

การศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงปกติ

พราว ศุภจริยาวัตร¹ ศราวุธ ระดาพงษ์¹ ตัญญาณี สาหิต¹ ณัฐภัทร หาญกิจ¹ กัญชริญา ภารเชอร์¹ ปฎิภาณ พรหมพราย¹
พิเชฐ บัญญัติ¹ ศิริวรรณ ชัยสมบุญพันธ์¹ ณัฐพงษ์ วิชัย² และพรชัย สันเจริญโกไคย¹

¹กรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ ถนนติวานนท์ อำเภอเมือง จังหวัดนนทบุรี 11000

²มหาวิทยาลัยมหาสารคาม อำเภอกันทรวิชัย จังหวัดมหาสารคาม 44150

บทคัดย่อ กัญชา (*Cannabis sativa* L.) เป็นพืชที่ได้รับความสนใจเป็นอย่างมากทั้งในทางการแพทย์และทางเศรษฐกิจ เนื่องจากมีการกล่าวถึงสรรพคุณในการรักษาโรค และสามารถผลักดันเป็นพืชเศรษฐกิจของประเทศไทยได้ ในปัจจุบันมีการใช้ประโยชน์ของกัญชาในทางการแพทย์โดยที่ไม่ทราบข้อมูลเกี่ยวกับประสิทธิภาพและผลข้างเคียงทั้งระยะสั้นและระยะยาว รวมถึงข้อมูลด้านพิษวิทยาและความปลอดภัยมีอยู่น้อย การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาพิษของสารสกัดช่อดอกกัญชาพันธุ์ไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC:CBD=2:1), PTC0602 (THC:CBD=10:1) และ PTC0729 (THC:CBD=1:6) ที่สกัดด้วยวิธีของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) วิเคราะห์ปริมาณด้วยวิธี HPLC ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver) และเซลล์ไต (HEK-293) โดยใช้วิธี MTT assay และเซลล์เอ็มบริโอหนู (BALB/c 3T3) โดยใช้วิธี Neutral red uptake assay เพื่อกำหนดขนาดและนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลัน ผลการทดลองพบว่าสารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC_{50}) ต่อเซลล์ไต (HEK-293) ต่ำที่สุด (มีความเป็นพิษสูงที่สุด) รองลงมาเซลล์ตับ และเซลล์ปอด ส่วนในเซลล์เอ็มบริโอหนู พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 สูงที่สุด รองลงมาคือ PTC0601 และ PTC0729 ขนาดและนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม งานวิจัยนี้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้นในการเตือนภัยผู้ป่วยที่ใช้ช่อดอกของกัญชาในการรักษาทางการแพทย์ ดังนั้นควรมีการศึกษาในเรื่องความปลอดภัยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ หรือในสัตว์ทดลอง และการนำกัญชาไปใช้เพิ่มเติมต่อไป

คำสำคัญ: สารสกัดกัญชา, พิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง, กัญชาพันธุ์ไทย, วิธี MTT, วิธี Neutral red uptake

Corresponding author E-mail: praw.s@dmsc.mail.go.th

Received: 15 July 2021

Revised: 23 August 2021

Accepted: 27 August 2021

บทนำ

กัญชา เป็นพืชเสพติดผิดกฎหมายในหลายประเทศและใช้ประโยชน์ในด้านสันตินาการเป็นหลัก แต่ในประเทศไทย ตามประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ลงราชกิจจานุเบกษา มีผลบังคับใช้ตั้งแต่ 15 ธันวาคม 2563 ประชาชนสามารถใช้ประโยชน์จากส่วนของกัญชา กัญชงที่ไม่จัดเป็นยาเสพติด ได้แก่ เมล็ดกัญชง น้ำมันและสารสกัดจากเมล็ดกัญชง ใบที่ไม่ติดกับช่อดอก กิ่ง ก้าน ลำต้น เปลือก ราก รวมถึงสารสกัด CBD และกากที่เหลือจากการสกัดซึ่งต้องมีปริมาณ THC ไม่เกิน 0.2%⁽¹⁾ จากประกาศดังกล่าวเปรียบเสมือนเป็นการปลดล็อกพืชกัญชาบางส่วนออกจากบัญชียาเสพติดให้โทษ ทำให้เป็นที่สนใจของประชาชน ผู้ประกอบการ ส่งผลให้เกิดเป็น “ตลาดกัญชา” จากข้อมูลรายงานพบว่า ตลาดกัญชาที่ถูกกฎหมายมีมูลค่ากว่า 1.75 หมื่นล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือ 5 แสนล้านบาท และเติบโตมากกว่า 17% โดยกัญชาในอุตสาหกรรมทางการแพทย์และสุขภาพสร้างรายได้สูงกว่า 70% ของมูลค่าทั้งหมด ขณะที่รายงานของ The Global Cannabis Report โดย Prohibition Partners คาดการณ์ว่า มูลค่าตลาดกัญชาทั่วโลกในปี 2567 จะมีแนวโน้มเติบโตอย่างต่อเนื่องหรือคิดเป็นมูลค่ากว่า 1.03 แสนล้านดอลลาร์สหรัฐ แบ่งเป็น ตลาดกัญชาเพื่อการแพทย์ 60% และอีก 40% เป็นตลาดกัญชาเพื่อการสันตินาการ สำหรับประเทศไทย คาดการณ์ว่าตลาดกัญชาจะเติบโตเป็น 661 ล้านดอลลาร์สหรัฐ หรือกว่า 2.1 หมื่นล้านบาท ภายในปี 2567 ซึ่งขณะนี้รัฐบาลได้มีนโยบายส่งเสริมและผลักดันให้กัญชาและกัญชงเป็น Product Champion ได้แก่ ยาแผนไทยผลิตภัณฑ์สุขภาพ และการท่องเที่ยวเชิงสุขภาพ ที่สามารถสร้างมูลค่าทางเศรษฐกิจได้⁽²⁾ ในส่วนของผู้ที่สามารถนำส่วนของกัญชาไปใช้ประโยชน์ได้นั้น ไม่ได้มีเพียงผู้ประกอบการเท่านั้นที่สามารถนำไปใช้เป็นวัตถุดิบในการผลิตผลิตภัณฑ์ต่าง ๆ แต่ประชาชนทั่วไปก็สามารถใช้ประโยชน์ได้ เช่น การนำไปประกอบอาหารในครัวเรือน หรือประกอบอาหารและเครื่องดื่มเพื่อขายในร้านอาหาร แต่ต้องเป็นผลผลิตจากผู้ที่ได้รับอนุญาตปลูกที่ถูกต้องตามกฎหมาย สามารถระบุที่มาของส่วนกัญชาได้ การนำกัญชาหรือส่วนของกัญชามาใช้ประโยชน์ จึงต้องมีข้อมูลด้านสรรพคุณและความปลอดภัยมารองรับเพื่อให้ประชาชนใช้พืชชนิดนี้ได้อย่างมั่นใจ

