



ผลของน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติกที่มีส่วนผสมของกัญชาต่อการลดสารสื่ออักเสบทูเมอร์เน็คโครติกแฟคเตอร์อัลฟา

The effect of probiotic mouthwash with cannabis extracts on the reduction of inflammatory cytokine: tumor necrosis factor alpha.

ณัฐพล นิสภา¹, มาลัย ทวีโชติภักตร์² และสรสัณห์ รังสิยานนท์^{3*}

Nattapon Nisapa¹, Malai Taveechotpatr² and Sorasun Rungsiyanont^{3*}

¹ นักศึกษาระดับบัณฑิตศึกษา, หลักสูตรวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต, สาขาวิชาวิทยาการช่องปากและแม็กซิลโลเฟเชียล, คณะทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพมหานคร

¹ Graduate student, Master of Science Program in Oral and Maxillofacial Sciences, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok.

² รองศาสตราจารย์, ภาควิชาจุลชีววิทยา, คณะแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพมหานคร

² Associate Professor, Department of Microbiology, Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Bangkok.

³ รองศาสตราจารย์, ภาควิชาศัลยศาสตร์และเวชศาสตร์ช่องปาก, คณะทันตแพทยศาสตร์, มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ, กรุงเทพมหานคร

³ Associate Professor, Department of Oral Surgery and Oral Medicine, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Bangkok.

*Corresponding author, E-mail: Sorasun@g.swu.ac.th

บทคัดย่อ

การศึกษาในครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติก ผสมสารสกัดจากกัญชา (แคนนาบิไดโอด, CBD) ต่อการลดระดับของทูเมอร์เน็คโครติกแฟคเตอร์อัลฟา (TNF- α) โดยเริ่มจาก เตรียมน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติก ผสมสารสกัดจากกัญชา (CBD) โดยมีความเข้มข้นของ CBD ตั้งแต่ 0.5-1.0 ปริมาตร/ปริมาตร จำนวน 7 สูตร มาทดสอบความสามารถในการลดระดับสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α โดยใช้โมเดลในการกระตุ้น human monocytic cell line (ATCC, TIB202) ชนิด THP-1 ด้วย ลิโปพอลิแซ็กคาไรด์บริสซูธิ์ (LPS) ให้เกิดการหลั่ง TNF- α และวัดความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง TNF- α ของน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตรด้วยวิธี ELISA พบว่าน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติก ผสมสารสกัดจากกัญชา (CBD) มีความสามารถในการลดระดับ TNF- α ได้เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม โดยพบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดโอด ร้อยละ 0.25, น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก), สูตรที่ 2 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดโอด ร้อยละ 0.5, น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก), สูตรที่ 3

(น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 1, น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก) และสูตรที่ 4 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก) สามารถลดระดับสารสื่ออักเสบได้ 91% สูตรที่ 5 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.25 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10), สูตรที่ 6 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.5 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 ; 0.5% CBD) และสูตรที่ 7 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 1 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10) ลดได้ที่ 49.30%, 80.94% และ 82.51% ตามลำดับ จากผลการทดลองครั้งนี้ชี้ให้เห็นว่าน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติกผสมสารสกัดจากัญชา (CBD) มีความสามารถในการลดระดับ TNF- α และมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ต่อไป

คำสำคัญ: น้ำยาบ้วนปาก, โพรไบโอติก, ัญชา, สารสื่ออักเสบ, ทูเมอร์เน็คโครติกแฟกเตอร์อัลฟา

Abstract

This study was aimed aimed evaluating the effects of probiotic mouthwash containing cannabis extracts (CBD) on the reduction of tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) levels. 7 probiotic mouthwashes were prepared by infusing cannabis extract (CBD) with the concentration varied from 0.5-1.0 v/v. The test for TNF- α reduction was performed using a lipopolysaccharide (LPS) model to activate type THP-1 human monocytic cell line (ATCC, TIB202) to produce TNF- α . To assess the TNF- α level reduction, the ELISA technique was performed. The result revealed the probiotic mouthwash containing CBD could reduce the TNF- α level regardless of its concentration when comparing with the control. The optimum ratio which could reduce the TNF- α level was in preparation 1 (0.25% CBD, 10% probiotic supernatant and mouthwash ingredient), 2 (0.5% CBD, 10% probiotic supernatant and mouthwash ingredient), 3 (1% CBD, 10% probiotic supernatant and mouthwash ingredient) and 4 (10% probiotic supernatant and mouthwash ingredient) at the similar level of inhibition at 91%. For preparation 5 (0.25% CBD and 10% probiotic supernatant), 6 (0.5% CBD and 10% probiotic supernatant), and 7 (1% CBD, 10% probiotic supernatant) the inhibitions were at 49.30, 80.94 and 82.51% respectively. Therefore, the probiotic mouthwash with CBD can reduce TNF- α levels and could potentially be applied in clinical usage.

