การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภาตามคู่มือแนะนำขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา

นางสาวนฎา สุระประสิทธิ์

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต
สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์
คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFICACY STUDY OF PORE SKIN® ARTIFICIAL DERMIS IN ANIMAL WOUND MODEL ACCORDING TO US-FDA : GUIDANCE FOR INDUSTRY CHRONIC CUTANEOUS ULCER AND BURN WOUNDS – DEVELOPING PRODUCTS FOR TREATMENT

Miss Nada Suraprasit

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements

for the Degree of Master of Science Program in Medical Science

Faculty of Medicine

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

หัวข้อวิทยานิพนธ์ การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภาตามคู่มือแนะนำขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา

โดย นางสาวนฎา สุระประสิทธิ์

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ

คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อนุมัติให้นับวิทยานิพนธ์ฉบับนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญามหาบัณฑิต

.....คณบดีคณะแพทยศาสตร์

(ศาสตราจารย์นายแพทย์ อดิศร ภัทราดูลย์)

คณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์

.....ประธานกรรมการ

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวิไล ชินธเนศ)

.....อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์นายแพทย์ถนอม บรรณประเสริฐ)

.....กรรมการ

(อาจารย์นายสัตวแพทย์สิริพงศ์ เกียรติกิตติคุณ)

.....กรรมการ

(รองศาสตราจารย์แพทย์หญิงวรนุช ธนากิจ)

.....กรรมการภายนอกมหาวิทยาลัย

(รองศาสตราจารย์นายแพทย์พรพรหม เมืองแมน)

นฎา สุระประสิทธิ์: การศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภาตามคู่มือแนะนำขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา
(EFFICACY STUDY OF PORE SKIN® ARTIFICIAL DERMIS IN ANIMAL WOUND MODEL ACCORDING TO US-FDA : GUIDANCE FOR INDUSTRY CHRONIC CUTANEOUS ULCER AND BURN WOUNDS – DEVELOPING PRODUCTS FOR TREATMENT) อ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก : ผศ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ, 142 หน้า.

ศึกษาก่อนการทดสอบทางคลินิกถึงประสิทธิภาพของผิวหนังสังเคราะห์ (พอร์สกิน) ที่ทำจากสารสกัดผิวหนังมนุษย์ในการรักษาแผล โดยมีจุดประสงค์เพื่อนำผิวหนังสังเคราะห์ไปใช้ในแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ทางคลินิก การศึกษาในครั้งนี้เลือกใช้หนูตะเภาเพศเมีย อายุ 6 เดือน จำนวน 16 ตัว ตามคู่มือแนะนำขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา ผ่าตัดเปิดชั้นผิวหนังที่มีความลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง รูปสี่เหลี่ยมจัตุรัส ขนาด 1.5X1.5 เซนติเมตรบริเวณแนวกลางหลังของหนูตะเภา จำนวน 2 แผล ทำการรักษาบาดแผล โดยแบ่งเป็น 2 กลุ่ม คือ บาดแผลที่รักษาด้วย 1% โพวิโดนไอโอดีน (แผลเปิดควบคุม) และผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกิน จากนั้นที่ 3 สัปดาห์ทำการประเมินประสิทธิภาพการยับยั้งการหดรั้งของแผลและการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของผิวหนังสังเคราะห์ โดยใช้ลักษณะทางมหพยาธิวิทยาของบาดแผล การวัดขนาดแผลและการศึกษาทางเนื้อเยื่อ โดยการย้อมสีฮีมาทอกซิลีนและอีโอซิน รวมทั้งการย้อมสีแมสสันไตรโครม ผลการศึกษาพบว่าหนูตะเภาจำนวน 8 ตัว ที่ยังคงมีพอร์สกินติดอยู่บนบาดแผลมีการสร้างคอลลาเจนใหม่ทั้งหมดซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามหนูอีก 8 ตัว ที่ไม่พบพอร์สกินติดอยู่บนบาดแผล ณ เวลาที่จะทำการประเมินพบว่าเกิดการหดรั้งของบาดแผลและไม่พบการสร้างคอลลาเจนคล้ายกับแผลเปิดควบคุม ลักษณะการหายของบาดแผลกลุ่มที่รักษาด้วยพอร์สกินมีการหดตัวน้อยกว่าแผลเปิดควบคุม 41.51 เปอร์เซ็นต์ นัยสำคัญทางสถิติ $P<0.0001$ จากผลการศึกษาเสนอแนะว่าผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกินมีประโยชน์ช่วยส่งเสริมการหายของบาดแผลเปิดบนผิวหนังด้วยการทำให้แผลมีคุณภาพดีขึ้น และในอนาคตอาจจะสามารถใช้รักษาบาดแผลเปิดที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ในมนุษย์ได้

สาขาวิชา วิทยาศาสตร์การแพทย์ ลายมือชื่อนิสิต .....
ปีการศึกษา 2551 ลายมือชื่ออ.ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก .....

507 47856 30 : MAJOR MEDICAL SCIENCE
KEYWORDS : ARTIFICIAL DERMIS / SKIN TISSUE ENGINEERING / WOUND HEALING / ANIMAL MODEL

NADA SURAPRASIT : EFFICACY STUDY OF PORE SKIN® ARTIFICIAL DERMIS IN ANIMAL WOUND MODEL ACCORDING TO US-FDA :GUIDANCE FOR INDUSTRY CHRONIC CUTANEOUS ULCER AND BURN WOUNDS – DEVELOPING PRODUCTS FOR TREATMENT. ADVISOR : ASST.PROF. TANOM BUNAPRASERT, M.D., 142 pp.

This preclinical study investigated wound healing efficacy of Artificial dermis (Pore Skin®) extracted from human dermis, that aim to use clinically in full-thickness excisional wounds. Animal model selected in this study was 6-mount-old female Guinea pig (n = 16) according to the guidance for industry; chronic cutaneous ulcer and burn wound - developing products for treatment of US Food and Drug Administration (US-FDA). Two rectangular 1.5x1.5 cm. full-thickness skin defect with excision carried down to the panniculus carnosus were created on both side of ventral midline of a rodent. The treatments were divided into two groups: 1) wound treated with 1% povidone iodine (control wound) and 2) wound treated with Pore Skin®- artificial dermis. Three weeks after implantation, end point efficacy of wound healing including inhibition of wound contraction and formation of new collagen in the porous cavity of scaffold were evaluated by gross pathology, wound size measured and histological stained by H&E staining and Masson Trichrome staining. The results demonstrated that extracellular matrix of new collagen was regenerated in wounds treated with Pore Skin® which was found in all eight guinea pigs (100%) in which Pore Skin® remained attaching to the wound surface. Unfortunately, another 8 treated rats lost the Pore Skin® before the evaluation time due to the difficulty of animal's wound care after implantation. Then, wound healing of latter lost Pore Skin® rodents were similar to the healing of the control wounds which showed contracted wounds and lack of new collagen formation. Contraction study confirmed that the wounds treated with Pore Skin® contracted 41.51% less than the control wounds (P-value < 0.0001). This finding suggested that Pore Skin® would be beneficial for promoting wound healing with improved quality and could be satisfactory when used for the treatment of full-thickness open wound in further clinical study.

Field of Study : Medical Science ..... Student's Signature .....

Academic Year : 2008 ..... Advisor's Signature .....

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงไปได้ดี โดยได้รับความช่วยเหลือจากหลายๆท่าน ซึ่งผู้วิจัยขอขอบพระคุณ ผศ.นพ.ถนอม บรรณประเสริฐ อาจารย์ที่ปรึกษา, อ.นสพ. สิริพงส์ เกียรติกิตติคุณ , รศ.นพ.อภิชัย อังสพัทธ์ และ รศ.นพ. พรพรหม เมืองแมน เป็นอย่างสูงสำหรับการให้คำปรึกษาต่องานวิจัย การออกแบบและวางแผนการวิจัย การตรวจสอบแก้ไขวิทยานิพนธ์ และแนวทางในการดำเนินการวิจัยอย่างถูกต้อง

ขอขอบคุณ รศ.พญ.วรนุช ธนากิจ และบุคลากร ภาควิชาพยาธิวิทยา คณะแพทยศาสตร์ ในการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อที่ได้

ขอขอบพระคุณรองศาสตราจารย์เภสัชกรหญิง สุมนา ขมวิลัย ที่ให้ความอนุเคราะห์ในด้านสถานที่สำหรับการเลี้ยงสัตว์ทดลอง ณ สถานเสาวภา สภากาชาดไทย

ขอขอบคุณ บริษัท อี ฟอร์ แอล อินเตอร์เนชั่นแนล จำกัด (OLYMPUS) ที่อนุเคราะห์กล้องกล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Light Microscope) สำหรับการถ่ายสไลด์ชิ้นเนื้อ

ขอขอบคุณ ทุนสนับสนุนงานวิจัยจากบัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.)

ขอบคุณมากๆ สำหรับ พี่ๆ เพื่อนๆ น้องๆ ห้องปฏิบัติการเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะสังเคราะห์ ตึก อปร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ได้ให้กำลังใจ คำแนะนำ และความช่วยเหลือ จนงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สุดท้ายนี้ ผู้วิจัย กราบขอบพระคุณ คุณพ่อ คุณแม่ และทุกคนในครอบครัวที่เป็นกำลังใจและให้การสนับสนุนตลอดมา จนกระทั่งงานวิจัยสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

หน้า

บทคัดย่อภาษาไทย…… ง

บทคัดย่อภาษาอังกฤษ..... จ

กิตติกรรมประกาศ..... ฉ

สารบัญ..... ช

สารบัญตาราง…… ญ

สารบัญภาพ…….. ฏ

บทที่

1. บทนำ…… 1

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา……..... 1

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย…… 7

1.3 ขอบเขตของการวิจัย…… 7

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย…….. 8

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ……... 8

2. เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง…… 9

2.1 แนวคิดและทฤษฎี…… 9

2.1.1 ผิวหนังมนุษย์…… 9

2.1.2 บาดแผล…… 18

2.1.3 การปลูกถ่ายผิวหนัง…….. 28

2.1.4 ผิวหนังสังเคราะห์…….. 29

2.1.5 ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกิน…….. 33

2.1.6 คู่มือแนะนำของการประเมินวัสดุปิดแผลขององค์การอาหารและยาของ

สหรัฐอเมริกา…… 41

2.1.7 การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อม……... 45

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง……... 47

3. อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย…….. 52

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย……... 52

3.2 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัย…… 53

บทที่ หน้า
3.3 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินการวิจัย..... 56
3.3.1 ขั้นตอนการผ่าตัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ในสัตว์ทดลอง..... 56
3.3.2 ขั้นตอนการดูแลสัตว์ทดลองก่อนการเก็บผลการทดลองที่สัปดาห์ที่ 3..... 59
3.3.3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการประเมินทางพยาธิวิทยา..... 59
3.3.4 การรวบรวมข้อมูล..... 60
3.3.5 เกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพของ Pore skin ® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภา..... 60
3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล..... 61
3.3.7 สถานที่ทำการวิจัย..... 65
4. ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง..... 66
4.1 กลุ่มหนูตะเภาที่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว..... 67
4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)..... 67
4.1.2 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)..... 71
4.1.3 ผลการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin®ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)..... 89
4.2 กลุ่มหนูตะเภาที่ไม่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว..... 106
4.2.1 ตัวอย่างผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของแผลทดสอบ(Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)..... 106
4.2.2 ตัวอย่างผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของแผลทดสอบที่ไม่พบ(Pore Skin®) ในหนูตะเภา..... 110
5. อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย..... 112
5.1 สรุปผลการวิจัย..... 112
5.2 อภิปรายผลการวิจัย..... 114
รายการอ้างอิง..... 115

ภาคผนวก..... 120
บทที่ หน้า
ภาคผนวก ก 121
ภาคผนวก ข 126
ภาคผนวก ค 127
ภาคผนวก ง 132
ภาคผนวก จ..... 140
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์..... 142

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
2.1	แสดงค่ามาตรฐานทั่วไปของคุณสมบัติทางด้านฟิสิกส์และชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®	39
4.1	แสดงหมายเลขของสัตว์ทดลอง ขนาดแผลเริ่มต้น (A_o) และขนาดแผลในสัปดาห์ที่ 3 (A_t)ทั้งแผลทดสอบ (Pore Skin®) และแผลควบคุม และเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) และแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3	72

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1.1	แผลน้ำร้อนลวก 95% ของร่างกาย.....	1
1.2	แผลไฟไหม้ความลึกระดับ 3.....	2
1.3	ผู้พิการจากแผลเป็นหดรั้งที่เกิดจากไฟลวก.....	2
1.4	แผลไฟลวกระดับที่ 3 ที่มือ.....	4
1.5	การรักษาด้วยผิวหนังสังเคราะห์ Integra®.....	4
1.6	ภายหลังรักษาด้วยผิวหนังสังเคราะห์ยี่ห้อ Integra® เป็นระยะเวลา 1 ปี นิ้วมือสามารถใช้งานได้ปกติ.....	4
2.1	ส่วนประกอบและโครงสร้างของผิวหนัง.....	10
2.2	แสดงลักษณะของผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนา.....	12
2.3	แสดงลักษณะของผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าบาง.....	13
2.4	แสดงคีราติโนไซต์ (Keratinocytes) เมลาโนไซต์ (Melanocytes) เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cells) และเซลล์เมอร์เคลส์ (Merkel	14
2.5	cells).....	15
	แสดงชั้นต่างๆของเยื่อรองรับที่อยู่ระหว่างชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้.....	
2.6	แสดงชั้นต่างๆของชั้นหนังแท้.....	17
2.7	บาดแผลดีกรีที่ 1 (First degree burn).....	18
2.8	บาดแผลดีกรีที่ 2 (Second degree burn).....	19
2.9	บาดแผลดีกรีที่ 3 (Third degree burn).....	20
2.10	การหายของบาดแผลระยะที่ 1 Provision matrix (Blood clot) วันที่ 0-3.....	22
2.11	การหายของบาดแผลระยะที่ 2 Formation of hyaluronic-based matrix (Granulation tissue) วันที่ 3-7.....	23
2.12	การเกิดโพลีเมอไรเซชั่นของคอลลาเจน (Polymerization of collagen) ในการหายของแผลระยะที่ 3 : Formation of collagen matrix (Permanent matrix) วันที่ 7-14.....	24
2.13	การหายของบาดแผลระยะที่ 4 : Degradation and apoptosis (Remodeling) วันที่ 14-สัปดาห์ที่ 6.....	25
2.14	แสดงผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Integra *(Integra Life Science Corporation, USA)*.....	32

ภาพที่ หน้า

2.15 แสดงกระบวนการเตรียมผิวหนังชั้นหนังแท้สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® 34

2.16 แสดงกระบวนการเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้..... 35

2.17 แสดงลักษณะสารละลายที่ได้จากกระบวนการเตรียมสารสกัดจากผิวหนังภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2นาที..... 36

2.18 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin®..... 37

2.19 แสดงลักษณะทั่วไปของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®..... 38

3.1 แสดงแผนดำเนินการวิจัย..... 52

3.2 หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley..... 53

3.3 แสดงขั้นตอนการผ่าตัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ในสัตว์ทดลอง..... 58

3.4 แสดงทิศทางการตัดชิ้นเนื้อบริเวณกึ่งกลางแบบตัดตามขวาง (cross section) ก่อนการนำไปย้อมด้วยวิธีทางพยาธิวิทยา..... 60

3.5 แสดงการวัดขนาดของแผลลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส..... 61

3.6 แสดงการตั้งค่าการวัดของแผล (Set Scale) ของแผล..... 62

3.7 แสดงการตั้งค่าการวัด (Set Scale) ของแผลเริ่มต้นของแผลควบคุม (A0) มีค่าเท่ากับ 1.6 เซนติเมตร..... 62

3.8 แสดงการวาดขอบเขตของแผล (Wound Boundary)..... 63

3.9 แสดงการคำนวณขนาดของแผลที่มีพื้นที่ (Wound Area) ขนาด 1.907 ตารางเซนติเมตร..... 63

4.1 แสดงภาพถ่ายลักษณะภายนอกทั่วไปของแผลทดสอบในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) เปรียบเทียบกับแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด..... 70

4.2 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การหดรั้งของแผลระหว่างแผลทดสอบที่ปิดทับด้วยผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์Pore Skin®กับ แผลควบคุม ในสัปดาห์ที่3 (n=8, ***P = 0.0001, Unpaired t-test)..... 71

4.3 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 1..... 73

ภาพที่		หน้า
4.4	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 2.....	74
4.5	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 3.....	75
4.6	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 4	76
4.7	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 5	77
4.8	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 6.....	78
4.9	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 7	79
4.10	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลทดสอบ ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 8	80
4.11	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 1.....	81
4.12	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 2.....	82
4.13	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 3.....	83
4.14	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 4.....	84
4.15	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 5.....	85
4.16	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 6.....	86
4.17	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 7.....	87
4.18	แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของ	

ภาพที่ หน้า

ลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 8..... 88
4.19 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 1..... 90
4.20 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 1..... 91
4.21 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 2..... 92
4.22 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 2..... 93
4.23 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 3..... 94
4.24 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 3..... 95
4.25 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 4..... 96
4.26 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 4..... 97
4.27 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 5..... 98
4.28 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 5..... 99
4.29 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 6..... 100
4.30 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 6..... 101
4.31 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 7..... 102
4.32 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 7..... 103
4.33 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 8..... 104
4.34 แสดงการเกิดคอลลาเจนในสัปดาห์ที่ 3 ของหนูตะเภาหมายเลข 8..... 105
4.35 แสดงภาพถ่ายลักษณะภายนอกทั่วไปของแผลทดสอบในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่ ไม่พบ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) เปรียบเทียบกับแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด..... 108

ภาพที่	แสดงตัวอย่างแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ไม่พบ	หน้า
4.36	Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 15.....	111
4.37	ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่ไม่พบ Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 15.....	111
	อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง.....	123
1ก	ผลลักษณะภายนอกทั่วไปผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ระยะเวลา 0, 1, 2,	
1ง	3, 4 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ.....	133
2ง	แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยา (Pathology) ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4และ 12 ที่กำลังขยาย x200.....	135
3ง	ลักษณะภายนอกระหว่างการประสบความสำเร็จในการเชื่อมติดกับแผล (ซ้าย) และกลายเป็นเนื้อเยื่อใหม่กับความล้มเหลวที่กลายเป็นหนอง ภายหลังการปิดแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์ (ขวา).....	137
4ง	ลักษณะรูพรุนของ Pore Skin® ที่ยังไม่เกิดการสร้างเนื้อเยื่อจากการย้อม H&E (ซ้าย) และการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (ขวา)...	137
5ง	แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่สำเร็จ(ซ้าย)กับการสร้างเนื้อเยื่อที่ล้มเหลวภายหลังการปิดแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์(ขวา).....	138
6ง	แสดงการเปรียบเทียบการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ระหว่างการทดสอบแบบการรักษาแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ด้วย Pore Skin® (ซ้าย) กับการฝัง Pore Skin® ใต้ชั้นผิวหนัง(ขวา)ที่สัปดาห์ที่ 3 ที่ให้ผลคล้ายกัน.....	138
7ง	การเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® (ซ้าย) กับ Integra® ที่บริเวณแผล(ขวา) ในสัปดาห์ที่ 3 ที่มีลักษณะคล้ายกัน....	139
8ง	การเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนแบบอิสระ (ซ้าย) กับเนื้อเยื่อคอลลาเจนแบบขนานที่พบในแผลเป็น (Scar).....	139

บทที่ 1

บทนำ

1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

บาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกในประเทศไทย เป็นอุบัติเหตุที่พบได้ บ่อยทั้งในเด็กและผู้ใหญ่ ถ้าเป็นเพียงเล็กน้อยและอาการไม่สาหัสมากนักสามารถรักษาให้หายขาดได้โดยการผ่าตัดและนำผิวหนังบริเวณอื่นมาทดแทนบริเวณบาดแผล ซึ่งจะหายได้ภายใน 2-3 สัปดาห์ แต่ถ้าเป็นมากคือแผลบริเวณกว้างและบาดแผลที่ลึกทะลุชั้นหนังแท้ มักจะมีภาวะแทรกซ้อน ทำให้ทุพพลภาพหรือเสียชีวิตได้ โดยสาเหตุมักเกิดจากความประมาทเลินเล่อ รู้เท่าไม่ถึงการณ์หรือเกิดจากอุบัติเหตุต่างๆ โดยสิ่งที่ทำให้เกิดบาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก ที่พบบ่อยได้แก่ สัมผัสกระแสไฟฟ้า รังสีและอุณหภูมิ (W85 - W99) การสัมผัสควัน ไฟ และเปลวไฟ (X00 - X09) และการสัมผัสความร้อนของร้อน (X10 - X19) ตั้งแต่ ปี พ.ศ. 2543-2550 มีจำนวนผู้ป่วยต่อปีอยู่ในช่วง 39,764 - 45,907 ราย และมีผู้เสียชีวิตในช่วง 629 – 809 รายต่อปี เนื่องจากการบาดเจ็บจากความร้อนเป็นสาเหตุที่อาจทำให้เกิดความพิการเรื้อรังตลอดชีวิต ดังนั้นเมื่อพิจารณาจำนวนผู้ป่วยสะสมตั้งแต่ พ.ศ. 2543-2550 (26 ธค. 50) จะมีจำนวนผู้ป่วยสะสมที่ได้รับผลกระทบมากถึง 346,834 ราย และมีจำนวนผู้เสียชีวิตสะสมมากถึง 5,404 ราย **[1]** นับเป็นความสูญเสียของประเทศที่ไม่อาจประเมินมูลค่าความเสียหาย เนื่องจากผลกระทบที่เกิดขึ้นทำให้บุคคลากรของประเทศต้องสูญเสียคุณภาพชีวิต และพิการไปตลอดชีวิต(แสดงดังรูปที่ 1.1, 1.2 และ 1.3) และส่งผลกระทบต่อครอบครัวของผู้ป่วยอย่างไม่อาจเลี่ยงได้ ดังนั้นวิธีการรักษาบาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวกด้วยเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง (Skin Tissue Engineering) หรือที่เรียกว่าผิวหนังสังเคราะห์ (Artificial Skin) จึงมีบทบาทสำคัญในการทดแทนผิวหนังที่สูญหายไป

รูปที่ 1.1 แผลน้ำร้อนลวก 95%ของร่างกาย (อนุเคราะห์ภาพจาก รศ.นพ. พรพรหมเมืองแมน โรงพยาบาลศิริราช)

รูปที่ 1.2 แผลไฟไหม้ความลึกระดับ 3
(อนุเคราะห์ภาพจาก รศ.นพ.พรพรหม เมืองแมน โรงพยาบาลศิริราช)

รูปที่ 1.3 ผู้พิการจากแผลเป็นหดรั้งที่เกิดจากไฟลวก
(อนุเคราะห์ภาพจาก รศ.นพ.พรพรหม เมืองแมน โรงพยาบาลศิริราช)

เทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อเป็นเทคโนโลยีเกิดใหม่ในวงการแพทย์ประมาณ30ปีได้ก่อให้เกิดวัสดุปิดแผล (Wound Dressing materials) ชนิดใหม่ที่เรียกว่า วัสดุปิดแผลชนิดออกฤทธิ์ (Interactive wound dressing หรือ Semi-occlusive dressing) ที่มีสมบัติทำปฏิกิริยากับแผลโดยตรง ปกป้องแผลจากภายนอกและเปลี่ยนแปลงสิ่งแวดล้อมภายในแผลส่งผลให้การหายของแผลเร็วขึ้น เช่นให้ความชุ่มชื้นพอเหมาะ ให้ความอบอุ่นพอให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (Fibroblast cell) ทำงานได้ดี บางชนิดมีสารกระตุ้นการเจริญเติบโต (Growth factor) มีเซลล์ที่มีชีวิตผสมอยู่ มีสารโปรตีนที่สนับสนุนการเคลื่อนที่ของเซลล์ เป็นต้น วัสดุปิดแผลแต่ละชนิดมีกลไกการทำงานที่แตกต่างกันจึงเหมาะสำหรับบาดแผลเฉพาะบางชนิดเท่านั้น เช่น วัสดุปิดแผลที่มีเซลล์เป็นองค์ประกอบมักใช้ในการรักษาแผลเรื้อรังเพื่อให้แผลหายเร็วขึ้น โดยอาศัยสารโปรตีนกระตุ้นการเจริญเติบโตต่างๆที่หลั่งจากเซลล์ที่ฝังไว้ในวัสดุปิดแผลกระตุ้นการทำงานของเซลล์ที่อยู่ในแผลของผู้ป่วย เป็นต้น [2,3] แม้ว่าจะมีผลิตภัณฑ์วิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังจำนวนมากกลุ่ม แต่วัสดุปิดแผลชนิดที่มีเซลล์ (Matrices containing living skin-derived cells) มีราคาสูง การขนส่งและเก็บรักษายุ่งยากจึงไม่ได้รับความนิยม ส่งผลให้กลุ่มวัสดุปิดแผลกลุ่มที่ไม่มีเซลล์เป็นองค์ประกอบ (Acellular matrices for dermal substitution) ที่มีชื่อว่า Integra® (Integra Life Science Corporation, USA) ได้รับการยอมรับจากวงการแพทย์อย่างกว้างขวางในสถาบันหลายแห่งของสหรัฐอเมริกา กลไกการรักษาบาดแผลของวัสดุชนิดนี้แตกต่างกับวัสดุปิดแผลชนิดอื่นโดยสิ้นเชิง วัสดุปิดแผลชนิดนี้ไม่ช่วยให้แผลหายเร็วขึ้น ไม่ช่วยให้แผลปิดเร็วขึ้น ในทางตรงกันข้ามการปิดแผลด้วยวัสดุชนิดนี้ทำให้แผลหายช้าขึ้น แผลไม่ปิด เมื่อวัสดุปิดแผลชนิดนี้ออกฤทธิ์ที่ 2-3 สัปดาห์ มีความจำเป็นต้องนำผิวหนังบริเวณอื่นมาปิดทับ เพื่อให้แผลหาย แต่สิ่งที่ทำให้วัสดุปิดแผลชนิดนี้มีความแตกต่างคือการเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแผล แผลที่หายด้วยการรักษาตามขั้นตอนของวัสดุปิดแผลชนิดนี้จะมีความอ่อนนุ่ม ไม่หดรั้ง ผู้ป่วยสามารถใช้อวัยวะได้ปกติ ไม่พิการ ซึ่งแสดงดังรูปที่ 1.4, 1.5 และ 1.6 โดยการรักษาแผลดังกล่าวมิได้มุ่งเน้นให้แผลหายเร็วแต่มุ่งเน้นให้การรักษาเพื่อเปลี่ยนแปลงคุณภาพของแผลหายให้เหมือนผิวหนังปกติเพื่อป้องกันความพิการของแผลที่เกิดขึ้น [4]

รูปที่ 1.4 แผลไฟลวกระดับ 3 ที่มือ (รูปขวา) และ รูปที่ 1.5 ทำการรักษาด้วยผิวหนังสังเคราะห์ Integra®
เมื่อครบ3 สัปดาห์จึงทำการลอกแผ่นซิลิโคนออก (รูปซ้าย)

รูปที่ 1.6 ภายหลังรักษาด้วยผิวหนังสังเคราะห์ยี่ห้อ Integra® เป็นระยะเวลา 1 ปี นิ้วมือสามารถใช้งานได้ปกติ
(อนุเคราะห์ภาพ 4, 5 และ6 จาก รศ.นพ.พรพรหม เมืองแมน โรงพยาบาลศิริราช)

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Integra® ต้องนำเข้าจากต่างประเทศเพียงอย่างเดียว ส่งผลให้มีราคาสูงมาก โดยผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Integra®ขนาดหนึ่งฝ่ามือมีราคาสูงถึง 40,000-50,000 บาท (19.46 ดอลลาร์ต่อตารางเซนติเมตร) **[5]**

ดังนั้นสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ (วช.) จึงต้องการพัฒนานวัตกรรมนี้ให้สามารถผลิตขึ้นใช้เองในประเทศได้ เพื่อลดการนำเข้าผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์และสามารถ

ช่วยลดอัตราการพิการหรือเสียชีวิตจากแผลเป็นหดรั้งในอุบัติเหตุไฟไหม้น้ำร้อนลวกและบาดแผลต่างๆได้ จึงมอบทุนสนับสนุนวิจัยวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนังในประเทศไทย แก่หัวหน้าโครงการวิจัยสหสาขาวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง(Multidisciplinary Study of Skin Tissue Engineering) เพื่อทำการวิจัยและผลิตผิวหนังสังเคราะห์ขึ้นเองภายในประเทศ

ขณะนี้งานวิจัยดังกล่าวประสบผลสำเร็จในระดับห้องปฏิบัติการ โดยทีมวิจัยได้พัฒนาการผลิตผิวหนังสังเคราะห์ต้นแบบขึ้นจนมีคุณภาพเหมือนกับผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์จากต่างประเทศที่พร้อมใช้งานได้จริงและเรียกผิวหนังสังเคราะห์ที่พัฒนาขึ้นนี้ว่า Pore Skin® (Pore Skin® - Artificial Dermis) ซึ่งทำมาจากคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังมนุษย์ มีคุณสมบัติเป็น เนื้อเยื่อสังเคราะห์ของชั้นหนังแท้ของผิวหนังด้านบน ปิดทับด้วยแผ่นซิลิโคนทางการแพทย์เป็นผลิตภัณฑ์ปิดแผลปราศจากเซลล์ สามารถทำปฏิกิริยากับแผลโดยเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจน ที่มีการเรียงตัวอย่างอิสระ ซึ่งมีคุณสมบัติคล้ายกับหนังแท้ ทั้งมีประสิทธิภาพในการป้องกันความพิการและความทุกข์ทรมานเรื้อรังจากแผลเป็นหดรั้งที่เกิดจากแผลไฟไหม้ โดยกระบวนการวิจัยผิวหนังสังเคราะห์ดังกล่าวอ้างอิงตามมาตรฐานขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA) เพื่อให้งานวิจัยมีความสมบูรณ์และมีทิศทางที่สามารถนำไปใช้งานได้อย่างชัดเจน โดยเฉพาะการศึกษา Pore Skin® ก่อนการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วยที่เรียกว่า Preclinical study ที่มีวัตถุประสงค์เพื่อพิสูจน์ความปลอดภัยและประสิทธิภาพของวัสดุปิดแผลชนิดทำปฏิกิริยากับแผลตามมาตรฐานอ้างอิงสากล ISO 10993 และ US-FDA Guidance for Industry : Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wounds - Developing Products for Treatment ตามลำดับ ก่อนนำผลิตภัณฑ์ไปทดสอบในมนุษย์ต่อไป

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา Pore Skin® ก่อนการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วย (Pore Skin® Preclinical Study) ที่มิได้มุ่งเน้นเป้าหมายเพียงเพื่อรายงานผลการวิจัยแบบพื้นฐานที่ทำกันทั่วไป หากแต่ต้องการศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ตามแนวทางที่หน่วยงานควบคุมคือองค์การอาหารและยา (อย.) ต้องการเป็นสำคัญแต่เนื่องจากขณะนี้องค์การอาหารและยา (อย.) ของประเทศไทยยังมิได้กำหนดแนวทางการศึกษาเพื่อขอการรับรองวัสดุปิดแผลชนิดออกฤทธิ์ (Interactive wound dressing) ดังนั้นผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของ Pore Skin® ในสัตว์ทดลองตามคู่มือแนะนำของการประเมินวัสดุปิดแผลขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA Guidance for Industry : Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wounds - Developing Products for Treatment)**[6]** ร่วมกับข้อมูลจากแหล่งอื่นๆเป็นครั้งแรกของประเทศไทย คู่มือแนะนำดังกล่าวมีความสำคัญ

เพราะเป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ต้องการพัฒนายา ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและอุปกรณ์การรักษาแผลเรื้อรังและแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก เช่น ผลิตภัณฑ์รักษาแผล โดยแบ่งคำแนะนำออกเป็นสองส่วน

<u>ส่วนที่1</u> คำแนะนำกล่าวถึงข้อพิจารณาการศึกษาเบื้องต้นก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ไปทดลองในระดับคลินิก

โดยในส่วนนี้ประกอบด้วยข้อพิจารณายาและผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพให้จำเพาะสำหรับลักษณะของแผล (รวมทั้งการหายของแผลและการรักษาแผล)

กล่าวถึงแนวทางการเลือกใช้สัตว์ทดลอง (Animal Wound Model) ว่าควรเลือกใช้สัตว์ทดลองให้มีความเหมาะสมที่สุดตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ เช่น สามารถนำมาใช้ได้ง่าย (Availability) สามารถใช้เพื่อตอบคำถามทางวิทยาศาสตร์ที่ต้องการได้ สามารถแสดงการตอบสนองทางชีวภาพเพื่อทดสอบผลิตภัณฑ์ แม้ว่าสัตว์ทดลองจะสามารถช่วยพิสูจน์แนวคิดเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์บางชนิด แต่โดยทั่วไปก็ไม่เพียงพอสำหรับการพิสูจน์ประสิทธิภาพในระดับคลินิก

งานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้หนูตะเภาในการศึกษาเนื่องจากข้อดี คือ มีช่วงชีวิตสั้น สามารถนำมาใช้ได้ง่าย ราคาถูก มีขนาดเล็ก เลี้ยงง่าย ง่ายต่อการจับด้วยมือ สามารถใช้ปริมาณมากได้เพื่อความแม่นยำทางสถิติ **[7]** นอกจากนี้ มักถูกใช้เป็นตัวเลือกในการทดสอบสภาวะของแผลโดยเฉพาะในกรณีการสร้าง*แผลที่สูญเสียบางส่วนของชั้นหนังแท้* (Partial-thickness wound) และ*แผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้* (Full-thickness wound)

<u>ส่วนที่2</u> คำแนะนำกล่าวถึงข้อพิจารณาในการออกแบบการศึกษาทางคลินิกรวมถึงเกณฑ์การคัดเลือก (endpoint) โดยทั่วไปผลลัพธ์ทางคลินิกที่สัมพันธ์กับการใช้ผลิตภัณฑ์รักษาแผลสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือเพื่อทำให้การหายของแผลดีขึ้น (Improved wound healing) และเพื่อทำให้การรักษาแผลดีขึ้น (Improved wound care) โดยแต่ละกลุ่มก็จะมีเกณฑ์การคัดเลือกที่หลากหลายในการทดลองระดับคลินิก เมื่อสามารถคัดเลือกเกณฑ์การคัดเลือกจากคำแนะนำในส่วนนี้เพื่อที่จะทดสอบได้แล้ว จึงทำการค้นคว้าผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการ เพื่อทำวิธีการทดลองของตนเอง

งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการประเมินประสิทธิภาพของวัสดุทางการแพทย์ที่ถูกพัฒนาขึ้น คือ ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่มีสมบัติทำให้การหายของแผลดีขึ้น โดยไม่ช่วยเร่งหรือสนับสนุนการปิดแผล (Wound closure) แต่จะออกฤทธิ์เฉพาะการช่วยเพิ่มคุณภาพการสมานแผล (Quality of wound healing) หมายถึงการลดแผลเป็นหดรั้งและการทำให้แผลที่หายมีความนุ่มใกล้เคียงผิวหนังปกติในสัตว์ทดลองก่อนการทดลองในระดับคลินิกต่อไป

1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการหายของแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของหนังแท้ (Full thickness wound) ของหนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley ตามคู่มือแนะนำขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา โดยมีวัตถุประสงค์จำเพาะดังนี้

1. ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผล (Wound Contraction Inhibition Study) ของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®
2. ทดสอบประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® เนื้อเยื่อใหม่ (Porous New Collagen Formation Study) ที่สัปดาห์ที่ 3

1.3 ขอบเขตของการวิจัย

ทดสอบและประเมินประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการหายของแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของหนังแท้ (Full thickness wound) ในสัตว์ทดลองตามลำดับดังนี้

1.3.1 การผ่าตัดเปิดแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของหนังแท้ บริเวณลำตัวทั้งสองข้างของสัตว์ทดลอง เย็บติดด้วยผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® บริเวณแผลทดสอบทางด้านซ้ายของลำตัวหนูตะเภา ส่วนแผลด้านขวาคือแผลควบคุมที่เป็นแผลเปิด และปล่อยให้หายเองตามธรรมชาติ

1.3.2 ทดสอบประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผลของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® โดยศึกษาและประเมินจากลักษณะภายนอกของแผล รวมทั้งเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุม

1.3.3 ทดสอบประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® เนื้อเยื่อใหม่ที่สัปดาห์ที่ 3 โดยศึกษาจากลักษณะภายนอกของแผลทดสอบและการวิเคราะห์ชิ้นเนื้อบริเวณแผลทดสอบ (Pore Skin®) ทางพยาธิวิทยา (Pathology)

1.3.3.1 การย้อม Hematoxylin and Eosin (H&E) stain เป็นการประเมินดูเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ(Inflammatory Cells)

1.3.3.2 การย้อม Masson's Trichrome (MT) stain เป็นการประเมินดูการคอลลาเจนใหม่ที่เกิดขึ้นภายในรูพรุนของผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ Pore Skin ®

1.4 คำจำกัดความที่ใช้ในการวิจัย

1.4.1 แผลควบคุม คือแผลที่ผ่าตัดเอาชั้นผิวหนังออกทั้งหมดเหลือชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง (Panniculus Carnosus) เป็นแผลเปิดขนาดประมาณ 1.5 x 1.5 เซนติเมตร ทำแผลด้วยเบตาดีน จนกระทั่งแผลแห้งและปล่อยให้แผลหายตามธรรมชาติ

1.4.2 แผลทดสอบ คือแผลที่ผ่าตัดเอาชั้นผิวหนังออกทั้งหมดเหลือชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง (Panniculus Carnosus) เป็นแผลเปิดขนาดประมาณ 1.5 x 1.5 เซนติเมตร จากนั้นปิดแผลด้วย Pore Skin® เย็บติดกับแผลและเปิดแผลในสัปดาห์ที่3

1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1.5.1 ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่มีประสิทธิภาพในการสร้างคอลลาเจนใหม่ของเนื้อเยื่อผิวหนังแท้ในขั้นการศึกษาวิจัยในสัตว์ทดลอง

1.5.2 ข้อมูลที่ได้จะเป็นแนวทางในการพัฒนาผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® สำหรับผลิตใช้ในทางคลินิกในมนุษย์ระยะที่ 1 ต่อไป

1.5.3 ส่งเสริมคุณภาพชีวิต และยกระดับการรักษาผู้ป่วยแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ด้วยเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ เมื่อมีการผลิตผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ภายในประเทศไทย

บทที่ 2

เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

2.1 แนวคิดและทฤษฎี

2.1.1 ผิวหนังมนุษย์ (Human Skin) [8]

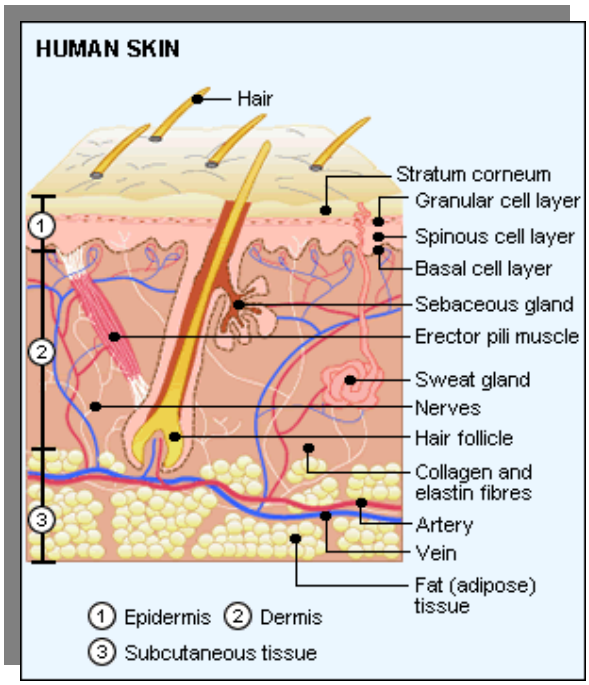
ผิวหนังเป็นอวัยวะที่มีขนาดใหญ่มากที่สุดในร่างกายมนุษย์ ที่ห่อหุ้มร่างกายเอาไว้ ผิวหนังของผู้ใหญ่คนหนึ่งมีพื้นที่ผิว 1.8 ตารางเมตรและคิดเป็น 16 เปอร์เซ็นต์ของน้ำหนักร่างกาย

ผิวหนังมีหน้าที่หลายประการดังนี้

1. ป้องกันและปกปิดอวัยวะภายในไม่ให้ได้รับอันตรายจากสิ่งแวดล้อมภายนอก
2. ป้องกันเชื้อโรคไม่ให้เข้าสู่ร่างกายโดยง่าย
3. ขับของเสียออกจากร่างกาย เช่น น้ำหรือเกลือแร่ ต่างๆ ผ่านทางต่อมเหงื่อ(Sweat glands)
4. ช่วยรักษาอุณหภูมิของร่ายกายให้คงที่ โดยใช้ระบบหลอดเลือดฝอยและการระเหยของเหงื่อ
5. รับความรู้สึกสัมผัสจากสิ่งแวดล้อมภายนอก เช่น การสัมผัส ความรู้สึกเจ็บ แรงกดและอุณหภูมิ เป็นต้น
6. ช่วยสร้างวิตามินดีให้แก่ร่างกาย โดยแสงแดดที่มีรังสีอัลตร้าไวโอเล็ต (UV) จะเปลี่ยนไขมันในผิวหนังให้เป็นวิตามินดี
7. ขับไขมันออกมาหล่อเลี้ยงเส้นผมและขน

ผิวหนังของคนเราแบ่งออกได้เป็นสามชั้น คือ ผิวหนังกำพร้า (Epidermis) ผิวหนังแท้ (Dermis) ที่เชื่อมติดกันด้วยเยื่อรองรับฐาน (Basement membrane) และชั้นใต้ผิวหนัง

(Hypodermis, Subcutis หรือ Subcutaneous fat) แสดงส่วนประกอบและโครงสร้างของผิวหนัง ดังรูปที่ 2.1



รูปที่ 2.1 ส่วนประกอบและโครงสร้างของผิวหนัง **[8]**

2.1.1.1 **ผิวหนังกำพร้าหรือผิวหนังชั้นนอก** (Epidermis) **[9, 10]**

เป็นส่วนที่อยู่ชั้นนอกสุดและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง มีลักษณะบางมาก ประกอบไปด้วยเซลล์ เรียงซ้อนกันเป็นชั้นๆ ประกอบไปด้วยเซลล์ต่างๆ 4 ชนิด ได้แก่ คีราติโนไซต์ (Keratinocytes) เมลาโนไซต์ (Melanocytes) เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cells) และเซลล์เมอร์เคลส์ (Merkel cells) โดยเซลล์ผิวหนังในชั้นหนังกำพร้า จะมีการสร้างขึ้นใหม่ตลอดเวลาจากชั้นลึกที่ติดกับผิวหนังแท้ มีการเคลื่อนตัวสู่ชั้นบน และ ลอกหลุดไปเป็นขี้ไคลใช้เวลาประมาณ 14 วัน

ผิวหนังกำพร้าแบ่งได้เป็น 2 ชนิด คือ ผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนา (Thick Skin) ที่มีความหนาประมาณ 0.8-1.4 มิลลิเมตร ได้แก่ บริเวณฝ่ามือและฝ่าเท้า ไม่มีขนและรูขุมขนแต่มีต่อมเหงื่ออยู่ปริมาณมาก และผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนา (Thin Skin) ที่มีความหนาประมาณ 0.1 มิลลิเมตร ที่พบได้ทั่วร่างกายมีอวัยวะที่มีต้นกำเนิดมาจากผิวหนัง (Skin derivatives หรือ Skin appendages) ทุกชนิด

ส่วนประกอบสำคัญของชั้นหนังกำพร้ามีดังนี้

1. คีราติโนไซต์ *(Keratinocytes):* 90 เปอร์เซ็นของชั้นหนังกำพร้า คือเซลล์ส่วนนี้ เซลล์คีราติโนไซต์มีหน้าที่ผลิตสารเคราติน (Keratin) ขึ้น เพื่อกันน้ำและช่วยปกป้องผิวหนังรวมถึงเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ข้างใต้ไม่ให้แห้งจากการสัมผัสอากาศ เซลล์ชนิดนี้แบ่งออกเป็น 4 ชั้น (สำหรับผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าบาง ช่วงนี้บางประมาณ 0.1 มิลลิเมตร; ดังรูปที่ 2.2) หรือ 5 ชั้น (สำหรับผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนา ช่วงนี้บางประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตร; ดังรูปที่ 2.3) ดังนี้

- *สตราตัม เบซาเล* (*Stratum Basale) หรือเรียกว่า สตราตัม เจอร์มินาติวัม (Stratum Germinativum)* : ชั้นล่างสุดของหนังกำพร้าติดกับชั้นหนังแท้ เป็นเซลล์ต้นกำเนิดที่เรียงต่อกัน (Columnar หรือ Cuboidal cells) เซลล์ในชั้นนี้มีการแบ่งเซลล์เกิดขึ้นเป็นเซลล์ใหม่เพื่อทดแทนเซลล์ที่หลุดลอกไปในชั้นบนๆ ด้านข้างของเซลล์มีการยึดเกาะกับเซลล์ข้างเคียงด้วยเดสโมโซม (Desmosome) ยึดเกาะกับเยื่อรองรับฐานด้วยเฮมิเดสโมโซม (Hemidesmosome) ภายในไซโทพลาสซึมของเซลล์จะพบอินเตอร์มีเดียท เคราติน ฟิลาเมนต์ (Intermediate keratin filaments) ที่มีการเพิ่มขึ้นเมื่อเซลล์ขึ้นไปอยู่บริเวณผิวด้านบน และบางส่วนของเซลล์ต้นกำเนิดที่เหลือจากการแบ่งตัวนี้จะเคลื่อนที่เข้าสู่หนังแท้และกลายเป็นต่อมเหงื่อ ต่อมไขมันและเซลล์รากผม นอกจากนี้เซลล์ชั้นนี้ยังเป็นแหล่งที่มีเซลล์สร้างเม็ดสีผิว (Melanocytes) ทำหน้าที่สร้างเม็ดสีเมลานิน (Melanin), เซลล์เมอร์เคลส์ (Merkel cells) ทำหน้าที่เป็นแผ่นรับสัมผัส และเป็นบริเวณเริ่มต้นของเซลล์มะเร็ง

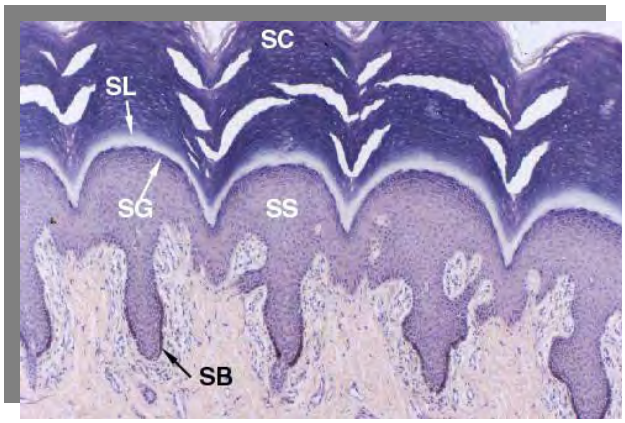
- *สตราตัม สไปโนซัม (Stratum Spinosum)*: ประกอบด้วยเซลล์หลายเหลี่ยม (Polyhedral cells) เรียงตัวหนาประมาณ 4-6 ชั้นซึ่งยึดเกาะกันด้วยเดสโมโซม เซลล์ในชั้นนี้จะมีส่วนที่ยื่นออกมาจากเซลล์เนื่องมาจากกระบวนการเตรียมสไลด์ เพราะส่วนที่เป็นเดสโมโซมยังคงถูกยึดติดกันอยู่กับเซลล์ข้างเคียงโดยกลุ่มของเส้นใยเคราติน (Keratin filaments หรือ Tonofilaments) เซลล์ในชั้นนี้มีความสามารถในการแบ่งตัว

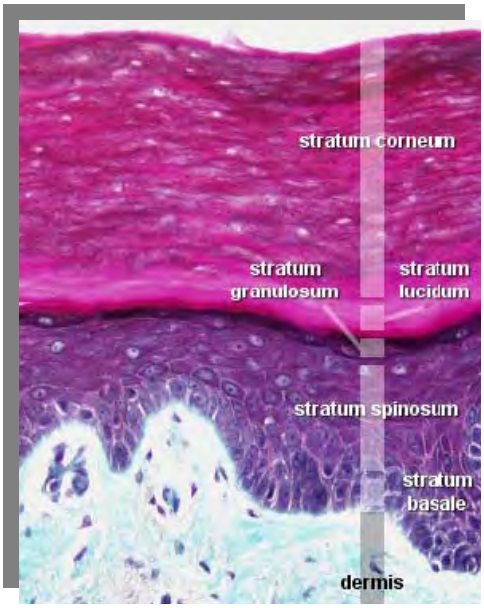
- *สตราตัม แกรนูโลซัม (Stratum Granulosum)*: เซลล์ในชั้นนี้มีลักษณะเป็นเซลล์แบนๆเรียงตัวซ้อนกัน 3-5 ชั้น ภายในไซโทพลาสซึมมีการสะสมแกรนูลที่ติดสีม่วงน้ำเงิน (Basophilic granules) ที่เรียกว่า เคอราโทไฮยาลินแกรนูล (Keratohyalin granules) และมีลาเมลลาแกรนูล (Lamellar granules) ที่สร้างจากชั้นไขมัน ถูกขับออกมาอยู่ในช่องว่างระหว่างเซลล์ (Intercellular spaces) ของชั้นสตราตัม แกรนูโลซัม เพื่อเคลือบผิวหนังป้องกันสารต่างๆที่เข้าสู่ร่างกายทางช่องว่างระหว่างเซลล์

- *สตราตัม ลูซิดัม* (*Stratum Lucidum)*: พบในผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนาเท่านั้น ชั้นนี้มีลักษณะบางๆ แทรกอยู่ชั้นระหว่างชั้นสตราตัม แกรนูโลซัม และสตราตัม คอร์เนียม เซลล์ในชั้นนี้จะไม่มีนิวเคลียส (Nucleus) และ ออร์แกเนลล์ (Organelles) แต่จะมีเส้นใยเคราตินอยู่อย่างหนาแน่นและเป็นเซลล์ที่เสื่อมสภาพแล้ว

- *สตราตัม คอร์เนียม (Stratum Corneum)*: เป็นชั้นที่อยู่บนสุดของผิวหนัง ประกอบด้วยเซลล์ที่ตายไม่มีนิวเคลียส มีลักษณะแบนซ้อนทับกัน 15-30 ชั้น โดยจะหนาที่สุดบริเวณฝ่าเท้าและฝ่ามือ เซลล์ในชั้นนี้จะหลุดลอกกลายเป็นขี้ไคลและจะมีเซลล์ใหม่ๆในชั้นล่างที่อยาถัดไปขึ้นมาแทนที่ หน้าที่ของเซลล์ในชั้นนี้คือ เป็นปราการปกป้องผิวจากแสงแดด ความร้อน เชื้อโรค และสารเคมีต่างๆ

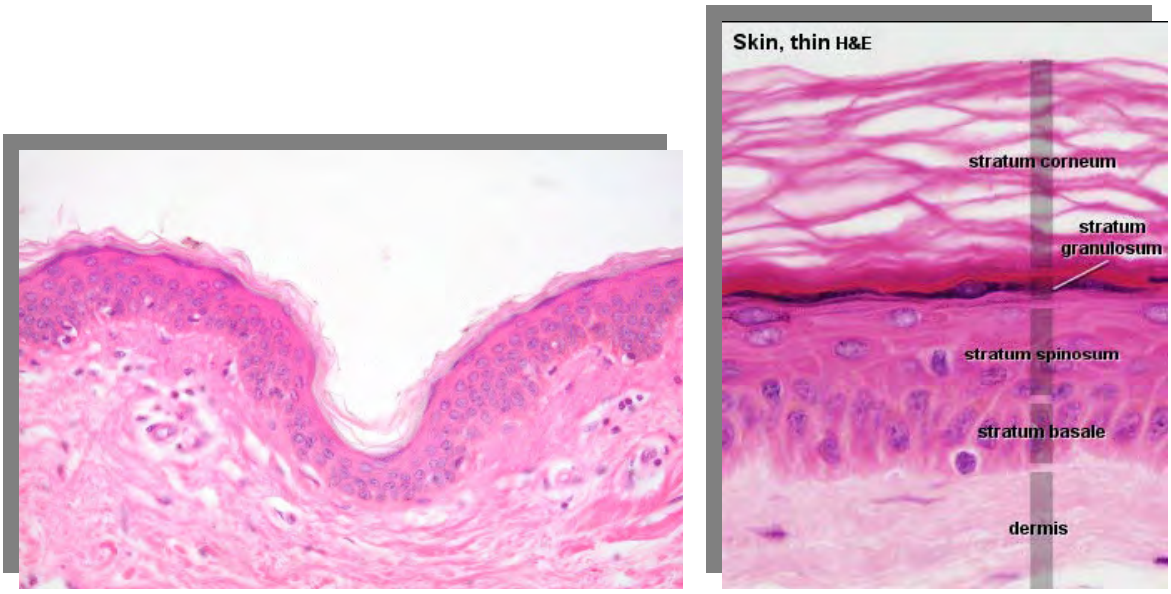
ขบวนการสร้างเคราติน (Keratinization) เกิดขึ้นเมื่อเซลล์ที่แบ่งตัวใหม่ในชั้นเบซาเลค่อยๆ พัฒนาเคลื่อนสู่ผิวบน ในระหว่างที่เซลล์เปลี่ยนชั้นจะมีการสะสมเคราตินอยู่เรื่อยๆ ขณะเดียวกันไซโทพลาสซึม นิวเคลียสและส่วนอื่นๆของเซลล์ก็จะค่อยๆสลายไปจนเซลล์ตายในที่สุด เมื่อเซลล์ตายเคลื่อนสู่ผิวบนเคอราตินจะถูกพัฒนาจนสมบูรณ์ ขบวนการนี้กินเวลาประมาณ 2-4 สัปดาห์





รูปที่ 2.2 แสดงลักษณะของผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าหนา (Thick skin) : SB=stratum basale, SG=stratum granulosum, SP=stratum spinosum, SL=stratum lucidum และ SC=stratum corneum

ที่มา : www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm#INTEGUMENTARY



รูปที่ 2.3 แสดงลักษณะของผิวหนังที่มีชั้นหนังกำพร้าบาง (Thin skin)

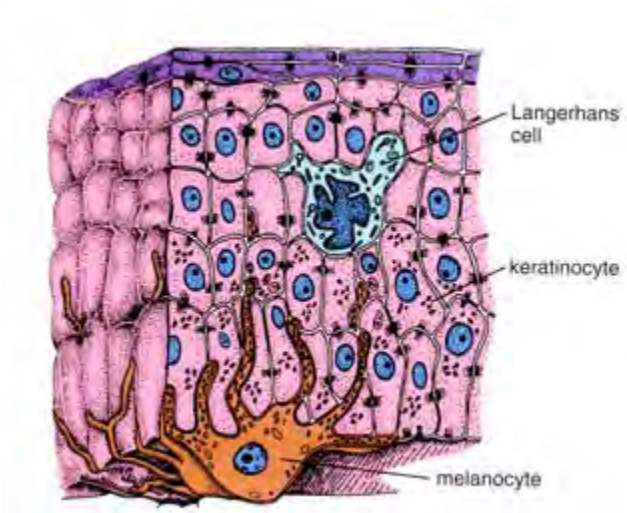
ที่มา : www.lab.anhb.uwa.edu.au/mb140/CorePages/Integumentary/Integum.htm#INTEGUMENTARY

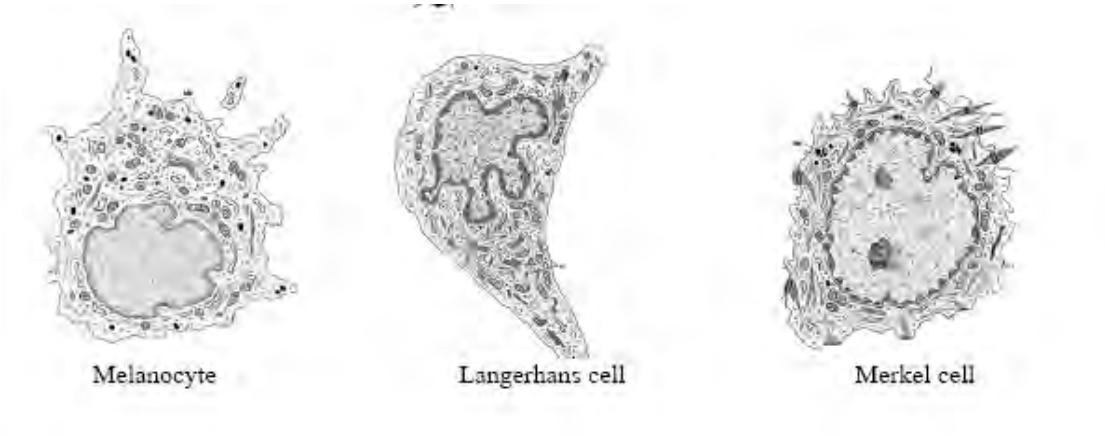
2. *อวัยวะที่มีต้นกำเนิดมาจากผิวหนัง (Skin derivatives หรือ Skin appendages)* คือ อวัยวะที่งอกมาจากเซลล์ชั้นหนังกำพร้าลึกลงไปในชั้นหนังแท้ ประกอบด้วย ต่อมเหงื่อ (Sweat glands), ผมหรือขน (Hair, Hair follicles), ต่อมน้ำมัน(Sebaceous glands) และเล็บ (Nail)

3. *เดนไดร์ติคเซลล์ (Dendritic cells)*: เป็นกลุ่มเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายดาว มีไซโทพลาสซึมยื่นออกมาจากตัวเป็นแขนขา ในชั้นหนังกำพร้าประกอบด้วยเซลล์หลายชนิดดังนี้

- *คีราติโนไซต์*: เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นนอก (Ectoderm) เป็นเซลล์ส่วนใหญ่ของเซลล์ในชั้นหนังกำพร้า ทำหน้าที่สร้างเคราติน และเก็บสะสมไว้ในไซโทพลาสซึม
- *เมลาโนไซต์*: เจริญมาจากกลุ่มของเซลล์ประสาท (Neural crest cells) ทำหน้าที่สร้างเมลานินเป็นเซลล์ที่พบมากเป็นอันดับ 2 รองจาก *คีราติโนไซต์* พบกระจายอยู่ในชั้น*สตราตัม เบซาเล* ชั้นหนังแท้ และในผมหรือขน โดย*เมลาโนไซต์* จะมีส่วนที่เป็นแขนงของไซโตปลาสซึม (Cytoplasmic processes) ยื่นเข้าไปในช่องว่างระหว่างเซลล์ของชั้น*สตราตัม สไปโนซัม* โดยที่เมลานินเป็นตัวทำให้เกิดสีผิว เมื่อถูกแสงแดดจะกระตุ้นให้เมลาโนไซต์ (Melanocytes) สังเคราะห์เมลานินซึ่งมีหน้าที่ป้องกันผิวหนังจากการถูกทำลายของรังสีอัลตร้าไวโอเลต
- เซลล์แลงเกอร์ฮานส์: เจริญมาจากไขกระดูก ส่วนใหญ่พบอยู่ในชั้น*สตราตัม สไปโนซัม* มีหน้าที่เป็นระบบภูมิคุ้มกันของผิวหนัง ถูกทำลายได้ง่ายโดยรังสียูวี

