รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์

ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล

เรื่อง

กลไกการออกฤทธิ์ของว่านหางจระเข้ต่อปัจจัยชีวภาพที่สำคัญ ต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ของแผล : เอ็นโดธีเลียลโปรเจนนิเตอร์ และแมทริกเมตตัลโลโปรติเนส

Mechanisms of Aloe vera on wound angiogenic biomarkers:

Endothelial progenitor cells (EPCs) and matrix metalloproteinase (MMP)

โดย

รศ.พญ.จุไรพร สมบุญวงค์ หัวหน้าโครงการ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศ.ดร.สุทธิลักษณ์ ปทุมราช ผู้ร่วมโครงการ

ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.นพ.ดร.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ผู้ร่วมโครงการ

ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557

สัญญาเลขที่ GRB_BSS_๕๗_๕๖_๓๐_๑๓

รายงานผลการวิจัยฉบับสมบูรณ์
ทุนอุดหนุนการวิจัยจากเงินอุดหนุนทั่วไปจากรัฐบาล
ทุนโครงการ/ผลผลิตเพื่อสร้างองค์ความรู้
ประจำปีงบประมาณ 2556 (โครงการต่อเนื่องปีที่ 1)

เรื่อง

กลไกการออกฤทธิ์ของว่านหางจระเข้ต่อปัจจัยชีวภาพที่สำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ของแผล: เอ็นโดธีเลียลโปรเจนนิเตอร์ และแมทริกเมตตัลโลโปรติเนส

Mechanisms of *Aloe vera* on wound angiogenic biomarkers:
endothelial progenitor cells (EPCs) and matrix metalloproteinase (MMP)

โดย

รศ.พญ.จุไรพร สมบุญวงค์ หัวหน้าโครงการ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ศ.ดร.สทธิลักษณ์ ปทุมราช ผู้ร่วมโครงการ
ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ผศ.นพ.ดร.นิพัญจน์ อิศรเสนา ณ อยุธยา ผู้ร่วมโครงการ
ภาควิชาเภสัชวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

เดือนพฤษภาคม พ.ศ. 2557

สัญญาเลขที่ GRB_BSS_๕๗_๕๖_๓๐_๑๓

โครงการวิจัย เรื่อง โครงการวิจัยกลไกการออกฤทธิ์ของว่านหางจระเข้ต่อปัจจัยชีวภาพที่สำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ของแผล: เอ็นโดธีเลียลโปรเจนนิเตอร์และแมทริกเมตตัลโล โปรติเนส

การรายงานฉบับสมบูรณ์ ประจำปีงบประมาณ 2556 (โครงการต่อเนื่องปีที่ 1)

.....

รายงานช่วงระยะตั้งแต่ วันที่ 1 ตุลาคม 2555 ถึงวันที่ 30 กันยายน 2556

ชื่อหัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงจุไรพร สมบุญวงค์

หน่วยงาน ภาควิชา สรีรวิทยา คณะ แพทยศาสตร์

การดำเนินงาน : [/] ได้ดำเนินงานตามแผนงานที่ได้วางไว้ทุกประการ

[ ] ได้เปลี่ยนแปลงแผนงานที่ได้วางไว้ดังนี้คือ

บทนำ

โรคเบาหวาน (Diabetes mellitus) เป็นหนึ่งในโรคความผิดปกติของระบบเมทาบอลิซึมซึ่งมีการดำเนินโรคเรื้อรังและมีอัตราการเพิ่มขึ้นของโรคอย่างรวดเร็ว ในผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานจะพบว่ามีภาวะระดับน้ำตาลในเลือดสูง (hyperglycemia) ผลจากการมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรังส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในอวัยวะต่างๆ โดยเฉพาะอย่างยิ่งที่หลอดเลือด ผู้ป่วยเบาหวานจะมีการไหลเวียนของเลือดลดลงเนื่องจากระดับน้ำตาลในเลือดที่สูงส่งผลให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ endothelial cells ที่ผนังหลอดเลือด (endothelial cell dysfunction) รวมทั้งมีการลดลงของการสร้างหลอดเลือดใหม่ ทำให้เลือดไปเลี้ยงที่เนื้อเยื่อบริเวณนั้นลดลง ผู้ป่วยเกิดภาวะขาดเลือด (ischemia) และเสี่ยงต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลต่อกระบวนการหายของแผล (wound healing) (Loomans et al., 2004; Sivan-Loukianova et al., 2003) ภาวะแทรกซ้อนอย่างหนึ่งที่พบได้มากในผู้ป่วยเบาหวานคือการเกิดบาดแผลที่เท้าหรือบริเวณ lower limb โดยประมาณ 15% ของผู้ป่วยเบาหวานทั่วโลกเกิดภาวะ foot ulcerations และมักจะกลายเป็นแผลเรื้อรังในที่สุด (Chew and Leslie, 2006)

ปัจจุบันพบว่า endothelial cells ของหลอดเลือดที่บาดเจ็บสามารถถูกซ่อมแซมโดยเซลล์ที่เรียกว่า endothelial progenitor cells (EPCs) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้างแขนงหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) จากรายงานพบว่าผู้ป่วยเบาหวานทั้งชนิดที่ 1 และ 2 จะมีปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ EPCs ที่

ลดลงเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ และปริมาณของ EPCs ที่ลดลงมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับระดับของ hemoglobin A1c (HbA1c) (Loomans et al., 2004; Tepper et al., 2002) มีรายงานพบว่าผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีจะมีปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ EPCs ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (Churdchomjan et al., 2010) แสดงให้เห็นว่า EPCs ในผู้ป่วยเบาหวานซึ่งมีความผิดปกติอาจส่งผลต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดและการหายของบาดแผล ในปี 2003 Sivan-Loukianova และคณะพบว่าการฉีด CD34+ cells ซึ่งทำหน้าที่เป็น endothelial cell progenitors ในแผลของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ส่งผลทำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นและการหายของแผลเร็วขึ้น ดังนั้นการรักษาด้วย EPCs จึงมีประโยชน์ต่อการหายของแผล

กระบวนการสำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้แก่ การ invade ของเซลล์ ซึ่งต้องใช้ proteases ในการ degrade extracellular matrix (ECM) และ proteolytic enzymes ที่สำคัญก็คือ matrix metalloproteinases (MMPs) (Sottile, 2004) MMPs อยู่ใน family ของ zinc dependent enzymes ซึ่งสามารถ degrade ได้ทุกส่วนประกอบของ ECM (Ravanti and Kahari, 2000; Armstrong and Jude, 2002; Lobmann et al., 2005) มีหลักฐานการศึกษาพบว่า MMPs ได้แก่ MMP-2 และ MMP–9 มีบทบาทสำคัญในการควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ใน *in vitro* model พบว่าการให้ statin ร่วมกับ SDF-1 แก่ EPCs ที่เลี้ยงให้เติบโตใน Matrigel จะช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยเพิ่มการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งพบว่า MMP-2 และ MMP-9 เพิ่มขึ้น 3.5 และ 6.5 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ EPC tube formation เพิ่มขึ้นเกือบ 50% (Shao et al., 2008)

ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) เป็นสมุนไพรที่นำมาใช้ในการรักษาโรคเบาหวาน เนื่องจากมีสรรพคุณในการลดระดับน้ำตาลในเลือด (Hamman, 2008) นอกจากนี้มีการนำว่านหางจระเข้มาใช้ในการรักษาบาดแผลตั้งแต่สมัยโบราณ เนื่องจากส่วนที่เป็นวุ้นใสในว่านหางจระเข้มีสรรพคุณในการรักษาบาดแผล มีการศึกษาถึงผลของว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลทั้งในคนและในสัตว์ทดลอง ในปี 1998 Chithra และคณะ ได้ศึกษาผลของการให้ว่านหางจระเข้ในหนูที่เป็นเบาหวานที่มีแผลแบบ full-thickness excision/incision wounds ทั้งโดยวิธีการกินและทาที่แผล พบว่าทำให้ collagen synthesis และ wound contraction เพิ่มขึ้น ส่วนระยะเวลาของ epithelialization ลดลง ส่งผลทำให้แผลหายเร็วขึ้น

การศึกษาพบว่าปริมาณและประสิทธิภาพในการทำหน้าที่สร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ลดลงในผู้ป่วยเบาหวานทั้งสองชนิด และการลดปริมาณของ EPCs ยังมีความสัมพันธ์ในทางตรงกันข้ามกับระดับของ HbA1c นอกจากนี้ปริมาณและประสิทธิภาพการทำหน้าที่ของ EPCs ในผู้ป่วยเบาหวานเพิ่มขึ้นได้หากมีการ

เลขหมู่
เลขทะเบียน 018089
วัน, เดือน, ปี 4 ก.พ. 62

ควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดี จากรายงานพบว่าว่านหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ดังนั้นว่านหางจระเข้อาจมีผลต่อ circulating EPCs นอกจากนี้ในว่านหางจระเข้ยังมี zinc เป็นส่วนประกอบ (Shelton, 1991; Yamaguchi et al., 1993) MMPs ทั้ง MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งมีบทบาทสำคัญในขั้นตอนการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ต้องอาศัย zinc ในการทำงาน ดังนั้นว่านหางจระเข้อาจส่งเสริมการหายของแผล โดยไปเพิ่มการสร้างหลอดเลือดใหม่โดย EPCs ผ่านทางกลไกของ MMP activity ข้อมูลจากงานวิจัยข้างต้นสามารถสรุปได้ว่าว่านหางจระเข้ช่วยส่งเสริมการหายของแผล แต่ยังไม่มีหลักฐานการศึกษาใดในงานวิจัยที่บ่งบอกถึงผลของว่านหางจระเข้ที่มีต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ และ circulating EPCs (ทั้งปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงาน) รวมถึงกลไกการทำงานที่ช่วยสนับสนุนการทำหน้าที่สร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs โดยผ่าน MMP activity (MMP-2 และ MMP-9) คณะผู้วิจัยจึงสนใจที่จะศึกษาในเรื่องดังกล่าว งานวิจัยครั้งนี้มีจุดมุ่งหมายที่จะศึกษากลไกการทำงานของว่านหางจระเข้ในการเกิดหลอดเลือดใหม่และการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวาน โดยศึกษาผลของว่านหางจระเข้ต่อปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ circulating EPCs รวมถึงกลไกที่ช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ผ่าน MMP activity (MMP-2 และ MMP-9)

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

- ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่และการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวานหลังจากให้กินว่านหางจระเข้เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ exogenous EPCs
- ศึกษาผลของการกินว่านหางจระเข้ต่อปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ circulating EPCs ในหนูที่เป็นเบาหวาน
- ศึกษากลไกที่ช่วยส่งเสริมการทำหน้าที่สร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ผ่าน MMP activity (MMP-2 และ MMP-9) หลังจากให้ว่านหางจระเข้

สมมุติฐาน และกรอบแนวความคิดของโครงการวิจัย

ผู้ป่วยที่เป็นโรคเบาหวานจะมีระดับน้ำตาลในเลือดสูง น้ำตาลจะไปทำปฏิกิริยาจับกับโปรตีนใน extracellular matrix และ plasma ทำให้เกิดการสร้างสารพวก advanced glycation end products (AGEs) ซึ่งสารชนิดนี้ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของ NFκB ทำให้เกิด vasoconstriction และเกิดการแสดงออกของ adhesion molecule และ procoagulant และยังไปกระตุ้นการสร้างสาร cytokine ซึ่งทำให้ endothelial permeability เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การที่ AGEs เกิดการสะสมอยู่ที่ basement membrane ทำให้เกิดการหนาตัวของ basement membrane ทั้งหมดนี้ส่งผลให้เกิดการสูญเสียหน้าที่ของ endothelial cells ที่ผนังหลอดเลือด ทำให้เลือดไปเลี้ยงที่เนื้อเยื่อบริเวณนั้นลดลง ผู้ป่วยเกิดภาวะ

ขาดเลือด รวมทั้งเสี่ยงต่อการติดเชื้อเพิ่มขึ้น ส่งผลให้การหายของแผลลดลง (Chew and Leslie, 2006; Goldin et al., 2006; Jakus et al., 2001) นอกจากนี้การมีระดับน้ำตาลในเลือดสูงส่งผลให้ปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ EPCs ลดลง ทำให้มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ลดลง ส่งผลให้การหายของแผลลดลง สำหรับการใช้สมุนไพรว่านหางจระเข้นั้น มีข้อดีคือสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ ดังนั้นจึงเป็นไปได้ว่าว่านหางจระเข้อาจมีผลให้ circulating EPCs เพิ่มขึ้น(ทั้งปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงาน) ส่งผลให้การสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นและช่วยให้แผลหายได้ดีขึ้น

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

โรคเบาหวานทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเป็นเวลานาน ส่งผลให้เกิดภาวะแทรกซ้อนในโรคเบาหวานที่อวัยวะต่างๆ เช่น ตา ไต หัวใจ ระบบประสาท และระบบหลอดเลือด เนื่องจากภาวะน้ำตาลในเลือดสูงเรื้อรังทำให้เกิดการสร้างสารพวก AGEs สารชนิดนี้ทำให้เกิดภาวะ oxidative stress ซึ่งจะไปกระตุ้นการทำงานของสารกลุ่ม pro-inflammatory transcriptional factor คือ NFκB ทำให้เกิด (1) vasoconstriction (2) เพิ่มการแสดงออกของ adhesion molecule ต่างๆ เช่น intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) ทำให้เกิดการเกาะติดของเม็ดเลือดขาว ส่งผลทำให้เกิดการอักเสบที่หลอดเลือด และเพิ่มการแสดงออกของ procoagulant (3) กระตุ้นการสร้างสาร cytokine ซึ่งทำให้ endothelial permeability เพิ่มขึ้น นอกจากนี้การที่ AGEs ไปสะสมอยู่ที่ basement membrane ทำให้เกิดการหนาตัวของ basement membrane ทั้งหมดนี้ส่งผลให้เกิด endothelial cell dysfunction ทำให้มีเลือดไปเลี้ยงที่เนื้อเยื่อลดลง ส่งผลให้การหายของแผลลดลง (Chew and Leslie, 2006; Goldin et al., 2006; Jakus et al., 2001) ผู้ป่วยเบาหวานมักเกิดแผลโดยเฉพาะที่เท้าหรือบริเวณ lower limb และเป็นแผลที่หายยาก ประมาณ 15% ของผู้ป่วยเบาหวานมี foot ulcerations และความเสี่ยงในการถูกตัดออกเพิ่มขึ้น 15 เท่าในผู้ป่วยเบาหวาน มีปัจจัยหลายอย่างที่ทำให้การหายของแผลไม่ดี เช่น การเพิ่มการหลั่งของ cytokine ซึ่งทำให้เกิดการอักเสบและการสร้างหลอดเลือดใหม่น้อยลง (Wu et al., 2007)

