

ผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยต่อความเป็นพิษและการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในของ
ฟันมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

Effect of Thai Propolis Crude Extracts on the Cytotoxicity and Proliferation of
Human Dental Pulp Cells, *in Vitro*

ปรีมา ชัยปัญหา (Preemine Chaipanha)* ดร.ปัทมา ชัยเลิศวานิชกุล (Dr.Pattama Chailertvanitkul)**

ดร.ธีระศักดิ์ ดำรงรุ่งเรือง (Dr.Teerasak Damrongrungruang)***

ดร.ประสาธ โพนินมแดง (Dr.Prasart Phonimdaeng)**** สุบิน พัวศิริ (Subin Puasiri)*****

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งต่อความเป็นพิษ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในของมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ สกัดสารพรอพอลิสไทยที่เก็บได้ในจังหวัดขอนแก่นด้วยตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 100 นำมาทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในที่ได้มาจากฟันกรามน้อยของมนุษย์โดยที่ไม่มีพยาธิสภาพใด ๆ ที่เพาะเลี้ยงในห้องปฏิบัติการ ผลการศึกษาพบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ความเข้มข้น 10,000 (ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 72 ชั่วโมง) และ 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร (ระยะเวลา 72 ชั่วโมง) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในด้วยการทดสอบวิธีอะลามาร์บลู ส่วนเมื่อทดสอบด้วยวิธีเมทิลีนบลูพบว่า ที่ระดับความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในได้มากที่สุดในช่วงระยะเวลา 48 ชั่วโมงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) การศึกษานี้สรุปได้ว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตรมีความสามารถเข้ากันได้ดีกับเซลล์ โดยไม่มีความเป็นพิษ และสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ได้ในชั่วโมงที่ 48

ABSTRACT

The aim of this *in vitro* study is to determine the cytotoxicity and proliferation of Thai propolis crude extracts from honey comb on the human dental pulp cells. Thai propolis crude extracts was collected from Khon Kean province in Thailand and extracted using 100 % ethanol. Then Thai propolis crude extracts were tested with human dental pulp cells, which obtained from non pathologic human's premolar, prior cultured *in Vitro*. The results of this study revealed that the concentration of 10,000 (at 6, 12, 24 and 72 hours) and 1,000 $\mu\text{g/ml}$ (at 72 hours) demonstrated no cytotoxicity by Alamar blue assay. Methylene blue assay showed that pulpal cells treated with Thai propolis crude extracts at concentration of 10,000 $\mu\text{g/ml}$ could increase cell numbers at 48 hours significantly ($p < 0.05$). It can be concluded that Thai propolis crude extracts at 10,000 $\mu\text{g/ml}$ is a biocompatible substance that has no cytotoxicity and can stimulate human dental pulp cells proliferation at 48 hours.

คำสำคัญ: สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย ความเป็นพิษต่อเซลล์ เซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์

Key Words: Thai propolis crude extracts, Cytotoxicity, Human dental pulp cells

* มหาวิทยาลัยเทคโนโลยีพระจอมเกล้าธนบุรี สาขาวิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

*** รองศาสตราจารย์ ภาควิชาวินิจฉัยโรคช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

**** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาจุลชีววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

***** ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมชุมชน คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

บทนำ

พรอปอลิส (propolis) หรือกาวผึ้ง (bee glue) เป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติจากผึ้ง ลักษณะทั่วไปจะเหนียวคล้ายยางไม้ โดยผึ้งเก็บสะสมจากสารหลังจากส่วนที่เป็นแผล ส่วนที่แตกออกของเปลือกไม้หรือส่วนใบอ่อนของพืช นำมาผสมกับเ็นไซม์ในน้ำลายผึ้ง หน้าทีของพรอปอลิส คือ ใช้อุดทางเข้ารังผึ้งเพื่อลดขนาดรูเปิดของรังผึ้งและป้องกันรังผึ้งจากศัตรู หรือเชื้อโรคเข้ามารุกรานในรังผึ้ง องค์ประกอบทางเคมีประกอบด้วย เรซินประมาณร้อยละ 50 ไขมันร้อยละ 30 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 10 ละอองเกสรร้อยละ 5 และ ส่วนประกอบอื่น ๆ อีกกว่า 22 ชนิดคิดเป็นร้อยละ 5 ได้แก่ กรดอะมิโน คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่ เ็นไซม์ และสารตั้งต้นของฮอร์โมนจากธรรมชาติ เป็นต้น (Marcucci, 1995) (Dobrowolski et al., 1991) เนื่องจากพรอปอลิสมีองค์ประกอบของสารเคมีที่แตกต่างกันหลายชนิด จึงมีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาที่หลากหลาย เช่น ด้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial activity) ด้านเนื้องอก (antitumor activity) ด้านออกซิเดชัน (antioxidative activity) ปกป้องตับ (hepatoprotective) ด้านการอักเสบ (anti-inflammatory activity) และเป็นยาชา (anesthesia) เป็นต้น ในทางการแพทย์นำมาใช้ด้านการอักเสบ ด้านเชื้อไวรัส ด้านเชื้อราและรักษามะเร็งเปื่อยได้ โดยสารประกอบหลักของพรอปอลิสที่ทำให้ออกฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้หลากหลาย คือ สารฟลาโวนอยด์ (flavonoids) ฟีนอลิก (phenolic) และอะโรมาติก (aromatic) เป็นต้น (Burdock, 1998)

