



การศึกษาผลการต้านสารอนุมูลอิสระและการอักเสบของน้ำเลี้ยงโพรบิโอติก
ต่อเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี

ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PROBIOTICS-DERIVED
SUPERNATANT ON UV-B-IRRADIATED HUMAN KERATINOCYTE CELL LINE

วิษณุ ตมภ์ ผลประสิทธิ์ทิโต

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

2567

การศึกษาผลการต้านสารอนุมูลอิสระและการอักเสบของน้ำเลี้ยงโพรบไอบิติก
ต่อเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตบี



วิษณุตม์ ผลประสิทธิ์โต

ปริญญานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ปีการศึกษา 2567

ลิขสิทธิ์ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PROBIOTICS-DERIVED
SUPERNATANT ON UV-B-IRRADIATED HUMAN KERATINOCYTE CELL LINE



WICHAYUT PHOLPRASITTHITO

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of MASTER OF SCIENCE
(Dermatology)

Faculty of Medicine, Srinakharinwirot University

2024

Copyright of Srinakharinwirot University

ปริญญานิพนธ์

เรื่อง

การศึกษาผลการต้านสารอนุมูลอิสระและการอักเสบของน้ำเลี้ยงโพไรโบไอดิก
ต่อเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเลตบี

ของ

วิษุตม์ ผลประสิทธิโต

ได้รับอนุมัติจากบัณฑิตวิทยาลัยให้นับเป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตร

ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาตจวิทยา

ของมหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒ

(รองศาสตราจารย์ นายแพทย์ฉัตรชัย เอกปัญญาสกุล)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

คณะกรรมการสอบปากเปล่าปริญญานิพนธ์

..... ที่ปรึกษาหลัก ประธาน
(รองศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภักดิ์)	(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสุวิภากร โอภาสงวงศ์)
..... ที่ปรึกษาร่วม กรรมการ
(ศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดมเพทายกุล)	(รองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสาลินี ใจจันท์รัฐกุล)

ชื่อเรื่อง	การศึกษาผลการต้านสารอนุมูลอิสระและการอักเสบของน้ำเลี้ยงโพไบโอติกต่อเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี
ผู้วิจัย	วิษณุตม์ ผลประสิทธิโต
ปริญญา	วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต
ปีการศึกษา	2567
อาจารย์ที่ปรึกษา	รองศาสตราจารย์ ดร. มาลัย ทวีโชติภัทร์
อาจารย์ที่ปรึกษาร่วม	ศาสตราจารย์ นายแพทย์ มนต์รี อุดมเพทายกุล

รังสีอัลตราไวโอเล็ตบีเป็นรังสีที่ส่งผลกระทบต่อผิวหนังของมนุษย์ สามารถเพิ่มการสร้างสารอนุมูลอิสระในเซลล์ของผิวหนัง ซึ่งสารอนุมูลอิสระในเซลล์ของผิวหนังส่งผลเสียต่อเซลล์ได้ เช่น กระตุ้นการอักเสบในชั้นของผิวหนังและสามารถทำลายดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ผิวหนังได้โดยตรง ซึ่งจะทำให้เซลล์เหล่านั้นพัฒนากลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ในที่สุด ในปัจจุบันมีการใช้ยาป้องกันแสงแดดและใช้สารต้านอนุมูลอิสระเพื่อปกป้องอันตรายกับผิวหนัง แต่สารเหล่านี้หากใช้มากเกินไปก็สามารถเกิดอันตรายกับผิวหนังของเราได้เช่นกัน อย่างไรก็ตาม การศึกษาก่อนหน้าได้ศึกษาเกี่ยวกับผลการต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของโพไบโอติกสายพันธุ์ไทย แต่ไม่มีการศึกษาผลการต้านอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบของเซลล์ผิวหนังที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี จึงได้ทำวิจัยนี้เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของโพไบโอติกสายพันธุ์ในไทย (*Bifidobacterium animalis* MSMC 83, *Lactobacillus reuteri* TF314, *Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1 และ *Lactobacillus salivarius* MSMC 105-3) โดยการศึกษาผ่านการศึกษาร่างกายในเซลล์และการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Superoxide dismutase ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตบีและเพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านการอักเสบผ่านการศึกษาระดับ Tumor necrotic factor – alpha (TNF- α) ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตบี งานวิจัยนี้เป็นงานวิจัยเชิงทดลอง โดยวัดความคงอยู่ของเซลล์ผิวหนังหลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติกและวัดประสิทธิภาพการต้านสารอนุมูลอิสระของน้ำเลี้ยงโพไบโอติกในเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ซึ่งวัดผ่านระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ Superoxide dismutase ในเซลล์ผิวหนัง นอกจากนี้ยังวัดประสิทธิภาพของน้ำเลี้ยงโพไบโอติกผ่านการวัดระดับของสารสื่อการอักเสบ Tumor necrotic factor – alpha ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตบี สำหรับผลการทดลองเป็นดังต่อไปนี้ ความคงอยู่ของเซลล์ผิวหนังที่บ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติกพบว่า ความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์ผิวหนังมีความคงอยู่มากกว่าร้อยละ 80 คือ ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ส่วนความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่มากที่สุดที่ทำให้เซลล์ผิวหนังมีความคงอยู่มากกว่าร้อยละ 60 คือ ความเข้มข้นที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร การทดลองวัดการต้านอนุมูลอิสระของน้ำเลี้ยงโพไบโอติกในเซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ผ่านการวัดระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ พบว่าน้ำเลี้ยงโพไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถลดระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้บ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก นอกจากนี้การต้านอนุมูลอิสระผ่านการเพิ่มของเอนไซม์ Superoxide dismutase พบว่าน้ำเลี้ยงโพไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มระดับเอนไซม์ Superoxide dismutase ในเซลล์ผิวหนังได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่วนการวัดการต้านการอักเสบของเซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ผ่านการวัดระดับของสารสื่อการอักเสบ TNF- α พบว่า น้ำเลี้ยงโพไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์สามารถลดสารสื่อการอักเสบของเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ดังนั้นน้ำเลี้ยงโพไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์มีประสิทธิภาพการต้านสารอนุมูลอิสระและด้านการอักเสบในเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก

คำสำคัญ : โพไบโอติก, เซลล์ผิวหนัง, ต้านอนุมูลอิสระ, ต้านการอักเสบ, การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี

Title	ANTIOXIDANT AND ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PROBIOTICS- DERIVED SUPERNATANT ON UV-B-IRRADIATED HUMAN KERATINOCYTE CELL LINE
Author	WICHAYUT PHOLPRASITTHITO
Degree	MASTER OF SCIENCE
Academic Year	2024
Thesis Advisor	Associate Professor Malai Taweechoitpatr , Ph.D.
Co Advisor	Professor Montri Udompataikul , M.D.

Probiotics are known to reduce reactive oxygen species (ROS) and inflammation, exhibiting well-established antioxidant and anti-inflammatory effects. However, studies on the antioxidant, anti-inflammatory, and UV-B-protective properties of supernatants derived from Thai probiotics remain limited. This study aimed to assess the antioxidant and anti-inflammatory properties of supernatants derived from probiotics in UV-B-irradiated human keratinocyte cell lines. Antioxidant effects were evaluated by measuring intracellular ROS levels and the activation of the endogenous antioxidant system, particularly through superoxide dismutase (SOD) levels. Anti-inflammatory effects were assessed by measuring tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) levels. Human keratinocyte cell lines (HaCaT cells) were treated with supernatants derived from Thai probiotic strains prior to UV-B irradiation. Antioxidant properties were evaluated by quantifying intracellular ROS using a fluorometric ROS assay and measuring SOD levels with a commercial SOD assay kit. Anti-inflammatory effects were assessed by measuring TNF- α levels using an ELISA kit. Pretreatment of HaCaT cells with Thai probiotic-derived supernatants prior to UV-B irradiation alleviated photodamage by reducing both intracellular oxidative stress and inflammatory responses. Supernatants derived from Thai probiotic strains exert photoprotective effects on human keratinocyte cell lines. These findings suggest their potential for further development as components in UV-protective skincare formulations.

Keyword : probiotics, keratinocyte, antioxidant, anti-inflammatory, ultraviolet-B-protection

กิตติกรรมประกาศ

ปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จสมบูรณ์ได้ด้วยความช่วยเหลือคำแนะนำอย่างดียิ่งจากคณาจารย์หลายท่าน ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ ดร.มาลัย ทวีโชติภักดิ์ ที่ปรึกษาหลักการทำวิจัย ศาสตราจารย์ นายแพทย์มนตรี อุดมเพทายกุล ที่ปรึกษาร่วมการทำวิจัย ผู้ให้คำแนะนำตลอดจนชี้แนะวิธีการศึกษาวิจัยในทุกขั้นตอนของการวิจัยครั้งนี้ รวมถึงแนะนำข้อมูลต่างๆ ที่เป็นประโยชน์ต่อการวิจัยมาตลอด ขอกราบขอบพระคุณรองศาสตราจารย์ แพทย์หญิงสาลินี ใจจันท์รัฐสกุล กรรมการสอบสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์และผู้ช่วยศาสตราจารย์แพทย์หญิง สุวิภากร โอภาสวงศ์ ที่กรุณามาเป็นประธานการสอบปากเปล่าวิทยานิพนธ์และให้คำแนะนำและข้อเสนอแนะในการทำวิจัยนี้ ตลอดจนแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ ในทุกขั้นตอนของการวิจัยและการเขียนปริญญาานิพนธ์

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในห้องปฏิบัติการจุลชีววิทยาทุกท่านที่ได้ให้ความรู้ ความช่วยเหลือในการทำการทดลองตั้งแต่แรกจนจบทุกการทดลอง

ขอขอบคุณเพื่อนแพทย์ทุกท่านในศูนย์ผิวน้ำ มหาวิทยาลัยศรีนครินทรวิโรฒที่ให้ ความช่วยเหลือตลอดจนให้คำแนะนำตลอดการวิจัย

ขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ในศูนย์ผิวน้ำทุกท่านที่ช่วยเหลือผู้วิจัยด้วยดีเสมอมา ผู้วิจัยรู้สึกซาบซึ้งในความกรุณาและขอขอบพระคุณไว้ ณ โอกาสนี้

ทำยนี้คุณค่าและประโยชน์ใดๆ อันเกิดจากปริญญาานิพนธ์ฉบับนี้ ผู้วิจัยขอมอบแต่บิดา มารดาที่ให้การสนับสนุนทางการศึกษาและให้กำลังใจแก่ผู้วิจัยอย่างดีมากตลอดมา

วิษุตม์ ผลประสิทธิโต

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ.....	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง.....	ฅ
สารบัญรูปภาพ	ฉ
บทที่ 1 บทนำ.....	1
ภูมิหลัง	1
คำถามงานวิจัย (Research questions).....	2
วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	2
ความสำคัญของงานวิจัย.....	2
ขอบเขตของงานวิจัย	5
กรอบแนวคิดงานวิจัย.....	6
สมมติฐานในการวิจัย.....	6
บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	7
2.1 รังสีอัลตราไวโอเล็ตและผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีผลต่อผิวหนัง	7
2.2 สารอนุมูลอิสระและสารการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์	12
2.3 การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ใช้ในปัจจุบัน.....	14
2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ.....	16
2.5 โพรไบโอติก (Probiotics)	21
2.6 ประโยชน์ของโพรไบโอติก.....	23

2.7 การคงอยู่ของเซลล์ (Cell viability).....	29
2.8 การศึกษาการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์ (Cell-based antioxidant assays)	30
2.9 การวัดระดับของสารก่อการอักเสบภายในเซลล์	33
บทที่ 3 วิธีการดำเนินการวิจัย.....	35
รูปแบบการวิจัย	35
อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา	35
ขั้นตอนการศึกษา	36
การประเมินผลการวิจัย	37
การวิเคราะห์ข้อมูล.....	38
บทที่ 4 ผลการวิจัย	39
ตอนที่ 1 ระดับของการคงอยู่ของเซลล์	39
ตอนที่ 2 ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์	51
ตอนที่ 3 ระดับของสารสื่อการอักเสบในเซลล์	67
บทที่ 5 สรุปอภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	75
สรุปผลการวิจัย.....	76
การอภิปรายผลการวิจัย	78
สรุป.....	82
บรรณานุกรม	83
ประวัติผู้เขียน.....	90

สารบัญตาราง

หน้า

ตาราง 1 แสดงงานวิจัยและรายละเอียดของแหล่งกำเนิดของรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี	10
ตาราง 2 แสดงระดับการคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยสาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	40
ตาราง 3 แสดงระดับการคงอยู่ของเซลล์หลังจากฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี	42
ตาราง 4 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	43
ตาราง 5 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	45
ตาราง 6 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	47
ตาราง 7 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	49
ตาราง 8 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	51
ตาราง 9 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	53
ตาราง 10 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	55
ตาราง 11 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	57

ตาราง 12 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	59
ตาราง 13 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	61
ตาราง 14 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	63
ตาราง 15 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	65
ตาราง 16 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	67
ตาราง 17 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	69
ตาราง 18 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	71
ตาราง 19 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	73
ตาราง 20 แสดงผลการเปรียบเทียบผลของการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ และผลของงานวิจัยนี้	80

สารบัญรูปภาพ

	หน้า
ภาพประกอบ 1 แสดงกรอบแนวคิดงานวิจัย.....	6
ภาพประกอบ 2 แสดงขั้นตอนการกระตุ้นการเกิดเม็ดสีจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต	9
ภาพประกอบ 3 แสดงปฏิกิริยารีดอกซ์จากสารอนุมูลอิสระและเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ	17
ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี.....	17
ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี.....	18
ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินเอ.....	19
ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ quercetin.....	20
ภาพประกอบ 8 แสดงการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์.....	31
ภาพประกอบ 9 แสดงการยับยั้งการเกิด lipid peroxidase ของเยื่อหุ้มเซลล์.....	32
ภาพประกอบ 10 แสดงการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์.....	33
ภาพประกอบ 11 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC 83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตาราง เซนติเมตร.....	44
ภาพประกอบ 12 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	46
ภาพประกอบ 13 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตาราง เซนติเมตร.....	48
ภาพประกอบ 14 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตาราง เซนติเมตร.....	50

ภาพประกอบ 15 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง โพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC 83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	52
ภาพประกอบ 16 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง โพรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	54
ภาพประกอบ 17 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง โพรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	56
ภาพประกอบ 18 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง โพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	58
ภาพประกอบ 19 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	60
ภาพประกอบ 20 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	62
ภาพประกอบ 21 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	64
ภาพประกอบ 22 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงด้วยโพรไบโอติก <i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	66
ภาพประกอบ 23 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก <i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร.....	68

ภาพประกอบ 24 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก
Lactobacillus reuteri TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร
 70

ภาพประกอบ 25 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก
Lactobacillus paracasei MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตาราง
 เซนติเมตร..... 72

ภาพประกอบ 26 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก
Lactobacillus salivarius MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตาราง
 เซนติเมตร..... 74



บทที่ 1

บทนำ

ภูมิหลัง

ในการดำรงชีวิตประจำวัน แสงแดดนับว่าเป็นปัจจัยที่ต้องพบเจออย่างหลีกเลี่ยงไม่ได้ โดยแสงแดดนั้นก่อให้เกิดทั้งคุณประโยชน์และโทษกับสิ่งมีชีวิตบนโลก เช่น ได้ให้คุณประโยชน์กับเราในเรื่องของการเป็นแหล่งสร้างพลังงานขนาดใหญ่ ทำให้เกิดการสร้างความอบอุ่นแก่ร่างกาย และเป็นแหล่งพลังงานที่สำคัญของสิ่งมีชีวิตบนโลก แต่ก็ปฏิเสธไม่ได้ว่า แสงแดดนั้นก็ทำให้โทษแก่มนุษย์ด้วยเช่นกัน โดยหนึ่งในส่วนประกอบที่สำคัญของแสงแดดคือ รังสีอัลตราไวโอเล็ต ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ตประกอบไปด้วย 3 ชนิด คือ รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอ (UVA) รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบี (UVB) และรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดซี (UVC) รังสีอัลตราไวโอเล็ตที่สามารถลงมาถึงชั้นพื้นโลกได้ คือรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอและบี ส่วนรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดซี จะถูกดูดกลืนด้วยชั้นโอโซนของโลกทั้งหมด จึงไม่พบรังสีอัลตราไวโอเล็ตซีที่พื้นโลก ในทางตจวิทยา เมื่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตกระทบกับชั้นผิวหนังของเรา จะทำให้เกิดการกระตุ้นการสร้างเม็ดสีในชั้นผิวหนัง ทำให้ผิวหนังมีสีเข้มขึ้น และสามารถสร้างสารอนุมูลอิสระในเซลล์ของผิวหนังให้มากขึ้นได้ ซึ่งสารอนุมูลอิสระในเซลล์ของผิวหนังต่อผลเสียต่อเซลล์ได้ในหลายประการ เช่น ไปกระตุ้นการอักเสบในชั้นของผิวหนัง มีการเปลี่ยนแปลงของโครงสร้างในเซลล์ผิวหนัง และสามารถกระตุ้นให้ผิวหนังแก่ก่อนวัยอันควร นอกจากนี้รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบียังสามารถไปทำลายดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ผิวหนังได้โดยตรง ซึ่งทำยที่สุดจากทั้งปัจจัยการเพิ่มขึ้นของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์และจากการทำลายดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ จะทำให้เซลล์เหล่านั้นพัฒนามากลายเป็นเซลล์มะเร็งได้ ซึ่งปัจจุบันได้มีการศึกษาค้นคว้าในการหาสารต้านอนุมูลอิสระมากขึ้น เพื่อนำมาพัฒนาและปรับใช้ทางการแพทย์ เพื่อเป็นการลดความเสียหายจากการถูกทำลายด้วยสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ และในปัจจุบันได้มีการศึกษาว่าโพรไบโอติก ซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในลำไส้ ทำหน้าที่คอยปกป้องอันตรายจากเชื้อก่อโรคต่างๆ มีประสิทธิภาพในการลดสารต้านอนุมูลอิสระได้ ในปัจจุบันจึงได้มีการนำโพรไบโอติกมาศึกษาทางด้านการแพทย์มากขึ้น เพื่อหาคุณประโยชน์ใหม่ที่ที่สามารถนำมาใช้ในการรักษาและป้องกันจากโรคมัยต่างๆ ได้

คำถามงานวิจัย (Research questions)

คำถามหลัก (Primary question)

โพรบิโอบิติกสามารถช่วยลดสารอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีได้หรือไม่

คำถามรอง (Secondary question)

โพรบิโอบิติกสามารถช่วยลดการอักเสบในเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีได้หรือไม่

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

1. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านอนุมูลอิสระของโพรบิโอบิติกสายพันธุ์ไทย ผ่านการศึกษาอนุมูลอิสระภายในเซลล์และการเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ Superoxide dismutase ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตบี

2. เพื่อศึกษาประสิทธิภาพการต้านการอักเสบของโพรบิโอบิติกสายพันธุ์ไทย ผ่านการศึกษา ระดับ Tumor necrotic factor - alpha ของเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยแสงอัลตราไวโอเล็ตบี

ความสำคัญของงานวิจัย

สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์ สามารถเกิดขึ้นได้ทั้งจากปัจจัยภายในและภายนอกเซลล์ สำหรับสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากปัจจัยภายในเซลล์ สามารถเกิดขึ้นได้จากในขั้นตอนต่างๆจากกระบวนการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย ส่วนปัจจัยภายนอกเซลล์ ได้แก่ มลภาวะทางอากาศ การฉายรังสี ยาหรือสารเคมีและรังสีอัลตราไวโอเล็ตในแสงแดด เป็นต้น รังสีอัลตราไวโอเล็ตในแสงแดดนับได้ว่าเป็นปัจจัยที่สำคัญในการก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เนื่องจากเป็นปัจจัยที่หลีกเลี่ยงได้ยากในชีวิตประจำวัน ซึ่งในทางผิวหนัง รังสีอัลตราไวโอเล็ตสามารถส่งผลเสียให้กับเซลล์ผิวหนังของเราได้ในหลายๆประการ เช่น ทำให้ผิวหนังได้รับการอักเสบ ทำให้ผิวหนังในส่วนที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตดูมีอายุมากกว่าในส่วนอื่น เช่น ทำให้เกิดริ้วรอยและผิวหนังที่เหี่ยวย่น นอกจากนี้ รังสีอัลตราไวโอเล็ตจะไปกระตุ้นกระบวนการการเกิดเม็ดสี (melanogenesis) ซึ่งทำให้ผิวมีสีคล้ำขึ้นหรืออาจเกิดเป็นฝ้าได้ และหากเซลล์ผิวหนังที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นระยะเวลาาน อาจทำให้เซลล์ผิวหนังนั้นกลายเป็นเซลล์มะเร็งได้^(1, 2)

ในการป้องกันความเสียหายของผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต สามารถแบ่งได้เป็นหลายๆส่วน ตั้งแต่การป้องกันของธรรมชาติ เช่น ชั้นบรรยากาศโอโซน ฝุ่นควัน และเมฆหมอก

ในส่วนต่อมาก็คือการเลือกใช้วัสดุทางกายภาพมาปกคลุมร่างกาย เช่น การเลือกใช้เสื้อผ้า เครื่องแต่งกายต่างๆ ที่สามารถป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้ หรือใช้ร่ม แว่นกันแดด หมวกปีกกว้างเพื่อลดการสัมผัสของผิวหนังและรังสีอัลตราไวโอเล็ตโดยตรง ซึ่งในบางครั้งอุปกรณ์เหล่านี้อาจไม่สามารถใช้ได้ตลอดเวลา เนื่องจากข้อจำกัดของกิจกรรมที่เราต้องทำ จึงได้มีการใช้ในส่วนของครีมกันแดด (Sunscreen) มาช่วยในการป้องกันการเกิดความเสียหายของผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตเพิ่มเติม⁽³⁾ แต่อย่างไรก็ตาม ครีมกันแดดก็ส่งผลเสียให้กับมนุษย์และสิ่งแวดล้อมได้เช่นกัน เช่น สามารถก่อให้เกิดอาการแพ้ผิวหนังจากส่วนประกอบของครีมกันแดด หรือส่งผลกระทบต่อปะการังในสิ่งแวดล้อม⁽⁴⁾ นอกจากนี้ยังได้มีการใช้สารสกัดจากผักและผลไม้ ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระเพื่อช่วยลดความเสียหายของผิวหนังที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ เช่น วิตามินซี วิตามินอี และวิตามินอี เป็นต้น⁽⁵⁾ จากการศึกษาของ Mary S. Matsui และคณะ ในปี 2009 พบว่าการใช้ครีมกันแดดที่มีส่วนผสมของสารต้านอนุมูลอิสระที่ได้จากพืชมีส่วนช่วยในการป้องกันความเสียหายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตในผิวหนังได้ดีกว่าการใช้ครีมกันแดดเพียงอย่างเดียว⁽⁶⁾ แต่สำหรับในสารต้านอนุมูลอิสระเหล่านี้ ถ้าหากได้รับปริมาณที่มากเกินไปก็สามารถส่งผลเสียต่อร่างกายได้เช่นกัน เช่น การเกิดภาวะhypervitaminosisในกรณีได้รับวิตามินเข้าสู่ร่างกายที่มากเกินไป โดยจะทำให้มีอาการ เช่น อ่อนเพลีย คลื่นไส้ อาเจียน ตับม้ามโตและเกิดเป็นภาวะเลือดออกง่ายได้ เป็นต้น⁽⁷⁾ ในปัจจุบันจึงได้มีการวิจัยค้นคว้าเกี่ยวกับสารต้านอนุมูลอิสระชนิดใหม่ๆที่มีความปลอดภัยต่อร่างกาย ซึ่งหนึ่งในนั้นก็คือ โพรไบโอติก ที่มีการศึกษาเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระมากขึ้นในปัจจุบัน

โพรไบโอติกเป็นจุลชีพหรือเป็นแบคทีเรียประจำถิ่นที่อาศัยอยู่ในลำไส้ คอยทำหน้าที่ในการปกป้องอันตรายจากจุลชีพก่อโรคต่างๆและในปัจจุบันได้มีการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกในด้านการแพทย์มากขึ้น สำหรับในทางผิวหนังก็ได้มีการนำโพรไบโอติกมาศึกษาในการรักษาในโรคต่างๆ เช่น โรคสะเก็ดเงิน⁽⁸⁾โรคภูมิแพ้ผิวหนัง⁽⁹⁾ สิวหรือนำมาใช้เป็นส่วนผสมของเครื่องสำอางต่างๆ

จากงานวิจัยของ Hyemin Kim ได้มีการนำโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* มาศึกษาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าโพรไบโอติกในแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน มีโพรไบโอติกเพียงบางชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการลดสารอนุมูลอิสระได้⁽¹⁰⁾

จากงานวิจัยของ A-Rang Im ได้นำโพรไบโอติกมาศึกษาการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte cell line) โดยได้มีการศึกษาเปรียบเทียบระดับและการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนัง โดยการนำเซลล์ผิวหนังมาบ่มด้วยโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302 ก่อนนำไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระในเซลล์มากขึ้นโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี เปรียบเทียบกับในกลุ่มของเซลล์ผิวหนังที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีแต่ไม่ได้บ่มด้วยโพรไบโอติก ซึ่งพบว่าในเซลล์ผิวหนังที่ถูกบ่มด้วยโพรไบโอติกจะมีการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase และเอนไซม์ catalase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์มีระดับสูงกว่าและมีการคงอยู่ของเซลล์ที่มากกว่าในกลุ่มที่ไม่ถูกบ่มด้วยโพรไบโอติก⁽¹¹⁾

นอกจากนี้ได้มีการศึกษาเกี่ยวกับโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทย โดยในปัจจุบันได้มีการศึกษาโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยเกี่ยวกับการคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระและการต้านการอักเสบเพิ่มมากขึ้น จากการศึกษาของ Porntipha Vitheejongjaroen และคณะ⁽¹²⁾ ได้ศึกษาเกี่ยวกับการทำโยเกิร์ตที่ทำจากการหมักโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Bifidobacterium animalis* MSMC83 พบว่า *B. animalis* MSMC83 มีคุณสมบัติต้านอนุมูลอิสระจากการทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical and hydroxyl radical scavenging activity

