

EFFECTIVENESS OF PROBIOTIC MOUTHWASH CONTAINING CANNABIS EXTRACTS AND PROPOLIS ON THE REDUCTION OF TUMOR NECROSIS FACTOR-ALPHA INFLAMMATORY CYTOKINE

Nattaya SUETRONGTRAKOOL¹, Malai TAWEECHOTIPATR² and Sorasun RUNGSIYANONTE^{3*}

1 Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Thailand; sorasun@g.swu.ac.th (Corresponding Author)

2 Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University, Thailand

3 Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Thailand

ARTICLE HISTORY

Received: 2 June 2023

Revised: 21 June 2023

Published: 3 July 2023

ABSTRACT

The objective of this research was to compare the effectiveness of probiotic mouthwash formulation with cannabis extracts (CBD) and propolis on the reduction of tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels. Four different probiotic mouthwash formulations were prepared by adding the cannabis extract (CBD), Propolis and both. The in vitro study was performed using type THP-1 monocytic cells, producing TNF- α activated by lipopolysaccharide (LPS). The reduction of TNF- α was then measured by Sandwich ELISA technique. Results showed that all 4 formulations show an effective reduction of TNF- α level. The formulation of probiotics with 1% propolis, probiotics with 1% CBD and 1% propolis, and the formulation of probiotics with 1% CBD and 5% propolis show the percentage of TNF- α inhibition more than 90% when compared with the control group. While the optimal formulation was probiotics with 5% propolis shows the TNF- α inhibition statistically significant ($p < 0.05$) when compared with probiotic mouthwash alone.

Keywords: Mouthwash, Probiotics, Propolis, Cannabis, TNF-alpha

CITATION INFORMATION: Suetrongtrakool, N., Taweechotipatr, M., & Rungsiyanonte, S. (2023). Effectiveness of Probiotic Mouthwash Containing Cannabis Extracts and Propolis on the Reduction of Tumor Necrosis Factor-Alpha inflammatory cytokine. *Procedia of Multidisciplinary Research*, 1(7), 52

ผลของน้ำยาบ้วนปากโพรบิโอดิก ผสมสารสกัดกัญชาและพรอพอลิส ในการลดสารสื่ออักเสบชนิดทูเมอร์เน็คโครซิสแฟคเตอร์อัลฟา

ณัฐญาณ์ ชื่อตรงตระกูล¹, มาลัย ทวีโชติภักดิ์² และ สรสิทธิ์ รังสิยานนท์^{3*}

1 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ; sorasun@g.swu.ac.th (ผู้ประพันธ์บรรณกิจ)

2 คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

3 คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

บทคัดย่อ

การวิจัยนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อเปรียบเทียบ ผลของน้ำยาบ้วนปากโพรบิโอดิก ที่มีส่วนผสมของกัญชา และ พรอพอลิส ในการลดสารสื่ออักเสบชนิดทูเมอร์เน็คโครซิสแฟคเตอร์อัลฟา (TNF- α) โดยเตรียมน้ำยาบ้วนปากโพรบิโอดิก สูตร ผสมสารสกัดกัญชา (CBD) สูตรผสมพรอพอลิส และสูตรผสมทั้งกัญชาและพรอพอลิส ทั้งหมด 4 สูตร เพื่อทดสอบในห้องปฏิบัติการ โดยทดสอบกับเซลล์โมโนไซต์ THP-1 ที่ถูกกระตุ้นให้เกิดการหลั่ง TNF- α ด้วยลิโพโพลิแซ็กคาไรด์ บริสุทธิ์ (LPS) และวัดความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง TNF- α ด้วยวิธี Sandwich ELISA และนำผลมาเปรียบเทียบกัน ผลวิจัยพบว่า น้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร ล้วนมีประสิทธิภาพในการลดการหลั่ง TNF- α ได้ดี โดยสูตรที่มีส่วนผสมของน้ำเลียงโพรบิโอดิก ผสมกับพรอพอลิสร้อยละ 1, สูตรน้ำเลียงโพรบิโอดิก, CBD ร้อยละ 1 และพรอพอลิสร้อยละ 1 และ สูตรน้ำเลียงโพรบิโอดิก, CBD ร้อยละ 1 และพรอพอลิสร้อยละ 5 มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้ง TNF- α มากกว่า ร้อยละ 90 เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และพบว่าสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลียงโพรบิโอดิก และ พรอพอลิสร้อยละ 5 มีประสิทธิภาพในการลดการหลั่ง TNF- α สูงที่สุด และมีประสิทธิภาพมากกว่าน้ำยาบ้วนปากจาก น้ำเลียงโพรบิโอดิกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

คำสำคัญ: น้ำยาบ้วนปาก, โพรบิโอดิก, พรอพอลิส, กัญชา, ทูเมอร์เน็คโครซิสแฟคเตอร์อัลฟา

ข้อมูลการอ้างอิง: ณัฐญาณ์ ชื่อตรงตระกูล, มาลัย ทวีโชติภักดิ์ และ สรสิทธิ์ รังสิยานนท์. (2566). ผลของน้ำยาบ้วนปากโพรบิโอดิก ผสมสารสกัดกัญชาและพรอพอลิส ในการลดสารสื่ออักเสบชนิดทูเมอร์เน็คโครซิสแฟคเตอร์อัลฟา.