- เซลล์เมอร์เคลส์: พบอยู่ในชั้น*สตราตัม เบซาเล* เฉพาะบางส่วนของร่ายกายที่ไม่มีเส้นขน (Hairless skin) เช่น ปลายนิ้ว ช่องปาก ริมฝีปาก เป็นต้น มีหน้าที่รับความรู้สึกสัมผัส





รูปที่ 2.4 แสดง คีราติโนไซต์ (Keratinocytes) เมลาโนไซต์ (Melanocytes) เซลล์แลงเกอร์ฮานส์ (Langerhans cells) และเซลล์เมอร์เคลส์ (Merkel cells)

ที่มา: www.bioeng.auckland.ac.nz/. ../images_map.php

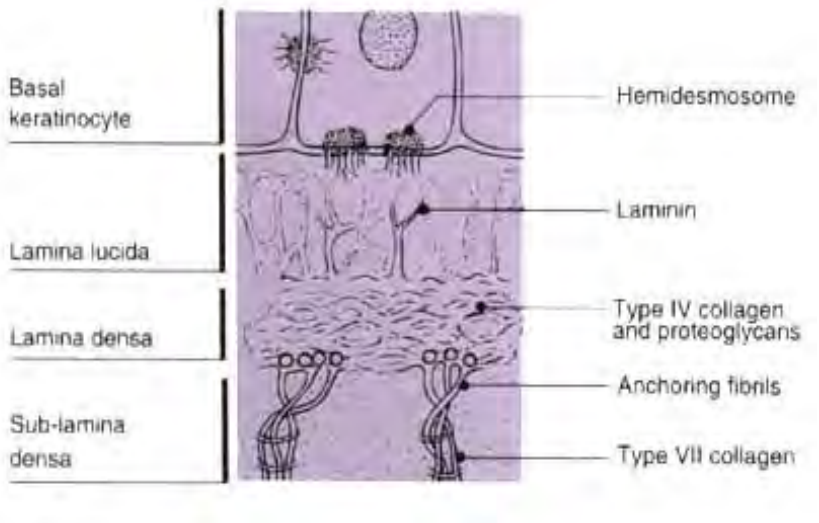
หลักการสำคัญคือ ชั้นหนังกำพร้าเป็นเนื้อเยื่อที่เกิดจากอวัยวะที่สามารถเกิดการงอกกลับได้อย่างสมบูรณ์ (Fully regeneration organ) ปัญหาของการงอกกลับของชั้นหนังกำพร้าทำให้เกิดปัญหาแผลปิดช้า (Delayed wound closure or chronic wound) เช่น แผลเบาหวาน แผลกดทับ เป็นต้น

2.1.1.2 **เยื่อรองรับฐาน** (Basement Membrane) **[11]**

เป็นแผ่นโปรตีนรองพื้นของผิวหนังกำพร้า ทำหน้าที่คล้ายกับกระดาษกาวสองหน้ายึดชั้นหนังกำพร้าให้ติดกับชั้นหนังแท้อย่างเหนียวแน่น โดยเยื่อรองรับฐานยึดติดกับ*สตราตัม เบซาเล* ของหนังกำพร้าด้วยเฮมิเดสโมโซม และฝังติดกับหนังแท้ด้วยเส้นใยชนิดฝังปลาย (Anchoring fibril) และ plaque

การสร้างเยื่อรองรับใหม่ จะสมบูรณ์ก็ต่อเมื่อมีการเชื่อมชั้นหนังกำพร้ากับชั้นหนังแท้อย่างสมบูรณ์ เยื่อรองรับฐานประกอบด้วยสามชั้นคือ

1. *Lamina Lucida:* เป็นชั้นที่มีความหนาประมาณ 20-40 นาโนเมตร อยู่บนสุดติดกับชั้นหนังกำพร้าด้วยเฮมิเดสโมโซม ประกอบด้วยโปรตีนลามินิน (Laminin) เป็นหลัก
2. *Lamina Densa:* เป็นชั้นที่มีความหนาประมาณ 40-50 นาโนเมตร อยู่ชั้นกลาง ประกอบด้วยโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่เจ็ด (Collagen type VII) เป็นหลัก
3. *Reticular Layer:* เป็นชั้นล่างสุด มีลักษณะยื่นเป็นรากเล็กๆ จำนวนมาก ฝังในชั้นหนังแท้ ประกอบด้วยโปรตีนคอลลาเจนชนิดที่เจ็ด ที่ทำหน้าที่เป็นเส้นใยชนิดฝังปลาย เชื่อมติดกับ anchoring plague



รูปที่ 2.5 แสดงชั้นต่าง ๆ ของเยื่อรองรับที่อยู่ระหว่างชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้ **[11]**

2.1.1.3 ผิวหนังแท้หรือผิวหนังชั้นใน (Dermis) **[10]**

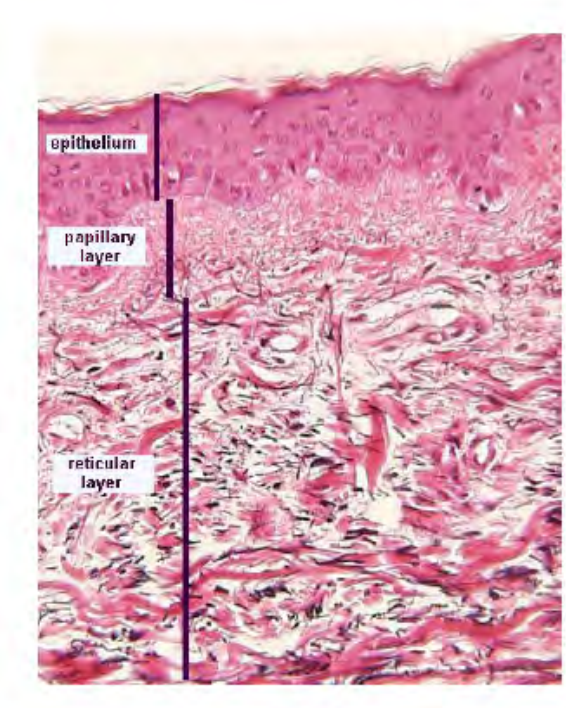
เป็นชั้นของผิวหนังที่อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้า เจริญมาจากเนื้อเยื่อชั้นกลาง (Mesoderm) มีความหนาเฉลี่ยประมาณ 1-2 มิลลิเมตร ตรงบริเวณที่ชั้นหนังกำพร้าต่อกับชั้นหนังแท้จะมีลักษณะเป็นรอยหยักคล้ายรูปคลื่นของชั้นหนังกำพร้าที่ยื่นลงมาในชั้นหนังแท้ที่เรียกว่า “Dermal ridges” เพื่อยึดทั้งสองส่วนให้ติดกันแน่นมากขึ้นและเพิ่มพื้นที่สัมผัส ทำให้เส้นเลือดจากชั้นหนังแท้ส่งผ่านไปเลี้ยงชั้นหนังกำพร้าได้มากขึ้น ผิวหนังแท้ประกอบด้วยไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) ที่ฝังอยู่ในโครงสร้างภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix ; EMC) ที่มีองค์ประกอบหลักคือ เส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 (Collagen Type I) และส่วนน้อยเป็นเส้นใยอีลาสติก (Elastic fibers) อยู่ในสารพื้นฐาน (ground substance GAG) เช่น คอนโดรอิตินโฟร์ซัลเฟต (chondroitin 4-sulfate), decroin, keratin sulfate เป็นต้น โดยจะมีลักษณะละเอียดเรียงตัวกันแบบหลวมๆในชั้นบน ในขณะที่ชั้นล่างจะมีลักษณะหยาบกว่าและรวมตัวกันหนาแน่นกว่าชั้นบน เราสามารถแบ่งผิวหนังแท้ออกได้เป็น 2 ชั้น คือ

1. ชั้นพาพิลารี (Papillary layer) :

เป็นชั้นที่อยู่ติดกับผิวหนังกำพร้า หนาประมาณ 1/5 ของชั้นหนังแท้ทั้งหมด ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รวมตัวกันแบบหลวมๆ และมีเส้นใยอีลาสติคที่มีลักษณะละเอียด ซึ่งมีไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) จำนวนมากที่มีความสามารถในการแบ่งตัวอย่างรวดเร็ว เพื่อประโยชน์ในการซ่อมแซมผิวหนัง ชั้นพาพิลารีจะมีการยกตัวขึ้นไปแทรกเข้าไปในชั้นหนังกำพร้าที่เรียกว่า dermal papilla และมีส่วนที่ยื่นลงมาแทรกอยู่ในชั้นหนังแท้ที่เรียกว่า epidermal ridges

2. ชั้นเรติคิวลาร์ (Reticular layer) :

เป็นชั้นที่หนาอยู่ติดกับชั้นชั้นใต้ชั้นหนังแท้ (Hypodermis) ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รวมตัวกันอย่างหนาแน่น โดยประกอบด้วย คอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (Collagen type I) เป็นส่วนใหญ่ และเส้นใยอีลาสติคที่มีลักษณะหยาบๆเกาะเกี่ยวกันเป็นแห ทิศทางการเรียงตัวของคอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติคจะมีแบบแผนที่แน่นอน นอกจากนี้ช่องว่างในร่างแหเป็นที่บรรจุของเซลล์ไขมัน รูขุมขน เส้นประสาท ต่อมไขมัน และท่อของต่อมเหงื่อ



รูปที่ 2.6 แสดงชั้นต่าง ๆ ของชั้นหนังแท้

ที่มา : www.neuromedia.neurobio.ucla.edu/ campbell/skin/wp.htm

หลักการสำคัญคือ ชั้นหนังแท้เป็นอวัยวะที่ไม่สามารถงอกกลับได้ (Non-regeneration organ) เมื่อสูญเสียชั้นหนังแท้ทั้งชั้นความหนา ผลจากการพยายามสร้างชั้นหนังแท้ขึ้นมาทดแทนชั้นหนังแท้ที่สูญเสียไป จะทำให้เกิดเนื้อเยื่อที่เรียกว่า แผลเป็น (Scar) ซึ่งมีองค์ประกอบคล้ายหนังแท้ แตกต่างกันที่หนังแท้จริงจะมีเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (Collagen type I fiber) เรียงตัวกันแบบตะกร้าสาน (basket weave หรือ reticular pattern) แต่แผลเป็นจะมีคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (Collagen Type I) เรียงตัวกันแบบขนานกับแนวแรงที่ผ่านเนื้อเยื่อนั้น คำว่าแผลเป็นจึงหมายถึง เนื้อเยื่อที่ประกอบด้วย ไฟโบรบลาสต์ (fibroblasts) และโครงสร้างภายนอกเซลล์ (Extracellular matrix ; EMC) ที่มีคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งเรียงตัวกันแบบขนาน ปัญหาการหายของชั้นหนังแท้จะทำให้เกิดแผลเป็นนูน (Hypertrophic scar หรือ keloid)

2.1.1.4 **ชั้นใต้ชั้นหนังแท้** (Hypodermis , Subcutis **หรือ** Subcutaneous fat)

เป็นชั้นที่อยู่ลึกกว่าชั้นหนังแท้ ประกอบด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่รวมตัวกันแบบหลวมๆ มีส่วนของต่อมเหงื่อ คอลลาเจนและเส้นใยอีลาสติคที่ต่อเนื่องลงมาจากชั้นหนังแท้ และเนื้อเยื่อไขมัน (Adipose tissue) จำนวนมาก โดยผมหรือขนที่กำลังเจริญเติบโตจะยื่นลงมาอยู่ในชั้นนี้ด้วย เซลล์ไขมันเป็นองค์ประกอบหลักของชั้นนี้ โดยจะรวมตัวกันเป็นกลุ่มๆ (lobule) ที่มีตัว

แบ่งกั้นที่เรียกว่า Fibrous septa ซึ่งจะมีเส้นเลือด, เส้นประสาท, หลอดน้ำเหลือง (lymphatic vessels) อยู่ภายใน **[12, 13]**

2.1.2 **บาดแผล** (Wounds)

2.1.2.1 **ประเภทของแผลที่เกิดขึ้นกับผิวหนัง** [14]

แผลที่เกิดขึ้นกับผิวหนังแบ่งได้เป็น 3 ประเภทใหญ่ตามความรุนแรงและความลึกของแผล ดังต่อไปนี้

1. *บาดแผลดีกรีที่ 1หรือแผลที่เกิดจากการหลุดลอกของชั้นขี้ไคล(Superficial หรือ First degree burn)* โดยหนังกำพร้าชั้นในยังไม่ถูกทำลาย สามารถเจริญขึ้นแทนที่ส่วนผิวนอกได้จึงมีโอกาสหายได้สนิท และ ไม่มีแผลเป็น ยกเว้นถ้ามีการติดเชื้ออักเสบ สำหรับแผลประเภทนี้ผิวหนังสามารถรักษาตัวเองได้เร็ว เนื่องจากผิวหนังมีการผลัดเซลล์ที่ไม่มีชีวิตแล้วออกมาจากชั้นหนังกำพร้าตลอดเวลา แต่เราอาจใช้การรักษาจากภายนอกร่วมด้วยเช่น การใช้วัสดุปิดแผลชั่วคราว (Temporary wound dressing) ช่วยเร่งให้แผลหายเร็วขึ้นได้ หลักการของวัสดุปิดแผลชั่วคราวคือการสร้างสภาวะที่เหมาะสมสำหรับการหายของแผลโดยการป้องกันการติดเชื้อและการสูญเสียน้ำของแผล

รูปที่ 2.7 บาดแผลดีกรีที่ 1 (First degree burn) [15]

2. *บาดแผลดีกรีที่ 2 หรือแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังกำพร้าตลอดทั้งชั้น และอาจรวมถึงชั้นหนังแท้ที่อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้าบางส่วน* (*Partial thickness หรือ Second degree burn)* สำหรับ*แผลที่สูญเสียบางส่วนของชั้นหนังแท้* ผิวหนังยังสามารถสร้างกลับคืนได้จากผิวหนังส่วนที่

ยังเหลืออยู่ เนื่องจากยังเหลือโครงสร้าง ECM เส้นประสาท และระบบเลือดที่ช่วยในการสร้างผิวหนังที่สูญเสียไปให้กลับคืนมาได้ และเนื่องจากชั้นหนังกำพร้ามีการสร้างเซลล์คีราติโนไซต์ และแบ่งตัวเคลื่อนออกมาด้านนอกตลอดเวลา จึงสามารถเข้ามาแทนที่ชั้นหนังกำพร้าส่วนที่สูญเสียไปได้เร็ว ดังนั้นส่วนสำคัญในการรักษาแผลชั้นหนังกำพร้าคือ เซลล์คีราติโนไซต์ วัสดุปิดแผลที่ช่วยเร่งการหายของแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังกำพร้ามีหลายชนิดซึ่งส่วนใหญ่จะเน้นการใส่เซลล์คีราติโนไซต์เข้าไปเพื่อเร่งการสร้างผิวหนังชั้นหนังกำพร้า

รูปที่ 2.8 บาดแผลดีกรีที่ 2 (Second degree burn) [15]

3. *บาดแผลดีกรีที่ 3หรือแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้* (*Full thickness หรือ Third degree burn)*เช่น แผลเรื้อรังหรือแผลถูกไฟไหม้ ทำให้การรักษาตามธรรมชาติเกิดได้ยาก และช้ากว่าแผล 2 ประเภทแรก เพราะ*แผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้* (Full-thickness wound) จะไม่เหลือโครงสร้าง ECM หรือแม้แต่ระบบเลือดไว้สร้างเนื้อเยื่อใหม่ได้ และเมื่อเกิดการซ่อมแซมหนังแท้ที่เสียไปจะทำให้เกิดเนื้อเยื่อที่เรียกว่า แผลเป็นที่มีลักษณะของแผลเป็นคือจะมีการเชื่อมโยงกันภายในโครงสร้างที่แน่น แต่มีความแข็งแรงเพียงแค่ 70% ของผิวหนังปกติ นอกจากนี้แผลเป็นยังไม่ทำหน้าที่ของผิวหนังได้อย่างสมบูรณ์ และมีรูปร่างไม่สวยงามเหมือนกับผิวหนังปกติ [16] ดังนั้นการรักษาแผลที่มีความลึกถึงชั้นผิวหนังแท้จึงใช้วิธีการปิดทับด้วยผิวหนังบริเวณอื่นของผู้ป่วยเอง (Autologous skin grafting) แต่วิธีดังกล่าวยังมีข้อจำกัดในด้านของปริมาณของพื้นที่ที่ได้รับความเสียหาย หากมีปริมาณมากก็ไม่สามารถใช้ผิวหนังบริเวณอื่นของผู้ป่วยมาทดแทนได้ ปัจจุบันผิวหนังสังเคราะห์จึงถูกพัฒนาเพื่อทดแทนหน้าที่ทั้งหมดของผิวหนังที่

ได้รับความเสียหาย โดยประกอบด้วยผิวหนังสังเคราะห์สำหรับแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังกำพร้า และผิวหนังสังเคราะห์สำหรับแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ **[17]**

รูปที่ 2.9 บาดแผลดีกรีที่ 3 (Third degree burn) **[15]**

2.1.2.2 รูปแบบการหายของบาดแผล (Wound Healing Model) [18]

ลักษณะการหายของแผลแบ่งได้ 3 ลักษณะคือ

1. *การหายของแผลแบบปฐมภูมิ (Primary wound healing)* เป็นการดึงของขอบแผลเพื่อให้ชิดติดกันมากที่สุด เช่น การเย็บแผล

2. *การหายของแผลแบบทุติยภูมิ (Secondary wound healing)* เป็นการปล่อยให้แผลหายเอง โดยไม่มีการช่วยลดขนาดของแผล การหายของแผลลักษณะดังกล่าวเป็นต้นแบบสำหรับการศึกษาการหายของแผล (Wound Healing) โดยเฉพาะแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของหนังแท้ ซึ่งเป็นต้นแบบของการออกแบบผิวหนังสังเคราะห์ชนิดต่างๆ

3. *การหายของแผลแบบปฐมภูมิ (Delay Primary wound healing)* แผลที่มีการดูแลบาดแผลระยะหนึ่ง และต้องมีการเย็บปิดแผล หรือปิดแผลด้วยด้วยผิวหนังบริเวณอื่น

2.1.2.3 การหายของแผลในผู้ใหญ่ (Adult Wound Healing)

การศึกษากระบวนการหายของแผลในผู้ใหญ่ (Adult Wound healing) มีสามกระบวนการสำคัญในการสร้างผิวหนังใหม่และหนึ่งกลไกการหดตัวของแผล ได้แก่

1. *การงอกใหม่ของชั้นหนังกำพร้าและเยื่อรองรับฐาน* (Regeneration of epidermis and basement membrane) การงอกใหม่ของชั้นหนังกำพร้าสามารถเกิดขึ้นได้ โดยอาศัยคีราติโนไซต์เพียงชนิดเดียว กระบวนการสร้างชั้นหนังกำพร้ากลับคืนมา (Re-epithelization) ถูกกระตุ้นจากการฉีกขาดของลามินินในชั้น Lamina lucida ของเยื่อรองรับฐาน (Basement membrane; BM) หลังจากการบาดเจ็บ เซลล์คีราติโนไซต์ในบริเวณใกล้เคียงจะเปลี่ยนเป็นเซลล์ที่สามารถเคลื่อนที่และแบ่งตัว (Migratory phenotype) ที่พร้อมจะเคลื่อนที่ไปปกคลุมตำแหน่งที่ได้รับบาดเจ็บ โดยทั่วไปเซลล์เคลื่อนที่ด้วยความเร็วประมาณ 1 ถึง 2 มิลลิเมตรต่อวัน ไซโตไคน์ (Cytokines) ที่เกี่ยวข้องในกระบวนการนี้มีหลายชนิด เช่น EGF (epidermal growth factor), KGF (Keratinocyte growth factor), IGF (Insulin-like growth factor) เป็นต้น

KGF มี 2 ชนิดคือ KGF-1, KGF-2 ที่ออกฤทธิ์ให้ความหนาของชั้นหนังกำพร้าเพิ่มขึ้น ส่วน EGFกระตุ้นการเคลื่อนตัวเข้ามาของเซลล์คีราติโนไซต์เป็นหลัก จากงานวิจัยในปี 1989 ของ Brown และคณะ **[19]** พบว่าส่วนมากการใช้ EGF กระตุ้นให้แผลไฟไหม้ปิดเร็วขึ้น 1.5 วัน อย่างไรก็ตามงานวิจัยส่วนใหญ่พบว่า EGF ไม่ช่วยทำให้แผลหายเร็วขึ้น

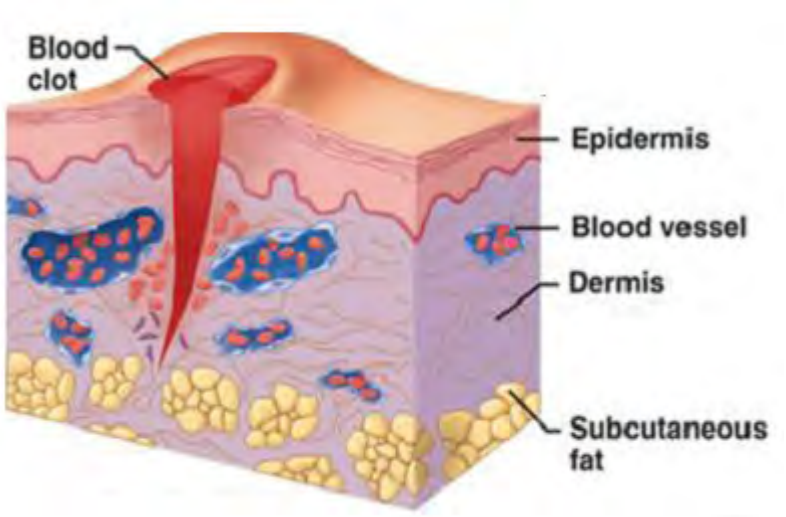
ในปี 1993 Cooper และคณะ **[20]** พบว่าการงอกใหม่ของเยื่อรองรับฐาน (BM) ถูกสร้างโดยเคลื่อนตัวเข้ามาของเซลล์คีราติโนไซต์ โดยเริ่มจากชั้นบนสุดคือ Lamina lucida ที่ประกอบด้วยลามินิน ซึ่งมีสมบัติกระตุ้นการเข้ามาของเซลล์คีราติโนไซต์ จากนั้นจึงสร้าง Lamina densa ที่ประกอบด้วยคอลลาเจนชนิดที่หก (Collagen type IV) และจึงยึดติดกับหนังแท้ด้วยเส้นใยชนิดฝังปลาย (Anchoring fibril)

2. *การหายของบาดแผลชั้นหนังแท้หรือระยะการหายของบาดแผล* (Healing of dermis or phase of wound healing) โดยในปี 2001 Yannas และคณะ **[21]** อธิบายการหายของแผลมีสี่ระยะ โดยแบ่งตามชนิดโครงสร้างภายนอก (ECM หรือ Matrix หรือ Scaffold) ของชั้นหนังแท้ของแต่ละระยะดังนี้

ระยะที่ 1: Provision matrix (Blood clot) วันที่ 0-3

Provision matrix คือ ลิ่มเลือด (Blood clot) ที่ภายในประกอบด้วยไฟบริน (Fibrin) 90 เปอร์เซ็นต์เป็นโครงที่จะจับกับเกร็ดเลือด (Platelet) เพื่อห้ามเลือด โดยเซลล์เกร็ดเลือดจะหลั่งสารกระตุ้นกลุ่มเซลล์ต่างๆที่มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผลในระยะถัดไป และไฟโบรเนคติน (Fibronectin) 10 เปอร์เซ็นต์ซึ่งมีหน้าที่สำคัญคือเป็น ลิแกนด์ยึดเกาะ (Adhesion ligand) ให้เซลล์ยึดเกาะและเคลื่อนตัวเข้าไปในลิ่มเลือด โดยเซลล์ที่เข้าไปในลิ่มเลือดได้เร็วที่สุดคือ มาโคร

ฟาจ (Macrophage) อันดับสองคือ นิวโตรฟิลล์ (Neutrophil)ที่ทำหน้าที่ทำความสะอาดแผลและฆ่าเชื้อโรค ส่วนไฟโบรบลาสต์ที่เข้ามาภายหลังจะเปลี่ยนลิ่มเลือดให้กลายเป็นเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่น (Granulation tissue) และคอลลาเจน เมทริกซ์ (Collagen matrix) ตามลำดับ



รูปที่ 2.10 การหายของบาดแผลระยะที่ 1 Provision matrix (Blood clot) วันที่ 0-3

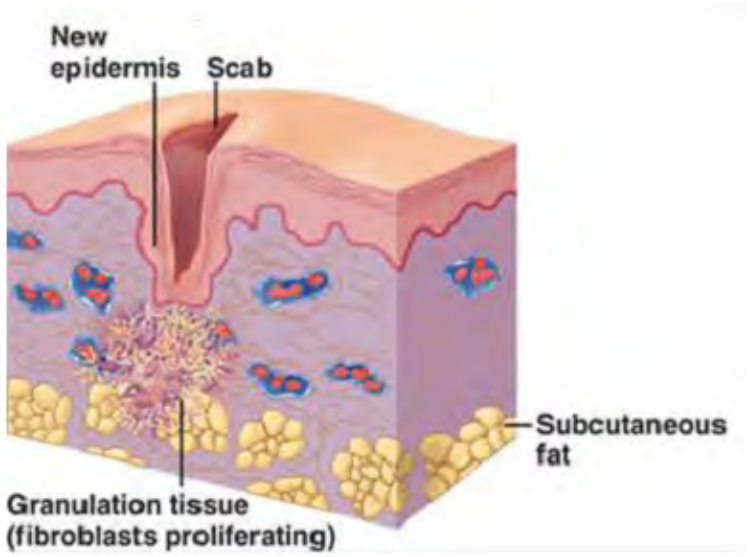
ระยะที่ 2: Formation of hyaluronic-based matrix (Granulation tissue)วันที่ 3-7

เมื่อลิ่มเลือดค่อยๆเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นในวันที่ 3 เมื่อไฟโบรบลาสต์รุ่นแรกเคลื่อนตัวเข้ามาในลิ่มเลือด จะผลิตไฟโบรเนคตินจำนวนมากเพื่อเป็นโครงให้ไฟโบรบลาสต์รุ่นหลังเข้ามาในลิ่มเลือด และทำการสร้างเส้นใยคอลลาเจน (Collagen fibril) เพิ่มขึ้นเรื่อยๆจนสูงสุดในสัปดาห์ที่สอง นอกจากนี้ไฟโบรบลาสต์ยังผลิตไกลโคสะมิโนไกลแคน (Glycosaminoglycan, GAG) ที่ชื่อกรดโฮยาลูรอนิค (Hyaluronic acid) ซึ่งเป็นไฮโดรเจล (Hydrogel) ที่สามารถอุ้มน้ำได้ 1,000 เท่า กรดโฮยาลูรอนิคนี้เป็นคุณลักษณะสำคัญของเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่น เพราะสามารถส่งเสริมการเข้ามาของเซลล์และการแบ่งตัวเพื่อเพิ่มจำนวนของเซลล์อย่างมาก เมื่อมีการเกิดเส้นเลือดใหม่ (Neovascularization) จำนวนมากงอกเข้ามาในลิ่มเลือดประมาณวันที่ 2 ถึง 3 ทำให้เนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นมีสีแดงและเลือดออกง่าย

กรดโฮยาลูรอนิคจะถูกดูดซึมไปหมดวันที่ 7 หลังการสร้างหนังกำพร้ากลับคืนมา (Re-epithelization) จากนั้นเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่น (Granulation tissue) ที่มีลักษณะคล้ายวุ้นจะค่อยๆแข็งขึ้นและขาวขึ้นเรียกว่า เนื้อเยื่อแผลเป็น (Scar tissue) เพราะมีคอลลาเจนเป็นร่างแหโปรตีนหลัก และชนิดของไกลโคสะมิโนไกลแคนที่เปลี่ยนไปจากกรดโฮยาลูรอนิคเป็น คอนโดรอิตินโฟร์

ซัลเฟต (chondroitin 4-sulfate), เดอร์มาแทนซัลเฟต (dermatan sulfate), decrotin ซึ่งทำให้เนื้อแข็งขึ้น ส่งผลให้แผลและขอบแผลแข็งในสัปดาห์แรกๆและค่อยๆนุ่มขึ้น

ระยะเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นเป็นระยะสะสมและผลิตวัตถุดิบของการสร้างเนื้อใหม่ มีเส้นเลือดและเซลล์จำนวนมาก มีการหลั่งเส้นใยคอลลาเจนที่ยังไม่ได้รวมตัวกันเป็นเส้นใยหรือมัด (Bundle) อย่างไรก็ตามพบว่าเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นอาจขัดขวางการหายของแผลได้เพราะผิวบนสุดของเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นอาจมีความหนาแน่นของลิแกนด์ยึดเกาะ (Adhesion ligand) ไม่พอสำหรับการเคลื่อนตัวเข้ามาคลุมเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นของเซลล์คีราติโนไซต์ ทำให้แผลไม่สามารถปิดหรือปิดช้า ดังนั้นการขูดเอาตอนบนของเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นออก จะทำให้พบเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิดแน่นทึบ (Dense collagen fiber) ที่อยู่ด้านล่างมากกว่าและทำให้เซลล์คีราติโนไซต์สามารถเคลื่อนตัวบนคอลลาเจน เพื่อสร้างเป็นชั้นหนังกำพร้าปกคลุมบาดแผล แผลจึงปิด (Wound closure) อย่างสมบูรณ์ อย่างไรก็ตามการปิดของชั้นหนังกำพร้าอย่างสมบูรณ์ไม่ใช่การหยุดกระบวนการเกิดแผลเป็นและการหดรั้งของแผลโดยตรง กลไกทั้งสองยังดำเนินต่อไปภายใต้ชั้นหนังกำพร้า



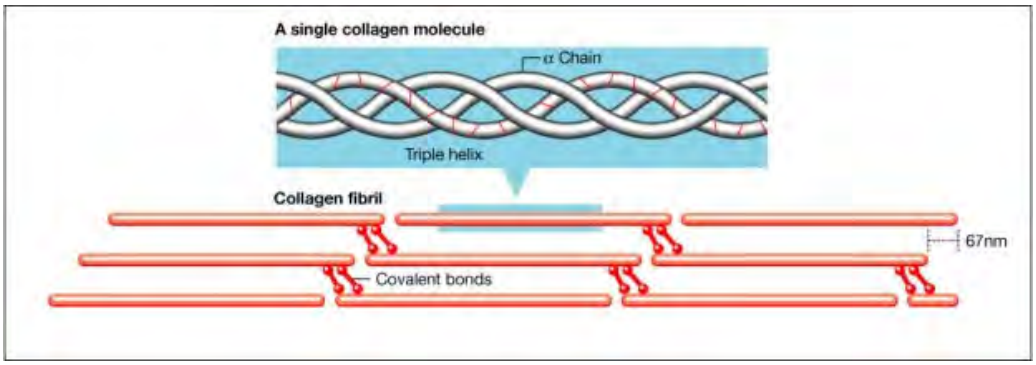
รูปที่ 2.11 การหายของบาดแผลระยะที่ 2: Formation of hyaluronic-based matrix (Granulation tissue) วันที่ 3-7

ระยะที่ 3: Formation of collagen matrix (Permanent matrix) วันที่ 7-14

ไฟโบรบลาสต์ใช้ไฟโบรเนคตินในเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่นเป็นโครงในการเข้ามาของและการสร้างคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งและสาม โดยปกติไฟโบรเนคตินจะสลายภายใน 6 สัปดาห์ การเคลื่อนที่เข้ามาของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ยังไม่มีการพัฒนา (Undifferentiated fibroblast) ในวันที่

2 ถึง 3 ทำให้เกิดการหดรั้งของแผลระยะเริ่มต้น (Early phase of wound contraction) และการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของไฟโบรบลาสต์เป็นไมโอไฟโบรบลาสต์ (Myofibroblast) ที่สามารถหดตัวได้เหมือนกล้ามเนื้อเรียบในวันที่ 5 และทำให้เกิดการหดรั้งของแผลระยะสุดท้าย (Late phase of wound contraction) โดยเฉพาะการเกิดแผลในสัตว์โดยเฉพาะสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมชนิดอื่น เช่น หนู แมว สุนัข แกะ กระต่าย มักจะเกิดการหดรั้งของแผลมากกว่าและเร็วกว่าในมนุษย์ การเกิดการหดตัวของแผลขึ้นอยู่กับขนาดของแผลและความสามารถในการเคลื่อนที่ของผิวหนังบริเวณนั้น

คอลลาเจนหลั่งออกมาจากไฟโบรบลาสต์ใหม่ๆจะเป็นใยเล็กๆเรียกว่า เส้นใยคอลลาเจน (Collagen fibril) ซึ่งสร้างจากโมเลกุลคอลลาเจนจำนวนมาก ใยไฟบรินเล็กๆนี้จะถูกเชื่อมเข้าหากันด้วยโมเลกุลหลายชนิด กลายเป็นใยขนาดใหญ่ขึ้นเรียกว่าเส้นใยคอลลาเจน (Collagen fiber) และถูกเชื่อมกันด้วยโมเลกุลแบบเชื่อมขวาง (Cross-linked molecule) กลายเป็นมัดคอลลาเจน (Collagen bundle) ซึ่งประสานกันมีทิศทางแบบขนาน ทำให้โครงสร้างของเนื้อเยื่อใหม่มีความแข็งแรงทนทานต่อแรงฉีกขาดได้เพิ่มขึ้น ขบวนการเชื่อมใยคอลลาเจนทั้งหมดนี้ถูกเรียกว่า โพลีเมอไรเซชั่นของคอลลาเจน (Polymerization of collagen) ในทางคลินิกเรียกว่าการจัดเรียงตัวของคอลลาเจน (Maturation of collagen)



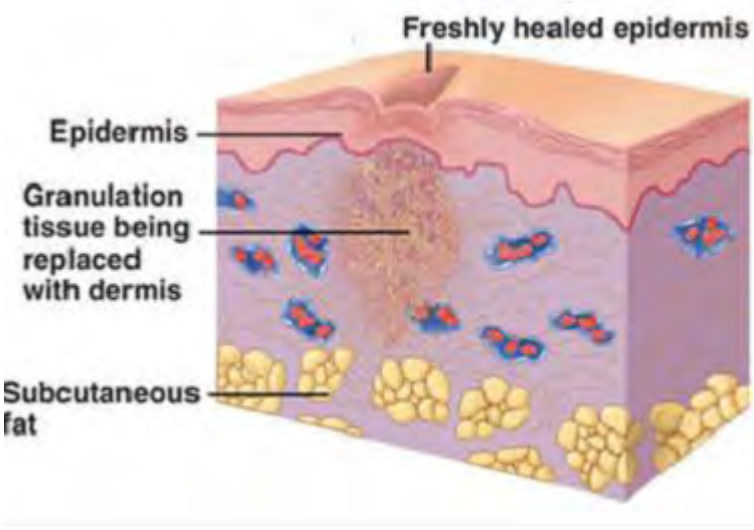
รูปที่ 2.12 การเกิดโพลีเมอไรเซชั่นของคอลลาเจน (Polymerization of collagen) ในการหายของบาดแผลระยะที่ 3: Formation of collagen matrix (Permanent matrix)วันที่ 7-14

ระยะที่ 4: Degradation and apoptosis (Remodeling) วันที่ 14-สัปดาห์ที่ 6

การลดขนาดแผลเป็นเกิดจากการกำจัดทั้งเซลล์และส่วนประกอบของ ECM ออกไปโดยเซลล์เกิดอะพอพโทซิส (Apoptosis) และองค์ประกอบของ ECM ทั้งคอลลาเจนและไกลโคสะมิโนไกลแคนถูกย่อยด้วยเอนไซม์กลุ่มเมททริกเมททอลโลโปรตีนเนส (Matrix metalloproteinase ; MMPs) ซึ่งถูกควบคุมการทำงานอีกชั้นหนึ่ง โดยโปรตีนที่ชื่อว่าการยับยั้งโดยตัวยับยั้งฤทธิ์

(Tissue inhibition of matrix metalloproteinase; TIMPs) และตัวโปรตีนนี้เองที่กำลังได้รับความสนใจศึกษาอย่างมากในปัจจุบัน การวิจัยในปี 1996 ของ Moses MA และคณะ **[22]** พบว่าในหนูที่ไม่มีการยับยั้งโดยตัวยับยั้งฤทธิ์ จะเกิดการหดรั้งของแผลและการหายของแผลช้ากว่าหนูปกติ กระบวนการสลายตัว (Degradation) และ อะพอพโทซิส (Apoptosis) เริ่มเกิดขึ้นตั้งแต่ปลายสัปดาห์แรกและค่อยๆเพิ่มขึ้น ในขณะที่การสร้างเมทริกซ์ใหม่ค่อยๆลดลงจนหลังสัปดาห์ที่สอง จะเกิดการสลายตัวเร็วกว่าการสร้าง แผลจึงเริ่มลดขนาดลงเข้าสู่ระยะที่ 4 และสิ้นสุดเมื่อไฟโบรบลาสต์หยุดทำงานสร้างเนื้อเยื่อถาวร

กระบวนการหายของแผลจะสิ้นสุดด้วยการเกิดเนื้อเยื่อใหม่ที่มีลักษณะมีปริมาณเซลล์น้อย เส้นเลือดน้อย และมีการจัดเรียวตัวของคอลลาเจนในเนื้อเยื่อแบบขนาน ที่มีองค์ประกอบคล้ายหนังแท้แต่ไม่ใช่หนังแท้



รูปที่ 2.13 การหายของบาดแผลระยะที่ 4: Degradation and apoptosis (Remodeling) วันที่ 14-สัปดาห์ที่ 6

3. การสร้างระบบเส้นเลือดใหม่ (Angiogenesis) เป็นกระบวนการที่เกิดร่วมกับกระบวนการหายของแผล โดยระบบเส้นเลือดใหม่เริ่มปรากฏประมาณวันที่ 2-3 และเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วในระยะเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่น จากนั้นจะค่อยๆลดลงในระยะคอลลาเจน เมทริกซ์ (Collagen matrix) โมเลกุลที่สนับสนุนกระบวนการการสร้างเส้นเลือดใหม่โดยช่วยให้เซลล์บุผิว (Endothelial cell) สามารถเคลื่อนเข้ามาบริเวณแผลอย่างรวดเร็วและมีเส้นเลือดใหม่งอกเข้ามาอย่างรวดเร็ว คือ ไฟโบรเนคติน ลามินิน คอลลาเจน ไฟบริโนเจน และไวโทรเนคติน ส่วนโมเลกุลที่ยับยั้งการ

สร้างเส้นเลือดใหม่คือ ทรอมโบสพอนดินวัน (thrombospondin-1), แองจิโอสแตนติน (angiostatin), เอนโดสแตติน (endostatin), แองจิโอโพอิตินทู (angiopoietin-2)

โดยในกระบวนการหายของแผลปกติพบว่า FGF-2 (β-fibroblast growth factor) มีอิทธิพลมากในกระบวนการสร้างระบบเส้นเลือดใหม่ วันที่ 0-3 และ VEGF (Vascular endothelial growth factor) มีอิทธิพลมากในกระบวนการสร้างระบบเส้นเลือดใหม่ วันที่ 4-7 ส่วนในระยะปรับตัว (Remodeling phase) ซึ่งมี ECM ที่เปลี่ยนแปลงไปจากกรดโฮยาลูรอนิคเป็นคอลลาเจน และมีการสร้างสารยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis inhibitory factor) ต่างๆ ร่วมกับอะพอพโทซิสของเซลล์บุผิว ทำให้เส้นเลือดที่เกิดใหม่ค่อยๆหายไปเกือบหมดเหลือเพียงเนื้อแผลที่มีลักษณะหลอดเลือดน้อย

4. กลไกการหดตัวของแผล (Wound Contraction Kinetic)

ระยะของการหดตัวของแผล (Phase of wound contraction) แผลมีการหดตัวหลายระยะจากกลไกหลายแบบดังนี้

4.1 ระยะการหดตัวของแผลเริ่มต้น (Early contraction phase) (วันที่2-3) แผลหดตัวเล็กน้อย เกิดจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ยังไม่มีการพัฒนาเคลื่อนตัวเข้ามาในแผล

4.2 ระยะการหดตัวของแผลคงที่ (Stationary phase) (วันที่3-5) แผลหยุดหดตัวชั่วคราวเพราะเซลล์ไฟโบรบลาสต์กำลังเปลี่ยนแปลงรูปร่างเป็นไมโอไฟโบรบลาสต์

4.3 ระยะการหดตัวของแผลอย่างรวดเร็ว (Rapid contraction phase) (วันที่5-20) แผลหดตัวอย่างรวดเร็วจากไมโอไฟโบรบลาสต์หดตัว

4.4 ระยะการหยุดการหดตัวของแผล (Contraction arrest) เริ่มตั้งแต่วันที่21เป็นต้นไป แผลหยุดหดตัว ทฤษฎีที่อธิบายกลไกการหยุดแผลหดตัว (Stop signal of wound contraction) มี 4 ทฤษฎีคือ

4.4.1 Grip to slip mechanism เกิดจากไฟโบรเนคตินลดจำนวนลงมากและหายไปเกือบหมดในสัปดาห์ที่ 6 ทำให้เซลล์เกาะกับ ECM ที่มีลักษณะหลวมมากขึ้น จึงหดแผลเป็นได้ไม่ดี เพราะไฟโบรเนคตินเป็นไลแกนด์ที่ช่วยยึดเหนี่ยวโครงสร้างภายใน ECM เข้าด้วยกันให้แข็งแรง

4.4.2 Matrix relaxation เกิดจากการทำลายเส้นใยคอลลาเจน ทำให้ร่างแหของเส้นใยคอลลาเจนขาดความต่อเนื่อง เมื่อไมโอไฟโบรบลาสต์หดตัวจึงไม่สามารถรวมแรงหดตัวของทุกเซลล์ให้เป็นแรงเดียวกัน แรงหดตัวจึงน้อยลง

4.4.3 Cell depletion เกิดจากไมโอไฟโบรบลาสต์เกิดอะพอพโทซิสจำนวนมาก (เริ่มตั้งแต่วันที่ 10) จึงไม่มีเซลล์ที่ทำหน้าที่ดึงรั้งแผล

4.4.4 Perilesional skin เกิดจากผิวหนังรอบๆแผลถูกดึงเข้าหาแผลจนยืดเต็มที่ไม่สามารถหดเข้าหาแผลได้อีกต่อไป

การงอกกลับคืนมาของหนังกำพร้าอย่างสมบูรณ์ (Complete reepithelization) ไม่มีผลต่อกลไกการหดตัวของแผล แรงดึงที่วิ่งผ่านเมทริกซ์ของแผลในช่วงแรกก่อนโพลีเมอไรเซชั่นของคอลลาเจน จะมีผลต่อไมโอไฟโบรบลาสต์โดยตรง โดยกระตุ้นให้ไมโอไฟโบรบลาสต์สร้างแผลเป็นเพิ่มขึ้น และรั้ง เพื่อต้านแรงที่ผ่านเมทริกซ์ ป้องกันไม่ให้แผลแยก จนกระทั่งโพลีเมอไรเซชั่นของคอลลาเจนสมบูรณ์ประมาณเดือนที่ 3 ทำให้เนื้อเยื่อแข็งแรงประมาณ 70 เปอร์เซ็นต์ของผิวหนังปกติ แรงที่วิ่งผ่านเมทริกซ์จะถูกทำให้สมดุลโดยโพลีเมอไรเซชั่นของคอลลาเจน (Polymerized parallel collagen bundle network) แรงที่กระทำต่อเซลล์จึงลดลง เซลล์จึงเข้าสู่กระบวนการอะพอพโทซิสและการปรับตัว จนสิ้นสุด

2.1.2.4 **การเหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการงอกใหม่ (Induced Regeneration)**

การหายของแผลในตัวอ่อน (Fetal wound healing) เป็นต้นแบบการศึกษาการหายของแผลที่ไม่เกิดแผลเป็นและไม่มีการหดรั้งของแผล ผิวหนังของทารกในครรภ์ (Fetus) สามารถงอกกลับใหม่ได้โดยสมบูรณ์ และไม่เกิดแผลเป็น เนื่องมาจากลักษณะการหายของแผลในตัวอ่อนที่พบคือ

1. ไม่มีการรวมตัวกันของลิ่มเลือด (Provisional Matrix)
2. เกือบจะไม่มีเซลล์อักเสบ (Inflammation cells) และการอักเสบ (inflammatory response)
3. พบการสลายตัวของเกร็ดเลือดต่ำ หรือมี PDGF น้อยมาก
4. มี TGF-β1ต่ำ ซึ่งเชื่อว่า TGF-β1 เป็นสารสื่อเซลล์ไซโตไคน์ (Cytokine) ตัวสำคัญที่ทำให้เกิดแผลเป็น
5. พบกรดโฮยาลูรอนิคมากและพบที่บริเวณแผลเป็นระยะเวลานานเมื่อเปรียบเทียบกับผู้ใหญ่ จึงคาดว่ากรดโฮยาลูรอนิคอาจเป็นอีกปัจจัยในการเกิดแผลเป็นน้อย

กระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อตามธรรมชาติถูกควบคุมได้ โดยใช้เซลล์ที่มีความสามารถในการงอกใหม่ (Regeneration) จะถูกชักนำเข้ามาเพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่และเซลล์ถูกบังคับให้เคลื่อนที่ไปในทิศทางที่ต้องการ และทำการสร้างเมทริกซ์ตามการออกแบบโครงจำลอง (Scaffold) ที่ทำจากวัสดุโพลีเมอร์ นอกจากนี้ไซโตไคน์ที่ไม่พึงประสงค์จะถูกกำจัดออกได้โดยใช้ Antibody protein drug รวมทั้งสภาพแวดล้อมของการซ่อมแซมเนื้อเยื่อจะถูกควบคุม เพื่อให้มีความเหมาะสมกับกระบวนการงอกใหม่มากที่สุด การเหนี่ยวนำการงอกใหม่จึงเข้ามามีบทบาทสำคัญ

ปฏิกิริยาระหว่างเซลล์กับเมทริกซ์ (Cell-Matrix Interaction) เป็นปฏิกิริยาที่มีอิทธิพลต่อกระบานการหายของแผลตามธรรมชาติ (Spontaneous healing) มาก การใช้เมทริกซ์ที่เปรียบเหมือนหนังแท้เหนี่ยวนำให้เกิดกระบวนการงอกใหม่ประสบความสำเร็จทั้งที่หนังแท้เป็นอวัยวะที่ไม่สามารถงอกกลับได้ ทำให้เกิดการสร้างวัสดุปิดแผลแบบใหม่ตามมาเพื่อเหนี่ยวนำให้เกิดการงอกใหม่ของผิวหนังทั้งส่วนที่เป็นชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้ โดยใช้เพียงเซลล์คีราติโนไซต์เพียงอย่างเดียวและใช้ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ที่ทำจากเทคโนโลยีวิศวกรรมเนื้อเยื่อ (Dermal regeneration template) ซึ่งจะบรรยายรายละเอียดในส่วนถัดไป

2.1.3 **การปลูกถ่ายผิวหนัง** (Skin grafts)

2.1.3.1 **ชนิดของการปลูกถ่ายผิวหนัง** (Type of skin grafts) **[23]**

วิธีการแก้ปัญหาที่ใช้กับเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถงอกกลับได้มี 5 วิธีดังนี้

2.1.3.1.1 Autograft (autologous graft)

เป็นกราฟท์ ชนิดที่ผู้ให้ (donor) และผู้รับ (recipient) เป็นบุคคลเดียวกัน ดังนั้นจึงไม่มีปฏิกิริยาการสลัดกราฟท์ (graft rejection) ตัวอย่าง การปลูกถ่ายผิวหนังที่ทำโดยการนำผิวหนังส่วนที่ดีมาปลูกทดแทนผิวหนังบริเวณที่ถูกไฟไหม้หรือน้ำร้อนลวก แต่วิธีดังกล่าวทำให้บริเวณผิวหนังส่วนที่ดีของผู้ป่วย (donor site) เกิดแผลเป็น และเป็นวิธีที่ไม่สามารถใช้ได้ในผู้ป่วยที่เกิดแผลไฟไหม้มากกว่า 30 เปอร์เซ็นต์ของพื้นที่ผิวร่างกาย

2.1.3.1.2 Allograft (allogenic graft, homograft)

เป็นกราฟท์ชนิดที่ผู้ให้และผู้รับอยู่ในเผ่าพันธุ์ (species) เดียวกัน เช่น ผู้ที่เสียชีวิตแล้ว (cadever) จึงยังคงมีความแตกต่างทางพันธุกรรม ซึ่งเป็นสาเหตุทำให้เกิดการสลัดกราฟท์ ยากแก่การหานำมาใช้ประโยชน์ ราคาแพง มีปัจจัยเสี่ยงต่อการติดเชื้อและการเก็บรักษาค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องแช่ตู้เย็นที่มีความเย็นจัด อย่างไรก็ตาม allograftเป็นกราฟท์ผิวหนังคน จึงประกอบด้วย

ทั้งชั้นหนังแท้และชั้นหนังกำพร้า ปิดไว้ครั้งหนึ่งอยู่ได้นานนับสัปดาห์ ชั้นหนังแท้ของ cadaver skin สามารถรวมเข้ากับบาดแผลได้เพราะมีคุณสมบัติการเป็นแอนติเจน (Antigenicity) ต่ำ และช่วยลดการเกิดแผลเป็นได้ จึงเป็นที่นิยมมากที่สุดในปัจจุบัน

2.1.3.1.3 Xenograft (xenogeneic graft, heterograft)

เป็นกราฟท์ชนิดที่ผู้ให้และผู้รับอยู่ต่างสายพันธุ์กัน เช่น หนังหมู หนังวัว เป็นต้น เป็นทางเลือกหนึ่งที่ใช้กันมานานกว่า 30 ปี แม้ว่าจะเป็นกราฟท์ที่ติดกับแผลดีไม่เท่าผิวหนังของผู้เสียชีวิต เพราะสามารถถูกสลัดออกจากร่างกายได้เร็วกว่า การเก็บรักษาค่อนข้างยุ่งยาก เพราะต้องแช่ตู้เย็นที่มีความเย็นจัด แต่มีราคาถูกและหาใช้ได้ง่ายกว่า มีความเสี่ยงต่อโรคติดต่อน้อยกว่า ลดการปวดของบาดแผล

2.1.3.1.4 การกราฟท์ด้วยเซลล์ที่ถูกเพาะเลี้ยงขึ้น (Grafting of cultured cells)

เป็นความพยายามในการสร้างเนื้อเยื่อในหลอดทดลองโดยใช้เซลล์จากคนไข้เอง วิธีดังกล่าวสามารถเพิ่มปริมาณเซลล์ชั้นหนังกำพร้า ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่สามารถงอกกลับได้เองตามธรรมชาติ โดยใช้เวลาประมาณ 2 ถึง 3 สัปดาห์ หลังจากคนไข้ได้รับบาดเจ็บ อย่างไรก็ตามปัจจุบันยังไม่ประสบความสำเร็จในการสร้างเนื้อเยื่อหนังแท้ในหลอดทดลอง ซึ่งเป็นเนื้อเยื่อที่ไม่สามารถงอกกลับได้ยัง

2.1.3.1.5 ผิวหนังสังเคราะห์ (Skin substitutes)

วิธีนี้อยู่บนพื้นฐานการค้นพบสารคล้ายโครงสร้างภายนอกเซลล์ (Extracellular Matrix; ECM) ที่เหนี่ยวนำการงอกใหม่บางส่วนของหนังแท้ในแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนม ทั้งสารสังเคราะห์และสารธรรมชาติสามารถใช้ผลิต ECM scaffold หรือผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ได้ เหตุของการผลิตผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ เนื่องจากข้อเสียจำนวนมากของวิธีการรักษาโดยทั่วไป การใช้แผ่นผิวหนังของสิ่งมีชีวิตสายพันธุ์เดียวกัน (Allograft) การใช้แผ่นผิวหนังของสิ่งมีชีวิตต่างสายพันธุ์ (Xenograft) เช่น เสี่ยงต่อการติดเชื้อ ราคาแพงและมีระยะเวลาในการใช้จำกัด ดังนั้นการผลิตผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์จากสารธรรมชาติ หรือสารสังเคราะห์ด้วยวิธีการใหม่ๆจึงถูกพัฒนาขึ้นทดแทนการรักษาด้วยวิธีการทั่วไป

2.1.4 **ผิวหนังสังเคราะห์** (Skin substitutes)

2.1.4.1 **ความหมายของผิวหนังสังเคราะห์**

ผิวหนังสังเคราะห์ คือ วัสดุที่ช่วยชักนำให้เกิดการงอกใหม่ของผิวหนังจากผิวหนังส่วนที่ยังเหลืออยู่ หรือจากเซลล์บริเวณรอบๆแผล ทำให้แผลหายได้เร็ว และมีประสิทธิภาพมากขึ้น

นอกจากนี้การรักษาแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์ยังช่วยลดการเกิดแผลเป็นที่เกิดจากการรักษาแผลตามธรรมชาติได้อีกด้วย หลักการของผิวหนังสังเคราะห์คือ การเป็นโครงเลี้ยงเซลล์ซึ่งเป็นต้นแบบให้กับการงอกใหม่ของผิวหนัง โดยเซลล์ที่อยู่บริเวณรอบๆจะเคลื่อนที่เข้ามาในผิวหนังสังเคราะห์เพื่อแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และสร้างเนื้อเยื่อใหม่ขึ้นมาแทนที่ผิวหนังสังเคราะห์ ในขณะที่ผิวหนังสังเคราะห์จะค่อยๆถูกย่อยสลายไปตามธรรมชาติ

2.1.4.2 ประเภทของผิวหนังสังเคราะห์ที่มีในระบบการค้า [24]

ผิวหนังสังเคราะห์ในระบบการค้าแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

2.1.4.2.1 ผิวหนังสังเคราะห์สำหรับปิดแผลชั่วคราว (Temporary skin substitute)

Biobrane (Dow Hickam/Bertek Pharmaceuticals, USA) ประกอบด้วยสองชั้น โดยชั้นล่างเป็นตาข่ายไนลอน และชั้นบนเป็นฟิล์มซิลิโคน ตาข่ายไนลอนจะถูกเคลือบด้วยเปปไทด์ที่สกัดมาจากคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งในหมู เพื่อช่วยให้เกิดการยึดติดกับแผลได้ดี ขณะที่ฟิล์มซิลิโคนทำหน้าที่เป็นเนื้อเยื่อเลือกผ่าน (Semi-permeable membrane) Biobraneใช้ได้ผลดีมากกับบาดแผลที่เกิดความเสียหายที่ชั้นหนังกำพร้า (Superficial burn)

Transcyte (Advanced Tissue Sciences Inc, USA) โครงสร้างเหมือน biobrane แต่มีการปลูกถ่ายเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลงในชั้นตาข่ายไนล่อนซึ่งช่วยให้แผลหายได้เร็วขึ้น มีสมบัติสามารถแนบติดกับบาดแผลได้ดี กระตุ้นการงอกกลับคืนมาของหนังกำพร้า โดยเฉพาะเมื่อใช้ในบาดแผลไฟไหม้ที่เกิดความเสียหายตลอดทั้งชั้นหนังกำพร้า และรวมถึงชั้นหนังแท้ที่อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้าบางส่วน ผลของการรักษาแผลด้วย Transcyte คือแผลหายอย่างสมบูรณ์และเกิดแผลเป็นน้อยมาก

Dermagraft (Advanced Tissue Sciences Inc, USA) เป็นวัสดุที่เลียนแบบโครงสร้างชั้นหนังแท้ ผลิตโดยการเพาะเลี้ยงเซลล์ไฟโบรบลาสต์ลงบนโครงร่างโพลิเมอร์ เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะหลั่งสารช่วยการเจริญเติบโต (Growth factor) และโปรตีนสำคัญที่พบในชั้นหนังแท้ Dermagraft ช่วยให้เกิดการหายของแผลโดยการกระตุ้นการเจริญเข้ามาของเนื้อเยื่อพังผืด (fibrovascular tissue) จากพื้นแผล และการงอกกลับคืนมาของหนังกำพร้าจากขอบแผล ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวนิยมใช้สำหรับกระตุ้นการหายของแผลเรื้อรังมากกว่าการปิดแผลไฟไหม้

2.1.4.2.2 ผิวหนังสังเคราะห์สำหรับปิดแผลถาวร (Permanent skin substitute)

ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ประเภทนี้สามารถแบ่งได้เป็น 2 ประเภทคือ

ก. *ผิวหนังสังเคราะห์สำหรับแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังกำพร้า* (Epithelial replacements) ผิวหนังสังเคราะห์ประเภทนี้ถูกผลิตขึ้นเพื่อใช้ในการรักษาแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังกำพร้าผลิตภัณฑ์ที่ได้รับการยอมรับกันอย่างแพร่หลายคือ

Epicel หรือ Cultred Epithelial Autpgraft (CEA) ซึ่งเป็นแผ่นโพลียูรีเทนที่บรรจุเซลล์คีราติโนไซต์-ที่ยังมีชีวิตไว้ โดยเซลล์เหล่านี้อาจถูกเพาะเลี้ยงให้ได้กลุ่มเล็กๆของเซลล์หรือให้ได้เซลล์เต็มทั้งแผ่นโพลียูรีเทน เวลาใช้งานจะปิดแผ่นโพลียูรีเทนด้านที่เลี้ยงเซลล์ไว้บนบาดแผล แผ่นนี้จะช่วยกระตุ้นการงอกใหม่ของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า

ข. ผิวหนังสังเคราะห์สำหรับแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ (Dermal replacements) ผิวหนังประเภทนี้มีทั้งชนิดที่ผลิตจากพอลิเมอร์ธรรมชาติที่สามารถย่อยสลายได้และจากวัสดุสังเคราะห์ที่ไม่สามารถย่อยสลายได้ สำหรับ*แผลที่สูญเสียบางส่วนของชั้นหนังแท้*สามารถรักษาให้ได้อย่างสมบูรณ์ด้วยการใช้ผิวหนังสังเคราะห์แบบไร้เซลล์ (Acellular matrices for dermal substitution)

Alloderm (LifeCell, USA) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ทำจากเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังแท้มนุษย์ (Allogenic dermis products) ที่ทำการลอกชั้นหนังกำพร้าและขจัดเซลล์ที่เป็นองค์ประกอบภายในชั้นหนังแท้ออกไปก่อนนำไปแช่แข็ง (Cryopreservation) เพื่อหลีกเลี่ยงการตอบสนองของระบบภูมิคุ้มกันอย่างจำเพาะ ผลิตภัณฑ์ชนิดนี้เปรียบเหมือนแม่แบบสำหรับเซลล์ของชั้นหนังแท้ พบว่าสามารถแนบติดกับบาดแผลได้ดีและลดการเกิดแผลเป็นในแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้

