บทที่ 5

อภิปรายและสรุปผลการวิจัย

Discussion and Conclusion

พรอโพลิส (Propolis) หรือกาวผึ้ง (bee glue) เป็นสิ่งที่ได้จากรังผึ้ง มีลักษณะเป็นของแข็ง สีเข้ม ผึ้งจะใช้พรอโพลิส ในการป้องกันรังจากความชื้น เสริมสร้างความแข็งแรงของรัง แต่ไม่เพียงเท่านั้นผึ้งยังใช้ประโยชน์จากพรอโพลิสในการปกป้องรังจากเชื้อจุลชีพต่างๆ (pathogen microorganisms) จนเรียกได้ว่าเป็น "chemical weapon" และด้วยประโยชน์เหล่านี้ จึงทำให้ในสมัยโบราณมีการนำมาใช้เป็นยาในการรักษาโรคเช่น ใช้ในการรักษาแผล หรือ แผลไฟไหม้ รักษาอาการแผลในช่องปากและลำคอ รักษาแผลในกระเพาะอาหาร เป็นต้น ด้วยเหตุนี้จึงทำให้มีการศึกษาฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของพรอโพลิสอย่างกว้างขวางเช่น ฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพต่างๆ (เชื้อแบคทีเรีย, เชื้อรา, เชื้อไวรัส) ฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระ ฤทธิ์ในการต้านมะเร็ง ฤทธิ์ในการป้องกันการทำลายตับ เป็นต้น รวมถึงฤทธิ์ในการต้านการอักเสบ (anti-inflammation) ด้วย และการศึกษาทางเคมีของพรอโพลิส พบว่ามีองค์ประกอบทางเคมีอยู่มากมาย อีกทั้งมีความหลากหลายขององค์ประกอบ ขึ้นอยู่กับชนิดของพืชที่ผึ้งเก็บมาเพื่อใช้ในการสร้างพรอโพลิส ดังนั้นจึงทำให้ฤทธิ์ต่างๆนั้นมีความแตกต่างกันไปตามแหล่งที่มาของพรอโพลิส ด้วย [44,45,46]

สำหรับพรอโพลิสที่ใช้ในการศึกษาวิจัยครั้งนี้เป็นพรอโพลิสที่ได้จากประเทศไทย แหล่งที่เลี้ยงผึ้งเป็นสวนลำไย ในจังหวัดเชียงใหม่ เมื่อนำมาทำการสกัดโดยใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลาย ได้สิ่งสกัดคิดเป็นเปอร์เซ็นต์เมื่อเทียบกับน้ำหนักของ propolis เริ่มต้น (%yield) เท่ากับ 88% และจากการทำการวิเคราะห์หาองค์ประกอบทางเคมีของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย (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 บัลกาเรีย อิตาลี และสวิสเซอร์แลนด์พบว่าองค์ประกอบ

ของพรอโพลิสจากทั้ง 3 ประเทศมีความแตกต่างกัน เช่น พรอโพลิสของประเทศบัลกาเรียและอิตาลี พบสาร chrysin แต่พรอโพลิสของประเทศสวิสเซอร์แลนด์ไม่พบสาร chrysin เป็นต้น จากที่กล่าวข้างต้นแสดงว่าแหล่งของพรอโพลิสที่ต่างกันก็จะมีองค์ประกอบทางเคมีที่ต่างกันด้วย 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) เป็นรูปแบบของการศึกษาสารที่นำมาใช้ยับยั้งการอักเสบแบบเฉียบพลันที่นิยมใช้มาก 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 รวมทั้งหลั่ง neutrophil derived mediators [49, 50]

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

บวมได้สูงกว่าขนาด 200 และ 400 mg/kg แต่อย่างไรก็ตามการฤทธิ์ในการยับยั้งการบวมของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ยังไม่เทียบเท่ากับยาต้านอักเสบ indomethacin ที่มีฤทธิ์ยับยั้งการอักเสบได้สูงสุดถึง 56.4 % ดังแสดงในภาพที่ 17 ดังนั้นจากการที่สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยสามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูซึ่งเป็นการอักเสบแบบเฉียบพลันได้นั้น น่าจะเกี่ยวข้องกับการยับยั้งสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบดังที่กล่าวไว้ข้างต้นได้

ในการศึกษาความเป็นพิษของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยด้วย MTT พบว่า สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 100 μg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์อย่างมีนัยสำคัญ ทำให้เซลล์มี %viability เหลือเพียง 55.55% (เมื่อเทียบกับน้ำกลั่น) จึงกล่าวได้ว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้นสูงกว่า 100 μg/ml มีความเป็นพิษต่อเซลล์ macrophage แต่ที่ความเข้มข้นที่ต่ำกว่าคือ 12.5, 25 และ 50 μg/ml ไม่มีผลต่อเซลล์ ดังนั้นในการศึกษาจึงเลือกความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ตั้งแต่ 12.5 – 50 μg/ml ในการศึกษาผลต่อการหลั่ง NO และ TNF-α

macrophage เป็นเซลล์ที่มีความสำคัญมากในระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย ในการกระตุ้นเซลล์ macrophage ด้วย lipopolysaccharide (LPS) หรือ IFN – γ จะทำให้มีการหลั่งสารต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบเช่น TNF - α, IL-1β, 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 NF-κB ให้มีการหลั่ง คือ TNF-α, IL-1β, IL-6, NO เป็นต้น โดยในการหลั่ง TNF-α จะมีผลทำให้เกิดการกระตุ้นให้มีการหลั่ง cytokine ตัวอื่นๆที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบทำให้เกิดการอักเสบต่อเนื่องไปจนอาจทำให้เกิด tissue injury, organ dysfunction และ potentially death ได้ ดังนั้นในการศึกษาครั้งนี้จึงสนใจในการศึกษาฤทธิ์การยับยั้ง pro-inflammatory mediators ที่สำคัญคือ TNF-α และ NO ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย โดยกระตุ้นให้เซลล์มีการหลั่งสาร mediators เหล่านั้นด้วย LPS

ผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลที่มีต่อการหลั่ง NO พบว่า สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ความเข้มข้น 25, 50 μg/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) ส่วนสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 μg/ml ไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง

NO ได้ อีกทั้งยังกระตุ้นการหลั่ง NO คือทำให้มีการหลั่ง NO ในปริมาณที่มากกว่ากลุ่มที่กระตุ้นด้วย LPS (พรอโพลิสไทยมีปริมาณ NO_2^- = 23.24 ± 2.59 LPS มีปริมาณ NO_2^- = 21.24 ± 2.47) แต่การกระตุ้นนั้นไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ จากผลที่ได้ทำการคำนวณหาความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ NO ได้ 50% (IC_{50}) คือ 33.1 μg/ml และสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยสามารถยับยั้งการหลั่ง TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญ ที่ความเข้มข้น 25, 50 μg/ml (%inhibition = 41.6 ± 13.0 และ 84.5 ± 8.6 ตามลำดับ) แต่ไม่เทียบเท่ายา dexamethasone (%inhibition = 92.2 ± 1.6) ส่วนสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 μg/ml ไม่สามารถลดปริมาณการหลั่ง TNF-α แต่มีการกระตุ้นให้มีการหลั่ง TNF-α เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ให้ LPS (พรอโพลิสไทยที่ความเข้มข้น 12.5 μg/ml มีการหลั่ง TNF-α = 30,489.83 ± 6428 LPSมีการหลั่ง TNF-α = 27,468.83 ± 5483) เมื่อทำการคำนวณหาความเข้มข้นของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่สามารถยับยั้งการหลั่งของ TNF-α ได้ 50% (IC_{50}) คือ 29.60 μg/ml ซึ่งผลของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยที่มีต่อการหลั่งของ TNF-α มีแนวโน้มในทางเดียวกับผลต่อหลั่งของ NO ด้วย

จากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยสามารถยับยั้งการหลั่ง pro-inflammatory cytokine คือ TNF-α ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบที่สำคัญ โดยสารดังกล่าวจะกระตุ้นให้มีการสร้าง phospholipase A_2, cyclooxygenase–2, iNOS รวมทั้งกระตุ้นให้มีหลั่ง cytokine อื่นๆ ตามมา เป็นผลให้เกิดการอักเสบมากยิ่งขึ้น ดังนั้นการยับยั้งการหลั่ง TNF-α จึงมีส่วนในการช่วยยับยั้งการอักเสบได้ ดังแสดงในภาพที่ 11 ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการใช้ในการต้านการอักเสบได้เป็นอย่างดี ซึ่งสอดคล้องกับผลการทดลองที่พบว่าสามารถยับยั้งการหลั่งปริมาณของ NO ได้

สรุปการทดลองในสัตว์ทดลอง (*in vivo*) สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 200, 300, และ 400 mg/kg สามารถยับยั้งการบวมของอุ้งเท้าหนูที่กระตุ้นด้วย 1% carrageenan ได้อย่างมีนัยสำคัญ และ การทดลองในหลอดทดลอง (*in vitro*) สิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ที่ความเข้มข้น 25 และ 50 μg/ml สามารถยับยั้งการหลั่ง NO และ TNF – α จากเซลล์ macrophage ที่กระตุ้นด้วย LPS 100 ng/ml ได้อย่างมีนัยสำคัญ แต่ผลการทดลองทั้งใน *in vivo* และ *in vitro* ของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย ไม่สามารถยับยั้งการอักเสบได้เทียบเท่ากับยาต้านการอักเสบมาตรฐาน และจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่าสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทยสามารถยับยั้งการหลั่ง NO และ TNF-α ได้อย่างมีนัยสำคัญที่ความเข้มข้นสูง (25, 50 μg/ml) แต่ที่ความเข้มข้นต่ำ 12.5 μg/ml พบว่าสามารถกระตุ้นการหลั่งของ mediators ได้

จึงอาจเป็นได้ว่าสิ่งสกัดที่ความเข้มข้นสูงสามารถมีฤทธิ์ในการยับยั้งการอักเสบ และที่ความเข้มข้นต่ำมีฤทธิ์ในการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulation)

ข้อเสนอแนะ

เนื่องจากการศึกษาในครั้งนี้แนวโน้มของสิ่งสกัดด้วยเอทานอลของพรอโพลิสไทย มีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบได้ดี ดังนั้นจึงสมควรที่จะนำไปศึกษาต่อเนื่องไปเพื่อให้สามารถได้เป็นยาชนิดใหม่ที่ได้จากสมุนไพร โดยแนวทางในการศึกษาในขั้นต่อไปเช่น

1. ศึกษาถึงองค์ประกอบทางเคมีอย่างละเอียดและนำองค์ประกอบแต่ละชนิดที่มีแนวโน้มจะเป็นสารสำคัญในการออกฤทธิ์มาศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบต่อไป
2. ทำการทดสอบฤทธิ์ต้านการอักเสบที่มีของสมุนไพรว่าสามารถยับยั้ง arachidonic acid metabolism โดยพิจารณาเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ได้เช่นเดียวกันกับยาประเภท NSAIDs หรือไม่
3. ศึกษาถึงกลไกในการเพิ่ม anti-inflammatory cytokine เช่น IL-4, IL-10, IL13 ซึ่งมีฤทธิ์ตรงข้ามกับ pro-inflammatory cytokine TNF – α ซึ่งได้ทำการศึกษาในการวิจัยครั้งนี้