จากการศึกษาของ Boonyarut Ladda และคณะ⁽¹³⁾ ได้ศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านการอักเสบของโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 ใน Hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2) พบว่า *L. paracasei* MSMC39-1 สามารถยับยั้งการหลั่ง TNF- α และสามารถลดระดับ aspartate aminotransferase ในหนูที่เป็นตับอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

จากการศึกษาของ Susama Banjonjit และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้ศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกสายพันธุ์ในไทย (*Lactobacillus paracasei* MSMC39-1) ในการลดการอักเสบผ่านการวัดระดับของ TNF- α ของน้ำเหลืองเหงือก (Crevicular fluid) ในผู้ป่วย 24 คนที่ได้รับการถอนฟันกรามซี่ที่สาม โดยได้แบ่งผู้ป่วยเป็นทั้งหมด 2 กลุ่ม ในกลุ่มแรกจะได้รับการล้างแผลด้วยโพรไบโอติก ในกลุ่มที่ 2 จะได้รับการล้างแผลด้วยน้ำเกลือ (0.9% Normal saline) โดยผลการวิจัยพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการล้างแผลด้วยโพรไบโอติกจะมีระดับ TNF- α ในน้ำเหลืองเหงือกน้อยกว่าในกลุ่มที่ได้รับการล้างแผลด้วยน้ำเกลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

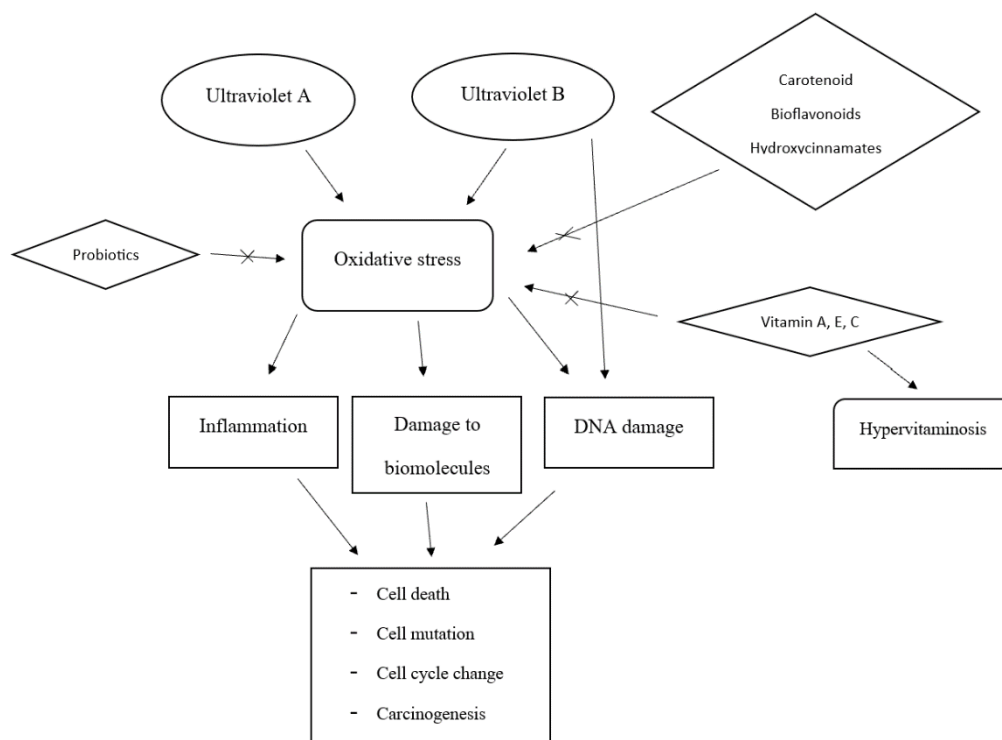
อย่างไรก็ตาม ผู้วิจัยได้สังเกตเห็นว่า (gap of knowledge) ในงานวิจัยที่ผ่านมา ยังไม่มีงานวิจัยที่นำโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยมาศึกษากับเซลล์ผิวหนังถึงประสิทธิภาพในการต้านอนุมูล

อิสระและการต้านการอักเสบภายในเซลล์ ดังนั้นผู้วิจัยจึงเห็นว่า หากได้นำโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยมาศึกษา การเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในเซลล์ผิวหนังจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต จะสามารถช่วยพัฒนาคุณสมบัติของโพรไบโอติกและพัฒนาการรักษาและการป้องกันอันตรายของสารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นจากแสงแดดในเซลล์ผิวหนังได้

ขอบเขตของงานวิจัย

จะศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกที่ได้จากการเก็บรวบรวมไว้เป็นแหล่งสายพันธุ์ของคนไทย โดยคัดเลือกโพรไบโอติกที่มีความหลากหลายมาทดสอบโดยเตรียมเป็น cell-free culture supernatants (CFS) มาศึกษาประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนังหลังได้รับการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตปีโดยผ่านการศึกษาระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์และการเพิ่มขึ้นของเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) และศึกษาประสิทธิภาพของการลดสารก่อการอักเสบในเซลล์ผิวหนังโดยการวัดระดับของ Tumor necrosis factor – alpha (TNF- α)

กรอบแนวคิดงานวิจัย



ภาพประกอบ 1 แสดงกรอบแนวคิดงานวิจัย

สมมติฐานในการวิจัย

1. โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการลดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์และการเพิ่มขึ้นของระดับเอนไซม์ Superoxide dismutase (SOD) ในเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี
2. โพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการลดสารก่อการอักเสบผ่านการศึกษาระดับ Tumor necrotic factor-alpha ในเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ในการวิจัยครั้งนี้ ผู้วิจัยได้ศึกษาเอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้องตามหัวข้อ ดังต่อไปนี้

1. รังสีอัลตราไวโอเล็ตและผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีผลต่อผิวหนัง
2. สารอนุมูลอิสระและสารการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์
3. การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ใช้ในปัจจุบัน
4. สารต้านอนุมูลอิสระ
5. โพรไบโอติก
6. ประโยชน์ของโพรไบโอติก
7. การวัดการคงอยู่ของเซลล์
8. การวัดค่าการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์
9. การวัดระดับของสารการอักเสบภายในเซลล์

2.1 รังสีอัลตราไวโอเล็ตและผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีผลต่อผิวหนัง

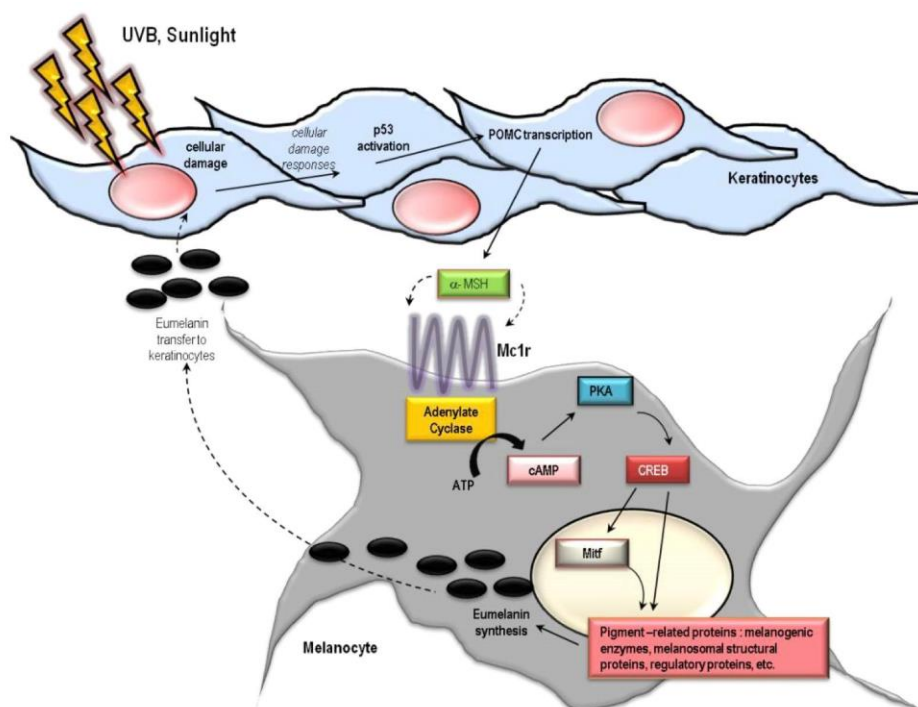
แสงอาทิตย์ (Solar radiation) ประกอบไปด้วยส่วนประกอบหลักทั้งหมด 3 ส่วน ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ต ที่มีความยาวคลื่นตั้งแต่ 100 ถึง 400 นาโนเมตร มีสัดส่วนเป็น 6.8 % ของรังสีจากแสงอาทิตย์ที่กระทบกับผิวโลก ลำดับต่อมาเป็นแสงที่เรามองเห็นด้วยตาเปล่า (visible light) ซึ่งมีความยาวคลื่น 400 ถึง 760 นาโนเมตร พบเป็นสัดส่วนประมาณ 38.9% ของรังสีจากแสงอาทิตย์ที่กระทบกับผิวโลกและรังสีอินฟราเรด มีความยาวคลื่นอยู่ที่ 760 ถึง 1,000 นาโนเมตร พบเป็นสัดส่วน 40% ของรังสีจากแสงอาทิตย์ที่กระทบสู่ผิวโลก⁽¹⁵⁾

รังสีอัลตราไวโอเล็ตประกอบไปด้วย 3 ชนิด คือ รังสีอัลตราไวโอเล็ตเอ (UVA) มีความยาวคลื่น 315 ถึง 400 นาโนเมตร รังสีอัลตราไวโอเล็ตบี (UVB) มีความยาวคลื่น 280 ถึง 320 นาโนเมตรและรังสีอัลตราไวโอเล็ตซี (UVC) มีความยาวคลื่น 200 ถึง 400 นาโนเมตร ซึ่งในแสงแดดที่ส่องถึงพื้นโลกพบว่า 90-95% เป็นรังสีอัลตราไวโอเล็ตเอ อีก 5 - 10 % เป็นรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ส่วนรังสีอัลตราไวโอเล็ตซีจะถูกดูดกลืน ที่ชั้นบรรยากาศชั้นโอโซนของโลก ก่อนที่จะกระทบลงมาถึงพื้นโลก⁽¹⁶⁾

สำหรับผลกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตในทางตจวิทยา เมื่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตมากระทบกับชั้นผิวหนัง รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดต่างกัน จะมีความยาวคลื่นในการทะลุชั้นผิวได้ต่างกัน โดยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่นมากกว่า จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ผิวหนังในชั้นชั้นหนังแท้(Dermis)ที่มีความลึกกว่าเป็นหลัก โดยปกติแล้ว ชั้นหนังแท้จะประกอบไปด้วยหลอดเลือด ปลายประสาทรับความรู้สึก ต่อมน้ำนม ต่อมน้ำมันและเส้นขน ซึ่งเซลล์ที่พบเป็นหลักในชั้นหนังแท้ ได้แก่ ไฟโบรบลาสต์(fibroblast) เป็นเซลล์ที่มีไว้สร้างคอลลาเจนและสร้างไฟเบอร์เพื่อเสริมสร้างความแข็งแรงของชั้นผิวหนัง เมื่อชั้นหนังแท้ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นระยะเวลานาน จะทำให้เซลล์ผิวหนังในชั้นนี้ถูกทำลาย ส่งผลให้ผิวหนังมีความแข็งแรงและความยืดหยุ่นลดน้อยลงและเกิดเป็นริ้วรอยที่ผิวหนัง(photoaging)ตามมาได้ และในส่วนของรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่นน้อยกว่า จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ผิวหนังในชั้นหนังกำพร้า(Epidermis) ที่มีความตื้นมากกว่า โดยเซลล์ที่พบในชั้นหนังกำพร้าส่วนใหญ่จะเป็นเซลล์ผิวหนัง(Keratinocyte) และเซลล์สร้างเม็ดสี(Melanocyte) ^(1, 16)

เมื่อเซลล์ผิวหนังได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต จะไปกระตุ้นให้เกิดสารอนุมูลอิสระในเซลล์ให้มีระดับสูงขึ้น เมื่อเซลล์เกิดความเสียหายระหว่างสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ จะก่อให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน(Oxidative stress) และการอักเสบ จะส่งผลให้ผิวหนังเกิดความเสียหายในระยะเฉียบพลันคือ จะทำให้ผิวหนังมีสีแดง(erythema) และมีผิวไหม้(sunburn) และเมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นเวลานานจะก่อให้เกิดความเสียหายต่อโปรตีน ไขมันและโครงสร้างของดีเอ็นเอในนิวเคลียส ^(17, 18) โดยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปีสามารถก่อให้เกิดความเสียหายของดีเอ็นเอในนิวเคลียสได้โดยตรง เนื่องจากดีเอ็นเอสามารถดูดกลืนรังสีได้ในช่วงความยาวคลื่น 245 ถึง 290 นาโนเมตร ซึ่งจะให้เกิดการสร้างของ pyrimidine dimer และ pyrimidine-pyrimidone photoproducts ⁽¹⁹⁾ โดยจะส่งผลให้เซลล์ที่ได้รับผลกระทบเกิดความเสียหาย เกิดการกลายพันธุ์หรือกลายเป็นเซลล์มะเร็ง (photocarcinogenesis) ได้ในที่สุด ⁽²⁾ ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ตปีที่มีพลังงานที่สูงกว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตเอ จะส่งผลทำให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตปีสามารถก่อให้เกิดความเสียหายกับดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ได้โดยตรง นอกจากนี้ เมื่อเซลล์ผิวหนังได้รับความเสียหายจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต จะกระตุ้นให้เกิดการถอดรหัสพันธุกรรม (Transcription) ของ pro-opiomelanocortin (POMC) gene เพิ่มสูงขึ้น ซึ่ง POMC gene มีหน้าที่ในการแปลงรหัสสำหรับการสร้างและหลั่ง melanocyte stimulating hormone (MSH) ซึ่ง MSH จะกระตุ้นให้มีการสร้างเม็ดสี (Melanin) ในลำดับต่อไป ⁽¹⁶⁾

ดั่งภาพประกอบ 2



ภาพประกอบ 2 แสดงขั้นตอนการกระตุ้นการเกิดเม็ดสีจากรังสีอัลตราไวโอเล็ต

ที่มา : D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, Scott T. Uv radiation and the skin. Int J Mol Sci. 2013;14(6):12222-48. eng. 2013/06/12.

สำหรับความเสียหายของชั้นผิวหนังที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่นอกจากเกิดการแดง การไหม้และการกลายเป็นมะเร็งได้แล้ว รังสีอัลตราไวโอเล็ตยังเป็นสาเหตุในการเกิดกลุ่มโรคทางผิวหนังที่มีความไวต่อแสง(Photodermatoses)ด้วย

โดยโรคในกลุ่ม Photodermatoses จะถูกแบ่งออกเป็นทั้งหมด 4 กลุ่ม ได้แก่

1. กลุ่มที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกัน (Immunologically-mediated photodermatoses) เช่น โรคผิวหนังแพ้แดดเรื้อรัง (Chronic actinic dermatitis) และโรคลมพิษจากแสงแดด (Solar urticaria) เป็นต้น
2. กลุ่มโรคที่เกิดจากยาหรือสารเคมีทำให้เกิดภาวะไวต่อแสง (Chemical and drug-induced photosensitivity)
3. กลุ่มที่เกิดจากความผิดปกติของยีนที่ทำให้ไวต่อแสงแดด (Genophotodermatoses) เช่น โรค Xeroderma pigmentosum

4. กลุ่มที่มีโรคผิวหนังเดิมแต่ถูกกระตุ้นให้กำเริบมากขึ้นจากแสงแดด (Photoexacerbated dermatoses) เช่น โรคเอสแอลอี (Systemic Lupus Erythematosus)⁽²⁰⁾

การใช้รังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่ใช้ในการทดลองของเซลล์ผิวหนัง ผู้วิจัยได้รวบรวมการศึกษาที่ใช้เซลล์ผิวหนังและรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีในการทดลอง เพื่อประเมินหาระดับของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีและระยะเวลาที่ใช้ในการฉายที่เหมาะสมในการทำการทดลองกับเซลล์ผิวหนัง ดังตาราง 1

ตาราง 1 แสดงงานวิจัยและรายละเอียดของแหล่งกำเนิดของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี

งานวิจัย	รายละเอียดของแหล่งกำเนิดของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี	ระยะเวลาในการฉายรังสี
Keratinocyte growth factor 2 ameliorates UVB-induced skin damage via activating the AhR/Nrf2 signaling pathway ⁽²¹⁾	VL6-M Biotronic device 200 mJ/cm ²	1 ชั่วโมง
Antioxidant and anti-inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCat keratinocyte cells ⁽²²⁾	Bio-Link BLX Cross linker 40 mJ/cm ²	24 ชั่วโมง
Potential Use of Amla (<i>Phyllanthus emblica L.</i>) Fruit Extract to Protect Skin Keratinocytes from Inflammation and Apoptosis after UVB Irradiation ⁽²³⁾	UV incubator BIO SUN Ultra violets 40 mJ/cm ²	18 ชั่วโมง

ตาราง 1 (ต่อ)

งานวิจัย	รายละเอียดของ แหล่งกำเนิดของรังสี อัลตราไวโอเล็ตบี	ระยะเวลาในการฉายรังสี
Protective effects of Timosaponin AIII against UVB-radiation induced inflammation and DNA injury in human epidermal keratinocytes ⁽²⁴⁾	UV crosslinker 5x8 W UV dual bipin discharge type CL-1000M 20 mJ/cm ²	15 วินาที
Protective effects of tyndallized Lactobacillus acidophilus IDCC3302 against UVB-induced photodamage to epidermal keratinocytes cells ⁽¹¹⁾	20 mJ/cm ²	24 ชั่วโมง
Effect of Cyanidin-3-O-glucoside on UVB-induced response in human keratinocytes ⁽²⁵⁾	Phillips TL-01 lamp 5,10,15 และ 20 mJ/cm ²	ไม่ระบุ
Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of <i>Lithospermum erythrorhizon</i> ⁽²⁶⁾	Ultraviolet Transiluminator, Model NTFM-26 52.5 mJ/cm ²	ไม่ระบุ
Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays ⁽²⁷⁾	10, 20 และ 40 mJ/cm ²	ไม่ระบุ

2.2 สารอนุมูลอิสระและสารการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในเซลล์

สารอนุมูลอิสระ (Oxidant) คือ สารที่มีหน้าที่แย่งอิเล็กตรอนจากสารโมเลกุลหนึ่งไปสู่สารอีกโมเลกุลหนึ่งในปฏิกิริยารีดอกซ์⁽²⁸⁾ สำหรับสารอนุมูลอิสระที่พบภายในเซลล์จะประกอบไปด้วย สารอนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive oxygen species : ROS), สารอนุมูลอิสระไนโตรเจน (Reactive nitrogen species : RNS) และสารอนุมูลอิสระซัลเฟอร์ (Reactive sulfur species : RSS)

สารอนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive oxygen species: ROS) เป็นสารอนุมูลอิสระหลักที่เกิดจากการทำปฏิกิริยาต่างๆภายในเซลล์ เช่น กระบวนการสร้างไขมันไม่อิ่มตัวในเอ็นโดพลาสมิก เรติคูลัม ปฏิกิริยาในกระบวนการหายใจระดับเซลล์ เป็นต้น ส่วนสารอนุมูลอิสระไนโตรเจน (Reactive nitrogen species : RNS) สามารถเกิดได้จากกระบวนการเมตาบอลิซึมของกรดอะมิโน(L-arginine) โดยอยู่ในรูปของNitric oxide (NO) ซึ่งเอนไซม์ที่ใช้ในปฏิกิริยานี้ คือ Nitric oxide synthase (NOS)

ตัวอย่างของสารอนุมูลอิสระออกซิเจนที่สำคัญ ได้แก่ ซุปเปอร์ออกไซด์ (Superoxide anion radical : O₂⁻) ไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (Hydrogen peroxide : H₂O₂) และไฮดรอกซิล (hydroxyl : OH) เป็นต้น ส่วนอนุมูลอิสระไนโตรเจนที่สำคัญประกอบด้วย ไนตริกออกไซด์ (Nitric oxide : NO) เพอร์ออกซีไนไตรท์ (Peroxyxynitrite) เป็นต้น⁽²⁹⁾

สารอนุมูลอิสระทำหน้าที่เป็นโมเลกุลที่ส่งสัญญาณที่สำคัญในการรักษาการทำงานเชิงสรีระวิทยาของเซลล์ เช่น การแบ่งตัวของเซลล์ การเจริญเติบโตของเซลล์และการอยู่รอดของเซลล์ แต่อย่างไรก็ตาม หากในเซลล์มีอนุมูลอิสระออกซิเจนที่มากเกินไป จะส่งผลให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชันของเซลล์และกระตุ้นให้เกิดภาวะการอักเสบภายในเซลล์ได้⁽³⁰⁾

ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน(Oxidative stress) เป็นภาวะที่เกิดจากการเสียสมดุลของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ภายในเซลล์ ซึ่งส่งผลให้เกิดความเสียหายของไขมันและโปรตีนผ่านกระบวนการ Protein carbonylation และกระบวนการ Lipid peroxidation ตามลำดับ⁽³¹⁾ นอกจากนี้ยังก่อให้เกิดความเสียหายต่อดีเอ็นเอที่อยู่ภายในเซลล์ด้วย^(17, 18)

สารอนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นภายในเซลล์สามารถเกิดได้จากทั้งปัจจัยภายนอกเซลล์และปัจจัยภายในเซลล์ ในส่วนของปัจจัยที่อยู่ภายในเซลล์สามารถเกิดได้จากเอนไซม์และสารไม่ใช่เอนไซม์ภายในเซลล์ เอนไซม์ภายในเซลล์ที่ทำให้เกิดสารอนุมูลอิสระได้ เช่น แชนนินออกซิเดส (Xanthine oxidase) ไซโคลออกซิจีเนส (Cyclooxygenase) ลิพอกซีจีเนส (Lipoxygenase) และ NADPH oxidase⁽³²⁾ ส่วนสารที่ไม่ใช่เอนไซม์ สามารถเกิดขึ้นได้จากกระบวนการหายใจระดับเซลล์

ในไมโตคอนเดรีย ภาวะการอักเสบ การออกกำลังกายหรือเกิดจากภาวะขาดเลือด ในส่วนของปัจจัยภายนอกเซลล์ สามารถเกิดได้จากการฉายรังสีรวมถึงการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ต มลภาวะทางอากาศ การสูบบุหรี่ หรือการได้รับสารเคมีหรือยาฆ่าแมลง เป็นต้น⁽¹⁾

ภาวะการอักเสบเป็นกลไกที่ร่างกายทำเพื่อปกป้องตัวเอง เพื่อต่อต้านสิ่งที่เป็นอันตรายหรือสิ่งแปลกปลอมที่เข้ามาในร่างกาย ซึ่งสามารถทำให้เกิดการแบ่งเซลล์ที่มากขึ้น มีการคงอยู่ของเซลล์มากขึ้น หรือทำให้เซลล์ตายมากขึ้น และการที่มีภาวะเครียดจากออกซิเดชันภายในเซลล์สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะการอักเสบภายในเซลล์ได้ โดยปกติภาวะเครียดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะประกอบไปด้วยวิถีหลักๆ อยู่ 3 ทาง ได้แก่ ผ่านทาง Nuclear factor kappa B (NF- κ B), Mitogen-activated protein kinase (MAPK) และ Nuclear factor erythroid-2 related factor- 2(Nrf-2)

ในภาวะปกติ NF- κ B จะอาศัยอยู่ในไซโตพลาสซึมโดยเกาะกับโปรตีน I κ B และจะอยู่ในรูปที่ไม่พร้อมทำงาน (inactive form) เมื่อเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน สารอนุมูลอิสระจะไปเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของสาร I κ B ส่งผลให้ NF- κ B เกิดเป็นอิสระและกระตุ้นให้มีการแสดงออกของยีนส์ที่ทำหน้าที่ในการแสดงออกของโปรตีนที่ทำให้เกิดการอักเสบ เช่น เกิดการหลั่งของไซโตไคน์ต่างๆที่ทำให้เกิดการอักเสบได้ เช่น Tumor necrosis factor alpha และ beta (TNF- α , TNF- β) จะทำให้มีการเรียกของเม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลและแมคโครฟาจ Interleukin-1 และ Interleukin-5 จะทำให้เกิดการเคลื่อนย้ายของนิวโทรฟิลและเกิดการสร้างเส้นเลือดใหม่ (Angiogenesis) ซึ่งเป็นหนึ่งในกระบวนการที่ทำให้เกิดการอักเสบภายในร่างกาย⁽¹⁷⁾

สำหรับ MAPK signaling pathways จะมีการกระตุ้นผ่านวิถีของ p38 และ JNK (Jun N-terminal kinase) ให้มีการสร้าง Matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่ง MMPs จะมีบทบาทหน้าที่ต่อกระบวนการต่างๆ ของร่างกาย เช่น wound healing, inflammation และ carcinogenesis⁽³³⁾

ในส่วนของ Nuclear factor erythroid-2 related factor-2 (Nrf-2) ในสภาวะปกติ Nrf-2 จะทำหน้าที่ในการกระตุ้นการสร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ภายในเซลล์ เช่น superoxide dismutase, catalase, glutathione แต่เมื่อเซลล์ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี จะทำให้มีการทำงานของ Nrf-2 ที่น้อยลง มีผลทำให้เซลล์สร้างสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์น้อยลงด้วย⁽³⁴⁾