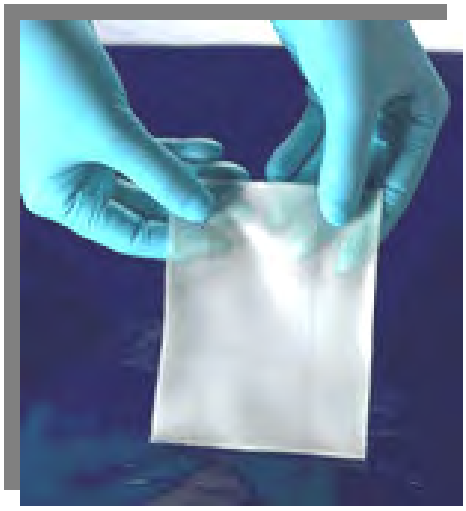
Sure derm (Hans Biomed, South Korea) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังแท้มนุษย์ ที่ทำการแยกเซลล์ออก ซึ่งใช้สำหรับซ่อมแซมหรือทดแทนเนื้อเยื่ออ่อนที่ได้รับความเสียหาย ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถใช้ทดแทนแผ่นผิวหนังของผู้ป่วยเอง (Autograft) เพราะมีประสิทธิภาพ ความปลอดภัยและนำมาแก้ปัญหาการบาดเจ็บภายหลังการทำ Autograft โดยปราศจากการต่อต้านจากระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เมื่อรักษาเสร็จสมบูรณ์ Sure derm จะกลายเป็นเนื้อเยื่อของผู้ป่วยเอง

Puros Dermis (Zimmer Dental Inc, USA) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ได้จากเนื้อเยื่อชั้นผิวหนังแท้มนุษย์ ใช้เป็นทางเลือกแทนการปิดเนื้อเยื่ออ่อนที่เสียหายด้วยเนื้อเยื่อของผู้ป่วยเอง สามารถใช้เพิ่มปริมาตรเนื้อเยื่อได้ทั้งแนวตั้ง และแนวนอนของบริเวณเหงือก รวมทั้งให้ผลทางรักษาสูงทางคลินิก

Terudermis (Olympus Terumo Biomaterials, Japan) เป็นผลิตภัณฑ์ที่ประกอบด้วยส่วนของชั้นล่างที่ทำมาจาก Atelocollagen ซึ่งถูกผลิตจากคอลลาเจนวัวที่ถูกขจัด telopeptide

โดยวิธีการย่อยด้วยเอนไซม์โปรติเอส และส่วนของซิลิโคนชั้นบนที่ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อและควบคุมการผ่านเข้าออกของน้ำที่ไหลซึมออกมาจากบาดแผล เป็นแผ่นสองชั้นเช่นกันชั้นบนเป็นซิลิโคน ชั้นล่างเป็นโฟมโปรตีนคอลลาเจน ผลิตภัณฑ์เป็นแบบแผ่นแห้ง

Integra (Integra Life Science Corporation, USA) เป็นผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ที่ได้รับความนิยมสูงสุดที่ถูกพัฒนาขึ้นโดย Yannas และคณะ ได้รับการรับรองจากองค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US FDA) เพื่อใช้ในผู้ป่วยแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก ผลิตภัณฑ์ Integra แสดงดังรูป 2.14 มีลักษณะเป็นโครงสร้างสองชั้น โดยชั้นล่างมีส่วนประกอบคือคอลลาเจนจากวัวผสมกับคอนโดอิตินซัลเฟตจากกระดูกอ่อนปลาฉลาม ซึ่งทำหน้าที่เป็นแม่พิมพ์ให้กับการงอกใหม่ของชั้นหนังแท้ และด้านบนปิดทับด้วยแผ่นซิลิโคนซึ่งทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อและการสูญเสียน้ำให้กับบาดแผลและสามารถลอกออกได้เมื่อเนื้อเยื่อใหม่เริ่มสร้าง ในการใช้งานขณะที่เนื้อเยื่อถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผู้ป่วยที่จะเข้ามายึดเกาะ และเจริญเติบโตในชั้นคอมโพสิตจนเกิดเป็นชั้นหนังแท้ จากนั้นทำการลอกแผ่นซิลิโคนออก โครงสร้างส่วนที่เป็นคอลลาเจนกับไกลโคสอะมิโนไกลแคนจะถูกย่อยสลายหมดไป แล้วนำชั้นหนังกำพร้าที่ได้จากการเพาะเลี้ยงเซลล์คีราติโนไซต์ของผู้ป่วยเอง (Autograft) มาปลูกถ่าย ข้อดีของ Integra คือ สามารถลดความหนาของผิวหนังที่ตัดออกมาจากผิวหนังผู้ป่วยได้ (Skin graft) ลดแผลเป็นหดรั้งจากไฟไหม้ได้ ใช้ทดแทนผิวหนังชั่วคราวช่วยให้ผู้ป่วยพ้นจากสภาวะวิกฤติทำให้มีโอกาสรอดชีวิตเพิ่มขึ้น



รูปที่ 2.14 แสดงผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Integra *(Integra Life Science Corporation, USA)* ที่มา : www.integra-ls.com/.../duragen-closeup.jpg

อย่างไรก็ตามผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ในระบบการค้าไม่ว่าจะแบบใดต้องนำเข้าจากต่างประเทศ ส่งผลให้มีราคาสูงมาก เช่น Integra®ขนาดหนึ่งฝ่ามือมีราคาสูงถึง 40,000-50,000 บาท (19.46 ดอลลาร์ต่อตารางเซนติเมตร) **[5]** อันเป็นสาเหตุให้คณะนักวิจัยจากศูนย์นวัตกรรมเซลล์ เนื้อเยื่อ และอวัยวะสังเคราะห์ จุฬาลงกรณ์ ประเทศไทย ทำการพัฒนาการผลิตผิวหนังสังเคราะห์ต้นแบบขึ้น จนมีคุณสมบัติใกล้เหมือนกับผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์จากต่างประเทศที่พร้อมใช้งานได้จริงที่มีชื่อว่า Pore Skin® โดยจะบรรยายรายละเอียดในส่วนถัดไป

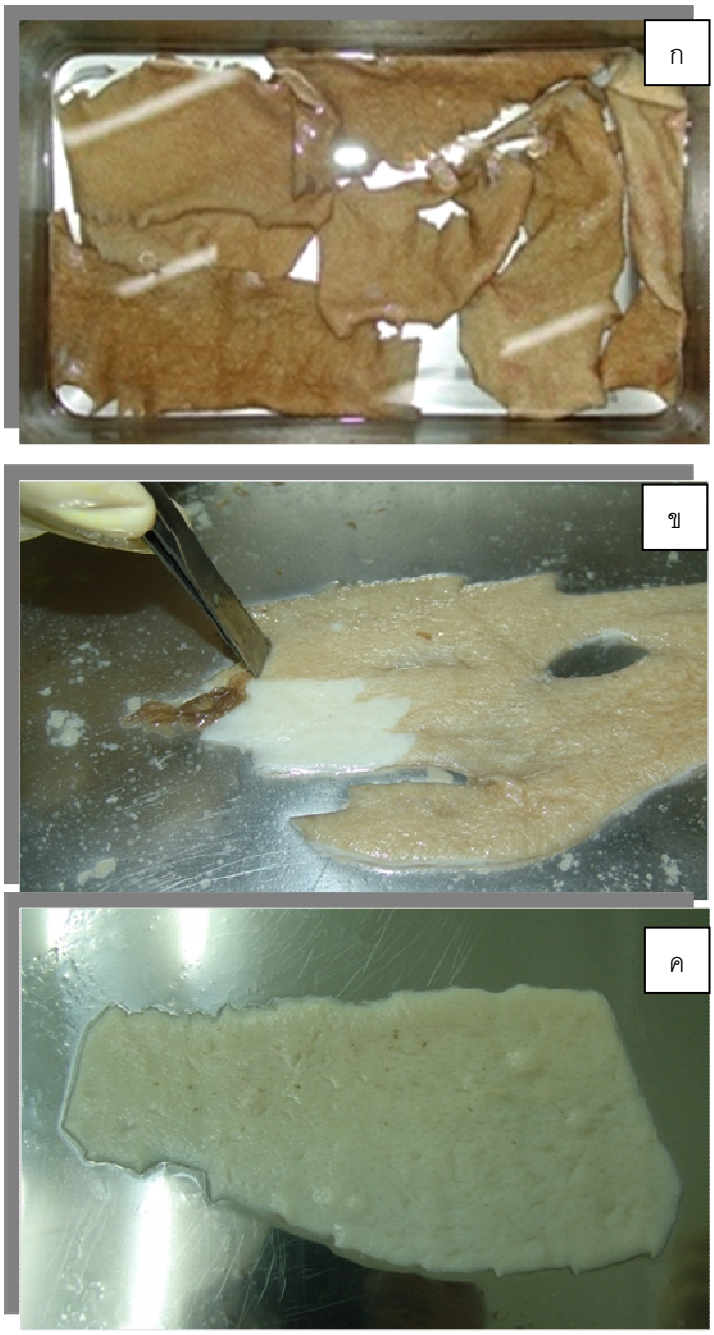
2.1.5 **ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกิน** (Pore Skin® Artificial dermis)

2.1.5.1 **การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง การเตรียมสารละลายชั้นหนังแท้และการเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง**

<u>การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง</u>

ตัวอย่างผิวหนังได้จากการเตรียมโดยใช้ Dermatome เก็บตัวอย่างผิวหนังหนาประมาณ 5 มิลลิเมตร จากบริเวณต้นขาด้านใน (Inner thigh) ของศพที่มีผู้แสดงความยินยอมบริจาคร่างกาย ภายหลังการเสียชีวิตแก่โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์ โดยใช้เกณฑ์การคัดเลือกเข้าสู่การวิจัยคือ เป็นศพผู้เสียชีวิตที่ได้แสดงความยินยอมอุทิศร่างกายแก่โรงพยาบาลก่อนเสียชีวิต โดยเสียชีวิตไม่เกิน 24 ชั่วโมง และไม่เสียชีวิตด้วยโรคติดต่อและมีผิวหนังปกติ

ลักษณะตัวอย่างผิวหนังที่ได้รับบริเวณด้านหนังกำพร้า (Epidermis) มีลักษณะเหมือนผิวหนังของมนุษย์ที่มองเห็นจากภายนอกทั่วไป ดังรูปที่ 2.15 บริเวณด้านหนังแท้ (Dermis) มีลักษณะสีขาวนวล ด้านล่างมีเนื้อเยื่อไขมันติด (Adipose tissue) มาบ้างเล็กน้อย เมื่อนำตัวอย่างผิวหนังมาแช่ในสารละลายโซเดียมคลอไรด์ ความเข้มข้น 1 นอร์มัล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ผิวหนังที่ได้จะมีลักษณะนุ่มบวมน้ำเพิ่มขึ้น (รูปที่ 2.15 ก) สามารถใช้ Forceps ลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกได้ง่าย (รูปที่ 2.15 ข) เมื่อลอกผิวหนังชั้นหนังกำพร้าออกจนหมดรวมทั้งลอกกำจัดเนื้อเยื่อไขมันที่ติดปนมาออกจนหมดเรียบร้อยแล้วจะได้ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่มีลักษณะสีขาว (รูปที่ 2.15 ค) ซึ่งพร้อมสำหรับการนำไปเตรียมเป็นสารสกัดจากผิวหนังต่อไป



รูปที่ 2.15 แสดงกระบวนการเตรียมผิวหนังชั้นหนังแท้สำหรับผลิตผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®

ก ตัวอย่างผิวหนังในสารละลายโซเดียมคลอไรด์เข้มข้น 1 นอร์มัล

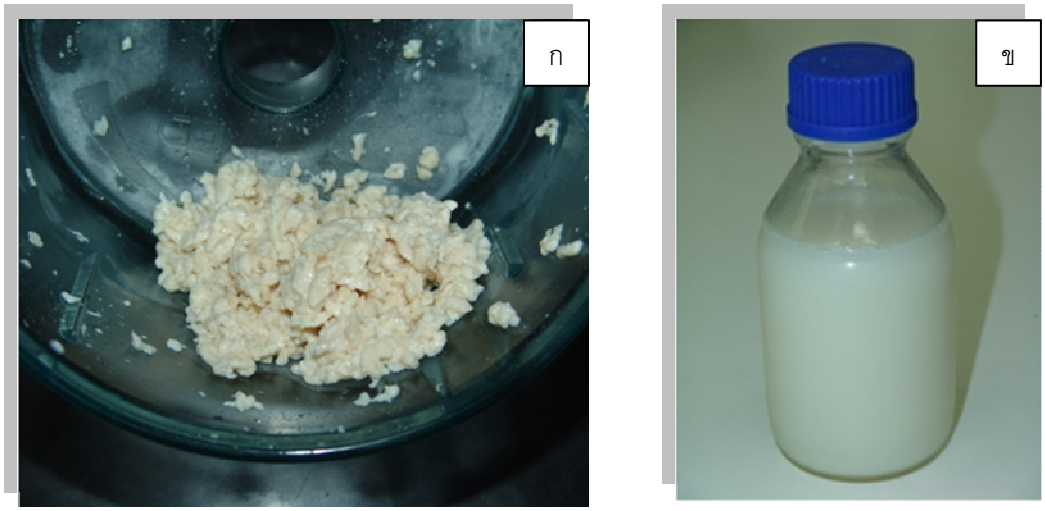
ข การลอกชั้นหนังกำพร้า

ค ผิวหนังชั้นหนังแท้ที่เตรียมได้

การเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้

นำผิวหนังชั้นหนังแท้ที่เตรียมไว้มาล้างด้วยน้ำบริสุทธิ์ให้สะอาด และล้างด้วยสารละลายเอทานอล ความเข้มข้นร้อยละ 70 จากนั้นชั่งน้ำหนักเปียก (Wet weight) ของผิวหนังชั้นหนังแท้และบดหนังแท้ให้ละเอียดด้วยเครื่องบดเนื้อ ดังรูปที่ 2.16ก

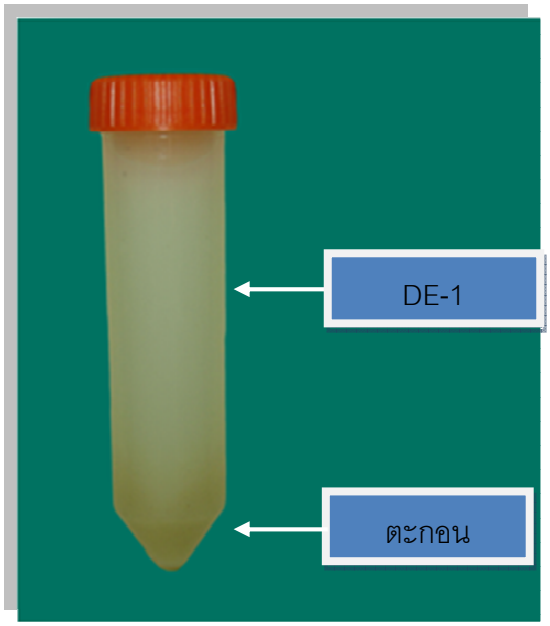
นำหนังแท้ที่บดละเอียดแล้วไปปั่นในเครื่องปั่นน้ำผลไม้ มาผสมกับสารละลายกรดแอซิติก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์ ปริมาตรเป็น 15 เท่าของน้ำหนักหนังแท้แล้วจึงปั่นให้สารละลายกลมกลืนเป็นเนื้อเดียวกันอีกครั้งด้วยเครื่อง Homogenizer จนได้สารละลายที่มีเนื้อเดียวกันดังรูปที่ 2.16ข



รูปที่ 2.16 กระบวนการเตรียมสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้
ก หนังแท้หลังการบดด้วยเครื่องบดเนื้อ
ข สารละลายผิวหนังที่เตรียมได้

การเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง

นำสารละลายผิวหนังชั้นหนังแท้ที่ได้มาปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 1,500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ตะกอนผิวหนังที่ไม่ละลายจะตกตะกอนอยู่ด้านล่าง ของเหลวด้านบนเป็นสารละลายผิวหนัง กำหนดชื่อเป็น DE-1 ดังรูปที่ 2.17



รูปที่ 2.17 ลักษณะสารละลายที่ได้จากกระบวนการเตรียมสารสกัดจากผิวหนัง ภายหลังการปั่นเหวี่ยงที่ความเร็วรอบ 1500 รอบ/นาที เป็นเวลา 2 นาที ของเหลวสีขาวด้านบนคือสารสกัดจากผิวหนังสูตร DE-1 ตะกอนด้านล่างเป็นตะกอนหยาบของผิวหนัง (Demal remnant) ที่ไม่ละลาย และจะถูกกำจัดทิ้งไป

2.1.5.2 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin®

การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin®

นำสารสกัดจากผิวหนังที่เตรียมได้ คือ DE-1 ถูกนำมาเตรียมเป็นโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ ความเข้มข้นร้อยละ 0.8 โดยมวล/ปริมาตร (ในสารละลายกรดแอซิติก ความเข้มข้น 0.05 โมลาร์) ฉีดเข้าสู่แม่แบบขึ้นรูป (Mould) แบบแผ่นความลึก 0.15 ซม. ดังรูปที่ 2.18ง และนำไปแช่แข็งที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นนำไปทำให้แห้งโดยวิธี Lyophilization ที่อุณหภูมิ 0 องศาเซลเซียส จนแห้งสนิท และย้ายโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ในแม่แบบขึ้นรูปไปทำให้อุ่นขึ้นที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลาอย่างน้อย 3 ชั่วโมง ในเครื่อง Vacuum oven นำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ออกจากแม่แบบขึ้นรูปแล้วไปนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส ภายใต้สภาวะสุญญากาศ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ในเครื่อง Vacuum oven

การผนึกซิลิโคนสองชั้นบนโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin®

เตรียมซิลิโคนชั้นที่ 1 โดยการผสมซิลิโคน Polydimethylsiloxane (PDMS) ในอัตราส่วน 10:1 และนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อ

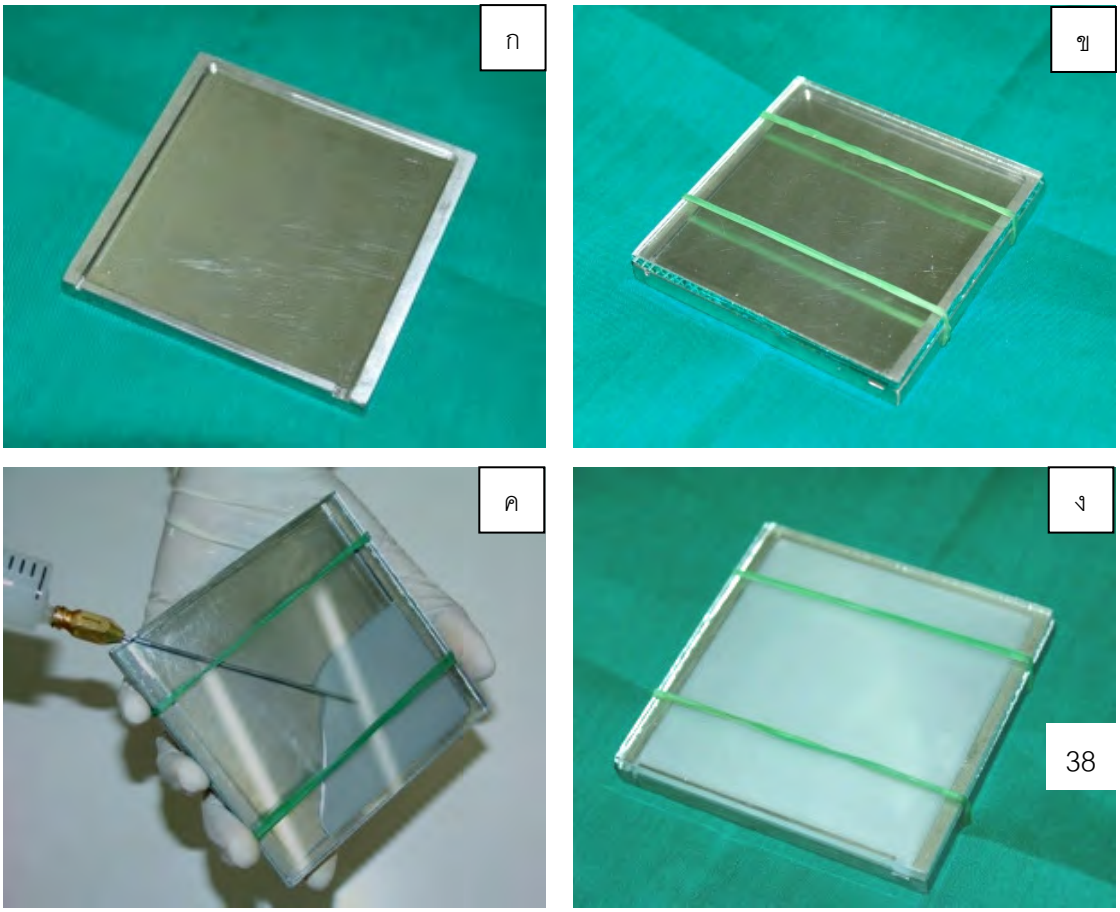
ไล่ฟองอากาศ จากนั้น Cast ซิลิโคนชั้นที่ 1 ให้มีความหนา 50 ไมครอนบนแผ่นใสที่ติดอยู่บนกระจก ตั้งทิ้งไว้ที่อุณหภูมิห้อง เป็นเวลา 24 ชั่วโมง

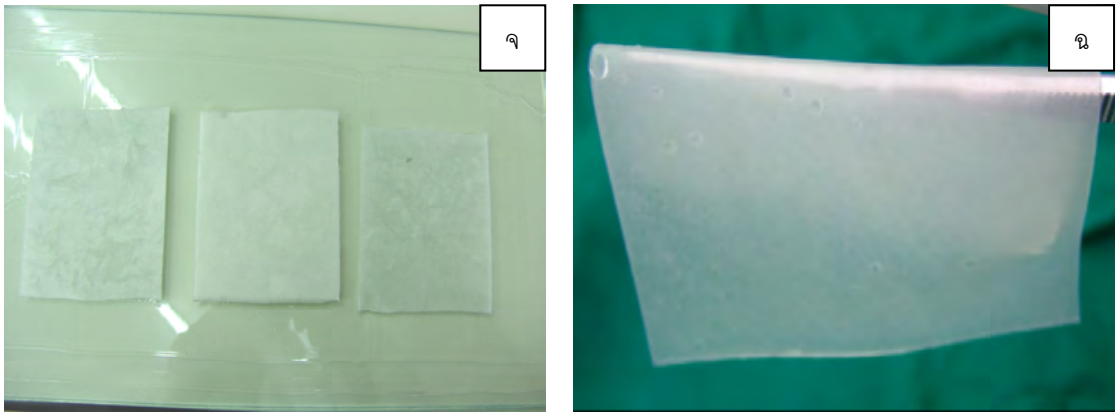
เตรียมซิลิโคนชั้นที่สอง โดยการผสมซิลิโคน Medical Grade ในอัตราส่วน 10:1 และนำไปปั่นเหวี่ยง (Centrifuge) ที่ความเร็วรอบ 5,000 รอบต่อนาที เป็นเวลา 2 นาที เพื่อไล่ฟองอากาศ จากนั้น Cast ซิลิโคนชั้นที่ 2 ให้มีความหนา 50 ไมครอนลงบนซิลิโคนชั้นที่ 1

จากนั้นนำโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin® ที่เตรียมไว้ข้างต้นมาติดลงบนซิลิโคนชั้นที่ 2 และนำไปอบที่อุณหภูมิ 80 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 2 ชั่วโมง ในเครื่อง Vacuum oven จนได้ลักษณะดังรูปที่ 2.18จ

<u>กระบวนการเชื่อมข้ามพันธะ (Cross-linking) ด้วยสารเคมี</u>

แช่โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ผนึกซิลิโคนสองชั้นเรียบร้อยแล้ว ลงในสารเคมี 0.25%Glutaraldehyde (GTA) ใน 70%เอทานอล ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลา 3 ชั่วโมง จากนั้นหยุดการทำงานของ Glutaraldehyde ด้วยสารละลาย 0.05 M ไกลซีน เป็นเวลา 2 ชั่วโมง และล้างด้วยน้ำ DI อีก 3 ครั้ง จนได้ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ดังรูป





รูปที่ 2.18 การเตรียมโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin®

ก แม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบแผ่น

ข แม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์แบบแผ่นหลังการปิดทับด้วยกระจก

ค การฉีดสารสกัดจากผิวหนังลงในแม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

ง สารสกัดจากผิวหนังหลังฉีดลงในแม่แบบขึ้นรูปโครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์

จ โครงเนื้อเยื่อสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ผนึกบนซิลิโคนจำนวน 2 ชั้น

ฉ ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®

2.1.5.3 ลักษณะและคุณสมบัติของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกิน

ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® เป็นวัสดุปิดแผลสองชั้น แสดงดังรูปที่ 2.19

รูปที่ 2.19 แสดงลักษณะทั่วไปของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®

ชั้นบนทำจากแผ่นฟิล์มซิลิโคนบางประมาณ 100 ไมครอน ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อที่แผลและชั้นหนังแท้สังเคราะห์ ทำจากซิลิโคนชนิดพิเศษที่ได้รับการรับรองให้ฝังในมนุษย์ได้ไม่เกิน

30 วัน ชั้นซิลิโคนนี้ทำหน้าที่คล้ายชั้นหนังกำพร้าชั่วคราว มีระยะเวลาการทำงานไม่เกิน 3 สัปดาห์ ช่วยป้องกันการระเหยของน้ำจากร่างกาย ทำให้สรีรวิทยาของร่างกายผู้ป่วยดีขึ้นในภาวะวิกฤติจากบาดแผลขนาดใหญ่ การทำให้แผ่นฟิล์มบางเป็นกรณีพิเศษเพื่อเพิ่มการยืดหยุ่นช่วยให้ Pore Skin® สามารถแนบกับผิวสัมผัสของแผลได้มากขึ้น ช่วยให้ Pore Skin® สามารถทำปฏิกิริยากับแผลได้ทั่วถึง

ชั้นล่างทำจากคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังมนุษย์แปรสภาพเป็นโฟมที่มีรูพรุนที่เชื่อมต่อกัน ช่วยให้เซลล์สามารถเคลื่อนเข้าไปภายในได้ง่ายขึ้น และมีการแลกเปลี่ยนสารอาหารต่างๆ ได้ดีขึ้น เมื่อปิดลงไปที่แผลและไม่มีการติดเชื้อ Pore Skin® แนบกับแผลสนิทไม่มีการขยับพบว่า มีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจนใหม่เกิดขึ้นภายในรูพรุน ซึ่งโครงสร้างของคอลลาเจนใหม่นี้จะเรียงตัวตามสถาปัตยกรรมของรูพรุนคือมีลักษณะอิสระ เนื้อเยื่อที่เกิดจึงมีลักษณะคล้ายกับชั้นหนังแท้ และเมื่อลอกชั้นซิลิโคนออกปิดทับด้วยผิวหนังกราฟท์ที่สัปดาห์ที่ 3 ผลการรักษาจะมีคุณภาพของแผลหายที่ดีที่สุด การปิดทับผิวหนังกราฟท์เร็วหรือช้าเกินไปจะเปลี่ยนผลลัพธ์ของการรักษา ความสำเร็จของการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างเนื้อเยื่อในลักษณะนี้เป็นจากคุณสมบัติของโมเลกุลของคอลลาเจนที่ ยังมีสภาพสมบูรณ์ตามธรรมชาติ

2.1.5.4 ผลการศึกษาผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกินก่อนการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วย (Pore Skin® Preclinical Study Results) [25]

ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ได้รับการทดสอบค่ามาตรฐานทั่วไปของผลิตภัณฑ์ ด้านฟิสิกส์และชีววิทยา แสดงดังตารางที่ 1 ดังนี้

ตารางที่ 2.1 แสดงค่ามาตรฐานทั่วไปของคุณสมบัติทางด้านฟิสิกส์และชีววิทยาของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®

คุณสมบัติ	ค่ามาตรฐานของผลิตภัณฑ์
1. ขนาดรูพรุนเฉลี่ย	150 ± 29 ไมโครเมตร
2. ลักษณะรูพรุน	เชื่อมต่อกันทั้งหมด
3. ค่าโมดูลัสของการดึง(จากไหมเย็บแผลไนลอน 4-0)	0.1 ± 0.01 เมกะปาสคาล
4. ค่าความเค้นในการดึง(จากไหมเย็บแผลไนลอน 4-0)	2.41 ± 0.21 เมกะปาสคาล

5. อัตราเฉลี่ยการแพร่ผ่านของออกซิเจน	15.0728 กิโลกรัม เมตร ต่อตาราง เมตร ต่อชั่วโมงที่ความดัน 1 ปาสคาล
6. อัตราเฉลี่ยการระเหยผ่านของน้ำ	0.095 ± 0.031กิโลกรัมต่อเมตร
7. การสลายตัวหมดจากการย่อยด้วยเอนไซน์คอลลาจีเนส	30 ชั่วโมง
8. ค่าการทดสอบการเจริญของเซลล์สูงสุดในผลิตภัณฑ์	723.26 เซลล์/ปริมาตรชิ้นงาน 1 ลบ.ซมในวันที่ 4
9. การทดสอบกลไกการออกฤทธิ์ด้วยการฝังใต้ผิวหนังของหนูวิสตาร์จำนวน 15 ตัว ที่ระยะเวลาต่างๆพบว่าที่ 3 สัปดาห์ - Pore Skin® สามารถเหนี่ยวนำการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจนให้เกิดภายในรูพรุนได้ และการเกิดเนื้อเยื่อนี้เป็นไปพร้อมกับการงอกของระบบเลือดเข้ามาภายใน Pore Skin® ที่ 12 สัปดาห์ – การคงอยู่ของเนื้อเยื่อที่มีชีวิตมีระบบหลอดเลือดภายใน Pore Skin®	
10. การทดสอบความปลอดภัยของผลิตภัณฑ์อ้างอิงตามมาตรฐานของ ISO 10993-5 (การทดสอบความเป็นพิษและการเข้ากันได้กับเซลล์มนุษย์)Pore Skin® ผ่านการทดสอบและได้การรับรองจากสถาบันวิจัยโลหะและวัสดุแห่งชาติ	
11. การทดสอบตามมาตรฐาน ISO 10993-6 เป็นการฝังทดสอบดูปฏิกิริยาอักเสบจากการฝัง Pore Skin® ในกล้ามเนื้อของสัตว์ทดลองจำนวน 24 ตัวแบ่งเป็น 2 กลุ่มๆ ละ 12 ตัว พบว่าที่ 2 และ 4 สัปดาห์พบว่า Pore Skin® ให้ผลไม่แตกต่างจาก Gel foam® ซึ่งเป็นผลิตภัณฑ์ควบคุมสำหรับเปรียบเทียบ	

ในการศึกษาครั้งนี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษา Pore Skin® ก่อนการทดลองทางคลินิกในผู้ป่วย (Pore Skin® Preclinical Study) ที่มุ่งเน้นศึกษาวิจัยอย่างเป็นระบบเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ตามแนวทางที่หน่วยงานควบคุม คือองค์การอาหารและยา (อย.) ต้องการเป็นสำคัญแต่เนื่องจากขณะนี้องค์การอาหารและยา (อย.) ของประเทศไทยยังมิได้กำหนดแนวทางการศึกษาเพื่อขอการรับรองวัสดุปิดแผลชนิดออกฤทธิ์ (Interactive wound dressing) ดังนั้นผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบประสิทธิภาพของ Pore Skin® ในสัตว์ทดลองตามคู่มือแนะนำของการประเมินวัสดุปิดแผลขององค์การอาหารและยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA Guidance for Industry : Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wounds - Developing Products for Treatment)

2.1.6 คู่มือแนะนำของการประเมินวัสดุปิดแผลขององค์การอาหาร และยาของสหรัฐอเมริกา (US-FDA Guidance for Industry : Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wounds - Developing Products for Treatment) [6]

คู่มือแนะนำดังกล่าวมีความสำคัญเพราะเป็นแนวทางสำหรับผู้ที่ต้องการพัฒนายา ผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพและอุปกรณ์การรักษาแผลเรื้อรังและแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก เช่น ผลิตภัณฑ์รักษาแผล โดยแบ่งคำแนะนำออกเป็นสองส่วน

ส่วนที่1 คำแนะนำกล่าวถึงข้อพิจารณาการศึกษาเบื้องต้นก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ไปทดลองในระดับคลินิก

ส่วนที่2 กล่าวถึงข้อพิจารณาในการออกแบบการศึกษาทางคลินิกรวมถึงเกณฑ์การคัดเลือก (endpoint)

คู่มือแนะนำนี้เฉพาะเจาะจงถึงแผลเลือดคั่ง (venous stasis ulcers), แผลที่เท้าของผู้ป่วยเบาหวาน (diabetic foot ulcers) และแผลไฟไหม้ (burn wounds) สำหรับจุดประสงค์ของคู่มือแนะนำนี้ แผลเรื้อรัง (chronic cutaneous ulcer) คือ หมายถึง บาดแผลที่ไม่สามารถหายได้เองตามระยะเวลาของกระบวนการหายของแผลตามปกติ **[26]** เป็นแผลที่หายช้า ไม่หาย หรือเกิดใหม่ซ้ำ ๆ **[27]** แผลไฟไหม้ (burn wound) คือแผลที่ถูกทำให้เกิดขึ้นโดยความร้อน สารเคมีหรือไฟฟ้า

<u>ส่วนที่1</u> คำแนะนำกล่าวถึงข้อพิจารณาการศึกษาเบื้องต้นก่อนที่จะนำผลิตภัณฑ์ไปทดลองในระดับคลินิก (Preclinical Considerations)

โดยในส่วนนี้ประกอบด้วยข้อพิจารณายาและผลิตภัณฑ์ทางชีวภาพให้จำเพาะสำหรับลักษณะของแผล (รวมทั้งการหายของแผลและการรักษาแผล)

A. Animal Wound Models

กล่าวถึงแนวทางการเลือกใช้สัตว์ทดลอง (Animal Wound Model) ว่าควรเลือกใช้สัตว์ทดลองที่สามารถช่วยในการเกิดผลตอบสนองทางเภสัชวิทยา (Pharmacological responses) และประเมินความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์รักษาแผล อีกทั้งควรมีความเหมาะสมที่สุดตามหลักการทางวิทยาศาสตร์ เช่น สามารถนำมาใช้ได้ง่าย (Availability) สามารถใช้เพื่อตอบคำถามทางวิทยาศาสตร์ที่ต้องการได้ สายพันธุ์ของสัตว์ทดลองที่ถูกเลือกควรแสดงการตอบสนองทางชีวภาพเพื่อทดสอบผลิตภัณฑ์ได้ (เช่น ควรเปิดเผยสายพันธุ์สัตว์ทดลอง) แม้ว่าสัตว์ทดลองจะสามารถช่วยพิสูจน์แนวคิดเกี่ยวกับผลิตภัณฑ์บางชนิดแต่โดยทั่วไปก็ไม่เพียงพอสำหรับการพิสูจน์

ประสิทธิภาพในระดับคลินิกและยังไม่มีสัตว์ทดลองชนิดใดที่ดีที่สุดสำหรับแผลเรื้อรัง หรือแผลไฟไหม้รุนแรง โดยมีสัตว์หลายชนิดที่ควรใช้ประเมินการทำงานของผลิตภัณฑ์รักษาแผล เช่น การเกิด fibroplasias และ stroma สามารถถูกประเมินโดยการฉีดผลิตภัณฑ์เข้าใต้ชั้นผิวหนังในสัตว์หลากหลายชนิด การหดรั้งของแผล(contraction)และการงอกกลับมาของชั้นหนังกำพร้า(re-epithelialization) สามารถถูกประเมินโดยการผ่าตัดทำให้เกิดแผลลึกถึงชั้นหนังแท้ในหมู หมูสามารถใช้เป็นต้นแบบเพราะหมูมีโครงสร้างผิวหนังส่วนใหญ่คล้ายผิวหนังมนุษย์มากที่สุด การเหนี่ยวนำการเกิดหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) สามารถถูกประเมินได้ในเยื่อหุ้มรกของไก่ (Chick chorioallantoic mambrane) หรือกระจกตากระต่าย (Rabbit cornea) ความทนแตกหัก (Breaking strength)สามารถถูกทดสอบในหนู (rat linear incision model)

ในต้นแบบแผลที่ไม่สามารถกลับไปสู่ปกติได้ (impaired-healing) จะมีใช้เวลาสำหรับวัดผลการรักษาเพิ่มขึ้น เช่นแผลที่ติดเชื้อ (Infection) (necrotizing trauma) การฉายรังสี (irradiation) ได้รับยา Corticosteriods หรือ Chemotherapeutic หรือถูกเหนี่ยวนำด้วยยา หรือโรคเบาหวาน (Genetic diabetes mellitus) ในหนูmice, หนู rats, หนูแฮมสเตอร์, หนูตะเภา และลูกหมู ในแต่ละต้นแบบจะมีหนึ่งหรือหลายลักษณะที่สามารถใช้สำหรับการประเมินการทำงานของผลิตภัณฑ์ สำหรับตัวอย่าง ผิวหนังบริเวณหูของกระต่ายเป็นประโยชน์สำหรับประเมินการงอกกลับของผิวหนังชั้นหนังกำพร้า (Re-epithelialization) เพราะมันไม่มีการหดรั้งของแผลที่พบในสัตว์ฟันแทะชนิดอื่น รวมทั้งสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการขาดเลือด (ischemia) ในแผล เป็นต้น

นอกจากนี้สามารถใช้บทความทางวิทยาศาสตร์ที่เผลแพร่ทั่วไปก่อนหน้านี้ในการประมวลข้อโต้แย้งของข้อดีและข้อเสียของต้นแบบ รวมทั้งความเหมาะสมอื่นๆของสัตว์ทดลองที่เลือกใช้

B. Biodistribution and Pharmacokinetic Studies

แม้ว่ายังไม่มีสัตว์ทดลองชนิดใดที่ดีที่สุดสำหรับแผลเรื้อรัง การศึกษาการกระจายตัวทางชีวภาพ (Biodistribution) และ เภสัชจลศาสตร์ (Pharmacokinetic) หรือที่เรียกว่า BD/PK ในสัตว์ทดลองโดยทั่วไปจะเป็นข้อมูลที่ช่วยในการออกแบบการศึกษาความเป็นพิษ โดยเฉพาะข้อมูลทางเภสัชจลศาสตร์ (PK) สามารถถูกกำหนดขึ้นในสัตว์สายพันธุ์เดียวกันที่จะใช้ในการประเมินความเป็นพิษ สำหรับผลิตภัณฑ์รักษาแผลที่เราสนใจซึ่งประโยชน์ของผลิตภัณฑ์ต่อบริเวณแผลบนผิวหนังสัตว์อาจจะให้ข้อมูลสำคัญมากกว่าประโยชน์ต่อผิวหนังสัตว์ปกติ การพิจารณาควรบ่งบอกผลการเปลี่ยนแปลงของข้อมูล BD/PK และแนวโน้มการสะสมของผลิตภัณฑ์ด้วยการให้ยาแบบซ้ำๆ ข้อมูลเกี่ยวกับความเสถียรของผลิตภัณฑ์ที่บริเวณเป้าหมาย (ระดับตัวรับเป้าหมาย

สำหรับผลิตภัณฑ์ชีวภาพ) เพื่อให้เข้าใจถึงการทำงาน และแนวโน้มความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์รักษาแผล

C. Toxicology Studies

รูปแบบของการศึกษาความเป็นพิษทั่วไปสำหรับผลิตภัณฑ์รักษาแผลควรสะท้อนถึง ความเป็นไปได้ วิธีที่จะใช้ผลิตภัณฑ์ดังกล่าวในคน แบบแผนการใช้ยา และระยะเวลาการออกฤทธิ์ ดังนั้นสิ่งสำคัญในการประเมินการเกิดผลตอบสนองทางเภสัชวิทยาและแนวโน้มความเป็นพิษของผลิตภัณฑ์รักษาแผล

งานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้หนูตะเภาในการศึกษาเนื่องจากข้อดี คือ มีช่วงชีวิตสั้น สามารถนำมาใช้ได้ง่าย ราคาถูก มีขนาดเล็ก เลี้ยงง่าย ง่ายต่อการจับด้วยมือ สามารถใช้ปริมาณมากได้เพื่อความแม่นยำทางสถิติ **[7]** นอกจากนี้ มักถูกใช้เป็นตัวเลือกในการทดสอบสภาวะของแผล โดยเฉพาะในกรณีการสร้าง*แผลที่สูญเสียบางส่วนของชั้นหนังแท้* (Partial-thickness wound) และ*แผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้* (Full-thickness wound)

<u>ส่วนที่2</u> คำแนะนำกล่าวถึงข้อพิจารณาในการออกแบบการศึกษาทางคลินิกรวมถึงเกณฑ์การคัดเลือก (endpoint) โดยทั่วไปผลลัพธ์ทางคลินิกที่สัมพันธ์กับการใช้ผลิตภัณฑ์รักษาแผลสามารถแบ่งได้เป็นสองกลุ่มคือเพื่อทำให้การหายของแผลดีขึ้น (Improved wound healing) และเพื่อทำให้การรักษาแผลดีขึ้น (Improved wound care) โดยแต่ละกลุ่มก็จะมีเกณฑ์การคัดเลือกที่หลากหลายในการทดลองระดับคลินิก เมื่อสามารถคัดเลือกเกณฑ์การคัดเลือกจากคำแนะนำในส่วนนี้เพื่อที่จะทดสอบได้แล้วจึงทำการค้นคว้าผลงานวิจัยตีพิมพ์ในวารสารทางวิชาการเพื่อทำวิธีการทดลองของตนเอง

1. อัตราการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ (Incidence of complete wound closure)

การปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ของแผลเรื้อรังซึ่งเป็นแผลที่ไม่สามารถหายเป็นปกติ (nonhealing wound) เป็นหนึ่งในวัตถุประสงค์ส่วนใหญ่และเป็นเกณฑ์การคัดเลือกที่มีความหมายอย่างยิ่งทางคลินิก *การปิดของแผลอย่างสมบูรณ์* หมายถึง การงอกกลับคืนของหนังกำพร้าโดยปราศจากการซับเลือดซับหนองหรือปิดด้วยวัสดุปิดแผล และถูกยืนยันที่การศึกษาอย่างต่อเนื่องโดยแยกพิจารณาที่สองสัปดาห์ โดยทั่วไปการทดลองเพื่อยืนยันการเกิดการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์จากอัตราการเกิดการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ในกลุ่มที่ถูกรักษา (treatment group) และกลุ่มควบคุม (control group) ที่ระยะเวลาเดียวกัน (landmark analysis) ในกรณีทั่วไปผลการรักษาควรจะแสดงให้เห็นถึงสัดส่วนของการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์มีนัยสำคัญทางสถิติและทางคลินิก

ในกลุ่มที่ถูกรักษามากกว่ากลุ่มควบคุม เวลาที่ใช้ในการวัดจุดสิ้นสุดควรอยู่บนพื้นฐานธรรมชาติของโรคนั้นๆ

2. การเร่งการปิดของแผล (Accelerated wound closure)

ข้อบ่งชี้การปิดของแผลเร็วขึ้นควรสะท้อนการลดลดเวลาของการหายของแผลอย่างมีความหมายทางคลินิกโดยใช้การวิเคราะห์เวลาต่อสิ่งที่เกิดขึ้น (สิ่งที่เกิดขึ้นเริ่มจากการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์) การประเมินควรแสดงเป็นความถี่ของระยะเวลาที่เหมาะสมเพื่อตรวจสอบความแตกต่างอย่างมีความหมายของระยะเวลาจนกว่าแผลจะปิดในกลุ่มที่ถูกรักษา ถ้ามีการกล่าวอ้างว่าผลิตภัณฑ์สามารถเพิ่มอัตราการปิดของแผลและการเร่งการปิดของแผล การศึกษาก็ควรที่จะออกแบบไว้เพื่อตรวจสอบทั้งสองอย่าง เพราะโดยทั่วไปแผลที่สูญเสียบางส่วนของชั้นหนังแท้ของผู้ป่วยจะหายภายในสองถึงสามสัปดาห์ด้วยการรักษาพื้นฐาน เมื่อพิจารณาถึงเกณฑ์การคัดเลือกสำหรับผลิตภัณฑ์ที่เร่งการปิดของแผลของผู้ป่วย สิ่งดังกล่าวก็เป็นที่คาดหวังในการรักษาอย่างหนึ่งด้วย ตัวอย่างผลิตภัณฑ์ที่เร่งการปิดของแผลเพียง 1ถึง 2 วันก็อาจเป็นประโยชน์ทางคลินิก ถ้าผลิตภัณฑ์ดังกล่าวสามารถใช้ได้อย่างปลอดภัยในผู้ป่วยแผลไฟไหม้บริเวณกว้างที่ต้องการใช้เนื้อเยื่อบริเวณอื่นของร่างกาย

3. ความสะดวกสบายของการปิดแผลผ่าตัด (Facilitation of surgical wound closure)

ถ้ามีการกล่าวอ้างว่าผลิตภัณฑ์สามารถให้ความสะดวกสบายของการปิดแผลผ่าตัด การศึกษาควรที่จะถูกออกแบบเพื่อวัดอัตราการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ตามมาด้วยขั้นตอนการผ่าตัดที่จำเป็น (เช่น การโยกย้ายเนื้อเยื่อบริเวณอื่นมาปิดแผล (flap closure) ของแผลกดทับเรื้อรังบริเวณกว้าง) ความสามารถในการต้านทานและคุณภาพของการปิดแผลผ่าตัดควรถูกประเมินผลที่ระยะยาวเพื่อให้มั่นใจว่าผลิตภัณฑ์ไม่มีอันตราย

4. คุณภาพของการสมานแผล ; ความสวยงามและการออกฤทธิ์ (Quality of healing; cosmesis and function)

การประเมินการศึกษาเครื่องสำอางที่ต้องการเพิ่มคุณภาพของความสวยงามของการสมานแผล ควรออกแบบให้แสดงผลอย่างมีนัยสำคัญทางคลินิก เช่น การเกิดแผลเป็น โครงสร้างที่เหมาะสมและความรู้สึกของผิวหนังที่ถูกสมาน หรือความปกติของสีผิว การเลือกเกณฑ์การตัดสินทางคลินิกสำหรับพิสูจน์คำกล่าวอ้างของผลิตภัณฑ์นั้น สิ่งสำคัญที่ควรพิจารณาคือชนิดและบริเวณของแผล และตระหนักถึงเครื่องมือที่มีหรือที่สามารถพัฒนาขึ้นได้

ผลของการสมานแผลในการเกิดแผลเป็นนูน (Hypertrophic scar) ซึ่งเป็นโรคระยะยาวที่เกิดจากการถูกยับยั้งการทำงาน เช่น การยับยั้งการเคลื่อนที่ข้ามข้อต่อ) ตัวอย่างผลิตภัณฑ์รัก

แผลที่ลดการเกิดแผลเป็นนูนอาจจะนำไปสู่การพิสูจน์การทำงาน การศึกษาที่ถูกออกแบบเพื่อประเมินผลลัพธ์ของการทำงานโดยผ่านเกณฑ์การตัดสินทางคลินิกสามารถใช้ในการสนับสนุนคำกล่าวอ้างในเชิงหน้าที่ของผลิตภัณฑ์ได้

งานวิจัยครั้งนี้จึงทำการประเมินประสิทธิภาพของวัสดุทางการแพทย์ที่ถูกพัฒนาขึ้น คือ ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่มีสมบัติทำให้การหายของแผลดีขึ้น โดยไม่ช่วยเร่งหรือสนับสนุนการปิดแผล (Wound closure) แต่จะออกฤทธิ์เฉพาะการช่วยเพิ่มคุณภาพการสมานแผล (Quality of wound healing) หมายถึงการลดแผลเป็นหดรั้งและการทำให้แผลที่หายมีความนุ่มใกล้เคียงผิวหนังปกติในสัตว์ทดลองก่อนการทดลองในระดับคลินิกต่อไป

2.1.7 **การตรวจสอบเนื้อเยื่อโดยการย้อมสี** [28]

วัตถุประสงค์ของการย้อมสีเนื้อเยื่อ คือ การย้อมสีของเซลล์และส่วนประกอบของเซลล์ที่อยู่ในเนื้อเยื่อนั้นๆ เพื่อให้ศึกษาลักษณะรูปร่าง หรือ ปริมาณ ของเซลล์ภายในเนื้อเยื่อ ซึ่งโดยทั่วไปเซลล์ในร่างกายนั้นประกอบด้วย 2 ส่วนคือ นิวเคลียส (Nucleus) และไซโตพลาสม (Cytoplasm)

2.1.7.1 เซลล์และองค์ประกอบของเซลล์

2.1.7.1.1 นิวเคลียส

ภายในนิวเคลียสมีนิวคลีโอลัส (Nucleolus) ซึ่งมีรูปร่างกลมติดสีเข้มจัดซึ่งมีสาร อาร์ เอ็น เอ (RNA ; ribonucleic acid) อยู่มาก นอกจากนี้ในนิวเคลียสยังมีส่วนประกอบสำคัญอีกอย่างคือ โครมาติน (chromatin) ซึ่งประกอบด้วย ดี เอ็น เอ (DNA ; Deoxyribonucleic acid) ซึ่งมีทั้งชนิดไม่ทำงาน (inactive) และทำงาน (active) ถ้าย้อมสีด้วย H&E พบว่าส่วน inactive chromatin จะติดสีน้ำเงิน ถ้าเป็นส่วน active จะไม่ติดสี

2.1.7.1.2 ไซโตพลาสม

เป็นส่วนหนึ่งของโปรโตพลาสม (Protoplasm) ที่อยู่รอบนิวเคลียส จะเป็นส่วนที่ติดสีจางมาก ถ้าตัดและย้อมด้วยวิธีธรรมดา ไซโทพลาสมจะประกอบด้วยส่วนเล็กๆ 2 ชนิด คือ ออร์แกเนล (Organelles) และ อินคลูชัน (Inclusion) คือส่วนมีชีวิตและไม่มีชีวิต โดยส่วนที่มีชีวิตประกอบไปด้วยเอนโดพลาสมิก เรติคูลัม (Endoplasmic reticulum), กอลจิ คอมเพล็กซ์ (Golgi complex), ไมโทคอนเดรีย (Mitochondia), ไลโซโซม (Lysosome), เส้นใยโปรตีน (Microtubule) ในขณะที่

ส่วนไม่มีชีวิตประกอบด้วย ส่วนกักเก็บอาหารประเภทไขมัน คาร์โบไฮเดรต และโปรตีนซึ่งส่วนใหญ่จะอยู่ในรูปเมตริกซ์ เอนไซม์ และเม็ดสีต่างๆ

2.1.7.1.2 เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (Connective tissue)

เป็นเนื้อเยื่อที่มีหน้าที่สำคัญในการยึดหรือเชื่อมโยงเนื้อเยื่อต่างๆเข้าด้วยกัน ประกอบด้วยเซลล์ที่มีจำนวนน้อยและสสารระหว่างเซลล์ที่เรียกว่าเมตริกซ์ที่มีอยู่จำนวนมาก ในส่วนของเมตริกซ์ประกอบด้วยไฟเบอร์ที่เป็นเส้นใยแทรกระหว่างเซลล์ และ Amorphous ground state ที่เป็นส่วนที่ไม่มีรูปร่าง ลักษณะคล้ายวุ้น เมตริกซ์ หรือ intercellular Substance มี 2 ชนิดคือไฟเบอร์และ ground substance

- ไฟเบอร์ แบ่งออกได้เป็น 3 ชนิด

1. คอลเจนไฟเบอร์ (collagen fiber) เป็นสารโปรตีนรวมตัวกันเป็นบันเดิล (bundle) เมื่อไม่ย้อมจะเห็นเป็นสีขาว เมื่อย้อมด้วย H&E จะติดสีแดงของ eosin คอลลาเจนไฟเบอร์ถูกสร้างโดยเซลล์ไฟโบรบลาส ซึ่งทำหน้าที่เป็นเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพัน

2. อิลาสติกไฟเบอร์ (elastic fiber) มีขนาดเล็กกว่าคอลลาเจนไฟเบอร์ถูกสร้างขึ้นโดยเซลล์ไฟโบรบลาส ขณะสดจะมีสีเหลือง เมื่อย้อมด้วย H&E จะติดสีแดงของ eosin

3. เรติคิวลาร์ไฟเบอร์ (reticular fiber) เป็นเส้นใยขนาดเล็กประสานกันเป็นร่างแห ทำหน้าที่เป็นโครงของอวัยวะต่างๆ เช่น ตับ ไขกระดูก เมื่อย้อมด้วย H&E

- Ground substance มีลักษณะคล้ายวุ้น (gel)ประกอบด้วย 2 ส่วนคือ

1. Protein polysaccharide (mocopolysac) ซึ่งมีอยู่ 2 แบบ

1.1 Non-sulfated form ส่วนใหญ่เป็นพวกกรดไฮยาลุโรนิค (hyaluronic acid)ที่สร้างโดยเซลล์ไฟโบรบลาส

1.2 Sulfated form เป็นพวก chondroitin sulfuric acid ติดสีชมพูของ erosin พบใน cartilage และ bone matrix

2. Tissue fluid เป็นของเหลวที่อยู่เนื้อเยื่อ

2.1.1.7.3 การย้อมสีชิ้นเนื้อ (Tissue staining)

การย้อมสีชิ้นเนื้อมีทั้งการย้อมธรรมดา (Rountine staining) และวิธีพิเศษ (Special staining) ซึ่งมีวิธีการต่างกันมาก โดยในทางปฏิบัติจะทำการย้อมสีธรรมดาก่อนเมื่อแปรผลได้ไม่ชัดเจนจึงจะอาศัยการย้อมสีวิธีพิเศษ เพื่อช่วยในการแปรผลภายหลัง

การย้อมสีชิ้นเนื้อด้วยวิธีธรรมดา ที่นิยมใช้เป็นมาตรฐานคือ วิธี Haematoxylin และ Erosin โดยผลที่ได้จากการย้อมคือ นิวเคลียสจะติดสีน้ำเงินของ Haematoxylin ส่วนไซโตพลาสมจะติดสีแดงของ Erosin

2.2 งานวิจัยที่เกี่ยวข้อง (Review literature and related article)

ในปี ค.ศ. 1996 Risako Matsui และคณะ นำผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Terudermis® มาประยุกต์ใช้กับแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้ในหนูตะเภาร่วมกับการปิดทับด้วยผิวหนังบริเวณอื่นของหนูเอง(Autologous skin grafting) พบว่าที่สัปดาห์ที่สองอัตราการติดของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Terudermis® ร่วมกับการปิดทับด้วยผิวหนังบริเวณอื่นของหนูเอง คิดเป็นอัตราส่วน 100 เปอร์เซ็นต์ และที่สัปดาห์ที่หกพบว่าพื้นที่ของแผลคิดเป็น 80 เปอร์เซ็นต์ ของพื้นที่แผลเดิมกลับมามีความหนาเท่ากับผิวหนังปกติ แสดงให้เห็นว่า Terudermis® มีสมบัติเป็นเมทริกซ์ที่ดีและใช้สำหรับการรักษาแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้ร่วมกับการปิดทับด้วยผิวหนังบริเวณอื่นได้ [29]

ในปี ค.ศ. 1997 W.W.K. King และคณะ นำผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Integra® มาประยุกต์ใช้กับแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้ในหนูตะเภา เพื่อประเมินอัตราการติดของผิวหนังสังเคราะห์กับแผลในสัตว์ทดลองและประเมินการเกิดการเจริญของหลอดเลือดใหม่ (Vascularization) ที่บ่งบอกความสัมพันธ์ทางชีวภาพของเนื้อเยื่อใหม่ ผลการทดลองคือ Integra® สามารถติดกับแผลได้ดีในหนู18ตัวทั้งหมดจาก 20 ตัว (คิดเป็นอัตราส่วน 90%) และใน 18 ตัวพบว่าเกิดการเจริญของหลอดเลือดใหม่ 14 ตัว (คิดเป็นอัตราส่วน 70%) ส่วนอีก 4 ตัวพบเนื้อตาย (Necrotic tissue) และไม่พบการเจริญของหลอดเลือดใหม่ จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า Integra® จะสามารถรวมตัวได้อย่างดีกับเนื้อเยื่อบริเวณแผลและรอบๆแผลเมื่อไม่มีการติดเชื้อ [30]

ในปี ค.ศ. 2003 Noppadon Sangjun และคณะ ทำการศึกษาประสิทธิภาพของไคติน-พีเอเอ(chitin-PAA) และฟิลม์พอลิเมอร์ผสมชนิดรับประทานได้จากไคโตซานกับแป้งดัดแปรเอสเทอร์

(carboxymethychitosan hydrogels) บนแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้ในหนูตะเภา 12 ตัว เปรียบเทียบกับวัสดุปิดแผลชั่วคราวที่ใช้อย่างแพร่หลายในท้องตลาด (Cutinova hydro) จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า แผลที่ถูกรักษาด้วยไคติน-พีเอเอ และฟิลม์พอลิเมอร์ฯ พบการงอกกลับเข้ามาของชั้นหนังกำพร้าและชั้นหนังแท้มายังบริเวณแผลอย่างเห็นได้ชัด และมีขนาดของแผลลดลงมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับวัสดุในท้องตลาด [31]

ในปี ค.ศ. 2005 Raveewan Siripokasupkul และคณะ ทำการเตรียมผลิตภัณฑ์แผ่นปิดแผลในรูปแบบของแผ่นฟิล์มและแผ่นใยแห้งจากสารเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกแห้งของทุเรียน ศึกษาผลของผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่เตรียมจากสารเจลพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการหายของบาดแผลเปิดบนผิวหนังของสุนัข โดยทำการผ่าตัดเปิดแผลผิวหนังสุนัขที่มีสุขภาพดี แนวกลางหลัง ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางของแผล 2 เซนติเมตร จำนวน 8 แผล รักษาบาดแผลด้วยวิธีสุ่มเป็น 4 กลุ่ม คือ บาดแผลที่รักษาด้วย 1% โพวิโดนไอโอดีน (กลุ่มควบคุม) รักษาด้วยแผ่นฟิล์มปิดแผลเจลพอลิแซ็กคาไรด์ (กลุ่มทดลองที่ 1)รักษาด้วยแผ่นใยแห้งปิดแผลเจลพอลิแซ็กคาไรด์ (กลุ่มทดลองที่ 2) รักษาด้วย 1% โพวิโดนไอโอดีนและปิดด้วยแผ่นฟิล์มปิดแผล Opsite® Flexigrid (กลุ่มทดลองที่ 3) ตามลำดับ ทุกแผลปิดทับด้วยผ้าก๊อซ วัดพื้นที่ของแผลเพื่อดูการปิดของแผลทุก 3 วัน ผลการศึกษาพบว่า กลุ่มทดลองที่ 2 แสดง 100% แผลปิดโดยสมบูรณ์ในวันที่ 21 ปากแผลมีพื้นที่เล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญ (p<0.05) ในวันที่ 12 และ 15 บาดแผลที่รักษาด้วยวิธีในกลุ่มทดลองที่ 1 และ 2 มีขนาดของแผลเหลืออยู่เล็กกว่าแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (p<0.05) เทียบกับกลุ่มควบคุมและกลุ่มทดลองที่ 3 ในวันที่ 18 และ 21 ของการรักษา กลุ่มควบคุม กลุ่มทดลองที่ 1 และ 3 มีการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ได้ 50.0 % 87.5% และ 37.5 % ในวันที่ 21 ตามลำดับ การประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลพบว่า แผลที่รักษาด้วยผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่เตรียมจากเจลพอลิแซ็กคาไรด์ เกิดปฏิกิริยาไม่พึงประสงค์น้อยโดยพิจารณาจากที่ไม่พบการอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลันในชั้นผิวหนังแท้ และการเกิดแกรนูโลมาในชั้นผิวหนังแท้ มีน้อยกว่าบาดแผลในกลุ่มควบคุมและการทดลองที่ 3 ผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่เตรียมจากเจลพอลิแซ็กคาไรด์ช่วยเร่งการหายของบาดแผล ลดการอักเสบและปฏิกิริยาของเนื้อเยื่อ ส่งเสริมการเจริญแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุผิวหนังและการเกิดไฟโบรซิส จากผลการศึกษาแนะนำว่าผลิตภัณฑ์ปิดแผลที่เตรียมจากเจลพอลิแซ็กคาไรด์ มีประสิทธิภาพ ใช้รักษาบาดแผลเปิดในสุนัขได้ [32]

