, 2015) จึงส่งผลให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าส่วนอื่น ๆ ของพืช โดยพืชหนามพุดทั้ง 3 ส่วนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH และ ABTS ได้น้อยกว่า ascorbic acid และจากรายงานสารที่พบในพืชหนามพุด ได้แก่ Triterpenoids (taraxerol taraxerone triterpenoid I และ triterpenoid II) Phytosterol (stigmasterol) flavonoids (stigmasteryl-3-O- beta-D-glucopyranoside) (Sunintaboon, 1999) ซึ่งสารในกลุ่มนี้พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Grassmann, 2005) พืชหนามแดงทั้ง 3 ส่วนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดหยาบส่วนรากมากที่สุด รองลงมาคือ ลำต้น และใบ โดยสารสกัดหยาบหนามแดงทั้ง 3 ส่วนมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH น้อยกว่า ascorbic acid และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนรากและลำต้นใกล้เคียงกับ ascorbic acid ขณะที่สารสกัดหยาบส่วนใบมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระน้อยกว่า ascorbic acid ทั้งนี้อาจเนื่องจากส่วนรากและลำต้นของพืชหนามแดงมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก จึงส่งผลให้ค่า IC_{50} ต่ำและใกล้เคียง ascorbic acid และจากรายงานสารที่พบในพืชหนามแดง ได้แก่ กลุ่ม Terpenoids (sesquiterpene alkaloids) (Linhatrakool *et al.*, 2011) ซึ่งสารในกลุ่มนี้พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Grassmann, 2005) พืชขลุ้ทั้ง 5 ส่วนมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ในสารสกัดหยาบส่วนดอกมากที่สุด โดยมีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระใกล้เคียงกับ ascorbic acid รองลงมาคือใบ เปลือกนอก ลำต้น และราก ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนดอกและใบมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ DPPH ไม่แตกต่างกัน และมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ในสารสกัดหยาบส่วนดอกมากที่สุด รองลงมาคือ เปลือกนอก ใบ ลำต้น และราก ตามลำดับ โดยสารสกัดหยาบส่วนดอกมีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้มากกว่า ascorbic acid

ทั้งนี้อาจเนื่องจากส่วนดอกของพืชกลุ่มมีสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจำนวนมาก จึงส่งผลให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่าส่วนอื่น ๆ ของพืช และจากรายงานสารที่พบในพืชขลุ้ ได้แก่ กลุ่มสารประกอบฟีนอลิก (กรดควินิก และกรดฟีนอลิก) และ flavonoids thiophenes (Ruan *et al.*, 2019) ซึ่งสารในกลุ่มนี้พบว่ามีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระได้ (Grassmann, 2005) อย่างไรก็ตามจะเห็นได้ว่าค่า IC_{50} ที่ได้จากวิธี DPPH สูงกว่าวิธี ABTS เนื่องจากทั้ง 2 วิธีมีกลไกการออกฤทธิ์ที่ต่างกัน จึงทำให้ผลของฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ได้แตกต่างกัน โดยวิธี DPPH เป็นการให้ไฮโดรเจนอะตอมแก่อนุมูลอิสระ และ DPPH มีความเสถียร (Shahidi and Zhong, 2015) ขณะที่วิธี ABTS เป็นการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระ และมีความไวต่อปฏิกิริยา (Mohamed *et al.*, 2016) จากการศึกษาจะเห็นได้ว่าสารสกัดหยาบทั้ง 11 ส่วน มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ABTS ได้ดีกว่า DPPH แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบมีความสามารถในการให้อิเล็กตรอนแก่อนุมูลอิสระได้ดี ซึ่งมีรายงานที่สอดคล้องกันว่าฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในวิธี ABTS มีความไวกว่า DPPH นอกจากนี้ DPPH นั้นไม่ไวต่อปฏิกิริยาเหมือน ABTS เนื่องจากอิเล็กตรอนคู่โดดเดี่ยวของ DPPH ถูกบดบังด้วยวงเบนซีนและหมู่ไนโตรเจน ทำให้สารต้านอนุมูลอิสระที่มีโมเลกุลขนาดใหญ่ไม่สามารถเข้าไปทำปฏิกิริยาได้หรือเกิดปฏิกิริยาช้า (Mohamed *et al.*, 2016)

สารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์นั้นมีฤทธิ์ การต้านอนุมูลอิสระที่ดี (Kaurinovic and Vastag, 2019) จากการศึกษาความสัมพันธ์ของปริมาณสารสำคัญ 2 ชนิดกับการต้านอนุมูลอิสระ โดยค่าความสัมพันธ์แสดงเป็น R^2 (correlation coefficient) ที่พิจารณาค่านัยสำคัญที่ $p < 0.05$ จัดแบ่งกลุ่มของค่าความสัมพันธ์ได้เป็น 5 กลุ่ม (Miot, 2018) พบว่า พืชหนามพุดดอ ปริมาณฟีนอลที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดดอไม่มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในวิธี DPPH และ ABTS และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์ที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามพุดดอมีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับกลางในวิธี ABTS แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ของพืชหนามพุดดออาจเป็นสารกลุ่มอื่นที่ไม่เป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ พืชหนามแดงพบว่าปริมาณฟีนอลที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดงมีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงมากในวิธี DPPH และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชหนามแดงมีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงมากในวิธี DPPH และระดับกลางในวิธี ABTS แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ของพืชหนามพุดดออาจเป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ พืชขลุ้ พบว่าปริมาณฟีนอลที่พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชขลุ้มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงในวิธี DPPH และพบว่าปริมาณฟลาโวนอยด์พบในส่วนต่าง ๆ ของพืชขลุ้ มีความสัมพันธ์กันกับฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระในระดับสูงในวิธี DPPH แสดงให้เห็นว่าสารต้านอนุมูลอิสระที่ออกฤทธิ์ของพืชหนามพุดดออาจเป็นสารกลุ่มฟีนอลและฟลาโวนอยด์ อย่างไรก็ตามจากการศึกษานี้ยังไม่สามารถอธิบายกลไกการต้านอนุมูลอิสระและความเป็นไปได้ที่อาจมาจาก

สารสำคัญที่พบได้ ต้องมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อวิเคราะห์สารประกอบที่บริสุทธิ์ในสารสกัดและกลไกในการต้านอนุมูลอิสระดังกล่าวต่อไป นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการต้านจุลินทรีย์ (Bahri-Sahloul *et al.*, 2014) ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์

นอกจากนี้ยังพบว่าสารต้านอนุมูลอิสระและสารประกอบฟีนอลและฟลาโวนอยด์มีความสัมพันธ์อย่างมากต่อการต้านจุลินทรีย์ (Bahri-Sahloul *et al.*, 2014) ผู้วิจัยจึงได้ศึกษาฤทธิ์การต้านจุลินทรีย์ ได้แก่ 1. *S. aureus* DMST 8840 เป็นเชื้อก่อโรคที่เป็นสาเหตุการติดเชื้อทางผิวหนัง แผลและเนื้อเยื่อ และโรคอาหารเป็นพิษ ที่จะส่งผลร้ายแรงเมื่อเข้าสู่กระแสเลือดและเนื้อเยื่อภายใน (Taylor and Unakal, 2020) 2. *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 เป็นเชื้อที่ดื้อต่อ methicillin ทำให้เกิดการติดเชื้อที่ร้ายแรงและเป็นสาเหตุหลักของการเสียชีวิต (Reddy *et al.*, 2017) 3. *E. coli* ATCC 25922 เป็นเชื้อ *E. coli* ที่ไม่ก่อโรค ได้รับการรับรองเป็น BSL-1 (Pang *et al.*, 2013) และ 4. *S. Typhimurium* TISTR 2511 เป็นเชื้อก่อโรคอุจจาระร่วงในมนุษย์ (Bottoni *et al.*, 2008) ด้วยวิธี agar disc diffusion และ MIC/MBC พบว่าพืชหนามพุดอ หนามแดง และ ชลู่ ทั้ง 11 ส่วน ไม่แสดงคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์ ที่ความเข้มข้น 0-5120 $\mu\text{g/mL}$ อย่างไรก็ตามเชื้อจุลินทรีย์ทั้ง 4 ชนิด จะก่อโรคเมื่อเข้าสู่ร่างกาย สารสกัดหยาบพืชหนามพุดอไม่แสดงฤทธิ์ต้านจุลินทรีย์โดยตรง ทั้งนี้อาจมีคุณสมบัติการต้านจุลินทรีย์โดยการกระตุ้นเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน จากการศึกษาครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบหนามพุดอทั้ง 3 ส่วน มีปริมาณสารสำคัญ 2 ชนิด และฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่น่าสนใจ ทั้งนี้สารสกัดหยาบทั้ง 3 ส่วนไม่แสดงความสามารถในการต้านจุลินทรีย์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงสนใจนำไปศึกษาเพื่อตรวจสอบผลของสารสกัดหยาบหนามพุดอต่อการปรับเปลี่ยนของเซลล์แมโครฟาจต่อไป

ระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายเป็นระบบที่เกิดจากการทำงานร่วมกันขององค์ประกอบต่าง ๆ ในร่างกาย ได้แก่ กลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาว แอนติบอดีในกระแสเลือดและสารคัดหลั่ง และอวัยวะต่าง ๆ (Abbas *et al.*, 2015) จากการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อเซลล์เม็ดเลือดขาว เซลล์กลุ่มโมโนไซต์ รวมถึงเซลล์กลุ่มไมโซไซโตไซต์ พบว่าการตอบสนองของเซลล์แต่ละชนิดต่อสารที่ความเข้มข้น 0-512 $\mu\text{g/ml}$ อาจมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับชนิดของเซลล์

เซลล์ในกลุ่มโมโนไซต์ เป็นกลุ่มเซลล์โมโนไซต์ที่จะพัฒนาไปเป็นเซลล์แมโครฟาจ (Abbas *et al.*, 2015) โดยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดหยาบหนามแดงทั้ง 3 ส่วน สารสกัดหยาบชลู่ 4 ส่วน ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และเปลือกนอก และสาร Propolis ทำให้เซลล์ในกลุ่มโมโนไซต์มีจำนวนเซลล์มากขึ้น ซึ่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์อาจเกิดจากสารไปกระตุ้นเซลล์ให้เกิด proliferation ของเซลล์แมโครฟาจ นอกจากนี้มีรายงานว่า น้ำผึ้งกระตุ้นการตอบสนองของภูมิคุ้มกัน

โดยกระตุ้นการ proliferation ของเซลล์โมโนไซต์ (Tonks *et al.*, 2003) ขณะที่สารสกัดหยาบหนาม พงคอตทั้ง 3 ส่วน และสารสกัดหยาบส่วนดอกขลุ่ย ไม่มีผลต่อเซลล์ ซึ่งอาจเกิดจากสารไม่มีความเป็นพิษ ต่อเซลล์กลุ่มนี้

เซลล์ในกลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ เป็นเซลล์กลุ่ม lymphocyte และเซลล์กลุ่ม granulocyte (Abbas *et al.*, 2015) โดยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ พบว่าสารสกัดหยาบหนามแดงทั้ง 3 ส่วน สารสกัดหยาบขลุ่ย 4 ส่วน ได้แก่ ราก ลำต้น ใบ และเปลือกนอก และสาร Propolis ทำให้เซลล์ กลุ่มไม่ใช่โมโนไซต์ มีจำนวนเซลล์มากขึ้น มีรายงานว่าสารธรรมชาติ oenothien B เป็น สารประกอบฟีนอลิกจากพืช *Epilobium angustifolium* สามารถกระตุ้นเซลล์ innate lymphocytes ที่ทำให้มีการแสดงออก CD25 หรือ CD69 เพิ่มขึ้น รวมถึงส่งเสริมการผลิต IFN- γ ใน เซลล์ NK และลิมโฟไซต์มนุษย์ ชนิดที่นอกจากนี้ มีรายงานว่า genistein จะเพิ่มจำนวนเซลล์ของ splenic B cells (L) แมโครฟาจ (L และ M) ลิมโฟไซต์ชนิดที่ (H) T Th (L และ H) และ cytotoxic T cells ซึ่ง genistein อาจปรับภูมิคุ้มกันโดยเป็นทั้งปฏิกริยาเอสโตรเจนหรือตัวต่อต้าน (Grigore, 2017) และ phytohemagglutinin (PHA) ซึ่งเป็นเลคตินที่พบในพืช สามารถกระตุ้นการแบ่งตัวของ lymphocytes ของมนุษย์ได้ (ที่ปราศจากโมโนไซต์) (Ocklind, 1986) ขณะที่สารสกัดหยาบหนาม พงคอตทั้ง 3 ส่วน และสารสกัดหยาบส่วนดอกขลุ่ย ไม่มีผลต่อเซลล์กลุ่มนี้

เซลล์เม็ดเลือดขาว โดยเมื่อถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบ พบว่า สารสกัดหยาบหนามแดง ทั้ง 3 ส่วน สารสกัดหยาบขลุ่ย 4 ส่วน ได้แก่ ราก ใบ ดอก และเปลือกนอก และสาร Propolis เป็น positive control ทำให้เซลล์ในกลุ่มเซลล์เม็ดเลือดขาวมีจำนวนเซลล์มากขึ้น และมีรายงานว่า 3,3'-diindolylmethane (DIM) ที่สกัดจากผัก Brassica เช่น บล็อกโคลี กะหล่ำปลี และเคล เพิ่มจำนวน เซลล์เม็ดเลือดขาว (WBCs) หรือลิมโฟไซต์ (lymphocytes) ได้เป็น 2 เท่า ซึ่งช่วยให้ร่างกายต่อสู้กับ การติดเชื้อโดยการฆ่าหรือจับกินเชื้อโรค (University of California - Berkeley, 2007) ขณะที่สาร สกัดหยาบหนามพงคอต 2 ส่วน ได้แก่ ลำต้น และใบ และสารสกัดหยาบส่วนลำต้นขลุ่ย ไม่มีผลต่อเซลล์ แต่ในสารสกัดหยาบส่วนรากหนามพงคอต ลดจำนวนเซลล์ ซึ่งการลดจำนวนของเซลล์อาจเกิดจากสาร มีผลให้เซลล์ตาย เนื่องจากเซลล์เม็ดเลือดขาวมีลักษณะประชากรเป็น heterogeneous population จึงเป็นผลให้ในบางครั้งผลไม่ได้เป็นไปในทิศทางเดียวกันกับผลของเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ และเซลล์กลุ่ม ไม่ใช่โมโนไซต์ ซึ่งอาจเกิดจากความหลากหลายของเซลล์ที่ส่งผลในการส่งเสริมหรือยับยั้งที่แตกต่าง กัน

นอกจากนี้ผู้วิจัยยังได้ทำการศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษของสารสกัดหยาบพืชขอบเค็มต่อ เซลล์เม็ดเลือดแดง โดยวิธี hemolysis assay พบว่าสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนใบ และหนามพงคอต ส่วนใบ แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับต่ำที่ความเข้มข้น 256 และ 512 $\mu\text{g/ml}$

ส่วนสกัดรากหนามแดง แสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดงในระดับต่ำที่ความเข้มข้น 512 $\mu\text{g/ml}$ ขณะที่ส่วนสกัดอื่น ๆ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง และมีรายงานความเป็นพิษของหนามพุดอง พบว่าสารสกัด 95% เอทานอลจากส่วนรากมีฤทธิ์เป็นพิษต่ออาร์ทีเมียหรือไรทะเล (*Artemia salina* Linn.) ที่ ระดับ LC_{50} เท่ากับ 0.09 และ 9.24 $\mu\text{g/mL}$ ตามลำดับ (Sunintaboon, 1999) ในพืชหนามแดง มีรายงานว่า สาร 2,9'-di-O-acetyl-5-O-benzoyl-5-deacetylwilforidine และ 9'-deacetoxymekongensine แสดงความเป็นพิษในระดับต่ำต่อเซลล์ human oral epidermal carcinoma (KB) cell line ที่ ระดับ IC_{50} เท่ากับ 28.2 และ 46.7 ตามลำดับ (Lhinhatrakool *et al.*, 2011) และมีรายงานความเป็นพิษของสารสกัด 95% เอทานอลของใบขลุ่ย ว่าไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เยื่อเมือกในช่องปาก (human oral squamous carcinoma cell line) นอกจากนี้พบว่าส่งเสริมให้เกิดการสมานแผลที่ดียิ่งขึ้น (wound healing activity) (Buranasukhon *et al.*, 2017) จากผลการทดลองผู้วิจัยจึงเลือกความเข้มข้นที่ 5 50 และ 500 $\mu\text{g/ml}$ สำหรับนำไปศึกษาต่อไป $\mu\text{g/ml}$ อย่างไรก็ตามควรมีการศึกษาถึงกลไกการออกฤทธิ์ของสารต่อเซลล์เพิ่มเติม

เซลล์แมโครฟาจ ($\text{CD14}^+\text{CD16}^+$) เป็นโมโนไซต์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ ที่พัฒนามาจากโมโนไซต์ ($\text{CD14}^+\text{CD16}^-$) เป็นเซลล์หลักในการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด มีหน้าที่ในการ phagocytosis นำเสนอแอนติเจน และซ่อมแซม เซลล์แมโครฟาจ แบ่งออกย่อยออกเป็น แมโครฟาจ ชนิด M1 (M1 macrophages) และแมโครฟาจชนิด M2 (M2a M2b หรือ M2c) โดยแบ่งตามการแสดงออกของ markers การหลั่งสารและการทำงาน เป็นต้น (Abbas *et al.*, 2015) ในงานวิจัยนี้ ตรวจสอบการเปลี่ยนแปลงของเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์แมโครฟาจที่เพาะเลี้ยง พบว่าเซลล์กลุ่มโมโนไซต์มีการแสดงออกของ CD14 ในวันแรก และเริ่มเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมโครฟาจที่มีการแสดงออกของ CD16 ในวันแรก จนถึงวันที่ 7 และหายไปในวันที่ 8 โดยมีรายงานที่สอดคล้องกันว่าการแยกโมโนไซต์เป็นแมโครฟาจได้ในการเพาะเลี้ยงเป็นเวลา 6 วัน (Rey-Giraud *et al.*, 2012) และไม่ควรเพาะเลี้ยงโมโนไซต์นานกว่า 7 วัน (Safi *et al.*, 2016) ดังนั้นผู้วิจัยจึงเลือกการเพาะเลี้ยงเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ สำหรับเปลี่ยนแปลงไปเป็นเซลล์แมโครฟาจในเป็นเวลา 6 วัน สำหรับการศึกษาการกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจด้วยสารสกัดหยาบพืชขอบเค็ม

แมโครฟาจ เป็นเซลล์ phagocytic ชนิด mononuclear phagocyte ที่อยู่ในเนื้อเยื่อ มีบทบาทหลักในการ phagocytosis (Abbas *et al.*, 2015) เราจึงได้ทำการตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ พบว่า แบคทีเรียทั้ง 4 ชนิด มีจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินสูงกว่า 1X PBS ที่เติมแบคทีเรีย ในทุกกลุ่ม internal control และลดลงในช่วงโมเมนต์ 2 ในทุกกลุ่ม control อาจเกิดจากการกลืนกินแบคทีเรียเข้าไปและทำลายแบคทีเรียภายใน

เซลล์หรือปล่อย reactive oxygen และ nitrogen species มาทำลายแบคทีเรีย (Billack, 2006) จึงทำให้จำนวนเซลล์ลดลงในชั่วโมงที่ 2 เมื่อกระตุ้นเซลล์แมโครฟาจด้วยสารสกัด พบว่า สารสกัดหยาบพืชทั้ง 3 ชนิด กระตุ้นให้เซลล์มีจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินทั้ง 4 ชนิดสูงกว่า 1X PBS ที่เติมแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 1 โดยจำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 ที่ถูกจับกินในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบหนามพุดและหนามแดง 2 ส่วน ได้แก่ ลำต้นและใบ มีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าราก และสารสกัดหยาบขลุ่ยส่วนใบและดอกมีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าส่วน ราก ลำต้น และเปลือกนอก และพบว่าจำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินลดลงในชั่วโมงที่ 2 ใน *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 และ *E. coli* ATCC 25922 ขณะที่จำนวนแบคทีเรียที่ถูกจับกินในชั่วโมงที่ 2 สูงขึ้นใน *S. aureus* DMST 8840 และ *S. Typhimurium* TISTR 2511 ซึ่งจำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 ถูกจับกินในเซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาบหนามพุดส่วนราก มีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าลำต้นและใบ และมีเพียงสารสกัดหยาบพุดส่วนลำต้น และส่วนใบความเข้มข้น 5 $\mu\text{g/ml}$ ที่มีจำนวน *S. Typhimurium* TISTR 2511 ลดลงในชั่วโมง 2 ในสารสกัดหยาบหนามแดงส่วนลำต้นและใบมีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าราก และสารสกัดหยาบขลุ่ยส่วนใบและดอกมีจำนวนแบคทีเรียสูงกว่าราก ลำต้น และเปลือกนอก ซึ่งสารสกัดหยาบมีผลต่อการจับกินแบคทีเรียของเซลล์แมโครฟาจ อาจทำให้เซลล์แมโครฟาจมีการจับกินแบคทีเรียสูงขึ้น แต่จำนวนแบคทีเรียที่สูงขึ้นอาจเกิดจาก ในบางกรณีการกำจัดเชื้อโรคของแมโครฟาจจะได้รับความช่วยเหลือจากลิโพไซด์ (Billack, 2006) จึงทำให้จำนวนแบคทีเรียในชั่วโมงที่ 2 สูงขึ้นจากชั่วโมงที่ 1 อย่างไรก็ตามควรศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับกลไกการทำงานของเซลล์ว่าการลดลงและเพิ่มขึ้นของการจับกินแบคทีเรียมีกลไกอย่างไร

เซลล์แมโครฟาจแบ่งออกเป็น 2 ชนิดหลัก ได้แก่แมโครฟาจชนิด M1 ที่มีบทบาทในการต้านไวรัส แบคทีเรีย และเนื้องอก ซึ่งเมื่อถูกกระตุ้นด้วย LPS IFN- γ GM-CSF และ IL-1 β ผ่าน pathway ต่าง ๆ ได้แก่ Signal transducer and activator of transcription (STAT) และ Nuclear factor- κ B (NF- κ B) pathway จะส่งผลให้เกิดการ polarization เป็นแมโครฟาจชนิด M1 ที่จะไปกระตุ้นให้มีการแสดงออกของไซโตไคน์ก่ออักเสบ เช่น TNF- α IL-1 β IL-16 IL-12 และ IL-23 ลดการแสดงออกของ IL-10 กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ MHC class II ที่สูง รวมถึงการแสดงออกของคีโมไคน์ ได้แก่ Cxcl5 Cxcl9 และ Cxcl10 เป็นต้น และแมโครฟาจชนิด M2 ที่มีบทบาทในการลดการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกัน ทำให้มีการสร้างเส้นเลือดเข้าไปยังเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งเป็น tumor promotion โดยตัวที่กระตุ้นให้เกิดการ polarization เป็นแมโครฟาจชนิด M2 ได้ดี คือ IL-4 และ IL-13 และส่งผลให้มีการผลิต polyamine ลดการแสดงออกของ IL-12 และ IL-23 กระตุ้นการแสดงออกของ IL-10 ในระดับสูง มีการหลั่งคีโมไคน์ต่าง ๆ เช่น Ccl17 Ccl22 และ Ccl24 กระตุ้นให้มี vascular endothelial growth factor (VEGF) และ matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) ที่

ส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดในก้อนมะเร็ง รวมถึงมีการแสดงออกของ M2 markers ได้แก่ MR Fizz-1 และ Yim1 เป็นต้น โดย M2 สามารถแบ่งย่อยได้เป็น 1) M2a ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-4 ผ่าน STAT6 pathway 2) M2b ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-1 β LPS และ immune complex ผ่าน AP1 pathway และ 3) M2c ที่ถูกกระตุ้นได้ด้วย IL-10 ผ่าน STAT3 pathway (Palma *et al.*, 2018; Través *et al.*, 2012) นอกจากการรับรู้แอนติเจนของแบบที่เรียกว่าผ่าน TLRs และไซโตไคน์ต่าง ๆ ที่กล่าวไปข้างต้นที่สามารถกระตุ้นให้เซลล์แมโครฟาจผลิตไซโตไคน์ proinflammatory แล้ว ยังมีรายงานว่า nitric oxide เป็น extracellular signaling molecule ที่ยอมรับกันในสากล ซึ่ง (H_2O_2) กระตุ้นการแสดงออกของ pro-inflammatory mediators ได้แก่ tumor necrosis factor (TNF- α) โดย H_2O_2 เดินทางผ่านเยื่อหุ้มเซลล์และเข้าไปใน extracellular space และเข้าสู่เซลล์และกระตุ้นการทำงานของเซลล์ข้างเคียง (Gunawardena *et al.*, 2019)

ในงานวิจัยนี้เราได้ใช้ H_2O_2 เป็นรูปแบบในการศึกษา ที่มีรายงานว่า Intracellular H_2O_2 สามารถกระตุ้น signal pathways ที่ควบคุม inducible expression ของยีนที่ควบคุมการทำงานของ macrophage-effector และ cytokine signaling และ H_2O_2 กระตุ้นให้มีการผลิตไซโตไคน์ก่ออักเสบแบบ *in vitro* และ *in vivo* ได้แก่ TNF- α ที่มีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการก่อโรคติดเชื้อและการอักเสบหลายชนิด และ H_2O_2 ทำให้เกิดการผลิต TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจ ผ่าน p38 และ stress-activated protein kinase (SAPK/JNK) (Nakao *et al.*, 2008) ผู้วิจัยได้ตรวจสอบการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดพืชชอบเค็ม และ H_2O_2 และยับยั้ง MAPK pathways พบว่า H_2O_2 กระตุ้นให้มีการแสดงออกของ TNF- α สูงขึ้น โดยเฉพาะเมื่อกระตุ้นด้วย IL-4 และเมื่อยับยั้งการผลิต TNF- α ผ่าน MAPK pathway ด้วย ด้วย MAPK inhibitor พบว่าเมื่อยับยั้งด้วย p38 MAPK inhibitor (SB203580) และ MAPK inhibitor ทั้ง 3 ชนิดร่วมกัน การแสดงออกของ TNF- α ลดลง โดยเฉพาะใน p38 MAPK inhibitor แสดงให้เห็นว่า H_2O_2 กระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจผ่าน p38 และจากการกระตุ้นด้วยสารสกัดหยาดพืชชอบเค็ม และ H_2O_2 พบว่าสารสกัดหยาดจากพืชชอบเค็มทั้ง 11 ส่วน สามารถกระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ได้ ในทั้ง 3 ระดับความเข้มข้นที่เลือก โดยสารสกัดหยาดส่วนรากและลำต้นหนามพุดอ ลำต้นและใบหนามแดง และดอกและเปลือกนอกขลุ้ กระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ได้แบบ dose dependent ซึ่งสารสกัดส่วนดอกขลุ้ รากหนามพุดอ เปลือกนอกขลุ้ กระตุ้นการแสดงออกของ TNF- α ได้สูงที่สุด ตามลำดับ ในขณะที่เดียวกัน พบว่า สารสกัดหยาดส่วนใบขลุ้ลดการแสดงออกของ TNF- α เมื่อความเข้มข้นของสารเพิ่มขึ้น โดยที่ความเข้มข้น 500 $\mu\text{g/mL}$ ลดลงในระดับ 1X PBS+ H_2O_2 นอกจากนี้มีรายงานว่าสารธรรมชาติ ได้แก่ aculeatiside A naringin และ

onionin A กระตุ้นให้เซลล์แมโครฟาจมี CD169⁺ ซึ่งเกี่ยวข้องกับกลไกการตอบสนองแบบ anti-tumor ของเซลล์แมโครฟาจและกระตุ้นการหลั่งของไซโตไคน์ที่ส่งเสริมการอักเสบ เช่น IL-1 β IL-12 และ TNF- α ใน Murine peritoneal macrophages (Fujiwara *et al.*, 2018) และมีรายงานว่า น้ำผึ้ง (manuka pasture และ jelly bush) กระตุ้นให้มีการหลั่ง TNF- α IL-1 β และ IL-6 เพิ่มขึ้น ในเซลล์โมโนไซต์ของมนุษย์ (Tonks *et al.*, 2003)นอกจากการตรวจสอบการแสดงออกของ TNF- α แล้ว ผู้วิจัยได้ทำการตรวจสอบการแสดงออกของ IL-10 แต่ไม่พบการแสดงออกของ IL-10 อาจเกิดจากการแสดงออกของ IL-10 มีระดับต่ำ และมีรายงานว่าไม่มีการผลิต IL-10 ใน RAW264.7 cells และ Jurkat T cells (live หรือ necrotic) ที่เกิดจากการที่มีเซลล์ apoptotic น้อย ($\sim 7\%$) ในประชากรของเซลล์ที่มีชีวิต จึงมี IL-10 ในระดับต่ำ (Chung *et al.*, 2008)

ปัจจุบันมีการศึกษาเพื่อค้นหาสารธรรมชาติที่มีคุณสมบัติสำหรับใช้เป็นกลยุทธ์การรักษาที่มีประสิทธิภาพทางการแพทย์ โดยเป้าหมายคือ เซลล์แมโครฟาจ สำหรับการรักษามะเร็ง การกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมโครฟาจสำหรับการรักษาด้วยภูมิคุ้มกัน การรักษาบาดแผล หรือการต้านการอักเสบ เป็นต้น (Fujiwara *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2020)

ในการศึกษานี้เราได้ทำการตรวจสอบสารสกัดหยาบเบื้องต้น พบว่าสารสกัดหยาบของพืชแต่ละชนิดมีคุณสมบัติที่แตกต่างกัน ในพืชหนามพุดอง จะให้ %yield สูงที่สุดในส่วนใบ ซึ่งมีปริมาณของสารประกอบปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์มาก และแสดงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระสูงกว่ารากและลำต้น จากการศึกษาชี้ให้เห็นว่าหนามพุดองไม่เป็นพิษต่อเซลล์ เพิ่มการตอบสนองของเซลล์แมโครฟาจโดยส่งเสริมการจับกินแบคทีเรียและการแสดงออกของ TNF- α และเมื่อคำนึงถึงความยั่งยืนของวัตถุดิบ ส่วนลำต้นและใบจึงคาดว่าจะนำมาพัฒนาเป็นยาหรือสารสมุนไพร ขณะที่พืชหนามแดงจะให้ %yield สูงที่สุดในส่วนใบ และส่วนรากมีปริมาณของสารประกอบปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าลำต้นและใบ โดยพืชหนามแดงทั้ง 3 ส่วนที่ความเข้มข้นน้อยแสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูง โดยเฉพาะส่วนรากที่มีฤทธิ์ใกล้เคียงกับ ascorbic acid แต่ส่วนรากเป็นส่วนที่เมื่อทำการเก็บเกี่ยวจะส่งผลให้ต้นไม่สามารถเจริญเติบโตต่อได้ ต้องทำการปลูกพืชใหม่ ซึ่งต้องใช้เวลากว่าพืชจะเจริญได้เหมาะสม จึงต้องหลีกเลี่ยงการนำรากไปใช้ ดังนั้นจึงเลือกใช้ส่วนที่ให้ผลรองลงมา คือ ลำต้นและใบ ที่ให้ผลในการเพิ่มการตอบสนองโดยการส่งเสริมการจับกินแบคทีเรียและการแสดงออกของ TNF- α สูงกว่าส่วนราก ที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง อีกทั้งยังส่งเสริมการ proliferation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิด ซึ่งเซลล์โมโนไซต์เป็นเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการซ่อมแซมบาดแผล ดังนั้นหนามแดงส่วนลำต้นและใบจึงคาดว่าจะนำมาพัฒนาเป็นยาหรือสารสมุนไพร และอาจสามารถใช้ในการกระตุ้นการเจริญของโมโนไซต์ที่ในการรักษาบาดแผล และพืชกลุ่มส่วนดอกและใบ เป็นส่วนที่มีปริมาณของสารประกอบปริมาณฟีนอลและฟ

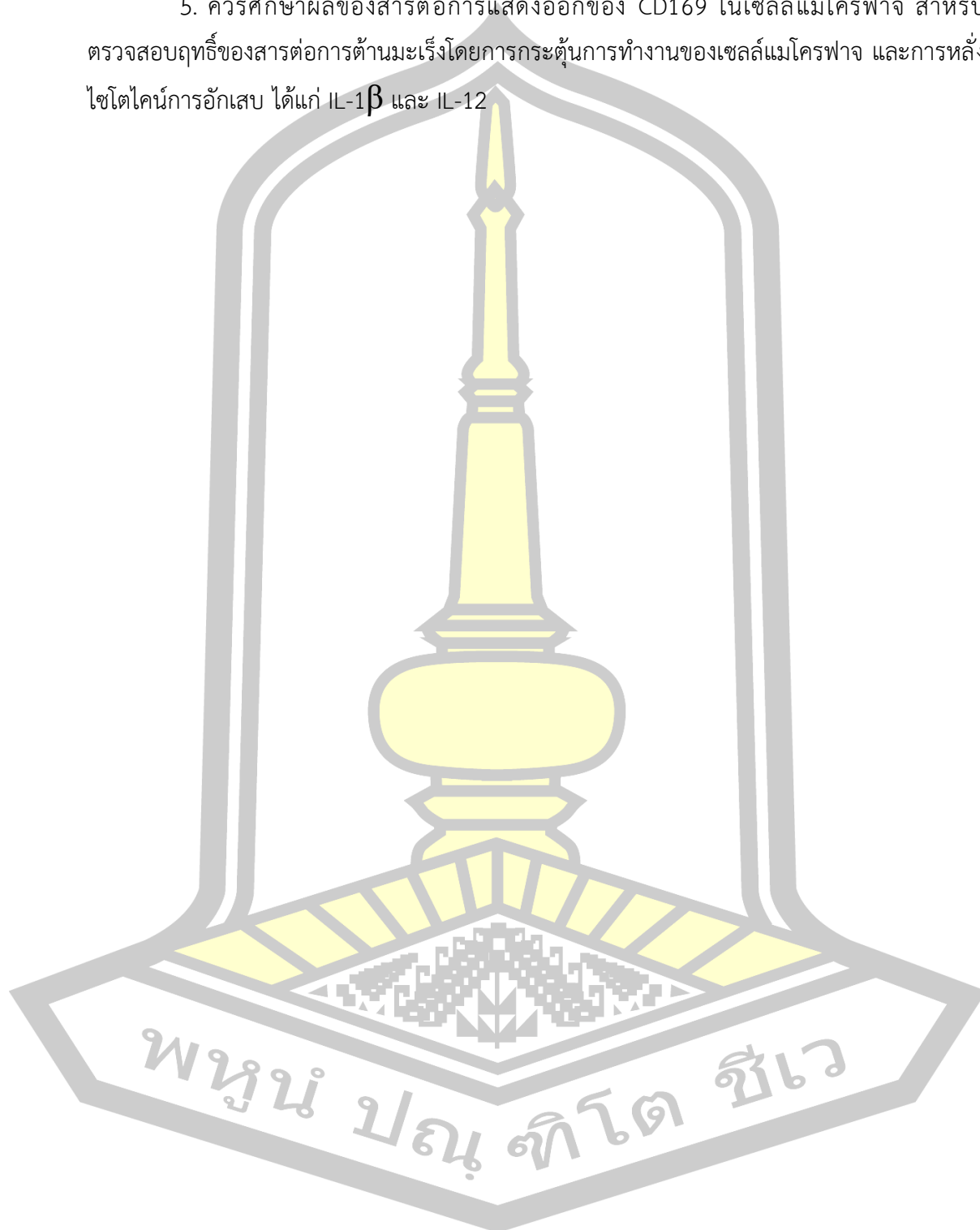
ลาไวโนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าส่วนต่าง ๆ ของพืช โดยที่ความเข้มข้นน้อย แสดงฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระที่สูงใกล้เคียงกับ ascorbic acid และยังให้ผลในการส่งเสริมการจับกินแบคทีเรีย นอกจากนี้ยังพบว่าส่วนดอกและเปลือกนอกส่งเสริมให้มีการแสดงออกของ TNF- α สูงในเซลล์แมโครฟาจ โดยไม่เป็นพิษต่อเซลล์เม็ดเลือดขาวและเม็ดเลือดแดง ส่งเสริมการ proliferation ของเซลล์เม็ดเลือดขาวทั้ง 3 ชนิด อีกทั้งยังเป็นส่วนที่เหมาะสมสำหรับการนำไปใช้เมื่อคำนึงถึงความยั่งยืนของวัตถุดิบและให้ %yield สูง อย่างไรก็ตามดอกขลุ่ยจะออกเป็นฤดูกาล ซึ่งจะเก็บตัวอย่างได้เมื่อมีดอกเท่านั้น ดังนั้นลำต้นและดอกจึงคาดว่าจะนำมาพัฒนาเป็นยาหรือสารสมุนไพร โดยชนิดและส่วนของพืชที่เลือก ได้แก่ หนามพุงตอส่วนลำต้นและใบ หนามแดงส่วนลำต้นและใบ และขลุ่ยส่วนดอกและใบ คาดว่าจะนำไปพัฒนาสำหรับใช้ในการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมโครฟาจสำหรับรักษาโรคต่าง ๆ ในผู้ที่มีภูมิคุ้มกันต่ำหรือการกดการตอบสนองทางภูมิคุ้มกัน หรือส่งเสริมการตอบสนองเมื่อมีการติดเชื้อ เช่น โรคเท้าช้างที่เกิดจากพยาธิตัวกลมในกลุ่มฟิลาเรีย จะมีกลไกในการกดการตอบสนองของภูมิคุ้มกันเพื่อหลบหลีกภูมิคุ้มกัน (Nutman, 2016) การกระตุ้นให้มีการตอบสนองเมื่อมีการติดเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* (MTB) ที่ก่อโรควัณโรค (Domingo-Gonzalez *et al.*, 2017) เป็นต้น และใช้ในการการซ่อมแซมบาดแผล ในทางตรงกันข้ามเราพบว่าพืชขลุ่ยส่วนใบเป็นส่วนที่มีความน่าสนใจ นอกจากคุณสมบัติของที่มีปริมาณของสารประกอบปริมาณฟีนอลและฟลาโวนอยด์ รวมถึงฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่สูงกว่าส่วนต่าง ๆ ของพืช และยังให้ผลในการส่งเสริมการจับกินแบคทีเรียแล้ว ยังแสดงผลในการยับยั้งการแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจ ซึ่งส่วนใบคาดว่าจะนำมาพัฒนาเป็นยาหรือสารสมุนไพร สำหรับใช้ในการซ่อมแซมบาดแผล และการต้านการอักเสบสำหรับโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบเรื้อรังโดยไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ โรคหัวใจและหลอดเลือด ลำไส้ เบาหวาน และมะเร็ง เป็นต้น (Chen *et al.*, 2018) โดยใช้ในการอักเสบระยะเฉียบพลัน (acute inflammation) รวมถึงเป็นการส่งเสริมการปลูกพืชท้องถิ่นในพื้นที่ดินเค็ม แต่ยังคงจำเป็นต้องมีการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของสารเพิ่มเติม

ข้อเสนอแนะ

1. ควรมีศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับองค์ประกอบของสารสำคัญในส่วนต่าง ๆ ของพืชทั้ง 3 ชนิด
2. จากผลการศึกษาของสารสกัดหยาบ ส่งผลให้เซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงขึ้นเมื่อความเข้มข้นสูง ดังนั้นจึงควรศึกษาผลของสารต่อการส่งเสริมหรือยับยั้งการเกิดเซลล์เนื้องอกหรือมะเร็งเพิ่มเติม
3. ควรศึกษาผลของสารต่อการ polarization ของเซลล์แมโครฟาจเพิ่มเติม เพื่อศึกษาผลของสารต่อการ polarization เป็น M1 หรือ M2 ของเซลล์แมโครฟาจในมนุษย์

4. คว้าศึกษาไกลของสารต่อการจับกินแบคทีเรียของเซลล์แมโครฟาจเพิ่มเติม

5. คว้าศึกษาผลของสารต่อการแสดงออกของ CD169 ในเซลล์แมโครฟาจ สำหรับตรวจสอบฤทธิ์ของสารต่อการต้านมะเร็งโดยการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมโครฟาจ และการหลั่งไซโตไคน์การอักเสบ ได้แก่ IL-1 β และ IL-12



บรรณานุกรม



บรรณานุกรม

- กระทรวงสาธารณสุข และองค์การภาครัฐ-เอกชน. (2559). แผนแม่บทแห่งชาติ ว่าด้วยการพัฒนา
สมุนไพรรักษาโรค ฉบับที่ 1 พ.ศ. 2560-2564. สมุทรปราการ: บจก.ทีเอส อินเทอร์เน็ต
กรมทรัพยากรธรณี. (2550). *ดินเค็มคืออะไร*. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://www.dmr.go.th/ewt_](http://www.dmr.go.th/ewt_news.php?nid=1097&filename=index)
[news.php?nid=1097&filename=index](http://www.dmr.go.th/ewt_news.php?nid=1097&filename=index) [สืบค้นเมื่อ วันที่ 21 ธันวาคม 2561].
- กรมพัฒนาที่ดิน. (2561). *ข้อมูลการจัดการดิน*. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://www.ldd.go.th](http://www.ldd.go.th/Web_Soil/salty.htm)
[/Web_Soil/salty.htm](http://www.ldd.go.th/Web_Soil/salty.htm) [สืบค้นเมื่อ วันที่ 21 ธันวาคม 2561].
- คณะกรรมการจัดทำตำราอ้างอิงยาสมุนไพรไทย ในคณะกรรมการคุ้มครองและส่งเสริมภูมิปัญญา
การแพทย์ไทย. (2558). *ตำรายาอ้างอิงสมุนไพรไทย เล่ม 2*. กรุงเทพฯ, อมรินทร์พริ้นติ้ง
แอนด์พับลิชชิ่ง จำกัด.
- ชุตินา ลิมมัทวาริทธิ์. (2555). การสกัดพืชสมุนไพรโดยการสกัดด้วยของไหลความดันสูง.
ไทยเภสัชวิทยนิพนธ์, 1-19.
- นพพล เกตุประสาท. (ม.ป.ป.). *ขลุ้*. [ออนไลน์]. ได้จาก: [http://clgc.agri.kps.ku.ac.th/resources/](http://clgc.agri.kps.ku.ac.th/resources/herb/pluchea.html)
[herb/pluchea.html](http://clgc.agri.kps.ku.ac.th/resources/herb/pluchea.html) [สืบค้นเมื่อ วันที่ 21 ธันวาคม 2561].
- บุปผา โตภาคนาม. (2549). *ดินเค็มภาคตะวันออกเฉียงเหนือ Saline Soils in Northeast Thailand*. ขอนแก่น, โรงพิมพ์มหาวิทยาลัยขอนแก่น.
- ประกาศคณะกรรมการพัฒนาระบบยาแห่งชาติ เรื่อง บัญชียาหลักแห่งชาติ พ.ศ. 2562. (2562, 17
เมษายน). *ราชกิจจานุเบกษา*, 136 (ตอนพิเศษ 95 ง), 8.
- มานพ ผู้พัฒน์, ปรีชา การะเกตุ, ขวัญใจ คำมงคล, และ ศรันย์ จิระกร. (2561). *ป่าบุ่งป่าทาม ภาค
อีสาน*. กรุงเทพฯ, บริษัท ประชาชน จำกัด.
- วิวัฒน์ วงศ์อรุณ, แหวดาว จงกลณี, รัตติยา เม่งกว้าง, อัจฉราพร กว้างสวัสดิ์, สุพจน์ สุขพัฒน์, และ
เอกฤทธิ ดวงมาลา. (2558). *โครงการความหลากหลายของพืชสมุนไพรในทุ่งสามร้อยยอด*.
มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีราชมงคลรัตนโกสินทร์.
- สมศักดิ์ สุขจันทร์. (2548). *ดินเค็มในภาคตะวันออกเฉียงเหนือ : การสำรวจและทำแผนที่จากคราบ
เกลือ*. (เอกสารวิชาการฉบับที่ 04/03/48). กรมพัฒนาที่ดิน
- สำนักงานหอพรรณไม้, สำนักวิจัยการอนุรักษ์ป่าไม้และพันธุ์พืช, กรมอุทยานแห่งชาติ สัตว์ป่า และ
พันธุ์พืช, และ กระทรวงทรัพยากรธรรมชาติและสิ่งแวดล้อม. (2559). *สารานุกรมพืชในประเทศไทย
ไทย (ฉบับย่อ)*. กรุงเทพฯ, โรงพิมพ์สำนักงานพระพุทธศาสนาแห่งชาติ.