การศึกษาของพรอปอลิสในทางทันตกรรม ที่เกี่ยวข้องกับความเป็นพิษของพรอปอลิส มีหลายการศึกษา เช่น การใช้เป็นวัสดุปิดทับเนื้อเยื่อโดยตรง (direct pulp capping) ในฟันหนู ผลการศึกษา พบว่าเกิดการสร้างเนื้อเยื่อแข็งขึ้นในสัปดาห์ที่ 4 ช่วยกระตุ้นการสร้างเนื้อฟันซ่อมสร้าง (reparative dentine) และทำให้การอักเสบเกิดช้าลง (Sabir et al., 2005) และเมื่อศึกษาโดยใช้เป็นน้ำยาล้างคลองรากฟันมนุษย์ พบว่าพรอปอลิสมีฤทธิ์ลดเชื้อจุลชีพในคลองรากฟันเทียบเท่า

กับโซเดียมไฮโปคลอไรต์ (sodium hypochlorite) แต่ยังคงขาดคุณสมบัติในการละลายเศษเนื้อเยื่อในคลองรากฟัน (Al-Qathami and Al-Madi, 2003) ส่วนการศึกษาที่นำมาใช้เป็นยาใส่รักษาคคลองรากฟันมนุษย์ เพื่อฆ่าเชื้อเ็นโทโรค็อกคัสฟีคอลลิส (*Enterococcus faecalis*) ที่มักคือต่อยาที่ใส่ในคลองรากฟันมนุษย์ในหลอดทดลอง พบว่า พรอปอลิสใช้เวลาที่สั้นกว่าในการกำจัดเชื้อเ็นโทโรค็อกคัสฟีคอลลิส เมื่อเทียบกับแคลเซียมไฮดรอกไซด์ โดยจะกระตุ้นเซลล์เนื้อเยื่อให้ปล่อยปัจจัยเจริญเติบโตทีจีเอฟบีตา 1 (transforming growth factor beta, TGF- β 1) และเพิ่มการสร้างคอลลาเจน จึงทำให้เกิดกระบวนการซ่อมแซม นอกจากนี้การศึกษานี้ใช้พรอปอลิสเป็นยาใส่ในคลองรากฟัน ในรูปแบบเพสต์ (paste) พบว่า มีประสิทธิภาพที่ดี ในการ ฆ่าสเตร็ปโตค็อกคัสมิวแทนส์ (*Streptococcus mutans*) สแตฟไฟโลค็อกคัสออเรียส (*Staphylococcus aureus*) โคคูเรียไรโซฟิลา (*Kocuria rhizophila*) เอสเชริเชียโคไล (*Escherichia coli*) ชูโดโมแนสแอโรจิโนซา (*Pseudomonas aeruginosa*) และเ็นโทโรค็อกคัสไฮเร (*Enterococcus hira*) (Ferreira et al., 2007) Valera et al. (2010) นำพรอปอลิสมาใช้ล้างคลองรากฟันในห้องปฏิบัติการ พบว่า สามารถฆ่าเชื้อเอสเชริเชียโคไลได้ แต่มีข้อเสีย คือ ไม่สามารถกำจัดชีวพิษภายใน (endotoxin) ที่ถูกปล่อยออกมาเมื่อเชื้อจุลชีพตาย ซึ่งต่างจากแคลเซียมไฮดรอกไซด์ ที่สามารถกำจัดชีวพิษภายในได้ดีกว่า เพราะมีความเป็นด่างสูง จึงมีผลต่อประจุลบในโมเลกุลชีวพิษภายใน ส่งผลให้ความรุนแรงของความเป็นพิษจากชีวพิษลดลง อย่างไรก็ตามการศึกษาของ Oncag et al. (2006) พบว่าพรอปอลิสสามารถกำจัดเชื้อเ็นโทโรค็อกคัสฟีคอลลิสได้ดีที่สุด เมื่อเทียบกับยาใส่ในคลองรากฟันชนิดอื่น นอกจากนี้การสกัดพรอปอลิสด้วยเอทานอลยังช่วยเสริมคุณสมบัติที่เหมาะสมในทางเ็นโดคอนดิกส์ เช่น สนับสนุนให้เกิดการงอกใหม่ (regeneration) ของกระดูก และเหนี่ยวนำการสร้างเนื้อเยื่อแข็งเมื่อใช้ในการปิดทับเนื้อเยื่อโดยตรง หรือ

