

ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย



นางสาวดวงใจ ปานแก้ว

สถาบันวิทยบริการ

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์

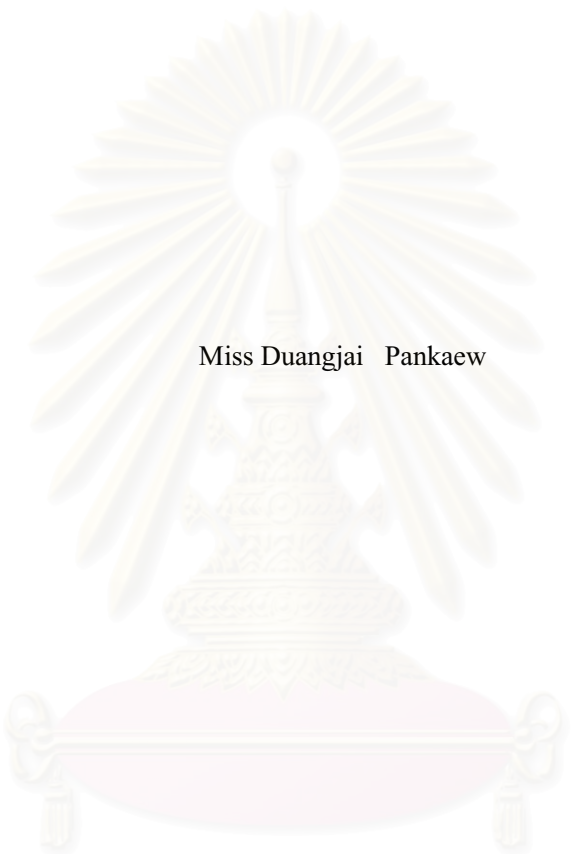
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2549

ISBN 974-14-3494-4

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF THAI PROPOLIS



Miss Duangjai Pankaew

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

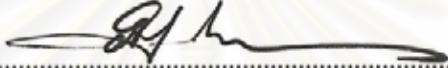
Academic Year 2006

ISBN 974-14-3494-4

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย
โดย นางสาวดวงใจ ปานแก้ว
สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ (เภสัชวิทยา)
อาจารย์ที่ปรึกษา รองศาสตราจารย์ จันทน์ อธิพานิชพงศ์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วน
หนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรบัณฑิต

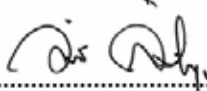

..... คณบดีคณะแพทยศาสตร์
(ศาสตราจารย์นายแพทย์ ภิรมย์ กมลรัตนกุล)

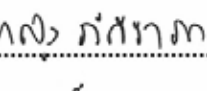
คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์


..... ประธานกรรมการ
(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิง วิไล ชินนเสน)


..... อาจารย์ที่ปรึกษา
(รองศาสตราจารย์ จันทน์ อธิพานิชพงศ์)


..... อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม
(รองศาสตราจารย์ ดร. นิจศิริ เรืองรังษี)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. วชิร ลิ้มปนลธิกุล)


..... กรรมการ
(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร.ท.หญิง ภัสราภา ไตวิวัฒน์)

ดวงใจ ปานแก้ว : ฤทธิ์ด้านการอักเสบของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย
(ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ETHANOLIC EXTRACT OF THAI
PROPOLIS) อ.ที่ปรึกษา: รศ.จันทน์ อธิพานิชพงศ์, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ดร.นิจิตติ เรือง
รังษี, 90 หน้า. ISBN 974-14-3494-4

พรอโพลิส (Propolis) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากรังผึ้งและเป็นที่รู้จักกันมานานหลายศตวรรษ ถึงประโยชน์ทางยาอันได้แก่ การรักษาภาวะอักเสบ อาการไข้ แผลในกระเพาะอาหาร การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย จากรังผึ้งเลี้ยงที่จังหวัดเชียงใหม่ ผลการศึกษาพบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบในหนูขาวที่กระตุ้นให้เกิดการบวมของอุ้งเท้าด้วย carrageenan โดยขนาดที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญนั้นคือ 200, 300 และ 400 mg/kg เมื่อให้โดยฉีดเข้าช่องท้อง และ สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ขนาด 300 mg/kg มีฤทธิ์ในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด (เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการบวมที่ชั่วโมงที่ 2 เท่ากับ 48.2) เมื่อศึกษากลไกของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อ pro-inflammatory mediators ในเซลล์เพาะเลี้ยงเซลล์ macrophage (RAW264.7) ที่ถูกกระตุ้นด้วย lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย สามารถยับยั้งการหลั่ง nitric oxide (NO) และ tumor necrosis factor - α (TNF- α) ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยพบว่าความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ NO และ TNF- α ได้ 50 เปอร์เซ็นต์ (IC_{50}) คือ 33.1 $\mu\text{g/ml}$ และ 29.6 $\mu\text{g/ml}$ ตามลำดับ ผลการทดลองแสดงว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง และยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory mediator ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบคือ NO และ TNF- α

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์
ปีการศึกษา 2549

ลายมือชื่อนิสิต.....ดวงใจ ปานแก้ว
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา.....อ.จันทน์ อธิพานิช-
ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม.....อ.นิจิตติ เรืองรังษี

477 48059 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE

KEY WORDS : THAI PROPOLIS / ANTI-INFLAMMATION

DUANGJAI PANKAEW : ANTI-INFLAMMATORY ACTIVITY OF ETHANOLIC
EXTRACT OF THAI PROPOLIS. THESIS ADVISOR : ASSOC. PROF.

CHANDHANEE ITTHIPANICHPONG, THESIS COADVISOR : ASSOC. PROF.

NIJSIRI RUANGRUNGSI, Ph.D., 90 pp. ISBN 974-14-3494-4

Propolis, a natural beehive product, has been known for centuries for a variety of beneficial traditional use, such as anti-inflammatory condition, fever, peptic ulcer. This study aimed to elucidate the anti-inflammatory effect of the ethanolic extract of Thai propolis (EEP) which obtained from Chiangmai bee farm. EEP exhibited anti-inflammatory effect in carrageenan induced rat paw edema at the dose of 200, 300 and 400 mg/ml when given intraperitoneally. Maximum inhibition was demonstrated when EEP 300 mg/ml was employed (%inhibition at the second hour = 48.2). The effect of EEP on pro-inflammatory mediators produced by the macrophage cell line (RAW 264.7) stimulated with lipopolysaccharide (LPS) 100 ng/ml revealed that EEP inhibited nitric oxide (NO) and tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) released significantly at the concentration of 25 and 50 μ g/ml (IC_{50} = 33.1 and 29.6 μ g/ml respectively). The results obtained from this study should be concluded that EEP possesses anti-inflammatory effect in acute inflammation model. Inhibition of proinflammatory mediators release, NO and TNF- α , are found.

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

Field of study Medical Science
Academic year 2006

Student's Signature... Duangjai Pankaew.
Advisor's Signature... C. Itthipanichpong
Co-advisor's Signature... Nij Siri Ruangrungsi

กิตติกรรมประกาศ

การศึกษาวิจัยนี้ ผู้วิจัยขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์จันทน์ อธิพานิชพงศ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ ที่กรุณาให้ความรู้ คำปรึกษา คำแนะนำ ตลอดจนข้อคิดเห็น ข้อเสนอแนะที่เป็นประโยชน์ และช่วยเหลือในด้านต่างๆ ทำให้วิทยานิพนธ์นี้สำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร.นิจศิริ เรืองรังษี อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาอนุเคราะห์สถานที่ อุปกรณ์ เครื่องมือต่างๆ ที่ใช้ในการสกัดสารสกัด propolis เพื่อนำมาใช้ในการวิจัยครั้งนี้ รวมทั้งกรุณาในการทำ fingerprint ของพรอโพลิสไทย

ขอขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ ประธานกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ และ ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ร.ท.หญิง ภัศราภา โตวิวัฒน์ คณะกรรมการในการสอบวิทยานิพนธ์ที่กรุณาให้คำแนะนำในการวิเคราะห์ วิจัย ผลการทดลอง

ขอขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร.วัชรวิทย์ ลิ้มปณิสติกุล ที่กรุณาให้คำปรึกษาและคำแนะนำในทุกๆ ด้านเสมอมา และเป็นกำลังใจให้ในการทำการทดลอง

ขอขอบพระคุณ คณาจารย์ทุกท่านในภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ที่ได้ให้ความรู้ตลอดการศึกษาในระดับปริญญาโท

ขอขอบพระคุณเงินทุนรัชดาภิเษกสมโภช คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่กรุณาให้ทุนอุดหนุนการทำวิจัยครั้งนี้

สุดท้ายนี้ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณบิดา มารดา ที่สนับสนุน เป็นกำลังใจในการศึกษาและการทำงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้จนเสร็จสมบูรณ์

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย.....	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ.....	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ.....	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญภาพ.....	ฉ
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ.....	ท
บทที่ 1 บทนำ.....	1
1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย.....	1
1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	3
1.3 สมมติฐานการวิจัย.....	3
1.4 รูปแบบการวิจัย.....	3
1.5 วิธีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย.....	4
1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย.....	4
1.7 ปัญหาทางจริยธรรม.....	5
1.8 คำสำคัญ.....	5
บทที่ 2 ทบทวนวรรณกรรม.....	6
2.1 พรอโพลิส.....	6
2.1.1 ลักษณะทางกายภาพของพรอโพลิส.....	6
2.1.2 องค์ประกอบของพรอโพลิส.....	6
2.1.3 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพรอโพลิส.....	8
2.1.3.1ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ.....	8
2.1.3.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ.....	9
2.1.3.3 ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง.....	9
2.1.3.4 ฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ.....	10

	หน้า
2.2 ภูมิคุ้มกันร่างกาย.....	11
2.2.1 ภูมิคุ้มกันร่างกายแบบไม่จำเพาะ.....	11
2.2.1.1 Physical barriers	11
2.2.1.2 Phagocytosis.....	11
2.2.1.3 Complement system.....	11
2.2.2 ภูมิคุ้มกันร่างกายแบบจำเพาะ.....	13
2.2.2.1 Humoral immune response.....	13
2.2.2.2 Cell mediated immune response.....	13
2.3 การอักเสบ.....	16
2.3.1 สาเหตุชักนำให้เกิดการอักเสบ.....	16
2.3.2 การอักเสบแบบเฉียบพลัน.....	17
2.3.3 การอักเสบแบบเรื้อรัง.....	19
2.4 สารที่เป็นสื่อทางเคมีในกระบวนการอักเสบ.....	22
2.4.1 Histamine.....	22
2.4.2 5-Hydroxytryptamine.....	22
2.4.3 Kinin.....	23
2.4.4 Prostaglandins.....	23
2.4.5 Leukotrienes and hydroxy arachidonic acid products.....	23
2.4.6 Platelet-Activating Factor.....	25
2.4.7 Complement.....	25
2.4.8 Hydrolytic enzymes.....	25
2.4.9 Products from Molecular of Oxygen.....	26
2.4.10 Cytokine.....	28
2.4.10.1 Pro-inflammatory cytokine.....	29
2.4.10.2 Anti-inflammatory cytokine.....	29

	หน้า
บทที่ 3 อุปกรณ์และวิธีการดำเนินการวิจัย	31
3.1 สมุนไพรและแหล่งที่มา	31
3.2 สัตว์ทดลอง เครื่องมือ อุปกรณ์และสารเคมี.....	31
3.2.1 สัตว์ทดลอง.....	31
3.2.2 เครื่องมือและอุปกรณ์.....	32
3.2.3 สารเคมี.....	33
3.3 Cell line.....	33
3.4 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	33
3.4.1 วิธีการสกัดพอลิฟอสฟอไรต์.....	33
<u>ขั้นตอนที่ 1</u>	
3.4.2 การเตรียมยา สารต่างๆ และสมุนไพร.....	34
3.4.2.1 การเตรียม 1% carrageenan.....	34
3.4.2.2 การเตรียมสารละลาย electrolyte.....	34
3.4.2.3 การเตรียมยา indomethacin.....	34
3.4.2.4 การเตรียมพอลิฟอสฟอไรต์สำหรับทดลองวัด	
paw edema	35
3.4.3 วิธีการทดลองวัดการบวมของอุ้งเท้าหนู.....	35
3.4.4 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอาการบวม.....	36
<u>ขั้นตอนที่ 2</u>	
3.4.5 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยง macrophage cell line RAW 264.7.....	38
3.4.6 การเลี้ยง macrophage cell line (RAW264.7)	
การตรวจสอบ cell viability	
และการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS.....	38
3.4.7 การทดสอบความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิฟอสฟอไรต์.....	39
3.4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide.....	40
3.4.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ tumor necrosis factor – α	42
3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล.....	44

	หน้า
บทที่ 4 ผลการวิจัย.....	45
4.1 ผลการสกัดพอลิไทป์ไทยด้วยเอทานอลและการทำ fingerprint.....	45
<u>ขั้นตอนที่ 1</u>	
4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิไทป์ไทย	
ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan.....	47
<u>ขั้นตอนที่ 2</u>	
4.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิไทป์ไทย.....	50
4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิไทป์ไทย	
ในการยับยั้งการหลั่งของ Nitric oxide (NO).....	51
4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิไทป์ไทย	
ในการยับยั้งการสร้าง TNF - α	56
บทที่ 5 อภิปรายและสรุปผลการวิจัย.....	60
เอกสารอ้างอิง.....	65
ภาคผนวก.....	71
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	90

สารบัญตาราง

ตารางที่	หน้า
1. แสดง mediators ต่างๆที่สร้างจากเซลล์ macrophage ที่มีผลต่อการทำลายเชื้อจุลชีพ	27
2. แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่ได้จากการแยกด้วย gas chromatography / mass spectrometer (GC/MS).....	46
3. แสดงค่าเฉลี่ย volume of edema และ %Inhibition ที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีด 1% carrageenan เข้าที่อุ้งเท้าหนูขาวหลังจากได้รับสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของ พรอโพลิสไทย และ ยา indomethacin.....	48
4. แสดงผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone ต่อการหลั่ง NO โดยวัดเป็นปริมาณของ NO ₂ ⁻ และ %inhibition.....	52
5. แสดงผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone ต่อการหลั่ง TNF - α และ %inhibition.....	56
6. แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มควบคุมที่ให้ DMSO ฉีดเข้าช่องท้อง.....	73
7. แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ indomethacin 5 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง.....	74
8. แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ EEP 200 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง.....	75
9. แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ EEP 300 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง.....	76
10. แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ EEP 400 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง.....	77
11. แสดงผลการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone.....	78
12. แสดงค่าของ NO ₂ ⁻ ที่วัดได้จากการทำปฏิกิริยา Griess ของสิ่งสกัดด้วย เอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone.....	80
13. แสดงค่าการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของ พรอโพลิสไทย และ dexamethasone.....	81
14. แสดงค่าของ TNF - α ที่วัดได้และ %inhibition ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone.....	83
15. แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่ได้จากการทำ GC/MS.....	85

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
1. แสดงกระบวนการเกิด phagocytosis.....	12
2. แสดง complement cascade.....	12
3. แสดงภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะ (specific immune system).....	14
4. แสดงภาพรวมของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีสิ่งที่มีมากระตุ้นโดยจะแบบออกเป็น innate และ acquired immunity.....	15
5. แสดงกลไกของ neutrophil ในการ migrate มาที่ตำแหน่งที่เกิดการอักเสบ เนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย.....	18
6. แสดงกลไกการเกิดการอักเสบเรื้อรังในโรคต่างๆ.....	21
7. แสดง arachidonic acid metabolism pathway.....	24
8. แสดง arachidonic acid metabolites,ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ eicosanoids ชนิดต่างๆ	24
9. แสดงผลของ reactive oxygen species และ reactive nitrogen species ที่ถูกสร้างขึ้นขณะเกิดการอักเสบ และ ผลของ species เหล่านั้น ไปทำต่อ biomolecule ต่างๆ.....	26
10. แสดง nitric oxide (NO) ในการควบคุมการเกิด vasodilation ระหว่างการเกิดการอักเสบ.....	28
11. แสดงกระบวนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย pro-inflammatory cytokine.....	29
12. แสดงฤทธิ์ของ Macrophage-derived cytokines และ chemokines.....	30
13. แสดงเครื่องมือ plethysmometer.....	37
14. แสดงสมการปฏิกิริยาของ NO ในการสลายตัวได้เป็น nitrate (NO_3^-) และ nitrite (NO_2^-) และปฏิกิริยาในการวัดปริมาณของ nitrite โดยใช้ Griess reaction.....	41
15. แสดงวิธีการวัดหาปริมาณ $\text{TNF} - \alpha$ โดยวิธีการ sandwich ELISA.....	43
16. แสดง chromatogram ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย.....	45
17. แสดงสูตรโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากการทำ GC/MS ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย.....	46
18. แสดงค่าเฉลี่ยการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน indomethacin.....	49

ภาพที่	หน้า
19. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ขนาด 200, 300 และ 400 mg/kg และค่าการยับยั้งการการบวมของอุ้งเท้าหนู ที่กระตุ้นด้วย carrageenan ที่เวลาต่างๆ.....	49
20. แสดง %viability ของเซลล์เมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ, LPS 100 ng/ml, 0.05%DMSO, dexamethasone 10μM และ doxorubicin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ให้น้ำกลั่น.....	50
21. แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ nitrite ที่เกิดขึ้นเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของ พรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ dexamethasone 10 μM.....	53
22. แสดงการยับยั้งการหลั่ง NO (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของ พรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 μg/ml และ ยา dexamethasone 10 μM.....	54
23. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 μg/ml และค่าการยับยั้งการหลั่ง NO.....	55
24. แสดงแสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF - α ที่เกิดขึ้นเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอล ของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ dexamethasone 10 μM.....	57
25. แสดงการยับยั้งการหลั่ง TNF - α (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอล ของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 μg/ml และ ยา dexamethasone 10 μM.....	58
26. แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 μg/ml และค่าการยับยั้งการหลั่ง TNF - α.....	59
27. แสดงค่าของ standard curve ของ NaNO ₂	79
28. แสดง standard curve ของ TNF - α.....	82
29. แสดง chromatogram ของ EEP ที่ได้จากการทำ GC/MS.....	85
30. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 3.56.....	86
31. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 7.67.....	86
32. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 13.08.....	87
33. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 14.66.....	87
34. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 16.68.....	88
35. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 18.33.....	88
36. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 19.40.....	89
37. แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 20.79.....	89

คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อ

CO ₂	carbondioxide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMSO	dimethyl sulfoxide
EEP	ethanolic extract of propolis
FBS	Fetal Bovine Serum
GC/MS	gas chromatography / mass spectrometry
HCl	hydrochloric acid
5-HT	5-hydroxytryptamine
IC ₅₀	inhibitory concentration 50%
KCl	potassium chloride
KOH	potassium hydroxide
LPS	lipopolysaccharide
mg	milligram(s)
ml	milliliter(s)
M	molarities (mole per liter)
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
n	sample size
NaCl	sodium chloride
NED	N-1-napthylethylenediamine dihydrochloride
NO	nitric oxide
NSAIDs	non steroidal anti-inflammatory drugs
O ₂	oxygen
OD	optical density
P	probability
PBS	phosphate buffer saline solution
PBMCs	peripheral blood mononuclear cells
pH	the negative logarithm of hydrogen ion concentration
ROS	reactive oxygen species
Rt	retention time
S.E.M.	standard error of mean

TNF – α	tumor necrosis factor – alpha
$^{\circ}$ C	degree Celsius
μ g	microgram (s)
ng	nanogram (s)
nm	nanometer (s)
pg	picogram (s)
%	percent
<	less than
/	per



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1

บทนำ

Introduction

1.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย (Background and Rationale)

การอักเสบเป็นปฏิกิริยาที่ซับซ้อนของสิ่งมีชีวิต เพื่อที่จะป้องกันการทำลายหรือควบคุมอันตรายต่างๆไม่ให้ลุกลามออกไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกาย โดยร่างกายจะมีการเพิ่มจำนวนเซลล์และผลิตผลของเซลล์ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการอักเสบขึ้นมาต่อต้านตัวกระตุ้นที่ทำให้เกิดอาการอักเสบ ทั้งยังช่วยซ่อมแซมเนื้อเยื่อส่วนที่ถูกทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาดังกล่าวให้กลับคืนสู่สภาพปกติ ซึ่งผลจากการอักเสบจะทำให้บริเวณนั้นเกิดอาการ 4 ประการ คือ ปวด (pain), บวม (swelling), แดง (redness) และร้อน (heat) ^(1,2)

ความรุนแรงของการอักเสบขึ้นกับชนิดของตัวกระตุ้นที่มากกระทำต่อเนื้อเยื่อให้บาดเจ็บและความสามารถของร่างกายที่จะต่อสู้กับสิ่งนั้น ปฏิกิริยาที่เกิดขึ้นอย่างรวดเร็วและรุนแรงหลังถูกกระตุ้นเรียกว่า การอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) ถ้าร่างกายไม่สามารถกำจัดเอาตัวกระตุ้นต่างๆออกไปได้หมด การอักเสบจะยังคงดำเนินอยู่ต่อไป อาจเป็นเดือนหรือเป็นปี กลายเป็นอาการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) ซึ่งจะส่งผลทำให้เนื้อเยื่อหรืออวัยวะบริเวณนั้นเกิดความเสียหายหรือพิการได้ ⁽³⁾

สิ่งที่มากระตุ้นให้เกิดการอักเสบมีอยู่หลายสาเหตุด้วยกัน คือ

1. mechanical stimulus เช่น การเกิดการกระทบกระแทก (trauma)
2. chemical stimulus ได้แก่ สารเคมีต่างๆ ยา หรือจำพวก toxin
3. infectious stimulus ได้แก่ เชื้อโรคหรือจุลชีพต่างๆ เช่น แบคทีเรีย ไวรัส รา หรือปรสิตต่างๆ

เมื่อร่างกายถูกกระตุ้นจากสาเหตุต่างๆดังที่ได้กล่าวมาแล้ว จะเกิดการเปลี่ยนแปลงของ microvasculature และมีการหลั่ง chemical mediators หลายชนิดออกมาในบริเวณที่เกิดการอักเสบ เช่น histamine, lysosomal compounds, prostaglandins, leukotrienes, 5-hydroxytryptamine (serotonin), lymphokines เป็นต้น

ในปัจจุบันมีการผลิตและจำหน่ายยาต้านการอักเสบที่ไม่ใช่สเตียรอยด์ (non steroidal anti-inflammatory drugs) หรือเรียกย่อๆว่า NSAIDs ออกมามากมายหลายชนิด โดยแบ่งกลุ่มตามลักษณะโครงสร้างทางเคมี ยาทุกชนิดในกลุ่มนี้มีกลไกการออกฤทธิ์ที่คล้ายคลึงกัน คือ ยับยั้งสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบ ชนิดที่สำคัญคือ prostaglandins โดยทั่วไปเมื่อให้ยาในกลุ่ม NSAIDs แล้วจะพบว่าอาการของผู้ป่วยดีขึ้นอย่างรวดเร็ว ซึ่งเป็นผลการรักษาระยะสั้นๆ แต่พยาธิสภาพของโรคยังอยู่ทำให้ผู้ป่วยเกิดอาการซ้ำขึ้นมาอีกได้ ดังนั้นจะเห็นว่าผู้ป่วยส่วนใหญ่จะมีการพัฒนาของโรคโดยมีอาการแบบเรื้อรัง ทำให้แพทย์ผู้รักษาต้องสั่งจ่ายยาให้แก่ผู้ป่วยต่อไปเป็นระยะเวลานานๆ แต่เนื่องจากกลไกการออกฤทธิ์ของยากลุ่มนี้ยับยั้งการสร้าง prostaglandins ทำให้ prostaglandins ตัวที่สำคัญที่เป็น protective mediators ในกระเพาะอาหารถูกยับยั้งไปด้วย ดังนั้นเยื่อบุกระเพาะอาหารจึงถูกทำลายโดยกรดได้มากขึ้น เมื่อใช้ยากลุ่มนี้นานๆ ก็จะค่อยๆปรากฏอาการไม่พึงประสงค์ต่างๆออกมาให้เห็นได้ เช่น อาการปวดท้อง เป็นแผลในระบบทางเดินอาหาร ซึ่งเป็นอาการข้างเคียงที่พบบ่อยที่สุดในผู้ป่วยที่ใช้ยากลุ่มนี้

ยาต้านการอักเสบประเภทสเตียรอยด์แม้ว่าจะมีกลไกต้านการอักเสบโดยยับยั้งการสร้างสารต้นกำเนิด (precursor) ของ prostaglandins และ leukotrienes ทำให้ได้ผลการรักษาดีและรวดเร็วในระยะเวลาดังกล่าว แต่เนื่องจากยาในกลุ่มนี้มีฤทธิ์ที่ไม่พึงประสงค์มากมาย เช่น ทำให้เกิดการสะสมไขมันบริเวณกลางลำตัว มีโหนกที่ด้านหลังต้นคอ ใบหน้ากลม มีลิ้นที่หนา และที่สำคัญคือกดภูมิคุ้มกันในร่างกายทำให้ร่างกายมีความต้านทานโรคน้อยลงและติดเชื้อได้ง่าย ดังนั้นการให้ยาดังกล่าวต่อเนื่องเป็นเวลานานจึงกลับทำให้อาการของผู้ป่วยเลวลง แพทย์ส่วนใหญ่จึงหลีกเลี่ยงที่จะให้ยาพวกสเตียรอยด์ร่วมด้วยในการรักษา⁽⁴⁾

เพื่อส่งเสริมนโยบายการใช้วัตถุที่ผลิตขึ้นในประเทศอันจะก่อให้เกิดการพึ่งตนเองในด้านบริการทางสาธารณสุข และบรรลุวัตถุประสงค์ที่ว่าสุขภาพดีถ้วนหน้า จึงมีการเล็งเห็นความสำคัญของสมุนไพร โดยผนวกกระบวนการค้นคว้าวิจัยทางวิทยาศาสตร์และประสบการณ์การใช้สมุนไพรของประชาชนเข้าด้วยกัน เพราะความรู้ทางวิทยาศาสตร์สมัยใหม่จะช่วยยืนยันฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา รวมทั้งพิษของสมุนไพรได้ถูกต้องชัดเจนยิ่งขึ้น หากข้อมูลที่มีอยู่ประสานกันได้อย่างเหมาะสมจะทำให้ประชาชนมียาดีและปลอดภัยไว้ใช้รักษาโรค อีกทั้งยังเป็นการลดดุลการค้าด้านยาที่จำเป็นต้องนำเข้าจากต่างประเทศ พรอโพลิสเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติที่ได้จากรังผึ้ง มีสรรพคุณทางยาแผนโบราณมากมาย มีการนำมาผลิตเป็นผลิตภัณฑ์หลากหลายชนิดเช่น สบู่ เครื่องสำอาง ยาสีฟัน ผลิตภัณฑ์เสริมอาหาร และอื่นๆอีกมาก รวมทั้งมีการศึกษาวิจัยฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในด้านต่างๆ เพื่อใช้เป็นหลักฐานทางวิทยาศาสตร์รองรับสรรพคุณ ได้แก่ ฤทธิ์ด้านเชื้อจุลินทรีย์ ฤทธิ์ด้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย รวมทั้งฤทธิ์ด้านการอักเสบ

อย่างไรก็ดีพบว่าพรอโพลิสที่ได้จากรังผึ้งจากแหล่งต่างๆกัน ที่มีความแตกต่างของสิ่งแวดล้อม ได้แก่แหล่งอาหารของผึ้ง ต้นพืชที่เป็นแหล่งในการสร้างพรอโพลิส จะทำให้องค์ประกอบของพรอโพลิสมีความแตกต่างกัน เป็นผลให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรอโพลิสแตกต่างกันด้วย ดังนั้นจึงเป็นที่มาของการศึกษาวิจัยฤทธิ์ด้านการอักเสบของพรอโพลิสไทย และกลไกที่เกี่ยวข้องกับฤทธิ์ด้านการอักเสบ

1.2 วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย (Objective)

1. เพื่อศึกษาฤทธิ์ในการต้านการอักเสบแบบเฉียบพลันของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (Ethanollic Extract of Thai Propolis : EEP) ในสัตว์ทดลองที่กระตุ้นให้อู้งเท้าบวมด้วย carrageenan
2. ศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่มีต่อการหลั่ง inflammatory mediators คือ nitric oxide และ TNF- α

1.3 สมมติฐานการวิจัย (Hypothesis)

สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย สามารถยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันในหนูทดลองที่กระตุ้นการอักเสบที่อู้งเท้าด้วย carrageenan และสามารถยับยั้งการสร้าง nitric oxide กับ pro-inflammatory cytokine คือ TNF- α ในเซลล์ mouse macrophage ได้

1.4 รูปแบบการวิจัย (Research design)

รูปแบบการศึกษาเป็นแบบ Experimental Research

1.5 วิธีที่ใช้ในการดำเนินการวิจัย (Study design and processes)

1.5.1 เตรียมสารสกัดของพรอโพลิสไทยด้วยเอทานอล

1.5.2 แบ่งการทดลองเป็น 2 ส่วนคือ

1.5.2.1 การทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*)

โดยการกระตุ้นการอักเสบที่อุ้งเท้าหนูด้วย carrageenan และทำการวัดเปรียบเทียบปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าของหนู (volume of edema) ระหว่างกลุ่มที่ได้รับสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และกลุ่มที่ได้รับยาต้านการอักเสบ indomethacin กับกลุ่มควบคุมที่ได้รับเฉพาะสารละลาย DMSO

1.5.2.2 การทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*)

ทำการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่มีต่อเซลล์ mouse macrophage ด้วยวิธี MTT assay

ทำการวัดระดับของ nitric oxide และ pro-inflammatory cytokine (TNF- α) ที่กระตุ้นด้วย LPS เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ได้รับสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และกลุ่มที่ได้รับยาต้านการอักเสบ dexamethasone

1.6 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับจากการวิจัย (Anticipated benefits from the study)

เมื่อได้ผลทดสอบของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย แล้วผลที่ได้มีแนวโน้มในการต้านการอักเสบได้ดี ก็จะสามารถนำไปศึกษาเพื่อหาสารสำคัญในการออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ และศึกษาตามขั้นตอนการพัฒนาต้านการอักเสบจากสมุนไพรต่อไป เพื่อเป็นการลดการนำเข้าของยาแก้อักเสบซึ่งเป็นสารเคมีสังเคราะห์จากต่างประเทศ อีกทั้งยังเป็นการส่งเสริมให้มีการเพาะเลี้ยงผึ้งเพื่อเก็บพรอโพลิส แล้วนำไปใช้ในการผลิตยาเป็นการสร้างรายได้ให้แก่ประชากรไทยได้อีกด้วย

