บทที่ 4

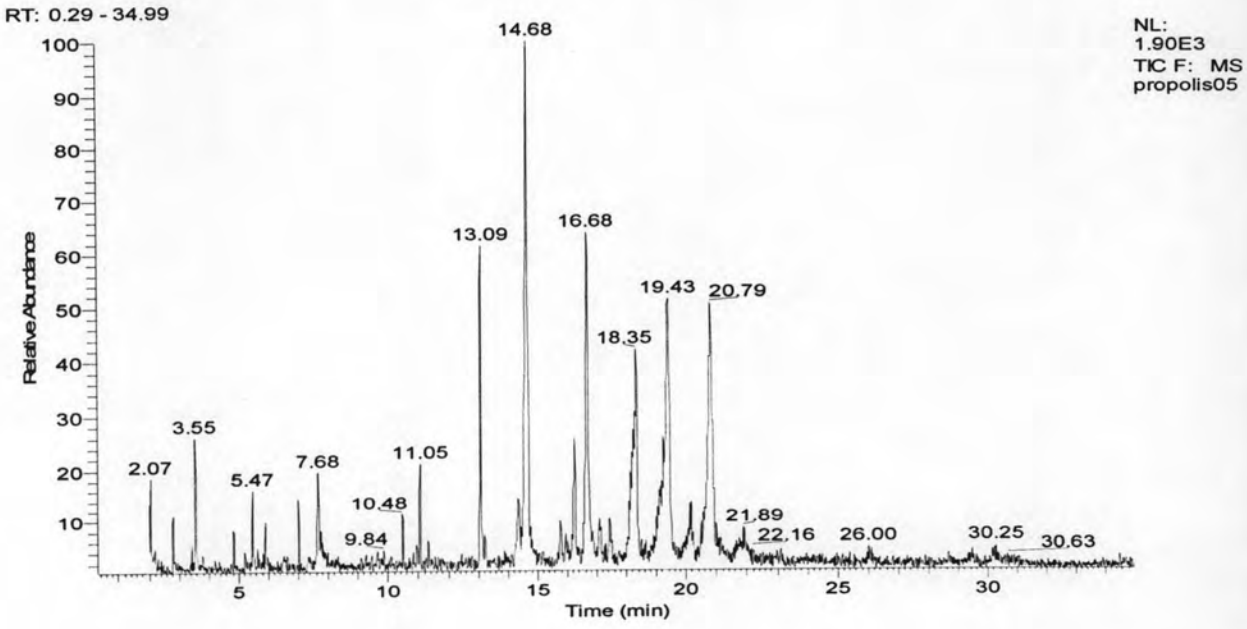
ผลการวิจัย

Results

4.1 ผลการสกัดพรอโพลิสไทยด้วยเอทานอล และ การทำ finger print

จากการสกัดพรอโพลิสไทยน้ำหนัก 600 กรัม ด้วยเอทานอล ได้สารสกัดออกมาเป็นสารหนืดสีดำมีกลิ่นเฉพาะ น้ำหนัก 528 กรัม ดังนั้นคิดเป็นเปอร์เซ็นต์ของสารที่สกัดได้ (%yield) 88% จากพรอโพลิสไทยทั้งหมด ซึ่งในการสกัดนี้เป็นการกำจัดสิ่งที่มีปนมากับพรอโพลิส ไม่ว่าจะเป็นเกสรดอกไม้ เศษของแมลงต่างๆ รวมทั้งสารที่ไม่สามารถละลายได้ในเอทานอล