การทำพัลพ์โพโทมิ (pulpotomies) เป็นต้น (Ferreira et al., 2007) การศึกษาล่าสุดใช้เป็นสารตัวกลางแช่ฟันในฟันที่หลุดจากเบ้าฟัน ซึ่งสามารถรักษาความมีชีวิตของเซลล์เอ็นดอดันต์ได้ดีกว่า เมื่อเทียบกับสารละลายอื่น ๆ เช่น สารละลายแฮงก์บาลานซ์ซอลต์ (Hank's balanced salt solution, HBSS) นม และ ViaSpan® เป็นต้น (Pileggi et al., 2009) จากการศึกษาข้างต้นจึงเห็นได้ว่า พรอพอลิสมีความปลอดภัย และอาจสามารถประยุกต์มาใช้ทางทันตกรรมได้ในอนาคต อย่างไรก็ตามยังไม่มีการศึกษาผลของพรอพอลิสไทยว่ามีฤทธิ์เป็นอย่างไร

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดพรอพอลิสไทยต่อความเป็นพิษและการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ

วิธีการวิจัย

เกณฑ์การเลือกตัวอย่างที่ศึกษา

ฟันกรามน้อยที่ถอนโดยไม่มีพยาธิสภาพใด ๆ ทั้งที่ตัวฟันและรากฟัน จากผู้ป่วยจัดฟันที่ต้องถอนฟันขึ้นนั้น ๆ ออกอยู่แล้ว และเป็นผู้ป่วยไม่มีโรคทางระบบใด ๆ อายุระหว่าง 15 ถึง 25 ปี จำนวน 5 ซี่

ระเบียบวิธีวิจัย

เป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental research) ในห้องปฏิบัติการ (laboratory based experiment)

1. การเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้ง (ดัดแปลงจาก Mello et al., 2010)

1.1 นึกรังผึ้งที่ได้จากจังหวัดขอนแก่น เป็นชิ้นเล็ก ๆ จากนั้นสกัดพรอพอลิส ด้วยการแช่รังผึ้งที่ฉีกแล้วในสารละลายเอทานอลร้อยละ 100 ในอัตราส่วนสารตั้งต้นรังผึ้ง 1 ส่วน ต่อเอทานอล 3 ส่วน (โดยมวลต่อปริมาตร) ในขวดแก้ว ขนาด 500 มิลลิลิตร

1.2 นำส่วนผสมข้างต้น ไปเขย่าบนเครื่องเขย่า (orbital shaker incubator, MRC lab, Hagavish st.,

Israel) ที่อุณหภูมิห้องปราศจากแสง เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองยี่ห้อวัตแมน เบอร์ 1 (Whatman™ filter paper no.1, Whatman Inc., Piscataway, USA) เพื่อแยกขี้ผึ้งออกมา

1.3 นำสารสกัดจากข้อ 2 ไประเหยตัวทำละลายเอทานอลออกในเครื่องระเหยชนิดสูญญากาศ (rotary evaporator, LabTech Ltd., Columbia, USA) จากนั้นนำมาเข้าเครื่องระเหิดแห้ง (freeze dryer, CHRIST, Shropshire, UK) ภายใต้อากาศแห้งที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส จนได้เป็นผง จากนั้นเก็บสารสกัดหยาบพรอพอลิสผงที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียสจนกว่าจะนำมาใช้ เมื่อต้องการใช้ให้ชั่งผงพรอพอลิสสกัดหยาบตามน้ำหนักที่ต้องการ แล้วทำละลายด้วยสารสกัดชนิดต่าง ๆ เช่น เอทานอลหรือไดเมทิลซัลฟอกไซด์ (dimethylsulfoxide, DMSO) เพื่อนำไปใช้ทดสอบต่อไป

2. ขั้นตอนการทดลอง

2.1 การเตรียมเซลล์เนื้อเยื่อในจากฟันมนุษย์

2.1.1 เก็บฟันกรามน้อยที่ถอนทันที ในภาชนะปลอดเชื้อที่มีฝาปิด และภายในบรรจุอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดดีเอ็มอีเอ็ม (Dulbecco's Modified Eagle Medium, DMEM) ที่ประกอบด้วยซีรัม (fetal bovine serum, FBS) ความเข้มข้นร้อยละ 10 เพนนิซิลินจี (penicillin G) 100 ยูนิตต่อมิลลิลิตร สเตรปโตมัยซิน (streptomycin) 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร และแอมโฟเทอริซินบี (amphotericin B) 25 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร จากนั้นตัดฟันในแนวตั้งจนถึงชั้นเนื้อเยื่อในด้วยแผ่นคาร์โบรันดัม ที่ผ่านการฆ่าเชื้อแล้ว และตัดชิ้นเนื้อเยื่อในเป็นชิ้นเล็ก ๆ ขนาดประมาณ 1×1×1 มิลลิเมตร ด้วยมีดเบอร์ 15 (สารเคมีทั้งหมดในข้อ 2.1.1 มาจาก BioWhittaker®, Lonza Walkersville, Inc., MD, USA)