กัญชาเป็นพืชในวงศ์ Cannabaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์คือ *Cannabis sativa* L. Subsp. indica (Lam.)⁽³⁾ มีชื่อเรียกอื่นว่า กัญชาจีน (ทั่วไป), ปาง (เงี้ยว-แม่ฮ่องสอน), ยานอ (กะเหรี่ยง-แม่ฮ่องสอน), คุณเช่า คุณเช่า (จีน), ต้าหมา (จีนกลาง) เป็นต้น ลักษณะทางพฤกษศาสตร์ของต้นกัญชา มีดังนี้ กัญชาเป็นไม้ล้มลุกปีเดียว ลำต้นตั้งตรง สูง 0.9-1.5 เมตร มีขนสีเขียวอมเทาและไม่ค่อยแตกสาขา ใบเดี่ยว รูปฝ่ามือ เรียงสลับ ขอบใบเว้าลึกจนถึงจุดโคนใบเป็น 5-7 แฉก แต่ละแฉกรูปยาวรี กว้าง 0.3-1.5 เซนติเมตร ยาว 6-10 เซนติเมตร โคนและปลายสอบ (oblanceolate leaf) ขอบจักฟันเลื่อย แผ่นใบด้านบนสีเขียวเข้มกว่าด้านล่าง ดอกแยกเพศต่างต้น ออกเป็นช่อกระจุกตามง่ามใบและปลายกิ่ง ช่อดอกและใบของต้นเพศผู้เรียงตัวกันห่าง ๆ ต่างจากต้นเพศเมียที่เรียงชิดกัน เกสรเพศผู้ 5 อัน ดอกเล็ก ดอกเพศเมียมีกลีบเลี้ยงหุ้ม ไม่มีกลีบดอก รังไข่อยู่เหนือวงกลีบ มี 1 ช่อ มีออวูล (ovule) 1 เม็ด ผลแบบผลแห้งเมล็ดล่อน เล็ก เรียบ สีน้ำตาล ยอดของต้นเพศเมียที่กำลังออกดอกเรียก กะหล่ำกัญชา เมื่อดอกให้แห้งแล้วนิยมนำมาใช้สูบ^(4, 5) ปัจจุบันสารสำคัญในกัญชาถูกพบมากกว่า 545 ชนิด และในจำนวนนี้สารกว่า 100 ชนิด ที่ถูกระบุว่าเป็นไฟโตแคนนาบินอยด์ (phytocannabinoids) ซึ่งเป็นสารกลุ่มหลัก มีโครงสร้างทางเคมีที่คล้ายคลึงกันและเป็นสารออกฤทธิ์ที่พบในกัญชา⁽⁶⁾ สารสำคัญในกัญชาปัจจุบันแบ่งออกเป็นได้ 3 กลุ่มหลัก ๆ คือ สารแคนนาบินอยด์ (Cannabinoids) ซึ่งสารที่มีการกล่าวถึงค่อนข้างมาก คือ Tetrahydrocannabinol (THC) และ Cannabidiol (CBD) สารเทอร์ปีน (Terpenes) เป็นสารประกอบอะโรมาติก (Aromatic) เป็นสารที่ทำให้มีกลิ่นเฉพาะตัว ทำให้เราสามารถแยกพันธุ์กัญชาได้จากกลิ่น ซึ่งกลิ่นเหล่านี้ทำให้กัญชาแต่ละพันธุ์มีความโดดเด่น สารฟลาโวนอยด์ (Flavonoids) ปัจจุบันมีการค้นพบ สารสำคัญในกัญชา ที่เป็นสารในกลุ่มฟลาโวนอยด์ มากถึง 20 ชนิด เช่น Apigenin, Luteolin, Quercetin, Kaempferol, Cann-f lavin A, Cann-f lavin B และ β -sitosterol เป็นต้น⁽⁷⁾ และปัจจุบันสารกลุ่ม terpenes ได้รับความสนใจจากนักวิจัยเป็นอย่างมาก มีการศึกษาถึงสรรพคุณของสารกลุ่มนี้กันอย่างแพร่หลาย การออกฤทธิ์ที่มีผลของสาร

Terpenes ใด ๆ ที่อาจมีการเปลี่ยนแปลงการเข้าร่วมของสารประกอบอื่น ๆ ปรากฏการณ์นี้เรียกว่า อองทูราจ เอฟเฟกต์ (entourage effect) หมายถึงการที่สารทั้งหมดในกัญชาซึ่งไม่ได้มีเพียงแค่ว่าสาร THC และ CBD สามารถส่งเสริมให้กัญชาออกฤทธิ์มีผลช่วยบำบัดรักษาโรคต่าง ๆ ได้อย่างมีประสิทธิภาพมากที่สุด ทั้งนี้จำเป็นต้องมีการศึกษาวิจัยเพิ่มเติมเพื่อทำความเข้าใจถึงผลกระทบของสาร terpenes ในแต่ละครั้งเมื่อใช้ร่วมกับสารอื่น⁽⁸⁾ เนื่องจากกลุ่มสาร terpenes เป็นสื่อกลางในการทำงานร่วมกันระหว่างร่างกายกับสาร cannabinoids ในการรักษา

การทดสอบความเป็นพิษโดยใช้เซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80) เซลล์ตับ (Chang-liver) เซลล์ไต (HEK-293) โดยใช้วิธีการทดสอบ MTT assay เป็นการทดสอบความมีชีวิตของเซลล์ (cell viability) โดยวัดความสามารถของ mitochondrial enzyme ที่เปลี่ยน tetrazolium salt (3-(4, 5-dimethyldiazol-2-yl)-2, 5-diphenyl tetrazolium bromide, MTT) ซึ่งมีสีเหลือง เปลี่ยนไปเป็น formazan product ที่มีสีม่วง จากระดับของสีจะสัมพันธ์กับจำนวนเซลล์ที่มีชีวิตอยู่ และเซลล์เอมบริโอหนูเมาส์ (BALB/c 3T3) ใช้วิธีทดสอบ Neutral red uptake assay เป็นการวัดความมีชีวิตของเซลล์ด้วยการแตกเซลล์ จากสีแดงของ Neutral red ซึ่งซึมผ่านเข้าไปใน lysosome โดย lysosome ของเซลล์มีชีวิตมีสถานะเป็นกรด ทำให้เกิด pH gradient ที่ให้ Neutral red ซึมผ่านเข้าไป และสะสมอยู่ใน lysosome ขณะที่เซลล์ตายจะไม่เกิดกิจกรรมนี้⁽⁹⁾ ซึ่งการศึกษาพิษของสมุนไพรในเซลล์เพาะเลี้ยงนับว่าเป็นการศึกษาเพื่อให้ได้ข้อมูลความปลอดภัยของสมุนไพรเบื้องต้นที่สามารถนำไปใช้คุ้มครองผู้บริโภค และสามารถนำไปวางแผนการวิจัยพิษวิทยาในสัตว์ทดลองเพื่อให้สอดคล้องกับหลัก 3Rs นอกจากนี้วิธีการทดสอบดังที่กล่าวข้างต้น ดำเนินการทดสอบตาม test guideline ที่เป็นมาตรฐาน ซึ่งยกระดับผลงานให้มีความน่าเชื่อถือทางวิชาการ อีกทั้งผลการทดสอบยังเป็นที่ยอมรับทั้งในและต่างประเทศ เป็นการลดการกีดกันทางการค้าได้ด้วย ในปัจจุบันพบว่ารายงานข้อมูลการศึกษาทางพิษวิทยาของกัญชาพันธุ์ไทยยังไม่ชัดเจนและยังไม่สามารถสรุปได้ว่ากัญชามีความปลอดภัยจริงหรือไม่ ประกอบกับข้อมูลการศึกษาพิษวิทยาของกัญชาในปัจจุบันเป็นข้อมูลของกัญชาที่มีพันธุ์เจริญเติบโตในต่างประเทศ ส่วนกัญชาพันธุ์ไทยมีข้อมูลไม่เพียงพอ จึงมีความจำเป็นต้องมีการศึกษาข้อมูลทางพิษวิทยาของพันธุ์กัญชาในประเทศไทยเพื่อสนับสนุนการพัฒนาเป็นยารักษาโรคหรือผลิตภัณฑ์สุขภาพอื่น ๆ ต่อไป

