

การทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพออลิสไทยของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ในห้องปฏิบัติการ

เฉลิมศักดิ์ สมศรีสมาน* จันทรีธิดา กวภูตานนท์ ณ มหาสารคาม* ณัฐพงษ์ กันตตรง*
สิริภา คำทวี** ณัฐพงษ์ ปานนาค*** ชลญา สุชนัน**** ปัทมา ชัยเลิศวิมลกุล*

บทคัดย่อ

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพออลิสไทยในความเข้มข้น และระยะเวลาที่ต่างกันด้วยวิธีเพอร์โตบรู โดยใช้เซลล์เอ็นอีคปริทันต์แช่แข็งที่ได้จากฟันกรามน้อยมนุษย์ที่ถอนเพื่อการจัดฟัน ทดสอบความมีชีวิตของเซลล์โดยเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพออลิสไทยในความเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีกลุ่มควบคุมบวกคือ สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ และกลุ่มควบคุมลบคือ อาหารเลี้ยงเซลล์ที่เอมิเอี่ยมปราศจากซีรัม เป็นระยะเวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง ประเมินความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ด้วยวิธีเพอร์โตบรู ผลการทดสอบพบว่า ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพออลิสไทย 2.5 1.25 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ในระยะเวลาการแช่ 3 6 และ 12 ชั่วโมง ตามลำดับอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบพรอพออลิสไทยในความเข้มข้นต่ำลง สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ในระยะเวลาที่นานขึ้น ดังนั้นสารสกัดหยาบพรอพออลิสไทยไม่เป็นพิษต่อเซลล์เอ็นอีคปริทันต์

คำไชรหัส: เซลล์เอ็นอีคปริทันต์/ สารสกัดหยาบพรอพออลิสไทย/ ความเป็นพิษต่อเซลล์

Received: March 12, 2020

Revised: November 05, 2020

Accepted: December 07, 2020

บทนำ

ฟันหลุดออกจากเบ้าฟัน (Avulsion tooth) เกิดขึ้นได้ทั้งในฟันน้ำนม และฟันแท้ มักพบในเด็กเล็กและวัยรุ่น โดยจะมีการทำลายอวัยวะของฟัน ได้แก่ เซลล์เอ็นอีคปริทันต์ เคลือบรากฟัน กระดูกเบ้าฟัน และอาจมีการฉีกขาดของเนื้อเยื่อเหงือกและเนื้อเยื่อใน¹ ปัจจัยที่สำคัญมากที่สุด คือ การทำลายของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ที่เกิดขึ้นขณะได้รับอุบัติเหตุขณะปลุกฟันกลับคืนเบ้าฟัน² โดยเซลล์เอ็นอีคปริทันต์มีรูปร่างคล้ายกระสวย มีกอลจิคอมเพล็กซ์ (Golgi complex) และเอนโดพลาสมิกเรติคูลัม (Endoplasmic reticulum) เป็นจำนวนมาก และมีโครงร่างเซลล์ที่พัฒนาอย่างดี เซลล์เอ็นอีคปริทันต์มีหน้าที่เป็นเบาะพองฟัน รับรู้การเคลื่อนที่ของฟันในเบ้าฟัน และรักษากภาวะสมดุลในการย่อยสลาย และสังเคราะห์สารนอกเซลล์ แต่เมื่อภาวะสมดุลเสียไปจากการทำลายของเอ็นอีคปริทันต์ขึ้นบางส่วนหรือทั้งหมด จะมีกระดูกมาสะสมจนบางครั้งเกิดการอุดตันของช่องเอ็นอีคปริทันต์นำไปสู่การเสื่อมของฟันและกระดูก³ เมื่อฟันหลุดออกจากเบ้าฟันควรรีบนำฟันกลับคืนใส่เบ้าฟันให้เร็วที่สุด⁴ แต่ในบางครั้งก็ไม่สามารถใส่ฟันหลุดออกจากเบ้าฟันได้ในทันที ดังนั้นสาร

ตัวกลางที่ใช้ในการเก็บฟันและระยะเวลาในการแช่ฟันจึงเป็นปัจจัยที่มีผลต่อความสำเร็จทางคลินิกในการปลุกฟันกลับคืนเบ้าฟัน⁴⁻⁷ ในการศึกษาปัจจุบันพบว่ามีการใช้สารตัวกลางที่ใช้ในการเก็บแช่ฟันหลายชนิด เช่น สารละลายแอสคอบาลานซ์ซอลด์ (Hank's balanced salt solution) นม น้ำเกลือ น้ำลาย ไข่ขาว สารสกัดชาเขียว สารสกัดพรอพออลิส (Propolis extract)

พรอพออลิสเป็นสารเหนียวคล้ายยางไม้ มีสีเหลืองอ่อนจนถึงน้ำตาลเข้ม ได้มาจากการที่ผึ้งงานเก็บสะสมยางไม้จากใบอ่อน ตาใบ หน่ออ่อน เปลือกไม้ แล้วนำมาผสมด้วยเอนไซม์ในน้ำลายของผึ้ง ผึ้งงานใช้พรอพออลิสในการเคลือบรังเพื่อคงสภาพและเพิ่มความแข็งแรง นำมาอุดลดขนาดรู ใช้เพื่อป้องกันอันตรายจากศัตรู และห่อหุ้มสิ่งมีชีวิตที่ถูกฆ่าภายในรังเพื่อป้องกันของเสียและเชื้อโรคจากการย่อยสลาย

พรอพออลิสมีลักษณะแข็งเปราะเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิต่ำ แต่จะเหนียวมากขึ้นเมื่ออยู่ในสภาวะที่มีอุณหภูมิสูง พรอพออลิสถูกเรียกอีกชื่อว่า กาวผึ้ง (Bee glue) มีสัดส่วนองค์ประกอบขึ้นอยู่กับพื้นที่ของพืชและช่วงเวลาเก็บ ซึ่งมีความแตกต่างในด้านลักษณะภูมิประเทศ และฤดูกาล⁸

* สาขาวิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น

** แผนกทันตกรรม โรงพยาบาลผาขาว อำเภอผาขาว จังหวัดเลย

*** แผนกทันตกรรม โรงพยาบาลภูหลวง อำเภอภูหลวง จังหวัดเลย

**** แผนกทันตกรรม โรงพยาบาลมหาสารคาม อำเภอเมือง จังหวัดมหาสารคาม

พรอฟอลิส ประกอบด้วย เรซินร้อยละ 50 ไซฟร้อยละ 30 น้ำมันหอมระเหยร้อยละ 10 ละอองเกสรดอกไม้ร้อยละ 5 และสารอื่น ๆ ร้อยละ 5 โดยก่อนการนำพรอฟอลิสมาใช้จะต้องนำพรอฟอลิสดิบมาละลายด้วยเอทานอลร้อยละ 95 เพื่อเปลี่ยนเป็นพรอฟอลิสสกัดจากเอทานอล (Ethanol extract of propolis: EEP) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า มนุษย์ได้นำพรอฟอลิสมาใช้เป็นส่วนประกอบในผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ ตั้งแต่สมัยโบราณ เช่น นามาสมในยาสีฟัน ไม้ขัดฟัน และอาหารเสริม เนื่องจากพบว่าพรอฟอลิสมีความเป็นพิษเฉียบพลันต่อช่องปากน้อย⁹

พรอฟอลิส มีองค์ประกอบทางเคมีหลักคือ ฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) กรดฟีนอลิก (Phenolic acid) และเอสเทอร์ (Ester) และพบสารกลุ่มอื่น เช่น ฟีนอลิกแอลดีไฮด์ (Phenolic aldehyde) และคีโตน (Ketone) มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาในการช่วยปกป้องตับ ด้านการเกิดเนื้องอก ด้านอนุมูลอิสระ ด้านแบคทีเรีย และด้านการอักเสบ⁹ แต่จากการศึกษาในห้องปฏิบัติการพบว่าความสามารถในการต้านเชื้อแบคทีเรียของสารสกัดหยาบพรอฟอลิสมีความหลากหลาย ขึ้นอยู่กับสถานที่แหล่งเก็บพรอฟอลิสและพบว่าพรอฟอลิสที่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียสูงมักเป็นพรอฟอลิสที่เก็บจากภูมิประเทศป่าดิบชื้น¹⁰