2.1.2 นำชิ้นเนื้อเยื่อในที่ได้ไปเลี้ยงในจานเลี้ยงเซลล์ ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 35 มิลลิเมตร ใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ ข้างต้นพอท่วม เลี้ยงเซลล์เนื้อเยื่อในไว้ในตู้บเลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส และ

คาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก 2 ถึง 3 วัน เมื่อเซลล์เริ่มเจริญออกจากชั้นเนื้อเยื่อใน จานเต็มจานเพาะเลี้ยงแล้ว ก็นำไปหว่าน (subculture) ในจานเพาะเลี้ยงใหม่ที่มีขนาดใหญ่ขึ้น (เส้นผ่านศูนย์กลาง 60 มิลลิเมตร) โดยใช้เอ็นไซม์ ทริปซินผสมกับสารอีดีทีเอ (trypsin with EDTA, BioWhittaker®, Lonza Walkersville, Inc., MD, USA) ที่มีความเข้มข้นร้อยละ 0.25 เพื่อให้เซลล์หลุดออกจากจานเพาะเลี้ยงเดิม แล้วนำเซลล์ถ่ายไปอยู่ในถาดเลี้ยงเซลล์ (flask) ขนาด 25 ตารางเซนติเมตร ถือเป็นเซลล์รุ่นที่ 1

2.1.3 เลี้ยงให้เซลล์เต็มถาดเลี้ยง โดยถ่ายเซลล์ไปเรื่อย ๆ ทุก ๆ 5 ถึง 7 วัน ในอัตราส่วน 1 ต่อ 3 จนได้เซลล์ในรุ่นที่ 3 ถึง 8 (3^{rd} - 8^{th} passage) ซึ่งเหมาะในการนำมาใช้งาน

2.2 การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งด้วยวิธีอะลามาร์บลู (Alamar blue assay)

2.2.1 หว่านเซลล์เนื้อเยื่อในลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ที่มีความหนาแน่นประมาณ 10^4 เซลล์ต่อหลุม (2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 10 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เลี้ยงไว้ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดไม่มีซีรัม 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ชั่วโมง และเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ไม่มีซีรัมต่อไปอีก 24 ชั่วโมง

2.2.2 นำผงสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่สกัดได้ มาละลายด้วยตัวทำละลาย ไดเมทิลซัลฟอกไซด์ ที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ที่เตรียมไว้ มาทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อใน

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 10 รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไป 3 หลุม

- กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน

(ความเข้มข้น 10,000, 1,000, 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไปความเข้มข้นละ 3 หลุม รวมเป็น 15 หลุม

- กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมบวก คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้สารละลายไดเมทิลซัลฟอกไซด์และอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไป 3 หลุม

- กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมลบ คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้สารที่เป็นพิษได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (hydrogen peroxide) ร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไป 3 หลุม

ทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในระยะเวลา ดังนี้ 6, 12, 24 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

2.2.3 เติมนสารละลายอะลามาร์บลู (alamar blue solution, AbD serotec, MorphoSys UK Ltd, Oxford, UK) ปริมาตร 5 ไมโครลิตร ลงไปในทุกหลุมทิ้งไว้ 4 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นร้อยละ 95

2.2.4 วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท (microplate reader; Varioskan Flash Thermo Fisher Scientific Inc, Vantaa, Finland) ที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร

2.3 การทดสอบสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งต่อการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ด้วยวิธีเมทิลีนบลู (methylene blue assay)

2.3.1 หว่านเซลล์เนื้อเยื่อในลงในจานเลี้ยงเซลล์แบบ 96 หลุม ที่มีความหนาแน่นประมาณ 10^4 เซลล์ต่อหลุม (2×10^5 เซลล์ต่อมิลลิเมตร) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 10 ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เลี้ยงไว้ในตู้บ่มที่มีคาร์บอนไดออกไซด์ ร้อยละ 5 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์เป็นชนิดไม่มีซีรัม 2 ครั้ง ๆ ละ 3 ชั่วโมง และเลี้ยงเซลล์ในภาวะที่ไม่มีซีรัมต่อไปอีก 24 ชั่วโมง

2.3.2 นำสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งทุกความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์จากการทดลองข้างต้น (ข้อ 2.2) (ความเข้มข้น 10,000, 5,000, 1,000, 500 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) มาทดสอบ ดังนี้

- กลุ่มที่ 1 กลุ่มควบคุม คือ กลุ่มเซลล์ที่มีเฉพาะอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมฮีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 10 รวมปริมาตร 50 ไมโครลิตร ใส่ลงไป 3 หลุม

- กลุ่มที่ 2 กลุ่มทดลอง คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ความเข้มข้นแตกต่างกัน (ความเข้มข้น 10,000, 5,000, 1,000, 500 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิกรัม) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร (ความเข้มข้นละ 3 หลุม)