นอกจากนี้ รังสีอัลตราไวโอเล็ตยังมีส่วนที่ทำให้เกิดมะเร็งในผิวหนังได้ (Carcinogenesis) โดยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปีจะไปทำลายดีเอ็นเอในเซลล์ได้โดยตรง โดยไปทำลายที่ pyrimidine

base ของดีเอ็นเอในนิวคลีออส ส่งผลให้เกิด pyrimidine-pyrimidone (6-4) photoproduct (6-4PPs) และ cyclobutene pyrimidine dimers (CPDs) ซึ่งส่งผลให้เกิดการเปลี่ยนแปลงโครงสร้างของดีเอ็นเอและเกิดการกลายพันธุ์เป็นเซลล์มะเร็งในที่สุด นอกจากนี้ ดีเอ็นเอในนิวคลีออสยังสามารถดูดซับรังสีได้สูงสุดในช่วงความยาวคลื่น 260 นาโนเมตรซึ่งตรงกับความยาวคลื่นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี⁽³⁵⁾

นอกจากการทำลายของดีเอ็นเอจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีโดยตรงแล้ว พบว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตบียังสามารถทำให้ยีนของเซลล์เกิดการกลายพันธุ์ (mutation) ได้โดยตรง เช่น รังสีอัลตราไวโอเล็ตบีทำให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *p53* ซึ่งพบว่ามีมะเร็งผิวหนังชนิด Squamous cell carcinoma มีการกลายพันธุ์ของยีน *p53* 90% ของคนไข้ทั้งหมด และรังสีอัลตราไวโอเล็ตบียังก่อให้เกิดการกลายพันธุ์ของยีน *PTCH* ซึ่งก่อให้เกิดมะเร็งผิวหนังชนิด Basal cell carcinoma ได้อีกด้วย⁽³⁶⁾

2.3 การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ใช้ในปัจจุบัน

การที่รังสีอัลตราไวโอเล็ตตกกระทบกับผิวหนังได้นั้น จะต้องผ่านการดูดกลืนของรังสีในหลายๆ ตัวกลาง ได้แก่

1. การป้องกันโดยธรรมชาติ (Naturally occurring photoprotective agent)
2. การป้องกันทางกายภาพ (Physical protective agents)
3. การใช้ยากันแดด (Sunscreen)
4. การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant agents)

1. การป้องกันโดยธรรมชาติ (Naturally occurring photoprotective agent) ถูกเริ่มตั้งแต่การที่รังสีอัลตราไวโอเล็ตผ่านเข้ามาถึงชั้นบรรยากาศของโลก ชั้นโอโซน รวมถึงผ่านโมเลกุลของก๊าซออกซิเจนและไนโตรเจนที่อยู่ในอากาศ ซึ่งส่งผลให้รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดที่ถูกดูดกลืนทั้งหมดตั้งแต่ในชั้นโอโซน เหลือเพียงรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอและบีที่ตกลงมาสู่พื้นโลก นอกจากนี้ในส่วนของชั้นบรรยากาศของโลกที่จะมีผลต่อรังสีอัลตราไวโอเล็ตแล้ว ยังมีปัจจัยอื่นๆ ที่สามารถส่งผลต่อการตกกระทบของรังสีอัลตราไวโอเล็ตมายังพื้นโลกได้ เช่น พิกัดที่อยู่ของพื้นที่ตามเส้นละติจูด และความสูงของที่อยู่นั้นๆ โดยในพื้นที่ที่จะได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตมากที่สุดคือในพื้นที่ที่อยู่บริเวณเส้นศูนย์สูตรของโลกและอยู่ในพื้นที่สูง โดยการส่งผ่านของรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบี จะลดลง 3% เมื่อพื้นที่นั้นมีการเพิ่มขึ้นของเส้นละติจูดในทุกๆ 3 องศา และในส่วนของความสูง รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบีจะเพิ่มขึ้น 4-10 % เมื่อพื้นที่นั้นมีการเพิ่ม

ความสูงในทุกๆ 1,000 ฟุต เนื่องจาก ในบริเวณที่มีความสูงจะมีชั้นบรรยากาศมาดูดกลืนรังสีอัลตราไวโอเล็ตได้น้อยลง นอกจากนี้ ยังมีปัจจัยทางธรรมชาติอื่นๆ ที่ส่งผลต่อการดูดกลืนของรังสีอัลตราไวโอเล็ต เช่น ฤดูกาล ช่วงเวลาในแต่ละวัน หมอกควันและมลพิษอื่นๆ ที่อยู่บนผิวโลก นอกจากนี้ การป้องกันโดยธรรมชาติไม่ได้เกิดขึ้นเฉพาะในสิ่งแวดล้อมภายนอกเพียงอย่างเดียว แต่ร่างกายยังมีชั้นผิวหนังที่มาป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตด้วยเช่นกัน

2. การป้องกันทางกายภาพ (Physical protective agents) ในการป้องกันทางกายภาพ สามารถป้องกันได้ตั้งแต่การเลือกใช้ชีวิตมาทำสิ่งก่อสร้าง เช่น การปิดผนังด้วยแผ่นปูนกระเบื้องหรือเลือกใช้เป็นวัสดุที่แสงสามารถผ่านได้ เช่น แผ่นกระจก โดยกระจกนั้นก็มิให้เลือกในหลายชนิด หลายความหนาขึ้นอยู่กับวัตถุประสงค์ของการนำมาใช้ นอกจากการใช้สิ่งก่อสร้างมาเป็นการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตในทางกายภาพแล้ว เรายังสามารถใช้เครื่องแต่งกายมาป้องกันทางกายภาพได้เช่นกัน เช่น การเลือกใช้เสื้อผ้ามาปกคลุมร่างกาย การสวมหมวก ใส่แว่นกันแดด หรือกางร่ม เป็นต้น⁽³⁾

3. การใช้สารกันแดด (Sunscreen) สารกันแดดที่จำหน่ายตามท้องตลาดในปัจจุบัน สามารถแบ่งตามกลไกการออกฤทธิ์ได้เป็น 2 ประเภท ได้แก่ ประเภทที่เป็นออร์แกนิก (Organic sunscreen) และไม่ใช่ออร์แกนิก (Inorganic sunscreen) สารกันแดดประเภทที่เป็นออร์แกนิก (Organic sunscreen) เป็นสารกันแดดที่มีการออกฤทธิ์แบบดูดซับแสง (absorb) เป็นหลัก โดยจะดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ตแล้วเปลี่ยนเป็นรูปของพลังงานความร้อนก่อนที่จะถูกปล่อยออกไปจากผิวหนัง ซึ่งสารกันแดดประเภทนี้ จะถูกแบ่งตามความยาวคลื่นของชนิดของรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่เราต้องการใช้ในการป้องกัน ได้แก่ รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอ (320-400 นาโนเมตร) รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบี (280-320 นาโนเมตร) และรังสีอัลตราไวโอเล็ตแบบกว้าง (broad-spectrum : 290-400 นาโนเมตร)

- สารกันแดดประเภทที่เป็นออร์แกนิกที่ใช้ในการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดเอ ได้แก่ Avobenzene, Ecamsule และ Bemotrizinol เป็นต้น

- สารกันแดดประเภทที่เป็นออร์แกนิกที่ใช้ในการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบี ได้แก่ กลุ่มอนุพันธ์ของ PABA กลุ่มCinnamates เช่น Octinoxate และกลุ่มของSalicylate เช่น Octisalate เป็นต้น

- สารกันแดดประเภทที่เป็นออร์แกนิกที่ใช้ในการป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ตแบบกว้าง(broad-spectrum) ได้แก่ Oxybenzone, Silatriazole และ Bemotrizinol เป็นต้น

สารกันแดดประเภทที่ไม่ใช่ซอร์แกนิก (Inorganic sunscreen) เป็นสารกันแดดที่มีการออกฤทธิ์โดยการสะท้อน(reflect)และกระจาย(scatter)รังสีอัลตราไวโอเล็ตเป็นหลัก โดยสารกันแดดในกลุ่มนี้จะมีความคงตัวต่อแสง(photostability)ที่มากกว่าและมีความไวในการแพ้(allergic sensitization)ที่น้อยกว่า ข้อเสียของการใช้สารกันแดดในกลุ่มนี้คือ เมื่อได้ทาบนผิวหนังแล้วจะทำให้ผิวหนังมีสีขาวยและมีประกายที่มากจนเกินไป ซึ่งอาจจะส่งผลต่อการนำไปทำเป็นส่วนประกอบของเครื่องสำอางได้ โดยตัวอย่างสารกันแดดในกลุ่มนี้ได้แก่ ไทเทเนียมไดออกไซด์ (Titanium dioxide) และซิงค์ออกไซด์ (Zinc oxide) เป็นต้น⁽³⁷⁾

4. การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant agents)

2.4 สารต้านอนุมูลอิสระ

สารต้านอนุมูลอิสระ คือสารที่ไปทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระ เพื่อให้เกิดความเป็นกลาง ลดความเสียหายของเซลล์ได้ ซึ่งสารต้านอนุมูลอิสระสามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ประเภท คือ สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์และสารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์

สารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นเอนไซม์ คือเอนไซม์ที่ไปทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์โดยตรง เช่น ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) แคตาเลส (Catalase) กลูตาไธโอน เพอรอกซิเดส (Glutathione peroxidase)

สำหรับเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) เป็นเอนไซม์ที่มีความสำคัญในการต้านอนุมูลอิสระ โดยทำหน้าที่ในการกระตุ้นการปฏิกิริยา(catalyze) การเปลี่ยนแปลงของsuperoxide anion (O_2^-)เป็นออกซิเจน(O_2) และ hydrogen peroxide (H_2O_2)ที่เกิดปฏิกิริยาได้ยากกว่า โดยเอนไซม์ซุปเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dismutase) ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม จะมีทั้งหมด3รูปแบบซึ่งจะแบ่งตามสารโลหะที่เป็นโคแฟกเตอร์ได้แก่

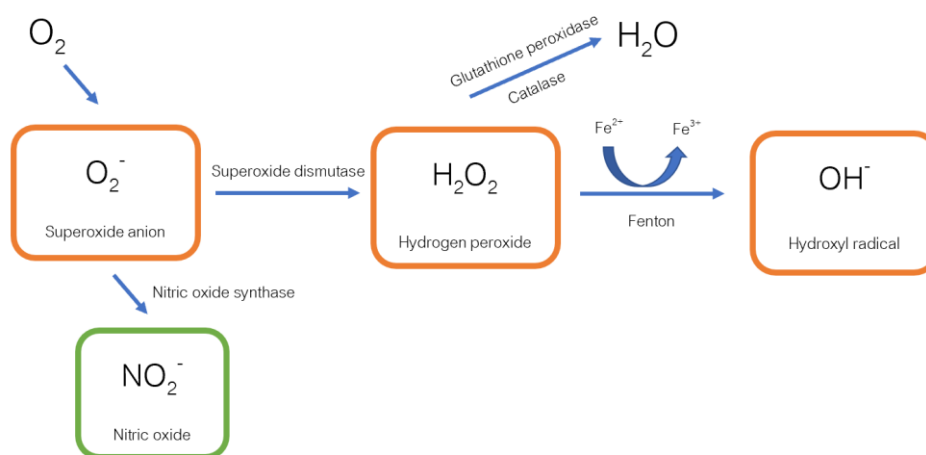
1. Cytosolic SOD

2. Extracellular SOD (CuZnSOD) มีบทบาทที่สำคัญในการเป็นเอนไซม์ตัวแรกที่ทำหน้าที่ต้านอนุมูลอิสระ

3. Mitochondrial SOD (MnSOD)

สำหรับเอนไซม์แคตาเลส (catalase)และเอนไซม์กลูตาไธโอนเพอรอกซิเดส (glutathione peroxidase) จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน hydrogen peroxide (H_2O_2) ให้เป็นน้ำ

(H₂O) ส่วนเอนไซม์ไนตริกออกไซด์ ซินเทส (nitric oxide synthase) จะทำหน้าที่ในการเปลี่ยน superoxide anion ให้เป็น nitric oxide ⁽³⁸⁾ ดังภาพประกอบ 3



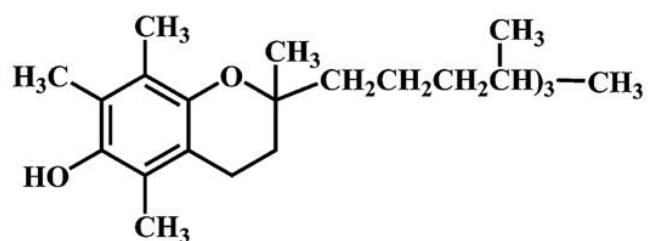
ภาพประกอบ 3 แสดงปฏิกิริยารีดอกซ์จากสารอนุมูลอิสระและเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ

ที่ ม ๑ : Addor FAS. Antioxidants in dermatology. An Bras Dermatol. 2017;92(3):356-62. eng. 2017/12/01.

สารต้านอนุมูลอิสระที่ไม่ใช่เอนไซม์ สามารถแบ่งได้เป็น 5 กลุ่ม คือ

1. วิตามิน

1.1 วิตามินอี (Tocopherol)

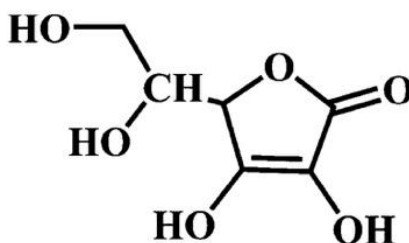


ภาพประกอบ 4 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินอี

ที่ ม ๑ : Nimse, S.B. and D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances, 2015. 5(35): p. 27986-28006.

วิตามินอีเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่เป็นสารประกอบฟีนอลที่สามารถละลายได้ในไขมันที่ถูกสังเคราะห์ได้จากพืช พบมากในถั่ว น้ำมันมะกอก น้ำมันดอกทานตะวันและธัญพืชต่างๆ โดยวิตามินอีประกอบไปด้วยอนุพันธ์ทั้งหมด 4 แบบ ได้แก่ α , β , γ และ δ ซึ่งมีความแตกต่างกันที่จำนวนและตำแหน่งของกลุ่มmethylในโครงสร้างทางเคมี ซึ่งวิตามินอีที่มีที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปของ α -tocopherol โดยวิตามินอีทำหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำให้สารอนุมูลอิสระมีความเป็นกลางและยับยั้งกระบวนการ lipid peroxidation ของเยื่อหุ้มเซลล์ ผ่านการสกัดกั้นของสาร lipid peroxy radicals⁽³⁸⁾ สำหรับในทางตจวิทยา วิตามินอีมีส่วนช่วยในการป้องกันการเกิดความเสียหายของผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตโดยผ่านการยับยั้งกระบวนการเกิด lipid peroxidation ของเซลล์ผิวหนัง จากงานวิจัยของ Emiko Yoshida และคณะในปี 2006 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการใช้อนุพันธ์วิตามินอีแบบใหม่ที่สามารถละลายได้ในน้ำ คือ γ -tocopherol-N, N-dimethylglycinate hydrochloride (γ -TDMG) ซึ่งสามารถเปลี่ยนเป็นรูปของ γ -tocopherol ในชั้นผิวหนังของหนูทดลองเปรียบเทียบกับประสิทธิภาพกับ α -tocopherol acetate พบว่าทั้ง α -tocopherol acetate และ γ -TDMG สามารถลดการแสดงของ COX-2 mRNA/protein ในชั้นผิวหนังของหนูหลังจากการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตและช่วยลดอาการบวมจากการอักเสบได้ด้วย⁽³⁹⁾ นอกจากนี้ ยังได้มีการศึกษาในการใช้วิตามินอีในการรักษาโรคทางผิวหนังอื่นๆ อีกด้วย เช่น cutaneous amyloidosis, subcorneal amyloidosis, atopic dermatitis และสะเก็ดเงิน เป็นต้น สำหรับผลข้างเคียงจากการใช้วิตามินอีจะมีในกรณีที่ได้รับวิตามินอีในปริมาณที่มากเกินไปจะทำให้เกิดภาวะ Hypervitaminosis E ซึ่งจะ ทำให้มีการลดการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือดและเกิดการรบกวนการทำงานของวิตามินเค ซึ่งจะทำให้เกิดภาวะเลือดออกง่ายได้⁽⁴⁰⁾

1.2 วิตามินซี (Ascorbic acid)

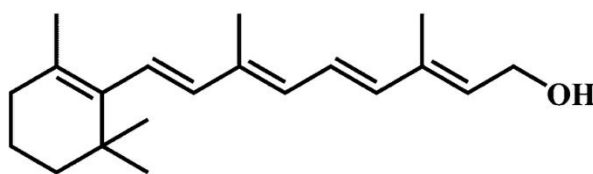


ภาพประกอบ 5 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินซี

ที่ ม ๑ : Nimse, S.B. and D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances, 2015. 5(35): p. 27986-28006.

วิตามินซีเป็นวิตามินสามารถสังเคราะห์ได้จากพืชและสัตว์บางชนิด มีคุณสมบัติสามารถละลายได้ในน้ำ โดยวิตามินซีมีฤทธิ์เป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่ทำหน้าที่ในการจ่ายอิเล็กตรอนให้กับ lipid radical เพื่อหยุดการเกิดปฏิกิริยา lipid peroxidation จากการศึกษาของ Richard E. Fitzpatrick ในปี 2002 ได้มีการทำวิจัยในกลุ่มตัวอย่างที่ได้รับ ความเสียหายจากแสงที่บริเวณใบหน้า (facial photodamage) โดยให้กลุ่มตัวอย่างทายาที่มีส่วนผสมของ 10% ascorbic acid ร่วมกับ 7% tetrahexyldecyl ascorbate บริเวณครึ่งใบหน้าของกลุ่มตัวอย่าง ส่วนอีกครึ่งหนึ่งให้ใช้เป็นยาหลอก พบว่าส่วนที่ทาเป็น 10% ascorbic acid ร่วมกับ 7% tetrahexyldecyl ascorbate สามารถลด photoaging score บริเวณแก้มและรอบปากได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับยาหลอก^(41, 42)

1.3 วิตามินเอ



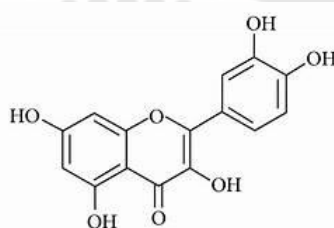
ภาพประกอบ 6 แสดงโครงสร้างทางเคมีของวิตามินเอ

ที่มา : Nimse, S.B. and D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances, 2015. 5(35): p. 27986-28006.

วิตามินเอเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สามารถละลายได้ในไขมัน ในทางตจวิทยา วิตามินเอเป็นส่วนประกอบที่สำคัญของชั้นหนังกำพร้ามีบทบาทสำคัญในการสร้างเซลล์ผิวหนังซึ่งจะทำให้เกิดการผลัดผิว คอยควบคุมการหลั่งของต่อมไขมันและเป็นส่วนประกอบของของเหลวภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix)⁽⁴³⁾ วิตามินเอเป็นสารที่มีความไวต่อแสง (photosensitive) โดยวิตามินเอที่อยู่ในรูปของ retinol และ retinyl esters สามารถดูดซับรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่มีความยาวคลื่นระหว่าง 290 ถึง 360 นาโนเมตร ซึ่งส่งผลให้ชั้นหนังกำพร้าของผิวหนังมีปริมาณลดลงเมื่อได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี จากการศึกษาของ O. Sorg และคณะในปี 2005 ได้ศึกษาโดยใช้วิตามินเอแบบเฉพาะที่ (topical retinoid) กับหนูทดลองที่ได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี พบว่า หนูทดลองที่ได้รับวิตามินเอแบบเฉพาะที่จะมีปริมาณของ thymine dimer ซึ่งเป็นสารบ่งชี้ของการได้รับความ

เสียหายของดีเอ็นเอในนิวเคลียสและมีปริมาณของเซลล์ผิวหนังที่ตาย (apoptosis) ในหนูทดลองน้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้รับวิตามินเอแบบเฉพาะที่แบบมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁴⁴⁾

2. Bioflavonoids เป็นสารอนุพันธ์ในกลุ่ม benzo- γ -pyran ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระที่ค่อนข้างรุนแรง มีรายงานว่า bioflavonoids สามารถช่วยป้องกันความเสียหายของดีเอ็นเอจาก hydroxyl radical ได้ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้คือ Quercetin และ Anthocyanidine ซึ่งสามารถพบได้ในผักและผลไม้ จากงานวิจัยของ Rubra Casagrande และคณะในปี 2006 ได้ทำการศึกษาการใช้ยาเฉพาะที่ที่มีส่วนประกอบของ quercetin ในหนูทดลองที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี พบว่า การได้รับยาเฉพาะที่ที่มีส่วนประกอบของ quercetin ในขนาดสูงสามารถช่วยลดการทำงานของ malondialdehyde (MDA) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁴⁵⁾



ภาพประกอบ 7 แสดงโครงสร้างทางเคมีของ quercetin

ที่มา : Nimse, S.B. and D. Pal, Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. RSC Advances, 2015. 5(35): p. 27986-28006.

3. Carotenoids เป็นสารจากพืชที่สามารถพบได้บ่อยที่สุด มีคุณสมบัติในการละลายในไขมัน ซึ่ง carotenoids สามารถทำลายสารในกลุ่ม peroxy radical ได้ดีกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสารอื่นๆ ในกลุ่มอนุมูลอิสระออกซิเจน (Reactive oxygen species) ซึ่ง carotenoids มีบทบาทสำคัญในการป้องกันเยื่อหุ้มเซลล์จากการทำลายของสารอนุมูลอิสระ ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้คือ ไลโคปีน เบต้าแคโรทีน เป็นต้น จากงานวิจัยของ Witoo Dilolthornsakul และคณะในปี 2018 ได้มีการรวบรวมงานวิจัยที่เกี่ยวข้องกับประสิทธิภาพในการปกป้องความเสียหายจากแสงของผิวหนังด้วยไลโคปีน (Systematic review and meta-analysis) ในกลุ่มตัวอย่างจากงานวิจัยที่ได้รับผลิตภัณฑ์ที่มีส่วนประกอบของไลโคปีนสามารถป้องกันความเสียหายของผิวหนังจากการได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีผ่านการศึกษาศึกษาของการแดงของผิวหนัง (skin erythema formation) และระดับของสารบ่งชี้ต่างๆ เช่น matrix metalloproteinase-1 (MMP), pCl, HO-1 และ ICAM-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁴⁶⁾

4. Hydroxycinnamates เป็นสารต้านอนุมูลอิสระในอาหาร ที่สามารถช่วยป้องกัน LDL จากภาวะออกซิเดชัน ใช้ในการป้องกันภาวะไขมันอุดตันในเส้นเลือด และหัวใจขาดเลือด ฉับพลัน ตัวอย่างของสารในกลุ่มนี้คือ ferulic acid, caffeic acid และ sinapic acid เป็นต้น

5. กลุ่มอื่นๆ เช่น piperine, allicin และ curcumin เป็นต้น⁽⁵⁾

2.5 โพรไบโอติก (Probiotics)

Probiotics มีรากศัพท์มาจากภาษากรีกแปลว่า เพื่อชีวิต (for life) โดยเริ่มจากในปี 1953 นักวิทยาศาสตร์ชาวเยอรมัน Woner Kollath ได้ให้การนิยามว่าเป็นสารที่ผลิตโดยจุลินทรีย์ที่สามารถไปกระตุ้นการเจริญเติบโตของสิ่งมีชีวิตอื่นๆได้ ในช่วงศตวรรษที่ 19 ได้มีนักวิทยาศาสตร์ชาวรัสเซีย Louis Pasteur ได้ให้คำจำกัดความว่าเป็น จุลชีพที่มีหน้าที่ในกระบวนการหมัก โดยแรกเริ่มได้มีการใช้โพรไบโอติกในอุตสาหกรรมทางอาหาร และในขณะเดียวกัน Metchnikoff ได้พยายามหาความเป็นไปได้ของโพรไบโอติกที่จะมีผลต่อร่างกายมนุษย์ โดยได้เริ่มจากการศึกษาในประชากรที่อาศัยอยู่ในชนบทของบัลแกเรีย พบว่ามีประชากรที่มีอายุยืนจำนวนมากขึ้น โดยพบว่าประชากรส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้มีการบริโภคของผลิตภัณฑ์ที่ได้จากการหมักเช่น โยเกิร์ต เป็นปกติ โดยได้เชื่อมโยงกับแพทย์ชาวบัลแกเรียที่ได้ศึกษาเกี่ยวกับจุลินทรีย์พบว่า lactobacilli สามารถช่วยลดความเจ็บป่วยที่เกิดจากจุลินทรีย์ก่อโรคในลำไส้ได้ ภายหลัง Metchnikoff ได้ให้ความเห็นว่า “การพึ่งพาอาศัยของจุลินทรีย์ในลำไส้ที่ได้จากอาหารจะส่งผลต่อการเปลี่ยนแปลงของจุลินทรีย์ในลำไส้ และสามารถใช้ในการแทนที่จุลินทรีย์ก่อโรคโดยจุลินทรีย์ที่มีประโยชน์ได้”⁽⁴⁷⁾ จากนั้นในปี 2013 องค์การอาหารและเกษตรแห่งสหประชาชาติ องค์การอนามัยโลก ได้ให้คำนิยามของโพรไบโอติกว่า “จุลินทรีย์ที่มีชีวิตที่หากได้รับในปริมาณที่เหมาะสม จะทำให้เกิดประโยชน์กับสุขภาพ”⁽⁴⁸⁾

โพรไบโอติกที่คนส่วนใหญ่ให้ความสำคัญ มากที่สุดคือ โพรไบโอติกในกลุ่มของแบคทีเรียที่ผลิตกรดแลคติก (Lactic acid bacteria) ซึ่งเป็นแบคทีเรียแกรมบวกและมีแคทาเลสเป็นผลลบ ซึ่งประกอบไปด้วย 2 จีแนส คือ *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria*

โดยคุณสมบัติในการคัดเลือกในการเป็นโพรไบโอติก ประกอบไปด้วย

1. มีความทนทานต่อกรดและน้ำดี
2. สามารถเกาะติดผิวของเยื่อและเซลล์บุผิวได้ดี
3. มีฤทธิ์ยับยั้งจุลินทรีย์ที่เป็นเชื้อก่อโรค
4. มีการทำงานของเอนไซม์ bile salt hydrolase⁽⁴⁹⁾

