รายงานการวิจัยฉบับสมบูรณ์

แผนงานวิจัยเรื่อง

การวิจัยและพัฒนาเลือดจระเข้พันธุ์ไทยเป็นผลิตภัณฑ์เสริมอาหารเพื่อสุขภาพ

Research and Development of Siamese Crocodile Blood as Food Supplement for Health

(ปีที่ 1 เล่มที่ 3/3)

โดย

นางสาวจินดาวรรณ สิรันทวิเนติ นายวิน เชยชมศรี นางราตรี ลีละวงค์เทวัญ นางกัลยา อารีย์
นางสาวสิรินดา กุสุมภ์ นางบริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช นางอรุณพร อิฐรัตน์
นางสาวดวงจันทร์ เฮงสวัสดิ์ นางสาวเยาวดี คุปตะพันธ์ นายเอกวิทย์ ตรีเนตร
นางสาววิภาภรณ์ ณ ถลาง นางบุญเกื้อ วัชรเสถียร และ นางสาวสุวรพร แซ่ลิ้ม

ภาควิชาสัตววิทยา คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
สถานวิทยาศาสตร์พรีคลินิก คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ฝ่ายวิจัยโภชนาการและสุขภาพ สถาบันค้นคว้าและพัฒนาผลิตภัณฑ์อาหาร มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์
ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์
ภาควิชาวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยีการอาหาร คณะวิทยาศาสตร์และเทคโนโลยี มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2551

กิตติกรรมประกาศ

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ที่ได้ให้ทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี พ.ศ. 2551

ขอขอบคุณ รศ. น. สพ.ปานเทพ รัตนากร ศูนย์เฝ้าระวังและติดตามโรคจากสัตว์ป่า สัตว์ต่างถิ่น และสัตว์อพยพ คณะสัตวแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยมหิดล จ. นครปฐม ที่ปรึกษาโครงการที่กรุณาให้คำแนะนำและข้อคิดเห็นต่างๆ

และคณะผู้วิจัยขอขอบคุณ คุณวิสาชิณี รุ่งทวีชัย ห้างหุ้นส่วนจำกัด วานิไทย และฟาร์มจระเข้รุ่งทวีชัย อ. ดอนตูม จ. นครปฐม ที่ให้การสนับสนุนวัตถุดิบเลือดจระเข้พันธุ์ไทย วัสดุอุปกรณ์ และข้อมูลต่างๆ ตลอดจนอำนวยความสะดวกในการเก็บตัวอย่างเพื่อการศึกษาในงานวิจัยของแผนงานวิจัยในปีที่ 1 นี้ให้สำเร็จ และบรรลุวัตถุประสงค์ด้วยดี

คณะผู้วิจัย

รายงานการวิจัย

ที่ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยแผนงานสนับสนุนการวิจัยรองรับการเปลี่ยนแปลงและพลวัตโลกเพื่อแก้ปัญหาสำคัญของชาติอย่างสมดุลและยั่งยืน ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2551

โครงการย่อยที่ 6 การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้

Study of Wound Healing Effect of Crocodile Blood Extract

หน่วยงานที่รับผิดชอบ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์

คณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ: นางบริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช

ผู้ร่วมงานวิจัย: นางอรุณพร อิฐรัตน์

นางสาวสุวรพร แซ่ลิ้ม

นายวิน เชยชมศรี

โครงการวิจัยเรื่อง **การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้**

Study of Wound Healing Effect of Crocodile Blood Extract

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัย ประจำปี 2551 จำนวนเงิน 527,000 บาท

ระยะเวลาทำการวิจัย 1 ปี ตั้งแต่ ตุลาคม 2551 ถึง กันยายน 2552 (ขยายเวลาถึง มีนาคม 2553)

ชื่อผู้วิจัย

นางบริสุทธิ์ แสนมโน หาญพานิช Ph.D. (Medical Science) โครงการบัณฑิตศึกษา คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 02-9269-9806

นางอรุณพร อิฐรัตน์ Ph.D. (Pharmacognosy) ศูนย์การแพทย์แผนไทยประยุกต์ คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2926-9749

นางสาวสุวรพร แซ่ลิ้ม วท. บ. (ชีววิทยา) งานวิจัย คณะแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยธรรมศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2926-9830

นายวิน เชยชมศรี ปร. ค. (เทคโนโลยีชีวภาพเกษตร) ภาควิชาสัตวศาสตร์ คณะวิทยาศาสตร์ มหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ โทรศัพท์ 0-2562-5555, 0-2562- 5444 ต่อ 3264

สารบัญเรื่อง

	หน้า
บทคัดย่อ	I
Abstract	V
สารบัญตาราง	XIII
สารบัญภาพ	XV
คำอธิบายสัญลักษณ์และคำย่อที่ใช้ในการวิจัย	XXI
บทนำรวม	1
สรุปภาพรวมของแผนงาน	13
ประวัติและผลงานวิจัยที่สำคัญของนักวิจัยและคณะ	17

โครงการวิจัยย่อยที่ 1 : การศึกษาองค์ประกอบทางเคมีของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (ปีที่ 1 เล่มที่ 1/3)

บทคัดย่อ	47
Abstract	49
บทนำ	51
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	53
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	58
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	64
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	88
บรรณานุกรม	89

โครงการวิจัยย่อยที่ 2 : การพัฒนากระบวนการเจาะเก็บเลือดจระเข้โดยไม่ทำลายชีวิต (ปีที่ 1 เล่มที่ 1/3)

บทคัดย่อ	99
Abstract	99
บทนำ	101
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง	102
ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย	107
ผลการวิจัยและอภิปรายผล	110
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ	120

หน้า

บรรณานุกรม 123

ภาคผนวก 126

โครงการวิจัยย่อยที่ 3 : ฤทธิ์การต้านเชื้อแบคทีเรียและเชื้อราของเลือดและส่วนประกอบของเลือดจากจระเข้พันธุ์ไทย

(ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

บทคัดย่อ 137

Abstract 137

บทนำ 139

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 140

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 142

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 150

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 166

บรรณานุกรม 166

ภาคผนวก 168

โครงการวิจัยย่อยที่ 4 : การศึกษาฤทธิ์ของเลือดจระเข้พันธุ์ไทย (*Crocodylus siamensis*) ในการกระตุ้นกระบวนการกลืนกินของแมโครเฟจและลิมโฟไซต์

(ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

บทคัดย่อ 173

Abstract 175

บทนำ 177

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 178

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 180

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 185

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 198

บรรณานุกรม 199

หน้า

โครงการวิจัยย่อยที่ 5 : สารยับยั้งแองจิโอเทนซินคอนเวอร์ตติงเอนไซม์ในเลือดจระเข้ไทย (ปีที่ 1 เล่มที่ 2/3)

บทคัดย่อ 207

Abstract 207

บทนำ 29

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 210

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 216

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 220

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 226

บรรณานุกรม 227

โครงการวิจัยย่อยที่ 6 : การศึกษาฤทธิ์ทางชีวภาพต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้ (ปีที่ 1 เล่มที่ 3/3)

บทคัดย่อ 235

Abstract 237

บทนำ 239

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง 240

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย 241

ผลการวิจัยและอภิปรายผล 244

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ 265

บรรณานุกรม 267

บทคัดย่อ

การหายของแผลมีได้สามลักษณะคือ การหายแบบปฐมภูมิ (Primary wound healing) การหายแบบทุติภูมิ (Secondary wound healing) และ การหายแบบตติยภูมิ (Tertiary wound healing) ทั้งสามระยะจะมีกลไกตามธรรมชาติเพื่อซ่อมแซม คือ 1. ระยะอักเสบ (Inflammatory phase) 2. การสมานแผลระยะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์บริเวณบาดแผลเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อที่หายไป (Proliferate phase) และ 3. การหายระยะปรับโครงสร้างของแผล (Remodeling phase) ในการหายของแผลระยะที่ 2 ที่มีการแบ่งตัวของเซลล์บริเวณบาดแผลเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อที่หายไป (Proliferate phase) มีความสำคัญในการสร้างเนื้อเยื่อทดแทนในชั้นหนังแท้ (dermis) และชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) ดังนั้นการศึกษาการแบ่งตัวของเซลล์ของชั้น Dermis และ Epidermis หรือเซลล์ Fibroblast และ Keratinocyte ตามลำดับ จึงอาจจะสามารถนำมาทดสอบการหายของแผลใน Vitro experiment ได้เพื่อบอกแนวโน้มการหายของแผลจากการทบทวนวรรณกรรมเกี่ยวกับคุณสมบัติของเลือดจระเข้ต่อการหายของแผลมีแนวโน้มเป็นไปในทิศทางที่ทำให้การสมานแผลดีขึ้น คณะผู้วิจัยศึกษาผลของเลือดจระเข้ที่มีต่อการหายของแผลโดยศึกษาผลของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) และผลต่อการหายของแผลในหนูทดลอง (Reepithelization in animal model) เพื่อรวบรวมข้อมูลของเลือดจระเข้ต่อการหายของแผลทั้ง Vitro และ Vivo effect สรุปผลการทดลองทั้ง Vitro และ Vivo สารสกัดจากเลือดจระเข้อาจทั้ง Serum และ Plasma อาจจะมีผลดีกว่า Control ใน Vitro effect แต่ไม่แตกต่างใน Vivo model และผลจาก Plasma extract ที่เหนือกว่า Serum extract น่าจะเป็นผลจาก Heparin มากกว่า เพราะ Heparin เองมีผลเร่ง Cell proliferation ได้ด้วยตัวมันเอง อย่างไรก็ตามการพัฒนาสารสกัดจากเลือดจระเข้เพื่อนำไปใช้ในทางคลินิกควรจะต้องผ่านระบบการคัดกรองความบริสุทธิ์ของสารสกัดและความปลอดภัยที่อาจเกิดจากการปนเปื้อนทางชีวภาพจากผลิตภัณฑ์จากสัตว์

Abstract

Wound healing is a complex system to repair both dermis and epidermis generally there are 3 main processes of wound healing, which are (1) primary wound healing, (2) secondary wound healing and (3) tertiary wound healing. There are three main phases of healing processes, which are (1) inflammatory phase, (2) proliferate phase and (3) remodeling phase. In proliferate phase, it is a critical step to regenerate dermal and epidermal tissue to cover denuded area. These need to regenerate cells of both dermis and epidermis, which are fibroblast and keratinocyte respectively. To study local effect of any chemical substance those can stimulate the reproduction of fibroblast and/or keratinocyte can represent vitro effect of those to wound healing. Here we hypothesize that crocodile blood extraction will accelerate wound healing, base on the observation of healing process on crocodile skin after fighting without any intervention. So we test the crocodile blood extraction to fibroblast and keratinocyte in vitro and re-epitheliration in animal model, to lead to the conclusion about crocodile blood extraction to wound healing both in vitro and vivo result. All results showed both serum and plasma extract of crocodile blood may have some proliferative effect in vitro test and plasma showed superior result, anyways in animal model either serum or plasma extract of crocodile blood failed to accelerated wound healing compare to control site; Zinc paste. Moreover the superior effect of plasma extract seemed like that was the effect from heparin. Literature reviews showed heparin has its own proliferative effect. However, before developing an animal product for real clinical applications needs to purify the product and also prove of it will not carry animal biological product contamination to human.

บทนำ

แผลที่ผิวหนัง (Cutaneous wound) คือ การฉีกขาดของชั้นผิวหนัง ตั้งแต่ชั้นหนังกำพร้า (Epidermis) จนถึงชั้นหนังแท้ (Dermis) หรือลึกกว่า [1] การหายของแผลมีได้สามลักษณะคือ การหายแบบปฐมภูมิ (Primary wound healing) เช่น การเย็บปิดแผลสดหลังหลังจากมีการเกิดขึ้นของแผลทันที แผลชนิดนี้จะมีรอยแผลเป็นน้อย, การหายแบบทุติภูมิ (Secondary wound healing) เช่น การหายเองของบาดแผล โดยรอให้ชั้นต่างๆของแผลแบ่งตัวมาเชื่อมประสานกันเอง, และ การหายแบบตติยภูมิ (Tertiary wound healing) เช่น การนำเนื้อเยื่อบริเวณอื่นหรือชิ้นเนื้อเยื่อสังเคราะห์มาปะลงบนบาดแผล (Skin graft) [2] การหายแบบปฐมภูมิจะมีรอยแผลขนาดใกล้เคียงกับบาดแผลเดิม ส่วนการหายแบบทุติภูมิและแบบตติยภูมิ ส่วนมากมักจะมีรอยแผลเป็นตามขนาดและรูปร่างของบาดแผลซึ่งจะมีขนาดใหญ่กว่าการหายแบบปฐมภูมิการสมานแผลทั้งสามระยะมีความสำคัญในแง่มุมต่างๆกันไป ระยะอักเสบ (Inflammatory phase) เป็นการเริ่มเกิดกลไกทั้งหมดของการหายของแผล ไม่ว่าจะเป็นการรวมตัวกันบริเวณรอยเปิดของแผลของเกร็ดเลือด (Platelets aggregation), การสะสมของเส้นใยไฟบริน (Fibrin deposition), การรวมตัวของเซลล์อักเสบชนิดต่างๆ (Migration of inflammatory cells) เพื่อหลั่งสารที่มีผลต่อการหายของแผลในระยะถัดไป เช่น Cytokines, growth factors เป็นต้น การสมานแผลระยะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์บริเวณบาดแผลเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อที่หายไป (Proliferate phase) มีความสำคัญคือทำให้ปากแผลปิดสนิท ส่วนการหายระยะปรับโครงสร้างของแผล (Remodeling phase) มีความสำคัญด้านการสร้างความยืดหยุ่น, รูปร่างและขนาดของแผลเมื่อหายสนิทแล้ว เพราะมีการปรับโครงสร้างทั้งหมดโดยเฉพะเส้นใยต่างๆ ที่เป็นส่วนประกอบของผิวหนัง เช่น เส้นใย Collagen และ Elastin เป็นต้น หลังจากการสมานแผลนั้น ผิวหนังบริเวณที่เกิดใหม่อาจจะไม่เหมือนเดิม 100% เช่น สีผิวบริเวณนั้นอาจจะมีสีผิวที่เข้มขึ้น (Hyperpigmentation) หรืออาจจะมีสีผิวที่อ่อนลง (Hypopigmentation) ซึ่งเกิดการเปลี่ยนแปลงในระดับหนังกำพร้า หากมีการเปลี่ยนแปลงในชั้นหนังแท้อาจมีผลทำให้เกิดแผลเป็นชนิดต่างๆ แผลเป็นที่มีการยุบตัวลงไปของผิวหนัง (Atrophic scar), แผลเป็นที่มีการพองนูนขึ้นมา (Hypertrophic scar), บางครั้งแผลเป็นที่พองนูนขึ้นมาอาจจะมีการขยายใหญ่กว่าบริเวณที่เป็นแผลและอาจจะมีการขยายต่อไปได้อีกร่วมกับมีอาการคันเรียกว่าแผลเป็นคีลอยด์ (Keloid) [5] หากมีภาวะใดๆ ที่ทำให้การสมานแผลระยะที่มีการแบ่งตัวของเซลล์บริเวณบาดแผลเพื่อเสริมสร้างเนื้อเยื่อที่หายไป (Proliferate phase) ผิดปกติ เช่น การติดเชื้อแทรกซ้อน (Infection) จะทำให้การหายชะลอตัวออกไป (Delayed wound healing) ดังนั้นการดูแลแผลระยะนี้ เช่น การรักษาความชุ่มชื้นบนแผล(Moisturizing effect), การทำความสะอาดแผล (Wound dressing), การป้องกันการติด

เชื้อแทรกซ้อน จึงมีความสำคัญ การใช้ผลิตภัณฑ์ทำความสะอาดแผลที่มีคุณสมบัติดังกล่าวจะช่วยให้การสมานแผลระยะที่สองนี้ เซลล์สามารถแบ่งตัวได้อย่างมีประสิทธิภาพ เช่นสารทำความสะอาดแผล (Wound dressing) ที่มีส่วนผสมของ Silver diazine หรือผลิตภัณฑ์ทางการค้าที่มีคุณสมบัติดังกล่าว [6-9] นอกเหนือจากสารทำความสะอาดแผลที่มีส่วนผสมของ Silver diazine แล้ว ยังมีสารอื่นๆที่น่าจะ มีผลต่อกระบวนการหายของแผลแต่ยังไม่ได้รับการศึกษาวิจัยอย่างจริงจัง เช่น สารที่มีฤทธิ์ต้านการอักเสบ(Anti-inflammatory effect), สารที่มีผลยับยั้งการเจริญเติบโตของเชื้อแบคทีเรีย (Anti-bacterial effect), หรือสารที่มีผลต่อโมเลกุลและการทำงานในระบบชีวโมเลกุล เช่น Cytokine หรือ Growth factor เป็นต้นคณะผู้วิจัยจึงได้เล็งเห็นความสำคัญของสารต่างๆ ที่เป็นองค์ประกอบทางธรรมชาติ ประกอบกับองค์ความรู้พื้นฐานของภูมิปัญญาไทยให้มีการพัฒนาเป็นรูปธรรมและมีการทดสอบด้วยระเบียบวิธีวิจัยทางวิทยาศาสตร์อย่างเป็นระบบ เพื่อมุ่งหวังพัฒนาองค์ความรู้เหล่านั้นมาประยุกต์ใช้ให้เกิดประโยชน์อย่างแท้จริง

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

จระเข้ (Crocodile) เป็นสัตว์เศรษฐกิจอย่างหนึ่งของประเทศ ส่วนต่างๆ ของร่างกายจระเข้สามารถนำไปแปรรูปใช้ประโยชน์ในทางอุตสาหกรรมได้ เช่น เนื้อจระเข้, หนังจระเข้, ไขจระเข้ เป็นต้น ในประเทศไทยมีฟาร์มจระเข้ทั้งขนาดใหญ่และขนาดเล็ก ในประเทศไทยจึงมีจระเข้หลายล้านตัวด้วยกัน อย่างที่ทราบกันดีว่าอวัยวะหลายส่วนของจระเข้สามารถนำมาใช้ประโยชน์ได้ แต่ยังมีส่วนหนึ่งที่ยังไม่ได้นำมาใช้ให้เกิดประโยชน์และเหลือทิ้งเป็นขยะ คือ เลือดจระเข้มีการศึกษาในกลุ่มนักวิจัยไทยจากมหาวิทยาลัยเกษตรศาสตร์ [Unpublished data] ว่าเลือดจระเข้ไทยเมื่อนำมาแปรรูปเป็นผง (Freeze dried) และนำไปทดสอบในสัตว์ทดลองพบว่า เลือดจระเข้มีคุณสมบัติต้านแบคทีเรีย (Anti-microbial effect) สามารถเพิ่มสารอาหารในอวัยวะต่างๆ ของหนูทดลองได้(Nutritional supplement) [Unpublished data] คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญของการศึกษาเลือดจระเข้แปรรูป เพื่อนำไปประยุกต์ใช้ประโยชน์ในทางการแพทย์ต่อไป จากการทบทวนวรรณกรรมพบว่า มีการศึกษาคุณสมบัติของเลือดจระเข้ทั่วโลก เช่น ผลของเลือดจระเข้ต่อระบบภูมิคุ้มกัน (Immune system)[10, 11, 12], ผลของเลือดจระเข้ในการต่อต้านเชื้อไวรัส (Anti-viral activity)[13], ผลของเลือดจระเข้ในการต่อต้านเชื้อแบคทีเรีย (Anti-bacterial activity)[14] ซึ่งคุณสมบัติต่างๆ ดังกล่าวมีความสำคัญต่อระบบการทำงานของสิ่งมีชีวิต อีกทั้งมีผลทำให้การหายของแผลเป็นไปในทิศทางที่ดีขึ้นอีกด้วย โดยเฉพาะระยะที่รอการงอกของเนื้อเยื่อผิวหนังมาปกคลุมบาดแผล(Re-epithelization)

คณะผู้วิจัยได้พิจารณาความสำคัญของเลือดและผลผลิตจากเลือด เช่น เส้นใยไฟบริน(Fibrin) และกลไกการแข็งตัวของเลือด (Clotting system) นอกเหนือจากเป็นกลไกทางธรรมชาติที่ช่วยป้องกันการไหลออกไม่หยุดของเลือดแล้ว สารประกอบต่างๆ เหล่านั้นยังทำหน้าที่เสมือนกาวประสานแผลและกระตุ้นเซลล์บริเวณที่เป็นแผลให้แบ่งตัวอีกด้วย [15, 16] ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความสำคัญในการศึกษาเลือดจระเข้เพื่อนำความรู้ที่ได้เป็นข้อมูลพื้นฐานในการประยุกต์ใช้กับการรักษาแผล โดยจะศึกษาผลของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ (Cytotoxicity test) และผลต่อการหายของแผลในหนูทดลอง (Re-epithelization in animal model) โดยจะเทียบผลกับสารที่ใช้ทำแผลมาตรฐานคือ 1% Silver diazine cream

ระเบียบวิธีดำเนินการวิจัย

1. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์

ทดสอบ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ ที่ความเข้มข้นต่างๆ กัน เพื่อทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ด้วยวิธี MTT assay โดยใช้เซลล์ Keratinocyte และ Fibroblast สกัดจากเนื้อเยื่อจากผิวหนังมนุษย์ที่เหลือจากการผ่าตัดโดยได้รับอนุญาตจากกรรมการจริยธรรมวิจัย มา Culture เพื่อทดสอบดังกล่าว

2. การเลี้ยง Keratinocyte

Keratinocytes สกัดจากเนื่อเยื่อจากผิวหนังมนุษย์ที่เหลือจากการผ่าตัด เลี้ยงใน Serum Free Medium (SFM) (Gibco) เติมยาปฏิชีวนะ Penicillin, 100 µg/mL Streptomycin, 2.5 µg/mL Fungizone® (Invitrogen, Grand Island, NY), แล้ว Keratinocytes จะถูก Sub-cultured เมื่อหนาแน่นประมาณ 90–100% ใช้ Keratinocytes ที่ Passages ประมาณ 3–5 ในการทดสอบ

3. การเลี้ยง Fibroblast

Fibroblast สกัดจากเนื้อเยื่อจากผิวหนังมนุษย์ที่เหลือจากการผ่าตัด เลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine (Sigma, St. Louis, MO) เสริมด้วย 10% FBS, 100 U/mL Penicillin, 100 µL/mL Streptomycin, and 0.25 µg/ µL Amphotericin B ใช้ Fibroblast ที่ Passages ประมาณ 3–5 ในการทดสอบ

4. ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ (Cytotoxicity testing) ด้วย Keratinocyte และ Fibroblast ในจานเลี้ยง (Monolayer cultures)

ทดสอบความเป็นพิษต่อเซลล์ของสารสกัดจากเลือดจระเข้เทียบกับต่อ Keratinocyte และ Fibroblast ในจานเลี้ยง (Monolayer cultures) Keratinocytes เลี้ยงในจาน 96 หลุม (Ninety six-well plates) ที่ ความหนาแน่น 1 × 105/well ส่วน Fibroblasts ใช้ที่ความหนาแน่น of 5×10^4/ well เลี้ยงไปประมาณ 3–4 วัน จนกว่าจะหนาแน่นที่ประมาณ 70–80% ของจานเลี้ยงเชื้อจากนั้นนำสารสกัดจากเลือดจระเข้, Serum หรือ Plasma ในความเข้มข้นที่ต้องการทดสอบ ลงไปในจานเลี้ยงเชื้อ เลี้ยงเซลล์ที่อุณหภูมิ 37°C ความเข้มข้นของก๊าซคาร์บอนไดอ๊อกไซด์ที่ 5% ทดสอบที่ 48 ชั่วโมงหลังหยอดสารสกัดด้วย 3-(4,5-dimethyl-2- thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay ให้ทำการทดลองซ้ำสามครั้ง (Triple experiment) จึงนำค่าที่ได้มาเฉลี่ยเพื่อแปลผล

5. MTT assay

MTT คือ สารสีเหลืองทองสามารถดูดซึมโดยเซลล์ที่มีชีวิตเท่านั้น โดยเซลล์จะเปลี่ยนสารสีเหลืองนั้นเป็นผลึก Formazen 8 (purple crystals) การเปลี่ยนสีดังกล่าวสามารถทดสอบได้ด้วยเครื่อง Spectrophotometrically การวัดความเข้มข้นของสีที่เปลี่ยนไปสามารถบ่งบอกถึงปริมาณเซลล์ที่ยังมีชีวิตอยู่ ได้ ให้อ่านเทียบคลื่นแสงที่ความยาวคลื่น 570 nm เทียบกับความยาวคลื่นมาตรฐานที่ 690 nm ผลของ MTT assay ให้วิเคราะห์โดยสถิติ Student's *t*- หาก $p<0.05$ ถือว่ามีนัยสำคัญทางสถิติ

6. การทดสอบในหนูทดลอง (Mouse excisional wound model)

ให้ใช้หนู Balb C mice ตัดให้มีแผลทุกชั้น (Four full-thickness) ทราบได้จากจะตัดถึงชั้น Panniculus carnosus ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1x1 cm^2 หลังจากนั้น ให้ทำแผลโดยสารสกัดจากเลือดจระเข้ ข้างซ้าย (Experimental site) เทียบกับ 1% Silver sulfadiazine cream ข้างขวา (Control site) ปิดด้วย Tegaderm (a semi-occlusive dressing) วัดขนาดแผลที่วันที่สี่ (Post-wounding day 4, PWD 4) และ 7 (PWD 7) ถ่ายรูปและวัดขนาดของแผลที่งอกจากเซลล์ผิวหนู (Re-epithelialization) โดยวัดตัวชี้วัดคือ อัตราการหายของแผลของ Experimental site เทียบกับ Control site และสังเกตการณ์เปลี่ยนแปลงอื่นๆ ถ้ามี เช่น ขน, ลักษณะการหดรั้งของแผล ฯลฯ

การคำนวณทางสถิติใช้วิธีการคำนวณขนาดของการศึกษาสำหรับการศึกษาเชิงวิเคราะห์ (Analytic Studies) โดยใช้ Cohort Studies หรือ Intervention Studies ที่ Outcome เป็น Proportion

$$N1 = \frac{(Z\alpha + Z\beta)^2 \text{ x } PQ \text{ x } (r + 1)}{(P1 - Po)^2 \text{ x } r} \qquad \text{เมื่อ } P = \frac{P1 + rPo}{1 + r} \quad \text{และ } r = \frac{no}{n1}$$

n1 = จำนวนกลุ่มที่ Exposed หรือกลุ่ม Treatment

no = จำนวนกลุ่มที่ Non-exposed หรือกลุ่ม Control

r = สัดส่วนของ Non-exposed ต่อ Exposed หรือ Control ต่อ Treatment

Zα = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับ Type I Error ที่

Zβ = ค่ามาตรฐานจากตาราง Z ที่ระดับ Type II Error ที่

P = สัดส่วนของ Outcome เฉลี่ยระหว่าง 2 กลุ่ม

Q = 1 – P

P1 = สัดส่วนของกลุ่ม Exposed หรือกลุ่ม Treatment ที่เกิด Outcome

Po = สัดส่วนของกลุ่ม Non-exposed หรือกลุ่ม Control ที่เกิด Outcome

ซึ่งจากการคำนวณ จะต้องใช้หนูในการทดลอง 5 ตัว/ ครีมที่จะใช้ทดสอบ

7. สรุปและรายงานผล

สรุปและรายงานผลว่าสารสกัดจากเลือดจระเข้ มีพิษต่อเซลล์ผิวหนังหรือไม่ และมีผลต่อการหายของแผลเป็นอย่างไร

ผลการวิจัยและอภิปรายผล

I. การทดลองรวม Cytotoxicity test จากวิธี MTT assay โดยใช้ Fibroblast และ Keratinocyte

1. เพาะเลี้ยงเซลล์ Fibroblasts ซึ่งสกัดจากเนื้อเยื่อจากผิวหนังมนุษย์ที่เหลือจากการผ่าตัด เลี้ยงใน Dulbecco's modified Eagle media (DMEM) supplemented with 2 mM L-glutamine เสริมด้วย 10% FBS, 100 U/mL penicillin, 100 uL/mL streptomycin, and 0.25 µg/ µL amphotericin B ใช้ Fibroblast ที่ passages ประมาณ 3–5 ในการทดสอบ

2. ทดสอบความเป็นพิษของเลือดจระเข้ต่อเซลล์ Fibroblasts โดยวิธี MTT assay

2.1 นำ Fibroblast ที่ Passages ประมาณ 3–5 ที่เลี้ยงใน 100 x 20 mm TC dish จนเจริญเต็ม Dish 100% Confluence แล้วมา Passages เพื่อ Seed cell Fibroblasts ปริมาณเซลล์ตั้งต้น 1 x 10^6 cell/ ml ใน 96 Well plate เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.2 ลงสารสกัด 2 ชนิด 3 Dilution ได้แก่

ชนิดของสาร	Code
- Serum ไม่เจือจาง (100%)	1
- Serum เจือจาง 10 เท่า (10 %)	2
- Serum เจือจาง 100 เท่า (1%)	3
- Plasma ไม่เจือจาง (100%)	4
- Plasma เจือจาง 10 เท่า (10 %)	5
- Plasma เจือจาง 100 เท่า (1%)	6
- Solvent Control	7
- Control	8

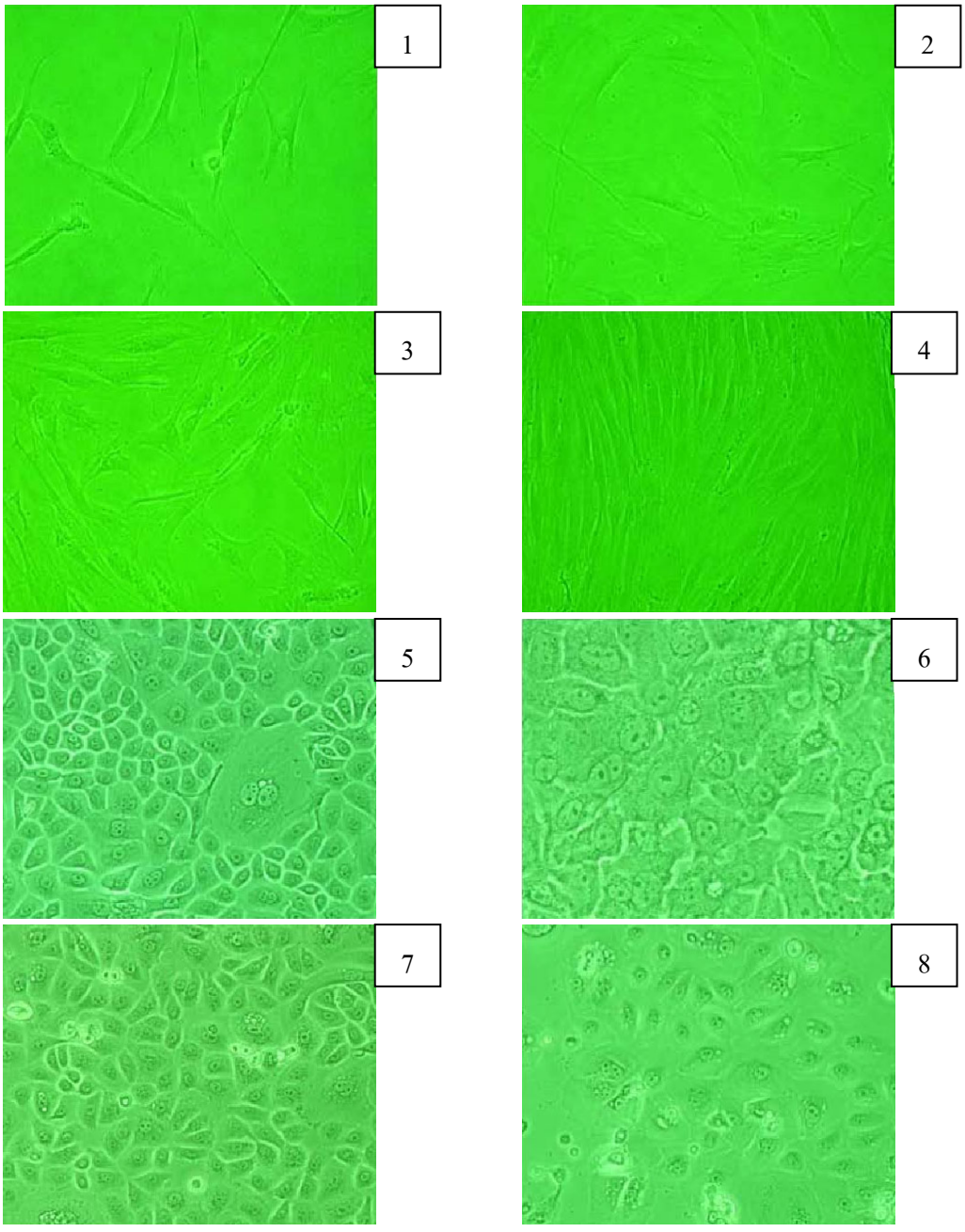
โดยใช้ Serum และ Plasma ของเลือดจระเข้ที่อยู่ในรูปของ Freeze dry มาละลายโดยใช้น้ำที่ผ่านการทำให้ปราศจากเชื้อ และกรอง และใช้น้ำ Distilled water in culture media (2%) เป็น Solvent control incubate ที่ 37 ^{O}C เป็นเวลา 48 ชั่วโมง

2.3 วิเคราะห์ MTT assay โดยการ

- เติมสารละลาย 3-(4,5-dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) ความเข้มข้น 1 mg/ ml จำนวน 10 µl incubate ที่ 37 ^{O}C 2 ชั่วโมง
- Remove MTT และเติมน้ำยา DMSO จำนวน 100 µl incubate ที่ 37 ^{O}C 2 ชั่วโมง
- วิเคราะห์ผลด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550, 560 และ 570 nm

แสดงภาพเซลล์ Fibroblasts และเซลล์ Keratinocyte

เซลล์ Fibroblasts ที่เลี้ยงใน 100 x 20 mm TC dish ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ DMEM รูปที่ 1, 2 แสดงเซลล์ Fibroblasts ที่เพิ่งเริ่มเลี้ยงเซลล์จะอยู่เป็นเซลล์เดี่ยวๆ เมื่อเลี้ยงในระยะเวลาที่นานขึ้นเซลล์ Fibroblasts จะเกาะตัวกันแน่นดังที่แสดงในรูปที่ 3, 4 และใช้ Fibroblast ที่ Passages ประมาณ 3–5 ในการ ทดสอบ รูปที่ 5 -8 แสดงเซลล์ Fibroblast (รูป 1-4) และ Keratinocyte (รูป 5-8) ที่เลี้ยงใน 100 x 20 mm TC dish ด้วยอาหารเลี้ยงเชื้อ Fibrolblast หรือ Keratinocyte media ตามลำดับ

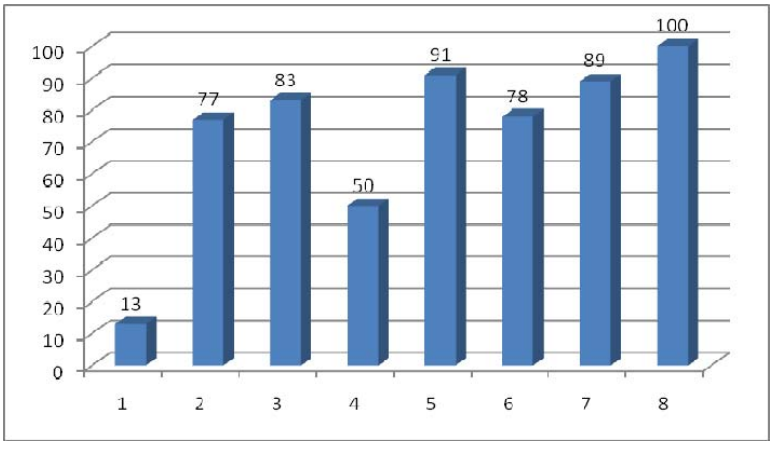


ผลการวิเคราะห์ MTT assay

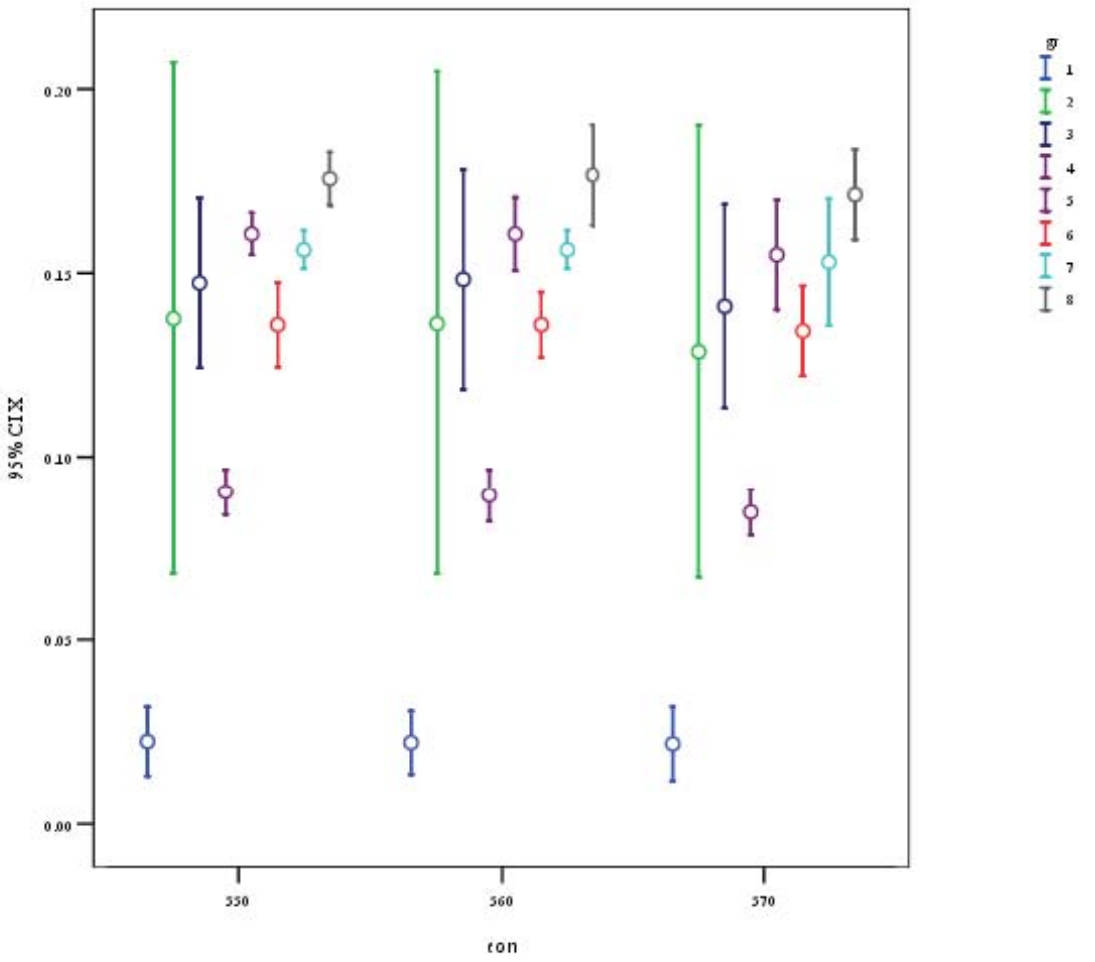
1. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ที่เหมาะกับเซลล์ Fibroblasts ด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550 , 560 และ 570 nm

ตารางที่ 1 ผลการทดสอบ cytotoxicity test ของ Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 100%, 10% และ 1%

	Serum			**Plasma**			**Solvent Control**	Control
	100%	10%	1%	100%	10%	1%		
	0.018	0.123	0.137	0.09	0.162	0.137	0.154	0.174
	0.024	0.17	0.155	0.093	0.162	0.131	0.158	0.179
	0.025	0.12	0.15	0.088	0.158	0.14	0.157	0.174
	0.018	0.123	0.136	0.091	0.16	0.135	0.154	0.174
	0.024	0.168	0.16	0.091	0.165	0.133	0.158	0.183
	0.024	0.118	0.149	0.086	0.157	0.14	0.157	0.173
	0.017	0.118	0.131	0.087	0.155	0.131	0.149	0.169
	0.024	0.157	0.153	0.085	0.161	0.132	0.149	0.177
	0.024	0.111	0.139	0.082	0.149	0.14	0.161	0.168
รวม	0.198	1.208	1.31	0.793	1.429	1.219	1.397	1.571
%	13	77	83	50	91	78	89	100
หมายเลข	1	2	3	4	5	6	7	8



ภาพที่ 1.1 กราฟแสดง %Viable cell เมื่อเทียบกับ Control



ภาพที่ 1.2 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ ต่อเซลล์ Fibroblasts

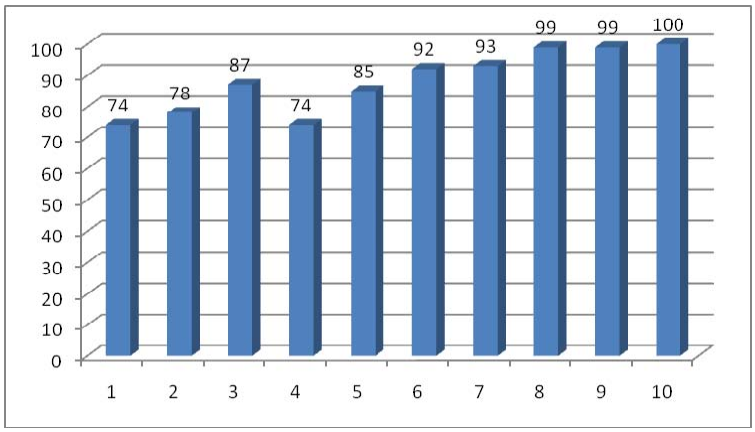
สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ Serum และ Plasma ที่ใช้ทดสอบมีความ Toxic กับ Cell fibroblasts สูง มีผลทำให้การเจริญของ Cell ลดลง เมื่อเทียบกับ Positive control

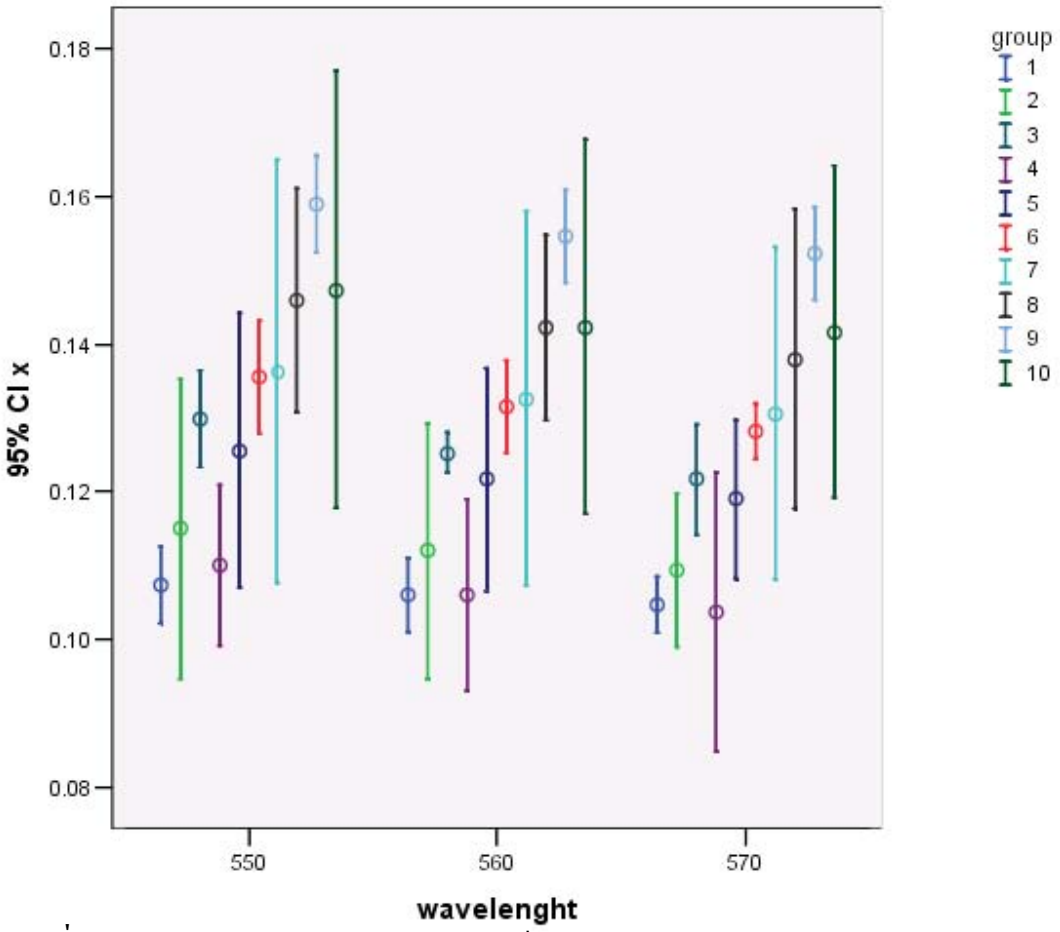
2. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ที่เหมาะกับเซลล์ Fibroblasts ด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550, 560 และ 570 nm

ตารางที่ 2 ผลการทดสอบ cytotoxicity test ของ Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 0.50 %, 0.10% ,0.05% และ 0.025%

	Serum				**Plasma**				**Solvent Control**	**Control**
	0.50%	**0.10%**	**0.05%**	**0.025%**	**0.50%**	**0.10%**	**0.05%**	**0.025%**		
	0.109	0.113	0.132	0.113	0.118	0.133	0.123	0.15	0.136	0.142
	0.105	0.124	0.131	0.105	0.133	0.139	0.143	0.149	0.15	0.161
	0.108	0.108	0.127	0.112	0.126	0.135	0.143	0.139	0.151	0.139
	0.106	0.109	0.126	0.109	0.115	0.129	0.121	0.147	0.132	0.138
	0.104	0.12	0.126	0.1	0.127	0.134	0.137	0.143	0.145	0.154
	0.108	0.107	0.124	0.109	0.123	0.132	0.14	0.137	0.147	0.135
	0.105	0.108	0.125	0.109	0.114	0.128	0.121	0.147	0.132	0.138
	0.103	0.114	0.119	0.095	0.122	0.127	0.132	0.136	0.14	0.152
	0.106	0.106	0.121	0.107	0.121	0.13	0.139	0.131	0.145	0.135
รวม	0.954	1.009	1.131	0.959	1.099	1.187	1.199	1.279	1.278	1.294
%	74	78	87	74	85	92	93	99	99	100
หมายเลข	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10



ภาพที่ 2.1 กราฟแสดง %Viable cell เมื่อเทียบกับ Control



ภาพที่ 2.2 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ ต่อเซลล์ Fibroblasts

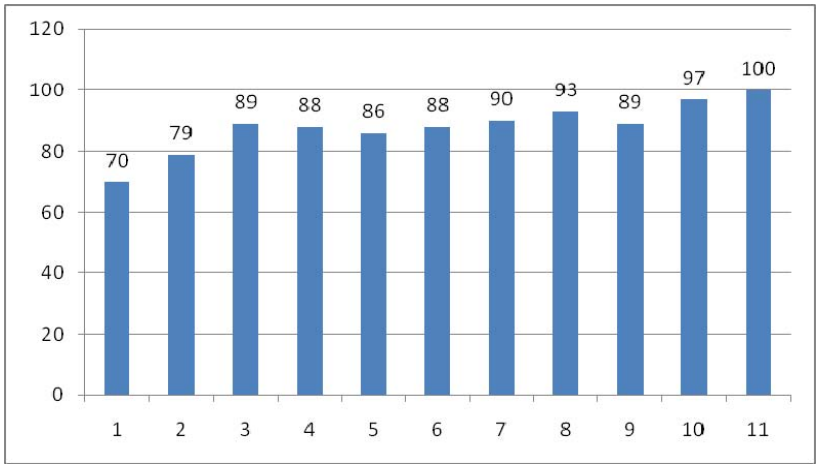
สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ Serum และ Plasma นั้น ที่ความเข้มข้น 0.10 % มีผลดี (positive effect) ต่อการเจริญของ Cell fibroblasts มากที่สุด เมื่อเทียบกับ Positive control ดังนั้นถัดไป จะนำ Serum และ Plasma มาพัฒนาเป็นครีม เพื่อทดสอบผลที่มีต่อการหายของแผลในสัตว์ทดลอง (Vivo experiment)

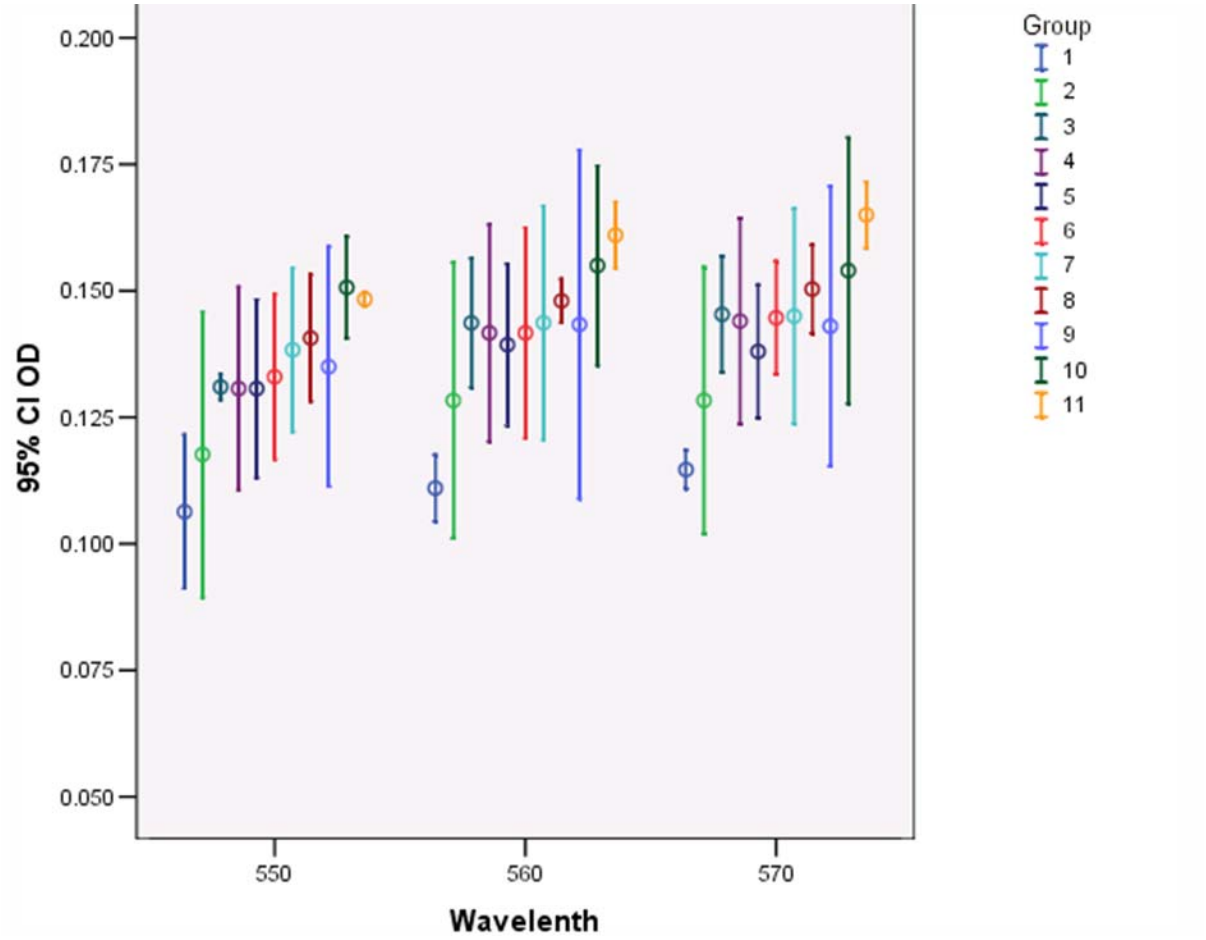
3. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ที่เหมาะกับเซลล์ Fibroblasts ด้วยเครื่อง Microplate reader ที่ความยาวคลื่น 550, 560 และ 570 nm

ตารางที่ 3 ผลการทดสอบ cytotoxicity test ของ Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 0.50%, 0.10%, 0.05%, 0.025% และ Heparin

	Serum				**Plasma**				**Solvent Control**	**Heparin**	**Control**
	0.50%	**0.10%**	**0.05%**	**0.025%**	**0.50%**	**0.10%**	**0.05%**	**0.025%**			
	0.113	0.127	0.132	0.132	0.132	0.139	0.132	0.136	0.144	0.15	0.149
	0.101	0.105	0.131	0.122	0.123	0.134	0.138	0.14	0.136	0.147	0.148
	0.105	0.121	0.13	0.138	0.137	0.126	0.145	0.146	0.125	0.155	0.148
	0.113	0.137	0.145	0.14	0.142	0.147	0.136	0.149	0.155	0.158	0.164
	0.108	0.116	0.138	0.134	0.132	0.146	0.141	0.149	0.147	0.146	0.159
	0.112	0.132	0.148	0.151	0.144	0.132	0.154	0.146	0.128	0.161	0.16
	0.115	0.138	0.148	0.142	0.14	0.149	0.137	0.147	0.153	0.158	0.168
	0.113	0.117	0.14	0.137	0.132	0.14	0.144	0.154	0.145	0.142	0.164
	0.116	0.13	0.148	0.153	0.142	0.145	0.154	0.15	0.131	0.162	0.163
รวม	0.996	1.123	1.26	1.249	1.224	1.258	1.281	1.317	1.264	1.379	1.423
%	70	79	89	88	86	88	90	93	89	97	100
หมายเลข	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11



ภาพที่ 3.1 กราฟแสดง %Viable cell เมื่อเทียบกับ Control



ภาพที่ 3.2 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ต่อเซลล์ Fibroblasts

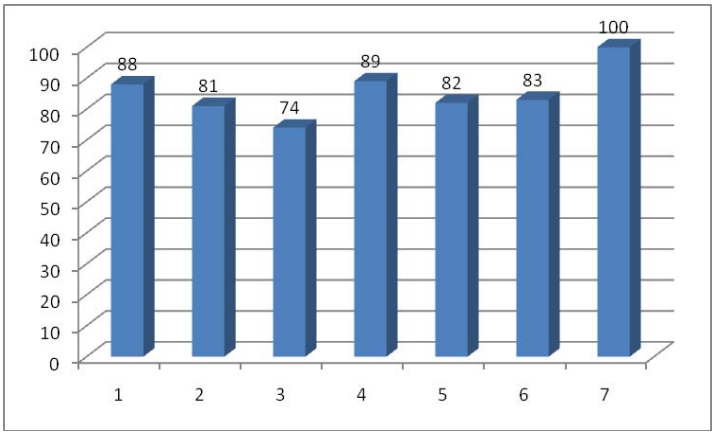
สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบ cytotoxicity test โดยวิธี MTT assay โดยใช้เซลล์ Fibroblast สารสกัดจากเลือดจระเข้โดยใช้ freeze dried serum และ plasma ที่ความเข้มข้น 0.05 % มีความเป็นพิษกับ fibroblast น้อยที่สุด

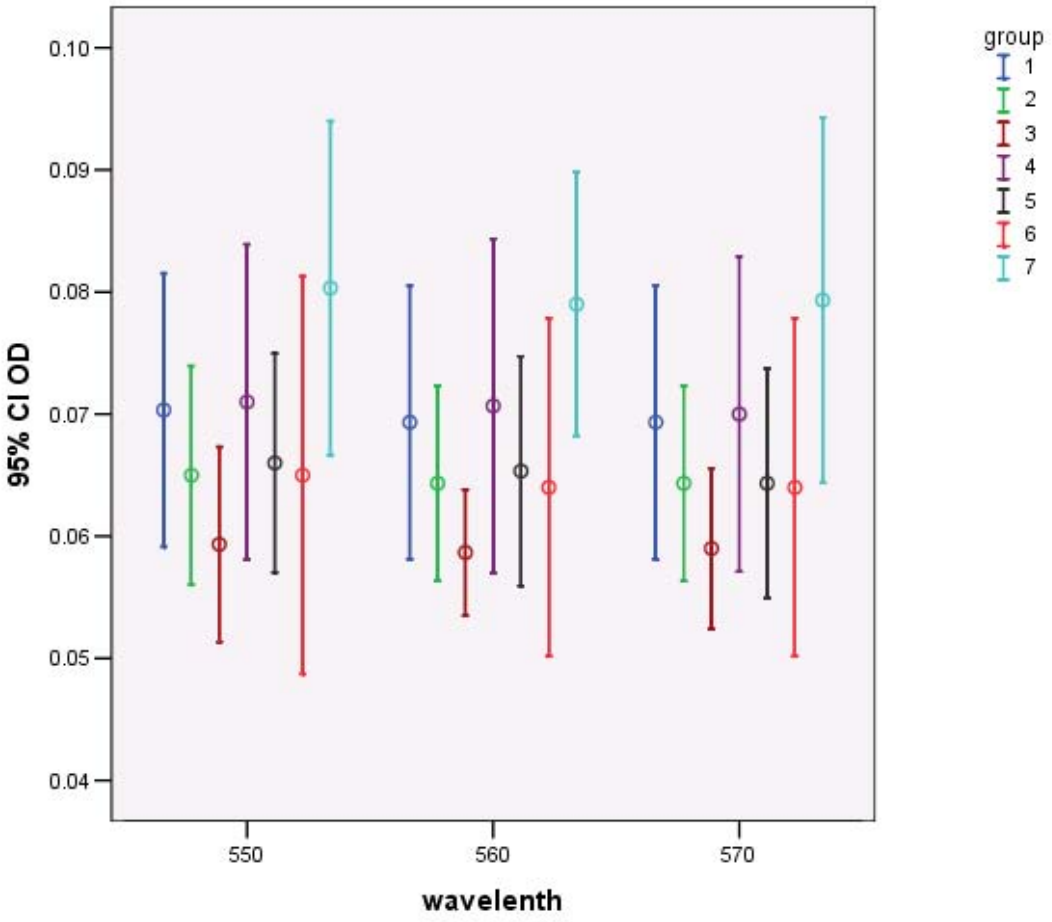
4. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ที่เหมาะกับเซลล์ Keratinocyte

ตารางที่ 4 ผลการทดสอบ cytotoxicity test ของ Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 100 % , 10% และ 1%

	Serum			Plasma			
	100%	**10%**	**1%**	**100%**	**10%**	**1%**	**Control**
	0.066	0.062	0.057	0.077	0.069	0.064	0.074
	0.075	0.069	0.063	0.068	0.062	0.064	0.084
	0.07	0.064	0.058	0.068	0.067	0.072	0.083
	0.065	0.062	0.057	0.077	0.068	0.064	0.074
	0.074	0.068	0.061	0.067	0.061	0.063	0.082
	0.069	0.063	0.058	0.068	0.067	0.07	0.081
	0.065	0.062	0.057	0.076	0.067	0.064	0.073
	0.074	0.068	0.062	0.067	0.06	0.063	0.08
	0.069	0.063	0.058	0.067	0.066	0.07	0.085
รวม	0.627	0.581	0.531	0.635	0.587	0.564	0.77
%	88	81	74	89	82	83	100
หมายเลข	1	2	3	4	5	6	7



ภาพที่ 4.1 กราฟแสดง %Viable cell เมื่อเทียบกับ Control



ภาพที่ 4.2 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ต่อเซลล์ Keratinocyte

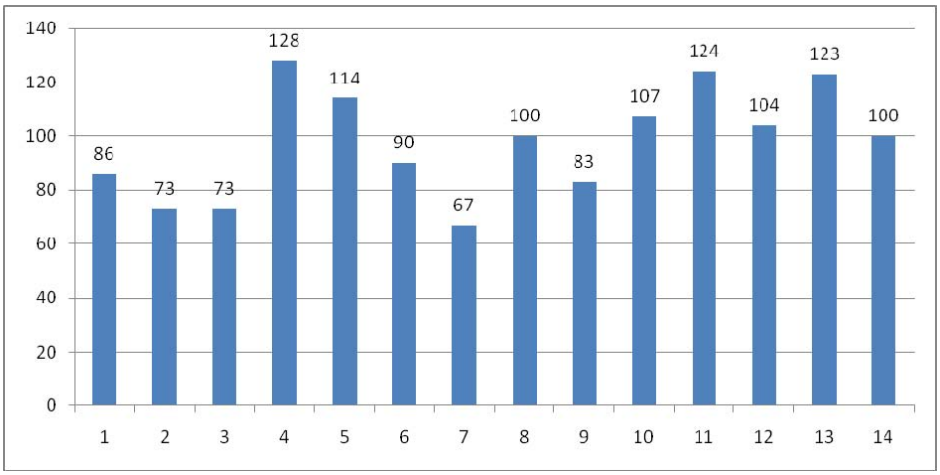
สรุปผลการทดลอง

จากการทดสอบพบว่าความเข้มข้นของ Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 1 % มีความ Toxic กับ Cell Keratinocyte น้อยที่สุดเมื่อเทียบกับความเข้มข้นอื่น

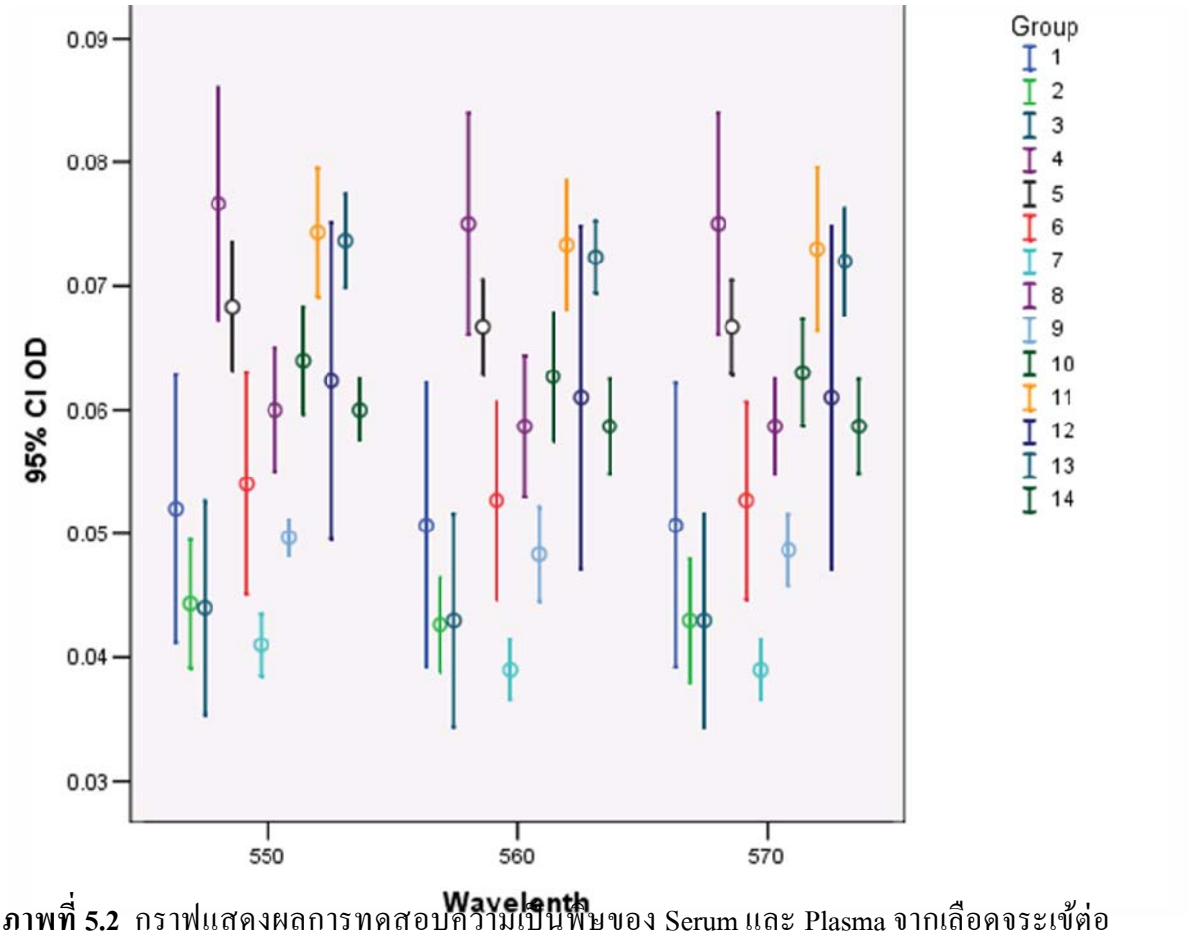
5. การทดสอบหาความเข้มข้นของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ที่เหมาะกับเซลล์ Keratinocyte

ตารางที่ 5 ผลการทดสอบ cytotoxicity test ของ Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 0.50%, 0.10%, 0.05%, 0.025% และ Heparin

	Serum (%)						Plasma %)						Heparin	Control
	10	**1**	**0.5**	**0.1**	**0.05**	**0.025**	**10**	**1**	**0.5**	**0.1**	**0.05**	**0.025**		
	0.057	0.046	0.04	0.075	0.066	0.055	0.042	0.06	0.05	0.063	0.072	0.061	0.072	0.059
	0.049	0.045	0.046	0.074	0.07	0.05	0.041	0.062	0.049	0.063	0.076	0.058	0.074	0.061
	0.05	0.042	0.046	0.081	0.069	0.057	0.04	0.058	0.05	0.066	0.075	0.068	0.075	0.06
	0.056	0.044	0.039	0.074	0.065	0.054	0.04	0.06	0.05	0.062	0.071	0.06	0.071	0.057
	0.048	0.043	0.045	0.072	0.068	0.049	0.039	0.06	0.047	0.061	0.075	0.056	0.073	0.06
	0.048	0.041	0.045	0.079	0.067	0.055	0.038	0.056	0.048	0.065	0.074	0.067	0.073	0.059
	0.056	0.045	0.039	0.074	0.065	0.054	0.04	0.059	0.05	0.062	0.07	0.06	0.07	0.057
	0.048	0.043	0.045	0.072	0.068	0.049	0.039	0.06	0.048	0.062	0.075	0.056	0.073	0.06
	0.048	0.041	0.045	0.079	0.067	0.055	0.038	0.057	0.048	0.065	0.074	0.067	0.073	0.059
รวม	0.46	0.39	0.39	0.68	0.605	0.478	0.357	0.532	0.44	0.569	0.662	0.553	0.654	0.532
%	86	73	73	128	114	90	67	100	83	107	124	104	123	100
หมายเลข	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14



ภาพที่ 5.1 กราฟแสดง %Viable cell เมื่อเทียบกับ Control



ภาพที่ 5.2 กราฟแสดงผลการทดสอบความเป็นพิษของ Serum และ Plasma จากเลือดจระเข้ต่อเซลล์ Keratinocyte

สรุปผลการทดลอง

จากผลการทดสอบ cytotoxicity test โดยวิธี MTT assay โดยใช้เซลล์ Keratinocyte สารสกัดจากเลือดจระเข้โดยใช้ freeze dried serum และ plasma ที่ความเข้มข้น 0.05 % มีความเป็นพิษกับ Keratinocyte น้อยที่สุดโดยเฉลี่ย

จากผลการทดลองรวม Cytotoxicity test จากวิธี MTT assay โดยใช้ Fibroblast และ Keratinocyte โดยรวมพบว่า ทั้งสารสกัดจากเลือดจระเข้จาก Serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 0.05 % มีความเป็นพิษกับ ทั้งเซลล์ Fibroblast และ Keratinocyte น้อยที่สุดโดยเฉลี่ย เราจึงเลือกสารสกัดที่ความเข้มข้นนี้ เพื่อทำการทดสอบผลต่อการหายของแผลในสัตว์ทดลองต่อไป

อนึ่งจากการสังเกตผลการทดลองพบว่า ณ ที่ความเข้มข้นเดียวกันของสารสกัดจาก Serum และPlasma สารสกัดจาก Plasma จะมีค่า Cytotoxicity test ต่ำกว่า Serum เสมอ สิ่งที่แตกต่างกันระหว่าง Serum และ Plasma extract คือ Blood anticoagulant ซึ่ง Specimen ที่เราใช้ในการทดลองนี้

คือ Heparin ซึ่ง Plasma ที่ใช้ในการทดลองนี้มีการเติมสาร Heparin เพื่อใช้เป็น Blood anticoagulant จากการ Review literatures พบว่าสาร Heparin เองมีผลบวกต่อ Cell proliferation และ Would healing *References: Heparin effect on wound healing* [1)-6)]

ดังนั้นเราจึงตั้งสมมุติฐานจากผลการทดลองที่ได้ว่า การที่สารสกัดจาก Plasma มี Positive effect ต่อ Cell proliferation ทั้งจาก Fibroblasts และ Kertinocytes อาจเป็นผลเนื่องมาจาก Heparin เอง ไม่ได้เป็นผลที่มา จากสารสกัดจากเลือดจระเข้ เราจึงทำการทดลองโดยใช้ Heparin เป็นตัวแปร เพื่อใช้ทดสอบ ใน MTT (vitro test) และ อัตราการหายของแผลในสัตว์ทดลอง Animal healing rate (vivo test) โดยใช้ความเข้มข้นของ Heparin ที่ 0.2 % ทั้งในการทดสอบ Cytotoxicity test และความเข้มข้นในครีมเพื่อใช้ในการทดสอบเพื่อทดสอบอัตราการหายของแผลในหนูทดลอง ซึ่งเป็นความเข้มข้นเดียวกันกับ Heparin ที่ใช้ใน Plasma ที่ได้มา

ผลเบื้องต้นในการทดสอบ ใน MTT (vitro test) ตาราง ที่ 5 และ ภาพที่ 5.2 แสดงให้เห็นว่า Heparin เองมีผลต่อ Cell proliferation ใกล้เคียงกับสารสกัดจาก Plasma และดีเหนือกว่าสารสกัดจาก Serum เทียบ ณ ความเข้มข้นของ Heparin 0.2% และ Freeze dried serum และ Plasma ที่ความเข้มข้น 0.05% (Column ที่ 13, 11 และ 5 ตามลำดับ)

ดังนั้นจากการทดลองใน Vitro test เบื้องต้นสรุปได้ว่า

1. ทั้ง Freeze dried serum และ Plasma ที่ความเข้มข้นที่เหมาะสมที่สุด ซึ่งเรา Titrate ได้ที่ 0.05% ไม่ทำให้ เกิด Cytotoxic ต่อทั้ง Fibroblast และ Keratinocyte โดย MTT assay

2. สารสกัดโดยวิธี Plasma มีผลโดยการ Test cytotoxicity เหนือกว่า สารสกัด serum

3. ทดสอบโดยใช้ Heparin 0.2% เพื่อทดสอบว่า ผลที่ทำให้ Plasma ดีเหนือกว่า Serum เนื่องมาจาก Plasma เอง หรือ Heparin ผลคือ Heparin 0.2% มีผลต่อเซลล์ใกล้เคียงกับ Plasma ที่ความเข้มข้น 0.05 % และเหนือกว่า Serum ที่ความเข้มข้น 0.05%

4. ผลที่ได้จาก Plasma ที่ความเข้มข้น 0.05% น่าจะเป็นผลจาก ตัว Heparin ที่เติมลงไปเพื่อเป็นAnti-coagulant มากกว่า

อย่างไรก็ตาม เพื่อสรุปผลใน vivo ใน Animal wound healing model ประกอบกันไปด้วย เราจึงดำเนินการทำการทดลองเพื่อ Observe ผลต่อ Wound healing โดยการใช้สารสกัดจาก Serum, Plasma และ Heparin โดยดูว่าเมื่อเทียบกับยาที่ใช้เป็น Standard treatment ต่อ Wound healing: zinc paste สารสกัดจากเลือดจระเข้ (ทั้ง Serum และ Plasma) และ Hparin ผลจะเป็นเช่นไร

References: Heparin effect on wound healing [1)-6)]

1) The effect of prophylactic dose of a low molecular weight heparin on skin wound healing of rats. Oken OF, Yildirim AO, Gulcek M, Unal VS, Karakuyu A, Ozlu K, Ucaner A. *Acta Cir. Bras*. 2009 Nov-Dec; 24(6):471-5.

2) Authors' response to 'Comments on the use of bemiparin in diabetic foot ulcers'. Rullan M, Cerdà L, Frontera G, Masmiquel L, Llobera *J. Diabet. Med*. 2009 Mar; 26(3):313-4.

3) Does low molecular weight heparin impair anastomotic wound healing? Ergul E, Ozgun YM, Kiyak G, Barit Ozgun G, Korukluoglu B, Kusdemir A. *J. Gastrointest. Surg*. 2009 Apr; 13(4):798-803. Epub 2008 Dec 13.

4) Low molecular weight heparin impairs tendon repair. Virchenko O, Aspenberg P, Lindahl TL. *J. Bone Joint Surg. Br*. 2008 Mar; 90(3):388-92.

5) Heparin-binding epidermal growth factor and Src family kinases in proliferation of renal epithelial cells. Zhuang S, Kinsey GR, Rasbach K, Schnellmann RG. *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2008 Mar; 294 (3): F459-68. Epub 2008 Jan 2.

6) Effect of heparin on production of basic fibroblast growth factor and transforming growth factor-beta1 by human normal skin and hyperplastic scar fibroblasts. Fan SQ, Qin LY, Cai JL, Zhu GY, Bin X, Yan HS. *J. Burn Care Res*. 2007 Sep-Oct; 28(5): 734-41.

II. <u>การทดลอง Animal wound healing model</u>

แบ่งการทดลองเป็น 4 ตอน

1. Zinc paste vs. Cream base เพื่อทดสอบอัตราการหายของแผลระหว่าง zinc paste เทียบกับ cream base

2. Zinc paste vs. Heparin in cream base เพื่อทดสอบอัตราการหายของแผลระหว่าง zinc paste เทียบกับ heparin in cream base

3. Zinc paste vs. Serum in cream base เพื่อทดสอบอัตราการหายของแผลระหว่าง zinc paste เทียบกับ serum in cream base

4. Zinc paste vs. Plasma in cream base เพื่อทดสอบอัตราการหายของแผลระหว่าง zinc paste เทียบกับ plasma in cream base

ผลการทดสอบการหายของแผลโดย Balb C mice model

ภาพขั้นตอนการทำให้หนู Balb C mice มีแผลทุกชั้น (Four full-thickness) ขนาดเส้นผ่านศูนย์กลาง 1x1 cm^2

1. โกนขนหนูบริเวณที่ทำแผล

2. วัดขนาดแผลและตัดผิวหนังออก full thickness excision ถึงชั้น muscle fascia

3. ทาครีม ด้านซ้ายเป็นครีมที่ผสมสารสกัดที่ต้องการจะทดสอบ ส่วนด้านขวาเป็น control ด้วย zinc pasteและปิดแผล โดยจะเปิดทำแผลอีก ครั้งโดยประมาณ 2 ครั้งต่อสัปดาห์ ที่ day 3, 5, 7, 9, 11 และ 14 ทำการวัดขนาดทุกครั้งที่ทำแผล และบันทึกการเปลี่ยนแปลงอื่นๆ ถ้ามีเช่น ลักษณะของขน ผิวที่ขึ้นมาใหม่ ฯลฯ

Zinc paste vs. Cream base:

โดยทา ครีม **Zinc** paste ที่ข้างขวาและทาครีมเบสที่ข้างซ้ายของ Balb C mice

ตารางที่ 6 ผลการทดสอบการหายของแผล Balb C mice model ระหว่างครีม Zinc เทียบกับครีมเบส

Day	**No.1**		**No.2**		No.3		No.4		**No.5**	
	ครีมเบส	**Zinc paste**	**ครีมเบส**	**Zinc paste**	**ครีมเบส**	**Zinc paste**	**ครีมเบส**	**Zinc paste**	**ครีมเบส**	**Zinc paste**
0	23-ธ.ค.-52						24-ธ.ค.-52			
2	10/12/10/12	10/12/10/12	10/10/9/10	10/8/9/10	8/6/7/7	9/10/9/9				
6	10/10/10/10	9/10/9/10	8/8/8/8	7/7/7/7	5/5/5/5	8/9/8/8	8/5/8/5	7/9/7/9	3/4/3/4	2/3/2/3
12	5/5/5/5	4/3/4/3	4/3/4/3	2/2/2/2	5/4/5/4	4/3/4/3	แผลหายแต่ตรงแผลที่ทาครีมเบสขนร่วงเป็นวงกว้าง		แผลหายแต่ตรงแผลที่ทา ครีมเบสขนร่วงเป็นวง กว้าง	
หยุดการทำแผลประมาณ 2 อาทิตย์ เนื่องจากแผลหาย และครีม Zinc paste ให้ผลดีกว่า ครีมเบส										
19	ขนร่วงเล็กน้อย		ขนร่วงเป็นวงกว้าง	ขนร่วงเล็กน้อย	ขนร่วงเล็กน้อย		ขนร่วงเล็กน้อย		ขนร่วงเป็นวงกว้าง	
27	ขนขึ้นเต็มหมดแล้วเท่ากันทั้งข้างที่ทาครีมเบสและข้างที่ทาครีม Zinc paste									

Zinc paste vs. Cream 0.2% heparin:

โดยทา ครีม Zinc paste ที่ข้างขวาและทาครีมเฮพารินเบสที่ข้างซ้ายของ Balb C mice

ตารางที่ 7 ผลการทดสอบการหายของแผล Balb C mice model ระหว่างครีม Zinc เทียบกับครีมเฮพาริน

Day	**No.16**		**No.17**		**No.18**		**No.19**		**No.20**	
	ครีม เฮพาริน	**Zinc paste**	**ครีม เฮพาริน**	**Zinc paste**	**ครีม เฮพาริน**	**Zinc paste**	**ครีม เฮพาริน**	**Zinc paste**	**ครีม เฮพาริน**	**Zinc paste**
0	26-ม.ค.-53									
3	10/10/10/10	10/10/10/10	9/8/9/8	10/9/10/9	10/10/10/10	10/9/10/9	10/10/10/10	10/10/10/10	10/10/10/10	10/7/10/7
7	8/8/8/8	8/7/8/7	9/7/9/7	9/8/9/8	9/8/9/8	9/8/9/8	8/7/8/7	9/6/9/6	10/7/10/7	10/4/10/4
10	4/3/4/3	3/3/3/3	5/4/5/4	5/4/5/4	3/2/3/2	4/3/4/3	3/3/3/3	4/3/4/3	6/3/6/3	4/3/4/3
14	แผลหายแต่ขนบริเวณที่ทาครีมเฮพารินร่วงมากกว่าบริเวณที่ทาครีม Zinc									
21	ขนขึ้นเต็มแล้วตั้ง 2 ข้าง									

Zinc paste vs. Cream 0.05% plasma:

โดยทา ครีม Zinc paste ที่ข้างขวาและทาครีมพลาสมา ที่ข้างซ้ายของ Balb C mice

ตางรางที่ 8 ผลการหายของแผล Balb C mice model ระหว่างครีม Zinc เทียบกับ ครีมพลาสมา

Day	No.21		No.22		No.23		No.24		No.25	
	ครีมพลาสมา	Zinc paste	ครีมพลาสมา	Zinc paste	ครีมพลาสมา	Zinc paste	ครีมพลาสมา	Zinc paste	ครีมพลาสมา	Zinc paste
0	8-ก.พ.-53									
4	8/8/8/8	10/7/10/7	10/9/10/9	10/9/10/9	10/9/10/9	9/8/9/8	9/8/9/8	10/9/10/9	10/10/10/10	10/8/10/8
8	5/4/5/4	5/5/5/5	10/9/10/9	10/7/10/7	7/6/7/6	5/5/5/5	6/5/6/5	8/5/8/5	9/8/9/8	10/4/10/4
11	แผลหาย	5/4/5/4	5/5/5/5	7/4/7/4	1/1/1/1	2/1/2/1	2/2/2/2	6/2/6/2	2/2/2/2	2/1/2/1
14	แผลหาย	1/1/1/1	แผลหายแต่บริเวณที่ทาครีมพลาสมาขนร่วงมากกว่าบริเวณที่ทาครีม Zinc							

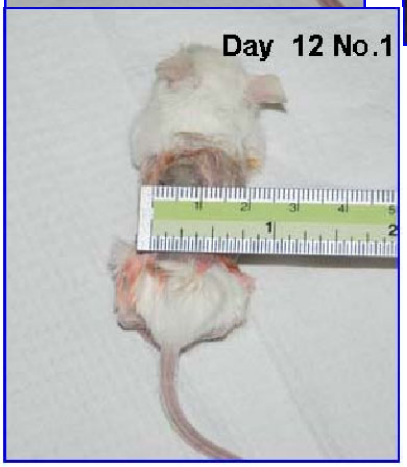
Zinc paste vs. Cream 0.05% Serum:

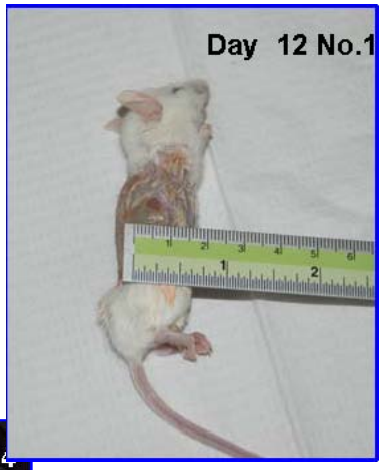
โดยทา ครีม **Zinc** paste ที่ข้างขวาและทาครีมซีรัม ที่ข้างซ้ายของ Balb C mice

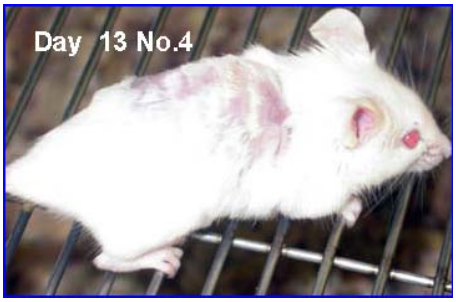
ตางรางที่ 8 ผลการทดสอบการหายของแผล Balb C mice model ระหว่างครีม Zinc เทียบกับ ครีมซีรัม

Day	No.26		No.27		No.28		No.29		No.30	
	ครีมซีรัม	Zinc paste	ครีมซีรัม	Zinc paste	ครีมซีรัม	Zinc paste	ครีมซีรัม	Zinc paste	ครีมซีรัม	Zinc paste
0	8-ก.พ.-53									
4	10/9/10/9	8/6/8/6	10/10/10/10	10/10/10/10	10/8/10/8	10/10/10/10	10/8/10/8	10/9/10/9	10/4/10/4	10/8/10/8
8	7/5/7/5	6/3/6/3	8/6/8/6	7/7/7/7	5/5/5/5	10/4/10/4	9/8/9/8	9/8/9/8	5/4/5/4	7/5/7/5
11	1/1/1/1	2/1/2/1	แผลหาย		1/2/1/2	1/1/1/1	4/4/4/4	2/1/2/1	แผลหาย	3/1/3/1
14	แผลหาย		แผลหาย		1/2/1/2	แผลหาย	แผลหาย		แผลหาย	

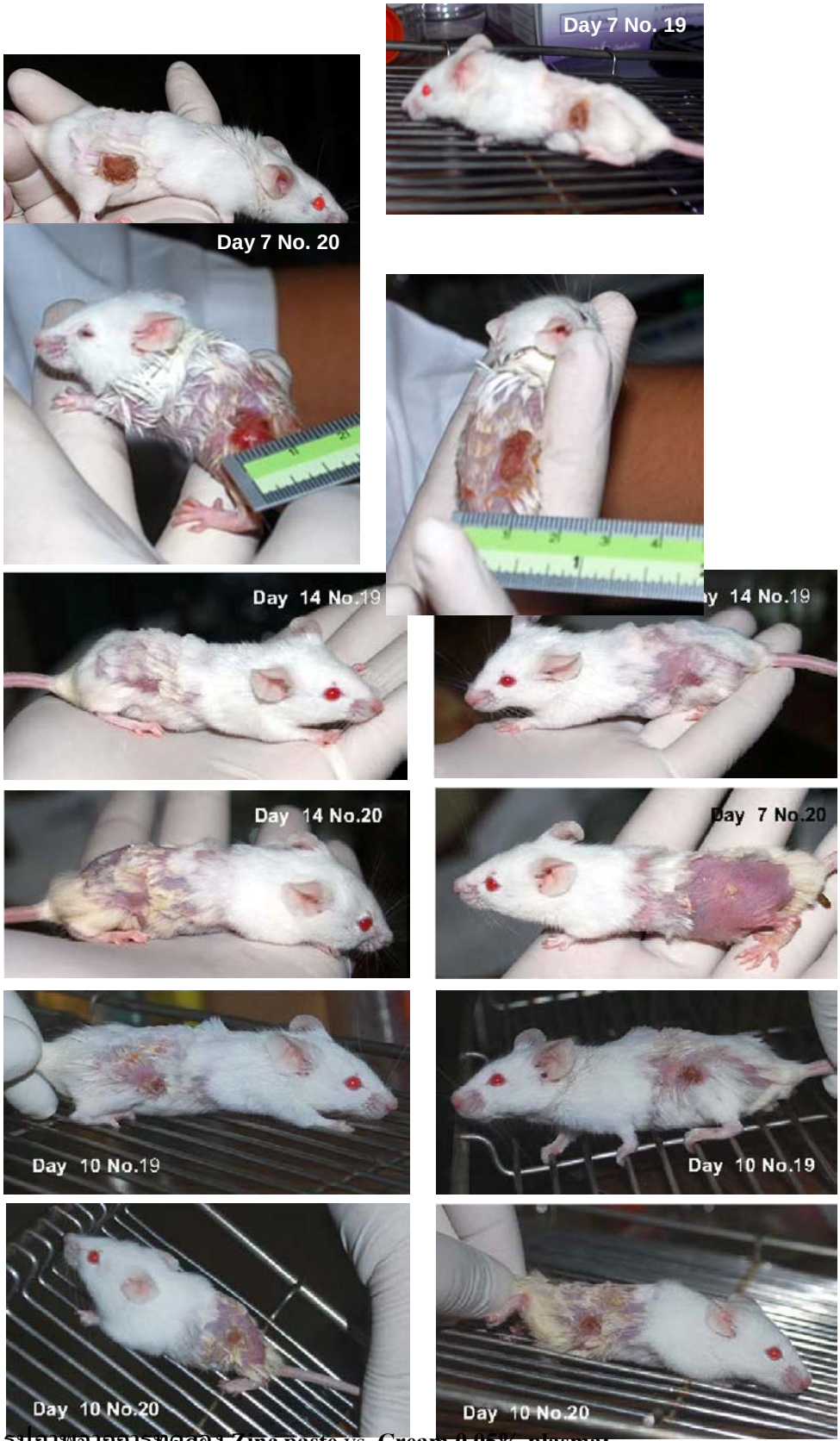
รูปภาพจากการทดลอง Zinc paste vs. **Cream base:**



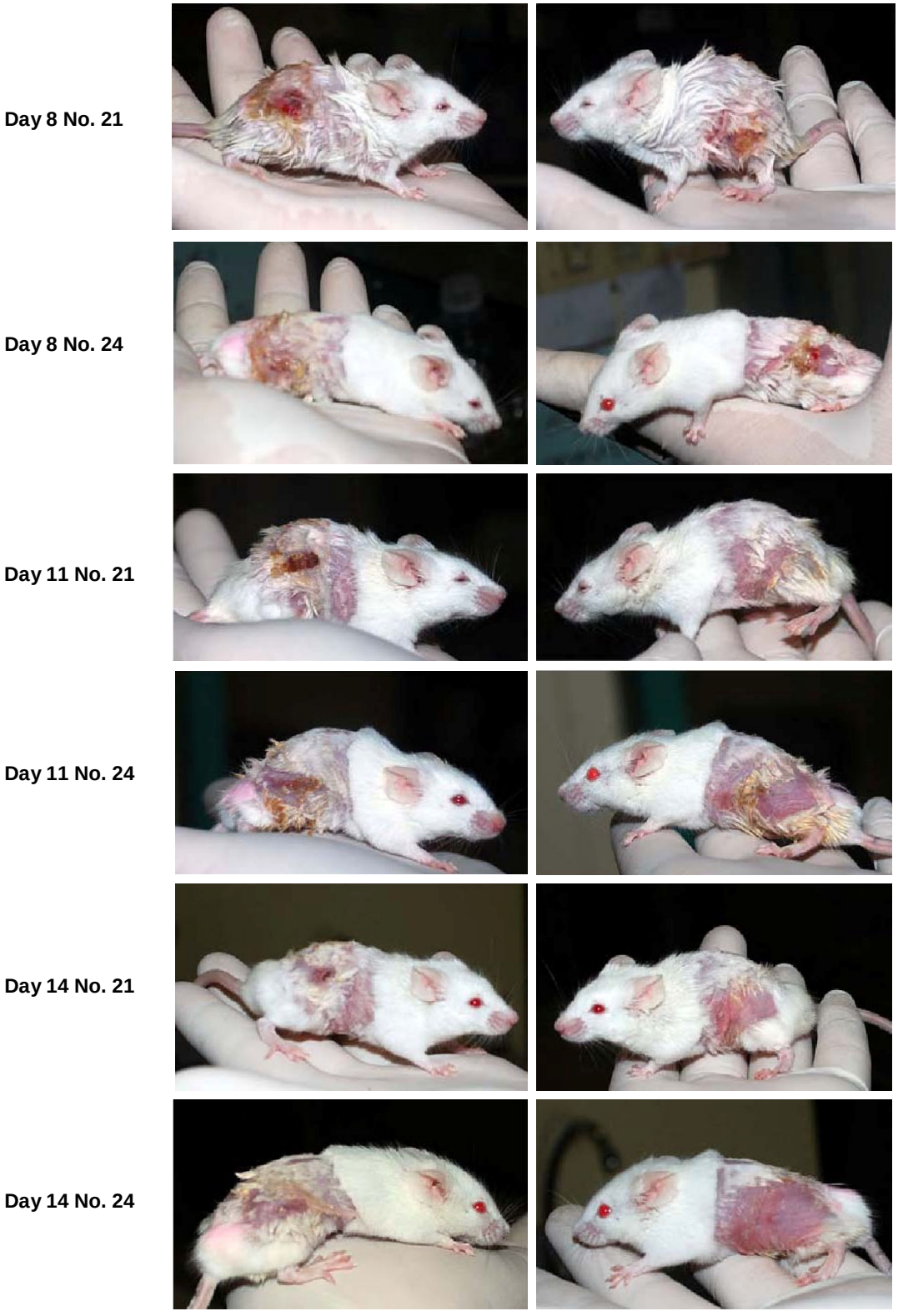




รูปภาพจากการทดลอง Zinc paste vs. Cream 0.2% heparin:



รูปภาพจากการทดลอง Zinc paste vs. **Cream 0.05% plasma:**



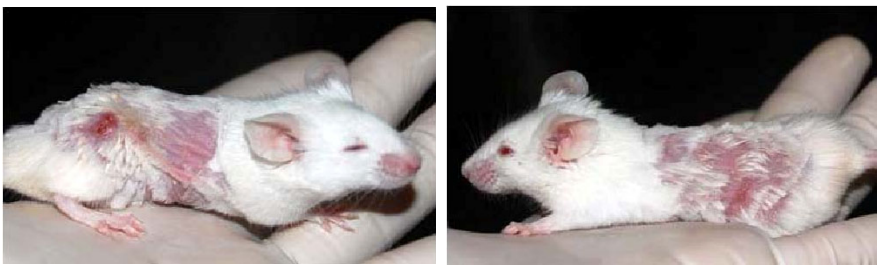
รูปภาพจากการทดลอง Zinc paste vs. **Cream 0.05% Serum:**

Day 8 No. 29

Day 8 No. 30

Day 11 No. 29

Day 11 No. 30



Day 14 No. 29

Day 14 No. 30

สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ

Vitro test

1. จากทดสอบสารสกัดจากเลือดจระเข้ 2 ชนิด คือ Serum และ Plasma (ใช้ Heparin เป็น Anti-coagulant) พบว่าเลือดจระเข้ทั้ง Serum และ plasma (ใช้ Heparin เป็น Anti-coagulant) ไม่มีความ Toxic กับ Cells ทดสอบโดยวิธี MTT assay โดยเซลล์ Keratinocyte และ Fibroblast เพื่อเปรียบเทียบการตอบสนองจากชั้นหนังกำพร้า และหนังแท้

2. จากการทดลองเพื่อหาความเข้มข้นของสารสกัดจากเลือดจระเข้ทั้ง Serum และ Plasma (ใช้ Heparin เป็น Anti-coagulant) เพื่อให้ได้สารสกัดที่มี Cytotoxic ต่อเซลล์ Fibroblast และ Keratinocyte น้อยที่สุดจาก 4 ความเข้มข้น; 100, 50, 25 และ 10 µg/ml, พบว่าที่ความเข้มข้นที่ 0.5% เป็นความเข้มข้นที่ทำให้สารสกัดที่ได้เป็นพิษกับเซลล์น้อยที่สุดของทั้ง Serum และ Plasma (ใช้ Heparin เป็น Anti-coagulant) แต่สารสกัดจาก Plasma ให้ผลดีกว่าสารสกัดจาก Serum สิ่งที่ต่างกันระหว่าง สารสกัดจากเลือดจระเข้ทั้ง Serum และ Plasma คือ Plasma ใช้ Heparin เป็น Anti-coagulant Review literature เองพบว่า Heparin มีผลต่อการสมานแผล โดยสามารถเร่งการปิดของแผลได้ เราจึงทำการทดสอบโดยใช้ Control เพิ่มโดยสาร Heparin 0.2% ตามความเข้มข้นมาตรฐานของ Heparin ที่ใช้ป้องกันการแข็งตัวของ Plasma จาก MTT assay พบว่า มีผล Positive effect ต่อการเจริญของเซลล์ Keratinocyte และ Fibroblast ใกล้เคียงกับระดับที่ Plasma ให้ผลดีกว่า Serum ในความเข้มข้นเดียวกัน เราจึงอนุมานว่า ผลที่ดีของ Plasma ที่เหนือกว่า Serum เป็นผลจาก Heparin มากกว่าผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้เอง อย่างไรก็ดีเพื่อทดสอบผลการทดลองใน vivo; Animal experiment เราตัดสินใจทำการทดสอบผลต่อการสมานแผลของสารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Serum, Plasma และ Heparin เปล่าๆ เทียบกับ Standard control คือ Zinc paste ด้วย

Vivo test

3. เราจึงใช้สารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Serum, Plasma และ Heparin ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.05% และ 0.2% มาทำการทดลองในสัตว์ทดลอง เพื่อวิเคราะห์ผล *in vivo* model โดยทำครีมสำหรับทำแผล Wound dressing เพื่อเทียบกับ Cream base และ Zinc paste (Standard control) ผลที่ได้ คือ

3.1 Zinc paste มีผลทำให้อัตราการหายของแผลเร็วกว่า Cream base ในหนูทุกตัว (5 ตัว) และสังเกตว่าผิวด้านที่ทา Cream base มีขนร่วงเป็นวงกว้างตามบริเวณที่ทาครีม แต่ไม่เกี่ยวกับอัตราการหายของแผล สันนิษฐานว่าเกิดจากคุณภาพของ Cream base มากกว่า

3.2 ครีมที่ผลิตจากสารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Serum ที่ความเข้มข้น 0.05% ไม่ได้มีผลเร่งอัตราการหายของแผลเร็วกว่า Zinc paste โดย Zinc paste ให้ผลดีกว่า 3 จาก 5 ตัว (ตัวที่ 26,

27 และ 30) ผลเท่ากัน 1 ตัว จาก 5 ตัว (ตัวที่ 29) ผลสารสกัดจาก Serum ดีกว่า Zinc paste 1 จาก 5 ตัว (ตัวที่ 28) โดยสรุป Cream base + สารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Serum ที่ความเข้มข้น 0.05% ไม่ได้ทำให้ผลการหายของแผลดีกว่า Zinc paste

3.3 ครีมที่ผลิตจากสารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Plasma ที่ความเข้มข้น 0.05% ไม่ได้มีผลเร่งอัตราการหายของแผลเร็วกว่า Zinc paste โดย Zinc paste ให้ผลดีกว่า 1 จาก 5 ตัว (ตัวที่ 23) ผลเท่ากัน 2 ตัวจาก 5 ตัว (ตัวที่ 21 และ 22) ผลสารสกัดจาก Plasma ดีกว่า zinc paste 2 จาก 5 ตัว (ตัวที่ 24 และ 25) โดยสรุป Cream base + สารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Plasma ที่ความเข้มข้น 0.05% ไม่ได้ทำให้ผลการหายของแผลดีกว่า Zinc paste

3.4 ครีมที่ผลิตจาก Heparin ที่ความเข้มข้น 0.2% ไม่ได้มีผลเร่งอัตราการหายของแผลเร็วกว่า Zinc paste โดย Heparin ให้ผลเท่ากับ Zinc paste 4 ตัว จาก 5 ตัว (ตัวที่ 16, 17, 18 และ 20) ผลสารสกัดจาก Heparin ดีกว่า Zinc paste 1 จาก 5 ตัว (ตัวที่ 19) โดยสรุป Cream base + สารสกัดผสม Heparin ที่ความเข้มข้น 0.2% ไม่ได้ทำให้ผลการหายของแผลดีกว่า Zinc paste

จากผลการทดลองทั้งหมด แสดงให้เห็นว่า สารสกัดจากเลือดจระเข้โดยวิธี Serum, Plasma และ Heparin ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.05% และ 0.2% ไม่มีผลทำให้เกิดการเป็นพิษต่อเซลล์ผิวหนังทั้งเซลล์จาก ชั้นหนังกำพร้าและหนังแท้ (Keratonocyte and Fibroblast) แต่ Positive effect ที่เกิดในผลจาก Plasma extraction จาก MTT assay น่าจะเกิดจาก Heparin เองมากกว่าสารสกัด และผลการทดลองการสมานแผลในสัตว์ทดลองทั้งสามสารสกัดเลือดจระเข้โดยวิธี Serum, Plasma และ Heparin ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.05% และ 0.2% ก็ไม่ได้ให้ผลดีกว่ายามาตรฐานที่ใช้ทำแผลในปัจจุบัน (Zinc paste) อย่างมีนัยสำคัญ

อนึ่งการใช้สารสกัดจากสัตว์ที่จะพัฒนามาเป็นผลิตภัณฑ์ทางคลินิกควรจะต้องมีการตรวจสอบการปนเปื้อนทางชีวภาพ (Biological contamination) ก่อน แต่สำหรับเลือดจระเข้ที่นำมาทดสอบยังไม่มีผลการทดสอบดังกล่าว จึงทำให้เป็นข้อคัดค้านในการประยุกต์ใช้เป็น End product ต่อไป อีกทั้งผลการทดสอบต่อ Wound healing effect ของสารสกัดจากจระเข้โดยวิธี Serum, Plasma และ Heparin ที่ความเข้มข้น 0.05%, 0.05% และ 0.2% ไม่ได้มีผลการรักษาที่เหนือกว่า Zinc paste ซึ่งเป็น Standard wound dressing ที่ปลอดภัย และใช้กันอย่างแพร่หลายในปัจจุบันแต่อย่างใด

บรรณานุกรม

1. Brem, H., Tomic-Canic, M. 2007. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J. Clin. Invest*. 117, 1219-1222. Review.

2. Werner, S., Krieg, T., Smola, H. 2007. Keratinocyte-fibroblast interactions in wound healing. *J. Invest. Dermatol*. 127, 998-1008. Review.

3. Raghow R. 1994. The role of extracellular matrix in postinflammatory wound healing and fibrosis. *FASEB J.* 8, 823-831. Review.

4. Kiritsy, C. P., Lynch, A. B., Lynch, S. E. 1993. Role of growth factors in cutaneous wound healing: a review. *Crit. Rev. Oral Biol. Med*. 4, 729-760. Review.

5. Rodrigues, L. M., Roberto, M. A. 2006. Characterization strategies for the functional assessment of the cutaneous lesion. *Burns* 32, 797-801. Epub 2006 Sep 26. Review.

6. Mahaffey, P. J. 2006. Something old, something new in wound dressings. *BMJ.* 332, 916.

7. Enoch, S., Grey, J. E., Harding, K. G. 2006. ABC of wound healing. Non-surgical and drug treatments. *BMJ.* 332, 900-903. Review.

8. Lopez, P., Dachs, R. 2007. Effectiveness of dressings for healing venous leg ulcers. *Am. Fam. Physician*. 75, 649-650. Review.

9. Jones, V., Grey, J. E., Harding, K. G. 2006. Wound dressings. *BMJ*. 332, 777-780. Review

10. Merchant, M., Britton, A. 2006. Characterization of serum complement activity of saltwater (*Crocodylus porosus*) and freshwater (*Crocodylus johnstoni*) crocodiles. *Comp. Biochem. Physiol. A Mol Integr Physiol.* 143, 488-493. Epub 2006 Feb 17.

11. Merchant, M. E., Verret, B., Elsey, R. M. 2005. Role of divalent metal ions in serum complement activity of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol B Biochem Mol Biol.* 141, 289-293.

12. Merchant, M. E., Roche, C. M., Thibodeaux, D., Elsey, R. M. 2005. Identification of alternative pathway serum complement activity in the blood of the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Comp. Biochem. Physiol. B Biochem. Mol. Biol*. 141, 281-288.

13. Merchant, M. E., Pallansch, M., Paulman, R. L., Wells, J. B., Nalca, A., Ptak, R. 2005. Antiviral activity of serum from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Antiviral Res*. 66, 35-38.

14. Merchant, M. E., Leger, N., Jerkins, E., Mills, K., Pallansch, M.B., Paulman, R. L., Ptak, R. G. 2006. Broad spectrum antimicrobial activity of leukocyte extracts from the American alligator (*Alligator mississippiensis*). *Vet. Immunol. Immunopathol*. 110, 221-8. Epub 2005 Nov 18.

15. Valbonesi, M. 2006. Fibrin glues of human origin. Best. Pract. Res. *Clin. Haematol*. 19, 191-203. Review.

16. Wang, L. Z., Gorlin, J., Michaud, S. E, Janmey, P. A., Goddeau, R. P., Kuuse, R., Uibo, R., Adams, D., Sawyer, E. S. 2000. Purification of salmon clotting factors and their use as tissue sealants. *Thromb. Res*. 100, 537-548.

17. Burd, A., Kwok, C. H., Hung, S. C., Chan, H. S., Gu, H., Lam, W. K., Huang, L. 2007. A comparative study of the cytotoxicity of silver-based dressings in monolayer cell, tissue explant, and animal models. Wound Repair Regen. 15, 94-104.