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.7 ปัญหาจริยธรรม (Ethical Consideration)

การวิจัยนี้ปฏิบัติตามจรรยาบรรณการใช้สัตว์ทดลองของสภาวิจัยแห่งชาติ พ.ศ. 2542 และสอดคล้องกับหลักการใช้สัตว์ทดลองในการศึกษาทางวิทยาศาสตร์ โดยใช้หลัก 3Rs ⁽⁵⁾ คือ ไม่สามารถใช้วิธีการศึกษาอื่นที่เหมาะสมทดแทนการใช้สัตว์ทดลองได้ (Replacement) การใช้จำนวนสัตว์ทดลองน้อยที่สุดที่สามารถแสดงผลในการทดลองได้ โดยใช้หลักทางสถิติ (Reduction) และการปฏิบัติต่อสัตว์ทดลองให้เกิดความทุกข์ทรมานน้อยที่สุด (Refinement) ซึ่งโครงการวิจัยนี้ได้ผ่านการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย จากคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

1.8 คำสำคัญ (Key words)

Thai propolis

Anti-inflammation

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 2

บททวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

Literature Reviews

2.1 พรอโพลิส (Propolis)

คำว่า PROPOLIS เป็นคำจากภาษากรีก โดย PRO มีความหมายว่า before และ POLIS มีความหมายว่า city หรือแปลว่า defender of city จึงน่าจะมีความหมายว่า propolis คือส่วนที่ใช้ในการป้องกันรังผึ้ง โดยพรอโพลิสเป็นที่รู้จักและมีการบันทึกและบอกรายละเอียดไว้ตั้งแต่สมัยของ Aristotle

2.1.1 ลักษณะทางกายภาพของพรอโพลิส (Physical characteristic of propolis)

พรอโพลิสมีสีเหลืองอ่อนจนถึงสีน้ำตาลเข้ม ขึ้นอยู่กับแหล่งของเรซินของต้นไม้ที่ผึ้งเก็บมาทำพรอโพลิส โดยความแข็งของพรอโพลิสขึ้นกับอุณหภูมิ ถ้าอุณหภูมิสูงกว่า 45 องศาเซลเซียส จะทำให้พรอโพลิสมีความอ่อนนุ่มจนกระทั่งกลายเป็นของเหลว และถ้าอุณหภูมิต่ำกว่า 45 องศาเซลเซียสพรอโพลิสจะมีความแข็งขึ้นจนกระทั่งเป็นก้อนแข็ง

2.1.2 องค์ประกอบของพรอโพลิส (The composition of propolis)

พรอโพลิสเป็นผลิตภัณฑ์ธรรมชาติ ที่เกิดจากส่วนผสมของสารเหนียวจากต้นไม้ที่ผึ้งงานเก็บมา ผสมกับน้ำลาย (catalytic enzyme) ที่ขับออกมาจากตัวผึ้ง และไขผึ้ง เกิดการเปลี่ยนแปลงจนได้เป็นพรอโพลิส เพื่อใช้ปิดรอยโหว่ รอยร้าวของรัง โดยจะเคลือบที่ผิวของรังผึ้งทั้งด้านในและด้านนอก ป้องกันรังจากการการเปียกชื้น รวมทั้งใช้ในการห่อหุ้มเศษซากของอาหารหรือศัตรูเพื่อป้องกันไม่ให้เกิดการเน่าเสียภายในรังและยังสามารถป้องกันการติดเชื้อภายในรังผึ้ง^(6,7) ดังนั้นพรอโพลิส จึงมีประโยชน์ต่อรังผึ้ง 2 ทางด้วยกัน คือ ทางแรกจะช่วยเพิ่มความแข็งแรงป้องกันการเปียกชื้นแก่รังผึ้ง ทางที่สองคือช่วยป้องกันรังจากการติดเชื้อต่างๆ ไม่ว่าจะเป็นเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา เชื้อไวรัส ซึ่งประโยชน์ในทางที่สองนี้เอง เป็นประโยชน์ที่นำมาศึกษากันอย่างแพร่หลายในด้านฤทธิ์ด้านเชื้อจุลชีพ และใช้เป็นยารักษาโรคหรือให้ร่วมกับยารักษาโรคเพื่อเพิ่มประสิทธิภาพของยา

พอรโพลิส ประกอบด้วย ยางไม้ (resin) ประมาณ 50%, ไขมัน (wax) ประมาณ 30%, น้ำมัน (oil) ประมาณ 10%, เกสรดอกไม้ (pollen) ประมาณ 5% อื่นๆประมาณ 5% โดยส่วนประกอบเหล่านี้ก็จะมีความแตกต่างกันขึ้นอยู่กับแหล่งที่อยู่ แหล่งอาหารของผึ้ง และสภาพแวดล้อมต่างๆ เช่น ฤดูกาล ก็มีผลทำให้พอรโพลิส มีสี, กลิ่น ที่แตกต่างกัน^(8,9)

เคยมีการศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของพอรโพลิส ของประเทศอื่นๆ พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีมากมาย มากกว่า 300 ชนิด เช่น cinnamic acids, benzoic acids, esters ของ benzoic acid, substituted phenolic acids, esters, flavonoids, amino acids, และ wax โดยสารพวก flavonoid aglycones ได้แก่ quercetin, kaempferol, apigenin, rhamnetin, pinocembrin, sakuranetin, chrysin, acacetin, galangin, kaempferide, tectochrysin เป็นต้น โดยองค์ประกอบทางเคมีของ พอรโพลิส จะมีการเปลี่ยนแปลงไปทั้งในด้านคุณภาพและปริมาณของสารเคมี รวมทั้งองค์ประกอบทางเคมีก็จะเปลี่ยนไปตามแหล่งของผึ้ง เปลี่ยนไปตามชนิดของผึ้ง ที่ผึ้งใช้กวาเหนียวมาทำพอรโพลิส ดังนั้นก็จะมีผลต่อการออกฤทธิ์ของพอรโพลิสด้วย โดยพอรโพลิสไทยที่นำมาทำการศึกษาเป็น พอรโพลิสที่ได้มาจากการเลี้ยงผึ้งที่สวนลำไยในจังหวัดเชียงใหม่ของประเทศไทย ซึ่งก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีแตกต่างไปจากที่เคยมีการรายงานในเอกสารวิชาการของพอรโพลิสที่ได้จากประเทศอื่นๆ

ได้มีการใช้ประโยชน์ของพอรโพลิส ในทางด้านการรักษามานานแล้วมากกว่า 1000 ปี ตั้งแต่สมัยอียิปต์ได้มีการนำไปใช้ในการรักษาอาการปวดและแผลในทางเดินอาหาร และในยุคโรมันมีการนำมาใช้ในการลดอาการบวม ปวดฟัน ไข้และรักษาแผลต่างๆ อีกทั้งในปัจจุบันได้มีการนำไปผสมกับยาสีฟันเพื่อใช้บรรเทาอาการอักเสบของเหงือกหรือนำมาเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารขายในท้องตลาด

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2.1.3 คุณสมบัติทางเภสัชวิทยาของพรอโพลิส (pharmacological properties of propolis)

2.1.3.1 ฤทธิ์ในการต้านจุลชีพ (antibiotic activity)

- ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)

ได้มีการศึกษาถึงฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรียของพรอโพลิส ใน *in vitro* พบว่าสามารถยับยั้งได้ทั้ง gram-positive และ gram-negative และมีการศึกษาถึงฤทธิ์ของพรอโพลิส ที่สามารถเสริมฤทธิ์ของยา streptomycin และ cloxacillin ใน *in vitro* ในด้านทันตกรรมได้นำเอาสิ่งสกัดที่ได้จากพรอโพลิส มาทดสอบฤทธิ์ใน *in vitro* ว่าสามารถยับยั้ง cell adherence และยับยั้ง water-insoluble glucan formation ของเชื้อแบคทีเรีย^(10,11,12,13)

มีผู้วิจัยทำการสกัดแยกเอาสารประกอบ phenolic ของพรอโพลิสมาทดสอบ พบว่ามีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้แก่ *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* และ *Streptococcus faecalis*⁽¹⁴⁾

- ฤทธิ์ต้านเชื้อรา (antifungal activity)

มีผู้ศึกษาโดยใช้ตัวอย่างของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิส จากแหล่งต่างๆ มาทำการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อรา *Candida albicans* พบว่าในทุกๆ ตัวอย่างสามารถยับยั้งเชื้อราได้เหมือนกัน แม้จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่แตกต่างกัน⁽¹⁵⁾

- ฤทธิ์ต้านเชื้อไวรัส (antiviral activity)

มีการศึกษาโดยใช้ครีมจากพรอโพลิส พบว่าสามารถรักษาและบรรเทาอาการที่เกิดจากการติดเชื้อที่ระบบสืบพันธุ์ (genital herpetic) และ ยังสามารถใช้ในการรักษาการติดเชื้อ herpes ที่ช่องปากได้อีกด้วย

มีการศึกษาพบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิส จากแหล่งต่างๆ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อ human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) ของ CD4⁺ lymphocytes และ microglial โดยสามารถยับยั้ง viral expression อีกทั้งยังยับยั้งการเข้าสู่เซลล์ของเชื้อไวรัสอีกด้วย⁽¹⁶⁾

2.1.3.2 ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant activity)

มีการศึกษาฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระของพอลิฟีนอล และผลิตภัณฑ์จากพืช เช่น น้ำมันพืช ที่ได้จากประเทศญี่ปุ่น พบว่าสามารถต้านอนุมูลอิสระได้ (โดยวัดจาก peroxidation ของ linoleic acid และ superoxide - scavenging activity) ⁽¹⁷⁾

มีการศึกษาสารประกอบ phenolic ของพอลิฟีนอลจากประเทศบราซิล พบว่ามี artepilin C ซึ่งสามารถป้องกันการเกิดการทำลายเนื่องจากปฏิกิริยาออกซิเดชันได้โดยลด lipid peroxidation ⁽¹⁸⁾

มีการศึกษาสิ่งสกัดของพอลิฟีนอลด้วยเอทานอล จากหลายประเทศเช่นจากประเทศอียิปต์, อาเจนตินา, อิตาลี, บราซิล และญี่ปุ่น รวมทั้งสาร caffeic acid phenethyl ester (CAPE) ที่สกัดได้จากพอลิฟีนอล พบว่าสารสามารถลดระดับของ malondialdehyde (MDA) และยับยั้ง malondialdehyde-like substance, เอนไซม์ xanthine oxidase และ lipoperoxidase รวมทั้งเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) และเพิ่มระดับของเอนไซม์ hepatic cytosol superoxide dismutase catalase และ glutathione peroxidase จึงกล่าวได้ว่า สิ่งสกัดของพอลิฟีนอล สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ ^(19,20)

สาร phenolic ที่สกัดได้จากพอลิฟีนอล สามารถยับยั้งการทำงานของไนตริกออกไซด์ และสาร CAPE สามารถป้องกันได้จากการเหนี่ยวนำให้เกิดการทำลายด้วยการใช้ยาเคมีบำบัด cisplatin และ carbontetrachloride ^(21,22)

2.1.3.3 ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง (antitumor)

มีการศึกษาฤทธิ์ของ water-soluble derivative ของพอลิฟีนอล (WSDP) เมื่อให้ร่วมกับการทำการบำบัดด้วยเคมีในผู้ป่วยโรคมะเร็งพบว่าสามารถเพิ่ม antimetastatic ให้กับการรักษามะเร็ง ดังนั้นการให้ WSDP จึงสามารถเพิ่มประสิทธิภาพในการรักษามะเร็งด้วยเคมี ⁽²³⁾

มีการศึกษาสิ่งสกัดที่ได้จากพอลิฟีนอลของประเทศโครเอเชีย คือ water-soluble derivative of propolis (WSDP), caffeic acid (CA), caffeic acid phenethyl ester (CAPE) และ quercetin (QU) พบว่าสามารถลดจำนวนของมะเร็งได้โดยการกระตุ้นให้เกิด apoptosis และ necrosis และเป็นในทิศทางเดียวกับฤทธิ์ในการปรับระบบภูมิคุ้มกัน (immunomodulatory) ⁽²⁴⁾

สิ่งที่สกัดได้จากพรอโพลิสด้วยเอทานอลของประเทศเกาหลีสามารถยับยั้งการเจริญของเซลล์มะเร็งเต้านม และ CAPE ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) ในเซลล์มะเร็ง รวมทั้งสามารถทำลายเซลล์มะเร็งที่ลำไส้ใหญ่โดยที่ไม่มีผลในการทำลายเซลล์ปกติ

2.1.3.4 ฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammation)

มีการศึกษาฤทธิ์ของพรอโพลิส และองค์ประกอบที่สกัดได้จากพรอโพลิส ว่าสามารถลดการสร้าง nitric oxide และช่วยป้องกันการทำลาย glycosaminoglycans ใน human cartilage และ chondrocytes ที่กระตุ้นการอักเสบด้วย IL-1 β ⁽²⁵⁾

CAPE ที่สกัดได้จากพรอโพลิส สามารถยับยั้ง ischemia – reperfusion injury และ oxidative stress ใน spinal cord tissue ของกระต่าย อีกทั้ง CAPE สามารถยับยั้งการผลิตของไนตริกออกไซด์ในการทดลอง experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) อีกด้วย ⁽²⁶⁾

สิ่งที่สกัดจากเอทานอลของพรอโพลิส และ สารองค์ประกอบของพรอโพลิส ที่เป็นสารประกอบ phenolic สามารถยับยั้ง chemiluminescence ของ neutrophils ได้แสดงว่าสิ่งที่สกัดจากเอทานอลของพรอโพลิส สามารถกำจัด free radical และ superoxide โดยยับยั้งเอนไซม์ที่ทำให้เกิดการสร้าง radical เหล่านั้น ⁽²⁷⁾

CAPE ที่สกัดได้จากพรอโพลิส สามารถยับยั้ง activity ของ NF-KB ยับยั้งการสร้าง TNF- α กับ NO และเพิ่ม activity ของ c-AMP responsive element binding protein (CREB) ที่วัดได้จากเซลล์ organotypic hippocampal อีกทั้งยังพบว่า CAPE สามารถออกฤทธิ์ได้ดีเนื่องจากเป็นสารที่สามารถผ่าน blood brain barrier ได้ดี ⁽²⁸⁾

มีการศึกษาถึงผลของสิ่งที่สกัดของพรอโพลิสด้วยเอทานอลและ CAPE ต่อการสร้างสาร eicosanoid พบว่าสิ่งที่สกัดที่ได้จากพรอโพลิส สามารถลดการสร้าง prostaglandin และ leukotriene ทั้งใน *in vitro* จาก murine peritoneal macrophages และ *in vivo* ที่กระตุ้นด้วย zymosan รวมทั้งยับยั้งการ expression ของ COX-2 ^(29,30)

2.2 ภูมิคุ้มกันร่างกาย (Immunity)

เป็นการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย (immune response) ต่อเชื้อโรคและสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายเพื่อกำจัดทิ้งไป แบ่งออกเป็น 2 แบบ คือ ^(31,32)

2.2.1. ภูมิคุ้มกันร่างกายแบบไม่จำเพาะ (Nonspecific or innate immunity)

เป็นภูมิคุ้มกันร่างกายที่มีอยู่แล้วก่อนที่จะเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมจะเข้าสู่ร่างกาย เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมจะถูกกำจัดออกไปโดยอาศัยองค์ประกอบต่างๆของระบบภูมิคุ้มกันร่างกาย และระบบอื่นของร่างกาย ได้แก่

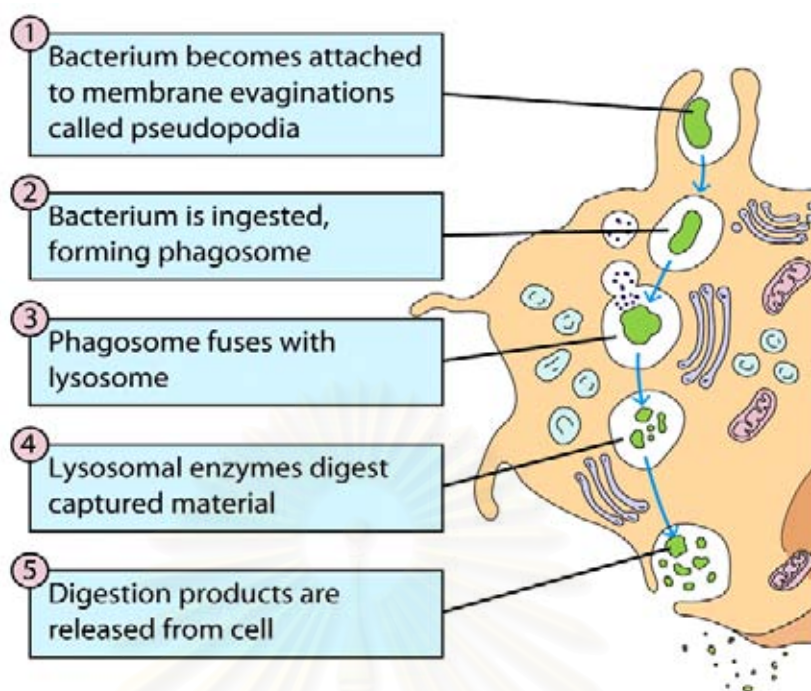
2.2.1.1 Physical barriers เป็นเครื่องกีดขวางตามธรรมชาติเพื่อไม่ให้เชื้อโรคเข้าสู่ร่างกาย ได้แก่ ผิวหนัง เยื่อเมือกที่บุตามอวัยวะต่างๆ ขนอ่อน (cilia) เป็นต้น

ถ้าเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมนั้นสามารถผ่านเครื่องกีดขวางเหล่านี้ได้จะถูกร่างกายกำจัดโดยใช้กลไกการจับกิน (phagocytosis) หรืออาศัยการทำงานของระบบคอมพลีเมนต์

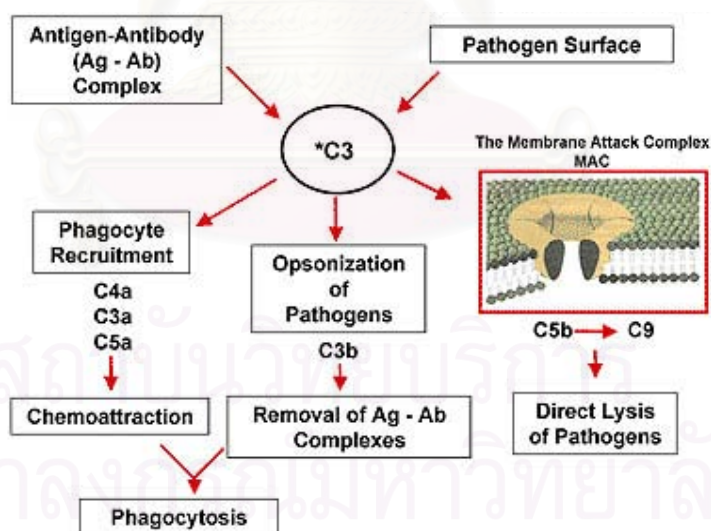
2.2.1.2 Phagocytosis คือ ขบวนการจับกินเพื่อทำลายเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งอาศัยการทำงานของเซลล์ neutrophil ในกระแสเลือด และ macrophage ในเนื้อเยื่อต่างๆ ซึ่งรวมเรียกว่า phagocytes โดยเซลล์เหล่านี้จะเคลื่อนตัวไปหาสิ่งแปลกปลอม(chemotaxis) ประกบติด (attachment) ต่อมาจะกลืน (ingestion) แล้วมีการย่อย (intracellular digestion) โดยอาศัยกลไกที่ไม่ใช้ออกซิเจน หรือ อาศัยกลไกที่ใช้ออกซิเจนเป็นตัวทำลายจุลชีพ เช่น hydrogen peroxide (H_2O_2), nitric oxide (NO), tumor necrosis factor- α (TNF- α) ดังแสดงในภาพที่ 1 หรือเตรียมสิ่งแปลกปลอมนั้นไว้ให้ ลิมโฟไซต์ ที่ทำหน้าที่ตอบสนองแบบจำเพาะต่อไป

2.2.1.3 Complement System เป็นระบบที่ทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอม ซึ่งอาศัยโปรตีน complement (C's) จำนวนหลายชนิด รวมทั้งโปรตีน C1-C9 ที่เกิดการกระตุ้นอย่างต่อเนื่องกัน จนได้เป็นสารตัวสุดท้าย คือ C9 หลายโมเลกุลที่รวมตัวกัน มีผลให้เกิดรูบนผิวของเชื้อโรคและทำให้เชื้อโรคตาย ดังแสดงในภาพที่ 2

การตอบสนองของภูมิคุ้มกันร่างกายชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมต่ำ



ภาพที่ 1 แสดงกระบวนการเกิด phagocytosis⁽³²⁾



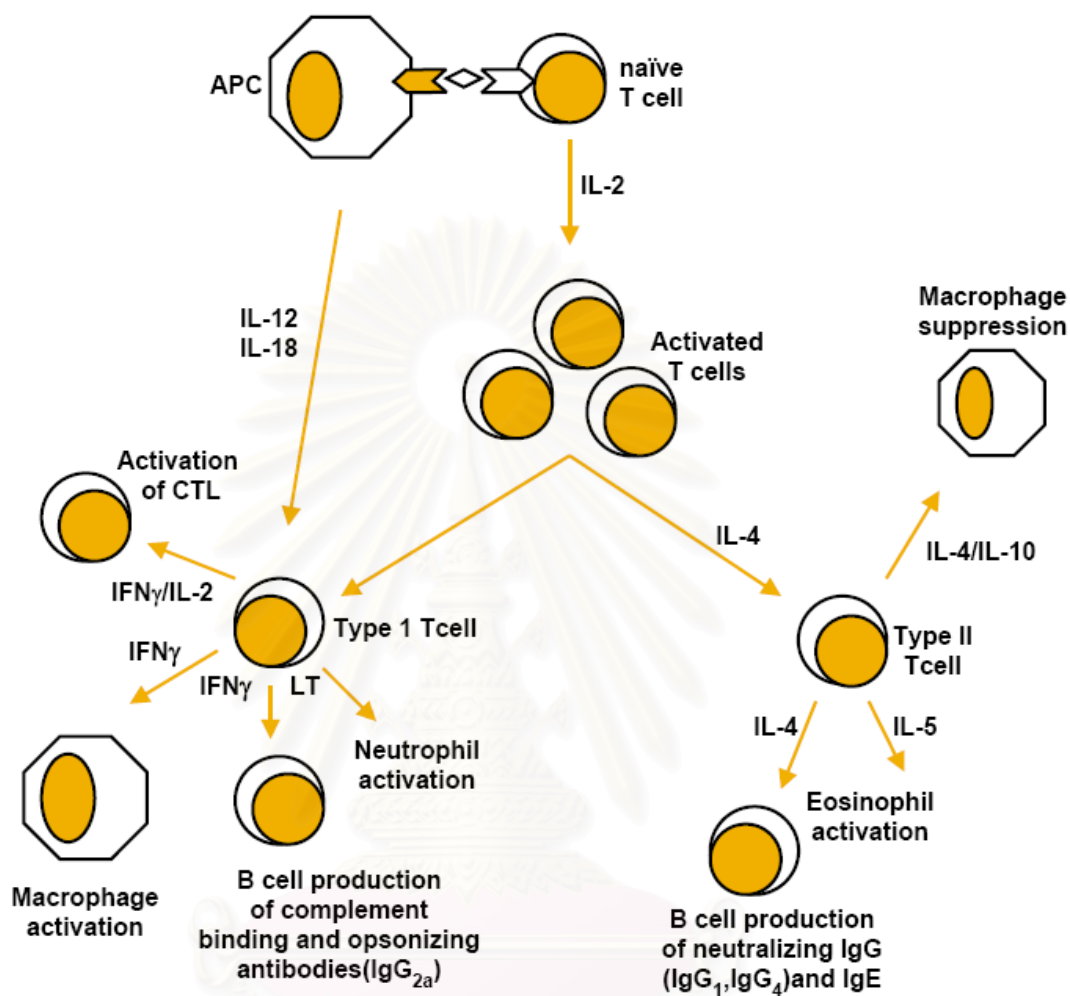
ภาพที่ 2 แสดง complement cascade⁽³²⁾

2.2.2. ภูมิคุ้มกันร่างกายแบบจำเพาะ (Specific or acquired immunity)

เป็นภูมิคุ้มกันร่างกายเกิดขึ้นหลังจากที่เชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมเข้าสู่ร่างกายแล้วหรือเกิดจากการกระตุ้นด้วยองค์ประกอบต่างๆที่ได้จากการกระตุ้น nonspecific immunity มาก่อน เซลล์สำคัญที่เกี่ยวข้องกับภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ คือ lymphocytes (T and B lymphocytes) การตอบสนองของภูมิคุ้มกันร่างกายชนิดนี้มีความจำเพาะเจาะจงต่อเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมสูง และสามารถจดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมที่เคยได้รับ ทำให้การตอบสนองต่อเชื้อโรคในครั้งถัดไป (secondary immune response) รวดเร็วและมีประสิทธิภาพสูงกว่าครั้งแรก (primary immune response) ซึ่งเป็นคุณสมบัติที่สำคัญของภูมิคุ้มกันร่างกายชนิดนี้ การตอบสนองทางภูมิคุ้มกันร่างกายที่เกิดขึ้นแบ่งย่อยออกเป็น 2 แบบ คือ

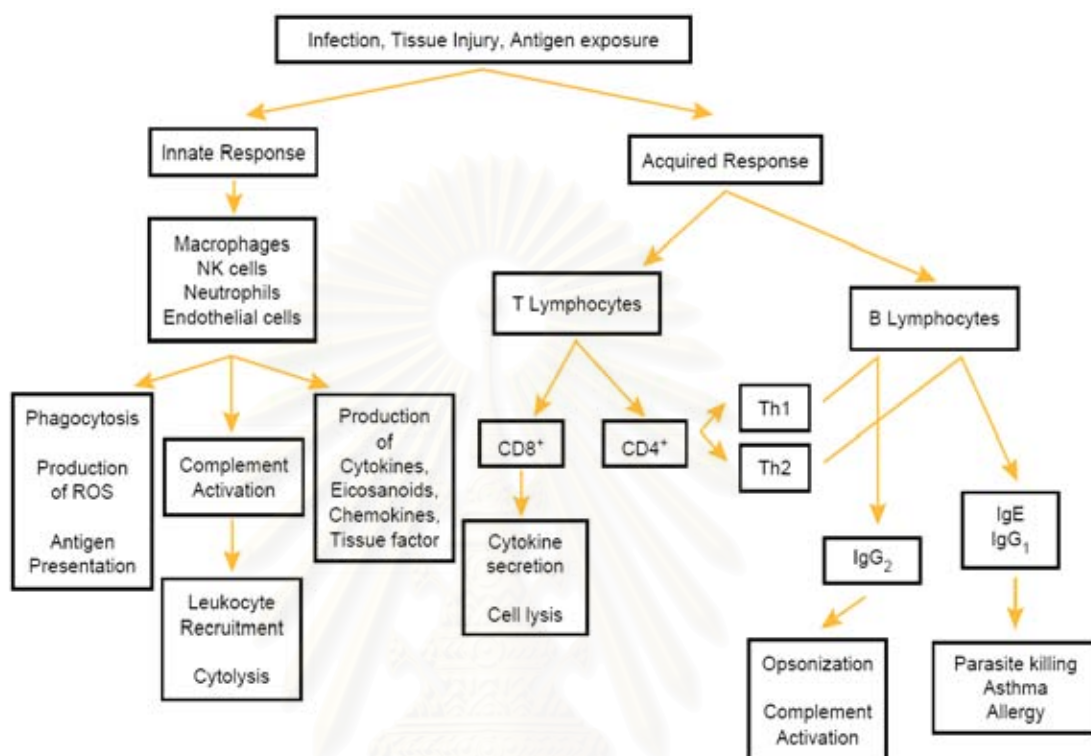
2.2.2.1 *Humoral immune response* เป็นการตอบสนองภูมิคุ้มกันโดยการใช้แอนติบอดี (antibody) ที่สร้างและหลั่งจาก plasma cell ที่พัฒนามาจาก B lymphocyte โดย antibody มีคุณสมบัติสำคัญ คือ จดจำเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมได้อย่างเฉพาะเจาะจงและสามารถรับรู้สิ่งแปลกปลอมได้มากกว่า 10 ชนิด humoral immunity มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อโรคและองค์ประกอบของเชื้อที่อยู่นอกเซลล์

2.2.2.2 *Cell mediated immune response* อาศัยการทำงานของ T lymphocyte ได้แก่ T helper cell และ cytotoxic T lymphocyte (CTL) โดย T helper cell มีหน้าที่กระตุ้นตัวเองและเซลล์อื่นในระบบ ได้แก่ cytotoxic T cell, B lymphocyte, natural killer (NK) cell, macrophage และ neutrophil โดยการหลั่งสาร cytokines เช่น interleukin-2 (IL-2) และ interferon gamma (IFN- γ) เป็นต้น เซลล์ต่างๆที่ถูกกระตุ้นด้วย cytokine ที่หลั่งจาก T helper cell จะทำหน้าที่กำจัดเชื้อโรคหรือสิ่งแปลกปลอมออกไปจากร่างกาย ส่วน CTL ทำหน้าที่โดยตรงในการปล่อยเอนไซม์และสารต่างๆออกมาทำลายเซลล์ที่เกิดการติดเชื้อ Cell mediated immune response มีบทบาทสำคัญในการกำจัดเชื้อโรคที่อยู่ในเซลล์เป็นหลัก



ภาพที่ 3 แสดงภูมิคุ้มกันแบบเฉพาะ (specific immune system) ⁽³²⁾

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 4 แสดงภาพรวมของระบบภูมิคุ้มกันเมื่อมีสิ่งที่มีมากระตุ้นโดยจะแบ่งออกเป็น innate และ acquired immunity (NK = natural killer; ROS = reactive oxygen species; CD = cluster of differentiation; Ig = immunoglobulin; Th = T helper.)⁽³²⁾

2.3 การอักเสบ (Inflammation)

