

แบบสรุปผู้บริหาร (Executive summary)

1. รายละเอียดเกี่ยวกับแผนงานวิจัย

1.1 ชื่อเรื่อง

(ภาษาไทย) การศึกษาผลของสารอะซีแมนแนนจากส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผล
ในช่องปากในสภาวะเป็นโรคเบาหวาน และกลไกที่เกี่ยวข้องในเซลล์บุผิวช่องปาก

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

1.2 คณะผู้วิจัย

1. นางสาวสุวิมล เจตนาเชี่ยวชาญกิจ

ภาควิชาชีววิทยาช่องปาก คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066

2. นางสาวนวภรณ์ จิตตภิรมย์ศักดิ์

ภาควิชาทันตกรรมบูรณะ คณะทันตแพทยศาสตร์ มหาวิทยาลัยนเรศวร
ต.ท่าโพธิ์ อ.เมือง จ.พิษณุโลก 65000
โทรศัพท์ 055-966-066

3. นายพสุธา ัญญะกิจไพศาล

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

1.3 งบประมาณและระยะเวลาทำวิจัย

ได้รับงบประมาณ ประจำปีงบประมาณ พ.ศ. 2555 งบประมาณที่ได้รับ 1,072,000 บาท
ระยะเวลาทำวิจัย ตั้งแต่ 31 สิงหาคม 2555 ถึง 30 เมษายน 2557

2. สรุปโครงการวิจัย

2.1 ความสำคัญและที่มาของปัญหาการวิจัย

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบ เช่น โรคเบาหวาน สารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ที่เป็นสมุนไพรที่มีการใช้รักษาแผลบริเวณผิวหนังมานาน จึงมีความเป็นไปได้ในการนำใช้ในเพื่อส่งเสริมการหายของแผลในช่องปาก ซึ่งผลของสารนี้ต่อเนื้อเยื่อและเซลล์ในช่องปากยังมีจำกัด

2.2 วัตถุประสงค์การวิจัย

การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลสารอะซีแมนแนนซึ่งสกัดจากส่วนวุ้นว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลในช่องปากหนุทดลองในสภาวะเบาหวาน และกลไกที่เป็นได้ในเซลล์บุผิวช่องปาก

2.3 ระเบียบวิธีวิจัย

ศึกษาของสารอะซีแมนแนนต่อการหายของแผลในช่องปากโดยการสร้างแผลจำลองบริเวณเพดานปากหนุทดลองที่เป็นเบาหวาน ทาสารอะซีแมนแนนเป็นเวลา 7 วัน ทำการวัดขนาดและศึกษาลักษณะของเนื้อเยื่อ

บริเวณเพดานด้วยกล้องจุลทรรศน์ ในขณะเดียวกันทำการเพาะเลี้ยงเซลล์บิวช่องปากมนุษย์ในห้องปฏิบัติการ และทำการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนต่อการเคลื่อนที่โดยการชุดผิวงานเพาะเลี้ยงและตรวจวัดการเคลื่อนที่ของเซลล์เป็นเวลา 8 ชั่วโมง และศึกษาการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บิวช่องปากโดยการศึกษาลักษณะของเซลล์ และการแสดงออกของยีนที่เกี่ยวข้องกับการเปลี่ยนสภาพเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง รวมทั้งศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อ และความคงตัวของสารอะซีแมนแน

2.4 ผลการวิจัย

สารอะซีแมนแนมีผลกระทบต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน โดยมีกลไกที่เป็นไปได้คือ การกระตุ้นการเคลื่อนที่ และการเปลี่ยนสภาพของเซลล์บิวช่องปาก โดยไม่มีฤทธิ์ต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans* และสารอะซีแมนแนยังคงอยู่ภายหลังเก็บในสภาวะเร่งเป็นเวลา 6 เดือน

2.5 ข้อเสนอแนะที่ได้จากการวิจัย

ผลการศึกษาแสดงให้เห็นว่า ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมด้านสมบัติทางกายภาพ และความคงตัว และพัฒนารูปแบบสารอะซีแมนแนให้เป็นผลิตภัณฑ์ที่เหมาะสมกับการใช้ในช่องปากต่อไป และการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนต่อเนื้อเยื่ออื่นของร่างกาย หรือภาวะที่บกพร่องในการหายของแผลอื่น ๆ อาจนำไปสู่การพัฒนาสารอะซีแมนแนเพื่อใช้ในรูปแบบอื่นได้ในอนาคต