- กลุ่มที่ 3 กลุ่มควบคุมบวก คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้สารละลายไคเมทิลซัลโฟนิกแอซิดและอาหารเลี้ยงเซลล์ที่เติมฮีเอ็มที่มีซีรัม ร้อยละ 10 ในอัตราส่วน 1 ต่อ 9 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร ลงไป 3 หลุม

- กลุ่มที่ 4 กลุ่มควบคุมลบ คือ กลุ่มเซลล์ที่ได้สารที่เป็นพิษได้แก่ ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ ร้อยละ 10 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 50 ไมโครลิตรลงไป 3 หลุม

ทดสอบกับเซลล์เนื้อเยื่อในระยะเวลา ดังนี้ 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมงตามลำดับ

2.3.3 เมื่อครบแต่ละช่วงเวลาข้างต้นให้ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ออก แล้วคงสภาพเซลล์ด้วยสารฟอร์มาดีไฮด์ (formaldehyde) ความเข้มข้นร้อยละ 4 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที

2.3.4 ล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาลายน์ (phosphate buffer saline, PBS, BioWhittaker®, Lonza Walkersville, Inc., MD, USA) ที่มีค่าพีเอช (pH) 7.4 ตามด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ซาลายน์ (borate buffer saline) ที่มีค่าพีเอช 8.5 ความเข้มข้น 0.01 โมล

2.3.5 ย้อมด้วยสีเมทิลีนบลู ความเข้มข้นร้อยละ 1 (โดยมวล) ปริมาตร 50 ไมโครลิตร เป็นเวลา 30 นาที

2.3.6 ล้างสีส่วนเกินออก ด้วยสารละลายบอเรตบัฟเฟอร์ 3 ครั้ง ทั้งไว้ให้แห้ง แล้วละลายสีที่ย้อมติดเซลล์ด้วยสารละลายเอทานอลกับกรดไฮโดรคลอริก (hydrochloric acid) ในอัตราส่วน 1 ต่อ 1 (โดยปริมาตร) ปริมาตร 100 ไมโครลิตร

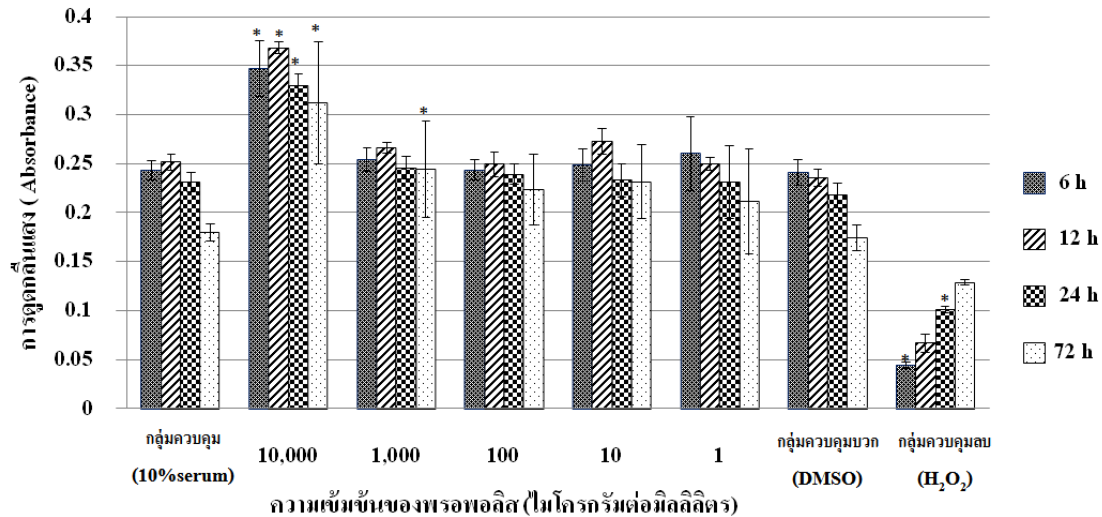
2.3.7 วัดการดูดกลืนแสงด้วยเครื่องวัดการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท ที่ความยาวคลื่น 667 นาโนเมตร