ในปัจจุบันมีการศึกษาทางทันตกรรมมากมายเกี่ยวกับพรอฟอลิสทั้งที่สกัดจากประเทศต่าง ๆ เช่น บราซิล อินเดีย และพรอฟอลิสจากประเทศไทย โดยการศึกษาที่ผ่านมาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอฟอลิสไทยต่อเซลล์ และความสามารถในการเป็นตัวกลางแช่ฟันของพรอฟอลิสไทยพบว่าสารสกัดหยาบพรอฟอลิสไทย ความเข้มข้น 10 (ระยะเวลา 6 12 24 และ 72 ชั่วโมง) และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร (ระยะเวลา 72 ชั่วโมง) ไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์เนื้อเยื่อในด้วยการทดสอบวิธีอะลามาร์บลู (Alamar Blue)¹¹ และพบว่าสารสกัดหยาบพรอฟอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นความเข้มข้นที่ไม่เป็นพิษ และมีร้อยละการมีชีวิตของเซลล์เอ็นโดทีเลียตมากที่สุด เมื่อศึกษาโดยการนำฟันที่ปล่อยในสภาวะแห้งนาน 30 นาที แล้วแช่ในสารสกัดหยาบพรอฟอลิสเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง และประเมินการมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีย้อมสีทริปแฟนบลู และนับภายใต้กล้องจุลทรรศน์ ซึ่งสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบพรอฟอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตรสามารถคงสภาพการมีชีวิตของเซลล์เอ็นโดทีเลียตได้ดีกว่านม และใกล้เคียงกับสารละลายแอสคอบาลานซ์ซอร์บิต¹²

วิธีการที่นิยมใช้ในการทดสอบการมีชีวิตของเซลล์ พบว่าการทดสอบโดยการตรวจอะทีพี (ATP detection assay)

การทดสอบเรซาซูรินรีดักชัน (Resazurin reduction assay) เป็นวิธีการที่สิ้นเปลืองน้อย และให้ผลที่เพียงพอที่สามารถออกแบบการทดลองได้ดี และพบว่าเพรสโตบลู (PrestoBlue) ซึ่งเป็นหนึ่งในวิธีการทดสอบเรซาซูรินรีดักชัน มีความไวมากกว่าวิธีเอ็มทีที (MTT assay) และยังมีการศึกษาในแบคทีเรียพบว่า เพรสโตบลูเปลี่ยนสีได้เร็วกว่าอะลามาร์บลู และเพรสโตบลูสามารถแสดงความแตกต่างที่ชัดเจนระหว่างเซลล์ที่ตายแล้วและยังมีชีวิตอยู่ได้ดีกว่าวิธีเอกซ์ทีที (XTT assay)¹³⁻¹⁵

ดังนั้นจึงมีความสนใจศึกษาเพิ่มเติมเกี่ยวกับความเป็นพิษของพรอฟอลิสไทย ในความเข้มข้นต่าง ๆ กัน โดยใช้วิธีการทดลองที่แม่นยำกว่า และแช่ในระยะเวลาที่นานขึ้น โดยใช้วิธีทดสอบการมีชีวิตของเซลล์เอ็นโดทีเลียตปริทันต์ เพื่อนำผลมาใช้ในการศึกษาการนำสารสกัดหยาบพรอฟอลิสไทยมาใช้ในคงสภาพเซลล์เอ็นโดทีเลียตปริทันต์ และพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์สารตัวกลางในการแช่ฟันหลุดออกจากเบ้าต่อไป

วัตถุประสงค์และวิธีการ

งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลองในห้องปฏิบัติการ (Laboratory experimental research) ที่ทำการศึกษาในเซลล์เอ็นโดทีเลียตปริทันต์แช่แข็งที่ได้จากฟันกรามน้อยที่ถอนจากผู้ป่วยโดยไม่มีข้อมูลเชื่อมโยงถึงบุคคลที่เป็นเจ้าของ และได้รับการยกเว้นการพิจารณาจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ จากคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น (HE612269)

กลุ่มตัวอย่าง เซลล์เอ็นโดทีเลียตปริทันต์แช่แข็งที่ได้จากฟันกรามน้อยที่ถูกถอนจากผู้ป่วยอายุระหว่าง 18 ถึง 20 ปี ที่จำเป็นต้องถอนขึ้นนั้น ๆ ออก เพื่อการจัดฟัน ด้วยวิธีการถอนฟันอย่างง่าย (Simple extraction) โดยฟันซี่นั้นต้องมีสภาพตัวฟันและรากฟันสมบูรณ์ ปลายรากฟันปิด ไม่มีรอยอันตรายจากการบดเคี้ยว (Trauma from occlusion) ไม่มีโรคปริทันต์ระดับปานกลางถึงรุนแรง ไม่มีการสูญเสียระดับการยึดเกาะทางคลินิกของเนื้อเยื่อปริทันต์ตั้งแต่ 3 มิลลิเมตรขึ้นไป และ ไม่เป็นพื้นที่โยกด้วยสาเหตุใด ๆ ก็ตาม

ขั้นตอนการวิจัย

1. การเตรียมเซลล์

1.1 ขั้นตอนการละลายเซลล์แช่แข็ง (Thawing frozen cell) นำเซลล์เอ็นโดทีเลียตปริทันต์รุ่นที่ 3 ที่แช่แข็งไว้ในไนโตรเจนเหลวออกมาละลายในอ่างน้ำควบคุมอุณหภูมิที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียสเป็นเวลาประมาณ 1 นาที นำไปเจือจางด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่อุ่นแล้ว ปริมาณ 5 มิลลิเมตร แล้วนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอนที่ความเร็ว

รอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนออกไป จนเหลือแต่ตะกอนเซลล์ แล้วจึงผสมอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้เข้ากับตะกอนเซลล์ แล้วนำไปเพาะเลี้ยงในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ขนาด 60x60 มิลลิเมตร เก็บจานเพาะเลี้ยงไว้ในตู้บ่มควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นร้อยละ 95 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง จึงเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ เป็นเวลา 3 วัน จนเซลล์เอนไซม์ปริพันธ์แบ่งตัวมีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 ของจานเพาะเลี้ยง

1.2 เพาะเลี้ยงขยายเซลล์เอนไซม์ปริพันธ์ (Subculture) ดูดอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 เดิมออก แล้วล้างด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ ปริมาณ 5 มิลลิลิตร แล้วดูดออก หลังจากนั้นเติมเอนไซม์ทริปซิน อีทีทีเอ ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 ปริมาณ 1 มิลลิลิตร เพื่อให้เซลล์หลุดจากหลุมเพาะเลี้ยงเดิม โดยนำไปเก็บไว้ในตู้บ่มควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 แล้วความชื้นร้อยละ 95 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 5 นาที เติมน้ำอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไปในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ปริมาณ 4 มิลลิลิตร แล้วใช้ปิเปตดูดขึ้นลงเพื่อให้เซลล์กระจายตัวเท่า ๆ กัน จากนั้นดูดใส่หลอดทดลองขนาด 15 มิลลิลิตร แล้วนำไปนำไปปั่นเหวี่ยงด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยงสารตกตะกอน ที่ความเร็วรอบ 1000 รอบต่อนาที เป็นระยะเวลา 5 นาที หลังจากนั้นดูดสารละลายส่วนบนออกจนเหลือแต่ตะกอนเซลล์ แล้วใส่อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ลงไปในหลอดทดลอง 1 มิลลิลิตร ใช้ปิเปตดูดขึ้นลงให้เซลล์กระจายตัวเท่า ๆ กัน แล้วทำการนับจำนวนเซลล์เพื่อแบ่งนำไปเพาะเลี้ยงเป็นเซลล์รุ่นที่ 4 เพื่อนำมาใช้ในการทดลอง

2. การเตรียมสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย นำสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร (สกัดได้จากยางเหนียวสีน้ำตาลเข้มจากรังผึ้ง ที่ได้จากจังหวัดหนองคายโดยการสกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 จำนวน 2 รอบ ไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส และนำไปกรองไขผึ้งจนได้ลักษณะใส แล้วทำการระเหยเอทานอลออก ได้เป็นสารสกัดที่มีลักษณะขุ่นหนืด สีน้ำตาลเข้มเก็บไว้ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส นำสารสกัดความเข้มข้น 1 กรัมต่อมิลลิลิตร มาละลายในสารละลายดี ฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ แล้วนำส่วนน้ำที่ได้มาละลายในอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็ม

ปราศจากซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ได้สารสกัดความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิเมตร เป็นสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นเริ่มต้น ก่อนจะนำไปละลายให้ได้ความเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อใช้ในการทดลอง

3. การเตรียมสารละลายเพรสโตบลู ละลายเพรสโตบลูจากความเข้มข้น 10 เท่า (10X) ด้วยอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มปราศจากซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ให้ได้เข้มข้น 1 เท่า (1X) เพื่อใช้ในการทดสอบวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์