2.3.1 สาเหตุชักนำให้เกิดการอักเสบ จัดแบ่งที่มาของสาเหตุได้ดังนี้

2.3.1.1 สิ่งมีชีวิต ได้แก่ จุลชีพที่ก่อโรคทั้งหลาย

- แบคทีเรีย (Bacteria)
- ไวรัส (Virus)
- เชื้อรา (Fungus)
- ปรสิต (Parasite)

2.3.1.2 สิ่งไม่มีชีวิต

- การตายของเซลล์และเนื้อเยื่อ จากการขาดเลือดหล่อเลี้ยง (infarction) หรือถูกทำลายจาก ขบวนการทางฟิสิกส์ ทางเคมี และ ภูมิคุ้มกัน

- ทางกายภาพ ได้แก่การบาดเจ็บจากแรงกระแทกกระแทก ความร้อนสูง ความเย็นจัด กระแสไฟฟ้าแรงสูง รังสี และ แสงอัลตราไวโอเลต

- ทางเคมี ได้แก่

สารเคมีที่สร้างจากเซลล์ เช่น สารเคมีที่สร้างจากจุลชีพก่อโรคและเซลล์อักเสบทั้งหลาย ตลอดจนน้ำย่อยที่สร้างจากต่อมต่างๆในร่างกาย เช่น กระเพาะอาหาร ตับอ่อน และถุงน้ำดี เป็นต้น

สารเคมีที่ไม่ได้สร้างจากเซลล์ ได้แก่ สารเคมีที่กักตรึงทั้งหลาย เช่น กรด ค่าง และสารออกซิไดซ์ทั้งหลาย

- สิ่งแปลกปลอมต่างๆ ที่เข้ามาอยู่ผิดที่ในร่างกาย เช่น เศษผงต่างๆที่ปลิวมาติดบนเสื้อผ้า หูมตาหรือทางเดินหายใจ เศษดินหรือเศษแก้ว และสิ่งสกปรกที่ติดเข้ามาในเนื้อเยื่อต่างๆ เมื่อเกิดการบาดเจ็บ ตลอดจนสิ่งขั้บถ่ายในร่างกาย เมื่อรู้่วไหลและเข้ามาอยู่ผิดที่ เช่น อุจจาระหรือเศษอาหาร รั่วไหลเข้าช่องท้อง เช่นในกรณีลำไส้หรือกระเพาะอาหารแตกหรือทะลุ

- ภูมิคุ้มกันของตนเอง ซึ่งก่อขึ้นด้วยตัวมันเอง เนื่องจากปฏิกิริยาภูมิคุ้มกันต่อต้านร่างกายตัวเอง (autoimmune)

- การแข็งตัวของเลือด (clotting factor และ complement) ผลผลิตที่ก่อขึ้นจากกระบวนการแข็งตัวของเลือดทั้งหลาย เช่น fibrin และ complement ต่างๆ เป็นต้น เป็นตัวชักนำให้เกิดการอักเสบ

2.3.2 การอักเสบแบบเฉียบพลัน (Acute Inflammation)

เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นทันทีและรวดเร็ว ใช้ระยะเวลาสั้นและกินเวลาไม่นาน ทั้งนี้ขึ้นกับสาเหตุชักนำคงอยู่นานเท่าใด โดยทั่วไปพยาธิสภาพประกอบด้วย การขยายขนาดของหลอดเลือดเล็ก พร้อมกับการคั่งของเม็ดเลือดแดง เกิดการบวมทั่วไปของเนื้อเยื่อบริเวณอักเสบ และเซลล์อักเสบที่พบรวมเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด polymorphonuclear เป็นส่วนใหญ่ นอกจากนี้อาจพบการตายของเซลล์เนื้อเยื่อบริเวณอักเสบร่วมด้วยซึ่งขึ้นกับชนิดและระยะเวลาของสาเหตุชักนำ

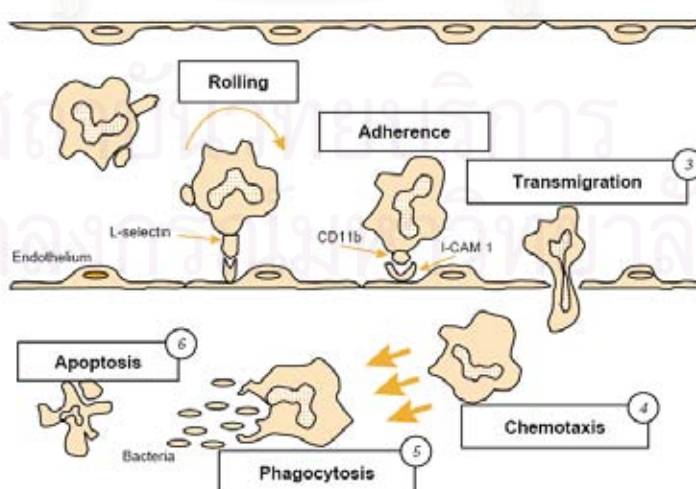
เริ่มแรกเมื่อเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นได้รับอันตราย หลอดเลือดพวก arteriolar vessels บริเวณที่มีการอักเสบจะมีการตอบสนองโดยการหดตัวเป็นระยะเวลาสั้นๆ (2-3 วินาที) ทำให้ผิวหนังบริเวณนั้นดูซีดลงชั่วขณะหนึ่ง หลังจากนั้น precapillary sphincters จะเปิดเต็มที่ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilation) พวกรวม endothelial cells ที่บุผนังหลอดเลือดจะหดตัวโดยเฉพาะบริเวณ postcapillary venules เป็นผลให้น้ำรวมทั้ง plasma proteins ต่างๆสามารถซึมผ่านผนังหลอดเลือด capillary และ venules เข้าไปสู่ interstitial tissue ได้มากขึ้น (increase vascular permeability)

ตามปกติแล้ว endothelial cells ที่บุผนังหลอดเลือดจะอยู่ชิดกัน เรียกว่า tight junction หรือ zonula occludens การหดตัวของ endothelial cells จะทำให้เกิดช่องว่างขึ้นระหว่างเซลล์ทำให้พวก macromolecules ต่างๆใน plasma สามารถหลุดลอดผ่านผนังหลอดเลือดเข้าไปสู่ interstitial tissue ได้ ดังแสดงในภาพที่ 5 การหดตัวของ endothelial cells ดังกล่าวนี้นี้เกิดจากการถูกกระตุ้นด้วยสารที่เป็นสื่อทางเคมีหลายชนิด (chemical mediators) ซึ่งจากการศึกษาพบว่า เมื่อมีอันตรายเกิดขึ้นกับหลอดเลือดจะทำให้ mast cell ที่เกาะอยู่ตามผนังหลอดเลือดแตกและหลั่งสารเคมี histamine ออกมาเป็นตัวแรก นอกจากนี้ยังมีสื่อทางเคมีอื่นๆที่มีผลต่อการเปลี่ยนแปลง vascular permeability เช่น 5-hydroxytryptamine (5HT) หรือ serotonin, kinins, prostaglandins (PGs) และ hydroxyeicosatetraenoic acid (HETEs)

เมื่อหลอดเลือดมี permeability เพิ่มขึ้น เม็ดเลือดขาวพวก polymorphonuclear leukocytes (PMNs) รวมทั้ง fibrinogen จะซึมผ่านผนังหลอดเลือด โดยมีสารเคมีเป็นสื่อดึงดูด (chemoattractant) เม็ดเลือดขาวพวก PMNs ให้เคลื่อนเข้ามาชิดกับ endothelium ของผนังหลอดเลือด (margination) ได้แก่ PGs และ thromboxane (Tx)

ต่อมาเม็ดเลือดขาวพวก PMNs จะไขว่ทะลุผนังหลอดเลือดออกมาสู่เนื้อเยื่อบริเวณรอบๆ หลอดเลือดและเคลื่อนย้ายไปสู่บริเวณที่มีการอักเสบตามอำนาจของ chemoattractant หลังจากเกิด PMN migration ได้ระยะหนึ่งแล้ว monocyte จะเคลื่อนย้ายตามออกมา ซึ่งขณะเกิด monocyte migration นั้น จะมีการแบ่งตัวหนึ่งหรือสองครั้งเพื่อให้ได้เซลล์ใหม่ที่ใหญ่ขึ้นและมีจำนวนมากขึ้น เรียกว่า macrophage, เซลล์ macrophage เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวที่มีความสามารถในการกลืนกิน (phagocytosis) สิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคต่างๆ ได้มากกว่าเม็ดเลือดขาวชนิด PMNs ถึง 10 เท่า ซึ่งในขั้นตอนนี้ การอักเสบจะเพิ่มความรุนแรงมากขึ้นด้วย⁽³³⁾

ถ้ากลไกการตอบสนองต่อสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาสู่ร่างกายบริเวณเนื้อเยื่อหรืออวัยวะนั้นๆ เป็นไปตามปกติ ร่างกายสามารถต่อสู้กับสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาทำอันตรายเหล่านั้นได้ การอักเสบแบบเฉียบพลันก็จะหายและกลับคืนสู่สภาพปกติ แต่ถ้าต่อสู้ไม่ได้ กระบวนการอักเสบจะยังคงดำเนินอยู่ต่อไปสู่อาการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) ผลจากการอักเสบแบบเรื้อรัง อาจทำให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ (เป็นแผลเป็น) หรืออวัยวะของร่างกาย เช่น กระดูกหรือข้อต่อต่างๆ เช่นในโรคข้ออักเสบรูห์มาตอยด์ (rheumatoid arthritis), โรคข้อเสื่อมอักเสบ (osteoarthritis) และโรคเกาต์ (gouty arthritis) เป็นต้น



ภาพที่ 5 แสดงกลไกของ neutrophil ในการ migrate มาที่ตำแหน่งที่เกิดการอักเสบเนื่องจากการติดเชื้อแบคทีเรีย⁽³³⁾

2.3.3 การอักเสบแบบเรื้อรัง (Chronic Inflammation)

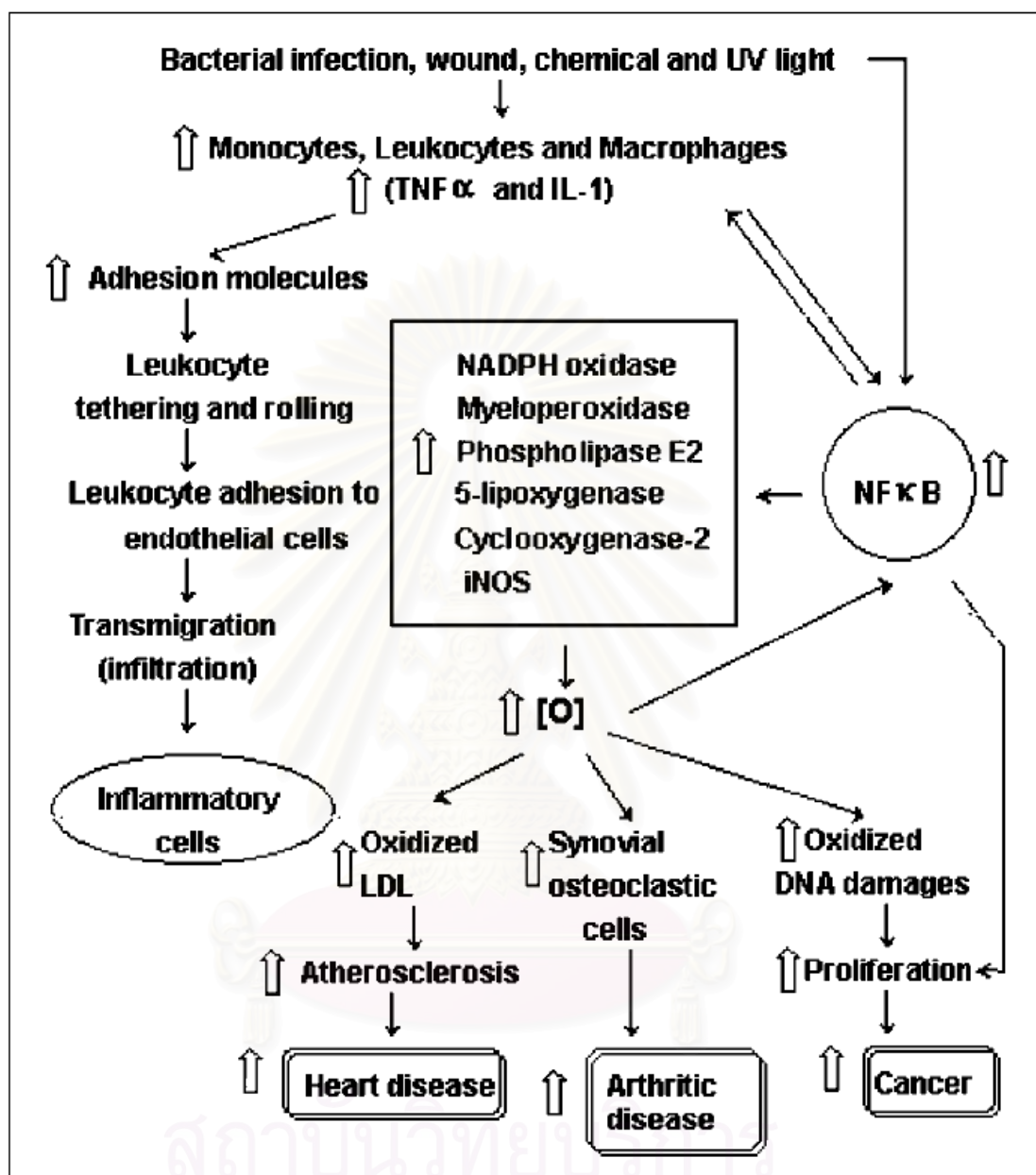
เป็นการอักเสบที่เกิดขึ้นซ้ำและกินระยะเวลานาน ทั้งนี้ขึ้นกับชนิดของสาเหตุชักนำและระยะเวลาของการอักเสบ อาจพบพยาธิสภาพร่วมของการซ่อมแซมส่วนสึกหรอ เช่น เกิดการพอกของเยื่อพังผืด (fibrosis) และสารหินปูน (calcification) หรือบางรายพบการสร้างเซลล์เนื้อเยื่อใหม่ขึ้นทดแทนที่ตายไป เป็นต้น หรือเกิดจากการอักเสบชนิดเฉียบพลันและต่อมากลายเป็นชนิดเรื้อรัง ถ้าหากสาเหตุชักนำยังไม่ถูกกำจัดออกไป พยาธิสภาพประกอบด้วยเซลล์อักเสบเม็ดเลือดขาวชนิด mononuclear cells เช่น lymphocytes plasma cells histiocytes หรือ macrophages

ในการอักเสบแบบเรื้อรังเป็นกระบวนการที่เกิดต่อการอักเสบแบบเฉียบพลัน โดยโปรตีนบริเวณเนื้อเยื่อที่เกิดการอักเสบถูกทำลายอย่างไม่สมบูรณ์ (incomplete degradation protein) จะเกิดการเปลี่ยนแปลงต่อไป โดยโปรตีนจะทำหน้าที่เป็น endogenous antigen ไปกระตุ้น B-cell ให้สร้าง antibody ออกมาเป็นจำนวนมาก เกิดการรวมตัวของ antigen และ antibody เป็น immune complex และไปกระตุ้นโปรตีนใน complement system ตัวที่สำคัญคือ C_{3a} และ C_{5a} ซึ่งทำหน้าที่เป็น chemoattractant ดึงดูดให้เม็ดเลือดขาวมาทำลายสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นอีก ขั้นตอนการอักเสบก็จะเกิดวนเวียนอยู่เช่นนี้เรื่อยไป

การศึกษาเกี่ยวกับการอักเสบแบบเรื้อรังอีกทางหนึ่งก็คือ ปฏิสัมพันธ์ระหว่าง macrophage, T และ B-cell interaction โดยที่เซลล์ macrophage จะสร้างสาร interleukin 1 (IL-1) หรือเรียกว่า cytokine ซึ่งเป็นโปรตีนชนิดหนึ่งทำหน้าที่คล้ายตัวกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (antigenic or mitogenic stimulant) โดยที่ IL-1 จะไปเปลี่ยน Pre-T cell ให้กลายเป็น T-cell และ T-cell จะหลั่งสาร Interleukin 2 (IL-2) ซึ่งเป็นสารกระตุ้นการเจริญเติบโตของ T-cell (T-cell growth factor) ทำให้มีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนและเปลี่ยนแปลง (proliferation and differentiation) ไปเป็น T-cell ชนิดต่างๆ เช่น T-Helper cell มีหน้าที่ควบคุม B-cell ให้ทำงาน โดยปลดปล่อย antibody ออกมา ส่วน T-Suppressor cell มีหน้าที่ควบคุม T-cell และ B-cell ให้ทำงานตามปกติ และ T-Cytotoxic cell มีหน้าที่ทำลาย target cell ซึ่งเป็น “self” endogenous antigen

ถ้าร่างกายมีสถานะสมดุลของ T-Helper cell, T-Suppressor cell และ T-Cytotoxic cell กระบวนการอักเสบก็จะหยุดลงได้ แต่เมื่อเกิดความไม่สมดุลของเซลล์เหล่านี้ขึ้นมา กระบวนการอักเสบก็จะดำเนินต่อไปไม่หยุดยั้ง T-Cytotoxic cell ซึ่งทำหน้าที่ขจัดสิ่งแปลกปลอม จะเข้าทำลาย target cell ขยายวงกว้างออกไปทุกที่จนลามไปถึงเนื้อเยื่อปกติที่อยู่รอบๆ ด้วย โดยการทำงานของ hydrolytic enzymes ซึ่งเอนไซม์นี้สามารถหลั่งออกมาได้จากเซลล์พวก phagocytes ที่ทำหน้าที่ทำลายสิ่งแปลกปลอมทั้งหลาย เช่น T-leukocytes, macrophage, monocytes และ polymorphonuclear leukocytes เป็นต้น นอกจากนี้การทำลายเนื้อเยื่อปกติก็อาจได้รับการส่งเสริมให้มีการทำลายมากขึ้นอีกจากสารอื่นๆ เช่น oxygen breakdown product (free radical) ^(34,35) ซึ่งได้จากการหมดยุและตายลงของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ การทำลายเนื้อเยื่อยังถูกส่งเสริมได้อีกจากพวก arachidonic acid metabolites ซึ่งได้รับการกระตุ้นให้มีการสร้างมากขึ้นจากเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆ ที่มาชุมนุมกันนั่นเอง ผลสุดท้ายก็คือ การอักเสบยังคงดำรงอยู่ต่อไปและมีอาการเรื้อรังเรียกว่า อาการอักเสบแบบเรื้อรัง หากไม่ได้รับการรักษาให้กลับสู่สภาวะปกติ เซลล์เนื้อเยื่อหรืออวัยวะบริเวณนั้นอาจได้รับอันตรายจนกระทั่งสูญเสียหน้าที่ในการทำงานได้ในที่สุด

เมื่อมีสิ่งกระตุ้น (stimulus) มากระทำทำให้เนื้อเยื่อของร่างกายเกิดการอักเสบขึ้น ร่างกายจะมีการตอบสนองเพื่อที่จะขจัดสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้นออกไป (defense mechanism) แต่ถ้าสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายนั้นมีคุณสมบัติเป็นสารที่คงทน ไม่ถูกย่อยหรือทำลายได้โดยง่ายด้วยเอนไซม์ต่างๆ และเป็นสารที่ไม่ละลายน้ำ (low degradability and Insolubility) ซึ่งสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าวนี้ สามารถกระตุ้นให้เกิดการสร้าง granulomas ได้ เรียกสารเหล่านี้ว่า granuloma-inducing agents ซึ่งได้แก่ แบคทีเรียบางชนิด, ทราช (silica), carrageenan, น้ำมันพาราฟิน (paraffin oil), สารจำพวกแป้ง (talc), insoluble immune complex และ insoluble materials ต่างๆ เป็นต้น เมื่อสิ่งกระตุ้นที่เข้าสู่ร่างกายเป็นสารที่มีคุณสมบัติดังกล่าว ร่างกายก็ไม่สามารถขจัดสิ่งแปลกปลอมนั้นๆ ให้ออกไปได้ และสารนั้นยังคงอยู่ในร่างกายต่อไป กระตุ้นให้ร่างกายเกิดการอักเสบวนเวียนอยู่เรื่อยไป ร่างกายจะมีการตอบสนองโดยเกิดปฏิกิริยาการสร้าง granulomas ขึ้นมาห่อหุ้มสิ่งแปลกปลอมเหล่านั้น ซึ่งปฏิกิริยานี้จัดเป็นกระบวนการอักเสบแบบเรื้อรังอย่างหนึ่ง



ภาพที่ 6 แสดงกลไกการเกิดการอักเสบเรื้อรังในโรคต่างๆ⁽³⁶⁾

2.4 สารที่เป็นสื่อทางเคมีในกระบวนการอักเสบ (Mediators of Inflammation)

พบว่า มี mediators หลายตัวที่มีความสำคัญในกระบวนการอักเสบ ซึ่ง mediators แต่ละชนิดมีบทบาทหน้าที่แตกต่างกันออกไปดังนี้ คือ

2.4.1. Histamine

histamine เป็นสารประกอบที่มีน้ำหนักโมเลกุลต่ำ โดยปกติรวมตัวเป็นสารประกอบเชิงซ้อนกับ heparin อยู่ใน mast cell, basophils และ platelets บางครั้ง heparin อาจถูกแทนที่โดย chondroitin และอยู่ในรูปสารประกอบเชิงซ้อนกับ histamine ได้เช่นเดียวกัน การหลั่ง histamine จะขึ้นอยู่กับระดับ Ca^{2+} ภายในเซลล์ซึ่งถูกกระตุ้นจากปฏิกิริยาจำเพาะของ antigen-antibody (โดยเฉพาะ IgE) นอกจากนี้ยังขึ้นอยู่กับระดับ cAMP และ cGMP ที่อยู่ในเซลล์ด้วย กล่าวคือ เมื่อ antigen เข้าไปจับกับ IgE จำเพาะ 2 โมเลกุลซึ่งเกาะอยู่บนเซลล์เหล่านั้น ก็จะส่งสัญญาณให้ระดับ cAMP ลดต่ำลง (ระดับ cGMP สูงขึ้น) และมี Ca^{2+} ไหลเข้ามาในเซลล์ทำให้ microtubules และ microfilaments หดตัว สารต่างๆที่อยู่ในแกรนูลรวมทั้ง histamine ก็จะหลั่งออกมานอกเซลล์ โดยที่เซลล์ยังไม่ตาย ในทำนองกลับกัน ถ้าระดับของ cAMP เพิ่มขึ้น (ระดับ cGMP ลดลง) จะมีผลให้การหลั่ง histamine ลดลงด้วย บทบาทสำคัญของ histamine ต่อการอักเสบคือ ทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (Dilation of terminal arterioles) และเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านหลอดเลือดของน้ำและโมเลกุลต่างๆได้มากขึ้น (increase permeability of post capillary venules) โดยทำให้เซลล์ชั้น endothelial ของผนังหลอดเลือดหดตัว

2.4.2. 5-Hydroxytryptamine (5-HT)

ในสัตว์พวกฟันแทะ (rodents) 5-HT จะหลั่งออกมาจาก platelets, mast cell และ basophils มีฤทธิ์ทำให้หลอดเลือดขยายตัวและมีความสามารถในการเพิ่มการซึมผ่านของน้ำและโมเลกุลต่างๆมากขึ้น แม้ว่า 5-HT จะมีฤทธิ์ในการเพิ่มการซึมผ่านของน้ำและโมเลกุลต่างๆจากผนังหลอดเลือดได้มากกว่า histamine แต่พบสารนี้เพียงเล็กน้อยในคน จึงคาดว่าอาจมีส่วนเกี่ยวข้องในการอักเสบแบบเฉียบพลันบ้างเพียงเล็กน้อยเท่านั้น

2.4.3. Kinin

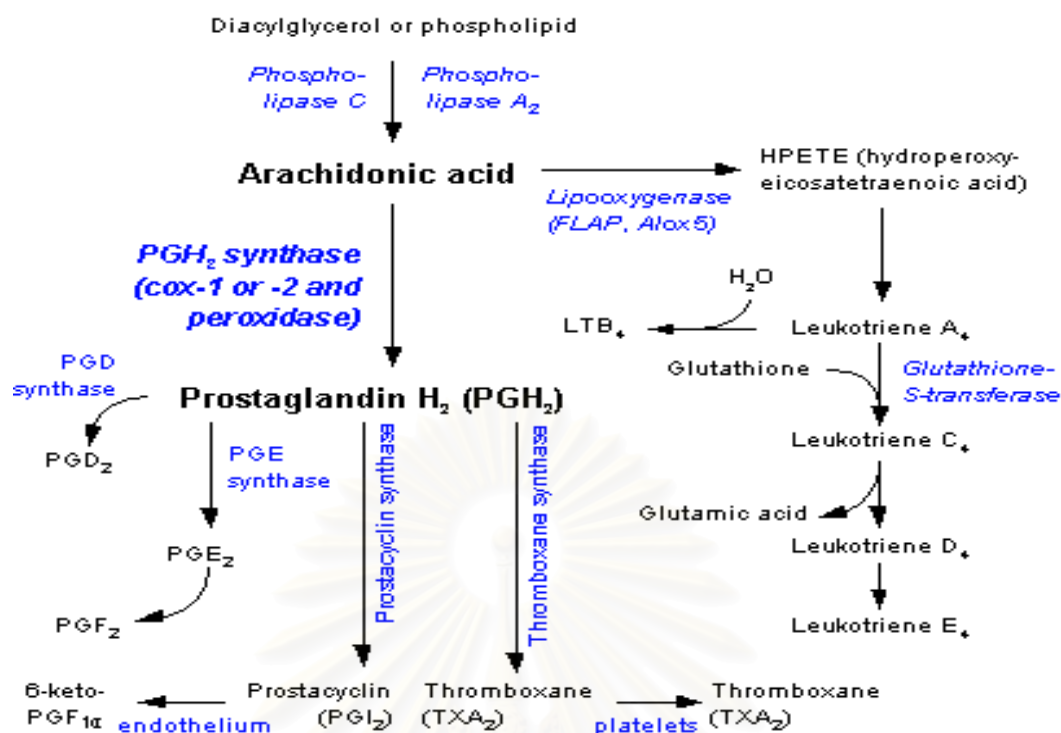
เป็นสารพวก straight chain polypeptide ที่สำคัญในคน มีอยู่ 2 ชนิด คือ bradykinin และ lysyl bradykinin (Kallidin) ปกติจะพบ kinin อยู่ในเลือด (plasma) ในสภาพของ inactive precursors เรียกว่า kininogen (alpha-2 globulin) ต้องอาศัยเอนไซม์ kininogenase มาย่อยเสียก่อน kininogenase ที่สำคัญในคนได้แก่ kallikrein มีอยู่หลายชนิดแล้วแต่ว่าจะมาจากอวัยวะส่วนใด เช่น จากตับอ่อน ต่อมไทรอยด์ เม็ดเลือดขาว หรือพลาสมา เช่น kallikrein จากตับอ่อนจะย่อย kininogen ได้ lysyl bradykinin เป็น inflammatory agents ซึ่งมี potency สูงมากในการทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของน้ำและโมเลกุลต่างๆจากผนังหลอดเลือด เร่งให้มีการเคลื่อนที่ของเม็ดเลือดขาวไปยังบริเวณที่มีการอักเสบและเป็นตัวกระตุ้นให้เกิดความรู้สึกเจ็บปวด bradykinin จะออกฤทธิ์สั้น เนื่องจากถูกทำลายให้หมดฤทธิ์อย่างรวดเร็วโดยเอนไซม์ kininases ในพลาสมาและเนื้อเยื่อต่างๆ

2.4.4. Prostaglandins (PGs)

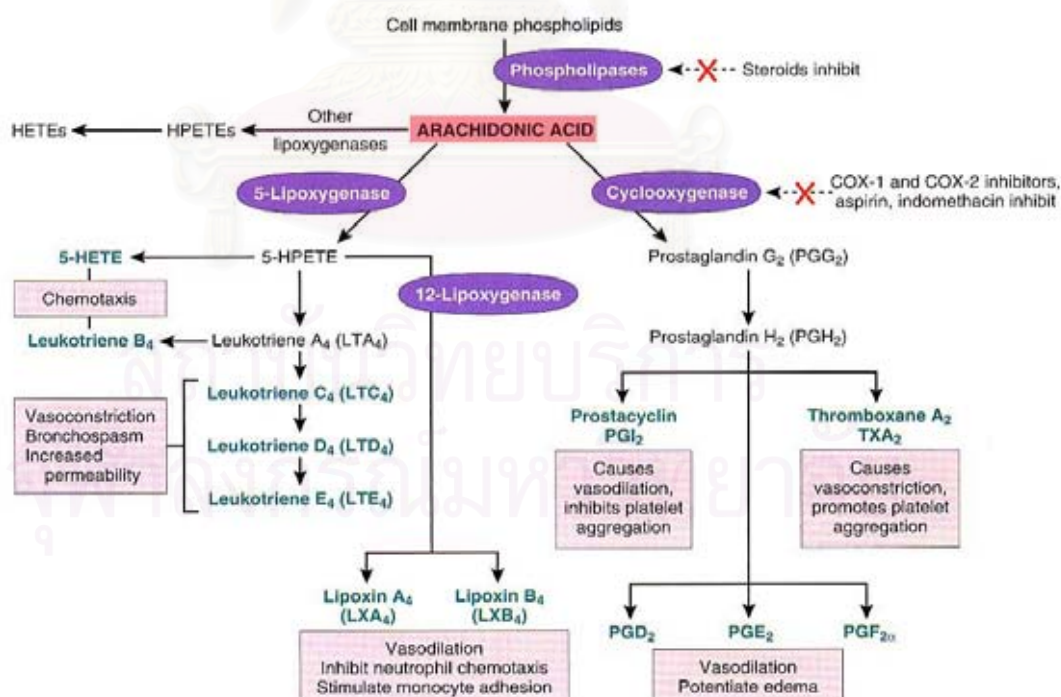
เป็นผลผลิตจากการเปลี่ยนแปลงของ arachidonic acid โดยเอนไซม์ cyclooxygenase เกิดปฏิกิริยาหลายขั้นตอนและได้ PGs ที่มีหลายตัวด้วยกัน เช่น PGG_2 , PGH_2 , PGF_2 , PGE_2 และ PGI_2 นอกจากนั้นยังมี thromboxane ผลผลิตทุกตัวล้วนมีความสำคัญในกระบวนการอักเสบด้วยกันทั้งสิ้น แต่ตัวที่มีความสำคัญที่สุด คือ PGE_2 ซึ่งทำให้เกิดการขยายตัวของหลอดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของน้ำและโปรตีนต่างๆในเลือดออกจากผนังหลอดเลือดมากขึ้น potency ของ PGE_2 สูงพอๆกับ kinin และสามารถกระตุ้น pain receptors ได้ด้วยเช่นกัน