ในปี ค.ศ. 2007 Lie Ma และคณะ รายงานว่า bilayer dermal equivalent (BDE) ที่มีลักษณะเป็นโครงร่างที่มีรูพรุนประกอบด้วยคอลลาเจน-ไคโตซาน และชั้นของซิลิโคนมีประสิทธิภาพในการเหนี่ยวนำการงอกใหม่ของชั้นหนังแท้ในสัตว์ทดลองที่สูญเสียทั้งชั้นความหนา

ของชั้นหนังแท้ โดยผลการทดลองในหลอดทดลอง (*In vitro*) พบว่า BDE ไม่เป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity) และไม่ระคายเคือง (Irritability) เนื่องจาก BDE สนับสนุนการเจริญเติบโตของเซลล์ไฟโบรบลาสได้อย่างดี อีกทั้งการทดสอบระดับเนื้อเยื่อของ BDE กับผิวหนังของหมู ในสัปดาห์ที่ 4 ภายหลังการผ่าตัดพบเซลล์ไฟโบรบลาสและเมทริกซ์นอกเซลล์(extracellular matrix) จำนวนมากภายในโครงร่างดังกล่าว นอกจากนี้ BDE ยังมีประสิทธิภาพในการสนับสนุนการงอกของเส้นเลือดใหม่ (Angiogenesis) ผลการทดลองทั้งหมดบ่งชี้ว่า BDE อาจจะเป็นทางเลือกหนึ่งในการรักษาการสูญเสียผิวหนังในอนาคต **[33]**

การทบทวนสิทธิบัตรที่เกี่ยวข้องกับผิวหนังสังเคราะห์

1) US patent no. 4947840 **[34]**

ในปี ค.ศ. 1990 Yannas. Ioannnis V. และคณะ ได้ทำการค้นพบส่วนผสมของวัตถุดิบขนาดรูพรุน ความสามารถในการสลายตัวของวัสดุ ซึ่งขนาดรูพรุน อัตราการสลายตัวทางชีวภาพและสัดส่วนปริมาตรรูพรุนดังกล่าวถูกควบคุมที่ถูกควบคุมดังกล่าว ส่งผลให้ค่าอัตราการหดรั้งของผิวหนังล้อมรอบพื้นที่แผลช้าลงกว่าปกติ

การอ้างสิทธิ์

วิธีการชะลอหรือยับยั้งการหดรั้งของขอบแผลและส่งเสริมการสร้างเนื้อเยื่อ ควรใช้วัสดุที่สามารถย่อยสลายได้เองตามธรรมชาติที่มีขนาดรูพรุนอยู่ระหว่าง 9 ไมโครเมตรถึง 630 ไมโครเมตร โดยมีสัดส่วนปริมาตรรูพรุนมากกว่า 80% และอัตราการย่อยสลายของวัสดุดังกล่าวมีประสิทธิภาพพอในการชะลอหรือยับยั้งการหดรั้งของขอบแผลอย่างมีนัยสำคัญ โดยประมาณมากกว่า 15 วัน

2) US patent no. 4985036 **[35]**

ในปี ค.ศ. 1991 Lommen, Etienne J. C. M. P. ได้ทำการค้นพบวัสดุซึ่งยอมให้เกิดการส่งผ่านสารคัดหลั่งของแผล โดยชั้นบนเป็นอีลาสโตเมอร์ (สารที่มีความยืดหยุ่นคล้ายยาง) ที่มีความหนา 0.01-0.2 มิลลิเมตร และมีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนไม่เกิน 0.7 ไมโครเมตร และมีความหนาแน่นของรูพรุนบริเวณผิวตั้งแต่ 1-75 เปอร์เซ็นต์ ส่วนชั้นล่างเป็นอีลาสโตเมอร์ที่มีความหนา 0.05-1 มิลลิเมตรและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนขนาดใหญ่ไม่เกิน 50-200 ไมโครเมตร โดยผนังของรูพรุนขนาดใหญ่ดังกล่าวต้องมีรูพรุนขนาดเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนขนาด 0.1-

0.25 ไมโครเมตร วัสดุในสิทธิบัตรนี้ถูกทำขึ้นให้มีความเหมาะสมสำหรับการใช้เป็นผิวหนังสังเคราะห์

การอ้างสิทธิ์

ผิวหนังสังเคราะห์ซึ่งยอมให้เกิดการส่งผ่านสารคัดหลั่งของแผล ประกอบด้วยชั้นบนเป็นอีลาสโตเมอร์ ที่มีความหนา 0.01-0.2 มิลลิเมตร ซึ่งมีรูพรุนเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนไม่เกิน 0.7 ไมโครเมตร และมีความหนาแน่นของรูพรุนบริเวณผิวตั้งแต่ 1-75 เปอร์เซ็นต์ และชั้นล่างเป็นอีลาสโตเมอร์ที่มีความหนา 0.05-1 มิลลิเมตรและมีเส้นผ่านศูนย์กลางของรูพรุนขนาดใหญ่ไม่เกิน 50-200 ไมโครเมตร โดยผนังของรูพรุนขนาดใหญ่ดังกล่าวต้องมีรูพรุนขนาดเล็กที่มีเส้นผ่านศูนย์กลางรูพรุนขนาด 0.1-0.25 ไมโครเมตร

3) US patent no. 4418691 **[36]**

ในปี ค.ศ. 1983 Yannas. Ioannnis V. และคณะ ได้ทำการค้นพบวิธีการใช้แรงปั่นเหวี่ยงเพื่อเหนี่ยวนำให้เซลล์ที่มีชีวิตกลายเป็นผลึกเส้นใย (fibrous lattice) เหมือนกับผลึกเส้นใยที่ถูกใส่เซลล์เข้าไปโดยการใช้แรงปั่นเหวี่ยง ความหลาหลายของผลึกเส้นใยดังกล่าวอาจจะถูกทำขึ้นมาโดยวิธีภายในสิทธิบัตรนี้ เช่น ผลึกเส้นใยคอมโพสิตคอลลาเจนที่มีรูพรุนมากและถูกเชื่อมข้ามพันธะกับไกลโคสอะมิโนไกลแคน โดยก่อนทำการปั่นเหวี่ยงชิ้นเนื้อเยื่อที่ได้จากผู้บริจาคต้องทำการใส่สารหนึ่งชนิดหรือหลายชนิด เช่น เอนไซม์ทริปซินหรือเอนไซม์คอลลาจิเนส เพื่อแยกเซลล์ออกจากเนื้อเยื่อ เซลล์จะถูกรวมเข้ากับสารละลายน้ำเพื่อสร้างให้เป็นสารแขวนลอยของเซลล์ ชิ้นส่วนของผลึกเส้นใยจะถูกใส่ไว้ในภาชนะ ในที่นี้เป็นถังหรือหลอดที่เหมาะสำหรับการหมุนด้วยเครื่องปั่นเหวี่ยง สารแขวนลอยของเซลล์จะถูกใส่เข้าไปในหลอดดังกล่าวและสามารถสัมผัสกับผลึก แรงการปั่นเหวี่ยงจะส่งผลให้เซลล์มีความหนาแน่นมากกว่าสารละลายน้ำจนเป็นโครงร่างผลึกกระจายตัวและด้วยปัจจัยที่หลากหลาย เซลล์จะสามารถถูกใส่เข้าไปภายในบริเวณของผลึกที่ต้องการได้ในลักษณะเดียวกัน

การอ้างสิทธิ์

ขั้นตอนการส่งเสริมการทดแทนเนื้อเยื่อที่ได้รับความเสียหายหรือเนื้อเยื่อแผลที่ถูกตัดออกไปประกอบด้วยขั้นตอนดังนี้ 1. สร้างสารแขวนลอยเซลล์ภายในของเหลวที่ความหนาแน่นต่ำกว่าเซลล์ 2. การแทนที่ของผลึกเส้นใยในบริเวณที่เหมาะสมระหว่างแรงการหมุนเหวี่ยง

4) US patent no. 4448718 **[37]**

ในปี ค.ศ. 1984 Yannas. Ioannnis V. และคณะ ได้ทำการค้นพบกระบวนการเตรียมวัสดุคอมโพสิตที่มีคอลลาเจนและไกลโคสอะมิโนไกลแคนถูกเชื่อมพันธะกัน ซึ่งเป็นการรวมเอาคอลลาเจนและไกลโคสอะมิโนไกลแคนที่มิได้อยู่ติดกันด้วยแรงเชื่อมพันธะแต่ติดกันด้วยก๊าซแอลดีไฮด์จนสามารถเชื่อมข้ามพันธะจากที่มีมวลโมเลกุลขนาด 800 เป็น 60,000 ดาลตันด้วยกระบวนการนี้ผิวหนังสังเคราะห์ที่ถูกผลิตขั้นโดยวิธีการนี้สามารถคงความเสถียรในการเก็บได้ระยะเวลานานกว่าวัสดุที่เตรียมโดยใช้วิธีการอื่นในการเชื่อมพันธะ

การอ้างสิทธิ์

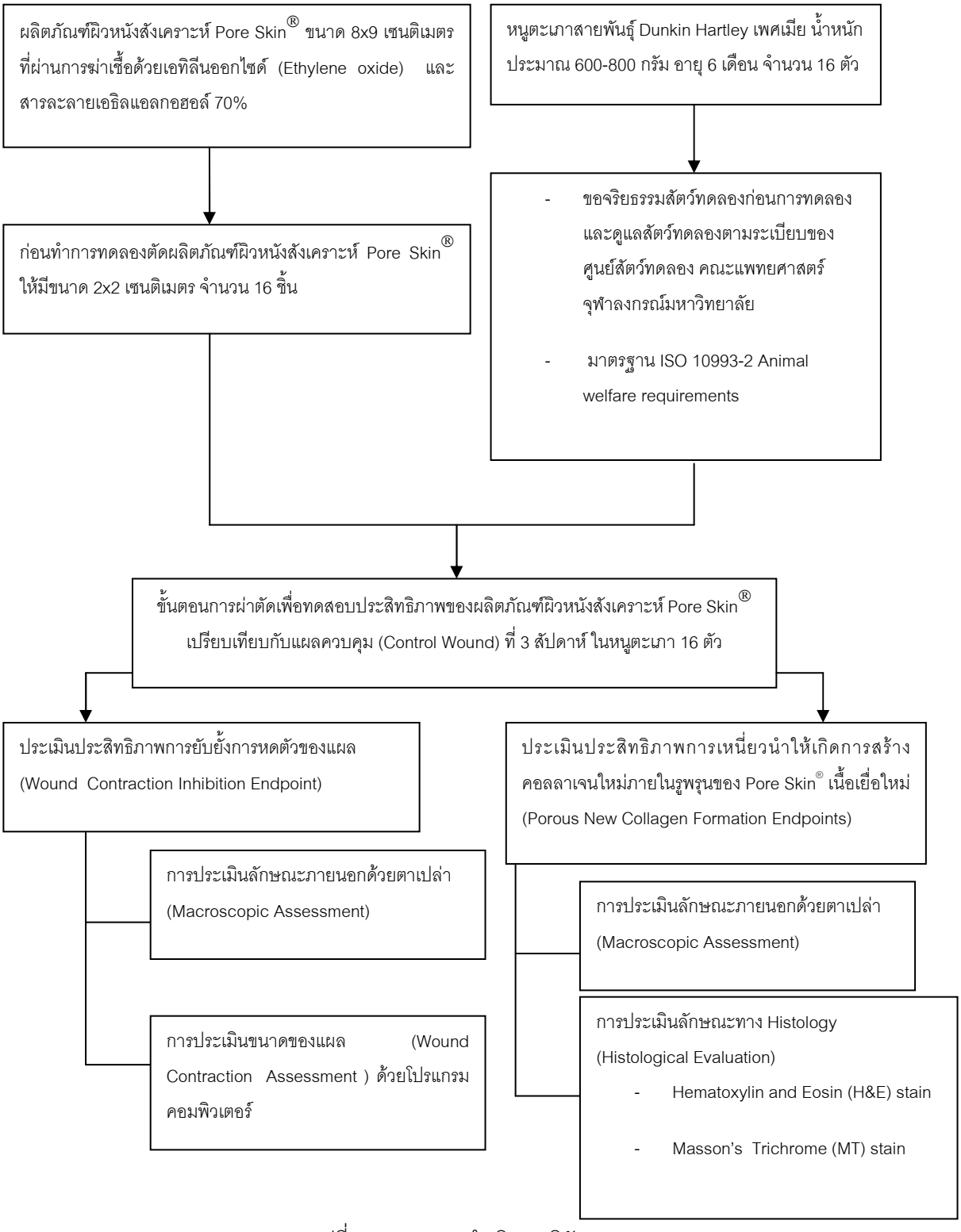
กระบวนการเตรียมวัสดุคอมโพสิตที่มีคอลลาเจนและไกลโคสอะมิโนไกลแคนถูกเชื่อมพันธะกัน ประกอบด้วยคอลลาเจนและไกลโคสอะมิโนไกลแคนที่มิได้อยู่ติดกันด้วยแรงเชื่อมพันธะแต่ติดกันด้วยก๊าซแอลดีไฮด์ จนสามารถเชื่อมข้ามพันธะจากที่มีมวลโมเลกุลขนาด 800 เป็น 60,000 ดาลตันด้วย สารละลายหรือก๊าซในกลุ่มแอลดีไฮด์ เช่น ฟอร์มัลดีไฮด์ (formaldehyde) อะซิทัลดีไฮด์ (acetaldehyde) ไกลออกซอล (glyoxal) หรือ กลูตารัลดิไฮด์ (glutaraldehyde)

บทที่ 3

อุปกรณ์และวิธีดำเนินการวิจัย

3.1 แผนการดำเนินงานวิจัย

สรุปแผนการดำเนินการวิจัยดังรูปที่ 3.1



รูปที่ 3.1 แสดงแผนดำเนินการวิจัย

3.2 วัตถุดิบ สารเคมี และอุปกรณ์ในการวิจัย

3.2.1 สัตว์ทดลอง

หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley เพศเมีย น้ำหนักประมาณ 600-800 กรัม อายุ 6 เดือน จำนวน 16 ตัว จากองค์การเภสัชกรรมแห่งประเทศไทย (รูปที่ 3.2) โดยมีรายละเอียดของสัตว์ทดลองดังภาคผนวก ก.

รูปที่ 3.2 หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley

ที่มา : http://www.nlac.mahidol.ac.th/nlacwwwtha/spec_outGuineapig.htm

3.2.2 วัตถุดิบ และสารเคมี

1. ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ขนาด 8.0x9.0 เซนติเมตร จำนวน 2 แผ่นที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทิลีนออกไซด์ และสารละลายเอทิลแอลกอฮอล์ 70% จากห้องปฏิบัติ การนวัตกรรมเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะสังเคราะห์ อาคาร อปร. ชั้น 9 ศูนย์วิจัยคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2. น้ำกลั่น (double-distilled water)
3. น้ำปราศจากไอออน (deionization water)
4. Ethanol 70% จากฝ่ายเภสัชกรรม โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์
5. Gentamycin จากบริษัท M&H Manufacturing, Samutprakarn, Thailand
6. L-Ascorbic Acid จากบริษัท Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
7. Normal Saline Solution (NSS) จากบริษัท General Hospital Products, Patumthani, Thailand

8. Phosphate Buffer Saline (PBS) จากบริษัท Invitrogen Corp., Paisley, UK (Cat. No.10010-031)
9. Paraformaldehyde จากบริษัท Sigma Chem,St. Louis, USA (Cat.No. P6148)
10. Mide Oxidising Solution จากบริษัท Tristel Solution Limited, UK (Cat.No. 10049-04-4)
11. ยาชา Chalocaine 1% จากบริษัท L.B.S. Laboratory Limited ประเทศไทย
12. ยาปฏิชีวนะ Lincimycin Injection จากบริษัท T.P. DRUG LABORATORIES (1969) CO.,LTD.
13. ยาแก้ปวด Millidol (Tramadol HCL 50 mg) จากบริษัท Millimed Co., Ltd. Samutprakarn, Thailand.
14. Thiopental Sodium for Injection BP 1กรัม จากบริษัท Jagsonpal Pharmceuticals Ltd., INDIA
15. ยาใส่แผล โพวิโดน-ไอโอดีน จากบริษัท ไบเออร์สด๊อรฟ (ประเทศไทย)

3.2.3 เครื่องมือที่ใช้ทำการวิจัย

1. เครื่องชั่ง 4 ตำแหน่ง (4-digit balance) ของบริษัท Mettler Toledo, Switzerland
2. เครื่องฆ่าเชื้อด้วยไอน้ำความดันสูง (Autoclave) รุ่น HVE 25/50 ของบริษัท Hirayama, Japan
3. ตู้อบ (Oven) อุณหภูมิ 45 – 65^{o}C
4. ตู้เย็น (Refrigerator)
5. กล้องจุลทรรศน์ (Phase contrast microscope)
6. กล้องจุลทรรศน์แบบแสง (Light Microscope) ยี่ห้อ Olympus
7. ปัตตาเลี่ยน (Hair clipper) ยี่ห้อ Remington จากบริษัท Rovcal, Inc., Germany
8. กล้องดิจิตอล Sony รุ่น DSC-F828 8.0 Mega Pixels

9. โถดูดความชื้น (Desiccator)

10. กระดาษทิชชู่ไม่มีขุย

11. สำลีที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทิลีนออกไซด์

12. ผ้าก็อซที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทิลีนออกไซด์

13. ไหมไวคิลเบอร์ 5-0 (Reverse cutting) W9514T จากบริษัท Johnson& Johnson Intl, Belgium

14. ROYAL™ (Single Use Skin Staplers with Stainless Steel Staples) รุ่น 35W จากบริษัท Autosuture , USA

15. APPOSE™ (Single Use Skin Staple Remover) จากบริษัท Autosuture , USA

16. ชุดอุปกรณ์ผ่าตัดExcision จากห้องผ่าตัดพันธุ์ทิพย์ โรงพยาบาลจุฬาลงกรณ์

17. แผ่นอลูมิเนียมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตรที่ผ่านการฆ่าเชื้อด้วยเอทิลีนออกไซด์

18. FEATHER SURGICAL DISPOSABLE BLADE – SCALPELS No.10, 11 และ 15 จากบริษัท FEATHER Safety Razor Co., Ltd, Japan.

19. 3M™ Tegaderm™ Transparent Dressing, 4" X 4.75"(10X12 เซนติเมตร) จากบริษัท 3M , USA.

20. เทปกาวเหนียว Neotape จากบริษัท Neoplast CO.LTD. ประเทศไทย

21. ถุงมือสำหรับการศัลยกรรม ดูร่า ชนิดปราศจากเชื้อ ขนาด 6, 6ครึ่ง และ 7 บริษัท สหบุญทองกรุ๊ป จำกัด

22. กระบอกฉีดยา นิโปร ความจุระบุ 1,3,5,10 และ 20 มิลลิลิตร บริษัท เซียงไฮ ไคนด์ลี่ เอนเตอร์ไพรส์ ดิเวลอปเมนท์ กรุ๊ป จำกัด ประเทศจีน

23. เข็มฉีดยา นิโปร เบอร์ 21, 26, 27 และ 28 ยาว 1 นิ้ว จากบริษัท Nipro Corporation, Japan.

3.3 รายละเอียดขั้นตอนการดำเนินการวิจัย

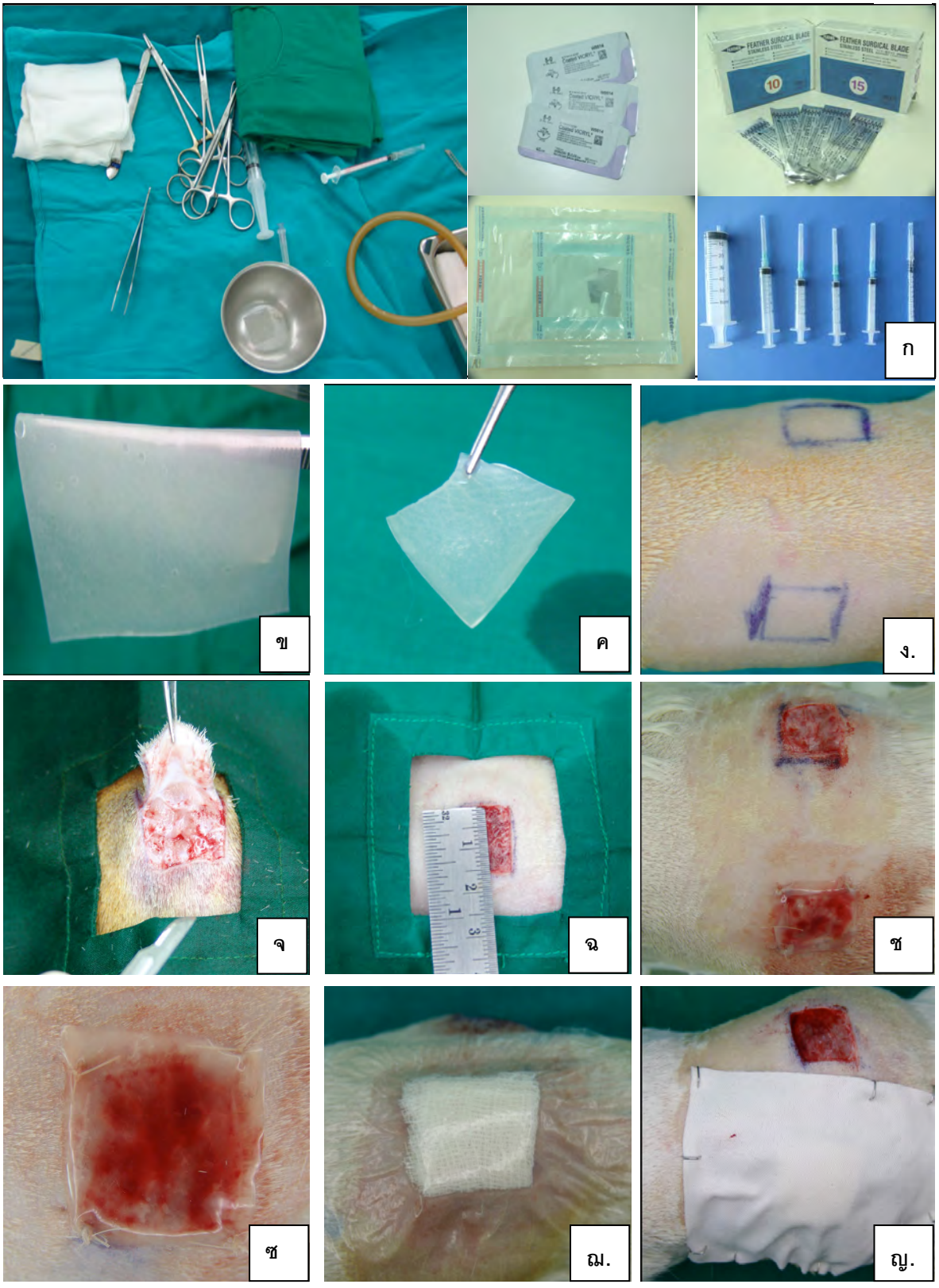
3.3.1 ขั้นตอนการผ่าตัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ในสัตว์ทดลอง (ดังรูปที่ 3.3)

1. จัดเตรียมอุปกรณ์ผ่าตัดในเขตพื้นที่ปลอดเชื้อ(Sterile)
2. ตัดผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ขนาด 8.0x9.0 เซนติเมตร โดยใช้มีดผ่าตัดเบอร์ 10 ให้มีขนาด 2.0x2.0 เซนติเมตร จำนวน 16 ชิ้น จากนั้นแช่ในยาปฏิชีวนะ Gentamycin® ก่อนการผ่าตัด
3. นำหนูตะเภาที่ผ่านการอดอาหารก่อนทดลองอย่างน้อย 4 ชั่วโมง มาทำการชั่งน้ำหนักและใส่หมายเลขสัตว์ทดลอง จากนั้นสลบหนูโดยใช้ยาสลบ Zoletil100 ขนาดที่ใช้ (Dose) 50 มก/กก. **[38]** ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลังอย่างช้าๆ จากนั้นนำสัตว์ไปพักในที่มืดและเงียบและตรวจดูการตอบสนองของสัตว์โดยดูจากการกระพริบตาเมื่อใช้นิ้วเคาะที่หัวถ้าสัตว์กระพริบตาแสดงว่ายังไม่สลบ แต่ถ้าหยุดกระพริบตาแสดงว่าสลบ
4. หลังจากที่หนูสลบแล้ว โกนขนบริเวณส่วนหลังบริเวณลำตัวทั้ง 2 ข้างของหนูด้วยปัตตาเลี่ยน ใช้ยาฆ่าเชื้อราและแอลกอฮอล์เช็ดผิวหนังหนูตะเภา
5. ใช้แผ่นอลูมิเนียมขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตรที่ผ่านการด้วยเอทิลีนออกไซด์เป็นแม่แบบ เพื่อวาดสี่เหลี่ยมจัตุรัสขนาด 1.5 x 1.5 เซนติเมตร จำนวน 2 ตำแหน่งคือด้านข้างลำตัวหนูทั้งซ้ายและขวาด้วยสี Gentian Violet
6. ฉีดยาชา Chalocaine 1% ตามแนวของแผลที่วาดด้วยสี Gentian Violet
7. กรีดและตัดผิวหนังออกตามแนวเส้นที่วาดไว้ให้ลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อใต้ผิวหนัง (Panniculus carnosus) ด้วยมีดผ่าตัดเบอร์ 10 และ 15 ตามลำดับ
8. วัดขนาดแผลใหม่อีกครั้ง เนื่องจากแผลที่เกิดขึ้นจึงมีขนาดเปลี่ยนแปลงไปจากขนาดที่วาดไว้และบันทึกผลเป็นขนาดแผลเริ่มต้น
9. โดยแผลด้านขวาคือแผลควบคุม เป็นแผลเปิด ทำความสะอาดแผลจนกระทั่งแห้งและปล่อยให้หายตามธรรมชาติ แผลด้านซ้ายคือแผลทดสอบ เป็นแผลที่ปิดด้วย

Pore Skin® ขนาด 2 x 2 เซนติเมตรซึ่งเย็บตรึงกับแผลด้วยไหมไวคิลเบอร์ 5-0 จากนั้นปิดแผลด้วยผ้าก๊อซ Tegaderm® และแผ่นเทปเหนียว Neotape ที่เย็บกับผิวหนังของหนูด้วย Staplers ตามลำดับ

10. ภายหลังการผ่าตัด (Post-surgical care) ทายา Visidic gel บริเวณกระจกตาของหนู ทำการฉีดยาปฏิชีวนะลินโคมัยซิน 0.03 ml และยาแก้ปวดมิลลิดอล 0.2 ml ตามลำดับ (รายละเอียดดังภาคผนวก ข.) จากนั้นให้ความอบอุ่นและรอจนกว่าหนูจะเคลื่อนไหวได้ จึงย้ายกลับเข้ากรง

หมายเหตุ ในการวิจัยครั้งนี้ได้รับการอนุมัติให้มีการทดลองในสัตว์ทดลองจากการประชุมคณะกรรมการพิจารณาจริยธรรมการวิจัย เลขที่ใบรับรอง 2/2552 โดยฝ่ายวิจัยคณะแพทยศาสตร์จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย (ภาคผนวก จ)



รูปที่ 3.3 แสดงขั้นตอนการผ่าตัดเพื่อทดสอบประสิทธิภาพของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ในสัตว์ทดลอง

รูป ก. อุปกรณ์สำหรับการผ่าตัดในเขตพื้นที่ปลอดเชื้อ

รูป ข. ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin®ขนาด 8x9 เซนติเมตร

รูป ค. ผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ภายหลังการตัดด้วยมีดผ่าตัดเบอร์ 10 จนมีขนาด 2.0x2.0 เซนติเมตร

รูป ง. ใช้สี Gentian Violet วาดตำแหน่งทำแผลขนาด 1.5X1.5 เซนติเมตร บริเวณลำตัวของหนูทั้งด้านซ้ายและด้านขวา

รูป จ. ใช้มีดเบอร์ 10 และ 15 ในการตัดผิวหนังทั้งหมดออกขนาด 1.5x1.5 เซนติเมตร ตามเส้นที่วาดไว้ให้ลึกถึงชั้นกล้ามเนื้อ Panniculus carnosus

รูป ฉ. วัดขนาดแผลอีกครั้ง โดยใช้ไม้บรรทัด

รูป ช. วางผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ขนาด 2X2 เซนติเมตร บริเวณแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัวหนูตะเภา ส่วนแผลด้านขวาคือแผลควบคุมเป็นแผลเปิด

รูป ซ, ฌ และ ญ. Pore Skin® ขนาด 2 x 2 เซนติเมตรถูกเย็บตรึงกับแผลด้วยไหมไวคิลเบอร์ 5-0 จากนั้นปิดแผลด้วยผ้าก๊อซ Tegaderm® และแผ่นเทปเหนียว Neotape ที่เย็บกับผิวหนังของหนูด้วย Staplers ตามลำดับ

3.3.2 ขั้นตอนการดูแลสัตว์ทดลองก่อนการเก็บผลการทดลองที่สัปดาห์ที่ 3

1. ชั่งน้ำหนักหนูตะเภาทุก 2 วันภายหลังการผ่าตัด เพื่อประเมินสุขภาพหนูเบื้องต้น และสังเกตพฤติกรรมการกินอาหารและน้ำในแต่ละวัน

2. หากพบว่าเทปเหนียว Neotape ที่เย็บกับผิวหนังของหนูด้วย Staplers เกิดหลุดออก เนื่องจากกาวของเทปขาดความเหนียว หรือขนของหนูตะเภาบริเวณโดนรอบแผลมีความยาวมากขึ้นจนเทปไม่สามารถยึดติดกับผิวหนังได้ และทำตามขั้นตอนดังต่อไปนี้

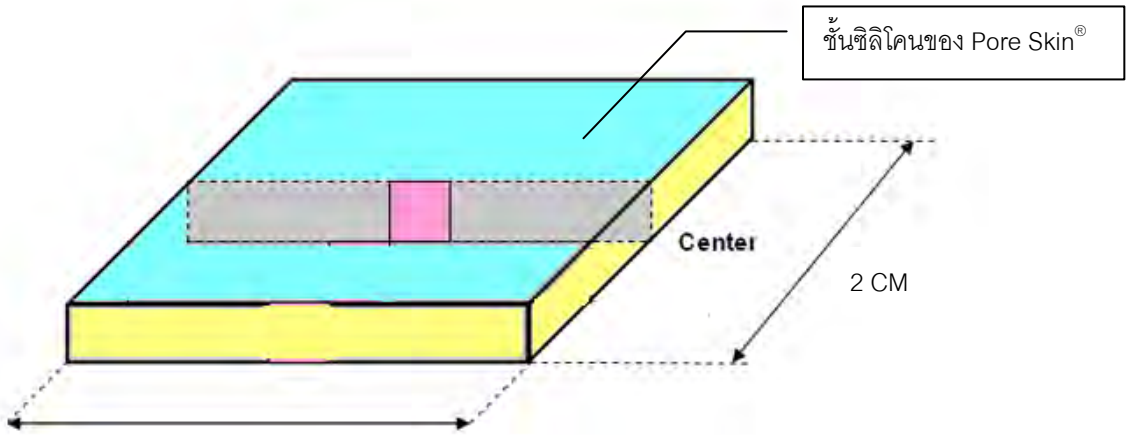
- ทำการสลบหนูโดยใช้ยาสลบ Zoletil100 ขนาดที่ใช้ (Dose) 50 มก/กก. ฉีดเข้ากล้ามเนื้อบริเวณขาหลังอย่างช้าๆ
- ใช้ Skin Staple Remover ในการนำลวดที่เย็บติดกับผิวหนังส่วนที่เหลือออก
- ทำการโกนขนรอบบริเวณแผลด้วยปัตตาเลียน หลังจากนั้นเย็บเทปเหนียว Neotape แผ่นใหม่กับผิวหนังของหนูด้วย Staple อีกครั้ง
- ภายหลังการผ่าตัด (Post-surgical care) ทายา Visidic gel บริเวณกระจกตาของหนู ทำการฉีดยาปฏิชีวนะ Lincomycin และยาแก้ปวด ตามลำดับ จากนั้นให้ความอบอุ่นและรอจนกว่าหนูจะเคลื่อนไหวได้ จึงย้ายกลับเข้ากรง

3.3.3 ขั้นตอนการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อสำหรับการประเมินทางพยาธิวิทยา

ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด ทำการสังเกตผลหลังทำการผ่าตัด ด้วยการถ่ายรูปลักษณะภายนอกและวัดขนาดของแผลควบคุมเปรียบเทียบกับแผลทดสอบ ทำการเก็บตัวอย่าง

ผิวหนังสังเคราะห์และผิวหนังบริเวณโดยรอบชิ้นงานด้วยมีดผ่าตัดเบอร์ 10 โดยก่อนการเก็บตัวอย่างต้องทำการฆ่าหนูโดยใช้ Overdose Thiopental Sodium (200mg/kg) **[39]** (ดูวิธีการเตรียมที่ภาคผนวก ข) ฉีดเข้าใต้ชั้นผิวหนัง จากนั้นนำตัวอย่างที่ได้มาแช่ใน 10%formalin (ดูวิธีการเตรียมที่ภาคผนวก ข) เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสและทำการตัดชิ้นเนื้อบริเวณกึ่งกลางแบบตัดตามขวาง (cross section) (ดังรูป 3.4) จากนั้นจึงทำการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค Heamatoxylin and Eosin (H&E) และ Masson Trichrome (MT)

หมายเหตุ ซากของหนูทดลองถูกนำไปทำลายโดยการทำลายในเตาเผาซากสัตว์ต่อไป



รูปที่ 3.4 แสดงทิศทางการตัดชิ้นเนื้อบริเวณกึ่งกลางแบบตัดตามขวาง (cross section) ก่อนการนำไปย้อมด้วยวิธีการทางพยาธิวิทยา

3.3.4 การรวบรวมข้อมูล

3.3.4.1 ผู้วิจัยเป็นผู้รวบรวมข้อมูล โดยอ่านผลการทดลองทั้งหมด โดยมีอาจารย์ที่ปรึกษาควบคุมการอ่านผลอีกครั้ง เพื่อลดความคลาดเคลื่อนที่อาจเกิดขึ้นจากการวิจัย

3.3.4.2 ผู้วิจัยเก็บรวบรวมข้อมูลโดยการจดบันทึกลงในสมุดบันทึกการทดลองและในคอมพิวเตอร์ ซึ่งผู้วิจัยจะเป็นผู้จดบันทึกทั้งหมด

3.3.5 เกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพของ Pore skin ® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภา

1. เกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผล (Wound Contraction Inhibition Endpoint)

คือ แผลที่ปิดด้วย Pore skin® ต้องมีการหดตัวน้อยกว่าแผลควบคุมอย่างมี นัยสำคัญทางสถิติในสัปดาห์ที่ 3

2. เกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore skin®เนื้อเยื่อใหม่ (Porous New Collagen Formation Endpoints)

คือ มีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจนใหม่เกิดขึ้นภายใน Pore skin®ที่มีลักษณะการเรียงตัวแบบอิสระที่เรียกว่า Porous new collagen formation ในสัปดาห์ที่ 3

3.3.6 การวิเคราะห์ข้อมูล

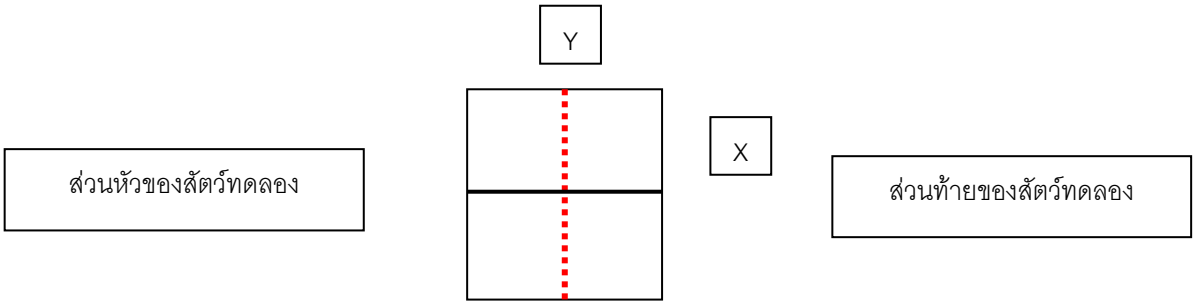
3.3.6.1 การประเมินจากลักษณะภายนอกด้วยตาเปล่า (Macroscopic assessment)

เป็นการตรวจลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเนื้อเยื่อของแผลทดสอบเปรียบเทียบกับแผลควบคุม เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผลและประสิทธิภาพการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ของ Pore Skin® ในเบื้องต้น โดยใช้การถ่ายรูปเก็บเป็นข้อมูล

3.3.6.2 การประเมินการหดรั้งของแผล (Wound contraction assessment)

เป็นการประเมินขนาดของแผลหลังการผ่าตัดเปรียบเทียบกับขนาดของแผลที่เหลืออยู่ที่สัปดาห์ที่ 3 โดยวิเคราะห์ขนาดแผลที่เปลี่ยนไปเป็นเปอร์เซ็นต์ จากนั้นนำขนาดที่เปลี่ยนแปลงไปของแผลที่ปิดด้วย Pore Skin® มาเปรียบเทียบกับขนาดของแผลควบคุมที่เปลี่ยนแปลงไปด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ และคำนวณนัยสำคัญทางสถิติ ($P<0.05$, Unpaired t-test) เพื่อใช้ในการวิเคราะห์ประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผลโดยมีวิธีการดังนี้

1. การวัดขนาดของแผลตามแนวเส้นดังแสดงในรูปที่ 3.5



รูปที่ 3.5 แสดงการวัดขนาดของแผลลักษณะเป็นสี่เหลี่ยมจัตุรัส

2. การคำนวณขนาดพื้นที่ของแผลของหนูแต่ละตัว โดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image J จากภาพถ่ายกล้องดิจิตอล (Sony DSC-F828) โดยมีวิธีดังนี้

2.1 การตั้งค่าการวัด (Set scale) ตัวอย่าง ขนาดแผลเริ่มต้นของแผลควบคุมที่วัดได้ คือแกน X = 1.6 เซนติเมตร ดังรูปที่ 3.6 และ 3.7

รูปที่ 3.6 แสดงการตั้งค่าการวัด (Set scale) ของแผล

รูปที่ 3.7 แสดงการตั้งค่าการวัด (Set scale) ของแผลเริ่มต้นของแผลควบคุม (Ao) มีค่าเท่ากับ 1.6 เซนติเมตร

2.2 การวาดขอบเขตของแผล (Wound Boundary) ดังรูปที่ 3.8

รูปที่ 3.8 แสดงการวาดขอบเขตของแผล (Wound Boundary)

2.4 การคำนวณขนาดของแผล(Measure) หน่วยเป็นตารางเซนติเมตร เช่น จากรูปแผลมีพื้นที่(Wound Area)ขนาด 1.907 ตารางเซนติเมตร ดังรูปที่ 3.9

รูปที่ 3.9 แสดงการคำนวณขนาดของแผลที่มีพื้นที่ (Wound Area)ขนาด 1.907 ตารางเซนติเมตร

3. การคำนวณการหดตัวของแผลเป็นเปอร์เซ็นต์

$$\text{สมการที่ 1 : การหดตัวของแผล(\%)} = \frac{A_0 - A_t}{A_0} \times 100 \quad \text{.....[40]}$$

โดย A_0คือ พื้นที่แผลเริ่มต้นหน่วยตารางเซนติเมตร

A_tคือ พื้นที่แผลหลังการผ่าตัดที่เวลาใดๆหน่วยตารางเซนติเมตร

3.3.6.3 การประเมินลักษณะทาง Histology (Histological Evaluation)

เป็นการประเมินชิ้นเนื้อทางพยาธิวิทยา (Pathology) จากการย้อมสี Hemetoxylin&eosin (H&E) และ Masson's trichrome (MT) และใช้การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์แบบแสง เพื่อใช้ในการวิเคราะห์การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ที่เกิดขึ้นใน Pore Skin ® (New collagen formation Analysis) โดยในการศึกษาครั้งนี้แบ่งเป็นการย้อม 2 ชนิดดังนี้

1. การย้อม Hematoxylin and Eosin (H&E) เป็นการประเมินดูเซลล์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ(Inflammatory Cells) ได้แก่ Polymorph nuclear, Mononuclear cell, เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ ซึ่งเป็นเทคนิคในการย้อมสีเซลล์โดยทั่วไป โดยบริเวณที่ติดสีแดงเป็นบริเวณไซโตพลาสซึม (Cytoplasm) สีน้ำเงินที่บริเวณนิวเคลียส และติดสีชมพูปนเทาที่เมทริกซ์ของเนื้อเยื่อ **[38]** ซึ่งมีรายละเอียดวิธีการย้อมดังภาคผนวก ค.
2. การย้อม Masson's trichrome (MT) เป็นการประเมินดูการคอลลาเจนใหม่ที่เกิดขึ้นภายในรูพรุนของผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ Pore Skin ® ภายหลังทำการย้อม เส้นใยคอลลาเจนของเนื้อเยื่อจะให้ผลสีฟ้าและนิวเคลียสของเซลล์จะให้ผลสีดำ ส่วนบริเวณไซโทพลาสซึมจะให้ผลเป็นสีแดง **[41]** ซึ่งมีรายละเอียดวิธีการย้อมดังภาคผนวก ค.

3.3.6.4 วิเคราะห์ผลทางสถิติ

วิเคราะห์ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญระหว่างกลุ่ม ด้วยการตรวจสอบแบบ (t-test) ที่มีตัวแปรเป็นอิสระต่อกัน ซึ่งคำนวณโดยการใช้โปรแกรม Minitab System for Windows (version 14, USA) ที่มีค่า $P<0.05$ เป็นค่าที่ใช้พิจารณาความมีนัยสำคัญ

3.3.7 สถานที่ทำการวิจัย

ทำการวิจัย ณ ห้องปฏิบัติการเซลล์ เนื้อเยื่อและอวัยวะสังเคราะห์ ชั้น 9 ตึก อปร. คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และห้องสัตว์ทดลอง อาคารสรีรวิทยา ชั้น 4 ภาควิชาสรีรวิทยา คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 4

ผลการทดลองและวิเคราะห์ผลการทดลอง

การทดลองการการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการรักษาแผล (แผลทดสอบ) เปรียบเทียบกับแผลที่หายตามธรรมชาติ (แผลควบคุม) ของหนูตะเภา จำนวน 16 ตัว ซึ่งมีวิธีและขั้นตอนการวิจัยดังแสดงในแผนผังรูป 3.1

ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด พบว่ามีหนู 8 ตัวที่ยังคงพบ Pore Skin ® ติดอยู่ที่แผล ส่วนอีก 8 ตัว ไม่พบ Pore Skin® ที่แผล ดังนั้นจึงมีรายงานผลการทดลองโดยลำดับต่อไปนี้

4.1 กลุ่มหนูตะเภาที่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว

4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

4.1.2 ผลการศึกษาการหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

4.1.3 ผลการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

4.2 กลุ่มหนูตะเภาที่ไม่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว

4.2.1 ตัวอย่างผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

4.2.2 ตัวอย่างผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของแผลทดสอบที่ไม่พบ Pore Skin® ในหนูตะเภา

4.1 กลุ่มหนูตะเภาที่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว

4.1.1 ผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

ลักษณะภายนอกทั่วไปของแผลทดสอบในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล พบว่าไม่มีการอักเสบของแผลและแผ่นซิลิโคนยังคงติดอยู่บริเวณแผล แผ่นซิลิโคนเปลี่ยนเป็นสีเหลืองอ่อน สามารถมองเป็นเนื้อเยื่อเกิดใหม่ที่เกิดจาก Pore Skin® อยู่ใต้แผ่นซิลิโคนเป็นสีชมพู บางตำแหน่งเห็นเป็นสีขาวเหลืองอยู่ใต้แผ่นซิลิโคนซึ่งเกิดจากส่วนของ Pore Skin® ที่ยังไม่เปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อใหม่ บางตำแหน่งเห็นเป็นสีดำๆ ที่เกิดจากเลือดออกเก่าที่แห้งติดอยู่ใต้แผ่นซิลิโคน

โดย หนูตะเภาหมายเลข 2 (รูปที่ 4.1-1ข), 3(รูปที่ 4.1-1ค) และ 8 (รูปที่ 4.1-1ซ) เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ภายในผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ Pore Skin® อย่างสม่ำเสมอ ซึ่งมีลักษณะเป็นเนื้อเยื่อสีชมพูใต้แผ่นซิลิโคน

หนูตะเภาหมายเลข 7(รูปที่ 4.1-1ช) เกิดการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โดยจะเห็นสีชมพูบางส่วนของแผลและบางส่วนยังเห็นเป็นเนื้อสีเหลืองใต้แผ่นซิลิโคน

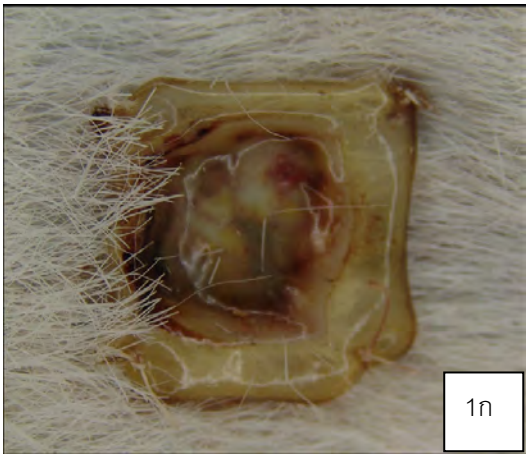
หนูตะเภาหมายเลข 4 (รูปที่ 4.1-1ง) และ 5 (รูปที่ 4.1-1จ) เกิดเนื้อเยื่อใหม่โดยจะเห็นสีชมพูบางส่วนของแผล และพบลิ่มเลือดสีดำบริเวณขอบแผลใต้แผ่นซิลิโคนที่เกิดจากเลือดเก่าติดอยู่

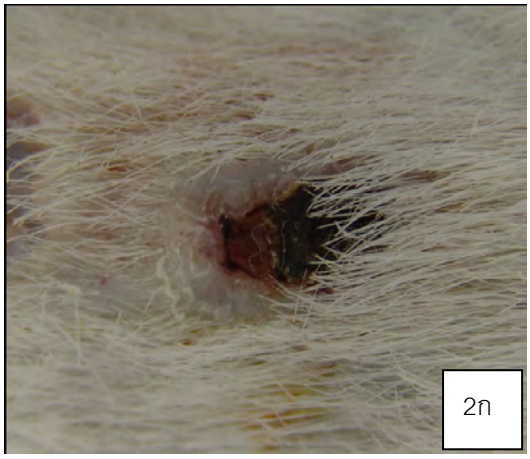
หนูตะเภาหมายเลข 1 (รูปที่ 4.1-1ก) และ 6 (รูปที่ 4.1-1ฉ) พบเฉพาะซิลิโคนมองไม่เห็นเนื้อเยื่อข้างใต้ เนื่องจากเป็นเพราะแผ่นซิลิโคนลอยตัวหลุดขึ้นมา โดยที่ชั้นล่างที่เป็นผิวหนังสังเคราะห์เชื่อมติดกับแผลไปแล้ว

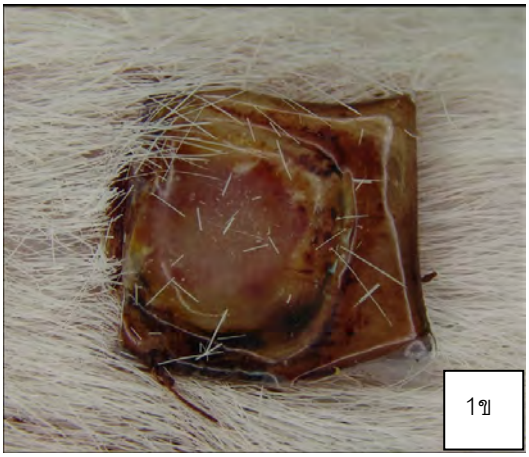
นอกจากนี้ผลการทดสอบพบว่าแผลของหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่มีผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® เชื่อมติดกับแผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัดมีขนาดใหญ่กว่าแผลควบคุมอย่างชัดเจน (รูปที่ 4.1) แสดงให้เห็นการหดตัวของแผลที่ปิดด้วย Pore Skin® ที่น้อยกว่าแผลควบคุมอย่างชัดเจน

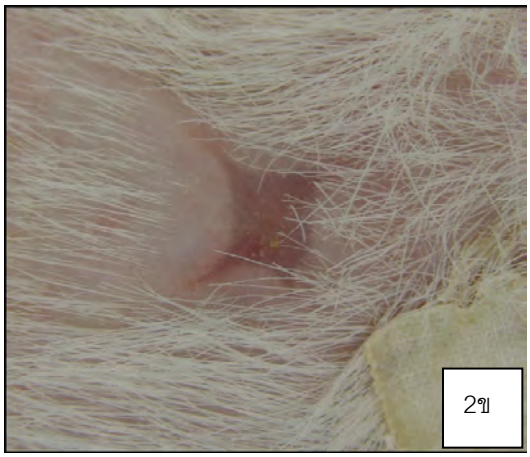
วิเคราะห์ผล

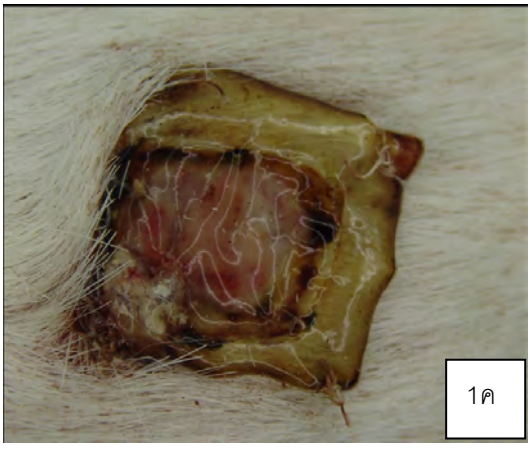
จากภาพถ่ายแสดงให้เห็นว่า Pore Skin® สามารถเชื่อมติดกับแผลโดยเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อสีชมพูที่ติดอยู่ใต้แผ่นซิลิโคน แผลที่ปิดด้วย Pore Skin® หดตัวน้อยกว่าแผลควบคุมอย่างชัดเจน จากลักษณะภายนอกที่สังเกตด้วยตาเปล่าผลการเกิดขึ้นเนื้อเยื่อและผลการยับยั้งการหดตัวของแผลจะถูกวิเคราะห์จากลักษณะทางพยาธิวิทยาและการวัดขนาดแผลในลำดับถัดไป

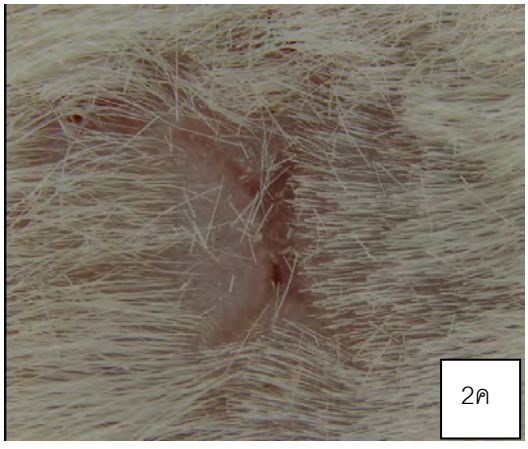

1ก

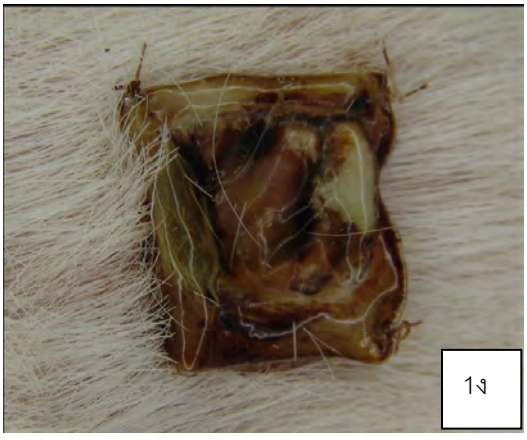

2ก

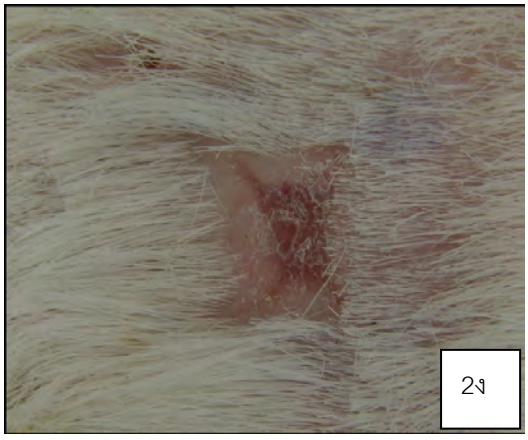

1ข

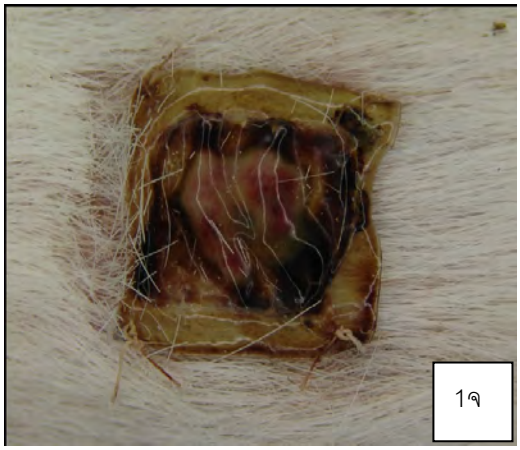

2ข

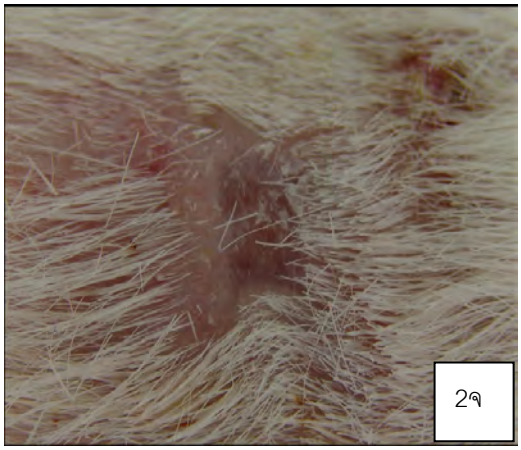

1ค

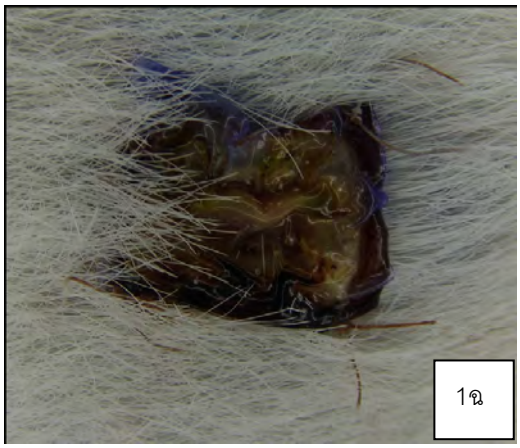

2ค

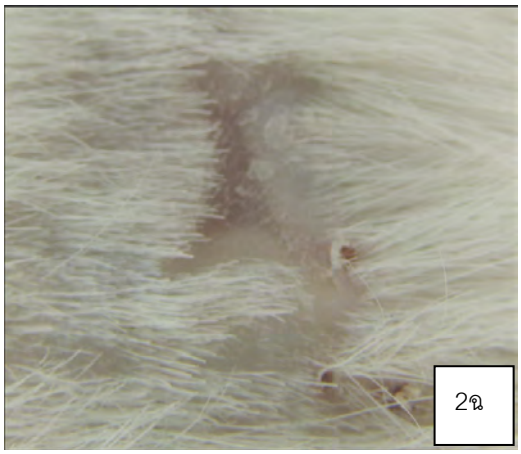

1ง

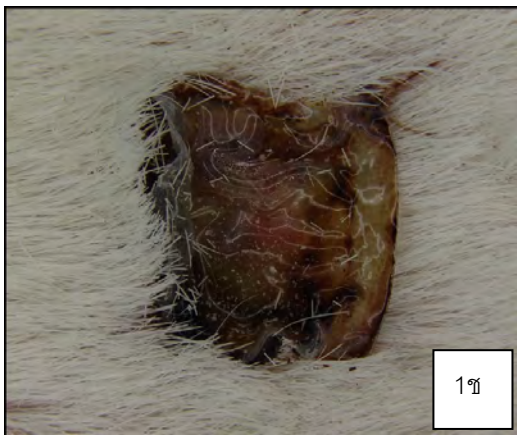

2ง

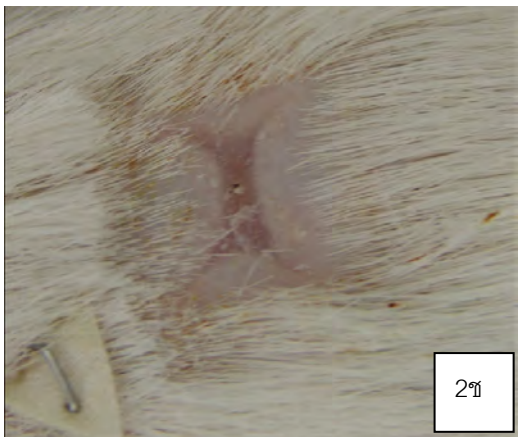

1จ

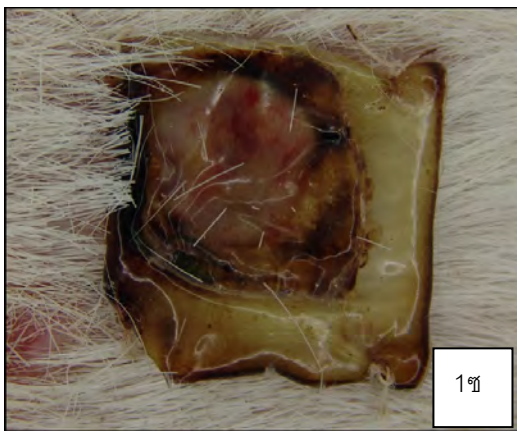

2จ

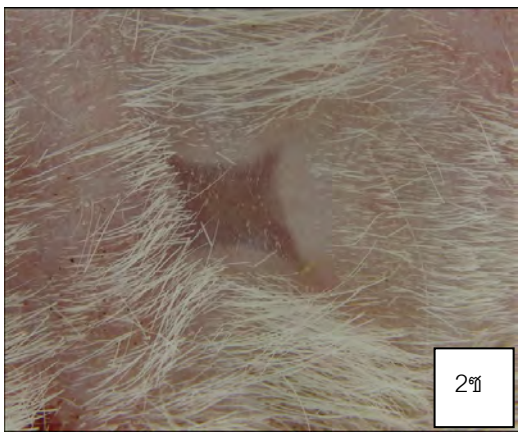

1ฉ


2ฉ


1ช


2ช


1ช


2ช

รูปที่ 4.1 แสดงภาพถ่ายลักษณะภายนอกทั่วไปของแผลทดสอบในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) เปรียบเทียบกับแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด

รูป 1ก และ 2ก แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 1 ตามลำดับ

รูป 1ข และ 2ข แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 2 ตามลำดับ

รูป 1ค และ 2ค แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 3 ตามลำดับ

รูป 1ง และ 2ง แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 4 ตามลำดับ

รูป 1จ และ 2จ แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 5 ตามลำดับ

รูป 1ฉ และ 2ฉ แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 6 ตามลำดับ

รูป 1ช และ 2ช แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 7 ตามลำดับ

รูป 1ซ และ 2ซ แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว (control) ของหนูตะเภาหมายเลข 8 ตามลำดับ

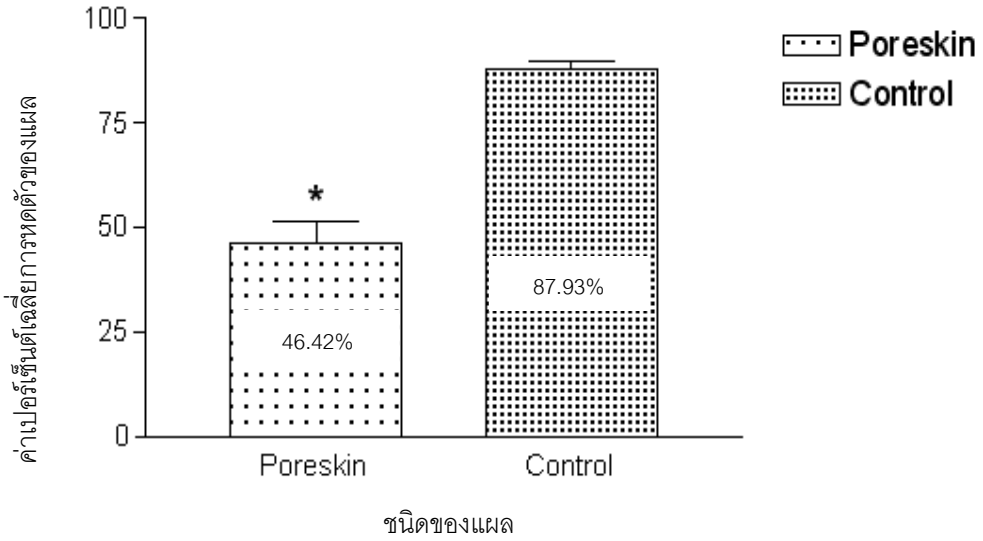
4.1.2 ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบ เทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

เมื่อทำการวัดขนาดแผลทดสอบ (Pore Skin®) และแผลควบคุม ภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที เปรียบเทียบกับขนาดแผลทดสอบและแผลควบคุมที่สัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด โดยใช้วิธีการวัดตามรูปที่ 3.5 จากนั้น นำค่าที่ได้มาทำการคำนวณพื้นที่แผลด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ Image J (โดยมีรายละเอียดดังรูปที่ 4.3-4.18) และนำค่าที่ได้มาคำนวณเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุม ดังสมการที่ 1 ซึ่งค่าทุกค่าที่กล่าวมาแสดงดังตารางที่ 4.1

จากตารางที่ 4.1 นำค่าเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลที่ปิดด้วย Pore Skin® และค่าเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลควบคุมมาหาค่าเฉลี่ย (N=8) พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด แผลที่ปิดด้วย Pore Skin® มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวของแผลเท่ากับ 46.42% และแผลควบคุม (Control) มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวของแผลเท่ากับ 87.93% (รูปที่ 4.2)

วิเคราะห์ผล

แผลทดสอบ (Pore Skin®) มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวน้อยกว่าแผลควบคุม 41.51% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P = 0.0001, Unpaired t-test)

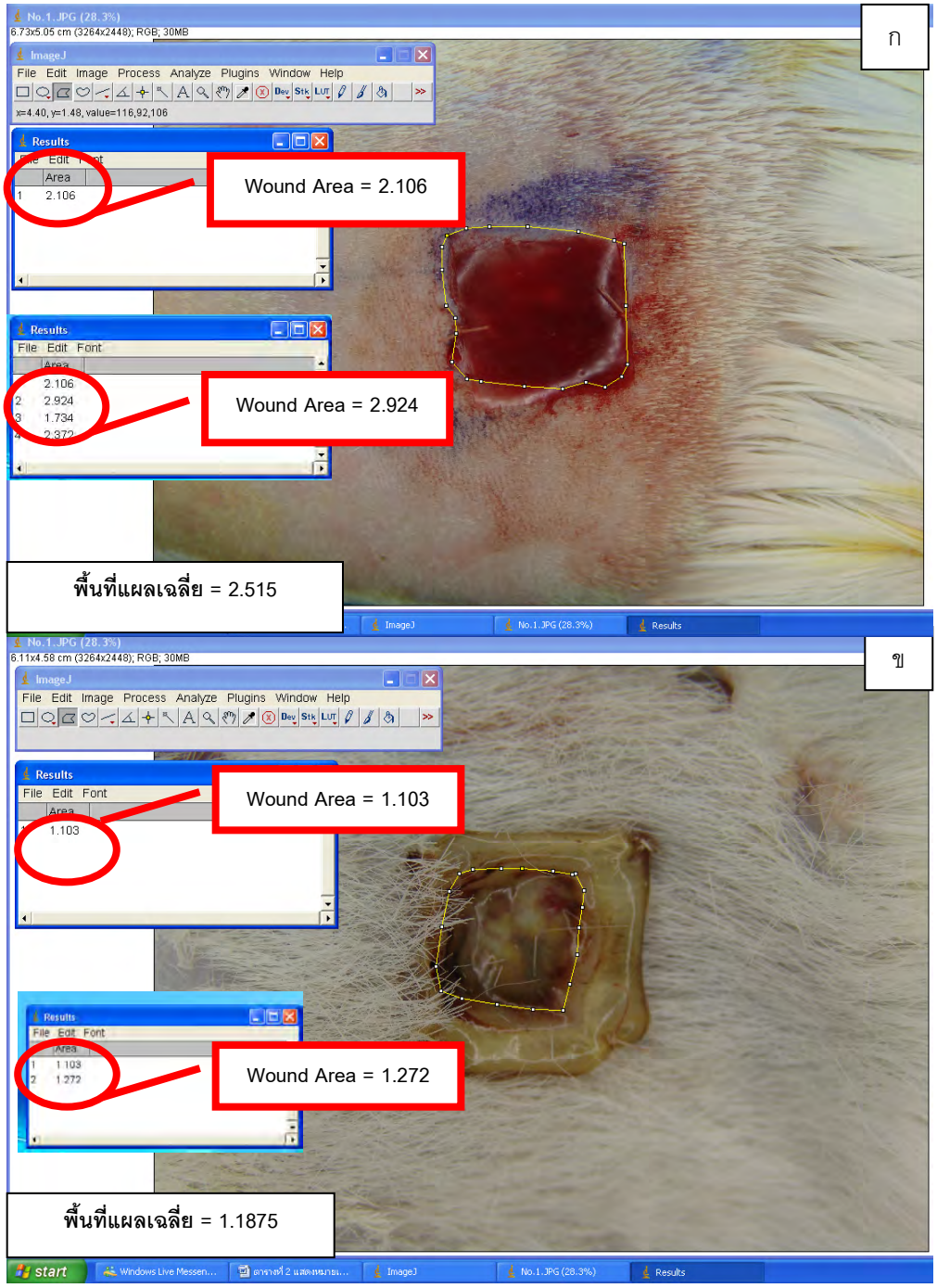


รูปที่ 4.2 แสดงการเปรียบเทียบเปอร์เซ็นต์การหดรั้งของแผลระหว่างแผลทดสอบที่ปิดทับด้วยผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์Pore Skin®กับ แผลควบคุม ในสัปดาห์ที่3 (n=8, *P = 0.0001, Unpaired t-test)

ตารางที่ 4.1 แสดงหมายเลขของสัตว์ทดลอง ขนาดแผลเริ่มต้น (A_0) และขนาดแผลในสัปดาห์ที่ 3 (A_3) ของแผลทดสอบ (Pore Skin®) และแผลควบคุม และเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) และแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3

หมายเลขหนูตะเภา	ขนาดแผลเริ่มต้น(A0) (ตารางเซนติเมตร)		ขนาดแผลในสัปดาห์ที่ 3 (A3) (ตารางเซนติเมตร)		การหดตัวของแผล (%)	
	Pore skin® ด้านซ้ายของลำตัว (X),(Y) (เซนติเมตร)	แผล Control ด้านขวาของลำตัว (X),(Y) (เซนติเมตร)	Pore skin® ด้านซ้ายของลำตัว (X),(Y) (เซนติเมตร)	แผล Control ด้านขวาของลำตัว (X),(Y) (เซนติเมตร)	Pore skin® ด้านซ้ายของลำตัว (%)	แผล Control ด้านขวาของลำตัว (%)
1	(1.6),(1.5) = 2.5150	(1.6),(1.4) = 2.1595	(1.0),(1.1) = 1.1875	(0.20),(0.30) = 0.2080	52.78%	90.37%
2	(1.5),(1.5) = 2.0530	(1.7),(1.6) = 2.5970	(1.1),(1.0) = 1.7115	(0.20),(0.35) = 0.2370	16.63%	90.87%
3	(1.5),(1.6) = 2.3890	(1.7),(1.5) = 2.4580	(1.2),(1.0) = 1.2860	(0.15),(0.35) = 0.3145	46.17%	87.21%
4	(1.5),(1.6) = 2.2275	(1.7),(1.6) = 2.5055	(1.0),(1.0) = 1.1785	(0.25),(0.35) = 0.5995	47.09%	76.07%
5	(1.6),(1.7) = 2.6580	(1.6),(1.5) = 1.8425	(1.0),(1.0) = 1.0910	(0.20),(0.35) = 0.2500	58.95%	86.43%
6	(1.7),(1.7) = 2.6115	(1.9),(1.5) = 2.5440	(1.1),(1.0) = 1.1090	(0.30),(0.10) = 0.1750	57.53%	93.12%
7	(1.5),(1.5) = 2.4900	(1.5),(1.5) = 2.2875	(1.0),(1.5) = 1.5835	(0.10),(0.30) = 0.2305	36.41%	89.92%
8	(1.5),(1.6) = 2.5235	(1.9),(1.6) = 2.7515	(1.0),(1.1) = 1.1165	(0.30),(0.25) = 0.2900	55.76%	89.46%

ดังนั้นค่าเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลควบคุมมาหาค่าเฉลี่ย (N=8) พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด แผลที่ปิดด้วย Pore Skin® มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวของแผลเท่ากับ 46.42% และแผลควบคุม (Control) มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวของแผลเท่ากับ 87.93%



รูปที่ 4.3 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 1 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.6) = 776.02 pixels/1.6 cm. = 485.01 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.106 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 620.98 pixels/1.5 cm. = 413.99 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.924 ตารางเซนติเมตร

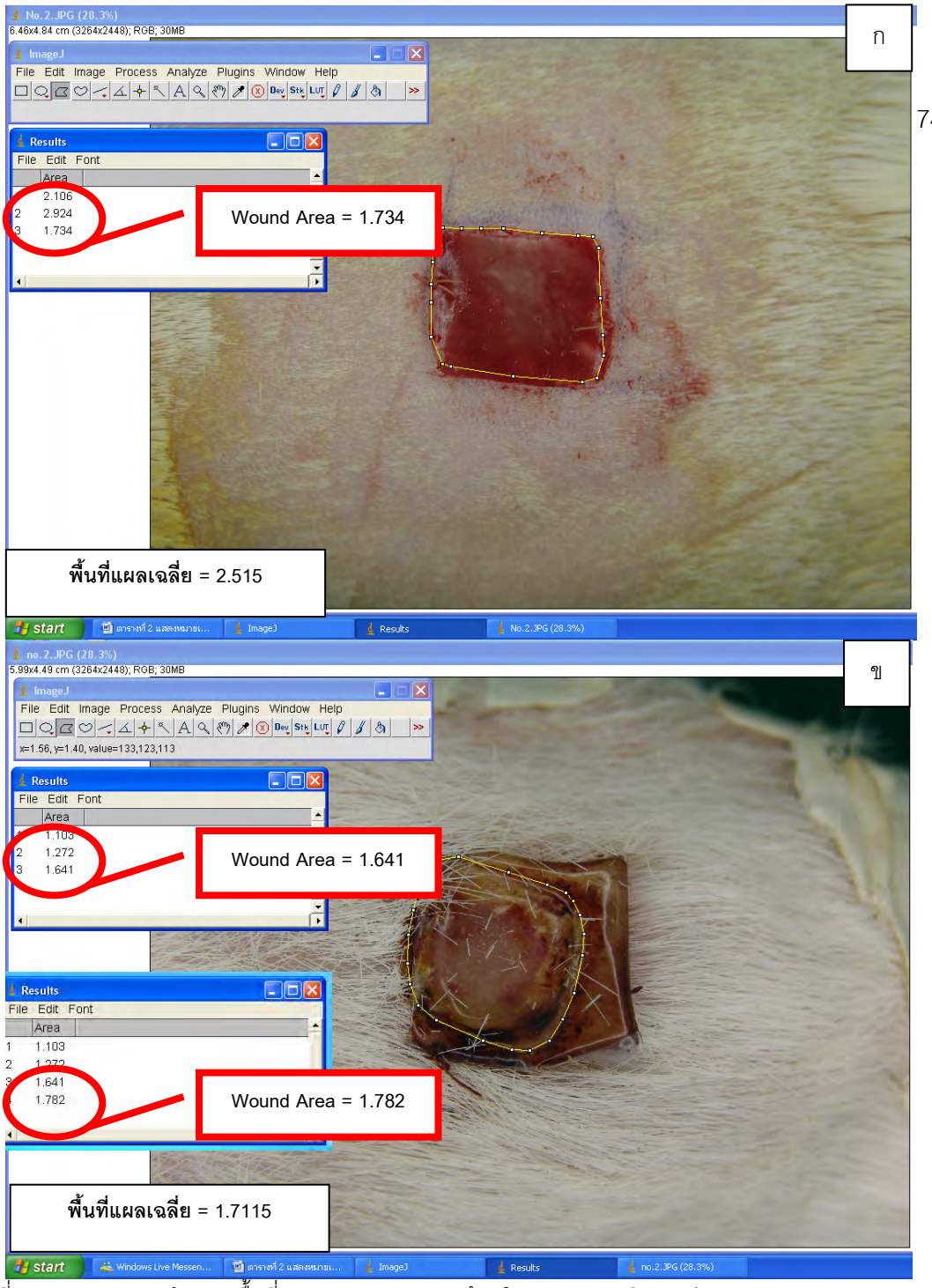
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.106+2.924)/2 = 2.515 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.0) = 534.00 pixels/1.0 cm. = 534.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.103 ตารางเซนติเมตร

Y (1.1) = 547.15 pixels/1.1 cm. = 497.41 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.272 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.103+1.272)/2 = 1.1875 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.4 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 2 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.5) = 785.42 pixels/1.5 cm. = 505.61 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.734 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 666.76 pixels/1.5 cm. = 444.51 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.372 ตารางเซนติเมตร

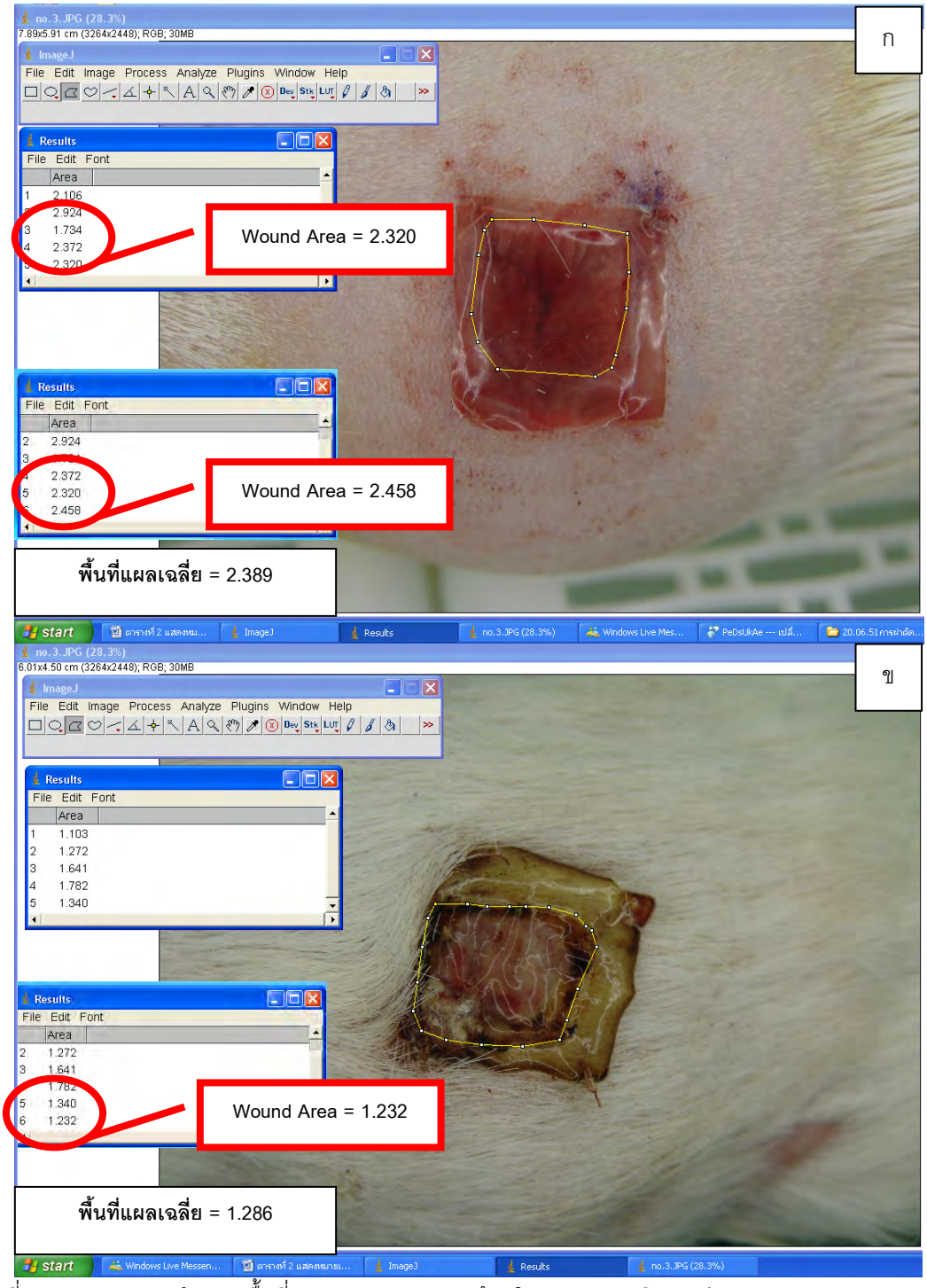
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.106+2.924)/2 = 2.515 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.1) = 599.82 pixels/1.1 cm. = 545.29 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.641 ตารางเซนติเมตร

Y (1.0) = 523.24 pixels/1.0 cm. = 523.24 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.782 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.641+1.782)/2 = 1.7115 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.5 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 3 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.5) = 620.82 pixels/1.5 cm. = 413.88 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.320 ตารางเซนติเมตร

Y (1.6) = 658.46 pixels/1.6 cm. = 411.54 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.458 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.320+2.458)/2 = 2.389 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.2) = 652.14 pixels/1.2 cm. = 543.45 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.340 ตารางเซนติเมตร

Y (1.0) = 566.86 pixels/1.0 cm. = 566.86 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.232 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.340+1.232)/2 = 1.286 ตารางเซนติเมตร

รูปที่ 4.6 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 4 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.5) = 629.55 pixels/1.5 cm. = 419.70 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.136 ตารางเซนติเมตร

Y (1.6) = 644.46 pixels/1.6 cm. = 402.79 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.319 ตารางเซนติเมตร

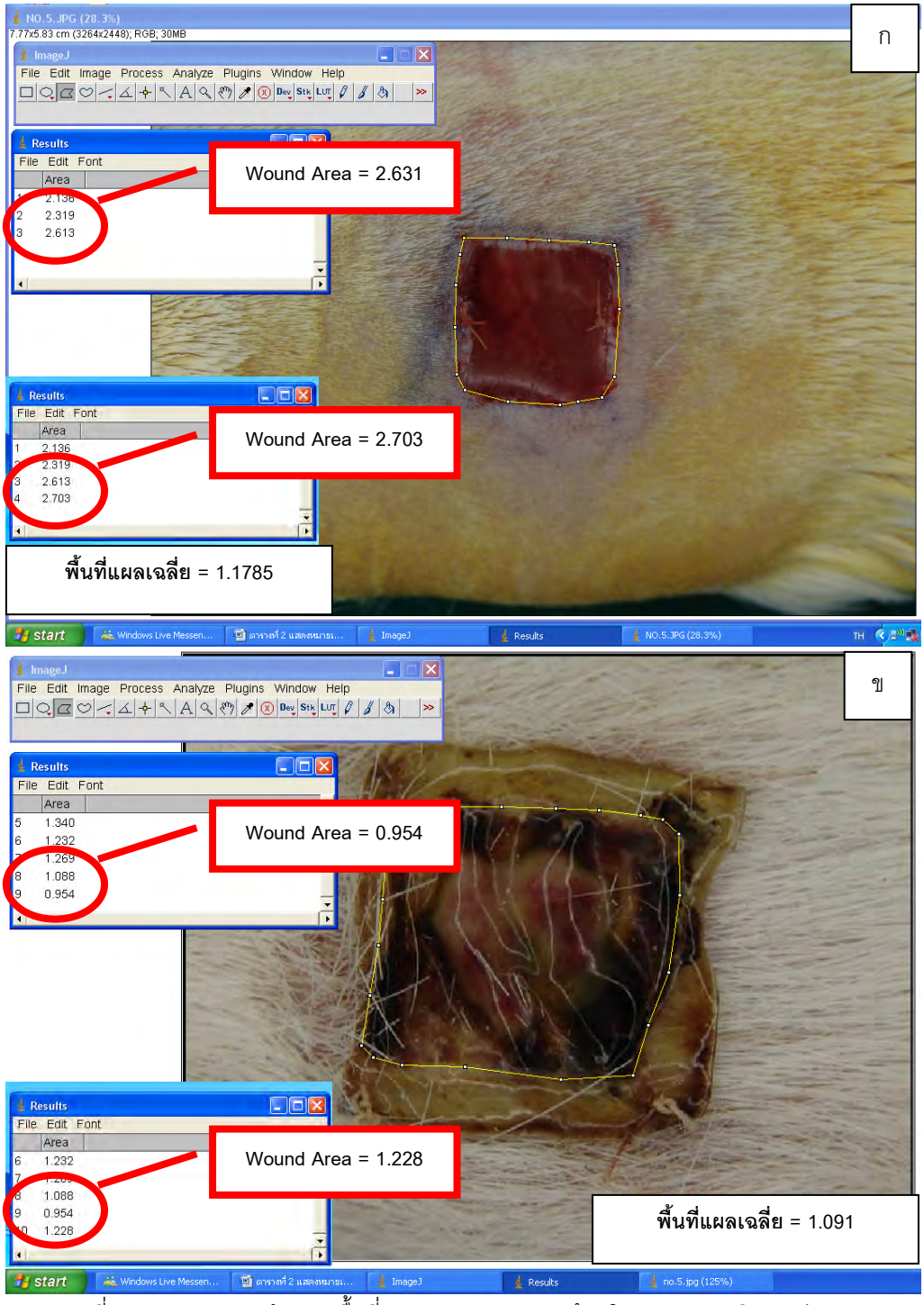
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.136+2.319)/2 = 2.2275 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.0) = 538.12 pixels/1.0 cm. = 538.12 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.269 ตารางเซนติเมตร

Y (1.0) = 581.16 pixels/1.0 cm. = 581.16 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.088 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.269+1.088)/2 = 1.1785 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.7 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 5 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.6) = 672.00 pixels/1.6 cm. = 420.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.631 ตารางเซนติเมตร

Y (1.7) = 702.00 pixels/1.7 cm. = 412.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.703 ตารางเซนติเมตร

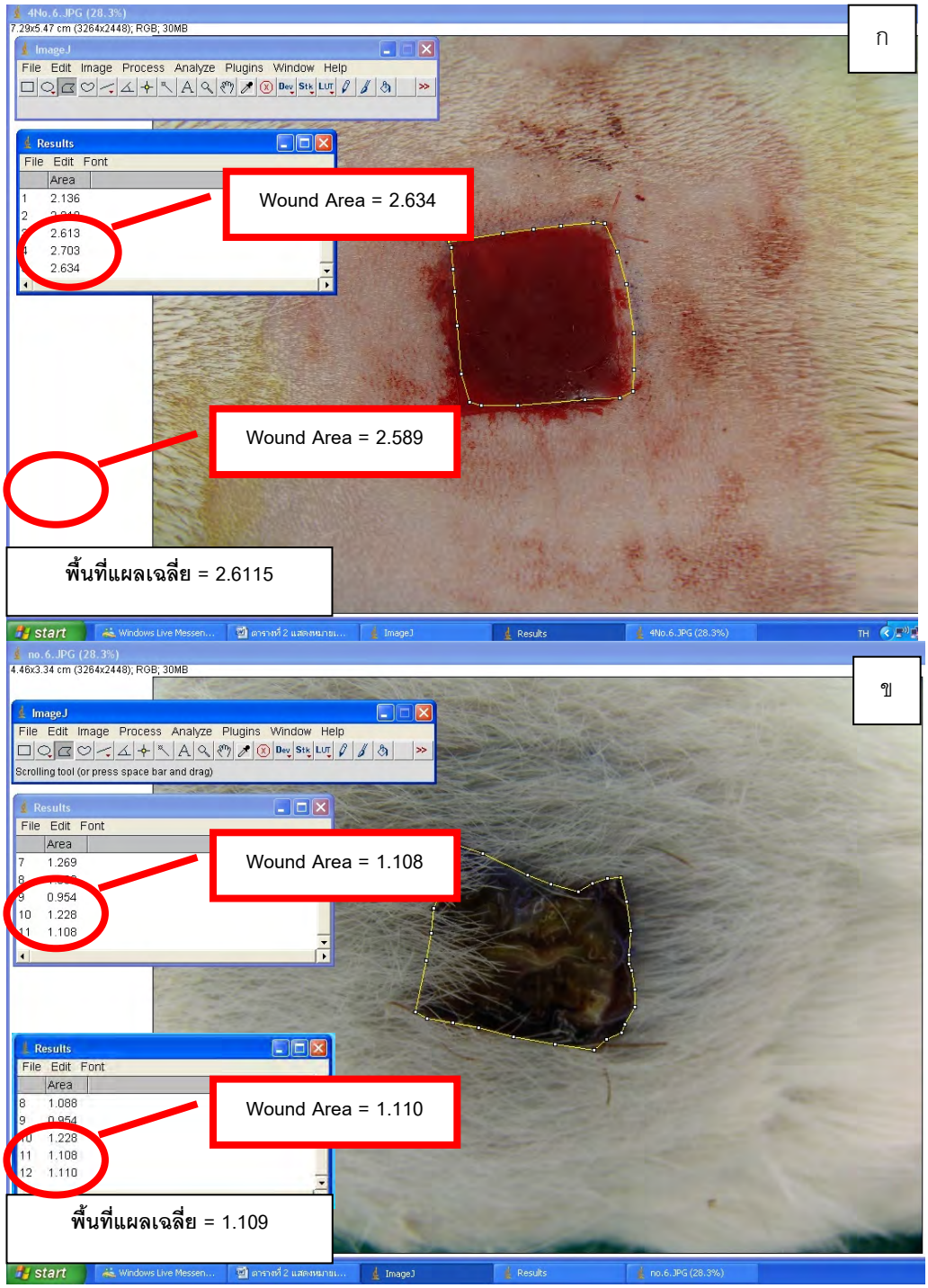
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.136+2.319)/2 = 2.658 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.0) = 262.61 pixels/1.0 cm. = 262.61 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.954 ตารางเซนติเมตร

Y (1.0) = 231.55 pixels/1.0 cm. = 231.55 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.228 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.954+1.228)/2 = 1.091 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.8 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 6 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.7) = 760.75 pixels/1.7 cm. = 447.50 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.634 ตารางเซนติเมตร

Y (1.7) = 767.41 pixels/1.7 cm. = 451.42 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.589 ตารางเซนติเมตร

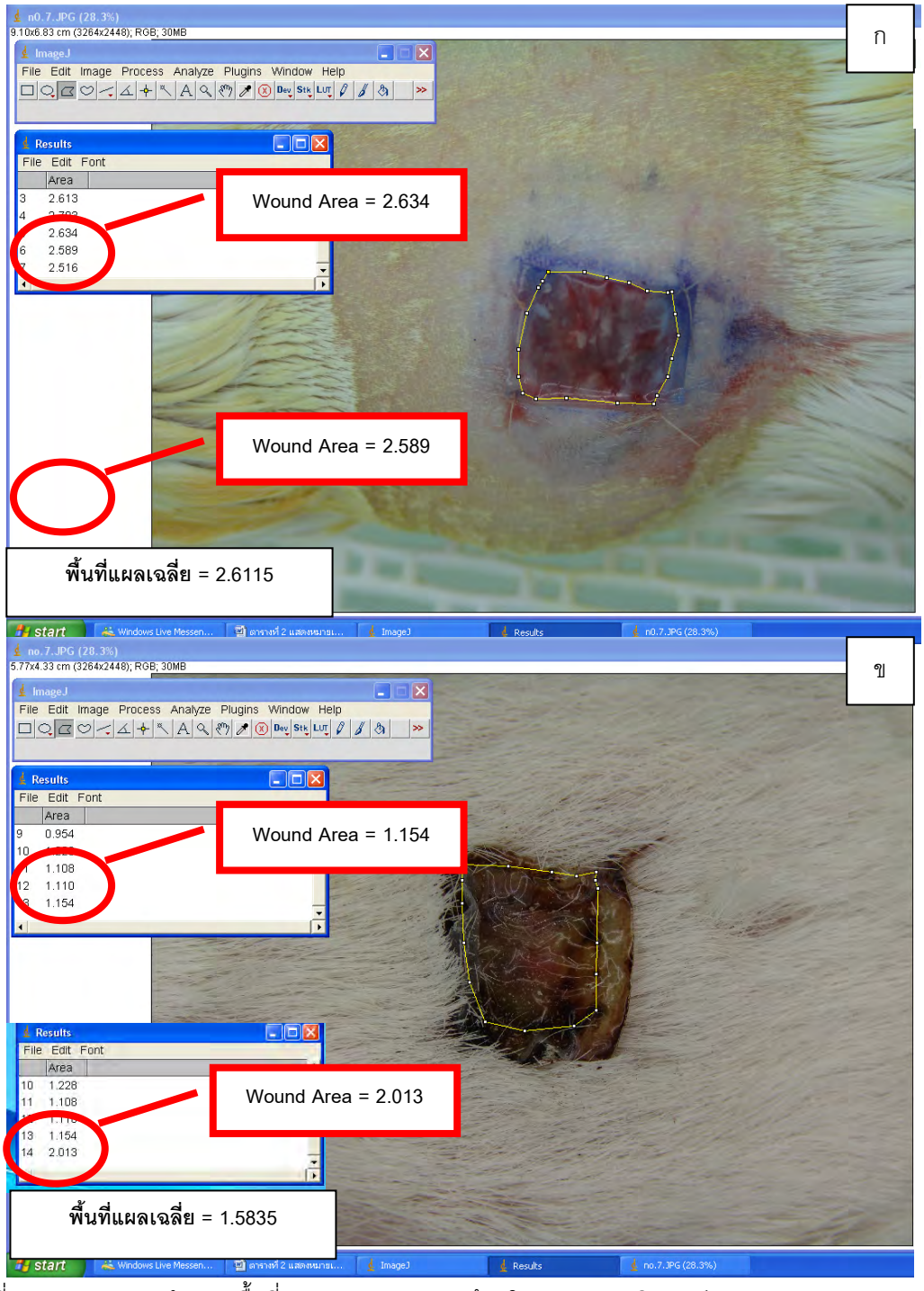
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.634+2.589)/2 = 2.6115 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.1) = 805.36 pixels/1.1 cm. = 732.15 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.108 ตารางเซนติเมตร

Y (1.0) = 731.55 pixels/1.0 cm. = 731.55 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.110 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.108+1.110)/2 = 1.109 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.9 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 7 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.5) = 537.83 pixels/1.5 cm. = 358.55 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.516 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 543.41 pixels/1.5 cm. = 362.27 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.464 ตารางเซนติเมตร

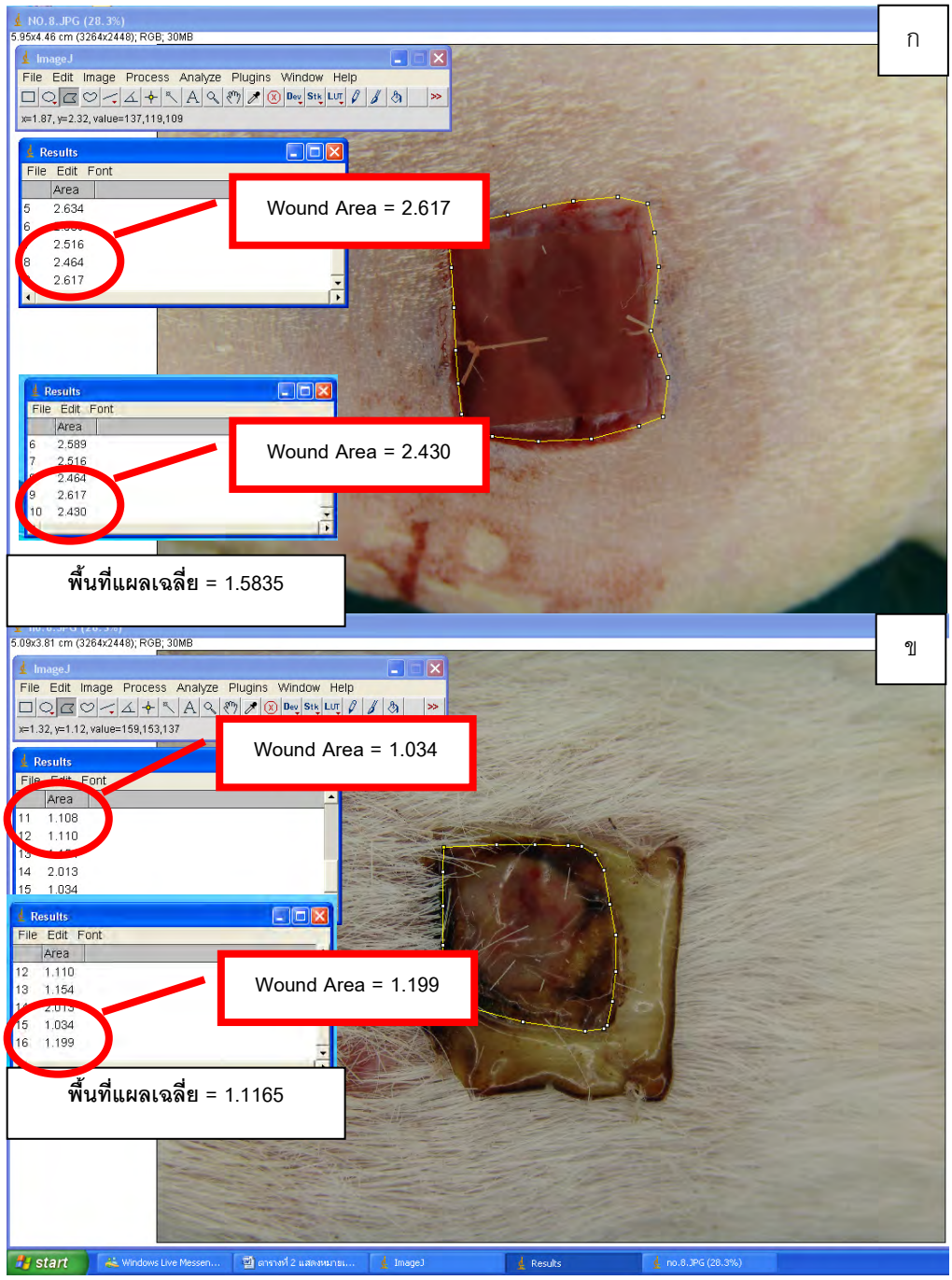
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.516+2.464)/2 = 2.6115 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.0) = 565.71 pixels/1.0 cm. = 565.71 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.154 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 642.33 pixels/1.5 cm. = 428.22 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.013 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.154+2.013)/2 = 1.5835 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.10 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลทดสอบของหนูตะเภาหมายเลข 8 ที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว)

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.5) = 832.07 pixels/1.5 cm. = 548.71 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.617 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 911.07 pixels/1.6 cm. = 569.42 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.430 ตารางเซนติเมตร

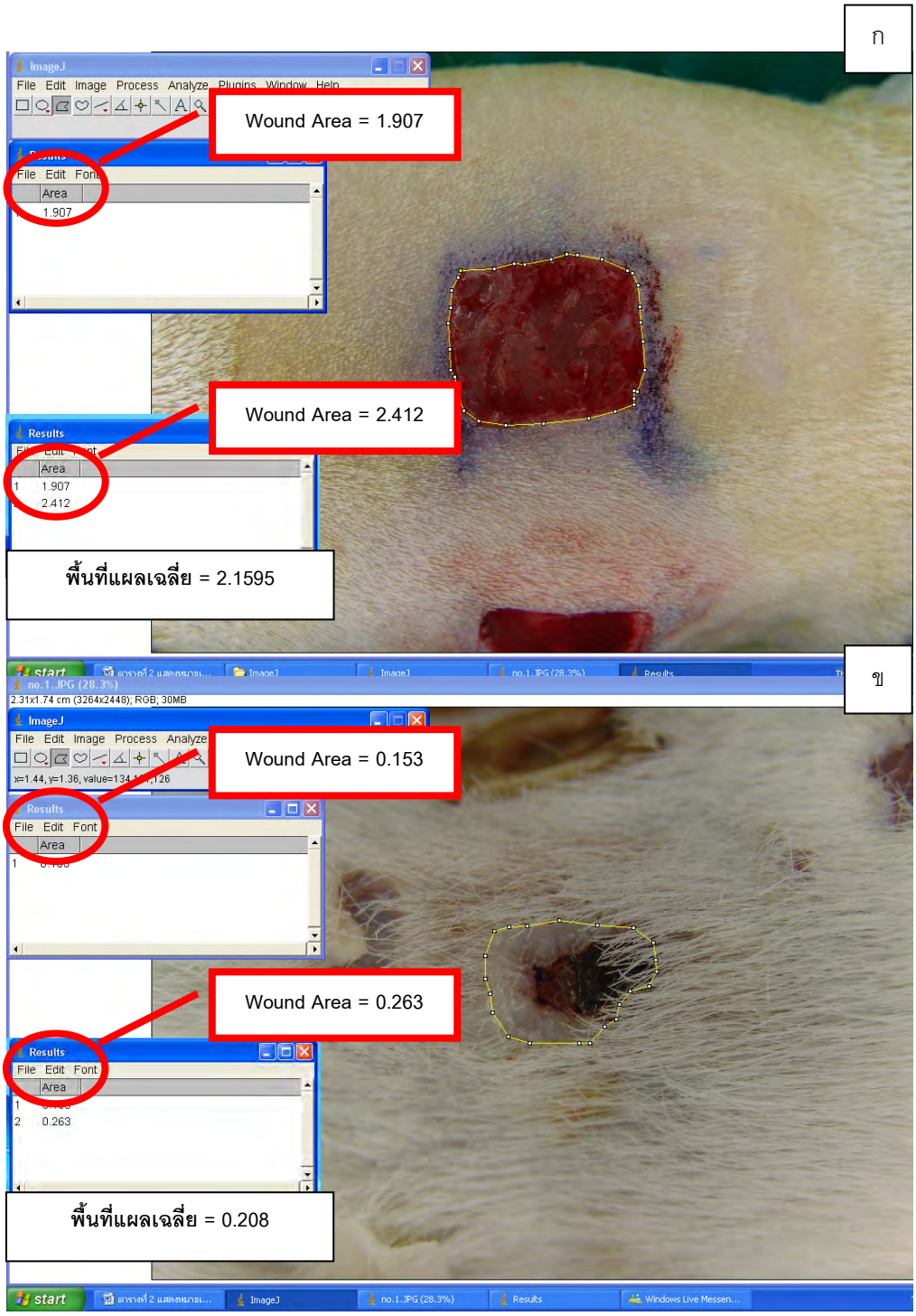
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.617+2.430)/2 = 2.5235 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (1.0) = 691.37 pixels/1.0 cm. = 691.37 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.034 ตารางเซนติเมตร

Y (1.1) = 706.04 pixels/1.1 cm. = 641.85 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.199 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.034+1.199)/2 = 1.1165 ตารางเซนติเมตร



รูปที่

4.11 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 1

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.6) = 832.81 pixels/1.6 cm. = 541.88 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.907 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 645.55 pixels/1.4 cm. = 461.11 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.412 ตารางเซนติเมตร

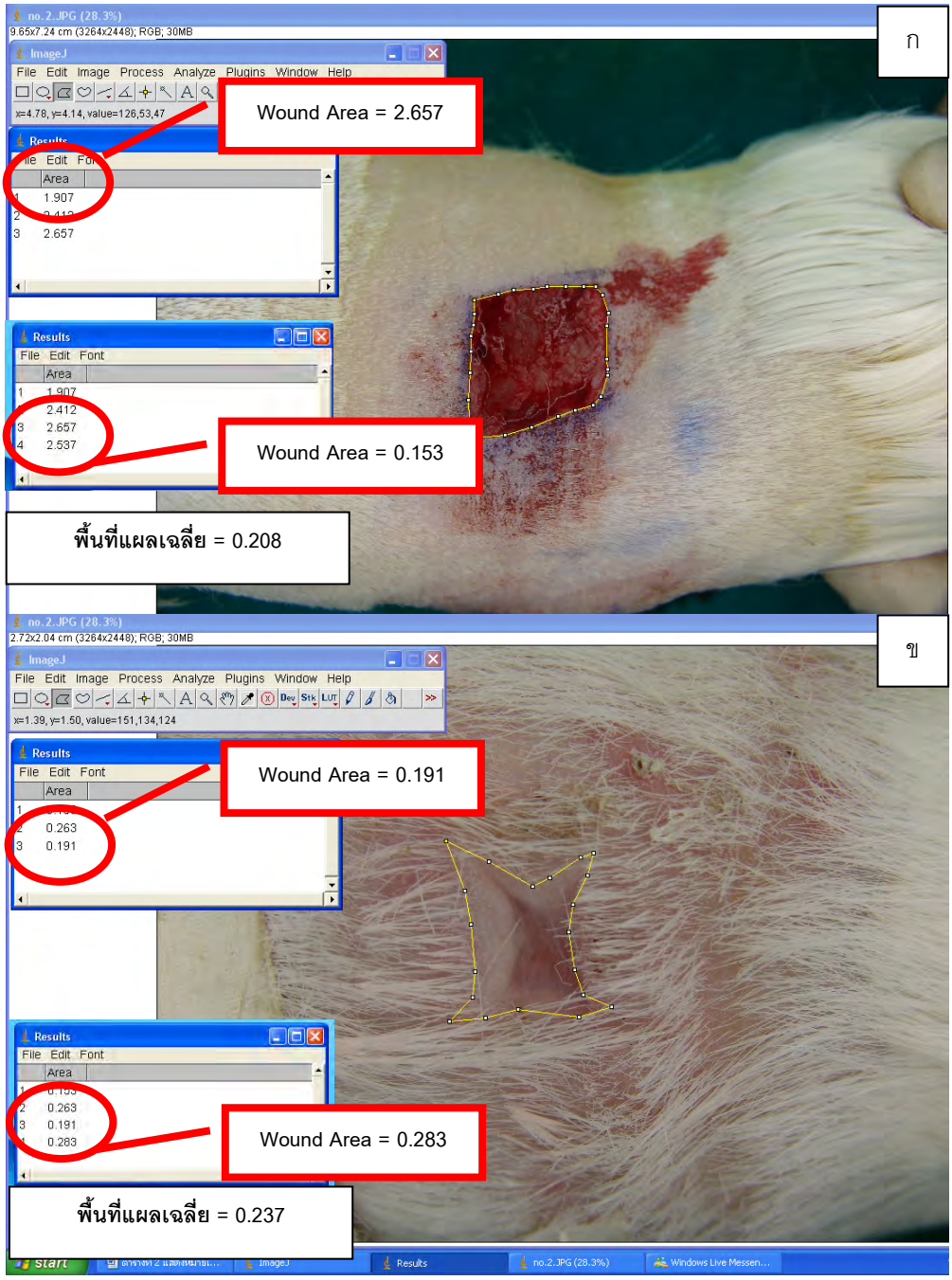
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.907+2.412)/2 = 2.1595 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.2) = 282.00 pixels/0.2 cm. = 1410.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.153 ตารางเซนติเมตร

Y (1.1) = 320.99 pixels/0.3 cm. = 1069.97 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.263 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.153 +0.263)/2 = 0.208 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.12 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 2

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.7) = 574.95 pixels/1.7 cm. = 338.21 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.657 ตารางเซนติเมตร

Y (1.6) = 558.04 pixels/1.6 cm. = 348.78 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.153 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (1.907+2.412)/2 = 0.208 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.2) = 240.00 pixels/0.2 cm. = 1200.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.191 ตารางเซนติเมตร

Y (0.35) = 335.00 pixels/0.35 cm. = 957.14 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.283 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.153 +0.263)/2 = 0.237 ตารางเซนติเมตร

รูปที่ 4.13 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 3

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.7) = 726.03 pixels/1.7 cm. = 427.08 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.376 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 558.04 pixels/1.6 cm. = 415.38 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.540 ตารางเซนติเมตร

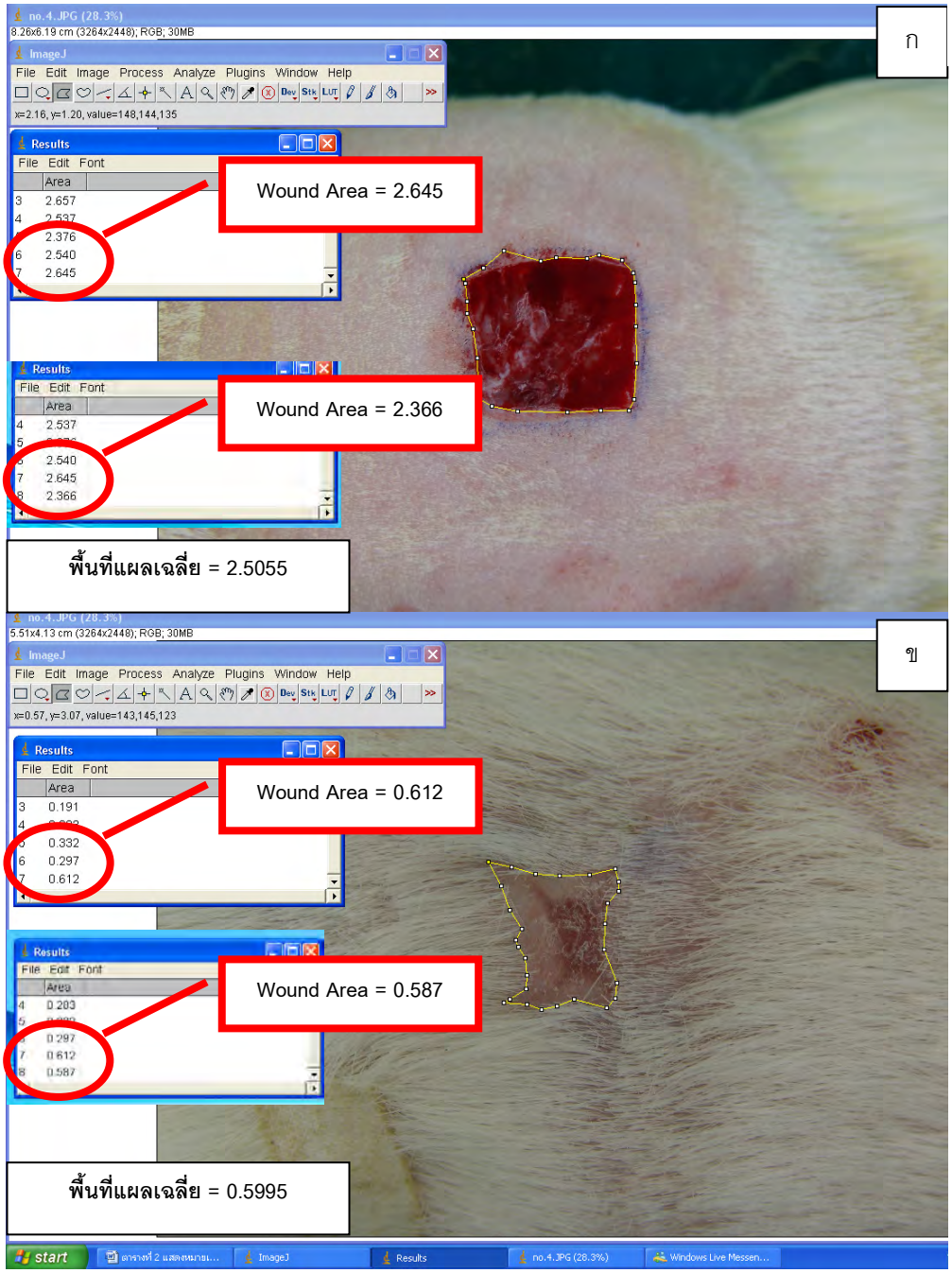
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.376+2.540)/2 = 2.458 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.15) = 144.00 pixels/0.15 cm. = 960.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.332 ตารางเซนติเมตร

Y (0.35) = 297.83 pixels/0.35 cm. = 1114.29 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.297 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.332 +0.297)/2 = 0.3145 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.14 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 4

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.7) = 672.02 pixels/1.7 cm. = 395.31 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.645 ตารางเซนติเมตร

Y (1.6) = 671.77 pixels/1.6 cm. = 419.86 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.366 ตารางเซนติเมตร

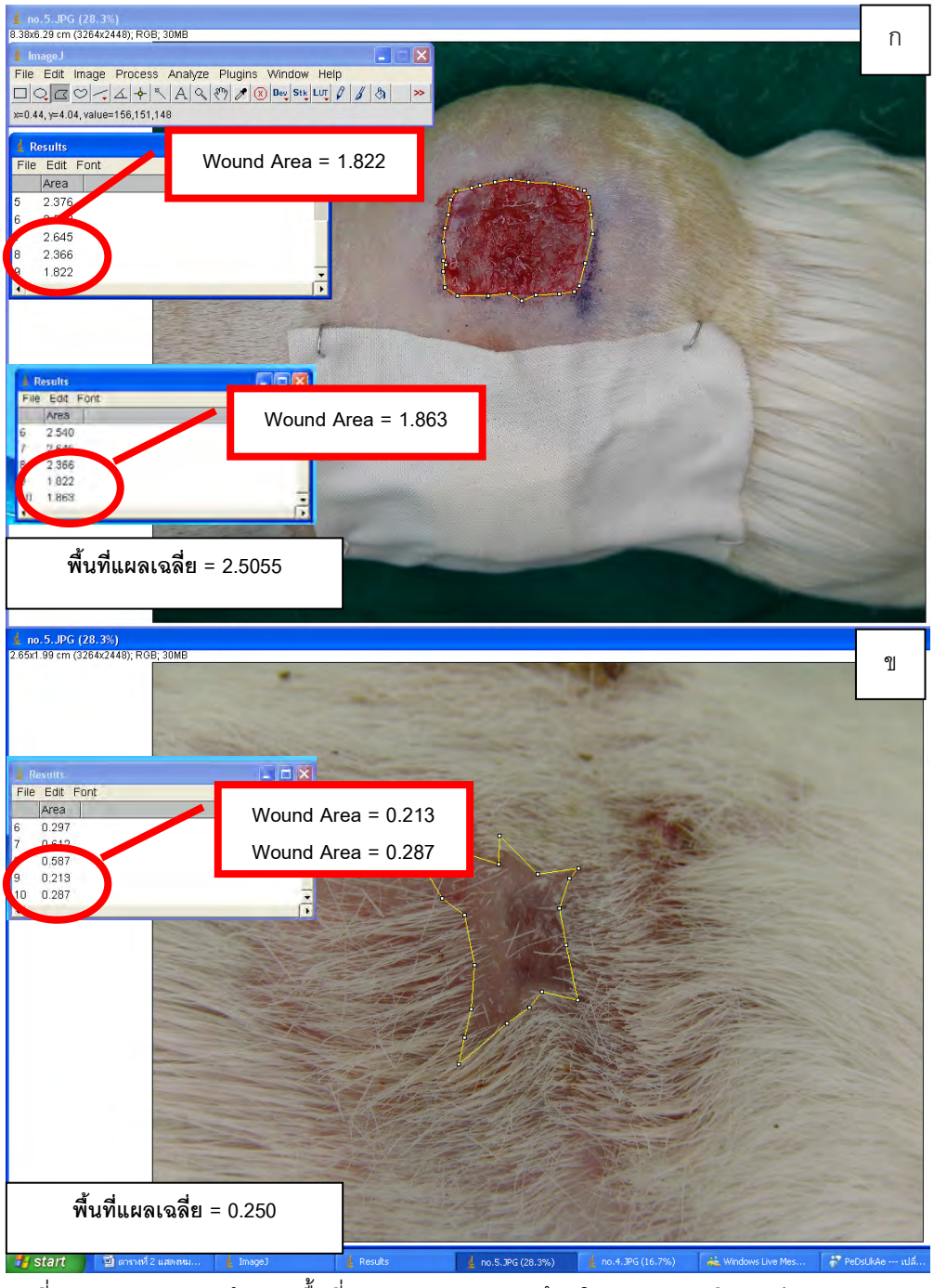
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.645+2.366)/2 = 2.5055 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.25) = 148.15 pixels/0.25 cm. = 592.60 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.612 ตารางเซนติเมตร

Y (0.35) = 207.83 pixels/0.35 cm. = 593.80 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.587 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.612 +0.587)/2 = 0.5995 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.15 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 5

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.6) = 623.00 pixels/1.6 cm. = 389.38 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.822 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 486.98 pixels/1.5 cm. = 389.38 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 1.863 ตารางเซนติเมตร

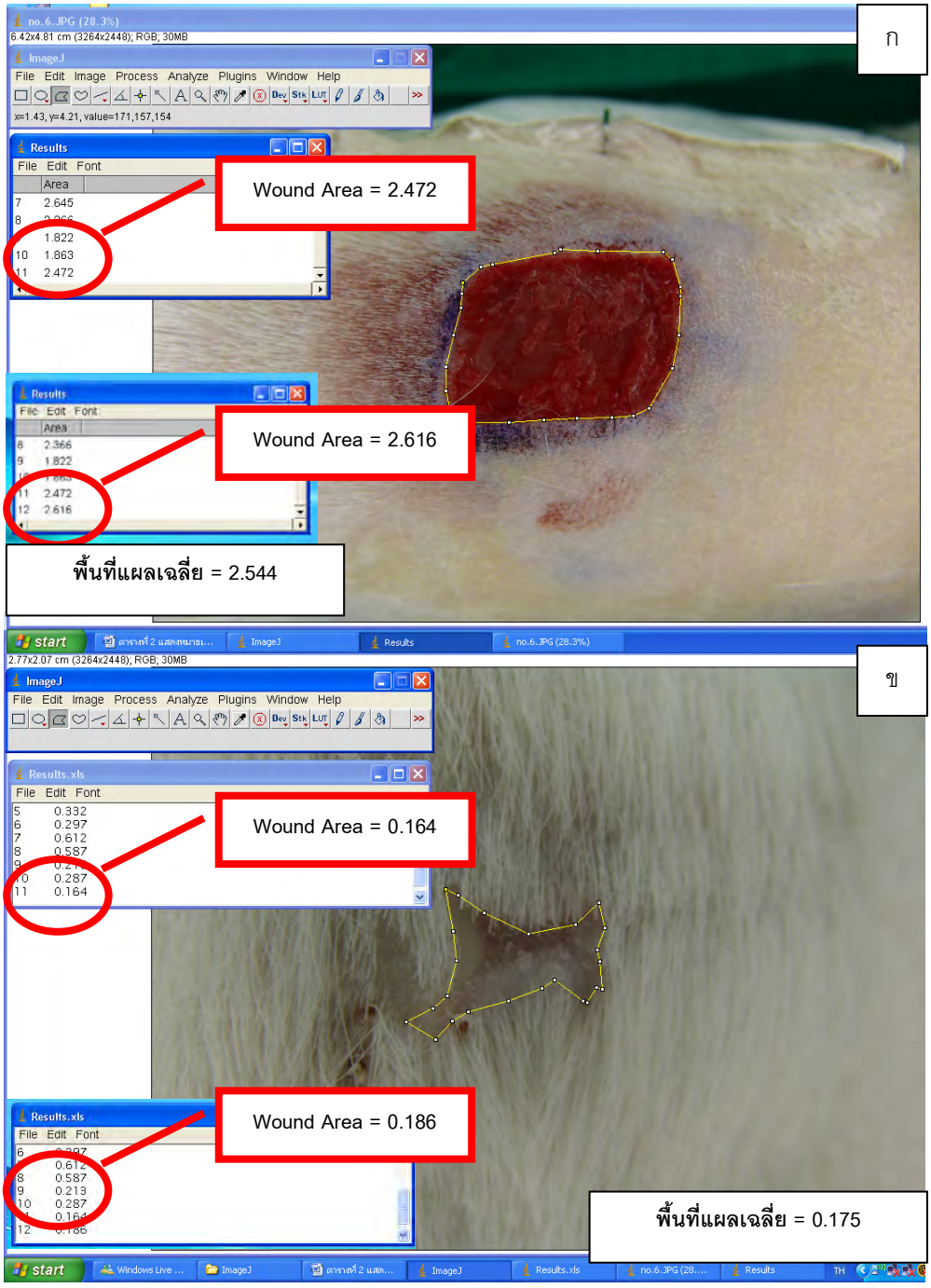
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.645+2.366)/2 = 2.5055 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.20) = 246.00 pixels/0.20 cm. = 1230.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.213 ตารางเซนติเมตร

Y (0.35) = 372.00 pixels/0.35 cm. = 1062.86 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.287 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.213 +0.287)/2 = 0.250 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.16 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 6

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.9) = 966.00 pixels/1.9 cm. = 508.42 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.472 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 741.29 pixels/1.5 cm. = 494.19 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.616 ตารางเซนติเมตร