แต่อย่างไรก็ตาม ข้อกำหนดข้างต้นยังอยู่ภายใต้การถกเถียง เนื่องจากยังไม่ได้มีข้อกำหนดที่เป็นมาตรฐาน ดังนั้นจึงยังไม่มีข้อกำหนดที่มีความเฉพาะเจาะจงในการเป็นโพรไบโอติก แต่จากคำนิยามขององค์การอนามัยโลกในข้างต้นสามารถเข้าใจได้ว่า โพรไบโอติกจะต้องมีคุณสมบัติ คือ มีความปลอดภัยในการนำไปใช้ โดยมีงานวิจัยที่ทำในมนุษย์มารับรองว่าสามารถใช้ประโยชน์ในการรักษาโรคต่างๆได้อย่างปลอดภัยและไม่มีผลข้างเคียง⁽⁴⁸⁾

สำหรับกลไกของโพรไบโอติกที่มีต่อร่างกายจะประกอบไปด้วย

1. ช่วยเพิ่มความแข็งแรงของเยื่อเมือก (Enhancement of the epithelial barrier) โดยในหลายการศึกษา พบว่า โพรไบโอติกจะไปช่วยเพิ่มการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการส่งสัญญาณของ Tight junction ซึ่งเป็นโปรตีนที่อยู่ระหว่างเซลล์ ทำให้เยื่อเมือกมีความแข็งแรงเพิ่มมากขึ้น นอกจากนี้โพรไบโอติกยังเป็นตัวเริ่มในการซ่อมแซมเยื่อเมือกที่เกิดความเสียหายได้อีกด้วย

2. ช่วยเพิ่มการเกาะติดระหว่างโพรไบโอติกกับเยื่อเมือก (Increased adhesion to intestinal mucosa) เมื่อโพรไบโอติกมีการเกาะติดกับเยื่อเมือกมากขึ้น จะทำให้เกิดการกระตุ้นของระบบภูมิคุ้มกันที่สูงขึ้นและจะช่วยป้องกันเชื้อก่อโรคได้ดีขึ้น

3. ช่วยยับยั้งการเกาะติดระหว่างเชื้อก่อโรคและเยื่อเมือก (Inhibition of pathogen adhesion)

4. ช่วยกีดกันเชื้อก่อโรค (Competitive exclusion of pathogenic microorganism) โดยการสร้างและหลั่งสารที่ทำหน้าที่ฆ่าเชื้อก่อโรค (Antimicrobial substance) กำจัดตำแหน่งการเกาะของแบคทีเรียชนิดอื่น และแย่งสารอาหารที่จำเป็นจากเชื้อก่อโรคชนิดอื่น

5. สร้างสารฆ่าเชื้อก่อโรค (Production of antimicrobial substances) เช่น กรดอะซิติกและกรดแลคติกที่มีคุณสมบัติในการยับยั้งเชื้อก่อโรคอื่นๆ

6. ช่วยเพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย โดยโพรไบโอติกจะไปทำปฏิกิริยากับเยื่อเมือกลำไส้ (intestinal epithelial cell) และ dendritic cell ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของทั้งระบบภูมิคุ้มกันโดยกำเนิด (Innate immune system) และระบบภูมิคุ้มกันแบบจำเพาะ (Adaptive immune system)⁽⁵⁰⁾

นอกจากนี้ จากการศึกษาเกี่ยวกับโพรไบโอติก ยังพบว่า โพรไบโอติกมีคุณสมบัติในเรื่องของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ผ่านกลไกดังต่อไปนี้

1. มีความสามารถในการคีเลชันสารโลหะ (Metal ion chelation ability) โดยการจับประจุของโลหะและป้องกันภาวะออกซิเดชัน

2. เพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ (Antioxidant enzyme system) เช่น เอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส (Superoxide dysmutase) และเอนไซม์แคทาเลส (Catalase) เป็นต้น
3. สารต้านอนุมูลอิสระที่เกิดจากกระบวนการเมตาบอลิซึม (Antioxidant metabolites) เช่น กลูต้าไธโอน (Glutathione : GSH) บิวไทเรต (butyrate) และโฟเลต (Folate)
4. เป็นสื่อการของ antioxidant signaling pathway เช่น ปฏิกริยา Nrf2-Keap1-ARE NFkB MAPK และ Protein kinase C (PKC)
5. ควบคุมการทำงานของเอนไซม์ที่ผลิตสารอนุมูลอิสระออกซิเจน (Regulation of the enzymes producing ROS) เช่น NADPH oxidase (NOX) Cyclo-oxygenase (COX) และ Cytochrome P450 (CYP450) enzymes
6. ควบคุมการทำงานของเชื้อประจำถิ่น (Regulation of the intestinal microbiota)⁽⁵¹⁾

2.6 ประโยชน์ของโพรไบโอติก

ในปัจจุบันได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ประโยชน์อย่างแพร่หลายในด้านการแพทย์ เริ่มจากการนำมาใช้ในระบบทางเดินอาหาร โดยนำมาใช้ในการปรับสมดุลระหว่างจุลินทรีย์ก่อโรค และจุลินทรีย์ประจำถิ่นในลำไส้ เพื่อลดการก่อโรคกับร่างกายได้ นอกจากนี้ในปัจจุบันได้มีการศึกษาโดยการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการรักษาและป้องกันในโรคระบบอื่นๆ⁽⁴⁸⁾ ได้แก่

- ระบบทางเดินอาหาร โดยโพรไบโอติกจะช่วยเพิ่มการทำงานของเยื่อลำไส้โดยการผลิตเมือกในลำไส้ให้มากขึ้น ซึ่งสามารถทำให้ช่วยลดการอักเสบของลำไส้และปรับการทำงานการบีบรัดของลำไส้ให้เป็นปกติได้ ซึ่งได้มีการศึกษาว่าโพรไบโอติกมีส่วนช่วยในการป้องกันและการรักษาในโรคของระบบทางเดินอาหารได้ในหลายๆโรค เช่น ภาวะลำไส้แปรปรวน (Irritable bowel disease) , Ulcerative colitis, necrotizing enterocolitis และภาวะท้องผูก (Constipation) นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาว่าโพรไบโอติกมีส่วนช่วยในการรักษาและป้องกันมะเร็งลำไส้ได้ผ่านหลายๆกลไก เช่น ลดการทำงานของสารก่อมะเร็ง เพิ่มการทำงานของระบบภูมิคุ้มกันในร่างกายและลดการแบ่งตัวของเซลล์ เป็นต้น⁽⁵²⁾

- โรคติดเชื้ โดยได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในโรคทางช่องปาก เช่น ฟันผุและเหงือกอักเสบ จากการศึกษาของ Ahola et al. ในปี 2002 ได้มีการศึกษากลุ่มตัวอย่างทั้งหมด 74 คน โดยการให้บริโภคน้ำที่มีส่วนผสมของโพรไบโอติก *L. rhamnosus* เป็นเวลา 3 สัปดาห์ พบว่า

ในกลุ่มตัวอย่างที่ได้บริโภคชีสชนิดนี้ มี *S. mutans* ซึ่งเป็นจุลชีพที่ก่อให้เกิดฟันผุ ลดลง 20% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม⁽⁵³⁾ นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาในโรคติดเชื้อของระบบอื่นๆ อีกด้วย เช่น ในระบบทางเดินปัสสาวะ โดยได้มีการศึกษาของ Kovachev และ Vatcheva Dobrevska ในปี 2015 ในเรื่องของการกลับเป็นซ้ำของการติดเชื้อราแคนดิดาที่ช่องคลอด (Recurrent vaginal candidiasis) โดยได้ศึกษาในกลุ่มผู้ป่วยหญิง 436 คน อายุระหว่าง 17-50 ปี โดยแบ่งออกทั้งหมด 2 กลุ่ม ในกลุ่มแรก 207 คน ได้ให้การรักษโดยใช้ fluconazole 150 มิลลิกรัม รับประทาน 1 ครั้ง ในวันแรกควบคู่กับการใช้ Fenticonazole 600 มิลลิกรัม ทางช่องคลอด 1 ครั้ง ในวันแรก และในกลุ่มที่ 2 กลุ่มตัวอย่าง 209 คน ได้รับการรักษาเพิ่มเติมจากกลุ่มแรก โดยให้เป็น โพรไบโอติกซึ่งประกอบด้วย *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Streptococcus thermophiles*, *L. debrueckii subsp. bulgaricus* เพิ่มเติมทางช่องคลอดในวันที่ 5 ของการรักษา ผลการวิจัย พบว่า ผู้ป่วยในกลุ่มแรกยังคงมีอาการของการติดเชื้อหลังได้รับการรักษาทั้งหมด 165 คน (79.7%) ในส่วนผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับโพรไบโอติกเพิ่มเติม พบว่ามีผู้ป่วยที่ยังคงมีอาการของการติดเชื้ออยู่ เพียง 65 คน (31.1%)⁽⁵⁴⁾ นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการรักษาโรคติดเชื้อในระบบอื่นๆ ด้วย เช่น โรคติดเชื้อในระบบทางเดินหายใจ ภาวะปอดบวม เป็นต้น

- ระบบต่อมไร้ท่อและเมตาบอลิซึม พบว่ามีการศึกษาว่าโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการควบคุมโรคเบาหวาน โดยเฉพาะโรคเบาหวานชนิดที่ 2 สำหรับในโรคเบาหวาน ภาวะเครียดจากออกซิเดชัน เป็นหนึ่งในสาเหตุสำคัญของการเกิดโรคเบาหวาน จะสามารถทำให้โรคมียุ่ ความรุนแรงมากขึ้น หรือเกิดภาวะแทรกซ้อนจากโรคเบาหวานได้ ซึ่งโพรไบโอติก มีคุณสมบัติเป็น สารต้านอนุมูลอิสระ จะสามารถลดภาวะเครียดจากออกซิเดชันได้ ส่งผลให้ลดภาวะอักเสบและลด การทำลายของเบต้าเซลล์ในตับอ่อนได้ นอกจากนี้ ยังพบว่าโพรไบโอติกมีประสิทธิภาพในการช่วยลดระดับไขมันและคอเลสเตอรอลในเลือดได้⁽⁵⁵⁾

- ระบบอื่น พบว่ามีการศึกษาว่าโพรไบโอติกมาใช้ในการรักษาและป้องกันในส่วนของโรคทางระบบภูมิคุ้มกัน เช่น โรคภูมิแพ้ผิวหนังและการแพ้อาหาร รวมถึงได้มีการศึกษาในกลุ่มที่เป็นโรคแพ้ภูมิตัวเอง (Autoimmune disease) เช่น โรคเบาหวานชนิดที่ 1 (Type 1 Diabetes) , โรคกล้ามเนื้ออ่อนแรง (Multiple sclerosis), โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (Rheumatoid arthritis)

⁽⁵⁶⁾

สำหรับในด้านตจวิทยา ได้มีการนำโพรไบโอติกมาใช้ในการรักษาโรคต่างๆ เช่น โรค สะเก็ดเงิน โรคภูมิแพ้ผิวหนัง (Atopic dermatitis) โดยได้มีการศึกษาของ Paula Danielle Santa Maria Albuquerque de Andrade และคณะได้ทำการศึกษาในผู้ป่วยเด็กและวัยรุ่นอายุระหว่าง 6

เดือนถึง 19 ปี ทั้งหมด 60 คน ที่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นโรคภูมิแพ้ผิวหนังที่มีความรุนแรงระดับน้อย ปานกลางและรุนแรง โดยแบ่งผู้ป่วยเป็น 2 กลุ่ม กลุ่มแรกได้รับการรักษาโดยใช้โพรไบโอติก (*L. rhamnosus*, *L. acidophilus*, *L. paracasei* และ *Bifidobacterium lactis*) และกลุ่มที่ 2 ได้รับการรักษาโดยใช้ Placebo พบว่าหลังจากการรักษา 6 เดือน ผู้ป่วยในกลุ่มที่ได้รับการรักษาโดยใช้โพรไบโอติกจะมี SCORAD น้อยลงอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁵⁷⁾

จากการศึกษาของ Tiiu Kullisaar ปี 2001 ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระของโพรไบโอติก *Lactobacillus fermentum* สายพันธุ์ E-3 และ E-18 โดยพบว่า *L. fermentum* สายพันธุ์ E-3 และ E-18 มีระยะเวลาการอยู่รอด (Survival time) ในภาวะที่มีสารอนุมูลอิสระ ได้แก่ hydrogen peroxide, superoxide anions และ hydroxyl radicals มากกว่าเมื่อเปรียบเทียบกับสายพันธุ์ที่ไม่มีคุณสมบัติการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระหรือสายพันธุ์ E-338-1-1 นอกจากนี้ยังพบว่าโพรไบโอติกทั้งสายพันธุ์ E-3 และ E-18 ยังสามารถแสดงออกเป็นเอนไซม์ MnSOD ซึ่งเป็นรูปแบบหนึ่งของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ ดิสมิวเทส⁽⁵⁸⁾

จากการศึกษาของ MEEI-YN Lin ปี 2000 ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระของโพรไบโอติก *Bifidobacterium lungum* (ATCC 15708) และ *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) พบว่า *B. lungum* และ *L. acidophilus* สามารถขจัด DPPH free radical ได้ 21-52% และสามารถลดความเป็นพิษ (Cytotoxicity) จาก 4NQQ ได้ ครั้งหนึ่งสำหรับ *L. acidophilus* และ ลดได้เกือบ 90% สำหรับ *B. longum* นอกจากนี้โพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ยังสามารถยับยั้งกระบวนการ plasma lipid peroxidation ได้ถึง 11-29%⁽⁵⁹⁾

จากการศึกษาของ Aksorntong Chooruk ปี 2017 ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระของ *Lactobacillus* ที่พบในช่องปากทั้ง 201 สายพันธุ์ ได้แก่ *L. casei* 10 สายพันธุ์, *L. fermentum* 51 สายพันธุ์, *L. gasseri* 18 สายพันธุ์, *L. mucosae* 12 สายพันธุ์, *L. oris* 12 สายพันธุ์, *L. paracasei* 22 สายพันธุ์, *L. plantarum* 11 สายพันธุ์, *L. rhamnosus* 14 สายพันธุ์, *L. salivarius* 41 สายพันธุ์และ *L. vaginalis* 10 สายพันธุ์ พบว่า *L. paracasei* มีความสามารถในการขจัด DPPH free radical ได้มากที่สุด *L. plantarum*, *L. rhamnosus* และ *L. mucosae* มีความสามารถในการยับยั้งกระบวนการ linoleic acid peroxidation ได้มากที่สุด ได้แก่ 65.1%, 58.15% และ 57.9% ตามลำดับ *L. fermentum* และ *L. paracasei* เป็นสายพันธุ์ที่มี SOD activity มากที่สุด และพบว่า *L. paracasei*, *L. casei* และ *L. fermentum* มีระดับของ

glutathione สูงที่สุด โดยในการศึกษาค้นคว้าพบว่า *Lactobacillus* ในหลายๆสายพันธุ์มีคุณสมบัติการของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระที่สูง ยกเว้นสายพันธุ์ *L. oris* และ *L. gasseri*⁽⁶⁰⁾

จากงานวิจัยของ Hyemin Kim ได้มีการนำโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus* และ *Bifidobacteria* มาศึกษาในเรื่องของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ พบว่าโพรไบโอติกในแต่ละสายพันธุ์มีประสิทธิภาพในการต้านอนุมูลอิสระที่แตกต่างกัน มีโพรไบโอติกเพียงบางชนิดที่สามารถนำมาใช้ในการลดสารอนุมูลอิสระได้ โดยพบว่าโพรไบโอติกที่มีการทำงานในการกำจัดสารอนุมูลอิสระมากที่สุด ได้แก่ โพรไบโอติกสายพันธุ์ *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis* MG741⁽¹⁰⁾

จากการศึกษาของ Guangqing Mu ปี 2018 ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติก *Lactobacillus* สายพันธุ์ต่างๆ ได้แก่ *L. casei* (Y3, Y4, Y16) และ *L. plantarum* (Y41, Y42, Y44) ทั้งในการประเมินทางทางเคมีด้วยวิธี DPPH free radical scavenging activity, oxygen radical absorbance capacity, resistance to H₂O₂ และ hydroxyl free radical scavenging activity และการประเมินผ่านเซลล์ด้วยวิธี cellular antioxidant assay และการปกป้องเซลล์ HT-29 ต่อสาร H₂O₂ พบว่า *L. plantarum* Y44 สามารถกำจัดสารอนุมูลอิสระออกซิเจน เช่น DPPH radicals, hydroxyl free radical และ oxygen free radicals นอกจากนี้ *L. plantarum* Y44 ยังมีความสามารถในการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระออกซิเจนในเซลล์ HT-29 ช่วยเพิ่มอัตราการรอดของ HT-29 ต่อ H₂O₂ ช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ซูเปอร์ออกไซด์ดิสมิวเทส และกลูตาไธโอนเพอร์ออกซิเดสได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁶¹⁾

จากการศึกษาของ Chin-Feng Liu ปี 2010 ได้มีการศึกษาคุณสมบัติของโพรไบโอติกสายพันธุ์ *L. paracasei* ssp. *paracasei* NTU 101, *L. plantarum* NUT 102 และ *Lactobacillus* อื่นๆ 10 สายพันธุ์จาก Biosource collection and research center (BCRC) จากไต้หวันในเรื่องของการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ผ่านการประเมินทางเคมีและการประเมินความสามารถในการยับยั้งเซลล์มะเร็งซึ่งเป็นเซลล์ของมะเร็งเต้านม (human breast adenocarcinoma : MDA-MB-231) พบว่า *L. acidophilus* BCRC14079 มีความสามารถในการต้านอนุมูลอิสระมากที่สุด ส่วนในด้านของการยับยั้งเซลล์มะเร็ง พบว่า สายพันธุ์ *L. paracasei* ssp. *paracasei* NTU 101, *L. plantarum* NUT 102 มีความสามารถในการหยุดการเจริญของเซลล์มะเร็งในระยะ G0/G1 ได้มากที่สุด⁽⁶²⁾

นอกจากนี้ ยังพบว่าโพรไบโอติกสามารถช่วยลดภาวะอักเสบของเซลล์ได้อีกด้วย จากการศึกษาค้นคว้าของ Yadan Deng ปี 2021 เกี่ยวกับโพรไบโอติกในการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์

ในโรคสะเก็ดเงิน โดยโพรไบโอติกที่ได้นำมาศึกษาคือ *Bifidobacterium animalis* CCFM1148 และ *Lactobacillus paracasei* CCFM1147 พบว่า โพรไบโอติกทั้ง 2 สายพันธุ์ สามารถยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์ได้ โดยผ่านการยับยั้งการทำงานของ NF- κ B และเพิ่มการทำงานของ Egr1⁽⁶³⁾

จากงานวิจัยของ A-Rang Im ในปี 2018 ได้นำโพรไบโอติกมาศึกษาในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนัง (Human keratinocyte cell line) โดยได้มีการศึกษาเปรียบเทียบระดับและการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนัง โดยการนำเซลล์ผิวหนังมาบ่มด้วยโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302 ก่อนนำไปกระตุ้นให้เกิดการสร้างสารอนุมูลอิสระในเซลล์มากขึ้นโดยการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี เปรียบเทียบกับในกลุ่มของเซลล์ผิวหนังที่ถูกกระตุ้นด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีแต่ไม่ได้บ่มด้วยโพรไบโอติก ซึ่งพบว่าในเซลล์ผิวหนังที่ถูกบ่มด้วยโพรไบโอติกจะมีการทำงานของเอนไซม์ superoxide dismutase และเอนไซม์ catalase ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ต้านสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์มีระดับสูงกว่าและมีการคงอยู่ของเซลล์ที่มากกว่าในกลุ่มที่ไม่ถูกบ่มด้วยโพรไบโอติก⁽¹¹⁾

จากการศึกษาของ Hye Yeon Lim และคณะ ในปี 2020 ได้มีการศึกษาโพรไบโอติก *Lactobacillus acidophilus* KCCM12625P ในฤทธิ์การต้านการเกิดรอยย่นและการสร้างเม็ดสี พบว่า โพรไบโอติกสายพันธุ์นี้มีฤทธิ์ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากการลด ABTS radical level มีฤทธิ์ในการยับยั้งการสร้าง elastase และ MMP-1 ใน HaCat keratinocyte และ human dermal fibroblast cell และนอกจากนี้ยังพบว่า *Lactobacillus acidophilus* KCCM12625P ยังสามารถช่วยลดการสร้างเม็ดสีจากการที่ไปยับยั้งการหลั่ง melanin จาก B16F10 cells อีกด้วย⁽⁶⁴⁾

จากการศึกษาของ Daehyun Shin และคณะ ปี 2018 ได้มีการศึกษาโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus rhamnosus* HK-9 ในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและการต้านการอักเสบ โดยได้มีการเปรียบเทียบระหว่างการใช้ *Agastache rugosa* ที่หมักด้วย *Lactobacillus rhamnosus* HK-9 และ *Agastache rugosa* ที่ไม่ได้ผ่านการหมัก พบว่า *Agastache rugosa* ที่หมักด้วย *Lactobacillus rhamnosus* HK-9 มีฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระมากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้หมัก โดยพบว่ามีระดับของ ROS น้อยกว่ากลุ่มที่ไม่ได้ผ่านการหมัก และมีการทำงานของ GSH และ SOD ที่เพิ่มสูงขึ้น นอกจากนี้ ในส่วนของการต้านการอักเสบ พบว่าในกลุ่มที่มีการหมักด้วยโพรไบโอติกจะมีการทำงานของ proMMP-2 น้อยลง⁽⁶⁵⁾

นอกจากนี้ยังได้มีการศึกษาการใช้โพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยในการลดการอักเสบ ได้มีการศึกษาของ Susama Banjonjit และคณะ ในปี 2022 ศึกษาประสิทธิภาพของโพรไบโอติกสาย

พันธุ์ไทย (*Lactobacillus paracasei* MSMC39-1) ในการลดการอักเสบผ่านการวัดระดับของ TNF- α ของน้ำเหลืองเหงือก (Crevicular fluid) ในผู้ป่วย 24 คนที่ได้รับการถอนฟันกรามซี่ที่สาม โดยได้แบ่งผู้ป่วยเป็นทั้งหมด 2 กลุ่ม ในกลุ่มแรกจะได้รับการล้างแผลด้วยโพโรไบโอติก ในกลุ่มที่ 2 จะได้รับการล้างแผลด้วยน้ำเกลือ (0.9% Normal saline) โดยผลการวิจัยพบว่าผู้ป่วยที่ได้รับการล้างแผลด้วยโพโรไบโอติกจะมีระดับ TNF- α ในน้ำเหลืองเหงือกน้อยกว่าในกลุ่มที่ได้รับการล้างแผลด้วยน้ำเกลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹⁴⁾

จากการศึกษาของ Boonyarut Ladda และคณะในปี 2015 ได้มีการศึกษาในโพโรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1, *Lactobacillus casei* MSMC39-3 และ *Weissella confusa* MSMC57-1 ในการต้านสารก่อการอักเสบ TNF- α ในเซลล์ THP-1 human monocytic cell line พบว่า cell-free culture supernatant ของ *L. paracasei* MSMC39-1, *L. casei* MSMC39-3 และ *W. confusa* MSMC 57-1 สามารถช่วยลดระดับของ TNF- α ในเซลล์ THP-1 ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽¹³⁾

จากการศึกษาของ Porntipha Vitheejongjaroen และคณะในปี 2021 ได้ศึกษาเกี่ยวกับการทำโยเกิร์ตที่ทำจากการหมักโพโรไบโอติกสายพันธุ์ *Bifidobacterium animalis* MSMC83 พบว่า *B. animalis* MSMC83 มีคุณสมบัติในการเป็นสารต้านอนุมูลอิสระจากการทำการทดสอบด้วยวิธี DPPH radical and hydroxyl radical scavenging activity และการวัดปริมาณของ intracellular ROS ด้วยวิธี dichlorofluorescein assay และพบว่าโยเกิร์ตที่ผลิตจาก *B. animalis* MSMC83 มี pH ที่ลดลงในช่วง 3 สัปดาห์ของการเก็บ ซึ่งการลดลงของ pH แสดงถึงว่า ยังมีการหมักอย่างต่อเนื่องของโพโรไบโอติกในโยเกิร์ต และหลังจากการเก็บ 4 สัปดาห์ พบว่าโยเกิร์ตที่ผลิตจาก *B. animalis* MSMC83 ยังมีการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ 8.53 log CFU/g ซึ่งมากกว่าขั้นต่ำของผลิตภัณฑ์ที่ผลิตจากโพโรไบโอติก ซึ่งอยู่ที่ 6 log CFU/g⁽¹²⁾

จากการศึกษาของ Boonyarut Ladda ในปี 2021 ได้มีการศึกษาคุณสมบัติการเป็นสารต้านการอักเสบของโพโรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 ใน Hepatocellular carcinoma cell line (HepG-2) พบว่า *L. paracasei* MSMC39-1 สามารถยับยั้งการหลั่ง TNF- α และสามารถลดระดับของ aspartate aminotransferase ในหนูที่เป็นตับอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁶⁶⁾

จากการศึกษาของ Sunattha Sathikulpakdee และคณะในปี 2022 ได้มีการศึกษาเปรียบเทียบประสิทธิภาพของไลซันที่มีส่วนประกอบของอนุพันธ์โพโรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 เปรียบเทียบกับ 2.5% Benzyl peroxide ในการรักษา

ลิวระดับน้อยถึงปานกลาง พบว่า กลุ่มตัวอย่างที่ใช้โลชั่นที่มีส่วนผสมของอนุพันธ์โพรไบโอติกและกลุ่มตัวอย่างที่ใช้ 2.5% Benzyl peroxide สามารถลดลิวอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติหลังจากได้รับการรักษา 4 สัปดาห์ แต่ทั้งสองกลุ่มสามารถลดลิวอักเสบได้อย่างไม่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ⁽⁶⁷⁾

2.7 การคงอยู่ของเซลล์ (Cell viability)

ในการนำสารต่างๆมาทดลองกับเซลล์ของสิ่งมีชีวิต จะต้องมีการทดลองก่อนว่า สารนั้นจะทำให้เกิดอันตรายต่อเซลล์หรือไม่ โดยการทดสอบการคงอยู่ของเซลล์สามารถทำได้ผ่าน 3 กลไก คือ

1. ความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ (Membrane integrity)

1.1 ใช้วิธีวิเคราะห์โดยทำให้เกิดสี (Colorimetric method)