วัสดุและวิธีการ

ขั้นตอนการเตรียมวัตถุดิบ

ตัวอย่างสมุนไพรช่อดอกเพศเมียกัญชาไทย 3 พันธุ์ เก็บจากโรงเรือนปลูกของกรมวิทยาศาสตร์การแพทย์ หนังสือสำคัญผลิตซึ่งยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 ที่ 90/2564 (ปลูก) โดยให้รหัสตัวอย่าง PTC0601 (พันธุ์ที่มี THC:CBD เท่ากับ 2:1) รหัสตัวอย่าง PTC0602 (พันธุ์ที่มี THC:CBD เท่ากับ 10:1) และรหัสตัวอย่าง PTC0729 (พันธุ์ที่มี THC:CBD เท่ากับ 1:6)

ขั้นตอนการสกัดช่อดอกกัญชา

นำตัวอย่างช่อดอกเพศเมีย PTC0601 จำนวน 132 กรัม, PTC0602 126 กรัม และ PTC0729 100 กรัม บดหยาบ ได้ปริมาณสารสกัด 10.92 กรัม, 8.95 กรัม และ 7.07 กรัม คิดเป็น %yield เท่ากับ 8.27, 7.10 และ 7.07% ตามลำดับ สกัดด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) โดยใช้เครื่องสกัดรุ่น Spe-ed SFE ของบริษัท Applied Separations ประเทศสหรัฐอเมริกา โดยใช้แรงดัน 250 bar อุณหภูมิของตู้อบ (oven) 40 องศาเซลเซียส วิเคราะห์ปริมาณ THC และ CBD ในสารสกัด ด้วยวิธี High Performance Liquid Chromatography (HPLC) รุ่น LC-40D ยี่ห้อ Shimadzu Japan โดยนำสารสกัด 20 มิลลิกรัม ปรับปริมาตรด้วย methanol : chloroform 9:1 ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร จากนั้น ปิเปตมา 1 มิลลิลิตร ปรับปริมาตรด้วย methanol ใน volumetric flask ขนาด 10 มิลลิลิตร กรองด้วย nylon syringe filter 0.45 micron

เซลล์เพาะเลี้ยงและอาหารเลี้ยงเซลล์

เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver, Hela derivative) และ เซลล์ไต (HEK-293) ซื้อจาก บริษัท CLS Cell line service GmbH ประเทศเยอรมนี เซลล์ SV-80 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) ส่วนเซลล์ Chang-liver และ HEK-293 เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Eagle's minimal essential medium (EMEM) ที่มี 2mM L-Glutamine, 0.1 mM Non-essential amino acid, 1 mM Sodium pyruvate และ Fetal bovine serum ร้อยละ 10 เซลล์เอ็มบริโอหนูไมซ์ (BALB/c 3T3 clone A31) ซื้อจาก European Collection of Cell Cultures ประเทศ สหราชอาณาจักร เลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิด Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) และร้อยละ 10 New born calf serum บ่มในตู้บ่มเพาะเชื้อแบบใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ อุณหภูมิ 37 ± 1 องศาเซลเซียส ความชื้นร้อยละ 90 ± 10 และความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5.0 ± 1.0

ศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, Chang-liver และ HEK-293 ด้วยวิธี MTT assay

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5,000 เซลล์ต่อหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดกัญชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์เปิดอาหารออกจากงานเพาะเลี้ยง จากนั้นเปิดสารสกัดกัญชาทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในงานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบกำหนดเวลา ล้างด้วย Phosphate Buffered Saline (PBS) จำนวน 1 ครั้ง เติมน้ำ MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร บ่มงานเพาะเลี้ยงในตู้เลี้ยงเซลล์เป็นระยะเวลา 4 ชั่วโมง ปิดเตาสารละลาย MTT ออกให้เหลือเฉพาะผลึก Formazan (ผลึกสีม่วง) เติมน้ำ DMSO (Dimethyl sulfoxide) ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ในแต่ละหลุมเพื่อละลายผลึก Formazan เขย่างานเพาะเลี้ยงแนวระนาบประมาณ 1 นาที วัดค่าดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 570 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) โดยเทียบกับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์เจือจางสารทดสอบ (Vehicle control)

ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ด้วยวิธี Neutral red uptake อ้างอิงวิธีตาม OECD Test Guideline 129⁽¹⁰⁾

เตรียมเซลล์เพาะเลี้ยงในงานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 96 หลุม โดยใช้เซลล์เริ่มต้น 5,000 เซลล์ต่อหลุม ๆ ละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ความเข้มข้นก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 24 ชั่วโมง เตรียมสารสกัดกัญชาที่ความเข้มข้นต่าง ๆ ตั้งแต่ระดับความเข้มข้นต่ำซึ่งไม่มีผลทำลายเซลล์จนถึงระดับความเข้มข้นสูงซึ่งมีผลทำลายเซลล์มากกว่าร้อยละ 90 จำนวน 8 ระดับความเข้มข้น (0.78, 1.56, 3.12, 6.25, 12.50, 25, 50 และ 100 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) เมื่อครบเวลาบ่มเลี้ยงเซลล์เปิดอาหารเลี้ยงเชื้อออกจากงานเพาะเลี้ยง จากนั้นเปิดสารสกัดกัญชาทั้ง 8 ระดับความเข้มข้นที่เตรียมไว้แล้ว ลงในงานเพาะเลี้ยงที่มีเซลล์ โดยเติมหลุมละ 100 ไมโครลิตร บ่มที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ร้อยละ 5 เป็นระยะเวลา 48 ชั่วโมง เมื่อครบเวลาบ่มเปิดเตาสารละลายออกจากทุกหลุม ล้างด้วย $1 \times$ PBS 1 ครั้ง เติมน้ำละลาย Neutral red ปริมาตร 200 ไมโครลิตร แล้วนำไปบ่มต่อเป็นระยะเวลา 3 ชั่วโมง ปิดเตาสารละลาย Neutral red ออกจากทุกหลุมและล้างสีด้วยสารละลาย $1 \times$ PBS ปริมาตร 200 ไมโครลิตร เติมน้ำ Neutral red destain solution ปริมาตร 200 ไมโครลิตร ลงในแต่ละหลุม เขย่า