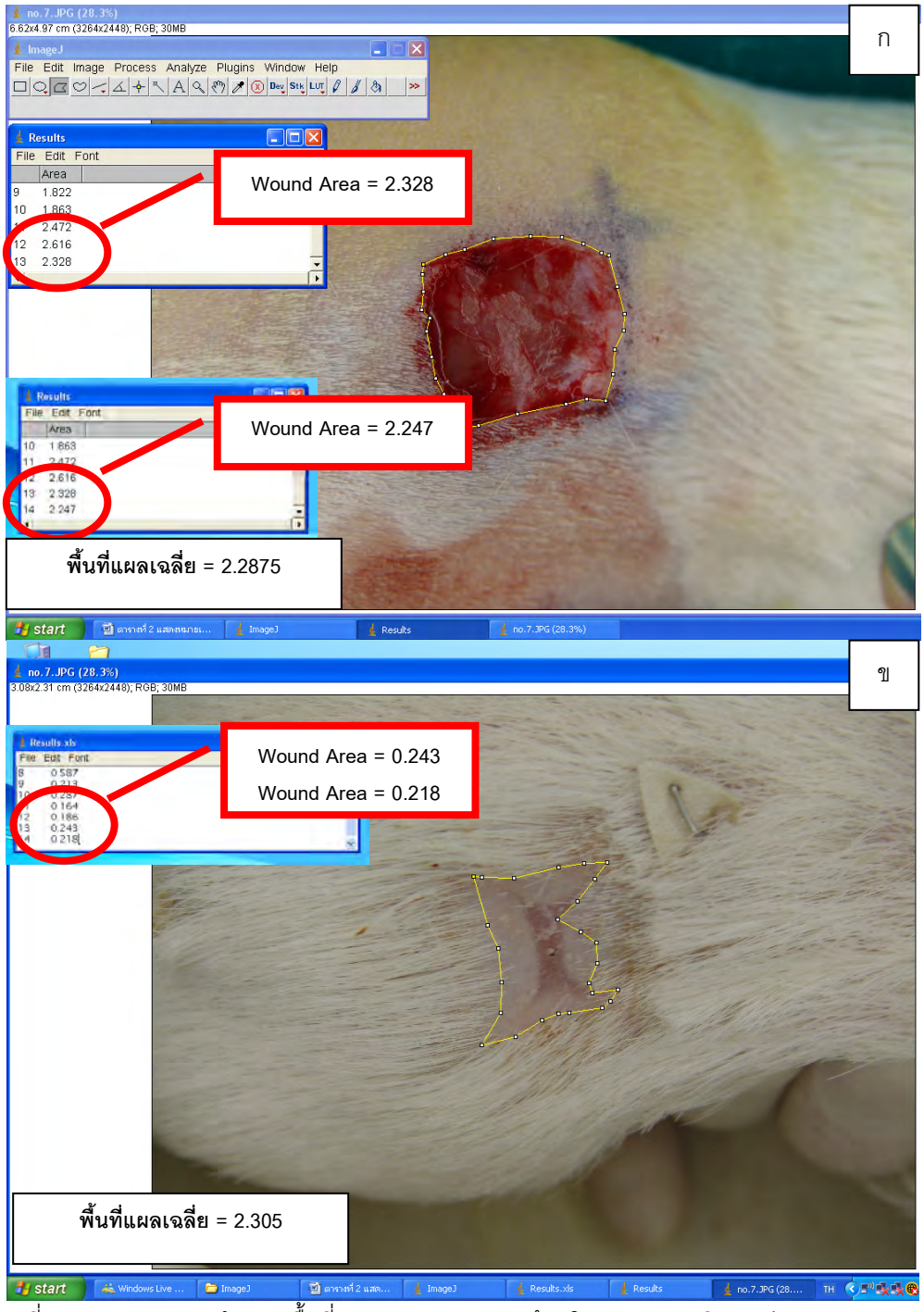
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.472+2.616)/2 = 2.544 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.30) = 354.00 pixels/0.30 cm. = 1180.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.164 ตารางเซนติเมตร

Y (0.35) = 113.00 pixels/0.10 cm. = 1130.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.186 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.164 +0.186)/2 = 0.175 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.17 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 7

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.5) = 739.40 pixels/1.5 cm. = 492.93 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.328 ตารางเซนติเมตร

Y (1.5) = 751.12pixels/1.5 cm. = 500.75 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.247 ตารางเซนติเมตร

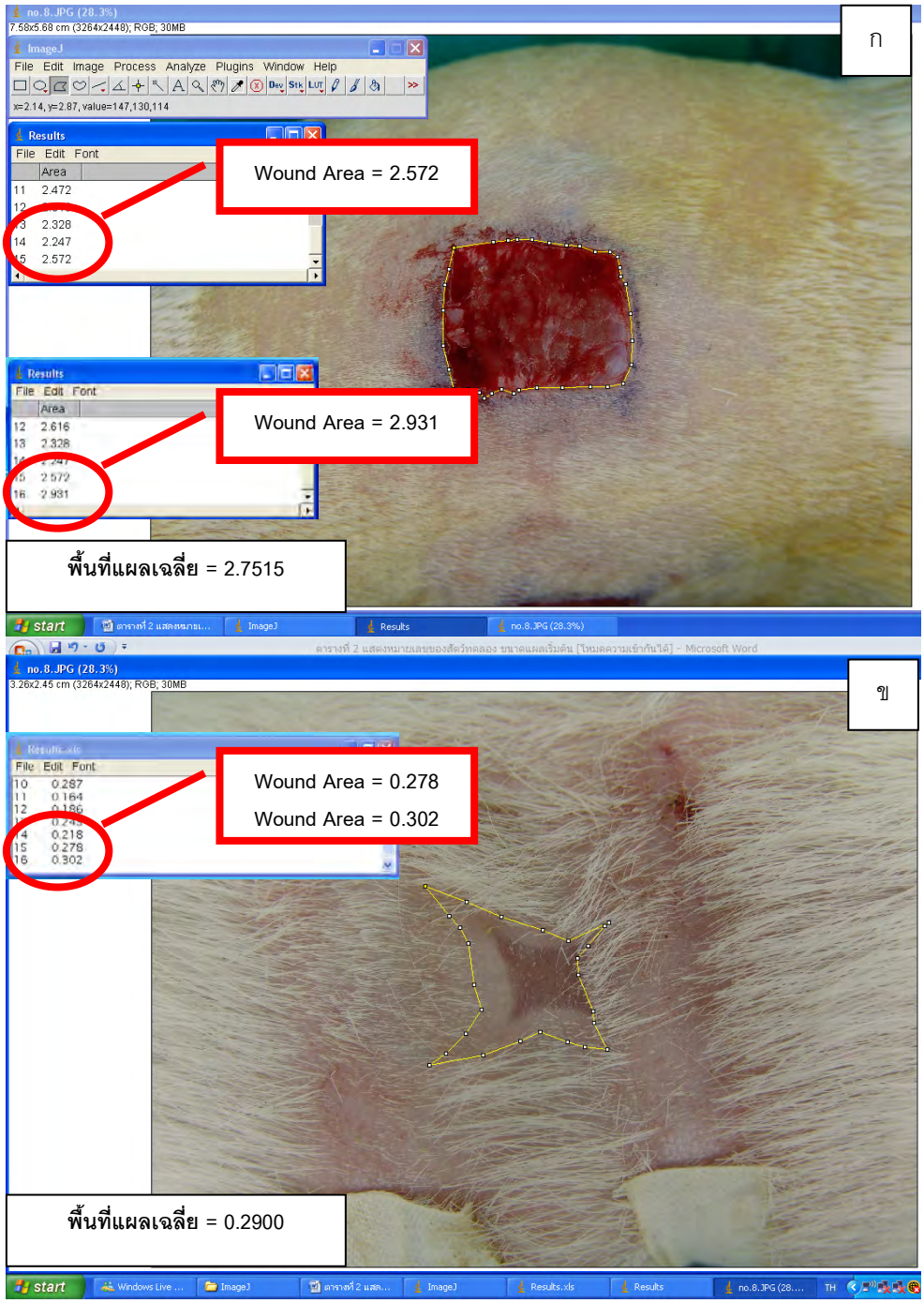
ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.328 +2.247)/2 = 2.2875 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.10) = 105.82 pixels/0.10 cm. = 1058.20 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.243 ตารางเซนติเมตร

Y (0.30) = 362.27 pixels/0.30 cm. = 1207.57 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.218 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.243 +0.218)/2 = 0.2305 ตารางเซนติเมตร



รูปที่ 4.18 แสดงผลการคำนวณพื้นที่แผล (Wound Area) ด้วยโปรแกรมคอมพิวเตอร์ (Image J) ของแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ของหนูตะเภาหมายเลข 8

ก) แผลภายหลังจากการผ่าตัดเอาผิวหนังแท้ของหนูตะเภาออกทั้งชั้นทันที (A_0)

X (1.9) = 818.36pixels/1.9 cm. = 430.72 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.572 ตารางเซนติเมตร

Y (1.6) = 645.60pixels/1.6 cm. = 403.50 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 2.931 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (2.572 +2.931)/2 = 2.7515 ตารางเซนติเมตร

ข) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (A_t)

X (0.30) = 300.00 pixels/0.30 cm. = 1000.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.278 ตารางเซนติเมตร

Y (0.25) = 243.00 pixels/0.25 cm. = 972.00 pixels/cm. ได้พื้นที่เท่ากับ 0.302 ตารางเซนติเมตร

ดังนั้นพื้นที่แผลเฉลี่ยเท่ากับ = (0.278 +0.302)/2 = 0.2900 ตารางเซนติเมตร

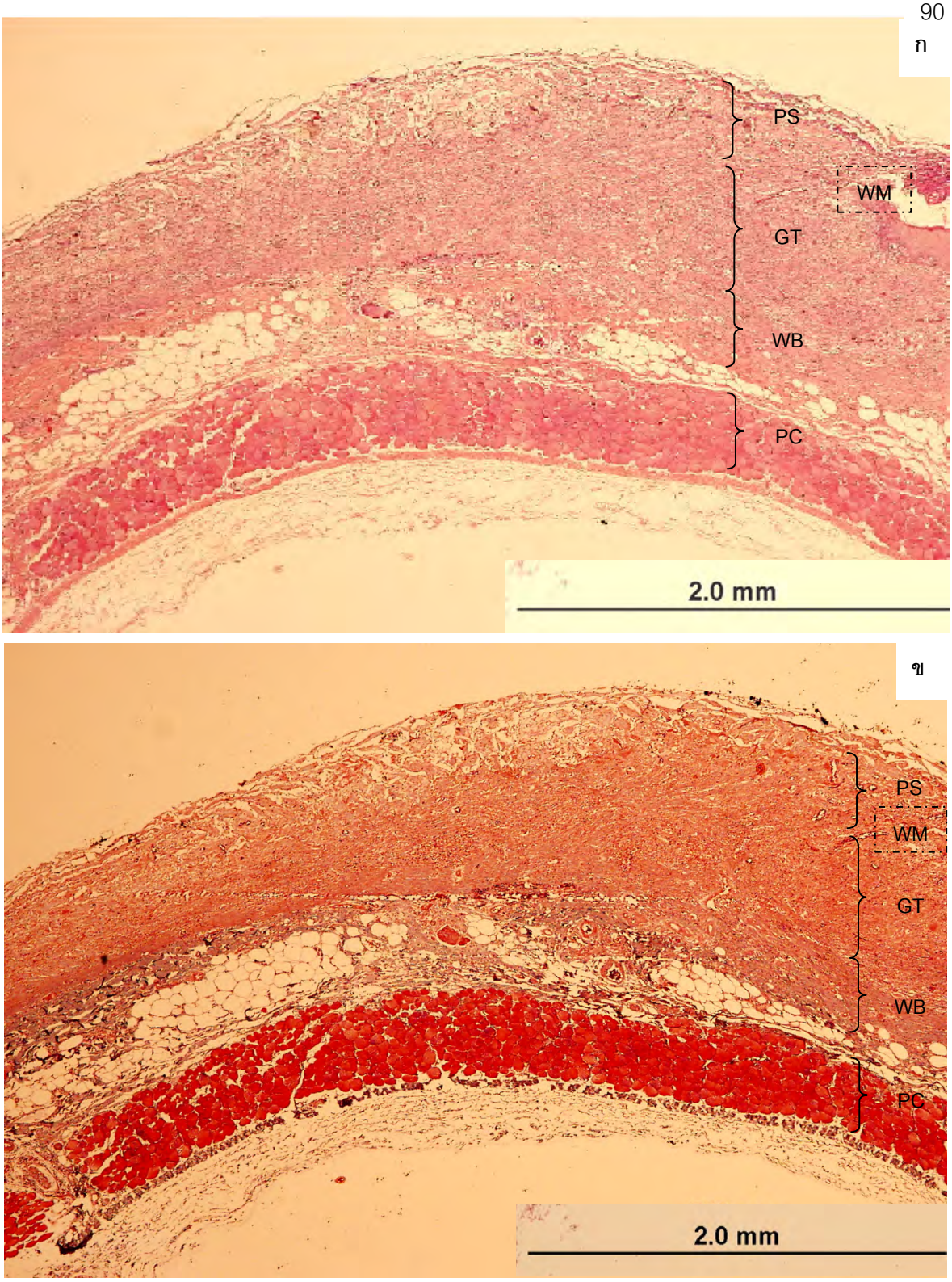
4.1.3 ผลการศึกษาการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

จากการนำชิ้นเนื้อของแผลทดสอบ (Pore Skin®) มาวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา (Pathology) ด้วยการย้อม Hematoxylin & eosin (H&E) เพื่อศึกษาลักษณะทั่วไปทางพยาธิวิทยา และการย้อม Masson trichrome (MT) เพื่อศึกษาลักษณะของคอลลาเจน โดยการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค Hematoxylin and Eosin (H&E) พบว่านิวเคลียสของเซลล์ถูกย้อมติดสีน้ำเงิน และ ไซโตพลาสมา หรือคอลลาเจนถูกย้อมติดสีแดง ซึ่งแตกต่างจากการย้อมชิ้นเนื้อด้วยเทคนิค Masson trichrome (MT) ที่นิวเคลียสของเซลล์ถูกย้อมติดสีดำ, ไซโตพลาสมากล้ามเนื้อและเซลล์เม็ดเลือดแดงถูกย้อมติดสี แดง และคอลลาเจนถูกย้อมติดสีน้ำเงิน โดยเมื่อเปรียบเทียบชิ้นเนื้อชนิดเดียวกันที่เวลาเดียวกันแต่มี การย้อมด้วยเทคนิคที่ต่างกัน พบว่าให้ผลการทดลองที่มีความสอดคล้องกัน ผลจาการถ่ายภาพโดยใช้ กล้องจุลทรรศน์พบว่า

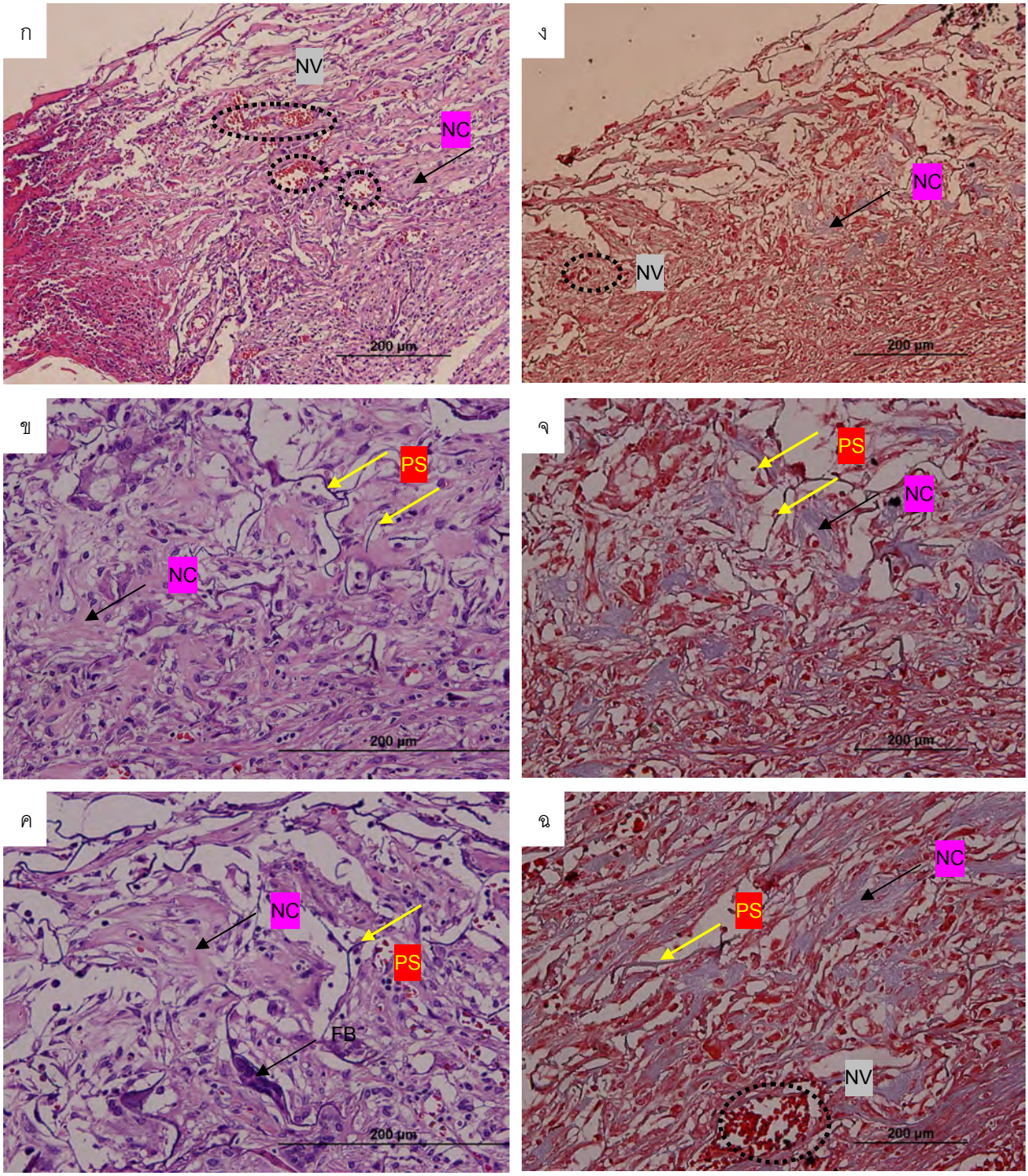
1. มีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจนใหม่ (New collagen) ที่ติดสีชมพูอ่อน (H&E) และติดสีน้ำเงิน (MT) โดยมีลักษณะการเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบเกิดขึ้นในโครงสร้างรูพรุน ของ Pore Skin® ในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัว (ดังรูป 4.19-4.34) ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน100% ของกลุ่มหนูตะเภาที่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว
2. มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) (ดังรูป 4.20, 4.22, 4.24, 4.26, 4.28, 4.30, 4.32 และ 4.34) ขนาดเล็กงอกเข้ามาภายในเนื้อรูพรุนของ Pore Skin® ซึ่งเห็นลักษณะเป็นช่องภายในบรรจุด้วยเซลล์เม็ดเลือดแดง
3. มีการสลายตัวบางส่วนของ Pore Skin® โดยเฉพาะด้านล่างที่ติดกับพื้นแผลมีการสลายตัวมากกว่าและถูกแทนที่ด้วยเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่
4. พบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell ที่เข้ามาจากบริเวณด้านล่างของแผล เพื่อเข้ามาเก็บกินซาก Pore Skin® จากทางด้านล่างของแผล (Wound Bed)

วิเคราะห์ผล

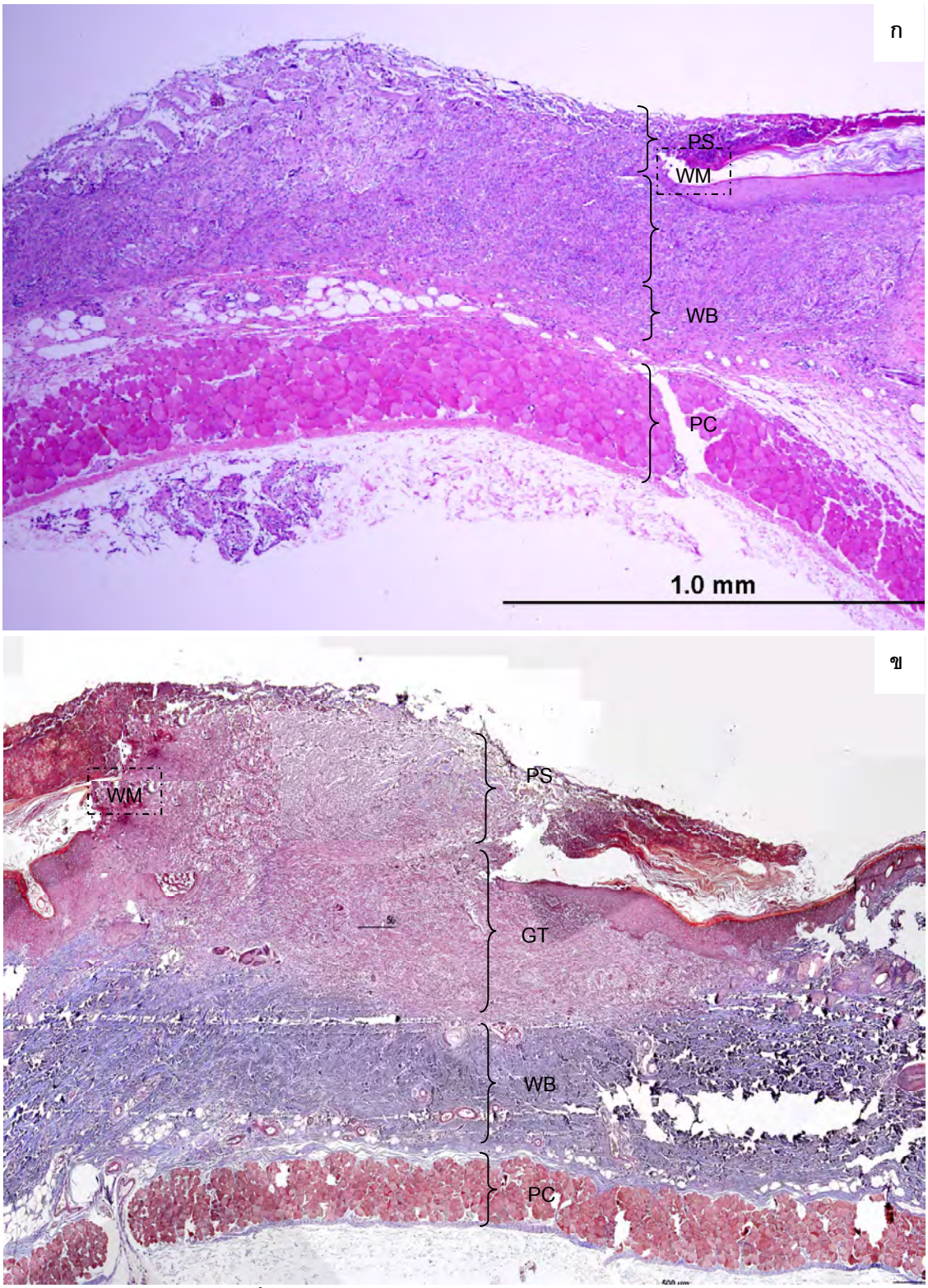
ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ได้ภายใน 3 สัปดาห์ โดยการสร้างเนื้อเยื่อใหม่จะเกิดขึ้นดีในตำแหน่งที่ Pore Skin® สัมผัสกับพื้นแผลดี เนื้อเยื่อใหม่ที่เกิดขึ้นมีเส้นเลือดมาเลี้ยง และคอลลาเจนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะอิสระตามลักษณะทางโครงสร้างของรูพรุน ซึ่งเนื้อเยื่อคอลลาเจนที่ ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นใหม่ที่มีลักษณะอิสระนี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่คล้ายชั้นหนังแท้ต่อไป หากปิดทับด้วยผิวหนังกราฟในสัปดาห์ที่ 3



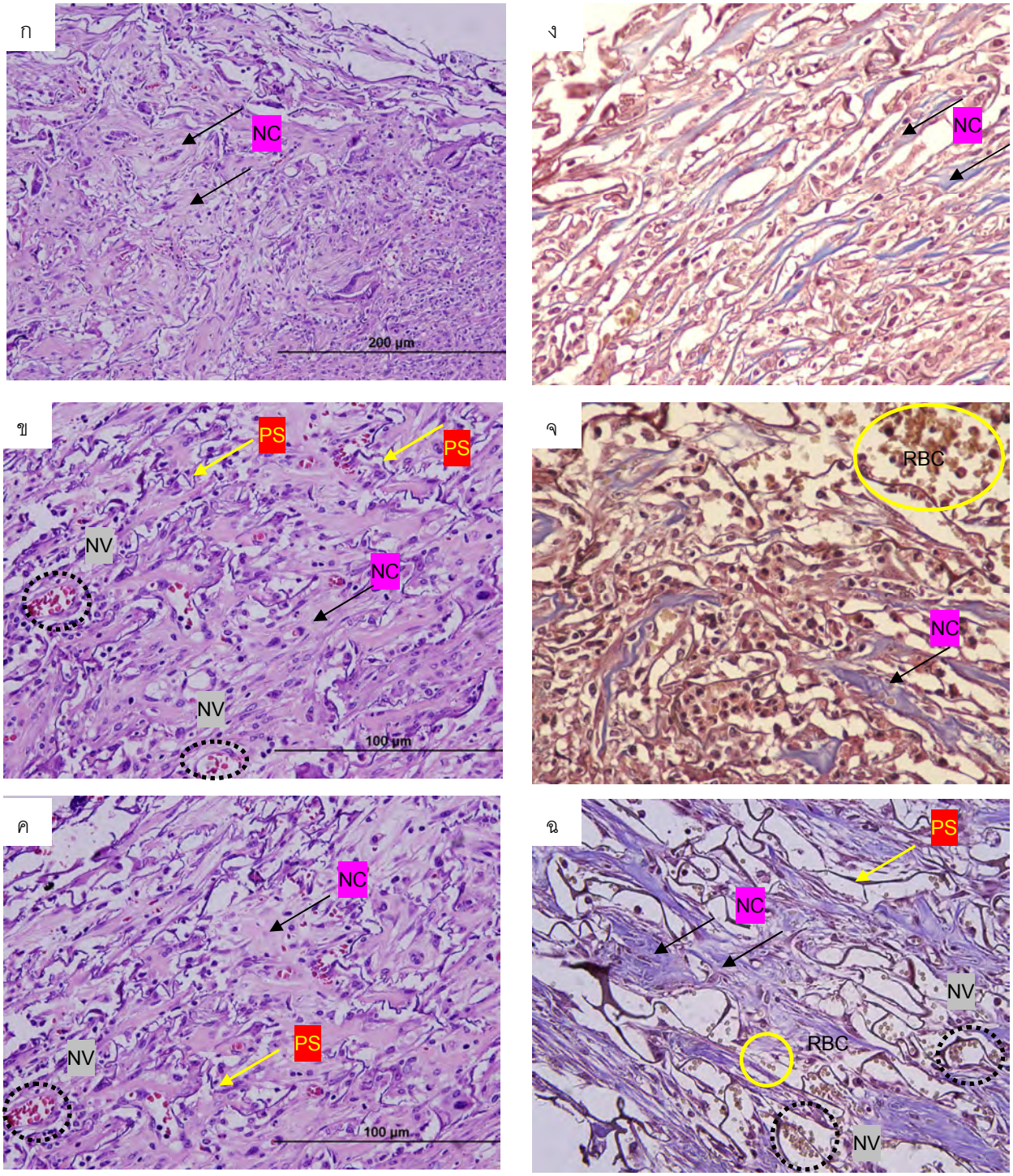
รูปที่ 4.19 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 1 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT(Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin®กับผิวหนังเดิม



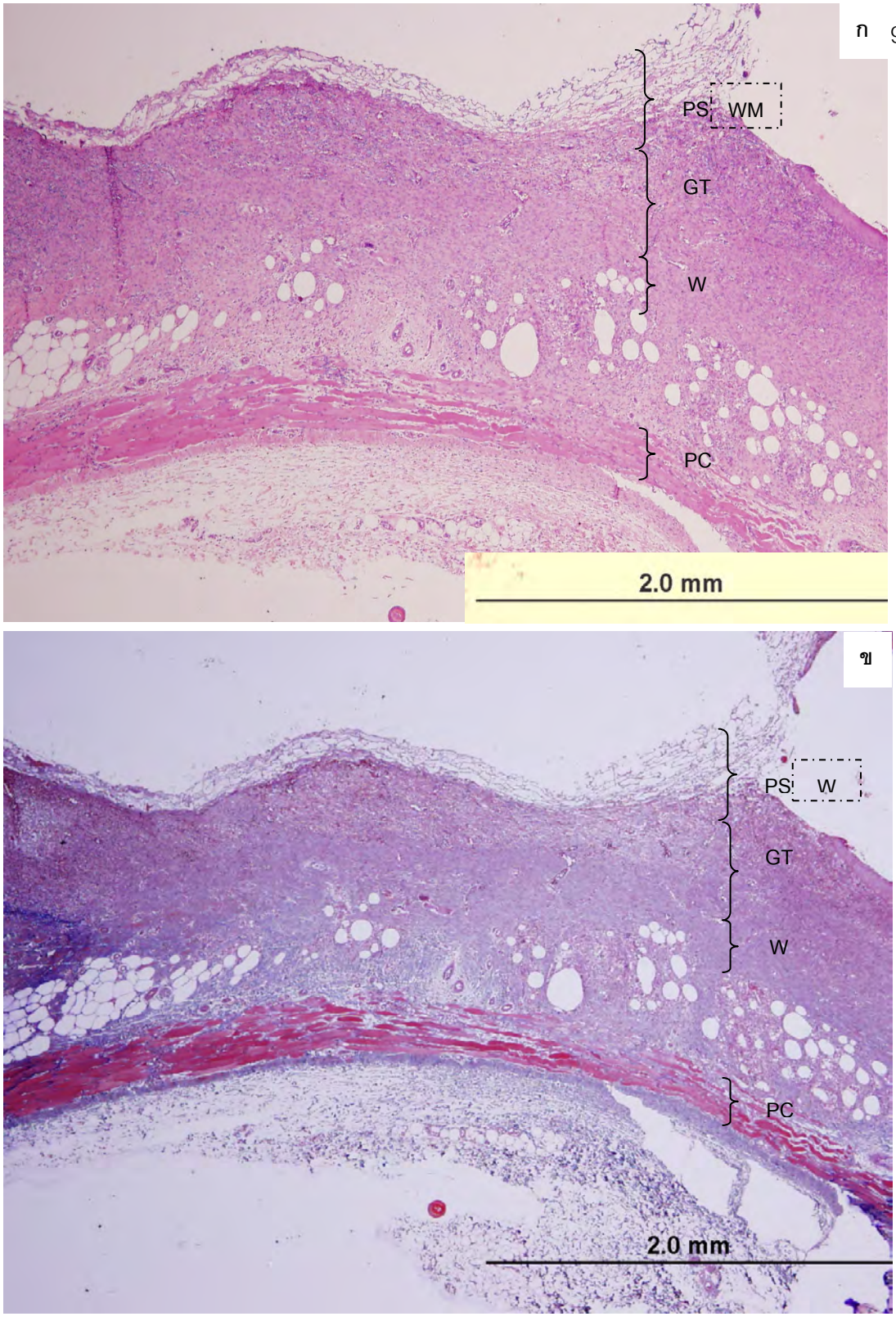
รูปที่ 4.20 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 1 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่ สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์ เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell และ PS คือ โครงรูพรุนของผิวหนัง สังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



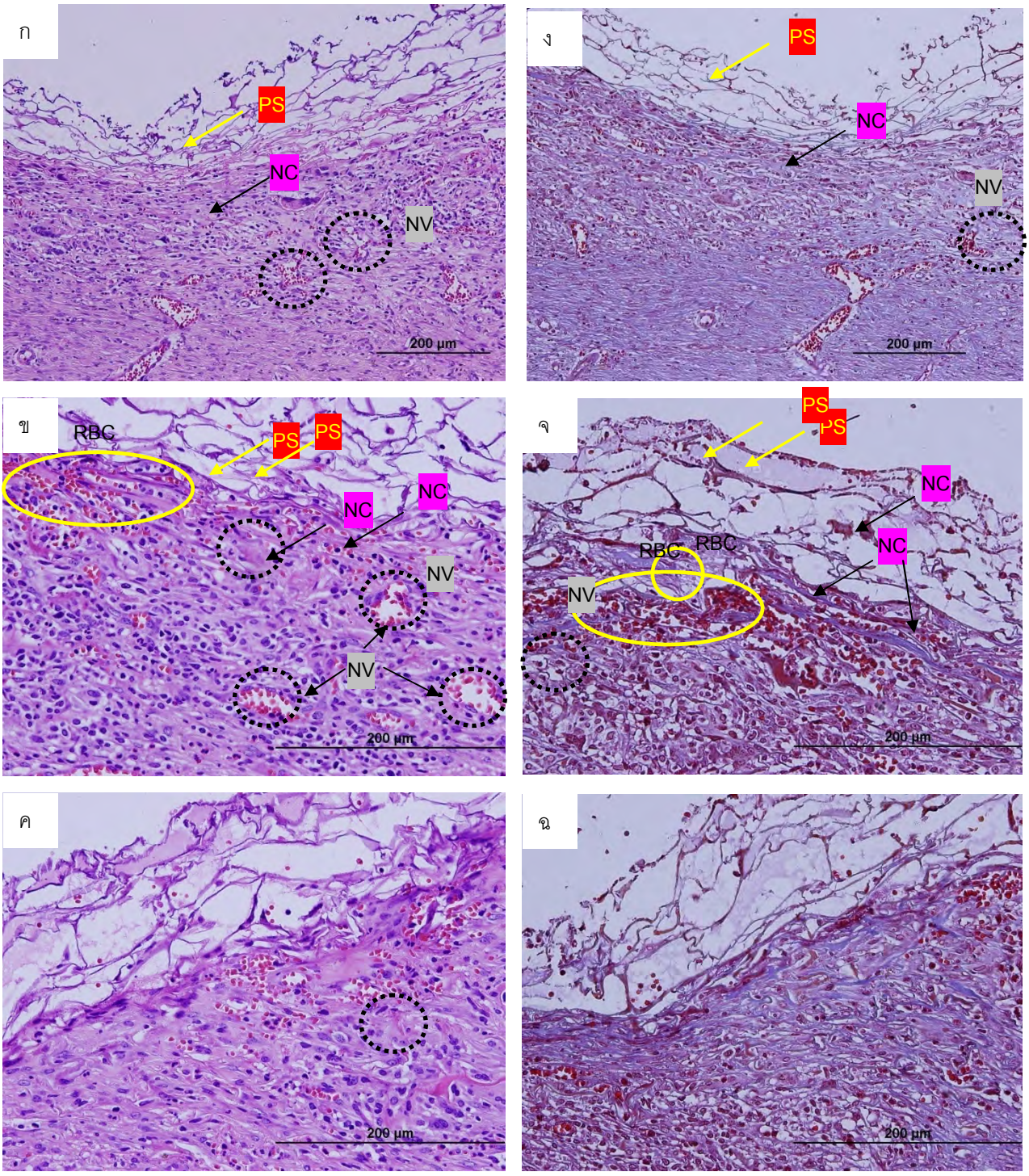
รูปที่ 4.21 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 2 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin® กับผิวหนังเดิม



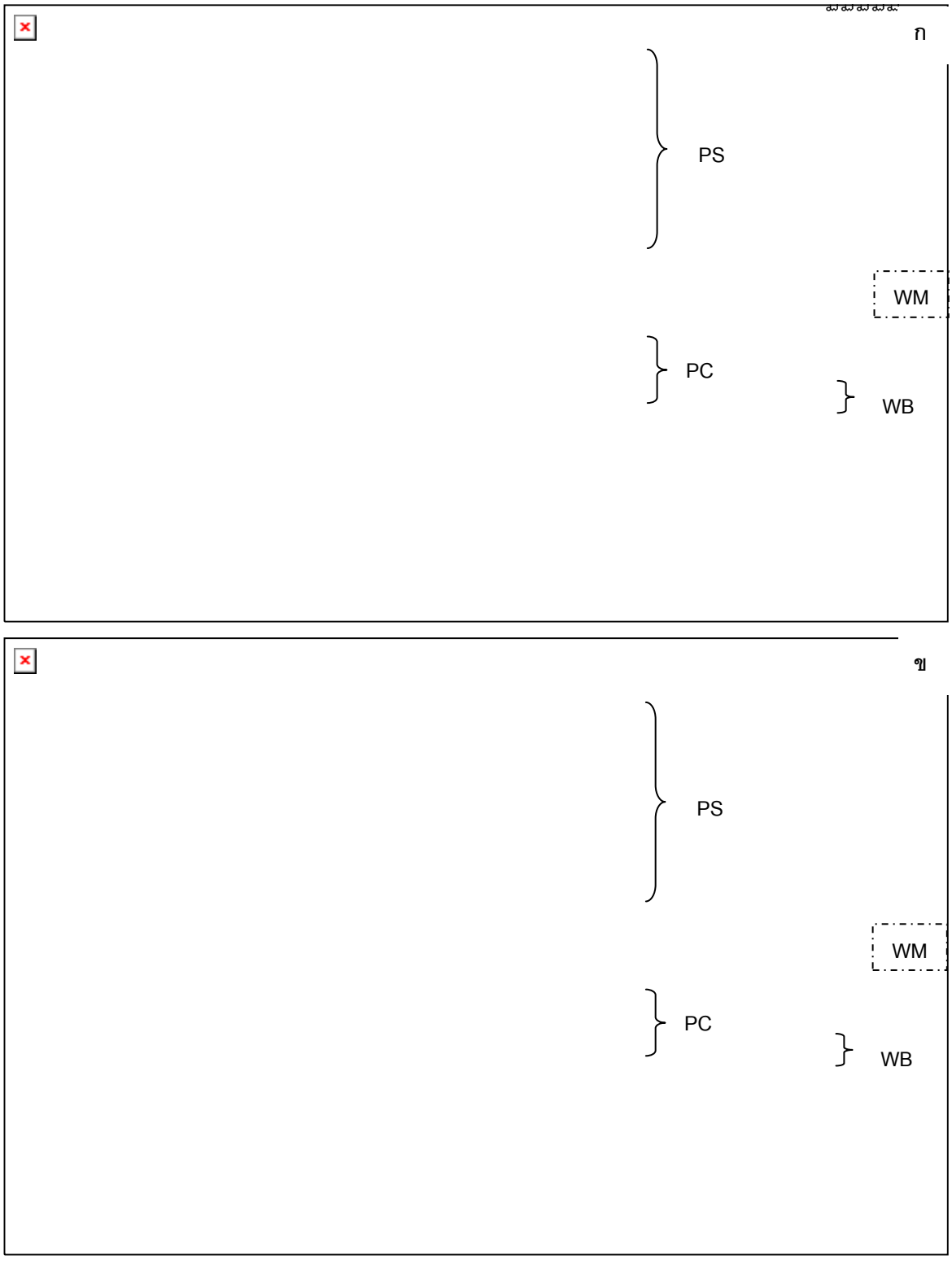
รูปที่ 4.22 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 2 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่ โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell, RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง และ PS คือ โครงรูพรุนของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



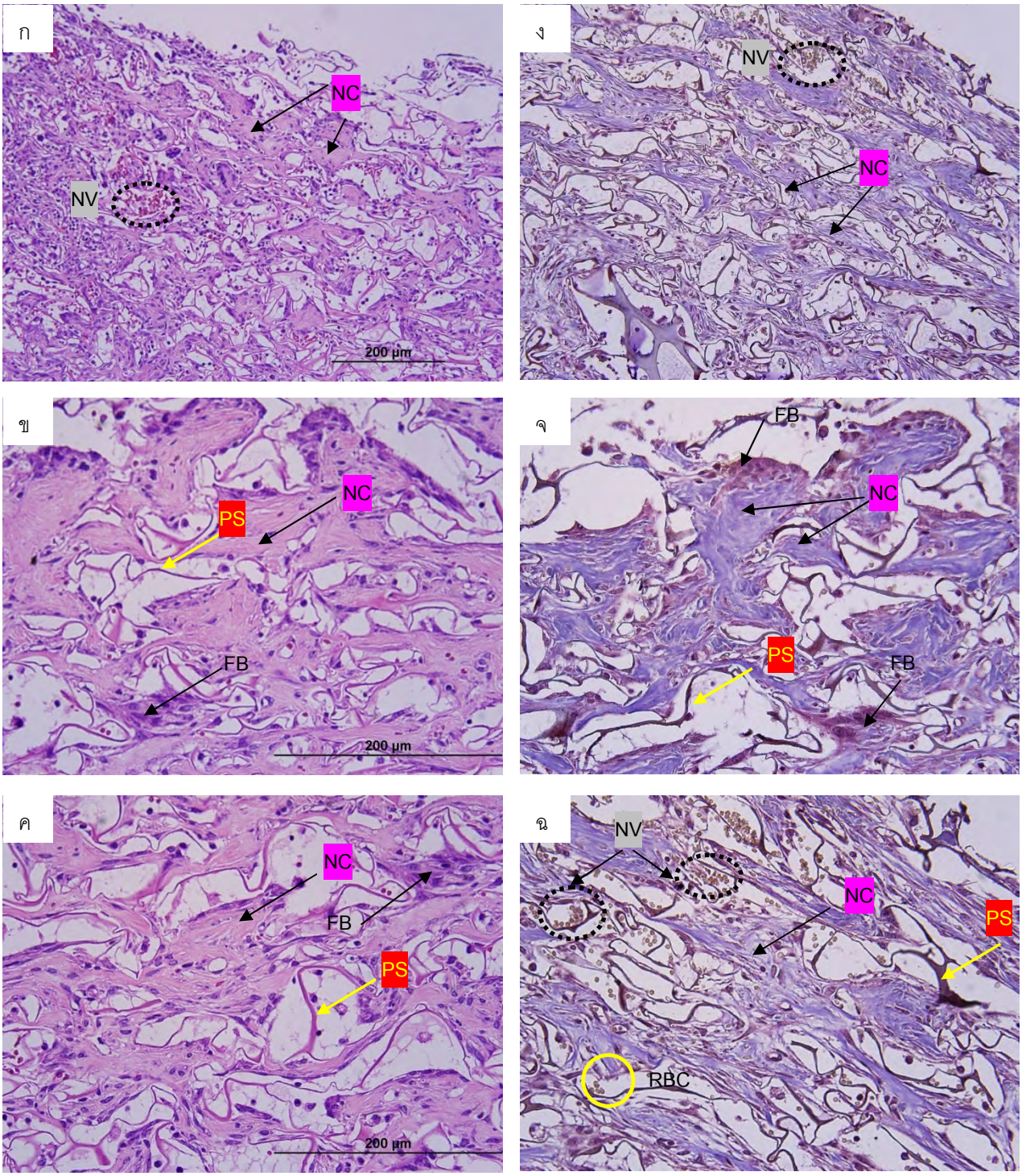
รูปที่ 4.23 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 3 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin® กับผิวหนังเดิม



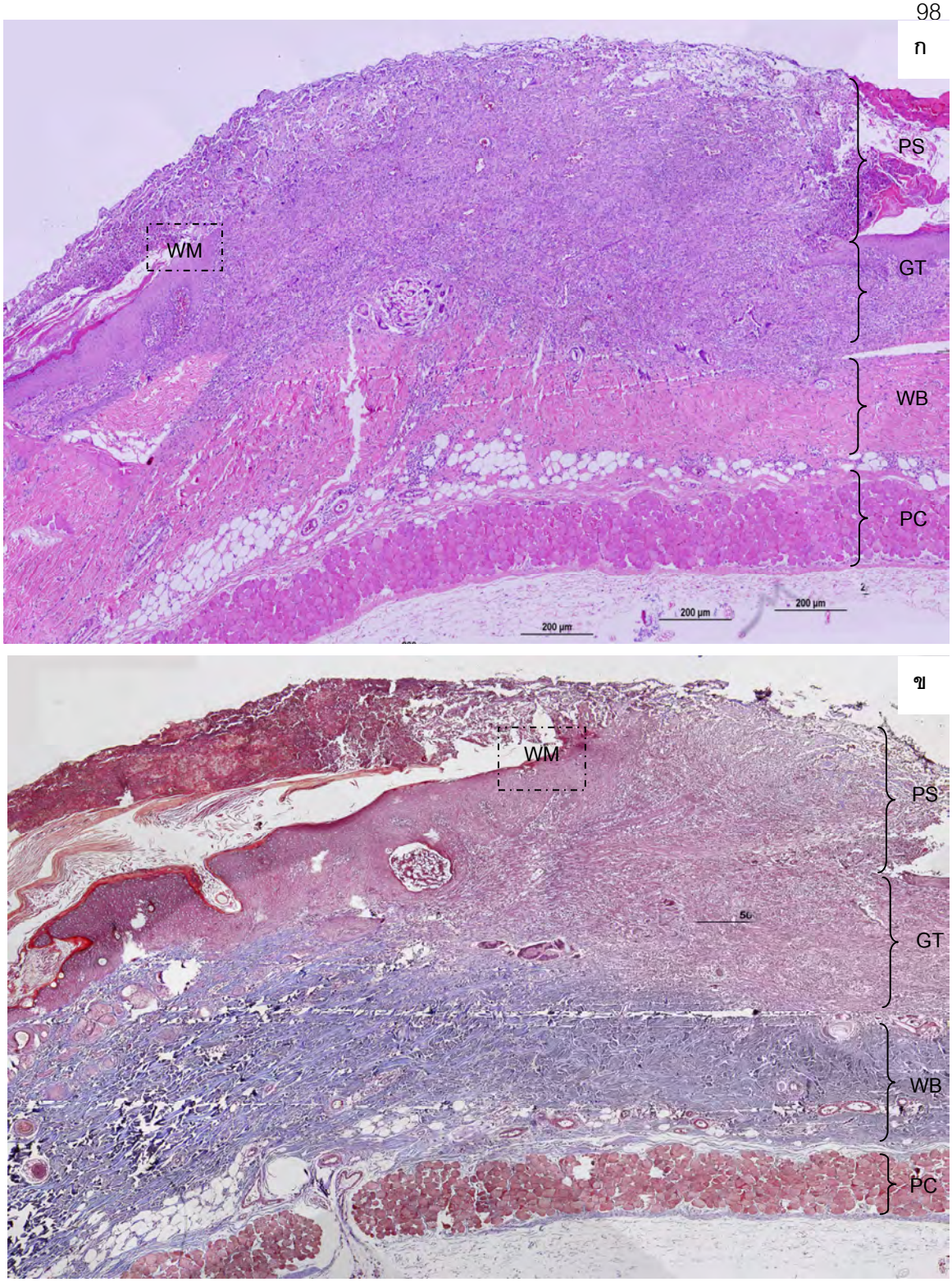
รูปที่ 4.24 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 3 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่ สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell, RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง และ PS คือ โครงรูพรุน ของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



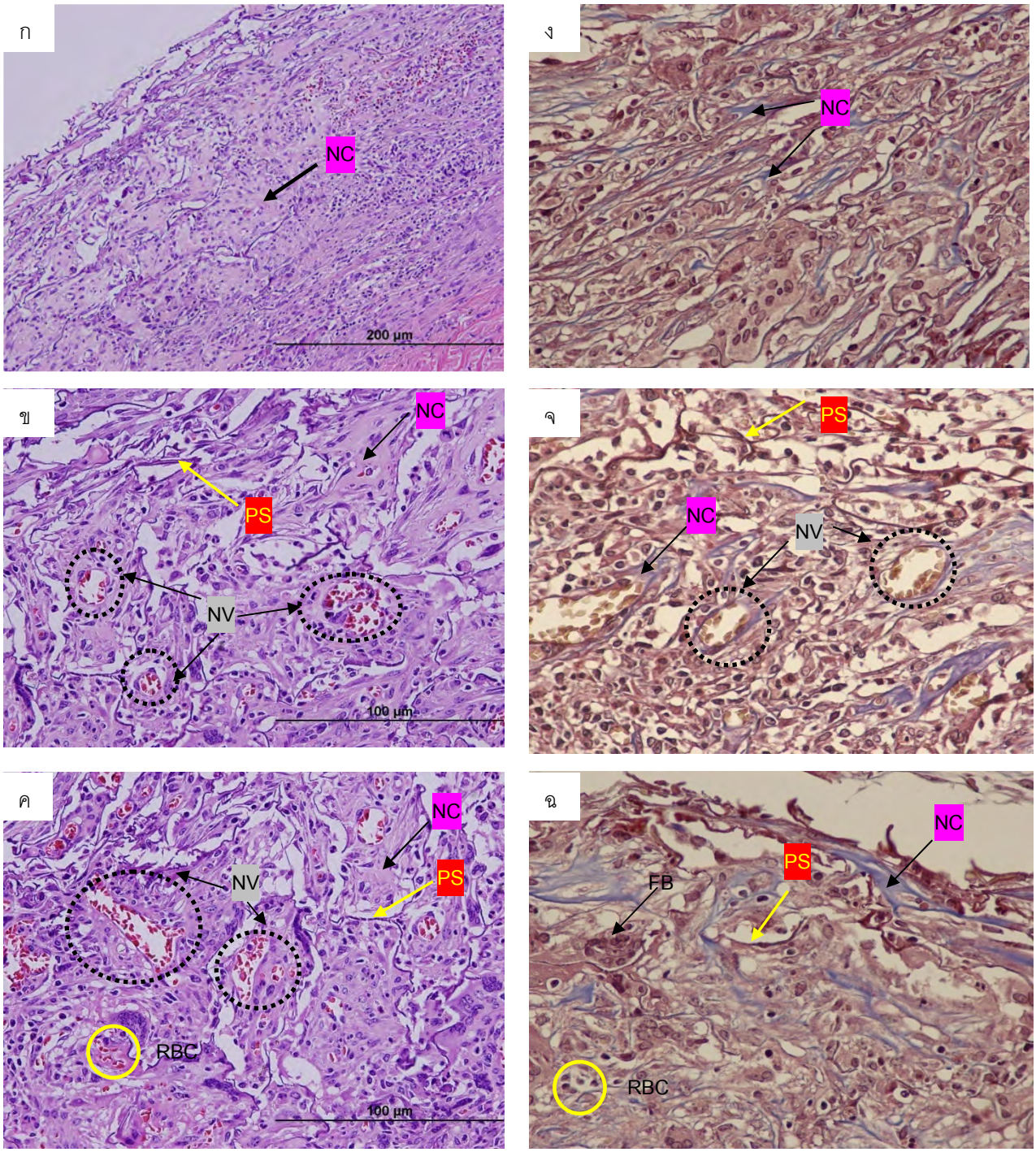
รูปที่ 4.25 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 4 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin®กับผิวหนังเดิม



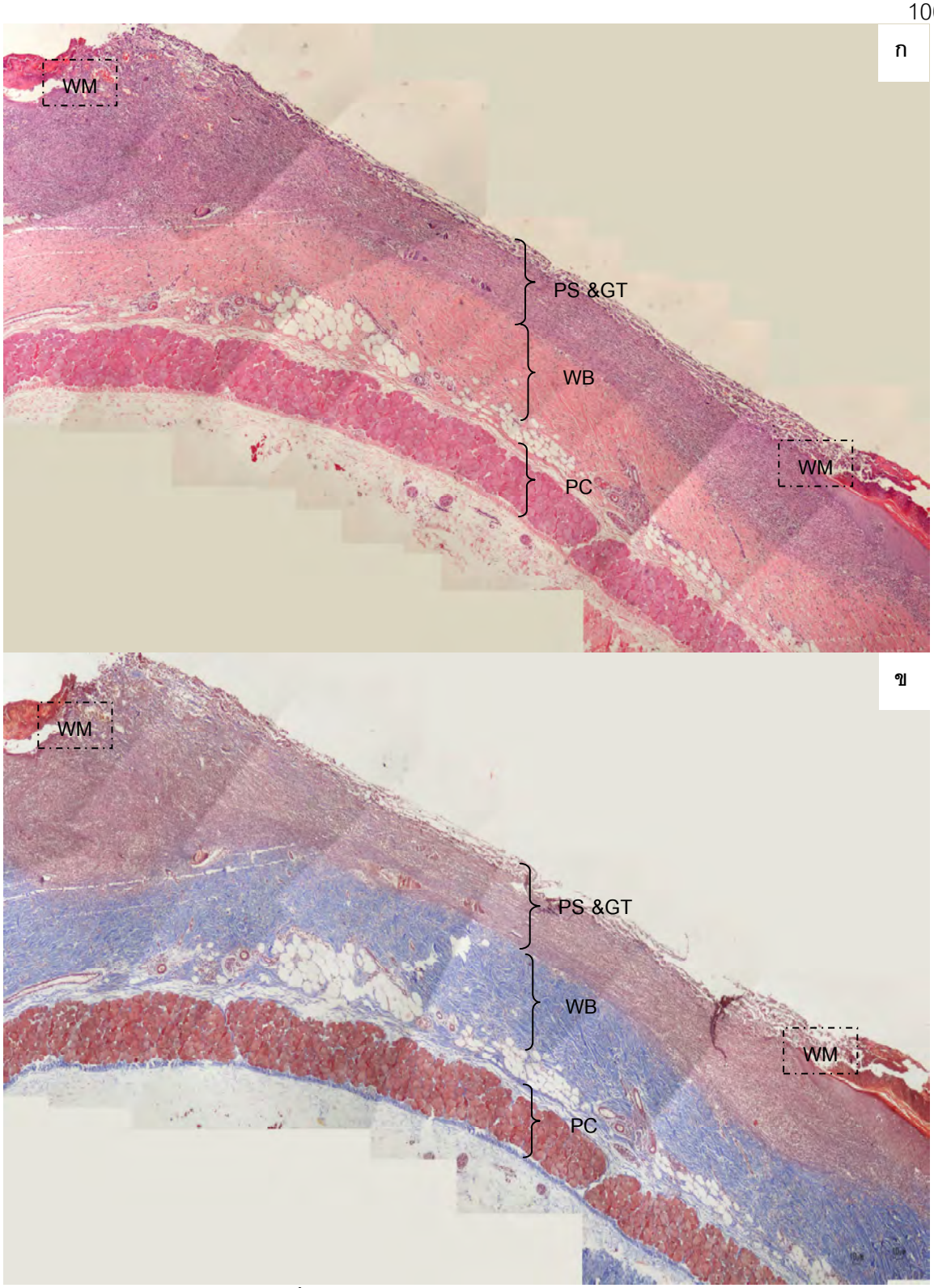
รูปที่ 4.26 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 4 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่ สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell, RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง และ PS คือ โครงรูพรุน ของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



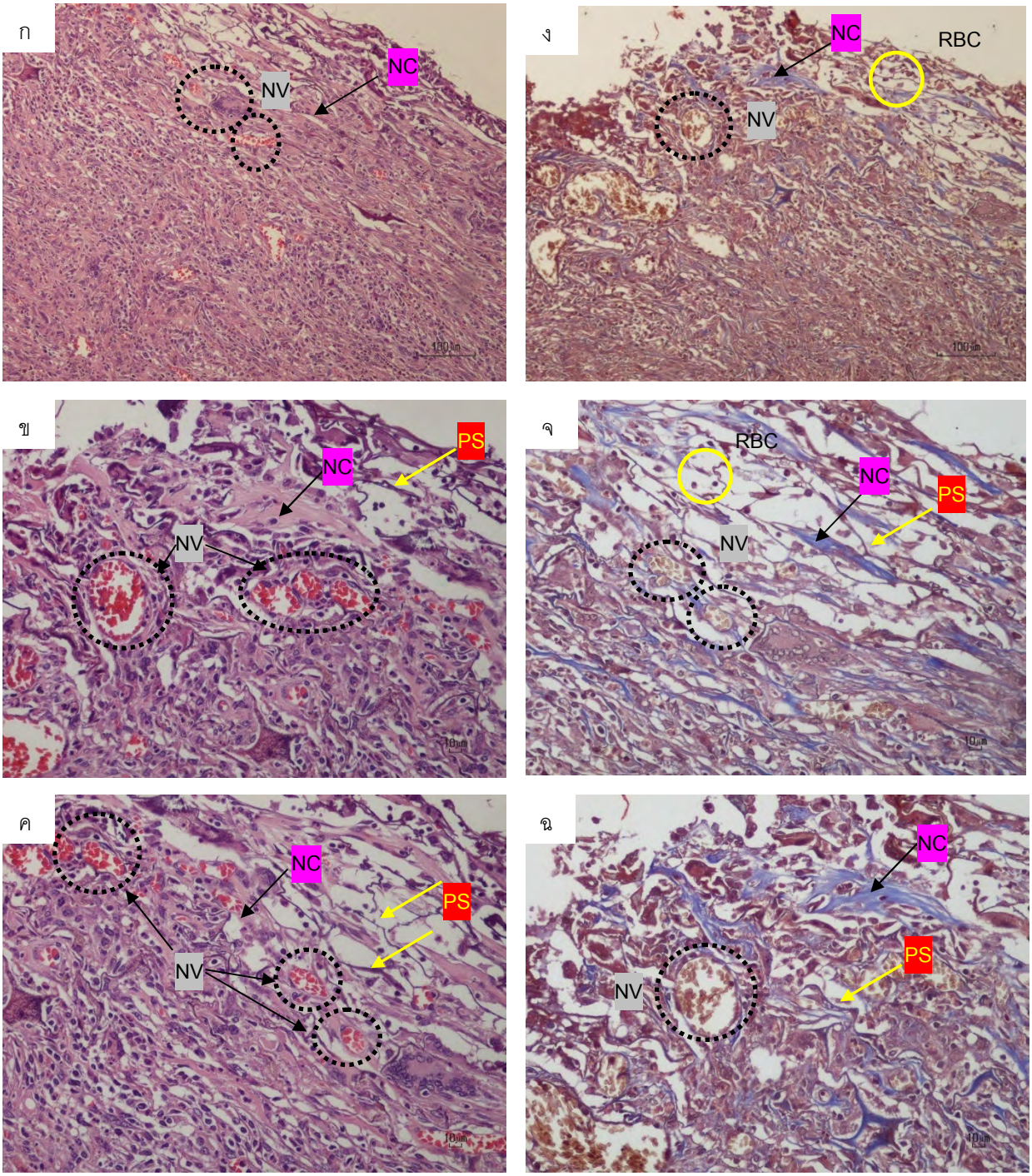
รูปที่ 4.27 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 5 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin® กับผิวหนังเดิม



