

Thesis Title Stimulatory Effects of Plant Extracts on Phagocytosis
Intracellular Killing and Oxidative Stress of Neutrophils in
Normal People

Author Mr. Pahol Sansomchai

Degree Master of Science (Biochemistry)

Thesis Advisory Committee

Assoc. Prof. Dr. Luksana Makonkawkeyoon	Chairperson
Asst. Prof. Dr. Yuttana Munde	Member

ABSTRACT

Phagocytosis and intracellular killing are primary mechanism which the non-specific immune system eliminates gram-positive and gram-negative microorganisms as well as pathogenic fungi. Neutrophils play a major role of this system. They are circulating scavengers highly concentrated in blood, liver, lymph nodes, and spleen. Additionally, they are found in all tissues, especially at sites of inflammation. Neutrophils kill foreign cells by engulfing and digesting them. Killing mechanism of neutrophils relate with catalytic enzymes, reactive oxygen species (ROS) and nitric oxide (NO). A large number of plants and their extracted constituents have been shown to potentiate such immunity. In recent years, natural products from the plant kingdom have been investigated for their immune modulating potential against infection. These properties can stimulate the body to fight against. Thai medicinal plants have been used for centuries to relieve symptoms of a number of diseases. Such plants display many pharmacological properties, including anti-cancer and anti-inflammatory activitied. This study aimed to evaluate Thai medicinal plant extracts that may stimulate the immune system, to investigate their effects on production of the ROS, and NO in neutrophils.

Phagocytotic activity and intracellular killing *C. albicans* by human neutrophils were measured, following exposure human neutrophils with and without 5 kinds of the ethanol extract of *Ocimum tenuiflorum* L. (leaf), *Curcuma longa* L. (rhizome), *Centella asiatica* L. (leaf), *Houttuynia cordata* Thunb. (leaf) and *Ficus religiosa* L. (leaf) by using flow cytometer. ROS production was also measured with the same technique. In addition, NO production was measured with a colorimetry.

Neutrophils treated with ethanol extract of *Ocimum tenuiflorum* L. at the concentration of 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, and 2000 µg/mL were significantly enhanced phagocytosis and intracellular killing of *Candida albicans* when compared to untreated or treated with others four medicinal plant extracts ($p < 0.05$). But, intracellular killing was significantly affected neutrophils treated with *Houttuynia cordata* Thunb. and *Ficus religiosa* L. at the concentration of 100 µg/mL, 500 µg/mL, 1000 µg/mL, and 2000 µg/mL. The production of ROS in neutrophils were significantly increased after treatment with the ethanol extract of *O.tenuiflorum* L. (500 µg/mL) alone or together with 5 µM phorbol 12-myristate 13-actate ($p < 0.05$). Similarly, the NO production in neutrophil was significantly increased after treatment with the ethanol extract of *O.tenuiflorum* L. (500 µg/mL) alone or together with 10 µg lipopolysaccharide ($p < 0.05$). In summary, activated neutrophils with *O. tenuiflorum* L. showed the most effective phagocytosis, intracellular killing of *Candida albicans*, and production of ROS and NO. The immunostimulatory effect of the ethanol extracts of *O. tenuiflorum* L. might be candidates to evoke the immune system and a new attractive medicinal plant for the treatment of infectious diseases.

ชื่อเรื่องวิทยานิพนธ์ ผลกระตุ้นของสารสกัดสมุนไพรต่อการกลืนกินของเซลล์และการฆ่าสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์และการเกิดอนุมูลอิสระในนิวโตรฟิลของคนปกติ

ผู้เขียน นาย พหล แสนสมชัย

ปริญญา วิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (ชีวเคมี)