3. บทคัดย่อภาษาไทย และบทคัดย่อภาษาอังกฤษ

บทคัดย่อ

แผลในช่องปากเป็นรอยโรคที่พบได้บ่อย ก่อให้เกิดความเจ็บปวดและส่งผลต่อคุณภาพชีวิตของผู้ป่วย โดยเฉพาะผู้ป่วยที่มีโรคทางระบบ การศึกษานี้มีวัตถุประสงค์เพื่อศึกษาผลสารอะซีแมนแนซึ่งสกัดจากส่วนหัวว่านหางจระเข้ต่อการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองในสภาวะเบาหวาน และกลไกที่เป็นได้ในเซลล์บิวช่องปาก โดยหนูจะถูกเหนี่ยวนำให้เป็นเบาหวาน และสร้างบาดแผลจำลองบริเวณกึ่งกลางเพดานปากด้วยการทำฟันซีโบออปซี่ แล้วทาสารต่างๆ (สารอะซีแมนแนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 และ 1 สารคาร์โบพอลเปล่า น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์) ทุกวันเป็นเวลา 7 วัน หลังจากนั้นทำการวัดขนาดบาดแผล ร่วมกับการศึกษาลักษณะทางจุลพยาธิวิทยา และทำการศึกษาผลของความคงตัวของสารอะซีแมนแนเมื่อเก็บรักษาที่สภาวะเร่งเป็นเวลา 3 และ 6 เดือนด้วยการสังเกตสเปกตรัม ^1H NMR นอกจากนี้ทำการศึกษาผลของสารอะซีแมนแนความเข้มข้นต่างๆ (0.25 0.5 1 2 และ 4 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตร) ต่อการเคลื่อนที่

ของเซลล์บุผิวช่องปากมนุษย์โดยเทคนิคการขูดพื้นงานเพาะเลี้ยงเซลล์เพื่อสร้างบาดแผลจำลอง ถ่ายภาพเซลล์ที่เวลา 0 4 และ 8 ชั่วโมง นำมาคำนวณร้อยละการเคลื่อนที่ของเซลล์ ศึกษาผลต่อการเปลี่ยนสภาพของเซลล์โดยวิธีรีเวิร์ส ทรานสคริปชัน โพลีเมอร์เรส เซนรีแอคชัน ของยีนเคอราติน K5 เคอราติน K1 ไฟแลคกริน และเอนไซม์ทรานกลูตามิเนส1 ที่ระยะเวลา 24 และ 48 ชั่วโมง และศึกษาฤทธิ์ต้านเชื้อจุลชีพด้วยวิธีดิสก์ดิฟฟิวชัน ผลการศึกษาพบว่า หนูกลุ่มที่ทาสารอะซีแมนแนนความเข้มข้นร้อยละ 0.5 มีขนาดแผลเล็กกว่ากลุ่มที่ทาสารคาร์โบพอลเปล่า น้ำเกลือปราศจากเชื้อ และยาไตรแอมซิโนโลน อะเซโทไนด์อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) และมีการสร้างชั้นเยื่อบุผิวใหม่ปกปิดบาดแผลเร็วกว่ากลุ่มทดสอบอื่น นอกจากนี้บาดแผลที่ได้รับสารอะซีแมนแนนทั้งสองความเข้มข้นมีปริมาณคอลลาเจนมากกว่ากลุ่มที่ได้รับน้ำเกลือปราศจากเชื้ออย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 5$) เมื่อเก็บสารอะซีแมนแนนในสภาวะเร่งเป็นเวลา 3 และ 6 เดือนพบว่า ยังคงมีสเปกตรัมของอะซีแมนแนนสอดคล้องกับสารอะซีแมนแนนที่ผลิตใหม่ จากการศึกษาในเซลล์บุผิวช่องปากพบว่า เมื่อได้รับสารอะซีแมนแนนความเข้มข้น 0.25 0.5 1 และ 2 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 8 ชั่วโมง เซลล์มีการเคลื่อนที่มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) นอกจากนี้เมื่อเซลล์ได้รับสารเป็นเวลา 24 และ 48 ชั่วโมงพบว่า ลักษณะของเซลล์เปลี่ยนไปสู่ลักษณะการเปลี่ยนสภาพโดยสูญเสียลักษณะหลายเหลี่ยมไป และเซลล์กลมใหญ่ขึ้น และเซลล์ที่ได้รับสารความเข้มข้น 0.25 และ 1 มิลลิกรัมต่อมิลลิลิตรเป็นเวลา 48 ชั่วโมง มีการแสดงออกของยีนทรานกลูตามิเนส1 มากกว่ากลุ่มควบคุมอย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($p < 0.05$, $n = 3$) ผลการทดสอบฤทธิ์ต้านจุลชีพพบว่า สารอะซีแมนแนนไม่มีฤทธิ์โดยตรงในการต้านเชื้อ *Staphylococcus aureus* เชื้อ *Pseudomonas aeruginosa* และเชื้อ *Candida albicans* จึงสรุปได้ว่า สารอะซีแมนแนนมีผลกระทบด้านการหายของแผลในช่องปากหนูทดลองที่เป็นเบาหวาน โดยมีกลไกที่เป็นไปได้คือ 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 acetonide) 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