- Abbas, A. K., Lichtman, A. H., & Pillai, S. (2015). Cellular and molecular immunology. In *Journal of Chemical Information and Modeling* (8th ed.). Saunders, an imprint of Elsevier Inc.
- Akira, S., Uematsu, S., & Takeuchi, O. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell*, *124*(4), 783–801.
- Alam, R. (1998). A brief review of the immune system. *Allergy and Immunology*, *25*(4), 727–738.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). Molecular biology of the cell. In *International Ophthalmology Clinics* (4th ed., Vol. 13, Issue 3). Garland Science.
- Arshad Ullah, M. (2019). Niazboo (*Ocimum Basilicum*) As Medicinal Plant Establishes Against Salinity and Sodidity. *Advances in Biotechnology & Microbiology*, *12*(5), 10–13.
- Arullappan, S., Zakaria, Z., & Basri, D. F. (2009). Preliminary screening of antibacterial activity using crude extracts of *Hibiscus rosa sinensis*. *Tropical Life Sciences Research*, *20*(2), 109–118.
- Aryal, S., Baniya, M. K., Danekhu, K., Kunwar, P., Gurung, R., & Koirala, N. (2019). Total Phenolic content, Flavonoid content and antioxidant potential of wild vegetables from western Nepal. *Plants*, *8*(4).
- Bahri-Sahloul, R., Ben Fredj, R., Boughalleb, N., Shriaa, J., Saguem, S., Hilbert, J. L., Trotin, F., Ammar, S., Bouzid, S., & Harzallah-Skhiri, F. (2014). Phenolic composition and antioxidant and antimicrobial activities of extracts obtained from *Crataegus azarolus* L. var. *aronia* (Willd.) Batt. ovaries calli. *Journal of Botany*, 2014.
- Billack, B. (2006). Macrophage activation: Role of Toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *American Journal of Pharmaceutical Education*, *70*(5).
- Bishop, F. L., Yardley, L., & Lewith, G. T. (2008). Treat or treatment: A qualitative study analyzing patients' use of complementary and alternative medicine. *American Journal of Public Health*, *98*(9), 1700–1705.

- Boonruang, S., Prakobsri, K., Pouyfung, P., Prasopthum, A., Rongnoparut, P., & Sarapusit, S. (2019). Structure–activity relationship and in vitro inhibition of human cytochrome CYP2A6 and CYP2A13 by flavonoids. *Xenobiotica*, 1–10.
- Bottoni, A., Croce, C. M., & Calin, G. A. (2008). Molecular pathogenesis. *Chronic Lymphocytic Leukemia*, 71(1), 35–44.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT - Food Science and Technology*, 28(1), 25–30.
- Buranasukhon, W., Athikomkulchai, S., Tadtong, S., & Chittasupho, C. (2017). Wound healing activity of *Pluchea indica* leaf extract in oral mucosal cell line and oral spray formulation containing nanoparticles of the extract. *Pharmaceutical Biology*, 55(1), 1767–1774. 1
- Burd, E. M. (2003). Human papillomavirus and cervical cancer. *Clinical Microbiology Reviews*, 16(1), 1–17.
- Carmichael, J., DeGraff, W., Gazdar, A., Minna, J., & Mitchell, J. (1987). Evaluation of a tetrazolium-based semiautomated colorimetric assay: assessment of chemosensitivity testing *Cancer Research*, 47(4), 936-42.
- Carr, A. C., & Maggini, S. (2017). Vitamin C and immune function. *Nutrients*, 9(11), 1–25.
- Castelo-Branco, C., & Soveral, I. (2014). The immune system and aging: A review. *Gynecological Endocrinology*, 30(1), 16–22.
- Chen, L., Deng, H., Cui, H., Fang, J., Zuo, Z., Deng, J., Li, Y., Wang, X., & Zhao, L. (2018). Inflammatory responses and inflammation-associated diseases in organs. *Oncotarget*, 9(6), 7204–7218.
- Cho, C.-L., Lee, Y.-Z., Tseng, C.-N., Cho, J., Cheng, Y.-B., Wang, K.-W., Chen, H.-J., Chiou, S.-J., Chou, C.-H., & Hong, Y.-R. (2017). Hexane fraction of *Pluchea indica* root extract inhibits proliferation and induces autophagy in human glioblastoma cells. *Biomedical Reports*, 7(5), 416–422.
- Cho, J. J., Cho, C. L., Kao, C. L., Chen, C. M., Tseng, C. N., Lee, Y. Z., Liao, L. J., & Hong, Y. R. (2012). Crude aqueous extracts of *Pluchea indica* (L.) Less. inhibit proliferation and migration of cancer cells through induction of p53-

dependent cell death. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 12(1), 1.

- Choe, J. Y., & Kim, S. K. (2017). Quercetin and Ascorbic Acid Suppress Fructose-Induced NLRP3 Inflammasome Activation by Blocking Intracellular Shuttling of TXNIP in Human Macrophage Cell Lines. *Inflammation*, 40(3), 980–994.
- Chung, E. Y., Liu, J., Homma, Y., Zhang, Y., Saggese, M., Han, J., Silverstein, R., & Selleri, L. (2008). Interleukin-10 expression in macrophages during phagocytosis of apoptotic cells mediated by the TALE homeoproteins Pbx-1 and Prep-1. *NIH Public Access*, 27(6), 952–964.
- Cicco, N., Lanorte, M. T., Paraggio, M., Viggiano, M., & Lattanzio, V. (2009). A reproducible, rapid and inexpensive Folin-Ciocalteu micro-method in determining phenolics of plant methanol extracts. *Microchemical Journal*, 91(1), 107–110.
- Deeprom, S., Trelo-Ges, V., Topark-Ngarm, B., Homchuen, S., & Kummee, T. (2015). Plant Diversity on Slightly Saline Soils in Chi River Basin of Northeast Thailand. *International Journal of Environmental and Rural Development*, 40–45.
- Dhanani, T., Shah, S., Gajbhiye, N. A., & Kumar, S. (2013). Effect of extraction methods on yield, phytochemical constituents and antioxidant activity of *Withania somnifera*. *Arabian Journal of Chemistry*, 1–7.
- Dolganiuc, A., Garcia, C., Kodys, K., & Szabo, G. (2006). Distinct toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection. *World Journal of Gastroenterology*, 12(8), 1198–1204.
- Domingo-Gonzalez, R., Prince, O., Cooper, A., & Khader, S. A. (2017). Cytokines and Chemokines in *Mycobacterium tuberculosis* Infection. *Tuberculosis and the Tubercle Bacillus*, 4(5), 33–72.
- Farina, C., Theil, D., Semlinger, B., Hohlfeld, R., & Meint, E. (2004). Distinct responses to monocytes to Toll-like receptor ligands and inflammatory cytokines. *International Immunology*, 16(6), 799–809.

- Fu, J., Huang, J., Lin, M., Xie, T., & You, T. (2020). Quercetin Promotes Diabetic Wound Healing via Switching Macrophages From M1 to M2 Polarization. *Journal of Surgical Research*, 246, 213–223.
- Fujiwara, Y., Saito, Y., Shiota, T., Cheng, P., Ikeda, T., Ohnishi, K., Takeya, M., & Komohara, Y. (2018). Natural compounds that regulate lymph node sinus macrophages: Inducing an anti-tumor effect by regulating macrophage activation. *Journal of Clinical and Experimental Hematopathology*, 58(1), 17–23.
- Google. (n.d.) [Computer software]. *Google Earth*. Retrieved October 22, 2020, from https://earth.google.com/web/search/16.4005+103.2703+/@16.4005,103.2703,149.69912762a,1008.60923736d,35y,0h,45t,0r/data=CLUaKxllGUoMAiuHZjBAIfYGX5hMOVIAKhExNi40MDA1IDEwMy4yNzAzlBgCIAEiJgokCYRaz1AdnzRAEZdTZDodnzTAGb229_BrojAIV2ohsrtHmDA
- Grassmann, J. (2005). Terpenoids as plant antioxidants. *Vitamins and Hormones*, 72, 505–535.
- Grigore, A. (2017). Plant phenolic compounds as immunomodulatory agents. In M. Soto-Hernandez, M. Palma-Tenango and R. GarciaMateos (Eds.), *Phenolic compounds –Biological activity*. London, UK: IntechOpen.
- Gunawardena, D., Raju, R., & Münch, G. (2019). Hydrogen peroxide mediates pro-inflammatory cell-to-cell signaling: A new therapeutic target for inflammation?. *Neural Regeneration Research*, 14(8), 1430–1437.
- Heinz, S. A., Henson, D. A., Nieman, D. C., Austin, M. D., & Jin, F. (2010). A 12-week supplementation with quercetin does not affect natural killer cell activity, granulocyte oxidative burst activity or granulocyte phagocytosis in female human subjects. *British Journal of Nutrition*, 104(6), 849–857.
- Hemmi, H., & Akira, S. (2005). TLR signalling and the function of dendritic cells. *Chemical Immunology and Allergy*, 86, 120–135.
- Houghton, P. J. (1995). The role of plants in traditional medicine. *The Journal of Alternative and Complementary Medicine*, 1(2), 131–143.

- Jadamba, E., & Shin, M. (2016). A Systematic Framework for Drug Repositioning from Integrated Omics and Drug Phenotype Profiles Using Pathway-Drug Network. *BioMed Research International*, 2016, 1–17.
- Kim, Y. J., & Park, W. (2016). Anti-Inflammatory Effect of Quercetin on RAW 264.7 Mouse Macrophages Induced with Polyinosinic-Polycytidylic Acid. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(4), 450.
- Krutzik, S. R., Tan, B., Li, H., Ochoa, M. T., Liu, P. T., Sharfstein, S. E., Graeber, T. G., Sieling, P. A., Liu, Y., Thomas, H., Bloom, B. R., & Modlin, R. L. (2006). TLR activation triggers the rapid differentiation of monocytes into macrophages and dendritic cells. *Nature Medicine*, 11(6), 653–660.
- Kuna, P., Jurkiewicz, D., Czarnecka-Operacz, M. M., Pawliczak, R., Woron, J., Moniuszko, M., & Emeryk, A. (2016). The role and choice criteria of antihistamines in allergy management - expert opinion. *Advances in Dermatology and Allergology*, 33(6), 397–410.
- Langhans, S. A. (2018). Three-dimensional in vitro cell culture models in drug discovery and drug repositioning. *Frontiers in Pharmacology*, 9, 1–14.
- Linhatrakool, T., Prabpai, S., Kongsaree, P., & Sutthivaiyakit, S. (2011). Antiplasmodial sesquiterpene alkaloids from the roots of *Maytenus mekongensis*. *Journal of Natural Products*, 74(6), 1386–1391.
- Li, C. L., Zhou, W. J., Ji, G., & Zhang, L. (2020). Natural products that target macrophages in treating non-alcoholic Steatohepatitis. *World Journal of Gastroenterology*, 26(18), 2155–2165.
- Li, Y. Y., & Jones, S. J. (2012). Drug repositioning for personalized medicine. *Genome Medicine*, 4(27), 1–14.
- Liso, A., Capitanio, N., Gerli, R., & Conese, M. (2018). From fever to immunity: A new role for IGF1BP6?. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 22(10), 4588–4596.
- Lloberas, J., Valverde-Estrella, L., Tur, J., Vico, T., & Celada, A. (2016). Mitogen-activated protein kinases and mitogen kinase phosphatase 1: A critical interplay in macrophage biology. *Frontiers in Molecular Biosciences*, 3(28), 1–8.

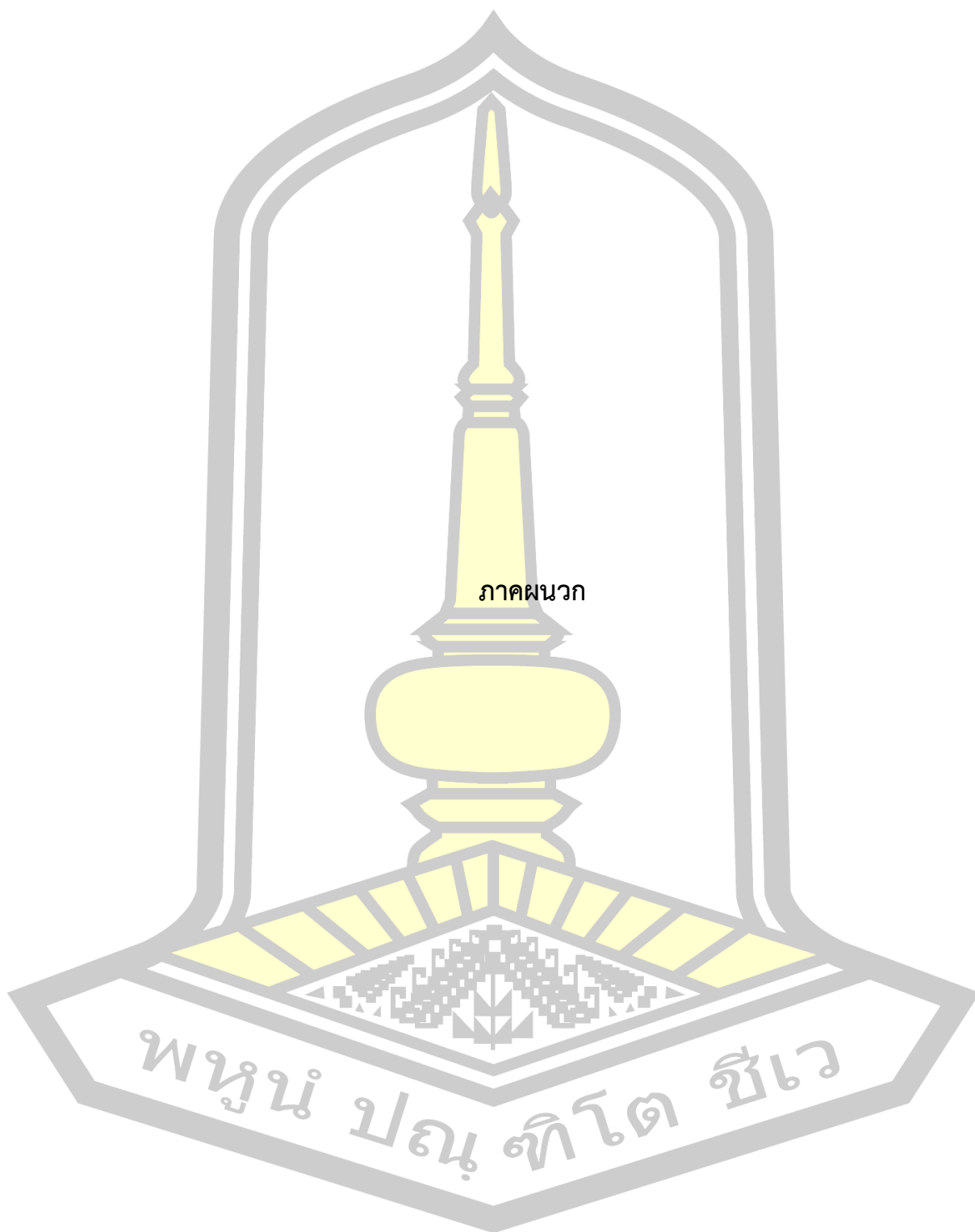
- Lu, T., Porter, A. R., Kennedy, A. D., Kobayashi, S. D., & DeLeo, F. R. (2014). Phagocytosis and killing of *Staphylococcus aureus* by human neutrophils. *Journal of Innate Immunity*, *6*(5), 639–649.
- Madhvi, A., Mishra, H., Leisching, G. R., Mahlobo, P. Z., & Baker, B. (2019). Comparison of human monocyte derived macrophages and THP1-like macrophages as in vitro models for *M. tuberculosis* infection. *Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases*, *67*, 1–8.
- Mao, T. K., Lian, Z. X., Selmi, C., Ichiki, Y., Ashwood, P., Ansari, A. A., Coppel, R. L., Shimoda, S., Ishibashi, H., & Gershwin, M. E. (2005). Altered monocyte responses to defined TLR ligands in patients with primary biliary cirrhosis. *Hepatology*, *42*(4), 802–808.
- McCrae, J. C., Morrison, E. E., MacIntyre, I. M., Dear, J. W., & Webb, D. J. (2018). Long-term adverse effects of paracetamol - a review. *British Journal of Clinical Pharmacology*, *84*(10), 2218–2230.
- Miot, H. A. (2018). Correlation analysis in clinical and experimental studies. *Jornal Vascular Brasileiro*, *17*(4), 275–279.
- Miteva, K., Madonna, R., De Caterina, R., & Van Linthout, S. (2018). Innate and adaptive immunity in atherosclerosis. *Vascular Pharmacology*, *107*, 67–77.
- Mohamed, S. A., Awad, M. A., El-Dengawy, E. R. F. A., Abdel-Mageed, H. M., El-Badry, M. O., Salah, H. A., Abdel-Aty, A. M., & Fahmy, A. S. (2016). Total phenolic and flavonoid contents and antioxidant activities of sixteen commercial date cultivars grown in Saudi Arabia. *RSC Advances*, *6*(50), 44814–44819.
- Morrison, D. K. (2012). MAP kinase pathways. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, *4*, 1–5.
- Nakao, N., Kurokawa, T., Nonami, T., Tumurkhuu, G., Koide, N., & Yokochi, T. (2008). Hydrogen peroxide induces the production of tumor necrosis factor- α in RAW 264.7 macrophage cells via activation of p38 and stress-activated protein kinase. *Innate Immunity*, *14*(3), 190–196.

- Nanasombat, S., & Teckchuen, N. (2009). Antimicrobial, antioxidant and anticancer activities of Thai local vegetables. *Journal of Medicinal Plants Research*, 3(5), 443–449.
- Nathan, C. F., & Root, R. K. (1977). Hydrogen peroxide release from mouse peritoneal macrophages: Dependence on sequential activation and triggering. *Journal of Experimental Medicine*, 146(6), 1648–1662.
- Nutman, T. B. (2016). Immunology of Lymphatic Filariasis. *Encyclopedia of Immunobiology*, 4(1), 142–149.
- Ocklind, G. (1986). Stimulation of human lymphocytes by phytohemagglutinin (PHA) in a new ultra-microtest plate. *Immunobiology*, 171(4–5), 339–344.
- Orecchioni, M., Ghosheh, Y., Pramod, A. B., & Ley, K. (2019). Macrophage Polarization: Different Gene Signatures in M1(LPS+) vs. Classically and M2(LPS-) vs. Alternatively Activated Macrophages. *Frontiers in immunology*, 10, 1-14
- Orsi, R. O., Funari, S. R. C., Soares, A. M. V. C., Calvi, S. A., Oliveira, S. L., Sforcin, J. M., & Bankova, V. (2000). Immunomodulatory action of propolis on macrophage activation. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, 6(2), 205–219.
- Kaurinovic, B., & Vastag, D. (2019). Flavonoids and Phenolic Acids as Potential Natural Antioxidants. In: Shalaby E, editor. *Antioxidants*. London: IntechOpen.
- Palma, A., Jarrah, A. S., Tieri, P., Cesareni, G., & Castiglione, F. (2018). Gene regulatory network modeling of macrophage differentiation corroborates the continuum hypothesis of polarization states. *Frontiers in Physiology*, 9, 1–19.
- Panche, A. N., Diwan, A. D., & Chandra, S. R. (2016). Flavonoids: An overview. *Journal of Nutritional Science*, 5.
- Pang, W., Wang, H., Shi, L., Sun, Y., Wang, X., Wang, M., Li, J., Wang, H., & Shi, G. (2013). Immunomodulatory effects of *Escherichia coli* ATCC 25922 on allergic airway inflammation in a mouse model. *PLoS ONE*, 8(3), 1–10.
- Ponnusamy, D., & Clinkenbeard, K. D. (2012). *Yersinia pestis* intracellular parasitism of macrophages from hosts exhibiting high and low severity of plague. 7(7), 1–12.
- Poodeetip, N., Homchuen, S., Toparkngam, B., & Kong-ngern, K. (2013). The Biochemical Substances in Plants on Salt Affected Area in Northeast

- Thailand, Bamnet Narong District, Chaiyaphum Province, Thailand. *IJERD-International Journal of Environmental and Rural Development*, 127–132.
- Rao, A., Gibon, E., Ma, T., Yao, Z., Smith, R., & Goodman, S. (2012). M1 and M2 Macrophage Polarization in vitro with exposure to LPS and IL-4. *ORS 2012 Annual Meeting*, 1917.
- Reddy, P. N., Srirama, K., & Dirisala, V. R. (2017). An Update on Clinical Burden, Diagnostic Tools, and Therapeutic Options of *Staphylococcus aureus*. *Infectious Diseases: Research and Treatment*, 10, 117991611770399.
- Rey-Giraud, F., Hafner, M., & Ries, C. H. (2012). In vitro generation of monocyte-derived macrophages under serum-free conditions improves their tumor promoting functions. *PLoS ONE*, 7(8).
- Ruan, J., Yan, J., Zheng, D., Sun, F., Wang, J., Han, L., Zhang, Y., & Wang, T. (2019). Comprehensive Chemical Profiling in the Ethanol Extract of *Pluchea indica* Aerial Parts by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry Analysis of Its Silica Gel Column Chromatography Fractions. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(15), 1–20.
- Safi, W., Kuehnl, A., Nüssler, A., Eckstein, H. H., & Pelisek, J. (2016). Differentiation of human CD14+ monocytes: an experimental investigation of the optimal culture medium and evidence of a lack of differentiation along the endothelial line. *Experimental & Molecular Medicine*, 48(4), e227.
- Said-Al Ahl, H. A. H. & Omer, E. A. (2011). Medicinal and aromatic plants production under salt stress. A review. *Herba Polonica*, 57(1), 72–87.
- Shahidi, F., & Zhong, Y. (2015). Measurement of antioxidant activity. *Journal of Functional Foods*, 18, 757–781.
- Sharmin, T., Rahman, M. S., & Mohammadi, H. (2018). Investigation of biological activities of the flowers of *Lagerstroemia speciosa*, the Jarul flower of Bangladesh. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 18(1), 1–10.
- Skinner, N. A., MacIsaac, C. M., Hamilton, J. A., & Visvanathan, K. (2005). Regulation of Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 on CD14 dimCD16+ monocytes in response to sepsis-related antigens. *Clinical and Experimental Immunology*, 141(2), 270–278.

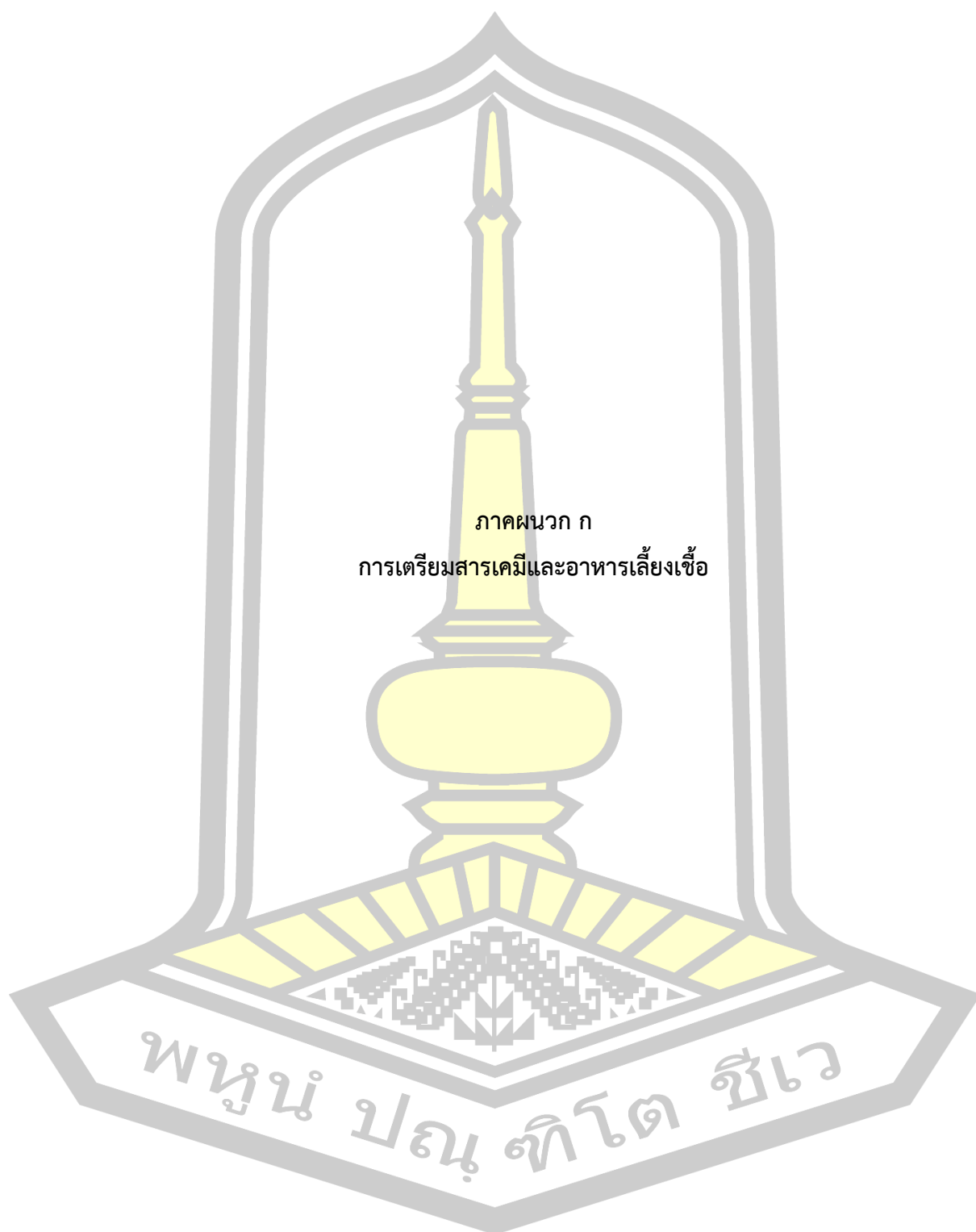
- Steck, N., & Grassl, G. A. (2014). Free radicals and pathogens - Role for reactive intermediates in innate immunity. In I. Laher (Ed.), *Systems Biology of Free Radicals and Antioxidants*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- Sunintaboon, P. (1999). *Chemical constituents of leaf and root extracts from Azima sarmentosa Benth and their biological activities*. Master of Science Thesis in Chemistry, Chulalongkorn University.
- Taylor, T. A., & Unakal, C. G. (2020). *Staphylococcus aureus*. In In: StatPearls (Ed.), *Institut Pertanian Bogor*. StatPearls Publishing.
- Thimbleby, H. (2013). Technology and the future of ophthalmology. *Journal of Public Health Research, 2*, 160–167.
- Tonks, A. J., Cooper, R. A., Jones, K. P., Blair, S., Parton, J., & Tonks, A. (2003). Honey stimulates inflammatory cytokine production from monocytes. *Cytokine, 21*(5), 242–247.
- Través, P. G., Luque, A., & Hortelano, S. (2012). Macrophages, inflammation, and tumor suppressors: ARF, a new player in the game. *Mediators of Inflammation, 2012*, 1–11.
- Tsao, R. (2010). Chemistry and biochemistry of dietary polyphenols. *Nutrients, 2*(12), 1231–1246.
- University of California - Berkeley. (2007, August 23). Compound In Broccoli Could Boost Immune System, Says Study. *ScienceDaily*. [Online]. Available from: www.sciencedaily.com/releases/2007/08/070820175422.htm. [accessed 26 October 2020]
- Vanaki, N., Aslani, S., Jamshidi, A., & Mahmoudi, M. (2018). Role of innate immune system in the pathogenesis of ankylosing spondylitis. *Biomedicine and Pharmacotherapy, 105*, 130–143.
- Wendakoon, C., & Gagnon, D. (2012). Evaluation of Selected Medicinal Plants Extracted in Different Ethanol Concentrations for Antibacterial Activity against Human Pathogens. *Journal of Medicinally Active Plants, 1*(2), 60–68.
- Wongrakpanich, S., Wongrakpanich, A., Melhado, K., & Rangaswami, J. (2018). A comprehensive review of non-steroidal anti-inflammatory drug use in the elderly. *Aging and Disease, 9*(1), 143–150.

- Xiao, M., Feng, Y., Cao, G., Liu, C., & Zhang, Z. (2018). A novel MtHSP70-FPR1 fusion protein enhances cytotoxic T lymphocyte responses to cervical cancer cells by activating human monocyte-derived dendritic cells via the p38 MAPK signaling pathway. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, *503*(3), 2108–2116.
- Yadav, M., Chatterjee, P., Tolani, S., Kulkarni, J., Mulye, M., Chauhan, N., Sakhi, A., & Gorey, S. (2018). A Nexus model of cellular transition in cancer. *Biological Research*, *51*(1), 1–11.
- Yatim, K. M., & Lakkis, F. G. (2015). A brief journey through the immune system. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*, *10*(7), 1274–1281.
- Yilmaz, C., & Gökmen, V. (2015). Chlorophyll. In *Encyclopedia of Food and Health* (pp. 37–41). Elsevier Inc.
- Yoo, K. M., Lee, C. H., Lee, H., Moon, B. K., & Lee, C. Y. (2008). Relative antioxidant and cytoprotective activities of common herbs. *Food Chemistry*, *106*(3), 929–936.
- Zhang, J., Onakpoya, I. J., Posadzki, P., & Eddouks, M. (2015). The safety of herbal medicine: From prejudice to evidence. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, *2015*, 1–3.
- Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, *13*(1), 1–26.
- Zhang, X., Wang, X., Wang, M., Cao, J., Xiao, J., & Wang, Q. (2019). Effects of different pretreatments on flavonoids and antioxidant activity of *Dryopteris erythrosora* leave. *PLoS ONE*, *14*(1), 1–17.
- Zheleva-dimitrova, D., Nedialkov, P., & Kitanov, G. (2010). Radical scavenging and antioxidant activities of methanolic extracts from *Hypericum* species growing in Bulgaria. *Pharmacognosy magazine*, *6*(22), 74–78.



ภาคผนวก

พหุ ประทีป ชัยเว



1. 70% เอทานอล

Ethanol Absolute	70 mL
DI	30 mL

2. 10% (v/v) Folin-Ciocalteu reagent

Folin-Ciocalteu reagent	10 mL
DI	90 mL

3. 7.5% (w/v) Na₂CO₃

Na ₂ CO ₃ (Kemaus, Australia)	7.5 g
DI	100 mL

4. สารมาตรฐาน 2,000 mg/L gallic Acid (GA)

Gallic Acid (Sigma, USA)	0.005 g
Ethanol Absolute	2.5 mL

5. 5% (w/v) NaNO₂

NaNO ₂	5 g
DI	100 mL

6. 10% (w/v) AlCl₃

AlCl ₃ (Kemaus, Australia)	10 g
DI	100 mL

7. 1M NaOH

NaOH (ACI Labscan, Patumwan, Bangkok)	4 g
DI	100 mL

8. สารมาตรฐาน 2,000 mg/L quercetin

Quercetin (Sigma, USA)	0.005 g
เมทานอล	2.5 mL

9. 160 μM DPPH

DPPH	0.01 g
เมทานอล	158 mL

10. สารมาตรฐาน 5,000 mg/L ascorbic acid

Ascorbic acid (ACI Labscan, Patumwan, Bangkok)	0.025 g
DI	5 mL

11. สารละลาย ABTS

1. เตรียมสารละลาย 24.5 mM potassium persulfate

potassium persulfate 0.007 g

DI 10 mL

2. เจือจาง 24.5 mM potassium persulfate ด้วย DI ให้ได้ 2.45 mM จากนั้นเติม 0.00424 g ABTS (Sigma, USA) บ่มที่มืดเป็นเวลา 14 ชั่วโมง จากนั้นเติมเมทานอล ในอัตราส่วน 1:10 (ABTS: เมทานอล) นำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ OD_{734nm} และปรับให้ได้ 0.7±0.01 ด้วย เมทานอล

12. อาหาร Mueller- Hinton broth (MHB)

Mueller- Hinton (Himedia, India) 38 g

DI 1000 mL

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

13. อาหาร Mueller- Hinton agar (MHA)

Mueller- Hinton (Himedia, India) 38 g

Agar 20 g

DI 1000 mL

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

14. อาหาร Tryptic Soy Broth (TSB)

Mueller- Hinton (Himedia, India) 40 g

DI 1000 mL

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

15. อาหาร Tryptic Soy Agar (TSA)

Tryptic Soy Agar (Himedia, India) 40 g

Agar 20 g

DI 1000 mL

นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

16. 0.5 McFarland standard (1.5×10^8 CFU/mL)

1% Sulfuric acid 99.5 ml

1.175% Barium chloride 0.5 ml

17. 20 mM EDTA

EDTA (ACI Labscan, Patumwan, Bangkok) 1.168 g

ละลายใน Distilled Water 800 mL

ปรับ pH ให้ได้ 8.0 ด้วย HCl

ปรับปริมาตรด้วย Distilled Water ให้ครบ 1000 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

18. 10X RBC lysis buffer

NH₄Cl (ACI Labscan, Patumwan, Bangkok) 8.02 gNaHPO₃ (ACI Labscan, Patumwan, Bangkok) 0.84 g

EDTA (ACI Labscan, Patumwan, Bangkok) 0.37 g

ปรับ pH เป็น 7.3 เติมน้ำให้ครบ 100 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศาเซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

19. อาหาร Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Thermo Fisher, USA)

RPMI-1640 10.4 g

NaHCO₃ 2 g

เติมน้ำให้ครบ 1000 mL กรองด้วย filter ขนาด 0.45 μ m และ 0.22 μ m และเก็บไว้ในตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

20. อาหาร RPMI-1640+5% FBS + 5% autologous serum+ Antibiotic-Antimycotic สำหรับเพาะเลี้ยงเซลล์

ส่วนผสม	ปริมาตร (ml)
RPMI-1640	89
Fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Thermo Fisher, USA)	5
autologous serum	5
100X Antibiotic/Antimycotic	1

จากนั้นนำไปเก็บที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส

21. 10x PBS (Phosphate buffer saline)

KCl (Kemaus, Australia) 0.2 g

KH₂PO₄ (Kemaus, Australia) 0.12 g

NaCl 8 g

Na₂HPO₄ (Kemaus, Australia) 0.91 g

ละลายใน Distilled Water ปรับค่า pH 7.5 แล้วปรับปริมาตร ด้วย Distilled Water ให้
ครบ 100 mL

22. สารละลาย 12 mM MTT

MTT (Invitrogen, Thermo Fisher, USA) 0.005

1X PBS 1 mL

23. 0.5X TBE Buffer

ประกอบด้วย

10X TBE Buffer (Vivantis, USA) 50 mL

ปรับปริมาตรด้วย Distilled Water จนครบ 1000 mL นำไปนึ่งฆ่าเชื้อที่ 121 องศา
เซลเซียส ความดัน 15 psi นาน 15 นาที

