

ผลของสารสกัดบัวบกต่อการสมานแผลในหนูขาว



นางสาว มัทนา กานต์ไกรศรี

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต

สาขาวิชาเภสัชวิทยา (สหสาขาวิชา)

บัณฑิตวิทยาลัย จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2548

ISBN 974-17-4438-2

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

EFFECTS OF *CENTELLA ASIATICA* EXTRACTS ON WOUND HEALING IN RATS

Miss Mattana Kankaisre

A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Pharmacology (Inter-Department)

Graduate School

Chulalongkorn University

Academic Year 2005

ISBN 974-17-4438-2

Thesis Title **EFFECTS OF *CENTELLA ASIATICA* EXTRACTS ON WOUND
HEALING IN RATS**

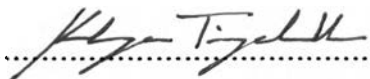
By **Miss Mattana Kankaisre**

Field of study **Pharmacology**


Thesis Advisor **Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.**

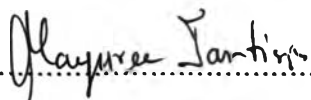
Thesis Co-advisor **Associate Professor Boonyong Tantisira, Ph.D.**
Associate Professor Juraiporn Somboonwong, M.D., M.Sc.

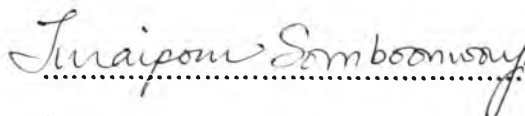
Accepted by the Graduate School, Chulalongkorn University in Partial
Fullfillment of the Requirements for the Master's Degree

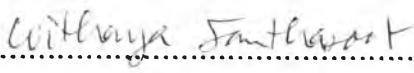
 Dean of the Graduate School
(Assistant Professor M.R. Kalaya Tingsabdh, Ph.D.)


THESIS COMMITTEE

 Chairman
(Associate Professor Supatra Srichairat, Ph.D.)

 Thesis Advisor
(Associate Professor Mayuree Tantisira, Ph.D.)

 Thesis Co-advisor
(Associate Professor Juraiporn Somboonwong, M.D., M.Sc.,
Dip in Dermatology)

 Member
(Assistant Professor Withaya Janthasoot, M.Sc.)

 Member
(Assistant Professor Kanokwan Tilokskulchai, Ph.D.)

มัทนา กานต์ไกรศรี : ผลของสารสกัดบัวบกต่อการสมานแผลในหนูขาว (EFFECTS OF *CENTELLA ASIATICA* EXTRACTS ON WOUND HEALING IN RATS) อ. ที่ปรึกษา:
 รศ. ดร. มยุรี ดันติสิระ, อ.ที่ปรึกษาร่วม รศ. ดร. บุญยงค์ ดันติสิระ, รศ. พญ. จุไรพร สมบุญวงศ์;
 74 หน้า. ISBN 974-17-4438-2.

เพื่อศึกษาผลของสารสกัดจากบัวบกต่อการสมานแผลในบาดแผลที่เกิดจากการกรีดและบาดแผลไหม้ในหนูขาวเพศผู้ จำนวน 112 ตัว น้ำหนัก 250-300 กรัม โดยแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่เท่า ๆ กัน สำหรับการทดลองในแผลที่เกิดจากการกรีดและแผลไหม้ สัตว์ทดลองแต่ละกลุ่มถูกแบ่งออกเป็น 7 กลุ่มย่อยเท่า ๆ กัน คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับการรักษา กลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารละลายน้ำเกลือ กลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารละลายทวิน 20 (กลุ่มควบคุม) กลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารสกัดเฮกเซน กลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารสกัดเอทิลอะซิเตต กลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารสกัดเมทานอล และกลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารสกัดน้ำ โดยใช้สารสกัดจากบัวบกความเข้มข้น 10 เปอร์เซ็นต์และทาแผลด้วยสารต่าง ๆ วันละครั้ง เป็นเวลา 7 และ 14 วันสำหรับแผลที่เกิดจากการกรีดและแผลไหม้ตามลำดับ กลุ่มบาดแผลที่เกิดจากการกรีดทำการวัดแรงดึงสูงสุดที่ทำให้แผลแยกออกจากกันในวันที่ 7 ส่วนกลุ่มบาดแผลไหม้สังเกตลักษณะภายนอกของแผลและคำนวณระดับการหายของแผลในวันที่ 3, 7, 10 และ 14 และศึกษาการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาโดยการย้อมด้วยฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (เอชแอนอี) ในวันที่ 14