Keywords: mouthwash, probiotic, cannabis, CBD, proinflammatory cytokine, TNF-alpha

บทนำ

งานศัลยกรรมช่องปาก เป็นงานผ่าตัดด้วยระยะภายในช่องปาก ประกอบด้วยหัตถการต่าง ๆ เช่น การถอนฟัน การผ่าตัดฟันคุด การผ่าตัดฟันผุ การผ่าตัดตกแต่งปุ่มกระดูก การผ่าตัดเนื้อเยื่อ การผ่าตัดเพื่อการทำศัลยกรรมรากเทียม เป็นต้น งานศัลยกรรมช่องปากมีความเกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผลอย่างมาก เนื่องจากหัตถการที่ทำนั้นเป็นการผ่าตัดที่ทำให้เกิดบาดแผล มีผลกระตุ้นร่างกายให้เกิดกระบวนการตอบสนองต่อการเกิดบาดแผล (Schwartz SI et al., 2015) โดยส่วนมากอาการบวมหลังการผ่าตัดในช่องปากนั้น เป็นผลข้างเคียงที่เกิดขึ้นได้เป็นปกติหลังการผ่าตัด เนื่องจากการตอบสนองต่อการบาดเจ็บของเนื้อเยื่อระหว่างการทำการผ่าตัด อาการบวมจะบวมสูงสุดในระยะเวลา 48 ชั่วโมงหลังจากการผ่าตัด (Darawade DA et al., 2014)

การบวมที่เป็นผลข้างเคียงจากการผ่าตัดศัลยกรรมช่องปากนั้น เป็นส่วนหนึ่งของการทำงานของสารสื่ออักเสบต่าง ๆ ที่อยู่ในกระบวนการตอบสนองของร่างกายต่อการเกิดแผล ซึ่งกระบวนการตอบสนองของร่างกายต่อการเกิดแผลนั้นจะพบว่าสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนที่มีความต่อเนื่องกัน นั่นคือ ภาวะ hemostasis และ inflammatory, ภาวะ proliferative และภาวะ remodeling (Sinno H et al., 2013) โดยแต่ละระยะของกระบวนการหายของแผลนั้น จะมีความเกี่ยวข้องกับเซลล์เม็ดเลือดขาวต่าง ๆ และสารสื่ออักเสบ เซลล์ที่มีบทบาทมากในกระบวนการหายของแผลนั้น คือ Neutrophils และ Macrophage เซลล์ทั้งสองชนิดนี้จะมามีบทบาทในการหลั่งสารสื่ออักเสบต่าง ๆ ออกมาเพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการหายของแผล (Schwartz SI et al., 2015) ในขณะเดียวกันสารที่หลั่งออกมาก็เป็นสารสื่ออักเสบซึ่งหากมีปริมาณไม่เหมาะสม หรือมากเกินไป จะทำให้การหายของแผลเกิดขึ้นได้ไม่ดี (Ashcroft GS et al., 2012) ในแผลที่การหายของแผลมีความบกพร่องจะพบว่ามีปริมาณของ Tumor necrosis factor alpha (TNF- α) เฉพาะที่ และในระบบที่สูงขึ้น มีรายงานพบว่า TNF- α มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการหายของแผลที่ช้าในคนได้ (Lassing AAD SI et al., 2019)

ปัจจุบันนอกจากการใช้ยาเพื่อรักษา และลดอักเสบแล้ว การใช้จุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ก็เป็นอีกทางหนึ่งที่เป็นที่นิยมในการนำมาใช้ เช่น ใช้ในการรักษาภาวะลำไส้อักเสบ หรือผิวหนังอักเสบ เป็นต้น โพรไบโอติก (probiotics) เป็นจุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อมีในปริมาณที่เหมาะสมจะส่งผลดีต่อสุขภาพร่างกาย ช่วยป้องกันและรักษาโรคได้ แต่โพรไบโอติกทุกชนิดไม่ได้มีผลลัพธ์เหมือนกัน แต่ละสายพันธุ์ แต่ละชนิดต่างมีการทำงาน และส่งผลต่อร่างกายโดยเฉพาะ เชื้อในสปีชีส์เดียวกันแต่เป็นคนละสายพันธุ์ก็ส่งผลแตกต่างกัน (Mileti E SI et al., 2009; FAO, WHO., 2002)