การวิเคราะห์ข้อมูล

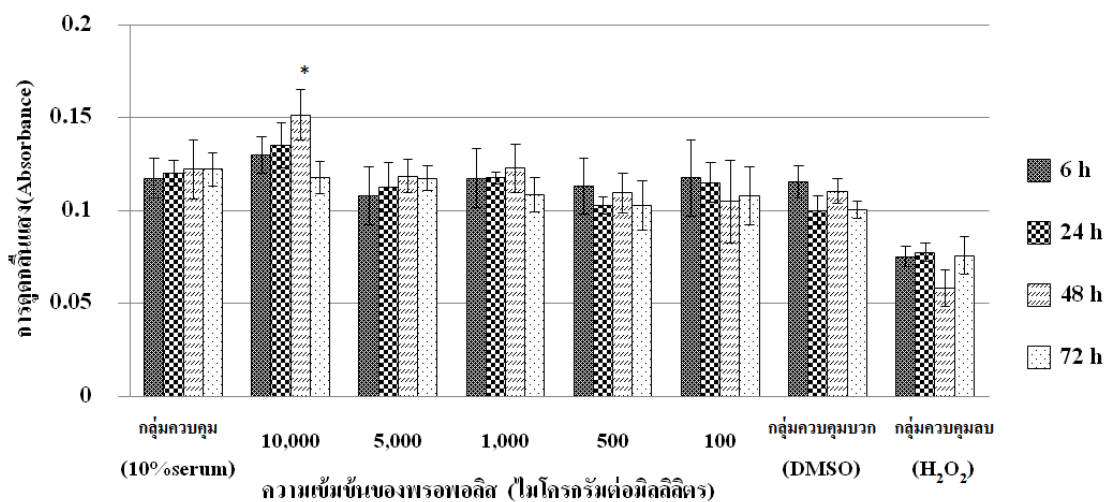
เปรียบเทียบความเป็นพิษ และการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในของพืชมมนุษย์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่มีความเข้มข้นแตกต่างกัน ณ ระยะเวลาต่าง ๆ โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one-way ANOVA) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผลการวิจัย

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบ



รูปที่ 1 แสดงการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพอร์บอลไทยจากรังผึ้งต่อเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ด้วยวิธีอะลามาร์บลู โดยทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพอร์บอลไทยจากรังผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 10,000, 1,000, 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ระยะเวลา 6, 12, 24 และ 72 ชั่วโมง ข้อมูลแสดงอยู่ในรูป ค่าเฉลี่ย ± ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม $p < 0.05$)



รูปที่ 2 แสดงการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ด้วยวิธีเมทิลทีนบลู โดยทดสอบด้วยสารสกัดหยาบพอร์บอลไทยจากรังผึ้งที่ระดับความเข้มข้น 10,000, 5,000, 1,000, 500 และ 100 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ระยะเวลา 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญจากกลุ่มควบคุม $p < 0.05$)

พรอพอลิสไทยจากรังผึ้ง ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 100 ด้วยวิธีอะลามาร์บลู พบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่ความเข้มข้น 100, 10 และ 1 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร) ไม่มีความแตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญ ในทุกระยะเวลาทดสอบ 6, 12, 24 และ 72 ชั่วโมง แต่จะพบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.001$) ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ระยะเวลาทดสอบ 6, 12, 24 และ 72 ชั่วโมง และที่ความเข้มข้น 1,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร ที่ระยะเวลาทดสอบ 72 ชั่วโมงเท่านั้น (ดังรูปที่ 1)

เมื่อศึกษาการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ด้วยวิธีเมทิลีนบลู ที่ระยะเวลา 6, 24, 48 และ 72 ชั่วโมง (ดังรูปที่ 2) พบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งทุกความเข้มข้นไม่มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 1.00$) ยกเว้นสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่ความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตรกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ได้มากที่สุด โดยจะกระตุ้นการสร้างเซลล์ได้แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p = 0.033$) ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง

บทวิจารณ์

การศึกษานี้พบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งความเข้มข้น 10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร (10 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร) มีความปลอดภัยต่อเซลล์เนื้อเยื่อในฟันของมนุษย์ ซึ่งความเข้มข้นนี้สูงกว่าการศึกษาของ Al-shaher et al. (2004) ที่พบว่า สารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้นต่ำกว่า 2 มิลลิกรัมไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในและเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ (periodontal ligament cells) ของฟันมนุษย์ นอกจากนี้ยังสูงกว่าการศึกษาของ Sabir et al. (2005) ที่พบว่า สารสกัดพรอพอลิสความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิตร ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในของหนู รวมถึงการศึกษาของ De Funari et al. (2007) ที่พบว่า

ความเข้มข้นต่ำกว่า 31.25 ไมโครกรัมต่อมิลลิตร มีความปลอดภัยต่อเซลล์สร้างเส้นใยของหนู (murine fibroblast cells) เหตุที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งในการศึกษานี้มีความแตกต่างจากการศึกษาอื่นอาจเกิดจากเซลล์ที่นำมาใช้ในการศึกษานี้แตกต่างไปจากเซลล์ในการศึกษาอื่นที่ใช้เซลล์จากสัตว์ทดลอง จึงอาจส่งผลให้มีการตอบสนองต่างกัน นอกจากนี้พรอพอลิสมีฤทธิ์หลายประกายขึ้นอยู่กับแหล่งกำเนิดและองค์ประกอบทางเคมี ซึ่งองค์ประกอบหลักที่สำคัญหลายชนิด ได้แก่ กลุ่มฟีนอลิก ฟลาโวนอยด์ และ ส่วนประกอบอะโรมาติก เป็นต้น จึงทำให้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยแสดงฤทธิ์ที่แตกต่างออกไปจากการศึกษาข้างต้น