2.4.5. Leukotrienes and hydroxy arachidonic acid products

ในเซลล์เม็ดเลือดขาว arachidonic acid จะถูกเปลี่ยนเป็น 5-hydroperoxyeicosatrienonic acid โดยเอนไซม์ lipoxygenase และผลิตผลในขั้นต่อมาจะได้ leukotrienes ชนิดต่างๆ เช่น A_4 , B_4 , C_4 , D_4 และ E_4 บทบาทที่แน่นอนของ leukotrienes ต่อการเกิดการอักเสบยังไม่ทราบแน่ชัด พบว่า leukotrienes B_4 (LTB_4) เป็นสารที่ดึงดูดเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดต่างๆให้เคลื่อนที่เข้ามาสู่บริเวณที่เกิดการอักเสบ (chemotactic agent) ได้ดี และมี potency สูงกว่า leukotrienes ตัวอื่นๆมาก และยังกระตุ้นให้มีการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือด ทำให้น้ำและโมเลกุลต่างๆซึมผ่านผนังหลอดเลือดได้มากขึ้น



ภาพที่ 7 แสดง arachidonic acid metabolism pathway



ภาพที่ 8 แสดง arachidonic acid metabolites,ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของ eicosanoids ชนิดต่างๆ โดย

สัญลักษณ์ ← X — แสดงการยับยั้ง pathways นั้น

2.4.6. Platelet-Activating Factor (PAF)

PAF (1-o-alkyl-2-acetyl-sn-glycerol-3-phosphorylcholine) เป็นสารที่หลั่งจาก platelets และ leukocytes หลายชนิด เมื่อได้รับตัวกระตุ้นที่เหมาะสม มีฤทธิ์ทำให้เกิดการเกาะกลุ่มกันของเกล็ดเลือดและเพิ่มการซึมผ่านของน้ำและโมเลกุลต่างๆออกนอกหลอดเลือด มีรายงานว่าสาร PAF เข้าสู่ง่ายๆทำให้หนูขาว จะทำให้เกิดการบวม ซึ่งสามารถยับยั้งได้ด้วย dexamethasone และพบว่า PAF เป็น mediators ตัวหนึ่งในกระบวนการอักเสบแบบเฉียบพลัน ทำหน้าที่ดึงดูดเม็ดเลือดขาวพวก PMNs ให้มารวมกลุ่มที่บริเวณเนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บและหลั่ง lysosomal enzymes ออกมา รวมทั้งเพิ่มการซึมผ่านของโปรตีนต่างๆจากหลอดเลือดด้วย ทำให้อาการอักเสบทวีความรุนแรงยิ่งขึ้น

2.4.7. Complement

เป็นโปรตีนในซีรัม (serum) ซึ่งสามารถกระตุ้นให้ออกฤทธิ์โดย immune reaction C_{3a} , C_{5a} ที่เกิดจากการกระตุ้น complement system จะมีคุณสมบัติในการเพิ่ม vascular permeability สารทั้งสองตัวนี้เราเรียกว่า anaphylatoxins เนื่องจากมีบทบาทสำคัญต่อการเปลี่ยนแปลงของหลอดเลือดในปฏิกิริยา anaphylaxis ปี 1973 Willoughby ได้พบว่า complement fraction ซึ่งเกิดจากการย่อยโปรตีนใน complement system จะหลั่งสารพวก vasoactive fraction ซึ่งจะไปกระตุ้น chemical mediators อื่นๆ แต่ปัจจุบันนี้ได้มีการคัดค้านข้อความดังกล่าว เนื่องจากพบว่า ในกรณีที่ complement ขาดหายไป จะมีผลเพียงเล็กน้อยต่อปฏิกิริยาต่างๆที่เกิดขึ้นในบริเวณที่มีการอักเสบแบบเฉียบพลัน

2.4.8. Hydrolytic enzymes

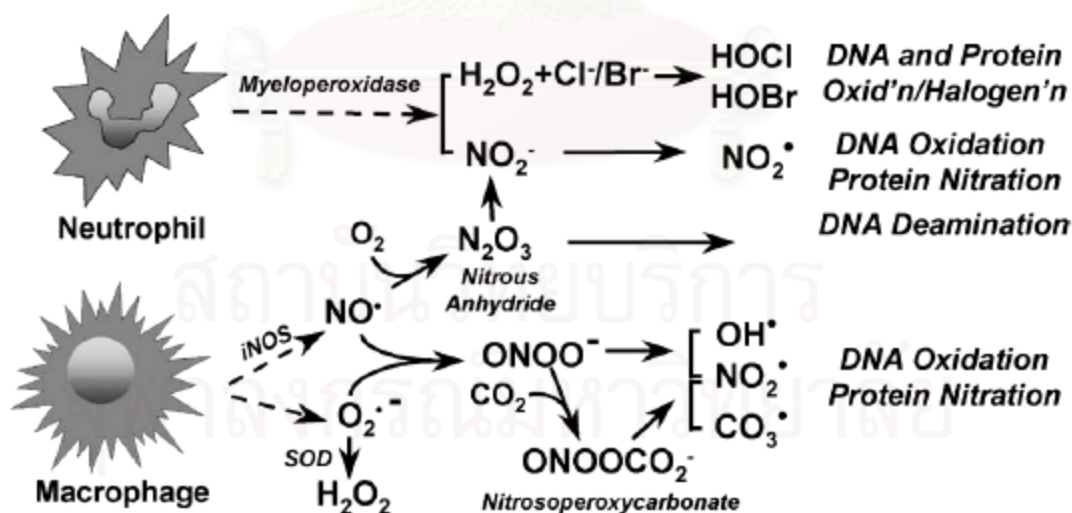
Hydrolytic enzymes เป็นเอนไซม์ที่หลั่งออกมาจาก intracellular vacuoles (lysosomes) ของเซลล์เม็ดเลือดขาวพวก PMNs ขณะที่เกิด phagocytosis เอนไซม์ดังกล่าวนี้แบ่งออกเป็น 2 ชนิด คือ

2.4.8.1 เอนไซม์ที่ออกฤทธิ์ pH 3-5 และสภาพปกติจะเก็บอยู่ใน lysosomes อยู่ในรูป secondary phagosomes ซึ่งไม่มีฤทธิ์เมื่ออยู่ในเซลล์ นอกจากว่าเซลล์หรือเนื้อเยื่อบริเวณนั้นตายแล้วจะกระตุ้นให้เอนไซม์หลั่งออกมาได้ ซึ่งปฏิกิริยานี้จะอยู่ในความควบคุมของตัวยับยั้งเอนไซม์ (enzymes inhibitors) ที่อยู่ในกระแสเลือดและในเนื้อเยื่อทั่วไป

2.4.8.2 เอนไซม์ออกฤทธิ์ที่เป็น pH เป็นกลาง สภาพปกติจะเก็บอยู่ในเซลล์การออกฤทธิ์จะทำงานร่วมกับเอนไซม์อื่นๆที่ชอบ pH กลางเช่นเดียวกัน เช่น collagenase, elastase เป็นผลให้การทำลายเนื้อเยื่อตลอดจนกระดูกอ่อน (cartilage) เพิ่มความรุนแรงขึ้นได้ เช่น ในโรคข้อกระดูกอักเสบรูห์มาตอยด์ (rheumatoid arthritis), โรคข้อเสื่อมอักเสบ (osteoarthritis) เป็นต้น

2.4.9. Products from molecular of oxygen

พบว่าพวก superoxide ต่างๆ เช่น hydroxyl radicals, singlet oxygen และ hydrogen peroxide เป็นสารทางเคมีชีวภาพที่มีผลต่อการทำลายเนื้อเยื่ออย่างเห็นได้ชัดเจนใน in vitro free radicals เหล่านี้มีผลต่อการทำงานของ DNA โดยการไปทำลายตัวของ DNA หรือไปเปลี่ยนแปลงเบสหรือโมเลกุลของน้ำตาลที่สายของ DNA ทำให้เกิดการตายของเซลล์ขึ้น อีกทั้ง free radical ยังเป็นสาเหตุของปฏิกิริยา oxidation, nitration, halogenation, deamination ซึ่งจะเป็นการทำปฏิกิริยากับ biomolecules หลายชนิดเช่น lipid, carbohydrate, protein และ nucleic acid ดังแสดงในภาพที่ 9 บทบาทที่สำคัญของ free radicals ในการอักเสบคือ มันจะกระตุ้นให้เซลล์เม็ดเลือดขาวเกิดการแตกและหลั่งพวก hydrolytic enzymes ที่มีอยู่ภายในเซลล์ออกมา นอกจากนั้นพวก free radicals ยังมีบทบาทสำคัญในการสังเคราะห์ prostaglandins ซึ่งเป็น mediators ที่สำคัญตัวหนึ่งในกระบวนการอักเสบอีกด้วยเช่นกัน^(36,37,38)

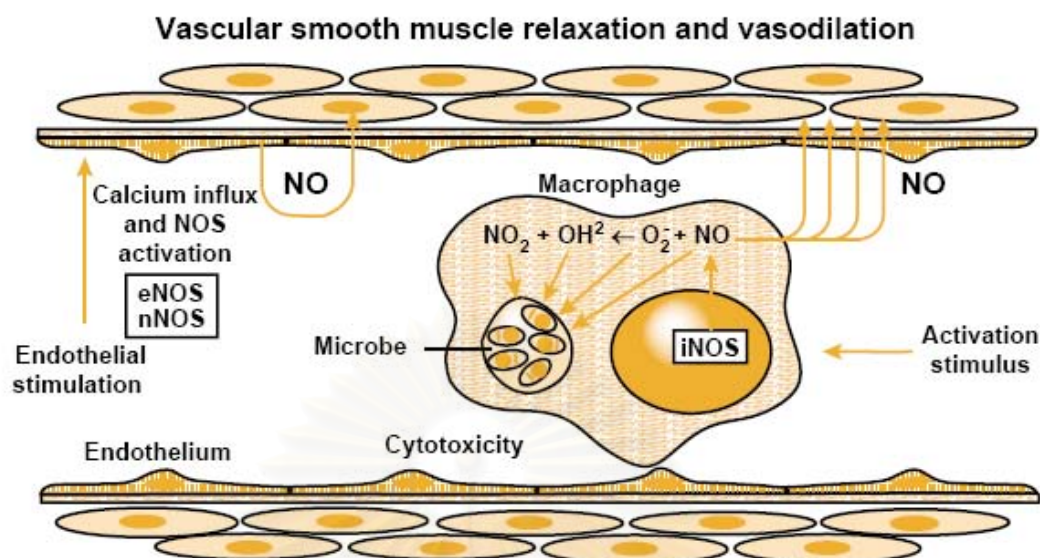


ภาพที่ 9 แสดงผลของ reactive oxygen species และ reactive nitrogen species ที่ถูกสร้างขึ้นขณะเกิดการอักเสบ และ ผลของ species เหล่านี้ไปทำต่อ biomolecule ต่างๆ⁽³⁹⁾

ไนตริก ออกไซด์ (Nitric oxide: NO): เซลล์ macrophages ที่ถูกกระตุ้นสามารถสังเคราะห์สารที่มีฤทธิ์เป็นพิษต่อเซลล์เพื่อใช้ในการทำลายเชื้อจุลชีพ โดยจะแสดงให้เห็นในตารางที่ 1 และหนึ่งใน mediator เหล่านั้นคือ nitric oxide (NO) radical ซึ่งเป็น mediator ที่สำคัญทั้งต่อระบบการทำงานของร่างกายในสภาวะปกติ และต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย

ตารางที่ 1 แสดง mediators ต่างๆที่สร้างจากเซลล์ macrophage ที่มีผลต่อการทำลายเชื้อจุลชีพ⁽³⁸⁾

Oxygen – depending killing	Oxygen – independent killing
Reactive oxygen intermediates	
O_2^- (superoxide anion)	Defensins
OH^- (hydroxyl radicals)	Tumor necrosis factor
H_2O_2 (hydrogen peroxide)	Lysozyme
ClO^- (hydrochloride anion)	Hydrolytic enzymes
Reactive nitrogen intermediates	
NO (nitric oxide)	
NO_2 (nitrogen dioxide)	
HNO_2 (nitrous acid)	
$OONO^-$ (peroxynitrite)	
Other	
NH_2Cl (monochloramine)	



ภาพที่ 10 แสดงฤทธิ์ของ nitric oxide (NO) ในการควบคุมการเกิด vasodilation ระหว่างการเกิดการอักเสบ โดยการสร้าง NO จะถูกสร้างมาจาก nitric oxide synthase (NOS) ซึ่ง NOS จะมีหลาย isoform ด้วยกัน eNOS, nNOS และ iNOS : การ expression ของ eNOS และ nNOS จะถูกควบคุมโดย transcellular calcium flux ขณะที่ iNOS จะถูกกระตุ้นโดย inflammatory mediators เช่น TNF- α และ IL-1⁽³⁶⁾

2.4.10. Cytokines

cytokine เป็นโมเลกุลเล็กๆของโปรตีน มีหน้าที่สำคัญในการสื่อสารระหว่างระบบภูมิคุ้มกัน และระหว่างเซลล์ cytokine ถูกสร้างมาจาก immune cell โดยจะออกฤทธิ์ เฉพาะที่แต่บางครั้งก็สามารถมีผลออกฤทธิ์ทั่วร่างกายได้ cytokine นั้นสามารถออกฤทธิ์ได้กับเซลล์หลายๆชนิด และก็สามารถมีฤทธิ์เสริม (synergistic) หรือต้าน (antagonistic) กับ cytokine ตัวอื่นได้ด้วย

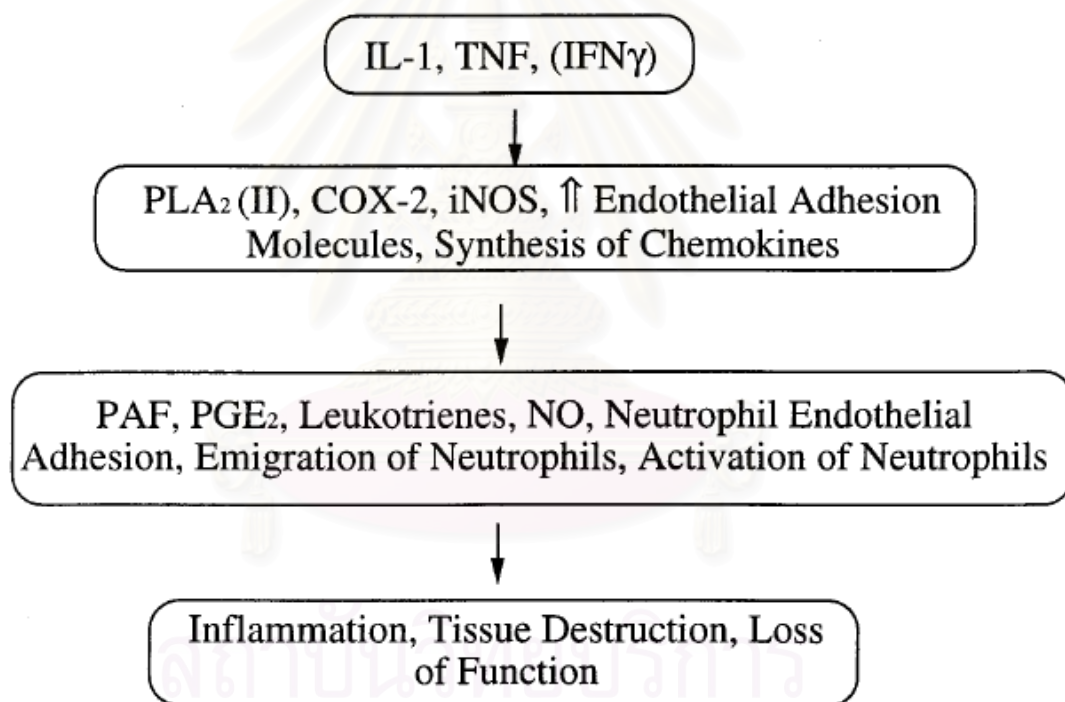
cytokine จะสามารถออกฤทธิ์ได้เมื่อมีการจับกับ receptor (มักเป็น tyrosine kinases) ของมันอย่างเฉพาะเจาะจง และทำให้เกิด signal transduction cascade และเริ่มกระบวนการต่างๆที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงภายในเซลล์เป้าหมาย

2.4.10.1. Pro-inflammatory cytokine

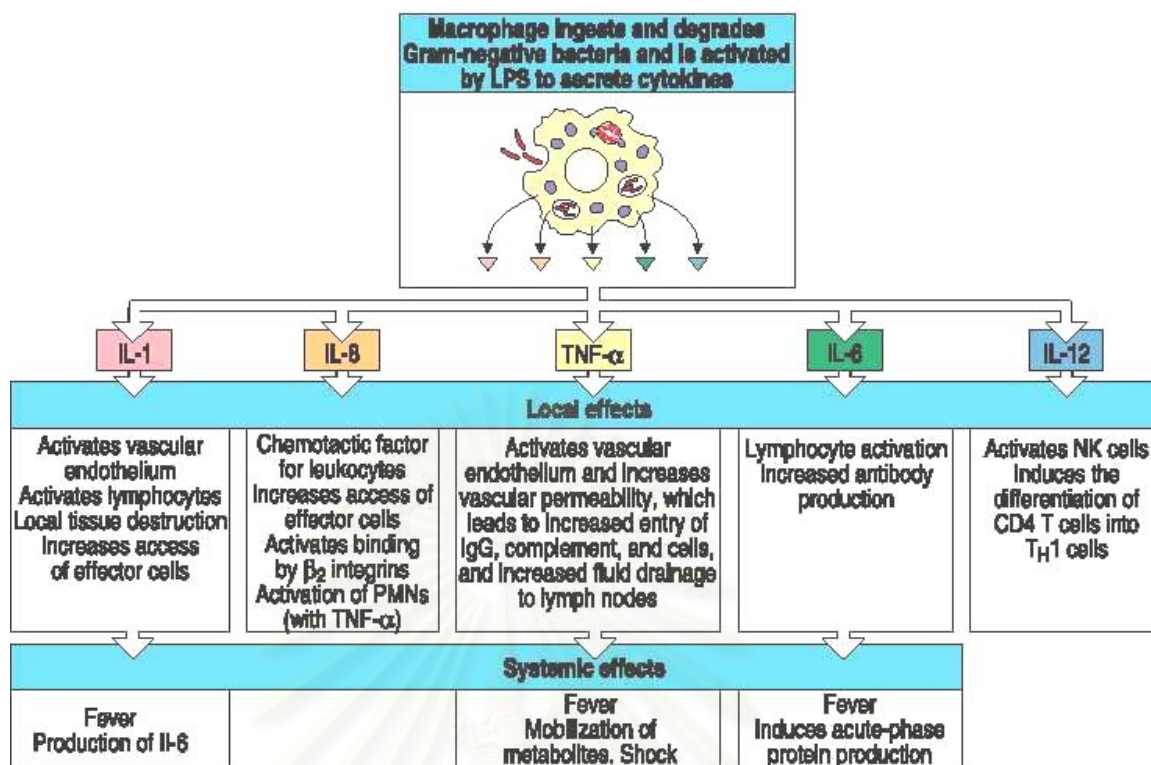
pro-inflammatory cytokine ถูกสร้างขึ้นโดย immune cell ที่ถูกกระตุ้น ทำให้เกิดการอักเสบขึ้น⁽⁴⁰⁾

2.4.10.2. Anti-inflammatory cytokine

Anti-inflammatory cytokine เป็น cytokine ที่มีฤทธิ์ในการจำกัดการเกิด inflammation จะมีฤทธิ์ตรงข้ามกับ pro-inflammatory cytokine



ภาพที่ 11 แสดงกระบวนการอักเสบที่ถูกกระตุ้นด้วย pro-inflammatory cytokine ชนิดต่างๆ⁽⁴⁰⁾



ภาพที่ 12 แสดงฤทธิ์ของ Macrophage-derived cytokines และ chemokines ⁽³⁵⁾

โดยสรุปแล้วการอักเสบที่เกิดขึ้นในร่างกายมีวัตถุประสงค์เพื่อควบคุมไม่ให้สารอันตรายที่เป็นตัวกระตุ้นให้มีการทำลายเนื้อเยื่อแพร่กระจายไปยังบริเวณอื่นๆของร่างกาย โดยการกำจัดสารอันตรายนั้นและซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่ถูกทำลายให้กลับคืนสู่สภาพปกติและสามารถทำหน้าที่ได้คงเดิม แต่ถ้ากลไกการควบคุมการอักเสบของร่างกายบกพร่อง ทำให้อาการอักเสบเกิดขึ้นมากเกินไป กระบวนการอักเสบนั้นจะกลับกลายเป็นอันตรายต่อร่างกายได้ ถ้าการอักเสบเกิดขึ้นที่อวัยวะสำคัญ ก็จะเป็นอันตรายมากขึ้น เกิดเป็นการอักเสบแบบเรื้อรังจนอาจทำให้อวัยวะนั้นเสียหายที่ในการทำงานได้ เมื่อได้ทราบสาเหตุ กลไกการเกิด และการดำเนินไปของกระบวนการอักเสบเช่นนี้แล้ว จะเป็นแนวทางชี้แนะได้ดีในการเลือกใช้ยาต้านการอักเสบให้เหมาะสมกับโรคของผู้ป่วยและมีประสิทธิภาพดียิ่งขึ้น ไม่ว่ายานั้นจะอยู่ในรูปของยาสังเคราะห์ทางเคมีหรือยาที่ได้จากสมุนไพรตามธรรมชาติก็ตาม สำหรับการวิจัยครั้งนี้เป็นการศึกษาฤทธิ์การต้านการอักเสบของสมุนไพรที่ได้จากฝรั่ง (พรอโพลิส) ก็สามารถใช้ความรู้เบื้องต้นของการอักเสบตลอดจนกลไกการเกิดและการดำเนินไปอย่างต่อเนื่องของการอักเสบแบบต่างๆ ช่วยเป็นแนวทางในการศึกษา, วิจัย, วิเคราะห์ผลการทดลองและเปรียบเทียบฤทธิ์การรักษากับยามาตรฐานได้

บทที่ 3

อุปกรณ์ และ วิธีดำเนินการวิจัย

Materials and Methods

3.1 สมุนไพรและแหล่งที่มา

พริกไทยดำจากบริษัทไทยลานนา ซึ่งเก็บจากกิ่งฝิ่งที่เลี้ยงในสวนลำไยที่ อำเภอลำปาง จังหวัด เชียงใหม่ มีลักษณะเป็นก้อนแข็งสีดำ มีกลิ่นเฉพาะ เก็บรักษาไว้ในที่เย็น เพื่อนำไปสกัดด้วยเอทานอล

3.2 สัตว์ทดลอง เครื่องมือ อุปกรณ์ และสารเคมี

3.2.1 สัตว์ทดลอง

ใช้หนูขาวพันธุ์ Wistar เพศผู้ น้ำหนักประมาณ 100-150 กรัม จากสำนักศูนย์สัตว์ทดลอง แห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล ศาลายา จังหวัดนครปฐม เมื่อได้หนูแล้วนำมาเลี้ยงเพื่อปรับสภาพหนู ก่อนทำการทดลองที่ศูนย์เลี้ยงสัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อย่างน้อย เป็นเวลา 1 สัปดาห์ ในห้องที่ควบคุมอุณหภูมิให้อยู่ในช่วง $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ มีแสงสว่างพอเหมาะ โดย ได้รับแสงสว่าง 12 ชั่วโมงสลับมืด 12 ชั่วโมง และเลี้ยงในกรงที่มีวัสดุรองนอนเป็นขี้เลื่อยสะอาด โดยให้อาหารสำเร็จรูปของบริษัทเจริญโภคภัณฑ์ (CP 082 mice feed) และ น้ำสะอาดอย่างเพียงพอ ตามความต้องการของสัตว์ทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.2.2 เครื่องมือ และอุปกรณ์

aluminum foils (Diamond, USA), autoclave tape (3M, USA), autoclave (Hirayama, Japan), autopipette (Gilson, France), beakers: 50 ml, 1,000 ml (Pyrex, USA), biohazard laminar flow hood (Science, Gelman), centrifuge, cylinders (Pyrex, USA), disposable gloves (Latex, USA), eppendorf (Corning, USA), ELISA microplate reader (Multiskan EX, Germany), evaporator, freezer – 80° C (Sanyo, Japan), glass pipettes: 1 ml, 5 ml, 10 ml (Witeg, Germany), hemocytometer (Boeco, Germany), hot air oven, incubator, light microscope (Olympus, Japan), microscope glass cover slips (Chance, England), 96 and 24 multi-well plates (Nunc, Denmark), parafilm (American National Can, USA), pH meter SA 520 (Orion, USA), pipette (Falcon, USA), pipette tip: 1000, 200, 20 µl (Molecular Bio- products, USA), plastic tube (Becton Dickinson), plethysmometer, reagent bottles: 50,100,250,500 and 1000 ml (Duran, Germany), scraper, sterile membrane filters (Whatman, Japan), sterile polypropylene centrifuge tube: 15 ml, 50 ml. (Nunc, Denmark), sterile millipore 0.22 µm, 0.45 µm (Millex-GP, USA), refrigerator 4°C, - 20°C (Sanyo, Japan), T- 25 and T-75 Tissue Culture flasks (Nunc, Denmark), vacuum pump, vortex mixer (Labnet, USA)

Plethysmometer, (UGO BASILE 7140) เป็นเครื่องมือสำหรับวัดปริมาตรการบวมที่บริเวณอุ้งเท้าของหนูขาว หลักการทำงานของเครื่องจะใช้หลักการแทนที่น้ำซึ่งจะมีหลอดแก้วรูปทรงกระบอกขนาดสูง 6 เซนติเมตร จำนวน 2 หลอด โดยทั้งสองหลอดมีช่องเล็กๆ เป็นทางเชื่อมติดต่อกันได้เมื่อใส่สารละลาย electrolyte ลงไป เมื่อทำการจุ่มอุ้งเท้าของหนูขาวลงไปทั้งหลอดแก้วด้านหนึ่งจะทำให้มีการเปลี่ยนแปลงของระดับน้ำเกิดขึ้น และจะวัดการเปลี่ยนแปลงด้วย volume transducer ค่าที่อ่านได้เป็นตัวเลขมีหน่วยเป็นมิลลิลิตร (ml) ดังแสดงในภาพที่ 13

3.2.3 สารเคมี

absolute ethanol (Merck, Germany), calcium chloride (Merck, Germany), carrageenan, dexamethasone, dimethyl sulfoxide (DMSO) (Sigma, USA), doxorubicin, dulbecco's modified eagle's medium (DMEM) (Sigma, USA), fetal bovine serum (Hyclone, USA), glucose (Merck, Germany), , HEPES (Hyclone, USA), hydrochloric acid: (Merck, Germany), Indomethacin, L-glutamine (Gibco, Germany), lipopolysaccharide (Sigma, USA), MTT (Sigma, USA), penicillin/streptomycin (Hyclone, USA), potassium chloride (Merck, Germany), potassium hydrogen phosphate (Merck, Germany), potassium hydroxide (Merck, Germany), sodium chloride (Sigma, USA), sodium hydroxide (Merck, Germany), di-sodium hydrogen phosphate monobasic (Merck, Germany), sodium bicarbonate (Baker, USA), sodium hypochloride (Clorox, USA), 0.4 % Trypan blue dye (Sigma, USA)

nitric oxide assay kit (Promega, USA), Mouse TNF- α ELISA test kit (Hycult biotechnology)

3.3 Cell line

Mouse monocyte / macrophage cell line: RAW 264.7 (ATCC Number TIB-71)

เลี้ยงเซลล์ใน 25-cm² cultured flasks ด้วยอาหาร complete DMEM ที่ 37 °C, 97% humidity, 5%CO₂

3.4 วิธีดำเนินการวิจัย

3.4.1 วิธีการสกัดพอลิฟีนอล

การสกัดนำมาตัดเป็นชิ้นเล็กๆ แล้วแช่ใน ethanol 95% ทิ้งไว้เป็นเวลา 3 คืน จากนั้นกรองด้วยกระดาษกรองแยกกากทิ้งไป นำสิ่งสกัดที่ได้ไปประเหยสารละลาย ethanol ด้วยเครื่อง vacuum evaporator จะได้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิฟีนอลไทยที่มีลักษณะเป็นสารหนืดสีดำ การเก็บรักษาจะเก็บสิ่งสกัดที่ได้ไว้ในที่อุณหภูมิประมาณ 4 °C

วิธีการทดสอบ แบ่งเป็น 2 ขั้นตอน คือ

ขั้นตอนที่ 1 : *in vivo* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งอาการบวมจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาด้านการอักเสบ indomethacin

ขั้นตอนที่ 2 : *in vitro* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และการหลั่ง cytokine TNF- α รวมทั้งศึกษา ความเป็นพิษของสมุนไพร โดยใช้การทำ MTT assay

ขั้นตอนที่ 1 : *in vivo* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งอาการบวมจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาด้านการอักเสบ indomethacin

3.4.2 การเตรียมยา, สารต่างๆ และสมุนไพร

3.4.2.1 การเตรียม 1% carrageenan ใน 0.9% sodium chloride solution

ชั่ง carrageenan 0.1 กรัม แล้วนำมาใส่ในสารละลาย 0.9% sodium chloride solution (normal saline) ปรับปริมาตรให้เป็น 10 ml คนให้เป็นเนื้อเดียวกัน ใส่ขวดปิดฝาให้มิด ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้องเป็นเวลา 2 วัน เพื่อให้ฟองตัวเต็มที่

3.4.2.2 การเตรียมสารละลาย electrolyte

ชั่ง sodium chloride 1.0 กรัม ปรับปริมาตรเป็น 1000 ml ด้วยน้ำกลั่น และเติมสารลดแรงตึงผิว (detergent) 5 ml เก็บใส่ขวดไว้ใช้เป็นสารละลายที่ใช้สำหรับการวัดปริมาตรของเท้าหนู

3.4.2.3 การเตรียมยา indomethacin

ยา indomethacin parenteral injection โดยฉีดเข้าช่องท้องหนูในขนาด 5 mg/kg เตรียม indomethacin ที่เป็น standard solution ความเข้มข้น 10 mg/ml โดยทำการ pipette ยามา 0.8 ml และปรับปริมาตรด้วย normal saline ให้ได้เป็น 2 ml