1.1.1 Trypan blue exclusion dye เป็นการย้อมสี trypan blue ซึ่งมีสีน้ำเงินลงบนเซลล์ที่เราต้องการ โดยใช้หลักการความแข็งแรงของเยื่อหุ้มเซลล์ ถ้าหากว่าเป็นเซลล์ที่มีชีวิต เซลล์นั้นจะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่สมบูรณ์ สีที่ใช้อ้อมจะไม่สามารถเข้าไปในเซลล์ได้ แต่ถ้าหากเซลล์นั้นตายแล้ว จะทำให้เกิดความไม่สมบูรณ์ของเยื่อหุ้มเซลล์ สีย้อมจะสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ เมื่อเรานำไปตรวจสอบผ่านกล้องจุลทรรศน์ เซลล์ที่ยังมีชีวิต จะเห็นสี ติดอยู่บริเวณขอบของเซลล์ จะไม่สามารถเข้าไปในเซลล์ได้ ในขณะที่เซลล์ที่ตายแล้ว สีที่ใช้อ้อมจะสามารถเข้าไปในเซลล์ได้ จะเห็นเป็นจุดที่บสีน้ำเงิน⁽⁶⁸⁾

1.1.2 การวัดการหลั่งของสาร LDH ในเซลล์ที่ตาย จะมีเยื่อหุ้มเซลล์ที่ไม่สมบูรณ์ จะทำให้เกิดการซึมผ่านของเยื่อหุ้มเซลล์(membrane permeability)ได้มากขึ้น ซึ่งจะทำให้มีการหลั่งสารที่บรรจุอยู่ในเซลล์ออกมาภายนอกเซลล์ ซึ่งหนึ่งในนั้นคือ LDH ซึ่ง LDH จะมีการแตกตัวได้ NADH ดังสมการ



โดยเราจะวัดการดูดกลืนแสงของสาร NADH ที่ความยาวคลื่น 340 นาโนเมตร

2. การทำงานของเซลล์ (Cell function)

2.1 การวัดโดยใช้สาร MTT tetrazolium โดยสาร MTT tetrazolium จะไปทำปฏิกิริยากับเอนไซม์ succinate dehydrogenase ที่มาจากการหายใจระดับเซลล์ โดยจะมีการ

เปลี่ยนสีของสาร MTT tetrazolium ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีเหลือง เป็นสาร formazan ซึ่งเป็นสารละลายที่มีสีม่วง

2.2 การวัดโดยใช้สาร Resazurin โดยสาร resazurin จะไปทำปฏิกิริยากับ เอนไซม์ diaphorase ได้เป็น resorufin ซึ่งเป็นสารละลายเรืองแสงสีชมพู

3. การตรวจหากลไกการตายของเซลล์ (Cell death mechanism)

3.1 การใช้เครื่องวัดขนาดเซลล์โดยใช้แสงเลเซอร์ (Flow cytometry) สำหรับในวิธีนี้นอกจากจะเป็นการแยกเซลล์ที่มีชีวิตและเซลล์ที่ตายแล้ว เรายังสามารถหากลไกการตายของเซลล์ได้ ผ่านการย้อมสีซึ่งสีที่เราใช้ย้อมประกอบไปด้วย Annexin-V และ Propidium iodide โดยสี Annexin-V จะย้อมติด phosphatidylserine ของเยื่อหุ้มเซลล์ ส่วน Propidium iodide จะไปทำลายเยื่อหุ้มเซลล์และสามารถไปติดกับ DNA ของเซลล์ได้ เมื่อเราให้เซลล์ผ่านเครื่อง flow cytometry และมีการวิเคราะห์ผล เราจะสามารถแบ่งออกได้ทั้งหมด 4 กลุ่ม ในกลุ่มที่ติดสี Annexin-V จะบ่งบอกว่าเป็นเซลล์ที่ตายจาก apoptosis ของเซลล์ ในกลุ่มที่ติดสี Propidium iodide จะบ่งบอกว่าเป็นเซลล์ที่ตายจากการ necrosis ของเซลล์ ในกลุ่มที่ติดสีทั้ง Annexin-V และ Propidium iodide จะบ่งบอกถึงว่าเซลล์นั้นตายจากการที่มี apoptosis หรือ necrosis ขึ้นรุนแรง ด้วยนะส่วนในกลุ่มที่ไม่ติดสีย้อมทั้งสองสี จะบ่งบอกว่าเซลล์นั้นเป็นเซลล์ปกติที่มีชีวิตอยู่^(69, 70)

2.8 การศึกษาการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์ (Cell-based antioxidant assays)

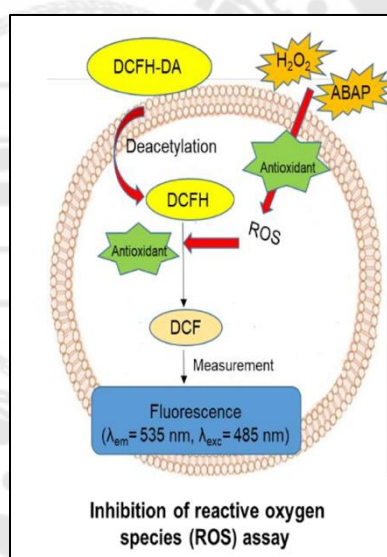
การศึกษาการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์สามารถศึกษาได้ ผ่าน 3 กลไก คือ

1. การยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (inhibition of intracellular ROS production)

ในเซลล์ของสิ่งมีชีวิต เมื่อมีการหายใจระดับเซลล์ในไมโทคอนเดรีย จะมีการสร้างสารอนุมูลอิสระเกิดขึ้น เช่น nitric oxide, hydroxyl, peroxy และ superoxide ถ้าภายในเซลล์มีการเสียดุลของสารอนุมูลอิสระและสารต้านอนุมูลอิสระจะทำให้เกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน (oxidative stress)

ในปัจจุบันได้มีการใช้การสร้างของสารอนุมูลอิสระเป็นตัววัดปริมาณการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ โดยการใช้สารเรืองแสงที่ไวต่อการออกซิเดชัน (Oxidation-sensitive fluorescence probe) ซึ่งในปัจจุบันสารที่นิยมใช้คือ สาร

2'-7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) เมื่อสารนี้เข้าไปในเซลล์จะถูก deacetylated กลายเป็น DCFH ซึ่งสารทั้ง DCFH-DA และ DCFH เป็นสารที่ไม่มีอาการเรืองแสง โดยสาร DCFH จะไปจับกับสารอนุมูลอิสระที่อยู่ภายในเซลล์ และจะกลายเป็นสาร DCF ซึ่งเป็นสารเรืองแสง โดยจะนำไปวัดความเข้มข้นของสารเรืองแสง (Fluorescence intensity) ที่ความยาวคลื่นที่มีการคายแสง (emission wavelength) 535 นาโนเมตร และความยาวคลื่นที่มีการดูดกลืนแสง (excitation wavelength) 485 นาโนเมตร ถ้าหากภายในเซลล์มีสารอนุมูลอิสระมากขึ้น DCF จะไปจับกับสารอนุมูลอิสระ จะทำให้มีความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่สูงขึ้น แต่ถ้าหากภายในเซลล์มีสารอนุมูลอิสระที่สูงขึ้น สารอนุมูลอิสระก็จะถูกสารต้านอนุมูลอิสระจับทำปฏิกิริยาก่อนที่จะไปทำปฏิกิริยากับ DCF เมื่อนำไปวัดความเข้มข้นของสารเรืองแสงก็จะพบว่า จะมีความเข้มข้นของสารเรืองแสงที่น้อยลง ดังภาพประกอบ 8



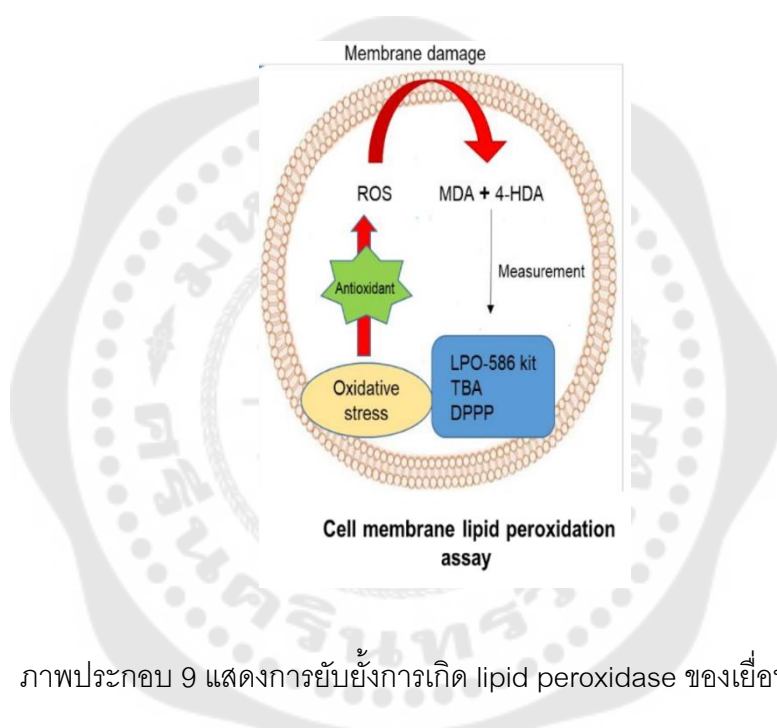
ภาพประกอบ 8 แสดงการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ที่มา : Nwachukwu, I.D., et al., A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*, 2021. 26(16).

2. การยับยั้งการเกิด lipid peroxidase ของเยื่อหุ้มเซลล์ (inhibition of cell membrane lipid peroxidase)

โดยปกติแล้ว เยื่อหุ้มเซลล์จะประกอบไปด้วยชั้นไขมัน เมื่อภายในเซลล์มีสารอนุมูลอิสระจะไปทำให้เกิดภาวะออกซิเดชันกับเยื่อหุ้มเซลล์ (cell membrane peroxidase)

ซึ่งก่อให้เกิดอันตรายกับเซลล์ได้ เมื่อสารอนุมูลอิสระไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ จะทำให้เกิดสารที่เป็นพิษภายในเซลล์ขึ้น คือ Malondialdehyde (MDA) และ 4-hydroxyalkenals (4-HDA) ซึ่ง สาร MDA ถือว่าเป็นสารที่สำคัญในการใช้วัดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน โดยในการวัดสาร MDA สามารถทำได้หลายวิธี เช่น การวัดโดยใช้สาร TBA (Thiobarbituric acid) และ DPPP (diphenyl-1-pyrenylphosphine) โดยการวัดโดยใช้สาร TBA ถือว่าเป็นวิธีมาตรฐาน ของการวัดภาวะเครียดจากออกซิเดชันที่เกิดจากสารอนุมูลอิสระไปทำปฏิกิริยากับเยื่อหุ้มเซลล์ (lipid peroxidase) โดย MDA จะไปทำปฏิกิริยากับ TBA ได้เป็นสารสีชมพู



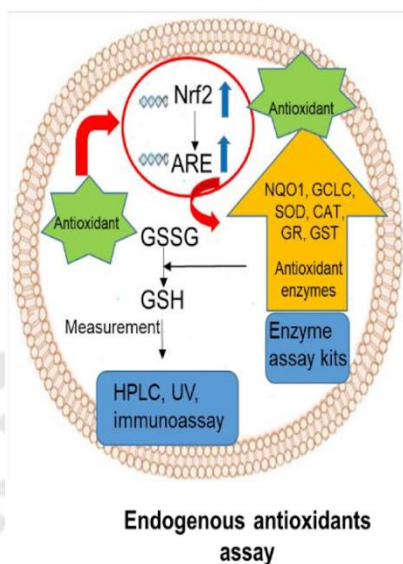
ภาพประกอบ 9 แสดงการยับยั้งการเกิด lipid peroxidase ของเยื่อหุ้มเซลล์

ที่มา : Nwachukwu, I.D., et al., A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*, 2021. 26(16).

3. การกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (activation of the endogenous antioxidant system)

ในเซลล์สิ่งมีชีวิตทั่วไป จะมีสารต้านอนุมูลอิสระไปทำปฏิกิริยากับสารอนุมูลอิสระเพื่อป้องกันการเกิดภาวะเครียดจากออกซิเดชัน ซึ่งคือเอนไซม์ที่อยู่ภายในเซลล์ เช่น superoxide dismutase (SOD) , catalase (CAT) , glutathione S-transferase (GST) , glutathione peroxidase (GPx), และ glutathione reductase (GR) โดยสารต้านอนุมูลอิสระจากภายนอกบางชนิด สามารถเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการต้านสารอนุมูลอิสระที่อยู่

ภายในเซลล์ ให้สูงขึ้นได้ ในการนี้จึงมีการใช้วัด ปริมาณของเอนไซม์ที่อยู่ในเซลล์ เพื่อเป็นตัวชี้วัดของการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระที่อยู่ภายนอกเซลล์ได้⁽⁷¹⁾



ภาพประกอบ 10 แสดงการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ที่มา : Nwachukwu, I.D., et al., A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*, 2021. 26(16).

2.9 การวัดระดับของสารก่อการอักเสบภายในเซลล์

สารอนุมูลอิสระที่อยู่ในเซลล์สามารถกระตุ้นให้เกิดภาวะอักเสบได้ ซึ่งสามารถวัดได้จากสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบภายในเซลล์ (pro-inflammatory cytokine) ซึ่งมีอยู่หลายชนิด เช่น Tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin-1 β และ interleukin-6 โดยการวัดปริมาณของสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบภายในเซลล์นิยมใช้อยู่ 2 วิธี คือ วิธี Western blot และ ELISA

1. Western blot

เป็นเทคนิคที่ใช้ในการแยกโปรตีนที่เราสนใจผ่านคลื่นไฟฟ้าบนแผ่นเจล (gel electrophoresis) ซึ่งจะมีการแยก โปรตีนตามน้ำหนักของโมเลกุล และจะมีการใช้เอนไซม์หรือสารเรืองแสง หรือ แอนติบอดี ที่มีความจำเพาะต่อ โปรตีนที่เราสนใจ

ข้อดี

- สามารถตรวจหาโปรตีนได้ถึงหน่วยพิโคกรัม

ข้อเสีย

- ใช้เวลาในการทำงาน เนื่องจากต้องทำหลายขั้นตอน
- จะต้องทำโดยผู้เชี่ยวชาญหรือผู้ที่มีประสบการณ์ในการทำ
- ต้องการสภาวะการทดลองที่เหมาะสม เช่น ต้องการบัพเพอร์หรือความเข้มข้นของเจลที่เหมาะสม

ข้อจำกัด

- จะต้องมีแอนติบอดีที่จำเพาะต่อโปรตีนที่เราสนใจ
- จะต้องทำโดยผู้ที่มีความเชี่ยวชาญ⁽⁷²⁾

2. ELISA (Enzyme linked-immunosorbent assay)

เป็นการตรวจหาแอนติเจน แอนติบอดีหรือโปรตีนที่เราสนใจจะตรวจ โดยใช้สารที่มีความจำเพาะกับสิ่งที่เราตรวจหา และดูการเปลี่ยนแปลงสีของสาร หลังการทำปฏิกิริยา

ข้อดี

- ทำได้ง่าย
- มีความไวและมีความจำเพาะสูง
- มีประสิทธิภาพสูง
- มีความปลอดภัยเนื่องจากไม่จำเป็นต้องใช้สารกัมมันตรังสี
- สารที่ใช้ในการทำปฏิกิริยาราคาไม่แพง

ข้อเสีย

- เนื่องจากจะต้องใช้สารที่มีความจำเพาะต่อแอนติเจนแอนติบอดีหรือโปรตีนที่สนใจ เพราะฉะนั้นขั้นตอนในการเตรียมสารที่มีความจำเพาะจะมีความยากและจะต้องใช้ค่าใช้จ่ายที่สูง
- สามารถเกิดผลบวกวงและลบวงได้
- แอนติบอดีอาจมีความไม่เสถียร เนื่องจากเป็นโปรตีนจะต้องถูกเก็บอยู่ในที่ที่มีอุณหภูมิที่เหมาะสม เพราะฉะนั้นอาจจะต้องมีการรักษาอุณหภูมิในขณะเก็บหรือขณะขนส่ง⁽⁷³⁾

บทที่ 3

วิธีการดำเนินการวิจัย

รูปแบบการวิจัย

งานวิจัยเชิงทดลอง (Experimental research)

อุปกรณ์และเครื่องมือที่ใช้ในการศึกษา

1. โพรไบโอติก

โพรไบโอติกที่นำมาใช้ในงานวิจัยนี้เป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ในไทย ได้แก่

- *Bifidobacterium animalis* MSMC83
- *Lactobacillus reuteri* TF314
- *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1
- *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3

2. เซลล์ผิวหนัง (HaCat keratinocyte cell)

เซลล์ผิวหนังที่ใช้ในงานวิจัยนี้เป็นเซลล์ผิวหนัง HaCat keratinocyte cells (CLS300493)

3. แหล่งกำเนิดรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบี

หลอดไฟฟ้ากำเนิดรังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบี กำลังไฟฟ้าหลอดละ 8 วัตต์ จำนวน 5 หลอด ที่สามารถปล่อยรังสี UV-B ที่มีความยาวคลื่น 280-320 นาโนเมตร โดยเครื่อง UV-B Bio-Link BLX Cross linker จากบริษัท BIO SUN UVB VILBER LOURMAT ประเทศฝรั่งเศส

4. การวัดการคงอยู่ของเซลล์

ใช้วิธีการวัดโดยการใช้สาร MTT tetrazolium

5. การวัดการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์

1. การวัดระดับของสารอนุมูลอิสระออกซิเจนภายในเซลล์ด้วยการศึกษาระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

2. การวัดการทำงานของ Superoxide dismutase ด้วยวิธี enzymatic assay

6. การวัดระดับการอักเสบของเซลล์

วัดระดับของ TNF-alpha ด้วยวิธี ELISA

ขั้นตอนการศึกษา

1. การเตรียมโพรไบโอติก

นำโพรไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bifidobacterium animalis* MSMC83, *Lactobacillus reuteri* TF3 1 4, *Lactobacillus paracasei* MSMC3 9-1 และ *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 มาเพาะเลี้ยงบนจานอาหารเลี้ยงเชื้อ deMan-Rogosa-Sharpe (MRS) agar นำไปบ่มในสภาวะไม่มีออกซิเจนใน anaerobic jar (Envimed, England) ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง จากนั้นเลือกโคโลนีเดียวมาเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเชื้อแบบเหลว (broth) นำไปบ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง ปรับปริมาณให้ได้ความขุ่น 10^9 CFU/mL นำไปบ่ม ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เมื่อครบ 24-48 ชั่วโมง นำมาปั่น 4,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 10 นาทีจากนั้นนำส่วนของ supernatant มาผ่านกระดาษกรอง และเก็บไว้ที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส จากนั้นนำไปทำเป็นผงแห้งด้วยการผ่านกระบวนการ freeze drying เพื่อให้เหมาะกับการนำไปใช้ในการทดสอบต่อไป

2. การเตรียมเซลล์ผิวหนัง

เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง HaCat keratinocyte cells (CLS300493) ในอาหารเลี้ยงเซลล์ dulbecco's modified eagle's minimal medium (DMEM) ที่มี 10% fetal bovine serum และ 1% penicillin-streptomycin ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ที่มี CO₂ 5% และมีความชื้น 95% โดยเปลี่ยนอาหารเลี้ยงเซลล์ทุก ๆ 2 วัน จนกระทั่งเซลล์มีการเจริญเติบโตได้ 70% จึงนำไปทดสอบต่อไป

3. การทดสอบความเป็นพิษของโพรไบโอติกกับเซลล์ผิวหนังโดยการวัดการคงอยู่ของเซลล์

เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนังและเติม cell free culture supernatants จากโพรไบโอติกที่เตรียมจาก 10^9 CFU/mL ในระดับความเข้มข้นที่ต่างกัน และบ่มกับเซลล์ผิวหนัง HaCat keratinocyte cells 1.5×10^4 cell/well เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนับจำนวนเซลล์ที่คงอยู่ด้วยวิธี MTT assay รวมทั้งทำการทดสอบร่วมกับการฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีด้วยเช่นกัน เพื่อหาความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่เหมาะสมเพื่อใช้ในการทำการทดลองถัดไป

4. การทดสอบการลดของสารอนุมูลอิสระและการเพิ่มของสารต้านอนุมูลอิสระของโพรไบโอติกในเซลล์ผิวหนัง

4.1 การทดสอบการลดของสารอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดระดับ Intracellular reactive oxygen species (ROS)

เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง จะนับจำนวนเซลล์และเพาะลงใน 96-well plates จำนวน 1.5×10^4 cells/well เติมน้ำ culture supernatants ที่เตรียมจาก 10^9 CFU/ml และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 mJ/cm^2 และบ่มต่อเป็นเวลา 30 นาที และเติมสารทดสอบ intracellular reactive oxygen species (ROS) บ่มต่ออีก 30 นาที เมื่อครบเวลานำไปวัดค่าการเรืองแสงที่ excitation 540 นาโนเมตร และ emission 570 นาโนเมตร

4.2 การทดสอบการเพิ่มของสารต้านอนุมูลอิสระด้วยวิธีการวัดระดับ Superoxide dismutase (SOD)

เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง จะนับจำนวนเซลล์และเพาะลงใน 96-well plates จำนวน 1.5×10^4 cells/well เติมน้ำ culture supernatants ที่เตรียมจาก 10^9 CFU/ml และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 mJ/cm^2 และบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและจากนั้นนำเซลล์และ supernatant เติมน้ำทดสอบ SOD และวัดค่า SOD activity โดยรายงานเป็น U/mL

5. การทดสอบการลดค่าของสารก่อการอักเสบของโปรไบโอติกในเซลล์ผิวหนัง

เพาะเลี้ยงเซลล์ผิวหนัง จะนับจำนวนเซลล์และเพาะลงใน 96-well plates จำนวน 1.5×10^4 cells/well เติมน้ำ culture supernatants ที่เตรียมจาก 10^9 CFU/ml และบ่มเป็นเวลา 2 ชั่วโมง จากนั้นฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 mJ/cm^2 และบ่มต่อเป็นเวลา 24 ชั่วโมงและนำส่วน supernatant มาวัดระดับ TNF- α ด้วยวิธี Enzyme-linked absorbent assay (ELISA) โดยคำนวณหาปริมาณของ TNF- α (pg/mL) โดยเทียบกับกราฟมาตรฐาน

การประเมินผลการวิจัย

1. การวัดระดับของการคงอยู่ของเซลล์

ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีวิเคราะห์การคงอยู่ของเซลล์ผ่านการศึกษาด้วย MTT Assay โดยการทดสอบนี้จะเป็นการศึกษาปฏิกิริยาของเกลือเตตราโซเลียม (Tetrazolium salt หรือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide หรือ MTT) ซึ่งมีสีเหลือง โดยจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลึกฟอร์มazan (Formazan) สีม่วงเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ไมโทคอนเดรียล ไรด์คเตส ดังนั้นถ้าหากเซลล์มีชีวิตเซลล์จะมีกระบวนการเมตาบอลิซึมและไมโทคอนเดรียล ไรด์คเตสในเซลล์ที่มีชีวิตจะไปเกิดปฏิกิริยารีดิวซ์กับ MTT ทำให้เกิดผลึก formazan ที่ไม่ละลายน้ำ แต่จะถูกละลายโดยใช้สารละลาย DMSO และสารละลายสีที่ได้จะถูกนำไปวัดปริมาณการมีชีวิตโดยการวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ 500-600 นาโนเมตร ดังนั้นยิ่ง

สารละลายมีสีเข้มขึ้นเท่าใด จะบ่งบอกถึงจำนวนเซลล์ที่มีกระบวนการเมตาบอลิซึมหรือเซลล์มีชีวิตมากยิ่งขึ้น ซึ่งในการทดลองเพื่อวัดระดับการคงอยู่ของเซลล์จะแบ่งเป็น 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1.1 วัดความเป็นพิษของสาร (น้ำเลี้ยงโพโรไบโอดีค) ที่มีต่อเซลล์ในตอนนี้จะวัดระดับการคงอยู่ของเซลล์ว่าสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ และหาระดับความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์มีความคงอยู่มากที่สุด ซึ่งจะวัดความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เพื่อนำระดับความเข้มข้นของสารนั้นมาใช้ในการทดลองตอนถัดไป

ตอนที่ 1.2 หาระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่มากที่สุดที่ฉายแล้วเซลล์มีความคงอยู่มากที่สุด โดยทำการทดสอบระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ตั้งแต่ 0 – 50 mJ/cm² เพื่อนำระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีมาใช้ในการทดลองถัดไป

ตอนที่ 1.3 หาระดับการคงอยู่ของเซลล์ โดยใช้ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงโพโรไบโอดีคที่เหมาะสมที่ได้จากตอนที่ 1.1 มาฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่มีความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ได้จากตอนที่ 1.2

2, การวัดระดับของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์

ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีศึกษาการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์ (Cell-based antioxidant assays) โดยศึกษาทั้งหมด 2 กลไก คือ

2.1 ศึกษาการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (inhibition of intracellular ROS production)

2.2 ศึกษาการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (activation of the endogenous antioxidant system) โดยการวัดระดับของ superoxide dismutase (SOD)

3. การวัดระดับของภาวะการอักเสบ

การวัดระดับของภาวะการอักเสบสามารถวัดได้จากสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบภายในเซลล์ (pro-inflammatory cytokine) สำหรับในงานวิจัย จะใช้ในการวัด TNF- α ด้วยวิธี ELISA

การวิเคราะห์ข้อมูล

ในงานวิจัยนี้จะทำตัวอย่างละ 3 ครั้งและทำซ้ำทั้งหมด 2 การทดลอง และนำข้อมูลมาวิเคราะห์เชิงสถิติด้วยวิธี One way Anova

บทที่ 4

ผลการวิจัย

การวิจัยเชิงทดลองในครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายเพื่อศึกษาผลการต้านสารอนุมูลอิสระและการอักเสบของโพรไบโอติกต่อเซลล์ผิวหนังที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ซึ่งผลการวิเคราะห์ข้อมูลจากการทดลอง สามารถแบ่งได้ทั้งหมด 3 ตอนคือ