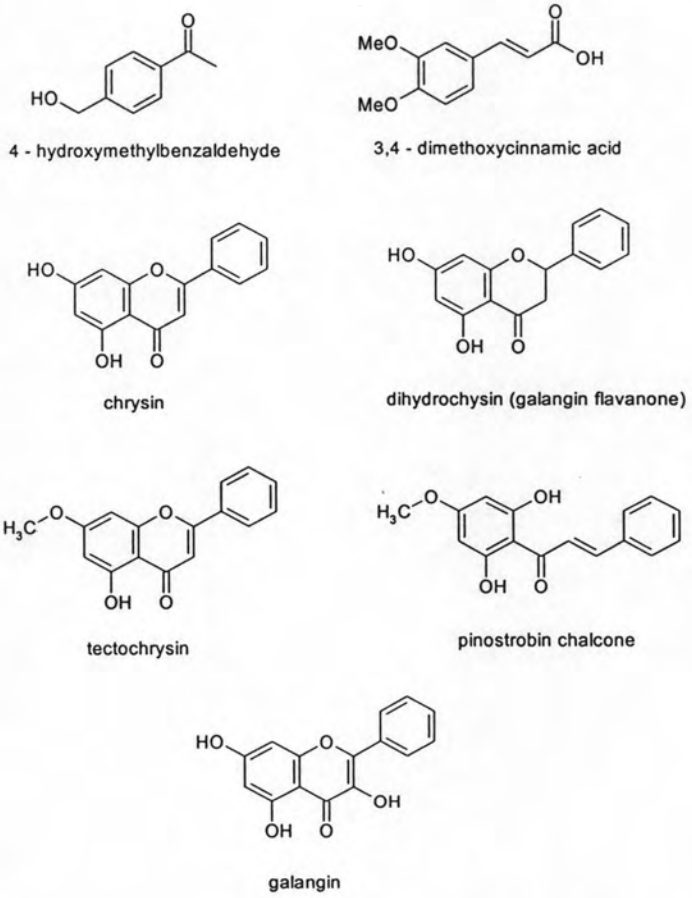
จากการทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยด้วยวิธีการ GC/MS (Gas chromatography / mass spectrometry) ด้วยการละลายสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย 0.1 กรัมในสารละลายเมทานอล 1 มิลลิลิตร และใช้แก๊สอีเลียมเป็นตัวพาที่ flow rate 1 ml/ min จะได้ chromatogram ดังรูปที่ 16



ภาพที่ 16 แสดง chromatogram ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย

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 เปรียบเทียบกับยาต้านการอักเสบ indomethacin

4.2 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ในการยับยั้งอาการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan

ในการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบเมื่อกระตุ้นให้อุ้งเท้าของหนูบวมด้วย 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 และนำค่าที่ได้คำนวณหาปริมาตรการบวมของอุ้งเท้าหนู (volume of edema) และ %inhibition

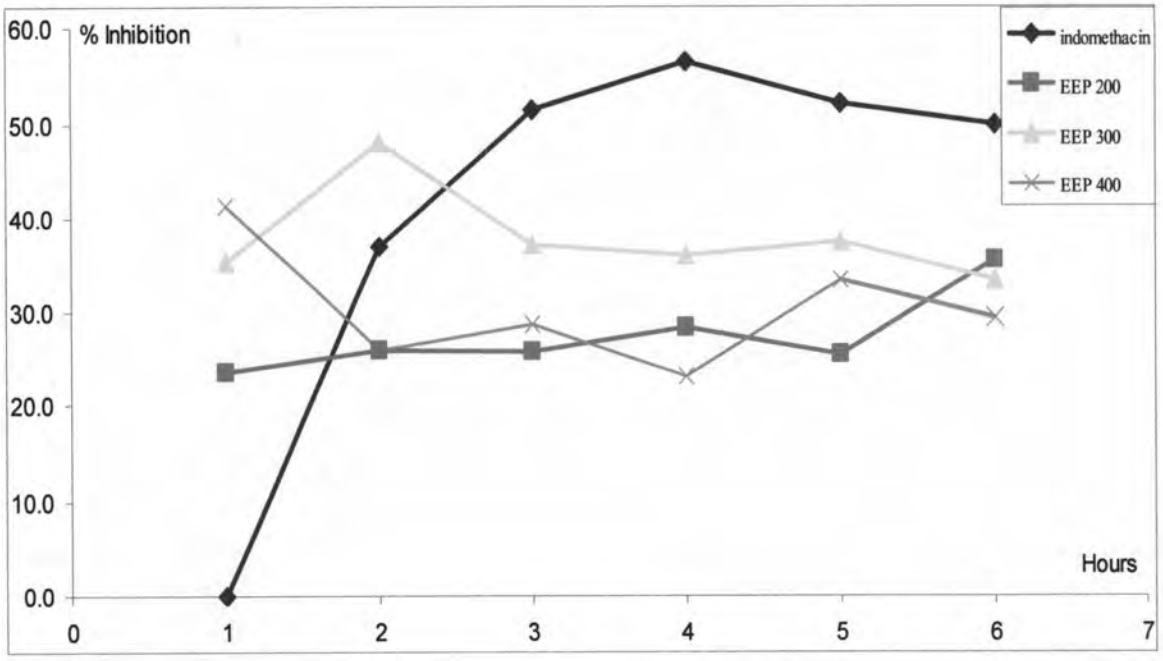
จากผลการทดลองพบว่ายา indomethacin สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 3 หลังจากฉีด carrageenan โดยยับยั้งการบวมได้สูงสุดที่ชั่วโมงที่ 4 (56.4%) พรอโพลิสไทยที่ขนาด 200 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูได้อย่างมีนัยสำคัญโดยเริ่มตั้งแต่ชั่วโมงที่ 5 หลังจากฉีด 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