3.4.2.4 การเตรียมพรอโพลิสไทยสำหรับทดลองวัด paw edema

ทำการเตรียมสารละลายพรอโพลิสไทยความเข้มข้น 200 mg/ml, 300 mg/ml และ 400 mg/ml ตามลำดับ โดยทำการชั่งพรอโพลิส แล้วละลายด้วย DMSO ให้ได้ความเข้มข้นตามต้องการ

3.4.3 วิธีการทดลองวัดการบวมของอุ้งเท้าหนู

ทำให้อุ้งเท้าหนูบวมโดยการฉีดสาร carrageenan เข้าที่อุ้งเท้าของหนูขาว (carrageenan induced - foot edema test) ซึ่งเป็นการศึกษาการอักเสบชนิดเฉียบพลัน (acute inflammation) ตามวิธีของ Winter⁽⁴¹⁾ ดังนี้

1. เตรียมหนูที่จะทำการทดลอง โดยงดอาหารหนูแต่สามารถให้น้ำได้เป็นเวลาอย่างน้อย 12 ชั่วโมง ก่อนการทดลองเพื่อป้องกันไม่ให้อาหารไปรบกวน bioavailability ของยา

2. แบ่งเป็นกลุ่มการทดลอง 5 กลุ่ม ใช้หนูกลุ่มการทดลองละ 8 ตัว⁽⁴²⁾ คือ

กลุ่มที่ 1 : negative control โดยให้ DMSO ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

กลุ่มที่ 2 : positive control โดยให้ยาด้านการอักเสบ indomethacin ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip) ขนาด 5 mg/kg

กลุ่มที่ 3 : ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (EEP) ที่ขนาด 200 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

กลุ่มที่ 4 : ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (EEP) ที่ขนาด 300 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

กลุ่มที่ 5 : ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (EEP) ที่ขนาด 400 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง (intraperitoneal : ip)

3. ชั่งน้ำหนักหนูแต่ละตัวเพื่อใช้ในการคำนวณขนาดของยา

4. จัดเส้นรอบข้อเท้าหนูบริเวณ กระดูก lateral malleolus เพื่อเป็นแนวที่จะใช้วัดปริมาตรของอุ้งเท้า

5. วัดปริมาตรของอุ้งเท้าหนูก่อนทำการฉีดสาร carrageenan ด้วยเครื่อง plethysmometer

6. ฉีดสารละลาย 1% carrageenan ใน 0.9% sodium chloride solution ปริมาตร 0.1 ml เข้าที่ใต้อุ้งเท้า (subplantar injection) หลังจากให้สารทดลองแล้ว 1 ชั่วโมง

7. ทำการวัดปริมาตรอุ้งเท้าหลังจากฉีด carrageenan แล้ว 1 ชั่วโมงและทำการวัดซ้ำอีกทุกๆ 1 ชั่วโมงจนครบ 6 ชั่วโมง แล้วบันทึกผล

8. ระหว่างการทดลองให้งดอาหารและน้ำหนูด้วย เพื่อป้องกันการรบกวนจากอาหารและน้ำต่อการบวมที่จะเกิดขึ้น

3.4.4 การคำนวณเปอร์เซ็นต์ในการยับยั้งอาการบวม

ก่อนการกระตุ้นให้อู้งเท้าหนูเกิดการอักเสบจะวัดปริมาตรอู้งเท้าข้างที่จะฉีดสารก่อน โดยทำเครื่องหมายขีดเส้นรอบข้อเท้าหนูบริเวณ กระดูก lateral malleolus เป็นแนวที่จะใช้วัดปริมาตรของอู้งเท้า เพื่อเป็นปริมาตรของอู้งเท้าหนูก่อนฉีด carrageenan เท่ากับ V_p เมื่อให้ยาแต่ละกลุ่มแล้ว 1 ชั่วโมง จึงฉีดสารกระตุ้นให้อู้งเท้าหนูเกิดการบวมด้วย 1% carrageenan ใน 9% sodium chloride 0.1 ml เข้าที่ใต้ผิวหนัง (subcutaneous) บริเวณอู้งเท้าด้านหลังของหนู หลังฉีด carrageenan แล้วทำการวัดอู้งเท้าหนูทุกๆ 1 ชั่วโมง เป็นเวลา 6 ชั่วโมง โดยการวัดกลุ่มที่ได้รับสารละลายยา indomethacin และ EEP วัดปริมาตรเท่ากับ V_d และกลุ่มที่ได้รับ DMSO วัดปริมาตรเท่ากับ V_c

ปริมาตรการบวมของอู้งเท้าหนู (volume of edema) เท่ากับ ปริมาตรอู้งเท้าโดยวัดหลังฉีด carrageenan ลบด้วยปริมาตรอู้งเท้าก่อนฉีด carrageenan

ดังนั้น ปริมาตรการบวมของอู้งเท้าหนูในกลุ่มควบคุม (DMSO) = $V_c - V_p$

ปริมาตรการบวมของอู้งเท้าหนูในกลุ่มที่ได้รับยา (indomethacin และ EEP) = $V_d - V_p$

$$\% \text{Inhibition} = \left(\frac{(V_c - V_p) - (V_d - V_p)}{V_c - V_p} \right) \times 100$$

$$\% \text{Inhibition} = \left(1 - \frac{V_d - V_p}{V_c - V_p} \right) \times 100$$

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 13 แสดงเครื่องมือ plethysmometer ที่ใช้ในการทดลองฤทธิ์การยับยั้งการบวมของ
อุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย 1% carrageenan

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ขั้นตอนที่ 2 : *in vitro* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และการหลั่ง cytokine TNF- α รวมทั้งศึกษา ความเป็นพิษของสมุนไพร โดยใช้การทำ MTT assay

3.4.5 การเตรียมอาหารสำหรับเลี้ยง macrophage cell line RAW 264.7

เซลล์ mouse macrophage cell line (RAW 264.7) จะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์คือ Dulbecco's Modified Eagles Medium (DMEM) ที่เพิ่ม supplement 10% fetal bovine serum, 2 mM glutamine, 25 mM HEPES, NaHCO₃, 100 U/ml penicillin และ 100 μ g/ml streptomycin

3.4.6 การเลี้ยง macrophage cell line (RAW264.7) การตรวจสอบ cell viability และการกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS

macrophage cell line (RAW264.7) เลี้ยงในอาหารเลี้ยง DMEM (ที่เตรียมจากข้อ 3.4.5) แล้วเลี้ยงที่ 37 องศาเซลเซียส ที่ 5% CO₂ และทำการแบ่งเซลล์ที่โตเต็มแล้วพร้อมกับเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเชื้อทุกๆ 3 วัน หรือเมื่อเซลล์เต็ม flask ถึง 70% ของพื้นที่ของ flask ที่เลี้ยง

การตรวจสอบ cell viability ทำโดยใช้ย้อมเซลล์ trypan blue และทำการนับจำนวนเซลล์ที่ยังมีชีวิตจะไม่สามารถติดสีน้ำเงิน โดยต้องมีปริมาณเซลล์ที่มีชีวิตไม่ต่ำกว่า 90% จึงจะสามารถนำมาทำการทดลองได้

การกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS โดยการแบ่งเซลล์มาจำนวน 1×10^5 cells/ml ใส่ใน 24-well plate โดยแบ่งกลุ่มการทดลองเป็น 3 กลุ่มการทดลองคือ

กลุ่มที่ 1 : negative control : เป็นสารละลายที่ใช้ในการละลายพรอโพลิสไทย (vehicle : 0.05 % DMSO)

กลุ่มที่ 2 : กระตุ้นเซลล์ด้วย LPS (100 ng/ml) เพียงอย่างเดียว

กลุ่มที่ 3 : pretreated เซลล์ด้วยพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ (10-100 μ g/ml) หรือด้วยยา dexamethasone 10 μ M เป็นเวลา 24 ชั่วโมง แล้วกระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (EEP+LPS) ⁽⁴³⁾

เก็บ supernatant นำไปวิเคราะห์หาปริมาณ NO และ TNF - α ตามวิธีการในข้อ 3.4.8 และ 3.4.9 ตามลำดับ

3.4.7 การทดสอบความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (MTT assay)

ทดสอบกับสมุนไพรที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50, และ 100 µg/ml และทดสอบกับ dexamethasone 10 µM ความเข้มข้นที่ใช้ในการทดลอง วิธีการทำ assay

1. นำเซลล์ RAW 264.7 ความเข้มข้น 1×10^5 cells/ml ที่อยู่ใน completed DMEM ปริมาตร 90 µl ใส่ลงใน 96-well plate

2. Incubate cells ไว้ 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO₂

3. เติมน้ำที่ทำการทดสอบความเป็นพิษ 10 µl ลงใน well โดยมีกลุ่มควบคุมคือ กลุ่มที่ให้น้ำกลั่น และกลุ่มที่ให้ยาต้านมะเร็ง doxorubicin

4. Incubate cells ไว้ 48 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37°C, 97% humidity, 5%CO₂.

5. เติม MTT solution (5 mg/ml ละลายใน PBS) 10 µl ลงในแต่ละ well

6. Incubate cells เป็นเวลา 3 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 37 °C, 97% humidity, 5%CO₂.

7. เท supernatant ทิ้งไป แล้วเติม concentrate DMSO 100 µl ลงในแต่ละ well เพื่อละลาย formazan crystal.

8. ตั้งทิ้งไว้ในที่มืดและสังเกตว่าผลึกของ formazan ละลายหมดจากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 570 nm และ 650 nm โดยเครื่อง microplate reader

9. นำค่าการดูดกลืนแสงที่ได้จากการวัดที่ความยาวคลื่นทั้ง 2 ความยาวคลื่นมาลบกันได้เป็นค่า delta absorbance (delta OD) แล้วนำไปคำนวณหาเป็น %viability เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น

$$\%viability = \left(\frac{\text{delta OD (sample)}}{\text{delta OD (control)}} \right) \times 100$$

delta OD (sample) = delta absorbance ของสารที่ทดสอบความเป็นพิษคือ สมุนไพรความเข้มข้นต่างๆ, ยา dexamethasone, ยา doxorubicin

delta OD (control) = delta absorbance ของน้ำกลั่น

3.4.8 การวิเคราะห์หาปริมาณ nitric oxide (Determination of nitric oxide concentration)

1. นำส่วน supernatant จากข้อ 3.4.6 ปริมาตร 100 μl ในแต่ละ well มาทำปฏิกิริยากับ Griess reagent 20 μl ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง นาน 10 นาที ในที่มืด (ทำตามวิธีที่แนบมาพร้อมกับ kit Promega Griess Reagent)
2. นำ plate ไปวัดค่าการดูดกลืนแสงโดยใช้เครื่อง microplate reader ที่ 550 nm
3. เปรียบเทียบปริมาณ nitric oxide ที่วัดได้จากตัวอย่างกับ standard sodium nitrite ที่ได้จากการทำ standard curve โดยค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น μM ของ nitrite

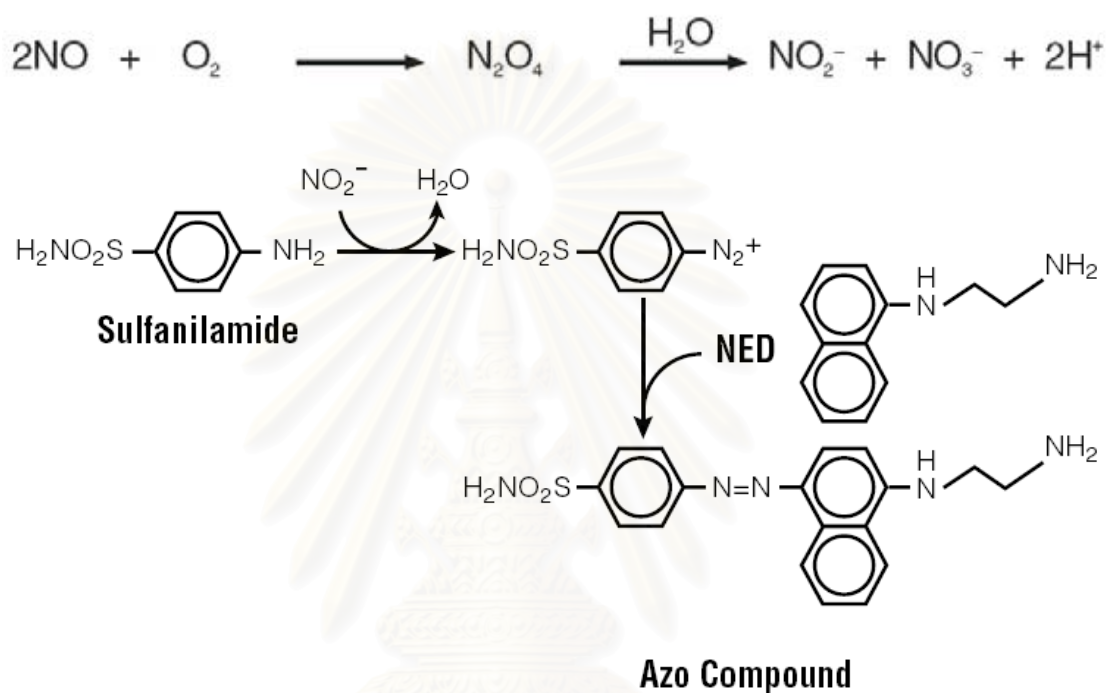
การคำนวณ %inhibition ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ LPS 100 ng/ml คำนวณโดยใช้สูตร

$$\%inhibition = \left(\frac{\text{NO}_2^- (\text{control}) - \text{NO}_2^- (\text{sample})}{\text{NO}_2^- (\text{control})} \right) \times 100$$

$\text{NO}_2^- (\text{control})$ = ปริมาณ NO_2^- ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้เพียง LPS 100 ng/ml (positive control)

$\text{NO}_2^- (\text{sample})$ = ปริมาณ NO_2^- ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้สมุนไพรหรือ dexamethasone ร่วมกับ LPS 100 ng/ml

*หมายเหตุ Griess reaction เป็นปฏิกิริยาเคมีที่เกิดขึ้น โดยในการวัดปริมาณของ NO ที่หลั่งออกมาโดยจะวัดในรูปของ nitrite (NO_2^-) เนื่องจาก NO เมื่อหลั่งออกมาจะทำปฏิกิริยากับออกซิเจน ได้เป็น dinitrogen tetraoxide และเมื่อทำปฏิกิริยาต่อกับน้ำจะได้ผลิตภัณฑ์คือ nitrate (NO_3^-) และ nitrite (NO_2^-) ดังที่แสดงในภาพที่ 14 และในการทดลองเพื่อวัดปริมาณ NO จะวัดในรูปของ nitrite (NO_2^-) ซึ่งสามารถทำปฏิกิริยาเคมีกับ Griess reagent ได้เป็น azo compound ที่มีสีทำให้สามารถวัดปริมาณของ nitrite (NO_2^-) ที่มีอยู่ได้ โดยใช้ เครื่องวัด spectrophotometer ที่สามารถวัดการดูดกลืนของแสงที่ความยาวคลื่น 550 nm



ภาพที่ 14 แสดงสมการปฏิกิริยาของ NO ในการสลายตัวได้เป็น nitrate (NO_3^-) และ nitrite (NO_2^-) และปฏิกิริยาในการวัดปริมาณของ nitrite โดยใช้ Griess reaction

NED = N-1-naphthylethylenediamine dihydrochloride

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3.4.9 การวิเคราะห์หาปริมาณ tumor necrosis factor – α (Determination of TNF – α concentration)

นำส่วน supernatant จากข้อ 3.4.6 มา 100 μ l ทำการวัดปริมาณ TNF – α โดยใช้วิธี sandwich ELISA (ทำตามวิธีที่แนบมาพร้อมกับ kit Hycult biotechnology ดังแสดงในรูปที่ 15) และนำไปอ่านผลโดยวัดค่า absorbance ที่ความยาวคลื่น 450 nm โดยใช้เครื่อง automated microplate reader และเปรียบเทียบปริมาณ TNF – α ที่วัดได้จากตัวอย่างกับ standard recombinant mouse TNF – α ที่ได้จากการทำ standard curve โดยค่าที่วัดได้มีหน่วยเป็น pg/ml

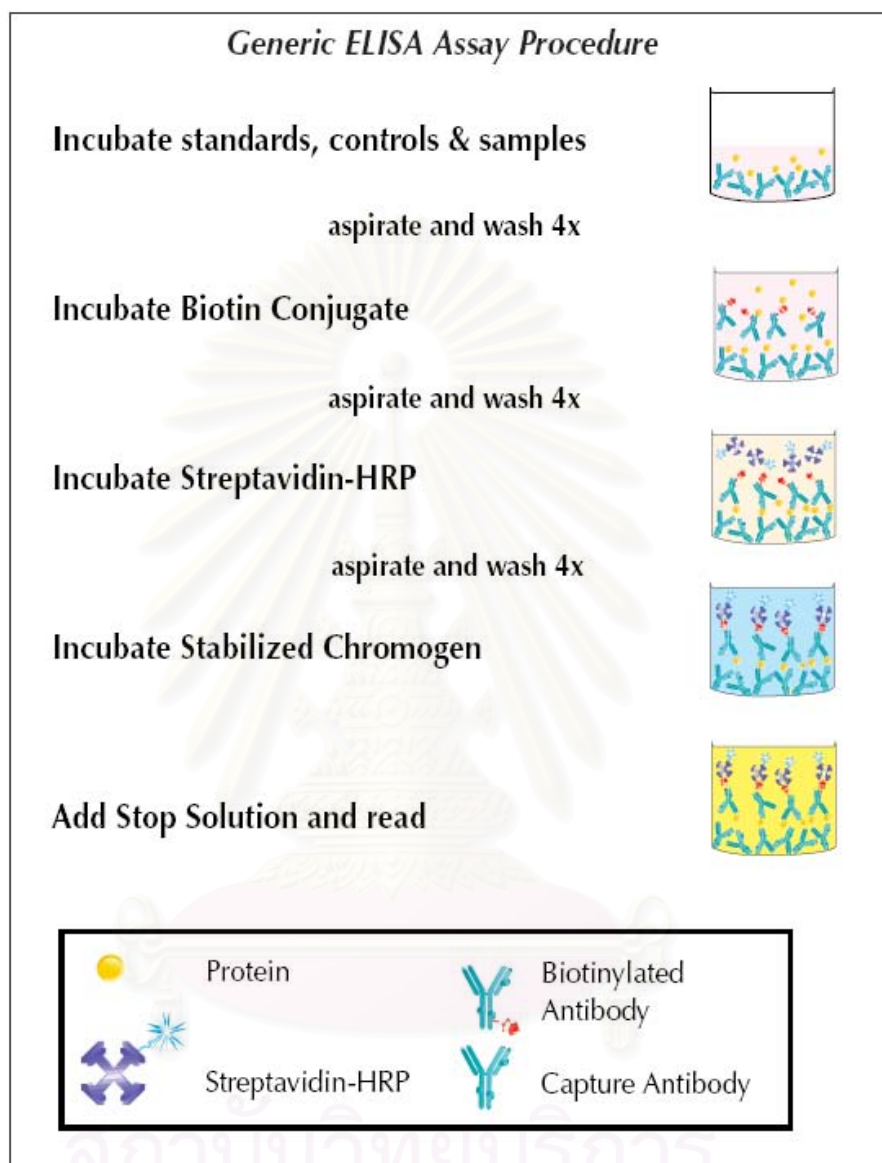
การคำนวณ %inhibition ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ LPS 100 ng/ml คำนวณโดยใช้สูตร

$$\%inhibition = \left(\frac{TNF - \alpha \text{ (control)} - TNF - \alpha \text{ (sample)}}{TNF - \alpha \text{ (control)}} \right) \times 100$$

TNF – α (control) = ปริมาณ TNF – α ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้เพียง LPS 100 ng/ml

TNF – α (sample) = ปริมาณ TNF – α ที่วัดได้จากกลุ่มที่ให้สมุนไพรหรือ dexamethasone ร่วมกับ LPS 100 ng/ml

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 15 แสดงวิธีการวัดหาปริมาณ TNF - α โดยวิธีการ sandwich ELISA

3.5 การรวบรวมและวิเคราะห์ข้อมูล

1. ขั้นตอนที่ 1 คำนวณ ค่าที่ได้เป็น %inhibition ในการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มสมุนไพรหรือกลุ่มที่ให้ยา indomethacin กับกลุ่มควบคุม (negative control)

ขั้นตอนที่ 2 นำปริมาณของ nitric oxide, TNF - α ที่ได้ไปคำนวณเป็น %inhibition เมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มสมุนไพรหรือกลุ่มที่ให้ยา dexamethasone กับกลุ่มควบคุม (negative control)

2. การวิเคราะห์ข้อมูล; ข้อมูลที่ได้แสดงเป็นค่าเฉลี่ย $\pm$ ความคลาดเคลื่อนมาตรฐานของค่าเฉลี่ย (mean $\pm$ S.E.M.)

3. เปรียบเทียบความแตกต่างทางสถิติของการทดลองแต่ละกลุ่มโดยใช้ ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่น 95% ($p < 0.05$)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

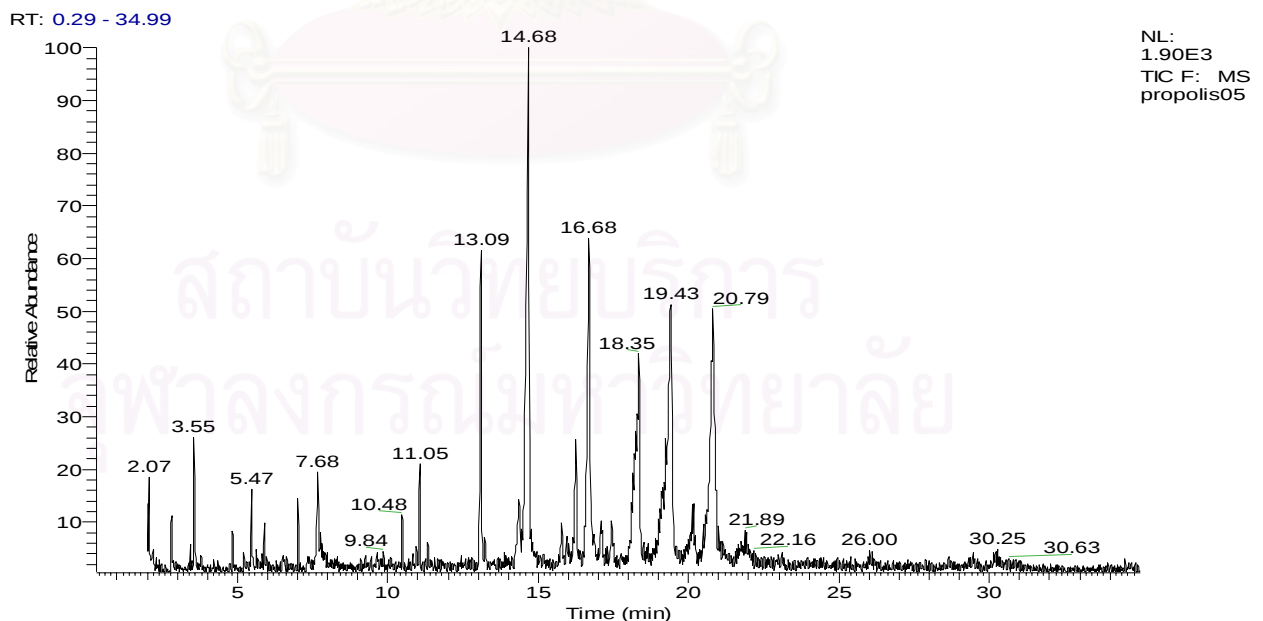
ผลการวิจัย

Results

4.1 ผลการสกัดพอลิสร้อยด้วยเอทานอล และ การทำ finger print

จากการสกัดพอลิสร้อยน้ำหนัก 600 กรัม ด้วยเอทานอล ได้สารสกัดออกมาเป็นสารหนืดสีน้ำตาลกึ่งใส น้ำหนัก 528 กรัม ดังนั้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้ (%yield) 88% จากพอลิสร้อยทั้งหมด ซึ่งในการสกัดนี้เป็นการกำจัดสิ่งที่มีปนมากับพอลิสร้อย ไม่ว่าจะเป็นเกสรดอกไม้ เศษของแมลงต่างๆ รวมทั้งสารที่ไม่สามารถละลายได้ในเอทานอล

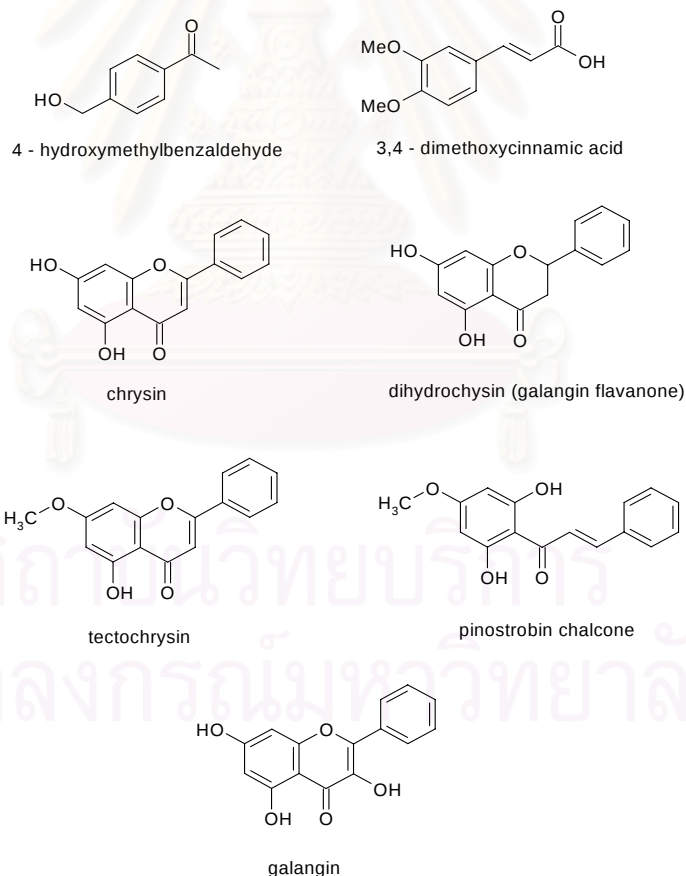
จากการทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิสร้อยด้วยวิธีการ GC/MS (Gas chromatography / mass spectrometry) ด้วยการละลายสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิสร้อย 0.1 กรัมในสารละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร และใช้แก๊สฮีเลียมเป็นตัวพาที่ flow rate 1 ml/ min จะได้ chromatogram ดังรูปที่ 16



ภาพที่ 16 แสดง chromatogram ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิสร้อย

ตารางที่ 2 แสดงองค์ประกอบทางเคมีที่สำคัญที่ได้จาก gas chromatography / mass spectrometry (GC/MS)

RT	Chemical composition	Peak Area	Area %
3.56	4-Hydroxymethylbenzaldehyde	1317	2.26
7.67	3,4-Dimethoxycinnamic acid	2454	4.22
13.08	Pinostrobin chalcone	4530	7.79
14.66	Dihydrochrysin (Galangin flavanone)	12313	21.16
16.68	Tectochrysin	7935	13.64
18.33	Chrysin derivative	7859	13.51
19.40	Chrysin	11407	19.61
20.79	Galangin	10365	17.81



ภาพที่ 17 แสดงสูตรโครงสร้างของสารที่เป็นองค์ประกอบทางเคมีที่แยกได้จากการทำ GC/MS ของสิ่งสกัดหยาบด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย

ขั้นตอนที่ 1 : *in vivo* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งอาการบวมจากการฉีดสารกระตุ้นให้เกิดการอักเสบด้วย carrageenan เปรียบเทียบกับยาด้านการอักเสบ indomethacin

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan

ในการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบเมื่อกระตุ้นให้อุ้งเท้าของหนูบวมด้วย 1% carrageenan โดยแบ่งกลุ่มที่ใช้ทดลองเป็น 5 กลุ่ม คือ

- กลุ่มที่ 1 Negative control: ให้ DMSO ฉีดเข้าช่องท้อง ปริมาตร 0.1 ml
- กลุ่มที่ 2 Positive control: ให้ Indomethacin ฉีดเข้าช่องท้องขนาด 5 mg/kg
- กลุ่มที่ 3 เป็นกลุ่มที่ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ฉีดเข้าช่องท้องขนาด 200 mg/kg
- กลุ่มที่ 4 เป็นกลุ่มที่ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ฉีดเข้าช่องท้องขนาด 300 mg/kg
- กลุ่มที่ 5 เป็นกลุ่มที่ให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ฉีดเข้าช่องท้องขนาด 400 mg/kg

เมื่อฉีดสารทดสอบในกลุ่มต่างๆ เข้าช่องท้อง แล้วทำการวัดปริมาตรอุ้งเท้าของหนูก่อนการฉีด 1% carrageenan และหลังฉีด 1% carrageenan ทุกๆ 1 ชั่วโมง จนกระทั่งครบ 6 ชั่วโมง และนำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาณการบวมของอุ้งเท้าหนู (volume of edema) และ %inhibition