ตอนที่ 1 ระดับการคงอยู่ของเซลล์

ตอนที่ 2 ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตอนที่ 3 ระดับของสารสื่อการอักเสบในเซลล์

ตอนที่ 1 ระดับของการคงอยู่ของเซลล์

การวัดระดับการคงอยู่ของเซลล์จะวัดระดับด้วย MTT Assay ซึ่งเป็นวิธีการวิเคราะห์การคงอยู่ของเซลล์ผ่านการศึกษาของปฏิกิริยาของเกลือเตตราโซเลียม (Tetrazolium salt หรือ 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide หรือ MTT) ซึ่งมีสีเหลือง โดยจะถูกเปลี่ยนไปเป็นผลึกฟอร์มazan (Formazan) สีม่วงเมื่อมีการทำปฏิกิริยากับเอ็นไซม์ไมโทคอนเดรียล ไรด์คเตสในเซลล์ที่มีชีวิต ดังนั้นถ้าหากมีเซลล์ที่มีชีวิตอยู่มาก จะทำให้ยิ่งเห็นเป็นสีม่วงที่เข้มขึ้น โดยในการวัดระดับการคงอยู่ของเซลล์จะแบ่งออกเป็นทั้งหมด 2 ตอน คือ

ตอนที่ 1.1 วัดความเป็นพิษของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่มีต่อเซลล์ สำหรับในตอนนี้จะวัดระดับความคงอยู่ของเซลล์ ว่าสารมีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่ และหาระดับความเข้มข้นของสารที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์มีความคงอยู่มากที่สุด ซึ่งจะวัดความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร โดยกำหนดค่าความไม่เป็นพิษต่อเซลล์จะต้องมีเซลล์คงอยู่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 90 โดยผลการคงอยู่ของเซลล์ต่อความเข้มข้นของสารแต่ละชนิดมีดังต่อไปนี้ (ตาราง 2)

ตาราง 2 แสดงระดับการคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยสาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)

สารและความเข้มข้น	ระดับของการคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
กลุ่มควบคุม (ไม่ฉายรังสีอัลตราไวโอเลตบี)	100	
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83		
0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	94.251 ± 1.407	0.9998
0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	91.974 ± 9.684	0.862
1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	89.951 ± 6.329	0.523
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	88.241 ± 7.826	0.273
5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	70.576 ± 6.447	<0.0001
10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	59.598 ± 6.151	<0.0001
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314		
0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	96.468 ± 5.157	>0.9999
0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	89.906 ± 6.288	0.515
1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	83.436 ± 10.394	0.018
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	75.604 ± 5.071	<0.0001
5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	65.456 ± 2.525	<0.0001
10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	59.011 ± 4.209	<0.0001
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1		
0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	100.571 ± 7.253	>0.9999
0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	91.463 ± 6.959	0.786
1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	87.817 ± 9.240	0.226
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	84.774 ± 8.913	0.044
5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	71.755 ± 6.524	<0.0001
10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	59.819 ± 5.514	<0.0001

ตาราง 2 (ต่อ)

สารและความเข้มข้น	ระดับของการคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3		
0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	105.666 ± 12.032	0.9999
0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	93.756 ± 10.283	0.993
1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	99.071 ± 7.372	0.9999
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	91.782 ± 7.204	0.835
5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	74.115 ± 5.368	<0.0001
10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	60.885 ± 5.424	<0.0001
De Man–Rogosa–Sharpe agar (MRS) (สารควบคุม)		
0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	99.225 ± 2.640	>0.9999
0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	96.214 ± 1.570	>0.9999
1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	97.261 ± 3.242	>0.9999
2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	96.432 ± 2.797	>0.9999
5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	92.447 ± 4.102	0.977
10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	89.569 ± 1.572	0.649

จากในตารางที่ 2 ข้างต้น เป็นผลการทดลองจากการวัดระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และหาระดับความเข้มข้นของสาร ที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์มีความคงอยู่ ซึ่งผลการทดลองสรุปได้ว่า สารน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกจาก *Bifidobacterium animalis* MSMC83, *Lactobacillus reuteri* TF314, *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และ *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 ในความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร เป็นความเข้มข้นที่ทำให้เซลล์มีความคงอยู่มากกว่าร้อยละ 90 และมีจำนวนเซลล์ที่มีความคงอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สาร และเมื่อเพิ่มความเข้มข้น

ของสาร จะทำให้ความคงอยู่ของเซลล์ลดลงไปเรื่อยๆ จนทำให้จำนวนเซลล์ที่มีความคงอยู่มีแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สาร

ตอนที่ 1.2 ทหาระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่มากที่สุดที่ฉายแล้ว เซลล์มีความคงอยู่มากที่สุด โดยทดลองในรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีทั้งหมด 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยกำหนดค่าความไม่เป็นพิษต่อเซลล์จะต้องมีเซลล์คงอยู่มากกว่าหรือเท่ากับร้อยละ 60 โดยผลของการคงอยู่ของเซลล์จากการถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีในระดับต่างๆมีผลดังต่อไปนี้ (ตาราง 3)

ตาราง 3 แสดงระดับการคงอยู่ของเซลล์หลังจากฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี

ระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี	ระดับของการคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
กลุ่มควบคุม (ไม่ฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี)	100	
15 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	82.294 ± 2.262	<0.0001
20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	66.893 ± 1.486	<0.0001
25 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	58.838 ± 3.103	<0.0001
30 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	56.773 ± 1.887	<0.0001
35 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	47.536 ± 1.085	<0.0001
40 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	37.670 ± 1.458	<0.0001
45 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	32.870 ± 0.996	<0.0001
50 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร	26.204 ± 1.193	<0.0001

จากการทดลองข้างต้น พบว่าหลังฉายรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ระดับความเข้มข้น 15 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 82.294 ± 2.262 ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 66.893 ± 1.486 ระดับความเข้มข้น 25 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 58.838 ± 3.103 ระดับความเข้มข้น 30 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 56.773 ± 1.887 ระดับความเข้มข้น 35 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 47.536 ± 1.085 ระดับความเข้มข้น 40 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 37.670 ± 1.458 ระดับความเข้มข้น 45 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 32.870 ± 0.996 ระดับความเข้มข้น 50 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 26.204 ± 1.193

ดังนั้น ระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตมากที่สุดที่ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์มากกว่าร้อยละ 60 คือ ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ซึ่งจะถูกนำไปใช้ในการทดลองถัดไป

ตอนที่ 1.3 การหาความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

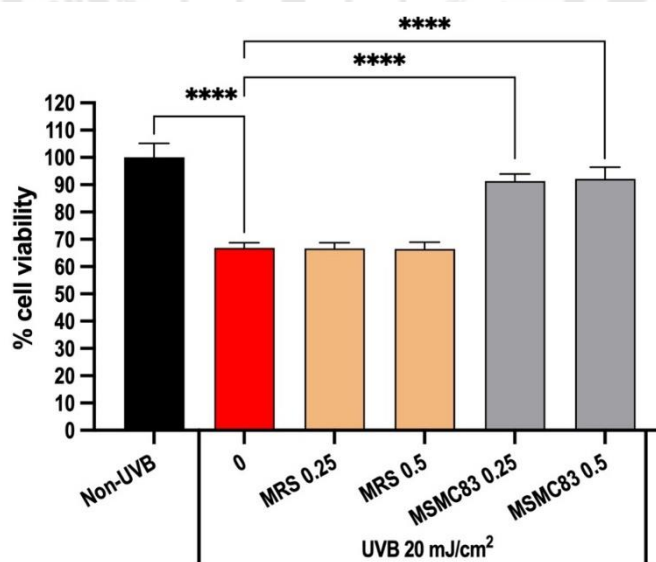
ตาราง 4 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับความคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
ไม่ถูกฉายด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ต	100 ± 5.107	<0.0001
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	66.893 ± 1.819	>0.9999

ตาราง 4 (ต่อ)

สารและความเข้มข้น	ระดับความคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	66.626 ± 2.145	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	66.497 ± 2.416	>0.9999
<i>Bifidobacterium animalis</i>		
MSMC83 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	91.387 ± 2.519	<0.0001
<i>Bifidobacterium animalis</i>		
MSMC83 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	92.101 ± 4.35	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



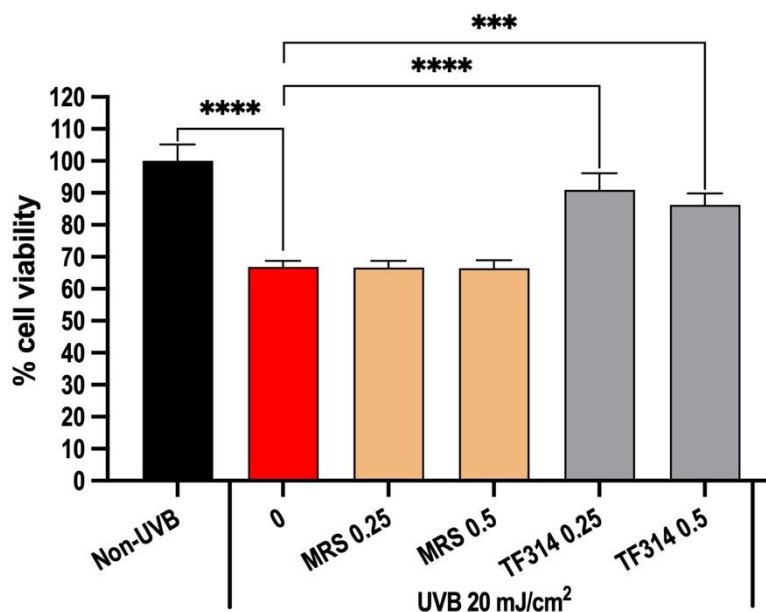
ภาพประกอบ 11 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC 83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตาราง เซนติเมตร

จากตาราง 4 และภาพประกอบ 11 แสดงผลของระดับของความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 (83) พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 83 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 91.387 ± 2.519 และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 92.101 ± 4.35 ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความคงอยู่ของเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับความคงอยู่ของเซลล์

ตาราง 5 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับความคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
ไม่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี	100 ± 5.107	<0.0001
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	66.893 ± 1.819	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	66.626 ± 2.145	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	66.497 ± 2.416	>0.9999
<i>Bifidobacterium animalis</i>		
MSMC83 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	90.581 ± 5.24	<0.0001
<i>Bifidobacterium animalis</i>		
MSMC83 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	86.248 ± 3.569	0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



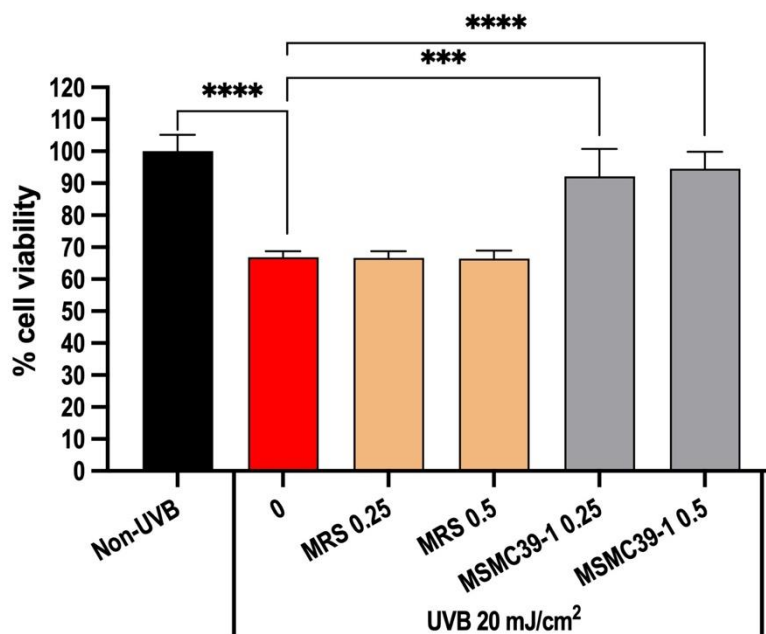
ภาพประกอบ 12 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 5 และภาพประกอบ 12 แสดงผลของระดับของความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 (TF314) พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก TF314 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 90.581 ± 5.24 และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 86.248 ± 3.569 ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความคงอยู่ของเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับความคงอยู่ของเซลล์

ตาราง 6 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับความคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
ไม่ถูกฉายด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ตบี	100 ± 5.107	<0.0001
ไม่ใช่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	66.893 ± 1.819	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	66.626 ± 2.145	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	66.497 ± 2.416	>0.9999
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	92.137 ± 8.656	0.0002
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	94.534 ± 5.357	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



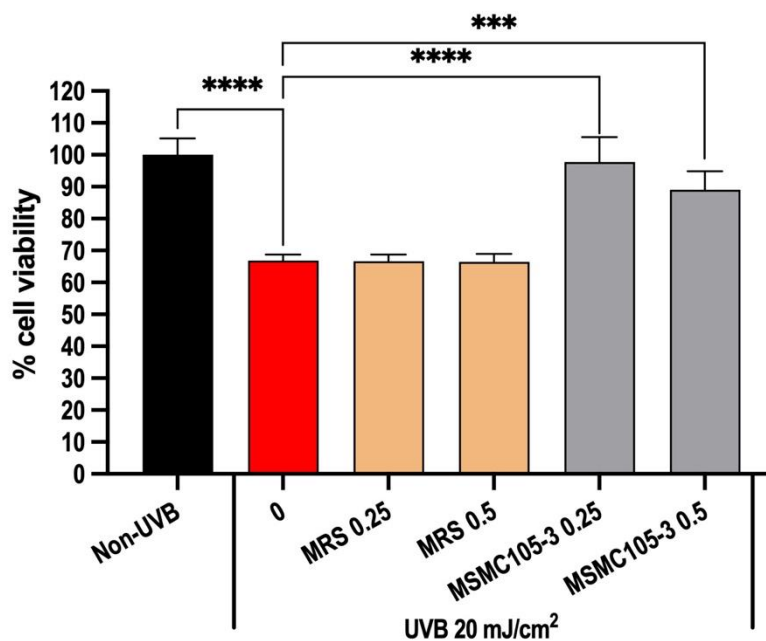
ภาพประกอบ 13 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 6 และภาพประกอบ 13 แสดงผลของระดับของความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC39-1 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 92.137 ± 8.656 และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 94.534 ± 5.357 มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความคงอยู่ของเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับความคงอยู่ของเซลล์

ตาราง 7 แสดงความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 ที่ความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับความคงอยู่ของเซลล์ (ร้อยละ)	P-value
ไม่ถูกฉายด้วยรังสี อัลตราไวโอเล็ตบี	100 ± 5.107	<0.0001
ไม่ใช่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	66.893 ± 1.819	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	66.626 ± 2.145	>0.9999
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	66.497 ± 2.416	>0.9999
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	97.777 ± 7.779	<0.0001
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	89.017 ± 5.785	0.0004

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



ภาพประกอบ 14 แสดงกราฟระดับความคงอยู่ของเซลล์หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 7 และภาพประกอบ 14 แสดงผลของระดับของความคงอยู่ของเซลล์ หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC105-3 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 97.777 ± 7.779 และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับความคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 89.017 ± 5.785 มีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับความคงอยู่ของเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับความคงอยู่ของเซลล์

ตอนที่ 2 ระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ในงานวิจัยนี้จะใช้วิธีศึกษาการทำงานของสารต้านอนุมูลอิสระผ่านเซลล์ (Cell-based antioxidant assays) โดยศึกษาทั้งหมด 2 กลไก คือ

2.1 ศึกษาการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (inhibition of intracellular ROS production)

2.2 ศึกษาการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (activation of the endogenous antioxidant system) โดยการวัดระดับของ superoxide dismutase (SOD)

โดยผลของงานวิจัยสำหรับตอนที่ 2 จะแบ่งเป็นทั้งหมด 2 ตอน คือ

ตอนที่ 2.1 ผลของระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตอนที่ 2.2 ผลของระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ผ่านการวัดระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ตอนที่ 2.1 ผลของระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร เทียบกับกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)

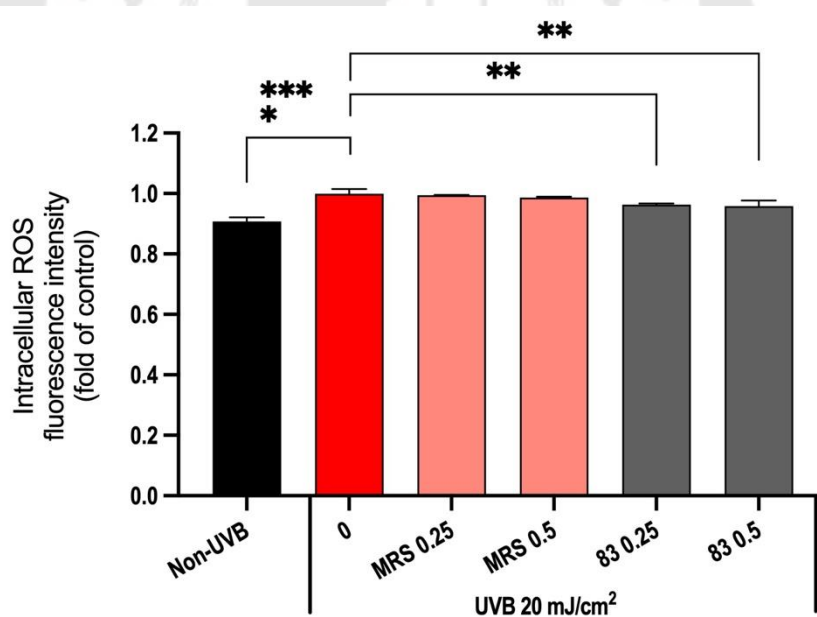
ตาราง 8 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของสารอนุมูลอิสระ (จำนวนเท่าของกลุ่มควบคุม)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	1.000 ± 0.012	0.998
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.994 ± 0.0001	0.958
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.986 ± 0.0001	0.691

ตาราง 8 (ต่อ)

สารและความเข้มข้น	ระดับของสารอนุมูลอิสระ (จำนวนเท่าของกลุ่มควบคุม)	P-value
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.963 ± 0.003	0.007
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.958 ± 0.014	0.003

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



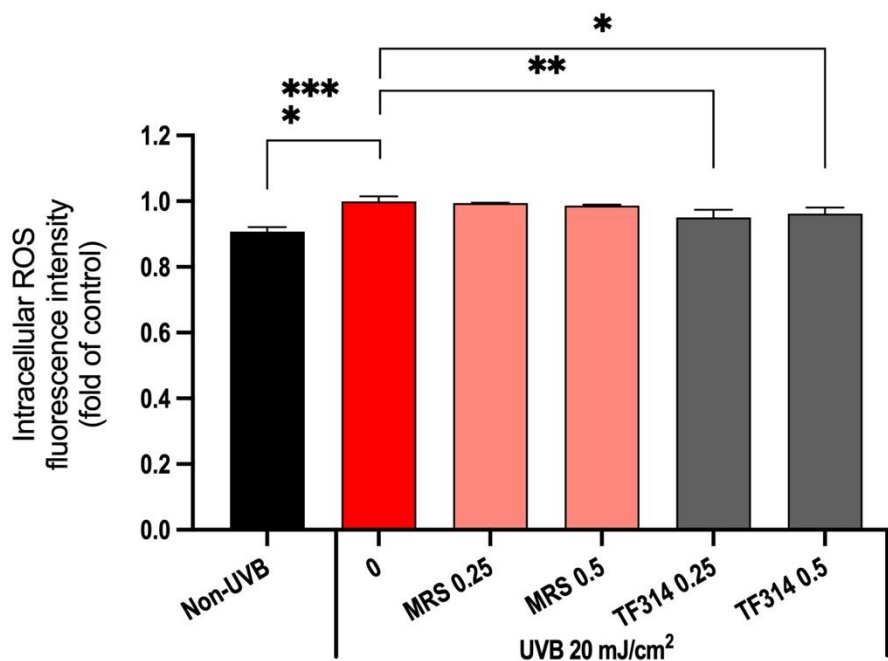
ภาพประกอบ 15 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง
โพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC 83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี
20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 8 และภาพประกอบ 15 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 (83) พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก 83 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.963 ± 0.003 เท่าของกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.958 ± 0.014 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตาราง 9 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของสารอนุมูลอิสระ (จำนวนเท่าของกลุ่มควบคุม)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	1.000 ± 0.012	0.998
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.994 ± 0.0001	0.958
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.986 ± 0.0001	0.691
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.950 ± 0.019	0.007
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.962 ± 0.015	0.03

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar

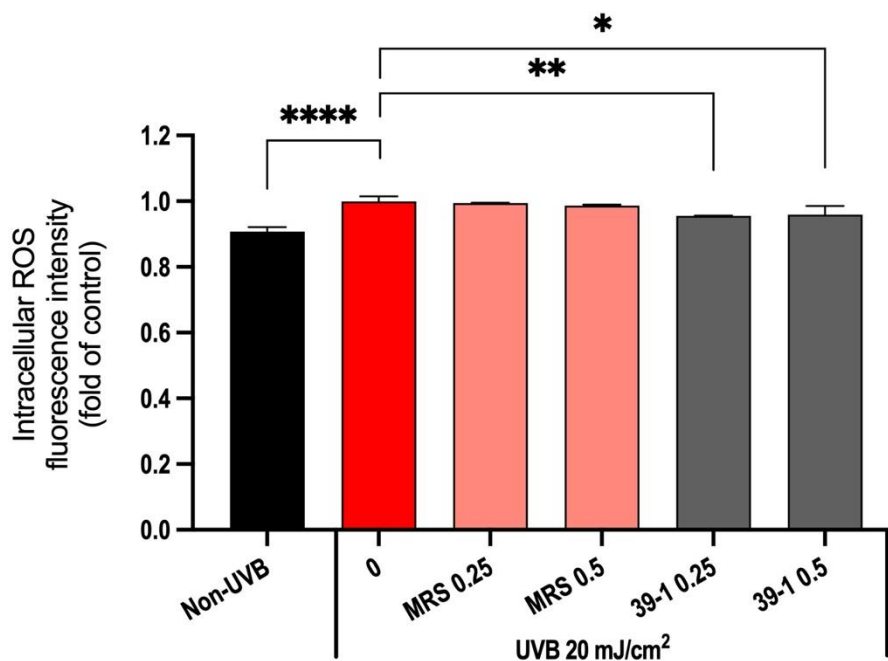


ภาพประกอบ 16 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง
โพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี
20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 9 และภาพประกอบ 16 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 (TF314) พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก TF314 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.950 ± 0.019 เท่าของกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.962 ± 0.015 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตาราง 10 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของสารอนุมูลอิสระ (จำนวนเท่าของกลุ่มควบคุม)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	1.000 ± 0.012	0.998
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.994 ± 0.0001	0.958
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.986 ± 0.0001	0.691
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.955 ± 0.0004	0.0083
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.959 ± 0.021	0.0013



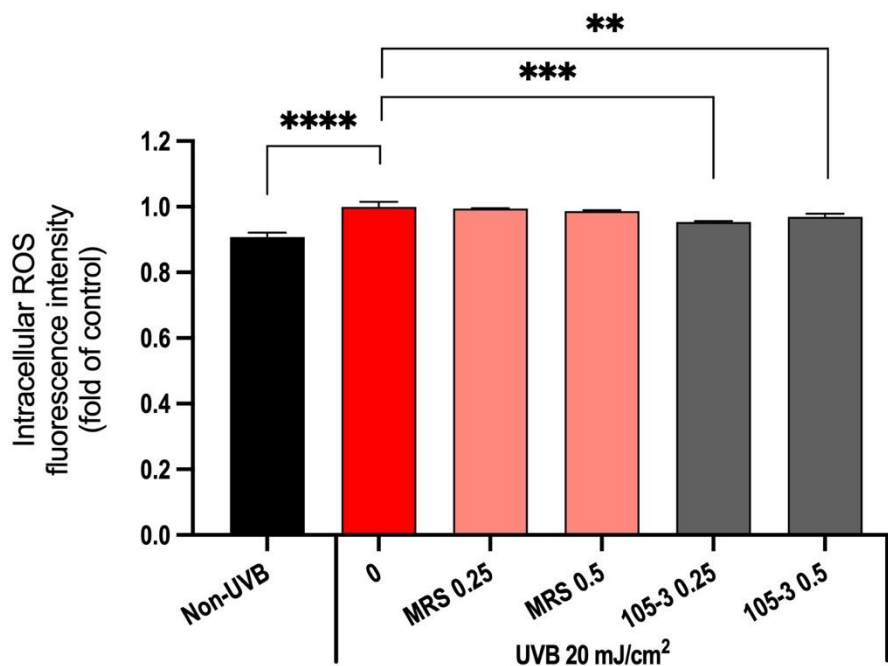
ภาพประกอบ 17 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยง
โพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี
20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 10 และภาพประกอบ 17 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC39-1 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.955 ± 0.0004 เท่าของกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.959 ± 0.021 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตาราง 11 แสดงระดับของสารอนุมูลอิสระ หลังจากป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของสารอนุมูลอิสระ	
	(จำนวนเท่าของกลุ่มควบคุม)	P-value
ไม่ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก	1.000 ± 0.012	0.998
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.994 ± 0.0001	0.958
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.986 ± 0.0001	0.691
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.952 ± 0.002	0.0002
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.969 ± 0.007	0.005

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



ภาพประกอบ 18 แสดงกราฟระดับของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