การเลือกสารที่ใช้สกัดพรอพอลิสเป็นปัจจัยหนึ่งที่มีผลต่อองค์ประกอบที่สำคัญในสารสกัดพรอพอลิส เนื่องมาจากการศึกษาของ Siripatrawan et al. (2013) พบว่า การสกัดพรอพอลิสไทยด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูง จะทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟีนอลิกมากกว่าการสกัดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า นอกจากนี้การศึกษาของ Coneac et al. (2008) ยังพบว่า การสกัดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นสูงนั้น จะทำให้ได้ปริมาณสารประกอบฟลาโวนอยด์มากกว่าการสกัดด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นต่ำกว่า นอกจากนี้ยังมีการศึกษาเปรียบเทียบการสกัดพรอพอลิสด้วยเอทานอลและน้ำ พบว่า การสกัดด้วยเอทานอล จะมีปริมาณสารประกอบฟีนอลิกและฟลาโวนอยด์มากกว่าสารสกัดพรอพอลิสด้วยน้ำ (Mello et al., 2010) (Mello et al., 2012) ดังนั้น การศึกษานี้จึงเลือกใช้การสกัดพรอพอลิสด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้นร้อยละ 100 เพื่อหวังผลให้ได้องค์ประกอบที่สำคัญของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้ง

เทคนิคอะลามาร์บลู เป็นวิธีวัดจำนวนเซลล์ซึ่งมีข้อดีที่เหนือกว่าวิธีเอ็มทีที คือ ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ขั้นตอนการทำงานง่าย และไม่ทำให้เซลล์ตายในขั้นตอนการวัดจำนวนเซลล์ นอกจากนี้สารละลายอะลามาร์บลูมีความไวต่อการตอบสนองต่อการนับ

จำนวนเซลล์มากกว่าวิธีเอ็มทีทีอีกด้วย เพราะอะลามาร์บลูจะเปลี่ยนรูปแบบของเอ็นไซม์ภายในไมโทคอนเดรีย (mitochondria) ของเซลล์ที่มีชีวิต ซึ่งต่างจากเอ็มทีทีที่เกิดจากความสามารถของเซลล์ที่มีชีวิตในการผลิตฟลักซ์ฟอร์มาซาน (formazan) จากการแยกเกลือเตตระโซเลียม (tetrasolium salt) ซึ่งเกิดจากการสร้างภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ที่มีชีวิต (Nociari et al., 1998) ในการศึกษานี้ได้ทำการศึกษานำร่อง (pilot study) โดยวัดจำนวนเซลล์ด้วยวิธีเอ็มทีที ผลการศึกษาพบว่า สีของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่มีสีเหลืองเข้ม จะไปเสริมกับสีของเอ็มทีที ทำให้มีสีเหลืองที่เข้มมากขึ้น ขีดขวางประสิทธิภาพในการวัดค่าการดูดกลืนแสงในเครื่องวัดการดูดกลืนแสงในไมโครเพลท ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการใช้อะลามาร์บลูที่มีสีน้ำเงิน ทำให้แตกต่างกับสีของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้ง ส่งผลให้การวัดค่าการดูดกลืนแสงถูกต้องแม่นยำมากขึ้น แต่ข้อเสียของวิธีอะลามาร์บลู คือ สารละลายมีราคาแพง

ส่วนการวิเคราะห์การเพิ่มจำนวนของเซลล์ในการศึกษานี้ ได้เลือกวิธีเมทิลลีนบลู เนื่องจากเป็นเทคนิคที่ทำได้ง่าย ราคาถูก อีกทั้งยังมีประสิทธิภาพที่ดีในการวัดจำนวนเซลล์ได้อย่างถูกต้องแม่นยำ ถึงแม้ว่าจำนวนเซลล์ มีน้อย เมื่อเทียบกับ การวัดวิธีอื่น ๆ เช่น เทคนิคทริปแลนบลู (trypan blue) และการสกัดโปรตีน (protein extraction) เป็นต้น (Felice et al., 2009) เพราะเมทิลลีนบลูจะยับยั้งจากหลุดออกของเซลล์จากหลุมทดสอบ ทั้งในขั้นตอนการทริปไซไนส์ (trypsinization) และการหว่านเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม ข้อเสียของเทคนิคนี้ คือ ขั้นตอนการทำซ้ำซ้อน ต้องใช้ความชำนาญของผู้ทดลอง และใช้เวลานาน

สรุปผลการวิจัย

สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้ง ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อใน และสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ ได้ที่ความเข้มข้น

10,000 ไมโครกรัมต่อมิลลิเมตร ที่ระยะเวลา 48 ชั่วโมง อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ $p < 0.05$