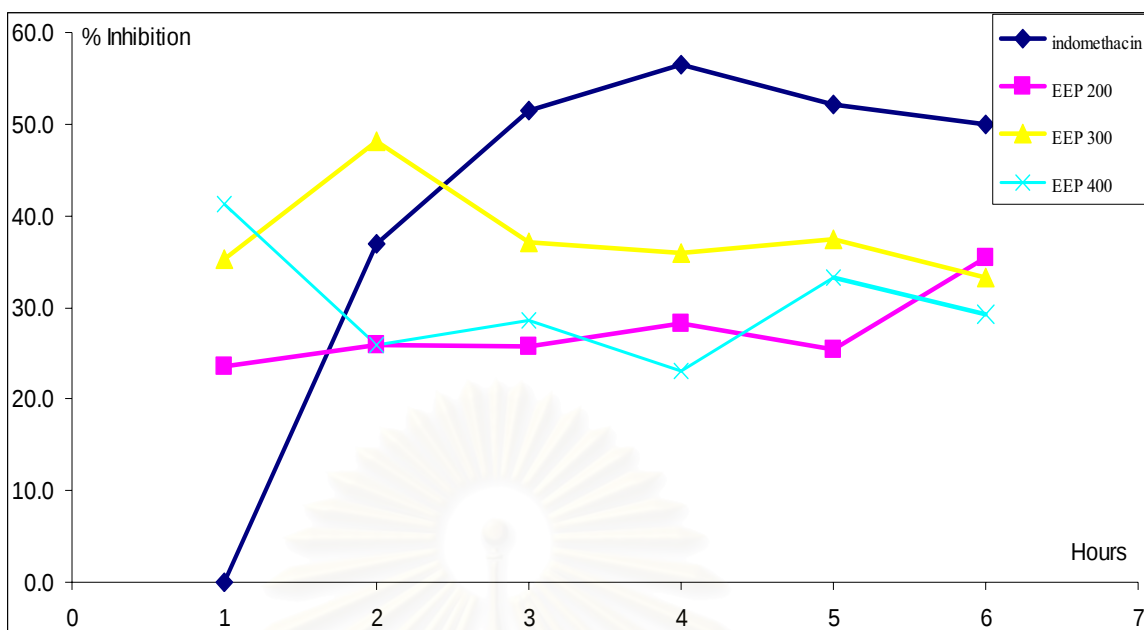
จากผลการทดลองพบว่ายา indomethacin สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 หลังจากฉีด carrageenan โดยยับยั้งการบวมได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4 (56.4%) พรอโพลิสไทยที่ขนาด 200 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 หลังจากฉีด carrageenan โดยยับยั้งการบวมได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 6 (35.4%) พรอโพลิสไทยที่ขนาด 300 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 2 หลังจากฉีด carrageenan โดยยับยั้งการบวมได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 2 (48.2%) และพรอโพลิสไทยที่ขนาด 400 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 หลังจากฉีด carrageenan และยับยั้งการบวมได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 5 (33.3%) ดังแสดงในตารางที่ 3

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ย volume of edema และ %Inhibition ที่เวลาต่างๆ หลังจากฉีด 1% carrageenan เข้าที่อุ้งเท้าหนูขาวหลังจากได้รับสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ ยา indomethacin

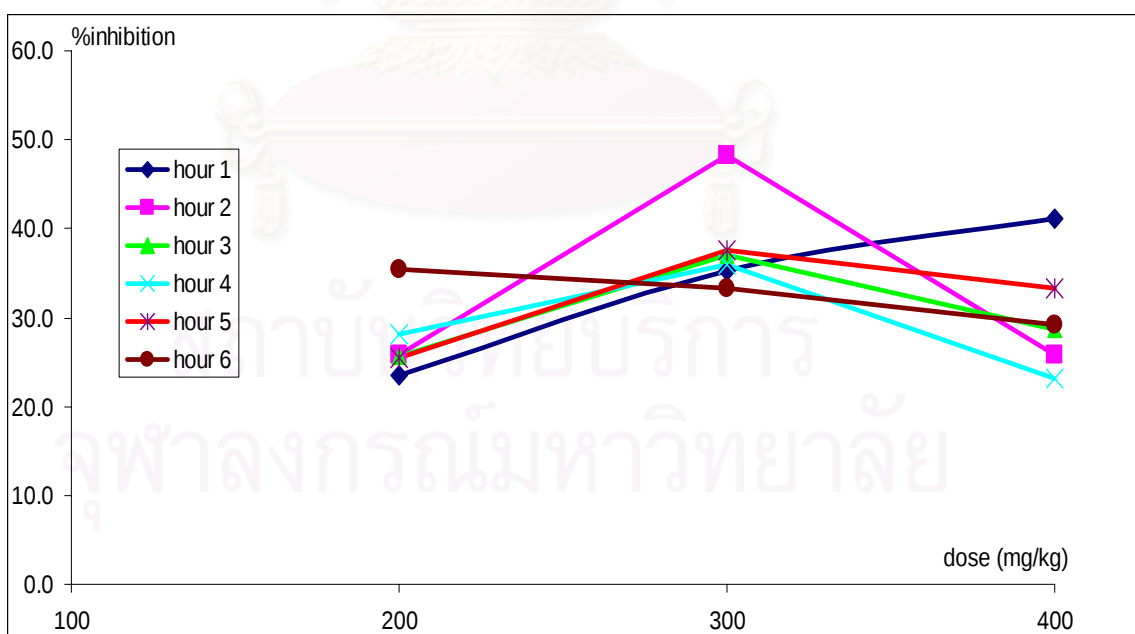
	Paw edema $\pm$ S.E.M.(%Inhibition)					
	ชม 1	ชม 2	ชม 3	ชม 4	ชม 5	ชม 6
negative control	0.17 $\pm$	0.27 $\pm$ 0.03	0.35 $\pm$ 0.03	0.39 $\pm$	0.48 $\pm$	0.48 $\pm$
DMSO	0.03			0.04	0.03	0.04
positive control	0.17 $\pm$	0.17 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$ 0.03	0.17 $\pm$	0.23 $\pm$	0.24 $\pm$
indomethacin 5	0.03	(37.0)	(51.4)***	0.03	0.03	0.03
mg/ml	(0.0)			(56.4)***	(52.1)***	(50.0)***
EEP 200 mg/ml	0.13 $\pm$	0.20 $\pm$ 0.04	0.26 $\pm$ 0.03	0.28 $\pm$	0.31 $\pm$	0.31 $\pm$
	0.02	(25.9)	(25.7)	0.05	0.05	0.05
	(23.5)			(28.2)	(25.4)**	(35.4)*
EEP 300 mg/ml	0.11 $\pm$	0.14 $\pm$ 0.03	0.22 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$	0.30 $\pm$	0.32 $\pm$
	0.02	(48.2)*	(37.1)**	0.04	0.05	0.04
	(35.3)			(35.9)*	(37.5)**	(33.3)*
EEP 400 mg/ml	0.10 $\pm$	0.20 $\pm$ 0.03	0.25 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$	0.32 $\pm$	0.34 $\pm$
	0.02	(25.9)	(28.6)	0.02	0.03	0.03
	(41.2)			(23.1)	(33.3)**	(29.2)*

ค่าแสดงเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M, n = 8 ตัว

* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ negative control (DMSO)



ภาพที่ 18 แสดงค่าเฉลี่ยการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ เปรียบเทียบกับยามาตรฐาน indomethacin

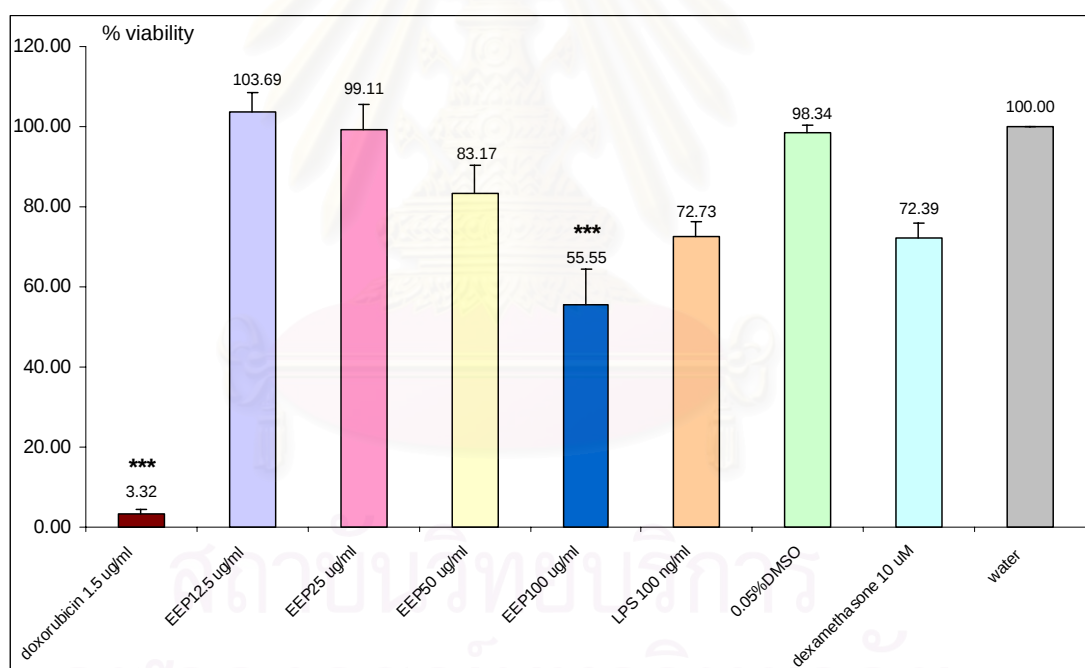


ภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ขนาด 200, 300 และ 400 mg/kg และค่าการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ที่เวลาต่างๆ

ขั้นตอนที่ 2 : *in vitro* การศึกษาผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ต่อการยับยั้งการสร้าง nitric oxide และการหลั่ง cytokine TNF- α รวมทั้งศึกษา ความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย โดยใช้การทำ MTT assay

4.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย

ในการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยโดยใช้วิธีการวัดด้วย MTT พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 100 $\mu\text{g/ml}$ มีผลทำให้ %viability ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 20 แสดงว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นสูง 100 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 แต่ที่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยความเข้มข้นต่ำกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลต่อ %viability ของเซลล์



ภาพที่ 20 แสดง %viability ของเซลล์เมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นต่างๆ, LPS 100 ng/ml, 0.05%DMSO, dexamethasone 10 μM , และ doxorubicin เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เพื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ที่ให้น้ำกลั่น เมื่อให้เซลล์ที่ให้น้ำกลั่นมี %viability = 100

ค่าแสดงเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M, n = 9

* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับน้ำกลั่น

4.4 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ในการยับยั้งการหลั่งของ Nitric oxide (NO)

ในการทดลองที่ทำการวัดปริมาณ nitrite โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 7 กลุ่มคือ

- กลุ่มที่ 1 negative control ให้ 0.05% DMSO
- กลุ่มที่ 2 positive control ให้ LPS 100 ng/ml
- กลุ่มที่ 3 ให้ EEP 12.5 µg/ml + LPS
- กลุ่มที่ 4 ให้ EEP 50 µg/ml + LPS
- กลุ่มที่ 5 ให้ EEP 25 µg/ml + LPS
- กลุ่มที่ 6 ให้ EEP 100 µg/ml + LPS
- กลุ่มที่ 7 ให้ยา dexamethasone 10 µM + LPS

ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เป็น negative control ก็สามารถหลั่ง NO ได้ ทำให้ base line ของ nitrite เป็น 2.86 ± 0.56 µM เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS สามารถกระตุ้นการหลั่งของ NO ได้ ปริมาณ nitrite 21.24 ± 2.47 µM และเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยก่อนการกระตุ้นด้วย LPS พบว่า EEP ที่ความเข้มข้น 25, 50 และ 100 µg/ml มีการหลั่ง NO และวัดปริมาณ nitrite ได้ 13.60 ± 3.15 µM, 6.70 ± 2.45 µM และ 1.35 ± 0.87 µM ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ nitrite ที่วัดได้ลดลงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญ แต่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 µg/ml ไม่สามารถลดการหลั่ง NO

เนื่องจากในการทดสอบความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ด้วย MTT assay พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ดังนั้นในการวัดการหลั่งของ NO ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 100 µg/ml จึงมีปริมาณ nitrite ที่ได้ (1.35 ± 0.87 µM) ต่ำกว่า base line ของ negative control (2.86 ± 0.56 µM) อันเนื่องมาจากการที่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 100 µg/ml มีผลทำให้เซลล์ตายไปประมาณ 45% จึงทำให้ปริมาณของ nitrite ที่วัดได้ต่ำไปด้วย ดังนั้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 100 µg/ml จึงไม่ควรนำมาใช้ในการศึกษาเนื่องจากมีความเป็นพิษสูง

เมื่อเปรียบเทียบสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยกับยา dexamethasone ซึ่งวัดปริมาณ nitrite ได้ $2.87 \pm 1.32 \mu\text{M}$ พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ยังไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้เทียบเท่ากับยา dexamethasone 10 μM ได้ ดังแสดงในภาพที่ 21 และ 22

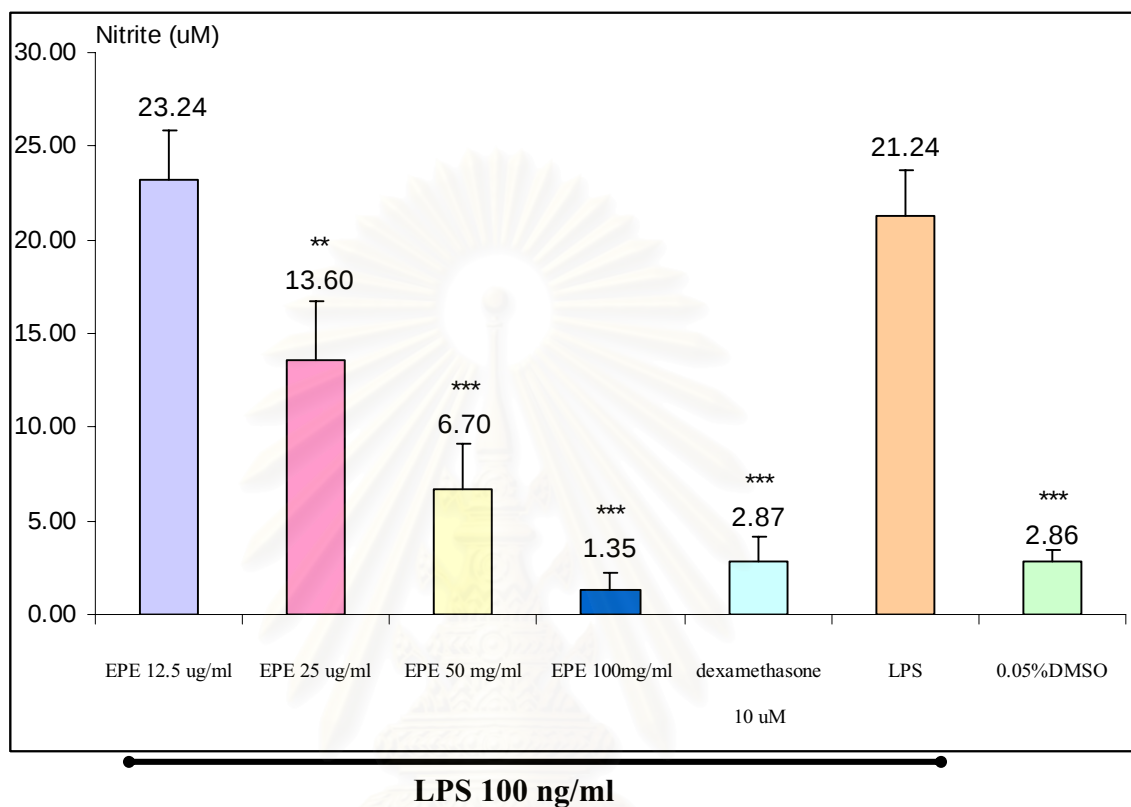
ตารางที่ 4 แสดงผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone ต่อการหลั่ง NO โดยวัดเป็นปริมาณของ NO_2^- และ %inhibition

	$\text{NO}_2^- (\mu\text{M})$	%inhibition
0.05% DMSO	2.86 ± 0.57 ***	-
EEP 12.5 $\mu\text{g/ml}$ + LPS	23.24 ± 2.59	-9.9 ± 3.59
EEP 25 $\mu\text{g/ml}$ + LPS	13.60 ± 3.16 **	38.9 ± 9.27
EEP 50 $\mu\text{g/ml}$ + LPS	6.70 ± 2.45 ***	71.6 ± 8.78
EEP 100 $\mu\text{g/ml}$ + LPS	1.35 ± 0.87 ***	-
dexamethasone 10 μM + LPS	2.87 ± 1.32 ***	87.7 ± 4.72
LPS 100 ng/ml	21.24 ± 2.47	-

ค่าแสดงเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M., n = 5

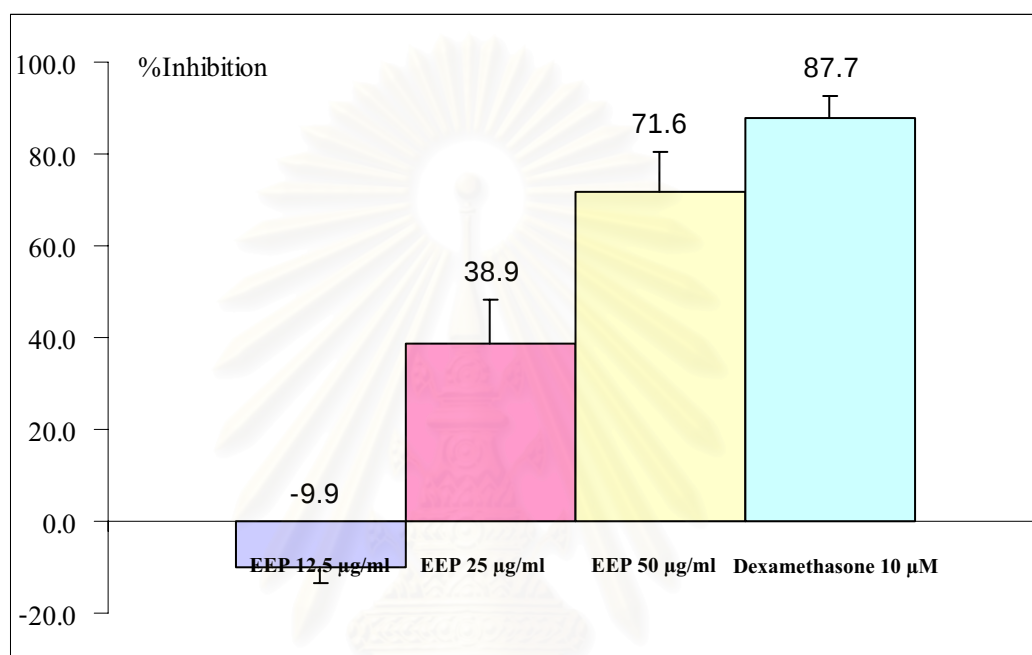
* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control(LPS 100 ng/ml)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



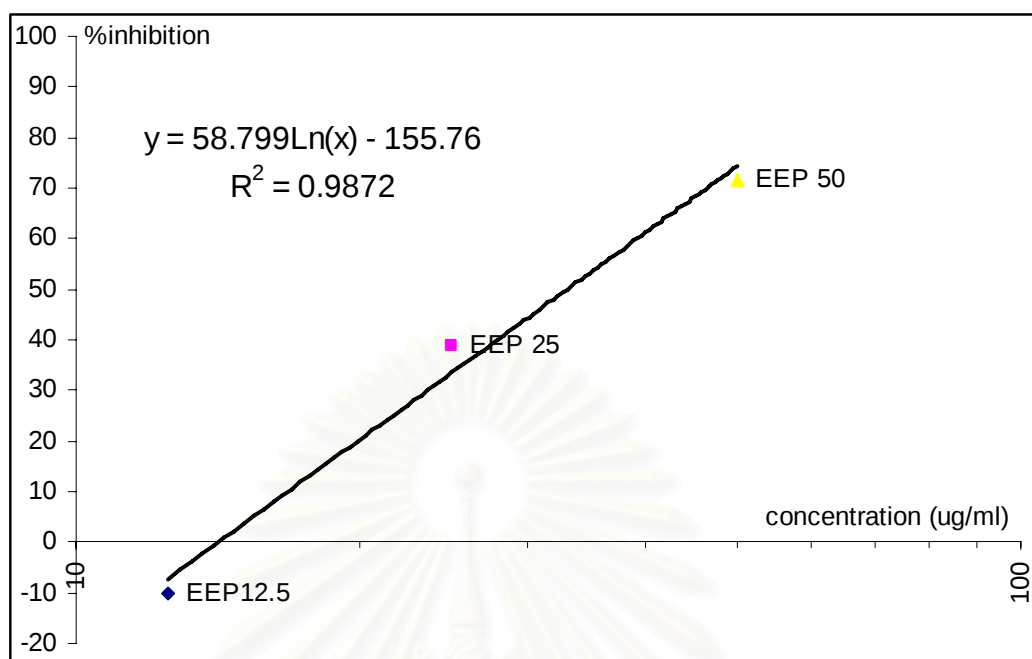
ภาพที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ nitrite ที่เกิดขึ้นเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ dexamethasone 10 μ M

n = 5 * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (LPS 100 ng/ml)



ภาพที่ 22 แสดงการยับยั้งการหลั่ง NO (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 µg/ml และยา dexamethasone 10 µM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ และค่าการยับยั้งการหลั่ง NO (%inhibition)

จากภาพที่ 23 เมื่อนำสมการจาก dose – dependent curve มาคำนวณหาค่า IC_{50} ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยจะได้ดังนี้

$$\text{IC}_{50} = \text{ความเข้มข้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ 50 \%}$$

ดังนั้น แทนค่า $Y = 50\%$ ในสมการ $y = 58.799\ln(x) - 155.76$ เพื่อหาค่า X ซึ่งก็คือค่า IC_{50} ได้ค่า $\text{IC}_{50} = 33.1 \mu\text{g/ml}$

เพราะฉะนั้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น $33.1 \mu\text{g/ml}$ จะสามารถยับยั้งการหลั่งของ NO ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้ 50 %

4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยในการยับยั้งการสร้าง TNF - α

ในการทดลองที่ทำการวัดปริมาณ TNF - α โดยแบ่งกลุ่มทดลองออกเป็น 6 กลุ่ม คือ

กลุ่มที่ 1 negative control ให้ 0.05% DMSO

กลุ่มที่ 2 positive control ให้ LPS 100 ng/ml

กลุ่มที่ 3 ให้ EEP 12.5 μ g/ml + LPS

กลุ่มที่ 4 ให้ EEP 25 μ g/ml + LPS

กลุ่มที่ 5 ให้ EEP 50 μ g/ml + LPS

กลุ่มที่ 6 ให้ยา dexamethasone 10 μ M + LPS

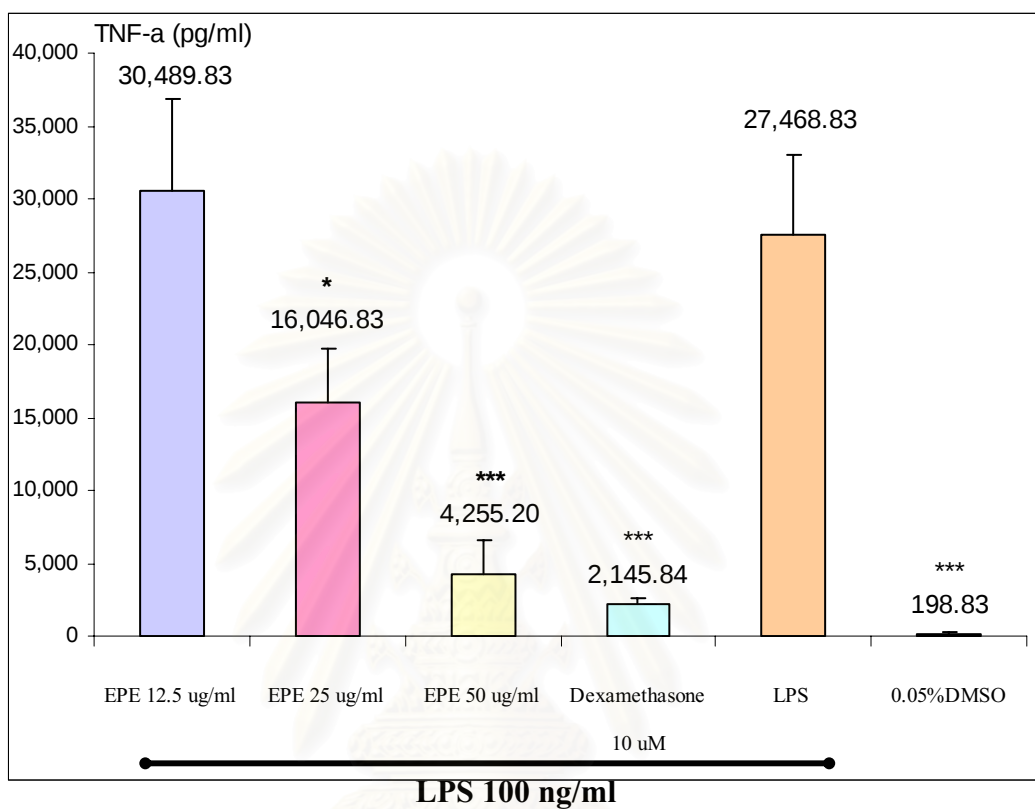
ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เป็น negative control ก็สามารถหลั่ง TNF - α ได้ ทำให้ base line ของ TNF - α เป็น 198.83 ± 29 pg/ml เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS สามารถกระตุ้นการหลั่งของ TNF - α ได้ $27,468.83 \pm 5483$ pg/ml และเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยก่อนการกระตุ้นด้วย LPS พบว่า EEP ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 μ g/ml มีการหลั่ง TNF - α ได้ pg/ml $16,046.83 \pm 3627$ และ $4,255.20 \pm 2381$ pg/ml ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ TNF - α ที่วัดได้ลดลงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญ แต่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 μ g/ml ไม่สามารถลดการหลั่ง TNF - α ได้

ตารางที่ 5 แสดงผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และยา dexamethasone ต่อการหลั่ง TNF - α และ %inhibition

	TNF - α (pg/ml)	%inhibition
0.05% DMSO	198.83 ± 29 ***	-
EEP 12.5 μ g/ml + LPS	$30,489.83 \pm 6428$	-11.0 ± 23.3
EEP 25 μ g/ml + LPS	$16,046.83 \pm 3627$ *	41.6 ± 13.1
EEP 50 μ g/ml + LPS	$4,255.20 \pm 2381$ ***	84.5 ± 8.6
dexamethasone 10 μ M + LPS	$2,145.84 \pm 501$ ***	92.2 ± 1.6
LPS 100 ng/ml	$27,468.83 \pm 5483$	-

ค่าแสดงเป็นค่า mean $\pm$ S.E.M., n = 6

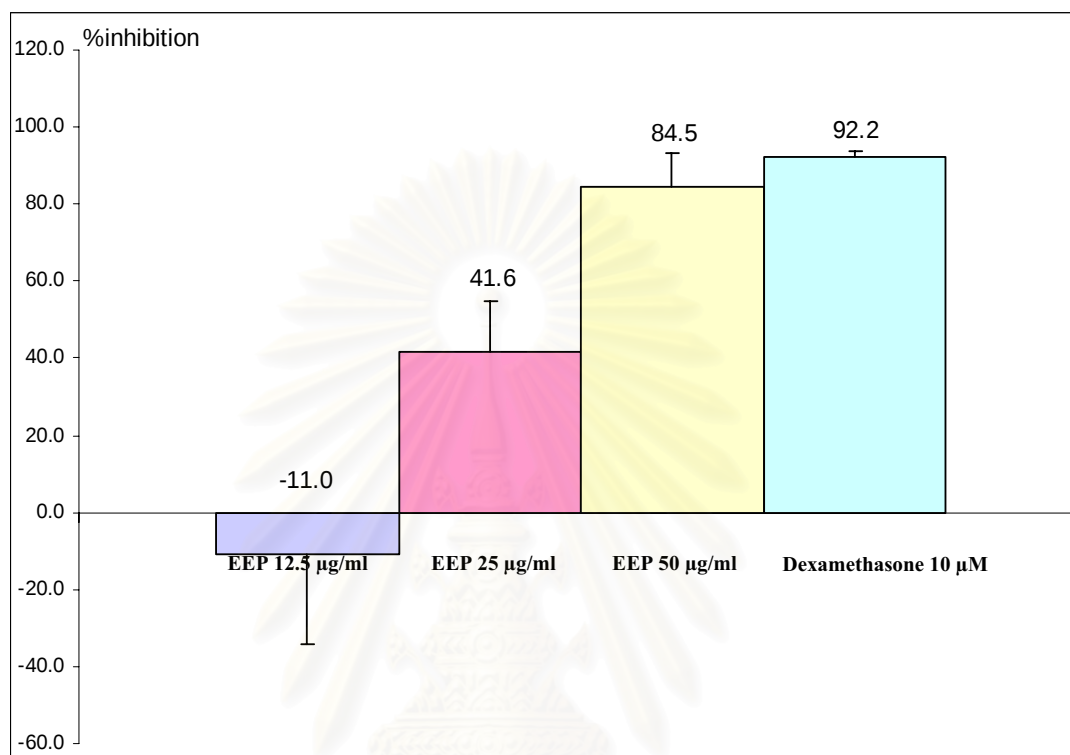
* P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (LPS 100 ng/ml)



ภาพที่ 24 แสดงแสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF - α ที่เกิดขึ้นเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ dexamethasone 10 μ M

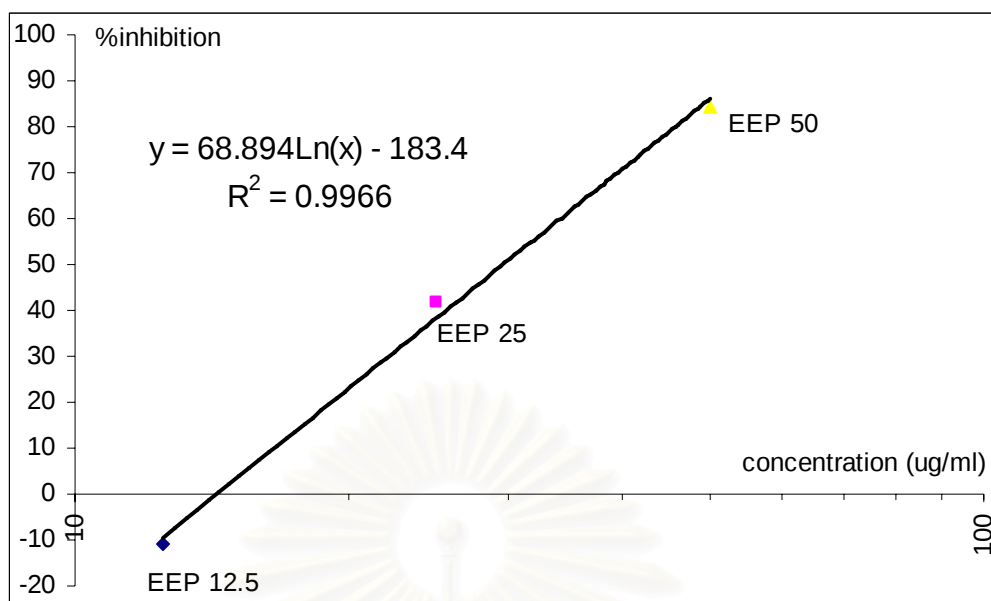
n = 6 * P < 0.05, ** P < 0.01, ***P < 0.001 เมื่อเปรียบเทียบกับ positive control (LPS 100 ng/ml)

