



ใบรับรองวิทยานิพนธ์
บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วิทยาศาสตร์มหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

ปริญญา

กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์

กายวิภาคศาสตร์

สาขา

ภาควิชา

เรื่องฤทธิ์ของสารสกัดหยาบเสกกลายต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในหนูเม้าส์

The Effect of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit Crude Extract on Wound Healing Stimulation in Mouse

นามผู้วิจัย นางสาวรุพลักษณ์ ศรีวิโรจน์

ได้พิจารณาเห็นชอบโดย

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุไร พงศ์ชัยฤกษ์, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(รองศาสตราจารย์ณรงค์ จึงสมานญาติ, Ph.D.)

อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ศิริรักษ์ จันทกรู, Ph.D.)

หัวหน้าภาควิชา

(ผู้ช่วยศาสตราจารย์ธีระศักดิ์ พราพงษ์, Ph.D.)

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์รับรองแล้ว

(รองศาสตราจารย์กัญญา ธีระกุล, D.Agr.)

คณบดีบัณฑิตวิทยาลัย

วันที่

เดือน

พ.ศ.

วิทยานิพนธ์

เรื่อง

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบแห้งกลายต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในหนูเมาส์

The Effect of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit Crude Extract
on Wound Healing Stimulation in Mouse

โดย

นางสาววรุฬักษณ์ ศรีวิโรจน์

เสนอ

บัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

เพื่อความสมบูรณ์แห่งปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์)

พ.ศ. 2554

ลิขสิทธิ์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์

วรุพลักษณ์ ศรีวิโรจน์ 2554:ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบแอสกลายต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในหนูเม้าส์ ปริญญาวิทยาศาสตรมหาบัณฑิต (กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์) สาขา กายวิภาคศาสตร์ทางสัตวแพทย์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก: ผู้ช่วยศาสตราจารย์อุไร พงศ์ชัยฤกษ์, Ph.D. 113 หน้า

การทดลองครั้งนี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดแอสกลายต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลแบบตัดเนื้อ โดยใช้หนูเม้าส์เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ สุ่มหนูทดลองออกเป็น 3 กลุ่ม แล้วสร้างบาดแผลขนาด 1 x 1 ซม. ที่บริเวณหลังของหนูทุกตัว หนูทดลองกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 จะได้รับการทาแผลด้วย methylcellulose สารสกัดหยาบจากใบแอสกลายความเข้มข้น 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ หนูจำนวน 6 ตัวในแต่ละกลุ่ม จะถูกเก็บบันทึกข้อมูลลักษณะบาดแผลและวัดขนาดพื้นที่แผลทุก 2 วัน จนครบ 16 วัน แล้วนำมาคำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction) และ ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing) ส่วนหนูอีก 8 ตัวจากแต่ละกลุ่ม จะถูกเก็บตัวอย่างผิวหนังบริเวณบาดแผลในวันที่ 4, 8, 12 และ 16 จำนวนครั้งละ 2 ตัว เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

ผลการทดลองพบว่า แผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลายจะเริ่มมีการสร้าง granulation tissue ได้รวดเร็ว และมีขนาดแผลเล็กลงเร็วกว่ากลุ่มควบคุม จนกระทั่งมีการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ภายในวันที่ 14 ในขณะที่แผลในกลุ่มควบคุมซึ่งทาด้วย methylcellulose นั้นจะปิดอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 16 อย่างไรก็ตาม แผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% จะมีค่า % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing สูงกว่าแผลในกลุ่มอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) ส่วนการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของแผลด้วยการย้อมสี H&E และ Masson's trichrome พบว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลายทั้ง 2 ความเข้มข้น สามารถพบการเจริญของ collagen fiber เส้นเลือด และ fibroblast ได้เร็วกว่าและมีความหนาแน่นมากกว่ากลุ่มควบคุม นอกจากนี้ยังพบ fibroblast ที่มีรูปร่าง stellate ในขณะที่ไม่พบเซลล์ลักษณะนี้ในกลุ่มควบคุมเลย อย่างไรก็ตาม แผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% จะพบ collagen fiber และ collagen bundle ที่มีขนาดใหญ่และเรียงตัวหนาแน่นที่สุด ศึกษาโดยการหาค่าเฉลี่ยจากการวัดขนาดของ collagen bundle และการวัดค่า intensity ของ collagen fiber โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) ดังนั้น จึงสรุปได้ว่าการใช้สารสกัดแอสกลายที่ความเข้มข้น 0.5% มีความเหมาะสมต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลได้ดีที่สุด เนื่องจากช่วยกระตุ้นการสร้าง granulation tissue และไม่ก่อให้เกิดการอักเสบเนื่องจากความระคายเคืองต่อแผล

Waroonluk Sriwiroch 2011: The Effect of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit Crude Extract on Wound Healing Stimulation in Mouse. Master of Science (Veterinary Anatomy), Major Field: Veterinary Anatomy, Department of Anatomy. Thesis Advisor: Assistant Professor Urai Pongchairerk, Ph.D. 113 pages.

The present study was aimed to investigate potential of ethanolic extract of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) in excision wound healing stimulation. The 8-week-old female mice were divided in to three groups to create 1x1 cm wounds on the back of each mouse daily with methylcellulose (negative control), 0.5% and 1.5% crude extract from *Pedilanthus tithymaloides* (L.) in group 1, 2 and 3, respectively. The results were compared among treatment and control groups, in term of wound gross appearance parameter of wound healing (%epithelization, %wound contraction and %total wound healing) and microscopic appearance.

From gross appearance, the wounds treated by crude extract showed faster granulation tissue formation and wound size reduction than control group. The wounds closure was completed on day 14 while methylcellulose treated wounds were completely closed on day 16. However, 0.5% crude extract caused significantly higher % epithelization, % wound contraction and % total wound healing ($P<0.05$) of wounds when compared to other groups. The microscopic appearance of wounds using H&E and Masson's trichrome stainings showed earlier development with higher amount of collagen fiber, blood vessel and fibroblasts in all wounds treated by crude extract than in control group. Moreover, the stellate shape fibroblasts were also found in crude extracted treated wounds while they were not existed in the control group at all. Nevertheless, the size and density of collagen fibers and bundles were the highest in wounds treated by 0.5% crude extract, evaluated by estimation from scale bar and using computer software (Image Analysis Software), respectively. In conclusion, the crude extract from *Pedilanthus tithymaloides* (L.) was efficient to stimulate wound healing. However, the practical concentration of crude extract was 0.5% since it did not cause irritation and inflammation to the wound.

Student's signature

Thesis Advisor's signature

กิตติกรรมประกาศ

ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ ผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. อุไร พงษ์ชัยฤกษ์ อาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์หลัก ที่ได้ช่วยเหลือในการวางแผนงานวิจัยในวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ ตลอดจนให้คำปรึกษาแนะนำ ตรวจสอบแก้ไขข้อบกพร่องต่างๆ และให้กำลังใจในการทำงานวิจัย ข้าพเจ้าขอกราบขอบพระคุณ รองศาสตราจารย์ ดร. ณรงค์ จึงสมานญาติ และผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. ศิริรักษ์ จันทครุอาจารย์ที่ปรึกษาวิทยานิพนธ์ร่วม ที่กรุณาให้คำปรึกษาแนะนำและช่วยเหลือในการทำวิทยานิพนธ์ให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ขอขอบพระคุณผู้ช่วยศาสตราจารย์ ดร. เฉลิมพล เล็กเจริญสุข ภาควิชาเวชศาสตร์คลินิก สัตว์เลี้ยง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ และคุณฉลองชัย คุ่มภัย นักวิชาการสถิติ 6 ภาควิชาสถิติ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ ที่ให้คำแนะนำปรึกษาในการวิเคราะห์ข้อมูลและแปลผลทางสถิติ และขอขอบคุณเจ้าหน้าที่ และนักวิทยาศาสตร์ประจำห้องปฏิบัติการจุลกายวิภาคศาสตร์ ที่คอยช่วยเหลือจัดหาเครื่องมืออุปกรณ์วิทยาศาสตร์ คอยให้คำปรึกษาและกำลังใจเป็นอย่างดี

ขอกราบขอบพระคุณคณาจารย์ทุกท่านที่ได้ประสิทธิ์ประสาทความรู้แก่ข้าพเจ้า ขอกราบขอบพระคุณ คุณพ่อวิจักขณ์-คุณแม่วารภรณ์ ศรีวิโรจน์ พี่สาวของข้าพเจ้า และเพื่อนๆทุกคนที่คอยให้ความช่วยเหลือ และเป็นกำลังใจอย่างดียิ่งเสมอมา ทำให้วิทยานิพนธ์เล่มนี้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

ผลงานวิทยานิพนธ์ฉบับนี้ได้รับทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา ประจำปีงบประมาณ 2551 จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน

วรุพลักษณ์ ศรีวิโรจน์
พฤษภาคม 2554

สารบัญ

หน้า

สารบัญ	(1)
สารบัญตาราง	(2)
สารบัญภาพ	(3)
คำอธิบายลักษณะตัวย่อ	(7)
คำนำ	1
วัตถุประสงค์ของการวิจัย	2
การตรวจเอกสาร	3
อุปกรณ์และวิธีการ	39
อุปกรณ์	39
วิธีการ	44
ผลและวิจารณ์	51
ผล	51
วิจารณ์	95
สรุปและข้อเสนอแนะ	101
สรุป	101
ข้อเสนอแนะ	102
เอกสารและสิ่งอ้างอิง	103
ประวัติการศึกษา และการทำงาน	113

สารบัญตาราง

ตารางที่		หน้า
1	ไซโตคายน์ที่มีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการหายของแผล	12
2	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization)	58
3	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction)	58
4	ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing)	59
5	ค่าเฉลี่ยร้อยละของ Intensity ของ collagen fiber ระหว่างกลุ่มทดลอง และกลุ่มควบคุม	93

สารบัญภาพ

ภาพที่		หน้า
1	โครงสร้างของผิวหนังประกอบด้วยชั้น epidermis และ dermis	4
2	ลักษณะของชั้นหนังกำพร้า สามารถจำแนกออกเป็น 5 ชั้น	6
3	กระบวนการหายของแผลที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติอย่างเป็นลำดับขั้น	10
4	การเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocytes โดยวิธี leapfrogging	16
5	ภาพถ่ายของต้นและดอกแอสทิล	24
6	โครงสร้างของฟินอล	25
7	เครื่อง tensiometer	33
8	ลักษณะพื้นที่แผลที่คัดลอกได้จากกระดาษ acetate sheet	38
9	ภาพจำลองการสร้างบาดแผลบริเวณหลังของหนูเม้าส์ โดยมีตำแหน่งแผลที่บริเวณระดับอกส่วนต้น	46
10	ภาพจำลองลักษณะของบาดแผล และพื้นที่ของแผลที่ทำการวัด	47
11	การสร้างบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ (วันที่ 0)	52
12	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 2	52
13	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 4	53
14	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 6	53
15	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 8	54
16	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 10	54
17	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 12	55
18	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 14	55
19	ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 16	56
20	(ก) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวใหม่ (% epithelization) (ข) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction) และ (ค) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing) ของแผลแบบ excision ในหนูเม้าส์วันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16	60
21	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังปกติ ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	62

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
22	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 8 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	64
23	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแคสซาย 0.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	65
24	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแคสซาย 1.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	66
25	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 12 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	67
26	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแคสซาย 0.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	68
27	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแคสซาย 1.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	69
28	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 16 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	70
29	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแคสซาย 0.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	71
30	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแคสซาย 1.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (กำลังขยาย 40X)	72

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
31	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังปกติ ที่ย้อมด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	74
32	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 8 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	75
33	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสกกลาย 0.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	76
34	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสกกลาย 1.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	77
35	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 12 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	78
36	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสกกลาย 0.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	79
37	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสกกลาย 1.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	80
38	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 16 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	81
39	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสกกลาย 0.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	82

สารบัญญภาพ (ต่อ)

ภาพที่		หน้า
40	ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสยกลาย 1.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)	83
41	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วย methylcellulose ในวันที่ 8	84
42	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วยสารสกัดแอสยกลาย 0.5% ในวันที่ 8	85
43	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วยสารสกัดแอสยกลาย 1.5% ในวันที่ 8	86
44	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วย methylcellulose ในวันที่ 12	87
45	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วยสารสกัดแอสยกลาย 0.5% ในวันที่ 12	88
46	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วยสารสกัดแอสยกลาย 1.5% ในวันที่ 12	89
47	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วย methylcellulose ในวันที่ 16	90
48	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วยสารสกัดแอสยกลาย 0.5% ในวันที่ 16	91
49	ตำแหน่งของการสะสมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผล ที่ทาด้วยสารสกัดแอสยกลาย 1.5% ในวันที่ 16	92
50	ค่าเฉลี่ยร้อยละ Intensity ของ collagen fiber ระหว่างกลุ่มการทดลอง	94

คำอธิบายสัญลักษณ์และตัวย่อ

H&E	Hematoxylin and Eosin
Co	Collagen bundle
Ep	Epidermis
De	Dermis
Ke	Keratin
Hf	Hair follicle
Sg	Sebaceous gland
Fb	Fibroblast cell
Fc	Fibrocyte cell
UV	Ultraviolet
PMNs	Polymorphonuclear cells
MCG	Membrane-coating granules
CE	Cornified cell envelope
RER	Rough endoplasmic reticulum
ECM	Extracellular matrix
PDGF	Platelet-derived growth factor
bFGF	Basic fibroblast growth factor
TGF- β	Transforming growth factor- β
TGF- α	Transforming growth factor- α
TNF- α	Tumor necrosis factor- α
PGE2	Prostaglandin E2
EGF	Epidermal growth factor
GAGs	Glycosaminoglycans
MMPs	Matrix metalloproteinases
IL-1	Interleukin-1
IP	Intraperitoneal
α -SMA	α - smooth muscle actin

คำอธิบายสัญลักษณ์และตัวย่อ (ต่อ)

IC ₅₀	Inhibition concentration 50 คือ ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเชื้อได้ครึ่งหนึ่งของปริมาณทั้งหมด
ROS	Reactive oxygen species
RNS	Reactive nitrogen species
ICR	Institute of Cancer Research
COX	Cyclooxygenase
O ₂ ⁻	Superoxide radical
ROO [·]	Peroxyl radical
H ₂ O ₂	Hydrogen peroxide
HO [·]	Hydroxyl radical
HOCl	Hypochlorous acid
ONOO ⁻	Peroxynitrite
NO	Nitric oxide
CH ₂ Cl ₂	Dichloromethane
μg	microgram
μm	micrometre
ml	milliliter
mg	milligram
kg	kilogram
cm	centimeter
cm ²	square centimeter
nm	nanometer
mm ²	square millimetre
N	Newton
ppm	part per million
w/v	Weight (of solute) per volume (of solvent)
w/w	Weight per weight

ฤทธิ์ของสารสกัดหยาบแสดกลายต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในหนูเมาส์

The Effect of *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit Crude Extract on Wound Healing Stimulation in Mouse

คำนำ

เมื่อเกิดบาดแผล ร่างกายจะมีกระบวนการซ่อมแซมบาดแผลได้เองโดยธรรมชาติ แต่หากบาดแผลมีลักษณะลึกและกว้าง กระบวนการดังกล่าวต้องใช้เวลาาน กว่าบาดแผลจะหายเป็นปกติ ดังนั้นจึงจำเป็นต้องมีการใช้ยารักษาบาดแผลร่วมด้วย เพื่อลดระยะเวลา และลดภาวะแทรกซ้อน เช่น การติดเชื้อที่บาดแผล เป็นต้น ในปัจจุบันมีการผลิตยารักษาบาดแผลออกมาหลายชนิด ซึ่งมักมีองค์ประกอบของยาปฏิชีวนะ หรือยาฆ่าเชื้อโรคอยู่ด้วย อันมีสรรพคุณช่วยลดการอักเสบ ป้องกันการติดเชื้อ และช่วยกระตุ้นให้แผลหายเร็วขึ้น นอกจากนี้ ในวงการแพทย์ยังได้นำพืชสมุนไพรมาใช้ในการรักษาบาดแผลด้วย จากงานวิจัยตั้งแต่อดีตถึงปัจจุบัน พบว่ามีพืชสมุนไพรไทยหลายชนิด ซึ่งเป็นที่ทราบกันดีว่ามีสรรพคุณช่วยในการรักษาบาดแผลได้ เช่น ว่านหางจระเข้ และใบบัวบก เป็นต้น (สุนทร, 2536) แสดกลายก็เป็นพืชสมุนไพรอีกชนิดหนึ่ง ซึ่งชาวบ้านนิยมนำใบมาตำพอกแผลสด เนื่องจากพบว่ามีสรรพคุณช่วยประสานเนื้อ (ปราโมทย์, 2524) จากรายงานวิจัยของ Abreu และคณะ (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของแสดกลายในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมน้ำที่อุ้งเท้าด้วย carrageenan โดยฉีดสารสกัดเอทานอลจากแสดกลายเข้าช่องท้องของหนูในปริมาณ 500, 750 และ 1000 มิลลิกรัม ต่อน้ำหนักตัว 1 กิโลกรัม พบว่าสมุนไพรชนิดนี้ สามารถยับยั้งการอักเสบได้ 83%, 94% และ 92% ตามลำดับ นอกจากนี้ยังได้ทำการศึกษาฤทธิ์การจับกับอนุมูลอิสระของสารสกัดจากแสดกลายแบบ *in vitro* (scavenging activity) โดยดูค่า IC₅₀ values (Inhibitory concentration) พบว่า สามารถต้านอนุมูลอิสระชนิด ROS (reactive oxygen species) และ RNS (reactive nitrogen species) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ (Abreu *et al.*, 2006) ซึ่งการต้านอนุมูลอิสระ มีส่วนช่วยในเรื่องการกระตุ้นกระบวนการหายของแผล โดยช่วยยับยั้งกระบวนการอักเสบ ด้านจุลชีพ และด้านการติดเชื้อ ดังนั้นการวิจัยครั้งนี้ จึงได้นำแสดกลายมาใช้ในการศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบจากใบแสดกลายต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลแบบตัดเฉียงในหนูเมาส์ โดยจะศึกษาถึงลักษณะของบาดแผล ระยะเวลาในการหาย และลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของบาดแผล ซึ่งผลจากการทดลองนี้ จะสามารถใช้เป็นข้อมูลพื้นฐานหรือเป็นแนวทางในการใช้สมุนไพรรักษาบาดแผลในคนและสัตว์ต่อไปในอนาคต นอกจากนี้ หากสารสกัดหยาบจากใบแสดกลายสามารถใช้กระตุ้นกระบวนการหายของบาดแผลได้ ก็จะสามารถนำมาผลิตในเชิงพาณิชย์ เป็นการเพิ่มมูลค่าของพืชได้อีกทางหนึ่งด้วย

วัตถุประสงค์ของการวิจัย

เพื่อศึกษาคุณสมบัติการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลแบบตัดเนื้อในหนูเม้าส์ โดยใช้สารสกัดหยาบจากใบเสวยกลาย โดยตรวจสอบจากลักษณะภายนอกของแผล ขนาดของแผล และลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ เปรียบเทียบกับแผลที่ไม่ได้รับสารสกัด

ขอบเขตของการวิจัย

ขอบเขตในการวิจัยครั้งนี้ มีดังนี้

1. ศึกษาผลของการใช้สารสกัดหยาบจากใบเสวยกลาย ในการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลแบบตัดเนื้อในหนูเม้าส์ เปรียบเทียบกับแผลที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยวิธีการ
 - 1.1 ศึกษาลักษณะภายนอกของแผล
 - 1.2 การใช้ค่าทางสถิติของร้อยละการเกิด epithelization, wound contraction และ total wound healing
 - 1.3 ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของแผล โดยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin (H&E) จากนั้นนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เพื่อศึกษาลักษณะ โครงสร้าง และส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ
 - 1.4 การวัดความเข้มและปริมาณการติดสีของ collagen fibers ภายในแผล โดยวิธีการย้อม Masson's Trichrome และใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) ในการคำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละของความหนาแน่นของเส้นใยคอลลาเจน (% collagen intensity)

การตรวจเอกสาร

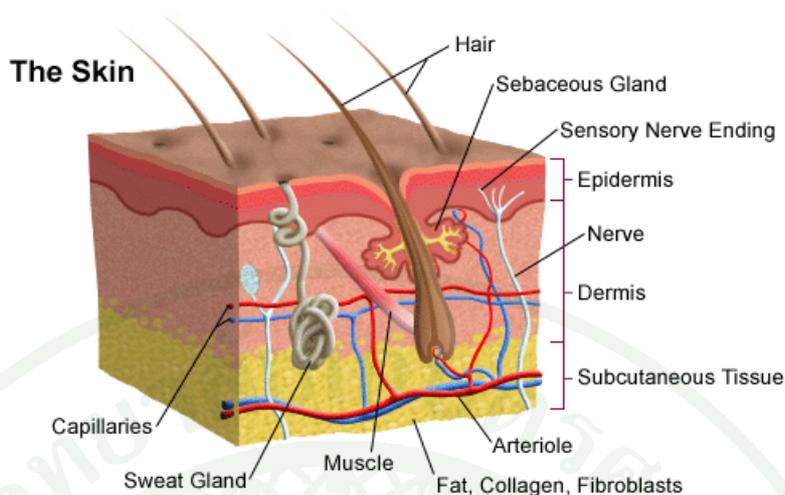
ผิวหนัง (skin)

ผิวหนังเป็นอวัยวะส่วนที่ใหญ่ที่สุดในร่างกาย ความหนาของผิวหนังจะแตกต่างกันไปตามอวัยวะส่วนต่างๆของร่างกาย โดยทั่วไปผิวหนังทางด้านหลังของร่างกายและด้านข้างของแขนและขาจะมีความหนามากที่สุด ส่วนทางด้านท้องของร่างกาย และด้านในของแขนและขาจะมีความหนาน้อยที่สุด ผิวหนังมีหน้าที่สำคัญหลายประการ เช่น

1. ป้องกันอวัยวะต่างๆ ภายในร่างกายไม่ให้เกิดการกระทบกระแทกจากอันตรายภายนอก และห่อหุ้มร่างกายให้คงรูปอยู่ได้
2. ควบคุมอุณหภูมิภายในร่างกาย และการสูญเสียน้ำของร่างกาย โดยผ่านกระบวนการทำงานของต่อมเหงื่อ และรูขุมขน
3. มีอวัยวะรับสัมผัส เนื่องจากผิวหนังเป็นที่รวมตัวของเส้นประสาทรับความรู้สึก ทำให้สามารถรับความรู้สึกต่างๆ ได้ เช่น รับน้ำหนักกดทับ ความเจ็บปวด ความรู้สึกร้อนหนาว เป็นต้น แล้วส่งสัญญาณให้ร่างกายเกิดการตอบสนองต่อสิ่งเหล่านั้น
4. เป็นอวัยวะช่วยขับถ่ายของเสียในรูปของเหงื่อ
5. วิตามินดี จะถูกสังเคราะห์มาจาก precursors ที่อยู่ภายใน epidermis ในขณะที่รังสีอัลตราไวโอเล็ต (UV) กระทบผิวหนัง (วิโรจน์, 2535)

โครงสร้างของผิวหนัง

โครงสร้างของผิวหนังประกอบไปด้วย 2 ชั้นที่สำคัญ ได้แก่ ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) และชั้นหนังแท้ (dermis) ชั้นหนังแท้ถูกเชื่อมติดกันกับ deep fascia ที่หุ้มกล้ามเนื้อ โดยเนื้อเยื่อเกี่ยวพันชนิด loose connective tissue เรียกว่า subcutaneous tissue (superficial fascia หรือ hypodermis) ซึ่งในชั้นนี้จะประกอบด้วยเซลล์ไขมันจำนวนมาก ชั้น hypodermis ไม่จัดเป็นส่วนหนึ่งของผิวหนัง (วิโรจน์, 2535) (ภาพที่ 1)



ภาพที่ 1 โครงสร้างของผิวหนังประกอบด้วยชั้น epidermis และ dermis

ที่มา: Driscoll (2009)

ผิวหนังแต่ละชั้นประกอบด้วยส่วนประกอบต่างๆ ดังนี้

1. ชั้นหนังกำพร้า (epidermis) เป็นเนื้อเยื่อชนิด stratified squamous epithelium (keratinized) อยู่ชั้นนอกสุดของผิวหนังและสัมผัสกับสิ่งแวดล้อมโดยตรง มีต้นกำเนิดมาจากชั้น ectoderm ผิวหนังชั้นนี้ไม่มีหลอดเลือด ความหนาจะแตกต่างกันขึ้นอยู่กับตำแหน่งของผิวหนัง และความหนาของ keratin เซลล์ผิวหนังในชั้นหนังกำพร้าจะมีการสร้างขึ้นใหม่อยู่ตลอดเวลาจากชั้นลึก และจะเคลื่อนจากชั้นลึกขึ้นสู่ชั้นบน และลอกหลุดไป นอกจากนี้ผิวหนังชั้นนี้ยังเป็นชั้นที่ให้กำเนิดโครงสร้างต่างๆ (skin derivatives หรือ skin appendages) ได้แก่ ขน และต่อมขน (hairs and hair follicles) ต่อมไขมัน (sebaceous glands) ต่อมเหงื่อ (sweat glands) เป็นต้น ผิวหนังชั้นหนังกำพร้าสามารถจำแนกออกเป็น 5 ชั้น เรียงลำดับจากด้านบนลงสู่ด้านล่างบนผิวหนัง (วิโรจน์, 2535) ดังนี้

1.1 Stratum basale (basal cell layer) ชั้นนี้จะอยู่ชั้นล่างสุด โดยมีโครงสร้างที่เรียกว่า basal lamina ยึดชั้นนี้ไว้ติดกับชั้น dermis ที่อยู่ด้านล่าง ตำแหน่งนี้เรียกว่า dermoepidermal junction ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์ที่เรียงตัวกันชั้นเดียว เรียกว่า basal cells เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวแบบ mitosis อยู่ตลอด จึงอาจเรียกชั้นนี้ได้อีกชื่อหนึ่งว่า stratum germinativum basal cells มีหน้าที่แบ่งตัวให้กำเนิด keratinocytes จากนั้น keratinocytes จะเคลื่อนที่ขึ้นมาชั้นบนที่มีชื่อเรียกว่า stratum spinosum รูปร่างของเซลล์ในชั้น stratum basale เป็น cuboidal หรือ columnar มี nucleus ขนาดใหญ่ cytoplasm คิดสี basophilic พบ endoplasmic reticulum ซึ่งมี ribosome อยู่เป็นจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ intermediate filament ที่เป็นลักษณะเส้นเดี่ยวๆ หรือรวมกันเป็น bundle อยู่

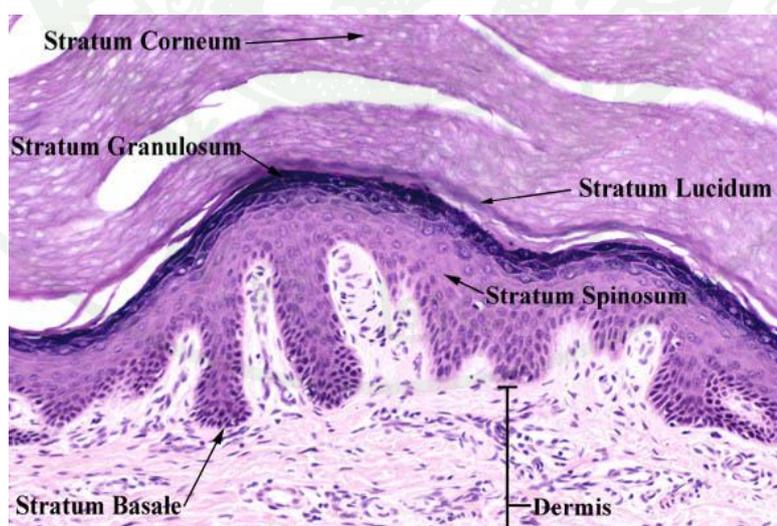
ภายใน cytoplasm ด้วย ซึ่งมักมีปลายมาสิ้นสุดที่ตำแหน่งของ desmosome ซึ่งยึดผนังด้านข้างของแต่ละเซลล์อยู่ หรือที่ hemidesmosome ซึ่งยึดฐานของเซลล์แต่ละเซลล์ให้ติดกับ basal lamina

1.2 Stratum spinosum (prickle cell layer) ประกอบไปด้วยเซลล์ที่เคลื่อนที่มาจากชั้น stratum basale เรียงตัวกันเป็นชั้น โดยเซลล์ที่อยู่ติดกับชั้น basal cell มากที่สุด (suprabasal spinous cells) จะเป็นเซลล์ที่มีอายุน้อยกว่าเซลล์ที่อยู่บนชั้นขึ้นไป รูปร่างเป็นแบบหลายเหลี่ยม (polyhedral) ส่วนเซลล์ที่อยู่บนๆ (upper spinous cell layer) จะเริ่มมีรูปร่างแบนลง รวมทั้งนิวเคลียสก็จะเริ่มแบนลงด้วย organelles ภายในเซลล์จะคล้ายคลึงกับชั้น stratum basale แต่พบว่า cytoplasm จะติดสี basophilic น้อยกว่า และมีจำนวน organelles น้อยกว่า ลักษณะที่พบชัดเจนที่สุดในชั้นนี้ คือ จะมี desmosome อยู่เป็นจำนวนมากยึดระหว่างผนังเซลล์ที่อยู่ติดกันในลักษณะ interdigitation ทำให้เห็นลักษณะที่คล้ายกับว่า เซลล์แต่ละเซลล์มีหนามแหลมยื่นออกมานอกเซลล์ (เป็นที่มาของชื่อ stratum spinosum) ซึ่งก็คือ ตำแหน่งของ desmosome นั่นเอง เรียกโครงสร้างนี้ว่า intercellular bridge นอกจากนี้ ภายใน cytoplasm ยังเริ่มพบ secretory granules ที่มีผนังหุ้ม เรียกว่า lamella granules หรือ membrane-coating granules (MCG) กระจายอยู่ทั่วไป ภายใน granules จะบรรจุไปด้วย secretion ที่มีไขมันจำนวนมากเป็นองค์ประกอบ (lipid rich secretory product) secretion เหล่านี้จะถูกหลั่งออกจากเซลล์โดยวิธี exocytosis แล้วกลายเป็นชั้นเคลือบอยู่รอบๆ ผิวเซลล์

1.3 Stratum granulosum (granular cell layer) ชั้นนี้ได้ชื่อตามลักษณะของเซลล์ คือ granular cells เรียงตัวกัน 3-5 ชั้น เป็นเซลล์ที่มีรูปร่างค่อนข้างแบน ภายใน cytoplasm บรรจุด้วย basophilic granules จำนวนมาก เป็น granules ที่ไม่มีผนังหุ้ม ซึ่งมีชื่อเฉพาะว่า keratohyalin granules เมื่อมองดูด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยายต่ำ จะเห็นเป็นจุดสีน้ำตาลกระจายอยู่ในเซลล์ จนบดบังโครงสร้างอื่นภายในเซลล์ keratohyalin granules ประกอบไปด้วยโปรตีนที่ชื่อ profilaggrin และ loricrin ซึ่งสารเหล่านี้เกี่ยวข้องกับขบวนการ keratinization โดย profilaggrin จะถูกสร้างและเปลี่ยนไปเป็น filaggrin ในชั้น stratum corneum ซึ่งทำหน้าที่เป็นเสมือนกาว (interfibrillary matrix) ยึดระหว่าง keratin filament ทำให้เกิดเป็นร่างแห keratin ที่แข็งแรง ส่วน loricrin เป็นโปรตีนที่เริ่มถูกสร้างในชั้น granular cell layer และจะกลายเป็นองค์ประกอบหลักประมาณ 75% ของเยื่อหุ้ม corneocytes ในชั้น stratum corneum เรียกว่า cornified cell envelope (CE) เมื่อเซลล์เคลื่อนตัวและเปลี่ยนแปลงมาจนถึงตำแหน่งรอยต่อระหว่าง granular cell กับ corneocyte เซลล์ก็จะเปลี่ยนกลายเป็น corneocytes ในชั้น stratum corneum

1.4 Stratum lucidum (clear layer) เป็นชั้นบางๆ แทรกอยู่ระหว่างชั้น granular cell layers และ stratum corneum พบเฉพาะในผิวหนังบริเวณที่หนามากๆ และไม่มีขนเท่านั้น เช่น บริเวณอุ้งเท้า เป็นต้น ชั้นนี้จะประกอบไปด้วยเซลล์หลายชั้น รูปร่างแบนมาก ไม่มีนิวเคลียส จะติดสีจาง หรือบางที่โปร่งแสง (เป็นที่มาของชื่อ stratum lucidum) พบว่า cytoplasm ของเซลล์ในชั้นนี้ จะมีส่วนประกอบของ phospholipid และ eleidin ซึ่งเป็น protein ที่คล้ายกับ keratin แต่มีรูปแบบการติดสีย้อมต่างกัน (Dellmann and Eurell, 1998)

1.5 Stratum corneum (horny layer หรือ cornified layer) ชั้นนี้ประกอบด้วยเซลล์ที่ชื่อว่า corneocyte หรือ cornified cell ซึ่งเปลี่ยนมาจาก granular cell ขอบเขตของ cell ที่อยู่ติดกันมีลักษณะคล้ายร่างแห ภายในเซลล์ไม่มีนิวเคลียส ไม่มี organelles ชนิดใด ยกเว้น keratin ที่สมบูรณ์แล้ว (mature keratin) มีหน้าที่ปกป้องผิวจากอันตรายภายนอก ป้องกันการสูญเสียน้ำไปจากผิวหนัง และเป็นทางผ่านของยาหรือสารต่างๆ จากภายนอก ในชั้นนี้ desmosome ซึ่งเป็นตัวยึดระหว่างเซลล์จะเริ่มถูกทำลาย ทำให้แต่ละเซลล์แยกจากกัน เริ่มขบวนการที่เรียกว่า desquamation คือ การลอกหลุดของ corneocytes ออกไป ชั้น stratum corneum นี้จะมีความหนาบางแตกต่างกันในแต่ละบริเวณของร่างกาย ผิวหนังที่จัดเป็น thick skin จะมีชั้น corneum หนา พบที่บริเวณฝ่าเท้า โดยปกติถ้าชั้น corneum หนา ชั้น granular cell layer ก็จะหนาตามไปด้วย ส่วนบริเวณผิวหนังที่จัดเป็น thin skin ได้แก่ ผิวหนังบริเวณต่างๆ ของลำตัว จะมีชั้น corneum บาง ชั้น granular cell layer ก็จะบางไปด้วย



ภาพที่ 2 ลักษณะของชั้นหนังกำพร้า สามารถจำแนกออกเป็น 5 ชั้น

ที่มา: Dempsey (2010)

เซลล์ที่เป็นองค์ประกอบในชั้นหนังกำพร้าส่วนใหญ่มากกว่า 80% คือ เซลล์ keratinocytes ได้แก่ เซลล์ที่เรียงตัวเป็นชั้นๆ ดังกล่าวมาแล้วข้างต้น และเซลล์ส่วนน้อยซึ่งไม่ได้เรียงตัวเป็นชั้นๆ และไม่สามารถหลุดลอกได้ เรียกว่าพวก non-keratinocytes ซึ่งเป็นเซลล์ที่เคลื่อนที่มาจากตำแหน่งอื่น มาอาศัยอยู่ที่ผิวหนัง (immigrant cells) ประกอบด้วยเซลล์ 3 ชนิด คือ melanocytes, merkel cells และ langerhans cells ซึ่งเซลล์แต่ละชนิดมีลักษณะดังนี้

1. melanocyte เป็น dendritic cell ชนิดหนึ่งที่มีต้นกำเนิดมาจาก neural crest cells แล้วเคลื่อนที่มาจากผิวหนังชั้นหนังกำพร้าโดยแทรกอยู่ระหว่าง basal cells ในชั้น basal layer melanocytes มีหน้าที่สร้างเม็ดสี melanin ซึ่งมีสีน้ำตาลดำ โดยอาศัยเอนไซม์ tyrosinase ซึ่งสร้างขึ้นใน rough endoplasmic reticulum (RER) ของเซลล์นั้น melanin ที่ถูกสร้างจะอยู่ในถุงหุ้มที่เรียกว่า melanosome แล้วถูกส่งไปยังเซลล์ keratinocytes ที่อยู่ข้างเคียง ผ่านไปทาง dendritic processes ที่แทรกอยู่ระหว่าง keratinocytes ทำให้เกิดเป็นสีผิวหนังขึ้น ซึ่งวิธีนี้เรียกว่า cytokine secretion

2. merkel cells เป็นเซลล์เกี่ยวกับการรับความรู้สึก เป็น dendritic cell ที่พบอยู่ที่ชั้น basal cell layer บริเวณผิวหนังด้านต่ำสุดของ epidermis เซลล์จะมีนิวเคลียสรูปร่างเป็น lobule cytoplasm มีลักษณะใส และไม่มี tonofilaments แต่จะพบ electron dense granules รูปร่างกลมรีจำนวนมากอยู่ใกล้กับผิวเซลล์ด้าน dermis โดยภายใน granules ชนิดนี้ จะบรรจุสารสื่อประสาทชนิดต่างๆ (ขึ้นอยู่กับชนิดของสัตว์) เช่น serotonin, serotonin-like substances, vasoactive intestinal polypeptide, peptide histidine-isoleucine และ substance P เป็นต้น merkel cells มีการยึดติดกับ keratinocytes ที่อยู่ข้างเคียงด้วย desmosome และเซลล์นี้ยังมี myelinated afferent nerve fibers เข้ามาชิดเพื่อ form เป็น Merkel cells-neurite complexes หรือ nonencapsulated tactile corpuscle และบริเวณของผิวหนังที่มีโครงสร้างนี้อยู่ จะเรียกว่า tactile hair discs หรือ tactile pads โดย myelinated nerve fibers ที่แทรกเข้ามายังส่วน epidermis แล้ว จะเปลี่ยนไปเป็นชนิด non-myelinated และเปลี่ยนรูปร่างให้เป็นแผ่นแบนแนบไปกับผิวที่ฐานของเซลล์ (Eurell and Frappier, 2006)

3. langerhans cell เป็นเซลล์ที่มีหน้าที่เกี่ยวข้องกับระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย เป็น dendritic cells พบอยู่ในชั้น stratum spinosum โดยแทรกอยู่ระหว่าง keratinocyte เป็นเซลล์ที่มีต้นกำเนิดจากไขกระดูก (bone marrow) การย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin จะพบว่าเซลล์นี้มีนิวเคลียสหยักลึกและติดสีเข้มล้อมรอบด้วย cytoplasm ติดสีจาง ถ้าย้อมด้วย gold chloride เซลล์จะติดสีเข้มดำ และเห็นแขนง หรือ dendritic form ชัดเจน ถ้าดูด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็กตรอนจะพบว่า นิวเคลียสของ langerhans cell จะมีรูปร่าง irregular ส่วน cytoplasm จะมีความหนาแน่นไม่มากนัก

ประกอบด้วย mitochondria จำนวนเล็กน้อย และมี endoplasmic reticulum, lysosome และ vesicle ขนาดเล็กๆจำนวนมาก นอกจากนี้ยังพบ membrane bound granules ซึ่งเป็นลักษณะพิเศษที่จะพบได้เฉพาะในเซลล์นี้เท่านั้น เรียกว่า birbeck granules หรือ vermiform granules (Dellmann and Eurell, 1998) ถ้าตัดผ่าน granules นี้ก็จะเห็นเป็น rod shape ความยาวประมาณ 15-50 nm และหนาประมาณ 4 nm มีแถบสีจางอยู่บริเวณขอบด้านในของ membrane ทำให้มองดูเหมือนมีแถบเข้มอยู่บริเวณแนวกลางของ granules ภายในบรรจุสาร Langerin ซึ่งเป็น Ca^{2+} dependent type II lectin ที่มีความแตกต่างกันไปตามแต่ละชนิดของสัตว์ (Eurell and Frappier, 2006)

2. ผิวหนังชั้นหนังแท้หรือผิวหนังชั้นใน (dermis) อยู่ใต้ชั้นหนังกำพร้า บริเวณที่ชั้นหนังกำพร้าต่อกับชั้นหนังแท้ นั้นจะเป็นรอยหยักคล้ายลูกคลื่นของชั้นหนังกำพร้าที่ยื่นลงมาในชั้นหนังแท้ เรียกว่า epidermal ridges และส่วนของหนังแท้ที่ยื่นขึ้นไปยังชั้นหนังกำพร้า เรียกว่า dermal ridges เพื่อให้ทั้ง 2 ส่วนนี้ยึดติดกันแน่นมากขึ้น และเป็นการเพิ่มพื้นที่สัมผัสทำให้เส้นเลือดในชั้นหนังแท้ไปเลี้ยงชั้นหนังกำพร้าได้มากขึ้น (Leon, 1988) ชั้นหนังแท้ มีต้นกำเนิดจากชั้น mesoderm ประกอบไปด้วยเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (connective tissue) ระบบเส้นเลือด (vascular network) และเส้นประสาท (nerve) เป็นที่อยู่ของ skin derivatives และเซลล์ต่างๆ เช่น fibroblasts macrophages mast cells และเซลล์ของระบบเลือด (blood-borne cells) เช่น lymphocytes และ plasma cells เป็นต้น (Samuelson, 2007) หน้าที่ของชั้นหนังแท้ คือ ทำให้ผิวหนังมีความยืดหยุ่น (elasticity) ทนแรงยืดผิวหนังได้ (extensibility) ปกป้องร่างกายจากอันตราย (mechanical injury) ช่วยอุ้มน้ำไว้เพื่อควบคุมสมดุลความร้อนของร่างกาย (thermal regulation) และเป็นประสาทรับสัมผัสต่างๆ (receptor of sensory stimuli) เนื้อเยื่อเกี่ยวพันของชั้นหนังแท้มีองค์ประกอบหลัก คือ collagen tissues และส่วนน้อยเป็น elastic tissues วางตัวอยู่ใน ground substance ซึ่งประกอบด้วยสารกลุ่ม glycoaminoglycans ที่เป็นโพลิเมอร์ของ disaccharide จับอยู่กับโปรตีน ได้แก่ hyaluronic acid, chondroitin sulfate, keratan sulfate, heparan sulfate, dermatan sulfate ผิวหนังชั้นหนังแท้สามารถแบ่งออกได้เป็น 2 ชั้น ตามความหนาแน่นของการจัดเรียงตัวของ connective tissues ระบบเส้นประสาท และระบบหลอดเลือดได้ดังนี้

2.1 Papillary layer อยู่ชิดกับ epidermis ประกอบด้วย loose connective tissue ซึ่งมี fibroblasts และ connective tissue cells อื่น ๆ โดยเฉพาะ mast cells และ macrophages ที่พบได้จำนวนมาก ในชั้นนี้ จะมีการยกตัวขึ้นไปแทรกอยู่ระหว่าง epidermis เรียกว่า dermal papilla บาง dermal papilla จะพบ Meissner's corpuscles ซึ่งเป็นหน่วยรับความรู้สึกสัมผัสอย่างละเอียด และมีส่วนของ epidermis ที่ยื่นลงมาแทรกอยู่ในชั้น dermis เรียกว่า epidermal ridges

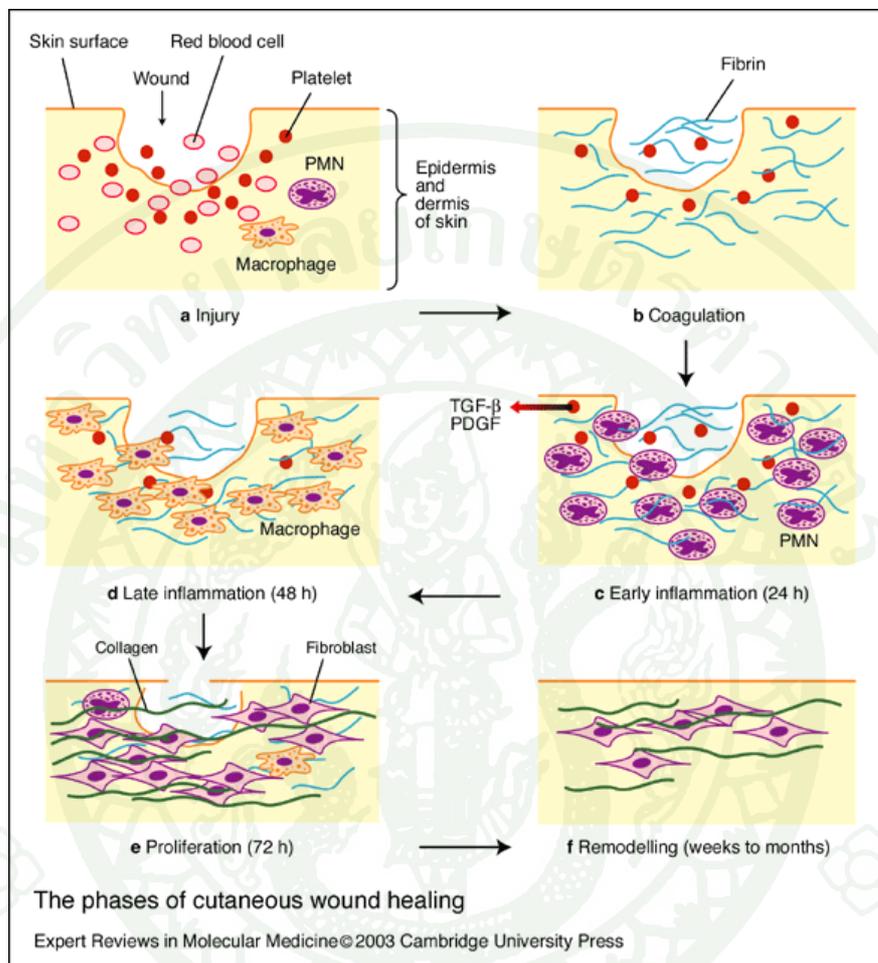
2.2 Reticular layer เป็นชั้นที่หนายึดติดกับชั้น hypodermis ประกอบด้วย dense irregular connective tissue ซึ่งมี collagen type I เป็นส่วนใหญ่ และมี elastic fiber จำนวนมาก ซึ่งจะมีลักษณะหยาย ทั้ง collagen และ elastic fiber จะมีขนาดใหญ่ขึ้นเรื่อยๆ เมื่อลึกลงไปในชั้นหนังแท้ต่อกับชั้นใต้หนังแท้ เส้นเลือดจะน้อยกว่าชั้น papillary dermis ชั้น reticular dermis นี้สามารถแบ่งย่อยลงไปได้อีกเป็น 2 ชั้น ได้แก่ upper zone คือ reticular dermis ชั้นบน ประกอบด้วย collagen bundle ที่มีขนาดกลางๆ ส่วน elastic fiber เรียงตัวตามแนวนอน (horizontal) และ deeper zone คือ ชั้น reticular dermis ที่อยู่ชั้นล่างสุดติดกับชั้นใต้หนังแท้ เป็นชั้นที่มี collagen bundle และ elastic fiber ขนาดใหญ่ และพบเซลล์ fibroblasts, mast cell, macrophage, plasma cell และเม็ดเลือดขาวบางชนิด (Samuelson, 2007)

ชั้นใต้หนังแท้ (hypodermis) เป็นชั้นของ connective tissue ที่ยึดชั้นหนังแท้กับกล้ามเนื้อ และกระดูกประกอบด้วย collagen และ elastic fibers ที่อยู่กันอย่างหลวมๆ ทำให้ผิวหนังสามารถเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระ และมีเนื้อเยื่อไขมัน (adipose tissues) อยู่ในชั้นนี้ ซึ่งอาจจะเป็นกลุ่มเซลล์เล็กๆ จนเป็นแผ่นขนาดใหญ่เรียกว่า panniculus adiposus หน้าที่ของชั้นนี้เพื่อรักษาความอบอุ่นของร่างกายไว้ เป็นแหล่งสะสมพลังงานของร่างกาย ทำหน้าที่ป้องกันการกระแทก และทำให้ผิวหนังเคลื่อนไหวได้อย่างอิสระจากชั้นกล้ามเนื้อหรือเนื้อเยื่ออื่น ๆ ที่อยู่ลึกลงไป ความหนาของชั้นนี้จะแตกต่างกันตามบริเวณต่าง ๆ ของร่างกาย (Dellmann and Eurell, 1998)

กระบวนการหายของแผล (wound healing)

บาดแผล (wound) คือ การเกิดการฉีกขาด หรือมีรอยขีดข่วน ทำให้เนื้อเยื่อส่วนใดส่วนหนึ่งของร่างกายแยกออกจากกัน (ไพวิกา, 2526) และมีการสูญเสียการทำงานจากภาวะปกติ ซึ่งสามารถจำแนกได้ 2 ประเภทบนพื้นฐานของกระบวนการซ่อมแซมตามธรรมชาติ ได้แก่ แผลเฉียบพลัน (acute wound) คือ การที่เนื้อเยื่อได้รับบาดเจ็บอันเนื่องจากการตัดหรือการผ่าตัดศัลยกรรม ซึ่งจะเกิดกระบวนการรักษาบาดแผลให้แผลหายอย่างสมบูรณ์ภายในระยะเวลาที่กำหนด และแผลเรื้อรัง (chronic wound) คือ การที่เนื้อเยื่อที่ได้รับบาดเจ็บ เกิดกระบวนการรักษาอย่างช้าๆ เนื่องจากเนื้อเยื่อได้รับสิ่งที่ทำให้เกิดบาดแผลซ้ำๆ หรือเกิดพยาธิสภาพขึ้นที่เนื้อเยื่อด้านล่าง ซึ่งรบกวนขั้นตอนการหายของบาดแผล บาดแผลอาจมีชื่อเรียกที่ต่างกัน ตามลักษณะของการเกิดความเสียหาย เช่น แผลฉีกขาด (laceration) เป็นบาดแผลที่มักเกิดร่วมกับอาการบาดเจ็บ ที่ส่งผลให้เกิดความเสียหายต่อเนื้อเยื่อ แผลเปื่อย (ulcer) เป็นบาดแผลลักษณะที่สูญเสียเยื่อบุผิว (epithelium) และเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ด้านล่างไปในปริมาณต่างๆ กัน ส่วนแผลตัดเนื้อ (excision wound) เป็นบาดแผลที่เกิดจากการตัดเนื้อเยื่อให้หลุดออกไป เป็นต้น (Strodtbeck, 2001)

การหายของแผลนั้น เป็นกระบวนการทางสรีรวิทยา ซึ่งเกิดขึ้นเป็นลำดับต่อเนื่องกัน (ภาพที่ 3) และมักมีความเหลื่อมล้ำกันในแต่ละระยะ ประกอบด้วย 4 ระยะดังนี้



ภาพที่ 3 กระบวนการหายของแผลที่เกิดขึ้นตามธรรมชาติอย่างเป็นลำดับขั้น ประกอบด้วย 4 ระยะ ดังนี้ เมื่อบาดเจ็บมีเลือดไหลออกมาจากบาดแผล (a) จะเกิดกระบวนการห้ามเลือดโดยการหดตัวของหลอดเลือด และสร้าง fibrin clot อุดบริเวณปากแผลไว้ชั่วคราว เพื่อให้เลือดหยุดไหลและป้องกันเชื้อโรค (b) จากนั้นจะเกิดการอักเสบ โดย PDGF และ TGF- β จะดึงดูด Neutrophil และ Macrophage มายังบริเวณแผลเพื่อกำจัดสิ่งแปลกปลอมและแบคทีเรีย (c และ d) จากนั้นจะเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์และซ่อมแซมบาดแผล โดยมีการสร้างหลอดเลือดใหม่ การเพิ่มจำนวนเซลล์ fibroblast เพื่อสร้าง granulation tissue และการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังใหม่ (e) แล้วเข้าสู่ระยะการปรับโครงสร้างเนื้อเยื่อ โดยจะมีการสลาย collagen ที่สร้างมากเกินไป และจัดรูปร่างของ connective tissue ซึ่งระยะนี้ granulation tissue จะเจริญเป็น connective tissue ที่สมบูรณ์

ที่มา: Cysts (2010)

ระยะที่ 1: ระยะห้ามเลือด (hemostasis)

เมื่อเกิดการบาดเจ็บ หลอดเลือดบริเวณนั้นจะถูกทำลาย จะมีเลือดไหลออกมาบริเวณบาดแผล จากนั้นจะเกิดกระบวนการห้ามเลือด โดยเกิดการหดตัวของหลอดเลือด (vasoconstriction) เนื่องจากการหลั่ง chemical mediators เช่น serotonin ออกมาจากเซลล์ของเนื้อเยื่อบริเวณที่ได้รับบาดเจ็บ และ endothelial cells (Stadelmann *et al.*, 1998) การหดตัวของหลอดเลือดจะเกิดขึ้นหลังจากเกิดบาดแผลเพียงระยะเวลา 5-10 นาที ต่อจากนั้นจะมีการรวมกลุ่มของเกล็ดเลือด โดยจะพบเกล็ดเลือดบริเวณที่เกิดบาดแผลในปริมาณมากภายในเวลาอันรวดเร็ว แล้วเกล็ดเลือดจะหลั่งสาร ไซโตไคน์ชนิดต่างๆ ได้แก่ Epidermal growth factor (EGF), Transforming growth factor $\beta 1$ and $\beta 2$, และ Platelet-derived growth factor ซึ่งแต่ละชนิดจะทำหน้าที่แตกต่างกันไป แสดงรายละเอียดดังตารางที่ 1 (Singer and Clark, 1999) นอกจากนี้เกล็ดเลือดยังหลั่ง pro-inflammatory cytokines ได้แก่ serotonin, bradykinin, prostaglandins, prostacyclins, thromboxane และ histamine ซึ่งสารกลุ่มนี้ถูกหลั่งออกมาเพื่อกระตุ้นให้เซลล์ในกระบวนการอักเสบแบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเคลื่อนที่มายังบริเวณบาดแผล กระตุ้นให้หลอดเลือดขยายตัว และเพิ่มความสามารถในการซึมผ่านเข้าออกของสารได้มากขึ้น ในขณะเดียวกันก็เกิดกระบวนการเปลี่ยน fibrinogen เป็น fibrin เกิดเป็น fibrin clot อุดบริเวณที่เกิดบาดแผลไว้ชั่วคราว เพื่อให้เลือดหยุดไหล และป้องกันเชื้อโรค นอกจากนี้ fibrin และ fibronectin จะสานกันเป็นร่างแหเพื่อช่วยในการเคลื่อนที่และเป็นที่ยึดเกาะของเซลล์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการหายของแผล เช่น neutrophils, macrophages และ fibroblasts เป็นต้น ที่เข้ามาบริเวณบาดแผลรวมทั้งเป็นที่ยึดเกาะของเกล็ดเลือดด้วย (Midwood *et al.*, 2004) เมื่อเลือดหยุดไหลแล้ว จะเกิดกระบวนการสลาย fibrin clot ออกไป โดยการทำงานของสาร plasminogen activator เปลี่ยน plasminogen เป็น plasmin ซึ่งเป็นเอนไซม์ย่อย fibrin จากนั้นเซลล์ต่างๆที่เกี่ยวข้องกับกระบวนการอักเสบ จะเคลื่อนตัวเข้ามาที่บริเวณบาดแผล เพื่อเข้าสู่ระยะต่อไป (Singer and Clark, 1999; Strodtbeck, 2001; Jones *et al.*, 2003; Bale and Jones, 2006)

ตารางที่ 1 ไซโตคายน์ที่มีความสัมพันธ์ต่อกระบวนการหายของแผล

ไซโตคายน์	เซลล์ที่สร้างและหลัง	เซลล์เป้าหมายและผลของการทำงาน
Epidermal growth factor family		ส่งผลต่อการสร้างเซลล์เยื่อผิวหนังและเซลล์มีเซนไคม์ชั้นใหม่
Epidermal growth factor	Platelets	การเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนของเซลล์
Transforming growth factor α	Macrophages, endothelial cells	การเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนของเซลล์
Heparin-binding epidermal growth factor	Macrophages	การเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนของเซลล์
Fibroblast growth factor family		ส่งผลต่อการสร้างหลอดเลือดบริเวณแผล
Basic fibroblast growth factor	Macrophages, endothelial cells	กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และการเพิ่มจำนวนเซลล์ fibroblast
Acidic fibroblast growth factor	Macrophages, endothelial cells	กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่และการเพิ่มจำนวนเซลล์ fibroblast
Keratinocyte growth factor	Fibroblasts	การเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนเซลล์เยื่อผิวหนัง
Transforming growth factor β family		ส่งผลต่อการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันและเพิ่มความแข็งแรงของเนื้อเยื่อ
Transforming growth factor $\beta 1$ & $\beta 2$	Platelets, macrophages	การเคลื่อนที่ของเซลล์เยื่อผิวหนัง, การดึงดูดเซลล์ macrophages และ fibroblasts, การสังเคราะห์ extracellular-matrix และการปรับโครงสร้างเนื้อเยื่อ
Transforming growth factor $\beta 3$	Macrophages	ต่อต้านการเกิดรอยแผลเป็น
Platelet-derived growth factor	Platelets, macrophages, epidermal cells	การเพิ่มจำนวนเซลล์ fibroblasts, การดึงดูดเซลล์ fibroblasts และ macrophages และกระตุ้นการทำงานของเซลล์
Vascular endothelial growth factor	Epidermal cells, macrophages	กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพิ่ม permeability ของหลอดเลือด
Tumor necrosis factor α	Neutrophils	การตอบสนองต่อ growth factor
Interleukin-1	Neutrophils	การตอบสนองต่อ growth factor
Insulin-like growth factor 1	Fibroblasts, epidermal cells	เพิ่มการสร้าง granulation tissue และเยื่อผิวหนังใหม่เพื่อปกคลุมบาดแผล
Colony-stimulating factor 1	Multiple cells	กระตุ้นการทำงานของ macrophage เพิ่มการสร้าง granulation tissue

ที่มา: Singer and Clark (1999)

ระยะที่ 2: ระยะการอักเสบ (inflammatory phase)

การอักเสบประกอบด้วยลักษณะการปวด บวม แดง และร้อนที่บริเวณแผล ซึ่งระยะนี้จะเกิดการขยายตัวของหลอดเลือด (vasodilatation) และเกิดกระบวนการอักเสบจากฤทธิ์ของ prostaglandins และ histamines ซึ่งหลั่งมาจาก mast cell ผนังหลอดเลือดยอมให้มีการซึมผ่านของของเหลวได้มากขึ้น (capillary permeability) เลือดจึงไหลสู่บริเวณที่อักเสบเร็วขึ้นและมากขึ้น (Strodtbeck, 2001) ทำให้สังเกตเห็นลักษณะการบวมที่บริเวณบาดแผล เซลล์เม็ดเลือดขาว (leukocytes) จะเคลื่อนออกจากหลอดเลือดทางบริเวณรอยต่อของเซลล์บุผิวหลอดเลือด เข้าสู่บริเวณที่มีการอักเสบ (Bale and Jones, 2006) เซลล์สำคัญที่เกี่ยวข้องในระยะเวลาของการอักเสบมี 2 ชนิด คือ Neutrophil และ Macrophage โดยที่ Neutrophil จะเคลื่อนที่มาเป็นอันดับแรก (Jones *et al.*, 2003) มาถึงบริเวณบาดแผลภายในระยะเวลา 1 ชั่วโมงหลังจากเกิดบาดแผล และพัฒนากลายเป็น predominant cells เพิ่มจำนวนมากที่สุดที่บริเวณบาดแผลภายใน 2 วันแรก Neutrophil และ Monocyte (ซึ่งต่อไปจะพัฒนาเป็น Macrophage) จะถูกดึงดูดเข้าสู่แผลโดย chemotactic factors หลายชนิด เช่น Platelet-derived growth factor (PDGF) และ Transforming growth factor- β (TGF- β) (Bale and Jones, 2006) Neutrophil จะกำจัดสิ่งแปลกปลอมและแบคทีเรียโดยกระบวนการ phagocytosis นอกจากนี้ยังสามารถฆ่าแบคทีเรียได้ด้วยวิธีการปล่อยอนุมูลอิสระเข้าไปฆ่าแบคทีเรีย เรียกว่า กระบวนการ respiratory burst รวมทั้งมีหน้าที่ทำความสะอาดแผล โดยการหลั่งเอนไซม์กลุ่ม proteases เพื่อมาย่อยเศษเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผล Neutrophil มีชีวิตสั้นมากและจะลดจำนวนลงอย่างรวดเร็วภายใน 3 วันหลังการบาดเจ็บ เมื่อ Neutrophil หมดยุติการทำงานก็จะเข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ (apoptosis) และถูกจับกินโดย Macrophage (Greenhalgh, 1998) เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดอื่นๆ ที่เข้ามายังบริเวณแผลอีก ได้แก่ helper T cell ซึ่งจะหลั่งสารไซโตไคน์กระตุ้นให้ T cell แบ่งตัวเพิ่มจำนวน และเพิ่มการอักเสบ ทำให้หลอดเลือดขยายตัวเพิ่มขึ้น เพิ่มความสามารถการซึมผ่านเข้าออกของสารผ่านผนังหลอดเลือด นอกจากนี้ T cell ยังกระตุ้นการทำงานของ Macrophage ด้วย Macrophage นั้นจะเข้ามาแทนที่ Neutrophil ในระยะเวลา 2 วันหลังจากเกิดบาดแผล บทบาทหลักของ Macrophage คือ จับกินแบคทีเรีย และย่อยสลายเนื้อเยื่อที่เสียหายโดยการหลั่งเอนไซม์กลุ่ม proteolytic enzymes (Deodhar and Rana, 1997) นอกจากนี้ Macrophage ยังหลั่งสารต่างๆ เช่น growth factors และไซโตไคน์ที่จำเป็นต่อกระบวนการหายของแผล เช่น Platelet-derived growth factor (PDGF) และ Transforming growth factor- β (TGF- β) เป็นต้น โดยเฉพาะในช่วงวันที่ 3 และวันที่ 4 หลังเกิดบาดแผล สารเหล่านี้จะดึงดูดเซลล์ที่เกี่ยวข้องในระยะการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน (Proliferative phase) ได้แก่ fibroblasts เข้ามายังบริเวณบาดแผล นอกจากนี้ Macrophage ยังถูกกระตุ้นด้วยสภาวะที่มีออกซิเจนต่ำที่เกิดขึ้นบริเวณบาดแผล ให้หลั่งสารไปกระตุ้นให้เกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) กระตุ้นเซลล์ในกระบวนการ re-epithelization และกระตุ้นการสร้าง granulation tissue และสาร extracellular matrix จากการที่ Macrophage หลั่งสารเหล่านี้ ส่งผลให้กระบวนการหายของแผลเข้าสู่ระยะถัดไปหากสิ่งแปลกปลอม

ถูกทำลายไปได้หมด หรือเหลือจำนวนน้อยจนไม่เป็นอันตราย จำนวนของ Neutrophil และ Macrophage ที่บริเวณบาดแผลจะลดลง ระยะการอักเสบก็จะสิ้นสุดลง แต่หากสิ่งแปลกปลอมมีความรุนแรงเกินกว่า Neutrophil และ Macrophage จะทำลายได้ เซลล์ทั้ง 2 ชนิด ก็ยังคงแบ่งตัวเพิ่มจำนวนอีก กระบวนการอักเสบก็จะดำเนินต่อไป (Jones *et al.*, 2003)

ระยะที่ 3: ระยะการแบ่งเซลล์และซ่อมแซมบาดแผล (proliferative phase and repair)

หลังจากเกิดบาดแผลขึ้น 2-3 วัน เซลล์ fibroblasts ก็จะเคลื่อนที่มายังบริเวณบาดแผล เพื่อเข้าสู่ระยะการแบ่งเซลล์ มีการเจริญของเนื้อเยื่อเพื่อซ่อมแซมบาดแผล ในขณะที่ระยะการอักเสบจะสิ้นสุดลง กระบวนการต่างๆที่เกิดขึ้นในระยะนี้ ได้แก่ มีการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) สร้างเนื้อเยื่อใหม่ (granulation tissue formation) ซึ่งประกอบด้วย fibrin, fibronectin, collagens, proteoglycans, glycoproteins และ glycosaminoglycans (GAGs) เช่น hyaluronan เป็นต้น มีการสะสมคอลลาเจน (collagen deposition) สร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่ (epithelization) และการหดตัวของแผล (wound contraction) ซึ่งแต่ละกระบวนการมีรายละเอียดดังนี้

การสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis หรือ neovascularization) กระบวนการนี้จะเกิดขึ้นพร้อมๆ กับการเจริญเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblast และ endothelial cell เนื่องจากในระยะแรกบาดแผลอยู่ในภาวะขาดออกซิเจน (hypoxia) และสารอาหาร จึงมีการกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดที่จะนำออกซิเจนและสารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเผาผลาญเพื่อให้ได้พลังงานของเซลล์ ทำให้มีหลอดเลือดฝอยเพิ่มขึ้น จนเลือดไหลผ่านได้ เนื้อเยื่อที่อยู่ในระยะที่มีการเกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ จะสังเกตเห็นลักษณะมีสีแดง เนื่องจากมีการสร้างหลอดเลือดฝอย (capillaries) ขึ้นใหม่เป็นจำนวนมาก เซลล์เริ่มต้นของ endothelial cell จะมาจากหลอดเลือดบริเวณที่ไม่เกิดบาดแผล พัฒนาตัวเองให้มี pseudopodia และผลัดตัวเองผ่าน extracellular matrix (ECM) เข้ามายังบริเวณบาดแผลเพื่อสร้างเป็นหลอดเลือดใหม่ (Greenhalgh, 1998) โดย endothelial cell ถูกดึงดูดให้เคลื่อนเข้ามายังบริเวณบาดแผล และเกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ด้วยสาร angiogenic factors ที่หลังจากเซลล์ต่างๆที่อยู่บริเวณแผล เช่น สาร TGF- α ที่หลังจาก macrophages และเกล็ดเลือด เป็นต้น นอกจากนี้สภาวะขาดออกซิเจน และการเกิดกรดแลคติกที่บริเวณบาดแผล ก็เป็นปัจจัยหนึ่งที่กระตุ้นการเจริญและเพิ่มจำนวนของ endothelial cell โดยตรง ในการเคลื่อนที่ของ endothelial cell มายังบริเวณบาดแผลต้องอาศัยเอนไซม์ collagenases, plasminogen activator และ metalloproteinases ในการย่อยเลือดที่แข็งตัว เนื้อเยื่อเก่าและ ECM เก่า เมื่อมีการสร้างหลอดเลือดใหม่อย่างสมบูรณ์แล้ว การเคลื่อนที่และเพิ่มจำนวนของ endothelial cell ก็จะลดลง และหลอดเลือดเก่าที่ถูกทำลายก็จะสลายไป (Strodtbeck, 2001)

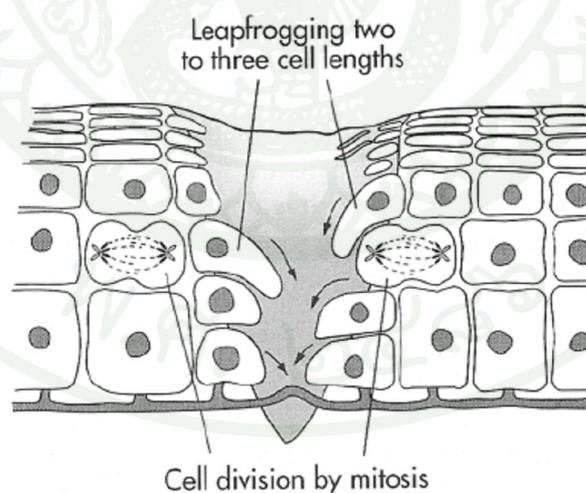
การสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (granulation tissue formation) ในขณะที่เกิดกระบวนการสร้างหลอดเลือดใหม่ เซลล์ fibroblasts จะเริ่มเคลื่อนที่มายังบริเวณบาดแผลภายในระยะเวลา 2-5 วัน หลังจากเกิดบาดแผล และจะเพิ่มจำนวนมากที่สุดหลังจากเกิดบาดแผลได้ 1-2 สัปดาห์ (Stadelmann *et al.*, 1998) fibroblast จะผลิต collagen fibers และ proteoglycans ซึ่งเป็น ground substance ที่มีลักษณะคล้ายกาว (glue-like ground substance) ซึ่งช่วยเติมพื้นที่ช่องว่างในแผลให้เต็ม เคลือบและเชื่อม fibers เข้าด้วยกัน ทำให้ fibers มีความยืดหยุ่นเพิ่มมากขึ้น และยังผลิต fibronectin เพื่อเป็นโครงข่ายสำหรับเนื้อเยื่อใหม่ ซึ่งจะยึด collagen fibers และเซลล์เข้าไว้ด้วยกัน (Bale and Jones, 2006) นอกจากนี้ยังมีการสังเคราะห์ collagen ที่บริเวณขอบแผลด้วย granulation tissue จะเริ่มพบที่บริเวณบาดแผลภายใน 2-5 วันหลังจากเกิดบาดแผล และจะเกิดขึ้นอย่างต่อเนื่องจนกว่าแผลจะปิดสนิท โดยภายใน granulation tissue จะประกอบไปด้วย หลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ เซลล์ fibroblasts, macrophage, myofibroblasts และสารประกอบ ECM ที่สร้างขึ้น โดยเซลล์ fibroblast เป็นหลัก ได้แก่ fibronectin, collagen, glycosaminoglycans, elastin, glycoproteins และ proteoglycans เป็นต้น โดยเฉพาะ fibronectin และ hyaluronan จะช่วยส่งเสริมการเคลื่อนที่ของเซลล์เข้ามายังบริเวณบาดแผล (Strodtbeck, 2001) ในขณะที่มีการสังเคราะห์ ECM ใหม่ขึ้นนี้ พบว่าจะมีการสลาย fibrin, collagen และองค์ประกอบอื่นๆของ ECM เก่าออกไป โดยการทำงานของเอนไซม์ matrix metalloproteinases (MMPs) และ plasminogen activators เป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเพื่อสร้างความสมดุลระหว่างการสร้าง และการสลาย ECM ซึ่งจะเกิดมากขึ้นในระยะการปรับโครงสร้างของเนื้อเยื่อ (remodeling) (Harding *et al.*, 2002)

การสะสมคอลลาเจน (collagen deposition) เซลล์ fibroblasts เป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่สร้าง collagen โดยจะสร้าง collagen หลังจากเกิดบาดแผลได้ 2-3 วัน และมีการสะสม collagen สูงที่สุดใน 1-3 สัปดาห์หลังจากเกิดบาดแผล กระบวนการสร้างและสะสม collagen นี้มีความสำคัญต่อกระบวนการหายของแผลในทุกๆระยะ เนื่องจากกระบวนการนี้จะช่วยเพิ่มความแข็งแรงของแผลเป็นที่ยึดเกาะของเกล็ดเลือดและกระตุ้นให้มีการหลั่ง activating chemotactic factors จากเกล็ดเลือด แต่ก่อนที่จะมีการสร้าง collagen เกิดขึ้น สิ่งที่ใช้เป็นที่ยึดเกาะของเซลล์ต่างๆที่เคลื่อนมายังบริเวณแผลคือ fibrin และ fibronectin เท่านั้น ซึ่งมีความแข็งแรงน้อยกว่า collagen มาก (Greenhalgh, 1998; Ruszczak, 2003)

การสร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่ (epithelization) จะเกิดขึ้นหลังจากที่มีการสร้าง granulation tissue แล้ว ซึ่งการสร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่จะเป็นการสร้าง epithelium มาปกคลุมผิวของบาดแผล โดย keratinocytes ที่อยู่บริเวณขอบแผล จะถูกกระตุ้นจาก growth factors เช่น epidermal growth factor (EGF) ที่หลั่งออกมาในบริเวณที่เกิดบาดแผล ให้มีการแบ่งเซลล์และเคลื่อนมายังบริเวณเนื้อเยื่อที่

ต้องได้รับการซ่อมแซม การเคลื่อนที่ของ keratinocytes ต้องการสภาวะแวดล้อมที่ชุ่มชื้น (Waldrop *et al.*, 1991) โดย keratinocytes จะเคลื่อนที่แบบ leapfrogging (ภาพที่ 4) คือ มันจะยึดตัวเองออก เริ่มจากขอบแผลแล้วยืดยาว (ความยาวประมาณ 2-3 เซลล์) เข้าไปจับที่ตำแหน่งหนึ่งในบริเวณ บาดแผล จากนั้นก็จะดึงตัวเองไปข้างหน้า เพื่อปกคลุมพื้นที่ผิวบาดแผล เซลล์ชั้นแรกที่เกิดการสร้าง เยื่อผิวหนังใหม่ คือ ชั้น stratum basale ซึ่งกระบวนการนี้จะเกิดขึ้นในแต่ละชั้นของเยื่อผิวหนัง จนกระทั่ง ขอบแผลบรรจบกัน กระบวนการเคลื่อนย้ายเซลล์จากขอบแผลไปยังศูนย์กลางบาดแผลก็จะเสร็จสิ้น และเมื่อพื้นผิวทั้งหมดของบาดแผลถูกปกคลุมด้วย keratinocytes แผลก็จะปิด (Swaim, 1980)

การหดตัวของแผล (wound contraction) จะเกิดขึ้นหลังจากเกิดบาดแผลประมาณ 1 สัปดาห์ และจะเกิดขึ้นจนกว่ากระบวนการ epithelization สิ้นสุดลง โดยเริ่มเกิดขึ้นเมื่อ fibroblasts ได้รับการ กระตุ้นจาก growth factors ให้พัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น myofibroblasts ซึ่งมีโครงสร้าง cytoskeleton เป็น α -actin คล้ายกับที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ (smooth muscle cell) (Hinz, 2005) ดังนั้น myofibroblasts จึงมีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยให้มีการหดตัวของเนื้อเยื่อ ช่วยดึงขอบของบาดแผลให้มา บรรจบกัน ทำให้แผลมีขนาดเล็กลง และลดปริมาณของ ECM ที่ใช้เพื่อการซ่อมแซมรอยแตกของ แผล นอกจากนี้การหดตัวยังช่วยส่งเสริมกระบวนการ epithelization โดยช่วยลดระยะเวลาในการ เคลื่อนที่ของ keratinocytes มายังบริเวณกลางแผลด้วย (Strodtbeck, 2001)



ภาพที่ 4 การเคลื่อนที่ของเซลล์ keratinocytes โดยวิธี leapfrogging

ที่มา: Strodtbeck (2001)

ระยะที่ 4: ระยะการปรับโครงสร้างเนื้อเยื่อ (Remodeling phase)

ระยะนี้ granulation tissue จะเจริญเป็น connective tissue ที่สมบูรณ์ หรือเกิดเป็นรอยแผลเป็น (scar) เอนไซม์ที่มีบทบาทสำคัญในระยะนี้คือ กลุ่ม matrix metalloproteinases (MMPs) ซึ่งหลั่งออกมาจากเซลล์ macrophages, epidermal cells, endothelial cells และ fibroblasts (Singer and Clark, 1999) เอนไซม์ MMPs ชนิดที่มีความสำคัญกับกระบวนการหายของแผลมาก คือ collagenases ซึ่งมีบทบาทสำคัญเกี่ยวกับการสลาย collagen ซ่อมแซมและจัดรูปร่างของ connective tissue ที่สร้างใหม่ ในระยะนี้ fibronectin และ hyaluronan จะถูกแทนที่ด้วยกลุ่มของ collagen bundles ที่มีขนาดใหญ่ และแข็งแรง ส่งผลให้ความตึงของแผล (tensile strength) เพิ่มมากขึ้น การสร้างหลอดเลือดใหม่หยุดลง ความหนาแน่นของเซลล์ต่างๆ เช่น macrophages, keratinocytes และ fibroblasts ลดลง จากการตายด้วยกระบวนการ apoptosis keratinocytes จะเป็นเซลล์ชนิดแรกที่จะเข้าสู่โปรแกรมการตายของเซลล์ ในระยะการปรับโครงสร้างของเนื้อเยื่อ เป็นระยะการสร้างความสัมพันธ์ระหว่าง collagen ใหม่และการทำลาย collagen เก่า กระบวนการซ่อมแซมบาดแผลจะหยุดลง เมื่อ connective tissue ที่สร้างขึ้นใหม่เจริญเติบโตเต็มที่ (Strodtbeck, 2001)

ความตึงของแผล (tensile strength) จะเกิดขึ้นตั้งแต่เริ่มมีการสะสม collagen และจะมีความตึงเพิ่มมากขึ้น เมื่อ collagen fibrils เกิดการจัดเรียงตัว (reorganized) สานกันเป็น โครงข่ายกลายเป็น collagen fibers และมีการรวมกลุ่มกันเป็นมัด (collagen bundles) ขนาดใหญ่และหนาแน่นขึ้นจากการสร้างพันธะโควาเลนต์เชื่อมต่อกันระหว่าง collagen fibers การเปลี่ยนแปลงขนาดของ collagen fibrils ไปเป็น collagen fibers และเป็น collagen bundles จะส่งผลต่อความแข็งแรง (strength) ของแผล โดยแผลที่ collagen fibers มีการจัดเรียงตัวที่หนาแน่นกว่าและรวมกลุ่มกันเป็น collagen bundles ที่ที่หนาแน่นมากกว่าจะมีความแข็งแรงและส่งผลทำให้ค่า tensile strength ของแผลมากกว่าแผลที่มี collagen fibers ที่บางกว่าและจัดเรียงตัวแบบกระจายไม่รวมกลุ่ม ดังนั้น เมื่อเกิดบาดแผลขึ้นที่ผิวหนัง collagen fibers ปกติที่อยู่บริเวณผิวหนังก็จะถูกแทนที่ด้วย collagen fibers จากรอยแผลเป็น ซึ่งจะมีการจัดเรียงตัวของ collagen fibers ไม่หนาแน่นเท่ากับที่พบในผิวหนังปกติก่อนเกิดแผล ส่งผลให้ผิวหนังบริเวณรอยแผลเป็นอ่อนแอและมีค่า tensile strength น้อยกว่าในผิวหนังปกติ นอกจากนี้ค่า tensile strength ยังมีความสัมพันธ์กับการเชื่อมต่อกันระหว่าง collagen fibers กับสาร ground substance ที่อยู่ในแผลด้วย เช่น proteoglycan หรือ glycoprotein เป็นต้น ซึ่งอาจเป็นปัจจัยหนึ่งที่ส่งผลทำให้ค่า tensile strength เพิ่มมากขึ้นด้วย (Rozaini *et al.*, 2004)

ปัจจัยที่มีผลต่อการหายของแผล

การหายของแผลแม้จะเป็นกระบวนการที่เกิดขึ้นเองตามธรรมชาติ แต่ก็มีปัจจัยหลายประการที่จะช่วยส่งเสริมหรือขัดขวางการหายของแผล ซึ่งสามารถจำแนกเป็นปัจจัยต่างๆ ได้ดังนี้

1. ปัจจัยเฉพาะที่

1.1 ขนาดของแผล แผลที่มีขนาดใหญ่และลึก กระบวนการหายของแผลจะช้ากว่าแผลที่มีขนาดเล็กและตื้น

1.2 ตำแหน่งของแผล หากบาดแผลเกิดขึ้นที่บริเวณที่มีการเคลื่อนไหวอยู่เสมอ จะส่งผลให้เส้นใย collagen และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ เกิดการฉีกขาดได้ง่าย ทำให้แผลหายช้า

1.3 ลักษณะของแผลที่มีการติดเชื้อ หรือมีสิ่งแปลกปลอมอยู่ในแผล เช่น การอักเสบเป็นหนอง จะเพิ่มความดันภายในแผล ทำให้แผลมีลักษณะบวม ขอบแผลจะติดกันยากขึ้น ขัดขวางการหายของแผล

1.4 เทคนิคการเย็บแผลและการทำแผล ต้องคำนึงถึงหลักการป้องกันการติดเชื้ออย่างเคร่งครัด และให้แผลเกิดการกระทบกระเทือนน้อยที่สุด

1.5 การไหลเวียนของเลือดบริเวณแผล ในภาวะที่มีการขาดเลือด กระบวนการสลายน้ําลิมเลือดจะลดลง ทำให้มีโอกาสดังกล่าวเกิดขึ้นในหลอดเลือดสูง เลือดจะมาเลี้ยงแผลได้น้อยลง รวมทั้งเส้นเลือดที่สร้างขึ้นใหม่บริเวณแผลจะบอบบาง และเกิดการเปลี่ยนแปลงได้ง่าย เช่น ในคนอ้วนที่มีชั้นไขมันหนา จะมีการไหลเวียนของเลือดไม่ดี แผลที่เกิดขึ้นจะหายได้ช้า

1.6 ปริมาณออกซิเจนที่บริเวณแผล สิ่งที่มีอิทธิพลต่อปริมาณออกซิเจนที่ไปเลี้ยงแผลนั้นขึ้นอยู่กับ การไหลเวียนของเลือดที่ไปยังแผล มากกว่าการให้ออกซิเจนโดยตรงที่แผล

1.7 อุณหภูมิของแผล ถ้าอุณหภูมิที่บริเวณแผลต่ำกว่าอุณหภูมิของร่างกาย (อุณหภูมิร่างกายปกติประมาณ 36-38°C) จะทำให้แผลหายช้าลง เนื่องจากจะส่งผลให้กระบวนการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่และการสังเคราะห์ collagen เกิดได้ช้าลง และส่งผลทำให้การทำงานของ neutrophil, fibroblast และ epithelial cell เกิดได้น้อยลงด้วย (McGuinness *et al.*, 2004)

2. ปัจจัยทั่วไป

2.1 อายุ คนและสัตว์ที่อยู่ในวัยสูงอายุจะมีการซ่อมแซมแผลได้ช้ากว่าวัยหนุ่มสาว เนื่องจากจะมีการตอบสนองต่อการอักเสบได้น้อย มีการสังเคราะห์ collagen และการซ่อมแซมเยื่อบุผิวลดลง สามารถสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ช้า เพราะผนังหลอดเลือดจะแข็งและหนาตัว ทำให้การไหลเวียนของเลือดเข้าสู่บริเวณบาดแผลได้น้อย

2.2 ภาวะโภชนาการ เป็นปัจจัยสำคัญในการส่งเสริมการหายของแผล เช่น โปรตีน เป็นองค์ประกอบสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ และเป็นส่วนประกอบในการนำออกซิเจน วิตามินซี ช่วยในการสร้าง collagen วิตามินเอ ช่วยในการสร้างเยื่อบุผิว เป็นต้น ดังนั้นการขาดสารอาหารที่จำเป็นต่อการสร้างเนื้อเยื่อจึงทำให้แผลหายช้า

2.3 สภาวะการเจ็บป่วย เช่น คนและสัตว์ที่ป่วยเป็นโรคเบาหวานจะมีการหายของบาดแผลช้ากว่าปกติ เพราะเม็ดเลือดขาวที่ทำหน้าที่กำจัดสิ่งแปลกปลอมและเชื้อโรคทำงานได้ไม่ดี มีการไหลเวียนของเลือดไปเลี้ยงบาดแผลได้น้อย เนื่องจากความผิดปกติของหลอดเลือด ภาวะความเครียด ทำให้มีการหลั่ง cortisol มากขึ้น ซึ่งฮอร์โมนดังกล่าวนี้จะยับยั้งกระบวนการอักเสบ ลดความสามารถในการซึมผ่านของของเหลว (permeability) ทำให้หลอดเลือดหดตัว และการไหลเวียนของเลือดลดลง

2.4 ยา ยาที่ได้รับอยู่อาจมีอิทธิพลต่อการหายของแผล เช่น ยาบางกลุ่มจะรบกวนการสังเคราะห์โปรตีน เป็นต้น (Harari, 1993)

จะเห็นได้ว่าในระหว่างกระบวนการหายของบาดแผล มีปัจจัยหลายอย่างที่ยับยั้งกระบวนการหายของบาดแผล เช่น การติดเชื้อแบคทีเรีย และการอักเสบของแผลที่รุนแรง ดังนั้นในบางครั้งอาจมีความจำเป็นจะต้องใช้ยารักษาแผล เพื่อช่วยลดภาวะดังกล่าว โดยมากแล้วยารักษาแผลมักมีส่วนผสมของยาปฏิชีวนะ หรือยาต้านจุลชีพ และยาลดอาการอักเสบ แต่ในปัจจุบันพบว่ามีพืชสมุนไพรหลายชนิด ที่ถูกนำมาใช้สมานแผล โดยภูมิปัญญาชาวบ้าน นอกจากนี้ยังมีงานวิจัยที่ศึกษาฤทธิ์ของสมุนไพรบางชนิดในการรักษาบาดแผล เช่น ใบบัวบก ว่านหางจระเข้ เป็นต้น (สุนทรี, 2535) สมุนไพรหลากหลายชนิดเหล่านี้ ต่างก็มีสรรพคุณแตกต่างกัน จึงจำเป็นต้องศึกษาสรรพคุณเคมีในพืชสมุนไพร เพื่อจะได้เข้าใจถึงสรรพคุณการออกฤทธิ์ ประโยชน์และโทษของสมุนไพรแต่ละชนิด ทำให้สามารถใช้สมุนไพรได้อย่างถูกต้องและปลอดภัย

สารพฤกษเคมีในพืชสมุนไพร

สมุนไพรประกอบด้วยสารพฤกษเคมี (phytochemicals) หลายชนิดที่แตกต่างกันออกไป ซึ่งสรรพคุณของพืชสมุนไพรจะขึ้นอยู่กับชนิดและปริมาณของสารประกอบทางเคมีเหล่านี้ ในแต่ละส่วนของพืชสมุนไพรมีสารประกอบที่แตกต่างกันไป และนอกจากนี้ชนิดและปริมาณของสารจะแปรไปตามปัจจัยอื่นๆ อีก เช่น ชนิดของพันธุ์สมุนไพร สภาพแวดล้อมที่ปลูก ช่วงเวลาที่เก็บเกี่ยว เป็นต้น สารประกอบทางเคมีในพืชสมุนไพรสามารถแบ่งออกเป็น 2 กลุ่มใหญ่ๆ คือ

1. สารปฐมภูมิ (Primary metabolite)

เป็นสารที่พบในพืชชั้นสูงทั่วไป พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด เป็นผลผลิตที่ได้จากกระบวนการสังเคราะห์แสง โดยพืชดูดน้ำ ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์ และพลังงานจากแสงแดด เพื่อสร้างสารจำพวกคาร์โบไฮเดรต ด้วยเหตุนี้พืชเกือบทุกชนิดจึงประกอบด้วยแป้ง และน้ำตาล สารเหล่านี้มนุษย์ได้นำมาใช้เป็นอาหาร นอกจากนี้สารปฐมภูมียังรวมถึงสารจำพวกไขมัน เม็ดสี และเกลือ เป็นต้น (วันดี, 2541) ซึ่งสารปฐมภูมิที่พบในพืช มีดังนี้

1.1 คาร์โบไฮเดรต (carbohydrate) เป็นสารอินทรีย์ที่ประกอบด้วยคาร์บอน (carbon) ไฮโดรเจน (hydrogen) และออกซิเจน (oxygen) โดยไฮโดรเจนและออกซิเจนมักจะพบในสัดส่วน 2:1 เป็นกลุ่มสารที่พบได้ทั้งในพืชและสัตว์ ในพืชคาร์โบไฮเดรตถูกสร้างขึ้นโดยการสังเคราะห์แสง ถูกเก็บสะสมไว้เป็นอาหารของพืช และถูกนำมาใช้เป็นอาหารของทั้งคนและสัตว์ คาร์โบไฮเดรตแบ่งได้เป็น 3 กลุ่มใหญ่ๆ คือ น้ำตาล (sugars) อนุพันธ์ของน้ำตาล (sugar derivatives) โพลีแซคคาไรด์และโพลียูโรไนด์ (polysaccharides and polyuronides)

1.2 ไขมัน (lipids) เป็นเอสเทอร์ที่เกิดจากกรดไขมันที่มีโมเลกุลยาวจับกับแอลกอฮอล์ ประกอบด้วย ไช (wax) และน้ำมันไม่ระเหย (fix oil) (รัตนา, 2547)

1.3 โปรตีน (proteins) และเอนไซม์ (enzymes) โปรตีน เป็นสารอินทรีย์ที่เกิดจากกรดอะมิโนมาจับกันเป็น โมเลกุลใหญ่ โปรตีนถูกสร้างขึ้นในสิ่งมีชีวิตทั้งในพืชและสัตว์ พืชมักเก็บโปรตีนไว้ในรูปเม็ด aleurone ส่วนเอนไซม์ เป็นโปรตีนชนิดหนึ่ง ที่มีน้ำหนักโมเลกุลอยู่ระหว่าง 13,000-840,000 คาลตัน ทำหน้าที่เป็นตัวเร่งปฏิกิริยาต่างๆ ในพืช (วันดี, 2541)

2. สารทุติยภูมิ (Secondary metabolite)

เป็นสารประกอบที่มีลักษณะค่อนข้างพิเศษ พบต่างกันในพื้นที่แต่ละชนิด สารเหล่านี้เกิดจากขบวนการชีวสังเคราะห์ (biosynthesis) ในพืช สารส่วนใหญ่ในกลุ่มนี้จะมีสรรพคุณทางยา หรือเป็นสารพิษ (วันดี, 2541) อย่างไรก็ตาม จากงานวิจัยพบว่า สารปฐมภูมิบางตัวก็ออกฤทธิ์ในการรักษาโรคได้เช่นกัน (ปัจจุบัน, 2541) นอกจากนี้พืชสมุนไพรชนิดหนึ่ง อาจมีสารประกอบที่มีฤทธิ์ทางยาเพียงตัวเดียว หรือหลายตัวก็ได้ สารทุติยภูมิกลุ่มสำคัญที่พบในพืช มีดังนี้

2.1 อัลคาลอยด์ (alkaloids) เป็นกลุ่มสารที่พบมากในพืชชั้นสูง พบบ้างในพืชชั้นต่ำ สัตว์ และจุลินทรีย์ เป็นกลุ่มสารที่ถูกนำมาใช้มากในการเป็นยารักษาโรค และส่วนหนึ่งเป็นสารพิษ ปัจจุบันพบอัลคาลอยด์มากกว่า 5,000 ชนิด เป็นสารอินทรีย์ที่มีลักษณะโดยรวม คือ ส่วนใหญ่มีฤทธิ์เป็นด่างและมีไนโตรเจน (nitrogen) อยู่ในโมเลกุล มีรสขม ไม่ละลายน้ำ แต่ละลายได้ดีในตัวทำละลายอินทรีย์ (organic solvent) เป็นสารที่พบมากในพืชสมุนไพร แต่ปริมาณสารจะต่างกันไปตามฤดูกาล (สุนทรี, 2535) อัลคาลอยด์เป็นสารที่พบมากในพืชใบเลี้ยงคู่ ที่พบได้บ่อย เช่นวงศ์ Apocynaceae, Papaveraceae, Papilionaceae, Rubiaceae, Rutaceae, Menispermaceae, Lauraceae, Solanaceae, Loganiaceae, Berberidaceae และ Compositae พืชใบเลี้ยงเดี่ยวที่พบอัลคาลอยด์ เช่นวงศ์ Liliaceae และ Amaryllidaceae เป็นต้น

พืชแต่ละชนิดจะสร้างและสะสมอัลคาลอยด์ในปริมาณต่างกันไป ขึ้นอยู่กับปัจจัยต่างๆ เช่น อายุของพืช อุณหภูมิ แสงสว่าง ฤดูกาล ความชื้นในอากาศ ปริมาณน้ำในดิน ความอุดมสมบูรณ์ของพื้นดิน ปริมาณน้ำฝน เป็นต้น อัลคาลอยด์มีการสะสมในเกือบทุกส่วนของพืช เช่น ใบ เส้นใบ ขน ดอก ผล เมล็ด ราก เปลือก หัวใต้ดิน และช่องว่างภายในเซลล์ (vacuole) โดยหน้าที่ของอัลคาลอยด์ในพืชยังไม่ทราบแน่ชัด คาดว่าอัลคาลอยด์ทำหน้าที่ช่วยป้องกันพืชจากสัตว์และแมลงต่างๆ เนื่องจากสารกลุ่มนี้ส่วนใหญ่มีรสขมและเป็นพิษ อัลคาลอยด์เป็นตัวเก็บสะสมแร่ธาตุ สามารถจะสลายตัวให้ธาตุไนโตรเจน และธาตุอื่นๆ ที่จำเป็นต่อการดำรงชีพของพืช นอกจากนี้ยังเป็นตัวช่วยควบคุมการเจริญเติบโตของพืช (growth regulator) เป็นต้น (นิจิตริ และพยอม, 2534) อัลคาลอยด์เป็นกลุ่มสารประเภทที่ทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาในหลายระบบ ตัวอย่างของอัลคาลอยด์ที่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา ได้แก่ เอฟเฟดรีน (ephedrine) คอลชิซิน (colchicine) ริซินิน (ricinine) โคเคน (cocaine) มอร์ฟีนและโคเดอีน (morphine และ codeine) คาร์ทราแรนทัส อัลคาลอยด์ (catharanthus alkaloids) คาเฟอีน (caffeine) นิโคติน (nicotine) อะโทรปีน และ ไฮออสไซยามีน (atropine and hyoscyamine) (Trease and Evans, 2002)

2.2 น้ำมันหอมระเหย (volatile oil, essential oil) เป็นน้ำมันที่ได้จากพืชโดยการกลั่นด้วยไอน้ำ (steam distillation) การบีบ (expression) หรือการสกัดด้วยสารเคมี (extraction) พบได้ในส่วนต่างๆของพืช เช่น ดอก ใบ ผล กลีบเลี้ยง มีกลิ่นและรสเฉพาะตัว ระเหยได้ง่ายในอุณหภูมิปกติ และมีความหนาแน่นน้อยกว่าน้ำ (นิจศิริและพยอม, 2534)

2.3 เรซิน และบาลซัม (resins and balsams) เรซินเป็นสารอินทรีย์ หรือสารผสมประเภทโพลีเมอร์ (polymer) มีรูปร่างไม่แน่นอน ส่วนใหญ่จะเปราะแตกง่าย บางชนิดจะนิ่มไม่ละลายน้ำ ละลายได้ในตัวทำละลายอินทรีย์ เมื่อเผาไปจะหลอมเหลวได้สารที่ใสขุ่นและเหนียว (ปัจจุบัน, 2541)

2.4 กลัยโคไซด์ (glycosides) เป็นสารกลุ่มใหญ่อีกกลุ่มหนึ่งที่พบมากในพืชสมุนไพร พบมากในพืชชั้นสูง ทั้งใบเลี้ยงเดี่ยว เช่น วงศ์ Liliaceae และใบเลี้ยงคู่ เช่น วงศ์ Rubiaceae, Leguminosae และ Euphorbaiceae เป็นต้น ในเกือบทุกส่วนของพืช เช่น ใบ ดอก ผล เมล็ด เปลือก ราก หัว โดยที่โครงสร้างหลักจะแบ่งเป็น 2 ส่วน คือ ส่วนที่เป็นน้ำตาล (glycone) และส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (aglycone) ส่วนที่เป็นน้ำตาลจะไม่มีฤทธิ์ทางเภสัชวิทยา แต่เป็นส่วนช่วยทำให้การละลายและดูดซึมเข้าสู่ร่างกายดีขึ้น ส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาลมีโครงสร้างที่แตกต่างกันไป ซึ่งมีผลทำให้ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของกลัยโคไซด์ต่างกัน เช่น มีฤทธิ์เป็นยาระบาย ยาลดการอักเสบ เป็นต้น (นิจศิริ และพยอม, 2534) ทำให้สามารถแบ่งชนิดของกลัยโคไซด์ได้หลายชนิด ตัวอย่างของกลัยโคไซด์ที่นำมาใช้ในทางยา ได้แก่

2.4.1 แอนทราควิโนน กลัยโคไซด์ (anthraquinone glycosides) พบมากในพืชวงศ์ Leguminosae เป็นสารกลุ่มที่มีอนุพันธ์ของแอนทราซีน (anthracene) เป็นส่วนประกอบของส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล (ส่วน aglycone)

2.4.2 ฟลาโวนอยด์ กลัยโคไซด์ (flavonoid glycosides) เป็นสารกลุ่มที่มีอนุพันธ์ของฟลาโวนอยด์เป็นองค์ประกอบในส่วนที่ไม่ใช่น้ำตาล ซึ่งฟลาโวนอยด์ยังแบ่งเป็นกลุ่มย่อยอีกหลายชนิด ตัวอย่างเช่น ฟลาโวนส์ (flavone) ฟลาโวนอล (flavonol) เป็นสารที่ให้สี เหลือง พบมากในพืชหลายชนิด ไอโซฟลาโวนอยด์ (isoflavonoids) พบมากในพืชตระกูลถั่ว เป็นสารที่ให้ฤทธิ์เลียนแบบฮอร์โมนเพศหญิง เช่น daidzein ในถั่วเหลือง เป็นต้น ฟลาโวนอยด์ (flavonoids) เป็นสารประกอบจำพวก polyphenolic มีคุณสมบัติ antioxidant บางชนิดมีสรรพคุณบรรเทาอาการอักเสบ ต้านไวรัส และช่วยบำรุงตับให้แข็งแรง (พรรณนิภา, 2544)

2.4.3 คาร์ดิแอค กลัยโคไซด์ (cardiac glycosides) เป็นกลัยโคไซด์ที่ออกฤทธิ์ต่อระบบกล้ามเนื้อหัวใจและการไหลเวียนของโลหิต (นิจศิริ และพยอม, 2534)

2.4.4 ซาโปนิน กลัยโคไซด์ (saponin glycosides) เป็นสารกลุ่มที่เกิดฟองเมื่อเขย่ากับน้ำ จึงเป็นสารลดแรงตึงผิวที่ดี ใช้เป็นสารชะล้างแทนสบู่ได้ (Ikan, 1999)

2.5 แทนนิน (tannin) เป็นสารโพลีฟีนอล (polyphenol) มีโมเลกุลใหญ่และโครงสร้างซับซ้อน พบได้ในพืชเกือบทุกชนิด มีรสฝาด จึงใช้เป็นยาฝาดสมาน มีคุณสมบัติตกตะกอน โปรตีนได้ และมีฤทธิ์ยับยั้งการเจริญของแบคทีเรีย พบในเปลือกมังคุด ทับทิม เปลือกต้นลิเลียด ใบฝรั่ง ผลและเมล็ดหมาก เป็นต้น

2.6 สเตียรอยด์ (steroid) เป็นสารประกอบในพืชที่ละลายได้ดีในไขมัน หรือตัวทำละลายที่ละลายในไขมัน ได้เป็นสารเคมีที่มีสูตรโครงสร้างคล้ายกับฮอร์โมนและยาต้านการอักเสบ (วันดี, 2541)

2.7 น้ำยาง (latex) พืชบางชนิดจะให้ น้ำยางซึ่งมีลักษณะสีขาวเหมือนน้ำมัน เรียกว่า ลาเท็กซ์ ได้จากส่วนของพืชที่เรียกว่า laticiferous vessels (ท่อน้ำยาง) ในน้ำยางประกอบด้วยแป้ง กัม เรซิน และสารอื่นๆ (สมพร, 2525)

สมุนไพรโดยทั่วไปมีทั้งการใช้แบบสดและการใช้แบบแห้ง การใช้แบบสดนั้นมีข้อดีตรงสะดวก ใช้ง่ายแต่ฤทธิ์การรักษาของยาไม่คงที่ ดังนั้นส่วนมากจึงนิยมใช้แบบแห้ง โดยเลือกเก็บยาสมุนไพรตามฤดูกาลเก็บเกี่ยวของพืช แล้วนำมาแปรรูปสภาพโดยผ่านขบวนการที่เหมาะสมเพื่อเก็บยาไว้ใช้ได้ยาวนาน พืชที่ใช้เป็นยาสมุนไพรนั้น การแปรรูปในขั้นต้นโดยมากใช้วิธีทำให้แห้ง ซึ่งมีหลายวิธี ได้แก่ วิธีอบให้แห้ง หรือผึ่งให้แห้ง เป็นต้น อุณหภูมิที่ทำให้แห้งโดยทั่วไป คือ 50-60 องศาเซลเซียส เนื่องจากอุณหภูมิที่สูงเกินไปอาจทำลายโครงสร้าง และคุณสมบัติของสารประกอบที่สำคัญทางยา หลังจากทำให้แห้งแล้ว จึงนำพืชสมุนไพรนั้นมาผ่านขั้นตอนการสกัดสารต่อไป

แอสกลาย

สมุนไพรที่สนใจนำมาศึกษาการกระตุ้นกระบวนการหายใจของแผลได้แก่ แอสกลาย ซึ่งมีชื่อท้องถิ่น คือ มหาประสาธน์ เกียะไก้ให้ ตาสีกะมอ นางกวัก ว่านสลิ กะแหยก ย่าง แอสกลายสามสี อยู่ใน

วงศ์ Euphorbiaceae มีชื่อวิทยาศาสตร์ คือ *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit ชื่อสามัญ คือ Redbird cactus, Sliper flower และ Jew bush แสยกลายมีถิ่นกำเนิดในป่าเขตอบอุ่นของฟลอริดา เม็กซิโก ทวีปอเมริกากลาง มีลักษณะเป็นไม้พุ่มผลัดใบสูง 40-100 ซม. แตกกิ่งก้านเป็นกอแน่น ลำต้นคดงอไปมา ผิวเรียบ สีเขียว ทุกส่วนของลำต้นมีน้ำยางสีขาว ใบมีลักษณะเป็นใบเดี่ยว มีสีเขียวสลับเขียว ใบจะเรียงสลับสองข้างในแนวระนาบเดียวกันของกิ่ง ใบกว้าง 2.5-5 ซม. ยาว 3.5-7 ซม. โคนใบและปลายใบมนหรือแหลม ขอบใบเรียบหรือหยักเป็นคลื่น ใบค่อนข้างหนา อวบน้ำ ด้านล่างมีขนอ่อน ก้านใบยาว 2-7 มม. (ภาพที่ 5) ต้นจะทิ้งใบก่อนออกดอก ดอกจะออกเป็นช่อสั้นๆ ตามลำต้น ที่ยอดและตามกิ่ง ดอกขนาดเล็ก มี 5 กลีบ เรียงเป็น 2 ชั้น เป็นดอกแบบแยกเพศอยู่บนต้นเดียวกัน ก้านช่อยาว 3-20 มม. ช่อดอกยาว 1-2.5 มม. ที่ฐานด้านนอกมีต่อมน้ำหวานรูปกระจุกกว่า 1 ต่อม ด้านในมีต่อม 2-4 ต่อม ดอกมีสีแดงสด รูปร่างคล้ายรวงเท้าหรือเรือ ปลายเรียวแหลม ผลเป็นชนิดแห้งแล้วแตก นิยมปลูกเป็นไม้ประดับ เป็นรั้ว ขอบสนาม น้ำยางสดจากต้นใช้เบื่อปลา เนื่องจากมีความเป็นพิษ ใช้กำจัดหูด ทาผิวหนังแก้เกื้อน แผลงป้องกัน ไซบและยอด ตำใส่แผลสด ใช้ประสานเนื้อ (รุ่งระวี และคณะ, 2542; ปราโมทย์, 2524)



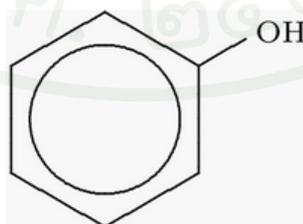
ภาพที่ 5 ภาพถ่ายของต้นและดอกแสยกลาย

ที่มา: Pereira (2007)

สารประกอบสำคัญที่พบในต้นแสยกลาย

ยางสีขาวจากทุกส่วนของต้นและเมล็ด จะพบสารพิษซึ่งเป็น phorbol derivatives ได้แก่ euphorbol, caoutchouc, resin และ pedilstatin สารพิษเหล่านี้จะทำให้เกิดการระคายเคืองต่อระบบทางเดินอาหารและผิวหนัง หากรับประทานส่วนของพืชที่มีน้ำยาง จะทำให้เยื่อเมือกกระเพาะอาหารและลำไส้อักเสบ มีอาการคลื่นไส้ อาเจียน ท้องเสียอย่างรุนแรง ถ้าได้รับมากอาจเสียชีวิตได้ และหากสัมผัสน้ำยาง จะทำให้ระคายเคือง เกิดอาการคัน ปวด ผิวหนังอักเสบ บวมแดง หรือพองเป็นตุ่มน้ำ กัดผิวหนังใหม่เป็นแผลพุพอง หากน้ำยางเข้าตา จะทำให้เยื่อบุตาอักเสบ เกิดอาการคัน หนองตาบวม อาจมีอาการตาบอดชั่วคราวได้ (Buckingham, 1994; Pettit *et al.*, 2002)

สารที่แยกได้จากส่วนใบโดยการสกัดด้วยเอทานอล ได้แก่ terpenoids และ long-chain alcohol (Misra and Khastgir, 1969; Mukherjee *et al.*, 1992) 5'-S-methylthioadenosine, pyrogallol, 1,4-dihydroquinone, nicotinamide, praline, butyric acid, 2-hexenoic acid, caproic acid, cinnamic acid, dihydroxycinnamic acid, *p*-hydroxycinnamic acid, gluconic acid, palmitic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, *m*-methoxy-*p*-hydroxycinnamic acid, docosenoic acid, hexaeicosanoic acid และ octaeicosanoic acids (Vidotti *et al.*, 2006) นอกจากนี้เมื่อศึกษาสารในต้นและใบ ที่ได้จากการสกัดด้วยเอทานอล โดยวิธี extensive spectroscopic จะพบ kaempferol 3-*O*- β -D-glucopyranoside-6-(3-hydroxy-3-methylglutarate), quercitrin, isoquercitrin และ scopoletin ซึ่งเป็นสารในกลุ่ม flavonoids จัดเป็นสาร phenolic compound (Abreu *et al.*, 2008) สอดคล้องกับ Kamalakannan *et al.* (2010) ที่รายงานว่า เมื่อสกัดใบของต้นแสยกลายด้วยเอทานอลจะพบสาร flavonoids, polyphenols และ steroids ซึ่งเชื่อว่าสารดังกล่าวนี้เป็นสารสำคัญหลักในแสยกลายที่ออกฤทธิ์ทางเภสัช (Kamalakannan *et al.*, 2010) นอกจากนี้ยังพบสาร hydroxyproline, γ -aminobutyric acid และ citrulline ในส่วนของเมล็ดอีกด้วย (Harborne, 1984) ซึ่งสาร โพลีฟีนอล (polyphenol) เป็นสารที่มีกลุ่มฟีนอล (phenol) (มีวงแหวนของเบนซีนและมีหมู่ไฮดรอกซิล) เป็นองค์ประกอบ (ภาพที่ 6) ด้วยโครงสร้างที่มีหมู่ไฮดรอกซิลอยู่นี้ ทำให้สารกลุ่มนี้มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระอย่างเด่นชัด (Robertson, 1992)



ภาพที่ 6 โครงสร้างของฟีนอล

ที่มา: Robertson (1992)

ฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาของแอสกัลาย

แอสกัลายเป็นพืชที่มีคุณสมบัติในการรักษาหลายประการด้วยกัน คือ ใช้ทำยาต้านการอักเสบ ยาปฏิชีวนะ สารที่ใช้ในการห้ามเลือด ยาต้านเชื้อไวรัส และยาต้านการเจริญของเซลล์มะเร็ง (Cáceres *et al.*, 1995; Pettit *et al.*, 2002) ซึ่งพอสรุปฤทธิ์ทางเภสัชวิทยาได้ ดังนี้

1. ฤทธิ์ต้านการอักเสบ

Abreu *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ต้านการอักเสบในหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมน้ำที่อุ้งเท้าด้วย carrageenan โดย carrageenan นี้จะไปเหนี่ยวนำให้มีการหลั่ง prostaglandins ซึ่งเป็นสารตัวกลางที่ทำให้เกิดกระบวนการอักเสบ และการบวมน้ำขึ้น นิสิตสารสกัดแอสกัลายด้วยเอทานอลเข้าช่องท้องของหนูในปริมาณ 500, 750 และ 1000 มก./กก. พบว่าสามารถยับยั้งการอักเสบได้ 83%, 94% และ 92% ตามลำดับ (Abreu *et al.*, 2006) นอกจากนี้เมื่อให้หนูกิน pedilanthain ซึ่งเป็นเอนไซม์กลุ่ม proteolytic enzyme ที่แยกได้จากน้ำยางจากลำต้นและใบของแอสกัลาย พบว่าสามารถต้านการอักเสบที่ช่องปากได้ (Dhar *et al.*, 1988) และยังพบว่า galactose-specific lectin ที่แยกได้จากน้ำยาง สามารถยับยั้งการแบ่งเซลล์ของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด lymphocytes ที่มีม้ามของหนูได้เช่นกัน (Seshagirao, 1995)

2. ฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ

Abreu *et al.* (2006) ได้ศึกษาฤทธิ์ของแอสกัลายต่อการต้านอนุมูลอิสระ พบว่าสารสกัดเอทานอลจากแอสกัลายสามารถต้านอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) และ reactive nitrogen species (RNS) ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเฉพาะอนุมูลอิสระชนิด HO^{\cdot} ($\text{IC}_{50}=345\pm 77 \mu\text{g/mL}$), $\text{O}_2^{\cdot-}$ ($\text{IC}_{50}=143\pm 7 \mu\text{g/mL}$), HOCl ($\text{IC}_{50}=113\pm 20 \mu\text{g/mL}$), ONOO^{\cdot} ($\text{IC}_{50}=44\pm 3 \mu\text{g/mL}$) และ $\cdot\text{NO}$ ($\text{IC}_{50}=54\pm 4 \mu\text{g/mL}$) (IC_{50} = Inhibition concentration 50 ได้แก่ ค่าความเข้มข้นของสารที่สามารถยับยั้งเชื่อได้ครึ่งหนึ่งของปริมาณทั้งหมด) โดยเชื่อว่าสารที่ออกฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระนี้เป็นกลุ่ม phenolic compound เนื่องจากพบในปริมาณสูงเมื่อสกัดแอสกัลายด้วยเอทานอล (Abreu *et al.*, 2006)

อนุมูลอิสระ คือ ไอออน หรือ โมเลกุลที่ไม่เสถียร ซึ่งมีความว่องไวต่อการเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นที่อยู่รอบๆ โดยการดึงหรือให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลข้างเคียงเพื่อให้ตัวเองมีความ

เสถียร และโมเลกุลข้างเคียงนั้นจะกลายเป็นอนุมูลอิสระตัวใหม่ที่จะเข้าทำปฏิกิริยากับโมเลกุลอื่นๆ เกิดเป็นปฏิกิริยาลูกโซ่ (chain reaction) ต่อไป อนุมูลอิสระที่เกิดขึ้นในร่างกายส่วนใหญ่นั้นเกิดจากระบวนการเผาผลาญสารอาหารในไมโทคอนเดรีย แต่หากร่างกายเกิดบาดแผลหรือติดเชื้อ การทำงานของ polymorphonuclear cells (PMNs) โดยเฉพาะ neutrophils และ phagocytic cells ที่เคลื่อนที่เข้ามาที่บริเวณนั้นเพื่อทำลายเชื้อโรคที่เข้ามารุกราน ก็ทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นด้วย (Swain *et al.*, 2002) โดยขณะที่เซลล์เม็ดเลือดขาวดังกล่าวโอบล้อมแปลกปลอมเข้ามา แล้วปล่อยเอนไซม์และสารต่างๆ ออกมาเพื่อฆ่าและย่อยเชื้อโรคนั้น จะเกิดกระบวนการ respiratory burst ซึ่งทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้น 2 ชนิด คือ ROS (ได้แก่ H_2O_2 , $O^{\cdot -}$, HO^{\cdot} , ROO^{\cdot} , $HOCl$) และ RNS (ได้แก่ NO และ $ONOO^{\cdot}$) การยับยั้งขบวนการนี้เกิดขึ้นได้โดยอาศัยสารต้านอนุมูลอิสระ (antioxidant) หรือสารต้านออกซิเดชัน ซึ่งทำหน้าที่เป็นตัวให้อิเล็กตรอนกับโมเลกุลที่ขาด และเมื่อให้อิเล็กตรอนไปแล้ว สารกลุ่มนี้จะเป็นโมเลกุลที่ขาดอิเล็กตรอน แต่จะไม่ก่อให้เกิดปฏิกิริยาต่อเนื่อง และจะไม่แย่งจับอิเล็กตรอนกับโมเลกุลอื่น ทำให้ไม่เกิดอันตรายต่อเซลล์ในร่างกาย (นวลศรี และอัญญา, 2545) มีการศึกษาพบว่าสารกลุ่มโพลีฟีนอลจัดเป็นสารที่มีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระ ดังนั้นสารสกัดแยกกลายในเอทานอลซึ่งมี phenolic compound เป็นองค์ประกอบหลัก จึงช่วยลดการถูกทำลายของผนังเซลล์ ทำให้เซลล์แข็งแรงและมีการทำงานได้ดีขึ้น อันเป็นส่วนสำคัญที่ช่วยด้านการอักเสบได้อีกทางหนึ่งด้วย (Hampton *et al.*, 1998; McCord, 2000)

3. ฤทธิ์ต้านเชื้อแบคทีเรีย

Vidotti *et al.* (2006) พบว่า เมื่อแยกสารจากการสกัดใบแยกกลายด้วยเอทานอลจะได้สาร 5'-S-methylthioadenosine, pyrogallol, 1,4-dihydroquinone, nicotinamide, proline, butyric acid, 2-hexenoic acid, caproic acid, cinnamic acid, dihydroxycinnamic acid, *p*-hydroxycinnamic acid, gluconic acid, palmitic acid, 3,4-dimethoxycinnamic acid, *m*-methoxy-*p*-hydroxycinnamic acid, docosenoic acid, hexaeicosanoic acid และ octaeicosanoic acids และพบว่าสาร 5'-S-methylthioadenosine และ 1,4-dihydroquinone มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อแบคทีเรียได้จากการศึกษาด้วยวิธี Broth microdilution method โดยสามารถยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* ได้ (Vidotti *et al.*, 2006) นอกจากนี้ สารกลุ่ม poly-*O*-acylated jatrophone diterpenes ที่สกัดได้จากน้ำยางของแยกกลาย โดยการสกัดด้วย dichloromethane (CH_2Cl_2) สามารถทำลายเชื้อ *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra ซึ่งเป็นแบคทีเรียที่ทำให้เกิดวัณโรคได้ (Mongkolvisut and Sutthivaiyakit, 2007)

4. ฤทธิ์อื่นๆ

Rahuman *et al.* (2007) รายงานว่า สารสกัดจากแสมกลายด้วยปีโตรเลียมอีเทอร์ มีฤทธิ์ในการฆ่าลูกน้ำของยุงได้ โดยค่า IC_{50} เท่ากับ 55.26 ppm (Rahuman *et al.*, 2007) นอกจากนี้ยังพบว่า สารกลุ่ม poly-*O*-acylated jatrophone diterpenes ที่สกัดได้จากน้ำยางของแสมกลายมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อปรสิตที่ทำให้เกิดไข้มาลาเรียได้ โดยมีค่า IC_{50} อยู่ในช่วง 3.4-4.4 $\mu\text{g/mL}$ (Mongkolvisut and Sutthivaiyakit, 2007) Kamalakannan *et al.* (2010) พบว่าสารสกัดจากใบของแสมกลายด้วยเอทานอลที่มีความเข้มข้น 2-6 ppm มีฤทธิ์ในการทำลายไข่ ตัวอ่อน และดักแด้ของยุงที่เป็นพาหะนำโรคเท้าช้าง (*Mansonia uniformis*) ได้มากกว่า 50% โดยสารสำคัญที่พบในสารสกัด ได้แก่ flavonoids, phenols และ steroids เป็นหลัก (Kamalakannan *et al.*, 2010)

ความเป็นพิษ

Hohmann and Molnár (2004) รายงานว่า น้ำยางสีขาวคล้ายน้ำมันที่พบในพืชวงศ์ Euphorbiaceae เช่น *Pedilanthus tithymaloides* (L.) Poit. หรือแสมกลาย จะเป็นพิษต่อผิวหนัง ทำให้ผิวหนังไหม้ เกิดการอักเสบ และเป็นสารก่อมะเร็ง โดยสารที่เป็นพิษที่แยกได้จากน้ำยางจะเป็นสารในกลุ่ม diterpenes ได้แก่ phorbol และ ingenol ester สารทั้ง 2 ชนิดนี้ จะก่อให้เกิดอันตรายต่อเซลล์ด้วยการไปกระตุ้นเอนไซม์ protein kinase C ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ควบคุมและส่งสัญญาณภายในเซลล์ ให้เกิดการตอบสนองต่อสัญญาณนั้นๆ เช่น ให้เซลล์เกิดการแบ่งตัว (cell proliferation) หรือให้เซลล์เกิดการเปลี่ยนแปลงรูปร่าง (cell differentiation) เป็นต้น เพื่อไปทำหน้าที่ต่างๆ ที่ร่างกายต้องการ หากเอนไซม์นี้ทำงานมากเกินไปเซลล์อาจเกิดการแบ่งตัวมากหรือเปลี่ยนแปลงรูปร่างไปจนผิดปกติ ทำให้เกิดเป็นเนื้องอกหรือมะเร็งได้ อย่างไรก็ตามในน้ำยางยังมีสารในกลุ่ม diterpenes ชนิดอื่นๆอีกที่ไม่เป็นพิษแต่มีฤทธิ์ทางยาเช่นกัน ได้แก่ สารที่มีโครงสร้างเป็น macrocyclic และ polycyclic structure เช่น polyphenol compounds จะไม่เป็นพิษ และมีฤทธิ์ด้านการอักเสบ (Cateni *et al.*, 2003; Hohmann and Molnár, 2004) นอกจากนี้ Lim and Soepadmo (1984) รายงานว่าน้ำยางของแสมกลายทำให้เยื่อบุดวงตาของกระต่ายเกิดการอักเสบและเจ็บปวด เนื่องจากพบสาร galactose specific lectin และ proteolytic enzyme ในน้ำยาง โดย galactose specific lectin จะทำให้เกิดการตกตะกอนของเม็ดเลือดแดง และ proteolytic enzyme จะไปทำลายเยื่อบุดวงตา (Lim and Soepadmo, 1984)

การทดลองในสัตว์

Abreu *et al.* (2006) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์ด้านการอักเสบของสารสกัดด้วยวิธี maceration จากต้นและใบแสดกหลายด้วย 30% เอทานอล โดยทำการทดลองในหนูที่เหนียวทำให้อุ้งเท้าบวมด้วยสาร carragenan แล้วฉีดสารสกัดแสดกหลายด้วยเอทานอลเข้าไปในช่องท้องพบว่า สามารถลดการอักเสบและลดอาการบวมได้ และยังได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) พบว่าสารสกัดแสดกหลายด้วยเอทานอลนี้มีฤทธิ์จับกับอนุมูลอิสระชนิด ROS และ RNS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ โดยเมื่อนำสารสกัดมาแยกสารจะพบโปรตีนประมาณ 0.70% พบกรดอะมิโนอิสระประมาณ 20 ชนิด และพบสารกลุ่ม phenolic compound ประมาณ 17.4 ± 0.15 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้งของสารสกัด จึงคาดว่าสารที่ออกฤทธิ์ด้านการอักเสบและต้านอนุมูลอิสระจะเป็นสารกลุ่ม phenolic compound (Abreu *et al.*, 2006) นอกจากนี้ Abreu *et al.* (2008) ได้ศึกษาฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระในห้องปฏิบัติการ (*in vitro*) ของสารสกัดด้วยวิธี percolation จากต้นและใบแสดกหลายด้วย 70% เอทานอล พบว่า สารสกัดแสดกหลายมีฤทธิ์จับกับอนุมูลอิสระชนิด ROS และ RNS ได้อย่างมีประสิทธิภาพ เมื่อนำสารสกัดมาแยกสารจะพบสารกลุ่ม phenolic compound และ flavonoids ประมาณ 76.0 ± 4.8 และ 9.8 ± 0.4 มิลลิกรัม/กรัม น้ำหนักแห้งของสารสกัด ตามลำดับ โดยเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาที่ผ่านมา จะพบว่าการใช้วิธีการสกัดสารที่ต่างกัน (maceration กับ percolation) และใช้ตัวทำละลายที่มีความเข้มข้นต่างกัน (30% EtOH กับ 70% EtOH) จะได้สาร phenolic compound ในปริมาณต่างกัน (Abreu *et al.*, 2006; Abreu *et al.*, 2008) สอดคล้องกับ Lee *et al.* (2006) ที่รายงานว่า สารกลุ่ม phenolic compound ที่ได้จากการสกัด *Gastrodia elata* ด้วยเมทานอล จะมีฤทธิ์ด้านการอักเสบได้ โดยทำการศึกษาในหนูที่ถูกเหนียวทำให้อุ้งเท้าและหูบวม ด้วยสาร carragenan และ arachidonic acid ตามลำดับ พบว่าสารกลุ่ม phenolic compound จะไปยับยั้งการทำงานของเอนไซม์ cyclooxygenase (COX) ซึ่งเป็นเอนไซม์ที่กระตุ้นให้เกิดกระบวนการอักเสบ และยังมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระจากการเข้าจับกับอนุมูลอิสระชนิด ROS ที่เกิดขึ้นในกระบวนการอักเสบอีกด้วย (Lee *et al.*, 2006)

การกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในพืชชนิดอื่น

การศึกษาวิจัยคุณสมบัติของสารสกัดจากพืชต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในสัตว์ทดลองนั้นมีมาอย่างต่อเนื่อง และตลอดระยะเวลาที่ผ่านมา ได้มีนักวิจัยพบว่าพืชหลายชนิดที่มีฤทธิ์ดังกล่าว ดังตัวอย่างเช่น Shukla *et al.* (1999) ได้ทำการศึกษาผลของ asiaticoside ที่สกัดได้จากบัวบก (*Centella asiatica* L.) ที่มีต่อการหายของแผลแบบตัดเฉือน โดยการสร้างแผลแบบตัดเฉือน

ที่หลังของหนูตะเภา (guinea pig) โดยใช้ biopsy punch แล้วทาแผลด้วยสารละลาย asiaticoside ในน้ำเกลือที่ระดับความเข้มข้น 0.05%, 0.1% หรือ 0.2% ปริมาณ 20 μ l/แผล/ครั้ง วันละ 2 ครั้ง นาน 7 วัน ส่วนกลุ่มควบคุมจะใช้ vehicle control ผลการทดลองพบว่าการทาแผลด้วยสารละลาย asiaticoside ในน้ำเกลือที่ระดับความเข้มข้น 0.2% จะช่วยเพิ่มปริมาณ hydroxyproline และค่า tensile strength ของแผลได้ 57% เมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม และยังช่วยเพิ่มปริมาณคอลลาเจน และกระตุ้นการสร้างเยื่อผิวใหม่ได้ดีกว่ากลุ่มอื่น เนื่องจากสาร asiaticoside กระตุ้นการสร้างและหลัง basic fibroblast growth factor (bFGF) ซึ่งจะกระตุ้นการทำงานของเซลล์ในกระบวนการหายของแผลหลายชนิด เช่น endothelial cell, fibroblast และ myofibroblast เป็นต้น (Shukla *et al.*, 1999) นอกจากนี้ Hamid *et al.* (2002) ได้ทำการศึกษาฤทธิ์กระตุ้นอนุมูลอิสระของสารสกัดที่ได้จากส่วนใบ ก้านใบ (Petioles) และรากของบัวบกด้วยเอทานอล น้ำ และ light petroleum โดยใช้วิธี diene conjugation formation test โดยใช้กรดไขมันชนิดลิโนเลอิก และ thiobarbituric acid test (TBA) ผลการทดลองพบว่าสารสกัดเอทานอลจากทุกส่วนของบัวบก สามารถต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าตัวทำละลายชนิดอื่นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) โดยสารสกัดจากรากบัวบกจะมีฤทธิ์ต้านอนุมูลอิสระได้ดีกว่าสารสกัดจากใบ และก้านใบอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.05$) (Hamid *et al.*, 2002)

นอกจากบัวบกแล้ว ยังมีการศึกษาในว่านหางจระเข้ โดย Chithra *et al.* (1998) ได้ศึกษาผลของว่านหางจระเข้ (*Aloe barbadensis*) ต่อการหายของแผลที่ผิวหนังในหนูที่เป็นเบาหวาน โดยหนู Wistar rat จะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยการฉีด streptozotocin ปริมาณ 70 mg/kg เป็นเวลา 7 วัน จากนั้น แบ่งหนูทดลองออกเป็น 2 ชุด เพื่อทำการสร้างบาดแผลแบบตัดเนื้อ ขนาด 2 x 2 cm ที่หลัง เพื่อใช้ศึกษาค่าทาง histology และ wound contraction หรือสร้างแผลแบบกรีด (incision) ยาว 6 cm ลึก 1 cm ที่หลัง และเย็บแผล เพื่อใช้ศึกษาค่า tensile strength จากนั้นหนูทดลองแต่ละชุดจะถูกแบ่งออกเป็น 3 กลุ่ม ตามชนิดและวิธีการให้สาร โดยกลุ่มที่ 1 ไม่ได้รับสารใดๆ กลุ่มที่ 2 ทาว่านหางจระเข้ที่แผล และกลุ่มที่ 3 ให้กินว่านหางจระเข้ซึ่งเตรียมจากว่านหางจระเข้ทำให้แห้งแล้วบดเป็นผง หากจะนำมาใช้ทาแผลก็ผสมน้ำเล็กน้อยให้ได้เป็นลักษณะเจลเหนียว ผลการทดลองพบว่าการใช้ว่านหางจระเข้รักษาแผลทั้ง 2 แบบ ช่วยให้แผลหายได้เร็วขึ้นโดยเพิ่มการสังเคราะห์คอลลาเจน เพิ่มการผลิตของขอบแผล ทำให้สามารถสร้างเยื่อผิวใหม่ปกคลุมผิวบาดแผลได้เร็วขึ้น และยังช่วยเพิ่มความแข็งแรงของแผลด้วยเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม (Chithra *et al.*, 1998) นอกจากนี้ Mendonca *et al.* (2009) ได้ศึกษาผลของเจลว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลผ่าตัด โดยใช้หนู Wistar rat สร้างแผลแบบกรีดขนาดยาว 20 มม. ลึก 2 มม. ที่หลัง แบ่งหนูออกเป็น 4 กลุ่มเพื่อทายาให้ครบ 10 วัน โดยกลุ่มที่ 1 ไม่ทายาใด กลุ่มที่ 2 ทาด้วยเจลว่านหางจระเข้ กลุ่มที่ 3 ทายา microcurrent และกลุ่มที่ 4 ทาเจลว่านหางจระเข้ร่วมกับยา microcurrent พบว่าแผลของหนูกลุ่มที่ 4 เข้าสู่ระยะ

proliferative phase เร็วกว่าและรอยแยกที่ชั้น dermis ปิดได้รวดเร็วกว่าแผลกลุ่มอื่น และยังมีจำนวน เซลล์ fibroblast และหลอดเลือดที่สร้างใหม่มากกว่ากลุ่มอื่น แสดงให้เห็นว่าการใช้ เจล ว่านหางจระเข้ ร่วมกับยา microcurrent มีฤทธิ์ส่งเสริมกัน ในการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลแบบแผลเปิด (Mendonca *et al.*, 2009)

นอกจากนี้แล้ว ครามป่า (*Tephrosia purpurea* Linn.) ก็เป็นพืชอีกชนิดหนึ่งที่มีคุณสมบัติ ในการกระตุ้นการหายของแผล โดย Lodhi *et al.* (2006) ได้การศึกษาผลของการทาสารสกัดด้วยเอทานอลจากต้นครามป่า บนแผลแบบตัดเฉือนของหนู โดยใช้หนู Wistar ทาแผลด้วยครีม simple ointment base, ครีมที่มีสารสกัดจากต้นครามป่าเข้มข้น 5% และ 0.005% Fluticasone propionate ทุกวัน แล้วทำการวัดปริมาณ hydroxyproline, ค่า wound contraction, epithelialization ทุก 2 วัน จากนั้น ตัดเนื้อเยื่อออกมาศึกษาลักษณะทาง histopathology พบว่า แผลที่ทาด้วยสารสกัดจากต้นครามป่าจะหายเร็วกว่ากลุ่มอื่น และพบ collagen fiber เซลล์ fibroblasts และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ปริมาณมากกว่ากลุ่มอื่น (Lodhi *et al.*, 2006)

วิธีการประเมินการหายของแผล

การหายของแผลสามารถประเมินได้โดยใช้วิธีการต่างๆ เช่น การสังเกตลักษณะภายนอก (gross appearance) การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological study) และการวัดค่าองค์ประกอบต่างๆในแผล เช่น การประมาณค่าปริมาณ collagen รวมในแผล จากการวัดปริมาณ hydroxyproline เป็นต้น ซึ่งจากการรายงานพบว่าวิธีประเมินการหายของแผลที่นิยมปฏิบัติอยู่ 4 วิธีการ ได้แก่

1. การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological study)
2. การวัดความแข็งแรงของแผล (tensile strength)
3. การวัดปริมาณ hydroxyproline
4. การใช้ค่าทางสถิติในการประเมินการหายของแผล (parameter of wound healing)

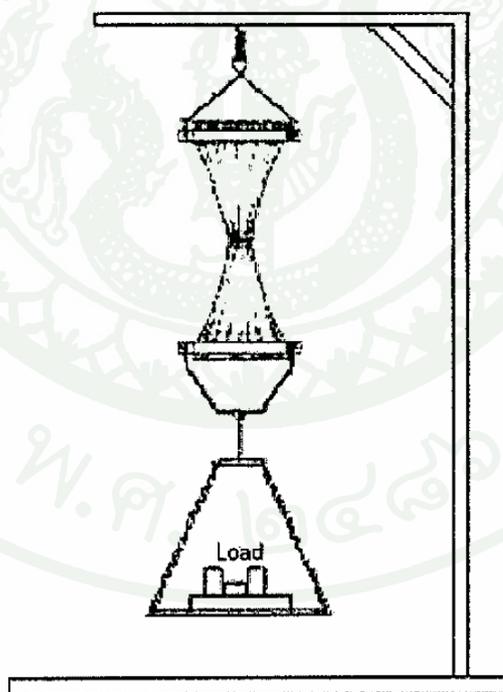
1. การศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ (histological study)

คือ การศึกษาองค์ประกอบต่างๆของเนื้อเยื่อที่ผ่านขั้นตอนการย้อมสี และทำเป็นสไลด์ถาวรโดยการใช้กล้องจุลทรรศน์ โดยมีสิ่งที่จะศึกษา ได้แก่ ลักษณะและความหนาแน่นของ fibroblast, fibrocyte, collagen fibers และหลอดเลือด Lodhi *et al.* (2006) ได้ศึกษาการทาสารสกัดด้วยเอทานอลจากต้นครามป่า (*Tephrosia purpurea* Linn.) โดยใช้ส่วนที่อยู่เหนือดินทั้งหมด ทาบนแผลของหนูแรททุกวันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ทาสารสกัด พบว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดจะหายเร็วกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลของหนูทั้ง 2 กลุ่ม มาทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในวันที่ 9 ด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ eosin พบว่า แผลที่ทาด้วยสารสกัด จะพบ collagen fiber เซลล์ fibroblasts และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุม (Lodhi *et al.*, 2006) Ajlia *et al.* (2010) ได้ทำการศึกษาการใช้ยาล้างแผลที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ papain ที่สกัดได้จากน้ำยางของผลมะละกอ เปรียบเทียบกับการใช้ยาฆ่าเชื้อ betadine ซึ่งมีสารออกฤทธิ์ คือ 1% povidone-iodine พบว่าแผลที่ทาด้วยน้ำยาล้างแผลที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ papain หายได้เร็วกว่าเมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม มาทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในวันที่ 7, 14 และ 21 โดยการย้อมสีด้วยวิธี Masson's trichrome พบว่าในวันที่ 7 แผลที่ทาด้วยน้ำยาล้างแผลที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ papain จะพบ granulation tissue, collagen fiber, fibroblasts และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ ในขณะที่แผลที่ทาด้วย betadine ยังพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ macrophage แต่ยังไม่พบ collagen fiber (Ajlia *et al.*, 2010) นอกจากนี้จากการศึกษาของ Nayak *et al.* (2006) พบว่า การทาแผลด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากใบบานบุรี (*Allamanda cathartica* L.) ทำให้แผลหายเร็วกว่าแผลกลุ่มควบคุมที่ไม่ทาสารสกัด เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม มาทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในวันที่ 11 โดยการย้อมด้วย Van Geison stain ซึ่ง collagen fiber จะติดสีชมพู และ macrophage จะติดสีน้ำตาลเข้ม พบว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดด้วยน้ำจากใบบานบุรี จะพบ collagen fiber หนาแน่นกว่า และพบเซลล์ fibroblasts จำนวนมากกว่ากลุ่มควบคุม (Nayak *et al.*, 2006) จากการศึกษาข้างต้นนี้แสดงให้เห็นว่า ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของแผลที่หายได้เร็ว คือ การพบ collagen fiber เซลล์ fibroblast และหลอดเลือดอยู่ในปริมาณที่หนาแน่น และพบเร็วกว่าแผลที่หายช้ากว่า นอกจากนี้ยังพบเซลล์เม็ดเลือดขาวในปริมาณน้อย หรือไม่พบเลย ซึ่งแสดงว่าแผลได้ผ่านจากระยะ inflammatory phase เข้าสู่ระยะ proliferative phase แล้ว

2. การวัดความแข็งแรงของแผล (tensile strength)

ความแข็งแรง (ความทนต่อแรงดึง) ของแผล คือ การต่อต้านการแตกออกของแผลโดยอาศัยแรงดึงของแผล ซึ่งเป็นค่าที่บ่งชี้ว่ามีการสร้าง collagen fibril network ปริมาณมากเท่าไร เพื่อซ่อมแซมเนื้อเยื่อที่เกิดบาดแผล โดยวัดได้จากความทนต่อแรงดึงของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เกิดขึ้น และอาจบ่งชี้ถึงลักษณะทางกายภาพของเนื้อเยื่อที่มีการซ่อมแซมนั้นๆ ได้อีกด้วย (Lodhi *et al.*, 2006)

หลักการวัดความแข็งแรงของแผล คือ การตัดเนื้อเยื่อแผลที่ต้องการทดสอบออกมา แล้ววัดค่าความทนต่อแรงดึงของแผลที่เกิดขึ้นจนกระทั่งแผลนั้นจะปริขาดออก โดยใช้เครื่องมือที่เรียกว่า tensiometer (ภาพที่ 7) เพื่อยึดขอบด้านหนึ่งของแผลเอาไว้กับเครื่อง ส่วนที่ขอบอีกด้านหนึ่ง (ด้านตรงข้าม) จะยึดอยู่กับส่วนที่ถ่วงน้ำหนัก จากนั้นค่อยๆ เพิ่มน้ำหนักอย่างช้าๆ เพื่อเป็นการรั้งขอบแผลลงมาเรื่อยๆ เมื่อรอยเย็บของแผลเริ่มปริหรือหากไม่ใช่แผลที่ถูกเย็บจะสังเกตจนกว่ารอยแผลเป็นขาดออกจากกัน ก็จะหยุดเพิ่มน้ำหนัก และน้ำหนักที่ได้นั้น คือ ค่าน้ำหนักที่ทำให้แผลปริแตก หรือค่า breaking strength โดยมีหน่วยเป็นกรัม (Noyak and Pereira, 2006)



ภาพที่ 7 เครื่อง tensiometer

ที่มา: Vaisberg *et al.*, (1989)

นอกจากนี้ยังมีวิธีการวัดความตึงของแผลโดยใช้เครื่อง tensiometer ที่มีการทำงานแบบอัตโนมัติโดยคำนวณค่าน้ำหนักด้วยระบบคอมพิวเตอร์ วิธีการ คือ นำตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผลเป็น เกี่ยวเข้ากับตะขอของเครื่องในช่องใส่ตัวอย่างทั้งด้านบนและด้านล่างตามแนวตั้ง จากนั้นเครื่องก็จะค่อยๆ ยึดตะขอทั้ง 2 ด้าน ให้ห่างออกจากกันด้วยอัตราเร็วคงที่ จนกว่าตัวอย่างจะขาด เครื่องก็จะหยุดทำงาน และคำนวณออกมาเป็นค่าน้ำหนักกรัมของแรง สูตรการคำนวณค่า tensile strength มีดังนี้ (Suntar *et al.*, 2010)

$$\text{Tensile strength (N/cm}^2\text{)} = \frac{\text{Breaking force (N)}}{\text{Area (cm}^2\text{)}}$$

$$\text{Area (cm}^2\text{)} = \text{Thickness (cm)} \times \text{Width (cm)}$$

โดยที่; Breaking force คือ ค่าแรงดึงที่ทำให้แผลปริแตก (N)

Area คือ พื้นที่ตัวอย่างเนื้อเยื่อแผลที่ตัดออกมาวัดค่า tensile strength (cm²)

Thickness คือ ความหนาของตัวอย่างเนื้อเยื่อ (cm)

Width คือ ความกว้างของตัวอย่างเนื้อเยื่อ (cm)

จากการวัดค่าความแข็งแรงของแผลนี้ พบว่าแผลที่มีการหายสมบูรณ์กว่าจะมีค่า tensile strength มากกว่าแผลที่ยังหายไม่สมบูรณ์ ทั้งนี้เนื่องจากค่า tensile strength มีความสัมพันธ์กับการจัดเรียงตัวและการพัฒนาของ collagen fiber ในพื้นที่แผล ที่บริเวณแผล collagen จะถูกสังเคราะห์และปลดปล่อยออกมาจาก fibroblast จากนั้นก็จะสร้างพันธะโควาเลนต์สานกันเป็นเส้นใย ซึ่งความแข็งแรงของเนื้อเยื่อบริเวณแผลเกิดจากการจัดเรียงตัวปรับโครงสร้างใหม่ (remodeling) และการสร้างพันธะโควาเลนต์ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุลของ collagen fiber รวมทั้งความคงตัว (stabilization) ของ collagen fiber อีกด้วย (Pather *et al.*, 2011)

3. การวัดปริมาณ hydroxyproline

ในกระบวนการหายของแผลนั้น มีระยะการแบ่งเซลล์และซ่อมแซมขนาดแผล (proliferative phase and repair) เป็นระยะที่ทำให้แผลเริ่มมีเนื้อเยื่อใหม่นานชนิดต่างๆเข้ามาทดแทนส่วนที่เสียหายไป ดังที่ได้กล่าวแล้วข้างต้น ซึ่งในระยะนี้ collagen จะมีบทบาทสำคัญในการซ่อมแซมแผลเป็นอย่างมาก collagen คือ โปรตีนที่อยู่ในเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่มีปริมาณมากที่สุดในตัวสัตว์ พบมากในเอ็น ผิวหนัง

และกระดูกอ่อน มีลักษณะเป็นเส้นยาว ขนาดเล็ก อยู่เป็นเส้นเดี่ยวหรืออยู่รวมกันหลายเส้นเป็นมัด เช่น เอ็น ซึ่งทำหน้าที่เชื่อมกล้ามเนื้อเข้าด้วยกันกับกระดูก collagen เป็นไกลโคโปรตีน (glycoprotein) มีน้ำตาล galactose และ glucose เป็นองค์ประกอบอยู่ด้วยเล็กน้อย และมีปริมาณของกรดอะมิโน glycine อยู่ 1/3 ของกรดอะมิโนทั้งหมดที่เป็นส่วนประกอบ collagen มีสีขาวเนื่องจากมีปริมาณกรดอะมิโนกลุ่ม hydroxyproline เป็นองค์ประกอบอยู่มาก

โครงสร้างพื้นฐานของ collagen เป็นเปปไทด์สายยาว 3 สาย พันกันเป็นเกลียว (triple helix) ประกอบด้วยกรดอะมิโนที่สำคัญ คือ ไกลซีน (glycine) 33%, ไฮดรอกซีโพรลีน (hydroxyproline) 10%, โพรลีน (proline) 12-25%, อะลานีน (alanine) 11% และไฮดรอกซีไลซีน (hydroxylysine) 1% สัดส่วนของกรดอะมิโนจะแตกต่างกันบ้างในเนื้อเยื่อส่วนต่างๆ แต่ลำดับกรดอะมิโนในสายเปปไทด์แต่ละเส้นของ collagen นั้น จะมีลักษณะเฉพาะคือ เป็น Gly-X-Y repeating unit คือ มี glycine อยู่ทุก 3 ตัวคั่นด้วยกรดอะมิโนอื่น 2 ตัว โดยที่ X และ Y มักเป็น proline และ hydroxyproline ทำให้ collagen มีสัดส่วนของกรดอะมิโนที่มีลักษณะเฉพาะ คือ มี glycine ประมาณ 30% และ proline รวมกับ hydroxyproline ประมาณ 30% ส่วนที่เหลือเป็นกรดอะมิโนชนิดอื่นๆ

Hydroxyproline ถูกสังเคราะห์ขึ้นจากการเกิดกระบวนการ hydroxylation ของ proline ไม่ได้มีรหัสโดยตรงมาจาก DNA โดย hydroxyproline เป็นองค์ประกอบที่พบใน collagen ทั้ง proline และ hydroxyproline มีบทบาทสำคัญในการทำให้ collagen มีความคงทน คงตัวอยู่ได้ ด้วยการทำให้โครงสร้างของ collagen เป็นแบบ triple helix จากการสร้างพันธะไฮโดรเจนระหว่างเส้นใย นอกจากนี้ใน collagen แล้ว สามารถพบ hydroxyproline ได้ในโปรตีนน้อยชนิด เช่น ในสัตว์เลี้ยงลูกด้วยนมอาจพบในอีลาสติน เป็นต้น หากร่างกายมีการผลิต collagen เพิ่มขึ้น ปริมาณของ proline และ hydroxyproline ก็จะเพิ่มขึ้นตามไปด้วย ดังนั้น จึงมักใช้ปริมาณ hydroxyproline มาเป็นค่าชี้วัดปริมาณการสังเคราะห์ collagen (Stegemann and Stalder, 1967)

การวัดปริมาณ hydroxyproline ทำได้โดยการวัดการเกิดปฏิกิริยาออกซิเดชันของ hydroxyproline ที่อยู่ใน granulation tissue โดยนำ granulation tissue มาย่อยด้วยกรดไฮโดรคลอริก จากนั้นปรับ pH ให้เป็นกลาง นำไปทำปฏิกิริยาออกซิเดชันด้วยการเติม Chloramine-T หยุดปฏิกิริยาด้วย perchloric acid และเติม Ehrlich reagent เพื่อทำให้เกิดสี จากนั้นนำไปวัดค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง spectrophotometer ที่ความยาวคลื่นแสง 557 นาโนเมตร คำนวณออกมาเป็นมิลลิกรัมของ hydroxyproline โดยใช้ standard curve ที่เตรียมจาก pure l-hydroxyproline แล้วคำนวณย้อนกลับมาเป็นมิลลิกรัมของ collagen (Silambujanaki *et al.*, 2006)

แผลที่มีปริมาณ hydroxyproline มากจะบ่งบอกได้ว่าการสังเคราะห์ collagen ใน granulation tissue ในระยะ proliferative phase มาก และแผลจะหายได้เร็วกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่มีปริมาณ hydroxyproline น้อยกว่า เนื่องจากจะมีปริมาณ collagen ใน granulation tissue น้อยกว่า จากการศึกษาของ Lodhi *et al.* (2006) พบว่าการทาสารสกัดด้วยเอทานอลจากต้น *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. บนแผลของหนูแรททุกวันจะทำให้แผลมีค่า hydroxyproline ใน granulation tissue สูงกว่าและแผลจะหายเร็วกว่ากลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับการทาสารสกัด แสดงให้เห็นว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดเกิดการสังเคราะห์ collagen มากกว่า และเข้าสู่ระยะ proliferative phase ได้เร็วกว่ากลุ่มควบคุม (Lodhi *et al.*, 2006) การเพิ่มขึ้นของปริมาณ hydroxyproline ใน granulation tissue แสดงถึงการเพิ่มขึ้นของ collagen ซึ่งเป็นองค์ประกอบหลักที่เป็นโครงสร้างที่ให้ความแข็งแรงของขอบแผล ดังนั้นเมื่อมี collagen เพิ่มขึ้นแผลจึงหายเร็วและมีความแข็งแรงมากขึ้นด้วย (Nayak *et al.*, 2006)

4. การใช้ค่าทางสถิติในการประเมินการหายของแผล (Parameter of wound healing)

ค่าทางสถิติที่นิยมนำมาใช้ในการประเมินการหายของแผล คือ ค่าการหดตัวของแผล (wound contraction) การสร้างเนื้อเยื่อบุผิวใหม่ (epithelization) เพื่อปกคลุมพื้นที่แผล และค่าการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing)

การหดตัวของแผล (wound contraction) เป็นกระบวนการที่มีความซับซ้อนและเกิดขึ้นอย่างเป็นลำดับจากการทำงานร่วมกันระหว่างเซลล์ extracellular matrix และไซโตคายน์ ซึ่งเชื่อกันว่าการหดตัวของขอบแผลเข้าสู่ศูนย์กลางของแผลเกิดจากการทำงานของ myofibroblast (Kumari *et al.*, 2010) จะเกิดขึ้นเมื่อ fibroblasts ได้รับการกระตุ้นจาก growth factors ให้พัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น myofibroblasts ซึ่งมีโครงสร้าง cytoskeleton เป็น α - actin คล้ายกับที่พบในกล้ามเนื้อเรียบ ดังนั้น myofibroblasts จึงมีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยให้มีการหดตัวของเนื้อเยื่อ (Hinz, 2005) ถ้าแผลนั้นวัดค่า wound contraction ได้มากและเริ่มเกิดขึ้นได้เร็วหลังจากเกิดบาดแผล แผลจะหายได้เร็วกว่าแผลที่มีค่า wound contraction น้อยกว่าและเริ่มเกิดขึ้นช้ากว่าหลังจากเกิดบาดแผล และค่า wound contraction ที่มากนี้อาจเกิดเนื่องจากการเพิ่มจำนวนของ myofibroblast และ myofibroblast ที่อยู่บริเวณแผลมีการหดตัวมาก (Kumari *et al.*, 2010) วิธีการวัดค่า wound contraction ทำได้โดยการวัดขนาดของแผลในวันที่กำหนด ด้วยกระดาษลอกลายโปร่งแสง (transparent paper) ทาบลงไปบนแผลแล้วทำการวาดตามรอยขอบแผล และพื้นที่ของแผลส่วนที่ยังไม่หาย จากนั้นนำมาคำนวณค่า % wound contraction ของแผลในวันต่างๆ ตามสูตรการคำนวณดังนี้ (Shivhare *et al.*, 2010)

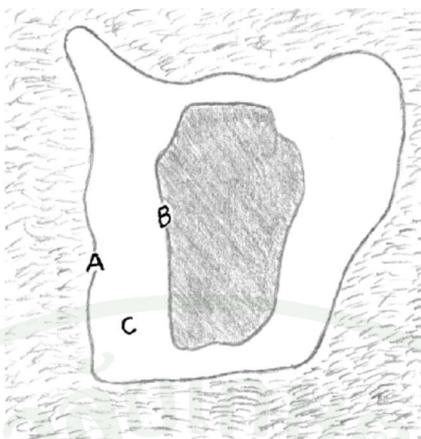
$$\% \text{ wound contraction} = \frac{\text{initial wound size} - \text{specific day wound size}}{\text{initial wound size}} \times 100$$

โดยที่; initial wound size คือ ขนาดของแผลในวันแรก (mm^2)

specific day wound size คือ ขนาดของแผลในวันนั้น (mm^2)

การสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังใหม่ (epithelization) เกิดจากการแบ่งเซลล์เพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ของ keratinocytes ที่อยู่บริเวณขอบแผลเพื่อมาปกคลุมพื้นที่ผิวของแผลที่ต้องได้รับการซ่อมแซม วิธีการวัดคือ นับจำนวนวันทั้งหมดตั้งแต่เกิดแผลกระทั่งแผลหายได้อย่างสมบูรณ์ โดยเริ่มตั้งแต่เกิดบาดแผลจนกระทั่งแผลตกสะเก็ด แล้วสะเก็ดของแผลหลุดออกจากผิวหนังแผลเห็นรอยแผลเป็น คือสิ้นสุดระยะ epithelization ซึ่งแผลที่หายได้เร็วกว่าจะมีค่าจำนวนวันทั้งหมดตั้งแต่เกิดแผลจนกระทั่งแผลหายอย่างสมบูรณ์น้อยกว่าแผลที่หายได้ช้ากว่า หรือแสดงว่าแผลที่หายได้เร็วกว่าจะมีค่า epithelization สูงกว่าแผลที่หายได้ช้ากว่า เนื่องจากแผลมีการสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังใหม่เพื่อปกคลุมแผลได้มากและเร็วกว่านั่นเอง (Shivhare *et al.*, 2010) ค่า epithelization มีความสัมพันธ์กับค่า wound contraction หากค่า wound contraction มีค่ามากและเกิดขึ้นได้เร็ว จะช่วยลดระยะเวลาในการเคลื่อนที่ของ keratinocytes มายังบริเวณกลางแผล (Strodtbeck, 2001) ทำให้สามารถสร้างเนื้อเยื่อผิวหนังใหม่ปกคลุมพื้นที่แผลจนเต็มผิวหนังแผลได้เร็วขึ้น ส่งผลให้ค่า epithelization มีค่าสูง Kumari *et al.* (2010) รายงานว่า สารสกัดจากใบของ blue-flower rattlepod หรือ purple popbush (*Crotalaria verrucosa*) ด้วยน้ำ ซึ่งเป็นสารกลุ่มฟลาโวนอยด์ จะช่วยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์และส่งเสริมการอยู่รอดของ epithelial cell ที่บริเวณบาดแผล ส่งผลให้ค่า epithelization ที่วัดได้มีค่าสูง และแผลหายได้เร็วขึ้น (Kumari *et al.*, 2010)

นอกจากนี้ Bohling *et al.* (2006) ได้ทำการวัดและคำนวณขนาดพื้นที่แผล โดยใช้กระดาษ acetate sheet ทาบลงไปบนรอยแผล แล้วใช้ปากกาเคมีทำการวาดตามรอยขอบแผล ลอกขนาดพื้นที่แผล ตามที่แสดงดังภาพที่ 8 จะได้พื้นที่แผลทั้งหมด (total wound area) และพื้นที่แผลเปิด (open wound area) นำมาหักลบกันจะได้ค่า area of epithelium แล้วนำค่าที่ได้มาคำนวณเป็นค่า % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing



ภาพที่ 8 ลักษณะพื้นที่แผลที่ตัดลอกได้จากกระดาษ acetate sheet ประกอบด้วย (A) total wound area, (B) open wound area และ (C) area of epithelium; $C = A - B$

ที่มา: Bohling *et al.*, (2006)

สูตรการคำนวณมีดังนี้

$$\% \text{ epithelization at day}_n = \frac{\text{area of epithelium at day}_n}{\text{total wound area at day}_n} \times 100$$

% wound contraction:

$$\text{Step 1: total wound at day}_n \text{ as \% of original} = \frac{\text{total wound area at day}_n}{\text{original wound area day}_0} \times 100$$

$$\text{Step 2: \%wound contraction at day}_n = 100 - \text{total wound at day}_n \text{ as \% of original}$$

% total wound healing:

$$\text{Step 1: open wound at day}_n \text{ as \% of original} = \frac{\text{open wound area at day}_n}{\text{original wound area day}_0} \times 100$$

$$\text{Step 2: \%total wound healing at day}_n = 100 - \text{open wound at day}_n \text{ as \% of original}$$

โดยที่	original wound area day ₀	คือ	พื้นที่แผลในวันแรก (mm ²)
	total wound area at day _n	คือ	พื้นที่แผลทั้งหมดในวันที่ n (mm ²)
	open wound area at day _n	คือ	พื้นที่แผลเปิดในวันที่ n (mm ²)
	area of epithelium at day _n	คือ	พื้นที่เยื่อบุผิวใหม่ในวันที่ n (mm ²)

หากค่า % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing ที่คำนวณได้มีค่ามาก แสดงว่ากระบวนการหายของแผลจะเกิดขึ้นได้เร็ว ส่งผลให้แผลหายเร็ว (Bohling *et al.*, 2006)

อุปกรณ์และวิธีการ

อุปกรณ์

1. หนูเมาส์พันธุ์ Institute of Cancer Research (ICR) เพศเมีย อายุประมาณ 8 สัปดาห์ น้ำหนัก 25- 30 กรัม จำนวน 42 ตัว
2. เครื่องมือผ่าตัด
3. กระจกน็อคขนาด 1 ml
4. เข็มฉีดยาเบอร์ 26 ขนาด 0.5 นิ้ว
5. เข็มฉีดยาเบอร์ 24 ขนาด 1 นิ้ว
6. ยาสลบ pentobarbital sodium
7. สำลีและผ้ากอซ
8. ขวดแก้วพร้อมฝา
 - 8.1 ขนาด 2000 ml
 - 8.2 ขนาด 1000 ml
 - 8.3 ขนาด 500 ml
 - 8.4 ขนาด 250 ml
9. ปีกเกอร์ (beaker)
10. กระจกตวง (cylinder)

11. ปิเปต (pipette) และกระเปาะยาง (pipette filler)
12. แท่งแก้ว (stirrer)
13. ภาชนะที่ใช้ในการชั่ง (jar) และ coupling jar
14. ภาชนะสำหรับใส่สไลด์ สำหรับชั่ง (rack)
15. เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการทำสารสกัดหยาบจากใบเสกกลาย
 - 15.1 ใบเสกกลายประมาณ 5 กิโลกรัม
 - 15.2 มีด
 - 15.3 เขียงไม้
 - 15.4 กรวยกรอง
 - 15.5 กระดาษกรองเบอร์ 2 เส้นผ่านศูนย์กลาง 185 mm
 - 15.6 ขาดั่ง
 - 15.7 เครื่องชั่งน้ำหนัก
 - 15.8 เครื่องระเหยแอลกอฮอล์ (rotary evaporator)
16. เครื่องมือ และอุปกรณ์ที่ใช้ในการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์
 - 16.1 ใบมีดผ่าตัดเบอร์ 24
 - 16.2 ใบมีด microtome ชนิดใช้แล้วทิ้ง (disposable microtome blade)
 - 16.3 ปากคีบ (forcep)

- 16.4 ขวดเก็บตัวอย่างขนาดเล็กจำนวน 50 ใบ
- 16.5 ถาดเทียมน
- 16.6 คลิปใส่เนื้อเยื่อ (cassette)
- 16.7 เครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor)
- 16.8 เครื่อง embed เนื้อเยื่อ (tissue embedder)
- 16.9 กระจกโลหะ (mold)
- 16.10 กรอบพลาสติก (embedding ring)
- 16.11 เครื่องมือตัดเนื้อเยื่อ (rotary microtome)
- 16.12 อ่างลอยเนื้อเยื่อ (water bath)
- 16.13 สไลด์กระจก (glass slide)
- 16.14 กระจกปิดสไลด์ (cover slip)
- 16.15 เครื่องอุ่นสไลด์ (slide warmer)
- 16.16 ตู้อบ (oven)
17. ถาดสแตนเลส
18. ฉลากสำหรับเขียนปิดที่ขวด (label)
19. เครื่องซังสารเคมี
20. กล่องใส่สไลด์ (slide box)

21. สารเคมี

21.1 methyl cellulose

21.2 normal saline (NaCl)

21.3 50% ethyl alcohol

21.4 70% ethyl alcohol

21.5 80% ethyl alcohol

21.6 95 % ethyl alcohol

21.7 100% ethyl alcohol (absolute alcohol)

21.8 saturated lithium carbonate

21.9 Bouin's fluid

21.9.1 saturated picric acid

21.9.2 formalin (40% formaldehyde)

21.9.3 acetic acid

21.10 1% acid alcohol

21.11 xylene

21.12 phosphomolybdic acid

21.13 phosphotungstic acid

21.14 1% glacial acetic acid

21.15 ferric chloride

21.16 hydrochloric acid

21.17 mounting media (permount)

22. สีย้อม

22.1 สีย้อม Hematoxylin และ Eosin

22.2 aniline blue

22.3 Hematoxylin crystals

22.4 biebrich scarlet

22.5 acid fuchsin

23. กล้องจุลทรรศน์แบบธรรมดา (light microscope)

24. สมุดบันทึก

25. ปากกาเคมีขนาดเล็ก (F)

26. แผ่นใส

27. กล้องถ่ายภาพบันทึกข้อมูล

28. คอมพิวเตอร์

29. เครื่องคิดเลข

วิธีการ

1. การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบเสยกกลาย

การสกัดสารจากใบเสยกกลาย

เตรียมใบสดน้ำหนัก 5 กิโลกรัม ล้างน้ำให้สะอาดแล้วผึ่งให้แห้งในที่ร่ม ซอยใบให้มีขนาดประมาณ 0.5×0.5 ซม. ชั่งน้ำหนักขวดเปล่าแล้วจذب้นตึกไว้ นำใบที่หั่นแล้วใส่ขวดจนเต็ม ชั่งน้ำหนักอีกครั้ง เพื่อหักลบจากน้ำหนักขวดเปล่า ทำให้ได้น้ำหนักของใบเสยกกลายที่อยู่ภายในขวด จากนั้นค่อยๆเติม 95% ethyl alcohol ลงไปในขวด ให้พอท่วมใบเสยกกลาย ปิดฝาขวดและตั้งทิ้งไว้ 48 ชั่วโมง เพื่อให้ ethyl alcohol สกัดสารออกมา จากนั้นถ่ายสารละลายสกัดที่ได้ลงในขวดเปล่า แล้วนำมากรองโดยใช้กรวยกรอง และกระดาษกรอง เบอร์ 2 วัดปริมาตรสารละลายสกัดที่กรองได้ นำสารละลายสกัด ไปเข้าเครื่องระเหยแอลกอฮอล์ (rotary evaporator) เพื่อระเหยเอา ethyl alcohol ออก ได้สารสกัดหยาบสีเขียวเข้ม มีลักษณะข้นเหนียว น้ำหนักของสารสกัดหยาบเท่ากับ 11 กรัม แสดงว่าการเตรียมสารสกัดหยาบจากใบเสยกกลายครั้งนี้ ได้ผลผลิต (yield) เท่ากับ 0.22 % (w/w) สารสกัดหยาบจะถูกรวบรวมไว้ในภาชนะที่สะอาดปิดฝา เก็บรักษาไว้ในตู้เย็น

การเตรียม methylcellulose

ชั่งผง methylcellulose 20 กรัม แล้วค่อยๆผสมลงในน้ำกลั่น 100 มิลลิลิตร โดยใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากัน ตั้งทิ้งไว้ข้ามคืน ผง methylcellulose จะดูดซับน้ำจนมีลักษณะเป็นเจลใส ซึ่งมีความเข้มข้น 20% (w/v) เพื่อใช้สำหรับผสมสารสกัดหยาบจากใบเสยกกลาย และใช้เป็นตัวควบคุม (negative control)

การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบเสยกกลายเพื่อใช้ทาบาดแผล

นำสารสกัดหยาบจากใบเสยกกลายมาผสมกับเจล methylcellulose ให้ได้ความเข้มข้น 0.5% และ 1.5% (w/w) โดยใช้แท่งแก้วคนให้เข้ากันจนมองเห็นเป็นเนื้อเดียว โดยไม่ใช้ความร้อน จากนั้นเก็บยาที่เตรียมได้ใส่ในขวดแก้วสะอาดปิดฝา และเก็บในตู้เย็น (อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียส)

2. สัตว์ทดลอง

ใช้หนูเม้าส์พันธุ์ ICR สุขภาพดี เพศเมีย อายุ 8 สัปดาห์ (น้ำหนักตัวระหว่าง 25-30 กรัม) จำนวน 42 ตัว เลี้ยงด้วยอาหารสำเร็จรูป และให้น้ำดื่มที่ สัตว์ทดลองจะถูกเลี้ยงภายในห้องสะอาด ก่อนเริ่มการทดลองเป็นเวลา 10 วัน เพื่อให้เกิดความคุ้นเคยกับสิ่งแวดล้อมใหม่ จากนั้นจะแบ่งหนู ออกเป็น 3 กลุ่ม โดยสุ่มกลุ่มละ 14 ตัว หนูแต่ละตัวได้รับการผ่าตัดเพื่อสร้างบาดแผล 1 แผลที่ บริเวณหลัง โดยมีตำแหน่งบาดแผลอยู่บริเวณระดับอก (thorax) ส่วนต้น (ระหว่างไหล่ทั้งสองข้าง) จากนั้นหนูแต่ละกลุ่มจะถูกทาแผลด้วยสาร ดังต่อไปนี้

หนูทดลองกลุ่มที่ 1 เจล methylcellulose (negative control)

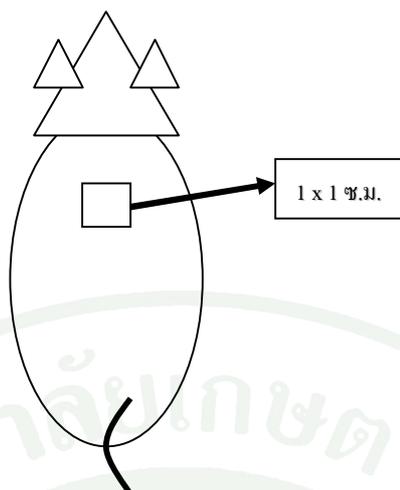
หนูทดลองกลุ่มที่ 2 ยาที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบจากใบเสลดถอย 0.5% ในเจล methylcellulose

หนูทดลองกลุ่มที่ 3 ยาที่มีส่วนผสมของสารสกัดหยาบจากใบเสลดถอย 1.5% ในเจล methylcellulose

3. การสร้างบาดแผล และการคำนวณค่าสถิติในการประเมินการหายของแผล

การสร้างบาดแผลแบบตัดเนื้อ

หนูทดลองทุกตัวในแต่ละกลุ่มจะถูกวางยาสลบ pentobarbital sodium (50-60 mg/kg, IP) (มาริชส์กร์, 2544) ก่อนที่จะทำการสร้างบาดแผล จากนั้นจับให้นอนราบโดยเอาด้านนอกแนบกับพื้น และส่วนด้านหลังของร่างกายจะเป็นตำแหน่งสำหรับการสร้างบาดแผล โดยกำหนดให้ตำแหน่ง บาดแผลอยู่บริเวณระดับอก (thorax) ส่วนต้น (ระหว่างไหล่ทั้งสองข้าง) เตรียมผิวหนังบริเวณผ่าตัด โดยวิธีปลอดเชื้อ กรีดแผลเพิ่มความหนาของผิวหนังขนาด 1×1 ซม. (ภาพที่ 9) (Sewall *et al.*, 2003) หลังจากทายาจนทั่วพื้นผิวของแผลแล้ว รอจนยาแห้งติดแผล ไม่ต้องปิดแผล และไม่มีการใช้ยาต้าน จุลชีพตลอดการทดลอง หนูทุกตัวจะถูกทาแผลทุกวัน วันละ 1 ครั้ง มีการจดบันทึกและถ่ายภาพ ลักษณะภายนอกของบาดแผล รวมทั้งบันทึกวันที่แผลเริ่มปิดจนกระทั่งปิดสนิท



ภาพที่ 9 ภาพจำลอง การสร้างบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ โดยมีตำแหน่งแผล ที่บริเวณระดับอก ส่วนต้น

การวัดพื้นที่แผลและการคำนวณค่าสถิติที่ใช้ประเมินการหายของแผล

หนูทดลองจากทุกกลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 6 ตัว จะถูกวัดพื้นที่ของแผลทุก 2 วัน โดยใช้แผ่นใส ทาบบริเวณแผล และใช้ปากกาเคมีวาดทับขอบแผลด้านนอกที่ชิดกับผิวหนังปกติ และขอบแผลเปิด ด้านใน (ภาพที่ 10) แล้วนำไปวัดพื้นที่โดยใช้กระดาษกราฟที่มีพื้นที่แต่ละช่องเท่ากับ 1 ตารางมิลลิเมตร ทำให้ได้ค่าพื้นที่แผลทั้งหมด (total wound area) และพื้นที่ที่แผลเปิด (open wound area) เมื่อนำมาหักลบกันจะได้ค่า area of epithelium จากนั้นนำไปคำนวณหาค่าทางสถิติที่ใช้สำหรับประเมินการหายของแผล คือ ค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization), ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction) และค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing) ดังสูตร (Bohling *et al.*, 2006)

ปัจจัยที่ใช้ประเมินการหายของแผล

ใช้สูตรคำนวณดังนี้ :

$$\% \text{ epithelization at day}_n = \frac{\text{area of epithelium at day}_n}{\text{total wound area at day}_n} \times 100$$

% wound contraction as :

$$\text{Step 1: total wound at day}_n \text{ as \% of original} = \frac{\text{total wound area at day}_n}{\text{original wound area (day}_0)} \times 100$$

$$\text{Step 2: \%wound contraction at day}_n = 100 - \text{total wound at day}_n \text{ as \% of original}$$

% total wound healing as :

$$\text{Step 1: open wound at day}_n \text{ as \% of original} = \frac{\text{open wound area at day}_n}{\text{original wound area (day}_0)} \times 100$$

$$\text{Step 2: \%total wound healing at day}_n = 100 - \text{open wound at day}_n \text{ as \% of original}$$

(Bohling *et al.*, 2006)



ภาพที่ 10 ภาพจำลองลักษณะของบาดแผล และพื้นที่ของแผลที่จะทำการวัด

4. การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

หนูทดลองจากทุกกลุ่ม จำนวนกลุ่มละ 8 ตัว จะถูกเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังบริเวณแผล ครั้งละ 2 ตัว จำนวน 4 ครั้ง คือ ในวันที่ 4, 8, 12 และ 16 หลังจากการผ่าตัด เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

การทำสไลด์ถาวรโดยวิธี paraffin section เพื่อนำไปศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

เนื้อเยื่อผิวหนังที่เก็บจากหนูแต่ละตัว จะถูกนำมาล้างใน normal saline เพื่อล้างคราบเลือดออกจากนั้นคงสภาพเนื้อเยื่อ (fixation) โดยการแช่ในน้ำยาคงสภาพ Bouin's solution ประมาณ 24 ชั่วโมง เพื่อป้องกันการเน่าเปื่อยของเนื้อเยื่อ ล้างน้ำยาคงสภาพออกจากเนื้อเยื่อ โดยใช้ 50% ethyl alcohol

ตามด้วย 70% ethyl alcohol ที่ผสม saturated lithium carbonate จนกว่าสีเหลืองจากน้ำยา Bouin's solution จะหมดไป นำเนื้อเยื่อใส่ตลับ (cassette) แล้วนำไปเข้าเครื่องเตรียมเนื้อเยื่ออัตโนมัติ (automatic tissue processor) โดยเครื่องนี้จะทำงานในขั้นตอนการขจัดน้ำออกจากเนื้อเยื่อ การขจัด alcohol และทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) รวมทั้งการแทรกซึมของ paraffin เหลวเข้าสู่เนื้อเยื่อ (infiltration) โดยใช้เวลารวมทั้งสิ้น 18 ชั่วโมง หลังจากนั้นนำเนื้อเยื่อออกจากเครื่องแล้ว ทำการฝังเนื้อเยื่อใน paraffin (embedding) เพื่อให้ได้ paraffin block แล้วนำ paraffin block ไปตัดด้วยเครื่อง rotary microtome ที่ความหนา 5 ไมโครเมตร จากนั้นนำ section ติดบนกระจกสไลด์ แล้วนำไปย้อมสี ตามด้วยการหยด permount บนชิ้นเนื้อเยื่อแล้ว ปิดทับด้วย cover slip

ขั้นตอนการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาจุ่มใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อขจัด paraffin (deparaffinization) ออกจากโครงสร้างของเซลล์และเนื้อเยื่อ นำน้ำเข้าเนื้อเยื่อ (hydration) โดยนำสไลด์มาจุ่มใน 100%, 95% และ 70% ethyl alcohol อย่างละ 2 นาทีตามลำดับ จากนั้นนำมาล้างน้ำประปาโดยเปิดน้ำให้ไหลผ่านตลอดเวลา ประมาณ 1-2 นาที นำสไลด์มาย้อมสีครั้งแรก (primary stain) ด้วยสี hematoxylin ซึ่งเป็นการย้อมนิวเคลียส นาน 5-6 นาที แล้วนำมาล้างน้ำประปาไหลผ่านนาน 1-2 นาที จุ่มสไลด์ใน 1% acid alcohol 1-2 ครั้ง เพื่อล้างสีส่วนเกินออก (differentiation) ตามด้วยการปรับเนื้อเยื่อให้มีสภาพเป็นกลาง (neutralization) โดยการจุ่มสไลด์ใน saturated lithium carbonate ประมาณ 1 นาที เนื้อเยื่อจะเป็นสีฟ้า (blue) มากยิ่งขึ้น จากนั้นนำไปล้างน้ำแบบน้ำไหลตลอดเวลา แล้วทำการย้อมสีซ้ำ (counterstain) โดยจุ่มสไลด์ในสี eosin นานประมาณ 2 นาที สี eosin เป็นสีประเภทกรด จึงจับกับส่วนประกอบที่เป็นด่างในไซโทพลาสซึม จากนั้นทำการขจัดน้ำออกจากเซลล์และเนื้อเยื่อ โดยจุ่มสไลด์ใน 70% alcohol นาน 30 วินาที ถึง 1 นาที แล้วจุ่มสไลด์ใน 95% และ 100% alcohol เพื่อขจัดน้ำออก อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ตามลำดับ จากนั้นจุ่มสไลด์ใน xylene อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อขจัด alcohol และทำให้เนื้อเยื่อใส ใช้ cover slip ปิดบนเนื้อเยื่อแผ่นบางที่ย้อมสีแล้ว โดยใช้ permount (Kiernan, 1999) จากนั้นนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของเนื้อเยื่อ

ขั้นตอนการย้อมด้วยวิธี Masson's Trichrome

นำสไลด์เนื้อเยื่อมาจุ่มใน xylene 2 ครั้ง ๆ ละ 5 นาที เพื่อขจัด paraffin ออกจากโครงสร้างของ เซลล์และเนื้อเยื่อ สไลด์ตัวอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น จากนั้นจุ่มสไลด์ใน Weigert's iron hematoxylin solution นาน 10 นาที แล้วล้างอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น ตามด้วยการจุ่ม biebrich scarlet-acid fuchsin solution นาน 2 นาที แล้วล้างอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น จากนั้นจุ่มใน phosphomolybdic-phosphotungstic acid solution นาน 10-15 นาที แล้วย้อมสีด้วย aniline blue solution นาน 5 นาที ล้างอย่างรวดเร็วในน้ำกลั่น จุ่มสไลด์ใน 1% glacial acetic acid 1 ครั้งอย่างรวดเร็ว ตามด้วย 95% และ 100% ethyl alcohol เพื่อขจัดน้ำออก อย่างละ 2 ครั้ง ๆ ละ 2 นาที ตามลำดับ จากนั้นจุ่มสไลด์ใน xylene เพื่อขจัด alcohol และทำให้เนื้อเยื่อใส อย่างละ 2 ครั้ง ครั้งละ 5 นาที หยอด permount แล้วปิด cover slip (ศุภลักษณ์, 2545) สไลด์เนื้อเยื่อถาวรที่ได้จากการย้อมด้วยวิธี Masson's Trichrome จะถูกนำมาวัดความเข้มและปริมาณ การติดสีของ collagen fibers ภายในแผล โดยวัดบริเวณตำแหน่งของ granulation tissue ที่อยู่ชิดกับ ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยเลือกวัดที่ตำแหน่งขอบแผลที่อยู่ชิดกับ dermis ของผิวหนังปกติ และวิเคราะห์ผลโดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) ในการคำนวณค่าเฉลี่ยร้อยละของความหนาแน่นของเส้นใย collagen (% collagen intensity) นอกจากนี้ ยังทำการวัดขนาดเฉลี่ยของ collagen bundles ภายใน granulation tissue ของแผลในวันที่ 16 โดยถ่ายภาพที่บริเวณกึ่งกลางแผลส่วนที่ติดกับชั้น epidermis จากสไลด์เนื้อเยื่อบาดแผลของหนูทั้ง 3 กลุ่ม กลุ่มละ 2 ตัว (กำลังขยาย 40X) โดยสไลด์จากหนูแต่ละตัว จะถูกเลือกถ่าย 3 ตำแหน่งที่อยู่ชิดกัน จึงได้ภาพทั้งหมด 6 ภาพต่อหนูทดลอง 1 กลุ่ม จากนั้น ทำการสุ่มวัดความหนาของ collagen bundles ภาพละ 10 bundles รวมทั้งสิ้น 60 bundles โดยเปรียบเทียบกับ scale ของ micron bar ที่อยู่ในแต่ละภาพ และพยายามวัดเฉพาะตำแหน่งที่มองเห็นเป็น bundle เดียวๆ จากนั้น หาค่าเฉลี่ย ของขนาด collagen bundles และค่าเบี่ยงเบนมาตรฐาน (Standard Deviation) ของแผลแต่ละกลุ่ม

5. การวิเคราะห์ทางสถิติ

ค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization), ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction) และค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing) จากกลุ่มทดลองและกลุ่มควบคุม (negative control) จะถูกนำมาวิเคราะห์ผลทางสถิติโดยใช้วิธี ANOVA เพื่อเปรียบเทียบหาความแตกต่างทางสถิติของทั้ง 3 กลุ่ม โดยมีระดับนัยสำคัญที่ $P < 0.05$

6. สถานที่ทำการศึกษาทดลอง

6.1 การเตรียมสารสกัดหยาบจากใบเสวยกลาย กระทำที่ห้องปฏิบัติการโครงการพัฒนาสมุนไพร คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตกำแพงแสน จังหวัดนครปฐม

6.2 การเลี้ยงหนูทดลองและเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อ กระทำที่อาคารสัตว์ทดลอง คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

6.3 ขั้นตอนพาราฟินเทคนิค กระทำที่ห้องปฏิบัติการจุลกายวิภาคศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

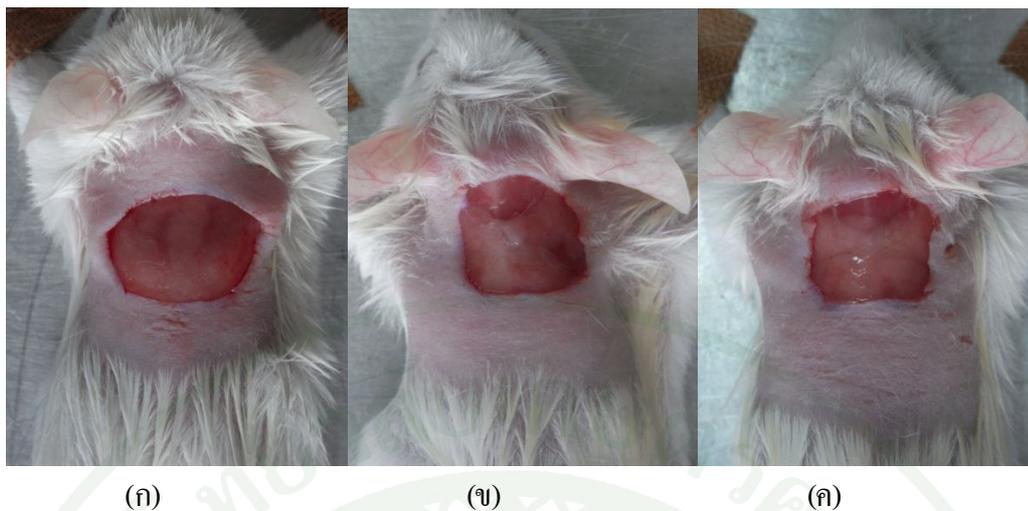
6.4 การถ่ายภาพจากกล้องจุลทรรศน์ และวิเคราะห์ภาพโดยใช้โปรแกรมคอมพิวเตอร์ กระทำที่ห้องปฏิบัติการจุลกายวิภาคศาสตร์ ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ วิทยาเขตบางเขน กรุงเทพมหานคร

ผลและวิจารณ์

ผล

ลักษณะบาดแผลและการหายของแผลจากการมองด้วยตาเปล่า

ในวันที่ 2 และ 4 ภายหลังกการสร้างบาดแผลพบว่าลักษณะบาดแผลของหนูทดลองทุกตัว มีลักษณะแห้ง และมีสะเก็ดที่เกิดจากน้ำเหลืองและเลือดที่แข็งตัวปกคลุมเต็มแผล เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่เริ่มสร้าง (วันที่ 0) (ภาพที่ 11) นอกจากนี้แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลาย 1.5% ยังมีลักษณะบวม มีเลือดซึม และมีขนาดกว้างขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกลาย 0.5% ซึ่งมีขนาดความกว้างบาดแผลลดลง โดยเฉพาะแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% จะมีขนาดแผลเล็กกว่ากลุ่มอื่น (ภาพที่ 12 และ 13) ต่อมาในวันที่ 6 และ 8 พบว่า ทุกแผลมีลักษณะชุ่มชื้นขึ้น โดยแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลายทั้ง 2 ความเข้มข้นเริ่มมีการสร้าง granulation tissue ขึ้นประมาณวันที่ 6 สังเกตเห็นได้จากพื้นผิวของแผลที่มีลักษณะนูน และขรุขระสีขาวอมชมพู โดยเฉพาะแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% จะเห็น granulation tissue ที่เกิดขึ้นในแผลนูนเด่นชัดจนมากที่สุดและมีขนาดแผลหดเล็กลงกว่ากลุ่มที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกลาย 1.5% (ภาพที่ 14 และ 15) ส่วนแผลที่ทำด้วย methylcellulose จะเริ่มพบ granulation tissue นูนขึ้นในแผลในวันที่ 8 (ภาพที่ 15) และสังเกตเห็นได้อย่างชัดเจนในวันที่ 10 (ภาพที่ 16) วันที่ 12 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% มีขนาดแผลหดเล็กกว่ากลุ่มที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกลาย 1.5% (ภาพที่ 17) อาจเนื่องจากแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% มีการสร้าง granulation tissue ในปริมาณมากตั้งแต่วันที่ 6 ส่งผลให้แผลมีการหดรั้งได้เร็วกว่ากลุ่มอื่น ในวันที่ 14 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกลายทั้ง 2 ความเข้มข้น มีการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ (ภาพที่ 18) ขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose จะมีการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 16 (ภาพที่ 19) ซึ่งอาจมีสาเหตุเนื่องจากการเริ่มสร้าง granulation tissue ช้ากว่ากลุ่มอื่น



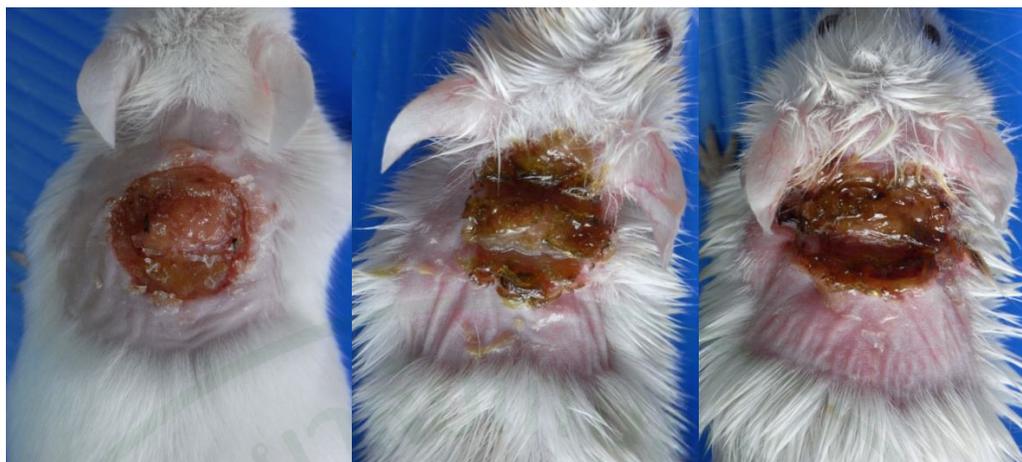
ภาพที่ 11 การสร้างบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ (วันที่ 0)

- (ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose
- (ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกกลาย 0.5%
- (ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกกลาย 1.5%



ภาพที่ 12 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 2

- (ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose
- (ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกกลาย 0.5%
- (ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกกลาย 1.5%



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 13 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 4

(ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose

(ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5%

(ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 1.5%



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 14 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 6

(ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose

(ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5%

(ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 1.5%



(ก)

(ข)

(ค)

ภาพที่ 15 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 8

(ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose

(ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแซกกลาย 0.5%

(ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแซกกลาย 1.5%



(ก)

(ข)

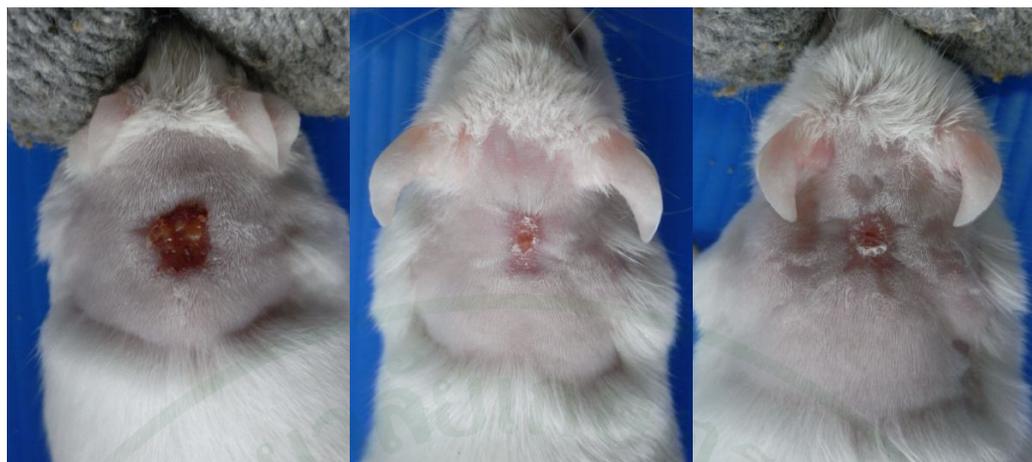
(ค)

ภาพที่ 16 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 10

(ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose

(ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแซกกลาย 0.5%

(ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสกัดแซกกลาย 1.5%



(ก)

(ข)

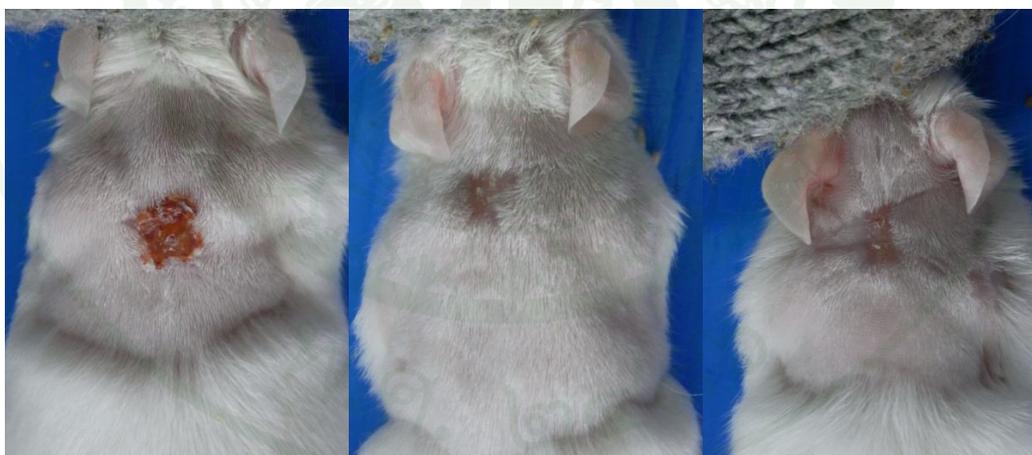
(ค)

ภาพที่ 17 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 12

(ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose

(ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5%

(ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 1.5%



(ก)

(ข)

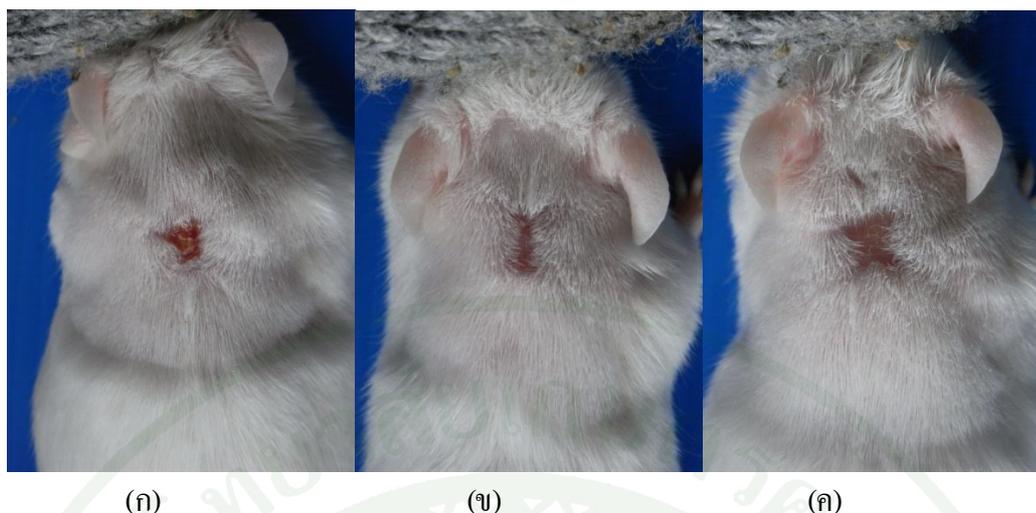
(ค)

ภาพที่ 18 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 14

(ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose

(ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5%

(ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 1.5%



ภาพที่ 19 ลักษณะบาดแผลบริเวณหลังหนูเม้าส์ ในวันที่ 16

- (ก) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วย Methylcellulose
- (ข) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5%
- (ค) ลักษณะบาดแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 1.5%

ค่าทางสถิติที่ใช้ในการประเมินการหายของแผล (Parameter of wound healing)

จากการวัดพื้นที่แผล แล้วนำมาคำนวณค่าทางสถิติที่ใช้สำหรับประเมินการหายของแผล พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization) ของแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5% และ 1.5% จะเริ่มเกิดขึ้นในวันที่ 6 มีค่าเท่ากับ 11.11% และ 10.86% ตามลำดับ ในขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose จะเริ่มเกิดขึ้นในวันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 23.31% นอกจากนี้ยังพบว่า % epithelization ของแผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลาย 0.5% มีค่าสูงกว่าแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสีกัดแสดยกลาย 1.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 10 (47.09%, 74.01% และ 49.01% ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสีกัดแสดยกลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ) และต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 12 (56.37%, 93.89% และ 70.37% ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose, สารสีกัดแสดยกลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ) เมื่อถึงวันที่ 14 แผลที่ทำด้วยสารสีกัดแสดยกลายทั้งสองความเข้มข้น มีค่า % epithelization สูงถึง 100% ซึ่งบ่งบอกถึงการปิดของแผลอย่างสมบูรณ์ ขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose ยังมีค่า % epithelization เพียง 80.84% และสูงขึ้นถึง 100% ในวันที่ 16 (ตารางที่ 2)

จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction) พบว่าในวันที่ 2 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกิลาย 1.5% มีค่าเป็นลบ (-6.65%) เนื่องจากแผลมีลักษณะบวม ขนาดบาดแผลจึงขยายกว้างมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (วันแรกที่สร้างบาดแผล) นอกจากนี้พบว่าแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกิลาย 0.5% มีค่า % wound contraction สูงกว่าแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 1.5% ตลอดการทดลอง แต่สูงกว่าอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ในวันที่ 4 (22.16%, 36.36% และ 5.93% ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ) และต่อเนื่องไปจนถึงวันที่ 6 (34.84%, 47.08% และ 30.74% ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ) ส่วนวันที่ 8, 10, 14 และ 16 ค่า % wound contraction ของแผลทั้ง 3 กลุ่ม ไม่มีความแตกต่างกันทางสถิติ ยกเว้นวันที่ 12 ในแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกิลาย 0.5% จะมีค่าสูงกว่าแผลที่ทำด้วย methylcellulose อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (73.97%, 82.28% และ 76.26% ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ) (ตารางที่ 3)

จากการคำนวณหาค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing) พบว่าในวันที่ 2 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกิลาย 1.5% มีค่าเป็นลบ (-6.65%) เช่นเดียวกับค่า % wound contraction เนื่องจากแผลมีลักษณะบวม ขนาดบาดแผลขยายกว้างมากขึ้นเมื่อเปรียบเทียบกับวันที่ 0 (วันแรกที่สร้างบาดแผล) และพบว่าแผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกิลาย 0.5% มีค่า % total wound healing สูงกว่าแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 1.5% อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติในวันที่ 4, 6, 8, 10 และ 12 (วันที่ 4 มีค่าเท่ากับ 22.16%, 36.36% และ 5.93%, วันที่ 6 มีค่าเท่ากับ 34.84%, 52.88% และ 38.35%, วันที่ 8 มีค่าเท่ากับ 60.77%, 79.89% และ 67.90%, วันที่ 10 มีค่าเท่ากับ 82.42%, 92.38% และ 83.79% และวันที่ 12 มีค่าเท่ากับ 89.18%, 98.66% และ 92.96%, ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ) เมื่อถึงวันที่ 14 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกิลาย 0.5% และ 1.5% มีค่า % total wound healing สูงถึง 100% บ่งบอกให้เห็นว่าลักษณะแผลที่มองเห็นด้วยตาเปล่านั้นหายอย่างสมบูรณ์ ขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose ยังมีค่า % total wound healing เพียง 96.50% ซึ่งค่านี้สูงขึ้นถึง 100% ในวันที่ 16 (ตารางที่ 4)

จากค่าเฉลี่ย % epithelization %, wound contraction และ % total wound healing ดังกล่าวมาข้างต้น สามารถนำมาวาดเป็นกราฟเส้น เพื่อให้มองเห็นความแตกต่างที่เปรียบเทียบระหว่างการ ใช้ methylcellulose และสารสกัดแอสกิลาย 0.5% และ 1.5% สำหรับทาแผล ได้ชัดเจนขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 20

ตารางที่ 2 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (% epithelization)

(N = 6)

กลุ่มทดลอง	วัน								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Methylcellulose	0	0	0	0 ^b	23.31±4.37 ^{ab}	47.09±20.57 ^b	56.37±23.44 ^b	80.84±16.04 ^b	100
0.5% crude extract	0	0	0	11.11±5.59 ^a	53.51±16.76 ^a	74.01±10.19 ^a	93.89±10.15 ^a	100 ^a	100
1.5% crude extract	0	0	0	10.86±3.35 ^a	34.49±17.72 ^a	49.01±16.05 ^b	70.37±5.83 ^b	100 ^a	100

¹ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± standard error)

^{a-c}อักษรที่ต่างกันบนค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

ตารางที่ 3 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction)

(N = 6)

กลุ่มทดลอง	วัน								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Methylcellulose	0	13.60±6.01 ^{1a}	22.16±5.01 ^b	34.84±5.42 ^b	49.00±6.19 ^a	64.72±8.68 ^a	73.97±7.02 ^b	82.31±5.31	82.67±4.93
0.5% crude extract	0	20.86±3.22 ^a	36.36±5.18 ^a	47.08±5.58 ^a	58.76±7.24 ^a	72.46±5.84 ^a	82.28±3.71 ^a	84.17±2.85	84.29±2.97
1.5% crude extract	0	-6.65±13.58 ^b	5.93±13.77 ^c	30.74±16.33 ^b	50.49±9.08 ^a	67.80±6.65 ^a	76.26±2.71 ^{ab}	80.50±3.44	80.50±3.44

¹ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± standard error)

^{a-c}อักษรที่ต่างกันบนค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)

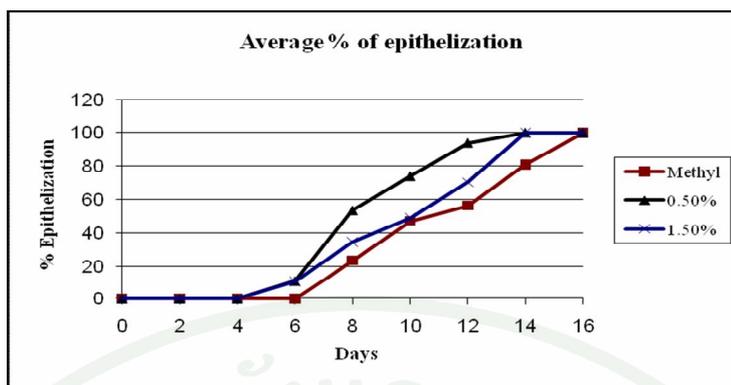
ตารางที่ 4 ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing)

(N = 6)

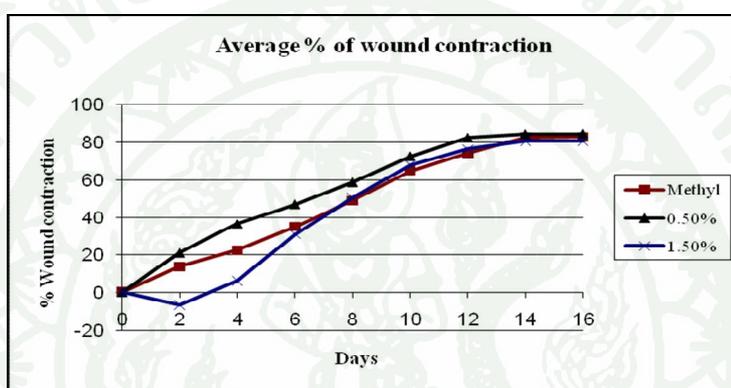
กลุ่มทดลอง	วัน								
	0	2	4	6	8	10	12	14	16
Methylcellulose	0	13.60±6.01 ^a	22.16±5.01 ^b	34.84±5.42 ^b	60.77±6.21 ^b	82.42±4.67 ^b	89.18±4.91 ^b	96.50±2.88 ^b	100
0.5% crude extract	0	20.86±3.22	36.36±5.18 ^a	52.88±6.60 ^a	79.89±10.33 ^a	92.38±4.57 ^a	98.66±2.21 ^a	100 ^a	100
1.5% crude extract	0	-6.65±13.58 ^b	5.93±13.77 ^c	38.35±9.63 ^b	67.90±9.11 ^{ab}	83.79±5.69 ^b	92.96±1.58 ^b	100 ^a	100

¹ค่าเฉลี่ย ± ค่าความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (mean ± standard error)

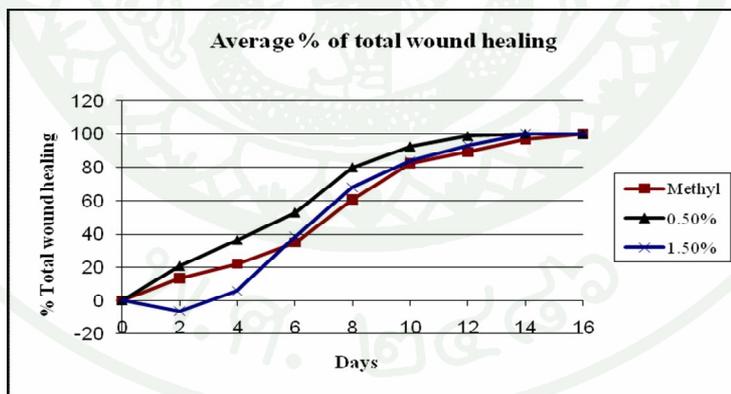
^{a-c}อักษรที่ต่างกันบนค่าเฉลี่ยในคอลัมน์เดียวกันแสดงความแตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (P<0.05)



(ก)



(ข)



(ค)

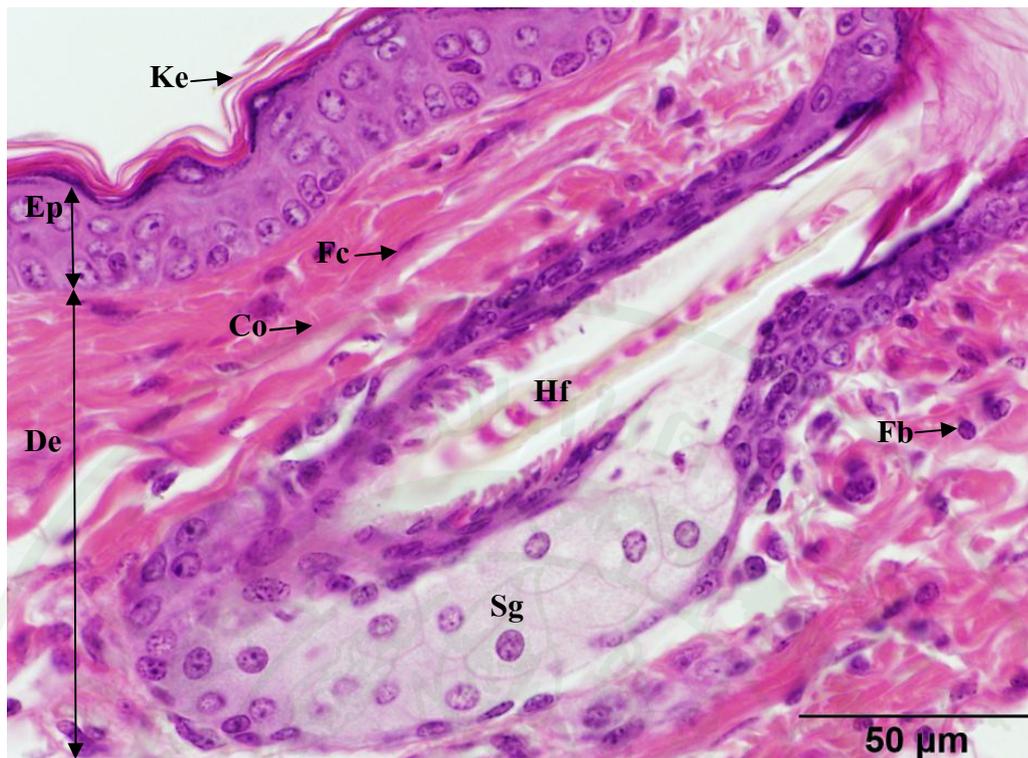
ภาพที่ 20 (ก) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการสร้างเยื่อผิวใหม่ (% epithelization) (ข) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหดตัวของแผล (% wound contraction) และ (ค) ค่าเฉลี่ยร้อยละของการหายของแผลโดยรวม (% total wound healing) ของแผลแบบ excision ในหนูเม้าส์วันที่ 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 และ 16

ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์

การศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ กระทำโดยการเก็บตัวอย่างเนื้อเยื่อผิวหนังปกติ และเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลของหนูทดลองทั้ง 3 กลุ่ม ในวันที่ 4, 8, 12 และ 16 เพื่อทำ Paraffin section แล้วย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H & E) จากนั้นนำมาศึกษาภายใต้กล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X เพื่อศึกษาลักษณะโครงสร้างและส่วนประกอบของตัวอย่างเนื้อเยื่อที่เก็บมานั้น นอกจากนี้ยังนำเนื้อเยื่อมาย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome เพื่อศึกษาความหนาแน่น และขนาดของ collagen fiber และ collagen bundle ที่ถูกสร้างขึ้นภายใน granulation tissue จากนั้นได้ใช้ โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) เพื่อวิเคราะห์ค่าเฉลี่ยร้อยละของความหนาแน่นของ collagen fiber และ collagen bundle ดังกล่าว เปรียบเทียบระหว่างแผลทั้ง 3 กลุ่ม

เนื้อเยื่อที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (H&E)

จากการนำเนื้อเยื่อผิวหนังปกติที่ย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์กำลังขยาย 40X พบว่า มีชั้น epidermis ซึ่งเป็น stratified squamous keratinized epithelium ปกคลุมอยู่ด้านบน และได้จากชั้นนี้ลงไป คือ ชั้น dermis ซึ่งประกอบด้วย collagen bundle ปริมาณมาก พบเซลล์ fibrocyte และ fibroblast กระจายอยู่ทั่วไป นอกจากนี้ยังพบต่อมขน (hair follicle) ต่อมเหงื่อ (apocrine sweat gland) และต่อมไขมัน (sebaceous gland) อยู่ที่ชั้นนี้ด้วย (ภาพที่ 21)



ภาพที่ 21 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังปกติ ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) ประกอบไปด้วยชั้น epidermis (Ep) และ dermis (De) ซึ่งเป็น dense irregular connective tissue ซึ่งมี collagen bundle (Co), hair follicle (Hf) และ sebaceous gland (Sg) เป็นองค์ประกอบ ; Ke = keratin, Fc = fibrocyte, Fb = fibroblast

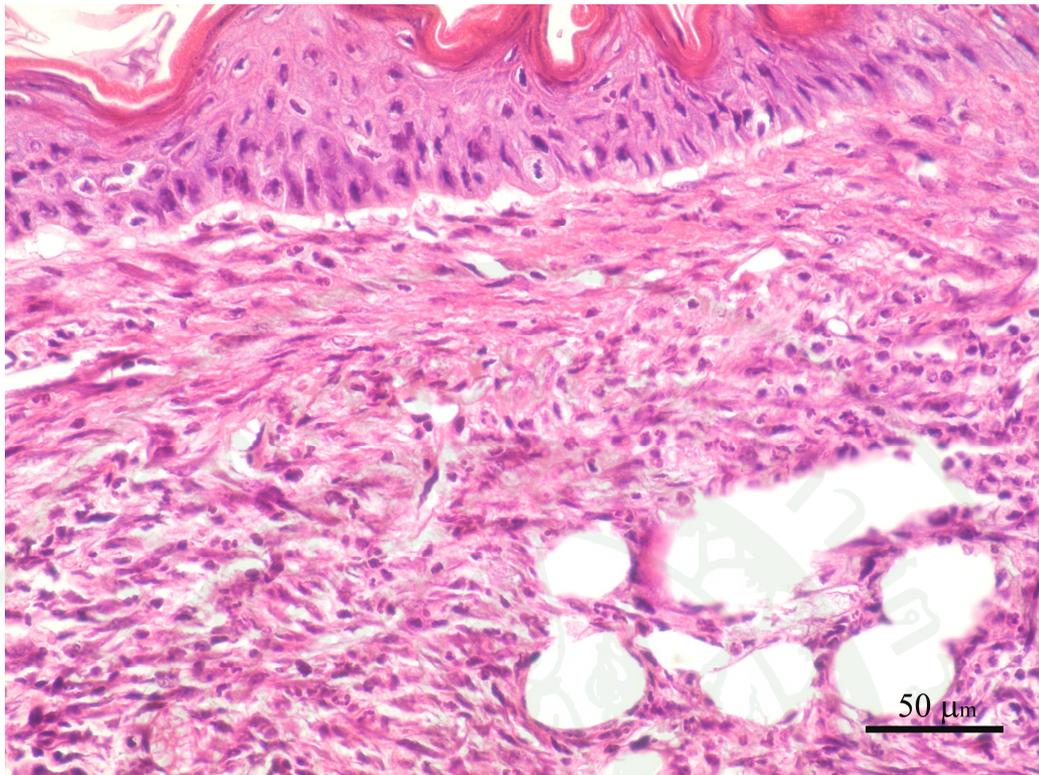
จากการทดลอง พบว่าเนื้อเยื่อผิวหนังที่เก็บในวันที่ 4 ไม่สามารถนำมาทำ Paraffin section ได้ เนื่องจากแผลในทุกกลุ่มมีการสร้างเนื้อเยื่อใหม่น้อยมาก ทำให้เมื่อทำการเก็บตัวอย่างจะได้เนื้อเยื่อที่ประกอบไปด้วยสะเก็ดที่เกิดจากน้ำเหลืองและเลือดที่แข็งตัว และเมื่อนำมาทำ Paraffin section เนื้อเยื่อจะมีลักษณะยุ่ย และหลุดจากแผ่นสไลด์เมื่อถึงขั้นตอนการย้อมสี ทำให้ไม่ได้ผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในวันที่ 4 จากแผลทั้ง 3 กลุ่ม

ส่วนลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ ของแผลที่พบในวันที่ 8 (ภาพที่ 22-24) จะพบช่องว่างขนาดใหญ่ภายใน extracellular matrix ในแผลที่ทำด้วย methylcellulose (ภาพที่ 22) และสารสกัด แสยกลาย 1.5% (ภาพที่ 24) มากกว่าในแผลที่ทำด้วยสารสกัด แสยกลาย 0.5% (ภาพที่ 23) แสดงให้เห็นว่าแผลที่ทำด้วยสารสกัด แสยกลาย 0.5% มีการสร้าง granulation tissue มากกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ ยังพบว่าแผลในกลุ่มนี้มีหลอดเลือดขนาดเล็ก และเซลล์ fibroblast กระจายอยู่หนาแน่นมากกว่า กลุ่มที่ทำ methylcellulose และสารสกัด แสยกลาย 1.5% แต่พบเซลล์ fibrocyte และเซลล์เม็ดเลือด

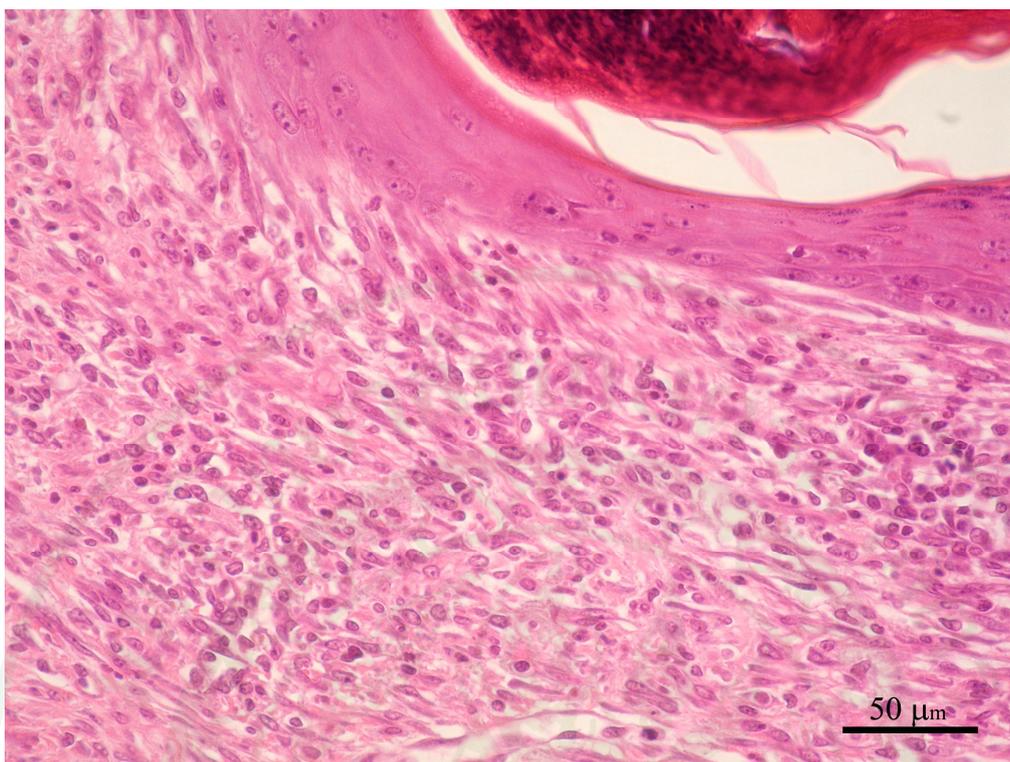
ขาวหนาแน่นน้อยกว่า โดยเฉพาะเซลล์เม็ดเลือดขาวจะพบในแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 1.5% หนาแน่นมากที่สุด แสดงให้เห็นว่าแผลยังเกิดกระบวนการอักเสบอยู่ ส่งผลให้การดำเนินขั้นตอนของกระบวนการหายของแผลเกิดได้ช้ากว่ากลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% ส่วนการสร้างชั้น epidermis ปกคลุมแผลในทั้ง 3 กลุ่มยังเกิดไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะบริเวณกลางบาดแผลยังไม่มี การปกคลุมของ epidermis และการจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังบาดแผลยัง เรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีความหนาไม่เท่ากันทั่วทั้งผิวหนังบาดแผล

ต่อมาในวันที่ 12 (ภาพที่ 25-27) พบว่าแผลที่ทาด้วย methylcellulose (ภาพที่ 25) และสาร สกัดแอสกลาย 0.5% (ภาพที่ 26) และ 1.5% (ภาพที่ 27) มีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ เซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังบาดแผลมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีความหนาเกือบ เท่ากันทั่วทั้งผิวหนังบาดแผล ภายใน granulation tissue พบเซลล์ fibrocyte และ fibroblast กระจายอยู่ อย่างหนาแน่น นอกจากนี้ในแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% และ 1.5% ยังพบเซลล์ fibroblast ซึ่งมีรูปร่าง stellate shape อยู่ที่ตำแหน่งลึกๆของ granulation tissue แต่ไม่พบเซลล์ชนิดนี้ในแผลที่ ทาด้วย methylcellulose แสดงให้เห็นว่าแผลที่ใช้สารสกัดแอสกลาย มีการหดตัวของแผลได้มากกว่า แผลที่ทาด้วย methylcellulose รวมทั้งกลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% และ 1.5% จะพบ หลอดเลือดกระจายอยู่อย่างหนาแน่นที่บริเวณตำแหน่งลึกๆของ granulation tissue แต่จะพบหนาแน่น น้อยในแผลที่ทาด้วย methylcellulose

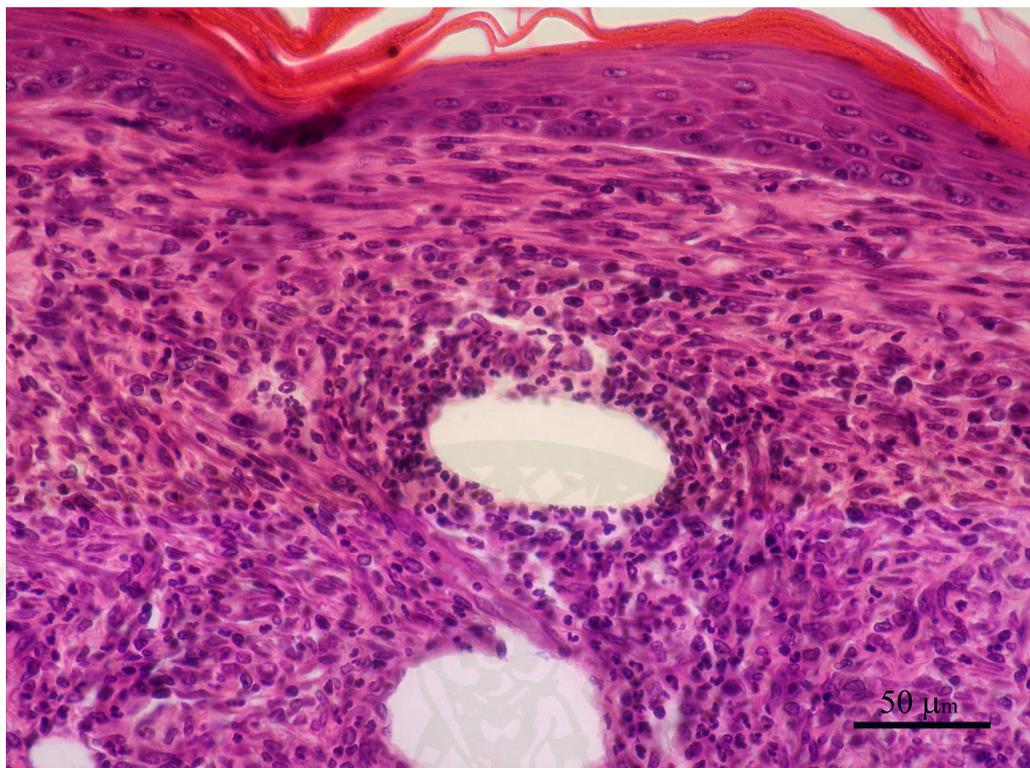
เมื่อถึงวันที่ 16 (ภาพที่ 28-30) แผลของหนูทุกกลุ่มมีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ เซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังบาดแผลมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีความหนาเท่ากัน ทั่วทั้งผิวหนังบาดแผล พบหลอดเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไปใน granulation tissue นอกจากนี้แผลที่ทา ด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% (ภาพที่ 29) และ 1.5% (ภาพที่ 30) ยังพบเซลล์ fibrocyte และ fibroblast ทั้งแบบที่มีรูปร่าง spindle และ stellate shape กระจายอยู่อย่างหนาแน่น ในขณะที่แผลที่ทาด้วย methylcellulose (ภาพที่ 28) จะพบเซลล์ fibrocyte และเซลล์ fibroblast ที่มีรูปร่าง spindle shape เพียงชนิดเดียวกระจายอยู่บริเวณใต้ epidermis



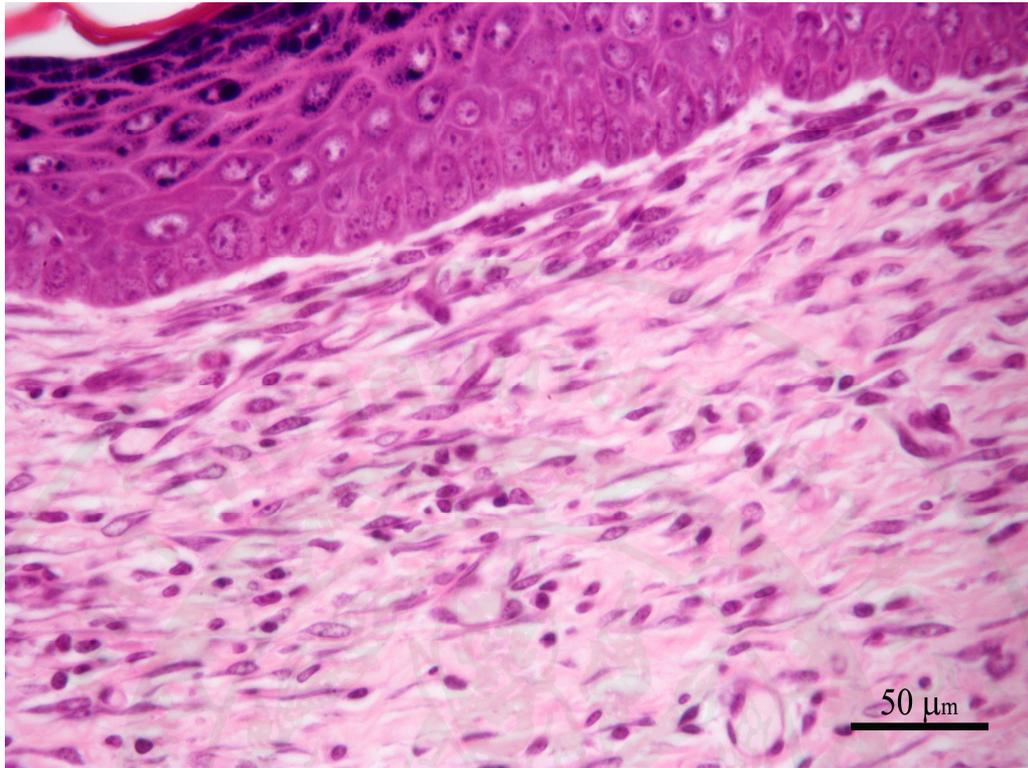
ภาพที่ 22 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 8 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบช่องว่างขนาดใหญ่ภายใน extracellular matrix และพบเซลล์เม็ดเลือดขาวหนาแน่นกระจายทั่วไปใน granulation tissue การสร้างชั้น epidermis ปกคลุมแผลยังเกิดไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะบริเวณกลางบาดแผลยังไม่มีการปกคลุมของ epidermis การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมแผลยังเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และมีความหนาไม่เท่ากันทั่วทั้งผิวบาดแผล



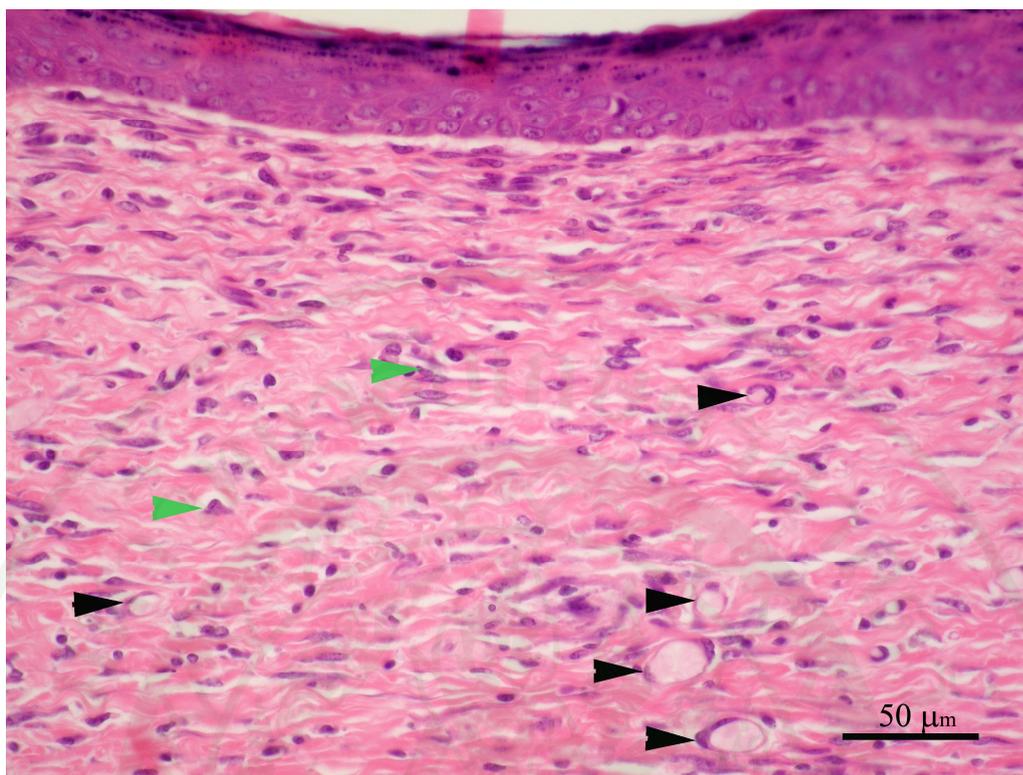
ภาพที่ 23 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดสะเดากลาย 0.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบเซลล์ fibroblast หนาแน่นภายใน granulation tissue และมีหลอดเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่ทั่วไป การสร้างชั้น epidermis ปกคลุมแผลยังเกิดไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะบริเวณกลางบาดแผลยังไม่มีการปกคลุมของ epidermis และการจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังบาดแผลยังเรียงตัวไม่เป็นระเบียบและมีความหนาไม่เท่ากันทั่วทั้งผิวหนังบาดแผล



ภาพที่ 24 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดเสกกลาย 1.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบช่องว่างขนาดใหญ่ภายใน extracellular matrix และพบเซลล์เม็ดเลือดขาวหนาแน่นกระจายทั่วไปใน granulation tissue การสร้างชั้น epidermis ปกคลุมแผลยังเกิดไม่สมบูรณ์ โดยเฉพาะบริเวณกลางบาดแผลยังไม่มีการปกคลุมของ epidermis การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมแผลยังเรียงตัวไม่เป็นระเบียบ และมีความหนาไม่เท่ากันทั่วทั้งผิวบาดแผล



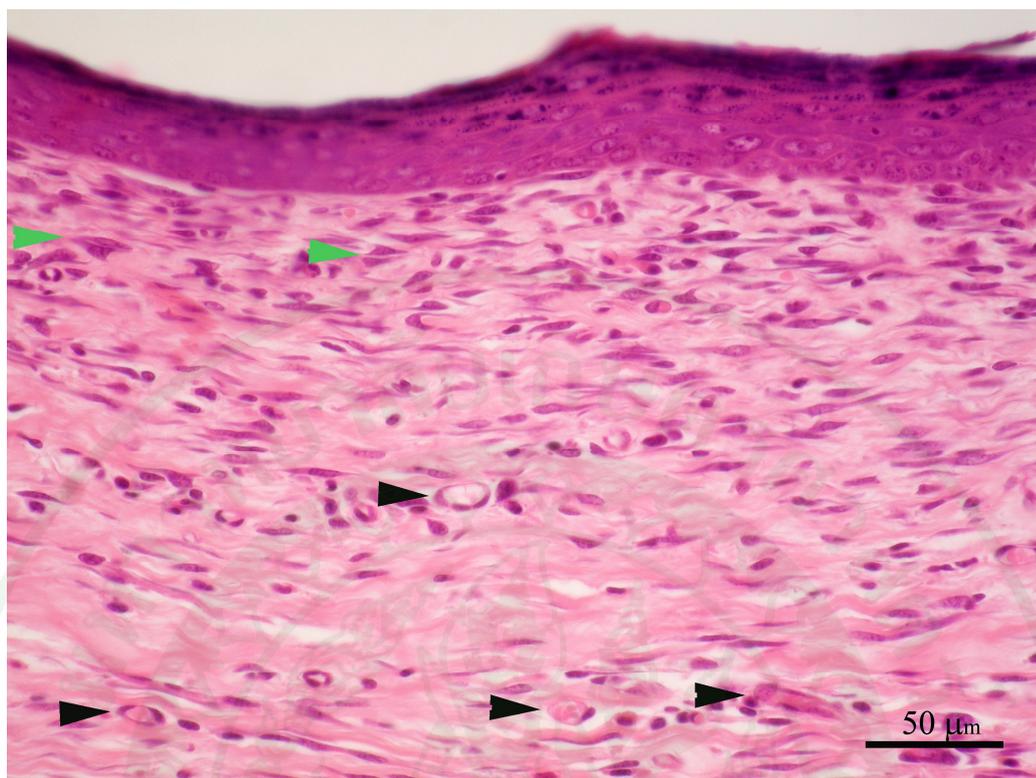
ภาพที่ 25 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 12 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบว่ามีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ เซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังแผลมีการเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีความหนาเกือบเท่ากันทั่วทั้งผิวหนังแผล ภายใน granulation tissue พบเซลล์ fibrocyte และ fibroblast กระจายอยู่อย่างหนาแน่น พบหลอดเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่ที่ชั้นลึก



ภาพที่ 26 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดสะเดกกลาย 0.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบว่ามีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังแผลเรียงตัวเป็นระเบียบและมีความหนาเกือบเท่ากันทั่วทั้งผิวหนังแผล ภายใน granulation tissue พบเซลล์ fibrocyte และ fibroblast กระจายอยู่อย่างหนาแน่น พบเซลล์ fibroblast ซึ่งมีรูปร่าง stellate shape และหลอดเลือดกระจายอยู่อย่างหนาแน่นที่ตำแหน่งลึกๆของ granulation tissue

หัวลูกศรสีดำ; small blood vessels

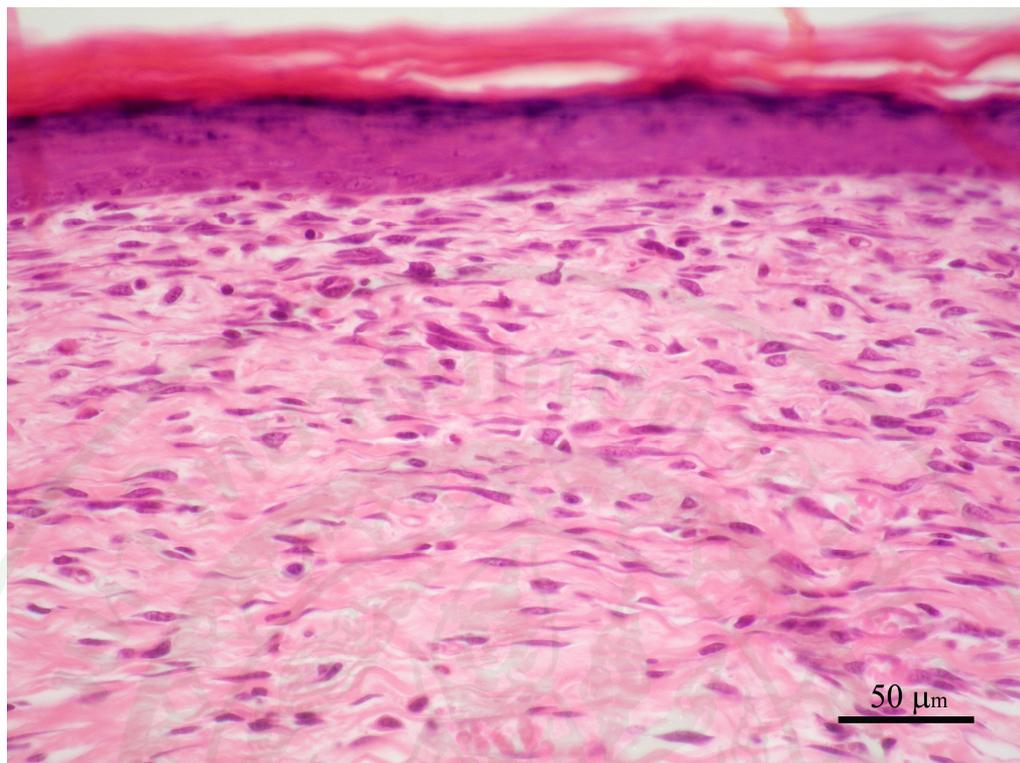
หัวลูกศรสีเขียว; stellate shaped fibroblasts



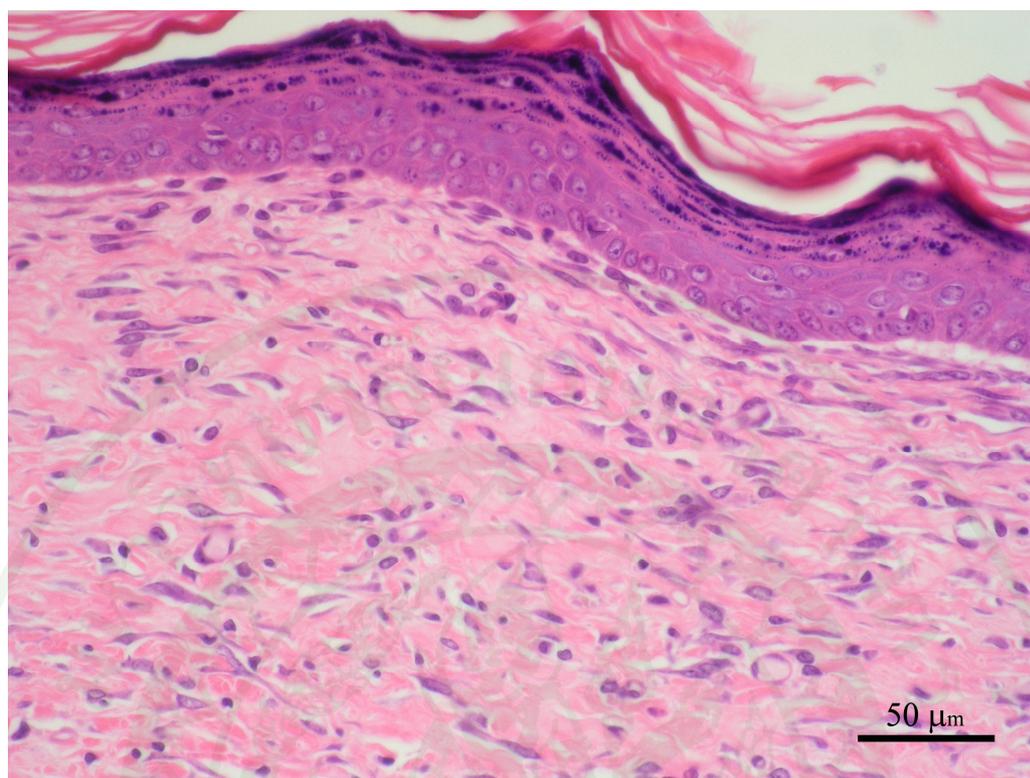
ภาพที่ 27 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดสะเดกกลาย 1.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบว่ามีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังแผลเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และมีความหนาเกือบเท่ากันทั่วทั้งผิวหนังแผล ภายใน granulation tissue พบเซลล์ fibrocyte และ fibroblast กระจายอยู่อย่างหนาแน่น พบเซลล์ fibroblast ซึ่งมีรูปร่าง stellate shape กระจายอยู่ที่บริเวณ superficial dermis และพบหลอดเลือดกระจายอยู่อย่างหนาแน่นที่ตำแหน่งลึกๆของ granulation tissue

หัวลูกศรสีดำ; small blood vessels

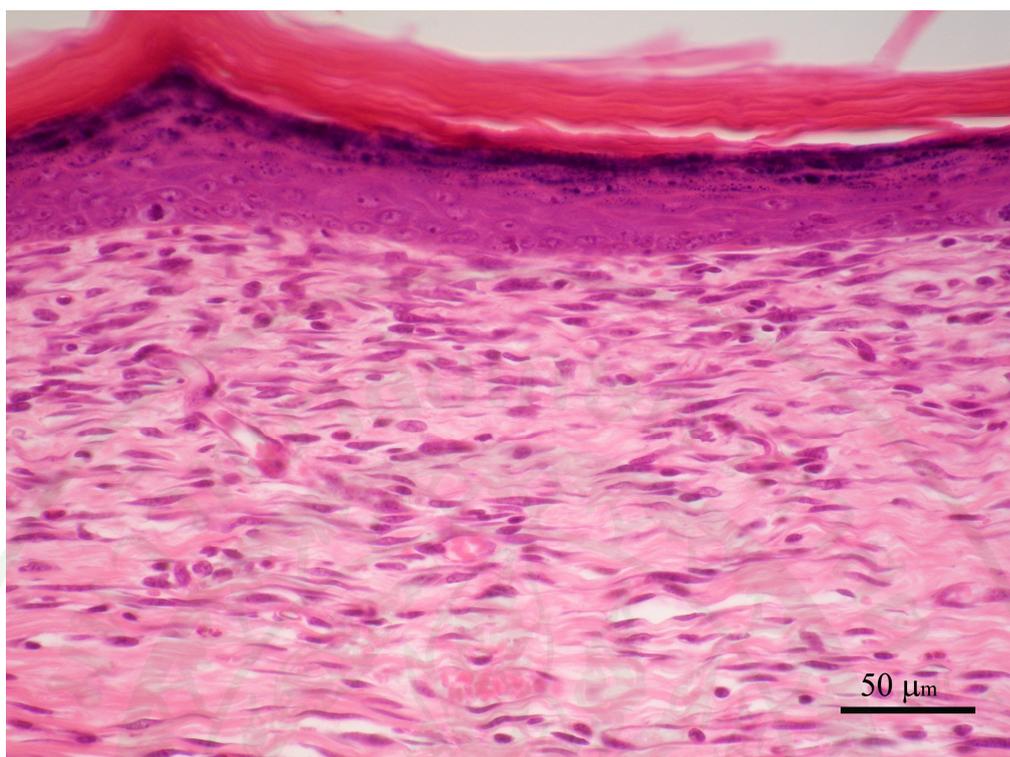
หัวลูกศรสีเขียว; stellate shaped fibroblasts



ภาพที่ 28 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 16 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบว่ามีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังแผล เรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และมีความหนาเกือบเท่ากันทั่วทั้งผิวหนังแผล พบหลอดเลือด ขนาดเล็ก เซลล์ fibrocyte และเซลล์ fibroblast ที่มีรูปร่าง spindle shape เพียงชนิดเดียว กระจายอยู่ทั่วไปใน granulation tissue



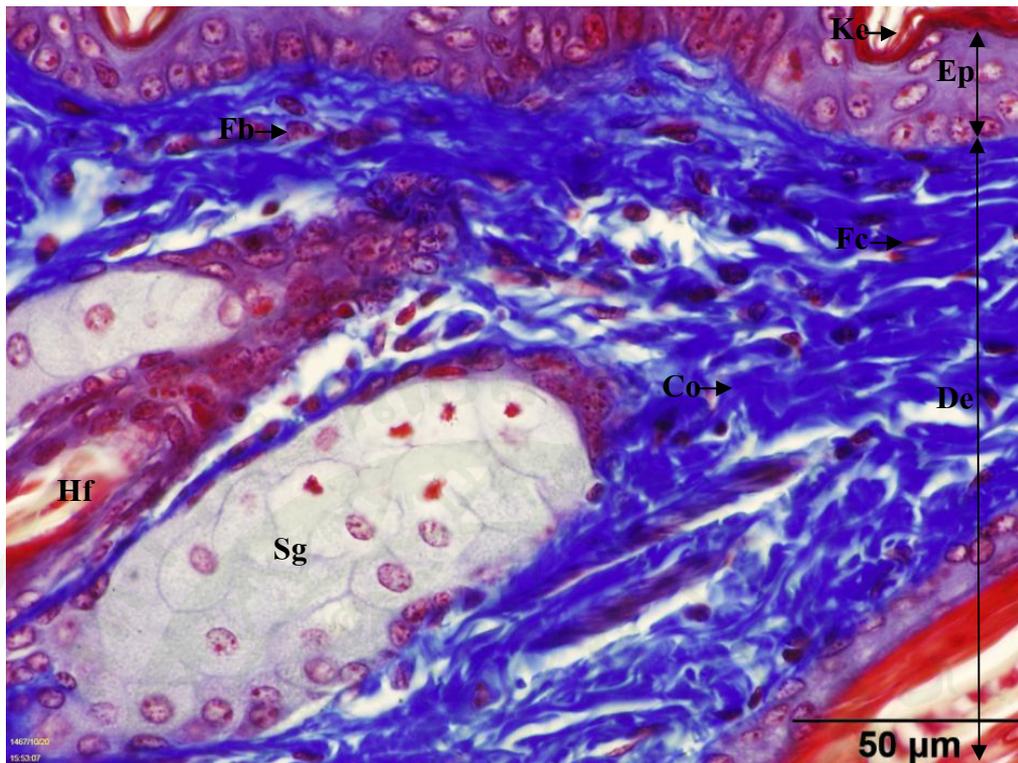
ภาพที่ 29 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดเสกกลาย 0.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบว่ามีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังแผลเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบ และมีความหนาเกือบเท่ากันทั่วทั้งผิวหนังแผล พบหลอดเลือดขนาดเล็กเซลล์ fibrocyte และเซลล์ fibroblast ทั้งแบบที่มีรูปร่าง spindle และ stellate shape กระจายอยู่อย่างหนาแน่นใน granulation tissue



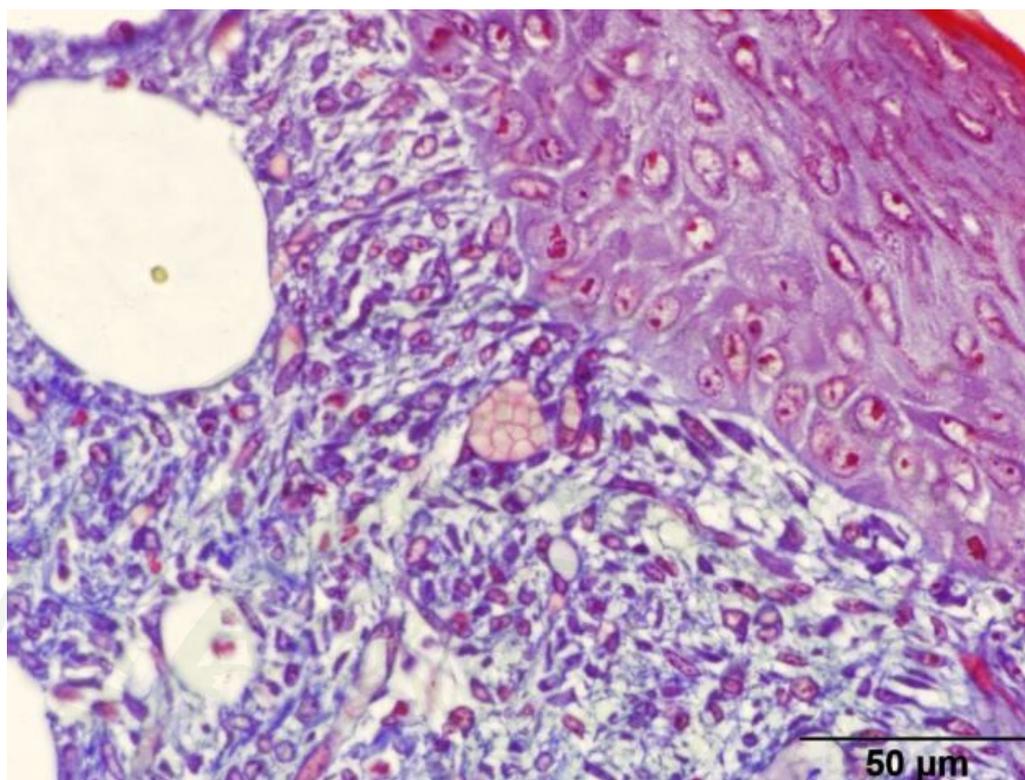
ภาพที่ 30 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดเสกกลาย 1.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมด้วยสี H&E (กำลังขยาย 40X) พบว่ามีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ การจัดเรียงตัวของเซลล์ในชั้น epidermis ที่ปกคลุมผิวหนังแผลเรียงตัวอย่างเป็นระเบียบและมีความหนาเกือบเท่ากันทั่วทั้งผิวหนังแผล พบหลอดเลือดขนาดใหญ่กระจายอยู่ในชั้นลึก พบเซลล์ fibrocyte และเซลล์ fibroblast ทั้งแบบที่มีรูปร่าง spindle และ stellate shape กระจายอยู่ใน granulation tissue

เนื้อเยื่อที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome

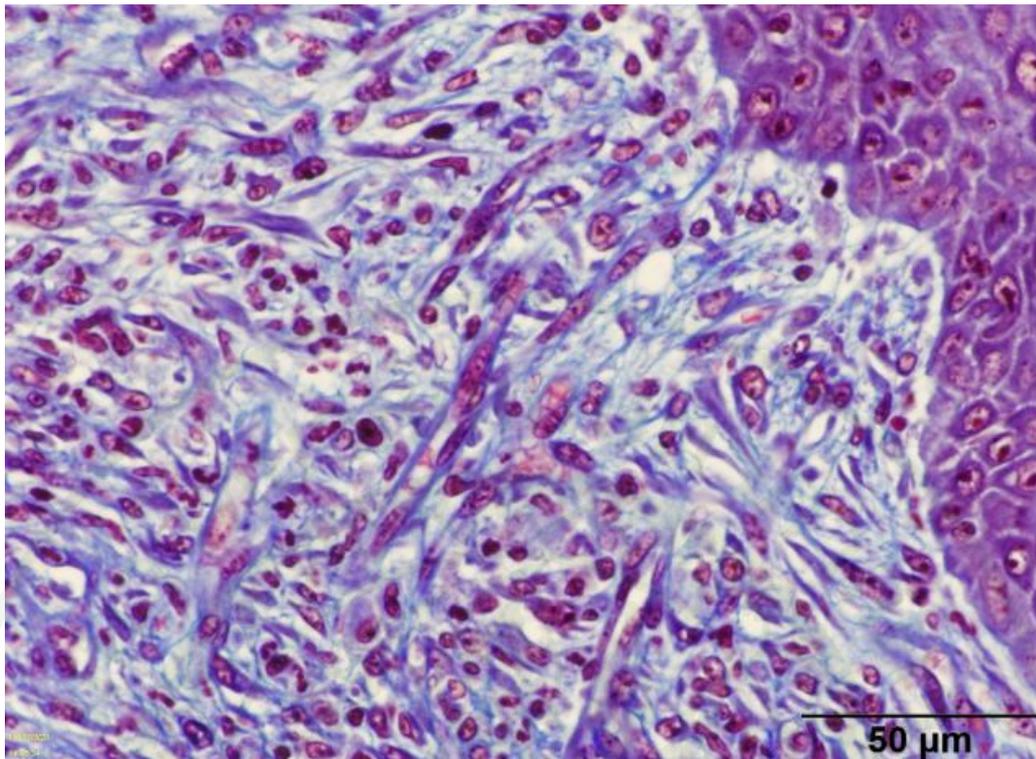
จากการนำเนื้อเยื่อผิวหนังปกติที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome ซึ่งเป็นการย้อมสีพิเศษ เพื่อใช้ศึกษาลักษณะของ connective tissue มาตรวจสอบด้วยกล้องจุลทรรศน์ที่กำลังขยาย 40X จะพบโครงสร้างของเนื้อเยื่อผิวหนังเช่นเดียวกับการย้อมด้วยสี Hematoxylin และ Eosin แต่ลักษณะการติดสีจะแตกต่างกันคือ นิวเคลียส จะติดสีดำ cytoplasm เคอราติน เส้นใยกล้ามเนื้อ จะติดสีแดง ส่วน collagen fiber และ collagen bundle จะติดสีฟ้า (Ajlia *et al.*, 2010) (ภาพที่ 31) ส่วนการศึกษาใน granulation tissue ของแผลทั้ง 3 กลุ่ม จะพบลักษณะการกระจายตัว และความหนาแน่นของ collagen fiber และ collagen bundle ที่แตกต่างกันในแต่ละช่วงเวลาของการเก็บข้อมูล โดยจะไม่พบลักษณะของ collagen fiber ที่ชัดเจนแทรกอยู่ใน granulation tissue ของทุกแผลจนกระทั่งวันที่ 8 (ภาพที่ 32-34) จึงพบว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกกลาย 0.5% (ภาพที่ 33) พบ collagen fiber แทรกอยู่ใน granulation tissue หนาแน่นกว่าแผลที่ทาด้วย methylcellulose (ภาพที่ 32) และสารสกัดแอสกกลาย 1.5% (ภาพที่ 34) แต่ลักษณะของ collagen fiber ที่พบในแผลทั้ง 3 กลุ่ม จะยังกระจายตัวกันอยู่ นอกจากนี้จะพบช่องว่างขนาดใหญ่แทรกอยู่ในแผลที่ทาด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกกลาย 1.5% ซึ่งสอดคล้องกับค่าเฉลี่ยร้อยละของ intensity ของ collagen fibers ที่ได้ทำการสุ่มวัดบริเวณตำแหน่งของ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่ง โดยการใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) โดยในวันที่ 8 ค่าเฉลี่ยร้อยละของ intensity ของ collagen fibers เท่ากับ 0.98%, 3.24% และ 2.50% ในกลุ่มที่ 1, 2 และ 3 ตามลำดับ ต่อมาในวันที่ 12 (ภาพที่ 35-37) สังเกตพบความหนาแน่นมากขึ้นของ collagen fibers ในแผลที่ทาด้วย methylcellulose (ภาพที่ 35) แต่อย่างน้อยกว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกกลาย 0.5% (ภาพที่ 36) และ 1.5% (ภาพที่ 37) นอกจากนี้ลักษณะของ collagen fiber ที่พบในแผลที่ทาด้วย methylcellulose ยังมีการกระจายตัว ในขณะที่แผลที่ใช้สารสกัดแอสกกลายทั้ง 2 กลุ่ม มี collagen fiber ที่เกาะกลุ่มกันหนาแน่นมากขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับแผลในวันที่ 8 และค่า intensity ของ collagen fibers มีค่าเท่ากับ 6.24%, 26.79% และ 12.26% ตามลำดับ ในวันที่ 16 (ภาพที่ 38-40) พบ collagen bundles เรียงตัวอย่างหนาแน่นแทรกอยู่ใน granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกกลาย 0.5% (ภาพที่ 39) และ 1.5% (ภาพที่ 40) เมื่อทำการวัดขนาดของ collagen bundles โดยสุ่มวัดทั้งหมด 60 bundles จะได้ขนาดของ collagen bundles โดยเฉลี่ย คือ 6.35 และ 5.76 μm (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 1.36 และ 1.30 ตามลำดับ) โดยมีค่า intensity ของ collagen เท่ากับ 56.28% และ 41.60% ตามลำดับ ส่วนแผลที่ทาด้วย methylcellulose (ภาพที่ 38) พบ collagen bundles เช่นกัน แต่จัดเรียงตัวไม่หนาแน่นเท่ากลุ่มอื่น เมื่อทำการวัดขนาดของ collagen bundles จะมีขนาดเฉลี่ย 3.30 μm (ค่าเบี่ยงเบนมาตรฐานเท่ากับ 0.73) และมีค่า intensity ของ collagen เพียง 29.53% (ตารางที่ 5)



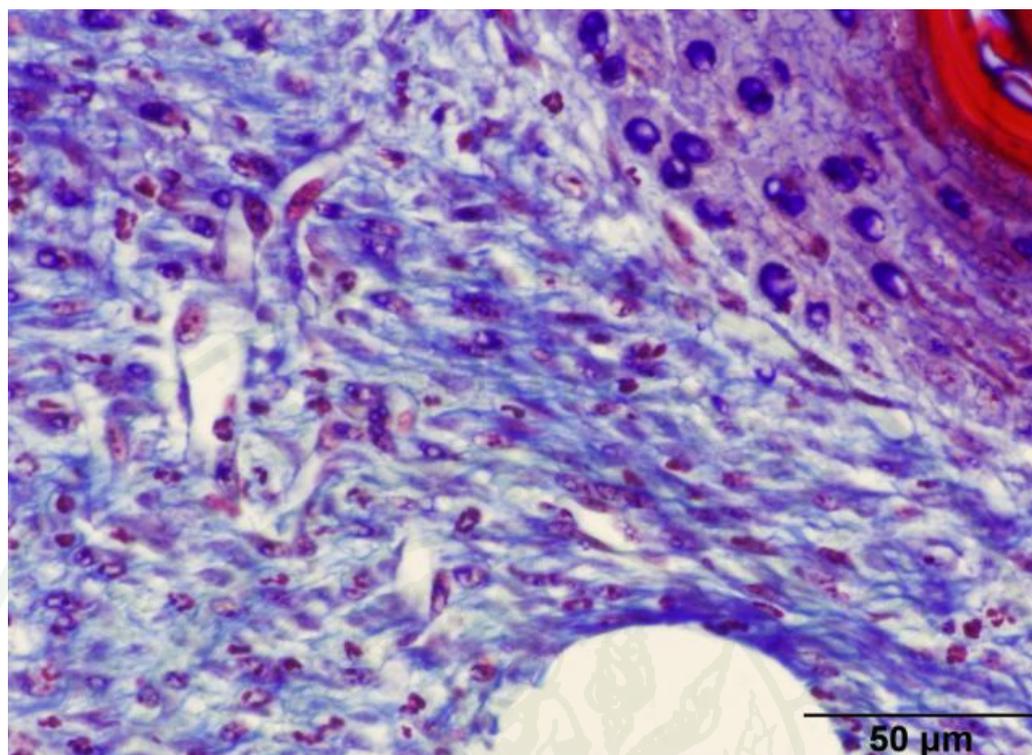
ภาพที่ 31 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของผิวหนังปกติ ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X) ประกอบไปด้วยชั้น epidermis (Ep) และ dermis (De) ซึ่งเป็น dense irregular connective tissue ซึ่งมี collagen bundle (Co), hair follicle (Hf) และ sebaceous gland (Sg) เป็นองค์ประกอบ ; Ke = keratin, Fc = fibrocyte, Fb = fibroblast



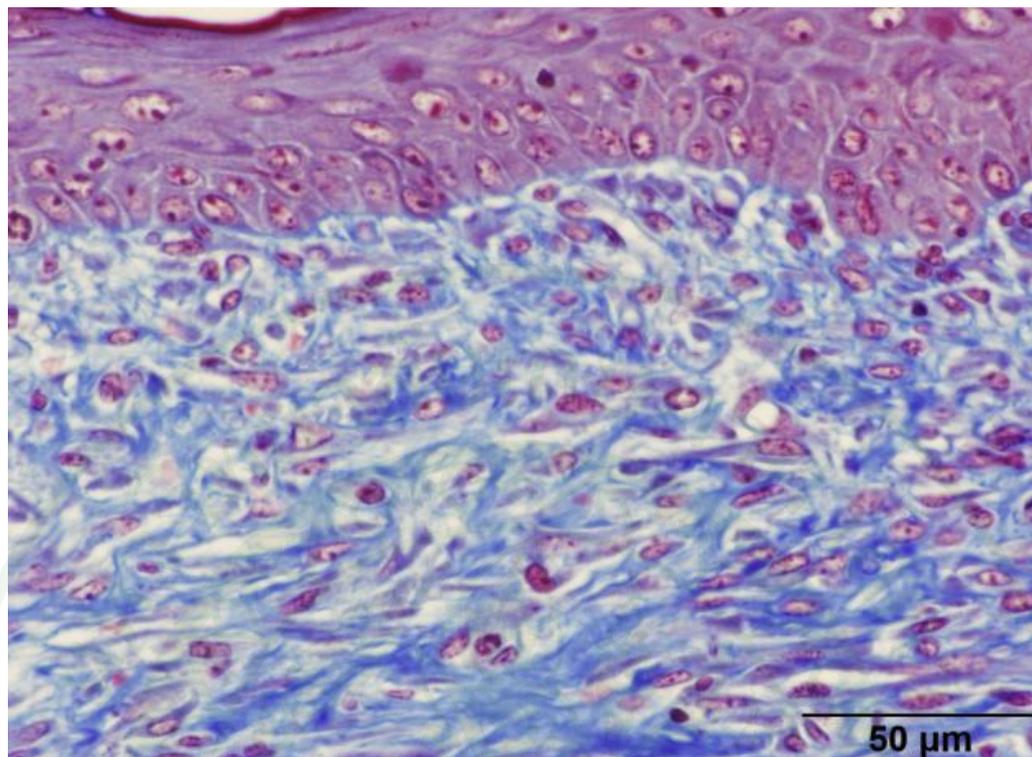
ภาพที่ 32 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 8 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)



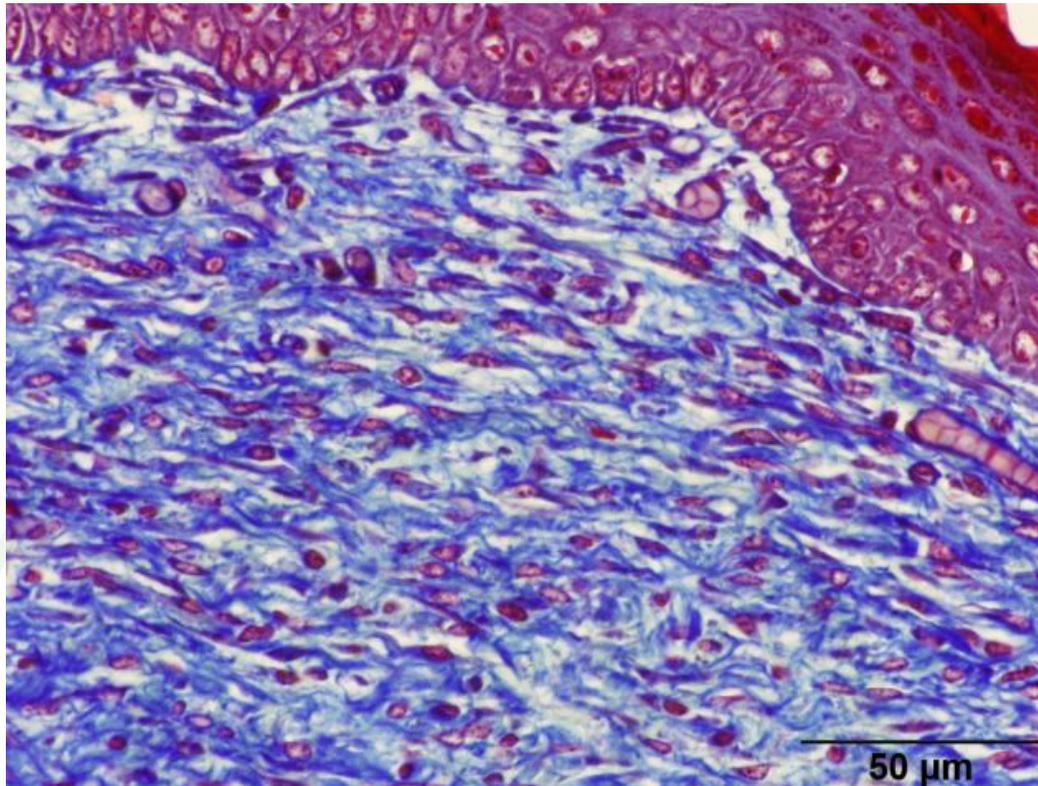
ภาพที่ 33 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัด
แสยกลาย 0.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)



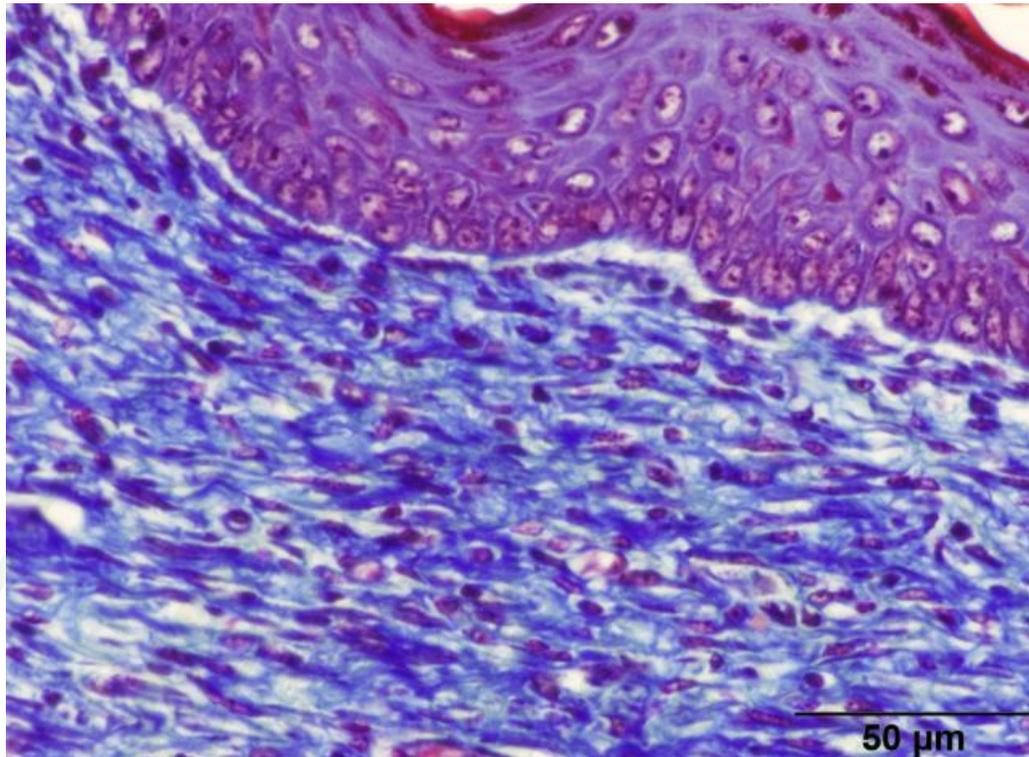
ภาพที่ 34 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัด
แสยกลาย 1.5% ในวันที่ 8 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)



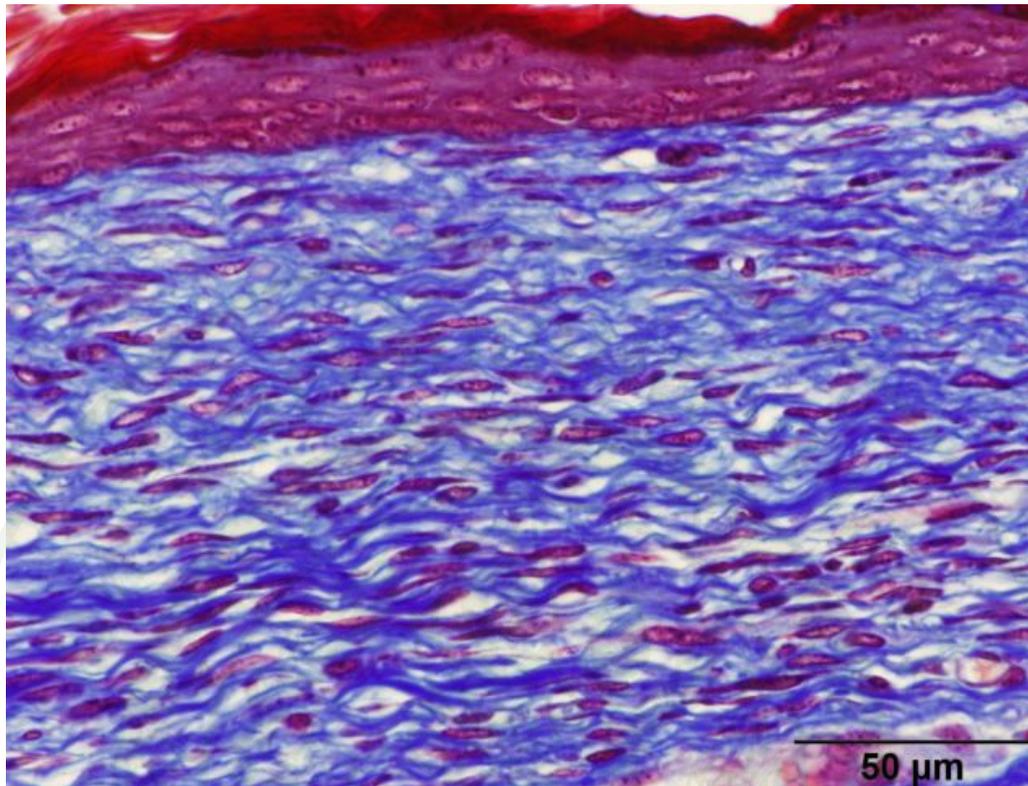
ภาพที่ 35 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทำด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 12 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)



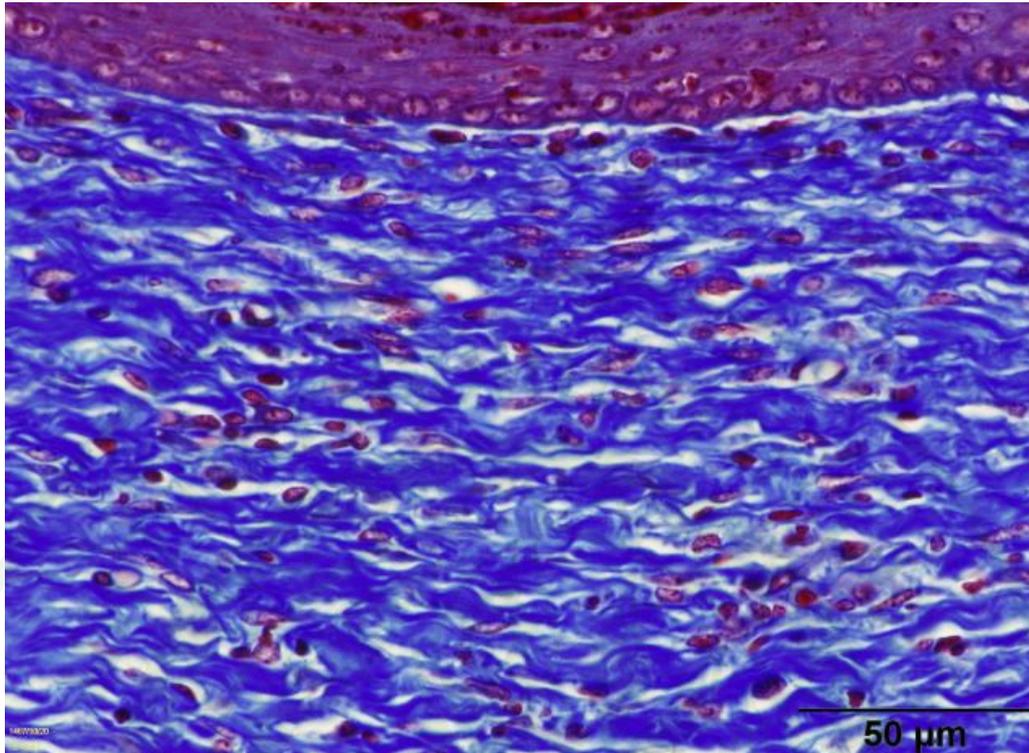
ภาพที่ 36 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัด
แสยกลาย 0.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)



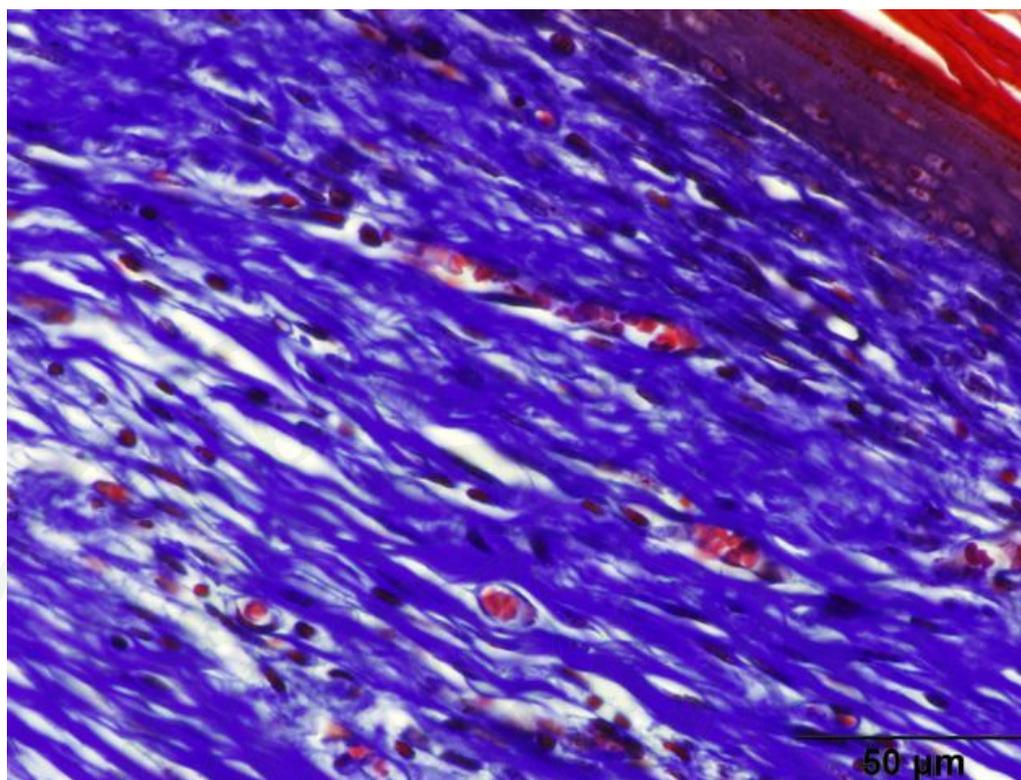
ภาพที่ 37 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัด
แสยกลาย 1.5% ในวันที่ 12 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)



ภาพที่ 38 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose (กลุ่มควบคุม) ในวันที่ 16 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)

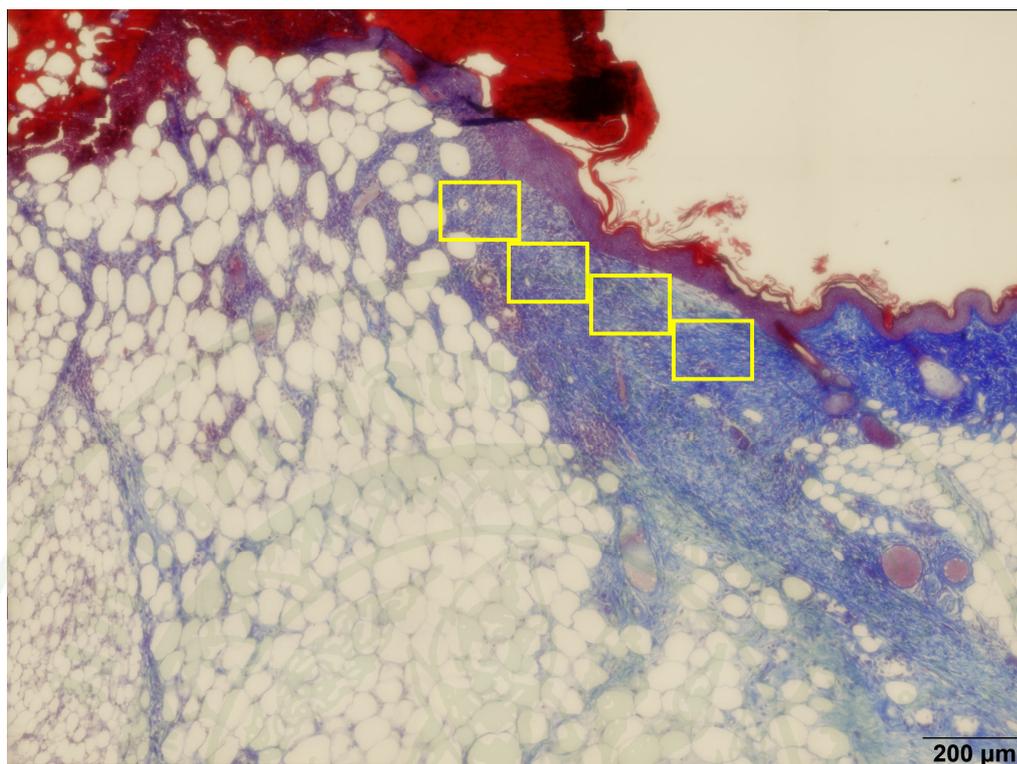


ภาพที่ 39 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัด
แสยกลาย 0.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)

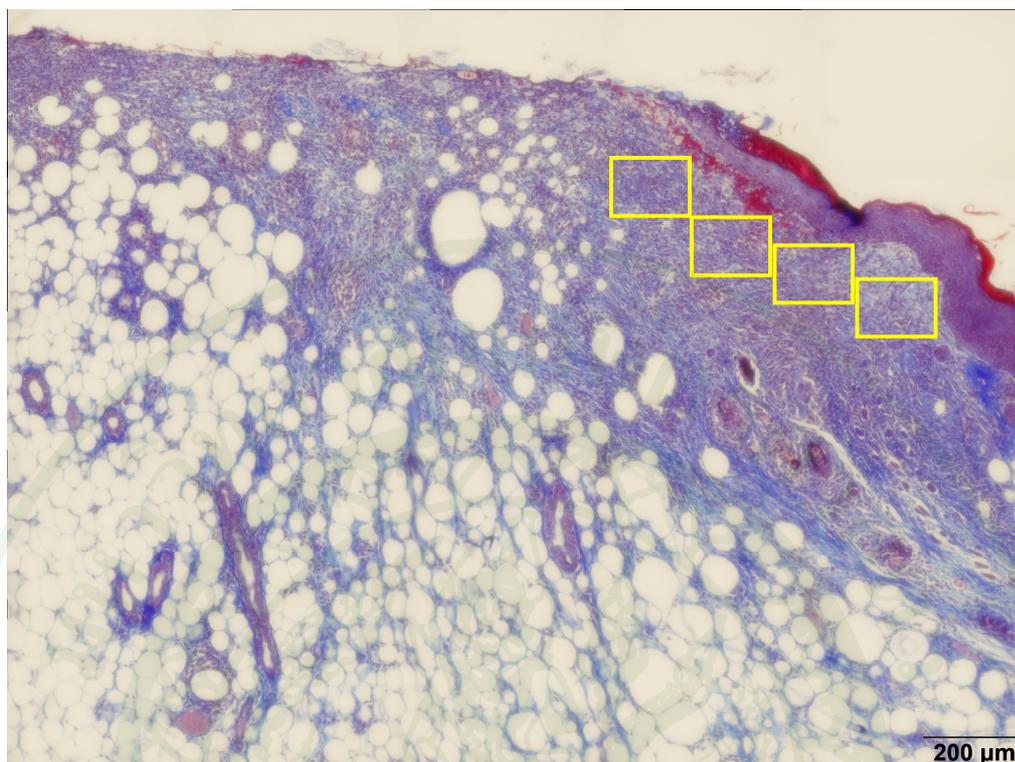


ภาพที่ 40 ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดแยกกลาย 1.5% ในวันที่ 16 ที่ย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome (กำลังขยาย 40X)

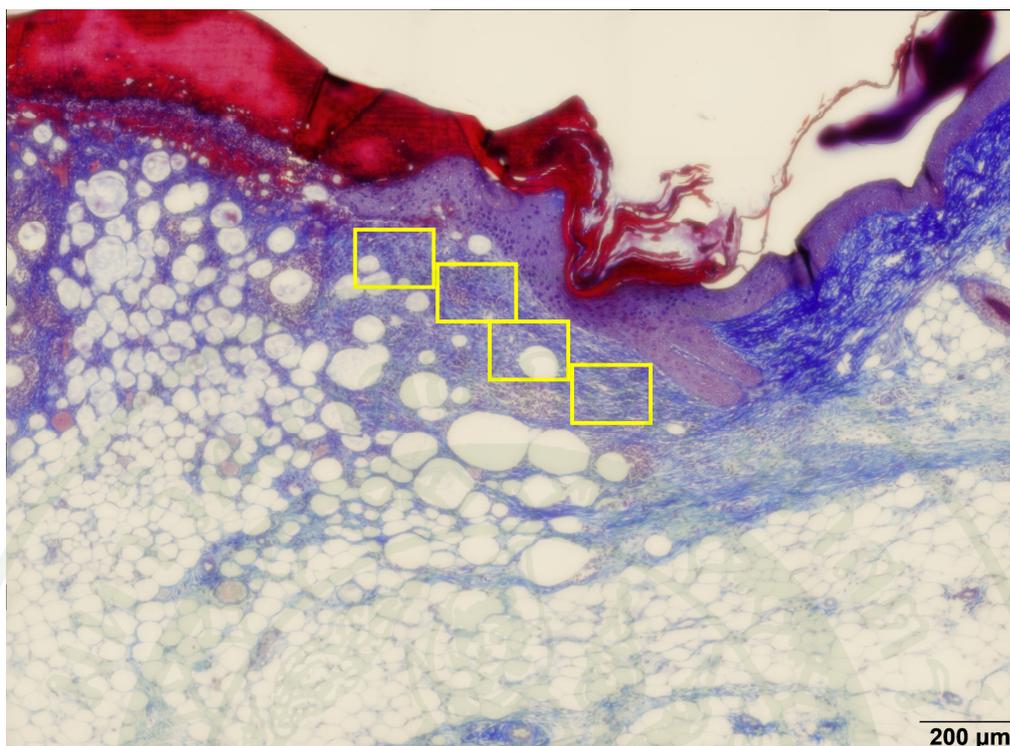
จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผลโดยใช้การย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome จะสังเกตได้ว่าความหนาแน่นของ collagen fibers และ collagen bundles ที่พบนั้น สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยร้อยละของ intensity ของ collagen fibers ที่ได้ทำการสุ่มวัดบริเวณตำแหน่งของ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยเลือกวัดที่ตำแหน่งขอบแผลบริเวณที่อยู่ชิดกับ dermis ของผิวหนังปกติ ซึ่งตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยในวันที่ 8 แสดงไว้ในภาพที่ 41-43 วันที่ 12 แสดงไว้ในภาพที่ 44-46 และวันที่ 16 แสดงไว้ในภาพที่ 47-49 โดยการใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) แสดงผลการวัดค่าออกมาดังแสดงในตารางที่ 5



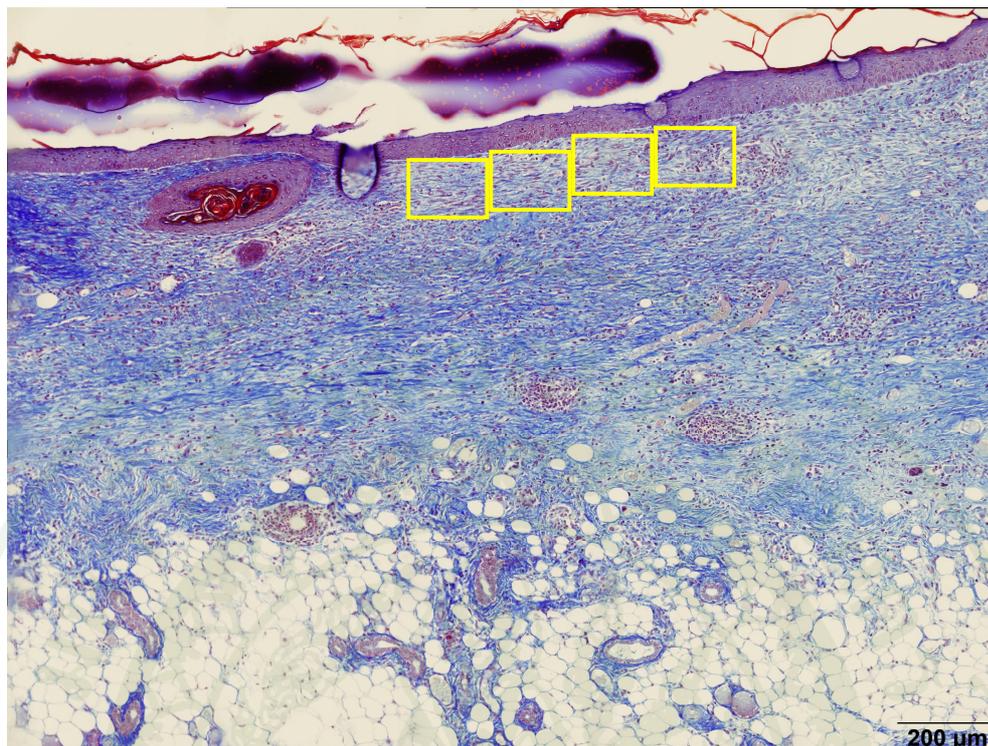
ภาพที่ 41 ตำแหน่งของการสุมวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทำด้วย methylcellulose ในวันที่ 8 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



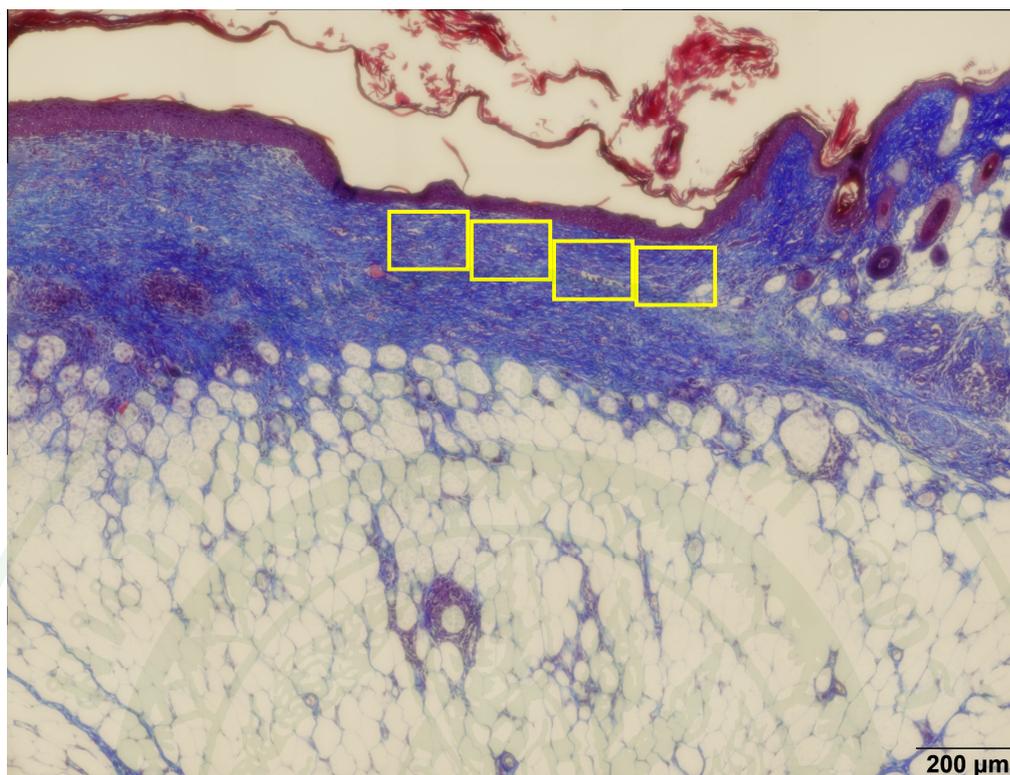
ภาพที่ 42 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทำด้วย สารสกัดแอสกลาย 0.5% ในวันที่ 8 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



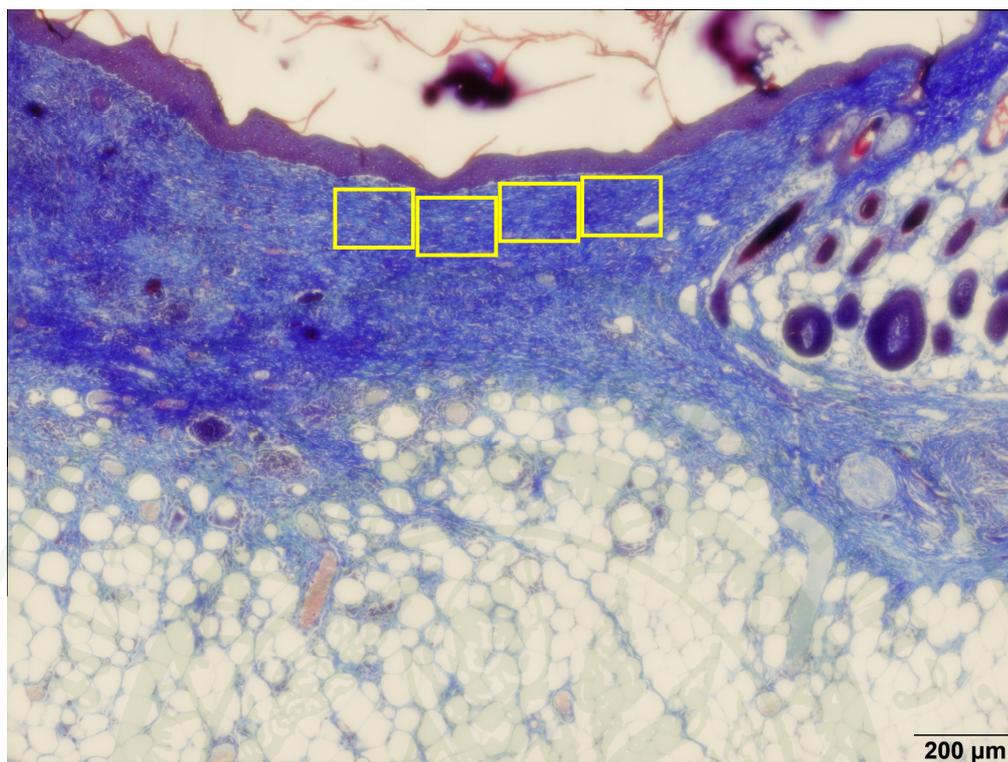
ภาพที่ 43 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแสมกลาย 1.5% ในวันที่ 8 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



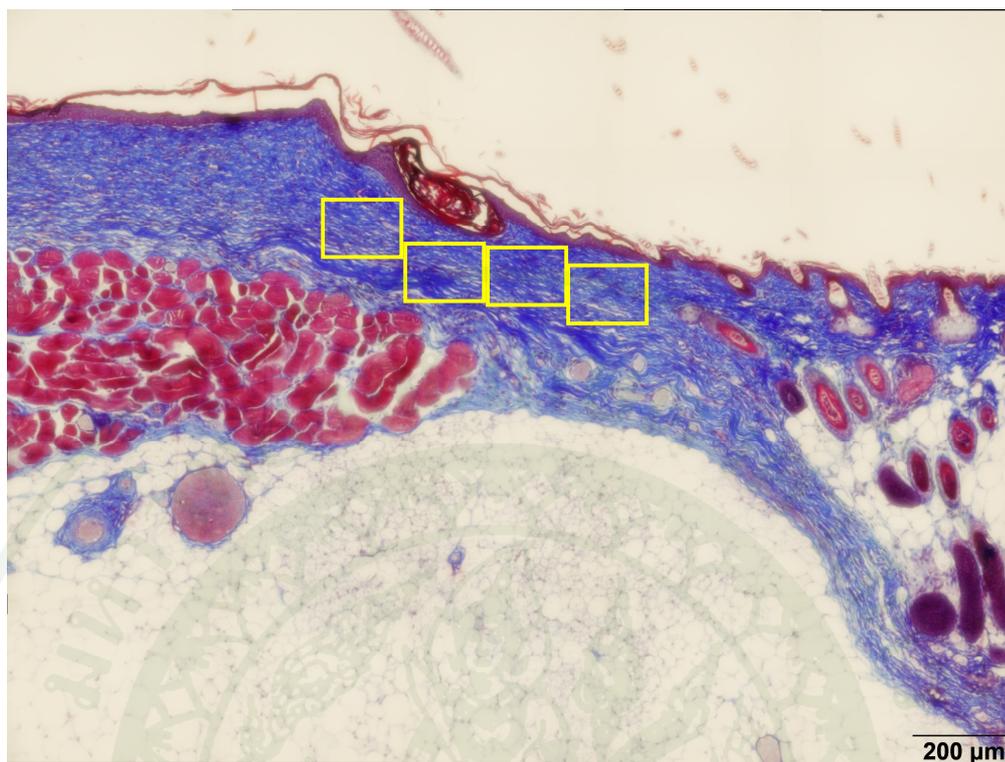
ภาพที่ 44 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose ในวันที่ 12 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



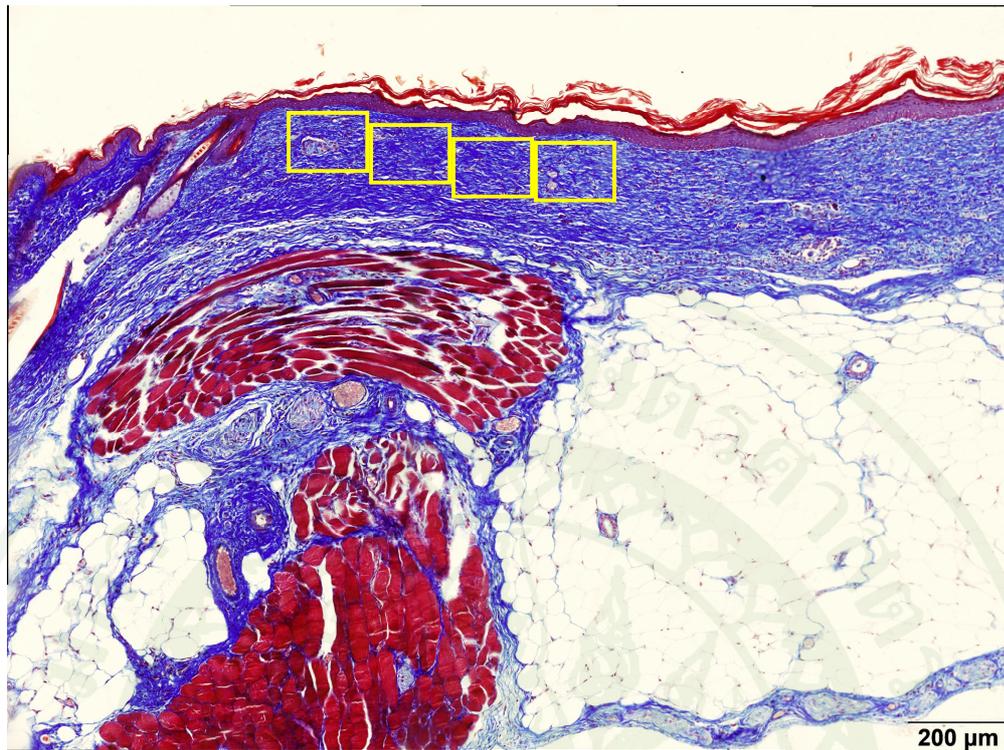
ภาพที่ 45 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทำด้วย สารสกัดแสมกลาย 0.5% ในวันที่ 12 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



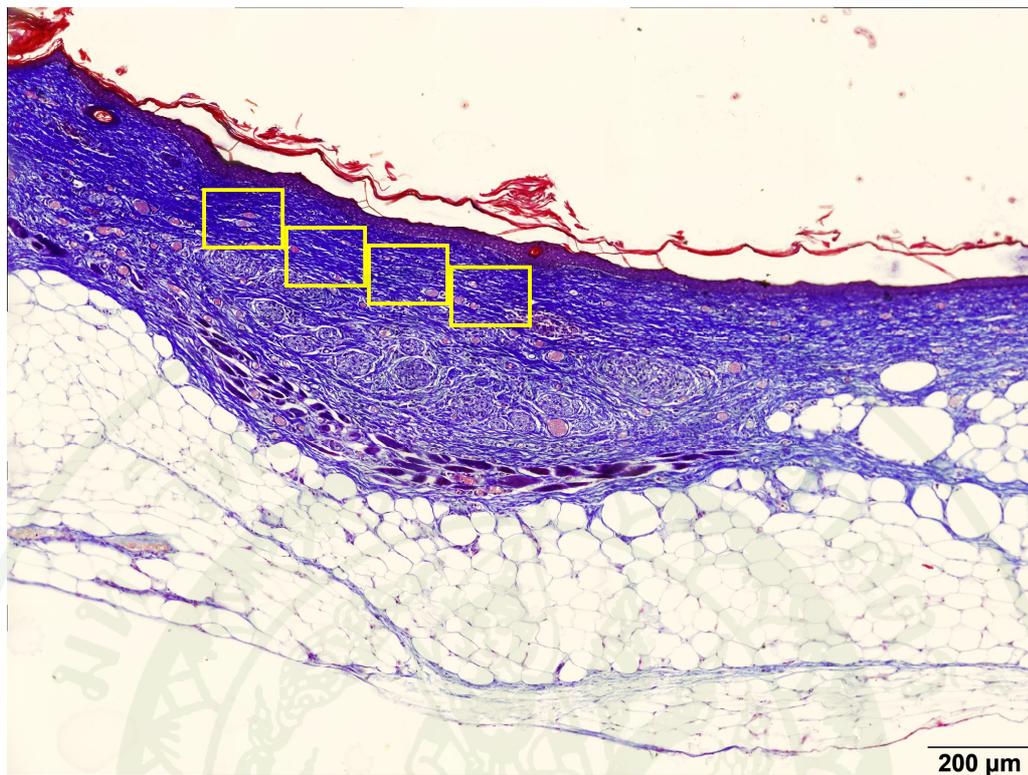
ภาพที่ 46 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทำด้วย สารสกัดแอสกลาย 1.5% ในวันที่ 12 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



ภาพที่ 47 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทาด้วย methylcellulose ในวันที่ 16 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



ภาพที่ 48 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทาด้วย สารสกัดแอสกกลาย 0.5% ในวันที่ 16 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)



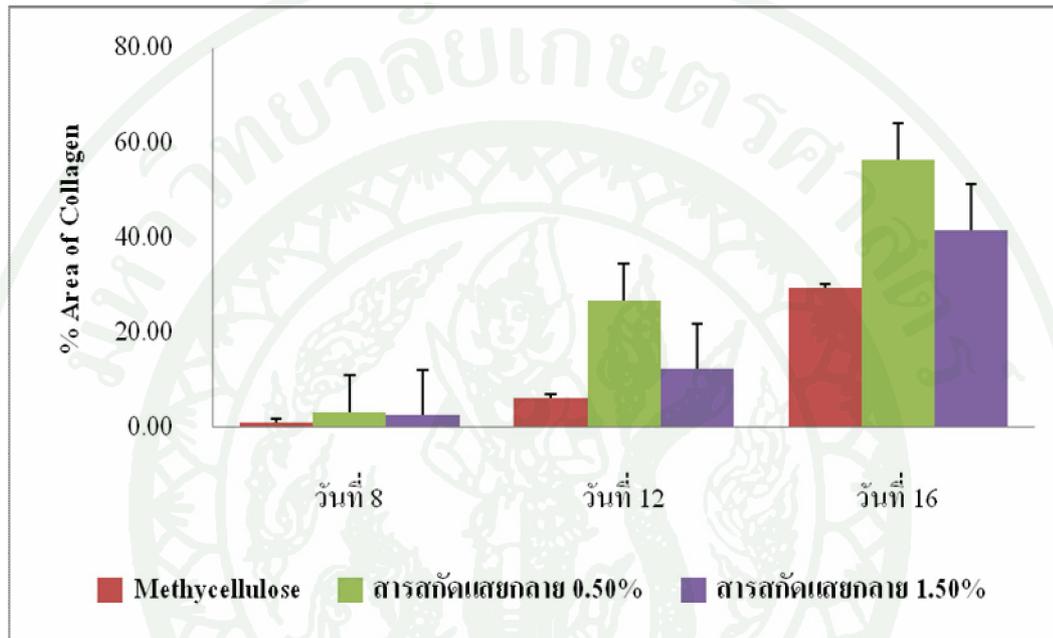
ภาพที่ 49 ตำแหน่งของการสุ่มวัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ของแผลที่ทำด้วย สารสกัดแอสกลาย 1.5% ในวันที่ 16 บริเวณ granulation tissue ที่อยู่ใต้ชั้น epidermis จำนวน 4 ตำแหน่งที่ต่อเนื่องกัน โดยใช้โปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)

ตารางที่ 5 ค่าเฉลี่ยร้อยละของ Intensity ของ collagen fiber ระหว่างกลุ่มที่ทำการทดลอง

วันที่		กลุ่มการทดลอง																	
		Methycellulose						สารสกัดแอสยกลาย 0.5%						สารสกัดแอสยกลาย 1.5%					
		1	2	3	4	เฉลี่ย	SD	1	2	3	4	เฉลี่ย	SD	1	2	3	4	เฉลี่ย	SD
8	%area of background	98.89 ¹	99.16	98.98	99.07	99.03	0.09	97.22	96.88	94.65	98.27	96.76	1.05	98.88	96.65	96.62	97.86	97.50	0.87
	%area of collagen	1.11	0.84	1.02	0.93	0.98	0.09	2.78	3.11	5.35	1.73	3.24	1.05	1.12	3.35	3.38	2.14	2.50	0.87
12	%area of background	89.80	96.33	91.84	97.08	93.76	2.94	69.40	74.35	75.70	73.38	73.21	1.90	87.30	88.27	87.71	87.67	87.74	0.27
	%area of collagen	10.20	3.67	8.16	2.92	6.24	2.94	30.60	25.65	24.30	26.62	26.79	1.90	12.70	11.73	12.29	12.33	12.26	0.27
16	%area of background	68.71	72.69	71.03	69.46	70.47	1.39	43.45	43.74	43.79	43.91	43.72	0.14	54.48	57.18	55.53	66.43	58.41	4.01
	%area of collagen	31.29	27.31	28.97	30.54	29.53	1.39	56.55	56.26	56.21	56.09	56.28	0.14	45.52	42.82	44.47	33.57	41.60	4.01

¹ค่าที่แสดง คำนวณจากโปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus)

จากค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ที่วัดได้จากผลของหนูที่ทาด้วย methylcellulose และสารสกัดแสยกลาย 0.5% และ 1.5% ในวันที่ 8, 12 และ 16 ตามที่แสดงในตารางที่ 5 สามารถนำมาแสดงเป็นแผนภูมิแท่ง เพื่อเปรียบเทียบให้เห็นความแตกต่างระหว่างกลุ่มการทดลองได้ชัดเจนมากขึ้น ดังแสดงในภาพที่ 50



ภาพที่ 50 ค่าเฉลี่ยร้อยละ Intensity ของ collagen fiber ระหว่างกลุ่มการทดลอง

วิจารณ์

จากการศึกษาลักษณะของบาดแผล (ภาพที่ 11-19) และค่าทางสถิติที่ใช้ในการประเมินการหายของแผล คือ % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing (ตารางที่ 2-4 ตามลำดับ) พบว่าในวันที่ 2 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกัลาย 1.5% มีลักษณะบวม มีเลือดซึม และมีขนาดกว้างขึ้น ซึ่งสอดคล้องกับค่า % wound contraction และ % total wound healing ที่มีค่าเป็นลบ (-6.65%) ในขณะที่แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกัลาย 0.5% มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่น และภายหลังการเกิดบาดแผลในระยะแรกๆ (วันที่ 2-4) การสร้างเยื่อผิวหนังใหม่ (epithelization) ในแผลของทั้ง 3 กลุ่มการทดลองยังไม่เกิดขึ้น ซึ่งเห็นได้จาก % epithelization ที่ยังมีค่าเป็นศูนย์ จนกระทั่งวันที่ 6 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกัลาย 0.5% และ 1.5% จะเริ่มเกิด granulation tissue สังเกตเห็นลักษณะเนื้อเยื่อสีขาวอมชมพู ผิวขรุขระ หนาขึ้นภายในแผล และเริ่มมีการสร้างเยื่อผิวหนัง เมื่อเปรียบเทียบระหว่างแผลที่ทำด้วยสารสกัดทั้ง 2 ความเข้มข้นแล้ว พบว่าแผลที่ทำด้วยสารสกัด 0.5% จะสังเกตเห็น granulation tissue ได้ชัดเจนมากกว่า ส่วนแผลที่ทำด้วย methylcellulose นั้น จะเริ่มมองเห็น granulation tissue และการเริ่มสร้างเยื่อผิวหนังได้ช้ากว่า คือ จะเริ่มในวันที่ 8 แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแอสกัลายน่าจะมีผลกระตุ้นการสร้าง granulation tissue และเยื่อผิวหนังใหม่บริเวณแผลให้เกิดขึ้นได้รวดเร็วขึ้น ในวันที่ 10-12 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกัลาย 0.5% มีขนาดเล็กกว่า และมีค่า % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing สูงกว่ากลุ่มที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกัลาย 1.5% เมื่อถึงวันที่ 14 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสกัลาย 0.5% และ 1.5% จะมีค่า % epithelization และ % total wound healing เท่ากับ 100% แสดงให้เห็นว่าแผลหายอย่างสมบูรณ์แล้วนั่นเอง ในขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose จะหายอย่างสมบูรณ์ (100%) ในวันที่ 16 ซึ่งเมื่อเปรียบเทียบกับการศึกษาของ Rashed *et al.* (2003) ที่ได้ศึกษาฤทธิ์จากใบสดของผักเบี้ยใหญ่ (*Portulaca oleracea* L.) ต่อการหายของแผลแบบตัดเนื้อขนาด 7 x 7 มม. ที่หลังของหนู Swiss albino mice (น้ำหนัก 23-26 กรัม) พบว่าเมื่อครบ 15 วัน แผลของหนูทุกกลุ่มจะยังหายไม่สมบูรณ์ โดยกลุ่มควบคุมซึ่งไม่ได้ใช้ใบสดปั่นทาแผล จะวัดค่า wound contraction ได้เพียง 74% เท่านั้น ในขณะที่แผลที่ทำด้วยผักเบี้ยใหญ่ทุกกลุ่มจะมีค่า wound contraction สูงกว่า ซึ่งแสดงให้เห็นว่าการหายตามธรรมชาติของแผลแบบตัดเนื้อขนาด 7 x 7 มม. ในหนู Swiss albino mice โดยไม่มีการทายาหรือสารใดๆ จะต้องอาศัยเวลามากกว่า 15 วัน (Rashed *et al.*, 2003) ข้อมูลนี้จึงสนับสนุนผลการทดลองในครั้งนี้ที่พบว่าสารสกัดแอสกัลายทั้งที่ระดับความเข้มข้น 0.5% และ 1.5% จะช่วยให้แผลของหนูหายได้เร็วขึ้น คือหายอย่างสมบูรณ์โดยใช้เวลาเพียง 14 วันเท่านั้น ทั้งๆ ที่มีขนาดแผลเริ่มต้นที่ใหญ่กว่า ถึงแม้ว่าจะเป็นหนู mice ที่ต่างสายพันธุ์กันก็ตาม และจากผลการทดลองในครั้งนี้แสดงให้เห็นว่า สารสกัดแอสกัลาย 0.5% เป็นระดับความเข้มข้นที่เหมาะสม ต่อการช่วยกระตุ้นกระบวนการหายของแผลให้ดำเนินไปได้

อย่างรวดเร็ว โดยช่วยลดกระบวนการอักเสบที่เกิดขึ้นภายในบาดแผล และกระตุ้นการสร้าง granulation tissue ส่งผลให้ค่า % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing มีค่าสูงกว่ากลุ่มอื่นตามไปด้วย จากการศึกษาของ Gupta *et al.* (2006) ที่นำสารกลุ่ม flavonoids ที่สกัดได้จากต้น *Hippophae rhamnoides* L. ซึ่งเป็นสารสำคัญกลุ่มเดียวกันกับที่พบในแสยกลาย มาร์กษาแผลตัดเนื้อที่ผิวหนังของหนูพบว่าสามารถช่วยให้แผลหายเร็วขึ้นได้ เมื่อเปรียบเทียบกับหนูกุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารสกัด โดยจะไปช่วยเพิ่ม % wound contraction ที่บาดแผล ส่งผลให้ช่วยลดระยะเวลาของการเกิด epithelization เนื่องจากปากแผลแคบลง แผลจึงปิดอย่างสมบูรณ์ได้เร็ว (Gupta *et al.*, 2006) สอดคล้องกับการศึกษาของ Abreu *et al.* (2006) พบว่า การฉีดสารสกัดแสยกลายเข้าช่องท้องของหนูที่ถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการบวมน้ำที่อุ้งเท้าในปริมาณ 500, 750 และ 1000 มก./กก. สามารถช่วยยับยั้งการอักเสบได้ 83%, 94% และ 92% ตามลำดับ (Abreu *et al.*, 2006) และยังพบว่าสารสกัดแสยกลายยังส่งผลทำให้ลดเลือดบริเวณบาดแผล ยอมให้มีการซึมผ่านเข้าออกของสารได้มากขึ้น ช่วยให้แผลหายเร็วได้ เนื่องจากช่วยเพิ่มออกซิเจน น้ำ และสารอาหาร ให้มาเลี้ยงเซลล์ต่างๆ ที่บริเวณแผลได้มากขึ้น รวมทั้งยังเพิ่มการเคลื่อนที่ของเซลล์เม็ดเลือดขาว (lymphocyte) ให้ออกมายังบริเวณแผลเพื่อกำจัดเชื้อโรคและเกิดกระบวนการอักเสบได้เร็วขึ้นด้วย (Ialenti *et al.*, 1995) นอกจากนี้ สารสกัดแสยกลายด้วยเอทานอลมีฤทธิ์ในการช่วยต้านเชื้อแบคทีเรีย โดยการไปยับยั้งการเจริญของเชื้อ *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* และ *Escherichia coli* ได้ (Vidotti *et al.*, 2006) จึงอาจเป็นฤทธิ์หนึ่งที่ช่วยลดจำนวนเชื้อแบคทีเรียในบาดแผล จนทำให้มีการอักเสบที่ลดลงอีกทางหนึ่งด้วย แต่การทาบาดแผลด้วยสารสกัดแสยกลาย 1.5% กลับส่งผลให้บาดแผลเกิดการอักเสบอย่างรุนแรง และแผลมีขนาดกว้างขึ้นในช่วง 2-4 วันแรกหลังการเกิดแผล อาจเนื่องมาจากการที่ความเข้มข้นของสารสกัด 1.5% นั้น เป็นระดับที่เข้มข้นมากเกินไป จนส่งผลให้เกิดการระคายเคืองที่แผล และหนูใช้ขาเกาที่บริเวณแผล ทำให้แผลมีขนาดกว้างขึ้น จนพบว่าในช่วงสัปดาห์แรกแผลที่ทำด้วยสารสกัดแสยกลาย 1.5% มีค่า % wound contraction และ % total wound healing ต่ำกว่ากลุ่มที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแสยกลาย 0.5% แม้ว่าแผลที่ทำด้วยสารสกัดแสยกลาย 1.5% จะหายอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 14 เท่ากับแผลที่ทำด้วยสารสกัดแสยกลาย 0.5% ก็ตาม สอดคล้องกับ Hohmann and Molnár (2004) ที่รายงานว่า น้ำยางที่พบในต้นแสยกลาย จะเป็นพิษต่อผิวหนัง ทำให้ผิวหนังระคายเคืองและอักเสบได้ (Hohmann and Molnár 2004) นอกจากนี้ยังพบว่าน้ำยางของต้นแสยกลายทำให้เยื่อบุดวงตาของกระต่ายเกิดการอักเสบและเจ็บปวด โดยสาร proteolytic enzyme ที่พบในน้ำยางจะไปทำลายเยื่อบุดวงตา (Lim and Soepadmo, 1984)

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (ภาพที่ 21-30) พบว่า ในวันที่ 8 แผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% จะมีหลอดเลือดขนาดเล็ก และเซลล์ fibroblast กระจายอยู่อย่างหนาแน่นมากกว่า และพบช่องว่างภายใน extracellular matrix น้อยกว่าแผลของกลุ่มที่ทาด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสกลาย 1.5% แสดงให้เห็นว่าแผลมีการสร้าง granulation tissue มากกว่ากลุ่มอื่น นอกจากนี้ยังพบว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 1.5% จะพบเซลล์เม็ดเลือดขาวหนาแน่นมากกว่ากลุ่มอื่น แสดงว่าแผลยังเกิดกระบวนการอักเสบอยู่ กระบวนการหายของแผลจึงยังไม่ดำเนินสู่ระยะถัดไป ต่อมาในวันที่ 12 granulation tissue ในแผลของหนูทดลองทุกกลุ่มจะพบเซลล์ fibroblast กระจายอยู่อย่างหนาแน่น โดยเฉพาะในแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% และ 1.5% จะพบเซลล์ fibroblast ที่มีรูปร่าง stellate shape อยู่ใน granulation tissue แต่ไม่พบในแผลที่ทาด้วย methylcellulose รวมทั้งกลุ่มที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย จะพบหลอดเลือดขนาดเล็กอย่างหนาแน่น แต่จะพบหนาแน่นน้อยในแผลที่ทาด้วย methylcellulose เมื่อถึงวันที่ 16 แผลของทุกกลุ่มมีชั้น epidermis ปกคลุมแผลอย่างสมบูรณ์ และพบหลอดเลือดขนาดเล็กกระจายอยู่อย่างหนาแน่นใน granulation tissue แผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลายทั้ง 2 ความเข้มข้น จะพบเซลล์ fibroblast ทั้งรูปร่าง spindle และ stellate shape กระจายอยู่อย่างหนาแน่น แต่แผลที่ทาด้วย methylcellulose จะพบเซลล์ fibroblast ที่มีรูปร่าง spindle shape เพียงชนิดเดียวเท่านั้น จากผลการทดลอง เป็นการยืนยันว่าสารสกัดแอสกลายนั้นสามารถช่วยลดการอักเสบ กระตุ้นการสร้างหลอดเลือดขนาดเล็กบริเวณบาดแผล กระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์ fibroblasts และการพัฒนาเปลี่ยนแปลงรูปร่างของเซลล์ fibroblasts ให้เป็น stellate shape ซึ่งส่งผลให้แผลมีการหดรั้งได้มาก สอดคล้องกับ Gao *et al.* (2010) ที่พบว่าสารกลุ่ม flavonoids ที่สกัดได้จากต้น *Erigeron breviscapus* (Vant.) Hand. Mazz. ซึ่งเป็นพืชสมุนไพรจีนชนิดหนึ่ง จะช่วยกระตุ้นการสร้างหลอดเลือดใหม่ได้ดี โดยการกระตุ้นการแบ่งตัวเพิ่มจำนวน เพิ่มการเคลื่อนที่และการเกาะยึดของเซลล์ endothelial cell ส่งเสริมให้มีการสร้างท่อหลอดเลือดฝอยบริเวณแผลให้มากขึ้น (Gao *et al.*, 2010) นอกจากนี้ จากการศึกษาของ Klass *et al.* (2010) พบว่า สารกลุ่ม polyphenols ซึ่งเป็นสารที่พบในพืชสมุนไพรทั่วไป จะไปกระตุ้นการหลั่ง Transforming growth factor- β (TGF- β) ส่งผลไปกระตุ้นให้เซลล์ fibroblast แบ่งตัวเพิ่มจำนวนมากขึ้น และสังเคราะห์ collagen เพิ่มมากขึ้น รวมทั้งกระตุ้นการพัฒนาเปลี่ยนแปลงจาก fibroblast ไปเป็น myofibroblast ส่งผลให้เพิ่มการหดรั้งของแผล ทำให้แผลปิดได้เร็วขึ้น และเพิ่มความแข็งแรงของแผลได้มากขึ้นด้วย (Klass *et al.*, 2010) ซึ่งการหดตัวของขอบแผลเข้าสู่ศูนย์กลางของแผลจะเกิดขึ้นเมื่อ fibroblasts ได้รับการกระตุ้นจาก growth factors ให้พัฒนาเปลี่ยนแปลงไปเป็น myofibroblasts ซึ่งมีโครงสร้าง cytoskeleton เป็น α -actin คล้ายกับที่พบในกล้ามเนื้อเรียบ เรียกว่า α -smooth muscle actin (α -SMA) ดังนั้น myofibroblasts จึงมีคุณสมบัติพิเศษที่ช่วยให้มีการหดตัวของเนื้อเยื่อ (Hinz, 2005) ถ้าแผลนั้นวัดค่า wound contraction

ได้มากและเริ่มเกิดขึ้นได้เร็วหลังจากเกิดบาดแผล แผลจะหายได้เร็วกว่าแผลที่มีค่า wound contraction น้อยกว่าและเริ่มเกิดขึ้นช้ากว่าหลังจากเกิดบาดแผล และค่า wound contraction ที่มากขึ้น เกิดเนื่องจากการเพิ่มจำนวนและการทำงานของ myofibroblast ที่อยู่บริเวณแผล (Kumari *et al.*, 2010) นอกจากนี้ Lodhi *et al.* (2006) ได้ศึกษาการทาสารสกัดด้วยเอทานอลจากต้นครามป่า (*Tephrosia purpurea* Linn.) ทาบนแผลของหนูแรททุกวันเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุมที่ไม่ทาสารสกัด พบว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดจะหายเร็วกว่ากลุ่มควบคุม เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลของหนูทั้ง 2 กลุ่ม มาทำการศึกษา ลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ในวันที่ 9 ด้วยการย้อมสี Hematoxylin และ Eosin พบว่า แผลที่ทาด้วยสารสกัด จะพบ collagen fiber เซลล์ fibroblasts และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ปริมาณมากกว่ากลุ่มควบคุม (Lodhi *et al.*, 2006) Suntar *et al.* (2010) รายงานว่า สารกลุ่มฟลาโวนอยด์สามารถต้านการอักเสบได้ โดยการยับยั้งการสร้างและหลั่งสาร pro-inflammatory mediators ได้แก่ prostaglandin E2 (PGE2), tumor necrosis factor- α (TNF- α) และ interleukin-10 (IL-10) ทำให้ช่วยต้านการอักเสบได้ (Suntar *et al.*, 2010) และการพบเส้นเลือดขนาดเล็กจำนวนมากแทรกอยู่ใน granulation tissue ในแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกลาย 0.5% ก่อนพบในแผลกลุ่มอื่น ทำให้ระยะเวลาหายของแผลเกิดขึ้นได้เร็วกว่าแผลอื่นๆ เนื่องจากสามารถลำเลียงออกซิเจน สารอาหารที่จำเป็นสำหรับการเผาผลาญ เพื่อให้ได้พลังงานของเซลล์ และสารต่างๆที่จำเป็นต่อการหายของแผลมายังบริเวณแผลได้มาก (Greenhalgh, 1998) กระบวนการหายของแผลจึงดำเนินไปอย่างต่อเนื่องและรวดเร็ว นอกจากนี้ฤทธิ์การต้านอนุมูลอิสระของแอสกลายก็ช่วยส่งเสริมกระบวนการหายของแผลด้วย เนื่องจากในกระบวนการหายของแผลจะเกิดอนุมูลอิสระขึ้นจากการทำงานกำจัดเชื้อแบคทีเรียของเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil ซึ่งเป็นเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดแรกที่เข้ามากำจัดเชื้อโรคเมื่อเกิดบาดแผล โดยการเข้ามาจับกิน ย่อย และฆ่าเชื้อที่เข้ามาสู่รุกราน (Swain *et al.*, 2002) ในระหว่างที่เซลล์เม็ดเลือดขาวชนิดนี้ทำการกำจัดเชื้อโรคจะเกิดกระบวนการ respiratory burst ซึ่งกระบวนการนี้จะทำให้เกิดอนุมูลอิสระขึ้นในบริเวณแผล หากปฏิกิริยาการอักเสบเกิดขึ้นอย่างรุนแรงก็จะเกิดอนุมูลอิสระมากตามไปด้วย และจะส่งผลเสียต่อกระบวนการหายของแผล การที่สารสกัดแอสกลายมีฤทธิ์ในการช่วยลดอนุมูลอิสระนี้ก็เป็นการช่วยลดการถูกทำลายของผนังเซลล์ต่างๆที่สร้างขึ้นใหม่บริเวณแผล ทำให้เซลล์แข็งแรงและมีการทำงานได้ดีขึ้น (Hampton *et al.*, 1998) จากการศึกษาของ Nizamutdinova *et al.* (2009) พบว่า สารกลุ่ม polyphenols มีฤทธิ์ในการต้านอนุมูลอิสระได้โดยการเข้าจับกับอนุมูลอิสระชนิด reactive oxygen species (ROS) และกำจัดออกนอกร่างกาย (Nizamutdinova *et al.*, 2009)

จากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วยวิธี Masson's Trichrome (ภาพที่ 31-40) ซึ่งเป็นการย้อมสีที่เฉพาะเจาะจงเพื่อศึกษาเปรียบเทียบลักษณะความหนาแน่นและขนาดของ collagen fiber และการวัดค่า intensity ของ collagen (ภาพที่ 41-49) ด้วยโปรแกรม Image

Analysis Software (Cell D; Olympus) ซึ่งแสดงในตารางที่ 5 และภาพที่ 50 ก็เป็นไปในทางเดียวกันกับการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Hematoxylin และ Eosin คือ ในวันที่ 8 แผลที่ทาด้วยสารสกัดแยกกลาย 0.5% พบ collagen fiber แทรกอยู่ใน granulation tissue หนาแน่นกว่าแผลที่ทาด้วย methylcellulose และสารสกัดแยกกลาย 1.5% แต่ลักษณะของ collagen fiber ที่พบในแผลทั้ง 3 กลุ่ม จะยังกระจายตัวกันอยู่อย่างหลวมๆ ลักษณะความหนาแน่นของ collagen fiber ภายในแผล สอดคล้องกับค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen ที่วัดได้เท่ากับ 0.98%, 3.24% และ 2.50% ในกลุ่มที่ทาด้วย methylcellulose, สารสกัดแยกกลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ ต่อมาในวันที่ 12 แผลทั้ง 3 กลุ่ม สังเกตพบ collagen fibers หนาแน่นขึ้น แต่ในแผลที่ทาด้วย methylcellulose นั้น collagen fibers จะยังกระจายตัวกันอยู่อย่างหลวมๆ ค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen เท่ากับ 6.24%, 26.79% และ 12.26% ในกลุ่มที่ทาด้วย methylcellulose, สารสกัดแยกกลาย 0.5% และ 1.5% ตามลำดับ ในวันที่ 16 พบ collagen bundles เรียงตัวอย่างหนาแน่นแทรกอยู่ภายใน granulation tissue ของแผลที่ทาด้วยสารสกัดแยกกลาย เมื่อทำการวัดขนาดของ collagen bundles ในกลุ่มที่ทาด้วย methylcellulose, สารสกัดแยกกลาย 0.5% และ 1.5% จะมีขนาดเฉลี่ย 3.30, 6.35 และ 5.76 μm ตามลำดับ ค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen เท่ากับ 29.53%, 56.28% และ 41.60% ตามลำดับ จากผลการทดลองชี้ให้เห็นว่า สารสกัดแยกกลายช่วยกระตุ้นและเพิ่มการสร้าง collagen ที่บริเวณบาดแผล รวมทั้งพัฒนาขนาดและความแข็งแรงของ collagen fiber ด้วย โดย collagen ที่ถูกสร้างและปลดปล่อยออกมาจาก fibroblast จะสร้างพันธะโควาเลนต์ทั้งภายในและระหว่างโมเลกุล จนสานกันเป็นเส้นใยที่มีขนาดใหญ่และแข็งแรงมากขึ้น ซึ่งความแข็งแรงของเนื้อเยื่อบริเวณแผลขึ้นอยู่กับการสร้างพันธะโควาเลนต์ดังกล่าว รวมทั้งความคงตัว (stabilization) และการปรับโครงสร้างใหม่ (remodeling) ของ collagen fibers (Pather *et al.*, 2011) ดังนั้นการที่แผลที่ทาด้วยสารสกัด 0.5% หายได้เร็วกว่าและมีความแข็งแรงของแผลมากกว่ากลุ่มอื่น เกิดเนื่องจากการจัดเรียงตัวของ collagen fibers อย่างหนาแน่น และเกิดรวดเร็วกว่าแผลกลุ่มอื่น สอดคล้องกับผลการศึกษาทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยการย้อมเนื้อเยื่อด้วยสี Hematoxylin และ Eosin (ภาพที่ 21-30) การพบ fibroblasts บริเวณแผลมาก แสดงว่าน่าจะมีการสร้าง collagen fibers มากตามไปด้วย จากการศึกษาของ Ajlia *et al.* (2010) พบว่า แผลที่ทาด้วยน้ำยาล้างแผลที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ papain หายได้เร็วกว่าการใช้ยาฆ่าเชื้อ betadine ซึ่งมีสารออกฤทธิ์คือ 1% povidone-iodine เมื่อทำการตัดเนื้อเยื่อบริเวณแผลของหนูแรททั้ง 2 กลุ่ม มาทำการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยการย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome พบว่าในวันที่ 7 แผลที่ทาด้วยน้ำยาล้างแผลที่มีส่วนผสมของเอนไซม์ papain จะพบ granulation tissue, collagen fibers, fibroblasts และหลอดเลือดที่สร้างขึ้นใหม่ปริมาณมาก ในขณะที่แผลที่ทาด้วย betadine ยังพบเซลล์เม็ดเลือดขาวชนิด neutrophil และ macrophage แต่ยังไม่พบ collagen fibers ซึ่ง collagen fibers จัดเป็นส่วนประกอบที่สำคัญตั้งแต่ระยะ proliferative and repair ของกระบวนการหายของแผล โดย collagen

fibers ใช้สำหรับการซ่อมแซมโครงสร้างของเนื้อเยื่อให้สามารถทำหน้าที่ได้ตามปกติ ทำให้แผลมีความแข็งแรง และเสริมสร้างโครงสร้างของเนื้อเยื่อบริเวณนั้นให้สมบูรณ์ ดังนั้นแผลที่สามารถสร้าง collagen fibers ได้อย่างรวดเร็วและปริมาณมากหลังจากเกิดบาดแผล แพล้นั้นๆจะหายได้เร็วกว่าแผลที่สร้าง collagen fibers ได้ช้ากว่า (Ajlia *et al.*, 2010)

นอกเหนือจากคุณสมบัติการกระตุ้นการหายของแผลของสารสกัดหยาบแอสกหลายแล้ว การศึกษาในครั้งนี้ยังสังเกตพบความผิดปกติบางประการ โดยพบว่าจากการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ของ granulation tissue ของแผล โดยการย้อมสีด้วยวิธี Masson's Trichrome นั้นในบางครั้งอาจพบว่าความหนาแน่นของ collagen fibers ซึ่งสังเกตได้จากความเข้มของการติดสีฟ้าของ aniline blue บนโครงสร้างเหล่านั้น ไม่สัมพันธ์กับค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ที่วัดได้ ยกตัวอย่างเช่น แผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกหลาย 1.5% ในวันที่ 16 (ภาพที่ 40) สังเกตเห็นการติดสีน้ำเงินเข้มของ collagen fibers มากกว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกหลาย 0.5% (ภาพที่ 39) แต่จากการวิเคราะห์ภาพด้วยโปรแกรม Image Analysis Software (Cell D; Olympus) พบว่าค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ในแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกหลาย 1.5% มีค่าน้อยกว่าแผลที่ทาด้วยสารสกัดแอสกหลาย 0.5% ทั้งนี้อาจมีสาเหตุเนื่องจากเจดสีฟ้าหรือน้ำเงินที่สังเกตได้จากภาพที่กำลังทำการวัด มีความแตกต่างจากเจดสีที่ตั้งค่าเป็นมาตรฐานเอาไว้ ทำให้ได้ค่าที่น้อยกว่าความเป็นจริง นอกจากนี้โครงสร้างอื่นๆที่ไม่ได้ติดสีฟ้าหรือน้ำเงิน จะถูกนับว่าเป็น background ทั้งหมด เช่น ช่องว่าง หลอดเลือดขนาดใหญ่ หรือบริเวณที่มีหลอดเลือด หรือเซลล์ต่างๆหนาแน่น ดังนั้นหากสังเกตลักษณะการติดสีของแผลที่ใช้สารสกัดแอสกหลาย 1.5% ในวันที่ 16 จะพบว่าบริเวณที่ติดสีฟ้านั้นเป็นเจดสีออกม่วง แทนที่จะเป็นสีฟ้าที่ใกล้เคียงกับมาตรฐานที่ตั้งไว้ ซึ่งสันนิษฐานว่าเจดสีม่วงนั้นเกิดจาก collagen fibers ซึ่งติดสีฟ้า อยู่ร่วมกับโครงสร้างอื่นๆซึ่งติดสีแดง ทำให้มองเห็นเหมือนมีความหนาแน่นมาก แต่แท้จริงแล้วมี collagen fibers เพียงส่วนหนึ่งเท่านั้น เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ใช้สารสกัดแอสกหลาย 0.5% ซึ่งสังเกตลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์แล้วดูเหมือนมี collagen fibers หนาแน่นน้อยกว่า แต่วัดค่าเฉลี่ยร้อยละ intensity ของ collagen fibers ได้สูงกว่า เนื่องจากบริเวณนั้นมี collagen fibers อยู่เป็นส่วนมากทำให้การติดสีฟ้าใกล้เคียงกับเจดสีที่ตั้งเป็นมาตรฐานมากกว่า

สรุปและข้อเสนอแนะ

สรุป

จากการใช้สารสกัดหยาบแอสเกลายเพื่อกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในหนูเมาส์ ได้ผลการทดลองโดยสรุปดังต่อไปนี้

1. บาดแผลของหนูทดลองที่ทำด้วยสารสกัดแอสเกลาย 0.5% เริ่มมีการสร้าง granulation tissue เกิดขึ้นภายในแผลก่อนกลุ่มอื่น (ตั้งแต่วันที่ 6) และในปริมาณมากกว่ากลุ่มอื่น เมื่อถึงวันที่ 14 แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสเกลายทั้ง 2 ความเข้มข้นจะหายอย่างสมบูรณ์ ขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose จะหายอย่างสมบูรณ์ในวันที่ 16
2. แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสเกลาย 0.5% มีค่า % epithelization, % wound contraction และ % total wound healing สูงที่สุด และจะเริ่มเกิดกระบวนการหายของแผลได้เร็วและมากกว่า เมื่อเปรียบเทียบกับแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสเกลาย 1.5%
3. แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสเกลายทั้ง 2 ความเข้มข้น จะพบเซลล์ fibroblast ทั้งรูปร่าง spindle shape และ stellate shape จำนวนมากกระจายอยู่ภายใน granulation tissue ซึ่งมีส่วนช่วยในเรื่องการสังเคราะห์ collagen และการหดตัวของแผลตามลำดับ ในขณะที่แผลที่ทำด้วย methylcellulose จะพบเซลล์ fibroblast รูปร่าง spindle shape เพียงชนิดเดียว
4. ในวันที่แผลปิดอย่างสมบูรณ์ (วันที่ 16) แผลที่ทำด้วยสารสกัดแอสเกลาย 0.5% พบ collagen bundle ขนาดเฉลี่ย 6.35 μm แทรกอยู่ใน granulation tissue หนาแน่นกว่าแผลที่ทำด้วย methylcellulose และสารสกัดแอสเกลาย 1.5% ซึ่งพบ collagen bundle ขนาดเฉลี่ย 3.30 และ 5.76 μm ตามลำดับ

จากผลการทดลองทั้งหมด สามารถสรุปได้ว่าสารสกัดแอสเกลายความเข้มข้น 0.5% เป็นระดับความที่เหมาะสมที่สุดสำหรับนำมาใช้รักษาบาดแผล เนื่องจากช่วยให้แผลหายได้เร็วขึ้น เมื่อเปรียบเทียบกับการใช้หรือไม่ใช้หรือใช้สารสกัดแอสเกลายที่มีความเข้มข้น 1.5% โดยสารสกัดแอสเกลาย 0.5% จะช่วยลดการอักเสบของแผล เร่งการสร้าง granulation tissue และหลอดเลือดขนาดเล็กบริเวณ

บาดแผล กระตุ้นให้มีการผลิตและการเจริญของ collagen fiber รวมทั้งยังช่วยให้แผลหดตัวเร็ว ทำให้อัตราการหายของแผลเล็กกลง ช่วยให้แผลหายได้อย่างรวดเร็ว

ข้อเสนอแนะ

1. การศึกษาฤทธิ์ของสารสกัดหยาบแห้งต่อการกระตุ้นกระบวนการหายของแผลในหนูเม้าส์ในครั้งนี้ ทำให้ได้ทราบข้อมูลเกี่ยวกับระดับความเข้มข้นของการใช้สารสกัดหยาบแห้งและแนวทางการใช้ที่เหมาะสมในการช่วยรักษาแผลในสัตว์ทดลอง ดังนั้น ผลการทดลองที่ได้จึงเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อนำไปใช้ในการพัฒนารูปแบบการใช้สารสกัดจากสมุนไพรเพื่อให้นำไปใช้จริงในเชิงอุตสาหกรรมได้ ซึ่งยังต้องมีการศึกษาหาข้อมูลเพิ่มเติมต่อไป เช่น ความเป็นพิษต่อสัตว์ระยะเวลาและรูปแบบการใช้ที่เหมาะสม เป็นต้น รวมทั้งมีการนำไปทดลองกับแผลในลักษณะอื่นๆ ร่วมด้วย

2. ในการเก็บตัวอย่างที่มีความบอบบาง หรือมีขนาดเล็ก เพื่อนำมาทำสไลด์ถาวรโดยวิธี paraffin section นั้น จำเป็นต้องยึดเนื้อเยื่อให้ติดบนสไลด์กระจกอย่างหนาแน่น เพื่อไม่ให้หลุดออกโดยง่าย เมื่อผ่านขั้นตอนต่างๆ ของการย้อมสี ดังนั้นการใช้ gelatin หรือไขขาวทาบนสไลด์ เพื่อเป็นสารช่วยยึดเนื้อเยื่อนั้นอาจไม่เพียงพอ จึงต้องใช้สารเคลือบสไลด์ชนิดอื่น เช่น poly L-lysine หรือ 3-aminopropyl triethoxysilane ซึ่งสามารถยึดเนื้อเยื่อให้ติดบนสไลด์กระจกได้ดียิ่งขึ้น

3. การศึกษาครั้งนี้พบเซลล์ fibroblast ที่มีรูปร่าง stellate shape อยู่ใน granulation tissue และสันนิษฐานว่าเซลล์นี้ คือ myofibroblast ซึ่งมีโครงสร้าง cytoskeleton คล้ายกับที่พบในเซลล์กล้ามเนื้อเรียบ ได้แก่ α -smooth muscle actin (α -SMA) ดังนั้นการยืนยันชนิดของเซลล์โดยใช้วิธี immunohistochemistry โดยใช้ Antibody ต่อ α -SMA เป็นสิ่งที่ควรกระทำควบคู่กันไปกับการศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ด้วย เพื่อยืนยันว่าเซลล์ลักษณะดังกล่าว คือ myofibroblast จริง

เอกสารและสิ่งอ้างอิง

นิจศิริ เรืองรังษี และ พยอม ดันติวัฒน์. 2534. **พืชสมุนไพร**. สำนักพิมพ์โอเดียนสโตร์, กรุงเทพฯ.

นวลศรี รักษิระธรรม และ อัญญา เจนวิถีสุข. 2545. **แอนติออกซิเดนท์: สารต้านมะเร็งในผักและสมุนไพรไทย**. นพบุรีการพิมพ์, เชียงใหม่.

ปราโมทย์ ศรีภิรมย์. 2524. **ชุมชนสมุนไพรไทย**. สำนักพิมพ์หอสมุดกลาง, กรุงเทพฯ.

ปัจจุบัน เหมหงษา. 2541. **การสืบทอดวัฒนธรรมการดูแลรักษาสุขภาพแบบพื้นบ้านไทย: สมุนไพรในงานสาธารณสุขมูลฐาน**. สำนักงานคณะกรรมการการสาธารณสุขมูลฐาน, กรุงเทพฯ.

พรรณีภา ชุมศรี. 2544. **สมุนไพรนานาชาติ**. คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล, กรุงเทพฯ.

ไพวิกา สุทธิพงศ์. 2527. **บาดแผล**. ภาควิชาศัลยศาสตร์ คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

มาริชศักดิ์ กัลล์ประวิทย์. 2544. **การวางยาสลบสัตว์**. โรงพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

รัตนา อินทรานุกกรณ์. 2547. **การตรวจสอบและการสกัดแยกสารสำคัญจากสมุนไพร**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

รุ่งระวี เต็มศิริฤกษ์กุล, วงศ์สถิตย์ ฉั่วกุล, สมภพ ประชานธูราษฎร์, พร้อมจิต ศรีลัมพ์, วิชิต เปานิล และ นพมาศ สุนทรเจริญนนท์. 2542. **สมุนไพรยาไทยที่ควรรู้**. สยามบุ๊กส์ แอนด์พับลิเคชันส์, กรุงเทพฯ.

วันดี กฤษณพันธ์. 2541. **สมุนไพรน่ารู้**. สำนักพิมพ์แห่งจุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย, กรุงเทพฯ.

- วิโรจน์ จันทร์ตน์. 2535. กายวิภาคและสรีรวิทยาของสัตว์เลี้ยง. ภาควิชาเทคโนโลยีทางสัตว
 คณะผลิตกรรมการเกษตร สถาบันเทคโนโลยีการเกษตร มหาวิทยาลัยแม่โจ้, เชียงใหม่.
- ศุภลักษณ์ โรมนันตพันธ์. 2545. เทคนิคเนื้อเยื่อสัตว์. สำนักพิมพ์มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์,
 กรุงเทพฯ.
- สุนทรี สิงหนุตรา. 2535. หนังสือสรรพคุณสมุนไพร200 ชนิด. โอ.เอส.พรีนติ้งเฮ้าส์, กรุงเทพฯ.
- สมพร หิรัญรามเดช. 2525. สมุนไพรใกล้ตัว ตอนที่ 3. ภาควิชาเภสัชเวท คณะเภสัชศาสตร์
 มหาวิทยาลัยเชียงใหม่, เชียงใหม่.
- Abreu, P., S. Matthew, T. Gonza'lez, L. Vanickova, D. Costa, A. Gomes, M.A. Segundo and
 E. Fernandes. 2008. Isolation and identification of antioxidants from *Pedilanthus*
Tithymaloides. **J Nat Med.** 62: 67-70.
- Abreu, P., S. Matthew, T. González, D. Costa, M.A. Segundo and E. Fernandes. 2006. Anti-
 inflammatory and antioxidant activity of a medicinal tincture from *Pedilanthus*
tithymaloides. **Life Sci.** 78: 1578-1585.
- Ajlia, S.A., F.A.A. Majid, A. Suvik, M.A.W. Effendy and H.S. Nouri. 2010. Efficacy of papain-
 based wound cleanser in promoting wound regeneration. **Pakistan J Biol Sci.**
 13(12): 596-603.
- Bale, S. and V. Jones. 2006. **Wound care nursing: A patient-centred approach.** 2nd ed.
 Edinburgh: Mosby Elsevier, Edinburgh.
- Bohling, M.W., R.A. Henderson, S.F. Swaim, S.A. Kincaid and J.C. Wright. 2006. Comparison
 of the role subcutaneous tissue in cutaneous wound healing in the dog and cat. **Vet Surg.**
 35: 3-14.
- Buckingham, J. 1994. **Dictionary of natural products D-F.** Chapman and Hall, London.

- Cáceres, A., H. Mene´ndez, E. Méndez, E. Cohobón, B.E. Samayoa, E. Jauregui, E. Peralta and G. Carrillo. 1995. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **J Ethnopharmacol.** 48: 85-88.
- Cateni, F., G. Falsone and J. Zilic. 2003. Terpenoids and glycolipids from euphorbiaceae. **Mini Rev Med Chem.** 3 (5): 425-437.
- Chithra, P., G.B. Sajithlal and G. Chandrakasan. 1998. Influence of aloe vera on the healing on the healing of dermal wounds in diabetic rats. **J Ethnopharmacol.** 59: 195-201.
- Cysts, P. 2010. **Wound Healing.** Source: http://www.pilonidal.org/aftercare/wound_healing_indepth.php, January 25, 2010.
- Dellmann, H.D. and J.A. Eurell. 1998. **Textbook of veterinary histology.** 5th ed. Baltimore Williams & Wilkins. USA.
- Dempsey, D.S. 2010. **Epidermis and dermis.** Source: <http://www.nku.edu/~dempseyd/SKIN.htm>, February 10, 2010.
- Deodhar, A.K. and R.E. Rana. 1997. Surgical physiological of wound healing: a review. **JPGM.** 43(2): 52-56.
- Dhar, S.N., S.M. Ray, A. Roy and S.K. Dutta. 1988. Oral anti-inflammatory activity of pedilanthain—a new proteolytic enzyme from *Pedilanthus tithymaloides*. **Indian J Pharm Sci.** 50: 281-283.
- Driscoll, P. 2009. **Skin.** Source: <http://mediligence.com/blog/2009/08/19/worldwide-wound-management-2009-2018>, January 17, 2010.

- Eurell, J.A. and B.L. Frappier. 2006. **Textbook of veterinary histology**. 6th ed. Blackwell Publishing Iowa. USA.
- Gao, Z.X., D.Y. Huang, H.X. Li, L.N. Zhang, Y.H. Lv, H.D. Cui and J.H. Zheng. 2010. Scutellarin promotes in vitro angiogenesis in human umbilical vein endothelial cells. **Biochem Biophys Res Commun**. 400(1):151-6.
- Greenhalgh, D.G. 1998. The role of apoptosis in wound healing. **Int J Biochem Cell Biol**. 30(9): 1019-1030.
- Gupta, A., R. Kumar, K. Pal, V. Singh, P.K. Banerjee and R.C. Sawhney. 2006. Influence of sea buckthorn (*Hippophae rhamnoides* L.) flavones on dermal wound healing in rats. **Mol Cell Biochem**. 290(1-2): 193-8
- Hamid, A.A., Z. M. Shaha, R. Museb and S. Mohameda. 2002. Characterisation of antioxidative activities of various extracts of *Centella asiatica* (L) Urban. **Food Chemistry**. 11: 465-469.
- Hampton, M.B., A.J. Kettle and C.C. Winterbourn. 1998. Inside the neutrophil phagosome: oxidants, myeloperoxidase and bacterial killing. **Blood**. 92: 3007-3017.
- Harari, J. 1993. **Surgical Complications and Wound Healing in the Small Animal Practice**. W.B. Saunders Company, London.
- Harborne, J.B. 1984. **Phytochemical methods**. A guide to modern techniques of plant analysis. Chapman and Hall, London.
- Harding, K.G., H.L. Morris and G.K. Patel. 2002. Science medicine and the future: Healing chronic wounds. **BMJ**. 324: 160-163.

- Hinz, B. 2005. Masters and servants of the force: The role of matrix adhesions in myofibroblast force perception and transmission. **Eur J Cell Biol.** 85 (3-4): 175-181.
- Hohmann, J. and J. Molnár. 2004. Euphorbiaceae diterpenes: plant toxins or promising molecules for the therapy. **Acta Pharm Hung.** 74 (3): 149-157.
- Ialenti, A., A. Ianaro, S. Moncada and M. Di Rosa. 1995. Modulation of acute inflammation by endogenous nitric oxide. **Eur J Pharmacol.** 211: 177-182.
- Ikan, R. 1999. **Naturally occurring glycosides.** Wiley, Chichester.
- Jones, V., S. Bale and K. Harding. 2003. **Acute and chronic wound healing.** In Baranoski, S. and E.A. Ayello. Wound care essentials: Practice principles. William and Wilkins, Philadelphia.
- Kamalakaran, S., P. Madhiyazhagan, A. Dhandapani, K. Murugan and D. Barnard. 2010. *Pedilanthus tithymaloides* (euphorbiaceae) leaf extract phytochemicals: toxicity to the filariasis vector *Culex quinquefasciatus* (Diptera: Culicidae). **Vector Borne Zoonotic Dis.** Abstract.
- Kiernan, J.A. 1999. **Histological and Histochemical Methods : Theory and practice.** 3rd ed., Butterworth Heinemann, Oxford.
- Klass, B.R., O.A. Branford, A.O. Grobbelaar and K.J. Rolfe. 2010. The effect of epigallocatechin-3-gallate, a constituent of green tea, on transforming growth factor-beta1-stimulated wound contraction. **Wound Repair Regen.** 18(1): 80-8.
- Kumari, M., B.R. Eesha, M. Amberkar, S.B. Rajshekar and N. Kumar. 2010. Wound healing activity of aqueous extract of *Crotalaria verrucosa* in Wistar albino rats. **APJTM.** 783-787.

- Lee, J.Y., Y.W. Jang, H.S. Kang, H. Moon, S.S. Sim and C.J. Kim. 2006. Anti-inflammatory action of phenolic compound from *Gastrodia elata* root. **Arch Pharm Res.** 29(10): 849-858.
- Leon, I.W. 1988. **Cell and Tissue Biology.** 5th ed. Urban & Schwarzenberg, Germany.
- Lim, T.K. and E. Soepadmo. 1984. Eye injury from plant sap of *Pedilanthus tithymaloides* Poit. **Singapore Med J.** 25 (6): 412-419.
- Lodhi, S., R.S. Pawar, A.P. Jain and A.K. Singhai. 2006. Wound healing potential of *Tephrosia purpurea* (Linn.) Pers. In rats. **J Ethnopharmacol.** 108: 204-210.
- McCord, J.M. 2000. The evolution of free radicals and oxidative stress. **Am J Med.** 108: 652-659.
- McGuinness, W., E. Vella and D. Harrison. 2004. Influence of dressing changes on wound temperature. **JWC.** 13(9):383-385.
- Mendonça, F.A.S., J.R.P. Junior, M.A.M. Esquisatto, J.S. Mendonça, C.C. Franchini and G.M.T. Santos. 2009. Effects of the application of Aloe vera (L.) and microcurrent on the healing of wounds surgically induced in Wistar rats. **Acta Cirúrgica Brasileira.** 24 (2) 150-155.
- Midwood, K.S., L.V. Williams and J.E. Schwarzbauer. 2004. Tissue repair and the dynamic of extracellular matrix. **Int J Biochem Cell Biol.** 36 (6): 1031-1037.
- Misra, D.R. and H.N. Khastgir, 1969. Terpenoids and related compounds. Chemical investigation of *Pedilanthus tithymaloides*. **J Indian Chem Soc.** 66: 843-844.
- Mongkolvisut, W. and S. Sutthivaiyakit. 2007. Antimalarial and antituberculous poly-o-acylated jatropane diterpenoids from *Pedilanthus tithymaloides*. **J Nat Prod.** 70: 1434-1438.

- Mukherjee, K.S., S. Laha, T.K. Manna and C.K. Chakraborty. 1992. Chemical investigation on *Limnophila rogusa* and *Pedilanthus tithymaloides*. **J Indian Chem Soc.** 69: 411-412.
- Nayak, S., P. Narabothu, S. Sandiford, V. Bhogadi and A. Adogwa. 2006. Evaluation of wound healing activity of *Allamanda cathartica*. L. and *Laurus nobilis*. L. extracts on rats. **BMC Complementary and Alternative Medicine.** 6: 12-17.
- Nizamutdinova, I.T., Y.M. Kim, J.I. Chung, S.C. Chin, Y.K. Jeong, H.G. Seo, J.H. Lee, K.C. Chang and H.J. Kim. 2009. Anthocyanins from black soy bean seed coats stimulate wound healing in fibroblasts and keratinocytes and prevent inflammation in endothelial cells. **Food Chem Toxicol.** 47(11): 2806-12.
- Noyak, B.S. and L.M.P. Pereira. 2006. *Cathalanthus roseus* flower extract has wound-healing activity in Sprague Dawley rats. **BMC Complement Altern Med.** 6: 41-46.
- Pather, N., A.M. Viljoen and B. Kramer. 2011. A biochemical comparison of the *in vivo* effects of *Bulbine frutescens* and *Bulbine natalensis* on cutaneous wound healing. **J Ethnopharmacol.** 133: 364-370.
- Pereira, C. 2007. *Pedilanthus tithymaloides*. Source: <http://plantayflor.blogspot.com/2011/03/Pedilanthus-tithymaloides.html>, March 18, 2010.
- Pettit, G.R., S. Ducki, R. Tan, R.S. Gardella, J.B. McMahon, M.R. Boyd, P.M. Blumberg, N.E. Lewin, D.L. Doubek, L.P. Tackett and M.D. Williams. 2002. Isolation and structure of Pedilstatin from a republic of maldives *Pedilanthus* sp. **J Nat Prod.** 65: 1262-1265.
- Rahuman, A.A., G. Gopalakrishnan, P. Venkatesan and K. Geetha. 2007. Larvicidal activity of some euphorbiaceae plant extracts against *Aedes aegypti* and *Culex quinquefasciatus*. **Parasitol Res.** 102: 867-873.

- Rashed, A.N., F.U. Afifia and A.M. Disi. 2003. Simple evaluation of the wound healing activity of a crude extract of *Portulaca oleracea* L. (growing in Jordan) in *Mus musculus* JVI-1. **J Ethanopharmacol.** 88: 131-136.
- Robertson, A. 1992. The chemistry and biochemistry of tea production-the non-volatiles, pp. 555-601. In K.C. Willson and M.N. Clifford, eds. **Tea: Cultivation to Consumption.** Chapman & Hill, London.
- Rozaini, M.Z., A.B.Z. Zuki, M. Noordin, Y. Norimah and A.N. Hakim. 2004. The effects of different types of honey on tensile strength evaluation of burn wound tissue healing. **Intern J Appl Res Vet Med.** 2(4): 290-295.
- Ruszczak, Z. 2003. Effect of collagen matrices on dermal wound healing. **Advanced Drug Delivery Reviews.** 55(12): 1595-1611.
- Samuelson, D.A. 2007. **Textbook of Veterinary Histology.** Missouri, Saunders.
- Seshagirirao, K. 1995. Purification and partial characterization of a lectin from *Pedilanthus tithymaloides* latex. **Biochem Arch.** 11: 197-201.
- Sewall, G.K., K.M. Robertson, N.P. Conner, D.M. Heisey, and G.K. Harting. 2003. Effect of topical mitomycin on skin wound contraction. **Arch Facial Plast Surg.** 5: 59-62.
- Shivhare, Y., P.K. Singour, U.K. Patil and R.S. Pawar. 2010. Wound healing potential of methanolic extract of *Trichosanthes dioica* Roxb (fruits) in rats. **J Ethanopharmacol.** 127: 614-619.
- Shukla, A., A.M. Rasik, G.K. Jain, R. Shankar, D.K. Kulshrestha and B.N. Dhawan. 1999. In vitro and in vivo wound healing activity of asiaticoside isolation from *Centella asiatica*. **J Ethanopharmacol.** 65: 1-11.

- Silambujanaki, P., C.H.B.T. Chandra, K.A. Kumar and V. Chitra. 2010. Wound healing activity of *Glycosmis arborea* leaf extract in rats. **J Ethnopharmacol.** Article in press, doi: 10.1016/j.jep.2010.11.046
- Singer, A.J. and R.A.F. Clark. 1999. Cutaneous wound healing. **N Engl J Med.** 341: 738-746.
- Stadelmann, W.K., A.G. Digenis and G.R. Tobin. 1998. Physiology and healing dynamics of chronic cutaneous wounds. **Am J Surg.** 176 (2): 26-38.
- Stegemann, H. and K. Stalder. 1967. Determination of hydroxyproline. **Clin Chem Acta.** 18: 267-273.
- Strodtbeck, F. 2001. Physiology of wound healing. **Newborn Infant Nurs Rev.** 1: 43-52.
- Suntar, I.P., E.K. Akkol, D. Yilmazer, T. Baykal, H. Kirmizibekmez, M. Alper and E. Yesilada. 2010. Investigations on *in vivo* wound healing potential of *Hypericum perforatum* L. **J Ethnopharmacol.** 127: 468-477.
- Swaim, S.F. 1980. **Surgery of Traumatized Skin: Management and reconstruction in the dog and cat.** W.B. Saunders Company, London.
- Swain, S.D., T.T. Rohn and M.T. Quinn. 2002. Neutrophil priming in host defense: role of oxidants as priming agents. **Antioxid Redox Signal.** 4: 69-83.
- Trease, G.E. and Evans, W.C. 2002. **Trease and Evans pharmacognosy.** 15th ed. W. B. Saunders, Edinburgh.
- Vaisberg, A.J., M. Milla, M.D.K. Planus, J.L. Cordova, R. Ferreya, M.D.C. Mustiga, L. Carlin and G.B. Hammond. 1989. Tapsine is the cicatrizant principle in Sangre de Grado extracted from *Croton lechleri*. **Planta Medica.** 55: 14-143.

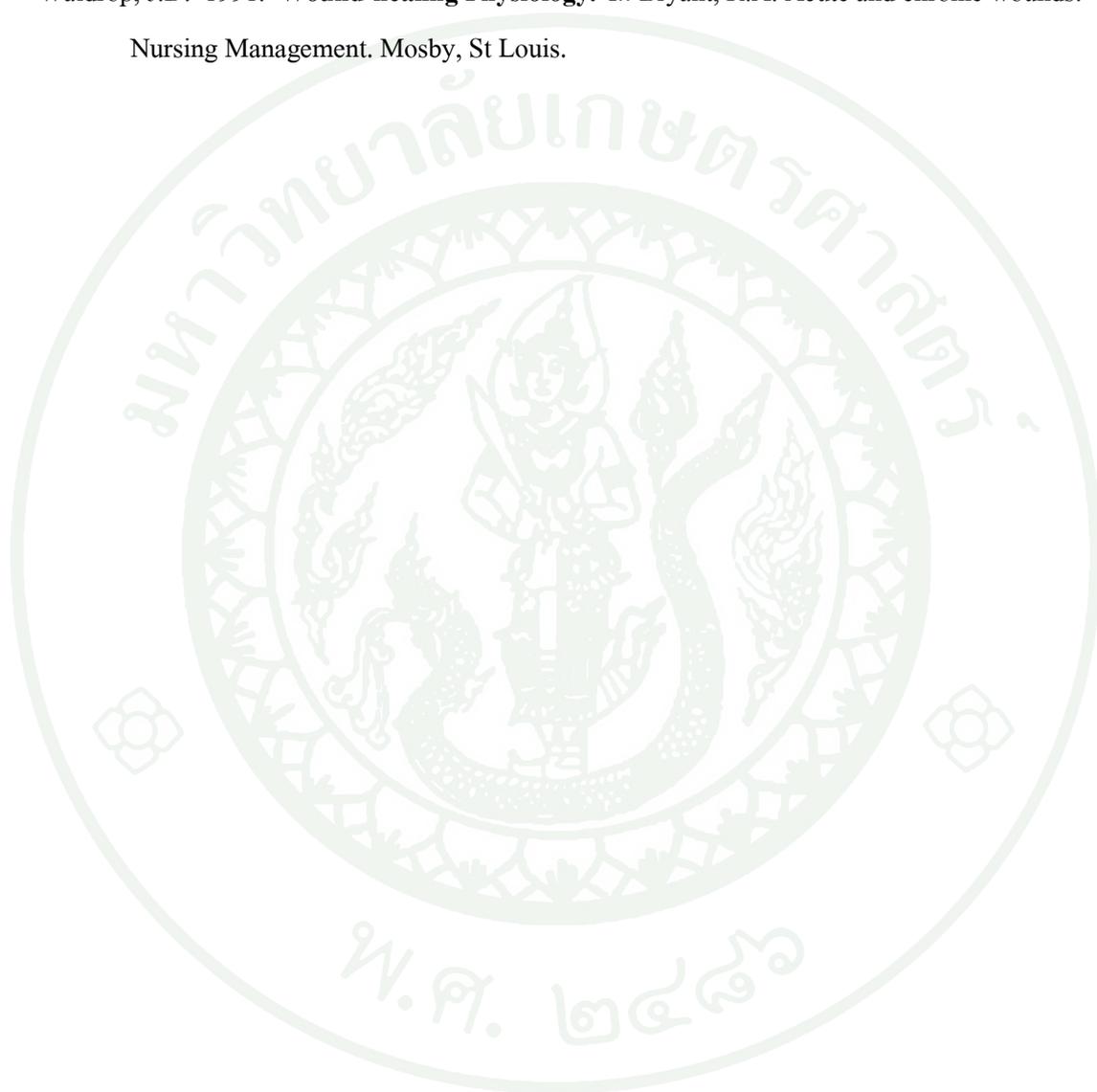
Vidotti, G.J., A. Zimmermann, M.H. Sarragiotto, C.V. Nakamura and B.P. Dias Filho. 2006.

Antimicrobial and phytochemical studies on *Pedilanthus tithymaloides*. **Fitoterapia.**

77: 43-46.

Waldrop, J.D. 1991. **Wound-healing Physiology.** In Bryant, R.A. Acute and chronic wounds:

Nursing Management. Mosby, St Louis.



ประวัติการศึกษา และการทำงาน

ชื่อ-นามสกุล	นางสาววรุฬักษณ์ ศรีวิโรจน์
วัน เดือน ปี ที่เกิด	วันที่ 13 พฤศจิกายน 2527
สถานที่เกิด	กรุงเทพมหานคร
ประวัติการศึกษา	วท.บ.(สัตวบาล) มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ (พ.ศ. 2549)
ผลงานทางวิชาการ	<p>ร่วมเสนอผลงานทางวิชาการระดับนานาชาติ</p> <ul style="list-style-type: none"> - หัวข้อเรื่อง The Effect of <i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poit Crude Extract on Wound Healing Stimulation in Mouse - เสนอภาคโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการ The Second Congress of the Asian Association of Veterinary Anatomists (AAVA) 4-6 November 2009 Chungbuk National University, Cheongju, Korea <p>ร่วมเสนอผลงานทางวิชาการระดับชาติ</p> <ul style="list-style-type: none"> - หัวข้อเรื่อง ผลของน้ำยางสมุนไพรหนุมนั่งแท่น ในการกระตุ้นขบวนการหายของแผลแบบ excision ในสุนัข - เสนอภาคโปสเตอร์ในงานประชุมวิชาการกายวิภาคศาสตร์ (ประเทศไทย) ครั้งที่ 31 วันที่ 30 เมษายน-2 พฤษภาคม 2551 โรงแรมเมธาวลัย อ.ชะอำ จ.เพชรบุรี <p>ตีพิมพ์ผลงานทางวิชาการ</p> <ul style="list-style-type: none"> - หัวข้อเรื่อง The effect of <i>Pedilanthus tithymaloides</i> (L.) Poit crude extract on wound healing stimulation in mice. Kasetsart J. (Nat Sci.) 44: 1121-1127 (2010)
ทุนสนับสนุนการวิจัย	ได้รับทุนสนับสนุนคุณภาพงานวิจัยระดับบัณฑิตศึกษา จากบัณฑิตวิทยาลัย มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์(พ.ศ. 2551)