คณะกรรมการที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์

รศ. ดร. ถักษณา มกรแก้วเกยูร

ประธานกรรมการ

ผศ. ดร. ยุทธนา หมั่นดี

กรรมการ

บทคัดย่อ

การกลืนกินของเซลล์และการฆ่าสิ่งแปลกปลอมภายในเซลล์เป็นกลไกขั้นพื้นฐานของระบบภูมิคุ้มกันแบบไม่จำเพาะของร่างกายเพื่อกำจัดจุลชีพแกรมบวกและแกรมลบรวมทั้งเชื้อรา เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลทำหน้าที่สำคัญในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยกวาดทำลายสิ่งแปลกปลอมที่อยู่ในระบบหมุนเวียนโลหิต ดับ ต่อม้ำเหลือง และม้าม อีกทั้งยังสามารถทำหน้าที่ได้ในเนื้อเยื่อต่างๆ โดยเฉพาะบริเวณที่เกิดการอักเสบ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิลฆ่าสิ่งแปลกปลอมโดยการโอบล้อมกลืนกินและย่อยสลายสิ่งแปลกปลอม โดยเร่งกัมมันตภาพของเอนไซม์ ปริมาณอนุมูลอิสระ และไนตริกออกไซด์ ฟืชสมุนไพรจำนวนมากและองค์ประกอบที่ได้จากการสกัดพืชสมุนไพรมีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายได้ เมื่อไม่นานมานี้สารจากพืชสมุนไพรได้ถูกนำมาตรวจสอบผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายในการต้านการติดเชื้อ พบว่าสารเหล่านี้มีคุณสมบัติกระตุ้นระบบความต้านทานโรคของร่างกาย สมุนไพรไทยถูกใช้มานานนับศตวรรษเพื่อบรรเทาอาการของโรคหลายชนิด สมุนไพรไทยบางชนิดมีสรรพคุณหลากหลายทางเภสัชวิทยา รวมทั้งสรรพคุณการต้านมะเร็ง และต้านการอักเสบ การศึกษาครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อประเมินผลของสารสกัดสมุนไพรไทยต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกายเช่นการกลืนกิน การฆ่าสิ่งแปลกปลอม *C. albicans* ภายในเซลล์ การสร้างอนุมูลอิสระและการเกิดไนตริกออกไซด์ในเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโตรฟิล กัมมันตภาพการกลืนกินและการฆ่าสิ่งแปลกปลอม *C. albicans* ภายในเซลล์ของนิวโตรฟิลของคนปกติโดยใช้สารสกัดด้วยเอทานอลของสมุนไพรไทย 5 ชนิด ได้แก่ ใบ

กะเพรา เงามิ้น ใบบัวบก ใบพลูขาว และ ใบโพธิ์ โดยนำเมล็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมาผสม หรือไม่ผสมกับสารสกัดจากสมุนไพรดังกล่าว ตรวจวัดการกลืนกินของเซลล์และการฆ่าถึง แปรสภาพภายในเซลล์ การเกิดอนุมูลอิสระโดยใช้เทคนิคโฟลโซโตเมตรี ส่วนปริมาณการเกิดใน ตรีคอกไฮด์ตรวจวัดโดยวิธีการเกิดสี จากการทดลองโดยกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วย สารสกัดจากกะเพราด้วยเอทานอล ณ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม 500 ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม 1000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถกระตุ้นระบบ ภูมิคุ้มกันของร่างกายอย่างมีนัยสำคัญต่อการกลืนกินและการฆ่าแคนดิดาอัลบิแคนภายในเซลล์ เมื่อ เปรียบเทียบกับเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลที่ไม่ได้กระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพร หรือเปรียบเทียบกับ เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลที่กระตุ้นด้วยสารสกัดสมุนไพรอีกสี่ชนิด ($p < 0.05$) แต่การฆ่า ภายในเซลล์ของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดจากเอทานอลของพลูขาวและ โพธิ์ ณ ความเข้มข้น 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม 1000 ไมโครกรัมต่อ มิลลิกรัม และ 2000 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม สามารถเกิดขึ้นได้ดีเช่นกัน การเกิดอนุมูลอิสระของเม็ด เลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลเมื่อกระตุ้นด้วยสารสกัดจากเอทานอลของกะเพรา ณ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัมหรือกระตุ้นร่วมกับพอบอล 12-ไมริสเทค 13-อาซีเทค ความเข้มข้น 5 ไมโคร โมลต่อมิลลิกรัม จะได้ปริมาณอนุมูลอิสระสูงกว่าสารสกัดอีกสี่ชนิดอย่างมีนัยสำคัญเมื่อ เปรียบเทียบกับไม่ถูกกระตุ้น ($p < 0.05$) นอกจากนี้การกระตุ้นเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลด้วย สารสกัดกะเพรา ณ ความเข้มข้น 500 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม ด้วยเอทานอลสามารถเพิ่มการเกิดใน ตรีคอกไฮด์ในสภาวะที่มีหรือไม่มีไลโปโพลีแซคคาไรด์ความเข้มข้น 10 ไมโครกรัมได้อย่างมี นัยสำคัญ ($p < 0.05$) จึงสรุปว่าในการศึกษาครั้งนี้เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลที่ถูกกระตุ้นด้วยสาร สกัดกะเพราด้วยเอทานอลเร่งการกลืนกิน การฆ่าทำลาย *C. albicans* การเกิดภาวะอนุมูลอิสระ และ การเกิดในตรีคอกไฮด์ในเซลล์ได้ดีที่สุด ดังนั้นสารสกัดกะเพราด้วยเอทานอลจึงเป็นสมุนไพรที่ น่าสนใจและอาจนำมาใช้ช่วยรักษาโรคติดเชื้อได้