รายงานการศึกษาพบว่า endothelial cells ของหลอดเลือดที่บาดเจ็บสามารถถูกซ่อมแซมโดยเซลล์ที่เรียกว่า endothelial progenitor cells (EPCs) ซึ่งมีหน้าที่สำคัญในการสร้างหลอดเลือดใหม่เนื่องจาก EPCs สามารถ differentiate ไปเป็น endothelial cells ได้ EPCs เป็นเซลล์ที่สร้างมาจากไขกระดูก EPCs สามารถแยกได้จากไขกระดูก peripheral blood และ umbilical cord blood พบว่า EPCs จะมีการแสดงออกของ surface markers ของทั้ง hematopoietic stem cells เช่น CD34, CD133 (AC133 หรือ prominin), CD45 และ endothelial cells เช่น vascular endothelial growth factor receptor-2 (VEGFR-2 or KDR), platelet-endothelial cells adhesion molecule-1 (PECAM-1 หรือ CD31), vascular endothelial-cadherin, von

Willebrand Factor, c-kit, Tie-2 และ VEGFR-1 ในภาวะปกติระดับของ circulating EPCs จะมีอยู่ในปริมาณที่ต่ำ (ประมาณ 0.01% ของเซลล์ในกระแสเลือด) แต่เมื่อเกิดการบาดเจ็บขึ้นระดับของ circulating EPCs จะสูงขึ้น เนื่องจากการถูกเหนี่ยวนำจาก growth factor และ cytokine ที่หลั่งมากขึ้นจากบริเวณที่บาดเจ็บ เช่น granulocyte macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), vascular endothelial growth factor (VEGF) ส่งผลกระตุ้นการทำงานของ matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) ที่บริเวณ membrane-bound stem cell ทำให้เกิดการ migration ของ EPCs และมีการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนมายังกระแสเลือด นอกจากนี้การ migration ของ EPCs ยังเกิดจากการสร้าง nitric oxide (NO) ที่บริเวณ stromal cells EPCs ในกระแสเลือดจะเกิดการ homing คือ การเดินทางของเซลล์ไปยังบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บ โดยการกระตุ้นของ angiogenic growth factors เช่น VEGF และ differentiation เป็น vascular endothelial cells ที่บริเวณที่บาดเจ็บ (Urbich and Dimmeler, 2004; Fadini et al., 2005; Zammaretti and Zisch, 2005) มีการวิจัยพบว่าเมื่อนำ EPCs ในกระแสเลือดของผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 และชนิดที่ 2 มาทำการเพาะเลี้ยง จำนวนของ EPCs ลดลง 44% และ 48% ตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ และจำนวนของ EPCs ในกระแสเลือดของผู้ป่วยโรคเบาหวานจะแปรผกผันกับระดับเปอร์เซ็นต์ความหนาแน่นของน้ำตาลในเม็ดเลือดแดงหรือที่เรียกว่า hemoglobin A1c (HbA1c) (Loomans et al., 2004; Tepper et al., 2002) นอกจากนี้ยังพบว่าผู้ป่วยเบาหวานทั้งสองชนิดจะมีประสิทธิภาพในการทำงานของ EPCs ลดลงด้วย EPCs ที่ได้จากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 1 มีประสิทธิภาพในการส่งเสริม endothelial tube formation ลดลงอย่างมีนัยสำคัญเมื่อเปรียบเทียบกับคนปกติ (*in vitro* angiogenesis assay) (Loomans et al., 2004) ส่วน EPCs ที่ได้จากผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 พบว่ามีการลด adherence to human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) ที่ถูก activate ด้วย tumor necrosis factor-α (TNF-α) (Tepper et al., 2002) ผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 ที่มีการควบคุมระดับน้ำตาลในเลือดได้ดีจะมีปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ EPCs ที่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ควบคุมระดับน้ำตาลได้ไม่ดี (Churdchomjan et al., 2010) แสดงให้เห็นว่าการลดลงของปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ EPCs ในผู้ป่วยเบาหวานอาจส่งผลต่อการเกิดภาวะแทรกซ้อนของหลอดเลือดและการหายของบาดแผล ดังนั้นการให้การรักษาด้วย EPCs จึงน่าจะมีประโยชน์ต่อการหายของแผล ผลจากงานวิจัยจำนวนมากพบว่าการรักษาโดยการให้ EPCs ช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่และการหายของแผล ดังในงานวิจัยของ Sivan-Loukianova และคณะ (2003) ซึ่งศึกษาผลของ human CD34+ peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) ซึ่งทำหน้าที่เป็น endothelial cell progenitors โดยวิธีการฉีดที่ใต้ wound bed ของแผลแบบ full-thickness skin wounds ในหนู nude mice ที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสาร streptozotocin พบว่าขนาดของแผลลดลง มีการสร้างหลอดเลือดใหม่และ re-epithelialization เพิ่มขึ้น การทดลองในบาดแผลปกติที่ไม่ได้เป็นเบาหวานก็ให้ผลเช่นเดียวกัน ดังเช่นงานวิจัยในหนู nude mice ที่มีบาดแผลแบบ full-

thickness excisional wound (เส้นผ่าศูนย์กลาง 0.5 cm) พบว่าหนูที่ได้รับ EPCs (จาก human umbilical cord blood) ทั้งโดยวิธี implant inside the wound และ intradermal injection จะมีการสร้างหลอดเลือดใหม่เพิ่มขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับ EPCs (Kim et al., 2009) การศึกษาของ Kung และคณะ (2008) พบว่าหนู mice ที่มีบาดแผลแบบ full-thickness excisional wound (1 cm^2) ที่ได้รับ human skin substitute seeded with EPCs (human CD34+ PBMCs) มีการสร้างหลอดเลือดใหม่มากกว่ากลุ่มที่ได้รับ human skin substitute เพียงอย่างเดียว

กระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่มีความสำคัญต่อการหายของแผล การ invade ของเซลล์เป็นขั้นตอนที่สำคัญระหว่างการสร้างหลอดเลือดใหม่ซึ่งต้องอาศัย proteases (proteolytic enzymes) ในการ degrade extracellular matrix (ECM) การ degrade ECM โดย proteases เป็นการจัดเตรียมสิ่งแวดล้อมเพื่อให้เซลล์เกิด sprout และ invade ไปยังบริเวณรอบๆ เพื่อให้สามารถสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ ขั้นตอนของการ invade มีความสัมพันธ์ร่วมกันกับ proteases ที่เพิ่มขึ้น EPCs มีความสามารถในการ differentiate กลายเป็น mature endothelial cells และในที่สุดจะพัฒนาเป็นหลอดเลือด ผลจากงานวิจัยพบว่า proteases ทำหน้าที่สำคัญในการควบคุมการสร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs และ proteases ที่สำคัญก็คือ matrix metalloproteinases (MMPs) (Sottile, 2004)

MMPs อยู่ใน family ของ zinc dependent enzymes ซึ่งสามารถ degrade ได้ทุกส่วนประกอบของ ECM (Ravanti and Kahari, 2000; Armstrong and Jude, 2002; Lobmann et al., 2005) MMPs แบ่งออกเป็นกลุ่มย่อย ได้แก่ collagenases, gelatinases, stromelysins และ membrane-type MMPs (MT-MMPs) (Woessner, 1994; Kähäri and Saarialho-Kere, 1997; Ravanti and Kahari, 2000) ในผิวหนัง MMPs ผลิตขึ้นโดยเซลล์หลายชนิดเช่น fibroblasts, keratinocytes, macrophages, endothelial cells, mast cells, eosinophils และ neutrophil (Kähäri and Saarialho-Kere, 1997; Armstrong and Jude, 2002) มีรายงานจำนวนมากพบว่า การสร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ต้องอาศัย activity ของ MMP-2 (gelatinase-A) และ MMP-9 (gelatinase-B) ในปี 2010 Wu และคณะพบว่า MMP-2 ช่วยเพิ่ม VEGF-stimulated differentiation ของ EPCs ไปเป็น capillary-like tube structures การยับยั้ง MMP-2 โดย MMP-2 Inhibitor I ทำให้การสร้าง tube structures ลดลง (Wu et al., 2010) ใน *in vitro* model ของเบาหวานพบว่า hyperglycemia ส่งผลให้มีการลดลงของ MMP-9 activity ซึ่งสัมพันธ์กับการลดความสามารถของ EPCs ในการ invade และ incorporate เป็น tube-like structures ความสามารถของ EPCs ที่เลี้ยงใน high glucose medium (12 mM D-glucose) ในการ invade ECM gel และ incorporate เป็น tube-like structures ลดลง 50% เมื่อเปรียบเทียบกับ EPCs ที่เลี้ยงใน control medium การประเมิน MMP-9 activity โดย gelatin

zymography พบว่า EPCs ที่เลี้ยงใน high glucose medium ลดลง 44% เมื่อเทียบกับที่เลี้ยงใน control medium ยิ่งกว่านั้นผลจาก matrigel assay ยังชี้ให้เห็นว่า MMP-9 activity มีความสัมพันธ์โดยตรงกับคุณสมบัติในการ invade และ incorporate ของ EPCs การยับยั้ง MMP-9 โดยใช้ MMP-9 inhibitor I ทำให้ MMP-9 activity และ invasive activity ลดลง (Kränkel et al., 2005) ใน *in vitro* model พบว่าการให้ statin ร่วมกับ SDF-1 แก่ EPCs ที่เลี้ยงให้เติบโตใน Matrigel จะช่วยส่งเสริมการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยเพิ่มการแสดงออกของ MMP-2 และ MMP-9 ซึ่งพบว่า MMP-2 และ MMP-9 เพิ่มขึ้น 3.5 และ 6.5 เท่าตามลำดับเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และ EPC tube formation เพิ่มขึ้นเกือบ 50% (Shao et al., 2008) ในปี 2007 Cheng และคณะได้ทำการศึกษาใน *In vivo* พบว่า capillary density และ blood flow ใน ischemic hindlimb ของ MMP-2 deficient mice ลดลง และยังพบว่า bone marrow-derived EPC-like c-kit^{+} cells ที่ได้มาจาก MMP-2 deficient mice สูญเสียความสามารถในการ proliferate และ invade ดังนั้น MMP-2 อาจมีส่วนทำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่โดยการส่งเสริมการ proliferate และ invade ของ EPCs

ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) เป็นสมุนไพรที่อยู่ในตระกูล Liliaceae พันธุ์ของว่านหางจระเข้มีมากมายกว่า 360 ชนิด (Klein and Penneys, 1988) มีใบเดี่ยวเรียงรอบต้น ใบแหลมหนาอ้วนสีเขียวถึงเทา-เขียว เนื้อในมีวุ้นใส แหล่งกำเนิดดั้งเดิมอยู่ในทวีปแอฟริกา ถูกนำมาใช้เพื่อการรักษามาเป็นเวลานาน เนื่องจากมีสรรพคุณหลายอย่าง สารออกฤทธิ์ในว่านหางจระเข้จะอยู่ทั้งที่ส่วนที่เป็นวุ้นใสและส่วนเปลือก (Rajasekaran, 2005) ว่านหางจระเข้ถูกนำมาใช้ในการรักษาเบาหวานเนื่องจากสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้ (Hamman, 2008) การศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานชนิดที่ 2 และในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 และ 2 พบว่าระดับน้ำตาลในเลือดลดลงหลังจากให้กินว่านหางจระเข้ (Ghannam et al., 1986; Can et al., 2004; Rajasekaran et al., 2005) นอกจากนี้ว่านหางจระเข้ยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ต้านการติดเชื้อแบคทีเรียและเชื้อรา ต้านการอักเสบ และรักษาบาดแผล (Habeeb et al., 2007; Hamman, 2008)

วิธีการดำเนินการวิจัย

โครงการวิจัยนี้เป็นโครงการต่อเนื่อง 2 ปี แบ่งการทดลองเป็น 3 ชุด ดังนี้

<u>การทดลองที่ 1</u>: ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่และการหายของแผลในหนูที่เป็นเบาหวานหลังจากให้กินว่านหางจระเข้ เปรียบเทียบกับกลุ่มที่ให้ exogenous EPCs

<u>การทดลองที่ 2</u>: ศึกษาผลของการกินว่านหางจระเข้ต่อปริมาณและประสิทธิภาพในการทำงานของ circulating EPCs ในหนูที่เป็นเบาหวาน โดย

- การตรวจสอบปริมาณของ circulating EPCs ทั้งก่อนและหลังจากให้หนูที่เป็นเบาหวานกินว่านหางจระเข้
- การตรวจสอบประสิทธิภาพในการทำงานของ circulating EPCs ในการ form capillary-like tube structures บน Matrigel ทั้งก่อนและหลังจากให้หนูที่เป็นเบาหวานกินว่านหางจระเข้ (Matrigel tubule assay)