งานเพาะเลี้ยงแวนระนาบที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นระยะเวลา 20 นาที จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงที่ความยาวคลื่น 540 นาโนเมตร คำนวณร้อยละความมีชีวิตของเซลล์ (% cell viability) กับกลุ่มควบคุมอาหารเลี้ยงเซลล์เจือจางสารทดสอบ (Vehicle control) คำนวณหาค่า LD₅₀ (50% lethal dose) หมายถึง ปริมาณของสารเคมี/ตัวอย่างที่ให้กับสัตว์ทดลองทั้งหมดเพียงครั้งเดียว แล้วทำให้กลุ่มของสัตว์ทดลองร้อยละ 50 (ครึ่งหนึ่ง) ตายลง LD₅₀ พิจารณาปริมาณที่ใช้ในสัตว์ทดลอง จากความสัมพันธ์ IC₅₀-LD₅₀ relationship ด้วยสมการ $\log LD_{50} \text{ (mg/kg)} = 0.372 \log IC_{50} \text{ (}\mu\text{g/mL)} + 2.024$

การวิเคราะห์ข้อมูลทางสถิติ

ข้อมูลการศึกษาความเป็นพิษของสารสกัดช่อดอกเพศเมียกัญชาไทย 3 พันธุ์ ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 4 ชนิด ด้วยวิธี MTT assay และวิธี Neutral red uptake assay โดยทำการทดลอง 3 ซ้ำ (n = 3) ใช้สถิติ One-way ANOVA วิธี Tukey's multiple comparisons test โดยโปรแกรม GraphPad Prism version 9.0.0 ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ผล

ผลการสกัดช่อดอกกัญชา

สารสกัดจากช่อดอกเพศเมียของกัญชาด้วยของไหลวิกฤตยิ่งยวด (Supercritical Fluid Extraction) ของกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้สารสกัดที่มีลักษณะเป็นของกึ่งแข็งกึ่งเหลว (semisolid) สีเหลืองน้ำตาล จากการวิเคราะห์ตัวอย่างปริมาณกลุ่ม cannabinoids ได้ปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ดังนี้

ตารางที่ 1 แสดงสัดส่วนปริมาณ THC และ CBD ในพันธุ์กัญชาไทย

รหัสตัวอย่างสารสกัดกัญชา	THC:CBD	Total THC (%)	Total CBD (%)
PTC0601	2:1	20.08	12.18
PTC0602	10:1	38.03	3.55
PTC0729	1:6	4.28	25.89

การศึกษาความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, Chang-liver และ HEK-293 ด้วยวิธี MTT assay

สารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC₅₀) ต่อเซลล์โต (HEK-293) ต่ำที่สุด (มีความเป็นพิษสูงที่สุด) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์อื่นๆ เท่ากับ 6.72 ± 0.72 , 7.47 ± 0.96 และ 6.63 ± 0.69 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ในเซลล์ตับ (Chang-liver) ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 9.69 ± 1.47 , 9.04 ± 0.80 และ 9.47 ± 0.37 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งค่าสูงกว่าเซลล์โตเล็กน้อย ส่วนในเซลล์ปอด (SV-80) ให้ค่า IC₅₀ เท่ากับ 20.08 ± 0.70 , 12.78 ± 0.61 และ 24.98 ± 3.58 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลองเมื่อคำนวณผลโดยใช้สถิติ one-way ANOVA แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ PTC0601, PTC0602 และ PTC 06729 มีความเป็นพิษต่อเซลล์โต (HEK-293) สูงที่สุด รองลงมาคือเซลล์ตับและเซลล์ปอดตามลำดับ

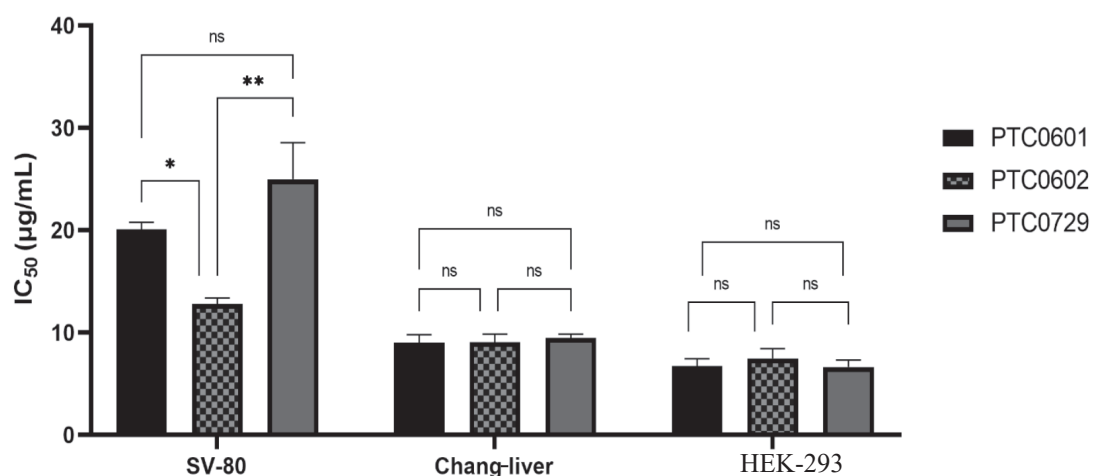
เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test แสดงในภาพที่ 1 สารสกัดกัญชาทั้ง 3 ชนิดมีพิษต่อเซลล์โต (HEK-293) สูงสุด (ให้ค่า IC₅₀ ต่ำสุด) และทั้ง 3 พันธุ์ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) ในเซลล์โตและเซลล์ตับ (Chang-

liver) ส่วนในเซลล์ปอด (SV-80) มีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ระหว่างพันธุ์ PTC0601 และ PTC0602 และระหว่างพันธุ์ PTC0602 และ PTC0729 มีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.005$) ภาพที่ 3A, 3B และ 3C แสดงถึงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง SV-80, Chang-liver และ HEK-293 ตามลำดับ ทำการส่องดูลักษณะของเซลล์และถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า