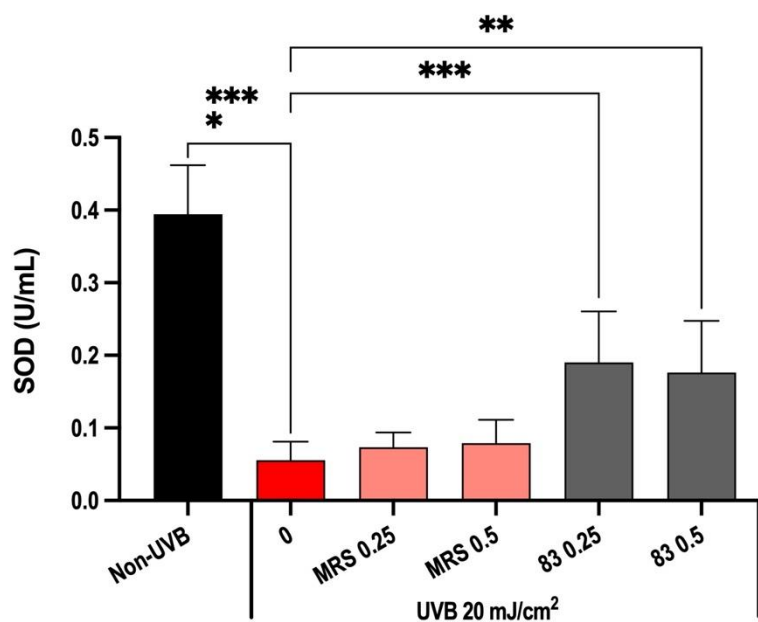
จากตาราง 11 และกราฟ 18 ข้างต้น แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC 105-3 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC105-3 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.952 ± 0.002 เท่าของกลุ่มควบคุม และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์อยู่ที่ 0.969 ± 0.007 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตอนที่ 2.2 ผลของระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์หลังจากถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร ผ่านการวัดระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ตาราง 12 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากป่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สารน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก	0.055 ± 0.023	0.988
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.073 ± 0.018	0.965
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.079 ± 0.029	0.902
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.190 ± 0.064	0.0006
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.176 ± 0.065	0.0019

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



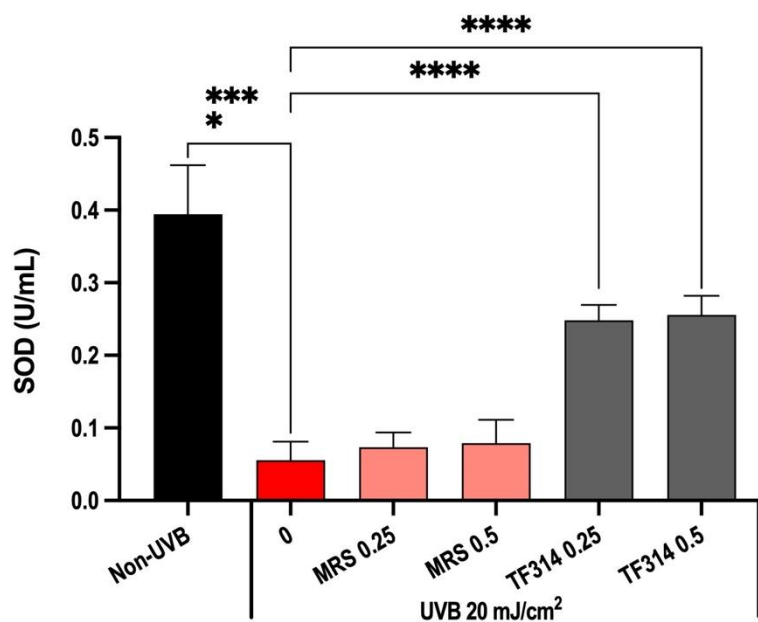
ภาพประกอบ 19 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 12 และภาพประกอบ 19 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC83 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.190 ± 0.064 ยูนิิตต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.176 ± 0.065 ยูนิิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ตาราง 13 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	0.055 ± 0.023	0.988
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.073 ± 0.018	0.965
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.079 ± 0.029	0.902
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.248 ± 0.019	<0.0001
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.255 ± 0.024	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



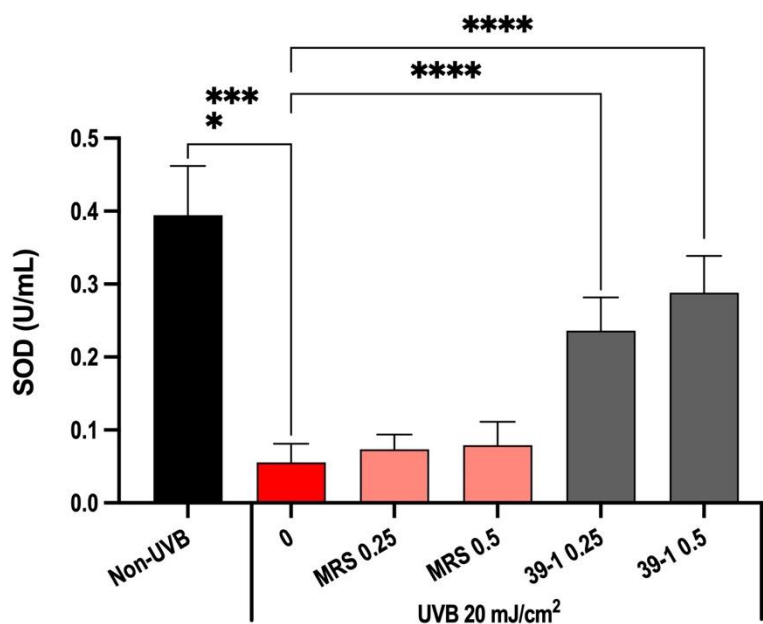
ภาพประกอบ 20 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 13 และภาพประกอบ 20 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก TF314 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.248 ± 0.019 ounit ต่อ มิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.255 ± 0.024 ounit ต่อ มิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ตาราง 14 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	0.055 ± 0.023	0.988
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.073 ± 0.018	0.965
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.079 ± 0.029	0.902
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC 39-1 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.236 ± 0.041	<0.0001
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC 39-1 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.288 ± 0.046	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



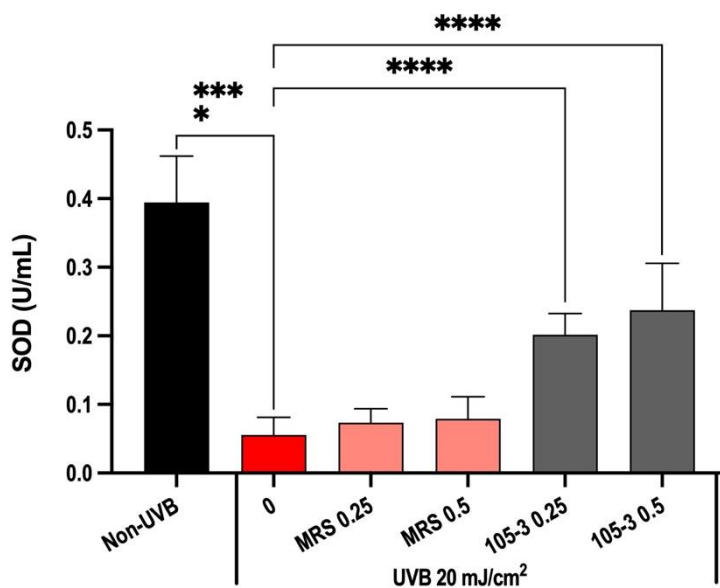
ภาพประกอบ 21 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 14 และภาพประกอบ 21 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพไบโอติก MSMC39-1 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.236 ± 0.041 ยูนิตต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.288 ± 0.046 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

ตาราง 15 แสดงระดับเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) หลังจากป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) (ยูนิตต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	0.055 ± 0.023	0.988
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.073 ± 0.018	0.965
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	0.079 ± 0.029	0.902
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.201 ± 0.028	<0.0001
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	0.237 ± 0.062	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



ภาพประกอบ 22 แสดงกราฟระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์ หลังจากบ่มน้ำเลี้ยงด้วยโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 15 และภาพประกอบ 22 แสดงผลของระดับของการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์จากการวัดระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC105-3 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.201 ± 0.028 หน่วยต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) อยู่ที่ 0.237 ± 0.062 หน่วยต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD)

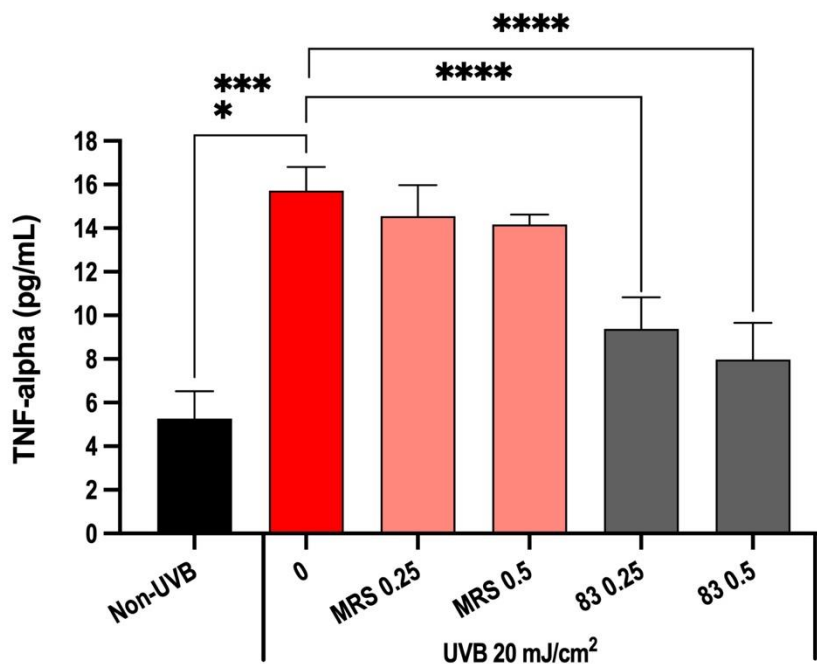
ตอนที่ 3 ระดับของสารสื่อการอักเสบในเซลล์

การวัดระดับของภาวะการอักเสบสามารถวัดได้จากสารที่ก่อให้เกิดการอักเสบภายในเซลล์ (pro-inflammatory cytokine) ซึ่งสำหรับในงานวิจัยนี้ จะวัด TNF- α ด้วยวิธี ELISA โดยผลของระดับการอักเสบภายในเซลล์หลังถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร มีผลดังต่อไปนี้

ตาราง 16 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของ TNF- α (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	15.727 \pm 0.987	0.878
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.546 \pm 1.302	0.382
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.177 \pm 0.414	0.163
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	9.386 \pm 1.317	<0.0001
<i>Bifidobacterium animalis</i> MSMC83 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	7.975 \pm 1.533	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



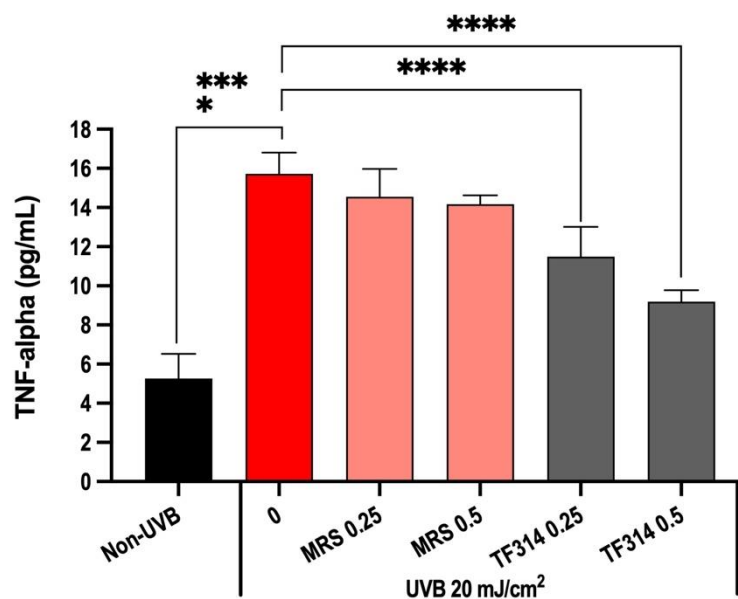
ภาพประกอบ 23 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 16 และภาพประกอบ 23 แสดงผลของระดับของการต้านการอักเสบภายในเซลล์จากการวัดระดับ TNF- α ด้วยวิธี ELISA ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Bifidobacterium animalis* MSMC83 พบว่า กลุ่มที่มีการป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC83 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 9.386 ± 1.317 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 7.975 ± 1.533 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับ TNF- α ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับ TNF- α

ตาราง 17 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของ TNF- α (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	15.727 \pm 0.987	0.878
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.546 \pm 1.302	0.382
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.177 \pm 0.414	0.163
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	11.490 \pm 1.393	<0.0001
<i>Lactobacillus reuteri</i> TF314 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	9.194 \pm 0.530	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



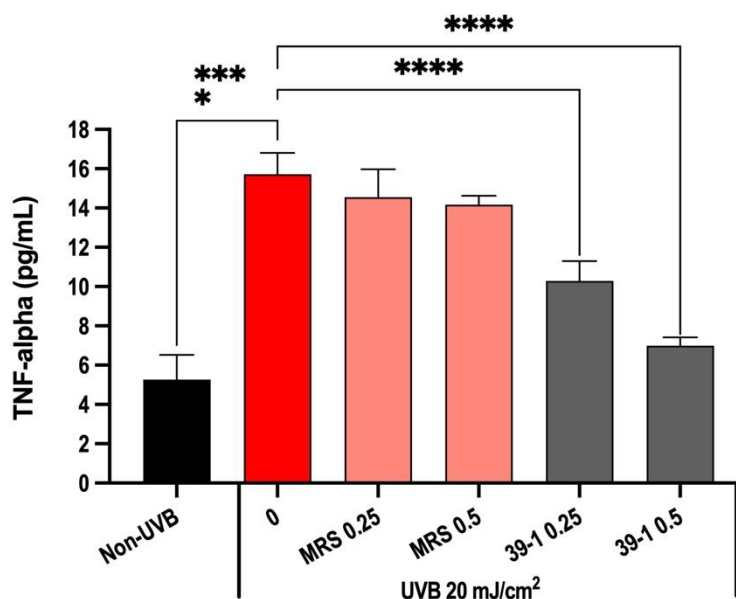
ภาพประกอบ 24 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 17 และภาพประกอบ 24 แสดงผลของระดับของการต้านการอักเสบภายในเซลล์จากการวัดระดับ TNF- α ด้วยวิธี ELISA ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตที่ 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก *Lactobacillus reuteri* TF314 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติก TF314 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 11.490 ± 1.393 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 9.194 ± 0.530 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงไฟโรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับ TNF- α ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงไฟโรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับ TNF- α

ตาราง 18 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของ TNF- α (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	15.727 \pm 0.987	0.878
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.546 \pm 1.302	0.382
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.177 \pm 0.414	0.163
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	10.291 \pm 0.918	<0.0001
<i>Lactobacillus paracasei</i> MSMC39-1 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	7.000 \pm 0.377	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



ภาพประกอบ 25 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก

Lactobacillus paracasei MSMC39-1 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี

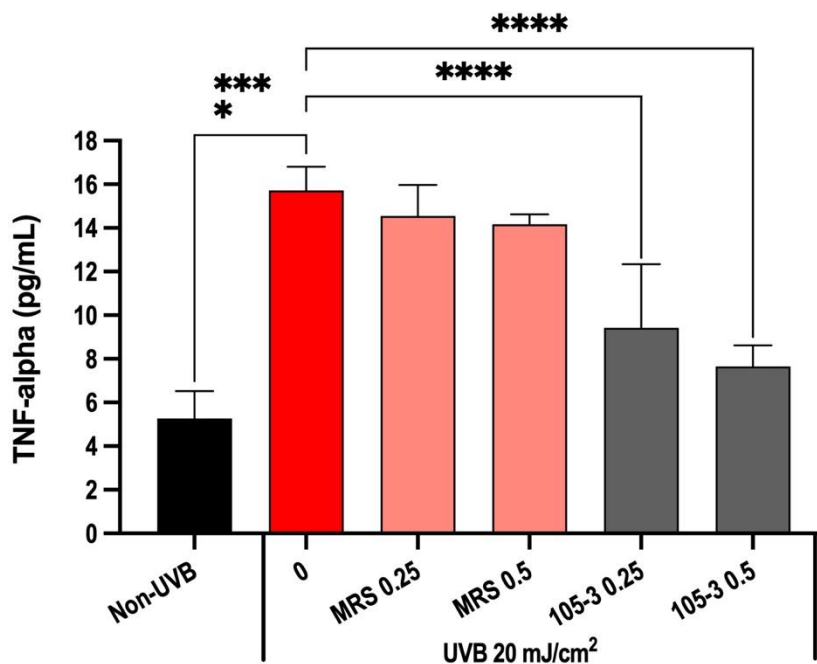
20 มิลลิจุลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 18 และภาพประกอบ 25 แสดงผลของระดับของการต้านการอักเสบภายในเซลล์จากการวัดระดับ TNF- α ด้วยวิธี ELISA ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจุลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก) และกลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 พบว่า กลุ่มที่มีการบ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก MSMC39-1 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 10.291 ± 0.918 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 7.000 ± 0.377 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับ TNF- α ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับ TNF- α

ตาราง 19 แสดงระดับของ TNF- α หลังจากป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

สารและความเข้มข้น	ระดับของ TNF- α (พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร)	P-value
ไม่ใส่สาร (น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก)	15.727 \pm 0.987	0.878
MRS ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	14.546 \pm 1.302	0.382
MRS ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัม ต่อมิลลิลิตร	14.177 \pm 0.414	0.163
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	9.431 \pm 2.655	<0.0001
<i>Lactobacillus salivarius</i> MSMC105-3 ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร	7.649 \pm 0.883	<0.0001

MRS : De Man–Rogosa–Sharpe agar



ภาพประกอบ 26 แสดงกราฟระดับของ TNF- α หลังจากป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรบิโอติก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 และฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

จากตาราง 19 และภาพประกอบ 26 แสดงผลของระดับของการต้านการอักเสบภายในเซลล์จากการวัดระดับ TNF- α ด้วยวิธี ELISA ภายในเซลล์หลังจากการฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตปี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยเทียบระหว่างกลุ่มควบคุม (กลุ่มที่ไม่ได้ใส่น้ำเลี้ยงโพรบิโอติก) และกลุ่มที่มีการป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรบิโอ *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 พบว่า กลุ่มที่มีการป้อนด้วยน้ำเลี้ยงโพรบิโอติก MSMC105-3 ที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 9.431 ± 2.655 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร และที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร มีระดับ TNF- α อยู่ที่ 7.649 ± 0.883 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และสำหรับ MRS ที่เป็นส่วนผสมของน้ำเลี้ยงโพรบิโอติกในการทดลอง ทั้งความเข้มข้นที่ 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ระดับ TNF- α ไม่พบความแตกต่างกับกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยอาหารเลี้ยงโพรบิโอติก MRS ไม่มีผลต่อระดับ TNF- α

บทที่ 5

สรุปอภิปรายผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

รังสีอัลตราไวโอเล็ตชนิดบีได้ว่าเป็นรังสีที่สามารถส่งผลกระทบต่อมนุษย์ได้โดยตรง โดยเฉพาะใน ส่วนของผิวหนัง รังสีอัลตราไวโอเล็ตต่างชนิดกัน จะมีความยาวคลื่นที่ต่างกัน รังสีอัลตราไวโอเล็ต เอ จะมีความยาวคลื่นที่มากกว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ซึ่งจะมีความยาวคลื่นอยู่ที่ 315 – 400 นาโนเมตร ในส่วนของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีจะมีความยาวคลื่นอยู่ที่ 280 – 320 นาโนเมตร ในส่วนของรังสีอัลตราไวโอเล็ตซีจะถูกดูดกลืนที่ชั้นบรรยากาศของโลก⁽¹⁶⁾

รังสีอัลตราไวโอเล็ตเอที่มีความยาวคลื่นมากกว่า จะสามารถถลอกได้ชั้นผิวได้มากกว่า โดยจะส่งผลเป็นหลักในชั้นหนังแท้ (Dermis) ซึ่งจะทำให้ผิวหนังมีความแข็งแรงของผิวน้อยลง เกิด เป็นริ้วรอยของผิวหนัง (photoaging) ตามมาได้ และในส่วนของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี จะมีความ ยาวคลื่นที่น้อยกว่า จะส่งผลกระทบต่อเซลล์ผิวหนังที่อยู่ในชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) ที่อยู่ในชั้นที่ตื้น กว่า โดยจะประกอบไปด้วยเซลล์ผิวหนัง (Keratinocyte) และเซลล์ที่สร้างเม็ดสี (Melanocyte) ถึงแม้ว่า รังสีอัลตราไวโอเล็ตบีจะมีความยาวคลื่นที่น้อยกว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตเอ แต่รังสี อัลตราไวโอเล็ตบีจะมีพลังงานที่มากกว่ารังสีอัลตราไวโอเล็ตเอซึ่งจะส่งผลทำให้ดีเอ็นเอ ใน นิวเคลียสของเซลล์ผิวหนังถูกทำลายซึ่งจะเพิ่มโอกาสในการเป็นโรคมะเร็งผิวหนังได้ในอนาคต⁽²⁾

เมื่อเซลล์ผิวหนังได้รับรังสีอัลตราไวโอเล็ตจะไปกระตุ้น ให้เกิดสารอนุมูลอิสระในเซลล์ ให้มีระดับสูงขึ้น เมื่อเซลล์มีสารอนุมูลอิสระที่มากกว่าสารต้านอนุมูลอิสระจะก่อให้เกิด ภาวะเครียดจากออกซิเดชันและการอักเสบ

ในปัจจุบันได้มีการใช้การป้องกันรังสีอัลตราไวโอเล็ต ไม่ว่าจะเป็นการใช้ยากันแดดหรือ การใช้สารต้านอนุมูลอิสระ ในปัจจุบันได้มีการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติของการต้านอนุมูลอิสระ และการต้านการอักเสบจากโพรบิโอดิก แต่ยังไม่มีการศึกษาเกี่ยวกับการต้านอนุมูลอิสระและการ ต้านการอักเสบของเซลล์ผิวหนังที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของโพรบิโอดิก โดยเฉพาะ โพรบิโอดิกสายพันธุ์ของไทย ที่มีการศึกษาก่อนหน้าเกี่ยวกับการต้านการอนุมูลอิสระและการต้าน การอักเสบ ผู้วิจัยจึงเล็งเห็นถึงช่องว่างของงานวิจัยเหล่านี้ จึงได้เลือกนำโพรบิโอดิกสายพันธุ์ไทย ที่มีการศึกษาว่ามีคุณสมบัติเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและต้านการอักเสบในงานวิจัยก่อนหน้ามา ทำการวิจัยในเซลล์ผิวหนัง เพื่อที่จะสามารถพัฒนาเป็นสารต้านอนุมูลอิสระและสารต้านการ อักเสบที่สามารถป้องกันผิวหนังจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีได้

สรุปผลการวิจัย

1. ผลของระดับการคงอยู่ของเซลล์

ตอนที่ 1.1 วัดความเป็นพิษของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่มีต่อเซลล์ โดยวัดระดับการคงอยู่ของเซลล์ ว่ามีความเป็นพิษต่อเซลล์หรือไม่และระดับความเข้มข้นที่เหมาะสมที่ทำให้เซลล์มีความคงอยู่มากที่สุด ซึ่งจะวัดความเข้มข้นทั้งหมด 6 ความเข้มข้น ได้แก่ 0.25, 0.5, 1, 2, 5 และ 10 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ผลการคงอยู่ของเซลล์พบว่า ความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ทำให้มีระดับการคงอยู่ของเซลล์มากกว่า 80% คือ 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรและทำให้มีจำนวนเซลล์ที่มีความคงอยู่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติก สำหรับความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์มากที่สุดคือ น้ำเลี้ยงจาก *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 ได้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 105.666 ± 12.032 สำหรับความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์มากที่สุดคือ *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 ได้ระดับการคงอยู่ของเซลล์อยู่ที่ร้อยละ 93.756 ± 10.283 สำหรับแนวโน้มของความเข้มข้นอื่นๆ พบว่า เมื่อมีความเข้มข้นของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกเพิ่มขึ้น ระดับการคงอยู่ของเซลล์ลดลงจนทำให้จำนวนเซลล์ที่มีความคงอยู่มีแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่สารและในส่วนของ De Man–Rogosa–Sharpe agar (MRS) ที่เป็นอาหารเลี้ยงโพรไบโอติก พบว่าในทุกความเข้มข้น ไม่ทำให้เกิดความแตกต่างของระดับการคงอยู่ของเซลล์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตอนที่ 1.2 หากระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่มากที่สุดที่ฉายแล้วเซลล์มีความคงอยู่มากที่สุด โดยทดลองในรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีทั้งหมด 8 ความเข้มข้น ได้แก่ 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45 และ 50 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร โดยผลของการคงอยู่ของเซลล์จากการถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีในระดับต่างๆ พบว่า ระดับความเข้มข้นของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีมากที่สุดที่ทำให้ระดับการคงอยู่ของเซลล์มากกว่าร้อยละ 60 คือ ระดับความเข้มข้น 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร

ตอนที่ 1.3 หากระดับการคงอยู่ของเซลล์ที่บ่มด้วยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้น 0.25 และ 0.5 มิลลิกรัมต่อตารางเซนติเมตรและฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร พบว่า น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ทำให้ความคงอยู่ของเซลล์มากที่สุดคือ *Lactobacillus salivarius* MSMC105-3 อยู่ที่ร้อยละ $97.777 \pm$

7.779 ส่วนน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ทำให้ความคงอยู่ของเซลล์มากที่สุดคือ *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 อยู่ที่ร้อยละ 94.534 ± 5.357

2. ผลของระดับของสารต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์

ตอนที่ 2.1 ศึกษาการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (inhibition of intracellular ROS production) พบว่า น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้มีระดับของสารอนุมูลอิสระน้อยที่สุด คือ *Lactobacillus reuteri* TF314 มีค่าเท่ากับ 0.950 ± 0.019 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้มีระดับของสารอนุมูลอิสระน้อยที่สุด คือ *Bifidobacterium animalis* MSMC83 ซึ่งมีค่าเท่ากับ 0.958 ± 0.014 เท่าของกลุ่มควบคุม ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

ตอนที่ 2.2 ศึกษาการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (activation of the endogenous antioxidant system) โดยการวัดระดับของ superoxide dismutase (SOD) หลังถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร พบว่า น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรที่ทำให้มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) มากที่สุดคือ *Lactobacillus reuteri* TF314 อยู่ที่ 0.248 ± 0.019 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่มีความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้มีระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) มากที่สุดคือ *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 ซึ่งมีปริมาณอยู่ที่ 0.288 ± 0.046 ยูนิตต่อมิลลิลิตร ซึ่งแตกต่างกับกลุ่มที่ไม่ใส่น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในส่วนของ MRS พบว่าไม่มีผลต่อระดับของเอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) เนื่องจากไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3. ผลของระดับการต้านการอักเสบภายในเซลล์