Lactobacilli เป็นแบคทีเรียแกรมบวกที่มีรูปร่างเป็นท่อนเดี่ยว หรือสาย เป็นเชื้อประจำถิ่นที่พบได้หลายอวัยวะ มีคุณสมบัติทนกรด และสามารถผลิตกรดแลคติกได้ มีหลากหลายสายพันธุ์ มีบทบาทสำคัญในการควบคุมระบบภูมิคุ้มกัน มีการศึกษาในคลินิกพบว่ามีความสามารถในการป้องกันและรักษากระบวนการอักเสบต่าง ๆ เช่น ลำไส้อักเสบ บางสายพันธุ์มีความสามารถในการลดการสร้าง proinflammatory cytokine เช่น TNF- α ได้ ซึ่งจุลินทรีย์กลุ่มที่มีรายงานว่าช่วยลด TNF- α ได้คือกลุ่ม

Lactobacilli (Masae R et al., 2017) จากการศึกษาค้นคว้าวิจัยเปรียบเทียบนั้นพบว่า *Lactobacillus paracasei* (*L. paracasei*) มีความสามารถในการปรับเปลี่ยนกระบวนการอักเสบได้ดี และสามารถลดระดับ TNF- α ได้ (Sun K-Y et al., 2017)

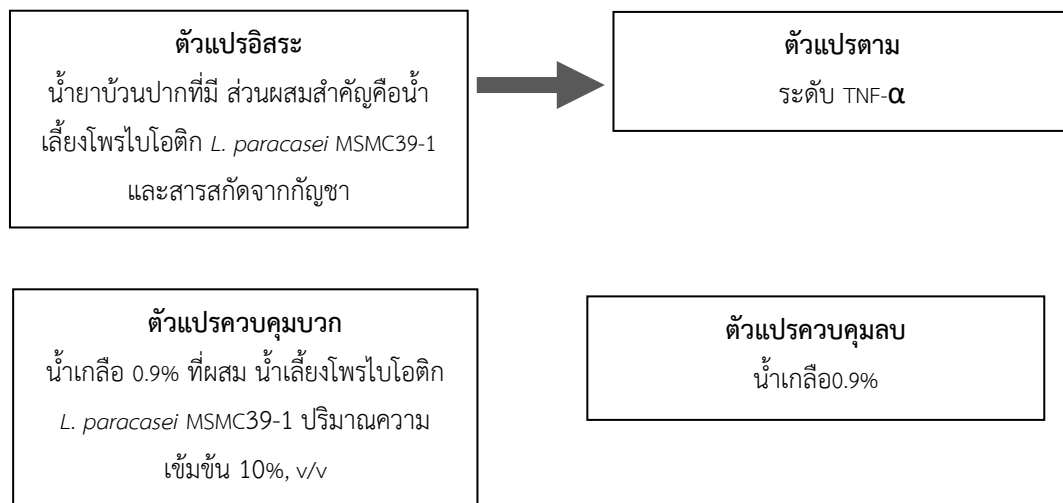
ปัจจุบันมีการนำสมุนไพร และสารสกัดจากธรรมชาติมาใช้เป็นทางเลือกในการรักษาทางการแพทย์มากขึ้น เพื่อลดผลข้างเคียงจากการใช้ยา และลดค่าใช้จ่ายในการรักษา พบว่าสารสกัดจากกัญชาที่เรียกว่าแคนนาบินอยด์ มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการหลั่งสารสื่ออักเสบได้ (Schwartz SI et al., 2015) โดยเฉพาะในผู้ที่ได้รับการศัลยกรรมช่องปาก ที่อาจทำความสะดวกได้ไม่เพียงพอ โดยพบว่าจะต้านเชื้อในกลุ่มแกรมบวก ได้ดีกว่าแกรมลบ (Wasim K et al., 1995; Appendino G et al., 2008; Kosgodage US et al., 2019) โดยการรบกวนการส่งสัญญาณ AI-2 quorum sensing signal cascade ในแบคทีเรีย *Vibrio harveyi* (Soni D et al., 2015) มีรายงานว่า CBD ที่เป็นสารสกัดจากกัญชาตัวหนึ่ง สามารถทำการยับยั้งการสร้างเยื่อหุ้มเซลล์ ในแบคทีเรียแกรมลบได้อย่างดี และยังสามารถเพิ่มประสิทธิภาพการฆ่าเชื้อแบคทีเรียของยาปฏิชีวนะ ทั้งในแกรมบวก และแกรมลบ ได้อีกด้วย (Kosgodage US et al., 2019) ด้วยความสามารถเหล่านี้แคนนาบินอยด์จึงน่าจะเป็นสารที่มีศักยภาพมาปรับใช้ในการยับยั้งแบคทีเรียในคราบจุลินทรีย์ได้