ตารางที่ 1 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร) ของสารสกัดช่อดอกกัญชา PTC0601 และ PTC0729 และ Doxorubicin ในเซลล์ SV-80, Chang-liver และ HEK-293

ชนิดเซลล์เพาะเลี้ยง	IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร)			
	PTC0601	PTC0602	PTC0729	Doxorubicin
SV-80	20.08 ± 0.70	12.78 ± 0.61	24.98 ± 3.58	0.44 ± 0.08
Chang-liver	9.69 ± 1.47	9.04 ± 0.80	9.47 ± 0.37	0.45 ± 0.01
HEK-293	6.72 ± 0.72	7.47 ± 0.96	6.63 ± 0.69	0.054 ± 0.03

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 1 แสดงผลของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601, PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง 3 ชนิด ค่า IC_{50} แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสารในเซลล์เพาะเลี้ยงแต่ละชนิดโดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test (ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$)

ศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ด้วยวิธี NRU assay ตาม OECD Test Guideline 129

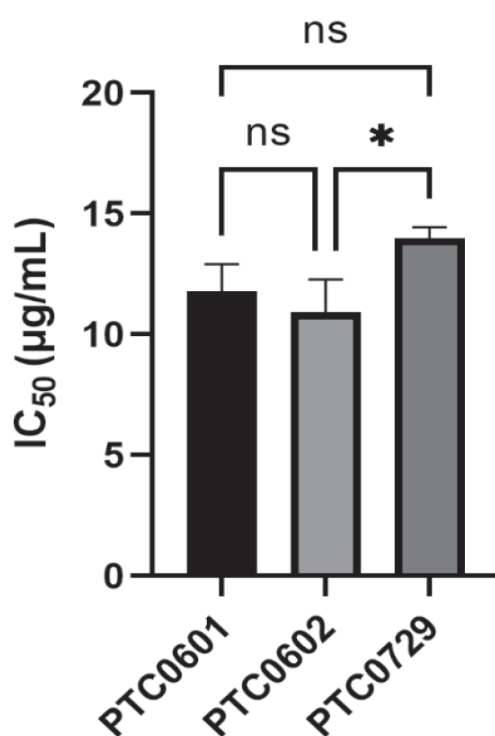
สารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 PTC0602 และ PTC0729 มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC_{50}) ในเซลล์ BALB/c 3T3 เท่ากับ 11.79 ± 1.12 , 10.90 ± 1.38 และ 13.99 ± 0.45 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ตามลำดับ นำค่าที่ได้คำนวณหาค่าประมาณของค่า LD_{50} ได้เท่ากับ 256.68 ± 12.37 , 264.39 ± 9.46 และ 281.96 ± 3.39 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ตามลำดับ ซึ่งจากผลการทดลอง แสดงให้เห็นว่า สารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 สูงที่สุด รองลงมาคือ PTC0601 และ PTC0729 ตามลำดับ และขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม

เมื่อเปรียบเทียบความแตกต่างของค่าความเป็นพิษของสารสกัดทั้ง 3 ชนิด โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test แสดงในภาพที่ 2 สารสกัดกัญชา PTC0601 และ PTC0602 ไม่แตกต่างกัน ($p > 0.05$) รวมถึง PTC0601 และ PTC0729 ก็ไม่แตกต่างกันเช่นเดียวกัน แต่ PTC0602 และ PTC0729 มีความแตกต่างของค่า IC_{50} อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ภาพที่ 3D แสดงถึงลักษณะของเซลล์เพาะเลี้ยง BALB/c 3T3 ทำการส่องดูลักษณะของเซลล์และถ่ายภาพโดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับ (Inverted Microscope) กำลังขยาย 20 เท่า

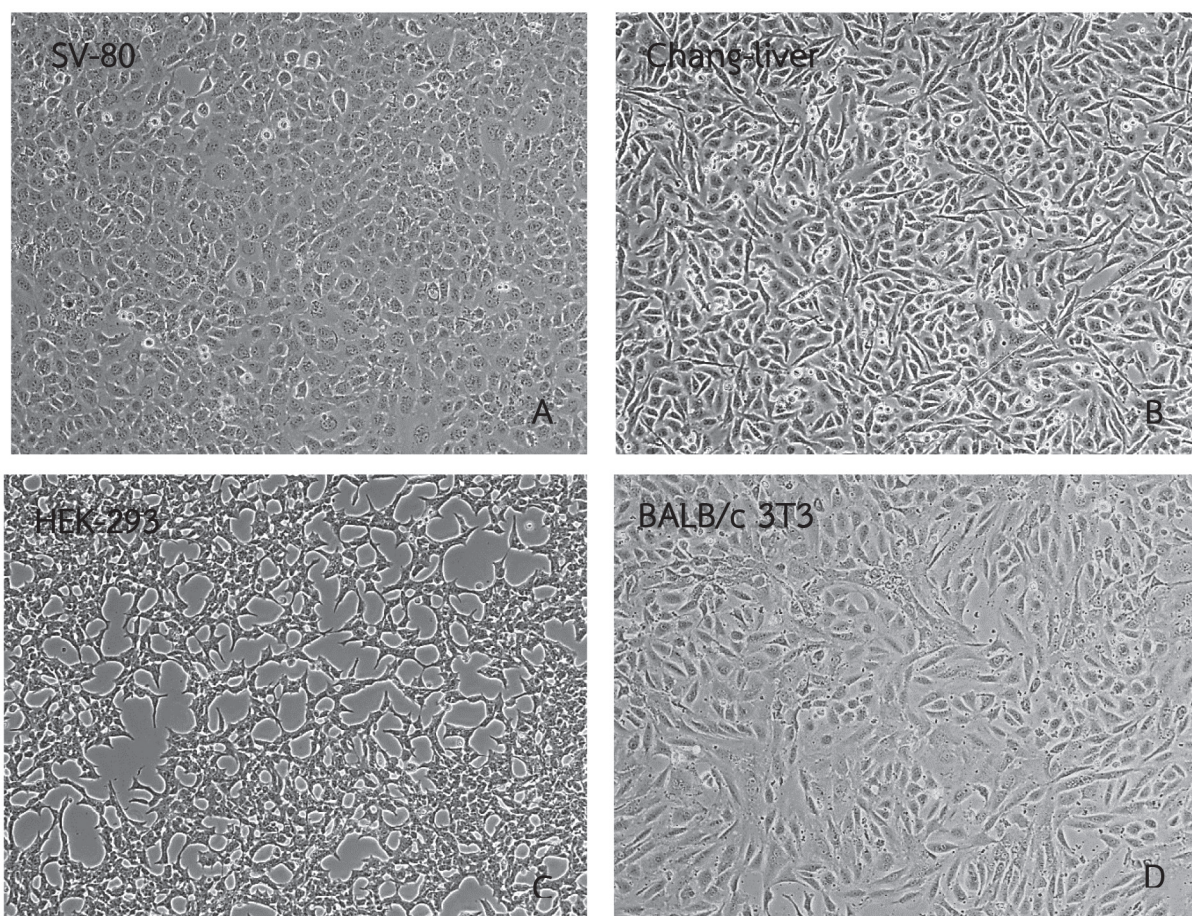
ตารางที่ 2 ค่า IC_{50} (ไมโครกรัม/มิลลิลิตร), LD_{50} (มิลลิกรัม/กิโลกรัม) และขนาดเริ่มต้นทดสอบพิษเฉียบพลันของสารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์