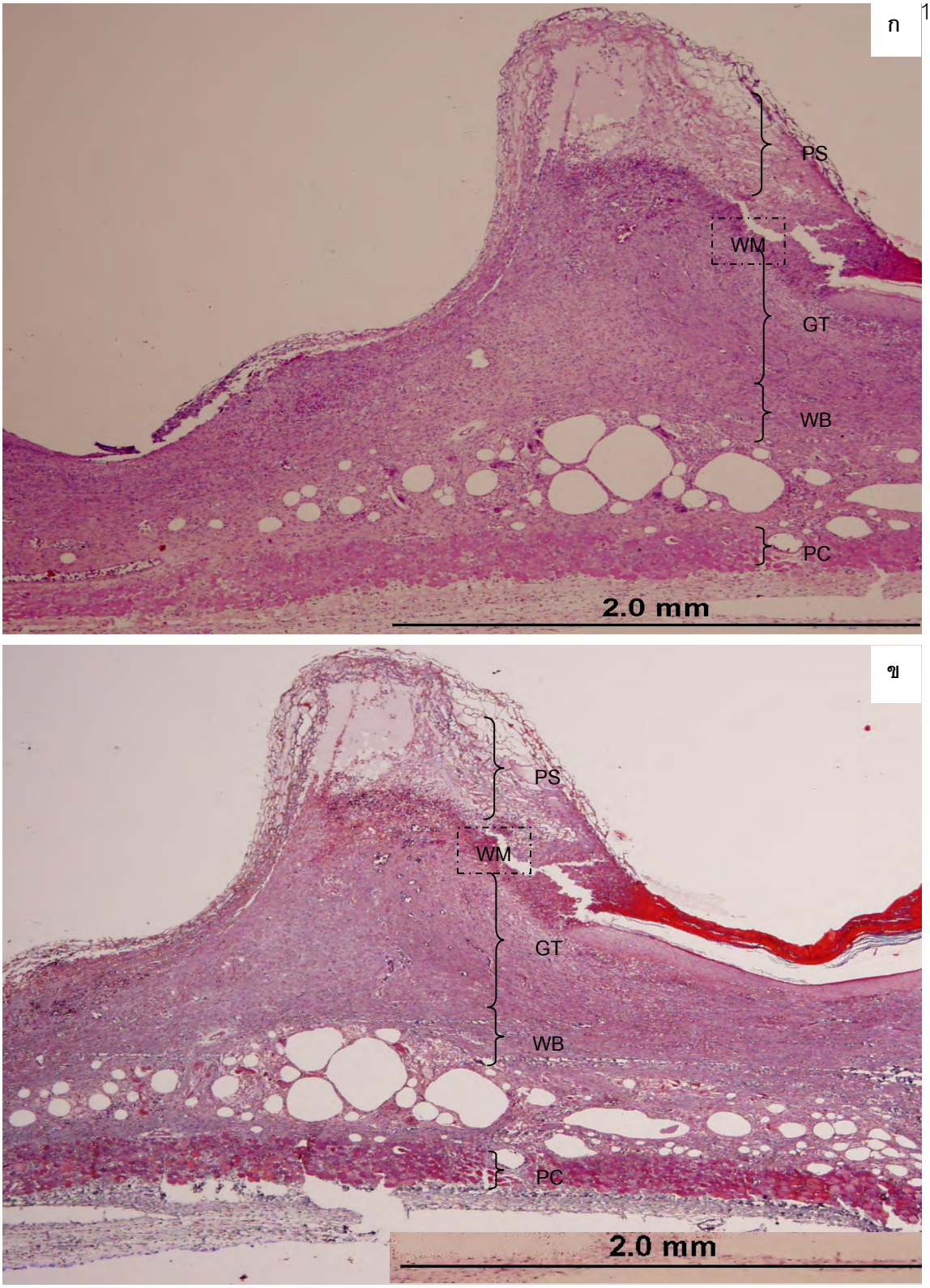
รูปที่ 4.28 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 5 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell, RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง และ PS คือ โครงรูพรุนของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



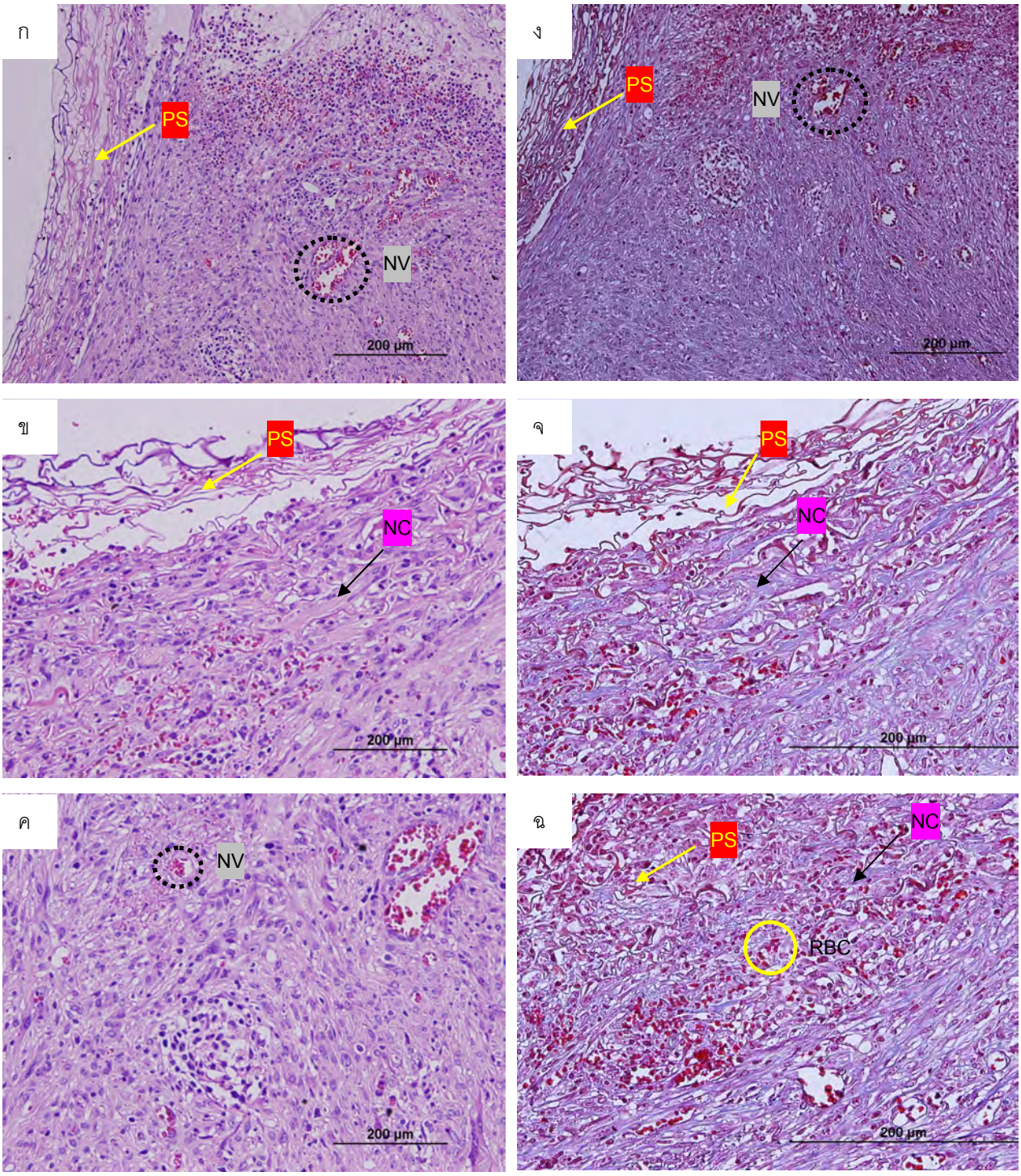
รูปที่ 4.29 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 6 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin® กับผิวหนังเดิม



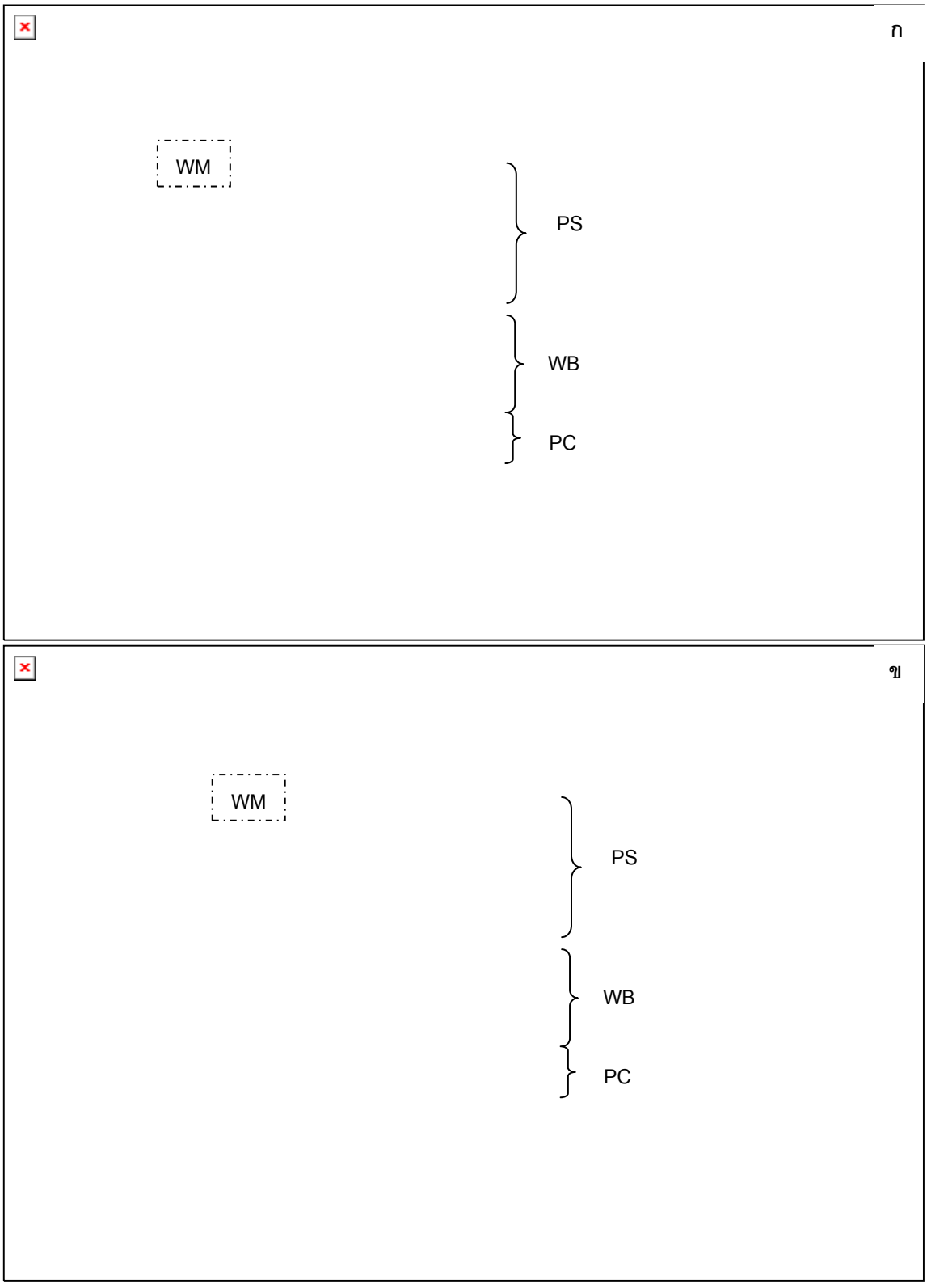
รูปที่ 4.30 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 6 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่ สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell, RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง และ PS คือ โครงรูพรุน ของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



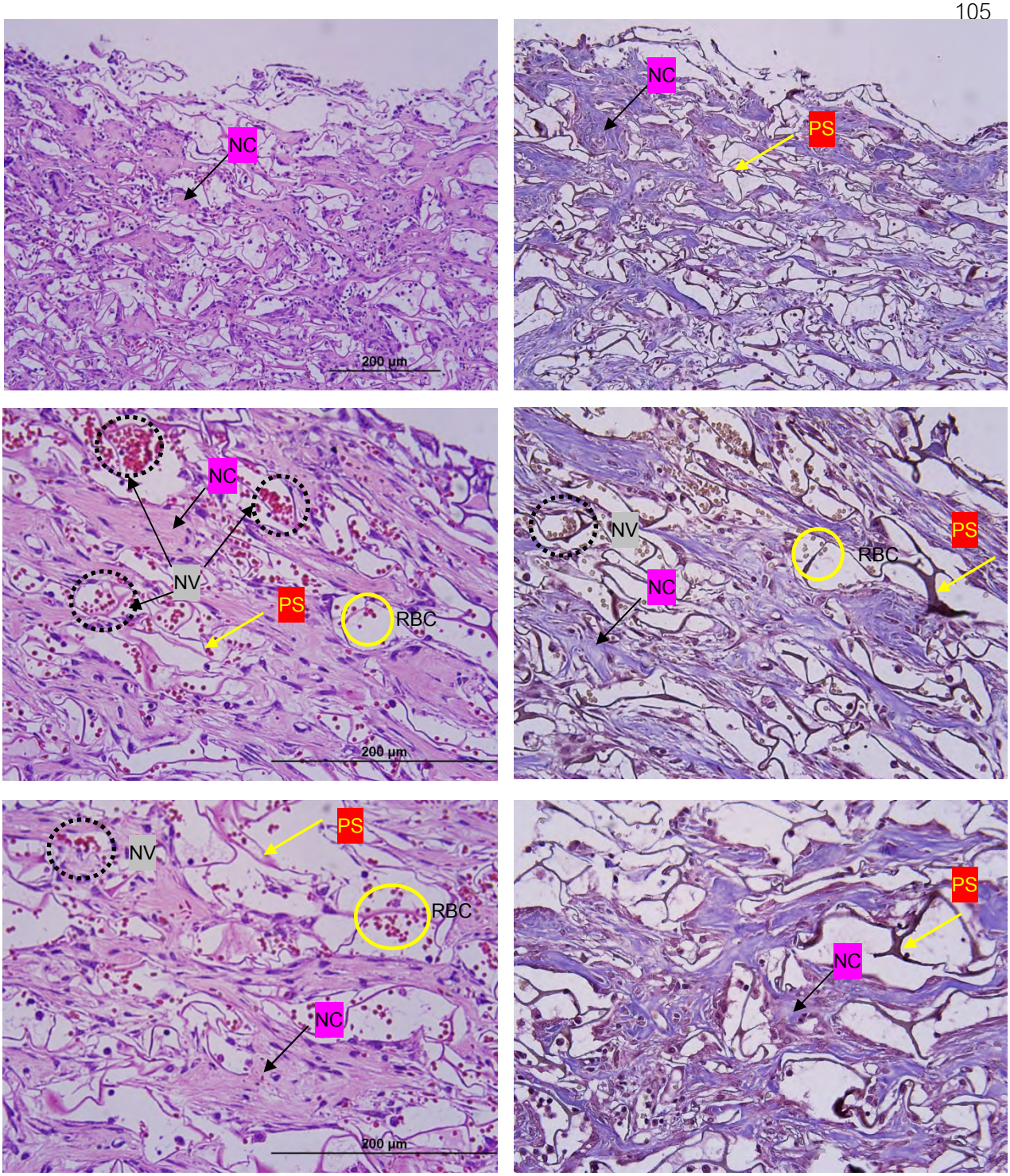
รูปที่ 4.31 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 7 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin® กับผิวหนังเดิม



รูปที่ 4.32 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 7 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่ สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell, RBC คือ เซลล์เม็ดเลือดแดง และ PS คือ โครงรูพรุน ของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย



รูปที่ 4.33 แสดงแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ทำการปิดด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 8 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย PS คือ Pore Skin® ร่วมกับเซลล์และเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่, WB(Wound bed) หรือบริเวณพื้นแผลเดิม, PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WM (Wound Margin) คือรอยต่อระหว่าง Pore Skin®กับผิวหนังเดิม



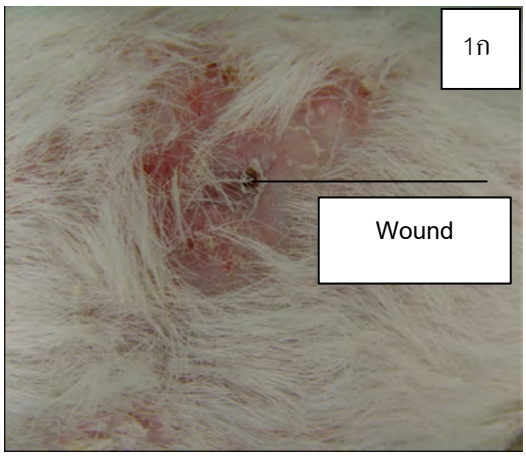
รูปที่ 4.34 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่รักษาด้วย Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 8 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่ สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell และ PS คือ โครงรูพรุนของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

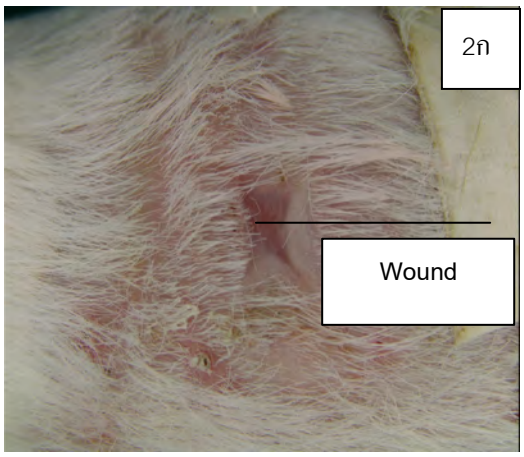
4.2 กลุ่มหนูตะเภาที่ไม่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัดจำนวน 8 ตัว

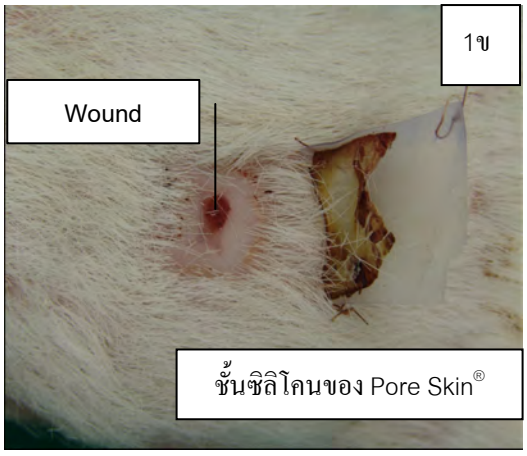
4.2.1 ตัวอย่างผลการศึกษาลักษณะทั่วไปของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8)

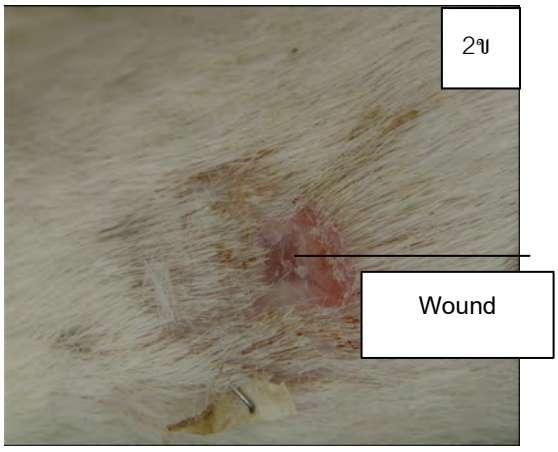
ลักษณะภายนอกทั่วไปของแผลทดสอบในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผลมีลักษณะดังนี้

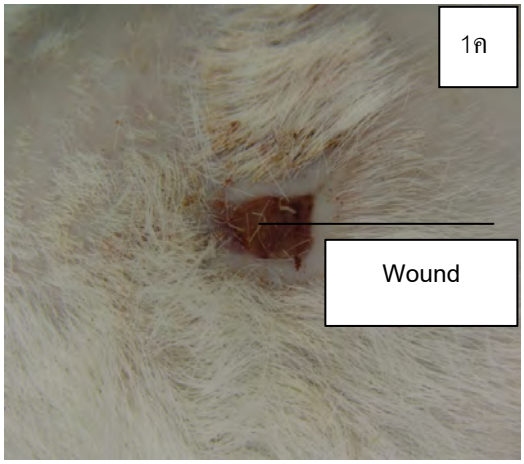
1. ไม่พบ Pore Skin® ที่บริเวณแผล เนื่องจากหนูตะเภาส่วนใหญ่จะพยายามกัดแทะ กิน ใช้หลัง หรือ สีข้างถูกับกรงทำให้ Pore Skin® เลื่อนหลุด ภายหลังการผ่าตัด(ดังรูปที่ 4.19 รูป 1ก-1ซ)
2. แผลที่ไม่พบ Pore Skin® ที่บริเวณแผลมีการหายอย่างปกติเมื่อเปรียบเทียบกับแผลควบคุม
3. ลักษณะทางพยาธิวิทยาของแผลเหมือนกับแผลปกติ คือมีการเคลื่อนตัวเข้ามาของชั้นหนังกำพร้าและพบเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ (Granulation tissue) (ดังรูปที่ 4.20 และ 4.21)

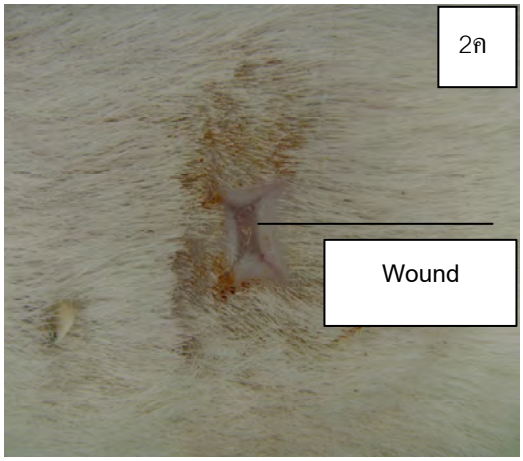


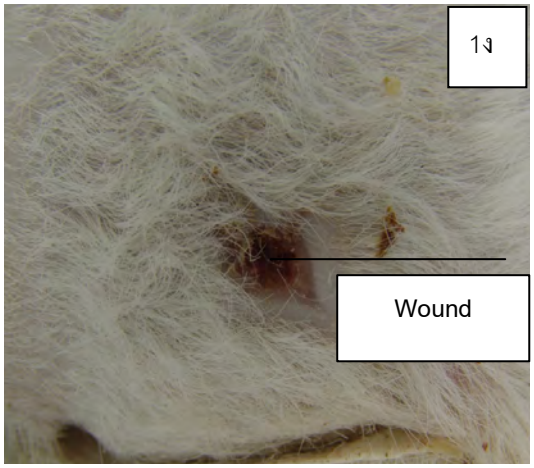


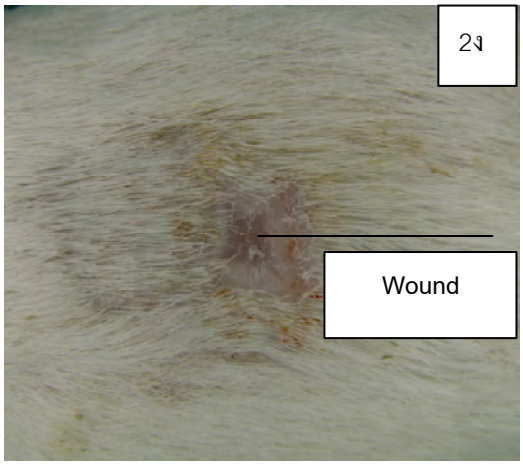


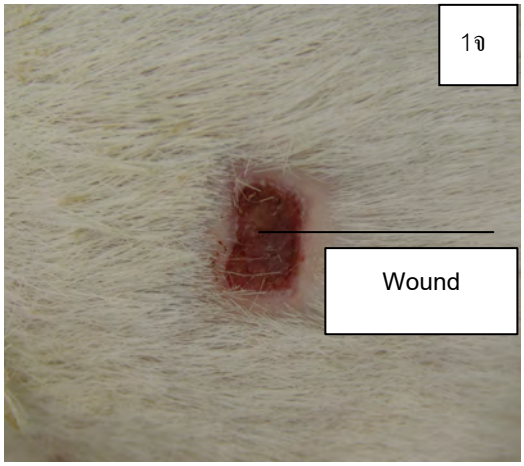


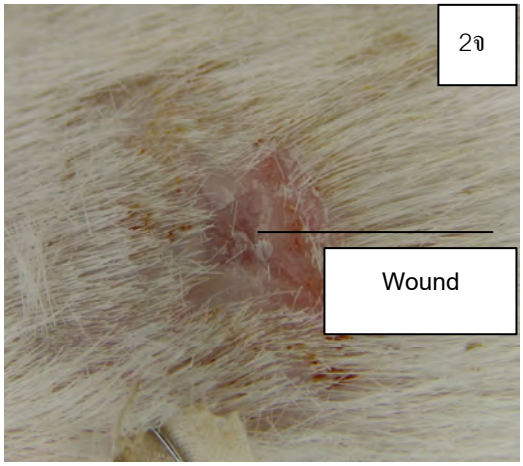

1ค
Wound

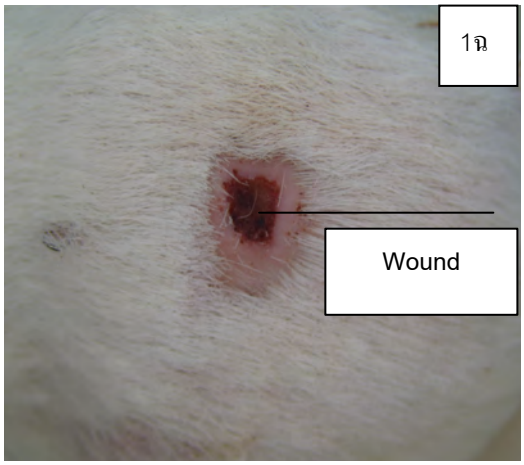

2ค
Wound

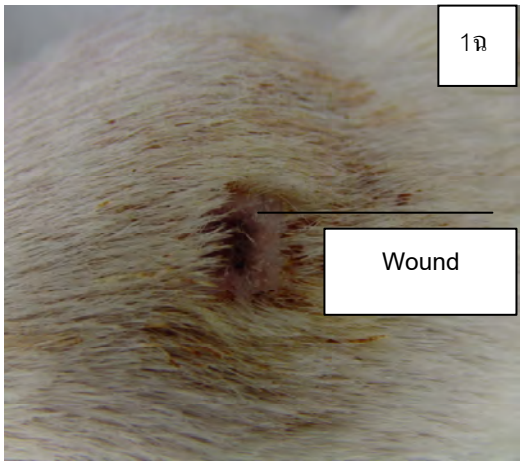

1ง
Wound

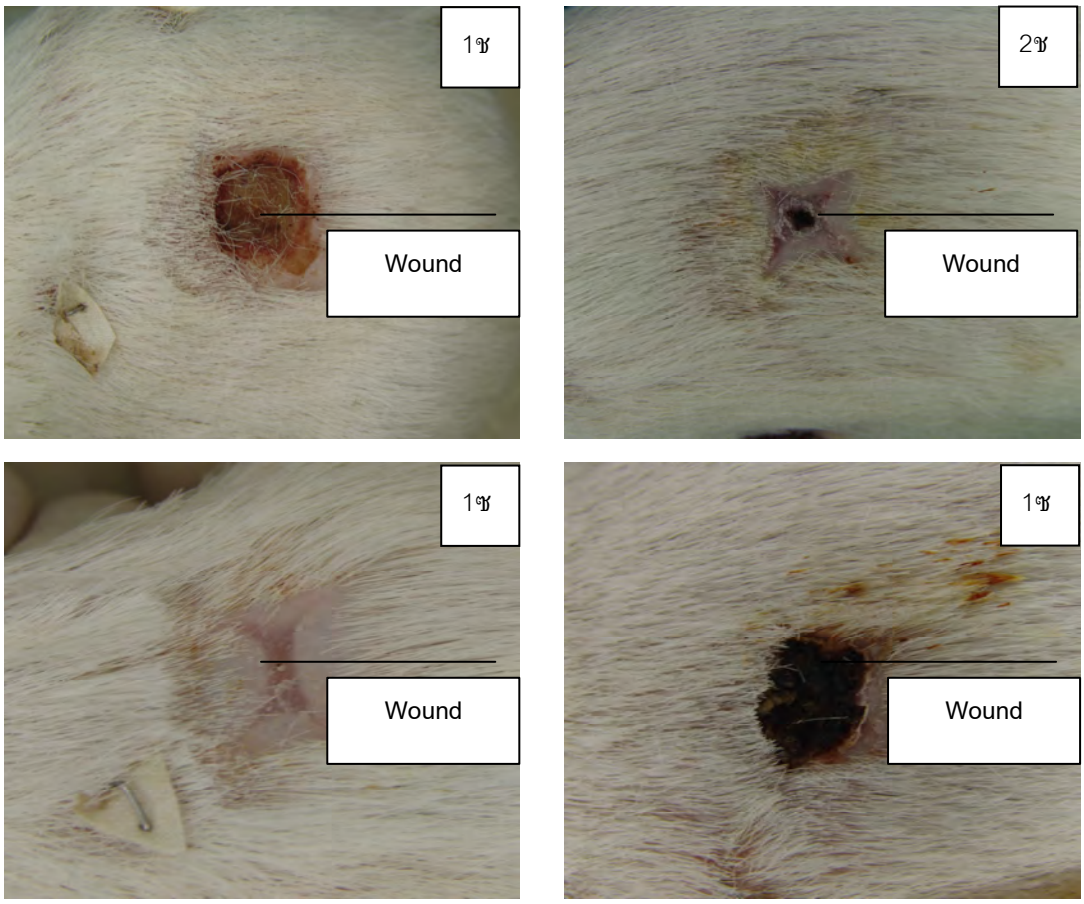

2ง
Wound


1จ
Wound


2จ
Wound


1ฉ
Wound


1ฉ
Wound



รูปที่ 4.35 แสดงภาพถ่ายลักษณะภายนอกทั่วไปของแผลทดสอบในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัวที่ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ด้านซ้ายของลำตัว) เปรียบเทียบกับแผลควบคุม (ด้านขวาของลำตัว) ในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด

รูป 1ก และ 2ก แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 9 ตามลำดับ

รูป 1ข และ 2ข แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 10 ตามลำดับ

รูป 1ค และ 2ค แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 11 ตามลำดับ

รูป 1ง และ 2ง แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภา 12 ตามลำดับ

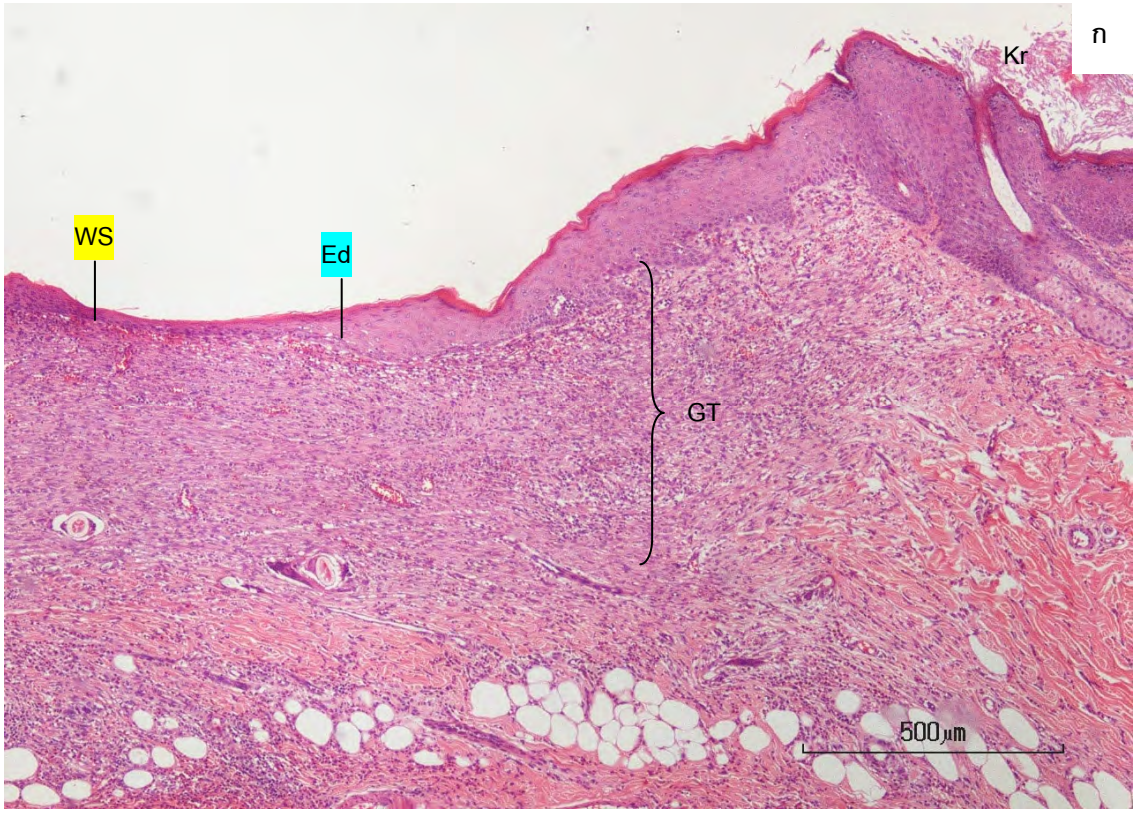
รูป 1จ และ 2จ แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 13 ตามลำดับ

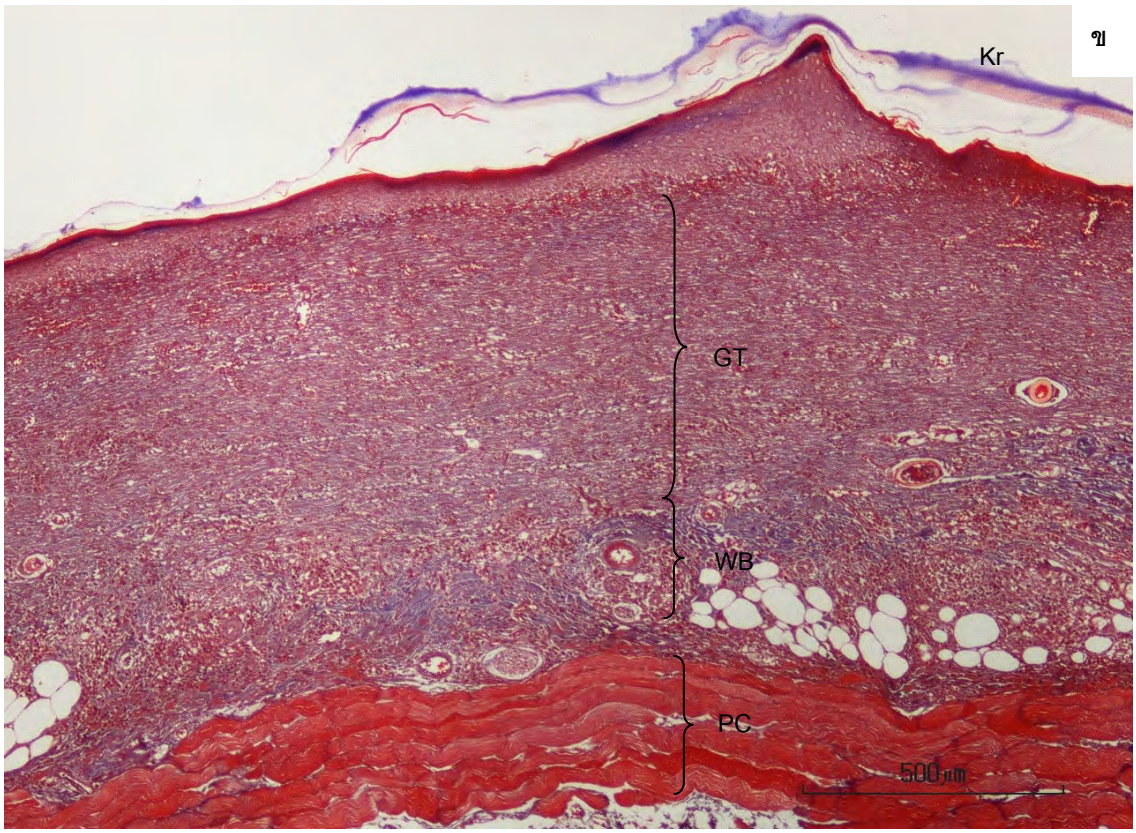
รูป 1ฉ และ 2ฉ แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 14 ตามลำดับ

รูป 1ช และ 2ช แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 15 ตามลำดับ

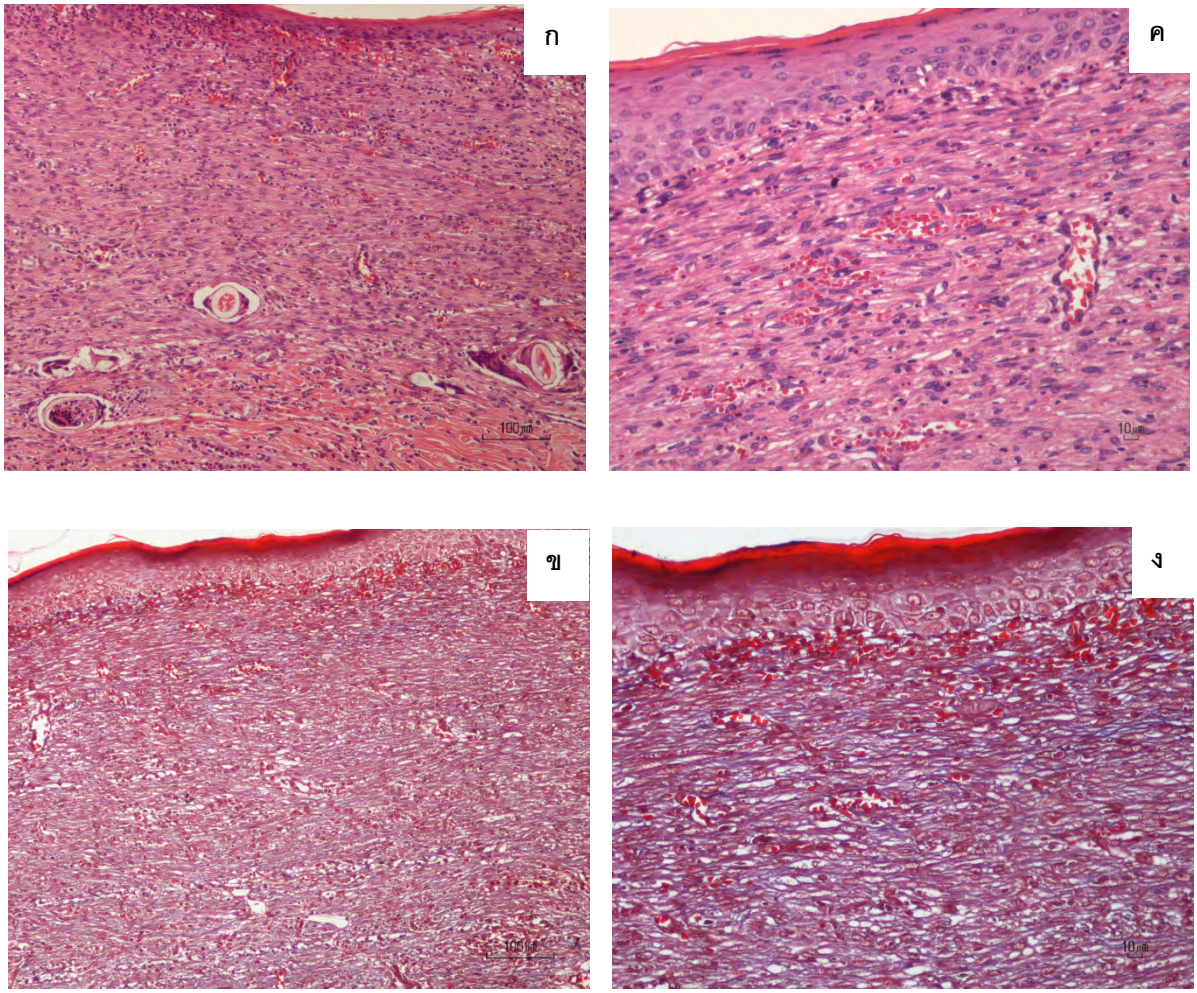
รูป 1ช และ 2ช แสดงแผลทดสอบด้านซ้ายของลำตัว (Pore Skin®) และแผลควบคุมด้านขวาของลำตัว(control) ของหนูตะเภาหมายเลข 16 ตามลำดับ

4.2.2 ตัวอย่างผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาของแผลทดสอบที่ไม่พบ Pore Skin® ใน หนูตะเภาหมายเลข 15





รูปที่ 4.36 แสดงตัวอย่างแผลเปิดลึกถึงชั้นหนังแท้ตามขวาง (cross section) ที่ไม่พบ Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 15 ก) H&E ,x40 ข) Masson Trichrome ,x40 โดย WS คือ Wound Surface หรือ พื้นผิวของแผล , Ed (Epidermis) หรือชั้นหนังกำพร้า, Kr (Keratinocyte) หรือขี้ไคล, GT (Granulation tissue) หรือเนื้อเยื่อที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ PC (Panniculus carnosus) หรือชั้นกล้ามเนื้อของหนูตะเภา และ WB (Wound Bed) หรือบริเวณพื้นผิวเดิม



รูปที่ 4.37 ภาพถ่ายบางส่วนของแผลที่ไม่พบ Pore Skin® ที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์ของหนูตะเภาหมายเลข 15 ก) (H&E,x200), ข) และ ค) (H&E,x400), ง) (MT,x200), จ) และ ฉ) (MT,x400) โดยที่ NC คือ คอลลาเจนไฟบริลที่สร้างขึ้นใหม่โดยเซลล์ (New Collagen), NV คือ หลอดเลือดใหม่ (Neo-vascular) ขนาดเล็ก, FB คือ เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด Foreign body type - multinucleated giant cell และ PS คือ โครงรูพรุนของผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ยังไม่ถูกย่อยสลาย

บทที่ 5
อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย

5.1 อภิปรายผลการวิจัย

จากการศึกษาก่อนหน้านี้มีรายงานว่า คอลลาเจนที่ผ่านกระบวนการเชื่อมพันธะด้วยการขจัดน้ำออกโดยใช้ความร้อน (Thermal Dehydration) เป็นวิธีการที่สามารถเพิ่มความเสถียรและคงความเข้ากันได้ทางชีวภาพ (Biocompatibility) ของวัสดุไว้ **[42]** ประโยชน์ของการค้นพบดังกล่าวส่งผลให้ต่อมา Yannas และ Burke พัฒนาผิวหนังสังเคราะห์ด้วยวิธีการทำให้คอลลาเจนจากวัวผสมคอนโดรอิติน 6-ซัลเฟต (chondroitin-6-sulphate) แห้งแบบเยือกแข็ง (Freeze Drying) จากนั้นเชื่อมติดกับแผ่นซิลิโคนด้านนอก **[43,44,45]** ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้คณะผู้วิจัย ได้ใช้คอลลาเจนจากผิวหนังมนุษย์แทนคอลลาเจนจากวัวเพื่อเตรียมผิวหนังสังเคราะห์ที่มีชื่อว่า Pore Skin® และนำผลิตภัณฑ์ดังกล่าวมาทำการศึกษาประสิทธิภาพของผลิตภัณฑ์ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภา โดยผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ Pore Skin® ที่ใช้รักษาแผลทดสอบในครั้งนี้ถูกออกแบบให้ประกอบด้วยสองชั้น คือ ชั้นล่างทำจากคอลลาเจนที่สกัดจากผิวหนังมนุษย์ ทำหน้าที่ช่วยให้เซลล์สามารถเคลื่อนเข้าไปภายในได้ง่ายขึ้น และมีการแลกเปลี่ยนสารอาหารต่างๆได้ดีขึ้น ส่วนชั้นบนทำจากแผ่นฟิล์มซิลิโคนบางประมาณ 100 ไมครอน ทำหน้าที่ป้องกันการติดเชื้อและป้องกันการสูญเสียน้ำที่แผล จากโครงสร้างดังกล่าวส่งผลให้การหายของบาดแผลที่รักษาด้วย ผลิตภัณฑ์สังเคราะห์ Pore Skin® เกิดการหายภายใต้สภาวะที่มีความชุ่มชื้นและมีเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลต่ำกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแผลควบคุมที่ปล่อยให้หายเองตามธรรมชาติที่ไม่มีชั้นฟิล์มป้องกัน การสูญเสียน้ำของบาดแผล (ดังรูปที่ 4.1)

เนื่องจากกระบวนการหายของบาดแผล (Wound healing) เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อน โดยประกอบด้วยการอักเสบ (Inflammation) การสร้างหลอดเลือดใหม่ (Angiogenesis) การเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Cell proliferation) การเคลื่อนตัวเข้ามาบริเวณบาดแผลและการเปลี่ยนแปลงตัวเองเพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆของเซลล์ (Migration and Differentiation) การสังเคราะห์เมทริกซ์นอกเซลล์ (Extracellular Matrix) และการปรับตัว (Remodeling)ของเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน ซึ่งสรุปได้เป็น 3 ระยะหลักคือ ระยะอักเสบของบาดแผล (Inflammatory phase) ระยะเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferative phase) และระยะการปรับตัว (Remodeling phase) **[46]** ดังนั้นที่สัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัดถือเป็นระยะสิ้นสุดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ (Proliferative phase) และเริ่มเกิดการลดลงของขนาดแผล แต่เป็นช่วงที่มีการเพิ่มการหดตัวของแผล (Wound contraction) อีกทั้งการเกิดสะเก็ดแผลในสัปดาห์ที่ 3 บ่งบอกให้รู้ว่ากระบวนการหายของบาดแผล

สามารถเกิดขึ้นได้ดีภายใต้สภาวะที่แผลมีความชุ่มชื้น **[47]** ระยะเวลาดังกล่าวจึงเหมาะสมในการศึกษาประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวการยับยั้งการหดตัวของแผล (Wound Contraction Inhibition Endpoint) นอกจากนี้ผลการศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Pore Skin® ในหนูวิสต้าก่อนหน้านี้ (The Study of Mechanism of Pore Skin® in Animal Implant Model) (รายละเอียดดังภาคผนวก ง) พบว่าผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีการสร้างเนื้อเยื่อภายในช่องว่างของรูพรุนและพบการงอกเข้ามาของหลอดเลือดใหม่ภายในรูพรุนที่ระยะเวลา 3 สัปดาห์

จากรายงานของ Freyman TM และคณะ แสดงถึงประโยชน์ของโครงร่างคอลลาเจนที่เพิ่มการงอกกลับมาของผิวหนังและการลดการเกิดแผลเป็นหดรั้ง **[48]** ผลการศึกษาเปอร์เซ็นต์การหดตัวของแผลทดสอบ (Pore Skin®) เปรียบเทียบกับแผลควบคุมในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด (N=8) แผลที่ปิดด้วย Pore Skin® มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวของแผลเท่ากับ 46.42% และแผลควบคุม (Control) มีค่าเปอร์เซ็นต์เฉลี่ยการหดตัวของแผลเท่ากับ 87.93% (รูปที่ 4.2) จากการศึกษาบ่งบอกได้ว่า Pore Skin®มีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหดตัวของแผลเมื่อเปรียบเทียบกับแผล 41.51% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P = 0.0001, Unpaired t-test)

จากรายงานของ Yannas และคณะ ในปี 1982 ได้ทำการประยุกต์ใช้ผิวหนังสังเคราะห์ที่มีลักษณะสองชั้นกับแผลที่สูญเสียทั้งชั้นความหนาของชั้นหนังแท้ในหนูตะเภาซึ่งผลการศึกษาทางพยาธิวิทยาไม่พบการอักเสบ หรือ ผิวหนังสังเคราะห์ดังกล่าว แต่มักพบว่าในหนูตะเภามักเกิดการปฏิเสธ (rejection) ผิวหนังมนุษย์ที่นำมาปิดทับผิวหนังสังเคราะห์ (Skin Allograft) ภายในวันที่ 16 ถึง 22 วัน **[49]** ซึ่งการศึกษาในครั้งนี้ทำการวิเคราะห์ผลที่สัปดาห์ที่ 3 หรือ 21 วัน โดยผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ทำจากคอลลาเจนผิวหนังมนุษย์ซึ่งมีโอกาสเกิดการปฏิเสธในหนูตะเภาได้สูง ดังนั้นผลการทดลองพบว่าอัตราการติดของ Pore Skin® ใน 3 สัปดาห์คิดเป็นอัตราส่วน 50% ซึ่งถือเป็นอัตราการติดที่ดี นอกจากนี้การศึกษาทางพยาธิวิทยาผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ได้ภายใน 3 สัปดาห์ มีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจนใหม่ (New collagen) ที่ติดสีชมพูอ่อน (H&E) และติดสีน้ำเงิน (MT) โดยมีลักษณะการเรียงตัวกันอย่างไม่เป็นระเบียบหรือเกิดขึ้นอย่างอิสระเกิดขึ้นในโครงสร้างรูพรุนของ Pore Skin® ในหนูตะเภาทั้ง 8 ตัว ที่พบ Pore Skin® ติดอยู่กับแผล (ดังรูป 4.19-4.34) ซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน100% ของกลุ่มหนูตะเภาที่พบ Pore Skin® ติดอยู่ที่แผลในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด จำนวน 8 ตัว โดยการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ดังกล่าวจะเกิดขึ้นดีในตำแหน่งที่ Pore Skin® สัมผัสกับพื้นแผลดี เนื้อเยื่อใหม่ที่เกิดขึ้นมีเส้นเลือดมาเลี้ยง และคอลลาเจนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นใหม่มีลักษณะอิสระตามลักษณะทางโครงสร้างของรูพรุน ซึ่งเนื้อเยื่อคอลลาเจนที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดขึ้นใหม่ที่มีลักษณะอิสระนี้จะเปลี่ยนแปลงไปเป็นเนื้อเยื่อที่คล้าย

ชั้นหนังแท้ต่อไป หากปิดทับด้วยผิวหนังกราฟในสัปดาห์ที่ 3 ซึ่งลักษณะของคอลลาเจนดังกล่าวมีลักษณะแตกต่างจากคอลลาเจนบริเวณแผลเป็น (รูปที่ 8ง)

จากผลการศึกษาเสนอแนะว่าผิวหนังสังเคราะห์พอร์สกินมีประโยชน์ช่วยส่งเสริมการหายของบาดแผลเปิดบนผิวหนังด้วยการทำให้แผลมีคุณภาพดีขึ้น และในอนาคตอาจจะสามารถใช้รักษาบาดแผลเปิดที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ในมนุษย์ได้

5.2 **สรุปผลการวิจัย**

จากผลการทดสอบประสิทธิภาพของ Pore Skin® ต่อการรักษาแผลของหนูตะเภาทั้ง 16 ตัว พบว่าในสัปดาห์ที่ 3 ภายหลังการผ่าตัด พบว่ามีหนูตะเภา 8ตัวที่ยังคงพบ Pore Skin ® ติดอยู่ที่แผล ส่วนอีก 8 ตัว ไม่พบ Pore Skin ® ที่แผล ดังนั้นการพิจารณาเกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผล และเกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® เนื้อเยื่อใหม่ยังคงเหลือเพียงหนูตะเภา 8 ตัวที่ยังคงพบ Pore Skin ® ติดอยู่ที่แผล

จากเกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพการยับยั้งการหดตัวของแผล (Wound Contraction Inhibition Endpoint) พบว่า Pore Skin® มีการหดตัวน้อยกว่าแผลควบคุมอย่าง 41.51% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (*P = 0.0001, Unpaired t-test)

จากเกณฑ์ในการตัดสินประสิทธิภาพการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® (Porous New Collagen Formation Endpoints) พบว่า Pore Skin® มีความสามารถในการเหนี่ยวนำให้เซลล์ยึดเกาะ เพิ่มจำนวน และย้ายที่เข้าสู่โครงรูพรุนของ Pore Skin® รวมถึงการเหนี่ยวนำให้เกิดการสร้างหลอดเลือดใหม่และเนื้อเยื่อคอลลาเจนใหม่ให้เกิดขึ้นภายใน Pore Skin® ที่มีลักษณะการเรียงตัวแบบอิสระที่เรียกว่า Porous new collagen formation ในสัปดาห์ที่ 3 ในหนูตะเภาทั้งหมด 8 ตัวที่ผ่านเกณฑ์การคัดเลือกซึ่งคิดเป็นอัตราส่วน 100%

สรุปผลการทดสอบของหนูตะเภาอีก 8 ตัวที่แผลทดสอบไม่พบ Pore Skin® แผลสามารถหายแบบแผลปกติเมื่อเปรียบเทียบกับแผลควบคุม

ดังนั้นผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่พัฒนาขึ้นมีประสิทธิภาพในการยับยั้งการหดตัวของแผลและเหนี่ยวนำการสร้างคอลลาเจนใหม่แบบอิสระ จึงคาดว่าจะมีประสิทธิภาพในการยับยั้งแผลเป็นดึงรั้งในผู้ป่วยไฟไหม้

รายการอ้างอิง

[1] เพ็ญศรี จิตรนำทรัพย์. **Annual Epidermiological Surveillance Report 2007** (2007): 146-150. [online]. แหล่งที่มา: http://www.epid.moph.go.th [2552, เมษายน 8]

[2] Veves A, Falanga V, Armstrong DG, et al. Graftskin, a human skin equivalent, is effective in the management of noninfected neuropathic diabetic foot ulcers: a prospective randomized multicenter clinical trial. **Diabetes Care** 24 (2001): 290-295.

[3] Sullivan TP, Eaglstein WH, Davis SC, Mertz P. The pig as a model for human wound healing. **Wound Repair Regen** 9 (2001), 66–76.

[4] วนิดา จันทร์วิกุลม, ดร. สิริพน โตนดแก้ว. **The first wound care meeting of the Thai society of wound healing.** พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร: ชมรมสมานแผลแห่งประเทศไทยและงานศัลยศาสตร์ตกแต่ง โรงพยาบาลราชวิถี กรมการแพทย์, 2552.

[5] Sandy Palmer, rhit. Saving our Skin! Coding for skin grafting procedures. **Coding Focus News** (2007): [online]. Available from: http://www.nursing.advanceweb.com [2008, March 9]

[6] **US-FDA Guidance for Industry Chronic Cutaneous Ulcer and Burn Wound – Developing Products for Treatment.** (2006): 1-18. [online]. Available from: http://www.fda.gov/cder/guidance/5512fnl.htm[2007, May 13]

[7] Roberto Perez, PhD and Stephen C. Davis, BS Feature. Relevance of Animal Models for Wound Healing. **Wounds** (2008); 2(1): 3-8.

[8] Gawkrodger, D.J. **Dermatology: An Illustrated Colour Text**. 2nd ed. New York: Churchill Livingstone, 1997.

[9] USC School of Dentistry. **Epidermis** [online]. Available from: http://sprojects.mmi.mcgill.ca/dermatology/epidermis.htm, [2008, December 20]

[10] USC School of Dentistry. **Dermis** [online]. Available from: http://sprojects.mmi.mcgill.ca/dermatology/dermis.htm, [2008, December 20]

[11] Gulsun, E.; Sheridan, R.L. Fibroblasts improve performance of cultured composite skin substitutes on athymic mice. **Burns** 30 (2004): 322-328.

[12] Tortora, G.J. & Grabowski, S.R.. **Principles of Anatomy and Physiology**. 7th ed. HarperCollins College Publisher, New York, 1993.

[13] USC School of Dentistry. **Skin** [online]. Available from: http://sprojects.mmi.mcgill.ca/dermatology/skin.htm, [2008, December 20]

[14] USC School of Dentistry. **Burn** [online]. Available from: http://www.burn-recovery.org/injuries.htm, [2007, April 14]

[15] Hipco International Massachusettes Institute of **Technlogy Scaffold** Casting. [online]. Available from: http://global.smithnephew.com

[16] Scott, T. Skin: Regeneration after full-thickness wounds. **Individual Inquiry Topic A Tissue engineering** (2000): [online]. Available from: http://www.millersville.edu/~biology/faculty/cebra_thomas/DB_lab/Student/katy/TScott.pdf [2001, June 3]

[17] Z.B. Ruszczak, Modern aspects of wound healing : an update, **Dermatol Surg** (2000) ; 26(3) : 219-29.

[18] Schuliz, Sibbald, Falanga et al. Wound bed preparation: a systemic approach to wound management. **Wound Regeneration** (2003); 11(2): 1-28

[19] Brown GL, et al. Enhancement of epidermal regeneration by biosynthetic epidermal growth factor. **J Exp Med** (1986); 163: 1314-24.

[20] Cooper ML, et al. Direct comparison of cultured composite skin substitute Containing human keratinocytes in athymic mice. **J Invest Dermatol** (1993) : 811-9.

[21] Yannas IV. **Tissue and Organ Regeneration in Adults.** 2nd ed. New York : Springer-Verlag, 2001.

[22] Moses MA ,et al. Temporal study of the activity of matrix metalloproteinases and their endogeneous inhibitors during wound healing. **Journal of Cellular Biochemistry**. (1996); 60(3): 379-386.

[23] USC School of Dentistry. **Organ Regeneration** [online]. Available from: http://202.28.95.5/11Department/micro/public_html [2005, May 3]

[24] Buckley, C. and O'Kelly, K. **Regular scaffold fabrication techniques for Investigations in tissue engineering.** 2nd ed, Dublin, Ireland, 2004.

[25] ถนอม บรรณประเสริฐ. **รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์ โครงการวิจัยสหสาขาวิศวกรรมเนื้อเยื่อผิวหนัง เรื่องการพัฒนาผิวหนังสังเคราะห์ต้นแบบชนิดใหม่** (Pore Skin® - Artificial Dermis 2008), 2551.

[26] Whitney, J.D.Overview: Acute and chronic wounds. **Nursing Clinics of North America**.(2005); 40(2): 191–205.

[27] Wysocki, A.B. Skin anatomy, physiology, and path ophysiology. **Nursing Clinics of North America**. (1999); 34(4): 777–797.

[28] กัลยา ผลากรกุล. **เนื้อเยื่อพื้นฐานของร่างกายและหลักปฏิบัติการด้านพยาธิวิทยา**. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพมหานคร : สถาบันพยาธิวิทยา กรมการแพทย์ กระทรวงสาธารณสุข , 2534.

[29] Risako Matsui, et al. Evaluation of an artificial dermis full-thickness skin defect model in the rat. **Biomatarials** (1996); 17(10): 989-94.

[30] W.W.K. King, et al. Evaluation of artificial skin (Integra) in a rodent model. **Burns** (1997); 23(1): 30-32.

[31] CPT Noppadon, et al : Animal Study of the Effect of Chitin-PAA and Carboxymethyl - chitosan Hydrogels on Healing of Deep Thickness Wounds. **Armed Forces Rsearch Institute of Medical Science, Annual Progress Report** (2003): 128-145.

[32] Raveewan Siripokasupkul. **Property of polysaccharide gel from durian as dressing preparations and its effect on wound healing in dog skin**. Master's Thesis Department of Pharmacology. Chulalongkorn University, 2004

[33] Lie Ma, Yanchao Shi, Yixin Chen, Haiguang Zhao, Changyou Gao and Chunmao Han. In vitro and in vivo biological performance of collagen-chitosan/silicone membrane bilayer dermal. Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2007); 18(11), 2185-2191.

[34] Yannas, I.Biodegradable templates for the regeneration of tissues. **United State Patent**. 4947840 (August 14th, 1990)

[35] Lommen, Etienne J. C. M. P. Artificial skin. **United State Patent**. 4985036 (January 15th, 1991)

[36] Yannas. Ioannnis V. Method of promoting the regeneration of tissue at a wound.

United State Patent. 4418691 (December 6th, 1983)

[37] Yannas. Ioannnis V. Method for preparation of collagen-glycosaminoglycan composite materials. **United State Patent**. 4418691 (May 15th, 1984)

[38] Arras et al "Optimisation of intraperitoneal injection anaesthesia in mice: drugs, dosages, adverse effects, and anaesthesia depth". **Comparative Medicine** (2001); 51(5): 443-456.

[39] Juan Carlos G. Marvizón et al. Calcitonin receptor-like receptor (CLR), receptor activity-modifying protein 1 (RAMP1), and calcitonin gene-related peptide (CGRP) immunoreactivity in the rat trigeminovascular system. The Journal of Comparative Neurology (2008); 507(3): 1277-1299.

[40] Kelly R. Kirker, Yi Luo, J. Harte Nielson, Jane Shelby and Glenn D. Prestwich. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound Healing. **Biomaterials** 23 (2002): 3661–3671.

[41] Young, B. and Heat, J.W. **Wheater's functional histology a text and colour atlas**, 4th ed. Edinburgh: Churchill Livingstone, 2000.

[42] Koide M, Osaki K, Konishi J et al. A new type of biomaterial for artificial skin: dehydrothermally cross-linked composites of fibrillar and denatured collagen. **J Biomed Mater Res** (1993); 27: 79-87.

[43] Yannas IV, Burke JF. Design of an artificial skin. I. **Basic design principles. J Biomed Mater Res** (1980); 14: 65-81.