4. การทดลอง หว่านเซลล์เอนไซม์ปริพันธ์ลงในไมโครเพลท 96 หลุม เป็นจำนวน 63 หลุม ให้แต่ละหลุมมีเซลล์ประมาณ 1×10^4 เซลล์ต่ออาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ปริมาตร 100 ไมโครลิตร เลี้ยงเซลล์ในตู้บ่มควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 ความชื้นร้อยละ 95 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง แล้วดูดอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ออก หลังจากนั้นแบ่งเซลล์เอนไซม์ปริพันธ์ ออกเป็น 7 กลุ่ม ในแต่ละกลุ่มจะมีเซลล์เอนไซม์ปริพันธ์ทั้งหมด 9 หลุม

กลุ่มทดลองที่ 1: สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ดูดอาหารอาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มที่มีส่วนผสมของซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10 ออกแล้วเติมสารสกัดความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในไมโครเพลท 96 หลุม หลุมละ 100 ไมโครลิตร หลุมที่ 1-3 เพื่อใช้ทดสอบการแช่เซลล์ที่ 12 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 6 ชั่วโมง ให้เติมสารสกัดความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในหลุมที่ 4-6 เพื่อใช้ทดสอบการแช่เซลล์ที่ 6 ชั่วโมง เมื่อเวลาผ่านไป 3 ชั่วโมง ให้เติมสารสกัดความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ลงไปในหลุมที่ 7-9 เพื่อใช้ทดสอบการแช่เซลล์ที่ 3 ชั่วโมง แช่เซลล์ทั้ง 9 หลุมไปอีก 3 ชั่วโมง ดูดสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยทั้ง 9 หลุมออก แล้วล้างเซลล์ด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์ซาไลน์ความเข้มข้น 1 เท่า ปริมาตร 100 ไมโครลิตร จำนวน 2 ครั้ง แล้วเติมสารละลายเพรสโตบลูจากความเข้มข้น 1X ที่ได้เตรียมไว้ ลงในหลุมทดลองทุกหลุม หลุมละ 50 ไมโครลิตร เขย่าให้ผสมเป็นเนื้อเดียวกัน เก็บในตู้บ่มควบคุมอัตราการไหลของก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 และความชื้นร้อยละ 95 อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 90 นาที แล้วนำออกมาวัดค่าการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ ด้วยเครื่องอ่านปฏิกิริยาบนไมโครเพลท บันทึกค่าฟลูออเรสเซนส์

ที่ความยาวคลื่นในการกระตุ้นพลังงาน (Excitation) เท่ากับ 560 นาโนเมตร และความยาวคลื่นในการปล่อยพลังงาน (Emission) เท่ากับ 590 นาโนเมตร

กลุ่มทดลองที่ 2-5: สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย ความเข้มข้น 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีขั้นตอนเหมือนกลุ่มทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น 0.625 1.25 2.5 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

กลุ่มทดลองที่ 6: กลุ่มควบคุมบวก มีขั้นตอนเหมือนกลุ่มทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นสารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 10

กลุ่มทดลองที่ 7: กลุ่มควบคุมลบ มีขั้นตอนเหมือนกลุ่มทดลองที่ 1 แต่เปลี่ยนความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็น อาหารเลี้ยงเซลล์ดีเอ็มอีเอ็มปราศจากซีรัมความเข้มข้นร้อยละ 10

1. ข้อมูลที่ได้จะนำเสนอในรูปแบบสถิติเชิงพรรณนา ด้วยค่ามัธยฐาน (Median) ค่าสูงสุด (Maximum) และค่าต่ำสุด (Minimum)

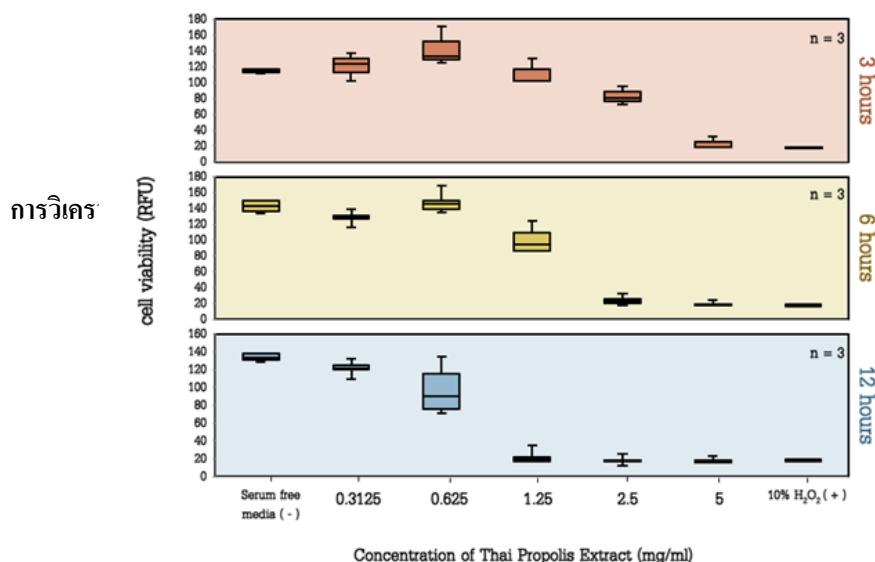
2. นำค่าเฉลี่ยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนซ์ของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์มาทดสอบการแจกแจงของข้อมูลด้วย Shapiro-Wilk ($n < 50$) และทดสอบความแปรปรวนของข้อมูลด้วย Bartlett's test

เนื่องจากข้อมูลมีการแจกแจงไม่ปกติ และมีความแปรปรวนของกลุ่มข้อมูลไม่เท่ากันจึงใช้ Kruskal-Wallis test ในการดูความแตกต่างของกลุ่มข้อมูล และใช้ Dunn's test ในการเปรียบเทียบความแตกต่างในแต่ละกลุ่มทดลอง

ทำการทดสอบสถิติทั้งหมดที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ($p=0.05$) โดยใช้โปรแกรม STATA 12.0 ในการคำนวณทั้งหมด

ผล

จากผลการทดสอบความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่สามารถลดความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์เมื่อแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นต่าง ๆ ในช่วงระยะเวลา 3 ชั่วโมง 6 ชั่วโมง และ 12 ชั่วโมงมีค่ามัธยฐาน การต่ำสุด และค่าสูงสุดของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ (รูปที่ 1 และตารางที่ 1)



รูปที่ 1 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่แช่ในความเข้มข้นแตกต่างกันที่ระยะเวลา 3, 6 และ 12 ชั่วโมง กราฟรูปกล่องแสดงค่าพิสัยของหน่วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ที่ตรวจวัดได้ เส้นความคลาดเคลื่อนบนและล่างแสดงค่ามากที่สุดและค่าที่น้อยที่สุดที่วัดได้ ตามลำดับ

Figure 1 Cytotoxic effect of Thai propolis extract on the viability of periodontal ligament (PDL) cells stored in different concentrations for 3, 6 and 12 hours. Boxplots show median of the detected relative fluorescence unit. Upper and lower error bars indicate the maximal and minimal RFU, respectively.

ตารางที่ 1 เปรียบเทียบค่าเฉลี่ยและส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ค่ามัธยฐาน ค่าต่ำสุด และค่าสูงสุดของการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ เมื่อแช่เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นต่าง ๆ ที่ระยะเวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง

Table 1 Comparison of mean and standard deviation, median, minimum and maximum of PDL cell viability when PDL cells was stored in different concentrations among 3, 6 and 12 hours

Stored period (hours)	Concentration of Thai Propolis Extract (mg/ml)	PDL cell viability (RFU)			
		Mean±SD	Median	Minimum	Maximum
3	Serum free media (negative control)	114.46±2.96	115.73	111.08	116.58
	0.3125	121.14±17.83	123.51	102.25	137.67
	0.625	142.67±24.46	132.86	124.64	170.64
	1.25	111.39±16.12	102.60	101.57	129.99
	2.5	82.96±11.80	80.33	72.69	95.85
	5	23.07±7.31	19.11	18.59	31.50
	hydrogen peroxide solution (positive control)	16.87±0.32	16.71	16.65	17.24
6	Serum free media (negative control)	142.75±13.57	142.79	129.16	156.30
	0.3125	129.75±5.04	126.85	126.82	135.57
	0.625	145.61±12.30	139.63	137.44	159.76
	1.25	94.68±26.08	108.88	64.59	110.58
	2.5	22.72±4.63	23.73	17.67	26.76
	5	17.46±0.36	17.58	17.05	17.74
	hydrogen peroxide solution (positive control)	17.50±1.18	17.21	16.49	18.79
12	Serum free media (negative control)	134.93±7.48	133.21	128.47	143.12
	0.3125	122.42±5.01	121.35	118.04	127.88
	0.625	101.56±41.69	89.99	66.88	174.81
	1.25	19.49±4.62	19.62	14.81	24.05
	2.5	17.08±1.05	16.61	16.35	18.29
	5	16.69±1.10	16.77	15.55	17.75
	hydrogen peroxide solution (positive control)	18.31±2.01	17.49	16.84	20.60