<u>การทดลองที่ 3:</u> ศึกษากลไกที่ช่วยส่งเสริมการทำหน้าที่สร้างหลอดเลือดใหม่ของ EPCs ผ่าน MMP activity (MMP-2 และ MMP-9) หลังจากให้ว่านหางจระเข้ โดยการตรวจสอบ MMP activity โดย Zymographic assay

ในส่วนของการทดลองที่ 1 มีรายละเอียดดังนี้

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการทดลองนี้คือ หนู nude mice (BALB/c nude mice) เพศผู้ อายุ 7-8 สัปดาห์ น้ำหนักประมาณ 20-25 g โดยแบ่งสัตว์ทดลองเป็น 5 กลุ่ม

(1) **กลุ่มควบคุมที่ได้รับ** fibrin gel (control + fibrin gel) (N=15) ได้แก่หนูที่ฉีด Citrate buffer (40 mg/kg body weight) โดยฉีดทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed แล้วจึงเลี้ยงตามปกติจนถึงวันที่นำมาทำการศึกษา

<u>หมายเหตุ</u> fibrin gel เป็นเสมือน vehicle ของ EPCs

(2) **กลุ่มควบคุมที่ได้รับ** fibrin gel **และ** Aloe vera (control + fibrin gel + Aloe vera) (N=15) ได้แก่หนูที่ฉีด Citrate buffer (40 mg/kg body weight) โดยฉีดทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed ร่วมกับให้กิน Aloe vera ในขนาด 400 mg/kg body weight วันละ 2 ครั้ง ทุกวันจนถึงวันที่นำมาศึกษา

(3) **กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ** fibrin gel (DM + fibrin gel) (N=15) ได้แก่หนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานชนิดที่ 1 โดยการฉีด streptozotocin (40 mg/kg body weight) โดยฉีดทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed แล้วจึงเลี้ยงตามปกติจนถึงวันที่นำมาทำการศึกษา

(4) **กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ** fibrin gel **และ** EPCs (DM + fibrin gel + EPCs) (N=15) โดยการฉีด streptozotocin (40 mg/kg body weight) ทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่มีเซลล์ EPCs ปริมาณ $1x10^6$ cells ที่บริเวณ wound bed แล้วจึงเลี้ยงตามปกติจนถึงวันที่นำมาทำการศึกษา (modified from Wu et al., 2007)

(5) **กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ** fibrin gel **และ** Aloe vera (DM + fibrin gel + Aloe vera) (N=40) โดยการฉีด streptozotocin (45 mg/kg body weight) ทางช่องท้องวันละครั้งติดต่อกัน 5 วัน และทำ wound model จากนั้นให้ fibrin gel ที่บริเวณ wound bed ร่วมกับให้กิน Aloe vera ในขนาด 400 mg/kg body weight ทุกวันจนถึงวันที่นำมาศึกษา

หนูทุกกลุ่มจะถูกแบ่งเป็นกลุ่มย่อยเพื่อนำมาศึกษาเมื่อครบ 7 และ14 วัน (N=5 ในแต่ละกลุ่ม) หลังจากทำ wound model เพื่อทำการเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลต่อไป

การทำ wound model

ทำการสลบหนูทดลองด้วย sodium pentobarbital 45 mg/kg body weight ทางช่องท้อง ทำการ swab ด้วย alcohol และตัดชั้นผิวหนังบริเวณด้านข้างทั้งซ้ายและด้านขวาจากแนวหลังของหนูทดลองและทำให้เกิดบาดแผลชนิด full-thickness excisional wound ด้วยการใช้กรรไกรตัดผิวหนังบริเวณด้านหลังให้มีขนาด 0.6 x 0.6 cm^2 จากนั้นใส่ fibrin gel หรือ fibrin gel ที่มี EPCs ตามการแบ่งกลุ่มเบื้องต้น ที่บริเวณ wound bed แล้วปิดด้วย tegaderm เมื่อครบ 7 และ14 วัน หลังจากทำ wound model จึงเก็บข้อมูลวิเคราะห์ผลต่อไป (Wu et al., 2007)

สรุปผลการดำเนินงาน

การดำเนินงานที่ได้ดำเนินการไปแล้วคือ ได้ทำการเหนี่ยวนำหนูกลุ่มเบาหวานด้วย Streptozotocin ความเข้มข้น 45 mg/kgBW เป็นเวลาติดต่อกัน 5 วัน หลังจากทำการเหนี่ยวนำหนูให้เป็นเบาหวานเป็นเวลา 2 สัปดาห์ นำหนูมาทำการวัดระดับน้ำตาลในเลือด หนูที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 200 mg/dL จะนำมาเข้ากลุ่มหนูเบาหวาน แล้วรอเวลาจนครบ 8 สัปดาห์ จึงนำมาเริ่มป้อน treatment (Aloe vera dose 400 mg/kgBW)

โดยในการดำเนินงานวิจัยในรอบนี้ได้ดำเนินการไปแล้ว 3 กลุ่ม ได้แก่

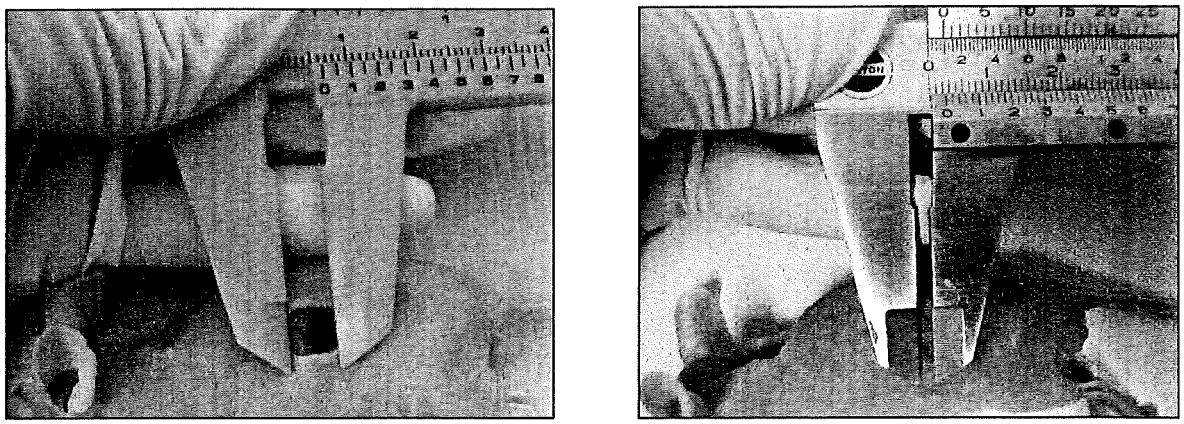
1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ fibrin gel เป็นเวลา 14 วัน (CF14D, n = 5)
2. กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel เป็นเวลา 14 วัน (DMF14D, n = 3)
3. กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel และ Aloe vera เป็นเวลา 14 วัน (DMFA14D, n = 3)