Procedia of Multidisciplinary Research, 1(7), 52

บทนำ

ปัจจุบันมีการศึกษาผลของโพรไบโอติกต่อร่างกายอย่างแพร่หลาย รวมไปถึงการนำโพรไบโอติกมาใช้ร่วมในการรักษาโรคทั้งในทางการแพทย์และทางทันตกรรม พบว่า โพรไบโอติกสามารถส่งเสริมการเจริญเติบโตของเชื้อที่เป็นประโยชน์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อก่อโรค ส่งผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย และด้านการอักเสบโดยลดการหลั่งสารก่ออักเสบต่างๆ (Gupta & Garg, 2009; Williams, 2010) นอกจากนี้ ยังส่งผลดีต่อการรักษาทางทันตกรรมในสาขาต่างๆ ทั้งการป้องกันฟันผุ การรักษาโรคปริทันต์ การรักษาคลองรากฟัน และการลดกลิ่นปาก (Anusha, Umar, Basheer, & Baroudi, 2015) ในขณะที่งานสาขา ศัลยศาสตร์ช่องปากยังมีการศึกษาเกี่ยวกับการใช้โพรไบโอติกร่วมกับการรักษาเพียงเล็กน้อยเท่านั้น จากผลของการรักษาทางศัลยกรรมที่มักทำให้เกิดแผลในช่องปาก ย่อมต้องการให้เกิดกระบวนการหายของแผลที่ดี จึงจำเป็นต้องควบคุมการอักเสบของแผลให้น้อยที่สุด สอดคล้องกับความสามารถในการต้านการอักเสบของโพรไบโอติก กลุ่มวิจัยจึงได้มีการศึกษาผลของโพรไบโอติก ชนิด *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 พบว่ามีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ซึ่งมีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการอักเสบของแผล (Banjonjit, Taweechoatpatr, & Rungsriyanont, 2022) และนำมาพัฒนาต่อน้ำยาบ้วนปาก เพื่อง่ายต่อการใช้งาน โดยได้มีการเพิ่มสารสกัดจากกัญชา ซึ่งกำลังได้รับความสนใจจากความสามารถต้านเชื้อแบคทีเรีย และด้านการอักเสบ โดยพบว่าสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกและสารสกัดกัญชา สามารถลดปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ ได้ดีมากขึ้นกว่าโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว (Nisapa, Taveechoatpatr, & Rungsriyanont, 2022) ผู้วิจัยจึงสนใจศึกษาผลของน้ำยาบ้วนปากดังกล่าว และเพิ่มสารออกฤทธิ์คือ พรอพอลิส ซึ่งมีความสามารถในการต้านการอักเสบ ส่งเสริมการหายของแผลเช่นกัน โดยมีวัตถุประสงค์การวิจัยเพื่อเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติกชนิด *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 ที่ผสมร่วมกับสารสกัดกัญชาในการศึกษาก่อนหน้า กับสูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดพรอพอลิส และสูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดกัญชาพร้อมกับสารสกัดพรอพอลิส ในการลดสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$

การทบทวนวรรณกรรม

โพรไบโอติก หมายถึง จุลินทรีย์ที่มีชีวิต เมื่อร่างกายได้รับในปริมาณที่เพียงพอจะก่อให้เกิดประโยชน์ต่อสุขภาพ (กระทรวงสาธารณสุข) ผลของโพรไบโอติกต่อร่างกาย ได้แก่ คงสมดุลของเชื้อที่เป็นประโยชน์ต่อร่างกายและเชื้อก่อโรค, ชัดขวางการก่อตัวของเชื้อก่อโรคบนเนื้อเยื่อ, ส่งเสริมเกราะป้องกันต่อการติดเชื้อ, และกระตุ้นความสามารถในการกำจัดเชื้อก่อโรคของระบบภูมิคุ้มกัน ด้านการอักเสบโดยลดการหลั่งสารก่อการอักเสบต่างๆ ปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับการนำโพรไบโอติกมาใช้ร่วมกับทั้งทางการแพทย์ และทางทันตกรรม เช่น การใช้ร่วมในการรักษาภาวะท้องเสียที่เกี่ยวข้องกับการได้รับยาปฏิชีวนะ, โรคกระเพาะอาหารที่มีสาเหตุจากเชื้อ *H. Pylori* (Gupta & Garg, 2009; Williams, 2010) การศึกษาโพรไบโอติกในการลดอัตราการเกิดฟันผุ และการใช้ร่วมในการรักษาโรคปริทันต์ (Anusha et al., 2015) ในขณะที่งานทางศัลยกรรมซึ่งมักจะเกี่ยวข้องกับการเกิดกระบวนการอักเสบเพื่อนำไปสู่การหายของแผล ยังมีการศึกษาเพียงเล็กน้อยในการนำโพรไบโอติกมาใช้ร่วมในการรักษา จึงยังเป็นประเด็นที่น่าทำการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อนำมาปรับใช้ในการส่งเสริมผลการรักษาหลังการผ่าตัดในช่องปากต่อไป