สารทดสอบ	IC_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	LD_{50} (mg/kg)	ขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลัน (mg/kg)
PTC0601	11.79 ± 1.12	256.68 ± 12.37	300
PTC0602	10.90 ± 1.38	264.39 ± 9.46	300
PTC0729	13.99 ± 0.45	281.96 ± 3.39	300
Doxorubicin	0.16 ± 0.04		

ค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน



ภาพที่ 2 ผลของสารสกัดกัญชาพันธุ์ไทย PTC0601, PTC0602 และ PTC0729 ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 ค่า IC_{50} แสดงค่าเฉลี่ย $\pm$ ส่วนเบี่ยงเบนมาตรฐาน ($n=3$) เปรียบเทียบความแตกต่างของค่าเฉลี่ยของสารในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c 3T3 โดยใช้สถิติ One-way ANOVA และ Tukey's multiple comparisons test (ns = not significant, $*p < 0.05$)



ภาพที่ 3 ลักษณะเซลล์ SV-80(A), Chang-liver(B), HEK-293(C), และ BALB/c 3T3(D) ส่องภายใต้ กล้องจุลทรรศน์หัวกลับกำลังขยาย 20 เท่า

วิจารณ์

ปัจจุบันหลายประเทศมีการใช้พืชกัญชาอย่างเสรี สำหรับประเทศไทยมีการปลดล็อกส่วนประกอบพืชกัญชาเพียงบางส่วน ออกจากการเป็นยาเสพติดให้โทษ อย่างไรก็ตามการปลดล็อกดังกล่าวยังต้องมีการขออนุญาตจากสำนักงานคณะกรรมการอาหารและยา และต้องปฏิบัติตามกฎระเบียบของกฎหมายของประเทศในการนำไปใช้ประโยชน์ เมื่อมีการเปิดเสรีกัญชา ทำให้เกิดความต้องการในการใช้กัญชามากยิ่งขึ้น จึงมีความกังวลเรื่องความปลอดภัยหรือผลข้างเคียงในการใช้กัญชา กัญชาเป็นพืชที่มีสารออกฤทธิ์ต่อร่างกายหลายชนิด ที่สำคัญคือสารแคนนาบินอยด์ ซึ่งส่งผลต่อร่างกายมนุษย์ในหลายด้าน โดยมีการนำมาใช้มากขึ้นแต่ยังขาดข้อมูลการศึกษาทางวิชาการที่น่าเชื่อถือ ที่สามารถนำมาใช้เพื่อการศึกษาวิจัยและเพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ได้ จากการใช้กัญชาทางการแพทย์โดยที่ไม่ทราบประสิทธิภาพและผลข้างเคียงทั้งระยะสั้นและระยะยาว งานวิจัยเรื่องความปลอดภัยของกัญชาจึงเป็นงานเร่งด่วนที่ต้องดำเนินการ จากผลการทดลองพบว่า กัญชาไทย 3 พันธุ์ มีความเป็นพิษต่อเซลล์ได้มากที่สุด ซึ่งมีข้อมูลจากหน่วยโรคไต ภาควิชาอายุรศาสตร์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยกล่าวว่า ในร่างกายของมนุษย์ มีตัวรับสารเคมีซึ่งลักษณะโครงสร้างคล้ายสารออกฤทธิ์จากกัญชา เรียกว่า ตัวรับสารแคนนาบินอยด์ ตัวรับสารเหล่านี้พบมากในสมอง เส้นประสาท ทำให้เมื่อได้รับกัญชาเข้าไป มีฤทธิ์เด่นในการกดประสาท แต่ในขณะเดียวกันก็พบในอวัยวะอื่น ๆ รวมถึงไต ดังนั้นการได้รับสารเคมีจากกัญชา อาจส่งผลถึงไตได้ มีการศึกษาผลของสารเคมีจากกัญชาต่อการทำงานของไตพบว่ามีความเกี่ยวข้องกัน ทำให้เกิดการอักเสบและเกิดพังผืดในไต⁽¹¹⁾ โดยยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัด ซึ่งเมื่อสังเกตค่ายับยั้งการเจริญเติบโต ร้อยละ 50 (IC_{50}) ของสารสกัดกัญชาทั้ง 3 พันธุ์ต่อเซลล์ตับ พบว่าค่า IC_{50} ไม่ได้แตกต่างจากเซลล์ไตมากนัก