ผลการทดลองในกลุ่มบาดแผลที่เกิดจากการกรีดพบว่าค่าแรงดึงสูงสุดที่ทำให้แผลแยกออกจากกันในกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารสกัดบัวบกเพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ไม่มีความแตกต่างกันเมื่อเปรียบเทียบกับระหว่างกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารสกัดบัวบกและกลุ่มที่ได้รับการรักษาด้วยสารละลายน้ำเกลือ ส่วนการทดลองในกลุ่มบาดแผลไหม้พบว่าระดับการหายของบาดแผลไหม้ในสัตว์ทดลองกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารสกัดเอทิลอะซิเตตมีค่าสูงกว่ากลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารละลายทวิน 20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติตั้งแต่วันที่ 3 ตลอดจนถึงสิ้นสุดการทดลอง ขณะที่ระดับการหายของแผลในกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารสกัดเฮกเซนมีค่าสูงกว่ากลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารละลายทวิน 20 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 10 และ 14 ระดับการหายของแผลในกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารสกัดเมทานอลและสารสกัดน้ำมีค่าสูงกว่ากลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารละลายทวิน 20 ในวันที่ 14 จากการสังเกตลักษณะแผลและการเปลี่ยนแปลงทางจุลพยาธิวิทยาพบว่าผลคล้ายคลึงกัน ลักษณะของแผลในกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารสกัดบัวบกมีลักษณะดีกว่าในกลุ่มซึ่งได้รับการรักษาด้วยสารละลายทวิน 20

เมื่อพิจารณาประกอบกับผลของการทำรงคเลขแผ่นบางที่พบว่าสารสำคัญในสารสกัดเฮกเซน เอทิลอะซิเตต และเมทานอล น่าจะเป็นเบนซาซิลิโตนีโตรล เอเซียติกแอซิด และเอเซียติกโคไซด์ ตามลำดับ ก็อาจกล่าวได้ว่าสารสกัดทุกชนิดของบัวบกสามารถเร่งกระบวนการหายของแผลทั้งแผลที่เกิดจากการกรีดและแผลไหม้ โดยที่สารสำคัญที่มีการออกฤทธิ์สมานแผลได้ดีที่สุดน่าจะเป็นเอเซียติกแอซิด ซึ่งพบในสารสกัดเอทิลอะซิเตต

สาขาวิชา เกษษวิทยา (สหสาขาวิชา)

ปีการศึกษา 2548

ลายมือชื่อนิสิต..... มัทนา กานต์ไกรศรี

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา..... รศ. ดร. มยุรี ดันติสิระ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ. ดร. บุญยงค์ ดันติสิระ

ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม..... รศ. พญ. จุไรพร สมบุญวงศ์

4589126820 : MAJOR PHARMACOLOGY

KEY WORD: *CENTELLA ASIATICA*/ WOUND HEALING/ INCISION WOUND/ BURN WOUND

MATTANA KANKAISRE : EFFECTS OF *CENTELLA ASIATICA* EXTRACTS ON

WOUND HEALING IN RATS. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. MAYUREE

TANTISIRA, Ph.D., THESIS CO-ADVISORS: ASSOC. PROF. BOONYONG

TANTISIRA, Ph.D., ASSOC. PROF. JURAIORN SOMBOONWONG, M.D., M.Sc., 74

pp. ISBN 974-17-4438 -2.

The purpose of this study was to investigate the effects of the extract from *Centella asiatica* Linn. Urban on wound healing in incision and burn wound models in rats.