จากผลการทดสอบที่เวลา 3 ชั่วโมง เมื่อแช่เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร มีค่ามัธยฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์สูงที่สุด คือ 142.67 RFU ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p<0.05$) แต่แตกต่างกับที่ความเข้มข้น 0.3125 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรอย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$) (รูปที่ 2)

เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 และ 0.625 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 3 ชั่วโมง (รูปที่ 6A-C) มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ปกติที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 6G) คือ มีรูปร่างเป็นรูปกระสวยที่มีนิวเคลียสรูปร่างกลมอยู่ตรงกลาง และมีไซโตพลาสซึมที่ยื่นยาวออกไป ในขณะที่เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิส

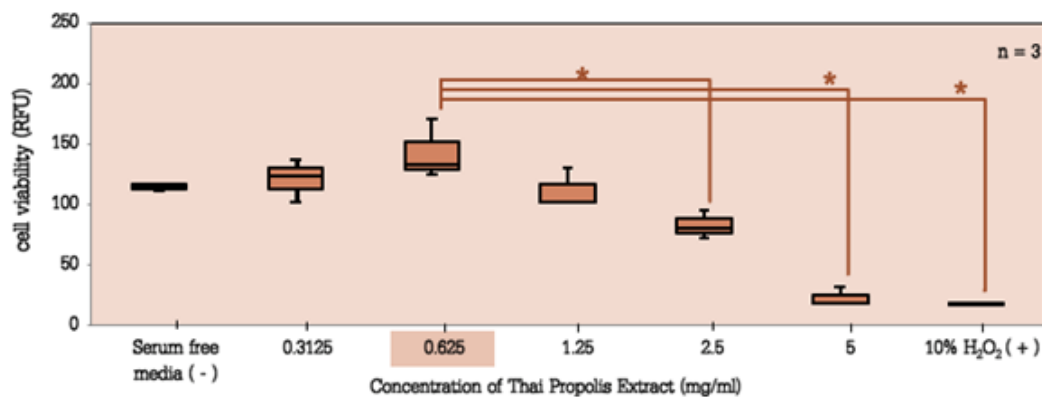
ไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะพบเซลล์ที่มีขนาดเล็กลง มีรูปร่างเป็นรูปกระสวยที่มีไซโตพลาสซึมที่ยื่นออกไปสั้นและลีบแบน แต่ยังคงพบนิวเคลียสรูปร่างกลมอยู่ตรงกลาง (รูปที่ 6D) ส่วนเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 6E) มีลักษณะเช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มควบคุมบวกที่เลี้ยงเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (รูปที่ 6F) โดยทั้ง 2 กลุ่มนี้พบว่าเซลล์มีการหดตัวอย่างมาก ไม่พบลักษณะการยื่นยาวของไซโตพลาสซึม มีนิวเคลียสที่ฝ่อลง และพบการหลุดลอกของเซลล์ออกจากหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์

จากผลการทดสอบที่เวลา 6 ชั่วโมง เมื่อแช่เซลล์เอ็นอีดีปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่ามัธยฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เอ็นอีดีปริทันต์สูงที่สุด คือ 145.61 RFU ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย

ความเข้มข้น 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่แตกต่างกับความเข้มข้น 0.3125 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 3)

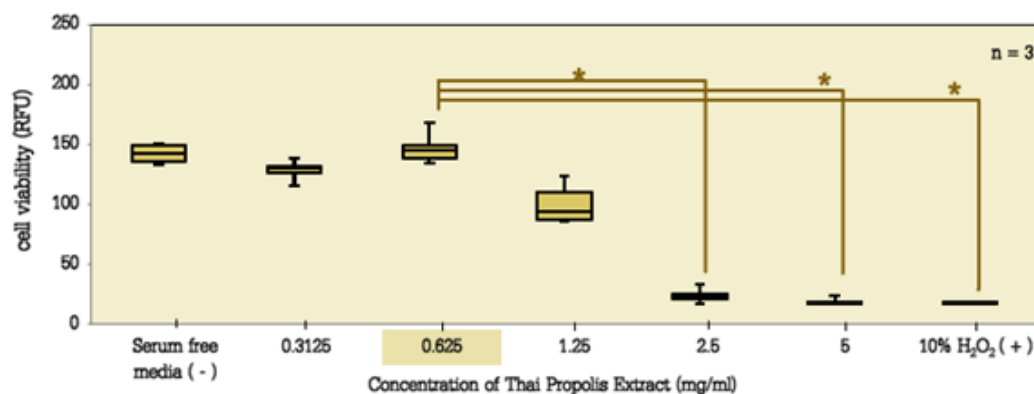
เซลล์เอ็นดอปรีทนต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นเวลา 6 ชั่วโมง (รูปที่ 7A-B) มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์เอ็นดอปรีทนต์ปกติที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยง

เซลล์ (รูปที่ 7G) ในขณะที่เซลล์เอ็นดอปรีทนต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบการเปลี่ยนแปลงของลักษณะรูปร่างของเซลล์ (รูปที่ 7C-D) ในขณะที่เซลล์เอ็นดอปรีทนต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 7E) แทบจะไม่พบเซลล์ที่เกาะอยู่บนหลุมเพาะเลี้ยงเซลล์เช่นเดียวกับที่พบในกลุ่มที่เลี้ยงด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (รูปที่ 7F)



รูปที่ 2 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อความมีชีวิตของเซลล์เอ็นดอปรีทนต์ที่แช่ในความเข้มข้นแตกต่างกันที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง กราฟรูปกล่องแสดงค่าพิสัยของหน่วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ที่ตรวจวัดได้ เส้นความคลาดเคลื่อนบนและล่างแสดงค่ามากที่สุดและค่าที่น้อยที่สุดที่วัดได้ ตามลำดับ, ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความมีชีวิตของเซลล์เอ็นดอปรีทนต์ ระหว่างสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยแต่ละความเข้มข้น แสดงด้วย * ($p < 0.05$)

Figure 2 Cytotoxic effect of Thai propolis extract on the viability of periodontal ligament (PDL) cells stored in different concentrations for 3 hours. Boxplots show median of the detected relative fluorescence unit. Upper and lower error bars indicate the maximal and minimal RFU, respectively. Significant difference in viability of periodontal ligament cells between concentrations of Thai Propolis are indicated with * ($p < 0.05$).



รูปที่ 3 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อความมีชีวิตของเซลล์เอ็นดอปรีทนต์ที่แช่ในความเข้มข้นแตกต่างกันที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง กราฟรูปกล่องแสดงค่าพิสัยของหน่วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ที่ตรวจวัดได้ เส้นความคลาดเคลื่อนบนและล่างแสดงค่ามากที่สุดและค่าที่น้อยที่สุดที่วัดได้ ตามลำดับ, ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความมีชีวิตของเซลล์เอ็นดอปรีทนต์ ระหว่างสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยแต่ละความเข้มข้น แสดงด้วย * ($p < 0.05$)

Figure 3 Cytotoxic effect of Thai Propolis Extract on the viability of periodontal ligament (PDL) cells were stored in different concentrations of Thai propolis extract among 6 hours. Boxplots show median of the detected relative fluorescence unit. Upper and lower error bars indicate the maximal and minimal RFU, respectively. Significant difference in viability of periodontal ligament cells between concentrations of Thai Propolis are indicated with * ($p < 0.05$).