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 25 แสดงการยับยั้งการหลั่ง TNF - α (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ และยา dexamethasone 10 μM

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 26 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ และค่าการยับยั้งการหลั่ง TNF - α (%inhibition)

จากภาพที่ 26 เมื่อนำสมการจาก dose – dependent curve มาคำนวณหาค่า IC_{50} ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยจะได้ดังนี้

IC_{50} = ความเข้มข้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่สามารถยับยั้งการหลั่ง TNF - α ได้ 50 %

ดังนั้น แทนค่า $Y = 50\%$ ในสมการ $y = 68.894\ln(x) - 183.4$ เพื่อหาค่า X ซึ่งก็คือค่า IC_{50} ได้ค่า $\text{IC}_{50} = 29.60 \mu\text{g/ml}$

เพราะฉะนั้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น $29.60 \mu\text{g/ml}$ จะสามารถยับยั้งการหลั่งของ TNF - α ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้ 50 %

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

Discussion and Conclusion

พรอโพลิส (Propolis) หรือกาวผึ้ง (bee glue) เป็นสิ่งที่ได้จากรังผึ้ง มีลักษณะเป็นของแข็ง สีเข้ม ผึ้งจะใช้พรอโพลิส ในการป้องกันรังจากความชื้น เสริมสร้างความแข็งแรงของรัง แต่ไม่เพียงเท่านั้น ผึ้งยังใช้ประโยชน์จากพรอโพลิสในการปกป้องรังจากเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (pathogen microorganisms) จนเรียกได้ว่าเป็น “chemical weapon” และด้วยประโยชน์เหล่านี้ จึงทำให้ในสมัยโบราณมีการนำมาใช้เป็นยาในการรักษาโรคเช่น ใช้ในการรักษาแผล หรือ แผลไฟไหม้ รักษาอาการแผลในช่องปากและลำคอ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรอโพลิสอย่างกว้างขวางเช่น ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ (เชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา, เชื้อไวรัส) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายตับ เป็นต้น รวมถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ด้วย และการศึกษาทางเคมีของพรอโพลิส พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีอยู่มากมาย อีกทั้งมีความหลากหลายขององค์ประกอบ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ผึ้งเก็บมาเพื่อใช้ในการสร้างพรอโพลิส ดังนั้นจึงทำให้ฤทธิ์ต่าง ๆ นั้นมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของพรอโพลิส ด้วย^(44,45,46)

สำหรับพรอโพลิสที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นพรอโพลิสที่ได้จากประเทศไทย แหล่งที่เลี้ยงผึ้งเป็นสวนลำไย ในจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำมาทำการสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ได้สิ่งสกัดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักของ propolis เริ่มต้น (%yield) เท่ากับ 88% และจากการทำการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (fingerprint) ด้วยวิธี gas chromatography / mass spectrometry พบว่ามีองค์ประกอบที่สำคัญเป็นสารในกลุ่ม flavonoid 6 ชนิด คือ pinostrobin chalcone, tectochrysin, chrysin derivative, galangin, chrysin และ dihydrochrysin (galangin flavanone) อีกทั้งมีองค์ประกอบอื่นๆอีกเช่น 4-hydroxymethylbenzaldehyde, 3,4-dimethoxycinnamic acid ได้เคยมีการศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีของพรอโพลิสที่ได้จากประเทศอื่นๆ เช่น มีการศึกษาสิ่งสกัดของพรอโพลิสด้วยเอทานอลจากทวีปอเมริกาเหนือ รัฐโอไฮโอ พบว่ามีสารในกลุ่ม flavonoid ที่สำคัญอยู่ 4 ชนิดคือ kaempferol, galangin, 3,3'- dimethoxyquercetin และ 3- methoxykaempferol⁽⁴⁷⁾ จะเห็นว่าสิ่งสกัดพรอโพลิสด้วยเอทานอลที่ได้จากประเทศไทยกับรัฐโอไฮโอมีองค์ประกอบที่แตกต่างกัน และการศึกษาพรอโพลิสของประเทศต่างๆในทวีปยุโรปคือ บัลแกเรีย อิตาลี และสวิตเซอร์แลนด์พบว่าองค์ประกอบ

ของพอลิฟีนอลจากทั้ง 3 ประเทศมีความแตกต่างกัน เช่น พอลิฟีนอลของประเทศบัลแกเรียและอิตาลีพบสาร chrysin แต่พอลิฟีนอลของประเทศสวีเดนและเดนมาร์กไม่พบสาร chrysin เป็นต้น จากที่กล่าวข้างต้นแสดงว่าแหล่งของพอลิฟีนอลที่ต่างกันก็จะมียีนที่ประกอบทางเคมีที่ต่างกันด้วย ดังนั้นจึงทำให้มีคุณสมบัติทางเภสัชวิทยาที่ต่างกันด้วย

การอักเสบนั้นแบ่งออกได้เป็นการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) และการอักเสบแบบเรื้อรัง (chronic inflammation) โดยปัจจัยที่มีผลในการกระตุ้นการอักเสบแบ่งออกได้เป็น 2 ชนิด คือ ชนิดแรกเป็น inflammation stimulation factor ได้แก่ physical (ไฟไหม้, รังสี, การกระแทก เป็นต้น), chemical factor (กรด ด่าง เป็นต้น), biochemical factor (microorganisms, parasites, endotoxins, transplant heterogeneity animal toxins เป็นต้น) อีกชนิดเป็น inflammatory mediators ได้แก่ histamine, bradykinin, prostaglandin, platelet activation factor, neutrophils hydrolase, inflammation prestimulation factors (TNF- α , IL-1, IL-6, cell chemotaxis factor เป็นต้น), adherence cell (select element, conformity element, adherence cell between cells, blood vessel cell adherence cell), acute reaction protein⁽⁴⁸⁾ การเหนี่ยวนำให้เกิดการอักเสบในอุ้งเท้าหนูโดยใช้ carrageenan (carrageenan - induced rat paw edema) เป็นรูปแบบของการศึกษาการอักเสบที่นำมาใช้ยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันที่นิยมใช้มาก โดย carrageenan จะกระตุ้นให้เกิดการอักเสบผ่าน mediators และ cytokines ชนิดต่างๆ โดยในระยะแรกของการอักเสบ (ภายใน 1 – 2 ชั่วโมง) carrageenan จะกระตุ้นให้มีการสร้างสาร histamine, leukotrienes, platelet activating factor, prostaglandins, bradykinin เป็นต้น ในขณะที่ระยะเวลา 4 – 24 ชั่วโมงต่อมา (delayed phase) carrageenan จะเหนี่ยวนำให้เกิด neutrophil infiltration และการสร้าง neutrophil derived free radical เช่น hydrogen peroxide, superoxide และ hydroxyl radicals เป็นต้น รวมทั้งหลัง neutrophil derived mediators^(49, 50)

การศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบแบบเฉียบพลัน (acute inflammation) โดยวิธีการกระตุ้นให้เกิดการบวมของอุ้งเท้าหนูขาวด้วย 1% carrageenan ใน normal saline เป็นตัวกระตุ้นการอักเสบ ฉีดเข้าที่อุ้งเท้าของหนู และวัดปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าของหนูก่อนฉีด carrageenan เปรียบเทียบกับหลังจากฉีด carrageenan ทุกๆ 1 ชั่วโมงเป็นเวลา 6 ชั่วโมง พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิฟีนอลไทย ที่ขนาด 200, 300 และ 400 mg/kg, ip. สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญ เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้เพียงสารละลาย DMSO ฉีดเข้าช่องท้อง เริ่มตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 5, 2 และ 5 ตามลำดับ จากการทดลองพบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอลิฟีนอลไทยที่ขนาด 300 mg/kg จะสามารถยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูได้มีประสิทธิภาพมากที่สุด ทั้งสามารถเริ่มการยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญตั้งแต่ในชั่วโมงที่ 2 และมีแนวโน้มที่จะสามารถยับยั้งการ

บวมได้สูงกว่าขนาด 200 และ 400 mg/kg แต่อย่างไรก็ตามการฤทธิ์ในการยับยั้งการบวมของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ยังไม่เทียบเท่ากับยาต้านอักเสบ indomethacin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้สูงสุดถึง 56.4 % ดังแสดงในภาพที่ 17 ดังนั้นจากการที่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูซึ่งเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันได้นั้น น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบดังที่กล่าวไว้ข้างต้นได้

ในการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยด้วย MTT พบว่า สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 100 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เซลล์มี %viability เหลือเพียง 55.55% (เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น) จึงกล่าวได้ว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 $\mu\text{g/ml}$ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ macrophage แต่ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าคือ 12.5, 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ ไม่มีผลต่อเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาจึงเลือกความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ตั้งแต่ 12.5 – 50 $\mu\text{g/ml}$ ในการศึกษาผลต่อการหลั่ง NO และ $\text{TNF-}\alpha$

macrophage เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญมากในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในการกระตุ้นเซลล์ macrophage ด้วย lipopolysaccharide (LPS) หรือ $\text{IFN-}\gamma$ จะทำให้มีการหลั่งสารต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเช่น $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , ROS, nitric oxide (NO)⁽⁵¹⁾ สำหรับ lipopolysaccharide (LPS) เป็นองค์ประกอบของเยื่อหุ้มเซลล์ชั้นนอกของเชื้อแบคทีเรีย gram-negative ซึ่งสามารถ recognized ได้ด้วยระบบภูมิคุ้มกัน โดยผลในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันของ LPS จะเกิดขึ้นเมื่อ LPS มี interaction กับ toll-like receptor (TLR4) ทำให้เกิดการกระตุ้น transcription factors $\text{NF-}\kappa\text{B}$ ให้มีการหลั่ง คือ $\text{TNF-}\alpha$, $\text{IL-1}\beta$, IL-6 , NO เป็นต้น โดยในการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ จะมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokine ตัวอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทำให้เกิดการอักเสบต่อเนื่องไปจนอาจทำให้เกิด tissue injury, organ dysfunction และ potentially death ได้ ดังนั้นในการศึกษารังนี้จึงสนใจในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง pro-inflammatory mediators ที่สำคัญคือ $\text{TNF-}\alpha$ และ NO ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย โดยกระตุ้นให้เซลล์มีการหลั่งสาร mediators เหล่านั้นด้วย LPS

ผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลที่มีต่อการหลั่ง NO พบว่า สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ความเข้มข้น 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการหลั่ง NO จากเซลล์ macrophage ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้อย่างมีนัยสำคัญ (%inhibition = 38.9 ± 9.27 และ 71.6 ± 8.78 ตามลำดับ) แต่ไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้เทียบเท่ากับยา dexamethasone (%inhibition = 87.7 ± 4.72) ส่วนสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง

NO ได้ อีกทั้งยังกระตุ้นการหลั่ง NO คือทำให้มีการหลั่ง NO ในปริมาณที่มากกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS (พอร์โพลิสไทยมีปริมาณ $\text{NO}_2^- = 23.24 \pm 2.59$ LPS มีปริมาณ $\text{NO}_2^- = 21.24 \pm 2.47$) แต่การกระตุ้นนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลที่ได้ทำการคำนวณหาความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ NO ได้ 50% (IC_{50}) คือ 33.1 $\mu\text{g/ml}$ และสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยสามารถยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 25, 50 $\mu\text{g/ml}$ (%inhibition = 41.6 ± 13.0 และ 84.5 ± 8.6 ตามลำดับ) แต่ไม่เทียบเท่ากับ dexamethasone (%inhibition = 92.2 ± 1.6) ส่วนสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/ml}$ ไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ แต่มีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ LPS (พอร์โพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 $\mu\text{g/ml}$ มีการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha = 30,489.83 \pm 6428$ LPS มีการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha = 27,468.83 \pm 5483$) เมื่อทำการคำนวณหาความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ $\text{TNF-}\alpha$ ได้ 50% (IC_{50}) คือ 29.60 $\mu\text{g/ml}$ ซึ่งผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยที่มีต่อการหลั่งของ $\text{TNF-}\alpha$ มีแนวโน้มในทางเดียวกับผลต่อหลั่งของ NO ด้วย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยสามารถยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokine คือ $\text{TNF-}\alpha$ ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบที่สำคัญ โดยสารดังกล่าวจะกระตุ้นให้มีการสร้าง phospholipase A_2 , cyclooxygenase-2, iNOS รวมทั้งกระตุ้นให้มีหลั่ง cytokine อื่นๆ ตามมา เป็นผลให้เกิดการอักเสบมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ จึงมีส่วนในการช่วยยับยั้งการอักเสบได้ ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งจะ เป็นประโยชน์ในการใช้ในการต้านการอักเสบได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าสามารถยับยั้งการหลั่งปริมาณของ NO ได้

สรุปการทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 200, 300, และ 400 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย 1% carrageenan ได้อย่างมีนัยสำคัญ และ การทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 $\mu\text{g/ml}$ สามารถยับยั้งการหลั่ง NO และ $\text{TNF-}\alpha$ จากเซลล์ macrophage ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ผลการทดลองทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทย ไม่สามารถยับยั้งการอักเสบได้ เทียบเท่ากับยาต้านการอักเสบมาตรฐาน และจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพอร์โพลิสไทยสามารถยับยั้งการหลั่ง NO และ $\text{TNF-}\alpha$ ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นสูง (25, 50 $\mu\text{g/ml}$) แต่ที่ความเข้มข้นต่ำ 12.5 $\mu\text{g/ml}$ พบว่าสามารถกระตุ้นการหลั่งของ mediators ได้

จึงอาจเป็นไปได้ว่าสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นสูงสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ และที่ความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulation)

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้แนวโน้มของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดี ดังนั้นจึงสมควรที่จะนำไปศึกษาต่อเนื่องไปเพื่อให้สามารถได้เป็นยาชนิดใหม่ที่ได้จากสมุนไพร โดยแนวทางในการศึกษาในขั้นต่อไปเช่น

1. ศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีอย่างละเอียดและนำองค์ประกอบแต่ละชนิดที่มีแนวโน้มจะเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์มาศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบต่อไป
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ด้านการอักเสบที่มีของสมุนไพรว่าสามารถยับยั้ง arachidonic acid metabolism โดยพิจารณาเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ได้เช่นเดียวกับยาประเภท NSAIDs หรือไม่
3. ศึกษาถึงกลไกในการเพิ่ม anti-inflammatory cytokine เช่น IL-4, IL-10, IL13 ซึ่งมีฤทธิ์ตรงข้ามกับ pro-inflammatory cytokine $\text{TNF} - \alpha$ ซึ่งได้ทำการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้

รายการอ้างอิง

1. Edward R. Sherwood E.R., Toliver-Kinsky T. Mechanisms of the inflammatory response. Best Practice & Research Clinical Anaesthesiology. 2004; 18(3): 385 – 405.
2. Huang M. T., Ghai G., Ho C. T. Inflammatory Process and Molecular Targets for Antiinflammatory Nutraceuticals. Comprehensive Review In Food Science And Food Safety. 2004; 3: 129 – 39.
3. Vane J., Botting R. Inflammation and the mechanism of action of anti-inflammatory drug. Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology. 1987; 1 : 89 – 96.
4. คณาจารย์ภาควิชาเภสัชวิทยา. เภสัชวิทยา1. กรุงเทพฯ: เท็กซ์แอนด์เจอร์นัล, 2545: 309-335
5. ปานเทพ รัตนกร. คู่มือการใช้สัตว์ทดลอง. กรุงเทพฯ: มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2535.
6. Burdock G. A. Review of the Biological properties and toxicity of bee propolis (propolis). Food and Chemical Toxicology. 1998; 36 : 347 – 63.
7. Castaldo S., Capasso F. Propolis, an old remedy used in modern medicine. Fitoterapia. 2002; 73 Suppl.: S1 – 6.
8. Marcucci M.C. Propolis: chemical composition, biological properties and therapeutic activity. Apidologie. 1995; 26 : 83 – 99.
9. Pietta P.G., Gardana C., Pietta A.M. Analytical methods for quality control of propolis. Fitoterapia. 2002; 73 suppl.: S7 – 20.

10. Cushnie T.P., Lamb A.J. Antimicrobial activity of flavonoids. International Journal of Antimicrobial Agents 2005; 26: 343 – 56.
11. Dobrowolski W., Vohorab S.B., Sharmab K., Shaukat A., Dandiyab P.C. Antibacterial, antifungal, antiamebic, antiinflammatory and antipyretic studies on propolis bee products. Journal of Ethnopharmacology. 1991; 35: 77-82.
12. Bankova V., Christov R., Marcucci M.C., Tsvetkova I., Kujumgiev A. Antibacterial activity of essential oils from Brazilian propolis. Fitoterapia. 1999; 70 :190 – 3.
13. Popova M., Silici S., Kaftanoglu O., Bankova V. Antibacterial activity of Turkish propolis and its qualitative and quantitative chemical composition. Phytomedicine. 2005; 12: 221 – 28.
14. Marcucci M.C., Ferreres F., Viguera C., Bankova V.S., Castro S.L., Dantas A.P., Valente P.H.M., Paulino N. Phenolic compounds from Brazilian propolis with pharmacological activities. Journal of Ethnopharmacology. 2001; 74: 105 – 12.
15. Kujumgiev A., Tsvetkova I., Serkedjieva Y., Bankova V., Christov R., Popov S. Antibacterial, antifungal and antiviral activity of propolis of different geographic origin. Journal of Ethnopharmacology. 1999; 64: 235 – 40.
16. Genya G., Shuxian H., Marla S., James R., Phillip K. Anti-HIV-1 activity of propolis in CD4+ lymphocyte and microglial cell cultures. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 102: 158 – 63.
17. Nagai T., Sakai M., Inoue R., Inoue H., Suzuki N. Antioxidative activities of some commercially honeys, royal jelly, and propolis. Food Chemistry. 2001; 75: 237 – 40.

18. Shimizu K., Ashida H., Matsuura Y., Kanazawa K. Antioxidative bioavailability of artemillin C in Brazilian propolis. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004; 424: 181 – 8.
19. Ogeturk M., Kus I., Colakoglu N., Zararsiz I., Ilhan N., Sarsilmaz M. Caffeic acid phenethyl ester protects kidneys against carbon tetrachloride toxicity in rats. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 97: 273 – 80.
20. Banskota A.H., Tezuka Y., Adnyana K., Midorikawa K., Matsushige K., Message D., Huertas A.G., Kadota S. Cytotoxic, hepatoprotective and free radical scavenging effects of propolis from Brazil, Peru, the Netherlands and China. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 72: 239 – 46.
21. Marquete F.D., Val'eria M., Georgetti S.R., Casagrande R., Valim Y.M.L., Maria J.V. F. Assessment of the antioxidant activities of Brazilian extracts of propolis alone and in topical pharmaceutical formulations. Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis. 2005; 39 : 455 – 62.
22. Ilter K., Colakoglu N., Pekmez H., Seckin D., Ogeturk M., Sarsilmaz M. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester (CAPE) on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats. Acta Histochemica. 2004; 106 : 289 – 97.
23. Oršolić N., Bašić I. Antitumor, hematostimulative and radioprotective action of water-soluble derivative of propolis (WSDP). Biomedicine and Pharmacotherapy. 2005; 75: 1-10.
24. Oršolić N. , Knežević A., Šver L., Terzić S., Bašić I. Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. Journal of Ethnopharmacology 2004; 94: 307–15.
25. Cardile V., Panico A., Gentile B., Borrelli F., Russo A. Effect of propolis on human cartilage and chondrocytes. Life Science. 2003; 73 : 1027 – 35.

26. Ilhan A., Akyol O., Gurel A., Armutcu F., Iraz M., Oztas E. Protective effect of Caffeic acid phenethyl ester against experimental allergic encephalomyelitis – induced oxidative stress in rat. Free Radical Biology and Medicine. 2004; 37 : 386 – 94.
27. Krop W., Scheller S., Czuba Z., Matsuno T., Zydowicz G., Shani J., Mos M. Inhibition of neutrophils' chemiluminescence by ethanol extract of propolis (EEP) and its phenolic components. Journal of Ethnopharmacology. 1996; 55 :19 – 25.
28. Montpied P., Rondouinb G., Nielc G., Briantd L., Courseau A., Lerner-Natoli M. , Bockaert J. Caffeic acid phenethyl ester (CAPE) prevents inflammatory stress in organotypic hippocampal slice cultures. Molecular Brain Research. 2003; 115 :111 – 20.
29. Rossi A., Ligresti A., Longo R., Russo A., Borrelli F., Sautebin L. The inhibitory effect of propolis and caffeic acid phenethyl ester on cyclooxygenase activity in J774 macrophages. Phytomedicine. 2002; 9: 530 – 5.
30. Mirzoeva O.K., Calder P. C. The effect of propolis and its components on eicosanoid production during the inflammatory response. Prostaglandins, Leukotrienes, and Essential Fatty Acids. 1996; 556: 441 – 9.
31. Andrea T., Shosaiko K. A review of their immunomodulatory activities. Journal of Ethnopharmacology. 2000; 73: 1 – 13.
32. Goldsby, R.A. Immunology. 5th Edit. New York: W.H. Freeman and Company, 2003.
33. David M. O., Adrian O. Phagocytosis of microbe complexity in action. Annual Review of Immunology. 2002; 20: 825 – 52.
34. Jae, B.P. Phagocytosis induces superoxide form action and apoptosis in macrophage. Experimental and Molecular Medicine. 2003; 35: 325 - 35.

35. John, M., Nitric oxide and macrophage function. Annual Review of Immunology. 1997; 15: 323 - 50.
36. Christian, B. Nitric oxide and the immune response. Nature Immunology. 2001; 2: 907 - 16.
37. Cochet, O. Immunological Techniques Made Easy. New York: John Wiley & Sons Inc, 1998.
38. Garcia X., Stein F. Nitric oxide. Seminars in Pediatric Infections Diseases. 2006; 17: 55 – 7.
39. Dedon P. C., Tannenbaum S. R. Reactive nitrogen species in the chemical biology of inflammation. Archives of Biochemistry and Biophysics. 2004; 423: 12 – 22.
40. Charles A., Dinarello. Proinflammatory Cytokines. Chest. 2000; 118: 503 – 8.
41. Winter C.A., Risley E.A, Nuss C.W. Carrageenin – induced oedema in hind paw of the rat as an assay for anti-inflammatory drug. Proceed Society Experimental Biology. 1964; 111 : 544 – 7.
42. Borrellia F., Maffiaa P., Pintoa L., Ianarao A., Russob A., Capassoa F., Ialenti A. Phytochemical compounds involved in the anti-inflammatory effect of propolis extract. Fitoterapia. 2002; 73 Suppl.1 : S53 – 63.
43. Song Y.S., Eun-Hee P., Gang M.H., Young S.R., Yong M.K. Ethanol extract of propolis inhibits nitric oxide synthase gene expression and enzyme activity. Journal of Ethnopharmacology. 2002; 155 – 61.
44. Bankova V. Chemical diversity of popolis and the problem of standardization. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 100: 114- 7.

45. Sforcin J.M., Orsi R.O., Bankova V. Effect of propolis, some isolated compounds and its source plant on antibody production. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 98: 301– 5.
46. Bankova V., Castro S.L., Marcucci M.C.,. Propolis: recent advances in chemistry and plant origin. Apidologie. 2000; 31: 3–15.
47. Johnson K.S., Eischen F.A., Giannasi D.E. Chemical composition of North American bee propolis and biological activity towards larvae of greater wax moth. Journal of Chemical Ecology. 1994; 20(7) : 9 – 10
48. Fuliang H., Hepburn H.R., Yinghua L., Chen M., Radloff S.E., Daya S. Effects of ethanol and water extracts of propolis (bee glue) on acute inflammatory animal models. Journal of Ethnopharmacology. 2005; 100: 276–283.
49. Cuzzocrea S, Zingarelli B, Gilard E, Hake P, Salzman AL, Szabó C. Protective effect of melatonin in carrageenan-induced models of local inflammation. Journal of Pineal Research. 1997; 23: 106-16.
50. Oh-ishi S, Hayashi I, Hayashi M, Yamaki K, Utsunomiya I. Pharmacological demonstration of inflammatory mediators using experimental inflammatory models: rat pleurisy induced by carrageenan and phorbol myristate acetate. Dermatologica. 1989; 179(Suppl 1): 68-71.
51. Salvemini D, Wang ZQ, Wyatt P, Bourdon DM, Marino MH, Manning PT, Currie MG. Nitric oxide: a key mediator in the early and late phase of carrageenan-induced rat paw inflammation. British Journal of Pharmacology. 1996; 118: 829-838.



ภาคผนวก

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาคผนวก ก.
แสดงผลการทดลอง

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 6 แสดงผลการศึกษาดูฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มควบคุมที่ให้ DMSO ฉีดเข้าช่องท้อง

		ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6	ตัวที่ 7	ตัวที่ 8	ค่าเฉลี่ย	% Inhibition
น้ำหนักหนู (g)		128	130	140	129	122	130	119	1.38	-	-
ปริมาตรสาร (ml)		0.1	0.1	0.1	0.1	0.2	0.2	0.2	0.2	-	-
Paw volume ชั่วโมงที่ 0		1.16	1.08	0.97	1.00	1.08	1.16	1.19	1.26	-	-
ชั่วโมงที่ 1	Paw volume	1.25	1.11	1.30	1.24	1.23	1.36	1.37	1.43	-	-
	Volume of edema	0.09	0.03	0.33	0.24	0.15	0.20	0.18	0.17	0.17	
ชั่วโมงที่ 2	Paw volume	1.37	1.15	1.39	1.29	1.33	1.44	1.54	1.52	-	-
	Volume of edema	0.21	0.07	0.42	0.29	0.25	0.28	0.35	0.26	0.27	
ชั่วโมงที่ 3	Paw volume	1.40	1.26	1.43	1.45	1.49	1.46	1.52	1.67	-	-
	Volume of edema	0.24	0.18	0.46	0.45	0.41	0.30	0.33	0.41	0.35	
ชั่วโมงที่ 4	Paw volume	1.51	1.34	1.54	1.52	1.53	1.42	1.52	1.60	-	-
	Volume of edema	0.35	0.26	0.57	0.52	0.45	0.26	0.33	0.34	0.39	
ชั่วโมงที่ 5	Paw volume	1.62	1.62	1.55	1.58	1.60	1.51	1.57	1.68	-	-
	Volume of edema	0.46	0.54	0.58	0.58	0.52	0.35	0.38	0.42	0.48	
ชั่วโมงที่ 6	Paw volume	1.62	1.40	1.64	1.54	1.63	1.49	1.68	1.70	-	-
	Volume of edema	0.46	0.32	0.67	0.54	0.55	0.33	0.49	0.44	0.48	

ตารางที่ 7 แสดงผลการศึกษากฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ indomethacin 5 mg/kg นิดเข้าช่องท้อง

		ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6	ตัวที่ 7	ตัวที่ 8	ค่าเฉลี่ย	% Inhibition
น้ำหนักหนู (g)		136	117	126	113	114	114	122	1.29	-	-
ปริมาตรสาร (ml)		0.07	0.06	0.07	0.06	0.114	0.114	0.122	0.129	-	-
Paw volume ชั่วโมงที่ 0		1.02	0.97	0.94	0.96	1.17	1.25	1.13	1.25	-	-
ชั่วโมงที่ 1	Paw volume	1.32	1.05	1.04	1.08	1.47	1.37	1.23	1.47	-	0.0
	Volume of edema	0.30	0.08	0.10	0.12	0.30	0.12	0.10	0.22	0.17	
ชั่วโมงที่ 2	Paw volume	1.32	1.00	1.05	1.03	1.44	1.45	1.29	1.46	-	37.0
	Volume of edema	0.30	0.03	0.11	0.07	0.27	0.20	0.16	0.21	0.17	
ชั่วโมงที่ 3	Paw volume	1.31	1.00	1.18	1.08	1.35	1.38	1.22	1.49	-	51.4
	Volume of edema	0.29	0.03	0.24	0.12	0.18	0.13	0.09	0.24	0.17	
ชั่วโมงที่ 4	Paw volume	1.42	1.02	1.12	1.16	1.30	1.35	1.24	1.46	-	56.4
	Volume of edema	0.40	0.05	0.18	0.20	0.13	0.10	0.11	0.21	0.17	
ชั่วโมงที่ 5	Paw volume	1.41	1.09	1.10	1.23	1.33	1.42	1.33	1.58	-	52.1
	Volume of edema	0.39	0.12	0.16	0.27	0.16	0.17	0.20	0.33	0.23	
ชั่วโมงที่ 6	Paw volume	1.43	1.03	1.20	1.07	1.44	1.49	1.41	1.54	-	50.0
	Volume of edema	0.41	0.06	0.26	0.11	0.27	0.24	0.28	0.29	0.24	

ตารางที่ 8 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ EEP 200 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง

		ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6	ตัวที่ 7	ตัวที่ 8	ค่าเฉลี่ย	% Inhibition
น้ำหนักหนู (g)		133	128	140	128	125	116	1.26	120	-	-
ปริมาตรสาร (ml)		0.14	0.13	0.14	0.13	0.125	0.116	0.126	0.12	-	-
Paw volume ชั่วโมงที่ 0		1.03	0.97	0.85	0.82	1.18	-	1.25	1.33	-	-
ชั่วโมงที่ 1	Paw volume	1.15	1.12	1.04	1.05	1.28	-	1.29	1.42	-	23.5
	Volume of edema	0.12	0.15	0.19	0.23	0.10	-	0.04	0.09	0.13	
ชั่วโมงที่ 2	Paw volume	1.20	1.07	1.08	1.06	1.54	-	1.29	1.60	-	25.9
	Volume of edema	0.17	0.10	0.23	0.24	0.36	-	0.04	0.27	0.20	
ชั่วโมงที่ 3	Paw volume	1.24	1.16	1.13	1.17	1.62	-	1.44	1.51	-	25.7
	Volume of edema	0.21	0.19	0.28	0.35	0.44	-	0.19	0.18	0.26	
ชั่วโมงที่ 4	Paw volume	1.35	1.12	1.10	1.16	1.71	-	1.36	1.59	-	28.2
	Volume of edema	0.32	0.15	0.25	0.34	0.53	-	0.11	0.26	0.28	
ชั่วโมงที่ 5	Paw volume	1.23	1.16	1.10	1.20	1.79	-	1.46	1.63	-	35.4
	Volume of edema	0.20	0.19	0.25	0.38	0.61	-	0.21	0.30	0.31	
ชั่วโมงที่ 6	Paw volume	1.27	1.13	1.05	1.20	1.73	-	1.52	1.70	-	35.4
	Volume of edema	0.24	0.16	0.20	0.38	0.55	-	0.27	0.37	0.31	