A total of 112 male Sprague Dawley rats weighing 250-300 g were divided randomly into two groups for the study of incision and burn wound. The animals in each group were equally subdivided into seven groups as follows: untreated, NSS-, Tween 20 (TW)- (vehicle control group), hexane extract (HE)-, ethyl acetate extract (EE)-, methanol extract (ME)-, and water extract (WE)-treated groups. NSS, Tween 20 and the extract (10% w/v) were applied topically once a day for seven and fourteen days in incision and burn wound, respectively. On day 7 post wounding, the tensile strength was tested in incision wound. In burn wound, the wound appearance was observed and the degree of wound healing was calculated on day 3, 7, 10 and 14 post burning. Histopathological evaluation was performed on day 14 post burning using Hematoxylin-Eosin technique (H&E).

The experimental results revealed that the tensile strength of the incision wound in all animal groups treated with any types of the extract was significantly increased in comparison to those in TW. However, none of them was significantly different from those of NSS-treated group. In burn wound, degree of wound healing in EE was significantly higher than those in TW since day 3 post burning, while significant difference of HE was evident in day 10 post burning. Healing observed in ME and WE were significantly higher than those in TW on day 14 post burning. Similar results were observed in wound lesion and histopathological study. The wound appearance in the extract-treated groups looked better than those in control.

Analysis by TLC indicated that the active ingredients in HE, EE and ME were β -sitosterol, asiatic acid and asiaticoside, respectively. Thus it can be concluded that all types of CA extract could facilitate wound healing process in both the incision and burn wounds. Asiatic acid which was found in EE seemed to be the most active component for wound healing.

Field of study Pharmacology

Academic year 2005

Student's signature..... *Mattana Kankaisre*

Advisor's signature..... *Mayuree Tantisira*

Co-advisor's signature..... *Boonyong Tantisira*

Co-advisor's signature..... *Jurajorn Somboonwong*

ACKNOWLEDGEMENTS

First of all, I wish to express my sincere gratitude and deepest appreciation to my thesis advisor, Associate Professor Dr. Mayuree Tantisira and my thesis co-advisor Associate Professor Dr. Juraiporn Somboonwong and Associate Professor Dr. Boonyong Tantisira for their kind suggestion, thoughtful advice, helpful guidance and constant encouragement through this thesis.

I would like to express my sincere thank to Associate Professor Dr. Rutt Suttisri and Mr. Chutichot Mungmee, Department of Pharmaceutical Botany, Faculty of Pharmaceutical Sciences for their kind preparation of crude extract of *Centella asiatica*.

I would like to express my sincere thank to Associate Professor Dr. Vilai Chinthanes and Mrs. Atitaya Kaewsema , Department of Anatomy, Faculty of Medicine for their help and facilitation on histopathological technique.

I would like to express my sincere thank to Associate Professor Dr. Chusak Wiratchai, Department of Pathology, Faculty of Medicine for his kind advice on histopathological evaluation.

I would like to thank Ms. Naphatsanan Duansak for training me on burn wound technique and Dr. Chanon Somprasong for helping me on technique of incision wound.

I would like to express my sincere thank to Mr. Sutee Vattanakitrunroj, Bara Scientific Co., Ltd. for providing me technical assistance of EZ-test whenever needed.

I am also very grateful to all of the teaching staffs of the Inter-department of Pharmacology, Graduate School, Chulalongkorn University for giving me the knowledge which have enabled me to succeed in my study.

I would like to thank the member of my thesis committee for their useful suggestion to improve my work.

I would like to thank all researchers from my literature for giving me the supporting data, knowledge and idea.

I wish to express my sincere thanks to my colleague for their helps, supports and friendship.

Finally, I would like to express my infinite thanks and gratitude to all of my friends and my family for their endless love, kindness, understanding and encouragement.

TABLE OF CONTENTS

	Page
ABSTRACT (THAI).....	iv
ABSTRACT (ENGLISH).....	v
ACKNOWLEDGEMENTS.....	vi
TABLE OF CONTENTS.....	vii
LIST OF TABLES.....	viii
LIST OF FIGURES.....	ix
LIST OF ABBREVIATIONS.....	xi
CHAPTER	
I INTRODUCTION.....	1
II REVIEW LITERATURE.....	4
III MATERIALS AND METHODS.....	34
IV RESULTS.....	43
V DISCUSSION AND CONCLUSION.....	61
REFERENCES.....	67
BIOGRAPHY.....	74

LIST OF TABLES

Table	Page
2.1 The effects of vitamins on wound healing.....	22
2.2 The effects of trace elements on wound healing.....	23
2.3 Characteristics of deep partial and full thickness burn wounds.....	30
2.4 Child burn size estimation (percent total body surface area).....	33
4.1 Tensile strength of incision wounds untreated and treated with NSS, Tween 20 or different fractions of CA extract at day 7 post wounding.....	47
4.2 The degree of wound healing in second-degree burn wound.....	57

LIST OF FIGURES

Figure	Page
2.1 <i>Centella asiatica</i> Linn. Urban.....	4
2.2 The skin.....	13
2.3 Steps in wound healing by first and second intention.....	20
2.4 The intensity of cellular impairment of three zones	27
2.5 Rule of 9s to estimate extent of burn injury by percentage.....	32
3.1 Diagram illustrating steps of extraction.....	36
3.2 Diagram illustrating the preparation of tissue for the determination of tensile strength	38
3.3 The tensiometer.....	39
3.4 The tissue holder.....	39
3.5 The area prepared for wounding.....	41
3.6 The sutured skin.....	41
3.7 The hot plate.....	42
4.1 TLC of hexane extract of CA using β -sitosterol as standard compound.....	43
4.2 TLC of ethyl acetate extract of CA using asiatic acid as standard compound.....	44
4.3 TLC of methanol extract of CA using asiaticoside and madecassoside as standard compound.....	44
4.4 TLC of water extract of CA using asiatic acid as standard compound.....	45
4.5 Tensile strength of wounds treated with Tween 20 solution and 10% of different fractions from CA extract at day 7 post wounding.....	46
4.6 The wound appearance on day 3.....	49
4.7 The wound appearance on day 7.....	50
4.8 The wound appearance on day 10.....	51
4.9 The wound appearance on day 14.....	52
4.10 The degree of wound healing on day 3 post burning.....	53
4.11 The degree of wound healing on day 7 post burning.....	54
4.12 The degree of wound healing on day 10 post burning.....	55
4.13 The degree of wound healing on day 14 post burning.....	56

Figure	Page
4.14 Histological changes of skin section at day 14 post burning.....	59
4.15 Histological changes of skin section at day 14 post burning.....	60
4.16 Proposed mechanism of action of CA extracts during the phases of burn wound healing.....	66

LIST OF ABBREVIATIONS

ACF	Aberrant crypt foci
AOM	Azoxymethane
ASR	Acoustic startle response
CA	<i>Centella asiatica</i> (Linn) Urban
CAT	Catalase
cm	Centimeter
cm ²	Square centimeter
CPK	Creatinine phosphokinase
° C	Degree Celsius
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	1, 1-diphenyl-2-picrylhydrazyl
e.g.	Exempli gratia (for example)
EGF	Epedermal growth factor
FGF-10	Fibroblast growth factor-10
FRAP	Ferric reducing antioxidant power
GOT	Glutamate oxaloacetate transaminase
GPT	Glutamate pyruvate transaminase
GSH	Total reduced glutathione
GSHPx	Glutathione peroxidase
G6PD	Glucose 6 phosphate dehydrogenase
GST	Glutathione S-transferase
IL-1	Interleukin-one
i.p.	Intraperitoneal
LDH	Lactate dehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharide
MDA	Malondialdehyde
mg/kg	Milligram per kilogram
ml	Milliliter
mm	Millimeter

m ²	Square meter
MPO	Myeloperoxidase
mRNA	Messenger riboxynucleotide
NO	Nitric oxide
N/cm ²	Newton per square centimeter
NSS	Normal saline
PMN	Polymorphonuclear leukocyte
PTZ	Pentylene tetrazole
RNA	Riboxynucleotide
ROS	Reactive oxygen species
SOD	Superoxide dismutase
TGF-β	Tumor growth factor-beta
TLC	Thin layer chromatography
TNF-α	Tumor necrotic factor-alpha
UV	Ultraviolet
VEGF	Vascular endothelial growth factor
v/v	Volume by volume
w/v	Weight by volume