24. 2.0 % Agarose gel

Agarose (Vivantis, USA) 2 g

ละลายและปรับปริมาตรด้วย Distilled Water ให้ครบ 100 mL

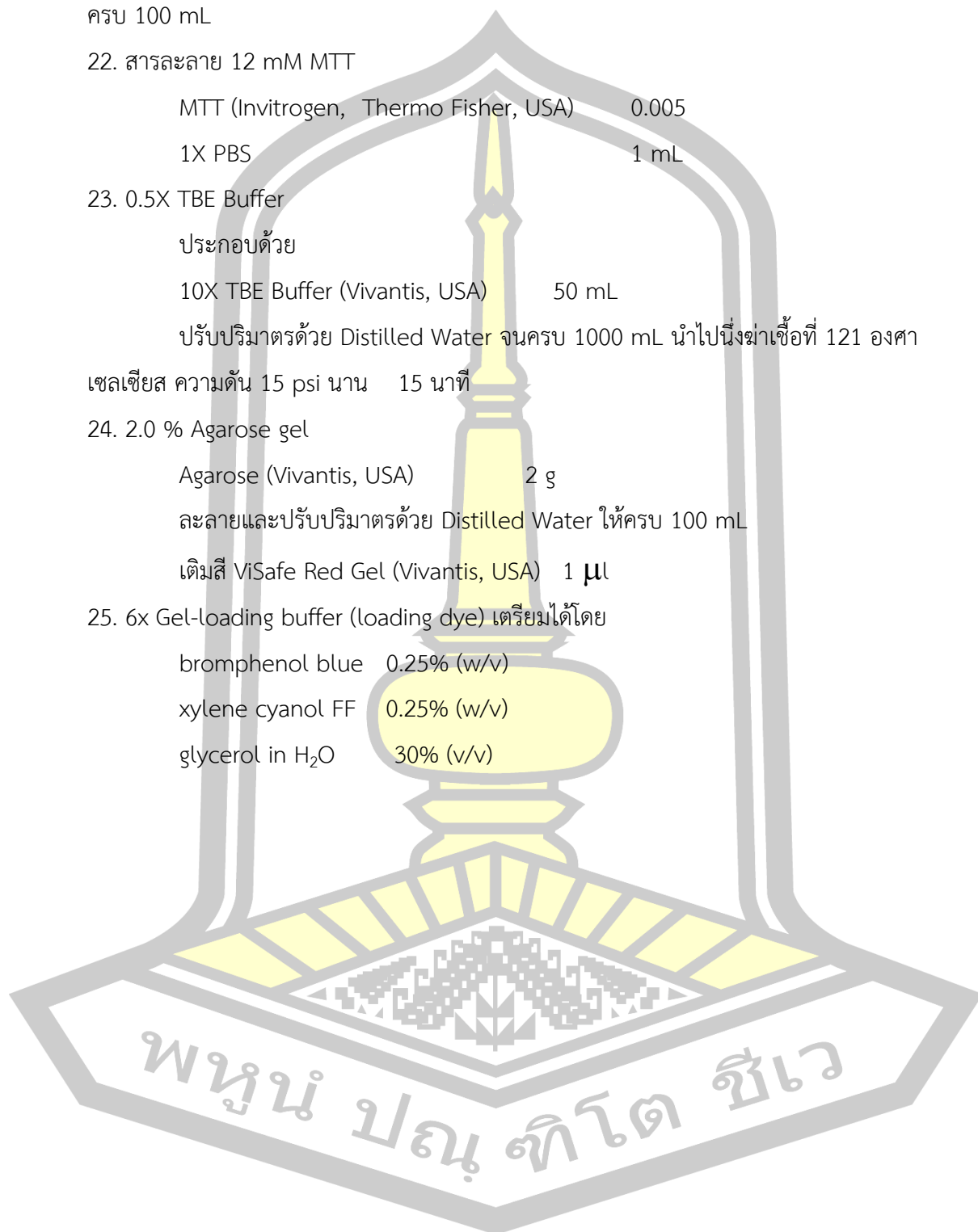
เติมสี ViSafe Red Gel (Vivantis, USA) 1 μ L

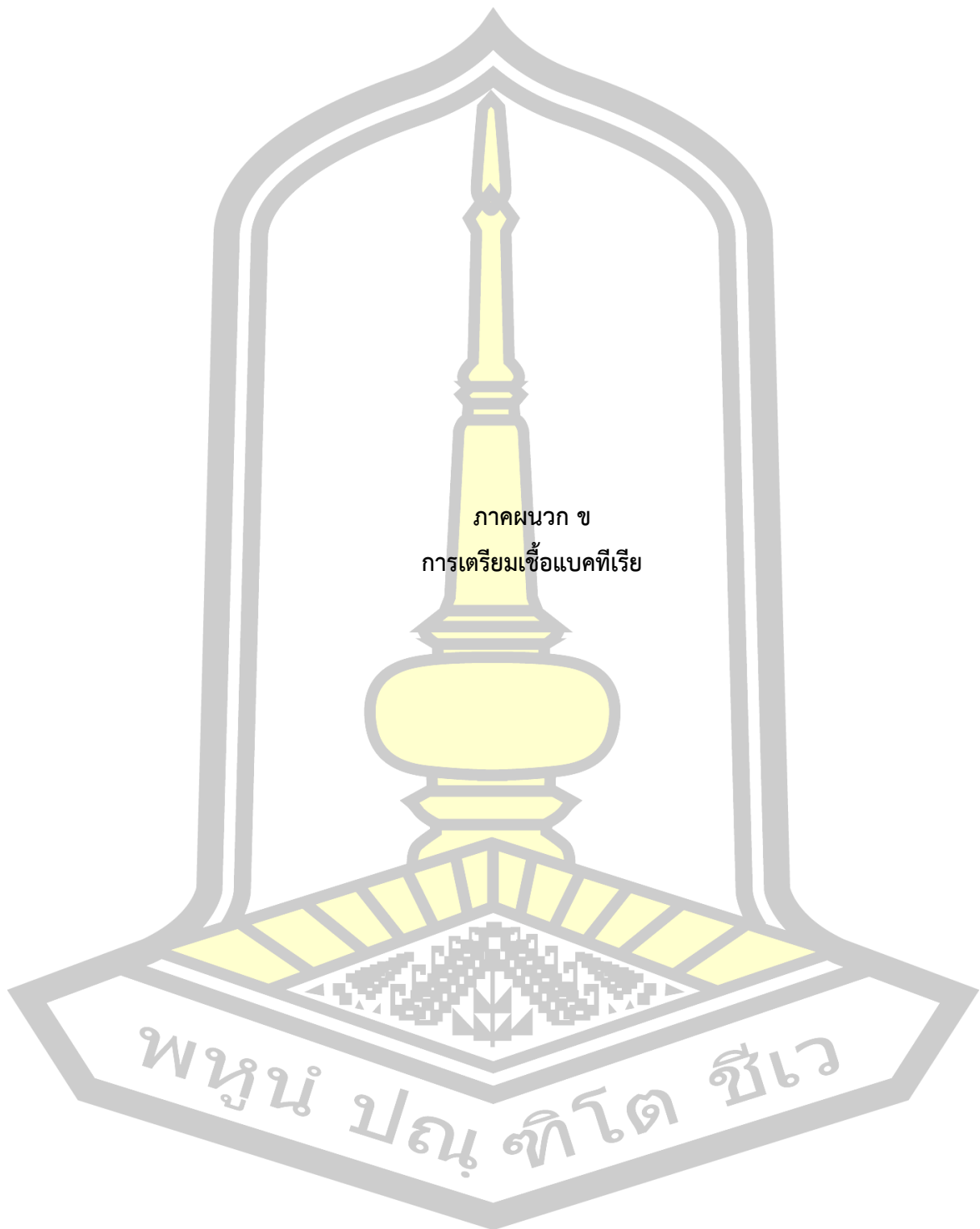
25. 6x Gel-loading buffer (loading dye) เตรียมได้โดย

bromphenol blue 0.25% (w/v)

xylene cyanol FF 0.25% (w/v)

glycerol in H₂O 30% (v/v)





1. การเตรียมจุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัย

จุลินทรีย์ที่ใช้ในการวิจัยได้รับความอนุเคราะห์จาก อาจารย์ ดร. รุ่งฤดี ทิวทอง ประกอบด้วย

1. *Staphylococcus aureus* DMST 8840
2. *Staphylococcus aureus* (MRSA) DMST 20654
3. *Escherichia coli* ATCC25922
4. *Salmonella* Typhimurium TISTR 2511

โดยนำเชื้อจากหลอดเก็บเชื้อกลีเซอรอลมาทำการเพาะเลี้ยงในอาหาร Trypticase Soy Broth (TSB) ก่อนนำไป Quadrant streak ในอาหาร Trypticase Soy Agar (TSA) และนำไปตรวจสอบบนอาหารที่จำเพาะ ได้แก่ Eosin Methylene Blue (EMB) agar สำหรับ *E. coli* (ลักษณะ metallic sheen ของเชื้อ *E. coli* บนจานอาหาร) และ Mannitol salt agar (MSA) agar สำหรับ *S. aureus* (ลักษณะโคโลนีสีเหลืองและโซนใสสีเหลือง) Salmonella-Shigella (SS) agar สำหรับ *Salmonella* (ลักษณะโคโลนีขนาดเล็ก ไม่มีสี) และทำการย้อมแกรมเพื่อยืนยันเชื้อก่อนการทดลอง

2. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น No. 0.5 Mcfarland Standard สำหรับการทำวิจัย

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียบนอาหาร TSA ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้มีอายุ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำเชื้อแบคทีเรียมาทำการ suspension ใน 0.85% NaCl และปรับความขุ่นเท่ากับ No. 0.5 McFarland Standard แล้วนำเชื้อที่ได้ไปทำการทดสอบภายในเวลา 15 นาที

3. การเตรียมเชื้อแบคทีเรียความเข้มข้น MOI เท่ากับ 30 (30 แบคทีเรีย/1 แมโครฟาจ)

เพาะเลี้ยงเชื้อแบคทีเรียในอาหาร TSB ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ให้มีอายุ 18-24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที ล้างตะกอนเซลล์ด้วย 1X PBS จากนั้นนับจำนวนเซลล์ด้วย hemocytometer โดยใช้ trypan blue ในการย้อมเซลล์สำหรับนับจำนวน จากนั้นเตรียมเซลล์ให้ได้ MOI เท่ากับ 30 (30 แบคทีเรีย/1 แมโครฟาจ) ในอาหาร RPMI-1640 ที่ไม่มี serum และไม่มียาปฏิชีวนะ



ภาคผนวก ค

พื้นที่เก็บตัวอย่างพืช การเตรียมตัวอย่างพืชและการสกัดสารสกัดหยาบด้วยวิธีฟลักซ์

ก



ข



ภาพผนวกที่ ค1 บริเวณพื้นที่ดินเค็มในการเก็บตัวอย่างพืช ณ หมู่บ้านโพนสิม ตำบลหัวนาคำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ ละติจูด 16.4005 ลองจิจูด 103.2703 (ก-ข)

ค


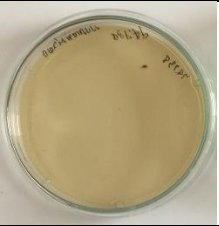
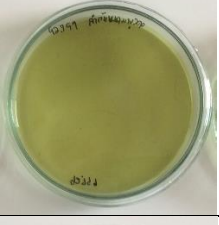


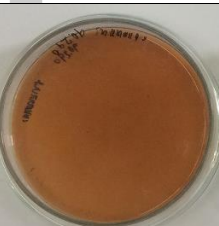
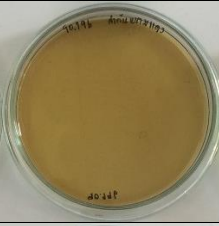



ง


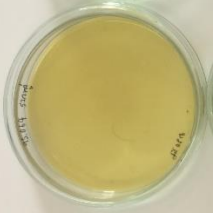
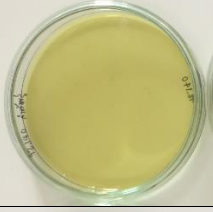
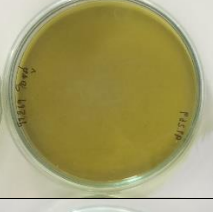
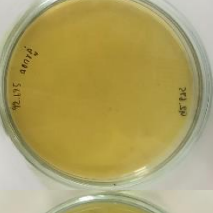
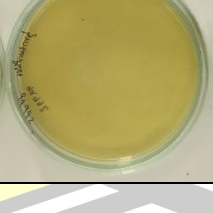


ภาพผนวกที่ ค1 บริเวณพื้นที่ดินเค็มในการเก็บตัวอย่างพืช ณ หมู่บ้านโพนสิม ตำบลหัวนาคำ อำเภอยางตลาด จังหวัดกาฬสินธุ์ ละติจูด 16.4005 ลองจิจูด 103.2703 (ค-ง) (ต่อ)

ตารางผนวกที่ ค1 สารสกัดพืชชอบเค็มจำนวน 11

หนามพุงดอ (<i>Azima sarmentosa</i>)		
ตัวอย่างพืชสด	ส่วนสกัด	สารสกัด 70% เอทานอล
	ราก	
	ลำต้น	
	ใบ	
หนามแดง (<i>Maytenus mekongensis</i>)		
ตัวอย่างพืชสด	ส่วนสกัด	สารสกัด 70% เอทานอล
	ราก	
	ลำต้น	
	ใบ	

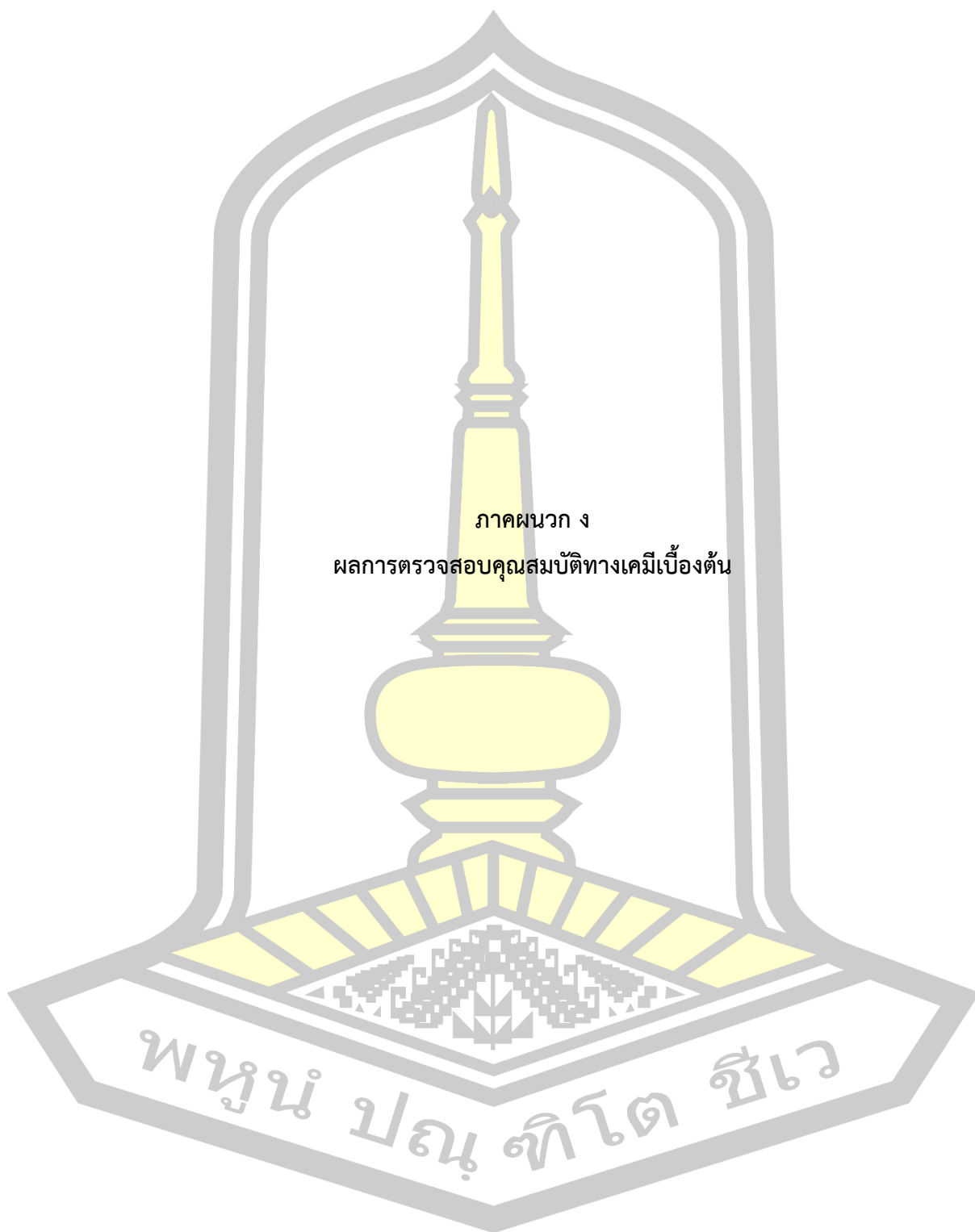
ตารางผนวกที่ ค1 สารสกัดพืชชอบเค็มจำนวน 11 ตัวอย่าง (ต่อ)

ขลุ้ (<i>Pluchea indica</i>)		
ตัวอย่างพืชสด	ส่วนสกัด	สารสกัด 70% เอทานอล
	ราก	
	ลำต้น	
	ใบ	
	ดอก	
	เปลือกนอก	

พหุพันธ์ ปณฺ ทิโต ชีเว

ตารางผนวกที่ ค2 ตารางแสดงค่า % yield ที่ได้จากการสกัด

ตัวอย่างพืช	dry weight (g)	70% ethanol (mL)	ปริมาณหลังสกัด (mL)	crude extract (g)	crude extract (mg)	% yield
ราก หนามพุดดอ	15.000	100	55	1.152	1152	7.68
ลำต้น หนามพุดดอ	15.019	100	57	1.491	1491	9.93
ราก หนามแดง	15.012	100	63	1.068	1068	7.11
ลำต้น หนามแดง	15.007	100	57	1.455	1455	9.70
ใบ หนามแดง	15.006	100	47	1.729	1729	11.52
ใบ หนามพุดดอ	15.000	100	61	2.518	2518	16.79
ราก กล้วย	15.009	100	52	1.549	1549	10.32
ลำต้น กล้วย	15.011	100	52	1.323	1323	8.81
ใบ กล้วย	15.010	100	47	1.94	1940	12.92
ดอก กล้วย	15.004	100	55	1.353	1353	9.02
เปลือกนอก กล้วย	15.002	100	41.5	1.053	1053	7.02

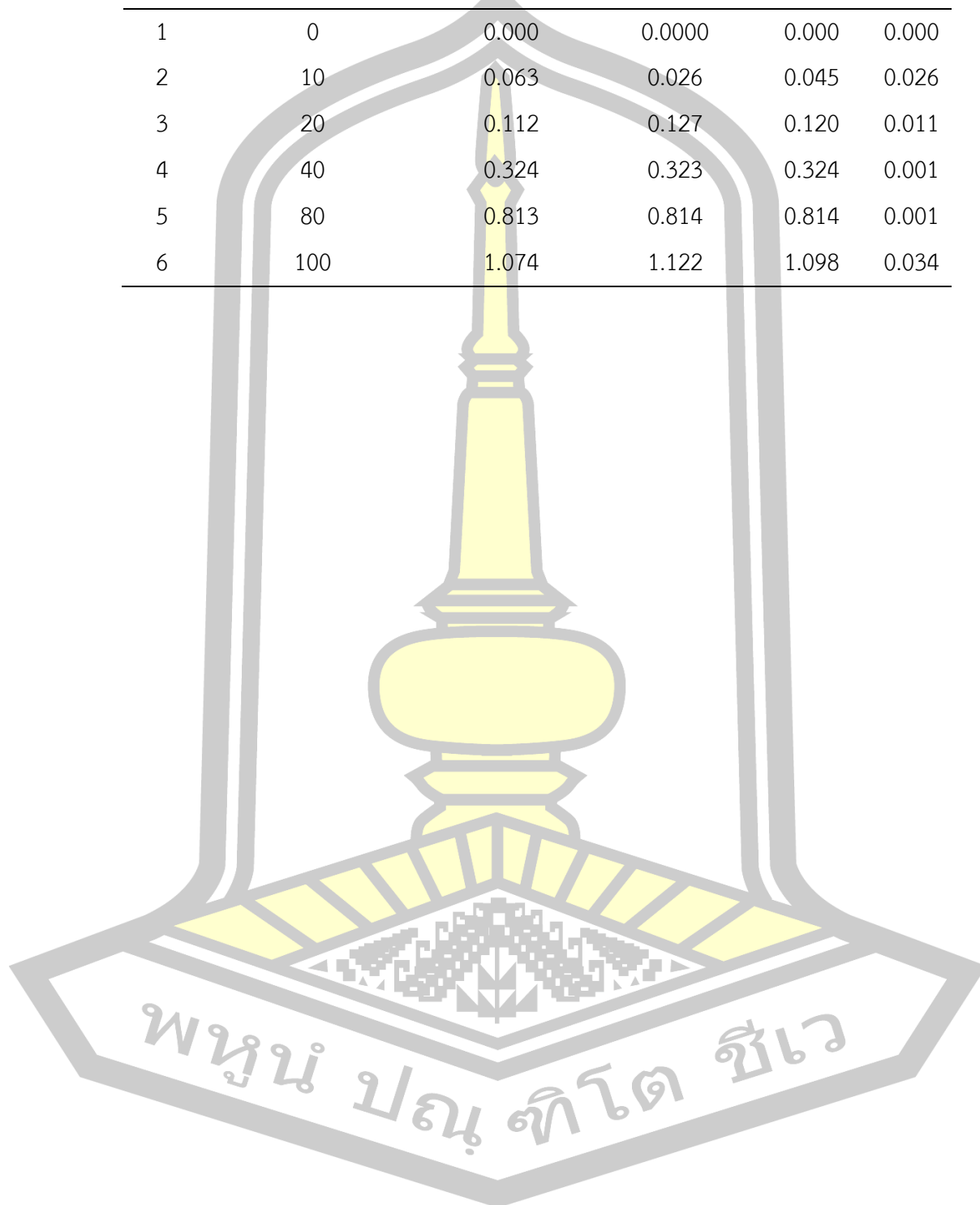


ภาคผนวก ง
ผลการตรวจสอบคุณสมบัติทางเคมีเบื้องต้น

พหุบัน ปณ ทิโต ชีเว

ตารางผนวกที่ ง1 ตารางแสดงค่า TPC ของสารมาตรฐาน gallic acid

ลำดับ	Gallic acid (mg/L)	OD _{731nm}	OD _{731nm}	OD _{731nm}	SD
1	0	0.000	0.0000	0.000	0.000
2	10	0.063	0.026	0.045	0.026
3	20	0.112	0.127	0.120	0.011
4	40	0.324	0.323	0.324	0.001
5	80	0.813	0.814	0.814	0.001
6	100	1.074	1.122	1.098	0.034

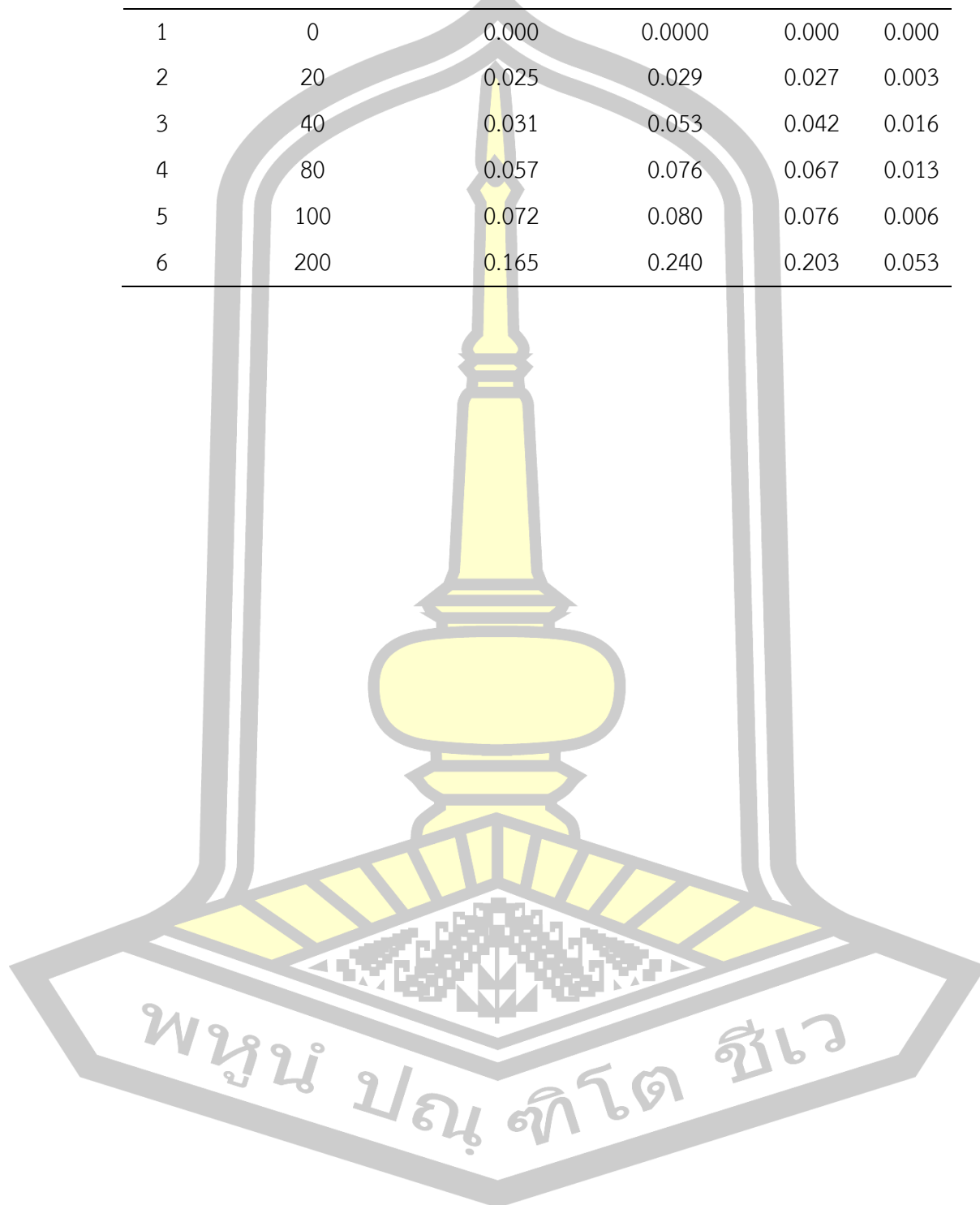


ตารางผนวกที่ ง2 ตารางแสดงค่า TPC ของสารสกัดขยายพืชชอบเค็ม

ลำดับ	สารสกัด	OD _{731nm}	OD _{731nm}	OD _{731nm}	SD	working conc. (mg/mL)	w/w (mg GAE/g crude extract)	w/w (mg GAE/g dry weight)
1	ราก หนามพุดอ	0.408	0.414	0.411	0.004	2	21.371	1.641
2	ลำต้น หนามพุดอ	0.590	0.576	0.583	0.010	2	29.049	2.884
3	ใบ หนามพุดอ	0.675	0.709	0.692	0.024	2	33.915	5.693
4	ราก หนามแดง	1.076	1.076	1.076	0.000	0.25	408.464	29.059
5	ลำต้น หนามแดง	0.374	0.377	0.376	0.002	0.25	158.286	15.347
6	ใบ หนามแดง	0.313	0.313	0.313	0.000	0.25	135.964	5.960
7	ราก ขลุ้	0.544	0.525	0.535	0.013	0.5	107.536	11.098
8	ลำต้น ขลุ้	0.291	0.275	0.283	0.011	0.5	62.625	5.523
9	ใบ ขลุ้	0.314	0.338	0.326	0.017	0.05	703.036	90.914
10	ดอก ขลุ้	0.219	0.222	0.221	0.002	0.05	514.643	52.651
11	เปลือกนอก ขลุ้	0.822	0.783	0.803	0.028	0.5	155.393	10.907

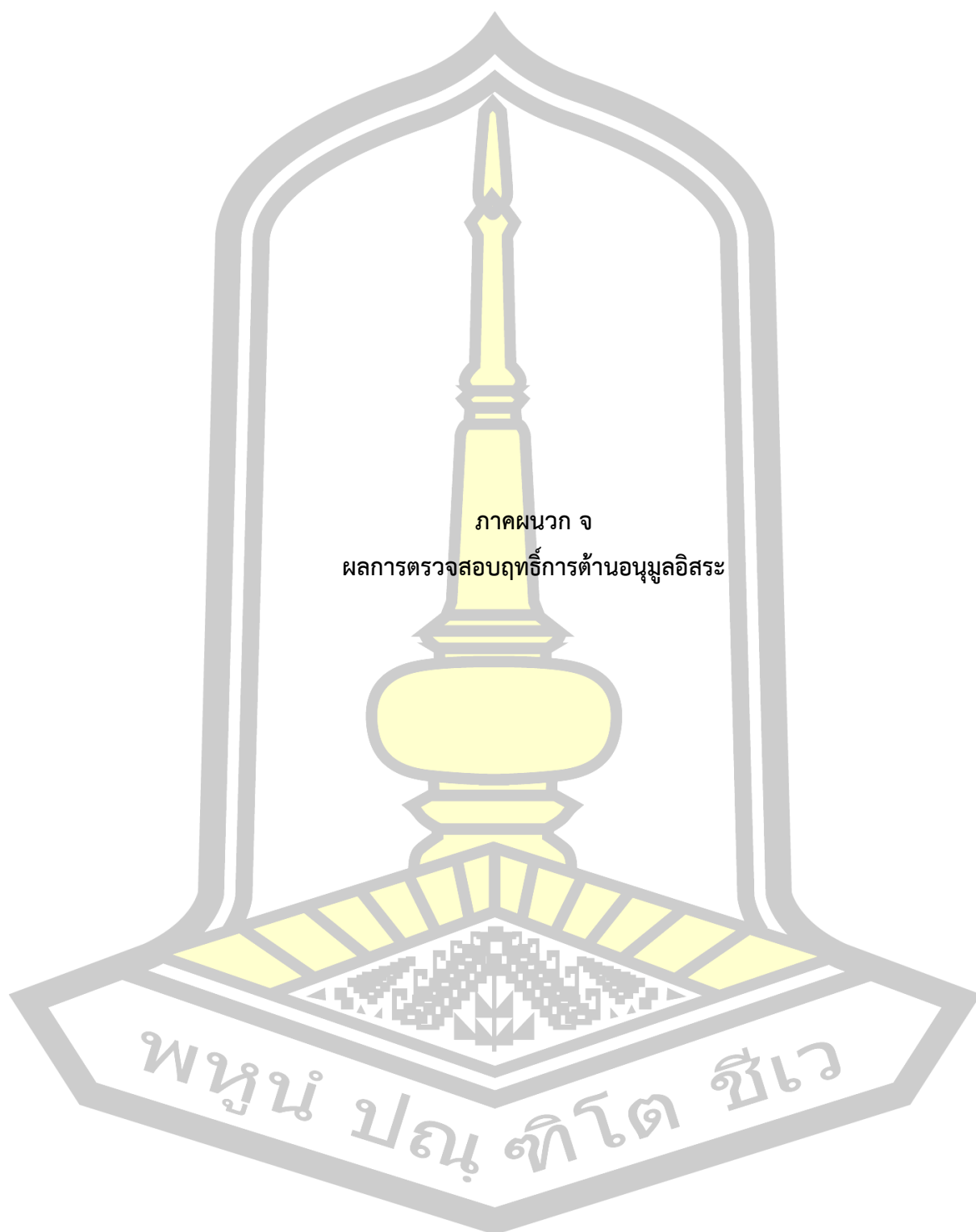
ตารางผนวกที่ 3 ตารางแสดงค่า TFC ของสารมาตรฐาน quercetin

ลำดับ	Quercetin (mg/L)	OD _{510nm}	OD _{510nm}	OD _{510nm}	SD
1	0	0.000	0.0000	0.000	0.000
2	20	0.025	0.029	0.027	0.003
3	40	0.031	0.053	0.042	0.016
4	80	0.057	0.076	0.067	0.013
5	100	0.072	0.080	0.076	0.006
6	200	0.165	0.240	0.203	0.053



ตารางผนวกที่ 4 ตารางแสดงค่า TFC ของสารสกัดหายาพืชชอบเค็ม

ลำดับ	สารสกัด	OD _{510nm}	OD _{510nm}	OD _{510nm}	SD	working conc. (mg/mL)	w/w (mg QE/g crude extract)	w/w (mg QE/g dry weight)
1	ราก หนามพุด	0.043	0.077	0.060	0.024	2	30.950	2.377
2	ลำต้น หนามพุด	0.070	0.069	0.070	0.001	2	35.700	3.544
3	ใบ หนามพุด	0.118	0.114	0.116	0.003	2	58.950	9.896
4	ราก หนามแดง	0.138	0.137	0.138	0.001	0.25	557.600	39.669
5	ลำต้น หนามแดง	0.134	0.134	0.134	0.000	0.5	271.800	26.352
6	ใบ หนามแดง	0.084	0.092	0.088	0.006	0.5	179.800	7.882
7	ราก ขลุ้	0.171	0.185	0.178	0.010	0.5	359.800	37.133
8	ลำต้น ขลุ้	0.211	0.113	0.162	0.069	0.5	327.800	28.910
9	ใบ ขลุ้	0.2	0.18	0.190	0.014	0.1	1919.000	248.158
10	ดอก ขลุ้	0.168	0.164	0.166	0.003	0.1	1679.000	171.772
11	เปลือกนอก ขลุ้	0.132	0.108	0.120	0.017	0.5	243.800	17.112



ตารางผนวกที่ จ1 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารมาตรฐาน ascorbic acid

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.615	0.614	0.615	0.000	0.001	0.001	0.00	1.5742422
2	0.504	0.502	0.503	18.145	0.001	0.001	22.04	
3	0.399	0.412	0.406	34.011	0.009	0.009	30.56	
4	0.189	0.184	0.187	69.650	0.004	0.004	49.70	
5	0.078	0.077	0.078	87.388	0.001	0.001	57.41	
6	0.064	0.061	0.063	89.829	0.002	0.002		
7	0.063	0.059	0.061	90.073	0.003	0.003		

ตารางผนวกที่ จ2 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาดส่วนรากหนามพุงดอ

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.499	0.499	0.499	0.000	0.00	197.133
2	0.050	0.375	0.403	0.389	0.020	22.04	
3	0.100	0.366	0.327	0.347	0.028	30.56	
4	0.200	0.253	0.249	0.251	0.003	49.70	
5	0.400	0.165	0.26	0.213	0.067	57.41	

ตารางผนวกที่ จ3 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาดส่วนลำต้นหนามพุงดอ

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.435	0.44	0.438	0.004	0.00	232.8123474
2	0.1	0.321	0.289	0.305	0.023	30.29	
3	0.2	0.213	0.216	0.215	0.002	50.97	
4	0.4	0.107	0.102	0.105	0.004	76.11	
5	0.8	0.156	0.148	0.152	0.006	65.26	

ตารางผนวกที่ จ4 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนใบหนามพุงดอ

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.504	0.491	0.498	0.009	0.00	124.8577458
2	0.0125	0.469	0.460	0.465	0.006	6.63	
3	0.025	0.435	0.446	0.441	0.008	11.46	
4	0.05	0.407	0.359	0.383	0.034	23.02	
5	0.1	0.251	0.245	0.248	0.004	50.15	
6	0.2	0.136	0.129	0.133	0.005	73.37	

ตารางผนวกที่ จ5 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนรากหนามแดง

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.0000	0.570	0.570	0.570	0.000	0.00	5.387895072
2	0.0029	0.482	0.484	0.483	0.001	15.26	
3	0.0033	0.38	0.385	0.383	0.004	32.89	
4	0.0040	0.396	0.346	0.371	0.035	34.91	
5	0.0050	0.267	0.296	0.282	0.021	50.61	

ตารางผนวกที่ ๖6 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนลำต้นหนามแดง

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.570	0.570	0.570	0.000	0.00	15.26134513
2	0.003125	0.512	0.532	0.522	0.014	8.42	
3	0.00625	0.47	0.42	0.445	0.035	21.93	
4	0.0125	0.335	0.31	0.323	0.018	43.42	
5	0.025	0.113	0.11	0.112	0.002	80.44	

ตารางผนวกที่ ๖7 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนใบหนามแดง

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.515	0.515	0.515	0.000	0.00	25.69943063
2	0.008	0.473	0.433	0.453	0.028	12.04	
3	0.013	0.395	0.395	0.395	0.000	23.30	
4	0.025	0.259	0.263	0.261	0.003	49.32	
5	0.050	0.283	0.282	0.283	0.001	45.15	
6	0.100	0.254	0.25	0.252	0.003	51.07	

ตารางผนวกที่ ๑8 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนรากขลุ่

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.458	0.460	0.459	0.001	0.00	32.4817357
2	0.006	0.461	0.443	0.452	0.013	1.53	
3	0.013	0.394	0.416	0.405	0.016	11.76	
4	0.025	0.248	0.269	0.259	0.015	43.68	
5	0.050	0.08	0.122	0.101	0.030	78.00	

ตารางผนวกที่ ๑9 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนลำต้นขลุ่

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.570	0.570	0.570	0.000	0.00	28.11584115
2	0.006	0.475	0.492	0.484	0.012	15.18	
3	0.013	0.411	0.416	0.414	0.004	27.46	
4	0.025	0.289	0.281	0.285	0.006	50.00	
5	0.050	0.084	0.121	0.103	0.026	82.02	

ตารางผนวกที่ 10 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนใบขี้เหล็ก

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.458	0.460	0.459	0.001	0.00	5.423
2	0.000	0.39	0.386	0.388	0.003	15.47	
3	0.001	0.388	0.399	0.394	0.386	14.27	
4	0.003	0.294	0.289	0.292	0.004	36.49	
5	0.010	0.259	0.056	0.158	0.144	65.69	

ตารางผนวกที่ 11 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนดอกขี้เหล็ก

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.458	0.460	0.459	0.001	0.00	3.663
2	0.001	0.321	0.396	0.359	0.053	21.90	
3	0.001	0.324	0.366	0.345	0.030	24.84	
4	0.003	0.302	0.265	0.284	0.026	38.24	
5	0.005	0.17	0.16	0.165	0.007	64.05	

ตารางผนวกที่ จ12 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี DPPH ของสารสกัดหยาบส่วนเปลือกนอกขลุ่

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	OD _{515 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000	0.377	0.288	0.333	0.063	0.00	17.753
2	0.006	0.3	0.296	0.298	0.003	10.38	
3	0.013	0.228	0.222	0.225	0.004	32.33	
4	0.025	0.103	0.1	0.102	0.002	69.47	
5	0.050	0.061	0.059	0.060	0.001	81.95	

ตารางผนวกที่ จ13 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารมาตรฐาน ascorbic acid

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.152	0.152	0.152	0.000	0.000	0.291
2	0.1	0.139	0.135	0.137	0.003	9.868	
3	0.2	0.138	0.105	0.122	0.023	20.066	
4	0.4	0.105	0.090	0.098	0.011	35.855	
5	0.8	0.070	0.012	0.041	0.041	73.026	
6	1.6	-0.004	-0.008	-0.006	0.003	103.947	
7	3.2	0.001	0.010	0.006	0.006	96.382	
8	6.4	-0.012	-0.006	-0.009	0.004	105.921	

ตารางผนวกที่ จ14 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนรากหนามพุงต่อ

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.000	0.038	0.042	0.040	0.00	12.026
2	0.0125	0.006	0.031	0.034	0.033	18.75	
3	0.025	0.013	0.016	0.020	0.018	55.00	
4	0.05	0.025	0.016	0.021	0.019	53.75	
5	0.1	0.050	0.010	0.014	0.012	70.00	
6	0.2	0.100	0.002	0.000	0.001	97.50	

ตารางผนวกที่ จ15 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนลำต้นนางามพุด

ลำดับ	Concentration (mg/L)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.00000	0.119	0.115	0.117	0.003	0.00	17.180
2	0.00625	0.096	0.096	0.096	0.000	17.95	
3	0.01250	0.074	0.074	0.074	0.000	36.75	
4	0.02500	0.032	0.032	0.032	0.000	72.65	
5	0.05000	0.016	0.017	0.017	0.001	85.90	
6	0.10000	0.025	0.025	0.025	0.000	78.63	
7	0.20000	0.088	0.093	0.091	0.004	22.65	

ตารางผนวกที่ จ16 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนใบหนามเมงตอ

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.125	0.128	0.127	0.002	0.00	11.811
2	0.00078125	0.124	0.103	0.114	0.015	10.28	
3	0.0015625	0.114	0.104	0.109	0.007	13.83	
4	0.003125	0.1	0.102	0.101	0.001	20.16	
5	0.00625	0.082	0.066	0.074	0.011	41.50	
6	0.0125	0.052	0.051	0.052	0.001	59.29	
7	0.025	0.015	0.012	0.014	0.002	89.33	

ตารางผนวกที่ จ17 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนรากหนามแดง

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.00000000	0.043	0.045	0.044	0.001	0.00	0.607
2	0.000312500	0.037	0.037	0.037	0.000	15.91	
3	0.000625000	0.020	0.019	0.020	0.001	55.68	
4	0.001250000	0.038	0.038	0.038	0.000	13.64	
5	0.002500000	0.048	0.048	0.048	0.000	-9.09	
6	0.005000000	0.021	0.021	0.021	0.000	52.27	

ตารางผนวกที่ จ18 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนลำต้นหนามแดง

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0	0.024	0.024	0.024	0.000	0.00	0.699
2	0.000625	0.011	0.012	0.012	0.001	52.08	
3	0.00125	0.003	0.005	0.004	0.001	83.33	
4	0.0025	0.012	0.012	0.012	0.000	50.00	
5	0.005	0.007	0.007	0.007	0.000	70.83	
6	0.01	0.008	0.008	0.008	0.000	66.67	