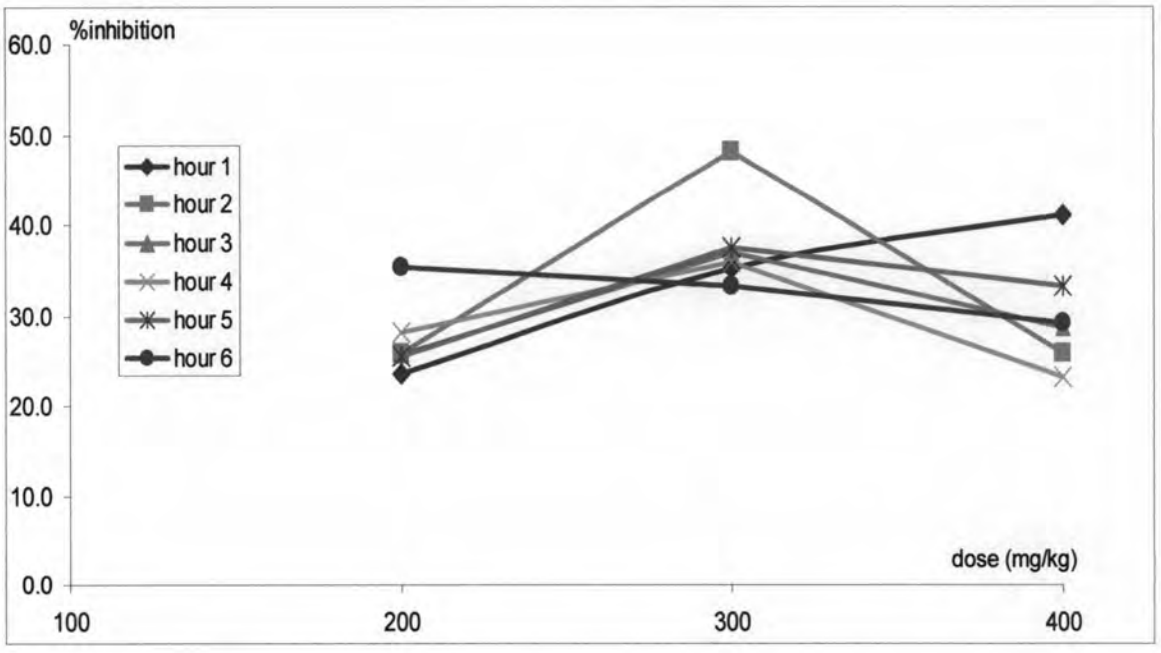
	Paw edema ± S.E.M.(%Inhibition)					
	ชม 1	ชม 2	ชม 3	ชม 4	ชม 5	ชม 6
negative control DMSO	0.17 ± 0.03	0.27 ± 0.03	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.04	0.48 ± 0.03	0.48 ± 0.04
positive control indomethacin 5 mg/ml	0.17 ± 0.03 (0.0)	0.17 ± 0.03 (37.0)	0.17 ± 0.03 (51.4)***	0.17 ± 0.03 (56.4)***	0.23 ± 0.03 (52.1)***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