นั่นคือก่อให้เกิดความเป็นพิษต่อตับได้ มีข้อมูลพบว่าสาร CBD ส่งผลให้ค่าเอนไซม์ตับสูงขึ้น⁽¹²⁾ สำหรับการศึกษาความเป็นพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิด BALB/c ด้วยวิธี NRU assay ตาม OECD Test Guideline 129 พบว่าขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบพิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งงานวิจัยของ Won Hyung Choi และคณะศึกษาพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดไฟโบรบลาสต์เอ็มบริโอหนู (NIH3T3) ของสาร CBD ให้ค่า IC_{50} เท่ากับ 40.78 ± 4.21 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร⁽¹³⁾ ซึ่งสอดคล้องกับงานวิจัยที่สารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ ให้ค่า IC_{50} ต่ำกว่า 50 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งเมื่อพิจารณาขนาดของการเริ่มต้นที่จะทดสอบในสัตว์ทดลองถือว่าค่าค่อนข้างต่ำมาก ฉะนั้น ผลการทดสอบพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ ได้แก่ เซลล์ปอด เซลล์ตับ เซลล์ไต และเซลล์เอ็มบริโอหนู ของสารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ ซึ่งมีสัดส่วนของ THC และ CBD แตกต่างกัน ให้ผลความเป็นพิษกับเซลล์ทั้ง 4 ชนิด และจะสังเกตว่าปริมาณ THC และ CBD มีผลในการเกิดความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยง และอาจจะมีสารอื่นๆ ในกัญชาที่ออกฤทธิ์ร่วมอยู่ด้วย งานวิจัยของ Aranya และคณะ ศึกษาพิษของสารสกัดใบและเมล็ดกัญชง (เฮมพ์) ที่เก็บจาก จ.เชียงใหม่ จ.เชียงราย และ จ.ตาก ของประเทศไทย ต่อเซลล์เพาะเลี้ยง human skin fibroblasts ด้วยวิธี SRB ผลการทดลองพบว่าเมื่อระดับความเข้มข้นสูงขึ้นตั้งแต่ 0.0625–5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ค่า % cell viability จะลดลง ที่ระดับความเข้มข้น 5 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ให้ค่า %cell viability ของใบกัญชง (เฮมพ์) เท่ากับ 57.66 ± 6.49 และเมล็ดกัญชง (เฮมพ์) เท่ากับ 32.37 ± 4.30 ซึ่งจากงานวิจัยระบุว่าค่าความเข้มข้นที่ 0.0625–1 มิลลิกรัม/มิลลิลิตร ไม่ก่อให้เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงซึ่งดูจากค่า %viability มากกว่า 70% ซึ่งค่าความเป็นพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงจะแตกต่างกันเนื่องมาจากองค์ประกอบของสารในสารสกัด⁽¹⁴⁾ งานวิจัยของ Martyna และคณะ ศึกษาความเป็นพิษของสารสกัด *Cannabis sativa* L. ที่มี CBD สูงกว่า THC ต่อเซลล์ keratinocyte (HaCaT) และ fibroblast (Bj) ซึ่งทั้งสองชนิดเป็นเซลล์ผิวหนังชนิดปกติ ด้วยวิธี Alamar Blue, Neutral red uptake และ Lactate dehydrogenase (LDH) ผลการทดลองพบว่าไม่เกิดพิษต่อเซลล์เพาะเลี้ยงกับทั้ง 2 เซลล์ที่ความเข้มข้น 1–1,000 ไมโครกรัม/มิลลิลิตร ซึ่งจากการทดสอบต่อเซลล์ผิวหนังทั้ง 2 งานวิจัย จะพบว่าสารสกัด *Cannabis sativa* L. จะไม่เกิดพิษต่อเซลล์ผิวหนังในความเข้มข้นที่ทดสอบ⁽¹⁵⁾ แต่งานทดสอบของผู้วิจัยจะทดสอบที่เซลล์อวัยวะเป้าหมาย 3 เซลล์คือเซลล์ปอด เซลล์ตับ และเซลล์ไต เป็นการศึกษาเซลล์เพาะเลี้ยงคนละชนิด ซึ่งกัญชาแต่ละพันธุ์ มีการเก็บในพื้นที่หรือในช่วงเวลาที่แตกต่างกัน จะให้สารสำคัญและองค์ประกอบทางเคมีในพืชที่แตกต่างกัน งานวิจัยการทดสอบพิษในเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติจะไม่นักวิจัยศึกษามากนัก ส่วนใหญ่มีการศึกษาในเซลล์มะเร็ง อย่างไรก็ตาม หากจะนำสมุนไพรมาพัฒนาเป็นยาหรือมีการศึกษาในมนุษย์ จะต้องคำนึงถึงว่าสมุนไพรนั้นหากมีฤทธิ์ยับยั้งเซลล์มะเร็งแล้ว จะส่งผลต่อเซลล์ปกติในร่างกายมนุษย์ควบคู่กันไป ฉะนั้นข้อควรระมัดระวัง การนำกัญชาไปใช้ ผู้บริโภคที่มีโรคประจำตัวหรือมีการรับประทานยาแผนปัจจุบันหรือยาอื่นๆ ควรใช้กัญชาภายใต้คำแนะนำของแพทย์ ถึงแม้ว่าปัจจุบันยังไม่พบหลักฐานที่กล่าวถึงการใช้กัญชาสัมพันธ์กับการเกิดโรคไตวายเรื้อรัง โรคตับ โรคปอด ก็ควรเฝ้าระวังภาวะแทรกซ้อนจากการใช้กัญชา และงานวิจัยนี้ใช้เป็นข้อมูลเบื้องต้น สามารถนำผลไปอ้างอิงและใช้ในการวิจัยเชิงลึก เช่น การศึกษาพิษเรื้อรังในสัตว์ทดลอง การศึกษากลไกต่างๆ ในสัตว์ทดลอง รวมถึงเป็นข้อมูลในการเตือนภัยผู้ป่วยที่ใช้ช่อดอกของกัญชาในการรักษาทางการแพทย์ต่อไป

สรุป

การศึกษความเป็นพิษของสารสกัดกัญชาไทย 3 พันธุ์ ได้แก่ PTC0601 (THC:CBD โกล้เคียงกัน) PTC0602 (THC เด่น) และ PTC0729 (CBD เด่น) ต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดปกติ 4 เซลล์ ได้แก่ เซลล์ปอด (SV-80), เซลล์ตับ (Chang-liver, Hela derivative) และ เซลล์ไต (HEK-293) พบว่า สารสกัดช่อดอกกัญชาไทย 3 พันธุ์ มีค่ายับยั้งการเจริญเติบโตร้อยละ 50 (IC_{50}) ต่อเซลล์ไต (HEK-293) ต่ำที่สุด นับว่ามีความเป็นพิษสูงที่สุด รองลงมาเซลล์ตับ และเซลล์ปอด ส่วนในเซลล์ BALB/c 3T3 พบว่าสารสกัดกัญชาพันธุ์ PTC0602 มีความเป็นพิษต่อเซลล์ BALB/c 3T3 สูงที่สุด รองลงมาคือ PTC0601 และ PTC0729 ขนาดแนะนำเริ่มต้นสำหรับทดสอบ

พิษเฉียบพลันในสัตว์ทดลอง เท่ากับ 300 มิลลิกรัม/กิโลกรัม ซึ่งเมื่อพิจารณาจากผลการทดลอง การใช้กัญชาที่มีความเป็นพิษเกิดขึ้นใน 3 เซลล์หลักคือ เซลล์ปอด เซลล์ตับ เซลล์ไต ฉะนั้นหากมีการนำกัญชาไปใช้ประโยชน์ ควรมีการศึกษาในเรื่องความปลอดภัยต่อเซลล์เพาะเลี้ยงชนิดอื่นๆ การทดสอบในสัตว์ทดลอง และการนำไปใช้เพิ่มเติมเพื่อค้นหาประโยชน์และผลข้างเคียงจากการใช้กัญชาในอนาคต และหากมีการนำไปใช้เพื่อประโยชน์ทางการแพทย์ ต้องอยู่ภายใต้คำแนะนำและคำปรึกษาของแพทย์เท่านั้น เนื่องจากงานวิจัยนี้เป็นการศึกษาวิจัยในช่อดอกกัญชา ซึ่งยังจัดเป็นยาเสพติด ดังนั้นผลการทดลองไม่ได้สะท้อนไปถึงการใช้ส่วนอื่นๆของกัญชา ซึ่งผู้วิจัยจะมีการศึกษาส่วนต่างๆของกัญชา เช่น ใบ ราก ฯลฯ ต่อไป