ตารางผนวกที่ จ19 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนใบหนามแดง

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.00000	0.050	0.052	0.051	0.001	0.00	2.875
2	0.003125	0.015	0.015	0.015	0.000	70.59	
3	0.006250	0.005	0.005	0.005	0.000	90.20	
4	0.012500	0.022	0.022	0.022	0.000	56.86	
5	0.025000	0.016	0.016	0.016	0.000	68.63	
6	0.050000	0.007	0.007	0.007	0.000	86.27	

ตารางผนวกที่ จ20 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนรากชั่ง

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.00000	0.021	0.021	0.021	0.000	0.00	47.331
2	0.015625	0.017	0.019	0.018	0.001	14.29	
3	0.031250	0.015	0.014	0.015	0.001	30.95	
4	0.062500	0.007	0.008	0.008	0.001	64.29	
5	0.125000	0.002	0.003	0.003	0.001	88.10	
6	0.250000	0.001	0.001	0.001	0.000	95.24	

ตารางผนวกที่ จ21 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนลำต้นขี้เหล็ก

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000000	0.093	0.052	0.073	0.029	0.00	1.403
2	0.000781	0.098	0.045	0.072	0.037	1.38	
3	0.001563	0.028	0.011	0.020	0.012	73.10	
4	0.003125	0.003	0.003	0.003	0.000	95.86	
5	0.006250	0.009	0.002	0.006	0.005	92.41	
6	0.012500	0.015	0.005	0.010	0.007	86.21	
7	0.025000	0.014	0.000	0.007	0.010	90.34	

ตารางผนวกที่ จ22 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนใบขี้เหล็ก

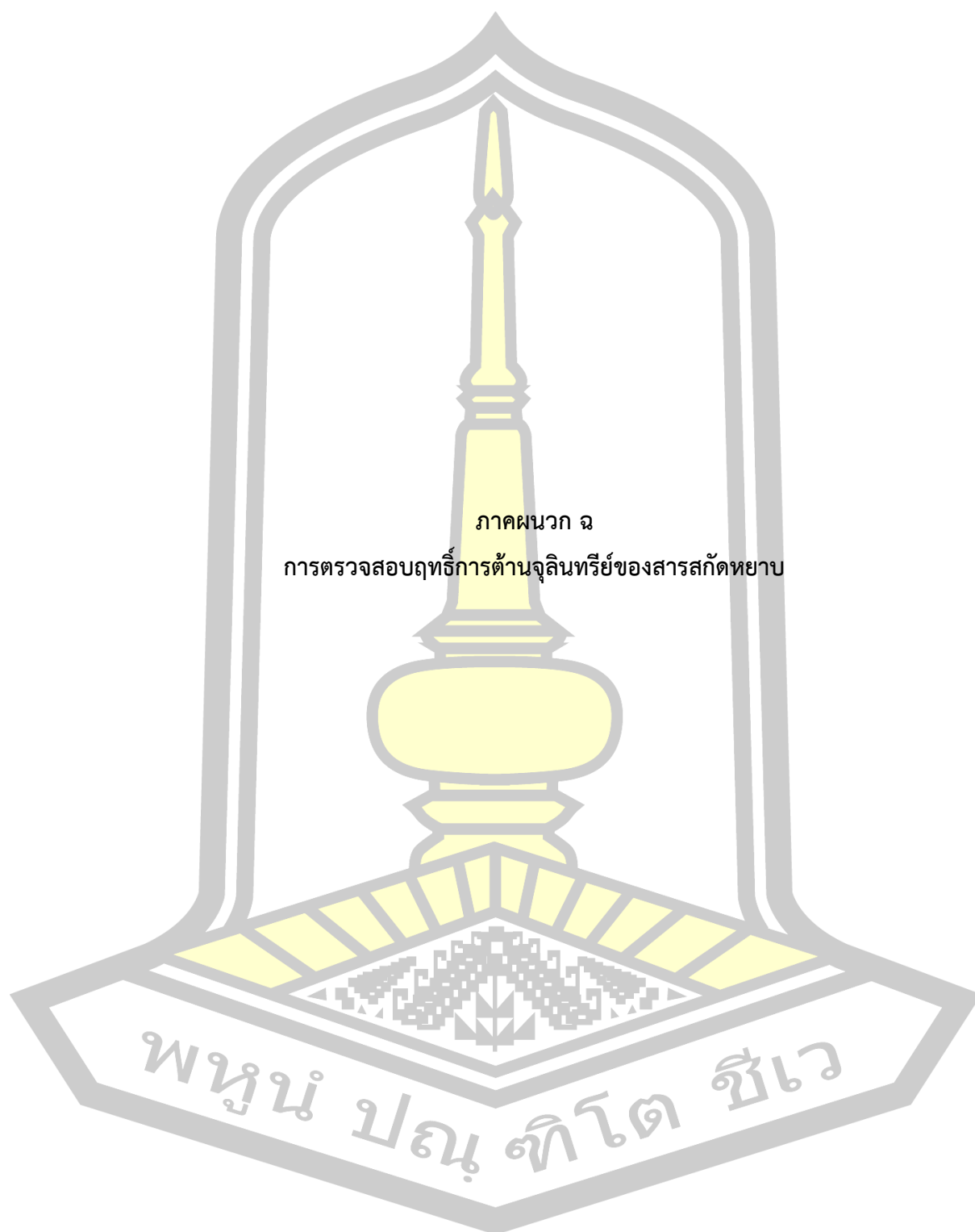
ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000000	0.052	0.052	0.052	0.000	0.00	0.761
2	0.000313	0.032	0.031	0.032	0.001	39.42	
3	0.000625	0.027	0.027	0.027	0.000	48.08	
4	0.001250	0.016	0.016	0.016	0.000	69.23	
5	0.002500	0.016	0.013	0.015	0.002	72.12	
6	0.005000	0.01	0.009	0.010	0.001	81.73	

ตารางผนวกที่ จ23 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนดอกขี้เหล็ก

ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000000	0.079	0.080	0.080	0.001	0.00	0.217
2	0.000078	0.044	0.065	0.055	0.015	31.45	
3	0.000156	0.052	0.045	0.049	0.005	38.99	
4	0.000313	0.028	0.021	0.025	0.005	69.18	
5	0.000625	0.012	0.013	0.013	0.001	84.28	
6	0.001250	0.01	0.012	0.011	0.001	86.16	

ตารางผนวกที่ จ24 ตารางแสดง antioxidant activity (%) ที่ตรวจสอบด้วยวิธี ABTS ของสารสกัดหยาบส่วนเปลือกนอกขลุ้

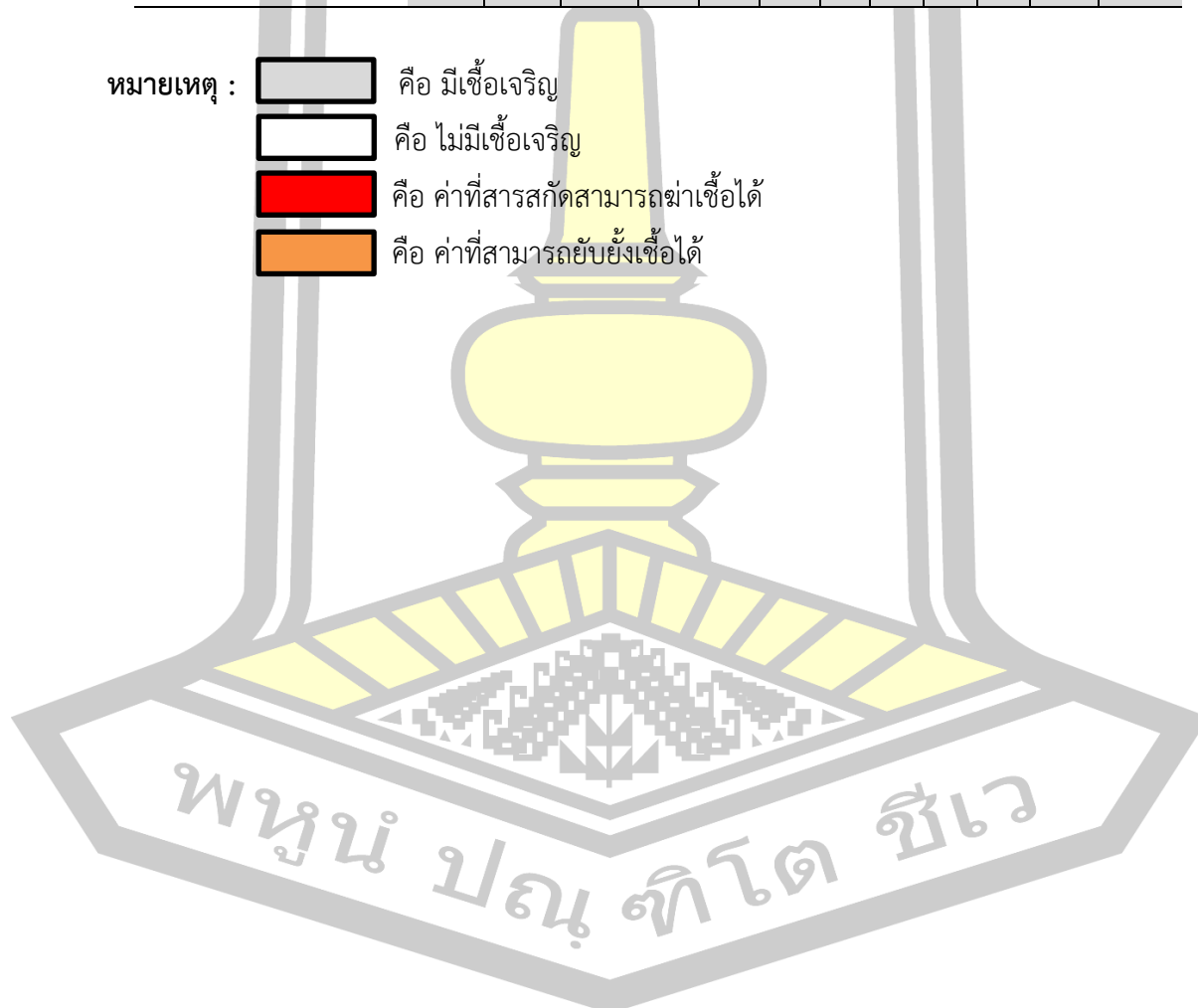
ลำดับ	Concentration (mg/mL)	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	OD _{734 nm}	SD	Antioxidant activity (%)	IC ₅₀ (µg/mL)
1	0.000000	0.112	0.096	0.104	0.011	0.00	0.735
2	0.000625	0.072	0.057	0.065	0.011	37.98	
3	0.001250	0.013	0.016	0.015	0.002	86.06	
4	0.002500	0.013	-0.004	0.005	0.012	95.67	
5	0.005000	-0.004	0.007	0.002	0.008	98.56	
6	0.010000	-0.003	0.049	0.023	0.037	77.88	



ตารางผนวกที่ ฉ1 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดรากหนามพุงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound	Concentration (ug/mL)											
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

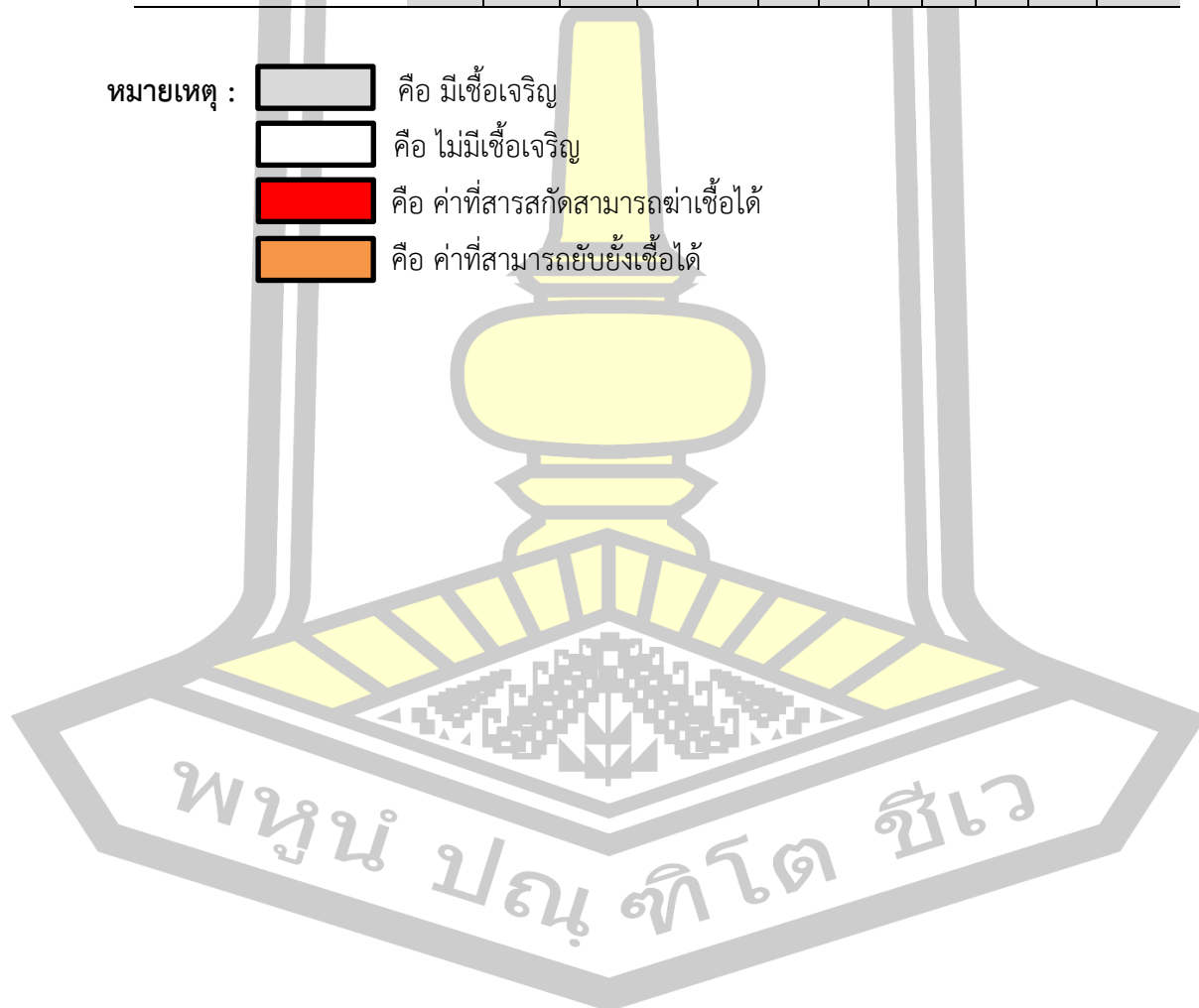
- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



ตารางผนวกที่ ๑๒ ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดลำต้นหนามพุงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound	Concentration (ug/mL)											
	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



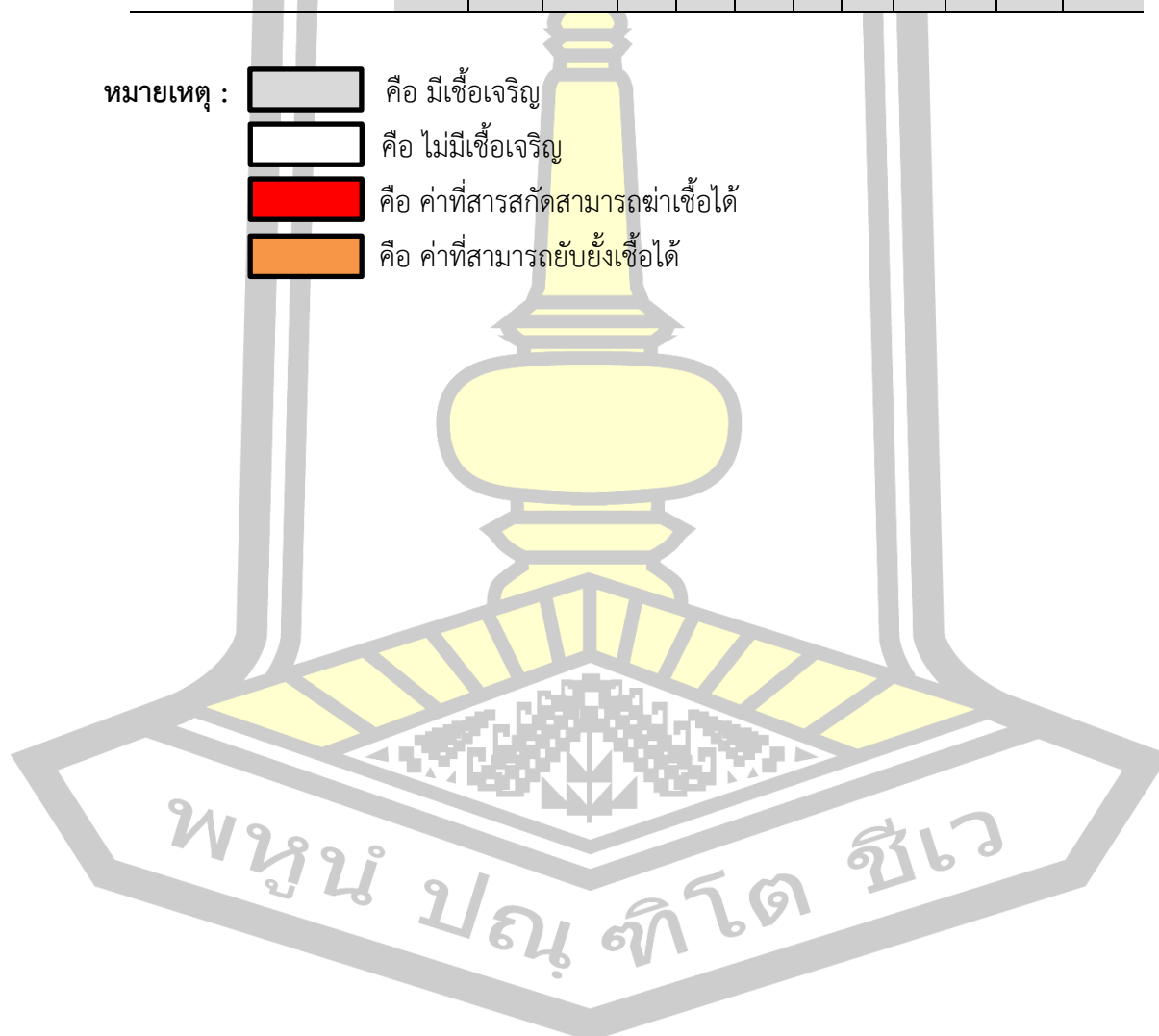
ตารางผนวกที่ ๓ ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดใบหนามพุงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



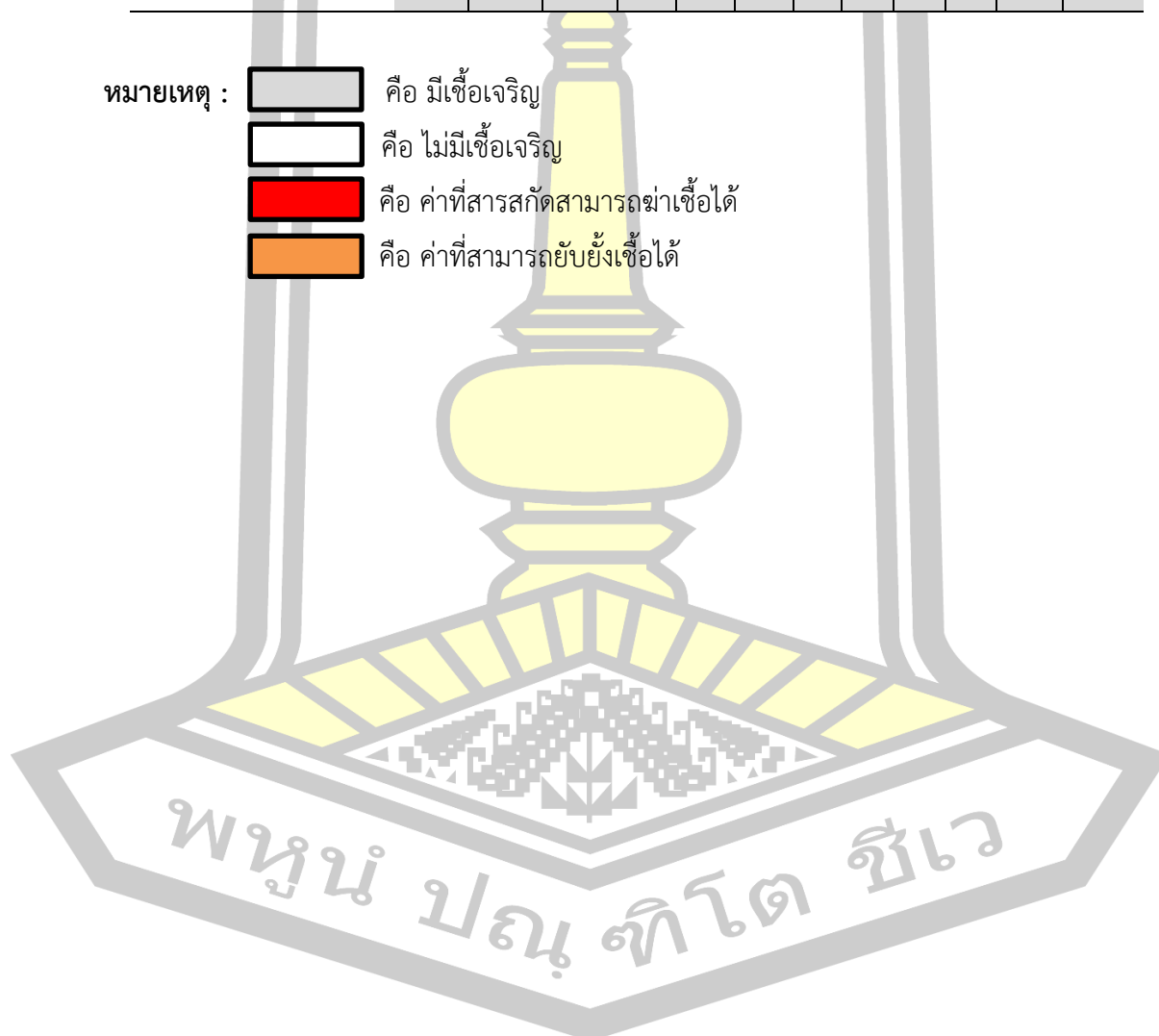
ตารางผนวกที่ ๑4 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดรากหนามแดงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
-  คือ มีเชื้อเจริญ
 -  คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 -  คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 -  คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



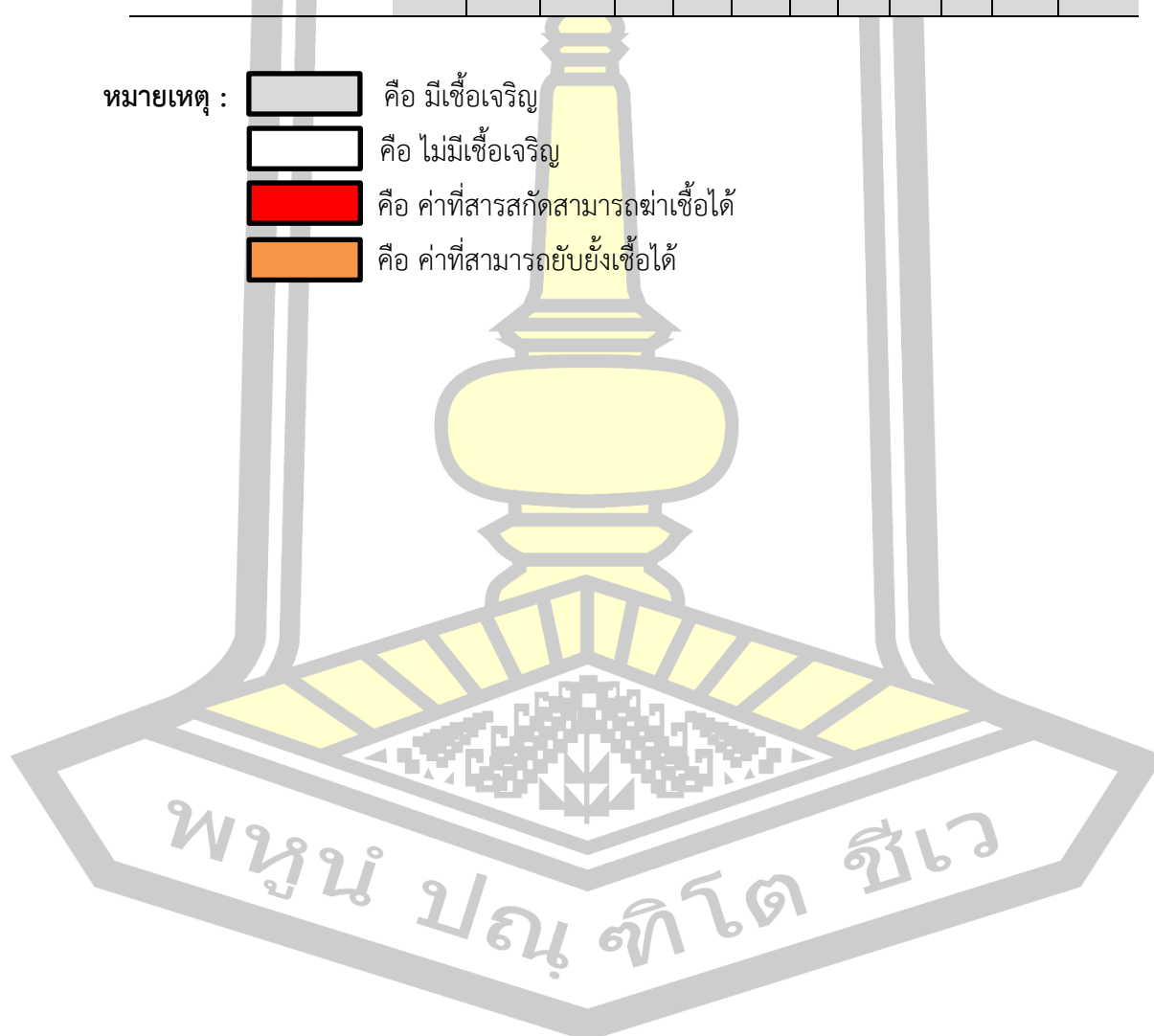
ตารางผนวกที่ ๑5 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดลำต้นหนามแดงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



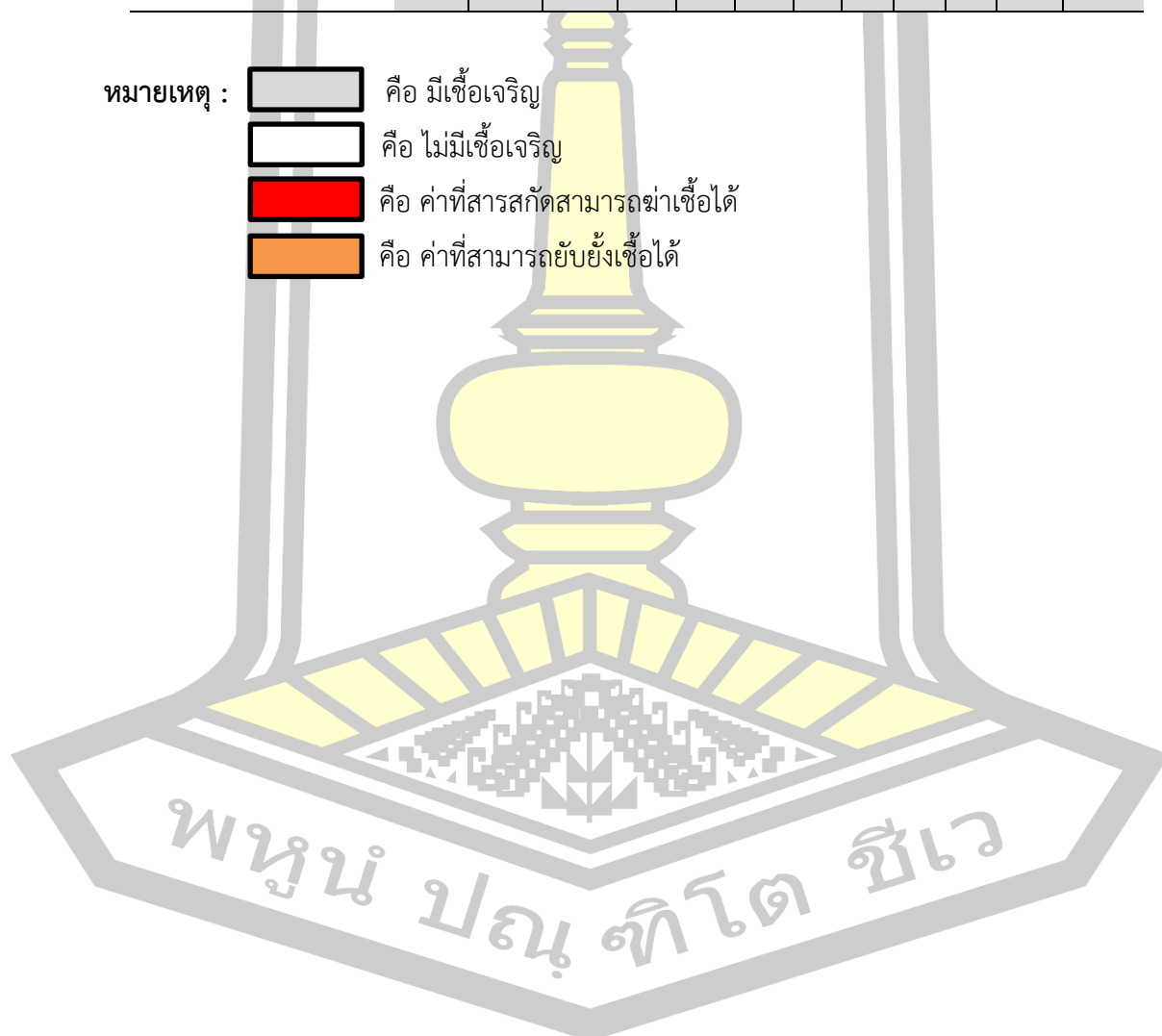
ตารางผนวกที่ ๑๖ ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดใบหนามแดงต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



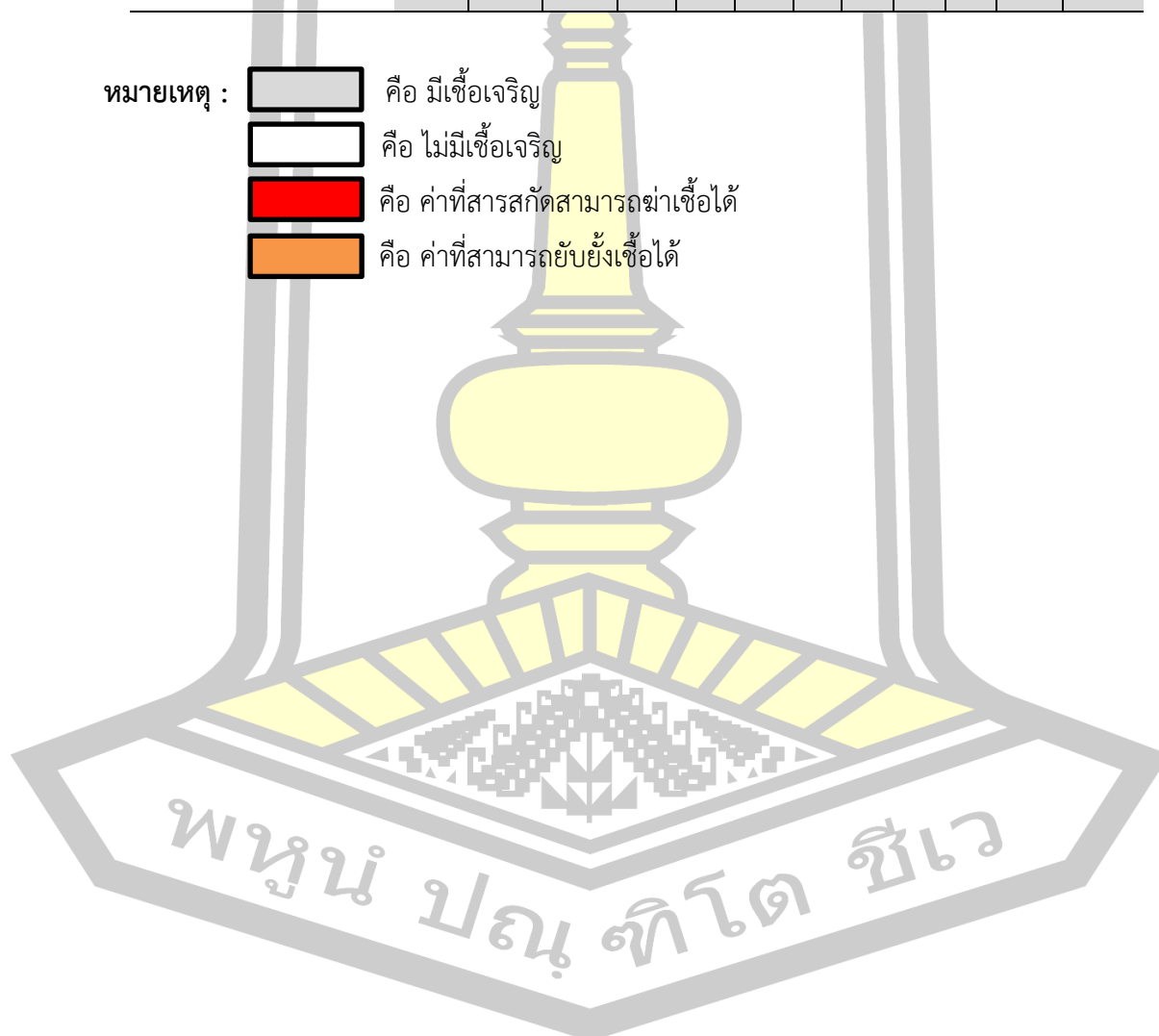
ตารางผนวกที่ ๑7 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดรากขลุ่ยต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



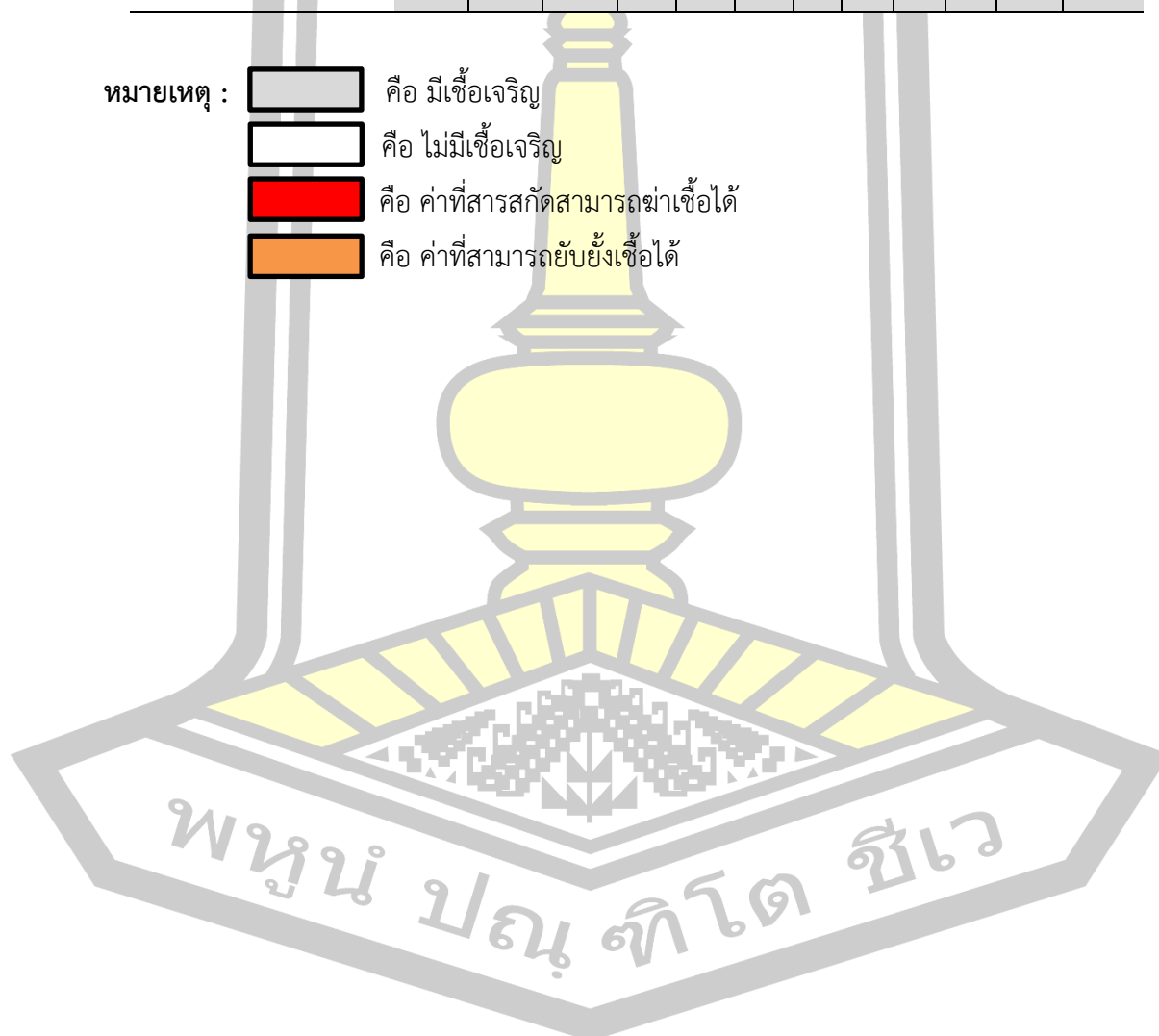
ตารางผนวกที่ ๘ ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดลำต้นขลุ่ยต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



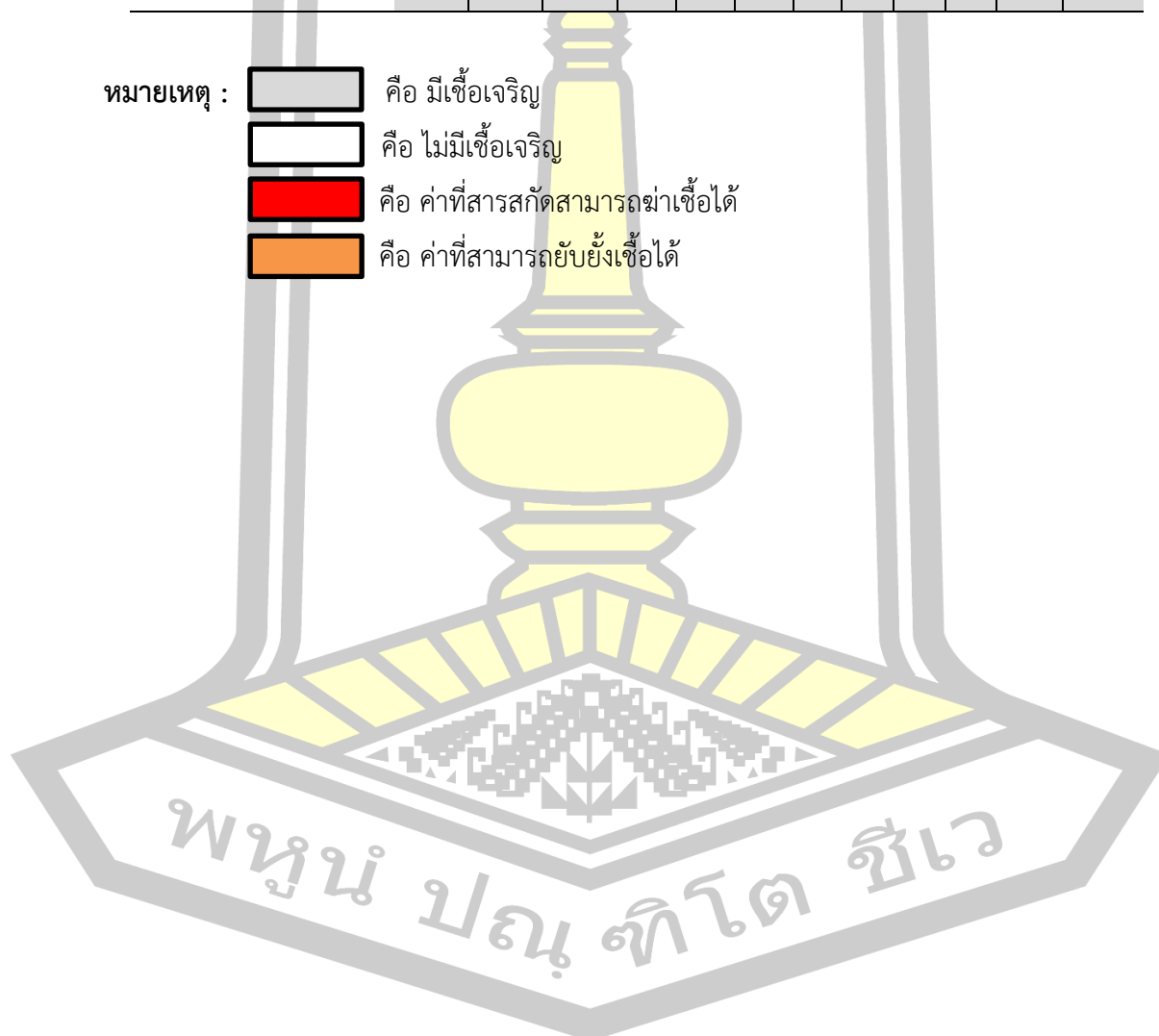
ตารางผนวกที่ ๑๑ ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดใบขลุ่ยต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
-  คือ มีเชื้อเจริญ
 -  คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 -  คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 -  คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



