



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนจากส่วนหัวหน้างาทางจระเข้
ต่อการหายของแผลในช่องปากในสภาวะเป็นโรคเบาหวาน
และกลไกที่เกี่ยวข้องในเซลล์บุผิวช่องปาก

Study of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on diabetic oral wound healing
and possible mechanism in oral epithelial cell

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ทญ.ดร.สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ
ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย

อ.ทญ.ดร.นวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์
ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ศ.ทพ.ดร.พสุธา ธีรบุญกิจไพศาล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557



รายงานการวิจัย

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนจากส่วนหัวหน้างาทางจระเข้
ต่อการหายของแผลในช่องปากในสภาวะเป็นโรคเบาหวาน
และกลไกที่เกี่ยวข้องในเซลล์บุผิวช่องปาก

Study of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on diabetic oral wound healing
and possible mechanism in oral epithelial cell

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ทญ.ดร.สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ
ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย

อ.ทญ.ดร.นวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์
ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ศ.ทพ.ดร.พสุธา ธีญะกิจไพศาล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

กิตติกรรมประกาศ

โครงการวิจัยนี้ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ ประจำปีงบประมาณ 2555 คณะผู้วิจัยขอกราบขอบพระคุณสำนักคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ และคณะกรรมการผู้ทรงคุณวุฒิทุกท่านอย่างสูงไว้ ณ ที่นี้

ขอขอบพระคุณ ศ.(พิเศษ) ทญ.ดร.วิสาขะ ลีม่วงศ์ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร รศ.ทญ.ดอลลี เมธาธราธิป คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ศ.ทพ.ดร.สุทธิชัย กฤษณะประกรกิจ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยเชียงใหม่ รศ.ดร.พลกฤษณ์ แสงวนิช คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ผศ.ดร.วันเพ็ญ เตชะบุญเกียรติ คณะวิทยาศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และรศ.สพ.ดร.วิจิตร บรรณาราช คณะสัตวแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย ที่ให้คำแนะนำในการทำวิจัยให้สำเร็จลุล่วงไปด้วยดี

คณะผู้วิจัยขอขอบคุณหน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรและสารจากธรรมชาติเพื่อการประยุกต์ใช้ในทางทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย และศูนย์วิจัยชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร และนักวิทยาศาสตร์ทุกท่านที่ให้ความช่วยเหลือ และอำนวยความสะดวกในการดำเนินการวิจัยตลอดโครงการ

นอกจากนี้ยังขอขอบคุณศูนย์สัตว์ทดลองเพื่อการวิจัย มหาวิทยาลัยนเรศวร ที่อำนวยความสะดวกและให้คำแนะนำที่เป็นประโยชน์ในการดำเนินการวิจัย

คณะผู้วิจัย

ชื่อโครงการ การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนจากส่วนฐานว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลในช่องปาก ในสภาวะเป็นโรคเบาหวาน และกลไกที่เกี่ยวข้องในเซลล์บุผิวช่องปาก

Study of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on diabetic oral wound healing and possible mechanism in oral epithelial cell

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี 8 เดือน ตั้งแต่ 31 สิงหาคม 2555 ถึง 30 เมษายน 2557

คณะผู้วิจัย 1. อ.ทญ.ดร. สุวิมล เจตนาเขียวชาญกิจ

ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร

- ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066
2. อ.ทญ.ดร. นวกรณ์ จิตติกรมย์ศักดิ์
ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066
3. ศ.ทพ.ดร. พสุธา ธีรณุกิจไพศาล
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 0-2218-8885

บทคัดย่อ

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนฐานว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองในสภาวะเบาหวาน และกลไกที่เป็นได้ในเซลล์บุผิวช่องปาก โดยหนูจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน และสร้างบาดแผลจำลองบริเวณกึ่งกลางเพดานปากด้วยการทำฟันซีไบออปซี่ แล้วทาสารต่างๆ (สารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 สารคาร์โบพอลเปล่าน้ำเกลือปราศจากเชื้อ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์) ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการวัดขนาดบาดแผล ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และทำการศึกษาผลของความคงตัวของสารอะซีแมนแนนเมื่อเก็บรักษาที่สภาวะเร่งเป็นเวลา 3 และ 6 เดือนด้วยการสังเกตสเปกตรัม ^1H NMR นอกจากนี้ทำการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่างๆ (0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์โดยเทคนิคการชุบพื้นงานเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อสร้างบาดแผลจำลอง ถ่ายภาพเซลล์

ที่เวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมง นำมาคำนวณร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ ศึกษาผลต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ โดยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชั่น ของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ไฟแลคกริน และ เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีขนาดแผลเล็กกว่ากลุ่ม ที่ทาสารคาร์โบพอลเปล่า น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) และมีการสร้างชั้นเยื่อผิวใหม่ปกปิดบาดแผลเร็วกว่ากลุ่มทดสอบอื่น นอกจากนี้บาดแผลที่ได้รับสารอะซีแมนแนนทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือปราศจากเชื้อ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) เมื่อเก็บสารอะซีแมนแนนในสภาวะเร่งเป็นเวลา 3 และ 6 เดือน พบว่า ยังคงมีสเปกตรัมของอะซีแมนแนนสอดคล้องกับสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่ จากการศึกษาในเซลล์บุ ผิวช่องปากพบว่า เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เซลล์มีการเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) นอกจากนี้เมื่อ เซลล์ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่า ลักษณะของเซลล์เปลี่ยนไปสู่ลักษณะการเปลี่ยนสภาพโดย สูญเสียลักษณะหลายเหลี่ยมไป และเซลล์กลมใหญ่ขึ้น และเซลล์ที่ได้รับสารความเข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนทรานกลูตามิเนส1 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่าง มีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า สารอะซีแมนแนนไม่มีฤทธิ์โดยตรง ในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans* จึงสรุปได้ว่า สารอะซีแมนแนนมีผลกระตุ้นการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน โดยมีกลไกที่เป็นไปได้อีกคือ การกระตุ้นการเคลื่อนที่ และเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก โดยไม่มีฤทธิ์การต้านจุลชีพ และสารอะซีแมนแนนยังคงอยู่ภายหลังเก็บในสภาวะเร่งเป็นเวลา 6 เดือน

คำสำคัญ ว่านหางจระเข้ สารอะซีแมนแนน หนูทดลอง แผลในช่องปาก เบาหวาน เซลล์บุผิวช่องปาก การเคลื่อนที่ของเซลล์ การเปลี่ยนสภาพ ความคงตัว ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Abstract

Oral ulcer is the most common lesion in the oral cavity, leading to the pain and reducing the quality of life especially in the patient with systemic disease, such as diabetes. As a response to injury, oral epithelial cells migrate and differentiate to restore the tissue integrity. The objectives of this study were to evaluate the effect of acemannan on oral wound healing in diabetic rat and possible mechanisms in oral epithelial cell. A wound was made on the midline of hard palate of diabetes rat using a punch biopsy. The animals were treated with various agents (0.5% acemannan, 1% acemannan, plain carbopol, normal saline, and triamcinolone acetone) once a day for 7 days. After 7 days, the wound area and the histopathologic features were evaluated. The stability of acemannan in accelerated storage condition was observed by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. In addition, the effect of acemannan (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml) on human oral epithelial cell migration was studied by *in vitro* scratch wound assay. The pictures of cells were taken at 0, 4 and 8 hours and then the percentage of cell migration was calculated. The effect of acemannan on oral epithelial cell differentiation was evaluated by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of keratin K5, keratin K1, filaggrin, transglutaminase1 at

24 and 48 hours. The antimicrobial activity of acemannan was performed using disk diffusion assay. From this study, the wound area of animals receiving 0.5% acemannan was significantly smaller than that of the plain carbopol, normal saline and triamcinolone acetonide groups ($p < 0.05$, $n = 5$). In addition, the 0.5% acemannan-treated wound has more re-epithelialization than the others groups. The collagen of the acemannan-treated wound was significantly higher than the normal saline-treated wound ($p < 0.05$, $n = 5$). After incubated in the accelerated condition for 3 and 6 months, the NMR spectrum of acemannan was consistent with the fresh one. From oral epithelial cell culture study found that at 8 hours, acemannan (0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml) significantly stimulate cell migration as compared to untreated control group ($p < 0.05$, $n = 3$). After treated with acemannan for 24 and 48 hours, the cell morphology was changed to the differentiated phenotype, lost of polygonal feature with large round shape. From the RT-PCR at 48 hours, acemannan (0.25 and 1 mg/ml) significantly induced the expression of the epithelial late differentiation marker, transglutaminase1, as compared to untreated control group ($p < 0.05$, $n = 3$). Acemannan did not have antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. In the conclusion, acemannan accelerated oral wound healing in diabetes condition by enhancing oral epithelial cell migration and differentiation. Acemannan was stable in the accelerated storage condition for 6 months.

Key words: *Aloe vera*, acemannan, rat, oral ulcer, diabetes, oral epithelial cell, migration, differentiation, stability, antimicrobial activity

สารบัญเรื่อง

	หน้า
กิตติกรรมประกาศ.....	iii
บทคัดย่อ.....	v
สารบัญเรื่อง.....	viii
สารบัญตาราง.....	x
สารบัญภาพ.....	xi
บทนำรวม.....	1
ความสำคัญและที่มาของปัญหา.....	1
วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย.....	1
รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย.....	1
สรุปผลการวิจัย.....	2
ประโยชน์ที่ได้รับ.....	3
หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์.....	3
โครงการย่อยที่ 1.....	4
บทคัดย่อ.....	6
บทนำ.....	8
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	9
วิธีดำเนินการวิจัย.....	11
ผลการวิจัย.....	14
การอภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	26
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	29
บรรณานุกรม.....	30
โครงการย่อยที่ 2.....	36

บทคัดย่อ.....	38
บทนำ.....	40
การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง.....	41
วิธีดำเนินการวิจัย.....	47
ผลการวิจัย.....	51
การอภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย.....	62

สารบัญเรื่อง

	หน้า
สรุปผลการวิจัยและข้อเสนอแนะ.....	65
บรรณานุกรม.....	66
ประวัตินักวิจัย.....	72

สารบัญตาราง

	หน้า
ตารางแสดงลำดับเลขของไพร์เมอร์ของยีนที่ใช้ในการศึกษานี้.....	48

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
โครงการย่อยที่ 1	

1	ผลจากเครื่อง High performance liquid chromatography ของสารอะซีแมนแนน	14
2	สเปกตรัมของสารอะซีแมนแนนจากการวิเคราะห์ด้วย FTIR spectroscopy.....	15
3	FTIR spectrum ของสารอะซีแมนแนนจากรายงานของ McAnalley	15
4	ตัวอย่างแผลบริเวณเพดานปากหนูทดลองที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวาน และทดสอบเป็นเวลา 7 วัน.....	16
5	การวิเคราะห์ขนาดแผลที่ทำด้วยสารทดสอบเป็นเวลา 7 วัน.....	17
6	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทดสอบสารอะซีแมนแนน ความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 7 วัน.....	18
7	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทดสอบสารอะซีแมนแนน ความเข้มข้นร้อยละ 1 เป็นเวลา 7 วัน.....	19
8	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทดสอบคาร์โบพอลเปล่า เป็นเวลา 7 วัน.....	20
9	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทานน้ำเกลือปราศจากเชื้อ เป็นเวลา 7 วัน.....	21
10	ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ เป็นเวลา 7 วัน.....	22
11	การวิเคราะห์ชิ้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของบาดแผลที่ย้อมด้วยสีแมซซงส์ ไตรโครม.....	23
12	สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนที่เก็บไว้ในสภาวะเร่งเป็นเวลานาน 6 เดือน.....	24
13	สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนที่เก็บไว้ในสภาวะเร่งเป็นเวลานาน 3 เดือน.....	24
14	สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่.....	25
15	สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนจากการทดลองของ Ray และ Aswatha.....	29

สารบัญภาพ

ภาพที่	หน้า
โครงการย่อยที่ 2	
1	เซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงได้ (กำลังขยาย 4 เท่า).....
2	เซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงได้ (กำลังขยาย 10 เท่า).....
3	การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากจากอาสาสมัคร 3 รายโดยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชั่น.....
4	ลักษณะบาดแผลจำลองของเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25

	มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และกลุ่มควบคุม.....	54
5	ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ ณ เวลา 0 ชั่วโมง.....	54
6	ผลการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ฟิแลคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ในเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	56
7	ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง.....	57
8	ผลการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ฟิแลคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ในเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	58
9	ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง.....	59
10	ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>Staphylococcus aureus</i> ของสารอะซีแมนแนน.....	60
11	ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ของสารอะซีแมนแนน.....	60
12	ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ <i>Candida albicans</i> ของสารอะซีแมนแนน.....	61

บทนำรวม

ความสำคัญและที่มาของปัญหา

ว่านหางจระเข้ เป็นพืชสมุนไพรที่ปลูกได้ง่าย สามารถพบได้ทั่วไปตามครัวเรือน และมีการนำส่วนหัวมาใช้รักษาแผลบริเวณผิวหนังมาช้านาน แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย และรบกวนการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วย เนื่องจากทำให้เกิดความเจ็บปวด เคี้ยวอาหาร และพูดสื่อสารไม่สะดวก การรักษาแผลในช่องปากในปัจจุบันจะเน้นการรักษาตามอาการ ได้แก่ ให้ยาบรรเทาอาการปวดหรือยาชาเฉพาะที่เพื่อบรรเทาอาการปวด และยาสเตียรอยด์เพื่อลดการอักเสบบริเวณที่เป็นแผล แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีสารซึ่งกระตุ้นการหายของบาดแผลในช่องปากได้โดยตรง และการใช้ยาสเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานาน อาจทำให้เกิดการติดเชื้อซ้ำในช่องปากได้ นอกจากนี้การใช้ยาสเตียรอยด์เป็นข้อควรระวังในผู้ป่วยเบาหวาน ซึ่งแผลของผู้ป่วยเบาหวานจะมีการหายของแผลที่ช้ากว่าแผลปกติ ก่อให้เกิดโอกาสติดเชื้อซ้ำได้สูง

สารอะซีแมนแนนซึ่งเป็นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากหัวว่านหางจระเข้ มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว ด้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง นอกจากนี้ยังสามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก กระตุ้นการสร้างเส้นใยคอลลาเจน และวาสคิวลาเอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์

ซึ่งเป็นโครงทแพคเตอร์ที่จำเป็นต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพื่อนำออกซิเจนและสารอาหารที่จำเป็นเข้ามาสู่บาดแผล

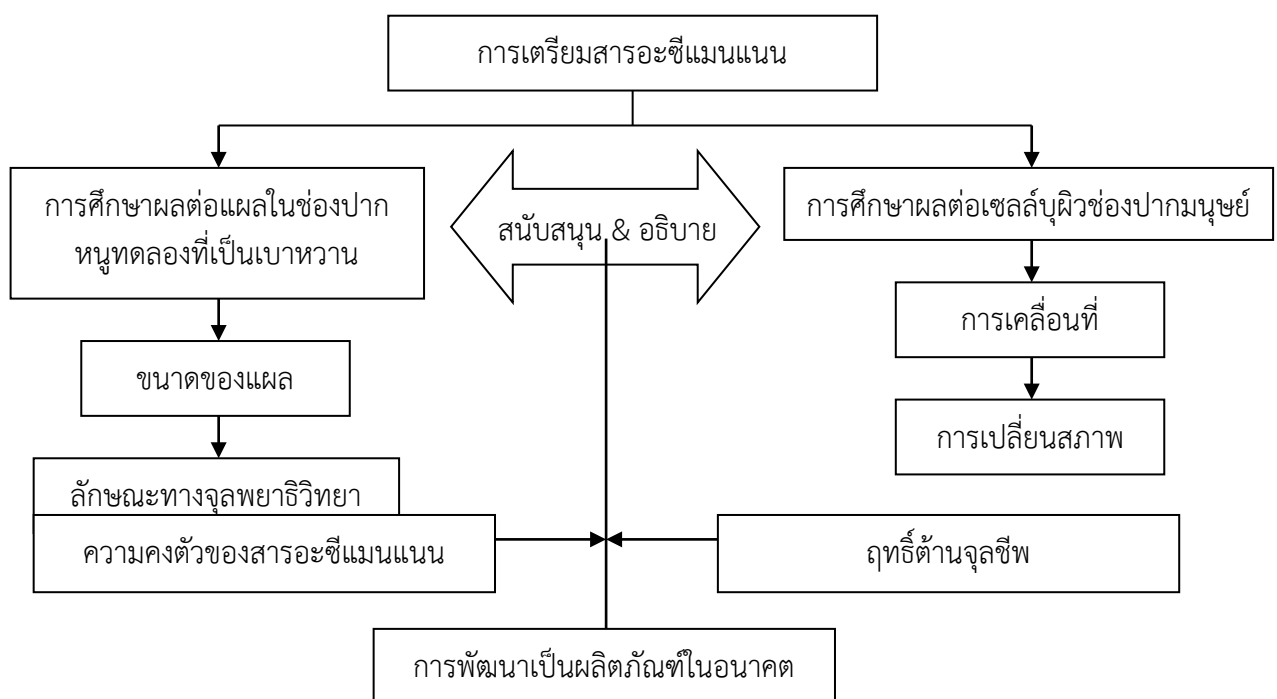
คณะผู้วิจัยเล็งเห็นความเป็นไปได้ในการนำสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนง้วนหางจระเข้มาใช้ในการประยุกต์รักษาแผลในช่องปากในผู้ป่วยเบาหวาน โดยมุ่งเน้นการศึกษาผลของการส่งเสริมการหายของแผลและอธิบายกลไกของการส่งเสริมการหายของแผลดังกล่าว โดยเฉพาะอย่างยิ่งกลไกซึ่งเกี่ยวข้องกับเซลล์บุผิวช่องปากซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างชั้นเยื่อบุผิวชั้นใหม่ เพื่อปิดปากแผลและปกป้องเนื้อเยื่อที่อยู่ด้านใต้ อีกทั้งยังศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ และความคงตัวของสารอะซีแมนแนน เพื่อให้สามารถอธิบายการออกฤทธิ์ของสมุนไพรได้ด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ที่ถูกต้อง และเป็นแนวทางในการพัฒนาสารสกัดจากส่วนง้วนหางจระเข้เป็นยาในการรักษาแผลในช่องปากเพื่อเป็นทางเลือกแก่ผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

วัตถุประสงค์ของโครงการวิจัย

เพื่อศึกษาความเป็นไปได้ในการนำสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนง้วนหางจระเข้มาใช้ในการส่งเสริมการหายของแผลในช่องปากในผู้ป่วยเบาหวาน พร้อมทั้งสามารถอธิบายกลไก หรือการออกฤทธิ์ของสารได้โดยมีข้อมูลทางวิทยาศาสตร์สนับสนุน

รายละเอียดความเชื่อมโยงระหว่างโครงการวิจัยย่อย

โครงการย่อยที่ 1 คือ การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนง้วนหางจระเข้ต่อแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน และโครงการย่อยที่ 2 คือ ผลของสารอะซีแมนแนนจากซึ่งสกัดส่วนง้วนหางจระเข้ต่อการเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก ทั้งสองโครงการมีความเชื่อมโยงกัน โดยมุ่งเน้นศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนที่เกี่ยวข้องกับเซลล์ในช่องปากทั้งในสภาวะจำลองในห้องปฏิบัติการ และในสภาพช่องปากจริงในสัตว์ทดลอง โดยผลการศึกษาในห้องปฏิบัติการจะช่วยสนับสนุน และอธิบายผลในสัตว์ทดลอง ซึ่งเป็นข้อมูลในการพัฒนาสารสกัดจากส่วนง้วนหางจระเข้เป็นยาในการรักษาแผลในช่องปากต่อไป โดยมีการวิจัยเชื่อมโยงกันดังแผนภาพ



สรุปผลการวิจัย

สารอะซีแมนแนนกระตุ้นการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน โดยมีกลไกที่เป็นไปได้ คือ การกระตุ้นการเคลื่อนที่ และเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก แต่สารอะซีแมนแนนไม่มีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ และสารอะซีแมนแนนยังคงอยู่เมื่อเก็บรักษาในสภาวะเร่งเป็นเวลา 6 เดือน อย่างไรก็ตาม การศึกษานี้เป็นการทดลองในสัตว์และห้องปฏิบัติการที่มีจำนวนตัวอย่างจำกัด สัตว์ทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีดสาร ทำให้การพัฒนากการเกิดโรคเบาหวานแตกต่างจากในผู้ป่วยจริง จึงสามารถจำลองเนื้อเยื่อในสภาวะที่เป็นเบาหวานได้เพียงระดับหนึ่ง และไม่อาจแสดงถึงภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในมนุษย์ได้ครบทุกสภาวะ และถึงแม้การศึกษาผลต่อเซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์ในห้องปฏิบัติการจะทำให้สามารถสรุปผลของสารต่อเซลล์ได้อย่างจำเพาะ แต่สภาวะจริงในร่างกายนั้นเซลล์แต่ละชนิด และเมทริกซ์ระหว่างเซลล์จะมีปฏิกิริยาและส่งผลต่อกันและกัน และเนื้อเยื่อได้รับผลจากระดับน้ำตาลในเลือดสูงอย่างต่อเนื่อง ดังนั้นจึงมีความจำเป็นในการศึกษาในผู้ป่วยเบาหวานที่แท้จริงต่อไป

ประโยชน์ที่ได้รับ

ทราบผลของสารอะซีแมนแนนต่อแผลในช่องปากในสภาวะที่เป็นเบาหวาน และสามารถอธิบายถึงกลไกการออกฤทธิ์ที่เป็นไปได้ด้วยหลักการทางวิทยาศาสตร์ ทำให้สารอะซีแมนแนนเป็นสารทางเลือกที่เป็นไปได้ในการพัฒนาเพื่อใช้รักษาแผลในช่องปากในผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

หน่วยงานที่นำผลงานวิจัยไปใช้ประโยชน์

เกษตรกรผู้ผลิตว่านหางจระเข้ เนื่องจากผลการวิจัยนี้จะเป็นการเพิ่มมูลค่าให้ว่านหางจระเข้ในทางการแพทย์

คณะทันตแพทยศาสตร์ และคณะเภสัชศาสตร์ เนื่องจากผลการวิจัยจะเป็นข้อมูลเบื้องต้นเพื่อพัฒนารูปแบบของสารอะซีแมนแนนให้ผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมเพื่อใช้ในช่องปาก และการศึกษาวิจัยในสภาวะจริงในช่องปากผู้ป่วยเบาหวานต่อไป

ผู้ป่วยเบาหวาน เนื่องจากผลการวิจัยจะนำไปสู่การพัฒนาผลิตภัณฑ์เพื่อเป็นทางเลือกของผู้ป่วยในการใช้รักษาแผลในช่องปากในอนาคต

โครงการย่อยที่ 1

ผลของสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ต่อแผลในช่องปาก
หนูทดลองที่เป็นเบาหวาน

Effect of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on oral ulcer in diabetic rat

หัวหน้าโครงการวิจัย

อ.ทญ.ดร.นวกรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์

ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย

อ.ทญ.ดร.สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ

ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์

มหาวิทยาลัยนเรศวร

ศ.ทพ.ดร.พสุธา ธีรบุญกิจไพศาล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์

จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

ชื่อโครงการ ผลของสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้ต่อแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน

Effect of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on oral ulcer in diabetic rat

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี 8 เดือน ตั้งแต่ 31 สิงหาคม 2555 ถึง 30 เมษายน 2557

- คณะผู้วิจัย
1. อ.ทญ.ดร. นวกรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์
ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066
 2. อ.ทญ.ดร. สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ
ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066
 3. ศ.ทพ.ดร. พสุธา ธัญญะกิจไพศาล
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 0-2218-8885

บทคัดย่อ

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและส่งผลต่อการใช้ชีวิตประจำวันของผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีภาวะซึ่งทำให้การหายของแผลช้าลง เช่น เบาหวาน การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองในสภาวะเบาหวาน โดยหนูจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยฉีดสารสเต็ปโทโซโทซิน สร้างบาดแผลจำลองบริเวณกึ่งกลางเพดานปากด้วยการทำฟันซ์ไบออพซี่ และทดสอบต่าง ๆ (สารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 สารคาร์โบพอลเปล่า น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์) ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการวัดขนาดบาดแผล ณ วันที่ 7 และศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาโดยการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน และศึกษาการสร้างคอลลาเจนบริเวณบาดแผลด้วยการย้อมสีแมชของส์ ไตรโครม นอกจากนี้ยังทำการศึกษาผลของความคงตัวของสารอะซีแมนแนนเมื่อเก็บรักษาที่สภาวะเร่งเป็นเวลา 3 และ 6 เดือนด้วยการสังเกตสเปกตรัม ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) ผลการศึกษาพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับการทา สารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีขนาดแผลเล็กกว่ากลุ่มที่ได้รับการทา สารคาร์โบพอลเปล่า น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) การศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาพบว่า บาดแผลที่ได้รับการทา สารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีการสร้างชั้นเยื่อผิวใหม่ปกปิดบาดแผลเร็วกว่ากลุ่มทดสอบอื่น และบาดแผลที่ได้รับสารอะซีแมนแนนทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือปราศจากเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) เมื่อวิเคราะห์สารอะซีแมนแนนที่เก็บในสภาวะเร่งเป็นเวลา 3 และ 6 เดือนพบว่า ยังคงมีสเปกตรัมของอะซีแมนแนนสอดคล้องกับสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่ ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารอะซีแมนแนนมีผลกระทบต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน และสารอะซีแมนแนนยังคงอยู่ภายหลังจากการเก็บในสภาวะเร่งเป็นเวลา 6 เดือน

คำสำคัญ วานทางจระเข้ สารอะซีแมนแนน หนูทดลอง แผลในช่องปาก เบาหวาน ความคงตัว

Abstract

Oral ulcer is the most common lesion in the oral cavity, leading to the pain and affecting the quality of life especially in the patient with systemic disease, such as diabetes. The objective of this study was to evaluate the effect of acemannan on diabetic oral wound healing in rat. The diabetes rats were induced by streptozotocin injection. A wound was made on the midline of hard palate using a punch biopsy. The animals were treated with

various agents (0.5% acemannan, 1% acemannan, plain carbopol, normal saline, and triamcinolone acetonide) once a day for 7 days. After that, the wound area was measured at day 7 and then the histopathologic study by hematoxylin and eosin staining was performed. The amount of collagen in the wound was evaluated in the slide which stained with Masson's trichrome. In addition, stability of acemannan in the accelerated storage condition was observed by ^1H nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. From this study, the wound area of animals receiving 0.5% acemannan was significantly smaller than that of the plain carbopol, normal saline and triamcinolone acetonide groups ($p < 0.05$, $n = 5$). The histopathologic study showed that the 0.5% acemannan-treated wound has more re-epithelialization than the others groups. The collagen of the acemannan-treated wound was significantly higher than the normal saline-treated wound ($p < 0.05$, $n = 5$). After incubated in the accelerated condition for 3 and 6 months, the NMR spectrum of acemannan was consistent with the fresh one. In the conclusion, acemannan accelerated oral wound healing in diabetes condition. Acemannan was stable in the accelerated storage condition for 6 months.

Key words: *Aloe vera*, acemannan, rat, oral ulcer, diabetes, stability

บทนำ

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย และก่อให้เกิดความเจ็บปวด ส่งผลกระทบต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยเฉพาะในผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบ ผู้ป่วยที่ได้รับยากดภูมิคุ้มกันหรือมีภาวะขาดสารอาหาร เป็นต้น⁽¹⁾ โรคเบาหวานเป็นโรคทางระบบที่มีความบกพร่องของการสร้างและ/หรือการทำหน้าที่ของอินซูลิน ทำให้เกิดภาวะน้ำตาลในเลือดสูง นำไปสู่โรคแทรกซ้อนหลายประการ รวมไปถึงความผิดปกติของขบวนการหายของแผล ได้แก่ การขาดออกซิเจนบริเวณบาดแผล ความผิดปกติของเม็ดเลือดขาวในการต่อต้านเชื้อโรค^(2, 3) ความบกพร่องในการสร้างเส้นใยคอลลาเจนมาทดแทนเนื้อเยื่อที่เสียหาย^(2, 4, 5) จึงทำให้บาดแผลของผู้ป่วยเบาหวานหายช้า และง่ายต่อการเกิดการติดเชื้อซ้ำ⁽²⁻⁴⁾ มีการศึกษามากมายมุ่งเน้นวิธีการเพื่อช่วยส่งเสริมการหายของแผลเบาหวาน เช่น การใช้สารโกรทแฟคเตอร์⁽⁶⁻⁹⁾ และการให้ออกซิเจนเข้มข้น^(10, 11) อย่างไรก็ตามวิธีการดังกล่าวมีค่าใช้จ่ายสูง ขั้นตอนสลับซับซ้อน โดยเฉพาะอย่างยิ่งข้อคำนึงในแง่ความปลอดภัยเนื่องจากสารโกรทแฟคเตอร์ผลิตจากเทคนิคพันธุวิศวกรรม คณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาการนำว่านหางจระเข้ ซึ่งเป็นพืช

สมุนไพรที่ใช้ในการรักษาแผลบริเวณผิวหนังมาประยุกต์ใช้ในการรักษาบาดแผลในช่องปากในผู้ป่วยเบาหวาน มีรายงานในหนูทดลองที่เป็นเบาหวานพบว่า วัณวานหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด ส่งเสริมการสร้างเส้นใยคอลลาเจนบริเวณผิวหนัง และมีการหายของแผลที่เร็วขึ้น⁽¹²⁾

สารอะซีแมนแนนเป็นสารกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ที่สกัดได้จากวัณวานหางจระเข้ มีความสามารถในการกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว^(13, 14) ต้านมะเร็งในสัตว์ทดลอง⁽¹⁵⁾ จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่า สารอะซีแมนแนนสามารถส่งเสริมการหายของแผลในช่องปากของหนูทดลอง โดยสารอะซีแมนแนนสามารถเหนี่ยวนำการเพิ่มจำนวนเซลล์ของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก กระตุ้นการสร้างเส้นใยคอลลาเจน และวาสคูลาเอนโดทีเลียลโกรทแฟคเตอร์ซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่จำเป็นต่อการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพื่อนำออกซิเจนและสารอาหารที่จำเป็นเข้ามาสู่บาดแผล⁽¹⁶⁾ คณะผู้วิจัยจึงเล็งเห็นความเป็นไปได้ในการนำสารอะซีแมนแนนมาใช้เป็นสารออกฤทธิ์หลักในยาสมานแผลเพื่อส่งเสริมการหายของแผลในช่องปากในผู้ป่วยเบาหวาน ดังนั้นจึงมีแนวคิดจะทำการศึกษาเบื้องต้นในหนูทดลองที่เหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้จะเป็นการสร้างองค์ความรู้เกี่ยวกับสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลในช่องปากในภาวะเบาหวาน และเป็นประโยชน์แก่การพัฒนานำสารอะซีแมนแนนมาใช้ในทางทันตกรรมต่อไปในอนาคต

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การหายของแผลในช่องปาก⁽¹⁷⁻¹⁹⁾ และแผลเบาหวาน

การหายของแผลในช่องปากมีขั้นตอนคล้ายกับการหายของบาดแผลทั่วไปของร่างกาย โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องต่อเนื่องกันไป ไม่สามารถแบ่งแยกได้อย่างชัดเจน ได้แก่ ระยะอักเสบ (inflammatory phase) ระยะการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (proliferative phase) และการปรับปรุงเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่ (remodeling phase)

เมื่อเกิดบาดแผลและการฉีกขาดของหลอดเลือด เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) และเกร็ดเลือด (platelets) จะมีการสร้างลิ่มเลือด (blood clot) เพื่อหยุดการสูญเสียเลือดออกจากร่างกาย ในลิ่มเลือดที่สร้างขึ้นนี้จะมีไซโตไคน์ต่างๆ (cytokines) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1), ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-แอลฟา (tumor necrosis factor- α), ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์-เบต้า (transforming growth factor- β) ซึ่งจะเหนี่ยวนำให้นิวโทรฟิล (neutrophils) และแมโครฟาจ (macrophages) เข้ามาสู่บาดแผลเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรคและเนื้อเยื่อที่ตาย

ระยะต่อมาบาดแผลจะเข้าสู่ระยะการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โดยเซลล์บุผิว (epithelial cells) บริเวณขอบของบาดแผลจะเริ่มเพิ่มจำนวน (proliferation) และเคลื่อนที่ (migration) เข้าสู่บริเวณบาดแผลเพื่อป้องกัน

การติดเชื่อและการสูญเสีย น้ำ ในขณะเดียวกันเซลล์สร้างเส้นใย (fibroblasts) ก็มีการเพิ่มจำนวน เคลื่อนที่ และสร้างโปรตีนต่างๆ เพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โปรตีนต่างๆ เหล่านี้ เช่น เคอราติโนไซต์โกรทแฟคเตอร์-1 (keratinocyte growth factor-1; KGF-1) ซึ่งสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิว วาสคิวลาเอนโดทีเลียลโกรทแฟคเตอร์ (vascular endothelial growth factor; VEGF) ซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีผลเหนี่ยวนำการสร้างหลอดเลือดใหม่ (angiogenesis) เพื่อนำสารอาหารและออกซิเจนเข้าสู่บริเวณบาดแผล คอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง (type I collagen) ซึ่งเป็นเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (extracellular matrix) ทำให้เนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่มีความแข็งแรงขึ้น

เมื่อเวลาผ่านไป บาดแผลจะเข้าสู่ระยะปรับปรุงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับปรุงเส้นใยคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่ ให้มีความเป็นระเบียบ มีการเชื่อมโยงระหว่างเส้นใยมากขึ้น เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่

บาดแผลในผู้ป่วยเบาหวานเป็นบาดแผลเรื้อรังที่มีความผิดปกติของกระบวนการหายของแผล เนื่องจากหลายสาเหตุ ได้แก่ ความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดเล็กทำให้บาดแผลขาดออกซิเจนและสารอาหารมาเลี้ยง การทำงานของเม็ดเลือดขาวบกพร่องทั้งในแง่การเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณบาดแผลและการกำจัดเชื้อโรค^(2, 3) เซลล์สร้างเส้นใยมีการเพิ่มจำนวนลดลง⁽⁴⁾ การสร้างเส้นใยคอลลาเจนลดลง^(2, 5) ทำให้แผลในผู้ป่วยเบาหวานหายช้า และง่ายต่อการติดเชื้อซ้ำ ถึงแม้ว่าการรักษาแผลเรื้อรังจะอาศัยหลักการการควบคุมและกำจัดสาเหตุของการเกิดแผลนั้น⁽²⁾ แต่หากสามารถควบคุมระดับน้ำตาล ร่วมกับการส่งเสริมการหายบริเวณบาดแผลให้เร็วขึ้น จะเป็นการลดความทรมาน และส่งเสริมคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเบาหวานให้ดียิ่งขึ้น

ว่านหางจระเข้

ว่านหางจระเข้เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้แพร่หลายมาช้านาน โดยใช้ทาบริเวณผิวหนังทั้งในแง่การรักษาบาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก น้ำแข็งกัด และการนำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหลายชนิด^(20, 21)

ว่านหางจระเข้มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Liliaceae มีลักษณะเป็นพืชอวบน้ำ สามารถปลูกและขยายพันธุ์ได้ง่ายแม้ในที่กั้นดาร⁽²²⁾ ใบมีลักษณะเรียวยาว มีหนามตาขอบใบ ใบมีเปลือกหนาสีเขียวเข้มซึ่งคิดเป็นร้อยละ 20-30 ของน้ำหนักใบทั้งหมด และเนื้อด้านในมีลักษณะเป็นวุ้นใสซึ่งเป็นส่วนที่มีการสะสมน้ำ คิดเป็นร้อยละ 70-80 ของน้ำหนักใบทั้งหมด⁽²³⁾ ส่วนวุ้นใสด้านในนี้เองเป็นส่วนที่มีการนำมาใช้ทาบริเวณผิวหนังเพื่อบรรเทาอาการต่าง ๆ วุ้นใสของว่านหางจระเข้ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 90-99 และส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่ และเอนไซม์ต่าง ๆ^(22, 23)

มีรายงานผลทางชีววิทยา (biological activity) ของวุ้นว่านหางจระเข้มากมาย เช่น มีผลเพิ่มความชุ่มชื้นบริเวณผิวหนัง⁽²⁴⁾ ลดการเกิดผื่นอักเสบ (erythema, irritant contact dermatitis)⁽²⁵⁾ ด้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity)^(26, 27) เชื้อรา (antifungal activity)⁽²⁷⁾ และต้านการอักเสบ (antiinflammatory activity)^(28, 29) และส่งเสริมการหายของแผลบริเวณผิวหนัง^(12, 20, 30, 31) นอกจากนี้ยังมีรายงานในหนูทดลองที่เป็นเบาหวานพบว่า การบริโภคร (oral administration) วุ้นของว่านหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และการบริโภครและการทาวุ้นว่านหางจระเข้สามารถส่งเสริมการหายของแผลบริเวณผิวหนังได้⁽¹²⁾

สารอะซีแมนแนน

สารอะซีแมนแนนเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์หลักที่สกัดได้จากวัชพืชรำหางจรเข้ มีลักษณะโครงสร้างเป็นแมนโนสต่อกันเป็นสายยาว (β -(1,4)-polymannose) การวิเคราะห์ทางเคมีพบว่า สารอะซีแมนแนนประกอบด้วยแมนโนสถึงร้อยละ 93.4 และกลูโคสและกาแลคโตสประมาณร้อยละ 3^(13, 14)

การศึกษาในหนูทดลอง และสุนัขโดยให้บริโภคสารอะซีแมนแนนพบว่า การให้สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวันในหนูทดลองเป็นเวลา 14 วัน และการให้สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวันในสุนัขเป็นเวลา 90 วันไม่ก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษเกิดขึ้น⁽³²⁾

สารอะซีแมนแนนมีคุณสมบัติกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulant activity) โดยกระตุ้นการทำงานของแมคโครฟาจ และเดนไดรติกเซลล์ (dendritic cells) กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์หลายชนิดจากแมคโครฟาจ เช่น กรานูโลไซโตไคน์สติมูเลตติ้งแฟกเตอร์ (granulocyte colony-stimulating factor) สเต็มเซลล์แฟกเตอร์ (stem cell factor) อินเตอร์ลิวคิน-6 (interleukin-6) และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา^(13, 33, 34)

การศึกษาในหนูทดลองพบว่า สารอะซีแมนแนนสามารถส่งเสริมการหายของบาดแผลในช่องปากเมื่อทาอย่างต่อเนื่องเป็นเวลา 7 วัน และการศึกษาในระดับเซลล์พบว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (gingival fibroblasts) อีกทั้งเหนี่ยวนำการสร้างเคราตินโนไซท์โกรทแฟกเตอร์-1 วาสคูลาเอนโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์ และคอลลาเจนชนิดที่หนึ่งจากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก⁽¹⁶⁾ จึงมีความเป็นไปได้ที่สารอะซีแมนแนนจะสามารถส่งเสริมการหายของแผลในช่องปากของผู้ป่วยเบาหวานได้เช่นเดียวกับแผลปกติ โดยผ่านกระบวนการทั้งการเพิ่มจำนวนเซลล์ และส่งเสริมการสร้างโกรทแฟกเตอร์และโปรตีนที่เกี่ยวข้อง

วิธีดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารอะซีแมนแนนจากวัชพืชรำหางจรเข้⁽¹⁶⁾

การเตรียมสารอะซีแมนแนน ทำตามวิธีที่ผู้วิจัยเคยรายงานมาก่อนหน้านี้ กล่าวโดยย่อคือ นำใบวัชพืชรำหางจรเข้ พันธุ์ *Aloe barbadensis* MILLER ที่มีความกว้างบริเวณโคนใบ 6-10 เซนติเมตรมาล้างให้สะอาดด้วยน้ำกลั่น และลอกส่วนผิวที่เป็นสีเขียวออก เหลือแต่ส่วนวุ้นใส ล้างด้วยน้ำกลั่นเพื่อกำจัดส่วนยางที่อาจปนเปื้อนกับส่วนวุ้น จากนั้นหั่นส่วนวุ้นใสเป็นชิ้นเล็กๆ ขนาดประมาณ 2x2x2 มิลลิเมตร แล้วทำให้ละเอียดด้วยเครื่องโฮโมจีไนเซอร์ (homogenizer; Wheaton, NJ, USA) จากนั้นทำการปั่นแยกกากด้วยเครื่องปั่นตกตะกอนและตกตะกอนด้วยแอลกอฮอล์ ทำให้แห้งและเก็บที่อุณหภูมิ -20 องศาเซลเซียส ปริมาณสารอะซีแมนแนนที่เตรียมได้คิดเป็นร้อยละ 0.2

การพิสูจน์เอกลักษณ์ของสารอะซีแมนแนน⁽¹⁶⁾

สารอะซีแมนแนนจะถูกนำมาพิสูจน์เอกลักษณ์ ผ่านเครื่อง high performance liquid chromatography และวิธี fourier transformed infrared (FTIR) spectroscopy

ขั้นตอนการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography โดยย่อ คือ สารอะซีแมนแนนที่เตรียมได้จะถูกวิเคราะห์ด้วยเครื่อง high performance liquid chromatography (Shimadzu, Japan) และ reflective index detector (RID-10A; Shimadzu, Japan) โดยใช้ Sugar KS-804 column (8x300 mm; Shodex, Japan) และมีน้ำเป็นเฟสเคลื่อนที่ (mobile phase) ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส และ flow rate 0.8 มิลลิลิตรต่อนาที

ขั้นตอนการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วย FTIR spectroscopy โดยย่อ คือ ผสมสารอะซีแมนแนนที่เตรียมได้เข้ากับผงโปแตสเซียม โบรไมด์ (potassium bromide) และวิเคราะห์ด้วยเครื่อง Spectrum One FTIR spectrometer (PerkinElmer, Waltham, MA, USA) โดยบันทึกค่าในช่วงความยาวคลื่น $4000-400\text{ cm}^{-1}$

การทดสอบสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่ถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน

วิธีการศึกษาดัดแปลงจากการศึกษาของ Kim และคณะ⁽³⁵⁾ และ Jettanacheawchankit และคณะ⁽¹⁶⁾ โดยผ่านการพิจารณาจากคณะกรรมการกำกับดูแล และการใช้สัตว์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (เลขที่โครงการ NU-AE550101 เลขที่เอกสารรับรอง 55 04 0011) โดยหนูทดลองที่ใช้ในการศึกษานี้ คือ หนูแรทพันธุ์ Sprague-Dawley เพศผู้อายุ 8 สัปดาห์ น้ำหนักเฉลี่ย 300-400 กรัม จำนวน 25 ตัวจากสำนักสัตว์ทดลองแห่งชาติ ซึ่งจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานโดยการฉีดสารสเตรปโตโซโทซิน (streptozotocin, Sigma; St Louis, MO, USA) ความเข้มข้น 65 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัว ล่วงหน้าก่อนวันทำการศึกษาคือ 2 วัน ในวันทำการศึกษาคือจะวัดระดับน้ำตาลในเลือดของหนูทดลองด้วยเครื่องแอคคู-เช็ก เพอร์ฟอร์มา (ACCU-CHEK® Performa, Roche diagnostics GmbH, Germany) โดยหนูทดลองที่มีระดับน้ำตาลในเลือดมากกว่า 200 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตรจะถือว่าเป็นเบาหวาน จากนั้นแบ่งหนูทดลองออกเป็น 5 กลุ่มทดลอง (treatment) กลุ่มละ 5 ตัว หนูจะถูกให้ยาสลบโซลิทิล (Zoletil®; chloral hydrate tiletamine และ chloral hydrate zolazepam, Verbac Laboratory; Carros Cedex; France) ฉีดเข้าช่องท้อง ขนาด 40 มิลลิกรัมต่อกรัมของน้ำหนักตัว เมื่อหนูสลบจึงสร้างแผลบริเวณกึ่งกลางเพดานขนาดเส้นผ่าศูนย์กลาง 3 มิลลิเมตรโดยใช้พินซ์ไบออปชี (punch biopsy; Stiefel®; Italy) และห้ามเลือดจนหยุดสนิทด้วยสำลีพันปลายไม้ แล้วจึงทาสารทดสอบตามลำดับดังนี้

กลุ่มที่ 1 ทาสารคาร์โบพอลเปลา (carbopol, Lubrizol, USA) ซึ่งเป็นเจลเบส (gel base) เพื่อให้สารอะซีแมนแนนอยู่ในรูปที่เหมาะสมกับการทาในช่องปาก

กลุ่มที่ 2 และ 3 ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 ซึ่งเตรียมในคาร์โบพอล

กลุ่มที่ 4 ทาน้ำเกลือปราศจากเชื้อ

กลุ่มที่ 5 ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ (triamcinolone acetonide 0.1% in dental paste; Keno oral paste, T.O. Chemicals, Thailand)

หนูแต่ละกลุ่มจะถูกทำให้สลบด้วยการดมสารไอโซฟลูเรน (isoflurane; Baxter, Guayama, Puerto Rico) และทาสารทดสอบวันละหนึ่งครั้งจนครบ 7 วัน จึงให้การการุณฆาต (euthanasia) โดยใช้ก๊าซคาร์บอนไดออกไซด์เกินขนาด (CO_2 overdose) แล้วเก็บซากกรไกรบน ถ่ายภาพในลักษณะตั้งฉากกับบาดแผล โดยใช้กล้องจุลทรรศน์สเตอริโอ (stereomicroscope BX50, Olympus; Japan) และวิเคราะห์ขนาดของบาดแผลด้วยโปรแกรมเซลล์เซนส์ ไดเมนชัน รุ่น 1.3 (CellSens Dimension, version 1.3, Olympus)

หลังจากถ่ายภาพเสร็จสิ้น ขากรรไกรบนของหนูจะผ่านขบวนการเตรียมสไลด์ทางจุลพยาธิวิทยา โดยแช่ลงในสารบัฟเฟอร์ฟอร์มาลิน (buffered formalin) ความเข้มข้นร้อยละ 10 ทันที เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จากนั้นจึงทำการดิ่งแร่ธาตุออก (decalcification) ด้วยสารละลายอีดีทีเอ (EDTA; ethylenediaminetetraacetic acid di-sodium salt; Ajax Finechem, NSW, Australia) แล้วนำชิ้นตัวอย่างผ่านขบวนการดึ่งน้ำออก (dehydration) โดยใช้แอลกอฮอล์ที่มีความเข้มข้นระดับต่าง ๆ จากร้อยละ 30, 50, 70, 90 และ 100 ตามลำดับ และผ่านการทำให้เนื้อเยื่อใส (clearing) โดยใช้สารไซลีน (xylene) และฝังชิ้นเนื้อเยื่อ (embedding) ลงในพาราฟิน (paraffin) จากนั้นตัดเนื้อเยื่อให้เป็นแผ่นบางความหนาประมาณ 5 ไมครอนด้วยเครื่องตัดชิ้นเนื้อ (ultramicrotome machine) นำเนื้อเยื่อที่ได้ไปวางบนแผ่นสไลด์ ละลายพาราฟินออกจากแผ่นเนื้อเยื่อ (deparaffinization) โดยใช้สารไซลีน และผ่านขบวนการนำน้ำกลับเข้าเนื้อเยื่ออย่างสมบูรณ์ (rehydration) ด้วยเอทานอล (ethanol) ย้อมสีโดยใช้ฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน (hematoxylin & eosin staining; H&E) และสีแมซซงส์ ไตรโครม (Masson's trichrome staining) แล้วทำการฉีกแผ่นเนื้อเยื่อ (mounting) ด้วยสารเปอเมาท (permount) ทำการอ่านผล และถ่ายภาพด้วยกล้องจุลทรรศน์ชนิดแสงสว่าง (light microscope, Olympus) และโปรแกรมเซลล์เซนส์ และทำการวิเคราะห์ปริมาณคอลลาเจนบริเวณบาดแผลในสไลด์ที่ย้อมสีแมซซงส์ ไตรโครม โดยวิเคราะห์ในพื้นที่บริเวณขอบแผลได้ต่อเยื่อผิวหนังที่สร้างใหม่ขนาด 2,500 ตารางไมโครเมตร จำนวน 10 ตำแหน่งที่กำลังขยาย 20 เท่าโดยใช้โปรแกรมเซลล์เซนส์ แล้วจึงนำมาหาค่าเฉลี่ยของหนูแต่ละตัว

การทดสอบความคงตัวของสารอะซีแมนแนนหลังจากเก็บรักษาในสภาวะเร่ง

ทดสอบความคงตัวของอะซีแมนแนนโดยดัดแปลงจากวิธีของ WHO⁽³⁶⁾ เริ่มจากนำผงอะซีแมนแนนปริมาณ 5 มิลลิกรัม เก็บรักษาในภาชนะปิดและอยู่ในสภาวะเร่ง ที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นระยะเวลา 3 และ 6 เดือน เมื่อครบตามระยะเวลาที่กำหนด ตรวจสอบสเปกตรัม ¹H NMR โดยใช้วิธีที่ดัดแปลงจาก Bozzi และคณะ และ Ray และ Aswatha (2013)^(37, 38) เริ่มจากทำละลายผงอะซีแมนแนนด้วยดิวทีเรียมออกไซด์ (deuterium oxide) ให้เป็นความเข้มข้น 5 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ปริมาณ 1 มิลลิลิตร แล้วนำไปใส่หลอด NMR และตรวจสอบสเปกตรัมของ ¹H NMR ที่ 400 MHz ด้วยเครื่องสเปกโตรโฟโตมิเตอร์ Bruker ADVANCE 400 โดยใช้หัวโพรบ BBI (broadband inverse probehead) ขนาด 5 มิลลิเมตร ที่อุณหภูมิ 60 องศาเซลเซียส 128 รอบ

การวิเคราะห์ผลการทดลอง

ประเมินผลของสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลโดยการเปรียบเทียบขนาดของบาดแผลของกลุ่มทดลองต่าง ๆ ในรูปค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SE) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส รุ่นที่ 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program version 11.5; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way analysis of variance, one way ANOVA) และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณแบบดันแคน (Duncan multiple comparison test) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

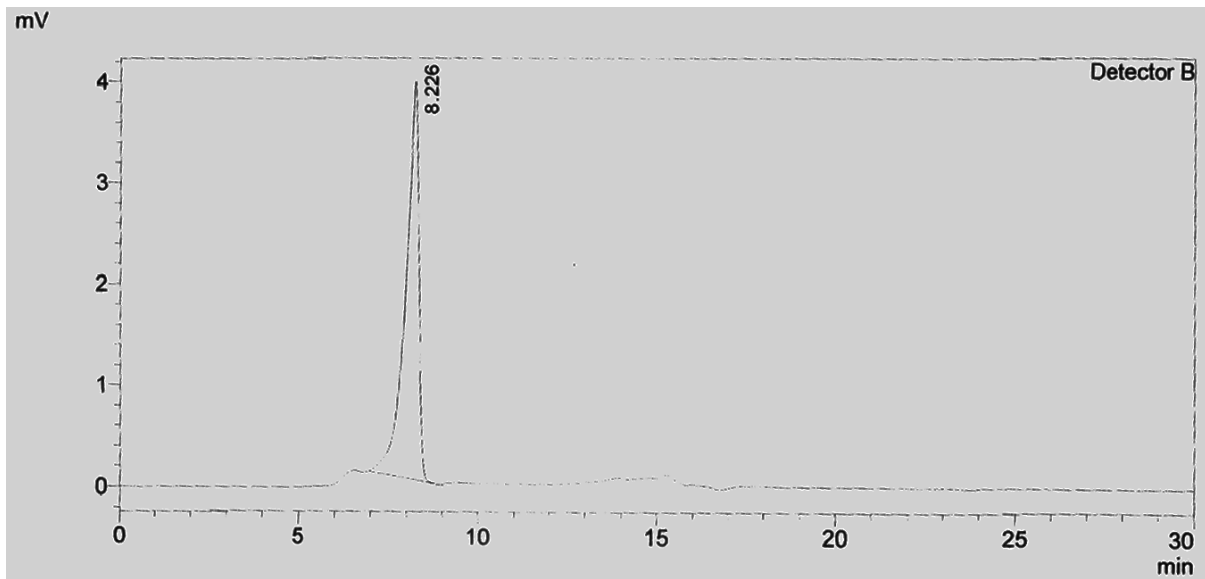
นำเสนอลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลของหนูทดลองในกลุ่มต่าง ๆ ในรูปแบบการบรรยายเปรียบเทียบ และแสดงปริมาณคอลลาเจนบริเวณบาดแผลในรูปค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส รุ่นที่ 11.5 โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณแบบต้นแค่น ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

ความคงตัวของสารอะซีแมนแนนนำเสนอในรูปของการเปรียบเทียบการคงอยู่ของสารอะซีแมนแนนเมื่อเก็บในสภาวะเร่งเทียบกับสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่

ผลการวิจัย

การเตรียม และพิสูจน์เอกลักษณ์สารอะซีแมนแนน

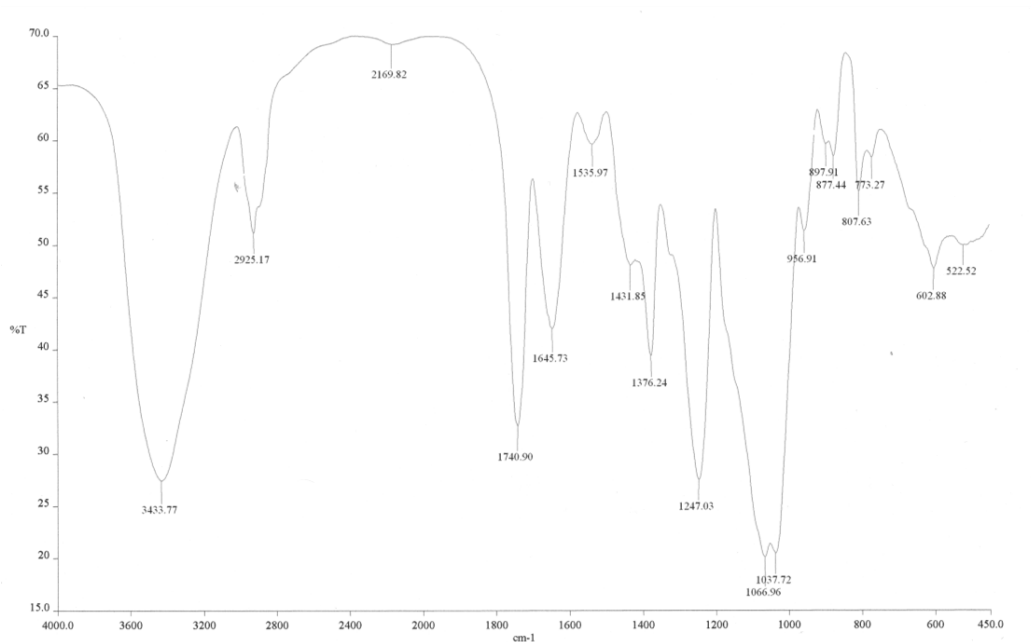
จากการวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography พบว่า สารอะซีแมนแนนที่เตรียมได้มี peak เดียว (ภาพที่ 1)



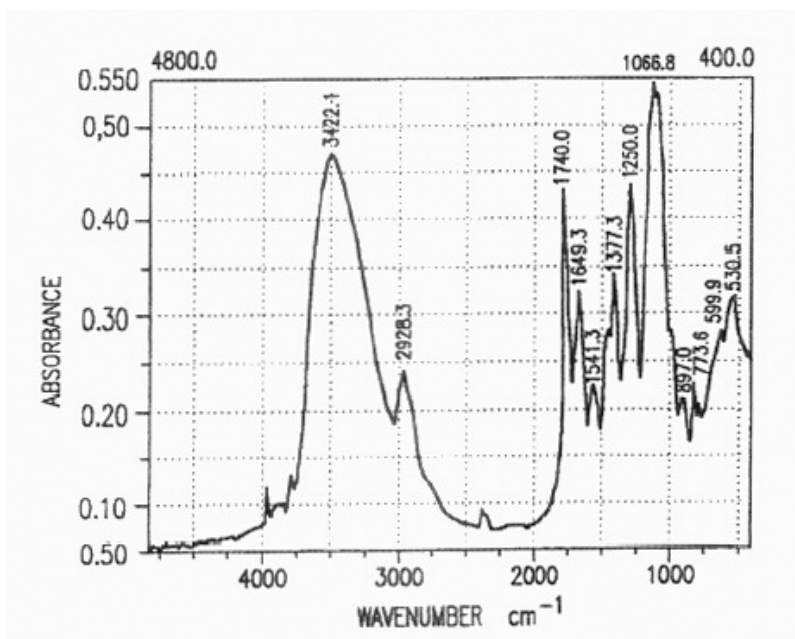
ภาพที่ 1 ผลจากเครื่อง High performance liquid chromatography ของสารอะซีแมนแนน

จากการวิเคราะห์ด้วย FTIR spectroscopy พบว่า สารอะซีแมนแนนที่เตรียมได้มี spectrum ของ functional group แสดงดังภาพที่ 2 ซึ่ง spectrum ดังกล่าวมีความสอดคล้องกับรายงานของ McAnalley⁽³⁹⁾ แสดงดังภาพที่ 3

เมื่อพิจารณาร่วมกันระหว่างการวิเคราะห์ด้วย high performance liquid chromatography และ FTIR spectroscopy จึงชี้ให้เห็นว่าสารที่เตรียมได้เป็นสารอะซีแมนแนนที่มีความบริสุทธิ์



ภาพที่ 2 spectrum ของสารอะซีแมนแนนจากการวิเคราะห์ด้วย FTIR spectroscopy



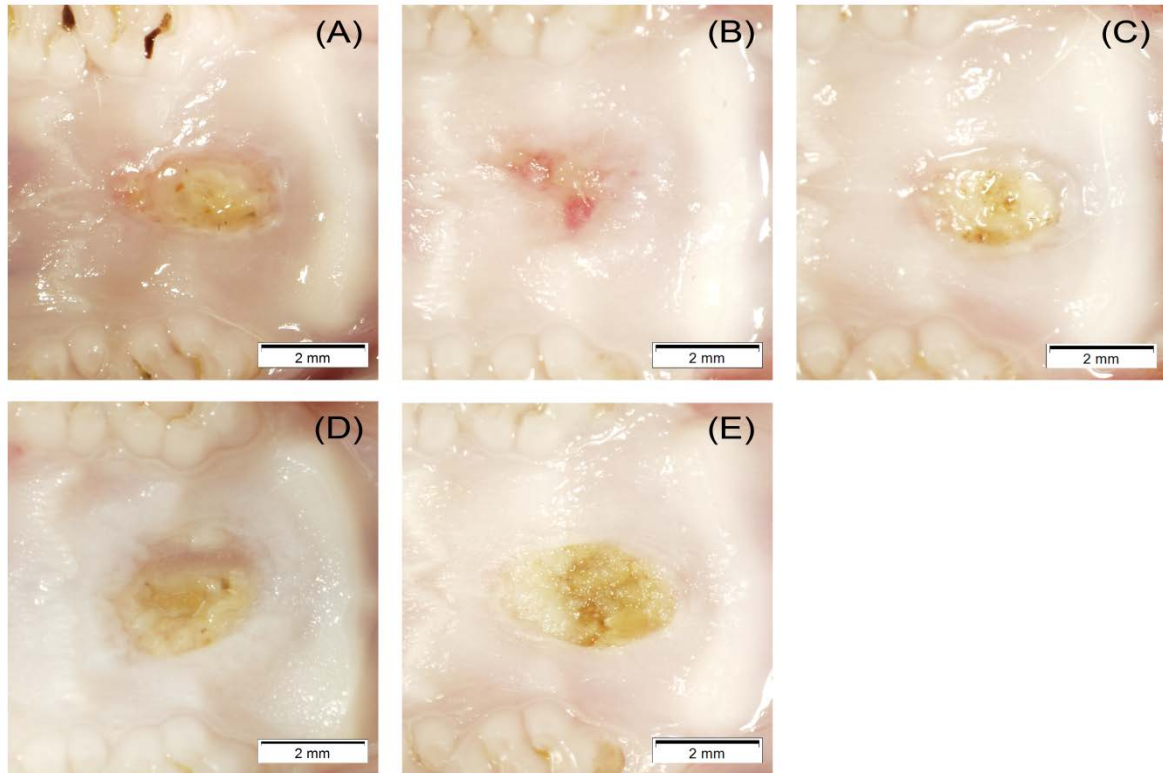
ภาพที่ 3 FTIR spectrum ของสารอะซีแมนแนนจากรายงานของ McAnalley⁽³⁹⁾

ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองในสภาวะที่เป็นเบาหวาน

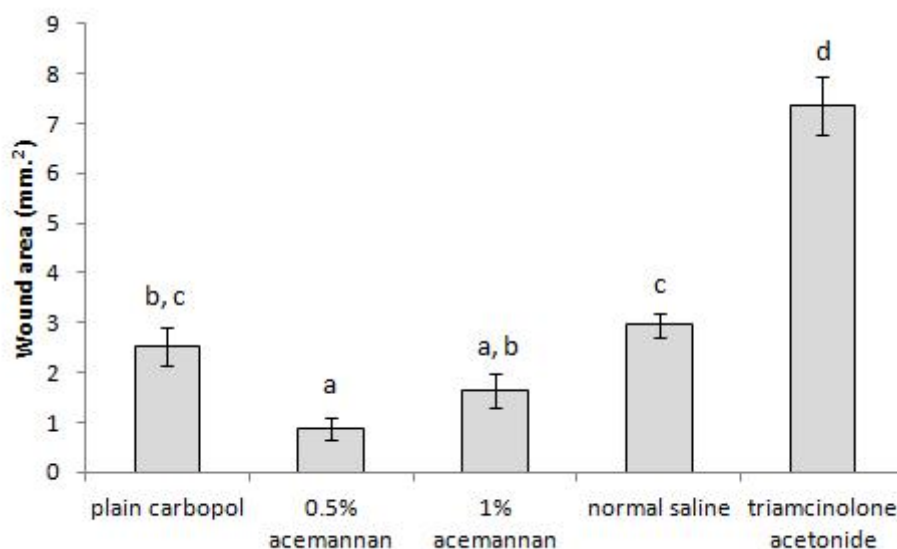
หนูทดลองที่ได้รับการเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวานด้วยสารสเตريبโทโซโทซิน และทาด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ สารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 และสารคาร์โบพอลเปล่า มีค่าระดับน้ำตาลในเลือดเฉลี่ย ณ 7 วัน ตามลำดับดังนี้ 534.00 ± 107.38 532.60 ± 44.31 347.2 ± 83.54 404.00 ± 135.51 และ 518.60 ± 119.64 มิลลิกรัมต่อเดซิลิตร และมีน้ำหนักตัวเฉลี่ย ณ 7 วัน 333.00 ± 23.32 324.40 ± 48.73 346.60 ± 26.19 329.00 ± 30.36 และ 322.80 ± 29.20 กรัม ตามลำดับ

จากการวิเคราะห์ขนาดแผลเมื่อทาสารทดสอบเป็นเวลา 7 วันพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ทำน้ำเกลือปราศจากเชื้อ กลุ่มที่ทำยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ กลุ่มที่ทำสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 และกลุ่มที่ทำสารคาร์โบพอลเปล่า มีขนาดของแผลเฉลี่ย 2.96 ± 0.54 7.36 ± 1.30 0.88 ± 0.51 1.64 ± 0.73 และ 2.53 ± 0.84 ตารางมิลลิเมตรตามลำดับ โดยหนูทดลองกลุ่มที่ทำสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีขนาดแผลเล็กกว่ากลุ่มที่ทำยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และสารคาร์โบพอลเปล่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ทำสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 มีขนาดแผลไม่ต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p > 0.05$, $n = 5$) แสดงดังภาพที่ 4 และภาพที่ 5

อย่างไรก็ตามเมื่อทาสารทดสอบทุกชนิดเป็นเวลา 7 วัน ไม่พบหนูทดลองกลุ่มใดที่มีแผลปิดอย่างสมบูรณ์



ภาพที่ 4 ตัวอย่างแผลบริเวณเพดานปากหนูทดลองที่เหนียวน้ำให้เป็นเบาหวาน และทดสอบเป็นเวลา 7 วัน (A) ทาสารคาร์โบพอลเปล่า; (B) ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5; (C) ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 1; (D) ทาด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ; (E) ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ความเข้มข้นร้อยละ 0.1

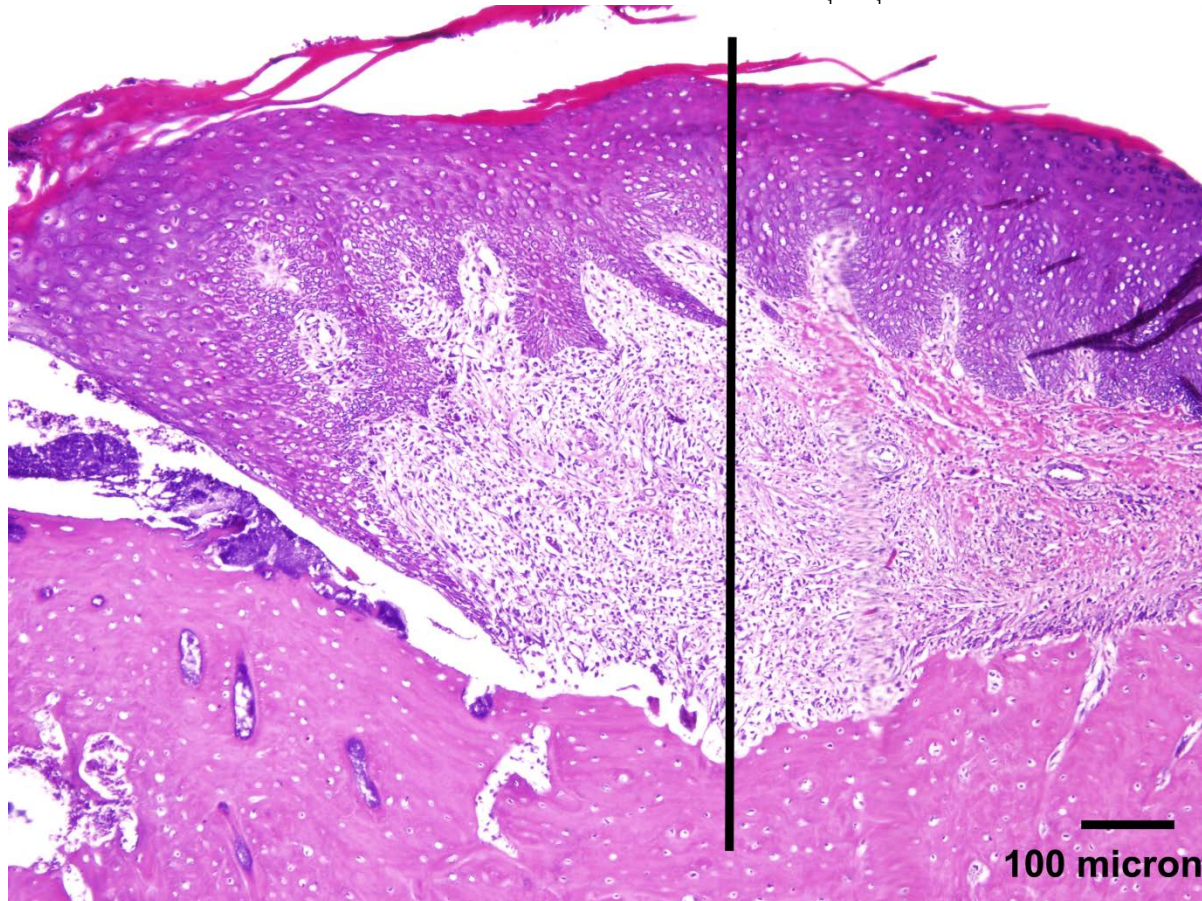


ภาพที่ 5 การวิเคราะห์ขนาดแผลที่ทำด้วยสารทดสอบเป็นเวลา 7 วันพบว่า หนูทดลองที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีขนาดแผลเล็กกว่ากลุ่มที่ได้รับการทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และสารคาร์โบพอลเปล่า อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$; ตัวอักษร a, b, c และ d แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ)

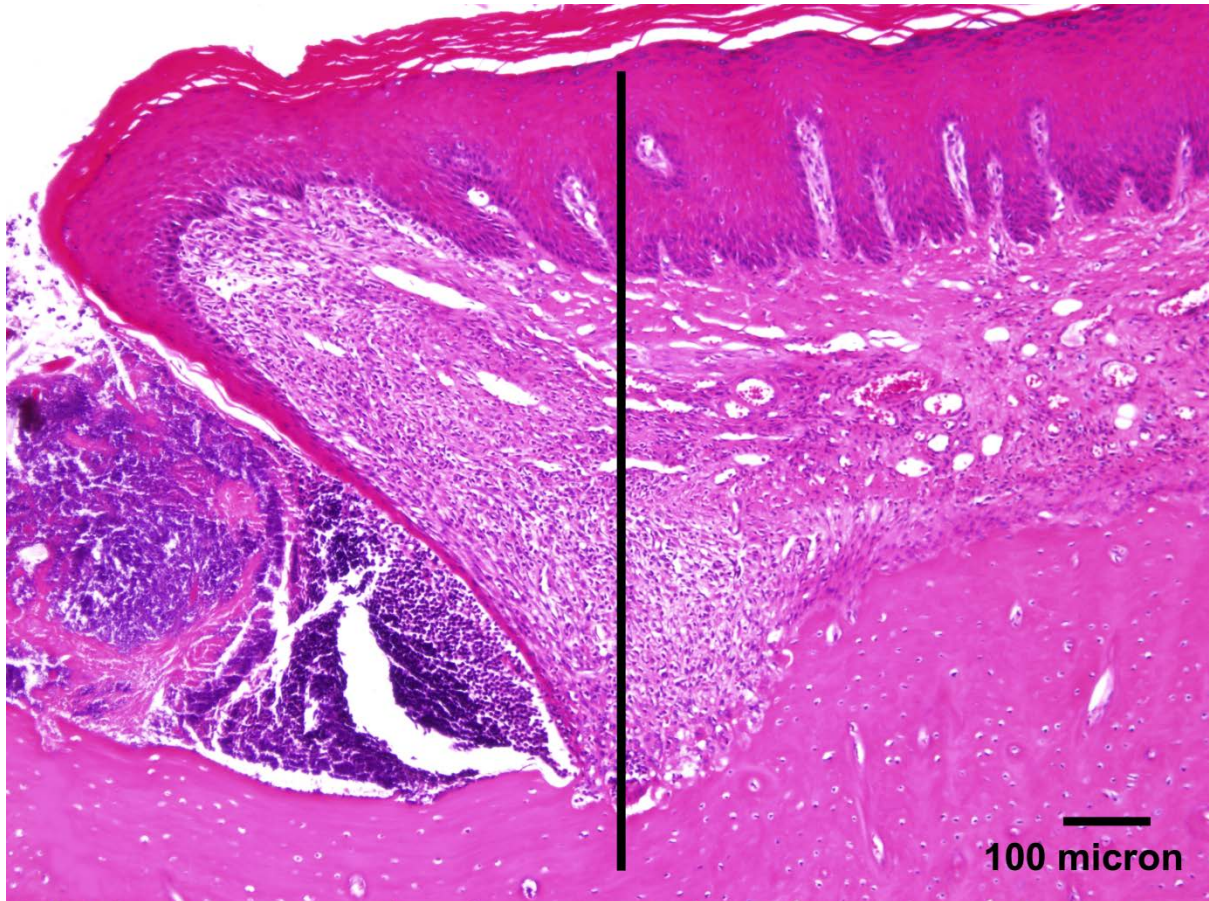
ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของแผลในช่องปากหนูทดลองในสภาวะที่เป็นเบาหวาน

เมื่อศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน และทำด้วยสารทดสอบต่าง ๆ เป็นเวลา 7 วัน โดยการย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน และสีแมชของส์ ไตรโครม พบว่า กลุ่มที่ได้รับการทาสารอะซีแมนแนนเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีการสร้างขึ้นเยื่อผิวใหม่ปกปิดบาดแผลเร็วกว่ากลุ่มที่ทำด้วยน้ำเกลือปราศจากเชื้อ ยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ และคาร์โบพอลเปล่า ทั้งนี้ในการวัดระยะการสร้างชั้นเยื่อผิวใหม่อ้างอิงจากแนวสมมติของขอบเขตที่เครื่องมือกดเพื่อสร้างบาดแผล ซึ่งสังเกตจากร่องรอยที่กระดูบริเวณเพดานถูกกดเป็นรอยหว้า (ภาพที่ 6 7 8 และ 9)

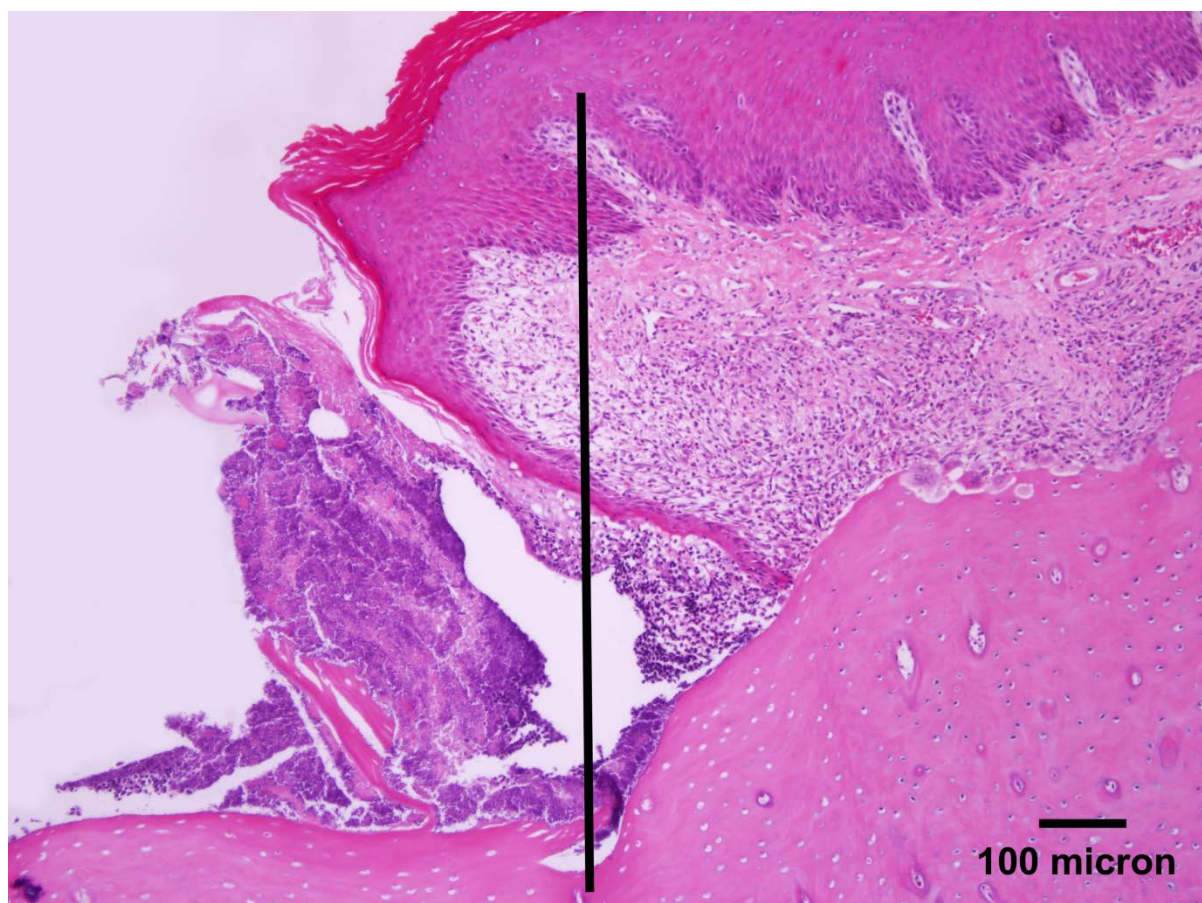
เมื่อพิจารณาในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันพบว่า แผลของกลุ่มที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 มีการสร้างเนื้อเยื่อเกี่ยวพันข้างใต้ใหม่สัมพันธ์กับชั้นเยื่อผิวที่ถูกสร้างขึ้นใหม่ และมีการสร้างคอลลาเจนในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันมากกว่ากลุ่มที่ได้รับการทาด้วยสารคาร์โบพอลเปล่า ยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ และน้ำเกลือ โดยแผลในกลุ่มที่ทาด้วยสารอะซีแมนแนนทั้งสองความเข้มข้น สารคาร์โบพอลเปล่า และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ มีการสร้างคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือปราศจากเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=5$; ภาพที่ 11) ในขณะที่ปริมาณเม็ดเลือดขาวที่เกี่ยวข้องกับขบวนการอักเสบ ได้แก่ นิวโทรฟิลล์ แมคโครฟาจ และลิมโฟไซต์ ในชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันใกล้เคียงกันในทุกกลุ่มทดลอง



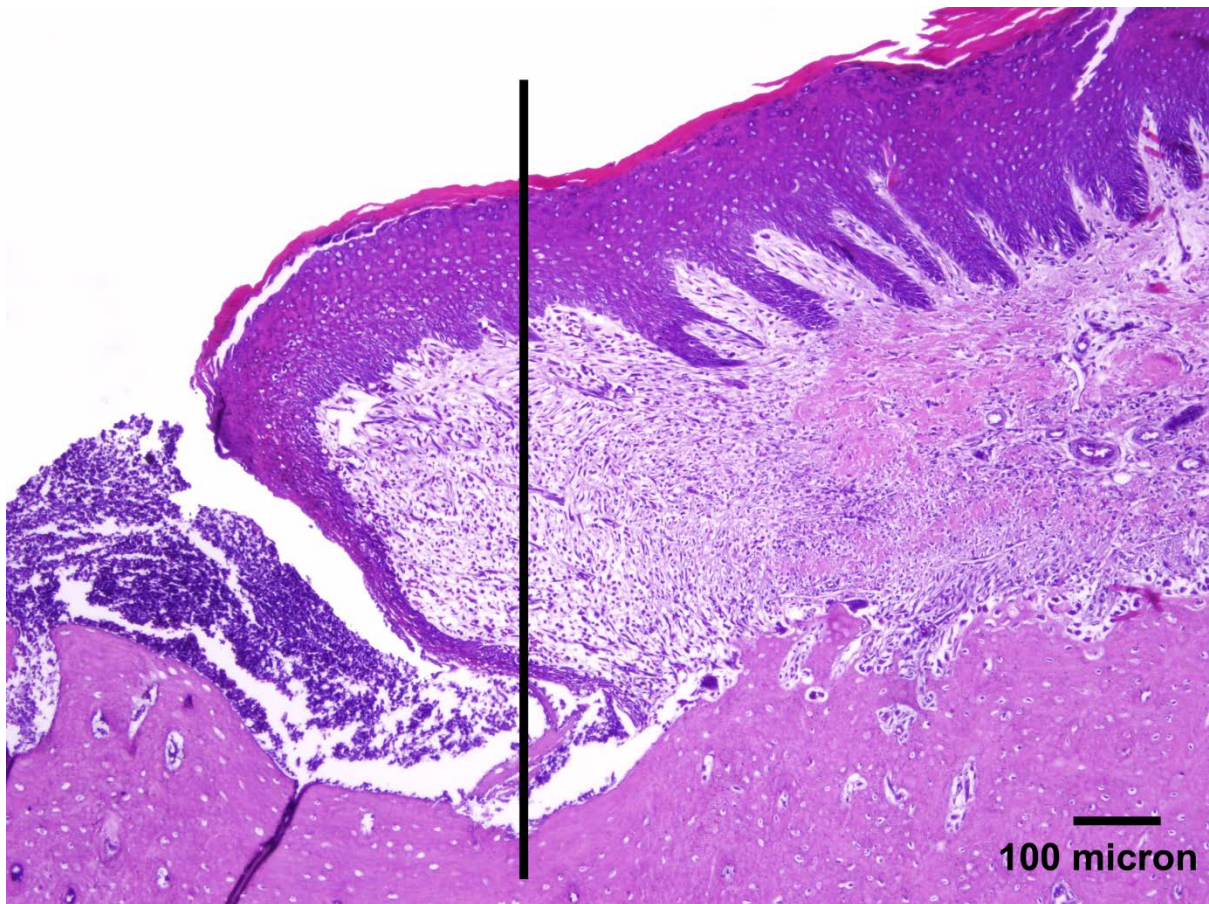
ภาพที่ 6 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 เป็นเวลา 7 วัน (เส้นทึบสีดำแสดงตำแหน่งที่เครื่องมือกดเพื่อสร้างบาดแผล; ย้อมสีฮีมาทอกซิลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่า)



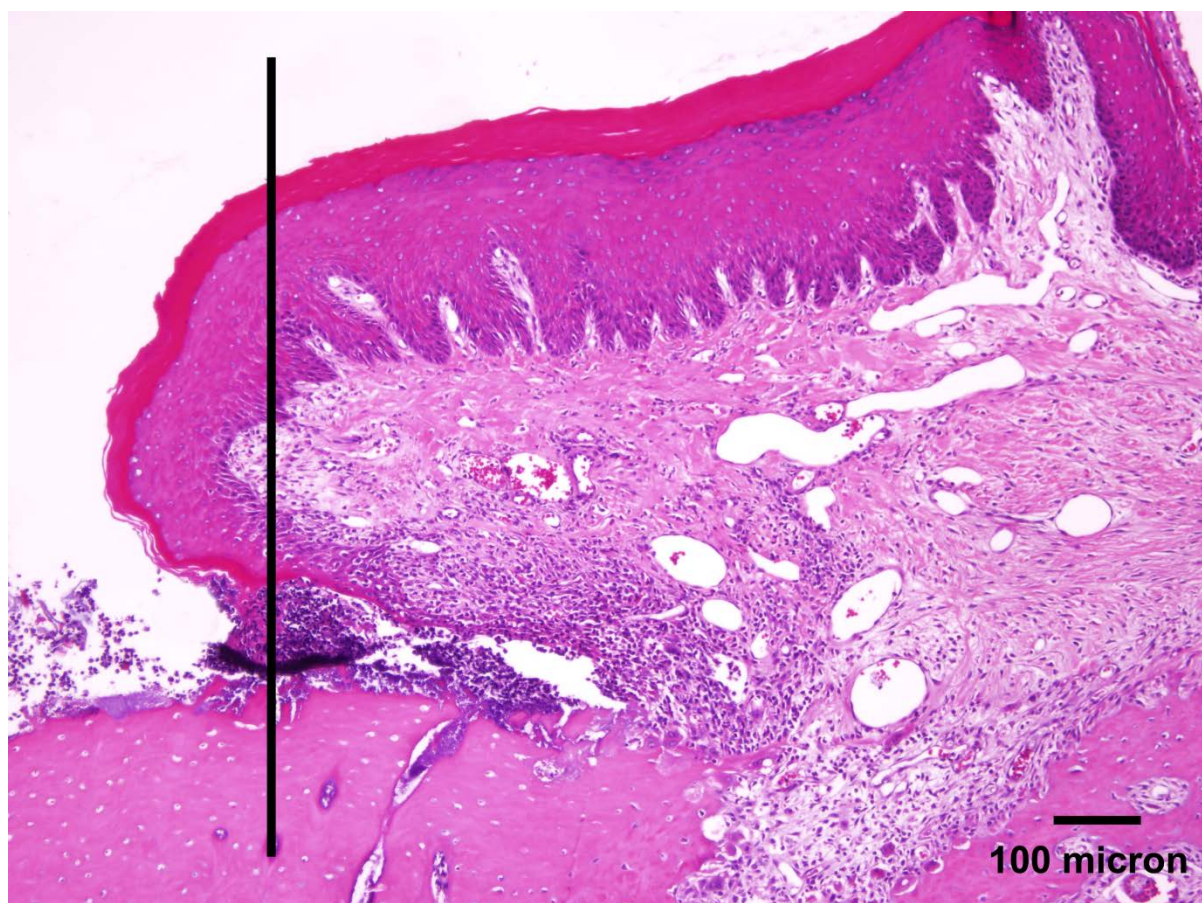
ภาพที่ 7 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น ร้อยละ 1 เป็นเวลา 7 วัน (เส้นทึบสีดำแสดงตำแหน่งที่เครื่องมือกดเพื่อสร้างบาดแผล; ย้อมสีอีมาทอคซิลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่า)



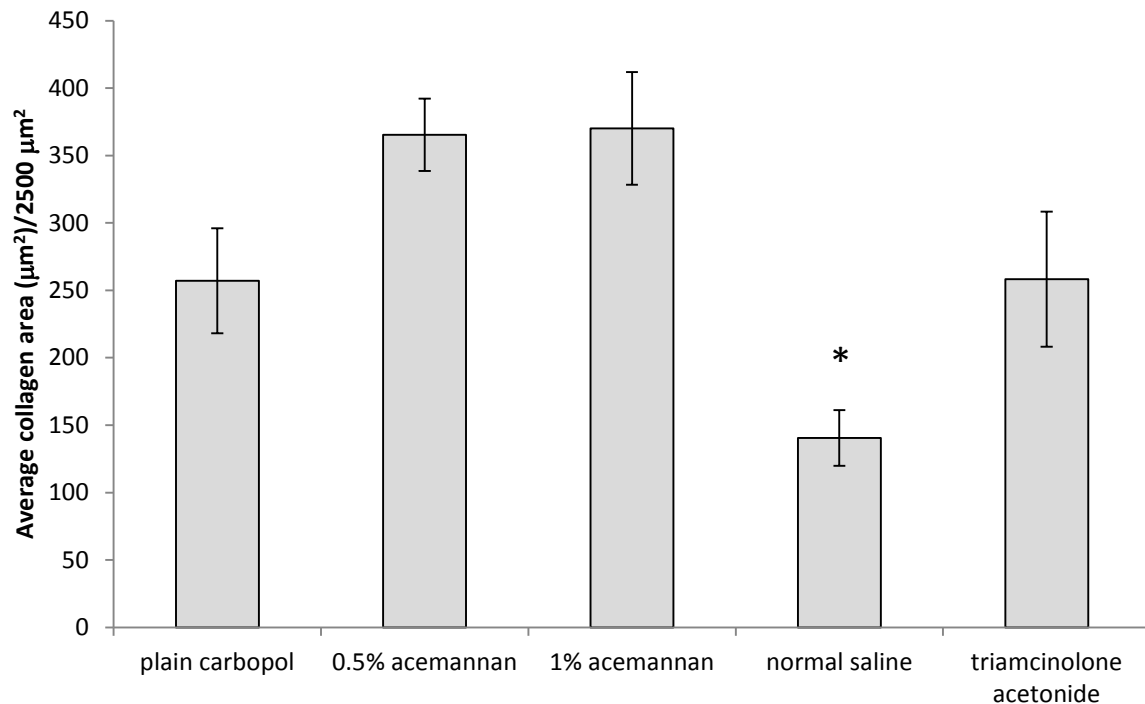
ภาพที่ 8 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทาสารคาร์โบพอลเปล่าเป็นเวลา 7 วัน
(เส้นทึบสีดำแสดงตำแหน่งที่เครื่องมือกดเพื่อสร้างบาดแผล;
ย้อมสีอีมาทอคซิลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่า)



ภาพที่ 9 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทานน้ำเกลือปราศจากเชื้อเป็นเวลา 7 วัน
(เส้นทึบสีดำแสดงตำแหน่งที่เครื่องมือกดเพื่อสร้างบาดแผล;
ย้อมสีอีมาทอคซิลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่า)



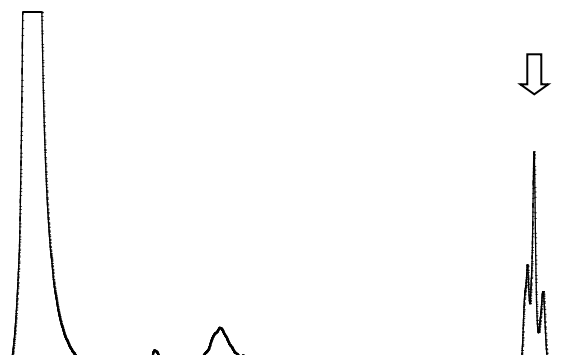
ภาพที่ 10 ลักษณะทางจุลพยาธิวิทยาของบาดแผลหนูทดลองกลุ่มที่ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ เป็นเวลา 7 วัน (เส้นทึบสีดำแสดงตำแหน่งที่เครื่องมือกดเพื่อสร้างบาดแผล; ย้อมสีอีมาทอคซิลินและอีโอซิน กำลังขยาย 10 เท่า)



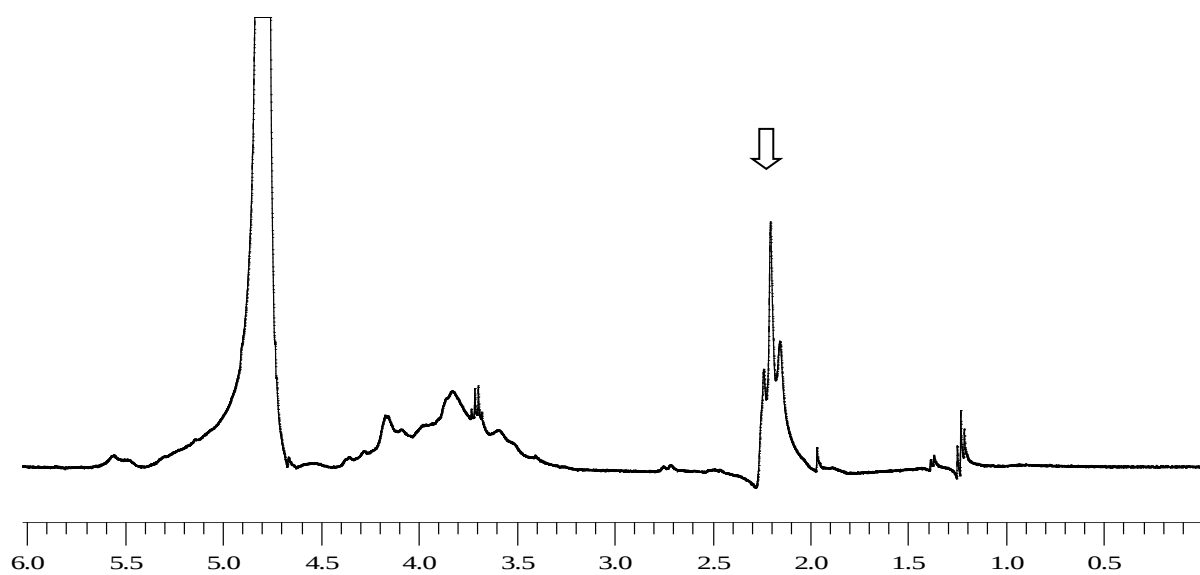
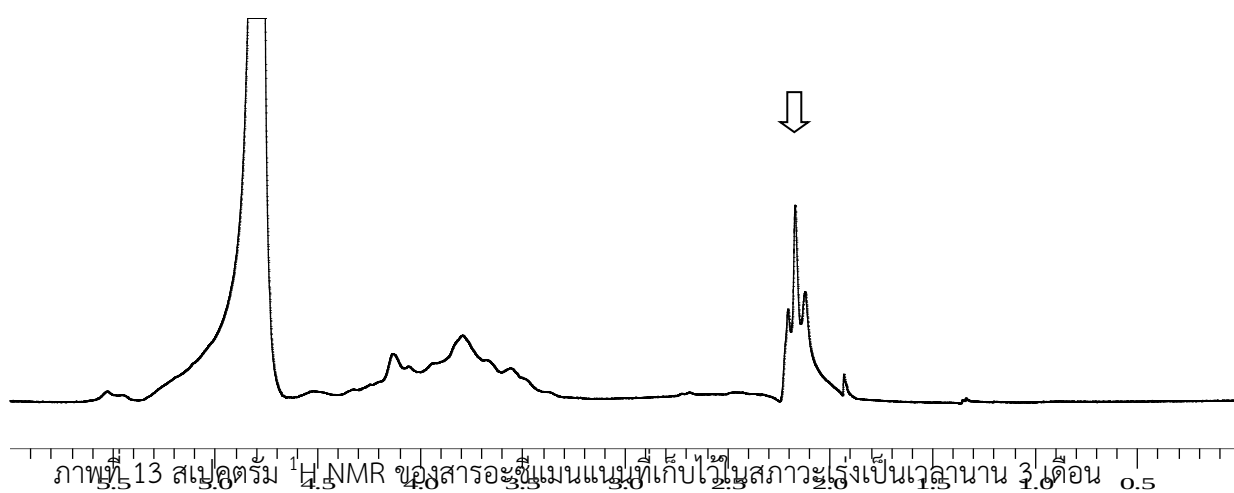
ภาพที่ 11 การวิเคราะห์ชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันของบาดแผลที่ย้อมด้วยสีแมชของส์ ไตรโครม พบว่า แผลที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 มีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มที่ ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ สารคาร์โบพอลเปล่า และน้ำเกลือปราศจากเชื้อ (* แสดงให้เห็นถึงความแตกต่างระหว่างกลุ่มอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติกับกลุ่มทดลองอื่นๆ; $p < 0.05$, $n = 5$)

ความคงตัวของสารอะซีแมนแนนหลังจากเก็บรักษาในสภาวะเร่ง

หลังจากเก็บสารอะซีแมนแนนในสภาวะเร่งเป็นเวลานาน 3 และ 6 เดือนพบว่า สารอะซีแมนแนน ยังคงมีลักษณะเป็นผง ไม่มีการจับตัวเป็นก้อน และยังคงละลายในน้ำกลั่นบริสุทธิ์ จากการตรวจสอบ สเปกตรัม ^1H NMR พบหมู่อะเซทิลซึ่งบ่งบอกถึงอะซีแมนแนนได้จากสเปกตรัมได้ที่ตำแหน่ง 2.119 – 2.215 ppm (ภาพที่ 12 และ 13) ในขณะเดียวกันเมื่อเปรียบเทียบกับสเปกตรัมสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่ พบ หมู่อะเซทิลที่ตำแหน่งใกล้เคียงกัน (ภาพที่ 14)



ภาพที่ 12 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนที่เก็บไว้ในสภาวะเร่งเป็นเวลานาน 6 เดือน
(ตำแหน่งลูกศรเป็นตำแหน่งหมู่อะเซทิล)



ภาพที่ 14 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่
(ตำแหน่งลูกศรเป็นตำแหน่งหมู่อะเซทิล)

การอภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย ทำให้เกิดความเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย เนื่องจากเนื้อเยื่อในช่องปากมีการเคลื่อนไหวสูง และได้รับการระคายเคืองได้ง่ายจากอาหารหรือเครื่องดื่มนในชีวิตประจำวัน⁽¹⁾ แนวทางการรักษาแผลในช่องปากปัจจุบันยังคงเป็นการรักษาตามอาการ โดยแนะนำให้ผู้ป่วยใช้ยาในกลุ่มสเตียรอยด์รอยทาเฉพาะที่เพื่อลดการอักเสบ⁽⁴⁰⁾

โรคเบาหวานเป็นโรคทางระบบที่ก่อให้เกิดภาวะแทรกซ้อนหลายระบบในร่างกาย รวมทั้งผลกระทบต่อการทำงานของบาดแผล โดยพบว่าผู้ป่วยโรคเบาหวานมีความเสี่ยงต่อการเป็นแผลเรื้อรัง เนื่องจากความผิดปกติของหลอดเลือดขนาดเล็กทำให้บาดแผลขาดออกซิเจนและสารอาหารมาเลี้ยง การทำงานของเม็ดเลือดขาว

บกพร่องทั้งในแง่การเคลื่อนที่เข้าสู่บริเวณบาดแผลและการกำจัดเชื้อโรค^(2, 3) ลดอัตราการสร้างเซลล์สร้างเส้นใย⁽⁴⁾ และลดอัตราการสร้างเส้นใยคอลลาเจน^(2, 5) ดังนั้นการพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยโดยการค้นคว้าสารทางเลือก โดยเฉพาะอย่างยิ่งสารที่สามารถกระตุ้นการหายของแผลได้โดยตรงจึงมีความสำคัญ มีการรายงานถึงผลของสมุนไพรหลายชนิดในการส่งเสริมการหายของแผลเบาหวานบริเวณผิวหนัง⁽⁴¹⁻⁴³⁾ แต่อย่างไรก็ตามยังไม่มีรายงานผลของสมุนไพรต่อการหายของแผลในช่องปากในสภาวะเบาหวาน

ว่านหางจระเข้ประกอบด้วยสารหลายชนิด โดยมีน้ำเป็นส่วนใหญ่ พอลิแซ็กคาไรด์ และสารอื่น ๆ ได้แก่ กรดอะมิโน เอนไซม์ต่าง ๆ วิตามินเอ วิตามินซี วิตามินอี แมกนีเซียม สังกะสี แคลเซียม ลิกนิน (lignins) ซาโปนิน (saponins) และสเตอรอล (sterols) เป็นต้น⁽²¹⁻²³⁾ ว่านหางจระเข้เป็นสมุนไพรที่ใช้ในการรักษาแผลบริเวณผิวหนังมาช้านาน โดยเฉพาะอย่างยิ่งแผลไฟไหม้⁽⁴⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานพบว่า ว่านหางจระเข้สามารถรักษาแผลในกระเพาะอาหาร^(45, 46) และรอยโรคไลเคน พลาเนียในช่องปาก⁽⁴⁷⁾ การศึกษาในสัตว์ทดลองพบว่า บาดแผลบริเวณผิวหนังที่ทำว่านหางจระเข้มีการหายของแผลที่เร็วกว่าและมีการอักเสบที่น้อยกว่าแผลปกติ^(48, 49) การรับประทานว่านหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดหนูทดลอง^(12, 50) และมนุษย์⁽⁵¹⁾

สารอะซีแมนแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์หลักจากว่านหางจระเข้⁽²³⁾ สามารถกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว โดยกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์หลายชนิดจากแมคโครฟาจ^(13, 33, 34) และสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และส่งเสริมการสร้างโกรทแฟกเตอร์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล ได้แก่ เคอราติโนไซต์ โกรทแฟกเตอร์-1 และวาสคูลาเอนโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์⁽¹⁶⁾ ดังนั้นสารอะซีแมนแนนจึงน่าจะมีบทบาทต่อทั้งระยะการอักเสบ และระยะการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ของการหายของแผล

การศึกษานี้ได้จำลองลักษณะแผลในช่องปากในสภาวะเป็นโรคเบาหวาน โดยการเหนี่ยวนำหนูทดลองให้เป็นเบาหวานโดยฉีดสารสเตโรปโทโซซิน ซึ่งสารนี้จะทำลายเบต้า เซลล์ของตับอ่อนโดยตรงทำให้ไม่สามารถผลิตอินซูลินได้ ทำให้เมตาบอลิซึมของน้ำตาล โปรตีน และไขมันในร่างกายเปลี่ยนแปลงไป⁽⁵²⁾ โรคเบาหวานแบ่งออกเป็น 2 ชนิด ได้แก่ โรคเบาหวานแบบที่ 1 ซึ่งเกิดจากการทำลายเบต้า เซลล์เนื่องจากความผิดปกติของระบบภูมิคุ้มกัน และโรคเบาหวานแบบที่ 2 ซึ่งเกิดจากร่างกายไม่สามารถนำอินซูลินที่ผลิตได้ไปใช้ร่วมกับมีการผลิตอินซูลินที่ลดลง ผู้ป่วยเหล่านี้ประมาณหนึ่งในสามจะมีการตายของเบต้าเซลล์เนื่องจากขบวนการอะพอพโทซิส (apoptosis) ดังนั้นจะเห็นว่าการเกิดเบาหวานทั้งสองแบบนี้จะมีการผลิตอินซูลินไม่เพียงพอ ทำให้เกิดการดำเนินของโรคเบาหวาน และภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ เกิดขึ้น⁽⁵³⁾ ถึงแม้ว่าภาวะจำลองเบาหวานในการศึกษานี้ไม่อาจแสดงการเกิดเบาหวานที่เกี่ยวข้องกับความอ้วน หรือการเกิดเบาหวานที่มีการพัฒนาของโรคอย่างช้า ๆ และภาวะแทรกซ้อนต่าง ๆ ที่เกิดขึ้นในมนุษย์ได้ครบทุกสภาวะ แต่ภาวะจำลองนี้ก็สามารถแสดงถึงลักษณะการมีน้ำตาลในเลือด หรือน้ำตาลปริมาณสูงซึ่งส่งผลต่อการหายของแผลในช่องปากได้⁽⁵²⁻⁵⁵⁾

การศึกษานี้พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ทำสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีขนาดแผลเล็กกว่าหนูทดลองที่ทำสารคาร์โบพอลเปล่า น้ำเกลือ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ถึงแม้ว่าแผลที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 จะมีขนาดเล็กกว่าแผลที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 1 แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ ผลการศึกษานี้สอดคล้องกับผลการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยซึ่งพบว่า สารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 สามารถกระตุ้นการหายของแผล

ในช่องปากหนูทดลองในสภาวะปกติเมื่อเปรียบเทียบกับยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ น้ำเกลือ และสารคาร์โบพอลเปล่า⁽¹⁶⁾ โดยผลนี้อาจเนื่องมาจากสารอะซีแมนแนนกระตุ้นการหายของแผลทั้งระยะการอักเสบโดยการกระตุ้นหลังไซโตไคน์จากแมคโครฟาจ^(13, 33, 34) และระยะการสร้างเนื้อเยื่อใหม่กระตุ้นการเพิ่มจำนวนและการทำงานของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกในการสร้างโครงกระดูก และคอลลาเจน⁽¹⁶⁾

อย่างไรก็ตามหนูทดลองกลุ่มที่ทาสารคาร์โบพอลเปล่ามีขนาดแผลที่เล็กกว่ากลุ่มที่ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ ผลการศึกษาที่พบอาจเนื่องจากสารคาร์โบพอลเปล่ามีผลในการป้องกันบาดแผลจากการระคายเคืองจากสภาพแวดล้อมในช่องปาก ทำให้เกิดสภาวะที่เหมาะสมต่อการหายของแผล^(16, 56)

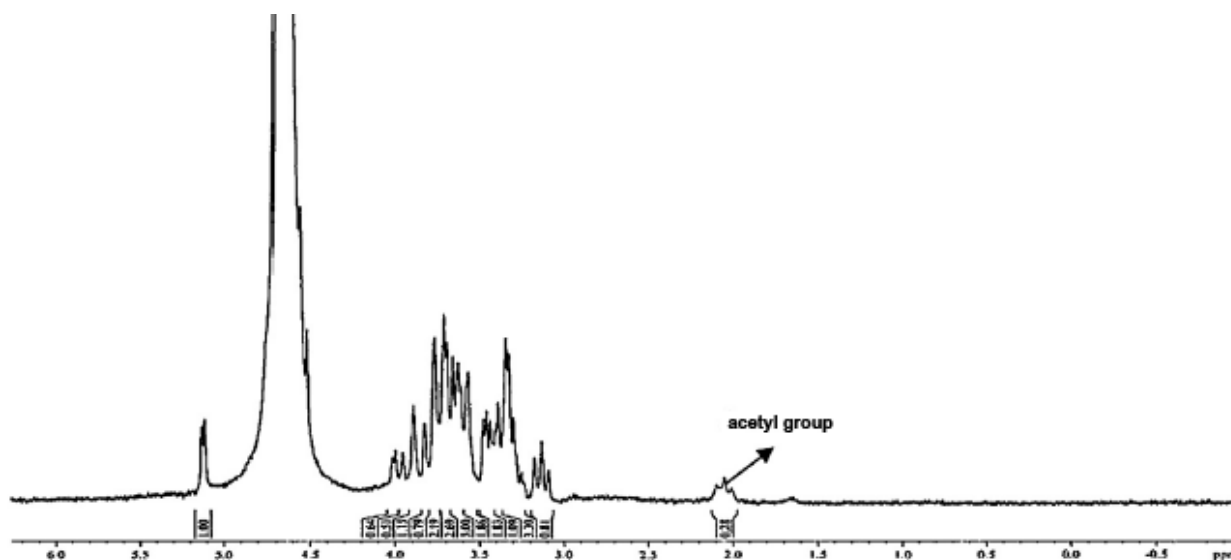
ในขณะที่หนูทดลองกลุ่มที่ทายาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ซึ่งเป็นยาที่แนะนำให้ใช้ทาแผลในช่องปากทั่วไป มีขนาดของแผลใหญ่ที่สุด อาจเนื่องจากยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์เป็นยาในกลุ่มสเตอรอยด์ ซึ่งออกฤทธิ์ในการลดการอักเสบของเนื้อเยื่อ⁽⁵⁷⁾ แต่ในสภาวะเบาหวาน เม็ดเลือดขาวชนิดนิวโทรฟิล และโมโนไซต์จะมีการตอบสนองต่อสารเหนี่ยวนำให้เคลื่อนที่ (chemotaxis) น้อยลง มีความสามารถในการกำจัดเชื้อโรคได้น้อยลง^(3, 53, 58) และมีไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบในกระแสเลือดสูงขึ้นทำให้บริเวณเนื้อเยื่อมีการอักเสบยาวนานกว่าปกติ^(53, 55, 58) จึงอาจทำให้เซลล์และเนื้อเยื่อบริเวณบาดแผลที่ได้รับยาไม่สามารถตอบสนองได้อย่างเหมาะสม ถึงแม้จะมีการศึกษาชี้ให้เห็นว่า ยาสเตอรอยด์สามารถลดการบวม และความเจ็บปวดของแผลจากการทำศัลยกรรมในช่องปาก โดยไม่มีผลเพิ่มความเสี่ยงต่อการติดเชื้อในช่องปาก และไม่ยับยั้งการหายของแผล⁽⁵⁹⁾ แต่ในขณะเดียวกันก็มีรายงานการศึกษาพบว่า ยาในกลุ่มสเตอรอยด์ยับยั้งการหายของบาดแผลโดยมีผลต่อหลายขบวนการในการหายของแผล⁽⁶⁰⁾ ได้แก่ ยับยั้งขบวนการอักเสบโดยการลดการสร้างพรอสตาไซคลินและไซโตไคน์ต่าง ๆ^(60, 61) ลดจำนวนเม็ดเลือดขาวที่เข้ามาสู่บริเวณบาดแผล⁽⁶⁰⁾ ยับยั้งการสร้างเนื้อเยื่อใหม่โดยการยับยั้งการแบ่งตัวของเซลล์บุผิวและเซลล์สร้างเส้นใย⁽⁶⁰⁾ ยับยั้งการสร้างหลอดเลือดใหม่⁽⁶²⁻⁶⁴⁾ ยับยั้งการสร้างคอลลาเจน^(65, 66) ดังนั้นบทบาทของยาสเตอรอยด์ต่อการหายของแผลในช่องปาก โดยเฉพาะอย่างยิ่งในสภาวะเบาหวานจึงควรมีการศึกษาต่อไป

การย้อมสีแมชของส์ ไตรโครมเป็นเทคนิคที่นิยมใช้ในการสังเกตปริมาณคอลลาเจนในตัวอย่างทางจุลพยาธิวิทยา⁽⁶⁷⁻⁶⁹⁾ โดยเส้นใยคอลลาเจนจะติดสีฟ้าหรือน้ำเงิน ในขณะที่เคราตินของเซลล์บุผิวจะติดสีแดง ไซโตพลาสซึมของเซลล์ต่างๆ จะติดสีแดงหรือชมพู และนิวเคลียสของเซลล์จะติดสีน้ำตาลเข้มหรือดำ ทำให้เห็นลักษณะของเส้นใยคอลลาเจนได้ชัดเจนกว่าการย้อมสีอีมาทอกซิลินและอีโอซิน^(68, 69) การศึกษาก่อนหน้านี้เกี่ยวกับลักษณะจุลพยาธิวิทยาของแผลเบาหวานพบว่า แผลจะมีเส้นใยคอลลาเจนที่บาง และกระจายตัว และเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกซึ่งเป็นเซลล์ที่ทำหน้าที่ในการสร้างคอลลาเจนมีลักษณะแตกต่างไปจากปกติ มีการเพิ่มจำนวนและการเคลื่อนที่ลดลง⁽⁷⁰⁻⁷²⁾ โดยคาดว่าเกิดจากการส่งสัญญาณผ่านการจับกันของแอดวานซ์ กลัยเคชัน เอน โพรดัคท์ (advanced glycation end-products; AGEs) ที่เกิดในสภาวะเบาหวานกับตัวรับ (receptor for advanced glycation end-products; RAGE)⁽⁷³⁾ ในการศึกษาเมื่อหนูทดลองได้รับสารอะซีแมนแนนทั้งสองความเข้มข้นพบว่า บาดแผลมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำเกลืออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ สอดคล้องกับการศึกษาของ Chithra และคณะที่พบว่า ไขมันทางจะเข้าสู่สามารถกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนและการหายของแผลบริเวณผิวหนังหนูที่เป็นเบาหวาน⁽¹²⁾ และจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยที่พบว่า สารอะซีแมนแนนกระตุ้นการสร้างคอลลาเจนจากเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก⁽¹⁶⁾ ดังนั้นสารอะซีแมนแนนจึงเป็นสารออกฤทธิ์ในไขมันทางจะเข้าสู่ที่ส่งเสริมการสร้างคอลลาเจนในบาดแผลที่เป็นเบาหวาน อย่างไรก็ตามถึงแม้ว่าปริมาณคอลลาเจนในบาดแผลของกลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับสารคาร์โบพอลเปล่า และ

ยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์ แต่ความแตกต่างนี้ไม่มีนัยสำคัญทางสถิติ อาจเนื่องมาจากในสภาวะเบาหวาน ซึ่งมีแอดวานส์ โกลเซซัน เอน โพรดักต์ อาจทำให้เซลล์สร้างเส้นใยไม่สามารถตอบสนองต่อการกระตุ้นคอลลาเจนได้อย่างสมบูรณ์

เมื่อพิจารณาระดับน้ำตาลในเลือดพบว่า หนูทดลองกลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนนมีระดับน้ำตาลในเลือดในวันที่ได้รับการผ่าตัดให้เกิดแผลในช่องปาก และเมื่อได้รับสารทดสอบครบ 7 วัน ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ แสดงให้เห็นว่า สารอะซีแมนแนนไม่มีผลลดระดับน้ำตาลในเลือด ซึ่งแตกต่างผลของวุ้นว่านหางจระเข้ซึ่งสามารถลดระดับน้ำตาลในเลือดได้^(12, 50, 51, 74) อาจเนื่องมาจากการศึกษาผลของการลดระดับน้ำตาลของวุ้นว่านหางจระเข้เป็นการบริโภคในปริมาณสูงกว่าปริมาณสารอะซีแมนแนนที่ใช้ทาแผลในการศึกษา นี้ และอาจเป็นผลจากการออกฤทธิ์ร่วมกันของสารหลากหลายในวุ้นว่านหางจระเข้ อาจจะมีได้เป็นเพียงผลจากสารอะซีแมนแนนเพียงสารเดียว

ความคงตัวของสารออกฤทธิ์ และผลิตภัณฑ์เป็นข้อมูลสำคัญในขั้นตอนการพัฒนาสู่การนำไปใช้ประโยชน์ โดยทำให้สามารถกำหนดสถานะการเก็บรักษา และอายุการเก็บรักษา (shelf life) ที่เหมาะสม⁽⁷⁵⁾ คณะผู้วิจัยจึงศึกษาความคงตัวของสารอะซีแมนแนนในเบื้องต้น ในการบ่งชี้ถึงสารอะซีแมนแนนจากวุ้นว่านหางจระเข้ด้วยการใช้เทคนิค ^1H NMR ดัดแปลงจาก Bozzi และคณะ และ Ray และ Aswatha ผลการทดลองพบรูปแบบของสเปกตรัมมีความคล้ายคลึงกับ Ray และ Aswatha (ภาพที่ 15)⁽³⁸⁾ โดยปกติสารอะซีแมนแนนมีกลุ่มแมนแนนที่ถูกอะเซทิลเลตที่ตำแหน่ง 2 3 และ 6 ดังนั้นจึงสังเกตุอะซีแมนแนนจากหมู่อะเซทิลที่ตำแหน่งของสเปกตรัมประมาณ 2.00 - 2.26 ppm⁽³⁷⁾ จากการทดลองนี้ พบหมู่อะเซทิลในตำแหน่งใกล้เคียงกัน คือ 2.119 - 2.215 ppm



ภาพที่ 15 สเปกตรัม ^1H NMR ของสารอะซีแมนแนนจากการทดลองของ Ray และ Aswatha พบหมู่อะเซทิลที่ตำแหน่งลูกศรชี้⁽³⁸⁾

ในการทดสอบความคงตัวของสารสำคัญในระยะเวลาการทดลองจำกัด มักใช้สภาวะเร่งเพื่อจำลองสถานการณ์ระยะเวลาจริง ดังนั้นตามแนวทางของ WHO⁽³⁶⁾ จึงได้เสนอให้ทดสอบที่อุณหภูมิ 40 องศาเซลเซียส ความชื้นสัมพัทธ์ร้อยละ 75 เป็นระยะเวลา 6 เดือน ซึ่งจากการทดลองนี้พบว่าหมู่อะเซทิล ซึ่งบ่งบอกถึงสารอะซีแมนแนนนั้นยังคงอยู่โดยตลอด ที่ 3 และ 6 เดือน เมื่อเปรียบเทียบกับขณะผลิตใหม่ ผลการทดลองนี้เป็นเพียงข้อมูลเบื้องต้นเกี่ยวกับความคงตัวของสารอะซีแมนแนน เพื่อการพัฒนารูปแบบในการเตรียมสารอะซีแมนแนนให้เหมาะสมในการใช้ในช่องปากต่อไป

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

ผลการวิจัยนี้สรุปว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการหายของแผลในช่องปากในสภาวะเป็นเบาหวานในหนูทดลอง แสดงให้เห็นว่าสารอะซีแมนแนนเป็นสารทางเลือกในการรักษาในแผลในช่องปากในสภาวะเบาหวานที่ควรพัฒนาต่อไปเพื่อนำไปสู่การใช้ในผู้ป่วย ดังนั้นความคงตัว และการพัฒนารูปแบบสารอะซีแมนแนนให้เหมาะสมกับการใช้ในช่องปาก มีความจำเป็นต้องศึกษาต่อไป

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลในสภาวะที่มีความบกพร่องอื่น ๆ หรือส่วนอื่นของร่างกาย มีความน่าสนใจในการศึกษาต่อไป เนื่องจากจะเป็นการสร้างทางเลือกให้กับผู้ป่วย และเป็นการเพิ่มมูลค่าให้วิสาหกิจทางจระเข้ และสมุนไพรต่อไป

บรรณานุกรม

1. Munoz-Corcuera M, Esparza-Gomez G, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Martinez A. Oral ulcers: clinical aspects. A tool for dermatologists. Part I. Acute ulcers. Clin Exp Dermatol. 2009;34(3):289-94.
2. Ekmektzoglou KA, Zografos GC. A concomitant review of the effects of diabetes mellitus and hypothyroidism in wound healing. World J Gastroenterol. 2006;12(17):2721-9.
3. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. Lancet. 2005;366(9498):1736-43.
4. Hehenberger K, Heilborn JD, Brismar K, Hansson A. Inhibited proliferation of fibroblasts derived from chronic diabetic wounds and normal dermal fibroblasts treated with high glucose is associated with increased formation of L-lactate. Wound Repair Regen. 1998;6(2):135-41.

5. Craig RG, Yu Z, Xu L, Barr R, Ramamurthy N, Boland J, et al. A chemically modified tetracycline inhibits streptozotocin-induced diabetic depression of skin collagen synthesis and steady-state type I procollagen mRNA. *Biochim Biophys Acta*. 1998;1402(3):250-60.
6. Goldman R. Growth factors and chronic wound healing: past, present, and future. *Adv Skin Wound Care*. 2004;17(1):24-35.
7. Branski LK, Pereira CT, Herndon DN, Jeschke MG. Gene therapy in wound healing: present status and future directions. *Gene Ther*. 2007;14(1):1-10.
8. Jarvis CI. Becaplermin (Regranex) for diabetic foot ulcers. *Am Fam Physician*. 2008;78(2):255.
9. Kwon MJ, An S, Choi S, Nam K, Jung HS, Yoon CS, et al. Effective healing of diabetic skin wounds by using nonviral gene therapy based on minicircle vascular endothelial growth factor DNA and a cationic dendrimer. *J Gene Med*. 2012;14(4):272-8.
10. Goldstein LJ. Hyperbaric oxygen for chronic wound. *Dermatol Ther*. 2013;26(3):207-14.
11. Aydin F, Kaya A, Karapinar L, Kumbaraci M, Imerci A, Karapinar H, et al. IGF-1 increases with hyperbaric oxygen therapy and promotes wound healing in diabetic foot ulcers. *J Diabetes Res*. 2013;2013:567834.
12. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 1998;59(3):195-201.
13. Talmadge J, Chavez J, Jacobs L, Munger C, Chinnah T, Chow JT, et al. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(14):1757-73.
14. Turner CE, Williamson DA, Stroud PA, Talley DJ. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *Int Immunopharmacol*. 2004;4(14):1727-37.
15. Kent EM. Use of an immunostimulant as an aid in treatment and management of fibrosarcoma in three cats. *Feline Practice*. 1993;21(6):13-7.
16. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *J Pharmacol Sci*. 2009;109(4):525-31.
17. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med*. 1999;341(10):738-46.
18. Aukhil I. Biology of wound healing. *Periodontol* 2000. 2000;22:44-50.
19. Hakkinen L, Uitto VJ, Larjava H. Cell biology of gingival wound healing. *Periodontol* 2000. 2000;24:127-52.
20. Reynolds T, Dweck AC. *Aloe vera* leaf gel: a review update. *J Ethnopharmacol*. 1999;68(1-3):3-37.

21. Sharraf Moghaddasi M. Aloe vera chemicals and usages. *Adv Environ Biol.* 2010;4(3):464-8.
22. Boudreau MD, Beland FA. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (miller), *Aloe vera*. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 2006;24(1):103-54.
23. Femenia A, Sanchez ES, Simal S, Rossello C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissue. *Carbohydrate Polymers.* 1999;39:109-17.
24. Dal'Belo SE, Gaspar LR, Maia Campos PM. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. *Skin Res Technol.* 2006;12(4):241-6.
25. West DP, Zhu YF. Evaluation of *Aloe vera* gel gloves in the treatment of dry skin associated with occupational exposure. *Am J Infect Control.* 2003;31(1):40-2.
26. Fani M, Kohanteb J. Inhibitory activity of Aloe vera gel on some clinically isolated cariogenic and periodontopathic bacteria. *J Oral Sci.* 2012;54(1):15-21.
27. Alemdar S, Agaoglu S. Investigation of *In vitro* antimicrobial activity of *Aloe vera* juice. *J Anim Vet Adv.* 2009;8(1):99-102.
28. Wynn RL. *Aloe vera* gel: update for dentistry. *Gen Dent.* 2005;53(1):6-9.
29. Vazquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. *J Ethnopharmacol.* 1996;55(1):69-75.
30. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. *Mol Cell Biochem.* 1998;181(1-2):71-6.
31. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. *J Ethnopharmacol.* 1998;59(3):179-86.
32. Fogleman RW, Shellenberger TE, Balmer MF, Carpenter RH, McAnalley BH. Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. *Vet Hum Toxicol.* 1992;34(2):144-7.
33. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. *Immunopharmacology.* 1996;35(2):119-28.
34. Djeraba A, Quere P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. *Int J Immunopharmacol.* 2000;22(5):365-72.
35. Kim YH, Choi MY, Kim YS, Park CH, Lee JH, Chung IY, et al. Triamcinolone acetone protects the rat retina from STZ-induced acute inflammation and early vascular leakage. *Life Sci.* 2007;81(14):1167-73.
36. WHO. Annex 2. Stability testing of active pharmaceutical ingredients and finished pharmaceutical products. World Health Organization. 2009.

37. Bozzi A, Perrin C, Austin S, Arce Vera F. Quality and authenticity of commercial aloe vera gel powders. *Food Chem.* 2007;103(1):22-30.
38. Ray A, Aswatha SM. An analysis of the influence of growth periods on physical appearance, and acemannan and elemental distribution of *Aloe vera* L. gel. *Ind Crop Prod.* 2013;48:36-42.
39. McAnalley BH, inventor Carrington Laboratories, Inc, assignee. Process for preparation of aloe products. United States patent 4851224. 1989 Jul 25.
40. Akintoye SO, Greenberg MS. Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am.* 2005;49(1):31-47.
41. Gupta A, Upadhyay NK, Sawhney RC, Kumar R. A poly-herbal formulation accelerates normal and impaired diabetic wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(6):784-90.
42. Tam JC, Lau KM, Liu CL, To MH, Kwok HF, Lai KK, et al. The in vivo and in vitro diabetic wound healing effects of a 2-herb formula and its mechanisms of action. *J Ethnopharmacol.* 2011;134(3):831-8.
43. Nayak SB, Pinto Pereira L, Maharaj D. Wound healing activity of *Carica papaya* L. in experimentally induced diabetic rats. *Indian J Exp Biol.* 2007;45(8):739-43.
44. Maethaisong R, Chaikunapruk N, Niruntraporn S, Kongkaew C. The efficacy of aloe vera used for burn wound healing: a systematic review. *Burns.* 2007;33(6):713-8.
45. Eamlamnam K, Patumraj S, Visedopas M, Thong-Ngam D. Effects of Aloe vera and sucralfate on gastric microcirculatory changes, cytokine levels and gastric ulcer healing in rats. *World J Gastroenterol.* 2006;12(13):2034-9.
46. Mahattanadul S. Antigastric ulcer properties of *Aloe vera*. *Songklanakarin J Sci Technol.* 1996;18(1):49-57.
47. Choonhakarn C, Busaracome P, Sripanidkulchai B, Sarakarn P. The efficacy of aloe vera gel in the treatment of oral lichen planus: a randomized controlled trial. *Brit J Dermatol.* 2008;158(3):573-7.
48. Oryan A, Naeini AT, Nikahval B, Gorjian E. Effect of aqueous extract of *Aloe vera* on experimental cutaneous wound healing in rat. *Vet Arhiv.* 2010;80(4):509-22.
49. Subramanian S, Kumar DS, Arulselvan P. Wound healing potential of *Aloe vera* leaf gel studied in experimental rabbits. *Asian J Biochem.* 2006;1(2):178-85.
50. Kim K, Kim H, Kwon J, Lee S, Kong H, Im S-A, et al. Hypoglycemic and hypolipidemic effects of processed *Aloe vera* gel in a mouse model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Phytomedicine.* 2009;16:856-63.
51. Huseini HF, Kianbakht S, Hajiaghaee R, Dabaghian FH. Anti-hyperglycemic and anti-hypercholesterolemic effects of Aloe vera leaf gel in hyperlipidemic type 2 diabetic patients: A randomized double-blind placebo-controlled clinical trial. *Planta Med.* 2012;78(4):311-6.

52. Srinivasan K, Ramarao P. Animal models in type 2 diabetes research: an overview. *Indian J Med Res.* 2007;125(3):451-72.
53. Graves DT, Liu R, Alikhani M, Al-Mashat H, Trackman PC. Diabetes-enhanced inflammation and apoptosis--impact on periodontal pathology. *J Dent Res.* 2006;85(1):15-21.
54. Wei M, Ong L, Smith MT, Ross FB, Schmid K, Hoey AJ, et al. The streptozotocin-diabetic rat as a model of the chronic complications of human diabetes. *Heart Lung Circ.* 2003;12(1):44-50.
55. Silva JA, Lorencini M, Reis JR, Carvalho HF, Cagnon VH, Stach-Machado DR. The influence of type I diabetes mellitus in periodontal disease induced changes of the gingival epithelium and connective tissue. *Tissue cell.* 2008;40(4):283-92.
56. Pal K, Banthia AK, Majumdar DK. Polymeric hydrogels: Characterization and biomedical applications - A mini review. *Des Monomers Polym.* 2009;12:197-220.
57. Scully C. Clinical practice. Aphthous ulceration. *N Engl J Med.* 2006;355(2):165-72.
58. Abiko Y, Selimovic D. The mechanism of protracted wound healing on oral mucosa in diabetes. Review. *Bosn J Basic Med Sci.* 2010;10(3):186-91.
59. Dan AEB, Thygesen TH, Pinholt EM. Corticosteroid administration in oral and orthognathic surgery: a systematic review of the literature and meta-analysis. *J Oral Maxillofac Surg.* 2010;68(9):2207-20.
60. Karukonda SRK, Flynn TC, Boh EE, McBurney EI, Russo GG, Millikan LE. The effects of drugs on wound healing: part 1. *Int J Dermatol.* 2000;39(4):250-7.
61. Schäcke H, Döcke WD, Asadullah K. Mechanisms involved in the side effects of glucocorticoids. *Pharmacol Ther.* 2002;96(1):23-43.
62. Spandau UHM, Sauder G, Schubert U, Hammes H-P, Jonas JB. Effect of triamcinolone acetonide on proliferation of retinal endothelial cells in vitro and in vivo. *Br J Ophthalmol.* 2005;89(6):745-7.
63. Hartnett ME, Martiniuk DJ, Saito Y, Geisen P, Peterson LJ, McColm JR. Triamcinolone reduces neovascularization, capillary density and IGF-1 receptor phosphorylation in a model of oxygen-induced retinopathy. 2006;47(11):4975-82.
64. Gal P, Kilik R, Mokry M, Vidinsky B, Vasilenko T, Mozes S, et al. Simple method of open skin wound healing model in corticosteroid-treated and diabetic rats: standardization of semi-quantitative and quantitative histological assessments. *Vet Med-Czech.* 2008;53(12):652-9.
65. Ponc M, Kempenaar JA, Van Der Meulen-Van Harskamp GA, Bachra BN. Effects of glucocorticosteroids on cultured human skin fibroblasts - IV. Specific decrease in the synthesis of collagen but no effect on its hydroxylation. *Biochem Pharmacol.* 1979;28:2777-83.
66. Hein T, Mauch C, Hatamochi A, Krieg TH. Influence of corticosteroids on chemotactic response and collagen metabolism of human skin fibroblasts. *Biochem Pharmacol.* 1988;37(14):2723-9.

67. Braiman-Wiksmann L, Solomonik I, Spira R, Tennenbaum T. Novel insights into wound healing sequence of events. *Toxicol Pathol.* 2007;35(6):767-79.
68. Ukong S, Ampawong S, Kengkoom K. Collagen measurement and staining pattern of wound healing comparison with fixations and stains. *JMST.* 2008;22:37-41.
69. Suvik A, Effendy AWM. The use of modified masson's trichrome staining in collagen evaluation in wound healing study. *MJVR.* 2012;3(1):39-47.
70. Brem H, Tomic-Canic M. Cellular and molecular basis of wound healing in diabetes. *J Clin Invest.* 2007;117(5):1219-22.
71. Desta T, Li J, Chino T, Graves DT. Altered fibroblast proliferation and apoptosis in diabetic gingival wounds. *J Dent Res.* 2010;89(6):609-14.
72. Devlin H, Garland H, Sloan P. Healing of tooth extraction sockets in experimental diabetes mellitus. *J Oral Maxillofac Surg.* 1996;54(9):1087-91.
73. Goova MT, Li J, Kislinger T, Qu W, Lu Y, Bucciarelli LG, et al. Blockade of receptor for advanced glycation end-products restores effective wound healing in diabetic mice. *Am J Pathol.* 2001;159(2):513-25.
74. Atiba A, Ueno H, Uzuka Y. The effect of aloe vera oral administration on cutaneous wound healing in type 2 diabetic rats. *J Vet Med Sci.* 2011;73(5):583-9.
75. Bajaj S, Singla D, Sakhuja N. Stability testing of pharmaceutical products. *J App Pharm Sci.* 2012;2(3):129-38.

ผลของสารอะซีแมนแนนจากซึ่งสกัดส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ต่อ
การเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก
Study of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on oral epithelial cell migration
and differentiation

หัวหน้าโครงการวิจัย
อ.ทญ.ดร.สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ
ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์
มหาวิทยาลัยนเรศวร

ผู้ร่วมวิจัย
ศ.ทพ.ดร.พสุธา รัญญะกิจไพศาล
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์
จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

ได้รับทุนอุดหนุนการวิจัยจากสำนักงานคณะกรรมการวิจัยแห่งชาติ

พ.ศ. 2557

ชื่อโครงการ ผลของสารอะซีแมนแนนจากซึ่งสกัดส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ต่อการเคลื่อนที่ และ
การเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก
Study of acemannan, *Aloe vera* gel extract, on oral epithelial cell migration
and differentiation

ระยะเวลาทำวิจัย 1 ปี 8 เดือน ตั้งแต่ 31 สิงหาคม 2555 ถึง 30 เมษายน 2557

คณะผู้วิจัย 1. อ.ทญ.ดร. สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ
ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066
2. ศ.ทพ.ดร. พสุธา รัญญะกิจไพศาล

ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
ถนนอังรีดูนังต์ เขตปทุมวัน กทม. 10330
โทรศัพท์ 0-2218-8885

บทคัดย่อ

เยื่อบุผิวช่องปากเป็นเนื้อเยื่อที่ทำหน้าที่ในการปกป้องช่องปากจากสิ่งระคายเคืองต่าง ๆ การฉีกขาดของชั้นเยื่อบุผิวนี้ทำให้เกิดบาดแผล โดยเซลล์บุผิวช่องปากจะเคลื่อนที่และเปลี่ยนสภาพเพื่อซ่อมแซมชั้นเยื่อบุผิวที่ฉีกขาด ลดโอกาสเกิดการติดเชื้อ และความเจ็บปวด การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้ต่อการเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก โดยทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์จากชิ้นเนื้อจากการผ่าตัดฟันคุดของอาสาสมัครที่สุขภาพแข็งแรง จากนั้นศึกษาผลของสารอะซีแมนแนน (ความเข้มข้น 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์โดยใช้เทคนิคการชุดพื้นจานเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อสร้างบาดแผลจำลอง และถ่ายภาพเซลล์ที่เวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมง นำมาคำนวณร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากศึกษาโดยใช้วิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชัน ของ ยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 พีแลคกริน และเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส1 ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง นอกจากนี้ยังศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ (เชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans*) ด้วยวิธีดิสก์ ดิฟฟิวชัน ผลการศึกษาพบว่า เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เซลล์บุผิวช่องปากมีการเคลื่อนที่มากกว่า

กลุ่มควบคุมที่ไม่ได้รับสารอะซีแมนแนนได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) นอกจากนี้เมื่อเซลล์ได้รับสารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่า ลักษณะของเซลล์เปลี่ยนไปสู่ลักษณะการเปลี่ยนสภาพ โดยสูญเสียลักษณะหลายเหลี่ยมไป และเซลล์กลมใหญ่ขึ้น และเซลล์ที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมงมีการแสดงออกของยีนทรานสกลูตามิเนส 1 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n=3$) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า สารอะซีแมนแนนไม่มีฤทธิ์โดยตรงในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans* ดังนั้นจึงสรุปได้ว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก

คำสำคัญ เซลล์บุผิวช่องปาก สารอะซีแมนแนน วานทางจระเข้ การเคลื่อนที่ การเปลี่ยนสภาพ ฤทธิ์ต้านจุลชีพ

Abstract

Oral epithelium is the protective layer of the oral cavity. The disruption of oral epithelium causes ulcer and pain. As a response to injury, oral epithelial cells migrate and differentiate to restore the tissue integrity. The objective of this study was to evaluate the effect of acemannan on oral epithelial cell migration and differentiation. The oral epithelial cells were prepared from gingival tissue obtained from the surgical removal of the impacted tooth from healthy volunteers. The effect of acemannan at various concentrations (0.25, 0.5, 1, 2 and 4 mg/ml) on cell migration was studied by *in vitro* scratch wound assay. The pictures of cells were taken at 0, 4 and 8 hours and then the percentage of cell migration of each group was calculated. The effect of acemannan on oral epithelial cell differentiation was evaluated by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) of keratin K5, keratin K1, filaggrin, transglutaminase1 at 24 and 48 hours. The antimicrobial activity of acemannan on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans* was performed by disk diffusion assay. From this study, Acemannan at concentrations of 0.25, 0.5, 1 and 2 mg/ml significantly stimulate oral epithelial cell migration as compared to untreated control group at 8 hours ($p < 0.05$, $n=3$). After cells were treated with acemannan for 24 and 48 hours, the cell morphology was changed to the differentiated phenotype, lost of polygonal feature with large round shape. From the RT-PCR at 48 hours, acemannan at concentrations 0.25 and 1 mg/ml significantly induced the expression of the epithelial late

differentiation marker, transglutaminase1, as compared to untreated control group ($p < 0.05$, $n = 3$). The disk diffusion assay showed that acemannan did not have antimicrobial activity on *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. In conclusion, Acemannan stimulated oral epithelial cell migration and differentiation

Key word: Oral epithelial cell, acemannan, *Aloe vera*, migration, differentiation, antimicrobial activity

บทนำ

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย และก่อให้เกิดความเจ็บปวด ส่งผลกระทบถึงคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย⁽¹⁾ การรักษาแผลในช่องปากในปัจจุบันเน้นการรักษาตามอาการ ได้แก่ การให้ยาสเตียรอยด์ทาเฉพาะที่เพื่อบรรเทาอาการอักเสบ การให้ยาชาเฉพาะที่เพื่อบรรเทาอาการปวด⁽²⁾ โดยยังไม่มียาหรือสารออกฤทธิ์ซึ่งส่งเสริมขบวนการหายของบาดแผลในช่องปากโดยตรง และนอกจากนี้การได้รับยาสเตียรอยด์ติดต่อกันเป็นเวลานานจะส่งผลให้เกิดการติดเชื้อซ้ำในช่องปาก⁽³⁾ ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีแนวคิดในการนำวุ้นว่านหางจระเข้ซึ่งเป็นสมุนไพรที่มีการใช้ในการรักษาแผลบริเวณผิวหนังมาใช้ในการรักษาแผลในช่องปาก

สารอะซีแมนแนนเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์ซึ่งสกัดได้จากวุ้นว่านหางจระเข้ ซึ่งจากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยพบว่า สารอะซีแมนแนนมีผลต่อเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก (gingival fibroblasts) ซึ่งเป็นเซลล์ที่จำเป็นต่อการหายของแผล โดยกระตุ้นการเพิ่มจำนวนเซลล์ (proliferation) และเหนี่ยวนำการหลั่งวาสคูเลเอนโดทีเลียล โกรทแฟคเตอร์ (vascular endothelial growth factor; VEGF) ซึ่งเป็นโกรทแฟคเตอร์ที่มีบทบาทในการสร้างเส้นเลือดใหม่ (angiogenesis) เข้ามาหล่อเลี้ยงบาดแผล และยังส่งเสริมการสร้างเส้นใยคอลลาเจนให้เพิ่มขึ้นด้วย⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามในการหายของบาดแผลต้องอาศัยเซลล์บุผิว (epithelial cells) ในการสร้างชั้นเยื่อบุผิวขึ้นใหม่ (re-epithelialization) ปิดปากแผลเพื่อลดการติดเชื้อ การเจ็บปวด และระคายเคือง โดยขบวนการนี้ต้องมีการเคลื่อนที่เข้าสู่บาดแผลของเซลล์บุผิวที่อยู่ข้างเคียง เพิ่มจำนวนและเปลี่ยนสภาพให้กลายเป็นชั้นเยื่อบุผิวปกติ หากแต่ผลของสารอะซีแมนแนนต่อเซลล์บุผิวช่องปาก และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพ (antimicrobial activity) ของสารอะซีแมนแนนยังไม่มีรายงานมาก่อน

ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงมีความสนใจศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก ซึ่งเป็นอีกขบวนการหนึ่งซึ่งมีบทบาทสำคัญในการหายของแผล และฤทธิ์การต้านเชื้อจุลชีพของสารอะซีแมนแนน ประโยชน์ที่ได้จากการศึกษานี้จะแสดงให้เห็นถึงกลไก ความปลอดภัยของสารอะซีแมนแนนต่อเซลล์ในช่องปาก และเป็นองค์ความรู้ในการนำสารสกัดจากวุ้นว่านหางจระเข้มาใช้ในทางทันตกรรม เป็นการต่อยอดภูมิปัญญาท้องถิ่นและส่งเสริมมูลค่าทางเศรษฐกิจของวุ้นว่านหางจระเข้ต่อไป

การทบทวนวรรณกรรมที่เกี่ยวข้อง

การหายของแผลในช่องปาก^(1, 2)

การหายของแผลในช่องปากมีขั้นตอนคล้ายกับการหายของบาดแผลทั่วไปของร่างกาย โดยสามารถแบ่งได้เป็น 3 ขั้นตอนที่เกี่ยวข้องต่อเนื่องกันไป ไม่สามารถแบ่งแยกได้อย่างชัดเจน ได้แก่ ระยะอักเสบ (inflammatory phase) ระยะการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ (proliferative phase) และระยะการปรับปรุงเนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่ (remodeling phase)

เมื่อเกิดบาดแผลและมีการฉีกขาดของหลอดเลือด เซลล์บุหลอดเลือด (endothelial cells) และเกร็ดเลือด (platelets) จะมีการสร้างลิ่มเลือด (blood clot) เพื่อหยุดการสูญเสียเลือดออกจากร่างกาย ในลิ่มเลือดที่สร้างขึ้นนี้จะมีไซโตไคน์ต่างๆ (cytokines) เช่น อินเตอร์ลิวคิน-1 (interleukin-1) ทูเมอร์เนโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา (tumor necrosis factor- α) ทรานฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์-เบต้า (transforming growth factor- β) เหนี่ยวนำให้นิวโทรฟิล (neutrophils) และแมคโครฟาจ (macrophages) เข้ามาสู่บาดแผลเพื่อทำลายสิ่งแปลกปลอม เชื้อโรคและเนื้อเยื่อที่ตาย

ระยะต่อมาบาดแผลจะเข้าสู่ระยะการสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โดยเซลล์บุผิวบริเวณขอบของบาดแผลจะเริ่มเคลื่อนที่ (migration) เข้าสู่บริเวณบาดแผล และเพิ่มจำนวนเพื่อป้องกันการติดเชื้อและการสูญเสียน้ำ ในขณะเดียวกันเซลล์สร้างเส้นใยก็มีการเคลื่อนที่ เพิ่มจำนวนและสร้างโปรตีนต่าง ๆ เพื่อสร้างเนื้อเยื่อใหม่ โปรตีนต่างๆ เหล่านี้ เช่น เคอราติโนไซต์โกรทแฟกเตอร์-1 (keratinocyte growth factor-1; KGF-1) ซึ่งสามารถส่งเสริมการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิว วัสดุคูลาเอนโดธีเลียลโกรทแฟกเตอร์ซึ่งเป็นโกรทแฟกเตอร์ที่มีผลเหนี่ยวนำการสร้างหลอดเลือดใหม่ เพื่อนำสารอาหารและออกซิเจนเข้าสู่บริเวณบาดแผล คอลลาเจนชนิดที่ 1 (type I collagen) ซึ่งเป็นเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (extracellular matrix) ทำให้เนื้อเยื่อที่สร้างขึ้นใหม่มีความแข็งแรงขึ้น

เมื่อเวลาผ่านไป บาดแผลจะเข้าสู่ระยะปรับปรุงเนื้อเยื่อ เพื่อปรับปรุงเส้นใยคอลลาเจนที่สร้างขึ้นใหม่ ให้มีความเป็นระเบียบ มีการเชื่อมโยงระหว่างเส้นใยมากขึ้น เพื่อเพิ่มความแข็งแรงให้กับเนื้อเยื่อที่สร้างใหม่

การเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวบริเวณบาดแผล⁽⁵⁾

ภายในเวลาไม่กี่ชั่วโมงภายหลังเกิดบาดแผล ร่างกายจะพยายามสร้างชั้นบุผิวขึ้นใหม่ โดยเซลล์บุผิวจากบริเวณข้างเคียงจะเกิดการหดตัว (retraction) ของโทโนฟิลาเมนต์ (tonofilament) ภายในเซลล์ เกิดการสลายตัว (dissolution) ของเดสโมโซม (desmosome) และเฮมิเดสโมโซม (hemidesmosome) เพื่อหลุดตัวออกจากเซลล์ข้างเคียงและเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้านใต้ พร้อมทั้งเกิดการสร้างเส้นใยแอกติน (actin filament) ในไซ

โทพลาสซึม (cytoplasm) เพื่อเกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ การเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวอาจถูกกระตุ้นได้โดยอีพีเดอร์มอล โกรทแฟคเตอร์ (epidermal growth factor) ทรานส์ฟอร์มมิงโกรทแฟคเตอร์ แอลฟา (transforming growth factor- α) และเคอราตินโอไซท์โกรทแฟคเตอร์ ขบวนการเคลื่อนที่ของเซลล์นี้ต้องอาศัยปฏิกิริยา (interaction) ระหว่างอินทิกริน (integrin) ชนิดต่าง ๆ และเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ ในขณะเดียวกันก็ต้องอาศัยเอนไซม์คอลลาจีเนส (collagenase) เพื่อสลายเมทริกซ์เหล่านั้นอีกด้วย

การเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก

เยื่อบุผิวช่องปาก (oral mucosa) มีลักษณะชั้นบุผิวเป็น stratified squamous epithelium ประกอบด้วยชั้นต่าง ๆ 4 ชั้น (strata) จากชั้นล่างสุดซึ่งติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันไปจนถึงชั้นบนสุดซึ่งติดกับช่องปาก ได้แก่ stratum basale stratum spinosum stratum granulosum และ stratum corneum ตามลำดับ เซลล์ที่อยู่ในชั้น stratum basale จะเป็นชั้นที่มีความสามารถในการเพิ่มจำนวนมากที่สุด และเมื่อเปลี่ยนสภาพ (differentiation) สู่เซลล์ในชั้นสูงขึ้นไปจะมีการสร้างไซโตเคอราติน (cytokeratin) และโปรตีนที่เกี่ยวข้องชนิดต่าง ๆ⁽⁶⁾ โดยเมื่อเซลล์บุผิวอยู่ในชั้น stratum basale จะมีการสร้างเคอราติน K5 (keratin K5) และเคอราติน K14 และเมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนสภาพสูงขึ้นจะมีการสร้างเคอราติน K1 และเคอราติน K10 ซึ่งถือเป็นตัวบ่งชี้ของการเปลี่ยนสภาพในระยะแรก (early differentiation marker)⁽⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีโปรตีนซึ่งเป็นตัวบ่งชี้ของการเปลี่ยนสภาพในระยะท้าย (late differentiation marker) ที่สำคัญ ได้แก่ ฟิแลคกริน (filaggrin) ซึ่งเป็นส่วนประกอบหลักของเคอราโตไฮยาลิน กรานูล (keratohyalin granule) ในชั้น stratum granulosum⁽⁸⁾ และ เอนไซม์ทรานส์กลูตามิเนส 1 (transglutaminase 1) ซึ่งมีบทบาทสำคัญในการสร้าง cornified cell envelope ซึ่งเป็นชั้นหนาของโปรตีนที่อยู่ภายในเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์ในชั้น stratum corneum⁽⁷⁾

ความเข้มข้นของแคลเซียมเป็นปัจจัยที่มีผลต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิว โดยแคลเซียมความเข้มข้นสูงจะเหนี่ยวนำให้เกิดการเปลี่ยนสภาพ และมีผลต่อการยึดเกาะระหว่างเซลล์บุผิวโดยเดสโมโซม (desmosome)^(8, 9) ซึ่งเป็นลักษณะเด่นของเซลล์ในชั้น stratum spinosum ในขณะที่การได้รับวิตามิน A (vitamin A) มากเกินไปจะมีผลยับยั้งการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิว^(8, 9)

เคอราติน

เคอราติน หรือไซโตเคอราติน (cytokeratin) เป็นอินเตอร์มีเดียท ฟิลาเมนต์ (intermediate filament) ซึ่งทำหน้าที่เป็นโครงร่างของเซลล์ที่พบเฉพาะในเซลล์บุผิว^(9, 10) มีลักษณะเป็นเกลียวแอลฟา (α -helical coils)⁽⁹⁾ ขนาดเส้นผ่าศูนย์กลางประมาณ 6 – 25 นาโนเมตร⁽¹⁰⁾ ในมนุษย์เคอราตินจะอยู่ในลักษณะเป็นคู่ โดยสายหนึ่งมีสมบัติเป็นกรด อีกสายหนึ่งจะมีสมบัติเป็นเบส^(9, 10) มีน้ำหนักโมเลกุล (molecular weight) ประมาณ 44 – 66 กิโลดาลตัน เส้นใยเคอราตินจะรวมตัวกันเป็นโครงร่างขนาดใหญ่กระจายอยู่ทั่วไปในไซโตพลาสซึมของเซลล์⁽⁹⁾ ใน stratified squamous epithelium เมื่อเซลล์บุผิวมีการเปลี่ยนสภาพจะมีการสร้างเคอราตินชนิดต่าง ๆ เปลี่ยนแปลงไปเมื่อเซลล์เคลื่อนที่ขึ้นสู่ชั้นบน โดยเคอราติน K5 และเคอราติน K14 เป็นคู่เคอราตินที่พบมากในชั้น stratum basale และพบลดลงเมื่อเซลล์เคลื่อนที่ขึ้นสู่ชั้น stratum spinosum ส่วนเคอราติน K1 และเคอราติน K10 เป็นคู่เคอราตินที่พบมากในชั้น stratum spinosum และ

ลดลงเมื่อเซลล์เคลื่อนขึ้นสู่ชั้น stratum granulosum⁽¹⁰⁾ นอกจากการเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของคู่เคอราตินจะแสดงถึงการเปลี่ยนสภาพของเยื่อบุผิวช่องปากที่ปกติดังที่กล่าวมาแล้ว การเปลี่ยนแปลงการแสดงออกของคู่เคอราตินอื่น ๆ ยังสัมพันธ์กับภาวะผิดปกติของเยื่อบุผิวช่องปากได้ เช่น epithelial dysplasia และ squamous cell carcinoma เป็นต้น⁽¹⁰⁾

ฟิแลคกริน

ฟิแลคกรินเป็นโปรตีนขนาดเล็กซึ่งถูกสร้างและสะสมในเคอราโตไฮยาลิน กราnul ของเซลล์ในชั้น stratum granulosum ในรูปโปรฟิแลคกริน เมื่อเซลล์เปลี่ยนสภาพขึ้นสู่ชั้น stratum corneum โปรฟิแลคกรินจะถูกเปลี่ยนเป็นฟิแลคกริน^(8, 9) โดยเอนไซม์โปรตีน ฟอสฟาเทส PP2A (protein phosphatase PP2A) โปรฟิแลคกริน เอนโดโปรตีนเนส1 (profilaggrin endoproteinase 1) และคัลเพน (calpain)⁽⁸⁾ ฟิแลคกรินทำให้เกิดพันธะไดซัลไฟด์ (disulphide bond) ระหว่างสายของเคอราติน เคอราตินจึงจับตัวแน่นขึ้น^(8, 10) นอกจากนี้ยังเชื่อว่า ฟิแลคกรินมีบทบาทเกี่ยวกับการสลายนิวเคลียสของเซลล์บุผิวในชั้น stratum corneum อีกด้วย เมื่อเซลล์มีการเปลี่ยนสภาพขึ้นสู่ชั้นบนของชั้น stratum corneum ฟิแลคกรินจะสลายกลายเป็นกรดอะมิโนที่มีบทบาทในการรักษาออสโมลาริตี (osmolarity) และความยืดหยุ่น (flexibility) ของเซลล์บุผิว หากมีการแสดงออกของฟิแลคกรินมากเกินไปจะทำให้ชั้นเคอราตินยุบตัวลง เกะกักรอบ ๆ นิวเคลียส ในขณะที่โรค ichthyosis vulgaris เป็นโรคที่เกิดจากการสร้างโปรฟิแลคกรินน้อยลงหรือไม่สร้างเลย จะพบผิวหนังของผู้ป่วยมีลักษณะแห้ง⁽⁸⁾

เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1

เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ทำหน้าที่ในการสร้างพันธะโควาเลนต์ ϵ -(γ -กลูตามิล)ไลซีน (ϵ -(γ -glutamyl)lysine) ระหว่างโปรตีนหลายชนิด เช่น โลริคริน (loricrin) อินวอลูคริน (involucrin) และโปรตีนขนาดเล็กซึ่งมีโพรลีนมาก (small proline-rich proteins; SPRs) เพื่อสร้างเป็น cornified cell envelope⁽⁸⁾ เป็นชั้นความหนาประมาณ 15 นาโนเมตรที่มีลักษณะแข็ง (rigidity) และไม่ละลายน้ำ (insolubility) อยู่ภายใต้เยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บุผิวเมื่อเซลล์เข้าสู่ระยะสุดท้ายของการเปลี่ยนสภาพในชั้น stratum corneum^(8, 11) cornified cell envelope นี้มีส่วนทำให้ชั้นบุผิวมีสมบัติเป็นด่านกั้น (barrier function) ซึ่งเป็นหน้าที่สำคัญประการหนึ่งของชั้นบุผิว นอกจากนี้เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ยังมีบทบาทในการสร้างพันธะระหว่าง ω -ไฮดรอกซีเซราไมด์ (ω -hydroxyceramide) เข้ากับโปรตีนของ cornified cell envelope เกิดเป็นชั้นบางของไขมันเพื่อป้องกันการสูญเสียน้ำ และการซึมผ่านของสารต่าง ๆ เข้าสู่ร่างกาย⁽¹²⁾ เอนไซม์ทรานกลูตามิเนสถูกสร้างในรูปไม่มีฤทธิ์ (inactive) ขนาดประมาณ 106 กิโลดาลตัน โดยมีการสร้างน้อยมากในเซลล์บุผิวที่กำลังแบ่งตัวเพิ่มจำนวน แต่มีการสร้างเพิ่มมากขึ้นเมื่อเซลล์บุผิวมีการเปลี่ยนสภาพ⁽¹²⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งในชั้น stratum granulosum⁽¹³⁾ เอนไซม์ส่วนใหญ่จะจับกับเยื่อหุ้มเซลล์ของเซลล์บุผิว และจะถูกทำให้มีฤทธิ์ (active) โดยการตัดของเอนไซม์ให้เป็นกลุ่มรวม (complex) ขนาด 10/67/33 กิโลดาลตัน⁽¹²⁾ ในหนูพันธุ์แท้ของการกลายพันธุ์ (homozygous mutation) ของยีนทรานกลูตามิเนส1 พบว่าผิวหนังมีความผิดปกติของการสร้าง cornified cell envelope ทำให้ชั้นบุผิวมีสภาพให้ซึมผ่านได้ (permeability) มากขึ้น

และหนูจะตายภายในระยะเวลาไม่นานหลังเกิดเนื่องจากการสูญเสียน้ำ⁽¹²⁾ เมื่อนำผิวหนังของหนูที่มีการกลายพันธุ์นี้ไปปลูกถ่าย (graft) บน athymic nude mice พบว่า มีการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวมาปิดบาดแผลซ้ำ และมีการหายของแผลซ้ำ แสดงให้เห็นถึงบทบาทของเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส1 ต่อการหายของแผลบริเวณผิวหนัง⁽¹⁴⁾

ว่านหางจระเข้

ว่านหางจระเข้เป็นพืชสมุนไพรที่มีการใช้แพร่หลายมาช้านานโดยการทาบริเวณผิวหนังทั้งในแง่การรักษาบาดแผลไฟไหม้ น้ำร้อนลวก น้ำแข็งกัด และการนำมาเป็นส่วนผสมในเครื่องสำอางหลายชนิด

ว่านหางจระเข้มีชื่อทางวิทยาศาสตร์ว่า *Aloe barbadensis* Miller (*Aloe vera* Linn.) เป็นพืชในวงศ์ Liliaceae มีลักษณะเป็นพืชอวบน้ำ สามารถปลูกและขยายพันธุ์ได้ง่ายแม้ในที่กึ่งหนาว⁽¹⁵⁾ ใบมีลักษณะเรียวยาว มีหนามตาขอบใบ ใบนี้มีเปลือกหนาสีเขียวเข้มคิดเป็นร้อยละ 20-30 ของน้ำหนักใบทั้งหมด และเนื้อด้านในมีลักษณะเป็นวุ้นใสซึ่งเป็นส่วนที่มีการสะสมน้ำคิดเป็นร้อยละ 70-80 ของน้ำหนักใบทั้งหมด⁽¹⁶⁾ ส่วนวุ้นใสด้านในนี้เองเป็นส่วนที่มีการนำมาใช้ทาบริเวณผิวหนังเพื่อบรรเทาอาการต่าง ๆ วุ้นว่านหางจระเข้ประกอบด้วยน้ำร้อยละ 90-99 ส่วนประกอบอื่น ๆ ได้แก่ คาร์โบไฮเดรต วิตามิน เกลือแร่ และเอนไซม์ต่าง ๆ^(15, 16)

มีรายงานผลทางชีววิทยา (biological activity) ของวุ้นว่านหางจระเข้มากมาย เช่น เพิ่มความชุ่มชื้นบริเวณผิวหนัง⁽¹⁷⁾ ลดการเกิดผื่นอักเสบ (erythema, irritant contact dermatitis)⁽¹⁸⁾ ด้านเชื้อแบคทีเรีย (antibacterial activity) เชื้อรา (antifungal activity) และต้านการอักเสบ (antiinflammatory activity)^(19, 20) และส่งเสริมการหายของแผลบริเวณผิวหนัง⁽²¹⁻²⁴⁾ นอกจากนี้ยังมีรายงานในหนูทดลองที่เป็นเบาหวานพบว่าการบริโภคร (oral administration) ส่วนวุ้นว่านหางจระเข้สามารถลดระดับน้ำตาลในเลือด และการบริโภคร และการทาว่านหางจระเข้สามารถส่งเสริมการหายของแผลบริเวณผิวหนังได้⁽²²⁾

สารอะซีแมนแนน

สารอะซีแมนแนนเป็นสารพอลิแซ็กคาไรด์หลักที่สกัดได้จากส่วนวุ้นของว่านหางจระเข้ มีลักษณะโครงสร้างเป็นแมนโนสต่อกันเป็นสายยาว (β -(1,4)-polymannose) การวิเคราะห์ทางเคมีพบว่าสารอะซีแมนแนนประกอบด้วยแมนโนสถึงร้อยละ 93.4 และกลูโคสและกาแลคโตสประมาณร้อยละ 3^(25, 26)

การศึกษาในหนูทดลองและสุนัขโดยให้บริโภครสารอะซีแมนแนนพบว่า การให้สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4,000 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวันในหนูทดลองเป็นเวลา 14 วัน และการให้สารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 1,500 มิลลิกรัมต่อกิโลกรัมของน้ำหนักตัวต่อวันในสุนัขเป็นเวลา 90 วันไม่ก่อให้เกิดภาวะเป็นพิษเกิดขึ้น⁽²⁷⁾

สารอะซีแมนแนนมีคุณสมบัติกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกัน (immunostimulant activity) โดยกระตุ้นการทำงานของแมโครฟาจ และเดนไดรติกเซลล์ (dendritic cells) กระตุ้นการสร้างไซโตไคน์หลายชนิดจากแมค

โครพาจ เช่น กรานูโลไซท์โคโลนีสติมูเลติงแฟกเตอร์ (granulocyte colony- stimulating factor) สเต็มเซลล์แฟกเตอร์ (stem cell factor) อินเตอร์ลิวคิน-6 และทูเมอร์เนคโครซิสแฟกเตอร์-แอลฟา^(25, 28, 29)

การศึกษาในเซลล์สร้างเส้นใยเหือกพบว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหือก อีกทั้งเหี่ยวว่าการสร้างเคอราติโนไซท์โกรทแฟกเตอร์-1 วาสคิวลาเอนโดทีเลียลโกรทแฟกเตอร์ และคอลลาเจนชนิดที่หนึ่ง⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก และฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารอะซีแมนแนน ซึ่งจะเป็นประโยชน์ในการส่งเสริมการหายของแผล ยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

เชื้อ *Staphylococcus aureus*

เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมบวกรูปร่างกลม (gram-positive cocci) ชนิดแพคัลเททีฟ แอนแอโรบ (facultative anaerobe) เติบโตได้ดีในสภาวะที่มีออกซิเจน และคาร์บอนไดออกไซด์ ที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส แต่เชื้อสามารถทนต่อสภาพแวดล้อมที่เป็นเกลือสูง ความเป็นกรดต่ำที่ผิดปกติ และอุณหภูมิสูงได้ อีกทั้งยังสามารถมีชีวิตอยู่ในอากาศแห้งได้เป็นเวลาหลายเดือน สามารถต้านทานต่อสารฆ่าเชื้อ (disinfectant) และยาปฏิชีวนะ (antibiotic) หลายชนิด⁽³⁰⁾

เชื้อ *Staphylococcus aureus* สามารถพบได้บริเวณผิวหนัง และเยื่อเมือกต่างๆ ของร่างกาย และเป็นสาเหตุสำคัญที่ทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาส (opportunistic infection) แก่ผู้ป่วย ทำให้เกิดการติดเชื้อเฉพาะที่ เป็นหนอง (abscess) และการติดเชื้อทางระบบ (systemic infection) รวมทั้งการติดเชื้อในโรงพยาบาล (nosocomial infection) ด้วย⁽³⁰⁾

ในทางทันตกรรมยังไม่มีที่แน่ชัดว่า เชื้อ *Staphylococcus aureus* เป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่น (normal flora) หรือไม่⁽³¹⁻³³⁾ แต่มีรายงานการพบเชื้อ *Staphylococcus aureus* ในช่องปากของผู้ป่วยเด็ก ผู้สูงอายุ^(31, 32) และผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบ เช่น โรคข้ออักเสบรูมาตอยด์ (rheumatoid arthritis) และมะเร็งเม็ดเลือดบางชนิด⁽³¹⁾ และพบว่าเชื้อ *Staphylococcus aureus* เกี่ยวข้องกับการติดเชื้อบริเวณช่องปากหลายชนิด เช่น มุมปากอักเสบ (angular cheilitis)^(31, 32) กระดูกขากรรไกรอักเสบเป็นหนอง (osteomyelitis of the jaw) ต่อมน้ำลายหน้าหูอักเสบ (parotitis) การติดเชื้อในคลองรากฟัน (endodontic infection)^(31, 33) ปากอักเสบเหตุฟันปลอม (denture stomatitis) และเยื่อช่องปากอักเสบ (oral mucositis) ในผู้ป่วยสูงอายุ⁽³¹⁾

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*

เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* เป็นเชื้อแบคทีเรียแกรมลบรูปร่างแท่ง (gram-negative rod) ชนิดออปลิเกตแอโรบ (obligate aerobe) ซึ่งสามารถพบได้ทั้งในดิน น้ำ น้ำลาย ผิวหนังและในลำไส้ของคนปกติ เนื่องจากเชื้อนี้ทนต่ออุณหภูมิสูง อากาศแห้ง สบู่ สีย้อม สารฆ่าเชื้อ และยาต่างๆ จึงทำให้เชื้อนี้เป็นอุปสรรคทางการแพทย์ต่างๆ ได้ ทำให้เกิดการติดเชื้อในโรงพยาบาล⁽³⁰⁾ และคลินิกทันตกรรม⁽³⁴⁾ และทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น เกิดผื่นที่ผิวหนัง (skin rash) เกิดหนอง โรคปอดอักเสบ (pneumonia) การติดเชื้อทางเดินปัสสาวะ (urinary tract infection) เยื่อหัวใจอักเสบ (endocarditis) และเยื่อหุ้มสมองอักเสบ (meningitis) เป็นต้น⁽³⁰⁾

เชื้อ *Candida albicans*

เชื้อ *Candida albicans* เป็นเชื้อราซึ่งเป็นจุลินทรีย์ประจำถิ่นในช่องปาก อวัยวะเพศ ลำไส้ใหญ่ และผิวหนังของมนุษย์ ซึ่งสามารถทำให้เกิดการติดเชื้อฉวยโอกาสเกิดเป็นโรคราแคนดิดา (candidiasis) ในผู้ที่ภูมิคุ้มกันต่ำ เช่น ผู้ป่วยที่อายุน้อยมาก ผู้ป่วยที่ได้รับเคมีบำบัด ผู้ป่วยภาวะภูมิคุ้มกันบกพร่อง เป็นต้น⁽³⁰⁾

เชื้อ *Candida albicans* มีความสามารถในการยึดเกาะบนพื้นผิววัสดุทางการแพทย์ได้หลายชนิด ในช่องปากเชื้อสามารถยึดเกาะกับวัสดุฐานฟันปลอมได้ จึงทำให้เป็นสาเหตุสำคัญของการติดเชื้อราในช่องปาก ทำให้เกิดอาการปากอักเสบเหตุฟันปลอม และมุมปากอักเสบ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผู้ป่วยสูงอายุที่มีโรคทางระบบรวมด้วย เช่น โรคเบาหวาน⁽³⁵⁻³⁷⁾ นอกจากนี้ยังมีการศึกษาพบว่า ในผู้ป่วยที่มีภูมิคุ้มกันบกพร่องและมีการติดเชื้อ *Candida albicans* ร่วมอาจส่งเสริมการเกิดฟันผุในผู้ป่วยให้มากขึ้น⁽³⁸⁾

วิธีการดำเนินการวิจัย

การเตรียมสารอะซีแมนแนนจากส่วนฟันของงูหางจรเข้ และการพิสูจน์เอกลักษณ์

ขั้นตอนการเตรียมสารอะซีแมนแนน และการพิสูจน์เอกลักษณ์ด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography และ fourier transformed infrared spectroscopy ดำเนินการตามขั้นตอนที่นำเสนอไว้ในโครงการย่อยที่ 1

การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์

เซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์เพาะเลี้ยงจากชิ้นเนื้อที่ได้จากการผ่าตัดฟันคุดจากอาสาสมัครที่มีสุขภาพดี ไม่มีโรคทางระบบ และไม่ได้รับการวินิจฉัยว่าเป็นผื่นอักเสบที่เหงือกอักเสบ (pericoronitis) ซึ่งมีอายุระหว่าง 18-30 ปี ณ โรงพยาบาลทันตกรรม คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร (ได้รับการรับรองโครงการวิจัยในมนุษย์ โดยคณะกรรมการจริยธรรมการวิจัยในมนุษย์ มหาวิทยาลัยนเรศวร เลขที่ 54 02 04 0016) โดยวิธีเพาะเลี้ยงดัดแปลงจากวิธีของ Oda และคณะ⁽³⁹⁾ กล่าวโดยย่อคือ หั่นชิ้นเนื้อที่ได้เป็นชิ้นเล็ก ๆ และบ่มด้วยเอนไซม์ดิสเปส (dispase; Invitrogen) ความเข้มข้นร้อยละ 0.4 ที่อุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสเป็นเวลาหนึ่งคืน จากนั้นแยกชั้นบุผิวและชิ้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันออกจากกันโดยใช้ปากคีบ นำชั้นบุผิวที่ได้มาย่อยให้เป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์ทริปซินความเข้มข้นร้อยละ 0.25 นำเซลล์ที่ได้มาทำการเพาะเลี้ยงในอาหารเลี้ยงเซลล์ชนิดเคอราตินไนท์ เบซัล มีเดียม (keratinocyte basal medium, KBM; Lonza, Walkersville, MD, USA) ที่มีอาหารเสริม (KBM SingleQuots; Lonza) และแคลเซียมคลอไรด์ (calcium chloride, CaCl₂; Asia Pacific Specialty Chemicals Limited, NSW, Australia) ความเข้มข้น 0.15 มิลลิโมลาร์ ภายใต้อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส สภาวะคาร์บอนไดออกไซด์ความเข้มข้นร้อยละ 5 จนมีความหนาแน่นประมาณร้อยละ 80 (80% confluence) จึงทำการเพาะเซลล์ต่อช่วง (subculture) สู่จานเพาะเลี้ยงที่ขนาดใหญ่ขึ้นโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน ความเข้มข้นร้อยละ 0.25 จนมีจำนวนเซลล์ตามต้องการจึงนำไปทำการทดสอบ และในการทดลองทุกครั้งจะใช้เซลล์ที่ได้จากการเพาะเซลล์ต่อช่วงในรุ่น (passage) ที่สามถึงห้า

การศึกษาลักษณะของเซลล์บุผิวช่องปากที่เพาะเลี้ยงได้

ศึกษาลักษณะทางจุลกายวิภาคศาสตร์ โดยใช้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับชนิดใช้แสง (inverted light microscope; Olympus, Shibuya-ku, Tokyo, Japan) และศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงของเซลล์บุผิวช่องปากที่เพาะเลี้ยงได้ในสภาวะปกติ โดยศึกษาการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ฟิลแลคกริน และเอนไซม์ทรานสกลูตามิเนส1 ด้วยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรี

แอกชั่น (reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) วิธีการโดยสังเขปคือ ทำการแยกอาร์เอ็นเอ (RNA extraction) โดยใช้ชุดแยกอาร์เอ็นเอ (RNeasy[®] Mini kit; Qiagen GmbH, Germany) จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis) จาก RNA ที่ได้ด้วยชุด SuperScript[®] III First-strand synthesis supermix (Invitrogen, USA) และทำปฏิกิริยาโพลิเมอร์เรส เซนรีแอกชั่นด้วยเครื่อง Mastercycler gradient (Eppendorf, Germany) และชุด Platinum[®] PCR SuperMIX (Invitrogen) และไพรเมอร์ (primer) ของยีนที่ต้องการศึกษา (ตารางที่ 1) โดยมีกลีเซอรอลดีไฮด์ 3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; GAPDH) เป็นตัวควบคุมภายใน (internal control) ในขณะเดียวกันก็ศึกษาการแสดงออกของยีนคอลลาเจน 1 ซึ่งจะพบการแสดงออกเฉพาะเซลล์สร้างเส้นใยเท่านั้น โดยปฏิกิริยาโพลิเมอร์เรส เซนรีแอกชั่นที่ใช้มีอุณหภูมิ denature 94 องศาเซลเซียส 15 วินาที อุณหภูมิ anneal 55 องศาเซลเซียส 15 วินาที และอุณหภูมิ extend 72 องศาเซลเซียส 1 นาที เป็นจำนวน 30 รอบ นำผลผลิตที่ได้ (PCR products) มาทำการแยกโดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟรีซิส โดยใช้อะกาโรส เจลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 จากนั้นถ่ายภาพแถบ PCR products โดยใช้ชุดถ่ายภาพ UV/white Darkroom & Transilluminator (UVP Bioimaging system, CA, USA)

ตารางแสดงลำดับเบสของไพรเมอร์ของยีนที่ใช้ในการศึกษานี้

ยีน	ลำดับเบส	ขนาดของ PCR product
เคอราติน K5 ⁽⁴⁰⁾	Fwd 5'- CCC AGT ATG AGG AGA TTG CCA ACC -3' Rev 5'- TAT CCA GAG GAA ACA CTG CTT GTG -3'	475 bp
เคอราติน K1 ⁽⁴¹⁾	Fwd 5'- CCT TAC TCT ACC TTG CTC CTA C -3' Rev 5'- GCC ACC ACC ACC ATA ACC -3'	332 bp
ฟิแลคกริน	Fwd 5'- CCT GAA GAA TCC AGA TGA CCC AG -3' Rev 5'- TGG GCT CTT GGA TCT TCC CTT -3'	301 bp
ทรานกลูตามิเนส 1	Fwd 5'- CTC ATC GGA AAC AAC CCC GA -3' Rev 5'- AAA CTG GCC GTA GTT CCA GG -3'	378 bp
คอลลาเจนชนิดที่ 1	Fwd 5'- CCC CAG CCA CAA AGA GTC TAC -3' Rev 5'- TCC CTT GGG TCC CTC GAC -3'	382bp
GAPDH	Fwd 5'- TGC CAC CCA GAA GAC TGT GGA T -3' Rev 5'- TCT CTC TCT TCC TCT TGT GCT C -3'	510 bp

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวช่องปาก

เซลล์บุผิวช่องปากที่ได้จากการเพาะเลี้ยง จะถูกหว่านในจานเพาะเลี้ยงเซลล์ชนิด 24 หลุม (24-well tissue culture plate; Nunc, Denmark) จำนวน 8×10^4 เซลล์ต่อหลุม เมื่อเซลล์เกาะจานเพาะเลี้ยง จึงจำลองการเกิดแผลด้วยวิธีการขูด (scratching assay) โดยลากปลายปิเปต (pipette tip) ขนาด 10 ไมโครลิตร ตลอดความยาวของเส้นผ่านศูนย์กลางของหลุมผ่านเซลล์ที่หนาแน่นอยู่บริเวณก้นหลุม⁽⁴²⁾ ล้างเศษเซลล์ที่ไม่ยึดติดกับจานเพาะเลี้ยงออกด้วยสารละลายฟอสเฟตบัฟเฟอร์เซไลน์ (phosphate buffer saline) 2 ครั้ง แล้วจึงทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนในความเข้มข้นต่าง ๆ (0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อ

มิลลิเมตร) เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับสารอะซีแมนแนน ได้รับเพียงอาหารเลี้ยงเซลล์ปกติ ทำการบันทึกภาพด้วยกล้องถ่ายภาพภายใต้กล้องจุลทรรศน์หัวกลับชนิดใช้แสงซึ่งมีกำลังขยายของหัววัตถุ 4 เท่า (objective piece 4x) ที่ระยะเวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมงภายหลังได้รับสาร พื้นที่ของบาดแผลจำลองจะถูกวัดและคำนวณจากภาพถ่ายโดยใช้โปรแกรมเซลล์เซนส์ ไดเมนชัน รุ่น 1.3 (CellSens Dimension, version 1.3, Olympus) พื้นที่บาดแผลจำลองที่ได้จะนำมาคำนวณเป็นร้อยละการเคลื่อนของเซลล์โดยใช้สูตร

$$\text{ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์} = \frac{(\text{พื้นที่บาดแผลจำลอง ณ 0 ชั่วโมง} - \text{พื้นที่บาดแผลจำลอง ณ 4 หรือ 8 ชั่วโมง}) \times 100}{\text{พื้นที่บาดแผลจำลอง ณ 0 ชั่วโมง}}$$

การทดลองจะถูกทำซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ที่ได้นำเสนอในรูปค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SE) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอสรุ่น 11.5 (Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) program version 11.5; SPSS, Inc., Chicago, IL, USA) โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว (one way analysis of variance, one way ANOVA) และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณแบบต้นแคน (Duncan multiple comparison) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก

โดยศึกษาการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ไฟลลาคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามินาส 1 ด้วยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชัน วิธีการโดยสังเขป คือ เซลล์บุผิวช่องปากจะถูกหว่านในจานเพาะเลี้ยงขนาด 100 มิลลิเมตร และทำการเพาะเลี้ยงจนแน่น (confluence) แล้วจึงทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่าง ๆ กัน เปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม คือ กลุ่มที่ไม่ได้รับสารอะซีแมนแนน เมื่อครบกำหนดเวลา 24 ชั่วโมงจึงแยกอาร์เอ็นเอ โดยใช้ชุดแยกอาร์เอ็นเอ จากนั้นทำการสังเคราะห์ cDNA (cDNA synthesis) จาก RNA และทำปฏิกิริยาโพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชันด้วยเอนไซม์แทค ดีเอ็นเอ โพลีเมอร์เรส และไพรเมอร์ (primer) ของยีนที่ต้องการศึกษา โดยมีกลีเซอรอลดีไฮด์ 3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนสเป็นตัวควบคุมภายใน นำผลผลิตที่ได้ (PCR products) มาทำการแยกโดยใช้เทคนิคอะกาโรส เจล อิเล็กโตรโฟเรซิส โดยใช้อะกาโรส เจลความเข้มข้นร้อยละ 1.5 จากนั้นถ่ายภาพ และวิเคราะห์ความเข้มของแถบ PCR products โดยใช้ชุดถ่ายภาพ UV/white Darkroom & Transilluminator และโปรแกรม LabWorks 4.0 (UVP Bioimaging system) เพื่อเปรียบเทียบความเข้มของแถบระหว่างกลุ่มทดสอบด้วยสารอะซีแมนแนน และกลุ่มควบคุม ทำการทดลองซ้ำทั้งหมด 3 ครั้ง โดยค่าความเข้มของแถบของ PCR product ที่ต้องการศึกษาจะถูกนำเสนอในรูปค่าเฉลี่ยและความคลาดเคลื่อนมาตรฐาน (Mean $\pm$ SE) และทำการวิเคราะห์ความแตกต่างระหว่างกลุ่มใช้โปรแกรมเอสพีเอสเอส โดยใช้สถิติการวิเคราะห์ความแปรปรวนแบบทางเดียว และการวิเคราะห์ความแตกต่างของค่าเฉลี่ยแบบจับคู่พหุคูณแบบต้นแคน (Duncan multiple comparison) ที่ระดับความเชื่อมั่นร้อยละ 95

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการต้านเชื้อจุลินทรีย์

โดยวิธีการดิสก์ ดิฟฟิวชัน (disc diffusion assay)⁽⁴³⁾ โดยทำการทดสอบกับเชื้อแบคทีเรีย 2 ชนิด ได้แก่ เชื้อ *Staphylococcus aureus* สายพันธุ์ ATCC 25923 และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* สายพันธุ์ ATCC 27853 และเชื้อรา 1 ชนิด คือ เชื้อ *Candida albicans* สายพันธุ์ ATCC 90028 (American Type Culture Collection, VA, USA) ขั้นตอนทดสอบโดยย่อคือ เตรียมเชื้อความเข้มข้น 10^6 colony forming units ต่อมิลลิลิตร ซึ่งเท่ากับ 0.5 McFarland standard โดยวัดจากค่าการดูดกลืนแสงด้วยเครื่อง UV spectrophotometer (Genesys™ 10 UV/visible scanning spectrophotometer, Thermo Scientific, MA, USA) ที่ความยาวคลื่นแสง 600 นาโนเมตร ให้มีค่าเท่ากับ 0.1 จากนั้นนำเชื้อมาเกลี่ยให้กระจายบนจานเพาะเลี้ยงเชื้อที่มีอาหารเลี้ยงเชื้อ Mueller Hinton ชนิดแข็ง (Difco™, Becton Dickinson microbiology system, MD, USA) สำหรับเชื้อแบคทีเรียและอาหารเลี้ยงเชื้อ Sabouraud Dextrose ชนิดแข็ง (Difco™) จากนั้นปิเปตสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรปริมาณ 20 ไมโครลิตร หยดลงบนดิสก์เส้นผ่าศูนย์กลาง 6 มิลลิเมตร ทิ้งไว้ให้แห้ง นำไปวางบนจานเพาะเลี้ยง กดให้แนบกับอาหารเลี้ยงเชื้อ โดยมีแผ่นดิสก์ที่มียาปฏิชีวนะแวนโคมัซิน (vancomycin; ; OXOID antimicrobial susceptibility test disc, Hants, UK) เป็นตัวควบคุมบวกสำหรับเชื้อ *Staphylococcus aureus* แผ่นดิสก์ที่มียาปฏิชีวนะเจนตามัยซิน (gentamycin; OXOID) เป็นตัวควบคุมบวกสำหรับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และแผ่นดิสก์ที่มียานิสแตติน (nystatin; OXOID) เป็นตัวควบคุมบวกสำหรับเชื้อรา และมีน้ำกลั่นเป็นตัวควบคุมลบ นำจานเพาะเลี้ยงเก็บที่ตู้เย็นอุณหภูมิ 4 องศาเซลเซียสข้ามคืน จากนั้นนำจานเพาะเลี้ยงไปบ่มในตู้เพาะเลี้ยงที่อุณหภูมิ 37 องศาเซลเซียส เป็นเวลา 24 ชั่วโมง จึงนำจานเพาะเลี้ยงออกมาวัดความกว้างของวงใสเพื่อแปลผล ทำการทดลองซ้ำ 3 ครั้ง

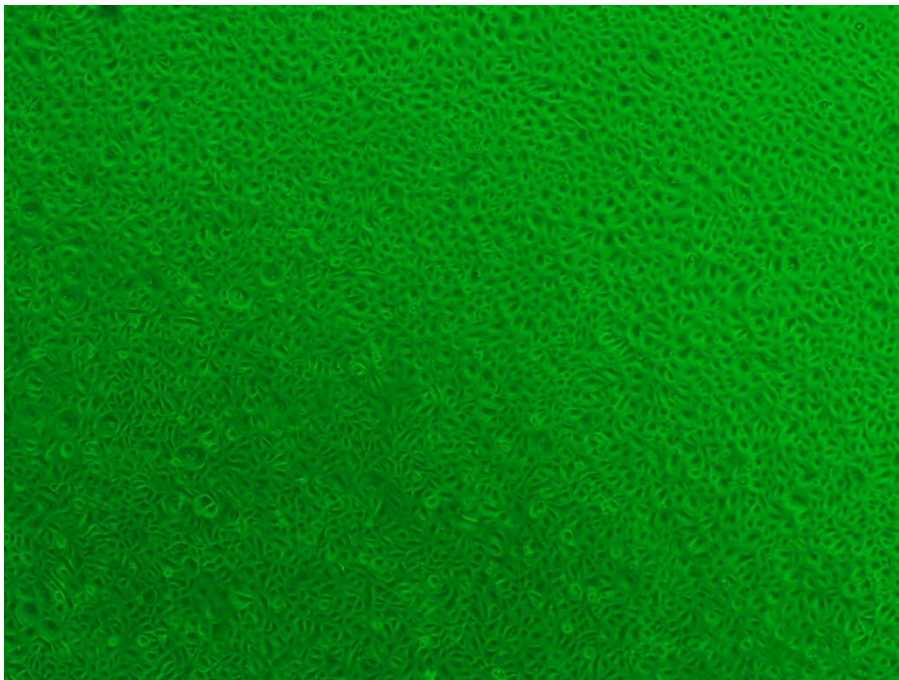
ผลการวิจัย

การเตรียม และพิสูจน์เอกลักษณ์สารอะซีแมนแนน

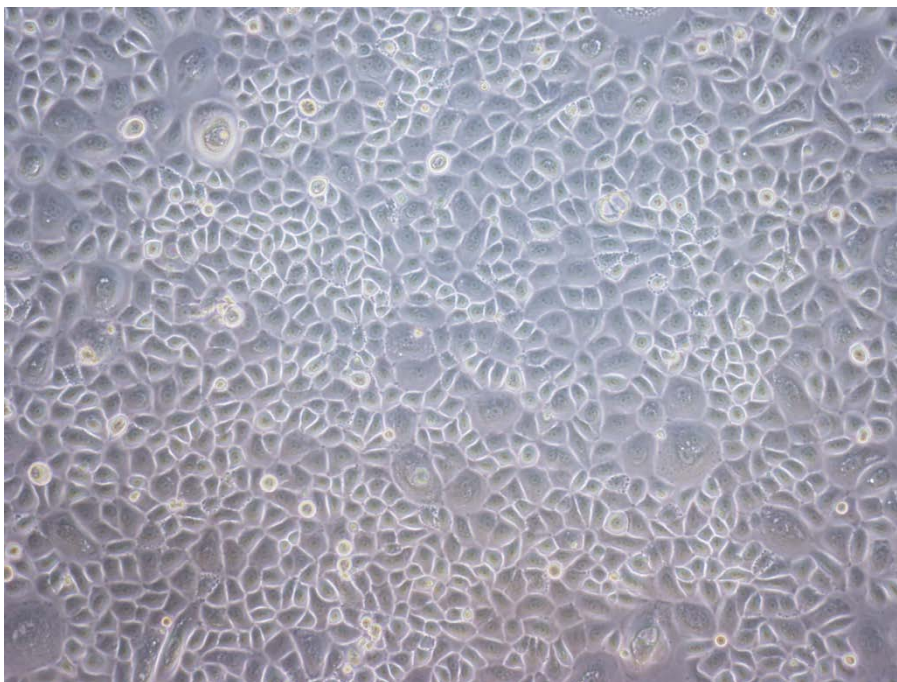
สารอะซีแมนแนนที่ใช้ในการศึกษานี้เตรียม และพิสูจน์เอกลักษณ์ดังแสดงผลด้วยเทคนิค high performance liquid chromatography และ fourier transformed infrared spectroscopy ดังแสดงในโครงการย่อยที่ 1

การเพาะเลี้ยงและการวิเคราะห์ลักษณะของเซลล์บุผิวช่องปาก

การเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากได้เซลล์ซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์หลายเหลี่ยม (polygonal) โดยพบเซลล์หลายขนาดปะปนกัน แสดงดังภาพที่ 1 และภาพที่ 2

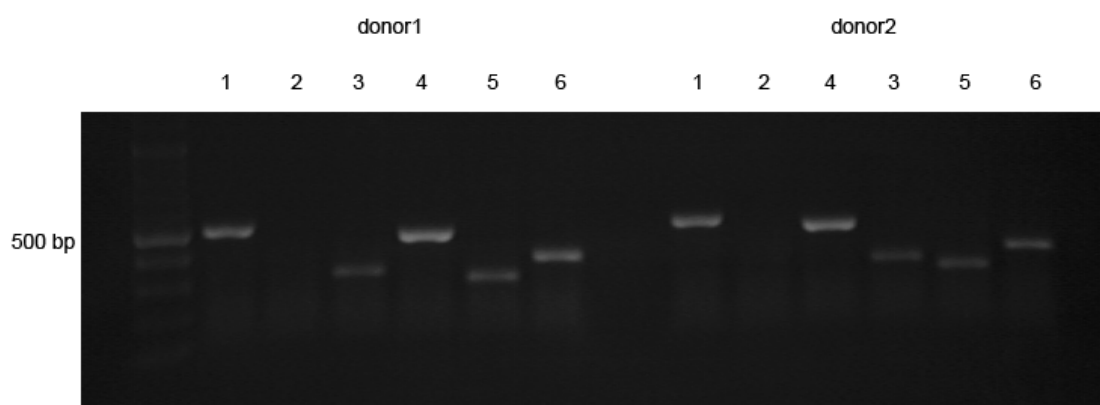


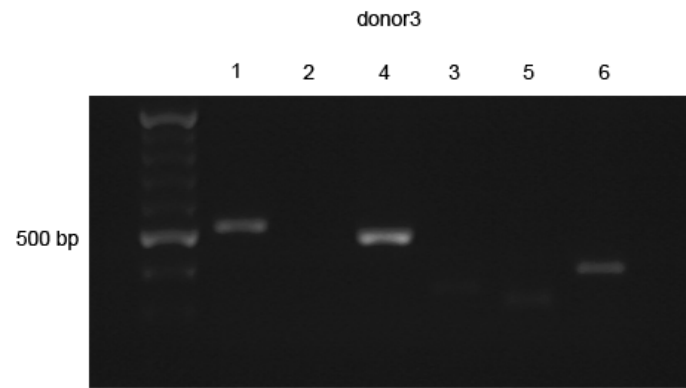
ภาพที่ 1 เซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงได้ (กำลังขยาย 4 เท่า)



ภาพที่ 2 เซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์ที่เพาะเลี้ยงได้ (กำลังขยาย 10 เท่า)

เมื่อทำการวิเคราะห์ลักษณะการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก โดยใช้วิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชัน พบว่าเซลล์บุผิวช่องปากที่เพาะเลี้ยงได้มีการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ไฟแลคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส 1 ซึ่งเป็นยีนที่แสดงออกในระยะต่างกันของการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก โดยไม่พบการแสดงออกของยีนคอลลาเจน 1 ซึ่งเป็นยีนที่พบการแสดงออกเฉพาะในเซลล์สร้างเส้นใยในเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน (ภาพที่ 3) แสดงให้เห็นว่าเทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากในการศึกษานี้ ทำให้ได้เซลล์บุผิวช่องปากโดยไม่มีเซลล์สร้างเส้นใยเจือปน และสามารถมีการแสดงออกของยีนที่เป็นลักษณะของเซลล์บุผิวได้

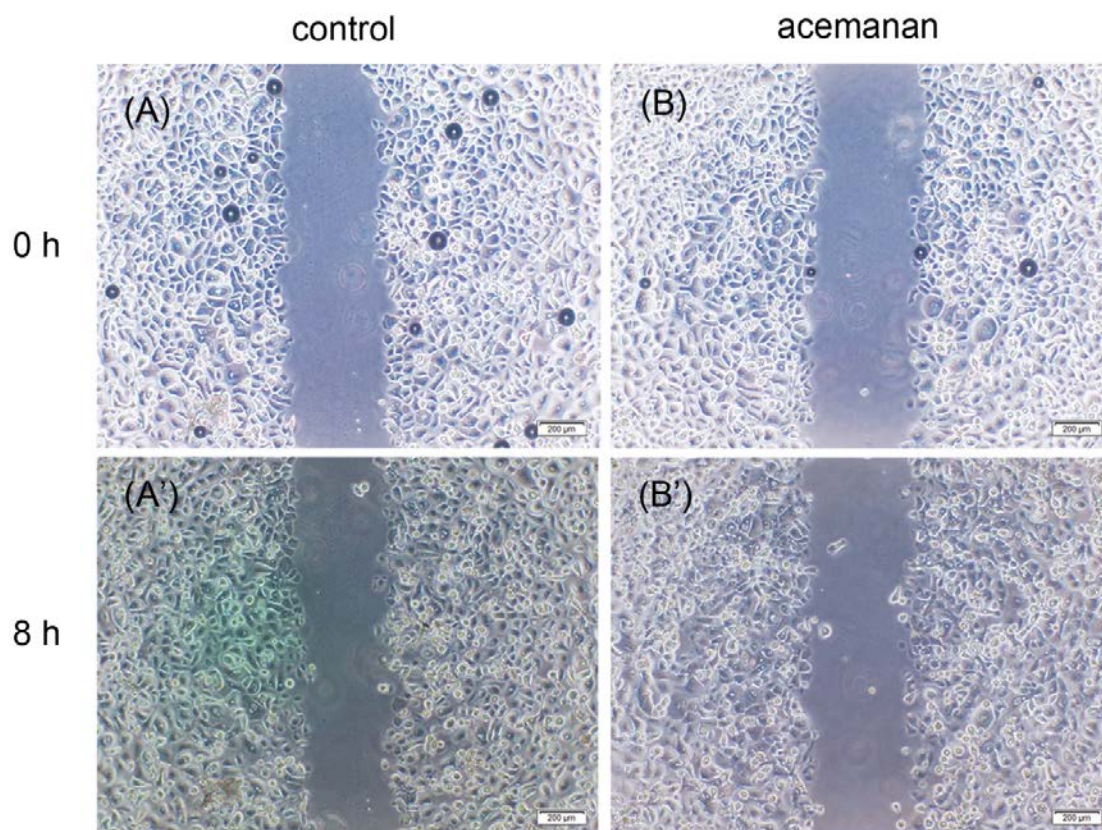




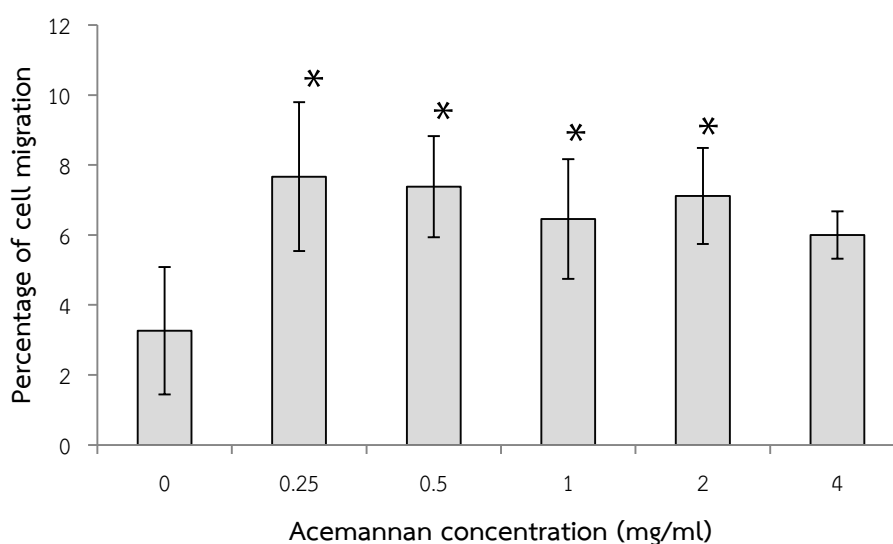
ภาพที่ 3 การแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพเซลล์บุช่องปากจากอาสาสมัคร 3 ราย โดยวิธี รีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชัน; GAPDH (เลนที่ 1) คอลลาเจนชนิดที่ 1 (เลนที่ 2) เคอราติน K5 (เลนที่ 3) เคอราติน K1 (เลนที่ 4) ฟิแลคกริน (เลนที่ 5) และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส 1 (เลนที่ 6)

ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเคลื่อนที่ของเซลล์บุช่องปาก

เมื่อเซลล์บุช่องปากได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรเป็นเวลา 4 ชั่วโมงพบว่า เซลล์ทุกกลุ่มในการศึกษามีการเคลื่อนที่ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทาง สถิติ (ไม่แสดงผล) แต่เมื่อเซลล์บุช่องปากได้รับสารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 8 ชั่วโมงพบว่า เซลล์กลุ่มที่ได้รับ สารอะซีแมนแนนทุกความเข้มข้นมีการเคลื่อนที่เข้าปิดช่องว่างของบาดแผลจำลองมากกว่ากลุ่มควบคุม (ไม่ได้ รับสารอะซีแมนแนน) โดยเซลล์ที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรมีการเคลื่อนที่เป็น 2.35 2.26 1.98 2.18 และ 1.84 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มควบคุม ตามลำดับ เมื่อ วิเคราะห์ทางสถิติพบว่า เซลล์ที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อ มิลลิลิตรมีการเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) (ภาพที่ 5)



ภาพที่ 4 ลักษณะบาดแผลจำลองของเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนน ความเข้มข้น 0.25 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร (B และ B') และกลุ่มควบคุม (A และ A') ที่เวลา 0 (A และ B) และ 8 ชั่วโมง (A' และ B')



ภาพที่ 5 ร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่างๆ เป็นเวลา 8 ชั่วโมง เมื่อเทียบกับ ณ เวลา 0 ชั่วโมง

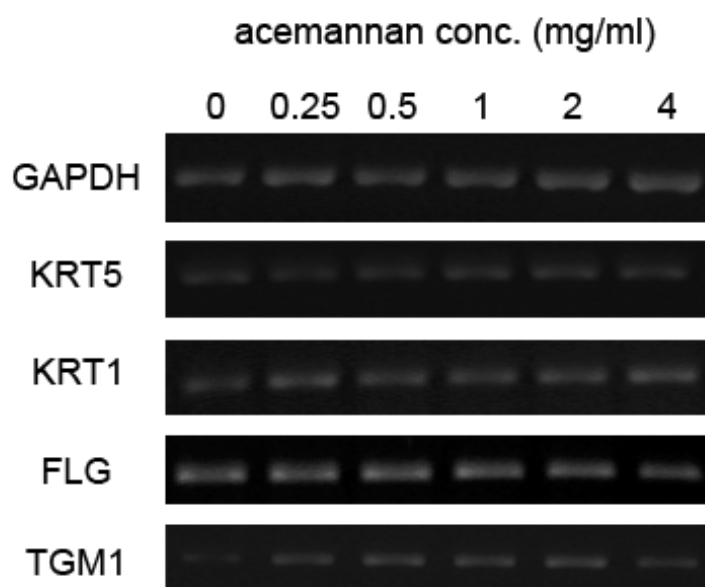
(* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$, $n = 3$)

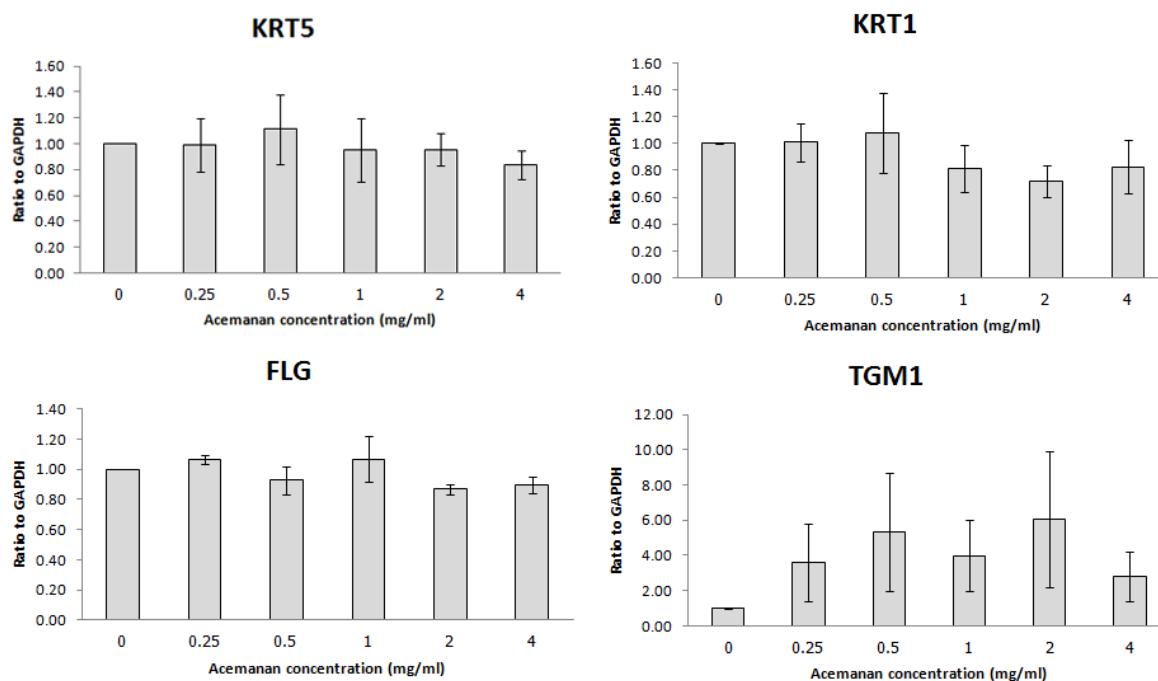
ผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก

เมื่อทำการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากด้วยวิธีรีเวิร์สทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชั่น โดยศึกษาแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ฟิแลคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่พบในระยะต่าง ๆ ของการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากพบว่า ในเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ฟิแลคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ไม่แตกต่างจากกลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ (ภาพที่ 6) อย่างไรก็ตามเมื่อสังเกตลักษณะของเซลล์พบว่า เมื่อเซลล์บุผิวช่องปากได้รับสารอะซีแมนแนนที่ความเข้มข้นเพิ่มขึ้น เซลล์จะสูญเสียลักษณะหลายเหลี่ยมไป มีลักษณะกลมใหญ่ขึ้นและแบนลง (ภาพที่ 7)

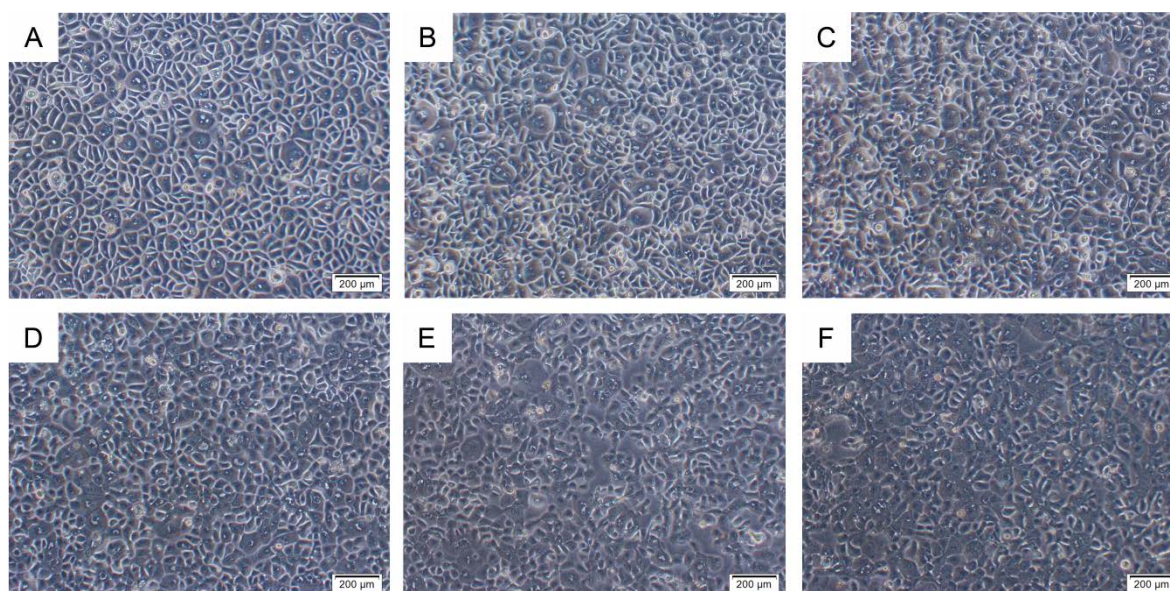
เมื่อเซลล์บุผิวช่องปากได้รับสารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 48 ชั่วโมงพบว่า กลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนนมีการแสดงออกของยีนเคอราติน K5 ในลักษณะคงที่ ส่วนการแสดงออกของยีนเคอราติน K1 มีแนวโน้มลดลงเมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และการแสดงออกของยีนฟิแลคกรินมีแนวโน้มเพิ่มขึ้นที่เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร และมีแนวโน้มลดลงที่ความเข้มข้น 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร แต่อย่างไรก็ตามแนวโน้มเหล่านี้ไม่แตกต่างกันอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อเปรียบเทียบกับกลุ่มควบคุม

ในขณะที่พบว่า กลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนนมีแนวโน้มการแสดงออกของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ซึ่งเป็นโปรตีนที่แสดงออกในระยะท้ายของการเปลี่ยนสภาพเพิ่มขึ้น โดยเซลล์ที่ได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรมีการแสดงออกของเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$) (ภาพที่ 8) และเมื่อศึกษาลักษณะของเซลล์ประกอบพบว่า เซลล์กลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนนมีการสูญเสียลักษณะหลายเหลี่ยม มีลักษณะกลมใหญ่ขึ้น บางบริเวณมีการเชื่อมต่อกับเซลล์ข้างเคียง โดยพบลักษณะนี้เพิ่มขึ้นตามความเข้มข้นของสารอะซีแมนแนนที่เพิ่มขึ้น (ภาพที่ 9)

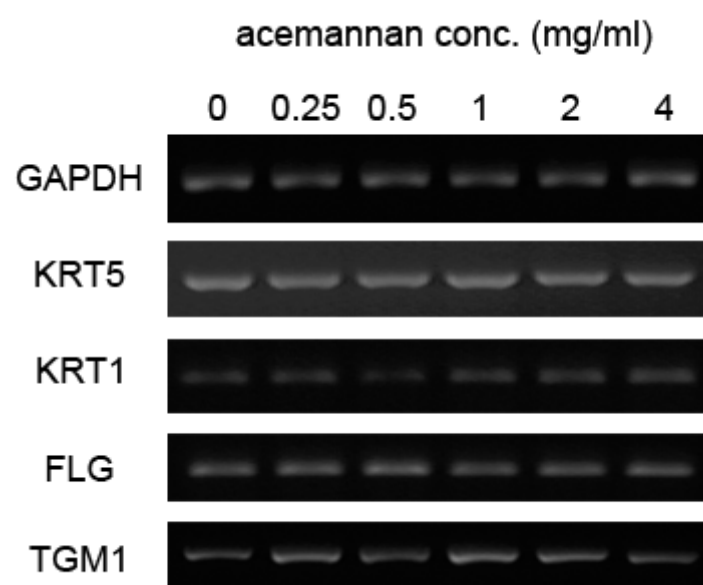


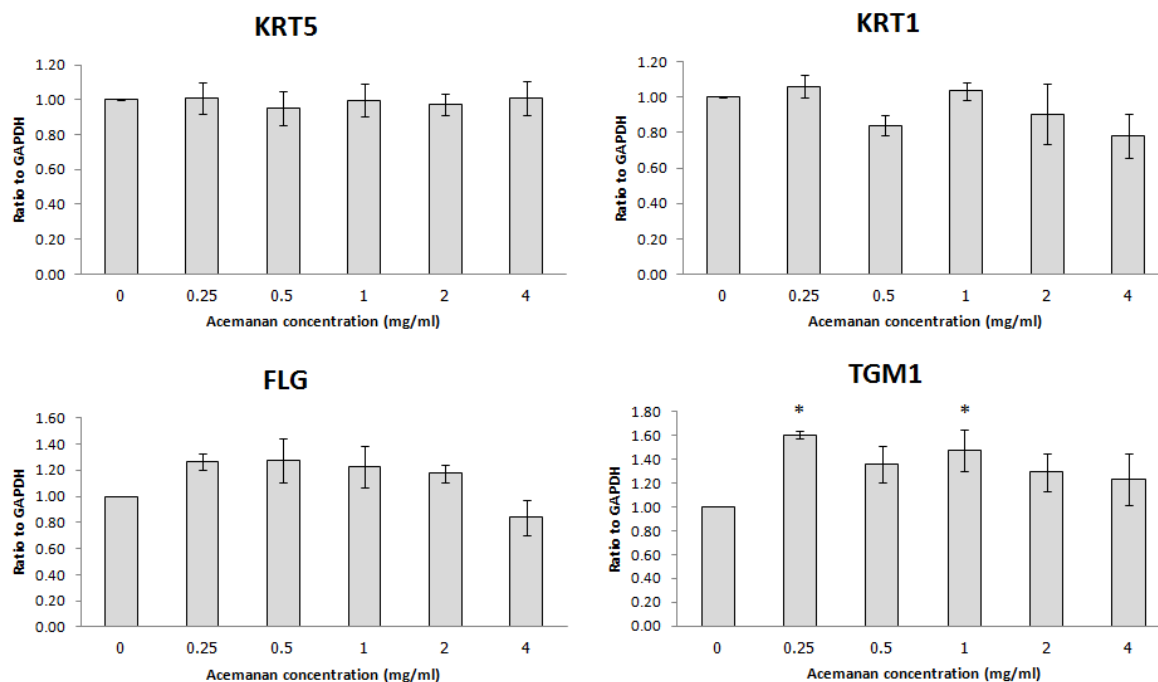


ภาพที่ 6 ผลการแสดงออกยีนเคอราติน K5 (KRT5) เคอราติน K1 (KRT1) ฟิแลคกริน (FLG) และเอนไซม์ ทรานสกลูตามิเนส (TGM1) ในเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนมความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง ด้วยวิธีไวรัส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชั่น โดยมีกลีเซอรอลดีไฮด์ 3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) เป็นตัวควบคุมภายใน (n=3)

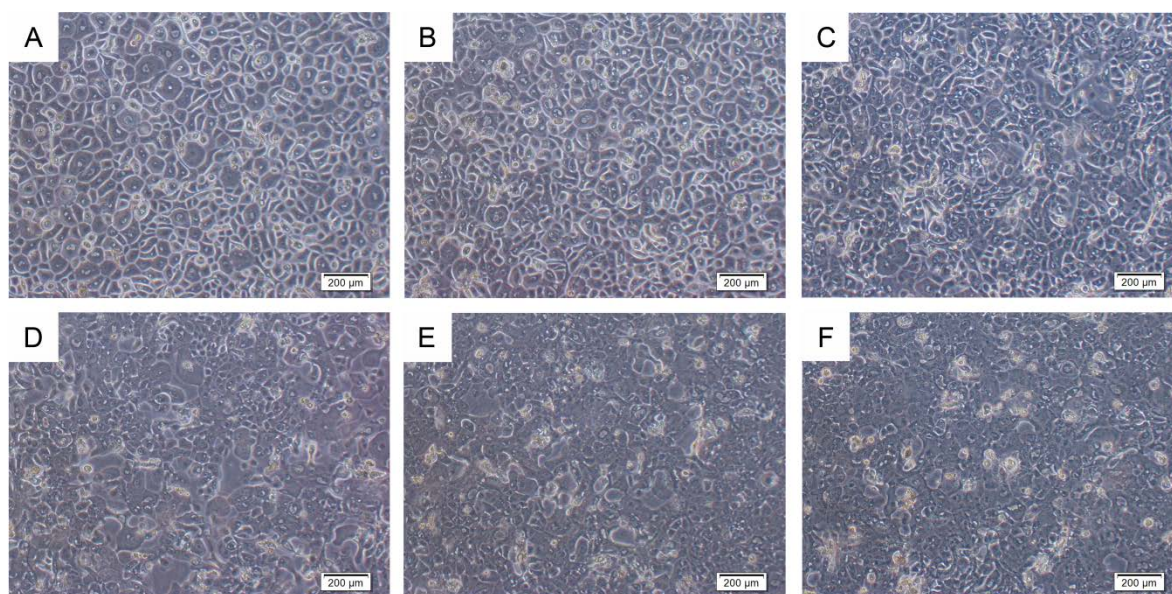


ภาพที่ 7 ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนมความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 24 ชั่วโมง (A) กลุ่มควบคุม; (B-F) กลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนมความเข้มข้น 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ





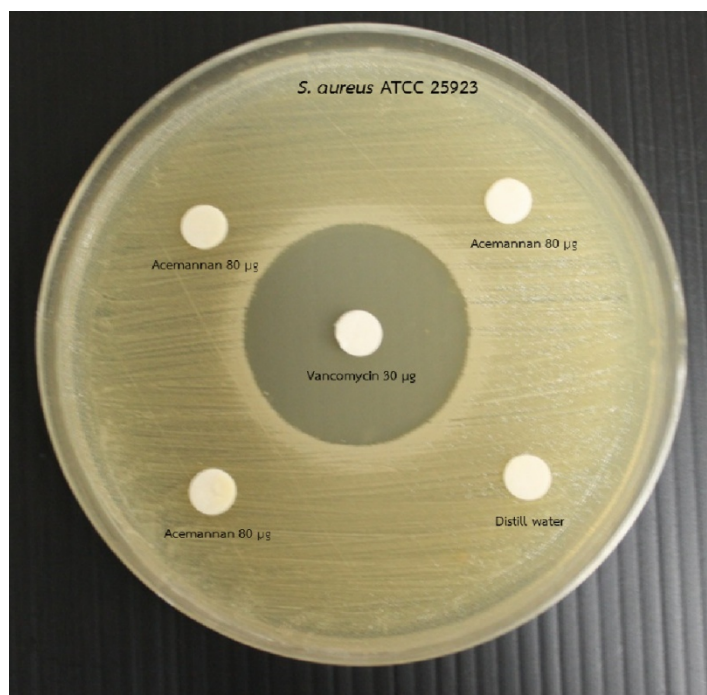
ภาพที่ 8 ผลการแสดงออกยีนเคอราติน K5 (KRT5) เคอราติน K1 (KRT1) ฟิแลคกริน (FLG) และเอนไซม์ ทรานสกลูตามิเนส (TGM1) ในเซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนมความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง ด้วยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอกชัน โดยมีกลีเซอรอลดีไฮด์ 3-ฟอสเฟต ดีไฮโดรจีเนส (GAPDH) เป็นตัวควบคุมภายใน (* แสดงความแตกต่างอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ $p < 0.05$, $n = 3$)



ภาพที่ 9 ลักษณะของเซลล์เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนมความเข้มข้นต่าง ๆ เป็นเวลา 48 ชั่วโมง (A) กลุ่มควบคุม; (B-F) กลุ่มที่ได้รับสารอะซีแมนแนมความเข้มข้น 0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร ตามลำดับ

ผลของสารอะซีแมนแนมต่อการต้านเชื้อจุลชีพ

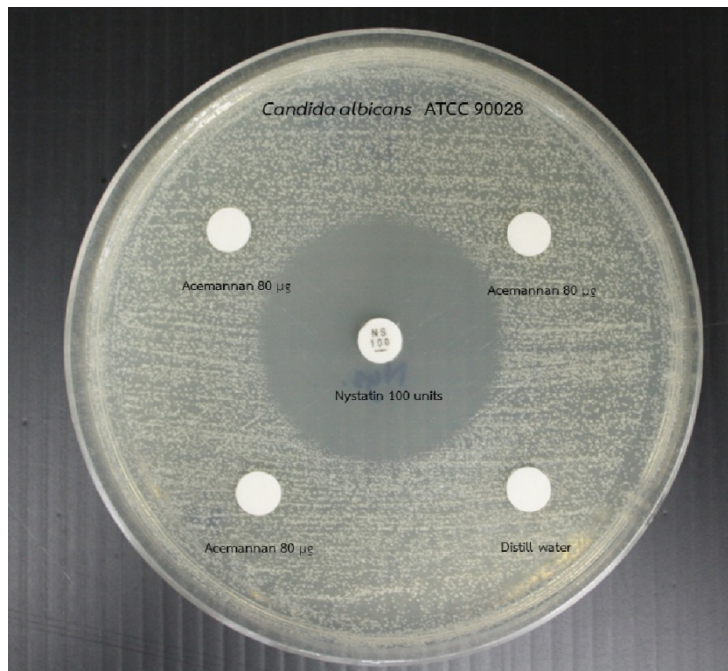
เมื่อทำการทดสอบสารอะซีแมนแนนต่อเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans* เป็นเวลา 24 ชั่วโมงพบว่า ไม่เกิดวงใสรอบแผ่นดิสก์ที่มีสารอะซีแมนแนน เช่นเดียวกันในกลุ่มควบคุมซึ่งเป็นแผ่นดิสก์ที่มีน้ำกลั่น ในขณะที่แผ่นดิสก์ยาปฏิชีวนะซึ่งเป็นกลุ่มควบคุมบวเกิดวงใสขึ้น โดยยาแวนโคมัยซินเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Staphylococcus aureus* พบวงใสขนาด 30.25 ± 0.03 มิลลิเมตร ยาเจนตามัยซินเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* พบวงใสขนาด 30.27 ± 0.19 มิลลิเมตร และยานิสเตตินเมื่อทดสอบกับเชื้อ *Candida albicans* พบวงใสขนาด 34.15 ± 0.29 มิลลิเมตร ($n=3$) ดังนั้นจึงแปลผลได้ว่า สารอะซีแมนแนนไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans*



ภาพที่ 10 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* ของสารอะซีแมนแนน ไม่พบวงใสซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ต้านเชื้อ ในขณะที่กลุ่มควบคุมบวก คือ ยาแวนโคมัยซินเกิดวงใส



ภาพที่ 11 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* ของสารอะซีแมนแนน ไม่พบวงใสซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ต้านเชื้อ ในขณะที่กลุ่มควบคุมบวก คือ ยาเจนตามัยซินเกิดวงใส



ภาพที่ 12 ตัวอย่างการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อ *Candida albicans* ของสารอะซีแมนแนน ไม่พบวงใสซึ่งแสดงถึงฤทธิ์ต้านเชื้อ ในขณะที่กลุ่มควบคุมบวก คือ ยานิสเตตินเกิดวงใส

การอภิปรายและวิจารณ์ผลการวิจัย

เยื่อบุผิวช่องปากเป็นเนื้อเยื่อที่มีความสำคัญ เนื่องจากเป็นทำหน้าที่เนื้อเยื่อชั้นแรกที่สัมผัสกับสิ่งแปลกปลอมที่เข้าสู่ร่างกายทางช่องปาก ทำหน้าที่ในการปกป้องเนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ด้านใต้จากการระคายเคืองต่าง ๆ นอกจากนี้ชั้นบุผิวช่องปากยังมีความสามารถในการผลิตสารต้านเชื้อจุลชีพ เช่น เบต้า ดีเฟนซิน (β -defensin) ได้อีกด้วย เยื่อบุผิวช่องปากประกอบด้วยเซลล์บุผิวช่องปากเรียงตัวเป็นชั้นต่าง ๆ 4 ชั้น เรียงตัวจากชั้นล่างที่ติดกับเนื้อเยื่อเกี่ยวพันสู่ชั้นบนซึ่งติดกับช่องปาก ได้แก่ ชั้น stratum basale ชั้น stratum spinosum ชั้น stratum granulosum และชั้น stratum corneum ตามลำดับ เซลล์บุผิวช่องปากที่อยู่ในแต่ละชั้นจะมีลักษณะและสมบัติที่แตกต่างกัน โดยเซลล์ที่อยู่ในชั้น stratum basale จะมีขนาดเล็ก เป็นเซลล์ที่มีความสามารถในการแบ่งตัวมากที่สุด ทำหน้าที่แบ่งตัวทดแทนเซลล์บุผิวช่องปากที่มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงสภาพสู่ชั้นต่อไป เมื่อเซลล์มีการพัฒนาเปลี่ยนแปลงสภาพสู่ชั้นที่อยู่สูงขึ้นเซลล์จะมีขนาดใหญ่ขึ้น และแบนลง มีการสร้างโปรตีนต่าง ๆ ที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนแปลงสภาพ ทำให้เกิดการสร้างชั้นเคอราตินและ cornified cell envelope เพื่อปกป้องเยื่อบุผิวช่องปากต่อไป^(6, 7)

การทำลาย หรือฉีกขาดของเยื่อบุผิวช่องปากทำให้เกิดบาดแผลขึ้น ทำให้เนื้อเยื่อเกี่ยวพันที่อยู่ข้างใต้สัมผัสต่อสิ่งแวดล้อมในช่องปาก และเชื้อแบคทีเรียซึ่งมีจำนวนมากในช่องปาก เกิดการเจ็บปวดแก่ผู้ป่วย⁽¹⁾ การรักษาแผลในช่องปากในปัจจุบันเป็นการรักษาตามอาการ ได้แก่ การแนะนำผู้ป่วยให้รักษาความสะอาดในช่องปาก และใช้ยาสเตียรอยด์ทาเฉพาะที่เพื่อบรรเทาอาการอักเสบ⁽⁴⁴⁾ การศึกษาสารซึ่งสามารถกระตุ้นให้เกิดการเคลื่อนที่ รวมไปถึงการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปาก เพื่อคืนสภาพเยื่อบุผิวช่องปากให้สมบูรณ์จึงมีประโยชน์ในการพัฒนาคุณภาพชีวิตของผู้ป่วยเป็นอย่างยิ่ง

สารอะซีแมนแนนเป็นพอลิแซ็กคาไรด์หลักจากส่วนฐานของวุ้นของวุ้นหางจระเข้⁽¹⁶⁾ สามารถกระตุ้นการหายของแผลได้โดยกระตุ้นการทำงานของเม็ดเลือดขาว โดยกระตุ้นการสร้างไซโตไคน์หลายชนิดจากแมคโครฟาจ^(25, 28, 29) และสามารถกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์สร้างเส้นใยเหงือก และส่งเสริมการสร้างโกรทแฟกเตอร์หลายชนิดที่เกี่ยวข้องกับการหายของแผล ได้แก่ เคอราติโนไซต์ โกรทแฟกเตอร์-1 และวาสคูลาเอนโดธีเลียลโกรทแฟกเตอร์⁽⁴⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษาลงมือของสารสกัดจากสมุนไพรต่อการเคลื่อนที่หรือการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากยังมีจำกัด⁽⁴⁵⁾ โดยเฉพาะอย่างยิ่งผลของสารอะซีแมนแนน หรือสารในกลุ่มพอลิแซ็กคาไรด์ต่อการเคลื่อนที่และการเปลี่ยนแปลงสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากยังไม่เคยมีรายงานมาก่อน

เนื่องจากวิธีในการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากมีหลายวิธี โดยวิธีดั้งเดิมส่วนใหญ่มีอาศัยชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพัน หรือเซลล์สร้างเส้นใยเหงือกเป็นชั้นรองพื้นช่วยในการเพาะเลี้ยง (feeder layer)⁽⁴⁶⁾ จึงทำให้ผลการศึกษาของสารที่ได้อาจเป็นผลทางอ้อมจากชั้นเพาะเลี้ยงเหล่านี้⁽⁴⁷⁾ ดังนั้นการศึกษานี้จึงเลือกใช้วิธีการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากจากชิ้นเหงือกของอาสาสมัครจากการผ่าฟันคุด โดยการใช้เอนไซม์ดิสเปสแยกชั้นเนื้อเยื่อเกี่ยวพันด้านใต้ ออก ทำการย่อยชั้นเยื่อบุผิวช่องปากให้ได้เซลล์บุผิวช่องปากที่เป็นเซลล์เดี่ยวโดยใช้เอนไซม์ทริปซิน แล้วจึงนำเซลล์ที่ได้มาเพาะเลี้ยง ทำให้ได้เซลล์บุผิวช่องปากซึ่งมีลักษณะเป็นเซลล์ขนาดเล็ก รูปร่างหลายเหลี่ยม ซึ่งสามารถเพิ่มจำนวนได้จนมีจำนวนเพียงพอที่ใช้ในการศึกษาต่อไป และพบเซลล์ซึ่งมีขนาดใหญ่ และรูปร่างค่อนข้างกลมได้จำนวนเล็กน้อย ซึ่งลักษณะของเซลล์บุผิวที่ได้นี้สอดคล้องกับรายงานก่อนหน้านี้

ของ Zhou และคณะ⁽⁴⁸⁾ โดยไม่พบเซลล์ลักษณะรูปกระสวย ซึ่งเป็นลักษณะของเซลล์สร้างเส้นใยในการเพาะเลี้ยง เมื่อทำการศึกษาการแสดงออกของยีนที่แสดงออกถึงลักษณะการเป็นเซลล์บุผิว ได้แก่ ยีนเคราติน K5 เคราติน K1 ฟิลแลกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 พบว่า เซลล์บุผิวช่องปากที่ทำการเพาะเลี้ยงได้สามารถมีการแสดงออกของยีนของเซลล์บุผิวได้ โดยไม่พบการแสดงออกของคอลลาเจน1 ซึ่งจะพบในเซลล์สร้างเส้นใย แสดงให้เห็นว่า เทคนิคการเพาะเลี้ยงเซลล์บุผิวช่องปากที่ใช้ในการศึกษานี้ทำให้ได้ผลการศึกษาที่มาจากเซลล์บุผิวช่องปากเพียงอย่างเดียว โดยไม่มีการเจือปนของเซลล์สร้างใย และเซลล์บุผิวช่องปากที่เพาะเลี้ยงได้สามารถแสดงออกยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากได้

การศึกษานี้เลือกใช้วิธีการชุดเพื่อศึกษาการเคลื่อนที่ของเซลล์ เนื่องจากเป็นวิธีที่ได้รับการยอมรับ ทำได้ง่าย และสามารถจำลองการเคลื่อนที่ในของลักษณะการเกิดแผลฉีกขาดบริเวณชั้นเยื่อบุผิวได้⁽⁴²⁾ ผลการศึกษาพบว่า เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เซลล์บุผิวช่องปากจะมีการเคลื่อนที่เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ โดยสารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ได้ประมาณ 2 เท่าเมื่อเทียบกับกลุ่มที่ไม่ได้รับสารอะซีแมนแนน จากการศึกษาก่อนหน้านี้ของคณะผู้วิจัยที่พบว่า สารอะซีแมนแนนไม่มีผลในการกระตุ้นการเพิ่มจำนวนของเซลล์บุผิวช่องปาก⁽⁴⁹⁾ ดังนั้นผลของการเคลื่อนที่ในการปิดบาดแผลจำลองนี้จึงไม่มีผลของการเพิ่มจำนวนเซลล์เข้ามาเกี่ยวข้อง และผลกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวช่องปากนี้สนับสนุนผลของสารอะซีแมนแนนต่อการกระตุ้นการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่พบว่า หนูทดลองกลุ่มที่รับสารอะซีแมนแนนจะมีการสร้างชั้นเยื่อบุผิวใหม่ที่เร็วกว่า⁽⁴⁾ แสดงให้เห็นว่า สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการหายของแผลในช่องปากได้โดยการกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิว ทำให้แผลปิดได้เร็วขึ้น

โกรทแฟกเตอร์ และไซโตไคน์ เช่น อีพีเดอร์มัลโกรทแฟกเตอร์ เคราติโนไซท์โกรทแฟกเตอร์ ทรานสฟอร์มมิงโกรทแฟกเตอร์ แอลฟา และเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ (extracellular matrix) เช่น คอลลาเจน ลามินิน เป็นปัจจัยที่สำคัญในการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิว⁽⁵⁰⁻⁵³⁾ ซึ่งโกรทแฟกเตอร์ ไซโตไคน์ และเมทริกซ์ระหว่างเซลล์มีบทบาทที่ต่างกันเกี่ยวกับการเคลื่อนที่โดยพบว่า เมทริกซ์ระหว่างเซลล์เพียงอย่างเดียวสามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ ในขณะที่โกรทแฟกเตอร์เพียงอย่างเดียวไม่สามารถเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์ได้ แต่โกรทแฟกเตอร์จะทำหน้าที่ส่งเสริมการเคลื่อนที่ให้มีทิศทางมากขึ้น⁽⁵¹⁾ เนื่องจากสารอะซีแมนแนนเป็นสารพอลิแซคคาไรด์ซึ่งมีลักษณะโครงสร้างขนาดใหญ่⁽⁵⁴⁾ จึงมีความเป็นไปได้ที่สารอะซีแมนแนนจะมีผลต่อการเคลื่อนที่ในลักษณะที่ทำหน้าที่คล้ายเมทริกซ์ระหว่างเซลล์ในการเหนี่ยวนำให้เกิดการเคลื่อนที่ของเซลล์

การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิวช่องปากพบว่า เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 48 ชั่วโมง เซลล์บุผิวช่องปากมีการแสดงออกของยีนเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 เพิ่มขึ้นอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เอนไซม์ทรานกลูตามิเนสเป็นเอนไซม์ที่ทำหน้าที่ในการเชื่อมโยงโมเลกุล (crosslink) ของโปรตีน เช่น โลริกริน (loricrin) อินวอลูคริน (involucrin) และเคราโตไฮาลิน (keratohyalin) เพื่อสร้างเป็น cornified cell envelope ของชั้นบุผิว⁽¹²⁾ เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 หรืออีพีเดอร์มัล ทรานกลูตามิเนส (epidermal transglutaminase) มีการสร้างน้อยในเซลล์บุผิวที่กำลังเพิ่มจำนวน แต่จะมีการสร้างมากขึ้นในเซลล์ที่กำลังเปลี่ยนสภาพเข้าสู่ระยะท้าย โดยจะพบบนผิวเซลล์ในส่วนบนของชั้น stratum spinosum และชั้น stratum granulosum^(55, 56) เอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 จึงเป็นตัวชี้วัดของการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิว⁽¹³⁾

⁵⁷⁾ นอกจากนี้เซลล์บุผิวช่องปากที่ได้รับสารอะซีแมนแนนยังมีลักษณะของเซลล์ที่เปลี่ยนไป โดยเซลล์มีลักษณะกลมแบนมากขึ้น มีเซลล์บางตำแหน่งมีเชื่อมต่อกับเซลล์ข้างเคียง ลักษณะการเปลี่ยนแปลงของเซลล์ที่พบนี้ สอดคล้องกับรายงานของ Hsu และคณะที่ศึกษาถึงผลของสารโพลีฟีนอล (polyphenol) จากชาเขียวต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บุผิว⁽⁵⁸⁾ อย่างไรก็ตามการศึกษานี้ศึกษาการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพในระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA) จากเซลล์เพาะเลี้ยงลักษณะแบบชั้นเดียว (monolayer) ซึ่งมีรายงานว่ามีการเปลี่ยนสภาพไม่สมบูรณ์เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์เพาะเลี้ยงในลักษณะออร์แกนไทป์ค (organotypic culture) โดยมีคอลลาเจน และ/หรือเซลล์สร้างเส้นใย เนื่องจากโกรทแฟกเตอร์จากเซลล์สร้างเส้นใย และเมทริกซ์ระหว่างเซลล์จะส่งเสริมการเปลี่ยนสภาพของเซลล์ได้ใกล้เคียงกับลักษณะของเยื่อบุผิวช่องปากปกติ⁽⁵⁹⁻⁶¹⁾ จึงควรทำการศึกษารายการแสดงออกในระดับโปรตีนของการเพาะเลี้ยงในลักษณะออร์แกนไทป์คต่อไปในอนาคต

อย่างไรก็ตามถึงแม้จะมีการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนอย่างกว้างขวางทั้งในเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน เช่น แมคโครฟาจ เดนไดร์ติคเซลล์^(28, 29, 62) และเซลล์หลายชนิดในช่องปาก^(4, 63, 64) ยังไม่มีรายงานถึงตัวรับ (receptor) ของสารอะซีแมนแนนบนผิวเซลล์ ดังนั้นกลไกในระดับโมเลกุลของสารอะซีแมนแนนต่อเซลล์บุผิวช่องปากจึงยังต้องมีการศึกษาต่อไป

การศึกษาของ Alemdar และ Agaoglu พบว่า วานหางจระเข้มีฤทธิ์ต้านจุลชีพ⁽⁶⁵⁾ ร่วมกับปัจจุบันมีการศึกษาพบว่าสารพอลิแซคคาไรด์สกัดจากพืช และสัตว์หลายชนิดมีฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพ^(66, 67) ดังนั้นคณะผู้วิจัยจึงดำเนินการทดสอบฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพของสารอะซีแมนแนนพบว่า สารอะซีแมนแนนซึ่งเป็นสารพอลิแซคคาไรด์จากวุ้นวานหางจระเข้ไม่มีฤทธิ์โดยตรงในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans* แตกต่างจากสารพอลิแซคคาไรด์จากเปลือกของผลทุเรียนมีฤทธิ์การต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* แต่ไม่มีฤทธิ์การต้านเชื้อ *Candida albicans*⁽⁶⁶⁾ และสารพอลิแซคคาไรด์จากปลาหมึกซึ่งสามารถต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* และเชื้อ *Pseudomonas aeruginosa*⁽⁶⁷⁾ แสดงให้เห็นถึงความจำเพาะของสารพอลิแซคคาไรด์ต่อฤทธิ์การต้านจุลชีพชนิดต่าง ๆ และสนับสนุนข้อเสนอแนะของ Alemdar และ Agaoglu ที่ว่า สารซึ่งมีฤทธิ์ต้านจุลชีพในวุ้นวานหางจระเข้เป็นสารในกลุ่มแอนทราควิโนน (anthraquinones)⁽⁶⁵⁾

เนื่องจากเซลล์บุผิวช่องปากสามารถผลิตสารเบต้า ดีเฟนซิน แคลโปรเทคติน (calprotectin) และแคทีลิกซิน (cathelicidin) ซึ่งมีฤทธิ์ในการต้านเชื้อจุลชีพ^(68, 69) อีกทั้งยังไม่มีรายงานถึงผลของสารอะซีแมนแนนต่อการสร้างสารต้านจุลชีพเหล่านี้ ดังนั้นผลของโดยอ้อมของสารอะซีแมนแนนต่อต้านจุลชีพ โดยการ เหนี่ยวนำการสร้างสารต้านจุลชีพจากเซลล์บุผิวช่องปากจึงควรมีการศึกษาต่อไป

สรุปผลการวิจัย และข้อเสนอแนะ

สารอะซีแมนแนนสามารถกระตุ้นการเคลื่อนที่ของเซลล์บุผิวช่องปากอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ เมื่อเซลล์ได้รับสารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 8 ชั่วโมง และสารอะซีแมนแนนสามารถทำให้เซลล์บุผิวช่องปากมีลักษณะเข้าสู่ระยะการเปลี่ยนสภาพเมื่อศึกษาด้วยลักษณะจุลกายวิภาคศาสตร์ และมีการเพิ่มขึ้นของการแสดงออกของยีนเอนไซม์ทรานสคริปต์ตามิเนส1 อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติเมื่อได้รับสารเป็นเวลา 48 ชั่วโมง

ผลการศึกษานี้สนับสนุน และอธิบาย ผลการกระตุ้นการหายของแผลในช่องปากของสารอะซีแมนแนน ดังนั้นการพัฒนาารูปแบบของสารอะซีแมนแนนให้เหมาะสมแก่การนำไปใช้กับสิ่งแวดล้อมในช่องปากในสภาวะจริงจึงควรมีการศึกษาต่อไป และการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนต่อเนื้อเยื่ออื่นของร่างกายที่มีความบกพร่องในการหายของแผลอาจนำไปสู่การพัฒนาเพื่อใช้ในรูปแบบอื่นต่อไป

บรรณานุกรม

1. Munoz-Corcuera M, Esparza-Gomez G, Gonzalez-Moles MA, Bascones-Martinez A. Oral ulcers: clinical aspects. A tool for dermatologists. Part I. Acute ulcers. Clin Exp Dermatol. 2009;34(3):289-94.
2. Scully C. Clinical practice. Aphthous ulceration. N Engl J Med. 2006;355(2):165-72.
3. Hengge UR, Ruzicka T, Schwartz RA, Cork M. Adverse effects of topical glucocorticosteroids. J Am Acad Dermatol. 2006;54(1):1-15.
4. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. J Pharmacol Sci. 2009;109(4):525-31.
5. Singer AJ, Clark RA. Cutaneous wound healing. N Engl J Med. 1999;341(10):738-46.
6. Avery JK, Steele PF, Avery N. Oral development and histology. 3rd ed. Stuttgart ; New York: Thieme; 2002.
7. Dale BA, Salonen J, Jones AH. New approaches and concepts in the study of differentiation of oral epithelia. Crit Rev Oral Biol Med. 1990;1(3):167-90.
8. Presland RB, Dale BA. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. Crit Rev Oral Biol Med. 2000;11(4):383-408.
9. Rao RS, Patil S, Ganavi BS. Oral cytokeratins in health and disease. J Contemp Dent Pract. 2014;15(1):127-36.
10. Chatterjee S. Cytokeratins in health and disease. OMPJ. 2012;3(1):198-202.
11. Katou F, Shirai N, Kamakura S, Tagami H, Nagura H, Motegi K. Differential expression of cornified cell envelope precursors in normal skin, intraorally transplanted skin and normal oral mucosa. Br J Dermatol. 2003;148(5):898-905.
12. Iismaa SE, Mearns BM, Lorand L, Graham RM. Transglutaminases and disease: lessons from genetically engineered mouse models and inherited disorders. Physiol Rev. 2009;89(3):991-1023.
13. Ta BM, Gallagher GT, Chakravarty R, Rice RH. Keratinocyte transglutaminase in human skin and oral mucosa: cytoplasmic localization and uncoupling of differentiation markers. J Cell Sci. 1990;95 (Pt 4):631-8.
14. Inada R, Matsuki M, Yamada K, Morishima Y, Shen SC, Kuramoto N, et al. Facilitated wound healing by activation of the Transglutaminase 1 gene. Am J Pathol. 2000;157(6):1875-82.
15. Boudreau MD, Beland FA. An evaluation of the biological and toxicological properties of *Aloe barbadensis* (miller), *Aloe vera*. J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev. 2006;24(1):103-54.

16. Femenia A, Sanchez ES, Simal S, Rossello C. Compositional features of polysaccharides from *Aloe vera* (*Aloe barbadensis* Miller) plant tissue. Carbohydrate Polymers. 1999;39:109-17.
17. Dal'Belo SE, Gaspar LR, Maia Campos PM. Moisturizing effect of cosmetic formulations containing Aloe vera extract in different concentrations assessed by skin bioengineering techniques. Skin Res Technol. 2006;12(4):241-6.
18. West DP, Zhu YF. Evaluation of *Aloe vera* gel gloves in the treatment of dry skin associated with occupational exposure. Am J Infect Control. 2003;31(1):40-2.
19. Wynn RL. *Aloe vera* gel: update for dentistry. Gen Dent. 2005;53(1):6-9.
20. Vazquez B, Avila G, Segura D, Escalante B. Antiinflammatory activity of extracts from *Aloe vera* gel. J Ethnopharmacol. 1996;55(1):69-75.
21. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on collagen characteristics in healing dermal wounds in rats. Mol Cell Biochem. 1998;181(1-2):71-6.
22. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on the healing of dermal wounds in diabetic rats. J Ethnopharmacol. 1998;59(3):195-201.
23. Chithra P, Sajithlal GB, Chandrakasan G. Influence of *Aloe vera* on the glycosaminoglycans in the matrix of healing dermal wounds in rats. J Ethnopharmacol. 1998;59(3):179-86.
24. Reynolds T, Dweck AC. *Aloe vera* leaf gel: a review update. J Ethnopharmacol. 1999;68(1-3):3-37.
25. Talmadge J, Chavez J, Jacobs L, Munger C, Chinnah T, Chow JT, et al. Fractionation of *Aloe vera* L. inner gel, purification and molecular profiling of activity. Int Immunopharmacol. 2004;4(14):1757-73.
26. Turner CE, Williamson DA, Stroud PA, Talley DJ. Evaluation and comparison of commercially available *Aloe vera* L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. Int Immunopharmacol. 2004;4(14):1727-37.
27. Fogleman RW, Shellenberger TE, Balmer MF, Carpenter RH, McAnalley BH. Subchronic oral administration of acemannan in the rat and dog. Vet Hum Toxicol. 1992;34(2):144-7.
28. Zhang L, Tizard IR. Activation of a mouse macrophage cell line by acemannan: the major carbohydrate fraction from *Aloe vera* gel. Immunopharmacology. 1996;35(2):119-28.
29. Djeraba A, Quere P. In vivo macrophage activation in chickens with Acemannan, a complex carbohydrate extracted from *Aloe vera*. Int J Immunopharmacol. 2000;22(5):365-72.
30. Talaro KP. Foundations in microbiology. 5th ed. New York: McGraw Hill; 2005.
31. Smith AJ, Jackson MS, Bagg J. The ecology of Staphylococcus species in the oral cavity. J Med Microbiol. 2001;50(11):940-6.

32. Smith AJ, Robertson D, Tang MK, Jackson MS, MacKenzie D, Bagg J. *Staphylococcus aureus* in the oral cavity: a three-year retrospective analysis of clinical laboratory data. *Br Dent J.* 2003;195(12):701-3; discussion 694.
33. Robertson D, Smith AJ. The microbiology of the acute dental abscess. *J Med Microbiol.* 2009;58(Pt 2):155-62.
34. de Oliveira AC, Maluta RP, Stella AE, Rigobelo EC, Marin JM, de Avila FA. Isolation of *Pseudomonas aeruginosa* strains from dental office environments and units in Barretos, state of Sao Paulo, Brazil, and analysis of their susceptibility to antimicrobial drugs. *Braz J Microbiol.* 2008;39(3):579-84.
35. Cannon RD, Chaffin WL. Oral colonization by *Candida albicans*. *Crit Rev Oral Biol Med.* 1999;10(3):359-83.
36. Williams DW, Kuriyama T, Silva S, Malic S, Lewis MA. *Candida* biofilms and oral candidosis: treatment and prevention. *Periodontol 2000.* 2011;55(1):250-65.
37. Barasch A, Safford MM, Litaker MS, Gilbert GH. Risk factors for oral postoperative infection in patients with diabetes. *Spec Care Dentist.* 2008;28(4):159-66.
38. Charone S, Portela MB, das Chagas MS, de Araujo Soares RM, de Araujo Castro GF. Biofilm of *Candida albicans* from oral cavity of an HIV-infected child: challenge on enamel microhardness. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol.* 2013;115(4):500-4.
39. Oda D, Savard CE, Eng L, Sekijima J, Haigh G, Lee SP. Reconstituted human oral and esophageal mucosa in culture. *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 1998;34(1):46-52.
40. Abiko Y, Hiratsuka K, Kiyama-Kishikawa M, Tsushima K, Ohta M, Sasahara H. Profiling of differentially expressed genes in human gingival epithelial cells and fibroblasts by DNA microarray. *J oral Sci.* 2004;46(1):19-24.
41. Steinberg T, Schulz S, Spatz JP, Grabe N, Mussig E, Kohl A, et al. Early keratinocyte differentiation on micropillar interfaces. *Nano Lett.* 2007;7(2):287-94.
42. Liang CC, Park AY, Guan JL. In vitro scratch assay: a convenient and inexpensive method for analysis of cell migration in vitro. *Nat Protoc.* 2007;2(2):329-33.
43. Jorgensen JH, Turnidge JD. Susceptibility test methods: Dilution and disk diffusion methods. In: Murray PR, Baron EJ, editors. *Manual of clinical microbiology.* 8th ed. Washington, D.C.: ASM Press; 2003. p. 1108-27.
44. Akintoye SO, Greenberg MS. Recurrent aphthous stomatitis. *Dent Clin North Am.* 2005;49(1):31-47.
45. Zubair M, Ekholm A, Nyboma H, Renvert S, Widén C, Rumpunena K. Effects of *Plantago major* L. leaf extracts on oral epithelial cells in a scratch assay. *J Ethnopharmacol.* 2012;2012(141):3.
46. Hashemi H, Salehnia M, Kamali M, Beigi Boroujeni M. The histological characteristics of cultured oral epithelium in different culture conditions. *Iran Biomed J.* 2009;13(2):109-15.

47. El Ghalbzouri A, Hensbergen P, Gibbs S, Kempenaar J, van der Schors R, Ponec M. Fibroblasts facilitate re-epithelialization in wounded human skin equivalents. *Lab Invest.* 2004;84(1):102-12.
48. Zhou Z, Zhou H, Shang Q, Cao Y. In-vitro cultivation of normal human oral keratinocytes. *Chin Med J (Engl).* 2001;114(7):731-41.
49. Jettanacheawchankit S. Effects of acemannan on gingival fibroblast and oral epithelial cell proliferation, expression of type I collagen and vascular endothelial growth factor [PhD thesis]. Bangkok, Thailand: Chulalongkorn University; 2009.
50. Garlick JA, Parks WC, Welgus HG, Taichman LB. Re-epithelialization of human oral keratinocytes in vitro. *J Dent Res.* 1996;75(3):912-8.
51. Li W, Henry G, Fan J, Bandyopadhyay B, Pang K, Garner W, et al. Signals that initiate, augment, and provide directionality for human keratinocyte motility. *J Invest Dermatol.* 2004;123(4):622-33.
52. Sarret Y, Woodley DT, Grigsby K, Wynn K, O'Keefe EJ. Human keratinocyte locomotion: the effect of selected cytokines. *J Invest Dermatol.* 1992;98(1):12-6.
53. Pierce GF, Yanagihara D, Klopchin K, Danilenko DM, Hsu E, Kenney WC, et al. Stimulation of all epithelial elements during skin regeneration by keratinocyte growth factor. *J Exp Med.* 1994;179(3):831-40.
54. Turner CE, Williamson DA, Stroud PA, Talley DJ. Evaluation and comparison of commercially available Aloe vera L. products using size exclusion chromatography with refractive index and multi-angle laser light scattering detection. *Int Immunopharmacol.* 2004;4(14):1727-37.
55. Pillai S, Bikle DD, Mancianti ML, Cline P, Hincenbergs M. Calcium regulation of growth and differentiation of normal human keratinocytes: modulation of differentiation competence by stages of growth and extracellular calcium. *J Cell Physiol.* 1990;143(2):294-302.
56. Duvic M, Nelson DC, Annarella M, Cho M, Esgleyes-Ribot T, Remenyik E, et al. Keratinocyte transglutaminase expression varies in squamous cell carcinomas. *J Invest Dermatol.* 1994;102(4):462-9.
57. Nakamura T, Nishida K, Dota A, Matsuki M, Yamanishi K, Kinoshita S. Elevated expression of transglutaminase 1 and keratinization-related proteins in conjunctiva in severe ocular surface disease. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2001;42(3):549-56.
58. Hsu S, Bollag WB, Lewis J, Huang Q, Singh B, Sharawy M, et al. Green tea polyphenols induce differentiation and proliferation in epidermal keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003;306(1):29-34.
59. El Ghalbzouri A, Lamme E, Ponec M. Crucial role of fibroblasts in regulating epidermal morphogenesis. *Cell Tissue Res.* 2002;310(2):189-99.

60. Costea DE, Loro LL, Dimba EA, Vintermyr OK, Johannessen AC. Crucial effects of fibroblasts and keratinocyte growth factor on morphogenesis of reconstituted human oral epithelium. *J Invest Dermatol*. 2003;121(6):1479-86.
61. Costea DE, Johannessen AC, Vintermyr OK. Fibroblast control on epithelial differentiation is gradually lost during in vitro tumor progression. *Differentiation*. 2005;73:134-41.
62. Lee JK, Lee MK, Yun YP, Kim Y, Kim JS, Kim YS, et al. Acemannan purified from *Aloe vera* induces phenotypic and functional maturation of immature dendritic cells. *Int Immunopharmacol*. 2001;1(7):1275-84.
63. Jittapiromsak N, Sahawat D, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. Acemannan, an extracted product from *Aloe vera*, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. *Tissue Eng Part A*. 2010;16(6):1997-2006.
64. Sahawat D, Kanthasuwana S, Sangvanich P, Takata T, Kitagawa M, Thunyakitpisal P. Acemannan induces cementoblast proliferation, differentiation, extracellular matrix secretion, and mineral deposition. *J Med Plants Res*. 2012;6(23):4069-76.
65. Alemdar S, Agaoglu S. Investigation of *In vitro* antimicrobial activity of *Aloe vera* juice. *J Anim Vet Adv*. 2009;8(1):99-102.
66. Lipipun V, Nantawanit N, Pongsamart S. Antimicrobial activity (*in vitro*) of polysaccharide gel from durian fruit-hulls. *Songklanakarin J Sci Technol*. 2001;24(1):31-8.
67. Ramasamy P, Vino AB, Saravanan R, Subhapradha N, Shanmugam V, Shanmugam A. Screening of antimicrobial potential of polysaccharide from cuttlebone and methanolic extract from bony tissue of *Sepia prashadi* Winkworth, 1936. *Asian Pac J Trop Biomed*. 2011;1(2):S244-S8.
68. Weinberg A, Krisanaprakornkit S, Dale BA. Epithelial antimicrobial peptides: review and significance for oral applications. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(4):399-414.
69. Dale BA, Fredericks LP. Antimicrobial peptides in the oral environment: expression and function in health and disease. *Curr Issues Mol Biol*. 2005;7(2):119-33.

ประวัติคณะผู้วิจัย

หัวหน้าโครงการ

1. ชื่อ - นามสกุล (ภาษาไทย) นางสาว สุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ
ชื่อ - นามสกุล (ภาษาอังกฤษ) Miss Suwimon Jettanacheawchankit
2. ตำแหน่งปัจจุบัน อาจารย์ ทันตแพทย์
3. หน่วยงานและสถานที่อยู่ติดต่อได้สะดวก
ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066 โทรสาร 055-966-053
E-mail suwimon_pj@hotmail.com

4. ประวัติการศึกษา
2546 ทันตแพทยศาสตรบัณฑิต
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย
2552 วิทยาศาสตร์สุขภาพบัณฑิต (ชีววิทยาช่องปาก)
คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย

2. ผลงานวิจัย

1. Jittapiromsak N, Jettanacheawchankit S, Lardungdee P, Sangvanich P, Thunyakitpisal P. Effect of acemannan on BMP-2 expression in primary pulpal fibroblasts and periodontal fibroblasts, in vitro study. J Oral Tissue Engin. 2007; 4: 149-154.
2. Jettanacheawchankit S, Sasitanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. J Pharmacol Sci. 2009; 109:525-53.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย 1

1. ชื่อ-นามสกุล นวกรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์
2. Last name: Jittapiromsak Date of birth: 5 January 1976
 First name: Nawaporn Nationality: Thai Sex: Female
 Position: _
3. Degree(s) (subjects, university or school, year)
 1999 D.D.S., Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand
 2003 M.Sc. Prosthodontics, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Thailand
 2010 Ph.D. Dental Biomaterial Sciences, Graduate School, Chulalongkorn University, Thailand
4. Position held (type of position, Institution/authority, dates)
 2000 Instructor, Department of Restorative Dentistry, Faculty of Dentistry, Naresuan University, Thailand
5. Recent publications:
Jittapiromsak, N. Sahawat, D., Banlunara, W., Sangvanish, P., Thunyakitpisal, P. Acemannan, an extracted product from *Aloe vera*, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. Tissue Eng Part A. 2010; 16(6): 1997-2006.
Jittapiromsak, N., Larduangdee, P., Sangvanish, P., Thunyakitpisal, P. Effect of acemannan on BMP-2 expression in primary pulpal fibroblasts and periodontal fibroblasts, in vitro study. J Oral Tissue Engin. 2007; 4(3): 149-154.
Jittapiromsak, N., Benjavongkulchai, B., and Puranaveja, P. Nystatin release from tissue conditioner and its Candidicidal effects. J Dent Assoc Thai. 2006; 56 (1): 30-35.

ผู้ร่วมโครงการวิจัย 2

1. ชื่อวิทยากรและหน่วยงาน

(ภาษาไทย) นายพสุธา ธัญญะกิจไพศาล ตำแหน่งทางวิชาการ ศาสตราจารย์
(ภาษาอังกฤษ) Pasutha Thunyakitpisal
ภาควิชากายวิภาคศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ โทรศัพท์ 0 2218 8885

2. ประวัติการศึกษา

ปริญญา	สาขาวิชา	มหาวิทยาลัย	ปี พ.ศ. ที่ได้รับ
ท.บ.	ทันตแพทยศาสตร์	จุฬาลงกรณ์มหาวิทยาลัย	2534
Ph.D.	Dental Science	Indiana University	2543
Postdoctoral Training	Anatomy	Indiana University	2543

3. หน้าที่และความรับผิดชอบ

- หัวหน้าหน่วยปฏิบัติการวิจัยและพัฒนาสมุนไพรและสารจากธรรมชาติ เพื่อการประยุกต์ใช้ในทางทันตกรรม
- President Elect, Southeast division, IADR 2009-2011
- ประธานหลักสูตรทันตชีววัสดุศาสตร์ คณะทันตแพทยศาสตร์ จุฬาฯ

4. ผลงานตีพิมพ์ในวารสารวิชาการ

ระดับนานาชาติ

1. Thunyakitpisal N, Thunyakitpisal P, Wiwatwarapan C. (2011) The effect of chemical surface treatments on the flexural strength of repaired acrylic denture base resin. J Prosthodont. 20(3):195-9.
2. Niyomploy P, Thunyakitpisal P, Karnchanatat A, Sangvanick P. (2010) Cell proliferative effect of polyxyloses extracted from the rhizomes of wild turmeric, *Curcuma aromatica*. Pharm Biol. 48:932-7.
3. Thunyakitpisal P, Saladyanant T, Hongprasong N, Pongsamart S, Apinhasmit W. (2010) Antibacterial activity of polysaccharide gel extract from fruit rinds of *Durio zibethinus*

Murr. Against oral pathogenic bacteria. *Journal of investigative and clinical dentistry*. 1:120-125.

4. Jittapiromsak N, Sahawat D, Banlunara W, Sangvanich P, Thunyakitpisal P.(2010) Acemannan, an extracted product from Aloe vera, stimulates dental pulp cell proliferation, differentiation, mineralization, and dentin formation. *Tissue Eng Part A*. 16:1997-2006
5. Jettanacheawchankit S, Sasithanasate S, Sangvanich P, Banlunara W, Thunyakitpisal P. (2009) Acemannan stimulates gingival fibroblast proliferation; expressions of keratinocyte growth factor-1, vascular endothelial growth factor, and type I collagen; and wound healing. *Journal of Pharmacological Science*. 109, 525-531.
6. Jittapiromsak, N., Jettanacheawchankit, S., Lardungdee, P., Sangvanich, P., Thunyakitpisal, P.D. (2007) Effect of Acemannan on BMP-2 Expression in Primary Pulpal Fibroblasts And Periodontal Fibroblasts, in vitro Study, *Journal of Oral Tissue Engineering* 4, 149-154.
7. Thunyakitpisal P, Chaisuparat R. (2004) Simvastatin, an HMG-CoA reductase inhibitor, reduced the expression of matrix metalloproteinase-9 (Gelatinase B) in osteoblastic cells and HT1080 fibrosarcoma cells. *Journal of Pharmacological Science*. 94, 403-9.

ระดับชาติ

1. Lardungdee P, Asvanit P, Thunyakitpisal P (2008). Effect of acemannan on the dentinosialophosphoprotein and dentin matrix protein 1 mRNA expressions in primary human pulpal cell. *CU Dent J*.31;407-14.
2. สุธาดา ศรีอรุณทัย ไพบูลย์ เตชะเลิศไพศาล พสุธา ัญญะกิจไพศาล สุนันท์ พงษ์สามารถ (2551) ผลการยับยั้งเชื้อสเตรปโตค็อกคัสมีวแทนส์ของกลาสไอโอโนเมอร์ที่ผสมเจลพอลิแซ็กคาไรด์จากเปลือกทุเรียน ว.ทันตะ จุฬาฯ 31;193-200.
3. Serichetaphongse P, Tasachan W, Kantasuwan S, Thunyakitpisal P. Antimicrobial activity of aluminium chloride against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *CU Dent J*. 2008;31:399-406.
4. Saladyanant T, Hongprasong N, Pongsamart S, Apinhasmit W, Thunyakitpisal P. Polysaccharide gel from durian fruit-hull extracts: antibacterial activity against *Streptococcus mutans* and *Aggregatibacter actinomycetemcomitans*. *CU Dent J*. 2007;30:235-244.

- Thunyakitpisal P. cDNA cloning and nucleotide sequencing of human connective tissue growth factor obtained from primary pulpal fibroblasts. CU Dent J. 2007:227-234.

5. การจดสิทธิบัตร/สิ่งประดิษฐ์/รางวัล

การจดสิทธิบัตร

- สูตรน้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน เพื่อการรักษาและป้องกันการเกิดโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และแผลในช่องปาก
- สูตรยาสีฟันสมุนไพรที่มีสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน เพื่อการรักษาและป้องกันการเกิดโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และแผลในช่องปาก
- สูตรยาสมานแผลในช่องปากที่มีสารอะซีแมนแนนสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้เป็นสารออกฤทธิ์หลัก
- สูตรน้ำดื่มเสริมทดแทนที่มีสารสกัดส่วนหัวของว่านหางจระเข้ ในผู้ป่วยที่ปากแห้งเหตุให้น้ำลายน้อย
- สูตรยาเร่งการสร้างกระดูกที่มีส่วนผสมของสารอะซีแมนแนนสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้และคอลลาเจน
- กรรมวิธีการสกัดสารสกัดส่วนหัวว่านหางจระเข้ที่มีผลเร่งการเพิ่มจำนวน ของเซลล์สร้างเส้นใยของเนื้อเยื่อเหงือก เอ็นยึดปริทันต์และเนื้อเยื่อโพรงฟัน

สิ่งประดิษฐ์

- น้ำยาบ้วนปากสมุนไพรที่มีสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน เพื่อการรักษาและป้องกันการเกิดโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และแผลในช่องปาก
- ยาสีฟันสมุนไพรที่มีสารโพลีแซคคาไรด์จากเปลือกทุเรียน เพื่อการรักษาและป้องกันการเกิดโรคฟันผุ โรคปริทันต์ และแผลในช่องปาก
- ยาสมานแผลในช่องปากที่มีสารอะซีแมนแนนสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้
- ยาเร่งการสร้างกระดูกที่มีส่วนผสมของสารอะซีแมนแนนสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้และคอลลาเจน

6. รางวัล

- The first winner award in the 13th Student Clinician Program, Santara Grand Hotel, Bangkok, Thailand. 15 December 2010 (Dental student, 2010)
- The first winner award in Dental Material category, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Senior student project, 2009)
- The first winner of Travel Award Competition, International Association of Dental Research – Southeast Asia Division, 21st Annual Meeting, Bali, Indonesia (Ph.D student, 2007)

4. The winner, the 2nd Hiroshima Conference, Dental school, Hiroshima University, Hiroshima, Japan (Ph.D student, 2007)
5. Charles T. Kean Memorial Award, International Association of Dental Research – Southeast Asia Division, 21st Annual Meeting, Bali, Indonesia (Ph.D student, 2007)
6. The first winner award in Dental Material category, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Senior student project, 2006)
7. The runner up award in the 6th Student Clinician Program, Central Convention Hotel, Bangkok, Thailand. December 2003 (Dental student, 2010)
8. The first winner award in Oral Biology category, Faculty of Dentistry, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand (Senior student project, 2002)