ระยะสำคัญที่ส่งผลต่อการเกิดแผลเรื้อรังในกระบวนการหายของแผลคือ ระยะการอักเสบ ซึ่ง Tumor necrosis factor- α ($\text{TNF-}\alpha$) เป็น proinflammatory cytokines ที่หลังในระยะนี้ มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการหายของแผล และหากมีปริมาณที่สูงผิดปกติจะเป็นสาเหตุหนึ่งของการเกิดแผลเรื้อรังได้ การศึกษาเพื่อรักษาภาวะผิดปกติของการอักเสบของแผลส่วนใหญ่จึงมุ่งเน้นไปที่การลดระดับของ $\text{TNF-}\alpha$ (Ashcroft et al., 2012; Parameswaran & Patial, 2010)

จากการวิจัยที่ผ่านมาของกลุ่มวิจัย พบว่า โพรไบโอติก ชนิด *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 สามารถลดปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ จากแผล หลังผ่าตัดฟันกรามซี่ที่ 3 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (Banjonjit et al., 2022) และนำมาพัฒนาต่อน้ำยาบ้วนปาก เพื่อง่ายต่อการใช้งาน โดยได้มีการเพิ่มสารสกัดจากกัญชา และพบว่าสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มี

ส่วนผสมของโพรไบโอติกและสารสกัดกัญชา สามารถลดปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ ได้ดีมากขึ้นกว่าโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว (Nisapa et al., 2022) จากการศึกษาอื่นยืนยันว่า กัญชามีคุณสมบัติหลากหลายทั้งด้านการอักเสบ ต้านอนุมูลอิสระ ต้านจุลินทรีย์ได้ (Schofs, Sparo, & Sánchez Bruni, 2021)

ในขณะเดียวกัน พรอพอลิส (Propolis) มีสารออกฤทธิ์สำคัญ ได้แก่ โพลีฟีนอล และสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ มีฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรีย เชื้อรา และด้านการอักเสบ (Braakhuis, 2019) ในทางทันตกรรมพบว่าพรอพอลิส สามารถต้านเชื้อก่อโรคในช่องปากได้หลายชนิด, ส่งเสริมการหายของแผลภายในช่องปาก, การด้านการอักเสบของเหงือก และพบว่า น้ำยาบ้วนปากจากพรอพอลิสสามารถลดการเกิดภาวะเยื่อช่องปากอักเสบ (oral mucositis) ในผู้ป่วยที่ได้รับการรังสีรักษา และเคมีบำบัดได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Abbasi et al., 2018)

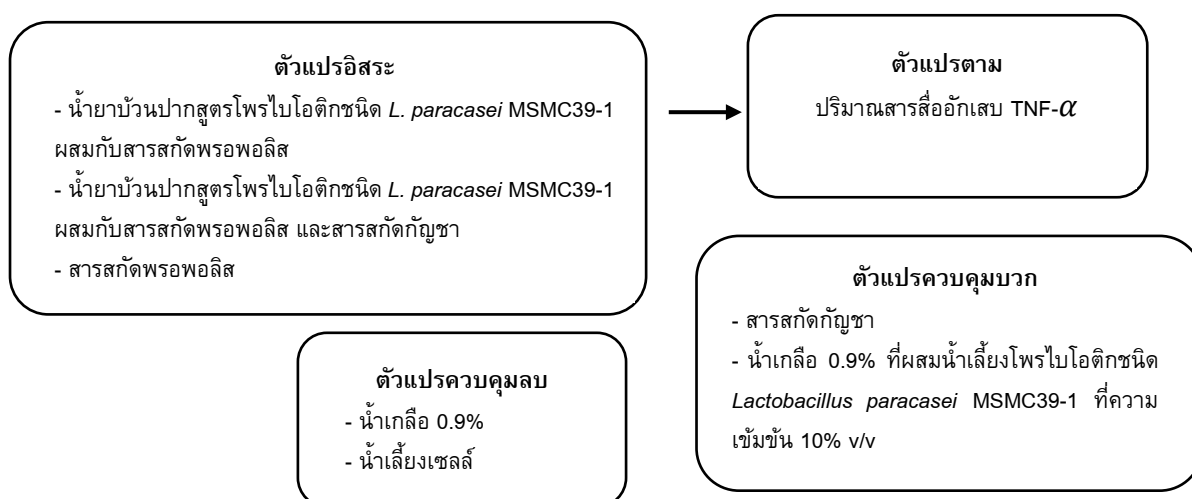
การศึกษานี้จึงมีเป้าหมายในการเปรียบเทียบประสิทธิภาพของน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติกที่มีส่วนผสมของสารสกัดจากกัญชา และน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติกที่มีส่วนผสมของพรอพอลิส รวมถึงน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติกที่มีส่วนผสมของทั้งสารสกัดจากกัญชาและพรอพอลิส ว่าจะให้ผลที่ดีแตกต่างกันอย่างไรในการด้านการอักเสบ ส่วนผสมเพิ่มเติมทั้งสองชนิดจะสามารถเสริมฤทธิ์ของโพรไบโอติก หรือเสริมฤทธิ์กันเองได้หรือไม่ หากการวิจัยนี้ประสบความสำเร็จในการพัฒนาสูตร จะมีประโยชน์ต่อทั้งงานสาขาศัลยกรรมที่ต้องการการหายของแผลที่ดี หรือใช้ร่วมกับการรักษาโรคทางช่องปากที่เกิดจากการอักเสบของเนื้อเยื่อได้

สมมติฐานการวิจัย

H_0 : ผลในการเปลี่ยนแปลงปริมาณสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ของน้ำยาบ้วนปากสูตรโพรไบโอติกผสมกับพรอพอลิส สูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดกัญชา และสูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดกัญชาและพรอพอลิสไม่แตกต่างกัน

H_a : 1) น้ำยาบ้วนปากสูตรโพรไบโอติกผสมกับพรอพอลิสลดปริมาณสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ได้มากกว่าสูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดกัญชา 2) น้ำยาบ้วนปากสูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดกัญชาและพรอพอลิสลดปริมาณสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ได้มากกว่าสูตรโพรไบโอติกผสมกับสารสกัดกัญชา และสูตรโพรไบโอติกผสมกับพรอพอลิส

กรอบแนวคิดการวิจัย



ภาพที่ 1 กรอบแนวคิด

วิธีดำเนินการวิจัย

วิธีการทดลองแบ่งออกเป็น 5 ขั้นตอน ดังนี้

ขั้นตอนที่ 1 เตรียมน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก (Probiotic supernatant) โดยนำโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 มาเจือจางในอาหารเหลว ให้ได้ปริมาณ 10^8 เซลล์/มิลลิลิตร เลี้ยงในสภาวะไม่มีออกซิเจน ที่อุณหภูมิ 37°C

เป็นเวลา 48 ชั่วโมง หลังจากนั้นจึงแยกเอาส่วนน้ำเลี้ยงเชื้อ (Supernatant) โดยนำไปกรองด้วยกระดาษกรองปลอดเชื้อ ขนาด $0.22\ \mu\text{m}$ และเก็บรักษาไว้ที่อุณหภูมิ -20°C จนกว่าจะนำมาใช้

ขั้นตอนที่ 2 เตรียมน้ำยาบ้วนปากโดยนำน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกมาละลายที่อุณหภูมิห้อง จากนั้นเจือจางน้ำเกลือให้ได้ความเข้มข้น 10% v/v, เตรียมพรอพอลิสที่ความเข้มข้น 1% และ 5% w/v, เตรียมโซเดียม แซคคาริน ความเข้มข้น 0.9% v/v และเตรียม Cannabidiol (CBD) 1% v/v จากนั้นนำมาผสมตามสูตรเติมน้ำเกลือเพื่อให้ได้ปริมาตรสูตรละ 10 มิลลิลิตร โดยทั้ง 4 สูตร (ตารางที่ 1) ได้แก่

สูตรที่ 1 น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกผสมพรอพอลิส 1%

สูตรที่ 2 น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกผสมพรอพอลิส 5%

สูตรที่ 3 น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกผสม CBD 1% และพรอพอลิส 1%

สูตรที่ 4 น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกผสม CBD 1% และพรอพอลิส 5%

ตารางที่ 1 แสดงส่วนผสมสูตรน้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร

ส่วนประกอบ	ปริมาณ				หน้าที่ของสาร
	สูตร 1	สูตร 2	สูตร 3	สูตร 4	
พรอพอลิส (ml)	0.1	0.5	0.1	0.5	สารออกฤทธิ์
CBD (ml)	-	-	0.1	0.1	สารออกฤทธิ์
น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% (ml)	1	1	1	1	สารออกฤทธิ์
โซเดียม แซคคาริน 0.9% (ml)	0.33	0.33	0.33	0.33	สารแต่งรส
น้ำเกลือ ปรับปริมาณให้ได้ (ml)	10	10	10	10	ตัวทำละลาย

ขั้นตอนที่ 3 เพาะเลี้ยง Human monocytic cell line ชนิด THP-1 ด้วย RPMI 1640 เสริมด้วย 10% Heat-inactive fetal bovine serum และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2

ขั้นตอนที่ 4 ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารตัวแปรที่จะใช้ทดสอบทั้งหมด ด้วยวิธี MTT โดยทำการทดสอบในภาชนะหลุมชนิด 96 หลุม ที่มี Human monocytic cell line ชนิด THP-1 หลุมละ 50,000 เซลล์ในน้ำเลี้ยง 100 μl เติมน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตร รวมถึงกลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ หลุมละ 100 μl สูตรละ 3 หลุม จากนั้นนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที แล้วจึงนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารออกแล้วเติม MTT ความเข้มข้น 0.5mg/ml หลุมละ 100 μl และบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลาอีก 2-4 ชั่วโมง นำไปปั่นเหวี่ยงอีกครั้งที่ 4,000 rpm เป็นเวลา 10 นาที ดูดสารออก เติมน้ำ DMSO หลุมละ 100 μl จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 595 nm นำค่าที่ได้ของสารแต่ละชนิดมาแปรผลความมีชีวิตของเซลล์

ขั้นตอนที่ 5 ทดสอบความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ ของน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตร โดยเติมน้ำยาบ้วนปากพร้อมกับการกระตุ้นการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ โดยเติม LPS (Lipopolysaccharide) บริสุทธิ์ ที่ได้จาก Escherichia coli ชนิด O127:B8 ปริมาณ 5 μl (ความเข้มข้นสุดท้าย 100 ng/ml) และเติมน้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตร รวมถึงกลุ่มควบคุมบวก และกลุ่มควบคุมลบ ใส่ลงในหลุม Human monocytic cell line ชนิด THP-1 สูตรละ 3 หลุม นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37°C , 5% CO_2 เป็นเวลา 3 ชั่วโมง 30 นาที เก็บน้ำเลี้ยงเชื้อ โดยนำไปปั่นเหวี่ยงที่ 3,000 rpm เป็นเวลา 5 นาที และนำไปวัดปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ ด้วยวิธี Sandwich ELISA จากนั้นนำค่าที่ได้ไปสร้างกราฟค่ามาตรฐาน (Standard curve) เพื่อคำนวณหาปริมาณสารตัวอย่าง และหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ โดยคำนวณจากสูตร

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

เมื่อสารละลายตัวอย่าง คือ ปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ใส่น้ำยาบ้วนปากแต่ละสูตร (pg/ml)

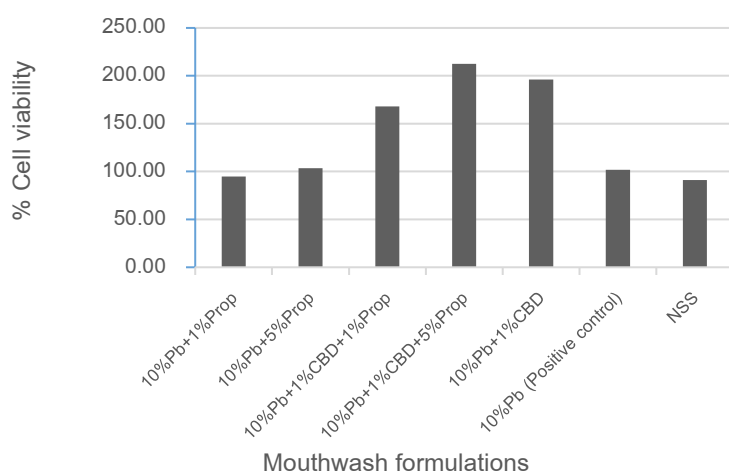
และตัวควบคุมลบ คือ ปริมาณ $\text{TNF-}\alpha$ จากน้ำเลี้ยงเชื้อที่ได้จากกลุ่มควบคุมลบ (pg/ml)

การวิเคราะห์ทางสถิติ คำนวณผ่านโปรแกรม GraphPad Prism เวอร์ชัน 9.3.1 ด้วย Kruskal-Wallis test ที่ระดับความเชื่อมั่น 95%

ผลการวิจัย

ผลการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 สารสกัดพรอพอลิส และสารสกัดจากกัญชาด้วย MTT assay

จากผลการทดสอบ เมื่อนำค่าเฉลี่ยของค่าดูดกลืนแสงที่วัดได้จากแต่ละตัวแปร มาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ (Percent cell viability) ที่ 3 ชั่วโมง 30 นาที พบว่าสูตรน้ำยาบ้วนปาก 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 2 (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% และพรอพอลิส 5%), สูตรที่ 3 (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอพอลิส 1%) และ สูตรที่ 4 (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอพอลิส 5%) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 103.36%, 168.05%, 212.63% ตามลำดับ ส่วนน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% และน้ำยาบ้วนปากสูตรน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% ผสมสารสกัดกัญชา 1% จากการศึกษาก่อนหน้า มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์เท่ากับ 101.97% และ 196.17% ตามลำดับ ในขณะที่น้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% ผสมกับพรอพอลิส 1%) และน้ำเกลือ มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ต่ำที่สุด คือ 94.74% และ 91.07% ตามลำดับ เมื่อเทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์โดยไม่ได้เติมสารใด (ภาพที่ 2)

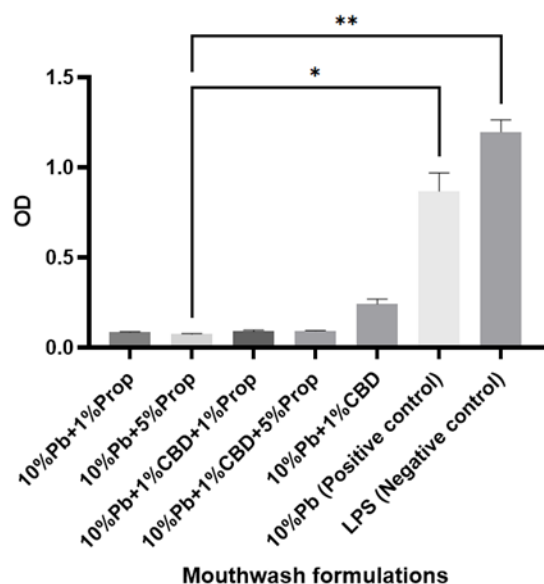


ภาพที่ 2 แผนภูมิแสดงเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตรอดของเซลล์ในน้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร, น้ำยาบ้วนปากสูตรจากการศึกษาก่อนหน้า, น้ำเกลือ และแปรงควบคุมบวก ได้แก่ โพรไบโอติกความเข้มข้น 10% เทียบกับเซลล์ที่เลี้ยงในน้ำเลี้ยงเซลล์โดยไม่ได้เติมสารใด

ผลการทดสอบการยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 สารสกัดพรอพอลิส และสารสกัดจากกัญชา

จากผลการทดสอบ พบว่าน้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร มีความสามารถในการลดปริมาณการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ เมื่อเทียบกับตัวแปรควบคุมลบ คือ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นด้วย LPS ในน้ำเลี้ยงเซลล์เพียงอย่างเดียว ที่มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 1.1966 และตัวแปรควบคุมบวก คือ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกความเข้มข้นร้อยละ 10 ที่มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ

0.8677 ในขณะที่ ผลค่าดูดกลืนแสงของน้ำยาบ้วนปาก สูตรที่ 1 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% ผสมกับพรอฟอลิส 1%), สูตรที่ 2 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% และพรอฟอลิส 5%), สูตรที่ 3 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอฟอลิส 1%) และ สูตรที่ 4 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอฟอลิส 5%) มีค่าดูดกลืนแสงเฉลี่ยเท่ากับ 0.0858, 0.0741, 0.0891 และ 0.0929 ตามลำดับ และ น้ำยาบ้วนปากสูตรน้ำเลียงโพรไบโอติก 10% ผสมสารสกัดกัญชา 1% จากการศึกษาก่อนหน้า มีค่าดูดกลืนแสงเท่ากับ 0.2413 เมื่อทำการคำนวณทางสถิติพบว่าสูตรที่มีความสามารถในการยับยั้งการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด $\text{TNF-}\alpha$ ได้ดีที่สุด ได้แก่ สูตรที่ 2 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% และพรอฟอลิส 5%) โดยพบว่า สามารถยับยั้งการหลั่งสาร $\text{TNF-}\alpha$ ได้ดีกว่า น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% และ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ในน้ำเลี้ยงเซลล์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 3)



ภาพที่ 3 แผนภูมิแสดงค่าดูดกลืนแสงของน้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร, น้ำยาบ้วนปากสูตรจากการศึกษาก่อนหน้า, ตัวแปรควบคุมบวก และตัวแปรควบคุมลบ เมื่อ *,** หมายถึง แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ผลการคำนวณเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ ของน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลียงโพรไบโอติก *L. paracasei* MSMC39-1 สารสกัดพรอฟอลิส และสารสกัดจากกัญชา

จากผลค่าดูดกลืนแสงที่ได้จากผลการศึกษาข้างต้น เมื่อนำมาคำนวณหาเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ ตามสูตรพบว่าน้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% ผสมกับพรอฟอลิส 1%), สูตรที่ 2 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% และพรอฟอลิส 5%), สูตรที่ 3 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอฟอลิส 1%) และ สูตรที่ 4 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอฟอลิส 5%) มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ เมื่อเทียบกับ เซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS ในน้ำเลี้ยงเซลล์ เท่ากับ 92.83%, 93.80%, 92.55%, 92.23% ตามลำดับ ส่วนน้ำยาบ้วนปากสูตรน้ำเลียงโพรไบโอติก 10% ผสมสารสกัดกัญชา 1% จากการศึกษาก่อนหน้า และน้ำเลียงโพรไบโอติก มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง $\text{TNF-}\alpha$ เท่ากับ 79.83% และ 27.48% ตามลำดับ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 แสดงค่าดูดกลืนแสงและเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ของสูตรน้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร, น้ำยาบ้วนปากสูตรจากการศึกษาก่อนหน้า และตัวแปรควบคุมบวก

สูตร	ส่วนประกอบ	ค่าเฉลี่ยค่าดูดกลืนแสง (OD)	เปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α
1	น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, พรอพอลิส 1%	0.0858	92.83
2	น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, พรอพอลิส 5%	0.0741	93.80
3	น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1%, พรอพอลิส 1%	0.0891	92.55
4	น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1%, พรอพอลิส 5%	0.0929	92.23
สูตรจากการศึกษาก่อนหน้า	น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1%	0.2413	79.83
ตัวแปรควบคุมบวก	น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%	0.8677	27.48

สรุปและอภิปรายผลการวิจัย

จากการทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของน้ำยาบ้วนปากสูตรต่างๆ ด้วย MTT assay ซึ่งเป็นวิธีที่นิยมใช้ในการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ ใช้เพื่อวัดความสามารถ และกระบวนการของเซลล์ในการเปลี่ยนสาร MTT เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซาน (Formazan) ที่มีสีม่วง ผ่านกระบวนการดีไฮโดรจีเนส (Dehydrogenase) ภายในไมโทคอนเดรียของเซลล์ ซึ่งจะเกิดกระบวนการดังกล่าวได้ในเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่เท่านั้น (López-García, Lehocký, Humpolíček, & Sába, 2014) ผลการทดสอบในการศึกษานี้ พบว่าน้ำยาบ้วนปากทั้ง 3 สูตร ได้แก่ สูตรที่ 2 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% และพรอพอลิส 5%), สูตรที่ 3 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอพอลิส 1%) และ สูตรที่ 4 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10%, CBD 1% และพรอพอลิส 5%) มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์มากกว่า 100% ในขณะที่น้ำยาบ้วนปากสูตรที่ 1 (น้ำเลียงโพรไบโอติก 10% ผสมกับพรอพอลิส 1%) และน้ำเกลือ มีเปอร์เซ็นต์การมีชีวิตของเซลล์ที่ต่ำกว่าสูตรข้างต้น แต่มากกว่า 90% ซึ่งจาก ISO 10993-5 กล่าวว่า การมีชีวิตของเซลล์ที่สูงกว่า 80% ถือว่าสารนั้นๆ ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ ส่วนค่า 80%-60%, 60%-40% และ ต่ำกว่า 40% หมายถึง สารนั้นๆ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ น้อย ปานกลาง และสูง ตามลำดับ ("ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity," 2009) จึงกล่าวได้ว่า น้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ ในขณะเดียวกัน ค่าที่สูงกว่า 100% อาจสามารถอธิบายได้ว่า สารที่ทดสอบนั้นๆ ส่งผลให้เซลล์มีกระบวนการต่างๆ ที่ไมโทคอนเดรียเพิ่มขึ้น มีการเปลี่ยนสาร MTT เป็นผลิตภัณฑ์ฟอร์มาซานมากขึ้น จึงส่งผลเห็นเป็นสีที่ชัดเจน มีค่าการดูดกลืนแสงเพิ่มขึ้น หรืออาจเกิดจากการที่สารทดสอบกระตุ้นการแบ่งตัวของเซลล์เพิ่มขึ้น (Ghasemi, Turnbull, Sebastian, & Kempson, 2021) ซึ่งควรต้องทดสอบด้วยวิธีที่จำเพาะต่อไป

การศึกษานี้ต้องการทดสอบความสามารถในการยับยั้งการหลั่ง TNF- α ของน้ำยาบ้วนปากทั้ง 4 สูตร และเปรียบเทียบกับน้ำยาบ้วนปากสูตรที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก และสารสกัดกัญชา 1% ซึ่งเป็นสูตรที่พบว่า มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ได้ดีที่สุดจากการศึกษาก่อนหน้าของกลุ่มวิจัย โดยในการศึกษานี้พบว่า สูตรน้ำยาบ้วนปากสูตรดังกล่าว มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α เท่ากับ 82.51% (Nisapa et al., 2022) และผลที่ได้จากการศึกษาครั้งนี้ เท่ากับ 79.83% ซึ่งมีความใกล้เคียงกัน ทั้งสองการศึกษาพบว่า การเพิ่มสารสกัดกัญชาส่งผลเพิ่มประสิทธิภาพในการยับยั้งการหลั่ง TNF- α ได้มากกว่าน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติกเพียงอย่างเดียว สอดคล้องกับจากการศึกษาของ James M. และคณะ ที่พบว่า สาร cannabidiol (CBD) ในกัญชามีผลต่อระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย หนึ่งในนั้นคือ ช่วยเพิ่มความสามารถของอะดีโนซีนในการยับยั้งการหลั่ง TNF- α (Nichols & Kaplan, 2020)

ในขณะที่จากการศึกษานี้ ผลที่ได้พบว่าสูตรที่ให้ผลที่ดีที่สุดคือ สูตรที่ 2 ที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% และพรอพอลิส 5% โดยพิจารณาจากค่าดูดกลืนแสงต่ำที่สุด เมื่อเทียบกับผลจากน้ำยาบ้วนปากโพรไบโอติก และผลจากเซลล์ที่ถูกกระตุ้นโดย LPS โดยไม่ได้เติมสารเพิ่มเติม พบว่า มีค่าต่ำกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ทั้งนี้สูตรน้ำยาบ้วนปากจากการศึกษานี้ทั้ง 4 สูตร ล้วนมีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α ที่สูง ต่างจากสูตรที่ 2 เพียงเล็กน้อย และสูงกว่าสูตรจากการศึกษาก่อนหน้าที่ใส่เพียงสารสกัดกัญชาอย่างเดียว กล่าวคือสูตรทั้ง 4 สูตร มีเปอร์เซ็นต์การยับยั้งการหลั่ง TNF- α สูงกว่า 90% จากการศึกษานี้ของ Andrea B. กล่าวว่าพรอพอลิสมีฤทธิ์ในการต้านการอักเสบจากสารประกอบหลายชนิด เช่น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids), เทอร์พีนอยด์ (terpenoids) และอื่นๆ ผ่านหลากหลายกระบวนการ หนึ่งในนั้นคือ การลดปริมาณการหลั่งสารสื่ออักเสบ รวมถึง TNF- α ได้อย่างมีประสิทธิภาพผ่านการยับยั้ง Nuclear factor-KB (Braakhuis, 2019) จึงอาจกล่าวได้ว่า พรอพอลิสเป็นสารที่เหมาะสมในการเสริมฤทธิ์การต้านการอักเสบของโพรไบโอติก และสารสกัดกัญชาได้ดี จากที่กล่าวมาทั้งหมดข้างต้น การศึกษานี้พบว่าสูตรน้ำยาบ้วนปากที่ทำการศึกษามีประสิทธิภาพในการต้านการอักเสบสูง นำศึกษาเพิ่มเติมถึงผลการส่งเสริมการหายของแผลในแง่อื่นๆ และสามารถนำไปพัฒนาเป็นน้ำยาบ้วนปากที่ใช้ได้จริง เพื่อดำเนินการอักเสบหลังผ่าตัดในช่องปากหรือประยุกต์ใช้รักษาในผู้ป่วยที่มีภาวะเยื่อช่องปากอักเสบ หรือมีรอยโรคในช่องปากอื่นๆ ได้