[44] Burke JF. Observation on the development of an artificial skin. **J Trauma** (1983): 23: 543-551.

[45] Heimbach D, Luterman A, Burke J et al. Artificial dermis for major burns: a multi-center randomized clinical trial. **Ann Surg** (1988); 208: 313-320.

[46] Clark,R. A. F. Wound repair : Overview and general consideration. **The Molecular and cellular biology of wound repair**. 2nd ed. New York : Plenum Press, 1995.

[47] Atiyeh B.S., Ioannovich J. Al-Amm C.A., and El-Musa K.A. Management of acute and chronic open wounds: the importance of moist environment in optimal wound healing. **Curr Pharm Biotechnol**(2002); 3(3): 179-195.

[48] Freyman,T.M.;Yannasb, I.V. and Gibson L.J.Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering. **Materials Science**(2001); 46: 273-282.

[49] Tom Jaksic. The use of Artificial skin for burns. **Ann.Rev.Med** (1987); 38: 107-17.

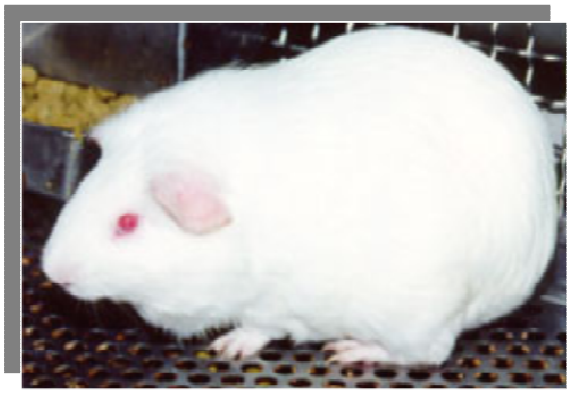
[50] ประดน จาติกวิช. **คู่มือการเลี้ยงสัตว์ทดลอง**. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2536.

[51] ปานเทพ รัตนากร. **คู่มือการใช้สัตว์ทดลอง**. พิมพ์ครั้งที่1. กรุงเทพมหานคร: ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์, 2535.

ภาคผนวก

ภาคผนวก ก.
ข้อมูลและวิธีการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

ข้อมูลสัตว์ทดลอง



สปีชีส์ (Species)	*Cavia porcellus*
สายพันธุ์ (Strain)	Dunkin Hartley Guinea pig
เพศ (Sex)	เมีย
อายุ (Age)	6 เดือน
น้ำหนัก (Weigh)	600-800 กรัม
ลักษณะทั่วไป	สัตว์ฟันแทะ มีรูปร่างอ้วนสั้น คอสั้น ขาสั้น มีเต้านม 1 คู่ทั้งตัวผู้และตัวเมีย ขาหน้ามีนิ้วเท้า 4 นิ้วและขาหลังมีนิ้วเท้า 3 นิ้ว
ลักษณะนิสัย	ขี้ตกใจ ตื่นเต้นง่าย มีนิสัยเชื่องง่ายต่อการควบคุมและการเลี้ยง เป็นสัตว์สังคมที่อยู่รวมกันเป็นกลุ่ม เป็นคู่ มีการสื่อสารกันด้วยการแสดงท่าทางและใช้เสียง ไม่มีการกระโดดหรือปีนป่าย
แหล่งที่มาของสัตว์ (Origin)	องค์การเภสัชกรรม 75/1 ถนนพระรามที่ 6 ราชเทวี กรุงเทพฯ 10400
สถานที่ทำการทดลอง	ศูนย์สัตว์ทดลอง สถานเสาวภา สภากาชาดไทย
ระบบที่อยู่อาศัย (Housing)	อนามัยเข้ม (Strictly hygienic conventional)
ขนาดกรง (ก x ย x ส) (Caging size)	25x36x9.5 นิ้ว
วัสดุที่ใช้เป็นกรง (Caging materials)	สแตนเลส
จำนวนสัตว์ทดลอง/กรง	2 ตัวต่อกรง

สภาพแวดล้อมของห้อง	อุณหภูมิ (Temperature); 23-27 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ (Relative humidity); 60-90% แสงสว่าง (Light intensity); ฟลูออเรสเซนต์ อัตราส่วนแสงสว่างกลางวันกับกลางคืน (Daylight: Darkness); 12ชั่วโมงมืดต่อ12ชั่วโมงสว่าง
อาหาร (Diet)	อาหารสำเร็จรูปจากสำนักสัตว์ทดลอง มหาวิทยาลัยมหิดล
การให้อาหาร	อัตราปกติมีกินตลอดเวลา (Ad libitum)
น้ำดื่ม (Water)	ชนิดของน้ำ; น้ำที่ผ่านการกรอง 2ครั้ง และปราศจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และผสมวิตามินซีในอัตราส่วน 400 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร
การให้น้ำ	มีน้ำให้ดื่มตลอดเวลา (Ad libitum)
จำนวนสัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัย	ใช้หนูตะเภาทั้งสิ้นจำนวน 16 ตัว

<u>วิธีการเลี้ยงสัตว์ทดลอง</u>

สัตว์ทดลองที่ใช้ในงานวิจัยคือ หนูตะเภาสายพันธุ์ Dunkin Hartley ซึ่งขณะที่ผู้วิจัยกำลังดำเนินงานวิจัยนี้ ทางศูนย์สัตว์ทดลองของคณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยยังขาดอุปกรณ์สำหรับเลี้ยงสัตว์สายพันธุ์ดังกล่าว อีกทั้งตึกศูนย์สัตว์ทดลอง คือ ตึกสรีระวิทยาอยู่ระหว่างการรื้อถอน มีการก่อสร้าง ส่งผลให้สิ่งแวดล้อมไม่เหมาะสมในการเลี้ยง ผู้วิจัยจึงโยกย้ายสัตว์ทดลองและอุปกรณ์ทั้งหมดไปยังสถานเสาวภา สภากาชาดไทย โดยมีรายละเอียดวิธีการเลี้ยงดังนี้

1. จัดสภาพแวดล้อมให้มีความเหมาะสม
    - อุณหภูมิในห้องเลี้ยง จะควบคุมที่ 25 องศาเซลเซียส เพราะหากอุณหภูมิสูงเกินไปขนจะร่วงหรือขนบาง และหนูอ่อนเพลีย
    - ความชื้นสัมพัทธ์อยู่ระหว่าง 60-90 %
    - การหมุนเวียนของอากาศในห้อเลี้ยง เป็นไปอย่างเพียงพอ
    - แสง อัตราส่วนชั่วโมงแสงสว่างกับความมืดเป็น 12 ต่อ 12 ชั่วโมง
    - เสียง หนูตะเภาเป็นสัตว์ที่ตื่นตกใจง่าย การปฏิบัติงานในห้องเลี้ยงจึงควรทำอย่างระมัดระวัง และเงียบที่สุด
2. วัสดุอุปกรณ์ที่ใช้ในงานเลี้ยง(แสดงดังรูปที่ 1ก)

- กรงสเตนเลส ใหญ่ มีขนาด 25x36x9.5 นิ้ว เลี้ยงหนูจำนวน 2ตัวต่อกรง โดยใช้แผ่นยางกั้นกลาง เนื่องจากในปัสสาวะของหนูจะมีสารจำพวกเกลือมาก เมื่อแห้งจะมีตะกรันเกาะที่ผิวเป็นคราบสกปรก ดังนั้นในการทำความสะอาดต้องฉีดน้ำล้างพื้นกรงและถาดรองทุกวัน เพื่อไม่ให้มีการหมักหมมของตะกรันที่เกิดจากปัสสาวะ
- อาหาร ใช้อาหารสำเร็จรูปผลิตโดยบริษัทเพอร์เฟค คอมพาเนียน เบอร์ 086 โดยสั่งซื้อผ่านสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติมหาลัยมหิดล และเสริมด้วยหญ้าแห้งที่ผ่านการอบนึ่งฆ่าเชื้อ โดยเปลี่ยนอาหารทุกวัน ทิ้งอาหารที่กินเหลือและใส่อาหารใหม่เข้าไป
- น้ำ ให้น้ำที่ผ่านการกรอง 2 ครั้ง และปราศจากเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ให้กินตลอดเวลา และผสมวิตามินซีในอัตราส่วน 400 มิลลิกรัมต่อน้ำ 1 ลิตร หนูตะเภาเป็นสัตว์ที่มีความจำเป็นต้องเสริมวิตามิน ซี เพราะไม่สามารถเปลี่ยนกลูโคสให้เป็นวิตามิน ซี ได้ เนื่องจากขาดเอ็นไซม์ Microsomal L-gluconolactone oxidase โดยขวดน้ำ(รวมทั้งจุกและหลอดน้ำ) เมื่อใช้แล้วล้างให้สะอาดและเข้า Autoclave

รูปที่ 1ก อุปกรณ์ที่ใช้ในการเลี้ยงสัตว์ทดลอง

(ก) เครื่องชั่งน้ำหนักจากศูนย์สัตว์ทดลอง คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(ข) ขวดน้ำและถาดใส่อาหาร 1 ชุดต่อสัตว์ทดลอง 1 ตัว

(ค) อาหารสำเร็จรูปผลิตโดยบริษัทเพอร์เฟค คอมพาเนียน เบอร์ 086

(ง) ฟิวเจอร์บอร์ดสำหรับคั้นกรงแยกสัตว์ทดลอง

(จ) วิตามินซี

3. เทคนิคพื้นฐานในการทำการทดลองในสัตว์ (Basic Techniques in Animal Experimentation)**[50,51]**

Handing & Restraint

แฮนเดิ้ล (Handle) คือการสามารถจับ ยกและเคลื่อนย้ายสัตว์ได้อย่างปลอดภัย ทั้งต่อตัวสัตว์และตัวผู้ปฏิบัติการ

เรสเทรน (Restraint) คือการที่สัตว์ถูกจับและควบคุมอย่างมั่งคงและอยู่นิ่งในท่าเดียว โดยสัตว์ไม่สามารถเคลื่อนไหวส่วนใดก็ตามของร่างกาย ข้อพึงระวังคือต้องไม่ใช้แรงมากเกินไป จนทำให้สัตว์เจ็บหรือได้รับบาดเจ็บ

หนูตะเภามีการแฮนเดิ้ล และเรสเทรน 2 ลักษณะคือ

- การจับแบบรวบตัว

  โดยใช้มือข้างซ้ายสำหรับผู้ถนัดขวา จับรวบตัวส่วนหน้าของหนูตะเภา โดยให้นิ้วหัวแม่มือช้อนใต้คาง และให้ขาหน้าของหนูข้างหนึ่งถูกควบคุมอยู่ระหว่างนิ้วชี้ จากนั้นใช้มืออีกข้างช้อนก้นหนูตะเภาไว้และให้ขาหลังของหนูสอดอยู่ระหว่างร่องของนิ้วหัวแม่มือกับนิ้วชี้และนิ้วกลางกับนิ้วนาง เพื่อป้องกันการดิ้นรนหรือข่วนจนมือผู้ปฏิบัติการบาดเจ็บ (โดยเฉพาะกรณีที่หนูมีขนาดตัวใหญ่มากๆ)

- การจับแบบหนังส่วนหลังคอ

  ทำโดยใช้นิ้วหัวแม่มือ นิ้วชี้ และนิ้วกลางจับรวบหนังบริเวณคอช่วงหลังใบหู แล้วยกตัวหนูขึ้น หรืออาจใช้มือขยุ้มหนังที่หลังตั้งแต่หลังใบหูลงไป ขยุ้มรัดให้หนังหน้าท้องตึงพอสมควร โดยไม่ทำให้หนูอึดอัดมากจนหายใจไม่ได้

ข้อควรระวัง

อย่าบีบรัดรอบตัวสัตว์จนแน่นเกินไป ถ้าหนูตะเภาเกิดการดิ้นรนให้ดึงตัวหนูมาแนบชิดกับลำตัวผู้จับ ถ้าหนูตะเภาตั้งท้องแก่และมีขนาดใหญ่มาก ทำให้การโอบรอบลำบาก ควรใช้มืออีกข้างหนึ่งช้อนบริเวณก้นไว้ และให้ตัวหนูแนบชิดกับลำตัวผู้จับ

การให้สารในสัตว์ทดลอง (หนูตะเภาต่อน้ำหนักตัว 100 กรัม)

- ทางระบบทางเดินอาหาร

  หนูตะเภากินอาหาร 6 กรัมต่อวัน และดื่มน้ำ 10 มิลลิลิตรต่อวัน ด้วยการป้อนทางปาก หรือด้วยการใช้เข็มป้อนสาร เพื่อให้สารเข้าสู่กระเพาะอาหารโดยตรง

- ทางระบบไหลเวียนโลหิต

ด้วยการฉีดสารเข้าเส้นเลือดดำ (IV)	น้อยกว่าหรือเท่ากับ	0.5 มิลลิลิตร
ด้วยการฉีดสารเข้าช่องท้อง (IP)	น้อยกว่าหรือเท่ากับ	10-15 มิลลิลิตร
ด้วยการฉีดสารเข้าใต้ผิวหนัง (SC)	น้อยกว่าหรือเท่ากับ	10 มิลลิลิตร
ด้วยการฉีดสารเข้ากล้ามเนื้อ (IM)	น้อยกว่าหรือเท่ากับ	0.3 มิลลิลิตร

ภาคผนวก ข.
การเตรียมสารเคมี

1. มิลลิดอล(Millidol)

ส่วนประกอบ : ใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย ทรามาดอล ไฮโดรคลอไรด์ 50 มก.

ข้อบ่งใช้ : อาการปวดปานกลางจนถึงขั้นรุนแรง

ขนาดและการบริหารยา : เด็ก : ในเด็กที่อายุตั้งแต่ 1 ปีขึ้นไป สามารถให้มิลลิดอลในขนาด 1-2 มก./น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม (0.1มล. มิลลิดอล = ทรามาดอล ไฮโดรคลอไรด์ 5 มก.)

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ขนาดและการบริหารยา : ทรามาดอลไฮโดรคลอไรด์ 5 มก./น้ำหนักตัวหนู1กิโลกรัม โดยการฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อ (i.m.)

ดังนั้น ทรามาดอล ไฮโดรคลอไรด์ 100 มก. จากมิลลิดอล 1 Amp.ปริมาณ 2 มิลลิลิตร

ทรามาดอล ไฮโดรคลอไรด์ 10 มก. ต้องใช้มิลลิดอลปริมาณ(10x2)/100 = 0.2 มล.

2. ลินโคมัยซิน (Lincomycin) ใช้สำหรับฉีดเข้ากล้ามเนื้อ

ส่วนประกอบ : ใน 1 มิลลิลิตร ประกอบด้วย Lincomycin Hydrochloride equivalent to Lincomycin 300 mg.

ข้อบ่งใช้ : ใช้รักษาอาการอักเสบ เนื่องจากเชื้อแกรมบวกและแกรมลบ

ขนาดและการบริหารยา : เด็กฉีด 10 มก./น้ำหนักตัวเป็นกิโลกรัม/วัน โดยแบ่งให้หลายครั้ง

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ขนาดและการบริหารยา : Lincomycin Hydrochloride 10 มก./น้ำหนักตัวหนู1กิโลกรัม โดยการฉีดยาเข้ากล้ามเนื้อ (i.m.)

ดังนั้น Lincomycin Hydrochloride 300 mg. Lincomycin 1 ml.

Lincomycin Hydrochloride Lincomycin 10 mg. Lincomycin 0.03 ml.

3. อาเนสทาล (Anesthal)

ส่วนประกอบ : ใน 1 ขวด ประกอบด้วย Thiopental sodium B.P. 1 gm.

ข้อบ่งใช้และขนาดวิธีใช้ : ชักนำให้เกิดการสลบและให้ร่วมกับยาสลบอื่นๆ

ในการศึกษาครั้งนี้ใช้ Overdose Thiopental Sodium (200mg/ml)

ดังนั้นถ้าต้องการ Thiopental Sodium 200 mg.ในสารละลาย 1 ml.

ใน 1 ขวด ประกอบด้วย Thiopental sodium 1000 mg.ในสารละลาย1000/200 = 5 ml.

ภาคผนวก ค.
เทคนิคการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Paraffin Technique) การย้อมสีชิ้นเนื้อเยื่อและเทคนิคการย้อม

ในงานวิจัยนี้ได้ทำการพิสูจน์ชิ้นเนื้อที่ได้โดยการวิเคราะห์ทางด้านพยาธิวิทยา(Pathology) โดยการย้อมเนื้อเยื่อบริเวณแผลทดสอบ (Pore Skin®) โดยใช้ขั้นตอนการเตรียมเนื้อเยื่อเพื่อศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ธรรมดา (Paraffin technique) ดังนี้

1) เนื้อเยื่อที่นำมาศึกษา (obtaining tissues) ตัวอย่างเนื้อเยื่ออาจตัดมาจากสัตว์ที่ทำให้สลบหรือสัตว์ที่เพิ่งตายใหม่ๆ โดยรีบนำมาแช่ในน้ำยาคงสภาพ (fixative) ให้เร็วที่สุด เพื่อป้องกันการย่อยตัวเอง (autolysis) ของเซลล์ซึ่งจะเกิดขึ้นภายหลังที่เนื้อเยื่อนั้นขาดเลือดมาเลี้ยง
2) การคงสภาพ (fixation) เป็นขั้นตอนที่สำคัญที่สุดและต้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุดและต้องปฏิบัติการโดยเร็วที่สุด เพื่อคงสภาพเนื้อเยื่อให้เหมือนกับในขณะที่อยู่ในร่างกายมากที่สุด เพื่อหยุดการสลายตัวของเซลล์และเนื้อเยื่อที่เกิดจากเอนไซม์ในเนื้อเยื่อเอง น้ำยาคงสภาพที่ใช้ในการวิจัยนี้คือ 10% neutral buffered formalin แช่เป็นเวลา 24-48 ชั่วโมง
3) การล้าง (washing) เป็นขั้นตอนการล้างเอาน้ำยาคงสภาพออกจากเนื้อเยื่อหลังจากที่แช่น้ำยาคงสภาพเป็นเวลาพอสมควรแล้วโดยอาศัยตัวทำละลาย (solvent) ของน้ำยาคงสภาพเป็นตัวล้าง เช่น 10% neutral buffered formalin ซึ่งมีน้ำเป็นตัวทำละลายจะล้างด้วยน้ำ
4) การขจัดน้ำออก (dehydration) เป็นขั้นตอนการขจัดน้ำาออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้เอทิลแอลกอฮอล์เปอร์เซ็นต์ต่างๆ เริ่มจากความเข้มข้นต่ำไปหาความเข้มข้นสูง เพื่อเข้าไปแทนที่น้ำในเซลล์ โดยปกติเริ่มจาก 70%, 80%, 95% และ 100% แอลกอฮอล์
5) การทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) เป็นขั้นตอนการนำเนื้อเยื่อที่ปราศจากน้ำไปแช่ในสารละลายอินทรีย์ที่เข้ากับสารขจัดเอาน้ำออก (dehydrating agent) และสารฝังตัวอย่าง (embedding agent) ได้ เช่น ไซลีน (xylene) ทอลลูอีน (toluene) คลอโรฟอร์ม (chloroform) และ เบนซีน (benzene) สารละลายเหล่านี้เรียกว่า สารทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing agent)
6) การซึมแทรก (infiltration) เป็นการทำให้สารฝังตัวอย่าง เช่น พาราฟิน ที่มีจุดหลอมเหลว 56-60 องศาเซลเซียส สามารถซึมแทรกเข้าไปในเนื้อเยื่อก่อนที่จะนำเนื้อเยื่อนั้นไปฝังในสารฝังตัวอย่าง

7) การฝังตัวอย่าง (embedding) เป็นขั้นตอนการนำเนื้อเยื่อไปฝังในพาราฟิน ซึ่งเป็นสารที่สามารถทำให้อยู่ได้ทั้งสภาพเหลวและแข็ง ขณะที่หลอมเหลวมีคุณสมบัติซึมแทรกได้ดี และเมื่อทิ้งไว้ให้เย็นจะแข็งตัวนำไปตัดได้
8) การตัด (sectioning) พาราฟินบล็อคที่มีเนื้อเยื่อฝังต้องนำมาตกแต่งหน้าบล็อค (trimming) ก่อนจึงนำไปตัดด้วยเครื่องไมโครโตม (microtome) ที่มีใบมีดเป็นเหล็กแต่ปัจจุบันมีใบมีดที่ใช้แล้วทิ้ง (disposable blade) และ ตัวมีดจับ (knife holder) ซึ่งทำให้สะดวกขึ้นความหนาของ section คือ 5 ไมโครเมตร (micrometers)
9) การติด sections (attaching) นำ sections ที่ได้มาติดกับสไลด์กระจกที่ฉาบด้วยไข่ขาว (egg albumin) โดยนำ sections ไปลอยในอ่างลอยเนื้อเยื่อ (tissue floating bath) ที่มีอุณหภูมิประมาณ 45 องศาเซลเซียส แล้วติดบนสไลด์กระจกจากนั้นวางบนเครื่องอุ่นสไลด์ (slide warming plate) ที่มีอุณหภูมิ 40-45 องศาเซลเซียสประมาณหนึ่งชั่วโมงหรือจนสไลด์แห้ง

ขั้นตอนต่อไปใช้เทคนิคการย้อม(Staining) 2 ประเภทคือ ฮีมาทอกซิลิน และ อีโอซิน (Hematoxylin and Eosin) หรือ ย่อว่าสี H&E และ Masson's Trichrome (MT) ซึ่งแต่ละเทคนิคที่ใช้มีคุณสมบัติแตกต่างกันดังนี้

Hematoxylin and Eosin (H&E) – เป็นเทคนิคที่ใช้กันอย่างแพร่หลายทางด้านพยาธิวิทยา ซึ่งเป็นการย้อมสีเซลล์และเนื้อเยื่อขั้นพื้นฐาน โดยใช้สีพวกด่าง (basic dye) ที่มีคุณสมบัติจับองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เป็นกรด เช่น นิวเคลียส ผลทำให้ติดสีน้ำเงินม่วง เรียกเซลล์หรือส่วนประกอบที่ติดสีพวกด่างว่า basophilic ส่วนสีอีโอซินเป็นสีพวกกรด (acid dye) มีคุณสมบัติจับองค์ประกอบภายในเซลล์ที่เป็นด่าง เช่นบางส่วนของไซโทพลาสซึม ผลทำให้ติดสีชมพู เรียกเซลล์หรือองค์ประกอบที่ติดสีพวกกรดว่า acidophilic

เทคนิคการย้อมสีเนื้อเยื่อ

Hematoxylin and Eosin

<u>สารเคมีที่ใช้</u>

1. Mayer's Hematoxylin Solution
2. Eosin Stock Solution

Eosin y Water	1.0 กรัม
น้ำกลั่น	100 มิลลิกรัม

3. Phloxine Stock Solution

Phloxine B	1.0 กรัม

น้ำกลั่น	100 มิลลิกรัม

4. Eosin-Phloxine working solution

Eosin Stock Solution	100 มิลลิกรัม
Phloxine Stock Solution	10 มิลลิกรัม
95% Ethanol	780 มิลลิกรัม
Glacial Acetic Acid	4 มิลลิกรัม

วิธีการย้อม

1. ต้องละลายพาราฟินที่อยู่บน sections ออกด้วย การแช่ในไซลีน (Xylene) นาน 10 นาที 3 ครั้ง และล้างไซลีน โดยการแช่ใน 95% เอทานอลนาน 1 นาที
2. ล้างในน้ำประปา โดยแช่ในน้ำไหลผ่าน นาน 2 นาที
3. แช่ในสาร Mayer's Hematoxylin นาน 10 นาที
4. จุ่มในสารละลาย Lithium Carbonate
5. ล้างในน้ำประปา โดยแช่ในน้ำไหลผ่าน นาน 5 นาที
6. จุ่มในสารละลาย 95% เอทานอล 3 ครั้ง
7. แช่ใน Eosin-Phloxine working solution นาน 5 นาที
8. จุ่มในสารละลาย 95% เอทานอล16 ครั้ง
9. จุ่มใน Absolute Ethanol 2 ครั้ง
10. จุ่มในไซลีน 2 ครั้งเพื่อทำให้ sections ใส
11. นำมาหยด Permount หรือ Canada balsam ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (coverslip) แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

ผลที่ได้จากการย้อมโดยใช้เทคนิค Hematoxylin and Eosin

- ติดสีน้ำเงินที่นิวเคลียสของเซลล์
- ติดสีแดงที่ไซไทพลาสซึมของเซลล์

Masson's Trichrome (MT) – เป็นเทคนิคที่ใช้เพื่อตรวจสอบเส้นใยคอลลาเจนในเนื้อเยื่อ เช่น ผิวหนัง หัวใจ เป็นต้น ภายหลังทำการย้อมเส้นใยคอลลาเจนของเนื้อเยื่อจะให้ผลสีฟ้าและนิวเคลียสของเซลล์จะให้ผลสีดำ ส่วนบริเวณไซโทพลาสซึมจะให้ผลเป็นสีแดง

เทคนิคการย้อมสีเนื้อเยื่อ

Masson's Trichrome

สารเคมีที่ใช้

1. Mayer's Hematoxylin Solution
2. Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution

1% Biebrich Scarlet	90 มิลลิลิตร
1% Acid Fuchsin	10 มิลลิลิตร
Glacial Acetic Acid	1 มิลลิลิตร

3. Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Solution

5% Phosphomolybdic acid	25 มิลลิลิตร
5% Phosphotungstic acid	25 มิลลิลิตร

4. Aniline Blue Solution

Aniline blue	2.5 กรัม
Glacial Acetic Acid	2 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	100 มิลลิลิตร

5. Acetic Acid Solution

Glacial Acetic Acid	1 มิลลิลิตร
น้ำกลั่น	99 มิลลิลิตร

วิธีการย้อม

1. ต้องละลายพาราฟินที่อยู่บน sections ออกด้วย การแช่ในไซลีน (Xylene) นาน 10 นาที 3 ครั้ง และล้างไซลีน โดยการแช่ใน 95% เอทานอลนาน 1 นาที
2. ล้างในน้ำกลั่น โดยแช่ในน้ำไหลผ่าน นาน 2 นาที
3. แช่ในสาร Mayer's Hematoxylin นาน 10 นาที
4. ล้างในน้ำกลั่น โดยแช่ในน้ำไหลผ่าน นาน 10 นาที
6. แช่ใน Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution* นาน 15 นาที

   หมายเหตุ Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution* สามารถเก็บไว้ใช้ครั้งต่อไปได้
5. ล้างในน้ำกลั่น โดยแช่ในน้ำไหลผ่าน
6. แช่ใน Phosphomolybdic-Phosphotungstic Acid Solution นาน 15 นาทีหรือจนกว่าคอลลาเจนจะไม่ติดสีแดง
7. แช่ใน Aniline Blue Solution นาน 5 ถึง 10 นาที ล้างในน้ำประปา โดยแช่ในน้ำไหลผ่านสักครู่หนึ่ง

7. แช่ใน Acetic Acid Solution นาน 2 ถึง 5 นาที จากนั้นล้างในน้ำกลั่น
8. จุ่มในสารละลาย 95% เอทานอล16 ครั้งและจุ่มใน Absolute Ethanol 2 ครั้ง โดยขั้นตอนนี้ทำเพื่อล้าง Biebrich Scarlet-Acid Fuchsin Solution ส่วนเกินออกไป
8. จุ่มในไซลีน 2 ครั้งเพื่อทำให้ sections ใส
9. นำมาหยด Permount หรือ Canada balsam ปิดด้วยกระจกปิดสไลด์ (coverslip) แล้วนำไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์

<u>ผลที่ได้จากการย้อมโดยใช้เทคนิค Masson's Trichrome</u>

- ติดสีน้ำเงินที่คอลลาเจนของเซลล์
- ติดสีดำที่นิวเคลียสของเซลล์
- ติดสีแดงที่ไซโตพลาสซึม เคราตินและกล้ามเนื้อของเซลล์

ภาคผนวก ง.
การศึกษากลไกการออกฤทธิ์ของ Pore Skin® ในหนูวิสต้า (The Study of Mechanism of Pore Skin® in Animal Implant Model)

จุดประสงค์ในการทดสอบ เพื่อศึกษากลไกการสร้างเนื้อเยื่อของผลิตภัณฑ์ Pore Skin®

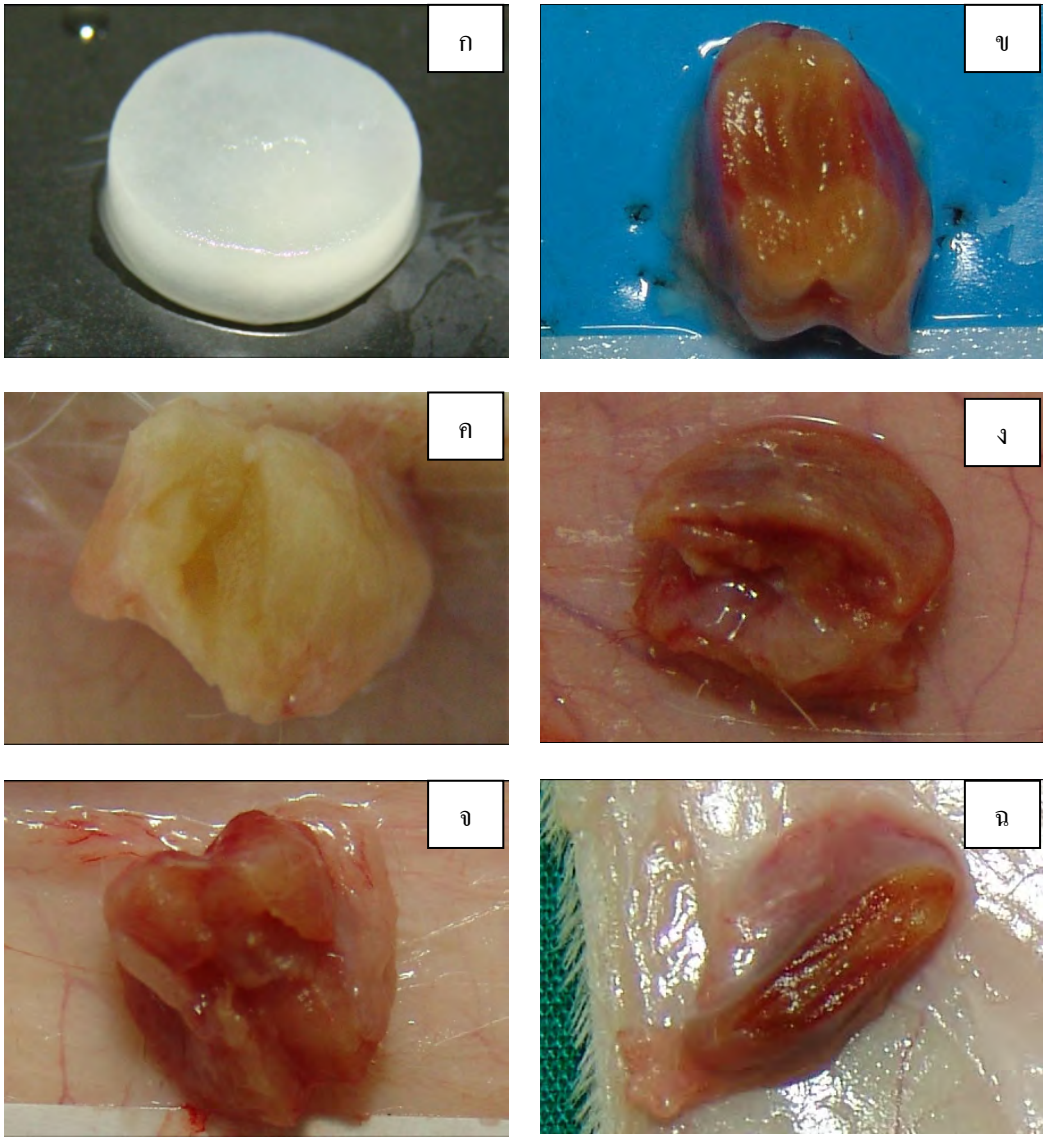
จำนวนสัตว์ทดลองต่อกลุ่มวิจัย หนูวิสต้า (Wistar rat) จำนวน 3 ตัวต่อกลุ่ม โดยแบ่งกลุ่มการวิจัยเป็น 5 กลุ่ม คือ กลุ่มที่ระยะเวลา 1, 2, 3, 4 และ 12 สัปดาห์

วิธีทดสอบ ทำการตัดฝังชิ้นงาน Pore Skin® เส้นผ่าศูนย์กลาง 1 เซนติเมตร ความหนา 3 มิลลิเมตร (ดังรูปที่ 1ง-ก) ลงในชั้นใต้ผิวหนัง (Subcutaneous) ของหนูวิสต้า เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 200-300 กรัม ก่อนทำการผ่าตัดฉีดยาสลบหนูและโกนขนบริเวณกลางหลัง นำชิ้นงานสอดเข้าไปภายใต้ชั้นผิวหนังและเย็บปิดแผลให้เรียบร้อย โดยดูผลในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4 และ 12 สัปดาห์ เมื่อถึงระยะเวลาที่กำหนดจึงเก็บตัวอย่างเพื่อวิเคราะห์ทางพยาธิวิทยา (Pathology) โดยย้อมด้วย Hemetoxylin & eosin (H&E) และ Masson Trichrome (MT)

ผลการทดสอบ

ลักษณะภายนอกทั่วไป

พบว่า สัปดาห์ที่ 1	ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีสีเหลืองเข้มที่ขอบมีสีแดง เนื่องจากซับเลือดเข้ามา (ดังรูปที่1ง-ข)
สัปดาห์ที่ 2	ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีสีขาวซีด ไม่พบการเกิดหนองในชิ้นงาน และไม่พบลักษณะการเกิดเนื้อเยื่อ (ดังรูปที่1ง-ค)
สัปดาห์ที่ 3-4	ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® เปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อสีแดงสด พร้อมกับการสร้างหลอดเลือดเข้ามาเลี้ยงภายใน (ดังรูปที่1ง-ง)
สัปดาห์ที่ 12	ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีลักษณะเหมือนเนื้อเยื่อ และมีความหนาลดลง (ดังรูปที่1ง-จ)



รูปที่ 1ง ผลลักษณะภายนอกทั่วไปผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ที่ระยะเวลา 0, 1, 2, 3, 4 และ 12 สัปดาห์ ตามลำดับ

ก) แสดงลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ก่อนการฝังใต้ชั้นผิวหนัง

ข) แสดงลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนังใน สัปดาห์ที่ 1

ค) แสดงลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนังใน สัปดาห์ที่ 2

ง) แสดงลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนังใน สัปดาห์ที่ 3

จ) แสดงลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนังใน สัปดาห์ที่ 4

ฉ) แสดงลักษณะภายนอกของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนังใน สัปดาห์ที่ 12

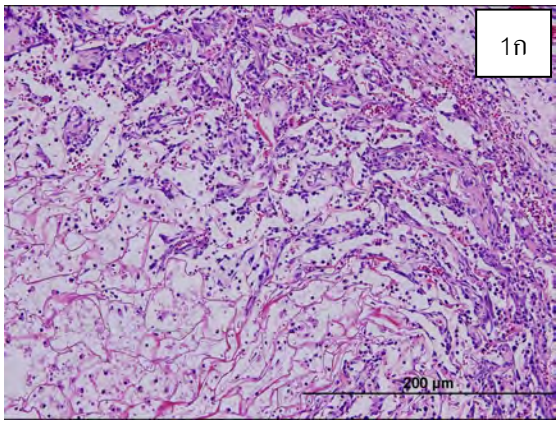
ลักษณะทางพยาธิวิทยา

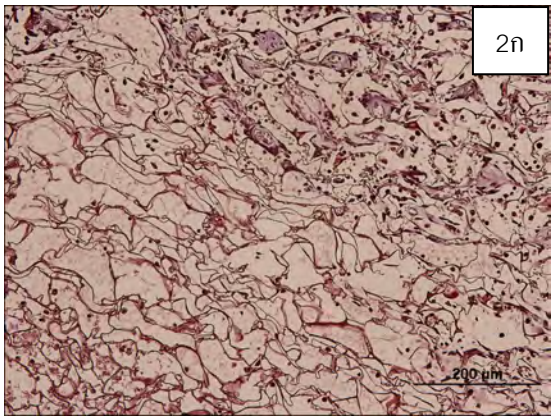
พบว่าสัปดาห์ที่ 1 ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีเซลล์เม็ดเลือดขาวเคลื่อนตังเข้ามาจากขอบชิ้นงานอย่างชัดเจน เนื่องมาจากปฏิกิริยาอักเสบเฉียบพลัน

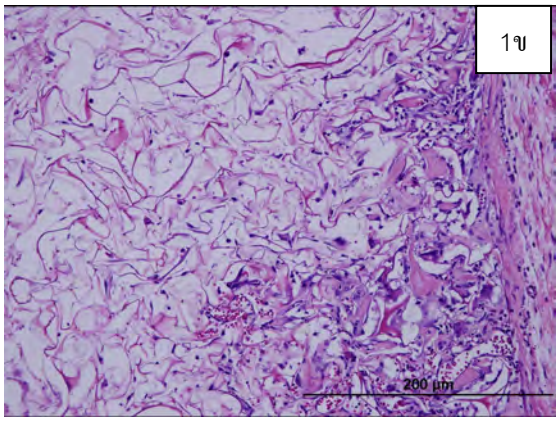
สัปดาห์ที่ 2 ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® ปฏิกิริยาอักเสบเฉียบพลันลดลง เซลล์เม็ดเลือดขาว ไม่มีลักษณะของหนองให้เห็น เริ่มมีการสร้างเนื้อเยื่อที่บริเวณขอบ

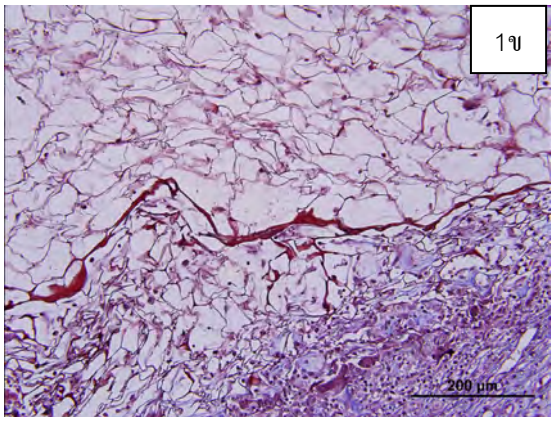
สัปดาห์ที่ 3-4 ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีการสร้างเนื้อเยื่อภายในช่องว่างของรูพรุน และพบการงอกเข้ามาของหลอดเลือดใหม่ภายในรูพรุน

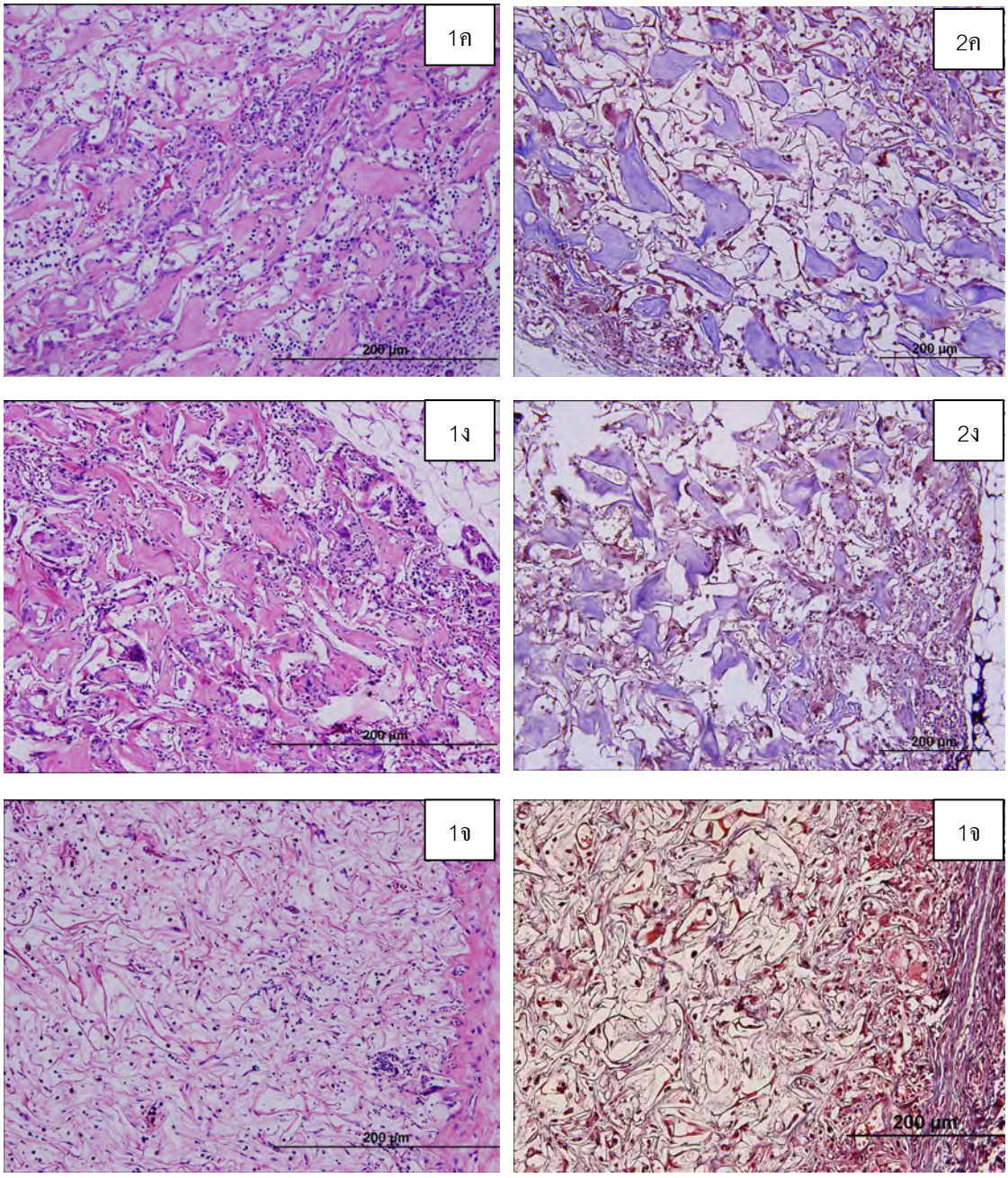
สัปดาห์ที่ 12 ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® มีลักษณะการสร้างเนื้อเยื่อภายในช่องว่างของรูพรุนมากกว่าในสัปดาห์ที่ 3-4 นอกจากนี้ Pore Skin® บางส่วนถูกย่อยสลายไป











รูปที่ 2ง แสดงลักษณะทางพยาธิวิทยา (Pathology) ในสัปดาห์ที่ 1, 2, 3, 4และ 12 ที่กำลังขยาย x200

1ก และ2ก แสดงลักษณะพยาธิสภาพโดยการย้อมด้วย Hemetoxylin & eosin (H&E) และ Masson's Trichrome (MT) ของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนัง 1 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งพบเซลล์อักเสบเฉียบพลันเข้ามาในส่วนของ Pore Skin®

1ข และ2ข แสดงลักษณะพยาธิสภาพโดยการย้อมด้วย Hemetoxylin & eosin (H&E) และ Masson's Trichrome (MT) ของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนัง 2 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งพบเซลล์อักเสบลดลงและเริ่มมีการสร้างคอลลาเจนใหม่(NC) ภายในโครงสร้าง Pore Skin®

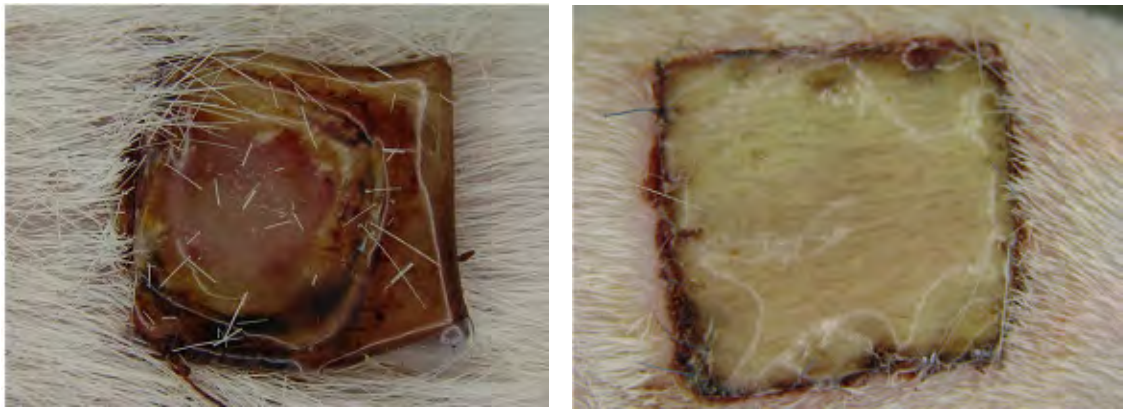
1ค และ2ค Masson's Trichrome (MT) ของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนัง 3 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งพบมีการสร้างคอลลาเจนใหม่(NC) ร่วมกับเซลล์อักเสบเรื้อรัง lymphocytes, macrophages และ foreign type multinucleated giant cells แทรกอยู่ระหว่างรูพรุนของผลิตภัณฑ์ Pore Skin®	แสดงลักษณะพยาธิสภาพโดยการย้อมด้วย Hemetoxylin & eosin (H&E) และ
1ง และ2ง	แสดงลักษณะพยาธิสภาพโดยการย้อมด้วย Hemetoxylin & eosin (H&E) และ Masson's Trichrome (MT) ของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนัง 4 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งพบการสร้างคอลลาเจนใหม่(NC) ภายในโครงสร้าง Pore Skin® และพบเซลล์อักเสบลดลง
1จ และ2จ	แสดงลักษณะพยาธิสภาพโดยการย้อมด้วย Hemetoxylin & eosin (H&E) และ Masson's Trichrome (MT) ของผลิตภัณฑ์ Pore Skin® ภายหลังจากฝังใต้ชั้นผิวหนัง 12 สัปดาห์ ตามลำดับ ซึ่งพบเซลล์อักเสบเล็กน้อย เพื่อเข้ามากินซากของชิ้นงานที่ยังเหลืออยู่

สรุปผลการทดลอง

ผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® สามารถเปลี่ยนเป็นเนื้อเยื่อที่มีชีวิตได้ที่สัปดาห์ที่ 3 โดยมีการสร้างเนื้อเยื่อคอลลาเจนในรูพรุนแบบอิสระ ซึ่งมีสีชมพูอ่อนจากการย้อม Hemetoxylin & eosin (H&E) และมีสีน้ำเงินจากการย้อม Masson's Trichrome (MT) เนื้อเยื่อที่เกิดขึ้นใหม่จากผิวหนังสังเคราะห์ Pore Skin® สามารถคงสภาพอยู่ได้แม้ที่ระยะเวลา 12 สัปดาห์

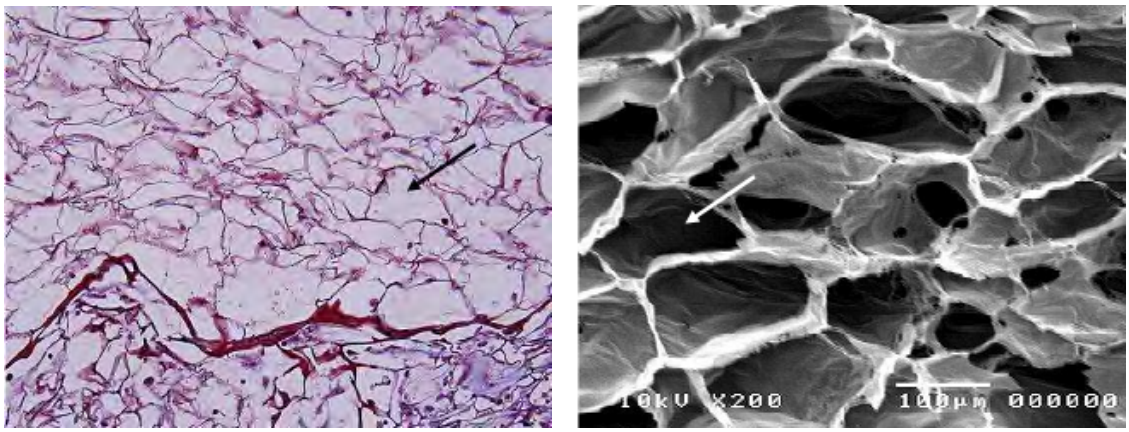
ผลการศึกษา Pore Skin® เพิ่มเติม ในหนูตะเภา

1. การเปรียบเทียบลักษณะภายนอกระหว่างการประสบความสำเร็จในการเชื่อมติดกับแผลและกลายเป็นเนื้อเยื่อใหม่กับความล้มเหลวที่กลายเป็นหนอง ภายหลังการปิดแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์



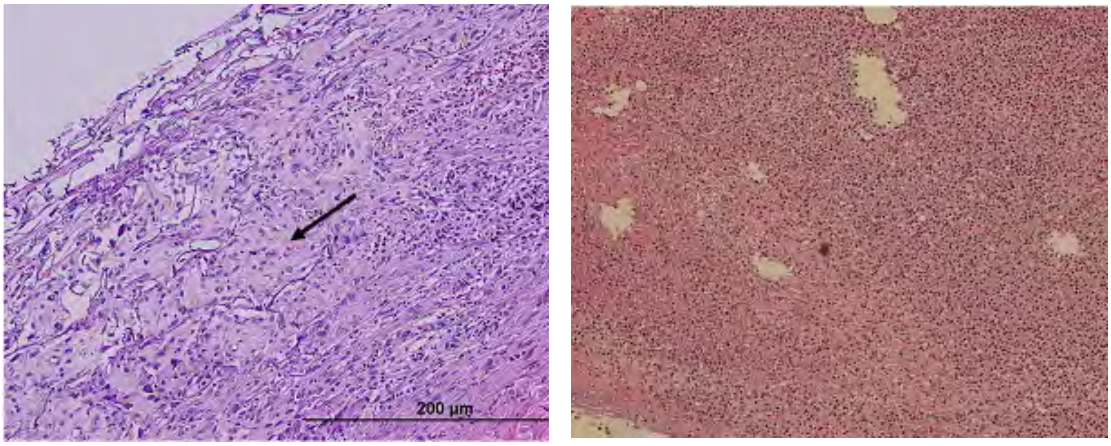
รูปที่ 3ง แสดงลักษณะลักษณะภายนอกระหว่างการประสบความสำเร็จในการเชื่อมติดกับแผล (ซ้าย) และกลายเป็นเนื้อเยื่อใหม่กับความล้มเหลวที่กลายเป็นหนอง ภายหลังการปิดแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์ (ขวา)

2. ลักษณะรูพรุนของ Pore Skin® ที่ยังไม่เกิดการสร้างเนื้อเยื่อ



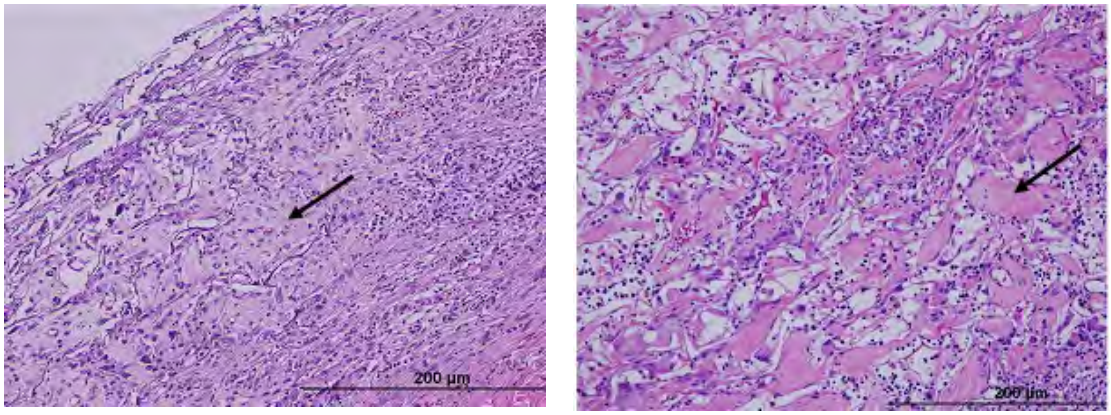
รูปที่ 4ง แสดงลักษณะรูพรุนของ Pore Skin® ที่ยังไม่เกิดการสร้างเนื้อเยื่อจากการย้อม H&E (ซ้าย) และการถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์อิเลคตรอนแบบส่องกราด (ขวา)

3. การเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่สำเร็จกับการสร้างเนื้อเยื่อที่ล้มเหลวภายหลังการปิดแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์



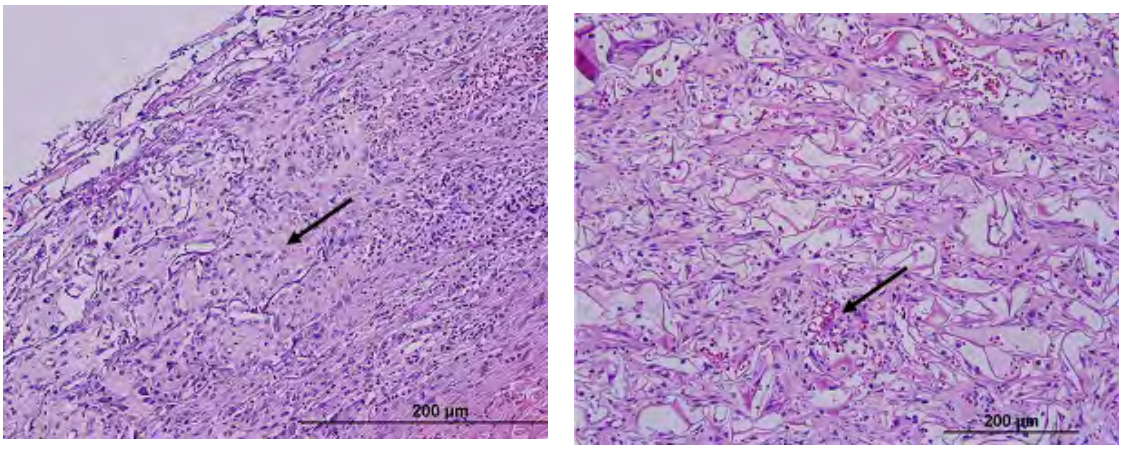
รูปที่ 5ง แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่สำเร็จ(ซ้าย)กับการสร้างเนื้อเยื่อที่ล้มเหลวภายหลังการปิดแผลด้วยผิวหนังสังเคราะห์(ขวา)

4. การเปรียบเทียบการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ระหว่างการทดสอบแบบการรักษาแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ด้วย Pore Skin® กับการฝัง Pore Skin® ใต้ชั้นผิวหนังที่สัปดาห์ที่ 3 ที่ให้ผลคล้ายกัน



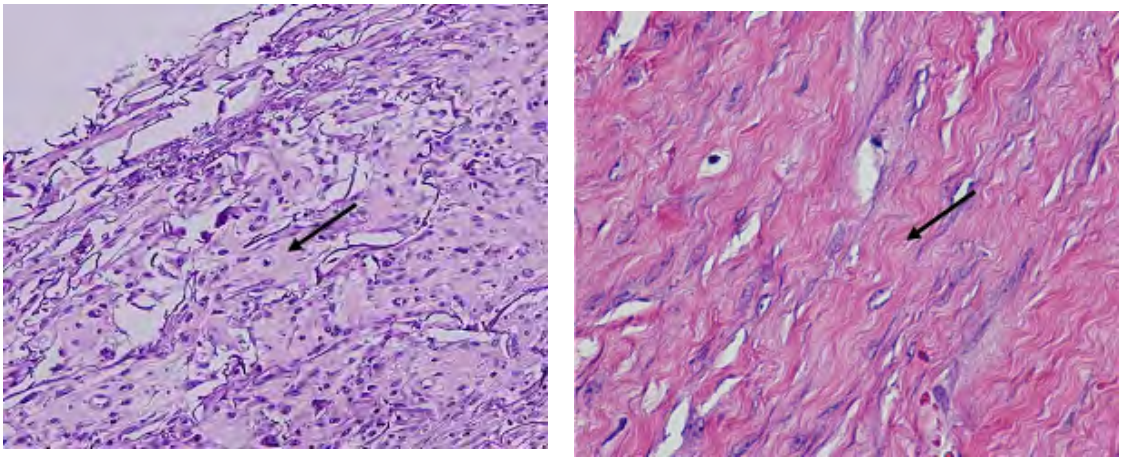
รูปที่ 6ง แสดงการเปรียบเทียบการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® ระหว่างการทดสอบแบบการรักษาแผลที่มีความลึกถึงชั้นหนังแท้ด้วย Pore Skin® (ซ้าย)กับการฝัง Pore Skin® ใต้ชั้นผิวหนัง(ขวา)ที่สัปดาห์ที่ 3 ที่ให้ผลคล้ายกัน

5. การเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® กับ Integra® ที่บริเวณแผลที่สัปดาห์ที่ 3 ที่มีลักษณะคล้ายกัน



รูปที่ 7ง แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนของ Pore Skin® (ซ้าย) กับ Integra® ที่บริเวณแผล(ขวา) ในสัปดาห์ที่ 3 ที่มีลักษณะคล้ายกัน

6. การเปรียบเทียบระหว่างเนื้อเยื่อคอลลาเจนที่เกิดภายในรูพรุนแบบอิสระกับเนื้อเยื่อคอลลาเจนแบบขนานที่พบในแผลเป็น (Scar)



รูปที่ 8ง แสดงการเปรียบเทียบระหว่างการสร้างคอลลาเจนใหม่ภายในรูพรุนแบบอิสระ (ซ้าย) กับเนื้อเยื่อคอลลาเจนแบบขนานที่พบในแผลเป็น (Scar)

ภาคผนวก จ.
สำเนาใบรับรองการอนุมัติให้ดำเนินการเลี้ยงและใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ ณ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

(หน้า 141)

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาว นฎา สุระประสิทธิ์ เกิดเมื่อวันที่ 27 มีนาคม พ.ศ. 2528 ที่จังหวัดกรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับชั้นมัธยมศึกษาที่โรงเรียนเซนต์โยเซฟ บางนา ในปีการศึกษา 2549 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรี วิทยาศาสตรบัณฑิต สาขาชีวเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และเมื่อปีการศึกษา 2550 เข้าศึกษาต่อในหลักสูตรหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต สาขาวิชาวิทยาศาสตร์การแพทย์ คณะแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ถูกนำเสนอในการประชุมผลงานทางวิชาการระดับชาติ การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16 ในวันที่ 25-27 มีนาคม 2552 ณ อาคารเรียนและปฏิบัติการ คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ ศูนย์รังสิต จ.ปทุมธานี

ส่วนหนึ่งของงานวิจัยนี้ถูกนำเสนอในการประชุมผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติ The 4th World Congress on Regenerative Medicine 2009 ในวันที่ 12-14 มีนาคม 2552 ณ Bangkok Convention Center Central World, Thailand

ผลงานที่นำเสนอ

N. Suraprasit, V.Tanakit, Apichai Angspatt (M.D.), Pornprom Muangman (M.D.), and T. Bunaprasert (M.D.). “Efficacy study of Pore Skin® Artificial dermis full thickness skin defect model in the rodent.”The 4th World Congress on Regenerative Medicine 2009

ผลงานที่นำเสนอ

N. Suraprasit, V.Tanakit, and T. Bunaprasert (M.D.). “Efficacy study of Pore Skin® Artificial dermis in animal wound model according to US-FDA guidance. การประชุมวิชาการพันธุศาสตร์แห่งชาติ ครั้งที่ 16