การเก็บข้อมูลและวิเคราะห์ผลดังต่อไปนี้

(1) <u>ศึกษาการปิดของแผล (wound closure)</u>

เมื่อครบ 7 และ 14 วัน ทำการถ่ายภาพ digital แล้วนำมาทำการวัดพื้นที่แผลด้วยโปรแกรม Image Pro-Plus ดังแสดงในรูปที่ 1 โดยหา percentage of wound closure ซึ่งคำนวณจาก

$$\% \text{ wound closure} = \frac{(\text{พื้นที่เริ่มต้นของแผล} - \text{พื้นที่ของแผลหลังครบเวลาที่กำหนด}) \times 100}{\text{พื้นที่เริ่มต้นของแผล}}$$



รูปที่ 1 แสดงการวัดค่าการปิดของแผล (Wound closure) ที่วันแรกของการทำแผลและวันสุดท้ายของการทดลอง

ผลการทดลองในการวัด % Wound closure ดังแสดงในตาราง

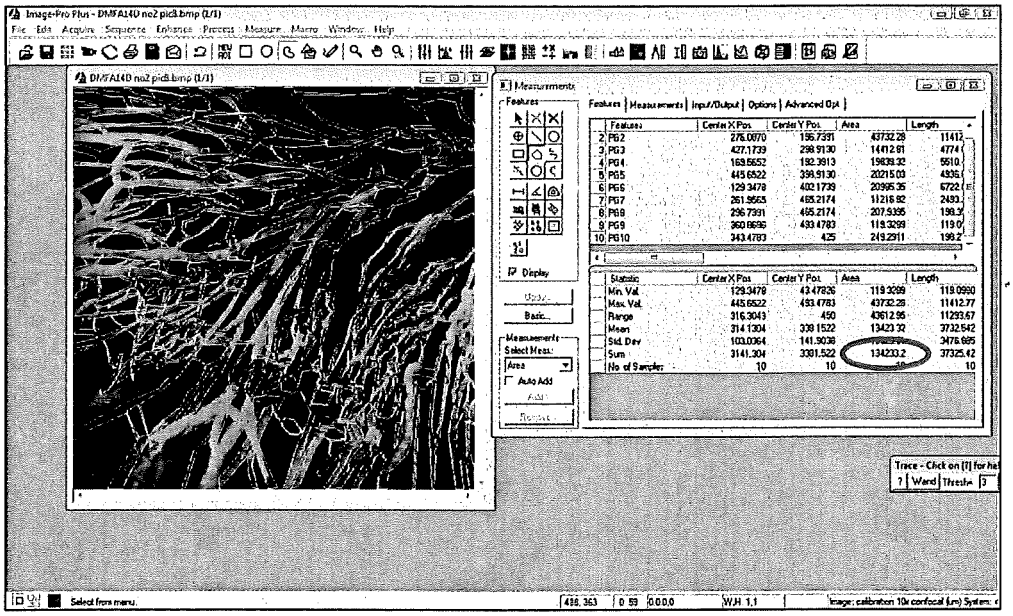
14-Day group	% Wound closure
CF14D (n=5)	68.74±2.24
DMF14D (n=3)	64.60±4.01
DMFA14D (n=3)	79.59±0.73

(2) ศึกษาการเกิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis)

เมื่อครบ 7 และ 14 วัน นำหนูมาตรวจสอบการเกิดหลอดเลือดใหม่โดย ทำการสลบหนูทดลองด้วย sodium pentobarbital (50 mg/100 g ทางช่องท้อง) จากนั้นนำหนูทดลองที่สลบแล้ววางให้อยู่ในท่านอนหงายและทำการ cannulate jugular vein เพื่อเป็นช่องทางให้สารเข้าทางหลอดเลือดดำ โดยสอดท่อ polyethylene (PE 10, inner diameter 0.2 mm) ที่มี 0.9% normal saline เข้าทาง jugular vein แล้วการทำการเปิดผิวหนังที่บริเวณโดยรอบของแผล ซึ่งขณะทำการทดลองนั้นจะทำการหยดด้วย 0.9% normal saline จากนั้นทำการวางหนูทดลองบน stage ของ Confocal microscope (Nikon EC1) และฉีดด้วยสารที่เข้าหลอดเลือดเพื่อ label พลาสมา ด้วย fluorescein isothiocyanate-labeled dextran-150 (FITC-DX-150,

Sigma Co., USA) ขนาด 0.2 ml (5 mg/100 µl NSS) เข้าทาง jugular vein เพื่อศึกษาหลอดเลือดบนผิวหนังที่บริเวณแผล หลังจากให้ FITC-DX-150 ประมาณ 30 วินาที ภาพของหลอดเลือดจะปรากฏขึ้นและถูกบันทึกโดยใช้เลนส์ซึ่งเป็น long working distance (CF Achromat) ที่มีกำลังขนาด 10x แล้วหา capillary vascularity (CV) โดยใช้ image software (Image Pro Plus) หาพื้นที่เฉพาะ capillary network ที่มีเส้นผ่าศูนย์กลางน้อยกว่า 15 µm เท่านั้น ดังแสดงในรูปที่ 2 แล้วค่านำไปประเมินผล

$$\% \text{ capillary vascularity (CV)} = \frac{\text{Area of capillaries} \times 100}{\text{Total area of frame}}$$



รูปที่ 2 แสดงการศึกษาหลอดเลือดที่เกิดขึ้นใหม่ที่บริเวณแผล

ผลการทดลองในการวัด % CV ดังแสดงในตาราง

14-Day group	% CV
CF14D (n=5)	43.67±3.50
DMF14D (n=3)	31.19±4.76
DMFA14D (n=3)	40.14±1.89

สรุปและวิเคราะห์ผล

หลังเกิดแผล 14 วัน กลุ่มหนูเบาหวานที่ได้รับ Aloe (DMFA14D) อัตราการหายของแผล (% wound closure) และ angiogenesis มีแนวโน้มสูงกว่ากลุ่มหนูเบาหวานที่ไม่ได้รับการรักษา (DMF14D)

การดำเนินงานในช่วงต่อไปสำหรับปีงบประมาณ 2557

หลังจากทำการเหนี่ยวนำหนูกลุ่มควบคุมและกลุ่มเบาหวาน จะทำการทำการสลบหนูทดลองด้วย sodium pentobarbital 45 mg/kg body weight ทางช่องท้อง ทำการ swab ด้วย alcohol และตัดชั้นผิวหนังบริเวณด้านข้างทั้งซ้ายและด้านขวาจากแนวหลังของหนูทดลองและทำให้เกิดบาดแผลชนิด full-thickness excisional wound ด้วยการใช้กรรไกรตัดผิวหนังบริเวณด้านหลังให้มีขนาด 0.6 x 0.6 cm^2 แล้วแบ่งกลุ่มออกเป็นดังนี้

1. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ fibrin gel เป็นเวลา 7 วัน
2. กลุ่มควบคุมที่ได้รับ fibrin gel และได้รับ Aloe vera ในขนาด 400 mg/kg body weight วันละ 1 ครั้ง เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน
3. กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel เป็นเวลา 7 วัน และ 14 วัน (เพิ่มจำนวน)
4. กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel และได้รับ Aloe vera เป็นเวลา 7 และ 14 วัน (เพิ่มจำนวน)
5. กลุ่มเบาหวานที่ได้รับ fibrin gel และได้รับ EPCs ปริมาณ 1x106 cells ที่บริเวณ wound bed เป็นเวลา 7 และ 14 วัน

เมื่อครบ 7 และ 14 วัน หลังจากทำ wound model จึงเก็บข้อมูลวิเคราะห์ผลต่อไป

อุปสรรคในการดำเนินงาน และแนวทางแก้ไข – ไม่มี

.....