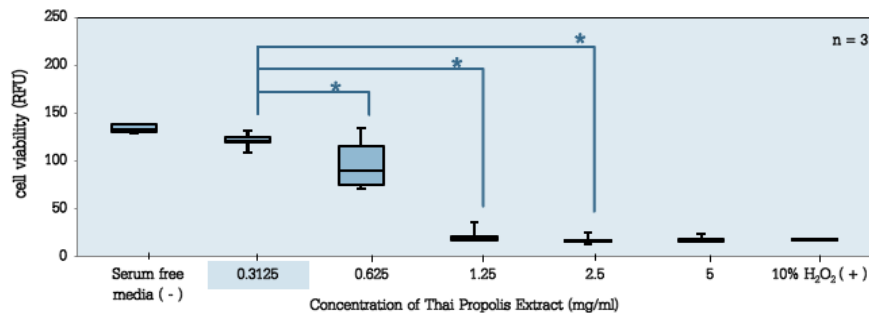
จากผลการทดสอบที่เวลา 12 ชั่วโมง เมื่อแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่ามัธยฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์สูงที่สุดคือ 122.42 RFU ซึ่งแตกต่างจากสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) แต่แตกต่างกับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร อย่างไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (รูปที่ 4)

พบว่าเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 12 ชั่วโมง (รูปที่ 8A) เท่านั้นที่มีลักษณะเช่นเดียวกับเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ปกติที่เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ (รูปที่ 8G) ในขณะที่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (รูปที่ 8B) พบการ

เปลี่ยนแปลงของลักษณะรูปร่างของเซลล์ และเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่เลี้ยงในกลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีลักษณะเช่นเดียวกับกลุ่มที่เลี้ยงด้วยไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (รูปที่ 8C-G)

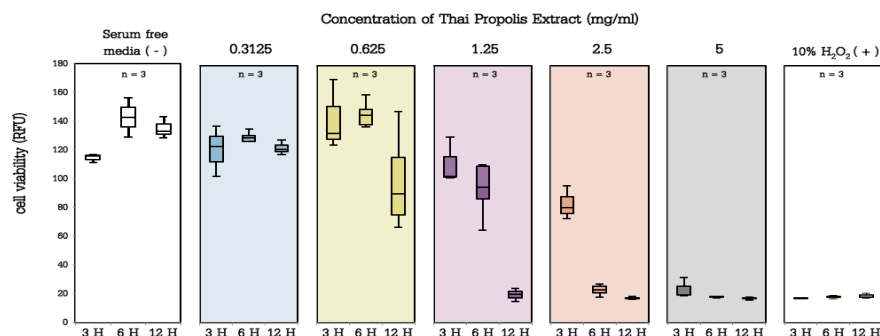
จากผลการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่ามัธยฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมไปจนถึงชั่วโมงที่ 3 (รูปที่ 5)

จากผลการทดสอบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ เมื่อแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์ในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 0.625 และ 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีค่ามัธยฐานการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์ของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ใกล้เคียงกับกลุ่มควบคุมไปจนถึงชั่วโมงที่ 6 และ 12 (รูปที่ 5)



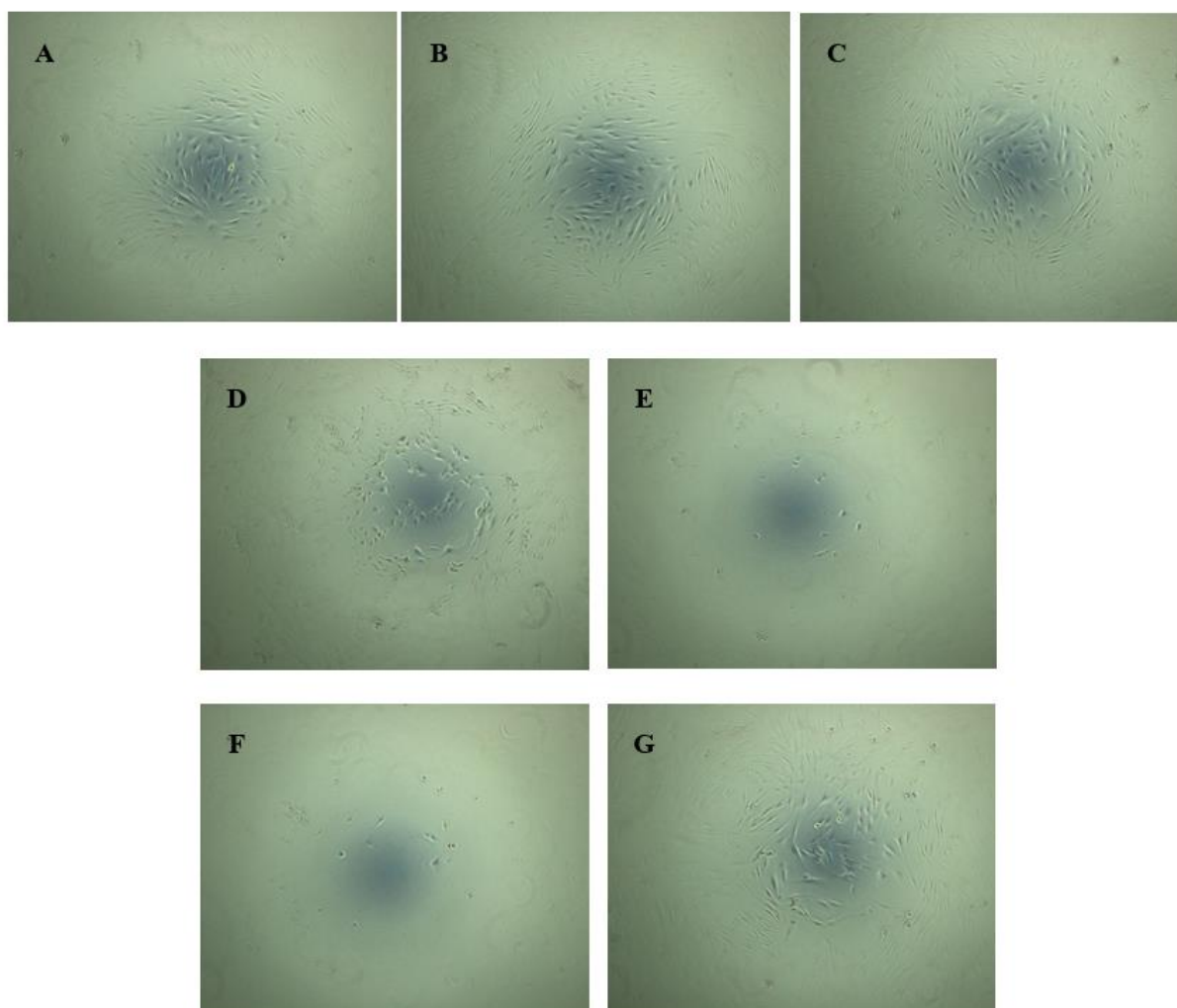
รูปที่ 4 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่แช่ในความเข้มข้นแตกต่างกันที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง กราฟรูปกล่องแสดงค่าพิสัยของหน่วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ที่ตรวจวัดได้ เส้นความคลาดเคลื่อนบนและล่างแสดงค่ามากที่สุดและค่าที่น้อยที่สุดที่วัดได้ ตามลำดับ, ความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติของความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ ระหว่างสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยแต่ละความเข้มข้น แสดงด้วย* ($p < 0.05$)

Figure 4 Cytotoxic effect of Thai propolis extract on the viability of periodontal ligament (PDL) cells were stored in different concentrations of Thai propolis extract among 12 hours. Boxplots show median of the detected relative fluorescence unit. Upper and lower error bars indicate the maximal and minimal RFU, respectively. Significant difference in viability of periodontal ligament cells between concentrations of Thai Propolis are indicated with* ($p < 0.05$).



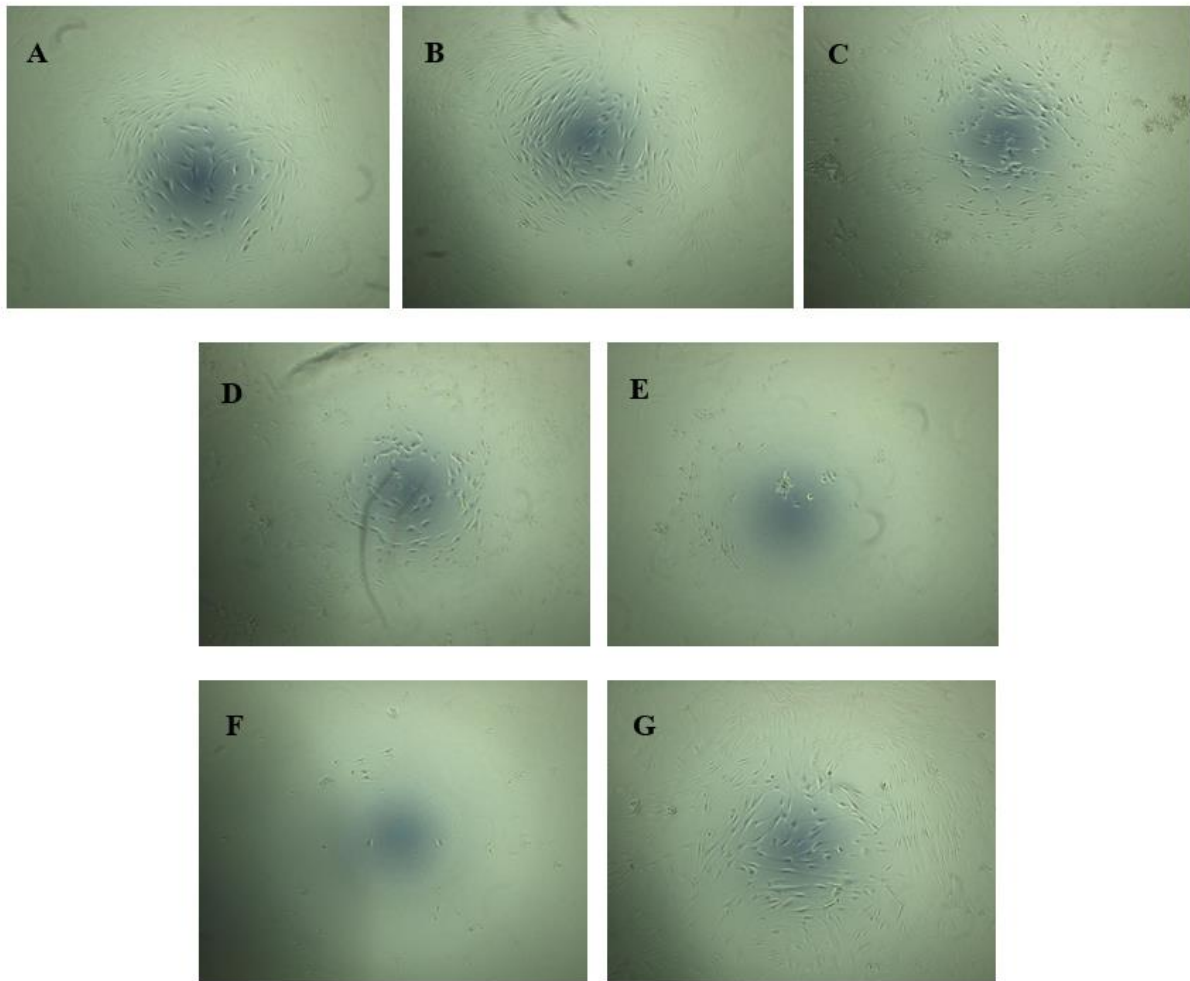
รูปที่ 5 ความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสต่อความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่แช่ในความเข้มข้นแตกต่างกัน กราฟรูปกล่องแสดงค่าพิสัยของหน่วยการเรืองแสงฟลูออเรสเซนส์สัมพันธ์ที่ตรวจวัดได้ เส้นความคลาดเคลื่อนบนและล่างแสดงค่ามากที่สุดและค่าที่น้อยที่สุดที่วัดได้ ตามลำดับ