ค่าแสดงเป็นค่า mean ± 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

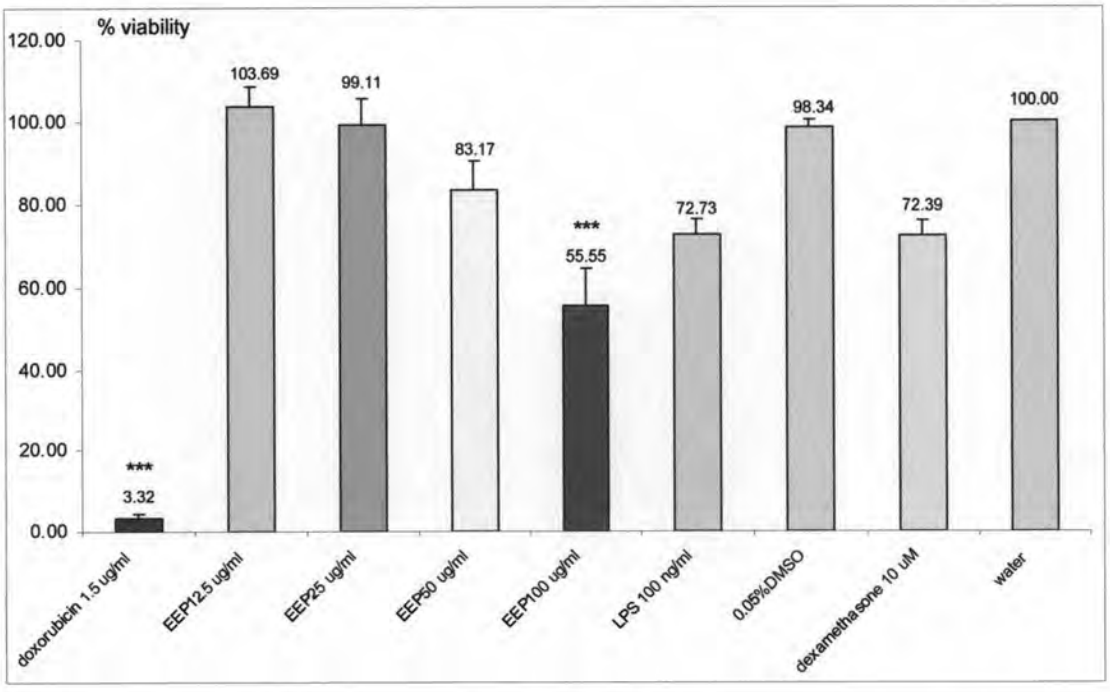


ภาพที่ 19 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ขนาด 200, 300 และ 400 mg/kg และค่าการยับยั้งการการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย carrageenan ที่เวลาต่างๆ

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

4.3 ผลการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย

ในการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยโดยใช้วิธีการวัดด้วย MTT พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นสูงสุดคือ 100 μg/ml มีผลทำให้ %viability ของเซลล์ลดลงอย่างมีนัยสำคัญ ดังแสดงในภาพที่ 20 แสดงว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นสูง 100 μg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์ RAW 264.7 แต่ที่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยความเข้มข้นต่ำกว่า 100 μg/ml ไม่มีผลต่อ %viability ของเซลล์



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

ค่าแสดงเป็นค่า mean ± 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

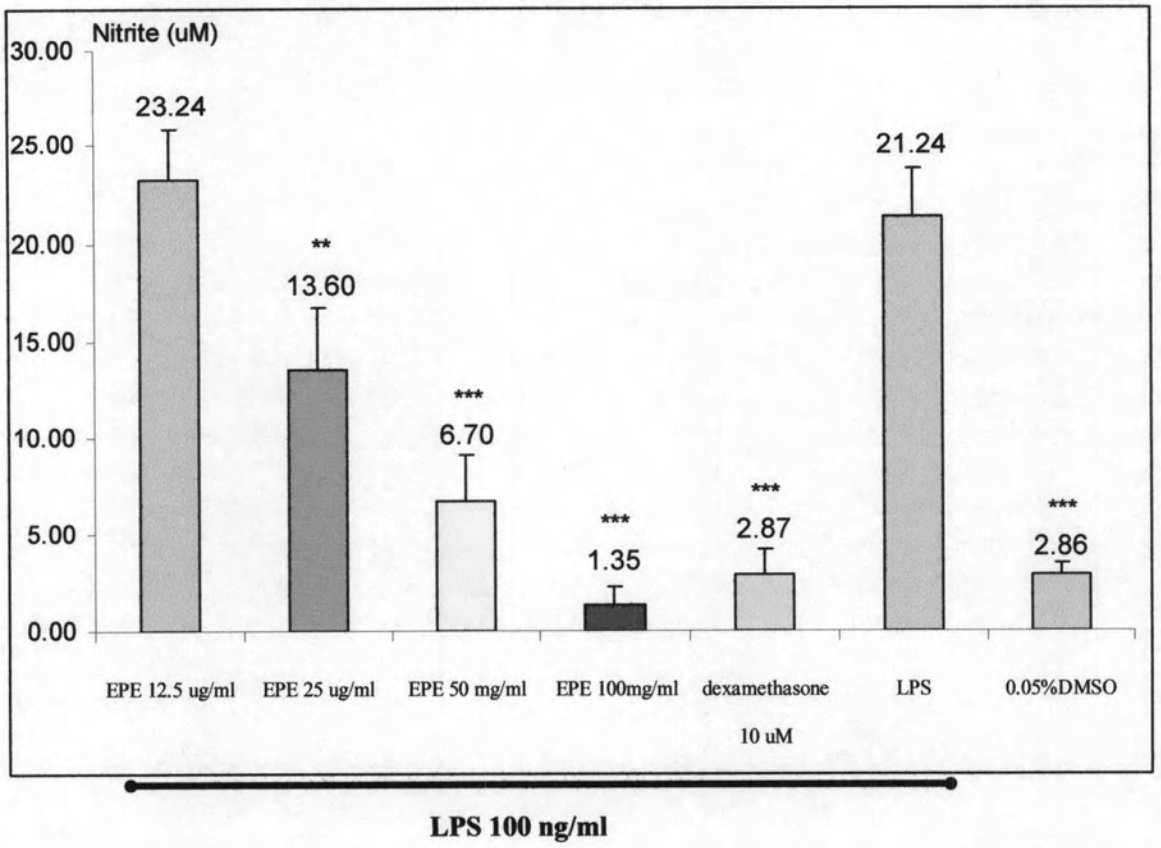
เมื่อเปรียบเทียบสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยกับยา dexamethasone ซึ่งวัดปริมาณ nitrite ได้ 2.87 ± 1.32 μM พบว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 μg/ml ยังไม่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้เทียบเท่ากับยา dexamethasone 10 μM ได้ ดังแสดงในภาพที่ 21 และ 22