(หัวหน้าโครงการวิจัย)

15 / มี.ค. / 57

เอกสารอ้างอิงของโครงการวิจัย

1. Armstrong DG, Jude EB. (2002). The role of matrix metalloproteinases in wound healing. *J Am Podiatr Med Assoc.* 92: 12–18.
2. Bedi MK, Shenefelt PD. (2002). Herbal therapy in dermatology. *Arch Dermatol.* 1138: 232-42.
3. Can A, Akev N, Ozsoy N, Bolkent S, Arda BP, Yanardag R, Okyar A. (2004). Effect of *Aloe vera* leaf gel and pulp extracts on the liver in type-II diabetic rat models. *Biol Pharm Bull.* 27(5): 694-8.
4. Cheng XW, Kuzuya M, Nakamura K, Maeda K, Tsuzuki M, Kim W, Sasaki T, Liu Z, Inoue N, Kondo T, Jin H, Numaguchi Y, Okumura K, Yokota M, Iguchi A, Murohara T. (2007). Mechanisms underlying the impairment of ischemia-induced neovascularization in matrix metalloproteinase 2-deficient mice. *Circ Res.* 100(6): 904-13.
5. Chew SL, Leslie D. (2006). Clinical endocrinology and diabetes. London: Churchill Livingstone. p. 55-81.
6. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. (1998). Influence of aloe vera on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *J Ethnopharmacol.* 59(3): 195-201.
7. Churdchomjan W, Kheolamai P, Manochantr S, Tapanadechopone P, Tantrawatpan C, U-Pratya Y, Issaragrisil S. (2010). Comparison of endothelial progenitor cell function in type 2 diabetes with good and poor glycemic control. *BMC Endocr Disord.* 10: 5.
8. Dorneles D, Wouk AF, Pontarolo R, Oliveira AB. (2003). Efeito de *Aloe vera* Linné sobre a cicatrização de feridas de pele em coelhos. Visão. *Acad.* 4(1): 39-46.
9. Duansak D, Somboonwong J, Patumraj S. (2003). Effects of Aloe vera on leukocyte adhesion and TNF-alpha and IL-6 levels in burn wounded rats. *Clinical Hemorheology and Microcirculation*, IOS Press. 29: 239-46.
10. Eshghi F, Hosseinimehr SJ, Rahmani N, Khademloo M, Norozi MS, Hojati O. (2010). Effects of *Aloe vera* cream on posthemorrhoidectomy pain and wound healing: results of a randomized, blind, placebo-control study. *J Altern Complement Med.* 16(6): 647-50.

11. Fadini GP, Agostini C, Avogaro A. (2005). Endothelial Progenitor Cells and Vascular Biology in Diabetes Mellitus: Current Knowledge and Future Perspectives. *Curr Diabetes Rev.* 1: 41-58.
12. Ghannam N, Kingston M, Al-Meshaal IA, Tariq M, Parman NS, Woodhouse N. (1986). The antidiabetic activity of aloes: preliminary clinical and experimental observations. *Horm Res.* 24(4): 288-94.
13. Goldin A, Beckman JA, Schmidt AM, Creager MA. (2006). Advanced glycation end products sparking the development of diabetic vascular injury. *Circulation.* 114: 597-605.
14. Habeeb F, Shakir E, Bradbury F, Cameron P, Taravati MR, Drummond AJ, Gray AI, Ferro VA. (2007). Screening methods used to determine the antimicrobial properties of *Aloe vera* inner gel. *Methods.* 42: 315-20.
15. Hamman J. (2008). Composition and applications of *Aloe vera* leaf gel. *Molecules.* 13: 1599–1616.
16. Hosseinimehr SJ, Khorasani G, Azadbakht M, Zamani P, Ghasemi M, Ahmadi A. (2010). Effect of aloe cream versus silver sulfadiazine for healing burn wounds in rats. *Acta Dermatovenerol Croat.* 18(1): 2-7.
17. Jakus V, Bauerova K, Michalkova D, Carsky J. (2001). Serum levels of advanced glycation end products in poorly metabolically controlled children with diabetes mellitus: relation to HbA1c. *Diabetes Nutr Metab.* 14: 207-11.
18. Kähäri VM, Saarialho-Kere U. (1997). Matrix metalloproteinases in skin. *Exp Dermatol.* 6(5): 199-213.
19. Kahn CR, Weir GC, King GL, Jacobson AM, Moses AC, Smith RJ. (2005). Joslin's Diabetes Mellitus. 14 th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. p. 331-40.
20. Khorasani G, Hosseinimehr SJ, Azadbakht M, Zamani A, Mahdavi MR. (2009). Aloe versus silver sulfadiazine creams for second-degree burns: a randomized controlled study. *Surg Today.* 39(7): 587-91.
21. Kim KL, Han DK, Park K, Song SH, Kim JY, Kim JM, Ki HY, Yie SW, Roh CR, Jeon ES, Kim DK, Suh W. (2009). Enhanced dermal wound neovascularization by targeted delivery of endothelial progenitor cells using an RGD-g-PLLA scaffold. *Biomaterials.* 30(22): 3742-8.

22. Klein AD, Penneys N. (1988). *Aloe vera. J Am Acad Dermatol.* 18: 714-20.

23. Kränkel N, Adams V, Linke A, Gielen S, Erbs S, Lenk K, Schuler G, Hambrecht R. (2005). Hyperglycemia reduces survival and impairs function of circulating blood-derived progenitor cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 25(4): 698-703.

24. Kung EF, Wang F, Schechner JS. (2008). In vivo perfusion of human skin substitutes with microvessels formed by adult circulating endothelial progenitor cells. *Dermatol Surg.* 34(2): 137-46.

25. Liu XH, Xia H, Zhou XT, Luo W, Zhou JG, Dong L. (2009). Effects of aloe gel on doxorubicin-induced extravasation injury in rats. *Ai Zheng.* 28(4): 356-60.

26. Lobmann R, Schultz G, Lehnert H. (2005). Proteases and the diabetic foot syndrome: mechanisms and therapeutic implications. *Diabetes Care.* 28: 461-71.

27. Loomans CJ, de Koning EJ, Staal FJ, Rookmaaker MB, Verseyden C, de Boer HC, Verhaar MC, Braam B, Rabelink TJ, van Zonneveld AJ. (2004). Endothelial progenitor cell dysfunction: a novel concept in the pathogenesis of vascular complications of type 1 diabetes. *Diabetes.* 53(1): 195-9.