Figure 5 Cytotoxic effect of Thai propolis extract on the viability of periodontal ligament (PDL) cells were stored in different concentrations of Thai propolis extract. Box plots show median of the detected relative fluorescence unit. Upper and lower error bars indicate the maximal and minimal RFU, respectively.



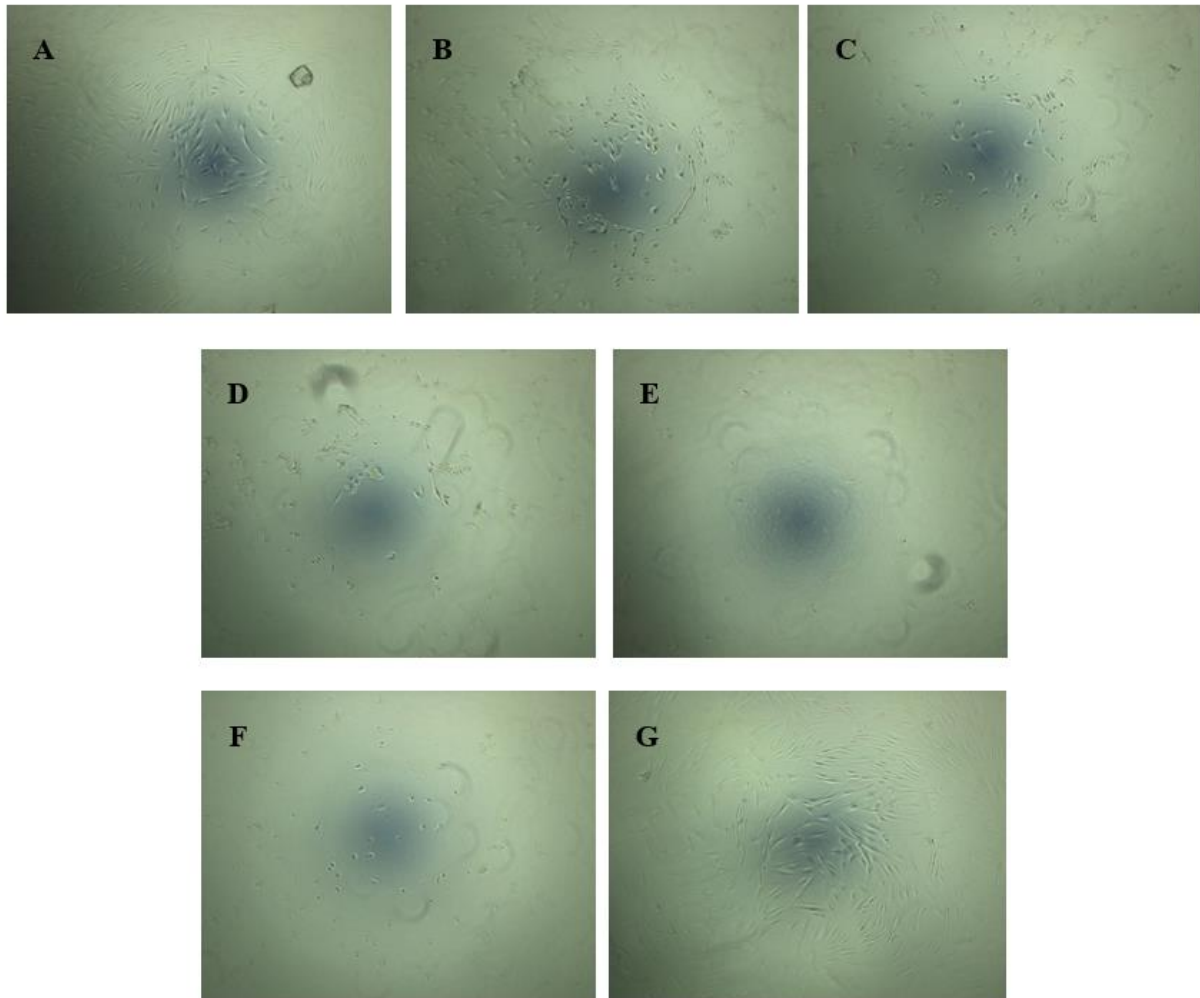
รูปที่ 6 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 10 เท่า ของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ หลังจากเติมสารทดสอบที่ระยะเวลา 3 ชั่วโมง (A) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (E) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (F) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (กลุ่มควบคุมบวก) (G) อาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุมลบ)

Figure 6 A representative photomicrograph taken under 10X magnification power of PDL cells after PDL cells were stored in different concentrations of Thai Propolis extract for 3 hours. (A) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 0.3125 mg./ml. (B) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 0.625 mg./ml. (C) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 1.25 mg./ml. (D) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 2.5 mg./ml. (E) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 5 mg./ml. (F) PDL cells were stored in hydrogen peroxide solution (positive control). (G) PDL cells were stored in Serum free media (negative control).



รูปที่ 7 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 10 เท่า ของเซลล์เอ็นอีคปริทันต์ หลังจากเดิมสารทดสอบที่ระยะเวลา 6 ชั่วโมง (A) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (E) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (F) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (กลุ่มควบคุมบวก) (G) อาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุมลบ)

Figure 7 A representative photomicrograph taken under 10X magnification power of PDL cells after PDL cells were stored in different concentrations of Thai Propolis extract for 6 hours. (A) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 0.3125 mg./ml. (B) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 0.625 mg./ml. (C) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 1.25 mg./ml. (D) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 2.5 mg./ml. (E) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 5 mg./ml. (F) PDL cells were stored in hydrogen peroxide solution (positive control). (G) PDL cells were stored in Serum free media (negative control).



รูปที่ 8 ภาพจากกล้องจุลทรรศน์ชนิดหัวกลับ กำลังขยาย 10 เท่า ของเซลล์เอ็นดอปรีทันต์ หลังจากเติมสารทดสอบที่ระยะเวลา 12 ชั่วโมง (A) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (C) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 1.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (D) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (E) กลุ่มสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (F) สารละลายไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (กลุ่มควบคุมบวก) (G) อาหารเลี้ยงเซลล์ (กลุ่มควบคุมลบ)

Figure 8 A representative photomicrograph taken under 10X magnification power of PDL cells after PDL cells were stored in different concentrations of Thai Propolis extract for 12 hours. (A) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 0.3125 mg./ml. (B) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 0.625 mg./ml. (C) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 1.25 mg./ml. (D) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 2.5 mg./ml. (E) PDL cells were stored in Thai Propolis extract 5 mg./ml. (F) PDL cells were stored in hydrogen peroxide solution (positive control). (G) PDL cells were stored in Serum free media (negative control).