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

	NO_2^- (μM)	%inhibition
0.05% DMSO	2.86 ± 0.57 ***	-
EEP 12.5 μg/ml + LPS	23.24 ± 2.59	-9.9 ± 3.59
EEP 25 μg/ml + LPS	13.60 ± 3.16 **	38.9 ± 9.27
EEP 50 μg/ml + LPS	6.70 ± 2.45 ***	71.6 ± 8.78
EEP 100 μg/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	-

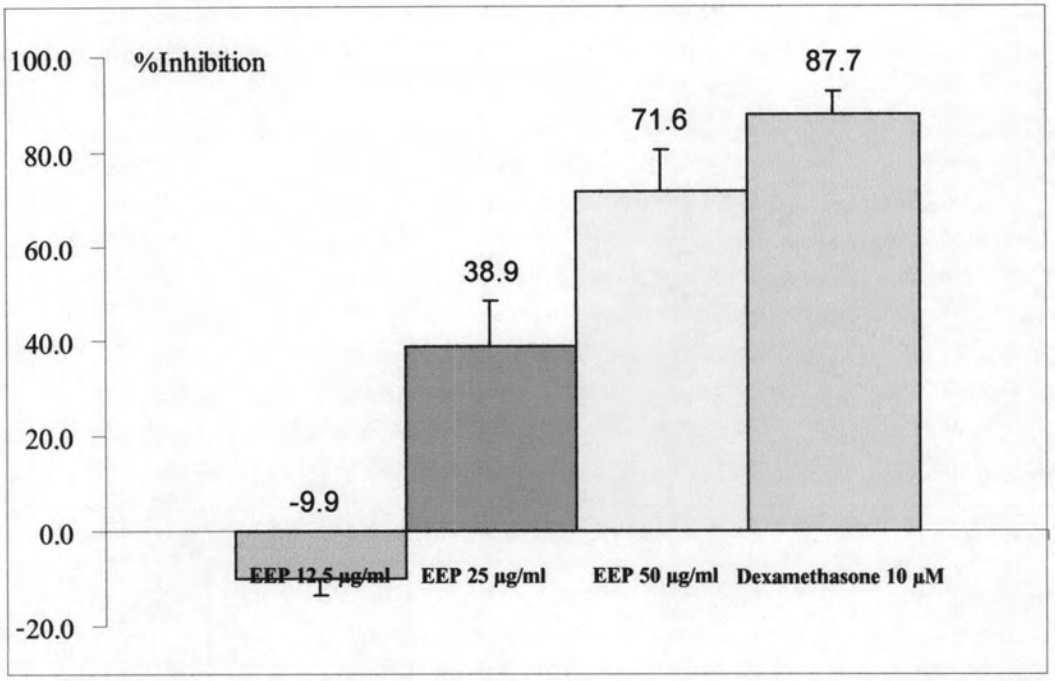
ค่าแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M., n = 5