การวัดระดับการอักเสบภายในเซลล์จะวัดผ่าน pro-inflammatory cytokine ซึ่งวัดผ่าน TNF- α ด้วยวิธี ELISA โดยผลของระดับการอักเสบภายในเซลล์หลังถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี 20 มิลลิจูลต่อตารางเซนติเมตร พบว่า น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้เกิดระดับ TNF- α น้อยที่สุด คือ *Bifidobacterium animalis* MSMC83 ซึ่งอยู่ที่ 9.386 ± 1.317 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และในส่วนของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ความเข้มข้น 0.5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ที่ทำให้เกิด

ระดับ TNF- α น้อยที่สุด คือ *Bifidobacterium animalis* MSMC 83 ซึ่งอยู่ที่ 7.975 ± 1.533 พิโคกรัมต่อมิลลิลิตร ซึ่งมีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

การอภิปรายผลการวิจัย

ในการศึกษานี้เป็นการศึกษาผลการต้านอนุมูลอิสระและการต้านอักเสบของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยต่อเซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ซึ่งรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีก่อให้เกิดสารอนุมูลอิสระและการอักเสบจนทำให้เกิดภาวะเครียดออกซิเดชัน (Oxidative stress) นอกจากนี้ยังทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงทางโครงสร้างของดีเอ็นเอในนิวเคลียสของเซลล์ผิวหนัง ซึ่งจะทำให้เกิดเป็นมะเร็งผิวหนังได้ในที่สุด⁽⁷⁴⁾ ผู้ทำวิจัยจึงศึกษาผลการต้านอนุมูลอิสระและการต้านอักเสบของน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกต่อเซลล์ผิวหนัง เช่นเดียวกับการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ แต่แตกต่างกันที่สายพันธุ์โพรไบโอติกและชนิดของตัวแปรที่ใช้ในการวัดผลการต้านอนุมูลอิสระและการอักเสบ โดยน้ำเลี้ยงโพรไบโอติกที่ใช้ในการศึกษาเป็นโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bifidobacterium animalis* MSMC 83, *Lactobacillus reuteri* TF314, *Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1 และ *Lactobacillus salivarius* MSMC 105-3 ในส่วนของการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ จะเป็นสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* IDCC3302

ผลของงานวิจัยนี้สอดคล้องกับการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่าโพรไบโอติกพันธุ์ไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถเพิ่มระดับการคงอยู่ของเซลล์ หลังจากที่เซลล์ผิวหนัง ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี ซึ่งสอดคล้องกับ ผลการคงอยู่ของเซลล์กับโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* IDCC3302 ในการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾

ตัวแปรที่ใช้ในการวัดการต้านอนุมูลอิสระวัดจาก 2 กลไก คือ จากการยับยั้งการสร้างของสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (inhibition of intracellular ROS production) และจากการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (activation of the endogenous antioxidant system) โดยการวัดระดับของ superoxide dismutase (SOD) ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ ของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ ที่วัดผลการต้านอนุมูลอิสระจากเพียงกลไกเดียว คือ วัดจากการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์ (activation of the endogenous antioxidant system) โดยการวัดระดับของ superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT)

ผลของระดับการต้านอนุมูลอิสระพบว่าสอดคล้องกับการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ พบว่าในการศึกษานี้ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถช่วยลดการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ และเพิ่มการทำงานของ เอนไซม์ superoxide dismutase (SOD) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ซึ่งสอดคล้องกับการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ คือ โพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* IDCC3302 ก็สามารถช่วย เพิ่มการสร้างเอนไซม์ที่มีหน้าที่เป็นสารต้านอนุมูลอิสระ ซึ่งคือ superoxide dismutase (SOD) และ catalase (CAT) ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเช่นเดียวกัน

เช่นเดียวกับการศึกษาของ Vitheejongjaroen และคณะ⁽¹²⁾ ที่ได้ทำการศึกษาเกี่ยวกับคุณสมบัติในการทำโยเกิร์ตจาก *Bifidobacterium animalis* MSMC 83 พบว่า *Bifidobacterium animalis* MSMC 83 มีผลการต้านอนุมูลอิสระที่สามารถลดสารอนุมูลอิสระใน Caco-2 cell ได้เหมือนกับที่สามารถลดสารอนุมูลอิสระในเซลล์ผิวหนังในวิจัยนี้

ตัวแปรที่ใช้ในการวัดระดับการอักเสบภายในเซลล์ ในการศึกษานี้ วัดจากระดับของ pro-inflammatory cytokine คือ TNF- α ด้วยวิธี ELISA ซึ่งแตกต่างกับการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ ที่วัดจากการสกัด RNA ของเซลล์ผิวหนังแล้ววัดระดับของ involucrin, filaggrin, TGF- β , interleukin-1 β และ TNF- α

ผลของระดับการต้านการอักเสบ พบว่าในการศึกษานี้ น้ำเลี้ยงโพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถช่วยลดระดับของ TNF- α ซึ่งเป็นตัวแปรในการวัดระดับของการอักเสบได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ⁽¹¹⁾ ที่ระดับของ involucrin, filaggrin, TGF- β , interleukin-1 β และ TNF- α ในเซลล์ผิวหนังในกลุ่มที่ บ่มด้วยเลี้ยงโพรไบโอติกสายพันธุ์ *Lactobacillus acidophilus* IDCC3302 น้อยกว่ากลุ่มควบคุม อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

สอดคล้องกับการศึกษาของ Sathikulpakdee และคณะ⁽⁶⁷⁾ ที่ศึกษาการลดการอักเสบจากไลซันที่มีส่วนผสมของ *Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1 โดยใช้ในการรักษาผิวหนังระดับถึงระยะปานกลางเปรียบเทียบกับ 2.5% Benzoyl peroxide พบว่า ไลซันที่มีส่วนผสมของ *Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1 สามารถช่วยลดผิวอักเสบได้ไม่ต่างกับการรักษาด้วย 2.5% Benzoyl peroxide อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาของ Banjongjit และคณะ⁽¹⁴⁾ ได้ศึกษาผลการต้านการอักเสบของน้ำเหลืองเหงือก (Gingival crevicular fluid) ของคนไข้หลังถอนฟันกราม โดยใช้ตัวชี้วัดเป็นระดับของ TNF- α ซึ่งเป็นการเปรียบเทียบกัน 2 กลุ่ม คือ 1. กลุ่มที่รักษาแผลด้วยโพรไบโอติก (*Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1) และ 2. กลุ่มที่

รักษาแผลด้วย 0.9%Normal saline ผลพบว่า ในกลุ่มที่รักษาแผลด้วยโพรไบโอติกจะสามารถลดระดับของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่รักษาด้วย 0.9%Normal saline

เนื่องจากการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ เป็นการศึกษาคุณสมบัติการต้านสารอนุมูลอิสระและการต้านการอักเสบของโพรไบโอติกในเซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี เช่นเดียวกันกับในส่วนของงานวิจัยนี้ จึงขอสรุปผลการอภิปรายดังตาราง 20

ตาราง 20 แสดงผลการเปรียบเทียบผลของการศึกษาของ A-RANG IM และคณะ และผลของงานวิจัยนี้

	การศึกษาของ A-RANG IM และคณะ ⁽¹¹⁾	การศึกษาในงานวิจัยนี้
โพรไบโอติก	Lactobacillus acidophilus IDCC3302	- Bifidobacterium animalis MSMC83 - Lactobacillus reuteri TF314 - Lactobacillus paracasei MSMC39-1 - Lactobacillus salivarius MSMC105-3
รูปแบบของโพรไบโอติก	Tyndallized	น้ำเลี้ยงของโพรไบโอติก (supernatant)
เซลล์ผิวหนังที่ใช้ในงานวิจัย	HaCat keratinocyte cell line	HaCat keratinocyte cell line
พลังงานของรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีที่ใช้ในงานวิจัย	20 มิลลิจูลต่อตาราง เซนติเมตร	20 มิลลิจูลต่อตาราง เซนติเมตร

ตาราง 20 (ต่อ)

	การศึกษาของ A-RANG IM และคณะ ⁽¹¹⁾	การศึกษาในงานวิจัยนี้
ผลของความคงอยู่ของเซลล์	เซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของกลุ่มที่บ่มด้วยโพไบโอติก มีความคงอยู่ของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยโพไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	เซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของกลุ่มที่บ่มด้วยโพไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ มีความคงอยู่ของเซลล์มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยโพไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ
ผลของการต้านอนุมูลอิสระ	เซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของกลุ่มที่บ่มด้วยโพไบโอติก มีระดับการทำงานของเอนไซม์ SOD และ CAT มากกว่ากลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยโพไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	เซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของกลุ่มที่บ่มด้วยโพไบโอติกทั้ง 4 สายพันธุ์ สามารถช่วยลดสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติและช่วยเพิ่มการทำงานของเอนไซม์ SOD ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยโพไบโอติก

ตาราง 20 (ต่อ)

	การศึกษาของ A-RANG IM และคณะ ⁽¹¹⁾	การศึกษาในงานวิจัยนี้
ผลของการต้านการอักเสบ	เซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของกลุ่มที่บ่มด้วยโพรไบโอติก สามารถลดระดับของ MMP-1, MMP-2 และ MMP-9 รวมถึงสามารถลดระดับของสารสื่อการอักเสบ ได้แก่ IL-1 β , IL-8 และ TNF- α เมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยโพรไบโอติกอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ	เซลล์ผิวหนังที่ฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีของกลุ่มที่บ่มด้วยโพรไบโอติก สามารถลดระดับของ TNF- α ได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้บ่มด้วยโพรไบโอติก

สรุป

โพรไบโอติกสายพันธุ์ไทยทั้งหมด 4 สายพันธุ์ ได้แก่ *Bifidobacterium animalis* MSMC 83, *Lactobacillus reuteri* TF314, *Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1 และ *Lactobacillus salivarius* MSMC 105-3 สามารถต้านอนุมูลอิสระผ่านการยับยั้งการสร้างสารอนุมูลอิสระภายในเซลล์และการกระตุ้นการทำงานของระบบการต้านอนุมูลอิสระภายในเซลล์และลดสารสื่อการอักเสบซึ่งคือ TNF- α ในเซลล์ผิวหนังหลังจากที่ถูกฉายด้วยรังสีอัลตราไวโอเล็ตบี โดยผลที่ได้จากการวิจัยในครั้งนี้ สามารถนำไปประยุกต์เป็นเวชสำอางกันแดดหรือเพื่อลดการอักเสบของผิวหนังที่เกิดจากรังสีอัลตราไวโอเล็ตบีได้ในอนาคต

บรรณานุกรม

1. Addor FASa. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol*. 2017 May-Jun; 92(3): 356-62.
2. Bito T, Nishigori C. Impact of reactive oxygen species on keratinocyte signaling pathways. *Journal of Dermatological Science*. 2012 2012/10/01/; 68(1): 3-8.
3. Jansen R, Wang SQ, Burnett M, et al. Photoprotection: part I. Photoprotection by naturally occurring, physical, and systemic agents. *J Am Acad Dermatol*. 2013 Dec; 69(6): 853.e1-12; quiz 65-6.
4. Geisler AN, Austin E, Nguyen J, et al. Visible light. Part II: Photoprotection against visible and ultraviolet light. *J Am Acad Dermatol*. 2021 May; 84(5): 1233-44.
5. Nimse SB, Pal D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. *RSC Advances*. 2015; 5(35): 27986-8006.
6. Matsui MS, Hsia A, Miller JD, et al. Non-Sunscreen Photoprotection: Antioxidants Add Value to a Sunscreen. *Journal of Investigative Dermatology Symposium Proceedings*. 2009 2009/08/01/; 14(1): 56-9.
7. Rutkowski M, Grzegorzczak K. Adverse effects of antioxidative vitamins. *Int J Occup Med Environ Health*. 2012 Jun; 25(2): 105-21.
8. Zeng L, Yu G, Wu Y, et al. The Effectiveness and Safety of Probiotic Supplements for Psoriasis: A Systematic Review and Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials and Preclinical Trials. *J Immunol Res*. 2021; 2021: 7552546.
9. Guéniche A, Philippe D, Bastien P, et al. Probiotics for photoprotection. *Dermatoendocrinol*. 2009; 1(5): 275-9.
10. Kim H, Kim J-S, Kim Y, et al. Antioxidant and Probiotic Properties of Lactobacilli and Bifidobacteria of Human Origins. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*. 2020 2020/06/01; 25(3): 421-30.
11. Im AR, Lee B, Kang DJ, et al. Protective effects of tyndallized *Lactobacillus acidophilus* IDCC 3302 against UVB-induced photodamage to epidermal keratinocytes cells. *Int J Mol Med*. 2019 Jun; 43(6): 2499-506.

12. Vitheejongjaroen P, Kanthawang P, Loison F, et al. Antioxidant activity of *Bifidobacterium animalis* MSMC83 and its application in set-style probiotic yoghurt. *Food Bioscience*. 2021 2021/10/01; 43: 101259.
13. Ladda B, Theparee T, Chimchang J, et al. In vitro modulation of tumor necrosis factor α production in THP-1 cells by lactic acid bacteria isolated from healthy human infants. *Anaerobe*. 2015 Jun; 33: 109-16.
14. Banjonjit S, Taweechoitipatr M, Rungsiyanont S. Effect of probiotic *Lactobacillus paracasei* on tumor necrosis factor-alpha level in gingival crevicular fluid of patients undergoing impacted third molar removal. *Journal of Oral Science*. 2022; advpub.
15. Sklar LR, Almutawa F, Lim HW, et al. Effects of ultraviolet radiation, visible light, and infrared radiation on erythema and pigmentation: a review. *Photochem Photobiol Sci*. 2013 Jan; 12(1): 54-64.
16. D'Orazio J, Jarrett S, Amaro-Ortiz A, et al. UV radiation and the skin. *Int J Mol Sci*. 2013 Jun 7; 14(6): 12222-48.
17. Chatterjee S. Chapter Two - Oxidative Stress, Inflammation, and Disease. In: Dziubla T, Butterfield DA, editors. *Oxidative Stress and Biomaterials*: Academic Press; 2016. p. 35-58.
18. Lobo V, Patil A, Phatak A, et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacogn Rev*. 2010; 4(8): 118-26.
19. Muthusamy V, Piva TJ. The UV response of the skin: a review of the MAPK, NFkappaB and TNFalpha signal transduction pathways. *Arch Dermatol Res*. 2010 Jan; 302(1): 5-17.
20. Santoro FA, Lim HW. Update on photodermatoses. *Semin Cutan Med Surg*. 2011 Dec; 30(4): 229-38.
21. Gao S, Guo K, Chen Y, et al. Keratinocyte Growth Factor 2 Ameliorates UVB-Induced Skin Damage via Activating the AhR/Nrf2 Signaling Pathway. *Frontiers in Pharmacology*. 2021 2021-June-07; 12.
22. Jaisin Y, Ratanachamnong P, Wongsawatkul O, et al. Antioxidant and anti-

inflammatory effects of piperine on UV-B-irradiated human HaCaT keratinocyte cells. *Life Sci.* 2020 Dec 15; 263: 118607.

23. Kunchana K, Jarisarapurin W, Chularojmontri L, et al. Potential Use of Amla (*Phyllanthus emblica* L.) Fruit Extract to Protect Skin Keratinocytes from Inflammation and Apoptosis after UVB Irradiation. *Antioxidants (Basel)*. 2021 Apr 29; 10(5).

24. Kim KM, Im AR, Park SK, et al. Protective Effects of Timosaponin AIII against UVB-Radiation Induced Inflammation and DNA Injury in Human Epidermal Keratinocytes. *Biol Pharm Bull.* 2019 Sep 1; 42(9): 1524-31.

25. Cimino F, Ambra R, Canali R, et al. Effect of Cyanidin-3-O-glucoside on UVB-Induced Response in Human Keratinocytes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 2006 2006/05/01; 54(11): 4041-7.

26. Ishida T, Sakaguchi I. Protection of human keratinocytes from UVB-induced inflammation using root extract of *Lithospermum erythrorhizon*. *Biol Pharm Bull.* 2007 May; 30(5): 928-34.

27. Sesto A, Navarro M, Burslem F, et al. Analysis of the ultraviolet B response in primary human keratinocytes using oligonucleotide microarrays. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2002 2002/03/05; 99(5): 2965-70.

28. Kunter I, Zabib N, Kosar M. A review of oxidants and antioxidants in biological systems. 2020 03/05; 3: 64-72.

29. Di Meo S, Reed TT, Venditti P, et al. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. *Oxid Med Cell Longev.* 2016; 2016: 1245049.

30. Addor FAS. Antioxidants in dermatology. *An Bras Dermatol.* 2017 May-Jun; 92(3): 356-62.

31. Aziz M, Diab K, Mohammed A. Antioxidant Categories and Mode of Action. 2019.

32. Aguilar T, Navarro B, Mendoza Perez JA. Endogenous Antioxidants: A Review of their Role in Oxidative Stress. 2016.

33. Teng Y, Huang Y, Danfeng X, et al. The Role of Probiotics in Skin Photoaging and Related Mechanisms: A Review. *Clin Cosmet Investig Dermatol.* 2022; 15: 2455-64.

34. Ryšavá A, Vostálová J, Rajnochová Svobodová A. Effect of ultraviolet radiation on

the Nrf2 signaling pathway in skin cells. *Int J Radiat Biol.* 2021; 97(10): 1383-403.

35. Anna B, Blazej Z, Jacqueline G, et al. Mechanism of UV-related carcinogenesis and its contribution to nevi/melanoma. *Expert Rev Dermatol.* 2007; 2(4): 451-69.

36. Mancebo SE, Wang SQ. Skin cancer: role of ultraviolet radiation in carcinogenesis. *Rev Environ Health.* 2014; 29(3): 265-73.

37. Geoffrey K, Mwangi AN, Maru SM. Sunscreen products: Rationale for use, formulation development and regulatory considerations. *Saudi Pharm J.* 2019 Nov; 27(7): 1009-18.

38. Manal Azat A, Abdulkareem Shehab D, Abeer Abdulrazak M. Antioxidant Categories and Mode of Action. In: Emad S, editor. *Antioxidants*. Rijeka: IntechOpen; 2019. p. Ch. 1.

39. Yoshida E, Watanabe T, Takata J, et al. Topical Application of a Novel, Hydrophilic γ -Tocopherol Derivative Reduces Photo-Inflammation in Mice Skin. *Journal of Investigative Dermatology.* 2006 2006/07/01; 126(7): 1633-40.

40. Keen MA, Hassan I. Vitamin E in dermatology. *Indian Dermatol Online J.* 2016 Jul-Aug; 7(4): 311-5.

41. Fitzpatrick RE, Rostan EF. Double-blind, half-face study comparing topical vitamin C and vehicle for rejuvenation of photodamage. *Dermatol Surg.* 2002 Mar; 28(3): 231-6.

42. Al-Niaimi F, Chiang NYZ. Topical Vitamin C and the Skin: Mechanisms of Action and Clinical Applications. *J Clin Aesthet Dermatol.* 2017; 10(7): 14-7.

43. Sorg O, Saurat JH. Topical retinoids in skin ageing: a focused update with reference to sun-induced epidermal vitamin A deficiency. *Dermatology.* 2014; 228(4): 314-25.

44. Sorg O, Tran C, Carraux P, et al. Spectral properties of topical retinoids prevent DNA damage and apoptosis after acute UV-B exposure in hairless mice. *Photochem Photobiol.* 2005 Jul-Aug; 81(4): 830-6.

45. Casagrande R, Georgetti SR, Verri WA, Jr., et al. Protective effect of topical formulations containing quercetin against UVB-induced oxidative stress in hairless mice. *J Photochem Photobiol B.* 2006 Jul 3; 84(1): 21-7.

46. Dilokthornsakul W, Dhippayom T, Dilokthornsakul P. The protective effect of lycopene-rich products on skin photodamage: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Thai Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2018 01/01; 42: 176-82.
47. Gasbarrini G, Bonvicini F, Gramenzi A. Probiotics History. *J Clin Gastroenterol*. 2016 Nov/Dec; 50 Suppl 2, Proceedings from the 8th Probiotics, Prebiotics & New Foods for Microbiota and Human Health meeting held in Rome, Italy on September 13-15, 2015: S116-s9.
48. Ranjha MMAN, Shafique B, Batool M, et al. Nutritional and Health Potential of Probiotics: A Review. *Applied Sciences*. 2021; 11(23): 11204.
49. Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, et al. Health benefits of probiotics: a review. *ISRN Nutr*. 2013; 2013: 481651-.
50. Bermudez-Brito M, Plaza-Díaz J, Muñoz-Quezada S, et al. Probiotic Mechanisms of Action. *Annals of Nutrition and Metabolism*. 2012; 61(2): 160-74.
51. Wang Y, Wu Y, Wang Y, et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. *Nutrients*. 2017 May 19; 9(5).
52. Sankarapandian V, Venmathi Maran BA, Rajendran RL, et al. An Update on the Effectiveness of Probiotics in the Prevention and Treatment of Cancer. *Life (Basel)*. 2022; 12(1): 59.
53. Ahola AJ, Yli-Knuuttila H, Suomalainen T, et al. Short-term consumption of probiotic-containing cheese and its effect on dental caries risk factors. *Arch Oral Biol*. 2002 Nov; 47(11): 799-804.
54. Kovachev SM, Vatcheva-Dobrevska RS. Local Probiotic Therapy for Vaginal *Candida albicans* Infections. *Probiotics Antimicrob Proteins*. 2015 Mar; 7(1): 38-44.
55. Farahmandi K, Sulaimany S, Kalhor K. Twenty years review of probiotic meta-analyses articles: Effects on disease prevention and treatment. *medRxiv*. 2021: 2021.08.23.21262411.
56. Sales-Campos H, Soares SC, Oliveira CJF. An introduction of the role of probiotics in human infections and autoimmune diseases. *Crit Rev Microbiol*. 2019 Aug; 45(4): 413-

- 32.
57. de Andrade PDSMA, Maria E Silva J, Carregaro V, et al. Efficacy of Probiotics in Children and Adolescents With Atopic Dermatitis: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled Study. *Front Nutr.* 2022; 8: 833666-.
58. Kullisaar T, Zilmer M, Mikelsaar M, et al. Two antioxidative lactobacilli strains as promising probiotics. *Int J Food Microbiol.* 2002 Feb 5; 72(3): 215-24.
59. Lin MY, Chang FJ. Antioxidative effect of intestinal bacteria *Bifidobacterium longum* ATCC 15708 and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. *Dig Dis Sci.* 2000 Aug; 45(8): 1617-22.
60. Chooruk A, Piwat S, Teanpaisan R. Antioxidant activity of various oral *Lactobacillus* strains. *J Appl Microbiol.* 2017 Jul; 123(1): 271-9.
61. Mu G, Gao Y, Tuo Y, et al. Assessing and comparing antioxidant activities of lactobacilli strains by using different chemical and cellular antioxidant methods. *J Dairy Sci.* 2018 Dec; 101(12): 10792-806.
62. Liu CF, Pan T-M. In Vitro Effects of Lactic Acid Bacteria on Cancer Cell Viability and Antioxidant Activity. *Journal of Food and Drug Analysis.* 2010 04/01; 18: 77-86.
63. Deng Y, Fang Z, Cui S, et al. Evaluation of probiotics for inhibiting hyperproliferation and inflammation relevant to psoriasis in vitro. *Journal of Functional Foods.* 2021 2021/06/01; 81: 104433.
64. Lim HY, Jeong D, Park SH, et al. Antiwrinkle and Antimelanogenesis Effects of Tyndallized *Lactobacillus acidophilus* KCCM12625P. *Int J Mol Sci.* 2020 Feb 27; 21(5).
65. Shin D, Lee Y, Huang Y-H, et al. Probiotic fermentation augments the skin anti-photoaging properties of *Agastache rugosa* through up-regulating antioxidant components in UV-B-irradiated HaCaT keratinocytes. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 2018 2018/06/26; 18(1): 196.
66. Boonyarut L, Piyatida T, Poolpol P, et al. Anti-inflammatory effect of probiotic *Lactobacillus paracasei* MSMC39-1 on alcohol-induced hepatitis in rats. *Journal of Applied Pharmaceutical Science.* 2021 04/05; 11.
67. Sathikulpakdee S, Kanokrungeee S, Vitheejongjaroen P, et al. Efficacy of probiotic-

derived lotion from *Lactobacillus paracasei* MSMC 39-1 in mild to moderate acne vulgaris, randomized controlled trial. *J Cosmet Dermatol*. 2022 Oct; 21(10): 5092-7.

68. Strober W. Trypan blue exclusion test of cell viability. *Curr Protoc Immunol*. 2001 May; Appendix 3: Appendix 3B.

69. Riss TL, Moravec RA, Niles AL, et al. Cell Viability Assays. In: Markossian S, Grossman A, Brimacombe K, et al., editors. *Assay Guidance Manual*. Bethesda (MD): Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences; 2004.

70. Shokrzade M, Kordi M. An overview of the most common methods for assessing cell viability. *Journal of Research in Medical and Dental Science*. 2017 04/01; 5: 33.

71. Nwachukwu ID, Sarteshnizi RA, Udenigwe CC, et al. A Concise Review of Current In Vitro Chemical and Cell-Based Antioxidant Assay Methods. *Molecules*. 2021 Aug 11; 26(16).

72. Ghosh R, Gilda JE, Gomes AV. The necessity of and strategies for improving confidence in the accuracy of western blots. *Expert Rev Proteomics*. 2014 Oct; 11(5): 549-60.

73. Sakamoto S, Putalun W, Vimolmangkang S, et al. Enzyme-linked immunosorbent assay for the quantitative/qualitative analysis of plant secondary metabolites. *Journal of Natural Medicines*. 2018 2018/01/01; 72(1): 32-42.

74. Chen J, Liu Y, Zhao Z, et al. Oxidative stress in the skin: Impact and related protection. *Int J Cosmet Sci*. 2021 Oct; 43(5): 495-509.

ประวัติผู้เขียน