ปัจจุบันมีการศึกษาค้นคว้าวิจัยในการนำโพรไบโอติกมาช่วยลดภาวะการอักเสบ โดยพบว่าน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracasei* MSMC39-1 ที่แยกได้จากอุจจาระเด็กทารกแรกคลอดที่มีสุขภาพดี ศูนย์การแพทย์พระเทพฯ มีผลลดระดับ TNF- α ได้ (Ladda B et al., 2015) งานวิจัยนี้จึงมีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมหลักคือ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และสารสกัดจากกัญชาต่อระดับของสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ร่วมกับการทำศัลยกรรมในช่องปาก โดยหวังผลเพื่อการลดผลแทรกซ้อนภายหลังงานศัลยกรรมที่เกิดจากการหลั่งของสารสื่ออักเสบ และส่งผลการรักษาที่ดีต่อไป

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาผลของสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมหลักคือ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมของสารสกัดจากกัญชา ว่ามีผลในการเพิ่ม หรือลดฤทธิ์ของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 ต่อระดับของสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α

แนวคิด ทฤษฎี กรอบแนวคิด



วิธีดำเนินการวิจัย

การวิจัยครั้งนี้ แบ่งวิธีการทดลองออกเป็น 5 ส่วน ดังนี้

ส่วนที่ 1 การเตรียมน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก (probiotic supernatant) *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1

นำเชื้อโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 ที่ทำการเพาะเลี้ยงไว้ในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจน มาทำการเจือจางในอาหารเหลว ให้ได้ปริมาณ 10^9 เซลล์/มิลลิลิตร แล้วทำการเลี้ยงในสภาวะที่ไม่มีออกซิเจนใน ที่อุณหภูมิ 37°C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง จากนั้นทำการแยกเอาส่วนของน้ำเลี้ยงเชื้อ (supernatant) โดยการปั่นเหวี่ยงที่ $4,000 \times g$ เป็นเวลา 10 นาที แล้วนำไปกรองด้วยกระดาษกรองปลอดเชื้อขนาดกรอง $0.22\mu\text{m}$ (Sigma, USA) และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะมีการนำมาใช้ต่อไป

ส่วนที่ 2 การเตรียมน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมจากกัญชา

การเตรียมน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมจากกัญชา

เตรียมน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1-7 ปริมาณ 10 ml โดยปรับเปลี่ยนปริมาณของสารต่าง ๆ ดังที่ได้แสดงไว้ในตารางที่ 1

ตารางที่ 1 แสดงส่วนผสมของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่1-7ที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพไบโอติก *L. paracasei* สายพันธุ์ MSMC39-1 และแคนนาบีไดออล ปริมาณ 10 ml

สูตร (หน่วย)	ปริมาณในตำรับยา							หน้าที่ของสาร
	1	2	3	4	5	6	7	
5% CBD (ml.)	0.5	1	2	-	0.5	1	2	สารสำคัญ
กลีเซอรีน (ml.)	2.5	2.5	2.5	2.5	-	-	-	สารให้ความชุ่มชื้น
พอลิซobet 80 (μl)	100	100	100	100	-	-	-	สารช่วยละลาย
0.9% โซเดียมแซคคาริน (μl)	333	333	333	333	-	-	-	สารแต่งรส
น้ำเลี้ยงโพไบโอติก (ml)	1	1	1	1	1	1	1	สารสำคัญ, ตัวทำละลาย
น้ำเกลือ 0.9% (μl)	5,567	5,067	4,067	6,067	8,500	8,000	7,000	ตัวทำละลาย

โดย

สูตรที่ 1 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 0.25, น้ำเลี้ยงโพไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก ; 0.25% CBD + 10%Pro + Mouthwash(MW)

สูตรที่ 2 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 0.5, น้ำเลี้ยงโพไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก ; 0.5% CBD + 10%Pro + MW

สูตรที่ 3 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 1, น้ำเลี้ยงโพไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก ; 1% CBD + 10%Pro + MW

สูตรที่ 4 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมน้ำเลี้ยงโพไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก ; 10%Pro + MW

สูตรที่ 5 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 0.25 และน้ำเลี้ยงโพไบโอติก ร้อยละ 10 ; 0.25% CBD + 10%Pro

สูตรที่ 6 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 0.5 และน้ำเลี้ยงโพไบโอติก ร้อยละ 10 ; 0.5% CBD + 10%Pro

สูตรที่ 7 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 1 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 ; 1% CBD + 10% Pro

ตัวควบคุมบวก คือ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกความเข้มข้นร้อยละ ; 10% Pro

หมายเหตุ เพอร์เซ็นต์ของสารสำคัญที่ระบุในแต่ละสูตร คือความเข้มข้นสุดท้ายที่ได้หลังการผสม

ส่วนที่ 3 การเพาะเลี้ยง human monocytic cell line ชนิด THP-1

การเพาะเลี้ยง human monocytic cell line (ATCC, TIB202) ชนิด THP-1

นำ human monocytic cell line (ATCC, TIB202) ชนิด THP-1 มาเลี้ยงในภาชนะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม ก้นแบน (Corning, USA) โดยเลี้ยงด้วย RPMI 1640 (Gibco-Invitrogen, USA) และเสริมด้วย 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS; Gibco-Invitrogen, USA) และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂

ส่วนที่ 4 การทดสอบน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก และส่วนผสมจากัญชา

การกระตุ้นให้เกิดหลั่ง TNF-α

นำ human monocytic cell line (ATCC, TIB202) ชนิด THP-1 ที่ได้เลี้ยงจนเข้าช่วงต้นมาทำการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง TNF-α โดยการเติมลิโปโพลีแซ็กคาไรด์ บริสุทธิ์ (LPS) ที่ได้จาก Escherichia coli ชนิด O127:B8 (Sigma, USA) ปริมาณ 10 μl (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ng/ml)

การทดสอบน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก และส่วนผสมจากัญชา

นำน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตรใส่ลงใน human monocytic cell line (ATCC, TIB202) ชนิด THP-1 ที่ได้ทำการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง TNF-α ไว้ สูตรละ 3 หลุม แล้วนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C, 5% CO₂ เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที จากนั้นทำการตรวจความมีชีวิตของเซลล์ โดยการนับเซลล์ด้วยฮีโมไซโตมิเตอร์ ภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ แล้วเก็บน้ำเลี้ยงเซลล์ไปตรวจระดับของ TNF-α โดยการนำน้ำเลี้ยงเซลล์ไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 × g เป็นเวลา 5 นาที ที่อุณหภูมิ 4°C จากนั้นนำไปเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -80°C ทันที เพื่อวิเคราะห์ความสามารถแล้วนำส่วนที่ได้ไปวัดความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง TNF-α ด้วยวิธี ELISA โดยทำตามคู่มือของบริษัท (R&D Systems, USA) ต่อไป

ส่วนที่ 5 การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF-α และการวิเคราะห์ทางสถิติ

การวิเคราะห์เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF-α

การคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF-α โดยคำนวณจากสูตร

$$\text{เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF-}\alpha = 100 \times (1 - (\text{สารละลายตัวอย่าง} \div \text{ตัวควบคุมลบ}))$$

เมื่อ สารละลายตัวอย่าง : ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ใส่น้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตร และ ตัวควบคุมลบ : ค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm จากน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ได้จากกลุ่มตัวแปรควบคุมลบ

การวิเคราะห์ทางสถิติ

การคำนวณค่าของข้อมูลที่ได้มาทั้งหมดผ่านโปรแกรมคำนวณทางสถิติ GraphPad Prism เวอร์ชัน 9.3.1 ด้วย Student's t-test with two-tailed distribution ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

ผลของค่าการดูดกลืนแสงของสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมของสารสกัดจากกัญชา ต่อระดับของสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α

ผลการทดลองน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมของสารสกัดจากกัญชา ต่อระดับของสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α โดยการกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง TNF- α ใน human monocytic cell line ชนิด THP-1 โดยการเติมลิโพพอลิแซ็กคาไรด์ บริสุทธิ์ และน้ำยาบ้วนปากสูตรต่าง ๆ แล้วบ่มไว้เป็นเวลา 3 ชม. 30 นาที ก่อนนำไปวิเคราะห์ด้วยวิธี ELISA พบว่า น้ำยาบ้วนปากทั้ง 7 สูตรมีความสามารถในการลดระดับสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมลบคือน้ำเกลือ 0.9% ที่มีค่าการดูดกลืนแสง เท่ากับ 0.94325 แต่หากเมื่อนำมาเทียบกับตัวแปรควบคุมบวก คือน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.3955 พบว่า 6 จาก 7 สูตร มีความสามารถในการลดสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้มากกว่า ยกเว้นสูตรน้ำยาบ้วนปากที่ 5 คือ น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.25 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 ที่ได้ค่าการดูดกลืนแสงที่ 0.47825 และนับเป็นสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีความสามารถในการลดสารสื่ออักเสบได้น้อยที่สุดในทั้ง 7 สูตร

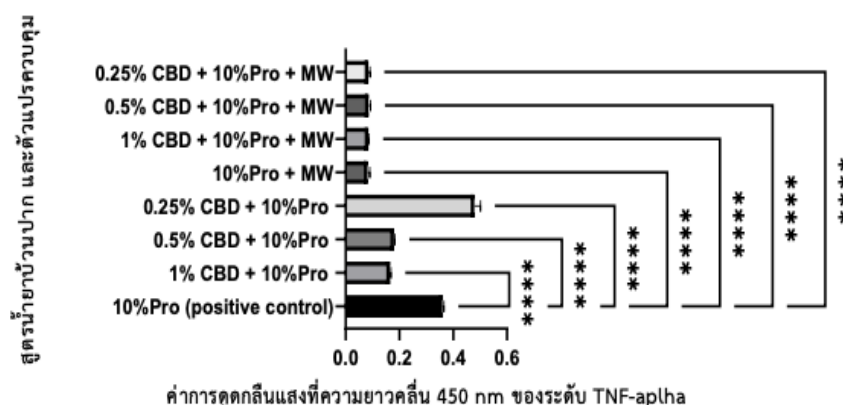
โดยพบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.25, น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก), น้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 2 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.5, น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก), น้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 3 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 1, น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่นๆของน้ำยาบ้วนปาก) และน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 4 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่น ๆ ของน้ำยาบ้วนปาก) มีความสามารถในการลดระดับสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้ใกล้เคียงกัน และมากที่สุด โดยค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.0847, 0.0848, 0.08415 และ 0.08175 ตามลำดับ

ส่วนน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 6 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.5 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10) และน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 7 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 1 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10) มีความสามารถในการลดสารสื่ออักเสบน้อยกว่า สูตรที่ 1, 2, 3, และ 4 แต่สูตรน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 6 มีความสามารถในการลดระดับสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้น้อยกว่าสูตรที่ 7 เล็กน้อย คือมีค่าการดูดกลืนแสงอยู่ที่ 0.1798 และ 0.16495 ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติพบว่า เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงของน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตร มาเทียบกับค่าที่ได้จากกลุ่มควบคุมบวก คือ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ปริมาณความเข้มข้น ร้อยละ 10 พบว่า น้ำยาบ้วนปากทุกสูตรยกเว้นสูตรที่ 5 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 0.25 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10) มีค่าการดูดกลืนแสง น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% แต่น้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 5 กลับมีค่าการดูดกลืนแสงที่มากกว่าตัวควบคุมบวกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% เช่นกัน (ตารางที่ 2 และภาพประกอบที่ 1)

ตารางที่ 2 แสดงผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm และเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1-7 และตัวแปรควบคุม ภายหลังการใส่สารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที

สูตร	ส่วนประกอบ	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง (OD)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α
1	0.25% CBD + 10%Pro + MW	0.08470	91.02%
2	0.5% CBD + 10%Pro + MW	0.08480	91.01%
3	1% CBD + 10%Pro + MW	0.08415	91.08%
4	10%Pro + MW	0.08175	91.33%
5	0.25% CBD + 10%Pro	0.47825	49.30%
6	0.5% CBD + 10%Pro	0.17980	80.94%
7	1% CBD + 10%Pro	0.16495	82.51%
8	10%Pro (positive control)	0.35955	61.88%



ภาพประกอบที่ 1 แผนภูมิแสดงผลค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 450 nm ของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1-7 และตัวแปรควบคุมบวก ภายหลังการใส่สารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที ค่าการดูดกลืนแสงที่ต่ำแสดงว่ามีระดับของ TNF- α ที่ต่ำลง จากแผนภูมิจะเห็นได้ชัดว่าเมื่อเทียบค่าการดูดกลืนแสงของตัวควบคุมบวกกับน้ำยาบ้วนปากสูตรต่าง ๆ พบว่าน้ำยาบ้วนปากทุกสูตรมีความสามารถในการลด TNF- α ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นสูตร 0.25% CBD + 10%Pro พบว่ามีความสามารถในการลด TNF- α ได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

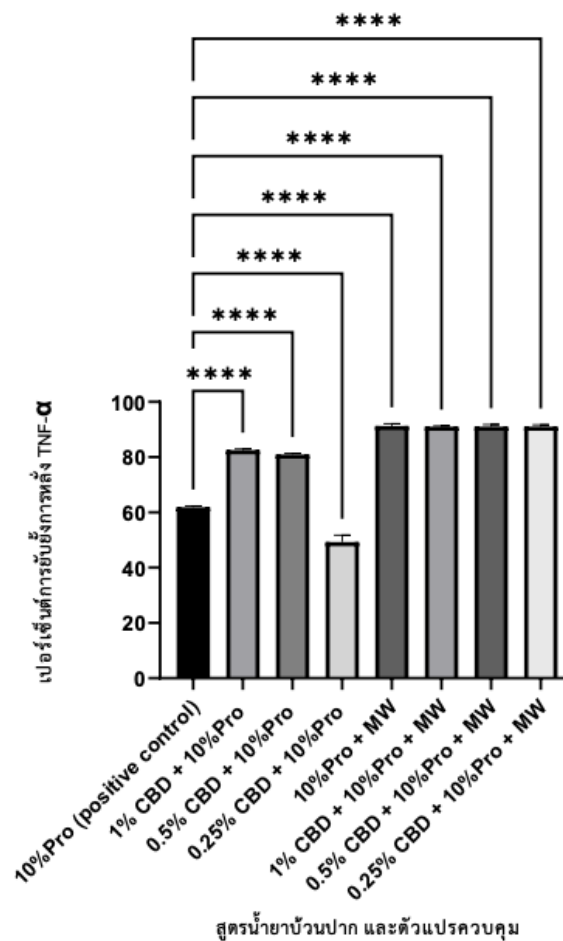
เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ของสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมของสารสกัดจากัญชา ต่อระดับของสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α

เมื่อนำค่าการดูดกลืนแสงมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α น้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1-4 มีความสามารถลดระดับสารสื่ออักเสบได้ใกล้เคียงกัน อยู่ที่ประมาณ 91% เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมที่เป็นน้ำเกลือ 0.9%

ส่วนน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 5 พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α อยู่ที่ 49.3% น้อยที่สุด และน้อยกว่าน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่เป็นตัวแปรควบคุมบวก ที่มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งอยู่ที่ 61.88%

และน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 7 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งสูงกว่าสูตรที่ 7 เล็กน้อย ที่ 82.51% และ 80.94% ตามลำดับ

เมื่อนำข้อมูลมาวิเคราะห์ทางสถิติก็ได้ผลวิเคราะห์ในทิศทางเดียวกับการวิเคราะห์ก่อนหน้านี้ กล่าวคือ เมื่อนำเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ของสูตรน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตรมาเทียบกับเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ของตัวควบคุมบวก พบว่าน้ำยาบ้วนปากทุกสูตรยกเว้นสูตรที่ 5 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบีไดออล ร้อยละ 0.25 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ที่มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติที่ระดับความเชื่อมั่น 95% (ตารางที่ 2 และภาพประกอบที่ 2)



ภาพประกอบที่ 2 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ของน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1-7 และตัวแปรควบคุมบวก ภายหลังจากใส่สารเป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที เปอร์เซ็นต์การยับยั้งที่สูง แสดงว่าสูตรน้ำยาบ้วนปากมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง TNF- α ที่มากขึ้น จากแผนภูมิจะเห็นได้ว่าเมื่อเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ของน้ำยาบ้วนปากสูตรต่างๆ กับตัวควบคุมบวก พบว่าน้ำยาบ้วนปากทุกสูตรมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ได้มากกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ยกเว้นสูตร 0.25% CBD + 10%Pro พบว่ามีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ได้น้อยกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$)

สรุปและอภิปรายผล

สารสื่ออักเสบชนิด TNF- α เป็นสารสื่ออักเสบ ที่หลั่งออกมาจาก Neutrophils และ Macrophage เพื่อกระตุ้นให้เกิดกระบวนการหายของแผล (Schwartz SI et al., 2015) การมีระดับของ TNF- α ทั้งเฉพาะที่ และในระบบที่สูงขึ้น มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เกิดการหายของแผลที่ช้าในคนได้ (Lassing AAD SI et al., 2019) หากสามารถลดระดับ TNF- α ที่มากเกินไปในระยะแรก ลงได้ก็จะสามารถลดภาวะแทรกซ้อนหลังการผ่าตัดลงได้ จากการทดลองสูตรน้ำยาบ้วนปากมีส่วนผสมของน้ำเลี่ยน

โพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมของสารสกัดจากกัญชา ทั้ง 7 สูตรพบว่า สามารถลดระดับ TNF- α ลงได้เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมลบ โดยเฉพาะสูตรที่ 1-4 สามารถลดระดับ TNF- α ได้ถึง 91 % สอดคล้องกับการศึกษาของ Ladda B และคณะในปี 2015 ที่พบว่าน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracasei* MSMC39-1 ที่แยกได้จากอุจจาระเด็กทารกแรกคลอดที่มีสุขภาพดี มีผลลดระดับ TNF- α ได้ รวมถึงงานวิจัยของ Masae R และคณะ ในปี 2017 และงานวิจัยของ Sun K-Y และคณะ ในปี 2017 ก็แสดงให้เห็นถึงความสามารถในการลดสารสื่ออักเสบชนิดนี้ลงได้

ในการศึกษาในครั้งนี้นอกเหนือจากน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracasei* MSMC39-1 ยังมีการใส่การใส่แคนนาบิไดออล เพื่อหวังผลถึงฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียซึ่งเป็นหนึ่งในสาเหตุที่ทำให้เกิดการหลังสารสื่ออักเสบได้ (Schwartz SI et al., 2015) โดยเฉพาะในคนไข้ที่ได้รับการศัลยกรรมช่องปากที่อาจจะไม่สามารถทำความสะอาดได้ดีพอ ซึ่งจะต้องมีการศึกษาต่อในคนไข้ต่อไปว่าจะสามารถลดระดับสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้ดีขึ้นหรือไม่เมื่อเทียบกับน้ำยาบ้วนปากสูตรอื่น ๆ

การศึกษาในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่าน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 และส่วนผสมของสารสกัดจากกัญชา มีความสามารถในการลดระดับสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้ในการทดลองใน human monocytic cell line ชนิด THP-1 และมีศักยภาพในการนำไปประยุกต์ใช้ทางคลินิกได้ต่อไป โดยพบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 4 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10 และส่วนประกอบอื่นๆของน้ำยาบ้วนปาก) มีความสามารถในการลดระดับ TNF- α ได้มากที่สุด และน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 5 (น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมแคนนาบิไดออล ร้อยละ 0.25 และน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ร้อยละ 10) มีความสามารถในการลดระดับ TNF- α ได้น้อยที่สุด

เอกสารอ้างอิง

- Schwartz, S. I., Brunickardi, F. C., Andersen, D. K., & Billiar, T. R. (2015). Schwartz's principles of surgery (10th ed.. ed.): New York : McGraw-Hill Education
- Darawade, D. A., Kumar, S., Mehta, R., Sharma, A. R., & Reddy, G. S. (2014). In search of a better option: dexamethasone versus methylprednisolone in third molar impaction surgery. Journal of international oral health : JIOH, 6(6)
- Susarla, S. M., Blaeser, B. F., & Magalnick, D. (2003). Third molar surgery and associated complications. Oral Maxillofac Surg Clin North Am, 15(2), 177-186. doi:10.1016/s1042-3699(02)00102-4.
- Sinno, H., & Prakash, S. (2013). Complements and the Wound Healing Cascade: An Updated Review. Plastic Surgery International, 2013. doi:10.1155/2013/146764



- Ashcroft, G. S., Jeong, M. J., Ashworth, J. J., Hardman, M., Jin, W., Moutsopoulos, N., . . . Wahl, S. M. (2012). Tumor necrosis factor- α (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair and Regeneration*, 20(1), 38-49. doi:10.1111/j.1524-475X.2011.00748.x
- Lassig, A. A. D., Lindgren, B. R., Itabiyi, R., Joseph, A. M., & Gupta, K. (2019). Excessive inflammation portends complications: Wound cytokines and head and neck surgery outcomes. *Laryngoscope*, 129(7), E238-E246. doi:10.1002/lary.27796
- Mileti, E., Matteoli, G., Iliev, I. D., & Rescigno, M. (2009). Comparison of the Immunomodulatory Properties of Three Probiotic Strains of Lactobacilli Using Complex Culture Systems: Prediction for In Vivo Efficacy (Immunomodulatory Probiotics). *PLoS ONE*, 4(9), e7056. doi:10.1371/journal.pone.0007056
- FAO/WHO. (2002). Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food.
- Masae, R., Kazuyoshi, K., Emi, K., Hiromasa, T., Keiko, I., Yoshimichi, I., . . . Masahiro, T. (2017). Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *Journal of Dermatology and Dermatologic Surgery*, 21(1), 14-19. doi:10.1016/j.jdds.2016.09.001
- Sun, K.-Y., Xu, D.-H., Xie, C., Plummer, S., Tang, J., Yang, X. F., & Ji, X. H. (2017). Lactobacillus paracasei modulates LPS-induced inflammatory cytokine release by monocyte-macrophages via the up-regulation of negative regulators of NF-kappaB signaling in a TLR2-dependent manner. *Cytokine (Philadelphia, Pa.)*, 92, 1-11. doi:10.1016/j.cyto.2017.01.003
- Wasim, K., Haq, I., & Ashraf, M. (1995). Antimicrobial studies of the leaf of cannabis sativa L. *Pak J Pharm Sci*, 8(1), 29-38.
- Appendino, G., Gibbons, S., Giana, A., Pagani, A., Grassi, G., Stavri, M., . . . Rahman, M. M. (2008). Antibacterial cannabinoids from Cannabis sativa: a structure-activity study. *J Nat Prod*, 71(8), 1427-1430. doi:10.1021/np8002673
- Soni, D., Smoum, R., Breuer, A., Mechoulam, R., & Steinberg, D. (2015). Effect of the synthetic cannabinoid HU-210 on quorum sensing and on the production of quorum sensing-mediated virulence factors by *Vibrio harveyi*. *BMC Microbiol*, 15, 159. doi:10.1186/s12866-015-0499-0



- Basavaraju, M., Sisnity, V. S., Palaparthi, R., & Addanki, P. K. (2016). Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms. *Journal of Dental Sciences*, 11(4), 349-352. doi:<https://doi.org/10.1016/j.jds.2016.02.002>
- Ladda, B., Theparee, T., Chimchang, J., Tanasupawat, S., & Taweechotipatr, M. (2015). In vitro modulation of tumor necrosis factor [alpha] production in THP-1 cells by lactic acid bacteria isolated from healthy human infants. *Anaerobe*, 33, 109.