ตารางที่ 9 แสดงผลการศึกษาฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ EEP 300 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง

		ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6	ตัวที่ 7	ตัวที่ 8	ค่าเฉลี่ย	% Inhibition
น้ำหนักหนู (g)		143	143	130	140	125	135	1.25	1.29	-	-
ปริมาตรสาร (ml)		0.15	0.15	0.13	0.14	0.125	0.135	0.125	0.129	-	-
Paw volume ชั่วโมงที่ 0		1.08	0.96	1.08	1.07	1.20	1.29	1.20	1.11	-	-
ชั่วโมงที่ 1	Paw volume	1.20	1.15	1.13	1.14	1.24	1.40	1.27	1.30	-	35.3
	Volume of edema	0.12	0.19	0.05	0.07	0.04	0.11	0.07	0.19	0.11	
ชั่วโมงที่ 2	Paw volume	1.20	1.14	1.13	1.05	1.22	1.43	1.41	1.37	-	48.2
	Volume of edema	0.12	0.18	0.05	-	0.02	0.14	0.21	0.26	0.14	
ชั่วโมงที่ 3	Paw volume	1.36	1.24	1.18	1.21	1.41	1.50	1.42	1.45	-	37.1
	Volume of edema	0.28	0.28	0.10	0.14	0.21	0.21	0.22	0.34	0.22	
ชั่วโมงที่ 4	Paw volume	1.29	1.32	1.20	1.29	1.36	1.48	1.45	1.59	-	35.9
	Volume of edema	0.21	0.36	0.12	0.22	0.16	0.19	0.25	0.48	0.25	
ชั่วโมงที่ 5	Paw volume	1.33	1.26	1.19	1.28	1.43	1.62	1.51	1.73	-	37.5
	Volume of edema	0.25	0.30	0.11	0.21	0.23	0.33	0.31	0.62	0.30	
ชั่วโมงที่ 6	Paw volume	1.26	1.38	1.24	1.36	1.50	1.61	1.56	1.67	-	33.3
	Volume of edema	0.18	0.42	0.16	0.29	0.30	0.32	0.36	0.56	0.32	

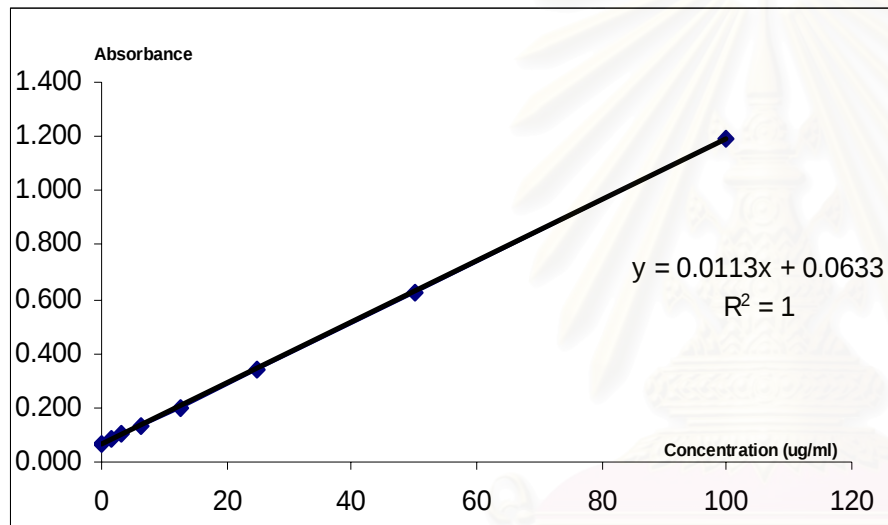
ตารางที่ 10 แสดงผลการศึกษากฤทธิ์ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ในกลุ่มที่ให้ EEP 400 mg/kg ฉีดเข้าช่องท้อง

		ตัวที่ 1	ตัวที่ 2	ตัวที่ 3	ตัวที่ 4	ตัวที่ 5	ตัวที่ 6	ตัวที่ 7	ตัวที่ 8	ค่าเฉลี่ย	% Inhibition
น้ำหนักหนู (g)		136	124	132	124	113	130	130	124	-	-
ปริมาตรสาร (ml)		0.14	0.13	0.14	0.13	0.113	0.13	0.13	0.124	-	-
Paw volume ชั่วโมงที่ 0		1.03	1.04	1.04	1.04	1.07	1.15	1.14	1.12	-	-
ชั่วโมงที่ 1	Paw volume	1.21	1.05	1.10	1.12	1.15	1.28	1.23	1.32	-	41.2
	Volume of edema	0.18	0.01	0.06	0.08	0.08	0.13	0.09	0.20	0.10	
ชั่วโมงที่ 2	Paw volume	1.40	1.16	1.20	1.12	1.28	1.27	1.31	1.47	-	25.9
	Volume of edema	0.37	0.12	0.16	0.08	0.21	0.12	0.17	0.35	0.20	
ชั่วโมงที่ 3	Paw volume	1.42	1.25	1.25	1.23	1.35	1.26	1.41	1.44	-	28.6
	Volume of edema	0.39	0.21	0.21	0.19	0.28	0.11	0.27	0.32	0.25	
ชั่วโมงที่ 4	Paw volume	1.42	1.32	1.24	1.29	1.38	1.42	1.55	1.38	-	23.1
	Volume of edema	0.39	0.28	0.20	0.25	0.31	0.27	0.41	0.26	0.30	
ชั่วโมงที่ 5	Paw volume	1.50	1.28	1.29	1.26	1.37	1.40	1.58	1.48	-	33.3
	Volume of edema	0.47	0.24	0.25	0.22	0.30	0.25	0.44	0.36	0.32	
ชั่วโมงที่ 6	Paw volume	1.59	1.26	1.28	1.37	1.42	1.48	1.57	1.14	-	29.2
	Volume of edema	0.56	0.22	0.24	0.33	0.35	0.33	0.43	0.29	0.34	

ตารางที่ 11 แสดงผลการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone

	%viability									mean	SD	SE
	n1	n2	n3	n4	n5	n6	n7	n8	n9			
doxorubicin 1.5 µg/ml	-	-	1.32	0.13	2.96	9.32	-	3.14	3.03	3.32	3.16	1.29
EEP 12.5 µg/ml	122.96	124.37	111.40	110.62	97.43	82.05	92.40	91.50	100.51	103.69	14.58	4.86
EEP 25 µg/ml	135.78	119.95	92.00	108.06	93.09	71.90	91.08	83.52	96.59	99.11	19.37	6.46
EEP 50 µg/ml	107.88	113.79	82.35	99.06	91.60	52.87	66.78	61.33	72.87	83.17	21.34	7.11
EEP 100 µg/ml	79.44	84.39	61.84	94.09	59.16	42.42	30.25	22.76	25.62	55.55	26.75	8.92
LPS 100 ng/ml	61.55	79.36	77.52	90.32	73.53	62.45	59.39	81.24	69.17	72.73	10.43	3.48
0.05%DMSO	113.48	97.05	97.15	99.73	96.59	94.80	93.97	95.30	96.94	98.34	5.92	1.97
dexamethasone 10 µM	-	-	-	-	64.35	64.95	81.78	74.11	76.75	72.39	7.58	3.39
water	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	0.00	0.00

ภาพที่ 27 แสดงค่าของ standard curve ของ sodium nitrite (NaNO_2)



Concentration NO_2^- (μM)	Absorbance		Average
	1	2	
100	1.153	1.231	1.192
50	0.620	0.628	0.624
25	0.339	0.348	0.344
12.5	0.205	0.200	0.203
6.25	0.133	0.132	0.133
3.13	0.100	0.099	0.100
1.56	0.082	0.082	0.082
0	0.067	0.066	0.067

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

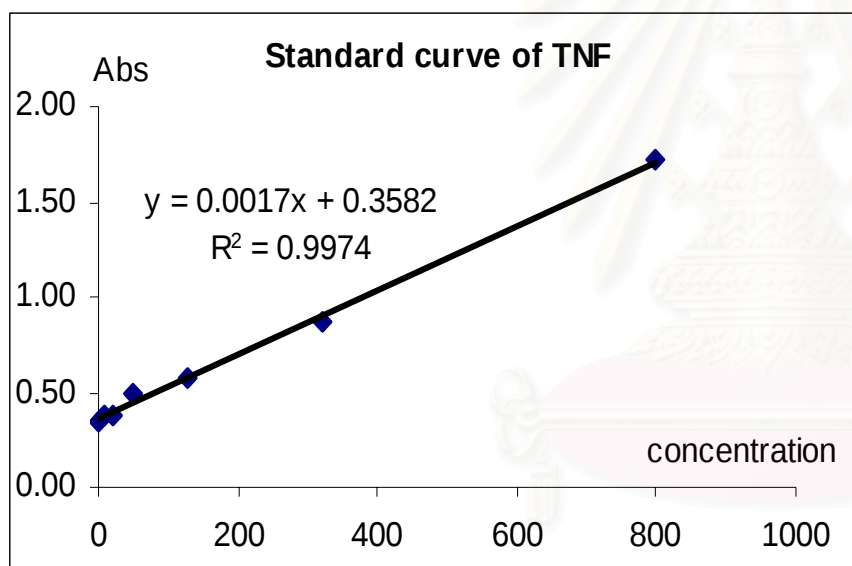
ตารางที่ 12 แสดงค่าของ NO_2^- ที่วัดได้จากการทำปฏิกิริยา Griess ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone

	NO_2^- (μM)					เฉลี่ย	SD	SEM
	n1	n2	n3	n4	n5			
0.05% DMSO	3.11	2.97	2.40	1.16	4.68	2.86	1.27	0.57
EEP 12.5 $\mu\text{g/ml}$	17.71	32.10	21.44	19.22	25.74	23.24	5.8	2.59
EEP 25 $\mu\text{g/ml}$	6.39	21.26	13.54	6.72	20.09	13.60	7.07	3.16
EEP 50 $\mu\text{g/ml}$	1.75	12.40	6.70	0.69	11.94	6.70	5.49	2.45
EEP 100 $\mu\text{g/ml}$	-0.10	3.85	0.47	-0.47	3.01	1.35	1.95	0.87
LPS 100 ng/ml	16.39	28.46	17.67	17.76	25.93	21.24	5.53	2.47
dexamethasone 10 μM	0.91	2.67	1.66	1.08	8.01	2.87	2.96	1.32

ตารางที่ 13 แสดงค่าการยับยั้งการหลั่ง nitric oxide ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone

	%inhibition						SD	SEM
	n1	n2	n3	n4	n5	เฉลี่ย		
EEP 12.5 µg/ml	-8.1	-12.8	-21.3	-8.2	0.7	-9.9	8.03	3.59
EEP 25 µg/ml	61.0	25.3	23.4	62.2	22.5	38.9	20.8	9.27
EEP 50 µg/ml	89.3	56.4	62.1	96.1	53.9	71.6	19.7	8.78
dexamethasone 10 µM	94.4	90.6	90.6	93.9	69.1	87.7	10.6	4.72

ภาพที่ 28 แสดง standard curve ของ TNF - α

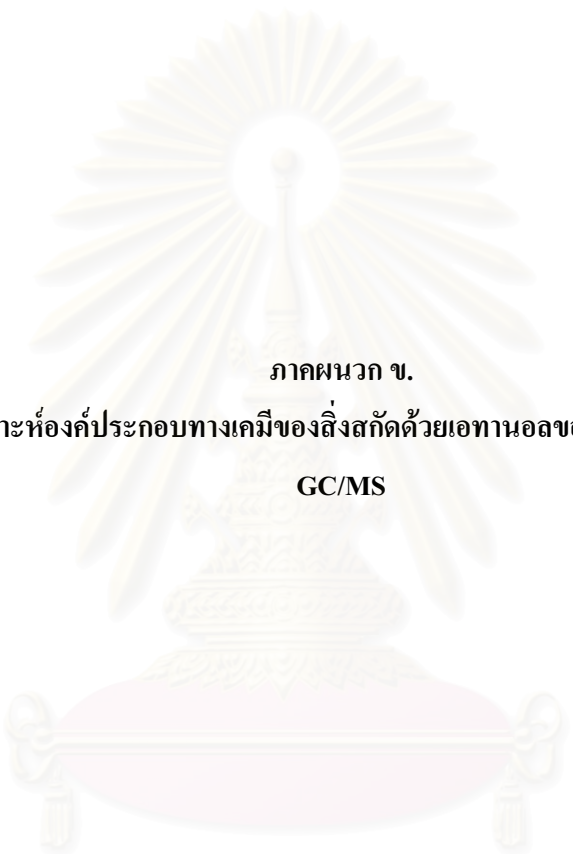


Concentration TNF - α (pg/ml)	Absorbance		Average
	1	2	
320	0.844	0.891	0.868
128	0.569	0.577	0.573
51	0.533	0.453	0.493
20	0.377	0.383	0.380
8	0.357	0.387	0.372
0	0.342	0.346	0.344

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ตารางที่ 14 แสดงค่าของ TNF - α ที่วัดได้และ %inhibition ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย และ dexamethasone

group	ครั้งที่ 1			ครั้งที่ 2			Average	SD	SE	%inhibition
	n1	n2	n3	n4	n5	n6				
EPE 12.5 μ g/ml	51,562.00	46,485.00	15,965.00	33,000.00	19,971.00	15,956.00	30,489.83	15742	6428	-11.0
EPE 25 μ g/ml	20,160.00	19,544.60	10,150.40	30,294.00	8,382.00	7,750.00	16,046.83	8882	3627	41.6
EPE 50 μ g/ml	2,097.73	2,108.12	1,942.35	16,103.00	2,456.00	824.00	4,255.20	5831	2381	84.5
Dexamethasone 10 μ M	1,872.92	2,024.85	1,314.27	4,074.00	2,971.00	618.00	2,145.84	1226	501	92.2
LPS 100 ng/ml	39,735.00	44,331.00	11,292.00	32,779.00	20,588.00	16,088.00	27,468.83	13428	5483	-
0.05%DMSO	142.35	214.27	93.69	281.62	195.03	266.03	198.83	72	29	-



ภาคผนวก ข.

แสดงผลการวิเคราะห์องค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยด้วยเครื่อง
GC/MS

สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาพที่ 29 แสดง chromatogram ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ได้จากการทำ GC/MS

Ethanol extract of propolis 0.1 g in methanol 1 ml, inject 1 μ l to GC/MS (Trace GC Finnigan, Polaris Q MS)

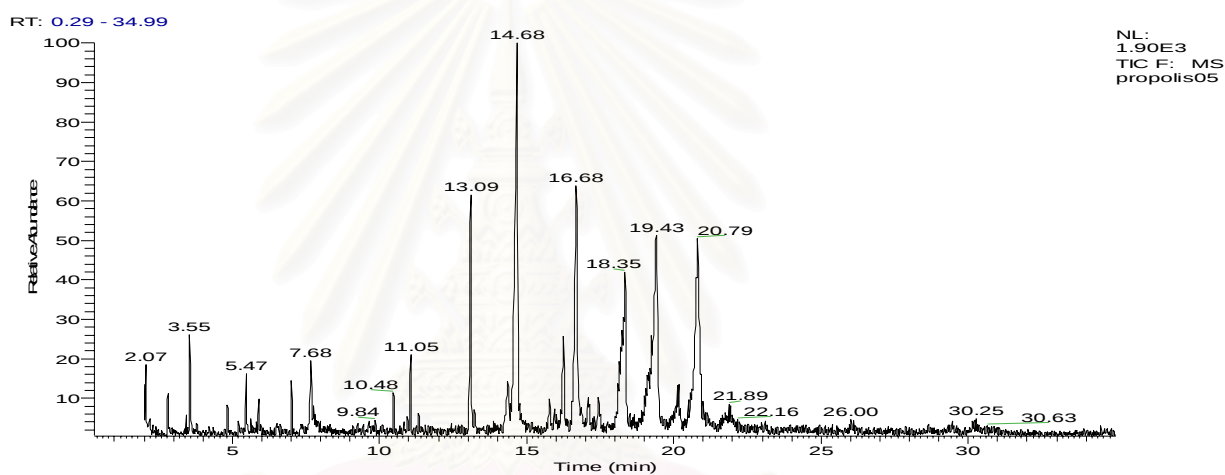
Column BPX5 30m x 0.25 mm x 0.25 μ m

Column temp 150 $^{\circ}$ C ramp 10 $^{\circ}$ C/ min to 250 $^{\circ}$ C hold 35 min

Injector temp 300 $^{\circ}$ C

Carrier gas He flow rate 1 ml/ min

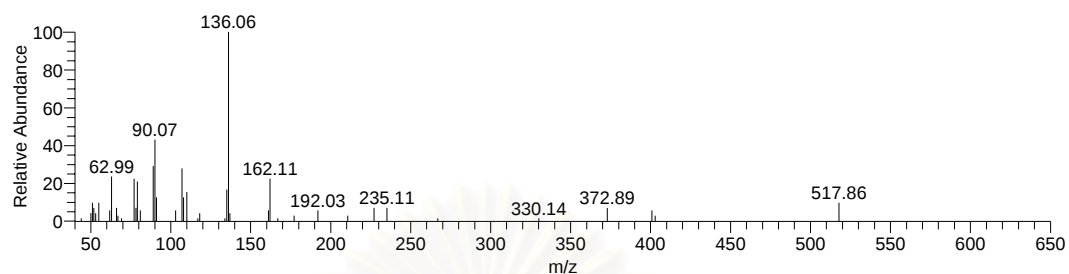
MS scan 40.00-650.00 m/z



ตารางที่ 15 แสดงองค์ประกอบทางเคมีของ EEP ที่ได้จากการทำ GC/MS

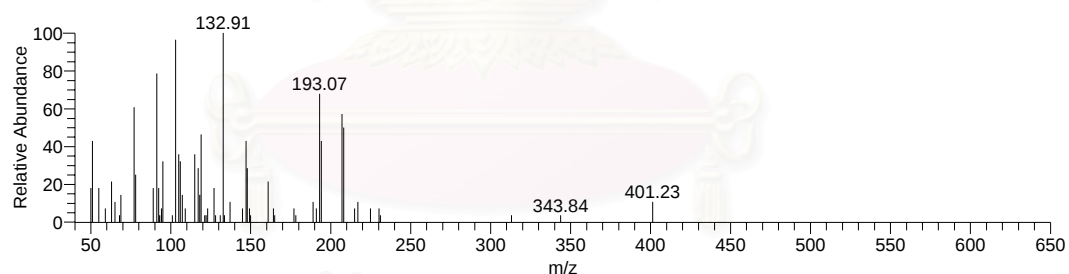
Rt	Chemical composition	Peak Area	Area %
3.56	4-Hydroxymethylbenzaldehyde	1317	2.26
7.67	3,4-Dimethoxycinnamic acid	2454	4.22
13.08	Pinostrobin chalcone	4530	7.79
14.66	Dihydrochrysin (Galangin flavanone)	12313	21.16
16.68	Tectochrysin	7935	13.64
18.33	Chrysin derivative	7859	13.51
19.40	Chrysin	11407	19.61
20.79	Galangin	10365	17.81

ภาพที่ 30 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 3.56



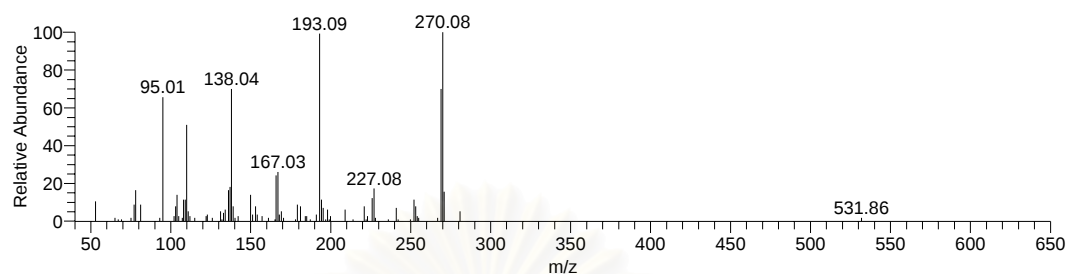
Rt	Name	SI	Library	Formula
3.56	Benzene, 1-(bromomethyl)-3-nitro-	481	replib	C7H6BrNO2
3.56	2-Hydroxy-3-methylbenzaldehyde	547	mainlib	C8H8O2
3.56	Benzaldehyde, 2-hydroxy-6-methyl-	557	mainlib	C8H8O2

ภาพที่ 31 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 7.67



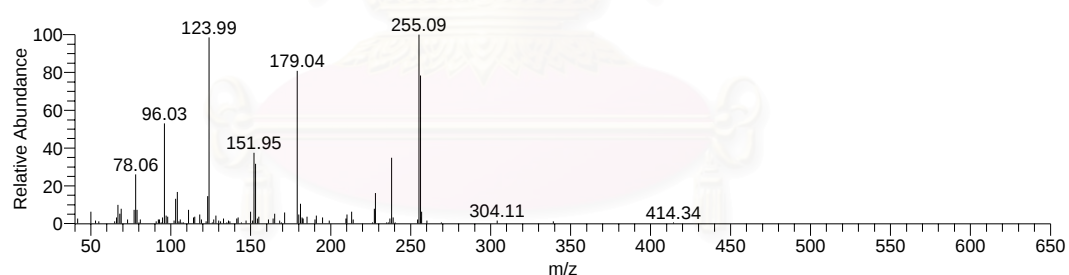
Rt	Name	SI	Library	Formula
7.67	trans-2,3-Methylenedioxy-b-methyl-b-nitrostyrene	382	mainlib	C10H9NO4
7.67	trans-3-Methoxy-b-methyl-b-nitrostyrene	394	mainlib	C10H11NO3
7.67	Benzaldehyde, 4-(1-methylethyl)-	425	replib	C10H12O

ภาพที่ 32 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 13.08



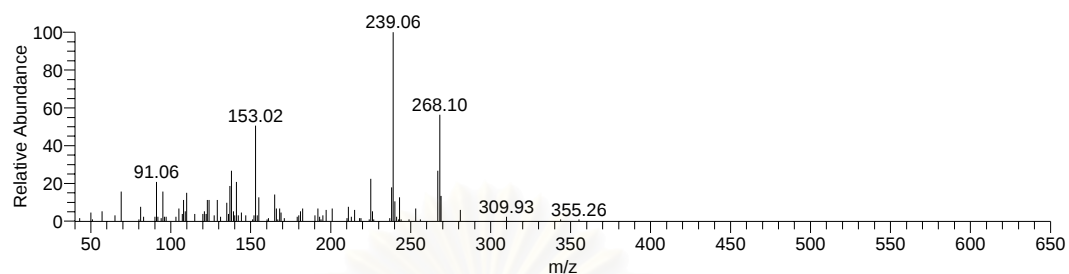
Rt	Name	SI	Library	Formula
13.08	1H-Benzimidazole, 1,2-diphenyl-	439	mainlib	C19H14N2
13.08	Physcion-10,10'-bianthrone	489	mainlib	C32H26O8
13.08	2-Propen-1-one, 1-(2,6-dihydroxy-4-methoxyphenyl)-3-phenyl-, (E)-	758	mainlib	C16H14O4

ภาพที่ 33 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 14.66



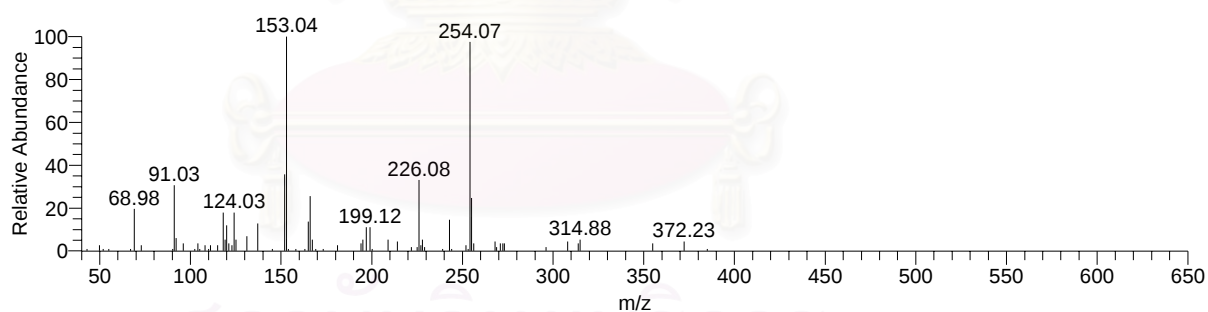
Rt	Name	SI	Library	Formula
14.66	2-Methylaminomethyl-5-nitrobenzophenone	334	replib	C14H12N2O3
14.66	Indolo[2,3-a]quinolizin-2-ol, 1,2,3,4,6,7,12,12b-octahydro-2-methyl-, trans-	345	mainlib	C16H20N2O
14.66	4H-1-Benzopyran-4-one, 2,3-dihydro-5,7-dihydroxy-2-phenyl-, (S)-	725	mainlib	C15H12O4

ภาพที่ 34 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 16.68



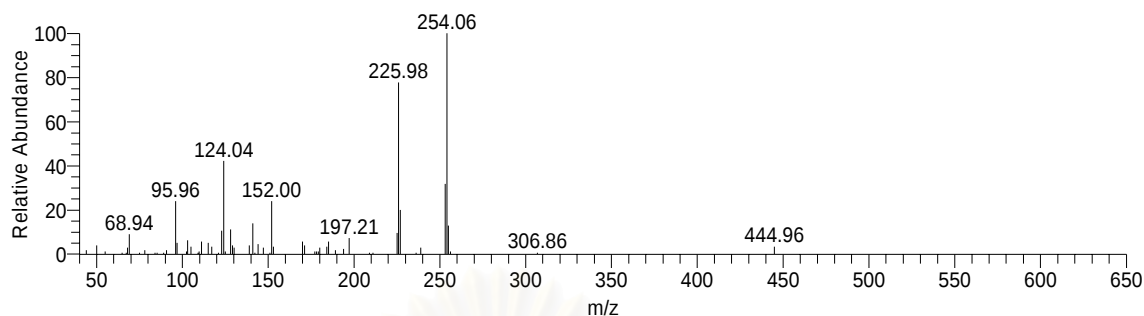
Rt	Name	SI	Library	Formula
16.68	p-Anisaldehyde, azine	349	mainlib	C16H16N2O2
16.68	4H-1-Benzopyran-4-one, 3-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl-	388	replib	C16H12O4
16.68	4H-1-Benzopyran-4-one, 5-hydroxy-7-methoxy-2-phenyl-	635	mainlib	C16H12O4

ภาพที่ 35 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 18.33



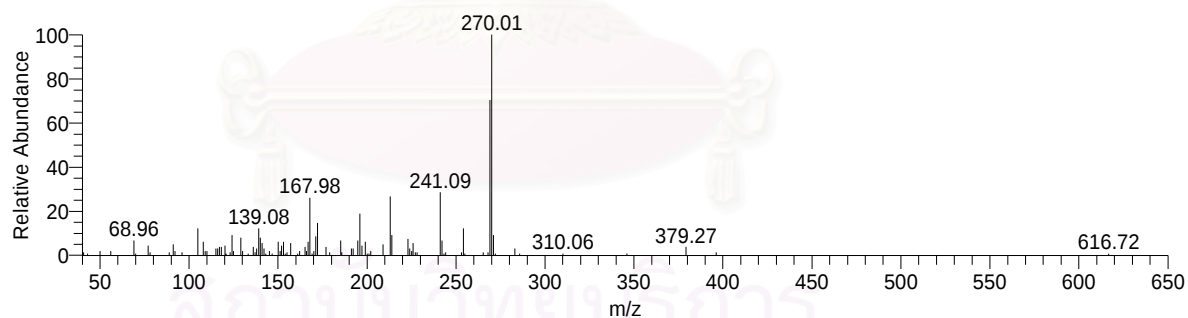
Rt	Name	SI	Library	Formula
18.33	Chrysin	450	replib	C15H10O4
18.33	Chrysin	486	replib	C15H10O4
18.33	[1,1'-Biphenyl]-4-carboxylic acid, 2',4'-dimethyl-, ethyl ester	488	mainlib	C17H18O2

ภาพที่ 36 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 19.40



Rt	Name	SI	Library	Formula
19.40	4H-1-Benzopyran-4-one, 5,7-dihydroxy-3-phenyl-	518	mainlib	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
19.40	Chrysin	726	replib	C ₁₅ H ₁₀ O ₄
19.40	Chrysin	734	mainlib	C ₁₅ H ₁₀ O ₄

ภาพที่ 37 แสดง Mass spectrum ของ EEP ที่ Rt 20.79



Rt	Name	SI	Library	Formula
20.79	9,10-Anthracenedione, 1,5-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-	401	mainlib	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
20.79	9,10-Anthracenedione, 1,8-dihydroxy-3-(hydroxymethyl)-	470	mainlib	C ₁₅ H ₁₀ O ₅
20.79	4H-1-Benzopyran-4-one, 3,5,7-trihydroxy-2-phenyl-	605	mainlib	C ₁₅ H ₁₀ O ₅



No.129/2006
REC. No. 461/2548

Certificates of Approval

The Ethics Committee of the Faculty of Medicine, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand has approved the following study to be carried out according to the protocol, the principal investigator and informed consent dated and/or amended as follows in compliance with the ICH/GCP.

Study Title : Anti-inflammatory Activity Of Ethanolic Of Thai Propolis
Study Code : -
Center : Chulalongkorn University
Principal Investigator : Miss Duangjai Pankaew
Protocol Date : December 27, 2005
Document Reviewed :

(Professor Anek Aribarg, M.D.)
Chairman of Ethics Committee

(Associate Professor. Vilai Chentanez, M.D.)
Associate Dean for Research Affairs

Date of Approval : March 21, 2006

Approval Expire Date : March 21, 2007

Approval is granted subject to the following conditions: (see back of this Certificates)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวดวงใจ ปานแก้ว เกิดเมื่อวันที่ 3 มีนาคม พ.ศ. 2525 กรุงเทพมหานคร. สำเร็จการศึกษาปริญญาตรีวิทยาศาสตร์บัณฑิต(เคมี) คณะวิทยาศาสตร์ ภาควิชาเคมี จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2546 และเข้าศึกษาต่อหลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ สาขาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2547 – 2549



สถาบันวิทยบริการ
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย