


ผลของการใช้สารสกัดอะซีแมนแนนจากว่านหางจระเข้ในการซ่อมแซมบาดแผล
เยื่อช่องปากของหนูขาว



นางสาวสิริวิรัช ศศิธนาเศรษฐ์

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

วิทยานิพนธ์นี้เป็นส่วนหนึ่งของการศึกษาตามหลักสูตรปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต


สาขาวิชาพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ ภาควิชาพยาธิวิทยา

คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ปีการศึกษา 2551

ลิขสิทธิ์ของจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

**EFFECT OF THE ACEMANNAN EXTRACT FROM ALOE VERA ON WOUND HEALING
OF RAT ORAL MUCOSA**



Miss Siriruk Sasithanasate

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
A Thesis Submitted in Partial Fulfillment of the Requirements
for the Degree of Master of Science Program in Veterinary Pathobiology

Department of Veterinary Pathology

Faculty of Veterinary Science

Chulalongkorn University

Academic Year 2008

Copyright of Chulalongkorn University

511958

สิริรักษ์ ศศิธนาเศรษฐ์: ผลของการใช้สารสกัดอะซีแมนแนนจากว่านหางจระเข้ในการ
 ซ่อมแซมบาดแผลเยื่อช่องปากหนูขาว (EFFECT OF THE ACEMANNAN EXTRACT
 FROM ALOE VERA ON WOUND HEALING OF RAT ORAL MUCOSA) อ. ที่ปรึกษา:
 รศ.น.สพ.ดร.วิจิตร บรรณูราร, อ.ที่ปรึกษาร่วม: รศ.ทพ.ดร.พสุธา รัญญะกิจไพศาล, 64
 หน้า.

การศึกษาผลของการใช้สารสกัดอะซีแมนแนนซ่อมแซมบาดแผลเยื่อช่องปากหนูขาว พันธุ์
 Sprague-Dawley จำนวน 80 ตัว หนูทุกตัวได้รับการผ่าตัดสร้างแผลจำลองที่เพดานแข็งด้วยอุปกรณ์ตัดชิ้นเนื้อชนิด
 เจาะ แบ่งหนูออกเป็น 5 กลุ่มๆละ 16 ตัว ดังนี้ คือ กลุ่มควบคุมลบ (น้ำกลั่น) กลุ่มสารสื่อผสม (สารคาร์โบไฮล) กลุ่ม
 สารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มไครแอมซิโนโลน อะซีไคไนด์ 0.1
 เปอร์เซ็นต์ (Kenalog™) หนูได้รับป้ายแผลด้วยสารดังกล่าววันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันนาน 14 วัน สุ่มหนูกลุ่มละ 4 ตัว
 ทำการดูขนาด ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง เก็บตัวอย่างชิ้นเนื้อเพดานแข็งในฟอร์มาลิน ตรวจและ
 วิเคราะห์ผลโดยการวัดขนาดแผล จุลพยาธิวิทยา และอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีต่อ α -smooth muscle actin,
 proliferating cell nuclear antigen (PCNA) และ transforming growth factor (TGF- β 1) ผลการทดลองพบว่า ในวันที่
 7 ของการทดลองกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์มีขนาดแผลเฉลี่ยเล็กกว่ากลุ่มทดลองอื่น และพบความ
 แตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มสารสื่อผสม ผลทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบความ
 แตกต่างระหว่างกลุ่มทดลองในวันที่เก็บตัวอย่าง ผลทางอิมมูโนฮิสโตเคมี พบว่า ดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ในชั้นเยื่อ
 บุและชั้น propria-submucosa กลุ่มอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยสูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นในวันที่ 3 และ 5 ของ
 การทดลอง และมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์สูงกว่ากลุ่มทดลองอื่น ยกเว้นกลุ่มควบคุมลบในวันที่ 5
 และ 7 ของการทดลอง และในวันที่ 14 ของการทดลอง กลุ่มสารอะซีแมนแนนทั้ง 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์มีจำนวน
 เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์สูงสุด แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ดังนั้นจากผลขนาดแผลและอิมมู
 โนฮิสโตเคมี บ่งชี้ถึงการออกฤทธิ์ของสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ที่เร่งให้แผลมีขนาดลดลงเร็วกว่ากลุ่ม
 ทดลองอื่น ผลค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 พบว่าทุกกลุ่มมีค่าเฉลี่ยขึ้นลงสลับกันตลอดการ
 ทดลอง โดยพบว่ากลุ่มควบคุมลบจะมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์สูงกว่ากลุ่มทดลองอื่นตลอดการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบ
 ความสัมพันธ์ระหว่างค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 และค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์
 พบว่าไม่มีความสัมพันธ์กัน ดังนั้นจากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า TGF- β 1 ไม่ได้เป็นปัจจัยหลักต่อการ
 เปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ จากผลการทดลองครั้งนี้สรุปว่า กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5
 เปอร์เซ็นต์สามารถเร่งการซ่อมแซมแผลในช่องปาก โดยออกฤทธิ์เพิ่มการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อในวันที่ 3 และ 5 ของ
 การทดลองและมีการเปลี่ยนแปลงเพิ่มจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง ดังนั้น
 การศึกษาครั้งนี้ยืนยันผลการใช้สารสกัดอะซีแมนแนนจากว่านหางจระเข้ ในการเร่งการหายของแผลจำลองในเยื่อ
 ช่องปากหนูขาว

ภาควิชา พยาธิวิทยา
 สาขาวิชา พยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์
 ปีการศึกษา 2551

ลายมือชื่อนิสิต อธิวัฒน์ ศศิธนาเศรษฐ์
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษา
 ลายมือชื่ออาจารย์ที่ปรึกษาร่วม พ.ศ. ๒๕๕๑

4875571231 : MAJOR VETERINARY PATHOBIOLOGY

KEY WORD: WOUND HEALING / ACEMANNAN /ORAL / MYOFIBROBLASTS/ TGF-β1

SIRIRUK SASITHANASATE: EFFECT OF THE ACEMANNAN EXTRACT FROM ALOE VERA ON WOUND HEALING OF RAT ORAL MUCOSA. THESIS ADVISOR: ASSOC. PROF. WIJIT BANLUNARA, Ph.D., THESIS COADVISOR: ASSOC.PROF.PASUTHA THUNYAKITPISAL, Ph. D., 64 pp.

This study investigated the accelerating effects of the acemannan on oral wound healing in the rat model. Eighty Sprague-Dawley rats were surgically made deep circular wound in the hard palate using a 4 mm biopsy punch. The 5 experimental groups were set of 16 rats each; negative control (distilled water), oral base (carbopol), 0.5% acemannan, 2% acemannan and 0.1% triamcinolone acetonide groups (Kenalog™). Each group was topically applied the chemical once daily for 14 day. Four animals of each group were sacrificed at 3, 5, 7 and 14 day post-wounding (dpw) and the palatal tissue was fixed in 10% buffered formalin. The result was evaluated by wound area measurement, histopathology and immunohistochemistry using primary antibodies against α-smooth muscle actin, proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and transforming growth factor β1 (TGF-β1). The result showed that the wound area of the 0.5% acemannan group were smaller than others and significantly statistic differed (p<0.05) from the oral base group at 7 dpw. Histopathology of the wound did not differed among the groups at the same dpw. Immunohistochemically, the average number of PCNA-positive cells in the epithelial cell and propria-submucosa layers of the 0.5% acemannan group was higher than in other groups at 3 and 5 dpw. and the average number of myofibroblasts of the 0.5% acemannan group was higher than in almost groups except for the negative control group at 5 and 7 dpw. At 14 dpw., the 0.5% acemannan and 2% acemannan groups showed the highest number of myofibroblasts than others, but they were not statistically differed. The number of TGF-β1-positive cells was fluctuated throughout the end of experiment. In addition, the negative control group had higher TGF-β1-positive cells than the others. The comparison between the average number of myofibroblasts and TGF-β1 positive cells did not correlated. This suggested that TGF-β1 was not the major factor for the myofibroblast transformation. In conclusion the 0.5% acemannan could be accelerate the oral wound healing by increasing of the epithelial cell proliferation at 3 and 5 dpw. and promoting of myofibroblast transformation at 5 and 7 dpw. This study confirms that acemannan extract from *Aloe vera* could accelerate the oral wound healing in the rat model.

Department: Veterinary Pathology
Field of study: Veterinary Pathobiology
Academic year: 2008

Student's signature Siriruk Sasithanasate
Advisor's signature W. Banlunara
Co-advisor's signature Pasutha Thunyakitpisal

กิตติกรรมประกาศ

วิทยานิพนธ์ฉบับนี้สำเร็จลุล่วงได้ด้วยดี จากความช่วยเหลือเป็นอย่างยิ่งของอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ รศ.น.สพ.ดร.วิจิตร บรรณานาวา และอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม รศ.ทพ.ดร. พสุธา รัชฎกิจไพศาล ที่ได้ให้ความรู้ ความช่วยเหลือในการทำวิจัย คำแนะนำ ข้อคิดเห็นที่เป็นประโยชน์ในหลายๆด้าน และตรวจทานแก้ไขต้นฉบับวิทยานิพนธ์จนสำเร็จได้ด้วยดี ผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณเป็นอย่างสูงมา ณ โอกาสนี้ด้วย รวมทั้งกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิ รศ.สพ.ญ.ดร. ศิรินทร หิบบไชคอนันต์ และคณะกรรมการสอบวิทยานิพนธ์ทุกท่านที่กรุณาสละเวลา และตรวจทานแก้ไขวิทยานิพนธ์ให้สมบูรณ์มากยิ่งขึ้น

ขอขอบคุณ ทูนางประมาณแผ่นดินจากคณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัยที่ให้ทุนอุดหนุนการวิจัยในครั้งนี้

ขอขอบคุณ สพ.ญ.คลฤทัย ศรีทะ น.สพ.รุ่งธรรม เกษโกวิท และน.สพ.ศุภฤกษ์ นันทวัน ณ อรุรยา ที่ให้ความช่วยเหลือในการปฏิบัติงานเป็นอย่างดี และคำแนะนำเกี่ยวกับสถิติ

ขอขอบคุณ น.สพ.อานนท์ ชุมคำลือ ในการอนุเคราะห์สารเคมี

ขอขอบคุณ คุณแสนาะ สุสันกุลชร เจ้าหน้าที่ประจำห้องปฏิบัติการทางเนื้อเยื่อวิทยา ศูนย์ฝึกนิสิต คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย จ. นครปฐม ในการอำนวยความสะดวกด้านห้องปฏิบัติการและความช่วยเหลือเป็นอย่างดี

ขอขอบคุณ คุณสุประคินธุ์ หวังในธรรม คุณสามารถ รัวชูศรี คุณดวงจันทร์ กลิ่นสีสุข และภาควิชาพยาธิวิทยา คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในการอำนวยความสะดวกด้านอุปกรณ์ สารเคมี และห้องปฏิบัติการ รวมถึงการติดต่อประสานงานในเรื่องต่างๆ

ขอขอบคุณคุณชไมพร ดุงเงินโต ในการเป็นผู้ช่วยเลี้ยงสัตว์ทดลองและร่วมปฏิบัติงานด้านสัตว์ทดลอง

ขอขอบคุณ ทพ.ญ.สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ และ ทพ.ญ.นวกรณ์ จิตภิรมย์ศักดิ์ นิสิตปริญญาเอก ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในความช่วยเหลือและคำแนะนำต่างๆ

ท้ายนี้ขอกราบขอบคุณสมาชิกในครอบครัวทุกท่านและเพื่อนๆทุกคนที่ให้กำลังใจและสนับสนุนการทำวิจัยครั้งนี้จนสำเร็จลุล่วงไปได้ด้วยดี

สารบัญ

	หน้า
บทคัดย่อภาษาไทย	ง
บทคัดย่อภาษาอังกฤษ	จ
กิตติกรรมประกาศ	ฉ
สารบัญ	ช
สารบัญตาราง	ฉ
สารบัญรูปภาพ	ญ
บทที่	
1 บทนำ	1
1.1 ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา	1
1.2 วัตถุประสงค์ของการวิจัย.....	3
1.3 ขอบเขตของการวิจัย	3
1.4 คำถามสำหรับงานวิจัย	4
1.5 ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ	4
2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง.....	5
2.1 ว่านหางจระเข้.....	5
2.2 สารสกัดอะซีแมนแนน	7
2.3 การซ่อมแซมแผลในช่องปาก	11
2.4 เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์กับการหดตัวของแผล	17
2.5 ดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย Proliferating cell nuclear antigen (PCNA).....	18
2.6 โพลีเมอร์สำหรับยึดเกาะเยื่อ.....	18
3 วิธีดำเนินการวิจัย.....	20
4 ผลการทดลอง.....	28
4.1 ผลอาการทางคลินิกและสุขภาพสัตว์ทดลอง.....	28
4.2 ผลทางมพยาธิวิทยา.....	28
- ขนาดแผลหลังการรักษา.....	28
4.3 ผลทางจุลพยาธิวิทยา	32

4.4 ผลการช้อมด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี.....	36
- ผลจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ด้วยแอนติบอดี α -smooth muscle actin	36
- ผลค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเพิ่มจำนวนด้วยดัชนี PCNA (Proliferating index)	39
- ผลจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1.....	44
5 อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ	48
รายการอ้างอิง	53
ภาคผนวก.....	61
ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์.....	64



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารบัญตาราง

		หน้า
ตารางที่ 1	สรุปการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารอะซีเมนแนนทีเคยมี รายงาน.....	11
ตารางที่ 2	ขนาดแผลเฉลี่ย (Mean±S.D.) และค่าเฉลี่ย percent wound closure (%) ใน วันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง.....	29
ตารางที่ 3	ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของ การทดลอง.....	37
ตารางที่ 4	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์.....	37
ตารางที่ 5	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เยื่อที่กำลังแบ่งตัวด้วย PCNA ในชั้นเยื่อ.....	41
ตารางที่ 6	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวด้วย PCNA ในชั้น propria- submucosa.....	41
ตารางที่ 7	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อที่กำลังแบ่งตัวในชั้นเยื่อ.....	42
ตารางที่ 8	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในชั้น propria-submucosa.....	42
ตารางที่ 9	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF-β1.....	45
ตารางที่ 10	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β1.....	46

สารบัญภาพ

	หน้า
ภาพที่ 1	ต้นว่านหางจระเข้..... 5
ภาพที่ 2	ใบว่านหางจระเข้ตัดตามขวาง..... 6
ภาพที่ 3	ตำแหน่งของสารอะซีแมนแนนในส่วนของเจลเหลวของว่านหางจระเข้..... 7
ภาพที่ 4	สูตร โครงสร้างทางเคมีของสารอะซีแมนแนน 8
ภาพที่ 5	โครงสร้างของตัวรับจำเพาะชนิด macrophage mannose receptor ของเซลล์แมคโครฟาจ..... 9
ภาพที่ 6	กระบวนการซ่อมแซมแผล..... 12
ภาพที่ 7	สารเคมี growth factors และไซโตไคน์ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจซึ่ง ส่งผลให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมบาดแผล..... 15
ภาพที่ 8	ปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์..... 17
ภาพที่ 9	ภาพถ่ายและภาพวาดของแผลที่สร้างขึ้นบริเวณเพดานแข็งของหนูขาว..... 21
ภาพที่ 10	ตัวอย่างวิธีการถ่ายภาพดิจิทัลเก็บข้อมูลขนาดของแผลจากหนูทดลองกลุ่ม ป้ายสารอะซีแมนแนนในวันที่ 3 ของการทดลอง..... 23
ภาพที่ 11	วิธีการสุ่มพื้นที่ประเมินผลการซ่อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี..... 27
ภาพที่ 12	กราฟขนาดแผลเฉลี่ยในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง..... 30
ภาพที่ 13	กราฟค่าเฉลี่ย percentw ound closure ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการ ทดลอง..... 30
ภาพที่ 14	ลักษณะทางมอร์ฟอวิทยาของแผลของแต่ละกลุ่มในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง..... 31
ภาพที่ 15	จุลพยาธิวิทยาของหนูกุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง..... 34
ภาพที่ 16	จุลพยาธิวิทยาของหนูกุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง..... 35
ภาพที่ 17	เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ที่ย้อมติดสีต่อแอนติบอดีต่อ α -smooth muscle actin ของกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5% ในวันที่ 3 ของการทดลอง..... 38
ภาพที่ 18	กราฟแสดงจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์เฉลี่ยในช่วงการทดลอง..... 38

ภาพที่ 19	เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวจำนวนมากด้วยแอนติบอดีคือ PCNA ของหนูกลุ่ม สารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง.....	43
ภาพที่ 20	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA ในชั้นเยื่อ.....	43
ภาพที่ 21	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA ในชั้น propria- submucosa.....	44
ภาพที่ 22	เซลล์ที่ย้อมติดสีด้วยแอนติบอดีคือ TGF- β 1 ของหนูกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง.....	46
ภาพที่ 23	กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TGF- β 1.....	47



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 1 บทนำ

ความเป็นมาและความสำคัญของปัญหา

การเกิดแผลในช่องปากของมนุษย์สามารถพบได้บ่อย โดยอาจเกิดจากสาเหตุต่างๆ เช่น การกัดกระแทกหรือการเสียดสี การติดเชื้อ โรคที่เกิดจากภูมิคุ้มกันต่อต้านตัวเอง (autoimmune diseases) การคัลยกรรมช่องปาก การอักเสบของเหงือกและเยื่อเย็ดปริทันต์ (gingival and periodontal inflammation) การขาดสารอาหาร และการฉายรังสีรักษามะเร็งส่วนศีรษะ เป็นต้น (McGrory et al., 2004) ในทางสัตวแพทย์แผลในช่องปากของสุนัขและแมวสามารถพบได้เช่นเดียวกับในมนุษย์ โดยมีสาเหตุจากการกัดกระแทก การชูดหินปูน หรือโรคติดเชื้อและกลุ่มอาการบางชนิด ได้แก่ feline eosinophilic granuloma ไวรัสมะเร็งเม็ดเลือดขาวในแมว (feline leukemia virus; FeLV) ไวรัสภูมิคุ้มกันบกพร่องในแมว (feline immunodeficiency virus; FIV), feline calicivirus โรคเบาหวาน (diabetes mellitus) ภาวะต่อมหมวกไตทำงานเกิน (hyperadrenocorticism) และโรคไต เป็นต้น (Nelson and Couto, 1998) แผลในช่องปากของทั้งมนุษย์และสัตว์ก่อให้เกิดความเจ็บปวด มีกลิ่นปาก และการกินอาหารลำบาก โดยเฉพาะการเกิดแผลในช่องปากของสัตว์เลี้ยงอาจทำให้สัตว์ไม่สามารถกินอาหารได้ และส่งผลเสียต่อสุขภาพในที่สุด

เมื่อเกิดแผลภายในช่องปากในระยะแรก ร่างกายจะกระตุ้นกระบวนการซ่อมแซมเนื้อเยื่อให้เริ่มทำงาน โดยแบ่งขั้นตอนต่างๆ ได้ 3 ระยะ คือ ระยะเลือดแข็งตัวและการอักเสบ (haemostasis and inflammation phase) ระยะการงอกขยาย (proliferation phase) และระยะการปรับแต่งบาดแผล (maturation and remodeling phase) โดยมีเซลล์หลายชนิดทำหน้าที่ในระยะต่างๆ เกิดขึ้นซ้อนกัน เซลล์ที่เข้ามาเกี่ยวข้อง ได้แก่ เกล็ดเลือด เม็ดเลือดขาว แมคโครฟาจ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroblast) เป็นต้น แต่เซลล์ที่สำคัญต่อการซ่อมแซมแผลมากที่สุด คือ แมคโครฟาจ (macrophage) (Cotran et al., 1994; Zuloff-shanee et al., 2004) เนื่องจากแมคโครฟาจทำหน้าที่ร่วมกับเซลล์อื่น เพื่อให้เกิดกระบวนการในระยะต่างๆ โดยแมคโครฟาจใช้การสื่อสารผ่านทางไนตริกออกไซด์ (nitric oxide) ไซโตไคน์ (cytokines) และปัจจัยที่กระตุ้นการเจริญเติบโต (growth factors)

ในทางการแพทย์ การรักษาแผลช่องปากในปัจจุบันเป็นเพียงการรักษาตามอาการ เช่น การใช้สารต้านจุลชีพ (anti-microbial drug) สารต้านอนุมูลอิสระ (anti-oxidant) (Katayama et al., 2000) ยาชาเฉพาะที่ (local analgesic drug) และยาด้านการอักเสบ (anti-inflammatory

drug) เป็นต้น ในปัจจุบันมีการนำ growth factors บางชนิดมาใช้ เช่น epidermal growth factor (EGF) และ basic fibroblast growth factor (bFGF) เป็นต้น (Fujisawa et al., 2003; Oda et al., 2004) ซึ่งสามารถออกฤทธิ์เร่งการซ่อมแซม และสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชั่น (granulation tissue) ได้ แต่อย่างไรก็ตาม growth factors ดังกล่าวยังอยู่ในขั้นตอนค้นคว้าวิจัยก่อนนำมาใช้จริง ในทางสัตวแพทย์การรักษาแผลในช่องปากเป็นการรักษาตามอาการเช่นกัน แต่แนวทางการรักษามีจำนวนน้อยกว่าที่ใช้ในมนุษย์ ทั้งนี้เนื่องจากยาที่ใช้ได้กับสัตว์ยังมีจำนวนจำกัด ดังนั้นแนวทางการรักษาทางสัตวแพทย์ ได้แก่ การให้สารต้านจุลชีพ และเน้นการทำความสะอาดช่องปากด้วยน้ำยาฆ่าเชื้อ เป็นต้น

การใช้ยาทาเฉพาะที่เพื่อเร่งการซ่อมแซมแผลในช่องปาก เป็นวิธีการรักษาที่ตรงวัตถุประสงค์มากที่สุด นอกจากนี้ยังพบว่าบริเวณเยื่อบุช่องปากเป็นส่วนที่มีคุณสมบัติเหมาะสมในการนำส่งยา เนื่องจากเป็นบริเวณที่มีเลือดมาเลี้ยงเป็นจำนวนมาก และเมื่อยาถูกดูดซึมแล้ว จะไหลเข้าสู่หลอดเลือดดำ jugular vein ไม่ผ่านไปยังตับ ทำให้ไม่ผ่านกระบวนการ first-pass metabolism (เกตุกานต์ และ มนวิดา, 2546) แต่ยาที่ใช้ในปัจจุบันมักเป็นสารลดการอักเสบชนิดสเตียรอยด์เป็นส่วนใหญ่ ซึ่งมีอยู่หลายรูปแบบในรูปแบบการค้ำ (สุชาติและชัยโย, 2541) สารสเตียรอยด์ชนิดทาไม่นิยมใช้ในสัตว์ เนื่องจากมีข้อควรระวังหลายประการ เช่น ห้ามใช้เป็นระยะเวลาานอาจส่งผลกระทบต่อการทำงานของสมองส่วนไฮโปทาลามัส (hypothalamus) และต่อมใต้สมอง (pituitary gland) ทำให้ต่อมหมวกไตฝ่อลีบได้ ห้ามใช้ในสัตว์ที่เป็นโรคเบาหวานและโรคไต และอาจมีผลทำให้แผลหายช้า (วราและคณะ, 2547) อย่างไรก็ตามในปัจจุบันพบสารสกัดจากธรรมชาติที่สามารถเร่งการสมานแผลในช่องปากได้ โดยมีการผลิตออกมาขายในรูปแบบของยาทาเฉพาะที่ ได้แก่ สารสกัดจากใบพลูายอ และสารสกัดจากใบบัวบก เป็นต้น แต่ในประเทศไทยยังมีพืชสมุนไพรอีกหลายชนิดที่ออกฤทธิ์เร่งการสมานแผลบนผิวหนังได้ และอาจเร่งสมานแผลในช่องปากได้เช่นกัน เช่น ว่านหางจระเข้ เป็นต้น

ตั้งแต่อดีตจนถึงปัจจุบัน สมุนไพรที่นิยมนำมาศึกษาในการเร่งกระบวนการหายของแผลมากที่สุด คือ ว่านหางจระเข้ (Coat and Ahola, 1979; Krishnan, 2006) โดยเฉพาะพันธุ์ *Aloe vera barbadensis* Miller ว่านหางจระเข้จัดเป็นสมุนไพรที่นิยมนำไปทดลองใช้ ตั้งแต่ระดับเซลล์เพาะเลี้ยง สัตว์ทดลอง ตลอดจนใช้กับมนุษย์ (Krishnan, 2006) จึงจัดเป็นพืชที่ค่อนข้างมีความปลอดภัยสูง สรรพคุณของใบว่านหางจระเข้มีหลายสรรพคุณ เช่น รักษาฝ้า (วิวัฒน์และคณะ, 2534) แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกของผิวหนังชนิดลึก (วิวัฒน์และคณะ, 2538) และใช้ในการรักษาแผลในกระเพาะอาหาร (ศิริมา, 2537) ซึ่งว่านหางจระเข้จะช่วยซ่อมแซมบาดแผลบนเยื่อผิวหนัง (epithelialization) และออกฤทธิ์เคลือบป้องกันเยื่อเมือกกระเพาะอาหาร เพิ่มแรงต้านทานของชั้น

เยื่อเมือกกระเพาะ จะช่วยเร่งการหายของแผลเร็วขึ้นด้วย นอกจากนี้ยังสามารถออกฤทธิ์ต้านการอักเสบ (anti-inflammatory effect) และช่วยเร่งการสมานแผลได้ (จุโรพรและคณะ, 2543)

สารอะซีแมนแนนเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่สกัดได้จากส่วนหัวของว่านหางจระเข้ สารสกัดดังกล่าวมีผลโดยตรงต่อการทำงานของแมคโครฟาจ (Karaca et al., 1995) กลไกการทำงานเริ่มขึ้นเมื่อ mannose residue ในสารอะซีแมนแนนจับตัวกับ mannose receptor บนผิวแมคโครฟาจ (Karaca et al., 1995; Stuart et al., 1997) เป็นการกระตุ้นแมคโครฟาจให้ทำงานโดยหลั่ง growth factors และไซโตไคน์หลายชนิดออกมา และส่งผลต่อเนื่องให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อหลอดเลือด (vascular endothelial cell) เพิ่มจำนวน ดังนั้นการซ่อมแซมจึงเริ่มเข้าสู่ระยะถัดไปเร็วขึ้น (Peng et al., 1991; Karaca et al., 1995) สารสกัดจะออกฤทธิ์กระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจโดยตรง ดังนั้น Transforming growth factor- beta 1 (TGF- β 1) เป็น growth factors ที่สำคัญของแมคโครฟาจ อาจมีการแสดงออกของโปรตีนที่เพิ่มขึ้น และในสภาพปกติ TGF- β 1 ยังส่งผลต่อการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (myofibroblast) ของเยื่อช่องปาก (Desmouliere et al., 1993; Funato et al., 1999) ทำให้แผลเกิดการหดตัว (wound contraction) เร็วขึ้น ส่งผลให้แผลสมานตัวเร็วขึ้น

เนื่องจากสารอะซีแมนแนนใช้ได้ผลดีในการรักษาแผลที่ผิวหนัง แต่การศึกษาวิจัยด้านประสิทธิภาพต่อแผลในช่องปากยังมีน้อย ดังนั้นการวิจัยในครั้งนี้มุ่งเน้นการศึกษาและพัฒนา ยาสมานแผลในช่องปาก โดยใช้สารอะซีแมนแนนที่สกัดจากว่านหางจระเข้เป็นตัวยาออกฤทธิ์ที่สำคัญ นอกจากนี้ถ้าสารอะซีแมนแนนสามารถเร่งการหายของแผลในช่องปากได้ จะช่วยเพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจกับว่านหางจระเข้ ลดต้นทุนการผลิตยาสมานแผล ปลอดภัยต่อผู้บริโภค และเป็นทางเลือกที่ดีอีกทางหนึ่งสำหรับยาสมานแผลช่องปากที่ใช้ได้กับทั้งมนุษย์และสัตว์

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาประสิทธิภาพ การเร่งซ่อมแซมแผลในช่องปากของสารอะซีแมนแนนจากว่านหางจระเข้ เปรียบเทียบความสัมพันธ์ของการแสดงออก (expression) ของโปรตีน TGF- β 1 จำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ และขนาดของแผล รวมถึงการศึกษาอัตราการงอกขยายของเซลล์เนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้วยดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ (proliferating cell nuclear antigen; PCNA)

ขอบเขตของการวิจัย

การวิจัยเป็นการวิจัยเชิงทดลอง (experimental study) ศึกษาการซ่อมแซมบาดแผลในช่องปากหนูขาว (rat) จำนวน 80 ตัว โดยเหนี่ยวนำการเกิดแผลจำลองที่เพดานแข็ง

(hard palate) ด้วย อุปกรณ์ตัดชิ้นเนื้อชนิดเจาะ (punch biopsy) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร เจาะลึกถึงชั้นเยื่อหุ้มกระดูก (periostium) แบ่งหนุออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 16 ตัว แต่ละกลุ่มจะได้รับการป้ายแผลด้วยสารดังนี้ สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ และ 2 เปอร์เซ็นต์ ไตรแอมซิโนโลน อะซิโตไนด์ ความเข้มข้น 0.1 เปอร์เซ็นต์ (0.1% triamcinolone acetonide; Kenalog™ in Orabase™, Bristol-Myers Squibb) สารคาร์โบโพล (carbopol) เป็นสารสื่อ (base) ที่ใช้ผสมกับสารอะซีแมนแนน และกลุ่มที่ป้ายด้วยน้ำกลั่น โดยทำการป้ายยาวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันนาน 14 วัน สุ่มหนูทำการุณฆาตและเก็บตัวอย่างเพดานแข็งกลุ่มละ 4 ตัว ในวันที่ 3 5 7 และ 14 วันของการทดลอง ประเมินผลการหายของแผลโดยวัดพื้นที่ของแผลทางมหาวิทยาลัยจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย อัตราการแบ่งตัวเพิ่มจำนวนของเซลล์ (PCNA) และการแสดงออกของโปรตีน TGF- β 1 และโปรตีน α -smooth muscle actin ด้วยเทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี

คำถามสำหรับงานวิจัย

1. สารสกัดอะซีแมนแนนสามารถเร่งการสร้างเนื้อเยื่อซ่อมแซมของแผลในช่องปากได้หรือไม่
2. ถ้าสารสกัดอะซีแมนแนนสามารถเร่งการสร้างเนื้อเยื่อได้ ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงของการแสดงออกของโปรตีน TGF- β 1 และเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์หรือไม่ อย่างไร

ประโยชน์ที่คาดว่าจะได้รับ

1. ประโยชน์ของสารอะซีแมนแนนต่อการเร่งซ่อมแซมเนื้อเยื่อช่องปาก หากสารอะซีแมนแนนสามารถเร่งการหายของแผลในช่องปากได้ เพื่อนำไปใช้กับคน และสามารถพัฒนาไปใช้รักษาแผลในช่องปากของสุนัขและแมวด้วย
2. การนำสารอะซีแมนแนนของว่านหางจระเข้ไปผลิตเป็นยาสมานแผล จะช่วยลดต้นทุนการผลิต
3. เพิ่มมูลค่าทางเศรษฐกิจของว่านหางจระเข้
4. มีความปลอดภัยต่อผู้บริโภคในด้านการใช้ทางสาธารณสุข

บทที่ 2 เอกสารและงานวิจัยที่เกี่ยวข้อง

ว่านหางจระเข้

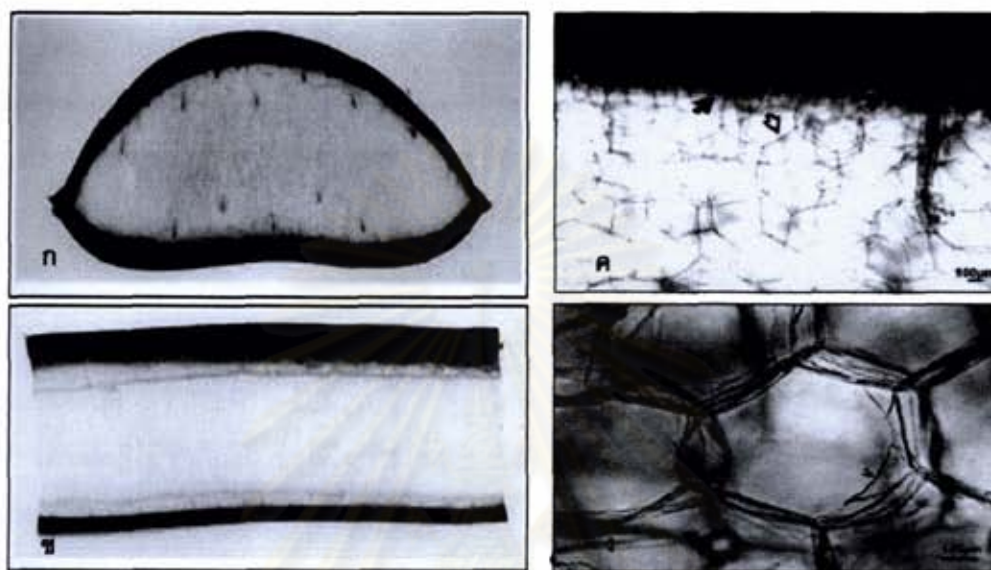
ว่านหางจระเข้ (*Aloe vera*) หรือ *Aloe barbadensis* Miller (หรือ *Aloe vera* L.) จัดอยู่ในวงศ์ Liliaceae ซึ่งมีมากกว่า 300 ชนิด ว่านหางจระเข้ได้รับความนิยม และใช้กันอย่างแพร่หลายในหลายประเทศ เนื่องจากมีสรรพคุณในการรักษาหลายด้าน เช่น แผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวกของผิวหนังชนิดลึก (วิวัฒน์และคณะ, 2538) รักษาฝ้า (วิวัฒน์และคณะ, 2534) แผลในกระเพาะอาหาร (ศิริมา, 2537) แผลในช่องปากชนิด Aphthous ulcer (Garnick et al., 1998) ลดการอักเสบ และเป็นสารเพิ่มความชุ่มชื้นแก่ผิวหนัง (Choi and Chung, 2003) ว่านหางจระเข้ถูกนำมาใช้เป็นเวลาหลายทศวรรษนับตั้งแต่สมัยโรมันหรือก่อน (Coat and Ahola, 1979) ในปัจจุบันมีการพัฒนาไปสู่การใช้เป็นส่วนประกอบในเครื่องสำอางค์ และเครื่องดื่มเพื่อสุขภาพมากขึ้น ว่านหางจระเข้เป็นพืชที่มีลำต้นสั้น มีส่วนที่เป็นใบมากกว่าลำต้น ใบว่านหางจระเข้มีลักษณะแหลมคล้ายเข็ม ใ้ล่พื้นดิน (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 แสดงต้นว่านหางจระเข้

โครงสร้างของใบประกอบด้วยโครงสร้าง 2 ส่วน (ภาพที่ 2ก-ข) คือ เปลือกนอกและเนื้อ ส่วนเปลือกนอกมีลักษณะหนาและแข็ง มีสีเขียว (thick epidermis หรือ outer green rind) และส่วนเนื้อ (pulp) มีลักษณะเป็นเจลเมือกใส (mucilaginous or liquid gel) ไม่มีสี เมื่อเทียบเป็นปริมาตรทั้งหมดของใบว่านหางจระเข้ พบว่าส่วนเนื้อเป็นส่วนที่มีปริมาตรมากที่สุด และเป็นส่วนที่ใช้ประโยชน์หลายด้าน เนื่องจากส่วนเนื้อมีสารออกฤทธิ์ที่สำคัญหลายชนิด โครงสร้างของส่วนเนื้อ เมื่อส่องดูด้วยกล้องจุลทรรศน์สแตอริโอ จะพบโครงสร้างรูปหกเหลี่ยมหลายอันเรียงต่อกันเป็นร่างแห

(ภาพที่ 2ค-ง) เรียกว่า มีโซฟิล (mesophyll) ซึ่งส่งผลให้เนื้อวุ้นทางจระเข้สามารถเก็บน้ำได้ ประมาณ 98-99 เปอร์เซ็นต์ (Femenia et al., 2003) จึงสามารถเจริญเติบโตในเขตอบอุ่น หรือแห้งแล้งได้ (Femenia et al., 2003; Ni et al., 2004)



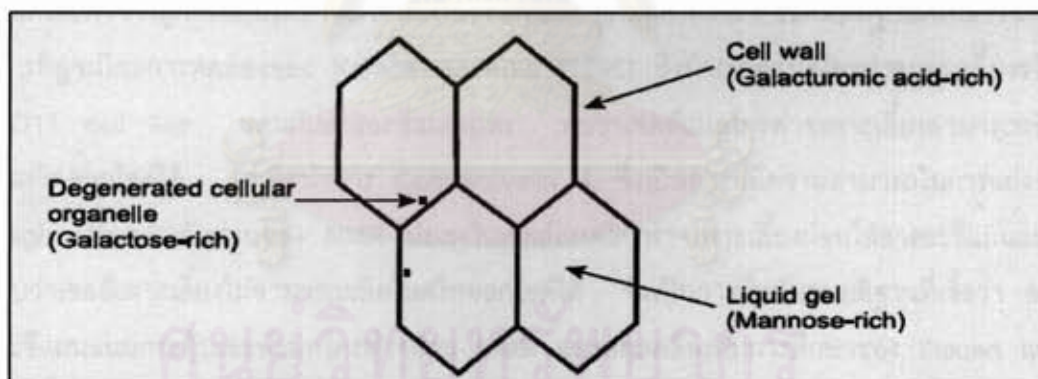
ภาพที่ 2 แสดงไปว่านหางจระเข้ตัดตามขวาง (ก) และตามยาว (ข) ส่องตรวจด้วยกล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (ค) ภาพขยายไปว่านหางจระเข้ส่วนเนื้อวุ้น (ลูกศรโปร่งสี) และส่วนเปลือกนอก (ลูกศรทึบ) (ง) ภาพขยายส่วนเนื้อแสดงโครงสร้างรูปหกเหลี่ยมหลายอันเรียงต่อกัน (ดัดแปลงจาก Ni et al., 2004)

องค์ประกอบทางเคมีของส่วนเนื้อวุ้นหางจระเข้ มีน้ำเป็นองค์ประกอบมากกว่า 99 เปอร์เซ็นต์ (Femenia et al., 2003) องค์ประกอบที่เหลืออีก 0.5 เปอร์เซ็นต์ เป็นองค์ประกอบของแข็ง (solid component) (เกษร, 2531; Femenia et al., 2003) ซึ่งประกอบไปด้วยสารต่างๆ ได้แก่ โพลีแซคคาไรด์ โปรตีน เอนไซม์ สเตอรอล (sterol) กรดอินทรีย์ วิตามิน กลีโอฟอสโฟลิวอน และสารอื่นๆ (เกษร, 2531; Choi and Chung, 2003) โดยพบโพลีแซคคาไรด์เป็นองค์ประกอบหลักใน solid component ซึ่งปริมาณจะแตกต่างกันไปตามฤดูกาล (เกษร, 2531; Femenia et al., 2003; Ni et al., 2004) โดยทั่วไปมีประมาณ 0.3-0.8 เปอร์เซ็นต์ของเจล สารโพลีแซคคาไรด์ที่พบ ได้แก่ แมนโนส (mannose) ฟูโคส (fucose) กลูโคส (glucose) และกาแลคโตส (galactose) แต่สารโพลีแซคคาไรด์หลักที่พบ คือ แมนโนส ซึ่งมีโครงสร้างเป็น acetylate mannan หรือเรียกว่า สารอะซีแมนแนน เชื่อว่าเป็นสารออกฤทธิ์ที่สำคัญในส่วนเนื้อวุ้นหางจระเข้ (Femenia et al., 2003; Ni et al., 2004)

ความเป็นพิษของว่านหางจระเข้ อาจเกิดขึ้นจากส่วนเปลือกใบ เนื่องจากมีสารประกอบจำพวก anthraquinone เช่น emodin และ aloin ซึ่งเป็นสารที่ก่อให้เกิดความเป็นพิษได้ (Avila et al., 1997) ทั้งจากการสัมผัสหรือรับประทาน ความเป็นพิษที่เกิดจากการรับประทาน ได้แก่ ท้องเสีย การสูญเสียความสมดุลกรดต่าง (electrolyte imbalance) การทำงานของไตบกพร่อง และ อาจเกิดปฏิกิริยากับยารชนิดอื่นที่ให้ร่วมกัน (conventional drug interaction) เป็นต้น ความเป็นพิษที่เกิดจากการสัมผัส ได้แก่ ผื่นแดง การไวต่อการแพ้แสง (phototoxicity) และผิวหนังอักเสบจากการสัมผัส (contact dermatitis) (Boudreau and Beland, 2006)

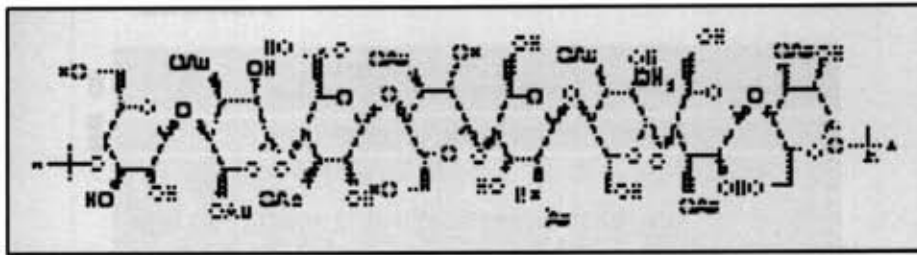
สารอะซีแมนแนน

สารอะซีแมนแนนเป็นสารออกฤทธิ์หลักที่สำคัญในส่วนว่านหางจระเข้ สารจะอยู่ในส่วนของเจลเหลว (liquid gel) (ภาพที่ 3) สูตรโครงสร้างทางเคมี คือ β -(1,4)-acetylated mannan (ภาพที่ 4) จึงมีชื่อพ้องอีกชื่อหนึ่ง คือ อะซีแมนแนน (acemannan) ซึ่งมาจากคำว่า อะซิทิวิต (acetylated) และน้ำตาลโมเลกุลเดี่ยวแมนแนน (mannan) สารอะซีแมนแนนมีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 1,678.46 ดาลตัน (NIH, 2007)



ภาพที่ 3 แสดงตำแหน่งของสารอะซีแมนแนนในส่วนของเจลเหลวของว่านหางจระเข้ (Ni et al., 2004)

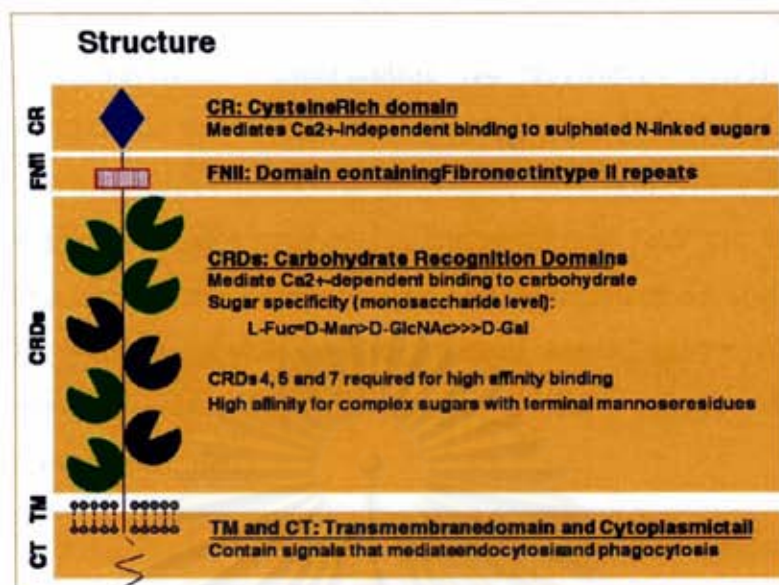
คุณประโยชน์ของสารอะซีแมนแนน ได้แก่ การเร่งสมานแผล (Thomas et al., 1998; Poor et al., 2002) การลดความรุนแรงของปฏิกิริยาข้างเคียงที่ผิวหนังของรังสีรักษา (Robert and Travis, 1995) การกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Womble and Helderman, 1988; Karaca et al., 1995) การต้านเชื้อไวรัสและแบคทีเรีย (Yate et al., 1992; Stuart et al., 1997) และการยับยั้งการเจริญเติบโตของเซลล์มะเร็ง (Peng et al., 1991; Ramamoorthy and Tizard, 1996)



ภาพที่ 4 แสดงสูตรโครงสร้างทางเคมีของสารอะซีแมนแนน (NIH, 2007)

กลไกการออกฤทธิ์เกิดขึ้นโดย macrophage mannose receptor (MMR) บนผิวแมคโครฟาจจับกับโมเลกุลของอะซีแมนแนน (Karaca et al., 1995; Stuart, 1997; Lee et al., 2001) จากนั้นจะเกิดการกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ ส่งผลให้เซลล์แมคโครฟาจหลั่ง growth factors และไซโตไคน์ต่างๆ ออกมา (Zhang and Tizard, 1996)

ตัวรับจำเพาะ macrophage mannose receptor (MMR) บนเซลล์แมคโครฟาจทำหน้าที่จับกับสิ่งแปลกปลอมที่มีโมเลกุลของ mannose residue (ภาพที่ 5) โดยในโครงสร้างของสารอะซีแมนแนนจะมีองค์ประกอบของโมเลกุลน้ำตาลแมนโนส จึงจับกับแมคโครฟาจ จากนั้นแมคโครฟาจจึงถูกกระตุ้นให้ทำหน้าที่หลั่งไซโตไคน์และ growth factors ข้อสมมติฐานดังกล่าวได้รับการพิสูจน์โดยการทดลองของ Karaca และคณะ (1995) ซึ่งนำเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงชนิด HD11 cell line ผสมกับสารอะซีแมนแนน พบว่าเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงสามารถผลิตไนตริกออกไซด์ได้ แต่เมื่อนำสาร Concanavalin A ซึ่งเป็นสารที่มีความสามารถในการแย่งจับ (high affinity) กับส่วนของ MMR บ่มลงในเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงก่อนใส่สารอะซีแมนแนน พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงไม่สามารถผลิตไนตริกออกไซด์ได้ จึงเป็นการยืนยันสมมติฐานที่เชื่อว่า สารอะซีแมนแนนกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจผ่าน MMR และสอดคล้องกับการศึกษาของ Stuart และคณะในปี ค.ศ. 1997 แต่ Lee และคณะในปี ค.ศ. 2001 คาดว่านอกจาก MMR แล้วอาจมีตัวรับตัวอื่นบนแมคโครฟาจที่สามารถจับกับสารอะซีแมนแนนได้อีก แต่หน้าที่อาจไม่เด่นชัดเท่า MMR



ภาพที่ 5 แสดงโครงสร้างของตัวรับจำเพาะชนิด macrophage mannose receptor ของเซลล์แมคโครฟาจ; สีเขียวเข้ม คือ ซีอาร์ดีที่สี่ ห้า และเจ็ด (CRDs) ซึ่งเป็นส่วนที่สามารถจับกับน้ำตาล manose (Martinez and Gordon, 1999)

สารเคมีหรือ growth factors ที่แมคโครฟาจหลั่งออกมาหลังจากได้รับการกระตุ้นจากสารอะซีแมนแนน ได้แก่ ไนตริกออกไซด์, tumor necrosis factor α (TNF- α), interleukin-1 (IL-1) และ interleukin-6 (IL-6) เป็นต้น ทั้งนี้แมคโครฟาจจะเป็นตัวกำหนดชนิดสารที่หลั่งโดยขึ้นอยู่กับ การตอบสนองของร่างกายร่วมด้วย โดยมีรายละเอียดดังนี้ (Womble and Helderan, 1988; Karaca et al., 1995; Zhang and Tizard, 1996; Stuart et al., 1997; Djeraba and Quere, 2000)

สารอะซีแมนแนนกับการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Immunostimulant): หลังกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจเพาะเลี้ยงด้วยสารอะซีแมนแนน พบว่าเซลล์เพาะเลี้ยงจะผลิต IL-1, IL-6, TNF- α และไนตริกออกไซด์ออกมา ซึ่งสารเคมีเหล่านี้มีบทบาทในการกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (Harris et al., 1991; Zhang and Tizard, 1996; Djeraba and Quere, 2000) IL-1 จะกระตุ้นเซลล์ทีลิมโฟไซต์ (T lymphocyte) ให้ทำงานและเพิ่มจำนวน (Womble and Helderan, 1992) ส่วน IL-6 กระตุ้น B lymphocyte ให้พัฒนาเป็นเซลล์เจริญเต็มวัย (maturation) และผลิตแอนติบอดี (antibody) ออกมา สารอะซีแมนแนนถูกนำมาใช้เป็นสารสื่อผสม (adjuvant) ในวัคซีนสำหรับไก่และสัตว์เลี้ยง พบว่าระดับการตอบสนองของภูมิคุ้มกันจะมากหรือน้อยขึ้นอยู่กับชนิดของแอนติเจนในวัคซีน (Chinnah et al., 1992; Usinger, 1997) นอกจากนี้สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นเซลล์เดนไดรติก (dendritic cell) ชนิดอ่อนให้เจริญเป็นเซลล์เจริญเต็มวัย (Lee et al., 2001)

สารอะซีแมนแนนกับการต้านเชื้อไวรัส (antiviral): สารอะซีแมนแนนสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวนของไวรัสบางสายพันธุ์ในมนุษย์ เช่น เชื้อไวรัสเอดส์ (AIDS) โดยในปี ค.ศ. 1991 Kahlon และคณะ พบว่าหากใช้สารอะซีแมนแนนร่วมกับยาด้านไวรัสเพื่อรักษาเชื้อ HIV-1 และ HSV-1 จะสามารถยับยั้งการเพิ่มจำนวน (replication) ของไวรัสได้ (Vlietinck et al., 1998) ในทางสัตวแพทย์มีการทดลองใช้สารอะซีแมนแนนรักษาแมวที่ติดเชื้อ FeLV และ FIV พบว่าแมวมีคุณภาพชีวิตดีขึ้น และมีระยะเวลาคงมีชีวิต (survival time) ยาวนานขึ้น (Sheet et al., 1991; Yates et al., 1992) กลไกการต้านเชื้อไวรัสของสารอะซีแมนแนน คาดว่าเป็นผลจากไรโบโคโคไรโบไซม์ที่ผลิตโดยเซลล์แมคโครฟาจ ส่งผลให้เซลล์ที่ผลิตไซโตไคน์เพิ่มจำนวนมากขึ้น และหลังสารต้านไวรัสมากขึ้น (Womble and Helderan, 1992)

สารอะซีแมนแนนกับการต้านเซลล์มะเร็ง (antitumor): เมื่อฉีดสารอะซีแมนแนนเข้าช่องท้องหนูที่ได้รับการปลูกถ่ายเซลล์มะเร็ง พบว่าเซลล์มะเร็งหลายตำแหน่งมีการตายเกิดขึ้น และมีระยะเวลาคงมีชีวิตยาวนานกว่ากลุ่มควบคุม (Peng et al., 1991) นอกจากนี้เมื่อนำมาทดลองใช้กับสุนัขและแมวที่เป็นเนื้องอกที่เกิดขึ้นเอง (spontaneous tumor) ส่งผลให้แมคโครฟาจหลั่งสาร TNF- α , IL-1 และ interferon- γ (Harris et al., 1991) ในปี ค.ศ. 1995 King และคณะทดลองรักษาสุนัขและแมวที่ป่วยเป็นมะเร็งชนิด fibrosarcoma ผลการรักษาเป็นที่น่าพอใจ และไม่พบก้อนเนื้อเกิดใหม่ภายใน 1 ปีต่อมา และมีระยะเวลาคงมีชีวิตยาวนานขึ้น ดังนั้นในปัจจุบันกระทรวงเกษตรของสหรัฐอเมริกา (United State Department of Agriculture; USDA) อนุญาตให้ใช้สารอะซีแมนแนนเป็นอีกทางเลือกหนึ่งหรือเสริมการรักษาเนื้องอกชนิด fibrosarcoma ในสุนัขและแมวได้ ชื่อการค้าว่า CarraVet™ Acemannan Immunostimulant (ข้อมูลจาก Center of Veterinary Biological Product)

สารอะซีแมนแนนกับการเร่งการหายของแผล: สารอะซีแมนแนนออกฤทธิ์กระตุ้นแมคโครฟาจที่อยู่บริเวณบาดแผลหลัง TNF- α และ IL-1 มากขึ้นเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ส่งผลให้พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์ผนังหลอดเลือดเข้ามายังบาดแผลเร็วขึ้น (Bradley, 1998) เซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเจริญเติบโต และเพิ่มจำนวนการสังเคราะห์คอลลาเจนเพิ่มขึ้น (collagen synthesis) คอลลาเจนที่ถูกสร้างขึ้นจะถูกสะสมไว้ในบริเวณดังกล่าว ส่วนเซลล์เยื่อหลอดเลือดจะกำเนิดหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) (Poor et al., 2002) ในปี ค.ศ. 1998 Thomas และคณะทดสอบการเร่งซ่อมแซมแผลของแผ่นเจลปิดแผลที่ผสมสารอะซีแมนแนน (acemannan hydrogel dressing) . เปรียบเทียบกับการปิดแผลด้วยผ้าก๊อซชุบน้ำเกลือ พบว่าแผ่นปิดแผลที่ผสมสารอะซีแมนแนนมีประสิทธิภาพทำให้แผลหายเร็วกว่า นอกจากนี้ในปี ค.ศ. 2005 Dart และคณะนำไปประยุกต์ใช้รักษาบาดแผลในม้า ซึ่งผลการรักษาได้ผลดี

ในปี ค.ศ. 1992 Fogleman และคณะทดสอบความเป็นพิษของสารอะซีแมนแนน โดยทดลองฉีดสารอะซีแมนแนนเข้าทางหลอดเลือด หรือช่องท้องของหนูถีบจักร (mouse) หนูขาว และสุนัขในขนาดยาที่ต่างกัน (ตารางที่ 1) ไม่พบความผิดปกติที่เกิดขึ้นกับหนูขาว และหนูถีบจักรที่รุนแรง แม้จะพบหนู 2-3 ตัวเสียชีวิตก็ตาม แต่คณะผู้ศึกษาคาดว่าสาเหตุการเสียชีวิตน่าจะมีสาเหตุมาจากเทคนิคการฉีดยา หรือเนื้อตายจากการฉีดยา ในสุนัขพบอาการข้างเคียงเพียงเล็กน้อย คือ อาเจียน ความกระตือรือร้นในกิจกรรมลดลง และอุจจาระเหลว ดังนั้นสารอะซีแมนแนน จึงมีความปลอดภัยในการใช้ค่อนข้างสูง

ตารางที่ 1: แสดงสรุปการศึกษาความเป็นพิษแบบเฉียบพลันของสารอะซีแมนแนนที่เคยมีรายงาน (Fogleman et al., 1992)

ชนิดสัตว์	ทางที่ใช้บริหารยา	ขนาดยา(มก./กก.)	ผลที่ได้
หนูถีบจักร	หลอดเลือด	20, 40, 80	ไม่แสดงอาการ, LD50 \geq 80
	ช่องท้อง	100, 200	ไม่แสดงอาการ, LD50 \geq 200
หนูขาว	หลอดเลือด	7.5, 15	ไม่แสดงอาการ, LD50 \geq 15
	ช่องท้อง	25, 50	ไม่แสดงอาการ, LD50 \geq 50
สุนัข	หลอดเลือด	10	อาเจียน ถ่ายเหลว กิจกรรมลดลง อาการเกิดขึ้นภายใน 2-4 ชั่วโมงหลังรับยา
	ช่องท้อง	50	อาเจียน ถ่ายเหลว กิจกรรมลดลง อาการเกิดขึ้นภายใน 2-4 ชั่วโมงหลังรับยา

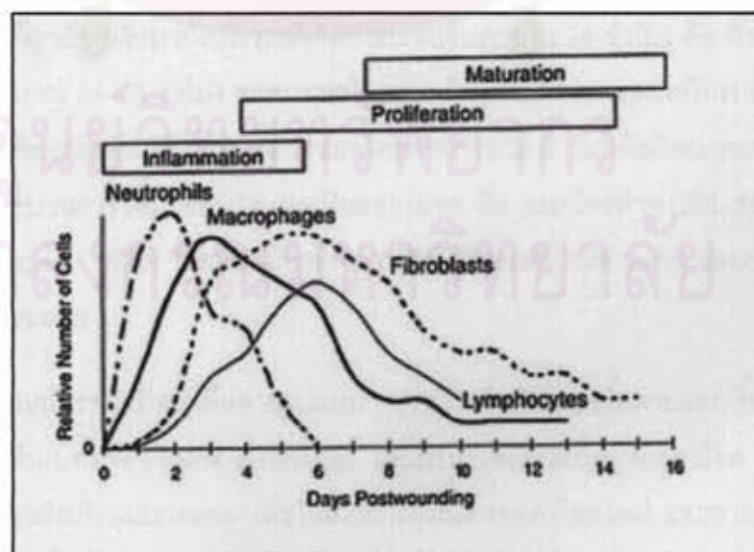
การซ่อมแซมแผลในช่องปาก

ระดับความเสียหายของเนื้อเยื่อในช่องปากอยู่ในระดับมากหรือน้อย ขึ้นอยู่กับสาเหตุของความเสียหาย (Sonis et al., 1978) โดยการรักษาในปัจจุบันที่พบบ่อย คือ การใช้ยาต้านจุลชีพ สารต้านอนุมูลอิสระ ยาลดปวด และยาลดการอักเสบ ซึ่งรูปแบบยาที่ใช้มี 2 รูปแบบ คือ ยาทาเฉพาะที่ และยากิน ยาเหล่านี้จะช่วยบรรเทาความเจ็บปวดได้บางส่วนเท่านั้น ดังนั้นหาก

พัฒนาการรักษาโดยใช้ยาลดการอักเสบร่วมกับยาที่สามารถเร่งการหายของบาดแผลได้ ประสิทธิภาพของการรักษาควรจะเพิ่มขึ้น (Katayama et al., 2000)

ระยะเวลาการซ่อมแซมของแผลที่ผิวหนังและช่องปากจะแตกต่างกัน โดยพบว่าแผลในช่องปากจะหายเร็วกว่า และโอกาสเกิดแผลเป็นน้อยกว่า (Hakkinen et al., 2000 cited by Van Beurden et al., 2005) ทั้งนี้อาจเป็นเพราะในช่องปากประกอบด้วยน้ำลาย เม็ดเลือดขาว growth factors และเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ซึ่งองค์ประกอบต่างๆเหล่านี้ล้วนมีผลต่อการหายของแผล (Van Beurden et al., 2005) คุณสมบัติบางประการของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในเยื่อบุผิวช่องปากดีกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ผิวหนัง ซึ่งอาจเป็นผลจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของเยื่อบุช่องปากมีการแสดงออกของโปรตีน Hepatocyte growth factor (HGF) และ Keratinocyte growth factor (KGF) ในช่วงการซ่อมแซมแผลมากกว่าเซลล์ไฟโบรบลาสต์ของผิวหนัง (Okazaki et al., 2002) แต่อย่างไรก็ตามขบวนการซ่อมแซมบาดแผลที่เกิดขึ้นไม่ว่าตำแหน่งใดก็มีหลักการเดียวกัน

ขบวนการซ่อมแซมบาดแผลมีความซับซ้อนทั้งทางชีวเคมี และบทบาทของเซลล์ที่เข้ามาทำหน้าที่ ขบวนการซ่อมแซมแบ่งเป็น 3 ระยะหลัก (ภาพที่ 6) คือ ระยะการแข็งตัวของเลือดและการอักเสบ (hemostasis and inflammation phase) ระยะการงอกขยาย (proliferation phase) และระยะสุดท้าย คือ ระยะการปรับแต่งบาดแผล (maturation and remodeling) (Witte and Barbul, 1997; Ringler, 1997; Gregory, 1999) โดยในบางระยะจะประกอบด้วยขั้นตอนย่อย เช่น การกำเนิดหลอดเลือดใหม่ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ (fibroplasia) และการเรียงตัวใหม่ของทั้งเซลล์เยื่อผิว และเส้นใยคอลลาเจน (McGrory et al., 2004)



ภาพที่ 6 แสดงกระบวนการซ่อมแซมแผลที่แบ่งออกเป็น 3 ระยะ (Witte and Barbul, 1997)

1. ระยะเวลาแข็งตัวของเลือดและการอักเสบ

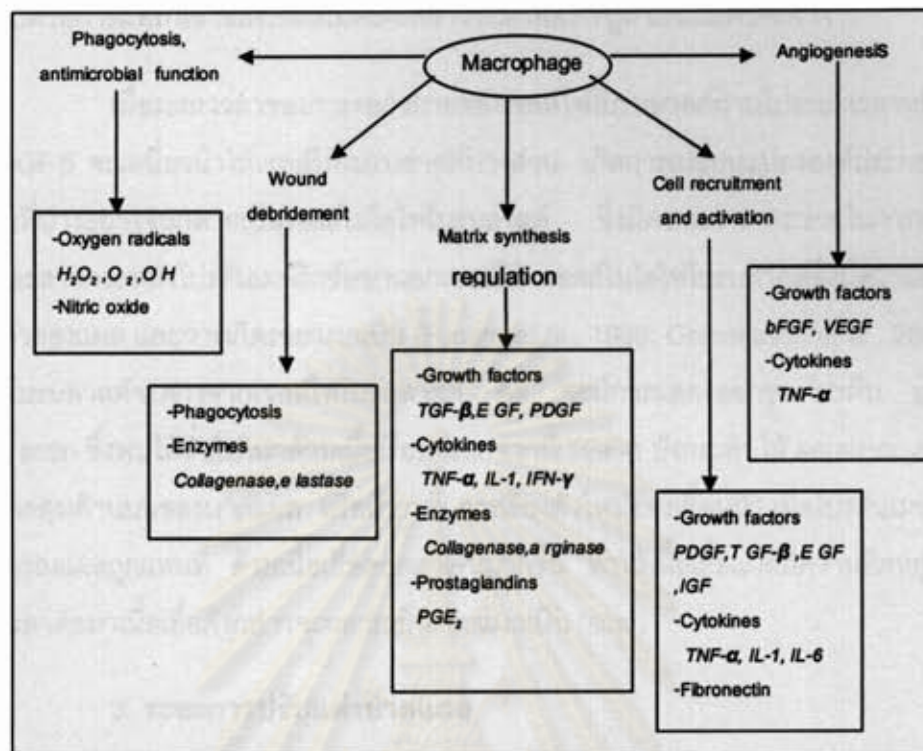
ในระยะแรกของการบาดเจ็บร่างกายจะควบคุมการเสียเลือด โดยกระตุ้นกระบวนการแข็งตัวของเลือด (hemostasis) ทำงาน ภายในหลอดเลือดที่เสียหายเกล็ดเลือดจะจับกับ subendothelial collagen ที่อยู่ใต้เซลล์ผนังหลอดเลือดที่เสียหาย โดยจับผ่านตัวรับจำเพาะที่อยู่บน plasma membrane ของเกล็ดเลือด จากนั้นคอลลาเจนจะส่งสัญญาณให้เกล็ดเลือดเปลี่ยนแปลงรูปร่าง และเริ่มทำงาน (activated platelet) เมื่อเกล็ดเลือดเริ่มทำงาน ตัวรับจำเพาะต่อไฟบริโนเจน (fibrinogen receptor) ที่อยู่บนผนังเซลล์ของเกล็ดเลือดก็เริ่มทำงานเช่นกัน โดยตัวรับดังกล่าวจะทำหน้าที่จับกับไฟบริโนเจน (fibrinogen) ส่งผลให้เกล็ดเลือดกับเกล็ดเลือดจับตัวกันเป็นกลุ่มก้อนมากขึ้น (platelet aggregation) ยิ่งไปกว่านั้นการรวมตัวกันของเกล็ดเลือดยังเหนี่ยวนำให้เกล็ดเลือดหลั่งสารเคมีที่อยู่ภายในอัลฟาแกรนูล (α -granule) ออกมา สารเคมีดังกล่าวจะประกอบไปด้วยไฟบริโนเจน ไฟโบรเนคติน (fibronectin) von Willebrand factor และ thrombospondin สารเหล่านี้ล้วนส่งผลให้เกล็ดเลือดยิ่งรวมตัวกันมากขึ้น จนเกิดเป็นก้อนเลือดอุดรอยฉีกขาดของหลอดเลือด นอกจากนี้ ลาสมาบริเวณรอบหลอดเลือดที่เสียหายมีไฟบริโนเจนเป็นส่วนประกอบเช่นเดียวกัน จึงทำหน้าที่เป็นตัวกระตุ้นให้เกิดการทำงานของกระบวนการแข็งตัวของเลือด ทั้งด้าน extrinsic pathway (มีเนื้อเยื่อฟกช้ำเป็นจุดเริ่มต้นกระบวนการ) และ intrinsic pathway (ไม่ต้องมีเนื้อเยื่อฟกช้ำเป็นจุดเริ่มต้นของกระบวนการ แต่เกิดได้โดยเข้าสู่สัมผัสกับผิววัตถุที่มีประจุลบและเปียกน้ำได้ เช่น ผิวแก้ว หรือ collagen fiber ของผนังหลอดเลือด) จนเกิดเป็นการจับตัวของไฟบริน (fibrin clot) เลือดออกที่เกิดขึ้นที่แผลจะเริ่มหยุดไหล ยิ่งไปกว่านั้นเกล็ดเลือดยังหลั่งสาร platelet growth factor และไซโตไคน์ ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการกระตุ้นให้เซลล์อักเสบเริ่มเข้ามาทำงาน โดยเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่ถูกเรียกเข้ามายังบริเวณที่เกิดการบาดเจ็บภายใน 24 ชั่วโมง คือ นิวโทรฟิล และในระยะต่อมาประมาณ 24-48 ชั่วโมง จะพบแมคโครฟาจ ลิมโฟไซต์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มเข้ามา จำนวนนิวโทรฟิลจะลดลงจนถูกแทนที่ด้วยแมคโครฟาจภายใน 3 วันหลังเกิดบาดแผล เซลล์ที่มีความสำคัญต่อกระบวนการซ่อมแซมบาดแผลเป็นอย่างมาก คือ แมคโครฟาจ (เล็ก, 2548; Cotran et al., 1994; Gregory, 1999) โดยแมคโครฟาจทำหน้าที่เป็นเซลล์ประสานงาน และกระตุ้นให้เริ่มเกิดกระบวนการซ่อมแซม

แมคโครฟาจมีหน้าที่หลายรูปแบบ เช่น เก็บกินเศษเนื้อตายและเชื้อจุลินทรีย์ต่างๆ การสังเคราะห์โปรตีนเมทริกซ์ (matrix synthesis) เหนี่ยวนำให้เซลล์เยื่อหลอดเลือด และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เข้ามายังบริเวณบาดแผล เพื่อให้เกิดการกำเนิดหลอดเลือดใหม่ และการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ หรือที่เรียกว่า เนื้อเยื่อแกรนูลเช่นกัน การทำหน้าที่ประสานงานของแมคโครฟาจใช้การสื่อสารผ่าน

ทางการหลังไฮโดโคโคและ growth factors เพื่อไปกระตุ้นเซลล์ข้างเคียงและแมคโครฟาจเองให้เข้าสู่กระบวนการซ่อมแซม ดังนั้นหากแมคโครฟาจถูกกีดการทำงาน พบว่าการหายของแผลจะไม่สมบูรณ์

ในช่วงแรกของการอักเสบ นิวโทรฟิล และแมคโครฟาจจำเป็นต้องใช้ออกซิเจนเป็นจำนวนมากในการสังดาป เพื่อนำพลังงานมาใช้ในการคงอยู่ของเซลล์ แต่บริเวณบาดแผลมีความเสียหายของหลอดเลือดเกิดขึ้น ทำให้ปริมาณออกซิเจนในเนื้อเยื่อมีปริมาณจำกัด ดังนั้นเมื่อแมคโครฟาจ และนิวโทรฟิลใช้ออกซิเจนเป็นระยะเวลาหนึ่ง จะเกิดภาวะที่ปริมาณออกซิเจนไม่เพียงพอในการสังดาป ดังนั้นเซลล์จะเปลี่ยนมาใช้พลังงานในรูปแบบของการไม่ใช้ออกซิเจน (anaerobic glycolysis) แทน ส่งผลให้ปริมาณกรดแลคติก (lactic acid) ซึ่งเป็นผลผลิตจากการสังดาปแบบไม่ใช้ออกซิเจนเพิ่มสูงขึ้น เมื่อระดับออกซิเจนในเนื้อเยื่อต่ำ (hypoxia) ร่วมกับความเป็นกรดสูง ทำให้แมคโครฟาจสูญเสียความสามารถในการทำงาน จึงจำเป็นต้องส่งสัญญาณ distress signal ออกไปในรูปของ specific growth factors เพื่อให้ระดับออกซิเจนสูงขึ้น โดย growth factors จะเหนี่ยวนำให้เกิดการกำเนิดหลอดเลือดใหม่ และนำเซลล์ชนิดอื่นเข้ามาช่วยแมคโครฟาจสร้างเนื้อเยื่อขึ้นใหม่ ซึ่งจะเริ่มเข้าสู่ระยะถัดไป specific growth factors ที่แมคโครฟาจสร้าง ได้แก่ platelet-derived growth factor (PDGF), vascular endothelial growth factor (VEGF), epidermal growth factor (EGF), fibroblast growth factor (FGF), TGF- β และ TNF- α เป็นต้น (ภาพที่ 7) ไฮโดโคโคและ growth factors ที่มีบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ และซ่อมแซมมากที่สุด คือ IL-1 และ TNF- α (Cotran et al., 1994)

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 7 แสดงสารเคมี growth factors และไซโตไคน์ที่หลังจากเซลล์แมคโครฟาจซึ่งส่งผลให้เกิดกระบวนการซ่อมแซมบาดแผล (Witte and Barbul, 1997)

2. ระยะการงอกขยายของเซลล์

ในระยะการงอกขยายของเซลล์ประกอบด้วยหลายกระบวนการย่อย เช่น การเรียงตัวใหม่ของชั้นเยื่อ (re-epithelialization) การกำเนิดหลอดเลือดใหม่ การสร้างเนื้อเยื่อแกรนูเลชันทดแทนเนื้อเยื่อที่เสียหาย และการเริ่มสะสมเส้นใยคอลลาเจน (collagen deposition) โดยกระบวนการงอกขยายเริ่มเกิดขึ้นประมาณ 24-36 ชั่วโมงหลังเกิดบาดแผล

IL-1 และ TNF- α ที่หลังจากทั้งแมคโครฟาจ และเกล็ดเลือดเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์เยื่อหลอดเลือดเคลื่อนตัวมายังขอบแผลมากขึ้น และแบ่งตัวเพิ่มจำนวนขึ้น โดยมีทิศเคลื่อนตัวจากขอบแผลเข้าสู่จุดศูนย์กลางของแผลมากขึ้น การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จะเกิดควบคู่ไปกับการกำเนิดหลอดเลือดใหม่ ดังนั้นเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่ในระบะนี้จะประกอบด้วยเมทริกซ์ที่เรียงตัวแบบหลวมๆของคอลลาเจน เช่น ไฟโบรเนคติน กรดไฮยาลูโรนิก แมคโครฟาจ เม็ดเลือดขาว เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และหลอดเลือดใหม่ที่กำลังก่อตัว เนื้อเยื่อ

แกรนูเลชั่นเป็นเนื้อเยื่อที่ค่อนข้างมีความต้านทานต่อการติดเชื้อสูง เนื่องจากบริเวณด้านบนของแผล จะเต็มไปด้วยการแทรกเข้าของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดที่มีแกรนูล และแมคโครฟาจ

เมื่อระยะเวลาของการงอกขยายของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ผ่านไประยะเวลาหนึ่ง จะพบว่า TGF- β จะเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์บางส่วน เกิดการเปลี่ยนแปลงองค์ประกอบภายใน และหน้าที่บางอย่างจนกลายเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ซึ่งมีความสามารถช่วยในการหดตัวของแผล และสามารถหลั่งโปรตีนเมทริกซ์ออกนอกเซลล์ได้ เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จึงมีความสำคัญต่อการหดตัวของแผล และการเกิดรอยแผลเป็น (Funato et al., 1999; Comelissen et al., 2000) เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จะต่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ คือ จะมีการแสดงออกของโปรตีน α -smooth muscle actin ซึ่งพบได้ทั่วไปในกล้ามเนื้อ นอกจากนี้ TGF- β ยังกระตุ้นให้ keratinocyte เคลื่อนตัวมาปกคลุมด้านบนของบาดแผล หรือเรียกว่า การเรียงตัวใหม่ของเยื่อบุผิว เมื่อโปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์บริเวณแผลถูกแทนที่ ด้วยเนื้อเยื่อคอลลาเจนมากขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อแผลมีความยืดหยุ่นมากขึ้น และในเวลาต่อมาเนื้อเยื่อดังกล่าวจะกลายเป็นรอยแผลเป็น (scar)

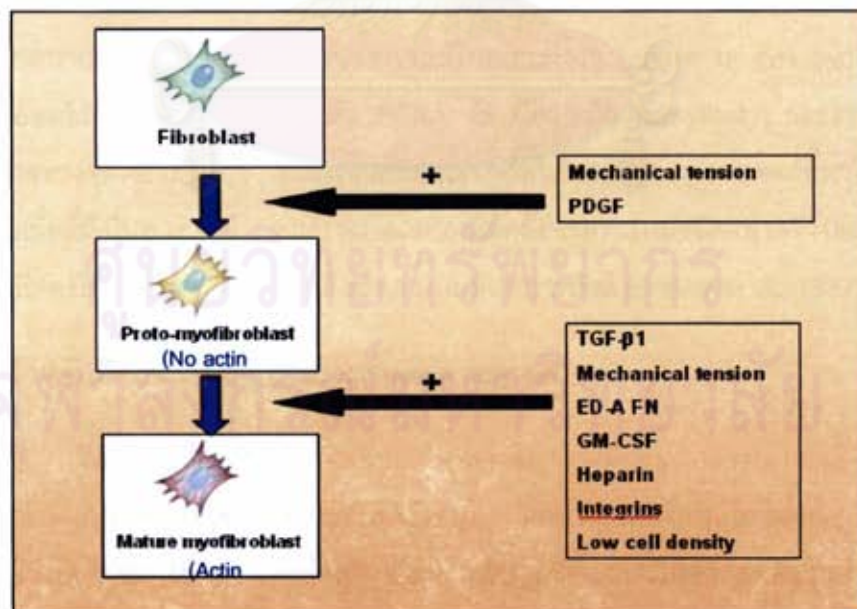
3. ระยะเวลาปรับแต่งบาดแผล

ในระยะเวลาปรับแต่งแผลอาจเริ่มขึ้นเมื่อประมาณวันที่ 15 หลังเกิดบาดแผล และจะดำเนินต่อเนื่องไปอย่างช้าๆ ซึ่งอาจใช้เวลาในการปรับแต่งแผลเป็นเวลานานหลายเดือน หรือเป็นปี โปรตีนเมทริกซ์นอกเซลล์จะเจริญเติบโตเต็มที่และจัดเรียงตัวใหม่ เมื่อการจัดเรียงสิ้นสุดจะเหลือรอยแผลเป็นเกิดขึ้น นอกจากนี้จะพบว่าจำนวนของหลอดเลือดเริ่มลดลง และเกิดการตายแบบอะพ็อพโตซิสของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์มากขึ้น ส่งผลให้ภายในรอยแผลเป็นจะมีเส้นใยคอลลาเจนเป็นจำนวนมาก แต่เหลือโปรตีนเมทริกซ์ และเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพียงเล็กน้อย (Gabbiani, 1994 cited by Van Beurden et al., 2005) การตายแบบอะพ็อพโตซิสของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์เกิดขึ้นโดยการเหนี่ยวนำของ TGF- β และ bFGF (Funato et al., 1999) ดังนั้น TGF- β จึงมีบทบาทสำคัญหลายอย่างในกระบวนการซ่อมแซมแผล ได้แก่ การเหนี่ยวนำให้เซลล์ไฟโบรบลาสต์เปลี่ยนเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ การกระตุ้นให้กำเนิดหลอดเลือดใหม่และร่วมกับ bFGF ในการเหนี่ยวนำเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ตายแบบอะพ็อพโตซิสหลังจากปากแผลปิดสนิท (Funato et al., 1999)

ในช่วงการปรับแต่งแผลรอยแผลเป็นจะมีความแข็งแรงมากที่สุด แต่อย่างไรก็ตามความแข็งแรงอาจเกิดขึ้นเพียง 70 เปอร์เซ็นต์ของความแข็งแรงเนื้อเยื่อเดิมในระยะปกติ (Ringler, 1997; Gregory, 1999) นอกจากนี้ยังพบว่าอัตราความเร็ว คุณภาพ และปริมาณของโปรตีนเมทริกซ์ที่มาสะสมมีผลต่อความแข็งแรงของรอยแผลเป็นเช่นกัน

เซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์กับการหดตัวของแผล

เซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างคล้ายเซลล์ไฟโบรลลาสต์ แต่มีความสามารถในการหดตัวคล้ายเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) เนื่องจากมี actin stress fiber ที่ช่วยในเรื่องการหดตัวและการเคลื่อนที่ของเซลล์ เซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์แบ่งออกเป็น 2 ชนิด ตามระยะการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (ภาพที่ 26) คือ proto-myofibroblasts และ mature myofibroblast โดย proto-myofibroblasts มี actin stress fiber เป็นองค์ประกอบแต่ไม่มีการแสดงออกของโปรตีน smooth muscle actin (SMA) ออกมาในเซลล์ ส่วนเซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์ตัวเต็มวัย (mature myofibroblasts) จะประกอบด้วย actin stress fiber และ fibronexi เป็นจำนวนมาก (van Beurden et al., 2005) และมีการแสดงออกของโปรตีน SMA ภายในเซลล์ ดังนั้นจึงใช้ SMA เป็นเครื่องหมายชี้ความเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์ตัวเต็มวัยที่น่าเชื่อถือที่สุด (Gabbiani, 2004) การเพิ่มจำนวนและการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์ต้องอาศัยการเหนี่ยวนำของ growth factor จำพวก TGF- β 1 เป็นหลัก (Desmoulière et al., 1993) อย่างไรก็ตามการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์พบว่าอาจมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น mechanical tension ของเซลล์ไฟโบรลลาสต์ต่างๆที่มีการเคลื่อนตัวมายังขอบแผล, ED-A FN, GM-CSF, heparin, integrins และ low cell density ดังนั้นจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์จึงไม่ได้ขึ้นอยู่กับปริมาณ TGF- β 1 เท่านั้น แต่เป็นการทำงานร่วมกับปัจจัยอื่นๆด้วย (ภาพที่ 8)



ภาพที่ 8 แสดงปัจจัยที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการในการเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ไฟโบรลลาสต์ไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรลลาสต์; F = fibroblast; Proto-MF = proto-myofibroblast; mature MF = mature myofibroblast; ED-A FN = ED-A (E111A) variant of fibronectin; GM-CSF = granulocyte/ macrophage-colony-stimulating factor (ดัดแปลงจาก van Beurden et al., 2005)

ดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ด้วย Proliferating cell nuclear antigen (PCNA)

Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) เป็นโปรตีนไซคลิน (cyclin) หรือ auxillary protein ของ DNA polymerase - δ ซึ่งเกี่ยวข้องกับการแบ่งตัวของเซลล์ โดยช่วยในการสังเคราะห์และซ่อมแซมดีเอ็นเอ ซึ่งโปรตีน PCNA จะเพิ่มมากขึ้นในเซลล์ที่กำลังเจริญเติบโต (proliferation) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์ในระยะพัก พบทั้งในมนุษย์ (Jain et al., 1991; Gelb et al., 1992) และในสัตว์ (Simoes et al., 1994) โดยจะเริ่มเพิ่มขึ้นในระหว่างระยะ G_1 -phase และเพิ่มสูงขึ้นในระยะ S-phase และค่อยๆ ลดลงในระหว่างระยะ G_2 -M phase ดังนั้นในการย้อมด้วยเทคนิควิธีอิมมูโนฮิสโตเคมี (immunohistochemistry; IHC) เซลล์ที่ให้ผลบวกจะมีความเข้มของสีต่างกัน ตั้งแต่ติดสีอ่อนจนถึงสีเข้มตามระยะในการแบ่งเซลล์ การพบความแตกต่างในลักษณะการติดสีย่อมมาจากความแตกต่างในแต่ละระยะของเซลล์ (Foley et al., 1991) แต่ PCNA ไม่สามารถตรวจพบได้ในเซลล์ที่ยังอยู่ในระยะเริ่ม G_0/G_1 (Giodardo et al., 1991) การย้อมด้วย PCNA จะย้อมติดนิวเคลียสของเซลล์ การเกิดผลบวกมักเกิดขึ้นมากในระยะ G_1/S phase โดย PCNA จับตรงบริเวณ tight junction ของโครมาตินในดีเอ็นเอที่ตำแหน่งกำลังแบ่งตัว และ nucleoplasmic-chromatin-associate โปรตีน PCNA เป็นดัชนีบ่งชี้ถึงการซ่อมแซมดีเอ็นเอและการสังเคราะห์ดีเอ็นเอ (Berges, 1993) ใช้ในการตรวจสอบเซลล์ในขณะที่มีการแบ่งตัว โดยการคำนวณเปอร์เซ็นต์การแบ่งเซลล์จะช่วยบอกระดับความเสียหายของเซลล์ โดยจะเร่งให้เซลล์เข้าสู่ระยะ G_1 phase มากขึ้น แต่ไม่สามารถบ่งบอกถึงการเปลี่ยนแปลงระดับลึกของเซลล์ จะบ่งบอกถึงการซ่อมแซม จึงต้องใช้วิธีที่มีความละเอียดมากในการตรวจการทำงานของเซลล์ในระยะต่างๆ (phase of cell cycle) ข้อดีของเทคนิคการย้อมอิมมูโนฮิสโตเคมีต่อโปรตีน PCNA คือ มีความไว (sensitivity) และรายละเอียดสูงกว่าการตรวจทางจุลพยาธิวิทยา สามารถแยกแยะเซลล์ที่ให้ผลบวกออกจากเซลล์อื่นๆได้ง่าย และย้อมบนเนื้อเยื่อที่ฝังในพาราฟิน รวมทั้งแปลผลโดยใช้กล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างธรรมดาซึ่งต่างกับวิธีอื่นๆ ที่ต้องใช้กล้องฟลูออเรสเซนซ์ หรือสารกัมมันตภาพรังสี (Bravor et al., 1987)

โพลิเมอร์สำหรับยึดเกาะเยื่อ (Mucoadhesive polymer)

โพลิเมอร์สำหรับยึดเกาะเยื่อ คือ สารสื่อกลางที่ผสมกับสารออกฤทธิ์ที่สำคัญ เพื่อทำให้เกิดการยึดเกาะระหว่างสารออกฤทธิ์และเยื่อ โดยโพลิเมอร์มีประโยชน์ต่อการควบคุมการหลั่งของยาให้เป็นไปอย่างช้าๆ และทำให้ยาติดเกาะกับจุดที่ต้องการให้ออกฤทธิ์นานขึ้น โพลิเมอร์เพื่อการยึดเกาะมีอยู่หลายชนิดทั้งแบบสังเคราะห์จากธรรมชาติและสังเคราะห์จากสารเคมี โดยแบ่งตามลักษณะทางเคมี เช่น hydrophilic soluble polymer, hydrogel polymer, thermoplastic polymer และ ion exchange resin (Nangia, 2006)

คาร์โบโพล (Carbopol) เป็น mucoadhesive polymer ชนิดไฮโดรเจล (hydrogel) ที่มีคุณสมบัติละลายในน้ำ สร้างการเชื่อมต่อนระหว่างโพลีเมอร์และสารออกฤทธิ์โดยอาศัยพันธะไฮโดรเจน (hydrogen bond) คาร์โบโพลได้รับความนิยมนำไปใช้ในผลิตภัณฑ์ยาหลายรูปแบบ เช่น swellable tablets, buccal tablets, chewable tablets, effervescent tablets, suppositories และ เจล (Thapa et al., 2005)



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 3 วิธีดำเนินการวิจัย

สัตว์ทดลองที่ใช้ในการศึกษา

หนูขาว (rat) พันธุ์ Sprague-Dawley (สำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ มหาวิทยาลัยมหิดล, นครปฐม) อายุ 9 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 250-280 กรัม จำนวน 80 ตัว หนูแต่ละตัวถูกแยกเลี้ยงบนกรงในห้องควบคุมอุณหภูมิ 25°C ภายใต้แสงสว่าง-มืด (dark-light cycle) 12 ชั่วโมงต่อวัน เลี้ยงด้วยอาหารเม็ดสำเร็จรูป (อาหารสัตว์สำเร็จรูป CP 082) โดยให้อาหาร และน้ำแบบไม่จำกัด (ad libitum) เป็นเวลาอย่างน้อย 3 วัน เพื่อปรับสภาพร่างกายให้เข้ากับสภาพสิ่งแวดล้อม (acclimatization) ก่อนการผ่าตัดสร้างแผลในช่องปาก เก็บบันทึกข้อมูลพื้นฐาน ได้แก่ ปริมาณอาหารและปริมาณน้ำที่กินและดื่มตามลำดับในแต่ละวัน พฤติกรรมทั่วไป ได้แก่ การเดิน การกินอาหาร เป็นต้น

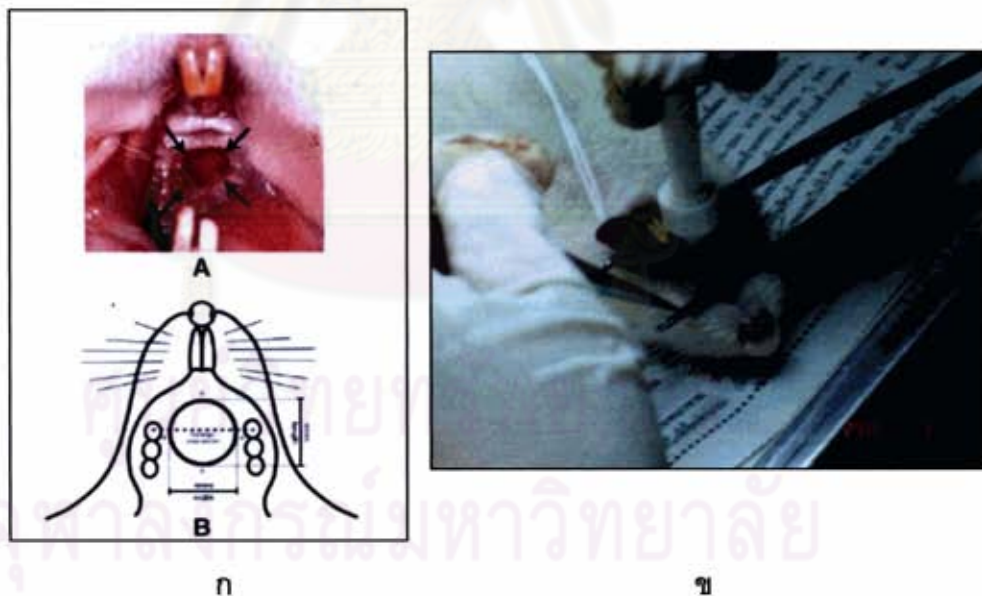
การทดลองได้รับอนุญาตการใช้สัตว์ทดลองเลขที่ 62/2549 จากคณะกรรมการควบคุมดูแลการเลี้ยงและการใช้สัตว์เพื่องานทางวิทยาศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

สารที่ใช้ในการทดลอง

สารอะซีแมนแนนสกัดจากส่วนหัวของว่านหางจระเข้ โดยในการศึกษานี้ได้รับความอนุเคราะห์ การเตรียมสารโดยห้องปฏิบัติการทันตวัสดุศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย สารอะซีแมนแนนที่เตรียมเป็นสารบริสุทธิ์ 100 เปอร์เซ็นต์ โดยการวัดค่าความเข้มข้นหรือความบริสุทธิ์ด้วยเครื่องโครมาโตกราฟฟีแบบแก๊ส (Gas Chromatography; Hewlett-Packard 5970 MSD instrument ด้วยความอนุเคราะห์จาก รศ. ดร. พลกฤษณ์ แสงวานิช ภาควิชาเคมี คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย) สารสกัดได้รับการเตรียมให้อยู่ในรูปแบบเจลที่มีความเข้มข้นของสารอะซีแมนแนน 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ ในเจลสารสื่อผสมคาร์โบโพล โดยความเข้มข้นของสารอะซีแมนแนนที่ใช้ในการทดลองในหนูทดลองนี้ ประเมินจากค่าความเข้มข้นในการทดลองกับเซลล์เพาะเลี้ยงของเซลล์สร้างเส้นใยของเยื่อช่องปาก (fibroblast cell culture) ที่ สารสกัดอะซีแมนแนน สามารถทำให้มีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เพาะเลี้ยงได้ดีที่สุด (Jettanacheaw chankit et al., 2008) จึงนำมาใช้ทดลองในสัตว์ทดลอง

วิธีการผ่าตัดสร้างบาดแผลจำลอง

หนูทุกตัวได้รับการผ่าตัดสร้างแผลในช่องปาก เพื่อจำลองแผลที่เกิดจากการทำ ศัลยกรรมในช่องปาก เช่น การผ่าฟันคุด และการผ่าตัดแก้ไขปากแหว่งเพดานโหว่ เป็นต้น การผ่าตัด สร้างแผลทำบริเวณกึ่งกลางของเพดานแข็ง (hard palate) ตามวิธีการศึกษาของ Oda และคณะ (2004) โดยมีขั้นตอนดังนี้ คือ ทำการชั่งน้ำหนักตัวหนูทดลอง ทำเครื่องหมายบนตัวสัตว์ จากนั้นจึง วางยาสลบด้วยการฉีดยาสลบชนิด Ketamine hydrochloride (Ketalar®, Bioniche, Pharma Ltd, Canada) ขนาด 100 มก./กก. กับ Xylazine hydrochloride (Rompun®, Bayer AG, Germany) ขนาด 10 มก./กก. เข้าทางช่องท้อง (มาริษคักร์, 2544) จัดให้หนูนอนหงาย (dorsal recumbency) ใช้ด้ายขาวทำเป็นเงื่อนแบบหลวมคล้องลิ้นและดึงลิ้นออกมาเบาๆ ทางด้านซ้ายของมุมปาก (ภาพที่ 9) จากนั้นใช้ punch biopsy ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 4 มิลลิเมตร (KRUUSE®, Denmark) กดตัด เยื่อบุเพดานแข็งที่ตำแหน่งระดับหลังฟัน premolar ที่ 1 (รูปที่ 9 ก และ ข) จากนั้นใช้เครื่องมือทาง ทันตกรรมชนิด bone curette (CM 2/4 HU-FRIEDY, USA) ตัดเนื้อเยื่อที่อยู่ภายในวงกลม ทำการ ห้ามเลือดและซับเลือดด้วยเครื่องดูดน้ำลายสุญญากาศ (vacuum suction)



ภาพที่ 9 ก) แสดงภาพถ่ายและภาพวาดของแผลที่ทำขึ้นบริเวณเพดานแข็งของหนูขาว (Oda et al., 2004); ข) แสดงวิธีการสร้างบาดแผลจำลองโดยใช้ punch biopsy

วิธีการทดลองหลังการผ่าตัดสร้างบาดแผลจำลอง การแบ่งกลุ่มและแผนการทดลอง

แบ่งหนูขาว จำนวน 80 ตัว ออกเป็น 5 กลุ่มๆ ละ 16 ตัว เพื่อป้ายแผลด้วยสารหรือ
ยาดังนี้

กลุ่มที่ 1: น้ำกลั่น (กลุ่มควบคุมลบ)

กลุ่มที่ 2: สารสื่อผสมชนิดคาร์โบโพล

กลุ่มที่ 3: เจลอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 4: เจลอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์

กลุ่มที่ 5: ยาป้ายปากในรูปแบบการค้ำ (Kenalog™ in Orabase™) ที่มีสารออกฤทธิ์หลัก คือ ไตรแอมซิโนโลนอะซิโตนด์ 0.1 เปอร์เซ็นต์ (triamcinolone acetonide) (Kenalog®, Bristol-Mayers Squibb, USA)

หนูแต่ละกลุ่มจะได้รับการป้ายแผลด้วยสารวันละ 1 ครั้ง ติดต่อกันนาน 14 วัน โดยการวางยาสลบหนูด้วยยาสลบชนิดสูดดม isoflurane (Aerranne®, Baxter healthcare corporation, Puerto Rico) ในแต่ละวันที่ป้ายแผล เพื่อลดความเครียดและการทรมานสัตว์ในการจับบังคับก่อนการป้ายยาในแต่ละวัน สังเกตและบันทึกอาการทางคลินิก หรือความผิดปกติในหนูทดลองทุกตัว ได้แก่ ปริมาณอาหารที่กิน และปริมาณน้ำที่ดื่ม พฤติกรรม ความเจ็บปวด สีเยื่อเมือก และลักษณะของแผล

ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง สุ่มหนูกลุ่มๆ ละ 4 ตัวต่อวันที่เก็บตัวอย่างทำการปฐมฤมาตด้วยยาสลบ isoflurane เกินขนาด ซึ่งน้ำหนักและบันทึก ชั้นสุตรซาก แยกเก็บตัวอย่างส่วนเพดานปากบนโดยเลาะขากรรไกรล่างออก ถ่ายรูปด้วยกล้องดิจิทัล โดยใช้ไม้บรรทัดที่มีหน่วยความยาวเป็นเซนติเมตร ในการกำหนดขนาดตามความเป็นจริงไว้ในการถ่ายภาพ (ภาพที่ 10)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 10 แสดงตัวอย่างวิธีการถ่ายภาพดิจิทัลเก็บข้อมูลขนาดของแผลจากหนูทดลองกลุ่มป้ายสารอะซีแมนแนนในวันที่ 3 ของการทดลอง

การเก็บตัวอย่างทางพยาธิวิทยา

หลังจากการถ่ายภาพดิจิทัล นำตัวอย่างแช่ในสารละลายบัพเฟอร์ฟอร์มาลิน 10 เปอร์เซ็นต์นานอย่างน้อย 24 ชั่วโมง จากนั้นตัดแต่งแยกส่วนพาดานแข็งที่มีรอยแผล นำไปผ่านกระบวนการละลายแคลเซียมจากกระดูก (decalcification) โดยใช้สารละลาย ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA) 10 เปอร์เซ็นต์ในน้ำกลั่น นาน 14 วัน จากนั้นนำชิ้นเนื้อที่ผ่านกระบวนการละลายแคลเซียมล้างด้วยน้ำสะอาด 2 ครั้งๆละ 10 นาที นำตัวอย่างไปผ่านกระบวนการเตรียมเนื้อเยื่อ (histological process) โดยผ่านกระบวนการดึงน้ำออก (dehydration step) ด้วยแอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นระดับต่างๆ จาก 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ตามลำดับ จากนั้นทำให้นเนื้อเยื่อใส (clearing step) โดยใช้ไซลีน (xylene) และฝังชิ้นเนื้อลงในก้อนพาราฟิน (paraffin embedding step)

การตรวจทางจุลพยาธิวิทยา

นำก้อนพาราฟินที่ฝังตัวอย่างชิ้นเนื้อพาดานแข็งตัวอย่าง ตัดด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ ultramicrotome machine ให้เป็นแผ่นบางหนา 4 ไมครอน นำเนื้อเยื่อที่ตัดวางบนแผ่นสไลด์ ทำการย้อมด้วยสี Hematoxylin and eosin (H&E) โดยมีขั้นตอนการย้อมดังนี้ คือ ละลายพาราฟินออกจากสไลด์เนื้อเยื่อโดยแช่ในไซลีน (deparaffinization) และผ่านกระบวนการนำน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่ออย่างสมบูรณ์ (rehydration) ด้วยการจุ่มสไลด์เนื้อเยื่อลงในแอลกอฮอล์ 100 95 80 และ 70 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ จากนั้นล้างด้วยน้ำกลั่น นำสไลด์เนื้อเยื่อไปย้อมด้วยน้ำยา Meyer's hematoxylin นาน 10 นาที แล้วล้างด้วยน้ำสะอาดนาน 5 นาที จากนั้นย้อมด้วย eosin นาน 4 นาที

ล้างด้วยน้ำปะปานาน 10 นาที จากนั้นเริ่มดึงน้ำออกจากเนื้อเยื่อโดยใช้แอลกอฮอล์ 70 80 95 และ 100 เปอร์เซ็นต์ และไซลินตามลำดับ ผนึกแผ่นเนื้อเยื่อด้วยแผ่นปิดสไลด์ (coverglass) และสารตรึง (permount; mounting step) แล้วนำสไลด์ไปศึกษาด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่างธรรมดา

การตรวจด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี (Immunohistochemical method; IHC)

การศึกษาด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี ใช้แอนติบอดีปฐมภูมิ (primary antibody) 3 ชนิด คือ แอนติบอดีต่อ TGF- β 1, α -smooth muscle actin และ PCNA โดยมีขั้นตอนการเตรียมและย้อม ดังนี้ คือ ตัดเนื้อเยื่อที่ฝังในก้อนพาราฟินหนา 4 ไมครอน นำเนื้อเยื่อที่ตัดวางบนแผ่นสไลด์ที่เคลือบด้วยสาร 3-aminopropyltriethoxysilane (Silane[®], Sigma, USA) 2 เปอร์เซ็นต์ ในอะซิโตน (acetone) อบแห้งก่อนนำสไลด์ไปย้อมต่อไป

เทคนิคการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีต่อ α -smooth muscle actin

นำสไลด์เนื้อเยื่อผ่านขบวนการละลายพาราฟิน และเติมน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อผ่านวิธีการเปิดเผยแอนติเจนด้วยเตาอบไมโครเวฟ กำลัง 1.38 กิโลวัตต์ ด้วยสารละลาย citrate buffer, pH 6 นาน 3 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที ลดปฏิกิริยา endogenous peroxidase โดยแช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย (phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) 3 ครั้งๆละ 5 นาที และลดปฏิกิริยา non-specific antigen ด้วย bovine serum albumin (BSA) 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที บ่มด้วยการหยดแอนติบอดีปฐมภูมิชนิด monoclonal mouse anti-human α -smooth muscle actin antibody ความเข้มข้น 1: 100 (Dako, Denmark) บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดแอนติบอดีทุติยภูมิชนิด biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (KPL, MD, USA) ความเข้มข้น 1:400 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จึงหยดด้วย avidin-biotin complex peroxidase kit (ABC kit, Dako) บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จึงทำให้เกิดสีโดยใส่ในสารละลาย DAB 0.05 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 0.01 M Tris-HCl pH 7.4 หยดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่น และล้างด้วยน้ำปะปา ย้อมทับ (counterstain) ด้วยสี Meyer's hematoxylin นำไปผ่านขั้นตอนดึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์ และไซลินตามลำดับ ผนึกแผ่นเนื้อเยื่อด้วยแผ่นปิดสไลด์และสารตรึง อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

เทคนิคการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีต่อ PCNA

นำสไลด์เนื้อเยื่อผ่านกระบวนการละลายพาราฟินและเติมน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อผ่านวิธีการเปิดเผยแอนติเจนด้วยเตาอบไมโครเวฟ กำลัง 1.38 กิโลวัตต์ (220 volt; 50 Hz) ด้วยสารละลาย PBS นาน 3 นาที ล้างด้วย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที ลดปฏิกิริยา endogenous peroxidase โดยแช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ 0.3 เปอร์เซ็นต์ใน absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที และลดปฏิกิริยา non-specific antigen ด้วย BSA 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที บ่มด้วยการหยดแอนติบอดีปฐมภูมิชนิด monoclonal mouse anti-PCNA antibody (Dako) ความเข้มข้น 1:200 บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดแอนติบอดีทุติยภูมิชนิด biotinylated rabbit anti-mouse IgG antibody (KPL) ความเข้มข้น 1:400 เท่า บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จึงหยดด้วย ABC kit บ่มที่อุณหภูมิ 37°C นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จึงทำให้เกิดสีโดยใส่ในสารละลาย DAB 0.05 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 0.01 M Tris-HCl pH 7.4 หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นและล้างด้วยน้ำปะปา ย้อมทับด้วย Meyer's hematoxylin นำไปผ่านขั้นตอนตึงน้ำออกด้วยแอลกอฮอล์และไซลีนตามลำดับ ผนึกแผ่นเนื้อเยื่อด้วยแผ่นปิดสไลด์และสารตรึง อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

เทคนิคการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมีด้วยแอนติบอดีต่อ TGF-β1

นำสไลด์เนื้อเยื่อผ่านกระบวนการละลายพาราฟินและเติมน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่อ นำเนื้อเยื่อผ่านวิธีการเปิดเผยแอนติเจน (antigen retrieval method) ด้วยเอนไซม์ ProteinaseK 0.1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 8 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 2 ครั้งๆละ 5 นาที ลดปฏิกิริยา endogenous peroxidase โดยแช่ในไฮโดรเจนเปอร์ออกไซด์ (H₂O₂) ความเข้มข้น 0.6 เปอร์เซ็นต์ ใน absolute methanol ที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างด้วยน้ำกลั่น 3 ครั้งๆละ 5 นาที และลดปฏิกิริยา non-specific antigen ด้วย normal goat serum 1 เปอร์เซ็นต์ ที่อุณหภูมิห้อง นาน 20 นาที เท normal goat serum ออกจากสไลด์โดยไม่ต้องล้าง แล้วหยดแอนติบอดีปฐมภูมิชนิด polyclonal rabbit anti-TGF-β1 antibody (Promega, Madison, U SA) ความเข้มข้น 1: 200 บ่มที่อุณหภูมิ 4°C นาน 15 ชั่วโมง ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที หยดด้วย DAKO REAL™ Envision™ Detection System, Peroxidase/DAB⁺/Rabbit/mouse (Dako, Denmark) บ่มที่อุณหภูมิห้อง นาน 30 นาที ล้างด้วยสารละลาย PBS 3 ครั้งๆละ 5 นาที จึงทำให้เกิดสีโดยใส่ในสารละลาย DAB 0.05 เปอร์เซ็นต์ในสารละลาย 0.01 M Tris-HCl pH 7.4 หยุดปฏิกิริยาด้วยน้ำกลั่นและล้างด้วยน้ำปะปา ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin นำไปผ่านขั้นตอนตึงน้ำออกด้วย

แอลกอฮอล์และไซลีนตามลำดับ ผึ่งแผ่นเนื้อเยื่อด้วยแผ่นปิดสไลด์และสารตรึง (permount) อ่านผลด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง

การประเมินผลและวิเคราะห์ข้อมูล

มหาวิทยาลัย

นำภาพถ่ายดิจิทัลของแผลในช่องปากของหนูทุกกลุ่ม จำนวนหาพื้นที่ของแผลด้วยโปรแกรม Scion Image เวอร์ชัน alpha 4.0.3.2 (<http://www.scioncorp.com>) โดยใช้มาตราวัดเป็นหน่วยมิลลิเมตร (ม.ม.) ค่าเฉลี่ยพื้นที่ของแผลเปรียบเทียบในแต่ละกลุ่มกับกลุ่มควบคุมโดยใช้สถิติ one way ANOVA ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

อัตราการหดตัวของแผล (wound closure%) คิดเป็นร้อยละของขนาดแผลที่เกิดขึ้นในวันแรกกับวันที่ทำการวัดขนาดโดยคำนวณจากสูตร (Rajasekaran et al., 2004)

$$\text{Wound closure \%} = \frac{\text{wound area day 0} - \text{wound area day (n)}}{\text{Wound area day 0}} \times 100$$

จุลพยาธิวิทยา

การประเมินผลเชิงพรรณนา (descriptive analysis) และกึ่งเชิงปริมาณ (semi-quantitative analysis) เปรียบเทียบระหว่างกลุ่มทดลอง โดยแบ่งออกเป็นระยะ และความรุนแรงของการอักเสบ ดังนี้ คือ

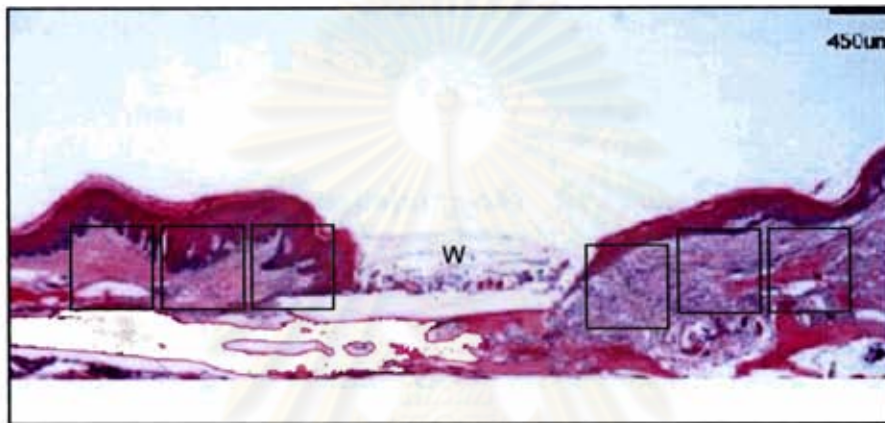
ระยะของการอักเสบ (inflammation stage) แบ่งออกเป็นแบบเฉียบพลัน (acute) เมื่อพบเซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิลมากกว่า 80 เปอร์เซ็นต์ แบบกึ่งเฉียบพลัน (subacute) เมื่อพบเซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล ช่วงระหว่าง 49-79 เปอร์เซ็นต์ร่วมกับโมโนไซต์ หรือแบบเรื้อรัง (chronic) เมื่อพบเซลล์อักเสบส่วนใหญ่เป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดลิมโฟไซต์และเซลล์พลาสมา

ระดับความรุนแรงของการอักเสบ (severity of inflammation) ประเมินจากจำนวนเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ ในระยะของการอักเสบที่แทรกเข้าอย่างอ่อน (mild, น้อยกว่า 50 cells/HPF) ปานกลาง (moderate, 50-100 cells/HPF) หรือรุนแรง (severe, มากกว่า 100 cells/HPF) โดยให้คะแนนความรุนแรงเท่ากับ +1 +2 และ +3 ตามลำดับ

นอกจากนี้ยังมีการประเมินการแทรกเข้าของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และการเรียงตัวใหม่ของเซลล์เยื่อบุผนังมีเกณฑ์การตัดสินคะแนนที่ระบุไว้ในภาคผนวก (Kawalac et al., 2004)

อิมมูโนฮิสโตเคมี

ประเมินผลการย้อมแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด โดยสุ่มนับจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกที่ขอบแผล 2 ด้านๆ ละ 3 บริเวณที่กำลังขยาย 400 เท่าของกล้องจุลทรรศน์แสงสว่างธรรมดา (ภาพที่ 11) โดยการบันทึกภาพด้วยกล้องดิจิทัล แล้วนำไปนับเซลล์ที่ให้ผลบวกติดสีน้ำตาลต่อแอนติบอดีต่อ TGF- β 1, PCNA และ α -smooth muscle actin ในชั้น propria-submucosa รวมทั้งนับเซลล์ที่ชั้นเยื่อ (epithelium) ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA โดยใช้โปรแกรม Adobe® Photoshop CS version 8 (Adope System Incorporated, USA)



ภาพที่ 11 แสดงวิธีการสุ่มพื้นที่ประเมินผลการย้อมทางอิมมูโนฮิสโตเคมี โดยสุ่มพื้นที่ที่ขอบแผลด้านละ 3 บริเวณ (สี่เหลี่ยมจัตุรัส); W = แผล; bar =450 ไมครอน

ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดี α -smooth muscle actin PCNA และ TGF- β 1 คำนวณได้จากการนับจำนวนเซลล์ที่ย้อมติดสีต่อพื้นที่ 1 ตารางมิลลิเมตร (ตร.มม.) นำค่าเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มเปรียบเทียบค่าทางสถิติด้วยวิธี non-paramatic Kruskal-Wallis ที่ระดับความเชื่อมั่น 95 เพื่อหาความแตกต่างระหว่างกลุ่มทดลอง (Sakata et al., 2007)

นำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีทั้ง 3 ชนิด คำนวณหาอัตราเฉลี่ยของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นของแต่ละช่วงเวลาต่อเนื่องในแต่ละกลุ่ม โดยแบ่งออกเป็น 3 ช่วง ดังนี้ ช่วงที่ 1 คือ ระหว่างวันที่ 3-5 ของการทดลอง ช่วงที่ 2 คือ ระหว่างวันที่ 5-7 และช่วงสุดท้าย คือ ระหว่างวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง อัตราเฉลี่ยของเซลล์ที่คำนวณได้นำมาเปรียบเทียบแนวโน้มการเพิ่มขึ้นหรือลดลงของเซลล์ ที่ให้ผลบวกต่อแอนติบอดีที่เกิดขึ้นภายในกลุ่มทดลองเดียวกันในแต่ละช่วงเวลา อภิปรายผลอัตราเฉลี่ยของเซลล์ที่เพิ่มขึ้นที่ได้ร่วมกับค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ เพื่อแสดงให้เห็นถึงการเปลี่ยนแปลงในส่วนอัตราเร่งที่เกิดขึ้น

บทที่ 4

ผลการทดลอง

อาการทางคลินิกและสุขภาพสัตว์ทดลอง

หลังการผ่าตัดสร้างแผลพบว่า ในแต่ละช่วงเวลาหนูทุกตัวสามารถกินอาหารได้ตามปกติ และผลการตรวจสภาพร่างกายโดยทั่วไป พบว่ามีสุขภาพปกติ เยื่อเมือกสีชมพู ขนไม่ฟู และไม่พบการแสดงอาการทางคลินิกใดๆ

ผลการตรวจทางมหาวิทยาลัย

1. ขนาดของแผลจำลอง

ในวันแรกของการสร้างแผลในหนูทุกตัว มีขนาดแผลโดยประมาณเท่ากับ 12.56 ตร.มม. ผลการวัดขนาดแผลหลังการทดลองในวันที่ 3 พบว่า ทุกกลุ่มมีขนาดแผลเฉลี่ยใกล้เคียงกัน (ตารางที่ 2) โดยมีขนาดเฉลี่ยตั้งแต่ 10.65 ± 1.8 ถึง 11.87 ± 1.9 ตร.มม. และไม่มี ความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) รวมถึงค่าเฉลี่ย percent wound closure โดยมีค่าตั้งแต่ 5.51 - 15.19 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีค่าเฉลี่ย percent wound closure สูงสุด โดยมีค่าเท่ากับ 15.19 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มสารสื่อผสมมีค่าต่ำสุดโดยมีค่าเท่ากับ 5.51 เปอร์เซ็นต์ ขณะที่กลุ่มควบคุมลบมีค่าเฉลี่ย percent wound closure เท่ากับ 10.61 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งค่าเฉลี่ย percent wound closure ต่ำสุดของกลุ่มสารสื่อผสมอาจเกิดจากขนาดแผลของหนู 1 ใน 4 ตัวของกลุ่มดังกล่าวมีขนาดใหญ่กว่าวันแรกที่ทำกรสร้างแผล จึงส่งผลต่อค่าเฉลี่ย percent wound closure ที่คำนวณได้

ในวันที่ 5 ของการทดลองพบว่า ทุกกลุ่มมีขนาดแผลเฉลี่ยลดลงเป็นลำดับจากวันที่ 3 ของการทดลอง โดยกลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแผลเล็กที่สุด ซึ่งมีค่าเท่ากับ 7.53 ± 0.8 ตร.มม. และกลุ่มขนาดเล็กลำดับรองลงมา คือ กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ (8.22 ± 0.6) ส่วนกลุ่มสารสื่อผสมเป็นกลุ่มที่มีขนาดแผลเฉลี่ยกว้างที่สุด คือ 9.79 ± 0.7 ตร.มม. กลุ่มควบคุมลบมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 9.14 ± 1.3 ตร.มม. จากการเปรียบเทียบขนาดเฉลี่ยของแต่ละกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$) (ภาพที่ 12, 13, 14) ขนาดแผลที่ลดลงสอดคล้องกับค่าเฉลี่ย percent wound closure โดยกลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์เป็นกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยสูงสุด (40.03) และกลุ่มสารสื่อผสมมีค่าเฉลี่ยต่ำสุด (22.07) อย่างไรก็ตามเมื่อนำมาเปรียบเทียบความแตกต่างระหว่างกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

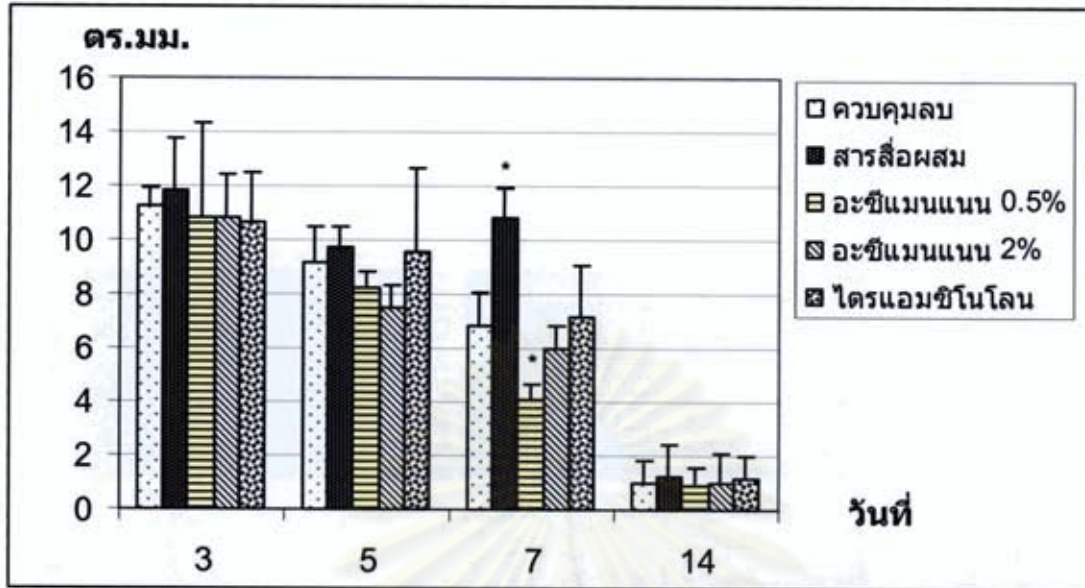
ในวันที่ 7 ของการทดลอง พบกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแผลเฉลี่ยเล็กที่สุด โดยมีขนาดเท่ากับ 4.09 ± 0.6 ตร.มม. และมีค่าเฉลี่ย percent wound closure มากที่สุด (67.4) แต่กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ มีขนาดแผลเล็กเป็นลำดับรองลงมา โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 5.97 ± 0.9 ตร.มม. ส่วนกลุ่มสารสื่อผสมมีขนาดแผลเฉลี่ยกว้างที่สุด โดยมีขนาดเฉลี่ยเท่ากับ 10.84 ± 1.1 ตร.มม. และมีค่าเฉลี่ย percent wound closure เท่ากับ 13.67 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งเป็นค่าต่ำสุดของในวันที่ 7 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบขนาดแผลเฉลี่ยของกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กับกลุ่มสารสื่อผสมพบว่า มีขนาดเล็กกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ในวันที่ 14 ของการทดลอง ขนาดแผลเฉลี่ยและค่าเฉลี่ย percent wound closure ของทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกันและไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 2 แสดงขนาดแผลเฉลี่ย (Mean \pm S.D.) และค่าเฉลี่ย percent wound closure (%) ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง

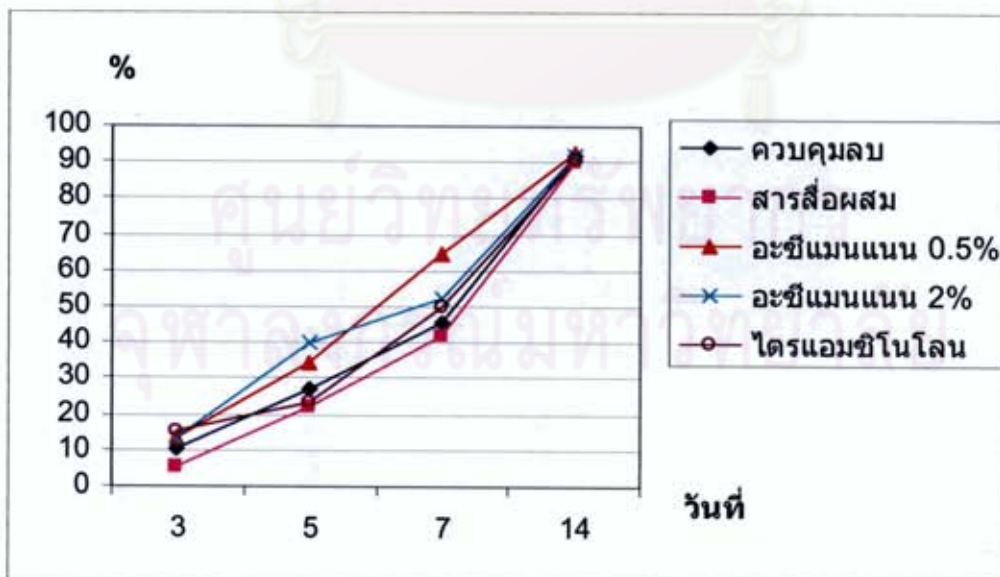
กลุ่ม	ขนาดแผลเฉลี่ย (ตร.มม.) (ค่าเฉลี่ย percent wound closure)			
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 14
ควบคุมลบ	11.23 ± 0.7 (10.6)	9.14 ± 1.3 (27.2)	6.84 ± 1.2 (45.6)	1.01 ± 0.8 (91.9)
สารสื่อผสม	11.87 ± 1.9 (5.5)	9.79 ± 0.7 (22.1)	10.84 ± 1.1^a (13.67)	1.25 ± 1.2 (90.1)
อะซีแมนแนน 0.5%	10.85 ± 3.5 (13.7)	8.22 ± 0.6 (34.6)	4.09 ± 0.6^b (67.4)	0.93 ± 0.6 (92.6)
อะซีแมนแนน 2%	10.82 ± 1.6 (13.9)	7.53 ± 0.8 (40.0)	5.97 ± 0.9 (52.4)	1.02 ± 1.1 (91.9)
ไตรแอมซิโนโลน	10.65 ± 1.8 (15.2)	9.59 ± 3.1 (23.7)	7.15 ± 1.9 (43.1)	1.16 ± 0.8 (90.8)

a,b ตัวอักษรที่ต่างกัน หมายถึง กลุ่มที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

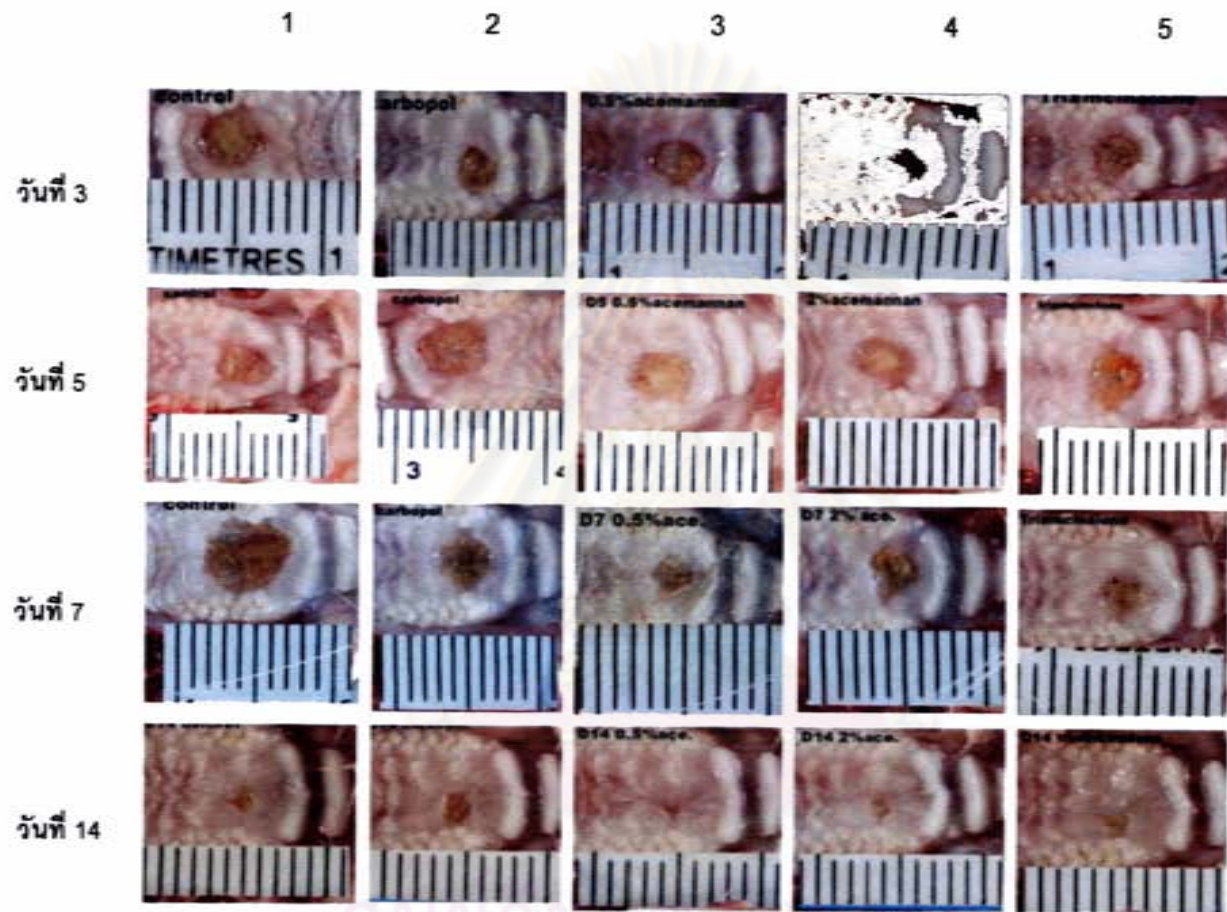


* หมายถึง กลุ่มที่มีความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$)

ภาพที่ 12 แสดงขนาดแผลเฉลี่ยในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง



ภาพที่ 13 กราฟแสดงค่าเฉลี่ย percent wound closure ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง



ภาพที่ 14 แสดงลักษณะทางมหพยาธิวิทยาของแมลงตัวอย่างของแต่ละกลุ่มในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง; 1 = กลุ่มควบคุมลบ; 2 = กลุ่มสารเชื่อมตม; 3 = กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์; 4 = กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์; 5 = กลุ่มไฮรแอมซิโนโลน

2. ผลทางจุลพยาธิวิทยา

ผลการศึกษาทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า การอักเสบที่เกิดขึ้นกับแต่ละกลุ่มใกล้เคียงกัน ทำให้ไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ชัดเจนภายในวันเดียวกันของการทดลอง แต่จะพบความแตกต่างของการอักเสบและการแทรกเข้าของเซลล์ระหว่างช่วงการทดลอง (ภาพที่ 15) โดยรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่าแผลเข้าสู่ระยะการอักเสบ ซึ่งพบเซลล์อักเสบชนิดนิวโทรฟิลเป็นจำนวนมากกระจายตัวบริเวณขอบแผล และเริ่มมีการแทรกเข้าของเซลล์แมคโครฟาจจำนวนเล็กน้อย (ภาพที่ 15ก-ข) ความรุนแรงของการอักเสบพบตั้งแต่ระดับรุนแรงมาก คิดเป็น 70 เปอร์เซ็นต์ของหนูทดลอง 14 ตัว จากจำนวนทั้งหมด 20 ตัว (14/20) จนถึงระดับปานกลาง (moderate) คิดเป็น 30 เปอร์เซ็นต์ (6/20) นอกจากนี้ในระยะดังกล่าว เริ่มมีการแทรกตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์จำนวนปานกลาง บริเวณขอบแผลมากขึ้น เซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่พบส่วนใหญ่เป็นเซลล์ที่ตื่นตัว (active fibroblast) มีรูปร่างคล้ายกระสวย (spindle shape) นิวเคลียสกลมใหญ่ ไซโทพลาสมามีปริมาณน้อยถึงปานกลาง การจัดเรียงตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไม่เป็นระเบียบ แต่เซลล์อยู่กันอย่างหนาแน่น

ในวันที่ 5 ของการทดลอง ทุกกลุ่มมีรอยโรคทางจุลพยาธิวิทยาเริ่มเข้าสู่ระยะการออกขยายของเซลล์โดยพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นจำนวนมาก (ภาพที่ 15ค-ง) มีการกระจายตัวกันเป็นกลุ่ม (cluster) หรือสาย (stream) บริเวณส่วนบนของชั้น propria-submucosa จนถึงบริเวณรอบ periosteum ของกระดูกเพดานแข็ง แต่เซลล์อักเสบลดจำนวนลง ชนิดของเซลล์อักเสบที่พบได้แก่ เซลล์นิวโทรฟิล เซลล์แมคโครฟาจ และลิมโฟไซต์ จึงยังคงเป็นการอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลัน ระดับของความรุนแรงของการอักเสบส่วนใหญ่ลดลง โดยระดับรุนแรงมากพบเพียง 30 เปอร์เซ็นต์ (6/20) รุนแรงปานกลาง 55 เปอร์เซ็นต์ (11/20) และรุนแรงต่ำ 15 เปอร์เซ็นต์ (3/20) โดยการอักเสบระดับต่ำอยู่ในกลุ่มของไครแอมซิโนโลนทั้งหมด (3/20) นอกจากนี้ในวันที่ 5 ของการทดลอง จะเริ่มพบการหนาตัวของเยื่อใยโดยเฉพาะบริเวณขอบแผลชัดเจนมากขึ้น

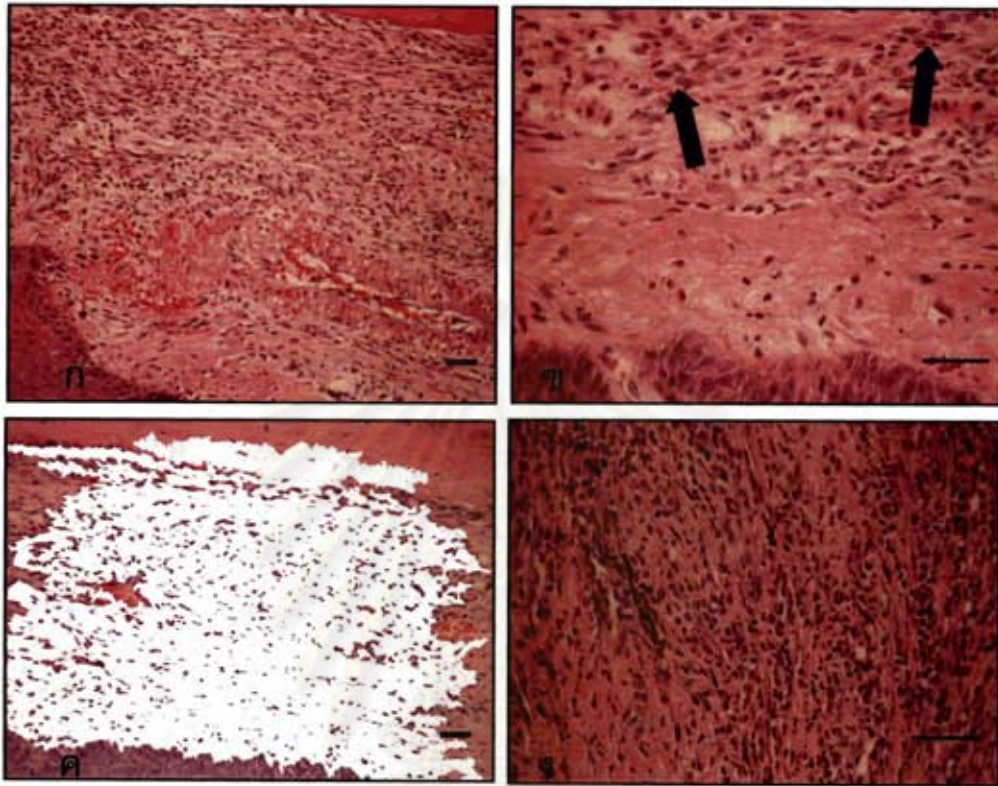
ในวันที่ 7 ของการทดลอง จุลพยาธิวิทยาของแผลพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์เรียงตัวเป็นระเบียบขึ้นโดยเรียงตัวขนาน (parallel) กับชั้นเยื่อใย (ภาพที่ 16ก-ข) ในส่วนของเซลล์เยื่อใยมีการเจริญเติบโตและเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่าวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง โดยเซลล์เยื่อใยในชั้น stratum basale มีการออกขยายคล้ายนิ้ว (papillae) ยื่นลงไปในพื้นที่ propria-submucosa การอักเสบยังคงเป็นแบบกึ่งเฉียบพลันในระดับรุนแรงต่ำโดยคิดเป็น 50 เปอร์เซ็นต์ของหนูทดลอง (10/20) ส่วนระดับรุนแรงปานกลางและมากพบ 30 (6/20) และ 15 (4/20) เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ

นอกจากนี้เริ่มพบการอักเสบแบบเรื้อรัง ในระดับรุนแรงต่ำ 5 เปอร์เซ็นต์ (3/20) และเริ่มพบ re-epithelialization ปิดแผลสมบูรณในหนูกลุ่มควบคุมลบ จำนวน 1 ตัว

ในวันที่ 14 ของการทดลอง แผลส่วนใหญ่มีการลดจำนวนลงของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ แต่มีการสะสมของเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้นในชั้น propria-submucosa (ภาพที่ 16 ค-ง) การอักเสบเป็นแบบเรื้อรัง 70 เปอร์เซ็นต์ (14/20) แต่ยังสามารถพบการอักเสบแบบกึ่งเฉียบพลันได้ในระดับความรุนแรงตั้งแต่มากถึงต่ำ แบ่งออกเป็น ระดับความรุนแรงมาก 25 เปอร์เซ็นต์ ระดับความรุนแรงปานกลาง 15 เปอร์เซ็นต์ และระดับความรุนแรงต่ำ 5 เปอร์เซ็นต์ ตามลำดับ พบการเกิด re-epithelialization ปิดสมบูรณในหนูเพิ่มขึ้น 30 เปอร์เซ็นต์ (6/20) แบ่งเป็นหนูในกลุ่มควบคุมลบ จำนวน 1 ตัว กลุ่มสารสื่อผสม จำนวน 1 ตัว กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 2 ตัว กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ จำนวน 1 ตัว และกลุ่มไตรแอมซิโนโลน จำนวน 1 ตัว

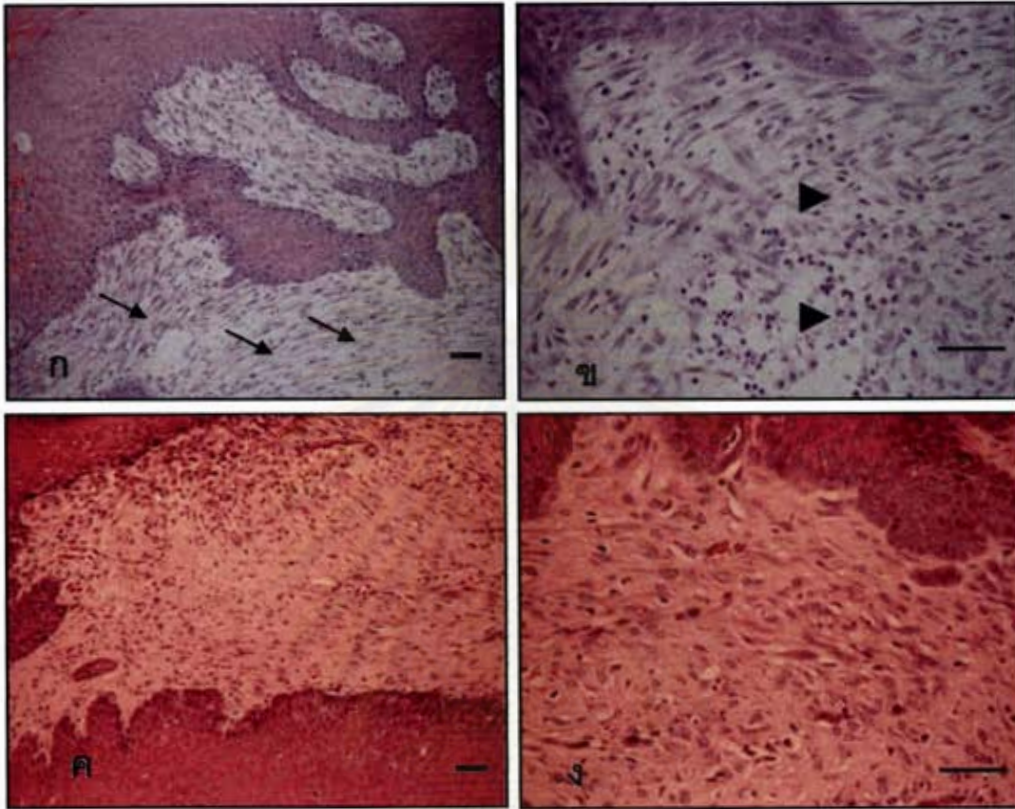


ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 15 แสดงจุลพยาธิวิทยาของหนูกุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง ก-ข) เซลล์อีกเสบส่วนใหญ่เป็นนิวโทรฟิล และเริ่มพบเซลล์ไฟโบรบลาสต์ตื่นตัว (active fibroblasts) (ลูกศรชี้) เข้ามาในบริเวณบาดแผลในวันที่ 3 ของการทดลอง; ค-ง) เซลล์อีกเสบลดจำนวนลง แต่เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีจำนวนเพิ่มขึ้น และเป็นเซลล์หลักที่พบในวันที่ 5 ของการทดลอง (สี H&E; bar = 50 ไมครอน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย



ภาพที่ 16 แสดงจุลพยาธิวิทยาของหนูกกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ในวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง ก-ข) ในวันที่ 7 ของการทดลอง เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีการเรียงตัวใหม่ (ลูกศรชี้) โดยเรียงตัวขนานกับชั้นเยื่อบุผิว และยังมีการแทรกเข้าของเซลล์นิวโทรฟิลเล็กน้อย (หัวลูกศรชี้); ค-ง) ในวันที่ 14 ของการทดลอง เซลล์ไฟโบรบลาสต์และเซลล์อักเสบจำนวนมาก และมีการสะสมของเส้นใยคอลลาเจนปริมาณมาก (สี H&E; bar = 50 ไมครอน)

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

3. ผลการยับยั้งด้วยเทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมี

3.1 ผลการนับจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ด้วยแอนติบอดีต่อ α -smooth muscle actin

ผลการตรวจนับเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จากเซลล์ที่มีรูปร่างเรียวยาว (spindle cell) ที่ย้อมติดสีน้ำตาลของ DAB ในไฟเบอร์และไซโทพลาสซึม (ภาพที่ 17) เซลล์ที่ย้อมติดสีด้วยแอนติบอดีต่อ α -smooth muscle actin ดังกล่าว ถือเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ซึ่งจัดเป็นเครื่องหมาย (marker) ที่น่าเชื่อถือที่สุดในปัจจุบัน (Funato et al., 1999)

ในวันที่ 3 ของการทดลอง ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์สูงสุด คือ กลุ่มควบคุมลบมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 141.61 ± 40.9 เซลล์/ตร.มม (ตารางที่ 3; ภาพที่ 18) และกลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีค่าเฉลี่ยต่ำสุด เท่ากับ 83.94 ± 43.0 เซลล์/ตร.มม เมื่อนำค่าเฉลี่ยทุกกลุ่มมาเปรียบเทียบกันไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แต่ในวันที่ 5 ของการทดลองพบว่ากลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยสูงสุด เท่ากับ 225.24 ± 65.3 เซลล์/ตร.มม โดยค่าเฉลี่ยดังกล่าวใกล้เคียงกับค่าเฉลี่ยของกลุ่มควบคุมลบ (224.64 ± 69.6) เมื่อเปรียบเทียบช่วงระหว่างวันที่ 3-5 ของการทดลอง อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มอะซีแมนแนนเกิดขึ้นเร็วกว่า พบว่ากลุ่มสารอะซีแมนแนนมีอัตราการเพิ่มของจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์เพิ่มมากที่สุด มีค่าเท่ากับ 58.27 เซลล์/ตร.มม./วัน (ตารางที่ 4) ในขณะที่กลุ่มควบคุมลบมีค่าเท่ากับ 41.52 เซลล์/ตร.มม./วัน

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง พบว่าทุกกลุ่มมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากขึ้น โดยกลุ่มสารสื่อผสมเป็นกลุ่มที่มีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์สูงสุด (66.02) แต่ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในช่วงเวลาดังกล่าว มีค่าน้อยกว่ากลุ่มทดลองอื่น โดยกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์สูงสุดในระหว่างวันที่ 5 และ 7 คือ กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ระหว่างกลุ่มทดลองในวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 7 และ 14 ของการทดลองพบว่า เกือบทุกกลุ่มทดลองยังคงมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์มากขึ้น แต่ในวันที่ 14 ของการทดลองกลุ่มควบคุมลบมีค่าเฉลี่ยลดลง นอกจากนี้ในระหว่างวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราเพิ่มจำนวนสูงสุด (60.21) รองลงมา คือ กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มสารอะซีแมนแนนทั้ง 2 กลุ่มกับ

กลุ่มควบคุมพบพบว่า กลุ่มสารอะซีแมนแนนมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์มากกว่ากลุ่มควบคุม แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 3 แสดงค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลอง

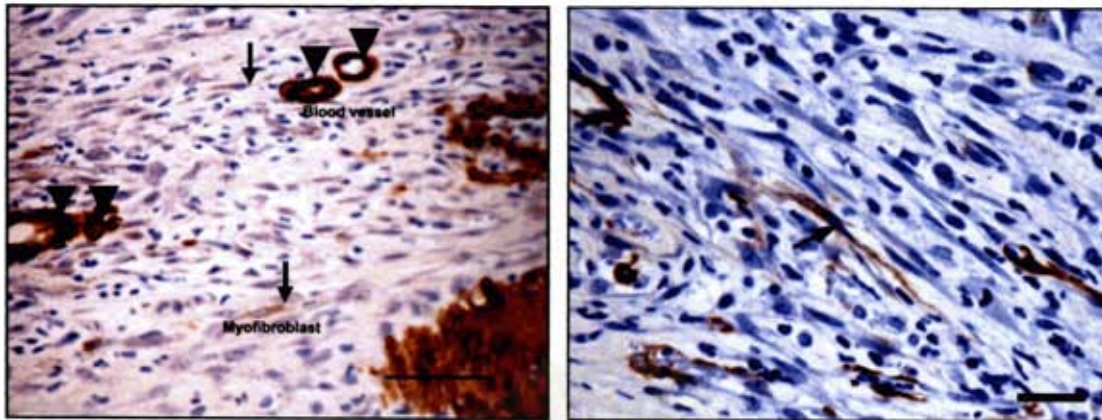
กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (เซลล์/ คร.มม.)*			
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 14
ควบคุม	141.61±40.9	224.64±120.5	353.86±89.6	306.16±257.4
สารที่ผสม	139.49±131.0	118.36±45.8	250.40±91.8	338.57±258.5
อะซีแมนแนน 0.5%	108.70±81.2	225.24±130.6	289.25±112.8	508.05±428.2
อะซีแมนแนน 2%	133.45±108.9	141.30±68.5	228.26±165.3	649.76±425.6
ไตรแอมซิโบลิน	83.94±43.0	169.08±140.9	238.53±139.2	410.63±374.6

* Mean±S.D.; n=4 ตัว/กลุ่ม/วัน

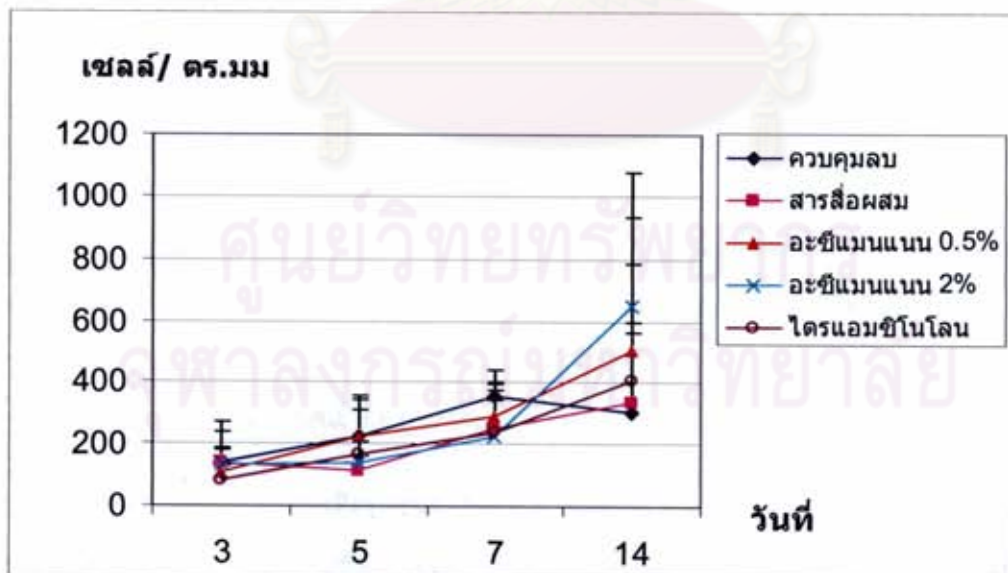
ตารางที่ 4 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์

กลุ่ม	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (เซลล์/ คร.มม./ วัน)*		
	วันที่ 3-5	วันที่ 5-7	วันที่ 7-14
ควบคุม	41.52	64.61	-6.81
สารที่ผสม	-10.57	66.02	12.60
อะซีแมนแนน 0.5%	58.27	32.01	31.26
อะซีแมนแนน 2%	3.93	43.48	60.21
ไตรแอมซิโบลิน	42.57	34.73	24.59

* เครื่องหมายลบแสดงว่าจำนวนเซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนลดลง



ภาพที่ 17 แสดงเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ที่ย้อมติดสีต่อแอนติบอดีต่อ α -smooth muscle actin ของกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5% ในวันที่ 3 ของการทดลอง; ก) แสดงเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (ลูกศรชี้) และหลอดเลือดในชั้น propria-submucosa (หัวลูกศรชี้); bar = 50 ไมครอน; ข) ภาพขยายของการย้อมติดสีในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ (ลูกศรชี้). (วิธี ABC, DAB, ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin; bar = 15 ไมครอน)



ภาพที่ 18 กราฟแสดงจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์เฉลี่ยในช่วงการทดลอง

3.2 ค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวเพิ่มจำนวนด้วย PCNA (Proliferating index)

ผลการศึกษาจำนวนเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวด้วยแอนติบอดีต่อ PCNA เซลล์ที่ให้ผลบวกจะย้อมติดสีน้ำตาลในนิวเคลียส อยู่ในชั้น stratum basale ของชั้นเยื่อ (ภาพที่ 19ก) และเซลล์เยื่อหลุดเลือด เซลล์อักเสบ เซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในชั้น propria-submucosa (ภาพที่ 19ข) ในการประเมินการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA โดยการนับเซลล์แบ่งเป็น 2 ชั้น คือ ชั้นเยื่อ (epithelium) และชั้น propria-submucosa

3.2.1 ผลการศึกษาดัชนีการแบ่งตัวของเซลล์ในชั้นเยื่อ

ผลการนับจำนวนเซลล์เยื่อ และวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เยื่อที่ให้ผลบวกต่อ PCNA ในวันที่ 3 ของการทดลอง พบว่ากลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในชั้นเยื่อมากที่สุดมีค่าเท่ากับ $1,174.52 \pm 613.7$ เซลล์/ ตร.มม (ตารางที่ 5; ภาพที่ 20) กลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์น้อยที่สุดมีค่าเท่ากับ 572.46 ± 252.5 เซลล์/ ตร.มม

ในระหว่างวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง พบว่าเกือบทุกกลุ่มทดลองมีจำนวนเซลล์เยื่อแบ่งตัวเพิ่มขึ้น ยกเว้นกลุ่มสารสื่อผสมที่มีค่าค่อนข้างคงที่ แต่กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบ่งตัวมากที่สุด มีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1,579.71 \pm 613.7$ เซลล์/ ตร.มม รองลงมา คือ กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ กลุ่มไตรแอมซิโนโลน และกลุ่มควบคุมลบตามลำดับ โดยกลุ่มควบคุมมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นต่ำสุด ในวันที่ 5 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ กับกลุ่มควบคุมพบว่ามีค่ามากกว่าอย่างเห็นได้ชัด แต่ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง เกือบทุกกลุ่มทดลองมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อลดลง ยกเว้นกลุ่มควบคุมที่มีค่าเพิ่มขึ้นอย่างรวดเร็ว โดยมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 7 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ $1,172.83 \pm 1,169.70$ เซลล์/ ตร.มม และมีอัตราการเพิ่มจำนวนเท่ากับ 240.20 เซลล์/ ตร.มม/ วัน (ตารางที่ 7)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง พบว่า กลุ่มสารอะซีแมนแนนทั้ง 2 ความเข้มข้น และกลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อเพิ่มขึ้น โดยเฉพาะในกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ที่มีการเพิ่มขึ้นสูงสุด โดยมีอัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์เท่ากับ 109.00 เซลล์/ ตร.มม./ วัน หรือมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในวันที่ 14 ของการทดลองเท่ากับ $1,335.39 \pm 479.50$ เซลล์/ ตร.มม ส่วนกลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ และ

กลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ใกล้เคียงกัน คือ 16.48 เซลล์/ ตร.มม./ วัน และ 16.16 เซลล์/ ตร.มม./ วัน ตามลำดับ ในขณะที่กลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มสารสื่อผสมมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยแต่ละกลุ่มในวันที่ 14 ของการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

จากผลการเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เยื่อแบ่งตัวของแต่ละกลุ่มในวันที่ 3 5 7 และ 14 ของการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

3.2.2 ผลการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ในชั้น propria-submucosa

ผลการนับจำนวนเซลล์แบ่งตัวในชั้น propria-submucosa พบว่าในวันที่ 3 ของการทดลอง กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีค่าเฉลี่ยสูงสุดมีค่าเท่ากับ $1,430.56 \pm 248.30$ เซลล์/ ตร.มม รองลงมาคือกลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ ส่วนกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ต่ำที่สุดคือ กลุ่มไตรแอมซิโนโลน โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 833.94 ± 468.0 เซลล์/ ตร.มม แต่ค่าเฉลี่ยดังกล่าวต่ำกว่ากลุ่มสารสื่อผสมเล็กน้อย (ตารางที่ 6; ภาพที่ 21)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง พบว่ากลุ่มสารสื่อผสมและไตรแอมซิโนโลนมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงขึ้น (ตารางที่ 8) ในขณะที่กลุ่มควบคุมลบและกลุ่มอะซีแมนแนนทั้ง 2 ความเข้มข้นมีจำนวนเซลล์แบ่งตัวลดลง อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของแต่ละกลุ่มในวันที่ 3 และ 5 ของการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง พบว่า กลุ่มสารอะซีแมนแนนทั้ง 2 ความเข้มข้นยังคงมีจำนวนเซลล์แบ่งตัวลดลงอย่างต่อเนื่อง นอกจากนี้ยังพบว่า กลุ่มไตรแอมซิโนโลน และกลุ่มสารสื่อผสมมีค่าเฉลี่ยลดลงเช่นกัน แต่กลุ่มควบคุมลบกลับพบว่ามีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามเมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ในวันที่ 7 ของการทดลองไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 7 และ 14 ของการทดลอง พบว่ากลุ่มสารสื่อผสมและกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ มีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวลดลง แต่กลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เพิ่มขึ้น นอกจากนี้ในกลุ่มควบคุมลบและกลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่ค่อนข้างคงที่ อย่างไรก็ตามพบว่า เมื่อเปรียบเทียบค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์แบ่งตัวในวันที่ 14 ของการทดลองในแต่ละกลุ่มไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p>0.05$)

ตารางที่ 5 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เยื่อที่กำบังแบ่งตัวด้วย PCNA ในชั้นเยื่อ

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่กำบังแบ่งตัว (เซลล์/ คร.มม.)*			
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 14
ควบคุมลบ	572.46±252.5	692.43±293.1	1,172.83±1,169.7	1,160.02±143.4
สารสีผสม	900.72±122.1	930.37± 898.1	882.45±116.5	863.93±549.1
อะซีแมนแนน 0.5%	1,174.52±613.7	1,579.71±613.7	572.46±276.7	1,335.39±479.5
อะซีแมนแนน 2%	878.62±270.2	1,407.00±259.2	771.74±263.7	887.08±562.1
ไครแอมซิโนโลน	730.68±410.5	1,094.20±788.9	1,013.29±640.4	1,126.41±182.2

* Mean±S.D.; n=4 ตัว/กลุ่ม/วัน

ตารางที่ 6 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่กำบังแบ่งตัวด้วย PCNA ในชั้น propria-submucosa

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่กำบังแบ่งตัว (เซลล์/ คร.มม.)*			
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 14
ควบคุมลบ	1,108.70±304.9	665.86±218.49	925.72±427.2	905.19±311.3
สารสีผสม	891.91 ± 339.1	1,198.67±150.0	685.99±593.8	363.61±304.4
อะซีแมนแนน 0.5%	1,430.56±248.3	967.39±418.2	760.87±489.1	654.59±404.8
อะซีแมนแนน 2%	1,137.68±442.6	753.02±294.2	575.48±369.5	752.42±480.2
ไครแอมซิโนโลน	833.94 ±468.0	1,161.23±325.3	961.96±510.5	944.44±206.6

* Mean±S.D.; n=4 ตัว/กลุ่ม/วัน

ตารางที่ 7 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อที่กำลังแบ่งตัวในชั้นเยื่อ

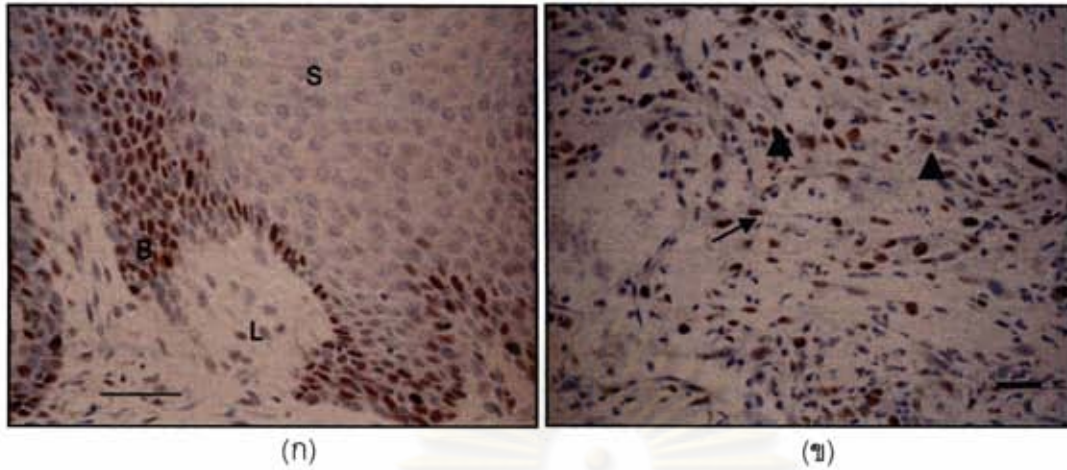
กลุ่ม	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้นเยื่อ (เซลล์/ ตร.มม./ วัน)*		
	วันที่ 3-5	วันที่ 5-7	วันที่ 7-14
ควบคุมลบ	59.99	240.2	-1.83
สารสื่อผสม	14.83	-23.96	-2.65
อะซีแมนแนน 0.5%	202.6	-503.63	109.0
อะซีแมนแนน 2%	264.19	-317.63	16.48
ไตรแอมซิโบลิน	181.76	-40.46	16.16

* เครื่องหมายลบแสดงว่าจำนวนเซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนลดลง

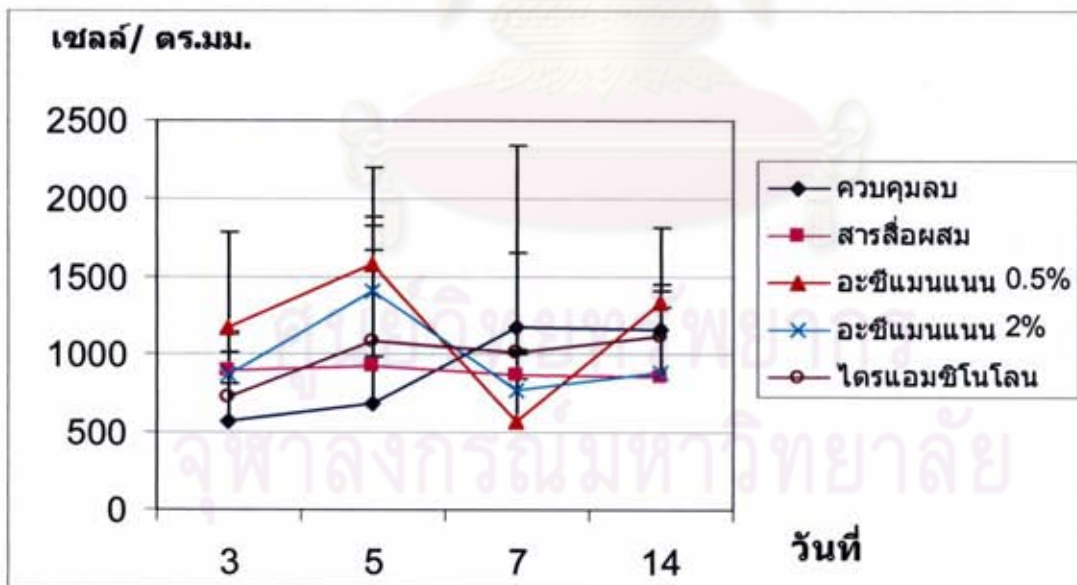
ตารางที่ 8 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในชั้น propria-submucosa

กลุ่ม	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ในชั้น propria-submucosa (เซลล์/ ตร.มม./ วัน)*		
	วันที่ 3-5	วันที่ 5-7	วันที่ 7-14
ควบคุมลบ	-221.42	129.93	-2.93
สารสื่อผสม	153.38	-256.34	-46.05
อะซีแมนแนน 0.5%	-231.59	-103.26	-15.18
อะซีแมนแนน 2%	-192.33	-88.77	25.28
ไตรแอมซิโบลิน	163.65	-99.64	-2.50

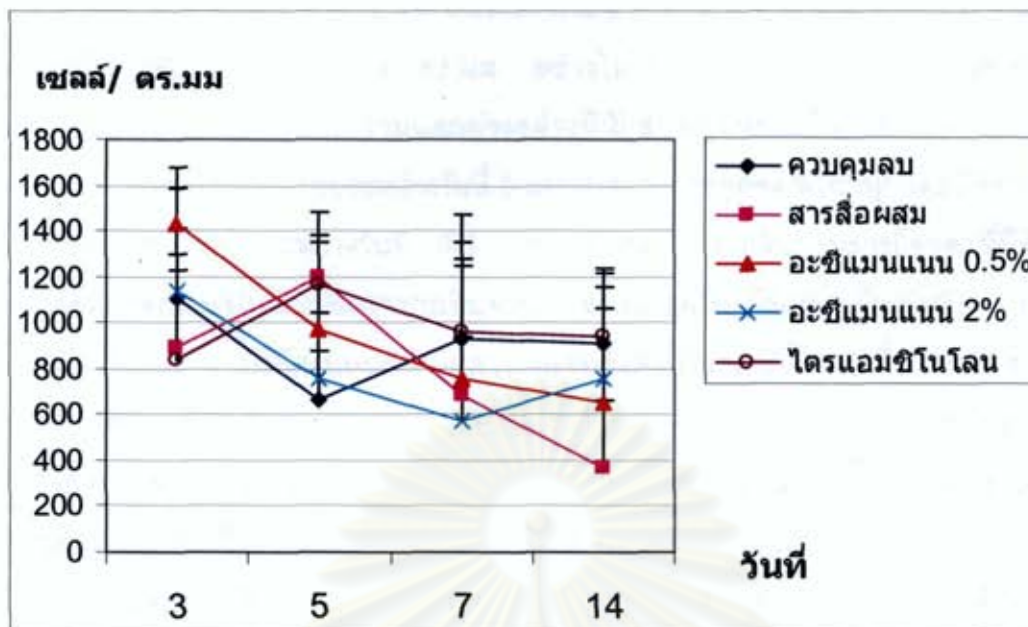
* เครื่องหมายลบแสดงว่าจำนวนเซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนลดลง



ภาพที่ 19 แสดงเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวจำนวนมากด้วยแอนติบอดีต่อ PCNA ของหนูกลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง; ก) เซลล์ในชั้น stratum basale (B) ของชั้นเยื่อที่ย้อมติดสี; S = stratum spinosum; L = lamina propria-submucosa; ข) เซลล์ไฟโบรบลาสต์ (หัวลูกศรชี้), เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ เซลล์เยื่อหลอดเลือด (ลูกศรชี้) ในชั้น lamina propria-submucosa. (วิธี ABC, DAB, ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin; bar = 50 ไมครอน)



ภาพที่ 20 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA ในชั้นเยื่อ



ภาพที่ 21 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ PCNA ในชั้น propria-submucosa

3.3 ผลจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน transforming growth factor (TGF- β 1)

ผลจากการศึกษาเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TGF- β 1 พบการย้อมติดสีน้ำตาลภายในไซโตพลาสซึมของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ เซลล์เยื่อบุหลอดเลือด เซลล์นิวโทรฟิล และ osteoclast ในการประเมินเลือกนับเซลล์ไฟโบรบลาสต์ เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ เซลล์แมคโครฟาจ และเซลล์เยื่อบุหลอดเลือด เซลล์ไฟโบรบลาสต์และแมคโครฟาจตลอดช่วงการทดลองเป็นเซลล์หลักที่พบให้ผลบวก โดยกระจายตัวอยู่ในชั้น propria-submucosa บริเวณขอบแผล (ภาพที่ 22) ส่วนใหญ่พบบริเวณใกล้ periosteum แต่เนื้อเยื่อที่อยู่ถัดจากบริเวณขอบแผลที่มีการอักเสบจะไม่พบเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TGF- β 1

ในวันที่ 3 ของการทดลองพบว่า กลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 มากที่สุด คือ 381.32 ± 106.0 เซลล์/ ตร.มม (ตารางที่ 9; ภาพที่ 23) แต่เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มอื่น ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

จากผลการเปรียบเทียบในระหว่างวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง พบว่ากลุ่มควบคุมลบ กลุ่มอะซีแมนแนน และกลุ่มสารสื่อผสมมีอัตราการเพิ่มขึ้นของเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 เพิ่มขึ้นเล็กน้อย (ตารางที่ 10; ภาพที่ 23) ในขณะที่กลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มไตรแอมซิโนโลน มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ลดลง โดยเฉพาะกลุ่มไตรแอมซิโนโลนที่มีอัตราการลดลงอย่างรวดเร็วเป็นจำนวนมาก ซึ่งพบว่าในวันที่ 5 ของการทดลองกลุ่มไตรแอมซิโนโลนจะมีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ต่ำสุด โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 124.4 ± 76.9

เซลล์/ ตร.มม. แต่กลุ่มควบคุมกลายเป็นกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 5 โดยมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 363.37 ± 157.8 เซลล์/ ตร.มม. อย่างไรก็ตามเมื่อนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของทุกกลุ่มมาเปรียบเทียบ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง พบว่าทุกกลุ่มมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์มากกว่าช่วงระหว่างวันที่ 3-5 ของการทดลอง ยกเว้นกลุ่มสารสื่อผสมที่มีอัตราลดลง โดยกลุ่มไตรแอมซิโนโลนมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดโดยมีอัตราเฉลี่ยเท่ากับ 136.47 เซลล์/ ตร.มม./ วัน แต่อย่างไรก็ตามพบว่ากลุ่มควบคุมยังคงเป็นกลุ่มที่มีค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 มากที่สุด โดยในวันที่ 7 ของการทดลองมีค่าเฉลี่ยเท่ากับ 549.92 ± 146.6 เซลล์/ ตร.มม. เมื่อนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของแต่ละกลุ่มในวันที่ 7 ของการทดลองมาเปรียบเทียบ พบว่าไม่มีความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ผลการเปรียบเทียบระหว่างวันที่ 7 และ 4 ของการทดลอง พบว่าทุกกลุ่มมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์ลดลง ยกเว้นกลุ่มสารสื่อผสมที่เพิ่มขึ้น อย่างไรก็ตามค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ของทุกกลุ่มมีค่าใกล้เคียงกัน โดยมีค่าเฉลี่ยต่ำสุดและสูงสุดเท่ากับ 225.44 ± 127.0 และ 313.16 ± 104.3 เซลล์/ ตร.มม. เป็นของกลุ่มอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ และกลุ่มสารสื่อผสมตามลำดับ และเมื่อนำค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ทุกกลุ่มมาเปรียบเทียบ ไม่พบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$)

ตารางที่ 9 แสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1

กลุ่ม	ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 (เซลล์/ ตร.มม.)*			
	วันที่ 3	วันที่ 5	วันที่ 7	วันที่ 14
ควบคุม	355.07 ± 166.2	363.37 ± 157.8	549.92 ± 146.6	293.40 ± 146.9
สารสื่อผสม	295.89 ± 200.9	309.58 ± 141.7	250.40 ± 24.4	313.61 ± 104.3
อะซีแมนแนน 0.5%	350.24 ± 53.3	223.43 ± 133.6	262.00 ± 85.5	225.44 ± 127.1
อะซีแมนแนน 2%	301.32 ± 133.7	317.23 ± 125.0	370.37 ± 55.1	285.43 ± 134.2
ไตรแอมซิโนโลน	381.32 ± 106.0	124.40 ± 76.9	397.34 ± 257.8	294.28 ± 118.8

* Mean \pm S.D.; n=4 ตัว/กลุ่ม/วัน

ตารางที่ 10 แสดงอัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1

กลุ่ม	อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1 (เซลล์/ ตร.มม./ วัน)*		
	วันที่ 3-5	วันที่ 5-7	วันที่ 7-14
ควบคุมลบ	4.15	93.28	-36.65
สารสื่อผสม	6.85	-29.59	9.03
อะซีแมนแนน 0.5%	-63.41	19.29	-5.22
อะซีแมนแนน 2%	7.96	26.57	-12.13
ไตรแอมซิโบลิน	-128.46	136.47	-14.72

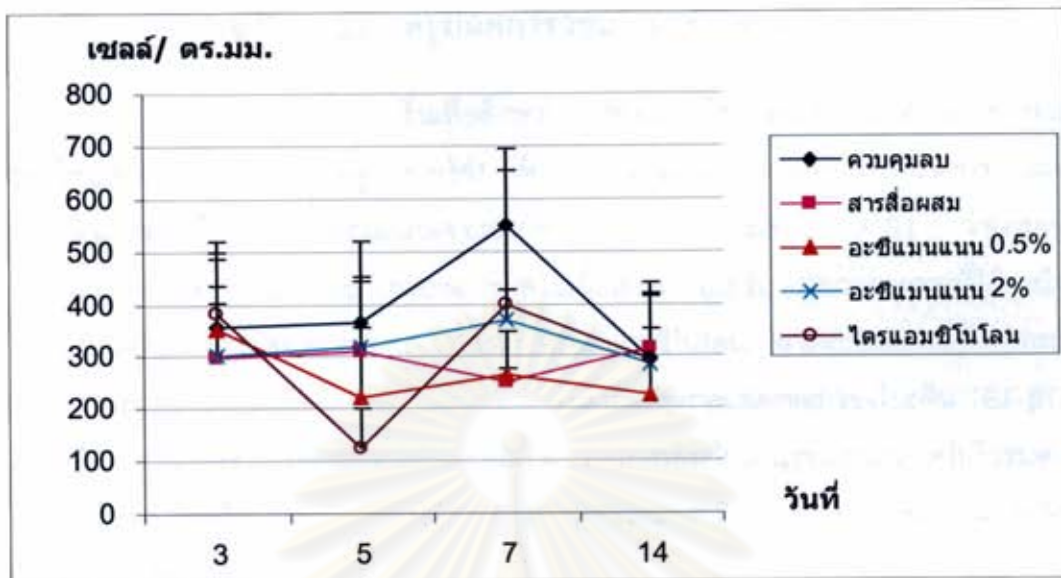
* เครื่องหมายลบแสดงว่าจำนวนเซลล์มีอัตราการเพิ่มจำนวนลดลง



(ก)

(ข)

ภาพที่ 22 แสดงเซลล์ที่ย้อมติดสีด้วยแอนติบอดีต่อ TGF- β 1 ของหนูกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ในวันที่ 3 ของการทดลอง; ก) เซลล์ที่ย้อมติดสีกระจายตัวในชั้น propria-submucosa โดยส่วนใหญ่พบบริเวณใกล้ periosteum (กรอบสี่เหลี่ยม); bar= 300 ไมครอน; U = แผล; P = กระดูกเพดานแข็ง; ข) ภาพขยายจาก (ก) เซลล์ที่ย้อมติดสีส่วนใหญ่เป็นเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และ เซลล์เยื่อหลอดเลือด (ลูกศร). (วิธี DAKO REAL™ Envision™, DAB, ย้อมทับด้วยสี Meyer's hematoxylin; bar = 20 ไมครอน)



ภาพที่ 23 กราฟแสดงค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TGF- β 1

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

บทที่ 5

อภิปรายผล สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

การวิจัยครั้งนี้จัดทำขึ้นเพื่อศึกษา ผลของการใช้สารอะซีแมนแนนในการซ่อมแซมแผลเย็บช่องปาก โดยมีสมมติฐานงานวิจัย คือ สารอะซีแมนแนนสามารถเร่งการหายของแผลได้ดีกว่ากลุ่มทดลองอื่น โดยประเมินผลจากรขนาดแผล ปริมาณของ TGF- β 1 จำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ และการงอกขยายของเซลล์ในเนื้อเยื่อแกรนูเลชัน ผลการทดลองที่ได้จะนำมาเปรียบเทียบกับผลของกลุ่มควบคุมลบ และกลุ่มไตรแอมซิโนโลน สารอะซีแมนแนนมีผลกระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจ และคาดว่าจะส่งผลต่อการแสดงออกของโปรตีน TGF- β 1 ให้เพิ่มสูงขึ้น อีกทั้งอาจส่งผลต่อเนื่องให้เกิดการเหนี่ยวนำ การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ และเมื่อจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในกลุ่มสารอะซีแมนแนนมีมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น จะส่งผลให้การหายของแผลเร็วขึ้น

จากการศึกษาค้นคว้าพบว่า แผลในช่องปากของกลุ่มสารอะซีแมนแนนมีขนาดลดลงเร็วกว่ากลุ่มทดลองอื่น โดยพบความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) ในวันที่ 7 ของการทดลอง และยังพบว่าค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์เย็บที่กำลังแบ่งตัว และค่าเฉลี่ย percent wound closure มีแนวโน้มเพิ่มขึ้นมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น ดังนั้น สารอะซีแมนแนนสามารถออกฤทธิ์เร่งการสมานแผลในช่องปากของหนูทดลองได้ดี โดยเฉพาะในระยะการอักเสบ และระยะการงอกขยายของเซลล์ซึ่งสอดคล้องกับรายงานการใช้สารอะซีแมนแนนที่สามารถเร่งการสมานแผลในสัตว์ชนิดอื่น เช่น แผลที่ผิวหนังของม้า (Dart et al., 2005) แผลเปิดระดับถึงกระดูกบริเวณ metatarsal ที่ 2 ของกระต่าย (Bradley, 1998) และแผลที่ลึ่งเท้า (foot pad) ของสุนัข (Krahwinkel and Boothe, 2006) เป็นต้น

จากงานวิจัยของ Plemon และคณะ ในปี ค.ศ. 1994 พบว่า การนำสารอะซีแมนแนนในรูปแบบยาทาเฉพาะที่สามารถเร่งสมานแผลในช่องปากชนิด recurrent aphthous ulcer ได้ดีกว่ากลุ่มควบคุมที่ใช้เพียงสารสื่อผสมอย่างเดียว (Orabase[®]-plain) โดยแผลจะสมานภายใน 5-6 วันหลังเริ่มใช้ยา ในขณะที่กลุ่มควบคุมใช้เวลาสมานแผล 7-8 วันหลังเริ่มใช้ยา สำหรับการทดลองในครั้งนี้เป็นการนำสารอะซีแมนแนนมาพัฒนาเป็นยาสมานแผลแบบเฉพาะที่ เพื่อรักษาแผลในเย็บช่องปากเช่นกัน โดยสกัดสารอะซีแมนแนนจากว่านหางจระเข้ที่ปลูกในประเทศไทย ซึ่งยังไม่เคยมีการศึกษา ถึงสภาพภูมิอากาศในประเทศไทย ที่อาจส่งผลต่อคุณภาพของสารอะซีแมนแนน จึงจำเป็นต้องได้รับการทดสอบจากหนูทดลองก่อนนำมาใช้จริงในคน แต่จากผลการทดลองแสดงให้เห็นว่า สารอะซีแมนแนนที่ผลิตขึ้นสามารถทำให้แผลมีขนาดเล็กเร็วกว่ากลุ่มทดลอง

อื่น และไม่พบความเป็นพิษของยาต่อเนื้อเยื่อแผล ดังนั้นสารอะซีแมนแนนที่พัฒนาขึ้นสามารถนำไปใช้ประโยชน์ได้จริง

จากผลการทดลองพบว่ากลุ่มสารอะซีแมนแนนทั้ง 2 ความเข้มข้น มีขนาดแผลที่เล็กลงกว่ากลุ่มทดลองอื่นอย่างชัดเจนในระหว่างวันที่ 5 และ 7 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับค่าเฉลี่ย percent wound closure ที่เพิ่มขึ้นในช่วงเวลาดังกล่าว และจากผลการทดลองแสดงว่าสารอะซีแมนแนนออกฤทธิ์เร่งการสมานแผลได้ดีในช่วงต้นของกระบวนการซ่อมแซมแผล สอดคล้องกับการศึกษาของ Krahwinkel และ Boothe ในปีค.ศ. 2006 นอกจากนี้ยังพบว่ากลุ่มที่ใช้สารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ สามารถเร่งการซ่อมแซมแผลได้ดีกว่ากลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ ทั้งนี้จำนวนเซลล์เยื่อบุแบ่งตัวที่มากกว่า ทำให้การเรียงตัวใหม่ของเซลล์เยื่อบุปิดบาดแผลใช้เวลาเร็วขึ้น รวมทั้งจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในวันที่ 3 5 และ 7 ของการทดลองสูงกว่ากลุ่มสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ ซึ่งอาจส่งผลให้เร่งการหดตัวของแผลในช่วงดังกล่าวเกิดขึ้นมากกว่า แต่อย่างไรก็ตาม สำหรับผลการศึกษาด้านความเข้มข้นของสารอะซีแมนแนนต่อความสามารถในการสมานแผลในงานวิจัยครั้งนี้ อาจจะไม่สามารถสรุปผลได้อย่างชัดเจน เนื่องจากลักษณะทางกายภาพของรูปแบบยาเตรียมของสารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ มีความหนืดกว่าความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้ความสามารถในการยึดเกาะกับพื้นผิวเยื่อบุช่องปากลดลงและน้อยกว่า ซึ่งคุณสมบัติการยึดเกาะของสารคาร์โบโพลกับเยื่อบุผิว จำเป็นต้องอาศัยพันธะไฮโดรเจน (Nangia, 2006) แต่สารอะซีแมนแนน 2 เปอร์เซ็นต์ มีส่วนประกอบของโมเลกุลน้ำปริมาณน้อยกว่าสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์ ทำให้มีความสามารถในการยึดเกาะที่ต่ำกว่า ดังนั้นจึงไม่สามารถเปรียบเทียบผลการทดลองของการใช้ขนาดยาที่ต่างกันได้

จากผลการศึกษาของกลุ่มที่ใช้เฉพาะสารสื่อผสมชนิดคาร์โบโพลพบว่า การหายของแผลเกิดขึ้นช้าลงกว่ากลุ่มทดลองอื่น โดยสังเกตได้จากขนาดแผลที่กว้างกว่ากลุ่มทดลองอื่น รวมถึงค่าเฉลี่ย percent wound closure ที่ต่ำกว่าตลอดระยะเวลาของการทดลอง นอกจากนี้การเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ และการแบ่งตัวของเซลล์เยื่อบุในกลุ่มสารสื่อผสมมีจำนวนน้อยกว่ากลุ่มอื่น ซึ่งผลของพารามิเตอร์ต่างๆ แสดงให้เห็นว่าการใช้สารสื่อผสมอย่างเดียวยังมีผลต่อการหายของแผล แต่เมื่อนำสารคาร์โบโพลผสมในสารอะซีแมนแนน ความเข้มข้น 0.5 และ 2 เปอร์เซ็นต์ พบว่าสารทั้ง 2 ชนิดสามารถเข้ากันได้ดี โดยสามารถออกฤทธิ์เร่งการสมานแผลได้ดีกว่าการใช้สารสื่อผสมอย่างเดียว โดยเฉพาะในกลุ่มสารอะซีแมนแนน 0.5 เปอร์เซ็นต์

จากผลการประเมินจุลพยาธิวิทยาของแผลในช่องปากพบว่า ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง เซลล์อักเสบหลัก คือ นิวโทรฟิล และสามารถพบได้จนถึงวันที่ 7 ของการทดลอง หรือบางตัว

ยังคงพบได้ในวันที่ 14 ของการทดลอง ซึ่งหากเป็นแผลที่ผิวหนังจำนวนนิวโทรฟิลจะลดลงตั้งแต่วันที่ 2 ของการอักเสบและอาจถูกแทนที่ด้วยแมคโครฟาจภายใน 3 วันหลังเกิดบาดแผล (เล็ก, 2548; Coutran et al., 1994; Gregory, 1999) แต่กระบวนการซ่อมแซมแผลในช่องปากพบว่า นิวโทรฟิลอาจอยู่ในบาดแผลได้เป็นระยะเวลานานกว่าผิวหนัง (Nooh et al., 2003) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Poor และคณะ (2002) พบว่าการใช้สารอะซีแอมแนนปิดแผล หลังการถอนฟันสามารถลดการอักเสบของกระดูกเบ้าฟันได้ดีกว่ากลุ่มที่ใช้ยาปฏิชีวนะเพียงอย่างเดียวในการปิดแผล แต่ผลที่ได้จากการทดลองครั้งนี้ ไม่พบความแตกต่างของระดับความรุนแรงของการอักเสบระหว่างกลุ่มที่ใช้สารอะซีแอมแนน และกลุ่มควบคุมลบที่ทำการเก็บตัวอย่างภายในวันเดียวกัน อย่างไรก็ตามการประเมินผลทางจุลพยาธิวิทยาไม่พบความแตกต่างระหว่างกลุ่มที่ชัดเจน ภายในวันเดียวกันของการทดลอง แต่จะพบความแตกต่างของการแทรกเข้าของเซลล์ในช่วงระหว่างวันที่ของการทดลอง จึงจำเป็นต้องอาศัยเทคนิคการตรวจวัดความเปลี่ยนแปลงที่เกิดขึ้น ด้วยวิธีอื่นที่สามารถตรวจวัดอย่างละเอียดมากขึ้น เช่น เทคนิคอิมมูโนฮิสโตเคมี ซึ่งในงานวิจัยครั้งนี้เลือกใช้เทคนิคทางอิมมูโนฮิสโตเคมีในการศึกษาจำนวนเซลล์ ได้แก่ เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ เซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในเนื้อเยื่อแผล และเซลล์ที่แสดงออกโปรตีน TGF- β 1

จากผลการศึกษาจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ พบว่าทุกกลุ่มทดลองสามารถพบเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ได้ตั้งแต่วันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งผลที่ได้ไม่แตกต่างจากการทำหน้าที่ของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในช่องปากทั่วไป (Cornelissen et al., 2000) แต่โดยปกติจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์จะมีจำนวนสูงสุดได้ตั้งแต่วันที่ 8 ถึง 14 ของการทดลอง (Funato et al., 1999; Cornelissen et al., 2000) แต่จากการทดลองพบว่ากลุ่มควบคุมลบมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 7 ของการทดลอง หลังจากนั้นจะพบว่ากลุ่มควบคุมลบมีจำนวนลดลง ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มสารอะซีแอมแนนทั้ง 2 ความเข้มข้น กลุ่มไตรแอมซิโนโลน และกลุ่มสารสื่อผสมที่ยังคงมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์อย่างต่อเนื่อง และมีค่าเฉลี่ยสูงสุดในวันที่ 14 ของการทดลอง โดยค่าเฉลี่ยดังกล่าวมีจำนวนมากกว่าค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ของกลุ่มควบคุมลบในวันที่ 7 ของการทดลอง ซึ่งผลการทดลองแสดงให้เห็นว่าแผลที่ได้รับการป้ายยาหรือสารสื่อผสม อาจทำให้เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์สามารถเพิ่มจำนวนมากขึ้น ทั้งนี้อาจเป็นผลจากการออกฤทธิ์ของสารอะซีแอมแนนโดยตรงหรือการปกคลุมแผลของสารสื่อผสมที่ทำให้ลดการระคายเคืองของบาดแผล กระบวนการซ่อมแซมแผลจึงทำหน้าที่อย่างมีประสิทธิภาพมากขึ้น แต่อย่างไรก็ตามยังไม่ทราบกลไกที่แน่ชัดของการเพิ่มจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ในวันที่ 14 ของการทดลอง โดยเฉพาะกลุ่มสารอะซีแอมแนน 2 เปอร์เซ็นต์ที่มีการเพิ่มจำนวนมาก

จากผลการศึกษาการเพิ่มจำนวนของเซลล์ที่กำลังแบ่งตัวในแผลพบว่า กลุ่มสารอะซีแมนแนนมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อบุเร็ววกกลุ่มทดลองอื่น โดยมีอัตราการเพิ่มจำนวนสูงสุดในระหว่างวันที่ 3 และ 5 ของการทดลอง นอกจากนี้ยังพบว่าในวันที่ 3 ของการทดลองค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์แบ่งตัวในชั้น propria-submucosa ในกลุ่มสารอะซีแมนแนนมีจำนวนมากกว่ากลุ่มทดลองอื่น และถือเป็นค่าเฉลี่ยที่สูงสุดของการทดลอง ซึ่งอาจไปได้ว่าสารอะซีแมนแนนสามารถออกฤทธิ์เร่งการเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ ในช่วงตั้งแต่เกิดแผลจนถึงก่อนวันที่ 3 ของการทดลอง ซึ่งสอดคล้องกับรายงานของ Jettanacheawchankit และคณะ (2008) โดยมีการทดลองนำเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยง ที่ได้จากเหงือกผู้ป่วยที่ได้รับการผ่าตัดทางทันตกรรมเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมสารอะซีแมนแนน เปรียบเทียบกับอาหารเลี้ยงเซลล์ธรรมดา เป็นเวลาอย่างน้อย 6 ชั่วโมง พบว่า ใน 24 ชั่วโมง เซลล์เพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ผสมสารอะซีแมนแนนมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ และมีการแสดงออกของโปรตีน keratinocyte growth factor (KGF-1) vascular endothelial growth factor (VEGF) และเส้นใยคอลลาเจนชนิดที่ 1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ

เมื่อวิเคราะห์ผลเปรียบเทียบ อัตราการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ในชั้น propria-submucosa ในกลุ่มสารอะซีแมนแนนมีอัตราการเพิ่มจำนวนเซลล์สูงสุดในวันที่ 3 ของการทดลองและลดจำนวนลงในวันถัดไป ซึ่งแตกต่างจากกลุ่มอื่นที่จะมีค่าเฉลี่ยเพิ่มขึ้นในช่วงระหว่างวันที่ 3-5 หรือระหว่างวันที่ 5-7 ของการทดลอง เมื่อเปรียบเทียบดัชนีการแบ่งตัวระหว่างชั้นเยื่อบุและชั้น propria-submucosa ของกลุ่มสารอะซีแมนแนนมีความแตกต่างค่อนข้างมาก ซึ่งเซลล์เยื่อบุจะมีดัชนีการแบ่งตัวที่สูงกว่า จากผลการทดลองสารอะซีแมนแนนออกฤทธิ์เร่งการสร้างเซลล์เยื่อบุได้โดยตรง อาจเนื่องจากการยึดเกาะของสารสื่อผสมมีประสิทธิภาพที่ดีต่อเซลล์เยื่อบุ หรือการดูดซึมยาเข้าไปในชั้น propria-submucosa อาจยังไม่ดีพอ จึงทำให้การออกฤทธิ์ต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์ยังทำได้ไม่เต็มที่ ผลดังกล่าวแตกต่างจากผลของสารอะซีแมนแนนต่อเซลล์ไฟโบรบลาสต์เพาะเลี้ยงในการศึกษาของ Jettanacheawchankit และคณะ (2008) ดังนั้นสารอะซีแมนแนนสามารถเร่งการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อบุได้ แต่ยังไม่สามารถระบุกลไกการออกฤทธิ์ที่แน่ชัดได้ ซึ่งอาจเป็นผลจาก KGF-1 ที่หลังจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่ได้รับการกระตุ้นจากสารอะซีแมนแนน (Jettanacheawchankit et al., 2008)

ผลการวิจัยหลายเรื่องได้กล่าวถึงความสำคัญของ TGF- β 1 ต่อกระบวนการซ่อมแซมบาดแผล (Desmoulier et al., 1993; Funato et al., 1999; van Beurden et al., 2005; Darby and Hewitson, 2007; McAnulty, 2007) โดยมีหน้าที่เหนี่ยวนำให้เกิดการเพิ่มจำนวนของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเปลี่ยนแปลงคุณสมบัติของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์