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

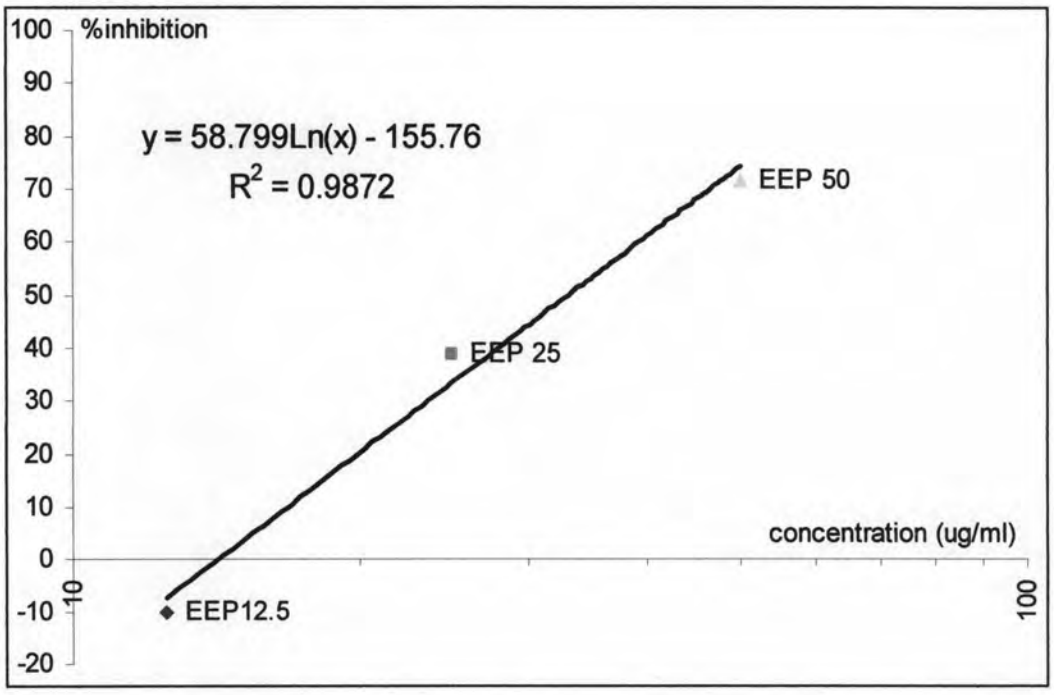


ภาพที่ 21 แสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ nitrite ที่เกิดขึ้นเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ dexamethasone 10 μM

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



ภาพที่ 23 แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 µg/ml และค่าการยับยั้งการหลั่ง NO (%inhibition)

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

IC_{50} = ความเข้มข้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่สามารถยับยั้งการหลั่ง NO ได้ 50 %

ดังนั้น แทนค่า Y = 50% ในสมการ y = 58.799ln(x) – 155.76 เพื่อหาค่า X ซึ่งก็คือค่า IC_{50} ได้ค่า IC_{50} = 33.1 µg/ml

เพราะฉะนั้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 33.1 µg/ml จะสามารถยับยั้งการหลั่งของ NO ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้ 50 %

4.5 ผลการศึกษาฤทธิ์ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ในการยับยั้งการสร้าง 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 μg/ml + LPS
กลุ่มที่ 4 ให้ EEP 25 μg/ml + LPS
กลุ่มที่ 5 ให้ EEP 50 μg/ml + LPS
กลุ่มที่ 6 ให้ยา dexamethasone 10 μM + LPS

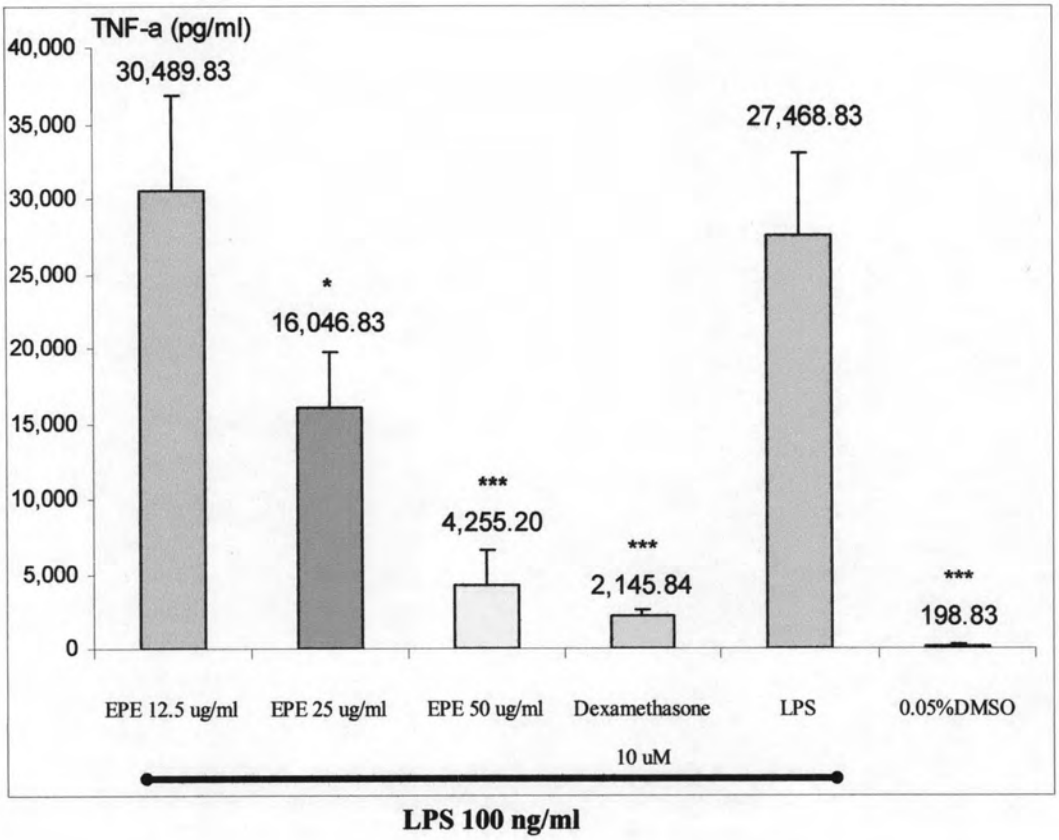
ผลที่ได้จากการทดลองพบว่าในกลุ่มที่เป็น negative control ก็สามารถหลั่ง TNF – α ได้ ทำให้ base line ของ TNF – α เป็น 198.83 ± 29 pg/ml เมื่อกระตุ้นเซลล์ด้วย LPS สามารถกระตุ้นการหลั่งของ TNF – α ได้ 27,468.83 ± 5483 pg/ml และเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยก่อนการกระตุ้นด้วย LPS พบว่า EEP ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 μg/ml มีการหลั่ง TNF – α ได้ pg/ml 16,046.83 ± 3627 และ 4,255.20 ± 2381pg/ml ตามลำดับ ซึ่งปริมาณ TNF – α ที่วัดได้ลดลงกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS อย่างมีนัยสำคัญ แต่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 μg/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 μg/ml + LPS	30,489.83 ± 6428	-11.0 ± 23.3
EEP 25 μg/ml + LPS	16,046.83 ± 3627 *	41.6 ± 13.1
EEP 50 μg/ml + LPS	4,255.20 ± 2381 ***	84.5 ± 8.6
dexamethasone 10 μM + LPS	2,145.84 ± 501 ***	92.2 ± 1.6
LPS 100 ng/ml	27,468.83 ± 5483	-

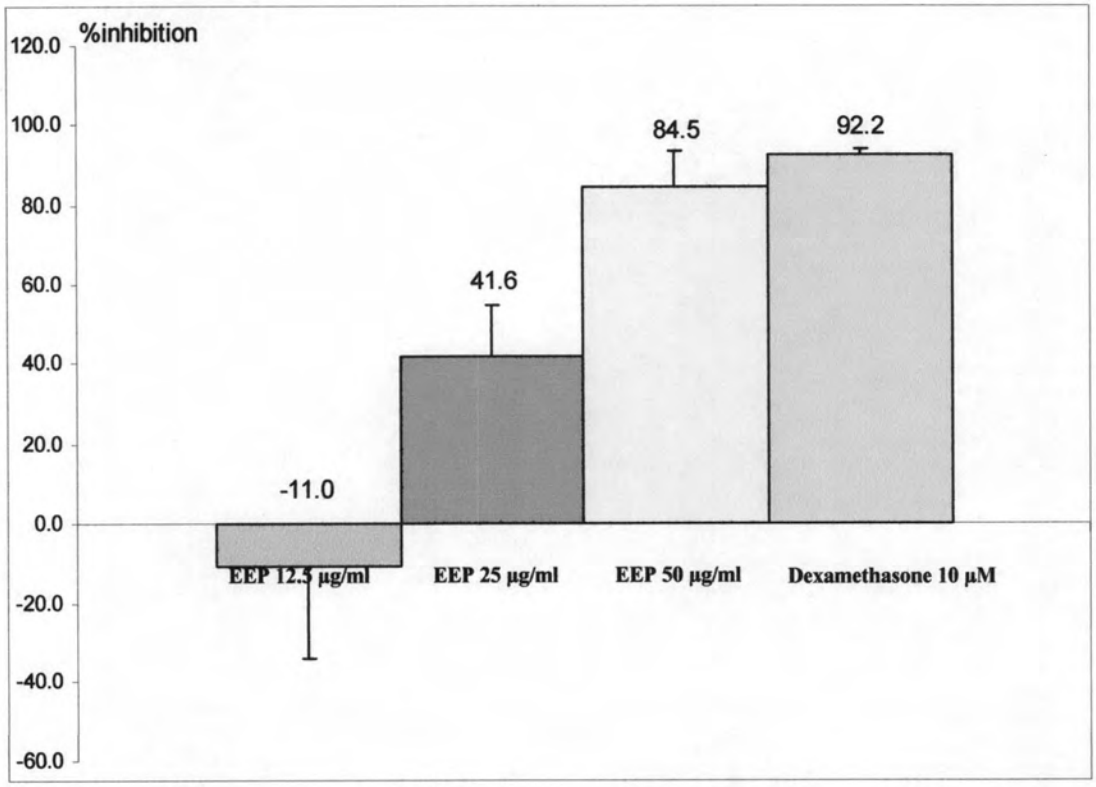
ค่าแสดงเป็นค่า mean ± S.E.M., n = 6

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

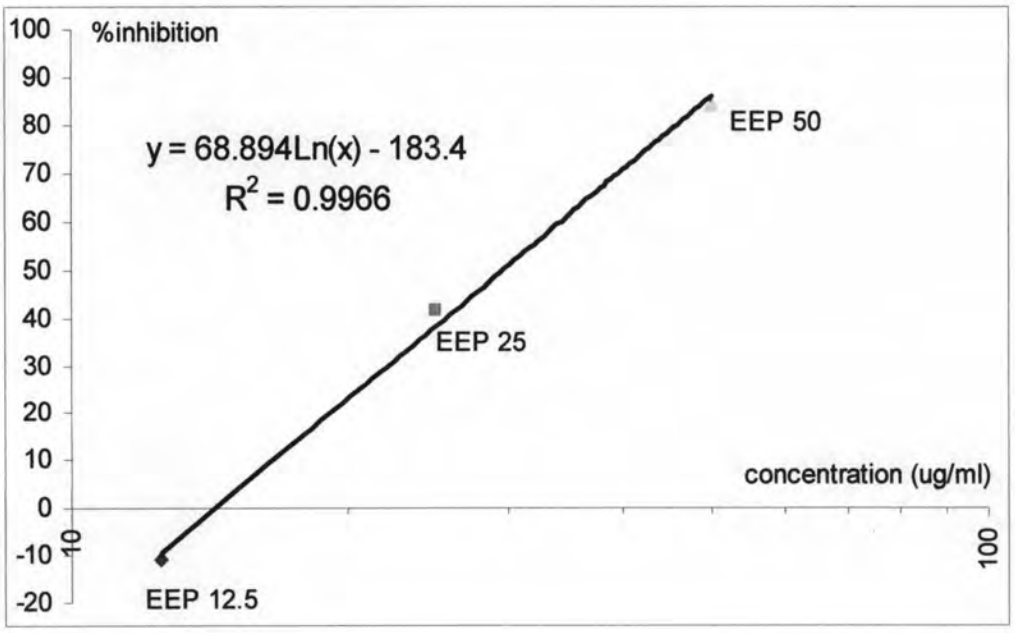


<u>ภาพที่ 24</u> แสดงแสดงค่าเฉลี่ยปริมาณ TNF - α ที่เกิดขึ้นเมื่อให้สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้นต่างๆ และ dexamethasone 10 μM

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



ภาพที่ 25 แสดงการยับยั้งการหลั่ง TNF - α (%inhibition) ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25, 50 µg/ml และยา dexamethasone 10 µM



<u>ภาพที่ 26</u> แสดงความสัมพันธ์ระหว่างสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 12.5, 25 และ 50 µg/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 = 68.894ln(x) – 183.4 เพื่อหาค่า X ซึ่งก็คือค่า IC_{50} ได้ค่า IC_{50} = 29.60 µg/ml

เพราะฉะนั้นสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 29.60 µg/ml จะสามารถยับยั้งการหลั่งของ TNF - α ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้ 50 %