กิตติกรรมประกาศ

งานวิจัยนี้ได้รับการสนับสนุนงบประมาณจากสำนักงานคณะกรรมการส่งเสริมวิทยาศาสตร์ วิจัยและนวัตกรรม (สกสว.) ขอขอบพระคุณห้องปฏิบัติการเพาะเลี้ยงเนื้อเยื่อพืช และห้องปฏิบัติการจีโนมิกส์พืช ในการเก็บตัวอย่างสมุนไพรกัญชา ภก. เสกสรรค์ บัวเบา ศูนย์ตรวจสอบและรับรองคุณภาพสมุนไพรในการควบคุมคุณภาพทางเคมีและแยกปริมาณสารสำคัญ THC และ CBD ของตัวอย่างกัญชา และเจ้าหน้าที่ห้องปฏิบัติการพิษวิทยาทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือในการทำงานวิจัยเป็นอย่างดี

เอกสารอ้างอิง

1. ประกาศกระทรวงสาธารณสุข เรื่อง ระบุชื่อยาเสพติดให้โทษในประเภท 5 (พ.ศ. 2563). ราชกิจจานุเบกษา เล่ม 137 ตอนพิเศษ ๒๕๐ ง (วันที่ 14 ธันวาคม 2563). หน้า 33.
2. กรุงเทพธุรกิจ. เตรียมลุย! เส้นทางกัญชาทางการแพทย์เพิ่มมูลค่าตลาดกัญชา. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 10 ก.ค. 2564]; [6 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/932483>.
3. Small E, Cronquist A. A practical and natural taxonomy for Cannabis. Taxon 1976; 25(4): 405-35.
4. ราชบัณฑิตยสถาน. หนังสืออนุกรมวิธานพืช อักษร ก. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: หจก. อรุณการพิมพ์; 2547.
5. Anderson LC. Leaf variation among Cannabis species from a controlled garden. Bot Mus Leaf Harv Univ 1980; 28(1): 61-9.
6. Hanus LO, Meyer SM, Munoz E, Taglialatela-Scafati O, Appendino G. Phytocannabinoids: a unified critical inventory. Nat Prod Rep 2016; 33(12): 1357-92.
7. กัญชายาเสพติดหรือยารักษาโรค “สารสำคัญในกัญชามีอะไร”. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 10 ก.ค. 2564]; [13 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://masakigarden.com/สารสำคัญในกัญชา>.
8. องค์ความรู้เรื่องกัญชาเพื่อสุขภาพ. อะไรคือ“เทอร์ปีน (Terpene)”ในกัญชา. [ออนไลน์]. 2562; [สืบค้น 7 ก.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.cannhealth.org/content/4894/terpene>.
9. Ehara M, Noguchi T, Ueda K. Uptake of neutral red by the vacuoles of a green alga, Micras-terias pinnatifida. Plant Cell Physiol 1996; 37(6): 734-41.
10. OECD Series on Testing and Assessment No. 129. Guidance document on using the cytotoxicity tests to estimate starting doses for acute oral systemic toxicity tests. Paris: Organization for Economic Co-operation and Development; 2010.

11. ขนิษฐา เจริญกานนท์, ณัฐวุฒิ โตวนำชัย. แพทย์แนะไม่ให้ใช้ “กัญชา” ชะลอความเสื่อมของไต. [ออนไลน์]. 2564; [สืบค้น 13 ก.ค. 2564]; [3 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: <https://www.bangkokbiznews.com/news/detail/930407>.
12. สมาคมประสาทวิทยาแห่งประเทศไทย. ความคิดเห็นต่อการนำกัญชามาใช้ประกอบการรักษาในโรกระบบประสาทสำหรับบุคลากรทางการแพทย์. [ออนไลน์]. 2563; [สืบค้น 13 ก.ค. 2564]; [5 หน้า]. เข้าถึงได้ที่: URL: http://neurothai.org/images/journal/2020/vol36_no2/07%20Various%20topics.pdf.
13. ChoiPark WHD, Baek SH, Chu JP, Kang MH, Mi YJ. Cannabidiol induces cytotoxicity and cell death via apoptotic pathway in cancer cell lines. *Biomolecules Therapeut* 2008; 16(2): 87-94.
14. Manosroi A, Chankhampan C, Kietthanakorn B, Ruksiriwanich W, Chaikul P, Boonpisuttinant K, et al. Pharmaceutical and cosmeceutical biological activities of hemp (*Cannabis sativa* L var. *sativa*) leaf and seed extracts. *Chiang Mai J Sci* 2019; 42(2): 180-95.
15. Zagórska-Dziok M, Bujak T, Ziemlewska A, Nizioł-Łukaszewska Z. Positive effect of *Cannabis sativa* L. herb extracts on skin cells and assessment of cannabinoid-based hydrogels properties. *Molecules* 2021; 26(4): 802. (20 pages).

Cytotoxicity of Thai *Cannabis sativa* L. Extract on Various Types of Normal Cells

Praw Suppajariyawat¹ Sarayut Radapong¹ Tiyanee Sahad¹ Nathaphat Harnkit¹
Kanchariya Phankhajon¹ Phatipan Primprai¹ Phichet Banyati¹ Siriwan Chaisomboonpan¹
Nuttapong Wichai² and Pornchai Sincharoenpokai¹

¹Department of Medical Sciences, Tiwanond Road, Mueang, Nonthaburi 11000

²Maharakham University, Amphoe Kantarawichai, Maharakham, 44150 Thailand

Abstract *Cannabis sativa* L. is an addictive plant that has been gained dramatic attention in Thailand. According to its medical and recreational properties, this plant can be developed as a drug or commercial product and boost the country medically and economically. However, the toxicity and safety data are still limited. This research aims to study the toxicity of female inflorescence extracts of Thai cannabis to normal cell lines. The three cannabis extracts, namely PTC0601 (THC: CBD=2:1), PTC0602 (THC: CBD=10:1) and PTC0729 (THC: CBD=1:6), were extracted using Supercritical Fluid Extraction and then quantitatively analyzed using HPLC. Cytotoxicity was investigated in normal cells, including lung (SV-80), liver (Chang-liver, Hela derivative) and kidney (HEK-293) cell lines using MTT assay. The in vitro dose estimation for acute toxicity using mouse embryo, BALB/c 3T3 cells, was also investigated using a neutral red uptake assay. The results showed that the extracts exhibited the highest cytotoxicity to kidney cells, followed by liver cells and lung cells, respectively. Neutral red uptake assay was found that PTC0602 posed the highest cytotoxicity, followed by PTC0601 and PTC0729, respectively. Which was 300 mg/kg, recommended as the initial dose for acute toxicity testing in animals. In conclusion, the three extracts exhibited toxicity to certain extents to normal cell lines and recommended at 300 mg/kg as the starting dose for in vivo acute toxicity testing. This finding could be used as preliminary toxicity and safety data. Moreover, more comprehensive research on other cultured cells or animal models should be investigated for Thai cannabis.

Keywords: *Cannabis sativa* extract, Cytotoxicity, Thai *Cannabis sativa*, MTT assay, Neutral red uptake assay