ไมโอไฟโบรบลาสต์ ซึ่งหน้าที่หลังสุดอาจทำให้จำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์เพิ่มขึ้นมาก และมีผลต่อการหดตัวของแผล (Desmoulier et al., 1993; Grinnell, 1994; Funato et al, 1999; van Beurden et al., 2005) แต่จากผลการศึกษาในครั้งนี้พบว่าไม่สอดคล้องกับทฤษฎีดังกล่าวเท่าที่ควร โดยค่าเฉลี่ยของจำนวนเซลล์ที่ให้ผลบวกต่อ TGF- β 1 ในทุกกลุ่มมีการเปลี่ยนแปลงขึ้นลง ไม่สัมพันธ์กับค่าเฉลี่ยจำนวนเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ที่เพิ่มขึ้นอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจากผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า TGF- β 1 อาจไม่ได้เป็นปัจจัยหลักที่ทำให้เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่างจากเซลล์ไฟโบรบลาสต์ไปเป็นเซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์ ซึ่งอาจมีปัจจัยอื่นร่วมด้วย เช่น กลไกการเคลื่อนตัวของเซลล์ไฟโบรบลาสต์ที่มายังขอบแผล (mechanical tension) และปริมาณของไฟโบรเนคติน ED-A เป็นต้น (Darby and Hewitson, 2007) ดังนั้นในการทดลองครั้งนี้แสดงว่าสารอะซีแมนแนนไม่มีผลต่อการเพิ่มปริมาณ TGF- β 1

สรุปผลงานวิจัยในครั้งนี้แสดงว่า สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.5 เปอร์เซ็นต์สามารถเร่งการซ่อมแซมแผลได้ดี โดยจะเร่งซ่อมแซมแผลแบ่งเป็น 2 ช่วง คือ ในช่วงระหว่างวันที่ 3-5 ของการทดลอง เกิดจากกระบวนการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อ (epithelization) และในช่วงระหว่างวันที่ 5-7 เป็นการเร่งเพิ่มจำนวนเซลล์ไฟโบรบลาสต์ และเปลี่ยนให้เซลล์ไมโอไฟโบรบลาสต์คงอยู่ในแผลเป็นเวลานานขึ้น ดังนั้นผลการศึกษาประสิทธิภาพของสารอะซีแมนแนนในครั้งนี้ พบว่าได้ผลดี และมีความปลอดภัยสูง จึงอาจใช้เป็นยารักษาแผลในช่องปากอีกทางเลือกหนึ่ง

ข้อเสนอแนะ

จากการศึกษาแผลในช่องปากในการใช้สัตว์เป็นหน่วยทดลอง (experimental unit) พบว่า มีความแตกต่างระหว่างตัวสัตว์ค่อนข้างมาก เนื่องจากมีข้อจำกัดหลายประการ เช่น การตอบสนองต่อยาในหนูแต่ละตัวก็แตกต่างกัน แม้จะได้รับสารชนิดเดียวกัน การทำให้ยายึดเกาะกับเยื่อเป็นเวลานาน จุดสิ่งแวดล้อมในช่องปาก (microenvironment) การจับบังคับสัตว์ เป็นต้น ปัจจัยเหล่านี้ล้วนมีผลกระทบต่อการศึกษาของแผลและส่งผลให้เกิดความแปรปรวนในการทดลองได้ ดังนั้นอาจต้องมีการศึกษาเพิ่มเติม ได้แก่ การเพิ่มจำนวนหนูทดลอง จำนวนครั้งในการป้ายยามากขึ้น การเปลี่ยนสารสื่อผสมที่มีคุณสมบัติการยึดเกาะเพิ่มสูงขึ้น การนำไปใช้ป้ายในช่องปากสุนัขหลังการอุดหินปูน หรือนำมาใช้รักษาแผลในช่องปากของคนไข้ชั้นทดลองเพื่อศึกษาประสิทธิภาพของยาในมนุษย์

รายการอ้างอิง

ภาษาไทย

- เกษร จันทร์ศิริ. 2531. เสถียรภาพของเจลจากต้นว่านหางจระเข้ในประเทศไทยและยาเตรียมขี้ผึ้ง. วิทยานิพนธ์ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต. ภาควิชาเภสัชกรรม คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- เกตุกานต์ นิละทัต, มนวิดา อินทรสันติ. 2546. การตั้งตำรับยาในรูปแบบแผ่นยัดติดเยื่อของปากของ ไตรแอมซิโนโลน อะซิโตไนด์. วิทยานิพนธ์. สาขาวิชาเทคโนโลยีการผลิตยา คณะเภสัชศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.
- จุไรพร สมบุญวงศ์, ศรีัญญา ธนมิตรามณี, อัมพร จาริยะพงศ์สกุล, สุทธิลักษณ์ ปทุมราช. 2543. ผลการรักษาของว่านหางจระเข้ต่อการไหลเวียนเลือดในหลอดเลือดขนาดเล็กของผิวหนัง และการสมานแผลในแบบจำลองแผลไหม้ระดับที่สองในหนูแรท. จดหมายเหตุทางการแพทย์ (J. Med. Assoc. Thai.). 83(4): 417-425.
- มาวิศศักดิ์ กัลล์ประวิทย์. 2544. การวางยาสัตว์ทดลองและสัตว์สวนสัตว์. ใน: การวางยาสลบสัตว์. พิมพ์ครั้งที่ 1. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย. 283-285.
- เล็ก อัครพลชัย. 2548. การซ่อมแซมเนื้อเยื่อ (Repair or Healing). ใน: หนังสือพยาธิวิทยาทั่วไป ทางสัตวแพทย์ (General Veterinary Pathology). พิมพ์ครั้งที่ 3. อนุเทพ รังสีพิพัฒน์ (บรรณาธิการ). กรุงเทพฯ. สนพ.ป๋อยน์กราฟิก. 121-130.
- วิวัฒน์ ก่อกิจ, ลัดดาวัลย์ บุญรัตนกรกิจ, สุธี เวคะวากยานนท์. 2534. การรักษาฝ้าด้วยสารสกัดจาก ใบว่านหางจระเข้. จุฬาลงกรณ์เวชสาร. 35(8): 501-506.
- วิวัฒน์ วิสุทธิโกศา, บวรศิลป์ เชาวชื่น, เขียวภา สุวรรณรัตน์ และวิจิตร บุญพรคนาวิก. 2538. รายงานการศึกษาว่านหางจระเข้ต่อบาดแผลไฟไหม้น้ำร้อนลวก. จดหมายเหตุทางการแพทย์ (J. Med. Assoc. Thai). 78(8): 403-409.
- วรา พาณิชเกรียงไกร, ศิรินทร หยิบโชคอนันต์, ปิยรัตน์ จันทร์ศิริพรชัย. 2547. การใช้ยา A to Z สำหรับสัตวแพทย์. 1,000 เล่ม. พิมพ์ครั้งที่ 2. กรุงเทพฯ: โรงพิมพ์ศิริณสาร.
- ศิริมา มหัทธนาตุลย์. 2537.ฤทธิ์สมุนไพรวานหางจระเข้ในการรักษาโรคแผลในกระเพาะอาหาร. ว. สงขลานครินทร์. 18(1): 49-57.
- สุชาดา ประเสริฐวิทยาการ, ชัยโย ชัยชาญพิทยุทธ. 2541. เจลบัวบกยัดติดเยื่อเมือกในช่องปาก. รายงานผลการวิจัย. กรุงเทพฯ. จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย.

ภาษาอังกฤษ

- Avila, H., Rivero, J., Herrerra, F. and Fraile, G. 1997. Cytotoxicity of a low molecular weight fraction from Aloe vera (*Aloe barbadensis* Miller) gel. Toxicol. 35(9): 1423-1430.

- Berges, M. C. 1993. Comparative aspects of aflatoxin-induced hepatic tumors. *Cancer Res.* 23: 2288-2293.
- Boudreau, M. D. and Beland, F. A. 2006. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (Miller), Aloe vera. *J. Environ. Sci. Health. C. Environ. Carcinog. Ecotoxicol. Rev.* 24(1): 103-154.
- Bradley, D. M. 1998. The effects of topically-applied acemannan on the healing of wounds with exposed bone. (dissertation) Auburn University. 1-24.
- Bravor, J. J., Liebenderg, N. and Joubert, H. J. B. 1987. Histochemical and electron microscopy of acute liver induced by aflatoxin B1 in duckling. *Nature.* 206: 905-908.
- Center of Veterinary Biological Product; United State Department of Agriculture. 2008. "License and permittee." [Online]. Available: www.aphis.usda.gov.
- Chinnah, A. D., Baig, M. A., Tizard, I. R. and Kemp, M.C. 1992. Antigen dependent adjuvant activity of a polydispersed β -(1, 4) - linked acetylated mannan (acemannan). *Vaccine.* 10(8): 551-557.
- Choi, S. and Chung, M. H. 2003. A review on the relationship between *Aloe vera* components and their biologic effects. *Semi. Integrat. Med.* 1(1): 53-62.
- Coats, B. C. and Ahola, R. 1979. Aloe vera the silent healer. A modern study of aloe vera. Dallas: Bill C. Coats. 1: 288-294.
- Cornelissen, A. M. H., Stoop, R., Von den Hoff, H. W., Maltha, J. C. and Kuijpers-Jagtman, A. M. 2000. Myofibroblasts and matrix components in healing palatal wounds in the rat. *J. Oral Pathol. Med.* 29: 1-7.
- Cotran, R. S., Kumar, V. and Robbin, S. L. 1994. Chapter three: Inflammation and Repair. In: Robbins: Pathologic basis of disease. W.B. Saunders company. 5th ed. Philadelphia. 51-92.
- Darby, I. A. and Hewitson, T. D. 2007. Fibroblast differentiation in wound healing and fibrosis. *Inter. Rev. Cyto.* 257: 143-179.
- Dart, A. J., Dowling, B. A. and Smith, C. L. 2005. Topical treatments in equine wound management. *Vet. Clin: North. Am. (Equine Pract).* 21(1): 77-89.
- Desmoulière, A., Geinoz, A., Gabbiani, F. And Gabbiani, G. 1993. Transforming Growth Factor- β 1 induces α -smooth muscle actin expression in granulation tissue

- myofibroblasts and in quiescent and growing cultured fibroblasts. *J. Cell Biol.* 122(1): 103-111.
- Djeraba, A. and Quere, P. 2000. *In vivo* macrophage activation in chickens with acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Int. J. Immunopharmacol.* 22: 365-372.
- Femenia, A., Garcia-Pascual, P., Simal, S. and Rossello, C. 2003. Effects of heat treatment and dehydration on bioactive polysaccharide acemannan and cell wall polymer from *Aloe barbadensis* Miller. *Carbohydr. Polymers.* 51: 397-405.
- Fogleman, R. W., Chapdelaine, J. M., Carpenter, R. H. and McAnalley, B. H. 1992. Toxicologic evaluation of injectable acemannan in the mouse, rat and dog. *Vet. Hum. Toxicol.* 34(3): 201-205.
- Foley, D. and Hall, P. A. 1991. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology.* 21: 591-594.
- Fujisawa, K., Miyamoto, Y. and Nagayama, M. 2003. Basic fibroblast growth factor and epidermal growth factor reverse impaired ulcer healing of the rabbit oral mucosa. *J. Oral Pathol. Med.* 32(6): 358-366.
- Funato, N., Moriyama, K., Baba, Y. and Kuroda, T. 1999. Evidence for apoptosis induction in myofibroblasts during palatal mucoperiosteal repair. *J. Dent. Res.* 78(9): 1511-1517.
- Gabbiani, G. 2004. The evolution of the myofibroblast concept: a key cell for wound healing and fibrotic diseases. *G. GERONTOL.* 52: 280-282.
- Garnick, J. J., Singh, B. and Winkley, G. 1998. Effectiveness of a medicament containing silicon dioxide, aloe, and allantoin on aphthous stomatitis. *Oral Surg. Oral Med. Oral Radiol. Endod.* 86(5): 550-556.
- Gelb, K., Young, W. and Victor, G. S. 1992. Nutrition benefaction and alleviation of aflatoxicosis in chicken meat eggs by dietary supplementation of mannans oligosaccharide. Agricultural Research Center, Prairie view A&M University. 2: 15-17.
- Giodardo, G. D., Carson, T. L., Buck, W. B. and Gelder, G. A. 1991. Aflatoxicosis. *Diagnostic Veterinary Toxicology.* 3rd ed. Carson T. L. (ed). New York: Kendall/hunt Publishing Co. 405-418.

- Gregory, C. R. 1999. Wound Healing and Influencing Factors. In: Manual of canine and feline wound management and reconstruction. Fowler, D. and Williams, J. M. (editor). 1st ed. U.K.: 13-23.
- Grinnell, F. 1994. Mini-Review on the cellular mechanisms of disease: fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J. cell biol.* 124(4): 401-404.
- Harris, C., Pierce, K., King, G., Yates, K. M., Hall, J. and Tizard, I. 1991. Efficacy of acemannan in treatment of canine and feline spontaneous neoplasms. *Mol. Biother.* 3(4): 207-213.
- Jain, S. H. and Hurwitz, J. 1991. Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase delta, proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 87(15): 672-676.
- Jettanacheawchankit, S., Sasithanasate, S., Sangvanich, P., Banlunara, W. and Thunyakitpisal, P. 2008. Acemannan stimulates GFs proliferation, KGF-1, VEGF expressions and wound healing. *International Association for Dental Research*. [Online]. Available: <http://iadr.confex.com/iadr/search.epl>
- Kahlon, J. B., Kemp, M. C., Yawei, N., Carpenter, R. H., Shannon, W. M. and McAnalley, B. H. 1991. In vitro evaluation of the synergistic antiviral effects of acemannan in combination with azidothymidine and acyclovir. *Mol. Biother.* 3(4): 214-223.
- Karaca, K., Sharma, J. M. and Nordgen, R. 1995. Nitric Oxide production by chicken macrophages activated by acemannan, A complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Int. J. Immunopharmacol.* 17(3): 183-188.
- Katayama, S., Nishizawa, K. and Hirano, M. 2000. Effect of polalrezinc on healing of acetic acid-induced stomatitis in hamsters. *J. Pharm. Pharm. Sci.* 3(1): 114-117.
- Kawalac, J. S., Hetherington, V. J., Pfennigwerth, T. C., Dockery, D.S. and Dolce, M. 2004. Effect of a Diode Laser on wound healing by using diabetic and nondiabetic mice. *J. Foot Ankle Surg.* 43 (4): 214-220.
- King, G. K., Yates, K. M., Greenlee, P. G., Pierce, K. R., Ford, C. R., McAnalley, B. H. and Tizard, I. R. 1995. The effect of acemannan Immunostimulant in combination with surgery and radiation therapy on spontaneous canine and feline fibrosarcomas. *J. Am. Anim. Hosp. Assoc.* 31(5): 439-447.

- Krahwinkel, D. J. and Boothe, H. W. 2006. Topical and systemic medications for wounds. *Vet. Clin. Small Anim.* 36: 739-757.
- Krishnan, P. 2006. The scientific study of herbal wound healing therapies: Current state of play. *Current Anesthesia & Critical Care.* 17: 21-27.
- Lee, J. K., Lee, M. K., Yun, Y. P., Kim, Y., Kim, J. S., Kim, Y. S., Kim, K., Han, S. S. and Lee, C. K. 2001. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int. J. Immunopharmacol.* 1: 1275-1284.
- Matinez-Pomaraz, L. and Gordon, L. 1999. Short communication: Potential role of the mannose receptor in antigen transport. *Immuno. Letter.* 65: 9-13.
- McAnulty, R. J. 2007. Fibroblasts and myofibroblasts: Their source, function and role in disease. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 39: 666-671.
- McGrory, K., Flaitz, C. M. and Klein, J. R. 2004. Chemokine changes during oral wound healing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 324: 317-320.
- Nangia, A. 2006. "Bioadhesives for targeted oral drug." [Online]. Available : http://www.drugdeliveryreport.com/articles/ddr_s2006_article08.pdf
- National Institutes of Health (NIH). 2007. Chemical database. "[Online]". Available: www.niaid.nih.gov.
- Nelson, R. W. and Couto, C. G. 1998. Disorders of the oral cavity, pharynx, and esophagus. In: *Small Animal Internal Medicine*. 2nd ed. Mosby, Inc. 410-412.
- Ni, Y., Turner, D., Yates, K.M. and Tizard, I. 2004. Isolation and characterization of structural components of *Aloe vera* L. leaf pulp. *Int. J. Immunopharmacol.* 4 (14): 1745-1755.
- Nooh, N. 2003. Healing is delayed in oral compared to dermal excisional wounds. *J. Periodontol.* 74(2): 242-246.
- Oda, Y., Kagami, H. and Ueda, M. 2004. Accelerating effects of basic fibroblast growth factor on wound healing of rat palatal mucosa. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 62 (1): 73-80.
- Okazaki, M., Yoshimura, K., Uchida, G. and Harii, K. 2002. Elevated expression of hepatocyte and keratinocyte growth factor in cultured buccal-mucosa-derived

- fibroblasts compared with normal-skin-derived fibroblasts. *J. Dermatol. Sci.* 30 (2): 108-115.
- Peng, S. Y., Norman, J., Curtin, G., Corrier, D., McDaniel, H.R. and Busbee, D. 1991. Decreased mortality of Norman murine sarcoma in mice treated with the immunomodulator, Acemannan. *Mol. Biother.* 3 (2): 79-87.
- Plemons, J. M. , Rees, T. D., Binnie, W. H, Wright, J. M. , Guo, I. and Hall, J. E. 1994. Evaluation of Acemannan in the treatment of Recurrent Aphthous Stomatitis. *Wounds: A Comp. Clin. Res. Prac.* 6(2): 40-45.
- Poor, M.R., Hall, J.E. and Poor, A.S. 2002. Reduction in the incidence of alveolar osteitis in patients treated with the SaliCept patch, containing Acemannan hydrogel. *J. Oral Maxillofac. Surg.* 60 (4): 374-379.
- Rajasekaran, N. S., Nithya, M., Rose, C. and Chundra, T. S. 2004. The effect of finger millet feeding on the early responses during the process of wound healing in diabetic rats. *Biochem. Biophys. Acta.* 1689 (3): 190-201.
- Ramamoorthy, L. and Tizard, I.R. 1996. Acemannan, a beta-(1,4)-acetylated mannan induces nitric oxide production in macrophage cell line RAW 264.7. *Mol. Pharmacol.* 50 (4): 878-884.
- Ringler, D. J. 1997. Inflammation and repair. In: *Veterinary Pathology*. Jones, T.C., Hunt, R.D. and King, N.W. (editors). 6th ed. U.S.A. William and Wilkins. 113-157.
- Roberts, D. B. and Travis, E. L. 1995. Acemannan-containing wound dressing gel reduces radiation-induced skin reactions in C3H mice. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 32(4): 1047-1052.
- Sakata, N., Nabeshima, K., Iwasaki, H., Tashiro, T., Uesugi, N., Nakashima, O., Ito, H., Kawanami, T., Furuya, K. and Kojima, M. 2007. Possible involvement of myofibroblast in development of inflammatory aortic aneurysm. *Pathol. Res. Prac.* 203: 21-29.
- Schultze-Mosgau, S., Wehrhan, F., Wichmann, M., Schlegel, K. A., Holst, S. and Thorwarth, M. 2006. Expression of interleukin 1-beta, transforming growth factor beta-1, and vascular endothelial growth factor in soft tissue over the implant before uncovering. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.* 101(5): 565-571.

- Sheets, M. A., Unger, B. A., Giggleman, G. F. Jr. and Tizard, I. R. 1991. Studies of the effect of acemannan on retrovirus infections: clinical stabilization of feline leukemia virus-infected cats. *Mol. Biother.* 3(1): 41-45.
- Simoes, J. P. C., Schoning, P. and Butine, M. 1994. Prognosis of canine mast cell tumors: a comparison of three methods. *Vet. Pathol.* 31(6): 637-647.
- Sonis, S. T., Sonis, A. L. and Ltederman, A. 1978. Oral complications in patients receiving treatment for malignancies other than of the head and neck. *J. Am. Dent. Assoc.* 97: 468-472.
- Stuart, R. W., Lefkowitz, D. L., Lincoln, J. A., Howard, K., Gelderman, M. P. and Lefkowitz, S. S. 1997. Upregulation of phagocytosis and Candidicidal activity of macrophages exposed to the immunostimulant, Acemannan. *Int. J. Immunopharmacol.* 19(2): 75-82.
- Thapa, P., Ghimire, M., Mullen, A. B. and Stevens, H. N. E. 2005. Controlled release oral delivery system containing water insoluble drug. *Kathmandu Univ. J. Sci.* 1(1): 1-10.
- Thomas, D. R., Goode, P.S., LaMaster, K. and Tennyson, T. 1998. Acemannan hydrogel dressing versus saline dressing for pressure ulcers. A randomized, controlled trial. *Adv. Wound Care.* 11(6): 273-276.
- Usinger, W. R. 1997. A comparison of antibody responses to veterinary vaccine antigens potentiated by different adjuvants. *Vaccine.* 15(17-18): 1902-1907.
- Van Beurden, H. E., Von den Hoff, J. W., Torensma, R., Maltha, J. C. and Kuijpers-Jagtman, A. M. 2005. Myofibroblasts in Palatal Wound Healing: Prospects for the Reduction of Wound Contraction after Cleft Palate Repair. *J. Dent. Res.* 84(10): 871-880.
- Vlientinck, A. J., De Bruvne, T., Apers, S. and Pieters, L. A. 1998. Plant-derived leading compounds for chemotherapy of human immunodeficiency virus (HIV) infection. *Planta. Med.* 64(2): 97-109.
- Witte, M. B. and Barbul, A. 1997. General principles of wound healing. *Surg. Clin. North. Am.* 77: 509-528.



ภาคผนวก

ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ภาคผนวก ก

ตารางแสดงข้อมูลขนาดแผลของหนูแต่ละตัว (คร.มม)

Groups	No.	วันที่ 3	No.	วันที่ 5	No.	วันที่ 7	No.	วันที่ 14
Control	1	11.02	21	8.18	41	5.55	61	0
	2	12.3	22	10.6	42	6	62	1.49
	3	10.79	23	7.84	43	7.8	63	0.84
	4	10.8	24	9.95	44	8	64	1.72
Carbopol	5	14.34	25	8.83	45	10.93	65	2.7
	6	12.35	26	9.81	46	11.99	66	0.69
	7	10.15	27	10.44	47	11.05	67	1.59
	8	10.63	28	10.07	48	9.4	68	0
0.5% ace.	9	12.97	29	7.35	49	3.78	69	1.73
	10	13.24	30	8.69	50	4.01	70	0.46
	11	11.34	31	8.69	51	4.96	71	0.37
	12	5.83	32	8.14	52	3.61	72	1.17
2% ace.	13	11.2	33	6.93	53	5.29	73	0
	14	11.62	34	7.28	54	5.13	74	1.07
	15	12.01	35	7.19	55	6.48	75	2.49
	16	8.44	36	8.73	56	6.97	76	0.53
0.1% triam.	17	12.37	37	11.3	57	9.95	77	0
	18	10.93	38	6.64	58	5.87	78	2
	19	8.07	39	7.36	59	6.85	79	1.24
	20	11.24	40	13.06	60	5.91	80	1.39

0 คือ แผลมีขนาดเล็กมากจนโปรแกรมไม่สามารถคำนวณได้หรือสมานปิดหมด

ภาคผนวก ข

ตารางที่ 12 แสดงการให้คะแนนทางจุลพยาธิวิทยา (Kawalac et al., 2004)

	0	1	2	3	4
1. ระดับความรุนแรงของการอักเสบ	-	น้อย	ปานกลาง	มาก	-
2. ชนิดของการอักเสบ	-	เฉียบพลัน	กึ่งเฉียบพลัน	เรื้อรัง	-
3. การแทรกเข้าของเซลล์ไฟโบรบลาสต์	ไม่พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์	พบเซลล์อักเสบเป็นส่วนใหญ่และเริ่มมีเซลล์ไฟโบรบลาสต์	เซลล์ไฟโบรบลาสต์มีจำนวนมากขึ้น	พบเซลล์ไฟโบรบลาสต์เป็นจำนวนมากแทรกในเนื้อเยื่อ	เซลล์ไฟโบรบลาสต์เริ่มลดจำนวนแต่มีการสะสมของเส้นใยคอลลาเจนเพิ่มขึ้น
4. การเรียงตัวใหม่ของเยื่อบุบริเวณขอบแผล	ไม่พบการเปลี่ยนแปลง	เล็กน้อยเริ่มมีการเพิ่มจำนวนของเซลล์เยื่อเล็กน้อย	เซลล์เยื่อเริ่มมีการเพิ่มจำนวนมากขึ้นและเริ่มมีการหนาตัวแต่ไม่มีการงอกขยายขึ้นไปในชั้น propria-submucosa	เซลล์เยื่อหนาตัวมากและมีบางส่วนยื่นลงไปในส่วน of propria-submucosa	เซลล์เยื่อจากขอบแผลทั้ง 2 ข้างเจริญมาเชื่อมกันสนิท

ศูนย์วิจัยทางการแพทย์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ประวัติผู้เขียนวิทยานิพนธ์

นางสาวสิริรักษ์ ศศิธนาเศรษฐ์ เกิดเมื่อวันที่ 16 มกราคม พ.ศ. 2524 ที่จังหวัด กรุงเทพมหานคร สำเร็จการศึกษาชั้นมัธยมศึกษาปีที่ 6 จากโรงเรียนสตรีศรีสุริโยทัย เขตยานนาวา จังหวัดกรุงเทพมหานคร เข้าศึกษาระดับอุดมศึกษาที่คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ปีการศึกษา 2541 สำเร็จการศึกษาระดับปริญญาตรีสัตวแพทยศาสตรบัณฑิต เมื่อปีการศึกษา 2547 และเข้าศึกษาต่อในระดับมหาบัณฑิต หลักสูตรพยาธิชีววิทยาทางสัตวแพทย์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ในปีการศึกษา 2548



ศูนย์วิทยทรัพยากร
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย