ผลต้านเชื้อราของสารสกัดหยาบนมผึ้งต่อการเกาะติดของแคนดิดาอัลบิแคนส์ บนพิววัสดุเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

ดวงพร ศรีสุภาพ* ภาวิณีย์ ปฏิพัทธ์วุฒิกุล ดิดรอน**

บทคัดย่อ

การอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียมเป็นโรคที่พบได้บ่อยในผู้ใส่ฟันเทียม โดยเฉพาะฟันเทียมที่มีฐานฟันเทียมทำจากอะคริลิก และมักพบเชื้อราชนิดแคนดิดาอัลบิแคนส์ซึ่งเป็นสาเหตุของการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียม การรักษาโรคนี้ให้หายขาดทำได้ยากเนื่องจาก ผู้ป่วยมักละเลยการทำความสะอาดฟันเทียมและเชื้อราสามารถกลับมายึดเกาะบนฐานฟันเทียมได้ง่าย ปัจจุบันการใช้ยาต้านจุลชีพในการรักษามักพบผลข้างเคียงและการดื้อยาเพิ่มมากขึ้น งานวิจัยนี้จึงมีความสนใจนำสารสกัดหยาบจากนมผึ้งมาทดสอบประสิทธิภาพในการยั้บยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราและฆ่าเชื้อรา พร้อมทั้งศึกษาการเกาะติดและการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อราบนผิววัสดุเรซินอะคริลิก ชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

ผู้วิจัยทำการเตรียมชิ้นงานอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนจำนวน 48 ชิ้น แบ่งเป็น 8 กลุ่มกลุ่มละ 6 ชิ้น โดยนำชิ้นงานมาทดสอบในน้ำเลี้ยงเชื้อชนิดซาโบรอดเดกซ์โทรสที่มีเชื้อและสารสกัดหยาบนมผึ้ง กลุ่มควบคุมเชิงบวกและกลุ่มควบคุมเชิงลบ บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เกาะบนชิ้นงานจะถูกวิเคราะห์ด้วยวิธีเอ็มทีที และส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด พบว่าสารสกัดหยาบนมผึ้งด้วยเอทานอลความเข้มข้นร้อยละ 20 สามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อโดยมีค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และสามารถลดปริมาณของเชื้อที่เกาะติดบนผิววัสดุได้ตั้งแต่ความเข้มข้นร้อยละ 6.25-50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 และมีผลใกล้เคียงกับไอทราโคนาโซลซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมเชิงบวก งานวิจัยนี้สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบนมผึ้งมีผลต่อการควบคุมปริมาณเชื้อที่เกาะบนพื้นผิวของฟันเทียม ซึ่งสามารถช่วยป้องกันการอักเสบของเนื้อเยื่อใต้ฐานฟันเทียม

คำสำคัญ: แคนดิดาอัลบิแคนส์ นมผึ้ง ไบโอฟิล์ม อะคริลิก ฐานฟันเทียม

**อาจารย์ ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

***ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ภาควิชาทันตกรรมทั่วไป คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23 แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กรุงเทพมหานคร 10110*

Antifungal Effect of Crude Royal Jelly Extract Against *Candida albicans* Adherence to Heat-Cured Denture Acrylic Resin

Duangporn Srisuparbh* Pavinee Padipatvuthikul Didron**

Abstract

Denture-induced stomatitis is a very common disease in denture wearers, particularly in patients wearing acrylic denture. *C. albicans* is often found as the cause of denture stomatitis. Treatment of this symptom is difficult since it is often the result of patients' negligence in properly and regularly cleaning their denture, thereby causing rapid microbial re-colonization. Furthermore, using antimicrobial agents may cause possible side effects as well as microbial resistance. The aim of this study is to determine the antifungal effect of Crude Royal Jelly (CRJ) extract against *C. albicans* adherence to heat-cured acrylic resin and biofilm formation.

Forty-eight heat-cured acrylic samples were prepared and divided into 8 groups of 6. Samples were incubated in Sabouraud Dextrose broth with *C. albicans* and CRJ extract, positive and negative controls at 37^{o}C for 24 hours. The effect of CRJ extract on *C. albicans* adhesion and biofilm formation was evaluated using MTT assay and Scanning Electron Microscope. It was observed that CRJ extract in 20% ethanol had an inhibitory effect against *C. albicans* with MIC of 25 mg/ml. A statistically significant reduction of *C. albicans* to heat-cured denture acrylic resin was found in CRJ extract (6.25-50 mg/ml) (p-value = 0.05). This inhibitory effect was similar to Itraconazole, the positive control. To conclude, CRJ extract was effective in controlling *C. albicans* adherence to the denture surface. This could help prevent denture-induced stomatitis.

Keywords: *Candida albicans*, Royal Jelly, Biofilm, Acrylic, Denture base

**Lecturer, Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, Thailand 10110*

***Assistant Professor, Department of General Dentistry, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, Thailand 10110*

บทนำ

แคนดิดาอัลบิแคนส์ *(Candida albicans)* เป็นเชื้อราประเภทยีสต์ ในสกุลแคนดิดา *(Candida)* ชนิดหนึ่งที่สามารถพบได้ทั่วไปในช่องปาก ในภาวะร่างกายปกติเชื้อชนิดนี้จะไม่ก่อให้เกิดโรค สามารถเจริญเติบโตเพิ่มจำนวนได้ตามปกติ และถูกขจัดออกได้โดยการกลืนหรือการทำความสะอาดช่องปาก หากแต่เมื่อร่างกายเกิดสภาวะที่เสียสมดุลระหว่างเชื้อชนิดนี้กับจุลชีพชนิดอื่นๆ หรือจากการที่ร่างกายมีภูมิคุ้มกันต้านทานโรคลดต่ำลงซึ่งมักจะเกิดกับผู้ป่วยที่ติดเชื้อเอชไอวี (HIV), ผู้ป่วยมะเร็งที่ได้รับการรักษาด้วยเคมีบำบัดและผู้ป่วยที่มีการปลูกถ่ายอวัยวะ จะส่งผลให้เชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์สามารถเจริญเติบโตได้ดี เพิ่มจำนวนขึ้นอย่างรวดเร็ว เกิดการเข้าเกาะที่พื้นผิวต่างๆ เช่น เซลล์เจ้าบ้าน (host cells) เซลล์จุลชีพอื่น ผิวฟัน หรือวัสดุทางทันตกรรมที่อยู่ในช่องปาก จนสามารถเป็นสาเหตุของการก่อให้เกิดโรคขึ้นได้ในที่สุด [1]

แคนดิดาอัลบิแคนส์เป็นเชื้อราที่มีรูปร่างได้หลายรูปได้แก่ ยีสต์ เซลล์หน่อ สายราเทียมและสายราแท้ สามารถเปลี่ยนแปลงรูปร่างได้ตามสภาพแวดล้อม รูปร่างต่างๆ ของเชื้อจะมีบทบาทสำคัญต่อการเกาะติดเชื้อการเกิดเป็นไบโอฟิล์มซึ่งเป็นปัจจัยหนึ่งที่ก่อให้เกิดความรุนแรงของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ โดยเริ่มต้นที่เชื้ออยู่เป็นเซลล์เดี่ยวอย่างอิสระเข้าเกาะบนพื้นผิวต่างๆ (substrate adhesion) โดยเชื้อบางส่วนสามารถยึดเกาะได้ดีและเชื้อบางส่วนสามารถหลุดจากพื้นผิวได้ เชื้อที่เกาะอยู่บนพื้นผิวได้จะสามารถเจริญและขยายจำนวน พัฒนาต่อไปเป็นแผ่นชั้นบางๆ ของไบโอฟิล์ม (biofilm development) และไบโอฟิล์มจะถูกสร้างให้แข็งแรงมากยิ่งขึ้น หลังจากนั้นเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์จะมีการเปลี่ยนแปลงรูปร่างโดยสร้างสายใย ขับสารต่างๆ ออกมานอกเซลล์ (biofilm maturation) สุดท้ายเมื่อเชื้อมีการเจริญมากขึ้นจะเกิดการแผ่ขยายไปยังพื้นที่ใหม่ (cell dispersal) [2,3,4]

ปัจจุบันพลาสติกที่ทำขึ้นจากโพลิเมทิลเมทาไครเลตหรือพีเอ็มเอ็มเอ (polymethyl methacrylate : PMMA) เป็นวัสดุที่มีความนิยมนำมาใช้ในงานทางทันตกรรมโดยนำมาประดิษฐ์เป็นฐานฟันเทียม ซึ่งมีรายงานมากมายที่พบความชุกของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่พบในผู้ใส่ฟันเทียม จะมีค่าเฉลี่ยมากกว่าร้อยละ 60 ซึ่งการใส่ฟันเทียมเป็นการลดปริมาณไหลเวียนของออกซิเจน และคุณสมบัติของน้ำลายจะช่วยส่งเสริมให้เกิดสภาพแวดล้อมที่ดีต่อการเจริญเติบโตของเชื้อได้ นอกจากนี้คุณสมบัติของวัสดุ ได้แก่ ความขรุขระพื้นผิว (surface roughness) พลังงานพื้นผิว (surface energy) ประจุบนพื้นผิว (surface charge) และความไม่ชอบน้ำ (hydrophobicity) ล้วนเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเกาะติดและการเกิดเป็นไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้เช่นเดียวกัน [5,6,7]

ยาที่ใช้ในรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ มีอยู่ด้วยกันมากมายหลายกลุ่มด้วยกัน ยาในกลุ่มหลักๆ ที่นำมาใช้ในการรักษา ได้แก่ พอลิอีน (polyenes) และเอโซล (azoles) แต่ยาสองกลุ่มนี้จะมีผลต่อเออร์โกสเตอรอลซึ่งเป็นองค์ประกอบที่อยู่บนเยื่อหุ้มเซลล์ของเชื้อราทั้งทางตรงและทางอ้อม ส่งผลให้เยื่อหุ้มเซลล์มีลักษณะเป็นรูและสูญเสียการทำงานควบคุมสารผ่านเข้าออกเซลล์ (membrane permeabilization) เกิดการเคลื่อนที่ของสารประกอบภายในเซลล์ของเชื้อออกสู่ภายนอก และยาในกลุ่มอื่นๆ เช่น ยาที่มีโครงสร้างคล้ายสารไพริมิดีน (pyrimidine analog) จะมีผลต่อการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (DNA) และอาร์เอ็นเอ (RNA) ยาแอคไคโนแคนดิน (echinocandins) จะมีผลต่อสร้างเบต้า (1,3) กลูแคน (β-(1,3) D-glucans) และยาอัลลิลเอมีน (allylamine) จะมีผลต่อเอนไซม์สควาลีนอิโพซิเดส (squalene epoxidase) ทั้งหมดนี้ล้วนมีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อและทำให้เชื้อไม่สามารถดำรงชีวิตต่อไปได้ [4,8] อย่างไรก็ตามการใช้ยาในการรักษาผู้ป่วยมักมีอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์ รวมทั้งการใช้ยารักษาเป็นระยะเวลานานจะทำให้เชื้อพัฒนาไปสู่การดื้อยาได้ซึ่งสามารถพบได้มากขึ้นในปัจจุบัน [3,4,9]

การใช้สารสกัดจากธรรมชาติเป็นอีกทางเลือกอีกหนึ่งของการรักษาโรค รอยัลเยลลี่ (Royal jelly) หรือ

ที่เรียกกันทั่วไปว่านมผึ้งเป็นผลิตภัณฑ์จากอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้ง คัดหลั่งมาจากต่อมไฮโปฟาริงจ์ (hypopharyngeal gland) และต่อมแมนดิบิวลาร์ (mandibular gland) ในบริเวณส่วนหัวของผึ้ง มีลักษณะเป็นของเหลวข้นสีขาวนวลเหมือนนมข้น กลิ่นออกเปรี้ยว รสเผ็ดเล็กน้อย นมผึ้งที่ได้จะใช้เป็นอาหารแรกให้ตัวอ่อนที่เพิ่งออกจากไข่จนอายุถึง 3 วัน และผึ้งที่ถูกคัดเลือกเป็นผึ้งนางพญาต่อไปเท่านั้น จึงเป็นอาหารที่สำคัญต่อการเจริญเติบโตและดำรงชีวิตของผึ้ง[10] องค์ประกอบหลักในนมผึ้งทั้งในรูปของนมผึ้งสดจะประกอบด้วยคาร์โบไฮเดรต, โปรตีน, ไขมัน และวิตามิน ในขณะที่นมผึ้งผงที่ผ่านกระบวนการการทำแห้งแบบแช่เยือกแข็งจะพบว่ามีองค์ประกอบหลักเพียงโปรตีนและไขมันเท่านั้น การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพของนมผึ้งจะพบว่าโปรตีนและไขมันในนมผึ้งมีบทบาทที่สำคัญมากมาย โดยเฉพาะฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพทั้งแบคทีเรียและเชื้อราที่มีบทบาทสำคัญต่อกระบวนการเกิดโรค [10,11,12]

ดังนั้นในงานวิจัยนี้จึงมีความสนใจศึกษาประสิทธิภาพของสารสกัดหยาบจากนมผึ้งในการยับยั้งการเจริญเติบและการเกาะติดของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์บนผิวเรซินอะคริลิก ชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน (heat-curedacrylicresin) ซึ่งเป็นวัสดุที่นิยมใช้กันทั่วไปในงานทางทันตกรรม

วัสดุอุปกรณ์และวิธีการ

1. การเตรียมเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์

ทำการเพาะเลี้ยงเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์สายพันธุ์มาตรฐาน 90028 จากการนำเข้าของบริษัท ไทย แคน ไบโอเทค จำกัด ที่แยกเป็นโคโลนีเดี่ยวลงในน้ำเลี้ยงเชื้อชนิดซาโบรอดเดกซ์โทรส (sabouraud dextrose) ซึ่งประกอบด้วยเพปโทนร้อยละ 2 และเดกซ์โทรสร้อยละ 4 บ่มที่อุณหภูมิ 37ºC เป็นเวลา 24 ชั่วโมง และปรับปริมาณของเชื้อราให้มีค่าเท่ากับ $1.5x10^6$ CFU ต่อมิลลิลิตร หรือมีค่าแมคฟาร์แลนด์ (McFarland) เท่ากับ 0.5 ด้วยการวัดค่าการดูดกลืนแสงให้มีค่าเท่ากับ 0.132 ที่ความยาวคลื่น 600 นาโนเมตรเพื่อใช้เป็นเชื้อเริ่มต้นตลอดการทดลอง

2. การเตรียมแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

นำเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนมาขึ้นรูปเป็นแผ่นวงกลมตามคำแนะนำที่บริษัทผู้ผลิตกำหนดโดยมีเส้นผ่านศูนย์กลางขนาด 13 มิลลิเมตร และความหนา 2 มิลลิเมตร จากนั้นจึงทำการขัดวัสดุด้วยกระดาษทรายที่ความละเอียดต่าง ๆ จากหยาบไปละเอียด และนำไปฆ่าเชื้อด้วยการแช่ในซีตา 1 อุลตรา (Zeta 1 ultra) ร้อยละ 1 เป็นเวลา 1 ชั่วโมง ล้างด้วยน้ำกลั่นที่ปราศจากเชื้อ 2 ครั้งและตั้งทิ้งให้แห้ง เพื่อใช้สำหรับการทดสอบการเจริญเติบโตและการเกาะติดของเชื้อบนพื้นผิวของแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

3. การเตรียมสารสกัดหยาบนมผึ้ง

นำนมผึ้งชนิดผง จากการผลิตของบริษัท สุภาฟาร์มผึ้ง จำกัด เติมตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 20 ให้ได้ความเข้มข้น 100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผสมและสกัดเบาๆ ด้วยการเขย่าเป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง จากนั้นนำมาปั่นให้ตกตะกอน ที่แรงเหวี่ยง 10,000 รอบต่อนาทีเป็นเวลา 10 นาที เก็บสารละลายส่วนใสด้านบน เก็บรักษาที่อุณหภูมิ 4ºC เพื่อใช้ในการทดลองต่อไป

4. การหาค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration: MIC) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Fungicidal Concentration : MFC)

นำเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ในน้ำเลี้ยงเชื้อชนิดซาโบรอดเดกซ์โทรส ที่มีค่าแมคฟาร์แลนด์เท่ากับ 0.5 จำนวน 1 มิลลิลิตร ทดสอบดูการเจริญเติบโตในสภาวะที่สารสกัดหยาบนมผึ้งความเข้มข้นต่างๆ จำนวน 1 มิลลิลิตร ซึ่งจะได้เป็นความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 25 12.5 6.25 และ 3.125 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยมีน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารสกัดหยาบนมผึ้งและสารละลายเอทานอลร้อยละ 20 (โดยเมื่อสิ้นสุดการ

ทดลองจะได้สารละลายเอทานอลร้อยละ 10) เป็นตัวควบคุมของสารสกัดที่ใช้ จากนั้นนำเข้าตู้อบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกค่าการทดลองจากความขุ่นของเชื้อที่มีการเจริญเติบโต หาค่า MIC

จากผลการทดลองที่หาค่า MIC นำหลอดทดลองที่ใส ไม่เห็นการเจริญเติบโตของเชื้อมาเพาะเลี้ยงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อต่อที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง บันทึกผลการทดลองจากการเจริญเติบโตของเชื้อ หาค่า MFC

5. การทดสอบการเกาะติดและเจริญเติบโตของเชื้อบนพื้นผิวของแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

นำเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ในน้ำเลี้ยงเชื้อชนิดซาโบรอดเดกซ์โทรส ที่มีค่าแมคฟาร์แลนด์เท่ากับ 0.5 จำนวน 0.5 มิลลิลิตร ทดสอบการเกาะติดของเชื้อบนผิวของแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนที่เตรียมไว้ โดยการบ่มเพาะเชื้อในสภาวะที่มีสารสกัดหยาบนมผึ้งที่มีความเข้มข้นต่างๆ เช่นเดียวกับการทดลองข้างต้น จำนวน 0.5 มิลลิลิตรลงในจานเพาะเลี้ยง ขนาด 24 หลุม โดยมีสารละลายไอทราโคนาโซล (Itraconazole) ความเข้มข้นสุดท้ายเท่ากับ 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นตัวควบคุมเชิงบวกและน้ำเลี้ยงเชื้อที่ปราศจากสารสกัดหยาบนมผึ้งเป็นตัวควบคุมเชิงลบ จำนวนตัวอย่างที่ทำการทดลอง 8 กลุ่ม มีจำนวนกลุ่มละ 6 ชิ้น ทั้งหมดรวม 48 ชิ้น จากนั้นผสมเชื้อและสารทดสอบให้เข้ากันอย่างเบาๆ นำแผ่นวัสดุที่เตรียมไว้ใส่ลงในสารละลายผสมทุกหลุม พร้อมเข้าตู้อบ เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

เมื่อครบตามเวลาที่กำหนด นำชิ้นวัสดุออกมาจากสารละลายผสมและทดสอบจำนวนเชื้อที่อยู่บนผิววัสดุด้วยวิธีเอ็มทีที (MTT assay) ซึ่งดัดแปลงมาจาก Jahn และคณะ ในปี 1995 โดยทำการชะล้างด้วยน้ำกลั่นอย่างเบาๆ และใส่ลงในจานเพาะเลี้ยง ขนาด 24 หลุมชุดใหม่เพื่อลดการปนเปื้อนของเชื้อจากจานเพาะเลี้ยงเดิม จากนั้นเติมน้ำเลี้ยงเชื้อชนิดซาโบรอดเดกซ์โทรส จำนวน 400 µl และสารละลายเอ็มทีที ที่ความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรลงไปจำนวน 100 µl ผสมให้เข้ากันและนำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 ºC เป็นเวลา 4 ชั่วโมง ดูดสารละลายในหลุมออกทิ้ง แล้วเติมสารไดเมทธิลซัลฟอกไซด์ (dymethylsulfoxide : DMSO) 500 µl เขย่าเป็นเวลา 15 นาที ดูดสารละลายที่ได้วัดค่าการดูดกลืนแสง (optical density, OD) ที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร [13] และเปรียบเทียบค่าการยับยั้งเชื้อได้จากร้อยละของเชื้อที่ลดลงดังสมการ

$$\text{ค่าการยับยั้งเชื้อ} = \frac{(OD_{570}\ \text{ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ} - OD_{570}\ \text{ของกลุ่มทดลอง})}{OD_{570}\ \text{ของกลุ่มควบคุมเชิงลบ}} \times 100$$

6. การวิเคราะห์แผ่นคราบจุลินทรีย์ของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

เตรียมตัวอย่างที่ได้จะทำศึกษาปริมาณและลักษณะสัณฐานของเชื้อที่เกาะติดบนพื้นผิววัสดุตามการทดลองในข้อ 5 โดยหลังจากนำเข้าตู้อบแล้วนำแผ่นวัสดุมาแช่ลงในกลูตาราลดีไฮด์ร้อยละ 2.5 และขจัดน้ำออกด้วยการแช่ในเอทานอลที่ความเข้มข้นร้อยละ 25 50 70 95 และ 100 ตามลำดับ และเฮกซะเมทิลไดซิลาเซน (hexamethyldisilazane : HMDS) เป็นสารละลายตัวสุดท้าย ก่อนนำตัวอย่างมาเคลือบทองและส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์ต่อไป

7. การวิเคราะห์ค่าทางสถิติ

นำผลการทดลองการเกาะติดและเจริญเติบโตของเชื้อบนพื้นผิววัสดุทางทันตกรรมในแต่ละกลุ่มทำการตรวจสอบข้อตกลงเบื้องต้นของความเป็นเอกภาพ (Test of Homogeneity) ทดสอบโดยใช้สถิติ

เลอวีน (Levene test) และวิเคราะห์ข้อมูลด้วยสถิติวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) และเปรียบเทียบค่าความแตกต่างของเฉลี่ยที่มีความแปรปรวนต่างกันภายหลัง (Post Hoc Contrast) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 ด้วยโปรแกรม SPSS for window 24.0

ผลการทดลอง

1. ค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถยับยั้งเชื้อ (Minimum Inhibitory Concentration : MIC) และค่าความเข้มข้นของสารสกัดที่น้อยที่สุดที่สามารถฆ่าเชื้อได้ (Minimum Fungicidal Concentration : MFC)

เมื่อนำนมผึ้งชนิดผงสกัดหยาบด้วยเอทานอลร้อยละ 20 พบว่านมผึ้งชนิดผงนี้ไม่สามารถละลายได้หมด จึงทำการแยกตะกอนออกจากสารละลายส่วนใส และเรียกสารละลายส่วนใสนี้ว่าสารสกัดหยาบนมผึ้ง เมื่อนำสารสกัดหยาบนมผึ้งทดสอบกับเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ สำหรับการหาค่า MIC ในช่วงความเข้มข้น 0-100 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร พบว่ามีค่าเท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่เมื่อเชื้อที่ได้จากการหาค่า MIC มาเพาะเลี้ยงบนวุ้นเลี้ยงเชื้อพบว่าเชื้อสามารถเจริญเติบโตได้ดี ภายใน 24 ชั่วโมง ดังนั้นช่วงความเข้มข้นของสารสกัดหยาบนมผึ้งที่นำมาทดสอบนั้นยังไม่สามารถสรุปค่า MFC ที่ชัดเจนได้

2. ผลของสารสกัดหยาบนมผึ้งต่อการเกาะติดของเชื้อราบนพื้นผิวของแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน

สำหรับการทดสอบการเกาะติดของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ ในระยะ 24 ชั่วโมง เพื่อจะเจริญเติบโตเป็นไบโอฟิลม์อย่างสมบูรณ์ต่อไปพบว่าสารสกัดหยาบนมผึ้งมีผลยับยั้งการเกาะติดของเชื้อชนิดนี้ โดยผลการวิเคราะห์ข้อมูลแบบจำแนกทางเดียว (one-way ANOVA) แสดงดังตารางที่ 1 มีความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง กลุ่มควบคุมเชิงบวกและกลุ่มควบคุมเชิงลบอย่างมีนัยสำคัญ และแต่ละกลุ่มการทดลองได้ทำเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแบบพหุคูณ (multiple comparison) แสดงดังตารางที่ 2

ตารางที่ 1 ผลการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทิศทางเดียวของผลการเกาะติดของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ระหว่างกลุ่มที่มีนมผึ้งสกัดหยาบที่ความเข้มข้นต่าง ๆ กลุ่มที่มีเอทานอล กลุ่มที่มียาไอทราโคนาโซล (กลุ่มควบคุมเชิงบวก) และกลุ่มน้ำเลี้ยงเชื้อ(กลุ่มควบคุมเชิงลบ)

Table 1. Results of *C. albicans* adhesion from one way analysis of variance between experimental groups, positive group and negative group.

แหล่งความแปรปรวน	Sum of Squares	df	Mean Square	F	*P*-value
ระหว่างกลุ่มการทดลอง	0.318	7	0.045	8.870	0.000*
ภายในกลุ่มการทดลอง	0.205	40	0.005		
รวม	0.523				

*การทดสอบข้อตกลงเบื้องต้นของความเป็นเอกภาพ โดยใช้สถิติของเลอวีนมีค่าเท่ากับ 5.577 ค่า *p*-value (sig) = 0.000 และการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบจำแนกทางเดียว ได้ยืนยันจากการทดสอบโดยใช้ค่าสถิติของบราวน์-ฟอร์ไซต์ (Brown-Forsynthe) = 8.870 ค่า *p*-value (sig) = 0.000

*Levene's test is used for homoscedasticity assumptions, the value was 5.577 and *p*-value (sig.) = 0.000. One way ANOVA was then performed using Brown–Forsythe test, the value was 8.870 and *p*-value (sig) = 0.000

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายแต่ละการทดลองและร้อยละของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสงของสารละลายของตัวควบคุมเชิงลบ (จำนวนตัวอย่าง = 6 ต่อกลุ่ม)

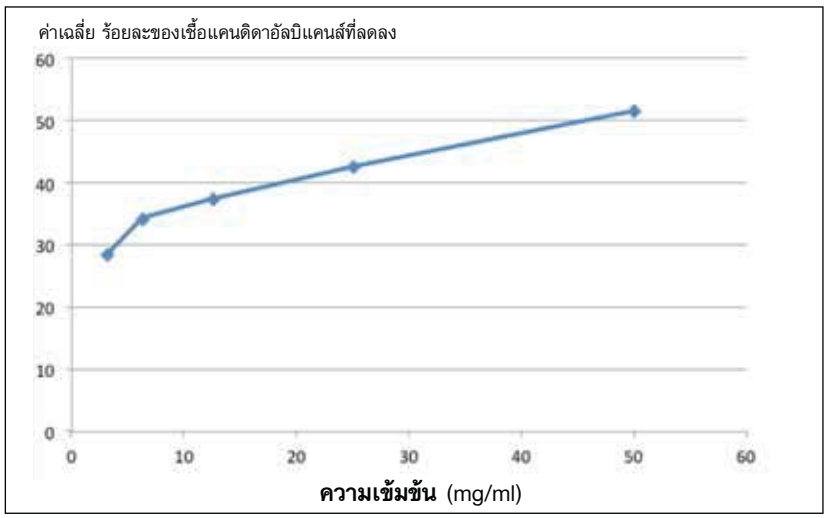
Table 2. Mean absorbances value of each experiment and percentages of *C. albicans* reduction compared to mean absorbance value of negative control (number of sample = 6 per group).

สารทดสอบ	ความเข้มข้นสุดท้าย	ค่าเฉลี่ยการดูดกลืนแสง		ร้อยละของเชื้อที่ลดลง
		ค่าเฉลี่ย	ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน	ค่าเฉลี่ย
สารสกัดหยาบนมผึ้ง	50 mg/ml	0.2779*	0.0459	51.52
	25 mg/ml	0.3230*	0.0671	42.51
	12.5 mg/ml	0.3514*	0.0899	37.40
	6.25 mg/ml	0.3694*	0.0854	34.25
	3.125 mg/ml	0.4021	0.0988	28.43
ไอทราโคนาโซล	50 mg/ml	0.3333*	0.0392	40.68
เอทานอลร้อยละ 20	ร้อยละ 10 (v/v)	0.3813	0.0428	23.11
น้ำเลี้ยงเชื้อ	-	0.5618	0.0810	0.00

*พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญ ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95 (p-value < 0.05) จากการทดสอบหลายคู่โดยใช้สถิติดันเนท ที 3 (Dunnett T3)

*Statistically significant difference was found at $p < 0.05$, using multiple comparisons, Dunnett T3 test.

ผลการทดลองแสดงให้เห็นสารสกัดหยาบนมผึ้งมีผลยับยั้งการเกาะติดของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์โดยมีจำนวนเชื้อบนผิววัสดุลดน้อยลงตั้งแต่ที่ความเข้มข้น 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งคิดเป็นจำนวนเชื้อที่ลดลงร้อยละ 34.25 การเปลี่ยนแปลงจำนวนเชื้อบนผิววัสดุจะแปรผกผันตามความเข้มข้นของสารสกัดหยาบนมผึ้งดังกราฟรูปที่ 1 ที่ความเข้มข้นสูงสุดของการทดลอง 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้นจะมีผลยับยั้งการเกาะติดของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์บนผิววัสดุได้สูงสุด คิดเป็นเชื้อที่ลดลงร้อยละ 51.52 ซึ่งสารสกัดหยาบนมผึ้งที่ความเข้มข้นดังกล่าวจะแสดงผลที่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมเชิงลบซึ่งเป็นน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มีการใส่สารทดสอบใดๆ และกลุ่มที่ทดสอบด้วยเอทานอลซึ่งเป็นตัวทำละลายที่ใช้ในการสกัดนมผึ้งอย่างมีนัยสำคัญ และแสดงผลที่ไม่แตกต่างเมื่อเปรียบเทียบกับสารละลายไอทราโคนาโซล ซึ่งเป็นยาที่ใช้ในการรักษาผู้ป่วยที่มีการติดเชื้อราแคนดิดาอัลบิแคนส์และเป็นตัวควบคุมเชิงบวกจะมีความสามารถในการลดปริมาณเชื้อราที่อยู่บนผิววัสดุได้ร้อยละ 40.68

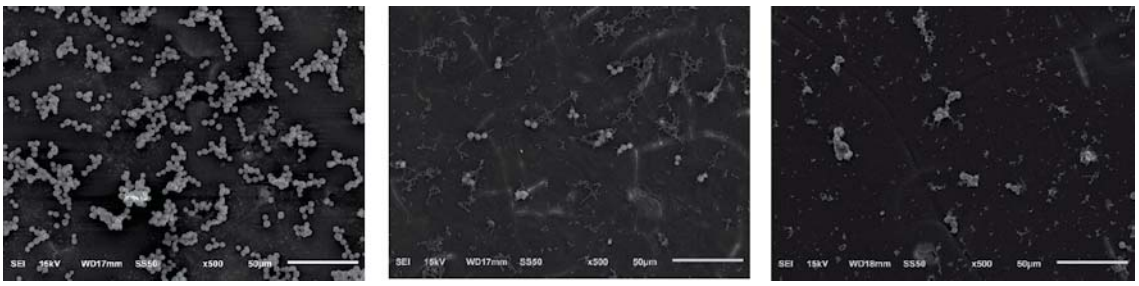


รูปที่ 1 ค่าร้อยละของจำนวนเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่ลดลงบนผิวเรซินอะคริลิก ชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนที่ลดลง ที่ความเข้มข้นของสารสกัดหยาบนมผึ้งต่างๆ จากการตรวจวัดด้วยวิธีเอ็มทีที

Fig 1. Percentage Reduction of C. albicans biofilm formation on heat-cured acrylic resin surface at different CRJ extract concentration as determined by MTT assay.

3. ผลของสารสกัดหยาบนมผึ้งต่อแผ่นคราบจุลินทรีย์ของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด (Scanning Electron Microscope: SEM)

เมื่อนำชิ้นวัสดุที่แช่ลงไปเลี้ยงกับเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ในสภาวะที่ไม่มีหรือมีสารสกัดหยาบนมผึ้งความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมงมาส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราดนั้น พบว่าเชื้อบนผิววัสดุที่ถูกเลี้ยงในสภาวะที่มีสารสกัดหยาบนมผึ้งในแต่ละความเข้มข้นจะมีจำนวนลดลงดับอย่างชัดเจน ดังรูปที่ 2 ซึ่งจะสังเกตเห็นเศษเซลล์ของเชื้อที่ตายไปบางส่วนคงค้างอยู่บนผิววัสดุอยู่ด้วยเช่นกัน



ก ข ค

รูปที่ 2 ภาพถ่ายจากกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนแบบส่องกราด ที่กำลังขยาย 500 เท่า ของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์บนผิวเรซินอะคริลิก ชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน ที่แช่และถูกเลี้ยงในน้ำเลี้ยงเชื้อที่ไม่มี (ก) และมีสารสกัดหยาบนมผึ้งความเข้มข้นต่ำที่สุด มีค่าเท่ากับ 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ข) และที่ความเข้มข้นสูงที่สุด 50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (ค) ที่มีผลต่อปริมาณเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ลดลง ในระยะเวลา 24 ชั่วโมง

Fig 2. Scanning electron microscope micrographs at 500x magnification of C. albicans on heat-cured acrylic resin surface, grown in the absence (a) and the presence of CRJ extract at the minimum concentration 6.5 mg/ml (b) and the maximum concentration 50 mg/ml (c) that effect C. albicans adherence for 24 hours.

บทวิจารณ์

นมผึ้งชนิดผงที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นที่ได้มาจากอุตสาหกรรมการเลี้ยงผึ้งทางภาคเหนือของประเทศไทย เมื่อนำมาสกัดหยาบจากเอทานอลร้อยละ 20 ซึ่งไม่สามารถละลายได้หมด เนื่องจากองค์ประกอบของนมผึ้งมีทั้งส่วนที่ละลายน้ำและไม่ละลายน้ำ โดยเคยมีรายงานถึงการสกัดสารจากนมผึ้งให้มีความบริสุทธิ์มากขึ้นด้วยตัวทำละลายต่างๆ และเก็บสารละลายส่วนใสด้านบนมาทำการทดลองเกี่ยวกับฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ [12,14] ดังนั้นงานวิจัยนี้จึงได้ทำการเก็บสารละลายส่วนใสด้านบนหลังจากที่ได้สกัดกับตัวทำละลายเอทานอลร้อยละ 20 มาทดสอบและพบว่ามีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ (fungistatic) โดยมีค่า MIC เท่ากับ 25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรนั้น แสดงให้เห็นว่าส่วนใสของการสกัดหยาบที่ได้มีองค์ประกอบที่มีผลต่อการเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ ซึ่งจากรายงานที่ศึกษามาก่อนหน้านี้จะพบว่าสารสกัดจากนมผึ้งอื่นๆ ก็มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อราได้เช่นเดียวกัน ดังการศึกษาของ Koc และคณะ ในปี 2011 ได้รายงานไว้ว่าสารสกัดหยาบนมผึ้งด้วย 10 มิลลิโมลาร์ โซเดียมฟอสเฟตบัฟเฟอร์ มีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราทั้งจีนัสของแคนดิดาและไตรโคสปอรอน *(Trichosporon)* มีค่า MIC ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 0.06-1 ไมโครกรัมต่อมิลลิลิตร [12] ขณะที่การศึกษาของ Moghim และคณะในปี 2015 ได้ทำการสกัดสารจากนมผึ้งด้วยแอลกอฮอล์ผสมกับน้ำ *(hydroalcoholic extract)* พบว่าสารสกัดหยาบนมผึ้งมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อราไรโซปัสโอริเซ่อี้ *(Rhizopus oryzae)* โดยมีค่า MIC และ MFC ที่ความเข้มข้นของสารสกัดเท่ากับ 100 ± 34 และ 133 ± 46 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ [14]ทั้งนี้ได้มีการศึกษาแยกองค์ประกอบที่สำคัญในนมผึ้งทั้งส่วนของโปรตีนที่มีชื่อว่ารอยัลไลซัน (Royalisin) และเปปไทด์ที่มีชื่อว่าเจลลีน (Jelleines) หรือส่วนของกรดไขมันที่มีชื่อว่ากรด 10-ไฮดรอกซี-2-เด็กคีโนอิก (10 hydroxy-2-decenoic acid) ล้วนมีบทบาทยับยั้งจุลชีพได้ทั้งสิ้น [11,15,16,17] ต่อมายังมีการศึกษาแยกองค์ประกอบของนมผึ้งในส่วนของกรดไขมันชนิดต่างๆ เพิ่มเติมอีกหลายชนิด ได้แก่ กรดทรานซ์-10-อะซิโทซีเด็กซ์-2-อีโนอิก (trans-10-acetoxydec-2-enoic acid), กรด 11- โอโซโดเด็กคาโนอิก (11-oxododecanoic acid), กรด (11เอส)-ไฮดรอกซีโดเด็กคาโนอิก ((11S)-hydroxydodecanoic acid), กรด (10-อาร์,11อาร์)-ไดไฮดรอกซีโดเด็กคาโนอิก ((10R,11R)-dihydroxy-dodecanoic acid), กรด 3, 11ไดไฮดรอกซีโดเด็กคาโนอิก (3,11-dihydroxydodecanoic acid) และกรด (11เอส), 12 ไดไฮดรอกซีโดเด็กคาโนอิก ((11S),12-dihydroxy-dodecanoic acid) จากการสกัดด้วยไดคลอโรมีเทนและเมทานอล และทำการแยกสารสกัดแต่ละชนิดให้บริสุทธิ์ด้วยเทคนิคโครมาโทกราฟีแนวตั้ง (column chromatography) พบสารที่สกัดดังกล่าวมีฤทธิ์ในการต้านทานจุลชีพด้วยเช่นกัน [18] อย่างไรก็ตามค่าความเข้มข้นสูงสุดของสารสกัดที่ใช้ในการศึกษาครั้งนี้ (50 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ยังไม่สามารถฆ่าเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ (fungicidal) ได้ จึงควรทำการศึกษาต่อไปให้มีความเข้มข้นของสารสกัดสูงขึ้น เพื่อพิสูจน์ความสามารถของสารสกัดในการฆ่าเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์และเพื่อหาค่า MFC ที่ชัดเจนต่อไป

การศึกษาเกี่ยวกับความเป็นพิษของสารสกัดที่ได้จากนมผึ้งนั้น Dhanesuan และคณะ ในปี 2011 ได้รายงานไว้ว่า สารสกัดนมผึ้งที่ได้จากการละลายด้วยฟอสเฟตบัฟเฟอร์น้ำเกลือ (Phosphate Buffer Saline: PBS) ที่ความเข้มข้น 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร จะมีความเป็นพิษต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อเหงือกมนุษย์และจากเอ็นยึดปริทันต์มนุษย์ แต่จะไม่พบความพิษต่อเซลล์กระดูกสะโพกมนุษย์ [19] รวมทั้งการศึกษา Musa และคณะ ในปี 2014 ได้รายงานไว้ว่านมผึ้งในส่วนที่ละลายด้วยน้ำเลี้ยงเซลล์ที่ความเข้มข้นสูงสุด 2.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรไม่มีความเป็นพิษต่อเซลล์ไลน์ชนิดเอ็มอาร์ซี-5 (MRC-5) ซึ่งเป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์จากเนื้อเยื่อปอดมนุษย์โดยยังคงความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) ถึงร้อยละ 71.46 [20] อย่างไรก็ตามสารสกัดที่มีการศึกษามาแล้วนั้นมาจากตัวทำละลายที่ต่างชนิดกัน ดังนั้นจึงเป็นขั้นตอนต่อไปที่จะทำการศึกษาถึงความเป็นพิษของสารสกัดที่ได้จากงานวิจัยนี้เพื่อการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์และนำไปใช้ในมนุษย์

สำหรับการใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดสารจากนมผึ้งชนิดผงนั้น จะมีผลยับยั้งการเกาะติดและเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์อยู่บ้างบางส่วน ซึ่งจากการศึกษาของ Peter และคณะในปี 2013 ได้รายงานไว้ว่าความเข้มข้นของเอทานอลมากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 30 จะสามารถยับยั้งการเกิดไบโอฟิล์มได้ สำหรับในงานวิจัยนี้การใช้เอทานอลเป็นตัวทำละลายในการสกัดและทดลองจะมีความเข้มข้นสุดท้ายร้อยละ 10 จึงไม่มีผลต่อการทดสอบฤทธิ์ของสารสกัดและสามารถสรุปได้ว่าสารสกัดหยาบนมผึ้งความเข้มข้นมากว่า 6.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีผลลดปริมาณของเชื้อที่การเกาะติดและเจริญเติบโตของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์บนพื้นผิววัสดุได้มากกว่าเอทานอล [21]

เมื่อนำเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ มาเลี้ยงให้เจริญเป็นไบโอฟิล์มบนผิวเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อน ซึ่งเป็นวัสดุทางทันกรรมชนิดที่นิยมนำมาใช้ทำฟันเทียม ในสภาวะที่ทดสอบสารสกัดหยาบนมผึ้งจะไม่มีผลต่อคุณสมบัติของเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนเนื่องจากชิ้นทดสอบเรซินอะคริลิกได้รับการบ่มตัวด้วยความร้อนโดยสมบูรณ์แล้วตามมาตรฐานของบริษัทผู้ผลิต อีกทั้งวัสดุที่ใช้ทดสอบมีคุณสมบัติการดูดซับและการละลายตัวตามมาตรฐาน ไอเอสโอ 4049 (ISO 4049) ขณะที่สภาวะที่ทดสอบนี้มีผลลดปริมาณเชื้อที่เกาะติดและเจริญเติบโตของเชื้อได้อย่างมีนัยสำคัญ ภายในระยะเวลา 24 ชั่วโมง โดยระยะเวลาที่ใช้นี้เป็นผลมาจากการเข้าเกาะของเชื้อหรือการเจริญเติบโตของเชื้อได้ ระยะเวลาที่ทำการทดลองนี้มีการรายงานไว้ว่าเป็นเวลาที่เกี่ยวข้องกับกับกระบวนการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์บนผิววัสดุในระยะกลาง (intermediate phase) ซึ่งอยู่ในช่วงระยะเวลา 12-30 ชั่วโมง เชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์จะมีการเจริญและรวมกลุ่มกัน (aggregation) โดยจะยังไม่มีเปลี่ยนแปลงรูปของเซลล์และการสร้างสารคัดหลั่งใดๆ ออกนอกเซลล์เพื่อเกิดเป็นไบโอฟิล์มอย่างสมบูรณ์ [22,23] ดังนั้นผลที่ได้จึงเป็นการแสดงให้เห็นว่าองค์ประกอบในนมผึ้งที่สกัดได้นี้จะมีประสิทธิภาพต่อการลดปริมาณเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เกาะบนพื้นผิวของแผ่นเรซินอะคริลิก ชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนเท่านั้น หากยังต้องทำการศึกษาต่อถึงกลไกที่เกี่ยวข้องให้มีความชัดเจนต่อไป อย่างไรก็ตามงานวิจัยนี้จะเป็นจุดเริ่มต้นที่มีบทบาทสำคัญต่อขั้นตอนที่นำไปสู่กระบวนการเกิดเป็นไบโอฟิล์มอย่างสมบูรณ์และนำไปสู่การเกิดการอักเสบและโรคเนื่องจากฟันปลอมต่อไป

นมผึ้งซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากธรรมและปัจจุบันใช้เป็นอาหารเสริมอย่างแพร่หลาย หากสารสกัดจากนมผึ้งสามารถช่วยลดปัจจัยที่ส่งเสริมต่อการเกิดโรคจากเชื้อราได้ จะเป็นอีกทางเลือกหนึ่งในการรักษาการติดเชื้อราของผู้ป่วยได้ดีกว่าการใช้ยารักษา ซึ่งผู้ป่วยที่มีการใช้ยารักษามักมีอาการข้างเคียงที่ไม่พึงประสงค์และหากใช้ยาเป็นระยะเวลานานจะทำให้เชื้อเกิดการดื้อยาในที่สุด ปัจจุบันยังมีอีกหลายงานวิจัยที่ทำการศึกษาผลของสารสกัดจากธรรมชาติชนิดต่างๆ ในประเทศไทยต่อการเข้าเกาะและการเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ เช่น ใบข่อย เปลือกมังคุด ขิง เป็นต้น [24,25,26] ดังนั้นการศึกษาสารสกัดธรรมชาติเหล่านี้จึงมีความน่าสนใจสำหรับการพัฒนาเป็นผลิตภัณฑ์ในการป้องกันหรือการรักษาโรคที่มีสาเหตุมาจากเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ในทางการแพทย์ต่อไป

บทสรุป

สารสกัดหยาบจากนมผึ้งในเอทานอลร้อยละ 20 มีผลในการยับยั้งเจริญเติบโตและลดปริมาณเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ที่เกาะติดบนพื้นผิวของแผ่นเรซินอะคริลิกชนิดบ่มตัวด้วยความร้อนอันนำไปสู่การเกิดไบโอฟิล์มของเชื้อแคนดิดาอัลบิแคนส์ได้ ซึ่งสามารถเป็นข้อมูลพื้นฐานและการริเริ่มนำสารสกัดจากธรรมชาติมาประยุกต์ใช้เพื่อการป้องกันและการรักษาโรคในช่องปากได้ในอนาคต ดังนั้นการศึกษาคุณสมบัติของสารสกัดเชิงลึก กลไกการออกฤทธิ์ทางชีวภาพ หรือการพัฒนาไปสู่ผลิตภัณฑ์ทางด้านทันตกรรม จึงเป็นขั้นตอนที่มีความสำคัญอย่างต่อเนื่องต่อไป

เอกสารอ้างอิง

1. Wanke B, Lazéra M, Nucci M. Fungal infections in the immunocompromised host. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 2000; 95 Suppl 1: 153-158.

2. Blankenship JR, Mitchell AP. How to build a biofilm: a fungal perspective. Curr Opin Microbiol 2006; 9(6): 588-594.

3. Berman J. *Candida albicans.* Curr Biol 2012; 22(16): 620-622.

4. Mathé L, Van Dijck P. Recent insights into *Candida albicans* biofilm resistance mechanisms. Curr Genet 2013; 59(4): 251-264.

5. Abu-Elteen KH1, Abu-Alteen RM. The prevalence of *Candida albicans* populations in the mouths of complete denture wearers. New Microbiol 1998; 21(1): 41-48.

6. Daniluk T, Tokajuk G, Stokowska W, Fiedoruk K, Sciepuk M, Zaremba ML, et al. Occurrence rate of oral *Candida albicans* in denture wearer patients. Adv Med Sci 2006; 51 Suppl 1: 77-80.

7. Pereira-Cenci T, Del Bel Cury AA, Crielaard W, Ten Cate JM. Development of *Candida*-associated denture stomatitis: new insights. J Appl Oral Sci 2008; 16(2):86-94.

8. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. Periodontol 2000 2011; 55(1): 250-265.

9. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans.* Crit Rev Oral Biol Med 1999; 10(3): 359-383.

10. Ramadan MF, Al-Ghamdi A. Bioactive compounds and health-promoting properties of royal jelly: A review. J Functional Foods 2012; 4(1): 39–52

11. Pavel CI, Marghitas LA, Bobis O, Dezmirean DS, Sapcaliu A, Radoi I, et al. Biological activities of royal jelly – review. SPASB 2011, 44(2): 108-134.

12. Koç AN, Silici S, Kasap F, Hörmet-Oz HT, Mavus-Buldu H, Ercal BD. Antifungal activity of the honeybee products against *Candida* spp. and *Trichosporon* spp. J Med Food 2011; 14(1-2): 128-134.

13. Jahn B, Martin E, Stueben A, Bhakdi S. Susceptibility testing of *Candida albicans* and *Aspergillus* species by a simple microtiter menadione-augmented 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2, 5-diphenyl-2H-tetrazolium bromide assay. J Clin Microbiol 1995; 33(3): 661–667.

14. Moghim H, Taghipoor S, Shahinfard N, Kheiri S, Khabbazi H. Comparative study on the antifungal activity of hydroalcoholic extract of Iranian Propolis and Royal jelly against *Rhizopus oryzae.* J Herbmed Pharmacology 2015; 4(3): 89-92.

15. Barnutiu LI, Marghitas LA, Dezmirean DS, Mihai CM, Bobis O. Chemical composition and antimicrobial activity of royal jelly – review. SPASB 2011, 44(2): 67-72.

16. Fujiwara S, Imai J, Fujiwara M, Yaeshima T, Kawashima T, Kobayashi K. A potent antibacterial protein in royal jelly. Purification and determination of the primary structure of royalisin. J Biol Chem 1990; 265(19): 11333-11337.

17. Fontana R, Mendes MA, de Souza BM, Konno K, César LM, Malaspina O, et al. Jelleines: a family of antimicrobial peptides from the Royal Jelly of honeybees *(Apis mellifera).* Peptides 2004; 25(6): 919-928.

18. Melliou E, Chinou I. Chemistry and bioactivity of royal jelly from Greece. J Agric Food Chem 2005; 53(23): 8987-8992.

19. Dhanesuan N, Srisuparbh D, Tiranathanagul S, Rungsiyanont S. The *in vitro* effect of royal jelly, *Apis mellifera,* on proliferation of human gingival, periodontal ligament fibroblast and human bone cell. Thai Pharm Health Sci J 2011; 6(3): 182-187.

20. Musa M, Nasir NF, Thirumulu KP. Evaluation of royal jelly as an alternative to fetal bovine serum in cell culture using cell proliferation assays and live cell imaging. Afr J Tradit Complement Altern Med 2013; 11(1): 148-155.

21. Peters BM, Ward RM, Rane HS, Lee SA, Noverr MC. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. Antimicrob Agents Chemother 2013; 57(1):74-82.

22. Zhu Z, Wang H, Shang Q, Jiang Y, Cao Y, Chai Y. Time course analysis of *Candida albicans* metabolites during biofilm development. J Proteome Res 2013; 12(6): 2375-2385.

23. Chandra J, Kuhn DM, Mukherjee PK, Hoyer LL, McCormick T, Ghannoum MA. Biofilm formation by the fungal pathogen *Candida albicans:* development, architecture, and drug resistance. J Bacteriol 2001; 183(18): 5385-5394.

24. Taweechaisupapong S, Klanrit P, Singhara S, Pitiphat W, Wongkham S. Inhibitory effect of Streblus asper leaf-extract on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. J Ethnopharmacol 2006; 106(3): 414-417.

25. Kaomongkolgit R, Jamdee K. Inhibitory effect of alpha-mangostin on adhesion of *Candida albicans* to denture acrylic. Open Dent J 2015; 9: 388-392.

26. Siripermpool P. Effect of essential oil from Zingiber officinale on planktonic cells and biofilms of *Candida albicans.* J Med Tech Phy Ther 2013; 25(3): 264-272.

ติดต่อบทความ:
อ.ดร.ดวงพร ศรีสุภาพ
ภาควิชาโอษฐวิทยา คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ สุขุมวิท 23
แขวงคลองเตยเหนือ เขตวัฒนา กทม 10110
โทรศัพท์ 02-649-5000 ต่อ 15130
จดหมายอเล็กทรอนิกส์ d_srisuparbh@yahoo.com

Corresponding author:
Dr. Duangporn Srisuparbh
Department of Stomatology, Faculty of Dentistry, Srinakharinwirot University, Sukhumvit 23, Wattana, Bangkok, Thailand 10110
Tel: 02-649-5000 ext. 15130
E-mail: d_srisuparbh@yahoo.com