ข้อเสนอแนะ

การวิจัยนี้เป็นการวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ ที่ทำในเซลล์ที่เพาะเลี้ยงจากเนื้อเยื่อในของฟันมนุษย์ เพียง 5 ซี่ จาก 5 คน จึงไม่สามารถสรุปผลของประชากรทั้งหมดได้ นอกจากนี้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากรังผึ้งที่ได้มีส่วนประกอบที่สำคัญหลายประการ ดังนั้น จึงไม่สามารถบ่งชี้ได้ว่าเป็นผลของสารชนิดใดในสารสกัดพรอพอลิสที่มีผลต่อความเป็นพิษและกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์เนื้อเยื่อในของฟัน รวมถึงคุณสมบัติของพรอพอลิสยังขึ้นอยู่กับแหล่งที่มาและฤดูกาลอีกด้วย

กิตติกรรมประกาศ

ขอขอบคุณ มหาวิทยาลัยขอนแก่น ที่ให้ทุนสนับสนุนการศึกษาวิจัยในครั้งนี้

เอกสารอ้างอิง

- Al-Qatham, H., and Al-Madi, E. 2003. Comparison of sodium hypochlorite, propolis and saline as root canal irrigants: a pilot study. Saudi Dental Journal. 15(2): 100-103.
- Al-Shaher, A., Wallace, J., Agarwal, S., Bretz, W., and Baugh, D. 2004. Effect of propolis on human fibroblasts from the pulp and periodontal ligament. J Endod. 30: 359-361.
- Burdock, GA. 1998. Review of biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food Chem Toxicol. 36: 347-363.

- Coneac, G., Gafitanu, E., Hadaruga, DI., Haddaruga, NG., Pinzaru, IA., Bandur, G., Paunescu, V., and Gruia, A. 2008. Flavonoid Contents of Propolis from the West Side of Romania and Correlation with the Antioxidant Activity. *Chem. Bull.* 53(67): 1-2.
- De Funari, CS., De Oliveira Ferro, V., and Mathor, MB. 2007. Analysis of propolis from *Baccharis dracunculifolia* DC. (Compositae) and its effects on mouse fibroblasts. *J Ethnopharmacol.* 111(2): 206-212.
- Dobrowolski, JW., Vohara, SB., Sharma, K., Shah, SA., Naqvi, SAH., and Dandiya, PC. 1991. Antibacterial, antifungal, antiamoebic, anti-inflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. *J Ethnopharmacol.* 35(1): 77-82.
- Felice, DL., Sun, J., and Liu, RH. 2009. A modified methylene blue assay for accurate cell counting. *J Funct Foods.* 1(1): 109-118.
- Ferreira, FB., Torres, SA., Rosa, OP., Ferreira, CM., Garcia, RB., Marcucci, MC., and Gomes, BP. 2007. Antimicrobial effect of propolis and other substances against selected endodontic pathogens. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 104(5): 709-716.
- Marcucci, MC. 1995. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Apidologie.* 26: 83-99.
- Mello, BCBS., Petrus, JCC., and Hubinger, MD. 2010. Concentration of flavonoids and phenolic compounds in aqueous and ethanolic propolis extracts through nanofiltration. *J Food Eng.* 96(4): 533-539.
- Mello, BCBS., Petrus, JCC., and Hubinger, MD. 2012. Antioxidant activity and polyphenol contents in Brazilian green propolis extracts prepared with the use of ethanol and water as solvents in different pH values. *IJFST.* 47: 2510-2518.
- Nociari, MM., Shalev, A., Benias, P., and Russo, C. 1998. A novel one-step, highly sensitive fluorometric assay to evaluate cell-mediated cytotoxicity. *J Immunol Meth.* 213: 157-167.
- Oncag, O., Cogulu, D., Uzel, A., and Sorkun, K. 2006. Efficacy of propolis as an intracanal medicament against *Enterococcus faecalis*. *Gen Dent.* 54(5): 319-322.
- Pileggi, R., Antony, K., Johnson, K., Zuo, J., and Shannon, HL. 2009. Propolis inhibits osteoclast maturation. *Dent Traumatol.* 25(6): 584-588.
- Sabir, A., Tabbu, CR., Agustiono, P., and Sosroseno, W. 2005. Histological analysis of rat dental pulp tissue capped with propolis. *J Oral Sci.* 47(3): 135-138.
- Siripatrawan, U., Vitchayakitti, W., and Sanguandeekul, R. 2013. Antioxidant and antimicrobial properties of Thai propolis extracted using ethanol aqueous solution. *IJFST.* 48: 22-27.
- Valera, MC., Da Rosa, JA., Maekawa, LE., Oliveira, LD., Carvalho, CA., Koga-Ito, CY., Antonio Olavo Cardoso Jorge, AOC., and Campos, SJD. 2010. Action of propolis and medications against *Escherichia coli* and endotoxin in root canals. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 110(4): e70-e74.