จากการศึกษาสามารถสรุปได้ว่า น้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมจากโพรไบโอติก สารสกัดกัญชาและพรอพอลิสทั้ง 4 สูตรมีประสิทธิภาพในการลดการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้ โดยสูตรที่สามารถลดการหลั่งสารสื่ออักเสบชนิด TNF- α ได้ดีที่สุดคือสูตรน้ำยาบ้วนปากที่มีส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 10% และพรอพอลิส 5% ($p < 0.05$)

เอกสารอ้างอิง

- กระทรวงสาธารณสุข. *ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง การใช้จุลินทรีย์โพรไบโอติกในอาหาร พ.ศ.2554*. ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 182, ตอนพิเศษ 86 ง. (ลงวันที่ 3 สิงหาคม 2554).
- Abbasi, A. J., Mohammadi, F., Bayat, M., Gema, S. M., Ghadirian, H., Seifi, H., . . . Bahrami, N. (2018). Applications of Propolis in Dentistry: A Review. *Ethiopian journal of health sciences*, 28(4), 505-512. doi:10.4314/ejhs.v28i4.16.
- Anusha, R. L., Umar, D., Basheer, B., & Baroudi, K. (2015). The magic of magic bugs in oral cavity: Probiotics. *Journal of advanced pharmaceutical technology & research*, 6(2), 43-47. doi:10.4103/2231-4040.154526.
- Ashcroft, G. S., Jeong, M. J., Ashworth, J. J., Hardman, M., Jin, W., Moutsopoulos, N., . . . Wahl, S. M. (2012). Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) is a therapeutic target for impaired cutaneous wound healing. *Wound Repair & Regeneration*, 20(1), 38-49. doi:10.1111/j.1524-475X.2011.00748.x.
- Banjonjit, S., Taweechotipatr, M., & Rungsriyanont, S. (2022). Effect of probiotic Lactobacillus paracasei on tumor necrosis factor-alpha level in gingival crevicular fluid of patients undergoing impacted third molar removal. *J Oral Sci*, 64(3), 185-189. doi:10.2334/josnurd.21-0457.
- Braakhuis, A. (2019). Evidence on the Health Benefits of Supplemental Propolis. *Nutrients*, 11(11). doi:10.3390/nu11112705.
- Ghasemi, M., Turnbull, T., Sebastian, S., & Kempson, I. (2021). The MTT Assay: Utility, Limitations, Pitfalls, and Interpretation in Bulk and Single-Cell Analysis. *Int J Mol Sci*, 22(23). doi:10.3390/ijms222312827.
- Gupta, V., & Garg, R. (2009). Probiotics. *Indian journal of medical microbiology*, 27(3), 202-209. doi:10.4103/0255-0857.53201.
- ISO 10993-5:2009 Biological Evaluation of Medical Devices. Part 5: Tests for In Vitro Cytotoxicity, (2009).

- López-García, J., Lehooký, M., Humpolíček, P., & Sáha, P. (2014). HaCaT Keratinocytes Response on Antimicrobial Atelocollagen Substrates: Extent of Cytotoxicity, Cell Viability and Proliferation. *J Funct Biomater*, 5(2), 43-57. doi:10.3390/jfb5020043.
- Nichols, J. M., & Kaplan, B. L. F. (2020). Immune Responses Regulated by Cannabidiol. *Cannabis Cannabinoid Res*, 5(1), 12-31. doi:10.1089/can.2018.0073.
- Nisapa, N., Taveechoatpatr, M., & Rungsiyanont, S. (2022). *The effect of probiotic mouthwash with cannabis extracts on the reduction of inflammatory cytokine: tumor necrosis factor alpha*. Paper presented at the The 13th Hatyai National and International Conference, Hat Yai, Thailand.
- Parameswaran, N., & Patial, S. (2010). Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20(2), 87-103. doi:10.1615/critrevueukargeneexpr.v20.i2.10.
- Schofs, L., Sparo, M. D., & Sánchez Bruni, S. F. (2021). The antimicrobial effect behind Cannabis sativa. *Pharmacol Res Perspect*, 9(2), e00761. doi:10.1002/prp2.761.
- Williams, N. T. (2010). Probiotics. *American Journal of Health-System Pharmacy*, 67(6), 449-458. doi:10.2146/ajhp090168.

Data Availability Statement: The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

Conflicts of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Publisher's Note: All claims expressed in this article are solely those of the authors and do not necessarily represent those of their affiliated organizations, or those of the publisher, the editors and the reviewers. Any product that may be evaluated in this article, or claim that may be made by its manufacturer, is not guaranteed or endorsed by the publisher.



Copyright: © 2023 by the authors. This is a fully open-access article distributed under the terms of the Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International (CC BY-NC-ND 4.0).