28. Lv RL, Wu BY, Chen XD, Jiang Q. (2006). The effects of aloe extract on nitric oxide and endothelin levels in deep-partial thickness burn wound tissue in rat. *Zhonghua Shao Shang Za Zhi.* 22(5): 362-5.

29. Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY. (2008). Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med.* 25(4): 419-26.

30. Rajasekaran S, Sivagnanam K, Subramanian S. (2005). Antioxidant effect of *Aloe vera* gel extract in streptozotocin-induced diabetes in rats. *Pharmacological Reports.* 57: 90-6.

31. Ravanti L, Kahari VM. (2000). Matrix metalloproteinases in wound repair (Review). *Int J Mol Med.* 6: 391-407.

32. Reimann M, Bonifacio E, Solimena M, Schwarz PEH, Ludwig B, Hanefeld M, Bornstein SR. (2009). An update on preventive and regenerative therapies in diabetes mellitus. *Pharmacol Therapeut.* 121: 317–31.

33. Shao H, Tan Y, Eton D, Yang Z, Uberti MG, Li S, Schulick A, Yu H. (2008). Statin and stromal cell-derived factor-1 additively promote angiogenesis by enhancement of progenitor cells incorporation into new vessels. *Stem Cells*. 26(5): 1376-84.
34. Shelton RM. (1991). *Aloe vera*: Its chemical and therapeutic properties. *Int J Dermatol*. 30: 679-83.
35. Sivan-Loukianova E, Awad OA, Stepanovic V, Bickenbach J, Schatteman GC. (2003). CD34+ blood cells accelerate vascularization and healing of diabetic mouse skin wounds. *J Vasc Res*. 40: 368-77.
36. Sottile J. (2004). Regulation of angiogenesis by extracellular matrix. *Biochim Biophys Acta*. 1654(1): 13-22.
37. Tepper OM, Galiano RD, Capla JM, Kalka C, Gagne PJ, Jacobowitz GR, Levine JP, Gurtner GC. (2002). Human endothelial progenitor cells from type II diabetics exhibit impaired proliferation, adhesion, and incorporation into vascular structures. *Circulation*. 106(22): 2781-6.
38. Urbich C, Dimmeler S. (2004). Endothelial progenitor cells: characterization and role in vascular biology. *Circ Res*. 95(4): 343-53.
39. Woessner JF Jr. (1994). The family of matrix metalloproteinases. *Ann N Y Acad Sci*. 732: 11-21.
40. Wu Y, Chen L, Scott PG, Tredget EE. (2007). Mesenchymal stem cells enhance wound healing through differentiation and angiogenesis. *Stem Cells*. 25: 2648-59.
41. Wu Y, Dai J, Schmuckler NG, Bakdash N, Yoder MC, Overall CM, Colman RW. (2010). Cleaved high molecular weight kininogen inhibits tube formation of endothelial progenitor cells via suppression of matrix metalloproteinase 2. *J Thromb Haemost*. 8(1): 185-93.
42. Yamaguchi I, Mega N, Sanada H. (1993). Components of the gel of Aloe vera (L.) burm. f. *Biosci Biotechnol Biochem*. 57(8): 1350-2.
43. Yoysungnoen P, Wirachwong P, Bhattarakosol P, Niimi H, Patumraj S. (2005). Antiangiogenic activity of curcumin in hepatocellular carcinoma in hepatocellular carcinoma cells implanted nude mice. *Clin Hemorheol Microcirc*. 33: 127-35.

44. Zammaretti P, Zisch AH. (2005). Adult 'endothelial progenitor cells' Renewing vasculature. *Int J Biochem Cell Biol.* 37: 493–503.

Zhou B, Cao XC, Fang ZH, Zheng CL, Han ZB, Ren H, Poon MC, Han ZC. (2007). Prevention of diabetic microangiopathy by prophylactic transplant of mobilized peripheral blood mononuclear cells. *Acta Pharmacol Sin.* 28(1): 89-97.

เอกสารแนบท้ายสัญญา ๖

สัญญาเลขที่ GRB_BSS_๕๗_๕๖_๓๐_๑๓

โครงการวิจัย เรื่อง โครงการวิจัยกลไกการออกฤทธิ์ของว่านหางจระเข้ต่อปัจจัยชีวภาพที่สำคัญต่อการเกิดหลอดเลือดใหม่ของแผล: เอ็นโดธีเลียลโปรเจนนิเตอร์และแมทริกเมตตัลโลโปรติเนส

สรุปรายงานการเงิน (งบดำเนินการ) งวดที่ ..2.....

.....

ชื่อหัวหน้าโครงการ รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงจุไรพร สมบุญวงค์

เงินงวดที่....2... ได้รับเป็นจำนวน.....143,500....บาท (.....หนึ่งแสนสี่หมื่นสามพันห้าร้อยบาทถ้วน.....)

มีการใช้จ่ายแล้วดังนี้

หมวดค่าใช้สอย

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
1	ใบสำคัญรับเงิน	08/01/2557	ค่าผู้ช่วยวิจัย จำนวน 8 เดือน เดือนละ 3,000 บาท	24,000.00	

หมวดค่าวัสดุ

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
1	82401/2556	23/05/2556	Glucostrip and syringe	1,700.00	
2	96037/2556	01/07/2556	Normal saline and tegaderm	350.00	
3	65546/655491	09/07/2556	Fibrin gel	8,418.00	
4	125/2557	14/10/2556	Nude mice	9,300.00	
5	126/2557	14/10/2556	Nude mice	6,300.00	
6	127/2557	14/10/2556	Nude mice	6,300.00	

ลำดับที่	เลขที่ใบเสร็จ ใบสำคัญรับเงิน	วัน/เดือน/ปี	รายการ	จำนวนเงิน	หมายเหตุ
7	128/2557	14/10/2556	Nude mice	5,100.00	
8	129/2557	14/10/2556	Nude mice	3,000.00	
9	130/2557	14/10/2556	Nude mice	1,200.00	
10	3181/2557	09/10/2556	Glucostrip and syringe	1,400.00	
11	033/1631	16/10/2556	Insulin syringe	1,337.50	
12	561110	24/10/2556	FITC	15,408.00	
13	69230/6922969	28/10/2556	Fibrin gel	8,861.00	
14	933/46617	30/10/2556	Streptozotocin	4,280.00	
15	933/46622	14/11/2556	Streptozotocin	4,280.00	
16	1051/2557	08/01/2557	Nude mice	6,300.00	
17	46431/2557	06/02/2557	Glucostrip and syringe	1,400.00	
18	1458/2557	24/02/2557	Nude mice	6,300.00	
19	1459/2557	24/02/2557	Nude mice	6,300.00	
20	1460/2557	24/02/2557	Nude mice	6,300.00	
21	1461/2557	24/02/2557	Nude mice	6,300.00	
22	1462/2557	24/02/2557	Nude mice	6,300.00	