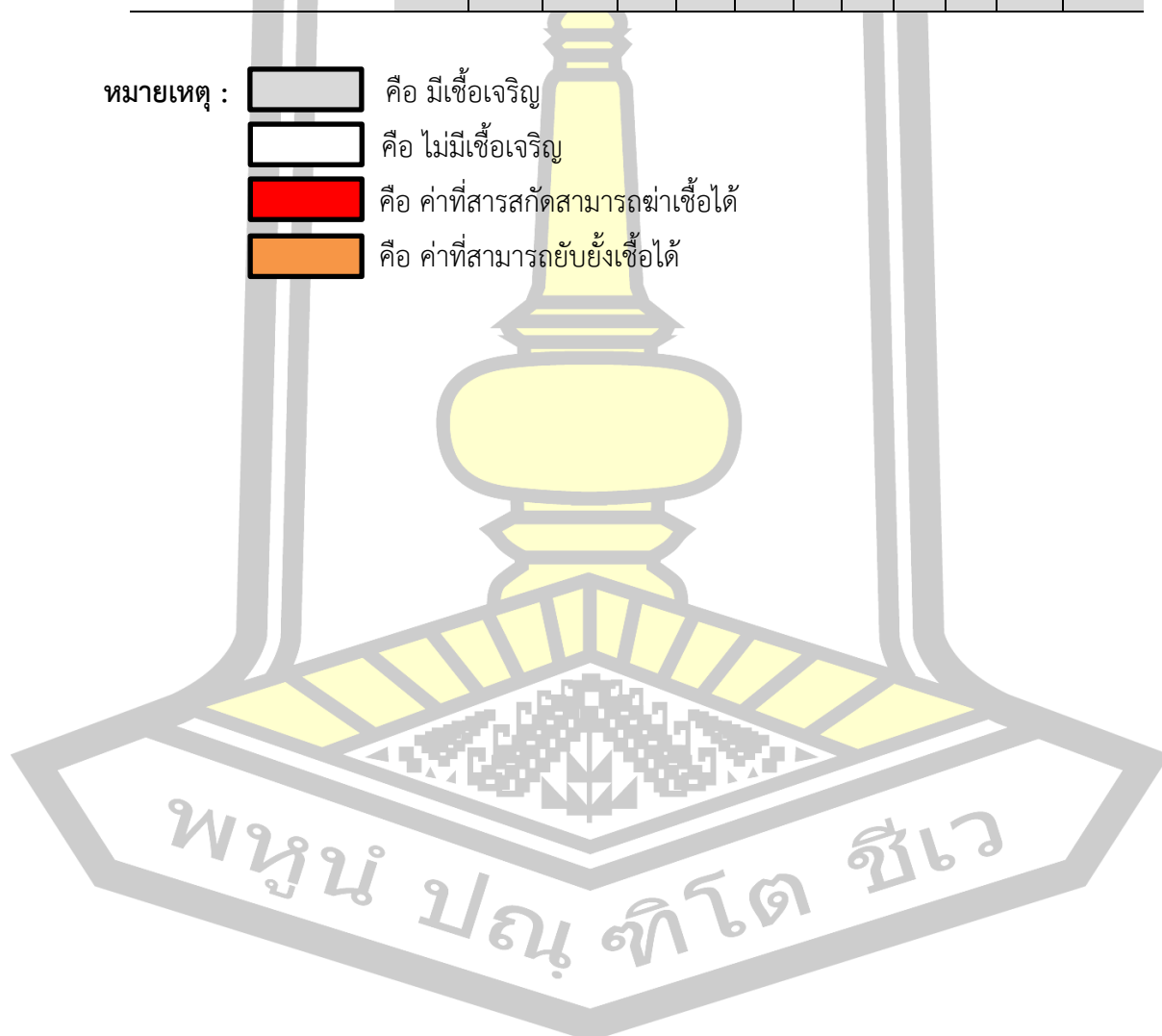
ตารางผนวกที่ ๑10 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดดอกขลุ่ยต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
-  คือ มีเชื้อเจริญ
 -  คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 -  คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 -  คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



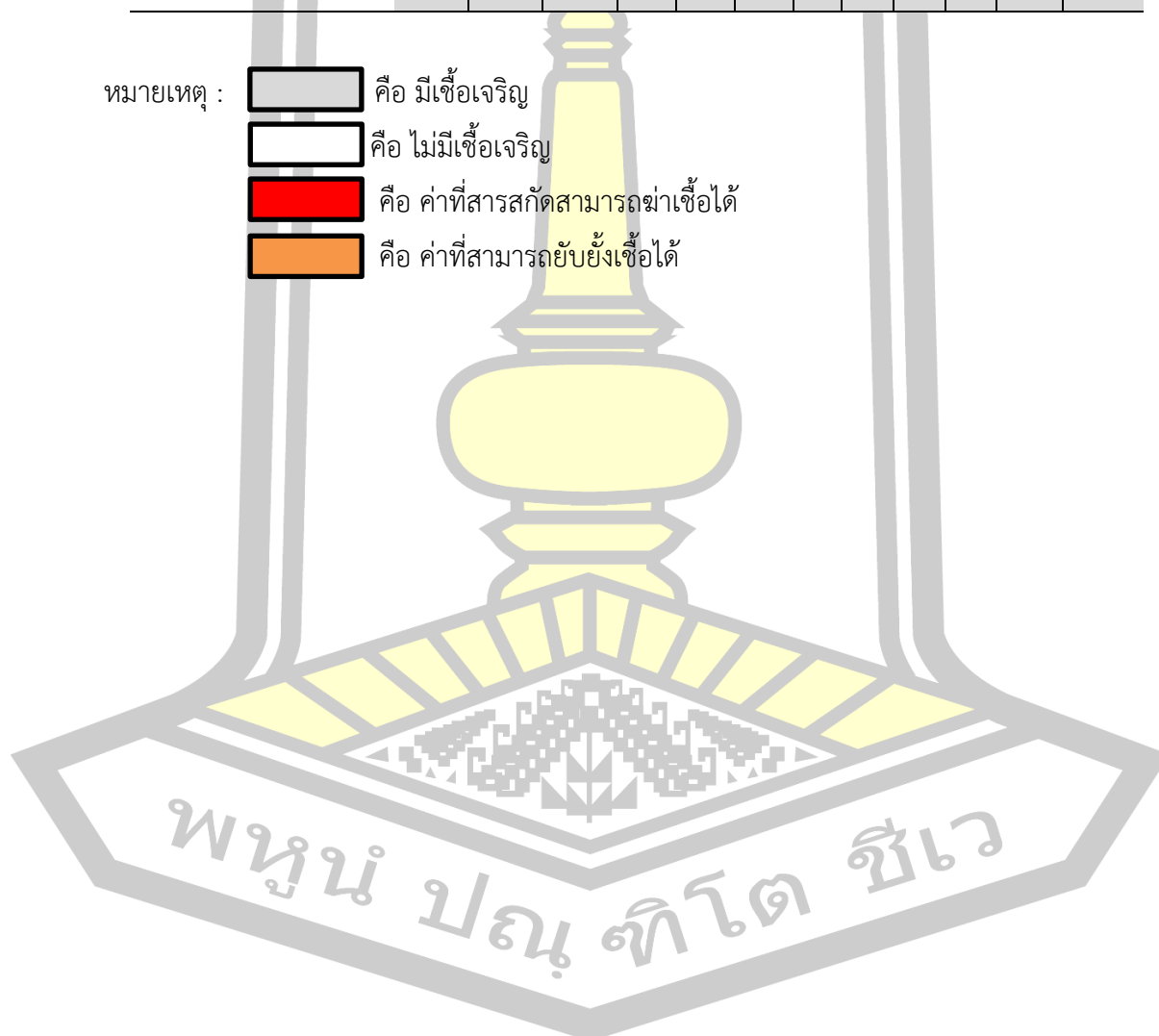
ตารางผนวกที่ ๑11 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของสารสกัดเปลือกนอกขลุ่ยต่อเชื้อแบคทีเรีย

Drug/Compound

Concentration (ug/mL)

	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	0.5	0.25
<i>S. aureus</i> DMST 8840												
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654												
<i>E. coli</i> ATCC 25922												
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511												

- หมายเหตุ :
- คือ มีเชื้อเจริญ
 - คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 - คือ ค่าที่สารสกัดสามารถฆ่าเชื้อได้
 - คือ ค่าที่สามารถยับยั้งเชื้อได้



ตารางผนวกที่ ๑12 ผลการทดสอบ MIC และ MBC ของกลุ่ม control ของสารสกัด

ชนิดของ control

1	2	3	4	5	6	7	8	9			

หมายเหตุ :  คือ มีเชื้อเจริญ
 คือ ไม่มีเชื้อเจริญ
 คือ หลุมว่าง

1 คือ negative control

2 คือ positive *S. aureus* DMST 8840

3 คือ *S. aureus* DMST 8840 เลี้ยงใน 1%DMSO

4 คือ positive *S. aureus* (MRSA) DMST 20654

5 คือ *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 เลี้ยงใน 1%DMSO

6 คือ positive *E. coli* ATCC 25922

7 คือ *E. coli* ATCC 25922 เลี้ยงใน 1%DMSO

8 คือ positive *S. Typhimurium* TISTR 2511

9 คือ *S. Typhimurium* TISTR 2511 เลี้ยงใน 1%DMSO

พหุบัน ปณ ทิโต ชีเว

ตารางผนวกที่ ๑13 ผลการทดสอบ MIC ของกลุ่ม control ยาลูกปัด

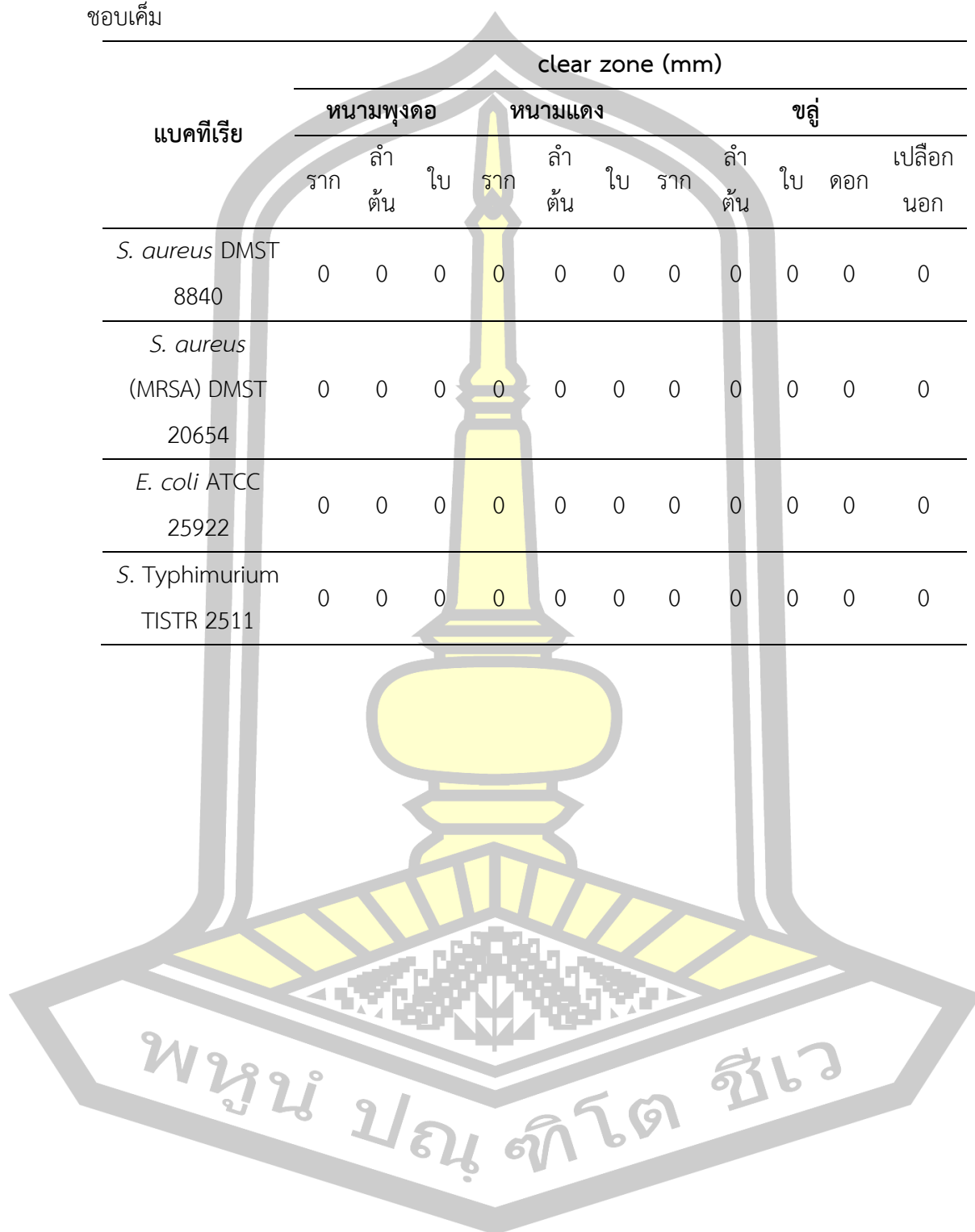
แบคทีเรีย	ความเข้มข้น (µg/mL)														
	Vancomycin		Gentamycin		Oxacillin		Polymyxin B		Streptomycin		Penicillin G				
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>S. aureus</i> DMST 8840	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654	2	1	1	2	0.5	1	>512	-	-	4	-	8	2	>2	8
<i>E. coli</i> ATCC 25922	2	>2	4	2	0.5	1	4	>4	>4	4	-	8	2	>2	8
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511	256	-	-	2	2	4	>512	-	-	4	-	4	8	-	16
	512	-	-	2	2	1	>512	-	-	2	2	4	8	-	16
													16	>16	32

ตารางผนวกที่ ๑14 ผลการทดสอบ MBC ของกลุ่ม control ยานปฏิชีวนะ

แบคทีเรีย	ความเข้มข้น (µg/mL)																	
	Vancomycin		Gentamycin		Oxacillin		Polymyxin B		Streptomycin		Penicillin G							
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3			
<i>S. aureus</i> DMST 8840	4	>2	1	2	1	4	>512	-	-	128	-	>32	8	>2	16	8	4	4
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654	16	>2	4	2	1	1	4	>4	32	256	-	>32	2	>2	16	8	8	2
<i>E. coli</i> ATCC 25922	256	-	-	2	2	32	>512	-	-	4	-	4	16	-	16	>512	-	-
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511	>512	-	-	2	2	16	>512	-	-	2	2	4	>8	-	>32	>16	>16	>32

ตารางผนวกที่ ๑15 ผลการทดสอบ agar disc diffusion ของกลุ่ม control ของสารสกัดหยาบพืช
ชอบเค็ม

แบคทีเรีย	clear zone (mm)										
	หนามพุงตอ			หนามแดง			ขลุ้				
	ราก	ลำ ต้น	ใบ	ราก	ลำ ต้น	ใบ	ราก	ลำ ต้น	ใบ	ดอก	เปลือก นอก
<i>S. aureus</i> DMST 8840	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0



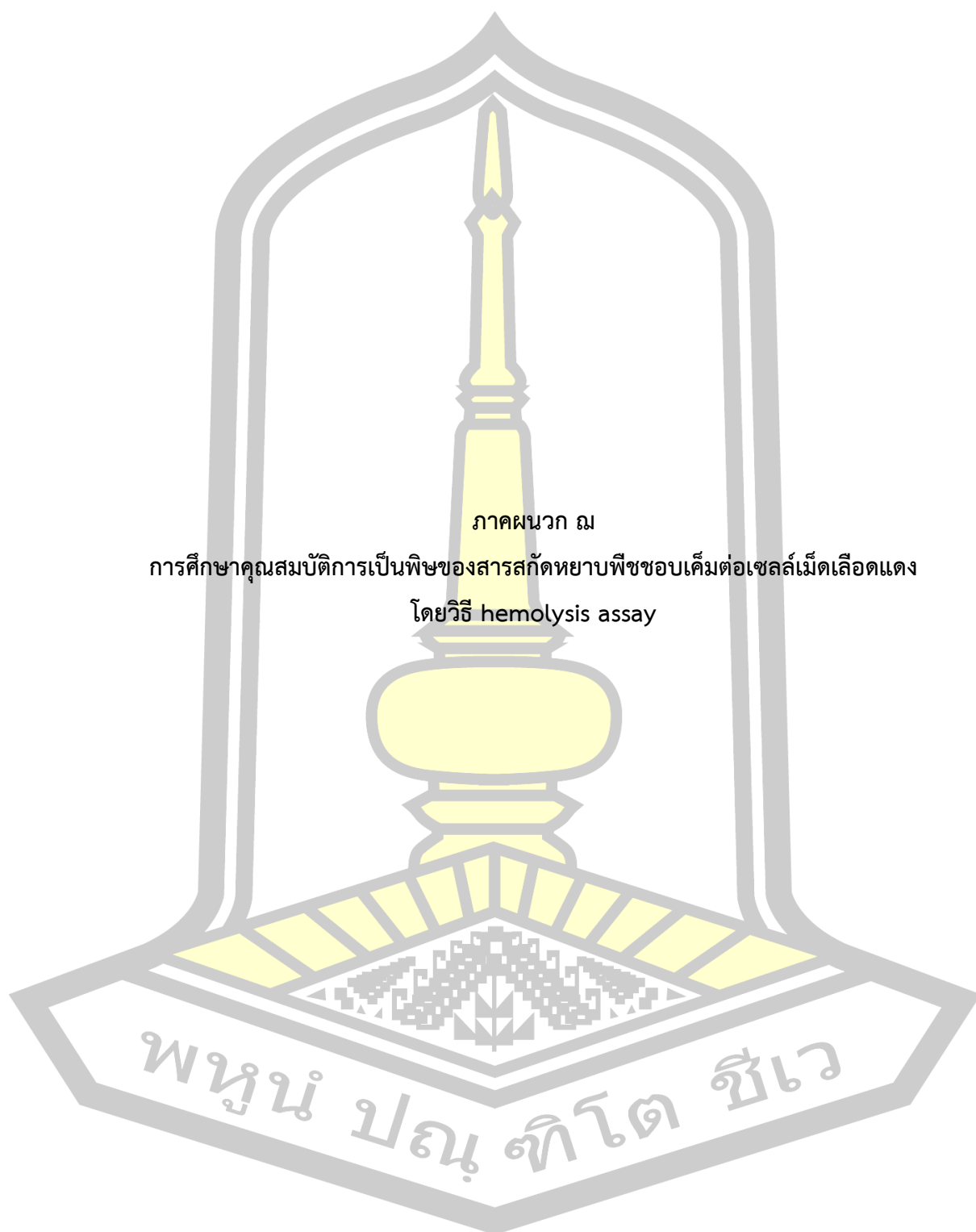
ตารางผนวกที่ ๑16 ผลการทดสอบ agar disc diffusion ของกลุ่ม control ยานปฏิชีวนะ

แบคทีเรีย	clear zone (mm)											
	Vancomycin		Gentamycin		Oxacillin		Polymyxin B		Streptomycin		Penicillin G	
	ซ้่า 1	ซ้่า 2	ซ้่า 1	ซ้่า 2	ซ้่า 1	ซ้่า 2	ซ้่า 1	ซ้่า 2	ซ้่า 1	ซ้่า 2	ซ้่า 1	ซ้่า 2
<i>S. aureus</i> DMST 8840	22	0	29	25	32	0	19	13	15	18	45	0
<i>S. aureus</i> (MRSA) DMST 20654	23	0	31	22	27	0	12	0	25	18	25	19
<i>E. coli</i> ATCC 25922	13	0	26	23	0	0	20	17	20	18	0	0
<i>S. Typhimurium</i> TISTR 2511	9	0	31	22	0	0	19	15	25	13	20	0



ตารางผนวกที่ ๕ ผลการตรวจสอบความเป็นพิษของสารต่อ WBCs เซลล์ CD14⁺ และ CD14⁻ สารสกัดหยาบลำต้นหนามแดง

ของสาร (µg/mL)	% viable cells													
	WBCs						CD14 ⁺						CD14 ⁻	
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3	ซ้ำ 4
512	231.89	306.87	358.12	238.48	225.33	231.06	168.98	337.35	390.20	210.90	362.02			
256	150.79	176.39	188.46	145.99	146.11	148.88	107.43	196.56	200.97	153.37	180.56			
128	120.08	133.05	143.59	117.15	116.56	158.68	88.62	120.51	159.96	131.12	145.96			
64	112.60	122.75	111.97	100.94	100.08	100.00	196.66	107.86	130.36	140.22	145.96			
32	117.32	104.29	110.26	96.33	95.28	116.42	71.03	103.98	119.70	131.69	159.89			
16	108.46	100.00	104.27	91.98	87.25	93.28	74.57	115.07	419.16	120.56	150.67			
8	100.20	97.42	85.47	84.04	89.24	96.18	65.99	111.95	111.63	2749.55	148.31			
4	110.04	111.16	86.75	86.60	104.30	119.78	65.17	112.49	439.94	135.73	136.97			
2	109.45	87.98	91.03	86.52	135.18	126.59	109.88	109.80	100.86	145.39	165.28			
1	109.84	97.00	90.60	84.47	129.55	140.95	87.53	118.95	103.01	134.04	152.58			
0.5	109.06	116.31	491.88	93.52	101.57	88.81	71.51	99.35	115.29	130.90	127.30			
0.5% DMSO	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00			



ภาคผนวก ฉ

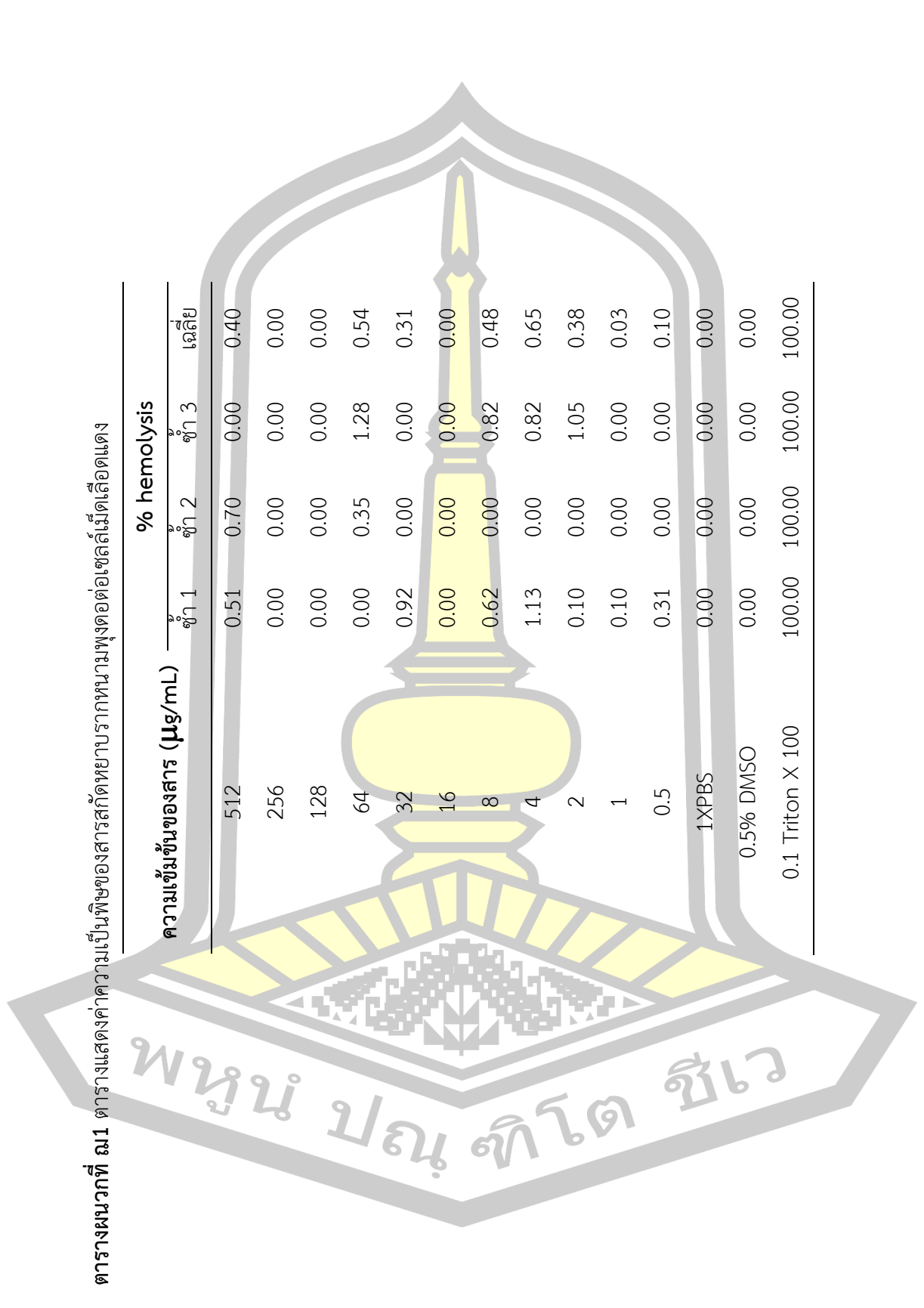
การศึกษาคุณสมบัติการเป็นพิษของสารสกัดหยาบพิชชอบเค็มต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

โดยวิธี hemolysis assay

พูนัน ปณุกิตโต สีเว

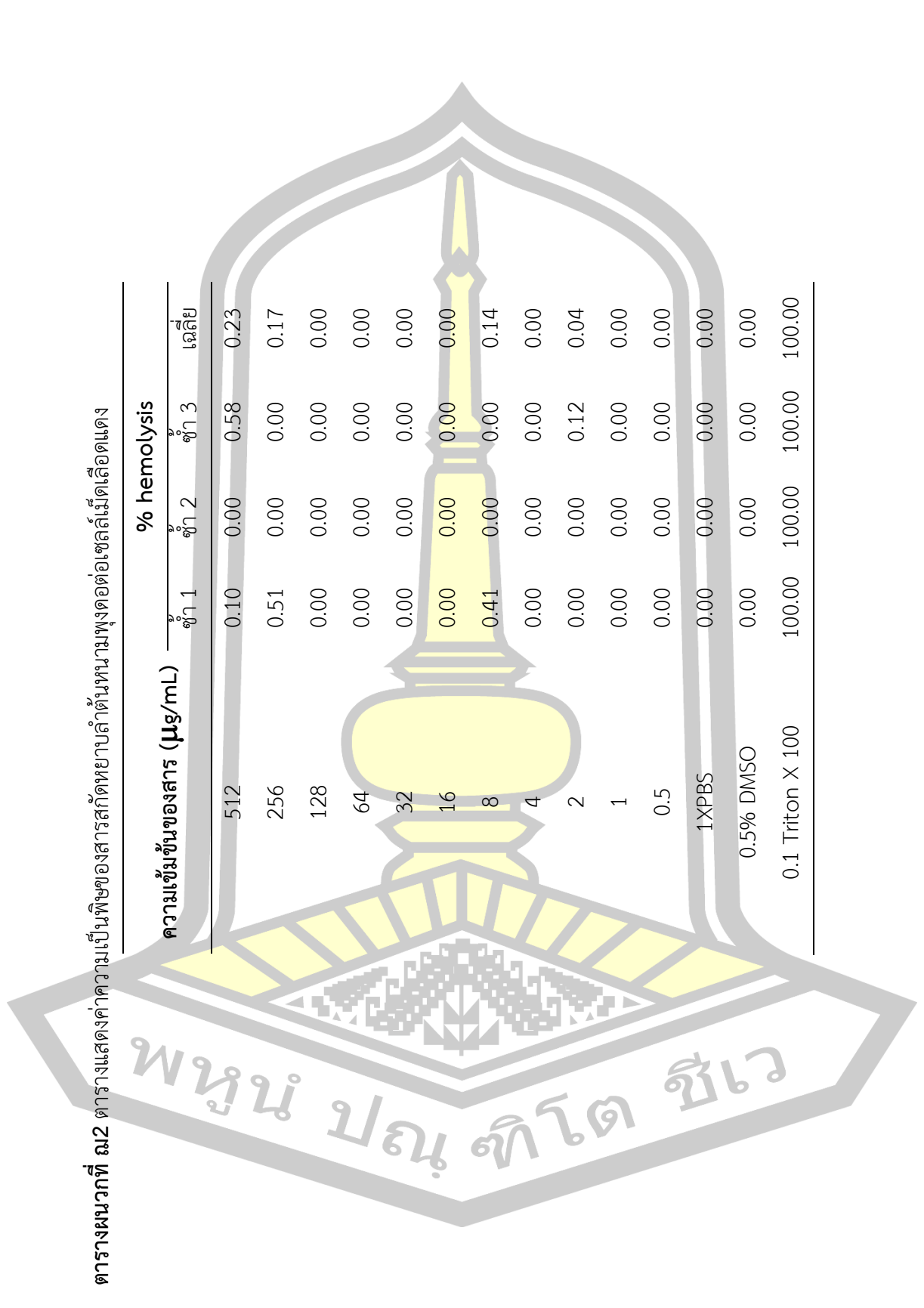
ตารางผนวกที่ ฅ1 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบรากหนมพุงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

	ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)			% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
512	0.51	0.70	0.00	0.40		
256	0.00	0.00	0.00	0.00		
128	0.00	0.00	0.00	0.00		
64	0.00	0.35	1.28	0.54		
32	0.92	0.00	0.00	0.31		
16	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	0.62	0.00	0.82	0.48		
4	1.13	0.00	0.82	0.65		
2	0.10	0.00	1.05	0.38		
1	0.10	0.00	0.00	0.03		
0.5	0.31	0.00	0.00	0.10		
1XPBS	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00	100.00		



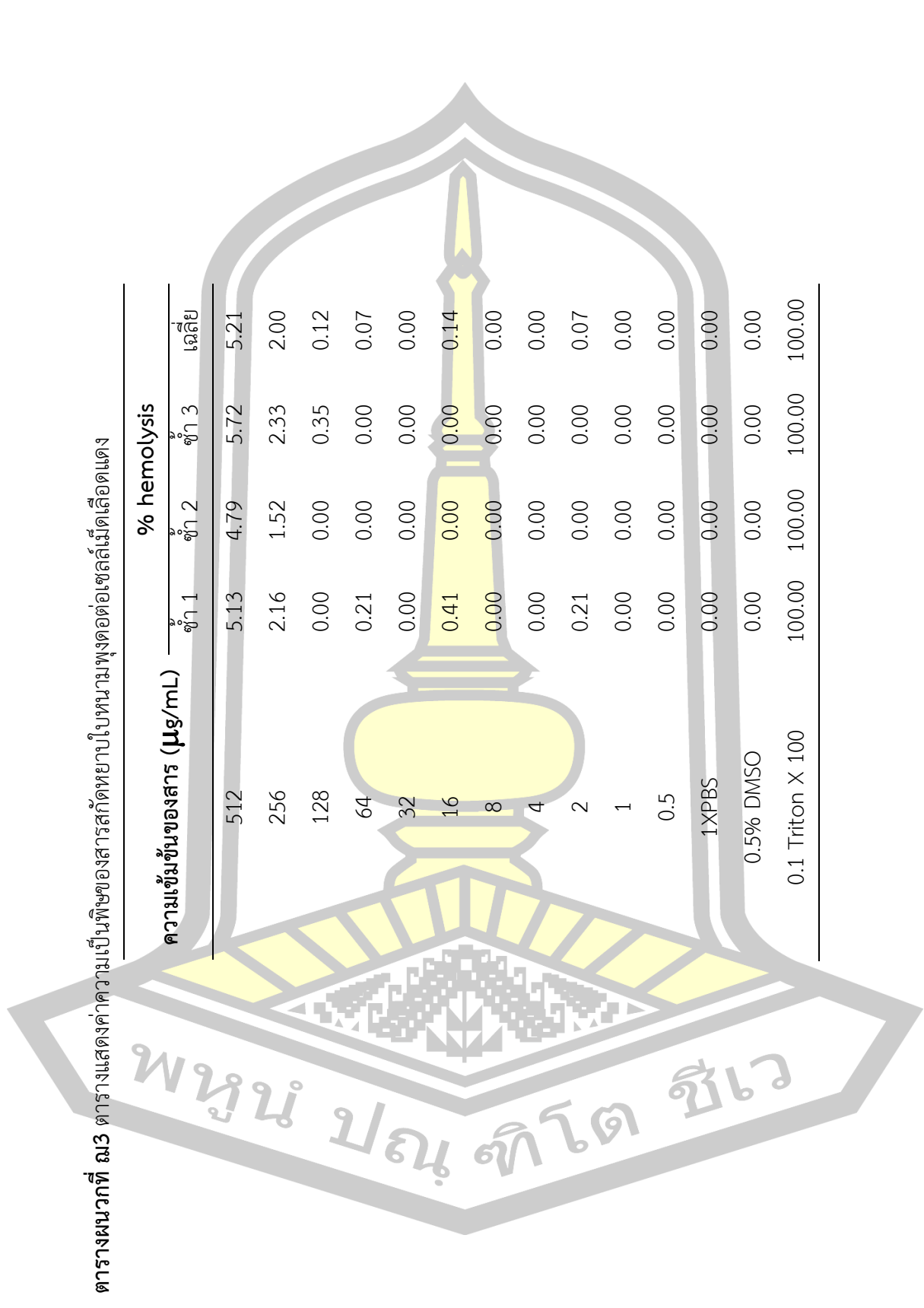
ตารางผนวกที่ ฅ2 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบลำดับต้นหามาถึงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

	ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)			% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
512	0.10	0.00	0.58	0.23		
256	0.51	0.00	0.00	0.17		
128	0.00	0.00	0.00	0.00		
64	0.00	0.00	0.00	0.00		
32	0.00	0.00	0.00	0.00		
16	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	0.41	0.00	0.00	0.14		
4	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	0.00	0.00	0.12	0.04		
1	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.5	0.00	0.00	0.00	0.00		
1XPBS	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00	100.00		



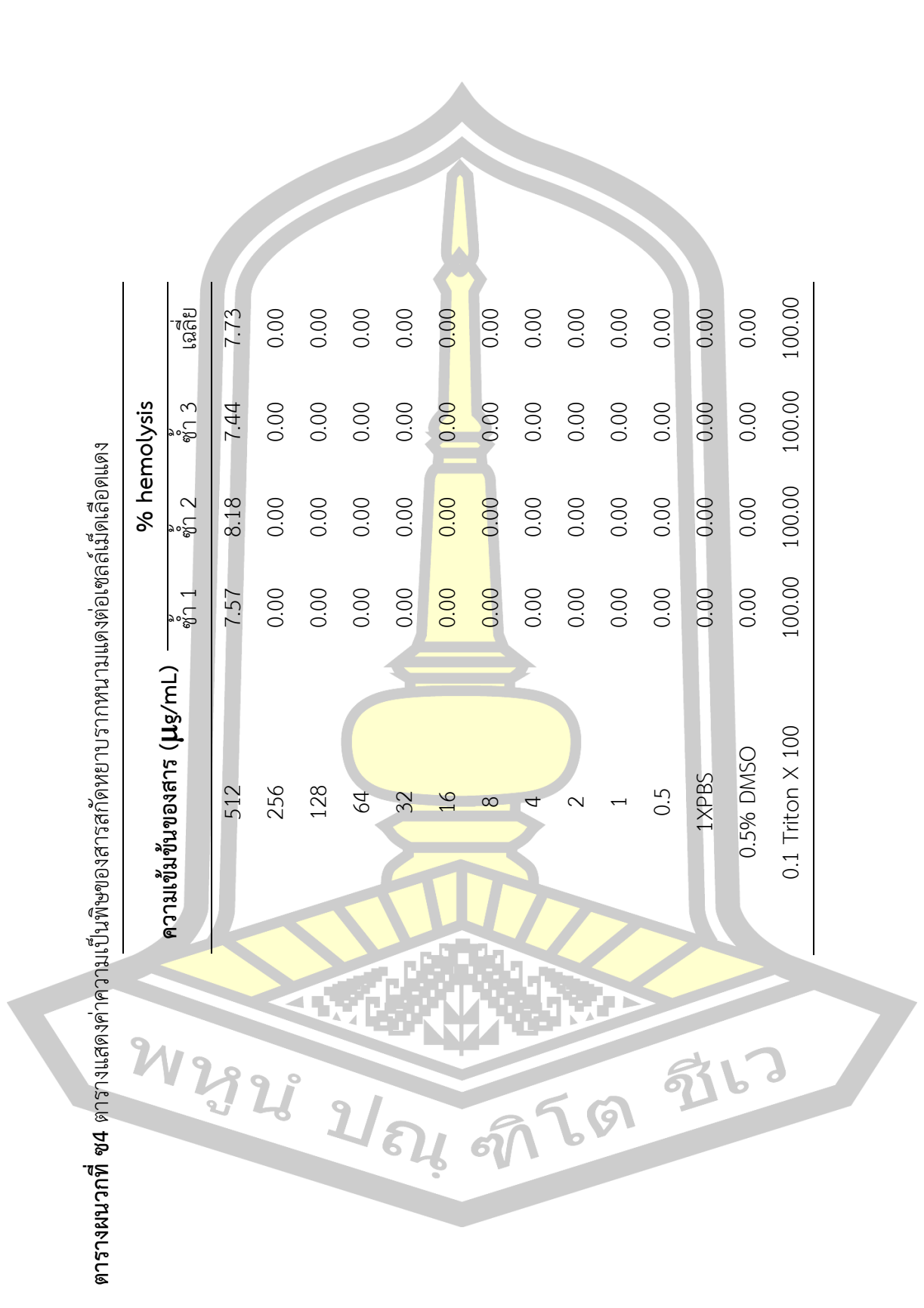
ตารางผนวกที่ ฌ3 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบหนามพุงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
512	5.13	4.79	5.72 5.21
256	2.16	1.52	2.33 2.00
128	0.00	0.00	0.35 0.12
64	0.21	0.00	0.00 0.07
32	0.00	0.00	0.00 0.00
16	0.41	0.00	0.00 0.14
8	0.00	0.00	0.00 0.00
4	0.00	0.00	0.00 0.00
2	0.21	0.00	0.00 0.07
1	0.00	0.00	0.00 0.00
0.5	0.00	0.00	0.00 0.00
1XPBS	0.00	0.00	0.00 0.00
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00 0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00 100.00



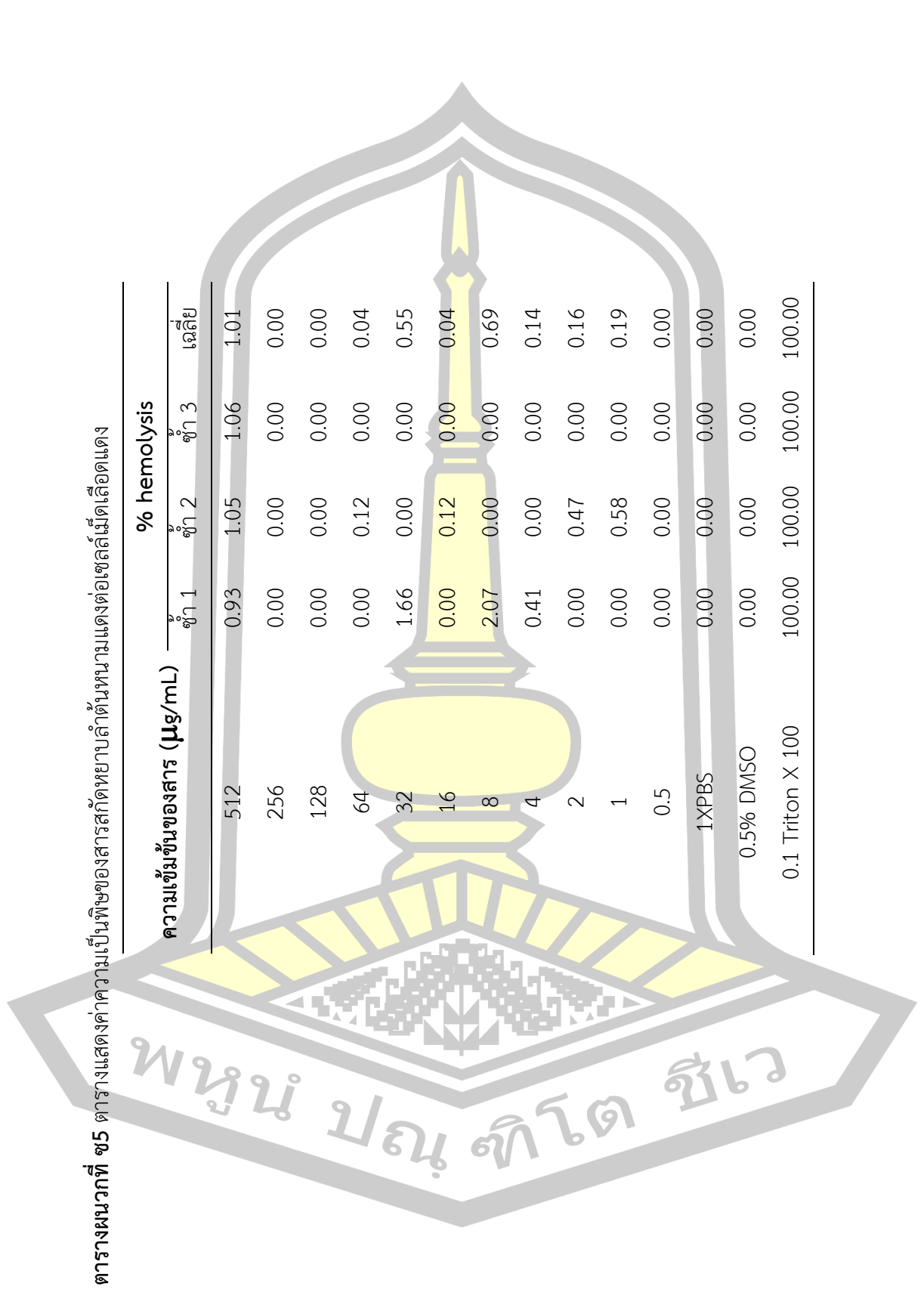
ตารางผนวกที่ ๗4 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบรากหนามแดงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
512	7.57	8.18	7.44
256	0.00	0.00	0.00
128	0.00	0.00	0.00
64	0.00	0.00	0.00
32	0.00	0.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00
8	0.00	0.00	0.00
4	0.00	0.00	0.00
2	0.00	0.00	0.00
1	0.00	0.00	0.00
0.5	0.00	0.00	0.00
1XPBS	0.00	0.00	0.00
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00



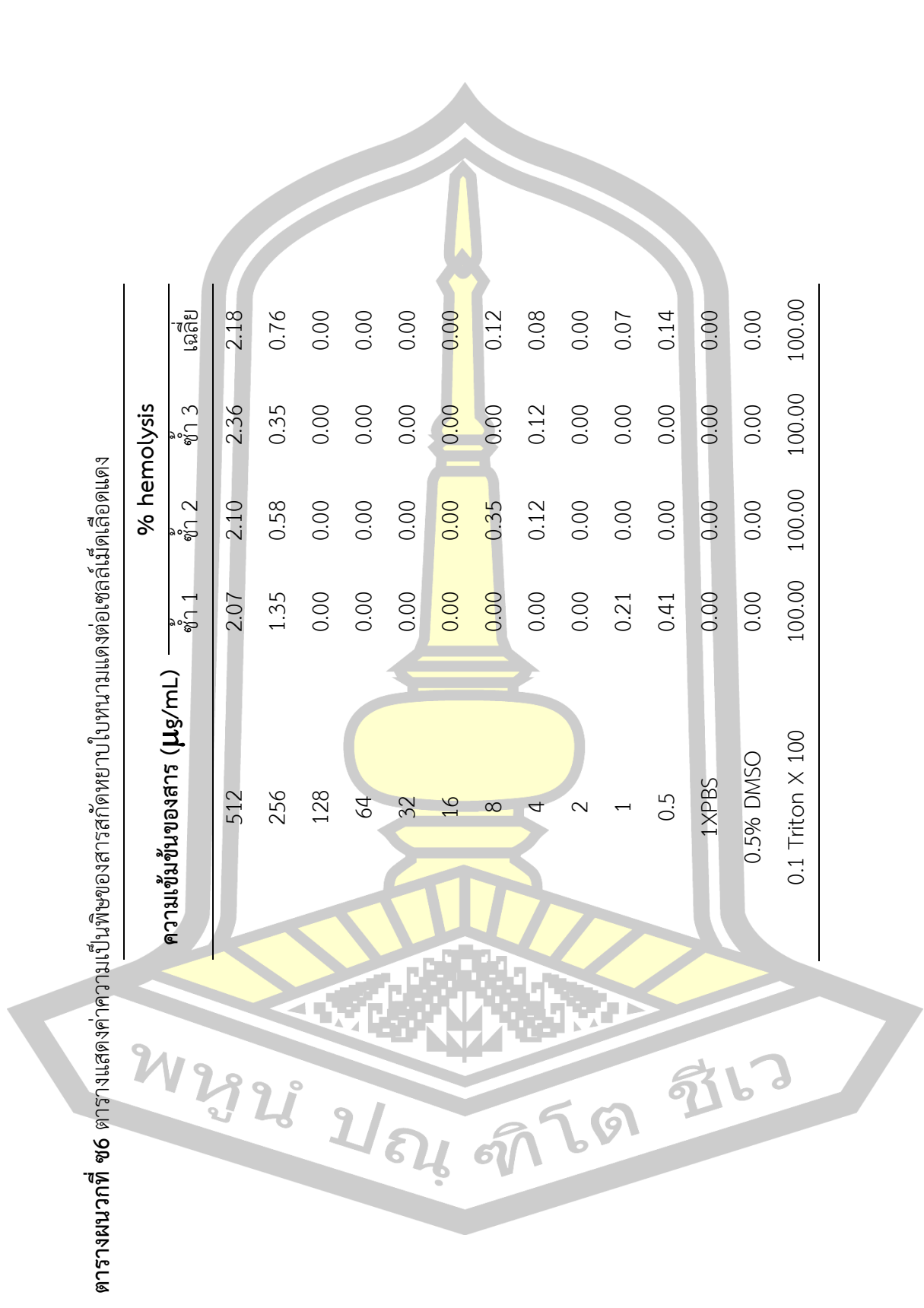
ตารางผนวกที่ ๕5 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบลำต้นหนามแดงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
512	0.93	1.05	1.06
256	0.00	0.00	0.00
128	0.00	0.00	0.00
64	0.00	0.12	0.04
32	1.66	0.00	0.55
16	0.00	0.12	0.04
8	2.07	0.00	0.69
4	0.41	0.00	0.14
2	0.00	0.47	0.16
1	0.00	0.58	0.19
0.5	0.00	0.00	0.00
1XPBS	0.00	0.00	0.00
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00



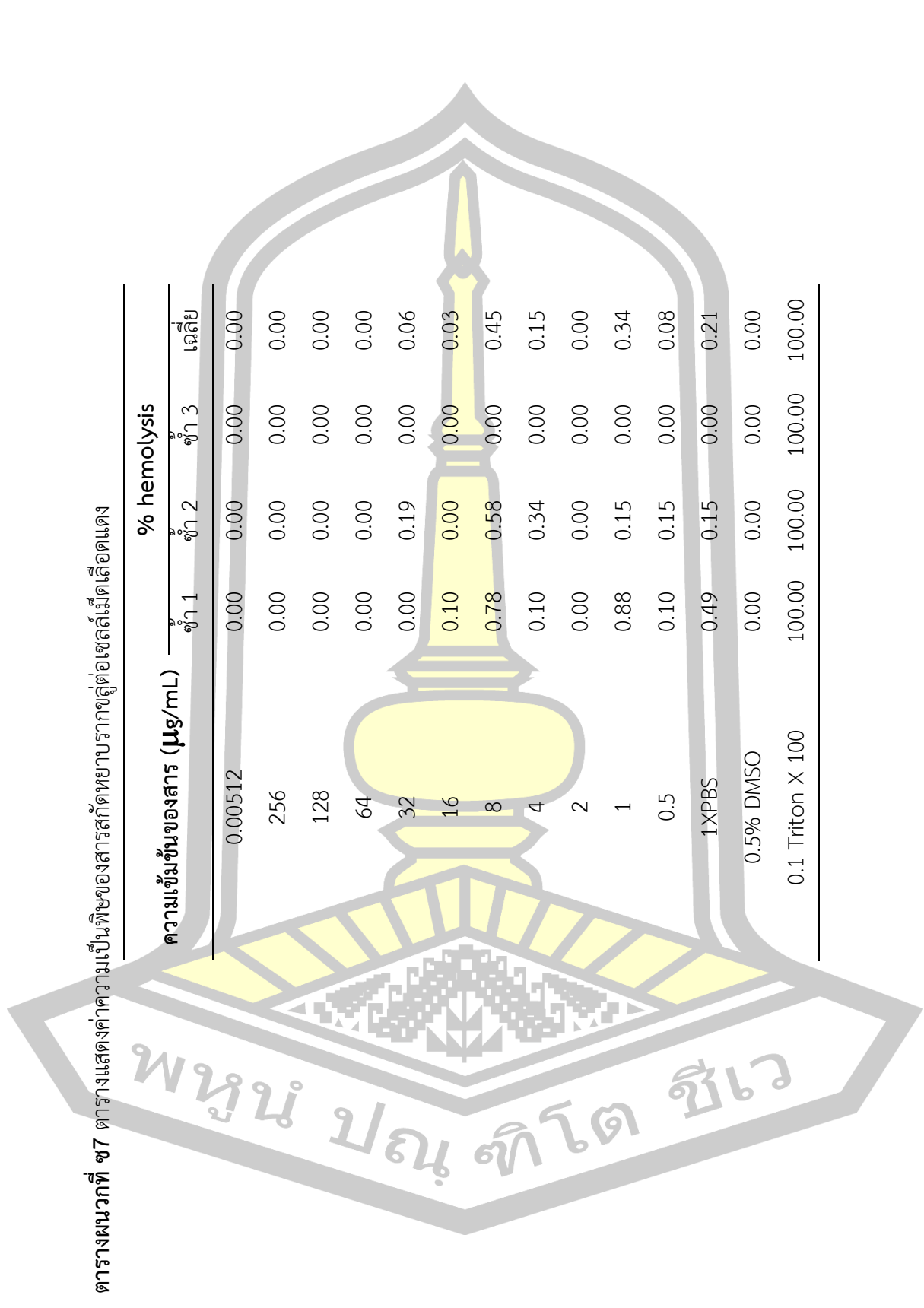
ตารางผนวกที่ ๖6 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบหนามแดงต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
512	2.07	2.10	2.36 2.18
256	1.35	0.58	0.35 0.76
128	0.00	0.00	0.00 0.00
64	0.00	0.00	0.00 0.00
32	0.00	0.00	0.00 0.00
16	0.00	0.00	0.00 0.00
8	0.00	0.35	0.00 0.12
4	0.00	0.12	0.12 0.08
2	0.00	0.00	0.00 0.00
1	0.21	0.00	0.00 0.07
0.5	0.41	0.00	0.00 0.14
1XPBS	0.00	0.00	0.00 0.00
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00 0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00 100.00



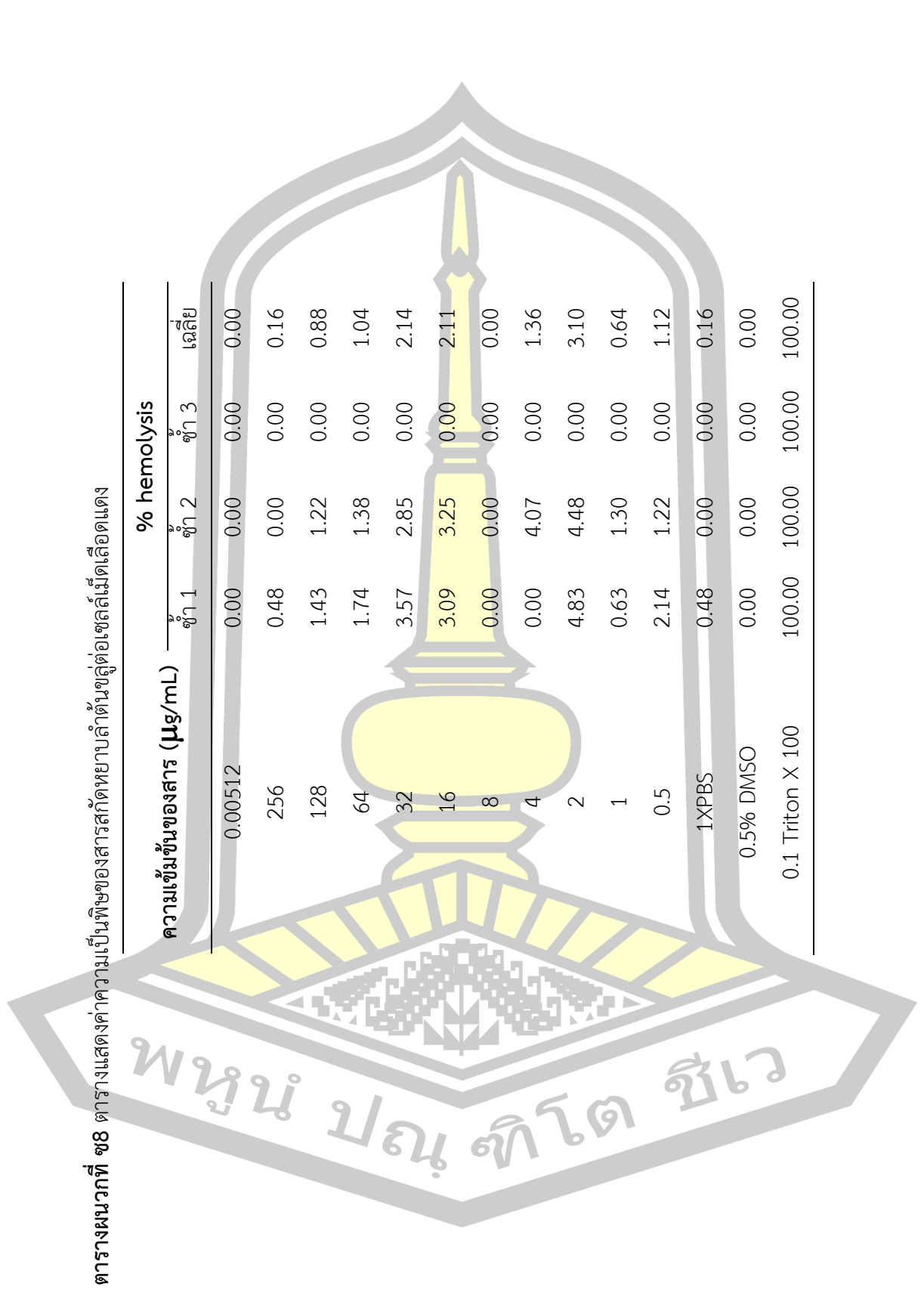
ตารางผนวกที่ ๗7 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบรากขลุ่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
0.00512	0.00	0.00	0.00
256	0.00	0.00	0.00
128	0.00	0.00	0.00
64	0.00	0.00	0.00
32	0.00	0.19	0.06
16	0.10	0.00	0.03
8	0.78	0.58	0.45
4	0.10	0.34	0.15
2	0.00	0.00	0.00
1	0.88	0.15	0.34
0.5	0.10	0.15	0.08
1XPBS	0.49	0.15	0.21
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00



ตารางผนวกที่ ๗8 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบลำดับชั้นต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
0.00512	0.00	0.00	0.00
256	0.48	0.00	0.16
128	1.43	1.22	0.88
64	1.74	1.38	1.04
32	3.57	2.85	2.14
16	3.09	3.25	2.11
8	0.00	0.00	0.00
4	0.00	4.07	1.36
2	4.83	4.48	3.10
1	0.63	1.30	0.64
0.5	2.14	1.22	1.12
1XPBS	0.48	0.00	0.16
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00



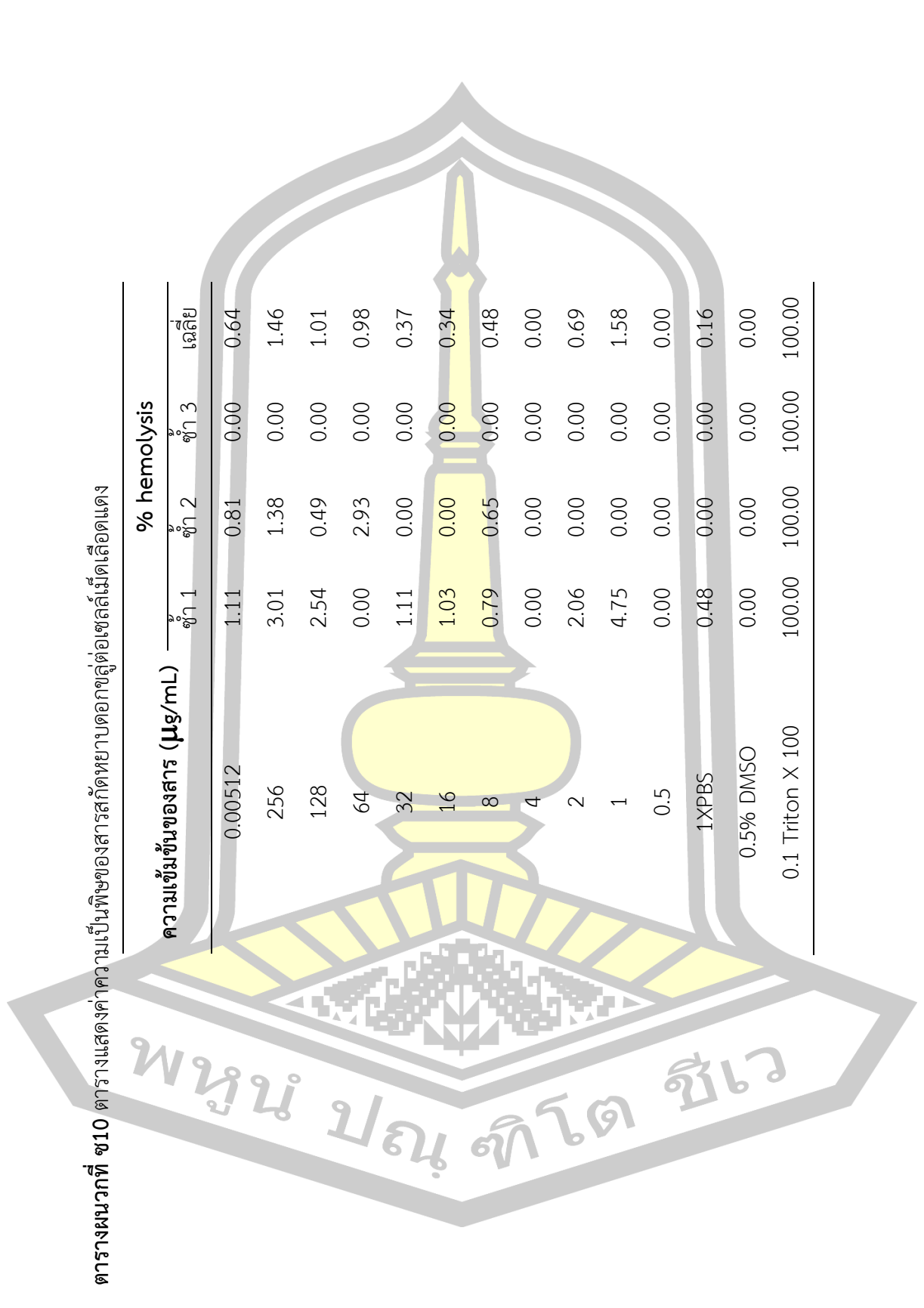
ตารางผนวกที่ ๑๑ ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบใบขลุ่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

ความเข้มข้นของสาร ($\mu\text{g/mL}$)	% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
0.00512	0.00	0.00	0.00
256	0.00	0.49	0.16
128	0.00	0.00	0.00
64	0.00	0.00	0.00
32	0.00	0.00	0.00
16	0.00	0.00	0.00
8	0.16	0.00	0.05
4	0.16	0.00	0.05
2	0.00	0.00	0.01
1	0.24	0.00	0.08
0.5	0.00	0.00	0.13
1XPBS	0.48	0.00	0.16
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00

พหุ ประถมศึกษา

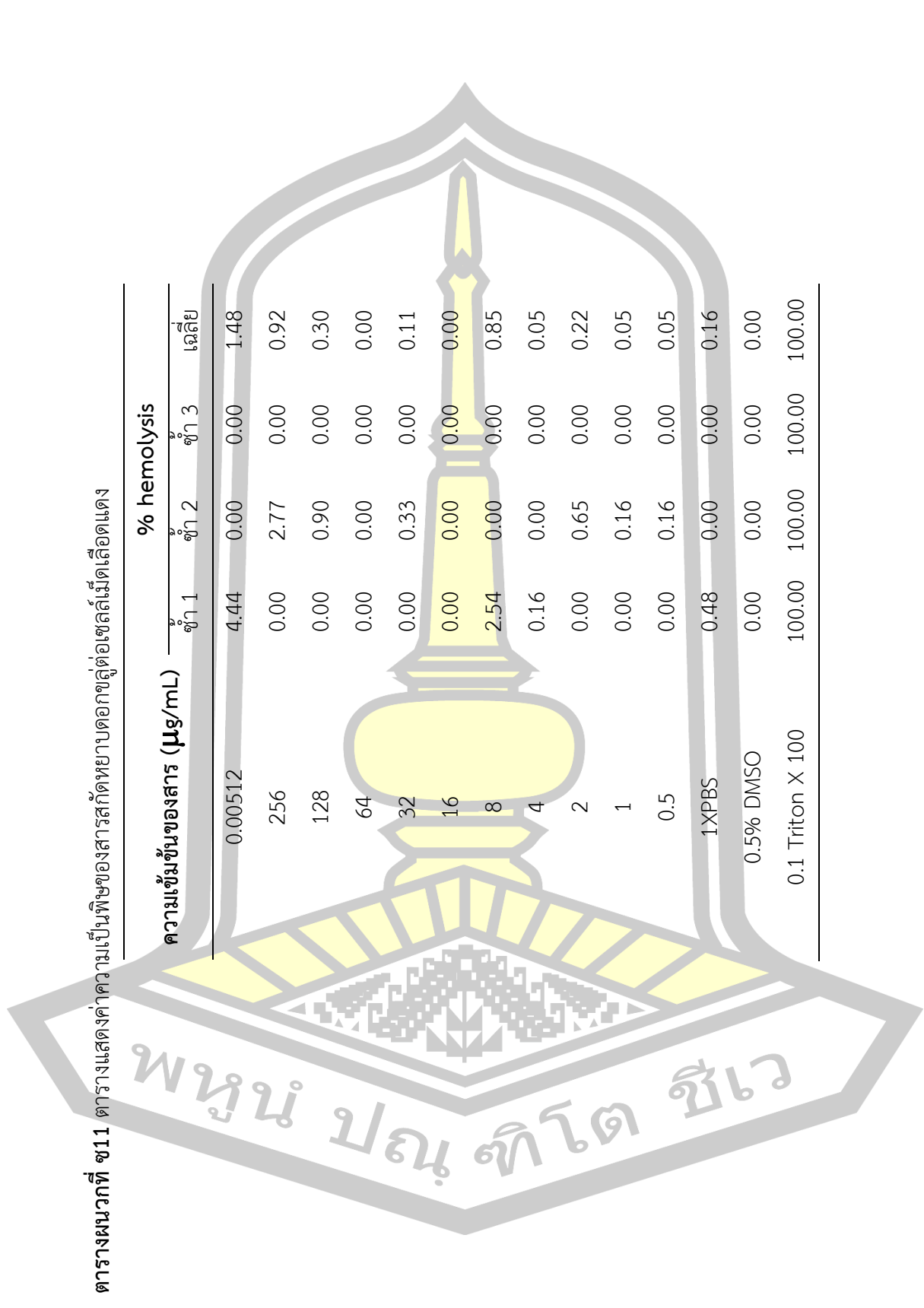
ตารางผนวกที่ 10 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบดอกขลุ่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

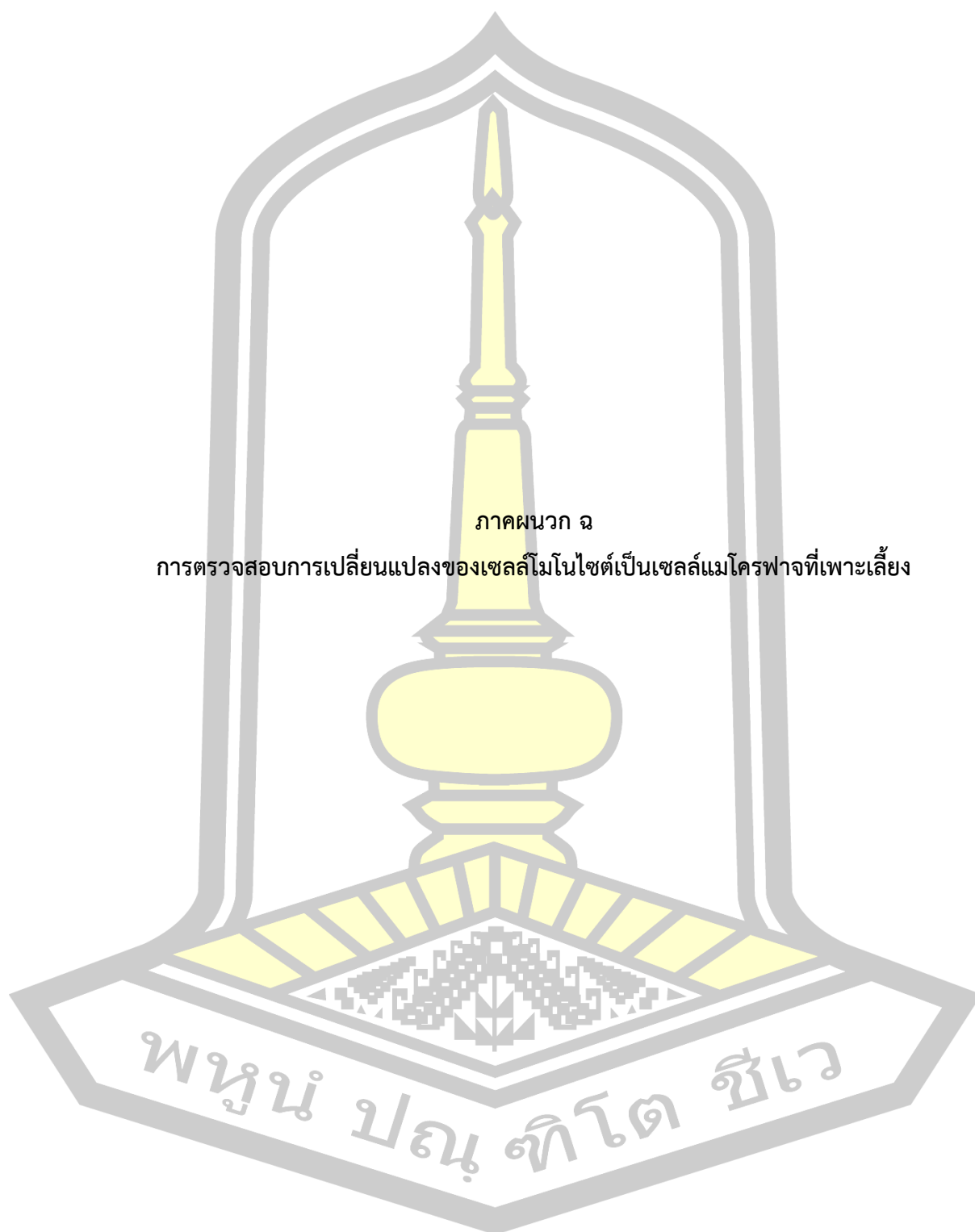
	ความเข้มข้นของสาร (µg/mL)			% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
0.00512	1.11	0.81	0.00	0.64		
256	3.01	1.38	0.00	1.46		
128	2.54	0.49	0.00	1.01		
64	0.00	2.93	0.00	0.98		
32	1.11	0.00	0.00	0.37		
16	1.03	0.00	0.00	0.34		
8	0.79	0.65	0.00	0.48		
4	0.00	0.00	0.00	0.00		
2	2.06	0.00	0.00	0.69		
1	4.75	0.00	0.00	1.58		
0.5	0.00	0.00	0.00	0.00		
1XPBS	0.48	0.00	0.00	0.16		
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00	100.00		



ตารางผนวกที่ 11 ตารางแสดงค่าความเป็นพิษของสารสกัดหยาบดอกขลุ่ยต่อเซลล์เม็ดเลือดแดง

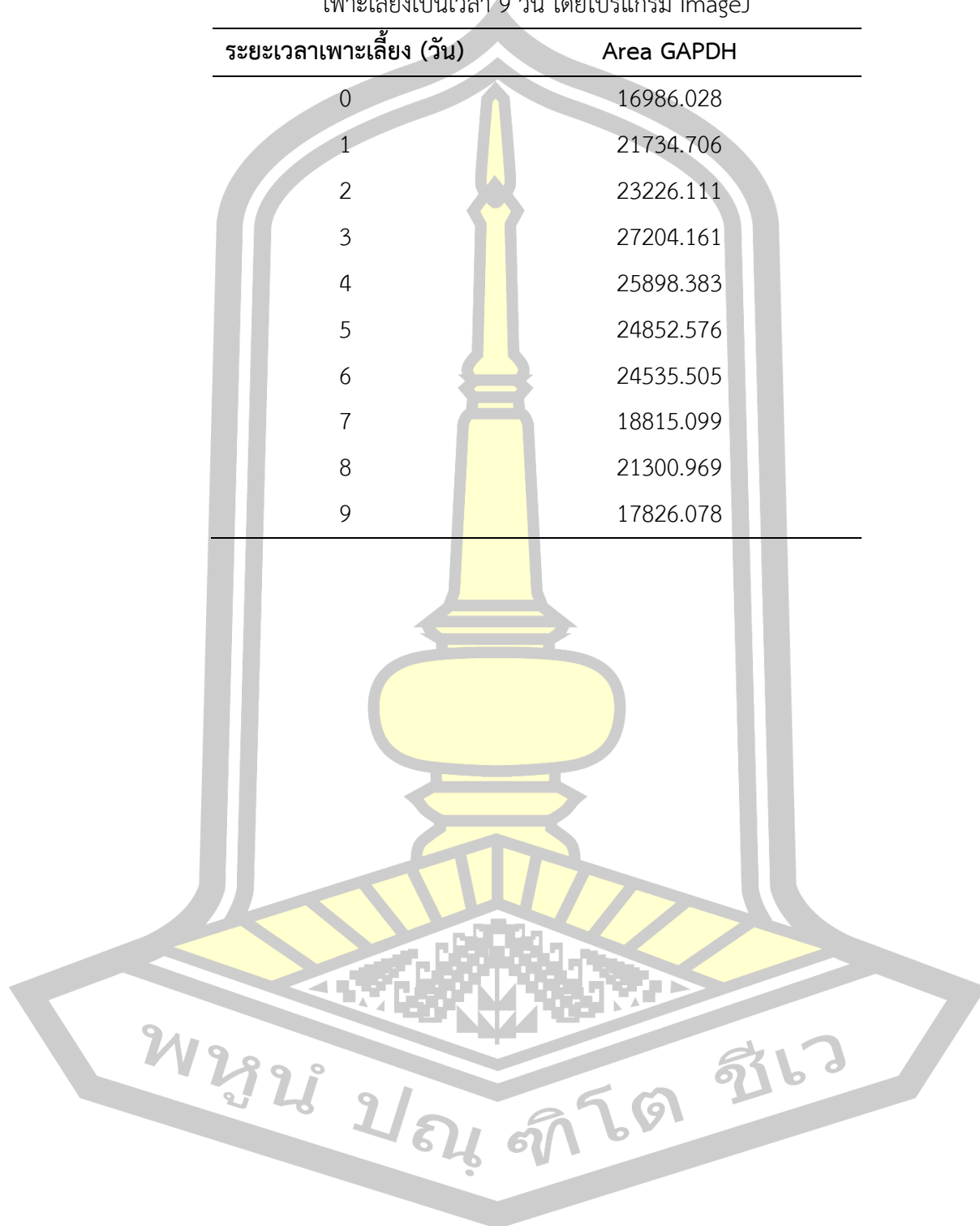
	ความเข้มข้นของสาร ($\mu\text{g/mL}$)			% hemolysis		
	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย	ซ้ำ 1	ซ้ำ 2	ซ้ำ 3 เฉลี่ย
0.00512	4.44	0.00	0.00	1.48		
256	0.00	2.77	0.00	0.92		
128	0.00	0.90	0.00	0.30		
64	0.00	0.00	0.00	0.00		
32	0.00	0.33	0.00	0.11		
16	0.00	0.00	0.00	0.00		
8	2.54	0.00	0.00	0.85		
4	0.16	0.00	0.00	0.05		
2	0.00	0.65	0.00	0.22		
1	0.00	0.16	0.00	0.05		
0.5	0.00	0.16	0.00	0.05		
1XPBS	0.48	0.00	0.00	0.16		
0.5% DMSO	0.00	0.00	0.00	0.00		
0.1 Triton X 100	100.00	100.00	100.00	100.00		





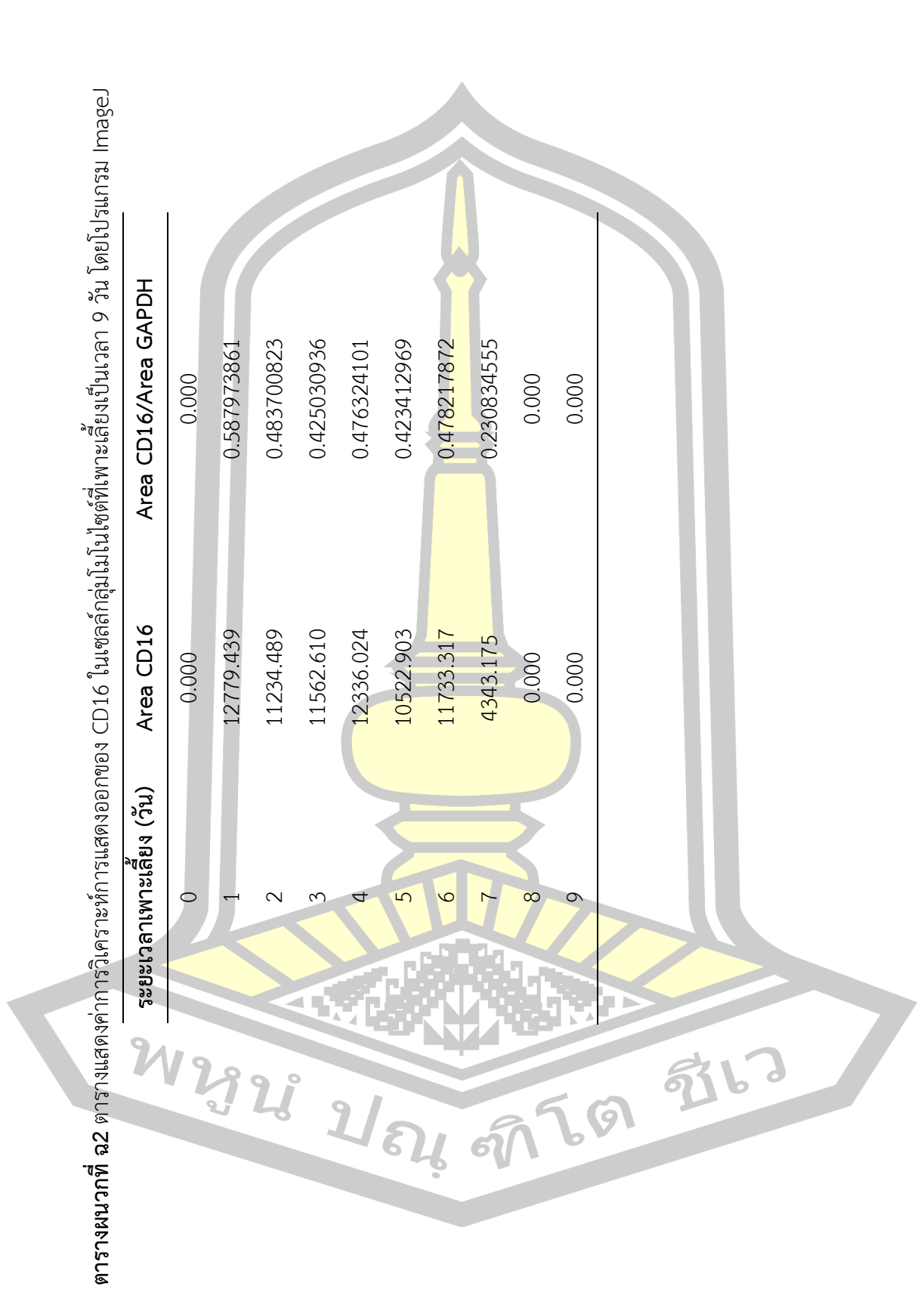
ตารางผนวกที่ ๑1 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงออกของ GAPDH ในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน โดยโปรแกรม ImageJ

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	Area GAPDH
0	16986.028
1	21734.706
2	23226.111
3	27204.161
4	25898.383
5	24852.576
6	24535.505
7	18815.099
8	21300.969
9	17826.078



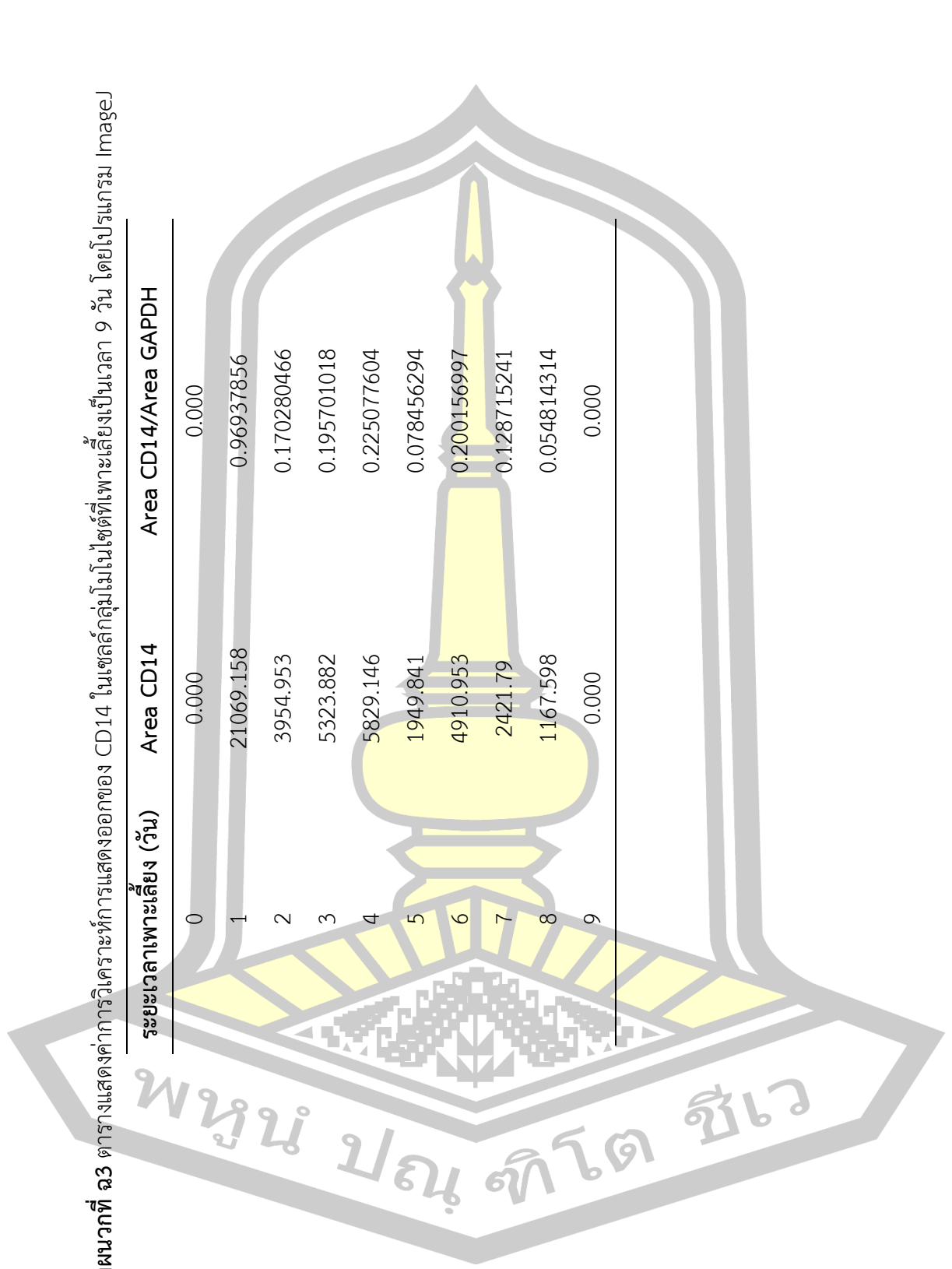
ตารางผนวกที่ ๑2 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงผลออกของ CD16 ในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน โดยโปรแกรม ImageJ

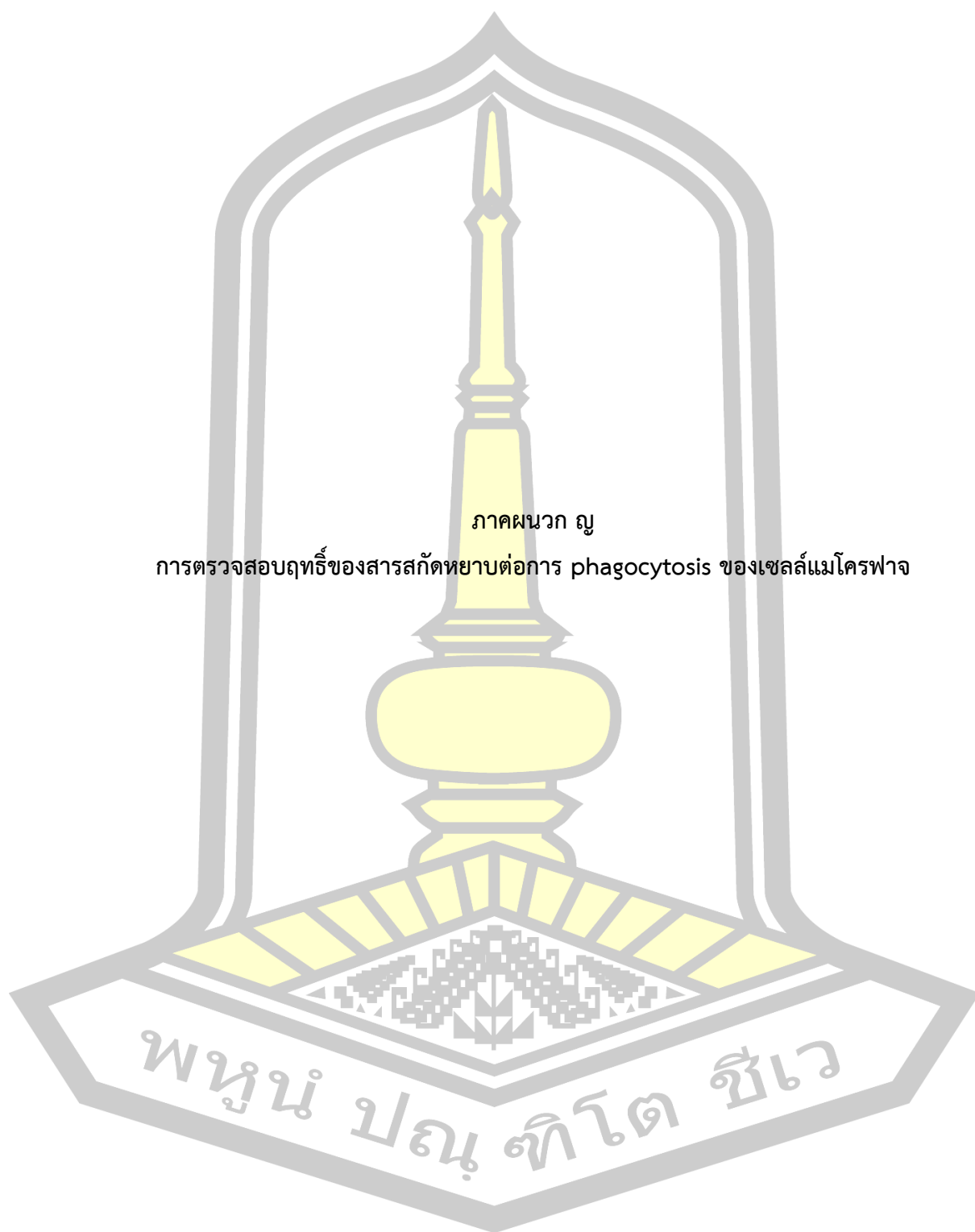
ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	Area CD16	Area CD16/Area GAPDH
0	0.000	0.000
1	12779.439	0.587973861
2	11234.489	0.483700823
3	11562.610	0.425030936
4	12336.024	0.476324101
5	10522.903	0.423412969
6	11733.317	0.478217872
7	4343.175	0.230834555
8	0.000	0.000
9	0.000	0.000



ตารางผนวกที่ ๓3 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงผลออกของ CD14 ในเซลล์กลุ่มโมโนไซต์ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 9 วัน โดยโปรแกรม ImageJ

ระยะเวลาเพาะเลี้ยง (วัน)	Area CD14	Area CD14/Area GAPDH
0	0.000	0.000
1	21069.158	0.96937856
2	3954.953	0.170280466
3	5323.882	0.195701018
4	5829.146	0.225077604
5	1949.841	0.078456294
6	4910.953	0.200156997
7	2421.79	0.128715241
8	1167.598	0.054814314
9	0.000	0.000





ภาคผนวก ญ

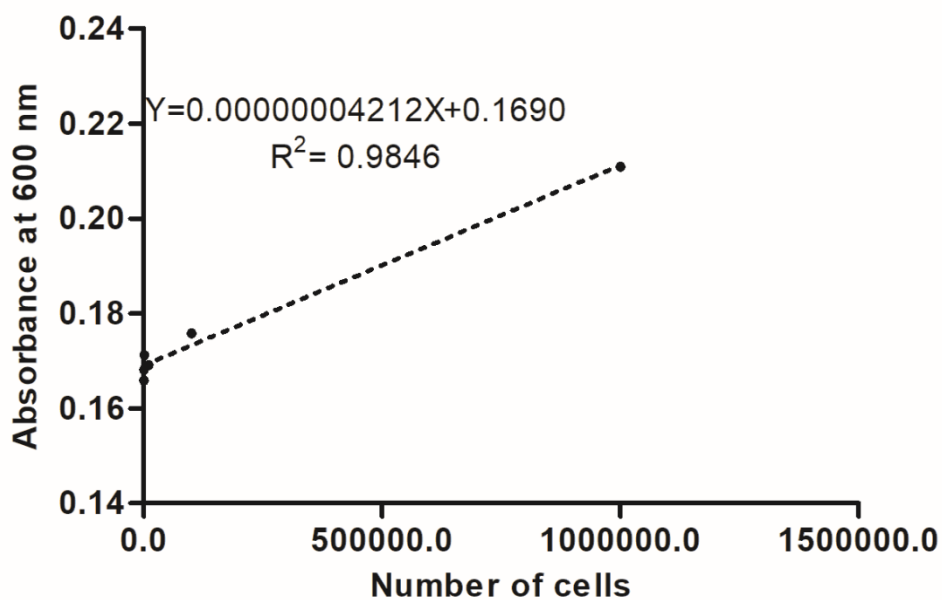
การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาบต่อการ phagocytosis ของเซลล์แมโครฟาจ

พหุณฺ์ ปณฺุ ทักิตฺ์ สีเว

ตารางผนวกที่ ๑๑ ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จำนวนเซลล์/well	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	ODเฉลี่ย	SD
1×10 ⁷	0.2276	0.2268	0.2268	0.2271	0.0005
1×10 ⁶	0.2111	0.2107	0.2108	0.2109	0.0002
1×10 ⁵	0.1753	0.1761	0.1760	0.1758	0.0004
1×10 ⁴	0.1700	0.1693	0.1681	0.1691	0.0010
1×10 ³	0.1717	0.1710	0.1710	0.1712	0.0004
1×10 ²	0.1683	0.1681	0.1680	0.1681	0.0002
1×10 ¹	0.1645	0.1648	0.1627	0.1640	0.0011
1×10 ⁰	0.1675	0.1668	0.1635	0.1659	0.0021
0	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001

S. aureus DMST 8840

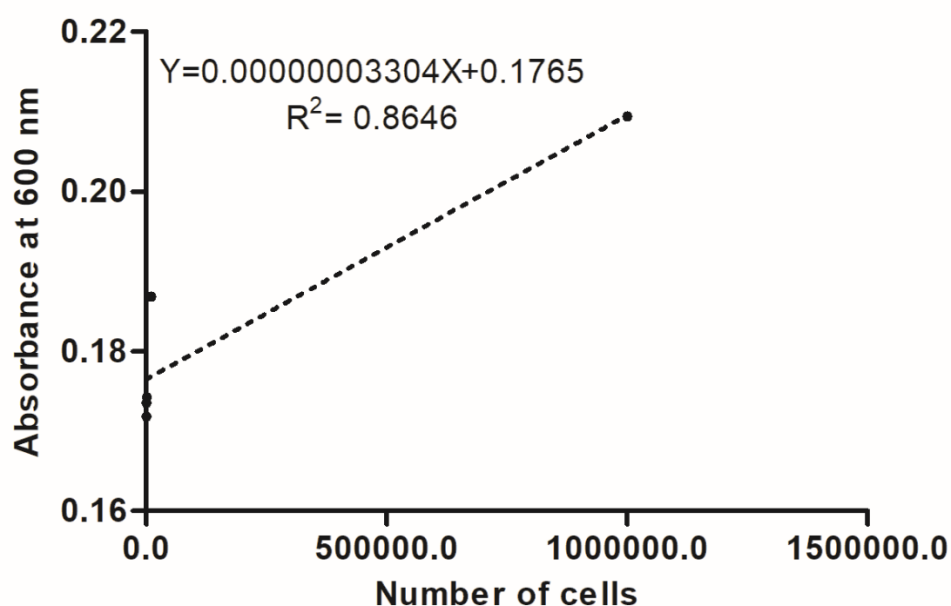


ภาพผนวกที่ ๑๑ กราฟมาตรฐานแบคทีเรีย *S. aureus* DMST 8840 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ๒ ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของแบคทีเรีย *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จำนวนเซลล์/well	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	ODเฉลี่ย	SD
1×10 ⁷	0.2103	0.2100	0.2097	0.2100	0.0003
1×10 ⁶	0.2095	0.2093	0.2093	0.2094	0.0001
1×10 ⁵	0.1865	0.1862	0.1860	0.0000	0.0003
1×10 ⁴	0.1875	0.1867	0.1861	0.1868	0.0007
1×10 ³	0.1790	0.1660	0.1777	0.1742	0.0072
1×10 ²	0.1741	0.1736	0.1730	0.1735	0.0006
1×10 ¹	0.1725	0.1723	0.1706	0.1718	0.0010
1×10 ⁰	0.1717	0.1725	0.1711	0.1718	0.0007
0	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001

S. aureus (MRSA) DMST 20654

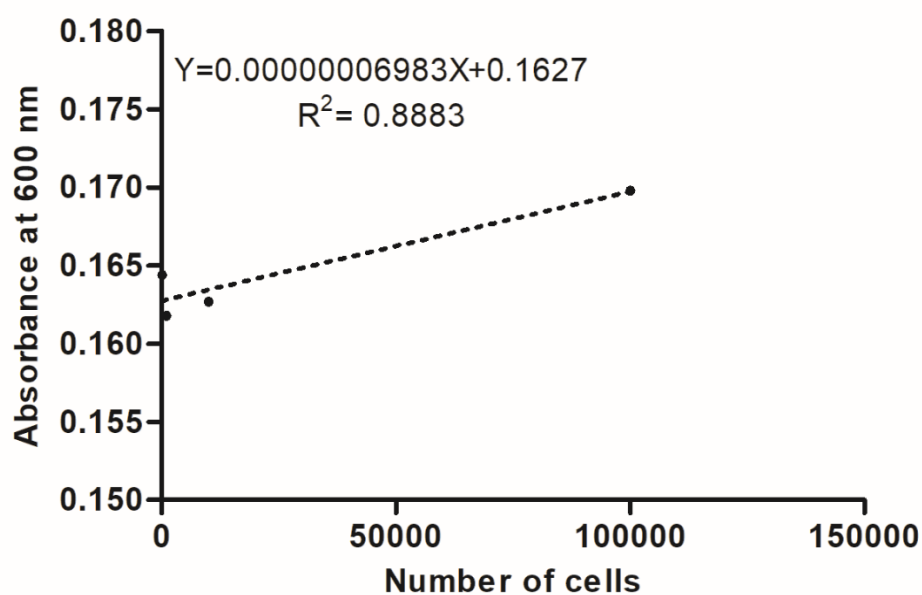


ภาพผนวกที่ ๒ กราฟมาตรฐานแบคทีเรีย *S. aureus* (MRSA) DMST 20654 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ๓ ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จำนวนเซลล์/well	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	ODเฉลี่ย	SD
1×10 ⁷	0.1891	0.1887	0.1887	0.1889	0.0002
1×10 ⁶	0.1680	0.1677	0.1677	0.1678	0.0002
1×10 ⁵	0.1703	0.1692	0.1692	0.1698	0.0006
1×10 ⁴	0.1631	0.1623	0.1623	0.1627	0.0005
1×10 ³	0.1622	0.1613	0.1613	0.1618	0.0005
1×10 ²	0.1652	0.1636	0.1636	0.1644	0.0009
1×10 ¹	0.1666	0.1640	0.1640	0.1647	0.0015
1×10 ⁰	0.1175	0.1175	0.1175	0.1330	0.0000
0	0.0001	0.0000	0.0000	0.0000	0.0001

E. coli ATCC 25922



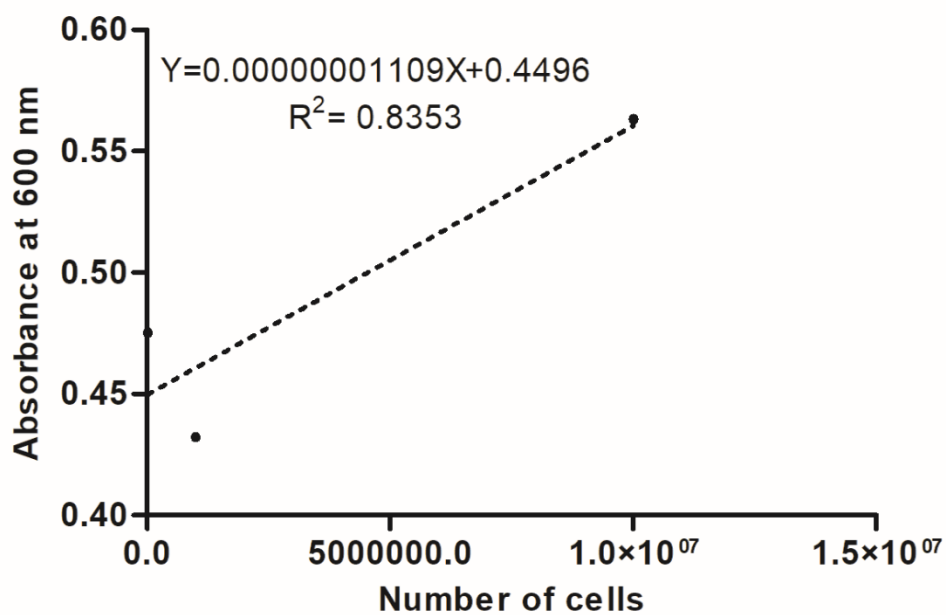
ภาพผนวกที่ ๓ กราฟมาตรฐานแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

ตารางผนวกที่ ๔ ตารางแสดงค่าดูดกลืนแสงที่ 600 nm ของแบคทีเรีย *S. Typhimurium* TISTR 2511 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

จำนวนเซลล์/well	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	OD _{600 nm}	ODเฉลี่ย	SD
1×10 ⁷	0.5613	0.5633	0.5653	0.5633	0.0020

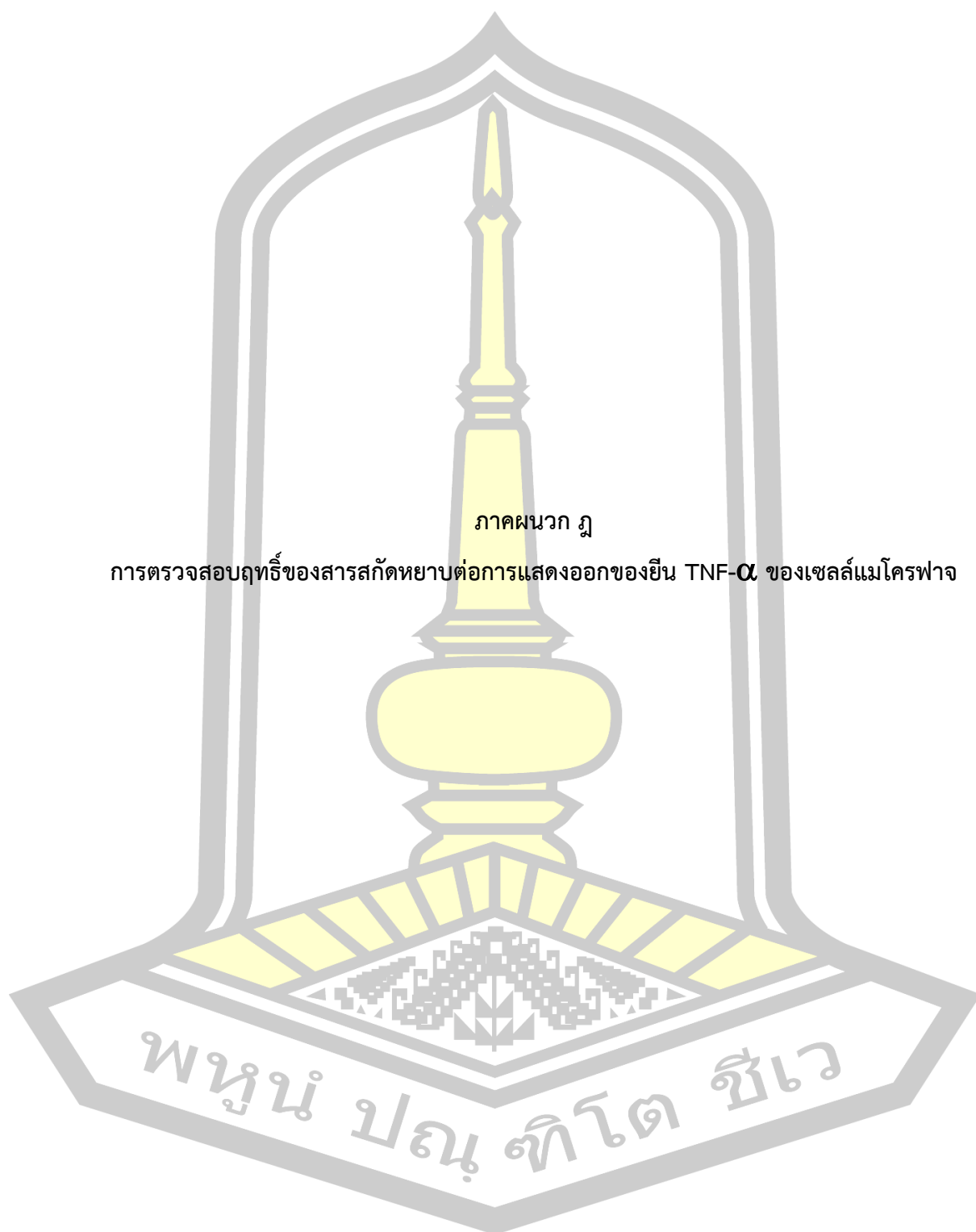
1×10^6	0.4313	0.4323	0.4333	0.4323	0.0010
1×10^5	0.5613	0.5633	0.5643	0.5630	0.0015
1×10^4	0.4753	0.4763	0.4743	0.4753	0.0010
1×10^3	0.6423	0.6433	0.6453	0.6437	0.0015
1×10^2	0.7213	0.7223	0.7233	0.7223	0.0010
1×10^1	0.6543	0.6553	0.6553	0.6550	0.0006
1×10^0	0.6193	0.6193	0.6203	0.6197	0.0006
0	0.0003	0.0003	0.0003	0.0003	0.0000

S. Typhimurium TISTR 2511



ภาพผนวกที่ ๓ กราฟมาตรฐานแบคทีเรีย *E. coli* ATCC 25922 ที่เพาะเลี้ยงเป็นเวลา 24 ชั่วโมง

พหุ ประถมศึกษา



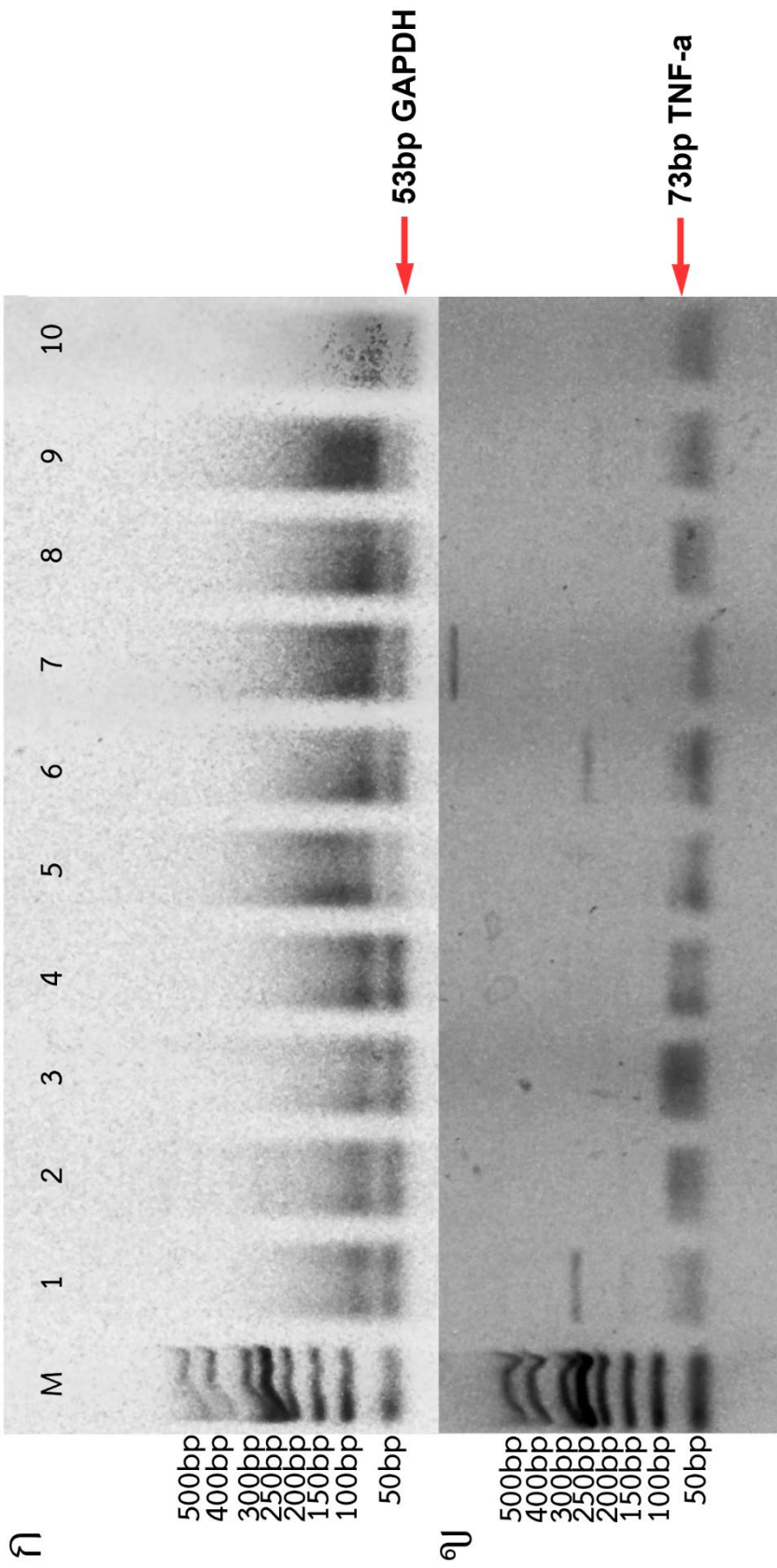
ภาคผนวก ฎ

การตรวจสอบฤทธิ์ของสารสกัดหยาดต่อการแสดงออกของยีน TNF- α ของเซลล์แมโครฟาจ

พหุณฺ์ ปณฺุ ทิโต สีเว

ตารางผนวกที่ 1 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจของกลุ่ม control โดยโปรแกรม ImageJ

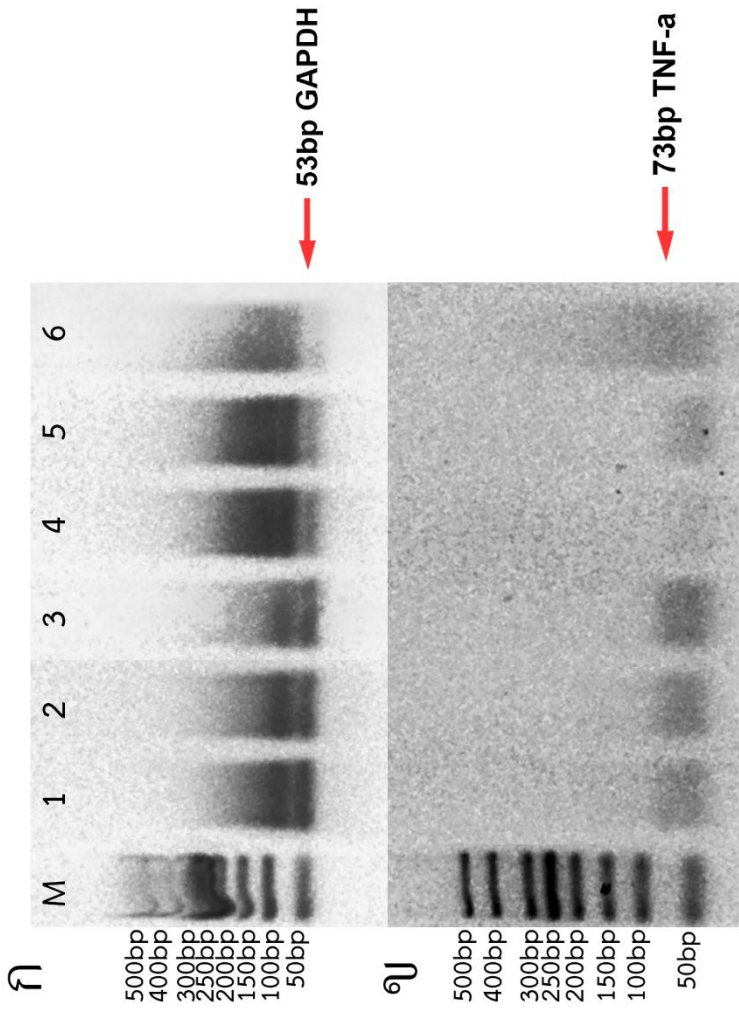
ตัวอย่าง	Area GAPDH _{เฉลี่ย}	Area TNF- α _{เฉลี่ย}	Area TNF- α /Area GAPDH _{เฉลี่ย}
10 ng/mL LPS	4341.5410	11583.8545	2.675992923
10 ng/mL IFN- γ	8756.8420	23507.4735	2.699500651
10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ	9249.1305	33644.929	3.794901383
2 ng/mL IL-4	9037.6300	26915.5905	2.983702163
Negative	5303.5365	15528.3505	3.288255294
10 ng/mL LPS	6405.1640	23186.0695	3.626262429
10 ng/mL IFN- γ	5352.3330	24317.3475	4.669261443
10 ng/mL LPS+10 ng/mL IFN- γ	4163.8440	20068.4985	4.75092689
2 ng/mL IL-4	3391.7625	19754.321	6.540483129
Negative+ H ₂ O ₂	5832.2705	23546.473	4.278394629



ภาพผนวกที่ ๑1 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจของกลุ่ม control ได้แก่ LPS (1) IFN- γ (2) LPS+ IFN- γ (3) IL-4 (4) 1XPBS (5) LPS+H₂O₂ (6) IFN- γ +H₂O₂ (7) LPS+ IFN- γ +H₂O₂ (8) IL-4+H₂O₂ (9) 1XPBS+H₂O₂ (10) โดย M คือ Marker (500bp)

ตารางผนวกที่ ๒ ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงออกของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจของกลุ่ม control ของสารสกัดและกลุ่มที่ยับยั้งด้วย MAPK inhibitor โดยโปรแกรม ImageJ

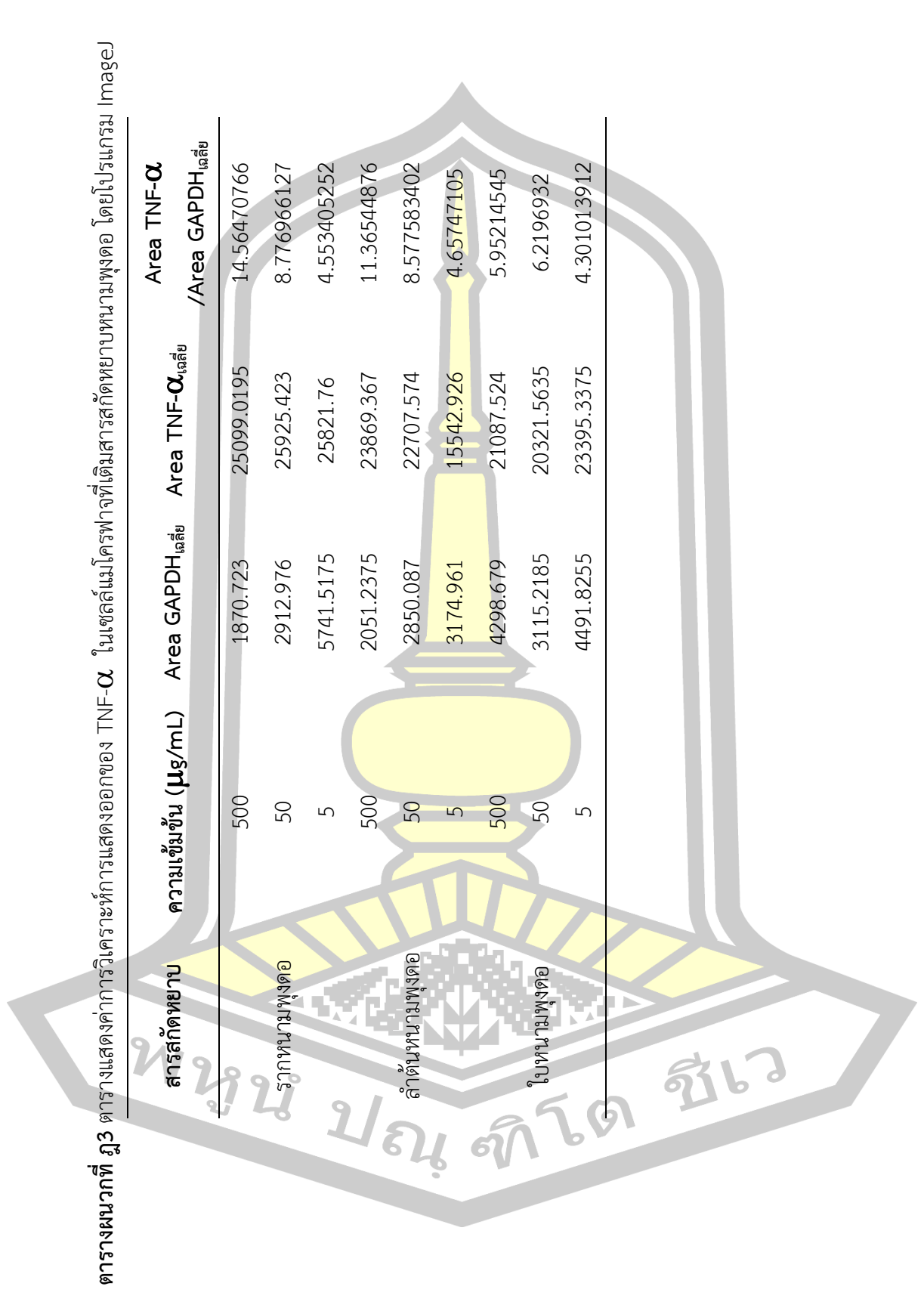
ตัวอย่าง	Area GAPDH _{เฉลี่ย}	Area TNF- α _{เฉลี่ย}	Area TNF- α / Area GAPDH _{เฉลี่ย}
20 μ M Quercetin	6571.0385	3.510082357	3.245298391
300 μ M Ascorbic acid	5717.2705	3.650167901	4.279618675
10 μ M ERK inhibitor PD98059	4497.007	3.179965415	4.019378551
10 μ M JNK inhibitor SP600125	4872.572	3.364847685	4.030876127
5 μ M p38 MAPK inhibitor SB203580	4594.942	2.378333266	2.433749878
Mix MAPK inhibitor	5715.7855	1.704871596	3.328257932

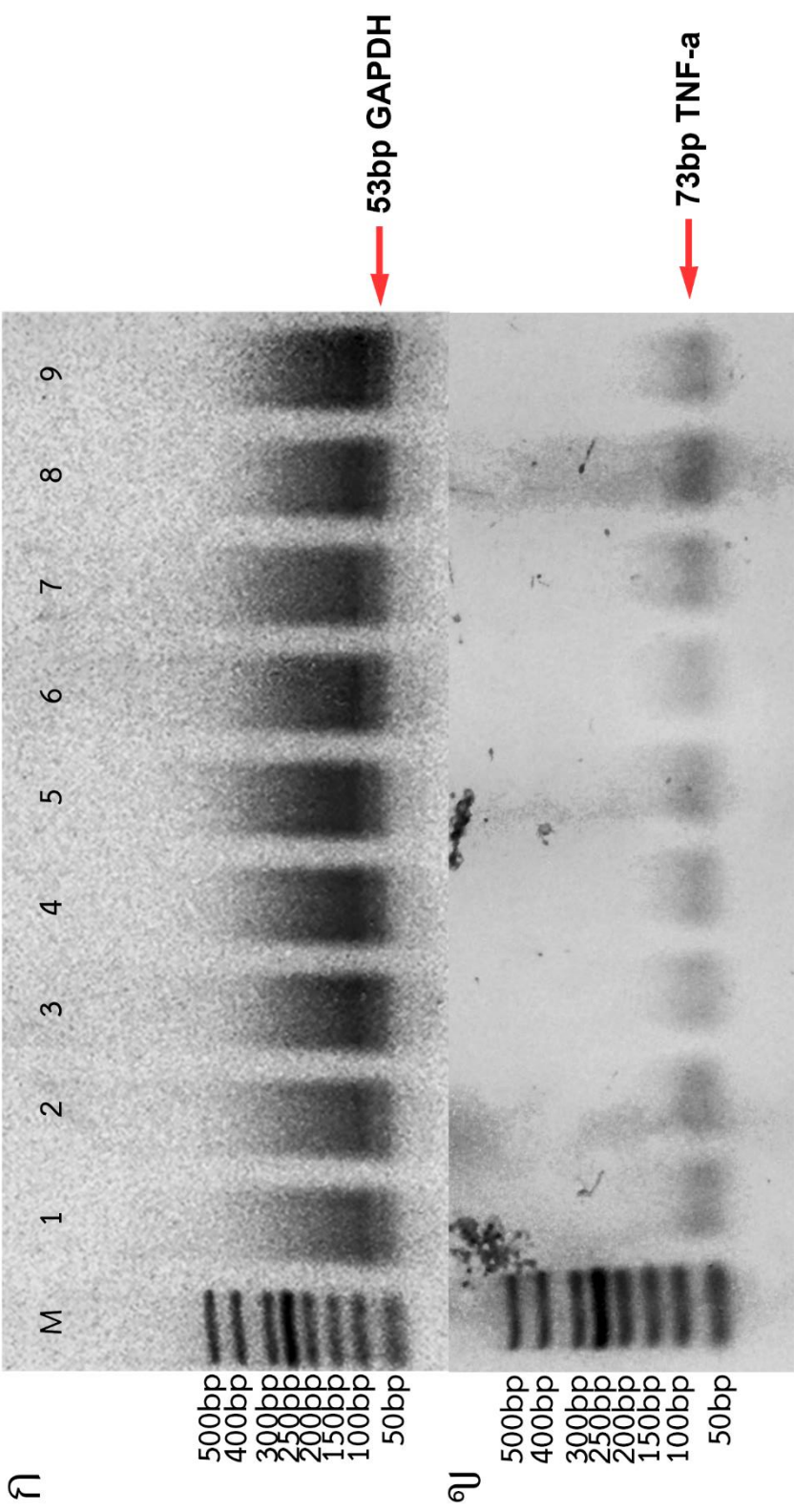


ภาพผนวกที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ หลังการเติมกลุ่ม control ของ สารสกัด ได้แก่ quercetin (1) ascorbic acid (2) และกลุ่มที่ยับยั้งด้วย MAPK inhibitor ได้แก่ ERK inhibitor PD98059 (3) JNK inhibitor SP600125 (4) p38 MAPK inhibitor SB203580 (5) และ Mix MAPK inhibitor (6) โดย M คือ Marker (500bp)

ตารางผนวกที่ 3 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงผลของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบหนามพุดอ โดยโปรแกรม ImageJ

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Area GAPDH _{เฉลี่ย}	Area TNF- α _{เฉลี่ย}	Area TNF- α /Area GAPDH _{เฉลี่ย}
500	1870.723	25099.0195	14.56470766	
รากหนามพุดอ	50	2912.976	25925.423	8.776966127
5	5741.5175	25821.76	4.553405252	
500	2051.2375	23869.367	11.36544876	
50	2850.087	22707.574	8.577583402	
5	3174.961	15542.926	4.65747105	
500	4298.679	21087.524	5.95214545	
ใบหนามพุดอ	50	3115.2185	20321.5635	6.2196932
5	4491.8255	23395.3375	4.301013912	

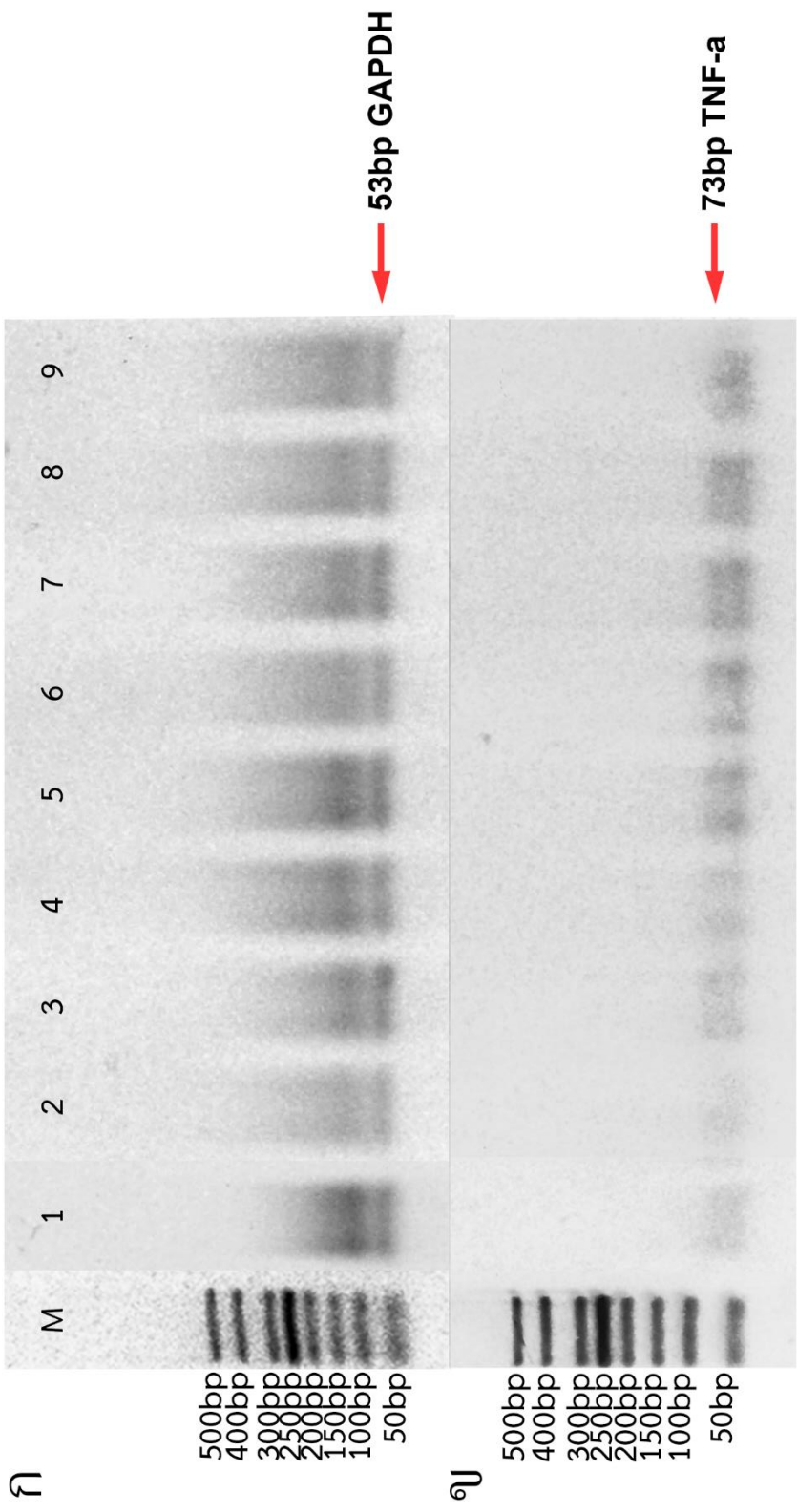




ภาพผนวกที่ 3 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครเฟจที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ หลังการเติมสารสกัดหยาบหนาม พงศ์ส่วนรอก (1-3) ลำต้น (4-6) และใบ (7-9) ที่ความเข้มข้น 500 50 และ 5 μ g/mL ตามลำดับ โดย M คือ Marker (500bp)

ตารางผนวกที่ ๓4 ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงผลของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหายาพนามแดง โดยโปรแกรม ImageJ

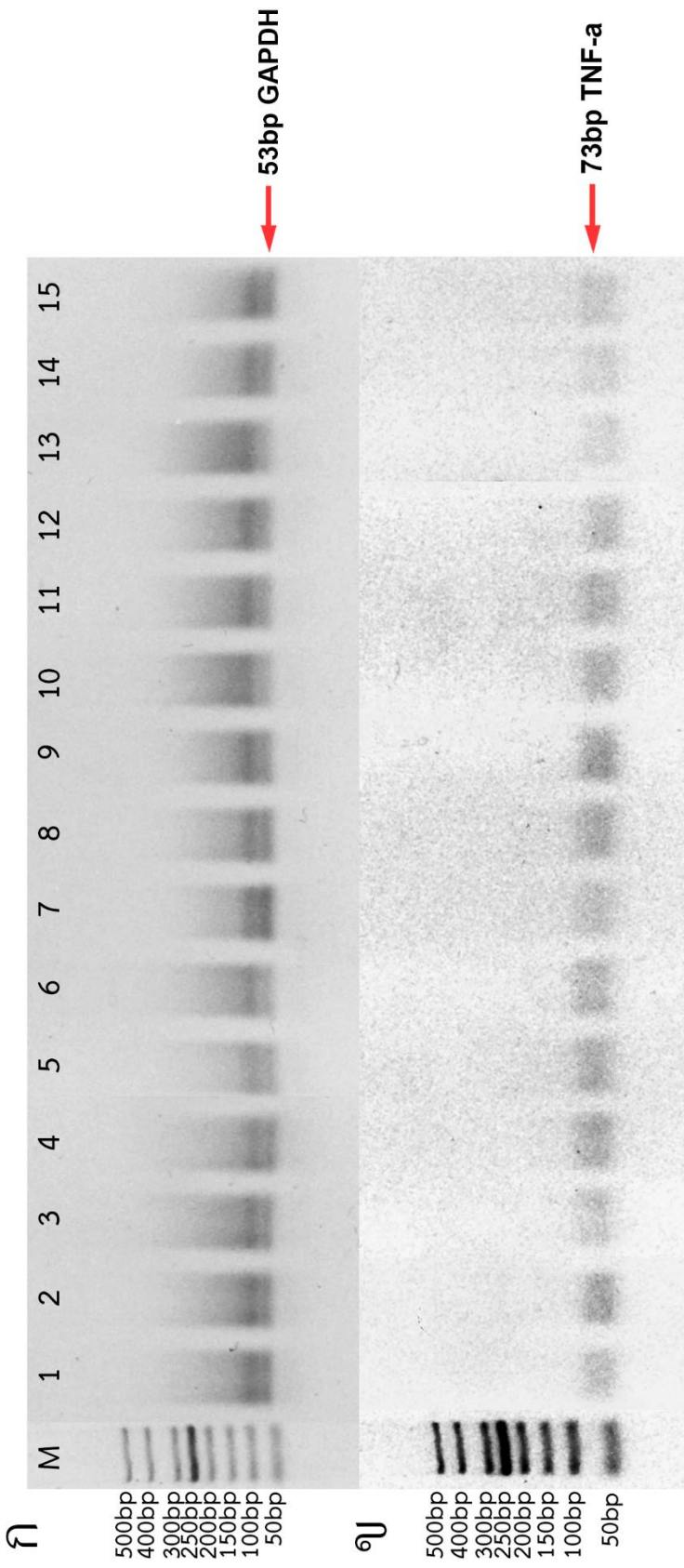
สารสกัดหายา	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Area GAPDH _{เฉลี่ย}	Area TNF- α _{เฉลี่ย}	Area TNF- α /Area GAPDH _{เฉลี่ย}
	500	4935.689	19818.2455	5.81445521
รากพนามแดง	50	2865.189	14825.549	5.397595139
	5	3626.0595	20286.917	5.111185334
	500	4044.67575	31797.879	10.61454887
ลำต้นพนามแดง	50	3745.73875	29730.854	8.710617703
	5	3915.8895	26808.3475	7.739663892
	500	4351.5085	32256.258	7.517127636
ใบพนามแดง	50	4222.9605	30456.08	8.346956179
	5	3719.5485	29545.176	8.524524577



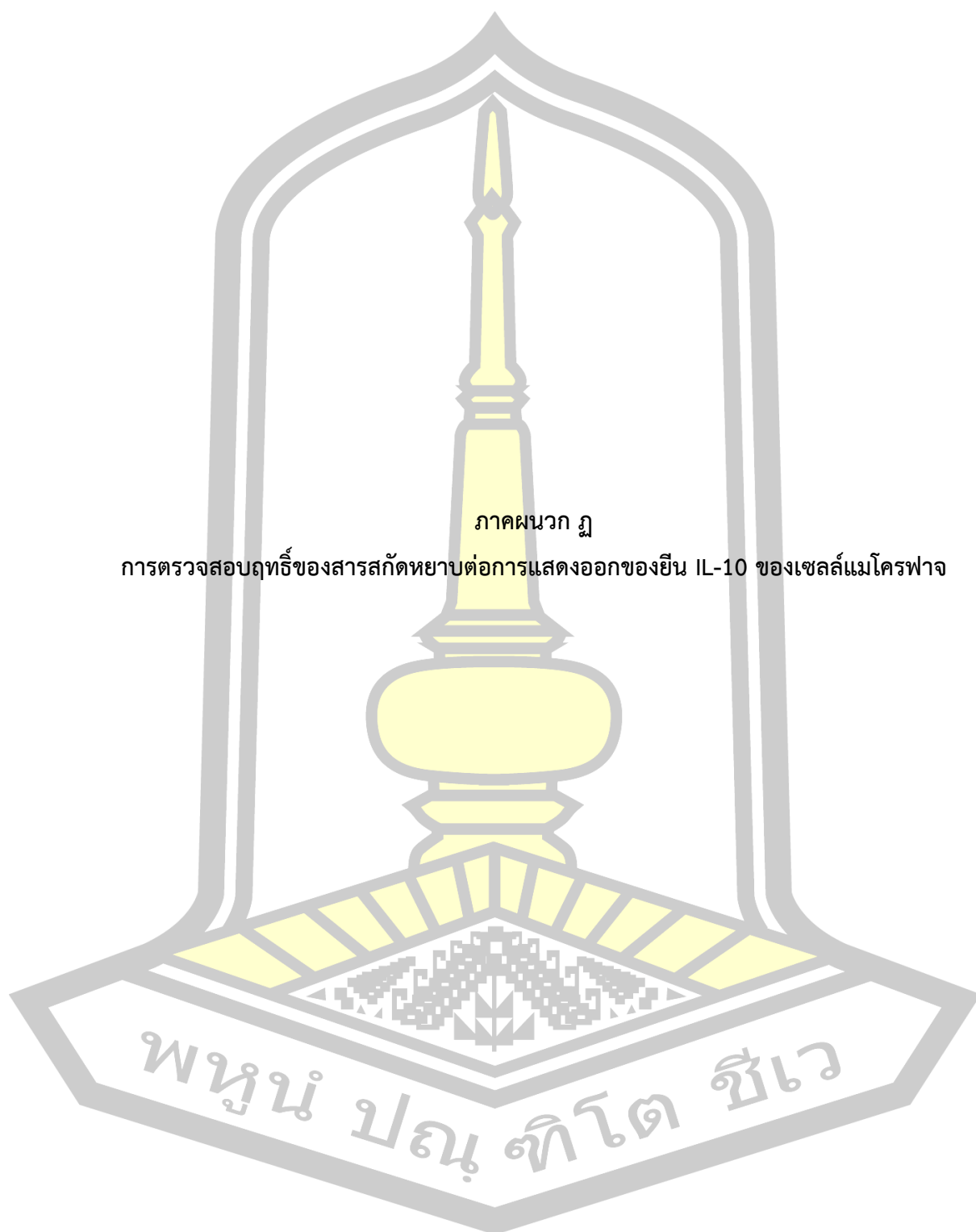
ภาพผนวกที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครโครฟาจที่ถูกกระตุ้น H_2O_2 หลังการเติมสารสกัดหยาบพนมาม แสดงส่วนราก (1-3) ลำต้น (4-6) และใบ (7-9) ที่ความเข้มข้น 500 50 และ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ โดย M คือ Marker (500bp)

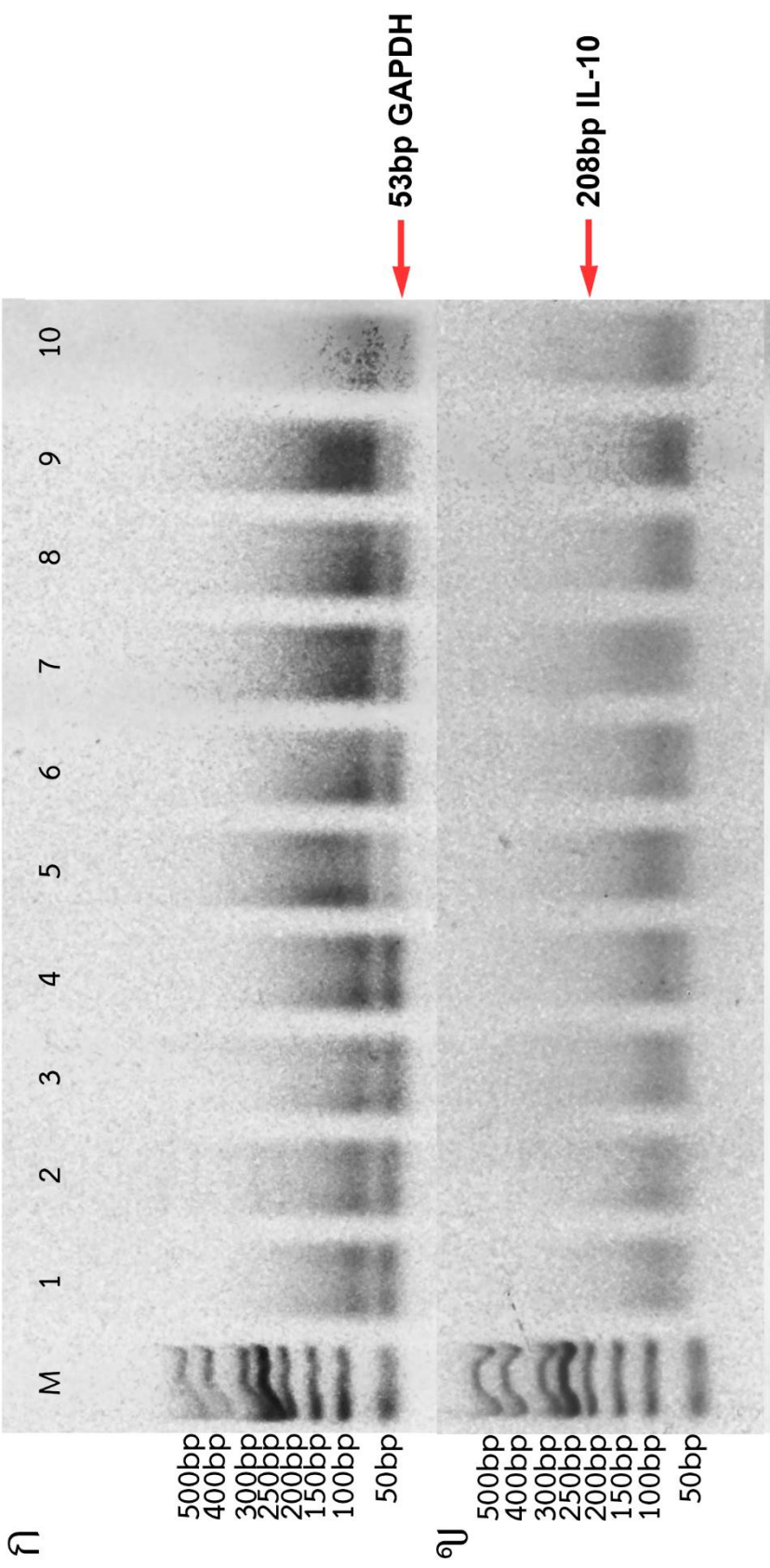
ตารางผนวกที่ ๕ ตารางแสดงค่าการวิเคราะห์การแสดงผลของ TNF- α ในเซลล์แมโครฟาจที่เติมสารสกัดหยาบขลุ้ โดยโปรแกรม ImageJ

สารสกัดหยาบ	ความเข้มข้น ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Area GAPDH _{เฉลี่ย}	Area TNF- α _{เฉลี่ย}	Area TNF- α /Area GAPDH _{เฉลี่ย}
	500	3624.975	23018.463	6.502018726
รากขลุ้	50	3702.523	28336.5595	7.34123451
	5	2748.0095	24476.8285	8.905678861
	500	4609.8695	34011.8245	8.267701412
ลำต้นขลุ้	50	4192.991	31862.481	7.95726257
	5	4118.6265	30056.925	7.766641589
	500	5308.254	23459.6175	5.715456209
ใบขลุ้	50	4141.405	34318.299	8.36419536
	5	2819.137	34879.743	12.35588628
	500	2210.338	34838.7175	20.48257511
ดอก	50	1940.798	29055.3895	16.69328
	5	2423.2585	22733.1805	9.652195789
	500	2549.1165	20964.99	14.24887559
เปลือกนอก	50	3572.951	23292.7115	6.734704094
	5	4513.401	26684.607	5.867854517

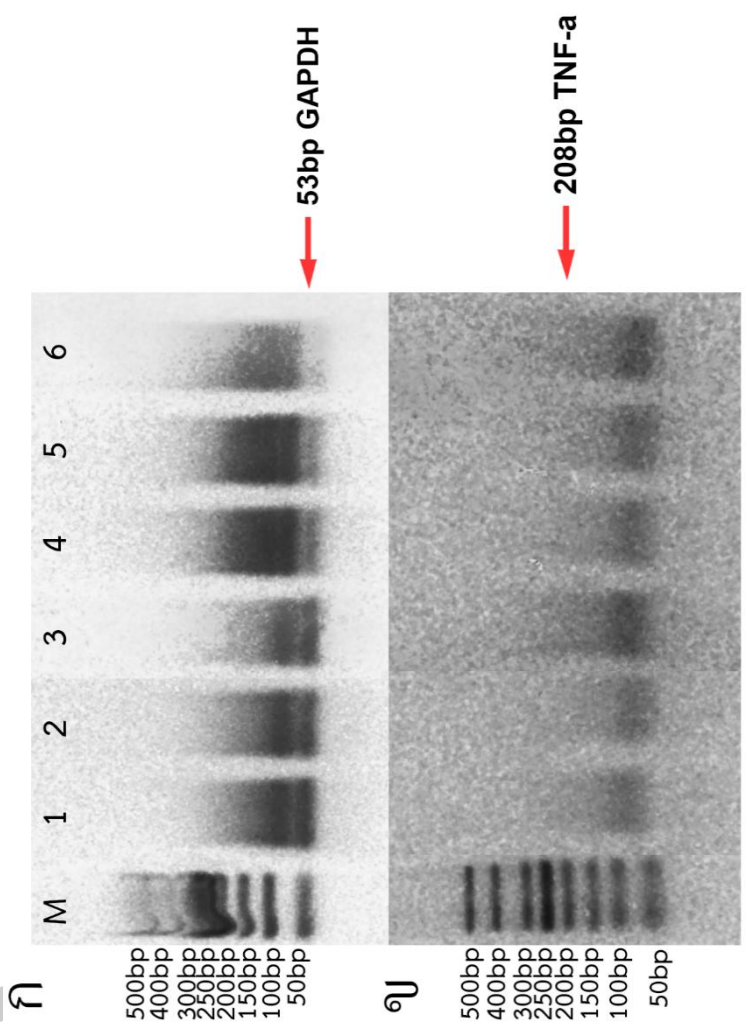


ภาพผนวกที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้น H_2O_2 หลังการเติมสารสกัดหยาบขี้เฒ่า ส่วนราก (1-3) ลำต้น (4-6) ใบ (7-9) ดอก (10-12) และเปลือกนอก (13-15) ที่ความเข้มข้น 500 50 และ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ โดย M คือ Marker (500bp)

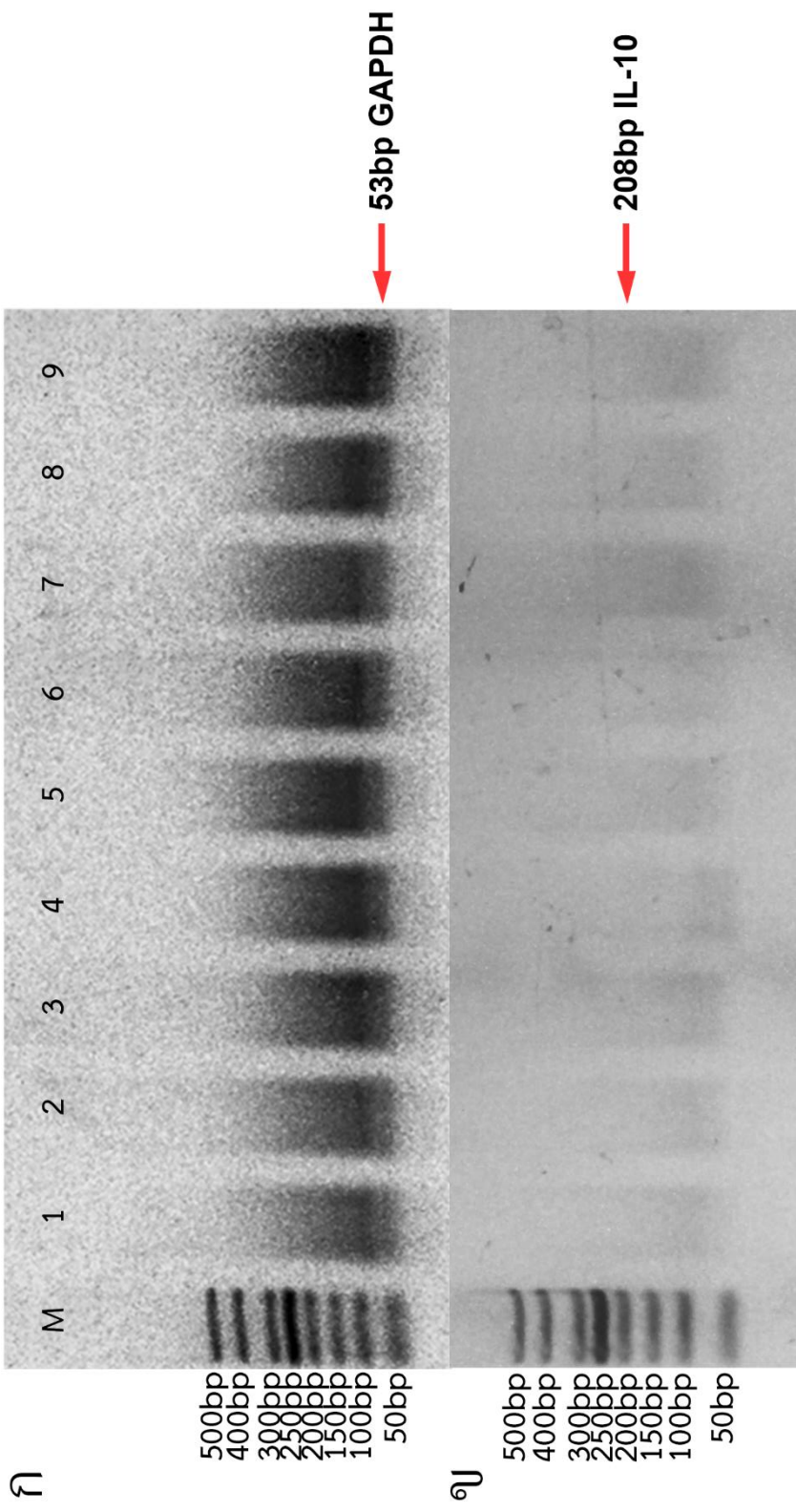




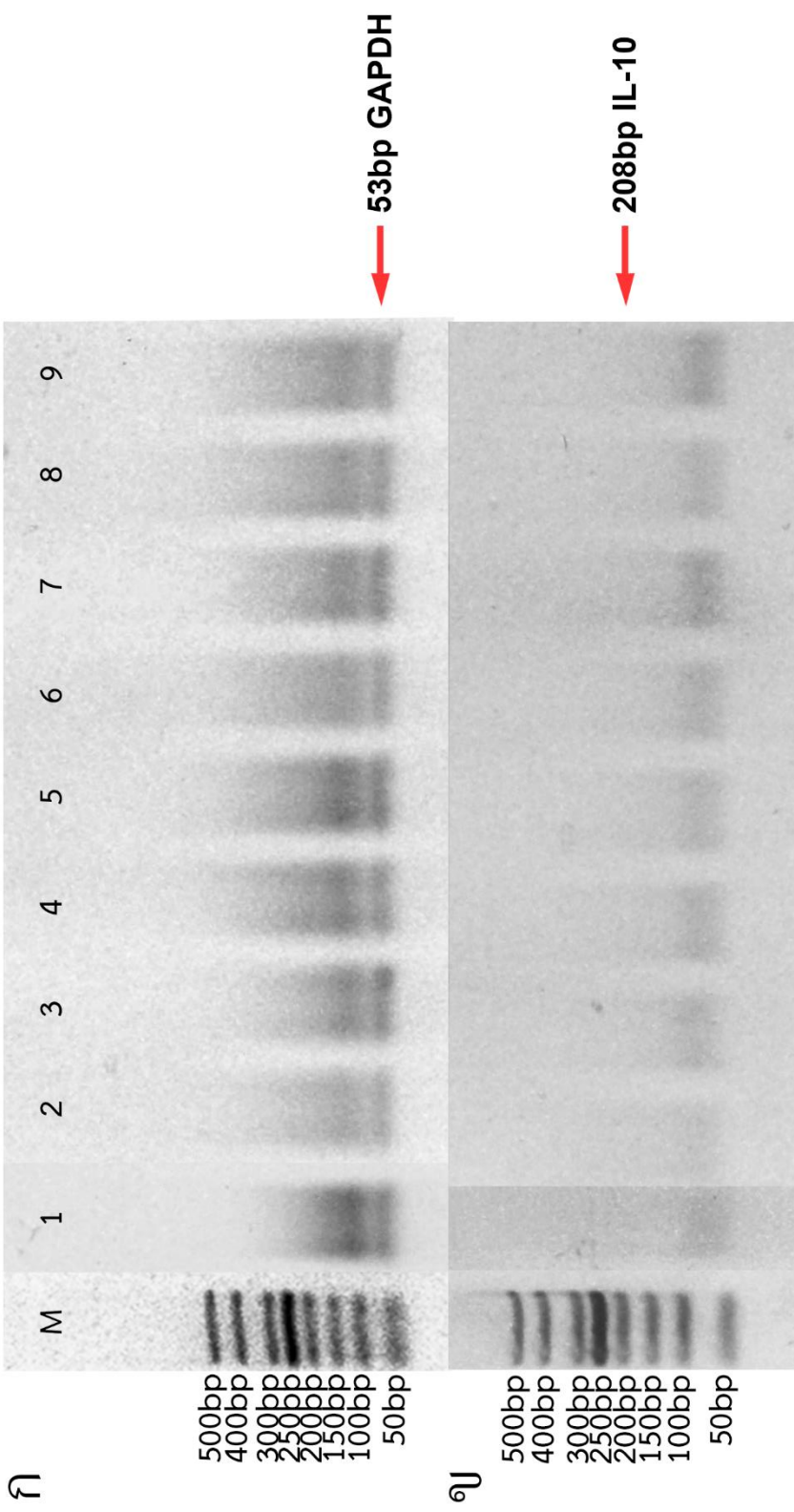
ภาพผนวกที่ 1 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจของกลุ่ม control ได้แก่ LPS (1) IFN- γ (2) LPS+ IFN- γ (3) IL-4 (4) 1XPBS (5) LPS+H₂O₂ (6) IFN- γ +H₂O₂ (7) LPS+ IFN- γ +H₂O₂ (8) IL-4+H₂O₂ (9) 1XPBS+H₂O₂ (10) transcriptase โดย M คือ Marker (500bp)



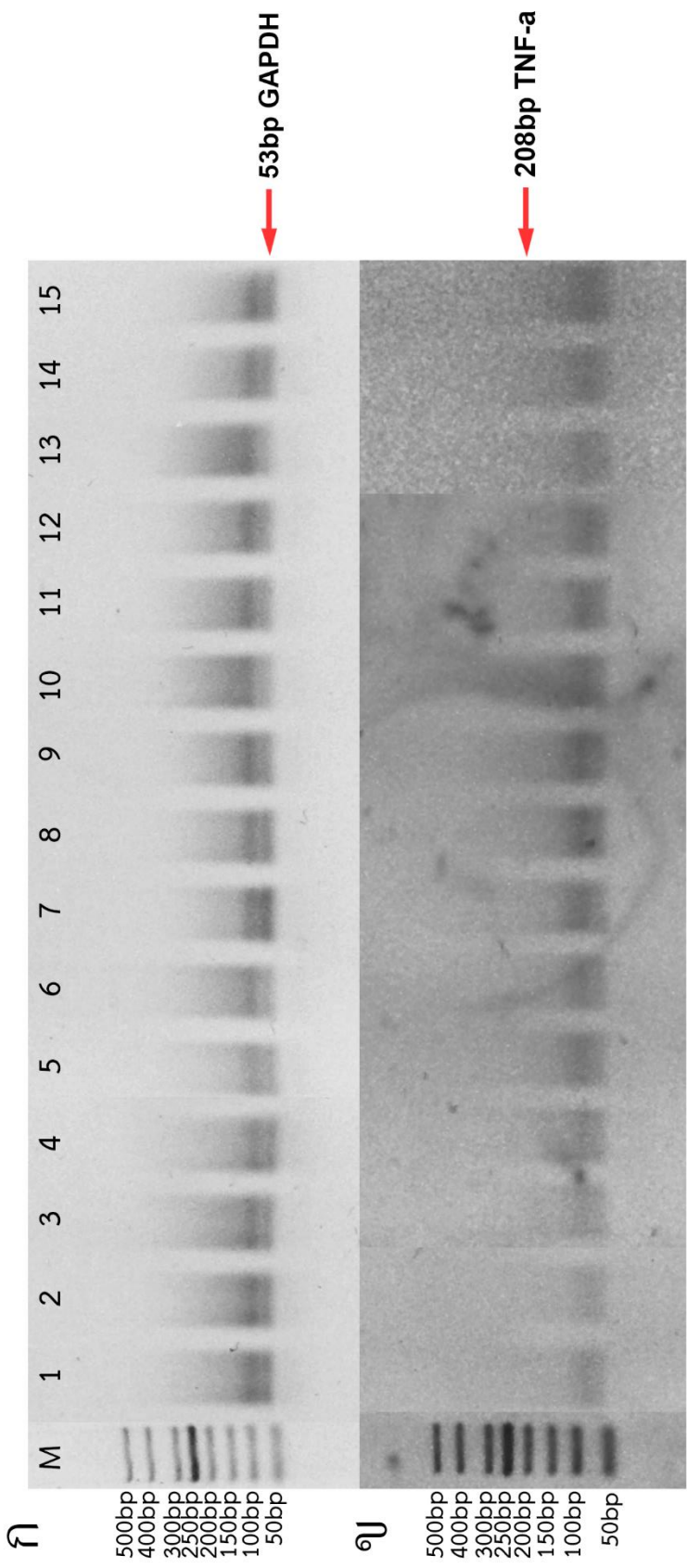
ภาพผนวกที่ 2 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้น H_2O_2 หลังการเติมกลุ่ม control ของ สารสกัดได้แก่ quercetin (1) ascorbic acid (2) และกลุ่มที่ยับยั้งด้วย MAPK inhibitor ได้แก่ ERK inhibitor PD98059 (3) JNK inhibitor SP600125 (4) p38 MAPK inhibitor SB203580 (5) และ Mix MAPK inhibitor (6) โดย M คือ Marker (500bp)



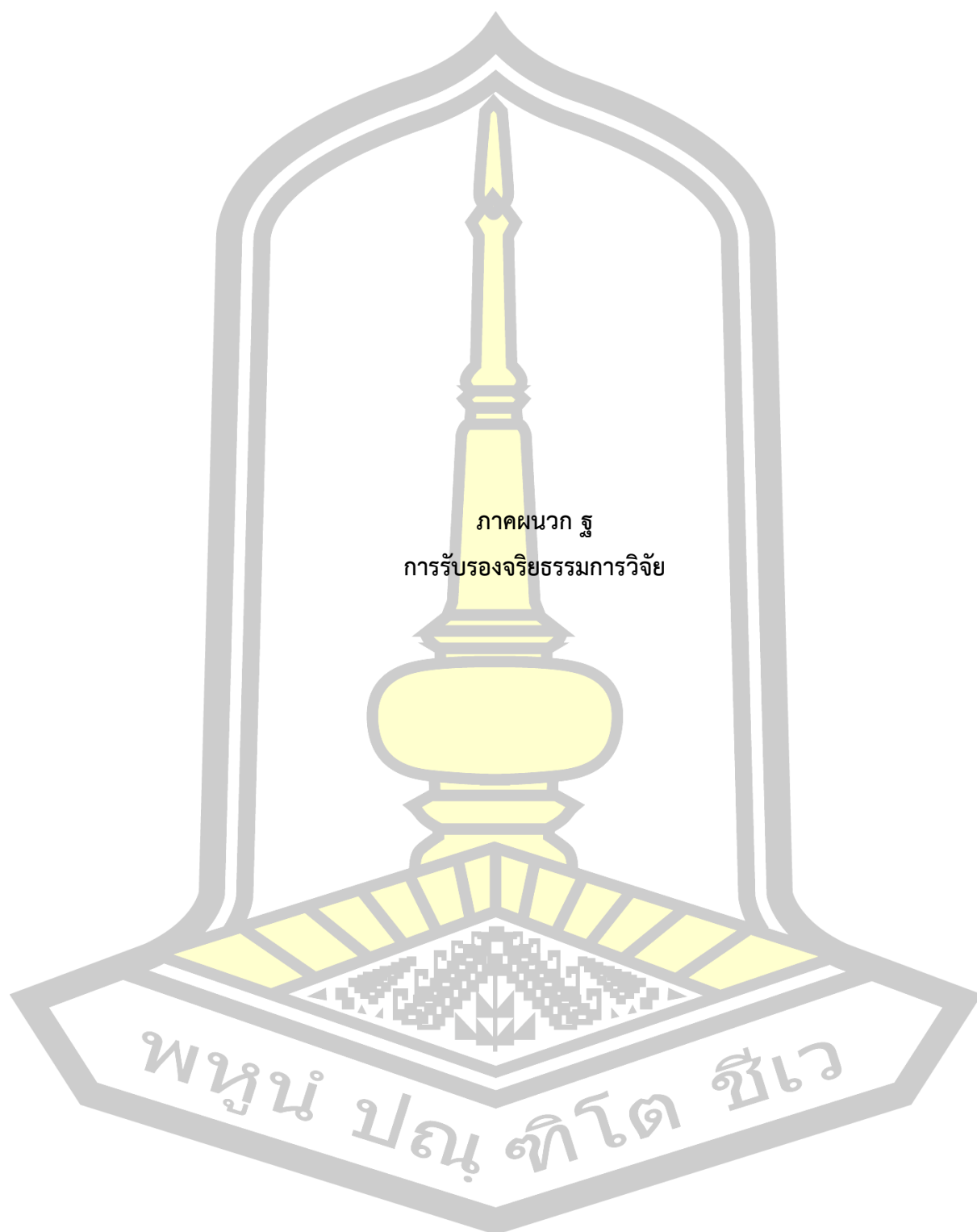
ภาพผนวกที่ ๓ แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ หลังการเติมสารสกัดหยาบหนาม พงต่อส่วนราก (1-3) ลำต้น (4-6) และใบ (7-9) ที่ความเข้มข้น 500 50 และ 5 μ g/mL ตามลำดับ โดย M คือ Marker (500bp)



ภาพผนวกที่ 4 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครโครฟาจที่ถูกกระตุ้น H_2O_2 หลังการเติมสารสกัดหยาดหยาด แสดงส่วนราก (1-3) ลำต้น (4-6) และใบ (7-9) ที่ความเข้มข้น 500 50 และ 5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ตามลำดับ โดย M คือ Marker (500bp)



ภาพผนวกที่ 5 แสดงผลการตรวจสอบการแสดงออกของ GAPDH (ก) และ TNF- α (ข) ในเซลล์แมโครฟาจที่ถูกกระตุ้นด้วย H₂O₂ หลังการเติมสารสกัดหยาดงู ส่วนแรก (1-3) ลำดับ (4-6) ไข่ (7-9) ดอก (10-12) และเปลือกนอก (13-15) ที่ความเข้มข้น 500 50 และ 5 μ g/mL ตามลำดับ โดย M คือ Marker (500bp)



ภาคผนวก ฐ
การรับรองจริยธรรมการวิจัย

พหุบัณฑิตศึกษา



คณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

เลขที่การรับรอง : 208/2563

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาไทย) ผลของสารสกัดหยาบจากพืชชอบเค็ม หนามทุงต่อ หนามแดง และขลุ่ย ต่อการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจในมนุษย์

ชื่อโครงการวิจัย (ภาษาอังกฤษ) Effect of Crude Extracts from Halophytes Azima sarmentosa, Maytenus mekongensis and Pluchea indica on Human Macrophages Activity Modulation.

ผู้วิจัย : นางสาวนิรุช แสนกล้า

หน่วยงานที่รับผิดชอบ : คณะวิทยาศาสตร์

สถานที่ทำการวิจัย : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประเภทการพิจารณาแบบ : แบบเร่งรัด

วันที่รับรอง : 24 กรกฎาคม 2563

วันหมดอายุ : 23 กรกฎาคม 2564

ข้อเสนอการวิจัยนี้ ได้รับการพิจารณาและให้ความเห็นชอบจากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหาสารคามแล้ว และอนุมัติในด้านจริยธรรมให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องข้างต้นได้ บนพื้นฐานของโครงการงานวิจัยที่คณะกรรมการฯ ได้รับและพิจารณา เมื่อเสร็จสิ้นโครงการแล้วให้ผู้วิจัยส่งแบบฟอร์มการปิดโครงการและรายงานผลการดำเนินงานมายังคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม หรือหากมีการเปลี่ยนแปลงใดๆ ในโครงการวิจัย ผู้วิจัยจักต้องยื่นขอรับการพิจารณาใหม่

ศาสตราจารย์ ดร. สว่างจิตร์

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ เกสิทธิ์หญิงรัตวี สว่างจิตร์)

ประธานคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในคน

มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ทั้งนี้ การรับรองนี้มีเงื่อนไขดังที่ระบุไว้ด้านหลังทุกข้อ (ดูด้านหลังของเอกสารรับรองโครงการวิจัย)

ภาพผนวกที่ ๑ ใบรับรองจริยธรรมการวิจัยในคน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม



คณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

เอกสารรับรองโครงการวิจัย

เลขที่การรับรอง : IBC09-10/2563

ชื่อโครงการวิจัย

ภาษาไทย : ผลของสารสกัดหายาจากพืชชอบเค็ม ทนทานพุททอง ทนทานแดง และขลุ่ย ต่อการปรับเปลี่ยนการทำงานของเซลล์แมโครฟาจในมนุษย์

ภาษาอังกฤษ : Effect of Crude Extracts from Halophytes *Azima sarmentosa*, *Maytenus mekongensis* and *Pluchea indica* on Human Macrophages Activity Modulation.

ผู้วิจัย : นางสาวนิรมุข แสนกล้า

หน่วยงานที่รับผิดชอบ : คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

สถานที่ทำการวิจัย : ภาควิชาชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

รับรองประเภทที่ 2

วันที่รับรอง : 4 มิถุนายน 2563

วันหมดอายุ : 3 มิถุนายน 2564

ข้อเสนอการวิจัยนี้ ได้รับการพิจารณาและให้ความเห็นชอบจากคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพระดับสถาบัน มหาวิทยาลัยมหาสารคามแล้ว และอนุมัติในด้านความปลอดภัยทางชีวภาพประเภทที่ 2 ให้ดำเนินการศึกษาวิจัยเรื่องข้างต้นได้ บนพื้นฐานของโครงร่างงานวิจัยที่คณะกรรมการฯ ได้รับและพิจารณา หากมีการเปลี่ยนแปลงใด ๆ ในโครงการวิจัย ผู้วิจัยจะต้องยื่นขอรับการพิจารณาใหม่

(ศาสตราจารย์อนงค์ฤทธิ์ แข็งแรง)

รองอธิการบดีฝ่ายพัฒนาโครงสร้างพื้นฐาน วิจัยและนวัตกรรม

ประธานคณะกรรมการความปลอดภัยทางชีวภาพ

ภาพผนวกที่ ๒ ใบรับรองความปลอดภัยทางชีวภาพ มหาวิทยาลัยมหาสารคาม

ประวัติผู้เขียน

ชื่อ	นางสาวนිරนุช แสนกล้า
วันเกิด	วันที่ 12 เดือนมีนาคม พ.ศ. 2538
สถานที่เกิด	อำเภอท่าตูม จังหวัดสุรินทร์
สถานที่อยู่ปัจจุบัน	บ้านเลขที่ 100 หมู่ 1 บ้านกันโจรง ตำบลกระหาด อำเภอจอมพระ จังหวัดสุรินทร์ รหัสไปรษณีย์ 32180
ประวัติการศึกษา	พ.ศ. 2549 ประถมศึกษา โรงเรียนบ้านกันโจรง อำเภอจอมพระ จังหวัดสุรินทร์ พ.ศ. 2555 มัธยมศึกษา โรงเรียนจอมพระประชาสรรค์ อำเภอจอมพระ จังหวัดสุรินทร์ พ.ศ. 2559 ปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต (วท.บ.) สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม พ.ศ. 2563 ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (วท.ม.) สาขาวิชาจุลชีววิทยา มหาวิทยาลัยมหาสารคาม
ทุนวิจัย	ทุนอุดหนุนการวิจัยสำหรับนิสิตระดับบัณฑิต (ปริญญาโท) งบประมาณเงินรายได้ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ.2564 จากมหาวิทยาลัยมหาสารคาม

พูนุ่ ปณุ่ ทิโต ชีเว