บทวิจารณ์

เซลล์เอ็นยิดปริทันต์มีความสำคัญในการคงสภาพของความสัมพันธ์ระหว่างเซลล์ต่าง ๆ ซึ่งหากมีการทำลายเอ็นยิดปริทันต์เกิดขึ้นจนทำให้เสียสมดุลระหว่างเซลล์ จะทำให้มีกระดูกมาสะสมจนบางครั้งเกิดการอุดตันของช่องเอ็นยิดปริทันต์และนำไปสู่การเสื่อมของฟันและกระดูก⁶ ซึ่งจากบทบาทดังกล่าวทำให้ความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ในฟันหลุดจากเบ้าเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการปลูกฟันหลุดจากเบ้ากลับคืนเบ้าฟัน² โดยในปัจจุบันมีหลายงานวิจัยศึกษาเกี่ยวกับสารที่มีความสามารถในการคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ เพื่อนำมาพัฒนาเป็นสารตัวกลางแช่ฟันหลุดจากเบ้า เช่น นม น้ำเกลือ น้ำลาย น้ำประปา น้ำมะพร้าว ไข่ขาว สารสกัดชาเขียว และสารสกัดหยาบพรอพอลิส

การศึกษานี้เลือกใช้พรอพอลิสไทยที่เก็บจากจังหวัดหนองคาย สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มาทดสอบผลต่อความเป็นพิษของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ เนื่องจากการศึกษาของ Namsirikul ในปี 2014 พบว่าพรอพอลิสจากจังหวัดหนองคาย ที่สกัดด้วยเอทานอลร้อยละ 95 มีองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญคือ ฟลาโวนอยด์ และฟีนอลิก¹⁶ ทำให้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยมีคุณสมบัติด้านอนุมูลอิสระ ด้านเชื้อแบคทีเรีย และด้านการอักเสบ⁹ และในปี 2016 การศึกษาของ Prueksakorn ทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากจังหวัดหนองคายเช่นกัน โดยทำการทดสอบผลของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยต่อการคงสภาพความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่ความเข้มข้น 0.25 0.5 1 2.5 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เมื่อแช่เป็นระยะ 3 ชั่วโมง ด้วยวิธีซ้อมสีทริปแฟนบลู และนับเซลล์ภายใต้กล้องจุลทรรศน์ พบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ได้สูงที่สุด และเมื่อเปรียบเทียบกับสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร กับสารละลายแอสคอบาลานซ์ซอลด์ และนม เมื่อแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์เป็นเวลา 3 ชั่วโมง และประเมินความมีชีวิตของเซลล์ด้วยวิธีอะลามาร์บลูพบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ของฟันมนุษย์ได้ใกล้เคียงกับสารละลายแอสคอบาลานซ์ซอลด์ และมากกว่านม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ในการศึกษานี้จึงทำการทดสอบความเป็นพิษของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจากจังหวัดหนองคายต่อเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ โดยศึกษาที่ความเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยเพิ่มระยะเวลาการแช่เป็น 3 6 และ 12 ชั่วโมง เพื่อเป็นการศึกษาเริ่มต้น ในการพัฒนานำสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยไปใช้เป็นตัวกลางในการแช่ฟันหลุดจากเบ้า ในกรณีที่ต้องการเก็บในตัวกลางแช่ฟันเป็นระยะเวลานานมากขึ้น และทดสอบความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ด้วยเพรสโตบลู เนื่องจาก เพรสโตบลูเป็นวิธีการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์แบบเรซอร์บิโนติกชั้นที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ขั้นตอนการทำงานง่าย มีความไวมากกว่า MTT แสดงความแตกต่างระหว่างเซลล์ที่ตายแล้ว และเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ได้ดีกว่า XTT และมีความไวในการเปลี่ยนสีมากกว่าอะลามาร์บลู¹³⁻¹⁵

จากผลการทดสอบภายหลังการแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์เป็นระยะเวลา 3, 6 และ 12 ชั่วโมงในสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 2.5 และ 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรพบว่าในระยะเวลาการแช่ที่เพิ่มขึ้น สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยจะเริ่มแสดงความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นยิดปริทันต์มากขึ้น และค่าความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์แสดงความสัมพันธ์แบบแปรผกผันกับความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทย โดยพบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้นสูงสุดที่ไม่เป็นพิษต่อเซลล์เมื่อทำการแช่เซลล์เอ็นยิดปริทันต์เป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 0.625 1.25 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความมีชีวิตของเซลล์ใกล้เคียงกับอาหารเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 2.5 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร สอดคล้องกับการศึกษาของ Prueksakorn ในปี 2016 ที่พบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีค่าความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ที่วัดค่าความมีชีวิตที่วัดจากพื้นที่ถูกถอนออกมาทันที ในขณะที่เดียวกัน ผลการทดลองพบว่า สารสกัดหยาบพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เริ่มมีค่าความมีชีวิตของเซลล์เอ็นยิดปริทันต์ลดลง ซึ่งอาจเกิดการใช้สารละลายเพรสโตบลูในการทดสอบ เพราะมีความแม่นยำในการวัดที่มากกว่า¹⁷

อย่างไรก็ตามการศึกษาครั้งนี้พบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยสามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ได้ถึง 12 ชั่วโมง สอดคล้องกับการศึกษาของ Casaroto และคณะในปี 2010 ที่ศึกษาเปรียบเทียบความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ในสารตัวกลางชนิดต่าง ๆ โดยพบว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้นร้อยละ 10 สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ได้ถึง 24 ชั่วโมง¹⁸ ซึ่งสอดคล้องกับผลการศึกษาในครั้งนี้ที่สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ที่สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยความเข้มข้น 0.3125 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร

จากผลการทดสอบแสดงให้เห็นว่าสารสกัดหยาบพรอพอลิสความเข้มข้นสูง และระยะเวลาการแช่ที่นานส่งผลให้พรอพอลิสเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ สอดคล้องกับการศึกษาของ Campos ในปี 2015 ที่พบว่า พรอพอลิสที่ความเข้มข้นสูงอาจทำให้เกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ได้ จากกรดฟีนอลิก และฟลาโวนอยด์ ในพรอพอลิสเนื่องจากฟีนอลิกประกอบด้วยกรดโคมาริก (Coumaric acid) กรดซินนามิก (Cinnamic acid) พินโนเซมบริน (Pinocembrin) และอนุพันธ์อื่นๆ ซึ่งทำให้รูซึมผ่านของไมโทครอนเดรีย เปิดจึงทำให้เกิดภาวะกลับขั้ว (Depolarization) ทำให้ปริมาณเอทีพีในเซลล์น้อยลงส่งผลให้เซลล์ตายในที่สุด นอกจากนี้ ปริมาณเอทีพีที่น้อยลง ยังทำให้เยื่อไมโทครอนเดรียเสียหายซึ่งทำให้ดีเอ็นเอ (DNA) เสียหายตามมาส่งผลให้เซลล์ตายเช่นกัน¹⁹

เนื่องจากการศึกษานี้เป็นการศึกษานำร่องและใช้เซลล์เอ็นอีพรีทันต์แช่แข็งจากฟันกรามน้อยเพียง 1 ซี่ จึงควรศึกษาเพิ่มเติมในฟันมนุษย์ที่ถอนออกมาและทิ้งไว้ให้แห้งนอกช่องปากในจำนวนที่เพิ่มขึ้นและศึกษาคุณลักษณะอื่นๆ เพิ่มเติมเช่นการแบ่งตัวของเซลล์ (Cell proliferation) การยึดเกาะของเซลล์ (Cell adhesion) รวมถึงคุณสมบัติของพรอพอลิสเพิ่มเติมในด้านระยะเวลาการออกฤทธิ์ ความเป็นกรด-เบสของพรอพอลิสที่อาจส่งผลต่อ นอกจากนี้ควรมีการศึกษากิจกรรมการเปลี่ยนแปลงระดับโมเลกุลของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์เช่นการทดสอบ MAP kinase และการกระตุ้นให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ด้วยวิธีที่มีความแม่นยำและน่าเชื่อถือสูงเช่น BrdU assay เซลล์ เพื่อสามารถหาค่าความเข้มข้นมาตรฐานเพื่อใช้ในการรักษาและพัฒนาสารตัวกลางแช่ฟันจากสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยให้สามารถนำไปใช้ได้อย่างกว้างขวางในทางคลินิกต่อไป นอกจากนี้ การศึกษาในอนาคตเพื่อจะพัฒนาผลิตภัณฑ์จากสารสกัดหยาบพรอพอลิสจำเป็นต้องมีการพัฒนาคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาให้มีความเหมาะสมกับสภาวะทางสรีระวิทยาสำหรับการรักษาความ

ชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ เช่น ความเป็นกรด-ด่าง ความเข้มข้นออสโมติก (Osmolarity) ความตึงผิวของสารละลายที่มีต่อเซลล์ (Surface tension) เป็นต้น เพื่อให้ได้ผลิตภัณฑ์ที่มีความเข้ากันได้กับเซลล์เอ็นอีพรีทันต์

สำหรับข้อจำกัดของการศึกษาในครั้งนี้คือการใช้เซลล์เอ็นอีพรีทันต์แช่แข็งจากผู้บริจาคเพียงคนเดียว จึงอาจแสดงผลตอบสนองต่อสารสกัดหยาบพรอพอลิสที่จำเพาะ และสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ใช้ถูกเก็บมาเป็นระยะเวลานาน ซึ่งอาจมีผลต่อองค์ประกอบทางเคมีที่ส่งผลต่อความเป็นพิษของเซลล์ ซึ่งอาจจะเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อการทดลองได้ และการศึกษาที่ใช้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ยังไม่มีการเติมสารเคมีใด ๆ เพื่อคงคุณภาพของสารสกัด จึงจำเป็นต้องเก็บรักษาในสภาวะเย็น และปราศจากแสง ก่อนนำมาทดสอบ ดังนั้นในการศึกษาต่อไปภายภาคหน้าจึงควรนำข้อจำกัดจากการวิจัยนี้มาประเมิน เพื่อพิจารณาออกแบบงานวิจัยให้ได้ผลงานวิจัยที่น่าเชื่อถือมากยิ่งขึ้น

อย่างไรก็ตาม ผลการทดลองนี้ถือเป็นทางเลือกหนึ่งในการตัดสินใจแก่ผู้อ่าน ในการเลือกใช้สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยเพื่อคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ โดยอาจต้องศึกษาเพิ่มเติมทั้งในห้องปฏิบัติการ และในทางคลินิกต่อไปเพื่อพัฒนาสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยเป็นสารตัวกลางแช่ฟันในภายภาคหน้า

บทสรุป

ความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ในฟันหลุดจากเบ้าเป็นปัจจัยสำคัญที่ส่งผลต่อความสำเร็จในการปลูกฟันหลุดจากเบ้ากลับคืนเบ้าฟัน สารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยที่ความเข้มข้นต่ำลง สามารถคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ในระยะเวลาที่นานขึ้น โดยความเข้มข้นของสารสกัดหยาบพรอพอลิสไทยในการคงความมีชีวิตของเซลล์เอ็นอีพรีทันต์ที่ระยะเวลา 3 6 และ 12 ชั่วโมง ไม่ควรเกิน 2.5 1.25 และ 0.625 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรตามลำดับ

เอกสารอ้างอิง

1. Barrett E, Kenny D. Avulsed permanent teeth: a review of the literature and treatment guidelines. *Endod Dent Traumatol* 1997;13(4):153-63.
2. Andreasen JO AF, Andersson L. Avulsion. 4th ed. UK: Blackwell Munksgaard: Oxford; 2007.
3. Damrongrungruang T. Oral anatomy and physiology I: Components of tooth. Khon Kaen: Klungnana Wittaya; 2549.

4. Andersson L, Andreasen JO, Day P, Heithersay G, Trope M, Diangelis AJ, et al. International association of dental traumatology guidelines for the management of traumatic dental injuries: 2. Avulsion of permanent teeth. *Dent Traumatol* 2012;28(2):88-96.
5. Hammarström L, Pierce A, Blomlof L, Feiglin B, Lindskog S. Tooth avulsion and replantation-a review. *Endod Dent Traumatol* 1986;2(1):1-8.
6. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 2. Factors related to pulpal healing. *Endod Dent Traumatol* 1995; 11(2):59-68.
7. Andreasen JO, Borum MK, Jacobsen HL, Andreasen FM. Replantation of 400 avulsed permanent incisors. 4. Factors related to periodontal ligament healing. *Endod Dent Traumatol* 1995;11(2):76-89.
8. Marcucci MC. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. *Api- dologie* 1995; 26(2):83-99.
9. Burdock GA. Review of the biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). *Food Chem Toxicol* 1998;36(4):347-63.
10. Seidel V, Peyfoon E, Watson DG, Fearnley J. Comparative study of the antibacterial activity of propolis from different geographical and climatic zones. *Phytother Res* 2008; 22(9):1256-63.
11. Chaipanha P, Chailertvanitkul P, Damrongrungruang T, Phonimdaeng P, Puasiri S. Effect of thai propolis crude extracts on the cytotoxicity and proliferation of human dental pulp cells, *in vitro*. Graduate Research Conference Khon Kaen University. 2013;MMP21:946-54.
12. Prueksakorn A, Chailertvanitkul P, Puasiri S, Ruangsri S. Effect of thai propolis crude extracts to preserve the viability of human periodontal ligament cells. The National and International Graduate Research Conference. 2016 (MMP18): 848-57.
13. Terry L Riss, Richard A Moravec, Andrew L Niles, Sarah Duellman, Hélène A Benink, Tracy J Worzella, et al. Cell viability assays [Internet]. 2013 [cited 26 Oct 2017]: Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK144065/>
14. Xu M, Mc Canna DJ, Sivak JG. Use of the viability reagent PrestoBlue in comparison with alamarBlue and MTT to assess the viability of human corneal epithelial cells. *J Pharmacol Toxicol Methods* 2015;71:1-7.
15. Lall N, Henley-Smith CJ, De Canha MN, Oosthuizen CB, Berrington D. Viability reagent, prestoblue, in comparison with other available reagents, utilized in cytotoxicity and antimicrobial assays. *Int J Microbiol* 2013;2013:420601.
16. Namsirikul T. Manufacturing of Thai propolis product for human pulp capping material [Master Thesis in Restorative Dentistry]. Khon Kaen: The Graduate School, Khon Kaen University; 2014.
17. Prueksakorn A, Puasiri S, Ruangsri S, Makeudom A, Sastraruji T, Krisanaprakornkit S, et al. The preservative effect of Thai propolis extract on the viability of human periodontal ligament cells. *Dent Traumatol* 2016;32(6):495-501.
18. Casaroto AR, Hidalgo MM, Sell AM, Franco SL, Cuman RKN, Moersch E, et al. Study of the effectiveness of propolis extract as a storage medium for avulsed teeth. *Dent Traumatol* 2010;26(4):323-31.
19. Campos JF, Santos UPd, Rocha PdSd, Damiao MJ, Balestieri JBPB, Cardoso CAL, et al. Antimicrobial, antioxidant, anti-Inflammatory, and cytotoxic activities of propolis from the stingless bee *tetragonisca fiebrigii*. *Evid Based Complement Alternat Med* 2015;2015:11.

ผู้รับผิดชอบบทความ

เกลิงศักดิ์ สัมครสมาน

สาขาวิชาทันตกรรมบูรณะ

คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยขอนแก่น

อำเภอเมือง จังหวัดขอนแก่น 40002

โทรศัพท์: 043 202 405 #45144

โทรสาร: 043 202 862

จดหมายอิเล็กทรอนิกส์: thalerngsaks@yahoo.com

Cytotoxicity of Thai Propolis Crude Extract on Human Periodontal ligament cell, *In Vitro*.

Samaksamarn T* Pawaputanon Na Mahasarakham C* Kantrong N* Kuntawee S** Pannak N*** Suknim C**** Chailertvanitkul P*

Abstract

The aim of this study was to compare the cytotoxicity of Thai Propolis crude extracts in which PDL cells were stored in different concentrations and amount of time. Frozen PDL cells derived from extracted human premolars for orthodontic treatment were stored in each Thai Propolis extract concentrations (0.3125, 0.625, 1.25, 2.5, 5 mg/mL), serum free media as a negative control, and hydrogen peroxide as a positive control for 3, 6 and 12 hours. The number of PDL cell viability was assessed by PrestoBlue assay. The result showed that the lower concentration of Thai Propolis extract was more effective in maintaining the viability of PDL cells. In conclusion, Thai Propolis extract is not cytotoxic to PDL cells.

Keywords: Periodontal ligament cell/ Thai Propolis crude extracts/ Cytotoxicity

Corresponding Author

Thalerngsak Samaksamarn
Department of Restorative Dentistry,
Faculty of Dentistry, Khon Kaen University,
Amphur Muang, Khon Kaen, 40002.
Tel.: +66 4 320 2405 #45144
Fax.: +66 4 320 2862
E-mail: thalerngsaks@yahoo.com

* Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Khon Kaen University, Amphur Muang, Khon Kaen.

** Dental Department, Pha Khao Hospital, Amphur Pha Khao, Loei.

*** Dental Department, Phu Luang Hospital, Amphur Phu Luang, Loei.

**** Dental Department, Maha Sarakham Hospital, Amphur Muang, Maha Sarakham.